

## 「生命現象と計測分析」研究領域 領域活動・評価報告書

—平成21年度終了研究課題—

研究総括 森島 績

## 1. 研究領域の概要

本研究領域は、生命現象の解明のために必要な新たな原理や手法に基づく計測・分析の技術に関して個人の独創的な発想に基づく革新技术の芽の創出を目指す研究を対象とするものです。

具体的には、細胞内の種々の化学過程の計測・分析や細胞から個体、生態系などのマイクロからマクロに至る多様なスケールでの生命現象を解明するための新規な計測・分析技術等を対象とします。生命系科学技術における斬新な成果の発掘を目指した新たな方法論の創出や技術展開の契機となることが期待される研究を対象とします。また生命現象に関連の深い環境の計測分析も含まれます。

## 2. 研究課題・研究者名

別紙一覧表参照

## 3. 選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

- 1) 選考は「生命現象と計測分析」領域に設けた領域アドバイザー9～10名、必要に応じて研究総括が委嘱した外部評価者3～4名と研究総括で行った。
- 2) 選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とした。
- 3) 選考に当たっては、募集要項に示した選考基準を基本としたが、以下の点に特に留意した。

生命科学の分野において、構造生物学などの「生体分子の科学」から「生命現象の科学」への流れが顕在化しつつある点に重点を置き、複雑系の科学である生命現象の本質にかかわる計測・分析技術の飛躍的展開を目指す研究、すなわち細胞間や細胞内での生体分子の動態を捉える新規な測定技法やそれを可能にするプローブの開発を重視した。また、構造生物学分野においても複雑な生体分子間相互作用や既存の方法では観測不可能な動的構造と機能との相関を見いだす新規な手法も選考の対象とした。さらには生物個体、生態レベルで生命現象の本質に関わる計測・分析技術の開発の提案も選考対象として含めた。

## 4. 選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザー・外部評価者3名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補者を選定した。

選考	書類選考	面接選考	採用者
対象者数	106名	24名	10名

## 5. 研究実施期間

平成18年10月～平成22年3月

## 6. 領域の活動状況

領域会議:7回

研究報告会:1回

生命・計測分析合同研究会:3回

研究総括(または技術参事)の研究実施場所訪問:21回

研究開始時に研究現場を訪問し、研究環境、設備等や研究費の確認及びヒヤリング、組織責任者への協力依頼を行った。研究期間内で異動した研究者をその都度訪問し、研究環境を確認した上、新組織責任者への協力依頼、研究継続に必要な支援の決定を行った。訪問には、技術参事が同行した。

研究総括の個別研究指導:10回

終了年度に、成果達成状況と残された課題の把握・アドバイスをを行うため、10名の研究者に対して、JST三番町事務所(4名)、領域事務所(6名)で、個別研究指導を行った。

## 7. 評価の手続き

研究者の研究課題別評価書を基に、領域アドバイザーの意見を参考にして研究総括がおこなった。

### (評価の流れ)

平成 21 年 9 月	第8回領域会議(総括・アドバイザーによる進捗評価とアドバイスの実施)
平成 22 年 1 月	研究報告会開催(総括・アドバイザーによる評価の実施)
平成 22 年 2 月	研究報告書及び研究課題別評価書提出(研究者作成)
平成 22 年 3 月	研究総括による評価に基づき領域活動・評価報告書提出
平成 22 年 3 月	研究期間終了
平成 22 年 4 月	研究報告書提出

## 8. 評価項目

- (1) 研究目標に対する研究課題の達成度
- (2) 得られた研究成果の科学技術への貢献(計画外成果も含む)
- (3) 外部発表(論文、口頭発表等)、特許出願など研究成果の発信状況
- (4) 受賞・招待講演など外部からの評価状況

## 9. 研究結果

本領域研究は、タンパク質などの生体分子そのもの(1分子を含む)の静的・動的構造解析を行う構造生物学的新手法の開発は一部には含むものの、複雑な生命現象(の一断面)を捉えて解析する研究を目指すものである。したがって細胞レベル、個体レベルでの生体分子の動的挙動やそれらの間の相互作用、などの研究に重点を置いている。本年度の終了研究課題は昨年度の終了研究課題に比べてこれら細胞・個体レベルの研究は比較的に少ない。しかしながら、*in vitro* 生体分子そのものの計測分析であっても新しい手法(たとえばラマン円偏光二色性分光法、AFMによるポリペプチド1分子の粘弾性測定、いくつかの1分子イメージング計測法)が含まれており、生物的、生化学的、生物物理学的新知見が得られることが期待された。これらの新測定手法の開発は3年間で概ね達成されたと言えよう。しかしながら、生物的、生化学的、生物物理学的新知見については未だしといった感があり、今後期待したい。

GFPなどの蛍光タンパク質を用いない合成プローブラベル法、光受容タンパク質を遺伝子発現のための光スイッチに用いる制御法、なども多方面での応用に繋がる可能性を持っているだけに、更なる展開を期待したい。ヒトES細胞、ヒトiPS細胞由来の肝組織の人工構築と機能の実証、チップ化の試みは高く評価したい。人の顔を位相情報から見分けるように細胞も同様に行う測定システムが出来上がり、無染色細胞イメージングへの途が開かれた。これからの展開を期待したい。MRI・蛍光同時測定による細胞イメージング法は極めて重要であるが、かなりの段階まで進展した。手法の完成までにはまだ克服すべき課題は残っており早急な進展が欲しいところだ。タンパク質における力発生の3次元可視化測定システムが完成した。力感受性蛍光タンパク質の分子設計、3次元可視化技術の開発は素晴らしいものがある。生細胞を用いた研究への展開を期待したい。

いずれの研究もかなりの成果を挙げているが最終目標への到達度は今ひとつといったところである。しかしながら、いずれの研究もこれから加速度的に進展し1、2年で達成されるものと確信している。

以下、研究者別にそれらの研究課題と成果ならびに評価を記す。

### 「ラマン円偏光二色性分光による生体分子の動的構造解析」(海野 雅司 研究者)

ラマン円偏光二色性分光装置の作製をとにかく仕上げたことは評価出来る。量子化学計算でシミュレーションした分子を実際に測定してどのような情報が得られるかを示して欲しかった。バクテリオロドプシンに応用し、暗状態と明状態でのスペクトルの違いを微弱な信号ながら観測したが、その解釈がないのは残念だ。今後感度向上に向けて特段の工夫を行い多成分系の測定まで発展させれば新しい分野を開拓することになる。

### 「プローブラベリングによるタンパク質間相互作用解析」(王子田 彰夫 研究者)

(Asp)4あるいはこれを倍長した亜鉛錯体をSH基と共有結合可能なタグ認識ラベル化分子を作製し、具体的応用例としてブラディキニン受容体をラベル化し多色イメージングに成功している。まだ細胞表層膜タンパク質だけであり、しかも細胞外からのラベル化など限定的である。しかし、pH感受性色素を用いてエンドソーム内の酸性度をイメージング化している点は興味深い。細胞研究のための合成小分子ラベル法を着実に進めていると評価出来る。より簡便な導入法と合成法の開発が望まれる。

「光受容タンパク質を利用した新しい遺伝子機能解析法の開発」(岡野 俊行 研究者)

当研究者の見出したニワトリ由来のクリプトクロム(CRY)を光で CRIP 結合を制御して転写活性につなげたことは高く評価出来る。まだ基礎的研究の段階であるが、この系が遺伝子発現のための光スイッチに用いる制御方法としてその応用性への期待が大きい。ほ乳類での発現も目指してほしい。基礎研究としては CRY のフラビンへの光照射で CRIP が解離するメカニズムや磁気センシング機構も解明してほしい(構造生物学者、生物物理化学者と協同で)。今後の研究発展に大きな期待が持てる。

「熱揺らぎを利用した粘弾性測定による 1 分子内部運動の解析」(川上 勝 研究者)

AFM でポリペプチド 1 分子の粘弾性を観測出来る装置を作製したことは高く評価出来る。タンパク質機能と関連する微小変形領域での粘弾性の測定が望まれるが、一層の測定感度の向上に努めて欲しい。また、生体系への応用として可能性があるのか少しでも示して欲しかった。

「ES細胞由来肝組織装置による薬物動態計測システム」(田川 陽一 研究者)

ヒト ES 細胞実験の許可の取得に時間がかかったにもかかわらず精力的な努力の結果、ヒト ES 細胞、ヒト iPS 細胞由来の肝組織構築に成功し、肝機能を発現することも実証したことは極めて高く評価出来る。チップとして利用出来る可能性も示した。実用段階までに発展すれば創薬研究などへの貢献は極めて大きいものがある。今後の発展を大いに期待したい。

「タンパク質 1 分子モーションキャプチャー技術の開発」(谷 知己 研究者)

蛍光分子の配向を時空間的に計測出来る新しい光学顕微鏡を開発したことは高く評価出来る。このイメージ技術は光学理論・実験両面から丁寧な検討がなされている。しかしながら、タンパク質の揺らぎなど動的挙動について何が新しく分かったかについては明瞭な説明が欲しいところだ。今後、膜タンパク質や細胞内の 1 分子の配向変化を機能とどのように関連させるかが課題となろう。

「MRI・蛍光同時計測による生体内分子・細胞イメージング法の開発」(森田 将史 研究者)

常磁性 Mn イオンをナノダイヤモンド(ND)に注入し、蛍光性でかつ MRI 適用可能性を示したことは評価する。マルチモーダル造影剤である ND がともかく開発された。しかしながら、生体適応性や感度の検討、さらには本来の目標である生体への適用は今後の課題として残された。今後の進展を期待したい。

「DNA/タンパク質間相互作用の高精度 1 分子多次元解析」(横田 浩章 研究者)

DNA とタンパク質(ヘリカーゼ)との相互作用(結合・解離)を、力を加えつつ 1 分子レベルで計測するための光学顕微鏡を開発した点は評価したい。しかしながら具体的測定対象については、DNA にヘリカーゼ何分子が結合しているかを直接観測したことは評価するものの、DNA-タンパク質間相互作用の何が初めて明らかにされたのかが明確でない。意義のあるターゲットの絞り込みが今後の課題であろう。

「細胞情報解析のための超高精度・高速位相計測システム」(渡邊 恵理子 研究者)

位相情報をもとに無染色で細胞イメージングを行うというユニークで新しい測定システムを開発し、限られてはいるものの細胞の形態測定などの基本実験にも成功している。今後多数のサンプルを計測して生細胞系への実際の応用が可能になることを大いに期待したい。

「生細胞内における蛍光蛋白質による力発生の 3 次元可視化」(渡邊 朋信 研究者)

3次元動的可視化のイメージングハードウェア作製の力量は素晴らしい。また、力感受性蛍光タンパク質の分子設計にも改良の余地はあるものが見事に成功している。目的に対する道具立てはほぼ達成したと言えよう。期間内にこれだけの成果を挙げたことを大いに評価する。今後の生細胞研究への応用展開が楽しみである。

10. 評価者

研究総括 森島 績 立命館大学総合理工学院生命科学部 客員教授、  
京都大学大学院工学研究科 名誉教授

領域アドバイザー氏名(五十音順)

石渡 信一 早稲田大学理工学術院 教授  
 神原 秀記 (株)日立製作所 フェロー  
 北川 禎三 (財)豊田理化学研究所 フェロー  
 桐野 豊 \*1 徳島文理大学 学長  
 栗原 和枝 東北大学多元物質研究所 教授  
 田村 守 清華大学医学院 高級訪問学者  
 長野 哲雄 東京大学大学院薬学系研究科 教授  
 難波 啓一 大阪大学大学院生命機能研究科 教授  
 藤吉 好則 京都大学大学院理学研究科 教授  
 柳田 敏雄 大阪大学大学院生命機能研究科 教授

\*1 平成19年3月から参画

(参考)

(1)外部発表件数

	国内	国際	計
論文	1	41	42
口頭	105	47	150
その他	13	1	14
合計	118	88	206

※平成22年3月現在

(2)特許出願件数

国内	国際	計
11	1	12

※平成22年3月現在

(3)受賞等

○川上勝研究者

・平成20年10月 AFM BioMed Conference Best Poster Presentation Award 受賞

○田川陽一研究者

・平成21年11月 第22回日本実験動物代替法学会総会 優秀演題賞受賞

(4)招待講演

国際 14 件

国内 35 件

※平成22年3月現在

## 「生命現象と計測分析」領域 研究課題名および研究者氏名

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職 (応募時所属)	研究費 (百万円)
海野 雅司 (兼任)	ラマン円偏光二色性分光による生体分子の動的構造解析 (佐賀大学 理工学部 機能物質化学科)	佐賀大学 理工学部 機能物質化学科 准教授 (同上 助教授)	48
王子田 彰夫 (兼任)	プローブラベリングによるタンパク質間相互作用解析 (京都大学大学院 工学研究科)	京都大学大学院 工学研究科 講師 (同上 助手)	47
岡野 俊行 (兼任)	光受容タンパク質を利用した新しい遺伝子機能解析法の開発 (早稲田大学 理工学術院 先進理工学研究科)	早稲田大学 理工学術院 先進理工学研究科 准教授 (同上 助教授)	43
川上 勝 (兼任)	熱揺らぎを利用した粘弾性測定による1分子内部運動の解析 (北陸先端科学技術大学院大学 マテリアルサイエンス研究科)	北陸先端科学技術大学院大学 マテリアルサイエンス研究科 講師 (Postdoctoral fellow, Institute of Molecular Biophysics, University of Leeds)	44
田川 陽一 (兼任)	ES細胞由来肝組織装置による薬物動態計測システム (東京工業大学 フロンティア創造共同研究センター 生命系)	東京工業大学 フロンティア創造共同研究センター 生命系 准教授 (東京工業大学大学院 生命理工学研究科 助教授)	43
谷 知己 (兼任)	タンパク質1分子モーションキャプチャー技術の開発 (北海道大学 電子科学研究所)	北海道大学 電子科学研究所 准教授 (同上 助教授)	42
森田 将史 (兼任)	MRI・蛍光同時計測による生体内分子・細胞イメージング法の開発 (大阪大学 免疫学フロンティア研究センター)	大阪大学 免疫学フロンティア研究センター 特任助教 (滋賀医科大学 MR医学総合研究センター 特任助手)	40
横田 浩章 (兼任)	DNA/タンパク質間相互作用の高精度1分子多次元解析 (京都大学 物質-細胞統合システム拠点)	京都大学 物質-細胞統合システム拠点 講師 (財)東京都医学研究機構 東京臨床医学総合研究所 主任研究員)	40
渡邊 恵理子 (兼任)	細胞情報解析のための超高精度・高速位相計測システム (独)物質・材料研究機構 国際ナノアーキテクトニクス研究拠点)	(独)物質・材料研究機構 国際ナノアーキテクトニクス研究拠点 独立研究者 (日本女子大学 理学研究科学術研究員)	42
渡邊 朋信 (兼任)	生細胞内における蛍光蛋白質による力発生の3次元可視化 (大阪大学 免疫学フロンティア研究センター)	大阪大学 免疫学フロンティア研究センター 特任助教 (東北大学 先進医工学研究機構 助手)	40

## 研究課題別評価書

### 1. 研究課題名

ラマン円偏光二色性分光による生体分子の動的構造解析

### 2. 氏名

海野 雅司

### 3. 研究のねらい

タンパク質の機能を分子構造レベルで明らかにするためにはその立体構造を知ることが必須であり、X線結晶構造解析やNMRなどが有力な研究手段となる。一方、結晶構造解析などでは判別出来ない微細な構造の違いや短寿命化学種の構造などを解析するため、さまざまな分光学的手法も併用していく必要がある。なかでもラマン散乱などの振動分光は分子の構造や周辺環境の違いに鋭敏で、例えば図1に示した4-ビニルフェノラートの場合、振動スペクトルから水素結合のない構造Aと水素結合を形成した構造Bを容易に区別することができる。しかしタンパク質の機能を解明するためにはしばしば水素結合の向きの違い(構造BとCの違い)など更に高次の構造情報が鍵を握るが、従来の手法では区別ができなかった。そこで我々は従来の限界を超えるブレークスルーとしてラマン円偏光二色性分光(Raman Optical Activity, ROA)に注目した。

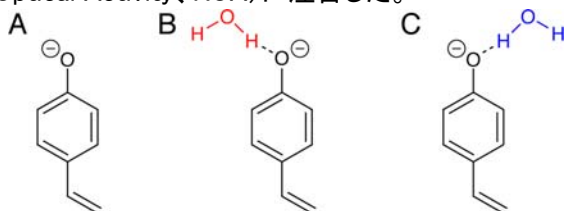


図1. 4-ビニルフェノラートの構造。BとCでは水分子と水素結合を形成しているが、その向きが異なる。

ラマン円偏光二色性分光は右回りと左回りに円偏光した励起光により測定したラマン散乱光の強度差が鏡像異性体では異なる点を用いた分光法である。ラマン円偏光二色性スペクトルの信号強度はただでさえ微弱なラマン散乱光より数桁( $10^{-3}$ ~ $10^{-4}$ 以下)も小さいためその測定は容易ではない。しかし、タンパク質をはじめとした生体分子の多くは光学活性であり、格好の応用例である。実際、最近の技術的な進展によってタンパク質などの生体分子への応用例が報告されるようになってきた。しかし、本手法の生体分子への応用は未だ限定的なものとなっている。その理由の一つは蛍光を発する試料には適用できない点である。これはラマン分光全般に当てはまる問題であるが、試料自身または試料に含まれる微量の夾雑物が励起レーザー光を吸収してそのエネルギーを蛍光として放出すると微弱なラマンスペクトルを覆い隠してしまい測定が不可能となる。またラマン円偏光二色性分光に特有の問題として、励起光の波長と試料の電子吸収帯の波長が一致したいわゆる“共鳴ラマン分光”の条件下では有益な構造情報を与えるラマン円偏光二色性スペクトルを測定できないという問題がある。このため従来の可視光を励起光としたラマン円偏光二色性分光では可視域に吸収のある試料には適用できず、例えばヘムタンパク質や光受容タンパク質などのような活性中心として色素分子を含んだタンパク質などへの応用はなかった。

そこで、我々は上記の蛍光と光吸収の問題を克服してさまざまな生体分子への応用を実現するため、近赤外励起のラマン円偏光二色性分光装置を開発することにした。本研究で開発した計測技術をさらに発展させ、短寿命化学種や生体組織・ナノ材料などへの応用への道を切り拓くことが本研究の究極の目標である。

### 4. 研究成果

#### A. 可視光励起ラマン円偏光二色性分光装置の開発

さまざまな生体分子に応用可能な近赤外励起のラマン円偏光二色性分光装置の開発が本研究の目的であるが、ラマン円偏光二色性スペクトルの信号強度は励起光の波長の4乗に

反比例するため、可視光励起に比べて近赤外光励起の測定はより難しいものとなる。そこで、我々はまず可視光(532 nm)を励起光源とするラマン円偏光二色性分光装置を開発してノウハウを蓄積したあとに近赤外励起(785 nm)の装置を開発することにした。

本研究で開発した入射円偏光型の可視光励起ラマン円偏光二色性分光装置では、光源には発振波長 532 nmの半導体励起固体(DPSS)レーザーを用い、 $\lambda/4$  波長板または液晶可変位相差板を用いて直線偏光を円偏光に変換した。ラマン散乱光は後方散乱方式で観測し、エッジフィルターでレーリー散乱光を除去したあとバンドルファイバーを用いて分光器に導入し、電子冷却型CCD検出器で測定した。ラマン円偏光二色性スペクトルはその信号強度が非常に小さいことから偽信号(アーチファクト)の影響を受けやすい。そこで偽信号を除去するため、 $\lambda/2$  波長板を用いたスペクトルの補正機構を導入した。実験は右回りまたは左回りに円偏光した励起光で測定したラマンスペクトル $I^R$ と $I^L$ を交互に測定し、これらの和( $I^R + I^L$ )がラマンスペクトル、差( $I^R - I^L$ )がラマン円偏光二色性スペクトルとなる。CCD検出器や液晶可変位相差板などの機器類は自作の測定プログラムから制御できるようにし、全自動で一連の測定ができるようにした。

生体関連試料の測定に先立ち、性能評価のために測定した(-)- $\alpha$ -ピネンと(+)- $\alpha$ -ピネンのラマンおよびラマン円偏光二色性スペクトルを図 2 に示した。ラマン円偏光二色性スペクトルの信号強度はラマンスペクトルの約 1000 分の 1 程度と小さいが、既報と一致する結果が得られた。また二つの鏡像異性体ではスペクトルの符号が反転して区別できることが確認できた。

次に生体関連試料としてアミノ酸(L-アラニン)とタンパク質(リゾチーム)についてラマン円偏光二色性スペクトルを測定した。図 3 左に示したようにL-アラニンについてもラマン円偏光二色性スペクトルを測定することができた。しかし、ピネンのような有機化合物に比べると水溶液試料であるL-アラニンでは信号強度が小さい上にスペクトルのバックグラウンドが大きいため、測定には長時間の積算が必要であった。図 3 右に示したようにリゾチームについても既報のラマン円偏光二色性スペクトルと一致する結果が得られることを確認できた。

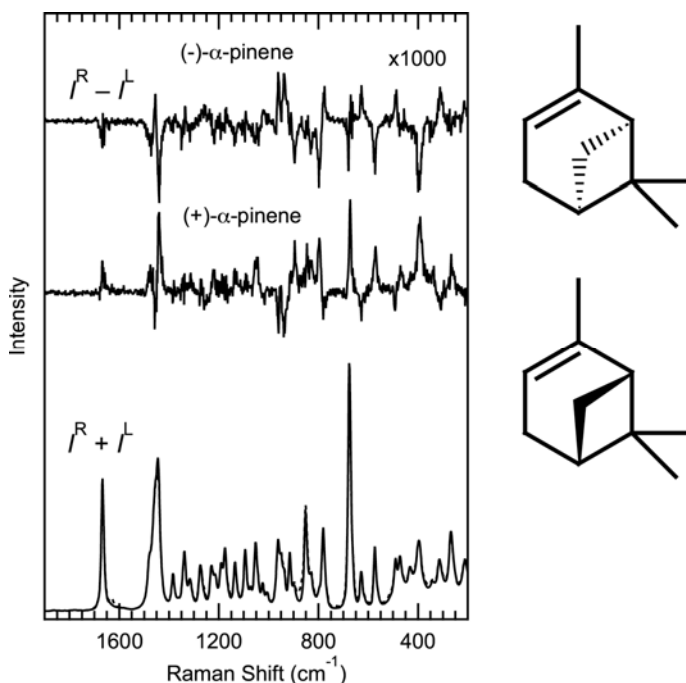


図 2. (-)- $\alpha$ -ピネンおよび(+)- $\alpha$ -ピネンのラマンスペクトルとラマン円偏光二色性スペクトル。励起波長 532 nm。

## B. 近赤外光励起ラマン円偏光二色性分光装置の開発

上記のように可視光励起の装置を開発し、信号-雑音比(SN 比)の点などで更なる改良が必要なものの、ラマン円偏光二色性スペクトルを測定できることを確認した。そこで本研究の目的であるさまざまな生体分子に応用可能な近赤外励起のラマン円偏光二色性分光装置の開発を行った。近赤外用装置の基本設計は可視光用装置と同じであるが、光源には半導体レーザー(発振波長 785 nm)を用い、分光器をはじめとした各種光学部品類に近赤外光用に最適化されたものを用いた。その結果、785 nm 励起においても可視光用装置と比べても遜色のないスペクトルを得られるようになった。

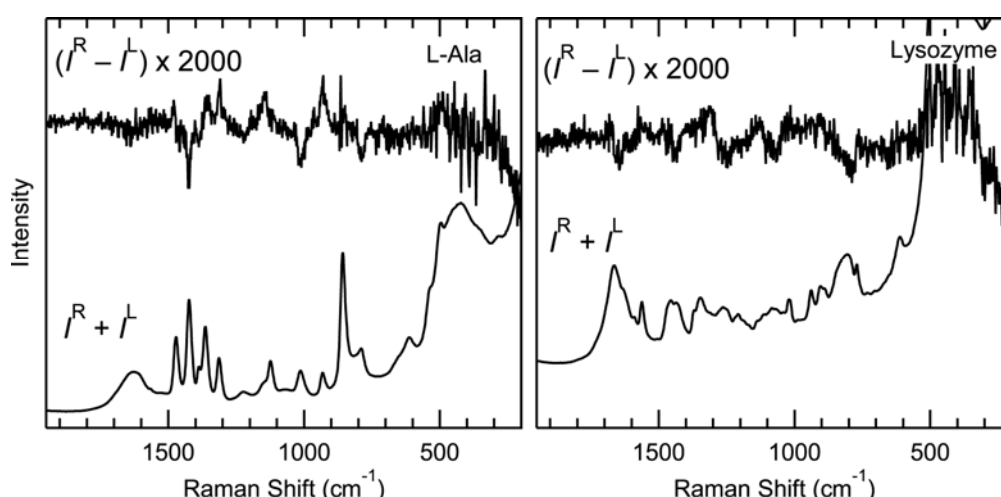


図 3. L-アラニン(左)とリゾチム(右)のラマンスペクトルとラマン円偏光二色性スペクトル。励起波長 532 nm。

開発した近赤外用装置を用いて測定した(-)- $\alpha$ -ピネンと(+)- $\alpha$ -ピネンのラマンおよびラマン円偏光二色性スペクトルを図4に示した。まずラマンスペクトルを図2の励起波長 532 nmでの測定結果と比べると 785 nm 励起においても同様のスペクトルが観測されていることがわかる。しかし、785 nm 励起のスペクトルでは高波数側のバンド強度が相対的に低くなった。可視光用装置と同じく近赤外用装置においても検出器として CCD を用いたが、CCD の検出感度は長波長側になるに従って減少するため、高波数側のバンド強度が小さくなっていると考えられる。

つぎに図2と4のラマン円偏光二色性スペクトルを比較すると、ラマンスペクトルと同様に 532 nm 励起に比べると 785 nm 励起で観測したスペクトルは高波数側のバンド強度が小さくなっている以外は類似の結果が得られた。しかしラマンスペクトルに対するラマン円偏光二色性スペクトルの強度比  $(I^R - I^L)/(I^R + I^L)$  は約半分になっており、可視光励起に比べるとより難しい測定であることが確認された。また可視励起ラマン円偏光二色性分光装置と同様に、近赤外用装置についても L-アラニンとリゾチムへの応用を試み、ラマン円偏光二色性スペクトルを測定できることを確認した。

以上のように、本研究において近赤外ラマン円偏光二色性分光装置の開発を行うことができた。そこで、開発した装置を用いて近赤外励起用装置でしか測定できない可視部に吸収をもつタンパク質試料としてバクテリオロドプシンとハロロドプシンについて測定を行い、ラマン円偏光二色性スペクトルの測定に世界で初めて成功した。

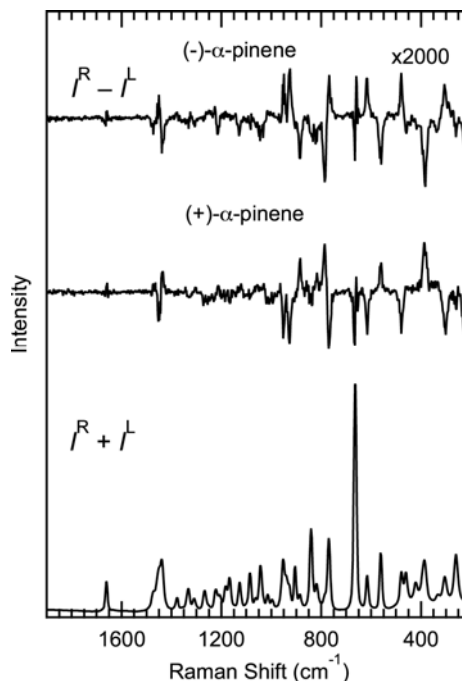


図 4. (-)- $\alpha$ -ピネンおよび(+)- $\alpha$ -ピネンのラマンスペクトルとラマン円偏光二色性スペクトル。励起波長 785 nm。



## 5. 自己評価

本さがけ研究では(1)可視光励起のラマン円偏光二色性分光装置と(2)近赤外光励起のラマン円偏光二色性分光装置を開発することができた。本研究の主目的である近赤外光励起ラマン円偏光二色性に関しては、従来の可視光励起の装置では測定できなかった色素タンパク質の代表例として、バクテリオロドプシンとハロロドプシンへの応用に世界で初めて成功した。しかし得られたラマン円偏光二色性スペクトルの解釈を含め、データの解析法の開発に関してはほとんど手つかずの状態である。また従来では測定できなかった生体関連試料への応用も少ない。今後は装置性能の更なる向上を図ると同時に、さまざまな生体関連試料に応用し、本手法の有用性を実証していく必要がある

## 6. 研究総括の見解

ラマン円偏光二色性分光装置の作製をとにかく仕上げたことは評価出来る。量子化学計算でシミュレーションした分子を実際に測定してどのような情報が得られるかを示して欲しかった。バクテリオロドプシンに応用し、暗状態と明状態でのスペクトルの違いを微弱な信号ながら観測したが、その解釈がないのは残念だ。今後感度向上に向けて特段の工夫を行い多成分系の測定まで発展させれば新しい分野を開拓することになる。

## 7. 研究成果リスト

### A. ささがけ個人研究者が主導で得られた成果

#### (1)論文(原著論文)発表

##### 論文(国際)

・Unno, M., Kumauchi, M., Tokunaga, F., & Yamauchi, S. Vibrational Assignment of the 4-Hydroxycinnamyl Chromophore in Photoactive Yellow Protein. *J. Phys. Chem. B.* 111, 2719-2726 (2007).

・Kikuchi, S. Unno, M., Zikihara, K., Tokutomi, S., & Yamauchi, S. Vibrational Assignment of the Flavin-Cysteiny Adduct in a Signaling State of the LOV Domain in FKF1. *J. Phys. Chem. B.* 113, 2913-2921 (2009).

・Unno, M., Kikuchi, S. & Masuda, S. Structural Refinement of a Key Tryptophan Residue in the BLUF Photoreceptor AppA by Ultraviolet Resonance Raman Spectroscopy. *Biophys. J.* in press.

#### (2)特許出願

研究期間累積件数:0件

#### (3)学会発表

##### 学会発表(国際)

・Unno, M., Masuda, S., Ono, T., & Yamauchi, S. Light-induced structural changes in the BLUF domain of AppA Revealed by Raman Spectroscopy. Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2006.11. Naha, Japan

・Unno, M., Kikuchi, S., Zikihara, K., Tokutomi, S., & Yamauchi, S. Raman Spectra and Vibrational Assignment for a Signaling State of FKF1 LOV Domain. In Proceedings of the XX1st International Conference on Raman Spectroscopy. Withnall, R., and Chowdhry, B. Z., Eds. 817-818, IM Publications (2008).

##### 学会発表(国内)

・菊池 定人、海野 雅司、直原 一徳、徳富 哲、山内 清語. シロイズナズナ FKF1-LOV ドメインにおけるフラビンのラマンスペクトルと基準振動解析. 第 34 回生体分子科学討論会. 2007.6. 仙台

・菊池 定人、海野 雅司、直原 一徳、徳富 哲、山内 清語. LOV ドメインにおけるフラビンのラマンおよび IR スペクトルとその振動解析. 日本生物物理学会第 45 回年会. 2007.12. 横浜

・立石 裕介、中尾 雄高、加茂 直樹、海野 雅司. ファラオニスフォボロドプシン光反応中間体の共鳴ラマン分光法による解析. 第 36 回生体分子科学討論会. 2009.6. 札幌

・海野 雅司、立石 裕介、中尾 雄高、田母神 淳、加茂 直樹. 共鳴ラマン分光法によるファラオニスフォボロドプシン N 中間体の検出. 日本生物物理学会第 47 回年会. 2009.10. 徳島

・新ヶ江 貴人、海野 雅司. 近赤外励起ラマン円偏光二色性分光装置の開発. 日本化学会第 90 季年会. 2010.3. 大阪

#### (4)招待講演

##### 招待講演(国際)

・Unno, M. Structural Changes during the Photocycle of Photoactive Yellow Protein Monitored by Ultraviolet Resonance Raman Spectra of Tyrosine and Tryptophan. Japan-China Crossover Science Symposium (JCCSS) 2006.10., Mito, Japan

・Unno, M. Flavin-Containing Blue-Light Receptor BLUF Protein Studied by Mutagenesis, Spectroscopy, and Quantum Chemical Calculations. 3rd International Forum: IFSC 2006 Winter. New Waves in Supramolecular Chemistry and Superstructured Materials, Kumamoto, Japan 2006.12., Kumamoto, Japan

・Unno, M. Flavin-Containing Blue Light Photoreceptor Proteins Studied by Raman Spectroscopy. International Symposium on the Biological Application of Vibrational Spectroscopy, 2007.3. Hyogo, Japan

##### 招待講演(国内)

・海野 雅司、振動分光と第一原理計算からタンパク質の動的構造を明らかにする. (社)新化学発展協会、ライフサイエンス技術部会講演会. 2007.6. 東京

・海野 雅司、ラマン円偏光二色性分光によるタンパク質の高次構造解析法の開発. 日本生物物理学会北海道支部会講演会. 2007.9. 札幌

・海野 雅司、分光学の立場から見た蛋白質合成法への期待-振動分光による光センサータンパク質の研究. 大阪大学蛋白質研究所セミナー「蛋白質合成法の最近の進歩と生命科学」2008.9. 吹田

・海野 雅司、ラマン分光法で迫るフラビタンパク質の光反応機構の解明. 日本生物物理学会第 47 回年会 シンポジウム「フラビン型青色光受容体の多様な光反応と機能」. 2009.10. 徳島

・海野 雅司、フラビンを発色団としてもつ光受容タンパク質の光反応機構の解明-ラマン分光法によるアプローチ. 平成 21 年度 物理化学インターカレッジセミナー. 2009.12. 福岡

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

(1) 論文(原著論文)発表

論文(国際)

• Nishihara, H., Yang, Q.-H., Hou, P.-X., Unno, M., Yamauchi, S., Saito, R., Paredes, J. I., Martinez-Alonso, A., Tascon, J. M. D., Sato, Y., Terauchi, M., & Kyotani, T. A Possible Buckybowl-Like Structure of Zeolite Templated Carbon. *Carbon* 47, 1220–1230 (2009).

## 研究課題別評価書

### 1. 研究課題名

プローブラベリングによるタンパク質間相互作用解析

### 2. 氏名

王子田 彰夫

### 3. 研究のねらい

細胞内の多くのタンパク質は、複数のタンパク質からなるタンパク質複合体を構成して機能を発現している。本研究では、タンパク質複合体の構成と機能を解析するため新しいタンパク質ラベル化法の開発を目指す。このタンパク質ラベル化技術を用いて様々な機能性分子プローブの標的タンパク質への特異的にラベル化を実現し、タンパク質複合体の蛍光可視化やタンパク質間相互作用変化の検出を可能とする基盤技術の確立を目指す。

### 4. 研究成果

機能性プローブによるタンパク質のラベル化は、タンパク質の機能解析に極めて有用な手法である。このプローブラベリングによるタンパク質機能解析を行うためには、小分子プローブを特定のタンパク質の特定部位に選択的に標識する技術が必要となる。タンパク質に導入した短いペプチドタグと、これと特異的に強く相互作用する小分子プローブの組み合わせを利用したタグ・プローブペアは、タンパク質の特異的ラベル化を可能とする分子ツールとして有用である。本さきがけ研究では、このタグ・プローブペアによるタンパク質ラベル化技術を応用して、様々な小分子プローブをタグ導入タンパク質へと共有結合ラベル化できる手法(リアクティブタグシステム)の開発を行った(図1)。本研究では、このタグ・プローブペアから構成されるタンパク質ラベル化法を、細胞系におけるタンパク質間相互作用解析へと応用することを目標として研究を展開した。

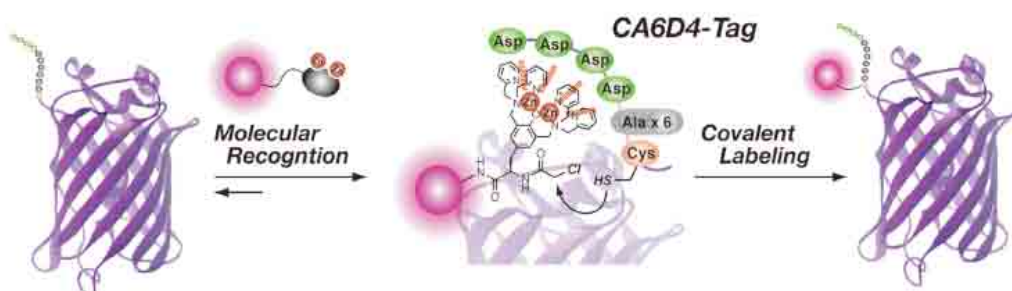


図1. リアクティブタグ法によるタグ導入タンパク質の特異的共有結合ラベル化

本研究の開始に先駆けて我々は、チロシンを基本骨格とする二核亜鉛錯体Zn(II)-DpaTyrが、連続するアスパラギン酸4連続配列(DDDD; D4 タグ)と1:1の複合体を形成して強く相互作用できる基礎的な知見を見出した(図2)。我々は、タグとZn(II)-DpaTyr亜鉛錯体間のより強い相互作用を得るために、D4 タグを二つ連続させた配列(DDDDGDDDD)を有するタンパク質とZn(II)-DpaTyrを二つ連結した亜鉛錯体ダイマーとの親和性は $K_d$ にして55 nMに達し、マルチバレントな相互作用により非常に強いタグ・プローブ間の相互作用が達成できることを明らかとした。本研究において我々は、このタグ/プローブペアを細胞表層に発現するGPCRタンパク質のバイオイメージングへと応用した。すなわち、細胞外領域にD4 タグを導入したアセチルコリン受容体(AChR)をCHO細胞に発現させ、亜鉛錯体型プローブ1-4Zn(II)を持ってラベル化する事により、細胞表層に発現している受容体を蛍光可視化することに成功した(図2)。

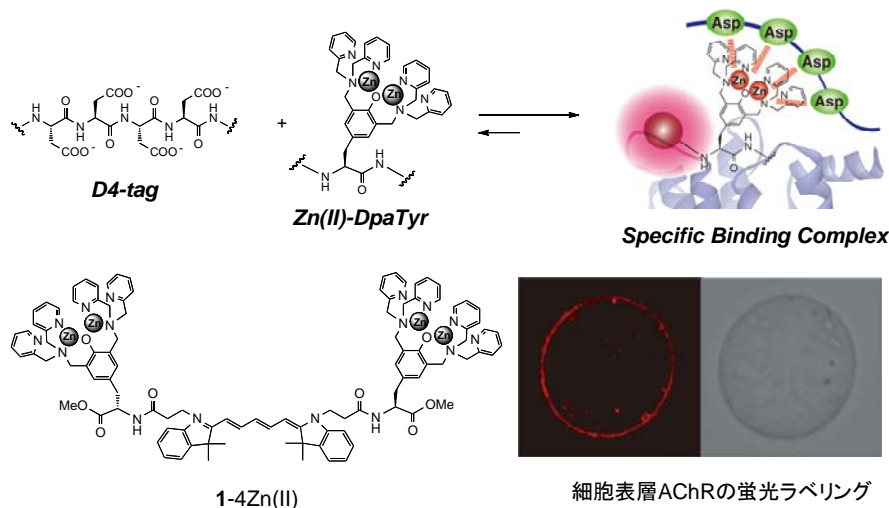


図2.D4 タグと Zn(II)-DpaTyr の特異的相互作用

しかしながら、このラベル化法では、タグとプローブは可逆な金属-配位子相互作用で結合しているのみであり、蛍光標識はしだいに減弱し、またラベル化後の FACS やブロットイング解析などは困難となりツールとしての応用性に限りがある。本研究では、この問題を解決するために、タグと小分子プローブとが非加逆的な共有結合により連結される新しい手法(リアクティブタグシステム)の開発を行った(図1)。このリアクティブタグシステムでは、タグとプローブとが分子認識により複合体を形成した状態において、両者の近接および配向効果により特異的な共有結合形成反応が起こる。このような共有結合反応を起こす組み合わせとして、タグとしてはシステインを有するアスパラギン酸4連続配列、プローブは $\alpha$ -クロロアセチル基を有する Zn(II)-DpaTyr を新たにデザインした(図3)。アスパラギン酸4連続配列とシステインとの間に複数個のアラニンを含むペプチドタグとプローブ 2-2Zn(II)との共有結合反応を検討したところ、アラニンが6個のペプチドタグ(CAAAAAADDDD; CA6D4 タグ)が非常に早い反応速度で特異的にラベル化されることが明らかとなった。その反応の初速度は、タグとプローブ間の分子間相互作用がない場合と比較すると約 1,500 倍加速されていた(図3)。アラニンの数が異なるペプチドでは、CA6D4 タグに見られる大きな反応速度は観測されず、CA6D4 タグの特異的な高反応性は興味ある現象である。次に CA6D4 タグを導入した EGFP タンパク質を用いてラベル化反応についての検討を行った。MALDI-TOF マスにより、CA6D4 タグを有する EGFP タンパク質のラベル化反応を追跡すると、反応は非常に迅速であり開始後15分でほぼ定量的なラベル化が起こる事が明らかとなった(図3)。また、フリーのシステインを有する複数のタンパク質との混合系において反応を行ったところ、反応は CA6D4 タグを有する EGFP へのみ選択的進行している事が明らかとなった。さらに我々は、大腸菌ライセート中において過剰発現させたタグ導入 MBP プロテインに対しても、ラベル化反応が選択的に進行する事を確認した。このような人工のタグ・プローブペア間の非酵素的かつ特異的な共有結合ラベル化法はこれまでに例がなく、我々はこれを「リアクティブタグシステム」と名付けた。

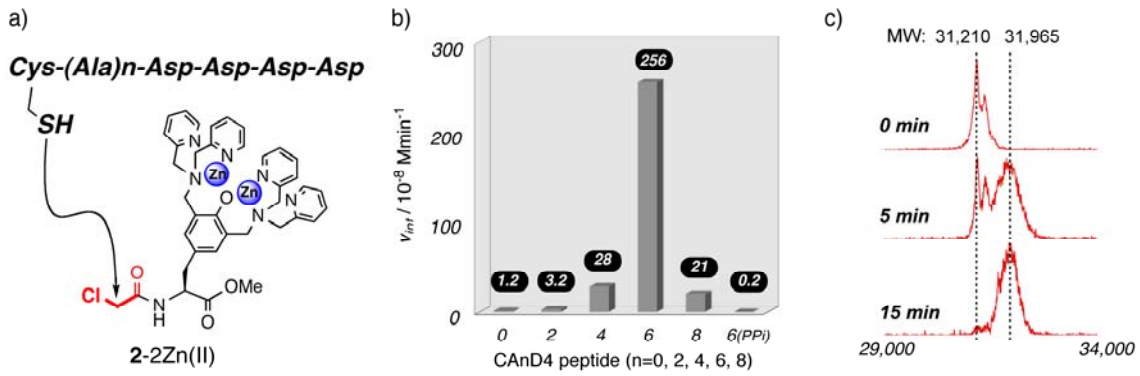


図3. a) リアクティブタグシステムにおける共有結合形成反応 b) 各タグペプチドの反応初速度の比較 c) CA6D4 タグを導入した EGFP タンパク質のラベル化反応の追跡(MALDI-TOF マス)

次に「リアクティブタグシステム」を細胞表層に発現させた GPCR 受容体の共有結合ラベル化へと応用した。GPCR としてまず、ブライキニン受容体(B2R)を選択し、細胞外領域に 16 残基のタグ配列(CAAAAAADDGDDDD;CA6D $\times$ 2 タグ)を有する形で HEK293 細胞に発現させた。プローブとしては、 $\alpha$ -クロロアセチル基(反応部位)とローダミン(蛍光団)を有する 4 核亜鉛錯体 3-4Zn(II)を設計した(図3)。当初、両者の反応は進行しなかったが、細胞を TCEP などの穏やかな還元剤で処理することにより、B2R 受容体の共有結合ラベル化反応が効よく進行することが共焦点レーザー顕微鏡を用いた蛍光イメージング実験から明らかとなった(図3)。この原因としては、タグ上のシステイン残基が細胞外の酸化雰囲気化で酸化され、ジスルフィドを形成、不活性化されているためであると考えられる。ラベル化反応の定量的解析を行ったところ、反応は細胞表層においても30分程度で飽和に達することが明らかとなった。通常の蛍光によりバイオイメージングを行うのであれば、ラベル化はわずか10分程度であった。ラベル化のコントロール実験としてタグのないB2R 受容体や $\alpha$ -クロロアセチル基を持たないプローブを用いた場合には、ラベル化反応は進行しない。これらの二つのコントロール実験の結果および上記の還元剤処理の必要性から、ラベル化反応は受容体に導入したタグ上のシステイン残基とプローブの $\alpha$ -クロロアセチル基間で進行していることが強く示唆される。また、GPCR としてアセチルコリン受容体(AChR)を用いても、ラベル化は HEK293 細胞表層において同様に効率よく進行することを確認した。本手法のラベル化技術としての汎用性を示す結果である。

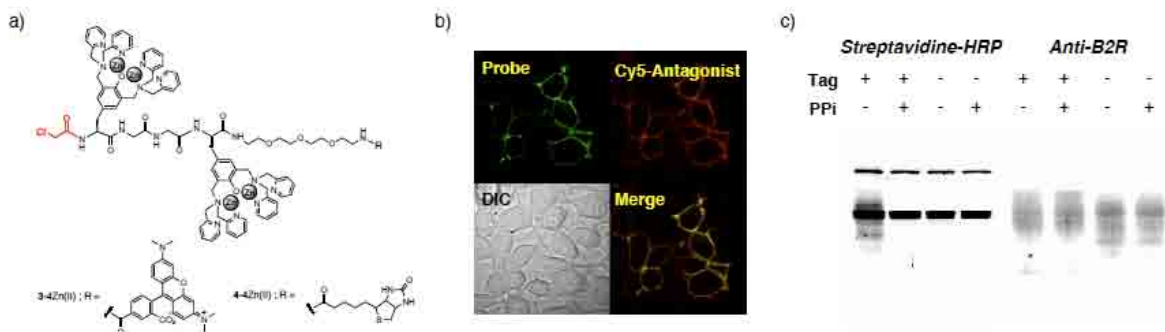


図4. a) ラベル化プローブ構造 b) 3-4Zn(II)による B2R 受容体の蛍光ラベリング c) 4-4Zn(II)による B2R 受容体ラベル化後のプロット解析

本ラベル化反応を用いることにより、様々な機能性プローブを GPCR 上に導入する事が可能である。例えば、異なる色の蛍光色素を有するプローブを用いてラベル化を行う事により、様々な蛍光波長での GPCR のイメージングが可能であった。また、ビオチン型プロ 4-4Zn(II)

を用いる事により、GPCR 上にビオチンを導入することが可能であった。ビオチンの導入は、細胞破碎後のブロッティング解析により確認された(図4)。このようなラベル化後のブロッティング解析は、付加逆な共有結合ラベル化においてはじめて可能であり、先に開発した分子間相互作用によるラベル化法ではなし得ない事である。我々はさらに、ラベル化を行った膜受容体の細胞内動態解析として、アゴニスト刺激による受容体インターナリゼーションの蛍光イメージングを行った(図5)。B2R および AChR をそれぞれ対応するアゴニストで刺激を行うと、蛍光ラベル化された受容体を含むエンドソーム顆粒が時間の経過に伴って細胞内に移行、蓄積する様子をとらえることに成功した。この結果は、標識された受容体の機能が阻害されおらず、アゴニスト刺激に対する応答能を維持している事を示す。また、pH 感受性の蛍光プローブをラベル化する事により、エンドソーム内の酸性化を蛍光により検出することにも成功し、本手法がタンパク質に関連した様々な細胞機能解析へと応用可能であることを実証した。

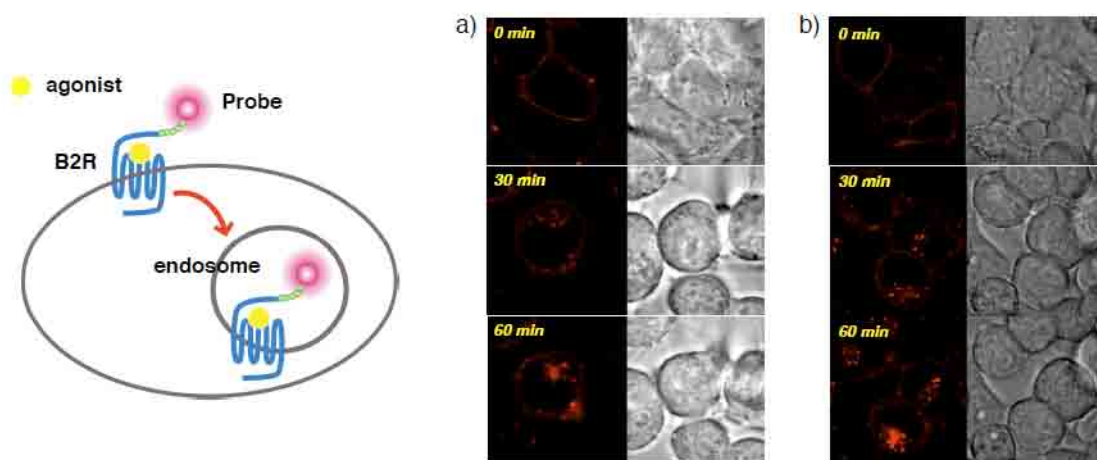


図5. 3-4Zn(II)でラベル化された B2R 受容体(a)および AChR 受容体(b)のアゴニスト刺激に伴うインターナリゼーションの蛍光可視化

## 5. 自己評価

標的タンパク質の特異的ラベル化を目指した「リアクティブタグシステム」として、1)非常に早い速度でラベル反応を起こすタグ/プローブのペアを見出した。2)見出したタグ/プローブペアを細胞表層に発現する GPCR 受容体タンパク質に対して適用し、特異的なラベル化に成功した。3)タンパク質機能の解析例として、GPCR 受容体のインターナリゼーションの可視化などへの応用に成功した。以上の結果から、細胞表層タンパク質のラベル化および機能解析の確かな技術として「リアクティブタグシステム」を確立できたと考えている。

## 6. 研究総括の見解

(Asp)4あるいはこれを倍長した亜鉛錯体を SH 基と共有結合可能なタグ認識ラベル化分子を作製し、具体的応用例としてブラディキニン受容体をラベル化し多色イメージングに成功している。まだ細胞表層膜タンパク質だけであり、しかも細胞外からのラベル化など限定的である。しかし、pH 感受性色素を用いてエンドソーム内の酸性度をイメージング化している点は興味深い。細胞研究のための合成小分子ラベル法を着実に進めていると評価出来る。より簡便な導入法と合成法の開発が望まれる。

## 7. 研究成果リスト

### A. さきがけ個人研究者が主導で得られた成果

#### (1) 論文(原著論文)発表

##### 論文(国際)

- ・K. HONDA, S. FUJISHIMA, A. OJIDA, I. HAMACHI, Pyrene Excimer Based Dual-Emission Detection of a Oligo-Aspartate Tag Fused Protein Using Zn(II)-DpaTyr Probe, ChemBioChem, 8, 1370-1372 (2007).
- ・H. NONAKA, S. TSUKIJI, A. OJIDA, I. HAMACHI, Non-enzymatic Covalent Protein Labeling Using a Reactive Tag, J. Am. Chem. Soc., 129, 15777-15779 (2007).
- ・S. UCHINOMIYA, H. NONAKA, S. FUJISHIMA, S. TSUKIJI, A. OJIDA, I. HAMACHI, Site-Specific Covalent Labeling of His-tag Fused Proteins with a Reactive Ni(II)-NTA Probe, Chem. Commun., 5880-5882 (2009).
- ・A. OJIDA, S. FUJISHIMA, K. HONDA, H. NONAKA, S. UCHINOMIYA, I. HAMACHI, Binuclear Ni(II)-DpaTyr Complex as a High Affinity Probe for an Oligo-Aspartate Tag Tethered to Proteins, Chemistry-An Asian Journal, in press.
- ・H. NONAKA, S. FUJISHIMA, S. UCHINOMIYA, A. OJIDA, I. HAMACHI, Selective Covalent Labeling of Tag-Fused Proteins with a Small Molecule Probe for Functional Analysis of Cell Surface GPCR Proteins, J. Am. Chem. Soc., in press.

#### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0件

#### (3) 学会発表

##### 学会発表(国内)

- ・野中洋、藤島祥平、本田圭、王子田彰夫、浜地 格、リアクティブタグシステムによる新規タンパク質ラベル化法の開発、日本化学会 第87春季年会(2007.3.25)
- ・王子田彰夫、「タグ-小分子プローブ」ペアによるタンパク質の特異的認識と可視化、日本薬学会 第127年会 (2007.3.30)
- ・王子田彰夫、野中 洋、藤島 祥平、内之宮 祥平、浜地 格、D4 タグに対するリアクティブタグシステムの開発、日本化学会第89春季年会 (2009.3.28)
- ・内之宮 祥平、野中 洋、藤島祥平、王子田彰夫、浜地 格、His タグに対するリアクティブタグシステムの開発、日本化学会第89春季年会 (2009.3.28)
- ・野中 洋、内之宮祥平、藤島 祥平、王子田 彰夫、浜地 格、D4 リアクティブタグシステムによる細胞表層受容体の機能解析、第24回生体機能関連化学シンポジウム (2009.9.14)

#### (4) 招待講演

##### 招待講演(国内)

- ・王子田彰夫、生体機能を探る金属錯体蛍光プローブ、第一回瀬戸薬セミナー (2007.12.05, 松山大学)
- ・王子田彰夫、バイオイメージングのための新しいタンパク質ラベル化技術の開発、生理学



研究所 公開セミナー (2008.11.25、岡崎)

・王子田彰夫、生体機能解析に使いたくなる蛍光プローブの開発、有機合成化学講演会 (2009. 5.22、福岡)

・王子田彰夫、生体機能を解き明かすツールとしての小分子プローブの開発、生体関連化学若手の会 (2009. 7.13、京都)

## 研究課題別評価書

### 1. 研究課題名

光受容タンパク質を利用した新しい遺伝子機能解析法の開発

### 2. 氏名

岡野 俊行

### 3. 研究のねらい

光を情報として利用するために、生物は進化の過程で多様な光応答システムを発達させ、巧みに生体を制御する仕組みを獲得してきた。この仕組みを理解し、さらに利用することは、生命現象の把握と新たな技術の創出につながると期待できる。本研究では、他の光受容分子に比べて機能解析が進んでおらず、基礎科学的にも生物工学的にも発展が期待されるクリプトクロム分子(CRY)に着目した。脊椎動物のクリプトクロムは、概日時計の発振分子としての機能が知られていると同時に、光受容体あるいは光エネルギーを利用した磁気受容体の有力候補として注目されている。しかしながら、光や磁気受容に関する機能の詳細は不明である。そこで本研究では、光スイッチ分子として利用を視野に入れつつ、分子から個体までの幅広い次元でクリプトクロム分子の性状と動物個体の磁気受容能を解析した。

### 4. 研究成果

上記のねらいのもと本研究では、脊椎動物のクリプトクロム(CRY)の分子生物学的・生化学的解析と動物個体の行動生理学的実験を行った。

様々な脊椎動物において CRY の比較解析を行った結果、ウズラの CRY4、およびアフリカツメガエル(*Xenopus tropicalis*)の CRY1, CRY2, CRY4 の遺伝子を新たに同定することができた。興味深いことに、アフリカツメガエルの CRY1, CRY2 の mRNA は卵巣に非常に高く発現していることを見出した(図1, Kubo et al., in press)。また、タンパク質レベルでの機能解析に向け、ニワトリとゼブラフィッシュの CRY4 それぞれに対するモノクローナル抗体を作成した。作成した抗体を用いた組織化学的解析の結果、ゼブラフィッシュにおいては、卵巣(図2)と脳内の一部のニューロンに CRY4 が発現していることが判明した。このように、ゼブラフィッシュとアフリカツメガエル両方で、卵巣での CRY の高い発現が見られたことから、下等脊椎動物の卵巣において共通の機能を担っている可能性が示唆された。

哺乳類の CRY の解析として、CRY と時計遺伝子 PER, BMAL1/2 の相互作用を調べた。BMAL2 は我々が以前同定した時計遺伝子であり、BMAL1 との機能の違いが不明であった。転写アッセイおよび免疫沈降実験の結果、CRY は BMAL1 に強く相互作用し、一方、PER は

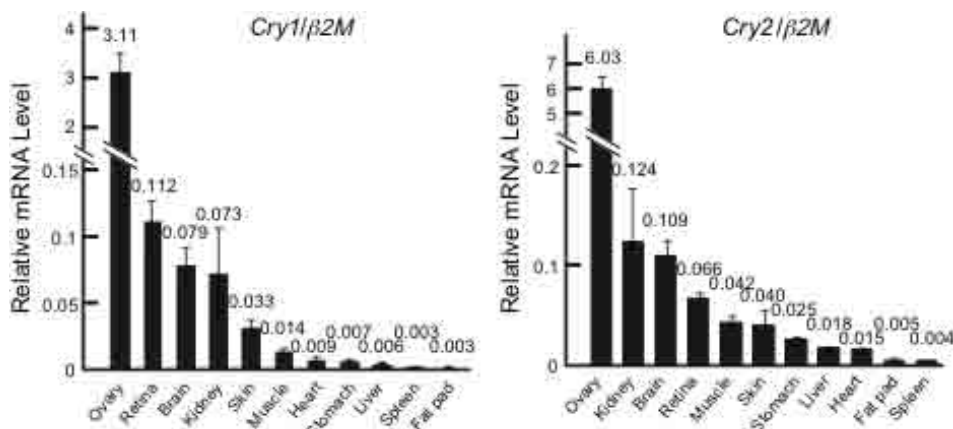


図1 アフリカツメガエル組織におけるクリプトクロム遺伝子発現  
XtCRY1, XtCRY2 はいずれも卵巣(Ovary)において非常に高い mRNA 発現を示した。

BMAL2 に強く相互作用することが明らかになった[Sasaki et al., J Biol Chem (2009)]。また、哺乳類における光スイッチを構築するための基盤研究として培養細胞を用いてヒト皮膚の光応答性を調べた[Akiyama et al., FEBS Lett (2009)]。

上記の分子生物学的・生化学的解析と並行して、CRY が関わると推定される磁気受容について、動物個体を用いた実験系の確立を試みた。モデル生物としてヒヨコ、アフリカツメガエル、ゼブラフィッシュ、メダカを対象とし、さまざまな刺激や指標を用いて、磁気に対する応答性を調べた。その結果、ヒヨコ、アフリカツメガエル、メダカでは磁気応答性を支持する明確な結果が得られなかったが、ゼブラフィッシュを用いた実験で有意な結果が得られた。具体的には、水槽の周囲に X-Y-Z の3軸方向にコイルを設置し、それぞれに適当な電流を流し磁場を発生させた。ここでは、磁気の大さは地磁気と同一とし、磁気ベクトルの方向のみを変化させた。ゼブラフィッシュの行動にどのような変化が現れるかを、記録した画像の解析により調べた結果、一定の磁気的方角に遊泳する傾向が見られた(図3)。ゼブラフィッシュはトランスジェニックによる遺伝子発現や、アンチセンスモルフォリノオリゴによる機能阻害が可能のため、この系を利用することによって今後、磁気受容にどのような分子・情報伝達経路が関与しているかを明らかにすることが可能と期待される。

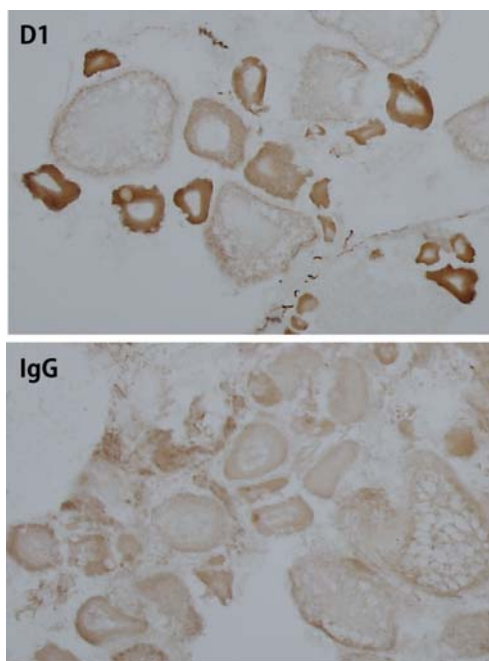


図2 ゼブラフィッシュ卵巣でのクリプトクロム4のタンパク質局在  
ゼブラフィッシュ CRY4 の C 末端付近と反応するモノクローナル抗体(D1)を用いて染色した。  
IgG は陰性対照実験。

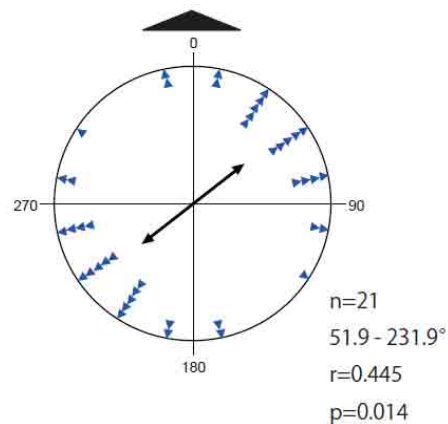


図3 ゼブラフィッシュ成体における磁気的な選好方位

上方向は磁気的な北を、円内の矢頭は個体を示す。ここでは定位の方向でなく軸(双方向性)を解析したところ、一定方向への有意な定位が観察された。

## 5. 自己評価

本研究では、研究者らが発見したニワトリクリプトクロムの性状解析を行い、さらにそれを光スイッチとして利用することを目標とした。特に、本研究において着目したクリプトクロム4は分子機能のみならず、生体内における局在すら明らかにされていなかったため、応用を目指した研究のための、基盤的な研究にも重点を置いた。その結果、ゼブラフィッシュやアフリカツメガエルといった遺伝子操作の可能な生物においてクリプトクロムを同定し、タンパク質レベルでの発現を明らかにすることができた。同時に、クリプトクロムが神経系のみならず卵巣や腎臓などにも多く発現していることをつきとめた。このように、モデル生物におけるクリプトクロムの基本的な解析結果は、今後の遺伝学的アプローチによる機能解析のために必須の研究であると考えている。特に、これまで知られていなかった卵巣における高い発現は、クリプトクロムが光受容体や磁気受容体といった機能とは別の機能をもつ可能性を示唆しており、今後の基礎研究への分野開拓的な仕事となったと考えている。

また、本研究の遂行と並行して、永く実体が不明である磁気受容体の実体がクリプトクロムではないかという研究が報告されたこともふまえ、本研究では個体レベルにおける動物の磁気感知能の研究も開始させていただいた。測定機器の開発から実験系を構築し、ゼブラフィッシュが地磁気を感知できることを示すことができた。今後、このアッセイ系を遺伝子組み替え技術と組み合わせることによって、磁気受容の分子メカニズム解析が可能となった。このシステムはおそらくゼブラフィッシュ以外の生物では困難であり、極めてオリジナリティの高い研究に発展させることができると考えている。

本研究では当初、クリプトクロムを光による遺伝子活性の制御に利用することに重きを置いたテーマ設定を行っていた。結果として、ほ乳類細胞における光制御は課題として残すことになったが、上記のように、当該分野の進展に柔軟に対応しつつ、基盤的研究を行えたことは学術的に大変有意義であった。研究室の立ち上げとほぼ同時期に研究提案を採択いただき、研究室の整備だけでなく、上記のように今後の研究の柱となるような萌芽的な成果を挙げることができたことに心より感謝している。

## 6. 研究総括の見解

当研究者の見出したニワトリ由来のクリプトクロム(CRY)を光で CRIP 結合を制御して転写活性につなげたことは高く評価出来る。まだ基礎的研究の段階であるが、この系が遺伝子発現のための光スイッチに用いる制御方法としてその応用性への期待が大きい。ほ乳類での発現も目指してほしい。基礎研究としては CRY のフラビンへの光照射で CRIP が解離するメカニズムや磁気センシング機構も解明してほしい(構造生物学者、生物物理化学者と協同で)。今後の研究発展に大きな期待が持てる。

## 7. 研究成果リスト

### A. さきがけ個人研究者が主導で得られた成果

- (1) 論文(原著論文)発表
  - 論文(国際)

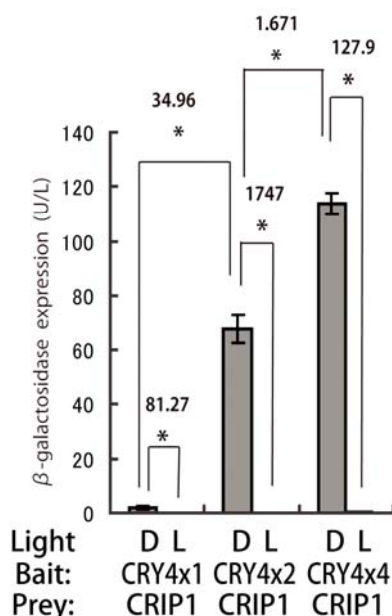


図6 クリプトクロムのタンデムリピート化による相互作用の強化

・Akiyama M., Okano K., Fukada Y., Okano T.  
Macrophage inhibitory cytokine MIC-1 is upregulated by short-wavelength light in cultured normal human dermal fibroblasts.  
FEBS Lett, 583, 933-937 (2009)

・Kubo Y.\*, Takeuchi T. \*, Okano K., Okano T. (\*Equal contribution)  
Cryptochrome genes are highly expressed in the ovary of the African clawed frog, *Xenopus tropicalis*.  
PLoS ONE, 5(2), e9273 (2010)

## (2)特許出願

研究期間累積件数: 1件(出願公開前)

## (3)著書

・岡野俊行、深田吉孝 第6章、概日リズムの分子機構  
シリーズ21世紀の動物科学、第9巻 動物の感覚とリズム  
培風館, pp126-147 (2007).

・岡野俊行 クリプトクロムの光反応と生理機能  
「動物の多様な生き方1 見える光、見えない光」  
共立出版(編集 日本比較生理生化学会), pp.114-133 (2009).

## (4)学会発表

学会発表(国内)

・東美幸・久保葉子・岡野恵子・岡野俊行 (早大理工)  
ニワトリ視細胞内節に特異的に発現する新規タンパク質 CRIP  
第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会、合同大会  
2007年12月11日(神戸)

・竹内崇裕(早大理工)・久保葉子(早大理工)・岡野恵子(早大理工)・岡野俊行(早大理工、JST)  
アフリカツメガエル(*Xenopus tropicalis*)における Cry4 遺伝子の同定と発現解析  
日本動物学会第79回大会  
2008年9月6日(福岡)

・武部明(早大理工)・鯉沼正美(早大理工)・久保葉子(早大理工)・岡野恵子(早大理工)・岡野俊行(早大理工、JST)  
ゼブラフィッシュは光と地磁気に依存して定位する。  
日本動物学会第80回大会  
2009年9月19日(静岡)

・浅野友彦(早大理工)・渡隆爾(早大理工)・久保葉子(早大理工)・岡野恵子(早大理工)・岡野俊行(早大理工、JST)  
ヒヨコ網膜におけるクリプトクロム相互作用分子のプロテオーム解析  
第82回 日本生化学会大会  
2009年10月24日(神戸)

・小林拓司(早大理工)・北原拓(早大理工)・久保葉子(早大理工)・岡野恵子(早大理工)・岡野俊行(早大理工、JST)

ゼブラフィッシュクリプトクロム 4 に対するモノクローナル抗体の作製とその性状解析  
第82回日本生化学会大会  
2009年10月24日(神戸)

(5)招待講演

招待講演(国内)

・岡野俊行(早大理工)・久保葉子(早大理工)・秋山正志(早大理工)・深田吉孝(東大院理)  
クリプトクロムファミリー分子の多様性  
日本時間生物学会、第13回学術大会  
2006年11月30日(東京)

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

(1)論文(原著論文)発表

論文(国際)

・Yoshitane H., Takao T., Satomi Y., Du N.-H., Okano T., Fukada Y.

Roles of CLOCK phosphorylation in suppression of E-box-dependent transcription.  
Mol Cell Biol, 29: 3675-3686 (2009).

・Sasaki M., Yoshitane H., Du NH., Okano T., Fukada Y.

Preferential inhibition of BMAL2-CLOCK activity by PER2 reemphasizes its negative role  
and a positive role of BMAL2 in the circadian transcription.  
J Biol Chem, 284, 25149-25159 (2009)

・Hirota T., Kon N., Itagaki T., Hoshina N., Okano T., Fukada Y.

Transcriptional repressor TIEG1 regulates Bmal1 gene through GC box and controls  
circadian clockwork.  
Genes Cells, 15, 111-121 (2010).

## 研究課題別評価書

### 1. 研究課題名

熱揺らぎを利用した粘弾性測定による1分子内部運動の解析

### 2. 氏名

川上 勝

### 3. 研究のねらい

生命現象の解明には、生体内で働いている分子、特にタンパク質分子の動的構造の研究が非常に重要となる。本研究では、原子間力顕微鏡(AFM)技術を基礎とし、基盤に固定された生体1分子をAFMカンチレバーで捕らえ、分子を引っ張りつつ、カンチレバーの「熱揺らぎ」や、磁化されたカンチレバーへの振動磁場による強制振動によって分子を揺らし、レバーの振動スペクトルの解析から分子の応答を「粘弾性」という形で計測する技術開発を目的とする。さらに、粘弾性を理論的に解釈し、対象分子の動的物性、内部構造のダイナミクスの議論を可能とし、究極的には、生体分子の重要な生化学的機能とダイナミクス情報の関係について、独自にあたらしい知見を得ることを目指す。

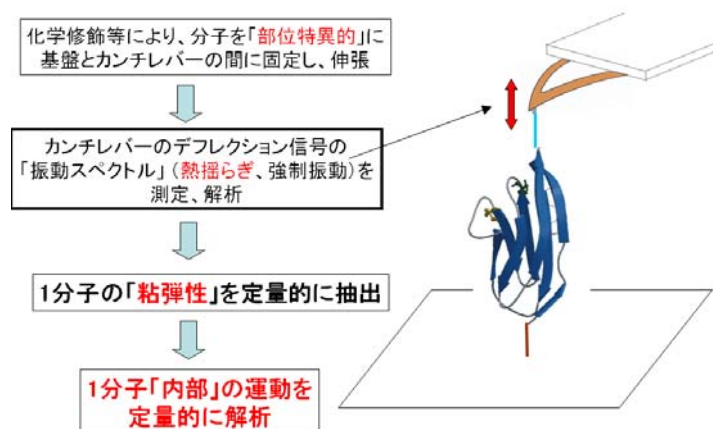


図1 AFMによる1分子ダイナミクス測定の様式図

### 4. 研究成果

#### 1分子粘弾性測定装置の開発

本研究の基礎となる1分子粘弾性測定システムを構築した。システム概念図を図2に示す。AFM検出部は市販の装置を用い、新たに導入したコンピュータによりカンチレバーの歪み信号(デフレクション)と振動成分を記録する。デフレクションは分子に加えられている力として記録され、またフィードバック機能によりスキヤナを駆動することで、分子にかかる力をリアルタイムに制御し、任意の張力における粘弾性の測定を可能としている。熱揺らぎによる測定の場合は、AC成分は熱ノイズスペクトルとして高速で記録され、これをフーリエ変換してスペクトル密度関数(PSD)とし、1分子を調和振動子として扱った場合のPSD式を用いたフィッティングにより、カンチレバーおよび1分子の粘弾性の値を決定する。磁場によるカンチレバーの強制振動を用いる場合は、カンチレバーの振幅と位相をコンピュータで記録し、調和振動子モデルによる解析から、1分子粘弾性を決定する。本研究期間前半期で、装置の作製は終了し、1分子粘弾性を定量的に測定するシステムを完成させた。

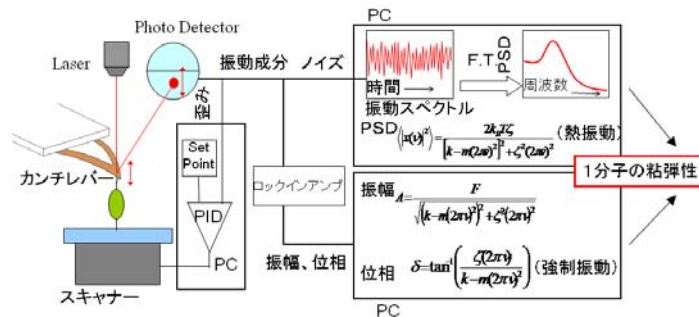


図2 1分子粘弾性測定用AFM装置の模式図

### 糖鎖(デキストランとセルロース)の粘弾性測定

生体分子の中でも構造が単純である糖鎖を対象として、デキストランとセルロースの各張力における粘弾性スペクトルを熱揺らぎ法により取得したところ、糖鎖の1分子粘弾性は分子の長さに関係することが分かった。弾性については、直列につながったバネの長さとしてバネ定数の関係からこれは予想された結果であるが、粘性についても同様の振る舞いが見られたことは新しい知見であった。1分子の粘性を考えると、対象とする1分子と、その周りの水分子との摩擦(粘性)が原因だとすると、粘性は分子の長さ(水分子との接触面積)に比例するはずであるが、実際には分子の長さに関係なく、さらには、デキストラン分子については、ピラノース環のイス型—舟型のコンフォメーションの張力による構造転移を反映して粘性が大きく変化することを見出した(図3左)。これらのことから、本手法で計測している粘性は、分子「内部」の「摩擦」によるものであり、粘弾性は分子の構造転移を鋭敏に示す指標となることが分かった。さらに、ピラノース環の構造転移を持たない糖鎖であるセルロースの粘弾性スペクトルとの比較により、ピラノース環のイス型—舟型間の構造転移に関するエネルギー地形を詳細に決定することができた(図3右)。

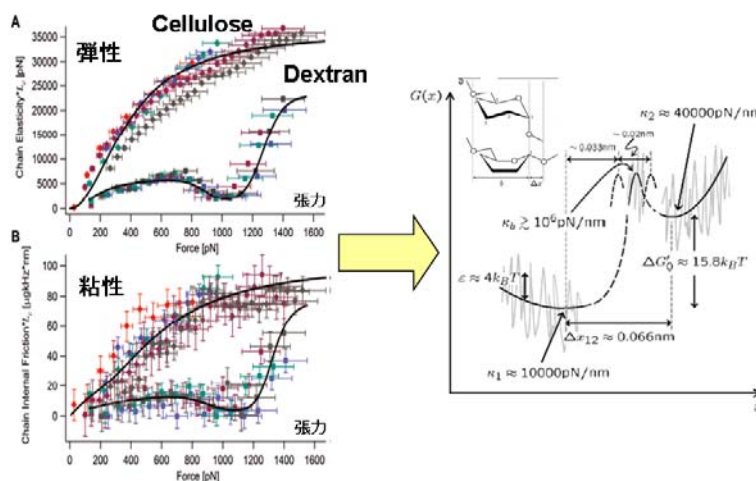


図3. セルロースとデキストランの1分子粘弾性スペクトルの解析から、ピラノース環のイス型—舟型間の構造転移に関するエネルギー地形を決定

### ポリペプチド鎖 1 分子の粘弾性測定

構造を持たないポリペプチド鎖を引っ張り、各張力における1分子粘弾性を熱揺らぎ法、強制振動法の双方の手法で測定し、その理論的解釈を試みた。その結果、ポリペプチド鎖の粘弾性は、分子内摩擦を持った worm-like-chain モデルを用いることで、実験結果をよく説明する



ことが出来た。セルロースとデキストランの例で分かるように、ある構造転移由来の粘弾性を抽出、議論するためには、構造を持たない分子の粘弾性を参照することが必要である。今回の結果から、タンパク質の構造の転移を議論するための参照分子として、構造を持たないポリペプチドの粘弾性の定量的測定とその理論的解釈を行うことが出来た。

#### ミオシン尾部構造の1分子粘弾性測定

2本のペプチド鎖が Coiled-coil 構造を取っているミオシンの尾部の1分子粘弾性測定を磁場強制振動法によって行った。その結果、デキストラン測定の際に見られたような、下に凸の粘弾性スペクトルが得られた(図4右)。これは内部構造転移の存在を示すものであり、この場合は明らかに Coiled-coil 構造の unfolding-refolding によるものである。転移前は、ミオシンは構造を持たないポリペプチド1本鎖、2本鎖よりもはるかに大きい粘弾性を示しており、転移後は、ポリペプチド1本鎖の粘弾性とほぼ一致することが分かる。これらの振る舞いはミオシン尾部の、モーター部で発生した力を伝達する機能と密接に関連していると考えられる。今後は、この unfolding-refolding 転移と、ポリペプチド鎖、さらに剛直な coiled-coil 構造の振る舞いを取り入れた理論モデルを構築して実測値を解析することで、coiled-coil 構造のフォールディングに関するエネルギー地形を詳細に求めることが可能になると期待される。もうひとつの興味深いこととして、転移後(図3右、 $>0.15$  nN)、ミオシンの粘性はポリペプチド一本鎖よりもわずかに大きい値を示していることが分かる。これは、coiled-coil 構造の崩壊後も、2本のポリペプチド鎖は絡み合っており、カンチレバーの振動により片方の一本鎖を揺らすことで、2本の鎖間の摩擦が起こり、これを1分子の粘性の増加分として検出している可能性がある。

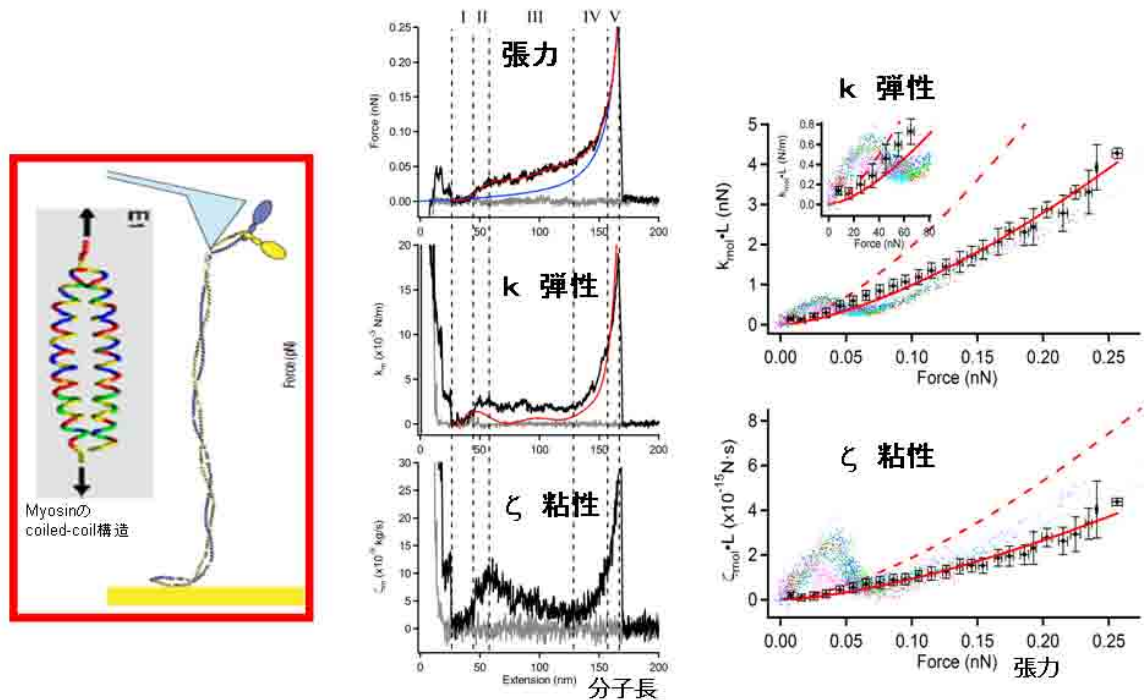


図4 (左)ミオシン尾部のAFM伸張実験の模式図。(中央)フォースカーブ、弾性、粘性の分子長依存性(右)ミオシンの1分子粘弾性スペクトル(dot)、ポリペプチド1本鎖の観測値(●)と1本鎖、2本鎖の理論曲線(赤実線、破線)

#### マイクロピラーを用いたAFMカンチレバーの粘性の低減と粘性、力感度の向上

次に2本のペプチド鎖が Coiled-coil 構造を取っているミオシンの尾部の1分子粘弾性測定を磁場強制振動法によって行った。その結果、デキストラン測定の際に見られたような、下に凸の粘弾性スペクトルが得られた(図4右)。これは内部構造転移の存在を示すものであり、この場合は明らかに Coiled-coil 構造の unfolding-refolding によるものである。転移前は、ミ

オシンは構造を持たないポリペプチド 1 本鎖、2 本鎖よりもはるかに大きい粘弾性を示しており、転移後は、ポリペプチド 1 本鎖の粘弾性とほぼ一致することが分かる。これらの振る舞いはミオシン尾部の、モーター部で発生した力を伝達する機能と密接に関連していると考えられる。今後は、この unfolding-refolding 転移と、ポリペプチド鎖、さらに剛直な coiled-coil 構造の振る舞いを取り入れた理論モデルを構築して実測値を解析することで、coiled-coil 構造のフォールディングに関するエネルギー地形を詳細に求めることが可能になると期待される。

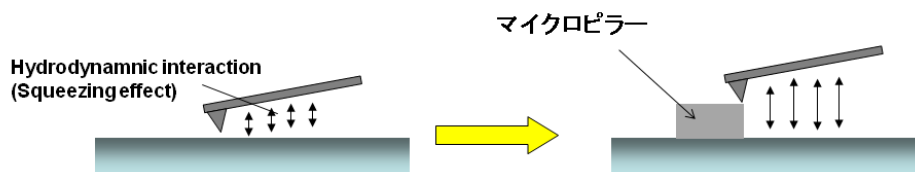


図5 マイクロピラー構造を持った基盤の使用によりカンチレバー自身の粘性の大幅な低減を実現。 →1分子粘性測定感度上昇が期待される。

## 5. 自己評価

当初の目標では、早い段階で1分子粘弾性測定システムを構築し、データを出すことを目標に掲げていたが、実際に研究開始から1年以内にシステムは完成し、安定して1分子粘弾性の測定を行うことに成功しており、装置開発の面ではほとんど目標をクリアできたと考える。AFMによる1分子力測定、粘弾性測定に関し、新しい測定法の提案や、粘性の大幅な低減をもたらす新手法の提案などについて論文発表(Nanotechnology (2008), Langmuir (2009))を行い、この分野に独自の貢献が出来たと評価する。

実際に得られた1分子の理論的解釈については、非常に単純な分子の粘弾性とダイナミクスに関連付けについては、国内外のポリマー理論研究者との議論を行い、学術雑誌上への論文発表(Biophys J (2007), Faraday Discussions (2008))という形で結果を出していると自己評価する。しかし、まだまだ酵素のような複雑なタンパク質分子における大きな構造変化を伴う内部運動については、粘弾性を一義的に関連付けるところまでには至っておらず、今後もデータ取得を重ね、議論を続けていくことが必要である。

また最大のテーマである、「生体機能に重要な機能と内部運動の関連について」の研究に関しては、目標とするタンパク質の調製に手間取り、さきがけ研究期間内に有用なデータを得て論文として公表できるまでには至らなかった。これは、さきがけ研究と同時に文字通りゼロからの研究室の立ち上げが必要であったこと、開始2年半の間は学外のレンタルラボ(貸しオフィス)という限られた研究環境であったことが多分に影響し、装置開発と同時に分子生物学という異なる分野の同時進行が非常に困難であることを痛感した。また、筋肉タンパク質ミオシンの粘弾性測定とその理論的解釈について、その成果をさきがけ期間中に論文を発表できなかったことが悔やまれる(現在 Biophys J に投稿中)。

現在は、新しい研究棟への移設も終了(2009年3月)し、整った研究環境を得て、精力的に新規タンパク質の調製と測定を行っており、研究の遅れを取り戻すよう努めている。今後2年の間には成果を論文としてまとめたい。

## 6. 研究総括の見解

AFMでポリペプチド1分子の粘弾性を観測出来る装置を作製したことは高く評価出来る。タンパク質機能と関連する微小変形領域での粘弾性の測定が望まれるが、一層の測定感度の向上に努めて欲しい。また、生体系への応用として可能性があるのか少しでも示して欲しい。

かった。

## 7. 研究成果リスト

### A. さきがけ個人研究者が主導で得られた成果

#### (1) 論文(原著論文)発表

##### 論文(国際)

• Y. Taniguchi, D. J. Brockwell, and M. Kawakami, The Effect of Temperature on Mechanical Resistance of the Native and Intermediate States of I27, *Biophysical Journal*, 95, 5296, 2008

• M. Kawakami and D.A. Smith, A new atomic force microscope force ramp technique using digital force feedback control reveals mechanically weak protein unfolding events, *Nanotechnology*, 19, 495704, 2008

• M. Kawakami, Y. Taniguchi, Y. Hiratsuka, M. Shimoike and D. A. Smith, Reduction of the damping on an AFM cantilever in fluid by the use of micro pillar stage, *Langmuir* 26, 1002, 2009

#### (2) 受賞

• AFM BioMed Conference Best Poster Presentation Award 受賞 (2008年10月)

#### (3) 著書

• Recent Advances in Single-Molecule Biophysics with the use of Atomic Force Microscopy, Masaru Kawakami and Yukinori Taniguchi, John Wiley & Sons Inc., 2010, Chapter 7

#### (4) 学会発表

##### 学会発表(国際)

• Y. Taniguchi, M. Kawakami Single Molecule dynamics studied with Atomic Force Microscopy: the effect of temperature on the energy landscape of mechanical unfolding of proteins MPSA 2008 (The 17th Meeting of Methods in Protein Structure Analysis), 2008/8/26

• Y. Taniguchi, M. Kawakami A single-molecule force spectroscopy study on the influence of temperature on the mechanical unfolding of proteins AFM Biomed Conference, 2008/10/15

• Y. Taniguchi, M. Kawakami Temperature Effect on the Fluctuation of Titin I27 Domain: A Single-Molecule Force Spectroscopy Study with AFM Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions and Chemistry of Biological Processes Created by Water and Biomolecules 2009/3/16

• M. Kawakami, Y. Taniguchi The Dynamic Force Spectroscopy with AFM Reveals the Internal Dynamics of Biomolecules at the Single Molecule Level Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions and Chemistry of Biological Processes Created by Water and Biomolecules 2009/3/16

• Y. Taniguchi, M. Kawakami Single-molecule viscoelasticity measurement of polysaccharides using the second vibration mode of cantilever XI International Scanning Probe Microscopy Conference, 2009/6/17

##### 学会発表(国内)

•Masaru Kawakami, Katherine Byrne, Bhavin S. Khatri, David J. Brockwell, Tom C. B. Mcleish, Sheena E. Radford and D. Alastair Smith, "Single molecule dynamics of biomolecules studied by atomic force microscopy" 有機バイオ SPM 研究会 2007, 2007/08/27

•Quantitative detection of the fluctuation of proteins with AFM, Masaru Kawakami, 生物物理学会年会(シンポジウム講演), アスティ徳島, 2009/10/31

#### (6)招待講演

##### 招待講演(国際)

•Recent advances in Single Molecule Dynamics of biomolecules With AFM., Masaru Kawakami and Yukinori Taniguchi, New Approaches to Complexity of Protein Dynamics by Single Molecule Measurements: Experiments and Theories, Osaka Univ., 2008/12/08

•Exploring the energy landscape of single protein molecules by mechanical unfolding experiments, Masaru Kawakami, The 3rd International Symposium on "Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions", Nagoya Univ., 2009/12/20-21

##### 招待講演(国内)

•原子間力顕微鏡による生体1分子の分子内ダイナミクス研究, 川上勝, 第122回物理化学セミナー, 大阪大学大学院理学研究科, 2006/12/23

•原子間力顕微鏡による一分子ダイナミクス, 川上勝, 文部科学省オープン・リサーチ・センター第2回生体分子システムの物理科学研究センター研究会, 関学・梅田キャンパス(梅田アプローズタワー), 2008/3/08

•原子間力顕微鏡による1分子生物物理学への挑戦, 川上勝、谷口幸範, 平成20年度日本顕微鏡学会 走査型プローブ顕微鏡分科会, 金沢 ITプラザ, 2009/01/29

•原子間力顕微鏡を用いた生体高分子の1分子ダイナミクスの研究, 川上勝、谷口幸範, 京都大学 非線形動力学コロキウム, 京都大学理学部5号館, 2009/04/22

•生体1分子の粘弾性測定, 川上勝, 167委員会, 大阪大学 銀杏会館, 2010/01/07

#### B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

##### (1)論文(原著論文)発表

###### 論文(国際)

•B. S. Khatri, K. Byrne, M. Kawakami, D. J. Brockwell, D. A. Smith, S. E. Radford and T. C. B. McLeish, Internal friction of single polypeptide chains at high stretch, Faraday Discussions, 139, 35, 2008

•P. Sadler, E. Petrik, Y. Taniguchi, J. R. Pullen, M. Kawakami, S. E. Radford, D. Brockwell, Identification of a Mechanical Rheostat in the Hydrophobic Core of Protein L, Journal of Molecular Biology, 393, 237, 2009

## 研究課題別評価書

### 1. 研究課題名

ES細胞由来肝組織装置による薬物動態計測システム

### 2. 氏名

田川 陽一

### 3. 研究のねらい

肝臓は薬物の代謝・解毒やアルブミンや血液凝固因子といった生命維持に必要なタンパク質の産生等、我々が生存するために極めて重要な役割を担っている臓器である。よって、創薬研究における薬物代謝評価では、ヒト肝臓のミクロゾームや実験動物が利用されている。本来ヒト肝臓から調製された実質細胞（肝細胞）を培養して薬物動態の解析や人工肝臓への応用をしたいが、肝細胞は長期間の培養も困難で、その肝機能を維持することもできない。本来からだの中の細胞は極性があるにも関わらず、*in vitro* 培養ではその極性にこだわらない強引な培養を行っている。肝臓は肝細胞の他にも、内皮細胞、クッパー細胞等の非実質細胞や細胞外マトリックスと共に肝組織を構築しており、肝細胞－肝細胞、肝細胞－胆管、肝細胞－ディッセ腔（類洞側）の3つの極性がある。この3つの極性を無視した培養方法では肝機能は維持できないし、薬物トランスポーターも構成が難しくなることが予想される。高機能を維持して肝細胞を培養するためには、肝組織の再構築が必要ではないかと考えた。我々はすでに分化に対して万能性であるマウス胚性幹（embryonic stem:ES）細胞を用いて、肝細胞だけでなく、肝細胞とネットワーク構造を有する内皮細胞からなる肝様組織の構築に成功し、その機能を高度に長期的に維持できることを確認している。そこで、新しい概念の人工肝臓への応用や薬物代謝計測肝臓チップを目指して、組織からの初代培養細胞やヒトES細胞を用いて、肝組織を再構築することが、第一の本課題のねらいである。近年、胚から樹立されたES細胞とは異なり、体細胞からES細胞と同様な分化能力を有するiPS（induced pluripotent stem）細胞の樹立方法が確立された。そこで、本研究では、ヒトES細胞だけでなく、ヒトiPS細胞を利用した肝様組織の構築も目指すことにした。

第二のねらいとして、このように再構築された「肝組織」をマイクロ培養装置で培養した「肝組織チップ」を開発し、薬物代謝試験への実用化を目指す。従来までは肝細胞のみの「肝細胞チップ」の開発研究がなされてきた。しかし、肝細胞のみでは、肝細胞極性がないために、薬物動態を計測することはできない。本研究の特色は、「肝組織チップ」の開発である。

さらに、ヒトES細胞やヒトiPS細胞からの肝組織が *in vitro* で再構築可能であれば、*in vivo* の肝臓組織に対応できる。*In vitro* 肝組織の応用として、従来の肝細胞株培養では難しかったヒト肝炎ウイルスの感染・増殖における抗ウイルス薬のスクリーニング等に役立つことが期待できる。

#### 4. 研究成果

##### 1) In vitro肝組織の構築

###### a) 初代培養細胞を用いた肝組織再構築

我々が独自に作出した赤色蛍光トランスジェニックマウスの肝臓から初代培養肝細胞を調製した。内皮細胞としては、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) と肺癌上皮細胞株の融合株に緑色蛍光タンパク質発現ベクターを導入した安定発現株GH7を用いた。動物由来のバイオマテリアルゲル上に緑色蛍光GH7と赤色蛍光肝細胞を播種したところ、図1に示すように肝類洞様構造を構築できた。緑色の内皮細胞株が管腔構造を形成し、その周囲に赤色の肝細胞が存在している肝組織様構造が確認できた。この初代肝細胞により再構築された肝様組織は、通常の2次元培養に比べて優位に高い肝機能を有していることを確認した。

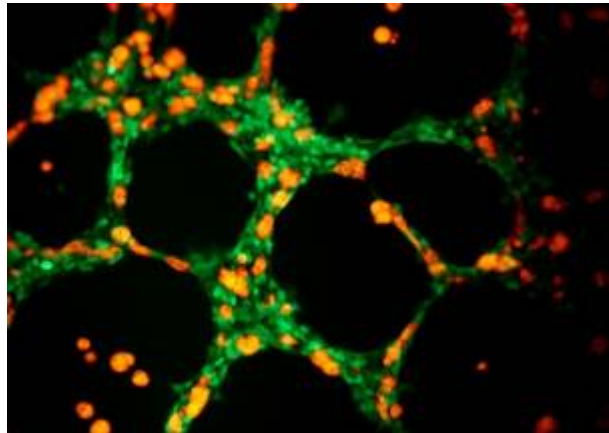


図1 初代培養肝細胞と内皮細胞による肝類洞様構造

赤色蛍光：肝細胞、  
緑色蛍光：内皮細胞株

###### b) ヒトES細胞を用いた肝組織への試み

ヒトES細胞は文部科学省の指針を遵守し、東京工業大学に学内指針、学内倫理委員会、ヒトES細胞専用実験室を整備した(図2)。本研究計画は東工大で審査・承認された後、文部科学大臣によって承認を受けた。ヒトES細胞国内樹立機関である京都大学よりヒトES細胞株を入手し、培養を開始し、現在、肝細胞への分化誘導をおこなっている。



図2 ヒトES細胞専用培養室

###### c) ヒトiPS細胞を用いた肝組織への試み

ヒトES細胞実験計画の承認に時間がかかったため、ヒトiPS細胞を国立成育医療センターより入手し、定法に従って肝細胞への分化誘導に成功した(図3)。さらに、類洞様構造の再構築に成功し、肝機能の測定をおこなって、マウスES細胞やマウスiPS細胞由来肝組織同様に十分な肝機能を有していることを確認した。

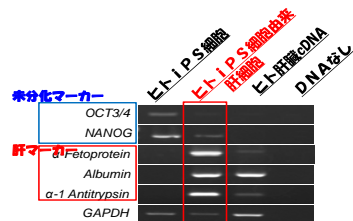


図3 ヒトiPS細胞由来肝細胞の遺伝子発現解析

##### 2) 肝組織チップ装置の開発

株式会社島津製作所との共同開発により、マイクロ培養装置(チップ)を作製した。培養装置はポリメチルシロキサン(PDMS)により加工を行い、流路を付与した。将来的には多流路にすることが可能である。さらに、肝臓は代謝が盛んに行われるために、溶存酸素やpHが非常に重要であることが分かっている。そこで、このような微量の流れのある状況でpHと溶存酸素濃度が計測できるようにしたシステムを作製した(図4)。

本研究は、「肝細胞チップ」ではなく、「肝組織チップ」の開発を目指した。本研究で開発した装置を用いて、肝組織を培養したところ、非常に高い尿素合成能力とテストス

テロン投与によるシクロオキシゲナーゼP450活性を確認できた。本肝組織チップシステムは薬物代謝を計測することが期待できる。現在、ヒトiPS細胞由来肝様組織を培養したマイクロ培養装置システムによる薬物代謝を計測している。

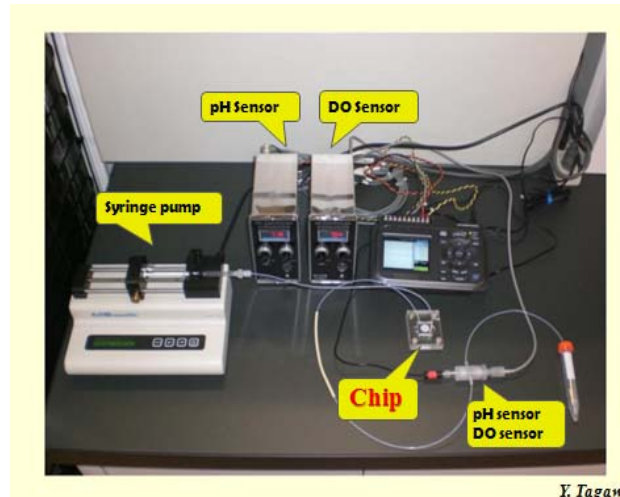


図4 マイクロ培養装置システム  
DO:溶存酸素

以上のように、初代培養細胞やヒトiPS細胞から肝様組織を構築することに成功した。これらの肝様組織は、通常の初代培養肝細胞の2次元培養に比べて肝機能が高く、薬物代謝活性の計測が可能であり、薬物スクリーニング等に十分期待できると思われる。また、その応用として、肝組織チップシステムを開発し、この流路を有することが薬物代謝測定にバリエーションを加えることが可能となり、さらに実際の肝臓に近い環境の再現が期待できる。

## 5. 自己評価

本研究は、ヒトES細胞を用いて肝組織を構築する。その一方でマイクロ培養装置を開発し、ヒトES細胞由来肝組織をそのマイクロ培養装置で培養し、薬物動態を計測することであった。ヒトES細胞使用許可を得るのに時間がかかり、ヒトES細胞を用いた肝組織チップまでは到達できなかった。しかしながら、ヒトES細胞とほぼ同等の分化能力を有するとされるヒトiPS細胞を用いて肝組織チップの作製に成功した。また、作製した肝組織チップにおいて通常のディッシュ上の培養に比して高肝機能を達成した。

多くの薬物における取り込み→代謝→排出の動態を計測できる検証が必要であるが、当初の目的にある程度達成したと考えている。

課題としては、上記の多くの薬物における動態と個体レベルとの検証が必要である。さらに、現時点の肝組織チップよりも小さく、ハイスループット化を目指す必要があると思っている。また、課題にあるようにヒトiPS細胞ではなく、ヒトES細胞で確立することが重要であると考えている。

## 6. 研究総括の見解

ヒトES細胞実験の許可の取得に時間がかかったにもかかわらず精力的な努力の結果、ヒトES細胞、ヒトiPS細胞由来の肝組織構築に成功し、肝機能を発現することも実証したことは極めて高く評価出来る。チップとして利用出来る可能性も示した。実用段階までに発展すれば創薬研究などへの貢献は極めて大きいものがある。今後の発展を大いに期待したい。

## 7. 研究成果リスト

### A. さきがけ個人研究者が主導で得られた成果

#### (1)論文(原著論文)発表

##### 論文(国際)

・Motoyama, H., S. Ogawa, A. Kubo, S. Miwa, J. Nakayama, Y. Tagawa, and S. Miyagawa: In vitro reprogramming of adult hepatocytes into insulin-producing cells without viral vectors. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2009

#### (2)特許出願

研究期間累積件数:1件

発明者:藤山陽一、田川陽一

発明の名称:バイオデバイス

出願人:島津製作所、東京工業大学

出願日:2008年2月4日

#### (3)受賞

・日本動物実験代替法学会 優秀演題賞受賞 (2009年11月)

#### (4)著書

・田川陽一、小川真一郎、玉井美保、小林俊介: 高性能・多機能肝臓モデルの作製を目指して「幹細胞の分化誘導とその応用」ブッカーズ pp.318-326. 2009

・後藤光昭、田川陽一、赤池敏弘: 新規バイオマテリアルを中心とした幹細胞の培養・文化誘導技術と誘導された肝細胞による薬物毒性評価用チップの可能性「幹細胞の分化誘導とその応用」ブッカーズ pp. 367-378. 2009

・田川陽一: 胚性幹(ES)細胞のバイオロジーとその応用と期待 「医療・診断をめざす先端バイオテクノロジー」(29名:関根光雄編)pp.68-78 2009

#### (5)学会発表

##### 学会発表(国際)

・H. Motoyama, S. Ogawa, S. Miyagawa, Y. TAGAWA : Ectopic Expression of Pdx1 and Ngn3 Are Highly Up-Regulated in Regenerative Liver, and Which Contributed to Transdifferentiation of Liver To Pancreas 2008 Annual Conference of Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society - Asian Pacific Region (2008 TERMIS-AP), Taipei, Taiwan 2008/11/06

・Y. Tagawa, S. Kobayashi, H. Okuyama, T. Shindo, T. Akaike. : In vitro reconstruction of hepatic tissue structure. The 8th World Biomaterials Congress, Amsterdam, Netherland, 2008/05/29

・Y. Tagawa : Developmental Engineering and Regenerative Medicine. SNU-TIT-TU-UT Joint Bioengineering Symposium, Seoul, Korea, 2009/03/27

##### 学会発表(国内)

・田川陽一 : ES細胞を用いたin vitro肝組織構築におけるバイオマテリアルへの期待:第29回日本バイオマテリアル学会 大阪 2007年11月27日



・小林俊介、藤山陽一、奥山久嗣、新藤隆行、赤池敏宏、小関英一、田川陽一：管化内皮細胞培養システムを用いた肝実質細胞との共培養における肝機能の解析：第29回日本バイオマテリアル学会 大阪 2007年11月27日

・小川真一郎、田川陽一：ES細胞を用いた肝再生医療への可能性－ES細胞由来肝組織の肝機能解析－ 第6回日本再生医療学会総会 横浜 2007年3月13日

・小林俊介、奥山久嗣、新藤隆行、赤池敏宏、田川陽一：管化内皮細胞共培養システムを用いた肝実質細胞との共培養における肝機能の解析：第30回日本分子生物学会および第80回日本生化学学会 合同大会 横浜 2007年12月13日

・安 成皓, 玉井 美保, 豊田 優, 奥山 久嗣, 赤池 敏宏, 新藤 隆行, 藤山 陽一, 小関 英一, 田川 陽一:ES細胞等を用いた肝組織チップの開発、第22回日本動物実験代替法学会 2009年11月14日、大阪

#### (6)招待講演

##### 招待講演(国際)

・Y. Tagawa. Embryonic stem cells in drug metabolism and toxicology 2008 Annual Conference of Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society – Asian Pacific Region (2008 TERMIS-AP), Taipei, Taiwan 2008/11/08

・Y. Tagawa. Super-functional Liver Model based on Developmental Engineering and Biomaterials. 2009 China-Japan Regenerative Medical Techniques Forum Shanghai, China 2009/03/18

・Y. Tagawa. Developmental Analysis using Multi-Color Fluorescent Embryonic Stem Cell Lines. 2009 Asia Conference for Biomaterials & Stem Cell Techniques Taipei, Taiwan 2009/09/20

・Y. Tagawa. Developmental Engineering and Development of Novel Artificial Liver System. 2009 Asia Conference for Biomaterials & Stem cell Techniques in Dong Hwa University Hualien, Taiwan 2009/09/22

・Y. Tagawa. Developmental Engineering and Development of Novel Artificial Liver System. Seminar at National Cheng Kung University Tainan, Taiwan 2009/12/04

##### 招待講演(国内)

・田川陽一:ES細胞から肝臓を造る 第6回日本再生医療学会総会 市民公開講座 再生医療最前線－臓器障害と機能の再生－ 2007年3月12日、横浜

#### B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

##### (1)論文(原著論文)発表

##### 論文(国際)

・Maruyama, H., M. Takahashi, M. Takamoto, Y. Shiba, H. Ise, J. Koyama, Y. Tagawa, Y. Iwakura, and U. Ikeda: Deficiency of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Interferon- $\gamma$  in bone marrow cells synergistically inhibits neointimal formation following vascular injury. Cardiovasc Res., 80:175-180, 2008

・Isoda, K., N. Kagaya, S. Akamatsu, S. Hayashi, M. Tamesada, A. Watanabe, M. Kobayashi, Y.

Tagawa, M. Kondoh, M. Kawase, and K. Yagi: Hepatoprotective effect of vitamin b(12) on dimethylnitrosamine-induced liver injury. Biol. Pharm. Bull. 31:309-311, 2008

•Hu, T., M. Takamoto, S. Hida, Y. Tagawa, K. Sugane: IFN- $\gamma$  deficiency worsen Pneumocystis pneumonia with Th17 development in nude mice. Immunol Lett., 127:55-59, 2009

•Iinuma, N., T. Sakurai, A. Kamiyoshi, Y. Ichikawa-Shindo, T. Arai, T. Yoshizawa, T. Koyama, R. Uetake, H. Kawate, S. Muto, Y. Tagawa, S. Miyagawa, T. Shindo: Adrenomedullin in sinusoidal endothelial cells play protective roles against cold injury of liver. Peptides 2010 in press

## 研究課題別評価書

### 1. 研究課題名

タンパク質1分子モーションキャプチャー技術の開発

### 2. 氏名

谷 知己

### 3. 研究のねらい

タンパク質の働きには、そのかたちの変化が密接に関係すると考えられている。タンパク質の形やその変化を知ることは、タンパク質がはたらく原理を理解する上で重要であるが、同時に、タンパク質が働くさまを見るよい手がかりともなるはずである。観察対象となるタンパク質を蛍光色素や蛍光タンパク質で標識し、蛍光顕微鏡で観察すると、ひとつひとつの分子が輝点として観察出来る。この蛍光像から得られる情報には、その位置や明るさ、波長などがあるが、驚くべきことに、この像には蛍光分子の向きに関する情報も含まれている。本研究では、観察対象となるタンパク質を GFP や蛍光色素で標識し、これらの分子の方向を1分子単位で観察することにより、生きたタンパク質の機能にともなう構造変化を生きた細胞内で観測する計測技術を開発することを、その最終目標としている。

### 4. 研究成果

#### 蛍光タンパク質1分子の向きを観察する全反射励起光学系の開発

細胞内で蛍光1分子を観察するためには、励起用の1本のレーザー光を開口数 1.4 以上の対物レンズの周縁から導入してガラス相と水相の界面で全反射させ、水相側の界面近傍に形成されるエバネッセント場を励起光とすることが多い。しかしながら、このエバネッセント場の偏光方向には偏りがある。励起光の偏光方向が入射光と反射光を含む平面に対して平行な場合、全反射界面で発生するエバネッセント場の偏光は全反射面に垂直な方向に大きく偏っている(図1A)。このため、このような条件では、吸収双極子が全反射面に対して垂直な蛍光分子が選択的に励起される。一方、励起用のレーザー光の偏光方向が、入射光と反射光を含む平面に対して直交する場合、全反射面で発生するエバネッセント場の偏光方向は、入射光と反射光を含む平面に垂直で、全反射面に平行である(図1C)。このような条件では、吸収双極子が全反射面に対して平行で、入射・反射光を含む平面に垂直な蛍光分子が選択的に励起される。このような現象は実際に、蛍光タンパク質を焦点位置から  $1\mu\text{m}$  以内の範囲でずらしたデフォーカス像から確認することが出来る。蛍光分子の発光双極子が観察光軸(Z軸)に対して平行な場合、その蛍光1分子のデフォーカス像は図1Bのようにドーナツ状となる。蛍光分子の発光双極子が観察光軸に直交する場合、蛍光1分子のデフォーカス像は、発光双極子方向が黒く抜けた図1Dのようなパターンとなる。吸収双極子と発光双極子が平行な蛍光分子では、図1Aの励起条件では主に図1Bのデフォーカス像が、図1Cの励起条件では主に図1Dのデフォーカス像が観察される。この理由は、これらの特定の方向を向いた分子が選択的に励起されているからである。そこで本研究ではまず、どのような方向を向いた蛍光分子も同様に観察することが出来る全反射照明法を開発した。この方法では、励起光を

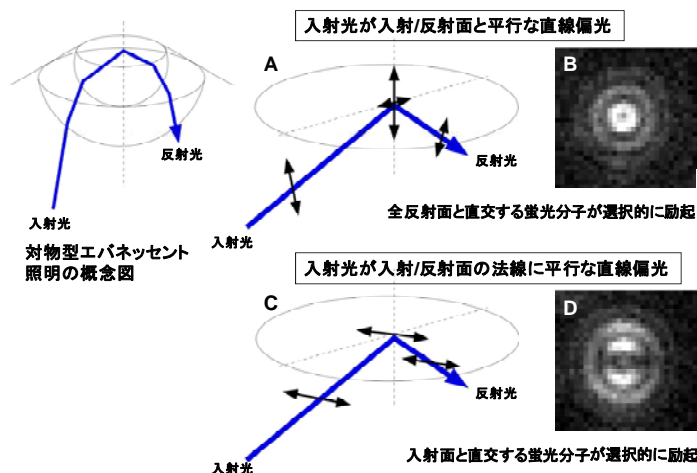


図1 エバネッセント場の偏光と励起分子の方向

偏光ビームスプリッターによって2光路にわけ、各々の入射・反射光路を含む平面が直交する様に対物レンズに導入する。これらの偏光方向を光路中におかれた波長板によって調整することにより、X軸、Y軸およびZ軸方向に平行な吸収双極子を持つ蛍光分子を等しく励起することが出来る。このような条件で観察した蛍光タンパク質1分子のデフォーカス像を図2に示す。様々な向きの1分子デフォーカス像が得られている。

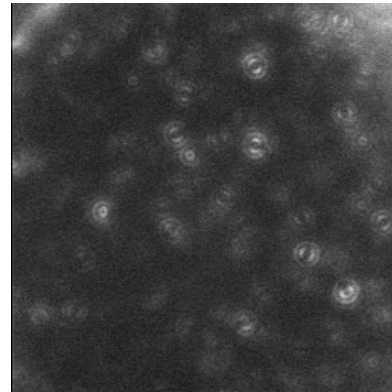


図2 新たに開発した全反射励起光学で得られた GFP1 分子のデフォーカス像

### 蛍光分子の方向を3次元的に定量する蛍光偏光観察光学系の開発

以上に述べた方法で励起した蛍光分子が発する光は、あらゆる方向に等方的に放射されるのではなく、その蛍光の放射方向にはある偏りが存在する。蛍光分子から放射される光は、その発光双極子に直交する方向に最もよく放射され、発光双極子に平行な方向には決して放射されることはない。このように発光双極子から放たれる光の方向に偏りがあるために、そのデフォーカス像の空間パターンは蛍光分子の方向を反映したものとなる。さて、このような蛍光1分子のデフォーカス像から分子の向きを計測する試みは1990年代後半に始まり、画像のパターンマッチング法を用いた定量法が Enderlein らによって報告されている。しかしながら、この方法は発光双極子と観察光軸方向がなす角度の定量性や、1分子像が得られない高濃度の観察対象には適用できない問題がある。これらの理由から、本研究では新しい光学的計測法の開発をおこなった。

対物レンズを通じて、観察光軸に対して平行な発光双極子を持つ蛍光分子を観察した場合、対物レンズ後焦点面における蛍光の偏光方向は光軸を中心として放射状に並んでいる。一方、観察光軸に直交する発光双極子を持つ蛍光分子を同様に観察した場合、対物レンズ後焦点面における蛍光の偏光方向は、発光双極子の方向にほぼ平行となっている。そこで本研究では、その偏光透過軸が光軸を中心として放射状となった偏光子と、偏光透過軸が光軸を中心として同心円状となった偏光子を組み合わせることにより、対物レンズ後焦点面を通過する蛍光偏光の軸対称性を定量する光学系を構築した(図3)。蛍光1分子から発した光は無偏光ビームスプリッターによ

って2分割され、それぞれ放射偏光子および同心円偏光子を通過した後電子増倍型 CCD 上に結像される。観察光軸(Z軸)に平行な発光双極子をもつ蛍光分子から発した光は、放射偏光子を通過することは出来るが、同心円偏光子を通過することが出来ない。この偏光子を通る蛍光の大部分は、発光双極子が観察光軸と直交するXY平面に平行な蛍光分子に由来する。さらに、偏光ビームスプリッターを用いて、同心円偏光子を通過する光をさらに直交する2つの偏光成分(X軸成分およびY軸成分)に分離することも出来る。このような光学系によって、蛍光分子が持つ発光双極子モーメントのZ軸成分、Y軸成分およびX軸成分を定量することが出来る。例として図4に、ガラス表面上に固定した GFP の蛍光を

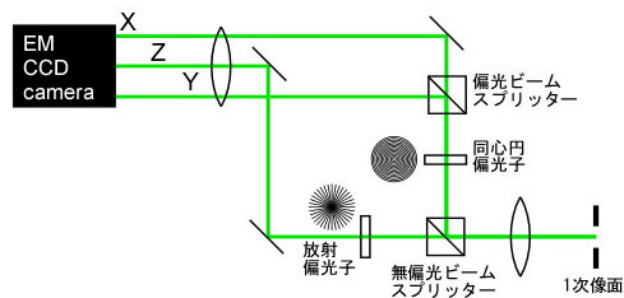
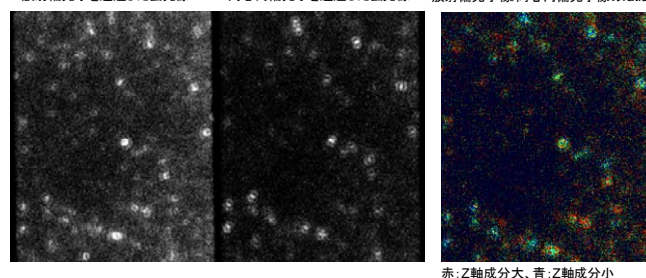


図3 発光双極子モーメントを3D計測する光学系

放射偏光子を透過した蛍光像 同心円偏光子を透過した蛍光像 放射偏光子像/同心円偏光子像のratio像



赤:Z軸成分大、青:Z軸成分小

図4 GFP 発光双極子の Z 軸成分定量

2分し、それぞれ放射偏光子と同心円偏光子を通過して得られた像を示した。これらの蛍光強度比(図4右端)は GFP 発光双極子の Z 軸成分を反映したものとなっている。

#### タンパク質 1 分子の向きの変化を生きた細胞内で 3 次元計測するーその応用

本研究では細胞機能に関わるタンパク質の、機能にともなう構造変化を生きた細胞内で検出することを目標としたが、このような計測で問題となる現象のひとつは、観察するタンパク質自体の拡散運動である。本研究では、細胞膜タンパク質や細胞骨格系タンパク質など、細胞内での拡散運動がある程度制限されたタンパク質をモデルとした。

神経細胞の軸索伸長を活性化する神経成長因子 NGF の受容体 TrkA はチロシンキナーゼ型受容体である。NGF との結合にともない、受容体はホモ2量体を形成し、その細胞質ドメインにあるチロシンがリン酸化される。X 線結晶構造解析から、チロシンキナーゼ型受容体では、このリン酸化にともなって細胞質ドメインに大きな構造変化が生じることが明らかとなっている。本研究では TrkA の細胞質ドメインを GFP で標識し、GFP 発色団分子の向きを時々刻々と観測することにより、NGF との結合にともなう TrkA 細胞質ドメインの構造変化を1分子単位で観察することを目指した。この受容体は一回膜貫通型であり、膜と平行な軸を中心とする回転拡散運動は制限されているので、タンパク質の構造変化に由来するこの方向への回転運動は比較的検出が容易であると考えられる。細胞膜がカバーガラスと平行に広がる場合、この構造変化は蛍光標識の Z 軸成分変化として検出される。そこで本研究では、神経成長因子受容体 TrkA の構造変化が見られると予想される細胞質ドメインの C 末端に GFP をつなげて、末梢神経様細胞株 PC12 細胞に発現させた。このような TrkA-GFP を 1 分子単位で観察し、NGF 投与後に観察される発光双極子方向の変化、特に Z 軸方向の成分について計測をおこなった(図5)現在のところ、NGF 投与に伴う明確な構造変化は

同心円偏光子を透過した蛍光像 放射偏光子を透過した蛍光像 ratio像 赤:Z軸成分大、青:Z軸成分小

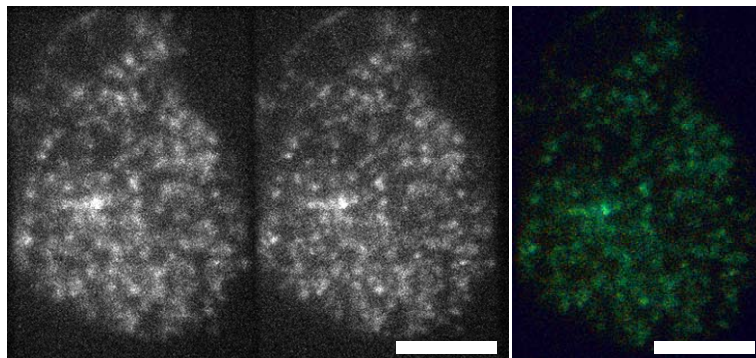


図5 TrkA-EGFP を発現した PC12 細胞 バー、5 μm

検出出来ていない。GFP と受容体細胞質ドメインとの連結が 1 本のポリペプチド鎖であるために、GFP が比較的自由に回転している可能性が原因として考えられる。GFP と TrkA 細胞質ドメインとの連結を 2 点でおこなうことにより、GFP 自体の拡散運動が抑制されることにより、受容体そのものの構造変化が検出される可能性がある。

## 5. 自己評価

### (1) 分子の向きを可視化する光学顕微鏡技術の開発について

これまで蛍光 1 分子観察ではあまりとりあつかわれることのなかった“分子の向き”に着目し、観察対象とするタンパク質に付加した蛍光マーカー分子の向きの変化から、観察対象となるタンパク質の構造変化やその機能を観察する試みは、光学顕微鏡技術の開発という点から見ればほぼ完成に近づいたと考えている。本研究で導入した軸対称偏光素子は、本来レーザー発振など、光学顕微鏡技術とはかけはなれた応用光学の分野で用いられているものであるが、この素子が蛍光顕微鏡観察における蛍光 1 分子の向きを検出に用いられることを世界ではじめて示したことは大きな成果と考えている。

### (2) 構造変化を可視化する蛍光マーカー分子の導入法について

本研究で観察対象として選んだ膜タンパク質の構造変化を生きた細胞中、1 分子単位で観察する目標には到達出来ていない。その大きな障壁となったのが、観察対象の構造変化をうまく反映するマーカー分子の付加法である。通常蛍光タンパク質標識によってあるタンパク質の細胞内動態

を可視化するには、蛍光タンパク質と観察対象となるタンパク質を、グリシンやセリンを多く含むフレキシブルなポリペプチドでつなぐことが多い。これは、フレキシブルなリンカーによって、蛍光タンパク質の付加が、観察対象となるタンパク質の機能の負荷とならないようにする工夫である。しかしながら本研究では、観察対象となるタンパク質の構造変化を出来るだけ反映するように蛍光タンパク質を付加することが目標となるため、従来の発想とは異なるリンカーの設計をおこなう必要があった。この問題は現在においても大きな課題として残っている。

### (3)細胞内タンパク質と特異的に結合する蛍光標識小分子を用いる試みについて

蛍光タンパク質の利点のひとつは、細胞内で発現する特定のタンパク質を、比較的容易に蛍光標識出来る事である。特定のタンパク質と結合する小分子を有機系蛍光色素で標識したプローブを用いることによっても、細胞内の特定のタンパク質を蛍光標識することが可能である。さきがけ研究の最終年度では、細胞内のアクチン線維と特異的に結合する小分子ファロイジンを蛍光色素ローダミンで標識したローダミンファロイジンを細胞内に導入することで、細胞内アクチン線維を蛍光標識し、さまざまな向きを向いた細胞内アクチンの配向を生きた細胞内で観察することに成功した。このことは、観察対象となるタンパク質と特異的に結合する小分子蛍光標識した分子が、観察対象となるタンパク質の構造変化をモニターするよいプローブとなる可能性を示している。また、ローダミンファロイジンを細胞内に導入するために用いたビーズローディング法は、膜透過能を持たない蛍光標識小分子を極めて簡便に細胞内に導入出来る方法であることが明らかとなった。

## 6. 研究総括の見解

蛍光分子の配向を時空間的に計測出来る新しい光学顕微鏡を開発したことは高く評価出来る。このイメージ技術は光学理論・実験両面から丁寧な検討がなされている。しかしながら、タンパク質の揺らぎなど動的挙動について何が新しく分かったかについては明瞭な説明が欲しいところだ。今後、膜タンパク質や細胞内の1分子の配向変化を機能とどのように関連させるかが課題となろう。

## 7. 研究成果リスト

### A. さきがけ個人研究者が主導で得られた成果

#### (1)学会発表

##### 学会発表(国際)

・Tomomi Tani. Single molecule analysis of NGF and the receptor trafficking on growth cones EMBO Conference Series on Spatial Dynamics of Intracellular Signaling 2009.3, Jerusalem (Maale Hachmisha), Israel

##### 学会発表(国内)

・谷知己・斉藤健太・永井健治 リガンド結合にともなう神経成長因子受容体 TrkA の構造ダイナミクスを可視化する試み 日本生物物理学会年大会 2007.12 横浜 (パシフィコ横浜)

・Tomomi Tani, Kenta Saito and Takeharu Nagai Trapping single molecules of GFP-tagged nerve growth factor receptor via ligands immobilized on a solid surface 第46回日本生物物理学会年会 2008.12 福岡 (福岡国際会議場)

#### (2)招待講演

##### 招待講演(国際)

・谷知己 Single-molecule analysis of membrane receptor activation during axonal growth of living neurons. 10<sup>th</sup> Hokudai-SNU Joint Symposium, Seoul, 2008年1月

##### 招待講演(国内)

・谷知己 ひとつひとつの生体分子を生きたまま観察してわかること FUJI FILM 先端研究所

セミナー 足柄 2008 年 6 月

・谷知己 情報伝達する分子同士の向きを見るー蛍光偏光からのアプローチ 2 分子計測  
ワークショップ 東京 2008 年 12 月

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

(1) 論文(原著論文)発表

論文(国際)

・Zhou, X., Babu, J. R., da Silva, S., Shu, Q., Graef, I. A., Oliver, T., Tomoda, T., Tani, T., Wooten, M. W. and Wang, F. Unc-51-like kinase 1/2 mediated endocytic processes regulate filopodia extension and branching of sensory axons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104, 5842-5847, 2007

・Saito K., Kobayashi K., Tani T. and Nagai T. A mercury arc lamp-based multi-color confocal real time imaging system for cellular structure and function. Cell Structure and Function 33, 133-141, 2008

・Tomosugi W., Matsuda T., Tani T., Nemoto T., Kotera I., Saito K., Horikawa K. and Nagai T. An ultramarine fluorescent protein with increased photostability and pH insensitivity. Nature Methods 6, 351- 353, 2009

(2) 学会発表

学会発表(国内)

・野村真未・原田慶恵・谷知己 切断された神経軸索の再生における神経成長因子の作用  
日本生物物理学会年大会 2007.12 横浜 (パシフィコ横浜)

・Mami Nomura, Takeharu Nagai, Yoshie Harada and Tomomi Tani Nerve growth factor-induced translocation of TrkA-GFP expressed on PC12 cells 第46回日本生物物理学会年会 2008.12 福岡 (福岡国際会議場)

(3) 招待講演

招待講演(国内)

・谷知己 成長円錐における神経軸索伸長シグナルの1 分子生理学 日本比較内分泌学会  
年会 シンポジウム 札幌 2006 年 11 月

・谷知己 神経軸索の伸長と再生に関わる分子のふるまいを可視化する 日本整形外科学  
会学術集会 浜松 2007 年 10 月

## 研究課題別評価書

### 1. 研究課題名

MRI・蛍光同時計測による生体内分子・細胞イメージング法の開発

### 2. 氏名

森田 将史

### 3. 研究のねらい

ゲノム情報が明らかになりつつある現在、再生医療や免疫療法での移植細胞や疾患における異常細胞での重要なバイオマーカー分子の生体内での時間的、空間的な振舞いを知ることは、治療の効果や病態変動を知るうえで重要である。とくに、再生医療や細胞治療を効率的に行うためには、まず生体外から投与した細胞が生体内のどこに位置するか確認し、その後、検出部位での生理的機能の発現を低侵襲的手法により分子レベルで確認する必要がある。低侵襲的なラベリング手法としては、超常磁性微粒子を用いたMRIによる方法があるが、この方法で長期に細胞追跡を行うと、鉄微粒子の被膜が分解されて毒を発生し、安全性に問題が生じることが分かってきている。また、分子・細胞レベルの解析は個体でなく取り出した組織切片で行う必要がある。T<sub>2</sub>ブロードニング効果により、細胞トラッキングはできても、生体機能の指標となる化合物のMR信号が低下してしまい、メタボミクス解析ができない、等の問題点があることも分かった。そこで、投与した細胞の体内動態を臓器レベル、および標的組織での細胞レベルで同時に確認するため、MR信号増強(T<sub>1</sub>短縮)効果を保持し、かつ近赤外蛍光する生体に毒性のない光・磁場応答性ナノ粒子バイオプローブを開発することが必要となってくる。

上記プローブを開発するにあたり、本研究では、物理的、化学的に安定なダイヤモンドナノ粒子(ナノダイヤモンド; ND)に注目した。NDは、近年プリンキングのない蛍光プローブとしての利用や、いままでのMRIの時間・空間分可能を凌駕する磁力計への応用など、ナノバイオイメージング領域への展開を見せており、近年注目されているナノ粒子である。本研究では、ほぼ炭素原子だけからなるため生体適合性に優れ、かつ高い剛性を持つと期待されるND内部に、毒性の高い常磁性イオンをイオン注入法により閉じ込める技術を確立することを目指した。この技術を用いて、臓器レベルから細胞レベルまでのマルチスケールでの分子イメージングを可能にする磁場・光応答性マルチモーダルダイヤモンドナノ粒子を創製し、マルチモーダル分子・細胞イメージングへの応用を図ることを目指した。

### 4. 研究成果

#### (1) ND への効率的イオン注入法の確立と注入後処理によるマルチモーダル ND の合成

NDへのイオン注入は、主にHイオン、Heイオン、およびNイオンなど軽元素で主に行われてきたが、常磁性イオン注入に関しては、技術が確立していなかった。そこでまず常磁性遷移金属イオンであるMn<sup>+</sup>イオン注入技術の確立を目指した。バルクダイヤモンドへのMnイオン注入深度を、イオン注入でよく使用されるシミュレーションソフトであるSRIMにより予測した。その結果、1 段注入(例えば、緑線の100keV)では、表面から80nm程度までしか侵入せず、50nm前後にMn<sup>+</sup>イオンが局在するが、注入エネルギーを50、100、160KeVの3種類で行うと、深さ方向により均一にイオン注入でき、130nm程度まで侵入できることが分かった。そこで、4インチのシリコンウエハ上にNDが約200、または400nm程度の膜厚になるようにスピコーターで薄膜化し、それぞれ3段注入、および1段注入で1x10<sup>16</sup>/cm<sup>2</sup>の濃度の

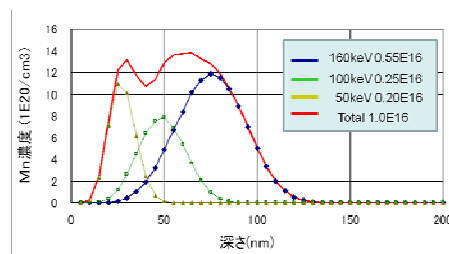


図1. SRIMによる効率的イオン注入条件の予測



Mn<sup>+</sup>イオンを注入した。本研究では、両者の Mn<sup>+</sup>イオン注入方法で得られた ND(Mn-ND)サンプルを使用した。Mn<sup>+</sup>イオン注入後、真空中で、700°C、2 時間、および空气中で 425°C、5 時間で処理したのち回収した。TEM 画像から、イオン注入直後の Mn-ND、および注入後アニールと空気酸化処理した Mn-ND は、いずれも大きな構造変化は起こしていないことが分かった。

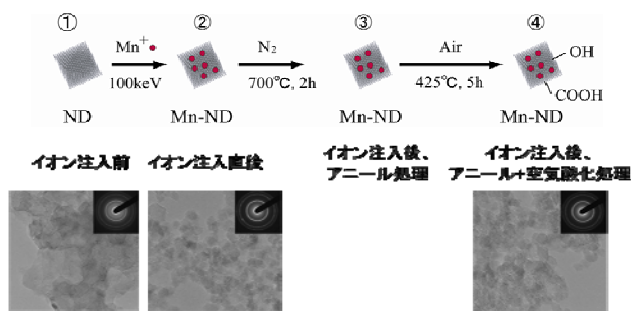


図 2. マルチモーダルナノダイヤモンドの合成方法

(2)マルチモーダルナノダイヤモンドの磁性評価方法の確立

合成した Mn-ND が、目的とするマルチモーダル造影剤として機能するかを調べるため、まず磁性機能を調べる方法の確立を目指した。MRI、および ESR による磁性評価、放射光分光による注入したイオンの注入後の処理による電子状態、および構造の変化の評価、および第一原理計算によるその評価を組み合わせる方法を確認した。

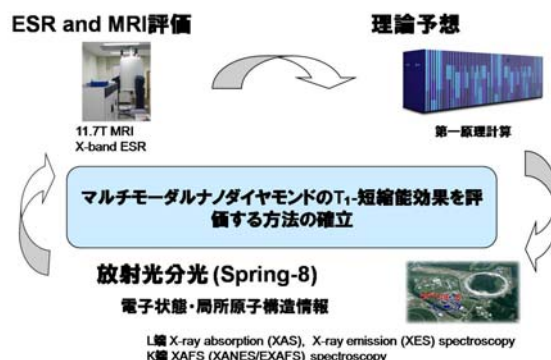


図 3. マルチモーダルナノダイヤモンドの磁場応答性の評価方法

まず、イオン注入、およびその後の処理サンプルの ESR 測定、および T<sub>1</sub> 強調画像撮影を行った。その結果、アニールと空気酸化した Mn-ND のみで、Mn<sup>2+</sup> イオンに由来する 6 本の ESR 信号、及び MRI での最も強い T<sub>1</sub> 短縮効果が見られた。この事実は、1 価で注入した Mn イオンが、ND 内部のダイヤモンド構造中で、2 価

Mn イオンとして安定に存在することを意味している。実際、MRI に効果を持つのは、いずれも 2 価の常磁性イオンになった場合のみであり、その 2 価イオンとしての安定性の原因を解明することは、効率的なイオン注入法の開発に役に立つと考えられる。そこで、放射光分光を用いた C の電子状態解析、Mn の電子状態と局所構造情報解析、および第一原理計算による ND 中に Mn イオンがエネルギー的に安定に存在できるかを理論予測を行った。まず、ダイヤモンド骨格そのものの安定性をより詳細に調べるため、炭素の K 殻励起吸収スペクトルを取得し、注入後のダイヤモンド構造の維持、および注入後処理の影響を探ることを目的とした。その結果、1. 285eV 付近の sp<sup>2</sup> 成分について、イオン注入後(青)でも、イオン注入前(緑)より、大きく増えない。2. 288eV 付近の sp<sup>3</sup> 成分は、どの条件でも大きく変化しない。3. アニール処理、空気酸化処理した後のサンプルでは、286.5eV 付近の酸素の成分が増えている、ことが分かった

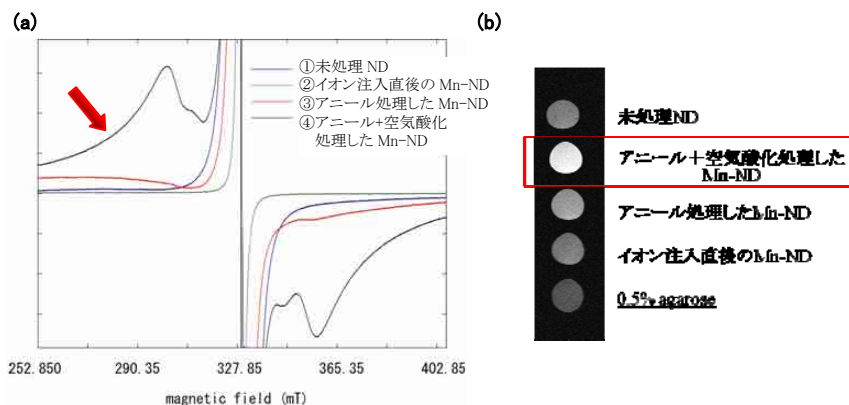


図 4. (a) X-band ESR アニール+空気酸化処理した Mn-ND(④; 矢印)のみ 6 本の高スピン信号が見られた。(b) 各処理後の各 T<sub>1</sub> 強調 MRI 画像 アニールと空気酸化した Mn-ND(□)が最も T<sub>1</sub> 短縮能が高かった。

(図 5)。以上の結果から、Mnイオン注入は、ナノダイヤモンド構造に対して、構造変化を引き起こさず、内部に滞留できていると考えられる。

次に、注入された Mn イオンの電子状態、およびダイヤモンドの C 原子との混成状態を構造情報から探ることとした。まず、Mn の電子状態については、以下のことが分かった。すなわち、イオン注入直後の Mn イオンは、2 価と 3 価が共存した(黒)が、アニールにより、MnO のスペクトル(青)とピークが一致した(赤)ことから、ほぼすべての Mn イオンが 2 価の状態になり、さらに空気酸化を施しても、Mn イオンは 2 価のまま、変化しなかった(緑)(図 6 (a))。以上の結果

から、MRI に効果がある 2 価の Mn イオンにするには、アニールが必要で、その結果形成された磁性センターは、非常に安定であることが分かった。

次に、Mnイオンが 2 価に安定に存在できることが理論的にも示唆されるかを調べるため、第一原理計

算によるスピン密度分布とその構造予想を行った(NIMS館山佳尚博士からの協力)。その結果、Mnは、歪んだ三方晶系六配位構造にある[V2:Mn]構造を取ることが分かった。また、スピン密度は、Mn原子に局在していた(図 6 (b))。このため、CとMnの混成が弱いため、電子緩和時間の長くなり、 $T_1$ 短縮能の増強に効果を持つと考えられた。

この予想を確認するため、イオン注入後の ND 内部での Mn イオンの炭素原子との結合状態を調べるために、Mn の K 殻 XAFS スペクトルを取得し、その安定性の構造基盤を探ることを目的とした。測定の結果、以下のことが分かった。1. イオン注入直後の動径分布関数は、1つのピークしか見られなかった(緑) 2. 真空中での 700℃、2 時間のアニールにより、第一、および第二近接のピークが見られ(青)、 3. アニール後の 425℃、5 時間の空気酸化でも、この傾向は変わらなかった(赤)。MRI に効果のある Mn-ND<sub>ao</sub> のデータを基に、DFT 計算により、求め ND 中の Mn イオンがもっとも安定な構造をモデル座標として、Artemis によるフィッティングを行ったところ、第一近接が、約 1.88 Å、第二近接が、2.67 Å であることが分かった。以上の結果からも、MRI に効果があると期待される常磁性イオンである 2 価の電子状態をとるようするにはアニールが必要であり、その構造は、理論から予想されたとおり、Mn イオンが周りの C と 6 配位を取ることにより安定していることが分かった(図 6 (c))。

### (3)マルチモーダルナノダイヤモンドの光学特性の評価

Mn-ND の光学特性を調べるために、単粒子蛍光解析を行った。その結果、NV センターと同様の退色のない蛍光特性を示すことが分かった(図 7)。このことは、Mn イオン注入のみで、マルチモーダルナノダイヤモンドが合成できたことを意味する。

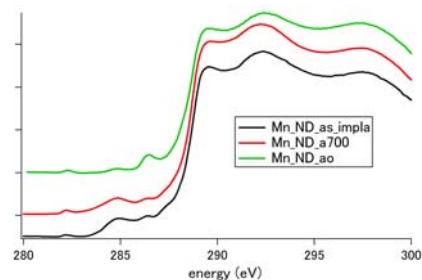


図 5. 放射光分光によるナノ粒子の C 原子骨格の電子状態

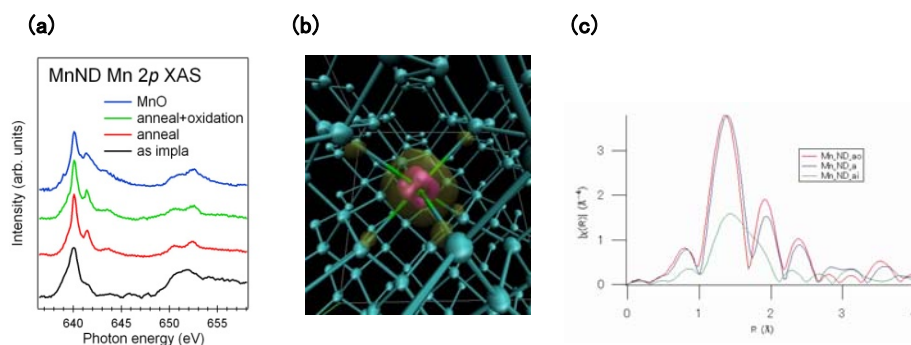


図 6. 放射光分光と理論計算によるナノ粒子内部での Mn イオンの電子状態、構造解析および安定構造予測(a)SPRing-8 で取得した Mn2p 吸収スペクトル(XAS) (b)第一原理計算から予想されるスピン密度分布と[V2:Mn]構造 (c) イオン注入後の各処理による動径分布関数の変化

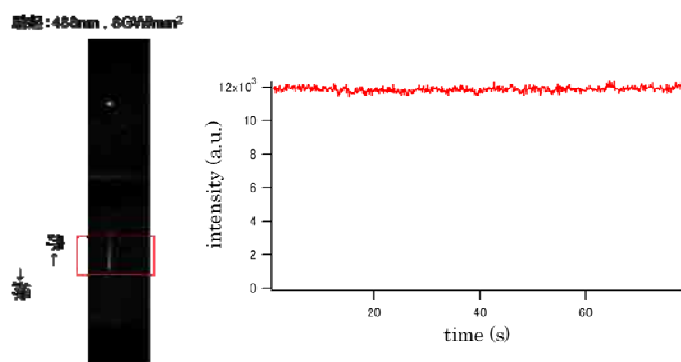


図 7. Mn イオン注入ナノダイヤモンドナノ粒子の蛍光画像と分光情報  
 左図上部にある輝点 1 個が、Mn-ND1 個の蛍光で、その下がその分光画像である。右図から、退色がないことが分かる。

以上の結果から、ND 内部に 1 価で注入した Mn イオンは、アニールと空気酸化処理を施すことでほぼ 100%、2 価の高スピン状態に活性化させることができると同時に、元々含まれた N とイオン注入時に生じた欠陥との NV カラーセンターを作成できる効率的なマルチモーダルナノ粒子合成法を確立したことを意味する。

## 5. 自己評価

本研究では、磁場・光応答性マルチモーダル造影剤の開発と MRI・蛍光内視鏡マルチモーダルイメージングデバイスを開発することを目指した。前者は、ダイヤモンドナノ粒子(ND)への常磁性イオン注入法を確立し、Mnイオンのみで、NDへの磁場・光応答性を付与させることに成功した。当初は、MRI造影剤としては、 $T_2$ 短縮能を持つと思われたが、イオン注入技術の改善や放射光分光、および第一原理計算による物性理論的な観点からも検討を行い、 $T_1$ 短縮能を持たせることに成功した。さらには、当初予想していなかった単一Mnイオン注入のみでの磁場・光応答性マルチモーダル造影剤が合成できたことは、大きな成果と考えられる。後者のデバイス開発に関しては、おもに蛍光内視鏡に必要な基盤技術の確立には、一応の成果は見られたものの、実際にマルチモーダル画像を取得するところまでには至らなかった。今後の課題としたい。

## 6. 研究総括の見解

常磁性 Mn イオンをナノダイヤモンド(ND)に注入し、蛍光性でかつ MRI 適用可能性を示したことは評価する。マルチモーダル造影剤である ND がともかく開発された。しかしながら、生体適応性や感度の検討、さらには本来の目標である生体への適用は今後の課題として残された。今後の進展を期待したい。

## 7. 研究成果リスト

### A. さきがけ個人研究者が主導で得られた成果

#### (1)特許出願

研究期間累積件数: 3件(うち1件は出願公開前)

発 明 者: 森田将史、犬伏俊郎、小松直樹、長町信治、佐々木玄

発明の名称: MR 画像法に利用する生体標識用ナノダイヤモンド

出 願 人: 株式会社イオン工学研究所

出 願 日: 平成18年9月27日

発 明 者： 森田将史、犬伏俊郎、小松直樹、長町信治、川野輪仁、西田幸子  
発明の名称：微細粉末へのイオン注入方法  
出 願 人：国立大学法人滋賀医科大学、株式会社イオン工学研究所  
出 願 日：平成 20 年 7 月 7 日

(2) 著書

・森田将史、マルチモーダル生体分子・細胞イメージングへの応用、p262-269 ”ナノ蛍光体の開発と応用” シーエムシー出版 (2007)

(3) 招待講演

招待講演(国内)

・Morita M., MRI and its application to visualization of physiological processes, The 84th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, 2007 年 3 月 20 日

・森田将史 ,MRI・蛍光による分子・細胞イメージング技術、第 64 回日本放射線技術学会シンポジウム、2008 年 4 月 4 日

・森田将史 ,分子・細胞イメージングのためのマルチモーダルイメージング技術、第 82 回日本生化学会学会シンポジウム、2009 年 10 月 21 日

## 研究課題別評価書

### 1. 研究課題名

DNA/タンパク質間相互作用の高精度 1 分子多次元解析

### 2. 氏名

横田 浩章

### 3. 研究のねらい

DNA 複製・修復・組み換えは、種の遺伝的連続性を保証する最も重要な機構である。これらの機構において、さまざまなタンパク質分子が実際にどのように相互作用しつつ、非常に複雑な反応を速やかに、そして絶妙の精度で触媒するのかについてのダイナミクスはわかっていない。DNA 修復装置が破綻すると突然変異が蓄積しやすくなり、細胞の癌化の原因となる。これらの過程では多くの酵素が構造タンパク質と多数のサブユニットからなる複合体として機能するが、3 次元構造を解くのが困難なこともあり、そのダイナミックなプロセスの理解には、直接タンパク質が機能している現場を可視化することが鍵となる。そこで本研究では、蛍光 1 分子イメージング技術と DNA 1 分子操作技術(磁気ピンセット)を組み合わせた同時計測顕微鏡を開発することにより、DNA/タンパク質間、タンパク質/タンパク質間の蛍光 1 分子イメージングと相互作用している DNA 1 分子の力学測定を同時計測を通して、DNA 複製・修復・組み換えの機構の素過程を 1 分子レベルで空間的・時間的に解明することを目指した。

### 4. 研究成果

1 分子同時計測(図 1)を達成するために、タンパク質と ATP の蛍光標識、観察ガラス基板上のタンパク質の非特異吸着を抑制する基板表面コーティング法の開発、1 分子同時計測システムの構築を行った(図 2)。本研究で主に取り扱った大腸菌の DNA 修復(ヌクレオチド除去修復・ミスマッチ修復)で、損傷(ミスマッチ)DNA を除去するヘリカース UvrD に関する成果について報告する。

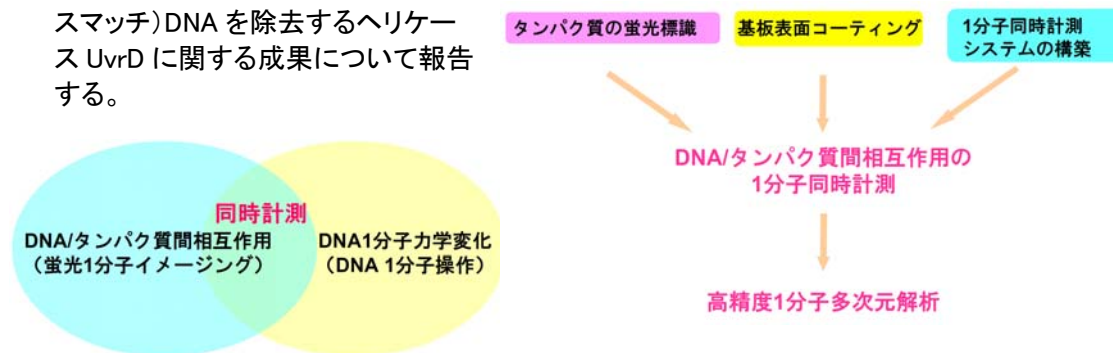


図 1 本研究で目指した 1 分子同時計測

図 2 1 分子同時計測の要素技術

#### (1) タンパク質と ATP の蛍光標識

高精度 1 分子解析を達成するためには、観察される蛍光 1 分子の輝点がタンパク質 1 分子に対応していることが望ましい。しかしながら、DNA 結合タンパク質に関しては蛍光標識の歴史が浅く、種々の標識法を試す必要がある。そこでまず、Cys 残基特異的に反応する官能基(マレイミド基)をもった蛍光色素がヘリカース UvrD の 2 つの Cys 残基(Cys52・Cys640)に標識されることを酵素消化・アミノ酸配列解析によって決定した。そして、この Cys 残基のうちの 1 つだけを欠失させた変異体(UvrDC640A)を作製し、単一の Cys 残基(Cys52)に 65%の標識率で蛍光

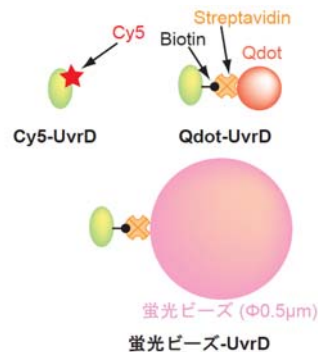


図 3 蛍光標識ヘリカース

標識することができた。また、分子生物学的手法によりビオチン化ペプチドタグを UvrD に導入し、ストレプトアビジンとの強固な相互作用を用いて、ヘリカーゼ活性を損なうことなく特異的に半導体超微粒子 (Qdot) や蛍光ビーズで標識することもできた (図 3)。その他、大腸菌やヒトの DNA 修復に関係するタンパク質のクローニング・発現・精製・蛍光標識も行った。ATP については、Cy3-ATP を合成し、それが UvrD の基質となることを確認した。

### (2) タンパク質のガラス基板への非特異吸着を抑制する表面コーティング法の開発

現在 1 分子計測の分野で、タンパク質のガラス基板への非特異吸着を抑制するために標準的に用いられているポリエチレングリコール (PEG) コーティングは、ガラス表面にシラン化によって修飾されたアミノ基にアミノ基反応性の官能基をもつ PEG を反応させて行う。本研究をすすめていくうちに、この方法で PEG 化した硼珪酸カバーガラス上では、十分なタンパク質非特異吸着抑制能がないという、まったく予想していなかった事態に遭遇した。そのため、PEG コーティングの反応条件に検討を加え、試行錯誤の上、非特異吸着抑制能を改良することに成功した。具体的には、PEG 化の溶液条件を、従来法の 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 8.3) から 50 mM MOPS (pH 7.5) に変えることによって、Cy5-UvrD について 10 倍の非特異吸着能の向上があった (図 4)。石英ガラス表面上でも 1.8 倍の非特異吸着能の向上があった。また、この方法で PEG 化したガラス表面上では Qdot-UvrD の非特異吸着も効率的に抑制することがわかった。この表面コーティング法の改良によって、DNA への UvrD の結合モードの違いを、非特異吸着に邪魔されずにクリアに 1 分子レベルで観察することに成功した (図 5)。

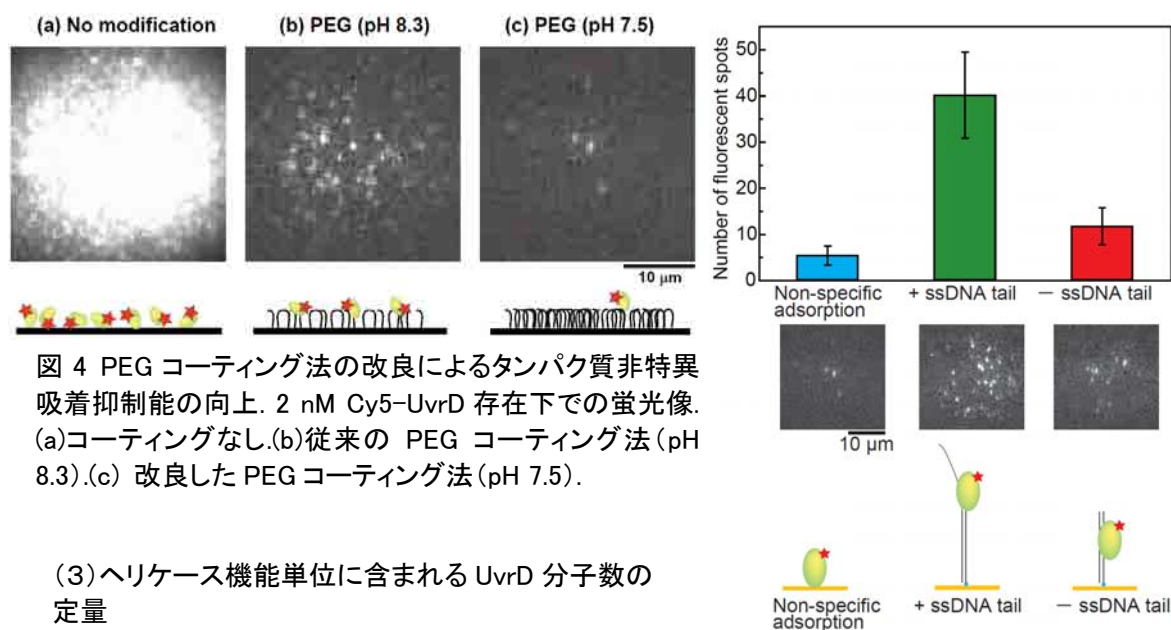


図 4 PEG コーティング法の改良によるタンパク質非特異吸着抑制能の向上。2 nM Cy5-UvrD 存在下での蛍光像。(a)コーティングなし。(b)従来の PEG コーティング法 (pH 8.3)。(c) 改良した PEG コーティング法 (pH 7.5)。

### (3) ヘリケース機能単位に含まれる UvrD 分子数の定量

Cy5 で標識した Cys 欠失変異体 UvrD (Cy5UvrD-C640A) を用いて、一本鎖突出 (dT<sub>12</sub>、dT<sub>20</sub> 及び dT<sub>40</sub>) をもつ 2 本鎖 DNA (18 bp) に結合する UvrD の分子数を Cy5 の 1 分子褪色の段階数で定量し、UvrD の DNA への結合分子数が、2 分子あるいは 3 分子であることを明らかにした。また、ATP 存在下での Cy5-UvrD-C640A の DNA への結合状態を観察したところ、やはり結合分子数が複数であることを明らかにした。この実験によって得られた結果は、UvrD が単量体ではなく、多量体でヘリケース活性を発揮していることを示している。

図 5 ヘリケース UvrD の DNA 結合モードの蛍光 1 分子イメージング。視野内の輝点数をヒストグラムにした。ss/dsDNA junction に結合しやすいことがわかる。

### (4) 1 分子同時計測システムの構築

本研究では、DNA 1 分子操作法として、蛍光 1 分子イメージングと相性がよい磁気ピンセットを採用した。磁気ピンセットは、DNA にかかる張力を自在に変化させながら DNA の長さ変

化を含む物理的・力学状態を計測できるのみならず、永久磁石を回転させることにより DNA の超らせん状態を制御することができる等の利点をもつ。

(4-1) 1分子同時計測顕微鏡の構築: 蛍光 1 分子イメージングと磁気ビーズセンシングが互いに干渉しないような光学系を構築した(図 6)。可視光レーザーによって励起した蛍光 1 分子像は、高感度 CCD カメラ(EMCCD カメラ)によって、蛍光 1 分子イメージングの障害とならないような波長の LED で照明した磁気ビーズ像は CCD カメラによって同時に観察できるようにした。この光学系によって、磁気ピンセットで DNA1 分子を操作している磁気ビーズとその DNA と相互作用する Qdot-UvrD の蛍光 1 分子イメージングを可能になった(図 7)。

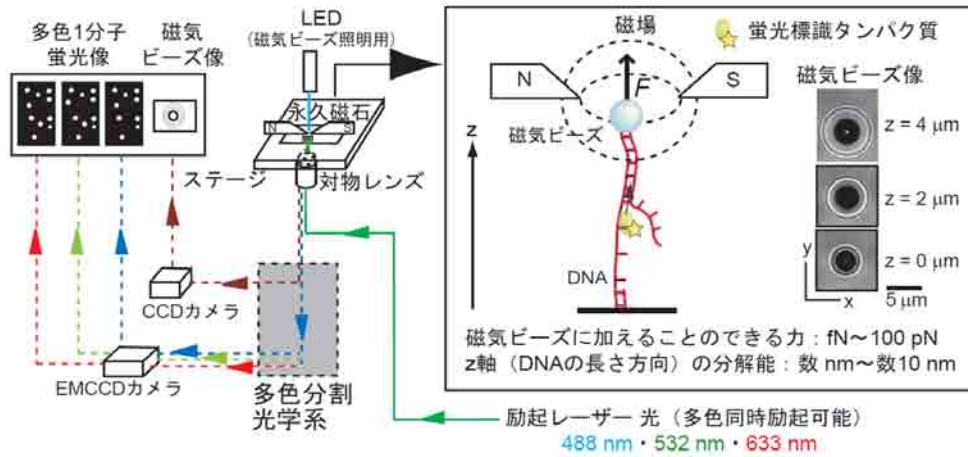


図 6 1 分子同時計測顕微鏡. 複数の可視光レーザーにより励起されたタンパク質に標識された蛍光分子から発する蛍光は、ダイクロイックミラー、バンドパスフィルターからなる多色分割光学系により、波長(色)で分けられた後、1 台の EMCCD カメラで多色同時 1 分子イメージングされる。磁気ピンセットによる DNA1 分子操作は DNA が結合した磁気ビーズを永久磁石によって引っ張ることで行う。蛍光 1 分子イメージングの背景光とならないような波長の LED によって照明された磁気ビーズは CCD カメラで観察され、そのデフォーカス像の実時間解析から DNA の長さ変化を、多色同時 1 分子イメージングしながらモニターすることができる。

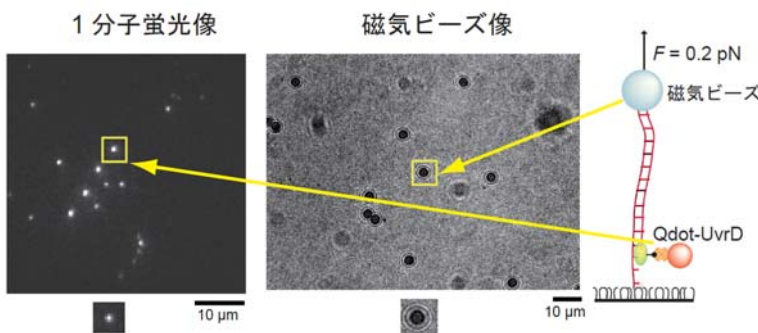


図 7 1 分子蛍光像と磁気ビーズ像の同時観察. 黄色い口で囲んだ部分にある蛍光像と磁気ビーズ像が右図を示す DNA/ヘリケース複合体を形成している。

(4-2) 高精度 1 分子多次元解析用ソフトウェアの開発: 機械的制御(対物レンズを微動するためのピエゾ素子の駆動、永久磁石を上下に動かすモーターの駆動、永久磁石を回転させるモーターの駆動)、画像取得

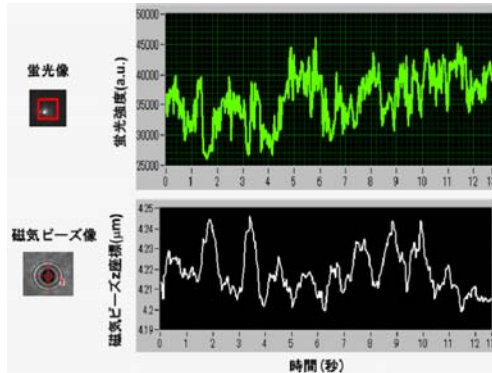


図 8 1 分子同時計測画面(抜粋). 1 分子蛍光像と磁気ビーズ像が右側に表示される。それらの像をもとに、蛍光強度と磁気ビーズの z 座標の時間変化が、右側のチャートに実時間表示されている。

(CCD カメラの磁気ビーズ像、EMCCD カメラの蛍光 1 分子像) 及び画像解析 (DNA の力学変化に伴う磁気ビーズの xyz の 3 次元座標実時間測定、蛍光輝点の 1 分子蛍光強度実時間測定) が総合的に見えるソフトウェアを開発し、実際に同時計測することができた (図 8)。

## 5. 自己評価

本研究では、これまできわめて限定的にしか行われてこなかった DNA 結合タンパク質の直接蛍光 1 分子イメージングを容易する基板表面コーティング法を開発しつつ、蛍光 1 分子イメージング技術と DNA 1 分子操作技術 (磁気ピンセット) を組み合わせた 1 分子同時計測顕微鏡を開発した。DNA を 1 分子操作しながら、その DNA と相互作用している 1 分子の DNA 結合タンパク質の蛍光 1 分子イメージングが可能となり、実時間で 1 分子の蛍光強度変化と DNA の物理変化に伴う磁気ビーズ (複数) の z 座標を計測できるこれまでにない新規の顕微鏡が完成したことになる。蛍光 1 分子イメージング技術及び DNA 1 分子操作技術は既存のものであるが、これらを組み合わせることには、顕微鏡のあらゆるコンポーネントの精査が必要であり、種々の工夫が必要であった。顕微鏡開発の過程以外で予想外であったのは、従来の表面コーティング法ではタンパク質のガラス基板上への非特異吸着抑制能が不十分で蛍光 1 分子イメージングが難しいことを発見したことである。蛍光 1 分子イメージングは本研究課題の最も基盤をなす技術であり、タンパク質のガラス基板上への非特異吸着抑制能を改良することが不可避となり、新しい表面コーティング法の開発に苦心した。

顕微鏡は完成したものの、研究期間中に最終目的である DNA/タンパク質間相互作用の素過程の解明には至らなかったのが残念であり、大いに反省すべき点である。具体的な成果としては、蛍光 1 分子イメージングによるヘリケースの DNA 結合モードのイメージングと、ヘリケースの機能単位中に含まれる分子数の定量にとどまり、1 分子同時計測による意味のあるデータを示すことができなかった。全体として達成度は 6 割程度と考えている。

今後、効率のよいデータ取得のため、さらなる系全体の改良が必要である。本研究で開発した顕微鏡によって得られるであろう情報は、これまで得られたことのない時間・空間的に多次元にわたるものであるので、何とか同時計測を実現させ、DNA 複製・修復・組み換えの機構において未解決の重要な問題に迫っていきたい。

## 6. 研究総括の見解

DNA とタンパク質 (ヘリカーゼ) との相互作用 (結合・解離) を、力を加えつつ 1 分子レベルで計測するための光学顕微鏡を開発した点は評価したい。しかしながら具体的測定対象については、DNA にヘリカーゼ何分子が結合しているかを直接観測したことは評価するものの、DNA-タンパク質間相互作用の何が初めて明らかにされたのかが明確でない。意義のあるターゲットの絞り込みが今後の課題であろう。

## 7. 研究成果リスト

### A. さきがけ個人研究者が主導で得られた成果

#### (1) 論文 (原著論文) 発表

論文 (国際)

・Yokota, H., Han, Y. W., Allemand, J.-F., Xi, X. G., Bensimon, D., Croquette, V., Ito, Y. and Harada, Y. Single-molecule visualization of binding modes of helicase to DNA on PEGylated surfaces. *Chem. Lett.* 38, 308-309 (2009).

#### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 1 件 (出願公開前)

#### (3) 学会発表

学会発表 (国際)

・Yokota, H., Han, Y. W., Allemand, J.-F., Xi, X. G., Croquette, V., Bensimon, D., Harada, Y.



Novel Microscopy for simultaneous single molecule measurement of DNA/protein interaction. 5th East Asian Biophysics Symposium & 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (2006/11/14).

•Yokota, H., Han, Y. W., Allemand, J.-F., Xi, X. G., Croquette, V., Bensimon, D., Harada, Y. Single-molecule Observation of DNA/helicase Interaction by Novel Microscopy. The joint 52nd Annual Meeting of the Biophysical Society and 16th IUPAB International Biophysics Congress (2007/12/3).

•Yokota, H., Han, Y. W., Allemand, J.-F., Xi, X. G., Croquette, V., Bensimon, D., Harada, Y. Single-molecule Observation of DNA/helicase Interaction by Novel Microscopy. The first iCeMS Symposium, featuring mesoscopic interactions in cells and cellular membranes and the 11th International Membrane Research Forum (2008/2/21).

•Yokota, H., Han, Y. W., Allemand, J.-F., Xi, X. G., Croquette, V., Bensimon, D., Harada, Y. Single-molecule observation of DNA/helicase interaction. Gordon Research Conference: Single molecule approaches to biology (2008/8/21).

•Chujo, Y., Harada, Y., Yokota, H. Single-molecule visualization of the oligomeric form of Escherichia coli UvrD helicase in vitro. 54th Biophysical Society Annual Meeting (2010/2/22).

#### 学会発表(国内)

•横田浩章, 韓龍雲, Allemand, J.-F., Xi, X. G., Croquette, V., Bensimon, D., 原田慶恵, 同時計測顕微鏡によるDNA/ヘリカーゼ相互作用の1分子観察. 日本生物物理学会第45回年会 (2007/12/23).

•横田浩章, 韓龍雲, Allemand, J.-F., Xi, X. G., Croquette, V., Bensimon, D., 原田慶恵, 同時計測顕微鏡によるDNA-ヘリカーゼ相互作用の1分子観察. 日本生物物理学会第46回年会 (2008/12/4).

•中条裕子、原田慶恵、横田浩章, DNAヘリカーゼUvrDの機能単位の1分子解析 2009年生体運動研究合同班会議 (2009/1/11).

•横田浩章, 中条裕子, 西幹栄美, 原田慶恵, Single-molecule observation of DNA-helicase interactions. 第47回日本生物物理学会年会 (2009/11/1).

#### (4)招待講演

##### 招待講演(国際)

•Yokota, H., Single-molecule imaging of DNA-protein interaction 5th Handai Nanoscience and Nanotechnology International Symposium Nano-Advanced Materials Design - From Nano-Structure to Nano-Functionality - (2009/9/2).

•Yokota, H., Harada, Y. Single-molecule observation of DNA-helicase interactions The 13th Membrane Research Forum & The 6th iCeMS International Symposium Featuring Nan-Meso Membrane Mechanisms. (2010/1/28).

#### B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

##### (1)論文(原著論文)発表

論文(国際)

・Kozuka, J., Yokota H., Arai Y., Ishi Y., Yanagida T. Dynamic polymorphism of actin as activation mechanism for cell motility. Biosystems 88, 273–282 (2007).

・Allemand, J.-F., Bensimon, D., Charvin, G., Croquette, V., Lia, G., Lionnet, T., Neuman, K. C., Saleh, O. A., and Yokota, H. Studies of DNA–protein interactions at the single molecule level with magnetic tweezers. Lect. Notes Phys. 711, 123–140 (2007).

(2) 著書

・横田浩章, 原田慶恵, 光ピンセット ～生体分子の操作と力・変位計測～ 生命科学のための機器分析実験ハンドブック(羊土社)p.99–104 (2007).

(3) 学会発表

学会発表(国内)

・大江良洋, 貴家康尋, 横田浩章, 小原収, 原田慶恵, マイクロビーズとマイクロ流路を組み合わせた新規プロテインアレイの開発 科研費・特定領域研究・「マルチスケール操作によるシステム細胞工学(バイオ操作)」第7回公開シンポジウム(2009/3/6).

(4) 招待講演

招待講演(国内)

・横田浩章, タンパク質分子ダイナミクスの 1 分子計測 慶應大学理工学部物理学科談話会 (2007/5/23).

・横田浩章, 光学顕微鏡による生体分子・細胞生物学研究のこれまでと将来展望 第 4 回放射光学会若手ワークショップ「次世代放射光源を用いた生命科学未踏領域への挑戦」(2007/8/6).

# 研究課題別評価書

## 1. 研究課題名

細胞情報解析のための超高精度・高速位相計測システム

## 2. 氏名

渡邊 恵理子

## 3. 研究のねらい

生体細胞のような無色透明体の形状の観察を行うためには、位相差顕微鏡や微分干渉顕微鏡、蛍光剤を用いる蛍光顕微鏡などが利用され、通常位相情報を強度情報に変換して測定される。しかし細胞の染色や固定化により、その後の試料の利用が制限されてしまうことや、対象によっては前処理や染色等が不向きな試料もある。したがって生体サンプルに特異な前処理を施さず、本来の状態の細胞情報を非侵襲かつ定量的に位相分布を計測する技術が求められている。また病変部より細胞を採取してきて顕微鏡標本を作製し、顕微鏡観察する細胞診断やフローサイトメリーやイメージングサイトメリーは現在の医療を大きく支えている。また、培養した細胞や培養により得られた組織の移植により、失われた臓器や組織の機能を修復・再生する再生医療も近年研究が活発化してきており、それに平行してそれらの細胞の生産効率向上、効率の良い検査技術も同時に求められている。

本研究では細胞などの透明物体を対象とし、特異な前処理を施さずに測定可能な高速高精度な位相計測システムを構築し、位相情報を高速・高精度に可視化する。さらに得られた情報から細胞を位相情報でモデリングし位相物体識別システムを提案し構築する。これらを新しい細胞情報の解析ツールとして生物・医療分野などへの幅広い応用を目指す。

## 4. 研究成果

### 【高速・高精度位相計測システムの開発】

Fig.1 に構築した位相計測システムの実験系を示す。光源にいくつかのレーザを用いたマツハツエンダー型干渉計を基本としている。干渉計の一方のビームに測定試料を挿入し、屈折率変化がある方向にスキャンして、透過光を参照光と干渉させて光路長差による干渉光の強度変化を検出している。微小領域を計測するために、レーザ光を顕微鏡用対物レンズで試料上に集光させ、別の対物レンズで平行光に戻した。この集光ビームの直径により横方向の空間分解能が決定する。本システムでは直径約  $2\mu\text{m}$  の面積内における平均位相を検出している。高精度かつ定量的に位相計測を実現するため、PD での受光強度が最小になるようにフィードバック制御を施し、ピエゾへの印加電圧を 16bit の AD ボードを用いて記録した。これを予め測定したピエゾの半波長電圧(半波長の光路長変化をもたらす電圧)と比較することにより位相の変化量を求めた。さらに厚さを考慮すると屈折率が求められる。

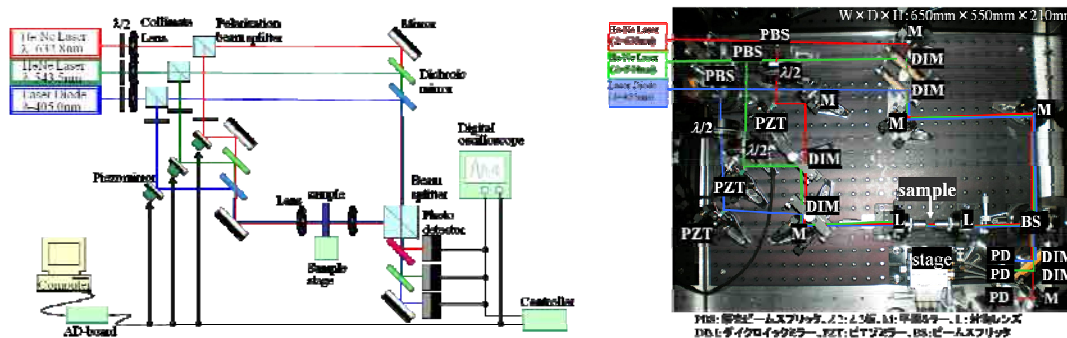


Fig.1 高速・高精度位相計測システム  
(a) 位相計測システム光学系概略図、(b) 外観写真

フィードバック制御を用いない位相算出方法では、スキャンした場合に位相変化( $\Delta\phi$ )が光強度  $P=(P_0/2)(1+\cos \Delta\phi)$  として表れるので、 $\arccos$  を利用して位相変化 $\Delta\phi$ に変換しなければならない。この際、 $\arccos$  の非線形性によって精度が低下してしまう場合があり、さらに多価関数であるために $\Delta\phi$ の値は不定性が残る。本研究では、フィードバック制御によりピエゾの印加電圧を計測しているため、逆関数を利用せずに直接位相変化を算出することが出来る。これにより、局所的な精度低下はなくなり均一な測定が可能となる。

構築した縦型 2 次元位相計測システムの基礎評価として、格子周期  $2.2 \mu\text{m}$ 、厚さ  $29 \mu\text{m}$  の屈折率変調格子の 2 次元計測を行った。 $20 \times 20 \mu\text{m}$  の面積内を x 軸方向に  $0.1 \mu\text{m}$  間隔でスキャンした後、y 方向に  $0.2 \mu\text{m}$  間隔でスキャンした。このとき光路長を補正するために生じたピエゾの印加電圧  $V$  を検出した。ピエゾの印加電圧  $V$  と 1 波長分の印加電圧  $V_\lambda$  より光路長変化  $L = V \lambda / V_\lambda$  を算出した。光路長変化に試料の厚みを考慮することにより電圧値を屈折率変化に変換した。測定結果を Fig.2(a) に示す。 $2.2 \mu\text{m}$  間隔で正弦波状の屈折率分布を高精度に 2 次元測定ができていることが確認できる。次に血液を採取し、赤血球の位相測定結果を Fig.2(b) に示す。 $10 \times 10 \mu\text{m}^2$  の面積内を X 軸方向に  $0.2 \mu\text{m}$ 、Y 方向に  $0.1 \mu\text{m}$  間隔でスキャンを行った。このように赤血球の位相変化を高精度な 2 次元計測することに成功した。このように光路長差  $0.3 \text{nm}$  から  $3 \mu\text{m}$  を超える位相変化を精度よく 2 次元計測可能なシステムの構築に成功した。

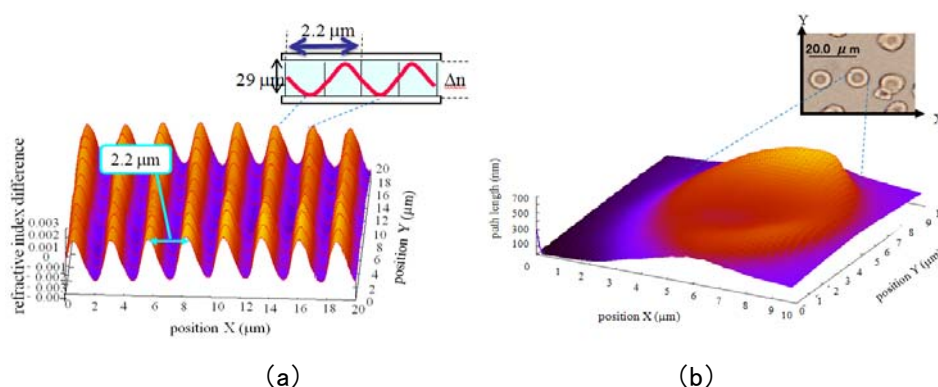


Fig.2 位相計測結果 (a)屈折率変調格子の測定結果 (b)赤血球の測定結果

### 【デジタルホログラフィック位相顕微鏡の開発】

通常の光学顕微鏡や 2.1 節における位相計測システムで 3 次元物体を観察する際には、レンズの焦点距離やステージを機械的に調節する必要がある。このため、高速に動く物体の観察には制限がある。デジタルホログラフィでは 3 次元情報が同時に記録されるので再生時の数値的焦点合わせによって任意の深度を再生することができる。また通常の顕微鏡では観察できない位相分布も測定可能である。今回我々は、結像レンズを使わずに球面参照光を用いるレンズレス方法によりデジタルホログラフィック位相顕微鏡システムを構築した。参照光の波面の曲率が再生における結像レンズの働きを果たしている。ホログラムを記録する CCD カメラの空間分解能が限られているため、物体光と参照光がほぼ平行となるインライン光学系を採用し、直接光や共役像は位相シフト法により複数のホログラムを用いることで除去した。CCD カメラと対象物体との間にはレンズを配置せず、参照光として発散光を用いることにより物体の拡大像を得る。今回の実験では CCD カメラのピクセルサイズ  $7.4 \mu\text{m}$  に対し再生画像のピクセルサイズは約  $1 \mu\text{m}$  となっている。取得したホログラムを元に計算によって物体面での複素振幅を再生し、各点における定量的な位相値 ( $\text{mod } 2\pi$ ) を位相接続処理することにより元の像を再現した。位相シフト型デジタルホログラフィーなどで用いられる離散フーリエ変換による光学伝搬のシミュレーション計算について、連続フーリエ変換と離散フーリエ変換の相違により、位相のそろった平面波に近い状態で離散フーリエ変換を用いて伝搬を計算すると、生成される画像の範囲が狭まり、なおかつ振動状のノイズが重複される問題がある。これらに対する対策を検討し、ノイズについてはノイズ除去用の関数を利用すること、画像範囲についてはデータ取得時点で工夫することでの改善を行った。

これらの改善事項を取り入れたレンズレスデジタルホログラフィシステムにより取得したミカズキ

モなどの位相形状を示す。今後今後精度・速度の向上を行い、細胞解析として意義深いサンプルを計測していく。

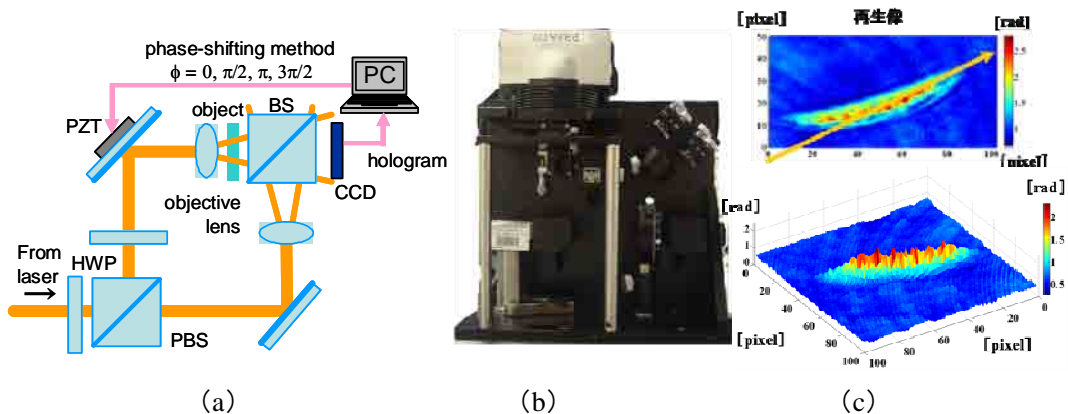


Fig.3 レンズレスデジタルホログラフィシステムと実験結果  
(a)光学系概要図、(b)試作装置外観、(c)ミカヅキモの位相計測実験結果

【ホログラフィックマッチトフィルタによる位相識別システム】

筆者は直接位相記録の可能な光相関システムの研究を行い、高精度・高速なシステム構築に成功している。構築してきた光相関システムは、無色透明の位相変調物体の識別が可能であり、背景で述べた細胞診断におけるサンプルを対象に何らかの診断や検査指針の一部を担える可能性がある。本研究では直接位相変調する透明物体を対象サンプルとして想定し、位相相関システムを提案し、原理的な実験に成功した。

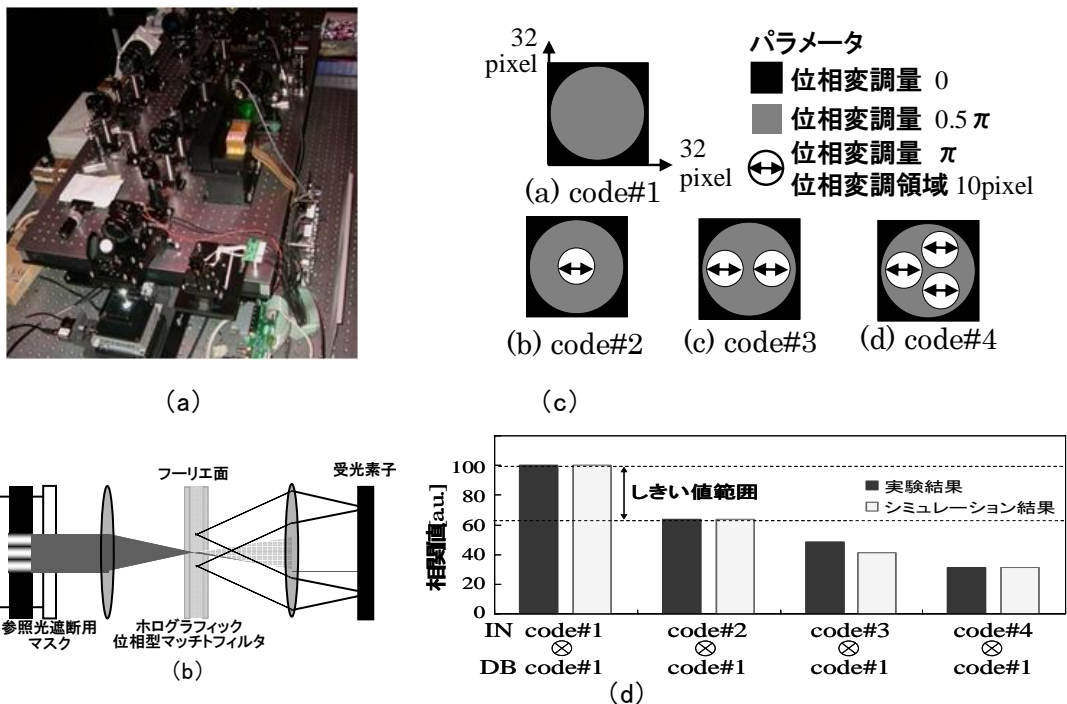


Fig.4 位相識別システムと実験結果  
(a)位相識別システム外観図、(b)ホログラフィックマッチトフィルタ、  
(c)位相差を持つ物体 (code#1~#4)模式図、(d)位相識別実験結果

同軸型ホログラムシステムにおいて、位相変化を強度情報として検出できる同軸ホログラム用強

度位相変換マスクを結像面に搭載し、位相型マッチフィルタを記録する。次にそのフィルタを用い、光相関演算を行う(Fig.4(a, b))。本実験では細胞サンプルの代用として位相変調型空間光変調器(PAL-SLM)を用い、識別する入力データは、各々 $\pi/2$ ずつ位相差を持つ物体 (code#1~#4) を使用した(Fig.4(c))。Fig.4(d)に実験結果を示す。細胞の核の個数などを想定した透明物体の識別の原理実験に成功した。

以上、高速・高精度な位相情報計測システムや位相物体識別システムなどの基盤技術の構築に成功した。これらのシステムをより意義深い生物・医療分野などの計測を行い、幅広い応用を目指す。

## 5. 自己評価

本研究では細胞などの透明物体を対象とし、特異な前処理を施さずに測定可能な高速高精度な位相計測システムを構築し、これまで測定の大変であった生体細胞や光デバイスなどにおける空間分解能 600nm 程度で、微小領域において光路長変化 1nm 以下という微小位相変化の計測に成功した。さらに将来的に超高速位相識別を可能にする位相物体識別システムを提案し、基盤技術の構築に成功した。このように当初目標にしていた位相計測・識別システムの構築には成功し、システム構築の目標は達成した。特に位相物体識別システムは次世代の細胞情報の解析ツールとなりうる研究者の独自性のある新しいシステムである。しかしながらより具体的で意義深い生体細胞サンプルの計測やこれらのシステムを利用したアプリケーションは、今後に向けてさらに追求していく必要がある。今後、構築したシステムを利用し、生物・医療分野などへの幅広い応用を目指す。

## 6. 研究総括の見解

位相情報をもとに無染色で細胞イメージングを行うというユニークで新しい測定システムを開発し、限られてはいるものの細胞の形態測定などの基本実験にも成功している。今後多数のサンプルを計測して生細胞系への実際の応用が可能になることを大いに期待したい。

## 7. 研究成果リスト

### A. さきがけ個人研究者が主導で得られた成果

#### (1) 論文(原著論文)発表

##### 論文(国際)

・E. Watanabe, Y. Ichikawa, R. Akiyama, and K. Kodate, "Ultra-high-Speed Optical Correlation System Using Holographic Disc," Japanese Journal of Applied Physics, 47, 5964-5967 (2008).

##### 論文(国内)

・中山朋子, 水野潤, 渡邊恵理子, 小舘香椎子, 「デジタルホログラフィにおける撮像素子の量子化による測定誤差の検討」, 日本女子大学紀要理学部, 17, 13-22 (2009).

#### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 3件 (うち2件は出願公開前)

発明者: 渡邊恵理子、水野潤、小舘香椎子

発明の名称: 「計測システム及び計測方法」

出願人: 小舘香椎子

出願日: 2008年5月7日

出願番号: 特願 2008-121300

### (3) 著書

- ・渡邊恵理子,「3.6.1 光情報処理」, 技術動向調査報告書(2007 年度), (財)光産業技術振興協会 (2008).
- ・渡邊恵理子,「3.5.1 光情報処理」, 技術動向調査報告書(2008 年度), (財)光産業技術振興協会 (2009).

### (4) 学会発表

#### 学会発表(国際)

- ・E. Watanabe, J. Mizuno, C. Fujikawa, and K. Kodate, “Measurement of refractive index of photopolymer for holographic gratings,” Proc. SPIE, 6488-09 (2007).
- ・M. Hanesaka, E. Watanabe, J. Mizuno, and K. Kodate, “Two dimensional phase measurement of microscopic objects using phase locking technique,” 13th Microoptics Conference (MOC) '07, 160-161 (2007).
- ・E. Watanabe, M. Hanesaka, J. Mizuno, and K. Kodate, “Two Dimensional Phase Measurement of biological cell Using Phase Locking Technique,” 6th International Conference on Optics-photonics Design & Fabrication (ODF) 2008, 547-548 (2008).
- ・E. Watanabe, A. Naito, and K. Kodate, “Ultra-high-speed compact optical correlation system using holographic disc,” Proc. SPIE, 7442, 74420X-74420X-8 (2009).

#### 学会発表(国内)

- ・渡邊恵理子, 水野潤, 藤川知栄美, 小館香椎子, 「閉ループフィードバック制御による高精度位相計測—Volume Phase Holographic Grating 作製のための屈折率変調量測定—」, Optics & Photonics Japan 2006 講演会予稿集, 366-367 (2006).
- ・羽根坂円彩, 渡邊恵理子, 水野潤, 小館香椎子, 「位相ロック技術を用いた微小物体 2 次元位相計測システム」, Optics & Photonics Japan 2007 講演会予稿集, 272-273 (2007).
- ・大財真梨子, 水野潤, 中山朋子, 渡邊恵理子, 小館香椎子, 「位相シフトデジタルホログラフィを用いたレンズレス顕微鏡による位相像の観察」, 第 69 回応用物理学会学術講演会, 3, 870 (2008).
- ・大財真梨子, 渡邊恵理子, 小館香椎子, 「位相シフト型レンズレスデジタルホログラフィによる位相計測システム」, 電子情報通信学会東京支部学生会研究発表会, 126 (2009).
- ・渡邊恵理子, 羽根坂円彩, 藤川知栄美, 水野潤, 小館香椎子, 「位相ロック技術を用いた二次元位相計測システムの高分解能化」, 2009 年春季第 56 回応用物理学会学術講演会, 1037 (2009).

### (5) 招待講演

#### 招待講演(国内)

- ・渡邊恵理子, 小館香椎子, “Two dimensional phase measurement of biological cell using phase locking technique”, 光設計研究グループ第 39 回研究会(ODF'08 ダイジェスト), 39, 41-46 (2008).
- ・渡邊恵理子, 小館香椎子, 「超高速光相関演算システムと応用」, 日本化学会第 89 春季年

会, 128 (2009)

・渡邊恵理子,「光演算に基づく情報処理システム」, 精密工学会・画像応用技術専門委員会  
サマーセミナー2009, 97-98 (2009).



## 研究課題別評価書

### 1. 研究課題名

生細胞内における蛍光蛋白質による力発生の3次元可視化

### 2. 氏名

渡邊 朋信

### 3. 研究のねらい

近接場を用いた1分子計測技術、光ピンセット法を用いたナノ計測技術等の光学技術が開発され、約10年が経過した。上記技術は、膜蛋白質1分子の運動やミオシンをはじめとするモーター蛋白質の運動機構の解明に新たな知見を見出した。しかし、細胞内では、多くの蛋白質が三次元的に局在、運動しており、二次元上の動きしか捉えることができない上記技術では、観測不可能であった。そのため、近年、共焦点顕微鏡法を用いた三次元観察法が開発されたが、時間分解能が低い(～秒)ため、nm,msの世界で三次元的に運動する蛋白質1分子の動きを観測することはできない。「生きた細胞内」で「蛋白質1分子」を「nm,ms」の精度で「三次元的」に観測する技術は、今後の細胞生物学、生物物理学研究において、多くの知見を生み出すと期待される。

上記光学技術と合わせて生物研究界に貢献した技術として、蛍光蛋白質 GFP (Green Fluorescent Protein) が挙げられる。蛍光蛋白質を融合させた標的蛋白質を細胞に発現させ、その局在を観察することにより、その標的蛋白質の機能を推測できる。近年は、pH感受性、Ca<sup>2+</sup>感受性などの環境感受性蛍光蛋白質も開発されている。蛋白質の機能を時間/空間的にモニターできれば、タンパク機能が細胞内の活性化する機構を解明すると言われているが、従来観察可能な局在や環境変化は、必ずしも蛋白質の機能に結びつくとは限らない。例えば、ミオシンにとって機能するとは、「力を発する」ことであり、「局在する」ことではないので、従来方法では、細胞内におけるミオシンの機能を正確に反映していないと言える。力学反応(力発生)をモニターできる蛍光蛋白質を開発することで、力発生を機能としている蛋白質が働く現場(収縮環や細胞の走化性)の観察が可能となる。

本研究課題では、生きた細胞内において、蛋白質が力を発する現場を三次元的に可視化することを目的とし、細胞内において蛋白質1分子をnm,msの精度で三次元的に観測できる新たな光学技術の開発と、蛋白質が発する力をモニターする蛍光プローブの開発を平行して進めてきた。

### 4. 研究成果

本研究は、二つの顕微鏡技術の開発と新規蛍光蛋白質の開発との計三つに分けられる。

#### 1) 三次元蛍光顕微鏡の開発

蛍光顕微鏡の三次元化における、もっとも単純なアイデアは、共焦点蛍光顕微鏡において、対物レンズをピエゾアクチュエータにより高速にステップ駆動させ、ビデオフレームに同期させる方法である。しかしながら、この方法では、対物レンズの重量や対物レンズと観察試料の間に挿入するイメージンオイルの粘性などの影響により、対物レンズ、あるいは、観察試料が振動してしまう。本研究者は、さきがけ研究開始前にすでに、屈折率1.52を保ちつつ、従来のイメージンオイルより粘性が低いオイルを開発しており、さらに、対物レンズが観察試料面を振動させない様な特殊なガラスボトムディッシュを考案していた。しかしながら、上記の改良を加えても、焦点面の振動を焦点深度以内(250nm)に抑えながら対物レンズを走査するためには、30ms毎に一枚の共焦点画像の取得が限界であった。

本さきがけ研究の第一の研究目標は、上記三次元共焦点顕微鏡法のさらなる高速化である。極近年、対物レンズを走査するピエゾアクチュエーターに、静電センサを付加したものが市販され、対物レンズの走査位置をフィードバック制御することで、その走査位置をnm精度で決めることができる。しかしながら、この制動方法を用いている限り、焦点面の振動減衰時間は、対物レンズの重量により決定されてしまい、原理的に高速化は不可能である。そこで本研究者は、対物レンズ

を共振させ、焦点の位置を画像と共に取得しておき、後にオフラインで三次元再構成する方法を選択した。焦点の位置は、 piezoelectric actuatorによる静電(歪み)センサからの戻り値を用いて計測しても良いが、本研究者らは、より正確な焦点面を計測するために、試料底面にレーザー光を当て、その全反射光の位置を二分割フォトダイオードにより検出するシステムを構築した(図 1)。本手法により、30ms の間に、15 枚もの共焦点画像を取得することに成功した。

上記方法により、確実に三次元可視化の時間分解能は向上したが、問題点が残っている。上記方法では、高速な共焦点画像取得の為に、ニプコウ板タイプの共焦点顕微鏡を用いた。ニプコウ板が高速に回転するため、その回転が像の振動が、1分子計測法の観察精度を低下させる。また、ニプコウ板の回転速度を取得するカメラのフレームレートと厳しく同期しなければ、照射斑や画像のチラつきが発生する。また、従来の共焦点顕微鏡は、価格が高く(~1000 万円)、装置も巨大化してしまう。これらの問題点を解決するために、本研究では、簡潔、かつ、安価な蛍光断層画像取得法の原理の開発を行ってきた。

本研究での蛍光断層画像取得法の開発は、従来の共焦点光学と違い、ピンホールを用いずに蛍光断層画像を生み出すことを目標とした。光を走査する必要がないので、複雑な機械を必要としない。従って、従来の共焦点顕微鏡では不可能であった光学系の小型化・高速化が可能である。基本原理は新規性が高く、現在、特許出願準備中のため、ここでは詳細を公開できないが、研究室レベルにおいて、ピンホールを用いずに蛍光断層画像を取得することに成功している。左に、実際に本手法で取得した光軸方向の点像分布を示す(図 2)。本さがけ研究修了後は、当該新規光学を用いて、対物レンズの走査をしない三次元画像取得方法の開発を予定している。

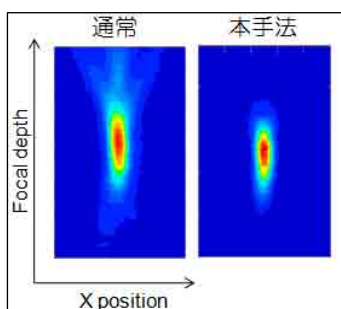


図 2. 新規光学による点像分布関数

## 2) 張力と蛍光スペクトルを同時に計測できる顕微鏡の開発

本研究の主と成る目標は、外力を感受する事のできる蛍光蛋白質の開発である。蛍光蛋白質の外力・波長特性を計測する装置は現存しておらず、本研究にとって、付加的に別途開発の必要性がある。そこで、本研究では、磁気トラップ法と1分子分光法を組み合わせた顕微鏡システムを開発した。磁気トラップ法とは、微小磁気ビーズを補足・操作することができる技術である。蛍光蛋白質の N 末端をガラス表面に、C 末端を磁気ビーズに架橋させれば、顕微鏡下で強磁場を与えることで、蛍光蛋白質に外力を加えることができる。1分子分光法は、すでに確立している技術であり、本研究における開発要素は、磁気トラップによる力計測法である。

開発した顕微鏡システムの概要を図 3 に示す。顕微鏡の試料ステージ部に電磁石を二つ設置した。電磁石は、試料面において最大 200G の磁力を生成できるように設計した。顕微鏡には、対物レンズ型エバネッセント照明の為に光学系を組み上げ、蛍光蛋白質による1分子の蛍光を取得できるようにした。結像側では、光路を二つに分け、片方は磁気ビーズの像を、もう一方は蛍光像を写させる。蛍光像の為に光路にペリンブロ

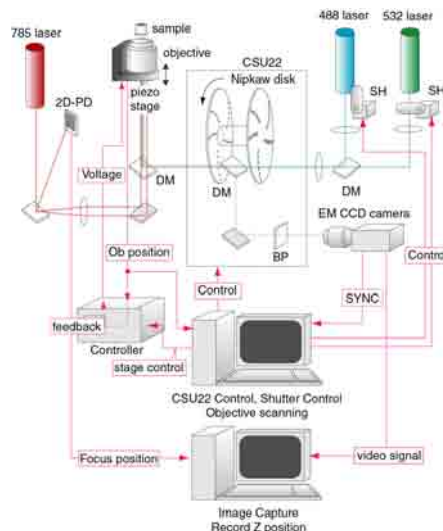


図 1. 高速三次元共焦点システム

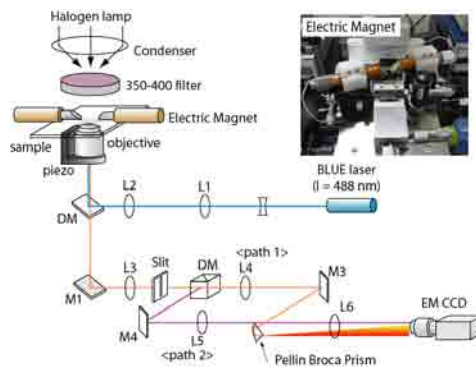


図 3. 張力と蛍光スペクトルを同時に計測できる顕微鏡

カプリズムを設置することで、蛍光像を分光する事ができる。

補足する磁気ビーズの大きさが完全に一様ではないため、磁気ビーズに係る外力は、その都度、該磁気ビーズの揺らぎ幅から算出しなくてはならない。従って、磁気ビーズの三次元位置を取得する必要がある。本研究者は、磁気ビーズの明視野像から、該ビーズの三次元位置を計算するアルゴリズムを作製した。ビーズの明視野像において、顕微鏡像の輪帯の半径が、ビーズの光軸方向の位置に比例する事は、周知である。本研究では、高速にビーズの三次元位置を計算するために、取得される明視野像の理論式を簡素化した近似式を考案した(図 4)。本近似式を用い明視野像を近似することにより、ビーズの中心位置(xy 軸)と輪帯の半径(z 軸)を求めることができる。実測精度は、xy 平面で 2nm、z 平面で 6nm であった。

当初の目的を達する顕微鏡システム・解析方法は完成したが、後に述べる様に、作製した蛍光蛋白質の発光強度が微弱なために、従来のエバネッセント照明を用いた 1 分子分光法では、感度が足りず、作製した蛍光蛋白質の張力・発光波長特性を計測する事はできなかった。

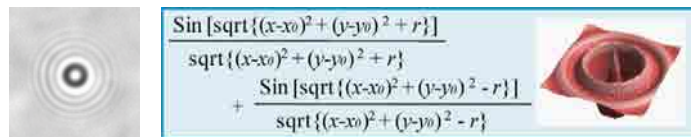


図 4.ビーズの明視野像(左)と三次元位置を取得する為の近似式(右)

### 3) 張力により波長特性が変化する蛍光蛋白質の開発

GFP や YFP などの蛍光蛋白質は、バネ定数約 7pN/nm 程度の蛋白質であると言われている。蛋白質 1 分子が発する力は数 pN 程度(筋肉のミオシン II で 3pN、キネシンで 8pN 程度)であるから、その張力によって、発光団(65-67 残基)を取り囲む  $\beta$  シートの配列(“ $\beta$  can”構造)に 1nm 程度の歪みが生じることが予想される。また、203 残基目のスレオニンをチロシンに換えた YFP(Yellow)は、発光団(65-67 残基)と 203 残基のチロシンのフェノール環が、電子的に相互作用していると考えられる。従って、YFP は、 $\beta$  can の構造変化に対し、敏感にその発光波長が変化することが期待される。

本研究では、まず、 $\beta$  can の構造の歪みと、YFP の吸収・発光波長の相関を調べた。YFP の 144 残基と 145 残基の間に、グリシンを 1 つずつ挿入し、その発光・蛍光波長を計測した。グリシンの挿入により、YFP の吸収波長、発光波長は共に短波長側に移行していた(図 5)。また、グリシンの挿入数を増やすと、吸収・蛍光波長の波長移行は強くなり、グリシン挿入による構造の歪みと吸収・蛍光波長の変化に相関がある事が証明された。YFP の “ $\beta$  can”構造に割目を入れるために 1-144 番目と

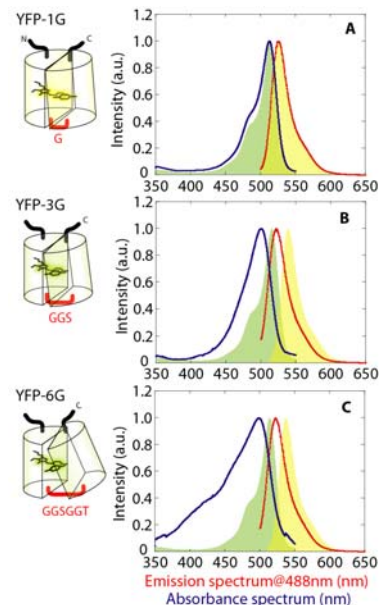


図 5. グリシン挿入による発光・蛍光波長の変化

145-238 番目を入れ替えた円循環変異体(cpYFP)においても、同様の波長移行が確認できた(図 6)。

次に、cpYFP の N 末と C 末にペプチドを付加し、cpYFP の開いた構造を閉じ、吸収・発光波長を元に戻す事を試みた(図 7)。上記ペプチドに張力が係ることで  $\beta$  can の割目が再度開き、吸収・発光波長が変化する力感受性

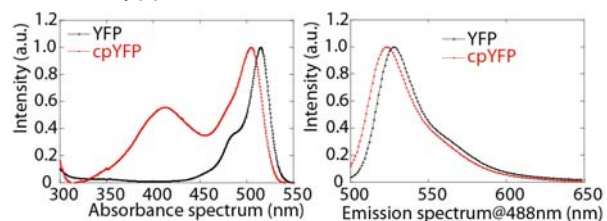


図 6. 円順環変異による YFP の発光・蛍光波長の変化

性蛍光蛋白質の作製である。該ペプチドとして、バネ蛋白質として知られる Ankyrin をはじめとして様々なペプチドで試行を行った。最終的に、 $\beta$ -hairpin を選択した。cpYFP の N 末端に GEWTYDD 配列を、C 末端に TKTFTVTE 配列を付加した(cpYFP- $\beta$  1)ところ、cpYFP の吸収波長のうち 400nm 付近にあったピークが激減した。cpYFP- $\beta$  1 の N 末端、C 末端の該ペプチド挿入箇所それぞれにグリシンを挿入し、張力が係ることを模倣する(cpYFP- $\beta$  2)と、400nm 付近の吸光度が増加した。

さらに大きな構造変化を模倣するために、グリシンではなくプロリンを挿入する(cpYFP-β3)と、やはり、400nm 付近の吸光度がさらに増加した。上記の結果は、cpYFP-β1 に付加されているβ-hairpin の構造の歪みが、cpYFP の吸収波長に大きく影響していることを示している。残念ながら、YFP に比べ量子効率が 1/10 程度にまで低下しているため、その1分子における、張力-波長特性の取得には至っていない。

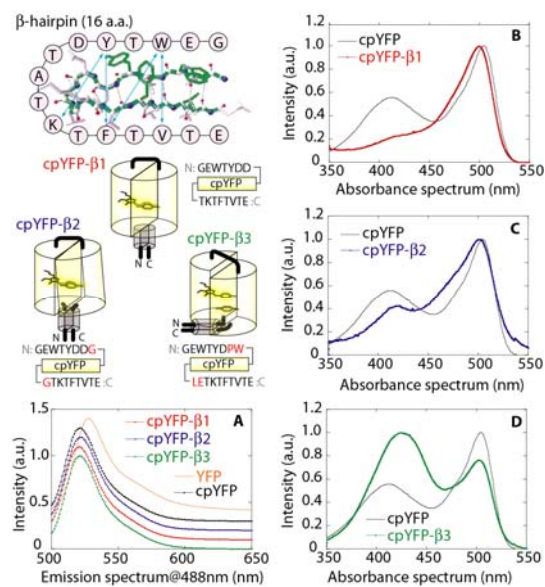


図 7. β-hairpin 付加による cpYFP の吸収波長の変化

## 5. 自己評価

個々の顕微鏡に関する技術開発においては、当初の目標を達成した。しかしながら、作製した改変蛍光蛋白質を計測するという目的に対しては、感度不足が原因となり、達成とは言えない。張力により波長特性が変化する蛍光蛋白質においては、当初の研究戦略とは異なり、また、量子効率が低いために、試験管実験系による蛍光・波長特性の計測は、出来なかった。しかしながら、蛍光蛋白質の構造の歪みと吸収・発光波長が変化する事を証明し、最終目標に到達するための十分な情報は得られたと考えている。

また、本研究課題より生み出された要素技術は、それぞれ、生物学実験に有効である。力感受性蛍光蛋白質の生物学実施実験にまで至らなかったことが残念である。

## 6. 研究総括の見解

3次元動的可視化のイメージングハードウェア作製の力量は素晴らしい。また、力感受性蛍光タンパク質の分子設計にも改良の余地はあるものの見事に成功している。目的に対する道具立てはほぼ達成したと言えよう。期間内にこれだけの成果を挙げたことを大いに評価する。今後の生細胞研究への応用展開が楽しみである。

## 7. 研究成果リスト

### A. さきがけ個人研究者が主導で得られた成果

#### (1) 論文(原著論文)

##### 論文(国際)

・Watanabe TM, Sato T, Gonda K, Higuchi H. Three-dimensional nanometry of vesicle transport in living cells using dual-focus imaging optics. *Biochem Biophys Res Commun.* 359:1-7. 2007

#### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 3件(出願公開前)

#### (3) 著書

・渡邊朋信 量子ドットの生命科学領域への応用『第 20 章バイオイメージング用の光学技術と解析技術』, シーエムシー出版, 2007

#### (4) 学会発表

##### 学会発表(国際)

・Watanabe TM, Sato T, Gonda K, Higuchi H. Three dimensional nanometry of moving

vesicles in a living cell. Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, November 15, 2006.

・Watanabe TM, Sato T, Gonda K, Higuchi H. Three dimensional nanometry of moving vesicles in a living cell. Joint Meeting of the Biophysical Society 52nd Annual Meeting & 16th International Biophysics Congress, Feb. 2-6, 2008.

・Watanabe TM, Tokuo H, Gonda K, Higuchi H, Ikebe M. The dynamics for myosin-X induced filopodia protrusion. Biophysical Society 54th Annual Meeting, February 24, 2010.

#### 学会発表(国内)

・渡邊朋信、徳王、権田、樋口、池辺 糸状仮足伸長時におけるミオシン X の『釣りかぎ』の役割 第46回日本生物物理学会年会、2008年12月3日

・渡邊朋信、慶澤、柳田 蛍光蛋白質を用いた張力感受性プローブの開発 第47回日本生物物理学会年会、2009年10月29日

#### (5) 招待講演

##### 招待講演(国際)

・Tomonobu M Watanabe, Nano-tracking methods of single particles using Quantum dot in 2D and 3D. 3rd International Symposium on Bioimaging, Okazaki International Conference Hall, Jan. 20, 2010.

##### 招待講演(国内)

・渡邊朋信 リレー光学系の自作について 第8回細胞生物学ワークショップ 北海道大学 2007年1月23日

・Tomonobu M Watanabe, Kohsuke Gonda and Hideo Higuchi, Methods for tracking the movements of the proteins in three-dimensions and in living cells, 第60回日本細胞生物学会大会, パシフィコ横浜、2008年6月29日

・渡邊朋信、樋口秀男 三次元単粒子追跡方法を用いた、細胞内小胞輸送のナノメトリ計測, マイクロビームアナリシス第141委員会, 成蹊大学, 2009年3月4日

・渡邊朋信 三次元単粒子ナノ追跡法で観た細胞内小胞輸送, 定量生物学の会 第1回キャラバン, 国立遺伝学研究所, 2009年3月14日

・渡邊朋信 三次元単粒子追跡方法を用いた細胞内ナノメトリ計測 定量生物学の会 第二回年会, 2010年1月11日

#### B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

##### (1) 論文(原著論文)発表

##### 論文(国際)

・Tada H, Higuchi H, Watanabe TM, Ohuchi N. In vivo real-time tracking of single quantum dots conjugated with monoclonal anti-HER2 antibody in tumors of mice. *Cancer Res.* 67, 1138-1144, 2007

・Dhermendra K. Tiwari, Shin-Ichi Tanaka, Yasushi Inouye, Keiko Yoshizawa, Tomonobu M. Watanabe and Takashi Jin, Synthesis and Characterization of Anti-HER2 Antibody

Conjugated CdSe/CdZnS Quantum Dots for Fluorescence Imaging of Breast Cancer Cells, *Sensors* 9, 9332–9354, 2009

•Gonda K, Watanabe TM, Ouchi N, Higuchi H. In Vivo nano-imaging of membrane dynamics in metastatic tumor cells using quantum dots. *J Biol. Chem.* 285, 2750–2757, 2010.