

光学系構築（実践編）

全反射蛍光顕微鏡（TIRFM）による 1 分子イメージング

Construction of an optical system (Practical): Single-molecule imaging using a total internal reflection fluorescence microscope (TIRFM)

飯野 亮太
Ryota IINO

大学共同利用機関法人自然科学研究機構 分子科学研究所
Institute for Molecular Science, National Institutes of Natural Sciences

〒 444-8787 岡崎市明大寺町字東山 5-1
5-1 Higashiyama, Myodaijicho, Okazaki 444-8787

e-mail: iino@ims.ac.jp

分類番号: 9.4, 7.10

本稿では、全反射蛍光顕微鏡（TIRFM）を用いた蛍光色素の 1 分子イメージングについて解説します。顕微鏡の空間分解能と位置決定精度の違い、実際の観察、データ解析についての具体例と留意点を述べます。また、関連の発展形として、全反射暗視野顕微鏡と金ナノ粒子を用いた高速・高精度位置決定精度 1 分子イメージングについても紹介します。

1. まえがき：1 分子蛍光イメージング小史

前回の基礎講座¹⁾で解説した全反射蛍光顕微鏡（Total Internal Reflection Fluorescence Microscope: TIRFM）を用いると、水溶液中の蛍光色素 1 分子のリアルタイムイメージングを行うことが可能です。1 分子が観察できるのは、励起光の全反射で形成されるエバネッセント場によりガラスと水の界面近傍の蛍光色素のみを選択的に励起し、水中の深い位置に存在する蛍光色素からの背景光を大幅に低減できるためです。1 分子蛍光イメージングが容易になったほかの要因としては、EM-CCD カメラ（浜松ホトニクス（株）や英国 Andor Technology 社から購入可能）を代表とする検出器の高感度化が挙げられます。

Yanagida らは 1990 年代初頭に、結像光学系の透過効率や検出器の感度などに基づいた計算から、1 分子の蛍光色素は十分検出可能な数の光子を発生しているとすでに指摘していました。昼間に星が見えないのと同じ理屈で、問題は感度でなく、むしろ背景光の高さでした。Yanagida らは背景光の低減にプリズム型 TIRFM を利用し世界で初めて、水中・常温での 1 分子蛍光イメージングに成功しました²⁾。前回の

基礎講座¹⁾で述べたとおり、最近ではプリズム型ではなく対物レンズ型がより多く用いられていますが、1 分子蛍光イメージングの手法として現在は世界中で利用されています。なお、Kinosita らは、従来の落射蛍光顕微鏡でも背景光の要因を丁寧に取り除けば 1 分子蛍光イメージングが可能であることをほぼ同時期に示しています³⁾。このように、1 分子蛍光イメージングの実現には日本の研究者が大きく貢献しました。

2. TIRFM の空間分解能

TIRFM の横方向の空間分解能は、通常の光学顕微鏡と同程度です。このため、1 分子蛍光イメージングを行うには、観察視野に存在する蛍光色素の密度を低くする必要があります。密度が高いと視野一面が光ってしまい、個々の分子を識別するのは困難になります。顕微鏡の空間分解能は、観察対象となる 2 つの微小な物体（分子）がどのくらい近づくと区別ができなくなるかの指標であり、回折限界によって対象の像（点像分布関数）が本来の大きさよりも広がってしまうことに起因します。レイリーの定義では、点像分布関数の広がり r （エアリーディスク：像のプロファイルをベッセル関数でフィットした際

に強度がはじめにゼロになる中心からの距離)と空間分解能は同一であり式(1)で表されます。

$$r = 0.61\lambda / n \sin \theta = 0.61\lambda / NA \quad (1)$$

ここで、 λ は観察に用いる光の波長、 $n \sin \theta (= NA)$ は対物レンズの開口数です。例えば、開口数 1.49 の対物レンズを用いた TIRFM で、蛍光波長 500 nm の色素を観察する場合、空間分解能は 205 nm となります。よって、ガラス基板上の分子の密度は 1 分子/ μm^2 以下に抑える必要があり、密度が低ければ低いほど、個々の分子の識別は容易になります。

3. 観察例と注意点：蛍光色素は退色する

対物レンズ型 TIRFM による蛍光色素 Cy3 の観察例を示します(図 1(a))。励起光レーザーの試料面での強度を 0.1~1 $\mu\text{W}/\mu\text{m}^2$ 程度に設定すれば十分に観察できます。個々の輝点が 1 分子の Cy3 に相当します。時間とともに輝点の数が減るのは分子がなくなったのではなく退色しているからです。退色は励起状態の蛍光色素が活性酸素などのラジカル種と反応して蛍光を発しない化学構造に不可逆的に変化することで起こります⁴⁾。退色は確率的に起こり、水溶液中の酸素を除去することで退色までの時間を長くすることも可能です。図 1(b)には Cy3 の蛍光強度の時間変化を示します。矢印の点で突然、蛍光強度が背景光のレベルまで落ちていきます。このような不可逆的な 1 段階での退色が 1 分子の蛍光色素の特徴であり、1 分子が観察できていることの簡便な指標としてよく用いられます。1 分子蛍光イメージングに以前から用いられている Cy3 やテトラメチルローダミンといった蛍光色素は、退色するまでに $10^7 \sim 10^8$ 個程度の光子を放出します⁵⁾。顕微鏡システム全体の光子の検出効率は 1% 程度なので、退色までに放出される $10^5 \sim 10^6$ 個程度の光子を用いて観察を行うことになります。励起光の強度を上げると、励起される頻度が高くなり単位時間当たりに放出される光子の数が増加してシグナルと位置決定精度(後述)は改善しますが、観察可能時間は短くなります。分子吸光係数と量子収率がともに高い蛍光色素の観察可能時間は数十秒から長くても数分程度、達成可能な時間分解能は最高で 1 ミリ秒程度となります。

4. 位置決定精度：空間分解能とは異なる概念

観察視野中の密度が低く、近傍にほかの分子が存在しないことが 1 分子蛍光イメージングに必要な点と述べました。他方、密度が低く個々の分子が識別できる場合には、分子の位置をナノメートルレベルの精度で決定することが可能です⁶⁾。この「位置決定精度」は、リアルタイムイメージングで分子の動きを正確に計測するうえで重要なパラメータであり、空間分解能

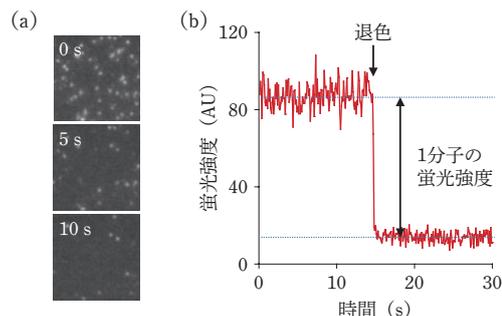


図 1 蛍光色素の 1 分子観察。(a) Cy3 の観察画像例 (30 $\mu\text{m} \times 30 \mu\text{m}$)。ICCD カメラを用い励起波長 532 nm、励起強度 1 $\mu\text{W}/\mu\text{m}^2$ 、時間分解能 33 ミリ秒で撮影。(b) Cy3 の蛍光強度の時間変化の例。15 秒付近(矢印)で退色が発生している。EM-CCD カメラを用いて励起波長 532 nm、励起強度 0.5 $\mu\text{W}/\mu\text{m}^2$ 、時間分解能 100 ミリ秒で撮影。

とは異なる概念です。なお、詳細は省きますが、2014 年ノーベル化学賞の対象となった超解像蛍光顕微鏡法である PALM (Photo-Activated Localization Microscopy)⁷⁾ や STORM (STochastic Optical Reconstruction Microscopy)⁸⁾ は 1 分子蛍光イメージングに基づいており、位置決定精度が空間分解能よりもはるかに小さな値を達成できることを巧みに利用して回折限界を超える解像度を達成しています。

1 分子イメージングにおける位置決定精度 σ は、理想的には分子の像の広がり s (エアリーディスクとは定義が若干異なり、ガウス関数で像の強度プロファイルをフィットした際の標準偏差)と、1 画像で得られる光子数 N で決まります(式(2))⁹⁾。

$$\sigma = \frac{s}{\sqrt{N}} \quad (2)$$

s はエアリーディスクの大きさ r より小さく 120 nm 程度であり、1 nm の位置決定精度を達成するには 1.4 万個の光子を得ればよい計算になります。しかし実際の計測では、画像のピクセルサイズ a が有限で背景光の揺らぎ(標準偏差 b)があることから、位置決定精度は理想的条件よりも劣ります(式(3))⁹⁾。

$$\sigma = \sqrt{\left(\frac{s^2}{N} + \frac{a^2}{12} + \frac{8\pi s^4 b^2}{a^2 N^2} \right)} \quad (3)$$

位置決定精度の測定例を以下に示します(図 2)。本測定では蛍光色素 Cy3 で標識したタンパク質をガラス基板に非特異的に結合させています。励起波長は 532 nm、励起光強度は 0.28 $\mu\text{W}/\mu\text{m}^2$ 、時間分解能は 1.0 秒です。1 分子の画像のシーケンス(動画)を取得し(図 2(a))、それぞれの画像における分子の中心位置を 2 次元ガウス関数でフィットして求め、その分布をプロットします(図 2(b))。2 次元ガウス関数のフィットは例えば、フリーの画像解析ソフトウェア ImageJ¹⁰⁾ のプラグイン Particle Track and Analysis (新井由之博士開発¹¹⁾)などが利用できます。なお、光子数 N

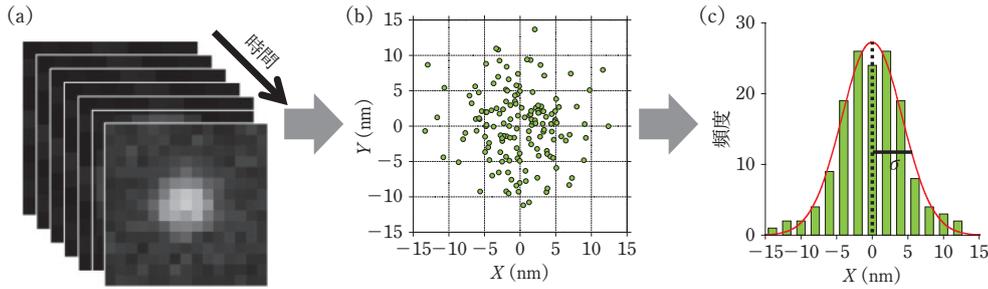


図2 位置決定精度の測定例。(a)ガラス基板に固定したCy3標識タンパク質の1分子蛍光像のシーケンス。励起波長532 nm, 励起光強度 $0.28 \mu\text{W}/\mu\text{m}^2$, 時間分解能1.0秒で撮影。(b)各フレームで求めた中心位置の2次元プロット。(c)X軸方向の中心位置の分布。ガウス関数でフィットし、位置決定精度 σ (標準偏差に相当)を測定。この例では、位置決定精度は6.0 nmである。

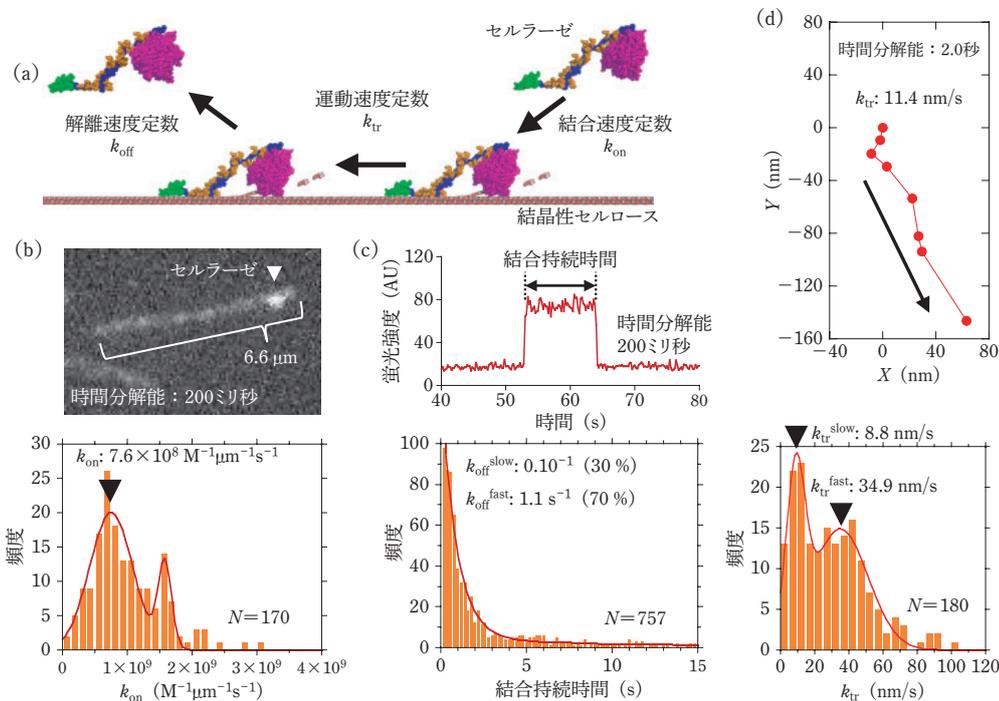


図3 Cy3標識セルラーゼの1分子計測。(a)セルラーゼの化学反応と運動の速度定数。 k_{on} : 結合速度定数。 k_{tr} : 運動速度定数。 k_{off} : 解離速度定数。(b) k_{on} の計測。▼はセルロースに結合したセルラーゼ。下は k_{on} の分布。最小のピークが1本のセルロース繊維状結晶への k_{on} に相当。時間分解能200ミリ秒で撮影。(c) k_{off} の計測。結合の持続時間を計測。下は k_{off} の分布。結合した結晶面の違いに対応する2成分の指数関数減衰でフィットしている。時間分解能200ミリ秒で撮影。(d) k_{tr} の計測。各フレーム中心位置の座標変化から運動速度を計算。下は k_{tr} の分布。遅い成分は分解を伴う直進運動、速い成分は分解を伴わない拡散運動に対応。時間分解能2.0秒で撮影。

(シグナル)が十分に大きい場合には、2次元ガウス関数フィットではなく画像の重心解析で中心位置を正確に求めることも可能です。図2(c)はX方向(水平方向)の中心位置の分布です(5分子のデータをまとめたもの)。この分布をガウス関数でフィットして得られる標準偏差がX方向の位置決定精度の実測値 σ_X となります。この例では、位置決定精度の実測値は $\sigma_X=6.0 \pm 0.3 \text{ nm}$, $\sigma_Y=5.5 \pm 0.9 \text{ nm}$ です。また、図

2(a)の個々の画像から求めた式(3)のパラメータはそれぞれ、 $s_X=120 \pm 4 \text{ nm}$, $s_Y=115 \pm 4 \text{ nm}$, $a=67.7 \text{ nm}$, $N=1039 \pm 279$, $b=0.5 \pm 0.1$ であり、これらの値を用いて式(3)から得られる位置決定精度の理論値は $\sigma_X=3.9 \pm 0.7 \text{ nm}$, $\sigma_Y=3.8 \pm 0.7 \text{ nm}$ となります。実測値が理論値よりも低下している理由には、試料ステージの振動やドリフトなどが考えられます。この例のように1分子蛍光イメージングでは、秒オーダの時間分解能で数nmの位置決定精度が得られます。時間分解能を100~数十ミリ秒に上げると、位置決定精度は数十nmに低下します。

5. 応用例：セルラーゼの1分子計測

ある種のセルラーゼは、結晶性セルロースを水溶性の2糖に連続的に分解しながら直進運動するリニア分子モーターであることが知られています。1分子蛍光イメージングでカビ由来セルラーゼの化学反応と運動の素過程を1分子計測した例を示します¹²⁾。

セルロースの繊維状結晶をガラス基板上に固定し、

蛍光色素Cy3で標識したセルラーゼの結合、解離、運動を計測しています(図3(a))。図3(b)は、セルロースへのセルラーゼの結合頻度を計測し、セルラーゼ濃度と繊維の長さで規格化することで結合速度定数を見積もった例です。図3(c)は、セルロースに結合してから解離するまでの時間を測定することで解離速度定数を計測しています。さらに図3(d)では、セルロースに結合したセルラーゼ分子の動きを計測することで

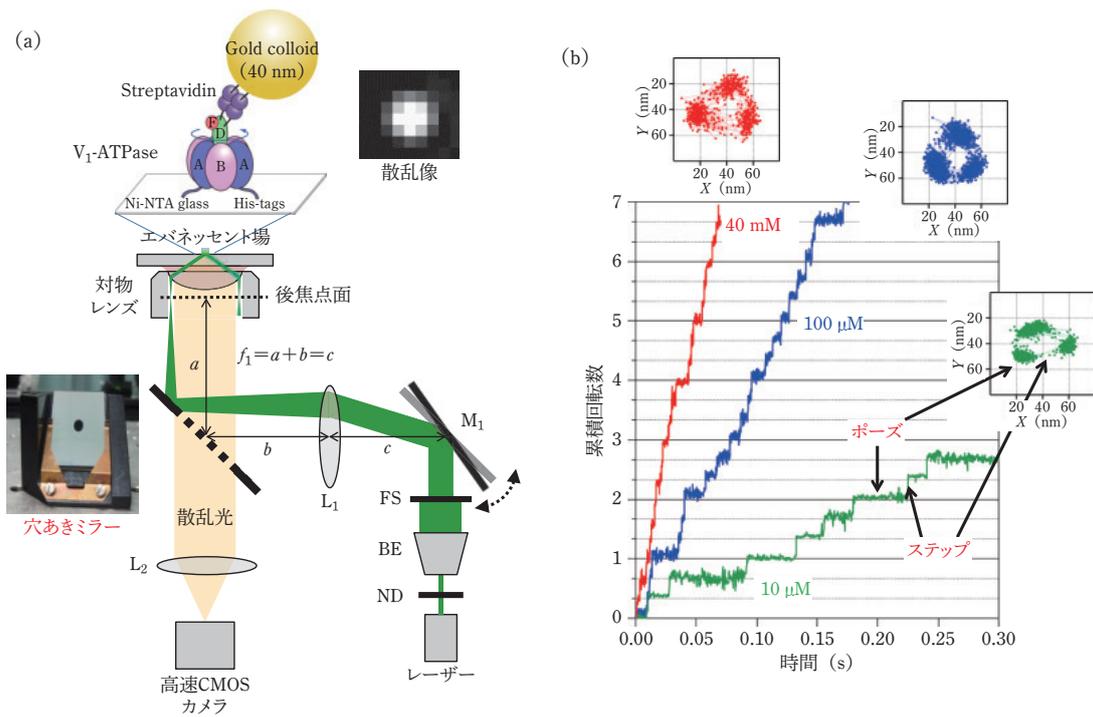


図4 全反射暗視野顕微鏡。(a)光学系の模式図。対物レンズ型 TIRFM のダイクロイックミラーとバリヤフィルタの代わりに穴あきミラーを用いることで金ナノ粒子の散乱像を観察。検出器には高速 CMOS カメラを使用。ほかの詳細は前回の基礎講座¹⁾の図 3(a)を参照されたい。上部は、タンパク質分子モータ V₁-ATPase の回転運動を観察する実験系の模式図。固定子リングをガラス基板に固定し、回転子サブユニットに粒径 40 nm の金ナノ粒子を結合。(b) V₁-ATPase の回転運動の軌跡の例。運動素過程であるポーズとステップが観察されている。ATP 濃度の増加に伴いポーズの持続時間が短くなり回転速度が増加する。時間分解能 100 マイクロ秒で撮影。

運動速度定数を見積もっています。なお、個々の分子は確率的に振る舞うので、1 分子計測では多数のデータを集めて統計的に解析する必要がある点に注意してください。

6. 蛍光以外への発展例：全反射暗視野顕微鏡と金ナノ粒子を用いた 1 分子イメージング

エバネッセント場は蛍光色素の励起以外にも用いることができます。我々は、対物レンズ型 TIRFM を改変した新しい暗視野顕微鏡を開発し、タンパク質分子モータの 1 分子イメージングに利用しています(図 4)¹³⁾。暗視野法は蛍光ではなく散乱光を観察する方法であり、粒径が数十 nm の金ナノ粒子を高いシグナル/ノイズ比で観察することができます。金ナノ粒子の散乱では蛍光色素より圧倒的に高い光子数 N が得られるため、マイクロ秒の時間分解能で 1 nm 以下の位置決定精度を達成することができます。我々は現在、100 マイクロ秒の時間分解能で 3 Å の位置決定精度を達成しています(未発表データ)。さらに金ナノ粒子は蛍光色素と異なり退色しないので、長時間の観察が可能になります。金ナノ粒子はタンパク質よりも大きいので、その機能を阻害する可能性もありますが、結合させる場所を適切に選べば問題は機能

します。
我々が開発した全反射暗視野顕微鏡は非常にシンプルで、TIRFM のダイクロイックミラーとバリヤフィルタを、中心に穴があいたミラーに交換しただけです(図 4(a))。金ナノ粒子で散乱された光を、この穴を通して検出器(高速 CMOS カメラ)に結像させます。穴を通ることで対物レンズの実効開口数が若干低下し、金ナノ粒子の像の広がり s は大きくなりますが、光子数 N が圧倒的に大きいので高い位置決定精度が得られます。図 4(b)は粒径 40 nm の金ナノ粒子をプローブとして用い、回転分子モータ V₁-ATPase の回転運動を 100 マイクロ秒の時間分解能で観察した例です¹⁴⁾。1 秒間に 100 回転以上の高速回転中のステップとポーズが明確に観察されており、V₁-ATPase がステッピングモータであることがわかります。本手法はまた、リニア分子モータであるキネシンの直進運動の詳細な解析にも適用されています¹⁵⁾。さらに金ナノ粒子の散乱像と色素 1 分子の蛍光像を同時に取得することも可能であり、分子モータの運動と化学反応(蛍光性 ATP の結合・解離)の同時計測にも適用が可能です。

7. むすび

TIRFMに限らず顕微鏡を使った研究の醍醐味^{だいごみ}は、世界でまだ誰も見たことのない映像を初めて目の当たりにする機会に巡り合えることだと思います。本稿により、皆さんがこの喜びを体験する一助になれば幸いです。

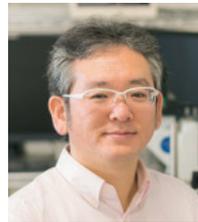
謝辞

本稿を作成するうえで中村彰彦博士、安藤潤博士（ともに（共）自然科学研究機構分子科学研究所）に協力、助言をいただきました。この場を借りて感謝いたします。

文献

- 1) 飯野亮太：応用物理 **87**, 442 (2018).
- 2) T. Funatsu, Y. Harada, M. Tokunaga, K. Saito, and T. Yanagida: Nature **374**, 555 (1995).
- 3) I. Sase, H. Miyata, J.E. Corrie, J.S. Craik, and K. Kinoshita Jr.: Biophys. J. **69**, 323 (1995).
- 4) T. Ha and P. Tinnefeld: Annu. Rev. Phys. Chem. **63**, 595 (2012).
- 5) X.S. Xie and J.K. Trautman: Annu. Rev. Phys. Chem. **49**, 441 (1998).
- 6) A. Yildiz, J.N. Forkey, S.A. McKinney, T. Ha, Y.E. Goldman, and P.R. Selvin: Science **300**, 2061 (2003).
- 7) E. Betzig, G.H. Patterson, R. Sougrat, O.W. Lindwasser, S. Olenych, J.S. Bonifacino, M.W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, and H.F. Hess: Science **313**, 1642 (2006).
- 8) M.J. Rust, M. Bates, and X. Zhuang: Nat. Methods **3**, 793 (2006).
- 9) R.E. Thompson, D.R. Larson, and W.W. Webb: Biophys. J. **82**, 2775 (2002).
- 10) <https://imagej.net/Welcome>
- 11) <http://www.sanken.osaka-u.ac.jp/labs/bse/ImageJcontents/frameImageJ.html>
- 12) A. Nakamura, T. Tasaki, D. Ishiwata, M. Yamamoto, Y. Okuni, A. Visotsat, M. Maximilien, H. Noji, T. Uchiyama, M. Samejima, K. Igarashi, and R. Iino: J. Biol. Chem. **291**, 22404 (2016).
- 13) H. Ueno, S. Nishikawa, R. Iino, K.V. Tabata, S. Sakakihara, T. Yanagida, and H. Noji: Biophys. J. **98**, 2014 (2010).
- 14) Y. Minagawa, H. Ueno, M. Hara, Y. Ishizuka-Katsura, N. Ohsawa, T. Terada, M. Shirouzu, S. Yokoyama, I. Yamato, E. Muneyuki, H. Noji, T. Murata, and R. Iino: J. Biol. Chem. **288**, 32700 (2013).
- 15) H. Isojima, R. Iino, Y. Niitani, H. Noji, and M. Tomishige: Nat. Chem. Biol. **12**, 290 (2016).

(2018年2月26日 受理)



飯野 亮太 (いいの りょうた)

2000年名古屋大学大学院理学研究科単位取得退学。03年博士（理学）取得。国立研究開発法人科学技術振興機構（JST）ERATO 研究員。大阪大学産業科学研究所特任助手、助手。助教。東京大学工学系研究科講師。准教授を経て、14年6月より大学共同利用機関法人自然科学研究機構分子科学研究所・岡崎総合バイオサイエンスセンター教授。総合研究大学院大学教授兼任。