

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：16201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659087

研究課題名(和文)水銀アーク光源蛍光顕微鏡をベースとしたタンパク質活性光制御システムの開発

研究課題名(英文)Development of an automated microscopic system for optogenetics using a mercury lamp fluorescence microscope

研究代表者

荒木 伸一 (ARAKI, NOBUKAZU)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：10202748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：光遺伝学(オプトジェネティクス)を用いた顕微鏡下でのタンパク質活性光制御は次世代タンパク質機能解析法として注目されている。本研究は、通常の水銀アーク光源を利用した電動蛍光顕微鏡をベースとしてイメージングソフトのマクロプログラミングにより高度に自動化した安価で実用的な光制御イメージングシステムを構築することを目的とした。イメージングソフトから制御できる電動励起光絞りを利用し励起光照射部位のサイズを調節することで細胞の一部または全視野を光刺激することを可能とした。ソフトウェアのプログラミングでこれらの動作を連動させ、自動で光刺激とタイムラプス画像取得を行うことに成功した。

研究成果の概要(英文)：Photomanipulation of genetically encoded photoactivatable proteins, also known as optogenetics, is one of the most innovative techniques in the fields of cell biology. Although photomanipulation is usually performed by diverting the photobleaching mode of a confocal laser microscope, photobleaching by the laser scanning unit is not always suitable for photoactivation. Therefore, we attempted to develop a simple automated wide-field fluorescence microscopy system for optogenetics. An automated fluorescence microscope can be controlled through MetaMorph imaging software, making it possible to acquire time-lapse, multiwavelength images of live cells. We wrote a macro program to change the excitation filter for photoactivation and illumination area during the intervals of image acquisition. When this program was run on the microscope, cells expressing photoactivatable Rac1 showed lamellipodial extension and cell surface ruffling in the illuminated region.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：顕微鏡技術 細胞・組織 光制御 シグナル伝達 分子スイッチ 蛍光顕微鏡 オプトジェネティクス

## 1. 研究開始当初の背景

植物の青色光センサータンパク質のLOVドメインを融合させた機能タンパク質を動物細胞に発現させ、レーザー照射によってタンパク質活性を細胞内の局所で可逆的に活性化させる光制御法(photo-manipulation)は、タンパク質の機能解析を生きた細胞内で時空間的におこなえる次世代タンパク質機能解析法として脚光を浴びている。この方法は、2009年にK.HahnらのグループによってNature誌に発表され、海外のいくつかのラボがこの方法を用い解析を始めているようであるが、技術的難度が高いためか未だその成果は多く発表されていない。国内では、申請者の研究室がこの方法を用いてGタンパク質であるRac1の活性を光制御し、その分子スイッチとしての真の役割を可視化することに成功した(荒木ら2011年日本顕微鏡学会シンポジウム講演)。我々は、レーザー顕微鏡下での光制御実験を行ううちこの方法の技術的難点に気づいた。それは、レーザー顕微鏡は、細胞の任意の領域を選択的に照射することができる一方、レーザーを走査させているため常に領域全体にレーザーが当たっているわけではない。広い領域をスキャン照射するには時間がかかるうえ、レーザー強度、スキャン速度、スキャン回数、ピンホールの大きさなどレーザー照射条件のパラメータがいくつもあるため、Rac1発現量の異なる様々な細胞で照射条件を適切に設定することは容易でなく安定した結果が得られにくい。光制御では、フォトブリーチングのような強い照射は必要としない。そこで、我々は、光照射時間や強度のコントロールが容易な水銀アーク光源を用いた通常の蛍光顕微鏡をベースとして簡便かつ正確な光制御法の開発を着想するに至った。

## 2. 研究の目的

顕微鏡下での特定波長光照射により細胞内のタンパク質活性を自在に操る光制御法は、タンパク質変異体発現やRNA干渉では不可能であったタンパク質活性の時間空間的制御を可能とする革新的技術であり、次世代のタンパク質機能解析法として注目されている。しかし、現状ではレーザー顕微鏡での条件設定を含め技術的難度は高く、安定した結果は得られにくい。我々は、この難点を克服すべく、水銀アーク光源の電動蛍光顕微鏡をベースとしたタンパク質活性光制御装置を開発し、安価で操作が簡便でありしかも安定した結果が得られるようなタンパク質機能解析システムの構築を目指す。

タンパク質活性光制御法に対応するアーク光源励起蛍光顕微鏡とイメージングソフトをベースとした光制御システムは、我々に

よって初めて提案されたものでありチャレンジ性に富む。従来は、共焦点レーザー顕微鏡でのフォトブリーチング機能で細胞の特定領域にレーザーをスキャン照射し、光制御を行っているが、レーザースキャンでは、スキャン速度、レーザー強度など条件設定が困難で、照射面積が広いと時間がかかる、実際に光が当たっている時間が分からないなど様々な問題があった。本応募は、これらの問題を解決し、条件設定が簡単で安定した結果を得ることを可能とする普及型システムの構築を目指すものである。これと類似する技術としては、蛍光顕微鏡に光刺激専用レーザー搭載し、ソフトウェアで照射部位をコントロールするMosaicというシステムが米国フォトリックインストゥルメンツ社から市販されているが、レーザー顕微鏡同様に非常に高価であり、ほとんど普及していない。このシステムは、従来のフォトブリーチングやフォトアクチベーション法を想定して作られたものであり、強力なレーザー照射や任意の形状で領域選択ができるなどの利点があるがタンパク質活性光制御法には無用の機能であるため、我々は、より安価で簡便かつ合理的なシステムを開発する。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞培養と遺伝子導入

細胞: RAW264マクロファージ(理研細胞バンク)を、10%牛胎児血清を加えたダルベッコ変法イーグル培養液中にて37℃、5%CO<sub>2</sub>環境下で培養した。他、一部の実験では、PC3前立腺がん細胞を使用した。

プラスミド: pTriEx-mCherry-fused LOV2 (Leu404-Leu546)-Rac1(11e4)-Q61L/E91H/N92H (mCherry-PA-Rac1)は Addgene (Cambridge, MA)から、pYFP-actinは Dr Joel Swanson (University of Michigan)から入手した。

遺伝子導入: 細胞は、Neon nucleofection system (Invitrogen)を利用し核内へのDNA導入を行い、25mm径円形カバースリップ上に培養した。遺伝子導入12-24時間後、カバースリップをAttoflour cell chamber (Invitrogen)に組み入れ37℃に温めた Ringer's buffer (155 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM glucose, 0.5 mg/ml bovine serum albumin and 10 mM HEPES at pH 7.2)を0.5 - 1.0 mlを入れてライブセルイメージングに供した。

細胞は倒立顕微鏡ステージ上の加温ステージチャンバー(東海ヒット, INU)で37℃に維持した。

(2) タンパク質活性光制御法に適合する蛍光顕微鏡システムの構築

顕微鏡は、電動蛍光視野絞りを備える倒立型電動顕微鏡(Leica DMI6000)をベースとして利用した。励起光源は、水銀のアーキ放電による発光を利用した高輝度、省電力、長寿命の超高圧水銀アーキランプ Osram HXP R 120 W/45C VIS を内蔵する Leica EL6000 を外部光源として用いた。Leica EL6000 は、12.5%, 25%, 50%, 100%の4段階で出力調整が可能で光ファイバにより顕微鏡内へ導入後、さらに Fluorescence Intensity Manager により5段階 ND フィルター(10%, 17%, 30%, 55%, 100%)の電動ホイールにより励起波長ごとに光量を調節することができる。

顕微鏡に内蔵されている電動の励起光絞りは、円形と四角形があり、サイズは5段階で選択できるようになっているが、細胞の局所照射(Local photoactivation)には最少径(10  $\mu\text{m}$ )の円形絞りを、全面照射(Global photoactivation)には最大径の絞りを選択することとした。蛍光フィルターキューブは、シアン蛍光タンパク(CFP)フィルター、緑色蛍光タンパク(GFP)フィルター、赤色蛍光タンパク(RFP)フィルター、イエロー蛍光タンパク(YFP)フィルターを電動ターレットに備え高速回転(約0.1秒)で波長チェンジさせ、photoactivationの波長、画像取得用の蛍光波長にあわせて選択した。照射光強度、絞りサイズ、蛍光フィルターは、MetaMorph イメージングソフトの機能を用いPCから連動制御した。

透過光(ハロゲン光源)には、高速シャッターを備え、位相差像撮影時のみ開く設定とする。透過光の光路には、530 nm-ロングパスフィルターを挿入することにより、LOV 感受性光をカットした。

対物レンズは100倍プランフルオール位相差または100倍プランアポDIC油浸レンズを用いた。画像取得には高感度 CMOS デジタルカメラ(浜松ホトニクス Orca Flash2.8)を使用した。

### (3) マクロプログラムの構築

MetaMorph Imaging system (Molecular Devise)において、アプリケーションソフトウェアでの作業を自動化するマクロプログラミング(ジャーナル機能)を用いて以下の作業が自動で行われるように構築する。

透過光源シャッターを開き、明視野画像を取得(0.05秒間)

透過光源シャッター閉じる

光絞り視野全開、指定した励起で蛍光画像取得(0.1~0.2秒間)

蛍光絞り視野制限(サイズ小)、CFP 励起照射(画像取得のインターバルの間に指定の秒数で継続光照射)

MetaMorphの'Enter Variable'コマンドにより4つのポップアップメニュー;

'Wavelength of photoactivation (PA)', 'Duration of photoactivation', 'Power of PA', 'Area of PA'を作成し、'Multi-Dimensional Acquisition'の'Acquire'ボタンをクリックすると自動的に上記のポップアップメニューが現れ photoactivationの光の波長、秒数、強さ、照射範囲の選択を順次入力し、OK ボタンをクリックするとからの作業が繰り返されて、15秒間隔での明視野画像、蛍光画像のタイムラプス取得とそのインターバル中に指定した光照射刺激を自動的に行う。

我々が作成した MetaMorph のマクロプログラム(journal file)は、発表論文(Araki et al. Microscopy, 2014)の supplementary information として以下のサイトに公開した。

[http://jmicro.oxfordjournals.org/content/suppl/2014/01/18/dfu003.DC1/dfu003supp\\_data1.txt](http://jmicro.oxfordjournals.org/content/suppl/2014/01/18/dfu003.DC1/dfu003supp_data1.txt)

[http://jmicro.oxfordjournals.org/content/suppl/2014/01/18/dfu003.DC1/dfu003supp\\_data2.txt](http://jmicro.oxfordjournals.org/content/suppl/2014/01/18/dfu003.DC1/dfu003supp_data2.txt)

このファイルを text ファイルでダウンロードし、拡張子を journal ファイル(.jnl)に変更すれば本研究で使われている同じ装置環境でそのまま利用できる。

## 4. 研究成果

(1) PA-Rac1 の光制御実験と至適条件の決定

RAW264 マクロファージ細胞に mCherry-PA-Rac1 を Neon 遺伝子導入装置で核内遺伝子導入し 12-24 時間後、上記イメージングシステムを用いて Rac1 活性化光制御実験を行った。蛍光顕微鏡観察により mCherry-PA-Rac1 を発現する細胞を赤色蛍光で確認し、照射領域のサイズ、照射光の強さ、照射時間を変化させて光制御実験を行い、安定して光活性化できる条件を探索した。

以前に我々が行った共焦点レーザー顕微鏡での PA-Rac1 の研究(Fujii et al. Sci Rep 2013)では、photoactivation のレーザーパワーは、通常の蛍光ブリーチングよりかなり弱いパワーで十分な効果がみられ、逆に強いレーザーではうまくいかないことが多かった。水銀アーキ光源を使った今回の顕微鏡の場合でも、最も弱い出力設定(最大出力の1.25%)で PA-Rac1 photoactivation が認められた。出力を12.5%まで段階的にあげても活性化の効果にはあまり変化は認められなかったが、25%以上になるとしばしば活性化が起こせなくなることがあった。そこで、我々の

実験では、2.5%の出力の photoactivation 照射を標準設定とした。360-500 nm の波長の光に反応することが知られている LOV を用いた PA-Rac1 活性化には、CFP 励起フィルターが最も効果的であるが GFP 励起フィルターでも PA-Rac1 活性化が認められた。しかし、YFP 励起フィルター、RFP 励起フィルターでは活性化は殆ど認められなかった。

照射時間は、2~3 秒でも、photoactivation の効果がみられたが、この活性化は一時的であり、数秒から数十秒でもとの状態に戻ると考えられているため、15 秒間のインターバルで 10 秒間の照射を行った。

### (2) 視野全体照射での PA-Rac1 global photoactivation

ガルバノミラー方式の共焦点レーザー顕微鏡では、広範囲のエリアを photoactivation するにはレーザーでスキャンする時間がかかり全視野を一度に照射することはできない。水銀光源の蛍光顕微鏡では、蛍光視野絞りを開くことで視野全面に一度に photoactivation の光を照射することができるというメリットがある。

我々が構築した顕微鏡システムで mCherry-PA-Rac1 を発現した RAW マクロファージに画像取得の 15 秒インターバルの間に 10 秒間全視野光刺激 (Global PA) を行うと CFP 励起光照射開始 30 秒から 1 分で細胞の背面側表面全体にラッフル (波状突起) 形成が観察された。ラッフルは、photoactivation を続けている限り持続して観察されたが (Fig. 1)、photoactivation の光照射を止めると 1~2 分で消失した。

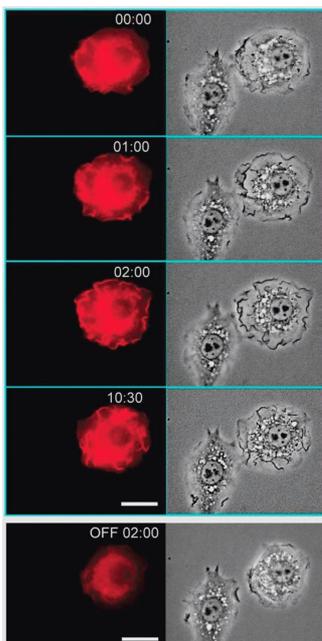


Fig. 1 .Global photoactivation of PA-Rac1. mCherry- PA-Rac1 (left), phase-contrast images (right). Scale bar= 10  $\mu$ m (Araki et

al. Microscopy 2014 より引用)

一方、mCherry-PA-Rac1 を発現していない細胞は、同じように photoactivation の光照射を受けても全く反応せず、ラッフル形成は認められなかった (図 1 の左の細胞)。これらの結果は、PA-Rac1 が CFP 励起光照射によって活性化され、Rac1 依存性の細胞運動であるラッフル形成が細胞全体に誘起されたことを示している。

### (3) PA-Rac1 の local photoactivation

CFP 励起光照射時に 10  $\mu$ m 径の円形絞りを選択することで mCherry-PA-Rac1 発現 RAW264 細胞の一部領域だけを photoactivation を行うと、照射した領域のみにラッフル形成が誘導された (Fig. 2)。

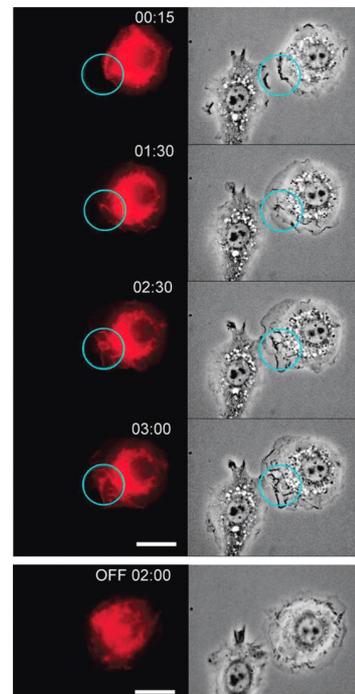


Fig.2. Local photoactivation of PA-Rac1. mCherry-PA-Rac1 (left), phase-contrast images(right). Scale bar= 10  $\mu$ m (Araki et al. Microscopy 2014 より引用)

Rac1 の活性化はアクチンの重合、集積を起こすことによりラッフル形成を行うと考えられている。そこで mCherry-PA-Rac1 と YFP-actin を共発現させた細胞で局所に photoactivation を行ったとこと、予想通り光照射した領域にはラッフル形成と同時に多くの YFP-actin の集積することが確認された (Fig. 3)。このように、この顕微鏡システムを使って細胞の局所でも可逆的に PA-Rac1 の活性を光制御することが証明された。

mCherry-PA-Rac1 を発現させた PC3 前立腺がん細胞においては、細胞辺縁への local photoactivation によりラメリポデ

ィア（葉状義足）伸展が誘起され、Rac1 依存性のラメリポディア伸展機構の分子メカニズム解析にも利用することができた。

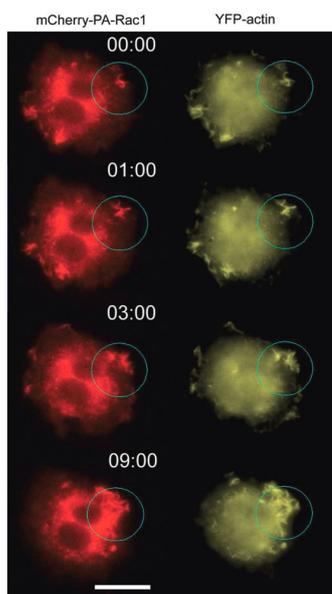


Fig.3. Local photoactivation. mCherry-PA-Rac1 (left), YFP-actin (right). Scale bar= 10  $\mu$ m (Araki et al. Microscopy 2014 より引用)

#### (4) オプトジェネティクス蛍光顕微鏡システムの利点

本研究で開発されたオプトジェネティクス蛍光顕微鏡システムの利点は、市販の電動蛍光顕微鏡を利用しソフトウェアのマクロプログラミングだけで構築されるため通常のライブセルイメージング用顕微鏡システムの初期投資だけで済み研究室単位での設置が可能である。また、レーザースキャンのように実際に細胞にあたる光照射時間や強さの設定が複雑でなく、条件設定が簡単に行える。さらに光刺激用励起フィルターを変更するだけで、異なる励起波長のオプトジェネティクスプローブや緑色光照射で活性酸素（ROS）を産生する KillerRed を用いた chromophore-assisted light inactivation (CALI)にも容易に対応でき、汎用性、拡張性の高いオプトジェネティクス顕微鏡システムとして利用されることが期待される。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Dissecting the roles of Rac1 activation and deactivation in macropinocytosis using microscopic photo-manipulation. Fujii, M., Kawai, K., Egami Y., Araki, N.: Scientific Reports 3, 2385, (2013) doi:10.1038/srep02385 査読有

2. Araki, N., Ikeda, Y., Kawai, K., Egami, Y., Miyake, K., Tsurumaki, N., Yamaguchi, M.: Development of an automated fluorescence microscopy system for photomanipulation of genetically encoded photoactivatable proteins (optogenetics) in live cells. Microscopy 63, (2014) doi: 10.1093/jmicro/dfu003 査読有

3. Kato, T., Kawai, K., Egami, Y., Kahehi, Y., Araki, N.: Rac1-dependent lamellipodial motility in prostate cancer PC-3 cells revealed by optogenetic control of Rac1 activity. PLOS ONE, in press, (2014) 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Araki, N., Fujii, M., Kawai, K. and Egami, Y.: Control of macropinocytosis by photo-manipulation of Rac1. 14<sup>th</sup> International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, 2012 年 8 月 26 日～29 日、京都

2. 藤井 誠, 荒木 伸一: Photo-activatable Rac1 を用いたマクロパイノサイトーシスの光制御. 第 6 回トランスポーター研究会九州部会、2012 年 9 月 1 日、福岡

3. 藤井 誠, 荒木 伸一: 光制御 Rac1 を用いたマクロパイノサイトーシス過程における Rac1 活性の役割解明. 第 65 回薬理学会西南部会、2012 年 11 月 23 日、熊本

4. 藤井 誠, 荒木 伸一: Photo-activatable Rac1 を用いてマクロパイノサイトーシスの形成・成熟過程を制御する. 第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 日～14 日、福岡

5. 荒木 伸一、川合 克久、藤井 誠、江上 洋平: Rac1 光制御により生細胞のマクロパイノサイトーシス過程を顕微鏡で操作する. 日本顕微鏡学会第 69 回学術講演会 2013. 5. 20-22 大阪府吹田市

6. 荒木 伸一、池田 結香、加藤 琢磨、川合 克久、江上 洋平、三宅 克也: 水銀アーク光源蛍光顕微鏡をベースとした photo-manipulation システムの構築.

日本解剖学会第 68 回中国・四国支部学術集会 2013.10.19-20 鳥取県米子市

7. 加藤 琢磨、川合 克久、江上 洋平、荒木 伸一、笥 善行:前立腺がん細胞移動 (migration)における低分子量 GTPase Rac1 を介した制御機構の optogenetics 解析.  
第 23 回泌尿器科分子・細胞研究会 2014. 3.14-15 山形市

8. 江上 洋平、川合 克久、荒木 伸一: Zymosan 貪食過程における Rit1 GTPase の機能解析.  
第 54 回日本組織細胞化学会総会・学術集会 2013.9.27-28 東京

9. 江上 洋平、川合 克久、荒木 伸一: Zymosan 貪食過程における Rit1 GTPase のライブセルイメージング.  
第 119 回日本解剖学会総会全国学術集会 2014. 3.27-29 栃木県下野市

10. 川合 克久、江上 洋平、荒木 伸一: ファゴゾーム成熟過程における Rab35 の役割  
第 119 回日本解剖学会総会全国学術集会 2014. 3.27-29 栃木県下野市

〔その他〕

マクロプログラム ダウンロードサイト  
[http://jmicro.oxfordjournals.org/content/suppl/2014/01/18/dfu003.DC1/dfu003supp\\_data1.txt](http://jmicro.oxfordjournals.org/content/suppl/2014/01/18/dfu003.DC1/dfu003supp_data1.txt)

[http://jmicro.oxfordjournals.org/content/suppl/2014/01/18/dfu003.DC1/dfu003supp\\_data2.txt](http://jmicro.oxfordjournals.org/content/suppl/2014/01/18/dfu003.DC1/dfu003supp_data2.txt)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

荒木 伸一 (ARAKI Nobukazu)  
香川大学・医学部・教授  
研究者番号: 10202748

### (2)研究分担者

江上 洋平 (EGAMI Youhei)  
香川大学・医学部・助教  
研究者番号: 80432780

### (3)研究分担者

川合 克久 (KAWAI Katsuhisa)  
香川大学・医学部・助教  
研究者番号: 80534510

### (3)連携研究者

三宅 克也 (MIYAKE Katsuya)  
香川大学・医学部・准教授

研究者番号: 30219745

### (4)研究協力者

加藤 琢磨 (KATO Takuma)  
香川大学・医学部・助教  
研究者番号: 7062573