

高圧力顕微鏡法による微小管の ダイナミックコントロール

High-Pressure Microscopy for Controlling Microtubule Dynamics

西山 雅祥^a, 瀧口 金吾^b, 林 真人^b

Masayoshi Nishiyama, Kingo Takiguchi and Masahito Hayashi

^a 京都大学白眉センター/物質-細胞統合システム拠点

^b 名古屋大学大学院理学研究科

要旨 細胞内にあるタンパク質は周りを水分子に取り囲まれている。筆者らは高圧力下でタンパク質と水との相互作用が変化することに着目し、タンパク質の分子構造や機能活性をコントロールしながら実時間で観察できる高圧力顕微鏡法を開発してきた。本稿では、高圧力顕微鏡の概略と細胞骨格・微小管の動態観察の結果について紹介する。

キーワード：高圧力顕微鏡，分子間相互作用，微小管，人工細胞

1. イントロダクション

近年、培養細胞系の実験を元にして、様々な細胞が外から与えた力を感知し、応答することが明らかとなりメカノバイオロジーとして注目を集めている¹⁾。例えば、応答の例として細胞膜を介したシグナル伝達過程、タンパク質発現量の変化などが挙げられよう。このような知見の多くは、細胞を基板に貼り付けて固定し、その後、水流によるズリ力を与える手法や、基板を動かし細胞を伸張させる手法から得られてきたものである。しかしながら、これらの手法には生体試料の形状や固定方法により刺激の強さが変わってしまう問題があり、幹細胞の分化が細胞を支える基質の硬さで変化してしまうことも知られている。

それに対して、筆者らは、生体試料に力学的な刺激を与える新しい手法として、静水圧の優位性に着目してきた^{2,3)}。静水圧を利用すれば、1) そもそも、細胞や組織を基板などに固定する必要がなく、2) 生体試料の形や固定方法に因らず、どの方向からも一様な力学刺激を与えることが可能であり、3) 生体試料を入れる容器を大きくすることでスケールアップを図りやすい。これらの特長は基礎研究のみならず、将来的な医療応用を見据えた場合にも大きなメリットになる。

従来までの高圧力研究により、生体組織が圧力により構造や機能を大きく変化させることは明らかにされている⁴⁾。細胞内にある物質の中でも、タンパク質は圧力の影響を受けやすい物質の代表例と言える。細胞内にあるタンパク質は周りを取り巻く水分子との相互作用により、複雑な立体構造を形成し、機能発現を行っている。概ね100 MPa、つまり私達が日常生活を過ごす大気圧環境 (0.1 MPa) の約1,000倍の圧力をかけると、タンパク質と水との相互作用が変化する。その結果、分子間の結合力 (静電相互作用、疎水性相互作用、水素結合など) が弱まる。大気圧を pN と nm を単位として記述すると、0.1 MPa = 0.1 pN nm⁻² となる。仮にタンパク質分子間の結合部位の面積を ~1 nm² とすると、この面積には 0.1 pN の力が加わることになる。それに対して、100 MPa の静水圧環境では 100 pN の力と計算されるので、確かに分子間の結合力は弱まり、分子構造や機能活性は変わりそうである。筆者らは、この高圧力下で生じる現象を光学顕微鏡下で可視化する新しい分析手法の開発を行ってきた^{2,3)}。本稿では、筆者らが開発してきた高圧力顕微鏡について解説し、高圧力下で行った細胞骨格・微小管の動態観察について紹介する。

2. 高圧力顕微鏡

意外なことに高圧力下での顕微鏡測りは古くから行われてきている。1880年代後半には、すでに深海から採取された海洋小生物を対象として高圧力での観察が実施されている⁴⁾。また、1970年代には Ted Salmon (その当時、Shinya Inoué^{5,6)} 研究室の大学院生) らは、卵母細胞の紡錘体を観察している⁷⁾。その他にも、細菌や酵母、培養細胞、筋肉や神経などの様々な生体組織の観察例が見られる⁴⁾。このように静水圧をかけながら顕微鏡下での観察を可能にしたのが高圧力顕微鏡である。

高圧力顕微鏡の要となるのは、観察対象となる生体試料を封入する高圧力チャンバーである。これまで、数多くの高圧力チャンバーが開発されてきたが⁸⁾、その多くは耐圧性能を重視するあまり顕微鏡としての光学性能を犠牲にしてきた経緯がある。というのも、高圧力チャンバーの観測窓にはダイヤモンド ($n_e = 2.424$) やサファイヤ ($n_e = 1.771$) などの強度の高い材質がよく採用されてきたからである。これらの材質は、対物レンズで想定される屈折率とは大きく異なるため結像能の低下を招いていた。それに対して、筆者らは顕微鏡としての光学性能を重視するため、ガラス基板 (BK7, 厚さ 1.5 mm, $n_e = 1.519$) を観測窓に使った高圧力チャンバーを開発した。

図1に筆者らが開発してきた高圧力顕微鏡の写真と概念図を示す^{2,3,9,10)}。装置は、市販の倒立型顕微鏡 (Ti-E, ニコン) に顕微鏡用の高圧力チャンバー、セパレーター (圧力変換器)、ハンドポンプから構成されている。高圧力チャンバーの内部は、長作動距離の対物レンズ (ELWD ADM40 × C, NA = 0.60, WD = 3.6–2.8 mm, カバーガラスの厚み = 0–2.0 mm, ニコン) を用いて観察した。ハンドポンプを文字通り「手」で10秒ほど動かせば、チャンバー内部の圧力は地球上で最も深

^a 〒606-8501 京都市左京区吉田本町 京都大学 iCeMS コンプレックス2

E-mail: mnishiyama@icems.kyoto-u.ac.jp

2016年4月15日受付, 2016年5月21日受理

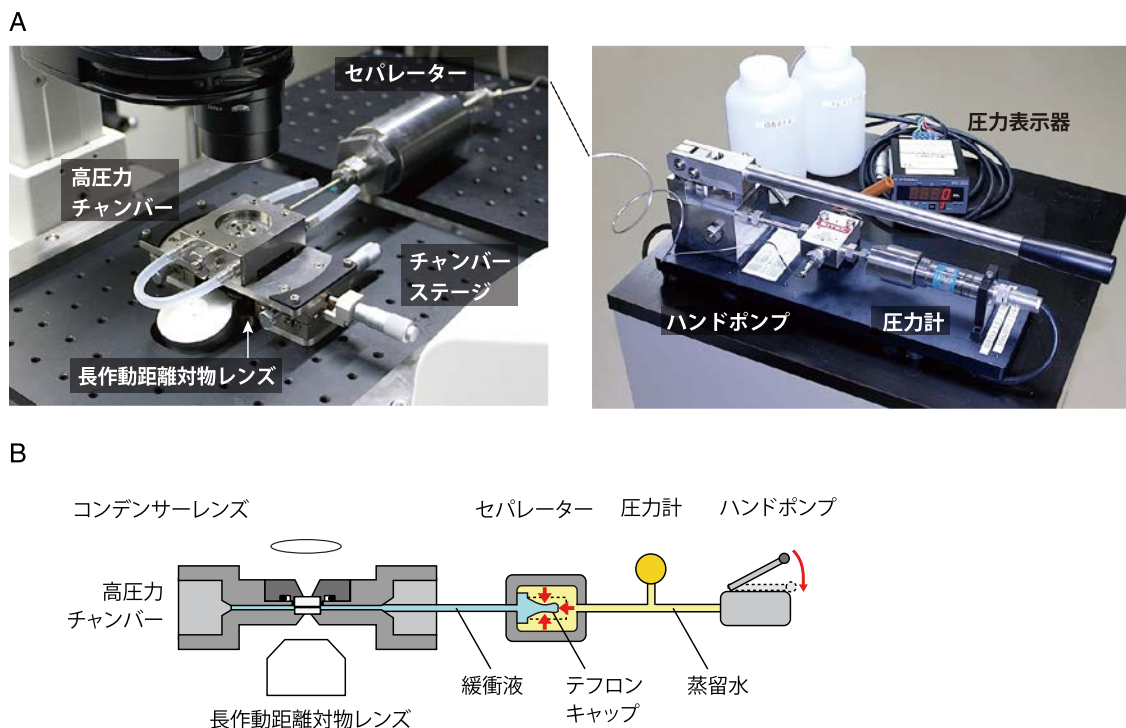


図1 高圧力顕微鏡^{9,10)}の写真(A)と構成図(B)。高圧力チャンパー(ハステロイ C276, 笹原技研, 京都)には対物レンズ側(NA = 0.6)とコンデンサーレンズ側(NA = 0.55)に開口部を設けてある。その内部はガラス厚み補正のついた長作動距離の対物レンズ(ELWD ADM40 × C, ニコン, 東京)で観察できる。ハンドポンプ(HP-150, シンコーポレーション, 京都)を動かすことで、ポンプ内に充填された蒸留水がセパレーター内へと流入する。テフロンキャップ(厚さ 0.2 mm)の変形を介して、高圧力チャンパーとテフロンキャップ内にある緩衝液(約 7 ml)へと圧力が伝えられる。この装置を利用すれば、最大 150 MPa の静水圧をかけながら、実時間で光学顕微鏡観察を実施できる。

い場所である太平洋にあるマリアナ海溝チャレンジャー海淵最深部(約 11,000 m)の静水圧~ 110 MPa まで到達できる(最大 150 MPa まで加圧可能)。この耐圧性能は、地球上にある多くの圧力環境を実験室で再現できることを意味する¹¹⁾。

次に、高圧力チャンパーの観測窓に吸着させた直径 1 μm のビーズを観察することで、光学性能を評価した。光学系を変えることで、同じビーズから多様な顕微鏡観察像(明視野, 暗視野, 位相差, 蛍光像)を取得できた^{9,10)}。さらに、結像能を精査するため、100 MPa にあるビーズの各種観察像を取得したところ、観察法によらずビーズの強度プロファイルは常圧力下で得られた結果とほぼ一致した。つまり、筆者らが開発した高圧力顕微鏡を利用すれば、高圧力条件下であってもかわらぬ解像度で観察できることになる。

では、顕微鏡下では「見えない」変化はどうであろうか? これまでの研究により圧力を変えると水溶液の物性が変化することが知られている。今回開発した装置を利用して 100 MPa の圧力をかけたところ、高圧力チャンパー内の温度は一過的に 0.1°C 上昇し、また粘性は 5% 増加した^{9,10)}。また緩衝液では(10 mM Tris など)、100 MPa の加圧で pH が 0.1 増加した。つまり、水溶液の物性は大きく変化しないことが確認できたことになる。現在、筆者らはこの高圧力顕微鏡を利用して、タンパク質の分子構造や機能発現を高圧力で操作する研究を実施中である^{2,3)}。

最後に高圧力顕微鏡の技術的課題についてふれておく。現状の装置では、対物レンズ側の開口数は 0.6 であり、特に蛍光観察時において観測対象の選択に大幅な制約を受けている。今後は、タンパク質分子間相互作用を変調できる 100 MPa 程度の耐圧性能を維持しながら、開口数がより大きな油浸対物レンズを利用できる装置開発に取り組んでいきたい¹²⁾。これが実現すれば、最先端の顕微鏡技術を導入することで、検出感度のみならず汎用性も拡げることが可能となる。高圧力容器としての耐圧性能、顕微鏡としての光学性能を両方みだし、さらに、使い勝手を良くしなければならない。これは設計者にとっては腕の見せ所であり、泣き所でもある。今後も新しい顕微鏡技術の開発に努めていきたい。

3. 高圧力下での微小管の重合・脱重合反応イメージング

冒頭でふれたように、高圧力をかけると、一般にタンパク質間の相互作用が弱まることが知られている。それでは「百聞は一見に如かず」との諺が示すように、開発した高圧力顕微鏡を利用して、「見る」ことは可能だろうか? タンパク質モノマーの大きさはせいぜい 10 nm 程度でしかなく、現状の装置では分子構造のわずかな変化をみるのは簡単ではない。そこで筆者らは、代表的な細胞骨格である微小管に着目し、高圧力顕微鏡を利用して 2 つの実験を行った。

微小管は全ての真核生物に存在する細胞骨格である¹³⁾。

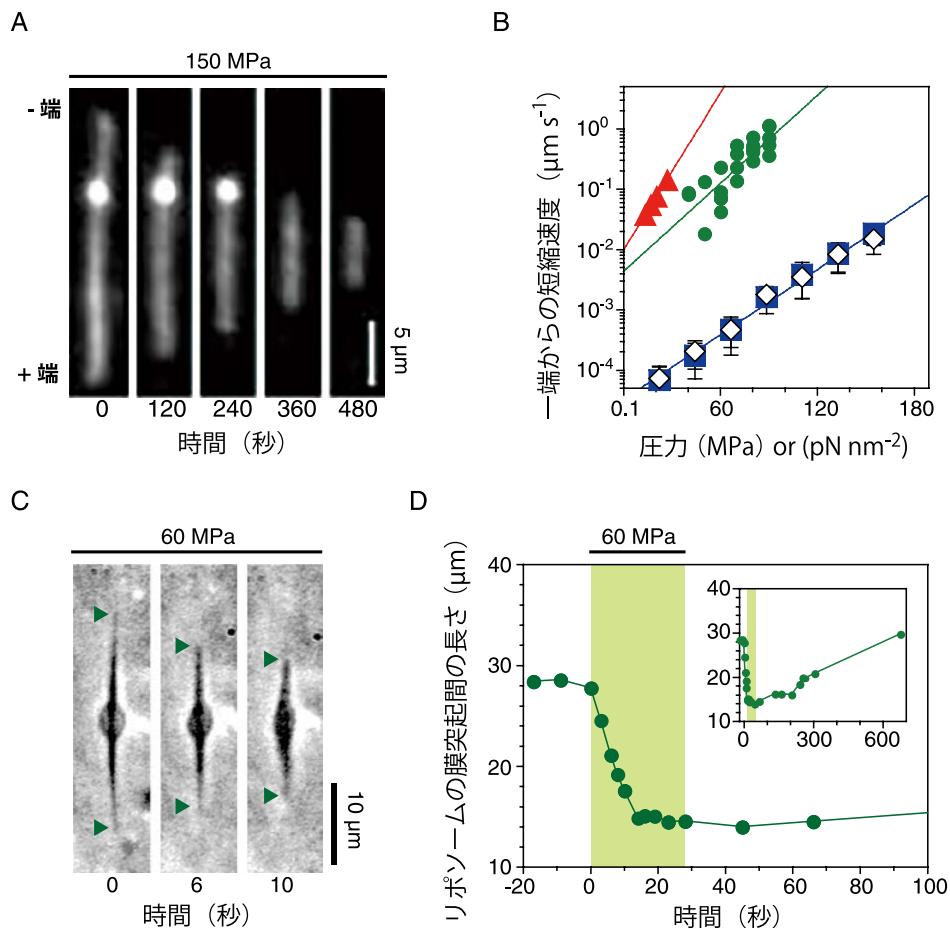


図2 微小管の動態観察 (A) 微小管の蛍光観察像 (150 MPa). 強く蛍光標識した微小管断片を“Seed (種)”として調製した. 弱く標識したチューブリンが種から長く伸張した方が+端, 他方が-端として識別. (B) 微小管短縮速度の圧力依存性. 微小管の短縮速度¹⁴⁾ (■: +端, ◇: -端, +10 μM paclitaxel, 活性化体積 $\Delta V^{\ddagger} = -0.17 \text{ nm}^3$). リボソームの膜突起¹⁷⁾ (●, -Paclitaxel, $\Delta V^{\ddagger} = -0.23 \text{ nm}^3$) と卵母細胞の紡錘体⁷⁾ (▲, -Paclitaxel, $\Delta V^{\ddagger} = -0.41 \text{ nm}^3$) の短縮速度は, 両端の長さ変化を2で割って算出した. (C) 微小管を封入したジャイアントリボソームの位相差像 (60 MPa). 膜突起の先端をやじりで示す. (D) 単一リボソームの膜突起間の長さ変化. 60 MPaに加圧した領域は色づけた.

チューブリン分子間の非共有結合により数珠つなぎりに結合することで, 直径約 25 nm の細長い管状のフィラメント構造を形成している. その長さは, (精製した系であれ, 細胞内であれ) 数十マイクロメートルにもおよぶため, 比較的簡単に顕微鏡下で観察できる. つまり, 高圧力下で分子間相互作用が弱まるのであれば, そのフィラメント長の変化として検出できるはずである. 現に Salmon らは加圧時に卵母細胞の紡錘体が消失することを観察し, 減圧後に元に戻る様子を報告している⁷⁾. 生細胞では無く *in Vitro* の系を用いれば, 微小管構造に対する圧力の影響をより直接的に検証できるだろう.

まず, 豚脳から精製したチューブリンで微小管を調製した. あらかじめ, 高圧力チャンバーの窓剤にキネシン分子を吸着させておき, 代表的な有糸分裂阻害剤 (10 μM paclitaxel) と 100 μM AMP-PNP 存在下で微小管を固定した. これにより同一微小管のフィラメント構造を追跡できるようになる. 常温常圧力環境下では, paclitaxel により微小管の脱重合反応

は抑制されるため, フィラメント長に大きな変化は見られなかった. しかしながら, 150 MPa の圧力下において, 同じ微小管の蛍光観察を実施したところ, 微小管の両端から同じ速度で短縮する様子を捉えることができた¹⁴⁾ (図 2A). 微小管の短縮速度に異方性はみられず, 圧力増加と共に短縮速度は指数関数的に増加した. この系では, 減圧後に再重合反応は観測されなかったが, これは脱重合したチューブリン分子が高圧力容器内に拡散し大幅に濃度が低下したからであろう.

次に, 人工細胞系を用いて実験を行った. 初め球状に近い形状をしていたリボソームの内部で微小管を重合させると (0.1 MPa, 25°C), 膜の内側から押す力で膜突起が形成された^{15,16)} (図 2C). これらの突起は, 方向性が揃わない微小管数十本程度から構成されていると考えられる. この膜突起をもつリボソームを加圧したところ (60 MPa), わずか数十秒で突起が短縮してしまった¹⁷⁾. その後, すぐに減圧して大気圧に戻し, 同じリボソームの観察を続けたところ, 膜突起はほぼ同じ位置から伸長しはじめ, 約 10 分後には元の長さに

戻った (図 2D). なお, この膜突起の短縮速度も圧力と共に増加した (図 2B). これら 2 つの系の結果を生細胞の結果⁷⁾と比べてみると, 圧力に対する短縮速度の増加率は似ていることが見て取れる (図 2B). これらの結果から, 高圧力は微小管を構成するチューブリン分子間の相互作用に直接作用していることが示唆された.

以上のように, 開発した高圧力顕微鏡を利用して, 2 つの異なる実験系で微小管の重合・脱重合反応をコントロールできることを示すことができた. 高圧力下では, チューブリン分子間の結合部分に水分子が侵入しやすくなり, 解離反応が進行すると考えられる. この水分子による微小管脱重合メカニズムは, 連なったチューブリン分子の MD 計算を併用することで明らかにできるであろう. 計算機実験の場合, チューブリンと水分子を入れる箱を小さくすると高圧力環境をつくりだすことができる. 高圧力顕微鏡を使って得られた結果と, MD 計算から示唆された水分子の動きを照らし合わせることで, 微小管の重合・脱重合の制御機構が明らかにできると期待される. また, 筆者らの高圧力顕微鏡法を応用すれば, 常圧力下よりも速い速度で微小管の解離反応がすすむため, 新しい抗がん剤のスクリーニングの迅速化にも貢献できそうである.

4. 今後の展望

本稿では, 高圧力技術を使って生体分子と周りを取り巻く水との相互作用を操り, 可視化する高圧力顕微鏡法を紹介してきた. 実は最後に紹介した人工細胞の実験は, 細胞サイズの巨大リポソームを可逆的, かつ, 繰り返し変形させることができた世界初の事例であり^{17,18)}, 生体分子からなるマイクロメーターサイズのロボット構築に向けた大きな一歩となるものである.

また, 細胞内には水が大量に含まれているので, 本稿で開発した技術は生きた細胞にも応用できる. 筆者らは, 大腸菌の回転器官であるべん毛モーターを観察したところ, 高圧力下ではモーターが逆向きに回りだすことを発見したところである^{2,3)}. ベン毛モーターには自動車のクラッチのように回転方向を切り替える部位があるので, その分子構造が高圧力下で大きく変化したものと推察される. 高圧力顕微鏡法は,

化学物質も遺伝子操作も使わずに, 細胞や組織の状態を操作できる可能性を秘めており, 今後もメカノバイオロジーの新潮流として発展させていきたい.

謝 辞

本稿の執筆に際して, 常日頃からご支援を頂いている京都大学の原田慶恵教授ならびに, 東京大学の風山祐輝博士, 豊田太郎准教授にお礼申し上げます. 本研究は科学研究費補助金, 武田科学振興財団と中谷医工計測技術振興財団のご支援により達成されたものです.

文 献

- 1) 曾我部正博 (編), メカノバイオロジー, 化学同人, 京都 (2015)
- 2) 西山雅祥, 曾和義幸: 化学, **68**, 33–38 (2013)
- 3) Nishiyama, M.: in Akasaka, K. and Matsuki, M. (Eds.), High Pressure Bioscience—Basic Concepts, Applications and Frontiers, Springer, 593–611 (2015)
- 4) 谷口吉弘: 毛利信男 (編), 新しい高圧力の科学, 講談社, 東京, 244–263 (2003)
- 5) Inoué, S.: Collected Works of Shinya Inoue: Microscopes, Living Cells, and Dynamic Molecules, World Scientific Pub. Co. Inc. (2008)
- 6) Inoué, S.: Pathway of a Cell Biologist—Through Yet Another Eye, Springer Japan, *in press*, DOI: 10.1007/978-981-10-0947-1
- 7) Salmon, E.D.: *J. Cell Biol.*, **65**, 603–614 (1975)
- 8) Vass, H., Black, S.L., Herzig, E.M., Ward, F.B., Clegg, P.S. and Allen, R.J.: *Rev. Sci. Instrum.*, **81**, 053710 (2010)
- 9) 西山雅祥, 木村佳文: LTM センター誌, **22**, 18–27 (2013)
- 10) Nishiyama, M. and Sowa, Y.: *Biophys. J.*, **102**, 1872–1880 (2012)
- 11) 深海と地球の事典編集委員会 (編): 深海と地球の事典, 丸善出版, 東京 (2014)
- 12) 西山雅祥: 特許第 5207300 号 (2013)
- 13) 貝淵弘三 他 (編), 細胞骨格と接着, 共立出版 (2006)
- 14) Nishiyama, M., Kimura, Y., Nishiyama, Y. and Terazima, M.: *Biophys. J.*, **96**, 1142–1150 (2009)
- 15) 宝谷紘一, 神谷 律 (編), 細胞のかたちと運動, 共立出版, 東京 (2000)
- 16) 宝谷紘一, 瀧口金吾: 日本機械学会誌, **103**, 74–77 (2000)
- 17) Hayashi, M., Nishiyama, M., Kazayama, Y., Toyota, T., Harada, Y. and Takiguchi, K.: *Langmuir*, **32**, 3794–3802 (2016)
- 18) Chun A.L.: *Nature Nanotechnology*, **11**, 403 (2016)