

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 8日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21710123

研究課題名（和文） 共鳴レーザー光を利用した細胞内ナノマニピュレーション

研究課題名（英文） Intracellular manipulation of proteins in neurons with resonance laser beam

研究代表者

細川 千絵（HOSOKAWA CHIE）

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・研究員

研究者番号：60435766

研究成果の概要（和文）： 生命現象は多様な機能分子の活動に応じて生体情報ネットワークを形成し、ダイナミックな時空間制御を受けている。本研究では、共鳴レーザー光を利用した新規な光操作により、細胞表面の特定分子のみを局所的に操作する手法を検討した。神経細胞の細胞表面に局在する神経細胞接着分子に量子ドットを標識し、分子動態を単一粒子レベルで追跡可能な実験系を構築した。蛍光相関分光解析により非共鳴、共鳴レーザー照射に伴う神経細胞接着分子の捕捉、集合過程を評価した。

研究成果の概要（英文）： Biological systems form complex networks related with functional molecules and are dynamically affected by spatio-temporal regulations. For aiming artificial control of the systems, we proposed and demonstrated intracellular manipulation of neural cell adhesion molecules (NCAMs) on living neuronal cells using resonance and nonresonance laser beams. The intracellular motion of NCAMs labeled with quantum dots was evaluated by fluorescence correlation spectroscopy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	0	0	0
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学・ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：光ピンセット・ナノバイオ・脳、神経・生物物理

1. 研究開始当初の背景

生命現象は多様な機能分子の活動に応じて生体情報ネットワークを形成し、ダイナミックな時空間制御を受けている。これまでにプロテオーム解析やX線構造解析により生体分子の静的な構造は解明されつつあるが、それらの機能分子の細胞内分子動態

を単一分子から分子集合体に至る階層レベルにおいて捉え、分子群が細胞内でどのように応答し、機能発現するかを明らかにすることが生命システムを理解する上で不可欠となる。生命現象はボトムアップ型の下に成り立っており、蛋白質分子や核酸、脂質分子等の生体機能分子が水素結合や静電反発

力などの分子間相互作用に基づいて分子集合体を形成する。その集合体が集まることにより細胞内小器官を形成し、種々の小器官が集合して細胞、細胞の集合体としての組織、組織から器官、そして個体へといった、ナノからメートルへと至る階層的な構造性を有している。また、それぞれの階層レベルにおいて特異な形態を有しており、その集合体は特徴的な機能を発現することが知られている。生命現象の本質は、蛋白質に代表される分子集合体が細胞内でどのような過程を経て機能を発現し、細胞ネットワークの形成に至るかを明らかにすることにある。そのためには、nm から μm 、 μsec から sec という時空間における細胞内分子の動的特性を解析することが極めて重要となる。しかしながら、これまでの先行研究では、蛍光イメージングや電子顕微鏡を用いた細胞内、或いは細胞間における機能分子の空間分布に関する研究が主流であり、ミリ秒から分オーダーの時間変化に特徴づけられる細胞内分子ダイナミクスに関する研究はほとんどない。細胞内の機能分子は周辺環境の弱い相互作用を感じながら拡散し、会合や反応を進めることから、細胞内分子動態の理解が必要となる。

共鳴レーザー光照射に基づくナノ粒子や分子の光捕捉力の増強に関しては、理論研究が主であり、共鳴波長レーザー光照射によりルビー粒子や半導体ナノ粒子に働く光捕捉力が3~50倍増大する数値計算結果が得られている。また、実験も行われており、色素溶液中に共鳴レーザー光を集光すると分子の拡散が抑制され、共鳴レーザー効果に基づく捕捉力の増加に起因する現象であると報告されている。しかしながら、色素分子の光捕捉時間は共鳴レーザー光照射により高々数ms程度しか増加しないため、実時間スケールでのナノマニピュレーションとして利用することは困難であった。研究代表者等は、ナノ粒子中の色素分子が吸収する共鳴レーザー光に加え、非共鳴である近赤外レーザー光を同時に照射し、ナノ粒子の光捕捉時間を延ばす、すなわち共鳴レーザー効果を増強できることをはじめて実証した。本手法を蛍光色素でラベルした細胞内生体分子に適用することにより、特定の分子を優先的に検出する、或いは捕捉・操作できると期待される。

2. 研究の目的

上述のとおり、細胞内分子動態を明らかにするための手法として、本研究では、従来の近赤外レーザー光を用いる光ピンセット技術に、共鳴レーザー光を組み合わせることにより、細胞表面や細胞内の特定分子のみを局所的に操作するナノマニピュレーション技術を開発することを研究の目的とした。培養

神経細胞表面や細胞内で機能・発現する神経情報伝達分子の拡散や反応、会合特性を近赤外レーザー光と共鳴レーザー光との同時照射により誘起される光捕捉ポテンシャルにより局所的に制御し、細胞内の高次操作技術への展開を図る。

3. 研究の方法

(1) 実験装置

共鳴レーザー光を利用した細胞内ナノマニピュレーションのための蛍光解析システムの構築を行った。図1に実験装置図を示す。細胞の特定部位の操作および蛍光解析を可能とするため、現有の倒立顕微鏡に顕微鏡自動XYステージを新たに装備し、非共鳴レーザーである YVO₄ レーザー(波長 1064 nm)および共鳴レーザーである Ar⁺ レーザー(波長 488 nm)を導入し、細胞内の局所領域に2波長のレーザー、すなわち非共鳴レーザー光と共鳴レーザー光を同時に、かつ高精度に集光するための顕微分光システムを作製した。蛍光検出系として、アバランシェフォトダイオードによりレーザー光の集光スポットからの蛍光強度を高感度検出し、得られた蛍光信号は解析用 PC に連結したカウンタボードで計数し、蛍光強度の時間変化を計測した。さらに、コリレータにより蛍光強度の相関関数を計測する蛍光相関分光測定も行った。

(2) 実証実験に向けた培養神経細胞表面分子の蛍光イメージング

脳・神経科学において、シナプス形成や神経回路網形成過程を解析する上で、脳組織そのものでは構造が複雑で、個々の神経細胞の可視化や機能分子レベルまでの解析

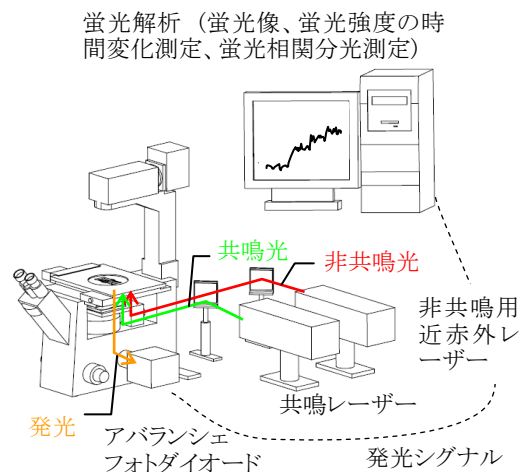


図1. 細胞内ナノマニピュレーションのための蛍光解析システム

は困難であることから、試料として分散培養した神経細胞を対象とした。本研究の遂

行のためには、共鳴レーザー光とカップリング可能な蛍光色素分子や量子ドット等を、神経細胞表面に局在する分子に結合し、細胞の蛍光イメージングを行うことが必要となる。神経細胞内の分子動態を蛍光検出するため、神経細胞シナプス領域の情報伝達分子や活動依存的変化に関わる分子（神経伝達受容体、膜結合型シグナル伝達分子、細胞骨格分子、神経成長因子、シナプス小胞等）を対象とし、蛍光抗体法により蛍光色素や量子ドットを付加したものを細胞内や細胞表面上に導入する手法を検討した。

4. 研究成果

(1) 免疫蛍光染色による神経細胞接着分子の可視化

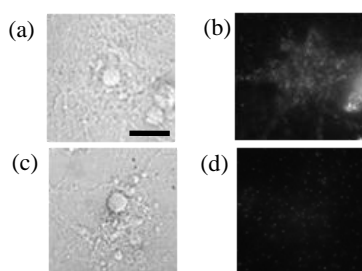


図2. 生細胞条件における神経細胞(培養23日目)の透過像(a)、(c)、および量子ドットにより可視化された神経細胞接着分子の蛍光像(b)、(d)。1次抗体有り(b)、および無し(d)。スケールは10 μm 。

細胞内分子動態のレーザー操作過程の蛍光解析を行うため、神経細胞の特定分子のみを蛍光標識法を検討した。具体的には、ラット胎児脳から調整した海馬神経細胞の分散培養系を対象とし、神経細胞接着分子 NCAM 抗体に量子ドット(発光ピーク波長 655 nm)を結合する免疫蛍光染色により、神経細胞接着分子の可視化の条件を検討した結果、神経細胞全体に量子ドットにより標識された神経細胞接着分子の局在を確認した。また、膜透過亢進処理を省いて免疫蛍光染色を行うことにより、図2に示すとおり、生細胞条件において神経細胞接着分子の可視化に成功し、生きた神経細胞の細胞表面における分子動態を単一粒子レベルで追跡できることを示した。

(2) 量子ドットで標識した神経細胞接着分子の光捕捉の蛍光解析

量子ドットで標識した神経細胞接着分子に光ピンセット用レーザーを集光し、蛍光像の経時観察を行った。波長 1064 nm の光ピンセット用レーザーを細胞表面に集光すると、集光位置において量子ドットからの二光子励起蛍光が観測され、神経細胞接着分子が時

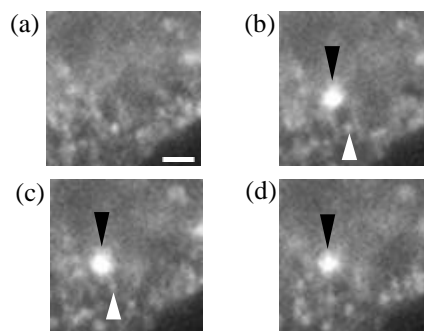


図3. 量子ドットにより可視化された神経細胞接着分子の蛍光像(培養20日目)。レーザー照射前(a)、レーザー照射直後(b)、照射1 s後(c)、照射1.1 s後(d)。レーザー光強度は300 mW。黒矢印はレーザー光照射位置、白矢印は神経細胞接着分子の動態を示す。スケールは2 μm 。

間とともに引き寄せられる様子が確認された(図3)。レーザー光強度が高くなるにつれ、集光位置での蛍光強度の増加が顕著にみられたことから、光捕捉力の増大に伴いレーザー集光領域内の分子数の増加が示唆された。次に、蛍光相関分光法により、集光位置での二光子励起蛍光強度の自己相関関数を解析した結果、レーザー光強度が高くなるにつれ、自己相関関数の減衰の開始時間が遅くなるという傾向がみられた。図4に示すとおり、自己相関関数を二成分関数によりフィッティングし、早い減衰成分と遅い減衰成分とを分離して解析したところ、両成分においてレーザー光強度が高くなるにつれ、自己相関関数の減衰時間が遅くなったことから、レーザー集光領域の分子数が増加し、分子運動が遅くなると考察した。以上の結果は、光ピンセット用レーザー照射により、神経細胞接着分子が捕捉され、集合することを明示している。

さらに、非共鳴である光ピンセット用レーザー光に加え、量子ドットの吸収波長領域となる波長 488 nm の共鳴レーザー光を同時に照射し、光捕捉時間を延ばす、すなわち共鳴レーザー効果の増強がみられるかを検討した。量子ドットで標識した神経細胞接着分子

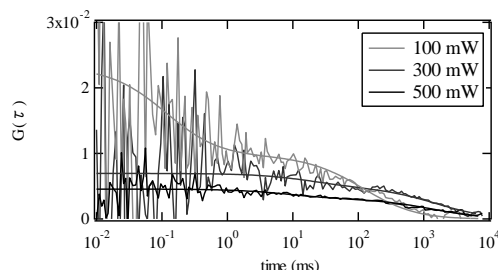


図4. 神経細胞接着分子の蛍光相関分光測定結果。レーザー光強度はそれぞれ100 mW、300 mW、500 mW。

に共鳴レーザー光と光ピンセット用レーザー光を同時に照射し、蛍光相関分光法により

集光位置での蛍光強度の自己相関関数を解析したところ、自己相関関数の減衰時間は、光ピンセット用レーザー照射のみに比べて遅くなる傾向がみられ、共鳴レーザー光との同時照射により捕捉力が増大している可能性が示唆された。今後理論モデルの検証も含め、ナノマニピュレーションを効率よく行うための条件を検討する必要がある。

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3件)

- ① Chie Hosokawa, Suguru N. Kudoh, Ai Kiyohara, and Takahisa Taguchi, "Optical trapping of synaptic vesicles in neurons", *Applied Physics Letters*, 査読有, Vol. 98, 2011, 163705-1-3, DOI: 10.1063/1.3579191
- ② Suguru N. Kudoh, Minori Tokuda, Ai Kiyohara, Chie Hosokawa, Takahisa Taguchi, and Isao Hayashi, "Vitroid - the robot system with an interface between a living neuronal network and outer world", *International Journal of Mechatronics and Manufacturing Systems*, 査読有, Vol. 4, No. 2, 2011, 135-149 DOI: 10.1504/IJMMS.2011.039264
- ③ Chie Hosokawa, Suguru N. Kudoh, Mariko Suzuki, Ai Kiyohara, Yoichiro Hosokawa, Kazunori Okano, Hiroshi Masuhara, and Takahisa Taguchi, "Micro-channel fabrication by femtosecond laser to arrange neuronal cells on multi-electrode arrays", *Applied Physics A*, 査読有, Vol. 101, 2010, 423-428. DOI: 10.1007/s00339-010-5836-4

[学会発表] (計10件)

- ① Chie Hosokawa, Yusuke Ueda, Yasutaka Sakamoto, Suguru N. Kudoh, and Takahisa Taguchi, Laser-induced perturbation of single neuron in a neuronal network, The 5th International Symposium on Nanomedicine (ISNM2012), 2012/3/16, 名古屋大学
- ② 細川 千絵, 植田 悠介, 坂本 泰隆, 大西 映里子, 工藤 卓, 田口 隆久, レーザー光摂動を用いた神経細胞ネットワーク操作過程の蛍光解析, 第24回バイオエンジニアリング講演会, 2012/1/8, 大阪大学
- ③ Chie Hosokawa, Yusuke Ueda, Suguru N. Kudoh, and Takahisa Taguchi, Optical trapping and assembling dynamics of

synaptic vesicles in neurons revealed by fluorescence correlation spectroscopy, Neuroscience 2011, The 41st annual meeting of SFN, 2011/11/13, Washington Convention Center, Washington DC, USA

- ④ 細川 千絵, 植田 悠介, 坂本 泰隆, 鈴木真理子, 工藤 卓, 田口 隆久, Optical perturbation of neuronal network by a focused laser beam, 第26回生体・生理工学シンポジウム, 2011/9/22, 立命館大学
- ⑤ 坂本 泰隆, 細川 千絵, 工藤 卓, 田口 隆久, 集光フェムト秒レーザーによる海馬神経細胞の光刺激, 第34回日本神経科学大会, 2011/9/15, パシフィコ横浜
- ⑥ 植田 悠介, 細川 千絵, 工藤 卓, 田口 隆久, 光ピンセットによる神経細胞内シナプス小胞群の集合操作の蛍光解析, 第72回応用物理学会学術講演会, 2011/9/1, 山形大学
- ⑦ 細川 千絵, 植田 悠介, 工藤 卓, 田口 隆久, 神経細胞内シナプス小胞群の光捕捉ダイナミクス, ナノ学会第9回大会, 2011/6/2, 北海道大学
- ⑧ 細川 千絵, 植田 悠介, 工藤 卓, 大西 映里子, 鈴木 真理子, 田口 隆久, 光捕捉された神経細胞内シナプス小胞群の蛍光相関分光解析, 第58回応用物理学関係連合講演会, 2011/3/25, 神奈川工科大学
- ⑨ 細川 千絵, 大西 映里子, 工藤 卓, 田口 隆久, 光ピンセットを用いた培養神経細胞シナプス操作過程の蛍光解析, 第33回日本神経科学大会, 2010/9/3, 神戸コンベンションセンター
- ⑩ 細川 千絵, 集光レーザービームによる培養神経回路網の操作技術の開発, バイオメクスフォーラム21 第56回研究会, 2010/4/17, 大阪大学

[図書] (計1件)

- ① 工藤卓, 細川千絵, "医療応用バイオロボティクスへの発展", *Medical Bio* 5月号, 第7巻, 第3号, 2010, 36-39

[その他]

<http://unit.aist.go.jp/gruop/birg/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細川 千絵 (HOSOKAWA CHIE)

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・研究員

研究者番号: 60435766