

蛍光相関分光法

北海道大学電子科学研究所
超分子分光研究分野
金城政孝

はじめに

細胞の中はさまざまな細胞内小器官や細胞骨格, タンパク質やmRNAをはじめとする高分子が存在し, それらが障害となつて単純には物は動かないと考えられがちだ。しかし細胞は外界からのいろいろな刺激(情報)に対して短時間のうちにさまざまな反応を起こす。このことは, 細胞の中でいろいろな情報処理・伝達が行われていることを示している。細胞の中の情報伝達の存在はとりもなおさず分子が移動や相互作用しながらダイナミックに動いていることを示唆している。物が動いたり運ばれたりするにはさまざまな機構が考えられるが, その中には標的を決めて配送するきわめて効率的なシステムも存在する。しかし一方ではそのような配送システムではなく単純な拡散を介したシステムもまた重要な役割を担っている。拡散を介したシステムがどのように機能していることを知るためには, 細胞の中で分子がどの程度自由に動くことができるのかを直接測定することが重要となる。

細胞の中で分子の動きやすさを測定する手法としては, FCSの他にもよく知られている方法としてはタイムラプスやSMT(single molecule tracking)、FRAP(Fluorescence Recovery After Photobleaching), iFRAP(inverse Recovery After Photobleaching)などがある。いずれも細胞内や生体膜中で分子の動きやすさを解析する方法であり, 拡散定数(車の運転で言えばスピードにあたる)として表わしている。同じ分子で細胞の中の状態が同じであるならその拡散定数は変化しない。もし、動きが変化するなら、分子のいる環境が変化したか、もしくは分子の性質や形状が変化したことを示す。環境の変化としては粘性の変化や細胞内の微細構造の変化が考えられる。一方、分子の形状や性質の変化としては、複合体の形成や2量体化などが考えられる。車の運転でなら、道路工事や雪や雨などの天候の変化

や、新しい信号機の設置だろうか。また、トレーラーなどをつけた時の動きの変化かもしれない。このように分子の動きやすさ(拡散定数)を測定することで分子の周りの微環境や分子間相互作用を解析することが可能である。大雑把な言い方を許してもらえば、タイムラプスやSMTでは画像での解析になるため、細胞内小器官などの比較的遅い動き($1 \mu\text{m}^2/\text{sec}$)、FRAPやiFRAPではそれ専用機やLSMなどを用いることで生体膜中の分子の動きやクロマチンなどの巨大分子複合体などの動き($10 \mu\text{m}^2/\text{sec}$)を測定に用いられている。FCSではさらに細胞質内の蛋白質の動きなどの早い動き($100 \mu\text{m}^2/\text{sec}$)を解析することができる。

分子の数は? = 濃度(M) × 容積(l) × アボガドロ数

Volume	Concentration					
	1M	10^{-3}M (mM)	10^{-6}M (μM)	10^{-9}M	10^{-12}M	10^{-15}M (nM)
1l	6×10^{23}	6×10^{20}	6×10^{17}	6×10^{15}	6×10^{12}	6×10^9
10^{-3}l (ml)	6×10^{20}	6×10^{17}	6×10^{14}	6×10^{12}	6×10^9	6×10^6
10^{-6}l (μl)	6×10^{17}	6×10^{14}	6×10^{11}	6×10^9	6×10^6	6×10^3
10^{-9}l (nl)	6×10^{14}	6×10^{11}	6×10^8	6×10^6	6×10^3	6×10^0
10^{-12}l (pl)	6×10^{11}	6×10^8	6×10^5	6×10^3	6000	600
10^{-15}l (fl)	6×10^8	6×10^5	600	60	6	0.6
10^{-18}l (afl)	6×10^5	6×10^2	60	6	0.6	0.06

表1 FCSの捕らえる領域

蛍光相関法の原理

1モル濃度で1リットル中には($1\text{M} \cdot 1\text{L}$)分子がアボガドロ数の分子、 6×10^{23} 個が存在する。そこで、ミリモル(mM)、マイクロモル(μM)、ナノモル(nM)と1000倍ずつ希釈していくと、1リットルの中に分子が何個存在するかが計算できる。つまり、1M1L中には 6×10^{23} 個存在するけど、その1/1000に希釈する濃度だと 6×10^{20} 個、さらにその1/1000なら 10^{17} 個で、さらにその1/1000だと 6×10^{14} 個の

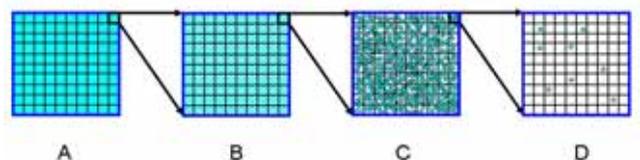


図1

分子が存在する、と単純に計算できる(表1)。同じように1M濃度であったとしても注目している領域(容量)を1Lではなくて1ミリリットル、もしくは1マイクロリットル、ナノリットルと、小さくしていくと、見える分子数は減っていくことになる。それらの操作を表にしたのが表1に示している。ナノモル(nM)濃度から見ていた領域を小さくしていくと、フェムトリットルで6個となりさらに1/10小さい領域、0.1フェムトリットルで0.6個というように分子の数は数えられるくらいの数になっていくことがわかります。ここでもう一つわかることは、0.6個というちょっと奇妙な数が出てくることだ。分子は1個以下に分けることはできない。図1に示したように希釈していくとあるときから柀の中(つまり観察視野)に分子が1個存在する場合と存在しない場合があることを示している(図1)。

つまりごく微小な領域を観察しているとある割合で分子が見えたり見えなかったりすることになる。非常に小さな場所だけを見ることは顕微鏡を使うことで可能だ。

市販の高性能のレンズを用いて、レーザー光を絞ると点のようにして小さな領域を作ることが可能だ(図2a)。し

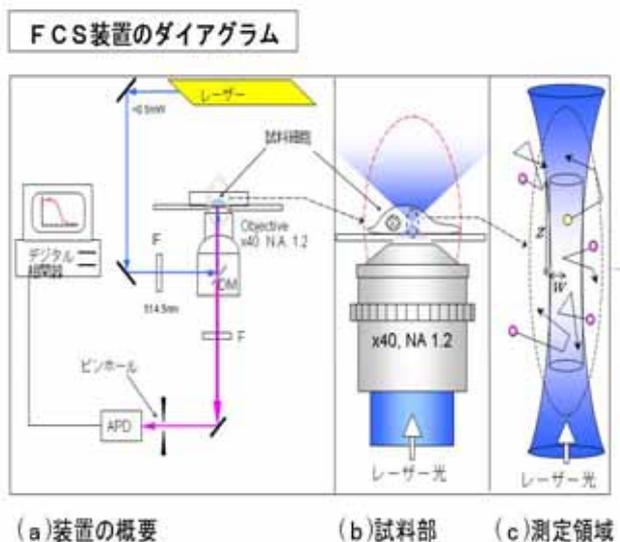


図2

(A) 蛍光相関分光(Fluorescence Correlation Spectroscopy)装置の全体の模式図。励起用のレーザー光源、光を絞るための対物レンズと検出器としてのAPD(アパランシェフォトダイオード)で構成されている。

IF:干渉フィルター、DM:ダイクロイックミラー、F:ロングパスフィルター

(B) 試料測定部の模式図。レーザー光は対物レンズでカバーガラスの上に溶液や細胞の中の1点に絞られている。

(C) 観察領域の拡大模式図。観察領域はここでは半径 w 、軸長 $2z$ で定義される円柱状の領域として示した。蛍光分子(●)はブラウン運動により溶液の中を自由に動き回り、この円柱の中で蛍光を発する。

かし光は波長という物理量を持っているため、無限に小さい点になることはなく、光の回折限界のため波長以上には絞れない。つまり、無限小の点にはできず、一定の体積となる(図2c)。その大きさは測定に用いるレーザーの波長くらいの幅は500nm、高さはだいたい1ミクロンから0.5ミクロンの間に絞ることがでる。

計算すると、この領域は0.1フェムトリットル、またはサブフェムトリットルになる。適当な濃度に希釈した試料をこのくらい小さな領域で囲ってみると、そこには先ほど説明したように、そこには分子が数個から数十個、もしくは1個以下なることになる。水の中の非常に小さな一点を見ていると何がわかるのだろうか?例えばナノモル濃度でフェムトリットルの領域をじっと見てみると、観察領域の中にブラウン運動によって分子が入って来たり、出ていったりするのが分かるはずだ。あるときには1個、あるときには0個、たまたま2個同時に入ってくることもあるかもしれない。そのようにして平均0.6個になることを示しています。つまり、表1からわかることは、適当な濃度に希釈した溶液を用意して、非常に小さい観察視野を使うと、分子の数と言うのは一定ではなく、常に変動しているのが観察されるはずである。つまり数の揺らぎが見えてくるとことになる。

ゆらぎからわかること

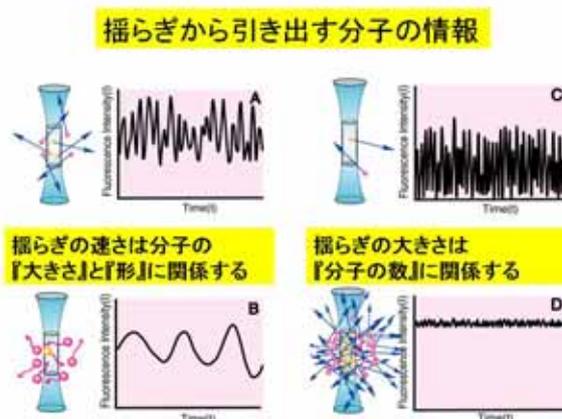


図3

ブラウン運動によって蛍光分子が観察領域の外から分子が入ってきて外に出る。そうすると、蛍光の強度がいったん上がって、それから減少する(図3A)。大きな分子だとこの強度はゆっくり増加して、ゆっくり減少する(図3B)。

もう一つわかることは、たとえばそこに分子の数が少ないとき、例えば1個かそれ以下に存在することを考えると、外から蛍光分子が入ってくると蛍光の光が急激に増加し、分子が出て行くと蛍光の光がなくなり真っ暗になり、光の点滅が激しく見えると言うことになる。つまり、光の増減は0から100%以上で大きく揺らいでいることを示している(図3C)。一方この領域に多数の分子、たとえば、平均100個の分子が存在すると、常に100近い分子が存在する上に、10個の分子が外から入って来たとしても、蛍光の揺らぎは10%にしかならず、揺らぎの幅は小さくなることになる(図3D)。分子の数がどんどん大きくなってくると、逆に、揺らぎの幅はますます小さくなる。通常の測定のように、揺らぎが観察できなくなる。これまでのことをまとめると、観察視野を十分に小さくすることで、個々の分子の明るさが全体の蛍光強度の明るさに影響を与えるようになり、そこから2つの物理量がわかる。1つは、このどのくらい速く動いているかと言う分子の動きやすさ(拡散定数)であり、そこに存在する分子の大きさ、もしくは形が推定できる。もう一つは揺らぎの大きさから、それからここに存在する分子数がわかる。このように、非常に小さな領域を見ているだけで、単一分子の運動に基づく観測と解析ができるため、一つの分子を画像化したり追跡したりする方法とは異

なるが、FCSも単一分子検出の一つと言われる。

得られたゆらぎの曲線の中には先ほど言った2つのパラメーターの情報が入っている。1つは分子の動きを反映した時間のパラメーター、もう一つは分子の数を反映した揺らぎの強さのパラメーターという2つの情報に分けることができます。FCSは蛍光の揺らぎから自己相関関数を用いて情報を抽出し、揺らぎのシグナルを1つの曲線に変換している(図4)。その曲線の形状の中には先ほどの分子の動きやすさと分子の数情報が含まれている(図5)。

測定法の特徴

装置は、大まかに言ってレーザー光源と顕微鏡、検出器と解析用コンピュータの3つから構成されている(図2)。通常市販の装置はLSM(レーザ走査型顕微鏡)をベースにして作っているため、次の4つの特徴を有する。まずフェムトリットルという非常に小さい領域を測定できる。これは細胞の体積に比較して十分小さいことが言える。それから、顕微鏡をベースにしているので、高い空間分解能がある。さらに、微量で測定ができる。微量とは小さなドロップレット、つまり、1, 2μLくらいの溶液があれば十分である。もう一つ大きな特徴は均一系の測定であるということだ。ブラウン運動を基本とした、つまり水系の

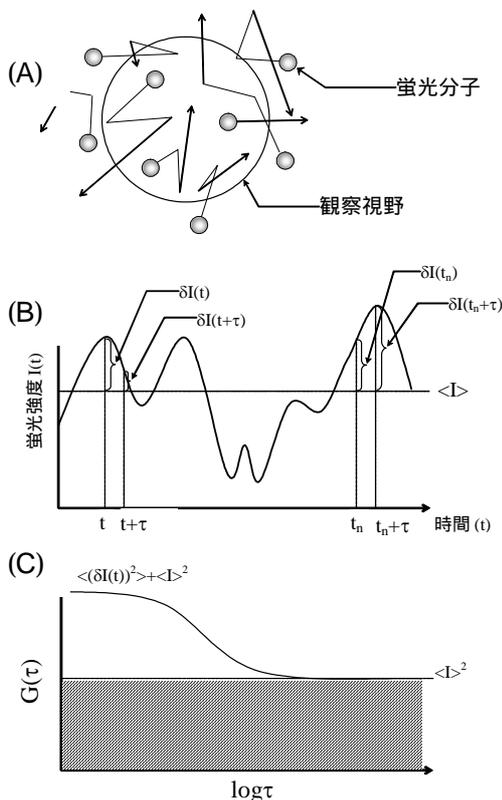


図4

(A) 顕微鏡視野のレーザー光の中を動きまわる蛍光分子の模式図。観察視野は実際には円柱形の立体構造をしている。

(B) 数ゆらぎに起因する蛍光強度の時間変化。平均蛍光強度を $\langle I \rangle$ 、平均からの偏差を $I(t) - \langle I \rangle$ とすると、 $I(t) = \langle I \rangle + \delta I(t)$ 、 $I(t+\tau) = \langle I \rangle + \delta I(t+\tau)$ とすることができる。ここではアナログ測定を例に示した。

(C) 蛍光強度の揺らぎ (B) の自己相関関数 $G(\tau)$ 。 $G(\tau)$ は (B) で測定された蛍光強度 $I(t)$ から次の式で求められる。 $G(\tau) = \langle (I(t) - \langle I \rangle)(I(t+\tau) - \langle I \rangle) \rangle$ ある時点の蛍光強度と十分長い時間の後の強度の相関はなくなるので、 $\langle I \rangle^2$ に近づいていく。

中なので、細胞の中で、分子を固定したり、止めたりする必要がない。つまり細胞 1 個の中の好きな場所を測ることも可能となる。

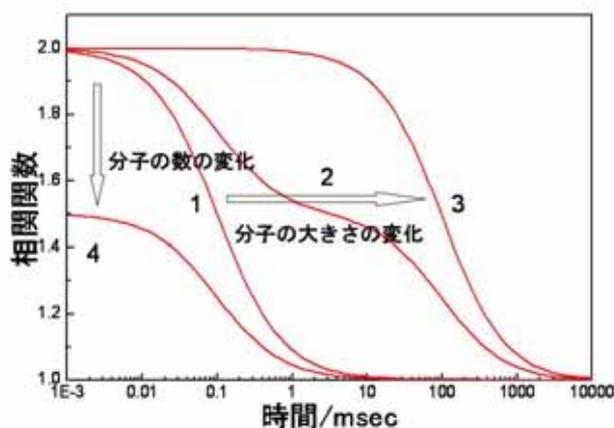


図 5

1~3)自己相関関数 $G(t)$ と分子の動きと数の関係。分子の大きさが大きくなると、水平の矢印のように自己相関関数は 1 から 3 へ減衰が遅くなるよう変化する。
2) は大きな分子と小さな分子が 50% ずつ混ざった状態を示す。
4) 観察領域に含まれる平均分子数が少ないと揺らぎは大きいため自己相関関数の振幅も大きい、分子数が増えると揺らぎは小さく振幅も小さくなる。1 から 4 の変化として示される。

FCS による細胞測定

次に FCS の測定について、モデルで説明したい。実際の細胞の測定はどのような蛍光色素や蛍光性蛋白質を利用するのか、細胞の種類やターゲットとなる蛋白質や分子により様々である。ここでは細胞内シグナル伝達メカニズムの解明に繋がる核の中の転写調節をモデルとして考える。

例えば特定の転写調節因子に GFP をラベルし、細胞質と核内で場所を区別して FCS の測定を行う。そうすると細胞質では GFP で標識した蛋白質の自由なブラウン運動だけが観察される (図 6 A)。一方、核内を測定した場合、特定の部位に結合して動きの遅くなった分子の動きと未結合の分子の動きの減衰曲線の足し合わせとして観察されることになる (図 6 B)。減衰の速さから結合した分子の大きさを推定することが可能である。一方、二つの減衰曲線の割合から、結合・未結合分子の割合を推定することも可能である。

我々は細胞質から核内へ移動し遺伝子の転写調節を行うグルコシルチコイドレセプター (GR) を研究対象としている。その主な理由は、これまで生化学的な研究が進み、様々な突然変異体とその機能が機知である。一方で細胞質、核質、遺伝子調整と様々に局在を変化させながら働いてい

るが、生細胞でのダイナミックな情報は少ないことがある。これまで、我々の予備的な FCS の測定から、核へ移行した GR-GFP の動きは核内の粘性以上に動きが制限されていることが明らかになった。またそれが 2 量体化と遺伝子発現に関係することが分かってきた。今後、細胞の微環境の影響を解析するための新規プローブの作成を行い、どのような分子との相互作用を反映しているのか解析して行きたいと考えている。

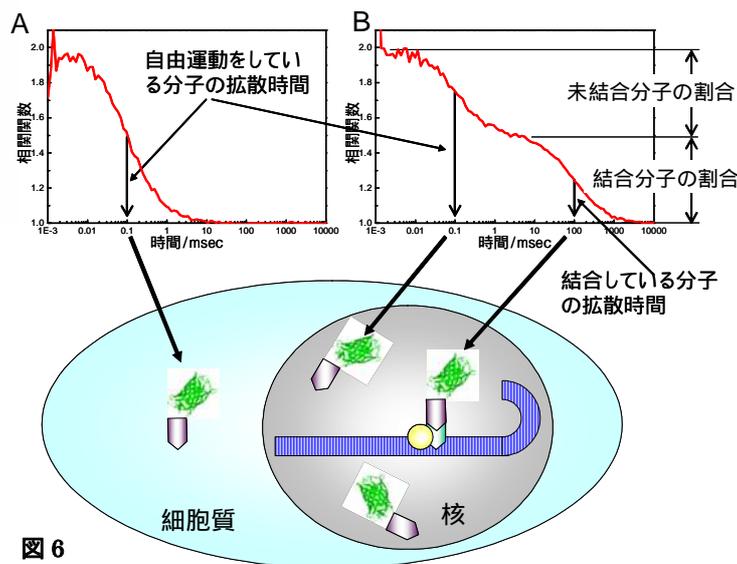


図 6

最後に

FCS は様々な実施例や応用例が報告されてきているが、まだハード面やソフト面、また、測定の条件など改良していく必要がある技術だと考えている。そのことは逆に研究者のアイデアで発展させていくことも可能であることを示している。FCS の細胞以外で応用などについては参考文献の 1, 2 を、また FCS と FRAP など他の手法との比較についての解説については 3 を参考してほしい。蛍光相互相関分光法 (FCCS) についてはまた別の機会に述べたい。

参考文献

- (1) 金城政孝 細胞内生体高分子相互作用の解析をめざす 蛍光相関分光法 (楠見明弘, 他編) バイオイメージングでここまで理解 (かわ) る。実験医学別冊 羊土社 (2003)
- (2) 金城政孝 蛍光相関分光法による一分子検出 蛋白核酸酵素 44, 1431-1438 (1999)
- (3) 和田郁夫、長屋寿雄、田村拓 FCS と FRAP による細胞内分子の拡散、結合解析 高松哲郎 編 バイオイメージングがわかる。羊土社 (2005)