

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640132

研究課題名(和文) 高速・高精細三次元1分子測定システムの開発

研究課題名(英文) Development of High-speed, High-resolution 3D Single-Molecule Measurement System

研究代表者

舟橋 啓 (Funahashi, Akira)

慶應義塾大学・理工学部・准教授

研究者番号：70324548

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)：細胞分裂過程における微小管動態の制御機構は未だ明らかにされていない点が多く、これを明らかにする上で3次元的な微小管動態を定量的に評価することが重要である。しかし、現行の顕微鏡システムでは焦点移動における技術的な問題から分裂期微小管動態の解析が困難であった。本研究課題では電気式焦点可変レンズ(ETL)を顕微鏡に組み込むことで分裂期微小管動態の3次元解析を可能とするトラッキングシステムを構築し、分裂期微小管動態の3次元トラッキングを行い、平均速度及びlifetimeを算出した。今後の展望として、長時間観察を可能とする実験系の構築、微小管動態の観測による紡錘体結合タンパク質の機能解析が挙げられる。

研究成果の概要(英文)：Although cell division is a well-known physiological event and historical target of biological research, the molecular mechanisms remains poorly understood area of biology.

Quantification of the microtubule dynamics in 3D is a key to reveal the mechanisms. However, due to the physical constraints of samples or the microscope objective in the 3D, conventional microscopes are not suitable for 3D analysis of microtubules. We solved this problem by attaching Electrically tunable lens (ETL) to the microscope and using the ETL as a focusing device.

By using our system, we measured the microtubule dynamics in mitosis and acquired quantitative data. The mean value of growth speed at 3D was statistically faster than the 2D result, on the other hand, there was no significant difference between the lifetime of at 3D analysis and 2D analysis because of the quick bleach of fluorescent proteins.

We are planning to improve the experimental method to achieve long time analysis of the microtubules.

研究分野：定量生物学

キーワード：1分子計測 コンピュータ制御 画像処理

### 1. 研究開始当初の背景

すべての生物は、細胞分裂というイベントを正常に繰り返すことにより、種の維持、発生、または健康状態を維持することができる。真核生物の場合、この細胞分裂の過程で2つの大きな作業が行われる。一つは染色体、すなわち遺伝情報の分割、もうひとつは細胞質、すなわち代謝・シグナル伝達系の分割である。二大イベントで共に中心的な役割を果たす存在が細胞骨格である。これらの内、微小管は染色体の分離においてダイナミックに運動しながらその役割を果たす。微小管上には多くのタンパク質複合体が存在し、そのいくつかは、微小管の伸長に必要なチューブリン分子のリクルートやガイダンスの役目を果たしている。この複合体は plusTip と呼ばれ、微小管の伸長する先端(プラス端)に結合している。この複合体を蛍光などでラベルすると、微小管の伸長・縮退の様子が観察可能となり、二次元では具体的な伸長速度等が計算できるようになった。しかしながら、微小管が最もダイナミックな動きを見せる分裂期の細胞では、細胞に厚みがあるため Z 軸方向への動きを考慮せずに複合体の動きを正確に追うことは難しい。染色体分配の不正確さに依存して発生する癌などの疾病の背後に有るメカニズムを突き止め、コントロールするためには、分裂期の細胞における細胞骨格を始めとした細胞分裂マシンのダイナミクス解析は避ける事の出来ない重要なテーマである。

これまで、厚みのある観察対象において微小管成長端のような速い動きをする分子の軌跡を正確に三次元で追う技術は確立されていない。二次元画像での測定、解析が広く普及している一方で三次元画像の測定が困難な理由として主に以下の2点が挙げられる。

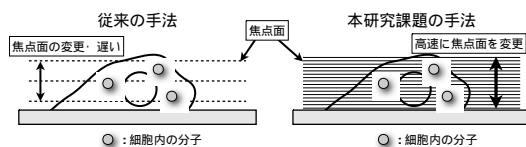
- (1) 共焦点顕微鏡を用いた場合、細胞の厚み方向に焦点面をずらしながら断層画像を撮影した後、三次元再構成を行う手法が提案されているが、リニアガイドとステップモーターを用いて細胞の厚み方向を変化させるため構造上厚み方向の分解能が低く、詳細な三次元再構成が困難であること
- (2) 電子顕微鏡を用いることで高精度な三次元測定が可能となるが、細胞を固定し薄片に切断する必要があり、細胞内の分子反応、時間的な変化を測定することが不可能であること

細胞内分子動態の時空間的な変化を測定するためには、細胞を固定し切断する電子顕微鏡を用いることは出来ない。一方で、共焦点顕微鏡を用いた測定は二次元画像の測定の場合、サンプリングレートを数百 Hz まで高めることが可能であるが、上述する1.の理由により分解能が低く、更には標本(細胞)を Z 方向に移動させる必要があるため時間分解能も低くなる問題点がある。近年、共焦点顕微鏡とピエゾ素子を用いたステー

ジを組み合わせる事によって三次元空間内の分子動態の時間的な変化を高速に測定する技術が提案されている。ピエゾ素子を用いたステージは高精度に Z 方向の制御を行うことが可能であるが、非常に高価であること、またそれ以上に標本自体を Z 方向に移動させるため、慣性の影響により時間分解能は 10Hz 程度となる問題点がある。

### 2. 研究の目的

本研究課題では短い時間刻みでの測定を三次元で行うことを目標に掲げ、既存のリニアガイドとステップモーターを利用した制御機構を用いず、電気的にレンズの焦点距離を調節可能な電気式焦点可変レンズを用いることで細胞内三次元1分子測定システムを構築する。電気式焦点可変レンズは標本を動かすのではなくレンズの焦点を変化させることで異なる断層画像を撮影するため、ピエゾ素子を用いたステージが持つ慣性の影響を受けることなく撮影を行うことが可能であり、100Hz のサンプリングレートを達成可能である(図1)。高速・高精細な1分子測定を達成するため、本研究課題ではレンズのドライバ、制御用ソフトウェア、画像解析ソフトウェアのすべてに当研究室で培われた高速処理技術を適用し、完全にコンピュータ制御の元で測定を行うシステムを構築する。



電気式焦点可変レンズを用いることで  
細胞を壊さずに高速・高精度な  
三次元1分子測定を行うことが可能  
図1: 既存技術との比較

### 3. 研究の方法

(1) 電気式焦点可変レンズドライバの開発  
電気的にレンズの焦点距離を調節可能な電気式焦点可変レンズとして、本研究課題では Optotune 社 EL-10-30 を用いた。電気式焦点可変レンズは制御用ハードウェアに接続され、USB を経由してコンピュータ制御が可能となっているが、Optotune 社が提供するソフトウェアからのみ制御が行える状態であり、また実装言語の都合上、顕微鏡・シャッター制御と同期して高速に電気式焦点可変レンズの制御を行うことは不可能であった。そこでレンズの焦点を制御するソフトウェア(ドライバ)を一から開発し、C 言語で記述されたプログラムから直接制御を行うソフトウェア基盤を構築した(図2)。構築したシステムを用い、焦点を変化させることで細胞内の異なる断層画像を複数枚撮影し、微小管先端に結合する複合体 (plusTip) の三次元動態を解析する。

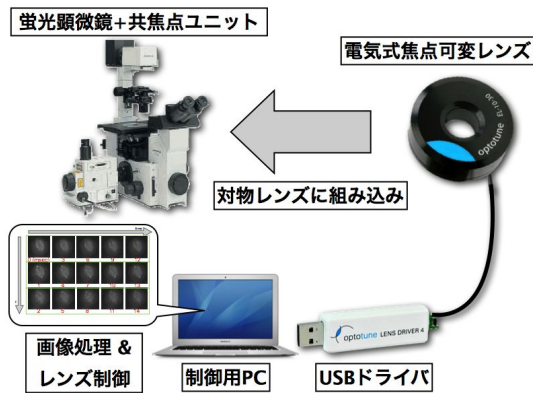


図 2: 三次元 1 分子測定システム構成図

## (2) 三次元 1 分子測定システムの評価

先行研究では ETL への入力電流を変化させた際、顕微鏡の光学的性能が変化することが示されている。そこで本研究課題においても構築したシステムの性能評価を行った。具体的には、電流値に応じて変化する焦点距離、倍率、光学分解能及び、焦点面の整定時間に対して評価を行い、三次元 1 分子測定として十分な光学的性能を満たしているかの確認を行った。評価手法として、ZEMAX (ZEMAX Development Corporation, Redmond, WA, USA) を用いた光線追跡シミュレーションと実測による評価を採用した。

## (3) *in vitro* 及び *in vivo* 環境での三次元 1 分子トラッキング

上記手順(2)の性能評価にて、ETL の光学的性能は ETL に与える電流値によって大きく変化することがわかったため、(2)にて求めた、ETL の光学的性能を最大限発揮可能な電流値の範囲を用いて *in vitro*, *in vivo* 環境での三次元 1 分子トラッキングを行なった。*in vitro* 環境では蛍光ビーズをカバーガラス間に封入し、その動態を測定した。調整したサンプルの厚みは約  $7\mu\text{m}$  であったため、その厚み分焦点移動が可能な電流値の範囲 ( $53.6 \sim 85.8\text{mA}$ ) を設定した。また、必要となるボクセルサイズはナイキストのサンプリング定理から算出される。今回使用した  $500\text{nm}$  蛍光ビーズの輝度分布の幅を測定した結果、 $x$ - $y$  方向は約  $1\mu\text{m}$ 、 $z$  軸方向は約  $2\mu\text{m}$  となった。したがって、ボクセルサイズはその輝度分布の  $1/3$  である  $350 \times 350 \times 700\text{nm}^3$  が適切であると判断した。撮影する  $z$  軸方向の範囲は約  $7\mu\text{m}$  であるため、 $z$  軸方向の空間分解能を  $700\text{nm}$  に設定するためには、一つの  $z$ -stack あたりの撮影枚数を 10 枚にする必要がある。上記観察条件にて撮像した蛍光ビーズの三次元タイムラプス画像に対し、(a)ノイズ除去、(b)ガウシアンフィッティングによる輝点の同定、(c)Linear Assignment Problem を用いた輝点の対応付けの 3 種の画像処理アルゴリズムにより三次元 1 分子トラッキングを行い、トラッキング結果から平均速度、lifetime、time-averaged mean square displacement (taMSD) を取得した。taMSD を用

いることで 1 分子トラッキング結果から平均二乗変位を算出可能となる。平均二乗変位を求めることで注目する分子の拡散の種類を判定可能である。*in vitro* 環境での実験では、予測される異常拡散の性質が本トラッキング結果からも導き出せるかの確認を行った。

*in vivo* 環境における三次元 1 分子トラッキングを行うため、EB1-Venus プラスミドをトランスフェクションによって人子宮頸部癌細胞 HeLa 細胞内に導入することで、微小管伸長端を可視化した。その後、EB1-Venus を発現させた分裂期細胞の三次元タイムラプス画像を取得した。今回行った測定では、露光時間を  $100\text{ms}$  に設定したため、1  $z$ -stack あたり 10 枚撮影可能であった。また、ナイキストのサンプリング定理から  $z$  軸方向の空間分解能は  $300\text{nm}$  である必要がある。したがって、今回の実験では  $3\mu\text{m}$  厚の範囲で三次元画像を取得した。*in vitro* 環境での実験と同様、トラッキング結果から平均速度、lifetime を求め、二次元トラッキングの結果と比較を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 電気式焦点可変レンズドライバの開発

電気式焦点可変レンズドライバは C 言語で開発され、Linux, FreeBSD, MacOSX をはじめとする Unix 系 OS 上で動作する。本研究課題にて実装されたレンズドライバを用いることで、ユーザは各自のプログラムから電気式焦点可変レンズの曲率の制御が可能となり、ひいては焦点距離の変更が可能となる。レンズドライバを用いることで任意の焦点距離に変更することが可能であるだけでなく、矩形波、三角波、正弦波なのでパターンで焦点距離の変更を行うことができる。これにより、顕微鏡に接続されたカメラをバーストモードで連続的に撮像する状態を保持したまま、焦点距離を高速、かつ連続的に変更させることが可能となった。

### (2) 三次元 1 分子測定システムの評価

電気式焦点可変レンズへの入力電流を制御するレンズドライバを用い、本システムの時空間分解能を測定した。その結果、時間分解能は平均  $8.2\text{ms}$ 、空間分解能は最小で  $16.7\text{nm}$  であり、細胞内 1 分子トラッキングに必要な時空間分解能を達成していることが示された。また、ZEMAX による本システムの光線追跡シミュレーションの結果を図 3 に示す。電流値を大きくするにつれて ETL の曲率が大きくなっており、これにより光路が変化していることが分かる(図 3a)。また、これに伴い焦点距離、倍率が変化することが分かった(図 3b,c)。さらに開口数(NA)が変化していることや(図 3a, 左:1.3, 中央:0.96, 右:0.8)、本来想定されていない光路を経ることで対物レンズ内で起こる収差や、ETL の曲率が大きくなることによって生じる球面

収差などの影響で光学分解能も変化することが予想される。

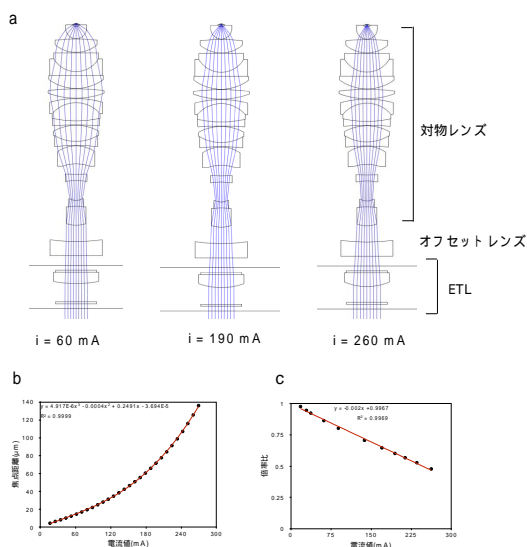


図3: ZEMAXを用いた光線追跡シミュレーション結果

また、本システムにおける光学的性能の測定結果を図4に示す。測定した本システムの光学的性能について: (a)z 軸方向空間分解能が最も高く、焦点距離と電流値の関係が線形であること、(b)光学分解能が最も高くなること、(c)微小管観察に求められる x-y 空間分解能を満たす倍率であることの3点から本システムの制御に最適な電流値は 50~80mA であると決定した。

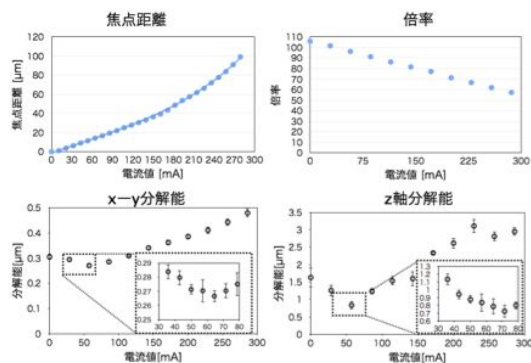


図4: 電流値に応じた光学的性能

### (3) *in vitro* 及び *in vivo* 環境での三次元1分子トラッキング

前節で電気式焦点可変レンズを組み込んだ光学系の性能評価を行い、本システムが細胞内タンパク質の三次元トラッキングに必要な時空間分解能を満たしていることを確認し、観察に最適な電流値を決定した。本節では前節で求められた電流値を用いて実際に三次元1分子トラッキングを行った結果を示す。

*in vitro* における拡散現象の実験系では蛍光ビーズが移動可能なz軸方向の範囲は制限されるため、観察される拡散現象は異常拡散であることが予想される。実際に測定された異

常拡散係数は異常拡散を示す 0.83 となり、本システムで1分子による三次元拡散現象を正確に測定できることを確認した。さらに、三次元及び二次元のトラッキング結果から lifetime、平均速度において三次元測定での結果に増加が見られたことから、三次元トラッキングを行う有用性を示すことに成功した。続いて、本研究の目的である *in vivo* における EB1 の三次元トラッキングを行い(図5)、EB1 の lifetime、平均速度を算出した。

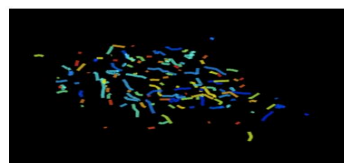


図5: EB1 の三次元トラッキング結果

二次元測定の結果と比較した結果、平均速度は増加しているが、lifetime に関しては減少していた。lifetime が減少した理由として、蛍光褪色の影響により十分な長さを持つ EB1 のトラックを取得できなかった点が挙げられる。今後の展望として長時間観察を可能とする実験系の構築、及び紡錘体結合タンパク質の機能解析が挙げられる。

### 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 1 件)

1. Y Nakai, M Ozeki, T Hiraiwa, R Tanimoto, A Funahashi, N Hiroi, et al. "High-speed microscopy with an electrically tunable lens to image the dynamics of *in vivo* molecular complexes", Review of Scientific Instruments, 査読有, 86, 2015. doi: 10.1063/1.4905330

[学会発表](計 5 件)

1. Y Nakai, T Hiraiwa, R Tanimoto, M Ozeki, A Taniguchi, S Nonaka, H Oku, V Draviam, N Hiroi, A Funahashi, "Development of 3D particle tracking system with an electrically tunable lens", NIG International Symposium: Force, Information and Dynamics: X factors shaping living systems, 9<sup>th</sup> Jan. 2016, University of Tokyo(Tokyo, Meguro).

2. K Ii, " Implementation of Spatial SBML Modeling Software based on Microscopic Image ", HARMONY 2015, 20<sup>th</sup> Apr. 2015, (Germany, Wittenberg).
3. K Mashimo, " Accelerating SBML Spatial Model Simulator using GPGPU ", HARMONY 2015, 20<sup>th</sup> Apr. 2015, (Germany, Wittenberg).
4. Y Nakai, N Hiroi, A Funahashi, " Development of high-speed 3D imaging system with electrically tunable lens ", Quantitative Bioimaging, 7<sup>th</sup> Jan. 2015, (France, Paris).
5. Y Nakai, N Hiroi, A Funahashi, " Development of high-speed 3D imaging system with electrically tunable lens ", European Bioimaging Analysis Symposium 2015, 5<sup>th</sup> Jan. 2015, (France, Paris).

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://fun.bio.keio.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

舟橋 啓 (FUNAHASHI, Akira)

慶應義塾大学・理工学部・生命情報学科・  
准教授

研究者番号：70324548

### (2)連携研究者

広井 賀子 (HIROI, Noriko)

慶應義塾大学・理工学部・生命情報学科・  
専任講師

研究者番号：20548408