

「生命現象の解明と応用に資する新しい計測・分析基盤技術」
平成 18 年度採択研究代表者

樋口 秀男

東京大学大学院理学系研究科・教授

In vivo ナノイメージング技術の開発と生体運動機構の解明

1. 研究実施の概要

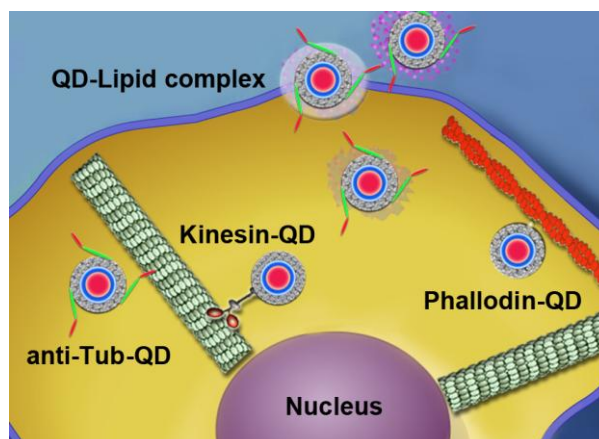
生命科学における最終ゴールの1つは、身体の仕組みを分子レベルで理解することである。本研究では、動物個体の機能を分子レベルで理解するために、マウス *in vivo* での生体運動に関連する分子の挙動をナノイメージングする装置を開発し、*in vivo* における生体運動の機構を解明する。本研究の鍵となる技術は、蛍光粒子の細胞内導入と様々な器官(骨格筋, 心筋, 平滑筋, がん腫瘍)のイメージングの可能性を、新しい装置を用いて検討を行った。この1年間の大きな進歩は、新たに強度の安定な量子マルチドットの合成に成功したこと、量子ドットを細胞内やマウスの中に入れる方法が完成したこと、がん細胞の動態の詳細をマウスの中で観察できたこと、心筋や平滑筋に量子ドットを導入して分子ダイナミクスを観察できたことである。マウスの *in vivo* を観察するための材料、導入方法そして実際の観測が進みつつある。

2. 研究実施内容

In vivo(マウスなど)でイメージングするために、1. 我々は明るく安定な量子ドットを作り、2. これに抗体や標的タンパク質を結合する。3. この量子ドット-タンパク質複合体をマウス内の細胞に導入して、4. 新たに開発した単一分子のイメージング装置にて、5. 骨格筋, 心筋, 平滑筋, がん細胞の運動を *in vivo* で3次元的に観測することである。この1年でそれぞれの研究で得られた結果と新たに出てきた問題点を述べる。

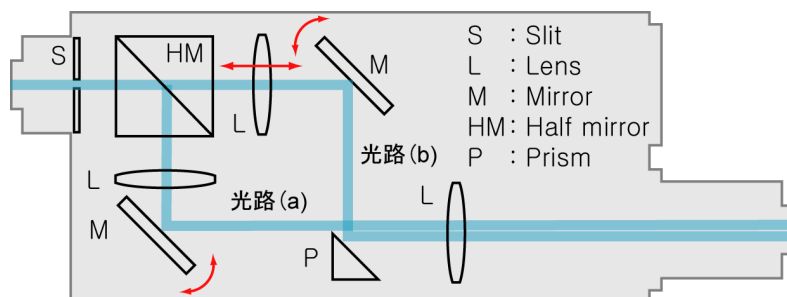
1. (田口班) 半導体量子ドットは発光波長の制御が可能であり高輝度化に有利であるなどの利点を有しており従来の蛍光色素の欠点をカバーするバイオ標識開発の可能性を秘めている。我々は、水溶液法による水分散性 CdTe 量子ドットの合成に成功し、発光効率 65%(赤)を達成し、また、非 Cd 系量子ドットの合成にも成功した。さらに、複数量子ドットを包含した分散ビーズを逆ミセル法で創製することに成功した。この分散ビーズには高輝度発光性や発光強度安定性(ブリンキング抑制)などの特徴がある。この分散ビーズを細胞内に取り込ませ観察することが可能であることを神経細胞を用いて実証し、細胞内部に取り込まれた輝点が分散ビーズであることは各輝点の発光スペクトルを解析することにより明らかにした。樋口班と共同で、この粒子が1分子観察に適しているかの検討も進めた。

2. (樋口班)量子ドット-タンパク質複合体を細胞に導入する新しい方法が確立した。市販 DNA をトランスフェクションさせる試薬 (FuGENE-HM) にファロイジン, 微小管抗体やキネシンを結合した量子ドット (QD) を混ぜて, これを培養細胞に導入することに成功した。ファロイジン-QD はアクチンに結合し, 抗体-QD はや微小管に結合することが確認された。モータータンパク質キネシンは, 微小管上を動いた。細胞内のキネシンの最大運動速度は, 精製したキネシンを用いた In vitro



motility assay における最大速度の約2倍もあった。これは, 微小管が重合脱重合によって動くため, その上で動くキネシンは微小管の速度が加算されたためであることが示唆された。この方法のマウスへの応用も試みている。

3. (樋口班)昨年度開発した3次元単一分子のイメージング装置 (図) を厚い試料 (細胞全体) でも観察できるように改良した。従来の, 共焦点顕微鏡と対物レンズの移動を組み合わせる3次元像を得る方法の欠点は, 速度が遅いことである。例えばビデオレートで1枚の共焦点像を取得して, 10枚から3次元像を得ると1立方体あたり 330ms を要する。これを解決するための方法として, 2焦点光学系を昨年開発した。この装置で観察できる範囲は厚さ 1-2 μm 程度なので, 細胞全体を一度に観察することが困難である。この困難を克服した新しい装置を新たに開発した。



4. 春日班 ラット骨格筋に損傷を与えて, 筋肉再生の指標を, 免疫染色法を用いて探索した。サテライト細胞の核には, 損傷から数日後には PCNA が特異的に発現をし, その細胞が, 損傷部位に移動することを示唆するデータを得た。今後はサテライト細胞核に PCNA 陽性反応を示す M-cadherin に量子ドットを結合して細胞の動態を観察する予定である。

5. 福田班 心筋収縮系は, 中間活性化条件で鋸波状の自励振動を示し (SPOC)、この振動数は静止時の心拍数にほぼ匹敵する。除膜処理したラットの単離心筋細胞の Z 線を α アクチニン抗体-量子ドット複合体でラベルし, 単一サルコメアでの SPOC の波形解析を試みた。量子ドットを用いることにより, 従来は不可能であった短いサルコメア長の正確な測定が可能になり, 生理的なサルコメア長の範囲内 (1.7-2.3 μm) で SPOC 振幅とサルコメア長との間に逆相関の関係があることが分かった (周波数: 約 2 Hz)。さらに, 樋口班が開発した方法を応用し, 細胞膜を有する生きて単離心筋細胞に α アクチニン抗体-量子ドット複合体を導入することに成功した。この心筋細

胞は電気刺激(周波数:1-5 Hz)に応答し、収縮中、任意の単一サルコメアは SPOOC に類似した鋸波状の振動特性を示すことが分かった。

6. 渡辺班 平滑筋筋フィラメントには、その収縮機構を含めて未だ不明な点が多い。そこで当班では、平滑筋のミオシン・アクチンフィラメントのダイナミクス解析を目的として、生きた平滑筋細胞内での平滑筋ミオシンの一分子追跡を試みた。現在までに平滑筋組織および単離平滑筋細胞内に抗平滑筋ミオシン抗体融合ー量子ドットを導入することに成功した。平滑筋組織の細胞内に導入された量子ドットの蛍光シグナルの運動を観察したところ、未融合の量子ドットがブラウン運動様のランダム な動きを見せたのに対し、抗ミオシン抗体融合量子ドットシグナルは紡錘形をしている平滑筋細胞の長軸方向に往復運動をしているのが観察された。この観察結果 は、平滑筋細胞内にアクトミオシン系とデンスボディによる「ミニサルコメア」が存在すると考える仮説と矛盾しない。

7. 樋口班 がん転移のイメージングと治療を目的として、細胞膜に発現し、転移能活性化因子 PAR1 in vivo ナノイメージングを行った。低転移性がん細胞 KPL に転移能活性化蛋白質 PAR1-GFP を発現させた細胞にてマウス内に腫瘍を作製した。マウス内でのがん細胞に、量子ドット-PAR1 抗体を結合して、細胞膜の流動性の検出に成功した。膜は、浸潤する際に流動性が高く、移動しない細胞においては、非常に遅いことが確かめられた。これは、おそらく In vivo 内で、細胞の流動性を正確に測定できた初のデータであろう。

3. 研究実施体制

(1)「技術」グループ

①研究分担グループ長:樋口 秀男(東京大学大学院、教授)

②研究項目

In vivo ナノイメージング装置の開発と生体運動のイメージング
技術開発

(2)「骨格筋」グループ

①研究分担グループ長:春日 規克(愛知教育大学、教授)

②研究項目

骨格筋の機能と分子挙動解析
骨格筋電子顕微鏡解析
骨格筋蛍光抗体像の解析

(3)「心筋」グループ

①研究分担グループ長:福田 紀男(東京慈恵会医科大学、講師)

②研究項目

In vivo 心筋ナノイメージング解析

(4)「平滑筋」グループ

①研究分担グループ長:渡辺 賢(東京医科大学、講師)

②研究項目

平滑筋 *in vivo* ナノイメージング

分光計測

(5)「量子ドット」グループ

①研究分担グループ長:田口 隆久((独)産業技術総合研究所、部門長)

②研究項目

多色量子ドット材料研究と計測解析技術研究

細胞内導入技術研究

量子ドット材料研究

計測解析技術研究

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表 (原著論文)

1. Yoo J, T. Kambara, K. Gonda, and *H. Higuchi. Intracellular imaging of targeted proteins labeled with Quantum Dots. *Exp Cell Res.*314, 3563-3569 (2008)
2. Fukuda, N., H.L. Granzier, S. Ishiwata, and S. Kurihara. 2008. Physiological functions of the giant elastic protein titin in mammalian striated muscle. *J. Physiol. Sci.* 58:151-159.
3. Terui, T., M. Sodnomtseren, D. Matsuba, J. Udaka, S. Ishiwata, I. Ohtsuki, S. Kurihara, and N. Fukuda. 2008. Troponin and titin coordinately regulate length-dependent activation in skinned porcine ventricular muscle. *J. Gen. Physiol.* 131:275-283.
4. Udaka, J., S. Ohmori, T. Terui, I. Ohtsuki, S. Ishiwata, S. Kurihara, and N. Fukuda. 2008. Disuse-induced preferential loss of the giant protein titin depresses muscle performance via abnormal sarcomeric organization. *J. Gen. Physiol.* 131:33-41.
5. Fukuda, N., J. O-Uchi, and S. Kurihara. Neuronal NO synthase-derived NO: a novel relaxing factor in myocardium? 2008. *Circ. Res.* 102:148-50.
6. Chie Hosokawa, Suguru N. Kudoh, Ai Kiyohara, and Takahisa Taguchi, *NeuroReport*, Vol. 19, No. 7, pp. 771-775 (2008).
7. Chie Hosokawa, Suguru N. Kudoh, Ai Kiyohara, Yoichiro Hosokawa, Kazunori Okano, Hiroshi Masuhara, and Takahisa Taguchi, *Applied Physics A*, Vol. 93, pp. 57-63 (2008).
8. Ishido M, Kasuga N, Masuhara M. Time course changes of the expression of IGF-I, phosphorylated Akt and phosphorylated mTOR in myofibers of the early stage of functionally overloaded skeletal muscle. *Advances in Exercise and Sports Physiology*, 14: 25-30, 2008.
9. 石道峰典, 春日規克. 自発走トレーニングを伴う慢性過負荷が骨格筋の形態特性, 筋線維タイプ構成比に及ぼす影響. *日本運動生理学雑誌*, 15: 19-25, 2008.

10. Ishido M, Kasuga N, Masuhara M. The expression patterns of Pax7 in satellite cells during overload-induced rat adult skeletal muscle hypertrophy. *Acta Physiologica*, 195, 459-569, 2009.

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 1 件)