

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25871144

研究課題名(和文)光第二高調波を用いた微小管構造の動的平衡の可視化

研究課題名(英文)Observation of structural dynamics of microtubules by optical second-harmonic generation

研究代表者

金城 純一(Kaneshiro, Junichi)

独立行政法人理化学研究所・生命システム研究センター・訪問研究員

研究者番号：90628471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：レーザー走査型光第二高調波(SHG)顕微鏡を用いて、液中の微小管を非染色で観察した。計測におけるノイズ源を可能な限り除去し、試験管内の再構成系および細胞内の単一微小管を鮮明に可視化できる感度を達成した。また、GTPアナログであるGMPCPP状態およびGDP-taxol状態の微小管に対して、それぞれSHG強度の偏光依存性を計測し、微小管のもつ分極状態と関連するSHGテンソルの解析を行った。その結果、2つの状態間で有意差が見出され、GTP加水分解前後で微小管構造が変化することを示す結果を得た。この結果は、過去に発表されたクライオ電子顕微鏡による構造解析の結果と一致する。

研究成果の概要(英文)：Label-free single microtubules are successfully observed both in vitro and in cells with the laser-scanning optical second harmonic generation (SHG) microscopy technique. Sufficient sensitivity to detect the SHG signal from a single microtubule with high signal-to-noise ratio is achieved by simple reduction of possible noise sources such as external SHG radiation from some optical elements, environmental light, cosmic ray. Polarization dependence of SHG intensity is measured for each of GMPCPP (analogue of GTP) bound and GDP-taxol bound microtubules to analyze their SHG tensors which are related to electronic polarization states. The SHG tensors of GMPCPP- and GDP-taxol- microtubules are statistically different, and it is indicated that the angle of a dipole moment in a tubulin heterodimer which mainly consists of alpha-helices changes through hydrolysis of GTP. The result is consistent with the already reported cryo-electron microscopy study.

研究分野：非線形光学

キーワード：微小管 光第二高調波発生 構造生物学

1. 研究開始当初の背景

細胞骨格の一種である微小管は、細胞の形状維持、分裂、運動に必要な要素である。微小管は直径約 25 nm の円筒状の構造体であり、 α チューブリンと β チューブリンのヘテロ二量体から成る構成要素が、向きを揃えてらせん状に重合したものである。チューブリンヘテロ二量体が重合することによって伸長し、脱重合することにより短縮する。重合と脱重合の動的平衡により、ダイナミックに伸縮を繰り返すことが知られており(動的不安定性)、それがチューブリンの GTP 加水分解に起因した現象であることは分かっているが、微小管の構造変化との関係は解明されていない。

微小管は、モータータンパク質であるキネシンやダイニンが、生命活動に必要な物資を輸送するためのレールとしての役割も担っている。微小管をレールとした物資の輸送には指向性があるが、キネシンやダイニンの運動活性バランスとの関係は明らかにされていない。1 つの仮説として、微小管のヌクレオチド状態に依存した構造を、モータータンパク質が識別することによって、輸送極性が生じているというものが提唱されている(文献)。上記に関連した現象として、神経細胞における微小管ヌクレオチド状態の不均一性とキネシン活性の関係が蛍光イメージングを用いて調べられている。神経細胞の分化過程は、前駆体からまずいくつかの樹状突起が形成され、そのうちの 1 つが軸索となり伸びてゆく。軸索先端部には、GTP と結合した微小管が多く存在する。また、その部分でキネシン運動活性が高まるというデータもある。

Yajima らは、クライオ電子顕微鏡を用いた観察で、微小管のプロトフィラメント軸に沿った方向、ならびに、それに垂直な面で隣り合うチューブリンの結合状態が、GMPCPP(GTP のアナログ)状態の微小管と、GTP が加水分解された GDP 状態の微小管との間で大きく異なることを明らかにし、これが GTP 状態の微小管とキネシンの結合が安定化することと関連している可能性を指摘した(文献)。一方、GTP 加水分解の前後で、チューブリン自体の構造は変化しないことも分かっており、ヌクレオチドと結合したチューブリンがコヒーレントに連なって、微小管を形成した段階ではじめて構造に変化が現れると予想される。しかしながら、微小管の構造変化を非破壊かつ液中で観察できる実験手段はこれまで無かったため、実証されていないのが現状である。

微小管の構成単位であるチューブリンヘテロ二量体は、それ自体が電氣的に非中性的で自発双極子モーメントを持っている。ゆえに、それがコヒーレントに結合して形成される微小管は巨視的な分極を持つ。Yajima らが示した、GMPCPP 状態と GDP 状態における微視的な結合状態の違いは、このような巨視

的な分極状態の違いに反映すると考えられる。つまり、巨視的な分極状態の違いをとらえることは、微視的な構造や結合状態の違いをとらえることに等しい。これを可能にする手法として、非線形光学効果の 1 つである、光第二高調波発生(Optical Second-Harmonic Generation; SHG)が挙げられる。SHG は、レーザーのようなコヒーレントで強い光が、巨視的な自発分極を持つ物質に照射された時、入射光電場の 2 乗に比例した非線形分極が発生し、それを源として入射光のちょうど半分の波長の光が放射される現象である。SHG の感受率は物質が持つ自発分極と線形にカップリングしており、非侵襲で本来の構造由来の物性を直接測定できる。これは、従来広く用いられてきた、蛍光標識を用いたイメージング法に対する、大きな利点である。微小管に起因した SHG を利用した研究は、多くはないが存在し、神経細胞を対象とした研究例もあり、Kwan らは SHG の前方散乱と後方散乱の強度比が、軸索と樹状突起で異なることを計算によって示した(文献)。一方で、*in vitro* における実験はこれまでの所、一例も報告されておらず、微小管単独での構造変化が明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究の最大の目的、および将来的に目指すことは、SHG 顕微鏡を用いて、試験管内の再構成系または細胞内で、微小管の構造ダイナミクスを実空間かつ実時間で計測することである。そのためには、顕微鏡の高感度化と高速化が必要となる。構造の不均一性および時間的ゆらぎを解明するためには、可能な限り単一微小管で計測できることが好ましいが、単一微小管の SHG 信号強度は、これまで報告されてきた、神経細胞突起のような微小管束に比べて、100 分の 1 以下に弱まってしまふことが予想される。これは、SHG 強度が分子密度の二乗に比例するためである。特定の標識を用いない SHG 計測では、人為的に強度を高めることが困難なため、顕微鏡の高感度化を行うためには、背景光を可能な限り低減することが命題の一つとなる。そこで、本研究では、*in vitro* 計測において背景光を下げ、信号/ノイズ比を上げることを第 1 の目的とした。次に、高感度化した SHG 顕微鏡を用いて、微小管のもつ分極状態に関連する SHG 強度の偏光依存性を取得し、そのヌクレオチド状態依存性を計測することを第 2 の目的とした。

3. 研究の方法

(1) SHG 顕微鏡の基本光学系

励起光には、波長 810 nm、パルス幅 200 fs、繰り返し周波数 80 MHz の Ti:Sapphire レーザーを用いる。励起レーザーは、40 倍、NA = 0.95 の対物レンズを用いて試料に集光する。SHG 強度を画像化するために、ガルバノスキャナおよびリレー系を用いて、試料上でビームを

走査する。試料から発生した SHG 信号のうち、前方散乱光(透過方向)を、100 倍、NA = 1.45、油浸の対物レンズに通し、中心波長 405 nm、幅 10 nm のバンドパスフィルタおよび偏光ビームスプリッタを透過させた後、光電子増倍管(単一光子計測モジュール)を用いて検出する。

(2) SHG 顕微鏡観察の高感度化

先に述べたとおり、SHG 計測の高感度化を行うためには、ノイズレベルを下げる事が重要である。SHG 計測において、ノイズ源となり得るものには、例えば偏光制御に用いる偏光子や波長板等の光学素子から発生する SHG 信号が挙げられる。このようなノイズ源を全て洗い出し、1つ1つを着実にカットし、超高感度顕微鏡を実現する。

(3) SHG 偏光依存性計測の高速化

開発中の SHG 顕微鏡は、半波長板を機械式回転ステージに固定し、回転させることで偏光制御を行っていたが、この方式は、十分な構造解析を行えるデータを取得するのに、数十分から1時間以上を要する非効率なものであった。そこで、高速電気光学変調器(EOM)を導入し、数 kHz で偏光を変調できる光学系を構築する。

(4) 単一微小管の SHG 偏光依存性計測と解析

(2)および(3)で高感度化・高速化を果たした SHG 顕微鏡を用いて、微小管の *in vitro* 計測を行う。試料は、2枚のカバーガラスで挟み込んだ、幅 1~2 mm の流路上に、ポリリジンを用いて固定する。この時、全ての微小管の方向を同一にそろえるために、流路体積の 5 倍から 10 倍容量のバッファを一定速度で流す。微小管試料は、GTP 状態として、GTP のアナログである GMPCPP を用い、GDP 状態として、GDP-taxol を結合させた 2 種類の試料をそれぞれ作成し、予め十分な長さ(数 μm 以上)になるまで重合させてから、ガラス上の流路に流し込んだ。試料溶液を封入したガラスは、顕微鏡ステージ上に磁石を用いて固定し、振動等で動かないようにする。微小管方向(Z)を基準として 0 度、30 度、60 度の偏光を入射させ、それぞれの入射偏光に対して、微小管軸に平行(Z)および垂直(X)な偏光成分の SHG 強度を個別に検出し、これを微小管の SHG 偏光依存性とする。

4. 研究成果

(1) SHG 顕微鏡の高感度化と単一微小管観察

考えられたノイズ源のうち、(i)環境光に関しては、実験室を暗室とし、顕微鏡ステージ周りおよび検出器周りを黒い厚紙で作成したボックスで覆うことで、光子計数におけるダークカウントをおよそ 10/秒まで落とすことに成功した。次に、(ii)光学素子から発生す

る SHG に関しては、素子に用いられている材料を詳細に検討した結果として、SHG 活性のある光学素子は EOM に用いられている KDP 結晶のみであることが分かった。そこで、EOM 通過後の光路上に、近赤外光を透過し、可視光を反射するロングパスフィルターを設置した。これにより、EOM から発生する SHG 光を 99.999%以上カットした。最後に、(iii)試料溶液を封入するカバーガラスに関する検討を行った結果、フェムト秒レーザーのような高強度パルスレーザーを用いた場合に発生する、光誘起 SHG 現象が、本研究の実験でも生じていることが分かった。基礎実験の結果、この光誘起 SHG は、レーザー強度に依存するある照射時間以下では、ランダムノイズのように振る舞うことが明らかになった。本研究では、ガラスから発せられる光誘起 SHG は、ガラスの含む不純物が原因であると予想し、不純物がほとんど含まれない合成石英のカバーガラスを特注し、それまで用いていた市販の硼珪酸ガラスとの比較を行った。その結果、合成石英では、硼珪酸ガラスに比べて光誘起 SHG の強度が 5 分の 1 以下に落ちることが分かり、これによって、信号/ノイズ比を 5 倍以上に高めることに成功した。

上記の成果により高感度化を果たした SHG 顕微鏡を用いて、カバーガラス内の単一微小管像の撮影を行ったところ、回折限界に近い 300 nm 程度の空間分解能で、微小管を可視化することに成功した。さらに、石英ガラス上に、Taxol と Triton X-100 を用いて固定した MDCK 細胞の SHG 顕微鏡観察を行った結果、細胞内の間期微小管の配列構造を鮮明に観察することに成功した。間期微小管からの SHG 強度は、微小管束から構成される紡錘体と比較して、10 の 3 乗から 4 乗程度微弱であることが分かった。

(2) 単一微小管の SHG 強度の偏光依存性測定と解析

前述の方法で、GMPCPP 状態と GDP-taxol 状態の微小管に対して SHG 強度の偏光依存性を測定した。統計解析の結果として、微小管軸に垂直な偏光(X)成分で有意差が見られた。また、X 偏光成分の最大強度は、微小管に平行な偏光(Z)成分の最小強度よりも一桁以上小さいことが分かった。次に、この結果を解析するために、微小管の SHG 偏光依存性を説明する物理モデルの構築を行った。微小管のもつ巨視的な分極は、チューブリン二量体のもつ永久双極子モーメントのコヒーレントな足し合わせで表現できる。SHG の偏光依存性を特徴付ける SHG テンソルも、同様にチューブリン二量体のもつ、非線形分極率のマクロな領域での積分値として表される。本研究では、微小管の構造対称性を円筒対称で近似し、巨視的な SHG テンソル成分を導出した。その結果として得られた独立な 2 成分である d_{31} および d_{33} は、チューブリン二量体

の双極子モーメントが微小管軸と成す角度に依存することが分かった。また、当モデルは、過去にコラーゲンや筋繊維の SHG 偏光依存性解析で用いられてきたものと同じのモデルであることも分かった(文献)。このモデルを、実験結果と照合した結果、微小管軸に平行な方向の偏光(0 度)を照射した際の SHG 強度(X 偏光成分)が、モデルではゼロとなるのに対して、実験結果では GMPCPP 状態、GDP-taxol 状態ともにゼロでない有限値となっている点で異なった。この理由として、以下の様な考察を行った。一般に、電磁波がレンズを透過する際、試料上および検出の座標系(X, Z)と、光線の進行方向とレンズ面で定義される p 偏光・ s 偏光の座標系が異なるため、レンズ透過後に偏光がわずかに回転する。この効果は、レンズの NA が高いほど大きくなる。本研究で検出に用いている対物レンズ(NA=1.45)は十分に高い NA をもつと言え、レンズ透過時に偏光回転が起こっている可能性は無視できない。回転した偏光がビームスプリッターで Z 成分、 X 成分に分割される際、本来は Z 成分であるものの一部が X 成分に“漏れ込む”現象が生じる。前述の通り、 Z 成分は X 成分の 10 倍以上強い場合、 X 成分に漏れ込んだ Z 成分が、本来の SHG 偏光依存性を歪ませたと考えることが出来る。この考察に基づき、球面収差の無い、理想的なレンズを仮定した光学系モデルを用いてシミュレーションを行った結果、SHG 偏光依存性の実験結果を、定性的には再現することに成功した。

以上をまとめると、本研究により次の 2 つの成果を上げることができた。(i)レーザー走査型 SHG 顕微鏡の高感度化を行い、試験管内および細胞内の単一微小管を可視化することに成功した。(ii)単一微小管の SHG 強度の偏光依存性を計測し、GMPCPP 状態と GDP-taxol 状態間に有意差を見出した。これによって、SHG を用いて液中で微小管構造の判別および時空間ゆらぎを計測できる可能性を示した。今後、顕微鏡のさらなる高感度化・高速化・高効率化、あるいは抜本的な計測法の改良を行い、微小管構造解析のための実用的な手法として確立させるべく、開発を継続していく予定である。

<引用文献>

- T. Nakata et al., J. Cell Biol. **194**, 245 (2011).
H. Yajima et al., J. Cell Biol. **198**, 315 (2012).
A. C. Kwan et al., PNAS **105**, 11370 (2008).
S. V. Plotnikov et al., Biophys. J **90**, 693 (2006).

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)

[学会発表](計 4 件)

金城 純一、「無標識で単一微小管を可視化する SHG 顕微鏡技術」、理研シンポジウム「第 4 回分子モーター討論会」、大阪大学吹田キャンパス、2014 年 6 月 27 日

金城 純一、島 知弘、岡田 康志、渡邊 朋信、市村 垂生、「SHG による細胞内単一微小管の無標識観察と微小管構造変化の解析」、第 66 回日本細胞生物学会大会、AW-6、奈良県新公会堂、2014 年 6 月 11 日

金城 純一、島 知弘、岡田 康志、渡邊 朋信、市村 垂生、「SHG による細胞内微小管の非染色観察」、理研シンポジウム「細胞システムの動態と論理 VI」、理研和光キャンパス(埼玉県和光市)、2014 年 4 月 3・4 日

Junichi Kaneshiro, Tomohiro Shima, Yasushi Okada, Taro Ichimura, Tomonobu M. Watanabe, “Label-Free Observation of Single Microtubules by Means of SHG Microscopy”, Biophysical Society 58th Annual Meeting, 1772-Pos, San Francisco, California, USA, February 17, 2014

6. 研究組織

(1)研究代表者

金城 純一 (KANESHIRO, Junichi)
理化学研究所・生命システム研究センター・
訪問研究員
研究者番号：90628471