

## II 分子イメージングの最新動向

## 3. 光イメージングの最新動向

2) 細胞内蛍光単分子イメージングが  
解き明かす生命の動的なしくみ

渡邊 直樹\* / 山城佐和子\* / 水野 裕昭\*

東北大学大学院生命科学研究所単分子動態生物学分野 (\*現・京都大学医学研究科薬理学教室)

細胞内で蛍光分子一つひとつを可視化する研究が広がりつつある。例えば、細胞の形や運動を制御する細胞骨格の組み換え、細胞のメカノセンス、細胞膜近傍のシグナル伝達経路や細胞接着の制御機構、転写因子の核内DNAとの相互作用など、分子の直接可視化により詳細な制御様式が把握されるようになった。多くの例で、試験管内の生化学的性質から想像されていたよりも速く複雑なダイナミクスがとらえられている。本稿では、細胞内蛍光単分子イメージングについて、自験例をはじめ最近の展開について紹介する。

細胞内でタンパク質  
1分子を可視化するには

蛍光イメージングは、1分子をも可視化できる最も感度の高い実験法の1つである。蛍光分子は、光のエネルギーを吸収し励起され、より波長の長い光を放出するサイクルを5ナノ秒程度の間に行う。強い励起光が与えられると、このサイクルを短時間に数百回繰り返す。開口数の大きな油浸対物レンズなどを備えた最新の顕微鏡や電子増倍型冷却CCDカメラは、この微弱な光(少ないフォトン)を高効率でとらえる。しかし、細胞内や培養液中には、リボフラビン(ビタミンB2)や、それに由来するフラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)など、背景蛍光や自家蛍光を発する物質が多数存在する。これらに由来するノイズを軽減するため、励起エネルギーを細胞底面のみに限局する全反射顕微鏡や<sup>1), 2)</sup>、細胞

周囲のみに励起光を照射する<sup>3)</sup>などの工夫がなされてきた。さらに、後述する新しい照明装置も開発されつつある。

ノイズと識別できるように分子を可視化するためには、相当数のフォトンを集積してとらえる必要がある。そのため、細胞骨格などに会合し動きを止める分子や、細胞膜上を遅く拡散する分子が観察対象に適する。実際、膜タンパク質<sup>2)</sup>や細胞外の生理活性物質<sup>1), 4)</sup>の可視化が当初試みられた。さらに、細胞伸展を駆動するアクチンが、意外にも先端端から離れた部位でも盛んに重合・脱重合を繰り返すことを明らかにしたわれわれの研究は、細胞深部でも的確な分子の可視化が可能であることを示した<sup>3)</sup>。

ダイナミックな生命現象  
—秒速720個のアクチンを  
重合させる分子機械の発見

白血球や線維芽細胞のアクチン線維は、骨格筋のそれとは違い絶えず重合と脱重合を繰り返し、細胞運動を助ける。この重合反応を促進する主要な分子群に、フォルミンファミリーがある。その1つ、mDia1タンパク質を細胞内蛍光単分子イメージングで可視化したところ、線維の重合端に結合したまま高速で動き、連続的に単量体アクチンを取り込み重合させることが明らかとなった<sup>5)</sup>。驚くべきことに、mDia1タンパク質の分子移動速度は、毎秒720個もの単量体アクチンを取り込む速さに達する。以前の研究から、単量体アクチンが線維端に衝突する

頻度が線維伸長速度を制限すると考えられていたのだが、フォルミンファミリーはその限界を超える速い線維伸長を実現することが判明した。細胞内はタンパク質が過密状態にあり、試験管内で同じ環境を再現することは難しいが、直接分子を見ることで予想を超えた性質が解明されることがある。

新しい細胞メカノセンス  
機構

分子機能がいつ、どこで役立つのか、生理的な制御のしくみを解明するためにも分子イメージングは役立つ。血管内壁を覆う内皮細胞など、多くの細胞は物理ストレスにさらされながら、われわれの体を支えている。細胞に物理ストレスが加わると、カルシウムイオンの上昇を含む種々の細胞シグナルが活性化し、アクチン細胞骨格が再編成される。しかし、どの分子機構がアクチン線維を組み換えるのか、そのメカニズムは不明であった。われわれは、フォルミンファミリーの分子イメージングから、機械刺激を与えた細胞内で、壊れたアクチン細胞骨格線維を再生する仕組みを発見した<sup>6)</sup>(図1)。アクチンを重合する分子を直接観察することで、わずか20秒ほどの間に活性化され消失する現象をとらえたのである。この一過性の機構は、細胞分子イメージングの手法なしに発見されなかったであろう。これは、細胞メカノセンスの研究で想定されてきた種々のシグナルとは独立した機構であり、単量体アクチンを