

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21770170

研究課題名（和文） 新規光学技術を用いた細胞膜の力学計測

研究課題名（英文） Physical measurement of cell membrane by using novel optical microscopy

研究代表者

渡邊 朋信（WATANABE TOMONOBU）

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教

研究者番号：00375205

研究成果の概要（和文）：

細胞運動における細胞形状の形成メカニズムの解明のため、細胞膜などの微細構造を高コントラストで実時間観察する新規顕微鏡法の開発を行ってきた。上記を達成するために、偏光板を回転させることなく、偏光像を取得する為に、フォトニック結晶を用いた軸対象偏光を利用した。残念ながら、助成期間内に上記を達成することはできなかったが、助成終了後に、達成されている。上述したように幹となる技術開発が予想以上に困難であったため、上位目的である細胞形状の形さらに、細胞膜の運動を90nm/80msの時空間分解能で観察する事に成功した (*Biophys. J.*, 99, L50-52)。

研究成果の概要（英文）：

In order to reveal mechanism of filopodia protrusion, we have developed a novel microscopy to detect nano structures like cekk membrane in real time with high contrast. Unfortunately, this development was not achieved for 2 year, however, done after the grant. Since the present developments have some trouble as above mentioned, we developed biological assay system to quantify the dynamics of myosin-X, which is responsible for filopodia protrusion (*J Biol Chem.*, 285, 19605). Furthermore, we developed superresolution microscopy to observe the cell membrane with 90 nm and 80 ms spatial-temporal resolutions (*Biophys. J.*, 99, L50-52).

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：生物物理、ナノバイオ、フォトニック結晶、可視化、1分子計測

1. 研究開始当初の背景

細胞は、自らの骨格の構造を変化させる事により動き、機能している。その先端端には

フィロポディア(糸状仮足)、ラメリポディア(葉状仮足)、ラッフル、フォーカルコンプレックス、フォーカルアドヒージョンといった

構造物が、細胞骨格の自己組織化を利用して形成される。上記のような細胞運動は、神経細胞の伸長、細胞の走化性、癌の転移など、重要な生命現象の基盤である。本研究では、新規光学技術を開発し、細胞運動における細胞形状の形成メカニズムの解明を目指した。

細胞運動に関わる様々な蛋白質が発見されており、生化学的知見も多く発表されている。また、近年、光学顕微鏡技術や蛍光蛋白質の開発により、細胞内におけるシグナル伝達経路が明らかになりつつある。しかしながら、『何が』『いつ』働くかは明らかになっても、『どのようにして』構造を作り上げているかは、依然不明なままである。例えるなら、自動車を構成する材料が判明しても、エンジンの振動運動から車輪に駆動力が伝わるメカニズムが分かっていない。

上記のメカニズムを明らかにするためには、細胞膜も同時に観測する必要がある。顕微鏡技術の発展により、蛋白質の運動はナノメートル、ミリ秒精度で観察する事ができるようになってきたが、細胞膜で同様の観察をできる技術が現存しない。例えば、電子顕微鏡により、膜の構造をナノメートル精度で観察できるが、実時間観測は不可能である。そのため、蛋白質の機能と細胞膜の形状との相関を理解できなかった。本研究課題では、細胞膜と蛋白質の両方の挙動をナノメートル、ミリ秒精度で実時間観測できる技術を開発する。

フィロポディア伸長など、細胞は、ATPやGTPを加水分解するエネルギーを利用して、自らの構造を変化させている。上記の化学・力学エネルギー変換の仕組みを理解するためには、細胞の構造変化の力学特性の取得が必須。しかしながら、細胞の構造変化の力学特性を計測する有効な技術がない。そのため、実験方法に寄って、整合性の取れない作業仮説が作られている。そこで本研究では、細胞の構造に係る力学特性を計測できる技術も合わせて開発する。

2. 研究の目的

フィロポディアは、一度に、約2.4ミクロンしか伸長する事ができず、この2.4ミクロンの伸長を繰り返し行うことで、10ミクロンを超えるような長いフィロポディアが作られていることを発見した。この過程には、細胞接着が必須であり、ガラス面から浮いてしまったフィロポディアは長く伸長することができなかった。

フィロポディアが伸長するためには、アクチン重合のエネルギーを使っているとされているが、そのエネルギーでは、約2ミクロンしか膜を伸長させる事が出来ない事が数値計算で明らかになっている。申請者の実験結果と合わせて考慮すると、フィロポディアが伸長を繰り返すためには、細胞接着によ

り伸びた膜を一時的にその場に留まらせて、膜に係る張力が緩和するのを待っていると想像されるが、この仮説を証明するためには、細胞膜に係る力の空間分布や、膜の流動性など、細胞膜の物性を測る必要がある。

本研究の目的は、研究の背景に挙げた2つの新たな光学技術を開発し、フィロポディア伸長時の細胞膜の物性を計測し、力学的に整合性の取れた作業仮説を提唱する事である。

3. 研究の方法

細胞膜をナノメートル精度、かつ、実時間観測する技術の開発

<課題の一般化>

顕微鏡観察において、細胞膜などの微細構造を高コントラストで実時間観察する。

<問題提起>

- ・位相差顕微鏡、微分干渉顕微鏡などが、従来技術として挙げられるが、細胞質と溶媒の屈折率の違いを利用するため、薄膜に関しては、十分なコントラストを得ることができない。

- ・十分なコントラストを得るために、細胞膜を有機色素で蛍光標識し、蛍光顕微鏡で観察する方法も考えられるが、蛍光標識では、色素の褪色の為に長時間の観察が不可能となる。

- ・上記問題を解決しうる技術として、偏光顕微鏡法が挙げられるが、偏光板を回転させる必要がある為に、顕微鏡装置が複雑になる上、時間分解能が低下する。

<解決方法>

- ・偏光板を回転させる事なく、偏光像を取得する為に、フォトニック結晶を用いた軸対象偏光を利用した、全方位偏光顕微鏡を開発する。

- ・入射側のフリーエ面にアジマス偏光、結像側のフリーエ面にラジアル偏光を作るフォトニック結晶を配置する。

- ・透過光によって細胞膜と溶液の境界面がぼけて観察されてしまう事を避けるために全反射照明法を利用する。これにより蛋白質1分子の蛍光観察も同時に行える。

生細胞において蛋白質の発する力を計測する技術の開発

<課題の一般化>

顕微鏡下で、多数の微小ビーズを操作する技術を開発する。

<問題提起 1>

- ・フィロポディアの伸縮に係る力を計測するために、従来は光ピンセット法を用いている。
- ・しかしながら、上記手法は、ある一箇所しか計測できない。

- ・その為、細胞が運動している時の細胞膜に係る力の空間的分布は計測できない。

<解決方法>

・先に開発する全方位偏光顕微鏡に、磁気ピンセット装置を組み込む。

<問題提起2>

・細胞膜の至る所に、磁気ビーズを結合させる必要がある。

・従来は、ビーズ表面に膜蛋白質の抗体を結合させ、抗原-抗体反応により、ビーズと細胞膜を結合させる。

・この方法では、膜蛋白質がビーズ表面で凝集する可能性があり、何かしらの反応を行う可能性が危惧される。

<解決方法>

・ビーズ表面をグルタチオンなどでプラス荷電を加え、静電相互作用によって、ビーズと細胞膜を結合させる。

・顕微鏡視野下に係る磁場によって、磁気ビーズを操作する。

・細胞膜に外力をかけた上で、細胞膜の伸縮を観察する。

4. 研究成果

顕微鏡には、レーザー光が設置された蛍光顕微鏡を用い、全反射照明が可能な光学系を構築し、上記顕微鏡に組み込んだ。入射側のフーリエ面にアジマス偏光、結像側のフーリエ面にラジアル偏光を作るフォトニック結晶を配置した。それぞれの偏光板は、入射側、結像側共に、瞳の位置に設置することが、コントラストを向上させる。対物レンズの瞳の位置に、上記偏光板を設置することは、物理的に不可能であるため、顕微鏡には、使用する対物レンズが作る像を、さらに、伝達するリレー光学系を付加した。観察試料の蛍光と反射光とを分けるために、上記リレー光学系はダイクロイックミラーを含み、同一のCCDカメラにて、反射光（偏光像）と蛍光（蛋白質の局在を示す像）を映し出せるように設計・構築した。

上記光学系において、全方位の偏光を検出できるはずであったが、実際には出来なかった。光が界面にて全反射を起こすときに、光が偏光性を持つことが原因と考えられる。本助成終了後、全反射を行うレーザーとは別の波長を持つレーザーを用意することで、上記問題は解決され、目的を達する顕微鏡が完成したが、特許取得前のため、本報告書においては詳細は記さない。

磁気ビーズによる力・蛍光同時観察顕微鏡に関しては、他事業により完成された。この顕微鏡装置に、全方位偏光光学系を組み込む予定であったが、助成期間内に全方位偏光光学系の完成が成されなかった為、行われなかった。しかし、磁気ビーズによる細胞膜の力と蛋白質の運動解析を行う生物実験系の構築は終了している。精製したカドヘリンを磁気ビーズに架橋して、細胞膜と結合させ、モデル実験系ではあるが、細胞膜の堅さを測り

ながら、細胞内のカドヘリンの集合を観察できている。

上述したように幹となる技術開発が予想以上に困難であった。そこで、上位目的である細胞形状の形成メカニズムの解明に関する研究開発を平行して行ない、助成が実になるように配慮した。具体的には、フィロポディア伸長に必須であるモーター蛋白質ミオシンXの一分子観察の為の実験系を確立し、フィロポディア形成初期、伸長時、短縮時におけるミオシンXの挙動を定量化し、ミオシンXにおけるフィロポディア伸長機構の作業モデルの構築を行った(J Biol Chem., 285, 19605)。さらに、新規光学系の開発に関して、細胞膜をナノメートル精度、かつ、実時間観測することが目的であったことから、細胞膜を実時間観察するための超解像顕微鏡技術の開発を行なってきた。本研究課題により開発された超解像法により、細胞膜の運動を90nm/80msの時空間分解能で観察する事に成功した(Biophys. J., 99, L50-52)。

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2件)

1. Watanabe TM, Fukui S, Jin T, Fumihiko F and Yanagida T, Real-time Nanoscopy by using Blinking Enhanced Quantum Dots., *Biophys. J.*, **99**, L50-52 (2010). 査読有
2. Watanabe TM, Tokuo H, Gonda K, Higuchi H and Ikebe M, Myosin-X induces filopodia by multiple elongation mechanism *J. Biol. Chem.*, **285**, 19605-19614 (2010). 査読有

[学会発表] (計8件)

1. 渡邊朋信, 蛍光揺らぎを利用した超解像法、第11回細胞生物学ワークショップ、北海道大学、2010年11月23日
2. 渡邊朋信, 量子ドットの蛍光揺らぎを利用した超解像法の開発、日本生物物理学会第48回年会、2010年9月16日、仙台

3. Tomonobu M Watanabe, Nano-tracking methods of single particles using Quantum dot in 2D and 3D. 3rd International Symposium on Bioimaging, Okazaki, Japan, 6.4.2010.
4. 渡邊朋信, 量子ドットの蛍光揺らぎを利用した超解像法の開発、ナノ学会第8回年会、2010年5月14日、岡崎
5. Tomonobu M Watanabe, Expanded methods of single molecular measurements, Single Molecule Nano Detection and Its Application to Life Science, Awaji, Japan, 4.17.2010.
6. Tomonobu M Watanabe, The dynamics for myosin-X induced filopodia protrusion. 54 th Annual Meeting on Biophysical Society, San Francisco, California, USA , 2.21.2010
7. Tomonobu M Watanabe, The dynamics of myosin-X induced filopodia protrusion, Integrating Immune Networks with Immuno-Imaging on SIGN-IFReC Joint Symposium, Biopolis, Singapore, 6.18.2009
8. Tomonobu M Watanabe, Dynamics of myosin-X during filopodia protrusion, International Symposium organized by JST & IFReC, Osaka. Japan, 5.11. 2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 朋信 (WATANABE TOMONOBU)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教

研究者番号：00375205

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：