

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770160

研究課題名(和文)細胞内ナノ空間の分子ダイナミクス計測技術の開発

研究課題名(英文)Development of measurement technology for molecular dynamics in intracellular nanospace

研究代表者

市村 垂生(Ichimura, Taro)

独立行政法人理化学研究所・生命システム研究センター・研究員

研究者番号：50600748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：生体分子の動態を細胞内で計測することは、生命システムを理解する上で欠かせないアプローチとなっている。分子の拡散係数、濃度、化学反応速度などの量を計測する方法として、蛍光相関分光法が広く用いられている。本研究では、光の回折限界を超える分解能で蛍光相関分光計測を実現するために、新規超解像顕微鏡法の開発に取り組んだ。光スイッチング蛍光分子を用いて、蛍光状態と非蛍光状態間での遷移過程を利用した手法を提案し、100nm程度の空間分解能を実現した。従来の計測領域に比べ、10分の1以下の体積に相当する。本手法は、超解像イメージング法としても新しい方法であり、広い応用を期待することができる。

研究成果の概要(英文)：Measurement of molecular dynamics inside living cells is one of important approaches for understanding the complex system of cells. Fluorescence correlation spectroscopy have been widely used to measure some quantities related to molecular dynamics, including diffusion constant, concentration, and reaction rate. In this study, I have developed a novel methodology to realize fluorescence correlation spectroscopy with high resolution beyond the diffraction limit of light. By using transition process between radiative and non-radiative states of photoswitchable fluorescent molecules, a high spatial resolution around 100 nm has been achieved beyond the diffraction limit, which is corresponding to ten times smaller focal volume than conventional fluorescence correlation spectroscopy. This method can also be used for super resolution imaging, it has a potential for wide application in the future biology study.

研究分野：生物学

キーワード：1分子計測・操作

1. 研究開始当初の背景

細胞の生命活動を司る生体分子の動態を細胞内で計測することは、生命システムを理解する上で欠かせない一つのアプローチとなっている。分子の移動度や拡散係数、濃度、化学反応速度などの量を計測する代表的な方法として、蛍光相関分光法(FCS)が広く用いられている。共焦点光学顕微鏡の焦点スポット内で運動する蛍光分子(蛍光標識された分子)からの蛍光強度の時間的変化を計測し、その自己相関関数より動態を理解することができる。近年の生命システム解明に向けた研究に於いて、非常に重要な役割を担っている。しかしながら従来の相関分光法では、通常のレーザー走査顕微鏡に実装されるため、その計測領域(=焦点スポット)のサイズを回折限界以下にすることはできない。焦点スポットは体積にして、 $1\text{fL}(=1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m})$ 程度が下限となっていて、濃度 nM オーダーの分子が1 fLより広い空間領域で移動できることが測定の条件となる。これは細胞内計測への応用範囲を厳しく制限する。すなわち、細胞内のナノ空間に閉じ込められた分子は、場所によって蛍光強度がほとんど変化しないため、時間揺らぎを計測することが困難である。また、高濃度($1\mu\text{M}$ 以上)の分子は、焦点スポット内の分子数が多すぎて蛍光強度が平均化されてしまうため解析できない。生細胞内には、このように従来の相関分光法を適用できない条件にある分子が多種類存在する。これらの生体分子を相関分光計測するには、焦点スポットを微小化するより他にない。相関分光法の応用を広げる上で、焦点スポットの微小化は本質的な課題である。

焦点スポットの微小化は、レーザー走査顕微鏡の分解能を向上することに相当する。これまで、多くの超解像顕微鏡法が提案されているが、その中でも、蛍光分子の可逆的な光スイッチング効果を利用した方法が、最もFCSと相性がいいと考えられる。すでに超解像顕微鏡法として、STEDやRESOLFT法が提案、実現している。これらの方法では、非蛍光状態に遷移させるための光をドーナツ型にし、蛍光励起光と同軸で集光することで、集光スポット周縁部の蛍光を抑制し、蛍光放出をスポット中央部の回折限界以下の微小領域に閉じ込めることで、高分解能化を実現している。しかしながら、ドーナツ光を用いる方法では、細胞などの複雑な3次元構造内に集光する際に、ビーム形状が変形してしまうため、応用が細胞表面付近の観察に限られている。細胞内の計測に特化した、新規超解像顕微鏡法の開発が囑望されている。

2. 研究の目的

本研究では、細胞内の微小領域の蛍光イメージングおよび蛍光相関分光計測を実現するための新規超解像法を提案・実証し、要素技術確立する。さらに、提案する手法により、細胞内の微小領域での分子動態観察への応用可能性を示すことを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、顕微鏡の焦点スポットを微小化するために、可逆的に活性化不活性化する蛍光蛋白質(Photoswitchable Fluorescent Protein: PSFP)の非線形効果を利用する。通常線形的に光応答する蛍光蛋白質であるが、活性化・不活性化する際に光学応答が非線形応答になる。レーザー光を集光するとき、集光スポット内で蛍光の有効スポットは非線形性によりさらに微小になる。これにより、通常の共焦点蛍光顕微鏡よりも高い空間分解能でのイメージングが可能となる。さらに、FCSなどの相関分光と組み合わせることで、より微細な構造内で拡散を測ることが可能となる。基礎実験として、活性化光と不活性化光を搭載した共焦点蛍光顕微鏡を試作し、その分解能向上の実験的検証に取り組んだ。

4. 研究成果

予備実験として、RSFPを表面に固着した100nmのポリスチレンビーズを用い、蛍光励起領域のサイズを、空間分解能の向上により評価した。照明および検出用の対物レンズはNA=0.95の高開口数のものを用いた。この結果、通常の共焦点顕微鏡では横方向の空間分解能250nm程度で観察されたのに対して、提案する手法では最高で80nm、平均的に150nm程度の分解能を実現した。試料や照明条件により、分解能の向上の程度は異なるが、従来法に対する優位性は再現性よく観察された。焦点スポットの体積に換算すると0.01fL(=10aL)程度であり、従来の共焦点顕微鏡と比べるとおよそ0.2倍程度に縮小できたことに相当する。

細胞の観察に応用する実験に取り組んだ。ここでは、HeLa細胞の微小管にRSFPを遺伝子導入し、試料として用いた。対物レンズに光軸方向に移動できる機構を搭載することで、三次元イメージングを可能にした。HeLa細胞の微小管に対して、従来の共焦点蛍光イメージングと、提案する超解像イメージング法を比較した。この結果、超解像イメージングにより180nm程度の分解能を実現した。これは、従来法での分解能が250nm程度であったことに比べて優位な工場であると言える。また、本手法は焦点スポット外からの背景光を抑制する効果があることも確認された。すなわち、分解能の向上と信号背景光比の両方の点において有効であることを確認した。

超解像イメージングの計測で得られた知見より、相関分光法の可能性を検討した。イメージングでは、1点あたり50 μs 程度で十分な信号雑音比が得られた。細胞内のタンパク質の拡散係数はおよそ $10\mu\text{m}^2/\text{s}$ であるため、拡散係数を測ることが可能な時間分解能であると言える。本手法を用いた蛍光相関分光技術の実験的実現は、今後の大きな展開である。

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6件)

渡邊朋信、神隆、市村垂生、生体分子動態のナノイメージング、光アライアンス、24巻、2013、pp. 15-20. [査読有]

T. Ichimura, et al., Visualizing cell state transition using Raman spectroscopy, Plos ONE Vol. 9, 2014, Art. No. e84478. [査読有]

DOI: 10.1371/journal.pone.0084478

S. Higuchi, T. Ichimura, et al., Culturing of mouse and human cells on soft substrates promote the expression of stem cell markers, J. Biosci. and Bioeng. Vol. S1389-1723, 2013, pp. 434-439. [査読有]

DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.11.011

T. Yano, T. Ichimura, et al., Tip-enhanced nano-Raman analytical imaging of locally induced strain distribution in carbon nanotubes, Nature Commun., Vol. 4, 2013, 2592. [査読有]

DOI: 10.1038/ncomms3592

J. Yu, T. Ichimura, et al., Far-field free tapping-mode tip-enhanced Raman microscopy, Appl. Phys. Lett., Vol. 102, 2013, 123110. [査読有]

DOI: 10.1063/1.4799496

T. M. Watanabe, T. Ichimura, et al., Distinct Modulated Pupil Function System for Real-Time Imaging of Living Cells, Plos ONE, Vol. 7, 2012, Art. No. e44028. [査読有]

DOI: 10.1371/journal.pone.0044028.

〔学会発表〕(計11件)

T. Ichimura, Measuring cellular state with optical microscopy, Japan Taiwan Bilateral Conference on Biomedical and Plasmonic Imaging (Taiwan, Feb 25-26, 2014). [招待講演]

T. Ichimura, Observing and measuring states of living cells with optical microscopy, 1st KANSAI Nanoscience and Nanotechnology International Symposium (Osaka, Japan, Feb 3-4, 2014). [招待講演]

市村垂生、システム生物学における分光学的アプローチ、理研シンポジウム「最先端光計測とライフサイエンスの近未来 -バイオ・ラマン2017[3]-」(愛媛大学重信キャンパス, 2013年8月7日-9日). [招待講演]

市村垂生、分光超解像ナノメトリー法の開発、第三回分子モーター討論会(東京大学, 2013年7月19-20日). [招待講演]

市村垂生、渡邊朋信、生命システム解明のための光学イメージング技術の開発と応用、第7回NIBBバイオイメージングフォーラム -顕微鏡の新機軸- (基礎生物学研究所, 2012年11月26日-27日). [招待講演]

矢野隆章、市村垂生、ほか、先端増強ラマン散乱顕微鏡を用いたカーボンナノチュー

ブ内部歪みのナノ分光・イメージング、平成25年度日本分光学会年次講演会、講演予稿集(大阪大学, 2013年11月19日-21日).
渡邊朋信、市村垂生、力学パラメーターを計測する蛍光蛋白質の開発、平成25年度日本分光学会年次講演会(大阪大学, 2013年11月19日-21日).

金城純一、上江洲由晃、市村垂生、渡邊朋信、光第二高調波干渉顕微鏡による反転分極構造の観察、平成25年度日本分光学会年次講演会(大阪大学, 2013年11月19日-21日).

垣塚太志、市村垂生、池崎圭吾、藤田英明、渡邊朋信、分光ナノメトリーによる複数モーターたんぱく質のナノ動態計測、平成25年度日本分光学会年次講演会(大阪大学, 2013年11月19日-21日).

市村垂生、藤田英明、慶澤景子、渡邊朋信、力を感じて色が変わる蛍光タンパク質の開発、平成24年度日本分光学会年次講演会(東京工業大学, 2012年11月27日-29日).

吉田宗生、市村垂生、邱亮達、藤田克昌、渡邊朋信、藤田英明、ラマン分光顕微鏡を用いて細胞の分化状態を識別する、第50回日本生物物理学会年会(名古屋大学, 2012年9月22-24日).

〔図書〕(計1件)

M. Hashimoto, T. Ichimura, and K. Fujita, "CARS Microscopy: Implementation of Nonlinear Vibrational Spectroscopy for Far-Field and Near-Field Imaging," in Raman Imaging, Springer Series in Optical Sciences 168 (edited by A. Zoubir), pp. 317-346 (Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2012). [分担執筆]

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 光学顕微鏡システム

発明者: 市村垂生

権利者: 独立行政法人理化学研究所

種類: 特許

番号: 特許願 2013-148638 号

取得年月日: 2013年7月17日

国内外の別: 国内

取得状況(計2件)

名称: 近接場光学顕微鏡の信号光測定システム

発明者: 市村垂生, 矢野隆章, 井上康志, 河田聡

権利者: 科学技術振興機構

種類: 特許

番号: 特許 5270280 号

取得年月日: 2013年5月17日

国内外の別: 国内

名称：金属ナノ粒子の製造方法
発明者：市村垂生, 田口敦清, 藤井信太郎, 井上康志, 河田聡
権利者：科学技術振興機構
種類：特許
番号：特許 5372450 号
取得年月日：2013 年 9 月 27 日
国内外の別：国内

6 . 研究組織

(1)研究代表者

市村 垂生 (Ichimura, Taro)
理化学研究所生命システム研究センター・研究員
研究者番号: 50600748