

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26790027

研究課題名(和文)新規光シート顕微鏡を用いた真核細胞内の1分子蛍光イメージング手法の開発

研究課題名(英文)Light Sheet Microscope Technics for a Single Molecule Imaging in Eukaryotic cell

研究代表者

西村 和哉(Nishimura, Kazuya)

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・客員研究員

研究者番号：50643186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では高次生物における1分子蛍光イメージングできる系の開発を目指して、新規の光シート顕微鏡の開発と細胞内で蛍光イメージングのアプリケーション開発を平行して行った。我々が開発した光シート顕微鏡を用いることにより、培養細胞の細胞全体において1分子の蛍光タンパク質を計測が可能となった。また、出芽酵母の遺伝子発現をmRNAレベルとタンパク質レベルで同時にリアルタイムの計測が可能となった。今後、他の細胞への応用が期待される。加えてハイスループット化により、ドラッグスクリーニングやライブラリー解析などのアプリケーションの開発を目指したい。

研究成果の概要(英文)：We developed a new light sheet microscope and measurement application of a single molecule imaging in a eukaryotic cell. As our light sheet microscope, it was able to measure the single fluorescent molecule in whole body of Mammalian cell. And we demonstrated real time imaging for simultaneous measurement of mRNA and protein expression in a yeast cell. In the future, it is expected to be applied for various cells. We will improve our microscope for high throughput applications as like Drug screening and library analysis.

研究分野：生物学

キーワード：蛍光イメージング 光シート顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

生物は様々な、そして多数の生体分子から構成されている。中でもタンパク質分子は生命現象の主要な担い手である。遺伝子上には数千から数万種類のタンパク質が存在するとされ、細胞内では、相互作用により結合して1ヶ所にとどまっておらず、解離して不規則に運動しているものもあり様々である。これらの局在・運動を直接観察し、相互作用などの物理量を計測する、1分子蛍光イメージングが1990年代に開発された。この計測手法はタンパク質の個数や相互作用や状態を1細胞内の1分子レベルで定量的に測定できることから生命現象を理解につながると期待されている。現状では計測できるタンパク質の種類、観察できる細胞の種類に限りがあるが、生物学で一般的に使われている大腸菌のような小さい細胞(数 μm)から受精卵のような大きい細胞($<50\mu\text{m}$)の中にある全てのタンパク質が可能な包括的な技術開発することで生命科学の分野が大いに進展する。

汎用的な1分子顕微鏡の広域顕微鏡(wide field)を用いて、大腸菌膜に固定された蛍光タンパク質1分子レベルで計測できる(Yu et al, science 2006)。また申請者の研究室では大腸菌のゲノム内の遺伝子のコード領域のC末端に、蛍光タンパク質遺伝子を挿入した株でほぼ全ての遺伝子についてタンパク質を定量化に成功している(図2)。広域顕微鏡では、大腸菌のように観察面に対して十分に薄い($1\mu\text{m}$ 以下)には適しているが、大きな細胞を計測した場合、観察面以外から光(背景光)がノイズとなり1分子の計測が困難である。背景光を低減して蛍光分子を1分子レベルで計測する方法としては全反射顕微鏡(TIRF)、斜光照明顕微鏡(HILO)があるが、1分子が検出できる範囲はそれぞれカバガラスより数百nm、 $10\mu\text{m}$ までとガラス近傍に限られている。近年、マウス胚の個体全体でもに対して背景光を低減される方法として、光シート照明顕微鏡(SPIM)が開発された。この顕微鏡では、図3で示したように蛍光観察に用いられる観察系と照明系の対物レンズが別々に用意されており、対物レンズの焦点面だけに励起光を照射することによって観察面以外で発生する背景光を軽減できる。この手法を用いることによって、培養細胞の核内の1分子のmRNAのトラッキングができことが報告されている(Siebasee et al, PANS 2012)。しかしながら、この手法では立体的な光の干渉によってサンプル底面の計測は困難である。SPIM以外にも計測範囲が限定されない光シート顕微鏡(Planchon et al, Nature method 2012)が開発されているが、培養液に観察用と照明用の対物レンズを浸けて観察する必要があ

り、複数サンプルの計測や長期間観察には課題が残っている。

2. 研究の目的

上記で示したように、現状の1分子蛍光顕微鏡では計測範囲やサンプル調製が限定されている。そこで本研究では、まず対象生物を選ばない1分子・1細胞計測可能な光シート顕微鏡の開発を行う。その顕微鏡を用いて、生体内1分子蛍光イメージング技術について、大腸菌内全遺伝子のプロテオーム解析手法を真核生物に拡張を行う、そしてモデル真核生物である出芽酵母のプロテオミクス解析を行う。そのために次の2つの課題を遂行する。

- (1) 真核細胞全体を高速イメージングできる顕微鏡システム開発
- (2) 細胞内を3次的に自由拡散する

3. 研究の方法

1) 細胞全体の高速イメージング

これまでの光シート顕微鏡の改良を行い、厚みのある細胞の細胞全体を計測の開発を行った。

1分子蛍光イメージングでは、蛍光強度を得るために高い開口数($NA > 1.1$)を持つ対物レンズ用いる必要があるが、レンズ高開口数の油浸対物レンズは有効な作動距離が薄く $10\mu\text{m}$ 程度である。開口数が比較的大きく、作動距離をもつ対物レンズとして水浸レンズを用いた。水浸レンズを用いることによる収差を抑えるために、水と屈折率に近い低屈折率の素材を用いた。これにより細胞全体を十分な作動距離と蛍光1分子のシグナルを検出できる感度を両立させた。

高い開口数のレンズを用いたことにより焦点深度が小さくなり、細胞全体を計測するためにステージを高速に移動させることができるペエゾステージを用いた。これによりHeLa細胞などの培養細胞でも1秒以内に細胞全体を1分子感度で計測を実現した。

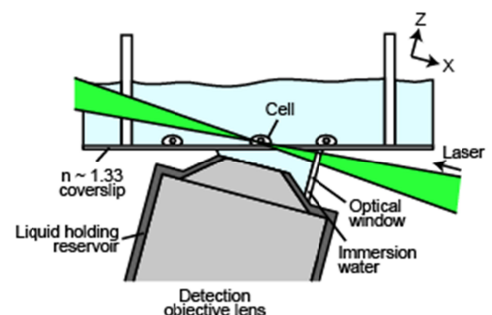


図1. 開発した顕微鏡の概略図。水浸レ

レンズを用いるために、専用のレンズキャップを製作し、液浸を保ったままステージの高速移動等を可能とした。

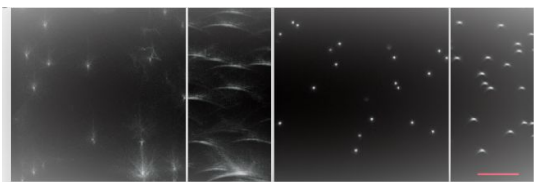


図 2. 収差の補正。上左一般的なカバーガラスを用いたときの蛍光微粒子の結像。上右屈折率が水に近いカバーガラス用いた場合の蛍光微粒子の結像。

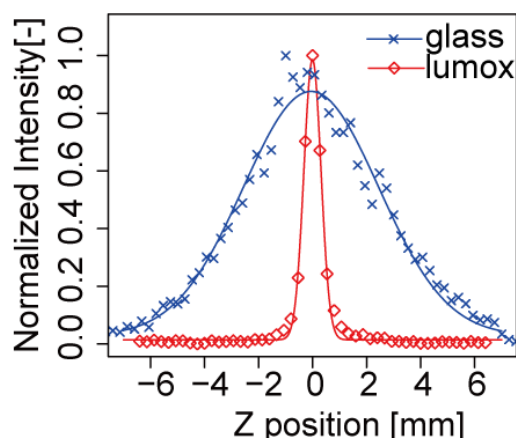


図 3 . 一般的なカバーガラスとの蛍光プロファイルの比較

2) 細胞内を自由拡散する分子を計測

細胞を最も早く動くタンパク質の例として自由拡散するタンパク質の定量方法を提案する。浮遊する分子は細胞質内を拡散によってランダムに動き回り、高速にスキャンしなければ、「同じ分子を他の平面で複数回計測」「分子が平面から移動」という恐れがある。これを解決するには、蛍光タンパク質の EGFP (細胞質内での拡散係数 $D=27 \mu\text{m}^2/\text{sec}$) の場合には 1 平面を $1 \mu\text{m}$ 間隔のスキャンを 6 ms 以内に行う必要がある。通常、イメージングでは市販の画像取得ソフトで観察位置およびカメラを制御しているが、スキャン速度の向上のため、申請者はデバイス制御プログラムを用いてステージ移動と CCD カメラの画像取得を同期させる。ここで問題になるのは 6 ms で十分な蛍光量を回収できるかである。その対策として十分な蛍光強度を得るためにラベルに用いている蛍光タンパク質を工夫する。具体的には遺伝子レベルで複数個の蛍光タンパク質つなげることで蛍光強度を強くする。また蛍光タンパ

ク質を複数個つなげることで拡散速度も低下することが報告されており (Hihara et al, Cell 2012)、長い露光時間でも 1 分子を静止した状態で検出することも期待できる。

3) 自家蛍光と蛍光分子の区別

細胞が持つ自家蛍光と蛍光分子を区別するために光スイッチ付きの蛍光タンパク質を用いた。光スイッチ付きの蛍光タンパク質は紫外光で刺激すると、吸収スペクトルと蛍光スペクトルが変化し、緑色蛍光から赤色蛍光にシフトする特性がある。これを利用して、光刺激を与えない状態で、まず自家蛍光物質のみを退色させる。この後、蛍光タンパク質を光刺激を行い赤色蛍光にシフトさせ、細胞内で蛍光タンパク質のみを検出する。これにより、目的とするタンパク質の検出が期待できる。

4. 研究成果

【平成 26 年度】

1 分子蛍光イメージングはタンパク質の直接観察することによって、タンパク質の運動、局在、相互作用を定量的に評価でき、あらゆる生命の現象の理解につながると期待されている。しかしながら、計測可能な細胞、タンパク質の種類には限りがある。本研究では厚みのある真核細胞全体を 1 分子計測できる系の開発を行う。平成 26 年度は研究代表者が開発した新規の光シート顕微鏡でモデル真核細胞である出芽酵母内にあるタンパク質の 1 分子レベルでの定量化を実施した。これまでは出芽酵母では自家蛍光を有しており通常の蛍光タンパク質ではシグナルが自家蛍光につぶれてしまう問題と、1 細胞全体を計測した場合従来の落射蛍光顕微鏡では観察面以外にも励起光があたり蛍光タンパク質が退色する問題があった。自家蛍光について、黄色蛍光タンパク質 (Venus) を 4 分子連結させ、さらに出芽酵母の細胞膜上にあるアンカータンパク質とタンデム化を行うことで自家蛍光に対して十分なシグナルを得ることができた。退色について、観察面を選択的に励起できる光シート顕微鏡の用いることによって、酵母内にあるタンパク質を 1 分子レベルで定量化に成功した。また、新規開発した光シート顕微鏡では従来の光シート顕微鏡より、サンプルの自由度が高く、1 度に複数のサンプルを計測することが可能あり、複数の酵母の遺伝子発現の時間変化を

計測した。その結果、タンパク質発現に時間的に揺らいでいるだけでなく、一過的に大量のタンパク質を発現していることが複数の遺伝子で行っていることがわかった。

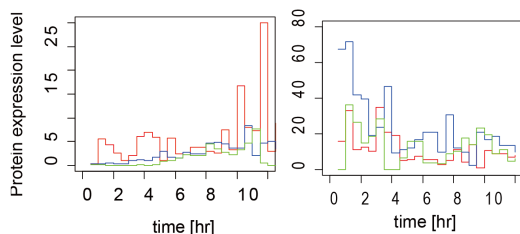


図3 出芽酵母ないでのタンパク質発現状態。左：一過的に大量のタンパク質を発現している遺伝子。右：時間的に変化している遺伝子

【平成 27 年度】

平成 27 年度では局在化しない状態での 1 分子観察を試みた。局在化しない状態では露光時間を長くすることができないため、励起光の強度を高くする施策をとった。しかしながら、シグナルとともに細胞内の自家蛍光もともに増加し観察は困難であった。自家蛍光を抑制するために、紫外光を与えると吸収波長と蛍光波長が変化する光変換型蛍光タンパク質の特性を利用した。波長変化させる前には、観察時に使う励起波長をでは励起されず退色しないので、あらかじめ細胞に自家蛍光成分を退色させてから、紫外光を照射し観察を行った。この方法を取ることで、細胞内にある 1 分子がブラウン運動している様子が計測することができた。

また、培養細胞である HeLa 細胞内でも光変換型蛍光タンパク質を用いることで 1 分子計測が可能であった。平成 27 年度では、出芽酵母および培養細胞内を自由に拡散しているタンパク質について 1 分子観察を行うことができた。

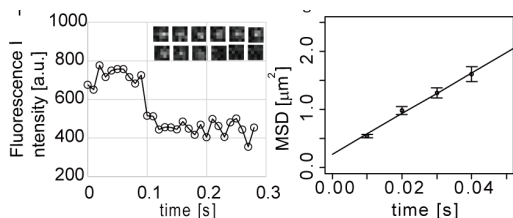


図 4 . HeLa 細胞での 1 分子計測。左一分子の蛍光分子が放つ蛍光量のトレース。右蛍光分子の移動距離と時間の関係

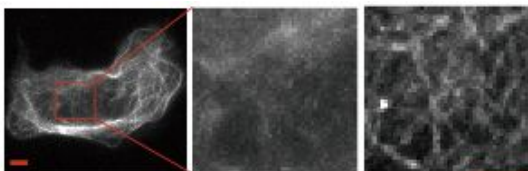


図 5 . HeLa 細胞での光変換型蛍光タンパク質を用いた 3 次イメージング。中：細胞骨格を光刺激まえに取得した画像。右：光刺激によって 1 分子ずつ蛍光観察を行いより鮮明な構造をイメージを取得できた。

【平成 28 年度】

平成 28 年度では、当初の計画では 1 分子蛍光観察のアプリケーションとして出芽酵母のプロテオーム解析の構築を予定していた。しかしながら、遺伝子組み換えの効率が著しく悪く (50%程度) であり、また C 末タグのライブラリー株の増殖速度が株ごとでことなり、管理運用上を考慮すると研究体制では実施困難と判断した。計画を一部変更し、特定の遺伝子に絞り、1 分子蛍光観察のアプリケーションとして出芽酵母内での遺伝子の転写産物である mRNA とタンパク質の同時計測する系の構築を行った。mRNA の可視化には P C P 赤色蛍光タンパク質を用いることを行った。mRNA の発現量をリアルタイムでトレースするために、P C P 蛍光タンパク質にタンパク質分解タグを用いることにより、退色の影響を受けないで恒常的に観察できる系を構築した。これにより、タグのないものより鮮明に 1 分子を観察することができた。顕微鏡下で 12 時間程度観察し、タンパク質の発現と mRNA の発現を同時に観測できた。しかしながら、分解タグの入った P C P 赤色蛍光タンパク質と mRNA を共発現させた場合に mRNA の分解に支障をきたし、論文での報告にはいたらなかった。

5 . 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

特になし

〔学会発表〕 (計 0 件)

特になし

〔図書〕 (計 0 件)

特になし

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

特になし

取得状況 (計 0 件)

特になし

〔その他〕

ホームページ等

特になし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

西村 和哉 (NISHIMURA KAZUYA)

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・客員研究員
研究者番号：50643186

(2)研究協力者

谷口 雄一 (TANIGUCHI YUICHI)
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・ユニットリーダー
研究者番号：90556276

(3)研究協力者

石田 真弓 (ISHIDA MAYU)
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・テクニカルスタッフ