



細胞の真の動きを見きわめる

徳永 万喜洋 研究室～生命情報専攻



徳永 万喜洋 教授

生物物理学という学問がある。これは、物理学的な観点や手法を用いて、生命体を構成する細胞などの構造や仕組みを研究する学問である。徳永研究室では、生物物理学の1分野である1分子イメージングの技術を開発するとともに、実際の生物学への応用を試みている。1分子イメージングにより細胞内のタンパク質分子の動きを直接見ることができるようになり、多くの新しい事実が明らかにされている。本稿では、1分子イメージングの歴史的な背景と共に、徳永研究室の最新の研究を紹介する。



1分子イメージングの夜明け

生物の体は多種多様な動きをする細胞から構成されている。それぞれの細胞は膨大な量のタンパク質分子からなり、よりミクロなレベルでとらえると、細胞の働きはこれらの分子同士の化学反応が組み合わさった結果であるといえる。例えば、細胞が外部から刺激を受けるとき、その刺激の伝達はタンパク質分子が担う。刺激が伝達されると、細胞は活動を始めて増殖したり、それまでの活動を停止したりする。この活動の開始を活性化、停止を不活性化と呼ぶ。これらの働きは、細胞内における複数のタンパク質分子間の結合や解離によって制御されている。

徳永研究室では、細胞の1分子イメージングを研究している。1分子イメージングとは、細胞を構成するタンパク質分子の挙動を分子単位で観察することである。そうすることで、分子の動きが、細胞全体としての働きと、どのように結びつかかを解き明かすことができる。

また、徳永研究室では、1分子イメージングによって得られたタンパク質の挙動をいくつかの要素に分けて解析、定量化しようとしている。定量化することで、細胞全体をシステムとして解明し、

コンピュータ上で細胞の動きを再現できるようになり、顕微鏡による観察だけではわからなかったことが、計算によって求められるようになるためである。

1分子イメージングの研究分野が開拓される以前は、細胞に刺激を与え、それに対する細胞全体の反応を計測することで、細胞内における生体分子の動きを論じていた。この方法では、細胞を構成する多種のタンパク質同士の複雑な反応を細かく捉えることはできないため、細胞内における生体分子の動きを論じるにあたり、すべての同種の分子は同様にふるまう、という考えを前提としていたことになる。それに対し、細胞全体としては毎回同じようにふるまっても、それを構成する一つ一つの分子はそれぞれで毎回異なった動きをしている、という考えも存在した。しかし、同種の生体分子一つ一つの動きは、当時の研究で解析できるスケールの限界を超えていたため、どちらの考えが正しいのかを断定することはできなかった。1分子イメージングの発展による成果の一つとして、この論争を解決する手段となったことが挙げられる。



一つの分子に光を当てる

徳永先生は1992年からの5年間、当時は確立されていなかった1分子イメージングの基礎技術を開発するプロジェクトに参加していた。1分子イメージングの発展には、顕微鏡の技術の発達が必要である。そのため、徳永先生は当時から1分子イメージングに用いる顕微鏡の技術開発にも携わっている。

顕微鏡には、大きく分けて電子顕微鏡と光学顕微鏡がある。電子顕微鏡は、より高倍率での観察が可能であるが、試料を真空中に置く必要があり、生きた細胞を試料とする1分子イメージングには適さない。それに対し、光学顕微鏡では試料を真空中に置く必要がないため、細胞を殺すことなく観察できる。このため、1分子イメージングには光学顕微鏡が用いられる。

徳永先生らは、光学顕微鏡を用いる上で必要な基礎技術を、いくつか開発してきた。現在、1分子イメージングの最先端においても欠かせない技術となっている照明方法と、さらに特定の分子を選択的に観察するために重要な蛍光色素による標識について紹介する。

照明方法について、当初、課題として挙げられていたのは、細胞内の観察対象とする部分のみを明るく照らし、なおかつ生きた細胞を傷めずに長時間照明できる適切な方法を探すことであった。照明が明るすぎると、細胞内の分子が光を吸収して不安定になり、細胞が死滅しやすくなる。また、試料が背景に同化してしまい、細胞内の1分子の

みを明確にとらえることもできない。注目とする分子のみを照らすという課題を解決するために、徳永先生らが用いたのは全反射照明である。

全反射照明とは、対物レンズの縁にレーザー光を入射させ、ガラスと試料の境界面で全反射させる照明方法である(図1中)。この方法では反射面の反対側、つまり試料のある側に約50~200 nmの範囲でエバネッセント光という光が局所的に発生するため、これを用いて照明することができる。

ここで、エバネッセント光について説明する。光は電場と磁場が交互に振動していく波であり、この二つの場を総称して電磁場という。電磁場は途中で障害物が存在していても、とぎれることなく連続しているため、全反射しても、反射面を境に突然0にはならない。全反射が起こるとき、反射面の反対側には光、すなわち電磁波が存在し、この微弱にしみ出している光がエバネッセント光である。

エバネッセント光は、反射面からの距離に対して急激に減衰するという性質を持つ。このため、試料のガラス表面との接面にある分子のみを鮮明に照明しつつ、試料の背後の分子は暗くして観察することができる。したがって、背後の分子が観察の邪魔にならないように、試料を薄片にしなくてもよいのである。

さらに、徳永研究室では2008年に薄層斜光照明法(Highly Inclined and Laminated Optical

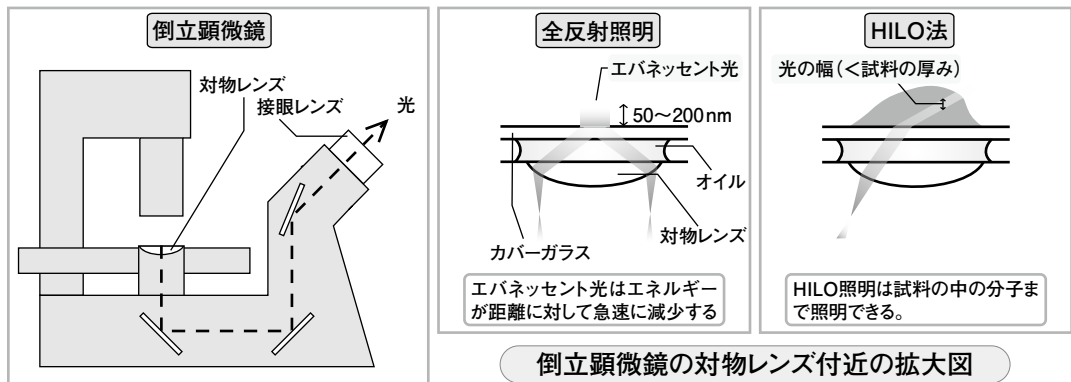


図1 顕微鏡の照明方法

sheet microscopy; HILO microscopy) という照明方法を開発した。これは、全反射照明とは違い、試料の厚みよりも細いレーザー照明を、試料に直接照射する照明方法で、細胞表面のみならず細胞内の分子も観察することができる (図1右)。

全反射照明では、対物レンズから一定の距離の範囲内に存在する分子しか照明できない。しかし、HILO 照明を用いると、対物レンズからの距離に関わらず細胞内の分子を照明できるようになる。つまり、HILO 照明を用いると、試料とする細胞内部の分子を立体的かつ鮮明に観察することができるようになる。

全反射照明と HILO 照明はどちらも、一般的な光学顕微鏡を用いながら、光源に工夫を加えるだけで使用することができる。専用の顕微鏡を用いる必要がなく、一つの顕微鏡で状況によって適切な方法を自由に切り替えられることも、これらの照明方法が優れている点だ。

1 分子イメージングを実現するためのもう一つの重要な技術が、蛍光色素による分子の標識だ。蛍光とは、色素分子が光のエネルギーを吸収して励起状態になり、再び基底状態に戻るときに光を発する現象のことである。観察対象とする分子に色素分子を付着させることで、分子の動きを観察することが可能になる。



生でとらえた分子の動態

1 分子イメージング研究における大きな成果の一つは、前述の通り、細胞内で個々の分子が一樣にふるまうのか、それとも確率的に動くのかという問題が解決されたことである。その具体的な事例の一つとして、筋肉を構成するタンパク質についての議論が挙げられる。

筋肉の基本単位は筋原繊維というものであり、そのうちの筋節という部分が、筋肉の収縮に直接関わっている。筋節は、アクチンとミオシンという二種類のタンパク質からなり、それぞれ糸状に連なって、アクチンフィラメントとミオシンフィラメントという部分を構成している。筋肉が収縮するとき、ミオシンフィラメントにエネルギーが与えられることでミオシンフィラメントの端の部分は首振り運動を起こし、アクチンフィラメントが引きずられるように中央方向へ滑り込む(図2)。

現在では、分子生物学や、ゲノムプロジェクトの進展により、生成されるタンパク質を決定する DNA 配列を調整することができる。この技術を利用して、緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein; GFP) などの蛍光タンパク質の遺伝子を、観察対象とするタンパク質の遺伝子につなげておく。こうすることで、対象とするタンパク質はその遺伝情報を基に生成された際、蛍光タンパク質が付着した状態となり、照明すると発光するため、その挙動を容易に視認できる。

従来は、GFP しか蛍光タンパク質が発見されていなかったため、一度に挙動を確かめられるのは、多くの種類が存在する分子のうちの一種類のみだった。現在では、赤色蛍光タンパク質 (Red Fluorescent Protein; RFP) 等がさらに発見されているため、それぞれ異なる色に標識した 2 種類以上の分子間の相互作用を、同時に観察することも可能となっている。

全反射照明と蛍光色素を用いることで、光学顕微鏡を用いた 1 分子イメージングの基礎技術が確立され、その後、広く 1 分子イメージングが研究されるようになった。徳永先生は、HILO 法などの最新の技術も積極的に用いて、細胞内におけるタンパク質同士のふるまいを一つ一つ解明しようとしている。

この結果、筋節は短くなり、収縮が起こる。

筋肉の収縮におけるタンパク質の動きを 1 分子レベルで考えたとき、かつて二つの学説が対立していた。一方は、ミオシンタンパク質は一樣に、入力されたエネルギーに対して一定の力を発生さ

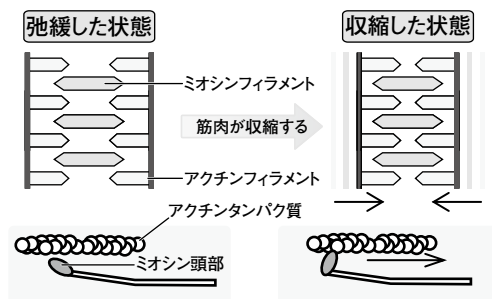


図2 筋節の収縮の仕組み

せる構造変化が起こり、収縮に結びつくという学説であった。他方は、ミオシタンパク質にエネルギーが入力されても、その動きは個々で確率的であり、それらの動きの総和が、収縮として捉えられるという学説であった。この論争は、1分子イメージング技術の確立によって、分子一つ一つを直接観察し、アクチンタンパク質、ミオシタンパク質間の相互作用で生まれる力を計測することができるようになって初めて解決された。

徳永先生らは、先端が分子一つのサイズ程度の先鋭なガラス管を用いてミオシタンパク質1分子を捕獲操作し、対物レンズ表面のアクチンタンパク質との相互作用を1分子イメージングにより観察、計測した。その結果、エネルギーが与えられると、ミオシタンパク質は、約5.5 nm ずつのステップで進んでは時々戻る、という運動を繰り返してアクチンタンパク質上を動いていることがわかった。しかも、ミオシタンパク質の運動は一様ではなかったため、個々の分子は確率的に動いているということが明らかになった。

1分子イメージングによるミオシタンパク質の運動に関する研究をきっかけに、従来のマクロな視点のみに頼った研究や、電子顕微鏡による静的な研究のみからはわからなかった多くのことがわかってきた。その一つに、刺激を与えたときの細胞内における分子の動きに関する研究がある。

従来のマクロな視点では、細胞に外部から刺激が与えられた場合、細胞膜を通して情報を担う分子が入り込み、最終的に細胞核に結合する、とい

う大まかな動きしか分析できなかった。この一連の反応を、1分子イメージングによるマイクロ視点で時間を追って観察すると、外部から情報を伝えるために細胞内に入り込んだ分子が高速で運動して、細胞内の他の分子と、結合と解離を繰り返す様子が観察された。この分子は、細胞内の他の分子と手当たり次第に結合し、もし結合した相手の分子が本来目的とするものでなかったら短時間で離れ、また他の分子と結合する、という動作を繰り返していた。そして、目的とする分子と偶然結合したときだけ離れなくなり、この瞬間に情報の伝達が正常に行われた。さらに、無数の分子が同様の運動を行った末、一定以上の数の分子が正常に結合を完了させたときにその細胞全体としての活性化が起こっていた。

1分子イメージングによる観察結果から、細胞の活性化に関して生体が合理的なシステムを持っていることが推測できる。もし、ある特定の分子同士が結合を完了させたかどうかで細胞の活性化の制御をしていたとすると、その分子が正しくない動きをした場合は細胞全体の動きがおかしくなってしまう。結合を完了させた分子の数により活性化のスイッチが切り替わるシステムを採っていると、正しくない動きをしている分子がいくつか存在しても、細胞全体の動きに影響を与えることは少なくなる。また、こうすることで多種類の細胞の活性化、不活性化を少ない種類の分子で制御することができ、このシステムは生体にとって都合の良いものだと考えられるのである。



免疫システムの謎を解き明かす

1分子イメージング研究で、徳永先生が現在、特に力を入れているのが免疫システムだ。生体の多くの器官は、多数の細胞で構成されているため、1分子の挙動と器官の働きが直接結びつかないことが多い。しかし、免疫システムは、ごく少ない個数の細胞で動く箇所があり、1分子イメージングの研究をその分析に結びつけやすい。

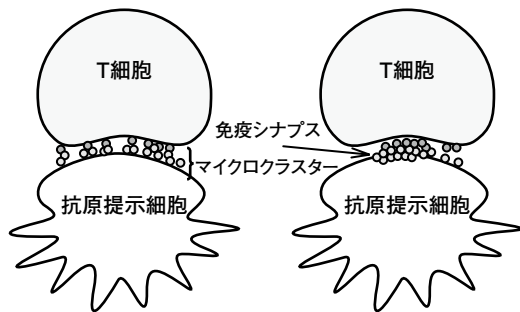
免疫には、主にB細胞とT細胞という2種類のリンパ球が関与している。体内にウイルスなどの異物が侵入すると、抗原提示細胞という細胞が異物を食べる。これらの異物もタンパク質の複合体であり、抗原提示細胞は、異物をアミノ酸8個

ずつ程度にまで分解し、膜表面に断片化された抗原を発現させる。すると、T細胞が抗原提示細胞に接触し、表面に提示された抗原をT細胞の表面の抗原受容体が認識する。これによって、T細胞への情報の伝達が行われる。情報を受け取ったT細胞は増殖、活性化し、実際に抗体を作るB細胞へ刺激を送り、指令を出す。ここまでの一連の流れを免疫応答という。

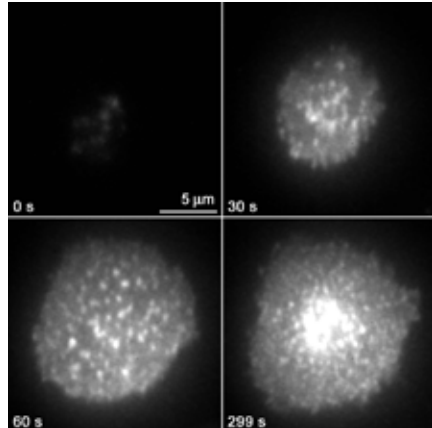
T細胞表面にある抗原受容体と、抗原提示細胞表面にある抗原が結びついた構造は、マイクロクラスターと呼ばれる。免疫応答の過程で、マイクロクラスターは時間が経つにしたがって接触面の

免疫シナプスの形成前

免疫シナプスの形成後



抗原提示細胞が断片化された抗原を表面に発現させると、T細胞が接触する。抗原とT細胞の受容体が結びつき、接触面全体にマイクログラスタが形成され、中心部に集まっていく。



1分子顕微鏡で観察した、T細胞と抗原提示細胞の接触面でマイクログラスタが形成される様子。写真の白い部分がマイクログラスタで、時間が経つことに多く形成され、中心に移動していることが分かる。

図3 免疫シナプスの形成

中心部に移動していき、免疫シナプスという部分を形成する（図3）。

1分子イメージングの基礎技術が確立されるまでは、T細胞と抗原提示細胞との情報伝達が実際に行われる部分は、免疫シナプスの部分のみであると考えられていた。つまり、マイクログラスタが一箇所に集まってから情報伝達が行われると考えられていたのである。徳永先生らは、この説の正否を確かめるため、抗原受容体や抗原提示細胞表面の抗原を蛍光色素により標識して、免疫応答の過程について1分子イメージングを行った。

すると、T細胞と抗原提示細胞が接触した直後から、接触面全体では50～200個程度のマイクログラスタができ、受容体の活性化が起こっている様子が観察された。マイクログラスタは、先に述べた通り、接触面の中心に移動して、免疫シナプスを形成したが、移動が完了したときには、すでにマイクログラスタにおける抗原受容体の活性化は終了していた。さらに、周りでは新たなマイクログラスタが続々と形成され、中心部へと移動していく様子が観察された。この結果から、これまで情報伝達の場所だと思われていた免疫シナプスは、実際には情報伝達の終わったマイクログラスタの集積される場所であるということが明らかになったのである。

クラスタの集積される場所であるということが明らかになったのである。

1分子イメージングの技術が確立され、発展したことにより、これまでに正しいとされていたことや、わからなかったことが、よりミクロなスケールで再度研究されている。徳永研究室においても、細胞核内のDNAが読み取られるところを観察するなど、研究の対象は多岐に渡り、多くの事実が明らかになってきている。

また、1分子イメージングは、研究の幅広い応用が期待されている。例えば、1分子イメージングで時間を追ってタンパク質の相互作用を観察することで、細胞内の分子の個数や濃度、反応にかかる時間を測定できる。さらに、ミオシンタンパク質の研究で用いた、1分子を捕獲操作する技術を組み合わせることによって、相互作用の強さなども定量化できる。徳永先生は、将来的に、1分子イメージングの技術を用いて得られる数値データをコンピュータ上で総合し、細胞全体をシステムとして再現することを目指している。

1分子イメージングを駆使した徳永研究室の研究は、これからも多くの新事実を発見し、生物学の発展に寄与していくだろう。

取材に伺ったときに見せていただいた、顕微鏡で捉えた分子の映像は非常に美しく、興味深いものでした。徳永先生は東工大と理化学研究所とを

兼務されています。お忙しい中、取材に御協力下さったことを、厚く御礼申し上げます。

(坂本 裕紀)