

# 銀, 金, 銀金合金ナノ粒子の光散乱を利用した マルチカラー生体1分子追跡

Multicolor tracking of single biomolecules with silver, gold and silver-gold alloy nanoparticles

安藤潤<sup>1</sup>, 飯野亮太<sup>2</sup> Jun Ando<sup>1</sup>, Ryota Iino<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 理化学研究所, 〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1, <sup>2</sup> 分子科学研究所, 〒444-8787 愛知県岡崎市明大寺町字東山 5-1

<sup>1</sup> RIKEN, 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan, <sup>2</sup> Institute for Molecular Science, 5-1 Higashiyama, Myodaiji, Okazaki, Aichi 444-8787, Japann

**Abstract** : Multicolor high-speed tracking of single biomolecules was demonstrated with silver, gold, and silver-gold alloy nanoparticles. This article describes the development of a multicolor dark-field imaging system with a spectrophotometer, and applications for single-molecule imaging of diffusional motions of phospholipids and stepping motions of kinesins.

**Keywords** : multicolor imaging, silver-gold alloy nanoparticles, single-molecule imaging, spectrophotometer

## はじめに

金ナノ粒子は、タンパク質や脂質、細胞小器官など、様々な生体分子や生体内の構造を光学顕微鏡で観察するためのプローブとして広く用いられてきた<sup>1)</sup>。標的とする生体分子や細胞小器官の挙動は、金ナノ粒子の光学像、なかでも暗視野像に現れる輝点を追跡することで観察できる。光学像の空間分解能は光の回折のため、波長の半分程度に制限されるが、孤立した単一の金ナノ粒子の中心位置は、ナノメートルスケールの高い精度で決定できる<sup>2)</sup>。これにより、細胞膜におけるリン脂質の区画化された拡散運動や、タンパク質分子モーターのステップ状の運動の詳細な観察などが可能となった<sup>1,3)</sup>。光学像における輝点の中心位置決め精度(位置決定精度)は、得られるフォトン数の平方根に反比例する<sup>4)</sup>。露光量の減少に伴ってフォトン数が線形に減少するため、高速かつ高精度な測定を実現するには、膨大なフォトン数が必要となる。金ナノ粒子は、プラズモン共鳴に起因する強い光散乱を示すことから、サブミリ秒の時間分解能とナノメートルスケールの位置決定精度を達成できる。我々の研究グループにより近年では、直径40 nmの金ナノ粒子を用い、オングストロームレベルの位置決定精度と、マイクロ秒オーダーの時間分解能も達成されている<sup>5)</sup>。

生体分子が発現する複雑な生体機能を理解するには、複数の生体分子が連携して働く様子を、同時に、かつ単一分子レベルで分析する必要がある。しかしながら、これまで高速・高精度な生体1分子の光計測は、

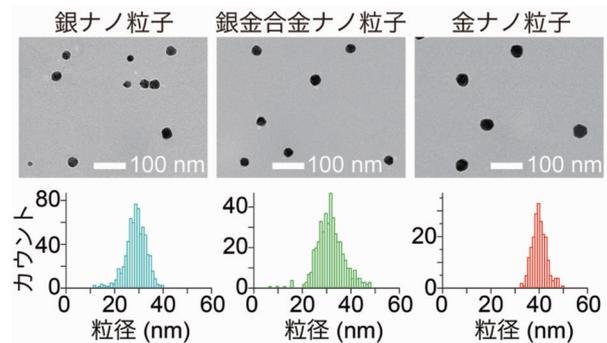


図1 銀, 銀金合金, 金ナノ粒子のTEM写真と粒径分布<sup>6)</sup>

金ナノ粒子をプローブに用いた単色のイメージングに限られてきた。本稿では、金ナノ粒子に加えて、銀ナノ粒子と銀金合金ナノ粒子を用い、マルチカラー、かつ高速・高精度に生体1分子の光計測を行った事例について紹介する<sup>6)</sup>。銀ナノ粒子のプラズモン共鳴波長は400 nm付近に見られ、530 nm付近にピークを示す金ナノ粒子のプラズモン共鳴波長よりも100 nm以上短い。さらに、銀金合金ナノ粒子は、両者の中間にプラズモン共鳴波長を示す。我々は、銀, 金, 銀金合金ナノ粒子のそれぞれのプラズモン共鳴波長と一致する複数のレーザーを光源に有する全反射マルチカラー暗視野顕微鏡システムを構築した。さらに、検出光学系にイメージング分光器を用いることで、単一の二次元検出器の異なる箇所、各波長の散乱画像を同時に結像する、新たな計測系を開発した。本稿では、上記の計測系の開発に加えて、銀, 金, 銀金合金ナノ粒子で標識したリン脂質分子の脂質膜中の挙動や、微小管

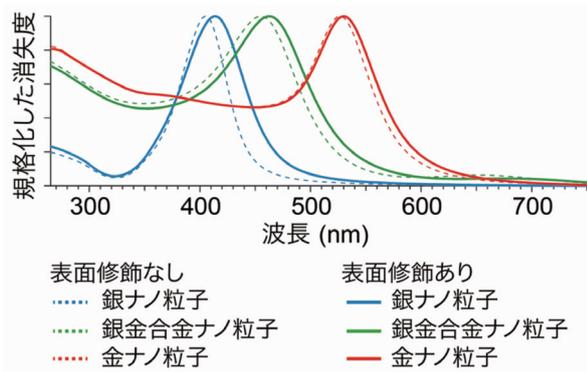


図2 銀，銀金合金，金ナノ粒子の消失スペクトル<sup>6)</sup>

上を直進するキネシン分子の挙動を，ナノスケールの位置決定精度とマイクロ秒の時間分解能で計測した結果についても紹介する。

### 銀，金，銀金合金ナノ粒子の粒径と光学特性

本研究で光プローブとして用いた銀，金，及び金銀合金ナノ粒子について，透過電子顕微鏡（TEM）による観察を行った（図1）。銀金合金ナノ粒子は，銀金の組成比が1:1のものを用いた。得られたTEM像から，金属ナノ粒子の断面積を計算し，形状が球体であると仮定した場合の粒子の直径を算出した。算出した金属ナノ粒子の直径の平均値（±標準偏差）は，銀ナノ粒子が28.5（±4.4）nm，銀金合金ナノ粒子が31.5（±5.7）nm，金ナノ粒子が39.9（±3.0）nmだった。銀ナノ粒子と銀金合金ナノ粒子の粒径分布は，金ナノ粒子の粒径分布よりも広い傾向にあった。

次に，上記の銀，金，銀金合金ナノ粒子の分散液について，消失スペクトルを取得した（図2）。本研究では，後述する生体1分子の計測において，金属ナノ粒子と生体分子を結合させるため，ストレプトアビジンで粒子表面を修飾している。このため，消失スペクトルの取得に際し，表面修飾なしの場合とありの場合について，それぞれ計測を行った。表面修飾なし，及び表面修飾ありの場合のプラズモン共鳴波長のピーク位置は，銀ナノ粒子が405 nm及び413 nm，銀金合金ナノ粒子が455 nm及び463 nm，金ナノ粒子が527 nm及び530 nmに位置していた。表面修飾によって，金属表面の屈折率が変化し，いずれの金属ナノ粒子においても，共鳴波長のピーク位置が長波長シフトしている様子が見られた。表面修飾を行った銀ナノ粒子のピーク波長は，同じく表面修飾を施した金ナノ粒子より117 nm短く，銀金合金ナノ粒子のピーク波長は両者のほぼ中央に位置していることが確認できた。

### マルチカラー全反射暗視野顕微鏡の構築

銀，金，銀金合金ナノ粒子を選択的に可視化するため，複数波長の光源を備えたマルチカラー全反射暗視野顕微鏡を構築した（図3a）。銀ナノ粒子の観察には404 nm，銀金合金ナノ粒子の観察には473 nm，金ナノ粒子の観察には561 nmのレーザー光源を用いた。さらに，近接する金属ナノ粒子対のプラズモンカップリングを捉えるため，649 nmのレーザー光源も追加した。これら4種のレーザー光源は，ダイクロイックミラーによって同一の光軸に統合し，対物レンズ直下に配置した穴あきミラーを介して，開口数1.40の油浸対物レンズに導いた。対物レンズの後ろ側焦点面のエッジ部に各光源を集光してカバーガラス界面にエバネッセント場を形成し，ガラス上面の試料に対して全反射照明を行った。試料から発生した散乱光は，穴あきミラーの中心部を透過させた後，イメージング分光器の入射スリットへと導いた。イメージング分光器内部のグレーティングによって，波長毎に散乱光の光路を分けることができる。さらに，イメージング分光器のスリットを開くことで，各波長の散乱画像を，単一の2次元検出器（高速CMOSカメラ）の異なる部分にそれぞれ結像させることができる（図3b）。マルチカラーイメージングを行う検出光学系としては，

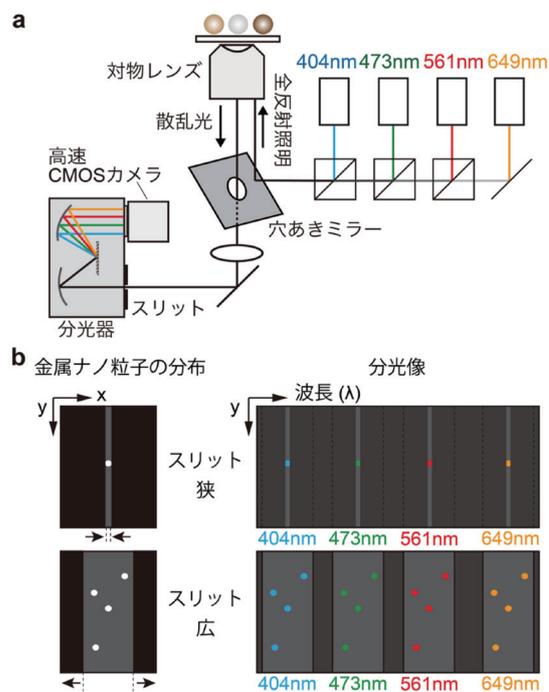


図3 マルチカラー全反射暗視野顕微鏡の模式図 (a) 光学系。(b) スリット幅の調整によるマルチカラー暗視野観察<sup>6)</sup>。

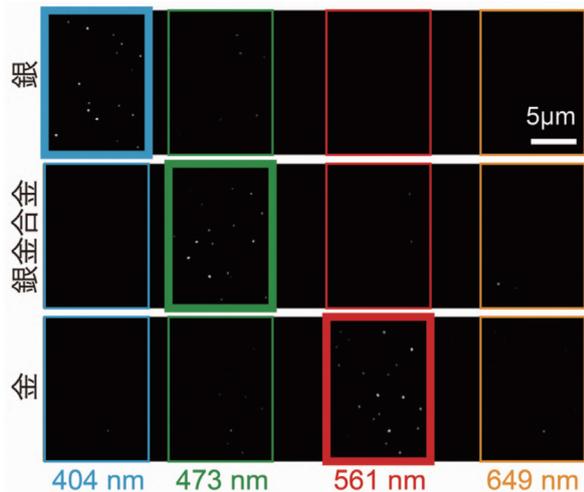


図4 銀、銀合金、金ナノ粒子のマルチカラー暗視野像<sup>6)</sup>

我々が用いたグレーティングの代わりに、複数のダイクロイックミラーを使用することもできる。しかしながら、ダイクロイックミラーを用いる手法の場合、観察に用いるチャンネル数が増えるに従って、光学系が複雑になる。さらに、各カラーチャンネルの位置、回転角、倍率、焦点位置などを調整する必要があり、複数の光学素子を精密に調整することが求められる。また、多くの場合、複数の検出器が必要となることから、検出器間で撮像時の露光のタイミングを同期させる必要が出てくる。我々が開発したイメージング分光器を用いたマルチカラーイメージング装置の場合、複数のダイクロイックミラーを用いた光学系と比較して、極めてシンプルな構成をとることができる。さらに、視野の大きさとのトレードオフにはなるものの、検出光学系に追加の光学部品を導入することなく、カラーチャンネル数を任意に増加できる点も利点として挙げられる。

### 銀合金ナノ粒子の暗視野像と位置精度

開発したマルチカラー暗視野顕微鏡を用いて、銀、金、銀合金ナノ粒子の観察を行った。レーザー光強度は404 nm、473 nm、649 nmが $3.2 \mu\text{W}/\mu\text{m}^2$ 、561 nmが $2.3 \mu\text{W}/\mu\text{m}^2$ で、時間分解能は333  $\mu\text{s}$ で撮像を行った。各粒子の散乱像は、それぞれ共鳴波長に合致した404 nm、473 nm、及び561 nmのチャンネルで最も強い散乱光を示した。一方、それぞれの金属ナノ粒子の散乱光が他のチャンネルでも観察されるクロストークが見られた。単一の金属ナノ粒子の散乱強度を4つのカラーチャンネルでそれぞれ比較し、各チャンネル間の信号のクロストークを評価したところ、カラーチャンネルの波長が粒子のプラズモン共鳴波長のピーク位置に

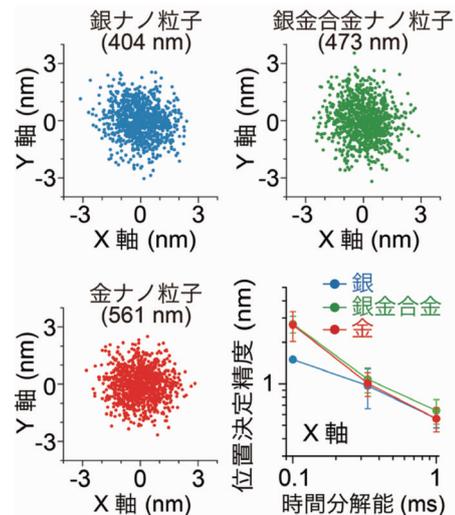


図5 マルチカラー暗視野顕微鏡で観察した銀、銀合金、金ナノ粒子の中心座標の2次元プロットと位置決定精度<sup>6)</sup>

近いほど、クロストークも高い傾向が見られた。クロストークは、共鳴波長に合致したチャンネルにおける粒子の散乱強度を100%とした場合に、最大で約30%だった。クロストークを抑制するため、ピクセル強度のオフセットを設定した。設定値は、リファレンスとなる金属ナノ粒子の散乱像の最大ピクセル強度の15%と定めた。図4に、15%のピクセル強度オフセットを設定した場合の、銀、金、及び銀合金ナノ粒子の暗視野像を示す。オフセットの設定により、クロストークを8%以下に抑えることができた。

次に、ガラス基板上に固定した銀、金、銀合金ナノ粒子に対して、暗視野像の動画を取得し、位置決定精度の解析を行った。銀ナノ粒子は404 nm、銀合金ナノ粒子は473 nm、金ナノ粒子は561 nmの各カラーチャンネルの暗視野像に対して、粒子の暗視野像の中心位置（重心）を解析した。位置決定精度は、X軸、Y軸に沿った金属ナノ粒子の中心位置の分布の標準偏差として算出した。333  $\mu\text{s}$ の時間分解能で取得した金属ナノ粒子の中心位置の2次元プロットの代表例を図5に示す。ドリフトがなく安定して粒子の中心位置を決定できていることがわかる。時間分解能を1,000  $\mu\text{s}$ 、333  $\mu\text{s}$ 、及び100  $\mu\text{s}$ に変えながら測定したところ、銀ナノ粒子（404 nmチャンネル）は0.6 nm、0.9 nm、及び1.4 nm、銀合金ナノ粒子（473 nmチャンネル）は0.6 nm、1.0 nm、及び2.4 nm、金ナノ粒子（561 nmチャンネル）では0.6 nm、1.1 nm、及び2.7 nmの位置決定精度が得られた。位置決定精度の値は、各金属ナノ粒子で類似した値であり、時間分解能が増加するにつれて値が増加した。

## カラーチャンネル間の位置ずれ補正

カラーチャンネル間の位置ずれについても検証を行った。まず、カバーガラスに固定した単一の金ナノ粒子を、二次元的にステージ走査しながら暗視野像を取得し、視野内に粒子散乱像の $10 \times 10$ のアレイパターンを形成した。光源として用いた4波長のレーザー光強度を調整し、いずれのカラーチャンネルでも同一程度の散乱光強度が得られる条件で計測を行った。アレイの間隔は、X軸とY軸に沿ってそれぞれ約 $1.0 \mu\text{m}$ と約 $1.5 \mu\text{m}$ とし、暗視野像は $1,000 \mu\text{s}$ の時間分解能で取得した。図6に、 $10 \times 10$ のアレイパターンの金ナノ粒子の暗視野像を示す。473 nmのカラーチャンネルの暗視野像を、リファレンスとして用いた561 nmのカラーチャンネルの暗視野像に重ね合わせて表示している。アレイの各位置でステージ走査を数秒間停止して、金ナノ粒子の中心位置を解析した。0.5秒間(500フレーム)の中心位置の平均値を、アレイ毎に計算した。404 nm、649 nmのカラーチャンネルについても、同様に操作を行った。位置決定精度は、404 nm、473 nm、561 nm、及び649 nmのカラーチャンネルでそれぞれ0.7 nm、0.6 nm、0.7 nm、及び0.6 nmの条件で解析した。404 nm / 561 nm、473 nm / 561 nm、及び649 nm / 561 nmチャンネル間の同一粒子の中心位置のずれ量を、アレイごとに計算した。平均位置ずれ量は最大で84.0 nmであり、ずれ量は視野依存性を示していた。上記のチャンネル間の位置ずれを補正するため、アフィン変換を利用した<sup>7)</sup>。561 nmチャンネルの金ナノ粒子の暗視野像をリファレンスとして用いた。図6に、アフィン変換前後の473 nmチャンネルの画像を、561 nmチャンネルの画像と重ね合わせた画像

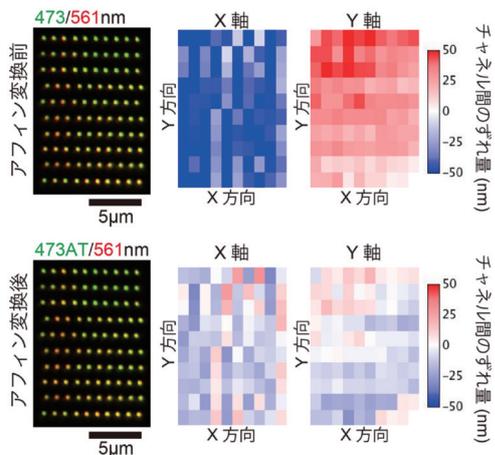


図6 473 nmと561 nmのカラーチャンネル間の位置ずれ量アフィン変換の有無でそれぞれ表示<sup>6)</sup>。

を示す。位置ずれ量は、全てのカラーチャンネルにおいてアフィン変換によって改善され、100箇所の測定点の平均位置ずれ量を16.6 nm以下に抑えることができた。ここで述べたアフィン変換によるカラーチャンネル間の位置ずれ補正を利用して、後述する脂質やタンパク質の挙動の詳細な観察を行っている。

## 脂質二重膜中を拡散するリン脂質の多色観察

開発したマルチカラー計測システムを用い、支持脂質二重膜中のリン脂質の拡散運動の観察を $100 \mu\text{s}$ の時間分解能で行った。1 mol%のビオチン化リン脂質を含む脂質二重膜をカバーガラス表面に形成し、ストレプトアビジンで金属表面をコーティングした銀、金、及び銀合金ナノ粒子でビオチン化リン脂質を標識して観察を行った。同一視野において、膜中のリン脂質と結合した銀、金、及び銀合金ナノ粒子が、404 nm、473 nm、及び561 nmの各カラーチャンネルにおいて同時に観察できた(図7)。図7cに、連続撮像して得られた動画の各フレームで金属ナノ粒子の中心座標を解析して得られた、0.18秒間のリン脂質の軌跡を示す。同一視野内の異なる脂質分子の挙動を、同時に、かつ高速に計測することが可能である。リン脂質の拡散運動に関し、得られた軌跡の平均二乗変位(MSD)の計算を行い、異常拡散モデルに基づき、拡散係数と異常拡散の指数を算出した<sup>8)</sup>。いずれの金属ナノ粒子も、異常拡散の指数は1に近い値をとっていたことから、金属ナノ粒子で標識したリン脂質の挙動は、単純なブラウン運動であることが示唆された。拡散係数は約 $0.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ であり、金ナノ粒子を用いて脂質の拡散運動を解析した先行研究の値とよく一致していた<sup>9)</sup>。

上記の脂質の拡散運動の解析中、膜上の複数の金属ナノ粒子が一過的に近接する様子が観察された。例

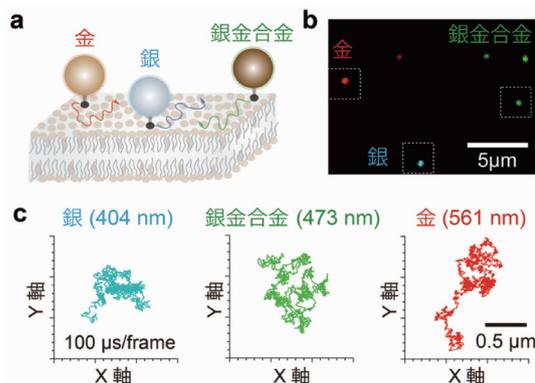


図7 膜中を拡散運動するリン脂質の多色観察

(a) 金属ナノ粒子で標識した膜中の脂質分子の模式図。(b) マルチカラー暗視野像。(c) 連続撮像から取得した粒子の軌跡<sup>6)</sup>。

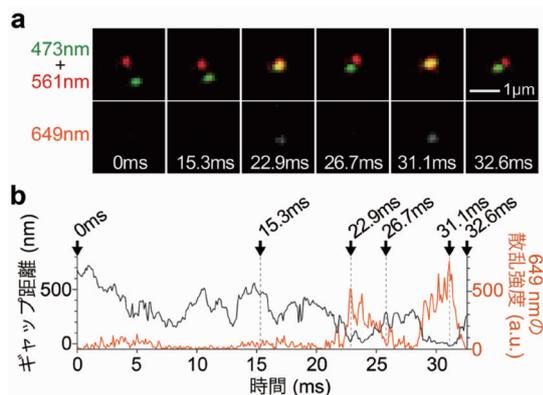


図8 近接する金属ナノ粒子対のマルチカラー高速観察 (a) 膜中のリン脂質に結合した銀金合金ナノ粒子と金ナノ粒子が近接した際の暗視野像。(b) 粒子対のギャップ距離と649 nmのチャンネルの散乱強度の時間変化<sup>6)</sup>。

として、図8aに、銀金合金ナノ粒子(473 nmチャンネル)と、金ナノ粒子(561 nmチャンネル)が近接した際の暗視野像を示す。さらに、同一視野における、649 nmチャンネルの暗視野像も示す。2つの金属ナノ粒子は、22.9 ms及び31.1 msにおいて一過的に近接し、649 nmチャンネルの散乱強度が近接時に顕著に増加した。金属ナノ粒子対の近接はプラズモンカップリングを誘起し、プラズモン共鳴波長の長波長シフトを生じる<sup>10)</sup>。実際に、粒子対のギャップ距離と649 nmチャンネルの散乱強度は逆相関の関係にあったことから(図8b)、649 nmチャンネルの散乱強度の増加はプラズモンカップリングに起因すると考えられた。本研究では、100 μsの時間分解能、かつ多色計測によって、数ミリ秒程度しか持続しない一過的な金属ナノ粒子対の近接時の挙動を詳細に捉えることを可能にした。

### 分子モーターキネシンの多色観察

直進型のモータータンパク質キネシンのマルチカラー1分子イメージングにも取り組んだ。キネシンは、細胞内の小胞輸送を担い、微小管に沿って直進する<sup>11)</sup>。また、キネシンは二量体のモータータンパク質であり、2つのモータードメインが交互にアデノシン三リン酸(ATP)を加水分解しながら前進する。2つのモータードメインの1つを銀、金、銀金合金ナノ粒子で標識して観察を行った。ATP濃度を1 mMとし、100 μsの時間分解能で5.92秒間計測を行った。視野内の金属ナノ粒子のいくつかは、微小管に沿って直進する様子が観察された。直進するキネシンの軌跡を解析した結果を図9に示す。微小管の長軸方向に平行な向きと直交した向きに分けてそれぞれ解析したところ、キネシンが微小管の長軸方向に沿って、ステップ状に直進

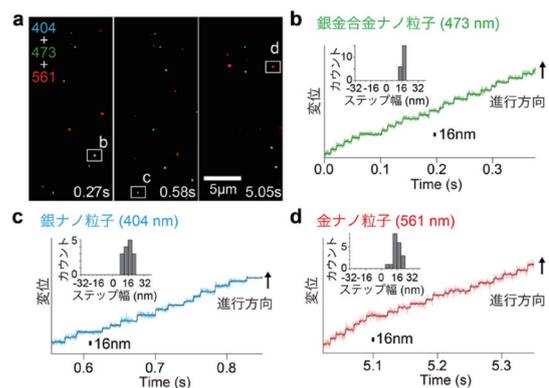


図9 微小管に沿って直進するキネシンのマルチカラー観察 (a) キネシンに結合した銀、金、銀金合金ナノ粒子のマルチカラー暗視野像。(b-d) 各金属ナノ粒子で標識したキネシンの直進運動の軌跡。時間分解能100 μsで取得<sup>6)</sup>。

している様子が明らかとなった。ステップサイズは、いずれのカラーチャンネルにおいても約16 nmであり、後ろ足が前足を追い越すハンドオーバーハンドで直進するとする以前の報告とよく一致していた<sup>11)</sup>。

### 謝辞

この研究はJSPS科研費JP18H05424, JP18H02418, JP18H04755, JP18H01904の補助を受けて実施した研究成果である。

### 【参考文献】

- Iino, R., et al.: "Single-molecule imaging and manipulation of biomolecular machines and systems," *BBA - General Subjects*, 1862 (2018) 241-252.
- Ober, R. J., et al.: "Localization accuracy in single-molecule microscopy," *Biophys. J.*, 86 (2004) 1185-1200.
- Fujiwara, T., et al.: "Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane," *J. Cell Biol.*, 157 (2002) 1071-1081.
- Thompson, R. E. et al.: "Precise Nanometer Localization Analysis for Individual Fluorescent Probes," *Biophys. J.*, 82 (2002) 2775-2783.
- Ando, J., et al.: "Single-Nanoparticle Tracking with Angstrom Localization Precision and Microsecond Time Resolution," *Biophys. J.*, 115 (2018) 2413-2427.
- Ando, J., et al.: "Multicolor High-Speed Tracking of Single Biomolecules with Silver, Gold, and Silver-Gold Alloy Nanoparticles," *ACS Photonics*, 6 (2019) 2870-2883.
- Niekamp, S., et al.: "Nanometer-accuracy distance measurements between fluorophores at the single-molecule level," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 116 (2019) 4275-4284.
- Saxton, M. J., et al.: "Single-particle tracking: Applications to membrane dynamics," *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 26 (1997) 373-399.
- Mascalchi, P., et al.: "Probing the influence of the particle in Single Particle Tracking measurements of lipid diffusion," *Soft Matter*, 8 (2012) 4462-4470.
- Ye, W., et al.: "Conformational Dynamics of a Single Protein Monitored for 24 h at Video Rate," *Nano Lett.*, 18 (2018) 6633-6637.
- Yildiz, A., et al.: "Kinesin walks hand-over-hand," *Science*, 303 (2004) 676-678.