

令和 4 年 11 月 25 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04013

研究課題名（和文）革新的蛍光偏光標識技術開発とその細胞生物学的応用

研究課題名（英文）Development of novel probes for fluorescence polarization and their application in cell biology

研究代表者

寺田 純雄 (Terada, Sumio)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：00262022

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,100,000 円

研究成果の概要（和文）：蛍光偏光を利用した顕微観察技術は、生体分子の1分子レベルの詳細な解析を可能とする夢の技術であるが、そのための標識が極めて困難で普及の障害となっていた。私たちはこのための新規手法の開発に成功し、特にアクチンを標的とするプローブを選んで、その細胞生物学的有用性を検討した。ヒトデの卵母細胞におけるアクチンの動態について同プローブによる解析を実施し、生化学的、薬理的解析と、新たに考案した画像処理により、従来全く知られていなかった広域的なアクチン関連構造の動態を発見することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

開発に成功した新規標識法は汎用性が高く、この技術を利用することによって今後、蛍光偏光を利用した生命科学領域における計測や観測の試行の増加が見込まれる。また、この新規手法により、私たちのグループの場合の応用例のような、高い基礎学術的意義を有する知見が蓄積すれば、細胞生物学、生物物理学、発生生物学をはじめ、基礎生命科学から蛍光計測を利用する応用生命科学まで、広範囲の応用成果が見込まれ、その社会的意義は大きいと予想される。

研究成果の概要（英文）：Monitoring molecular orientation is the key approach to study the spatial organization of molecular alignments within supramolecular complexes in living cells. Fluorescence polarization microscopy is a promising solution, but it is challenging to label target proteins with fluorescent probes. We have developed a genetically encoded probe for fluorescence polarization microscopy. Observation of living starfish embryos expressing our probe that specifically binds to actin revealed a novel 3D structure that had been escaping from previous observations.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：蛍光偏光 細胞骨格

1. 研究開始当初の背景

蛍光偏光を利用した顕微観察技術は、生体分子の1分子レベルの詳細な解析を可能とする夢の技術である。かつて可視光の偏光顕微鏡の出現によって細胞分裂における分裂紡錘の動態観察が初めて可能になったのと同様、蛍光偏光顕微鏡によれば様々な細胞骨格動態の詳細な1分子観察が可能となる筈である。しかしながら蛍光偏光顕微鏡の細胞生物学的応用は、世界的に極少数の成功例を除いてなかなか広まっていない。その最大の理由は、対象とする生体分子の機能を阻害せずに、蛍光分子によって「固く」(蛍光分子と被標識分子との相互の立体的位置関係が固定された状態で)標識すること(=constrained tagging と呼ばれる)が極めて困難な為であった。

私たちのグループは、チューブリン-微小管系やアクチン系と比較して著しく解明の遅れている中間径フィラメント系の動態制御機構について、蛍光偏光観察を利用して研究を進めてきた。これまでの蛍光偏光顕微観察の成功例に倣い(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 111:2146-51, 2014)各被標識分子中の適当なヘリックス領域に GFP の N 末に存在するヘリックス構造を連続させた融合蛋白質を作成、試行錯誤を繰り返して constrained tagging を行ってきた。この分野における先駆的成功例として知られる septin の場合(Nature 443:466-9, 2006)のように、被標識分子の C 末に都合良くヘリックス領域が存在すればこの種の constrained tagging は容易であるが、一般にそのような幸運は稀である。私たちの場合も厳密な意味で被標識分子の生理的な重合能を保ったまま標識に成功したのは極少数であり、研究遂行に苦慮してきた。

蛍光偏光顕微技術の用途は、上述の細胞骨格動態観察例に代表される細胞生物学的バイオセンサー開発に留まらない。有望な応用例は蛍光相関分光法(FCS)である。FCSは局所における蛍光標識分子由来の蛍光信号の時系列データを自己相関関数により解析し、測定領域における蛍光標識分子の数と蛍光標識分子の動きやすさ(並進拡散)を評価する手法である。従来の FCS の問題点は、並進拡散の変化が分子状態の変化に必ずしも敏感ではない為、バックグラウンドから有意な信号を検出しづらいことであった。蛍光偏光計測によればこの困難を乗り越える可能性が考えられた。回転拡散は並進拡散より様々な分子状態の変化に鋭敏であり、分子量の多寡や分子の形状に大きく左右されないからである。

2. 研究の目的

上述の背景の下、蛍光偏光顕微観察応用、普及の鍵となる新規 constrained tagging 法を開発し、この手法を蛍光偏光バイオセンサー構築による細胞骨格動態機構解明と新規偏光 FCS の二つのテーマについて応用し、有用性を検証することを目的とした。

具体的には蛍光偏光顕微観察の為の新規 constrained tagging 法を開発し、細胞内バイオセンサーとしての用途を検討することと、同技術の偏光 FCS への応用を目指すこととした。より具体的には、新規 constrained tagging 法の候補として三種の手法につき比較検討し、なるべく容易かつ汎用性の高い方法論の確立を目指すこと、及びこの方法論の確立を前提として、回転拡散の評価可能な偏光 FCS 用高速計測系と解析プログラムの確立を目指して研究を実施した。

3. 研究の方法

まず最初に、蛍光偏光顕微観察の為の新規 constrained tagging 法として三種の標識技術、即ち改変直接ヘリックス法、protein ligation 反応を利用した circularization 法、被標識分子に強く結合する人工小分子を介する抗体様小分子法を開発する。改変直接ヘリックス法は従来の constrained tagging の成功例に倣い、被標識分子の有するヘリックス構造と GFP およびその変異体のヘリックス構造を連続させて結合させる方法である。GFP の変異体に工夫を加えることにより、従来法よりも自由度の高い標識法とすることを目指した。Protein ligation 反応を利用した circularization 法では、同反応により被標識分子と蛍光分子を二か所で結合させ、細胞内で constrained tagging を実現する可能性を検討する。抗体様小分子法では、足場として被標識分子に固く結合する人工小分子に、あらかじめ GFP を constrained tagging することで、間接的に蛍光偏光観察の為の標識を実現する方法で、各種抗体様小分子について検討を進めることを方針とする。

以上の方法論の確立を前提として、その中で最も有望なプローブ候補につき、これを細胞骨格分子の細胞内動態を計測するバイオセンサーとして応用することを目指した。当初の応用例としては、初代培養神経細胞や通常の培養細胞における細胞骨格動態の検証を目指すこととした。更に並行して同プローブの偏光 FCS へ応用可能性を検討することを目的に、装置構築と解析プログラム作成を企図した。

4. 研究成果

蛍光偏光顕微観察の前提となる新規 constrained tagging 法の開発に成功した。

まず、F アクチンに結合するカルボニンホモロジドメインに、GFP の循環置換体を利用して

constrained tagging を行う改変 ヘリックス法により、実際に F アクチンの蛍光偏光顕微鏡観測が可能となったことが明らかとなった。所見については *Microscopy*, **68**, 359–68, 2019 にて報告し、同論文は Editor's Choice 論文に選定され、オープンアクセス化されるなど一定の評価を受けた。

以上の所見から、足場分子を介して間接的に constrained tagging を行うことが可能となったことが明らかとなったので、この成功をもとに、抗体様小分子を介して間接的に constrained tagging を行う抗体様小分子法の開発を目指した。その結果得られた新規プローブが、以下に述べるように予想外の発展を見せ、汎用性も期待できることがわかったので、当初の予定を変更し、同手法の多色化、応用範囲を拡大する各種改変等を実施し、手法としての確立を実施し、概ね開発に成功した。

具体例として、アクチンを標的とする抗体様小分子を利用し、全反射照明下でアクチン動態を検証したところ、蛍光ファロイジンと同等の蛍光偏光観測が可能であることが明らかとなった。更に同プローブの結晶化により、タンパク質の構造面からも、確かに constrained tagging が実現されていることを確かめた。抗体様小分子法は、一般的なファージディスプレイ法により、任意の生体分子を標的とするプローブが取得可能で、汎用性の高い、遺伝子にコードされたプローブを生成可能という優れた特徴を有する。更に、いったん足場としての抗体様小分子と蛍光分子の間の結合を constrained tagging となるように構成できれば、任意の標的分子について条件を細かく振ることなく、蛍光偏光観察に適した条件で蛍光標識可能となる。以上の成功所見と開発経過をもとに、抗体様小分子法の標識法としての有用性と、他の手法に対する優位性が明らかとなったため、改変 ヘリックス法、circularization 法については、以降の開発は中止した。

細胞骨格分子の細胞内動態計測については、手法の初期応用例の対象につき、複数の標的分子について上述の培養神経細胞や通常の培養細胞等で様々な検討を進めた。当初の応用目的の主眼は中間径フィラメントタンパク質であったが、上述の検討の結果から、特にアクチンを標的とする抗体様小分子法によるプローブを選んで、解析を進めることとした。遺伝子にコードされている特徴を生かし、培養細胞を使用した実験に留まらず、発生生物学領域への応用を目指したところ、様々な成果を得ることができた。

具体的には、上述の結晶化によるプローブ構造の確認に加え、凍結電顕による実験により、アクチンを標的とするプローブのアクチン線維との結合状態についての構造情報の取得にも成功した(共同研究)。続いて、細胞生物学、発生生物学への応用例として、ヒトデの卵母細胞におけるアクチンの動態について新規プローブによる解析を実施した。既知のアクチン構造動態の追跡に加え、生化学的、薬理的解析と、新たに考案した画像処理法により、従来全く知られていなかった広域的なアクチン関連構造の動態を発見することにも成功した。以上の蓄積データをとりまとめ、一部は解剖学会全国学術集会にて発表した。また所見をまとめた論文は現在投稿中である。

偏光 FCS については、光学系構築と解析プログラムの調整をほぼ終了し、実際の計測検討を行うと共に、新たに別途共同研究による高速計測実験を開始している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nori Nakai, Keisuke Sato, Tomomi Tani, Kenta Saito, Fumiya Sato, Sumio Terada	4. 巻 68
2. 論文標題 Genetically encoded orientation probes for F-actin for fluorescence polarization microscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 359-368
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jmicro/dfz022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Nori Nakai, Fumiya Sato, Keisuke Sato, Tomomi Tani, Sumio Terada
2. 発表標題 Development of genetically-encoded actin probes for fluorescence polarization microscopy
3. 学会等名 The American Society for Cell Biology Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nori Nakai, Fumiya Sato, Keisuke Sato, Tomomi Tani, Sumio Terada
2. 発表標題 Development of genetically-encoded actin probes for fluorescence polarization microscopy
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会・第51回日本発生生物学会 合同大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中井紀、佐藤文哉、佐藤啓介、谷知己、寺田純雄
2. 発表標題 蛍光偏光顕微鏡観察のための遺伝子にコードされたアクチンプローブの開発
3. 学会等名 第11回 脳統合機能研究センター・お茶の水ニューロサイエンス協会共催 若手インスパイアシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉崎綾奈、佐藤啓介、千葉和義、Mehta Shalin、谷知己、寺田純雄
2. 発表標題 新規アクチン蛍光偏光プローブの開発
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中井紀、佐藤文哉、佐藤啓介、谷知己、寺田純雄
2. 発表標題 蛍光偏光顕微鏡観察のためのアクチンプローブPANDIAの改良
3. 学会等名 第123回日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 寺田純雄
2. 発表標題 Toward deciphering the mystery of cytoskeletal dynamics. Keynote Speech
3. 学会等名 The 33rd Joint Annual Conference of Biomedical Science, Taiwan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	川岸 将彦 (Kawagishi Masahiko) (60323606)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教 (12602)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	齊藤 健太 (Saito Kenta) (60374659)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教 (12602)	
研究分担者	佐藤 啓介 (Sato Keisuke) (60644044)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教 (12602)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	谷 知己 (Tani Tomomi)	ウツホール海洋生物学研究所・研究員	
連携研究者	千葉 和義 (Chiba Kazuyoshi) (70222130)	お茶の水女子大学・基幹研究院・教授 (12611)	
連携研究者	白水 美香子 (Shirouzu Mikako) (70280732)	国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー (82401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関