

1 分子追跡によって細胞のナノシステムを解く

小山-本田 郁子・楠見 明弘

Understanding Cellular Nanosystems Using Single-Molecule Tracking

Ikuko KOYAMA-HONDA and Akihiro KUSUMI

To understand how cellular nanosystems work, direct observations of the nanosystems at work in living cells is highly desirable. Cellular nanosystems appear to form and work, at the very fundamental level, based on the thermal fluctuation of the structure and interactions and thermal diffusion of their constituent molecules, and as a result, they function non-synchronously. The recent advent of single-molecule tracking techniques has allowed researchers to directly observe non-synchronous, stochastic, single-molecule events in living cells. Using these techniques, researchers found that many cellular functions, several signal transduction systems in particular, are carried out by the transient assemblies of several to several tens of molecules. In the present article, we describe these new observations as well as a new method of simultaneously tracking two species of molecules with two different colors and detecting their short-term binding to each other developed in our laboratory.

Key words: single-molecule tracking, stochastic events, transient binding, plasma membrane, signal transduction

1. 生命の基本単位である細胞を理解するには、細胞のナノシステムを解く必要がある：ポストゲノム時代の意義

細胞のはたらきを担っているのは、ナノメートルサイズの生体分子、すなわちタンパク質、脂質、核酸などの分子である。これらの分子の大きさがナノメートルサイズだから、ナノシステムなどというものが出てきたのだろうというのは、しかし、話半分でしかない。というより、実は話3分の1といたいところである。実際、少し乱暴にいうと、「遺伝子（ゲノム）の全解読ができて、細胞をつくるナノパーツの多くがカタログ化されたにもかかわらず、細胞のナノシステムのはたらき方は相変わらずわからない」。このことは、遺伝子が全解読される前からわかっていたはずなのだが、全解読されてはじめて、研究者の意識が大きく変わったといつてよい。細胞をつくる部品はほとんどすべてテーブルの上に並べられているという状況を目の前にすると、やはり、圧倒された気がするのと同時に、それに

基づいて生命科学を進めなくてはいけない、と考えるのは当然であろう。そこで、誰しもが、これらの部品の組み合わせを知ることが次の重要な課題であることを認識するに至ったのである。これが、細胞のナノシステムについての2番目の話3分の1である。このことを、生物学の世界では、「ポストゲノム時代」などとよんでいる。

いま、多くの生物の研究者は、これらの部品、ナノパーツがどのように組み合わされて、もう少し複雑な調節などをおこなうはたらきが出現するかということに興味を駆り立てられている。ナノパーツがつくる数十から数百ナノメートル程度の大きさをもつシステム、ナノシステムのはたらきを仕組みを理解したいのである。ナノシステムは、多くの場合、パーツのセルフアセンブリー（自己組織化）によってできる。さらに、細胞外からのシグナルを受けたときなどは、それが引き金となって、新しい分子集合体（ナノシステム）をあっという間に（といってもミリ秒から秒程度の時間はかかる）つくってシグナルを伝達したりするこ

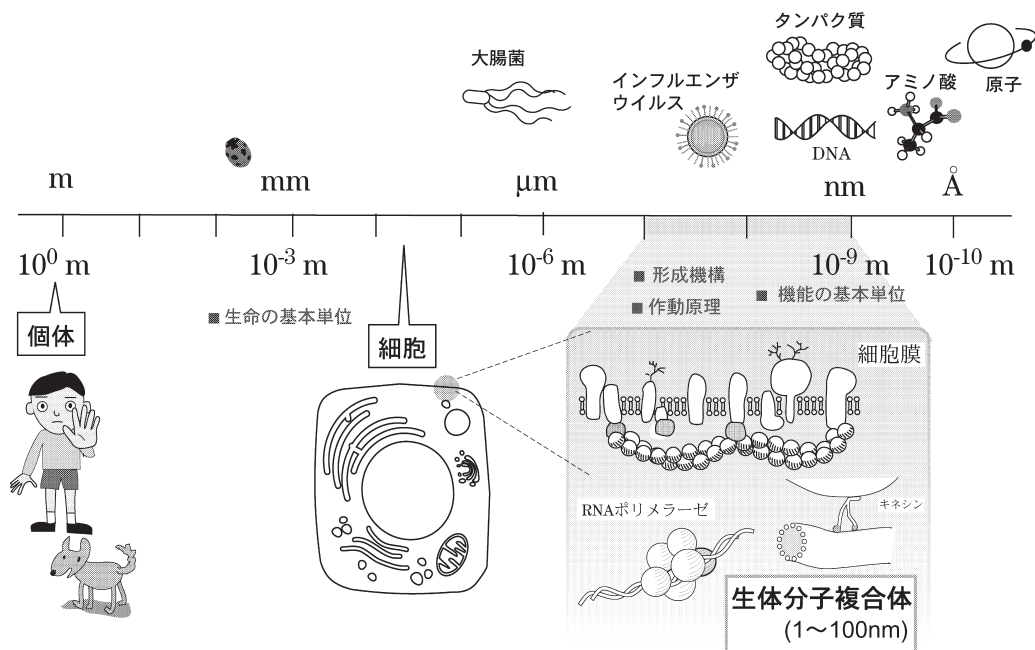


図1 生体ナノ集合体の概念図。ナノメートルサイズの生体分子（タンパク質、脂質、核酸など）が集まり、数十～数百ナノメートルの、調節機能をもった生体ナノシステムをつくりだす。このような細胞のサブシステムの理解が、細胞のはたらく仕組みの解明の鍵となる。

とも多い。細胞内のナノシステムの例，ナノパーツ，ナノシステム，細胞の大きさの比較を図1に示した。スケールは対数になっていることに留意していただきたい。

2. 多くの細胞内ナノシステムはナノパーツの熱拡散運動でつくらはたらく

ナノシステムという言葉は、機能や作動機構を強調した言葉であるが、モノの面を強調するときは、生体ナノマシン、ナノデバイスというような言葉が使われる。これらは、細胞の物質・エネルギー・情報の変換を担う装置である。

しかし、マシンとかデバイスという言葉を生体細胞内のナノシステムに使うと、読者は違和感をもたれるのではないかと思う。実は、筆者らも同様に感じる。この違和感はどこから来るのだろうか。実際、この違和感が、最後の話3分の1につながっていく。

この違和感は、おそらく、生体とか生物とかいう言葉が連想させるものが、マシンとかデバイスというイメージとかけ離れているからに違いない。マシンやデバイスというと、歯車や固体電子回路のように形が決まっていて、きちりと動くモノが連想されるのに対し、細胞内のナノシステム、水中ではたらく生体分子の複合体は、タンパク質のようなナノパーツからなり、それらはどうも、水に濡れていて、柔らかそうで、およそ、人工の機械のようなはたらき方ができるように思えない。

では、生体ナノシステムはどのようにはたらくのだろうか。細胞に細胞外から増殖シグナルが来たとき、それを核に伝え、また、細胞質にもそのためのさまざまな準備を促す細胞内のシグナル伝達系の一部を例にとってみよう（図2）。ここで現れるパーツは、増殖因子を細胞表面で受け取るための受容体と、細胞膜の内側表面ではたらく Ras, Raf, SUR8 などの一群のタンパク質である。また、Ras というパーツはよく故障を起こし、細胞増殖シグナルが来っていないにもかかわらず、増殖信号を出すように変化することが知られている。誤った増殖シグナルが出つづけた細胞は、がん細胞なのであるが、がん組織の30%程度で、Rasの変異が見つかったという報告もある。すなわち、Rasのはたらき方が変わることによって、がんの病因にもなるという点でも、そのはたらき方を知ることが重要となっている。

Ras分子は、細胞膜の細胞質側（細胞膜の内側）表面に存在する分子である。ところで、細胞膜は、実は、二次元状の（厚さは、ほぼ脂質2分子分で5nm程度ある）液体である。粘性は大雑把にいうと水の100倍くらいであり、オリーブオイルなどよりも、少し高いと考えていただくとよい。液体である証拠に、Ras分子は、細胞膜中を動き回っている。Ras分子を1分子毎にみたときの運動軌跡を図3に示す。これは、蛍光を発する緑色蛍光タンパク質（YFP）とRasのcDNAをつなぎ、それを細胞に入れて、YFP-Ras融合タンパク質分子を細胞膜上に発現させて観

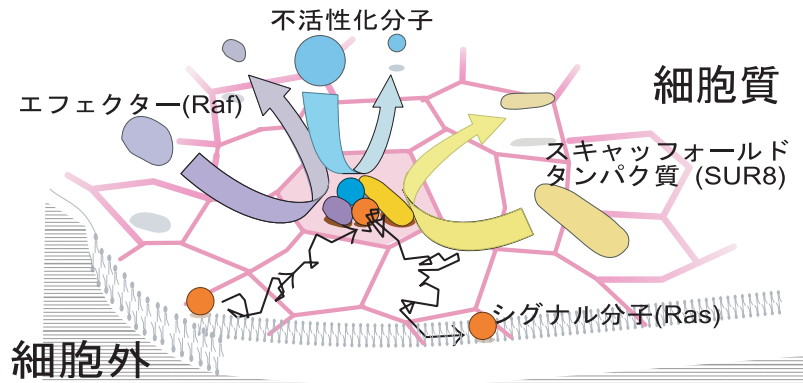


図2 コンパートメント化された細胞膜の模式図。細胞膜上を拡散していたシグナル分子は受容体のあるコンパートメント（真中の色のついた部分）で活性化され、そのスキヤッフオールドタンパク質、下流シグナル分子（エフェクター）、最初のシグナル分子を不活性化する分子などと協同的に会合しシグナル複合体を形成する。すると、複合体は膜骨格に結合したり、膜骨格の網目にトラップされたりするので動かなくなる。ここで下流のシグナル分子へシグナルが伝わる。したがって、ここまでシグナルの空間情報が保持される。次に、大抵1秒以内に最初のシグナル分子が不活性化され、複合体は分解し、各シグナル分子は速い拡散運動を回復したり細胞質に戻ったりする。

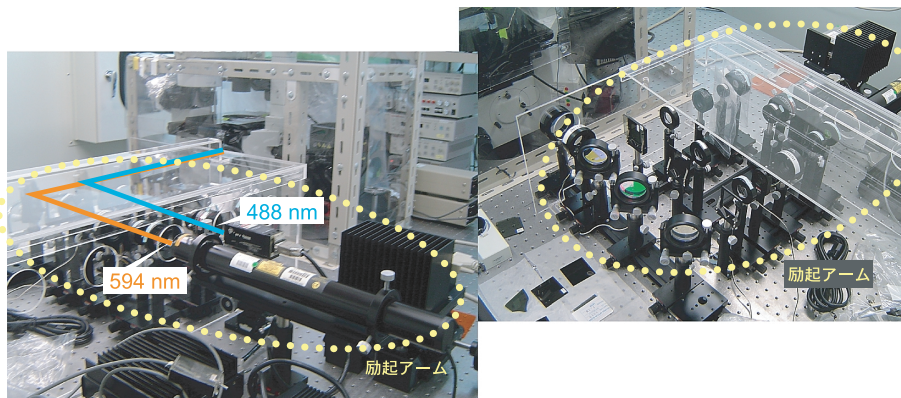
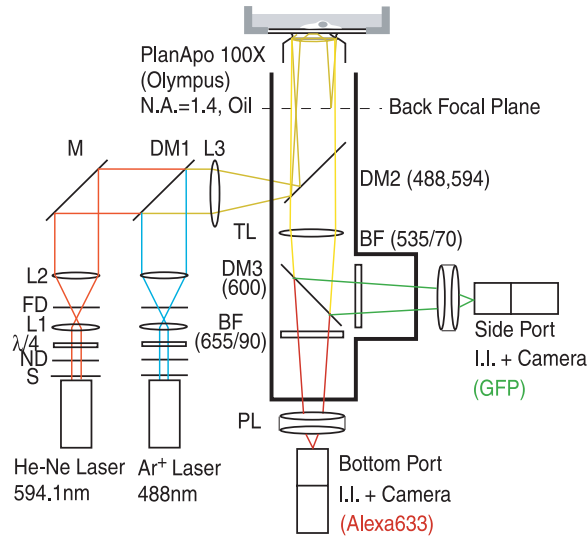


図4 2色蛍光同時1分子観察装置の光路図と写真。倒立型顕微鏡をベースとした、対物レンズ型の2色全反射蛍光顕微鏡。GFPとAlexa633の同時観察用の装置設定例である。その他の蛍光色素の観察のためには、2倍波Nd:YAG(532nm)、He-Cd(442nm)レーザーなども応用できる。写真の点線内は励起アーム。蛍光の励起アームにある光学部品は次のようである。S: electronic shutter, ND: neutral density filter, $\lambda/4$: quarter-wave plate, L1およびL2: 488nm励起用10×beam expander, あるいは594nm励起用4×beam expander, FD: field diaphragm, M: mirror, DM: dichroic mirror, L3: focussing lens, BP: bandpass filter. GFP励起用のArレーザー, Alexa633励起用のHe-Neレーザーを平行に並べ、同じ焦点面すなわち対物レンズで全反射させるように設置する。2種類の蛍光色素の発光は、対物レンズを通りダイクロミックミラー(DM3)によってサイド側と底面側に振り分けられ、それぞれイメージインテンシファイヤーとカメラによって検出される。TL: tube lens (1×または2×), BF: barrier filter, PL: projection lens (2×), I.I.: image intensifier.

察したものである。1分子を観察するための全反射蛍光顕微鏡装置の光路図を図4に示しておく。このように分子が動き回れるからには、細胞膜は液体であるに違いない。

動き回れることが、何かの役に立つのであろうか。例えば、細胞外には、細胞の核に増殖せよというシグナルを伝えるためのタンパク質分子、増殖因子、などが多数ある。それらが細胞表面の受容体に結合すると、それらは、細胞膜の近傍において、増幅されたり、他のシグナルと合成されたり、さまざまな経路へと分岐されたり、ということがおこなわれる。これは、実際の生体高分子では、次のようにおこなわれる。まず、その分子の構造が変化して、その分子が次の（下流の）分子に結合してはたらきかけることができる状態（これを活性化状態という）になり、次に、下流分子を見つけて、それにはたらきかける。ではこのとき、どのように下流分子を細胞内で見つけるのだろうか。

ここに、分子の動きがかかわってくるのである。例えば、受容体と Ras は細胞膜上で熱拡散運動のために動き回り、衝突することによって、結合がおこり、さらに受容体による Ras の活性化がおこる（詳しくは、この両者の途中にも、別の分子がいくつか関与し、それらが Ras の活性化を誘導する）。このとき、これらの分子が細胞膜上で動かないと、衝突がおこらず、受容体は Ras の活性化を誘起できない。さらに、Ras は上で述べた Raf と結合する。このとき、Raf は細胞質中の三次元液体中にあるのだが、熱拡散運動で二次元の膜表面にやってくる。そこで、活性化された Ras と衝突し結合することによって Raf は活性化される。このとき、三次元空間内での衝突より、二次元表面での衝突のほうがはるかに能率がよいこと、さらに、二次元空間（液体）内での衝突頻度と会合体のつくりやすさは、三次元の水中よりも桁違いに（おそらく100万倍というレベルで）効率がよいことに注目すべきである。このように熱拡散運動や各パーツの構造の熱ゆらぎに依存してはたらくところが、細胞内ナノシステムの第3の大きな特徴である。

3. 短寿命のナノ集合体がシグナル伝達の中心を担う

さらに最近、これらの分子を1分子追跡した結果、いっそう面白いことがわかってきた。Ras と Raf の結合を安定化する分子、SUR8、という分子が存在するのだが、この分子が多く分子を結合するための足場を提供し、そのため、Ras が活性化すると SUR8 と結合することによって、さまざまな分子が集まった大きな分子集合体を形成するらしい（図2）。しかも、この Ras シグナル複合体は、細胞膜直下に存在する膜骨格の網目に結合したり、網目の

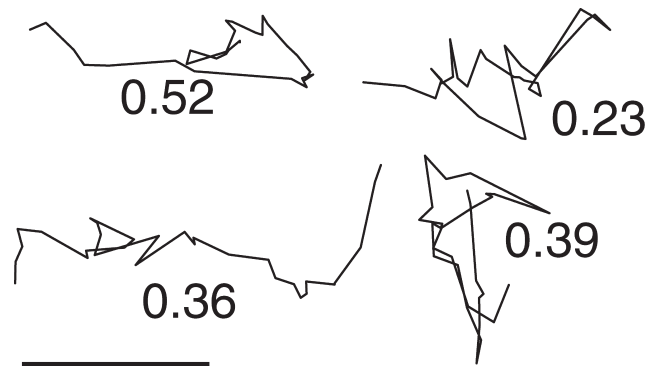


図3 細胞膜上の YFP-H-Ras 1 分子の典型的な軌跡。KB 細胞に YFP-H-Ras を発現させ、定常状態における細胞膜上の YFP-H-Ras 1 分子蛍光観察をおこなった。1 分子 YFP-H-Ras の軌跡とそれぞれの軌跡の拡散係数 ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)。バーは $1 \mu\text{m}$ 。

中に閉じ込められたりして、運動が止まる¹⁾。さらに驚いたことには、この運動停止は、0.5 秒程度しか続かない。すなわち、活性化された Ras は大きな集合体を形成して、さまざまな下流分子を活性化してシグナルを伝えるのだが、あっという間に分解されてしまうのである。細胞全体でみると、Ras の活性化は数分間続く。したがって、このようなシグナル複合体は、数分間安定化しておくほうが、細胞にとって都合がよいように思われる。にもかかわらず、シグナル伝達の素過程を1分子毎に追跡すると、それぞれのシグナル複合体は0.5秒程度の寿命しかないのである。

このような重要なシグナル経路は進化の過程でよくチューニングされ、かなりの程度、合目的にはたらいていると考えられる。細胞全体としては数分間続かせる必要があるシグナル系において、下流にシグナルを伝える重要なシグナル複合体の寿命が0.5秒しかないというのには、どういう意義があるのだろうか。私たちは、このシグナル経路は、基本的に（デフォルトが）オフであり、熱ゆらぎという常にはたらき故障する心配がない機構によって、複合体がすぐに分解するようにしておくことが重要なのではないかと考えている。こうすることによって、間違っただけ信号が出つづけるという可能性を大きく減らすことが可能になる。すなわち、細胞に増殖信号が出つづけ、細胞ががん化する可能性を下げている。受容体からの入力なくなると、特にオフのシグナルを出さなくても、下流へのシグナルはすぐに止まってしまう。さらに、シグナルの制御の仕方も簡単になる。個々のシグナルが、それぞれ1分間も続くと、それらを全部重ね合わせて、数分間、適度な活性化レベルを保とうというのは難しい積分制御を必要とする。しかし、個々のシグナル伝達事象がパルス的におこるのであれば、単位時間あたりのパルス数を制御すれば足り

る。すなわち、細胞内のシグナル伝達の多くは、強度変調 (AM) ではなく、周波数変調 (FM) によって担われている可能性がみえてきた。

4. 拡散に依存する伝達系とパイプラインとの違い

以上のように、細胞中のナノシステムは、熱拡散運動による分子の衝突と、短寿命の分子複合体によって担われていることが多いことがわかってきた。ここで、第2章で述べた、生物ナノシステムと人工機械との違いに戻りたい。すなわち、マシンやデバイスという歯車や固体電子回路のように、形が決まっています、きっちりと動くモノが連想されるのに対し、細胞内の水中ではたらく多くのナノシステムの特徴のひとつは、はたらく仕組みが本質的に熱拡散に依存しているということである。しかし、拡散に依存するシステムというのは、われわれ人類が発展させてきた工学からみると、いかに頼りなく、いい加減そうで、しかも、限りなく遅いように見える。このようなシステムが、実質的に役に立ち、はたらくのだろうか。例えば、拡散に依存する過程という化学反応が思い浮かぶ。しかし、化学工場のことを考えてみると、システムとしては、拡散に依存して反応が起こるといふ部分はほんの一部である。工場というシステムとしてはたらかせるためには、反応槽そのものというよりも、反応させる分子をそこまでもっていったり、生成したものを分離したものを取り出す仕組みが重要で、具体的には、パイプラインを用いて順序よく混合したり、生成物を取り出したりする仕組みがシステムのエッセンスなのである。

では、パイプラインがあまり存在しない細胞で (モノや情報の一部は、パイプラインのような仕組みで運ばれることがわかっている)、情報を伝えたり、加工して演算したり、というようなことが、細胞として意味ある時間内 (おそらく、ミリ秒から数十分の範囲) で、できるのだろうか。

答えを探すために、拡散過程またはパイプラインを利用してつくりうる細胞のナノシステムの特徴を表1にまとめた。当座の結論としては、下流のシグナル分子にさまざまな種類の分子があつて、それらが細胞内のさまざまな場所にあつて、それぞれ違う時間スケールで応答し、さらに、それらの応答が時空間的に重ね合わされて、細胞がさまざまな応答を示す、というような系だと、拡散過程で系をつくるというのは、なかなか魅力的なやり方ではないか、というのが筆者らの意見である。概念的には、細胞のシグナル系は、個々の分子が演算素子として並列してはたらく超並列コンピューターのようなものだという考え方だ。各演

表1 拡散過程とパイプライン過程の比較。

拡散過程	パイプライン過程
ブラウン運動/エネルギー不要	エネルギーの供給が必要
確率過程論的にはたらく	決定論的にはたらく
並列の多経路	割と単純な数経路
複雑なネットワーク	単純なネットワーク
単純な過程は遅い	単純な過程は速い
複雑な過程にも対応できる	画一的大量生産
きわめて多数の作用点	作用点は数か所程度
(ほとんど連続的に作用点がある)	
濃度自体も情報	濃度は出力の強度にかかわる
(経路の選択などに使われる)	(濃度の経路の切り替えは困難)
柔軟性のあるシステム	システム変更は難しい
(細胞の前状態によって異なる応答が可能)	
ローバスト (robust)	1つのラインの故障で全体が停止

算素子は、熱運動に依存しておこる分子どうしの会合や分散によってはたらく確率過程論的素子である。このような考えは、十分に検討に値すると考えている。

5. 1分子毎、ナノメートル精度、ミリ秒分解能での追跡が研究の鍵

ところで、シグナル分子が短寿命のナノ集合体をつくるというような観察は、多数分子の平均をみるような通常のイメージング法ではまったく不可能であることに注意していただきたい。もちろん、通常の生化学的方法や細胞生物学的方法のようにアボガドロ数に匹敵する分子を一度に扱う方法では、まったく検知できない。多数分子をみると、0.5秒間だけ数分子が会合するとか、その間だけ拡散運動が停止して、膜骨格と相互作用しているらしいとか、そのようなことは全部平均操作で霧の中に埋もれてしまう。すなわち、細胞のなかでの分子のはたらく方を調べるという研究では、「複数分子の平均操作=雲散霧消」。これは、筆者らの研究室の標語のひとつである。したがって、観察は1分子ずつ、それを、何百回、何千回と繰り返して、分子の挙動の典型的パターンを抽出し、それぞれのパターンへの分布を求めなくてはいけないということだ。

分子の挙動を追跡しようとする、分子レベルの空間精度で追跡できなくてはいけない。数ナノメートル程度の精度はほしい。時間分解能はどれくらい必要だろうか。上で述べたように、分子の相互作用時間、膜骨格との相互作用時間は、0.1秒くらいのものがみえている。それを、間違いなく検出するには、1ミリ秒程度の時間分解能はほしい。空間精度と時間分解能の両方をこのレベルで達成するのは、現在の技術では容易ではない²⁾。現在、6.5ミリ秒

分解能での1蛍光分子観察では、その分子の位置決め精度は45 nm程度、違う蛍光分子で標識した2分子が同じ位置にあるかどうかを決める空間精度は96 nm程度である。したがって、1分子ナノバイオテクノロジーの進展のためには、さらに方法が改善される必要がある。

第1に、新しいタイプの蛍光プローブが必要であろう。蛍光分子は、退色するまでに励起できる回数が限られており、1個の分子についていうと、1万~10万回のあいだ、生きて細胞を用いると、酸素を抜くことは避けたいので、千~1万回のあいだであろう。特に、緑色蛍光タンパク質のようなプローブは、生細胞を用いた観察を容易にするので便利であるが、退色しやすい欠点がある。さらにブリンキング（瞬き現象）が激しいので、1分子を連続して追える時間がきわめて限られる。退色しにくい有機分子を細胞内の特定のターゲットに結合させる方法（SNAP-tagTM, Covalys社^{3,4}）、HaloTagTM, Promega社）、退色もブリンキングもしない数ナノメートルの大きさの蛍光性シリコンナノ粒子を使った方法^{5,6}）などの開発が進んでいる。

第2に、レーザーのビーム強度が十分に得られない波長帯がある。例えば、He-Neレーザーの594 nmでは、あと5倍くらい強いビームがほしい。また、気体レーザーや色素レーザーよりも固体レーザーのほうが小さい、安定、寿命が長い、扱いやすい、静かで疲れない、などの利点があるが、488 nmとそれよりも短波長側では、十分な強度が得られないものが多い。

第3に、細胞自体がもつ蛍光分子を、観察中の15分だけでも一時的に減らすような方法がほしい。

第4に、顕微鏡の検出側の問題だが、2色、3色の同時観察が簡単にでき（+色の組み合わせの変更も簡単にでき）、しかも1色観察のときに比べて、シグナル強度の減少がスペクトルから予想されるよりもはるかに少ないということがない、というものがほしい。

第5に、細胞の刺激のために細胞外液を交換したり洗ったりすることが多いので、その間も、フォーカスが同じ場所に合いつづけるような、自動焦点装置が望ましい。

第6に、光検出系の感度がもう数倍ほしい。

第7に、光検出系の一番の問題である、増倍ゆらぎ（時間的空間的の両方で）を、現在の3分の1程度にしたい。細胞の自家蛍光と観察したいもののシグナル強度の違いはせいぜい3倍程度であることが多く、そこに増倍ゆらぎが加わると、みたい蛍光シグナルと、細胞中の蛍光分子によるシグナルの区別がつかなくなる。実際、いまでは、顕微鏡やカメラの単純なバックグラウンドシグナルの問題はメーカーの努力のかけがえがなくて大きく改善されており、一番

の問題は、増倍ゆらぎになっていると思う（これは、生細胞を用いた1分子観察の特徴）。

第8に、2分子が結合したり解離したりする観察において、装置のS/N比まで含めて統計的に正しく評価する方法の開発が必要である。最近、筆者らは、1分子レベルでの多種分子の同時追跡において、2種類の分子の相互作用、共局在、結合を1分子レベルで検出するための簡単で有効な方法を開発した²。すなわち、各ビデオフレームの画像全体に対して空間補正を施すことによって、高い精度（~15 nm）での2色画像の重ね合わせを実現し、分子の存在位置の決定精度を含めた共局在の実験的定義を確立した。この方法を細胞膜上の分子に適用すると、2種類の蛍光色素で標識された分子の共局在を64 nm（68%の検出能）、あるいは100 nm（90%検出能）以内の距離で、統計的に正しいやり方で検出することができる。これにより、1分子共局在の研究が大きく進むことが期待できる。

6. ま と め

細胞は数ナノメートルくらいの大きさの分子からなり、それらの相互作用によってはたらいしている。その相互作用の多くは、熱拡散運動に依存しておこる。概念的には、細胞は、個々の分子が演算素子として並列してはたらく非常に大きな並列コンピューターのようなものだ。各演算素子は、熱運動に依存しておこる分子どうしの会合や分散によってはたらくので、確率過程論的にはたらく素子といてよい。このように、細胞は、生物が進化の過程で作り上げてきたナノテクノロジーの塊のようなものだ。ナノテク装置がはたらいしているのをみるためには、われわれもナノテクを駆使した観察法を開発しなくてはいけない。また、熱拡散運動によって確率過程論的に誘起される分子どうしの会合や分散は同期しないし、しかも多くの重要なシグナル伝達過程は、短寿命の分子複合体によって担われている。このような現象の検出と観察のためには、1分子ずつを観察する方法を考える必要がある。すなわち、1分子ナノバイオテクノロジーの方法の開発をさらに進めることが重要である。生きて細胞、はたらいしているナノシステムを直接にみる必要があるので、「光学」に期待するところが大きい。

文 献

- 1) H. Murakoshi, R. Iino, T. Kobayashi, T. Fujiwara, C. Ohshima, A. Yoshimura and A. Kusumi: "Single-molecule imaging analysis of Ras activation in living cells," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **101** (2004) 7317-7322.
- 2) I. Koyama-Honda, K. Ritchie, T. Fujiwara, R. Iino, H.

- Murakoshi, R. S. Kasai and A. Kusumi: "Fluorescence imaging for monitoring the colocalization of two single molecules in living cells," *Biophys. J.*, **88** (2005) 2126-2136.
- 3) A. Keppler, S. Gendreizig, T. Gronemeyer, H. Pick, H. Vogel and K. Johnsson: "A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo," *Nat. Biotechnol.*, **21** (2003) 86-89.
 - 4) A. Keppler, H. Pick, C. Arrivoli, H. Vogel and K. Johnsson: "Labeling of fusion proteins with synthetic fluorophores in live cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101** (2004) 9955-9959.
 - 5) Ritchie Ken, 後藤美紀, 西村博仁, 楠見明弘: "Silicon nanoparticle: Application to imaging the motion of single molecules in live cell membranes," 第42回日本生物物理学会年会 (国立京都国際会館, 京都, 2004).
 - 6) 西村博仁, Ritchie Ken, 後藤美紀, 楠見明弘: "新規シリコンナノ粒子の開発による1分子追跡法の大幅な改善", 第43回日本生物物理学会年会 (札幌コンベンションセンター, 札幌, 2005).

(2005年12月13日受理)