

レーザー暗視野顕微鏡を用いた高速高精度生体1分子イメージング

Fast and precise single biomolecule imaging with laser dark-field microscopy

○飯野 亮太 (自然科学研究機構 分子科学研究所, 総合研究大学院大学)

Ryota IINO (Institute for Molecular Science, NINS, and SOKENDAI)

タンパク質分子モーターのエネルギー変換の仕組みや、分子モーターを構成するサブユニット (部品) 間の協調の仕組みを徹底的に理解したい[1, 2]. 我々はこの目的の一環として、金ナノ粒子の散乱イメージングをタンパク質分子モーターの高速高精度1分子計測に利用している. 金ナノ粒子のサイズは20~40 nm程度であり、粒子の慣性質量や粒子にかかる水の粘性抵抗が小さいため、分子モーターの自由な速い動きを追跡することができる. 金ナノ粒子はプラズモン共鳴の波長で光を強く散乱し、100以上の高いS/N比の画像が得られる. 金ナノ粒子は散乱像の重心位置を解析することで、マイクロ秒の時間分解能やオングストロームレベルの位置決定精度を達成することができる (図1) [3]. 金ナノ粒子は、分子モーターの運動の素過程を調べる強力なツールである. 本講演では、金ナノ粒子の散乱イメージングを用いた生体1分子計測の適用例として、回転分子モーターV-ATPase [4, 5], リニア分子モーターキネシン [6], ダイニン [7], およびキチナーゼ [8]の成果について、時間が許す限り紹介する.

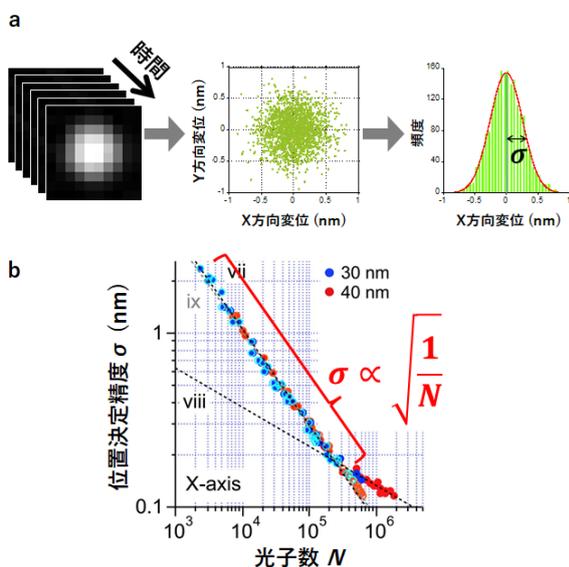


図1. 金ナノ粒子の位置決定精度の計測[3]. a) ガラス基板に固定した40 nmの金ナノ粒子の散乱像 (左) を取得, 重心の分布 (中央) を求め, 分布の標準偏差 σ (右) を位置決定精度とする. b) 1フレームの画像で得られた光子数 N と位置決定精度 σ の関係. 100万個の光子でオングストロームの位置決定精度が達成可能となる.

例えば、キネシンは2本足で微小管上を歩く分子モーターである (図2) [6]. キネシンは2本の足を交互に前に踏みだしながら、まるでヒトが歩くように直進運動することが知られている. しかし、ナノサイズのキネシンがどのようにして正確に一方方向に歩くのか、その詳細な仕組みはわかっていない. ナノの世界では質量はとて小さく慣性は働かないので、ヒトが歩く時のように浮かせた足を勢いに任せて前に着地させることはできない. また、キネシンは水中で歩くので、熱運動する周囲の水分子がものすごいスピードで衝突し、浮いた足はふらふらとブラウン運動をする. よって、キネシンが歩く仕組みはヒトが歩く仕組みとは大きく異なると考えられる. 実際、金ナノ粒子を用いた高速高精度1分子イメージングにより、微小管から解離したキネシンの足は、ブラウン運動で激しく非対称に揺らぐことが示されている.

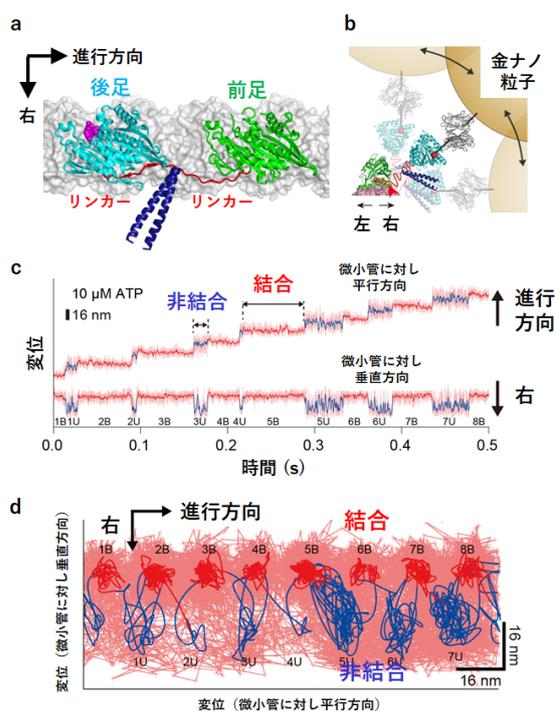


図2. キネシンの高速高精度1分子計測[6]. a) 上から見たキネシンの構造モデル (両足結合状態). b) 後ろから見たキネシンの構造モデル (片足結合状態). c) キネシンの片足の動きのタイムコース. d) キネシンの片足の動きの二次元プロット. 時間分解能は55マイクロ秒.

さらに本講演では、金ナノ粒子に加えて銀ナノ粒子と銀金合金ナノ粒子を同時に用い、マルチカラーかつ高速高精度な1分子計測を達成した成果についても紹介する[9]。銀ナノ粒子のプラズモン共鳴波長は400 nm付近にみられ、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レーザー暗視野顕微鏡システムを開発した(図3)。本システムでは、検出光学系に分光器を用いることで、単一の2次元検出器(高速CMOSカメラ)の異なる位置に、各波長の散乱画像を同時に結像できる。本顕微鏡システムの詳細に加え、銀、金、銀金合金ナノ粒子で標識したリン脂質の基盤支持脂質二重膜中の拡散運動や(図4)、キネシンの微小管上の直進運動を、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マルチカラー1分子計測した結果についても紹介する。

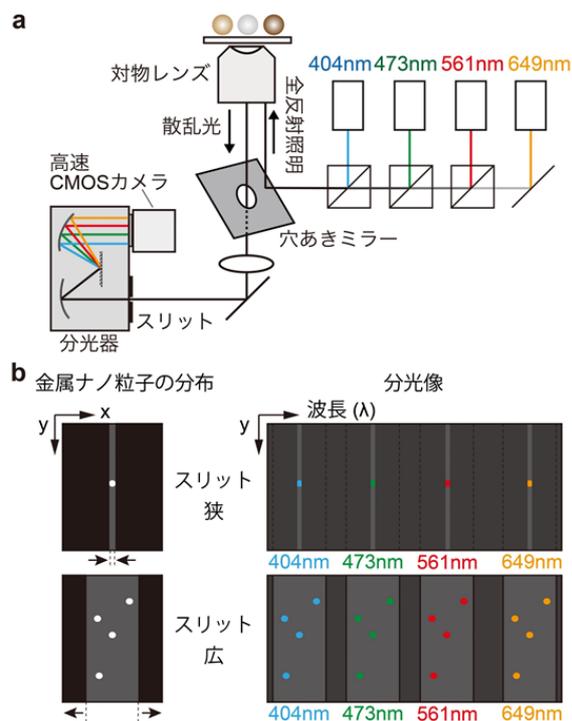


図3. 全反射マルチカラーレーザー暗視野顕微鏡システム [9]. a) 光学系の模式図. 穴あきミラーを用いて複数のレーザー光源を同時に導入し、分光器を用いて各波長の散乱画像を同時に取得. b) 観察視野の模式図. 分光器のスリットを拡げることで広視野観察が可能となる.

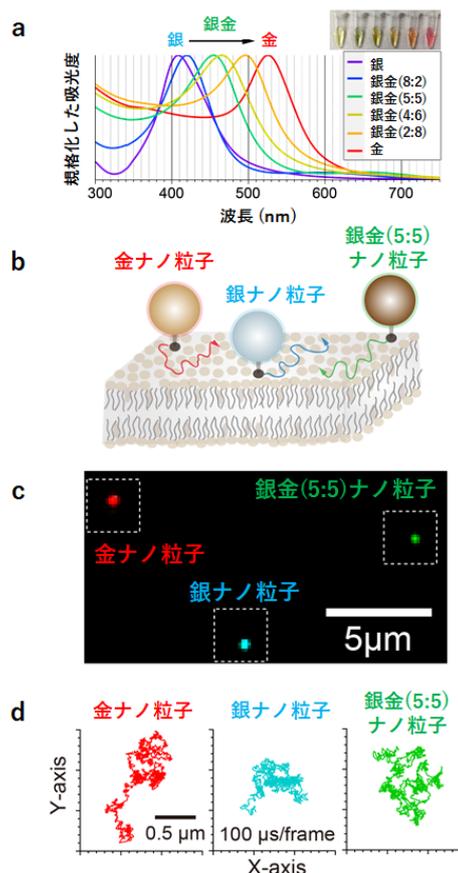


図4. 基板支持脂質二重膜中のリン脂質の拡散運動のマルチカラー高速高精度1分子計測[9]. a) 銀、金、銀金合金ナノ粒子の消光スペクトル. 合金は混合比を変えることでプラズモン共鳴のピーク波長を変化させることが可能. b) 実験系の模式図. c) 観察像の例. d) 拡散運動の軌跡. 時間分解能は100マイクロ秒.

参考文献

- 1) R. Iino 他, Chem. Rev., **120** (2020) 1
- 2) R. Iino 他, BBA Gen. Sub. **1862** (2018) 241
- 3) J. Ando 他, Biophys. J., **115** (2018) 2413
- 4) T. Iida 他, J. Biol. Chem., **294** (2019) 17017
- 5) A. Otomo 他, 投稿中
- 6) H. Isojima 他, Nat. Chem. Biol., **12** (2016) 290
- 7) J. Ando 他, Sci. Rep., **10** (2020) 1080
- 8) A. Nakamura 他, Nat. Commun., **9** (2018) 3814
- 9) J. Ando 他, ACS Photonics, **6** (2019) 2870