別紙4

「生命現象と計測分析」研究領域 領域活動・評価報告書

-平成22年度終了研究課題-

研究総括 森島 績

1. 研究領域の概要

本研究領域は、生命現象の解明のために必要な新たな原理や手法に基づく計測・分析の技術に関して個人の独創的な発想に基づく革新技術の芽の創出を目指す研究を対象とするものです。

具体的には、細胞内の種々の化学過程の計測・分析や細胞から個体、生態系などのミクロからマクロに至る多様なスケールでの生命現象を解明するための新規な計測・分析技術等を対象とします。生命系科学技術における斬新な成果の発掘を目指した新たな方法論の創出や技術展開の契機となることが期待される研究を対象とします。また生命現象に関連の深い環境の計測分析も含みます。

2. 研究課題·研究者名

別紙一覧表参照

3. 選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

- 1) 選考は「生命現象と計測分析」領域に設けた領域アドバイザー9~10 名、必要に応じて研究総括が委嘱 した外部評価者 3~4 名と研究総括で行った。
- 2) 選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とした。
- 3) 選考に当たっては、募集要項に示した選考基準を基本としたが、以下の点に特に留意した。 生命科学の分野において、構造生物学などの「生体分子の科学」から「生命現象の科学」への流れが顕 在化しつつある点に重点を置き、複雑系の科学である生命現象の本質にかかわる計測・分析技術の飛躍 的展開を目指す研究、すなわち細胞間や細胞内での生体分子の動態を捉える新規な測定技法やそれを 可能にするプローブの開発を重視した。また、構造生物学分野においても複雑な生体分子間相互作用や 既存の方法では観測不可能な動的構造と機能との相関を見いだす新規な手法も選考の対象とした。さら には生物個体、生態レベルで生命現象の本質に関わる計測・分析技術の開発の提案も選考対象として含 めた。
- 4. 選考の経緯

ー応募課題につき領域アドバイザー・外部評価者3名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者 を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補者を選定した。

選考	書類選考	面接選考	採用者
対象者数	132名	24 名	10 名

5. 研究実施期間

平成 19年 10 月~平成 23年 3 月

- 6. 領域の活動状況
 - •領域会議:7回
 - ·研究報告会:1回
 - ·生命·計測分析合同研究会:3回
 - ・研究総括(または技術参事)の研究実施場所訪問:24回

研究開始時に研究現場を訪問し、研究環境、設備等や研究費の確認及びヒヤリング、組織責任者への協力依 頼を行った。研究期間内で異動した研究者をその都度訪問し、研究環境を確認した上、新組織責任者への協 力依頼、研究継続に必要となる支援の決定を行った。訪問には、技術参事が同行した。

・研究総括の個別研究指導:10回 終了年度に、成果達成状況と残された課題の把握・アドバイスを行うため、10名の研究者に対して、JST三番 町事務所(4名)、領域事務所(6名)で、個別研究指導を行った。

7. 評価の手続き

研究者の研究課題別評価書を基に、領域アドバイザーの意見を参考にして研究総括がおこなった。

(評価の流れ)

平成 22 年 9 月 第 10 回領域会議(総括・アドバイザーによる進捗評価とアドバイスの実施)

平成 22 年 12 月 研究報告会開催(総括・アドバイザーによる総合評価とアドバイスの実施)

- 平成 23 年 1 月 研究報告書提出(研究者作成)
- 平成 22 年 2 月 研究総括による評価に基づき領域活動・評価報告書提出
- 平成 22 年 3 月 研究報告書提出
- 平成 22 年 3 月 研究期間終了

8. 評価項目

- (1) 研究目標に対する研究課題の達成度
- (2) 得られた研究成果の科学技術への貢献(計画外成果も含む)
- (3) 外部発表(論文、口頭発表等)、特許出願など研究成果の発信状況
- (4) 受賞・招待講演など外部からの評価状況

9. 研究結果

本領域研究は、タンパク質などの生体分子そのもの(1分子を含む)の静的・動的構造解析を行う構造生物学的 新手法の開発は一部には含むものの、複雑でダイナミックな生命現象(の一断面)を捉えて解析する手法を研究す ることを主として目指すものである。本年度は全て後者に属する研究が遂行された。すなわち細胞レベル、個体レベ ルでの生体分子の動的挙動やそれらの間の相互作用、などの研究に重点を置いている。

本年度は本研究領域の最終年度にあたるためか一昨年度、昨年度の終了研究課題に比べて研究課題の研究 進捗の目標達成度は高いように思われる。今年度の最大の成果はアメリカのバイオベンチャーの開発した超高速 1 分子 DNA シークエンサーを用いて生命現象の基本問題であるタンパク質翻訳過程の 1 分子可視化に成功したこと であろう。計測手法そのものも開発した訳ではないが、測定対象が細胞内の条件(高濃度)と同一であり、既存の全 反射1分子計測法では不可能の測定をリアルタイムで測定し、永年未解決の翻訳メカニズムを解明した。この手法 の生命科学一般への応用範囲は計り知れないと思われる。これによって1分子生物学という新しい分野が拓けたと 言えよう。実用化に近い計測法の開発もいくつかあった。新しいアイデアに基づく超分解能光学顕微鏡の開発であ る。企業の研究者によるものであるだけに既存の顕微鏡に実装出来るように設計されている。無線・無電極水晶振 動子を用いた高感度タンパク質センサもその一つである。これは Αβペプチドの凝集過程の解析に威力を発揮しつ つある。高速化した変調原子間顕微鏡(FM-AFM)も一般に普及させたい計測法である。水和層が原子分解能で測 定出来、生体膜への応用等柔らかい物質の原子分解能測定が可能になった。多周波高感度 ESR および ENDOR 装 置の開発も実用レベルにある。プローブ開発に工夫がなされて達成された。いままで不可能であった整数電子スピ ンの ESR 測定に世界で初めて成功した。生体系(光合成系での酸素発生メカニズム)への応用は途半ばであるがこ の装置は我が国に常置してもらいたい。CARS 内視鏡の開発では白色レーザーを光源とする CARS 分子イメージン グ(細胞レベル)に成功している。感度と空間分解能の改善が進めばいわゆる内視鏡のレベルにまで発展するであ ろう。圧力変調顕微鏡の開発もユニークだ。圧力という摂動は様々な生命現象のメカニズムの解明に手掛かりを与 えてくれる可能性を秘めている。一方、ハードウエアの開発とは異なり細胞生物学的研究として、自家蛍光の強い細 胞内の小分子の可視化プローブを独創的なアイデア(分割ルシフェラーゼ)で開発し多方面に応用し成功している。 また、病態モデル細胞をセミインタクト・リシール細胞でミミックして再構築するという独創的な技法が完成した。病態 と細胞内変異とを結びつけるこの方法の発展性は極めて高いものと思われる。生化学的・細胞生物学手法とタンパ クエ学的手法を融合させてタンパク質(脳内のニューログロビン、tRNA 合成酵素)の新規機能発現機構を解明した 研究もあった。これは従来のアミノ酸置換やドメイン置換ではなく、モジュール(DNA のエクソンに対応)置換しこのモ ジュールが機能単位であることを実証しながら人エキメラタンパク質が細胞内でたとえば酸化ストレスから細胞死を 防ぐことを解明した(ニューログロビン)ものである。細胞生物学での技法として利用出来る可能性がある。 本年度はいずれの研究も十分の成果を挙げており最終目標への到達度はかない高いと言えよう。

以下、研究者別にそれらの研究課題と成果ならびに評価を記す。

「1分子超解像空間分析法の開発」(池滝 慶記 研究者) 波動光学と分光学を融合した超解像度光学顕微鏡、すなわち erase 光としてダークホール状あるいはマカロニ状 にしたものを用い、pump光で照射された回折限界スポット中において、さらに小さなスポットができるユニークな手法 を用いた3次元的に回折限界を超えた顕微鏡の開発に成功したと言えるであろう。大いに評価したい。ダークホール 型を蛍光相関法に適用し小さなスポットでの相関関数が得られるようにしたことも評価出来る。検証実験も今のとこ ろ蛍光染色した微小管のイメージングなど限られているものの超解像度をチェックしている。共同研究等で生物試料 の測定例をさらに蓄積して本手法の有効性をさらに示し、生物研究者が使い易いものへと実装化されることを期待 する。顕微鏡技術では日本の優位性を維持し続けていただきたい。

「1分子同時計測技術によるタンパク質翻訳操作」(上村 想太郎 研究者)

申請研究課題を途中で変更しているがむしろ本領域研究により適した研究を遂行した。東大の助教の職を辞して までアメリカで本研究に集中し、短期間でありながら生命現象の本質の一つであるリボソームでのタンパク質合成の ダイナミックな分子機構を新しい1分子計測技術 ZMW 法を用いて解明した。構造生物学を超え生命現象における1 分子計測の新しい利用の途を切り開いた実に素晴らしい成果を挙げている。ZMW 法自体は Pacific Biosciences 社 が新しい DNA シークゥエンサーとして開発したものであるが生命現象の本質に迫る課題解決に応用し得ることを実 証したことを特に高く評価したい。今後様々な生命現象の解明に応用展開されるものと期待する。

このような見事な成果を挙げ得たのも、本研究者が以前留学先のスタンフォード大医学部でリボソームの研究を 行っていた研究室との共同研究でもあることが大いに寄与していよう。課題に対する問題点をとことんまで煮詰めて いたからこそ達し得たものと思われる。この研究には本研究者の強靭な意思、実行力、そして1分子生物学分野を 創造しようとする夢があるように思われる。本総括もサイトヴィジットし研究現場を見、共同研究者と意見交換してみ てこのことを強く感じた。

「無線・無電極振動子たんぱく質マイクロアレイの創製」(荻 博次 研究者)

水晶振動子の無線・無電極化と薄型化により、当初の目標を十分にクリアする高感度センサの開発に成功したこ とは大変素晴らしい成果であり、実用的なセンサとして様々な現場で有効活用されることが期待される。ラムネ型 QCM も装置として完成させた点も高く評価出来る。ナノ量の物質を計測する方法は新しい技術として発展すること が期待される。一方、感度を上げることによって動特性に影響を与える振動子表面でのタンパク質の状態が重要視 されよう。すなわち、相互作用の強さの違う状態を吸着分子数(質量の違い)として見る以外の方法が必要となってく ると思われる。特に吸着分子が大きなタンパク質において感度上昇とともに重要になってくると思われる。 多数のセンサを同時に働かせて得られる情報の有効な利用法の開発も必要ではないだろうか。

「不透明な生体内における細胞内小分子の可視化と光制御法の開発」(小澤 岳昌 研究者)

自己評価にも記載されているように自家蛍光の強い細胞内蛍光イメージングを本研究者が開発したルシフェラー ゼ分割・再構成法を確立し、さらに多色での分子間相互作用のイメージングにも成功している。cGMP 産生のイメー ジングは大変立派な成果である。自家蛍光の強いツメガエル卵の初期発生段階のイメージングは新しい発見をもた らしている。そのほか多彩な研究が成功裏に進められている。マウス個体での現象・解析への発展を期待したい。 多大な努力と困難な問題を着実に解決されての独創性の高い素晴らしい成果である。高く評価したい。

「コヒーレント・ラマン内視分光鏡による生体組織の in vivo 計測」 (加納 英明 研究者)

白色レーザーを光源とする CARS による分子イメージング技術の開発に成功し細胞への応用(基礎データ)には ー応成果が挙っている点は高く評価したい。ファイバープローブの開発に成功したこともCARS 内視鏡の製作に寄与 した。生体組織を見るレベルには至っていないが今後に期待したい。ここで得られた分子構造情報を生体情報とど のように関連づけるのか、すなわちどのような生命現象を分子レベルで語れるようにするのかが課題となろう。膜中 の C-C 結合の trans-gauche に対応するピークを見た点は興味深い。細胞生物学、分子生理学、病理学、臨床への 応用など今後の発展を大いに期待したい。いずれにしても良く頑張ったと高く評価したい。

「セミインタクト細胞を用いた蛋白質の一生の可視化解析」(加納 ふみ 研究者)

タンパク質をセミインタクト細胞に導入する技術で病気のモデル細胞を実現したばかりか、それをインタクト細胞に 戻すリシール細胞技術を完成させた。これを用いて病体変異(高脂血症)モデル細胞のシグナル伝達特性を調べ、 アポトーシスが起こり易いこと、ミトコンドリアの形態変異を見出すなど、病体モデル細胞をセミインタクト・リシール細 胞によって再構築出来ることが示された。独創的な研究で素晴らしい成果を挙げ高く評価したい。今後当初の目的 に向かって可視化と他の病体モデル細胞研究への発展が大いに期待される。これによって病気の要因が細胞レベ ルで理解され、臨床応用に繋がればなお素晴らしいことであろう。

「高圧力による分子間相互作用変調イメージング」(西山 雅祥 研究者)

タンパク質、生体膜、細胞、個体等への圧力効果はかなり以前から種々の分光法等を用いて研究されて来ており、 バロバイオロジーという研究分野に発展している。本研究では圧力変調出来る光学顕微鏡を新たに開発したことは 大いに評価出来る。これを用いてべん毛モーターの回転に及ぼす圧力の作用の研究に応用している。圧力を変える ことによって H+や Na+の流入が変調しモータータンパク質のトルクに影響を与えていることを明らかにしている。しか し何故 800 気圧でモーターの回転方向が逆転するのか解明してほしい。圧力の作用は水構造の変化や分子集合体 の変化をもたらす。分子レベルの変化と分子システムの変化を区別して解明するには高圧力顕微鏡のみでは困難 ではないだろうか。しかしながら本研究はその方向に着実に進展しつつあると言えよう。ユニークな本研究を高く評 価したい。

「ビデオフレーム液中原子分解能AFMの開発」(福間 剛士 研究者)

FM-AFM を高速化することで生体膜構造(モデル膜)を原子分解能で 3D イメージングする方法を開発したことは 大きな成果である。高く評価したい。これには様々の要素技術の積み重ねがあってこその成功だと思う。脂質-水界 面における水和層の構造を可視化出来ただけでなく、微小管中にあるチューブリン分子のヘリックス構造が見える ようになったことは素晴らしい。さらに技術改良によって時間分解能を高めていただきたい。また、実際の生体膜とく にラフト構造も観測していただきたい。とにかく画期的な成果を挙げつつあると言えよう。

「多周波電子核2重共鳴法による酸素発生機構の解明」 (八代 晴彦 研究者)

多周波ESRの高感度化に成功したことは大いに評価出来る。これによって整数スピン (S=2)をもつデオキシヘモ グロビンの ESR スペクトル測定に成功した。これは永年の課題が一応クリアされたといえるがその解釈も出来れば していただきたかった。これは理論家との共同研究が必要であろうが。多周波 ENDORもほぼ目処がついた。本研究 の課題である光合成系の酸素発生中心である Mn4-Ca クラスターの反応中間体で未解明のものの測定については 今後に残された。2010 年にこのクラスター部位の X 線結晶構造解析がなされたが肝心の水分子の位置はわかって いない。これを本研究で開発された ENDORで解決してほしかった。我が国ではこのような難易度の高い ESR 測定出 来る施設は無いので是非とも今後継続的に研究出来る拠点にしてほしいものだ。

「蛋白質工学的手法による細胞内環境の計測」 (若杉 桂輔 研究者)

ヒト脳内で見出されたニューログロビンがミオグロビン、ヘモグロビンサブユニットとヘム近傍構造が似ているにも かかわらず虚血・再還流による酸化ストレスによる細胞死を防ぐ機能を持つことをキメラタンパク質・変異タンパク質 を用いて細胞内で実証したことは評価に値する。着実な研究の成果である。機能発現部位(Gタンパク質との相互作 用部位)もモジュール(遺伝子上のエクソンに対応)置換と部位特異的アミノ酸置換によって同定している。基礎的な 研究で重要な成果を挙げているが、課題に掲げている細胞内環境の計測との結びつきが希薄と思われる。今後は この人工蛋白質を細胞内可視化技術と結びつけて酸化ストレスを計測出来るように期待したい。

10. 評価者

研究総括 森島 績	立命館大学総合理工学院生命科学部	客員教授、
	京都大学 名誉教授	

領域アドバイザー氏名(五十音順)

石渡	信一	早稲田大学理工学術院 教授
神原	秀記	(株)日立製作所 フェロー
北川	禎三	兵庫県立大学大学院生命理学研究科 特任教授
桐野	豊*1	徳島文理大学 学長
栗原	和枝	東北大学原子分子材料科学高等研究機構 教授
田村	守	清華大学医学院 高級訪問学者

- 長野 哲雄 東京大学大学院薬学系研究科 教授
- 難波 啓一 大阪大学大学院生命機能研究科 教授
- 藤吉 好則 京都大学大学院理学研究科 教授
- 柳田 敏雄 大阪大学大学院生命機能研究科 特任教授

*1 平成 19 年 3 月から参画

(参考)

(1)外部発表件数

	国内	国際	計	
論 文	10	65	75	
口頭	191	79	270	
その他	3	3	6	
合 計	204	147	351	

※平成 23 年 3 月現在

(2)特許出願件数

国内	国際	計	
23	8	31	

※平成 23 年 3 月現在

(3)受賞等

〇上村想太郎研究者

·2009年3月 、光科学技術振興財団 研究表彰

〇小澤岳昌研究者

・2009年3月、 バイオビジネスコンペ JAPAN バイオ先端知賞(武田計測先端知財団)

·2011年2月、 第7回(平成22年度) 日本学術振興会賞

〇加納英明研究者

·2008 年 3 月、光科学技術研究振興財団 研究表彰

·2008 年 3 月、 日本化学会 第 57 回進歩賞

·2009 年 11 月、 日本分光学会 若手奨励賞

〇西山雅祥研究者

·2009 年 10 月、日本生物物理学会 第5回若手奨励賞受賞

〇福間剛士研究者

・2008年3月、未踏科学技術協会 バイオ・ナノテクフォーラム 高木賞

·2008年12月、日本生物物理学会 第4回若手奨励賞

·2009 年 9 月、応用物理学会 第 56 回応用物理学会議 講演奨励賞

·2010 年1月、日本 MRS 第19回日本 MRS 学術シンポジウム 奨励賞

(4)招待講演

国際 41 件

国内 81件 合計 122件

※平成 22 年 3 月現在

「生命現象と計測分析」領域 研究課題名および研究者氏名

r			
研究者氏名	研究課題名	現職	研究費
(参加形態)	(研究実施場所)	(応募時所属)	(百万円)
池滝 慶記	1分子超解像空間分析法の開発	オリンパス(株)未来創造研究所	43
(出向)		主任研究員	
	(オリンパス(株)未来創造研究所)	(オリンパス(株)基礎技術部 主任	
		研究員)	
上村 想太郎	1分子同時計測技術によるタンパク質	(独)理化学研究所 横浜研究所	40
(兼任)	翻訳操作	オミックス基盤研究領域 LSAシ	
		ステム構築グループ ゲノム解	
	((独)理化学研究所 横浜研究所)	析技術展開ユニット ユニットリ	
		- <i>ý</i> -	
		(東京大学大学院薬学系研究科	
		助教)	
荻 博次	無線・無電極振動子たんぱく質マイク	大阪大学大学院基礎工学研究科	44
(兼任)	ロアレイの創製	准教授	
() () ()	(大阪大学大学院基礎工学研究科)		
小澤岳昌	不透明な生体内における細胞内小分	東京大学大学院理学系研究科	40
(兼任)	子の可視化と光制御法の開発	为授	
	(東京大学大学院理学系研究科)		
加納 英明	コヒーレント・ラマン内視分光鏡による	<u></u> 東京大学大学院理学系研究科	40
(兼任)	 生体組織の in vivo 計測		10
加納 ふみ	セミインタクト細胞を用いた蛋白質の		40
(兼任)	一生の可視化解析		10
西山 雅祥	高圧力による分子間相互作用変調イ	京都大学大学院理学研究科	47
(兼任)	メージング	助教	
() () ()	(京都大学大学院理学研究科)		
福間 剛十	ビデオフレーム液中原子分解能AFM	金沢大学フロンティアサイエンス機	46
(兼任)	の開発	構 特任准教授	10
() () ()	(金沢大学フロンティアサイエンス機	(同上)	
	構)		
八代 晴彦	多周波電子核2重共鳴法による酸素	(独)科学技術振興機構	44
(専任)	発生機構の解明	さきがけ専任研究者	
	(大阪大学 極限量子科学研究センタ	(大阪大学 特別研究員)	
	—)		
若杉 桂輔	蛋白質工学的手法による細胞内環境	東京大学大学院総合文化研究科	47
(兼任)	の計測	准教授	
	(東京大学大学院総合文化研究科)	(同上)	

研究報告書

「1 分子超解像空間分析法の開発」 研究期間: 平成19年10月~平成23年3月 研究者: 池滝 慶記

1. 研究のねらい

取り扱いが簡単で生きた試料を観察できる光学顕微鏡は、生物学における不可欠な分析ツ ールであるが、回折限界が存在するため、空間分解能は200nm程度である。研究現場では、 回折限界に制限されず高い空間分解能を提供できる光学計測法(超解像空間分析法或いは 超解像法)の開発が大きな技術課題となっている。この課題を解決するために、2波長蛍光分 光法と波面制御光学を技術融合させた超解像空間分析法を提案する。本分析法は2波長蛍光 分光法で誘導される蛍光抑制効果を基礎とする(図1)。まず、第1のレーザー光(ポンプ光)で分



図1 超解像法の原理

子をS₁状態へ励起し、次に第2のレーザー光(イレース光)を照 射しS。へさらに励起する。高励起状態S。に励起された分子は速 い無輻射過程により蛍光を発しない。このため、2つの光が重な った領域では分子が S_aに励起され、S₁からの蛍光が消失する (蛍光抑制効果)。もし、イレース光をドーナッツ状に整形して、2 つの光を重ねて試料に集光照射すると、蛍光抑制効果により蛍 光像は回折限界以下のサイズになる。イレース光として、マカロ ニ状のタイプ(図2-1)焦点のみで3次元的に光の当たらない ダークホール(図2-2)をもつタイプがある。特に後者は、光軸 方向に対しても蛍光像が収縮し、3次元的に回折限界以下のサ イズになる。これを空間計測プローブとすることで横分解能に止 まらず、深さ方向に対しても100nm 上回る空間分解能を提供で きる(超解像法)。この方法と蛍光相関法を組み合わせると、単 に試料の空間構造を可視化するだけでなく、10-21 立方メートル (アトQ)内に存在する溶液中の分子の相互作用を1分子レベル で解析できる。本研究では、上記機能をもつ1分子超解像空間 分析法を確立し、バイオ分野における革新的な基盤技術を提供 することを目標とする。



図2-1 マカロニ型



図2-2 ダークホール型

- 2. 研究成果
- 1) 1 分子超解像空間分析法の理論構築

フーリエ結像論を用いて3次元ダークホールの空間形状について理論的に評価を行った (図3)。この結果を元に、既存の2次元の超解像理論を3次元に拡張することに成功した。更 に、これと蛍光相関計測理論と統合することにより、1分子超解像空間分析法に関する指導理 論を構築することができた。ローダミン 6Gをテスト分子に選定し、3次元的な蛍光スポットを計 算した。その結果、100nm³(アトリットル)の立体分解能が期待できることが分かった。この蛍 光スポットを用いて蛍光相関関数を計算したところ、通常の蛍光相関法に比べ、色素分子の 濃度が2桁程度高い条件下でも蛍光相関関数が得られることが分かった。1分子超解像空間 分析法の機能をほぼ予測できる指導理論が構築でき、その為の自作シミュレーションプログラムも整った。



(a) 焦点面内形状

(b) 光軸断面形状

図1:フーリエ解析結像論を用いて計算した焦点面近傍の3次元ダークホールの空間形状

2) 1分子超解像空間分析装置の作製

検証実験装置は市販レーザー走査型顕微鏡をベースに作製した。図4に示す様に、 Nd:YAGレーザーの2倍波(532nm)をポンプ光とし、Krレーザーより発振した波長:647 nm の光 をイレース光とした。1 本のシングルモードファイバーでデリバリーされたこれらの 2 色の照明 光は、コリメートされた後、FV1000 ユニットの入射光に導入される。この際、イレース光を空間 整形するために 2 種類の位相板を挿入した。一つは光軸を中心に4分割した位相板であり、 透過したイレース光の位相が90°づつ階段状に変化する。この様な光を集光すると光軸上で 電場強度が相殺され、マカロニ状の強度分布をもつ。これは、微細な中空パターン形成できる 特徴をもち、高い横分解能を提供できる。もう一つは、中央部分で位相が反転するタイプ様の 輪帯位相板であり、これを通過したイレース光は干渉により焦点のみで光が当たらない3次元 的な中空構造、すなわちダークホールをもつ様に集光される。これは、深さ方向の分解能を提 供できる特長をもつ。何れの場合も位相差は光学多層膜で与えられ、光学多層膜の波長分散 性を用いイレース光のみが位相変調される様に設計されている。これらのビームをガルバノミ ラーにより、常に同軸で試料に対して空間走査する。本装置により、ポンプ光単独照射の蛍光 像(通常計測)とポンプ光・イレース光同時照射の場合の蛍光像(超解像)を比較できる。



図4 実験装置の基本概念図

3) 超解像空間分析機能の評価

構築した分析装置を用い、提案原理に従い回折限界以下の空間分解能を有するかどうか検 証した。まず、4分割位相板でビーム整形をしたイレース光を用いた場合における空間分解能 の変化を調べた。具体的には、蛍光色素ナイルレッドを含有した粒径 60nm のポリスチレンビ ーズの蛍光像を計測する。図5-1はポンプ光単独照射時の蛍光像(通常計測)であるが、開 ロ数 1.3 の対物レンズで 10mW のイレース光を同時照射すると(超解像計測)、蛍光像の径は、 ほぼビーズ粒径の 60nm のサイズまで収縮している(図5-2)。すなわち、回折限界時の像の 径が 250nm であることを考慮すると、回折限界の4倍以上空間分解能が向上している。



(1) 通常計測像 (2) 超解像計測像 図5 4分割位相板でビーム整形をしたイレース光を用いた場合における空間分解能の変化

次に、輪帯位相板でビーム整形をしたイレース光を用いた場合における空間分解能の変化 を調べた。この場合には、深さ方向にも蛍光像が収縮するため、ピエゾスステージにより対物レ ンズと試料間の距離を相対的に変化させて3次元蛍光像を計測する。図6-1は、隣接した2個 の隣接した蛍光ビーズのポンプ光単独照射時における蛍光像である。一方、図6-2は、2色 の光を同時照射した場合における蛍光像である。焦点面内の蛍光像のサイズはポンプ光単独 照射の場合と比較すると半分の120nm 程度に縮小し(図6-3)、しかも、2点分解能が向上し ている。特に、光軸方向の蛍光像の収縮が著しく、サイズが回折限界の1/3以下の170nmに収 縮している(図6-4)。これは、体積に換算すると共焦点顕微鏡と比較して1桁小さい大よそ2 アト2に相当する。すなわち3次元的に超解像空間計測が実現できたことを示している。



(1) 通常計測

120nm

0.5

(3)X 軸上の強度分布

X distance [µm]

1

Fluorescence intensity [arb, units] 9.0 6 0.4 0.4 0.5 0 0.4 0.4 0.5 0 0.4 0.4 0.5 0 0

0





図6 輪帯位相板でビーム整形をしたイレース光を用いた場合における空間分解能の変化: (3)(4)において灰色線と赤線は、それぞれポンプ光単独照射時とイレース光同時照射時の 強度分布を示す。

4) 生物用超解像レーザー走査型顕微鏡への応用

提案する空間分析法は、市販レーザー顕微鏡本体を改造することなく容易に機能搭載が可 能であるので、空間分解能において差別化された汎用型の顕微鏡システムに応用できる。そこ で、抗体染色したラットカンガルーの腎細胞の微小管(直径:30nm)を蛍光観察した。色素には、 市販のAlexa546を用いた。イレース光は、平面分解能が期待できる4分割位相板を用いてビー ム整形した。図7によれば、超解像計測時には、重なり合った繊維構造が分解して観察でき、ま た、各微小管の蛍光像が細くなっていることが分かる(図7-2)。断面の蛍光強度を調べてみ ると、通常計測時には 250nm であった太さが、超解像計測時には少なくとも 100nm 以下に収縮 している。これは、図4の蛍光ビーズで得られた結果と一致している。更に、隣接した微小管が 分解できていることが分かる。これは、蛍光ビーズを用いた空間分解能評価と矛盾しない結果 を与えている。



(1)通常計測像 (2)超解像計測像 (3)通常計測強度断面(4)超解像計強度断面 図7 超解像空間計測法を用いたラットカンガルー微小管の観察(4分割位相板)

5) 蛍光相関法への応用

本分析法では、顕微鏡といった可視化手段にとどまらず微小空間領域における粒子の挙 動を解析することも可能である。ポンプ光とダークホールもつイレース光を同時に集光して、蛍 光相関法により溶液中の蛍光体の強度揺らぎを解析すれば、ダークホール内の分子数や拡 散定数等を多元的に解析できる。そこで、輪帯位相板でビーム整形をしたイレース光を用いて、 前記蛍光ビーズ分散させた水溶液(10⁻⁸mol/2)の蛍光相関関数を計測した。図8が示す様に、 イレースの光強度を増加させると、相関関数の変曲点が短時間側にシフトしていくことが分か る。これは、超解像機能により蛍光スポットの体積が実行的に小さくなり、ビーム内に滞在する 平均時間が短くなることを示しているので、提案する超解像空間計測が蛍光相関法に応用で きることを意味している。すなわち、回折限界を上回る立体分解能で、蛍光相関計測が可能な ことを示している。



図8 超解像法を適用したときの蛍光相関関数の形状変化

3. 今後の展開

提案分析法においては、試料照明法の最適化およびレーザー走査型顕微鏡の光学系の 精査により、空間分解能は更に向上する。現在、立体分解能は2アト2であるが、横分解能と 縦分解能が同時に100nmを凌駕することが可能であり、次の目標として光学顕微鏡としては 極限のゼプト2(10⁻²¹2)の立体分解能を目指す。それと同時、レーザー走査型顕微鏡への技 術搭載における実用面の個別課題を抽出し、これを解決することで、可視化や分析ツールと してバイオサイエンスの現場で広く使える商品を創出して行きたい。本研究成果は、単にレ ーザー顕微鏡や蛍光相関分析装置といった既存商品への応用にとどまらない。フォトクロミ ック分子などの新たな記録材料などを用いることで、微小空間領域を選択的に光化学反応さ せたり力学的操作を加えたりすることができる。単に計測技術としてではなく、新しい高密度 記録法、光造形法、更には生体組織のマイクロマニピュレーション手段としても利用できる。 実用展開と同時に、このような新領域への展開をも目指す。

4. 自己評価

アト2(10⁻¹⁸2)の立体分解能を有する超解像空間分析法を確立し、これが蛍光相関計測 法に応用できることを実証した。これにより、超微小空間内でおきる拡散現象を解析できるツ ールとして期待できることを示すことができた。また、本技術は、生物用のレーザー顕微鏡に おける空間分解能の向上に寄与できることも確認した。本研究で確立した計測法は、既存の レーザー走査型顕微鏡へ容易に技術搭載が可能であり、きわめて実用性が高いことが判明 した。これは、計測機器産業における新たなイノベーション技術として期待できるものであり、 予想外の成果であった。光学計測科学としての目標は、ほぼ達成したと考えられるが、当初 目標に対して2つの未達成課題を残した。すなわち、現行では、蛍光相関機能を蛍光ビーズ で検証している段階であり、まだ、1分子レベルでの機能確認に至っていない。また、生物試 料への応用はまだ着手段階であり、バイオ分野へ幅広く応用展開を図る必要がある。今後、 これらの課題を克服し、速やかに産業応用への道筋をつけることが新たな責務と考える。

5. 研究総括の見解

波動光学と分光学を融合した超解像度光学顕微鏡、すなわち erase 光としてダークホール 状あるいはマカロニ状にしたものを用い、pump 光で照射された回折限界スポット中において、 さらに小さなスポットができるユニークな手法を用いた3次元的に回折限界を超えた顕微鏡の 開発に成功したと言えるであろう。大いに評価したい。ダークホール型を蛍光相関法に適用し 小さなスポットでの相関関数が得られるようにしたことも評価出来る。検証実験も今のところ蛍 光染色した微小管のイメージングなど限られているものの超解像度をチェックしている。共同 研究等で生物試料の測定例をさらに蓄積して本手法の有効性をさらに示し、生物研究者が使 い易いものへと実装化されることを期待する。顕微鏡技術では日本の優位性を維持し続けて いただきたい。

6. 主要な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. <u>Y. Iketaki</u>, Three-Dimensional Super-Resolution Microscope Using Two -Color Annular Phase Plate, Appl. Phys. Express 3, 085203, 2010.

2. <u>Y. Iketaki</u>, Fabrication of a Calibration Scale for Biological Fluorescence Microscopy Using Nano Imprinting, Jpn. J. Appl. Phys. 49, 048003, 2010.

3. <u>Y. Iketaki</u> and T. Watanabe, Two-Photon Absorption in Rhodamine 6G Occurring in Concert with Fluorescence Depletion, Appl. Spectroscopy 64, 396, 2010.

4. Y. Iketaki, T. Watanabe, N. Bokor, M. Fujii and T. Watanabe, Development of

Super-Resolution Microscopy: Application of Laguerre-Gaussian Beam to Microscopy, Toplogica 2, 009,2009

5. N. Bokor and <u>Y. Iketaki</u>, Laguerre-Gaussian Radial Hilbert Transform for Edge-enhancement Fourier Transform X-ray Microscope, Opt. Express 17, 5533–5539, 2009.

(2)特許出願

研究期間累積件数:13件(海外1件、国内12件)(13件とも非公開希望)

(3)学会発表

学会発表(国際)

•N. Bokor, A. Domonondon, and Y. Iketaki, Edge-Enhancement Fourier-Transform X-ray Microscopy, 18th International Symposium on the Photochemistry and Photophysics of Coordination Compounds, 2009.7. Sapporo.

学会発表(国内)

・池滝慶記、ナンドール・ボコル、渡邊武史、藤井正明. 直線偏光及び円偏光状態をもつ1次及・2次のラゲール・ガウシアンビームにおける中心強度に関する考察. 2008 年秋季第69回応用物理学会学術講演会. 2008.9.名古屋.

 ・池滝慶記、渡邊武史.2波長蛍光 Dip 分光法を用いた超解像顕微鏡法—3次元空間分 析機能に関する理論的考察—.2008年第2回分子科学討論会.2008.9. 福岡.

・池滝慶記、渡邊武史. ローダミン 6G おける2光子吸収過程と蛍光抑制効果の競合. 第5 6回応用物理学関係連合講演会. 2009.3. 筑波.

・池滝慶記. ナノインプリント法による顕微鏡用スケールパターンの形成. 2009 年光化学 討論会. 2009.9. 桐生..

・池滝慶記. 超解像蛍光計測法における空間分析能力に関する考察. 日本膜学会膜シンポジウム 2010. 2010.11. 京都.

研究報告書

「1分子同時計測技術によるタンパク質翻訳操作」 研究期間: 平成 19 年 10 月~平成 23 年 3 月 研究者: 上村 想太郎

1. 研究のねらい

1分子蛍光イメージング法は、蛍光色素をタンパク質や核酸などの特定の部位に付けること で分子1つ1つの動きを直接リアルタイムに計測することができる手法である。しかし、従来の 1分子蛍光イメージング法(全反射型)は、細胞内の本来の環境に比べると極めて低い濃度 で測定することしかできないことから、研究の対象となるタンパク質や核酸が細胞内でどのよ うに働いているか分からないことが問題だった。その原因は、溶液内に浮遊している蛍光因 子も蛍光励起されてしまうため、背景光と基板固定された目的分子に結合する蛍光シグナル との識別が困難であることである(図1)。さらに低い蛍光濃度での測定による極めて大きな問 題がある。それは低い濃度での反応は反応時間がとても遅いために通常数十秒内で起こる 「蛍光退色」と呼ばれる蛍光消光現象によって観測したい生命現象が正確に観測することが できないことである。なぜなら分子の解離現象か、退色による消光かを識別することができな いからである。通常この退色時間を酸素除去酵素系を用いて引き伸ばす方法が用いられる が数倍程度であり、限界がある。

この2つの問題を見事に解決したのが新しい1分子イメージング法である「Zero-mode wav eguides法(ZMW法)」である。ZMW法は米国・Pacific Biosciences社によって次世代DNAシー ケンサーに応用されている。ZMW法は、基板にアルミニウム膜を蒸着させて100nmほどの 穴を開けたところに局所励起光を当てるため、蛍光色素が高濃度に存在していても背景光を 激減させることができる(図1)。そのため、上述の濃度問題を解決し、より細胞内に近い条件 で生命現象を1分子レベルで可視化できる。さらに高濃度による反応速度の上昇によって退 色時間に比べて十分速い生命現象を捉えることができた結果、上述の退色問題も解決するこ とができる。すなわち1分子蛍光イメージング法の長年の大きな問題を解決することのでき、 生命現象を新しい角度でより生命の本質に迫ることのできる大きな技術革新である。

この新しいZMW法を用いて私はタンパク質翻訳の計測を試みた。2009年、リボソームの 分子構造を突き止めた研究者3人がノーベル化学賞を受賞した。リボソームの構造が明らか になったことはタンパク質翻訳機構の理解に大きな貢献をしたが、構造を解明するには分子 を結晶化しなければならないため、時々刻々と変化する分子の動的な変化をとらえることはで きない。この問題を解決するために通常用いられる手法は多数の分子を用いる生化学的手



(図1)従来型全反射法と新ZMW法

以上の理由からリボソームによる翻訳過程はZMW法による新しい1分子計測に最も適した 研究対象であると考え、Pacific Biosciences社と共同研究でより詳細なタンパク質翻訳のダイナ ミクスを可視化することを目標に研究を行った。

2. 研究成果

A) ZMW法による新しい1分子翻訳反応実験系の構築と評価

ZMW法の特徴は縦横に3000個ほど配列された各穴の計測を同時並列で行うことができる だけでなく、各色素の蛍光パターンから4種類の蛍光色を識別することも可能である(図2)。 したがって高濃度条件下において多色同時並列高速反応を1分子レベルで測定することがで きる。さらに励起光は穴配列と同じパターンを持つピンホールを用いることによって共焦点励 起が用いられている。それによって高いS/N比を得ることができるだけでなくアルミニウムへ の励起光照射による温度上昇も防ぐ働きがある。これらの理由により現状ではPacific Bios cience社のZMW計測装置は世界最高能を誇っている。

我々はまずタンパク質翻訳系の構築のためにリボソーム複合体のZMW面への特異的固定を行った。特異的固定はビオチン化mRNA・70S・Cy3標識fMet-tRNAfMet(fMetはNフォルミル化メチオニン)の安定初期複合体を用いた。検出されたCy3の蛍光密度は複合体濃度に比例し、底面に固定されたアビジンにビオチンを結合させ複合体のアビジンへの結合を

遮断すると蛍光は消失した。 この結果はリボソーム複合体 がZMW表面に特異的に固 定されたことを示している。

次にCy5で標識したPhetRNA^{Phe}(Pheはフェニルアラ ニン)及びCy2で標識した L ys-tRNA^{Lys}(Lysはリジン) の調製を行い、短いPheとLy sを用いた人工mRNAで翻 訳反応が可視化できるかを 低濃度tRNA添加によって蛍 光を確認した。蛍光はmRN Aのコドンに従って検出された。



(図2)ZMWアレイによる1分子翻訳可視化

B) 高濃度蛍光tRNAによる翻訳反応1分子可視化の成功

次にCy3の1分子蛍光を確認した後、蛍光観察しながら200nM Phe(Cy5)tRNA^{Phe}及 び200nM Lys(Cy2)tRNA^{Lys}さらに2種類の伸長因子(EF-Tu及びEF-G)をそれぞれ

含む溶液を添加した。実験 に使用したmRNAは、UTR を先頭にメチオニンMet(A UG) が続き、更にその後に フェニルアラニンPhe (UU C)とリジンLys(AAA)の6回

繰り返しとストップコドンを含 む配列を使用した。

我々はmRNA配列の各コ ドンパターンに対応したtRN Aの蛍光色のパターンを得る ことができた(図3上)。この 結果は世界で初めてタンパク 質の翻訳反応をコドンレベルで



(図3)1分子翻訳過程可視化蛍光トレース

1分子可視化したことを示している。さらにCy3.5 で蛍光標識したVal-tRNAValを加えた4色の翻訳可視化も成功した(図3下)。各蛍光パルスのパルス時間はEF-Gの濃度が高いほど短くなることを示し、トランスロケーションに依存した反応であることも示された。

興味深いことにストップコドンの位置において非常に短い時間(数十ミリ秒)のtRNAパルスが 連続的に観測された。これはストップコドン位置におけるtRNAの高速サンプリング現象を示 している。

また、エリスロマイシン抗生物質を用いて翻訳反応中に実際にタンパク質を合成していることも証明することができた。エリスロマイシンは50Sサブユニット内のペプチドトンネル内に結合し、合成された新生ペプチドを物理的にブロックし、タンパク質合成を阻害する薬剤である。 他の翻訳阻害を引き起こす抗生物質であるアミノグリコシド系においても翻訳阻害のダイナミクスを確認することができた。

C) 翻訳中のtRNA分子数可視化による新しい翻訳モデルの特定

リボソームには3つのtRNA結合部位が存在することがわかっている。この結合部位に対し てtRNAがどのようにどのタイミングでどの順番で結合するのかは長年の謎であった。我々は 得られた翻訳中のtRNA蛍光トレースからtRNAの結合数と結合・解離のタイミングを直接解 析することによって新しいtRNA解離モデルを明らかにすることができた。結合数の時間変化

はEF-Gのトランスロケーション に強く依存し、次のtRNAのA部 位への結合には依存しないこと が分かった。

従って、EF-Gによるトランス ロケーションに伴ってtRNAがP 部位からE部位へと移動し、その tRNAは次のtRNAのA部位へ の結合に関わらずただちに解離 するというモデルが特定された。

ZMW法によって蛍光標識さ れたtRNAを高濃度存在下で翻 訳反応を直接可視化することに よって従来までの1分子計測で 大きな問題であった「高濃度計 測不可能」「退色問題」の2点を 解決し、翻訳時のリアルタイムな 配列情報だけでなく結合数の変 化やタイミングなど唯一1分子計 測でのみ計測可能な結果を解析 することによって新しいメカニズ ムを明らかにすることができた。



(図4) 結合数変化と新しい翻訳モデル

3. 今後の展開

これらの成果はNature誌のArticleに掲載されただけでなくNature誌を含む他のジャーナ ルにも大きく取り上げられた。今回の結果で大きな成果はZMW法による高濃度1分子計測 はあらゆる生命現象に応用可能であるということを具体的に証明したことにある。すでに我々 は今回の結果を他の生命現象の可視化に応用している。翻訳反応ではtRNAの蛍光標識だ けでなく翻訳開始因子への蛍光標識によって翻訳初期における各因子の役割を調べている。 翻訳初期における各因子の役割はおよそ50年間謎とされていたが、ようやくこの手法を用 いて明らかにされようとしている。さらに、翻訳阻害を引き起こす抗生物質が翻訳中にどのよ うに阻害を引き起こすのかを初めて1分子で捉えることに成功した。この結果は薬剤開発に 応用される重要な結果であり、他の薬剤反応にも応用されるべきである。そして真核細胞の 翻訳過程の可視化にも着手した。真核の翻訳過程はより複雑で細かい制御メカニズムが存 在するため、この手法がその詳しいメカニズム解明に大きく貢献することは明らかである。

さらに、最近ではHIVウイルスに存在する2本鎖RNAがヒト免疫細胞内のProtein Kinas e R(PKR)を活性化する過程を可視化することに世界で初めて成功した。PKRの活性化は 免疫細胞内の翻訳初期因子eIF2のリン酸化を引き起こすことによって結果的に翻訳阻害を 引き起こす。

このようにあらゆる生命現象に応用可能なこの手法は分野横断的に応用されるべきであり、 新しい学問領域を創成する可能性を秘めている。従って我々は多くの他分野の研究者と新し い生命現象についての理解を深め、具体的にどの生命現象に応用すればいいのかを常に開 拓していかなければならない。

4. 自己評価

個人的にはさきがけ研究期間で得られた我々の成果は当初の予想を遥かに超え、大変満 足のいく成果が達成できたと自負している。それは次の点についてである。1)次世代シーケ ンサーとしてのみ用いられていた新しい1分子 ZMW 法をタンパク質翻訳過程に応用し、従来 の常識では得られることのできない翻訳ダイナミクスを直接可視化することができた。2)詳 細な解析から従来まで謎とされてきた tRNA 解離モデルを特定することに成功した。3)薬剤 がどのように翻訳過程に作用するのかをより詳細に明らかにした。4)これらの手法はあらゆ る生命現象に応用可能であることを具体的に証明した。

5. 研究総括の見解

申請研究課題を途中で変更しているがむしろ本領域研究により適した研究を遂行した。東 大の助教の職を辞してまでアメリカで本研究に集中し、短期間でありながら生命現象の本質 の一つであるリボソームでのタンパク質合成のダイナミックな分子機構を新しい1分子計測 技術 ZMW 法を用いて解明した。構造生物学を超え生命現象における1分子計測の新しい利 用の途を切り開いた実に素晴らしい成果を挙げている。ZMW 法自体は Pacific Biosciences 社が新しい DNA シークゥエンサーとして開発したものであるが生命現象の本質に迫る課題解 決に応用し得ることを実証したことを特に高く評価したい。今後様々な生命現象の解明に応 用展開されるものと期待する。

このような見事な成果を挙げ得たのも、本研究者が以前留学先のスタンフォード大医学部 でリボソームの研究を行っていた研究室との共同研究でもあることが大いに寄与していよう。 課題に対する問題点をとことんまで煮詰めていたからこそ達し得たものと思われる。この研 究には本研究者の強靭な意思、実行力、そして1分子生物学分野を創造しようとする夢があ るように思われる。本総括もサイトヴィジットし研究現場を見、共同研究者と意見交換してみ てこのことを強く感じた。

6. 主要な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

• <u>S. Uemura</u>, C. E. Aitken, J. Korlach, B. Flusberg, S. Turner, and J. D. Puglisi. 'Real time tRNA transit on single translating ribosomes at codon resolution' *Nature* **464**, 1012-1017. (2010)

• <u>S. Uemura</u>, R. Iizuka, T. Ueno, Y. Shimizu, H. Taguchi, T. Ueda, J. D. Puglisi and T. Funatsu. 'Single molecule imaging of full protein synthesis by immobilized ribosomes'. *Nucleic Acids Research* **36**, e70 (2008)

• <u>S. Uemura</u>, M. Dorywalska, T. H. Lee, H. D. Kim, J. D. Puglisi, and S. Chu. 'Peptide bond formation destabilizes Shine-Dalgarno interaction on the ribosome'. *Nature* **446**, 454-457 (2007)

(2)特許出願 研究期間累積件数:O件

(3)受賞

·上村想太郎、光科学技術振興財団 研究表彰(2009年3月)

(4)著書

・上村想太郎. 'ついに可視化されたコドンレベルのタンパク質合成'
 生物物理 50,294-295. (2010)

<u>・上村想太郎</u>. 'レーザートラップや蛍光を用いた1分子計測のタンパク質翻訳機構への応用' *BIOINDUSTRY* シーエムシー出版 2月号 (2009)

<u>・上村想太郎</u>. 'タンパク質誕生の1分子可視化法' **生物物理 48**, 340-341. (2008)

- ・上村想太郎、船津高志. 'タンパク質の翻訳と折りたたみ過程の1分子蛍光イメージング'
 ぶんせき 11, 582-586. (2008)
- ・上村想太郎. 'リニア分子モーターの奥深さ~細胞骨格モーターから核酸モーターへ~'
 化学同人. 化学同人編集部編「最新分子マシン」113-117. (2008)

(5)招待講演

招待講演(国際)

- <u>S. Uemura</u> 'Real time tRNA shuttle on the ribosome during translation' *Structural Biology, Retreat conference*, Stanford, U.S.A (2009)
- <u>S. Uemura</u> 'Single molecule measurement for protein synthesis' SSF-JST joint symposium, Sigtuna, Sweden (2008)
- <u>S. Uemura</u> 'Single molecule force measurement for protein synthesis' *The 21st century COE international symposium, Waseda*, Japan (2007)

研究報告書

「無線・無電極振動子たんぱく質マイクロアレイの創製」 研究期間: 平成19年10月~平成23年3月 研究者: 荻 博次

1. 研究のねらい

癌やアルツハイマー病などの難病の早期の発見、および、それらに対する創薬プロ セスに貢献するための高感度振動子たんぱく質アレイチップ開発を目指す。振動子セ ンサにおいては不可欠と考えられていました電極と配線を使用しない技術を独自に考 案・確立し、従来の振動子センサの感度を飛躍的に向上する。一枚のチップ内に多数 の測定領域を作り、一度に複数のたんぱく質相互作用をモニタリングするマイクロア レイチップを創製する。さらに、ナノ構造体を振動子とする次世代の超高感度振動子 バイオセンサの基礎技術を確立する。

2. 研究成果

振動子バイオセンサーは生体分子 間の反応をリアルタイムにモニタリ ングすることができる. 振動子表面に 固定化したレセプタにより目的たん ぱく質を捕捉し,振動子の有効質量を 増加させて系の共振周波数の変化量 を測定し、吸着物質の定量評価を行う という原理である.標識を一切用いる 必要が無いために迅速な計測が可能 であり、また、反応過程をリアルタイ ムにモニタリングすることができるた め、たんぱく質間の親和性を定量的に 評価することができる(図1). この原 理を考えるとき、振動子センサの感度 の向上は、「同じ質量付加に対していか に大きな周波数変化を得るか」という 点に帰着する. 質量付加による共振周 波数の変化量は振動子の厚さの自乗に



図1 振動子バイオセンサーの原理.振動子 に固定化したレセプタたんぱく質(分子B) に目的たんぱく質(分子A)が吸着すると共 振周波数が指数関数的に減少する.減少量 ・fから分子Aの濃度を,周波数の減少率(指 数係数)から分子AとB間の熱力学的諸量を 定量的に決定することができる.

反比例する. つまり, 振動子センサの感度を向上させるには, できるだけ薄い振動子 を用いれば良いことになる. しかし, 従来の振動子ではこれは原理的に困難であった. というのは, 有効な電場を与えるために, 振動子両面に貴金属電極が成膜されており, さらに金属配線が接続されているからである. 比重の大きい貴金属電極は, 都合の悪 いことに, 振動加速度の最も大きい表面に存在し, 大きな慣性抵抗を生み出し, 発振 を妨げる. 配線との機械的な接続も振動の Q 値を大きく低下させることは言うまでも ない. 振動子が薄くなるほど, こういった電極と配線の悪影響が顕著になる. この欠 点は従来の圧電振動子においては原理的に不可避であり, その結果, 検出限界が存在 した.

振動子センサの感度限界を打ち破るための最も明快かつ確実なアプローチは「無線・無電極測定」である.つまり、諸悪の根源となる電極と配線を無くせば良い.そ こで、我々は高周波平面アンテナによって非接触で圧電振動子の共振周波数を計測す る手法を独自に考案し、孤立した水晶振動子を有するバイオセンサーを開発し、感度 を3桁向上させることに成功した.さらに、裸の振動子表面にたんぱく質が非特異的





図 3 裸の水晶振動子表面への各種たんぱく質 の非特異吸着の様子(左)と水晶-たんぱく質 間の解離定数(右). SA:ストレプトアビジン, hlgG:ヒト免疫グロブリンG, SPA:黄色ブドウ 球菌プロテインA, BSA:ウシ血清アルブミン, PEG:ポリエチレングリコール.

図2 多チャンネル無線・無電極水 晶振動子バイオセンサの概略図.

に強く吸着することを見出し,水晶振動子を Si ウェーハに内に埋め込んだラムネ型振動子センサを開発し,半永久使用可能なバイオセンサーの基礎概念を構築した.

図 2 に多チャンネルの無線・無電極水晶振動子バイオセンサーの概略を示す. 裸の 水晶振動子を直線アンテナ上に配列し, アンテナより電磁場を送り一斉に振動させる. 圧電体水晶の振動は, 別のアンテナによって圧電効果により受信する. 振動子の板厚 をわずかに変化させることにより, 発振源の振動子を周波数により特定する. アース 部は送受信アンテナの中央部に設置するタイプとそれらの対面側のセル壁に埋め込む タイプを開発した. このように, 完全に非接触測定が可能であるため, 振動子表面に は電極や配線を接続する必要が無い. さらに, 振動子の全面かつ両面を溶液に浸すこ とができ, 反応面積を増加することができるだけでなく, 液圧による振動子の破損を 防ぐこともできる.

図 3 は酸で洗浄した裸の水晶表面に様々なたんぱく質溶液をフローさせた際の周 波数変化および解離定数 KD を示している.多くのたんぱく質は水晶表面と高い親和性 を示す.特にストレプトアビジンが高い親和性を示し,これを土台としてビオチン化 した任意のたんぱく質を固定化することも可能である.

図4は、黄色ブドウ球菌プロテインA(SPA)を非特異的に固定化した水晶振動子を 用いてヒト免疫グロブリンG(hlgG)を検出した際の周波数変化を示す.従来の振動子 バイオセンサー(黒線)と比較して、新たに開発した無線・無電極振動子バイオセン サー(青線と赤線)の周波数低下量が飛躍的に増加していることが分かる.特に、厚 さ9.7 µmの水晶振動子を用いた基本周波数170 MHzのバイオセンサーにおいては、 従来の1000倍以上の感度を示す結果となった.

裸の水晶振動子を用いてレセプタたんぱく質を非特異的に吸着させてアッセイを行った場合,強酸等による洗浄によって水晶振動子表面のたんぱく質を全て洗い流すことができ,一つの振動子を用いて何度でもアッセイを繰り返すことが可能となる.この利点を生かして,Siやガラスウェーハに微細流路を作成し,そこに裸の水晶振動子を力学的な拘束を与えることなく埋め込んだQCMを開発した.我々は,このバイオセンサを「ラムネQセンサ」(<u>Resonant Acoustic Microbalance with Noncontacting Electrodeless Quartz Sensor: RAMNE-Q Sensor)と呼ぶ.清涼飲料水のラムネのビン内のビー玉が拘束無く設置されており,その表面を沿うように飲料が流れ出ることか</u>



図 4 SPA と hlgG 間の結合反応のリアルタイムモニタリング. レセプタとして SPA を非特異的にセンサ表面に吸着させた後, hlgG を含む PBS 溶液を注入した. 黒実線 は従来の 300 μ m 厚さの振動子バイオセンサの応答を示す. 青および赤実線はそれ ぞれ 30 μ m および 9.7 μ m 厚さの無線・無電極バイオセンサの応答を示す. 右図は 周波数変化量の絶対値の対数表示. 図中の数値は hlgG の濃度を表す.



図 5 ガラス/Si/ガラス構造からなるラムネ QCM. MEMS プロセスにより大量のセンサチップの作成が可能となる.

らヒントを得た. 使い捨てが常識であったバイオチップの分野において, 取替え不要 のセンサを作成することができる. 例えば, 図5はSiウェーハと2枚のガラスウェー ハに MEMS プロセスを用いて微細流路を作成し, 中央のSi 部に厚さ9.7 ・mの裸のAT カット水晶振動子を設置して, Si 部をサンドイッチするようにこれらを接合したセン サチップである. 水晶板は上下より伸ばした微細ピラーにより支持しているが, ピラ 一の間隙が水晶の厚さよりも大きいため, その間に水晶板が位置することとなり, カ 学的な負荷を与えていない. 外部に設置したアンテナにより内部の水晶を発振させる ことができる. また, 複数のチップを並べて発振させることにより多チャンネル化も 可能となる. このラムネQセンサを用いて hlgG の検出を行った. 最初にプロテインA を流入して水晶表面に非特異的に固定化し, その後に hlgG 溶液を流入してプロテイン A による hlgG の捕捉を行った. この結果, hlgG 溶液の到達とともに 70 kHz にもおよ ぶ周波数の低下量が観測され(従来の変化量の 1000 倍以上), 高感度かつ取替え不要 のバイオセンサーの基礎モデルとして作動することを確認した.

3. 今後の展開

超高感度振動子バイオセンサの開発を目指して,水晶振動子の無線・無電極化を中心に 研究開発を行ってきた.その結果、ラムネQセンサへとたどり着いた.MEMS プロセスを用 いたセンサチップの開発が可能であることから、センサチップの更なる小型化、振動子の 薄型化も容易に行えるため、本研究で達成した以上の検出感度が期待される.

また, 高感度 QCM バイオセンサが A β ペプチドの凝集能の定量評価に極めて有効であることが明らかとなったため, 系統的な研究をさらに行うことにより, その凝集メカニズムと 細胞毒性を明らかにしたい.

さらに、ナノ構造体振動子バイオセンサの確立により、次世代振動子バイオセンサの確 立を目指す.

4. 自己評価

圧電振動子の無線・無電極化を行うことにより、3桁を上回る感度向上を第一の目的と して研究開発を進めたが、厚さ9・m程度の無電極水晶振動子センサを用いることにより、 これを可能とした.また、ラムネQセンサの開発にたどり着き、今後さらなる小型化・高 感度化の術を確立し得たと考えている.ただし、生命機能の解明に資するための系統的研 究においてはまだ研究遂行中であり、特に、Aβペプチドの凝集メカニズムの研究に関し ては、今後更なるデータの蓄積と解析を要する.

5. 研究総括の見解

水晶振動子の無線・無電極化と薄型化により、当初の目標を十分にクリアする高感度センサの 開発に成功したことは大変素晴らしい成果であり、実用的なセンサとして様々な現場で有効活用 されることが期待される。ラムネ型 QCM も装置として完成させた点も高く評価出来る。ナノ量の物 質を計測する方法は新しい技術として発展することが期待される。一方、感度を上げることによっ て動特性に影響を与える振動子表面でのタンパク質の状態が重要視されよう。すなわち、相互作 用の強さの違う状態を吸着分子数(質量の違い)として見る以外の方法が必要となってくると思わ れる。特に吸着分子が大きなタンパク質において感度上昇とともに重要になってくると思われる。

多数のセンサを同時に働かせて得られる情報の有効な利用法の開発も必要ではないだろう か。

6. 主要な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- H. Ogi, Y. Fukunishi, T. Omori, K. Hatanaka, M. Hirao, M. Nishiyama, Effects of Flow Rate on Sensitivity and Affinity in Flow Injection Biosensor Systems Studied by 55-MHz Wireless Quartz Crystal Microbalance, Anal. Chem. 80, 5494-5500 (2008).
 - H. Ogi, H. Nagai, Y. Fukunishi, M. Hirao, and M. Nishiyama, 170-MHz Electrodeless Quartz Crystal Microbalance Biosensor: Capability and Limitation of Higher Frequency Measurement, Anal. Chem. 81, 8068-8073 (2009).

• H. Ogi, K. Okamoto, H. Nagai, Y. Fukunishi, and M. Hirao, Replacement-Free Electrodeless QCM Biosensor Using Nonspecific-Adsorption of Streptavidin on Quartz, Anal. Chem. 81, 4015-4020 (2009).

- H. Ogi, Y. Fukunishi, H. Nagai, K. Okamoto, M. Hirao, and M. Nishiyama, Nonspecific-Adsorption Behavior of Polyethylenglycol and Bovine Serum Albumin Studied by 55-MHz Wireless-Electrodeless Quartz Crystal Microbalance, Biosens. Bioelectron. 24, 3148-3152, (2009).
- H. Ogi, H. Nagai, Y. Fukunishi, T. Yanagida, M. Hirao, and M. Nishiyama, Multichannel Wireless-Electrodeless Quartz-Crystal Microbalance Immunosensor, Anal. Chem. 82, 3957-3962 (2010).
- (2)特許出願研究期間累積件数:3件(海外1件、国内2件)

(海外出願)

発	明	者	:	荻 博次,加藤史仁,平尾雅彦
発り	月の名	S称	:	検出素子
出	願	人	:	科学技術振興機構
出	願	日	:	2010/12/9

(国内出願)

発	明	者	:	荻 博次,平尾雅彦
発り	月の名	称	:	検出素子、それを備えた検出装置、検出素子に用いられる振動
				子,および検出装置における検出対象物の検知方法
出	願	人	:	財団法人大阪産業振興機構,国立大学法人大阪大学
出	願	日	:	2008/12/10
-				
発	明	者	:	荻 博次,加藤史仁,平尾雅彦
発り	月の名	ι称	:	検出素子
出	願	人	:	科学技術振興機構
出	願	日	:	2010/3/29

(3) 学会発表

学会発表 (国際)

- H. Ogi, H. Nagai, Y. Fukunishi, T. Yanagida, M. Hirao, M. Nishiyama, Multichannel High-Frequency Electrodeless Quartz Crystal Microbalance Biosensors, 20th Anniversary World Congress on Biosensors (Biosensors 2010), 2010 年 5 月 26 日~5 月 28 日 於 Glasgow, UK.
- ・H. Ogi, T. Kawamoto, N. Nakamura, M. Hirao, and M. Nishiyama, Ultrathin Film Oscillator Biosensors Excited by Ultrafast Light Pulses, 20th Anniversary World Congress on Biosensors (Biosensors 2010), 2010 年 5 月 26 日~5 月 28 日 於 Glasgow, UK.
- H. Ogi, K. Matsumoto, Y. Fujita, T. Kawamoto, N. Nakamura, and M. Hirao, Ultrathin Pt film oscillator biosensor, The 13th International Conference on Phonon Scattering in Condensed Matter (Phonons 2010), 2010 年 4 月 19 日

~4月23日於 Taipei, Taiwan.

学会発表 (国内)

- T. Yanagida, H. Ogi, M. Hirao, M. Nishiyama, M. Koyama, and S. Watanabe, Detection of C-reactive protein with mass-amplified sandwith assay using electrodeless quartz-crystal microbalance biosensor, 第31回超音波エレク トロニクスの基礎と応用に関するシンポジウム(平成22年12月6日~12月8日, 明治大学駿河台キャンパス).
- F. Kato, S. Nishikawa, T. Yanagida, H. Ogi, M. Hirao, M. Koyama, and S. Watanabe, Development of a high-frequency electrodeless quartz crystal microbalance chip with a bare quartz resonator encapsulated in a silicon microchannel and its application to a biosensor, 第31回超音波エレクトロニクスの基礎と応 用に関するシンポジウム (平成22年12月6日~12月8日,明治大学駿河台キャ ンパス).
- ・加藤史仁,西川慎太郎,柳田泰次,荻博次,平尾雅彦,ベア水晶内蔵シリコン微 細流路タイプ 無線・無電極高周波 QCM センサの開発,第 71 回応用物理学会学術 講演会(平成 22 年 9 月 14~9 月 17 日 於 長崎大学文教キャンパス).
- H. Nagai, Y. Fukunishi, H. Ogi, M. Hirao, and M. Nishiyama, Development of 170-MHz Wireless-Electrodeless Quartz Crystal Microbalance Biosensor, 第 30回 超音波エレクトロニクスの基礎と応用に関するシンポジウム (平成21年 11月18~20日 於 同志社大学今出川キャンパス寒梅館).
- Y. Fukunishi, H. Nagai, H. Ogi, M. Hirao, and M. Nishiyama, Systematic research on the dependence of the aggregation behavior of A peptides on the amyloid nuclei using multichannel wireless-electrodeless QCM, 第 30回 超音波エレ クトロニクスの基礎と応用に関するシンポジウム (平成21年11月18~20日 於 同志社大学今出川キャンパス寒梅館).
- (4) 招待講演

招待講演(国内)

- ・荻博次,超高感度振動子バイオセンサの創成:診断・創薬への貢献を目指して、早稲田大学ナノテクノロジーフォーラム、未踏・ナノデバイステクノロジー第 151 委員会研究会(2010/7/30).
- ・荻博次, ピコ秒超音波による線形・非線形計測:波長 30nm の超音波非破壊検査, 日本非破壊検査協会 第5回 非線形超音波研究会 (2010/3/9).
- ・荻博次,ナノ構造物の共振計測と物性評価およびセンシングへの応用,日本材料 学会 第42回マイクロマテリアル部門委員会講演会 (2008/12/12).

研究報告書

「不透明な生体内における細胞内小分子の可視化と光制御法の開発」 研究期間: 平成19年10月~平成23年3月 研究者: 小澤 岳昌

1. 研究のねらい

生物個体が生きた状態で、生体分子の機能や動態を可視化する技術、いわゆる「生体分 子イメージング」は、生命科学研究の新たな基盤技術として大きな期待が寄せられている。こ れまでに緑色蛍光タンパク質(GFP)やその色変異体を用いて、生きた細胞内の生体分子を リアルタイムに可視化する方法が開発されてきた。しかし不透明な生物個体や自家蛍光の 強い組織において、生体分子の機能やダイナミクスを検出することは未だ容易ではない。 我々はこれまでに、緑色蛍光タンパク質(GFP)や生物発光タンパク質(ルシフェラーゼ)の切 断と再構成を利用した「タンパク質再構成法」という、新たなレポータータンパク質の概念を創 出し、その応用研究を展開してきた。タンパク質再構成法とは、特定のアミノ酸残基で二分し て失活させたレポータータンパク質を、近接あるいはペプチド組み継ぎ反応により再連結させ、 そのレポーターとしての機能を回復させる方法である(図1)。

本研究ではルシフェラーゼ再構成法を応用展開し, 自家蛍光の強い組織や不透明な生体 内の サイクリック GMP(cGMP), タンパク質間相互作用, pH 変化を低侵襲的に時空間解析 する技術の開発を目的とした.

2. 研究成果

2-1)コメツキムシ由来ルシフェラーゼの再構成法 最も発光強度が強いコメツキムシ由来のルシフェ ラーゼ(ELuc)を基に、その切断位置を検討した、 ラパマイシン添加により相互作用するFKBPとFRB タンパク質を利用して、FKBP-FRB 相互作用が起 きた時に最大応答が得られるフラグメントの取得を 目的とした. 542 アミノ酸からなる ELuc の N 末側フ ラグメント1〜mアミノ酸(m=406〜417)とC末側フ ラグメントn~542 アミノ酸(n=389~413)をコードす るcDNA を PCR により作製した. N 末側のフラグメ ント各々には FKBP のcDNA を、C 末側のフラグメ ント各々に FRBの cDNA を連結した.N 末のフラグ メントと C 末のフラグメントを含む融合タンパク質を HEK293 細胞に発現させた.一定時間後にラパマ イシンを添加し、発光検出用プレートリーダーを用 いて発光測定を行った. その結果, ラパマイシンの





添加にともない,100 倍以上の大きな発光シグナルの上昇が観測された.N 末フラグメントと C 末フラグメントの最適な組み合わせは、N 末が 1〜415 番目のアミノ酸、C 末が 394〜542 番目のアミノ酸であることが解った.同様にコメツキムシ由来赤色ルシフェラーゼ(RLuc)につ いての切断位置を検討した.N 末側フラグメントが 1〜414 番目,C 末側フラグメントが 395〜 542 番目のアミノ酸が,最も高い発光値を示すことが解った.

2-2) ルシフェラーゼ再構成法を用いた生物個体内の cGMP の可視化

これまでに cGMP の可視化には, GFP 誘導体を基にした蛍光プローブが用いられている. しかし生体組織や個体を用いたイメージングでは, その自家蛍光が cGMP 観察の障害となっ ている. 本研究ではルシフェラーゼを用いた cGMP プローブを作製し, 自家蛍光の強い生体 組織で観察可能な cGMP イ メージング法の開発を目的と した.

cGMP 検出プローブは, ル シフェラーゼの N 末断片とC 末断片との間に, ホスホジエ ステラーゼ 5 (PDE5)の cGMP 結合ドメインを挿入し た融合タンパク質からなる (図2A). cGMP が PDE5 の cGMP 結合ドメインに結合す ると, その立体構造が変化し, 二分割したルシフェラーゼが 再構成する結果, その発光 能が回復する. すなわち cGMP の量に依存して, ルシ



図2. (A)cGMP 発光プローブの原理. (B)ツメガエル卵発生過程の発 光イメージング.

フェラーゼの発光シグナルが得られる.

大腸菌発現系を用いて, cGMP プローブを精製した. このプローブに cGMP および cAMP を 濃度依存的に添加した. その結果, cGMP の生理濃度で 30 倍以上の強い発光強度変化が 得られること, また cAMP に対して 100 倍以上の選択性があることが解った.

次にアフリカツメガエル胚の発生過程における cGMP 産生の時空間解析を行った. アフリカ ツメガエル胚は卵黄を多く含むため自家蛍光が非常に強く、蛍光イメージングが難しい生物 の一つである. cGMP 発光検出プローブの mRNA を4 細胞期のアフリカツメガエル胚にインジ ェクションし、初期発生過程の cGMP 発光イメージングを行った. 神経胚において形成された 神経溝より発光が生じ、神経管が形成される尾芽胚まで発光強度の上昇が続いた. また、図 3B に示すように頭部にドット状の発光が、また心臓に一過的な発光が生じた. これは脳・心 臓形成と cGMP 濃度上昇の関連を示唆する結果となった. さらに cGMP 産生酵素の阻害剤 ODQ を添加すると、発光強度は速やかに減衰することが解った.

さらに開発した cGMP 発光プローブの応用可能性を実証するために, 植物個体で産生する cGMP のイメージングを試みた. 先ず cGMP 発光プローブを恒常的に発現するシロイヌナズ ナを作製した. このシロイヌナズナ個体について, 塩刺激の有無における cGMP レベルの変 動を調べた. その結果, 1.5 M NaCl の塩刺激を加えると 0-60 分間に発光上昇が, また塩刺 激を取り除くと 60-90 分に発光減衰が検出された. 0.75M KCl(塩刺激)および 1.5 M Sorbitol (浸透圧刺激)を加えた場合にも顕著な発光上昇が検出された. 以上の結果から, 開発した cGMP プローブは自家蛍光の強い動物組織や植物個体において, 生理条件下の cGMP 濃度 変動を可視化するツールとなることを実証した. 本プローブの応答原理を更に応用し, cAMP の発光プローブの開発に成功している.

2-3)マルチカラールシフェラーゼを用いた Smads 間相互作用の可視化

ッメガエル卵の発生過程において、Smads タンパク質は形態形成に重要な役割の担ってい る. たとえば骨形成因子(BMP)が膜上のリセプターに作用すると、Smad1 がリン酸化され Smad4 と相互作用し、必要な遺伝子群を転写する. 一方、Smad2 は、アクチビンなどの働き によりリン酸化され Smad4 と相互作用し、その生理機能を発動する. 本研究では Smad1-Smad4 と Smad2-Smad4 相互作用を同時発光イメージングする技術開発を目的とし た. Smad1 には RLuc の N 末側フラグメントを、Smad4 には ELuc の N 末側フラグメントを連 結した. 一方 Smad4 は、 RLuc の C 末側フラグメントに3カ所アミノ酸変異を導入した新規フ ラグメント(McLuc1)を連結した. もし、Smad4 が Smad1 と相互作用すれば赤色のルシフェラ ーゼ発光が検出される. Smad4 が Smad2 と相互作用すれば緑色のルシフェラーゼ発光が検 出される. 2 色の異なる発光はフィルターを用いて分離することにより、どちらの相互作用が

起きているか判別が可能となる.

先ず培養細胞 COS-7 を用いて, Smad1-Smad4 相互作用による発光シグナル変化を検討 した. リセプターの常時活性体を細胞に発現させると, 発現していない場合と比較し 12 倍の シグナル変化が得られた. Smad2-Smad4 相互作用による発光シグナルについても同様に検 討したところ, 14 倍のシグナル変化が得られた. 次に, 各々の Smad タンパク質をコードする mRNA と黄色蛍光タンパク質(Venus)の mRNA を, ツメガエル卵の 2 細胞期にインジェクショ ンした. 独自に開発した発光顕微鏡を利用し, 卵割から 48 時間の発生過程における個体の 形態を Venus で, また Smad 間相互作用の局在をルシフェラーゼの発光により高感度冷却 CCD カメラで連続的に画像取得した. その結果, ステージ 12 から局所的な発光が観察され, ステージ 26 において Smad1-Smad4 相互作用は腹側で, Smad2-Smad4 相互作用は背側で 起きていることが解った. ツメガエル卵の発生過程における Smad 間相互作用を初めて時空 間解析することに成功した.



図3. ツメガエル卵発生過程における Smad1-Smad4 相互作用の発光イメージング.

2-4) 光応答性ルシフェラーゼの開発と細胞内 pH 変化のイメージング

pH 感受性プローブは,細胞内タンパク質輸送の解析やガン細胞の可視化ツールとして期 待されている.これまで蛍光性 pH プローブは様々開発されてきたが,動植物個体に応用可 能な発光プローブは未だ開発途上である.本研究では,細胞内 pH をモニターするルシフェラ ーゼ発光プローブの開発を目的とした.pH 感受性タンパク質には,光受容タンパク質フォトト ロピンの LOV2ドメインを利用した.LOV2の明状態と暗状態における構造変化の速度は,pH に依存することが知られている.

LOV2のN末端とC末端に二分割したルシフェラーゼの断片を連結した,光応答性ルシフェ ラーゼを開発した(図 4A). この融合タンパク質は,暗状態ではルシフェラーゼの発光能を維 持することが解った.一方 440 nm の光を照射すると一時的に発光反応が低下し,さらに暗所 におくと発光が次第に回復する特徴を有することを明かにした(図 4B).この発光の回復時 間は pH に大きく依存することがわかった.特に,pH7.0以下の範囲において,高感度にルシ フェラーゼの発光回復時間が変化することがわかった.すなわち,プローブに光照射した後, 発光の回復速度をモニターすることにより,プローブ周囲の pH 変化を検出することができる. 一方,発光基質濃度や ATP 濃度には,発光の回復時間は影響を受けないことが解った.こ の基質や ATP の濃度変動による発光値の不安定化は,発光イメージングの大きな問題点で あった.本検出系はこれらの問題点を克服する画期的な検出系となり得る.

次に、タンパク質プローブの利点である細胞内局在性を生かし、ミトコンドリアの自食(マイトファジー)にともなうpH 変化のインビボ検出を目的とした. 光応答性ルシフェラーゼの N 末端に、ミトコンドリア外膜に局在する Tom20 を連結したプローブを作製した. プローブを培養細胞に発現し、プローブをミトコンドリア外膜に局在させた. マイトファジーを誘導する試薬 CCCP を細胞に添加し、発光の回復時間を測定した. その結果、 CCCP 添加後 15 分後から



図4. (A)光応答性ルシフェラーゼの原理. (B)光照射に伴う一過的な発光値の減少. (C)マイトフ ァジーによる pH の経時変化. プローブをミトコンドリア(赤)とサイトゾル(青)に局在させた. (D) CCCP 刺激によるマイトファジーの蛍光観察. ミトコンドリア(赤), リソソーム(緑), 核(青)を蛍光試 薬で染色した.

発光回復時間が増加した(図4C). この CCCP 刺激による応答の時間変化は, マイトファジーの蛍光イメージングによる時間変化と一致することがわかった(図4D).

開発したプローブの重要な特徴は、従来のルシフェラーゼの「発光量」に基づく分析ではな く、「発光回復時間」という新たな指標を導入することで、基質や ATP の濃度に依存しない確 度の高い検出系が確立できた点にある。従って、マイトファジーや細胞のガン化など、数時間 から数日にわたる細胞内 pH 変動でも、基質や ATP の濃度変動を考慮することなく、定量分 析できる画期的な手法となることが期待できる。今後はガン細胞のモニタリングなどに応用 が期待できる。

3. 今後の展開

独自に開発したタンパク質再構成法を基軸として、ルシフェラーゼを用いた分子プローブを 開発し、蛍光イメージングでは困難であった自家蛍光の強いツメガエル卵やシロイヌナズナ 植物個体をモデルとして、個体内ではたらく生体分子イメージングを可能にした.また、ルシ フェラーゼの発光回復時間(LOV2 構造変化の速度)を指標とする、全く新たな原理に基づい た発光イメージング法を創出したことは大きな成果である.現在ルシフェラーゼを用いた発光 イメージングは、顕微鏡開発を含め世界に浸透し始めている一方、解決すべき課題が数多く 顕在化してきた.その一つは空間解像度の改善である.現状の発光イメージングは蛍光イメ ージングと比較すると、平面解像度において未だ劣っている.また組織深部からのシグナル を検出することはできるが、正確な深度情報は得ることはできない.3次元空間解像度を如 何に上げるかは今後の重要な課題である.また現在の技術では、時間分解能が秒オーダー であり生体内の早いシグナルを追跡することができない.時間分解能の向上は、より発光強 度の強いルシフェラーゼの開発により達成されるであろう.今後は、これらの課題を一つずつ 解決すると同時に、新たな生理現象やシグナルを可視化するプローブ開発をさらに進める予 定である.このような生物個体の細胞内小分子やシグナル伝達を解析する新たな基盤技術 の開拓は、生命のより深い理解に繋がるものと期待される.

4. 自己評価

ルシフェラーゼの生物発光を利用して、自家蛍光の強い組織や個体のなかで働く生体分子のイメージングを可能にしたことは大きな成果である. これまでルシフェラーゼはフォトンカウントによる定量分析に応用されてきが、検出感度の不足から分子イメージングを実現することは容易ではなかった. 本研究では、顕微鏡の光学系の改良や高感度 CCD カメラの活用により、ルシフェラーゼプローブの微弱な発光が検出できるようになり、自家蛍光の強い生体内のシグナルを追跡できることを実証したことは、当初の目的を達成し得たといえる. さらにツメガエル卵の cGMP 発光イメージングにより、cGMP の新たな役割や植物個体内の cGMP の機能について、予期していなかった新たな生理現象が見えてきたことは大きな成果であった. 現在生化学実験および分子生物学実験おこない、cGMP の生理的意義を探究している段階にある. 新規発光イメージングから新たな生理現象を発見する最終ゴールには期間内に達成できなかったが、発光イメージングによる生物個体のイメージングを実現し、その大きな可能性を提示することが十分にできた点は大きな成果である.

5. 研究総括の見解

自己評価にも記載されているように自家蛍光の強い細胞内蛍光イメージングを本研究者が 開発したルシフェラーゼ分割・再構成法を確立し、さらに多色での分子間相互作用のイメージ ングにも成功している。cGMP 産生のイメージングは大変立派な成果である。自家蛍光の強 いツメガエル卵の初期発生段階のイメージングは新しい発見をもたらしている。そのほか多 彩な研究が成功裏に進められている。マウス個体での現象・解析への発展を期待したい。 多大な努力と困難な問題を着実に解決されての独創性の高い素晴らしい成果である。高く 評価したい。

6. 主要な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

 N. Hida, M. Awais, M. Takeuchi, N. Ueno, M. Tashiro, T. Singh, M. Hayashi, K. Ohmiya and <u>T. Ozawa</u>, "High-Sensitivity Real-Time Imaging of Dual Protein-Protein Interactions in Living Subjects Using Multicolor Luciferases", PLoS ONE, 4, e5868 (2009).
 M. Takeuchi, Y. Nagaoka, T. Yamada, H. Takakura and <u>T. Ozawa</u>, "Ratiometric Bioluminescence Indicators for Monitoring Cyclic AMP in Live Cells Based on Luciferase-Fragment Complementation", Anal. Chem., 82, 9306–9313 (2010).
 N. Misawa, A.K.M. Kafi, M. Hattori, K. Miura, K. Masuda and <u>T. Ozawa</u>, "Rapid and High-sensitivity Cell-based Assays of Protein-protein Interactions Using Split Click Beetle Luciferase Complementation: An Approach to the Study of G Protein-coupled Receptors", Anal. Chem., 82, 2552-2560 (2010).
 S. B. Kim and <u>T. Ozawa</u>, "Creating Bioluminescent Indicators to Visualize Biological Events in Living Cells and Animals" Supramol. Chem., 22, 439–448 (2010).
 A.K.M. Kafi, M. Hattori and <u>T. Ozawa</u>, "Luciferases for the Study of Protein–Protein Interactions in Live Cells and Animals", Nano Life, 1, 45–62 (2010).

(2)特許出願

研究期間累積件数:5件(海外2件、国内3件)(非公開を希望)

(3)受賞

- ・小澤岳昌、バイオビジネスコンペ JAPAN バイオ先端知賞(武田計測先端知財団)
 (2009 年 3 月)
- ・小澤岳昌、第7回(平成22年度)日本学術振興会賞 (2011年2月)

(4)著書

- ・小澤岳昌,「RNA イメージング法」実験医学増刊, 26, 59-67 (2008).
- ・小澤岳昌、「発光タンパク質で細胞内をみる」、未来材料、vol 9, p28-35 (2009).
- 小澤岳昌、「RNA とタンパク質局在のイメージング(新しい地平をひらく分析手法の最前線)」化学フロンティア、北森武彦編、111-118、化学同人(2009).
- 小澤岳昌、「生体分子の機能を可視化するGFP再構成法」化学と工業、62, 129-132 (2009).
- ・小澤岳昌、「蛍光・発光タンパク質を用いた再構成法による分子イメージング」実験医学、 28, 27-32 (2010).

(5)招待講演

招待講演(国際)

• <u>T. Ozawa</u>, "Optical Imaging of Biomolecules in Living Cells and Animals Using Split-Reporter Reconstitution Analysis", 1st Workshop in the Advanced Light Microscopy (DKFZ), Heidelberg, Germany (2008).

• <u>T. Ozawa</u>, "Fluorescent and Bioluminescent Proteins Engineered by Protein Splicing to Visualize Biological Function", VIII European Symposium of the Protein Society, Zurich, Swiss (2009).

•<u>T. Ozawa</u>, "Fluorescent and Bioluminescent Probes for Visualizing Biological Functions in Living Cells", NF-kB Training Session & Symposium, Liverpool, UK (2009).

•<u>T. Ozawa</u>, "Fluorescent and Bioluminescent Proteins Engineered for Visualizing Biological Function in Live Cells", Annual Meeting of Korean Society for Molecular Imaging, Seoul, Korea (2010).

•<u>T. Ozawa</u>, "Fluorescent and Bioluminescent Proteins Engineered to Visualize Biological Function in Single Living Cells", Single Cell Analysis Summit, San Diego, USA (2010).

招待講演(国内)

- ・小澤岳昌、「タンパク質再構成法を用いた生体分子イメージング」,薬物動態学会23回年 会(熊本)(2008).
- ・小澤岳昌,「GFP 再構成技術を用いた生体分子の可視化」,日本化学会第89春季年会 (千葉),3月(2009).
- 小澤岳昌,「新規光プローブが拓く生体分子イメージング」,第 31 回日本光医学・光生物
 学会(大阪)(2009).

- ・小澤岳昌,「分子プローブが拓く生細胞内シグナルの可視化法」, 2009 年電気化学秋季 大会(東京)(2009).
- ・小澤岳昌,「生きた動物体内における分子機能イメージング」,日本分子イメージング学 会第5回学術集会(滋賀)(2010).

研究報告書

「コヒーレント・ラマン内視分光鏡による生体組織の in vivo 計測」 研究期間: 平成19年10月~平成23年3月 研究者: 加納 英明

1. 研究のねらい

ラマン分光法は、非染色・非侵襲で生体の"その場観察"を可能とするため、分子レベルでの生細胞分析や病理診断など、生命科学・医学双方に大きなブレイクスルーを創出することが期待される。本研究では、ラマン散乱光を増幅するコヒーレント・ラマン分光法を利用することで、薬剤や病変等による生体組織の構造変化を in vivo、in situ で高速に可視化できる、まったく新しいコヒーレント・ラマン内視分光鏡を開発することを目標として、研究を行った。

2. 研究成果

本研究では、コヒーレント・ラマン過程として coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS)を採用した(図1)。CARS光は入射レーザー光の波長より短波長側(アンチストークス

側)に発生するため、生体組織の計測でしばしば発生 する自家蛍光が問題とならない。本研究では、近年注 目を集めている<u>白色レーザー光</u>を光源として用いるこ とで、"分子の指紋"であるラマン(CARS)スペクトル を 取得できる、マルチプレックスCARS過程を生細胞・生 体計測に応用した。本研究成果は主に、(1)マルチプ レックスCARS分光による非染色・非標識・マルチカラ ー(マルチモード)イメージングのための基盤技術の確 立、そして(2)CARSファイバープローブの開発とin vivo計測の試み、の二つに分けられる。

0 1 00₂ 00 1 00_{CARS}

図1. マルチプレックスCARS過程;狭 帯域ω₁光、広帯域ω₂光(白色レーザ 一光;挿入写真)により、幅広い振動 スペクトル領域においてCARS光発生 を実現した。

2. 1. CARS 分光イメージングのための基盤技術の確立 複雑なCARSスペクトルから分子の情報を抽出し、

分子の指紋を"読み解く"ためには、CARSスペクトルを解析する新しい方法論の開発が必要 である。そこで本研究では、最大エントロピー法(Maximum Entropy Method; MEM)及び特異 値解析(Singular Value Decomposition; SVD)を用いたスペクトル解析を、CARS分光イメージ ングに導入した。図2に、出芽酵母(zygote of *Saccharomyces cerevisiae* and

Saccharomyces bayanus) 生細胞内の異 なる空間点におけるCARSスペクトル((a) 及び(b))、MEM及びSVDを用いたスペクト ル解析の結果((c)及び(d))を示す。露光 時間は50 msである。指紋領域の信号強 度は、C-H伸縮振動など 3000 cm⁻¹付近 に現れる信号強度より一般に小さく、生 細胞でのCARS測定はこれまで困難であ ったが、ナノ秒白色レーザーという新しい 光源及びCARS測定に最適化した顕微イ メージングシステムの構築により、今回明 瞭に検出することに成功した。一般に、 CARSスペクトルには非共鳴バックグラウ ンドと呼ばれる背景光が重畳するため、 分散型の複雑なスペクトル形状になる



図2. 出芽酵母生細胞の CARS スペクトル(a,b)。(a) 及び(b)は異なる空間位置でのもの;(c,d) MEM 及 び SVD により(a)及び(b)から再構成した $Im[\chi^{(3)}]$ ス ペクトル(通常のラマンスペクトルに相当する) ((a)及び(b))。MEMでは、この非共鳴バックグラウンドを逆に活用することで、自発ラマンスペクトルに対応するIm[$\chi^{(3)}$]スペクトル(三次の非線形感受率の虚部)を得ることが出来る。図2 (c)及び(d)は、各々主に脂質及びタンパク質のスペクトルに対応している。これに加え、ミトコンドリアの代謝活性を反映する 1602 cm⁻¹ のラマンバンドも見られる¹。各々のバンドを用いて、生細胞を可視化した結果を図3に示す。生細胞のラベルフリー・マルチカラー(マルチモード)イメージングに、はじめて成功した。



図3. 出芽酵母生細胞のラベルフリー・マルチカラー(マルチモード)CARS 分光イメージ。左上 に、ラマンシフトの値と対応する振動モードの帰属を示す。





図4. 動物細胞(CHL 細胞)の CARS スペ クトル(a)及び MEM により(a)から再構成し た $Im[\gamma^{(3)}]$ スペクトル(b)

図5. 動物細胞(CHL 細胞)の CARS 分光イメージ。右上に振動モードの帰属を示す。

次に、本方法を動物細胞に適用した。図4(a)にChinese hamster lung (CHL)生細胞の CARSスペクトル(a)及びMEMにより復元した $Im[\chi^{(3)}]$ スペクトル(b)を示す。自発ラマンスペクト ルに対応する、歪みのないスペクトルが得られた。 $Im[\chi^{(3)}]$ スペクトルにおいて特徴的な 4 つ のバンド(CH₃伸縮、CH₂伸縮、アミドI及び*cis* C=Cの重畳したバンド、CH変角振動)を用いて イメージを構成した結果を図5に示す。CH₃伸縮(a)、CH₂伸縮(b)は、タンパク質及び脂質の分 布にそれぞれほぼ対応する。CH₂伸縮(b)のイメージで黒くなったエリアは、細胞核に相当す る。このエリアにおけるCH₃伸縮イメージ(a)には、核内に構造物が見られるが、これらは核小 体であると考えられる。この他、CH₂伸縮(b)のイメージには、信号の強い領域が細胞内に局 在しているが、これらは脂質リッチなオルガネラ(膜系オルガネラや脂肪滴等)であると考えら れる。このように、生細胞内のオルガネラを非染色・非標識にて可視化することが出来た。こ の他、生体組織(毛髪、皮膚等)についても、非染色・マルチカラーイメージを得ることに成功 した。以上のように、白色レーザーを用いた実験手法とMEMによるスペクトル解析により、生 細胞から生体組織まで、様々な対象のCARS分光イメージングに成功し、CARS分光を用い た本手法の基盤技術を確立することができた。

2. 2. CARS ファイバープローブの開発

CARS内視分光鏡実現のため、プロトタイプとしてCARSファイバープローブを設計、開発し

た。ファイバープローブの写真及び実験 装置を図6(a)に示す。光源にはピコ秒モ ード同期Nd:YVO」レーザー(パルス幅 8 ps, 中心波長 1064 nm, 繰り返し 76 MHz)を用いた。発振器からの出力を二 分岐し、一方を第二高調波(532 nm, 4W)に変換後、光パラメトリック発振器 (optical parametric oscillator; OPO)のポ ンプ光として用いた。OPOからはシグナ ル光(690 - 990 nm)及びアイドラー光 (1150-2300 nm)の二つの波長可変パ ルスが同時に出力される。本研究では、 アイドラー光(~1147 nm)を用いた。光 源から分岐したもう一方の光パルスは、 基本波のままフォトニック結晶ファイバ ー(photonic crystal fiber; PCF)に導入し て白色レーザー光を発生させた。白色 レーザー光のスペクトルと写真を図6(b) に示す。白色レーザー光は可視から近 赤外まで幅広いスペクトル広がりを持つ が、そのうち近赤外光のみを用いた。近 赤外光を用いることで、侵入長が深く、 かつ生体試料に対する光損傷を抑える ことができると期待される。OPOからの



図6(a) CARS ファイバープローブの写真(挿入図)及 び実験装置図; PCF (photonic crystal fiber), (b)発 生させた白色レーザー光のスペクトル (InGaAs 検出 器の感度特性のため近赤外光のみ検出)及び写真

アイドラー光及びPCFからの白色レーザー光を、各々CARS過程のω₁光、ω₂光として用いた。 ω₁光、ω₂光を、時間的遅延(τ)を合わせた後、同軸にしてシングルモードファイバーに導入し た。ファイバープローブ(特注品)にはダイクロイックミラーが内蔵されており、レーザー入射 用とCARS受光用の二つの経路が一つの筐体にコンパクトにおさめられている(図6(a)写真)。 ω₁光、ω₂光を、プローブ先端に搭載したレンズ(焦点距離 10 mm)により試料に集光し、試料 から発生したCARS光の後方散乱成分を、同じレンズで集めた。ダイクロイックミラーを透過し たCARS光をマルチモードファイバーにより分光器へと導き、CCDカメラによりスペクトル測定 を行った。試料は三軸ピエゾステージに載せることもできるため、スキャンすることでCARS分 光イメージを得ることも可能である。

図7に、テスト試料として用いたρーニトロアニリン微結晶(a)及びポリ(3-ヘキシルチオフェン) のキャスト膜(b)のCARSスペクトルを示す。露光時間はどちらも100 msである。指紋領域にお いて、各々NO2対称伸縮(a)、CH変角振動(b)に由来する強い信号が観測された他、ρーニトロ アニリン微結晶では様々な振動モードに由来するバンドを多数検出した。ρーニトロアニリン微 結晶について、NO2対称伸縮のバンドを用いたCARS分光イメージングを行った結果を図8に 示す。数マイクロメートルのサイズの微結晶が明瞭に可視化できていることがわかる。以上 のように、CARSファイバープローブを用いることで、マイクロメートルスケールの分解能にて CARSスペクトル及びイメージの取得が可能であることが示された。



図7. *p*-ニトロアニリン微結晶(a)及びポリ (3-ヘキシルチオフェン)(b)の CARS スペクト ル

最後に、*in-vivo* CARS分光を試みた。ヒト (H.K.)の上腕皮膚にマッサージオイルを塗布し、 測定した結果を図9に示す。露光時間は10秒で ある。オイルに由来すると思われる信号が、微 弱ながらCH変角振動領域(1450 cm⁻¹付近)に観 測された。

以上のように、CARS 内視分光鏡に向けて、 白色レーザーを利用した、新しい CARS ファイバ ープローブの開発を行った。顕微鏡では測定が 困難である試料について、CARS の強みを活か した高速振動分光イメージングを行える可能性 が示された。

参考文献

[1] Y. -S. Huang, T. Karashima, M. Yamamoto, and H. Hamaguchi, *Biochemistry* 44, 10009 (2005).



図8. *p*-ニトロアニリン微結晶の CARS イ メージ(a)及び強度プロファイル((a)の白 点線)(b)



図9. ヒト上腕部(写真)にマッサージオイル 塗布後、ファイバープローブにて測定した CARS スペクトル(青実線)。露光時間は 10 秒。CH 変角振動領域に微弱な信号が観測 された。図中赤点線は、マッサージオイル の CARS スペクトル。

3. 今後の展開

本研究により、白色レーザー光を用いた生細胞、生体組織のCARS分光イメージングの有 用性を示すことが出来た。すなわち、生体試料を染色/標識することなく、"分子の指紋"で あるラマン(CARS)スペクトルのみを用いて、分子レベルで"色づけ"できることが示された。 本研究の今後の発展としては、この"分子の指紋"をより広く、そして深く活用することが挙げ られる。例えば幹細胞科学と再生医療の分野では、細胞を選択して再利用する必要がある が、その際の選別は非侵襲的に行うことが必須である。細胞の分化プロセスのモニタリング、 細胞スクリーニングなどに、本手法は大変有効であると考える。また、分子の指紋であるラマ ンスペクトルを丹念に"読む"ことは、分子の構造・機能・相互作用を"観る"ことにつながる。 スペクトル情報を十二分に活用することで、生細胞、生体組織、そして生体個体まで、幅広い 生命システムを対象として、分子の"機能"を観ることができるイメージングシステムを実現で きる可能性がある。蛍光イメージングなど、従来法ではアプローチできない対象に本手法を 適用し、更なる研究を展開していきたい。

4. 自己評価

本研究では、目標として掲げた CARS 内視分光鏡を、研究期間中に開発することができな かった。しかしながら、(1)新しい白色レーザー光源を用いることにより、生細胞や生体組織 から分子の情報を直接抽出することのできる、新しい実験及び解析手法の立ち上げに成功 した。そして、(2)新しい CARS ファイバープローブを開発し、テスト試料について、CARS 光の 検出に成功した。以上により、CARS 内視分光鏡を開発するための基盤となる結果を得るこ とができた。

(1)については、顕微鏡、内視鏡、腹腔鏡などハードウェアによらない、CARS 分光イメージング全般に適用できる成果である。特に顕微イメージングについては、その方法論を確立したと考えている。

(2)で開発した CARS ファイバープローブは、内視分光鏡の実現を目指したプロトタイプの ものであり、最終目標に向けて依然多くの課題が残っている。しかしながら、ハンディなプロ ーブタイプの装置により、CARS スペクトルが取得可能であることが今回示せた。生体組織か らの信号は未だ得られていないが、研究期間中に見つけた問題点を解決し、蓄積したアイデ アを試すことで、近い将来是非"使えるモノ"を立ち上げたい。

上記に加え、研究期間中、フランスの研究者との国際共同研究を並行して進めた。これに より、新しい白色レーザー光源を用いた、低コストかつコンパクトな CARS 分光イメージングシ ステムの製作が可能であることがわかった。製品化する上で基盤となる要素技術を、特許 (加納英明・濵口 宏夫、「非線形分光計測システム用の光源装置、非線形分光計測システム 及び方法」,特願 2008-66832)として申請することが出来たことも、本研究の重要な成果の一 つである。

5. 研究総括の見解

白色レーザーを光源とする CARS による分子イメージング技術の開発に成功し細胞への 応用(基礎データ)には一応成果が挙っている点は高く評価したい。ファイバープローブの開 発に成功したことも CARS 内視鏡の製作に寄与した。生体組織を見るレベルには至っていな いが今後に期待したい。ここで得られた分子構造情報を生体情報とどのように関連づけるの か、すなわちどのような生命現象を分子レベルで語れるようにするのかが課題となろう。膜中 の C-C 結合の trans-gauche に対応するピークを見た点は興味深い。細胞生物学、分子生理 学、病理学、臨床への応用など今後の発展を大いに期待したい。いずれにしても良く頑張っ たと高く評価したい。

6. 主要な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

• Masanari Okuno, Hideaki Kano, Philippe Leproux, Vincent Couderc, James Day, Mischa

Bonn, and Hiro-o Hamaguchi, "Quantitative CARS molecular fingerprinting of single living cells with the use of the maximum entropy method", *Angewandte Chemie International Edition*, 49, 6773–6777 (2010).

- Hideaki Kano, "Molecular Spectroscopic Imaging Using a White-Light Laser Source", *Bulletin of The Chemical Society of Japan* 83, 735-743 (2010).
- Hideaki Kano, "Molecular Vibrational Imaging of a Human Cell by Multiplex Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microspectroscopy Using a Supercontinuum Light Source", *Journal of Raman Spectroscopy* 39, 1649–1652 (2008)

 Masanari Okuno, Hideaki Kano, Philippe Leproux, Vincent Couderc, and Hiro-o Hamaguchi, "Ultrabroadband multiplex CARS microspectroscopy and imaging using a subnanosecond supercontinuum light source in the deep near infrared", *Optics Letters*, 33 (9), 923-925 (2008).

(2)特許出願

研究期間累積件数:1件

発	明	者:	加納 英明, 濵口 宏夫
発明	月の名	3称:	非線形分光計測システム用の光源装置、非線形分光計測システム
			及び方法
出	願	人:	東京大学
出	願	日:	2008/3/14

(3)受賞

·加納英明、 光科学技術研究振興財団 研究表彰 (,2008 年 3 月)

·加納英明、日本化学会 第 57 回進歩賞 (2008 年 3 月)

·加納英明、 日本分光学会 若手奨励賞 (2009 年 11 月)

(4)著書

・加納 英明, 奥野 将成, 濵口 宏夫, "脂質分子を"ありのまま"にとらえる-白色レーザ ーを用いた脂質分子の CARS 分光イメージングー", 実験医学 5 月号 28 (8), 1234-1240 (2010).

・加納 英明, 奥野 将成, 濵口 宏夫, "ナノ秒白色レーザーを用いたコヒーレント・ラマン 分光イメージング", レーザー研究 37(10), 739-745 (2009).

・加納 英明, 濵口 宏夫, "コヒーレントラマン分光イメージング", オプトロニクス 8 月号 (332), 108-114 (2009).

・奥野 将成,加納 英明,濵口 宏夫,"生細胞のラマン分光イメージング ~生命の分子 レベル時空間解析に向けて~",遺伝 63(3),80-84 (2009).

・加納英明, "白色レーザーを用いた非線形ラマン分光イメージング", 分光研究 57, 238-248 (2008).

(5)招待講演

招待講演(国際会議)

•Hideaki Kano, Masanari Okuno, and Hiro-o Hamaguchi, "CARS molecular fingerprinting using a white-light laser source", The 22nd International Conference on Raman Spectroscopy, Boston (2010).

• Hideaki Kano, Masanari Okuno, and Hiro-o Hamaguchi, "Label-free, multi-colour, high-speed imaging of a living cell by CARS spectral imaging", Laser Application in Life Sciences Conference (LALS-2010), Oulu (2010).

•Hideaki Kano, "CARS spectroscopic imaging using a white-light laser source", 5th International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy (ICAVS-5), Melbourne (2009).

•Hideaki Kano, Hiro-o Hamaguchi, "CARS Spectroscopic Imaging Using a Supercontinuum Light Source", The 21st International Conference on Raman Spectroscopy, London (2008).

招待講演(国内会議)

・加納英明・濵口宏夫,"白色レーザー光を用いたコヒーレントラマン分光イメージング", レ ーザー学会学術講演会第 30 回年次大会, Feb 2 (2010).

・加納英明・濵口宏夫,"生細胞を染めずに見る ~振動分光を用いたアプローチ~",2009 年度 薬物動態談話会 特別例会,浜松,Nov 19 (2009).

・加納英明・濵口宏夫,"コヒーレントラマン分光によるラベルフリー・マルチカラーイメージン グ", 生体医工学会, 東京, Apr 25 (2009).

・加納英明・濵口宏夫,"非線形ラマン分光法による非染色・マルチカラー生体計測 ~分 子から生体組織まで~",(財)バイオインダストリー協会"未来へのバイオ技術"勉強会, 東京, Jan 14 (2009).

・加納英明・濵口宏夫, "生細胞の非線形ラマン分光イメージング", 光・量子デバイス研究 会(電気学会研究会), 横浜, Feb 8 (2008).

研究報告書

「セミインタクト細胞を用いた蛋白質の一生の可視化解析」 研究期間: 平成 19 年 10 月~平成 23 年 3 月 研究者: 加納 ふみ

1. 研究のねらい

本研究では、次の3つのねらいを持って独創的で、汎用性が高いタンパク質の機能解析システムを構築し、その解析システムを利用したタンパク質機能と病態との関連解析システムのプロトタイプを構築することを目的とした。

(1)できるだけ細胞内で機能するタンパク質の環境を重視した解析系を作る:個々のタンパク質に は、その機能発現を最適にする「環境」が存在している。その環境にはタンパク質の機能発現を 助ける脂質や他のタンパク質が、特定の細胞内スポットへとタイミング良く集積する仕組みがある。 よってタンパク質の真の機能解析のため、「オルガネラや細胞骨格が作る細胞のトポロジーが保 持された状態での機能解析」を行う。

(2)反応の素過程を解析する:細胞内反応の多くは多数のタンパク質がネットワークを作り協奏的に反応が進む。本研究では協奏的に進む生命反応を「素過程に分割し」、それに関わるタンパク質群の機能発現を「同調させた状態で解析できる」システムを作る。

(3)汎用性の高い解析システムをつくる:個々のタンパク質の機能は千差万別であるため、個々の機能に特化した解析システムはあえて行わない。まず、(A)全てのタンパク質に共通する「タンパク質の一生」の4段階:全てのタンパク質は次の4段階、すなわち DNA からmRNA への転写段階、タンパク質への翻訳段階、細胞内局在が規定される輸送段階、分解段階、で精密な機能発現制御を受けている。タンパク質の一生のうちどの段階が病態発現時に異常・攪乱を来しているかを明らかにすることは、病態原因・増悪の分子機構解明のみならず、病態改善のための創薬ターゲットスクリーニングのためにも重要であると考える。また、(B)シグナル伝達:細胞の生命機能は細胞外からのシグナルを核内へと伝播させるシグナル伝達過程によって、多大な影響を受けている。そこで病態におけるシグナル伝達過程の以上を検出し解析するためのシステムが、早急に必要とされている。

以上の「ねらい」を満たすタンパク質の機能計測・解析システムとして、細胞型試験管・「セミイン タクト細胞系」と可視化技術を最適にカップルさせた「セミインタクト細胞・リシール細胞によるタン パク質機能可視化解析システム」を提案した。

2. 研究成果

(1)基盤技術セミインタクト細胞解析システムの成熟とリシール細胞技術の確立

セミインタクト細胞とは、連鎖球菌の酵素感受性毒素であるストレプトリシンO(streptolysin O: SLO)などを形質膜に作用させることにより、形質膜を部分的に透過性にした細胞(セミインタクト

細胞)のことである(図 1)。<u>オル</u> <u>ガネラや細胞骨格そのものと</u> <u>そのトポロジーは保持したま</u> <u>ま、細胞質を流出させることが</u> できる。ここ(細胞を一個の試 験管に見立てて)に新たに外 部より分画した細胞質(又はそ の成分)とATP再生系などを添 加し、細胞質に依存的な細胞 内のイベント(細胞内膜動過 程、タンパク質間相互作用、タ ンパク質のターゲティングなど)



図1 セミインタクト細胞・リシール細胞技術概要

を再構成できれば、生起する生命現象を生物物理学的、生化学的に解析できる(図 1)。例えば、 セミインタクト正常細胞に「病態モデルマウス組織より調製した病態細胞質」を導入することにより 真の細胞質状態に近い「病態モデル細胞」を作成できる(図2)。この様にセミインタクト細胞を用 いることにより、擬似的に細胞形質を<u>病態のものに同調した細胞アッセイ系を構築し、その中で同</u> 期して生起する生命現象をS/N比良く検出できることになる。

さらに本研究において、我々はセミインタクト細胞 の穴を閉じインタクト細胞へと復帰させる技術「リシ ール細胞技術」を確立することに成功した。カルシ ウムイオンと細胞質依存的にセミインタクト細胞の 形質膜に形成された穴が閉じ、生細胞に戻ること がわかった。さらに興味深いことに一部のリシール 細胞は継代・培養も可能であった。この「リシール 細胞技術」は以下の2点でセミインタクト細胞の新 たな展開技術になり得ると考えられる。まず、(I)リシ ール細胞では形質膜がインタクトに戻っているため、 今までセミインタクト細胞で難しかった形質膜を介し た受容体媒介のシグナル伝達過程、物質の取込過 程であるエンドサイトーシス過程の再構成・解析が 可能となった。またセミインタクト細胞内ではおそらく



図2 病態モデル細胞構築スキーム

イオン環境の変化で小胞化していたミトコンドリア形態を、リシール細胞内では正常な形態として 観察できたため、近年疾患との関係が急速に注目されつつあるミトコンドリア形態・機能アッセイ 系の確立が本技術によって実現できた。(II)リシール細胞技術により、細胞内に導入した標識分子 の動態や機能の長時間追跡が可能になった。さらに一部の細胞では継代・培養することが可能と なったため、本リシール細胞技術は新規細胞形質転換法、エピジェネティクス改変誘導法としての 応用が期待できる。

以上の基盤技術を基に、本さきがけ研究期間中に以下の生命現象に対して可視化再構成系を 構築することに成功した。

- ・転写:メチル化 DNA 結合タンパク質 MeCP2 の局在・動態変化過程
- ・翻訳:転写因子 ATF4 のストレス依存的な翻訳過程
- ・輸送:小胞体⇔ゴルジ体間小胞輸送、エンドサイトーシス
- ・ シグナル伝達: Ras-MAPK シグナル伝達、PI3 キナーゼ(PI3K)-Akt シグナル伝達
- ・その他:インシュリン分泌、エンドソーム特異的に局在する脂質 (PI3P)の局在変化

ミトコンドリア動態・形態変化解析

(2)高脂血症モデル細胞を用いたシグナル伝達攪乱とアポトーシス・ミトコンドリア機能低下誘導 メカニズムの研究

本項では、高脂血症モデル細胞の構築と、その病態モデル細胞内で PI3K-Akt シグナル伝達破 綻によって誘導される抗アポトーシス機能の脆弱化について述べる。

上記方法を用いて高脂血症における病態細胞内環境をセミインタクト細胞内で再現し、「高脂血 症モデル細胞」を構築した。具体的には、高脂血症モデルマウスとして汎用される ApoE ノックアウ トマウスの肝臓から調製した細胞質「高脂血症細胞質」をセミインタクト HeLa 細胞に添加し、細胞 内の環境を高脂血症時のものに改変した。その後形質膜を封入(リシール)し、この細胞を「高脂 血症モデル細胞」として解析を進めた。高脂血症環境下におけるシグナル伝達攪乱を検証するた めに、受容体チロシンキナーゼ下流で駆動される2つのシグナル伝達経路、Ras-MAPK 経路と PI3 キナーゼ(PI3K)-Akt 経路に注目した。これら2 つの経路は血清あるいは上皮成長因子 EGF 刺激により活性化され、MAPK あるいは Akt のリン酸化がそれぞれの経路の活性化の指標となっ ている。まず、野生型マウス肝臓から調製した細胞質「正常細胞質」を加えたセミインタクト HeLa 細胞をリシールした(これが「正常モデル細胞」となる)。正常モデル細胞を刺激したところ、インタ クト細胞と同様のキネティクスで MAPK や Akt のリン酸化が検出された。ところが、高脂血症モデ ル細胞においては刺激依存的な MAPK リン酸化は正常モデル細胞と同様に誘導されるが、Akt

のリン酸化が阻害されていることが明らか になり(図 3)、高脂血症の細胞内環境では PI3K-Akt シグナルがうまく伝播されていな い可能性が示唆された。

以上の結果から高脂血症環境下では PI3K-Akt シグナルによって制御を受ける多 くの生命現象がネガティブな作用を受ける と予想されるが、その中でも我々は特に PI3K-Akt シグナルによってダイレクトに制 御されるアポトーシス過程に注目した。そこ で正常/高脂血症細胞質を添加したリシー ル細胞を UV 照射・血清飢餓環境におきア ポトーシスを誘導した。すると、アポトーシス の誘導効率が高脂血症モデル細胞では正 常モデル細胞に比べて増大していることが 明らかとなり、Akt シグナル伝達経路が阻害 されている高脂血症モデル細胞はアポトー シス誘導に対して脆弱性を持つことが確認さ れた。さらに、高脂血症環境下におけるミトコ ンドリア形態と機能も同時に解析した。ミトコ ンドリアはアポトーシス誘導に中心的役割を 果たすオルガネラであり、Akt シグナル破綻が ミトコンドリア形態・機能を阻害し、その結果 Akt 依存的な抗アポトーシス効果が攪乱され、









細胞病態が発現する可能性が大きいと考えた。興味深いことに、高脂血症細胞質を導入したリシ ール細胞内のミトコンドリア長は全体的に長くなり、ヒストグラムは最少は 0.5 µm から最大は20 µm 以上のものまで様々な長さに分布した(図 4)。また、長さの変化だけでなく、形態的にも swell(膨潤)した形のものが多くなっているように見えた。さらに正常/高脂血症細胞質環境下に おけるリシール細胞内ミトコンドリアの膜電位を tetramethylrhodamine metyhylester(TMRM)を用 いて計測したところ、高脂血症モデル細胞ではミトコンドリア膜電位が〜12%減少しており、高脂血 症環境下においてミトコンドリアの機能低下の可能性が示唆された。PI3K-Akt シグナルは抗アポ トーシス活性をもつこと、さらに平行して行った網羅的キナーゼ阻害剤スクリーニングの結果 PI3K-Akt シグナル伝達に関わる複数キナーゼの阻害剤がミトコンドリア長を長くすることから、高 脂血症環境下における PI3K-Akt シグナル伝達阻害がミトコンドリア機能低下ひいてはアポトーシ スを誘導するという分子機構モデルを考えており、生細胞およびリシール細胞系を用いてモデル の検証を進めている。

3. 今後の展開

以上、本研究ではセミインタクト細胞・リシール細胞を用いた疾患モデル細胞構築と病態時に攪乱されるタンパク質機能と病態との関連・分子メカニズム解析システムのプロトタイプ構築を実現した。この系を駆使し、現在我々は高脂血症モデル細胞における PI3K-Akt シグナル伝達破綻の 鍵因子同定を進めている。本技術は他の病態におけるタンパク質機能解析への応用、低分子化 合物ライブラリースクリーニングへの応用へと展開しうると考えており、汎用性の高いタンパク質 機能と病態との関連研究に応用できる解析システムの完成が期待できる。

また、ここで開発したセミインタクト細胞リシール技術は、多様な細胞状態をシステムとして供す ることができる汎用性の高い計測系であるとともに、タンパク質導入だけによる(ゲノムに傷を付け ない安全な)新規細胞形質転換法やエピジェネティクス改変法といった新たな「細胞創成法」として の応用も十分期待できる。今後はリシール細胞技術を基盤とした病態細胞内における生命現象 可視化計測システムの構築を通し、生命現象を「見て」「理解して」、その知見を新規細胞を「創る」ことにフィードバックしたいと考えている。

4. 自己評価

私にとって一番大きな成果は、さきがけ研究期間中にセミインタクト細胞をインタクト細胞に戻す 「リシール細胞技術」を確立でき、それを用いた「病態モデル細胞」内現象の可視化解析のプロト タイプを構築できたことである。リシール細胞技術によりセミインタクト細胞では再構成が難しかっ た細胞膜(細胞膜受容体)を介した細胞内のシグナル伝達過程を可視化解析することが可能とな り、病態におけるシグナル伝達異常の検出およびその分子メカニズム解明に着手することができ るようになった。現在のところ、シグナル伝達の可視化を蛍光抗体法によって行っているが、リシ ール法を用いた「病態モデル細胞」系を用いた解析の妙味は、まさに病態細胞内で撹乱を受ける シグナル伝達の空間的・時間的変化(動態)解析であるため、現在定量可能なシグナル伝達可視 化蛍光プローブの設計と作成に取りかかっているところである。

5. 研究総括の見解

タンパク質をセミインタクト細胞に導入する技術で病気のモデル細胞を実現したばかりか、それ をインタクト細胞に戻すリシール細胞技術を完成させた。これを用いて病体変異(高脂血症)モデ ル細胞のシグナル伝達特性を調べ、アポトーシスが起こり易いこと、ミトコンドリアの形態変異を見 出すなど、病体モデル細胞をセミインタクト・リシール細胞によって再構築出来ることが示された。 独創的な研究で素晴らしい成果を挙げ高く評価したい。今後当初の目的に向かって可視化と他の 病体モデル細胞研究への発展が大いに期待される。これによって病気の要因が細胞レベルで理 解され、臨床応用に繋がればなお素晴らしいことであろう。

6. 主要な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文) 発表

	 Adachi A, Kano F, Tsuboi T, Fujita M, Maeda Y, Murata M Golgi-associated GSK3beta regulates the sorting process of post-Golgi membrane trafficking. J. Cell Sci., 123, 3215-3225, 2010.
	 Kano. F., Yamauchi, S., Yoshida, Y., Watanabe-Takahashi, M., Nishikawa, K., Nakamura, N., and Murata, M. Yip1A regulates the retrograde transport form the Golgi apparatus to the endoplasmic reticulum. J. Cell Sci., 122, 2218-2227, 2009
	 Fujiki, K., Kano, F., and Murata, M. Expression of the peroxisome proliferator activated receptor gamma gene is repressed by DNA methylation in visceral adipose tissue of mouse models of diabetes. BMC Biology, Jul 10;7:38, 2009
	 Adachi, A., Kano, F., Saido, T.C., and Murata M. Visual screening and analysis for kinase-regulated membrane trafficking pathways that are involved in extensive beta-amyloid secretion. Genes Cells. 14, 355-369, 2009
	 Kano, F., Arai, T., Matsuto, M., Hayashi, H., Sato, M., Murata M. Hydrogen peroxide depletes phosphatidylinosidol-3-phosphate from endosomes in a p38 MAPK-dependent manner and perturbs endocytosis. BBA - Molecular Cell Research, in press.
(2)	特許出願

研究期間累積件数:2件(1件は非公開希望)

発明者: 村田 昌之、臼井 貴史,加納 ふみ、安達 淳博

発明	の名	i称:	細胞内における生体物質の局在制御関連酵素の特定法
出	願	人:	東京大学、日京テクノス(株)
出	願	日:	2008/7/15

(3)学会発表

学会発表(国際)

•Fumi Kano, Shinobu Yamauchi, Yumi Yoshida, Nobuhiro Nakamura, and Masayuki Murata Reconstitution of anterograde and retrograde transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus in semi-intact CHO cells: The role of Yip1A in retrograde transport. The American Society for Cell Biology 48th Annual Meeting. 2008.12. San Francisco, USA.

•Masayuki Murata, Atsuhiro Adachi, Katsunori Fujiki, and Fumi Kano. Coupled dynamics of organelle biogenesis and vesicular transport during cell cycle. The American Society for Cell Biology 48th Annual Meeting. 2008.12. San Francisco, USA

•Atsuhiro Adachi, Fumi Kano, Masayuki Murata. Visual screening for kinase-regulated membrane trafficking between endosomes and Golgi : Identification of the kianses that involved in extensive β -amyloid secretion. The American Society for Cell Biology 48th Annual Meeting. 2008.12. San Francisco, USA.

•Katsunori Fujiki, Fumi Kano, Kunio Shiota, Masayuki Murata. Expression of PPAR γ Gene is Repressed by DNA Methylation in Adipose Tissue of Diabetes Model Mice. The American Society for Cell Biology 48th Annual Meeting. 2008.12. San Francisco, USA.

学会発表(国内)

•Fumi Kano, Tamaki Arai, Mariko Matsuto, Masayuki Murata. p38-dependent loss of phosphatidylinositol-3-phosphate at endosomes affects the retrograde transport of cholera toxin from cell surface to the Golgi. 第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会大会 合同大会. 2010 年 12 月 8 日.

•Fumi Kano, Tamaki Arai, Mariko Matsuto, Masayuki Murata. Establishment of semi-intact cell system and application of its resealing technique: a study of membrane dynamics. 第4 8回日本生物物理学会年会. 2010 年 9 月 21 日.

・荒井珠貴、松戸真理子、加納ふみ、村田昌之. セミインタクト細胞を利用した細胞機能改変と細胞創成. 細胞を創る研究会 2.0. 2009 年 10 月 2 日.

・安達淳博、加納ふみ、村田昌之. セルアレイチップを用いた細胞内キナーゼネットワーク 可視化解析システムの構築. 第31回日本分子生物学会年会 第81回日本生化学会大 会 合同大会. 2008 年 12 月 10 日.

・加納ふみ、安達淳博、村田昌之. セミインタクト細胞を用いた小胞体-ゴルジ体間小胞輸送アッセイの構築とその応用. 日本ケミカルバイオロジー学会第三回年会. 2008 年 5 月 19・20 日. ポスター賞受賞.

招待講演(国内)

・細胞を創る研究会 3.0 セッション「うつわを創る」ポスターセレクション セミインタクト細胞

⁽⁴⁾招待講演

リシール法を用いたシグナル伝達経路解析システムの構築. 2010年11月12日.

・日本薬学会第130年会シンポジウム「薬学における生命指向型化学」 セミインタクト細胞を用いたオルガネラダイナミクスの分子機構解明. 2010年3月29日

・日本生物物理学会 第 57 回年会 シンポジウム「メンブレントランスフォーマー!! ~生体 膜の形を変えるための合体と解離~」Mechanistic Insights into Membrane Dynamics Using Semi-Intact Cell System 2009 年 11 月 30 日.

・日本化学会 第3回関東支部大会シンポジウム「ケミカルバイオロジーが拓く生命科学研究の新展開」生命現象の可視化解析ツールとしてのセミインタクト細胞系. 2009 年 9 月 4 日.

研究報告書

「高圧力を用いた分子間相互作用変調イメージング」 研究期間: 平成19年10月~平成23年3月 研究者: 西山 雅祥

1. 研究のねらい

水溶液中でタンパク質1分子の構造変化や機能を観測できる1分子イメージングが開発さ れたのは15年前のことである。1分子イメージングは、開発当初から今日に至るまで、従来 までの膨大な分子を用いた実験系では平均化の過程で失われていた「個々の分子の生の 情報」を得ることができる手法として、多くの研究者に利用されてきた。タンパク質分子機械 の代表例である分子モーターでは、1分子に目印を取り付けることで、ナノメートルの変位や 構造変化などを検出することが幅広く行われるようになり、動作原理を調べる強力なツール として定着した感がある。分子モーター1個の動きを見ていると、メインの運動方向とは異な った方向、つまり、逆向きにも、時々、ステップすることが検出されてきた。これらのマイナー イベントの検出は、1分子計測の開発当初に期待されていたことであり、熱揺らぎに激しく揺 さぶられながらも効率よく駆動する分子モーターの運動特性を明らかにする上で鍵となる重 要なイベントであると考えられている。しかしながら、分子モーターの多くは、構造的に定めら れた方向に、動くように巧妙に仕掛けられており、マイナーイベントの検出は可能であっても、 定量的な議論に持ち込むことは、ほとんどの場合困難となっている。言い換えると、生体分 子機械の精緻な構造や機能を少しいじって、マイナーイベントを効率よく検出、定量化できれ ば、動作原理の解明につながることを意味する。さきがけ研究では、細胞内にあるタンパク 質をとりまく水分子に着目し、高圧力技術で、タンパク質と水分子との相互作用を変化させて、 その構造変化・機能変調について顕微観測を行う新しい分析手法の開発に取り組んだ。



Figure 1 さきがけ研究の概要

2. 研究成果

さきがけ研究では、1)高圧力下での高感度実時間イメージングを可能にする高圧力顕 微鏡を開発し、2)バクテリアの運動器官であるべん毛モーターの回転運動を研究ターゲット として研究をすすめた(Fig. 1)。これまでの研究により、高圧力の影響は、測定対象となる構 造体が複雑であるほど、より低い圧力下で構造と機能が変化することが知られている。バク テリアの運動器官であるべん毛モーターは巨大なタンパク質複合体であり、高圧力によるダ イナミックな構造変化と機能変調が期待され、かつ、遺伝子操作および、培養方法の簡便さ などメリットも多い。また、「動き」という機能は顕微鏡下での精密計測が可能であるため、定 量的なデータを元にして動作原理に迫ることができる。

1) 新しい分析手法: 高圧力顕微鏡の開発

細胞内にある水分子は、タンパク質を取り囲むとともに、エネルギー的に最適化し、高次 の立体構造形成や酵素活性を円滑に進める働きがある。言い換えると、タンパク質と水との 相互作用を変えることができれば、構造や機能活性のコントロールを行えることを意味する。 これまでの研究により、高圧力下では、タンパク質の水和状態が変化するため、立体構造の 揺らぎが大きくなり、また、タンパク質間の相互作用が弱まることが知られている。こうした知 見は、NMR や吸光・蛍光などの分光測定を通じて得られたものであるが、高圧力技術と光学 顕微鏡を組み合わせた報告例はほとんどない。なぜなら、耐圧性能を維持することと、開口 数を拡げて高解像の顕微観察像を取得することは相反する要素であり、両立させることは困 難であったからである。さきがけ研究において、研究代表者は、高圧力技術をタンパク質構 造と機能をかえる変調作用として用い、その変化を高解像の顕微観察により検出する新しい 分析技術の開発に取り組んだ。

高圧力下の実時間イメージングを可能にする「高圧力顕微鏡」の開発において、最も重要な課題は、耐圧性能を維持しながら、高開口数の観測窓をもつ高圧チャンバーの開発に ある(Fig. 2a)。これまでから、トライアンドエラーを繰り返しながら設計を繰り返し、耐圧性能 重視型と高開口数重視型の異なる2種類の高圧チャンバーを開発してきた。耐圧性能重視 型高圧チャンバーでは、本体の材料として、粘りがあり可塑的に変化するニッケル合金(ハス テロイ C276)、また、観測窓の材料としては、良好な顕微観察像を得るため通常のガラスを 採用した。この結果、マリアナ海溝最深部(11,000m)の静水圧の約2倍に相当する2000気圧 までの耐圧性能を有しながら、長作動距離の対物レンズ(WD[~]3mm, NA=0.6)を用いて、チャ ンバー内の明視野像、位相差像、暗視野像、落射蛍光像を観察できる顕微鏡を開発できた (Fig. 2b)。この高圧チャンバーにハイスピードカメラを組み合わせることで、チャンバー内の 生体分子に取り付けたビーズの重心位置を画像解析によりナノメートルレベルの精度で計測 できる観測システムを構築できた。



Figure 2 高圧力下での光学顕微観測システム a, 高圧チャンバーと周辺部の写真。b, 高圧 チャンバーの観測窓に固定した 1µm ビーズの各種顕微観察像。Bar= 5µm

次に、高開口数型高圧チャンバーでは、高解像度の顕微観測を可能にするため、開口 数が高く、作動距離の短い油浸型の対物レンズ(WD=0.15, NA=1.65, APO100XOHR, Olympus)を利用できる仕様とした。耐圧性能を確保するため、開口径を0.1mmと小さくし、硬 度の高いサファイア窓剤(厚さ0.2mm)を外側から貼り付けることで(西山雅祥, 顕微観測用 高圧容器, 特願 2008-264944)、現在、1000 気圧程度の耐圧性能を達成させることに成功し ている。この高圧チャンバーに、光ピンセットによる操作技術や、対物レンズ型エバネッセント 照明の光学系を組み込みずみであるため、今後は、高圧力下での1分子イメージングへと展 開していきたい。

2) バクテリア・ベん毛モーターの回転運動変調イメージング

バクテリアのべん毛モーターは、自然界には数少ない回転運動を生み出す生物分子機 械であり、その速度は毎分1万回転にも達している。バクテリアは、この回転モーターで長い らせん状のフィラメント(べん毛繊維)をスクリューのように回転させることで、水の中を自由に 泳ぎまわっている。べん毛モーターは、数十種類ものタンパク質が何百個と集まってできてい る複雑な分子集合体である。回転運動の発生に関わる重要な部位として、べん毛繊維の根 元に位置する「回転子」と、それを取り囲むように位置する約 10 個の「固定子」が挙げられる (Fig.1)。細胞外にあるイオンが固定子に結合後、固定子ー回転子間の相互作用によりトルク を発生させているのだが、その詳細な動作メカニズムは明らかにされていない。機能評価の 点からみても、*in Vitro* 再構成系での実験ができないので、生きた細胞内で行われる回転方 向の調節、ならびにトルク発生を制御し計測することが技術的に困難であることが、大きな理 由として挙げられる。さきがけ研究では、高圧力技術を利用して、細胞内にある水分子とべ ん毛モーターの相互作用を変えることで、回転機能の変調と検出に取り組んだ。

高圧力顕微鏡の観測窓にべん毛繊維を吸着させて、細胞本体の回転運動を観察した (Fig. 3a)。実験に用いた菌体からは、べん毛モーターを時計方向(CW)に回転させるシグナ ルタンパク質である CheY を欠失させているので、通常条件下では、全てのモーターは反時 計方向(CCW)に回転することになる(Fig.3b)。しかしながら、このモーターは、1200 気圧下で は、時計方向(CW)に回転しはじめた(Fig.3c)。あるモーターに着目し、各圧力下における回 転運動のトレースを Fig. 3d に示す。回転速度が圧力増加とともに単調に減少したのに対して、 回転方向が 1200 気圧を境に反転した様子が見て取れる。それ以外の例として、高圧力下で



Figure 3 高圧力により引き起こされたべん毛モーターの逆回転運動。 a, 実験系。b and c, 回転する菌体の連続写真。同じべん毛モーターの回転運動について 1 気圧(b)と 1200 気圧 (c)で位相差像を観察した。赤い矢印は1回転を示す。時間間隔は33ms.Bar = 2µm. d, 同じべん毛モーターにおける回転運動のトレース(CCW 向きの回転を正の値)。e, CW バイアス。各条件下でべん毛モーターが CW 方向に回転する時間をもとめ、全体として CW 方向に回転する確率について計算した。

回転方向が定まらず両方向に回転するモーターや、依 然として CCW 方向に回転するモーター、回転を停止さ せた例などが見られた。このような回転の方向性につ いて定量的に評価するため、1つ1つのモーターが CW 方向に回転する時間を求め、全体として、モーターが CW 方向に回転する確率(CW バイアス)を計算した (Fig.3e)。圧力の増加と共に、CW バイアス)を計算した (Fig.3e)。圧力の増加と共に、CW バイアスはシグモイド 状に増加し、低温では圧力の影響がより顕著にあらわ れることが明らかになった。高圧力と低温は平衡定数 や反応速度に対して同様の効果が期待されるので、熱 力学的にもつじつまはあう。おそらく、高圧力をかける ことで、べん毛モーターが CheY 結合時のような構造へ と変化していると考えられる。

次に、高圧力がどのようにして、べん毛モーターの トルク発生過程を変調するのか明らかにするため、ベ ん毛モーターの高速回転ナノ計測を行った。高圧力顕 微鏡にハイスピードカメラを組み合わせて、べん毛繊維 に取り付けたポリスチレン・ビーズの高速回転運動を記 録した(Fig. 4a)。その回転速度と発生トルクを様々な圧 カ下で測定したところ、常温常圧力において、べん毛モ



Figure 4 べん毛モーターの 回転ナノ計測。a,実験系。 b.トルク-スピード関係

ーターが低速度で回転する領域では(0^{~140Hz})、見かけのトルクは約 1500pNnm でほぼー 定であり、高速度領域では(>140Hz)発生トルクは急激に減少した。圧力の増加に伴い、幅 広い速度領域で回転速度の低下が見られたが、べん毛モーターが発生できる見かけ上のト ルクの最大値に変化は見られなかった(Fig.4b)。この高圧力下でのトルクースピード関係は、 サルモネラ菌で、細胞内 pH を下げて得られた結果とよく一致していた(Nakamura *et al., J. Mol. Biol.* 386, 332-338 (2009))。したがって、高圧力下では、あたかも細胞内のプロトン濃度 が増加したかのように、プロトンの流入速度が低下していると考えられる。同様の結果は、海 洋性ビブリオ菌・周毛欠損株の遊泳運動や、ならびに、同菌体由来の Na+駆動型べん毛モー ターの高速回転計測からも得られた。

また、モーターの回転速度の圧力依存性解析から、圧力やビーズサイズに伴う粘性抵抗 値に関わらず、モーターが発生するトルクは常に一定値(1470pNnm)であることが明らかに なった。この知見を元にすると、べん毛モーターのトルク発生モデルとしては、イオンの流入 と構造変化が1:1に共役したタイトカップリングモデルのみならず、必ずしも1:1に対応しな いルースカップリング型のモデルでも説明できることが判明した。今後は、高圧力下での固定 子ー回転子の結合解離の直接観察や、モデル解析を通じて、詳細な動作原理を明らかにし ていきたい。

3. 今後の展開

本研究課題で開発した高圧力顕微鏡法は、今後2つの展開を期待できる。まず、基礎研 究では、比較的低分子の構造変化や機能活性を高圧力下で計測し、水を含んだMD計算と の比較から、機能発現における水分子の役割を具体的に解き明かすことができるであろう。 具体的には、ATP合成酵素:F₁モーターがその対象としてもっともふさわしいと考えられる。次 に、応用研究として、高圧力が等方的な力学作用であることを利用して、細胞・組織に対する ー様な力学効果として用いることができる。これまでの研究では、細胞などに力学作用を与 えるさいには、水流によるズリカなどが用いられてきたが、細胞の形などによりその効果が 異なるというデメリットがある。高圧力技術を用いて、細胞膜を介したシグナル伝達過程やタ ンパク質発現量の制御を行い、メカノバイオロジーの新潮流として展開していきたい。

4. 自己評価

さきがけ研究では、1)高圧力下での光学顕微観測を行える新しい分析技術の開発と、2) バクテリアベん毛モーターの回転運動を研究対象にして3年半の研究を行ってきた。まず、 1)において顕微観測用の高圧力チャンバーの開発が要であり、耐圧性能と高開口数の維持、 次に、汎用性の2点が重要項目であった。前者については、1分子イメージングを可能にする 高開口数は達成し、特許申請にいたったものの、耐圧性能が未だ不十分であり、今後に課 題を残す状況である。後者については、汎用性を重視した高圧チャンバーを開発することで、 明視野像、暗視野像、位相差像、蛍光像と各種の顕微画像の取得が可能であり、現在では、 装置一式を共同研究者にあずけて、研究を開始するに至っている。今後は、高圧力を用いた 新しい分析技術として普及させていきたい。

次に、研究対象として選んだべん毛モーターには、大腸菌の培養の容易さに加えて、複雑 な構造体であるがゆえに高圧力の影響を出しやすく、かつ、その機能である回転運動は光 学顕微鏡下で定量しやすいというメリットがあった。研究課題として挙げた高圧力下での回転 方向と回転速度の定量化はほぼ達成できた。残された課題として、べん毛モーターのトルク 発生時における固定子ー回転子間の結合解離反応の圧力による変調と可視化が挙げられる。 高圧力顕微鏡の改良を進めながら、残された課題として取り組んでいきたい。

5. 研究総括の見解

タンパク質、生体膜、細胞、個体等への圧力効果はかなり以前から種々の分光法等を用 いて研究されて来ており、バロバイオロジーという研究分野に発展している。本研究では圧 力変調出来る光学顕微鏡を新たに開発したことは大いに評価出来る。これを用いてべん毛 モーターの回転に及ぼす圧力の作用の研究に応用している。圧力を変えることによって H+ や Na+の流入が変調しモータータンパク質のトルクに影響を与えていることを明らかにしてい る。しかし何故 800 気圧でモーターの回転方向が逆転するのか解明してほしい。圧力の作用 は水構造の変化や分子集合体の変化をもたらす。分子レベルの変化と分子システムの変化 を区別して解明するには高圧力顕微鏡のみでは困難ではないだろうか。しかしながら本研究 はその方向に着実に進展しつつあると言えよう。ユニークな本研究を高く評価したい。

6. 主要な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

 <u>Nishiyama M.</u>, Kimura Y., Nishiyama Y. & Terazima M. Pressure-induced changes in the structure and function of the kinesin- microtubule complex. *Biophysical Journal*, 96 (3) 1142-1150 (2009).

 <u>Nishiyama M.</u>, Shimoda Y., Hasumi M., Kimura Y. & Terazima M. Microtubule depolymerization at high pressure. *Ann NY Acad Sci.* 89 (1) 86–90 (2010).

(2)特許出願

研究期間累積件数:1件

発	明	者:	西山雅祥
発明	明の名	3称:	顕微観測用高圧容器
出	願	人:	JST
出	願	日:	2008/10/14

(3)受賞

·西山雅祥、日本生物物理学会 第5回若手奨励賞受賞(2009 年 10 月)

(4)著書

・西山雅祥、(仮題)べん毛モーターが高圧力下で逆に回り出す?!、生物物理 (*in preparation*)

(5)学会発表

学会発表(国際)

<u>Nishiyama M.</u>, Shimoda Y., Hasumi M., Kimura Y., Terazima M. Direct observation of microtubule depolymerization *in vitro* at high-pressure conditions. 5th International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology. San Diego, SA, USA, Sep. 2008

<u>Nishiyama M.</u> Sowa Y., Kumazaki S., Kimura Y., Homma M., Ishijima A., Terazima M. High-pressure microscopy for modulating the torque generation of bacterial flagellar motors, 53rd Annual Meeting of Biophysical Society, Boston, USA, Mar, 2009.

•Nishiyama M., Kimura Y., Terazima M. High-pressure microscopy for modulating the structure and function of biomolecules. 52nd Annual Meeting of Biophysical Society, San Francisco, SA, USA, Feb. 2010.

 Hasumi M., Terazima M., <u>Nishiyama M.</u>, Effect of pressure on the torque of the bacterial flagellar motor. 52nd Annual Meeting of Biophysical Society, San Francisco, SA, USA, Feb. 2010.

<u>•Nishiyama M.</u>, Sowa Y., Kimura Y., Homma M., Ishijima A., Terazima M. Reverse rotation in bacterial flagellar motors at high hydrostatic pressures. BLAST XI, New Orleans, LA, USA, Jan. 2011, "<u>Scheduled for a Talk</u>"

学会発表(国内)

・下田義樹、西山雅祥、小嶋誠司、本間通夫、木村佳文、寺嶋正秀、Na⁺駆動型べん毛モーターにおける遊泳速度の圧力応答、第45回日本生物物理学会年会、横浜、2007年12月

・西山雅祥、木村佳文、寺嶋正秀、1分子イメージング・ナノ操作を可能にする高圧力顕微 鏡法、第46回日本生物物理学会年会、福岡、2008年12月

・蓮見学、寺嶋正秀、西山雅祥、バクテリアベん毛モーターの発生トルクの圧力依存性、
 第 47回日本生物物理学会年会、徳島、2009年10月

・加藤篤、寺嶋正秀、<u>西山雅祥</u>、Na⁺駆動型べん毛モーターの回転速度の圧力依存性、 第 48 回日本生物物理学会年会、仙台、2010 年 9 月

(6)招待講演

招待講演(国際)

<u>Nishiyama M.</u> Control of Bio-nanomotors by High-pressure Techniques, *NanoMedicine* 2010, Beijing, China, Oct. 2010

<u>• Nishiyama M.</u> Pressure-induced reverse rotation in bacterial flagellar motors,6th International Meeting on Biomolecules under Pressure ,March 2011 招待講演(国内)

・西山雅祥 高圧力による生体分子間相互作用変調イメージング、CREST 中山チームミー ティング、京都、2008 年9月

<u>・西山雅祥</u>高圧力によるべん毛モーターの回転運動変調、第46回日本生物物理学会 年会、福岡、2008年12月

<u>・西山雅祥</u>高圧力顕微鏡の開発とバクテリアベん毛モーターの回転計測、圧カバイオサイエンスセミナー、横浜、2009年6月

<u>・西山雅祥</u>高速カメラを用いたリアルタイムナノ計測、デジモ社ランチョンセミナー、第48 回日本生物物理学会年会、仙台、2010年9月

・西山雅祥 ワークショップ"(仮称)化学反応や生体高分子の構造変化における状態変化の起源を探る"、新潟、2011 年 3 月(予定)

研究報告書

「ビデオフレーム液中原子分解能AFMの開発」 研究期間: 平成19年10月~平成23年3月 研究者: 福間 剛士

1. 研究のねらい

原子間力顕微鏡(AFM)は、液中動作が可能であるため液中での生体分子イメージングへ と従来から用いられてきた。しかしながら、原子スケールの構造・物性計測や原子操作を実 現している超高真空AFMに比べ、液中AFMの性能は大きく劣っていた。超高真空中における 原子分解能観察は、周波数変調AFM(FM-AFM)と呼ばれる動作モードを用いることにより実 現していたが、これを液中で動作させることは非常に困難であると予想されていた。我々は、 そのような予想を覆して、これを実現する技術を 2005 年に開発し、FM-AFMによる液中原子 分解能観察を世界で初めて実現した。さらに、この技術を用いて生体分子や水和層などの、 従来観察できなかった対象の原子・分子スケール観察を実現してきた。しかしながら、液中 FM-AFMを生命現象の計測分析へと応用するためには、動作速度が遅すぎるという大きな 問題があった。FM-AFM技術は、従来、超高真空中における原子レベルで平坦な表面の精 密分析に用いられてきた。そのため、FM-AFMの典型的な動作条件は、1 frame/min以下の 速度で、0.1 nm以下の凹凸を持つ表面を、10 × 10 nm²以下の走査範囲でイメージングする というものであり、比較的大きな揺動、凹凸、不均一性を持つ生体試料の表面を観察するた めには、動作速度が不足している場合が多く、その応用範囲は限られていた。本研究では、 この問題を克服するために、原子分解能を有する液中FM-AFMの動作速度を飛躍的に向上 させる技術の開発に取り組んだ。さらに、開発した技術を用いて、従来技術では不可能だっ た生命現象の計測分析をサブナノメータ分解能で実現することを目標とした。

2. 研究成果

液中 FM-AFM の高速化

図 1 に、FM-AFM の装置構成を示す。 AFM では、鋭く尖った探針を先端に有する 片持ち梁(カンチレバー)を力検出器として 用いる。FM-AFM では、このカンチレバー を機械的にその共振周波数で振動させ、 それを試料表面へと近付ける。すると、探 針ー試料間に相互作用力が働き、カンチ レバーの共振周波数がシフトする。この周 波数シフト量を一定に保つように、探針-試料間距離を制御する。この状態で、試料 を水平方向に走査すると、試料の垂直位 置は試料表面の凹凸をなぞるように上下 する。したがって、試料の垂直位置に比例



図 1. FM-AFM の装置構成.赤字と青字で 示した周波数は、各構成要素の帯域また は共振周波数の改良前後の数値である.

した信号である Z スキャナの制御信号を、XY スキャナの制御信号に対して記録すれば、表面形状像が得られる。

FM-AFM の動作速度を向上させるためには、探針ー試料間距離制御ループを構成する すべての要素を高速化する必要がある。本研究では、まずこれらの構成要素の動作速度を 改善するための装置開発に取り組んだ。プリアンプ回路を改良することで、帯域を1 MHz か ら 10 MHz に向上させた。カンチレバーの励振法をピエゾ励振法から光熱励振法へと改良す ることで、励振帯域を1 MHz から 25 MHz に向上させた。位相同期ループ(PLL)回路の内部 で使われる位相比較器を乗算式から減算式に変更することで、周波数検出帯域を1 kHz か ら 1 MHz へ、カンチレバー励振帯域 を 1 MHz から 5 MHz へと向上させた。 PI 制御回路を高速 FPGA 回路へと 組み込むことで、その帯域を 10 kHz から 1 MHz へと向上させた。高圧ア ンプ回路を改良することで、その帯 域を 1 kHz から 1 MHz に向上させた。 Z スキャナの新たな支持方法を提 案し、その共振周波数を 1 kHz から 540 kHz へと向上させた。カンチレ バーを小型化することで、共振周波 数を 130 kHz から 2.8 MHz に向上さ せた。

これらの改良の結果、各構成要素の動作帯域を格段に向上させる ことに成功した。ただし、高いフレー ムレートでの高速 AFM イメージング を実現するためには、これらの要素 技術を統合するためのシステム開



図 2. (a)2D-SFM と(b)3D-SFM の動作原理. (c)マイ カ/水界面の 3D-SFM 像.

発が必要となる。その中心となるのが、FPGA 回路を制御するファームウェアと、ホスト PC を 制御するソフトウェアの開発である。これまで 2 年以上にわたって、これらのプログラムの開 発に取り組んできており、あと少しで高速 AFM 動作を実現できる段階まできている。

高速イメージングの実現にまでは至らなかったが、AFM の構成要素を高速化することで、 これまで不可能だった様々な計測が実現可能になった。なかでも、固液界面における3次元 カ分布計測の実現は最も大きな成果と言える。従来の AFM では、探針の試料表面からの高 さを一定に保ちながら、試料を水平に走査することで、2次元的な凹凸像を得る手法であった。 しかし、固液界面では、固体表面と水分子が相互作用することによって、水分子の分布に局 所的な偏りがみられ、その分布は 3 次元的な広がりを持っている。したがって、従来の AFM で得られる 2 次元画像では 3 次元的な広がりを持って生じる水和現象を計測・分析すること が不可能に近かった。そこで我々は、従来の 2 次元走査型原子間力顕微鏡(2D-SFM:図 2(a))を発展させた 3 次元走査型原子間力顕微鏡(3D-SFM:図 2(b))を開発した。3D-SFM で は、探針を水平方向に走査させると同時に、探針—試料間距離の制御帯域よりも高速に探 針を Z 方向に走査させ、その間に生じる周波数シフト量の変化をリアルタイムに高速記録す る。これにより、固体表面近傍の 3 次元空間(固液界面空間)における 3 次元的なカ分布を 可視化できるようになった。たとえば、図 2(c)に示した 3D-SFM 像では、マイカ/水界面に形 成された水和層と、マイカ表面に局所的に存在する吸着水の分布を反映したカ分布が明瞭 に観察されている。この結果は、X 線反射率測定やモンテカルロシミュレーションの結果とも 良い一致を示している。固液界面の水分子の3次元分布を原子スケールの分解能で可視化 できる技術はこれまでになく、生物学分野のみならず、触媒・摩擦・電気化学など水和が関係 する様々な研究開発分野での応用が期待される。

液中 FM-AFM による生体分子イメージング

液中 FM-AFM を用いることで、生体試料の構造やその表面における水和分布をサブナノ メートルスケールの分解能で可視化することができる。本研究で行った装置開発により、従 来よりも動作速度が改善され、3 次元計測機能も備えた FM-AFM が利用可能となった。本研 究では、この装置を用いて、モデル生体膜やチュブリン集合体の研究を行った。

我々はこれまで、液中 FM-AFM を用いてマイカ基板上に作製した DPPC 脂質二重層と PBS 溶液の界面を分子分解能で観察する研究を行ってきた。本研究では、この研究をさらに 発展させて、DPPC/コレステロール(1:1)混合膜を PBS 溶液中で観察した。図 3(a)にその FM-AFM 像を示す。この FM-AFM 像では、左上から右 下にかけて伸びる 0.71 nm 間 隔のストライプ構造と、それを 構成する 0.46 nm 間隔の輝点 がそれぞれ観察されている。 この FM-AFM 像をDPPC 二重 層の FM-AFM 像と比較し、過 去の文献の結果などを考慮し て、我々は図 3(b)に示すよう な分子モデルを提案した。す なわち、この FM-AFM 像にみ



図 3. PBS 溶液中で取得した DPPC/コレステロール(1:1) 混合膜の FM-AFM 像と、(b)その構造モデル.

られるストライプ状の構造が DPPC 分子列に相当し、DPPC 分子列の間にコレステロール分 子列が挿入されているというモデルである。このようなモデルは過去に MDシミュレーション等 で短距離的な規則構造として予測されていたものではあるが、実験的に確認されたのはこれ が初めてである。また、DPPC 膜と比べると、DPPC/コレステロール混合膜では、分子レベル の欠陥の増加、分子列の規則性の低下などが確認された。このような違いも分子レベルの 観察で初めて明らかとなったものである。これらの結果は、コレステロールの挿入によって脂 質膜の膜強度が増加し、分子流動性が増大するという、膜物性への影響の分子レベルの起 源を明らかにするものであり、非常に有用な情報である。

3. 今後の展開

本研究により、液中 FM-AFM を高速化するための要素技術は、ほぼその開発を終了した。 今後は、それらの要素技術の実用性を改善し、さらにそれらを統合して AFM システムとして 動作させるための開発を進める。これにより、液中 FM-AFM の探針位置制御速度は飛躍的 に向上し、より不均一で、凹凸が大きく、揺動するナノバイオ界面を可視化できる技術へと発 展させていきたい。また、3次元計測技術については、これまでは水平方向の高分解能観察 を実現するために、比較的小さな観察範囲を対象に実験を行ってきたが、より大きな観察範 囲での3次元計測を行えるよう装置を改良し、ナノスケールの異種ドメイン間での水和構造・ 揺動構造の違いなどを可視化できる技術へと発展させていきたい。

本研究では、液中 FM-AFM を用いてモデル生体膜とチュブリン分子集合体の観察を行っ てきた。モデル生体膜に関しては、これまで室温で安定なゲル相をとる DPPC 脂質膜、さらに それにコレステロールを加えた DPPC/コレステロール混合膜を観察してきた。これらは、いず れも室温において比較的安定な構造をとっており、個々の分子を観察したり、それらと水分 子との相互作用を計測するにはよい対象であった。しかし、今後は、よりダイナミックな動きを 伴う脂質膜の挙動を調べるために、DPPC やスフィンゴ脂質などの飽和炭素鎖を持つ脂質分 子と、DOPC などの不飽和炭素鎖を持つ脂質分子とコレステロールの3種類の分子を含む混 合膜を用いて、そこに形成されるラフト構造と水和構造の関係を調べたい。さらに、その水和 構造が、膜表面とタンパク質やペプチドとの相互作用に与える影響を分子レベルで調べてい きたい。一方、微小管については、これまでチュブリン分子のシート状集合体を観察してきた が、最近ようやく微小管の構造を形成し、その表面における観察が可能になってきた。今後 は、微小管の表面において C 末端の構造をサブナノスケールで観察していきたい。ここで、C 末端の構造は3次元的な揺らぎを持っている可能性が示唆されているため、我々の開発した 3次元計測技術を用いて、揺動するC末端の3次元分布を直接可視化したい。そして、その 構造が分子種によって、または化学修飾前後に、どのような違いを示すのかを明らかにした い。さらに、そのようなサブナノレベルの構造変化が、微小管とモータタンパク質との相互作 用の制御にどのような役割を果たしているのかを明らかにしたい。

4. 自己評価

本研究では、液中 FM-AFM を高速化することで、大きな揺動、凹凸、不均一性を持つ生体 試料の表面をサブナノメートルスケールで可視化できる技術を開発することを目標として研 究を行った。その結果、液中 FM-AFM の構成要素を高速化する多くの要素技術が開発され、 異種分子で構成されたモデル生体膜や、多数のチュブリン分子の集合体をサブナノスケー ルで観察できるようになった。FM-AFM 装置全体を高速化し、生体分子の動的挙動をサブナ ノメートルで可視化するところまでには至らなかったものの、そのための基盤を築くことができ た。この結果をもとに、今後2、3年の間に、当初の目標が達成できるものと確信している。

また、高速化によって、生体分子/生理溶液界面において、揺動する水分子の3次元分 布や、揺動する生体分子の3次元構造などが、直接サブナノスケールの分解能で可視化で きる計測技術を開発することができた。この技術の開発は、当初の目的にはなかったが、こ のさきがけ研究を進めていく中で、その必要性に気付き、それを実現させたものである。明確 な必要性があって、開発したため、開発直後から、その有用性を示すデータがいくつも得られ ている。この技術は、生命現象の計測分析はもちろん、固液界面現象を扱うあらゆる学術・ 産業分野での研究開発に寄与するものと確信している。

当初の研究計画の達成度としては7-8割程度と考えるが、その不足を補って余りある、 大きな成果が、当初の計画になかった部分で得られている。したがって、総合して考えると当 初目標としていた以上の大きな成果が得られたと考えている。

5. 研究総括の見解

FM-AFM を高速化することで生体膜構造(モデル膜)を原子分解能で 3D イメージングする方 法を開発したことは大きな成果である。高く評価したい。これには様々の要素技術の積み重 ねがあってこその成功だと思う。脂質-水界面における水和層の構造を可視化出来ただけで なく、微小管中にあるチューブリン分子のヘリックス構造が見えるようになったことは素晴らし い。さらに技術改良によって時間分解能を高めていただきたい。また、実際の生体膜とくにラ フト構造も観測していただきたい。とにかく画期的な成果を挙げつつあると言えよう。

6. 主要な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

 T. Fukuma, Y. Ueda, S. Yoshioka, H. Asakawa, "Atomic-Scale Distribution of Water Molecules at the Mica-Water Interface Visualized by Three-Dimensional Scanning Force Microscopy", Phys. Rev. Lett. 104 (2010) 016101.
 Y. Mitani, M. Kubo, K. Muramoto, T. Fukuma, "Wideband digital frequency detector with subtraction-based phase comparator for frequency modulation atomic force microscopy" Rev. Sci. Instrum. 80 (2009) 083705.
 H. Asakawa, T. Fukuma, "The molecular-scale arrangement and mechanical strength of phospholipid/cholesterol mixed bilayers investigated by frequency modulation atomic force microscopy in liquid" Nanotechnology 20 (2009) 264008.
 T. Fukuma "Wideband low-noise optical beam deflection sensor with photothermal excitation for liquid-environment atomic force microscopy" Rev. Sci. Instrum. 80 (2009) 023707.
 T. Fukuma, Y. Okazaki, N. Kodera, T. Uchihashi, T. Ando, "High resonance frequency force microscope scanner using inertia balance support" Appl. Phys. Lett. 92 (2008) 243119.

(2)特許出願

研究期間累積件数:8件(海外4件、国内4件)

発 発明の名 出 願 出 願	者: 3称: 人: 日:	福間剛士、岡崎康孝、安藤敏夫 走査型プローブ顕微鏡用のスキャナ装置 金沢大学 2008/6/4(国内出願)、2009/5/29(PCT 出願)
発 発明の名 出 願 出願	者: 3称: 人: 日:	福間剛士、三谷悠士 走査型プローブ顕微鏡 金沢大学 2008/8/28(国内出願)、2009/7/16(PCT 出願)
発 発明の名 出 願 出 願	者: 3称: 人: 日:	福間剛士、植田泰仁 走査型プローブ顕微鏡 金沢大学 2009/2/2(国内出願)、2010/1/14(PCT 出願)
発 発明の名 出 願 出願	者: 3称: 人: 日:	淺川雅、福間剛士 カンチレバー励振装置及び走査型プローブ顕微鏡 金沢大学 2009/8/6(国内出願)、2010/8/6(PCT 出願)

(3)受賞

・福間剛士、未踏科学技術協会 バイオ・ナノテクフォーラム 高木賞(2008年3月)

·福間剛士、日本生物物理学会 第4回若手奨励賞(2008年12月)

·淺川 雅、応用物理学会 第 56 回応用物理学会議 講演奨励賞(2009 年 9 月)

・福間剛士、日本 MRS 第 19 回日本 MRS 学術シンポジウム 奨励賞(2010年1月)

(4)著書

• T. Fukuma, S. P. Javis, "Biological Applications of FM-AFM in Liquid Environment Noncontact Atomic Force Microscopy Volume 2" Chap. 16, pp. 329-345 S. Morita, F. J. Giessibl, R. Wiesendanger (Eds.), Springer 2009.

•S. P. Jarvis, J. E. Sader, T. Fukuma, "Frequency Modulation Atomic Force Microscopy in Liquids Applied Scanning Probe Methods VIII - Scanning Probe Microscopy Techniques" Chap. 9, pp. 315-350, B. Bhushan, H. Fuchs, M. Tomitori (Eds.), Springer 2008.

(5)学会発表

学会発表(国際)

•H. Asakawa, K. Ikegami, T. Hayasaka, M. Setou, T. Fukuma, "Submolecular-scale imaging of tubulin assemblies by FM-AFM in liquid", 13th International Conference on Non-Contact Atomic Force Microscopy (NC-AFM 2010), Kanazawa, Japan Aug., 2010.

•H. Asakawa, K. Nishimura, S. Yoshioka, T. Fukuma, "Distribution of Water Molecules Adjacent to Biological Membranes Visualized by Three-Dimensional Scanning Force Microscopy", 17th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM17) Atagawa, Japan, Dec., 2009.

•T. Fukuma, H. Asakawa, S. Yoshioka, "Three-dimensional Distribution of Water Molecules Visualized by 3D Scanning Force Microscopy with Atomic-Scale Resolution", Hydrogen and Water in Condensed Matter Physics, ISSP-11, International Symposium 2009 (ISSP11), Kashiwa, Japan, Oct., 2009.

•H. Asakawa, Y. Ueda, T. Fukuma, "Anisotropic Hydration of Biological Molecules Visualized by Three-dimensional Scanning Force Microscopy", 12th International Conference on Noncontact Atomic Force Microscopy and Casimir 2009 Workshop (NC-AFM 2009), New Haven, USA, Aug., 2009.

•T. Fukuma, Y. Ueda, "3D Scanning Force Microscopy at Solid/Liquid Interface", 12th International Conference on Noncontact Atomic Force Microscopy and Casimir 2009 Workshop (NC-AFM 2009), New Haven, USA, Aug., 2009.

学会発表(国内)

・福間剛士、淺川雅、"脂質膜/水界面の3次元走査型原子間力顕微鏡による分子スケール イメージング"、日本生物物理学会第48回年会 (東北大学)、2010年9月20日

・浅川雅、池上浩司、早坂孝宏、瀬籐光利、福間剛士、"液中周波数変調原子間力顕微鏡
 (FM-AFM)によるチューブリン表面構造の実空間観察"、日本生物物理学会第 48 回年会
 (東北大学)、2010年9月20日

・吉岡俊輔、福間剛士、"周波数変調原子間力顕微鏡におけるリアルタイム位相補正技術の 開発"、2010 年(平成 22 年)春季 第 57 回応用物理学関係連合講演会(東海大学)、2010 年3月18日

・福間剛士、吉岡俊輔、"液中3次元走査型原子間力顕微鏡の開発とその水和構造観察への応用"、2009年(平成 21 年)秋季 第 70 回応用物理学会学術講演会(富山大学)、2009年9月8日

・淺川雅、西村謙一、吉岡俊輔、福間剛士、"3次元走査型原子間力顕微鏡によるモデル生体膜上に形成された水和構造の観察"、2009年(平成21年)秋季 第70回応用物理学会学術講演会(富山大学)、2009年9月8日

(6)招待講演

招待講演(国際)

• Takeshi Fukuma, "Subnanometer-scale Imaging of Interfacial Water by Frequency Modulation Atomic Force Microscopy" Miniworkshop on Aqueous Interfaces in Physics, Chemistry and Biology, (Taipei, Taiwan), 27 Nov., 2010.

•Takeshi Fukuma, "Subnanometer-scale Visualization of Nanobio-interfaces by Frequency Modulation Atomic Force Microscopy" BIT's 1st Annual Congress of Nanomedicine 2010 (Beijing, China), 25 Oct., 2010.

• Takeshi Fukuma, "Instrumentation and Applications of Liquid-Environment Frequency Modulation Atomic Force Microscopy" MRS fall meeting 2009 (Boston, USA), 1 Dec., 2009. • Takeshi Fukuma, "Molecular-Scale Investigations on Model Biological Membranes by Frequency Modulation Atomic Force Microscopy" The XI Linz Winter Workshop 2009 (Linz, Austria), 6-9 Feb., 2009.

• Takeshi Fukuma, "High-Speed Frequency Modulation Atomic Force Microscopy" 16th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM16) (Atagawa, Japan), 11 Dec., 2008.

招待講演(国内)

・福間剛士、"超高分解能原子間力顕微鏡を用いた液中界面イメージング"、日本顕微鏡学 会第 66 回学術講演会(名古屋)、2010 年 5 月 26 日

・福間剛士、"AFM で探る脂質二重膜界面の溶液構造"、日本化学会第 90 春季年会(2010) (東大阪)、2010 年 3 月 26 日

・福間剛士、"液中周波数変調 AFM による生体試料の分子スケール観察"、2010年(平成 22 年)春季第 57 回応用物理学関係連合講演会(平塚)、2010年3月 19 日

・福間剛士、"三次元走査型原子間力顕微鏡を用いた固液界面空間の研究"、日本顕微鏡 学会 SPM 研究部会 第12回研究会(湯沢)、2009年12月6日

・福間剛士、"周波数変調原子間力顕微鏡によるモデル生体膜上に形成された水和層の分子分解能観察"、日本生物物理学会第46回年会(福岡)、2008 年 12 月 3 日

研究報告書

「多周波電子核二重共鳴法による酸素発生機構の解明」 研究期間: 平成19年10月~平成23年3月 研究者: 八代 晴彦

1. 研究のねらい

生命現象に不可欠な地球上の酸素の生成のほとんどをつかさどっているシアノバクテリア や緑藻、高等植物中の光合成系II(PSII)の酸素発生機構を解明するため、さまざまな研究が 進められている。1970年台には4つの光子吸収し5つの酸化状態S_n(n=0~4)を経由して2

つの水分子から1つの酸素分子が生成するコックサイ クルが確立された(図1)。また、2001年からのX線構造 解析の進展でPSII複合膜タンパク質の構造のおおよそ が判明し、 Mn_4Ca 錯体が酸素発生反応を行っているこ とが分かった。しかし、各S_n状態でどの水分子が反応 に関与しどう酸素を発生するかは依然として不明であ る。さらに、X線により Mn_4Ca 錯体が容易にダメージを 受けてしまうことが問題になっている。そこで本研究で は非侵襲型の磁気共鳴法である電子核二重共鳴法 (ENDOR)を用いて酸素発生機構を解明することを目 標とした。ENDOR法による反応機構解明の概略を図2 に示す。S₀~S₃の状態では反応中心の Mn_4Ca 錯体が





不対電子スピンを持つことが分かっており各S_n状態の電子スピンと¹⁷O(核スピンをもつ)で置換した水の磁気ダイポール相互作用を利用してMn₄Ca錯体周辺の反応に関与する水の位置 情報を得ることから反応機構を解明することが可能と考えた。ENDORではMn₄Ca錯体の電子 スピン共鳴(ESR)下での核スピン(¹⁷O)共鳴(NMR)をESRの強度変化として検出するため Mn₄Ca錯体周辺の反応に寄与する水分子のみを検出できる。さらに、これらの複雑な構造を 一意に決めるためにはESRの多周波数化が必須である。



図2 電子核二重共鳴法による反応機構の解明



本研究者らの測定法の主たる特徴は電子スピン共鳴法の部分にある。従来法(磁場変 調法)は変調幅を超える広い線幅の系で劇的に感度が減少するが、我々の非変調法では感 度が一定である(図3)。このため、従来の方法ではほぼ不可能であった異方性の大きな整 数電子スピンをもつ系の測定も可能であり、S=1/2を持つS₀,S₂状態に加え整数スピンを持つ とされるS₁とS₃状態のへの応用を主なねらいとした。 2. 研究成果

■多周波電子スピン共鳴法の高感度化

ENDOR の信号強度は ESR の数%と小さいため整数電子スピン系の ENDOR を実現する ためには ESR(さきがけ前は整数スピン系 ESR の SN 比=100 程度)の高感度化が必要であった。

<u>周波数先鋭化による多周波ESRの高感度化</u>: 我々のESR、ENDORシステムはネットワーク アナライザーをベースとしたシステムである(図4左)。また、変調を用いない直接検出法のた め、発振器の微小な周波数揺らぎ(~10⁻⁶)がノイズの主因と考えられた。このため、高精度の 周波数基準を用いた発振器(図4中のSG、~10⁻¹⁰)を組込んだ。この結果、原理的には4桁の 高感度化が可能となった。ここでは受信機の性能で頭打ちとなるが 35GHzにおいて約 17 倍 の高感度化(1.4 x 10⁹ spins/G・s^{0.5}、1.4K)に成功した。また、本手法ではこの基準発振器の 逓倍(HG)で発振するため 8~700GHzでも同様の高感度を得ることが出来る。これにより幅 広いESR周波数にわたりENDORが可能な感度が得られた。



図 4 多周波 ESR 概略図

高感度多周波ESR共振器の開発: PSII中のMn₄Ca錯体のように複雑で光や温度環境に 対してデリケートな測定対象や、同時に存在するシトクロームb₅₅₉、非ヘム鉄、キノン等の

ESR活性種が混在する場合には、正確かつ一意な解析のため多周波ESR 測定が有効である。単一周波数プロ ーブは最高の感度を実現できるが、 周波数毎の試料交換、光照射等で条件がばらつくため、周波数可変で高 感度なESR、ENDORプローブが望ま しい。そこで図 5 に示した新型のファ ブリーペロー共振器(FPR)を開発し た。ESR測定に必要な強結合可能な 従来の連続的に周波数が可変できる FPRの共振特性Qは常温で理論値の 5~10%と非常に小さかったが、偏光 を利用した新タイプのミラーを開発し 40~120GHzの広範囲で 94%の性能



図 5 新型 Fabry-Perot 共振器

を2 枚の新ミラーでカバーできた。また、ESR測定条件であるヘリウム温度でQ値がさらに約2.5 倍となり、単一周波数共振器とほぼ同等の高感度を実現した。しかし、周波数調整機構の不安定性のため信号の再現性が悪く線幅の広い信号が多数存在するPSII中のMn₄Ca錯体への応用は現時点で困難である。

受信系の高感度化: 35²220GHzにわたってハーモニックミキサーのランクを下げるシス テムを構築した。結果、ノイズが 1/5(35GHz)~1/100(180GHz)の大幅な高感度化を実現し た。このシステムを用いて、整数スピン金属タンパク質の中で最も基本的な(Fe(II) S = 2)デ オキシヘモグロビン多周波EPR測定を行った(図 6)。結果 110GHz(^{3.7cm⁻¹})程度のゼロ磁場 ギャップがあること、110GHz 以上では非線形に共鳴磁場が増加していくことを初めて明らか にした。10~100GHzではゼロ磁場信号が常に存在し、その電子状態を解析する一般的な ESRのスピンハミルトニアン解析が出来ない特異な周波数依存性も観測され解析法を検討し ている。

■多周波 ENDOR の開発

低磁気回転比をもつ核スピン(17O)の共鳴を効 率的に引き起こすため出来るだけコンパクトな NMR用RFコイルと試料の量を最大限確保できる ESR共振器の両立が必要である。そこで、図 7 上 に示したような試料ホルダーとRFコイルー体型の ENDORプローブを開発した。RF強度 100W時、180 $\mu s \tilde{c}^{17}O$ 核の π -pulseを照射可能であり、コンパク トなRFコイルによって約1GHzまでのRF照射が可 能である。35 GHz ENDORプローブの無負荷時の Q。~23000 (T = 1.5K)と市販プローブの約3倍 以上の感度を得ることが出来た。さらに、プローブ の先端部分のみを交換可能にし、容易に多周波 ENDORも可能とした。また、ソフトウェアによってRF 周波数の高速ランダムスイープを導入しRF照射に よる熱揺らぎと飽和の影響を最小限に押させた高 感度ENDORシステムを開発した(図7下)。しかし、 整数電子スピン系のENDOR信号の観測には適切 な実験条件の探索が間に合わず観測には至って いない。



図 7 多周波 ENDOR プローブ (上)と ENDOR システム(下)

■PSII Mn4Ca 錯体への応用

開発したシステムでS₂状態のESRは容易に観測可能になった。さらに、整数電子スピンを 持つS₁状態のESRは観測されつつある。しかし、高感度になった分、試料中の溶存酸素が大 きく観測され、S₁状態の信号との重なりによりS₁状態のスピン状態の解明には至っていない。 今後ESRプローブ中での試料調整を工夫し解明を進める予定である。

3. 今後の展開

現時点でまだ整数電子スピン金属タンパク質の電子核二重共鳴(ENDOR)の観測にはいたっていないが、測定条件をつめ安定してENDORが測定できるようにしたい。これを用い特に構造がはっきり分かってきたPSIIのS₁状態の観測・解析を進めていく。また、多周波ESRの高感度化に伴って付加的に得られたFe(II) S =2をもつデオキシへモグロビンのESRから得られる電子状態とその酸素親和依存性や α 、 β ユニット依存性も興味深く共同研究を進めていく予定である。依然問題が残っているが新型Fabry-Perot共振器の安定性を向上させ微量(~ μ L)の試料でも整数スピン金属タンパク質の多周波ESRも容易に観測できるようにしたい。これを用い金属タンパク質のみならず、これまでESR活性がありながら研究対象になりえ

なかった様々な試料に応用していければと考えている。

4. 自己評価

独自の手法により、整数電子スピンが検出可能なENDOR装置に必要な多周波ESRの高 感度化はほぼ実現できた。この高感度化の副産物として、40年来ベールに包まれていた鉄2 価、S=2 を持つデオキシヘモグロビン、ミオグロビンの多周波ESRを世界で初めて明確に出 来た。この結果は、これまで不可能とされてきた様々な整数電子スピンをもつ金属タンパク質 のESRを通して電子状態と機能相関等の研究に広く応用できることを示したといえる。酸素発 生系に関しては、整数スピンを持つS₁状態のESRも観測できるようになったが、試料中の残 存酸素の対処に手間取り、その解明が出来なかった点が悔やまれる。一方、ENDORに関し ては高感度なハード、ソフトとも完成し測定可能になったが、目標とした整数電子スピン系の 信号検出には温度、電磁波のパワー等の条件出しの段階であり、実現していない。このため、 酸素発生機構(Mn₄Ca)のENDORによる測定、解析は手付かずとなってしまった。

5. 研究総括の見解

多周波 ESR の高感度化に成功したことは大いに評価出来る。これによって整数スピン (S=2)をもつデオキシヘモグロビンの ESR スペクトル測定に成功した。これは永年の課題が 一応クリアされたといえるがその解釈も出来ればしていただきたかった。これは理論家との 共同研究が必要であろうが。多周波 ENDORもほぼ目処がついた。本研究の課題である光合 成系の酸素発生中心である Mn4-Ca クラスターの反応中間体で未解明のものの測定につい ては今後に残された。2010 年にこのクラスター部位の X 線結晶構造解析がなされたが肝心 の水分子の位置はわかっていない。これを本研究で開発された ENDOR で解決してほしかっ た。我が国ではこのような難易度の高い ESR 測定出来る施設は無いので是非とも今後継続 的に研究出来る拠点にしてほしいものだ。

6. 主要な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

M. Horitani, <u>H. Yashiro</u>, M. Hagiwara, H. Hori, "Multi-frequency and high-field EPR study of manganese(III) protoporphyrin IX reconstituted myoglobin with an S = 2 integer electron spin" Journal of Inorganic Biochemistry 102(4) 781-788 (2008) (2008/1/10)

(2)特許出願

研究期間累積件数:O件

(3)学会発表(国際)

学会発表(国際)

•<u>H. Yashiro</u>, M. Horitani, K. Takanari, M. Hagiwara, H. Hori, "Multi-frequency and high-field EPR study of a metalloprotein with a silent spin" Asia Pacific EPR Society - EPR Symposium 2008 2008/7/14 Cairns, Australia

学会発表(国内)

•H. Hori, K. Ninomiya, M. Horitani, <u>H. Yashiro</u>, M. Hagiwara, "The Low Lying Electronic States of the Ferrous High Spin (S = 2) Heme in Deoxy Hb Using High-sensitive Multi-frequency and High-field EPR Techniques" 第 48 回日本生物物理学会年会 (2010.9.21) 仙台

•二宮謙太, <u>八代晴彦</u>, 堀洋, 萩原政幸,"Development of a continuously frequency-variable EPR resonator to elucidate the electronic structures of deoxy-hemoglobin" 第 47 回日本 生物物理学会年会(2009.10.30-11.1) 徳島 ・<u>八代晴彦</u>, 二宮謙太, 堀洋, 萩原政幸, "整数電子スピン系の測定に適した多周波 E NDOR システムの開発"日本物理学会 2009 年秋季大会(2009.9.27) 熊本

•<u>八代晴彦</u>, 堀谷正樹, 柏木隆成, 堀洋, 萩原政幸, "High-Field and Multi-Frequency EPR in Deoxyhemoglobin" 日本生物物理学会第 46 回年会(2008/12/3)福岡

・<u>八代晴彦</u>, 堀谷正樹, 柏木隆成, 堀洋, 萩原政幸, "周波数標準を用いた超高感度多周 波 ESR 装置の開発と整数スピン金属タンパク質への応用" 日本物理学会 2008 年秋季大 会(2008/9/23) 岩手

(4)招待講演

招待講演(国内)

・<u>八代晴彦</u>, 二宮謙太, 堀谷正樹, 堀洋, 萩原政幸, "High-field and Multi-frequency EPR study of metalloproteins with non-Kramers ions" 第 47 回日本生物物理学会年会 シンポ ジウム「生物物理と新世代の ESR」(2009.10.31) 徳島

・<u>八代晴彦</u>, 堀谷正樹, 幸田庄司, 柏木隆成, 堀洋, 萩原政幸, "整数スピン金属タンパク 質の測定が可能な高感度多周波 ESR 装置の開発" 分子研研究会「先端的 ESR 手法による分子性物質の新機能性探索」(2007/12/19) 岡崎

研究報告書

「蛋白質工学的手法による細胞内環境の計測」 研究期間: 平成19年10月~平成23年3月 研究者: 若杉 桂輔

1. 研究のねらい

本プロジェクトでは、これまで研究を行ってきた蛋白質工学、生化学、分子生物学、生物物理化 学の領域と、新たに細胞生物学とを融合させ、分子進化に着目した「天然蛋白質の新規機能の探 索」及び「新規機能性蛋白質の創製」を目指した。特に、非凡な機能を有する蛋白質(従来の蛋白 質の機能分類とは異なる機能を持った蛋白質)である脊椎動物の脳内グロビン蛋白質「ニューロ グロビン(Ngb)」と「アミノアシル tRNA 合成酵素」をターゲットに選び、「非凡な機能を有する蛋白質 の生理機能、制御機構、分子進化過程の解明」に挑んだ。また、蛋白質の構造・機能単位である 「モジュール」に着目し、「新たな機能性蛋白質の創製を目指したモジュール工学的分子設計戦 略」の可能性についても検証した。

従来、グロビン蛋白質は酸素結合蛋白質としてだけ働くものと考えられてきたが、私のこれまで の研究から、脳神経細胞に存在する Ngb は酸化ストレスに応答し蛋白質の立体構造を大きく変化 させ、細胞の生死をつかさどる細胞内シグナル伝達過程を制御することにより、神経細胞死を防 いでいる可能性が高いことが示唆された。本プロジェクトでは、実際の細胞を使ってこの仮説を検 証し、さらに、Ngb の生理機能を明らかにすることを目的とした。その結果、神経細胞死抑制活性 にヒト Ngb が持つ「GDP/GTP 交換反応抑制蛋白質(GDI)」としての活性が極めて重要であることを 実証でき、ヒト Ngb の細胞保護機構を明らかにできた。また、魚類の Ngb が「細胞膜貫通特性」を 持つことを発見し、その活性に重要な残基を特定し、さらに魚類 Ngb と結合する細胞表面の分子 も特定できた。さらに、モジュール構造に基づく蛋白質工学的手法を駆使することにより、培地に 加えるだけで細胞内に導入されしかも神経細胞を保護する新規人工蛋白質の創製にも成功し た。

2. 研究成果

1) ヒトのニューログロビン(Ngb)の細胞保護機構の解明

1-1) ヒト Ngb の神経細胞死抑制活性に Ngb が持つ GDI 活性が極めて重要であることを実証 2000 年、神経細胞に特異的に発現し可逆的な酸素結合が可能な蛋白質「ニューログロビン (Ngb)」が報告された。このNgbを過剰に発現させると脳虚血・再灌流に伴う細胞死が減少し、逆に、

Ngbの発現量を低下させると細胞死が 増加することから、酸化ストレスに伴う 細胞死を抑制する働きがNgbにあるこ とが示唆された。しかし、その神経細 胞死の抑制メカニズムはまだ明らかに なっていなかった。そこで、以前、私は ヒトNgbの神経細胞死の抑制メカニズ ムの解明を目指し、酸化ストレスによ り生じる酸化型Ngbが、ヘテロ三量体 $Gタンパク質の \alpha サブユニット(G \alpha_{i/a})$ と特異的に結合し、「GDP/GTP交換 反応抑制蛋白質(GDI)」として機能する ことを明らかにした。また、通常の酸 素結合型NgbはG $\alpha_{i/a}$ と結合できない ことも明らかになった。以上のことから、 Ngbは酸化ストレス応答性のセンサー



図1. Ngb の神経細胞死抑制機構

蛋白質として働き、酸化ストレスを受けた時のみGα_{i/o}と結合し、Gα_{i/o}のGDIとして機能することに より、神経細胞死を抑制している可能性が高まった(図1)。

本プロジェクトでは、ヒトの Ngb が持つ GDI として の活性の重要性について検証するために、GDI 活 性を持たないヒトの Ngb 変異体 (E53Q, R97Q, E118Q, E151N)、及び、GDI 活性を持つヒト Ngb 変異体 (R47A, K102N, K119N, D149A)を作製し、精製後、 細胞内への蛋白質導入試薬 Chariot を用いてそれ ぞれ PC12 細胞内に導入し、酸化ストレスを誘導す ることにより、酸化ストレス下での細胞死抑制能につ いて検討した。その結果、GDI 活性を持たないヒトの Ngb 変異体はいずれも全く細胞死を防がなかったの に対し、GDI 活性を持つヒト Ngb 変異体はすべて野 生型ヒト Ngb 同様、細胞死を抑制することが明らか になった(図2)。これら実験結果は Ngb による細胞 死の抑制とGDI活性の間に密接な関係があることを 示しており、ヒト Ngb の神経細胞死抑制活性に GDI 活性が極めて重要であることが明らかになった。



図2. ヒト Ngb 変異体の細胞死抑制能

野生型 Ngb の細胞保護活性を 100 %、緩衝液のみの 場合を 0 %とし、相対的な割合として表した。 GDI 活 性のある Ngb を青色で、GDI 活性のない Ngb を赤色 で示した。

1-2) ヒト Ngb の細胞保護能に、酸化ストレスに伴う Ngb の構造変化が重要であることを実証 ヒトの Ngb は、通常の酸素濃度正常状態と虚血・再灌流(酸化ストレス)状態とでは異なる構造を とる。酸素濃度正常状態では、ヘム鉄に近位側のヒスチジン(His)のみ結合しており、遠位側の His はヘム鉄から離れ、遠位側の空間には酸素が結合している(図3)。他方、虚血・再灌流(酸化スト

レス)状態では、ヘム鉄の近位 側、遠位側ともに His が配位して いる(図3)。今回、酸化ストレス 下におけるヒト Ngb の構造変化 が細胞死抑制に重要であること を検証するため、酸化ストレス下 でヘムに配位する 64 番目の遠 位ヒスチジン(His64)が離れてい る酸素正常状態のモデルとし て、ヘムを亜鉛ポルフィリンで

置換することにより酸化ストレス下で His64 が配位できない ようにした亜鉛ポルフィリン置換 Ngb、及び、His64 をヘムに 配位できないバリンに置換したヒト H64V Ngb 変異体を作製 し、これらが PC12 細胞の酸化ストレスに伴う細胞死を抑制 するかを調べた。その結果、亜鉛ポルフィリン置換ヒト Ngb とヒト H64V Ngb 変異体はいずれも細胞死保護しないことが 明らかになった。つまり、通常の酸素濃度正常状態型のヒ ト Ngb は神経細胞を保護せず、ヘム鉄への遠位側ヒスチジ ンの配位に伴う大きな構造変化が Ngb の細胞保護活性に 必須であることが明らかになった。

2) 魚類 Ngb の新規機能の探索

—ゼブラフィッシュ Ngb の「細胞膜貫通特性」の発見— ヒト Ngb, ゼブラフィッシュ Ngb を各々FITC で蛍光標識し、 Chariot 非存在下で培地に添加して一定時間培養後、蛍光顕 微鏡により観察した。その結果、ヒト Ngb には細胞膜貫通特性



図3. Ngb のヘム近傍構造変化



図4. ゼブラフィッシュ Ngb の 細胞膜貫通特性(共焦点顕微 鏡画像)FM4-64 はエンドサイトーシ スのマーカーである。

はないが、ゼブラフィッシュ Ngb には細胞の外から細胞内に自ら移行する働き「細胞膜貫通特性」 があることが明らかになった(図4)。この発見により、今回はじめて細胞膜貫通特性を持つグロビ ン蛋白質の存在が明らかになった。ゼブラフィッシュ Ngb の N 末端領域には細胞膜貫通特性を持 つ代表的な蛋白質である HIV TAT 蛋白質同様に Arg, Lys に富むアミノ酸配列を有することから、 ゼブラフィッシュ Ngb の N 末端領域の塩基性アミノ酸残基が細胞膜貫通特性に重要であると考え られる。細胞膜貫通特性のないヒト Ngb ではこれらに対応する残基は Pro となっている。そこで、N 末端領域の Arg, Lys の重要性について検証するために部位特異的アミノ酸置換体を作製し、細 胞膜貫通特性について解析した。その結果、ゼブラフィッシュ Ngb の Lys7, Lys9, Lys21, Lys23 が 細胞膜貫通能に重要であることが明らかになった。また、各種生物由来の Ngb のアミノ酸配列比 較をした結果、これら塩基性アミノ酸に富む配列は、魚類にのみ保存されており、両生類、鳥類、 哺乳類の Ngb には存在しないことが明らかになった。

3) 蛋白質のモジュール構造に基 づく新規機能性蛋白質の創製 3-1) 細胞膜貫通能がありしかも 神経保護作用のある新規モジュ ール置換蛋白質「キメラ ZHHH Ngb」の創出に成功

Eト Ngb には GDI 活性があり PC12 細胞に対し細胞死抑制する 働きがあるが、ゼブラフィッシュ

Ngb にはそのような働きはない。また、ゼブラフィッシュ Ngb には細 胞の外から細胞内に自ら移行する細胞膜貫通特性があるが、ヒト Ngb にはない。ヒト Ngb 及びゼブラフィッシュ Ngb はともに構造単位 「モジュール」M1から M4で構成されている(図5)。今回、蛋白質工 学的手法を駆使し、細胞膜貫通特性に重要なゼブラフィッシュ Ngb のモジュール M1と GDI 活性(神経細胞保護作用)に重要なヒト Ngb 由来のモジュール M2~M4との融合蛋白質であるキメラ ZHHH Ngb(CNgb)を作製した(図5)。分光装置などを用いた物理化学的な 解析により、このキメラ蛋白質は天然の蛋白質同様の安定な構造 を形成していることが明らかになった。また、「キメラ ZHHH Ngb」は ゼブラフィッシュ Ngb 同様の細胞膜貫通特性を有し(図6)、しかもヒ ト Ngb 同様の GDI 活性を持つため、Chariot 存在下でも、非存在下 でも、細胞死を抑制できることが明らかになった(図7)。つまり、細 胞の外の培養液に加えておくだけで細胞質内に入っていき酸化スト レスに伴う神経細胞死を抑制する働きがある新規機能性蛋白質の 創製に成功したことが明らかになった。この実験結果は、新規 機能性蛋白質を創出するうえでモジュール置換法が有効な手 法となりうることを示している。

3-2) ゼブラフィッシュ Ngb のモジュール M1 を使った蛋白質工 学による「細胞膜貫通特性を有する新規ミオグロビン(Mb)」の 創製

Mb を土台にした蛋白質工学により、ゼブラフィッシュ Ngb 由 来のモジュール M1 の融合による細胞膜貫通能の付与の可能 性について検証した。ゼブラフィッシュ Ngb のモジュール M1 を 完全長の Mb の N 末端に融合したキメラ蛋白質を作製したとこ ろ、このキメラ蛋白質は天然蛋白質同様へムを取り込み安定



図5. キメラ ZHHH Ngb の作製



図6. PC12 細胞への Ngb の 細胞膜貫通活性





な構造を形成し、さらに、ゼブラフィッシュ Ngb 同様の細胞膜貫通特性を持つことが明らかになっ

た。この実験から、ゼブラフィッシュ Ngb のモジュール M1 は、細胞膜貫通能を付与できる"取り付け可能な"「構造及び機能単位」として機能することが実証できた。

4) トリプトファニル tRNA 合成酵素(TrpRS)の新規機能の探索

TrpRS は、tRNA にトリプトファンを結合させる反応(アミノアシル化反応)を触媒する酵素であり、 細胞質内で蛋白質合成において重要な役割を担っている。以前私は、ヒト TrpRS の余分な付加ド メインが alternative splicing またはプロテアーゼで切断された後、TrpRS 触媒活性ドメインが血管 新生抑制因子として働くことを発見した。本プロジェクトでは、多機能性蛋白質である TrpRS の機 能の分子進化の解明、及び、新たな生理機能の発見を目指した。具体的には、ヒト以外のウシ、 マウス、ゼブラフィッシュの TrpRS のアミノアシル化活性は、ヘムあるいは亜鉛イオンの存在には 依存せず、常に活性が高いことを初めて明らかにした。これらの特性は、ヘムあるいは亜鉛イオン と結合した時のみアミノアシル化活性があらわれるヒトの TrpRS の特性と大きく異なる。さらに、蛋 白質工学を駆使し、ヒト TrpRS を常時活性型に、ウシ TrpRS をヘムあるいは亜鉛イオン依存型に 相互に改変することにも成功した。現在、ヒト TrpRS にのみ存在するアミノアシル活性の不活性型 (ヘム、亜鉛イオン非結合時)の存在理由、その生理学的意義の解明を目指している。特に、ヒト の TrpRS の場合のみインターフェロンにより高発現誘導されることがわかっており、このことと関 連があるかどうか現在解析を推し進めている。

3. 今後の展開

現在進行中のテーマを以下に記す。

- 1) ヒト Ngb の細胞保護機構のさらなる解明 ヒトNgbとG α_{i/o}との複合体の構造解析を目指している。また、Ngbが関わるG α_{i/o}以降の下流 シグナル伝達経路の特定にも挑んでいる。
- 2) 魚類 Ngb の細胞内での生理機能の解明 魚類 Ngb と相互作用する蛋白質の特定に挑み、その分子を手掛かりにして、生理機能の解明 を目指している。
- 3) モジュール単位での改変によるさらなる新規機能性蛋白質の創製 細胞膜貫通特性を有するゼブラフィッシュ Ngb のモジュール M1 を他の蛋白質にも融合し、モジ ュール置換法の有効性についてさらに検証を行っている。
- 4. 自己評価

本さきがけは2度目のさきがけプロジェクトである。一度目のさきがけ(「タイムシグナルと制御」 領域)において、私は、酸化ストレスによる神経細胞死を抑制する働きのあるNgbが非凡な機能性 蛋白質であることを見い出した。具体的には、精製蛋白質を用いた生化学的解析により、酸化ス トレス条件下のヒトNgbが三量体G蛋白質 α サブユニット(G α_{i/o})に結合し、GDP/GTP交換反応抑 制蛋白質(GDI)として働く活性があることを発見した。また、ヒトNgbが酸化ストレスに対するセンサ 一蛋白質として機能しうることを見い出した。二度目のさきがけである本プロジェクトでは、実際の 細胞を使って、一度目のさきがけで提唱したヒトNgbの細胞保護機構の作用機序に関する仮説を 検証し、さらに、Ngbの生理機能、分子進化過程などを解明することを目的とした。その結果、以下 のことが明らかになった。

1) ヒトNgbの細胞保護には、ヒトNgbが持つG $\alpha_{i/o}$ に対するGDI活性が必須であることを実証した。 また、ヒトNgbの細胞保護には酸化ストレスに伴うNgbの構造変化が重要であることも明らかにした。このように、以前のさきがけプロジェクトで発見したNgbの機能が実際細胞内で重要な働きをしていることを自ら実証することができた。

2) 魚類 Ngb が細胞膜貫通することを発見した。蛋白質工学的手法を駆使することにより、魚類 Ngb の細胞膜貫通特性には、モジュール M1 内の4つの Lys 残基が重要であることを明らかにした。さらに、魚類 Ngb のモジュール M1 の立体構造を明らかにし、魚類 Ngb と結合する細胞表面分

子の特定にも成功した。

3) 培地に加えるだけで細胞保護効果のある新規機能性蛋白質を創製することに成功した。つま り、細胞保護能に重要なゼブラフィッシュ Ngb のモジュール M1 と細胞保護能(GDI 活性)に重要な ヒト Ngb のモジュール M2-M4 を融合することにより、細胞膜貫通能と細胞保護能を合わせ持つ新 規蛋白質の創製に成功した。さらに、ゼブラフィッシュ Ngb のモジュール M1 を完全長ミオグロビン の N 末端側に融合することにより、構造的に安定な細胞膜貫通能を有する蛋白質が得られること を示し、魚類 Ngb のモジュール M1 が細胞膜貫通特性を付与できる"取り付け可能な"「構造及び 機能単位」として利用できることを実証した。

以上のように、独自のアイディアで研究を行い、オリジナリティーの高い研究成果が得られたと確 信している。また、さきがけの期間中に共同研究も積極的に行い、新たな分野を開拓できた。今後 も、これまでの知見を基に、さらに研究を発展させていきたい。

5. 研究総括の見解

ヒト脳内で見出されたニューログロビンがミオグロビン、ヘモグロビンサブユニットとヘム近傍構 造が似ているにもかかわらず虚血・再還流による酸化ストレスによる細胞死を防ぐ機能を持つこと をキメラタンパク質・変異タンパク質を用いて細胞内で実証したことは評価に値する。着実な研究 の成果である。機能発現部位(G タンパク質との相互作用部位)もモジュール(遺伝子上のエクソ ンに対応)置換と部位特異的アミノ酸置換によって同定している。基礎的な研究で重要な成果を 挙げているが、課題に掲げている細胞内環境の計測との結びつきが希薄と思われる。今後はこ の人工蛋白質を細胞内可視化技術と結びつけて酸化ストレスを計測出来るように期待したい。

6. 主要な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

- Watanabe, S., and <u>Wakasugi, K.*</u> Neuroprotective function of human neuroglobin is correlated with its guanine nucleotide dissociation inhibitor activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 369, 695–700 (2008). (*corresponding author)
- Watanabe, S., and <u>Wakasugi, K.</u>^{*} Zebrafish neuroglobin is a cell-membrane-penetrating globin. *Biochemistry* 47, 5266-5270 (2008).
- <u>Wakasugi, K.</u>* Species-specific differences in the regulation of the aminoacylation activity of mammalian tryptophanyl-tRNA synthetases. *FEBS Lett.* 584, 229–232 (2010).
- Watanabe, S., and <u>Wakasugi, K.*</u> Identification of residues critical for the cell -membrane-penetrating activity of zebrafish neuroglobin. *FEBS Lett.* **584**, 2467–2472 (2010).
- •Watanabe, S., and <u>Wakasugi, K.</u>* Module M1 of zebrafish neuroglobin acts as a structural and functional protein building block for a cell-membrane-penetrating activity. *PLoS ONE*, 6(2):e16808 (2011)

(2)特許出願 研究期間累積件数:O件

(3)著書

・<u>若杉桂輔</u>「酸素結合タンパク質(ニューログロビン、サイトグロビン):酸化ストレスに対し細胞 を保護するタンパク質」、からだと酸素の事典(酸素ダイナミックス研究会編集)、朝倉書店、 253-255 ページ (2009). ・<u>若杉桂輔</u>「モジュール構造に着目した新規酵素の分子設計」、酵素利用技術大系—基礎・ 解析から改変・高機能化・産業利用まで一、株式会社エヌ・ティー・エス、493-496ページ (2010).

(4)学会発表

学会発表(国際)

- <u>Wakasugi, K.</u> "Oxidative stress-responsive intracellular regulation for human tryptophanyl-tRNA synthetase", The 1st international conference on ARS network and signaling. Hoam Convention Center, Seoul, Korea, November 12–13, 2007.
- •<u>Wakasugi, K.</u> "Regulation of human tryptophanyl-tRNA synthetase activity by heme", 14th International Conference on Biological Inorganic Chemistry, Nagoya, July 25-30, 2009.
- •Watanabe, S., and <u>Wakasugi, K.</u> "Functional characterization of neuroglobin, a novel member of the vertebrate globin family", 14th International Conference on Biological Inorganic Chemistry, Nagoya, July 25–30, 2009.
- •Watanabe, S., and <u>Wakasugi, K.</u> "Chimeric ZHHH neuroglobin as a cell-membrane-penetrating neuroprotective globin", 10th International Conference on Neuroprotective Agents, Asilomar, CA, September 19-22, 2010.
- <u>Wakasugi, K.</u>, Takahashi, N., and Watanabe, S. "Investigation of a neuroprotective mechanism of human neuroglobin", 10th International Conference on Neuroprotective Agents, Asilomar, CA, September 19–22, 2010.

学会発表(国内)

- ・<u>若杉桂輔</u>、渡邊征爾「ニューログロビンの新規機能の探索」、第36回生体分子科学討論会、 北海道大学学術交流会館、2009年6月19日
- ・渡邊征爾、<u>若杉桂輔</u>「ヒトのニューログロビンによる神経細胞死の抑制には酸化ストレスに 伴う構造変化が重要である」、第82回 日本生化学大会、神戸ポートアイランド、 2009年10月23日
- ・勝又理恵、<u>若杉桂輔</u>「培養細胞におけるヒトのトリプトファニルtRNA合成酵素の発現解析」、 BMB2010(第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学大会 合同大会)、神戸ポー トアイランド、2010年12月10日
- ・高橋 望、渡邊征爾、<u>若杉桂輔</u>「過剰発現系を用いたヒトのニューログロビンの細胞死抑制メ カニズムの解明」、BMB2010(第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学大会 合 同大会)、神戸ポートアイランド、2010年12月8日
- ・渡邊征爾、<u>若杉桂輔</u>「ゼブラフィッシュのニューログロビンが持つ細胞膜貫通特性に必須の 残基の特定」、BMB2010(第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学大会 合同大 会)、神戸ポートアイランド、2010年12月10日

(5)招待講演

招待講演(国際)

• <u>Wakasugi, K.</u> "Oxidative stress-responsive intracellular regulation for human

tryptophanyl-tRNA synthetase", The 1st international conference on ARS network and signaling. Hoam Convention Center, Seoul, Korea, November 12-13, 2007.

•<u>Wakasugi, K.</u>, Takahashi, N., and Watanabe, S. "Investigation of a neuroprotective mechanism of human neuroglobin", 10th International Conference on Neuroprotective Agents, Asilomar, CA, September 19-22, 2010.