

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K14679

研究課題名(和文)ダイヤモンドの蛍光を使ったタンパク質1分子の磁気共鳴検出

研究課題名(英文)Diamond NVC for protein analysis

研究代表者

朽尾 豪人(Tochio, Hidehito)

京都大学・理学研究科・教授

研究者番号：70336593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、NVCを含むナノダイヤモンドを特定のタンパク質に繋ぎ、NVCの光検出磁気共鳴(Optically Detected Magnetic Resonance)を検出することでタンパク質の構造情報を獲得することを目標に研究を行った。まず、NVCを持つナノダイヤを細胞膜上の特定のタンパク質に共有結合的に繋ぎ、既存の1分子蛍光観察技術を利用してNVCの蛍光を観察した。次いで、マイクロ波照射を行い、NVCのODMR信号の取得を試みた。期間内にODMR信号を得るには至らなかったが、蛍光強度の検出感度の不足など、実現に必要な様々な条件を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, an application of ODMR(Optically Detected Magnetic Resonance) of NVC of nanodiamonds to analyzing protein structures was examined. Nanodiamonds artificially enriched with NVCs were covalently conjugated to membranous proteins on the plasma membrane. The movement of the proteins were successfully tracked on the membrane with the fluorescence of NVC with a TIRF microscope. Then detection of ODMR was attempted. However, ODMR signals were not obtained successfully, which was mainly due to low signal to noise ratio of the fluorescence signals. Through this study, requirements for the system to achieve the ODMR detection has been revealed, which would be addressed in the future research projects.

研究分野：構造生物学

キーワード：ダイヤモンドNVC

## 1. 研究開始当初の背景

蛍光イメージング技術は、現代の細胞生物学研究において決定的に重要な位置を占めており、2014年のノーベル化学賞が与えられた超解像蛍光顕微鏡技術がもたらす高精細な画像は、生命科学に革命的な進歩をもたらしつつある。また、応用物理学分野では、ダイヤモンドが発する蛍光を利用した超高感度磁気センサーが注目を集めている。天然、人工に関わらず、ダイヤモンドは不純物や格子欠陥に由来する蛍光を発するが、なかでも、不純物窒素と格子欠陥(vacancy)からなるnitrogen-vacancy center(NVC)由来の蛍光が注目の対象である。

NVCの蛍光は、フルオロセインや蛍光タンパク質、量子ドットなどの蛍光プローブに比べて寿命が長く、量子収率が高いうえに、褪色・明滅を示さない。また、通常、ダイヤモンドの微粒子は生体・細胞に対して毒性を持たないことから、NVCを含んだダイヤモンドを量子ドットサイズまで微粒子化すれば、優れた蛍光プローブになると目されている。NVCの蛍光強度は周囲の磁場に対する感受性が極めて高い。このため、単なる蛍光イメージングというだけでなく、この特性を利用することで、NVC近傍に置かれた分子の電子スピン共鳴(ESR:Electron Spin Resonance)や核磁気共鳴(NMR:Nuclear Magnetic Resonance)信号をも取得することができる。実際に、これまでにタンパク質1分子に由来するESRや(*Science* 347,p1135(2015))、高分子ポリマー由来の数百個の<sup>1</sup>HからのNMR信号の検出が実現されている(*Science* 339,p561(2013))。これら報告では、例えば、NMRの化学シフトなどの情報は得られていないが、従来型のESRやNMRの信号を検出するためには、 $10^{12} \sim 10^{14}$ 個以上もの分子を必要とすることを考えると、驚異的に高い検出感度と言えよう。

このタンパク質1分子のESR等、これまで報告されているNVC磁気センサーでは、板状ダイヤモンドの表面直下に作成したNVCが使われている。しかし、原理的にNVCから遠距離(>数十nm)にある分子からの信号は検出できないため、細胞内環境にあるタンパク質の測定などは、そのままでは不可能である。従って、例えば、ダイヤモンドをナノ粒子化して、これを観察対象のタンパク質に共有結合的に繋ぐことで、NVCを含むダイヤモンドセンサーをタンパク質のごく近傍に配置する等の工夫が必要になると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、NVCダイヤモンドをナノ粒子化し、これを特定のタンパク質に繋いで、NVCの光検出磁気共鳴(Optically Detected Magnetic Resonance)を検出し、これによってタンパク質の構造情報が獲得できるかどうかを目標に研究を行った。

まず、NVCを持つナノダイヤを特定のタンパク質の特定の部位に共有結合的に繋ぎ、既存の1分子蛍光観察技術を利用してNVCの蛍光を観察する。さらに、マイクロ波及びラジオ波照射を行い、NVCのODMR信号の取得を試みる。ODMR信号自体はNVCの電子スピンを観測しているが、近傍に磁性を持った分子が存在すればその影響を受けると考えられる。ODMRが検出できれば、タンパク質にラジカル等でスピンラベルを施し、タンパク質の構造変化・状態変化をODMRで検出する。

## 3. 研究の方法

### (1) タンパク質を標識するためのNVCダイヤモンドナノ粒子の調製

市販のナノダイヤモンド(粒径約30nm)に、Heイオン(エネルギー:40keV, ドーズ: $1 \times 10^{13}/\text{cm}^2$ )を照射することで、ダイヤモンド格子内に空孔を生成させた。このナノダイヤモンドを、真空中800で加熱し、その後、徐冷することで、ダイヤモンド格子内の窒素と空孔の結合、すなわちNVCの生成を促進させた。通常、市販品のナノダイヤモンドは表面がグラファイトに覆われており、そのままでは蛍光検出ができない。そこで、上記のナノダイヤモンドを、550にて焼成し、グラファイト層を酸化し、蛍光性のNVCナノダイヤモンド(NVC-ND)を得た。ナノダイヤモンド表面は、通常疎水性が高く、そのままでは凝集しやすく、また、非特異的な吸着が起こる。これを防ぐために、表面を高分岐ポリエチレングリコール(HPG)鎖でコートした(図1)。NVC-NDを硫酸/硝酸9:1混合溶液で過熱して酸化し、表面がカルボキシ化されたナノダイヤモンド(ND-COOH)を得た。これに既報の方法でHPG鎖付加伸長反応を行なって、高分岐鎖PEGで覆われたNVC-ND(ND-HPG)とした。

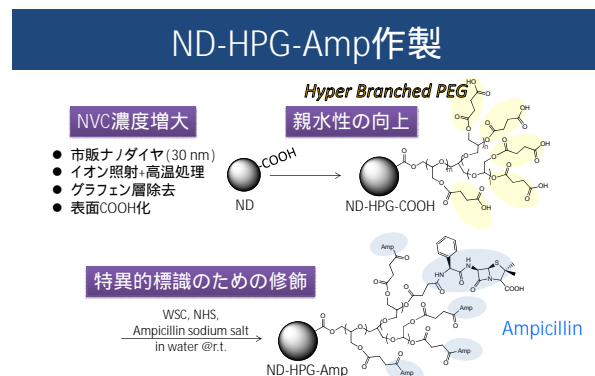


図1. NVCナノダイヤの高分岐鎖PEG修飾と、アンプシリン化

ND-HPGをタンパク質に繋ぐために、BL(-lactamase)-tagを用いた。BL-tagは、菊地和也博士(阪大・工)、水上進博士(東北大・多元研)により開発されたタンパク質

性のタグで、 $\beta$ -ラクタマーゼのアンピシリン結合サイトに変異が導入されており、アンピシリンに共有結合したあと、これが切断されないように設計されており(図2) アンピシリンと特異的に共有結合を形成する(Bioconj Chem 21,p2320(2010))。このタグを利用するためには、ND-HPGの末端にアンピシリンを繋いでおく必要がある。そこで、ND-HPGのHPG鎖末端の水酸基をCOOH化し、活性エステルを経て、アンピシリンのアミノ基を反応させ、アミド結合を介してHPG鎖末端にアンピシリンを繋いだ(ND-HPG-Amp)(図1)

## 受容体分子への特異的標識

- Mutaed  $\beta$ -lactamase tag (BL-tag)

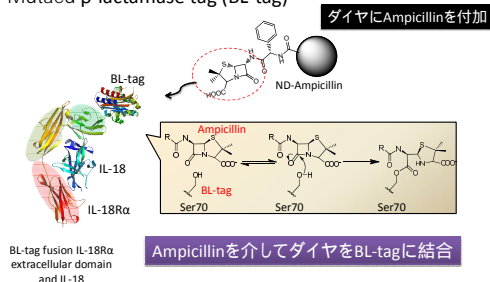


図2. BL-tagを融合した受容体タンパク質にアンピシリンを介してNVC ナノダイヤを繋ぐ

### (2) ナノダイヤによる膜タンパク質の標識

筆者らは、別の研究で、BL-tagを融合したInterleukin-18の受容体(BL-IL-18R)を安定発現するHEK293細胞を既に樹立していたこともあり、まずは、このBL-IL-18Rをナノダイヤで標識することにした。まず、BL-IL-18Rを安定に発現するHEK293細胞株をガラスボトムデバイス上に培養し、ここに(1)で作成したND-HPG-Ampの培地懸濁液を添加した。30分間程度インキュベートした後、培地で細胞を洗浄して、未反応のND-HPG-Ampを除去した。調製した細胞試料を、連携研究者・藤原がセットアップした全反射照明蛍光顕微鏡を用いて1分子観察を行った。

### (3) ダイア標識のODMR信号検出の試み

図3右に示すように、ダイヤモンドNVCの蛍光を観察しつつ、これにマイクロ波を照射、その周波数を掃引していくと、2870MHzの所で蛍光強度が急激に低下する(図3左)。これは、NVC構造に属する電子の電子スピン共鳴(ESR)現象を反映している(ダイヤモンド結晶場に由来する電子スピン状態のエネルギー差が2870MHz)。ここで、NVC近傍に磁場が印加されると、この周波数が変化する。ここから、NVC近傍のナノ空間の磁場の情報を得ることができる。

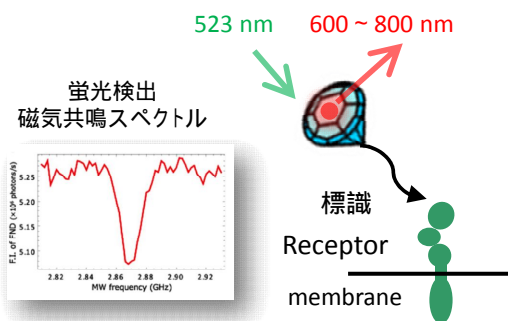


図3. 細胞膜上のIL-18Rをナノダイヤで標識し、NVC由来のODMR信号を得る

すなわち、NVCダイヤを繋いだIL-18Rにラジカルなどのスピンラベルを施しておけば、その常磁性をNVCのODMR信号によって検出でき、IL-18Rの構造変化・状態変化をODMR信号によって検出できる可能性がある(図4)

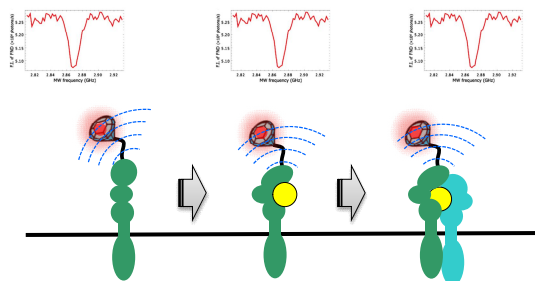


図4. ODMR信号からIL-18Rの動態を観察

筆者らは、過去に、京大iCeMSの原田慶恵教授らとの共同研究で、ナノダイヤNVC由来のODMR信号を検出する装置を作成している(Nano Lett 12,p5726(2012))。この装置を使用して、BL-IL-18Rに標識したナノダイヤNVCのODMR信号の検出を試みた。

## 4. 研究成果

研究方法(2)で述べたようにして調製した細胞試料を対象に、ダイヤNVCの蛍光を使って1分子観察したところ、細胞膜上のIL-18Rの動きを1分子レベルで観察することに成功した(図5)。並進拡散係数を求めると、約 $0.7 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ であった。これは、一般的な膜受容体の値( $\sim 1 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ )に近く、細胞膜上のIL-18Rを1分子追跡できていると考えられた(Nanomaterials,6,56(2016))

次に、同様にして調製した細胞試料について、研究方法(3)で述べたようにしてODMRの測定を試みた。しかし、この測定からはODMR信号を検出することができなかった。

ODMR信号を得るためには、マイクロ波のONとOFFを、それぞれ奇数フレームと偶数フレームごとに行って動画を取得し、この2フレームの差から求める。しかし、現状では、

マイクロ波 OFF の状態でも蛍光強度のブレが大きく(図6)、マイクロ波 ON との差を有意に検出できないことに原因があることがわかった。つまり、蛍光強度の検出感度が不十分なため、ODMR の信号が蛍光強度の検出誤差に埋もれてしまっていると考えられる。

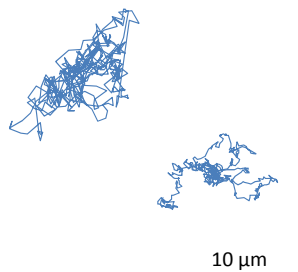


図5. HEK293 細胞膜上の BL- IL-18R の軌跡  
ND-HPG-Amp で標識し、ND の蛍光で観察

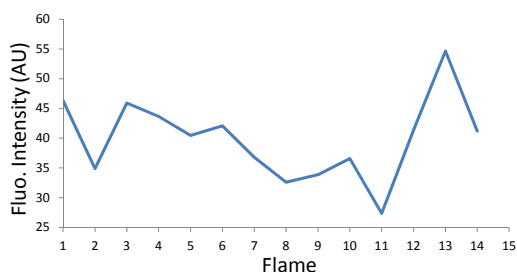


図6. 測定開始後 15 フレーム間での蛍光強度  
の変化 (マイクロ波 OFF 状態) 蛍光強度が  
不安定なため ODMR 信号の取得が困難。フ  
レーム間の蛍光強度差 1% 以内が望まれる。

以上の様に、細胞膜上のタンパク質をナノダイヤで標識する方法を確立することができ、1 分子蛍光観察にも成功しているが、研究期間内に、そのナノダイヤ中の NVC から ODMR 信号を取得するには至らなかった。ただし、細胞上のタンパク質 1 分子から ODMR を検出するために必要な装置のスペックや実験条件について明確にすることができたことは大きな収穫である。本研究課題で得られた知見に基づいて、今後も、ダイヤ NVC を使ったタンパク質の構造解析法の研究を進めていきたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

五十嵐 龍治、朽尾 豪人、白川 昌宏、  
ナノダイヤモンド NVC を使った新しい生体・  
細胞計測法、光技術コンタクト、査読無、54  
巻、2016、3-11

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
特になし。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

朽尾 豪人 (TOCHIO, Hidehito)  
京都大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号：70336593

### (2) 研究分担者

該当なし。

### (3) 連携研究者

藤原 敬宏 (FUJIWARA, Takahiro)  
京都大学・物質-細胞統合システム拠点・  
准教授  
研究者番号：80423060