

研究課題別評価書

1. 研究課題名

生細胞内における蛍光蛋白質による力発生の3次元可視化

2. 氏名

渡邊 朋信

3. 研究のねらい

近接場を用いた1分子計測技術、光ピンセット法を用いたナノ計測技術等の光学技術が開発され、約10年が経過した。上記技術は、膜蛋白質1分子の運動やミオシンをはじめとするモーター蛋白質の運動機構の解明に新たな知見を見出した。しかし、細胞内では、多くの蛋白質が三次元的に局在、運動しており、二次元上の動きしか捉えることができない上記技術では、観測不可能であった。そのため、近年、共焦点顕微鏡法を用いた三次元観察法が開発されたが、時間分解能が低い(〜秒)ため、nm,msの世界で三次元的に運動する蛋白質1分子の動きを観測することはできない。「生きた細胞内」で「蛋白質1分子」を「nm,ms」の精度で「三次元的」に観測する技術は、今後の細胞生物学、生物物理学研究において、多くの知見を生み出すと期待される。

上記光学技術と合わせて生物研究界に貢献した技術として、蛍光蛋白質 GFP (Green Fluorescent Protein) が挙げられる。蛍光蛋白質を融合させた標的蛋白質を細胞に発現させ、その局在を観察することにより、その標的蛋白質の機能を推測できる。近年は、pH感受性、Ca²⁺感受性などの環境感受性蛍光蛋白質も開発されている。蛋白質の機能を時間/空間的にモニターできれば、タンパク機能が細胞内の活性化する機構を解明すると言われているが、従来観察可能な局在や環境変化は、必ずしも蛋白質の機能に結びつくとは限らない。例えば、ミオシンにとって機能するとは、「力を発する」ことであり、「局在する」ことではないので、従来方法では、細胞内におけるミオシンの機能を正確に反映していないと言える。力学反応(力発生)をモニターできる蛍光蛋白質を開発することで、力発生を機能としている蛋白質が働く現場(収縮環や細胞の走化性)の観察が可能となる。

本研究課題では、生きた細胞内において、蛋白質が力を発する現場を三次元的に可視化することを目的とし、細胞内において蛋白質1分子をnm,msの精度で三次元的に観測できる新たな光学技術の開発と、蛋白質が発する力をモニターする蛍光プローブの開発を平行して進めてきた。

4. 研究成果

本研究は、二つの顕微鏡技術の開発と新規蛍光蛋白質の開発との計三つに分けられる。

1) 三次元蛍光顕微鏡の開発

蛍光顕微鏡の三次元化における、もっとも単純なアイデアは、共焦点蛍光顕微鏡において、対物レンズをピエゾアクチュエータにより高速にステップ駆動させ、ビデオフレームに同期させる方法である。しかしながら、この方法では、対物レンズの重量や対物レンズと観察試料の間に挿入するイメージンオイルの粘性などの影響により、対物レンズ、あるいは、観察試料が振動してしまう。本研究者は、さきがけ研究開始前にすでに、屈折率1.52を保ちつつ、従来のイメージンオイルより粘性が低いオイルを開発しており、さらに、対物レンズが観察試料面を振動させない様な特殊なガラスボトムディッシュを考案していた。しかしながら、上記の改良を加えても、焦点面の振動を焦点深度以内(250nm)に抑えながら対物レンズを走査するためには、30ms毎に一枚の共焦点画像の取得が限界であった。

本さきがけ研究の第一の研究目標は、上記三次元共焦点顕微鏡法のさらなる高速化である。極近年、対物レンズを走査するピエゾアクチュエーターに、静電センサを付加したものが市販され、対物レンズの走査位置をフィードバック制御することで、その走査位置をnm精度で決めることができる。しかしながら、この制動方法を用いている限り、焦点面の振動減衰時間は、対物レンズの重量により決定されてしまい、原理的に高速化は不可能である。そこで本研究者は、対物レンズ

を共振させ、焦点の位置を画像と共に取得しておき、後にオフラインで三次元再構成する方法を選択した。焦点の位置は、 piezoelectric actuatorによる静電(歪み)センサからの戻り値を用いて計測しても良いが、本研究者らは、より正確な焦点面を計測するために、試料底面にレーザー光を当て、その全反射光の位置を二分割フォトダイオードにより検出するシステムを構築した(図 1)。本手法により、30ms の間に、15 枚もの共焦点画像を取得することに成功した。

上記方法により、確実に三次元可視化の時間分解能は向上したが、問題点が残っている。上記方法では、高速な共焦点画像取得の為に、ニプコウ板タイプの共焦点顕微鏡を用いた。ニプコウ板が高速に回転するため、その回転が像の振動が、1分子計測法の観察精度を低下させる。また、ニプコウ板の回転速度を取得するカメラのフレームレートと厳しく同期しなければ、照射斑や画像のチラつきが発生する。また、従来の共焦点顕微鏡は、価格が高く(~1000 万円)、装置も巨大化してしまう。これらの問題点を解決するために、本研究では、簡潔、かつ、安価な蛍光断層画像取得法の原理の開発を行ってきた。

本研究での蛍光断層画像取得法の開発は、従来の共焦点光学と違い、ピンホールを用いずに蛍光断層画像を生み出すことを目標とした。光を走査する必要がないので、複雑な機械を必要としない。従って、従来の共焦点顕微鏡では不可能であった光学系の小型化・高速化が可能である。基本原理は新規性が高く、現在、特許出願準備中のため、ここでは詳細を公開できないが、研究室レベルにおいて、ピンホールを用いずに蛍光断層画像を取得することに成功している。左に、実際に本手法で取得した光軸方向の点像分布を示す(図 2)。本さがけ研究修了後は、当該新規光学を用いて、対物レンズの走査をしない三次元画像取得方法の開発を予定している。

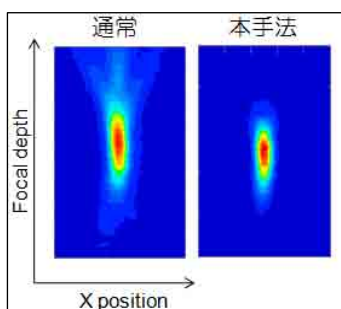


図 2. 新規光学による点像分布関数

2) 張力と蛍光スペクトルを同時に計測できる顕微鏡の開発

本研究の主と成る目標は、外力を感受する事のできる蛍光蛋白質の開発である。蛍光蛋白質の外力・波長特性を計測する装置は現存しておらず、本研究にとって、付加的に別途開発の必要性がある。そこで、本研究では、磁気トラップ法と1分子分光法を組み合わせた顕微鏡システムを開発した。磁気トラップ法とは、微小磁気ビーズを補足・操作することができる技術である。蛍光蛋白質の N 末端をガラス表面に、C 末端を磁気ビーズに架橋させれば、顕微鏡下で強磁場を与えることで、蛍光蛋白質に外力を加えることができる。1分子分光法は、すでに確立している技術であり、本研究における開発要素は、磁気トラップによる力計測法である。

開発した顕微鏡システムの概要を図 3 に示す。顕微鏡の試料ステージ部に電磁石を二つ設置した。電磁石は、試料面において最大 200G の磁力を生成できるように設計した。顕微鏡には、対物レンズ型エバネッセント照明の為に光学系を組み上げ、蛍光蛋白質による1分子の蛍光を取得できるようにした。結像側では、光路を二つに分け、片方は磁気ビーズの像を、もう一方は蛍光像を写させる。蛍光像の為に光路にペリンブロ

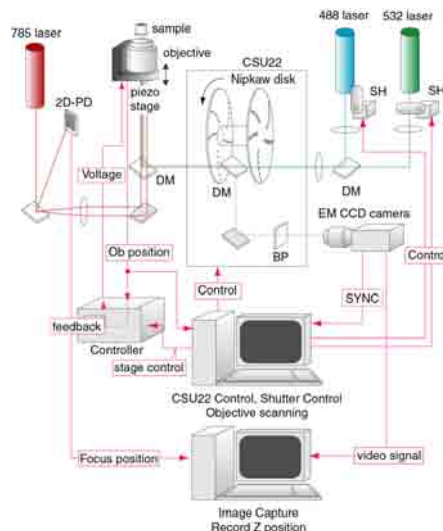


図 1. 高速三次元共焦点システム

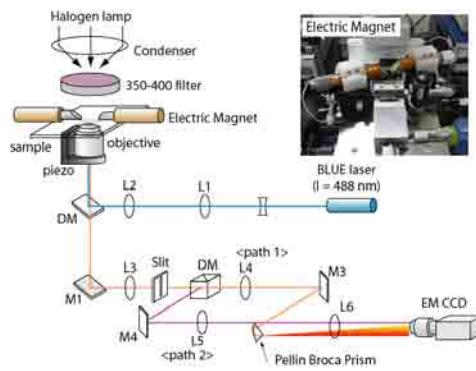


図 3. 張力と蛍光スペクトルを同時に計測できる顕微鏡

カプリズムを設置することで、蛍光像を分光する事ができる。

補足する磁気ビーズの大きさが完全に一様ではないため、磁気ビーズに係る外力は、その都度、該磁気ビーズの揺らぎ幅から算出しなくてはならない。従って、磁気ビーズの三次元位置を取得する必要がある。本研究者は、磁気ビーズの明視野像から、該ビーズの三次元位置を計算するアルゴリズムを作製した。ビーズの明視野像において、顕微鏡像の輪帯の半径が、ビーズの光軸方向の位置に比例する事は、周知である。本研究では、高速にビーズの三次元位置を計算するために、取得される明視野像の理論式を簡素化した近似式を考案した(図 4)。本近似式を用い明視野像を近似することにより、ビーズの中心位置(xy 軸)と輪帯の半径(z 軸)を求めることができる。実測精度は、xy 平面で 2nm、z 平面で 6nm であった。

当初の目的を達する顕微鏡システム・解析方法は完成したが、後に述べる様に、作製した蛍光蛋白質の発光強度が微弱なために、従来のエバネッセント照明を用いた 1 分子分光法では、感度が足りず、作製した蛍光蛋白質の張力・発光波長特性を計測する事はできなかった。

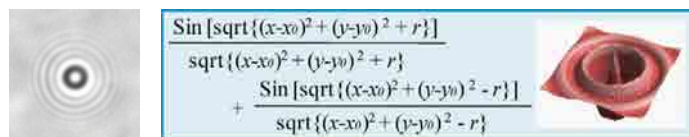


図 4.ビーズの明視野像(左)と三次元位置を取得する為の近似式(右)

3) 張力により波長特性が変化する蛍光蛋白質の開発

GFP や YFP などの蛍光蛋白質は、バネ定数約 7pN/nm 程度の蛋白質であると言われている。蛋白質 1 分子が発する力は数 pN 程度(筋肉のミオシン II で 3pN、キネシンで 8pN 程度)であるから、その張力によって、発光団(65-67 残基)を取り囲む β シートの配列(“ β can”構造)に 1nm 程度の歪みが生じることが予想される。また、203 残基目のスレオニンをチロシンに換えた YFP(Yellow)は、発光団(65-67 残基)と 203 残基のチロシンのフェノール環が、電子的に相互作用していると考えられる。従って、YFP は、 β can の構造変化に対し、敏感にその発光波長が変化することが期待される。

本研究では、まず、 β can の構造の歪みと、YFP の吸収・発光波長の相関を調べた。YFP の 144 残基と 145 残基の間に、グリシンを 1 つずつ挿入し、その発光・蛍光波長を計測した。グリシンの挿入により、YFP の吸収波長、発光波長は共に短波長側に移行していた(図 5)。また、グリシンの挿入数を増やすと、吸収・蛍光波長の波長移行は強くなり、グリシン挿入による構造の歪みと吸収・蛍光波長の変化に相関がある事が証明された。YFP の “ β can”構造に割目を入れるために 1-144 番目と

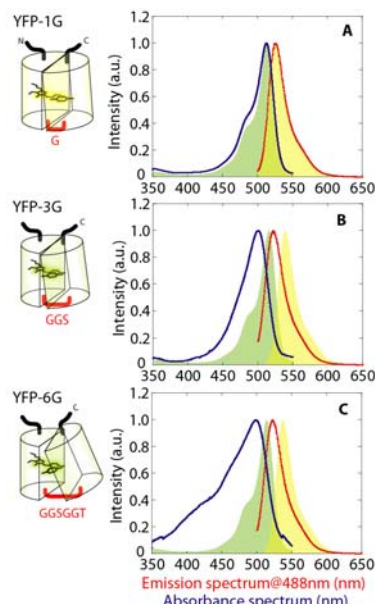


図 5. グリシン挿入による発光・蛍光波長の変化

145-238 番目を入れ替えた円循環変異体(cpYFP)においても、同様の波長移行が確認できた(図 6)。

次に、cpYFP の N 末と C 末にペプチドを付加し、cpYFP の開いた構造を閉じ、吸収・発光波長を元に戻す事を試みた(図 7)。上記ペプチドに張力が係ることによって β can の割目が再度開き、吸収・発光波長が変化する力感受性蛍光蛋白質の作製である。該ペプチドとして、バネ蛋白質として知られる Ankyrin をはじめとして

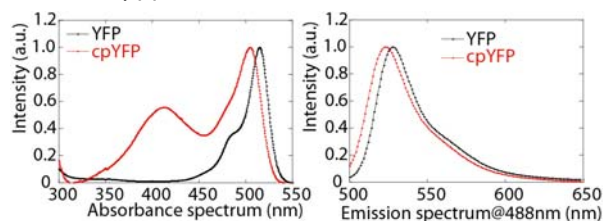


図 6. 円循環変異による YFP の発光・蛍光波長の変化

様々なペプチドで試行を行った。最終的に、 β -hairpin を選択した。cpYFP の N 末端に GEWTYDD 配列を、C 末端に TKTFTVTE 配列を付加した(cpYFP- β 1)ところ、cpYFP の吸収波長のうち 400nm 付近にあったピークが激減した。cpYFP- β 1 の N 末端、C 末端の該ペプチド挿入箇所それぞれにグリシンを挿入し、張力が係ることを模倣する(cpYFP- β 2)と、400nm 付近の吸光度が増加した。

さらに大きな構造変化を模倣するために、グリシンではなくプロリンを挿入する(cpYFP-β3)と、やはり、400nm 付近の吸光度がさらに増加した。上記の結果は、cpYFP-β1 に付加されているβ-hairpin の構造の歪みが、cpYFP の吸収波長に大きく影響していることを示している。残念ながら、YFP に比べ量子効率が 1/10 程度にまで低下しているため、その1分子における、張力-波長特性の取得には至っていない。

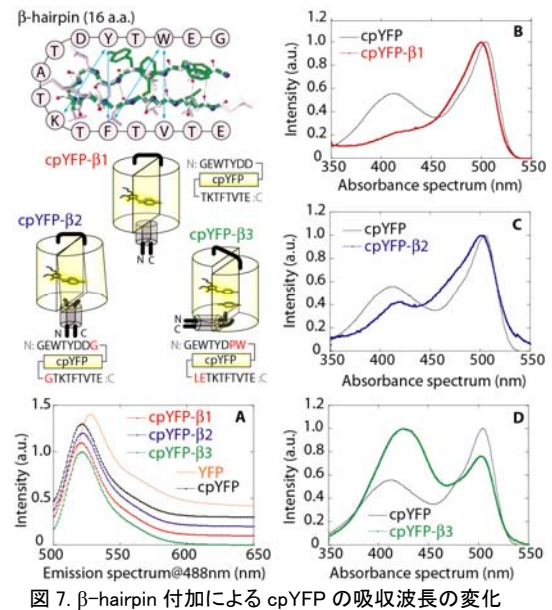


図 7. β-hairpin 付加による cpYFP の吸収波長の変化

5. 自己評価

個々の顕微鏡に関する技術開発においては、当初の目標を達成した。しかしながら、作製した改変蛍光蛋白質を計測するという目的に対しては、感度不足が原因となり、達成とは言えない。張力により波長特性が変化する蛍光蛋白質においては、当初の研究戦略とは異なり、また、量子効率が低いため、試験管実験系による蛍光・波長特性の計測は、出来なかった。しかしながら、蛍光蛋白質の構造の歪みと吸収・発光波長が変化する事を証明し、最終目標に到達するための十分な情報は得られたと考えている。

また、本研究課題より生み出された要素技術は、それぞれ、生物学実験に有効である。力感受性蛍光蛋白質の生物学実施実験にまで至らなかったことが残念である。

6. 研究総括の見解

3次元動的可視化のイメージングハードウェア作製の力量は素晴らしい。また、力感受性蛍光タンパク質の分子設計にも改良の余地はあるもの見事に成功している。目的に対する道具立てはほぼ達成したと言えよう。期間内にこれだけの成果を挙げたことを大いに評価する。今後の生細胞研究への応用展開が楽しみである。

7. 研究成果リスト

A. さきがけ個人研究者が主導で得られた成果

(1) 論文(原著論文)

論文(国際)

・Watanabe TM, Sato T, Gonda K, Higuchi H. Three-dimensional nanometry of vesicle transport in living cells using dual-focus imaging optics. *Biochem Biophys Res Commun.* 359:1-7. 2007

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 3件(出願公開前)

(3) 著書

・渡邊朋信 量子ドットの生命科学領域への応用『第 20 章バイオイメージング用の光学技術と解析技術』, シーエムシー出版, 2007

(4) 学会発表

学会発表(国際)

・Watanabe TM, Sato T, Gonda K, Higuchi H. Three dimensional nanometry of moving

vesicles in a living cell. Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, November 15, 2006.

・Watanabe TM, Sato T, Gonda K, Higuchi H. Three dimensional nanometry of moving vesicles in a living cell. Joint Meeting of the Biophysical Society 52nd Annual Meeting & 16th International Biophysics Congress, Feb. 2-6, 2008.

・Watanabe TM, Tokuo H, Gonda K, Higuchi H, Ikebe M. The dynamics for myosin-X induced filopodia protrusion. Biophysical Society 54th Annual Meeting, February 24, 2010.

学会発表(国内)

・渡邊朋信、徳王、権田、樋口、池辺 糸状仮足伸長時におけるミオシン X の『釣りかぎ』の役割 第46回日本生物物理学会年会、2008年12月3日

・渡邊朋信、慶澤、柳田 蛍光蛋白質を用いた張力感受性プローブの開発 第47回日本生物物理学会年会、2009年10月29日

(5) 招待講演

招待講演(国際)

・Tomonobu M Watanabe, Nano-tracking methods of single particles using Quantum dot in 2D and 3D. 3rd International Symposium on Bioimaging, Okazaki International Conference Hall, Jan. 20, 2010.

招待講演(国内)

・渡邊朋信 リレー光学系の自作について 第8回細胞生物学ワークショップ 北海道大学 2007年1月23日

・Tomonobu M Watanabe, Kohsuke Gonda and Hideo Higuchi, Methods for tracking the movements of the proteins in three-dimensions and in living cells, 第60回日本細胞生物学会大会, パシフィコ横浜、2008年6月29日

・渡邊朋信、樋口秀男 三次元単粒子追跡方法を用いた、細胞内小胞輸送のナノメトリ計測, マイクロビームアナリシス第141委員会, 成蹊大学, 2009年3月4日

・渡邊朋信 三次元単粒子ナノ追跡法で観た細胞内小胞輸送, 定量生物学の会 第1回キャラバン, 国立遺伝学研究所, 2009年3月14日

・渡邊朋信 三次元単粒子追跡方法を用いた細胞内ナノメトリ計測 定量生物学の会 第二回年会, 2010年1月11日

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

(1) 論文(原著論文)発表

論文(国際)

・Tada H, Higuchi H, Watanabe TM, Ohuchi N. In vivo real-time tracking of single quantum dots conjugated with monoclonal anti-HER2 antibody in tumors of mice. *Cancer Res.* 67, 1138-1144, 2007

・Dhermendra K. Tiwari, Shin-Ichi Tanaka, Yasushi Inouye, Keiko Yoshizawa, Tomonobu M. Watanabe and Takashi Jin, Synthesis and Characterization of Anti-HER2 Antibody

Conjugated CdSe/CdZnS Quantum Dots for Fluorescence Imaging of Breast Cancer Cells, *Sensors* 9, 9332–9354, 2009

•Gonda K, Watanabe TM, Ouchi N, Higuchi H. In Vivo nano-imaging of membrane dynamics in metastatic tumor cells using quantum dots. *J Biol. Chem.* 285, 2750–2757, 2010.