

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650069

研究課題名(和文) 高速3次元一分子イメージングによる細胞質内タンパク質動態の直接観察

研究課題名(英文) Direct imaging of the dynamics of cytoplasmic proteins

研究代表者

岡田 康志 (Okada, Yasushi)

国立研究開発法人理化学研究所・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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、高速一分子イメージングにより細胞質内を自由拡散するタンパク質一分子の三次元動態計測の実現を目指して、以下の技術開発に取り組んだ。

- 1) ミリ秒程度の時間分解能を達成するための新規輪帯全反射照明系の開発と、これを利用した高感度高速顕微鏡イメージングシステムの開発。
- 2) ミリ秒観察に耐える蛍光標識・細胞調製方法の確立。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have developed the following two items to enable the three dimensional tracking of single molecule freely diffusing in the cytoplasm.

- 1) Development of the microscope system for the single molecule imaging with a few milliseconds time resolution.
- 2) Development of the sample preparation methods for the above microscope.

研究分野：生物物理学、細胞生物学

キーワード：一分子計測 キネシン 微小管

## 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。申請者は、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(Science 1999; PNAS 2000; Nature 2003)。その後、細胞内での蛍光一分子イメージングは、細胞膜上でのシグナル伝達の現場を直接観察することが出来る方法論として発展してきた。しかし、その対象は、細胞膜に結合して 2 次元的に拡散するシグナル分子や、細胞骨格などに結合して 1 次元的に運動するモーター分子などに限られ、細胞質内を自由拡散する分子の動態計測には、消退後蛍光回復法(FRAP)や蛍光分子相関分光法(FCS)などの方法が用いられてきた。

申請者らは、蛍光一分子イメージングを発展させた超解像顕微鏡法(蛍光分子局在化法)のライブイメージングへの応用を目指した開発の過程で、ミリ秒程度の高速イメージングを行うと細胞質内を自由拡散する蛍光一分子が点像として検出できることに気付いた。FCS などによる細胞質でのタンパク質の拡散係数が  $1\sim 30\mu\text{m}^2/\text{s}$  程度であり、1 ms の間に拡散で移動する距離は  $30\sim 100\text{nm}$  程度と回折限界以下であることを考えると当然の結果であるが、このことはミリ秒程度の高速蛍光一分子イメージングを行うことで細胞質中を自由拡散するタンパク質一分子の動態計測が可能であることを意味する。

## 2. 研究の目的

そこで、本申請では、ミリ秒程度の高速一分子イメージングにより細胞質内を自由拡散するタンパク質一分子の 3 次元動態計測の実現を目指した開発を行った。

具体的には、

- ① 高速 3 次元一分子イメージング顕微鏡開発

- ② ミリ秒観察に耐える蛍光標識、細胞調製方法の確立

を行った。

開発にあたっては、具体的な生物学的課題として、シグナル伝達分子 ERK、分子モーターの kinesin、細胞骨格タンパクである tubulin を対象とすることで、実際の細胞生物学的課題に適用可能な観察方法の確立を目指した。

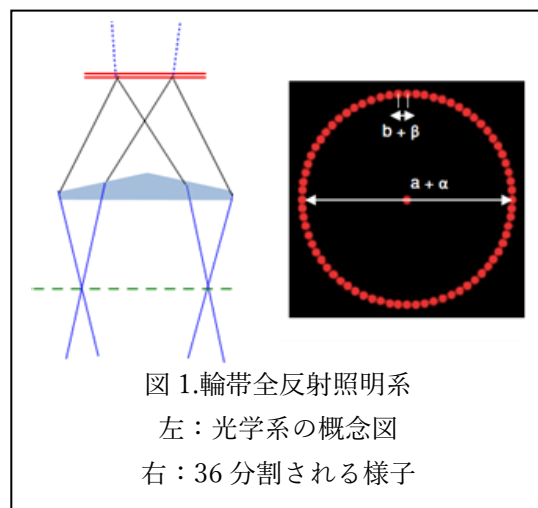
## 3. 研究の方法

高い時間分解能で十分な蛍光信号強度を達成するには、励起光密度が十分に高い全反射照明を実現する必要がある。

しかし、対物レンズの一点から励起光を入射する従来の対物レンズ型全反射照明光学系では、対物レンズが損傷される虞があるため、一定以上に励起光を強くすることは出来なかった。

また、励起光強度を稼ぐためにクリティカル照明を行うこととなり、強く一様に照明される視野が狭く制限される欠点があった。

そこで、本研究では、励起レーザー光を 36 分割し、対物レンズ外周から入射する輪帯状の全反射照明系を新しく開発した(図 1)。これにより、対物レンズ損傷の虞なく、広く一様に強力な照明を実現することが出来る。



さらに、この強力な照明下で光毒性を抑え、褪色も抑えるために、量子収率が高く褪色もしにくい近赤外蛍光色素を用いた細胞内タンパク質分子標識法を開発した。

#### 4. 研究成果

まず、本手法を用いて、細胞内でのキネシンの一分子計測を行い、確かに細胞質中を自由拡散するキネシン分子が1個1個個別の分子として検出されることを実証した(図 2)。

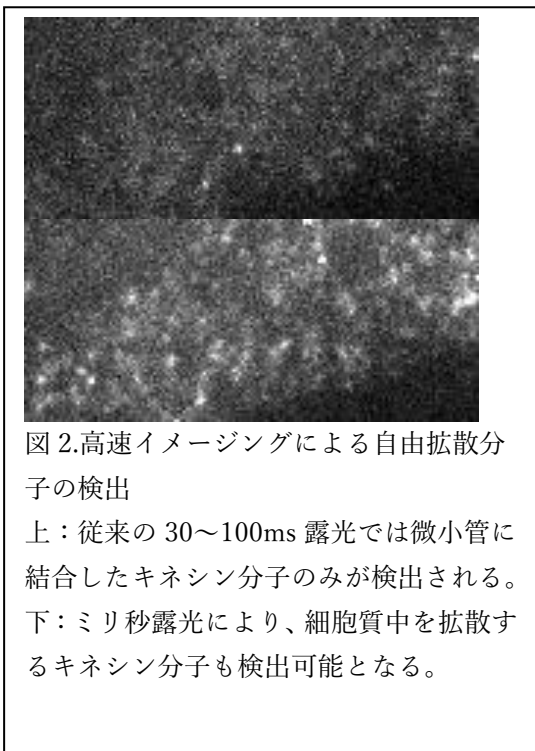


図 2.高速イメージングによる自由拡散分子の検出

上：従来の 30~100ms 露光では微小管に結合したキネシン分子のみが検出される。  
下：ミリ秒露光により、細胞質中を拡散するキネシン分子も検出可能となる。

さらに、本手法を用いて、細胞内でのキネシンと微小管の結合速度定数の直接計測が実現され、細胞内の微小管の機能分化が実証された。

また、同じ手法で、ERK の核輸送の一分子速度論解析や、ES 細胞の核内での転写因子動態の計測と細胞分化に伴う変化の計測が実現された。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 10 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 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 0 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・生命システム研究センター・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：