

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：82636

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14500

研究課題名(和文) 蛍光タンパク質が局在する細胞内構造から分子を抽出する技術の開発

研究課題名(英文) Development of a method to isolate molecules in cellular structures where fluorescent proteins localize

研究代表者

松田 厚志 (Matsuda, Atsushi)

国立研究開発法人情報通信研究機構・未来ICT研究所フロンティア創造総合研究室・主任研究員

研究者番号：20585723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、蛍光タンパク質の局在を利用して、凍結させた細胞内小区画を単離する技術の開発を目的とする。氷を微細な粒子に粉碎する弾丸破砕法やビーズミル法などを使用し、本研究に適した粉碎法を検討した。また、冷凍庫内で蛍光を頼りに細胞断片を含む氷粒子を選別するソーター顕微鏡の設計・開発・組み立てを行った。同時に、光学機器への霜の付着を防止する装置を設計・開発した。この顕微鏡を用いて、弾丸破砕法により粉碎した氷を低温で観察したところ、10マイクロメートル以下の径を持つ微小な氷粒子を作成できることがわかった。

研究成果の概要(英文)：This study is intended to develop a method to isolate frozen cellular micro-compartments relying on fluorescence of localized proteins. We examined methods for crushing ice into small particles, which is suitable for sorting by fluorescence, using bullet fracturing and beads milling. Also, we have designed and built a sorter microscope to sort ice particles containing cellular micro-compartments using fluorescence under low temperature. Simultaneously we have developed a system that prevents solidification of water vapor on the optical components. Using this microscope, we were able to observe ice particles made by bullet fracturing under low temperature, and found that these ice particles are below 10 micrometers in diameter.

研究分野：生物物理

キーワード：バイオイメージング 低温工学

### 1. 研究開始当初の背景

科学研究者にとって、可視化は不可欠な研究手段である。細胞内小区画の観察はその一例である。細胞内の化学反応は一様に起こるのではなく、空間的集合性を伴っているため、細胞機能を理解する上で、特定の細胞内小区画を区別して観察することは極めて重要である。特定の蛍光タンパク質の局在を利用した蛍光イメージングを用いれば、DNA 組換え領域や細胞末端に集積する分子のように、他に手がかりのない領域でも同定することが出来る。また、核膜やオートファゴソームのように膜構造を持っていてもそれ以外の膜構造と外見上では区別できないが、蛍光タンパク質を用いた蛍光イメージングにより始めて区別出来る領域もある。それ以外の方法では極めて困難にもかかわらず、蛍光イメージングを用いれば、細胞内小区画をいとも簡単に同定できる。

もし、ある細胞内小区画にどのような分子が集合しているのかを網羅的に知ることができれば、細胞内空間を詳細に理解することが可能となる。たとえば、細胞末端の空間そのものを、物理的に単離することができれば、その場に存在するタンパク質、RNA、脂質、小分子などを網羅的に解析することができ、細胞の形の制御機構や細胞極性の研究を推進できる。

### 2. 研究の目的

本研究は、蛍光タンパク質の局在を利用して、その細胞内小区画を化学的に変化させずに単離する技術を開発する。単離した細胞内小区画は、質量分析や次世代シーケンサーなど、各種オミクスに用いることができる。

### 3. 研究の方法

本研究では、まず、GFP 融合タンパク質により、目的区画がラベルされた細胞を用意する。液体窒素などで凍結させたこの細胞を、最先端の粉砕機を用いて 500nm の氷の粒子に粉砕する。この氷の粒子を冷媒に懸濁し、GFP の蛍光を用いて選別することで、微小な細胞破片を収集することができる。集めた多数の破片からタンパク質や RNA など目的の分子を精製し、各種オミクスで解析することができる。

### 4. 研究成果

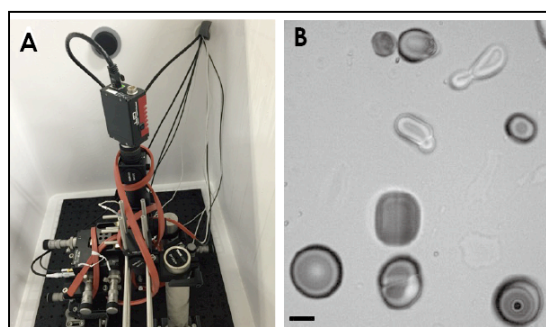
まず、低温で氷粒子を扱うための検討を行った。本研究における目的分子の精製度は、破砕された氷の粒子径により決定され、粒子径が小さいほど精製度が向上する。しかし、粒子径が小さいほど、粒子の選別に時間がかかる。そこで、本研究では数マイクロメートルの比較的大きな氷粒子で第一段階の選別を行い、選別後の氷粒子をさらに数百ナノメートルに粉砕し、第二段階の選別を行う。このように、段階的に粉砕と選別を行い、高精製度を達成する。そのためには、粉砕後の氷

粒子の径を自在に調節できる必要がある。しかし、このような研究は過去に例がないため、本研究において、二種類の粉砕方法（弾丸破砕法とビーズミル法）を検討した。粒子径の計測は目視により行った。弾丸破砕法では肉眼で確認可能な大きさの粒子（百マイクロメートル以下）の粒子が形成された。一方、ビーズミル法では、肉眼では確認できないほどの細かい粒子が形成された。また、粉砕時間による粒子径を検討したが、粉砕時間を短縮すると大きな氷粒子が残存するが、偏差が大きくなる傾向があった。従って、粉砕時間による粒子径の調節は困難であり、異なる破砕方法や使用するビーズの径などにより、粒子径を調節する必要があると結論できた。

本研究の達成には、冷凍庫内で蛍光を頼りに細胞断片を含む氷粒子を選別するソーター顕微鏡の開発が必要となる。ソーター顕微鏡は通常の蛍光顕微鏡の他に蛍光粒子を選別する機能や、遠隔で連続操作するための仕組みが必要となる。そのような装置は前例がない。そこで、低温で動作可能な顕微鏡の設計・開発を行った。蛍光ソーターとして必須となる3つの光路、すなわち（1）蛍光励起用光路（2）蛍光検知用光路（3）パルスレーザー照射用光路の3光路に加えて、蛍光感度を向上させるため、対物レンズを流路の上下に配置し、（4）第二の蛍光検知用光路を追加した。さらに（5、6）それぞれの対物レンズのアライメント用カメラ設置光路（7）焦点を長時間維持するためのレーザー照射用光路（8、9）焦点維持用レーザー検知光路（二つ必要）、さらに、（10）明視野観察用の光源照射光路の、計10光路となった。また、ステージには手動ステージの他に、低温でも動作可能なピエゾ素子による自動ステージを装備し、遠隔アライメントと、フィードバックによる焦点維持を可能にした。以上の理論的設計を終え、組み立てを行った。まず、氷の確認のためにアライメント用明視野顕微鏡部分の作成を行い、期待通りの分解能を発揮できることを確認した。またカメラやステージなどの電子部品が遠隔から期待通りの動作をすることを確認した。

また、光学機器への霜の付着を防止する必要がある。霜は、水分が温度の高いところから低いところへ移動することによって蓄積するので、光学機器の温度を周囲よりもわずかに上昇させることができれば、霜の付着を防止できる。 $-30^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫内で顕微鏡を温度調節可能な市販機器は見つからなかったため、本研究で設計・開発を行った。 $-100^{\circ}\text{C}$ ～ $200^{\circ}\text{C}$ まで温度調節可能なフィードバック調節器に、形状を変形できるシリコンベルトヒーターと、ワイヤー状のプラチナ温度センサーを組み合わせた。このシリコンベルトヒーターを顕微鏡に巻き付け、温度センサーを顕微鏡に取り付けることにより、 $-30^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫内で顕微鏡を $-26^{\circ}\text{C}$ に安定的に保持することができた。また、冷凍庫の電源を切る際には、

顕微鏡の温度を徐々に上昇させ、作業の終始で霜を付着させずに実験を行うことができた。この顕微鏡を用いて、弾丸破砕法により粉碎した氷を観察したところ、10 マイクロメートル以下の径を持つ微小な氷粒子を作ることができることがわかった (図1)。



**図 4**  
**低温での氷粒子の観察**  
 (A) 開発中の顕微鏡部分を市販の冷凍庫内で動作させている様子。シリコンラバーヒーターを巻き付け、周囲より温度を高く保つことで光学部品への結露を防いでいる。  
 (B) 粉碎した氷の粒子の塊を冷凍庫内で撮影 (バーは 10 $\mu$ m)。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① Kraus F, Miron E, Demmerle J, Chitiashvili T, Busco A, Alle Q, Matsuda A, Leonhardt H, Schermelleh L & Markaki Y (2017) Quantitative 3D structured illumination microscopy of nuclear structures. **Nature Protocols** **12**:1011-1028、査読有  
DOI: 10.1038/nprot.2017.020
- ② Demmerle J, Innocent C, North AJ, Ball G, Müller M, Miron E, Matsuda A, Dobbie IM, Markaki Y & Schermelleh L (2017) Strategic and practical guidelines for successful structured illumination microscopy. **Nature Protocols** **12**: 988-1010、査読有  
DOI: 10.1038/nprot.2017.019
- ③ Matsuda A, Asakawa H, Haraguchi T, Hiraoka Y (2017) Spatial organization of the *Schizosaccharomyces pombe* genome within the nucleus. **Yeast** **34**:55-66、査読有  
DOI: 10.1002/yea.3217.
- ④ Hirai Y, Hirano Y, Matsuda A, Hiraoka Y, Honda T, and Tomonaga K (2016) Borna disease virus assembles porous cage-like viral factories in the nucleus. **The Journal of Biological Chemistry** **291**: 25789-25798、査読有  
DOI: 10.1074/jbc.M116.746396
- ⑤ Rong M, Matsuda A, Hiraoka Y, Lee J (2016) Meiotic cohesin subunits RAD21L and REC8 are positioned at distinct regions between lateral elements and transverse filaments in the synaptonemal complex of mouse spermatocytes. **J Reprod Dev** **62**:623-630、査読有  
DOI: 10.1262/jrd.2016-127
- ⑥ 松田厚志、平野泰弘、平岡泰 (2016) 構造化照明顕微鏡法 SIM - 縞照明のつくるモアレが可能にする超解像観察、**実験医学別冊**「初めてでもできる！ 超解像イメージング (岡田康志 編)」羊土社、pp219-226、査読無  
<https://www.yodosha.co.jp/yodobook/book/9784758101950/>
- ⑦ 平野泰弘、松田厚志、平岡泰 (2016) 3D-SIM による細胞内構造の超解像イメージング---アーティファクトの少ない SIM 画像の取得、**実験医学別冊**「初めてでもできる！ 超解像イメージング (岡田康志 編)」羊土社、pp146-155、査読無  
<https://www.yodosha.co.jp/yodobook/book/9784758101950/>
- ⑧ Tahiro, S., Handa, T., Matsuda, A., Ban, T., Takigawa, T., Miyasato, K., Ishii, K., Kugou, K., Ohta, K., Hiraoka, Y., Masukata, H., Kanoh, J., (2016) Shugoshin forms a specialized chromatin domain at subtelomeres that regulates transcription and replication timing. **Nat. Commun.** **7**:10393.、査読有  
DOI: 10.1038/ncomms10393
- ⑨ Ding DQ, Matsuda A, Okamasu K, Nagahama Y, Haraguchi T, Hiraoka Y (2016) Meiotic cohesin-based chromosome structure is essential for homologous chromosome pairing in *Schizosaccharomyces pombe*. **Chromosoma** **125**:205-214、査読有  
DOI: 10.1007/s00412-015-0551-8
- ⑩ Hirano Y, Matsuda A, Hiraoka Y, (2015) Recent advancements in structured-illumination microscopy toward live-cell imaging. **Microscopy (Oxf)** **64**:237-249、査読有  
DOI: 10.1093/jmicro/dfv034
- ⑪ Poonperm R, Takata H, Hamano T, Matsuda A, Uchiyama S, Hiraoka Y, Fukui

- K, (2015) Chromosome scaffold is a double-stranded assembly of scaffold proteins. **Sci. Rep.** **5**:11916、査読有  
DOI: 10.1038/srep11916.
- ⑫ Matsuda A, Chikashige Y, Ding DQ, Ohtsuki C, Mori C, Asakawa H, Kimura H, Haraguchi T, Hiraoka Y, (2015) Highly condensed chromatins are formed adjacent to subtelomeric and decondensed silent chromatin in fission yeast. **Nat. Commun.** **6**: 7753、査読有  
DOI: 10.1038/ncomms8753
- [学会発表] (計 13 件)
- ① Atsushi Matsuda, Haruhiko Asakawa, Yasuhiro Hirano, Lothar Schermelleh, Tokuko Haraguchi, and Yasushi Hiraoka  
Three-dimensional chromatic correction for fluorescence microscopy enabling precise distance measurements in the nuclear pore complex  
**Focus in Microscopy 2017** (Apr. 10, 2017) Bordeaux (France)
- ② Atsushi Matsuda, Tokuko Haraguchi, Yasushi Hiraoka  
Super-resolution imaging and precise distance measurements in live fission yeast cells  
**The 14th International Congress on Yeasts** (Sep. 14, 2016) 淡路島夢舞台国際会議場 (兵庫県淡路市) 招待講演
- ③ Atsushi Matsuda, Yasuhiro Hirano, Tokuko Haraguchi and Yasushi Hiraoka  
Super-Resolution and Chromatic Correction Above the Cover Slip  
**Biomedical Imaging and Sensing Conference 2016** (May 19, 2016) パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市) 招待講演
- ④ 松田厚志  
蛍光顕微鏡で回折限界を超える  
**第 10 回 NIBB バイオイメーキングフォーラム「新時代のバイオイメーキングの開拓」** (2016 年 2 月 16 日) 基礎生物学研究所 (愛知県岡崎市) 招待講演
- ⑤ Rawin Poonperm、高田 英昭、濱野 徹、松田 厚志、内山 進、平岡 泰、福井 希一  
染色体スキヤフオールドはスキヤフオールドタンパク質の 2 本鎖構造をもつ  
**第 38 回日本分子生物学会年会** (2015 年 12 月 1 日) 神戸国際展示場 (兵庫県神戸市)
- ⑥ 松田厚志  
回折限界を超えた蛍光顕微鏡とクロマチン高次構造  
本能構造の発現メカニズムに関する総合科学研究推進拠点第 8 回研究セミナー (2015 年 10 月 28 日) 広島大学 (広島県東広島市) 招待講演
- ⑦ Atsushi Matsuda, Yasuhiro Hirano, Tokuko Haraguchi, Yasushi Hiraoka  
Highly condensed chromatins are formed adjacent to subtelomeric and decondensed silent chromatin in fission yeast  
**International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics, and Function** (2015/8/25) Awaji Yumebutai International Conference Center (兵庫県淡路市)
- ⑧ 松田厚志  
超分解能顕微鏡  
**第 25 回細胞生物学ワークショップ** (2015 年 7 月 31 日) 未来 ICT 研究所 (兵庫県神戸市)
- ⑨ 松田厚志  
デノイジング  
**第 25 回細胞生物学ワークショップ** (2015 年 7 月 29 日) 未来 ICT 研究所 (兵庫県神戸市)
- ⑩ Sanki Tashiro, Tetsuya Handa, Atsushi Matsuda, Takuto Ban, Toru Takigawa, Kazumi Miyasato, Kojiro Ishii, Kazuto Kugou, Kunihiro Ohta, Yasushi Hiraoka, Hisao Masukata, Junko Kanoh  
Shugoshin forms a specialized chromatin domain at subtelomeres, repressing transcription and replication  
**Pombe2015 8th International Fission Yeast Meeting** (2015/6/24) 生田神社会館 (兵庫県神戸市)
- ⑪ Atsushi Matsuda, Yasuhiro Hirano, Tokuko Haraguchi, Yasushi Hiraoka  
Super-resolution microscopy reveals highly condensed chromatin adjacent to subtelomeric, decondensed silent chromatin  
**Pombe2015 8th International Fission Yeast Meeting** (2015/6/24) 生田神社会館 (兵庫県神戸市)
- ⑫ Daqiao Ding, Atsushi Matsuda, Tokuko Haraguchi, Yasushi Hiraoka  
3D-SIM Analysis of Meiotic Chromosome Structure in Live Cells of *S. pombe*  
**Pombe2015 8th International Fission Yeast Meeting** (2015/6/22) 生田神社会館 (兵庫県神戸市)

- ⑬ 松田厚志  
分解能の壁を越えて見る染色体高次構造  
日本顕微鏡学会第71回学術講演会  
(2015年5月14日) 京都国際会館 (京  
都府京都市) 招待講演

[図書] (計 2件)

- ① 平野泰弘、松田厚志 (2015) 超分解能  
蛍光顕微鏡法「新・生細胞蛍光イメー  
ジング (原口徳子・木村宏・平岡泰編)」  
共立出版、pp49-58
- ② 松田厚志 (2015) ノイズ除去法「新・  
生細胞蛍光イメージング (原口徳子・  
木村宏・平岡泰編)」共立出版、pp88-95

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

松田 厚志 (MATSUDA, Atsushi)  
国立研究開発法人情報通信研究機構・未来  
ICT 研究所・フロンティア創造総合研究  
室・主任研究員  
研究者番号：20585723