

博士論文

論文題目 線形ゼロモード導波路を用いた
アクチン重合の1分子蛍光イメージング解析

氏名 藤井 聡一郎

目次

略語集	4
第1章 序論	6
1-1. actin の G-F 変換	6
1-2. actin の重合理論	7
1-3. 伸長過程と定常状態における重合速度定数の違い	8
1-4. 1 分子蛍光イメージング法	9
1-5. 本研究の目的および概要	11
第1章の図	12
第2章 actin 重合過程の 1 分子蛍光イメージングに向けた試料の調製	18
2-1. 序文	18
2-2. 実験方法	18
2-2-1. 使用した試薬および機器	18
2-2-2. 鶏の胸肉からアセトンパウダーの調製	20
2-2-3. アセトンパウダーから G-actin の精製	20
2-2-4. G-actin の濃度の算出	21
2-2-5. 溶液中における無標識 G-actin の重合能の確認	21
2-2-6. actin の Cy3、biotin、BODIPY-FL 標識	21
2-2-7. 標識された G-actin の濃度およびラベル率の算出	22
(1) Cy3 G-actin の濃度およびラベル率の算出	22
(2) biotin G-actin の濃度の算出	22
(3) BODIPY-FL G-actin の濃度およびラベル率の算出	22
2-2-8. 溶液中における Cy3 G-actin の重合能の確認	23
2-2-9. 溶液中における BODIPY-FL G-actin の重合能の確認	23
2-3. 実験結果および考察	23
2-3-1. G-actin の精製	23
2-3-2. G-actin の濃度の算出	24
2-3-3. 溶液中における無標識 G-actin の重合能の確認	24
2-3-4. actin の Cy3、biotin、BODIPY-FL 標識	24
(1) Cy3 G-actin の濃度およびラベル率の算出	24
(2) biotin G-actin の濃度の算出	25
(3) BODIPY-FL G-actin の濃度およびラベル率の算出	25
2-3-5. 溶液中における Cy3 G-actin の重合能の確認	25
2-3-6. 溶液中における BODIPY-FL G-actin の重合能の確認	25

2-4. 小括	25
第2章の図	26
第3章 カバーガラス上および LZMW 内における actin の伸長	33
3-1. 序文	33
3-2. 実験方法	33
3-2-1. 使用した試薬および機器	33
3-2-2. actin の調製および標識	34
3-2-3. 試薬の調製	35
(1) 基板固定用試薬の調製	35
(2) 顕微鏡観察用試薬の調製	35
3-2-4. LZMW の作製	35
3-2-5. カバーガラスおよび LZMW の表面処理	35
(1) カバーガラスの表面処理	35
(2) LZMW の表面処理 (PVPA 処理)	36
3-2-6. カバーガラス上における Cy3 F-actin から BODIPY-FL actin の伸長	36
3-2-7. LZMW 内における Cy3 F-actin から BODIPY-FL actin の伸長	37
3-2-8. 伸長速度の算出	38
3-3. 実験結果および考察	38
3-3-1. カバーガラス上における Cy3 F-actin から BODIPY-FL actin の伸長	38
(1) カバーガラス上における Cy3 F-actin から BODIPY-FL actin の伸長の観察	38
(2) 伸長速度の算出および評価	39
3-3-2. LZMW 内における Cy3 F-actin から BODIPY-FL actin の伸長	39
(1) LZMW 内における Cy3 F-actin から BODIPY-FL actin の伸長の観察	39
(2) 伸長速度の算出および評価	39
3-4. 小括	40
第3章の図	41
第4章 LZMW 内における actin 重合過程の1分子蛍光イメージング	50
4-1. 序文	50
4-2. 実験方法	50
4-2-1. 使用した試薬および機器	50
4-2-2. actin の調製および標識	51
4-2-3. 1分子蛍光イメージング用の試薬および基板の調製	52
(1) 基板固定用試薬の調製	52
(2) 酸素除去酵素系および酸化剤の調製	52
(3) LZMW 基板のコーティング	52

4-2-4. 観察条件の検討	52
(1) 観察試料の調製	52
(2) 試料の観察	52
(3) データの解析	53
(4) SNR (Signal to Noise Ratio) の評価	53
4-2-5. 伸長過程における BODIPY-FL actin の重合	53
(1) 観察試料の調製	53
(2) 試料の観察	53
(3) データの解析	53
4-2-6. 定常状態における BODIPY-FL actin の重合	53
(1) 観察試料の調製	53
(2) 試料の観察	54
(3) データの解析	54
4-2-7. 1分子の BODIPY-FL G-actin monomer の蛍光強度測定	54
(1) 観察試料の調製	54
(2) 試料の観察	54
(3) データの解析	54
4-3. 実験結果および考察	54
4-3-1. 観察条件の検討	54
4-3-2. 重合反応の1分子蛍光イメージング	55
(1) 定常状態における重合反応の協同性の検討	55
(2) 伸長過程と定常状態における重合単位の比較	56
4-4. 小括	57
第4章の図	58
第5章 総括および今後の展望	69
5-1. 総括	69
5-2. 今後の展望	70
参考文献	71
謝辞	74

略語集

ADP	Adenosine diphosphate
APS	Ammonium peroxodisulfate
ATP	Adenosine triphosphate
Biotin PEAC ₅	<i>N</i> -6-(Biotinylamino)hexanoyl- <i>N'</i> -[2-(<i>N</i> -maleimido)ethyl]piperazine, hydrochloride
BODIPY-FL	<i>N</i> -(4,4-Difluoro-5,7-Dimethyl-4-Bora-3a,4a-Diaza- <i>s</i> -Indacene-3-yl)Methyl) Iodoacetamide
BSA	Bovine serum albumin
B 端	Barbed end
Cy3	Cy3 Maleimide Mono-reactive Dye
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EM-CCD	Electron multiplying charge coupled device
EM-Gain	Electron multiplying gain
F-actin	Filamentous actin
G-actin	Globular actin
GODCAT	Glucose oxidase and catalase
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
LZMW	Linear zero-mode waveguide
MV	Methyl viologen dichloride hydrate
ND filter	Neutral density filter
PCA	Protocatechuic acid
PCD	Protocatechuate 3,4-dioxygenase from <i>Pseudomonas</i> sp.
PCH	Photon counting histogram
PD	Prepacked disposable
PIPES	Piperazine- <i>N,N</i> -bis(2-ethanesulfonic acid)
PVPA	Poly(vinylphosphonic acid)
P 端	Pointed end
ROI	Region of interest
rpm	revolution per minute
SD	Standard deviation
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Poly-acrylamide gel electrophoresis
SEM	Scanning electron microscope
SNR	Signal to noise ratio

TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylenediamine
TIRFM	Total internal reflection fluorescence microscopy
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol acetate
w/v	weight/volume
ZMW	Zero-mode waveguide

第1章 序論

1-1. actin の G-F 変換

Actin は、全ての真核生物に遍く大量に存在する細胞骨格タンパク質で、G-actin (globular actin) と F-actin (filamentous actin) という2種類の可逆的な状態をとる。G-actin は、球状の monomer で、中心に ATP 結合部位が存在している。F-actin は、G-actin が重合して、直径 7-9 nm の右巻きの二本鎖フィラメントを形成したものである。その両端は、重合速度が大きく異なっており、重合速度が速い端を barbed end (B 端)、遅い端を pointed end (P 端) と呼ぶ (Alberts *et al.*, 2007) (Fig. 1-1)。

Actin のダイナミックな重合・脱重合は、ネットワークや束を形成し、細胞の形態変化や運動において重要な役割を担っている。例えば、細胞内の動的な構造であり、扁平な膜状突起であるラメリポディア (葉状仮足)、細い膜状突起であるフィロポディア (糸状仮足) は、それぞれフィラメントのネットワーク、束が動力を生み出している。いずれの場合においても、細胞膜側にフィラメントの B 端側が位置しており、細胞膜は絶えずブラウン運動している。フィラメントの B 端と細胞膜との間の間に actin が入り込み重合することで、その重合した actin の大きさの分だけブラウン運動する空間が狭くなる。これが継続的に起こると、ラメリポディアは前進し、フィロポディアは伸長する (三木, 2004)。

Actin の重合は、G-actin の濃度が臨界濃度である 100 nM 以上の場合にのみ起こることが知られており、その過程は、核形成過程、伸長過程、定常状態の3段階に分けられる。核形成過程では、数個の monomer が集まって、フィラメント形成のための重合の種となる安定な核が作られる。この核形成はゆっくり行われるため、重合の律速段階である。伸長過程では、形成された安定な重合核からフィラメントが伸び始め、G-actin の濃度が臨界濃度に達するまで継続する。臨界濃度に達すると、定常状態となり、重合と脱重合の速度が等しくなるため、フィラメントの長さは見かけ上、定常となる (Alberts *et al.*, 2007) (Fig. 1-2)。

定常状態における F-actin には、トレッドミル過程と呼ばれる actin の交換過程が知られている (Fig. 1-3)。B 端での重合速度が P 端での脱重合速度と等しくなるため、常に新しい actin が B 端から供給されるとともに、古い actin が P 端から放出され、重合した G-actin は、次第に P 端に向かって移動していくように見える。

1-2. actin の重合理論

Actin は、低イオン強度の溶液中では monomer であるが、塩濃度を上げると、臨界濃度以上では重合してフィラメントを形成する。全 actin 濃度が臨界濃度以下の場合、monomer 濃度は、全 actin 濃度に比例する。全 actin 濃度が臨界濃度を超えると、monomer は、臨界濃度付近ではほぼ一定の濃度を保つが、それを超えた濃度分の actin がフィラメントを形成する。また、フィラメントは、長いものほど指数関数的に減少するような分布を示す。

大沢らは、monomer、直線状重合体、らせん状重合体という 3 種類からなる平衡状態のモデル (Oosawa and Asakura, 1975; Oosawa and Kasai, 1962) (Fig. 1-4) を考えることで、この現象を説明した。以下に、そのモデルについて示す (式は、寺田(2007)を改変)。

i 量体の直線状重合体の濃度 c_{il} は、monomer と直線状重合体との間の平衡定数 K_l を用いて、

$$c_{il} = K_l c_{(i-1)l}$$

と書ける。最初に 2 量体が形成されるときは、

$$c_2 = K_l c_1$$

となるので、これらの式から、 i 量体の直線状重合体の濃度 c_{il} は、

$$c_{il} = K_l^{-1} (K_l c_1)^i$$

と表せる。よって、monomer と直線状重合体の全濃度 c_l は、

$$c_l = \sum_{i \geq 1} i c_{il} = \frac{c_1}{(1 - K_l c_1)^2}$$

と求められる。

次に、重合核が 3 量体であると仮定すると、らせん状重合体の 3 量体の濃度 c_{3h} は、らせん状 3 量体の直線状 3 量体に対する割合 γ を用いて、

$$c_{3h} = \gamma c_{3l} = \gamma K_l^{-1} (K_l c_1)^3$$

と書ける。これに平衡定数 K_h (monomer とらせん状重合体との間の平衡定数) で monomer が結合していくので、

$$c_{4h} = K_h c_{3h} c_1$$

となる。これより、 i 量体のらせん状重合体の濃度 c_{ih} は、

$$c_{ih} = \sigma K_h^{-1} (K_h c_1)^i$$

ただし、

$$\sigma = \gamma (K_l / K_h)^2$$

と表せる。よって、らせん状重合体の全濃度 c_h は、

$$c_h = \sum_{i \geq 3} i c_{ih} = \frac{\sigma c_1}{(1 - K_h c_1)^2} - (\sigma c_1 + 2\sigma K_h c_1^2)$$

と求められる。

以上から、actin の全濃度 c_0 は、次のように表される。

$$c_0 = c_l + c_h = \frac{c_1}{(1 - K_l c_1)^2} + \frac{\sigma c_1}{(1 - K_h c_1)^2} - (\sigma c_1 + 2\sigma K_h c_1^2)$$

ここで、 σ が 1 より十分小さく、 $K_l < K_h$ とすると、

$$c_0 = c_1 + \frac{\sigma c_1}{(1 - K_h c_1)^2}$$

となる。

この式において、 c_0 を増加させていくと、 c_0 が小さいときは、 σ が1より十分小さいため、第2項は無視できる。よって、monomer濃度 c_1 は、 c_0 とほぼ等しく、比例して増加する。しかし、 $c_0 (= c_1)$ が $1/K_h$ に近づくと、第2項が無視できなくなる。 c_0 が $1/K_h$ を超えても、 c_1 は、 $1/K_h$ を超えることができず、ほぼこの値に保たれる。つまり、 $1/K_h$ が臨界濃度であり、残りのactinは重合体を形成する (Fig. 1-5)。したがって、このモデルでは、臨界濃度を超えると、超えた濃度分のactinが重合体を形成することが示されている。このモデルは、臨界濃度が存在する理由を簡単な式でうまく説明している。また、actinがらせん状重合体であるという予言が、ネガティブ染色したactinフィラメントの電子顕微鏡観察によって確認され (Hanson and Lowy, 1963)、このモデルは、多くの研究者の支持を受けることになった。そして、actinの重合は、monomerを単位として起こると考えられるようになった。

1-3. 伸長過程と定常状態における重合速度定数の違い

これまで、actinの重合・脱重合に関する研究は多くなされてきた。しかし、Pyreneなどで蛍光標識されたactinの蛍光強度変化を利用した溶液系の実験 (Kouyama and Mihashi, 1981) では、得られる結果は、複数のフィラメントの平均値に過ぎず、1本のフィラメントのダイナミクスについて議論することはできなかった。そこで、藤原らは、TIRFM (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy: 全反射照明蛍光顕微鏡法) (Funatsu *et al.*, 1995) を用いて、フィラメント1本1本の振る舞いを調べた (Fujiwara *et al.*, 2002)。その結果、単一フィラメントの長さ変化を経時的に追跡することで、溶液系では議論することができなかった、様々なactinの振る舞いが明らかになった。特に、定常状態におけるF-actinの長さゆらぎに着目したことにより、actinの重合単位に関して興味深い結果を得た。

測定時間間隔 τ を変えて、F-actinの長さを測定したところ、 τ が長くなるにつれて、長さゆらぎの標準偏差 (S.D.) が大きくなることが分かった。さらに、横軸に τ (min)、縦軸に $(S.D.)^2$ (μm)²をとってプロットしたところ、その近似直線は、 $(S.D.)^2 = 0.025\tau + 0.58$ となった。 $(S.D.)^2$ が τ に比例していたことから、F-actinへの重合・脱重合が拡散過程に従うと結論付けられた (Fig. 1-6)。

F-actinの長さゆらぎが、その両端におけるランダムな重合・脱重合に由来するものならば、時刻 t における長さ x のフィラメントの存在確率を $P(x, t)$ ($0 \leq P(x, t) \leq 1$) とすると、

$$\frac{\partial P(x, t)}{\partial t} = \{k^- P(x+a) - k^+ C P(x)\} + \{k^+ C P(x-a) - k^- P(x)\}$$

と表せる。ただし、

k^+ : 重合速度定数

k^- : 脱重合速度定数

C : monomer濃度

a : 重合・脱重合するactinがフィラメント長に寄与する長さ (monomerが重合・脱重合するなら

ば、2.7 nm)

とする。この式の $P(x+a)$ の項と $P(x-a)$ の項を、 a の2次の項までテイラー展開すると、

$$\frac{\partial P(x,t)}{\partial t} = \frac{1}{2}a^2 \frac{\partial^2 P(x,t)}{\partial x^2} (k^+C + k^-) - a \frac{\partial P(x,t)}{\partial x} (k^+C - k^-)$$

となり、第1項は拡散項、第2項は移流項を表している。定常状態において、重合速度と脱重合速度は等しく、 $k^+C_0 = k^-$ (C_0 : 定常状態における monomer の濃度である臨界濃度) であるため、第2項の移流項は存在せず、

$$\frac{\partial P(x,t)}{\partial t} = \frac{1}{2}a^2(k^+C + k^-) \frac{\partial^2 P(x,t)}{\partial x^2}$$

となる。これは拡散方程式の形をしており、その拡散係数 D は、

$$D = \frac{1}{2}a^2(k^+C_0 + k^-)$$

と表せる。また、拡散過程においては、

$$\langle (\Delta x)^2 \rangle = 2D\tau$$

すなわち、

$$(S.D.)^2 = 2D\tau$$

が成り立つので、

$$(S.D.)^2 = a^2(k^+C_0 + k^-)\tau$$

となる。この式を、 $a = 2.7$ nm、 $k^+C_0 = k^-$ を用いて、 $(S.D.)^2 = 0.025\tau + 0.58$ と比較すると、

$$k^+ = 4.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$$

$$k^- = 29 \text{ s}^{-1}$$

と求められた。これらを伸長過程での値と比較すると、30–45倍程度の値であった。この結果は、定常状態において、平均して複数個の G-actin が重合に関与していることを示唆している。これは、actin の重合が、どの段階においても、monomer を単位として起こるとされてきた従来の知見を覆すものであり、様々な重合メカニズムが考えられる。考え得るメカニズムとしては、伸長過程において monomer が重合し、定常状態において、oligomer が重合する会合体によるメカニズム、あるいは、monomer が重合することで更に重合が促進される協同性によるメカニズムなどが挙げられるが、その詳細は明らかになっていない (Fig. 1-7)。

1-4. 1分子蛍光イメージング法

1-3 で述べた藤原らが行った、1本のフィラメントの長さ変化を利用した実験においては、actin の重合・脱重合について、フィラメントの長さを測定するという間接的な方法でしか議論することができなかった。そこで、さらに詳細な actin の振る舞いを明らかにする目的で、重合・脱重合そのものを1分子レベルで直接的に観察する必要性が出てきた。

Actin の重合は、100 nM (臨界濃度) 以上で起こるため、このような高濃度の蛍光標識 actin 存在下で、その重合過程の1分子蛍光イメージングを行う必要がある。しかし、一般的な1分子蛍光イメージング法である TIRFM では、励起範囲がレーザーの浸透方向にしか制限されないため、

溶液中の蛍光標識分子が背景光となり、上記のような高濃度下で 1 分子観察を行うことは困難である。そこで、高濃度下での観察が可能である基板として、ZMW (zero-mode waveguide : ゼロモード導波路) が考え出された (Levene *et al.*, 2003)。ZMW は、石英ガラスに蒸着したアルミニウム薄膜上に円形の開口を設けた基板であり、その開口の下側から光を照射すると、開口底面近傍のみに非常に局在化したエバネッセント場が発生する。これを励起光とすることで、100 nM 以上の蛍光標識分子が存在していても、1 分子蛍光イメージングを行うことができる。ZMW を用いた研究には、これまでに、DNA ポリメラーゼの反応 (Korlach *et al.*, 2008) や、GroEL と GroES の分子間相互作用 (Miyake *et al.*, 2008) を 1 分子レベルで観察したものなどがある。しかし、ZMW は、円形で三次元的に制限された構造をしているため、actin フィラメントなどの繊維状重合体や、微小管に沿って運動するモータータンパク質などの運動性を持った分子の観察には利用することができない。そこで、円形の開口ではなく、可視光の波長よりも細い幅のスリットを設けた LZMW (linear zero-mode waveguide : 線形ゼロモード導波路) が考案された (Elting *et al.*, 2013)。X 軸方向の制限を取り去ることで、1 次元方向の運動が可能となるため、actin 重合の 1 分子観察が実現できると考えた (Fig. 1-8)。

1-5. 本研究の目的および概要

本研究では、先行研究 (Fujiwara *et al.*, 2002) での伸長過程と定常状態の重合速度定数が大きく異なるという結果を受けて、1 分子蛍光イメージング法を用いて、伸長過程と定常状態における actin の重合単位を決定することにより、actin の重合メカニズムを明らかにすることを目的とした。

第 1 章では、actin の構造および重合過程、大沢らのモデル (Oosawa and Asakura, 1975; Oosawa and Kasai, 1962) を用いた actin の重合理論、先行研究 (Fujiwara *et al.*, 2002) での伸長過程と定常状態における重合速度定数の違いから考え得る重合メカニズム、TIRFM と ZMW の比較から LZMW を用いた 1 分子蛍光イメージング法について述べた。

第 2 章では、actin 重合過程の 1 分子蛍光イメージングに向けた試料の調製について述べる。

第 3 章では、カバーガラス上および LZMW 内における actin の伸長について述べる。

第 4 章では、LZMW 内における actin 重合過程の 1 分子蛍光イメージングから、重合協同性の検討および重合単位について述べる。

第 5 章では、本研究の総括および今後の展望について述べる。

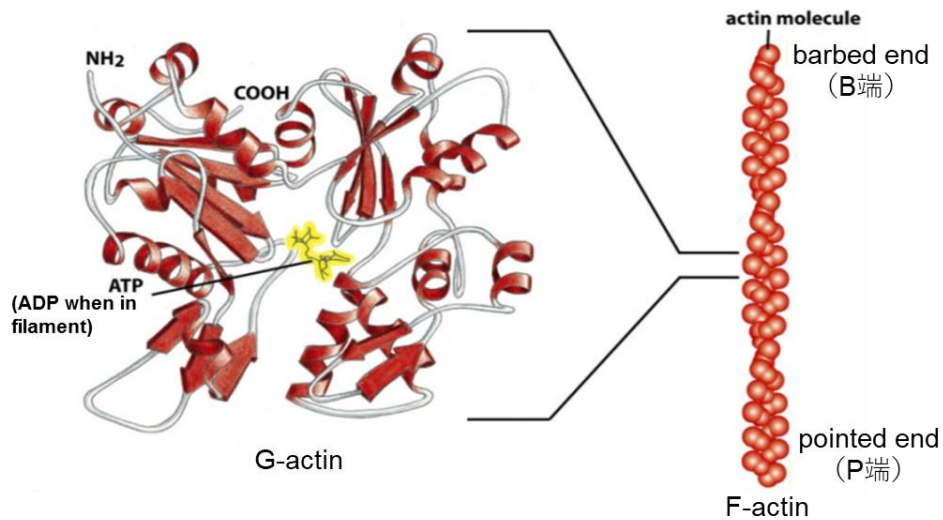


Fig. 1-1 actin の構造

Actin には、G-actin と F-actin という 2 種類の状態が存在する。G-actin は、球状の monomer で、中心に ATP 結合部位が存在している。F-actin は、G-actin が重合して、右巻きの二本鎖フィラメントを形成したもので、重合速度が速い端を barbed end (B 端)、遅い端を pointed end (P 端) と呼ぶ。図は、Alberts *et al.* (2007) を改変。

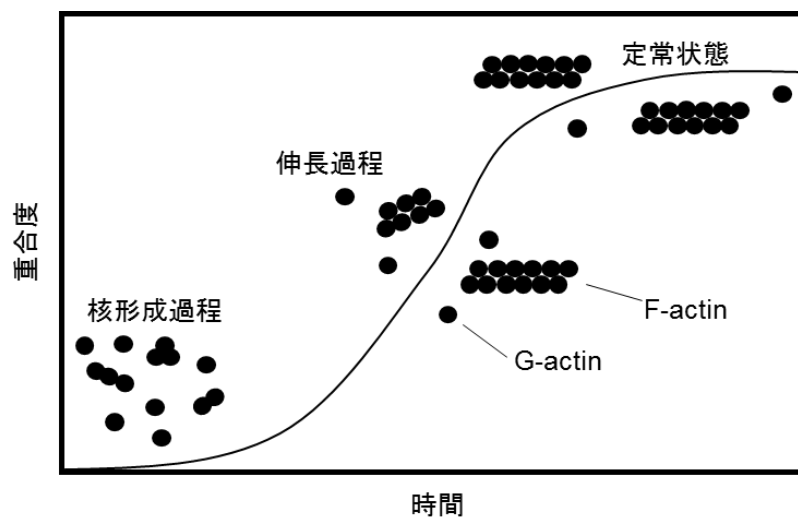


Fig. 1-2 actin の重合過程

Actin の重合過程は、核形成過程、伸長過程、定常状態の 3 段階に分けられる。核形成過程では、重合の種となる安定な核が形成される。伸長過程では、重合核からフィラメントが伸び始め、G-actin の濃度が臨界濃度に達するまで継続する。定常状態では、重合と脱重合の速度が等しくなるため、フィラメントの長さは見かけ上、定常となる。

図は、Alberts *et al.* (2007) を改変。

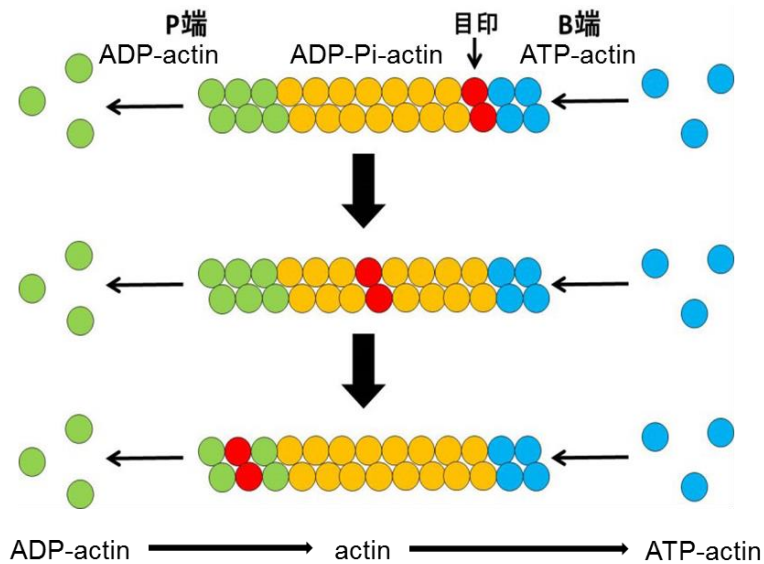


Fig. 1-3 トレッドミル過程の模式図

溶液中の G-actin は、ATP と結合して、ATP-actin として存在している（青）。G-actin が F-actin に重合すると、ATP が加水分解され、ATP-actin は、ADP-Pi-actin となる（オレンジ）。その後、ADP-Pi-actin は、Pi を放出して、ADP-actin（緑）となり、P 端から脱重合する。脱重合した ADP-actin は、ADP を放出して、再び ATP と結合する（青）。この一連の過程は、トレッドミル過程と呼ばれる。常に新しい actin が B 端から供給されるとともに、古い actin が P 端から放出されているため、重合した G-actin は、次第に P 端に向かって移動していくように見える（赤）。

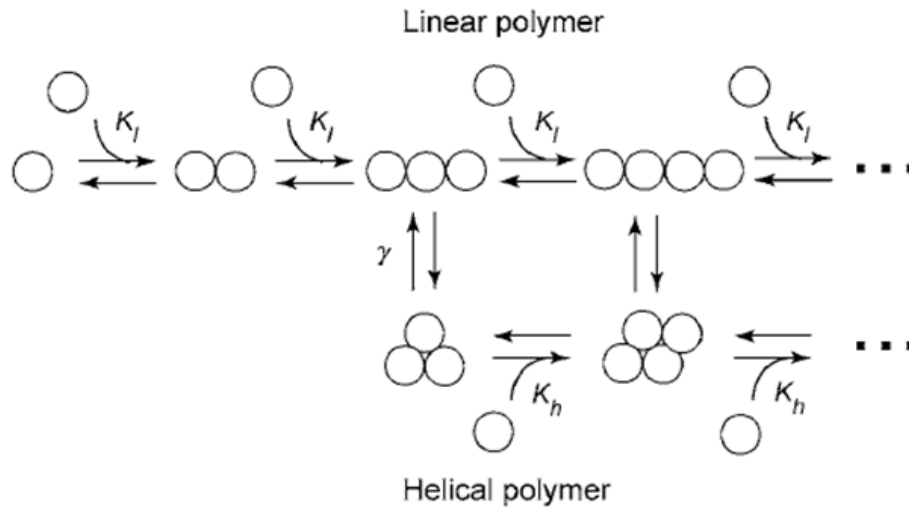


Fig. 1-4 大沢らの actin 重合モデル

monomer と直線状重合体との間の平衡定数を K_l 、らせん状重合体の直線状重合体に対する割合を γ 、monomer とらせん状重合体との間の平衡定数を K_h とする。

図は、Terada *et al.* (2007)より転載。

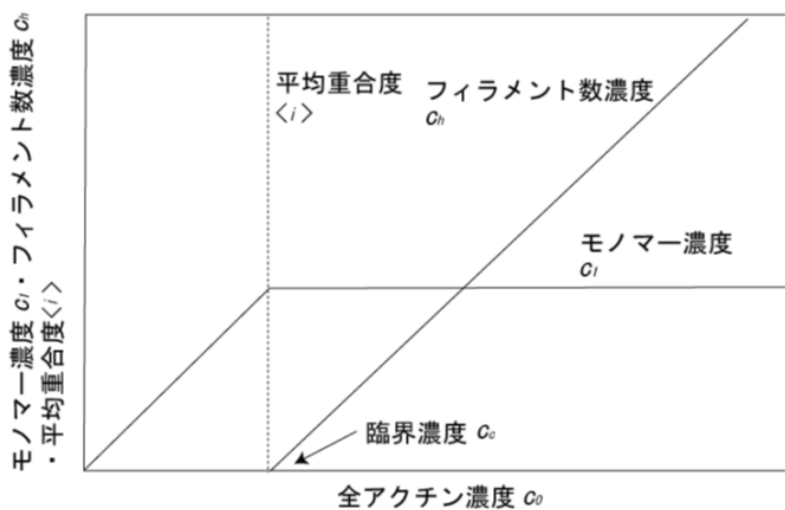


Fig. 1-5 大沢らのモデルによる相図

臨界濃度を超えると、超えた濃度分の actin がフィラメントを形成する。

図は、寺田 (2007) より転載。

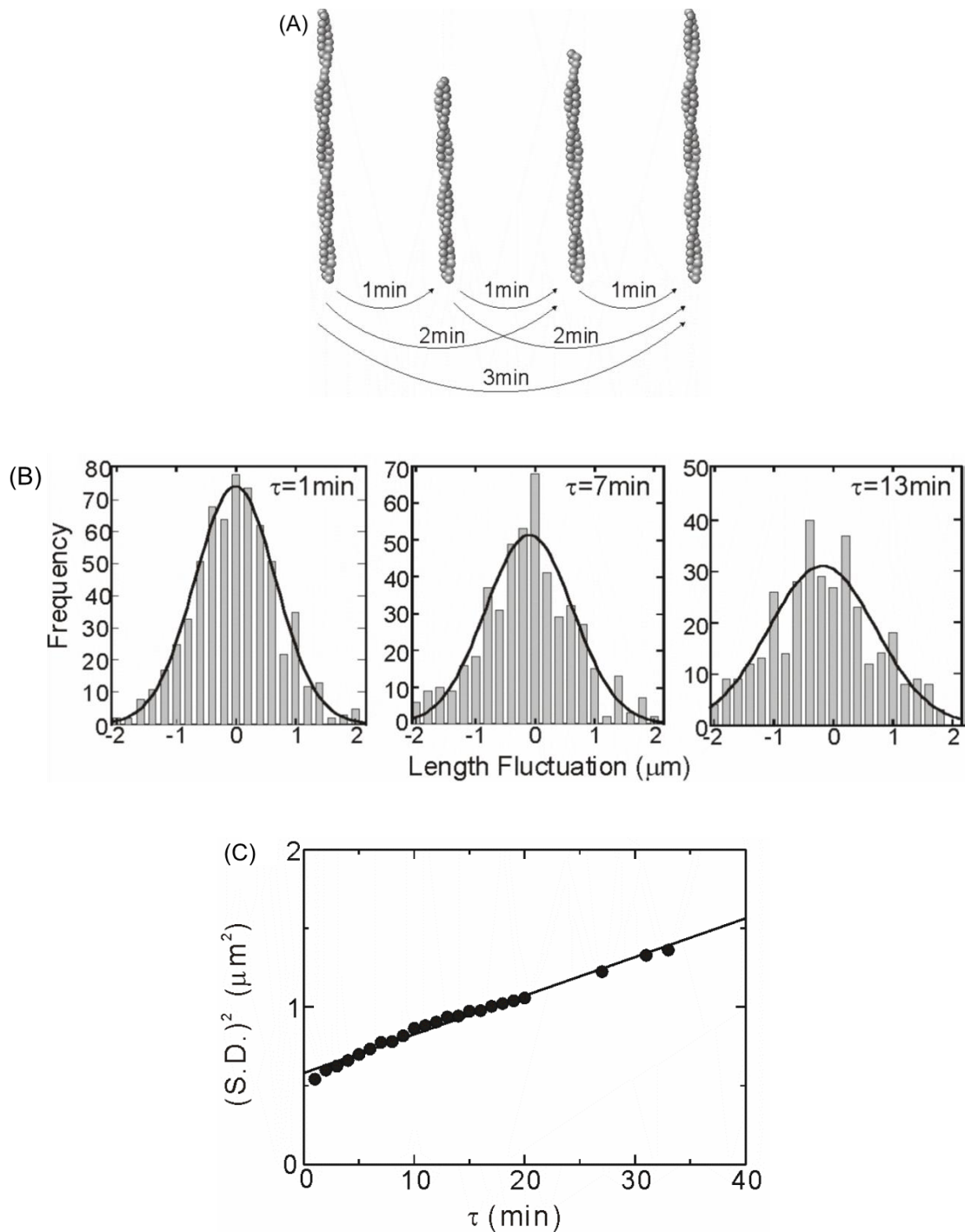


Fig. 1-6 定常状態における F-actin の長さゆらぎ

(A) F-actin の長さ変化測定方法の模式図 (時間間隔を 1, 2, 3 min, ... と変えて測定)。

(B) 異なる測定時間間隔での長さゆらぎの分布。時間間隔 τ が 1, 7, 13 min と長くなるほど、長さゆらぎの標準偏差 (S.D.) が大きくなった。

(C) $(S.D.)^2$ と時間間隔 τ の関係。 $(S.D.)^2 = 0.025\tau + 0.58$ と近似でき、 $(S.D.)^2$ が τ に比例していた。

図は、Fujiwara *et al.* (2002) より転載。

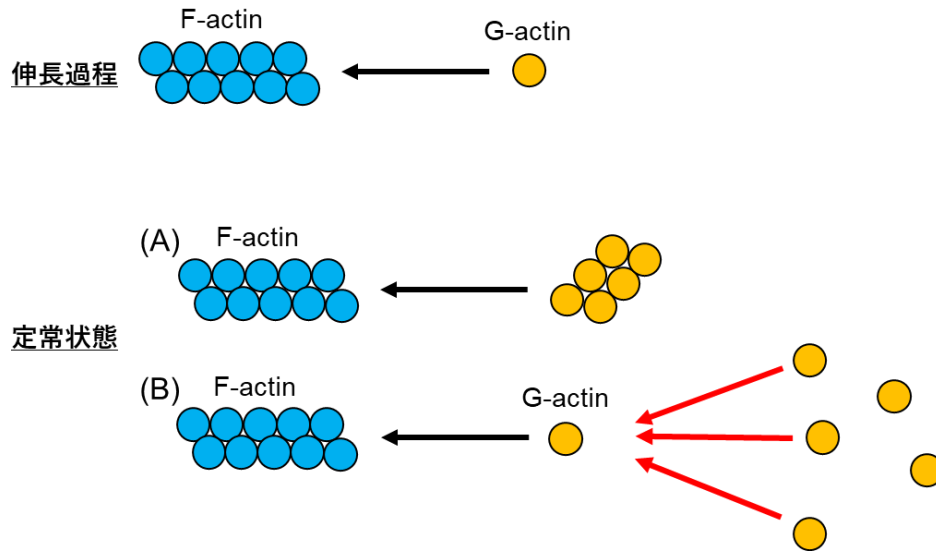


Fig. 1-7 考え得る重合メカニズムの模式図

伸長過程で、monomer が重合するのに対し、定常状態で、

(A) oligomer が重合する会合体によるメカニズム

(B) monomer が重合することで更に重合が促進される協同性によるメカニズム

などが考えられる。

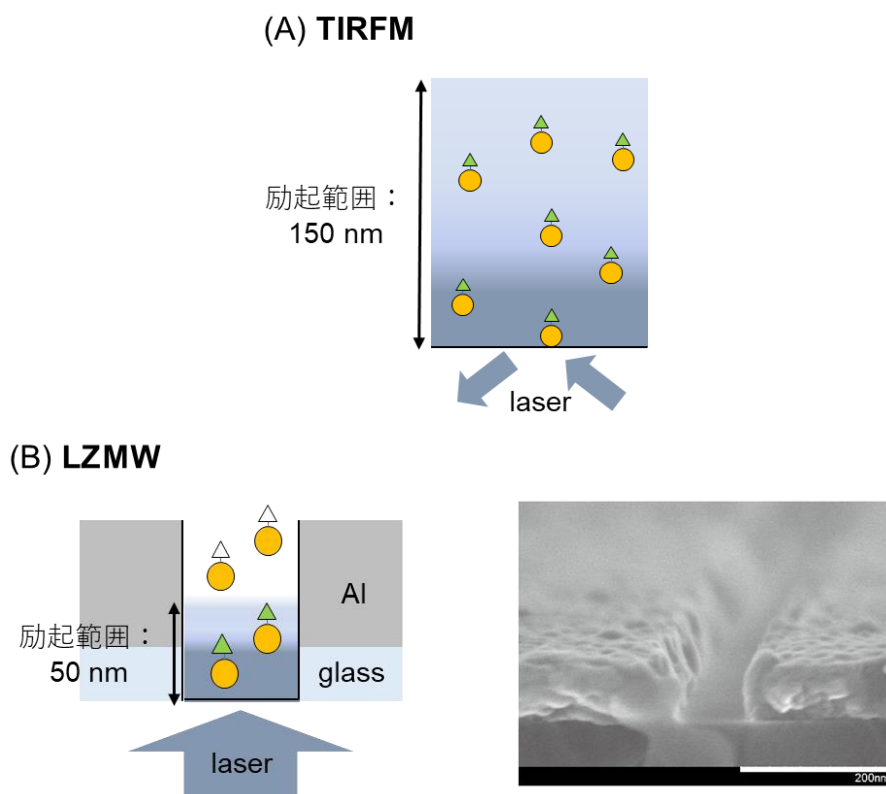


Fig. 1-8 TIRFM と LZMW の比較

(A) レーザー光がガラス基板と溶液の界面で全反射することにより、溶液側のガラス基板近傍のみに電磁場が生じる。この電磁場をエバネッセント場と呼ぶ。TIRFM では、このエバネッセント場により、Z 軸方向の励起範囲は、150 nm 程度に制限されるが、X, Y 軸方向には制限がない。このため、溶液中の蛍光標識分子が背景光となり、1 分子蛍光イメージングを行うためには、その濃度を 50 nM 以下に抑える必要がある。

(B) LZMW では、スリットの下側から光を照射することで、開口底面近傍のみに非常に局在化したエバネッセント場が発生する。これにより、Z 軸方向の励起範囲は、50 nm 程度に制限され、Y 軸方向もアルミニウムの薄膜により物理的に制限される。そのため、TIRFM よりも背景光を抑えられ、100 nM 以上の蛍光標識分子存在下でも、1 分子蛍光イメージングを行うことができる。

右は、SEM（走査電子顕微鏡）で撮影した LZMW（スケールバー：200 nm）。

第2章 actin 重合過程の1分子蛍光イメージングに向けた試料の調製

2-1. 序文

本研究では、actin の重合単位、つまり、重合する actin の個数を決定することを目的としている。しかし、溶液中に蛍光標識されていない actin が存在し、それらが重合に関与すると、正しく重合単位を決定することができない。そのため、本研究で用いる actin は、100%のラベル率で蛍光標識されること、および、その標識により重合が阻害されないことが必要である。そこで、このような条件を満たす蛍光色素として、BODIPY-FL を用いて標識を試みた (Terada *et al.*, 2007) (Fig. 2-1)。また、重合の核となる F-actin と、それに重合する actin (BODIPY-FL actin) を区別するために、重合核の F-actin については、1分子蛍光イメージングでよく用いられる Cy3 を用いて、10%程度のラベル率で標識を行った。

2-2. 実験方法

2-2-1. 使用した試薬および機器

試薬

Acetone	和光純薬工業
Acrylamide	和光純薬工業
2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol acetate (Tris base)	和光純薬工業
Ammonium peroxodisulfate	和光純薬工業
ATP	Roche
Biotin-PEAC ₅ -Maleimide	同仁化学研究所
BODIPY-FL iodoacetamide	ThermoFisher Scientific
CaCl ₂	和光純薬工業
Cy3 Maleimide Mono-reactive	GE ヘルスケア バイオサイエンス
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	和光純薬工業
Glycine	和光純薬工業
HCl	和光純薬工業
HEPES	同仁化学研究所
KCl	和光純薬工業
KH ₂ PO ₄	和光純薬工業
KOH	関東化学
<i>N,N</i> -Methylenebis(acrylamide)	和光純薬工業
MgCl ₂	和光純薬工業
NaHCO ₃	和光純薬工業
NaN ₃	和光純薬工業

Phalloidin
Precision Plus Protein™ All Blue Standards
Sodium dodecyl sulfate (SDS)
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine

ThermoFisher Scientific
Bio-Rad
和光純薬工業
和光純薬工業

機器

O₂ プラズマリアクター (FEMTO plasma system)
カバーガラス (18 × 18 mm, 厚さ 0.12–0.17 mm)
ガラスキャピラリー (MICROCAPS, 100 μL)
ストップウォッチ
スライドガラス (76 × 26 mm, 厚さ 0.9–1.2 mm)
超遠心機 (Optima L-90K)
低自家蛍光イマージョンオイル
定性濾紙 (grade: 2, size: 55 × 55 mm)
テフロン棒
透析チューブ (Spectra/Por 1)
ナイロンガーゼ
分光光度計 (V-670)
分離用小型超遠心機 (himac CS 100GXL)
ボールペン替芯 (ボール径 0.38 mm)
マニキュア
ミンチ機
冷却遠心機 (himac CR 21G)

Diener electronic GmbH
松浪硝子工業
DRUMMOND SCIENTIFIC COMPANY
CASIO
松浪硝子工業
BECKMAN COULTER
オリンパス
ADOVANTEC
アズワン
Spectrum Laboratories
ヤリタ医療衛材
ジャスコエンジニアリング
日立工機
三菱鉛筆
ちふれ化粧品
ボニー
日立工機

顕微鏡システム

488 nm レーザー (Sphire488LP-75)
532 nm レーザー (COMPASS315M-100)
EM-CCD カメラ (C9100-13)
Emission filter (FF01-520/35-25)
Emission filter (FF01-593/40-25)
ND filter (MFND-25-1)
外部循環付恒温水槽 (ZL-100)
ダイクロイックミラー (505DRLP)
ダイクロイックミラー (緑・赤同時観察用; 特注)
対物レンズ (UApo 150× OTIRF)
超安定ステージ (Model KS-O)
倒立型顕微鏡 (IX-71)

Coherent
Coherent
浜松ホトニクス
Semrock
Semrock
シグマ光機
タイテック
Omega Optical
朝日分光
オリンパス
中興社製作所
オリンパス

ソフトウェア

画像解析ソフト (ImageJ)
グラフ作成ソフト (KaleidaGraph)

National Institutes of Health
Synergy Software

2-2-2. 鶏の胸肉からアセトンパウダーの調製

調製前日に屠殺した鶏の胸肉から筋膜、脂身、腱を取り除き、ミンチ機でミンチ状にした。得られたミンチに対して、0°Cに冷やした3倍量の Guba-Straub solution (0.3 M KCl, 0.15 M KH₂PO₄, pH 6.4) を加え、10 分間テフロン棒でかき混ぜた。遠心分離 (5,000 rpm, 15 min, 4°C) により得られたペレットに対して、0°C に冷やした超純水を 4 倍量加え、テフロン棒で攪拌後、ナイロンガーゼで濾した。残った肉の塊に対して、4%(w/v) NaHCO₃ を 500 mL、超純水を 4.5 L 加え、1 分ほどテフロン棒で攪拌後、ナイロンガーゼで濾した (この操作を 2 回繰り返した)。次に、0°C に冷やした超純水を 5 L 加え、テフロン棒で攪拌後、ナイロンガーゼで濾した (この操作を 3 回繰り返した)。さらに、0°C に冷やした超純水を 2 L 加え、数時間静置した。遠心分離 (5,000 rpm, 30 min, 4°C) を行い、得られたペレットに対して、0°C に冷やしたアセトンを 2 L 加え、テフロン棒で攪拌後、ナイロンガーゼで濾した (この操作を 3 回繰り返した)。得られたペレットに対して、室温のアセトンを 2 L 加え、10 min 静置した。ナイロンガーゼで濾し、濾紙の上で十分にアセトンを蒸発させ、乾燥後、得られたアセトンパウダーを-30°C で保存した。

2-2-3. アセトンパウダーから G-actin の精製

-30°C で保存したアセトンパウダーを室温に戻した。2.0 g のアセトンパウダーに対して、0°C に冷やした 40 mL の buffer A (20 mM HEPES-KOH pH 7.8, 0.2 mM ATP, 5 mM DTT, 0.2 mM CaCl₂) を加え、30 min 静置した。吸引濾過を行った後、超遠心分離 (40,000 rpm, 60 min, 4°C) し、上清を回収した。回収した上清に対して、終濃度が 50 mM, 2 mM となるように KCl, MgCl₂ を添加し、イオン強度を上昇させ、室温で 90 min 静置して、G-actin から F-actin へと重合させた。さらに、終濃度 0.6 M KCl となるように固体の KCl を加え、30 min 静置後、超遠心分離 (50,000 rpm, 90 min, 4°C) して、ペレットを回収した。回収したペレットに対して、buffer A を 1 mL、0.1 M ATP を 1 μL 加えて溶解させた。1 L の buffer B (20 mM HEPES-KOH pH 7.8, 0.1 mM ATP) を透析外液として、3 日間透析し、イオン強度を低下させることにより、F-actin から G-actin へと脱重合させた (半日に 1 回程度、透析外液を交換した)。透析後、遠心分離 (70,000 rpm, 90 min, 4°C) して、上清を回収し、その体積の 1/300 量の 0.5 M Na₃N を加えた。G-actin の精製度は、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により評価した。

2-2-4. G-actin の濃度の算出

G-actin の吸光度を測定し、その濃度を算出した。G-actin が溶解している溶液には、ATP が含まれているため、通常タンパク質の濃度を測定する 280 nm の吸光度からでは、正確に濃度を決定することができない。そこで、290 nm における吸光度を用いて、G-actin の濃度を求めた。なお、ブランクの測定には buffer B を用いた。

$$\text{G-actin の濃度 (M)} = \frac{A_{290}}{26,600}$$

A_{290} : 290 nm における G-actin の吸光度

26,600: 290 nm における G-actin のモル吸光係数 (/M/cm)

2-2-5. 溶液中における無標識 G-actin の重合能の確認

Actin は、重合してフィラメントを形成すると、粘度が高くなるという性質を持つ。この粘度の相対的な変化を利用して、actin の重合が起こっているかどうか確認する方法として、フォーリングボール法が挙げられる。フォーリングボール法は、actin 溶液を入れたガラスキャピラリー（内径 1.05 mm、長さ 116 mm）内をボール（ボールペンの先の金属の球、直径 0.38 mm）を落下させ、その落下に要する時間をストップウォッチで測定するという手法である。Actin の重合が進行してフィラメントが形成されると、溶液の粘度が高くなるため、ボールの落下時間が長くなる。

2-2-3 で調製した無標識の G-actin に対して、KCl を終濃度が 100 mM となるように加えた溶液をキャピラリーに入れ、ボールの落下時間の経時的な変化を調べた。

2-2-6. actin の Cy3、biotin、BODIPY-FL 標識

-30°C で保存した Cy3 Maleimide Mono-reactive (Fig. 2-2)、Biotin-PEAC₅-Maleimide (Fig. 2-3)、BODIPY-FL iodoacetamide (Fig. 2-4) を室温に戻した。2-2-3 で調製した G-actin 1 mL に対して、終濃度 0.9 mM ATP、100 mM KCl、2 mM MgCl₂ となるように加え、室温で 120 min 静置し、G-actin から F-actin へと重合させた。調製した F-actin のうち 900 μL (Cy3、biotin、BODIPY-FL 標識用にそれぞれに 300 μL ずつ) を用いて、標識を行った。DMSO に溶解させた Cy3 Maleimide Mono-reactive、Biotin-PEAC₅-Maleimide をモル比で actin の 0.2 倍量、BODIPY-FL iodoacetamide を 10 倍量となるように加え、室温で 60 min 反応させた。その後、DTT を終濃度 3 mM となるように加えて、反応を停止させた。遠心分離 (70,000 rpm, 90 min, 4°C) して回収した、それぞれのペレットに対して、buffer B を 300 μL、0.1 mM ATP を 0.3 μL 加えて溶解させた。1 L の buffer B で 1 晩透析し、F-actin から G-actin へと脱重合させた。透析後、遠心分離 (70,000 rpm, 90 min, 4°C) して、上清を回収した。

2-2-7. 標識された G-actin の濃度およびラベル率の算出

標識された G-actin の吸収スペクトルを測定し、濃度およびラベル率を決定した。Biotin は 290 nm に吸収を持たないのに対し、Cy3 および BODIPY-FL は吸収を有する。そのため、Cy3 および BODIPY-FL で標識された G-actin については、蛍光色素の吸収の寄与を考慮し、その濃度を決定した。なお、ブランクの測定には buffer B を用いた。

(1) Cy3 G-actin の濃度およびラベル率の算出

Cy3 G-actin の濃度およびラベル率は、次のように決定した。

$$\text{Cy3 の濃度 (M)} = \frac{A_{506}}{155,000}$$

A_{506} : 506 nm における Cy3 の吸光度

155,000: 506 nm における Cy3 のモル吸光係数 (/M/cm)

$$\text{G-actin の濃度 (M)} = \frac{A_{290} - A_{506} \times 0.065}{26,600}$$

A_{290} : 290 nm における吸光度

0.065: 290 nm における Cy3 の吸収の寄与率

26,600: 290 nm における G-actin のモル吸光係数 (/M/cm)

$$\text{ラベル率} = \frac{\text{Cy3 の濃度}}{\text{G-actin の濃度}} \times 100$$

(2) biotin G-actin の濃度の算出

Biotin G-actin の濃度は、次のように決定した。

$$\text{G-actin の濃度 (M)} = \frac{A_{290}}{26,600}$$

A_{290} : 290 nm における G-actin の吸光度

26,600: 290 nm における G-actin のモル吸光係数 (/M/cm)

(3) BODIPY-FL G-actin の濃度およびラベル率の算出

BODIPY-FL G-actin の濃度およびラベル率は、次のように決定した。

$$\text{BODIPY-FL の濃度 (M)} = \frac{A_{554}}{47,700}$$

A_{554} : 554 nm における BODIPY-FL の吸光度

47,700: 554 nm における BODIPY-FL のモル吸光係数 (/M/cm)

$$\text{G-actin の濃度 (M)} = \frac{A_{290} - A_{554} \times 0.031}{26,600}$$

A_{290} : 290 nm における吸光度

0.031: 290 nm における BODIPY-FL の吸収の寄与率

26,600: 290 nm における G-actin のモル吸光係数 (/M/cm)

$$\text{ラベル率} = \frac{\text{BODIPY-FL の濃度}}{\text{G-actin の濃度}} \times 100$$

2-2-8. 溶液中における Cy3 G-actin の重合能の確認

2-2-6 で調製した Cy3 G-actin の溶液中における重合能の確認を行った。重合反応溶液には、F-actin の脱重合を阻害することが知られている phalloidin (タマゴテングタケ由来の毒) を添加し、生成する F-actin の構造を安定化させた。

1 μM G-actin (0.5 μM Cy3 G-actin, 0.5 μM biotin G-actin) を、3 μM phalloidin (G-actin に対して3倍量) を添加した F-buffer (20 mM PIPES-KOH pH 6.8, 1 mM ATP, 100 mM KCl, 2 mM MgCl_2) 中で、室温で 120 min 静置した。その後、この調製した溶液を F-buffer で 10 倍希釈した。この希釈溶液を 2 μL 程度スライドガラス上に滴下し、カバーガラスをかぶせ、マニキュアで封をした後、全反射照明蛍光顕微鏡法で観察した。露光時間を 100 ms/frame、EM ゲインを 255、レーザー強度を 75 μW として撮影を行った。

2-2-9. 溶液中における BODIPY-FL G-actin の重合能の確認

2-2-6 で調製した BODIPY-FL G-actin の溶液中における重合能の確認を行った。ここで調製する BODIPY-FL F-actin は、4-2-6 の定常状態における重合の実験に用いるため、actin フィラメントの長さ分布が定常状態に達している必要があった。そこで、1 μM BODIPY-FL G-actin を F-buffer 中で、室温で 2 日間静置した (Kawamura and Maruyama, 1972)。その後の手順は、2-2-8 と同様に行った。ただし、レーザー強度を 7.5 μW とした。

2-3. 実験結果および考察

2-3-1. G-actin の精製

G-actin は、鶏の胸肉より調製したアセトンパウダーから抽出し、重合・脱重合を繰り返すことで精製した。得られた G-actin の精製度を、SDS-PAGE により評価した (Fig. 2-5)。Actin には様々なタンパク質が結合していることが知られているが、ほぼ単一バンドになるまで精製することができた。

2-3-2. G-actin の濃度の算出

得られた G-actin の吸収スペクトルを Fig. 2-6 に示した。2-2-4 に示した式を用いて、G-actin の濃度を求めると、次のような結果となった。

$$\text{G-actin の濃度} = \frac{0.662}{26,600} = 25 \mu\text{M}$$

2-3-3. 溶液中における無標識 G-actin の重合能の確認

フォーリングボール法を用いて、調製した無標識の G-actin に対して、KCl を終濃度が 100 mM となるように加えた溶液をキャピラリーに入れ、ボールの落下時間の経時的な変化を調べた。その結果を Fig. 2-7 に示した。これより、KCl を加えてから時間が経過するにつれて、ボールの落下時間が長くなっていることが分かった。このことは、溶液の粘度が上昇していることを意味しており、actin の重合が進行し、フィラメントが形成されていると考えられる。以上から、調製した無標識の G-actin が、溶液中において重合能を有していることが確認できた。

2-3-4. actin の Cy3、biotin、BODIPY-FL 標識

Actin の 374 番目の Cys 残基は、非常に標識されやすいことが知られている (Yasunaga and Wakabayashi, 2001)。この特性を利用して、actin を蛍光色素および biotin で標識した。標識によって actin の重合能が失われやすいが、本研究では、重合を阻害しないように 100% のラベル率で actin を蛍光標識する必要があるため、その条件を満たす BODIPY-FL iodoacetamide を用いて標識を行った。また、Cy3 による標識は、ラベル率が低ければ重合することが知られており (Hansen *et al.*, 2013)、重合核として用いるために標識を行った。Biotin に関しては、actin を基板に固定する際に必要である。

(1) Cy3 G-actin の濃度およびラベル率の算出

Cy3 G-actin の吸収スペクトルを Fig. 2-8 に示した。2-2-7-(1) に示した式を用いて、Cy3 G-actin の濃度およびラベル率を求めると、次のような結果となった。

$$\text{Cy3 の濃度} = \frac{0.0934}{155,000} = 0.60 \mu\text{M}$$

$$\text{G-actin の濃度} = \frac{0.252 - 0.065 \times 0.0934}{26,600} = 9.3 \mu\text{M}$$

$$\text{ラベル率} = \frac{0.60}{9.3} \times 100 = 6\%$$

(2) biotin G-actin の濃度の算出

Biotin actin の吸収スペクトルを Fig. 2-9 に示した。2-2-7-(2)に示した式を用いて、biotin G-actin の濃度を求めると、次のような結果となった。

$$\text{G-actin の濃度} = \frac{0.337}{26,600} = 13 \mu\text{M}$$

(3) BODIPY-FL G-actin の濃度およびラベル率の算出

BODIPY-FL actin の吸収スペクトルを Fig. 2-10 に示した。2-2-7-(3)に示した式を用いて、BODIPY-FL G-actin の濃度およびラベル率を求めると、次のような結果となった。

$$\text{BODIPY-FL の濃度} = \frac{0.614}{47,700} = 13 \mu\text{M}$$

$$\text{G-actin の濃度} = \frac{0.369 - 0.031 \times 0.614}{26,600} = 13 \mu\text{M}$$

$$\text{ラベル率} = \frac{13}{13} \times 100 = 100\%$$

2-3-5. 溶液中における Cy3 G-actin の重合能の確認

調製したサンプルを顕微鏡で観察した結果を Fig. 2-11 に示した。フィラメントが観察されたことから、既報 (Hansen *et al.*, 2013) 通り、低いラベル率 (6%) で Cy3 標識された G-actin の溶液中での重合が確認できた。

2-3-6. 溶液中における BODIPY-FL G-actin の重合能の確認

調製したサンプルを顕微鏡で観察した結果を Fig. 2-12 に示した。フィラメントが観察されたことから、100%のラベル率で BODIPY-FL 標識された G-actin の溶液中での重合が確認できた。

2-4. 小括

溶液中で調製した Cy3, BODIPY-FL F-actin の蛍光像から、10%程度という低いラベル率で Cy3 標識された actin、および、100%のラベル率で BODIPY-FL 標識された actin の溶液中での重合が確認できた。この結果から、BODIPY-FL actin は、ラベル率が 100%であっても、重合を阻害しないことが確認できた。よって、actin の重合単位を明らかにするという本研究の目的を達成するためには、BODIPY-FL actin を用いるのが適切であると考えられる。

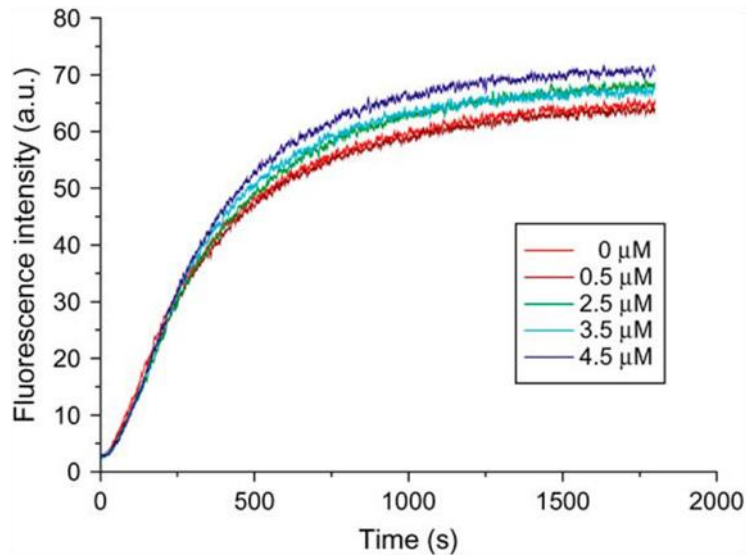


Fig. 2-1 pyrene actin と BODIPY-FL actin の重合

Pyrene actin の濃度を $0.5 \mu\text{M}$ に固定し、BODIPY-FL actin (ラベル率 100%) の濃度を $0\text{--}4.5 \mu\text{M}$ で変化させて、重合させた際の蛍光強度の経時変化 (全体として $5 \mu\text{M}$ となるように無標識の actin で調整している)。 $4.5 \mu\text{M}$ BODIPY-FL actin と重合させた場合の方が、 $5 \mu\text{M}$ の無標識 actin ($0 \mu\text{M}$ BODIPY-FL actin) と重合させた場合よりも、最終的な pyrene の蛍光強度が 10%程度大きくなったが、重合速度は、BODIPY-FL actin の濃度に関わらずほぼ同じであった。このことから、BODIPY-FL は、ラベル率が 100%であっても、actin の重合に大きな影響を与えないことが分かった。

図は、Terada *et al.* (2007)より転載。

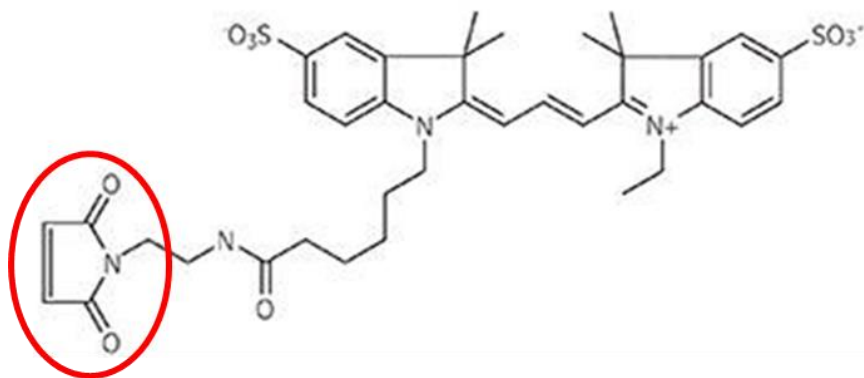


Fig. 2-2 Cy3 Maleimide Mono-reactive の構造

赤丸で示した maleimide 基が Cys 残基の側鎖と反応する。図は、GE ヘルスケア バイオサイエンスのホームページ (<http://www.gelifesciences.co.jp/catalog/0439.html>) を改変。

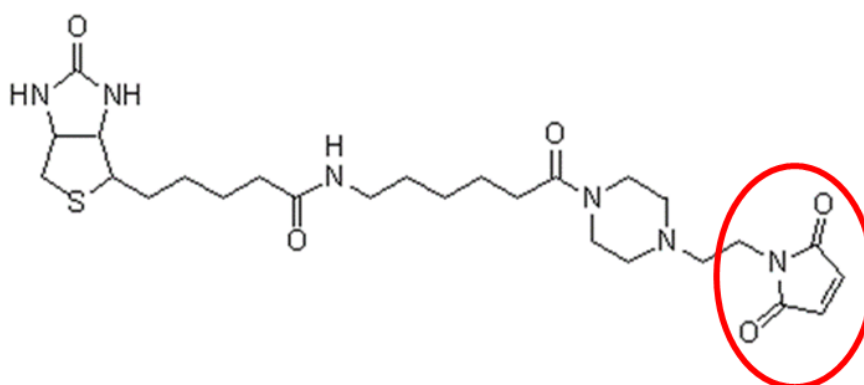


Fig. 2-3 Biotin-PEAC₅-Maleimide の構造

赤丸で示した maleimide 基が Cys 残基の側鎖と反応する。図は、同仁化学研究所のホームページ (http://dominoweb.dojindo.co.jp/goodsr7.nsf/View_Display/B299?OpenDocument) を改変。

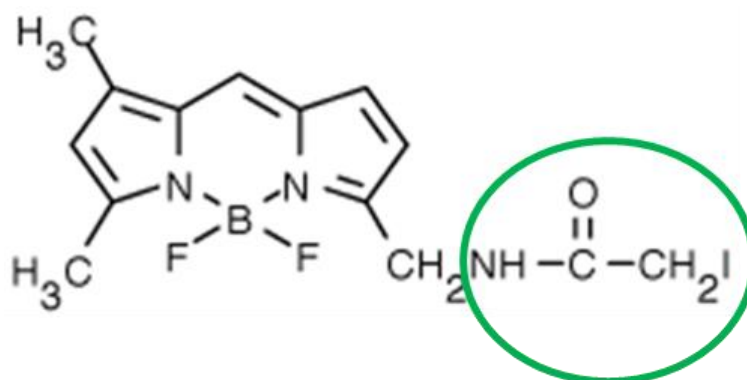


Fig.2-4 BODIPY-FL iodoacetamide の構造

緑丸で示した iodoacetamide 基が Cys 残基の側鎖と反応する。図は、ThermoFisher Scientific のホームページ (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/D6003>) を改変。

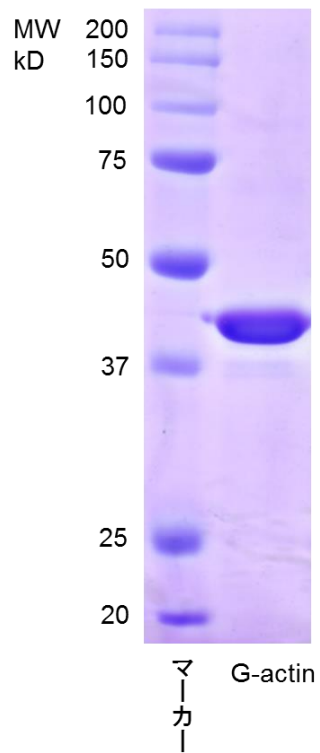


Fig. 2-5 SDS-PAGE の結果

Actin の質量は、42 kDa。ほぼ単一バンドまで精製することができた。

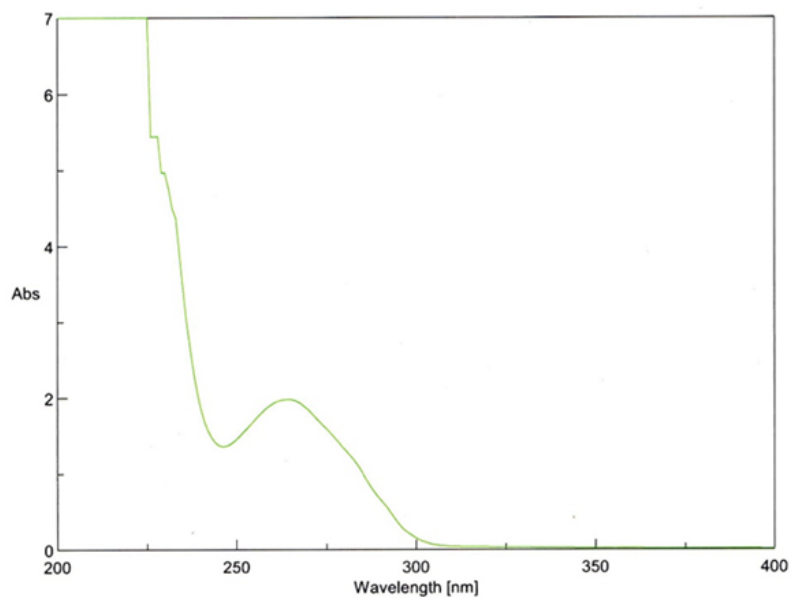


Fig. 2-6 G-actin の吸収スペクトル

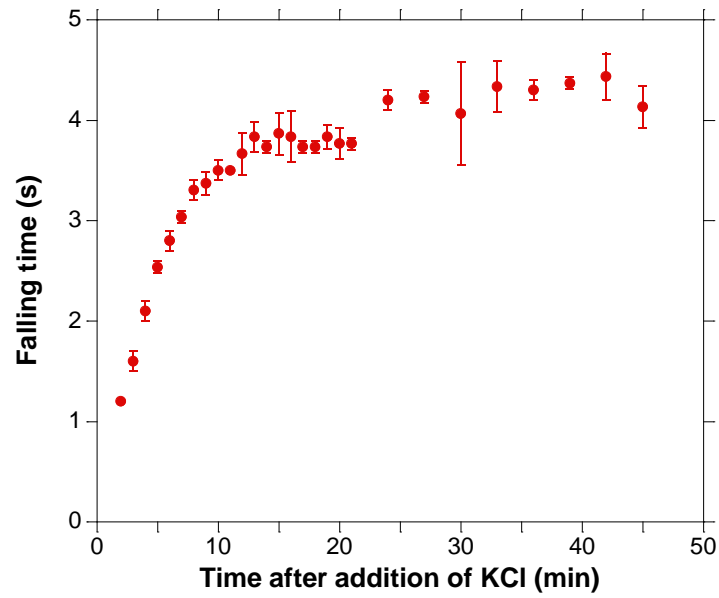


Fig. 2-7 フォーリングボール法による **actin** の重合能の確認 ($n = 3$)

KClを加えてから時間が経過するにつれて、ボールの落下時間が1 s程度から4 s程度まで増加したことから、溶液中における **actin** の重合が確認できた。エラーバーは、標準偏差を示す。

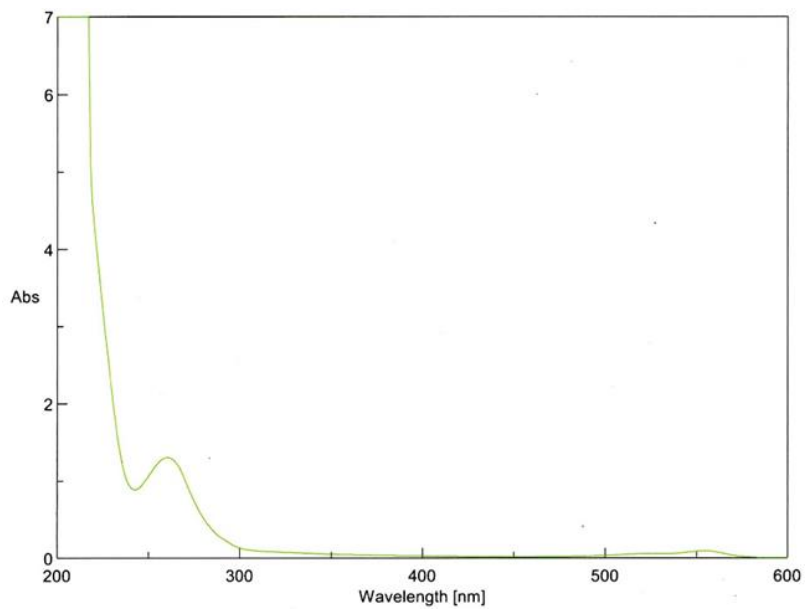


Fig. 2-8 Cy3 G-actin の吸収スペクトル

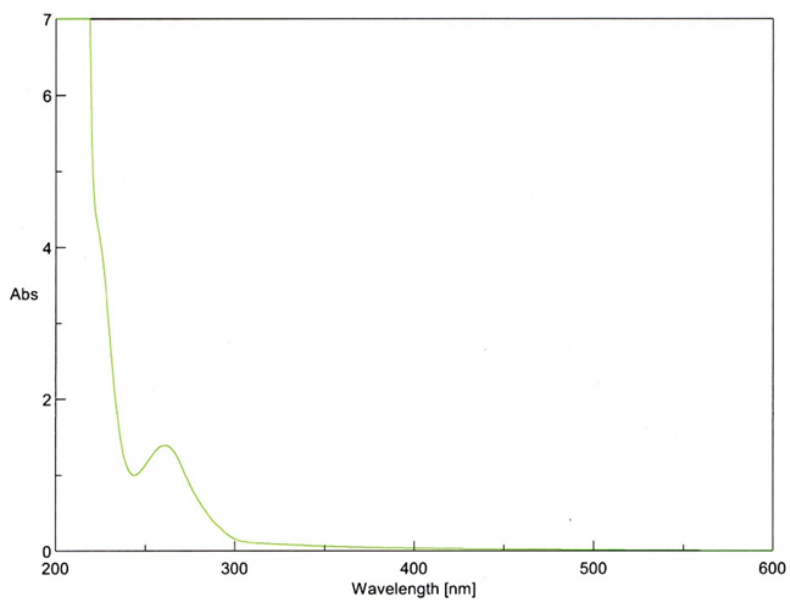


Fig. 2-9 biotin G-actin の吸収スペクトル

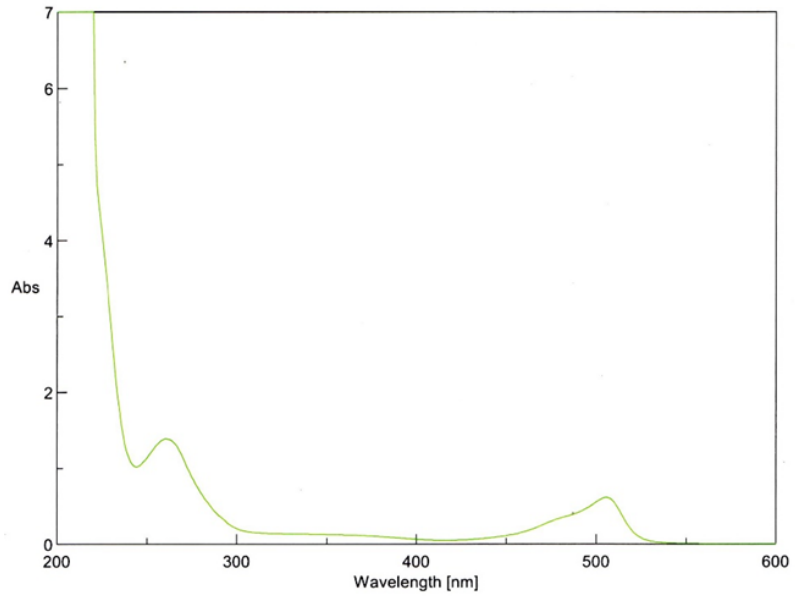


Fig. 2-10 BODIPY-FL G-actin の吸収スペクトル

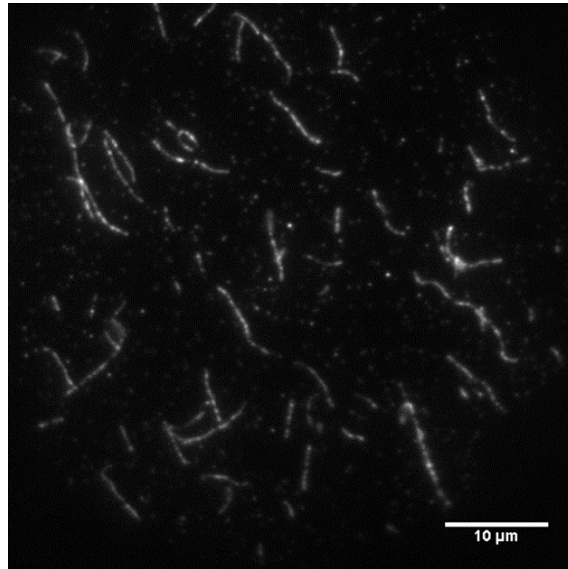


Fig. 2-11 溶液中で調製した Cy3 F-actin の蛍光像

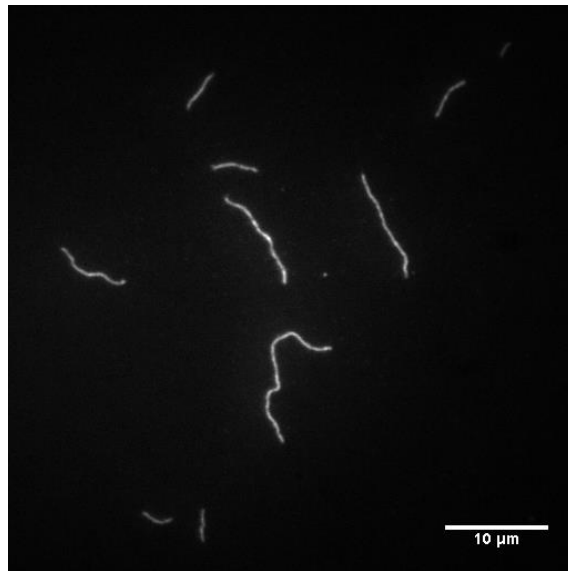


Fig. 2-12 溶液中で調製した BODIPY-FL F-actin の蛍光像

第3章 カバーガラス上および LZMW 内における actin の伸長

3-1. 序文

第2章において、100%のラベル率で BODIPY-FL 標識された actin の溶液中における重合が確認できた。しかし、基板上などの物理的に制限された領域において、同様に actin が重合するかどうかは確認されていない。そこで、本章では、actin 重合過程の1分子蛍光イメージングに先立ち、カバーガラス上および LZMW 内において、100%のラベル率で BODIPY-FL 標識された actin が伸長するかどうかの検討を行った。

3-2. 実験方法

3-2-1. 使用した試薬および機器

試薬

Acetylated BSA	Sigma-Aldrich
ATP	Roche
Biotin-PEAC ₅ -Maleimide	同仁化学研究所
BODIPY-FL iodoacetamide	ThermoFisher Scientific
Catalase	Sigma-Aldrich
Cy3 Maleimide Mono-reactive	GE ヘルスケア バイオサイエンス
DMSO	和光純薬工業
DTT	和光純薬工業
EZ-Link Maleimide-PEG ₂ -Biotin	ThermoFisher Scientific
Glucose	和光純薬工業
Glucose oxidase	Sigma-Aldrich
HEPES	同仁化学研究所
KCl	和光純薬工業
KOH	関東化学
Methylcellulose	ナカライテスク
MgCl ₂	和光純薬工業
Phalloidin	ThermoFisher Scientific
PD10 column	GE ヘルスケア バイオサイエンス
PIPES	同仁化学研究所
Poly(vinylphosphonic acid), 30% Soln.	Polysciences
Streptavidin	ThermoFisher Scientific

機器

O ₂ プラズマリアクター (FEMTO plasma system)	Diener electronic GmbH
エアロダスター	エーゼット
オーブン (SS-K-300)	いすゞ製作所
カバーガラス (18 × 18 mm, 厚さ 0.12–0.17 mm)	松浪硝子工業
恒温槽 (ecoline 003)	アーンスト・ハンセン
スぺーサー (ルミラー, 厚さ 50 μm)	東レ
スライドガラス (76 × 26 mm, 厚さ 0.9–1.2 mm)	松浪硝子工業
注射針 (BD ロードーズ 30G: 0.03 mm)	Becton, Dickinson and Company
低自家蛍光イメージジョンオイル	オリンパス
マニキュア	ちふれ化粧品

顕微鏡システム

488 nm レーザー (Sphire488LP-75)	Coherent
532 nm レーザー (COMPASS315M-100)	Coherent
EM-CCD カメラ (C9100-13)	浜松ホトニクス
Emission filter (FF01-520/35-25)	Semrock
Emission filter (FF01-593/40-25)	Semrock
ND filter (MFND-25-1)	シグマ光機
外部循環付恒温水槽 (ZL-100)	タイテック
ダイクロイックミラー (505DRLP)	Omega Optical
ダイクロイックミラー (緑・赤同時観察用; 特注)	朝日分光
対物レンズ (UApo 150× OTIRF)	オリンパス
超安定ステージ (Model KS-O)	中興社製作所
倒立型顕微鏡 (IX-71)	オリンパス

ソフトウェア

画像解析ソフト (ImageJ)	National Institutes of Health
グラフ作成ソフト (KaleidaGraph)	Synergy Software

3-2-2. actin の調製および標識

Actin の調製および標識は、第 2 章で述べた手法で行った。

3-2-3. 試薬の調製

(1) 基板固定用試薬の調製

Biotin 化 BSA は、以下の方法で調製した。まず、Acetylated BSA を HKM buffer (25 mM HEPES-KOH pH 7.4, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂) に 6.25 mg/mL となるように溶解させた。そこに、DMSO に溶解した EZ-Link Maleimide-PEG₂-Biotin を添加し (BSA : biotin = 1 : 20)、90 分間室温で放置した。Biotin 化された BSA は、HKM buffer で平衡化した PD-10 column を用いて精製し、最終濃度が 3 mg/mL となるように HKM buffer で希釈した。Biotin 化 BSA の溶液は、分注後、液体窒素で急速凍結し、-30°C で保存した。

Streptavidin は、0.33 mg/mL となるように超純水に溶解させた後、液体窒素で急速凍結して、-30°C で保存した。

(2) 顕微鏡観察用試薬の調製

蛍光イメージングに用いられる蛍光色素は、観察溶液中の溶存酸素の影響により、退色が速い場合が多い。そのため、観察に必要な時間スケールにおいて、安定した蛍光を保つことが難しい。そこで、その溶存酸素を取り除くために、GODCAT (glucose、glucose oxidase、catalase を用いた酸素除去系) がよく用いられる (Aitken *et al.*, 2008) (Fig. 3-1)。

Glucose は、450 mg/mL となるように超純水に溶解させた後、液体窒素で急速凍結して、-30°C で保存した。Glucose oxidase は、5,000 unit/mL となるように超純水に溶解させた後、液体窒素で急速凍結して、-30°C で保存した。Catalase は、5,000 unit/mL となるように超純水に溶解させた後、液体窒素で急速凍結して、-30°C で保存した。

DTT は、1 M となるように超純水に溶解させた後、液体窒素で急速凍結して、-30°C で保存した。

3-2-4. LZMW の作製

LZMW の作製は、リフトオフ法 (Fig. 3-2) を用いて、早稲田大学理工学術院 谷井研究室にて行われた。用いた LZMW は、石英ガラスに蒸着したアルミニウム薄膜 (厚さ 50 nm) 上に、可視光の波長よりも細い幅のスリット (幅 50 nm、長さ 50 μm、ガラスへの掘り下げ深さ 30 nm) を多数配列した基板である (Fig. 3-3)。

3-2-5. カバーガラスおよび LZMW の表面処理

(1) カバーガラスの表面処理

カバーガラス表面の蛍光性の不純物を除去するため、プラズマアッシャーを用いて、15 分間 O₂ プラズマ処理を施した。

(2) LZMW の表面処理 (PVPA 処理)

LZMW 基板のアルミニウム部分は、タンパク質を吸着しやすい。基板内に actin を固定し、重合させるためには、この非特異的な吸着を防止する必要がある。そこで、poly(vinylphosphonic acid) (PVPA) を用いて、アルミニウム表面をコーティングすることで、非特異的な吸着を低減させた (Korlach *et al.*, 2008) (Fig. 3-4)。

まず、プラズマアッシャーを用いて、基板表面を 15 分間 O₂ プラズマ処理し、アルミニウム表面を酸化させた。2% (v/v) PVPA 溶液 (30% (v/v) PVPA 溶液 0.3 mL と超純水 4.2 mL を混合して調製) を調製し、90°C の湯浴で 1 分間加熱した。それに基板を浸漬させ、90°C の湯浴で 2 分間反応させ、アルミニウム表面に PVPA を結合させた。その後、超純水で洗浄し、エアロダスターで乾燥させた。さらに、80°C のオーブン中で 20 分間加熱し、アルミニウムと PVPA の結合を強固にした。

3-2-6. カバーガラス上における Cy3 F-actin から BODIPY-FL actin の伸長

カバーガラス上で actin が伸長するかどうかの検討を行った。なお、2-2-8 で調製した Cy3 F-actin を重合の核となるフィラメントとして用いた。また、LZMW を用いる際に、Cy3 F-actin そのままでは長く、基板に固定することが困難である。そこで、LZMW で実験を行うための準備として、注射針でピペッティングして短く切断したものを用いて実験を行った。

最終溶液に含まれている actin は、BODIPY-FL で標識したものしかないため、カバーガラス上に固定することができず、蛍光像を撮影できない。そのため、methylcellulose を加え、そのメッシュ構造により、重合した F-actin の Z 軸方向のブラウン運動を制限し、カバーガラス表面付近へ押さえ付けるといった方法をとった。

スライドガラス、O₂ プラズマ処理を施したカバーガラス、スぺーサーを用いて、フローセルを作製 (Fig. 3-5) し、観察試料を調製した。まず、3.0 mg/mL biotin 化 BSA を 20 μ L フローセルに流し入れ、カバーガラスに biotin 化 BSA を吸着させた。吸着後、F-buffer を 30 μ L 流して、未吸着の biotin 化 BSA を洗い流した。次に、0.33 mg/mL streptavidin を 20 μ L 流し入れ、biotin 化 BSA と結合させた。結合後、F-buffer を 30 μ L 流して、未結合の streptavidin を洗い流した。さらに、重合の核となる Cy3 F-actin を 20 μ L 流し入れ、biotin-streptavidin 結合を介して基板上へ固定させた。固定後、F-buffer を 30 μ L 流して、固定されていない Cy3 F-actin を洗い流した。最後に、最終溶液 (250 nM BODIPY-FL G-actin, 酸素除去酵素系 (4.5 mg/mL glucose, 50 unit/mL glucose oxidase, 50 unit/mL catalase), 10 mM DTT, 5% (w/v) methylcellulose in F-buffer) を 30 μ L 流し入れた。その後、カバーガラスの周囲をマニキュアで封をした。

試料を観察するための光学系を Fig. 3-6 に示す。顕微鏡は倒立型顕微鏡 (IX-71)、対物レンズは油浸レンズ (UApo 150 \times OTIRF) を用いた。488, 532 nm のレーザー光 (Sphire488LP-75, COMPASS315M-100) は、投光管を通り、顕微鏡のターレット内に設置したダイクロイックミラー (505DRLP, 特注) で反射後、対物レンズでの全反射により発生するエバネッセント場を利用して、試料を励起した (全反射照明)。蛍光分子からのシグナルは、エミッションフィルター (FF01-520/35-25, FF01-593/40-25) 通過後、EM-CCD (Electron Multiplying Charge Coupled Device) カメラ (C9100-

13) を用いて検出した。

まず、532 nm のレーザー光を照射し、Cy3 actin の蛍光を観察した。次に、488 nm のレーザー光を照射し、BODIPY-FL actin の蛍光を観察した。レーザー強度は、75 μ W (Cy3 actin 観察時)、7.5 μ W (BODIPY-FL actin 観察時) とした。観察は、EM ゲインを 255、露光時間を 100 ms/frame とし、最終溶液を加えた時点を 0 分として、それから 5 分ごとに BODIPY-FL actin の蛍光像を撮影した。

3-2-7. LZMW 内における Cy3 F-actin から BODIPY-FL actin の伸長

LZMW 内で actin が伸長するかどうかの検討を行った。また、2-2-8 で調製した Cy3 F-actin を重合の核となるフィラメントとして用いた。ただし、Cy3 F-actin そのままでは長く、LZMW 内に固定することが困難であるため、注射針で 10 回ピペッティングして短く切断したものを用いた。

スライドガラス、PVPA 処理を施した LZMW、スペーサーを用いて、フローセルを作製 (Fig.3-5) し、観察試料を調製した。まず、3.0 mg/mL biotin 化 BSA を 20 μ L フローセルに流し入れ、LZMW 内に biotin 化 BSA を吸着させた。吸着後、F-buffer を 30 μ L 流して、未吸着の biotin 化 BSA を洗い流した。次に、0.33 mg/mL streptavidin を 20 μ L 流し入れ、biotin 化 BSA と結合させた。結合後、F-buffer を 30 μ L 流して、未結合の streptavidin を洗い流した。さらに、重合の核となる Cy3 F-actin (10 回ピペッティングして短く切断したもの) を 20 μ L 流し入れ、biotin-streptavidin 結合を介して基板上へ固定させた。固定後、F-buffer を 30 μ L 流して、固定されていない Cy3 F-actin を洗い流した。最後に、最終溶液 (250 nM BODIPY-FL G-actin, 酸素除去酵素系 (4.5 mg/mL glucose, 50 unit/mL glucose oxidase, 50 unit/mL catalase), 10 mM DTT, 5% (w/v) methylcellulose in F-buffer) を 30 μ L 流し入れた (Fig. 3-7)。その後、マニキュアで封をした。

試料の観察は、3-2-6 と同様にして行った。ただし、ダイクロイックミラーで反射後、対物レンズを通過することで試料に照射した (落射照明)。また、試料を観察する前に、ハロゲンランプを照射し、LZMW の位置を確認した (Fig. 3-3)。レーザー強度は、75 μ W (Cy3 actin、BODIPY-FL actin 観察時で共通) とした。

3-2-8. 伸長速度の算出

伸長が観察できたフィラメントについて、ImageJを用いて、蛍光像を撮影した5分ごとの長さを測定した。その結果に対して、横軸 x を時間 (min)、縦軸 y をフィラメントの長さ (μm)としてプロットした。これを次式でフィッティングし、その傾き m_1 ($\mu\text{m}/\text{min}$)を伸長速度とした。

$$y = m_1 \cdot x + m_2$$

このようにして求めた伸長速度のヒストグラム (横軸 x を伸長速度 ($\mu\text{m}/\text{min}$)、縦軸 y をフィラメントの数) を作成し、次の正規分布の式でフィッティングし、平均伸長速度 m_4 ($\mu\text{m}/\text{min}$)を算出した。

$$y = m_3 \cdot \exp\left(\frac{-(x - m_4)^2}{2 \cdot m_5^2}\right)$$

ここでのグラフの作成およびフィッティングは、KaleidaGraphを用いて行った。

3-3. 実験結果および考察

3-3-1. カバーガラス上における Cy3 F-actin から BODIPY-FL actin の伸長

(1) カバーガラス上における Cy3 F-actin から BODIPY-FL actin の伸長の観察

Fig. 2-11 に示したように、Cy3 F-actin は、10 μm 程度であるため、スリット長 50 μm の LZMW 内に固定することが困難である。そこで、Cy3 F-actin をピペッティングにより断片化し、それが重合の際の核として機能するかどうかの評価を行った。

カバーガラス上において、長いままの Cy3 F-actin (ピペッティング 0 回) から BODIPY-FL actin が伸長する様子を撮影した蛍光像を Fig. 3-8 に示した。同様に、10 回ピペッティングすることにより、1 μm 程度まで短く切断した Cy3 F-actin (Fig. 3-9) から伸長する様子も観察できた (Fig. 3-10)。

(2) 伸長速度の算出および評価

伸長したフィラメントの伸長速度のヒストグラムを Fig. 3-11 に示した。この分布を正規分布の式でフィッティングしたところ、平均伸長速度は、 $0.24 \pm 0.12 \mu\text{m}/\text{min}$ (mean \pm standard deviation (SD)) ($n=68$)と求められた。これを、methylcellulose で Z 軸方向のブラウン運動を抑制することにより、actin の重合をカバーガラス上で観察した先行研究 (Fujiwara *et al.*, 2002) で得られた重合速度定数から算出した重合速度の $0.41 \mu\text{m}/\text{min}$ と比較すると、やや小さい値であった。この原因として、actin をカバーガラス上に固定したため、溶液中よりもその運動が妨げられた可能性や、actin を高いラベル率で蛍光標識したため、重合がやや阻害された可能性などが考えられる。しかし、これらの要因を考慮すると、先行研究とほぼ同等の結果が得られたと言える。

また、フィラメントの伸長速度を、重合の核となる Cy3 F-actin を長いままで用いた場合と、ピペッティングにより短く断片化した場合で分けたヒストグラムを Fig. 3-12 に示した。同様の解析から、平均伸長速度が、Cy3 F-actin を長いままで用いた場合には、 $0.21 \pm 0.10 \mu\text{m}/\text{min}$ (mean \pm SD) ($n=28$)、短く断片化した場合には、 $0.30 \pm 0.16 \mu\text{m}/\text{min}$ (mean \pm SD) ($n=40$)と求められた。両者を比較すると、後者の方がやや大きな値となっていたことから、Cy3 F-actin をピペッティングで断片化することによる BODIPY-FL actin の伸長への悪影響はないと考えられる。

3-3-2. LZMW 内における Cy3 F-actin から BODIPY-FL actin の伸長

(1) LZMW 内における Cy3 F-actin から BODIPY-FL actin の伸長の観察

LZMW 内において、注射針で 10 回ピペッティングすることにより短く切断した Cy3 F-actin (Fig. 3-9) から BODIPY-FL actin が伸長する様子を撮影した蛍光像を Fig. 3-13 に示した。これらの蛍光像から、LZMW 内においても、Cy3 F-actin を核とし、BODIPY-FL actin が伸長することが確認できた。

(2) 伸長速度の算出および評価

伸長したフィラメントの伸長速度のヒストグラムを Fig. 3-14 に示した。この分布を正規分布の式でフィッティングすると、平均伸長速度が、 $0.05 \pm 0.01 \mu\text{m}/\text{min}$ (mean \pm SD) ($n=20$)と求められた。これをカバーガラス上における伸長速度 $0.30 \pm 0.16 \mu\text{m}/\text{min}$ (ピペッティングにより短く断片化した Cy3 F-actin から BODIPY-FL actin が伸長する場合) と比較すると、6 分の 1 程度の値であった。この原因として、actin を LZMW 内に固定したため、カバーガラス上に固定した場合よりもその運動が妨げられた可能性や、actin の基板表面への吸着により、その実効濃度が減少した可能性などが考えられる。しかし、これらの要因を考慮すると、カバーガラス上での実験と比較しても、十分に BODIPY-FL actin が伸長していると考えられる。

3-4. 小括

1分子蛍光イメージングに先立ち、カバーガラス上およびLZMW内において、100%のラベル率でBODIPY-FL標識されたactinの伸長を観察し、その伸長速度を算出した。まず、カバーガラス上における実験では、溶液中での場合と比較して、その速度はやや減少していたものの、十分に伸長していると言える結果が得られた。また、重合の核となるCy3 F-actinをピペッティングにより短く断片化した場合にも、伸長速度の減少は見られず、重合核を断片化することによる悪影響はないことが明らかになった。次に、LZMW内におけるBODIPY-FL actinの伸長速度を、カバーガラス上における断片化したCy3 F-actinからのそれと比較して、LZMW内においても、BODIPY-FL actinが十分に伸長していると結論付けることができた。以上から、Fig. 3-7に示した実験系が問題なく機能することが確認できた。

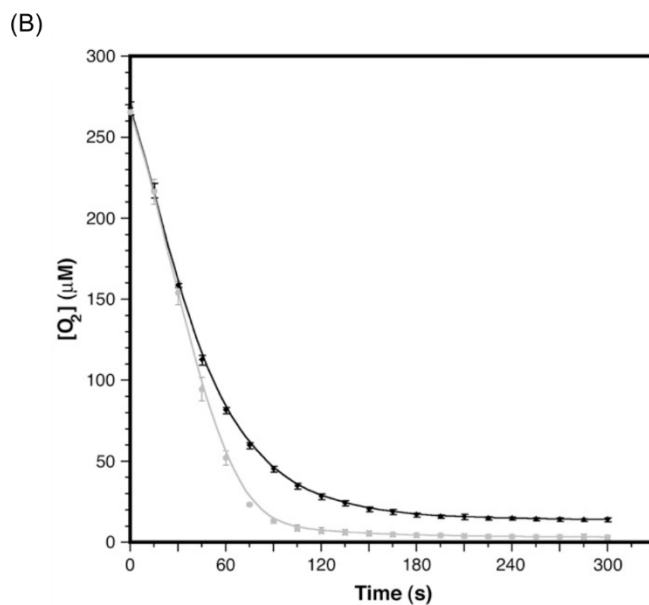
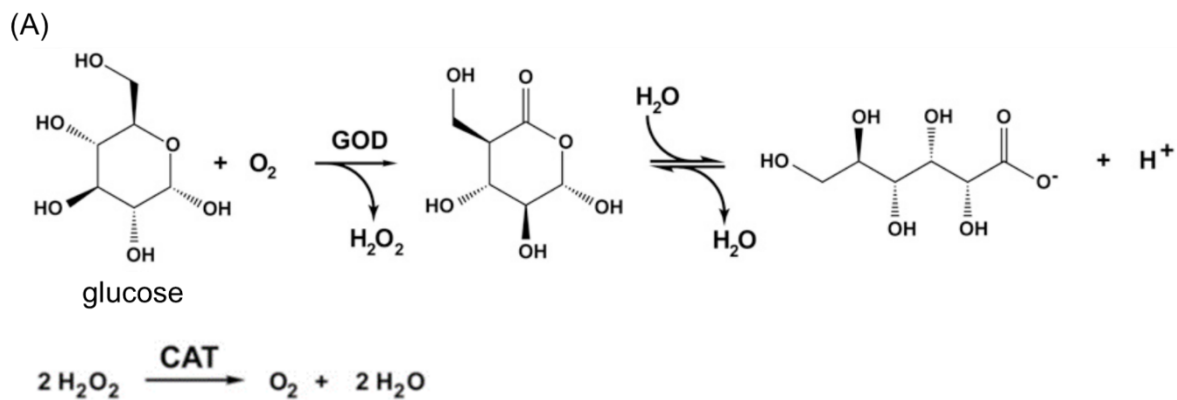


Fig. 3-1 GODCAT による酸素除去機構

(A) GODCAT による酸素除去機構の化学反応の概略図。

(B) 溶存酸素濃度の経時変化 (実線)。

GOD (glucose-oxidase) により、glucose と酸素から過酸化水素が生成する。次に、CAT (catalase) により、過酸化水素が水と酸素に分解される。これらの反応を経るごとに、酸素が 1/2 分子ずつ減少する。これを繰り返すことで、溶液中から酸素がほとんど除去される。

図は、Aitken *et al.* (2008) を改変。

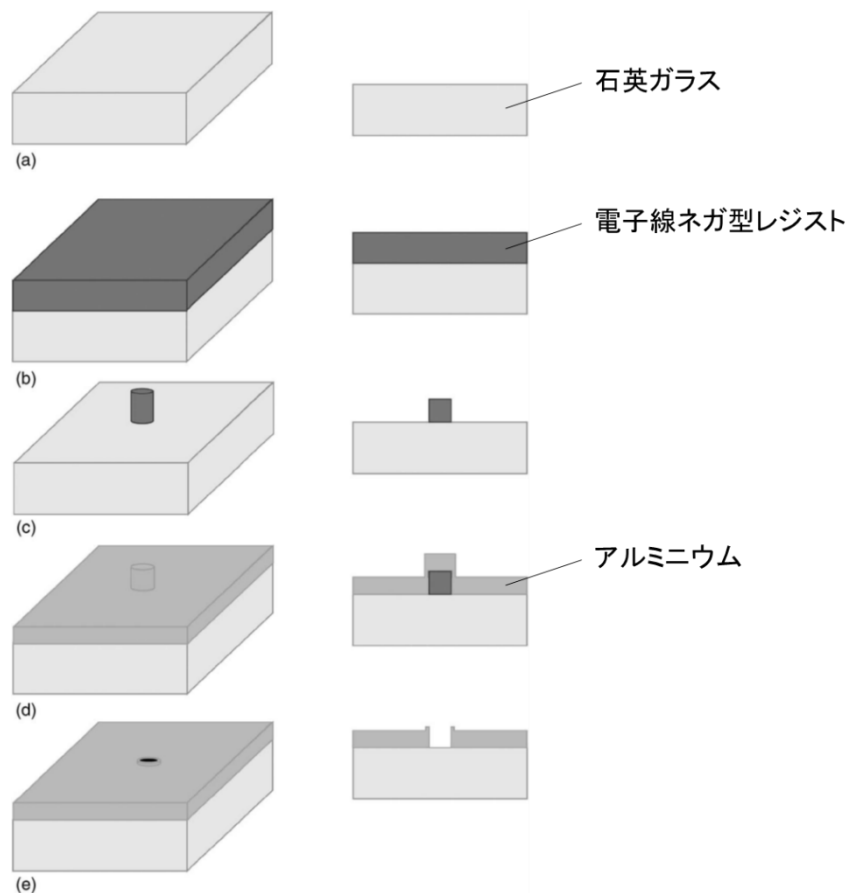


Fig. 3-2 リフトオフ法

(a) 石英ガラス、(b) 電子線ネガ型レジストをスピコート、(c) 電子線パターンニング、(d) アルミニウム薄膜を蒸着、(e) アルミニウム薄膜をエッチング

図は、Foquet *et al.* (2008)を改変。

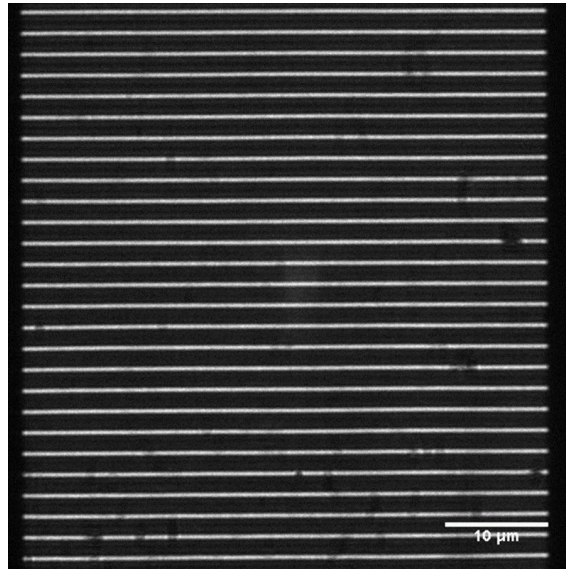


Fig. 3-3 用いた LZMW の構造
幅 50 nm、スリット長 50 μm。

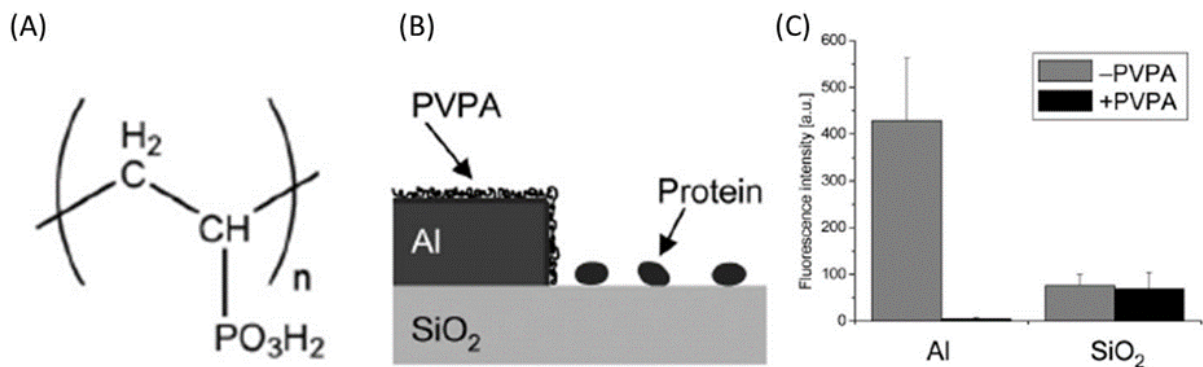


Fig. 3-4 PVPA 処理

(A) PVPA の分子構造。

(B) PVPA によるアルミニウム表面の選択的コーティング。

(C) アルミニウムおよびガラス表面での、蛍光性の latex beads で標識されたタンパク質の蛍光強度比較。アルミニウム表面では、PVPA 処理を施したことにより、蛍光強度が減少したことから、タンパク質の吸着を防ぐことができた。一方で、ガラス表面では、蛍光強度に差は見られず、タンパク質が同程度吸着していた。

図は、Korlach *et al.* (2008)より転載。

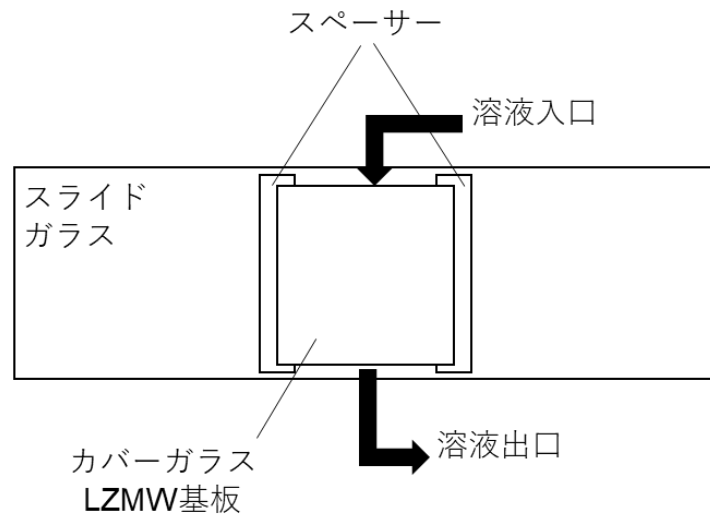


Fig. 3-5 フローセルの模式図

カバーガラス（または LZMW 基板）、スライドガラス、スペーサーを用いて、フローセルを作製して、溶液を順に流し入れた。

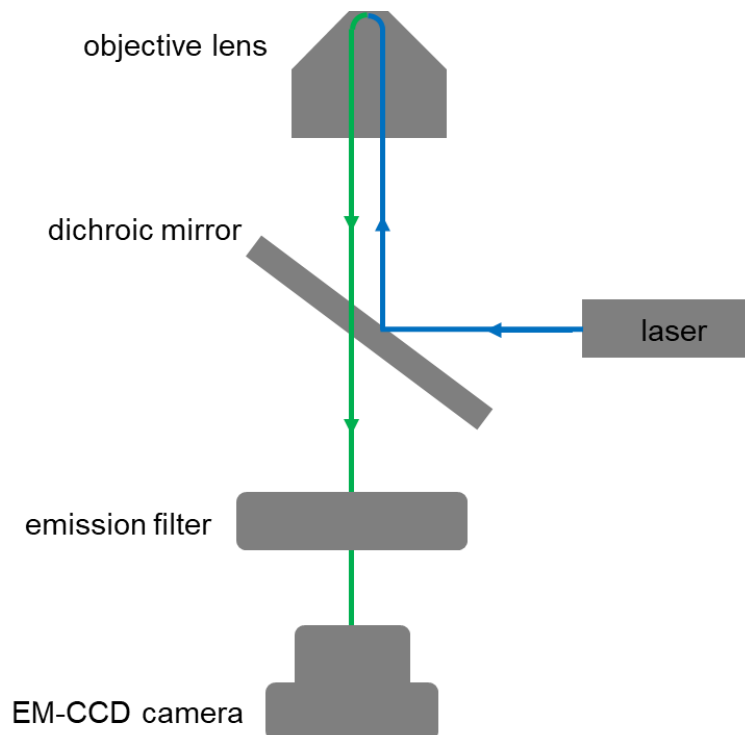


Fig. 3-6 Cy3 actin、BODIPY-FL actin 観察のための光学系の模式図

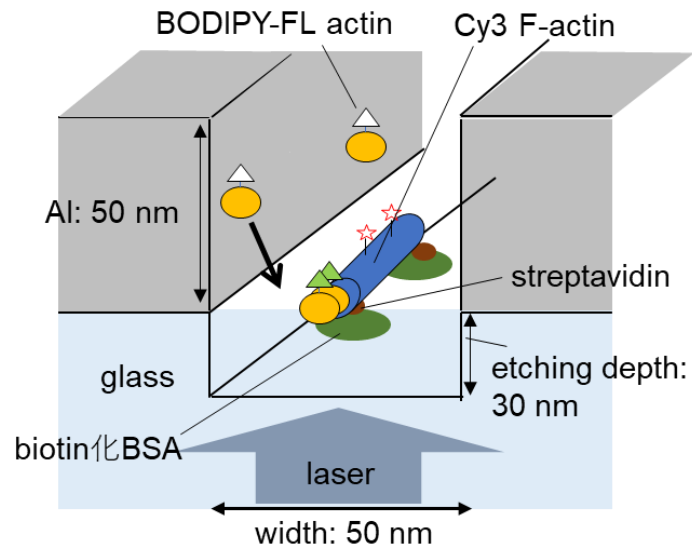


Fig. 3-7 LZMW の実験系の模式図

Biotin 化 BSA および streptavidin を用いて、重合の核となる Cy3 F-actin を LZMW 内に固定し、それに BODIPY-FL actin が重合する様子を観察した。

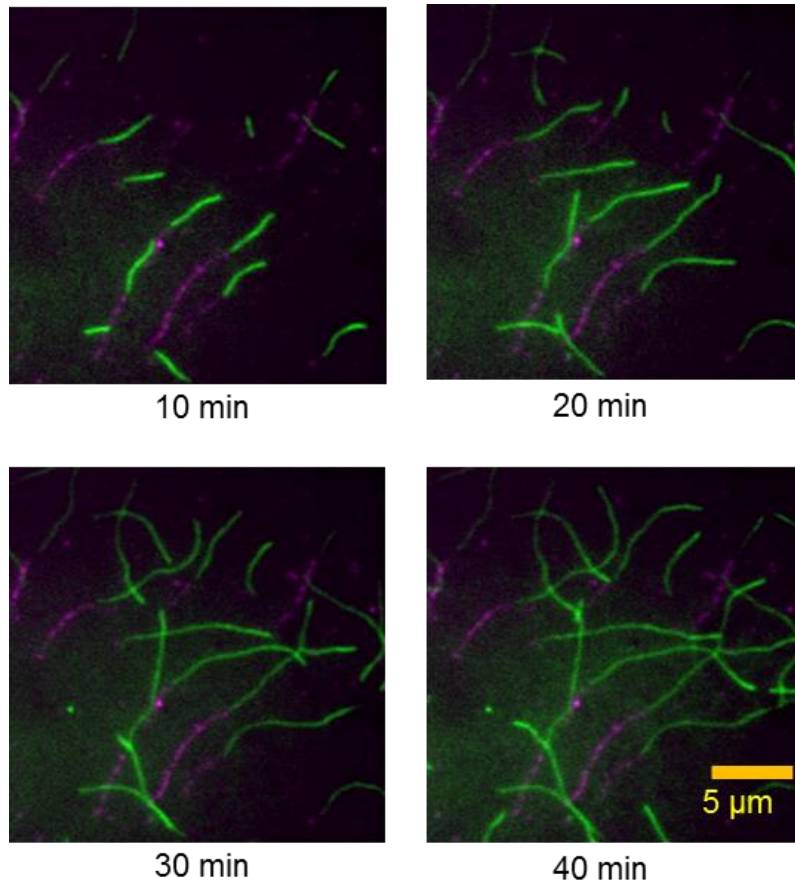


Fig. 3-8 カバーガラス上における Cy3 F-actin (長いまま) から BODIPY-FL actin の伸長
(マゼンタ : Cy3 actin、緑 : BODIPY-FL actin)
長いままの Cy3 F-actin から、250 nM BODIPY-FL actin が伸長している様子が観察された。

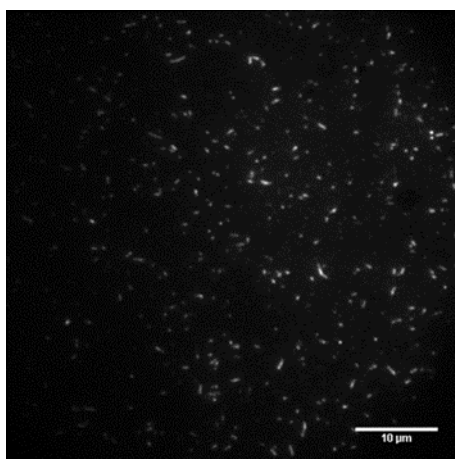


Fig. 3-9 注射針で10回ピペッティングしたことにより短く切断した Cy3 F-actin

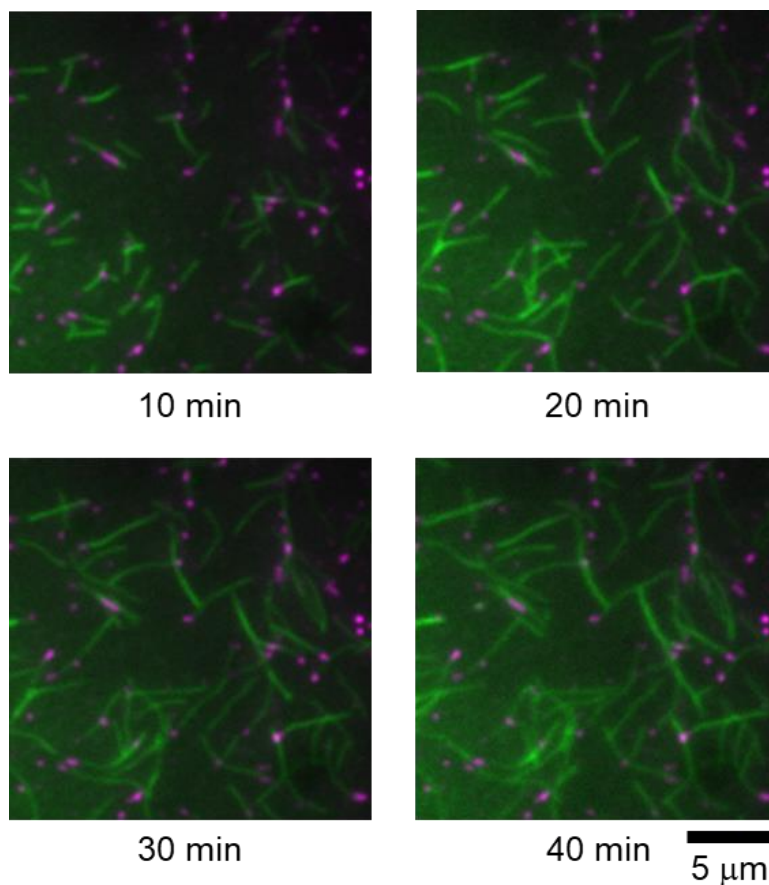


Fig. 3-10 カバーガラス上における Cy3 F-actin (短く断片化) から BODIPY-FL actin の伸長
(マゼンタ : Cy3 actin、緑 : BODIPY-FL actin)

ピペッティングにより短く断片化した Cy3 F-actin から、250 nM BODIPY-FL actin が伸長している様子が観察された。

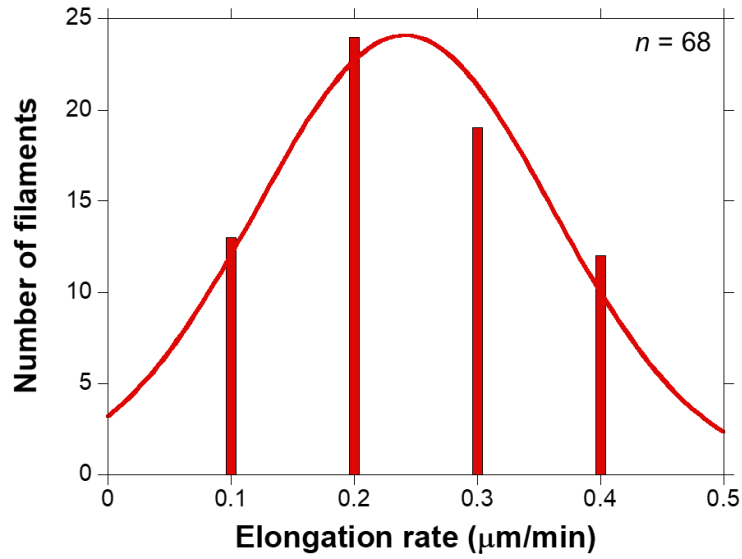


Fig. 3-11 カバーガラス上における BODIPY-FL actin の伸長速度

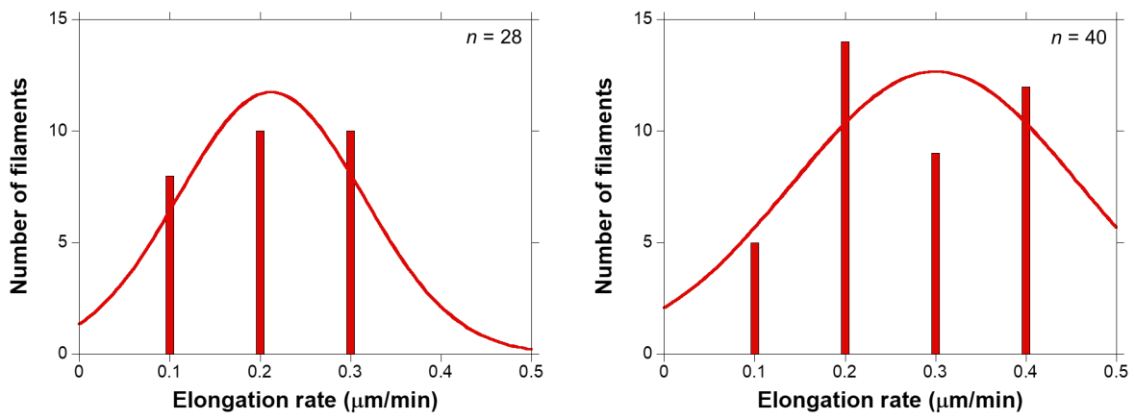


Fig. 3-12 カバーガラス上における BODIPY-FL actin の伸長速度

左は長いままの Cy3 F-actin、右はピペッティングにより短く断片化した Cy3 F-actin を重合の核として用いた場合。

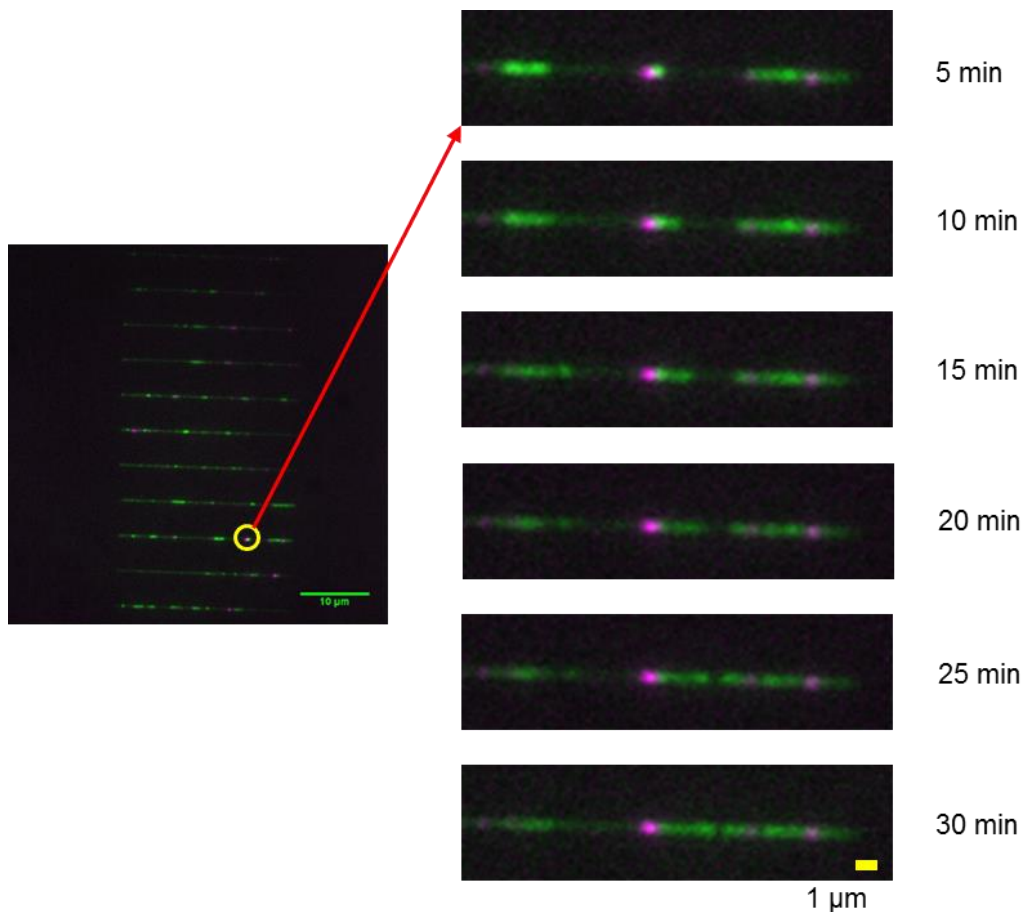


Fig. 3-13 LZMW 内における Cy3 F-actin (短く断片化) から BODIPY-FL actin の伸長
 (マゼンタ : Cy3 actin、緑 : BODIPY-FL actin)

ピペッティングにより短く断片化した Cy3 F-actin から、250 nM BODIPY-FL actin が伸長している様子が観察された。

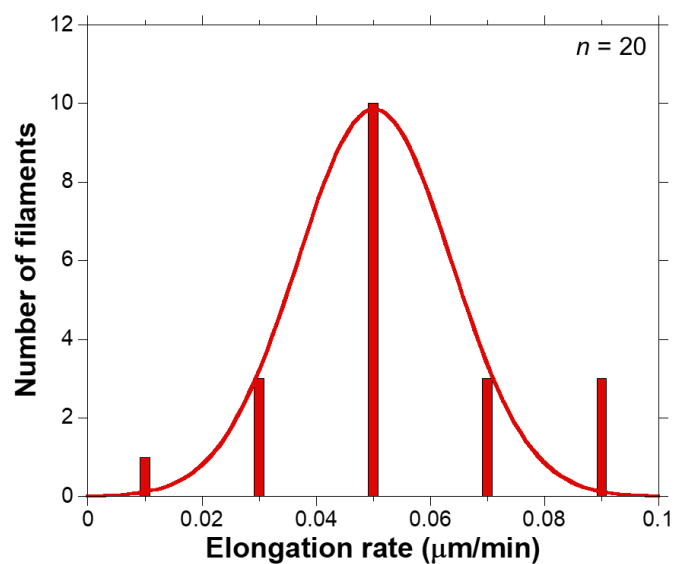


Fig. 3-14 LZMW 内における BODIPY-FL actin の伸長速度

第4章 LZMW 内における actin 重合過程の1分子蛍光イメージング

4-1. 序文

第3章において、100%のラベル率で BODIPY-FL 標識された actin の LZMW 内での重合が確認でき、Fig. 3-7 に示した実験系が問題なく機能することが確かめられた。そこで、本章では、その実験系を用いて、actin 重合過程の1分子蛍光イメージングを行った。

まず、1分子蛍光イメージングを行うことができる条件の検討を行った。その後、actin 重合過程の1分子蛍光リアルタイムイメージングにより、定常状態における重合反応の協同性の検討、および、伸長過程と定常状態における重合単位の比較を行い、actin の重合メカニズムの解明を目指した。

4-2. 実験方法

4-2-1. 使用した試薬および機器

試薬

Acetylated BSA	Sigma-Aldrich
ATP	Roche
Biotin-PEAC ₅ -Maleimide	同仁化学研究所
BODIPY-FL iodoacetamide	ThermoFisher Scientific
Cy3 Maleimide Mono-reactive	GE ヘルスケア バイオサイエンス
DMSO	Sigma-Aldrich
EDTA	同仁化学研究所
EZ-Link Maleimide-PEG ₂ -Biotin	ThermoFisher Scientific
Glycerol	和光純薬工業
HCl	和光純薬工業
HEPES	同仁化学研究所
KCl	和光純薬工業
KOH	関東化学
MgCl ₂	和光純薬工業
Methyl viologen dichloride hydrate (MV)	Sigma-Aldrich
NaOH	関東化学
Phalloidin	ThermoFisher Scientific
PIPES	同仁化学研究所
Protocatechuic acid (PCA)	和光純薬工業
Protocatechuate-3,4-dioxygenase (PCD)	Sigma-Aldrich
PD-10 column	GE ヘルスケアバイオサイエンス
Poly(vinylphosphonic acid), 30% Soln.	Polysciences

Streptavidin
Tris base

ThermoFisher Scientific
和光純薬工業

機器

O₂ プラズマリアクター (FEMTO plasma system)
エアロダスター
オーブン (SS-K-300)
恒温槽 (ecoline 003)
スぺーサー (ルミラー, 厚さ 50 μm)
スライドガラス (76 × 26 mm, 厚さ 0.9–1.2 mm)
注射針 (BD ロードーズ 30G: 0.03 mm)
低自家蛍光イマージョンオイル
マニキュア

Diener electronic GmbH
エーゼット
いすゞ製作所
アーンスト・ハンセン
東レ
松浪硝子工業
Becton, Dickinson and Company
オリンパス
ちふれ化粧品

顕微鏡システム

488 nm レーザー (Sphire488LP-75)
532 nm レーザー (COMPASS315M-100)
EM-CCD カメラ (C9100-13)
Emission filter (FF01-520/35-25)
Emission filter (FF01-593/40-25)
外部循環付恒温水槽 (ZL-100)
ダイクロイックミラー (505DRLP)
ダイクロイックミラー (緑・赤同時観察用; 特注)
対物レンズ (UApo 150× OTIRF)
超安定ステージ (Model KS-O)
倒立型顕微鏡 (IX-71)

Coherent
Coherent
浜松ホトニクス
Semrock
Semrock
タイテック
Omega Optical
朝日分光
オリンパス
中興社製作所
オリンパス

ソフトウェア

画像解析ソフト (Image J)
グラフ作成ソフト (KaleidaGraph)

National Institutes of Health
Synergy Software

4-2-2. actin の調製および標識

Actin の調製および標識は、第 2 章で述べた手法で行った。

4-2-3. 1分子蛍光イメージング用の試薬および基板の調製

(1) 基板固定用試薬の調製

Biotin 化 BSA および streptavidin の調製は、3-2-3-(1)と同様にして行った。

(2) 酸素除去酵素系および酸化剤の調製

Fig. 2-1 で示したように、BODIPY-FL は、その構造的な小ささから、ラベル率が 100%であっても、actin の重合に大きな影響を与えないという利点がある。しかし、退色が速く、蛍光強度が弱いという問題がある (Gall *et al.*, 2011)。これらの問題を改善する方法として、PCA/PCD (PCA、PCD を用いた酸素除去系 ; Fig. 4-1) および MV (還元剤である PCA と結びついて酸素を除去する働きを持つ酸化剤) (Gall *et al.*, 2011) を観察の最終溶液に添加する方法が知られている (Table 4-1)。本研究では、この方法を利用することで、BODIPY-FL の退色を抑えることにした。

PCA は、1 M となるように超純水に溶解させ、NaOH で pH 9.0 に調整した後、液体窒素で急速凍結して、 -30°C で保存した。PCD は、20 μM となるように 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 50% glycerol で溶解させた後、液体窒素で急速凍結して、 -30°C で保存した。MV は、50 mM となるように超純水に溶解させた。

(3) LZMW 基板のコーティング

PVPA コーティングは、3-2-5-(2)と同様にして行った。

4-2-4. 観察条件の検討

(1) 観察試料の調製

実験系は、Fig. 3-7 に示したものをを用いた。スリット幅に関しては、先行研究 (山本, 2014) において、S/N 比が最も良かった 50 nm のものをを用いた。

まず、3.0 mg/mL biotin 化 BSA を 20 μL 流し入れ、LZMW 内に biotin 化 BSA を吸着させた。吸着後、F-buffer を 30 μL フローセルに流して、未吸着の biotin 化 BSA を洗い流した。次に、0.33 mg/mL streptavidin を 20 μL 流し入れ、biotin 化 BSA と結合させた。結合後、F-buffer を 30 μL 流して、未結合の streptavidin を洗い流した。さらに、重合の核となる Cy3 F-actin を 20 μL 流し入れ、biotin-streptavidin 結合を介して基板上へ固定させた。固定後、F-buffer を 30 μL 流して、固定されていない Cy3 F-actin を洗い流した。最後に、最終溶液 (600 nM BODIPY-FL G-actin, 10 mM PCA, 200 nM PCD, 500 μM MV in F-buffer) を 30 μL 流し入れた。その後、マニキュアで封をした。

(2) 試料の観察

試料の観察は、3-2-7 と同様にして行った。レーザー強度は、Cy3 actin 観察時には 75 μW とし、BODIPY-FL actin 観察時には 7.5, 20, 60 mW と変化させた。露光時間を 50 ms/frame とし、5 分間撮影した。

(3) データの解析

ImageJ を用いて、LZMW 内に固定された Cy3 F-actin の両端に ROI (region of interest) を設定し、BODIPY-FL actin の蛍光強度の経時変化を調べた。また、この Cy3 F-actin の付近に参照 ROI を設け、バックグラウンドノイズ、および、非特異的に基板に吸着した BODIPY-FL actin の蛍光強度の経時変化を調べた (Fig. 4-2)。

(4) SNR (Signal to Noise Ratio) の評価

まず、BODIPY-FL actin に由来するシグナルの蛍光強度からバックグラウンドの蛍光強度を差し引いた値のヒストグラムを作成した。これを正規分布の式でフィッティングし、そのピーク値をシグナルの平均蛍光強度とした。次に、参照 ROI で測定した蛍光強度のヒストグラムを作成し、正規分布の式でフィッティングした。得られた σ (標準偏差) 値をその参照 ROI におけるノイズ値とした。複数の参照 ROI について、同様の解析を行い、ノイズ値のヒストグラムを作成した。これを正規分布の式でフィッティングし、そのピーク値をノイズの平均蛍光強度とした。なお、グラフの作成およびフィッティングは、KaleidaGraph を用いて行った。

SNR は、次式より算出した。

$$SNR = \frac{\text{シグナルの平均蛍光強度}}{\text{ノイズの平均蛍光強度}}$$

4-2-5. 伸長過程における BODIPY-FL actin の重合

(1) 観察試料の調製

観察試料の調製は、4-2-4-(1)と同様にして行った。

(2) 試料の観察

試料の観察は、4-2-4-(2)と同様にして行った。レーザー強度は、75 μ W (Cy3 actin 観察時)、7.5 mW (BODIPY-FL actin 観察時) とした。露光時間を 30.5 ms/frame とし、3 分間撮影した。

(3) データの解析

データの解析は、4-2-4-(3)と同様にして行った。

4-2-6. 定常状態における BODIPY-FL actin の重合

(1) 観察試料の調製

観察試料の調製は、4-2-4-(1)と同様にして行った。ただし、最終溶液として、2-2-9 で調製した BODIPY-FL F-actin 溶液 48.5 μ L, 1 M PCA 0.5 μ L, 20 μ M PCD 0.5 μ L, 50 mM MV 0.5 μ L を混合した溶液を 20 μ L フローセルに流し入れた。

(2) 試料の観察

試料の観察は、4-2-4-(2)と同様にして行った。レーザー強度は、75 μ W (Cy3 actin 観察時)、7.5 mW (BODIPY-FL actin 観察時) とした。露光時間を 30.5 ms/frame とし、3 分間撮影した。

(3) データの解析

データの解析は、4-2-4-(3)と同様にして行った。

4-2-7. 1 分子の BODIPY-FL G-actin monomer の蛍光強度測定

(1) 観察試料の調製

まず、LZMW に、終濃度 600 nM BODIPY-FL G-actin となるように G-buffer (20 mM PIPES-KOH pH 6.8, 1 mM ATP) で調製した溶液を 20 μ L 流し入れた。BODIPY-FL G-actin が基板に吸着した後、最終溶液 (10 mM PCA, 200 nM PCD, 500 μ M MV in G-buffer) を 20 μ L 流して、未吸着の BODIPY-FL G-actin を洗い流した。その後、マニキュアで封をした。

(2) 試料の観察

試料の観察は、4-2-4-(2)と同様にして行った。ただし、ハロゲンランプを照射し、LZMW の位置を確認した後、488 nm のレーザー光を照射し、BODIPY-FL -actin の蛍光を観察した。レーザー強度は、7.5 mW とした。露光時間を 30.5 ms/frame とし、3 分間撮影した。

(3) データの解析

基板に吸着した BODIPY-FL G-actin の輝点の位置に ROI を設け、蛍光強度の経時変化を調べた。また、その付近でシグナルが検出されない位置に参照 ROI を設け、バックグラウンドの蛍光強度の経時変化も調べた。

4-3. 実験結果および考察

4-3-1. 観察条件の検討

1 分子蛍光イメージングを行うためには、SNR が 3 より大きい必要があることが知られている (Kaiser, 1965)。そこで、本研究の実験系において、 $SNR > 3$ が達成できる条件の検討を行った。

レーザー強度を 7.5 mW とした場合について述べる。重合に由来する BODIPY-FL actin のシグナルの蛍光強度のヒストグラムを作成し、それを正規分布の式でフィッティングした結果を Fig. 4-3 に示した。これより、シグナルの平均蛍光強度が、 318 ± 108 a.u. (mean \pm SD) ($n = 115$) と求められた。参照 ROI で測定した蛍光強度に対して、そのヒストグラムを作成し、正規分布の式でフィッティングを行った一例を Fig. 4-4 (左) に示した。この場合は、ノイズ σ は、92 a.u. となった。さらに、複数の参照 ROI について、同様の解析を行った。それらのノイズのヒストグラムを作成し、正規分布の式でフィッティングを行った (Fig. 4-4 (右)) ところ、ノイズの平均蛍光強度が、 84 ± 15 a.u. (mean \pm SD) ($n = 29$) となった。よって、 $SNR = 318 / 84 = 3.8$ と求められた。

レーザー強度を 20, 60 mW とした場合には、同様の手順から、それぞれ、SNR = 4.2, 5.2 と求められた。

いずれのレーザー強度においても、SNR > 3 を達成することができた。BODIPY-FL の退色の速さを考慮すると、励起光強度は、出来る限り弱い方が好ましい。そこで、以後のレーザー強度は、7.5 mW とした。

4-3-2. 重合反応の 1 分子蛍光イメージング

Biotin 化 BSA と streptavidin の結合を介して、LZMW 内に Cy3 F-actin を固定し、BODIPY-FL actin の蛍光を観察した (Fig. 3-7)。Cy3 F-actin の端での BODIPY-FL actin の蛍光強度の経時変化のグラフの一例 (Fig. 4-5 (上)) において、スパイクが 10 個程度見られたのに対して、参照 ROI 内での蛍光強度の経時変化のグラフの一例 (Fig. 4-5 (下)) においては、BODIPY-FL actin の基板への非特異的な吸着と見られるスパイクが 1 個観察されたのみであった。溶液中に存在する actin は、ブラウン運動しているため、輝点として検出できないのに対し、基板上に固定された F-actin に結合した actin は、輝点として検出される。そのため、Fig. 4-5 (上) において、黒矢印で示したスパイクが、Cy3 F-actin の端に重合した BODIPY-FL actin のシグナルであると考えられる。そこで、Cy3 F-actin の端での BODIPY-FL actin の蛍光強度の経時変化を調べることから、重合反応の詳細を解析した。

(1) 定常状態における重合反応の協同性の検討

・自己相関を用いた解析

Cy3 F-actin の端での BODIPY-FL actin の蛍光強度変化のグラフ (Fig. 4-6) に対して、自己相関を用いて解析を行った。1 分子のシグナルの検出限界である (平均値 + 3 x 標準偏差) を閾値として、値がそれ以上の場合を 1、それ未満の場合を 0 とし、自己相関を求めた (Fig. 4-7)。また、Cy3 F-actin の端に重合した BODIPY-FL actin の退色時間を Fig. 4-8 に示した。これらより、相関時間が短い場合にのみ相関が見られ、その相関が見られた時間が、重合した BODIPY-FL actin の退色時間とおおよそ一致していることが分かった。この結果から、定常状態における重合は、ランダムに起こっていると考えられる。以上から、定常状態において monomer がフィラメントに結合することで更に重合が促進される協同性によるメカニズムは否定された。

・重合に由来するシグナルの時間間隔分布を用いた解析

Cy3 F-actin の端での BODIPY-FL actin の蛍光強度変化 (Fig. 4-9) から、重合に由来するシグナルの時間間隔 (溶液中の actin が F-actin に重合するまでの待ち時間) の分布を調べた (Fig. 4-10)。重合がランダムに起こっているとすれば、その分布は、指数分布に従う。協同的に起こっているとすれば、シグナルの時間間隔が規則性を示し、指数分布からずれた分布になると考えられる。今回、定常状態における待ち時間分布は、一次の指数関数で近似することができた (Fig. 4-10 (左))。また、伸長過程における待ち時間の分布も、指数分布となった (Fig. 4-10 (右))。以上の結果から、定常状態における重合は、協同的ではなく、伸長過程と同様に、ランダムに起こっていると考えられる。

(2) 伸長過程と定常状態における重合単位の比較

Cy3 F-actin の端での BODIPY-FL actin の蛍光強度の経時変化において、BODIPY-FL G-actin の会合体が重合して、蛍光強度が上昇した場合には、退色により、1 分子分ずつ蛍光強度が下降する (階段退色) はずである。しかし、BODIPY-FL は、退色が速く、多くの場合、1 frame (= 30.5 ms) 以内に退色してしまう。そこで、単純に蛍光強度の大きさを比較することで重合単位を比較するという手法を用いた。蛍光標識された actin は、重合して actin 間の距離が短くなると、蛍光強度が下がる場合がある (クエンチング)。BODIPY-FL actin でも、このような現象が起こるかどうかについては、先行研究において、ラベル率を変化させると、隣接する actin 間の距離が変化することを利用して調べられている (Terada *et al.*, 2007)。BODIPY-FL actin のラベル率と蛍光強度が比例関係となっている (Fig. 4-11) ことから、BODIPY-FL actin 間の距離が蛍光強度に影響しない。つまり、BODIPY-FL actin に関しては、重合によるクエンチングは起こらないと言える。よって、蛍光強度の大きさの比較から、重合単位の比較が行える。

Cy3 F-actin の端に重合した BODIPY-FL actin の蛍光強度分布を、B 端と P 端を区別しない場合 (Fig. 4-12)、および、B 端と P 端を区別した場合 (Fig. 4-13) について示した。ただし、後者については、重合に由来する BODIPY-FL actin のシグナルが検出された回数 (重合頻度) を両端で比較して、その回数が多い方を B 端、少ない方を P 端とみなした。

これらの蛍光強度分布 (Fig. 4-12, 4-13) には、非特異的に基板に吸着した BODIPY-FL actin のシグナルも含まれている可能性がある。そのため、参照 ROI 内での蛍光強度の経時変化 (Fig. 4-5 (下)) から、参照 ROI 内で非特異的に基板に吸着した BODIPY-FL actin のシグナルの蛍光強度分布のヒストグラム (Fig. 4-14) を作成し、このヒストグラムを Fig. 4-12, 4-13 から引き算することで、非特異的な吸着の可能性を排除した蛍光強度分布 (Fig. 4-15, 4-16) を求めた。

Fig. 4-15, 4-16 から、両端を区別しない場合、および、区別した場合、いずれの場合についても、伸長過程では、蛍光強度 350 a.u. 付近をシングルピークとする分布となった。基板に吸着した BODIPY-FL G-actin monomer の平均蛍光強度が、 362 ± 101 a.u. (mean \pm SD) ($n = 129$) であった (Fig. 4-17) ことから、monomer のみが重合に関与していると考えられる。一方、定常状態では、蛍光強度 350 a.u. 付近だけではなく、700, 1050 a.u. 付近にもピークが現れた。この結果から、定常状態では、monomer だけではなく、dimer や trimer も重合していることが示唆される。

さらに、Fig. 4-15, 4-16 の定常状態における蛍光強度分布について、複数個のガウス分布でフィッティングすることにより、面積の比較から、重合に関与した monomer、dimer、trimer の割合を概算すると、両端を区別しない場合、monomer : dimer = 1 : 6.6、両端を区別した場合、B 端では、monomer : dimer = 1 : 7.6、P 端では、monomer : dimer : trimer = 1 : 1.9 : 0.70 と求められた。この結果から、monomer、trimer と比較して、dimer の割合が多いことが分かった。

先行研究において、PCH (Photon Counting Histogram) 法 (共焦点観察領域を横切る蛍光粒子の蛍光強度のヒストグラムに対してフィッティングを行い、明るさの異なる粒子の領域内の平均分子数を求める方法) により、溶液中における BODIPY-FL actin の明るさ分布が調べられている (Terada *et al.*, 2007) (Fig. 4-18)。Buffer G (低塩濃度溶液) 中においては、シングルピークが観測された。Buffer G 中では、actin は、monomer として存在しているため、このピークは、monomer を意味していると考えられる。本研究において、動画の撮影を行った最終溶液を加えてから 3 分間程度では、重合は、伸長過程の初期段階にあると予想される。つまり、重合は進んでおらず、溶液中には、monomer のみが存在していると考えられる。よって、本研究における伸長過程のシングルピークが monomer を表していることが支持される。これに対して、本研究の定常状態に相当する buffer F (高塩濃度溶液) 中においては、buffer G 中で観測されたシングルピークと同程度の位置だけではなく、その 2-3 倍の位置にもピークが観測された。よって、buffer F 中では、monomer だけではなく、dimer や trimer も平衡状態として存在していると考えられる。さらに、それらの割合が、monomer : dimer : trimer = 1 : 0.35 : 0.14 であることも概算でき、本研究の結果は、この溶液中における割合から予想されるよりも、はるかに dimer が結合しやすいことを示唆している。

4-4. 小括

定常状態における Cy3 F-actin の端での BODIPY-FL actin の蛍光強度の経時変化から、自己相関を用いた解析、および、重合に由来する BODIPY-FL actin のシグナルの時間間隔を用いた解析を行った結果、定常状態において monomer が重合することで更に重合が促進される協同性によるメカニズムは否定された。

重合に由来する BODIPY-FL actin の蛍光強度分布を、両端を区別しない場合、および、両端を区別した場合について調べた結果、伸長過程では、monomer のみが重合に関与していると考えられる。一方、定常状態では、monomer だけではなく、dimer や trimer も重合しており、さらに、先行研究 (Terada *et al.*, 2007) における溶液中での BODIPY-FL actin の明るさ分布と比較することで、dimer が結合しやすいことも示唆された。

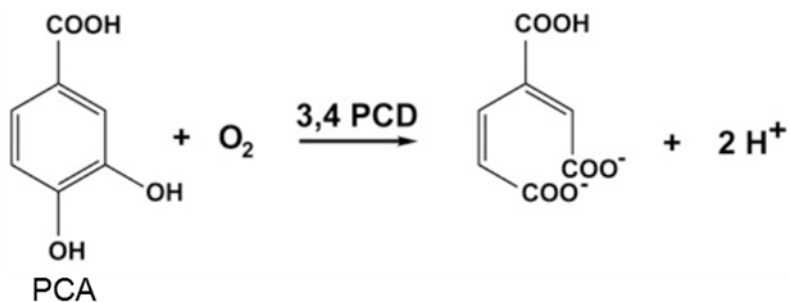


Fig. 4-1 PCA/PCD による酸素除去機構

PCD により、PCA が酸素と反応することで、溶液中から酸素が除去される。

図は、Aitken *et al.* (2008)を改変。

Table 4-1 PCA、PCD、MV の有無による BODIPY-FL の退色時間および放出されるフォトン数の比較

	Buffer T	Buffer R
Total number of emitted photons	5,000 ± 500	100,000 ± 7,000
Total lifetime (s)	0.20 ± 0.02	3.7 ± 0.3

PCA、PCD、MV を含まない Buffer T と比較して、これらを含む Buffer R では、BODIPY-FL の退色時間 (Total lifetime) が大きく伸びた。また、退色までに放出されるフォトン数 (Total number of emitted photons) も大幅に増加した。

表は、Gall *et al.* (2011)を改変。

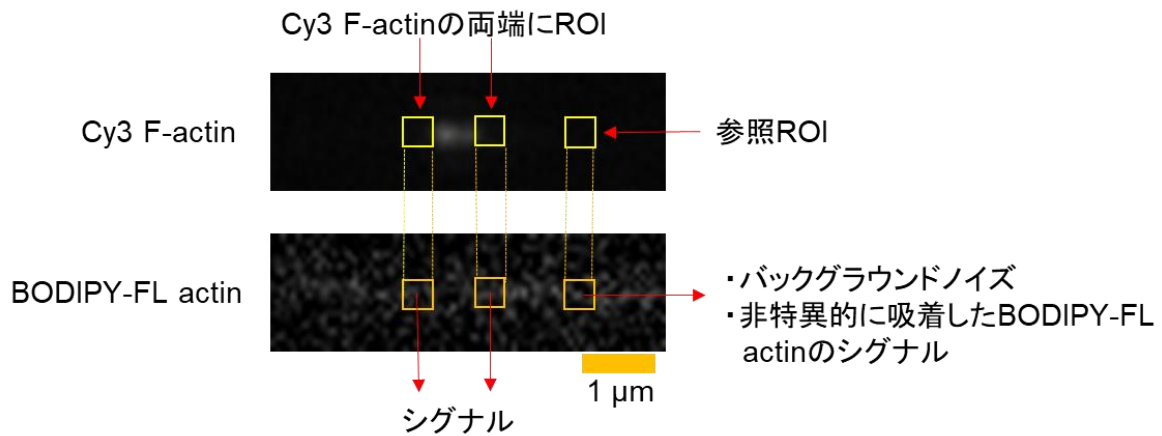


Fig. 4-2 1分子蛍光イメージングの解析手法

LZMW 内に固定した Cy3 F-actin の両端の ROI で、重合した BODIPY-FL actin のシグナル、参照 ROI で、バックグラウンドノイズ、および、非特異的に基板に吸着した BODIPY-FL actin のシグナルを検出した。

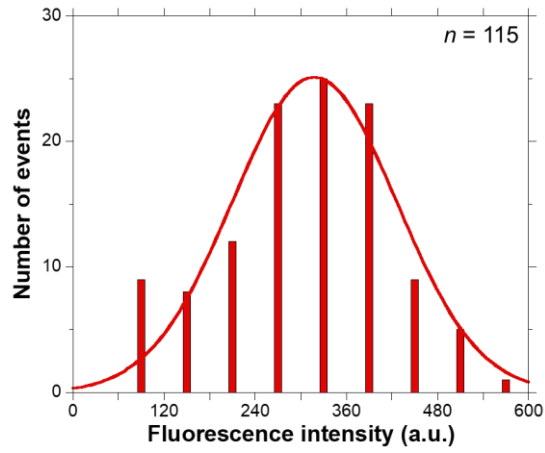


Fig. 4-3 重合に由来する BODIPY-FL actin のシグナルの蛍光強度分布

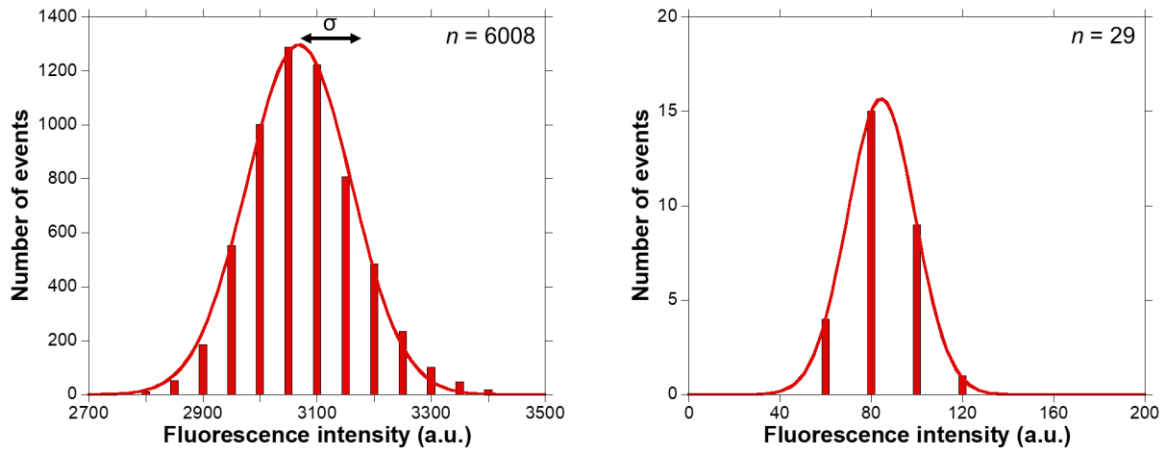


Fig. 4-4 参照 ROI 内での蛍光強度分布 (n はフレーム数) (左)、ノイズの蛍光強度分布 (右)

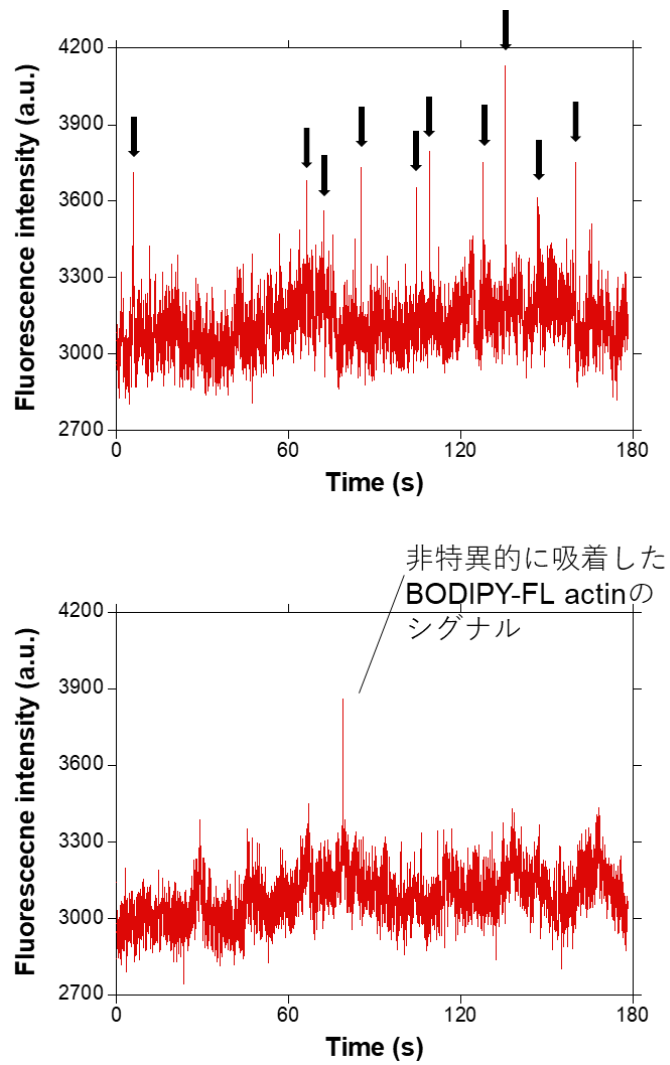


Fig. 4-5 Cy3 F-actin の端での BODIPY-FL actin の蛍光強度の経時変化 (上)、参照 ROI 内での 蛍光強度の経時変化 (下)

黒矢印で示したスパイクが、重合した BODIPY-FL actin のシグナルであると考えられる。

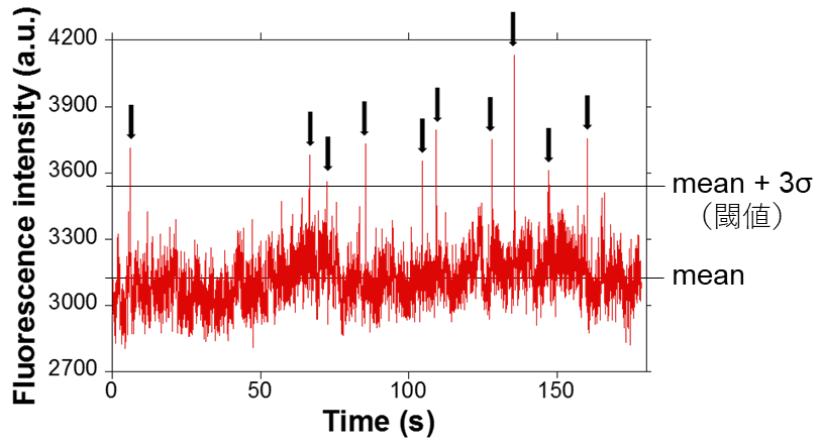


Fig. 4-6 定常状態における Cy3 F-actin の端での BODIPY-FL actin の蛍光強度の経時変化
 $\text{mean} + 3\sigma$ (閾値) 以上の蛍光強度を重合した BODIPY-FL actin のシグナルとみなした。

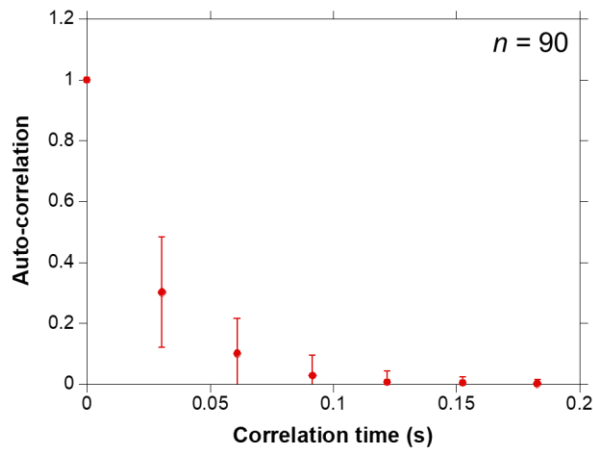


Fig. 4-7 自己相関

蛍光強度が、 $\text{mean} + 3\sigma$ (閾値) 以上の場合を 1、未満の場合を 0 として、自己相関を求めた。
 エラーバーは、標準偏差を示す。

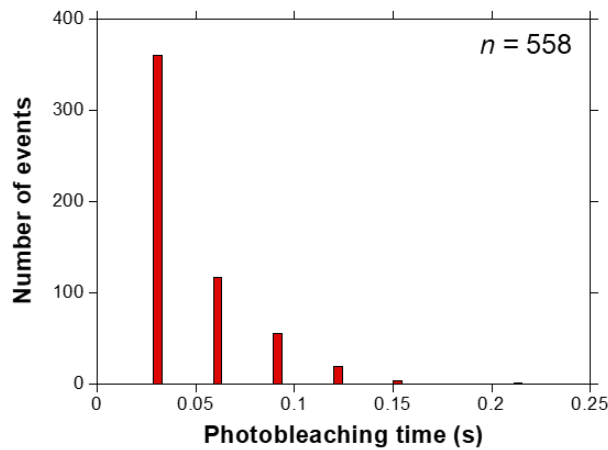


Fig. 4-8 Cy3 F-actin の端に重合した BODIPY-FL actin の退色時間

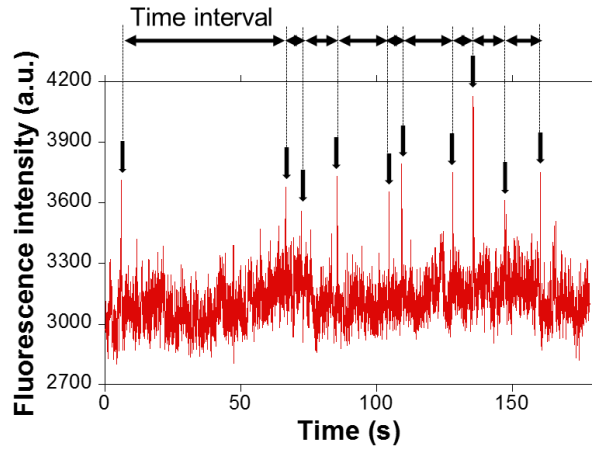


Fig. 4-9 定常状態における Cy3 F-actin の端での BODIPY-FL actin の蛍光強度の経時変化
重合に由来するシグナルの時間間隔を調べた。

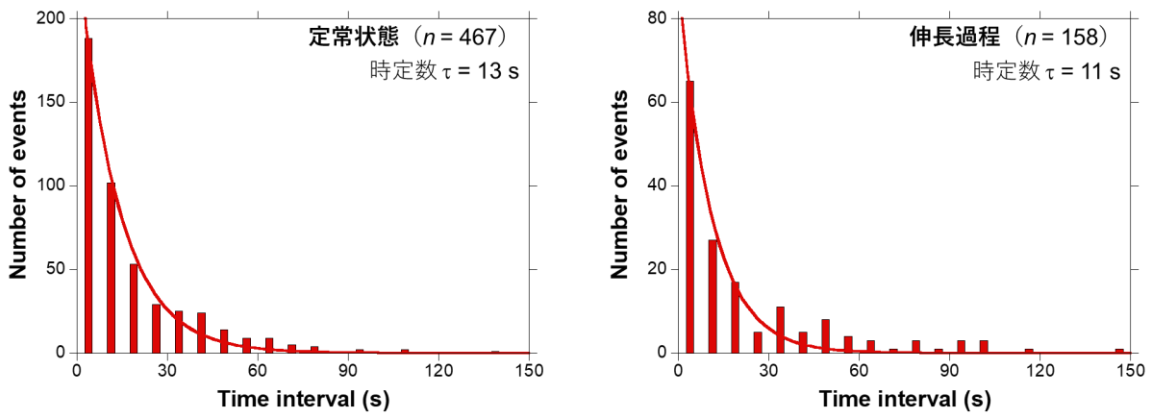


Fig. 4-10 Cy3 F-actin の端に重合した BODIPY-FL actin のシグナルの時間間隔分布
時間間隔の分布は、指数分布の式 ($\text{Number of events} = C \cdot \exp(-t/\tau)$) でよくフィッティングされた。

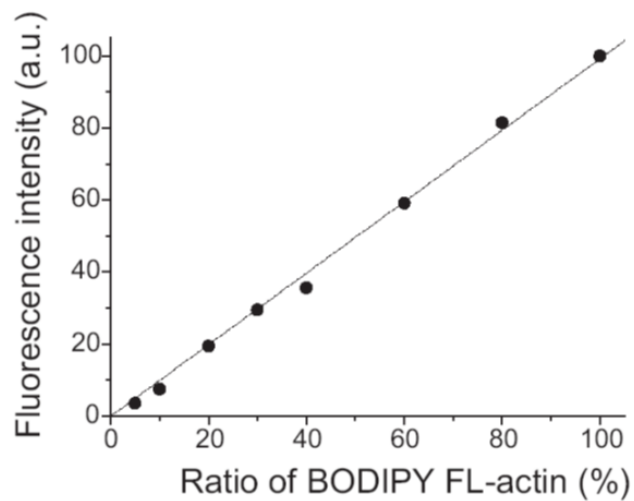


Fig. 4-11 BODIPY-FL actin のラベル率と蛍光強度の関係

ラベル率と蛍光強度は比例していた。

図は、Terada *et al.* (2007)より転載。

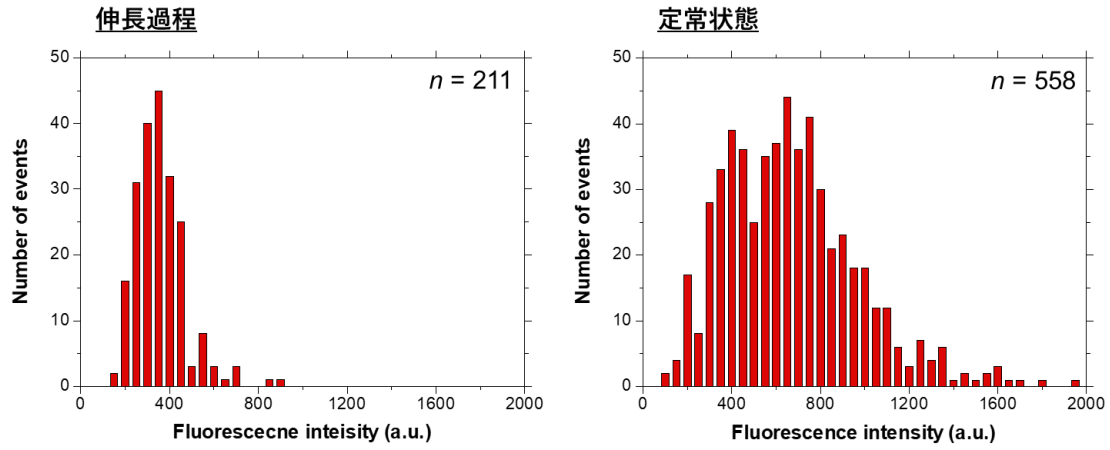


Fig. 4-12 B 端と P 端を区別しない場合の伸長過程と定常状態の蛍光強度分布

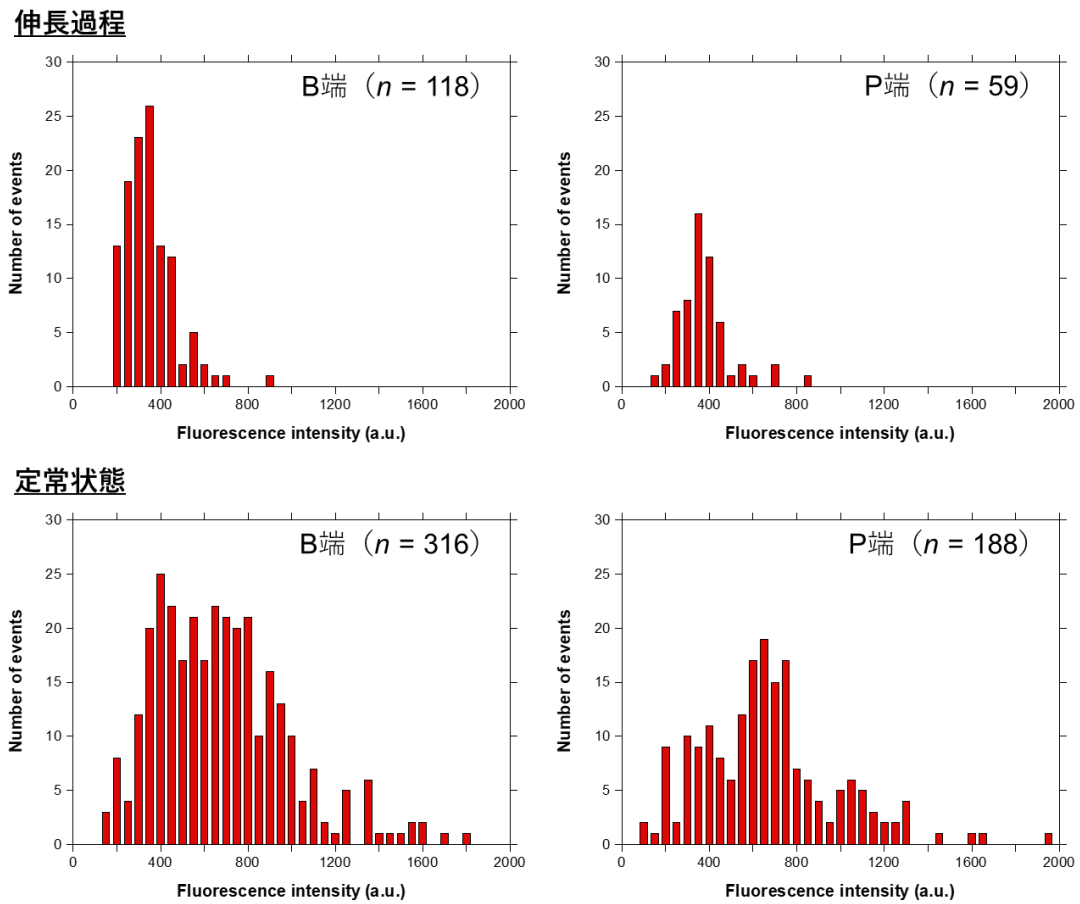


Fig. 4-13 B 端と P 端を区別した場合の伸長過程と定常状態の蛍光強度分布

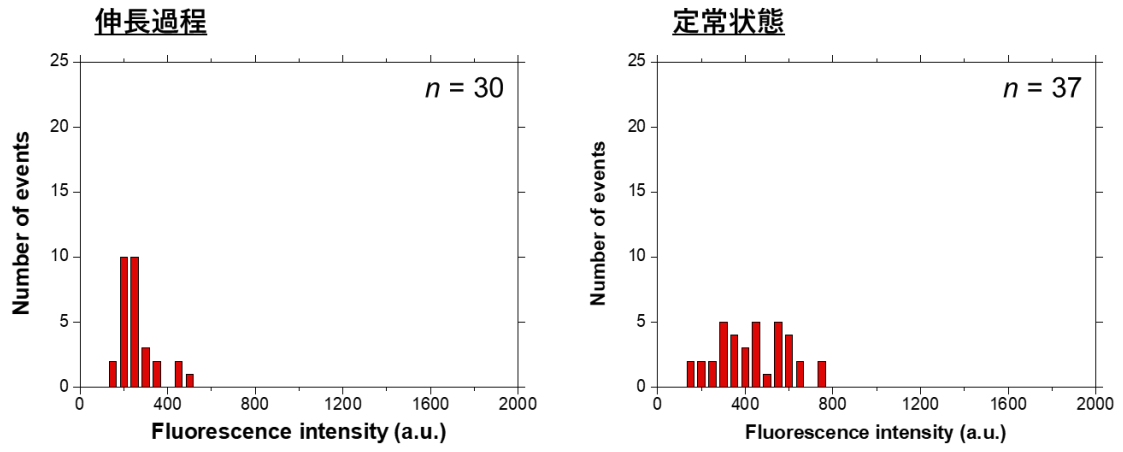


Fig. 4-14 参照 ROI 内で非特異的に基板に吸着した BODIPY-FL actin のシグナルの蛍光強度分布

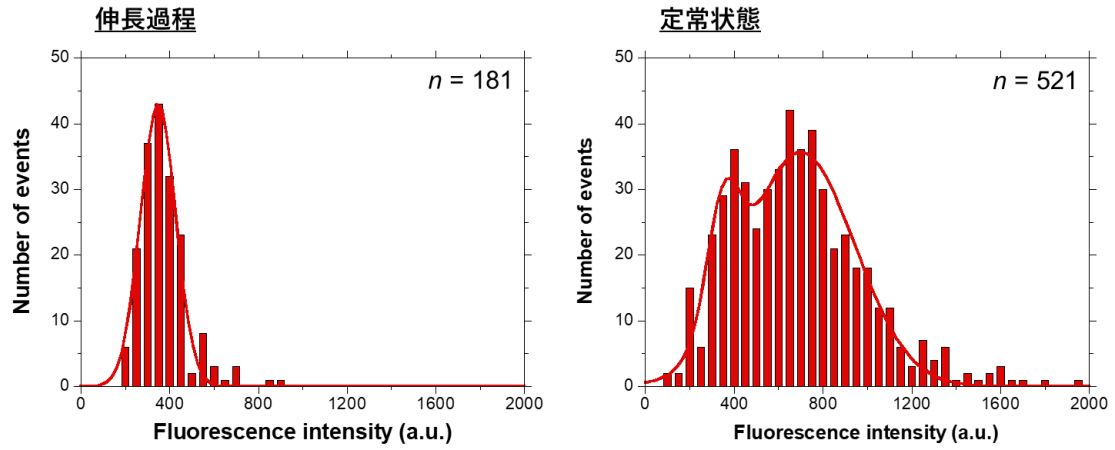


Fig. 4-15 B 端と P 端を区別しない場合の伸長過程と定常状態の蛍光強度分布
(参照 ROI 内で非特異的に基板に吸着した BODIPY-FL actin のシグナルを除いた場合)

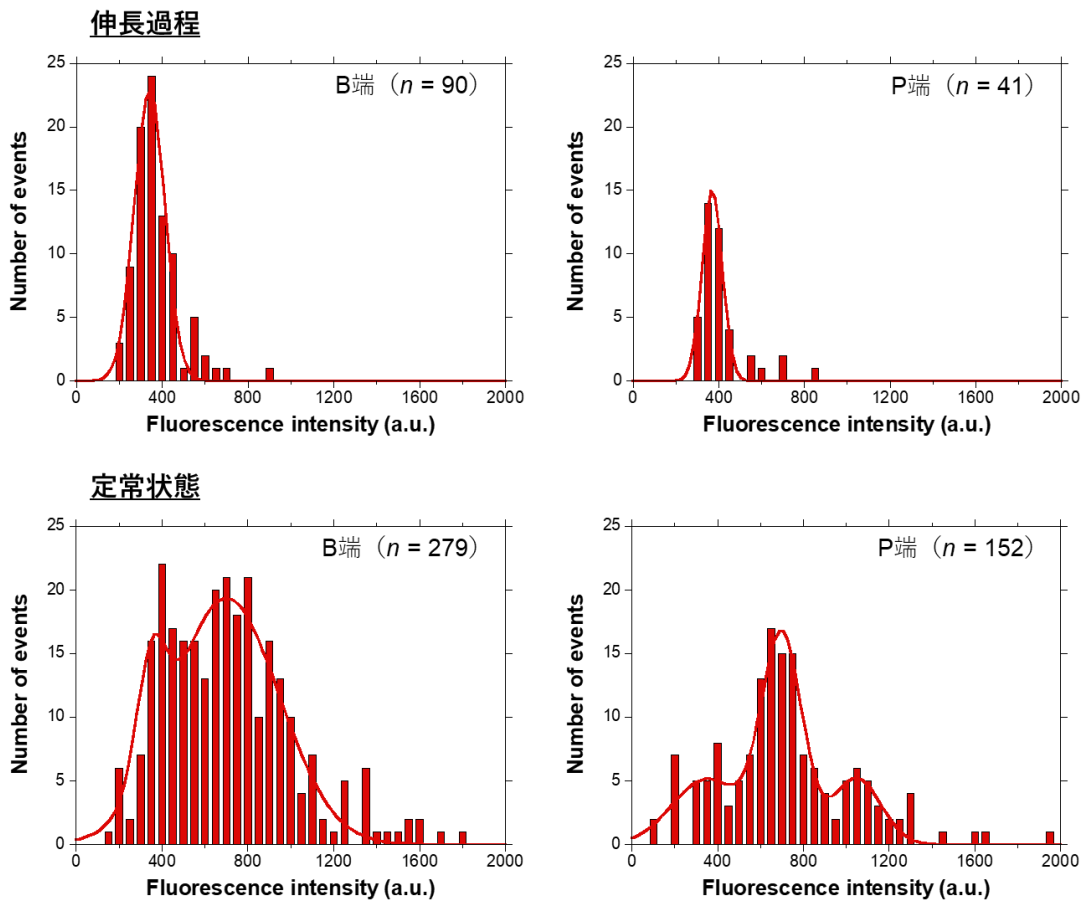


Fig. 4-16 B 端と P 端を区別した場合の伸長過程と定常状態の蛍光強度分布
(参照 ROI 内で非特異的に基板に吸着した BODIPY-FL actin のシグナルを除いた場合)

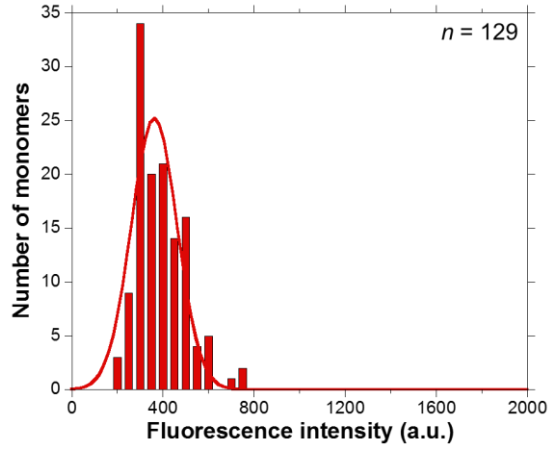


Fig. 4-17 1分子の BODIPY-FL G-actin monomer の蛍光強度分布

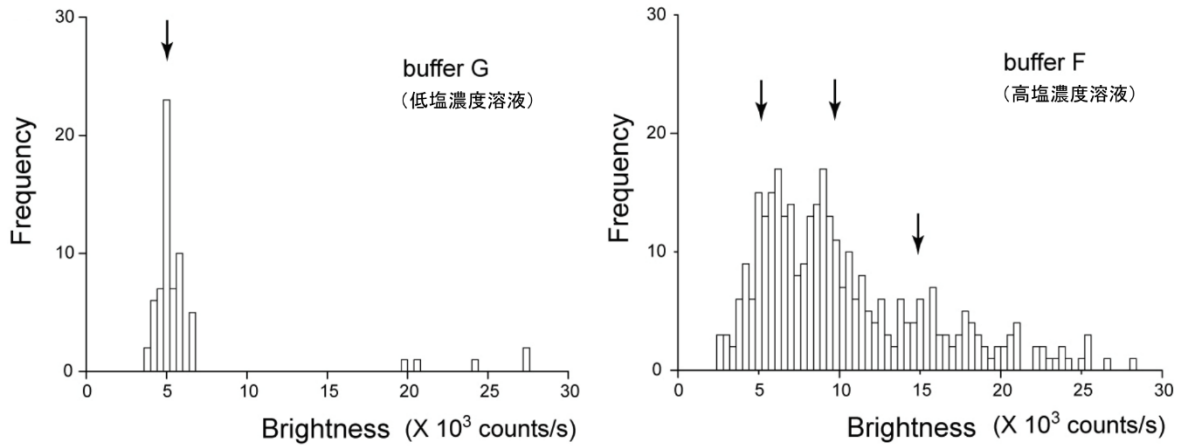


Fig. 4-18 BODIPY-FL actin の明るさ分布

PCH 法により求められた。

図は、Terada *et al.* (2007)を改変。

第5章 総括および今後の展望

5-1. 総括

本研究は、1分子蛍光イメージング法を用いて、伸長過程と定常状態における actin の重合単位を決定することにより、actin の重合メカニズムを解明することを目的とした。

第2章では、actin 重合過程の1分子蛍光イメージングに必要な試料の調製を行った。鶏の胸肉から G-actin を抽出し、その G-actin を Cy3、biotin、BODIPY-FL で標識した。100%のラベル率で BODIPY-FL 標識された G-actin から、第4章の定常状態の実験で用いた BODIPY-FL F-actin を調製した。それと同時に、10%程度の低いラベル率で Cy3 標識された G-actin、および、biotin で標識された G-actin から、重合の核となる Cy3 F-actin を調製した。

第3章では、カバーガラス上および LZMW 内において、actin が伸長するかどうかの確認を行った。カバーガラス上において、Cy3 F-actin から BODIPY-FL actin が伸長する様子を観察でき、重合の核を短く断片化した場合も、伸長速度への悪影響はなかった。さらに、LZMW 内において、短く断片化した Cy3 F-actin から BODIPY-FL actin が十分に伸長することも確認できた。

第4章では、まず、1分子蛍光イメージングを行うために、レーザー強度を変えて、SNR > 3 を満たす条件の検討を行った。次に、定常状態における重合反応の協同性の検討を行った。自己相関を用いた解析、および、重合に由来する BODIPY-FL actin のシグナルの時間間隔分布を用いた解析から、定常状態における重合は、ランダムに起こっており、monomer が重合することで更に重合が促進される協同性によるメカニズムは否定された。最後に、重合した BODIPY-FL actin の蛍光強度分布から、伸長過程と定常状態における重合単位の比較を行った。その結果、伸長過程では、monomer のみが重合に関与している一方で、定常状態では、monomer だけではなく、dimer や trimer などの oligomer も重合していることが示された。さらに、先行研究 (Terada *et al.*, 2007) との比較から、定常状態では、dimer が結合しやすいことが示唆された。

5-2. 今後の展望

今後は、今回用いた両端の区別方法（重合に由来する BODIPY-FL actin のシグナルが検出された回数の多少から B 端と P 端を区別）よりも正確に両端を区別することにより、その重合単位の比率の違い（Fig. 4-16 のようなヒストグラムを作成した際の両端での分布の違いなど）などの詳細な重合メカニズムの解析に取り組んでいきたいと考えている。正確に両端を区別する方法として、actin フィラメントの B 端と結合することにより、B 端での重合を阻害する働きを持つ CapZ を用いることも考えている。さらに、このような actin 結合タンパク質は、数多く存在しており、それらが actin フィラメントのどこに、どのようなメカニズムで結合し、それにより重合に影響を与えるか否かなどを 1 分子レベルで理解することも興味深い研究であると考えられる。

また、本研究で用いた LZMW は、通常のコイル状の ZMW とは異なり、actin フィラメントや微小管などの繊維状の物質に沿って運動するモータータンパク質などの運動性を持った分子の観察に適していると考えられる。最近では、高濃度蛍光 ATP 存在下でのキネシン運動と ATP 結合を同時蛍光 1 分子計測した研究（Fujimoto *et al.*, 2018）にも利用されている。さらに、現在のところ治療法が見つかっていないプリオン病に関係している繊維状重合体などの重合反応の 1 分子蛍光イメージングにも利用することが可能であり、その重合メカニズムの解明に貢献することが期待される。

参考文献

Aitken, C. E., Marshall, R. A., & Puglisi, J. D. An oxygen scavenging system for improvement of dye stability in single-molecule fluorescence experiments. *Biophys. J.* **94**, 1826–1835 (2008).

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. Molecular biology of the cell, 5th edition. *Garl. Sci.* (2007).

Elting, M. W., Leslie, S. R., Churchman, L. S., Korlach, J., McFaul, M. J., Leith, J. S., Levene, M. J., Cohen, A. E., & Spudich, J. A. Single-molecule fluorescence imaging of processive myosin with enhanced background suppression using linear zero-mode waveguides (ZMWs) and convex lens induced confinement (CLIC). *Opt. Soc. A.* **21**, 1189–1202 (2013).

Foquet, M., Samiee, K. T., Kong, X., Chauduri, B. P., Lundquist, P. M., Turner, S. W., Freudenthal, J., & Roitman, D. B. Improved fabrication of zero-mode waveguides for single-molecule detection. *J. Appl. Phys.* **103**, 034301 (2008).

Fujimoto, K., Morita, Y., Iino, R., Tomishige, M., Shintaku, H., Kotera, H., & Yokokawa, R. Simultaneous observation of kinesin-driven microtubule motility and binding of adenosine triphosphate using linear zero-mode waveguides. *Acs Nano* **2018**, **12**, 11975–11985 (2018).

Fujiwara, I., Takahashi, S., Tadakuma, H., Funatsu, T., & Ishiwata, S. Microscopic analysis of polymerization dynamics with individual actin filaments. *Nat. Cell Biol.* **4**, 666–673 (2002).

Funatsu, T., Harada, Y., Tokunaga, M., Saito, K., & Yanagida, T. Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution. *NATURE* **374**, 555–559 (1995).

Gall, A. L., Dulin, D., Clavier, G., Meallet-Renault, R., Bouyer, P., Perronet, K., & Westbrook, N. Improved photon yield from a green dye with a reducing and oxidizing system. *ChemPhysChem* **2011**, **12**, 1657–1660 (2011).

Hansen, S. D., Zuchero, J. B., & Mullins, R. D. Cytoplasmic actin: purification and single molecule assembly assays. *Methods Mol. Biol.* **1046**, 145–170 (2013).

Hanson, J. & Lowy, J. The structure of F-actin and of actin filaments isolated from muscle. *J. Mol. Biol.* **6**, 46–60 (1963).

- Kaiser, H. Zum problem nachweisgrenze. *Fresenius Z. Anal. Chem.* **209**, 1 (1965).
- Kawamura, M. & Maruyama, K. Length distribution of F-actin transformed from Mg-polymer. *Biochim. Biophys. Acta.* **267**, 422–434 (1972).
- Korlach, J., Marks, P. J., Cicero, R. L., Gray, J. J., Murphy, D. L., Roitman, D. B., Pham, T. T., Otto, G. A., Foquet, M., & Turner, S. W. Selective aluminum passivation for targeted immobilization of single DNA polymerase molecules in zero-mode waveguide nanostructures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 1176–1181 (2008).
- Kouyama, T. & Mihashi, K. Fluorimetry study of *N*-(1-pyrenyl)iodoacetamide-labelled F-actin. *Eur. J. Biochem.* **114**, 33–38 (1981).
- Levene, M. J., Korlach, J., Turner, S. W., Foquet, M., Craighead, H. G., & Webb, W. W. Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations. *Science*. **299**, 682–686 (2003).
- Miyake, T., Tanii, T., Sonobe, H., Akahori, R., Shimamoto, N., Ueno, T., Funatsu, T., & Ohdomari, I. Real-time imaging of single-molecule fluorescence with a zero-mode waveguide for the analysis of protein-protein interaction. *Anal. Chem.* **80**, 6018–6022 (2008).
- Oosawa, F., & Asakura, S. Thermodynamics of the polymerization of proteins. *Academic Press, New York.* (1975).
- Oosawa, F., & Kasai, M. A theory of linear and helical aggregations of macromolecules. *J. Mol. Biol.* **4**, 10–21 (1962).
- Terada, N. Studies on the diffusion of protein molecules in a cell and the number distribution of actin oligomers using confocal laser microscopy. 早稲田大学大学院理工学研究科博士論文 (2007).
- Terada, N., Shimozawa, T., Ishiwata, S., & Funatsu, T. Size distribution of linear and helical polymers in actin solution analyzed by photon counting histogram. *Biophys. J.* **92**, 2162–2171 (2007).
- Yasunaga, T. & Wakabayashi, T. Relocation of Cys374 of actin induced by labeling with fluorescent dyes. *J. Biochem.* **129**, 201–204 (2001).

三木裕明 『細胞骨格・運動がわかる』 羊土社 (2004).

山本正道 「ナノスリット基板を用いた actin 重合過程の 1 分子レベルの観察」 東京大学大学院薬学系研究科修士論文 (2014).

謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました、東京大学大学院薬学系研究科生体分析化学教室の船津高志教授に謹んで感謝いたします。

懇切なるご助言、ご教示頂きました、東京大学大学院薬学系研究科生体分析化学教室の飯塚怜助教に深く感謝いたします。

LZMW を恵与して頂きました、早稲田大学理工学術院谷井孝至教授に感謝いたします。

本研究に関して、ご助言、ご協力を頂きました、東京大学大学院薬学系研究科生体分析化学教室の研究員の皆さまに感謝いたします。

最後に、ここまでの歩みを支えてくださった、両親、友人をはじめ、多くのお世話になった方々に感謝いたします。

2020年1月
東京大学大学院 薬学系研究科
生体分析化学教室
藤井 聡一郎