

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、強度の安定な量子マルチドットの合成に成功したこと、量子ドットをラット内骨格筋に導入して衛生細胞の動きを捉えたこと、GFP タンパク質をマウス内に入れる方法が完成したこと、マウスがん細胞内の微小管動態の詳細を観察できたこと、心筋に GFP 融合タンパク質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飛躍的に進んだ。

§ 2. 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 (東京大学大学院理学系研究科)
- 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
 - ・技術開発とモデル化

(2)「骨格筋」グループ

① 研究分担グループ長:春日規克(愛知教育大学教育学部)

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 細胞生理学講座)

② 研究項目

- ・*In vivo* 心筋ナノイメージング解析

(4)「量子ドット」グループ

① 研究分担グループ長:田口隆久(産業技術総合研究所)

② 研究項目

- ・多色量子ドット材料の合成と計測解析技術の研究
- ・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

§ 3. 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)

前年度に改良スーパーストリー法で量子ドット(疎水性 CdSe/ZnS 量子ドット)を多数、ガラスナノビーズにつめることに成功した⁸⁾. それを受けて、今年度は作製したガラスナノビーズを神経細胞に導入する実験を進めている。また、非特異吸着を除去して目的の抗原にのみガラスナノビーズを接着させるためのガラス表面処理方法について、樋口班と共同で研究を進めた。さらに、現状の量子ドットの発光波長が 620 nm 程度であるのに対して、in vivo での応用を考えると 650 nm 以上が望ましいことがはっきりした。このため、新たな合成を開始した。

従来、疎水性 CdSe/ZnS 量子ドットは市販のものを用いていたが、波長 650 nm 以上の市販品(疎水性)は発光効率が低く希薄溶液中での劣化も見られたため、新たな合成には使えないと判断し、自分達で合成方法を開発することにした。文献で最も一般的な合成法ではトリオチルフォスフィンオキサイド(TOPO)を量子ドット表面の配位子として使用する。しかしながら、TOPO には不純物が含まれ、市販薬品のロットによって不純物の割合が異なるために再現性良く合成できないことが判明。別途 TOPO を使わない合成法を採用し、さらに工夫して波長 650 nm 以上で高い発光効率を得た。これをガラスナノビーズに封入するために、前年度に開発した方法を適用したが、発光効率の低下、沈殿などが生じた。これは、量子ドットの表面状態が異なるために、ゾル-ゲル過程でガラス分子が均一に量子ドット表面に接着しないためであることが判明、現在、新たな合成法を開発中である。

これと並行して、輝度を上げる別の方法として金属ナノ粒子-量子ドット複合ガラスビーズの作製を進めている。大きさ 10 nm 程度の小さい金ナノ粒子を薄いガラス薄膜で覆うことに始めて成功した。反応速度を制御することで、金ナノ粒子表面にガラス分子を均一接着させることが重要なステップであった。

2. (樋口班)

従来の方法でニポウディスク式共焦点スキャナによる観察は、撮像装置に CCD カメラを用いることで高時間分解能で共焦点像が得られるため、さまざまな用途で活用されている¹⁾。しかし、あくまでも同時に観察できるのは、単一の Z 位置の観察面に限られていた。これに対して、本研究では、ニポウディスク式共焦点スキャナを複数台使用し、複数の Z 位置に共焦点面を作り出し、それぞれの共焦点面をリレーレンズ系と投影ユニットにより一台の CCD 受像面に分割して投影することで、複数の Z 位置の共焦点画像を同時に記録した。異なる Z 位置の共焦点画像を得ることで、異

なる焦点面の現象を同時に見ることができた。さらに、従来法では観察物質のZ方向の位置を正確には知ることができなかったが、本発明では、同一の物質のZ方向に位置を正確に算出できる。一方、共焦点スキャナBを取り去れば、透過照明像、位相差像、微分干渉像などを得ることができるので、共焦点スキャナAで得られる蛍光像と同時にこれらの像を同時に観察できた。

3. (春日班)

吸引麻酔下にあるラットの下肢骨格筋(ひらめ筋)を M-cadherin-Qdot 複合体/0.1M PBS で incubation を行い *in vivo* にて観察した結果、Qdot が導入され筋衛星細胞(サテライトセル)の *in vivo* real-time imaging が可能となった⁹⁾。発生過程における形態形成ばかりでなく、生後の筋細胞の成長(伸長肥大)にともなう筋核の増加などは、骨格筋内に局在するサテライトセルの増殖に頼っている。新たな筋節が線維端に形成されながら細長く成長する筋線維において、長軸構造内の均等配置を保った筋核数の増加は、筋線維上に分布は筋衛星細胞の増殖・遊走(細胞運動)・分化によっていると考えられるが、発育期の筋衛星細胞の細胞運動について確認されていない。そこで、発育初期にある筋衛星細胞の動態を *in vivo* バイオイメージングした。成熟したラットの無傷ヒラメ筋に対して M-cadherin-Qdot 複合体で incubation を行い、30 分毎 90 分間の観察を行ったが、筋衛星細胞の移動は観察されなかった。一方、生後 14 日齢のヒラメ筋に対して M-cadherin-Qdot 複合体で incubation を行い *in vivo* にて 80 分間の連続観察した結果、経時的に移動する、M-cadherin+ 筋衛星細胞を確認することが出来た。遊走は筋線維中央側から筋節が新生される筋端方向に起きており、観察できた筋衛星細胞の平均移動速度は 105nm/min であった。

4. (福田班)

4.1 心筋のサルコメアは中間活性化条件において、ゆっくりとした収縮相と素早い伸展相から成る鋸波状の自励振動を示す(SPOC)。SPOC は、心筋細胞の端から端に渡り、動物種によって決まった振動数で伝播される¹⁵⁾。本年度、SPOC の普遍性を明らかにするため、幼弱ラット心筋細胞(4 days)の Z 線(α -アクチニン)に GFP を発現させ、電気刺激に対するサルコメアの応答性を解析した。その結果、電気刺激頻度が低い時(1 Hz)には、サルコメア長変化は SPOC と逆位相であったが、電気刺激頻度の上昇(最大 5 Hz)にともない位相が反転し、SPOC 様の振動現象が生じることを見出した。この結果は、発育状態によらず、SPOC が心拍調節に積極的に関与していることを示している。

4.2 アデノウイルスベクターを用い、*in vivo* 成熟ラットの心筋細胞の Z 線(α -アクチニン)に GFP を発現させた。心臓を摘出し、自動拍動時に観察すると、サルコメアの収縮・弛緩は心筋細胞内で一様に生じるのではなく、SPOC 様、すなわち細胞の端から端にわたって伝播されることが明らかとなった。

5. (樋口班)

微小管結合タンパク質 EB1 の動態変化をマウス生体内において経時観察し、体内における細胞内微小管の動態変化をナノメーター精度で解析した。微小管結合タンパク質 (end-binding protein 1, EB1 と略す) は微小管プラス端集積因子の一種で、他のプラス端集積因子と共に微小管の機能制御に働いていると考えられているが、その機能の詳細は未だ不明である。EB1 分子の局在は、微小管先端を起点にして尾を引くような様相を呈する。つまり EB1 の集積を追跡することで細胞内における微小管の動態を観察することが可能になる。本研究では、ヒト乳癌由来培養細胞内で発現させた EB1-GFP のコメット様の局在を微小管伸長端マーカーとして利用し、動態の観察・追跡を行った。観察にはスピンドイスク型共焦点顕微鏡(横河・CSU)を使用した。自動輝点追跡プログラムを用いて EB1-GFP コメットの輝度中心をナノメーター精度で追跡することにより、EB1-GFP の細胞内速度分布を微小管伸長速度の細胞内分布として算出した。その結果、中心体付近の EB1 コメット速度は細胞膜付近のものより速いことが明らかになった。また、細胞外マトリクスを模したゲル中で立体培養を行った細胞でも同様の傾向が見られた。さらに、生きたマウスの体内における微小管動態を調査するため、GFP-EB1 を発現したヒト乳癌細胞をヌードマウスに移植し、移植細胞内の GFP-EB1 の *in vivo* 観察を行うことに成功した。In vivo において細胞内タンパク質の動態を観察する本手法は、血流や免疫系、細胞外マトリクス等の多様な要素が存在する生体内において、細胞の周辺微小環境変化への応答や、生体への剤投与に対する応答を分子レベルで解析、定量することを可能にすると期待される。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Hirota Y., A. Meunier, S.Huang, T. Shimozawa, O.Yamada, Y.S Kida, M. Inoue, T. Ito, H. Kato, M. Sakaguchi, T. Sunabori, M. Nakaya, S. Nonaka, T. Ogura, H. Higuchi, H. Okano, N.Spasky, and *K. Sawamoto. Planar polarity of multiciliated ependymal cells involves the anterior migration of basal bodies regulated by non-muscle myosin II. *Development* 137, 3037-3046 (2010)
DOI:10.1242/dev.050120
2. Fujita H, H. Hatakeyama, TM. Watanabe, M. Sato, H. Higuchi and * M. Kanzaki. Identification of Three Distinct Functional Sites of Insulin-mediated GLUT4 Trafficking in Adipocytes Using Quantitative Single Molecule Imaging. *Mol. Biol. Cell* 21, 2721-2731 (2010) DOI 10.1074/jbc.M109.093864
3. Watanabe TM, H. Tokuo, K. Gonda, H. Higuchi and * M. Ikebe. Myosin-X induces filopodia by multiple elongation mechanism. *J. Biol. Chem.* 285, 19605-14 (2010)
DOI 10.1074/jbc.M109.093864
4. Yang, P., Ando, M., Taguchi, T. and Murase, N., Encapsulation of Multiple QDs

- into SiO₂ Beads by Reflux without Degrading Initial Photoluminescence Properties, *J. Phys. Chem. C*, 114: 20962–20967. (2010) DOI: 10.1021/jp1051326
5. Yang, P., Ando, M. and Murase, N. Highly luminescent SiO₂ beads with multiple QDs: preparation conditions and size distributions. *J. Colloid Interf. Sci.* 354: 455-460. (2011). DOI:10.1016/j.jcis.2010.11.018
 6. Yang, P., Ando, M. and Murase, N. Various Au Nanoparticle Organizations Fabricated through SiO₂ Monomer Induced Self-Assembly, *Langmuir*. 27: 895-901. (2010). DOI: 10.1021/la103143j
 7. Li, C. L., Ando, M., Sakai, E., Enomoto, H., and Murase, N. Aqueous Preparation of Highly Luminescent CdSe/ZnS Nanocrystals Through Photochemical Processing. *Chem. Lett.* 40: 258-260. (2011). DOI: 10.1246/cl.2011.258
 8. Ishido M, Kasuga N, In situ real-time imaging of the satellite cells in rat intact and injured soleus muscles using quantaum dots. *Histochem. Cell Biol.*, 135,21-26 (2011) DOI 10.1007/s00418-010-0767-x
 9. Fujimoto E, Machida S, Higuchi M, Tabata I, Effects of nonexhaustive bouts of high-intensity intermittent swimming training on GLUT-4 expression in rat skeletal muscle. *J. Physiol. Sci.*, 60:95-101, (2010.) DOI: 10.1007/s12576-009-0072-4
 10. Yuki A, Yotani K, Tamaki H, Kasuga N, Takekura H. Upregulation of osteogenic factors induced by high-impact jumping suppresses adipogenesis in marrow but not adipogenic transcription factors in rat tibiae. *Eur J Appl Physiol.* 109-4:641-50.(2010). DOI: 10.1007/s00421-010-1383-0
 11. Tomori K, Ohta Y, Nishizawa T, Tamaki H, Takekura H. Low-intensity electrical stimulation ameliorates disruption of transverse tubules and neuromuscular junctional architecture in denervated rat skeletal muscle fibers. *J Muscle Res Cell Motil.* 31-3:195-205.(2010). DOI: 10.1007/s10974-010-9223-8
 12. Fukuda N, Terui T, Ishiwata S, Kurihara S. Titin-based regulations of diastolic and systolic functions of mammalian cardiac muscle. *J Mol Cell Cardiol.* 48, 876-881, (2010). doi:10.1016/j.yjmcc.2009.11.013
 13. Terui T, Shimamoto Y, Yamane M, Kobirumaki F, Ohtsuki I, Ishiwata S, Kurihara S, Fukuda N. Regulatory mechanism of length-dependent activation in skinned porcine ventricular muscle: role of thin filament cooperative activation in the Frank-Starling relation. *J Gen Physiol.* 136, 469-482, (2010). doi: 10.1085/jgp.201010502
 14. Ishiwata S, Shimamoto Y, Fukuda N. Contractile system of muscle as an

auto-oscillator. *Prog Biophys Mol Biol.* 105, 187-198, (2010).
doi:10.1016/j.pbiomolbio.2010.11.009

(4-2) 知財出願

- ① 平成22年度特許出願件数(国内 3件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 5件)