

## 3-3 蛍光顕微鏡による生細胞イメージング

### 3-3 *Live Cell Imaging by Fluorescence Microscopy*

原口徳子 丁大橋 近重裕次 山本歩 平岡泰

HARAGUCHI Tokuko, DING Da-Qiao, CHIKASHIGE Yuji,  
YAMAMOTO Ayumu, and HIRAOKA Yasushi

#### 要旨

生物の中の分子の挙動は、まるで現代社会の情報通信網の縮図と言っても過言ではない。細胞内でネットワークを形成している生体分子の挙動を、生きた細胞の中でとらえることにより、生体内分子の情報ネットワーク形成の仕組みが理解できるようになる。我々は、生体分子の挙動を、生きた細胞で可視化するためのイメージングシステムを構築してきた。本稿では、これらの装置がどのような分子挙動を見るのに適しているか紹介し、それらの装置のハードウェア上の特徴を概説する。

Communications within the cell are accomplished by the coordinated interactions of molecular components. Observation of such molecular interactions in living cells can be essential for understanding cellular communications. Toward this end, we have developed microscope systems for imaging intracellular molecular components in living cells. Here we introduce unique features of these microscope systems and their applications.

#### [キーワード]

生体分子間情報通信, 蛍光顕微鏡法, ダイナミクス, 3次元可視化

Bio-molecular communications, Fluorescence microscopy, Dynamics, Three-dimensional imaging

## 1 まえがき

現代社会の情報通信のあり方は急速に変化しており、従来の固定的なシステムから柔軟でダイナミックなシステムの構築が必要となっている。自然界の中で、このような柔軟でダイナミックな情報通信のシステムを構築し運用しているのが生物である。生物の持つこのような優れた情報通信機能を学ぶためには、まず、生物の持つ情報伝達システムを理解する必要がある。そのために、我々の生物情報グループは、生体分子の挙動を、生物が生きている状態で観察することが可能なイメージングシステムを開発した。ここで紹介する蛍光顕微鏡を中心とした幾つかのイメージング装置は、生体内の特定の分子を染め分けて、その動きをトレースすることが可能であり、目的に応じて装置、方法を使い分けることにより、生きた細胞内の分子の運動や結合を可視化することができる。ここでは、

生物情報グループの研究の一環として開発されたこれらの生体イメージング装置を紹介する。

## 2 蛍光顕微鏡による生体分子イメージング

解像度の高い顕微鏡法というと、一般的には電子顕微鏡法が挙げられる。電子顕微鏡法は、解像度の高さでは確かに優れた顕微鏡法であるが、生きている魚の挙動を調べたいときでも、切り身の魚を電子線で焼いた焼き魚の状態を観察するようなもので、生きた状態で観察することができない。生きた細胞で、細胞内の特定の分子を継続的に観察していくために、我々は蛍光顕微鏡を選んだ。蛍光顕微鏡法は、分子特異性が高く特定の分子を色分けして染めることが可能であり、その上、蛍光染色の細胞毒性は比較的弱いので生きた生体標本でも観察できるという利点がある。その点は、試料を切り身にし

て、かつ強い電子線を試料に当てる電子顕微鏡法とは、決定的に違う点といえる。しかし、蛍光顕微鏡といえども、蛍光染色や蛍光観察をする場合の細胞毒性は高く、細胞を生かし続けた状態で連続的に観察していくためには、死んだ標本を扱うのとは全く異なる問題があり、生きた細胞の観察に最適化したイメージング法の開発が必要であった。我々は、蛍光染色や蛍光の連続観察の際に起こる様々な問題点を回避するために、様々な工夫をした装置を幾つか開発し、生きた細胞内の分子の挙動を連続的に観察することに成功した。以下にそれらの装置がどのような目的のために適するのか述べるとともに、そのハードウェアとしての特徴について述べる。

## 2.1 マルチカラー3次元蛍光顕微鏡システム

このイメージング装置は、最大4色に染め分けた細胞を、生きた状態で数日という比較的長時間、立体試料として3次元観察するための装置として開発された。多色の蛍光を長時間3次元観察するということは、細胞に対する毒性や温度ド

リフトによる焦点面の移動が、イメージングを行う上での主な問題となる。そのような問題を解決するために、観察が細胞に与える毒性を減らす工夫や正確な温度制御などの工夫がなされている。ハードウェアとして主な部分は、顕微鏡としてwide-field 蛍光顕微鏡、受光器として冷却CCD、画像の取り込みと機器を制御するコンピュータ、その観察装置全体を覆う温度制御装置(実際には温度制御室)が挙げられる(図1)。その他、蛍光顕微鏡部分では、多色に対応する蛍光フィルターをコンピュータで自動切り替えするための装置、3次元観察に対応するための焦点制御、視野を自由に選ぶことができるXY-motorized stage、蛍光照明の明るさを調節できる装置、蛍光照明を均一にする装置、細胞の外形を観察するための対物外位相差装置などが付けられている。この装置の詳細は、文献を参照していただきたい [1][2]。この装置は、上記のような装置の導入により、生きた細胞の蛍光観察に大変適しているが(図2)、それに加えてdeconvolution 演算をすることにより高い空間解像度を持つ画

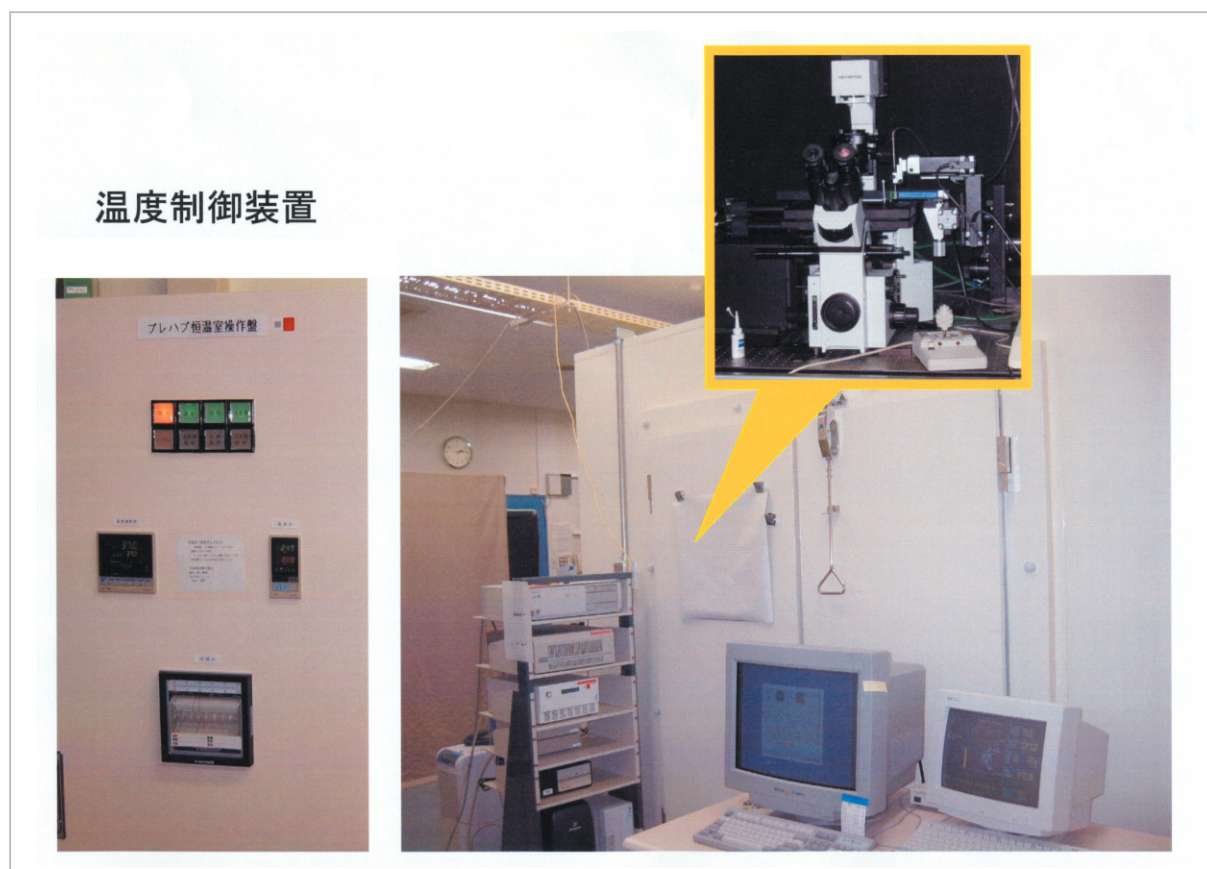


図1 マルチカラー3次元蛍光顕微鏡システム



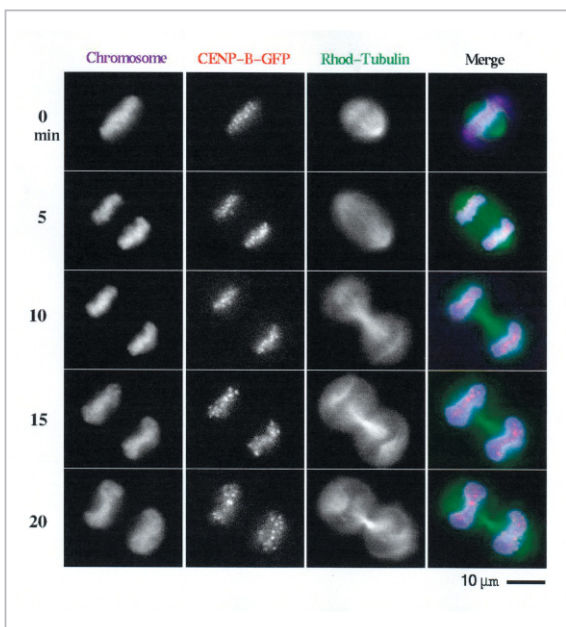


図2 ヒト細胞の細胞分裂

像を取得することも可能である [3]。

## 2.2 スペクトル蛍光顕微鏡システム

この装置の特長は、蛍光スペクトルを計測することが可能な点である。この装置を用いることにより、生きた細胞内で、目的分子の蛍光スペクトルを連続観察することが可能である [4]。生体内の化学変化が蛍光スペクトルの変化となるような蛍光プローブを用いることにより、生体内の化学反応を生きた細胞で可視化することができる。例えば、生体内のカルシウム濃度を測定するための蛍光プローブとして、CFPとYFPの間で起こる蛍光共鳴エネルギー転移 (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) を利用した cameleon と呼ばれる蛍光プローブが開発されており [5]、この装置を用いると、細胞内でのカルシウム濃度を蛍光スペクトルの変化として測定することができる [6] [7]。ハードウェアとしては、共焦点顕微鏡に分光装置が付いた顕微鏡に、生物試料を保温するための温度制御装置を用いている。蛍光色素を励起するためのレーザーとして、一般的によく使われている Ar と Kr のレーザー励起光源のほかに、水冷の Kr レーザー (413 nm) を用いているために、励起波長のピークが 430 nm 付近にある CFP を効率よく励起することができる。そのために CFP を用いた FRET の測定を効率よく行うことがで

きる。FRET は、二つの蛍光分子が数 nm 程度の距離に存在し、かつ蛍光の双極子モーメントがそろった時に起こるエネルギー転移で、分子間結合を測定するのに有用である (図 4)。この装置は、FRET 測定のほかには、特定領域の蛍光を bleach することもできる。蛍光染色した目的分子を bleach して、その領域内での蛍光の回復を測定ことによって、目的分子の移動速度を計測することができる [8]。



図3 スペクトル蛍光顕微鏡システム

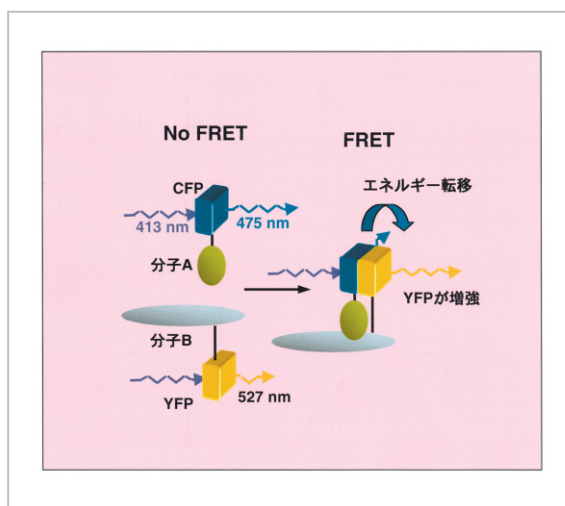


図4 FRET の概念図

## 2.3 FRET 測定用蛍光顕微鏡システム

この装置は、CFP と YFP の間に起こる FRET を測定する目的に特化したイメージングシステムとして構築された。顕微鏡としては通常の蛍光顕微鏡に、横河電気が開発したニポーディスク (Nipkow disk) 方式の共焦点ユニットを組み込

んだ光学系を用いており、出てきた蛍光をCFPとYFPに分光し、冷却CCD上で同時計測することができる。励起用光源としてCFPを励起するのに最適な430 nmの半導体レーザーを用いている。FRET測定に対しては、CFPとYFPの2色の蛍光の量比 (ratio) を精度良く計算することができ、2色の色素間のFRET量の評価が容易となる。そのため、FRET量の変化を生きた細胞で経時測定していくのに適している。FRETは、細胞内にある二つの分子間の結合を意味しており、その有無が生きた細胞で測定できるということは、細胞内の複数の分子間で起こる分子間通信を可視化できるということの意味するものである。

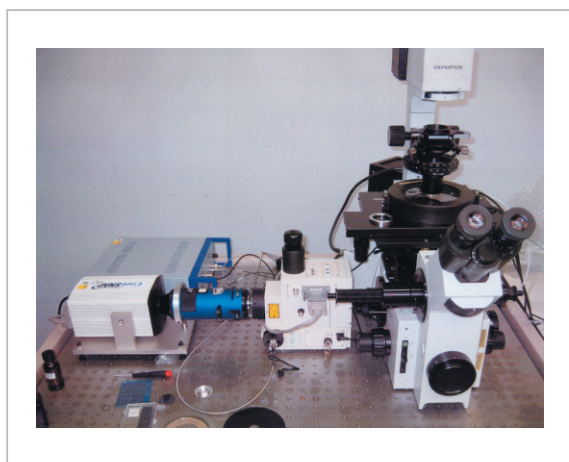


図5 FRET測定用蛍光顕微鏡システム

### 3 むすび

生体イメージング技術の開発は、米国では21世紀の最重要課題と位置付けられており、欧米を中心に開発競争が激化している分野である。生物情報グループの行ってきた、生細胞での生体分子イメージング技術の開発は、技術力の高さに加え、多くの成果を生んできた点で、世界的にも高く評価されている。この技術を用いて、生体分子の挙動の理解が進み、生体情報分子の特性が明らかになると考えられる。そのような理解があつて初めて、生物特有の考え方を模した新しい情報通信メディアの開発につながるものと思われる。

本稿は、生物情報グループが構築・開発してきたイメージング法を、装置という側面から紹介した。更に詳細な学問的成果については、生物情報グループのHPに掲載しているので参照していただきたい [9]。本研究は、1991年6月に生物情報研究室としてスタートしたプロジェクトに端を発しており、それ以来、情報通信研究機構(旧、通信総合研究所)からの予算に加えて、科学技術振興機構(旧、科学技術振興事業団)から省際基礎研究、重点研究支援協力員、戦略的創造研究「ゲノムの構造と機能」、戦略的創造研究「ソフトナノマシン」、Human Frontier Science Programからの支援を受けて行ったものである。その支援に対し深く感謝する。

#### 参考文献

- 1 平岡泰, 原口徳子, “生細胞のマルチカラー蛍光画像化”, 細胞工学, 17: 956-965, 1998.
- 2 Haraguchi, T and Hiraoka, Y, Imaging Hoechst 33342-labeled chromosomes and fluorescent proteins during the cell cycle. In “Live Cell Imaging: A Laboratory Manual”, (David Spector, ed.) Cold Spring Harbor Laboratory Press. in press, 2004.
- 3 Agard. D.A, Hiraoka. Y, Shaw. P, and Sedat. J.W, “Fluorescence microscopy in three dimensions”, *Methods Cell Biol.* 30: 353-377, 1989.
- 4 平岡泰, 志見剛, 原口徳子, “蛍光スペクトル顕微鏡”, 生体の科学, Vol. 54, No. 6, pp562-569, 2003.
- 5 Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery. J.M, Adams. J.A, Ikura. M, and Tsien. R.Y. “Fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> based on green fluorescent proteins and calmodulin”, *Nature.* 388: 882-887, 1997.
- 6 Haraguchi. T, Shimi. T, Koujin. T, Hashiguchi. N, and Hiraoka. Y, “Spectral imaging fluorescence microscopy”, *Genes Cells* 7, 881-887, 2002.
- 7 Hiraoka. Y, Shimi. T, and Haraguchi. T, “Multispectral imaging fluorescence microscopy for living cells”, *Cell Struct Funct.* 27, 367-374, 2002.

- 8 Shimi. T, Koujin. T, Segura-Totten. M, Wilson. K.L, Haraguchi. T, and Hiraoka. Y, “Dynamic interaction between BAF and emerin revealed by FRAP, FLIP and FRET analyses in living HeLa cells”, J. Struct. Biol. 147, 31-41, 2004.
- 9 [http://www-karc.nict.go.jp/d332/CellMagic/paper\\_n.html](http://www-karc.nict.go.jp/d332/CellMagic/paper_n.html)

はらぐち たくこ  
原口徳子

基礎先端部門関西先端研究センター生  
物情報グループ主任研究員 医学博士  
細胞生物学

ちかしば ゆうじ  
近重裕次

基礎先端部門関西先端研究センター生  
物情報グループ主任研究員 理学博士  
細胞生物学

ひらおか たい  
平岡 泰

基礎先端部門関西先端研究センター生  
物情報グループリーダー 理学博士  
物物理学、細胞生物学

てい だいきょう (DING Da-Qiao)

基礎先端部門関西先端研究センター生  
物情報グループ主任研究員 理学博士  
植物生理学、細胞生物学

やまもと すすむ  
山本 歩

基礎先端部門関西先端研究センター生  
物情報グループ主任研究員 農学博士  
細胞生物学・分子生物学

