

研究課題別評価

1 研究課題名: 成長円錐の運動解析による神経細胞形成へのアプローチ

2 研究者氏名: 加藤 薫

3 研究の狙い:

成長円錐は伸長中の神経の先端に見られる構造で、神経発生の過程で、周囲の環境を「認識」し、神経系を「形成」する上で重要な役割を果たす。本研究はこの成長円錐の運動機構の解明を目的としている。神経成長円錐の運動はアクチンによるといわれているが、生きた細胞での細胞骨格(繊維状アクチン)の観察は従来の光学顕微鏡では難しく、その仕組みは明らかではない。この分野の研究には、生物学の新しい知見だけでなく、新しい実験系の開発と導入が必要である。

本研究では、最新の光学顕微鏡技術を駆使し、または自ら開発し、生きた神経細胞の観察に応用し、成長円錐の運動機構の解明を目指した。つまり、「偏光顕微鏡」や「位相差顕微鏡」により細胞骨格(アクチン束)の形態を可視化し、「蛍光」により細胞質 Ca²⁺濃度や蛍光ラベルした調節分子(アクチン関連蛋白質)の細胞内分布を同時に可視化し、外界からの刺激により、細胞質の調節分子の分布が変化し、アクチンからなる細胞骨格の動きが変わり、成長円錐の運動が変化する課程を観察し明らかにすることを目指した。

4 研究成果:

I) 神経成長円錐における、アクチン関連蛋白質とアクチンの役割

アクチン関連蛋白質ファシンのアクチンへの結合制御

群馬大学の石川良樹講師と共同で、ファシン(アクチン繊維の束化蛋白質)の動態を解析した。これまでの報告通り、ファシンは filopodia とそれに付随したアクチン束に存在するだけでなく、成長円錐のアクチンの網目でアクチンが束化した部分にも特異的に存在することをみいだした。この性質を利用し、蛍光ファシンをマーカーとして使いアクチンの網目を光学顕微鏡で直接観察することに成功した。

さらに、ファシンのアクチンへの結合乖離とリン酸化の関係を成長円錐で解析した。野生型、リン酸化型、脱リン酸化型のファシンを成長円錐に発現させ比較した。野生型ファシンは細胞質とアクチン束の両方に、リン酸化型は細胞質のみに、脱リン酸化型はアクチン束に分布した。ファシンのアクチンへの結合はリン酸化で制御されることを示した(2003年バイオイメージング学会の年会でベストイメージ賞を受賞)。

成長円錐内部のアクチン関連蛋白質の網羅的解析

プロテオミクスの手法で、成長円錐のアクチン関連蛋白質の同定を進めている新潟大学の五十嵐道弘教授と共同で、成長円錐のアクチン関連蛋白質の動態の網羅的解析を試みた。プロテオミクスの手法で同定した成長円錐のアクチン関連蛋白質と GFP の融合蛋白質を作り、ニューロプラストーマの成長円錐に発現させ、網羅的に運動解析を行った。成長円錐のアクチン関連蛋白質(約30種類)で、それらの動態を記録した。現在、解析精度をあげ、1分子に近い状態での解析を試みている。

II) 神経成長円錐のアクチンの可視化手法の高解像度化

成長円錐のラメリポーディアの運動はアクチンの網目が担う。この成長円錐のアクチンの網目(太い部分でも 20nm 程度)は、電子顕微鏡では観察される。光学顕微鏡で、無染色の生きた状態で動きを捉えた報告はなく、この分野の研究の壁になっている。もし生きた細胞のアクチンの網目が検出できる顕微鏡が開発できれば、大きな進歩になると考えた。これまでの研究では、ケラサイトの細胞でのみ、汎用の位相差顕微鏡でアクチンの網目が観察できると報告されている。位相差顕微鏡を高解像度化すれば、成長円錐でもアクチンの網目が観察できると考えた。

位相差顕微鏡では、試料(細胞など)の周囲が光る(ハロ)アーティファクトが知られている。最近、こ

のハロを減弱する方法(アポディゼーション位相差法)をニコンの大瀧氏が考案した。この方法は、対物レンズ内部の位相リングを、特殊な位相リング(アポディゼーション位相リング)で置き換えるだけで、光学系は極めて単純である。それ故、顕微鏡設計の専門家から過小評価され、安価な低倍率(10-40倍)のレンズのみに応用されていた。私と大瀧氏は、低倍率のアポディゼーション位相差顕微鏡の評価を通じて、高倍率でこそハロ(アーティファクト)の除去効果が大きいと考えた。高倍率のアポディゼーション位相差法の高倍率の対物レンズを作れば、アクチンの網目が見えるかも知れないと考え、大瀧氏と共に光学条件を決め試作した。

この方法を成長円錐の観察に適用した。誰も可視化に成功していない成長円錐のアクチンの網目の無染色の生きた状態で可視化に成功し、その運動を記録することが出来た。この高倍率のアポディゼーション位相差法は様々な細胞観察に応用可能で、かつ、光学系も単純である。生物学者だけではなく、光学者にも大きなインパクトを与えた(「アポディゼーション位相差顕微鏡の生細胞への適用」として、ニコンの大瀧氏、鈴木氏と共に日本光学会から光設計優秀賞受賞)。生物学に留まらず、広範な分野の光学顕微鏡観察で、利用されると期待される。

III) 高解像度の光学顕微鏡による各種細胞運動や粒子の観察

本研究で用いた高解像度の光学顕微鏡による各種細胞運動の計測および観察依頼があり、共同研究を行った。「心筋」、「好中球」、「コロイド粒子」等を可視化した。

5 自己評価:

この研究は成長円錐の動態解析を目指した。提案書では、新型偏光顕微鏡と蛍光顕微鏡を組み合わせ合わせて用いて、成長円錐内部の、蛍光ラベルした特定の分子の動態解析を行うと提案した。しかし、実際に蛍光顕微鏡と偏光顕微鏡を組み合わせた系で、実験を行ってみると、偏光顕微鏡の分解能が足りず、蛍光像との比較解析は難しいことがわかった。そこで方針転換し、以下の2点を重点的に進めた。

GFP-アクチン関連蛋白質の動態解析を主体とした実験を進める

高解像で細かい構造が見える光学顕微鏡を作る

結果を出しやすい を経常的なテーマとして進め、出来れば画期的だが、結果が出ないリスクがあるをサブテーマとして進めた。

GFP を用いたアクチン関連蛋白質の動態解析はうまく進み、ファシオンとアクチンの相互作用について一定の成果がでて学会発表した(バイオイメージング学会ベストイメージ賞)。しかし、論文投稿の直前に、アメリカのグループに先を越されてしまった。更にデータを加えた上で、投稿せねばならなかった。努力不足を反省している。

高倍率(高開口数)のアポディゼーション位相差顕微鏡の試作は大瀧氏(ニコン)と共同で進め、位相差顕微鏡の高解像度化を進めた。光学顕微鏡や位相差顕微鏡の理論は、50年以上前のアップ(分解能の定義をした人)やゼルニケ(位相差法の開発者)の時代に完成された。顕微鏡設計の専門家の多くが、位相差顕微鏡を改良しても、光学顕微鏡観察の大きな進歩には繋がらないと考えていた。私たちは、低倍率のアポディゼーション位相差法の技術評価を行い、その画像データから、高倍率(高開口数)でこそアポディゼーション位相差法の効果が大きいと予想した。そして、大瀧氏と共にニコンを説得し、試作を進め、位相差顕微鏡の高解像度化に繋がった。神経成長円錐内部の微細なアクチンの網目(直径20nm程度)の可視化に成功した。

位相差顕微鏡の理論は、既に完成し、改良の余地がないという一般的考えに反し、位相差顕微鏡の高解像度化を図ることが出来た。2004年6月、光学シンポジウムの一般講演の口頭発表では、大きな反響があった。プレリミナルなデータの発表だったが評価され、「アポディゼーション位相差顕微鏡の生細胞への適用」として、日本光学会から大瀧、加藤、鈴木の3名の共同研究として、光設計賞を頂いた。生物学者、光学者の両方にインパクトを与える仕事になった。このアポディゼーション位相差顕微鏡の試作が完成したのは、さきかけの最終年である。秋から本格的な観察データを取り始め、まもなく投稿である。また、このアポディゼーション位相差顕微鏡での試料の実測を通じて、従来の位

相差顕微鏡の理論では説明が出来ない部分があることを見いだした。今後、この部分を実験的に検証し、生体試料への応用へと繋げたい。

本研究は、成長円錐の運動解析を目指し、院生や共同研究者と共に進めることを想定して計画を立てた。しかし、人が集まらなかった。周囲に生物系の研究室がない建物で、本当に単独で進めることになった。さきがけの領域会議の期間中、培養細胞の培地替えにも困っていた。このため、GFP とアクチン関連タンパクの融合蛋白質の発現解析は、マンパワーの面で無理が出てしまった。この点は深く反省している。

そこで、アポディゼーション位相差顕微鏡の試作を主体に進めることに、最終年度に戦略を換えた。この仕事は、私と大瀧氏の連携がうまく進み、他の人には真似の出来ないものになった。今後、この顕微鏡は、様々な分野で広く使われると期待されている。

自己評価としては、GFP-アクチン関連蛋白質の動態解析に関してはマイナス評価、アポディゼーション位相差顕微鏡の開発試作ではプラス評価と考えている。総合的には5段階評価で3と思う。

私は「認識と形成」という生物系の領域で、成長円錐が観察できる光学顕微鏡の開発という物理系の仕事を結果として報告した。計画通りに生物系の実験が進まなかった点は、言い訳できないと思う。今後、この研究を基礎として、成長円錐の運動のメカニズムに迫りたいと考えている。

6 研究総括の見解:

光学顕微鏡を用いて神経細胞を生きのまま観察し成長円錐の運動機構を解明することを目的とした。GFP-アクチン関連タンパク質を neuroblastoma の成長円錐に発現させ、それを標識として成長円錐の運動を解析した。その過程でアポディゼーション位相差顕微鏡を企業(Nikon)との共同研究によって開発試作し、成長円錐内部の微細なアクチン繊維の網目構造を可視化することに成功した。初期計画は実質的には機器開発に変更されたが、その成果は非常に高く評価でき関連研究に対する貢献度も大きい。この機器開発の成功によって、当初の目的はいずれ達成されるものと期待する。

7 主な論文など:

原著論文

1) Yang B., Matsumura H, Katoh K, Kise H, Furusawa K.

Formation of multilayer particles comprised of silica vesicle / silica particles by heterocoagulation. *Langmuir* 17,p2283-2286. 2001

2) Yasuda S, Sugiura S, Kobayakawa N, Fujita H, Yamashita H, Katoh K, Saeki Y, Kaneko H, Suda Y, Nagai R, and Sugi H

A novel method to study contraction characteristics of a single cardiac myocyte using carbon fibers coupled with a feedback system.

Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 281, p1442-1446, 2001

3) Yasuda S, Sugiura S, Yamashita H, Saeki Y, Momomura S, Katoh K, Nagai R Sugi H

Unloaded shortening increases peak of Ca²⁺ transients but accelerates their decay in rat single cardiac myocytes.

Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol 285 p470-475. 2003

4) Matsuoka T, Katoh K, Hoshino N, Matsunaga T, Saito N, Suzuki K, Yamada M, Shimojo N, Kono Y, Arai T and Suzuki K.

Disorganization of actin polymerization in neutrophils of a patient with leukocyte adhesion dysfunction: A bioimaging analysis using a polarized microscopic system LC-polscope.

Bioimages 11 p105-114. 2003

著書

- 1) 加藤 薫 (2003)
ナノバイオテクノロジーの最前線 (植田充美監修)
「4.3 偏光顕微鏡等による細胞の観察」(分担執筆) p389 - 394
- 2) KATO H., Yoshida F., Ishikawa R.: "Actin dynamics in neuronal growth cone revealed with a polarized light microscopy" .
'Molecular and cellular aspects of muscle contraction' (H. Sugi 編集),
Plenum Press (NY), p347-359, 2004
- 3) Seiryu Sugiura, So-ichiro Yasuda, Hiroshi Yamashita, Yasutake Saeki, Kaoru KATO H., Ryoza Nagai, Haruo Sugi (2003)
"A novel method to measure force, displacement and Ca²⁺ transients of a single cardiac myocyte."
in 'Molecular and cellular aspects of muscle contraction' (H. Sugi ed) Plenum Press (NY)
p381-388

総説

1. 加藤 薫, 山田雅弘 (2002)
光学顕微鏡による成長円錐の運動の観察
Molecular Medicine 別冊 39巻 p210-220
2. 加藤 薫, 吉田史子 (2004)
新しい偏光顕微鏡 (Pol-Scope) その原理と応用
生物物理 Vol. 44, p226-229
3. 加藤 薫, 大瀧達朗, 鈴木基弘 (2004)
アポディゼーション位相差法による生体試料の可視化
生物物理 Vol 44, p260-264

招待講演(国際)

1. **Kaoru KATO H.**, Fumiko Yoshida, Ryoki Ishikawa
"Actin dynamics in neuronal growth cone revealed with a polarized light microscopy.----Difference and similarity between growth cones and muscles.----"
The fourth Fujiwara Seminar "Molecular and Cellular Aspects of Muscle Contraction"
(2002年10月) 箱根
2. Seiryu Sugiura, So-ichiro Yasuda, Hiroshi Yamashita, Yasutake Saeki, **Kaoru Kato H.**, Ryoza Nagai, Haruo Sugi "A novel method to measure force, displacement and Ca²⁺ transients of a single cardiac myocyte."
The fourth Fujiwara Seminar "Molecular and Cellular Aspects of Muscle Contraction"
(2002年10月) 箱根

招待講演(国内)

1. 杉浦清了, 保田壮一郎, 山下尋史, 三枝木泰丈, 加藤 薫, 杉 晴夫, 永井良三
"心筋細胞の力学負荷に対する応答とその調節"
第75回日本薬理学会年会 シンポジウム「メカニカルストレス応答による細胞機能制御 創薬と再生臓器開発への応用」(2002年3月13日) 熊本
2. 加藤 薫
"神経成長円錐の形態から動きのメカニズムを探る"
バイオレオロジー学会 (2002年6月) 信州大学
(第25回日本バイオレオロジー学会年会 プログラム・抄録集 p44)

3. **加藤 薫**,吉田史子

"新しい偏光顕微鏡と蛍光法の組み合わせによる成長円錐の観察"

浜松医科大学 メディカルホトニクスコース (2002年7月)浜松

4. 大瀧達朗, **加藤薫**, 吉田史子

「光学顕微鏡における位相物体観察法」

日本顕微鏡学会 第47回シンポジウム「顕微鏡法の限界とそのブレイクスルーを目指して」

(2002年11月) 仙台

5. **加藤 薫**, 吉田史子, 山田亨

「液晶偏光顕微鏡法の新展開 - 偏光等を用いた数十 nm 物体の検出 - 」

日本顕微鏡学会 第47回シンポジウム「顕微鏡法の限界とそのブレイクスルーを目指して」

(2002年11月) 仙台

6. **加藤 薫**(2003.2)

「光学顕微鏡による生細胞のナノオーダーの計測」

公開シンポジウム「バイオイメージングとナノテクノロジー」(2003年2月)東京

7. **Kaoru KATOH**

「Direct Observation and Analysis of Actin Bundle Dynamics in Neuronal Growth Cones」

システム神経科学スプリングスクール(2003年3月) 奈良先端大

8. **加藤 薫**

「光学顕微鏡で生細胞のナノオーダーの現象をみる」

岡山県医用工学研究会 シンポジウム(2003年3月) 岡山

9. 石川良樹, **加藤 薫**, 小浜一弘

「Actin dynamics in filopodia: Possible roles of actin-binding proteins」

第26回日本神経科学大会(2003年7月) 名古屋

10. **加藤 薫**, 吉田史子, 萩原妙子, 古川孔基, 山田雅弘

「マイクロスコープ(光学顕微鏡)でナノメートルオーダーの試料をとらえる」

日本機械学会, オrganizedセッション(2003年8月) 徳島

11. **加藤 薫**, 吉田史子, 石川良樹

「Dynamics of actin filaments and actin associate proteins revealed by polarized light and fluorescence microscopy」

第46回日本神経化学学会年会シンポジウム(2003年9月)新潟

12. **加藤 薫**

「偏光顕微鏡による観察」

第2回細胞生物学ワークショップ(2003年11月) 北海道大学

13. 大瀧達朗, **加藤薫**, 鈴木基弘

「アポディゼーション位相差顕微鏡の生細胞への適用」

(日本光学会, 光設計 優秀賞 受賞講演)OpticsJapan, (2004年11月) 大阪

14. **加藤 薫**

「新型偏光顕微鏡や, アポダイズド位相差顕微鏡による神経成長円錐の運動の可視化・動態解析」

バイオメディカル光科学研究会(2004年11月) 静岡県立大学

15. **加藤 薫**

「新型偏光顕微鏡や, アポダイズド位相差顕微鏡による神経細胞の可視化・動態解析」

第4回細胞生物学ワークショップ(2004年11月) 北海道大学

16. **加藤 薫**, 大瀧達朗

「アポディゼーション位相差法による生細胞の内部構造の動態観察とその利点」

生物物理学学会 ランチョンセミナー(2004年12月) 京都

口頭発表(一般) 11件

特許

- 1) 加藤 薫, 岡本治正, 金子浩子, 須田吉久, 山田邦生
細胞培養観察方法, 細胞培養観察用基板, およびその製造方法 (2005 年 2 月 21 日出願)

受賞

- 1) バイオイメージング学会 ベストイメージ賞(ニコン賞) 2003 年 11 月
- 2) 日本光学会 光設計優秀賞 2004 年 11 月
(大瀧, 加藤, 鈴木の 3 名での受賞)