

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：12602

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B））

研究期間：2018～2022

課題番号：18KK0222

研究課題名（和文）生命現象に迫るユニバーサルな蛍光偏光顕微鏡測法開発

研究課題名（英文）Development of universal fluorescence polarization microspectroscopic methods for life science

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） 19,400,000円

研究成果の概要（和文）：蛍光偏光顕微鏡測法の為の新規プローブであるPOLArISプローブ（蛍光分子と非標識分子の立体的相互関係を固く維持した状態で両者を結合させる方法）について、使用する人工抗体様小分子種の拡張と多色化に成功した。アクチンを標的とするプローブについては、蛍光双極子モーメントの方向、アクチン線維との結合状態について詳細が判明している。また、このプローブを利用してヒトデ卵母細胞の発生過程におけるアクチン動態を蛍光偏光顕微鏡により観察し、従来知られていなかった大域的なアクチン構造の発見に成功した。各種蛍光偏光顕微鏡の最適化、プローブ側の改良、偏光蛍光相関分光装置の計測基礎条件の決定を並行して継続している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人工抗体様小分子種の拡張と多色化により、新規開発に成功した標識法POLArIS法は更にその汎用性が向上し、生命科学領域における蛍光偏光を利用した計測の可能性を大きく拡張した。また、アクチンをはじめとする細胞骨格分子を標的としたイメージングの成果から明らかのように、様々な学術的意義を高い知見の蓄積が期待できる。また高感度蛍光相関分光法への展開も予想され、細胞生物学、生物物理学、発生生物学の他、基礎から応用まで生命科学の広い領域で成果が見込まれる。

研究成果の概要（英文）：We have succeeded in expanding the variety of artificial antibody-like molecule in the POLArIS probe, a novel probe for fluorescence polarized microspectroscopies. Regarding a probe targeting actin, both the direction of fluorescent dipole moment and the binding state to actin fibers were determined. Using this probe, we observed actin dynamics during starfish oocyte/embryo development and succeeded in discovering previously unknown dynamics of global actin structure. Currently, optimizations of both various spectroscopies and probes are underway.

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

遺伝子にコードされた蛍光標識としての蛍光タンパク質の実用化以来、蛍光イメージングは基礎生物医学研究の基盤技術としてゆるぎない進歩を遂げている。しかし近年頻用されるようになった超解像顕微鏡法をはじめ、従来の蛍光顕微鏡測光法はいずれも蛍光標識分子の「輝点」としての位置情報を精密に計測する手法であり、被標識分子の構造変化を直接観察することは困難であった。光は横波としての性質をもち、その振動面を偏光面とよぶ。蛍光にも偏光面があり多くの場合その偏光面は蛍光分子を電気双極子とみなした場合の双極子方向と一致する。蛍光標識分子の発光双極子の方向を介して被標識分子の動態を観測する蛍光偏光顕微鏡測光法が実現すれば、高い時間分解能で従来の蛍光顕微鏡技術では見過ごされてきた分子の配向や回転運動に関する情報を同時に取得できる。この情報から、既存の超解像技術や構造生物学的手法では不可能な、生体分子の構造変化や超分子構造動態、分子間の相関関係を動的に計測する新たな微細構造解析が可能となる。

これまで蛍光偏光計測に適した一般的な蛍光標識技術がなかった為、蛍光偏光顕微鏡測光法は普及していなかった。研究代表者のグループは2016年末、この問題を根本的に解決する新規蛍光偏光プローブ法 POLArIS (Probe for Orientation and Localization of Arbitrary Intracellular Structures) 法開発に成功した。このプローブは2つの可変ループドメインを介して被標識分子と安定に結合する人工抗体様小分子を利用する。我々の最初の成功例はアクチンを被標識分子とするプローブであるが、可変ドメインはファージディスプレイを用いたスクリーニングにより任意の個別のタンパク質に特異的に結合するよう適応させることができる。この人工抗体様小分子を剛直なポリペプチドリンカーを介して蛍光タンパク質等と結合させ、蛍光偏光プローブとすることで、原理的に任意の生体分子に対し蛍光偏光計測に適した標識が可能になることが期待された。

2. 研究の目的

研究計画の目的は、この独自の新規プローブ法と海外共同研究先の蛍光偏光方向を3次元で観測する光学顕微鏡技術 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA:113, E6352-61, 2016) を融合し、蛍光偏光を用いた蛍光イメージング法を、生命科学におけるナノメートルスケールの微細構造・ミリ秒単位の分子間相互作用の解析の為に応用可能な独自のイメージング技術として確立し、未知の生命現象を発見、解析することであった。具体的な技術達成目標として(1) POLArIS法の汎用化の為に技術的基盤の確立、(2) POLArIS法により標識された生体分子の蛍光偏光顕微鏡観察、(3) 蛍光偏光を利用した新規蛍光相関分光関連手法の開発、が挙げられ、研究期間終了時には生命科学領域における蛍光偏光顕微鏡観察の普及、汎用化の前提となる光学システム設定と環境整備を終え、初期応用例を提示することを目標とした。研究代表者グループの新規プローブ技術、シカゴ大グループの蛍光偏光顕微鏡技術を中心とした国内外の研究機関の協力により、国際共同研究基盤強化と若手研究者育成・国際交流を目指した。

3. 研究の方法

以下に列挙する方法により研究を進めた。

(1) POLArIS法の汎用化の為に技術的基盤の確立

人工抗体様小分子と蛍光タンパク質発光双極子の位置関係の検証
結晶化等により POLArIS法アクチンプローブの構造情報を決定し、in vitroにおけるアクチンとの結合関係を利用して蛍光偏光軸を定量的に検証する。

POLArIS法の多色化、蛍光スイッチング化

各種蛍光タンパク質等を利用し、3色同時観察が可能な条件を実現する。並行して光照射により蛍光偏光を発する光活性型プローブ等を開発する。

POLArIS法のターゲット分子スクリーニング

限定コドンによりアミノ酸配列にバイアスがかからない形で DNA ライブラリーを合成、ファージミドリブラリーを構築し、ファージディスプレイによるターゲット分子(各種細胞骨格タンパク質他)のスクリーニングを行う。

(2) POLArIS法により標識された生体分子の蛍光偏光顕微鏡観察

項目(1)の成果を元に各種の蛍光偏光顕微鏡観察を行う。POLArIS法により標識された生体分子の多次元蛍光偏光顕微鏡観察として、(i)細胞分裂や受精時のアクチン系細胞骨格動態追跡(哺乳類培養細胞株、分裂酵母、ヒト精子・卵(母)細胞等を利用)、(ii)神経系におけるアクチン系細胞骨格動態追跡等。

(3) 蛍光偏光を利用した新規蛍光相関分光関連手法の開発

蛍光相関分光法は、レーザー光を回折限界まで絞り込み、照射領域に出入りする蛍光分子をフォトンカウンティングによってマイクロ秒オーダーの時間分解能で検出し、その時系列変化を自己相関関数で解析することにより蛍光標識された分子の多寡(濃度)と動きやすさ(並進拡散定数)を推定する汎用性の高い手法である。分子間相互作用による並進拡散の変化が観測できれば、

分子間相互作用の動態を液相で検出することが可能である。我々の新規標識法を利用すれば、並進ではなく分子の回転拡散の変化を追跡することが可能であり、並進拡散を検出する従来の蛍光相関分光法より遥かに高感度で汎用性の高い分子間相互作用解析装置となる。蛍光偏光揺らぎの時系列変化を計測し、POLARIS法により標識された複数のタンパク質に対し蛍光偏光相関同時観察と相互作用解析を目指した。

4. 研究成果

(1) POLARISプローブの汎用化を目的として、人工抗体様小分子種の拡張と多色化実験を行い、開発に成功した。開発に成功した人工抗体様小分子法による新規プローブの多色化、応用範囲を拡大する改変等に関する所見を、査読付き英文速報誌(BBRC 565:50-56, 2021)に発表し、大きな反響を得ている。研究の競合の関係から速報誌への発表となったが、投稿後改訂なしに即座に掲載受理され、SNS上でも有力研究者や有力誌編集者からの反響がみられた。また、人工抗体様小分子としてアクチンを標的とするアフィマーを使用したPOLARISプローブについて、タンパク質結晶構造解析により詳細な配向双極子の配置検証等を行った(PNAS 118:e2019071118, 2021)。このプローブについては、クライオ電顕による分析から、アクチン線維との結合状態についての構造情報をもとに結合に関与するプローブの配列についても検討が終了し、他のアクチン結合プローブとの比較所見とまとめて現在論文発表を準備中である。また色変換型プローブの作成にも成功し、これを利用したイメージングの実験を継続している。POLARIS法のターゲット分子スクリーニングについては、途中より方針を変更し、専門の研究室との協業関係を構築、協力を仰ぐ形とした。

(2) POLARIS法により標識された生体分子の蛍光偏光顕微鏡観察として、ヒトデの卵母細胞の発生過程におけるアクチンの動態についてPOLARISプローブを利用して解析した。既知のアクチン動態の追跡に加え、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、従来全く存在の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、これをフレア構造と命名した(PNAS 118:e2019071118, 2021)。この成果の反響は大きく、大学からプレスリリースとなったほか、海外を含む各種メディアでその内容が紹介された。培養神経細胞等その他の実証実験も継続中である。

(3) 蛍光偏光を利用した新規蛍光相関分光関連手法の開発について、COVID-19の影響により、予定より遅れたが、偏光蛍光相関分光装置の構築と解析プログラムの調整を実施し、共同研究による予備的な所見について学会発表を行った。計測基礎条件の決定のためのモデル分子を設計、これを利用した実験を開始している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakai Nori, Sato Keisuke, Tani Tomomi, Kawagishi Masahiko, Ka Hiromasa, Saito Kenta, Terada Sumio.	4. 巻 565
2. 論文標題 Development of nanobody-based POLARIS orientation probes enabled multi-color/multi-target orientation imaging in living cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications.	6. 最初と最後の頁 50-56
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.05.088	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ayana Sugizaki, Keisuke Sato, Kazuyoshi Chiba, Kenta Saito, Masahiko Kawagishi, Yuri Tomabechi, Shalin B Mehta, Hirokazu Ishii, Naoki Sakai, Mikako Shirouzu, Tomomi Tani, Sumio Terada.	4. 巻 118 (11)
2. 論文標題 POLARIS, a versatile probe for molecular orientation, revealed actin filaments associated with microtubule asters in early embryos	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	6. 最初と最後の頁 e2019071118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2019071118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakai N, Sato K, Tani T, Saito K, Sato F, Terada S.	4. 巻 68(5)
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 (Oxford, England).	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18件（うち招待講演 4件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Sumio Terada他
2. 発表標題 Expanded repertoire of POLARIS, a versatile fluorescent probe for molecular orientation.
3. 学会等名 The 66th Biophysical Society Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中井紀ほか
2. 発表標題 Nonobodyを利用した蛍光偏光ライブイメージングのためのプローブNonobody-based POLArISの開発
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 寺田純雄
2. 発表標題 論文賞授賞講演
3. 学会等名 日本顕微鏡学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤啓介ほか
2. 発表標題 ユニバーサル分子配向プローブ POLArIS の開発と細胞骨格動態解析への応用
3. 学会等名 生体運動研究合同班会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 寺田純雄
2. 発表標題 生体分子の配向を可視化する蛍光プローブの開発と応用
3. 学会等名 日本レーザー学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷知己ほか
2. 発表標題 蛍光偏光で見る細胞皮層アクチンの配向ダイナミクス
3. 学会等名 生体運動研究合同班会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤啓介、杉崎綾奈、齊藤健太、Shalin B. Mehta、白水美香子、谷知己、寺田純雄
2. 発表標題 F-actin特異的分子配向プローブPOLArISactの開発と評価
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会/第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉崎綾奈、佐藤啓介、千葉和義、川岸将彦、寺田純雄
2. 発表標題 ヒトデ初期発生の有糸分裂においてアクチン線維は微小管星状体と関連して放射状に伸長する
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会/第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺田純雄
2. 発表標題 新規汎用蛍光偏光プローブPOLArISの開発とライブイメージングへの応用
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会/第98回日本生理学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中井紀、寺田純雄
2. 発表標題 英文誌"Microscopy"が選んだ顕微鏡ホットトピック Genetically encoded orientation probes for F-actin for fluorescence polarization microscopy.
3. 学会等名 日本顕微鏡学会第63回シンポジウム顕微鏡オンラ インフォーラム2020 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤啓介, 杉崎綾奈, 斎藤健太, Mehta Shalin, 白水美香子, 谷知己, 寺田純雄.
2. 発表標題 新規ユニバーサル蛍光偏光プローブPOLARISの開発.
3. 学会等名 第125回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉崎綾奈, 佐藤啓介, 千葉和義, 川岸将彦, 寺田純雄.
2. 発表標題 蛍光偏光ライブイメージングによるヒトデ卵の初期発生におけるアクチン動態の解析.
3. 学会等名 第125回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中井紀, 佐藤啓介, 杉崎綾奈, 永嶋一貴, 齊藤健太, 川岸将彦, 谷知己, 寺田純雄.
2. 発表標題 蛍光偏光ライブイメージングのためのプローブPOLARISの汎用性拡張の試み.
3. 学会等名 第125回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 N.Nakai,K.Sato,T.Tani,K.Saito,F.Sato,S.Terada.
2. 発表標題 GFP-based F-actin Orientation Probes for Fluorescence Polarization Microscopy and Speckle F-actin Orientation Imaginag in Living Cells.
3. 学会等名 2019 The American Society for Cell Biology (国際学会)
4. 発表年 2019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 The American Soceity for Cell Biology 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

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計4件

産業財産権の名称 抗原結合タンパク質と蛍光タンパク質または蛍光標識されるタグタンパク質との融合タンパク質	発明者 寺田 純雄：佐藤啓介：中井 紀：齊藤 健太：川岸 将	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、17/434261	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 抗原結合タンパク質と蛍光タンパク質または蛍光標識されるタグタンパク質との融合タンパク質	発明者 寺田 純雄：佐藤啓介：中井 紀：齊藤 健太：川岸 将	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、20763771.1	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 (蛍光標識に関する新規手法)	発明者 寺田純雄他4名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/7568	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 抗原結合タンパク質と蛍光タンパク質または蛍光標識されるタグタンパク質との融合タンパク質	発明者 寺田純雄、佐藤啓介、中井紀、齊藤健太、川岸将彦	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-034315	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>TMDU Research Activities 2021-2022 https://www.youtube.com/watch?v=6V5Y59CUZV0 新規蛍光顕微鏡測を実現する蛍光標識技術ポラリス法の開発 https://www.tmd.ac.jp/press-release/20210312_1/ POLARIS, a versatile probe... https://www.tmd.ac.jp/english/press-release/20210312_1/</p>
--

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)	
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)	
研究分担者	中木戸 誠 (Nakakiodo Makoto) (80784511)	東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・助教 (12601)	

	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)		
研究協力者	千葉 和義 (Chiba Kazuyoshi)		
研究協力者	白水 美香子 (Shirouzu Mikako)		

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
研究協力者	メータ シャーリン (Mehta Shalin)		

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			
米国	ウッズホール海洋生物学研究所			
米国	CZ Biohub			