

第 23 回日本バイオイメーjing学会学術集会 「公開講座」並びに「学術講演会」のお知らせ

第 23 回日本バイオイメーjing学会学術集会・大会長 菊地和也

第 23 回日本バイオイメーjing学会学術集会を開催いたします。多くの方々にご参加頂きたくご案内申し上げます。プログラム等の詳細につきましては学術集会 URL : <http://www-molpro.mls.eng.osaka-u.ac.jp/bioimage2014/> をご覧ください。

会期：平成 26 年 9 月 4 日（木）～9 月 6 日（土）

◆公開講座：9 月 6 日（土）13:00～17:00

◆学術講演会：9 月 4 日（木）13:30 ～9 月 6 日（土）12:00

会場：大阪大学銀杏会館（大阪府吹田市山田丘 2-2）

（<http://www.office.med.osaka-u.ac.jp/icho/icho-jp.html> を参照）

協賛学会（五十音順）

応用物理学会	化学工学会	可視化情報学会
日本医学物理学会	日本化学会	日本細胞生物学会
日本磁気共鳴医学会	日本神経科学学会	日本神経化学会
日本生物物理学会	日本生理学会	日本組織細胞化学会
日本蛋白質科学会	日本超音波医学会	日本農芸化学会
日本物理学会	日本分光学会	日本分子イメーjing学会
日本分析化学会	日本免疫学会	日本薬学会
日本レーザー医学会		

◎重要事項の締切り期日、等

◆講演受付締切り期日

○演題申込み・締切り 平成 26 年 6 月 30 日（月）

○日本語、英語抄録原稿・締切り 平成 26 年 6 月 30 日（月）

◆参加登録・締切り 平成 26 年 7 月 30 日（水）

◆懇親会参加登録・締切り 平成 26 年 7 月 30 日（水）

★一般口演（ポスター発表）の演題を募集しています。代表して発表する著者は本学会の会員に限ります。入会がお済みでない方は、学会のホームページで入会申込書を入手し、手続きをしてください。

一般口演の申込手順は次のようになっています。締切り日を厳守して下さい。

○演題申込み・日本語抄録および英語抄録提出（6 月 30 日（月））

○申込方法：

大会ホームページ（<http://www-molpro.mls.eng.osaka-u.ac.jp/bioimage2014/>）より日本語抄録および英語抄録のテンプレートをダウンロードし、抄録を作成してください。作成した抄録は、参加申込書と同時に事務局宛にメールにて提出をお願いします。

◎事前参加登録

演題を出される方も、参加のみの方も事前参加登録を済ませてください。締切りは7月30日（水）です。

◎懇親会の参加登録も7月30日（水）までに済ませてください。

◎参加費、懇親会費と支払い方法

事前参加登録頂きましたら、参加費と懇親会費の合計（懇親会に出席されない方は参加費のみ）を下記口座に平成26年8月14日（木）までにご入金ください。領収書は、学術集会受付にてネームカードと共にお渡しします。

参加費：公開講座（無料）

学術集会：一般（会員・協賛学会員：6,000円、非会員：8,000円） 学生（3,000円）

懇親会費： 一般 5,000円 学生：2,000円

振込および振替手数料は、ご負担いただきたくお願い申し上げます。

①郵便振替の場合

口座記号番号：14010－54506921

口座名称： 第23回日本バイオイメージング学会学術集会

②銀行振込の場合

銀行・支店名： 三菱東京UFJ銀行・千里中央支店（店番号240）

口座番号： 0292414

口座名称： 第23回日本バイオイメージング学会学術集会

◎公開講座プログラム

日時：9月6日（土）13:00～17:00（受付12:00～13:00）

会場：大阪大学銀杏会館（大阪府吹田市山田丘2-2）

「融合研究が拓くバイオイメージング ～物理学・化学の生命科学研究への新展開～」

13:00～15:00

1. 「はじめに」

川西徹（国立医薬品食品衛生研究所）

2. 「植物の重力受容メカニズムに迫る」

森田美代（名古屋大学大学院生命農学研究科）

3. 「細胞機能を分子スパイで探る」

新井由之（大阪大学産業科学研究所）

4. 「細胞エネルギーを可視化する」

今村博臣（京都大学白眉センター）

5. 「植物の細胞内ダイナミクス」

上田晴子（京都大学大学院理学研究科）

15:15～16:45

6. 「細胞の細部構造をありのままに調べるラマン顕微鏡」

小関泰之（東京大学大学院工学系研究科）

7. 「神経細胞の興奮を可視化する」

筒井秀和（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）

8. 「ナノダイヤモンドで細胞機能を視る・操作する」
原田慶恵（京都大学物質－細胞統合システム拠点）
9. 「おわりに」
菊地和也（大阪大学大学院工学研究科）

17:00～18:00 懇談会

◎学術講演会プログラム

日時：9月4日（木）13:30 ～ 9月6日（土）12:00

会場：大阪大学銀杏会館（大阪府吹田市山田丘 2-2）

9月4日（木）

13:30 開会

13:40～15:40 シンポジウム1「生命・イメージング・データベース」

オーガナイザー：木原裕（姫路日本短期大学）、小島正樹（東京薬科大学生命科学部）

- 1-1. 「生命とは何か（仮）」 金子邦彦（東京大学大学院総合文化研究科）
- 1-2. 「ダイナミック・イメージング（仮）」 澤井哲（東京大学大学院総合文化研究科）
- 1-3. 「構造生命科学の世界展開」 若槻壮市（スタンフォード大学医学部）
- 1-4. 「イメージングのデータベース（仮）」 京田耕司（理化学研究所生命システムセンター）

15:50～17:30 シンポジウム2「20年後に見えているもの」

オーガナイザー：樋口ゆり子（京都大学大学院薬学研究科）

- 2-1. 「細胞の個性を創る、探す、使う」 合田圭介（東京大学大学院理学系研究科）
- 2-2. 「脳活動のモデル化と知覚体験の可視化：現在と未来」 西本伸志（情報通信研究機構）
- 2-3. 「X線光学はどこまで進むか？」 玉作賢治（理化学研究所）
- 2-4. 「超高速分光の未来～アト秒・zeptasecondとイメージング～」
新倉弘倫（早稲田大学理工学術院先進理工学部）

9月5日（金）

9:30～11:30 シンポジウム3「脱ラベル化イメージング」

オーガナイザー：藤田克昌（大阪大学大学院工学研究科）

- 3-1. 「ラベルフリーイメージングの医療応用」
高松哲郎（京都府立医科大学大学院医学研究科）
- 3-2. 「非標識光学イメージングで細胞状態を観る」
市村垂生、渡邊朋信（理化学研究所生命システム研究センター）
- 3-3. 「吸収増幅顕微鏡による細胞個性計測」
新井由之、永井健治（大阪大学産業科学研究所）

3-4. 「Multimodal Raman and phase imaging for maximal information retrieval from cellular targets」

Nicholas I Smith (大阪大学免疫学フロンティア研究センター)

3-5. 「Digital Holographic Microscopy: Applications in Coherent Superresolution and Monitoring of Neuronal

Dynamics」 Nicolas Pavillon (大阪大学免疫学フロンティア研究センター)

13:00～14:40 ポスター討論 (前半：奇数、後半：偶数)

14:55～15:45 特別講演 1 三浦正幸 (東京大学大学院薬学系研究科)

15:55～16:45 特別講演 2 難波啓一 (大阪大学大学院生命機能研究科)

16:55～17:25 奨励賞受賞講演

17:35～17:50 ベストイメージング賞授賞式

18:00～19:30 懇親会

9月6日(土)

9:30～11:10 シンポジウム 4「おもしろイメージング」

オーガナイザー：渡邊朋信 (理化学研究所生命システム研究センター)

4-1. 「光音響 (仮)」 石原美弥 (防衛医科大学校医用工学講座)

4-2. 「補償光学 (仮)」 早野裕 (国立天文台ハワイ観測所)

4-3. 「ホログラフィック顕微鏡 (仮)」 田原樹 (関西大学システム理工学部)

4-4. 「MRI による温度計測 (仮)」 森勇樹 (大阪大学免疫学フロンティア研究センター)

11:20～11:50 総会

11:50 閉会

◆理事会 : 9月4日(木) 17:30～19:30

◆評議員会 : 9月5日(金) 11:30～13:00

◆総会 : 9月6日(土) 11:20～11:50

◎本学術集会についての問い合わせ先

大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻物質生命工学コース

ケミカルバイオロジー領域内第23回日本バイオイメージング学会学術集会事務局

大会長 菊地和也

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-1 総合研究棟5階

TEL: 06-6879-7924, FAX : 06-6879-7875

E-mail : bioimage2014@mls.eng.osaka-u.ac.jp

URL : <http://www-molpro.mls.eng.osaka-u.ac.jp/bioimage2014/>

第 22 回日本バイオイメーjingグ学会学術集会報告

船津 高志^{1,2}¹第 22 回日本バイオイメーjingグ学会学術集会大会長; ²東京大学大学院薬学系研究科

* E-mail: funatsu@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

本学会の第 22 回学術集会が、2013 年 9 月 14 日～16 日に、東京大学薬学部講堂にて行われました。以下に、集会のご報告をしたいと思います。

まず、9 月 14 日には、高校生や一般の方を対象とした公開講座を開催しました。開催案内を協賛学会のホームページでお知らせしたほか、ポスターをスーパーサイエンスハイスクールに指定されている高等学校、東京都内の高等学校に郵送しました。その結果、当日は 163 名の参加者があり、薬学部講堂がほぼ満席になりました。参加者の内訳は、大学や病院関係者が約 80 名、企業や一般人が約 70 名、高校生・引率の教師が 16 名、さらに中学生が 1 名でした。

バイオイメーjingグの分野で最先端の研究を展開されている政池知子（東京理科大）、古寺哲幸（金沢大学）、神谷真子（東京大学）、喜多村和郎（東京大学）、樋口ゆり子（京都大学）、小野正博（京都大学）先生に講演をしていただきました。生体分子、組織内の細胞、個体内の分子プローブのイメージングに加えて、蛍光イメージングや SPECT（単一光子放射断層撮影）のためのプローブ開発が紹介されました。講演会終了後は、東京大学大学院薬学系研究科生体分析化学教室の見学会を行いました。1 分子蛍光顕微鏡によるキネシン分子の運動観察や光ピンセットが実演されました。約 60 名の方が見学会に参加されました。見学会と並行して、講師の先生方を囲んで軽食をとりながら懇談しました。中学生が講師の先生に熱心に質問していた姿が印象に残りました。なお、公開講座は科学研究費補助金（研究成果公開促進費）の援助を得て行いました。記して感謝します。

続いて、9 月 15 日、16 日には学術講演会を開催しました。180 名の参加者があり、薬学部講堂が満席になりました。15 日は、シンポジウムが 2 件「ラマン・イメージングの最前線」、「超解像顕微鏡の現状と課題」が行われました。非線形ラマン分光法により画像の取得が飛躍的に高速化されたことが印象的でした。また、超解像顕微鏡のシン

ポジウムでは、様々な超解像顕微鏡法が原理から解説されたほか、画像処理による高解像化も紹介され、参加者の興味を惹きつけました。シンポジウムを挟んで、ポスター討論が行われました。43 題のポスターがエントランスホールに掲示され、15 日は、そのうちの 21 件について討論が行われました。その後、日本バイオイメーjingグ学会奨励賞受賞者による講演が行われました。本年度は、桧垣匠博士（東京大学）が奨励賞を受賞されました。引き続き、浜地格先生（京都大学）による特別講演が行われました。生きた組織にプローブを入れて狙った受容体などを特異的に標識する技術が紹介されました。

16 日も、引き続き学術講演会を行う予定でしたが台風 18 号が会場付近を通過し、暴風警報が発令されたため中止としました。ポスターや講演の準備をしていただいた皆様、遠慮はるばる東京までお越しにいただいていた方、当日悪天候にもかかわらず会場までいらしてくださった方、誠に申し訳ありませんでした。

なお、16 日は、シンポジウムが 2 件「医薬品をイメージングする ―革命的医薬品創出のための基盤技術―」、「生命・イメージング・データベース」、ポスター討論 22 件、三浦正幸先生（東京大学）による特別講演が予定されていましたが、これらの発表を楽しみにしていましたが、中止になりましたことを、たいへん残念に思います。参加者の皆様に被害がでなかったことを願うばかりです。

なお、本学術講演会は、19 の関連学会の協賛を得て開催しました。また、公益財団法人サントリー生命科学財団をはじめ、25 の協賛企業のご援助をいただきました。記して感謝申し上げます。明年の第 23 回日本バイオイメーjingグ学会学術集会は、大阪大学において菊地和也大会長のもとで開催されます。皆さんの参加をお待ちしています。

植物の孔辺細胞をモデルとした蛍光タンパク質の統計的局在解析

桧垣 匠*

東京大・院・新領域創成科学

* E-mail: higaki@k.u-tokyo.ac.jp

はじめに

蛍光イメージングによるタンパク質の細胞内局在解析は、その機能推定や相互作用因子の探索のための基本的な研究手段である。タンパク質の細胞内局在を網羅的に決定し、データベースとして公開する試みはおよそ 10 年以上前より積極的に進められており [1]、近年の蛍光標識や顕微鏡撮影のハイスループット化はその潮流をますます加速させている。このような網羅的な細胞内局在情報は localizome と呼ばれ、他のオミクス情報との統合への期待も高まっている [2]。その一方で、細胞内局在の表現方法に関しては、例えば「ゴルジ体」や「細胞核、細胞質」のように、蛍光画像の定性的な目視判断により同定した細胞内構造の名前を挙げる従来通りの方法に留まることが多い。しかしながら、本来、タンパク質の細胞内局在とは各細胞内構造の中に存在するタンパク質分子の割合のことであり、細胞内構造の名前を示すだけの端的な記述はあくまでも近似的な表現に過ぎない。すなわち、細胞内局在が「小胞体、ゴルジ体」とされているタンパク質群であっても、タンパク質の種類ごとに両者への局在の程度は異なる場合があり、その差異あるいは類似性を細胞内構造名だけで表現することには限界がある。理論的には、タンパク質の細胞内局在の類似性は数値として定量的に評価することができるはずである (図 1)。もちろん、細胞内構造名として近似された局在情報だけでも、私たちは十分に研究目的を達成できる場合も多いが、局在の程度としては低

くとも生物学的に重要な意味を持つ局在性を見逃している可能性には注意を払うべきであろうと思われる。もちろん、このような細胞内局在に対する定量的な考え方は細胞分化状態、外部環境刺激、遺伝子変異に応じたタンパク質の局在変化を厳密に議論する上においては必要不可欠となる。蛍光タンパク質の細胞内局在をイメージング技術によって定量的に評価する方法としてまず考えられるのは、各種細胞内構造内における蛍光輝度を測定することである。実際、外部環境刺激に応じて細胞質と細胞核を行き来する転写因子の動態は、細胞質と細胞核における蛍光輝度比を測定することで定量的に評価できる [3]。しかし、通常の蛍光顕微鏡画像ではあらゆる細胞内構造の形状や配置の情報を同時に得ることはほぼ不可能である。そのため、蛍光タンパク質の細胞内局在を定量的に表現するために、細胞内構造の領域を切り分けて蛍光輝度を測定する手段は現実的ではない。

この問題を克服するために、私たちは多数の蛍光顕微鏡画像から細胞内局在確率マッピング (intracellular localization probabilistic mapping) と呼ばれる手法によって蛍光タンパク質の細胞内局在を統計的に可視化し、これらをクラスタリング解析する方法を提案してきた [4, 5]。本稿では、植物の孔辺細胞をモデル細胞として各種細胞内構造の蛍光マーカータンパク質群の細胞内局在を定量評価した研究について概説する。

植物の孔辺細胞

まず、本研究の材料である植物の孔辺細胞について説明

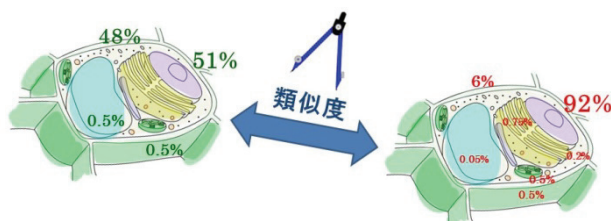


図 1. どうすれば細胞内局在を定量的に評価できるだろうか？

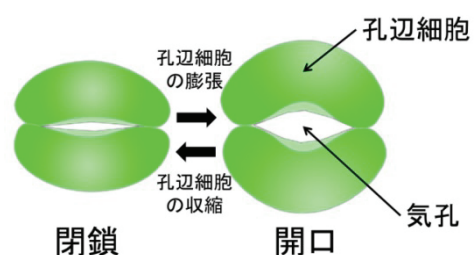


図 2. 気孔開閉の模式図

*2013 年度日本バイオイメージング学会奨励賞受賞者

したい。植物の葉や茎の表面には微細な孔が無数に存在しており、これは気孔と呼ばれている。気孔は二酸化炭素(光合成の基質)をはじめとする生理機能に関わるガス代謝の調節を担っており、植物の生存にとって必要不可欠な器官である。葉内における二酸化炭素分圧は大気環境に比べて十分に低いため、気孔が開くと二酸化炭素は拡散によって葉内へ取り込まれ、光合成反応が進む。これと同時に、葉内の水蒸気は気孔を通して大気へ放出される。この現象は蒸散と呼ばれており、根から新たな水分を吸い上げる原動力になっていると考えられている。しかし、気孔が開き過ぎれば植物は水分不足に陥ってしまい、最終的には萎れて枯れてしまう。このため、気孔の開閉は光強度や水環境などの変化に応じて厳密に制御される。植物は外部環境変化に応じた気孔の開閉機能を獲得することで、陸上の厳しい環境変化に対処してきたと考えられる。この気孔の開閉機能は、気孔を形成する一対の孔辺細胞の膨圧運動により実現されている。孔辺細胞の細胞壁の厚さは均一ではなく、気孔に面した側が肥厚して伸展しにくくなっているために、孔辺細胞が膨張すると弓型に変形して気孔が開く。逆に孔辺細胞が収縮すると気孔は閉じる(図2)。孔辺細胞の膨圧運動の機構に関しては盛んに研究が進められており、私たちのグループもオルガネラや細胞骨格系などの細胞内構造の寄与に着目して解析を進めている[4, 6]。私たちは蛍光タンパク質の細胞内局在解析のモデル系としても孔辺細胞は有用な材料だと考えている。まず、孔辺細胞は葉の表面に位置しており、顕微鏡観察のためのサンプル作成が容易である。また、成熟した孔辺細胞は大きさや形状が比較的均質であるとともに、気孔に対して近位側-遠位側で明確な細胞極性があり、オルガネラや細胞骨格系の偏在も認められる。このような特徴から、孔辺細胞は細胞

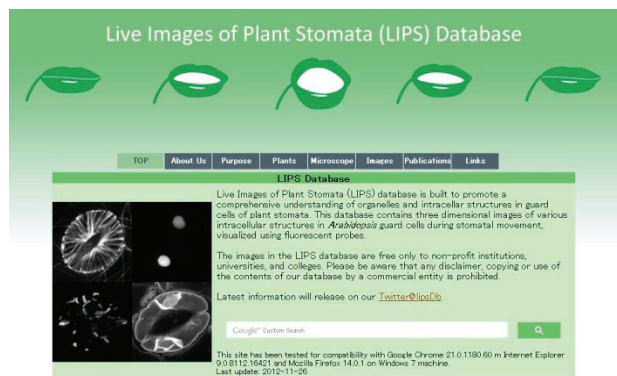


図3. 顕微鏡画像データベース LIPS

内局在確率マッピングにうってつけの材料と言える。

蛍光マーカー画像の網羅的取得

細胞内局在確率マッピングのためには、各々の蛍光マーカーについて複数の画像を得る必要がある。そこで、モデル植物のシロイヌナズナを材料とし、植物細胞における代表的な細胞内構造の蛍光マーカータンパク質を発現する20種類の形質転換株について、それぞれ100細胞の孔辺細胞の連続光学切片画像を、高速撮影に向くスピニングディスク式共焦点レーザー顕微鏡を用いて撮影した[4]。取得した顕微鏡画像の一部はデータベース(LIPS database)として纏め、当研究室のホームページで公開している(<http://hasezawa.ib.k.u-tokyo.ac.jp/lips/>) (図3)。本データベースでは、(1) 明視野画像および蛍光画像(原画像)、(2) ボリュームレンダリング法による三次元再構築蛍光画像(GIFアニメーション、ウェブ上での閲覧を前提としている)、(3) 後述する細胞形状を画一化した標準蛍光画像、(4) 気孔開度や細胞長軸の長さなどの形態計測情報、を無償で公開している。特に、三次元再構築蛍光画像は細胞内構造の立体的な分布や形状を視覚的に把握することができるため、教育にも活用して頂ければ幸いである[7]。なお、今回の解析に供した各種蛍光マーカータンパク質発現株について、野生株と比較して孔辺細胞の形状、細胞極性、気孔開閉能に顕著な差が無いことを確認している[4]。本研究では連続光学切片像から最大輝度投影像を得ることにより、二次元的な細胞内局在の定量評価に取り組んだ。

細胞内局在確率マップ：複数の蛍光画像の平均化

孔辺細胞は比較的形状が均一な細胞とは言え、当然ながらその大きさや形状にはばらつきがあり、そのままでは細

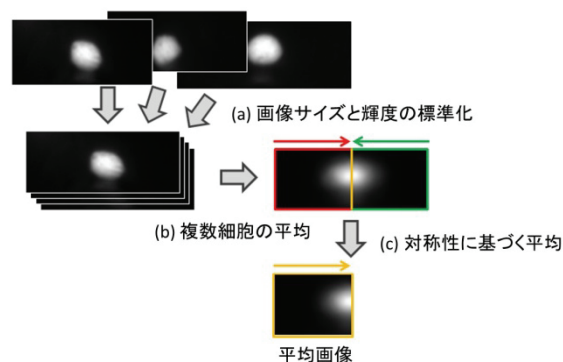


図4. 細胞内局在確率マッピングのための画像処理

胞内局在確率マップを得ることは難しい。そこで、すべての孔辺細胞を平均的な形状へ画一化するための画像処理が必要となる。本研究では、まず明視野画像を用いて解析対象とした全 2000 細胞の孔辺細胞に対して外接矩形を手動で設定し、長辺および短辺の平均値を求めた。すべての蛍光画像に対して設定した外接矩形を平均サイズになるように画像変形するとともに、細胞ごとの明るさのバラつきを軽減するため、蛍光輝度を標準化した (図 4a)。このように、細胞サイズと輝度を標準化した画像群の一部は LIPS データベースにて公開している (LIPS dataset III; <http://hasezawa.ib.k.u-tokyo.ac.jp/lips/images.html>)。この標準化蛍光画像の平均を各蛍光マーカーについて得た (図 4b)。さらに、細胞長軸方向に関してはオルガネラの偏在など明確な細胞極性は認められなかったことから、細胞端部から細胞中央部にかけて対称的に加算平均像を得て (図 4c)、最終的な細胞内局在確率マップとした [4, 5]。各々の蛍光マーカータンパク質に関する細胞内局在確率

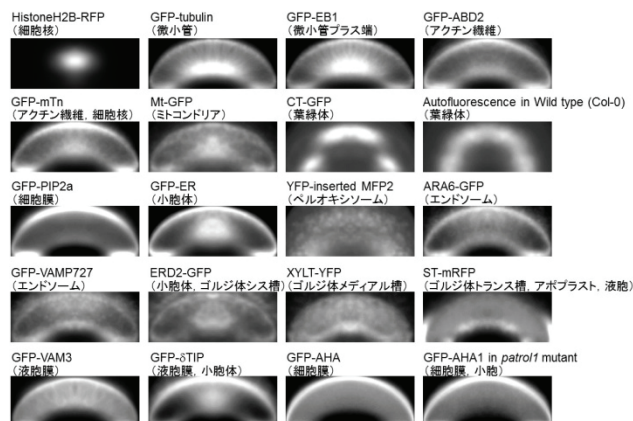


図 5. 各種蛍光タンパク質の輝度平均に基づく細胞内局在確率



図 6. 輝度平均に基づく細胞内局在確率クラスタリング

マップを図 5 に示す。

平均輝度の細胞内分布に基づくクラスタリング解析

クラスタリングはデータ間の類似度に基づいてデータ群を整理する分析手法のひとつであり、生命科学分野においては遺伝子配列や遺伝子発現パターンの解析などによく用いられる。私たちは顕微鏡画像の解析においてもクラスタリングが有用であることを示してきた [6]。ここでは、細胞内局在確率マップの類似性を評価するため、各画素における輝度に基づくクラスタリングを行った。なお、元の細胞内局在確率マップは 304×119 画素であったが、次元縮約のために 70×27 画素へ画像を縮尺した後に、全 1890 画素の輝度を測定した [4]。20 種類の蛍光マーカータンパク質について、自己組織化マップによるクラスタリング結果を図 6 に示す。類似したデータは自己組織化マップ上において近くに位置する。解析の結果、例えば図 6 の左下に位置する微小管マーカーである GFP-tubulin と微小管プラス端マーカーである GFP-EB1 のように、細胞内局在の類似性に応じてクラスターを形成していることが確認でき、本手法の妥当性が示唆された。また、GFP-mTn は植物のアクチン繊維マーカーとして知られているものの、アクチン繊維に加えて細胞核においても局在が認められる。一方、GFP-ABD2 も同様に植物のアクチン繊維マーカーであるが、GFP-mTn のような細胞核でのシグナルはほとんど認められない [6, 8]。両者は自己組織化マップ上で近くに位置しており、アクチン繊維局在という共通性が見てとれる一方で、興味深いことに、小胞体マーカーである GFP-ER は GFP-ABD2 よりも GFP-mTn の近くに位置していた (図 6、青矢印)。この結果は、小胞体はアクチン繊維と共に細胞表層に局在するだけでなく、核膜とも繋がっているた

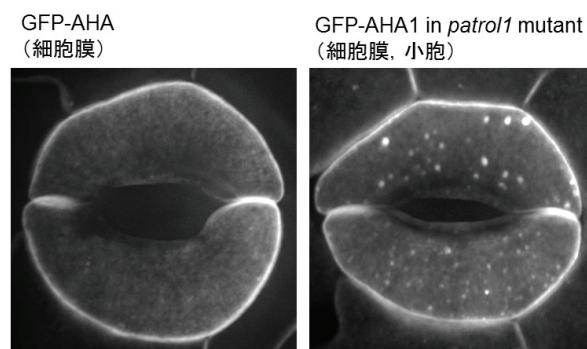


図 7. *pat1* 変異による GFP-AHA1 の小胞状構造の内在化

めに細胞核にも局在が認められる GFP-mTn との類似性が高くなったと解釈できる。このように、本手法は事前の知識にとらわれずに細胞内局在を再確認する上でも有益と思われる。

複数画像の標準偏差による GFP-AHA1 小胞状構造の検出

シロイヌナズナのプロトンポンプの一種である AHA1 は主に細胞膜に局在し、気孔開口に必須な細胞膜の過分極を引き起こす。私たちは動物のシナプス小胞の融合に必要な *MUNC-13* の植物のホモログである *PATROL1* の欠損変異体において、GFP-AHA1 が小胞状構造として内在化することを報告しており、*PATROL1* は少なくとも孔辺細胞において AHA1 を細胞膜に局在化させる機能を持つと考えている [9, 10]。野生株背景および *patroll* 変異体背景における個々の孔辺細胞での GFP-AHA1 局在の見た目の差異は顕著であるにもかかわらず (図 7)、輝度平均に基づく

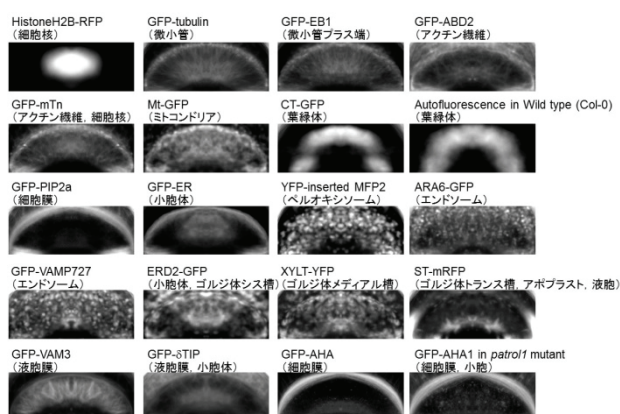


図 8. 各種蛍光タンパク質の標準偏差に基づく細胞内局在確率

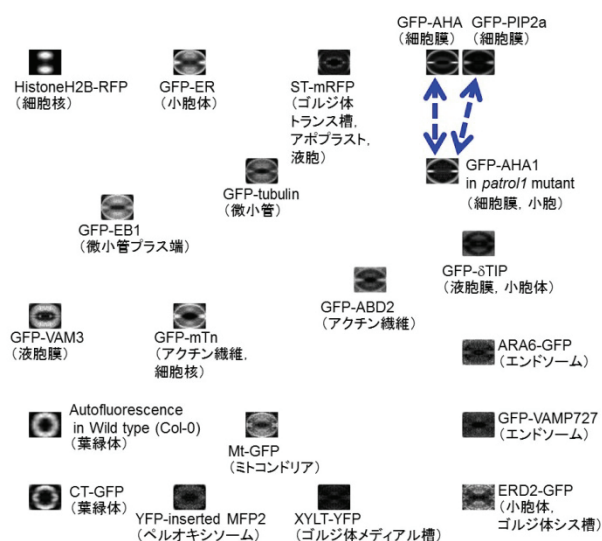


図 9. 輝度の標準偏差に基づく細胞内局在確率クラスタリング

細胞内局在確率マップでは両者はよく類似しており (図 5、GFP-AHA1, GFP-AHA1 in *patroll* mutant)、自己組織化マップ上でも近くに位置していた (図 6、左上)。この結果は、GFP-AHA1 の小胞の出現位置に偏りがなく、輝度平均に基づく方法では *patroll* 変異による GFP-AHA1 の局在変化を検出できていないことを示している。そこで、GFP-AHA1 の小胞化を細胞内局在確率マップにより検出するため、小胞状構造が出現した場合の細胞膜近傍における輝度の不均一性に着目し、複数細胞の輝度の平均ではなく標準偏差による検討を試みた。標準偏差による細胞内局在確率マップを図 8 に示す。一見して、ペルオキシソームやエンドソーム、ゴルジ体といった小胞状のオルガネラの構造が強調されているのが見てとれる (図 8)。輝度に基づくクラスタリングを実施したところ、輝度平均に基づくクラスタリングと同様に、主な細胞内局在が共通の蛍光マーカーは近くに位置することが確認された。その一方で、輝度平均の場合とは異なり、*patroll* 変異体背景における GFP-AHA1 局在は、野生株背景における GFP-AHA1 および細胞膜マーカーである GFP-PIP2a (野生株背景) に対して離れて位置した (図 9、青矢印)。この結果は、標準偏差の導入によって *patroll* 変異による GFP-AHA1 の小胞化を検出できたことを示している。このように、どのような特徴量を利用するかによってクラスタリング結果は大きく変わり得るため、研究目的に応じた適切な統計量の設定が必要となる。

おわりに

本稿では、私たちが蛍光タンパク質の細胞内局在を定量的に評価するために取り組んだシロイヌナズナの孔辺細胞をモデルとした細胞内局在確率マッピングと画像クラスタリングに関する研究を紹介した。ここでは焦点面に対して垂直方向に投影した二次元画像に対する解析について述べたが、同様の解析を三次元画像に応用することも可能である。本研究手法は、解析対象とする細胞の形状が均一な方が望ましいという制限があるものの、条件さえ整えば、蛍光タンパク質の細胞内局在を議論する上で有用な方法と考えている。また、本稿で紹介した解析例では気孔の開度については考慮せずにあらゆる開き具合の孔辺細胞を解析対象としたが、私たちは開口時および閉鎖時それぞれの輝度平均に基づく細胞内局在確率マップの差分から、

気孔開閉に伴う小胞体の移動という新奇の細胞内動態を見出している [4]。この小胞体の移動は複数の蛍光顕微鏡画像による統計的解析だけでなく、白色光照射による気孔開口、および孔辺細胞に隣接した表皮細胞のレーザーアブレーションによる強制的な気孔開口においても起こることを経時的な観察により確認できた [4]。このように本手法は新たな細胞生物学的なイベントを発見する上でもその威力を発揮すると考えられる。

細胞生物学分野において、蛍光タンパク質の局在や細胞内構造の分布を表現する場合、印象的な美しい顕微鏡画像を一枚だけ示すことも多い。研究者渾身の顕微鏡画像は有無も言わせぬ説得力があるが、たまたま撮影することのできた「奇跡の一枚」をあたかも全ての細胞で起きているかのように思わせてしまう危険性を持つことも否定できない。こういった顕微鏡画像データのバイアスを検証するには、やはり顕微鏡撮影の実験を複数細胞で繰り返し、多量の画像を統計的に解析する他に手だてはないと思われる。最近では顕微鏡撮影装置や画像処理技術の発展に伴って、ハイコンテンツアナリシスと称される多量の画像取得および画像解析のプラットフォームも身近な存在になりつつある。これまで研究者の主観に基づく定性的な判断に留まっていた細胞内局在が、客観的かつ定量的に決定されるようになる時代が着実に近づいているのではないかと期待している。

謝辞

共同研究者である東京大学新領域創成科学研究科・馳澤盛一郎教授、朽名夏磨助教、秋田佳恵さんに心より感謝いたします。また、本研究は科学研究費助成事業（若手研究(A)、課題番号 25711017）の助成を受けました。ここに謝意を示します。

引用文献

1. Huh WK, Falvo JV, Gerke LC, Carroll AS, Howson RW, Weissman JS, O'Shea EK (2003) Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425: 686-691.
2. Joyce AR, Palsson BØ (2006) The model organism as a system: integrating 'omics' data sets. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7: 198-210.

3. Pelet S, Dechant R, Lee SS, van Drogen F, Peter M (2012) An integrated image analysis platform to quantify signal transduction in single cells. *Integrative Biology* 4: 1274-1282.
4. Higaki T, Kutsuna N, Hosokawa Y, Akita K, Ebine K, Ueda T, Kondo N, Hasezawa S (2012) Statistical organelle dissection of *Arabidopsis* guard cells using image database LIPS. *Scientific Reports* 2: 405.
5. Higaki T, Kutsuna N, & Hasezawa S (2012) Probabilistic mapping and image clustering for quantitative assessment of fluorescent protein localizations in *Arabidopsis* guard cells. *Protocol Exchange* doi: 10.1038/protex.2012.013.
6. Higaki T, Kutsuna N, Sano T, Kondo N, Hasezawa S (2010) Quantification and cluster analysis of actin cytoskeletal structures in plant cells: role of actin bundling in stomatal movement during diurnal cycles in *Arabidopsis* guard cells. *The Plant Journal* 61: 156-165.
7. Higaki T, Kutsuna N, Hasezawa S (2013) LIPS database with LIPService: a microscopic image database of intracellular structures in *Arabidopsis* guard cells. *BMC Plant Biology* 13: 81.
8. Higaki T, Sano T, Hasezawa S (2007) Actin microfilament dynamics and actin side-binding proteins in plants. *Current Opinon in Plant Biology* 10: 549-556.
9. Hashimoto-Sugimoto M, Higaki T, Yaeno T, Nagami A, Irie M, Fujimi M, Miyamoto M, Akita K, Negi J, Shirasu K, Hasezawa S, Iba K (2013) A Munc13-like protein in *Arabidopsis* mediates H⁺-ATPase translocation that is essential for stomatal responses. *Nature Communications* 4: 2215.
10. Higaki, T, Hashimoto-Sugimoto M, Akita K, Iba K, Hasezawa, S (2013) Dynamics and environmental responses of PATROL1 in *Arabidopsis* subsidiary cells. *Plant & Cell Physiology* 55: 773-780.

(2013 年 12 月 20 日受付、2014 年 1 月 10 日受理)

特集「顕微鏡で測る」

測定装置としての顕微鏡を用いた生物機能の解析

村田 隆^{1*}、稲田 のりこ²、朽津 和幸³¹ 基生研・生物進化；² 奈良先端大・バイオ・植物グローバル；³ 東京理科大・理工・応用生物科学

* E-mail: tkmurata@nibb.ac.jp

顕微鏡は、物体の微細な構造を拡大して観察する装置、つまり形を見る道具である。生物学において、顕微鏡の開発は、生物の基本単位である細胞の発見と細胞生物学の発展につながる非常に重要なものであった。その後も顕微鏡技術の進化により、裸眼では見ることでできない生物の微細構造が次々と明らかになり、更に写真やデジタル画像の撮影装置というデータ記録技術の確立は、生物機能の理解に大きな貢献を果たしてきた。

一方、生物機能を理解するためには、構造の観察のような形態の定性的な解析のみならず、細胞内の環境やその構成要素の動態などの機能的情報を定量的に解析することが必要である。従来は、細胞の機能を理解する上で欠かすことのできない遺伝子発現やタンパク質量の変化などの量的情報は、破碎した細胞抽出液を用いた分子生物学的・生化学的手法により解析することが一般的であった。しかしながら、こうした手法では、生きている組織中の個々の細胞の振る舞いを知ることは難しい。

近年、蛍光タンパク質や他の化学プローブの発達により、細胞内のタンパク質動態についての量的情報、更にはpHなどの細胞内環境について様々な情報が得られるようになった。また画像撮影技術の進歩により、顕微鏡の写真撮影装置は、銀塩フィルムから、半導体や真空管を用いたCCD(電荷結合素子)、CMOS(相補型金属酸化膜半導体)、PMT(光電子増倍管)などの定量性に優れた受光素子に置き換えられ、顕微鏡下の各々の構造から来る光を定量できるようになった。これらの技術進歩は、生きている生物内や細胞内の微小空間の様々な情報を測定し、定量的なデータを得ることを可能にした。

空間・時間分解能の高い定量測定装置としての顕微鏡は、今後の生命科学研究に欠かすことができないツールとなることが予想される。このような状況を踏まえ、本誌で

は、本号及び次号において、顕微鏡を使った測定解析の実際や、新しい手法の開発の現状について、特集を組むことにした。

本号では、稲田ら(奈良先端大)が、一般に蛍光の定量に用いられる蛍光強度ではなく、蛍光寿命をパラメータとして、細胞内温度を定量解析する新技術について紹介する。また、北村(北海道大)は、蛍光相関分光法とFRET(蛍光共鳴エネルギー移動)の定量的解析により、タンパク質凝集体の分解と毒性の機構について明らかにした例について紹介する。朽津・花保ら(東京理科大)は、蛍光のpH依存性が異なる2種の蛍光タンパク質を直列につないだプローブを使って、細胞質から酸性コンパートメント(液胞)へのオートファジー(細胞内自食作用)の動態を定量的かつ簡便に解析した例を紹介する。

次号では、今井ら(基生研)が、発光を用いた一細胞レベルでの遺伝子発現の定量化の試みについて、村田(基生研)は、光退色法を用いて細胞骨格の動態を定量した例を紹介する。三輪(筑波大)は新規蛍光色素を用いた蛍光寿命計測やマウス非侵襲イメージングについて紹介する予定である。

本特集の企画は、2014年3月20日に日本植物生理学会第55回年会のシンポジウム「顕微鏡で測るー測定装置としての顕微鏡を用いた生物機能の解析」をきっかけとして始まった。広範な分野の読者に研究の現状と展望を解説することを目指した本特集が、学際的な連携研究の呼び水となり、今後の生命科学の発展に少しでも寄与することができれば幸いである。

(2014年5月27日投稿；2014年5月29日受理)

特集「顕微鏡で測る」

蛍光相関分光法と FRET を用いた細胞内タンパク質品質管理機構の解析

北村 朗

北海道大・院・先端生命科学

* E-mail: akita@sci.hokudai.ac.jp

要旨

細胞が恒常性を維持するために、タンパク質は合成と分解、輸送などの点で調節を受けている。このようにして保たれた細胞恒常性を「タンパク質恒常性」という。タンパク質恒常性の破たんは神経変性疾患などの病因となると考えられている。筆者らは、蛍光相関分光法、FRET 法、光活性化型蛍光タンパク質などを用いることで、神経変性疾患の一つである筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因因子である SOD1 タンパク質凝集体形成と除去の機構を明らかにした。さらに、これらの蛍光イメージング法で得られた結果と、古典的な生化学解析の結果を比較または統合的に解釈することで、より詳細な機構の解明を行った結果についてまとめて紹介する。

細胞内タンパク質の誕生と死—タンパク質の品質管理—

細胞が恒常性を維持するためには、数々の分子がそれぞれの機能を維持することが重要である。タンパク質はこのような細胞恒常性を維持するために重要な生体分子である。それでは、生命の基本単位である細胞の恒常性を維持するために、タンパク質にどのようなことが求められるのであろうか。それは、「量」と「質」であると解釈することが出来る。タンパク質の「量」と「質」を維持するためにはどのようにすればよいか。それは工場における製品生産を思い浮かべるとわかりやすい。工場で生産される製品は、需要に応じた供給量と品質を維持する必要がある。このような維持機構は「工場製品の品質管理」と言われる。細胞内におけるタンパク質の生産過程では、遺伝子からの転写、リボソームにおける翻訳、そしてポリペプチドを正

しく折り畳み機能的なタンパク質へとまとめあげるフォールディング過程が必要である [1]。そしてミスフォールディングしてしまったタンパク質 (不良品) は分解して壊す必要がある。これらの過程をまとめて、細胞内における「タンパク質の品質管理機構」と呼ばれている [2]。このような品質管理機構と共に細胞内外への輸送環境など生命プロセスが維持されている状態を「タンパク質恒常性 (Protein homeostasis/Proteostasis)」という [3, 4]。

細胞内タンパク質凝集体の細胞毒性

細胞内では翻訳されたポリペプチド鎖を機能的なタンパク質へとフォールディングする際に介在するのは「分子シャペロン」である。この分子シャペロンはタンパク質恒常性を維持するために重要な一つ目の砦である [1]。次に、細胞内のタンパク質分解システムには、主要な二つの経路が知られている。ひとつはユビキチン-プロテアソーム経路、もうひとつはオートファジー-リソソーム経路である [5, 6]。前者のユビキチン-プロテアソーム経路は、不要になったタンパク質に多量体化ユビキチンタンパク質で標識をする。この標識を「ポリユビキチン化」という。ポリユビキチン化されたタンパク質は、プロテアソームに送られ、タンパク質はポリペプチドの状態へと解きほぐされながら、針の穴に糸を通すようにプロテアソームの中へ送り込まれアミノ酸へと分解される。後者のオートファジー-リソソーム経路は、タンパク質のみならずオルガネラな

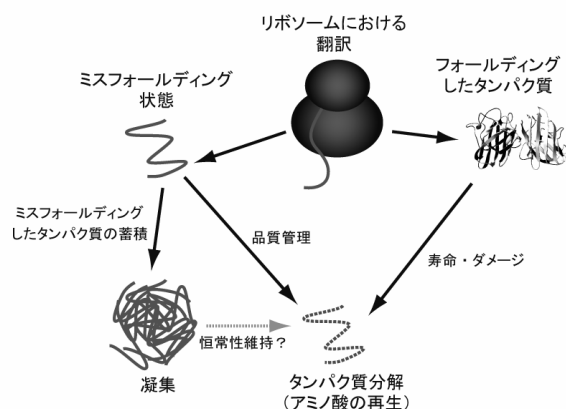


図 1. 細胞内タンパク質の品質管理機構

ども含めて不要となった対象を脂質の二重膜で隔離し、リソソームと融合させて分解するシステムである。これらのタンパク質分解経路が正しく働かなくなると、ミスフォールドしたタンパク質が増加する。増加したミスフォールドタンパク質が効率よく除去されない場合は凝集する [6]。この凝集状態には数～十量体程度の「オリゴマー」から、数 μm 程度という光学顕微鏡で容易に観察できるほどの大きさに至り、「封入体」と呼ばれるものもある。こういった凝集体は、他の正しくフォールディングしたタンパク質に結合してその機能を失わせることで、細胞にとって毒となりうることを示唆されている [7, 8]。このようなタンパク質凝集体が原因であると考えられている病気として、神経変性疾患、白内障、アミロイドーシスなどが知られている。神経変性疾患では、細胞内外にタンパク質が集積した「封入体」が病理学的によく高頻度で観察されることが多く、さらに、「封入体」には、ユビキチン化されたタンパク質が豊富に含まれることから、細胞内タンパク質分解系の破たんによるミスフォールドタンパク質の増加が「封入体」形成の重要な契機となっていると考えられている [7, 9]。目の水晶体でクリスタリンタンパク質が変性し凝集すると白く濁り光を通しにくくなるため、これが白内障の原因となることが知られている [10]。また、細胞外のタンパク質が構造変化を起こし、 β シート構造に富んだ不溶性のアミロイドという繊維状構造を形成すると、アミロイドが体内の臓器などに沈着し、機能不全を引き起こすと、アミロイドーシスと呼ばれる [11]。どの病気においてもタンパク質のフォールディング状態が変化することが共通項である。また、凝集したタンパク質の分子量はさまざまな大きさを持っているが、なかでも数量体～数十量体程度の可溶性オリゴマーが強い細胞毒性を獲得すると考えられている。

凝集体の大きさを測る—蛍光相関分光法—

それでは、タンパク質凝集体の大きさを測るためにはどのようにすれば良いであろうか？ 古典的には、ゲル濾過法やショ糖密度勾配超遠心分画などの生化学的手法が使われていた。ただし、これらの実験系は準備から検出までに長い時間を要する。そこで、著者らは、蛍光相関分光法 (Fluorescence correlation spectroscopy; FCS) を利用することにした [12-14]。蛍光相関分光法は共焦点レーザー顕微鏡

でつくりだした微小な検出領域に蛍光分子が出入りすることにより生ずる蛍光ゆらぎを測定し、その自己相関関数を計算することで、蛍光分子の大きさと、検出領域内の平均分子数を解析する手法である。測定された蛍光強度の平均値を、検出領域内の平均分子数で割ると、単一粒子あたりの平均蛍光強度 (Counts per molecule; CPM) が求められる。この CPM 値の増大は凝集体解析において重要な情報をもたらしてくれる。細胞抽出液などの場合、蛍光分子で標識されたタンパク質が、自己会合して凝集体を形成しているのか、あるいは内在性のタンパク質と結合して分子量が大きく計測されているのかという問題点が出てくる。CPM 値はこの問題に対し、自己会合している分子種が存在することの直接的な証拠となる。著者らの研究では、神経変性疾患のひとつである筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因因子である ALS 関連変異型 SOD1 タンパク質に黄色蛍光タンパク質 (YFP) を融合し、機械的に破碎した細胞抽出液の可溶性画分で凝集形成解析を行った [15]。この結果、プロテアソーム活性の阻害時、拡散係数より 1 MDa と推定される SOD1 分子種が出現した。さらに、CPM 値の増加が見られた。一方、野生型 SOD1-YFP では変化は見られなかった。次に、同様に調整した細胞抽出液に対し、抗 YFP 抗体による免疫沈降を行った後、抗ユビキチン抗体でウェスタンブロットを行ったところ、プロテアソーム活性低下に伴い、ALS 変異型 SOD1-YFP はポリユビキチン化された分子種が増えていることを確認した。これらの結果は、可溶性画分中に SOD1-YFP の凝集オリゴマーと、ユビキチン化された SOD1-YFP が混在していることを示唆している。

蛍光相関分光法は、分子量が一サンプルあたりの解析に必要なサンプル量が数十マイクロリットルですみ、さらに、測定時間が数分程度であることから、多くのサンプル数を解析する上できわめて有用なツールであると考えられる。

蛍光相関分光法のもう一つ重要な利点は、生細胞内での測定が可能なところである。上述の ALS 関連変異型 SOD1-YFP を発現する生細胞のプロテアソーム活性を阻害し、蛍光相関分光法測定を行ったところ、有意な拡散係数の低下と CPM 値の上昇が計測された [15]。このことは、生細胞内においても変異型 SOD1-YFP の凝集オリゴマーが形成されていることを示唆している。ただし、生細胞内においては、さまざまな生理的相互作用が存在することは

予想できる。そのため、測定された拡散係数の解釈は慎重に行わなければならない。著者らのグループが行った別の研究では、もやもや病リスク因子であり、ATPases Associated with diverse cellular Activities (AAA+)ファミリーに属するMysterin/RNF213タンパク質の生細胞内におけるオリゴマー化を蛍光相関分光法で解析した [16]。ここでは、生細胞内で測定された拡散係数を元に、Stokes-Einstein関係式による球状分子として仮定したときの分子量を算出した。その結果、AAA+ファミリータンパク質の性質からは六量体を形成すると考えられていたMysterinが、細胞質で拡散する成分のうち約半分が単量体として存在することが明らかとなった。CPM値は単量体GFPと比較して増加しなかったことも、この単量体説を支持する結果となった。

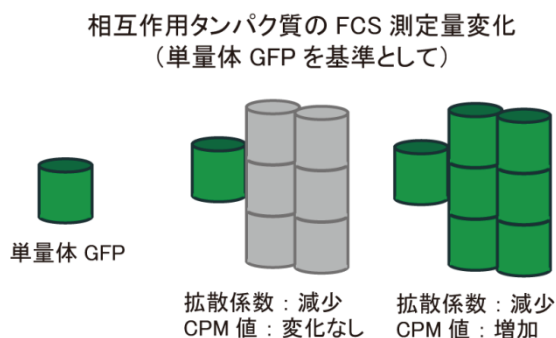


図2. 蛍光相関分光法で得られる測定値の解釈

凝集体と相互作用するタンパク質を調べる—蛍光相互相関分光法—

蛍光相関分光法の有用性は前項で概説したが、一つ大きな欠点が存在する。それは、相互作用する異種の相手が不明な点である。この問題点を解決するための方法として、蛍光相互相関分光法 (Fluorescence cross-correlation spectroscopy; FCCS)がある [17]。相互作用相手を異なる色の蛍光色素でラベルし、二色蛍光シグナル間の同時性を検出することで、相互作用の強弱を調べることができる。

著者らのグループは、細胞間でタンパク質の形質が遺伝する酵母ブリオンと分子シャペロンとの相互作用について、FCCS法を用いて検出することに成功した [18]。FCCS法も蛍光相関分光法同様、数十マイクロリットル程度の溶液量で済み、短時間で測定が可能なおことから、免疫沈降—ウェスタンブロット法などの結合実験と比較して簡便に解析ができると思われる。

また、筆者の属する研究室では、FCCS法を用いることで、生細胞内における解離定数 (K_d)を求める系を確立した [19]。FCCS法では、蛍光相関分光法同様に、各蛍光分子の平均分子数と、相互作用している分子の割合が求められる。よって、濃度に変換することで解離定数の算出が可能である。

ただし、FCCS法は相互作用相手が既知でなければ適応が困難な手法である。相互作用相手を見つけ出すためには、免疫沈降—マスマスプロトスコピー (IP-MS)法などのようなプロテオーム解析の技術と組み合わせることが肝要であると考えられる。著者らは一つの検討として、ALS関連TDP43タンパク質に着目した。このTDP43タンパク質が切断されて生じるカルボキシル末端断片 (TDP43CTF) は、全長よりも凝集しやすい。そこで、このTDP43CTFに結合するタンパク質を、IP-MS法により調べたところ、分子シャペロンであるHsp70が同定された。そこで、GFP-TDP43CTFとHsp70-RFPを共発現した細胞抽出液をFCCS法で解析したところ、相互作用が検出された (未発表データ)。この結果は、分子間相互作用解析にFCCS法が利用できることを示している。

従来型共焦点顕微鏡の光学系を元にしたFCCS法の典型的な問題点としては、10 μ M以上の高濃度域における解析が難しいことが挙げられる。より高濃度での測定を可能にするためには、検出領域の体積を減らすことが一つの解決法である。そのために、超解像蛍光顕微鏡技術の一つであるSTED (Stimulated emission depletion) 顕微鏡と、FCS/FCCSとの組み合わせが検討されている [20]。また、今回紹介したものは二色FCCS法であり、二種類の分子間相互作用のみを解析する手法であったが、四色FCCS法も

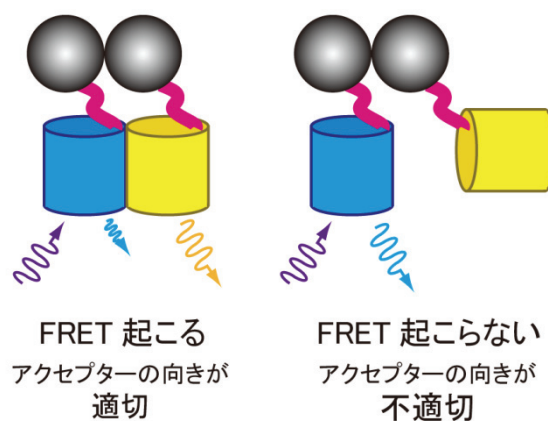


図3. ドナー・アクセプター間の立体配座がFRETに及ぼす影響の模式図

報告されている [21]。これは、六通りの分子間相互作用を同一時空間的に測定することが可能であることから、今後の生物学応用が期待される。

凝集体の構造を調べる—FRET 法—

これまで述べてきた蛍光相関分光またはその発展系である蛍光相互相関分光法は、分子の動きと数に着目するための方法であったが、凝集体を知るためには、凝集体に含まれる分子構造を解析する必要がある。このような構造に対してアプローチするための手法として、蛍光共鳴エネルギー移動 (Förster/Fluorescence resonance energy transfer; FRET) 法がある。FRET は、おおよそ 10 nm 以内に近接し、エネルギーが移動しやすい相対的配座にある二つの蛍光分子間で起こる物理現象である。理論的には、蛍光分子間距離の近接は FRET を起こす必要条件にしか過ぎないことを理解しておかねばならないであろう。FRET を細胞などでイメージング計測するための手法については、文献 22 と文献 23 に詳しいが、ここでは最も重要な点のみを書き記しておきたい。それは、「FRET 効率」と「FRET インデックス」の違いである。前者の「FRET 効率」とは、励起状態にあるドナー分子のうち、アクセプター分子にエネルギーを受け渡す分子の割合を示し、アクセプターを褪色させたときのドナー蛍光強度変化 (アクセプターフォトブリーチング法) や、ドナーの蛍光寿命測定から求められる。後者の「FRET インデックス」は、ドナー・アクセプターの蛍光強度比を算出することで、FRET シグナルを強調する方法であり、計測装置によって値は変化する。分子間 FRET を利用する場合、より定量的である「FRET 効率」を計測するのが良いと思われる。そこで筆者らは、プロテアソーム活性阻害時、ALS 関連変異をもつ SOD1 タンパク質が形成する凝集体内部における分子間立体配座について解析するために、シアン色蛍光タンパク質で単一成分の蛍光寿命を示す mTFP1 を融合した変異型 SOD1 (SOD1-G85R-mTFP1) と 173 番目の残基で円順列変異を施した mVenus を融合した SOD1-G85R-cp173mVenus を共発現させた細胞に対し蛍光寿命イメージング法により解析を行った [15]。その結果、まず、プロテアソーム活性を阻害しないとき、FRET は観察されなかった。次に、プロテアソーム活性阻害を開始してから 8 時間後、封入体構造が見られない細胞質において、FRET 効率は平均 24% と

計測された。蛍光相関分光法を用いた解析結果から、分子量 1 MDa 程度のオリゴマーはこのときすでに形成していたので、この FRET は、SOD1 タンパク質のオリゴマー化による構造変化を捉えているものと思われる。続いて、プロテアソーム活性阻害を 16 時間行くと、中心体近傍にアグリソーム様の封入体構造が出現した。このアグリソーム様封入体構造中における FRET 効率は平均 38% であった。以上のことは、プロテアソーム活性阻害時、まず細胞質で形成されたオリゴマーが、次に中心体近傍のアグリソーム様封入体へと運ばれて、分子間の立体配座がより FRET が起こりやすいものに変化していることが示唆された。さらに興味深いことに、アクセプターを cp173mVenus から、通常型の mVenus へ置換した SOD1-G85R-mVenus へ変更すると、アグリソーム様封入体における FRET 効率は平均 10% へと大きく減少した。円順列変異は蛍光タンパク質発色団の向きを変化させることから、アグリソーム様封入体に含まれる変異型 SOD1 は、ランダムな立体配座で分子間が会合して凝集しているのではなく、規則的な形で会合していることが示唆された。このように、アクセプターの向きを変更して FRET 測定を行い、比較することで、凝集タンパク質の立体配座に関する情報を抽出することができる。

変異型 SOD1 を含む細胞内封入体のプロテアソーム活性依存的ダイナミクスと細胞毒性

細胞内タンパク質の品質管理においてタンパク質分解が重要な経路であることは述べてきた。では、このタンパク質の分解を可視化解析するためにはどのようなアプローチが可能であろうか。先述の変異型 SOD1-G85R-YFP タンパク質を、プロテアソーム活性阻害によりアグリソーム形成させ、続いてプロテアソーム阻害剤を培地中から洗い流した後、蛍光タイムラプスイメージングを行った [15]。細胞内に形成されたアグリソーム様封入体は、半減期 9 時間で消失した。このとき、プロテアソームで分解されるデグロンタグと融合した GFP-CL1 タンパク質を発現させた細胞で、プロテアソーム活性の回復をモニターしたところ、阻害剤の除去後すみやかにプロテアソーム活性が回復していることが示された。このことは、封入体に含まれた凝集タンパク質であっても、ときほぐされてプロテアソームで分解されることを示している。

次に、光活性化型 GFP である PAGFP を融合した SOD1-G85R-PAGFP を使って、プロテアソーム活性阻害時と活性回復時におけるアグリソーム様封入体と細胞質に存在する分子集団同士の交換速度を測定した。この結果、プロテアソーム活性回復時に交換速度が速くなっていることがわかった [15]。これは、プロテアソームの活性が回復すると、アグリソーム様封入体に集積した凝集タンパク質を分解するために再び細胞質へ送り出されることを意味すると解釈される。

さらに、封入体に含まれない、細胞質集団の SOD1-G85R-PAGFP を活性化した後、細胞の蛍光強度を観察するという細胞質内パルスチェイスイメージングを行ったところ、プロテアソーム活性阻害時よりも阻害していない時のほうが蛍光強度は速く減衰することがわかった。上述のパルスチェイスイメージング法を用いることで、局在依存的なタンパク質分解速度を生細胞内で定量化することが可能になる。

さらに、先項で述べた FRET 計測を、プロテアソーム活性回復時に行った。結果は、プロテアソーム活性回復 10 時間後の時点でアグリソーム様封入体における FRET 効率が平均 14%まで低下した。このことから、封入体に取り込まれた凝集タンパク質がときほぐされるとともに、封入体内部でもゆっくりと配座を変化させている可能性が考えられる。これらの知見から、封入体構造が静的な構造ではなく、細胞内のタンパク質分解活性の阻害や回復とともに、その性質をダイナミックに変化させることで、細胞におけるストレス回避やタンパク質品質管理を行っている予想される。このように、蛍光イメージングの手法を用いることにより、タンパク質封入体の新たな特徴が明らかになってきている。

さらに驚くべきことに、変異型 SOD1 を発現する細胞は、プロテアソーム活性阻害時より活性回復時のときに細胞死が増えることが明らかになった [15]。このことは、プロテアソーム活性回復時に生じる凝集性オリゴマーが細胞にとってより強い毒性を持つのかかもしれない。また、プロテアソーム活性の変動が繰り返されると、細胞毒性がより増加し、ALS を発症しやすくなるのかかもしれない。

以上で述べてきたように、細胞内タンパク質恒常性を維持するメカニズムを明らかにする上で、蛍光イメージング、

なかでも、蛍光相関分光法と FRET の手法は有用であり、さまざまな機構の解明に利用できるものであると思われる。なかでも、神経変性疾患は細胞内タンパク質恒常性の破たんにより引き起こされると考えられているが、タンパク質のどのような構造変化や多量体化形成が具体的に細胞毒性を獲得するのかについて、未解明な部分が多い。生細胞内におけるタンパク質の状態を明らかにするために、蛍光イメージングの手法は直接的かつ有用なアプローチであると考えられる。今後、新たな蛍光プローブの開発や計測手法の確立により、病気の原因となる分子基盤を明らかにしていきたい。

引用文献

1. Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M (2011) Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* 475: 324-332.
2. Wolff S, Weissman JS, Dillin A (2014) Differential scales of protein quality control. *Cell* 157: 52-64.
3. Balch WE, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW (2008) Adapting proteostasis for disease intervention. *Science* 319: 916-919.
4. Lindquist SL, Kelly JW (2011) Chemical and biological approaches for adapting proteostasis to ameliorate protein misfolding and aggregation diseases: progress and prognosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3: a004507.
5. Klionsky DJ, Schulman BA (2014) Dynamic regulation of macroautophagy by distinctive ubiquitin-like proteins. *Nature Structural and Molecular Biology* 21: 336-345.
6. Kopito RR (2000) Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends in Cell Biology* 10: 524-530.
7. Morimoto RI (2008) Proteotoxic stress and inducible chaperone networks in neurodegenerative disease and aging. *Genes and Development* 22: 1427-1438.
8. Calamini B and Morimoto RI (2012) Protein homeostasis as a therapeutic target for diseases of protein conformation. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 12: 2623-2640.
9. Ilieva H, Polymenidou M, Cleveland DW (2009) Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond. *Journal of Cell Biology* 187: 761-772.

10. Moreau KL, King JA (2012) Protein misfolding and aggregation in cataract disease and prospects for prevention. *Trends in Molecular Medicine* 18: 273-282.
11. Radford SE, Weissman JS (2012) Special issue: the molecular and cellular mechanisms of amyloidosis. *Journal of Molecular Biology* 421: 139-141.
12. Rigler R, Mets U, Widengren J, Kask P (1993) Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion. *European Biophysics Journal* 22: 169-175.
13. Lippincott-Schwartz J, Snapp E, Kenworthy A (2001) Studying protein dynamics in living cells. *Nature Reviews Molecular and Cell Biology* 2: 444-456.
14. Kitamura A, Kubota H, Pack CG, Matsumoto G, Hirayama S, Takahashi Y, Kimura H, Kinjo M, Morimoto RI, Nagata K (2006) Cytosolic chaperonin prevents polyglutamine toxicity with altering the aggregation state. *Nature Cell Biology* 8: 1163-1170.
15. Kitamura A, Inada N, Kubota H, Matsumoto G, Kinjo M, Morimoto RI, Nagata K (2014) Dysregulation of the proteasome increases the toxicity of ALS-linked mutant SOD1. *Genes to Cells* 19: 209-224.
16. Morito D, Nishikawa K, Hoseki J, Kitamura A, Kotani Y, Kiso K, Kinjo M, Fujiyoshi Y, Nagata K (2014) Moyamoya disease-associated protein myserin/RNF213 is a novel AAA+ ATPase, which dynamically changes its oligomeric state. *Scientific Reports* 4: 4442.
17. Bacia K, Kim SA, Schwille P (2006) Fluorescence cross-correlation spectroscopy in living cells. *Nature Methods* 3: 83-89.
18. Ohta S, Kawai-Noma S, Kitamura A, Pack CG, Kinjo M, Taguchi H (2013) The interaction of Hsp104 with yeast prion Sup35 as analyzed by fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 442: 28-32.
19. Tiwari M, Mikuni S, Muto H, Kinjo M. (2013) Determination of dissociation constant of the NFκB p50/p65 heterodimer using fluorescence cross-correlation spectroscopy in the living cell. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 436: 430-435.
20. Eggeling C, Ringemann C, Medda R, Schwarzmann G, Sandhoff K, Polyakova S, Belov VN, Hein B, von Middendorff C, Schönle A, Hell SW (2009) Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. *Nature* 457: 1159-1162.
21. Shcherbakova DM, Hink MA, Joosen L, Gadella TW, Verkhusha VV (2012) An orange fluorescent protein with a large Stokes shift for single-excitation multicolor FCCS and FRET imaging. *Journal of the American Chemical Society* 134: 7913-7923.
22. 平岡泰、原口徳子、木村宏編 (2007) 生細胞蛍光イメージング 共立出版
23. 宮脇敦史 (2010) 蛍光イメージング革命 秀潤社
(2014年5月3日受付; 2014年5月26日受理)

特集「顕微鏡で測る」

細胞の温度を測る

稲田のりこ^{1*}、林晃之¹、福田七穂¹、内山聖一²

¹奈良先端大・バイオ・植物グローバル; ²東京大・院・薬

* E-mail: norikoi@bs.naist.jp

要旨

生物にとって、温度は最も重要な物理量である。生物の基本単位である細胞温度を計測することにより、細胞の状態について様々な情報を得ることができると考えられる。私たちは、新規の蛍光温度プローブと蛍光寿命イメージング顕微鏡を用いて、細胞内の局所的温度変化を正確に定量化し、温度分布を可視化する手法を、世界に先駆けて開発することに成功した。本稿では、私たちが開発した細胞内温度計測の手法と、それによって得られた結果について紹介する。また、蛍光温度プローブの改良に向けた取組みについても紹介する。

はじめに

はじめに読者の皆さんに質問をしたい。細胞の中の温度は何度だと思いますか？

恐らく、細胞内温度の研究を始めた当初の私たちがそうであったように、大多数の方は「細胞の中の温度は何度であるか？」という問題について考えたことはないのではないだろうか。少考の後、動物組織、細胞を扱う研究者の方なら、「恒温動物である哺乳類なら 37℃前後」、植物分野の研究者なら「外気温と同じ」と答えるのではないかと思います。しかし本当にそうなのだろうか？組織や細胞種、細胞の状態によって違いはないだろうか？細胞内部には様々な役割を担う細胞小器官があるが、それら細胞小器官の温度はすべて同じなのだろうか？

この間に答えるため、顕微鏡を使って細胞温度を測る技術の開発が、近年盛んに進められている[1-4]。顕微鏡は、光学顕微鏡なら最高で 200 nm、電子顕微鏡なら 2 nm という非常に高い空間分解能を有しており、細胞のような非常に小さい物質を対象とする解析には欠かすことができないツールである。筆者らは、そのような細胞内温度計測技術の発展に先駆けて、2012 年に細胞内の温度分布を高い精度で計測し可視化する手法を報告し、更にそれを用いて細胞内部に温度差があること、細胞小器官ごとに温度が異なることを明らかにした[5-7]。

本稿では、新規の蛍光温度プローブと蛍光寿命イメージング顕微鏡 (Fluorescence Lifetime Imaging Microscope、FLIM) を用いた細胞内温度計測法の詳細について説明し、

その手法により初めて明らかになった細胞内の温度分布について紹介する。また最後に、細胞内温度計測法のさらなる改良に向けて私たちが取り組んできたプロジェクトについても紹介したい。

蛍光温度プローブ

筆者らが用いた蛍光温度プローブは、温度感受性高分子と環境応答性蛍光団とを組み合わせたものである。温度感受性ユニット NNPAM は、低温では NNPAM ユニットの溶媒の水分子との間で形成される水素結合により伸張した構造を取るものの、水溶液の温度が上昇すると水素結合が切

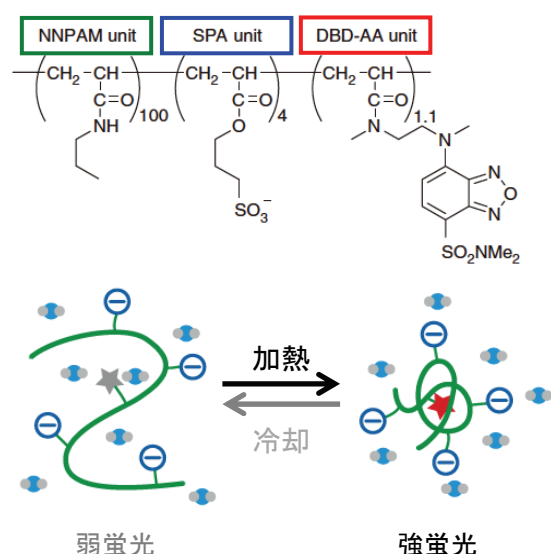


図 1. ポリマー状蛍光温度プローブ FPT の化学式 (上) と機能原理 (下)。

断され、NNPAM 内の疎水性相互作用により丸まった構造に変化する。一方蛍光性ユニット DBD-AA は、疎水性環境で強い蛍光を発するという特徴を持っている。温度変化による NNPAM ユニットの構造変化を DBD-AA ユニットが感知し、水溶液の温度上昇を蛍光強度の上昇として検出するというのがこの蛍光温度プローブの原理である (図 1)。

内山らはこの原理に基づく蛍光温度プローブの開発に取組み、2003 年には水溶液中で機能する蛍光性高分子を報告している[8]。更に 2009 年には、基本構造にイオン性ユニットを導入することにより、細胞の中のような高イオン環境でも沈殿することなく機能するナノゲル状蛍光温度プローブを開発し、生きている細胞の温度計測に成功している[9]。このナノゲル状の蛍光温度プローブは、培地温度を 30℃以上に上げると細胞内でプローブ同士が集まってドット状の塊となる。この高温で塊になるという性質のため、このプローブを用いた細胞内温度計測では細胞内部の温度分布を計測することが困難であり、蛍光顕微鏡と CCD カメラを用いて細胞全体の蛍光輝度を測定することによって細胞 1 個あたりの温度変化を計測した[9]。

上述の蛍光温度プローブは、温度分解能が 27~33℃の間で 0.29~0.50℃と非常に高いものであったが、上記の理由から測定できる範囲、つまり空間分解能が細胞 1 個の単位 (50 μm 程度) に限られていた。より空間分解能を上げ、細胞の中の温度分布をも計測できるようにと開発されたのが、2012 年に報告したポリマー状の蛍光温度プローブ (Fluorescent Polymeric Thermometer, FPT) である (図 1)。これは、2009 年に報告されたナノゲル状蛍光温度プローブと同じ基本構造を直鎖状にしたものであり、プローブ自体のサイズは、収縮時でナノゲル状のものが 51.2 nm に対し、FPT は 8.9 nm とずっと小さい。ナノゲル状蛍光温度プローブと同様、温度特異的な応答性を示し、pH、イオン濃度、タンパク質濃度など、細胞内で変化する可能性がある温度以外の要因には影響されない[5]。

FPT をマイクロインジェクションによりアフリカミドリザル腎臓由来の培養細胞 COS7 に導入したところ、細胞核を含む細胞全体に蛍光が分布することが確認された。更に培地温度を 30℃以上に上げてもドット状の塊になることなく一様に分布していたことから、FPT は高い空間分解

能を持ち、細胞内の温度分布を計測しうるプローブであることが示された。

蛍光寿命イメージング顕微鏡 (FLIM)

FPT を COS7 細胞に導入し培地の温度を上昇させたときにまず気づいたのが、細胞核での顕著な蛍光強度の上昇である。上述のように FPT の蛍光強度は温度の上昇とともに上昇する。では細胞核の温度は細胞質よりも高いのだろうか？

環境変化に応答して蛍光特性が変化する蛍光物質を用いて定量的な解析を行う場合、蛍光強度は最も一般的に使われるパラメーターである。しかしながら蛍光強度は、励起光の強さ、検出器の感度などの画像取得条件、および、蛍光物質の濃度に大きく依存して変化する。特に、細胞内部における蛍光物質の局所的な濃度変化は大きな問題になりうる。FPT によって得られた結果についても、何らかの理由により細胞核に FPT が蓄積し、蛍光強度が高くなっている可能性が考えられた。

この可能性を検証するために筆者らが用いたのが、蛍光物質の濃度への依存性が低いパラメーターとして知られる蛍光寿命を計測する方法である。蛍光寿命とは、蛍光物質が励起されてから蛍光を発して基底状態に戻るまでに励起状態にとどまっている時間の長さであり、例えばフルオレセインは 4 ナノ秒、オワンクラゲ由来の蛍光タンパク質 GFP は 3 ナノ秒程度の蛍光寿命値を示す。蛍光寿命値はその蛍光物質がおかれている環境に依存して変化的ことから、蛍光寿命を可視化する FLIM 解析を行なうことにより、微小空間の環境変化を捉えることができる。FLIM

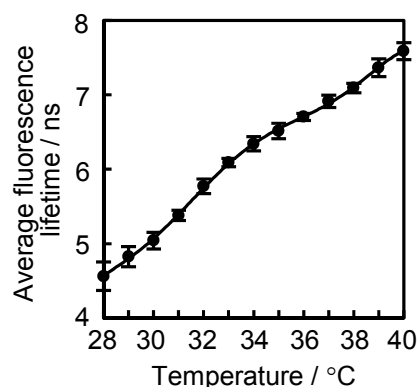


図 2. 動物培養細胞抽出液における FPT の蛍光寿命と温度の相関を示すグラフ。

は、機器が高額であり、またその解析法が蛍光強度の計測など従来の顕微鏡画像定量法とは大きく異なることから、一般に広く利用されるには至っていないが、蛍光物質の濃度や画像取得条件の変化に影響を受けにくく、顕微鏡を用いた解析法としては非常に定量性が高い手法であると言える。

動物培養細胞の抽出液を用いて温度依存的な FPT の蛍光寿命変化を調べた結果、温度上昇に伴って蛍光寿命値が長くなることが確かめられた (図 2)。この蛍光寿命値の延長は、水素結合を形成していない蛍光団 DBD ユニットの割合が増加することに由来している[10]。このグラフから求められた FPT の温度分解能は 29–39℃の間で 0.18–0.58℃であった。以下の解析では、このグラフを検量線として細胞内温度分布を計測した。

細胞内温度分布の解析

FPT と FLIM による細胞内温度イメージング解析の結果、大多数の細胞において細胞核における FPT の蛍光寿命が長くなっていることが確認され (図 3)、確かに細胞核の温度は細胞質と比較して高いこと、またこの温度差は 1℃近くにも達することが明らかになった。この結果は、細胞内で 1℃近くの温度差があるということを明らかにした初めての報告である。また、この細胞質と細胞核との温度差は細胞周期に依存して変化し、G1 期では細胞核と細胞質との温度差が比較的大きいのに対し、S/G2 期では温度差が殆どなくなることがわかった[5]。

多数の細胞について解析している途中で私たちは、細胞核の横に高温のドット状構造が存在することに気がついた (図 3、矢頭)。免疫抗体染色の結果この高温構造が中心体であることが確かめられ、中心体付近の温度は細胞質の他の部分と比較して平均 0.8℃高いことが明らかになった[5]。

ミトコンドリアは細胞における発熱器官として知られている。ミトコンドリア染色剤である MitoTracker DeepRed で染色し高倍率で観察した結果、ミトコンドリア周辺で FPT の蛍光寿命が長くなっていることがわかった[5]。このミトコンドリア周辺での発熱が、ミトコンドリアの機能に由来するものであることを調べるため、ミトコンドリアの脱共役剤である FCCP 処理を行った。FCCP で細胞を処理すると、ATP 合成に使用される筈だったエネル

ギーが熱に変換されて放出され、細胞の温度が上昇することが知られている[11]。FPT を導入した細胞を脱共役剤で処理したところ、30 分後にはミトコンドリア周辺で顕著に蛍光寿命が長くなっている様子が観察されたことから、ミトコンドリア周辺で見られた発熱が、確かにミトコンドリアの機能に由来するものであることが明らかになった。

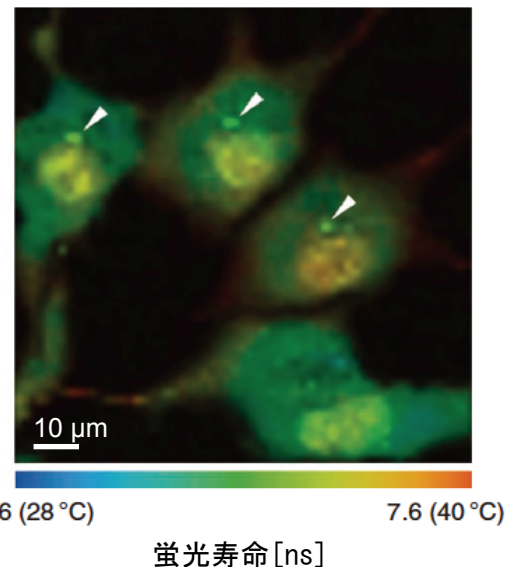


図 3. COS7 細胞に導入した FPT の FLIM 像。低い温度を青、高い温度を赤の擬似カラーで示す。矢頭は中心体を示す。

ここで、本稿の最初で提示した質問「細胞の温度は何度なのか？」に立ち戻ってみたい。筆者らの研究は細胞内部の温度差の数値化にとどまっており、実は細胞の絶対温度を数値化して示すには至っていない。検量線を元に数値化することは可能であるが、本当に細胞の温度がその値なのかを検証する他の手段がないためである。しかしながら、最初の問に派生する「細胞内部の温度は均一なのか？」という質問には、「細胞小器官ごとに温度は異なる」という答えを与えることができた。更に細胞機能が細胞温度と密接に結びついていることを示し、様々な細胞機能を明らかにする手法として細胞温度の計測が今後大きな役割を果たす可能性を示すことができたと考えている。

新しい蛍光温度プローブの開発

2012 年の論文で使用した FPT は、現在 Diffusive thermoprobe という商品名で市販されており (<http://www.funakoshi.co.jp/contents/7538>)、細胞内温度に興味を持つ研究者なら誰でも使用できるようになっている。

しかし、この細胞内温度イメージング法を生命科学研究におけるより一般的な手法にするためには、まだいくつかの課題が残されていると考えている。

課題の一つが細胞内への導入法である。FPT を細胞内に導入するにはマイクロインジェクション法が必要であるが、プローブに細胞膜透過性があればより簡便に実験ができる。この点を改良するために開発されたのが、イオン性ユニットをカチオン性の APTMA ユニットに変換した FPT である。細胞壁の存在とサイズの小ささからマイクロインジェクションによる導入が難しい材料である酵母細胞を対象として作られたものであり、プローブと酵母細胞を共培養して 20 分以内には速やかに細胞内に取り込まれる[12]。また酵母と同様に、動物培養細胞へも導入されることが示されている[12]。

もう一つの課題が、蛍光温度プローブの褪色耐性の改良である。FLIM の中でも、筆者らが用いている単一光子計測法は、蛍光強度の弱い試料でも測定が可能であると一般に言われている。しかしながら筆者らの経験では、蛍光強度が弱くいわゆる S/N 比の低い試料では、蛍光寿命測定におけるノイズの影響が強くなり、蛍光寿命値が実際よりも長く算出されるなど、正確な測定が難しくなる。一方、FLIM のための画像取得には時間がかかる。温度イメージングでは 1 分かけて 1 枚の FLIM 像を取得するため、2012 年に報告した蛍光温度プローブは 1 回の FLIM 像取得でかなりの褪色が観察されており、同じ試料の FLIM 像を経時的に何回も取得するということが困難であった。温度プローブの褪色耐性を向上させるために、蛍光ユニットの DBD-AA を DBThD-AA に変換した蛍光温度プローブを作成し、褪色耐性を 10 倍向上させることに成功した[13]。この改良により、今後、薬剤処理による経時的な細胞内温度変化を解析するというような実験も可能になると考えている。

更に現在、この二つの改良点を組み合わせた蛍光温度プローブを動物培養細胞に適用し、簡便に細胞内温度分布をイメージングするためのプロトコルの確立を進めている(林・稲田、未発表)。この新規蛍光温度プローブでも、細胞核と細胞質との温度差やミトコンドリア周辺の発熱が観察されること(林・稲田、未発表)を確認しており、さらにこのプロトコルが様々な動物培養細胞に応用可能であること(福田・林・稲田、未発表)を明らかにして

いる。また、動物培養細胞以外の細胞種—特に筆頭著者の本来の専門である植物細胞への応用技術についても現在確立を進めており、これらの技術開発が、温度という観点から細胞機能を探る研究発展のきっかけとなることと期待している。

おわりに

最初に記載した通り、細胞内温度計測に関する技術開発は現在非常に盛んに進められている。昨年だけでも、ナノダイヤモンド粒子を用いた細胞内温度上昇の計測[14]、サルモネラ菌の温度感受性ペプチドを GFP に結合させることによって GFP の温度依存的蛍光強度変化を増大させた蛍光温度計[15]、ラマン顕微鏡による細胞内温度計測[16]、光音響顕微鏡を用いた細胞内温度計測[17]などの例が報告されている。今後、著者らの開発した細胞内温度計と他の温度計を組み合わせる使用することにより、測定精度の検証や絶対温度の定量解析など、技術面での改良が期待される。また細胞内温度計の多様化により、温度という観点からの解析がより一般的になることが期待される。著者らの研究成果と本稿が、多くの研究者が細胞内温度と細胞機能との関係に興味を持つきっかけとなることを願っている。

謝辞

本研究の遂行に当たり、JST 研究成果展開事業(先端計測分析技術・機器開発プログラム)、文部科学省特別教育研究経費 植物科学研究教育推進事業・植物科学グローバルトップ教育推進プログラム、公益財団法人三菱財団による助成を受けました。ここに感謝の意を記します。

引用文献

1. Brites CD, Lima PP, Silva NJ, Millan A, Amaral VS, Palacio F, Carlos LD (2012) Thermometry at the nanoscale. *Nanoscale* 4: 4799-4829.
2. Jaque D, Vetrone F (2012) Luminescence nanothermometry. *Nanoscale* 4: 4301-4326.
3. Inada N, Uchiyama S (2013) Methods and benefits of imaging the temperature distribution inside living cells. *Imaging in Medicine* 5: 303-305.
4. Wang XD, Walfbeis OS, Meier RJ (2013) Luminescent

- probes and sensors for temperature. *Chemical Society Reviews* 42: 7834-7869.
5. Okabe K, Inada N, Gota C, Harada Y, Funatsu T, Uchiyama S (2012) Intracellular temperature mapping with a fluorescent polymeric thermometer and fluorescence lifetime imaging microscopy. *Nature Communications* 3: 705.
6. 内山聖一、岡部弘基、稲田のりこ (2012) 蛍光寿命測定による細胞内温度分布イメージング *光化学* 43: 24-27.
7. 稲田のりこ、岡部弘基、林晃之、内山聖一 (2013) 新規蛍光プローブと蛍光寿命イメージング顕微鏡を用いた細胞内温度計測イメージング *Plant Morphology* 25: 55-60.
8. Uchiyama S, Matsumura Y, de Silva AP, Iwai K (2003) Fluorescent molecular thermometers based on polymers showing temperature-induced phase transitions and labeled with polarity-responsive benzoflurazans. *Analytical Chemistry* 75: 5926-5935.
9. Gota C, Okabe K, Funatsu T, Harada Y, Uchiyama S (2009) Hydrophilic fluorescent nanogel thermometer for intracellular thermometry. *Journal of the American Chemical Society* 131: 2766-2767.
10. Gota C, Uchiyama S, Yoshihara T, Tobita T, Ohwada T (2008) Temperature-dependent fluorescence lifetime of a fluorescent polymeric thermometer, poly(*N*-isopropylacrylamide), labeled by polarity and hydrogen bonding sensitive 4-sulfamoyl-7-aminobenzofurazan. *Journal of Physical Chemistry B* 112: 2829-2836.
11. Heytler PG, Prichard WW (1962) A new class of uncoupling agents- carbonyl cyanide phenylhydrazones. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 7: 272-275.
12. Tsuji T, Yoshida S, Yoshida A, Uchiyama S (2013) Cationic fluorescent polymeric thermometers with the ability to enter yeast and mammalian cells for practical intracellular temperature measurements. *Analytical Chemistry* 85: 9815-9823.
13. Uchiyama S, Kimura K, Gota C, Okabe K, Kawamoto K, Inada N, Yoshihara T, Tobita S (2012) Environment-sensitive fluorophores with benzothiadiazole and benzoselenadiazole structures as candidate components of a fluorescent polymeric thermometer. *Chemistry – A European Journal* 18: 9552-9563.
14. Kucsko G, Maurer PC, Yao NY, Kubo M, Noh HJ, Lo PK, Park H, Lukin MD (2013) Nanometre-scale thermometry in a living cell. *Nature* 500: 54-58.
15. Kiyonaka S, Kajimoto T, Sakaguchi R, Shinmi D, Omatsu-Kanbe M, Matsuura H, Imamura H, Yoshizaki T, Hamachi I, Morii T, Mori Y (2013) Genetically encoded fluorescent thermosensors visualize subcellular thermoregulation in living cells. *Nature Methods* 10: 1232-1238.
16. Chiu YF, Huang CK, Shigeto S (2013) In vivo probing of the temperature responses of intracellular biomolecules in yeast cells by label-free Raman microscopy. *ChemBioChem* 14: 1001-1005.
17. Gao L, Zhang C, Li C, Wang LV (2013) Intracellular temperature mapping with fluorescence-assisted photoacoustic thermometry. *Applied Physics Letters* 102: 193705.

(2014 年 5 月 5 日受付; 2014 年 5 月 23 日受理)

特集「顕微鏡で測る」

植物のオートファジー動態の簡便な定量解析

花俣 繁¹、来須 孝光^{1,2*}、朽津 和幸^{1**}¹ 東京理科大・理工・応用生物学; ² 東京工科大・応用生物

E-mail: *kurusutkmt@stf.teu.ac.jp; **kuchitsu@rs.noda.tus.ac.jp

要旨

細胞内の大規模分解系であるオートファジー（細胞内自食作用）は、植物を含む真核生物の様々な高次生命機能に関与する。一方、細胞の90%以上を液胞が占める植物細胞においては、細胞内での動的なオートファゴソームの形成、そして液胞への分解産物の運搬というオートファジーの一連の動態（オートファジーフラックス）を簡便に観察することは難しく、植物のオートファジーフラックスの定量的なモニタリング技術の開発は重要な課題であった。我々は、オートファゴソームマーカーとして知られる ATG8 タンパク質のタバコホモログ（NtATG8a）と、性質の異なる2種類の蛍光タンパク質（mRFP1, YFP）を利用することにより、植物のオートファジーフラックスを非破壊的、且つ簡便に定量的に検出する方法を開発した。本稿では、YFP-NtATG8aの挙動を基に、新規に構築したオートファジープローブの特徴や、オートファジーの動態（フラックス）を定量的に評価する手法について述べる。

植物培養細胞におけるオートファジーマーカータンパク質の動態

細胞内の大規模分解系であるオートファジー（細胞内自食作用）の実行に関与する ATG (Autophagy-related) 遺伝子群は、多くの真核生物に保存され、共通の機能を果たしている[1, 2]。中でも、ATG8 はオートファゴソームマーカーとして、植物を含む真核生物に普遍的に有用であり、これまでに、モデル植物であるシロイヌナズナ、イネや、細胞内の分子動態の観察に適したタバコ培養細胞 BY-2 において、緑色蛍光タンパク質（GFP）やその改変タンパク質と ATG8 群との融合タンパク質を用いることで、植物のオートファジー動態について解析が進められて来た[1, 3-7]。

YFP-NtATG8 群（NtATG8a, b, c, d）を発現させたタバコ培養細胞において、栄養源が豊富な条件下では YFP のシグナルは主に細胞質と核質において検出されるが、窒素やシヨ糖およびリン酸欠乏条件下で培養すると、細胞質中に YFP-NtATG8s の局在化する構造体が増加する（図 1）。これらの構造体の形成過程は、蛍光顕微鏡を用いたリアルタイムイメージングにより捉えることができ、YFP-NtATG8a の局在化するカップ状構造体はリング状構造体へと成熟し、形成したオートファゴソームは最終的に液胞と融合し、消失する[5]。

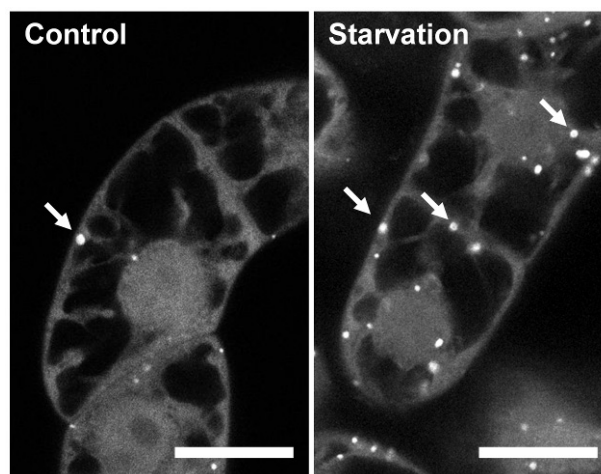


図 1. オートファゴソームのマーカータンパク質

（YFP-NtATG8a）を発現させたタバコ培養細胞 BY-2。細胞をシヨ糖欠乏条件下で培養すると、細胞質において輝度の高い顆粒状の構造体が形成される。Bar = 20 μm

YFP-NtATG8a による点状構造体（オートファゴソーム）数の変化

タバコ BY-2 細胞をシヨ糖欠乏条件下で培養し、共焦点レーザー顕微鏡により観察すると、細胞質においてオートファゴソーム数の増加が観察される[3, 5]。しかし、この増加は、シヨ糖欠乏条件下での培養 2 時間後にはほぼ一定に達し、その後

はほとんど変化しない (図 2)。このことは、オートファゴソームの数は、オートファジー活性化状態の判断を可能にするものの、オートファジー活性の定量的な指標としては向いていないことを示している。

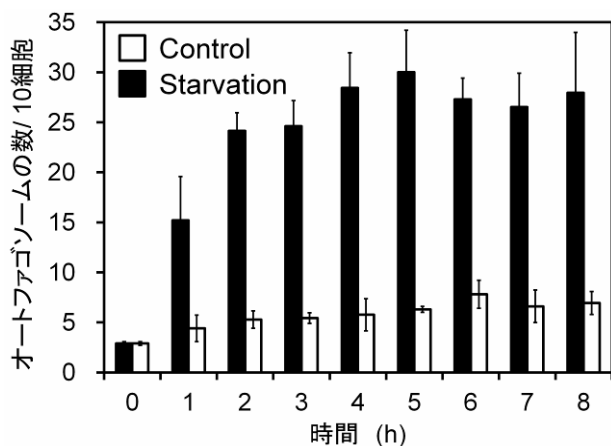


図 2. ショ糖欠乏処理により誘導されるオートファゴソームの数の変化。オートファゴソームの数は、細胞をショ糖欠乏状態においてから数時間後に一定に達し、その後は大きく変化しない。

細胞内の YFP-NtATG8a の蛍光強度の変化

オートファジー誘導に伴い、ATG8 は液胞へと運ばれ、分解される。そこで、オートファジー誘導による細胞質と核質の YFP 蛍光強度の変化を観察すると同時に、YFP-NtATG8a タンパク質量をウェスタンブロット法により調べた。その結果、通常生育条件下では、細胞内の YFP 蛍光強度とタンパク質量に大きな変化は見られなかったが、ショ糖飢餓条件下では、細胞内の YFP 蛍光強度とタンパク質量が、時間依存的に減少した (図 3Starvation) [3]。これらの結果は、オートファジー誘導に伴うオートファゴソーム数の増加が、見かけ上平衡に達した後も、YFP-NtATG8a は細胞質から液胞へと運搬され続けていることを示唆している。

液胞内の YFP-NtATG8a の蛍光強度の変化

植物の液胞内は液胞膜に存在する H^+ -ATPase の働きにより、酸性に保たれている。GFP-AtATG8a を発現させたシロイヌナズナの根の細胞に、液胞膜 H^+ -ATPase 阻害剤の一つであるコンカナマイシン A (ConcA) を処理すると、液胞内 pH が上昇し、その結果として、GFP 蛍光を伴う小胞構造体 (オートファジックボディ) が蓄積する[1, 3-4]。

そこで我々は、YFP-NtATG8a の液胞内への運搬に伴う、液胞内の YFP 蛍光強度変化に着目し、蛍光強度の増大が、オー

トファジーフラックスを反映するかどうかを調べた。ショ糖欠乏培地に細胞を移し、ConcA を処理し、共焦点レーザー顕微鏡により、液胞内 YFP 蛍光強度を継続的に測定した。その結果、ConcA を処理することで、液胞内の YFP 蛍光強度が時間依存的に増大し (図 4A、Control)、その増大はショ糖欠乏により加速した (図 4B、Starvation)。これらの結果は、細胞質から液胞内への NtATG8a タンパク質の移動を追跡することは、オートファジーフラックスをモニターするために有用な指標となる可能性を意味する。

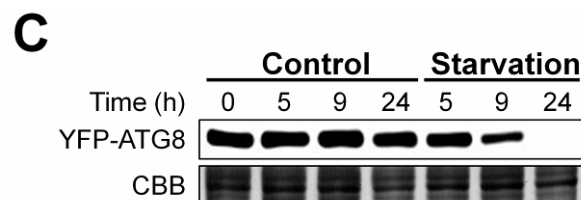
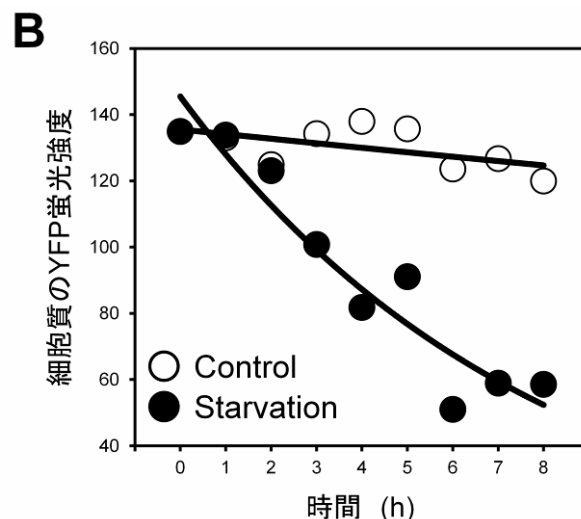
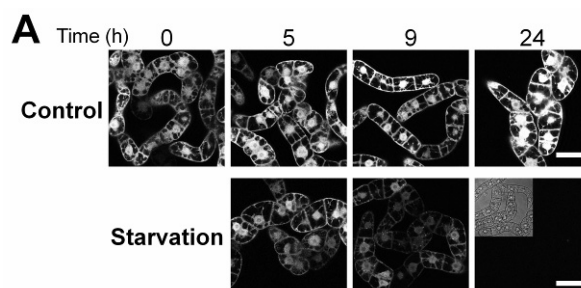


図 3. オートファジー誘導時の YFP の蛍光強度とマーカータンパク質量の減少。(A-B)細胞をショ糖欠乏条件下で培養すると、細胞質および核質の YFP 蛍光強度が時間依存的に減少した。Bar = 50 μ m。(C)オートファジー誘導時におけるオートファゴソームマーカータンパク質量の経時的な変化。YFP-NtATG8a タンパク質量は、BY-2 細胞をショ糖欠乏状態に移した後に、時間依存的に減少した。

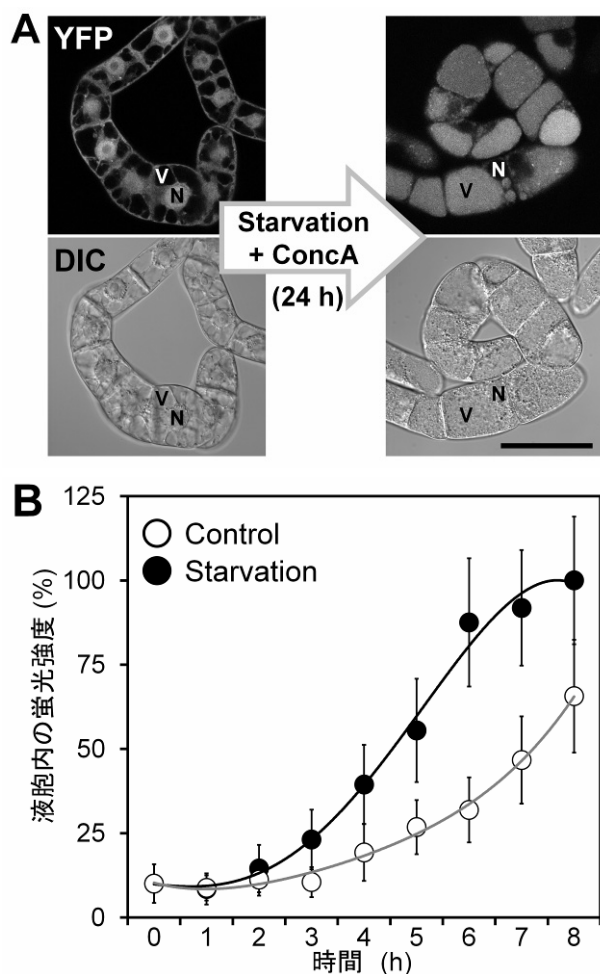


図 4. 液胞膜 H^+ -ATPase 阻害剤の処理により起こる液胞内の YFP 蛍光強度の変化。(A)細胞を ConcA 存在下で培養すると、液胞内にオートファジックボディが蓄積するとともに、YFP 蛍光強度が増大した。(B)液胞内の YFP 蛍光強度の増大はショ糖欠乏条件下において、加速した。

オートファジー特異的プローブの構築

我々は上記の指標を、定量評価出来れば、植物細胞のオートファジーフラックスを細胞レベルで、解析出来ると考えた。しかしながら、これらを定量的に観察・評価するためには、煩雑な操作と、ConcA 処理による、細胞への影響を考慮する必要が生じる。

そこで、これらの問題を解決するために、植物細胞の細胞質と液胞内の pH の違いに着目した。植物細胞の細胞質は弱アルカリ性 (pH 約 7.2) であるが、酸性コンパートメントである液胞内の pH は約 5.5 である[8]。蛍光タンパク質の発色団は、プロトンの有無により波長特性が変化し、酸性 pH で蛍光が弱まることが知られている。オワンクラゲ(*Aequorea victoria*)の改変 GFP タンパク質のうち、YFP はとりわけ pH 感受性が高く、

pH インジケータースとして、しばしば用いられている[9-11]。一方で、サンゴの一種 (*Discosoma*) に由来する DsRed およびその変異体シリーズ (mRFP1 等) はプロトン感受性が低い。そのため、低 pH においても消光しないことが知られており、GFP や YFP と DsRed 等をタンデムに連結した融合タンパク質を用いて、生体内での pH 変化観察に利用されている[9-11]。そこで、mRFP1 と YFP および NtATG8a をタンデムに連結した融合タンパク質(mRFP1-YFP-NtATG8a)を設計した (図 5)。大腸菌を用いて mRFP1-YFP-NtATG8a タンパク質を発現させ、蛍光分光光度計を用いて、溶菌液の mRFP1 と YFP の蛍光強度を測定したところ、mRFP1 蛍光強度は pH7.0-5.4 の間で殆ど変化しなかったが、YFP 蛍光強度は pH 依存的に減少し、細胞内での生理的な使用範囲において有用となる可能性が高いことが示された [3]。

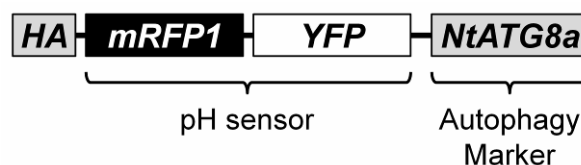


図 5. pH センサーを付加したオートファジープローブの構造。オートファジープローブは、pH センサー部分(mRFP1-YFP)とオートファジーのマーカー部分(NtATG8a)から構成されている。

タバコ培養細胞におけるプローブの細胞内動態

HA タグを付加した上記プローブ (HA-mRFP1-YFP-NtATG8a) を発現させたタバコ BY-2 株を作出し、オートファジー誘導時の細胞内動態について解析した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて、通常生育条件下の細胞を観察したところ、YFP 蛍光は、YFP-NtATG8a 発現細胞と同様に、主に細胞質と核質において強く検出された。一方、mRFP1 蛍光は、細胞質と核質で強く、液胞において弱く検出された (図 6A Control)。次に、オートファジーを誘導し、細胞を観察した結果、細胞質と核質の mRFP1 と YFP 両方の蛍光強度が減少し、液胞内において mRFP1 蛍光のみが強く検出された (図 6A Starvation)。これらの結果は、細胞質と核質の mRFP1 と YFP 蛍光強度の減少、および液胞内の mRFP1 蛍光強度の増大の追跡が、オートファジーフラックスをモニターするための優れた指標となることを示唆している (図 6B)。

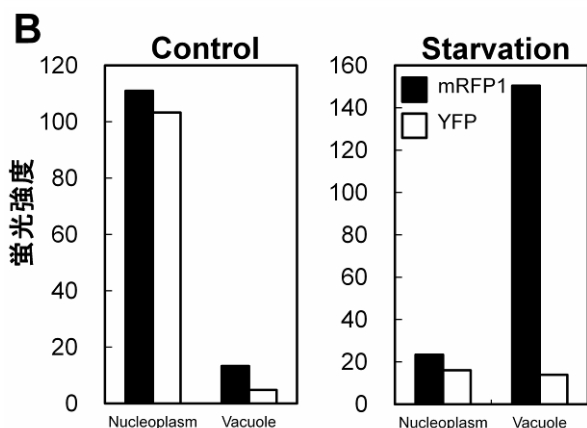
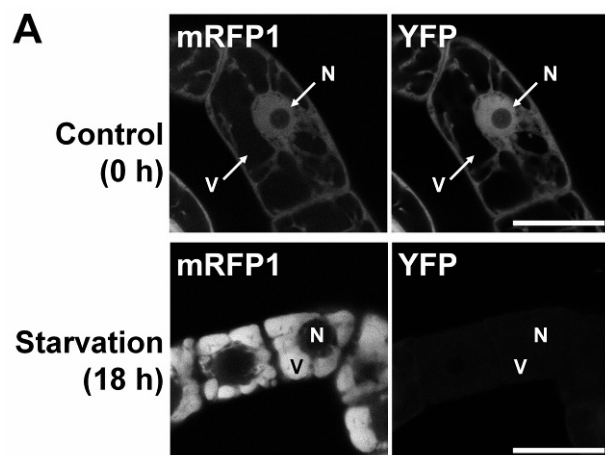


図 6. タバコ培養細胞 BY-2 におけるオートファジー誘導時のプロンプタンパク質の細胞内動態の *in vivo* イメージング。 (A-B) HA-mRFP1-YFP-NtATG8a タンパク質を恒常的に発現させた形質転換 BY-2 細胞において、ショ糖が豊富な条件下では mRFP1 と YFP の両蛍光は主に核と細胞質において検出された。ショ糖欠乏によりオートファジーを誘導すると YFP 蛍光強度が減少し、一方で mRFP1 の蛍光が液胞で強く検出された。

細胞懸濁液の蛍光強度変化によるオートファジー評価系の確立

上述のように、オートファジー誘導時において、細胞質と核質の RFP と YFP の蛍光強度の減少が観察された。一方、YFP 蛍光は液胞内ではほとんど検出されなかったのに対して、RFP 蛍光は液胞内においても観察された。これらの結果は、オートファジー誘導に伴い、プローブの局在が変化し、YFP 蛍光強度は減少するが、RFP 蛍光強度は大きく影響を受けないことを意味しており、細胞全体の RFP と YFP の蛍光強度の変化が、オートファジーフラックスを簡便にモニターするための有用な指標である可能性が示唆された。

そこで、細胞全体の RFP と YFP の蛍光強度を、蛍光顕微鏡

を用いて継続的に観察した。その結果、通常生育条件下では、細胞全体の YFP 蛍光強度と RFP 蛍光強度は大きく変化しなかった (図 7A)。一方、ショ糖飢餓条件下では、細胞全体の RFP 蛍光強度は大きく変化しなかったものの、YFP 蛍光強度が時間の経過とともに減少した。結果として、細胞懸濁液の RFP/YFP の蛍光強度の Ratio はオートファジーの実行に伴い、時間依存的に増大した (図 7B)。

これらの結果は、(1) RFP/YFP の Ratio 変化がオートファジー経路に特異的に変化すること、(2) Ratio の増大は、オートファジーフラックス検出における、良い指標となること、(3) 細胞懸濁液の蛍光強度を測定するだけで、オートファジーフラックスを、極めて簡便に検出可能であることを示している。

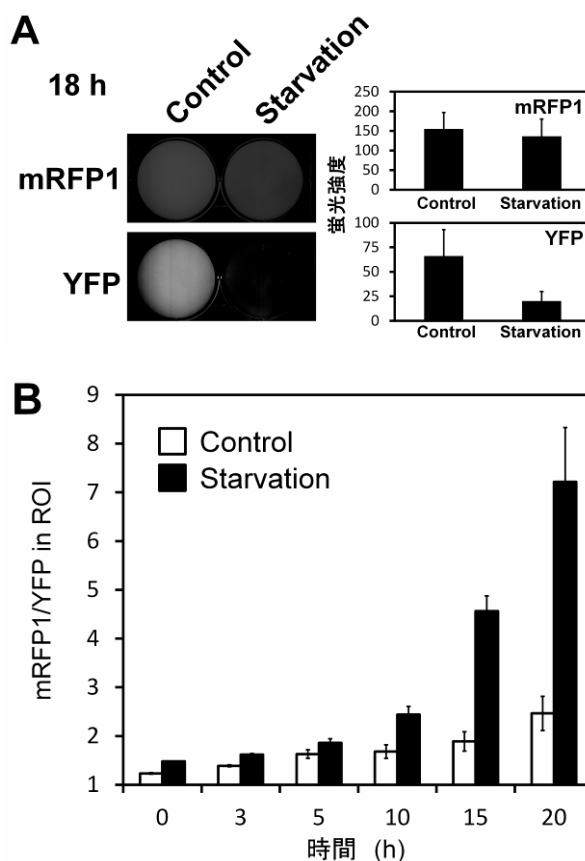


図 7. 細胞懸濁液の蛍光強度の変化を指標としたオートファジーフラックスの定量的モニタリング。 (A) HA-mRFP1-YFP-NtATG8a を発現させたタバコ BY-2 細胞をショ糖欠乏状態におくと、オートファジーの誘導に伴い、細胞懸濁液の YFP 蛍光強度が減少するが、RFP 蛍光強度はほとんど変化しない。(B) オートファジーの誘導に伴い、細胞懸濁液の mRFP1/YFP の Ratio が時間依存的に増大した。

おわりに

本稿では、タバコ培養細胞 BY-2 における ATG8 タンパク質の動態に着目し、蛍光特性の異なる 2 種類の蛍光タンパク質を融合することで、BY-2 細胞のオートファジーフラックスを、非破壊的かつ定量的にモニタリングする方法を解説した。

本手法は、植物細胞内のオートファジー動態変化だけでなく、様々な刺激に対するオートファジーの定量的解析や、オートファジー制御化合物のハイスループットスクリーニングに有効と期待される。併せて同定される抑制剤に関しても、作用点を検証することで、未解明な部分が多い、植物のオートファジー実行過程や制御機構を解明する上でも、有用であると想定される。

謝辞

YFP-NtATG8a コンストラクトは、松岡健博士（九州大学農学部）、mRFP1-AtATG8a コンストラクトは、吉本光希博士（フランス国立農学研究所）から分与された。花俣は、文部科学省支援事業「植物科学グローバルトップ教育推進プログラム」に参加した。ここに感謝致します。

引用文献

1. Yoshimoto K (2012) Beginning to understand autophagy, an intracellular self-degradation system in plants. *Plant & Cell Physiology* 53: 1355-1365.
2. Mizushima N, Komatsu M (2011) Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 147: 728-741.
3. Hanamata S, Kurusu T, Okada M, Suda A, Kawamura K, Tsukada E, Kuchitsu K (2013) *In vivo* imaging and quantitative monitoring of autophagic flux in tobacco BY-2 cells. *Plant Signaling and Behavior* 8: e22510.
4. Yoshimoto K, Hanaoka H, Sato S, Kato T, Tabata S, Noda T, Ohsumi Y (2004) Processing of ATG8s, ubiquitin-like proteins, and their deconjugation by ATG4s are essential for plant autophagy. *The Plant Cell* 16: 2967-2983.
5. Toyooka K, Moriyasu Y, Goto Y, Takeuchi M, Fukuda H, Matsuoka K (2006) Protein aggregates are transported to vacuoles by a macroautophagic mechanism in nutrient-starved plant cells. *Autophagy* 2: 96-106.
6. Moriyasu Y, Ohsumi Y (1996) Autophagy in tobacco suspension-cultured cells in response to sucrose

starvation. *Plant Physiology* 111: 1233-1241.

7. Kurusu T, Koyano T, Hanamata S, Kubo T, Noguchi Y, Yagi C, Nagata N, Yamamoto T, Ohnishi T, Okazaki Y, Kitahata N, Ando D, Ishikawa M, Wada S, Miyao A, Hirochika H, Shimada S, Makino A, Saito K, Ishida H, Kinoshita T, Kurata N, Kuchitsu K (2014) OsATG7 is required for autophagy-dependent lipid metabolism in rice post-meiotic anther development. *Autophagy* 10: 878-888.
8. Kuchitsu K, Yazaki Y, Sakano K, Shibuya N (1997) Transient cytoplasmic pH change and ion fluxes through the plasma membrane in suspension-cultured rice cells triggered by N-acetylchitoooligosaccharide elicitor. *Plant & Cell Physiology* 38: 1012-1018.
9. Gjetting S K, Ytting CK, Schulz A, Fuglsang AT (2012) Live imaging of intra-and extracellular pH in plants using pHusion, a novel genetically encoded biosensor. *Journal of Experimental Botany* 63: 3207-3218.
10. Kimura S, Noda T, Yoshimori T (2007) Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. *Autophagy* 3: 452-460.
11. Svenning S, Lamark T, Krause K, Johansen T (2011) Plant NBR1 is a selective autophagy substrate and a functional hybrid of the mammalian autophagic adapters NBR1 and p62/SQSTM1. *Autophagy* 7: 993-1010.

(2014 年 5 月 26 日受付; 2014 年 5 月 29 日受理)

「バイオイメージング」投稿要領

タイトル(明朝体 12 ポイント)

著者名 1^{1*}、著者名 2²

¹ 所属 (略称) 1; ² 所属 (略称) 2

* E-mail: 責任著者のメールアドレス

本文 9 ポイント○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○

1. 本誌は、日本バイオイメージング学会の高い学際性に基づき、バイオイメージング及び関連領域に関する、広範な専門分野の研究者や学生が理解しやすい和文の原著論文、総説、解説等を掲載する。また、会員が所属する研究室や研究機関の紹介記事等を掲載する。論文等は、編集委員と当該分野の専門家が審査を行い、編集委員会が採否を決定する。本誌に掲載された著作物の著作権は、日本バイオイメージング学会に帰属することを前提とする。

2. 他の雑誌・書籍等にすでに掲載された内容を含む原稿や、他の雑誌等に投稿中の原稿は、原著論文として投稿できない。総説、解説等において、図・表・文章など出版済みの内容を転載する場合は、投稿前に著作権所持者の許可を取る。これらの規定に反した場合、また、データの捏造や他の著作物からの盗用など、科学的ないし社会的倫理に反する行為が判明した場合には、編集委員会は掲載決定後あるいは掲載後においてもその原稿の掲載取り消しを行うことができる。

3. 投稿原稿の体裁は次のとおりとする。(1) テキストは、原則として MS-Word 形式のファイルとする。(2) 原稿の最初に、表題、著者氏名、所属先、電子メールアドレスを記載する。また原則として要旨を付ける。(3) A4 版で 6 ページ以内を標準とする。原則として和文フォントは MS 明朝、英文は Times New Roman または Times を用いる。

余白は上下 25 mm、左右 20 mm、タイトル・著者氏名・所属・要旨は全段、本文は 2 段組として、40 行/ページ、行送り 17.5 pt とする。タイトルは 12 ポイント、執筆者氏名・所属・本文は 9 ポイントを用いる。図表等は、必要に応じて 2 段組にせず、全段で掲載することも可能。

(4) 図・写真・表・図の説明文は、ファイル本文中の希望箇

所に挿入し、8 ポイント、原則として和文フォントは MS ゴシック、英文は Arial を用いる。

4. 投稿にあたっては、投稿原稿のファイル (MS-Word 形式と pdf 形式の双方; 図、写真の元データファイル (300 dpi 以上の解像度) を含む) を日本バイオイメージング学会「バイオイメージング」編集長宛に、電子データとして送付する。

5. 校正は、著者の責任において行う。

6. 著者の希望によりカラー印刷する場合の別途費用は、著者負担とする。別刷を 50 部単位で購入することができる。



図 1. バイオイメージング Bioimages

引用文献

1. Murakami T, Ono M, Ishikawa H (1993) Confocal interference reflection microscopy of cultured cells. *Bioimages* 1: 1-8.
2. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263: 802-805.