

パク質の外に放出されやすくなることが期待されるアミノ酸残基を予想し、それに変異を導入した。得られた変異体が大腸菌に発現させて精製し、試験管内で活性酸素産生活性を評価した後、哺乳類の培養細胞のミトコンドリアに発現させて光照射に伴うアポトーシス誘導の活性を評価した。

### 高性能FRETプローブの作製法の確立

代表的なFRETプローブであるYC3.60やTN-XLに二量体形成を抑制・促進する変異を部位特異的変異導入法により導入し、二量体形成と指示薬の性能との関係を*in vitro*でシステムティックに解析した。また、二量体界面に変異を導入したプローブを生細胞に遺伝子導入し、実際の測定条件下でのプローブの性能を評価した。さらに、こうして得られた知見から帰納的にFRETプローブの設計指針を確立した。

### 化学発光性Ca<sup>2+</sup>指示薬の開発

FRETを用いたCa<sup>2+</sup>プローブであるYC3.60内のCFPを化学発光タンパク質*Renilla* Luciferase (RLuc)へ置換することでBRETをベースとする化学発光性Ca<sup>2+</sup>プローブへと変化させ、そのダイナミックレンジを最大化するためにBRETアクセプターであるVenusの様々な円順列変異体を導入後、それらの性能を試験管内および細胞内で評価した。

## C. 研究結果

### 単量体化KillerRedの波長変異体開発：

mKillerRedの発色団を構成するアミノ酸残基に変異を導入したところ橙色蛍光 (Ex=455nm, Em=544nm) を発するmKiller-0が得られた。さらに発色団と相互作用するアミノ酸に変異を導入することで、吸収・蛍光極大はさらに短波長側へ移行し、緑色蛍光 (Ex=439nm, Em=496nm) を発するmKiller-Gを得ることができた。mKiller-0, mKiller-Gはともに一重項酸素放出量が2-3倍程度に増加し、FITCに匹敵する光増感活性を有することが明らかになった。mKillerRedまたはmKiller-Gを哺乳類細胞のミトコンドリアに発現させ光照射してからアポトーシスが誘導されるまでの時間を比較したところ、mKillerRedは120分以上かかったのに対し、mKiller-Gは10分以内にアポトーシス様の形態変化が観察された。

### 高性能FRETプローブの作製法の確立

蛍光タンパク質の二量体化を抑制・促進する何れの界面変異も、FRETプローブのダイナミックレンジを低下させた。こうした傾向は、今回解析した全てのFRETプローブにおいて見られ、また生細胞内においても*in vitro*の実験結果と同様の結果が得られたことから、FRETプローブの一般的な設計・作成指針となることが明らかとなった。

### 化学発光を原理とする機能プローブの開発

作成した化学発光性Ca<sup>2+</sup>プローブ変異体の中から最も大きなダイナミックレンジ (60%) を持つものを見出しBRACと名付けた。BRACのCa<sup>2+</sup>解

離定数 (Kd値) は1.9  $\mu\text{M}$ であり、生理的pHに対しては安定な応答を示すことが明らかとなった。また、をHeLa細胞に発現させ、10  $\mu\text{M}$ のヒスタミン刺激を加えることで、数十秒周期での $\text{Ca}^{2+}$ 振動を確認する事に成功した。

## D. 考察

### 単量体化KillerRedの波長変異体開発

これまでに報告例がない光照射依存的に活性酸素を産生する蛍光タンパク質の緑およびオレンジ蛍光変異体の開発に成功したことで、一つの細胞内における複数種のタンパク質の機能を光照射により不活性化させることが可能になった。これにより動的なタンパク質間ネットワークの機能連関が解析可能になると期待される。

### 高性能FRETプローブの作製法の確立

FRETプローブのアクセプターに円順列変異体を用いるとFRET効率が上昇することが従来から知られていたが、この理由として双極子モーメントを回転させることによる方向因子の最適化による影響が考えられていた。しかし、こうした円順列変異体はドナーとアクセプターの位置関係をアンチパラレルにすることと、上記の界面変異の解析結果とから、蛍光タンパク質ドメインの効率的な二量体化がFRETプローブのダイナミックレンジを決定する大きな要因であることが示された。さらに、オワンクラゲ由来以外の蛍光タンパク質において高いFRET効率を達成出来ていない原因として、これらの蛍光タンパク質の二量体形成が抑制され

ていることが推測された。

### 化学発光を原理とする機能プローブの開発

BRACはこれまで開発されてきたFRETを原理とする $\text{Ca}^{2+}$ 指示薬 (YC3.1等) と同程度のKd値を持ち、生理的に安定した応答を示す事から、細胞内や組織内の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度測定に応用可能であることが示唆された。また、これまで発光性の $\text{Ca}^{2+}$ 指示薬はAequorinや分割Rluc、Gluc等があったが、それらは繰り返しの $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇に追従できなかつたため、 $\text{Ca}^{2+}$ 振動のような長時間に渡る周期的変動を測定するのは困難であった。BRACでは発光性でありながら、数十秒周期の $\text{Ca}^{2+}$ 振動を観察することができ、これまでに無い画期的な化学発光性 $\text{Ca}^{2+}$ プローブとして有用である。特に、自家蛍光が強い植物における $\text{Ca}^{2+}$ 観察に威力を発揮するものと期待される。

## E. 結論

KillerRedの単量体化と生理機能は開放への応用：光照射依存的に活性酸素を産生する光増感型蛍光タンパク質の緑およびオレンジ蛍光変異体の開発に成功した。これらはmKillerRedに比べ活性酸素の放出量が2-3倍増加しており、細胞内でも強い光毒性を示した。

### 高性能FRETプローブの作製法の確立

FRETプローブの高性能化には、ドナー・アクセプタ界面の最適化による適度な二量体化が重要であり、これはFRETプローブの設計・作成において一般的な指針であることが明らかにな

った。

## 化学発光を原理とする機能プローブの開発

化学発光性Ca<sup>2+</sup>プローブBRACを開発した。これにより、自家蛍光を誘発する励起光を照射することなく細胞内のCa<sup>2+</sup>動態を長時間に渡り観察することができるようになった。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) Saito K, Hatsugai N, Horikawa K, Kobayashi K, Matsu-ura T, Mikoshiba K, Nagai T. Auto-luminescent genetically-encoded ratiometric indicator for real-time Ca<sup>2+</sup> imaging at the single cell level. *PLoS ONE*, in press
- (2) Lütcke H, Murayama M, Hahn T, Margolis DJ, Astori S, Borgloh SMzA, Göbel W, Yang Y, Tang W, Kügler S, Sprengel R, Nagai T, Miyawaki A, Larkum ME, Helmchen F, Hasan MT. Optical recording of neuronal activity with a genetically-encoded Ca<sup>2+</sup> indicator in anesthetized and freely moving mice. *Frontiers in Neural Circuit*, in press
- (3) Hong JH, Min CH, Jeong B, Kojiya T, Morioka E, Nagai T, Ikeda M, Lee K, *PLoS ONE*, in press
- (4) Kotera I, Iwasaki T, Imamura H, Noji H, Nagai T. Reversible dimerization of *Aequorea victoria* fluorescent proteins increases the dynamic range of FRET-based indicators. *ACS Chem Biol*. 5:215-222, 2010
- (5) Imamura H, Nhat KPH, Togawa H, Saito K, Iino R, Kato-Yamada Y, Nagai T, Noji H. Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. *Proc. Natl, Acad, Sci. USA* 106:15651-15656, 2009
- (6) Iwano M, Entani T, Shiba H, Kakita H, Nagai T, Mizuno H, Miyawaki A, Shoji T, Kubo K, Isogai A and Takayama S. Fine-tuning of the cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> concentration is essential for pollen tube growth. *Plant Physiology*, 150: 1322-1334, 2009
- (7) Tomosugi W, Matsuda T, Tani T, Nemoto T, Kotera I, Saito K, Horikawa K & Nagai T. An ultramarine fluorescent protein with increased photostability and pH insensitivity. *Nature Methods* 6: 351-353, 2009
- (8) 永井健治、小林健太郎  
1波長励起 Dual FRET による生細胞内における複数現象の可視化  
*実験医学*、28: 589-598, 2010
- (9) 野地博行、永井健治 生命システムの階層間をまたぐイメージング技術 蛋白質 核酸 酵素、54:1913-1917, 2009
- (10) 堀川一樹、永井健治 細胞結合振動システムを対象にした超高感度大規模イメージング 蛋白質 核酸 酵素、54:1945-1951, 2009
- (11) 永井健治、松田知己 生細胞内でのタンパク質動態測定とその意義 *生物物理*、49: 181-186, 2009

- (12) 永井健治、松田知己 光スイッチング蛍光タンパク質を用いた生細胞内でのタンパク質動態定量法 日本組織細胞化学会編、組織細胞化学 2009, 99-105、2009
- (13) 小寺一平、永井健治 ワンステップ全自動プラスミド構築方法 細胞工学、28:402-407, 2009
- (14) 永井健治 光スイッチング蛍光タンパク質を用いた超解像観察法 分光研究、58:7-9, 2009
- (5) S. J. Lee<sup>1</sup>, S. V. Alworth, C. Huang, S. Oh, H. Watanabe, K. Saito, K. Horikawa, M. Nomura, T. Tani, I. Nagai "Automated Kinetic Characterization of Intracellular Single Molecule Trafficking" 49th Annual Meeting of American Society for Cell Biology, 2009.12.5-9 (San Diego Convention Center, USA)

## 2. 学会発表

- (1) Nagai I. "Toward elucidation of biological enigma by genetically-encoded molecular spies" International Symposium on Watching Biomolecules in Action, 2009.12.16 (Senri Life Science Center, Osaka)
- (2) 永井健治 「蛍光タンパク質テクノロジーの展望 - 観て触って探る生命の不思議 -」平成21年度生理学研究所シナプス研究会「シナプス機能と病態」、2009.12.14 (生理学研究所、岡崎市)
- (3) 小寺一平, 岩崎卓也, 今村博臣, 野地博行, 永井健治 「A new way to make your FRET-based indicator more efficient: dimerization interface engineering of fluorescent protein」第32回日本分子生物学会年会、2009.12.9 (パシフィコ横浜、横浜市)
- (4) 永井健治 「蛍光タンパク質性機能プローブの精密設計とバイオイメージングへの応用」第7回脳科学研究教育センターシンポジウム、2009.12.9 (北海道大学、札幌市)
- (6) Takeharu Nagai "Toward understanding biological phenomena by genetically-encoded molecular spies" BIT's 3rd Annual World Congress of Gene-2009, 2009.12.4 (Foshan Sansui Golden Sun Hotel, China)
- (7) 永井健治 「FRET指示薬」第14回細胞生物学ワークショップ、2009.11.24 (北海道大学、札幌市)
- (8) 永井健治 「蛍光タンパク質テクノロジー」第14回細胞生物学ワークショップ、2009.11.22 (北海道大学、札幌市)
- (9) 永井健治 「Toward understanding biological phenomena by genetically-encoded molecular spies」2009年生物物理・生化学・分子生物学会北海道支部会合同年会、2009.11.13 (北海道大学、札幌市)
- (10) Takeharu Nagai "Toward understanding biological phenomena by genetically-encoded molecular spies" Molecular Imaging for Systems Biology, 2009.11.6 (Okazaki Conference Center, Okazaki)
- (11) Tomoki Matsuda, Atsushi Miyawaki, Takeharu Nagai "Direct measurement of

- protein dynamics in single living cells using a photoconvertible fluorescent protein Phamret” Fluorescent proteins and biological sensors II, 2009.11.1-4 (Jenelia farm/HHMI, Ashburn(USA))
- (12) 永井健治 「蛍光タンパク質を巧妙に用いた生理機能動態の可視化」第47回日本生物物理学会年会、2009.10.30(アスティ徳島、徳島市)
- (13) 小寺一平、岩崎卓也、今村博臣、野地博行、永井健治 「The effects on the dynamic range of FRET indicators by the mutations in the dimerization interface of fluorescent proteins」第47回日本生物物理学会年会、2009.10.30(アスティ徳島、徳島市)
- (14) 植松利亮、小寺一平、斎藤健太、初谷紀幸、堀川一樹、永井健治 「Toward long time physiological imaging of plant cells with reduced autofluorescence by using a Ca<sup>2+</sup> indicator composed of a red-shifted FRET pair」第47回日本生物物理学会年会、2009.10.30-11.1(アスティ徳島、徳島市)
- (15) 永井大輔、谷知己、永井健治 「Correlation among dipole orientation, FRET efficiency and dynamic range of FRET-based indicators」第47回日本生物物理学会年会、2009.10.30-11.1(アスティ徳島、徳島市)
- (16) Takeharu Nagai “Toward elucidation of dynamic living system by hierarchical molecular imaging” 82th Annual meeting of JBS, 2009.10.21 (Kobe Convention Center, Kobe)
- (17) Takeharu Nagai “Vivid visualization of biological functions using fluorescent protein-based molecular spies” 91th G-COE seminar, 2009.10.20 (Kyusyu University, Fukuoka)
- (18) Takeharu Nagai “Toward understanding biological enigma by genetically-encoded molecular spies” Hokkaido University-Academia Sinica Joint Symposium, 2009.10.7 (Hokkaido University, Sapporo)
- (19) 永井健治 「GFP は何故光るか？-機能指示薬作成法と生理機能の可視化/フェルスター共鳴エネルギー移動(FRET)を利用したバイオセンサー作成法」第5回ライブセルイメージング講習会、2009.10.6 (産業技術総合研究所つくばセンター、つくば市)
- (20) 永井健治 「Visualization of Cellular Functions and Dynamics by the Smart Use of Fluorescent Proteins」30th iCeM Seminer、2009.9.28 (京都大学吉田キャンパス、京都市)
- (21) 永井健治 「新規蛍光タンパク質の開発とバイオイメージングへの応用」BioOpto Japan 2009、2009.9.17 (パシフィコ横浜、横浜市)
- (22) 永井健治 「Vivid visualization of biological functions using fluorescent protein-based molecular spies」非常勤講師、2009.9.16 (熊本大学、熊本市)
- (23) 永井健治 「Deciphering enigma of biological functions by genetically-encoded molecular spies」東大医科研大学院セミナー

- 「分子と生命現象の可視化」、2009.9.14 (東京大学医科学研究所、東京都港区)
- (24) 永井健治「Toward elucidation of biological enigma by genetically-encoded molecular spies and snipers」第2回 スイス-日本 生命化学シンポジウム、2009.9.12 (東京大学駒場キャンパス、東京都目黒区)
- (25) 永井健治「Perspective of bioimaging and biomanipulation techniques」International Symposium of post-silicon materials and devices research alliance project International Symposium "Innovative Nanoscience of Supramolecular Motor Proteins"、2009.9.8 (京都大学芝蘭会館、京都市)
- (26) 永井健治「Molecular Nano-Mechanics & Bio-Mechanics Research Group(G3)」International Symposium of post-silicon materials and devices research alliance project、2009.9.6 (大阪大学銀杏会館、吹田市)
- (27) 永井健治「革新的蛍光タンパク質技術による生命現象の解明に向けて」非常勤講師、2009.9.3 (東京大学医学部、東京都港区)
- (28) Ippei Kotera, Takeharu Nagai "Utilization of type IIS restriction enzyme for single-molecule DNA sequencing and in vitro DNA recombination " The EMBO Meeting2009、2009.8.29-9.1 (Amsterdam RAI, Amsterdam)
- (29) 松田知己、宮脇敦史、永井健治「蛍光・化学発光タンパク質の基礎と応用」第18回浜松医科大学メディカルホトニクス・コース、2009.8.25 (浜松医科大学、浜松市)
- (30) Takeharu Nagai "Toward understanding biological phenomena by genetically-encoded molecular spies " Inviting Talk, 2009.8.19 (NIH, Bethesda(USA))
- (31) Takeharu Nagai "Rational design of photoswitchable fluorescent probes and its use for bioimaging" 238th American Chemical Society Meeting, 2009.8.18 (Washington Convention Center, Washington DC(USA))
- (32) 松田知己、宮脇敦史、永井健治「光変換蛍光タンパク質による生きた細胞内のタンパク質動態測定」光イメージング若手の会「光塾」第1回、2009.8.15-16 (未来ICT研究センター、神戸市)
- (33) 松田知己、宮脇敦史、永井健治「光変換蛍光タンパク質による生きた細胞内のタンパク質動態測定」光イメージング若手の会「光塾」第1回、2009.8.15-16 (未来ICT研究センター、神戸市)
- (34) Kazuki Horikawa, Takeharu Nagai "Constructive role of noise in self-organized pattern formation in social amoeba "The Third q-bio Conference on Cellular Information Processing, 2009.8.8 (John's College ,Santa Fe(USA))
- (35) 永井健治「Deciphering Enigma of Biological Function by Genetically-encoded

- Molecular Spies」光イメージング国際シンポジウム、2009.8.1 (京王プラザホテル、札幌市)
- (36) 永井健治「蛍光タンパク質テクノロジーの最前線」第34回組織細胞化学会講習会、2009.7.29 (徳島大学長井記念ホール、徳島市)
- (37) 永井健治「レーザーが拓く新たな蛍光タンパク質技術」第2回「レーザーをライフサイエンスに橋渡しする」専門委員会、2009.7.24 (北海道大学、札幌市)
- (38) Kazuki Horikawa, Takeharu Nagai “Ca<sup>2+</sup> dynamics in large-scale cellular networks visualized by ultra-sensitive Ca<sup>2+</sup> probe, “cameleon Nano” 2009 Gordon Research Conferences calcium signaling, 2009.7.16 (Il Ciocco Hotel ,Lucca(Italy))
- (39) Takeharu Nagai “Tune-up of FRET-based functional indicators for high sensitive bioimaging” Application Trends of Live Cell Imaging, 2009.7.17 (Ewha Woman University, Soul(Korea))
- (40) Takeharu Nagai “Deciphering enigma of biological function by a genetically-encoded fluorescent indicator” Gordon Research Conferences (Fertilization & Activation Of Development), 2009.7.13 (the Holderness School in Plymouth, NH(USA) ,Plymouth)
- (41) 永井健治「階層間分子イメージングによる動的な生命システム解明へのアプローチ」非常勤講師、2009.7.3 (長崎大学医学部良順会館ボードインホール、長崎市)
- (42) 永井健治「タンパク質でできた分子スパイによる細胞内非平衡現象の可視化」ソフトマター物理第4回領域研究会、2009.7.2 (北海道大学、札幌市)
- (43) 松田知己、宮脇敦史、永井健治「光変換蛍光タンパク質による生きた細胞内のタンパク質動態測定」第8回北陸ポストゲノム研究フォーラム、2009.6.11 (金沢大学十全講堂、金沢市)
- (44) 永井健治「生理機能・動態を計測するための蛍光タンパク質技術」第9回日本蛋白質科学会年会、2009.5.22 (熊本全日空ホテルニュースカイ、熊本市)
- (45) 松田知己、堀川一樹、永井健治「生体組織内の1細胞レベルでの機能イメージングを可能にする光活性型生理機能プローブ」第9回日本蛋白質科学会年会、2009.5.22 (熊本全日空ホテルニュースカイ、熊本市)
- (46) 堀川一樹 永井健治「生体内ライブイメージングを可能にするバイオプローブの開発」ナノテクノロジー研究センター、2009.5.21 (北海道大学、札幌市)
- (47) 齊藤健太、小林健太郎、谷知己、永井健治「A mercury Arc Lamp-Based Multi-Color Confocal Real Time Imaging System for Cellular Structure and Function」第9回 NIBB-EMBLシンポジウム、2009.4.22 (岡崎コンファレンスセンター、岡崎市)
- (48) 永井健治「Measurement of Diffusion Coefficient of Biomolecules by Fluorescence Decay After Photostimulation of

Photoswitchable Fluorescent Proteins in  
Living Cells」第9回NIBB-EMBLシンポジウム、  
2009.4.21 (岡崎コンファレンスセンター、岡崎  
市)

(49) Takeharu Nagai “Multifunctional imaging  
by genetically-encoded homo-FRET-based  
indicator” Focus On Microscopy 2009、  
2009.4.7 (Jagiellonian University  
Auditorium Maximum Krakow, Poland)

#### I. 知的財産権の出願・登録状況

- (1) 特願 2010-22603、光増感性蛍光タンパク質
- (2) 特願 2009-149338、蛍光温度プローブおよびそれを用いた温度測定装置
- (3) 特願 2009-233826、光活性化生理機能センサータンパク質



## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Morone N and Aoyama K	Structural Analysis of Cell Membranes by Small Convergence Angle HAADF-STEM Tomography	Kenbikyo			2009
Nishikawa T, Iwakiri N, Kaneko Y, Taguchi A, Fukushima K, Mori H, Morone N, Kadokawa J.	Nitric oxide release in human aortic endothelial cells mediated by delivery of amphiphilic polysiloxane nanoparticles to caveolae.	Biomacromolecule	10(8)	2074-85	2009
木森義隆、諸根信弘、片山栄作	Mathematical morphologyに基づくバイオイメージからの構造情報の抽出と解析	顕微鏡	44	1-6	2009
Kunimoto S, Nakamura S, Wada K, Inoue T.	Cronic Stress-mutated presenilin 1 gene interaction perturbs neurogenesis and accelerates	Exp Neurol.	221	175-185	2010
Fukumoto N, Takashi F, Kamboh MI, Tsai S-J, Matsushita S, Nacmias B, Comings D, Arboleda H, Ingelsson M, Hyman B, Akatsu H, Nishimura A, Zata M, Mattila K, Goto Y, Asada T, Nakamura S, Kunigi H.	Sexually dimorphic effect of the Val66Met Polymorphism of BDNF on susceptibility to Alzheimer's disease:new data and meta-analysis.	Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet	153B	235-242	2010
Goto, A., Wang, Y.L., Kabuta, T., Setsuie, R., Osaka,	Proteomic and histochemical analysis of proteins involved in the	Neurochem. Int.	54	330-338	2009

H., Sawa, A., Ishiura, S., Wada, K.	dying-back-type of axonal degeneration in the gracile axonal dystrophy (gad) mouse.				
Setsuie, R., Sakurai, M., Sakaguchi, Y., Wada, K.	Ubiquitin dimers control the hydrolase activity of UCH-L3.	Neurochem. Int.	54	314-321	2009
Kabuta, T., Kinugawa, A., TsUCHiya, Y., Kabuta, C., Setsuie, R., Tateno, M., Araki, T., Wada, K.	Familial amyotrophic lateral sclerosis-linked mutant SOD1 aberrantly interacts with tubulin.	Biochem Biophys Res Commun.	387	121-126	2009
Higashi. S., Moore, D.J., Biskup, S., Yamamoto, R., Minegishi, M., Sato, K., Togo, T., Katsuse, O. UCHikada, H., Furukawa, Y., Hino, H., Kosaka, K., Emson, P.C., Wada, K., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Arai, H., Iseki, E.	Abnormal localization of Leucine-Rich Repeat Kinase 2 to the endosomal-lysosomal compartment in Lewy body disease.	J. Neuropathol. Exp. Neurol.	68	994-1005	2009
Kunimoto S., Nakamura, S., Wada, K Inoue, T.	Chronic Stress-mutated presenilin 1 gene interaction perturbs neurogenesis and accelerates neurodegeneration.	Exp. Neurol.	221	175-185	2010
Nagai, Y., Fujikake, N., Popiel, A., Wada, K.	Induction of molecular chaperones as a therapeutic strategy for the polyglutamine diseases.	Curr. Pharm. Biotechnol.			2010
Maekawa M, Namba T, Suzuki E, Yuasa S, Kohsaka S, <u>Uchino S.</u>	NMDA receptor antagonist memantine promotes cell proliferation and production of mature granule neurons in the adult hippocampus.	Neurosci. Res.	63	259-266	2009
Namba T, Maekawa T, Yuasa S, Kohsaka S, <u>Uchino S.</u>	The Alzheimer's disease drug memantine increases the number of radial glia-like progenitor cells in the adult hippocampus.	GLIA	57	1082-1090	2009
Namba T, Yabe T, Gonda Y, Ichikawa N, Sanagi T, Hirasawa E, Mochizuki H, Kohsaka S, <u>Uchino S.</u>	PEDF up-regulation induced by memantine, an NMDA receptor antagonist, is involved in the increased proliferation hippocampal progenitor cells.	Neuroscience		In press	2010
Saito K, Hatsugai N,	Auto-luminescent	PLoS ONE			in press

Horikawa K, Kobayashi K, Matsu-ura T, Mikoshiha K, Nagai T	genetically-encoded ratiometric indicator for real-time Ca <sup>2+</sup> imaging at the single cell level.				
Lütcke H, Murayama M, Hahn T, Margolis DJ, Astori S, Borgloh SMzA, Göbel W, Yang Y, Tang W, Kügler S, Sprengel R, Nagai T, Miyawaki A, Larkum ME, Helmchen1 F, Hasan MT	Optical recording of neuronal activity with a genetically-encoded Ca <sup>2+</sup> indicator in anesthetized and freely moving mice.	Frontiers in Neural Circuit			in press
Hong JH, Min CH, Jeong B, Kojiya T, Morioka E, Nagai T, Ikeda M. Lee K	PLoS ONE				in press
Kotera I, Iwasaki T, Imamura H, Noji H, Nagai T	Reversible dimerization of Aequorea victoria fluorescent proteins increases the dynamic range of FRET-based indicators.	ACS Chem Biol.	5	215-222	2010
Imamura H, Nhat KPH, Togawa H, Saito K, Iino R, Kato-Yamada Y, Nagai T, Noji H	Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators.	Proc. Natl, Acad, Sci. USA	106	15651-156 56	2009
Iwano M, Entani T, Shiba H, Kakita H, Nagai T, Mizuno H, Miyawaki A, Shoji T, Kubo K, Isogai A, Takayama S	Fine-tuning of the cytoplasmic Ca <sup>2+</sup> concentration is essential for pollen tube growth.	Plant Physiology	150	1322-1334	2009
Tomosugi W, Matsuda T, Tani T, Nemoto T, Kotera I, Saito K, Horikawa K, Nagai T	An ultramarine fluorescent protein with increased photostability and pH insensitivity.	Nature Methods	6	351-353	2009
永井健治、松田知己	生細胞内でのタンパク質 動態測定とその意義	生物物理	49	181-186	2009
永井健治、松田知己	光スイッチング蛍光タン パク質を用いた生細胞内 でのタンパク質動態定量 法	日本組織細胞化 学会編、組織細胞 化学 2009		99-105	2009
永井健治	光スイッチング蛍光タン パク質を用いた超解像観 察法	分光研究	58	7-9	2009

小収束角 HAADF-STEM トモグラフィによる細胞膜構造の解析  
～次世代のフリーズエッチトモグラフィの可能性に向けて～Structural Analysis of Cell Membranes  
by Small Convergence Angle HAADF-STEM Tomography諸 根 信 弘<sup>a</sup>, 青 山 一 弘<sup>b</sup>

Nobuhiro Morone and Kazuhiro Aoyama

<sup>a</sup>国立精神・神経センター神経研究所<sup>b</sup>日本エフィー・アイ株式会社アプリケーションラボラトリー

**要 旨** 細胞膜の細胞質側表面を急速凍結・ディープエッチング像で観察すると、カベオラやクラスリン被覆ピット、アクチン膜骨格のネットワークによってアンジュレーションが激しいことがわかる。本特集では、このように視野全体で大きく焦点距離が異なる構造のプラチナレプリカについて、取差補正付き3コンデンサシステムを持った電子顕微鏡を利用して、従来のTEMトモグラフィと収束角を変化させたSTEMトモグラフィによる3次元再構築像を比較した。小収束角HAADF-STEMトモグラフィによる3次元再構築では、ミッシングウェッジによる計算上のアーティファクト（ゴースト）がほとんど生じないことが初めて明らかとなった。細胞膜研究の新しいツールとして期待できる。

キーワード：細胞膜、クラスリン被覆ピット、フリーズエッチ、STEM収束角、HAADF-STEMトモグラフィ

## 1. はじめに：細胞膜構造とSTEMトモグラフィ

細胞膜の厚さは僅か5 nmではあるが、電子顕微鏡で観察すると膜表面のアンジュレーションが激しいことがわかる。特に、細胞質側表面には、クラスリン被覆ピットやカベオラ、アクチン膜骨格などの膜ドメインに関わる構造が構築されているため、通常の2次元透過像で観察される以上に、膜表面の凹凸が著しく、複雑な3次元構造が形成されている。これまでに、私たちは、急速凍結した細胞膜をディープエッチング後にロータリーシャドウウィングしたプラチナレプリカを試料として、電子線トモグラフィによる3次元再構築法（Freeze-etch Tomography：フリーズエッチトモグラフィ）を開発してきた。特に、細胞質側表面から10 nm領域にあるアクチン線維のメッシュワークを「膜骨格」と定義して、このアクチン膜骨格で囲まれたメッシュの大きさを3次元定量解析することに成功した<sup>1)</sup>。この電子線トモグラフィによる結果は、超高速ビデオカメラによる、生きた細胞膜上での膜分子の1分子運動解析と良い相関性を示すと同時に、膜骨格フェンスモデルの構造的基盤を初めて明らかにした<sup>1~4)</sup>。

このようなアンジュレーションの激しい生物試料を、より高い分解能で観察するためには、①厳密には焦点距離の異なる

複数の観察点に対して、より多く焦点を併せることが要求される。併せて、②金属レプリカ試料のプラチナが持つ高いコントラストは、焦点を合わせるうえで有効であると期待できるため、このような元素番号効果を活かした観察法が望まれる。

本特集の別稿で議論されているように、最近、生物分野においてもSTEM (Scanning Transmission Electron Microscope) トモグラフィを用いた3次元構造解析がTEMトモグラフィに対して多くの優位点を持つことが明らかになってきた<sup>5,6)</sup>。本稿では、既述の課題①②を検討するために、アンジュレーションの激しいプラチナレプリカに対して、STEMトモグラフィを試みた。その結果、小収束角HAADF (High-Angle Annular Dark-Field) モードで、これまで以上に優れた3次元再構築像が得られたので、その実験的試行錯誤を概説したい。

## 2. STEMトモグラフィとプローブ収束角

青山らの論文<sup>5)</sup>でも注目されている、厚みのある試料のSTEMトモグラフィでは、その入射電子線によるプローブの収束角 (Convergence Angle) が得られる3次元再構築像の画質に大きく影響する。簡単な光学的考察から明らかなように (図1)、収束角を小さくすれば被写界深度が深くなり、より広い範囲でフォーカスのあった像を撮ることができるためである。これは、普通の一眼レフカメラにおける絞りの役割と同じであり、逆に収束角を大きくとることにより極端に

<sup>a</sup> 〒187-8502 東京都小平市小川東町4-1-1

E-mail: morone@ncnp.go.jp

2009年8月29日受付

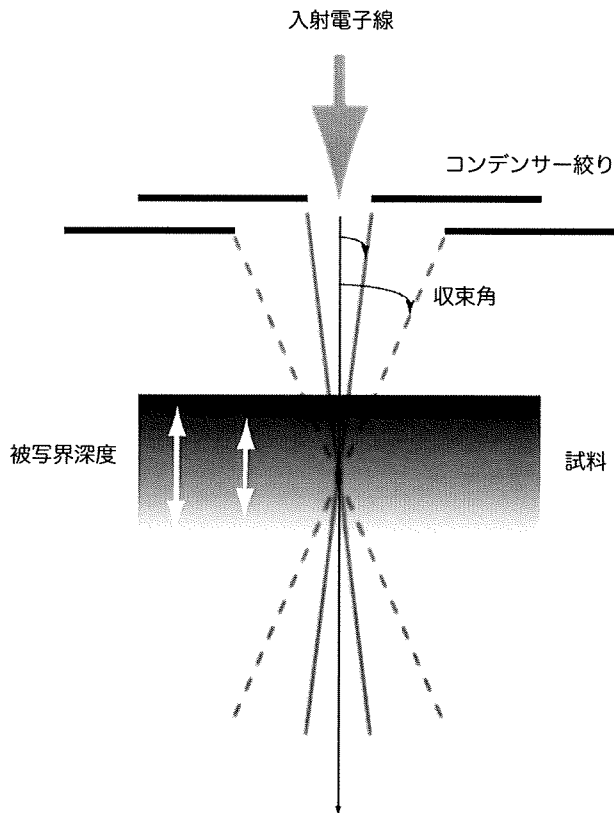


図1 電子線収束角と被写界深度の関係

STEMでは収束した電子線を走査するが、この収束角を変えることにより被写界深度の深さを変えることができる。つまり、小さいコンデンサ絞りを用いて、入射電子線の収束角を小さくすれば、より広い範囲でボケの少ない像を得ることができる。アンジュレーションの激しい試料を観察するためには小さい絞りを有利である。

浅い被写界深度とすることも可能である。フリーズレプリカを試料とし、高い分解能での構造解析を行おうとした場合、厚み方向の凹凸が問題となる。つまり、飛び出した部分とへこんだ部分の両方にフォーカスをあわせられなければ精密な構造解析はできない。これはトモグラフィのために試料を高傾斜した場合にも要求される。現在の自動化されたトモグラフィデータ取得システムでは、高傾斜時にも全体にフォーカスをあわす機能(ダイナミックフォーカス)およびオートフォーカス機能が備わっているが、高傾斜した凹凸の多い試料で全視野に対してフォーカスのあった像を撮影するためには被写界深度の深さは非常に重要である。

実際、ディープエッチングされた細胞膜の細胞質側表面には、直径7~9 nmのアクチン線維のネットワークが3次元的に絡んで広がっている。そのなかに、膜陥入構造である直径100~300 nmのクラスリン被覆ピットや直径50~80 nmのカベオラがドメインを形成している(図2)。そのため、試料傾斜角が0度のときでも、同一視野で観察される構造物には、100 nm以上の高低差があることになる。これまで私たちが実施してきたフリーズエッチトモグラフィでは、細胞

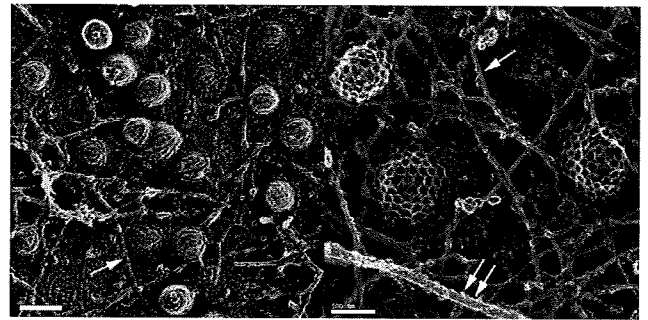


図2 繊維芽細胞の細胞質側表面のディープエッチング像カベオラ(左図)やクラスリン被覆ピット(右図)の間をアクチン膜骨格のネットワーク(1本矢印)や微小管(2本矢印)が走っている。

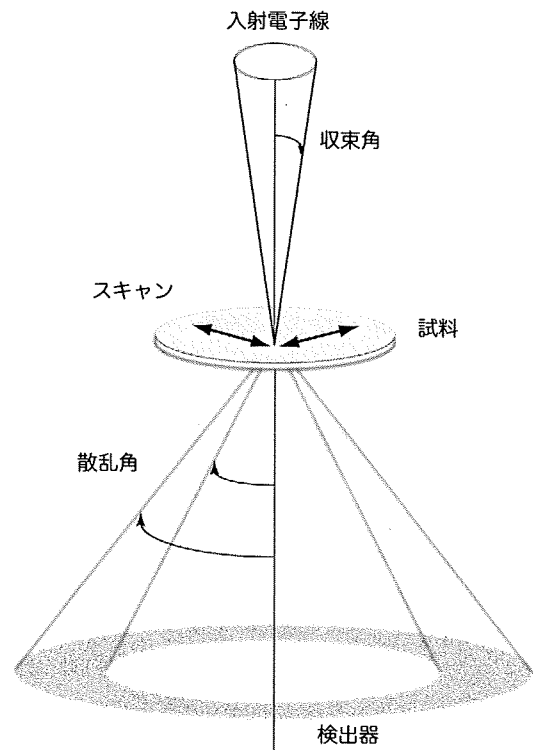


図3 HAADF-STEMと試料の関係

HAADF検出器で検出される電子線の高角散乱強度は、試料に含まれる原子の原子番号の2乗に比例する。本研究で扱うフリーズレプリカ試料は、高い像コントラストが期待できる。

質側表面から10 nmまでに広がるアクチン膜骨格で囲まれる領域が、50~200 nm程度であることを明らかにした。そのため、従来のTEMトモグラフィでも、解像度の面では充分であった。しかし、アクチンフィラメントの5.5 nm間隔のストライプ模様や、カベオラやクラスリン被覆ピットに特徴的な表面模様のような、タンパク質複合体の分子構造を反映した構造を、アンジュレーションの激しい視野で定量評価するためには、小収束角STEMトモグラフィのような次世代の可視化技術が必要である。

### 3. HAADF-STEM トモグラフィとプラチナレプリカ

本研究で扱った STEM は、高角環状暗視野 (HAADF: High-Angle Annular Dark-Field) モードの特徴を良く生かしている。この方法では、非常に小さく絞った電子線を試料にあてて、プローブの位置を変えてスキャンしながら、散乱強度をマッピングする (図 3)。このとき、電子線の高角散乱強度は、試料に含まれる原子の原子番号の 2 乗に比例する。本研究のフリーズレプリカ試料は、プラチナ (Pt: 原子番号  $Z=78$ ) で作製されているため、原子番号効果により、高い像コントラストが期待できる<sup>7-9)</sup>。実際、小収束角と HAADF の条件を効果的に調整することで、フリーズレプリカのトモグラムが実現できたので、その詳細を説明したい。

### 4. 小収束角 HAADF-STEM トモグラフィの実際

これまでの電子顕微鏡では広い範囲で収束角を自由自在に変更することは難しかったが、本研究では、3枚の集束レンズを持つ Titan80-300 (FEI) により、小収束角 HAADF-STEM トモグラフィが可能となった。また、今回使用した装

表 1 本研究で比較された電子線トモグラフィの観察条件

	収束角 mrad*	3次元再構成
小収束角 STEM tomography	0.5	SIRT**
大収束角 STEM tomography	15	SIRT**
TEM tomography		SIRT**

mrad\*:  $2\pi \text{ rad} = 360^\circ$  なので、 $0.5 \text{ mrad} = \text{約} 0.0285^\circ$

SIRT\*\*: Simultaneous Iterative Reconstruction Tomography

連続傾斜像の取得: Titan80-300 (FEI)

3次元再構築の計算: Inspect3D (FEI) と ResolveRT Amira for microscopy (Mercury computer systems, Inc)

置は集光系の収差補正装置を実装しているため、収束角を非常に小さくしても STEM プローブを充分小さく絞ることが可能であり、分解能低下も問題とならなかった。従来装置 (例えば FEI TECNAI F30ST) でも、極端に小さいコンデンサ絞りを使う場合、小さい収束角を作ること自体は可能ではあるが、このとき極端な電子量の減少と分解能の低下を招くことになり、実用には耐えない。詳細については本稿では触れないが、3枚の集光レンズで構成された集光系により電子線量

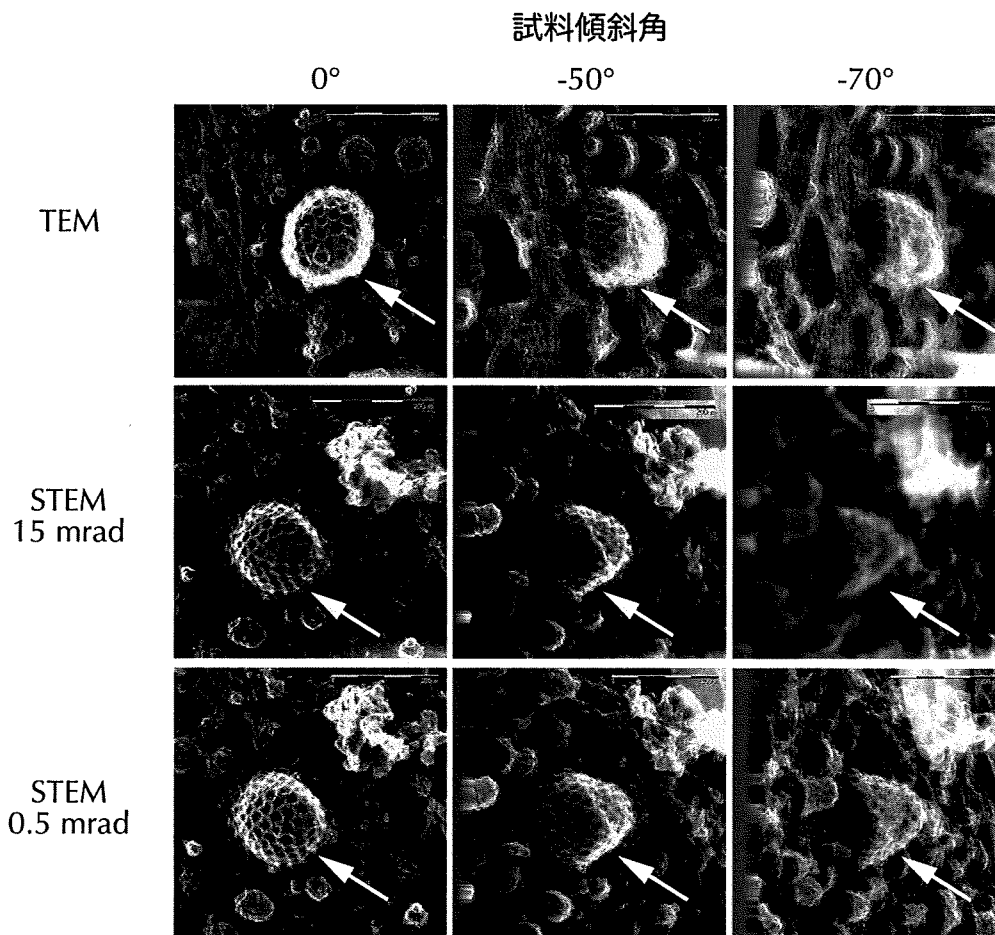


図 4 小収束角 STEM 像では高傾斜角でも視野全体に焦点があっている

従来の TEM に加えて、広収束角 (15 mrad) STEM と小収束角 (0.5 mrad) STEM モードでの観察像を、試料傾斜角 0 度と -50 度 (あるいは -70 度) で比較した。各観察モードで、白い矢印は同一のクラスリン被覆ピットを示している。

は変えずに収束角だけ変化させるということが可能となったことも、明記しておきたい。

本研究では、マウス胎児由来線維芽細胞の細胞質側表面を裸出させ、急速凍結・ディープエッチング・ロータリーシャ

ドーウィングを経て、プラチナ製のフリーズレプリカを調製した。このレプリカ試料を用いて、小収束角STEMトモグラフィ、大収束角のSTEMトモグラフィ、TEMトモグラフィによる3つのデータを比較した。加速電圧は300 kV, STEM

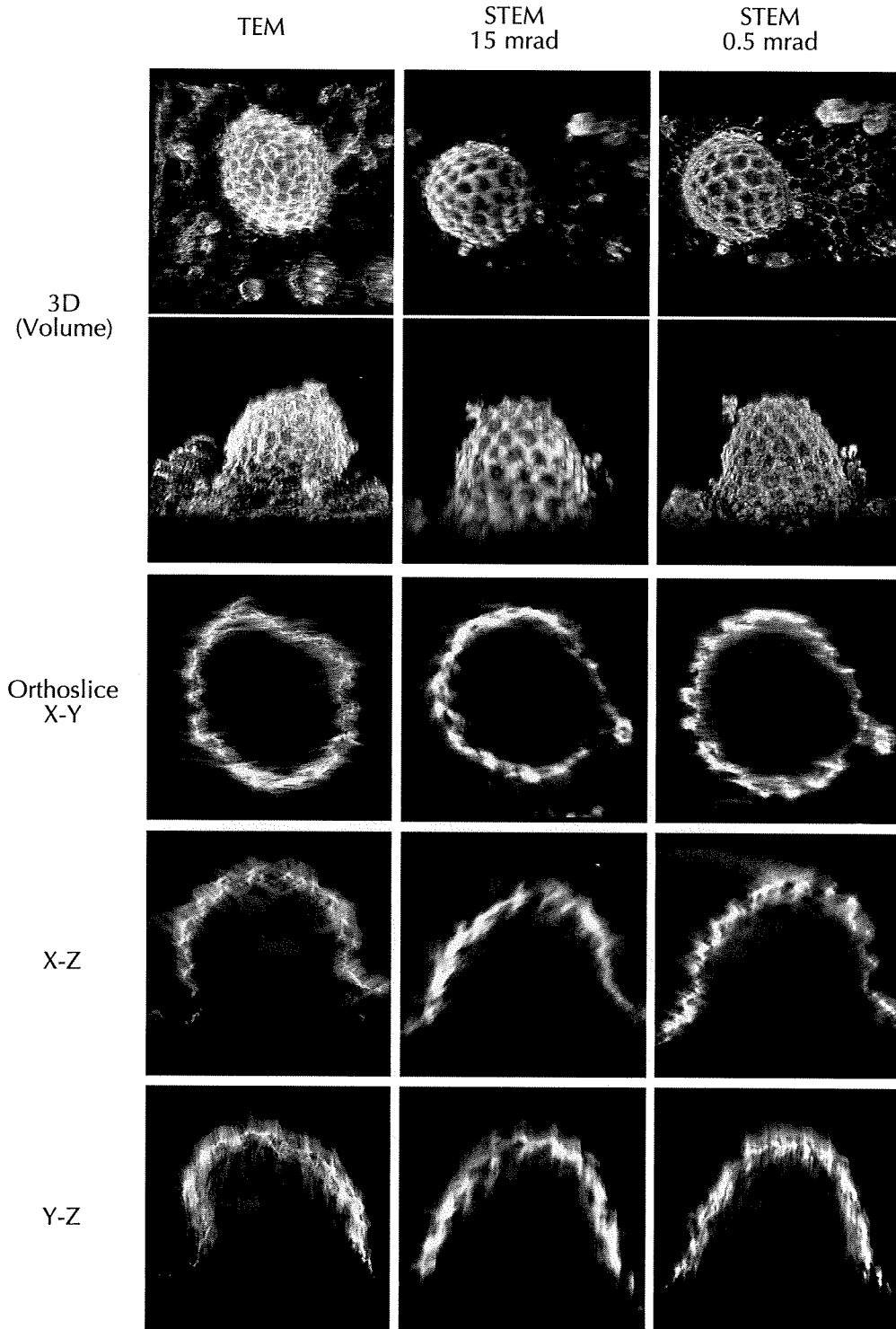


図5 小収束角STEMトモグラフィによる3次元再構築像ではアーティファクトによるゴーストがない。ボリュームレンダリングによる3次元像とオルソスライスによる断面像を利用して、再構築計算で生じるアーティファクトによるゴーストを比較した。

収束角は少収束角で 0.5 mrad, 大収束角で 15 mrad とした (表 1)。ちなみに従来装置における STEM (高分解能) 観察時の収束角は 7 mrad 程度の収束角である。なお TEM 像の取得にはガタンエネルギーフィルタによるゼロロス像を用いた。

電子線トモグラフィの第 1 ステップは、連続傾斜像の取得になる。各々のデータセットの高傾斜時 (50 ~ 70 度付近) の像を比較してみた。図 4 のように、小収束角の STEM トモグラフィで、直径 150 nm 程度のクラスリン被覆ピット全体に良く焦点が揃っていることが分かる (白い矢印)。このように陥入が進んだピットを観察する場合、TEM モードでは、ピットの辺縁部に焦点が合いにくく、コントラストが白くハレーションすることがある。この傾向は、高傾斜像で著しくなる。これに対して驚くべきことに、小収束角の STEM モードでは、-70 度でも、比較的良く焦点が揃っていることがわかる。このような連続傾斜像の 1 枚 1 枚に見られる、焦点やコントラストによる像質も、最終的な 3 次元再構築像に影響を及ぼすことが予想される。

本研究では、1 軸傾斜の SIRT によって、クラスリン被覆ピットの 3 次元再構築の計算をおこなった。図 5 に、ボリュームレンダリングによる全構築像やオルソスライスによる XY, XZ, YZ 断面像 (中心付近) を示す。TEM トモグラフィによる 3 次元再構築像は、コントラストが低い。クラスリン被覆ピットのようなアンジュレーションの激しい試料では、視野全体に焦点を合わせることが難しく、特に高傾斜時の像質の悪化が顕著であるため、再構築ボリュームに高傾斜データがうまく寄与していない。そのため、全構築像や断面像でも、トモグラフィのアーティファクトが目立つ。これに対して、大収束角 STEM トモグラフィによる 3 次元再構築像は、従来の TEM トモグラフィと比べてコントラストは高い。この理由には、HAADF によるプラチナレプリカに対する元素番号効果も効いていると考えられる。しかし、収束角が大きいことで被写界深度が浅くなるため、フォーカスが少しずれると傾斜像において像のボケが顕著になってしまう。そのボケのため再構築ボリュームもボケてしまっている。また、大きくボケた傾斜像は再構築に使えないため (含めると悪化してしまう)、取得したにもかかわらず再構築時に捨てるを得なかった角度があり、そのためのアーティファクトの増加を招いている。本研究で注目した小収束角 STEM トモグラフィでは、もっともコントラスト高く、ゴーストの少ない良質な 3 次元再構築像が得られることが初めてわかった。試料傾斜角が 75 度付近まで視野全体に焦点があい、ほぼ完璧な連続

傾斜像が取得されているので、いわゆるミッシングウェッジによるアーティファクトもまったく目立たない。見た目の定性的にも、非常に美しい再構築ボリュームが得られた。当然のことだが、ほとんどの傾斜角度の視野全体に焦点があると、連続傾斜像取得時の位置補正もスムーズに進むので、3 次元再構築の精度も向上する。

## 5. おわりに

本研究により (定性的ではあるが)、小収束角 STEM トモグラフィ、通常の広収束角 STEM トモグラフィ、従来の TEM トモグラフィによる 3 次元再構築像について、初めて比較することができた。小収束角プローブを用いた STEM が、少なくともプラチナ製のフリーズレプリカ試料に対しては、最良であることが明らかとなった。特に、細胞膜の細胞質側表面にあるアンジュレーションの激しい構造群 (膜骨格、カベオラ、クラスリン被覆ピット) に対しては非常に有効であり、これまで私たちが提案してきたフリーズエッチトモグラフィの次世代版として大いに期待できる。収差補正付き 3 コンデンサシステムを持った電子顕微鏡であれば、入射電子線の収束角を小さく (0.5 mrad 程度まで) 絞ることにより生じるデメリットは何もない。研究者にとって唯一の難点は、装置の価格が高価であることであろうか。

## 文 献

- 1) Morone, N., Fujiwara, T., Murase, K., Kasai, S.R., Ike, H., Yuasa, S., Usukura, J. and Kusumi, A.: *J. Cell Biol.*, 174, 851-862 (2006)
- 2) Fujiwara, T., Ritchie, K., Murakoshi, H., Jacobson, K. and Kusumi, A.: *J. Cell Biol.*, 157, 1071-1081 (2002)
- 3) Kusumi, A., Umemura, Y., Morone, N. and Fujiwara, T.: *Anomalous Transport: Foundations and Applications*, edited by Rainer Klages, Günter Radons, Igor M. Sokolov. 545-574 (2008)
- 4) Morone, N., Nakada, C., Umemura, Y., Usukura, J. and Kusumi, A.: *Methods Cell Biol.*, 88, 207-236 (2008)
- 5) Aoyama, K., Takagi, T., Hirase, A. and Miyazawa, A.: *Ultramicroscopy*, 109, 70-80 (2008)
- 6) Yakushevskaya, A.E., Lebbink, M.N., Geerts, W.J.C., Spek, L., van Donselaar, E.G., Jansen, K.A., Humbel, B.M., Post, J.A., Verkleij, A.J. and Koster, A.J.: *J. Struct. Biol.*, 159, 381-391 (2007)
- 7) Midgley, P.A. and Weyland, M.: *Ultramicroscopy*, 96, 413-431 (2003)
- 8) Kübel, C., Voigt, A., Schoenmakers, R., Otten, M., Su, D., Lee, T.C., Carlsson, A. and Bradley, J.: *Microsc. Microanal.*, 11, 378-400 (2005)
- 9) Friedrich, H., McCartney, M.R. and Buseck, P.R.: *Ultramicroscopy*, 106, 18-27 (2005)



# Nitric Oxide Release in Human Aortic Endothelial Cells Mediated by Delivery of Amphiphilic Polysiloxane Nanoparticles to Caveolae

Takehiro Nishikawa,<sup>\*,†</sup> Norio Iwakiri,<sup>‡</sup> Yoshiro Kaneko,<sup>‡</sup> Akihiko Taguchi,<sup>†</sup> Kazuhito Fukushima,<sup>†</sup> Hidezo Mori,<sup>†</sup> Nobuhiro Morone,<sup>§</sup> and Jun-ichi Kadokawa<sup>\*,‡</sup>

National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1, Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan, National Center of Neurology and Psychiatry, National Institute of Neuroscience, 4-1-1, Ogawahigashimachi, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan, and Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University, 1-21-40 Korimoto, Kagoshima, Kagoshima 890-0065, Japan

Received February 1, 2009; Revised Manuscript Received June 8, 2009

Microdomains such as lipid raft and caveolae are organized as functional compartments in plasma membrane of cells. In this study, we note the functional platform of caveolae with dual functions, internalization of external substances and cell signalings leading to nitric oxide release, and hypothesize that the switching of enzyme activity of endothelial nitric oxide synthase can be achieved by targeting caveolae with nanoparticles. We prepared polysiloxane nanoparticles and studied cellular uptake of the nanoparticles and its concomitant influence on the nitric oxide release in human aortic endothelial cells. We found that polysiloxane nanoparticles were endocytosed via caveolae in human aortic endothelial cells and that enhanced nitric oxide release was followed by the cellular uptake of the nanoparticles. Furthermore, we confirmed that endothelial nitric oxide synthase was activated during cellular uptake of the nanoparticles. These findings support our idea that delivery of the polymeric nanoparticles to endothelial cells can lead to the induction of nitric oxide release.

## Introduction

With the recent progress in structural biology, it has been revealed that microdomains such as lipid raft and caveolae are organized as functional compartments in plasma membrane of cells.<sup>1</sup> Caveolae in particular are abundant in the plasma membrane of endothelial cells, occupying 15% of total cell volume and function as platforms for signaling and transporting.<sup>2</sup> In relation with pathology, it is pointed out that a lost function of caveolae is involved in various cardiovascular diseases such as vascular dysfunction, atherosclerosis, and hypertrophy.<sup>3</sup> For instance, hypertension is one of the risk factors for various cardiovascular diseases such as atherosclerosis, ischemic heart failure, stroke, and chronic renal failure. Blood pressure is controlled using antihypertensive drugs, which are the major medication for treating hypertension. Nitric oxide (NO) is a key substance in the vasorelaxation process and plays a crucial role in the regulation of blood pressure.<sup>4</sup> Direct control of nitric oxide (NO) production in vascular endothelium can be a novel strategy of the medication for hypertension and can lead to the improvement of endothelial functions.<sup>5</sup> NO molecules are released from vascular endothelium, are diffused to media, the outer layer of smooth muscle cells, and trigger the activation of soluble guanylate cyclase that leads to smooth muscle cell relaxation.<sup>6</sup> NO is synthesized by endothelial nitric oxide synthase (eNOS) that is embedded in caveolae and is activated by external stimuli such as bioactive substances and dynamic environmental factors.<sup>7</sup> Caveolae are characteristic flask-shaped

invaginations of plasma membrane with diameters of 50–100 nm and work as functional platforms for internalization of extracellular materials (endocytosis) and cell signalings leading to NO production.<sup>3</sup>

In the past studies about vascular drug delivery, it was noted that caveolae can provide a possible pathway for drug delivery coupled with caveoli-mediated endocytosis.<sup>8</sup> To date, nanoparticles as drug carriers have been extensively studied with regards to delivery, drug loading, drug release, in vivo circulation, and toxicological properties.<sup>9</sup> However, whether such a nanoparticle cause effects on the functions of cells, tissues, and organ remains still unclear. Considering the endocytic pathways of cells, it is known that four basic mechanisms, macropinocytosis, clathrin-mediated endocytosis, caveolin-mediated endocytosis, and clathrin- and caveolin-independent endocytosis, are involved in pinocytosis (endocytosis in all mammalian cells).<sup>10</sup> Bioactive substances and serum proteins circulating in bloodstream have been found to be external stimuli for the activation of signal transduction. Although it was reported that artificial nanoparticles could influence a cell function of macrophages upon the association with lipopolysaccharide,<sup>11</sup> the artificial nanoparticles have not been considered and discussed in terms of the external stimuli as an input signal at specific membrane microdomain of cells for the activation of signal transduction, so far. Therefore, we have an interest in the influence of cellular uptake of nanoparticles on the signal transductions leading to the expression of cell functions. As the first attempt, we prepared nanoparticles from amphiphilic polysiloxane and studied cellular uptake of the nanoparticles and its concomitant influence on NO release in human aortic endothelial cells.

In this research, we chose polysiloxane as a polymeric material for the preparation of nanoparticles, because siloxane backbone with self-repair property is quite stable in physiological conditions<sup>12</sup> and nanoparticles of polysiloxane are expected

\* To whom correspondence should be addressed. Tel.: 81-6-6833-5012 (T.N.); 81-99-285-7743 (J.-i.K.). Fax: 81-6-6872-7485 (T.N.); 81-99-285-3253 (J.-i.K.). E-mail: tnishi@ri.ncvc.go.jp (T.N.); kadokawa@eng.kagoshima-u.ac.jp (J.-i.K.).

<sup>†</sup> National Cardiovascular Center Research Institute.

<sup>‡</sup> Kagoshima University.

<sup>§</sup> National Center of Neurology and Psychiatry.

to be resistant to biological degradation in both extracellular and cytoplasmic environments. Silicone derivatives are known to be very attractive materials, because they exhibit low toxicity and unique physical properties. Therefore they have been widely used as versatile products such as foam stabilizer, rubber, paint, fiber, glass, and textile.<sup>13</sup> In spite of the usage of polysiloxane in wide fields, polysiloxane has not been studied so far in terms of polymeric materials for nanoparticles that are aimed at drug delivery system. Although biodegradable polymers have been extensively studied as polymeric materials for nanocarriers, a recent review article indicates the toxicological problems associated with degradation products of biodegradable polymeric carriers.<sup>14</sup> Polysiloxane has noteworthy properties with regard to degradation, stability and durability, based on a self-repair mechanism where silanol groups generated by the degradation of siloxane backbone can condense each other to form new siloxane bonds.<sup>12</sup> Polysiloxane with stability and inertness is expected to achieve reduced toxicity and longer circulation in terms of their usage as a drug carrier. Here, we describe nanoparticle formation of amphiphilic polysiloxane, cellular uptake of polysiloxane nanoparticles via caveolae of membrane microdomains, and influence of polysiloxane nanoparticles on cellular function; nitric oxide release in human aortic endothelial cells.

### Experimental Section

**Materials.** Amphiphilic polysiloxane (Am-PAPS) was prepared by the method described in our previous report.<sup>15</sup> Am-PAPS was labeled with fluorescein thioisocyanate and was named Flu-Am-PAPS. Rabbit anti-caveolin-1 IgG was purchased from Sigma (St. Louis, MI). Mouse anti-eNOS IgG and mouse antiphospho-Ser1177-eNOS IgG was purchased from BD Transduction Laboratories (Franklin Lakes, NJ). Rabbit anti-fluorescein IgG was purchased from Molecular Probes (Eugene, OR). Anti-rabbit IgG conjugated with gold nanoparticles (5 nm in diameter) was purchased from GE healthcare. TRITC-labeled anti-rabbit IgG and TRITC-labeled anti-mouse IgG were purchased from Molecular Probes (Eugene, OR). HRP conjugated antimouse IgG was purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, Mass). Mono-sulfo-*N*-hydroxy-succinimido nanogold (NANOGOLD) was purchased from Nanoprobes (Yaphank, NY). Gold nanoparticle labeled Am-PAPS (Au-Am-PAPS) was prepared by coupling NANOGOLD to the amphiphilic polysiloxane. All other reagents were purchased from Gibco, Nacalai Tesque, Sigma, or Wako Pure Chemicals unless otherwise indicated.

**Nanoparticles Suspension.** Aqueous suspension of each amphiphilic polysiloxane (Am-PAPS, Flu-Am-PAPS, or Au-Am-PAPS) was prepared by dispersing it (initial concentration: 1 mg/mL) into cell culture medium (EGM-2; Cambrex) and sonication with bath-type ultrasound washer (25 W and 40 kHz for 5 min). The suspension was passed through the membrane filters with the pore size of 0.45  $\mu\text{m}$  (Millex-GV; Millipore) and 0.22  $\mu\text{m}$  (Millex-GV; Millipore) for sterilization. Concentration of Flu-Am-PAPS was determined by fluorescence spectroscopy and was 0.1 mg/mL that was based on calibration with fluorescein-labeled sugar conjugated PAPS (1 mg/mL dissolved in EGM-2).

**Measurements.** The <sup>1</sup>H NMR spectra (600 MHz) were recorded using a JEOL ECA600 spectrometer. Fluorescence spectra for quantitative analysis were obtained on a fluorescence spectrometer (RF-5300 PC; Shimadzu) using a quartz cuvette (1 mm path length). The dynamic light scattering (DLS) measurement was performed on a Zetasizer 3000 (Malvern Instruments). Morphological study of nanoparticles was carried out by scanning electron microscope (Hitachi S-4100 electron microscope). The observation of plasma membrane and cytosol of human aortic endothelial cells was performed by a transmission electron microscope (Tecnai G2 Sphera, FEI, U.S.A.). Fluorescence imaging was performed on a IX-71 (Olympus) equipped with a fluorescence

mirror unit, U-MNIBA3 (band-pass filter from 470 to 495 nm for excitation light and using a long pass filter from 510 to 550 nm for emission light) for the detection of fluorescein emission and U-MWIG3 (band-pass filter from 530 to 550 nm for excitation light and using a long pass filter >575 nm for emission light) for the detection of rhodamine emission. High-pressure mercury lamp (USH-1030 L; Olympus) was used as a light source for the fluorescence microscopy and was powered by a power supply (BH2-RFL-T3; Olympus).

**Cell Culture Experiment.** Human aortic endothelial cells (HAECs) were purchased as cryopreserved samples of third passage (Lot: 4F1350) from Cambrex, Walkersville, MD. The HAECs used in the experiment were fourth passage. Polystyrene dishes ( $\phi$ 35 mm, Iwaki) were filled with 2 mL of a supplemented culture medium (EGM-2; Cambrex) and equilibrated in a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> humidified incubator for 30 min before cell seeding. After the frozen cells were thawed at 37 °C, 70  $\mu\text{L}$  of the cell suspension ( $8.0 \times 10^5$  cells/mL, viability: 85% (determined by trypan blue exclusion test)) were seeded in the culture dishes. The cell-seeded plates were placed in a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> humidified incubator. The HAECs were cultured for 72 h before the medium exchange with nanoparticle suspension. For fluorescence microscopy observation, the cells were rinsed with PBS (warmed at 37 °C), fixed by immersing into 10% formaldehyde neutral buffer solution (Nacalai tesque) at room temperature (22 °C) for 15 min and washed three times with PBS (Gibco). Fluorescence images used for the quantitative analysis of the cellular uptake of nanoparticles were taken at the constant exposure time to compare fluorescence intensity of the images at prescribed incubation time. Fluorescence images of the cells were taken by a fluorescence microscope (IX71; Olympus) equipped with a CCD camera (DP70; Olympus). To perform quantitative evaluation of fluorescence intensity, the fluorescence images were taken at the same exposure time (1/6.0 s). The exposure time was automatically measured by the operating software of DP70. The appropriate exposure time was chosen under the condition that over exposed images should be avoided to calculate fluorescence intensity of the images as correct as possible. The excess over exposure and under exposure could be prevented when the exposure time was set at 1/6.0 s that was measured when the HAECs exposed to Flu-Am-PAPS for 6 h were photographed by DP70. Fluorescence intensity of the incorporated nanoparticles of Flu-Am-PAPS was measured by integrating the fluorescence intensity observed at each pixel of the fluorescence images using image analysis software (Fluoview ver. 5.0; Olympus).

**Cytotoxicity Assay.** Cytotoxicity of polysiloxane nanoparticles were assessed using Cell Count Reagent SF (Nacalai Tesque, Kyoto) as a colorimetric indicator for living cells. HAECs were seeded in each well of 96-well plates and were incubated in a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> humidified incubator for 24 h before cytotoxicity assay. Cell number in each well was adjusted by stepwise 2-fold dilution of HAECs cell suspension. The cell number per well ranged from 5000 to 40000 cells. The total amount of the cell suspension including growth medium was 100  $\mu\text{L}$  per well. The growth medium was replaced with 100  $\mu\text{L}$  of a suspension of polysiloxane nanoparticle (1 mg/mL) for cytotoxicity testing. After 6 or 24 h incubation, each well was rinsed with 100  $\mu\text{L}$  of growth medium to remove polysiloxane nanoparticles and was filled with 100  $\mu\text{L}$  of fresh growth medium. Then, 10  $\mu\text{L}$  of Cell Count Reagent SF solution containing WST-8 (5 mM),<sup>16</sup> colorimetric indicator, was added to each well to evaluate cell viability. HAECs were incubated with WST-8 for 4 h. WST-8 is converted to water-soluble formazan by an electron mediator coupled to the intracellular reduction of NAD<sup>+</sup>. Absorbance of each well was measured at 450 nm using a microplate reader (Model 680, Bio-Rad, Hercules, CA). Cell viability was evaluated by the following equation: (cell viability) = (Abs for samples to be tested - Abs for blank)/(Abs for control - Abs for blank)  $\times$  100, "Abs" stands for absorbance of each well at 450 nm.

**Immunostaining.** To visualize the localization of caveolin-1 and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in HAECs, each antigen was stained by immunological method using primary antibodies (rabbit anti-caveolin-1 IgG; Sigma and mouse anti-eNOS IgG; BD) and fluores-

cence labeled secondary antibodies (TRITC labeled anti-rabbit IgG and TRITC labeled anti-mouse IgG; Molecular Probes). For immunostaining, cells were fixed by 10% formaldehyde neutral buffer solution (Nacalai tesque) at room temperature (22 °C) for 15 min and permeated with 0.1% PBS (pH 7.2, Gibco) solution of Triton X-100 (Sigma) for 5 min at 20 °C. After 1 h of blocking with 1% normal goat serum solution, HAECs were incubated with a primary antibody (200 times dilution with 0.1% normal goat serum solution) for 1 h. The HAECs treated with primary antibody were incubated with fluorescent dye labeled secondary IgG for 1 h. Fluorescence images of the cells were taken by a fluorescence microscope (IX71; Olympus) equipped with a CCD camera (DP70; Olympus) and confocal laser scanning microscope (FV 100; Olympus).

**Transmission Electron Microscopy (TEM).** Two types of specimens, ultrathin section and rapid-freeze, deep-etch, freeze-replica, were prepared for the observation of fine structure of plasma membrane and cytosol in cells using transmission electron microscopy. HAECs were grown on carbon-coated sapphire glass with a diameter of 5 mm for 2 days after inoculation. Specimens for ultrathin section were prepared by the following method. For the TEM observation of polysiloxane nanoparticles in caveolae, HAECs were exposed to gold nanoparticle labeled Am-PAPS (Au-Am-PAPS) dispersed in growth medium (EGM-2) for 3 h. After a 3 h incubation with Au-Am-PAPS, the HAECs attached on coverslips were washed with NaHCa buffer (30 mM HEPES, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.3) and treated with chemical fixation reagent (2.5% glutaraldehyde (GA), 150 mM sucrose in PBS buffer). In the case of the immunodetection of caveolae in HAECs, HAECs were fixed with NaHCa buffer containing 4% paraformaldehyde for 1 h, then treated with a quenching solution containing 50 mM lysine, 50 mM glycine, and 50 mM ammonium chloride, and permeated with 0.1% NaHCa buffer solution of Triton X-100 for 1 min. After 1 h of blocking with 1% BSA solution, HAECs were incubated with a primary antibody to caveolin-1 (200 times dilution with 0.1% BSA solution) for 1 h. The HAECs treated with anti-caveolin-1 IgG were incubated with 10 nm colloidal gold conjugated anti-rabbit IgG (10 times dilution with 0.1% BSA solution) for 1 h and treated with PBS containing 2.5% glutaraldehyde for 15 min. These fixed specimens of HAECs were postfixed with Osmium (0.1%) in 0.1 M PBS buffer. The cells were rinsed with PBS and distilled water, dehydrated with ethanol, and embedded in epoxy resin (EPON 812, TAAB Laboratories Equipment Ltd., UK) by polymerization for 72 h at 70 °C. Ultrathin sections of the embedded HAECs were cut at thickness of 70 nm with an ultramicrotome (Reichert-Nissei Ultracut N, Nissei Sangyo Co., Tokyo, Japan), mounted on electron microscope grids, stained with uranyl acetate/lead citrate, and then observed by TEM (Tecnai G2 *Sphera*, FEI, USA).

Specimens for the rapid-freeze, deep-etch, freeze-replica were prepared by the following method.<sup>17</sup> After a 1 h incubation with fluorescein-labeled nanoparticles (Flu-Am-PAPS), the HAECs were washed with the mammalian ringer solution (155 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 5 mM HEPES brought to pH 7.4 with NaOH, plus 10 mM glucose). Immediately after being unroofed from the apical cell membrane, the basal cell membrane was fixed for 15 min in 1% paraformaldehyde/0.25% glutaraldehyde in buffer A (70 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 mM EGTA, 30 mM HEPES buffer adjusted at pH 7.4 with KOH) and washed with the NaHCa buffer for 10 min three times. To identify the nanoparticles attached to the undercoat structure of plasma membrane, the detached basal side of plasma membrane of HAECs was labeled by treating with a primary antibody against the fluorescein molecule and a secondary antibody conjugated with 5 nm diameter colloidal gold. The labeled specimen was further fixed in 2% GA buffer on ice for 15 min. The specimen was washed in distilled water for 1 min before rapid freezing. The coverslip attached to the basal side of the HAECs was set on the plunger tip of the rapid freezing device (Polaron, U.S.A.) with the cytoplasmic surface of the plasma membrane down. The coverslip was fallen onto a polished pure copper block, which was precooled by liquid helium.

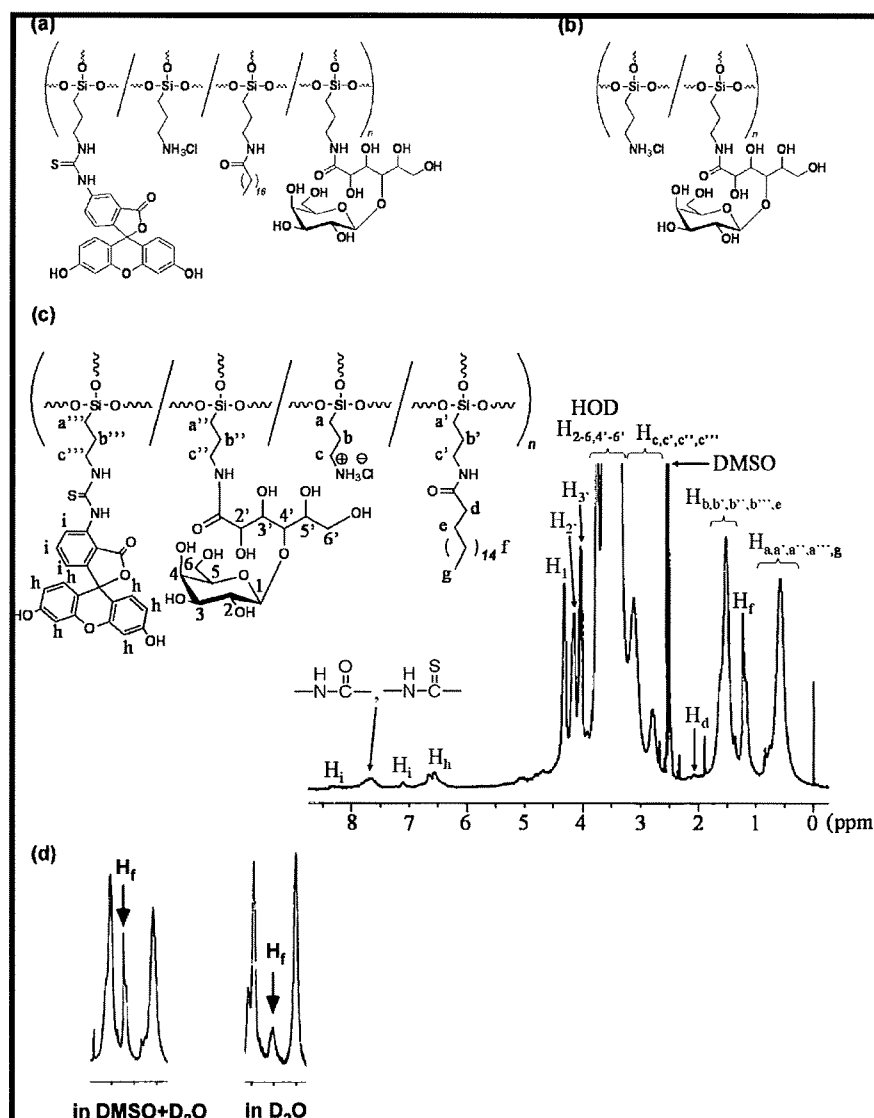
The frozen coverslip was immersed in liquid nitrogen and was transferred into the freeze etching shadowing chamber (Bal-Tec BAF060, Liechtenstein). The cytoplasmic surface was deeply etched and rotary shadowed with platinum/carbon at an angle of 22° from the surface and with carbon from the top. The replica was removed from the coverslip in aqueous solution of 1% hydrofluoric acid. After the replica was washed with distilled water, the replica was mounted on mesh copper grid coated with polyvinyl Formvar (Nisshin EM, Japan). Finally, the sample grid was observed by TEM.

**Nitric Oxide (NO) Detection.** NO detection was carried out by referencing the previous literature.<sup>18</sup> HAECs were exposed to Dulbecco's modified Eagle medium (phenol red free DMEM, Invitrogen) containing 50 μM diaminorhodamine-4 acetoxyethyl ester (DAR-4 M AM; Daiichi pure chemicals) for 10 min. The DAR-4 M AM loaded sample was washed with DMEM (1 mL) and filled with 2 mL of DMEM for post incubation. Post incubation was performed for 15 min in a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> humidified incubator. The sample was rinsed with DMEM (1 mL) twice and filled with 1 mL of DMEM. Then, the dish was fixed on a microscope stage with adhesive tape. Fluorescence images were captured to monitor NO release by fluorescence microscope (IX-71 equipped with a temperature controlled stage (Microwarm Plate, Kitazato Supply) and a CCD camera (DP-70) Olympus) after the addition of DMEM (in case of resting state or after the cellular uptake of nanoparticles) or DMEM solution of bradykinin (1 μM) (in case of stimulation). Image capture was carried out every 30 s by initial 180 s of monitoring, then every 60 s by the end of monitoring at 900 s.

**Western Blotting.** HAECs cultured on a plastic culture dish (Iwaki, φ35 mm) were lysed with 40 μL of RIPA lysis buffer (Rockland, Gilbertsville, PA) for 5 min at 4 °C and scraped from the dish surface with a cell scraper. The lysates were collected and then centrifuged to remove insoluble materials at 10000g for 20 min. The supernatant was collected in a test tube. Protein concentration in the supernatant was determined by the Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) based on the method of Bradford. The supernatant was mixed with Laemmli sample buffer (Bio-Rad, Hercules, CA) containing 5% (V/V) β-mercaptoethanol and heated at 100 °C for 2 min. The reduced protein solutions, including 2 μg of the extracted proteins, were loaded into each well of 5–20% gradient SDS-PAGE gel (e-PAGEL, ATTO, Tokyo). The gel was run at 20 mA constant current in an electrophoresis chamber (AE6500, ATTO, Tokyo) plugged with a power supply (AE8135, ATTO, Tokyo). The proteins on a gel were transferred to a PVDF membrane (Clear Blot Membrane-P, ATTO, Tokyo) at 140 mA in a semi-dry electrophoretic transfer cell (AE6678, ATTO, Tokyo). The PVDF membrane was blocked with a blocking buffer (Blocking One-P, Nacalai Tesque, Kyoto) for 30 min at 20 °C and then incubated with a primary antibody (1000 times dilution with Can-Get-Signal; solution 1; Toyobo, Osaka) to each target protein (eNOS, phosphorylated eNOS at Ser1177, β-Tubulin) overnight at 4 °C. The target protein transferred on the PVDF membrane was reacted with horseradish peroxidase (HRP) conjugated secondary antibody (Cell Signaling, Danvers, Mass; 1000 times dilution with Can-Get-Signal (solution 2)) for 1 h at 20 °C and detected using colorimetric detection reagent (Ez West Blue, ATTO, Tokyo). The reagent contains 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), colorimetric reagent, and hydrogen peroxide, substrate for HRP. TMB yields blue color when oxidized with hydrogen peroxide (catalyzed by HRP). Blue bands indicating the target proteins appeared on a PVDF membrane after a PVDF membrane was treated with Ez West Blue. Colorimetric intensity of the bands on a PVDF membrane was measured by image capture using a digital scanner (GT-X700, EPSON, Tokyo) and image analysis software (Fluoview ver. 5.0; Olympus, Tokyo).

## Results and Discussion

**Polysiloxane Nanoparticles.** In our previous report<sup>15</sup> we synthesized a novel amphiphilic polysiloxane and found that the amphiphilic polysiloxane formed nanoparticles with diameters of several tens of nanometers in water. In addition to the



**Figure 1.** Chemical structure of (a) fluorescein-labeled amphiphilic polysiloxane (Flu-Am-PAPS) and (b) water-soluble sugar conjugated polysiloxane. (c)  $^1\text{H}$  NMR spectrum of Flu-Am-PAPS in  $\text{DMSO-}d_6$  (including a small amount of  $\text{D}_2\text{O}$ ). Chemical shifts were referenced to  $\text{DMSO}$  ( $\delta$  2.5 ppm). (d)  $^1\text{H}$  NMR signal of stearyl group ( $\text{H}_i$ ) observed in  $\text{DMSO-}d_6$  (including a small amount of  $\text{D}_2\text{O}$ ; left) and in  $\text{D}_2\text{O}$  (right).

amphiphilic polysiloxane, we obtained a fluorescence dye-labeled amphiphilic polysiloxane to track cellular uptake of the nanoparticles. We selected a fluorescein moiety as the fluorescent dye and synthesized the fluorescein-labeled amphiphilic polysiloxanes (Figure 1a) by using water-soluble poly(3-aminopropyl)siloxane (PAPS) having amino groups as a starting substrate as follows:<sup>19</sup> first, stearyl groups as hydrophobic part and galactose moieties as hydrophilic part were introduced to PAPS in this order by the reactions of stearyl chloride and lactobionolactone with the amino groups, respectively, giving an amphiphilic polysiloxane (Am-PAPS), and then, fluorescein-labeled polysiloxane (Flu-Am-PAPS; Figure 1a) was obtained by conjugation of fluorescein thioisocyanate to Am-PAPS. The molecular weight of PAPS as a polysiloxane backbone of Flu-Am-PAPS was measured by gel permeation chromatography with water as eluent and estimated to be 10300 g/mol ( $M_w/M_n = 1.41$ ; pullulan was used as molecular weight standards). The substitution of amino groups in PAPS was estimated by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy (Figure 1c) of the Flu-Am-PAPS; 2% of all amino groups was substituted for stearyl group, 80% of those for galactose group, 4% of those for fluorescein and the rest of the amino groups were unreacted, that had been converted into the ammonium chlorides. For comparison, water-soluble sugar

conjugated polysiloxane was synthesized (Figure 1b) by following the above method. The content of galactose moieties in the water-soluble polysiloxane was determined by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy to be 43% (data not shown).

The amphiphilic polysiloxane (Am-PAPS/Flu-Am-PAPS) can form nanoparticles upon self-organization process in aqueous medium. Aqueous suspension of each amphiphilic polysiloxane was prepared by dispersing it (1 mg/mL) into cell culture medium for human aortic endothelial cells. The particle size of nanoparticles of the amphiphilic polysiloxane was measured by dynamic light scattering (DLS) measurement. The DLS measurement demonstrated that the Flu-Am-PAPS formed nanoparticles with a z-average diameter of 79 nm (0.290 for polydispersity index) in pure water. The particle size ranged from 40 to 400 nm (Figure 2a). About 48% of the nanoparticles comprised the group of nanoparticles whose diameter is less than 100 nm that is close to the caveolae size. The SEM image (Figure 2b) shows that the amphiphilic polysiloxane forms nanoparticles with diameters ranging from several tens of nanometers to 200 nm in diameter (average:  $66 \pm 30$  nm). The difference in particle size between DLS and SEM is attributable to the sample conditions (wet or dry) in these measurements.