

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月24日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790039

研究課題名（和文） 超解像多光子顕微鏡による機能特化細胞の膜動態イメージング

研究課題名（英文） Imaging of membrane dynamics in specialized differentiated cells by multiphoton super-resolution microscopy

研究代表者

日比 輝正（HIBI TERUMASA）

北海道大学・電子科学研究所・助教

研究者番号：50554292

研究成果の概要（和文）：

ヒトの体内では、様々な分化し専門的な役割を担う「機能特化細胞」が適切に働くことにより、その恒常性が保たれている。その機能の多くは、小胞輸送と膜融合によるものである。本研究では、破骨細胞と脂肪細胞の小胞輸送について、多光子蛍光4次元イメージングによって解析する方法を構築した。また、以前の研究によって開発した液晶位相変調素子と多光子顕微鏡を組み合わせることによって、xy方向の分解能を向上しつつ同時に深い被写界深度を得ることに成功した。

研究成果の概要（英文）：

In human body, homeostasis is maintained by functions of various specialized differentiated cells. Most of functions are due to vesicular trafficking and membrane fusion. In this work, vesicular trafficking in osteoclasts and adipocytes was analyzed with multiphoton fluorescent 4D microscopy. Additionally, combination of multiphoton microscopy with our previously developed liquid crystal devices realized both high lateral resolution and deep depth-of-field.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：分子細胞生物学、生物物理学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：破骨細胞、脂肪細胞、小胞輸送、蛍光タンパク質、多光子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

ヒトの体内では、様々な分化し専門的な役割を担う「機能特化細胞」が適切に働くことにより、その恒常性が保たれている。機能特化細胞では、発生・発達の段階で種々の転写因子が働き、その細胞に特徴的なタンパク質を発現する。それぞれのタンパク質を適切に機能させ、細胞が専門的能力を発揮するためには、これらの機能タンパク質を細胞内外の適切な場所に輸送しなければならない。多く

の機能特化細胞においては、この輸送は小胞輸送系と膜融合によって実現されている。個々の細胞が専門的な機能を果たすために、この膜動態は巧妙に調節されており、その調節メカニズムの破綻は、生活習慣病に代表される代謝疾患や内外分泌の障害を招く。このため、機能特化細胞における膜動態を分子レベルで理解することは、多くの疾患のしくみの理解や画期的な新規医薬品の開発に極めて重要である。

本研究では、研究対象として、機能特化細胞の中でも特に特殊な形態と専門的機能を持ち、ヒトの生体恒常性にとって極めて重要である破骨細胞と脂肪細胞を選んだ。破骨細胞は、単球/マクロファージ系の前駆細胞から分化した特殊な巨大多核細胞であり、生体内の骨代謝における骨破壊機能を担っている。破骨細胞の細胞内にはリソソーム様の酸性小胞が多数存在し、この小胞を骨表面側の形質膜と融合させて、分解酵素やプロトンポンプを骨表面に輸送して骨破壊を行なうと考えられている。しかし、この酸性小胞の輸送及び膜融合を制御する分子は不明なままである。一方の脂肪細胞は、体の様々な部位に蓄えられる脂肪組織を形成している細胞であり、細胞外からの刺激により、糖取り込みを促進し、取り込んだ糖から合成した脂肪を脂肪滴として細胞内に蓄える。この糖取り込みの促進時に、細胞内の小胞の膜上に存在するグルコーストランスポーター**GLUT4**を細胞表面に露出させることによって、細胞内への糖取り込みの機能を調節していることが判っている。

破骨細胞の骨破壊小胞の内容物の放出と、脂肪細胞における **GLUT4** 小胞の細胞表面への露出には、どちらも **SNARE** タンパク質が関わっていると考えられるが、これらの細胞の小胞輸送と膜融合の分子機構について、共通点と相違点を明らかにすることは、例えば治療薬の副作用を予見することなどに繋がり、大きな意味を持つ。細胞内の膜動態の分子機構を明らかにするには、単に **mRNA** やタンパク質の発現レベルを調べるだけでは不十分であり、小胞の空間的配置とそれら時間変化が最も重要な情報である。すなわち、この目的においては、生きた細胞内での1個1個の小胞の動きやそれに関わる分子の挙動を可視化する研究手法が必要となる。

一方で、研究開始時までに我々は、光の回折限界以下の分解能を実現できる「超解像レーザー顕微鏡」を東北大学及びシチズンホールディングス社との共同研究により開発していた (**Y. Kozawa, T. Hibi et al., Optics Express, 2011**)。この技術は、新開発の液晶光学位相変調素子を市販の共焦点レーザー顕微鏡に装着することにより、顕微鏡の焦点面内の空間分解能を約 **30%**も向上させることが出来るという技術である。本技術は、他の超解像技術とは異なり、非常に広範囲の波長に適用可能であるという特長を有しており、生きた細胞に対して少ないダメージでの観察が可能な多光子顕微鏡と組み合わせることも可能である。また、使用するレーザー顕微鏡自身の時間分解能を全く低下させないという特長も有しており、生細胞内の微小構造を可視化解析するための非常に強力なツールとなることが期待された。

2. 研究の目的

上記のことを踏まえ、本研究では、ヒトの生体恒常性に極めて重要な2つの代謝系に関与する細胞である、破骨細胞と脂肪細胞という全く別種の細胞の機能について、その膜動態の共通点と相違点を明らかにするための基盤技術を開発することを目指し、これら細胞の膜動態について、空間の3次元に時間を加えた4次元のイメージングを行なうことを計画した。

3. 研究の方法

破骨細胞として、マウスマクロファージ系細胞株 RAW264.7 細胞を誘導培地で数日間培養することにより、破骨細胞に誘導する系を用いた。破骨細胞の骨破壊小胞は、プロトンポンプを含有することが知られていることから、酸性部に局在する蛍光色素である Lyso Green ID を利用して染色し、破骨細胞内の酸性小胞を可視化した。

また、脂肪細胞として、マウス線維芽細胞を誘導培地で数日間培養することにより脂肪細胞に誘導する系を用いた。用いるマウス線維芽細胞については、複数の細胞種を検討し、安定して実験可能な細胞種を選んで以降の実験に用いることとした。脂肪細胞の **GLUT4** 小胞を経時的に追うために、**GLUT4** と蛍光蛋白質 **mCitrine** との融合タンパク質を発現するプラスミド DNA を作製した。このプラスミドを XtreamGene9 (Roche) を用いて分化誘導前の培養細胞に導入したのち、分化誘導を行なうことで **GLUT4** 小胞が **mCitrine** で標識された脂肪細胞を得た。

上記細胞内の小胞の動態を経時的に解析するために、未固定のまま培地中、多光子顕微鏡による観察を行なった。観察には、超短パルス近赤外レーザーに加えて、レゾナント型高速スキャナと GaAsP 型高感度検出器を備えた、高速高感度多光子顕微鏡を用い、60倍のウォーターディッピング式の対物レンズを装着して、XYZの空間の3次元に時間(T)を加えた4次元でのイメージングを実施した。

4. 研究成果

最初に、培養細胞を用いた分化誘導系の実験条件の検討を行なった。破骨細胞については、研究計画通り RAW264.7 を用いることで問題無かった。一方、脂肪細胞については、計画当初は 3T3-L1 細胞を用いる予定であったが、3T3F442A 細胞、C3H10T1/2 細胞についても比較検討を行なったところ、良好な遺伝子導入効率と良好な分化誘導効率を共に満たす条件は限られていた。結果を総合的に判断すると、C3H10T1/2 細胞を用いた場合の成績が良かったことから、以降の研究では C3H10T1/2 細胞を使用することとした。また、

灌流系など、観察に用いる顕微鏡周りの整備と、培養時の細胞接着面についての検討も行ない、実験系を確立した。

上記で確立した実験系を用い、破骨細胞の酸性小胞を Lyso-ID Green にて標識し、また脂肪細胞の GLUT4 含有小胞については GLUT4-mCitrine プラスミドの遺伝子導入により標識し、それぞれの細胞における小胞輸送の4次元観察を行なった。得られた4次元画像を、画像解析ソフトウェア Imaris (BIT PLANE) を用いて解析することにより、小胞の位置と速さの変化についての計測が可能となった。

破骨細胞の4次元画像から得た、多数の小胞の各フレームにおける速さをグラフに表したものが、図1である。

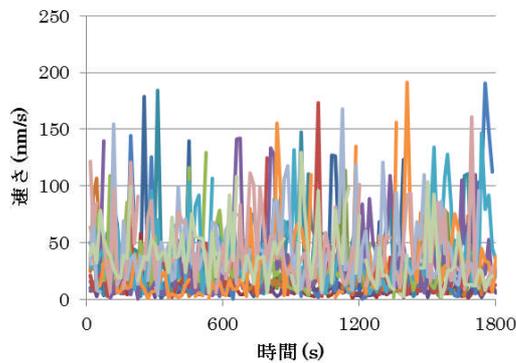


図1

このグラフから、小胞は最大で 200 nm/s 程度の速さで移動するものの、連続的に移動するのではなく、低速で動いている中に瞬間的に高速な移動をしていた。小胞の速さのヒストグラムを描いたものが、図2であり、小胞の多くは 10 nm/s 程度のわずかな動きであるものの、様々な速さを示していた。

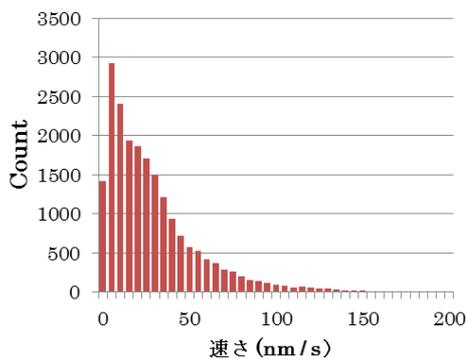


図2

しかし、非常に高速で移動する小胞については、画像の取得時の時間分解能が十分ではなく、追跡しきれないことも判明した。

一方、脂肪細胞についても4次元観察を行

なった。GLUT4 含有小胞を可視化した脂肪細胞の画像を図3に示した。

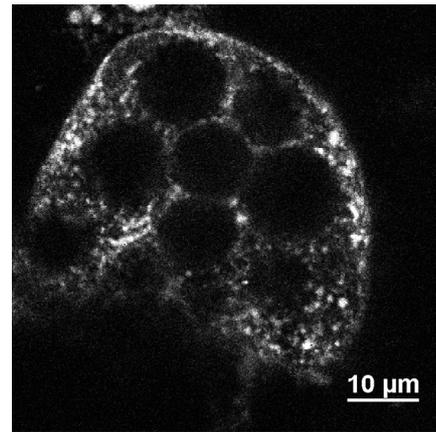


図3

図4に示したように、一部の小胞については動きを追跡することができた。しかし、多数の小胞については非常に高速で直線的な動きをしており、今回の画像取得法と解析法では、正確な速さの分布を知ることが出来なかった。

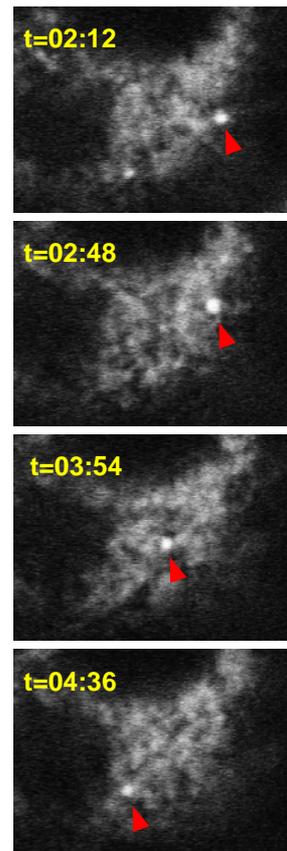


図4

以上のように、本研究における解析では、1個1個の小胞の遅い動きについては、十分に追跡できる速さだったが、一部で見られる、

非常に高速かつ直線的な動きをする場合については、正確な小胞の動態を把握するには、更なる観察系の改良が必要であることも明らかとなった。そこで、観察に用いる顕微鏡について、更なる改良を行なった。研究開始時までに我々が開発していた液晶光学位相変調素子を多光子顕微鏡に応用した場合には、非線形効果と共焦点ピンホールを用いないことにより、対物レンズによる集光時のパターンを更に強調した形状となり、光軸と直交した面内 (xy 方向) では非常に小さく、光軸方向 (z 方向) に長く伸びた形状となる。この集光パターンをスキャンしてシグナルを得ることにより、xy 方向の空間分解能を向上させると共に、被写界深度を深くすることが可能となった (論文投稿中)。

本研究によって構築した培養細胞を利用した小胞動態の可視化系と、改良した超解像イメージング法を組み合わせることで、既存の方法では解析できなかった膜動態についても計測・解析を行なうことが可能になると考えられる。今後も追加の測定を行なうことにより、各種機能特化細胞における膜動態における種々の物理量を把握でき、機能特化細胞の膜動態の分子機構解明に貢献できるものと考えている。

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) 日比輝正、一本嶋佐理、根本知己、ベクトルビームによるレーザー顕微鏡の超解像化の試み、光技術コンタクト、査読無、Vol. 51、No.4、2013、pp.20 - 26

(2) 根本知己、川上良介、日比輝正、超短光パルスレーザーによる非線形光学過程を用いた超解像イメージング、光アライアンス、査読無、Vol.24、No.4、2013、10 - 14

(3) 根本知己、川上良介、日比輝正、多光子励起レーザー顕微鏡の高深度化・超解像化、レーザー研究、査読無、Vol.41、No.2、2013、107 - 112

(4) Ryosuke Kawakami、Kazuaki Sawada、Aya Sato、Terumasa Hibi、Yuichi Kozawa、Shunichi Sato、Hiroyuki Yokoyama、Tomomi Nemoto、Visualizing hippocampal neurons with in vivo two-photon microscopy using a 1030 nm picosecond pulse laser、Scientific Reports、査読有、Vol.3、2013、pp.1014、DOI: 10.1038/srep01014

(5) Tomomi Nemoto、Terumasa Hibi、Sari

Ipponjima、Liquid crystal devices heighten resolution in biological cell microscopy、SPIE Newsroom、査読無、10 December 2012、DOI: 10.1117/2.1201211.004549

(6) 川上良介、日比輝正、根本知己、生体深部を可視化する in vivo 多光子励起顕微鏡法、ドージンニュース、査読無、Vol.144、2012、pp.123 - 128、<http://www.dojindo.co.jp/letterj/144/144.pdf>

(7) 根本知己、日比輝正、川上良介、"in vivo" 多光子顕微鏡による生体機能のイメージング、未来材料、査読無、Vol.12、No.7、2012、pp.2 - 4

(8) 根本知己、川上良介、日比輝正、青柳佑佳、澤田和明、脳の in vivo イメージング、病理と臨床、査読無、Vol.30、No.7、2012、pp.725 - 731

(9) 日比輝正、川上良介、根本知己、生体深部の二光子イメージング - その深部化と高解像化の試み -、血管医学、査読無、Vol.13、No.2、2012、pp.123 - 128

(10) 根本知己、日比輝正、川上良介、多光子励起レーザー顕微鏡を用いた生理機能の非侵襲的生体深部イメージング、ファルマシア、査読無、Vol.47、No.8、2011、pp.724 - 728

(11) Yuichi Kozawa †*, Terumasa Hibi †*, Aya Sato、Hibiki Horanai、Makoto Kurihara、Nobuyuki Hashimoto、Hiroyuki Yokoyama、Tomomi Nemoto、Shunichi Sato、Lateral resolution enhancement of laser scanning microscopy by higher-order radially polarized mode beam、Optics Express、査読有、Vol.19、No.17、2011、pp.15947 - 15954、DOI: 10.1364/OE.19.015947 († equally contributed, * co-corresponding author)

[学会発表] (計 22 件)

(1) 日比輝正、液晶位相変調素子を用いたベクトルビームによるレーザー顕微鏡の高解像化、2012 年度日本分光学会北海道支部シンポジウム、2013 年 3 月 1 日、北海道大学電子科学研究所 (北海道札幌市)

(2) Ryosuke Kawakami、Kazuaki Sawada、Aya Sato、Terumasa Hibi、Yuichi Kozawa、Shunichi Sato、Hiroyuki Yokoyama、Tomomi Nemoto、In vivo two-photon microscopy with a 1030 nm (high-peak-power) picosecond-pulse laser to visualize the cortex and hippocampal

pyramidal neurons in H-Line mice, Society for Neuroscience 2012, 2012年10月15日、Ernest N. Morial Convention Center (New Orleans, 米国)

(3) Ayano Tanabe, Masafumi Yokoyama, Kenji Matsumoto, Makoto Kurihara, Nobuyuki Hashimoto, Terumasa Hibi, Tomomi Nemoto, Simple adaptive optic device for confocal laser scanning microscopy using liquid crystals, Frontiers in Optics, 2012年10月14日、Rochester Riverside Convention Center (New York, 米国)

(4) 田辺綾乃、横山正史、松本健志、栗原誠、橋本信幸、日比輝正、一本嶋佐理、根本知己、レーザー共焦点顕微鏡用液晶収差補正素子の開発、日本時計学会マイクロメカトロニクス学術講演会、2012年9月7日、中央大学後楽園キャンパス (東京都文京区)

(5) 田辺綾乃、横山正史、松本健志、栗原誠、橋本信幸、日比輝正、根本知己、顕微鏡用液晶収差補正素子の開発とイメージング応用、第37回光学シンポジウム、2012年6月15日、東京大学生産技術研究所 (東京都目黒区)

(6) Sari Ipponjima, Terumasa Hibi, Yuichi Kozawa, Hibiki Horanai, Aya Sato, Makoto Kurihara, Nobuyuki Hashimoto, Hiroyuki Yokoyama, Shunichi Sato, Tomomi Nemoto, Improvement of the spatial resolution in two-photon microscopy with a vector beam generated by liquid crystal devices, Focus on Microscopy 2012, 2012年4月2日、Suntec Singapore International Convention & Exhibition centre (Singapore, シンガポール)

(7) 日比輝正、小澤祐市、一本嶋佐理、洞内響、佐藤綾耶、栗原誠、橋本信幸、横山弘之、佐藤俊一、根本知己、高次径偏光ビームによるレーザー顕微鏡の分解能の向上、日本薬学会第132年会、2012年3月29日、北海道大学 (北海道札幌市)

(8) 根本知己、日比輝正、川上良介、一本嶋佐理、青柳佑佳、澤田和明、2光子顕微鏡によるイメージング技術の高度化、第1回伊香保BSの会、2012年3月14-15日、群馬大学昭和キャンパス (群馬県前橋市)

(9) 日比輝正、液品位相変調素子を利用したレーザー走査型顕微鏡の改良、第2回 vivid workshop, 2012年3月1-3日、瑠璃光 (石川県加賀市)

(10) Ayano Tanabe, Yuka Saito, Makoto Kurihara, Nobuyuki Hashimoto, Yuichi Kozawa, Shunichi Sato, Terumasa Hibi, Tomomi Nemoto, Observation of PDLCs by SHG laser scanning microscopy using a liquid crystal vector beam generator, Photonics West, 2012年1月23日、Moscone Center (San Francisco, 米国)

(11) 日比輝正、小澤祐市、一本嶋佐理、洞内響、佐藤綾耶、栗原誠、橋本信幸、横山弘之、佐藤俊一、根本知己、ベクトルビームの利用によるレーザー走査型顕微鏡の分解能の向上、定量生物学の会第4回年会、2012年1月8-9日、名古屋大学野依記念学術交流館 (愛知県名古屋市)

(12) 日比輝正、根本知己、新規超解像顕微鏡の開発と医学研究への応用、第34回日本分子生物学会年会ワークショップ、2011年12月13日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

(13) 日比輝正、生細胞観察に適した超解像レーザー走査型顕微鏡の開発、平成23年度日本分光学会生細胞分光部会シンポジウム、2011年11月23日、東京工業大学すずかけ台キャンパス (神奈川県横浜市)

(14) Sari Ipponjima, Terumasa Hibi, Yuichi Kozawa, Hibiki Horanai, Aya Sato, Makoto Kurihara, Nobuyuki Hashimoto, Hiroyuki Yokoyama, Shunichi Sato, Tomomi Nemoto, Improvement of spatial resolution in laser scanning microscopy with higher-order radially polarized beam generated by liquid crystal device, The 12th RIES-Hokudai International Symposium, 2011年11月21-22日、Chateraise Gateaux Kingdom Sapporo (北海道札幌市)

(15) Ryosuke Kawakami, Terumasa Hibi, Tomomi Nemoto, Development of in vivo multi-photon microscopy for elucidation of neural activity with morphological changes in living mouse brain, The 12th RIES-Hokudai International Symposium, 2011年11月21-22日、Chateraise Gateaux Kingdom Sapporo (北海道札幌市)

(16) 小澤祐市、日比輝正、佐藤綾耶、洞内響、栗原誠、橋本信幸、横山弘之、根本知己、佐藤俊一、高次径偏光モードビームを用いたレーザー走査顕微鏡の分解能向上、第4回東北大学光科学技術フォーラム、2011年11月16日、東北大学電気通信研究所 (宮城県仙台市)

(17) 一本嶋佐理、日比輝正、小澤祐市、洞内響、佐藤綾耶、栗原誠、橋本信幸、横山弘之、佐藤俊一、根本知己、ベクトルビームによるレーザー走査型顕微鏡の超解像化、第4回文部科学省「最先端の光の創成を目指したネットワーク研究拠点プログラム」シンポジウム、2011年11月14日、名古屋キャッスルプラザホテル（愛知県名古屋市）

(18) 小澤祐市、日比輝正、佐藤綾耶、洞内響、栗原誠、橋本信幸、横山弘之、根本知己、佐藤俊一、高次径偏光モードビームを用いたレーザー走査顕微鏡の分解能向上、科学技術振興機構 CREST 光展開領域報告会、2011年10月25日、大田区産業プラザ PiO（東京都大田区）

(19) Ryosuke Kawakami, Terumasa Hibi, Tomomi Nemoto, Development of "*in vivo*" multi-photon and super-resolution microscopy for elucidation of neural activity、Innsbruck Medical University Studentische Seminar、2011年10月14日、Innsbruck Medical University (Innsbruck、オーストリア)

(20) Ryosuke Kawakami, Terumasa Hibi, Tomomi Nemoto, Development of "*in vivo*" multi-photon and super-resolution microscopy for elucidation of neural activity、The France-Japan workshop "Bio-inspired approaches: Micro- and Nano-Architectures, Materials & imaging、2011年10月11日、IECB (Bordeaux、フランス)

(21) 一本嶋佐理、日比輝正、小澤祐市、洞内響、佐藤綾耶、栗原誠、橋本信幸、横山弘之、佐藤俊一、根本知己、高次径偏光ビームによる超解像イメージング、第20回日本バイオイメージング学術集会、2011年9月1-2日、千歳科学技術大学（北海道千歳市）
※「ベストイメージング賞（ニコソ賞）」を受賞

(22) 田辺綾乃、齋藤友香、栗原誠、橋本信幸、小澤祐市、佐藤俊一、日比輝正、根本知己、ベクトルビームレーザーSHG 顕微鏡を用いたPDLCの観察、日本光学会第36回光学シンポジウム、2011年7月8日、東京大学生産技術研究所（東京都目黒区）

〔図書〕（計1件）

(1) 根本知己、日比輝正、川上良介、朝倉書店、発光の事典（太田信廣ら編）（担当範囲：第6.3.2節「2光子蛍光イメージング」）、2013年、印刷中

〔その他〕

●ホームページ等

北海道大学電子科学研究所光細胞生理研究分野

<http://www.es.hokudai.ac.jp/lab/mcb/>

●アウトリーチ活動について

(1) 2011年6月4日、および2012年6月9日のそれぞれに、北海道大学電子科学研究所の一般公開が行なわれたため、その機会を利用して、来場した一般の方々に、蛍光蛋白質を用いた技術や最先端の顕微光学技術などについて、解説を行なった。また、蛍光蛋白質を発現する試料を実際に蛍光顕微鏡により観察して戴くことも実施した。

(2) 米国マサチューセッツ工科大学で行われる合成生物学の国際大会である iGEM (International Genetically Engineered Machine competition) に北海道大学から参加したチームである「iGEM HokkaidoU」の活動に協力し、2011年9月7~8日に札幌市地下歩行空間にて開催されたBio-Artギャラリーに私が撮像した蛍光顕微鏡画像を提供し、一般市民の方々に、美しい蛍光顕微鏡画像をご覧戴くと同時に科学技術や研究について知って戴くことができた。

参考 URL : http://2011.igem.org/Team:HokkaidoU_Japan/HumanPractice

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日比 輝正 (HIBI TERUMASA)

北海道大学・電子科学研究所・助教

研究者番号：50554292

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし