

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659092

研究課題名(和文)非侵襲生体内1分子イメージング顕微鏡の開発

研究課題名(英文)Development of microscope system for single fluorescent molecule imaging in vivo

研究代表者

岡田 康志 (Yasushi, Okada)

独立行政法人理化学研究所・生命システム研究センター・チームリーダー

研究者番号：50272430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：我が国で開発された1分子イメージング技術は、これまでin vitroでの分子モーター研究などタンパク質分子機械の動作原理の解明や細胞膜表面でのシグナル伝達の研究など様々な応用される基盤技術である。しかし、全反射顕微鏡をベースとした方法であるため、カバーガラス近傍100nm程度の範囲しか観察できず、細胞内部や個体内での生命現象には適用できなかった。本研究では、ニポウディスク方式の共焦点顕微鏡と高感度低ノイズ検出器を組み合わせることで、細胞深部における1分子イメージングを実現した。さらに、新規に開発された色素と組み合わせることで、細胞深部における超解像イメージングに成功した。

研究成果の概要(英文)：Since the development of the single molecule imaging technique in Japan, it has been applied to wide areas of researches including in vitro analysis of molecular motors and single molecule measurements of signal transduction at the plasma membrane. However, this method is based on the total internal reflection microscopy, which limited its application to the region closer than 100 nm from the cover glass surface. In this project, we have tried to break this limitation and to observe single molecule deep inside the cell. By the combination of a Nipow-type confocal microscope and a high sensitivity-low noise camera, we have successfully observe the dynamics of single molecule deep inside the cell. We have further applied this technique for the super resolution imaging deep inside the cell.

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：1分子イメージング ライブイメージング ゼブラフィッシュ 蛍光ライブイメージング 蛍光顕微鏡
共焦点顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

一分子イメージングは 1990 年代末に、我が国で開発された技術である。以来、in vitro での分子モーター研究など分子機械の動作原理の解明や、細胞膜表面でのシグナル伝達の研究、さらには次世代シーケンサーへと様々に応用される基盤技術となった。

我々は、キネシン型分子モーターの運動機構の研究を通じて、独自に蛍光一分子イメージングのための顕微鏡システムを開発し、キネシンの運動の一分子計測を行ってきた。

一方、我々は、脊椎動物初期胚のライブイメージングにより、左右非対称性を決定する初期の機構を解明し、発生生物学の分野に大きなインパクトを与えた。

我々は、両者を統合して、蛍光一分子イメージング法を細胞あるいは初期胚へ応用しようと検討したが、これまでの一分子イメージング法では、細胞膜表面近傍約 100nm 程度の範囲しか観察できず、細胞の内部の現象や個体レベルのイメージングには応用できなかった。

2. 研究の目的

本研究では、顕微鏡の改良、蛍光プローブの最適化、細胞培養など試料作成条件の工夫などを組み合わせることで、細胞深部さらには初期胚の内部で蛍光一分子イメージングを可能とする実験系の構築を目指す。

3. 研究の方法

(1) 初期胚非侵襲蛍光ライブイメージングシステムの構築

我々がこれまで用いてきた初期胚ライブイメージング用の顕微鏡システムを発展させて、蛍光一分子観察用の照明系およびカメラを組み込み、観察深度と検出感度という相反する要求を満たす顕微鏡システムを構築する。

(2) ゼブラフィッシュ初期胚の自家蛍光低減

蛍光一分子観察で重要なのは、背景光を十分に低減させることである。個体レベルのイメージングでは、特に、試料由来の自家蛍光が大きな問題となる。そこで、透明で光学観察に適した脊椎動物のモデル動物であるゼブラフィッシュを用いて、自家蛍光の原因と低減策を検討する。

(3) 細胞深部・個体内での一分子計測に適した蛍光プローブの選定

前項の結果を基に、自家蛍光の影響を受けにくい波長帯で十分な蛍光強度を示す傾向プローブを選定する。

(4) 深部蛍光一分子イメージングの実現

(1)~(3)を組み合わせることで、細胞深部さらにはゼブラフィッシュ初期胚において蛍光一分子イメージングを実現する。

4. 研究成果

(1) 初期胚非侵襲蛍光ライブイメージングシステムの構築

これまで蛍光一分子イメージングで全反射顕微鏡法が用いられてきたのは、背景光を抑えるためである。全反射顕微鏡法では、カバーガラス近傍 100nm 程度の領域しか照明されないため、通常の落射蛍光顕微鏡に比べて背景光が 1/100 以下に抑えられる。

当初我々は、初期胚ライブイメージング用の顕微鏡システムに蛍光一分子観察用の照明系を組み込むことで細胞深部および個体内での蛍光一分子イメージングを試みた。しかし、背景光が高く、薄く拡がった細胞のカバーガラス付近でのみ良好な蛍光一分子像が得られるに留まり、細胞深部での蛍光一分子観察は困難であった。

そこで我々は、共焦点顕微鏡法により、光学切片効果で背景光を 1/20 以下に抑えることを試みた。しかし、一般に共焦点顕微鏡法は、背景光の除去と同時に焦点面からの信号もロスしてしまうため S/N が悪く、これまで蛍光一分子イメージングには用いられてきていなかった。私たちは、光の利用効率の高い回転ディスク式共焦点顕微鏡をベースに、背景光除去と信号減弱のバランスを最適化することで、ディスク式共焦点顕微鏡を用いた蛍光一分子イメージングに成功し、細胞深部でキネシン 1 分子が微小管に沿って移動する過程の観察に成功した(図 1)。

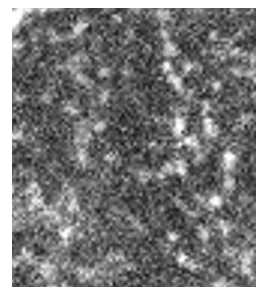


図 1. ディスク式共焦点顕微鏡を用いたキネシン 1 分子のイメージング

また、この顕微鏡を用いて、ゼブラフィッシュ初期胚におけるアセチル化ヒストン(H3K9ac)の動態のライブイメージングを行った(Sato et al., Sci Rep 3:2436, 2013, 図2)

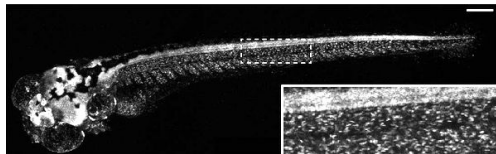


図 2. ゼブラフィッシュ初期胚におけるアセチル化ヒストン(H3K9ac)動態のライブイメージング

(2) ゼブラフィッシュ初期胚の自家蛍光低減

ゼブラフィッシュは、その名前の通り3種類の色素細胞が表皮に帯状に並び特徴的な縞模様を作っている。このうち、黒色素胞および紅色素胞は特徴的な蛍光を発生し、虹色素胞はグアニン結晶による強い散乱を示す。このため、これらの色素胞はゼブラフィッシュの蛍光ライブイメージングの障害となり、これまでは色素胞が分化するまでのごく初期の胚しか観察することが出来なかった。我々は、色素胞を3種類とも欠く *Casper* 変異体(図3)を用いることで、この問題を解決できることを確認した。

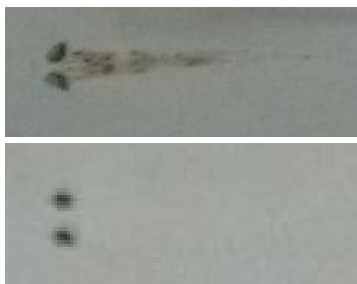


図 3. ゼブラフィッシュの稚魚
上: 野生型、下: *Casper*

(3) 細胞深部・個体内での一分子計測に適した蛍光プローブの選定

これまで細胞膜表面付近での蛍光一分子イメージングでは、EGFP など緑色の蛍光タンパク質が多く用いられてきた。しかし、青色光励起、緑色光蛍光の組み合わせは自家蛍光の影響を受けやすく、また短波長側であるため生体試料による散乱の影響も大きい。そこで、*in vitro* での蛍光一分子イメージングでよく用いられるローダミン系の色素に注目した。Halo-tag 法を用いて細胞内で標的タンパク

質を特異的にローダミン標識する方法を開発し、細胞内でローダミン標識されたタンパク質の蛍光一分子イメージングを実現した。

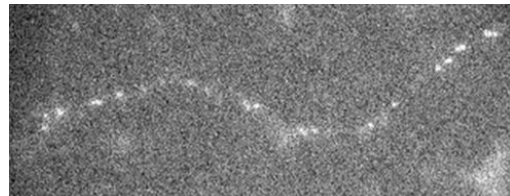


図 4. Halo-tag 法を用いてローダミン標識した tubulin の蛍光一分子イメージング

(4) 深部蛍光一分子イメージングの実現

共同研究者である浦野らによって、新規にローダミン系の色素であるシリコンローダミンが作成された。従来のローダミンより長波長化された近赤外域の蛍光色素であるため、自家蛍光の影響が更に低減された。浦野らは、さらにシリコンローダミンに修飾を加えることで自己点滅するシリコンローダミンの作成に成功した。

我々は、この自己点滅型シリコンローダミンを Halo-tag 法により標識することで細胞内部での蛍光一分子計測を行い、蛍光分子局在化法による超解像ライブイメージングに成功した。さらに、(1)で開発した回転ディスク式蛍光一分子検出顕微鏡と組み合わせることで、細胞深部(核の頂側表面)での蛍光一分子計測・局在化法による超解像イメージングに成功した(Uno et al., Nat Chem, in press, 図4)。

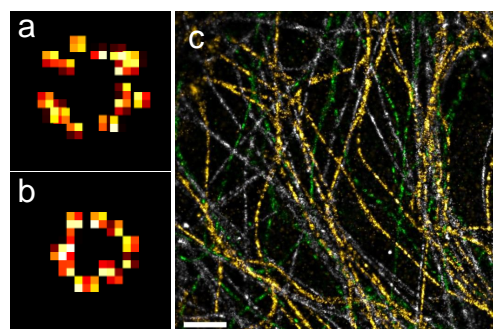


図 4. 自己点滅型シリコンローダミンを用いた核膜孔(a, b)および微小管(c)の超解像イメージング

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) S. Uno, M. Kamiya, T. Yoshihara, K. Sugawara, K. Okabe, M. C. Tarham, H. Fujita, T. Funatsu, Y. Okada, S. Tobita and Y. Urano. A spontaneously blinking fluorophore based on intramolecular spirocyclization for live-cell super-resolution imaging. Nat Chem, in press. (査読あり)

2) K. Hayashi, C.G. Pack, M. K. Sato, K. Mouri, K. Kaizu, K. Takahashi and Y. Okada. Viscosity and drag force involved in organelle transport: Investigation of the fluctuation dissipation theorem. Euro Phys J E 36: 136, 2013 (査読あり) doi: 10.1140/epje/i2013-13136-6

3) Y. Sato, M. Mukai, J. Ueda, M. Muraki, T. J. Staasevich, N. Horikoshi, T. Kujirai, H. Kita, T. Kimura, S. Hira, Y. Okada, Y. Hayashi-Takanaka, C. Obuse, H. Kurumizaka, A. Kawahara, K. Yamagata, N. Nozaki, H. Kimura. Genetically encoded system to track histone modification in vivo. Sci Rep 3; 3436, 2013 (査読あり) doi: 10.1038/srep02436.

〔学会発表〕(計 8件)

1) 岡田康志「高速・広視野・高分解能ライブセルイメージングのための超解像顕微鏡開発」日本顕微鏡学会第 70 回記念学術講演会 2014 年 5 月 13 日幕張

2) 岡田康志「超解像顕微鏡の現状と課題～補償光学への期待」若手研究者による分野間連携研究プロジェクトシンポジウムすばる望遠鏡から顕微鏡へ, 2014 年 3 月 24 日東京

3) Y. Okada “Imaging-based analyses of the intracellular navigation mechanism of molecular motor, kinesin” 第 36 回日本分子生物学会シンポジウム, 2013 年 12 月 3 日神戸

4) Y. Okada “Super-resolution live imaging of intracellular transport system”, Super Imaging 2013, 2013 年 12 月 2 日浜松

5) Y. Okada “Atomic mechanism for the intracellular navigation of molecular motor, kinesin”, Joint Weizmann-MBI mechanobiology conference, 2013 年 10 月 21 日 Singapore

6) 岡田康志「誘導放出制御法(STED)およびその他の手法を用いた超解像ライブイメージング」バイオイメージング学会第 22 回学術集会シンポジウム, 2013 年 9 月 15 日東京

7) 岡田康志「細胞内物質輸送の制御機構解明を目指した超解像ライブイメージング手法の開発」第 2 回クリニカルサミット 2012 年 12 月 25 日東京

8) 岡田康志「ライブセルイメージングのための超解像蛍光顕微鏡法」日本バイオイメージング学会第 21 回学術集会シンポジウム 2012 年 8 月 27 日京都

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 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 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

岡田 康志 (OKADA, Yasushi)
理化学研究所生命システムセンター
チームリーダー
研究者番号：50272430

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：