

研究種目：特定領域研究  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：19021030  
 研究課題名（和文） 非線形フォトリクスを用いた細胞内局在性代謝産物の取得と動態解析  
 研究課題名（英文） Subcellular dissection and dynamic analysis of intracellular metabolites using non-linear photonics

## 研究代表者

梶山 慎一郎 (KAJIYAMA SHINICHIRO)  
 近畿大学・生物理工学部・准教授  
 研究者番号：20243496

## 研究成果の概要：

本研究課題では、極短パルスレーザーによる非線形光学効果を利用して、新しい細胞内代謝産物の取得方法と解析方法を開発するとともに、これらを用いて細胞毒性を有する細菌由来アミロイド様凝集性タンパク質の細胞内での作用機作の解析を行った。この過程で、フェムト秒レーザーを用いた細胞微細加工装置により細胞内に凝集するタンパク質部分を切削・回収することに成功するとともに、非線形光学顕微鏡による無線色での細胞の観察に成功した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	3,700,000	0	3,700,000
2007年度	2,500,000	0	2,500,000
2008年度	2,500,000	0	2,500,000
年度			
年度			
総計	8,700,000	0	8,700,000

## 研究分野：細胞工学

科研費の分科・細目：生物分子科学・生体機能関連物質

キーワード：レーザ細胞加工，サブセラーマイクロサンプリング，非線形光学顕微鏡，細胞内凝集性タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

細胞間あるいは、細胞内の情報伝達やこれに関わる各種生理作用物質の研究が分子レベルで論じられるようになってきた。一方、現在これらの研究は主に、組織や個体を用いたミュータントのフェノタイプの観察あるいは、関連分子のバルク調製による生化学的相互作用の解析に基づいて行われている。しかしながら、より正確で、直接的な知見を得るためには、バルクでの観測ではなく、個々の

細胞で実際に起こっている現象をオンサイトで観測し、そこで作用している物質の動態を直接観測することが望ましい。これを実現するためには、これまでになく新しい細胞の解析手段を開発する必要があると考えられる。我々は以上の点から、これまでの研究で、極短パルスレーザーを用いた細胞のマイクロサンプリングや、四光波混合過程を利用した誘導パラメトリック発光分光法の手法を開発してきた。

## 2. 研究の目的

本研究では、細胞内で作用する物質として強い細胞毒性を有する細菌由来アミロイド様凝集性タンパク質 (TDH) を取り上げ、申請者が有する微量物質分析技術および、細胞内物質可視化技術を用いて毒性発現機構の解析を試みることを通じ、1 細胞を基盤とした細胞解析技術の発展を意図した、ライブサーベイヤ研究の重要性を示すことを目的として研究を行った。

## 3. 研究の方法

(1) フェムト秒レーザー細胞微細加工装置を用いた細胞内凝集 TDH の取得：TDH は、別の相互作用因子と協調することによって凝集体の形成や毒性の発現を行っていると考えられるが、一部ガングリオシドとの相互作用が報告されているものの、相互作用因子に関する知見は極めて少ない。そこでまず、凝集体を細胞から単離し、作用因子に関する知見を得るため、サブセラーでのマイクロディセクションが可能なフェムト秒細胞微細加工装置の開発を行うとともに、これを用いて細胞内に凝集している TDH の切除と回収方法の検討を行った。

(2) 誘導パラメトリック発光顕微鏡 (SPE 顕微鏡) による観察：TDH の細胞内凝集の様子をさらに詳しく観察するため、細胞を無線色で生きたまま観察可能な SPE 顕微鏡による観察を試みた。

(3) 人工細胞膜による凝集の観察：TDH の生体膜への作用を解析するため、ガラス板上に人工細胞膜を調製し、TDH を作用させた後、顕微鏡観察することを試みた。まず、ガングリオシド GT1b と TDH の相互作用を確認するため、ガラス板上にベシクル融合法によって脂質膜を作製し、TDH を添加してその集積を観察した。また、GT1b の濃度を変化させたベシクルを調製し、これに TDH を作用させることにより、膜の崩壊と、TDH、および、GT1b の関係を探った。また、TDH が膜の透過性に影響を与えている可能性を考え、蛍光色素を封入したベシクルを調製し、これに TDH を作用させることにより蛍光色素の漏れの有無を調べた。

## 4. 研究成果

(1) フェムト秒レーザー細胞微細加工装置を用いた細胞内凝集 TDH の取得：近年、フェムト秒レーザーなどの極短パルスレーザーが使用できるようになり、多光子吸収による非線形加工が行えるようになって来た。本方法では、透過性の高い 800-1000nm の長波長領域のパルスレーザーを用いるが、平均パワーはごく小さく、ピークパワーが非常に大

きいため、集光点付近のごく限られた範囲においてのみ多光子吸収が起こりアブレーションを生じさせることが可能である。この性質は、生体サンプルなどに適用した場合、周辺への熱の影響を避けつつ、深部の加工ができる点で好適であると考えられる。そこで、下図のようなフェムト秒レーザー細胞微細加工装置を用い、細胞内に凝集する TDH の切除と回収を行った。

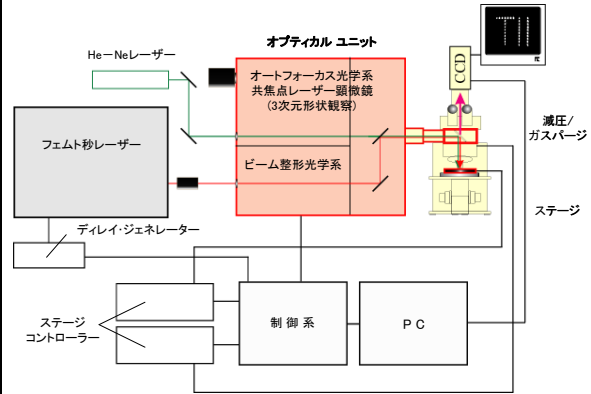


図1 フェムト秒レーザー細胞微細加工装置

まず、TDH を細胞内で可視化するために、TDH-GFP 融合タンパク質を発現する HeLa 細胞を作出した。作出した細胞を、レーザーマイクロディセクション用フィルムボトムシャーレにて培養し、培地を完全に満たしたシャーレを上下反転させ、フィルム面を上面にして蛍光観察により TDH 凝集体を観察し、該部位をフェムト秒レーザー細胞微細加工装置にて切削した。

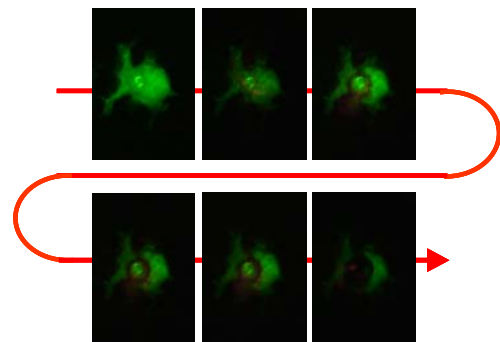
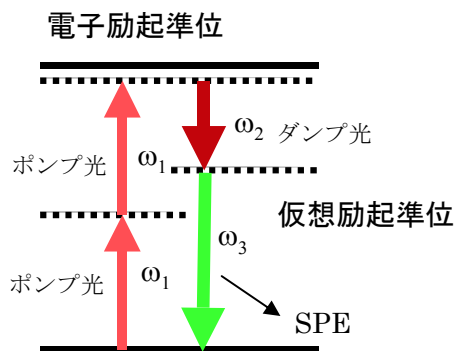


図1 TDH 凝集体のディセクションの様子

フィルムボトムはレーザーによって切り出され、浮力によって培地上に浮遊する。これをガラス製マイクロキャピラリーを装着したマニピュレーターにて回収することに成功した。

(2) SPE 顕微鏡による観察：細胞構造の解析研究は、高性能顕微鏡の進歩

とともに進んできたといっても過言ではない。特に、共焦点レーザー顕微鏡は、蛍光標識した細胞内構造体やタンパク質の三次元観察を可能にし、細胞構造に関する多くの知見を与えた。一方で、本方法は、対象物を蛍光物質による染色や蛍光タンパク質との融合などにより標識する必要があり、標識物質が観察対象に与える影響を無視できない。したがって、観察結果がアーティファクトである可能性を完全に否定することは難しい。このような中、我々は、照射により対象物の電子状態を直接可視化する全く新しい非線形光学顕微鏡、すなわち SPE 顕微鏡に着目した。本顕微鏡は、従来必要であった蛍光分子による標識を行わず、観測分子の電子状態を元に分子識別を可能とする。本方法では、ポンプ光とダンプ光という二種類の波長の異なるレーザー光を使用する。ポンプ光として周波数 $\omega_1$ の極短光パルスを試料へ集光し、さらに、ダンプ光として周波数 $\omega_2$ の光パルスを集光することにより、焦点点における三次の非線形光学効果を介して、四波混合 (four-wave mixing, FWM) 光 $\omega_3$ が誘導放出される(図2)。



$2\omega_1$  の周波数が試料の電子共鳴順位に共鳴する周波数に近くなると信号光強度が増強されるため、 $\omega_3$  が観測することにより電子共鳴に基づくイメージングが可能となる。すなわち、蛍光を発しない物質であっても可視・紫外域の電子共鳴準位の映像化により、無染色イメージングが可能となる。また、光点を三次元走査することにより、SPE 光の三次元分布を得ることができ、全く新しい三次元無染色観察が可能となる。SPE 顕微鏡は、生きた細胞あるいは細胞内小器官を用いて、完全無染色での三次元観察を可能とする。本実験では、HeLa 細胞にリコンビナント TDH 処理した後の細胞の動態を SPE 顕微鏡によって観察したところ、生きたままその形態変化を観察することに成功し、TDH 添加後細胞が収縮する様子が観察された。しかしながら、明確な TDH の細胞内凝集や、細胞内の TDH の様態はみられなかった。

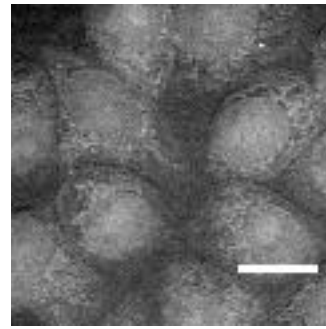


図3 SPE 顕微鏡による HeLa 細胞の観察 (Bar: 15  $\mu\text{m}$ )

(3) 人工細胞膜による凝集の観察： Ganglioside GT1b と TDH の相互作用を確認するため、ガラス板上にベシクル融合法によって脂質膜を作製し、TDH を添加してその集積を観察した。PC に GT1b の濃度を変えて混合した膜 (モル比で 0~5%) においては、明らかな集積は観察されなかった。しかしながら、蛍光標識 PC, コレステロール, GT1b にて作成した脂質膜の崩壊過程について、観察を行ったところ、GT1b 含有比率が 20% のとき、明らかな膜細分化活性を示した。(図4上) しかし、含有比率が 30% 以上の場合、親水頭部の大きい Ganglioside によるミセル形成が優先的に行われるため、ベシクルを作成することができなかった。(図4下)

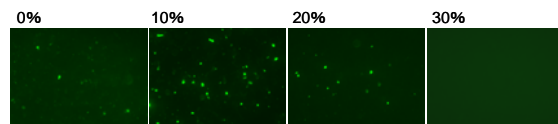
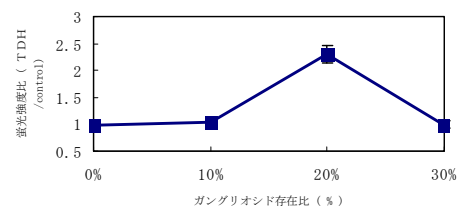


図4 ベシクルの細分化と  $G_{T1b}$  含有比率の関係

さらに脂質膜内部に蛍光色素を封入し同様の実験を試みた。その結果、TDH 添加により FITC (分子量 389) では蛍光色素の漏出を確認することができたが、カルセイン (分子量 622) では確認できなかった。これらの結果から、1) 膜の崩壊には、GT1b の脂質膜における比率が重要であること。2) 脂質膜内部に存在する物質のサイズによって漏出の有無があることが示された。これらのことは、従来型の孔形成性毒素のメカニズムでは説明できず、TDH の脂質膜傷害は、これとは異なるメカニズムを有している可能性を示唆するものである。

## 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 11 件)

① Yoshihiro Izumi, Shin' ichiro Kajiyama, Ryosuke Nakamura, Atsushi Ishihara, Atsushi Okazawa, Eiichiro Fukusaki, Yasuo Kanematsu, Akio Kobayashi (2009) High-resolution spatial and temporal analysis of phytoalexin production in oats. *Planta* 229: 931-943.

② Nakamura, R., Izumi, Y., Kajiyama, S., Kobayashi, A., Kanematsu, Y. (2008) Line-scanning microscopy for time-gated and spectrally-resolved fluorescence imaging. *J. Biol. Phys.* 34: 51-62.

③ Kajiyama, S., Joseph, B., Inoue, F., Shimamura, M., Fukusaki, E., Tomizawa, K., Kobayashi, A. (2008) Transient Gene Expression in Guard Cell Chloroplasts of Tobacco Using ArF Excimer Laser Microablation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 106: 194-198.

④ Hamaguchi M, Hamada D, Suzuki KN, Sakata I, Yanagihara I. (2008) Molecular basis of action reorganization promoted by binding of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* EspB to alpha-catenin. *FEBS J.* 275: 6260-6267.

⑤ Hamada D, Tsumoto K, Sawara M, Tanaka N, Nakahira K, Shiraki K, Yanagihara I. (2008) Effect of an amyloidogenic sequence attached to yellow fluorescent protein. *Proteins* 72: 811-821.

⑥ Sakakura M, Kajiyama S., Tsutsumi M, Si J, Fukusaki E, Tamaru Y, Akiyama S, Miura K, Hirao K, and Ueda M. (2007) Femtosecond Pulsed Laser as a Micro-Scalpel for Microdissection and Isolation of Specific Sections from Biological Samples. *Japanese Journal of Applied Physics* 46: 5859-5864.

他 5 件

[学会発表] (計 13 件)

国際

① Kajiyama S., Sakakura M, Ueda M, Itoh K, and Fukui K. "Single cell sampling and analysis by ultra short pulse laser", 5th International forum of post genome technologies, 2007/9, Bamboo Grove Hotel, Suzhou, China. (Invited)

他 4 件

国内

① Dang, H., Kawasumi, T., Kajiyama, S., Ozeki, Y., Itoh, K., Fukui, K. "Stimulated parametric emission microscopy for high-resolution 3-D imaging of unstained live-cell" 3次元画像コンファレンス, 2008年7月, 東京大学

他 7 件

[図書] (計 2 件)

① 梶山慎一郎(2007) 「ナノバイオ大辞典」(執筆分担 山根恒夫, 松永是, 民谷栄一 監修) 株式会社 テクノシステム pp.479-480

② 梶山慎一郎(2008) 「ナノイメージング」(執筆分担) 株式会社 NTS 第4編第3節

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: PCRにより増幅された伸長 DNA 鎖の検出方法、および、標的配列の測定方法

発明者: 梶山慎一郎, 福崎英一郎, 梨原善行, 広実慶彦

権利者: 大阪大学

種類: 特許

番号: 特願 2006-346582

出願年月日: 平成 18 年 12 月 22 日

国内外の別: 国内

[その他]

インタビュー記事

「細胞内分子動態計測への挑戦」

精密工学会誌、72(11). pp. 1307-1310.

新聞記事

2008年2月11日 日本経済新聞  
科学欄「細胞一つだけ取り出し」

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶山 慎一郎 (KAJIYAMA SHINICHIRO)

近畿大学・生物理工学部・准教授

研究者番号: 20243496

(2) 研究分担者

柳原 格 (YANAGIHARA ITARU)

大阪府母子センター・研究所・研究員

研究者番号: 60314415

(3) 連携研究者

該当なし