

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25291032

研究課題名(和文) 超解像1分子イメージング解析法の開発による細胞分子動態制御のナノ定量

研究課題名(英文) Nanoquantification of the regulatory mechanism of molecular dynamics by development of super-resolution microscopy using single molecule imaging

研究代表者

徳永 万喜洋 (Tokunaga, Makio)

東京工業大学・生命理工学研究科・教授

研究者番号：00192659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：光学顕微鏡における生細胞蛍光1分子超解像顕微鏡法を超解像法へと発展させ、生細胞分子動態を定量し、分子機構を解明することを目的として、次の3項目を行った。1. 超解像1分子顕微鏡システムの改良。照明光の均質化、結像系の最適化、画像の位置ずれ抑制を中心に、高解像度化を行った。2. 超解像多色同期1分子イメージング解析法の改良。超解像分子動態・相互作用解析における多色同期画像を用いた高精度解析において、多色間画像の位置ずれ補正を中心に改良した。3. 生細胞シグナル伝達の超解像1分子イメージング・定量解析。上記技術を用い、シグナル伝達や転写・細胞核構造に関わる分子の動態解析を推進した。

研究成果の概要(英文)：We have developed an integrated method for quantitative analysis of molecular dynamics and interactions, combining multiple methods of microscopy, multi-color single-molecule imaging, single molecule tracking and super-resolution microscopy. We have improved resolution in multi-color single-molecule microscopy by optimization of illumination and stabilization of optics. We also improved accuracy in analysis method for superresolution single-molecule microscopy by optimizing alignment. The improved integrated microscopy provides a means to obtain new view of spatio-temporal and kinetic parameters of molecular dynamics and interactions in living cells. We carried out imaging analysis of molecules involved in signal transduction and translation.

研究分野：生物物理学

キーワード：1分子イメージング バイオイメージング 細胞機能と構造 超解像顕微鏡 生体分子計測 生細胞分子動態

1. 研究開始当初の背景

1 分子研究は、日本が先駆けて開拓した分野であり、生きた細胞の動態可視化という新たな発展機を国内外ともに迎えている。その重要な研究対象の一つが免疫系等に関わる細胞シグナル伝達や、DNA 情報を読み取る転写と細胞核内構造である。これら分子機構を解明するうえで重要なのは、そのダイナミックな特性であり、細胞内における定量的な知見である。

この分野の大きな発展に、新たな世界的潮流が起こっている。光学顕微鏡における超解像技術である。複数の方法が開発されており、PALM/STORM, STED, SIM 法が用いられ始めている。STED 法は空間分解能が xy 方向に通常 60 nm 最高 30 nm、z 方向に通常 600 nm 最高 200 nm であるが、原理的に多色化が難しく、レーザー走査共焦点顕微鏡を使用するためにリアルタイム性に劣る。PALM/STORM 法は、空間分解能が xy 方向に 30 nm、z 方向に約 140 nm と優れるが、退色/蛍光活性化を 1 平面画像あたり 1,000 回程度繰り返す方式のため、蛍光色素に制約があり、多色化が難しく、時間分解能に難点がある。SIM 法は、超解像顕微鏡では最速の 2 次元画像 0.6 秒/枚の性能を有し、多色化にも適しているが、空間分解能が高くない。このように、超分解能イメージングは大きな可能性を秘めているにもかかわらず、それぞれの技術に長所短所がある。また、いずれの方法も欧米で開発されたものであり、日本の技術貢献度が低い。

申請者は、当初から新規技術開発により 1 分子研究の分野を開拓してきた。細胞表面では対物レンズ型全反射照明を用いた 1 分子イメージング (Tokunaga et al., BBRC, 1997; Kitamura, et al., Nature, 1999)、細胞内部の観察には薄層斜光 (HILO) 照明法を開発し、従来の落射照明法より S/N 比が 2~8 倍高い画質を実現した (Tokunaga et al., Nat. Methods, 2008)。

また我々は、免疫システムに関し従来の定説とは異なり、免疫細胞において約 50 分子の受容体分子が集合してマイクロクラスターが形成されると、シグナル伝達が活性化されることを見いだしている (Yokosuka, Sakata-Sogawa, et al., Nat. Immunology, 2005, Immunity 2008, 2010, 2011)。

2. 研究の目的

申請者の開発した HILO 照明による 1 分子顕微鏡法を活かし発展させることにより、xy 方向 60 nm の分解能にて、リアルタイムで 4 色同時に生細胞をイメージングすることが可能である。さらに、多色同期イメージングまたは超解像法により 10 nm 分解能で生きた細胞における分子間距離の定量が可能である。以上の技術構築と改良を行い確立する。

開発した技術を用い、免疫系等に関わるシグナル伝達分子に関し、細胞表面での反応から、細胞核内構造や DNA 情報を読み取る転

写の制御まで、これらに係わる分子動態と相互作用の定量解析を行い、分子機構をシステムとして解明する。免疫細胞システムの面白さは、『大きくゆらぐ超多様な入力に対し、高い選択特異性と確実性で応答する』という点にある。しかしながら、この特性を実現している分子機構は未解明である。まず、超解像 1 分子イメージング定量解析により、空間・時間・多種分子の 5 次元定量情報を求め、これらを用いて細胞を分子システムとしてシミュレーションできるようにする。何故 50 分子集合で免疫シグナルが開始されるのか？『大きくゆらぐ超多様な入力に、高い選択特異性と確実性で応答』できるのは何故か？など、免疫細胞の特性に焦点を定め、分子機構を解明する。

この課題を解決するために、本技術開発による超解像多色イメージング・定量ナノ解析や、他の顕微鏡法とを統合的に用いることにより、免疫システムや転写制御における未解明のなぞに迫る。

3. 研究の方法

薄層斜光 (HILO) 照明を用いた 1 分子顕微鏡画像に、新たなアルゴリズムを開発し用いることにより、xy 方向 60 nm の分解能にてリアルタイムで 4 色同時に生細胞をイメージングする方法を開発する。さらに、S/N の高い 1 分子画像を得る技術を有する特長を活かし、多色同期イメージング画像を用いて 10 nm 分解能で、生きた細胞における分子間距離の定量法を確立する。

開発した当技術を応用し、免疫系や Ca シグナルに関わるシグナル伝達分子動態と相互作用の解析を行い、免疫細胞シグナル伝達の分子機構を定量的に解明する。特に、シグナル起点としての細胞表面のマイクロクラスター形成と機能、およびシグナル終点としての核内転写制御および核内構造に注力して行う。

複数の顕微鏡法と解析法を統合的に用い、シグナル伝達系や転写・核構造に関わる分子系を細胞システムとして解析し、“生物らしい”分子機構を解明する。

4. 研究成果

本研究では、生細胞蛍光 1 分子顕微鏡法による分子動態イメージングと超解像法による高分解能イメージングとを統合的に用いる顕微鏡法と、生細胞分子動態と構造を定量的に解析する手法とを構築改良した。また、開発した顕微鏡法を用い、分子機構を解明することを目的として、分子イメージングを推進した。主に次の 3 点の成果を得た。

(1) 超解像 1 分子イメージング顕微鏡システムの改良。対物レンズ型全反射照明と薄層斜光照明法を使った 1 分子イメージング顕微鏡に関し、顕微鏡ステージの安定性向上、照明光の均質化、結像系の最適化による、超解像分解能の高解像度化のための改良を行

った。多色同時観察のための、光学系の高画質化・高精度化と多色画像間のずれ補正機構改良を進めた。

(2) 超解像多色同期1分子イメージング画像解析法の構築改良。超解像分子動態・相互作用解析において、上記1の改良された顕微鏡システムを用い、多色同期画像を用いた高分解能解析のために、細胞内分子間距離の定量法を改良した。光学顕微鏡の分解能限界とされる2点識別分解能 $0.61 \times \text{開口数} / \text{波長}$ の制約を受けることがないという、多色同期画像の利点を生かし、10 nm 超分解能解析を可能にするためには、多色間画像の位置ずれ補正が重要であり、この点を中心に開発改良した。また、時間による画像の位置ずれ補正も重要であり、(1)の顕微鏡改良と(2)の解析法改良との間でフィードバックしながら、高精度化を行った。

(3) 生細胞シグナル伝達の超解像1分子イメージング・定量解析。1および2のイメージングシステムに加え、生細胞分子動態の高解像度解析のために、細胞表面分子の本来の動態を維持したまま、細胞を基板上に保持する新しい方法を開発した。ガラス表面上に脂質二重膜を簡便に構築する方法であり、均一な膜を再現性高く作製できる。生細胞や *in vitro* での1分子解析や表面分子の分析など、広汎な利用を可能とするものである。これら手法を用い、連携研究者との共同研究により、シグナル伝達活性化による生細胞の分子動態・分子間相互作用を観察した。多色対応の、リセプター・リン酸化酵素等のシグナル分子、actin等の細胞骨格、Caシグナルおよび関係分子、転写に関わる核内分子とGFP融合タンパク質を、適宜組合せ、細胞に複数種同時発現させ、観察解析し、分子動態に関する新しい描像を得た。

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5件)

Stasevich TJ, Hayashi-Takanaka Y, Sato Y, Maehara K, Ohkawa Y, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M, Nagase T, Nozaki N, McNally JG, Kimura H, Regulation of RNA polymerase II activation by histone acetylation in single living cells, *Nature*, 査読有、516巻、2014、pp.272-275

Ito Y, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M, A Facile Preparation of Glass-supported Lipid Bilayers for Analyzing Molecular Dynamics, *Anal Sci*, 査読有、30巻、2014、pp. 1103-1106

Yamazaki S, Yamamoto K, Tokunaga M, Sakata-Sogawa K, Harata M, Nuclear actin activates human transcription factor genes including the OCT4 gene, *Biosci Biotechnol Biochem*, 査読有、79巻、2014、pp. 242-246

Asakawa H, Yang HJ, Yamamoto TG, Ohtsuki C, Chikashige Y, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M, Iwamoto M, Hiraoka Y, Haraguchi T, Characterization of nuclear pore complex components in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Nucleus*, 査読有、5巻、2014、pp.1-14

Hotta K, Nashimoto A, Yasumura E, Suzuki M, Azuma M, Iizumi Y, Shima D, Nabeshima R, Hiramoto M, Okada A, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M, Ito T, Ando H, Sakamoto S, Kabe Y, Aizawa S, Imai T, Yamaguchi Y, Watanabe H, Handa H, Vesnarinone Suppresses TNF mRNA Expression by Inhibiting Valosin-containing Protein, *Mol Pharmacol*, 査読有、83巻、2013、pp. 930-938

[学会発表](計39件)

(1)山本 浩志, 山崎 祥他, 十川 久美子, 徳永 万喜洋, 原田 昌彦、細胞分化における核内アクチンの機能解析、第33回染色体ワークショップ・第14回核ダイナミクス研究会、2016.1.12-14、一の坊、松島町、宮城
(2)山崎 祥他, 山本 浩二、十川 久美子, 徳永 万喜洋, 原田 昌彦、細胞核内アクチンフィラメントのゲノム機能への関与、第33回染色体ワークショップ・第14回核ダイナミクス研究会、2016.1.12-14、一の坊、松島町、宮城

(3)市川 翔太, 伊藤 由馬, 田中 貴志, 徳永 万喜洋, 十川 久美子、Quantitative imaging analysis of anti-inflammatory protein PDLIM2 activation upon LPS stimulation、第53回日本生物物理学会年会、2015.9.13-15、金沢大学角間キャンパス、金沢市、石川

(4)Wei Ming Lim, 伊藤 由馬, 徳永 万喜洋, 十川 久美子、CLIP-170 phosphorylation mediates repositioning of microtubule-organizing center during T cell activation、第53回日本生物物理学会年会、2015.9.13-15、金沢大学角間キャンパス、金沢市、石川

(5)池田 大地, 伊藤 由馬, 徳永 万喜洋, 十川 久美子、Quantitative analysis of dynamics of negative elongation factor NELF and DSIF by single molecule imaging、第53回日本生物物理学会年会、2015.9.13-15、金沢大学角間キャンパス、金沢市、石川

(6)深川 暁宏, 廣島 通夫, 徳永 万喜洋、Entropic effects of hydrogen bonds to the double-stranded DNA structure revealed by single-molecule mechanical unzipping、第53回日本生物物理学会年会、2015.9.13-15、金沢大学角間キャンパス、金沢市、石川

(7)伊藤 由馬, 磯垣 翼, 木村 宏, 原田 昌彦, 十川 久美子, 徳永 万喜洋、Intranuclear dynamics of INO80 chromatin remodeling complex by fluorescent recovery after photobleaching、第53回日

本生物物理学会年会、2015.9.13-15、金沢大学角間キャンパス、金沢市、石川

(8)Chanyoung Shin, 伊藤 由馬, 十川 久美子, 田中 貴志, 徳永 万喜洋、Identification of PDLIM2 interacting protein using yeast two-hybrid system and quantitative imaging analysis、第53回日本生物物理学会年会、2015.9.13-15、金沢大学角間キャンパス、金沢市、石川

(9)伊藤 由馬, 木村 宏, 原田 昌彦, 十川 久美子, 徳永 万喜洋、Dynamics of actin-related protein 4 in living cell nucleus for dynamic chromatin regulation、第53回日本生物物理学会年会、2015.9.13-15、金沢大学角間キャンパス、金沢市、石川

(10)Ito Y, Harata M, Kimura K, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M、Dynamics of INO80 Chromatin Remodeling Complex by Live-cell Molecular Imaging、International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics, and Function、2015.8.23-26、Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji, Hyogo, Japan

(11)Ito Y, Harata M, Kimura K, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M、Integrated Imaging Approach to the Study of Chromatin Dynamics、International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics, and Function、2015.8.23-26、Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji, Hyogo, Japan

(12)徳永 万喜洋、生体分子機能の1分子計測とイメージング定量解析、第12回原子・分子・光科学(AMO)討論会、2015.6.20、東京大学理学部化学本館、文京区、東京

(13)山崎 祥他, 山本 浩二, 十川 久美子, 徳永 万喜洋, 原田 昌彦、核内アクチンフィラメントの転写制御への関与とその分子機構の解析、第32回染色体ワークショップ・第13回核ダイナミクス研究会、2014.12.15-17、安芸グランドホテル、広島県

(14)Shota Yamazaki, Koji Yamamoto, Kumiko Sakata-Sogawa, Makio Tokunaga, Masahiko Harata、Roles of nuclear filamentous-actin in transcriptional regulation、2014 ASCB/IFCB Meeting (The American Society for Cell Biology / International Federation for Cell Biology)、2014.12.6-10、Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, USA

(15)伊藤 由馬, 十川 久美子, 徳永 万喜洋、Live cell single-molecule imaging of T cell receptor and microcluster with planar lipid bilayers、第37回日本分子生物学会年会、2014.11.25-27、パシフィコ横浜、神奈川県

(16)Wei Ming Lim, 伊藤 由馬, 十川 久美子, 徳永 万喜洋、Microtubules Instability and Dynamics Mediated by CLIP-170 in T Cells、

第37回日本分子生物学会年会、2014.11.25-27、パシフィコ横浜、神奈川県

(17)山崎 祥他, 十川 久美子, 徳永 万喜洋, 原田 昌彦、Functional regulation of the dynamics of actin in the nucleus、第87回日本生化学会大会、2014.10.15-18、国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都、京都府

(18)山本 浩志, 山崎 祥他, 十川 久美子, 徳永 万喜洋, 原田 昌彦、Analysis of the function of nuclear actin in cell differentiation、第87回日本生化学会大会、2014.10.15-18、国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都、京都府

(19)伊藤 由馬, 十川 久美子, 徳永 万喜洋、T cell receptor on the surface of living cells changes in the dynamics inside microclusters revealed by single-molecule imaging analysis、第52回日本生物物理学会年会、2014.9.27(25-27)、札幌コンベンションセンター、札幌市、北海道

(20)大木 杜生, 伊藤 由馬, 徳永 万喜洋, 十川 久美子、A series of GECO mutants suitable for calcium imaging in a wide range of calcium concentration、第52回日本生物物理学会年会、2014.9.26(25-27)、札幌コンベンションセンター、札幌市、北海道

(21)鳥山 悟, 伊藤 由馬, 田中 貴志, 徳永 万喜洋, 十川 久美子、The elucidation of the molecular mechanism of PDLIM2 activation、第52回日本生物物理学会年会、2014.9.26(25-27)、札幌コンベンションセンター、札幌市、北海道

(22)池田 大地, 伊藤 由馬, 徳永 万喜洋, 十川 久美子、Single molecule imaging and quantitative analysis of dynamics of negative elongation factor NELF、第52回日本生物物理学会年会、2014.9.25(25-27)、札幌コンベンションセンター、札幌市、北海道

(23)深川 暁宏, 十川 久美子, 徳永 万喜洋、Formation of microclusters of receptor molecules improves signal/noise ratio in cellular signal transduction、第52回日本生物物理学会年会、2014.9.25(25-27)、札幌コンベンションセンター、札幌市、北海道

(24)十川 久美子, 伊藤 由馬, 深川 暁宏, 原田 昌彦, 木村 宏, 徳永 万喜洋、Studies of dynamic chromatin structure and function to understand fundamentals of life、第52回日本生物物理学会年会、2014.9.26(25-27)、札幌コンベンションセンター、札幌市、北海道

(25)徳永 万喜洋, 原口徳子(オーガナイザー)、Studies of dynamic chromatin structure and function to understand fundamentals of life (organizer introduction)、第52回日本生物物理学会年

会、2014.9.26(25-27)、札幌コンベンションセンター,札幌市,北海道
(26)Yuma Ito, Jun Takimoto, Takashi Tanaka, Tsuneyasu Kaisho, Kumiko Sakata-Sogawa, Makio Tokunaga, Molecular imaging analysis of regulatory mechanism of inflammatory response、58th Annual Meeting of Biophysical Society (USA)、2014.2.17(15-19)、Moscone Center, San Francisco,USA
(27)Yuma Ito, Naomichi Inaba, Masahiko Harata, Hiroshi Kimura, Makio Tokunaga, Kumiko Sakata-Sogawa、Quantitative imaging analysis of molecular dynamics of actin-related protein in the nucleus、58th Annual Meeting of Biophysical Society (USA)、2014.2.17(15-19)、Moscone Center, San Francisco,USA
(28)松島悠、戸田収、伊藤由馬、十川久美子、Thanai Paxton、朴明宣、大野敏、米澤貴之、横川隆志、西川一八、鄭雄一、徳永万喜洋、林宣宏、Action mechanism of neuronal membrane lipid raft、第36回日本分子生物学会年会、2013.12.05(03-06)、神戸国際展示場,神戸市,兵庫
(29)千葉晃生、深川暁弘、十川久美子、徳永万喜洋、Responses of a stochastic signaling cascade to input signals with extrinsic noise、第36回日本分子生物学会年会、2013.12.05(03-06)、神戸国際展示場,神戸市,兵庫
(30)Wei Ming Lim、伊藤由馬、十川久美子、徳永万喜洋、Microtubules Organizing Center (MTOC) Dynamics and Migration Upon T Cell Activation、第51回日本生物物理学会年会、2013.10.28(28-30)、国立京都国際会館,京都府
(31)鳥山悟、伊藤由馬、徳永万喜洋、十川久美子、The elucidation of the mechanism of PDLIM2 localization regulation、第51回日本生物物理学会年会、2013.10.29(28-30)、国立京都国際会館,京都府
(32)大木杜生、伊藤由馬、十川久美子、徳永万喜洋、Quantification of calcium concentration in cells by imaging analysis using GEM-GECO、第51回日本生物物理学会年会、2013.10.29(28-30)、国立京都国際会館,京都府
(33)稲葉直道、伊藤由馬、原田昌彦、木村宏、徳永万喜洋、十川久美子、Quantitative analysis of molecular dynamics of Arp4beta upon transcriptional activation by single-molecule fluorescence imaging and FRAP、第51回日本生物物理学会年会、2013.10.29(28-30)、国立京都国際会館,京都府
(34)大山浩史、伊藤由馬、十川久美子、徳永万喜洋、FRET-based analysis of interactions between elongin B and elongin C、第51回日本生物物理学会年会、2013.10.29

(28-30)、国立京都国際会館,京都府
(35)伊藤由馬、十川久美子、徳永万喜洋、Single molecule analysis of signaling membrane proteins in T cell microcluster by multicolor live cell imaging、第51回日本生物物理学会年会、2013.10.29(28-30)、国立京都国際会館,京都府
(36)深川暁弘、梶田真司、十川久美子、徳永万喜洋、Why do cells use signaling cascades with a variety of the number of steps?、2013.10.28(28-30)、国立京都国際会館,京都市,京都
(37)徳永万喜洋、分子1個を光で観る生命のダイナミックな姿、一般公開シンポジウム「DNAをあやつる生物のしくみ」、2013.8.25、千里ライフサイエンスセンター,豊中市,大阪
(38)徳永万喜洋、1分子イメージング TIRF法とHILO法を中心として、第21回細胞生物学ワークショップ、2013.8.09、情報通信研究機構・未来ICT研究所,神戸市,兵庫
(39)徳永万喜洋、深川暁弘、十川久美子、1分子研究が明かす動的でエントロピー的な分子間・分子内相互作用、日本顕微鏡学会第69回学術講演会・シンポジウム「超解像顕微鏡技術と生物応用」、2013.5.20-22、ホテル阪急エキスポパーク,吹田市,大阪

〔図書〕(計1件)

原田慶恵、石渡信一、宝谷紘一、船津高志、城口克之、吉田賢右、上村想太郎、井出徹、佐甲靖志、上田昌宏、十川久美子、樋口秀男、多田隈尚史、渡邊朋信、徳永万喜洋、石島秋彦、安藤敏夫、岡田康志、他、化学同人、1分子生物学、2014、304(215-227)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)
取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.toku.bio.titech.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳永万喜洋 (TOKUNAGA MAKIO)
東京工業大学・生命理工学研究科
教授
研究者番号：00192659

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

十川久美子 (KUMIKO SAKATA-SOGAWA)
東京工業大学・生命理工学研究科
准教授
研究者番号：20291073