

## 自己評価報告書

平成23年5月23日現在

機関番号：12608

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2008～2012

課題番号：20114004

研究課題名（和文）1分子イメージングによる生命情報の「その場」計測

研究課題名（英文）In-situ real-time measurement of biological informations using single molecule imaging

研究代表者

徳永 万喜洋 (TOKUNAGA MAKIO)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授

研究者番号：00192659

研究分野：生物物理学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：1分子イメージング、分子システム、その場計測、3次元イメージング、マルチカラーイメージング、HILO 照明法、分子定量、遺伝情報場

## 1. 研究計画の概要

1分子イメージングと、細胞シミュレーション研究を融合させ、分子をシステムとして統合的に理解する、新しい細胞分子システム研究を開拓することを目的とする。今後解明すべき重要な課題は、ダイナミックに変化し、特定の時期に局所領域に局限して起こる生命現象を分子レベルで解明することである。細胞の1分子イメージングにより、個々の分子・部位を直接に生きた細胞で「その場」計測し、細胞内で定量情報を計測できる。この定量解析により、生きた細胞において、分子数・濃度、相互作用時間・反応速度、結合定数・結合分子数、時空間変化・速度・拡散係数といった諸量を求められる。さらに、時間・空間・多種分子(多色)の5次元の情報を定量的に得ることができる(Tokunaga, et al., *Nature Methods*, 2008)。この情報は、細胞を分子システムとしてシミュレーションする上で、従来得られることが困難であったものである。これを用い、局所的局時的なイベントに基づく細胞システムを、実測データに基づいてシミュレーションする。1分子イメージングと細胞シミュレーション研究をフィードバックさせ、融合し展開する。

## 2. 研究の進捗状況 (600-800 字)

細胞核内外の物流や構造を、時空間の関数として「その場」計測するため、1分子イメージング観察と定量法を最適化した仕様の顕微鏡を、構築し改良した。まず光学系の収差の極小化を行い、細胞内部特に核内の1分子画像が理論点像に近づくよう結像系全般を見直し、使用レンズとその配置を最適化した。また、機械的ドリフトを最小限にする焦

準機構の導入改良を行った。

染色体は、非常に多くの蛋白質と複合体を形成し、高度に高次な構造体として機能している。しかも、その構造は、転写・複製・修復・組換えなどの生命現象において一定不変でなくダイナミックに変化し、機能に応じ、特定の時期に特定の局所領域に局限して段階的に起こる。染色体の局所領域に一過的に作られる、この特殊な構造と変化を明らかにするため、個々の時空間場で直接観察計測できるという1分子イメージング定量技術の特性を生かすべく、細胞の厚みより薄い局所的照明である HILO 照明法を用いた。これにより、生細胞の生体1分子イメージングにおいて従来の楽射照明法よりも最高で8倍のシグナルノイズ比の高画質が得られる。この性能を活かし、遺伝情報「場」計測のため、可視領域の任意の2～3色の蛍光を同時に1分子観察できる顕微鏡システムを構築発展させた。また、生きた試料の臨機の変化に観察中随時に対応するため、パソコン制御システムを構築しさらに改良した。細胞内部での高 S/N 比の画像を生かし、細胞内部における分子数・濃度・相互作用時間・解離定数・拡散係数・物理的動態特性といったパラメータを、多種分子・時間・空間の関数として求める研究を進めた。転写因子、RNA PolymeraseII、クロマチン構造関連分子を GFP, RFP 標識した細胞を作成し、上記顕微鏡システムを用い、遺伝情報場の「その場」計測を展開した。

## 3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している。

(理由)

顕微鏡システムとして、光学系・機械系・パソコン制御・定量解析システムを構築した。また、これを用いて、遺伝情報場の「その場」計測を、定量情報として得ている。

#### 4. 今後の研究の推進方策

顕微鏡システム、光学系・機械系・パソコン制御・定量解析システムをさらに改良する。特に、定量解析システムを、新たなアルゴリズム開発を含め、重点的に推進する。

遺伝情報場の「その場」計測を推進する。特に、当「遺伝情報場」研究領域内での異分野融合による共同研究を推進する。

#### 5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Shiina, N., Yamaguchi, K., Tokunaga M. (2010) RNG105 deficiency impairs the dendritic transport of mRNAs for Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase subunit isoforms and leads to the degeneration of neuronal networks. *J. Neuroscience*, 30, 12816-12830, 査読有
- ② Yokosuka T., Kobayashi W., Takamatsu M., Sakata-Sogawa K., Zeng H., Yagita H., Tokunaga M., Saito T. (2011) Spatiotemporal basis of CTLA-4-mediated negative regulation of T-cell activation. *Immunity*, 33, 326-339, 査読有
- ③ Shiina, N., Tokunaga, M. (2010) RNA Granule Protein 140 (RNG140): A Paralog of RNG105 Localized to Distinct RNA Granules in Neuronal Dendrites in the Adult Vertebrate Brain. *J. Biol. Chem.*, 285, 24260-24269, 査読有
- ④ Miletic, A. V., Graham, D. B., Sakata-Sogawa, K., Hiroshima, M., Hamann, M. J., Cemerski, S., Kloeppe, T., Billadeau, D. D., Kanagawa, O., Tokunaga, M., Swat, W. (2009) Vav links the T cell antigen receptor to the actin cytoskeleton and T cell activation independently of intrinsic Guanine nucleotide exchange activity. *PLoS One*, 4, e6599, 査読有
- ⑤ Fukagawa, A., Hiroshima, M., Sakane, I., Tokunaga, M. (2009) Stochastic emergence of multiple intermediates detected by single-molecule quasi-static mechanical unfolding of protein. *BIOPHYSICS*, 5, 25-35, 査読有

[学会発表] (計 37 件)

- ① Sakata-Sogawa K. and Tokunaga M.: Dynamics of transcription factor proteins in nucleus by single molecule analysis. Gordon Research Conference Single Molecule Approaches To Biology, il Ciocco

Hotel, Lucca, Italy, Jun 27-Jul 2, 2010.  
② Fukagawa A., Hiroshima M., Tokunaga M.: Stochastic and dynamic pathways detected by quasi-static mechanical unzipping of single-base pair of DNA and MD simulations. Gordon Research Conference Single Molecule Approaches To Biology, il Ciocco Hotel, Lucca, Italy, Jun 27-Jul 2, 2010.  
③ Sakata-Sogawa K., Tokunaga M.: Single Molecule Microscopy for Immunological Cell Signaling. Sweden-Japan Joint Colloquium "Current Approaches & Future Perspectives on the Human Genome, Transcriptome & Proteome", Nobel Forum, Karolinka Institute, Stockholm, Sweden, Jan 2010.

④ Tokunaga M.: TIRF principle and applications with a focus on biological samples. DKFZ/EMBL Practical Course, Advanced Training Center of the EMBL, Heidelberg, Germany, Mar 2010.

⑤ Sakata-Sogawa K., Tokunaga M.: Single molecule imaging and quantitative analysis in living cells. EMBO Workshop "Visualizing Immune System Complexity", Centre d'Immunologie Morseeille-Luminiy, Morseeille, French, Jan 15-17, 2009.

[図書] (計 2 件)

- ① 徳永万喜洋、十川久美子: 「薄層斜光照明法で見えてくる新たな生命現象」, 実験医学 2008 年 10 月増刊号 Vol. 26, No. 17 "生命現象の動的理解を目指すライブイメージング", 宮脇敦史編, 羊土社, 第 3 章, 163-168, 2008.
- ② 徳永万喜洋、十川久美子: 「全反射照明蛍光顕微鏡」, "第 3 版 現代界面コロイド化学の基礎", 日本化学会編, 丸善, 第 9 章, 399-401, 2009.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 顕微鏡システム  
発明者: 宮脇成礼、徳永万喜洋、十川久美子、江部康平、堀博文  
権利者: オリンパスソフトウェアテクノロジー株式会社、国立大学法人東京工業大学、独立行政法人理化学研究所  
種類: 特許出願  
番号: 特願 2010-145571  
出願年月日: 2010 年 6 月 25 日  
国内外の別: 国内

[その他]