

## 一粒子追跡法と光ピンセット法による膜タンパク質の動態解析

富重道雄・楠見明弘

(東京大学大学院・総合文化研究科・生命環境科学系)

### I. はじめに

生きている細胞を用いて、細胞内や細胞膜上で機能しているタンパク質の分布や動きを見ることができれば、細胞生物学のたいていの問題は解決してしまうに違いない。夢のような話だが、都合のよい場合には、タンパク質一分子を標識して、その動きを生きている細胞中で観察するという方法が開発された。一粒子追跡法 (Single Particle Tracking: SPT) とは、細胞膜上の膜タンパク質や脂質をプローブでラベルし、プローブの運動をビデオマイクروسコピーを用いて追跡する方法である (図1)。プローブとしては、金コロイド粒子、ラテックスビーズ、蛍光色素の集団が用いられている。一粒子追跡法を用いると、個々の膜タンパク質や脂質について 1 nm レベルの空間精度と 33 ミリ秒の時間

分解能 (あるいは 5 nm の空間精度で 0.2 ミリ秒の時間分解能) で運動を追跡することができる。プローブを細胞内に顕微注入することで、細胞内のタンパク質の動きを追うことも可能である。

一粒子追跡法はおもに膜タンパク質や膜脂質の運動観察に用いられてきた。細胞膜の構造としては、Singer と Nicolson によって提唱された流動モザイクモデルが基本になる。しかし、一粒子追跡法によって得られた知見によって、膜の構造はもっと複雑であり、流動モザイクモデルを大きく見直した新しいモデルを考える必要があるということがわかってきた [1,2]。

SPT を用いると、分子の運動を 1 ~ 数分子のレベルで調べることができる。そのため、同じ種類の膜タンパク質が異なった制御を受けていたり、同一タンパク質が時間によって異なる

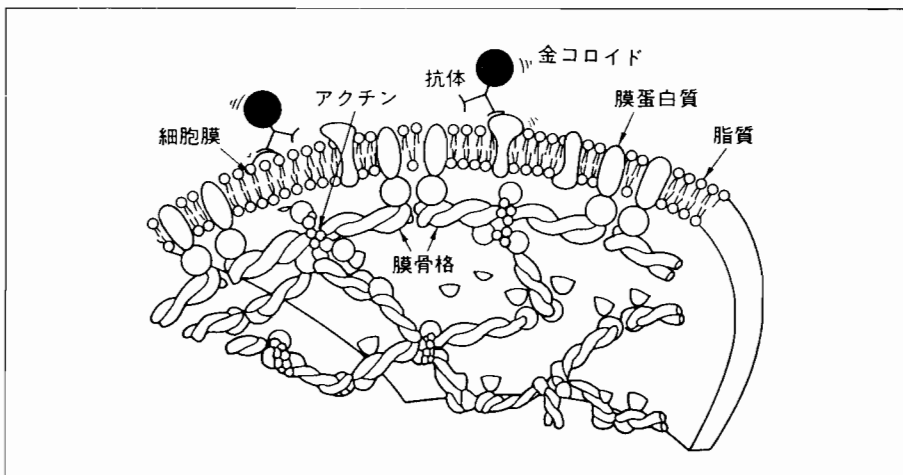


図1. 一粒子追跡法の概略。直径 20~40 nm の金コロイド粒子を、リガンドや抗体を介して標的タンパク質に結合させる。金コロイド粒子は光散乱能が高いので、ビデオエンハンス顕微鏡法により可視化できる。こうして、生きている細胞で、金コロイドの結合した特定のタンパク質分子の運動を追跡することができる。

制御を受けるといったようすを明らかにすることができる。また、空間分解能はナノメートルレベルであり、膜の微細な構造を反映した膜タンパク質の運動が観察できる。さらに、SPT法は光ピンセット法と組み合わせることが容易であり、それによって、ただ運動を観察するだけではなく、外部から摂動を与えてその影響を見るといったことも可能になった。本稿では、ビデオマイクロスコープの応用としての一粒子追跡法について概説し、その適用例として我々の研究室で行った膜タンパク質の運動観察例を挙げる。

## II. 一粒子追跡法の歴史と特徴

寺川氏の総説でも述べられているように、ビデオマイクロスコープ(ビデオエンハンス顕微鏡法)は生体試料の形態や構造を高解像度・高コントラストで観察することを可能にした。しかし、それでもなおタンパク質1分子をじかに見るというわけにはいかない。そこで、特定のタンパク質の動態を追うために、光散乱能の高いものをマーカーとしてタンパク質分子をラベルし、その複合体を観察するという方法が考えられた。De Brabanderらは、光散乱能の高い金コロイド粒子でレセプタータンパクをラベルして、それをビデオエンハンス顕微鏡法で観察するという、ナノビド顕微鏡法(Nanometer Particle Video Microscopy: Nanovid Microscopy)という方法を開発した[3,4]。彼らはこの方法を用いて、トランスフェリンレセプターの運動などを調べた。

ビデオマイクロスコープで直径が40 nmの金コロイドを見た場合、金コロイドの大きさは光の回折限界以下であるので、エアリーディスク(546 nmの光源と開口数1.4の対物レンズを用いた場合、半径は238 nmとなる)の大きさに広がって見える。したがって、エアリーディスクの半径以上近づいた2点を区別することはできない。しかし、金コロイドの重心の位置はきわめて精度よく求めることができる。つまり、分解能は回折限界を超えることはできないが、

検出能はいくらでも上げることができるわけである。Sheetzらは粒子像の相関をとることによって、重心位置をピクセルサイズ以下の精度で求める方法を開発した。彼らは直径190 nmのビーズを用いて1~2 nmの精度で微小管上のキネシンの運動を追跡した[5]。Sheetzらはこの方法を一粒子追跡法(Single Particle Tracking: SPT)と命名した。

それ以降、SPTを用いてさまざまな膜タンパク質、膜脂質の運動が観察されてきたが、その過程で運動の軌跡の解釈に関する問題が提起された。Saxtonは、単純ブラウン運動と、何らかの制御を受けた運動とをきちんと区別するには統計的な解析が必要であることを指摘した[6]。そして、我々は、単純拡散からのずれを表す指標RD(Relative Deviation)を導入し、それを用いて運動のモード分けをする方法を提案し、カドヘリンやトランスフェリンレセプターの運動は4つのタイプの運動に分類されることを示した[7]。

このように一粒子追跡法を実際におこなうには、ビデオマイクロスコープによる金コロイドの可視化に加えて、座標決定法や統計的解析にもとづいた運動のモード分類法などが必要とされる。

## III. 一粒子追跡法のシステムと観察方法

### 1) 金コロイドラベルの作製

金コロイド溶液は、15~50 nmの範囲の大きさであれば、くえん酸三ナトリウムによる還元によってサイズのそろったコロイド溶液を簡単に作るすることができる[8]。なお、SPTで用いる金コロイドとして、どのサイズのものを選択すべきかについてであるが、金コロイドのサイズが小さくなるほど光散乱能は半径の6乗に比例して小さくなり、SPTで検出できる最小のサイズは5 nmである。しかし、細胞膜上ではバックグラウンドノイズが上昇して見えにくくなることや位置決定の誤差が大きくなることなどのため、通常は20~40 nm程度の大きさのものが使われる。

金コロイドと抗体・リガンドとの結合反応は、ただ混ぜるだけで起こる。その理由は、金コロイド表面は疎水的かつマイナスに荷電しているため、タンパク質と容易に疎水的結合や電気的相互作用を起こすからである。しかし、安定な金コロイドラベルを作るには、混ぜる際のイオン強度、タンパク質濃度、pHなどをうまく調節する必要がある。金コロイドへの抗体やリガンドの結合法については、くわしい総説がいくつか書かれている[9-11]ので、詳しいことはそちらを参考にさせていただきたい。ここではSPTに特殊な事柄についてのみ触れることにする。

上に挙げた文献に書かれている方法にしたがって金コロイドラベルを作ると、通常は多価のラベルができる。20~40 nmの金コロイド表面に吸着するタンパク質の数は金コロイド粒子あたり50~200個程度(IgGの場合)であるからだ。金コロイド表面に吸着したタンパク質の多くは変性したり、立体障害によって不活性化するので、実際に活性をもつ金コロイド表面の抗体・リガンドはこの数よりも少ないがそれでも一つの金コロイドの価数は高い。このようなラベルを細胞に加えると、ラベルによって複数の膜タンパク質がクロスリンクされて、クラスターを形成してしまう。そうすると、膜タンパク質の並進拡散は見かけ上遅くなってしまふ。さらに、クラスター化によってシグナル伝達系を活性化したり、膜骨格の構造変化を引き起こしたりする可能性もあるため、金-タンパク質複合体の結合価をできるだけ一価近くまで引き下げることが重要である。

金-タンパク質複合体の結合価を下げる方法として、Jacobsonらは、標的タンパク質に対する抗体と非特異的な抗体を適当な比率(30 nm金コロイドの場合には1:20ぐらい)で混ぜ、その混合液を金コロイドと混ぜて反応させることにより、金コロイド表面に吸着した標的タンパク質に対する抗体の量を減らし、結合価を下げた。彼らはこれを paucivalent ラベルと呼んでいる。再構成膜中の fluorescein-PE

(phosphatidylethanolamine)を paucivalent ラベルで標識した場合、通常のラベルを用いた場合に比べて拡散係数が3倍上昇した[12]。

## 2) 試料の準備

我々の研究室では、表皮細胞や繊維芽細胞といった培養細胞や赤血球などの細胞を観察に用いている。培養細胞はカバーグラスの上にまいて培養したものを観察に用いる。浮遊細胞の場合にはポリリシンなどでコートしたカバーグラスの上に固定する。細胞膜が固定されておらずゆらいていると、レセプターの位置検出の際のノイズの原因になるので、しっかりとカバーグラス上に固定しておく必要がある。

このようにして準備した細胞に、金コロイドラベルを反応させ、特定のタンパク質を金コロイドで標識し、その試料をビデオマイクロコピーで観察する。観察は生きた状態で行うため、観察時に試料が、バッファーもしくは培地に浸かっているなければならない。我々は、スライドグラス上にビニールテープを貼ってスペーサーとし、その上に細胞の張り付いたカバーグラスを裏返しにしてのせ、その隙間(0.2 mm程度)にバッファーや培地を加えたものをチャンバーとして用いている。四方はパラフィンで密封する。長時間観察を行う場合には、四方を閉じずに一部開けておき、観察の途中で培地を交換することもある。

## 3) ビデオエンハンス顕微鏡法

ビデオマイクロコピーの手法については、寺川氏の総説やさまざまな本に書かれているのでここでは詳しくは述べない。ここでは、一粒子追跡法の場合に特殊な事柄を中心に述べることにする[13,14]。

我々の用いている観察システムのプロックダイアグラムを図2に示す[7]。顕微鏡は正立型顕微鏡(Zeiss, Axioplan)で、対物レンズは油浸で開口数1.3の100倍のレンズ、コンデンサーは油浸で開口数1.4のものを用いている。顕微鏡は特別に製作したインキュベーター中に置かれており、温度コントローラーによって試料の温度を一定に保つ。光源は100 W水銀ランプ

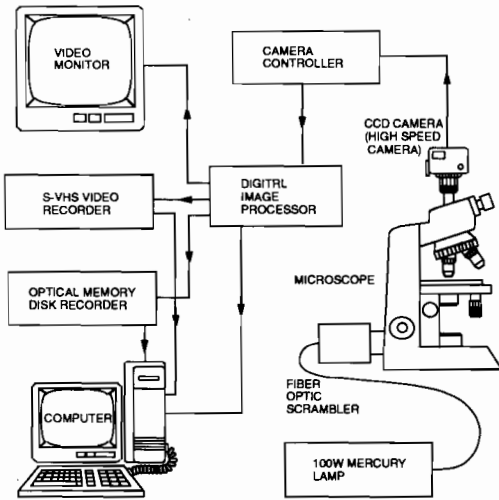


図2. 一粒子追跡法で用いる観察システムのブロックダイアグラム. 光源は100 W水銀灯の光を光ファイバースクランプラーと546 nmのフィルターに通したものを、CCDカメラ(もしくは高速カメラ)で試料像を得て、アナログエンハンス処理を行った後、必要に応じて画像処理装置でコントラストを増強し、追記型光磁気ディスクレコーダーもしくはビデオレコーダーに記録する. 33ミリ秒ごとに記録した各フレームの静止画像を、画像解析装置を用いてデジタル化し32回積算した後、パーソナルコンピュータにデータを送って、各フレームにおける金コロイド粒子の座標を計算する. 座標の計算には、Gellesらの方法を用いる[5].

を546 nmのグリーンフィルターに通したものをを用いている. なお、コンデンサーターレット、アナライザー、ポラライザーのセットを変更することによって、明視野観察と微分干渉観察との間を10秒程度で切り替えることができるようになっていく.

顕微鏡の画像はCCDカメラ(浜松ホトニクス, C2400-77), もしくは高速カメラ(PHOTRON, FASTCAM-ultima)で撮像し、カメラコントローラーでアナログコントラスト増強を行った後、この画像をデジタル画像処理装置(浜松ホトニクス, DVS-3000)に送り、バックグラウンド減算とデジタルコントラスト増強を行う. なお、ローリングアベレージは時間分解能を損なうので通常は行わない. このようにしてコントラスト増強した画像をモニターで観察し、また、光ディスク、もしくはビデオテープ

に録画する.

モニターで見ると、前述したように、金粒子は半径240 nm程度の円盤として見える. 2つの粒子が240 nm以上近づくとその2つを区別することはできないが、スポットの光強度が上昇するため、いくつの粒子が重なっているかを知ることができる. したがって、観察の際にはそのようなコントラストの高い粒子はのぞいて、一粒子のコントラストのものだけを追うようにすればよい. なお、観察時の倍率については、座標計算の際に粒子の像がある程度大きくないと位置決定の精度が悪くなるので、粒子像(直径約500 nm)がモニター上で10~20ピクセル程度になるように総合倍率を上げている.

我々は、顕微鏡の観察方法として、明視野法と微分干渉法の2種類を用いており、状況に応じて使い分けている(図3). それぞれに利点欠点があり、微分干渉法の利点は、細胞や細胞内の形態が見やすいことであるが、細胞内のオルガネラや顆粒と金とを判別しにくくなる欠点がある. 一方、明視野法では、細胞の形態が見にくくなるが、金はコントラストよく見えるので、細胞内のオルガネラや顆粒と金とを判別しやすくなる. そこで、金コロイドかどうかを確認したい場合には明視野に切り替え、細胞の構造を同時に見たい場合には微分干渉に切り替えるといった使い分けをおこなっている.

観察の時間分解能はCCDカメラを使った場合には、ビデオレート(33ミリ秒)であるが、高速カメラを使用することによって時間分解能を上げることができる. SPTの時間分解能を上げる方法としては、その他に、四分分割フォトダイオードを用いる方法がある[15].

#### 4) 座標計算

座標計算のアルゴリズムは、まず対照となる粒子の像をメモリに記憶しておき、各フレームの画像と対照像との相関をとってゆき、相関の一番強くなる場所を粒子の中心の座標とする、というものである. 光ディスクもしくはビデオテープに録画した画像を、画像処理装置(イメージングテクノロジー社, 151イメージングプロ

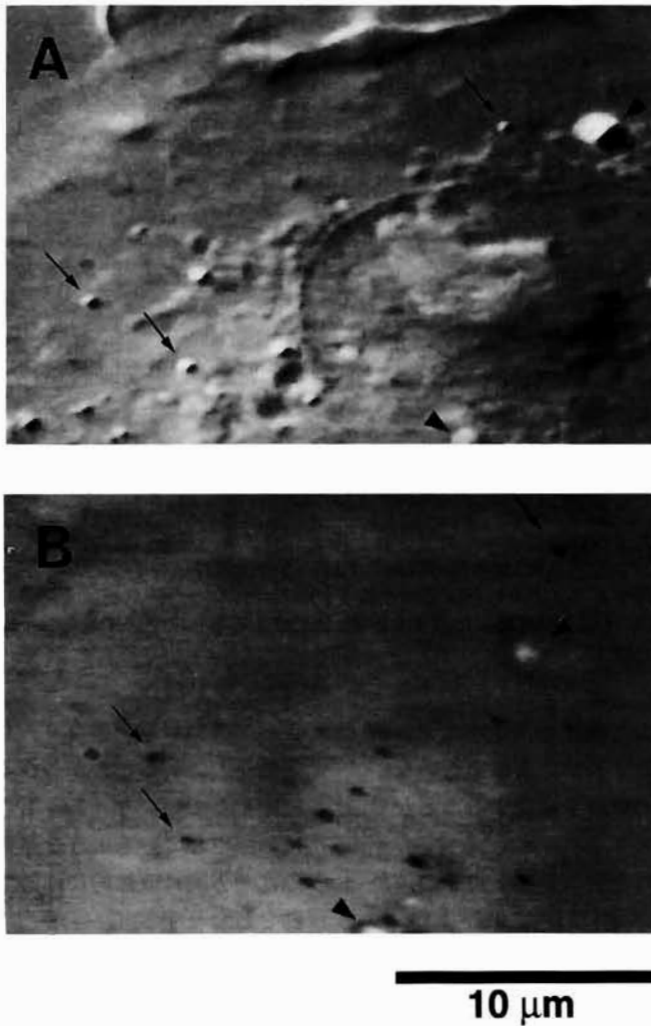


図3. IgG Fc 受容体(FcγR)に対する抗体の Fab 断片を吸着させた直径 40 nm の金コロイド粒子によって標識された CHO 細胞(FcγR の cDNA をトランスフェクトした細胞). A はノルスキー-微分干渉像, B は同視野での明視野像. 矢印は対応する金コロイド粒子, 矢じりは対応する細胞内顆粒を示す. 微分干渉像では核やオルガネラなどの細胞内の膜構造が確認できる. B の画像は A の画像の約30秒後に取られた画像であり, その間に金コロイド粒子は拡散して移動している.

セッサ)でデジタル化し, 電氣的ノイズを減らすために, 32回積算した後, データをコンピュータに送り, 各フレームにおける金コロイド粒子の重心座標を計算する. 計算は Gelles らの方法[5]にもとづいて我々の研究室で作成したプログラムを用いて行っている. 我々のシステムでの, 金コロイド粒子の座標決定の精度は, 画面水平方向に 1.8 nm, 垂直方向に 1.4 nm であ

り, Sheetz らのシステム(ただし彼らの場合は 190 nm のビーズ)とほぼ同じである.

なお, 画像をデジタル化しコンピュータ上で重心計算するという一連のプロセスを33ミリ秒以内に行うことができれば, 観察中の粒子の位置をリアルタイムで決定することが可能になる. 最近の PCI バスに対応した画像ボードで転送速度の速いものが市場に出てきたので,

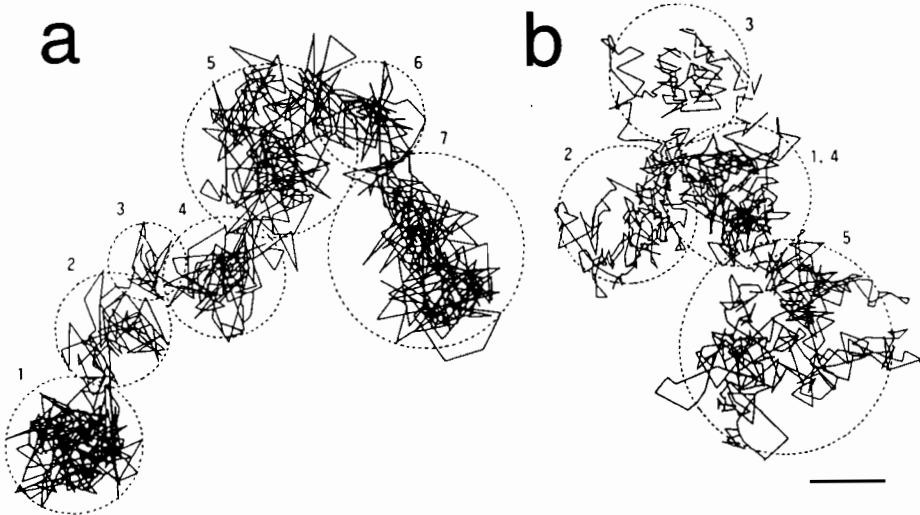


図4. 一粒子追跡法によって測定された膜タンパク質の運動の軌跡. NRK細胞上のトランスフェリン受容体の330秒間の運動の軌跡. トランスフェリン受容体がドメイン間を移動して隣接するドメインに移っていく様子が明らかになった. 点線は予想されるドメイン構造で, 数字は粒子が移動した順序を示す. Bでは1で示したドメインに粒子がまた戻ってきた. バーは500 nm.

我々は, リアルタイムで座標を決定するシステムも開発した. これによって, 実験を行いながら即座に粒子の運動の軌跡を確認することができる.

このようにして求めた金コロイド粒子の運動の軌跡の例を図4に示す[16]. これはNRK細胞上のトランスフェリン受容体の330秒間の運動である. この図では点が混みすぎるのを避けるために1/10の頻度で座標点を打ち, それを直線で結んで表示してある. この結果は, 細胞膜は, 膜タンパク質にとっては, 微小領域にコンパートメント化されていることを示唆するものである. このような結果は, 他の細胞でも,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, カドヘリン, アニオンチャネルバンド3などの膜タンパク質について見られた. 我々は, このような細胞膜のコンパートメント構造(膜骨格フェンスモデル)は, 細胞膜構造の一般的な特徴であると考えている.

#### IV. 運動のモード分類

一粒子追跡法を用いて膜タンパク質の運動を観察すると, 同じ種類のタンパク質でも粒子に

よって運動形態が異なり, さまざまなタイプの運動をしていることがわかる. あるものは自由拡散をしていたり, あるものはある領域の内部に制限されているような運動をしたり, あるものは一方向に直線的に輸送されているような運動をしたりする.

これまでのSPTによる膜タンパク質の運動観察の結果から, 膜タンパク質の運動にはいくつかの運動モードが存在することが知られている: 単純ブラウン運動(Simple, 図5B), 方向性をもった拡散運動(Directed, 図5C), ある領域内部に制限された拡散運動(Confined, 図5D), 領域間をつぎつぎとホップしていく運動(Intercompartmental Hop, 図4), 弾力的なひもにつながり止められた状態での拡散運動(Tethered), 全く動かないもの(Stationary, 図5A). これらの運動モードは平均二乗変位の時間に対するプロットが互いに異なるので, 統計的に見分けることができる(TetheredとConfinedの区別は困難なことがある). 図6に示すように, 理論的には, Simpleは直線(図6a), Directedは放物線(図6b), Confinedと

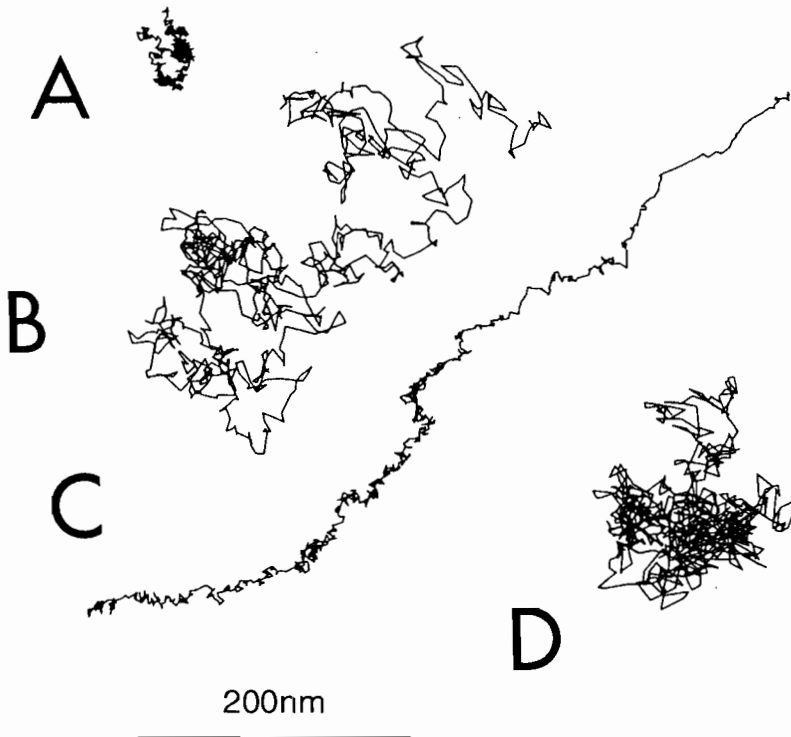


図5. カドヘリン分子のさまざまなタイプの運動. F細胞上のカドヘリン分子の30秒間の運動の軌跡. カドヘリン分子の運動はこの4つのタイプに分類された. 運動のモードはそれぞれ, Aは Stationary, Bは Simple, Cは Directed, Dは Confined.

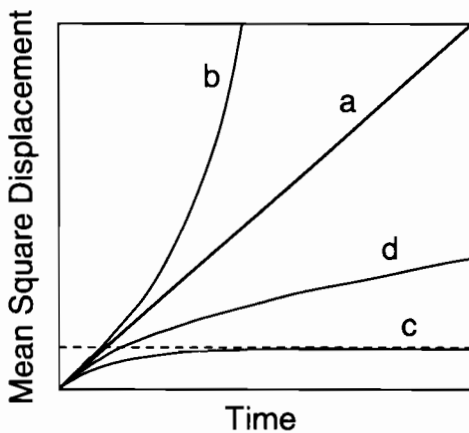


図6. 平均二乗変位の時間に対するプロット. 運動の形態によって, プロットが異なる. 単純ブラウン運動をしている場合(Simple)には, aのように直線になる. 方向性をもった拡散運動をしている場合(Directed)には, bのように放物線になる. ある領域内部に制限された運動をしている場合(Confined)には, cのように頭打ちの漸近線になる. さらに, 何らかの障害物存在下で広い範囲を拡散していく場合(Anomalous, または Intercompartmental Hop)にはdのようにaとcの中間のプロットになる.

Tethered は頭打ちの曲線(図6 c), Intercompartmental Hop は速い立ち上がりの後に緩やかな直線のつづく曲線(図6 d)になる. さらに, 実験で得られた平均二乗変位のプロットを, これらの理論式でフィッティングすることによって, 拡散係数, および, Directed の場合にはドリフト速度, Confined の場合には制限範囲, Tethered の場合にはバネ定数, Intercompartmental Hop の場合には制限範囲とホップの頻度が求められる[7,17-19].

図5に, マウス培養ケラチノサイトのF細胞上のカドヘリン分子の典型的な運動の軌跡を示す. 図5のCやDのような運動は単純ブラウン運動であるとは考えにくい. しかし, シミュレーションで単純ブラウン運動の軌跡を生成すると, たまにこのような軌跡が生み出されることもある. しかし, それは確率的に非常にまれにしか起きない. したがって, 単純ブラウン運動

であるか否かを決めるには、統計的な判断基準が必要である。我々は膜タンパク質の運動の分類わけの基準として、RD (Relative Deviation) というパラメータを次のように定義した[7].

$$RD(\Delta t) = \frac{MSD(\Delta t)}{4 \cdot D_{micro} \cdot \Delta t}$$

$RD(\Delta t)$  は、単純ブラウン運動からの相対的な偏差をあらわす。ある領域内部に制限された拡散運動 (Confined) の場合には 1 よりも小さくなり、方向性をもった拡散運動 (Directed) の場合には 1 よりも大きくなる。実際には、コンピュータシミュレーションで単純ブラウン運動の軌跡をランダムに発生させ、その RD の分布の上下 2.5% を与える RD の値をそれぞれ  $RD_{max}$ ,  $RD_{min}$  とした。そして、実験データから計算した RD の値が  $RD_{max}$  より大きければ方向性をもった拡散運動 (Directed) に、 $RD_{min}$  より小さければある領域内部に制限された拡散運動 (Confined) に、その間であれば単純ブラウン運動 (Simple) に分類した。

この分類法にもとづいて、細胞の自由表面上のカドヘリンの運動を分類したところ[7]、低カルシウム濃度 (50  $\mu$ M) で培養した細胞 (脱分化状態にあるケラチノサイト) では、Directed が 37%, Confined が 30% であった。しかし、通常のカルシウム濃度 (1.8 mM) で培養した細胞 (分化状態のケラチノサイト) では、Directed が 2%, Confined が 64% となり、運動形態が大きく変化することがわかった。低カルシウム条件下ではカドヘリンは細胞間接着をおこさず、すべてが自由表面上にある。この時、多くのカドヘリンは細胞骨格に結合して、方向性のある運動を示すということらしい。

## V. 光ピンセットと一粒子追跡法の併用

最近では、一粒子追跡法単独ではなく、光ピンセット法と組み合わせた実験がよく行われるようになった[20,21]。方法は簡単で、顕微鏡に落射照明用もしくはカメラ用のポートが開いていれば、そこから近赤外の連続光レーザービームを入射し、対物レンズでビームを集光して粒

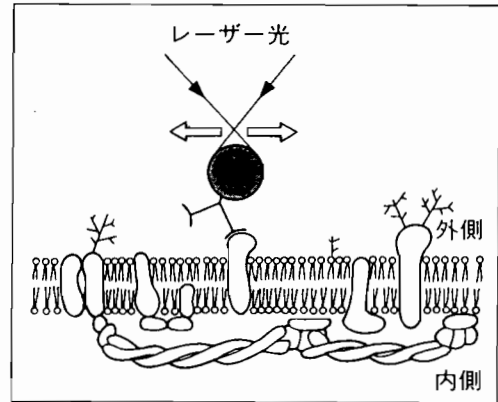


図7. 光ピンセット法の概略。光ピンセットによって金コロイド粒子を捕捉し、細胞膜に沿って膜タンパク質を動かすことを示す模式図。

子に当てればよい。金コロイド粒子は光ピンセットでの捕捉力が強いので、金コロイド粒子を光ピンセットで捕捉して、特定の膜タンパク質を膜中で牽引することができる(図7)。その応答を一粒子追跡法で追うことにより、膜タンパク質と細胞骨格との相互作用を、直接に観察することが可能になったわけである。

光ピンセット法は、1986年に Ashkin によって初めて実用化された[22,23]。一本のレーザー光を対物レンズを用いて集光すると、焦点付近で強い電場勾配が生ずる。電場中にある誘電体粒子には分極が誘導され、粒子は、電場の強い方向、すなわち、焦点の方へ引き寄せられ、焦点付近で安定に捕捉される。光ピンセットにより、ラテックス、シリカ、金などの微粒子のほか、細胞や細胞内オルガネラなどを捕捉し、動かすことが可能である。光ピンセット法については、Svoboda らによって書かれた非常によい総説[24]があるので、詳しいことはそちらを参考にさせていただきたい。ここでは、二つの応用例を示すにとどめる。

一つ目の適用例を図8 A, Bに示す。これは、光ピンセットを膜面上で 2  $\mu$ m 移動 (走査) して、その後また原点にまで戻したときの、光ピンセットで捕捉されたトランスフェリン受容体の運動の軌跡である[25]。微視的な拡散係数が大きい受容体 (1.5  $\times 10^{-10}$  cm<sup>2</sup>/s 以上) につい



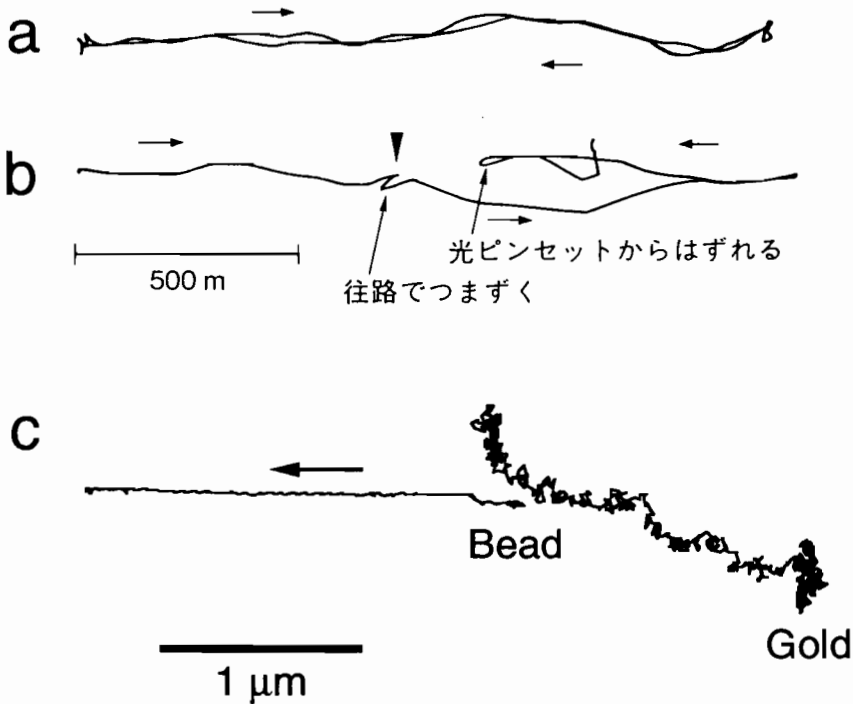


図8. 光ピンセットの適用例. AとBの実験では, 金コロイド-トランスフェリン受容体複合体を光ピンセットで左から右へと  $2\mu\text{m}$  動かした後, 右から左へと動かして開始点へ戻っている. Aの実験では, 金コロイド-受容体複合体は光ピンセットの動きに追従して, 往復する. Bの実験では, 往路は完全に追従したが, 復路で複合体は光ピンセットから外れた. 外れた付近の往路の軌跡を見ると, 往路でも同じ障害物らしきものに当たっていることがわかる. Cの実験では, 膜骨格(Bead)を光ピンセットで引っ張ったときの, 同じ膜上のバンド3(Gold)の動きを見ている. これらのバンド3は膜骨格には結合しておらず, ホップしながら広い範囲を運動(Intercompartmental Hop)している. それにもかかわらず, 膜骨格を引っ張ると, このバンド3分子も同じ方向に引きずられてゆく. これはバンド3の細胞質部分と膜骨格との間に立体障害が存在することを示す.

ては,  $0.25\text{ pN}$  の力で引っ張ると, 光ピンセットの走査の端まで(この場合は  $2\mu\text{m}$ ) 追従することが多く(往路), そこから走査の開始点まで光ピンセットを移動すると(復路), それにも追従してくる(図8 A). しかし, 捕捉力を弱くして  $0.05\text{ pN}$  にすると, 往路の走査中でも復路の走査中でも, 受容体は光ピンセットから逃げるが多くなる. 図8 Bに示したように, 復路で逃げた場合に逃げた場所の近くの往路の軌跡を見ると, 往路でもつまづいている場合(矢印)が多く見られた. これらは, 膜骨格フェンスモデルを支持するものである.

もう一つ適用例を上げる. 図8 A, Bではレセプターを強制的に移動させることにより,

フェンスのような構造によって制限されていることを示したが, こゝでは制限している方の膜骨格を光ピンセットで動かしたときに, レセプターの動きに影響が見られるかどうかを調べた(図8 C). 表面に赤血球のバンド3に対する抗体をたくさん吸着させた直径  $1\mu\text{m}$  のラテックスビーズを赤血球ゴースト膜に結合させた. 30%程度のバンド3は膜骨格に結合しているので, このラテックスビーズはバンド3を介して膜骨格に結合している. このラテックスビーズを光ピンセットで引っ張ると最大で  $10\sim 20\text{ pN}$  の力(レーザー強度  $100\text{ mW}$  の場合)を膜骨格に加えることができる. さらに, 赤血球膜の別の部位にあるバンド3を paucivalent 金コロイ

ドラベル(少数の抗バンド3 Fab が結合してある)で標識した。ここで示したバンド3は、膜骨格に結合しておらず、ホップを繰り返しながら拡散運動をしている。図8Cは、ビーズを引っ張って膜骨格ネットワークを変形させたときの、これらのバンド3分子の運動を示したものである。膜骨格を引っ張ると、バンド3は拡散しながらも同じ方向へ引っ張られた。これは、バンド3の細胞質部分が膜骨格にぶつかって、その内部に運動が制限されていることを直接的に示すものである。

このように、光ピンセット法を用いることにより、特定の膜タンパク質分子を観察して、さらに、動かしてみることができるようになった。つまり、光ピンセットの利用により、系に攪乱を加え、それに対する応答を観察すること、相互作用の力を直接測定すること、が可能になったわけである。タンパク質一分子を観察して、操作する、といった手法が、細胞生理学における分子間相互作用の解明に大きく役立つものと期待している。

#### 参 考 文 献

- Jacobson, K., Sheets, E. D. & Simson, R.: Revisiting the fluid mosaic model of membranes. *Science*. **268**: 1441-1442, 1995.
- Kusumi, A. & Sako, Y.: Cell surface organization by the membrane skeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**: 566-574, 1996.
- De Brabander, M., Geuens, G., Nuydens, R., Moeremans, M. & de Mey, J.: Probing microtubule-dependent intracellular motility with nanometre particle video ultramicroscopy (nanovid ultramicroscopy). *Cytobios*. **43**: 273-283, 1985.
- De Brabander, M., Nuydens, R., Geuens, G., Moeremans, M. & de Mey, J.: The use of submicroscopic gold particles combined with video contrast enhancement as a simple molecular probe for the living cell. *Cell Motil. Cytoskeleton*. **6**: 105-113, 1986.
- Gelles, J., Schnapp, B. J. & Sheetz, M. P.: Tracking kinesin-driven movements with nanometre-scale precision. *Nature*. **331**: 450-453, 1988.
- Saxton, M. J.: Lateral diffusion in an archipelago: single-particle diffusion. *Biophys. J.* **64**: 1766-1780, 1993.
- Kusumi, A., Sako, Y. & Yamamoto, M.: Confined lateral diffusion of membrane receptors as studied by single particle tracking (nanovid microscopy): effects of calcium-induced differentiation in cultured epithelial cells. *Biophys. J.* **65**: 2021-2040, 1993.
- Frens, G.: Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nat. Phys. Sci.* **241**: 20-22, 1973.
- De Mey, J.: Colloidal gold probes in immunocytochemistry. In: *Immunocytochemistry. Practical Applications in Pathology and Biology*. Ed. Polak, J. M. & van Noorden, S. Wright PSG Bristol, U. K. pp. 82-111, 1983.
- Roth, J.: The colloidal gold marker system for light and electron microscopic cytochemistry. In: *Techniques in Immunocytochemistry, Vol. 2*. Ed. Bullock, G. R. & Petrusz, P. Academic Press, New York. pp. 217-284, 1983.
- Leunissen, J. L. M. & de Mey, J. R.: Preparation of gold probes. In: *Immuno-Gold Labeling in Cell Biology*. Ed. Verkleij, A. J. and Leunissen, J. M. CRC Press. pp. 3-16, 1989.
- Lee, G. M., Ishihara, A. & Jacobson, K. A.: Direct observation of Brownian motion of lipids in a membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **88**: 6274-6278, 1991.
- De Brabander, M., Geerts, H., Nuydens, R. & Nuyens, R.: Detection of gold probes with video-enhanced contrast microscopy: nanovid microscopy. *Am. J. Anat.* **185**: 282-295, 1989.
- 山本陸也, 佐甲靖志, 楠見明弘: ナノメートル計測による細胞接着レセプター・カドヘリンの動態の解析. *Cell Science*. **7**: 400-407, 1991.
- Kamimura, S. & Kamiya, R.: High-frequency vibration in flagellar axonemes with amplitudes reflecting the size of tubulin. *J. Cell Biol.* **116**: 1443-1454, 1992.
- Sako, Y. & Kusumi, A.: Compartmentalized structure of the plasma membrane for receptor movements as revealed by a nanometer-level motion analysis. *J. Cell Biol.* **125**: 1251-1264, 1994.
- 富重道雄: 一粒子操作・追跡による赤血球膜裏打ちネットワークの機能の解析: 弾性的変形能と膜内在性タンパク質の運動制御機能. 東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻修士論文, 1995.
- Balogh, N., 辻 明彦, 佐甲靖志, 楠見明弘: Detection of rapid intercompartmental hop diffusion. *生物物理*, **36**(suppl.): S24, 1996.
- Balogh, N., Tsuji, A., Sako, Y. & Kusumi, A. 投稿準備中, 1996.
- 鈴木直哉, 木下一彦: 光ピンセット. *生体の科学*, **44**: 159-165, 1993.
- 佐甲靖志, 富重道雄, 藤原敬宏: 光ピンセット法とその細胞膜研究への応用. *ファルマシア*, **32**: 271-275, 1996.
- Ashkin, A.: Trapping of atoms by resonance

- radiation pressure. *Phys. Rev. Lett.* **40**: 729-732, 1978.
- 23) Ashkin, A., Dziedzic, J. M., Bjorkholm, J. E. & Chu, S.: Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Opt. Lett.* **11**: 288-290, 1986.
- 24) Svoboda, K. & Block, S. M.: Biological applications of optical forces. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **23**: 247-285, 1994.
- 25) Sako, Y. & Kusumi, A.: Barriers for lateral diffusion of transferrin receptors in the plasma membrane as characterized by receptor dragging by laser tweezers: fence versus tether. *J. Cell Biol.* **129**: 1559-1574, 1995.