

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K16471

研究課題名(和文) 回転拡散を利用した蛍光相関分光による細胞骨格蛋白分子の重合過程の解析

研究課題名(英文) Analysis of cytoskeletal proteins using polarization-dependent fluorescence correlation spectroscopy

研究代表者

川岸 将彦 (KAWAGISHI, Masahiko)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：60323606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、回転拡散を利用した蛍光相関分光法により、細胞骨格蛋白分子の重合を観察する事を目的とする。回転拡散は、並進拡散に比べて分子量の変化に敏感なので、それを利用した蛍光相関分光法は、対象分子の変化を鋭敏に、しかも溶液の中で観察出来る。本研究費で高速の光子検出器を購入して、測定光学系を更新することが出来た。実験中の課題から、有限時間測定での回転拡散の推定のバイアスの補正法を作り、又、測定試料の状態変化によって生じる回転拡散の変化を検出するための種々の条件を求め、現在論文発表の準備を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

蛍光偏光を利用して回転拡散を計測する蛍光相関分光法は、従来の並進拡散のみを使った方法よりも、分子量の変化を鋭敏に、しかも溶液の中で直接に計測する事が出来る利点がある。しかし、測定の複雑さや時間の長さのため、あまり広く使われていなかった。本研究の成果は、短かい測定時間の際のバイアスや精度を補正する方法を提示することで、測定をしやすくする意義を持つ。これは、この測定法を検査などに応用する基盤になりうるものである。

研究成果の概要(英文)：This research aims to characterize cytoskeletal proteins using polarization-dependent fluorescence correlation spectroscopy (Pol-FCS). Because rotational diffusion is more sensitive to the change in the molecular weight of the fluorophores than translational diffusion is, Pol-FCS that uses polarization to monitor the rotation of fluorophores can be a sensitive measure to study proteins in solution. I studied the correction method for estimation bias of rotational diffusion in finite-length data and the condition required to detect the change in rotational diffusion parameters caused by the interaction of fluorescence-labeled molecules. These studies are now in preparation for publication.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞骨格 蛍光相関分光

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

蛍光相関分光法 (Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS)とは、溶液溶液中の蛍光分子からの蛍光強度の揺らぎを測定して、そこから蛍光分子の運動状態を調べる手法である。光学顕微鏡の焦点領域は $1 \mu\text{m}^3 = 10^{-15} \text{L}$ 程度の微小領域であるので、 $\text{nM} = 10^{-9} \text{M}$ 程度の濃度の蛍光分子を観測する場合、観測される分子数は数えられる程度のもことになる。従って、その観測領域中の蛍光分子が運動などを起こすと、それは蛍光強度の揺らぎとして観測され、そこから逆に、蛍光分子の運動のパラメーターを算出する事が出来る。この手法は、溶液中の蛍光分子、蛍光蛋白の挙動を調べる有用な方法となっている。

蛍光相関分光法で主に測定されるパラメーターは、蛍光分子の並進拡散係数、分子数である。また、複数の蛍光分子を同時に観測し、その両者の蛍光強度の揺らぎの相関性から、両者の共局在や相互作用の程度を求める蛍光共相関分光法 (Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy, FCCS) も行われる。分子の並進拡散係数から、分子の大きさを推定する事が出来る。しかし、並進拡散係数は分子量の立方根に反比例する量なので、分子の相互作用による分子量の変化にあまり敏感ではないという問題があった。例えば、2分子が結合して分子量が2倍になっても、並進拡散係数は $2^{-1/3} = 0.79$ 倍程度にしか小さくならなかった。

2. 研究の目的

蛍光分子の並進拡散係数ではなく、回転拡散係数を測定すれば、これは分子量に反比例する量なので、分子の相互作用による分子量の変化に敏感である。例えば、2分子が結合して分子量が2倍になると、並進拡散係数は半分程度に小さくなる。本研究は、回転拡散係数を利用した蛍光相関分光法により、蛋白の溶液中での相互作用の動態を観察する事を目的とする。それにより、細胞骨格蛋白分子の重合を観察する事を目指す。

蛋白の相互作用は、一方の蛋白を固相化し、それに結合作用する相手を液相から分離して検出するのが通常であるが、この蛍光相関分光法では、溶液中の相互作用を液相から分離せずに観察する事が出来る。この事は、溶液中で重合状態が変化するような蛋白、固相化によって重合状態が変化するような蛋白を観察するのに有利である。

3. 研究の方法

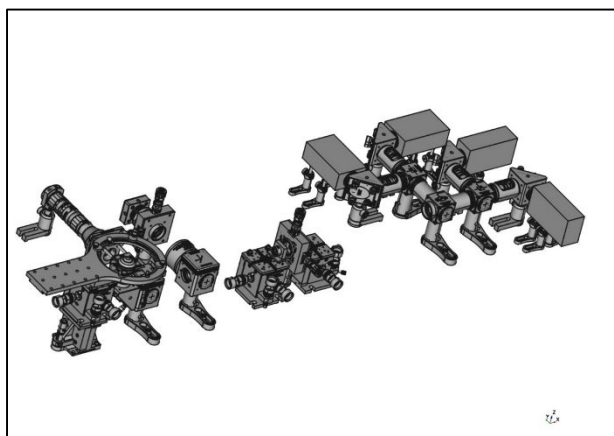
並進拡散と回転拡散とを観測する上で、最も異なる点は時間領域である。通常の蛋白分子が、光学顕微鏡の観測領域程度の距離を並進拡散するには、マイクロ秒程度の時間がかかるが、蛋白の向きが回転拡散するには、ナノ秒程度の時間がかかる。よって、回転拡散の観測に必要なものは、高速の光子検出器である。現在、入手可能な光子検出器としては、光電子増倍管、アヴァランシェフォトダイオード、ハイブリッドフォトディテクタなど複数の種類が出て来ており、それぞれ、感度、ダークカウント、不応時間、アフターパルスなどの性能に差異がある。そこで、それらを試して、相応しい機種を選んで導入し、それに合わせて測定光学系を構築する。

又、細胞骨格蛋白分子の測定の試験を続ける中で、回転拡散を利用した蛍光相関分光法の解析を行う上で、二つの課題が見付かった。それらに対処するため、補正法などの考案も行った。

4. 研究成果

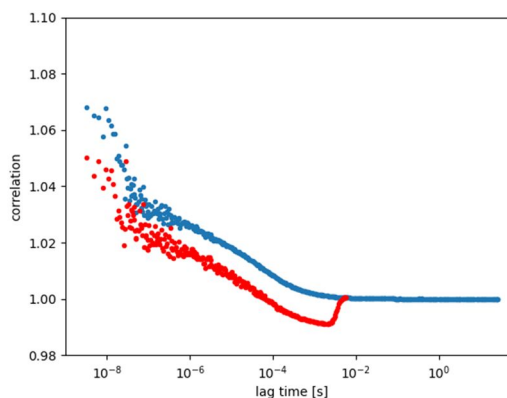
(1) 測定光学系の構築

高速の光子検出器の選定は、機器を所有している研究施設で使わせて貰ったり、機器をデモで借用したりして行った。しかし、COVID-19の流行による活動制限と混乱、その後の半導体の品薄により、当初の想定以上に時間がかかって遅れることになった。最終的に、アフターパルスが少ない新しい高速の光子検出器として、シリコンフォトマルチプライアのMPPCモジュールを導入した。その検出器の性能に合わせて、測定光学系も種々の調整を行い、構築した(右に全体概略図)。現在、当初の目的の細胞骨格分子の重合の計測を行っている。



(2) 有限長の測定データのバイアスの処理について

測定の試験を続ける中で、出て来た課題の一つは、実際の測定時間長が有限だという制限である。FCS の解析に於いては、測定された蛍光強度の揺らぎから自己相関函数を求め、それを理論的に求められる拡散の形と比較して、蛍光分子の動態を求めるという操作を行う。理論式は理想的に無限時間の測定データを想定したものであるが、実際の測定に於いては、限られた長さのデータしか得られない。近年、有限データからの並進拡散の自己相関函数の推定では系統的なバイアスが生じることが指摘されている (Kohler et al. Biophys J. 122, 241–253, 2023)。更に、回転拡散の推定の場合には、並進拡散よりも短い時間領域の推定を行うため、並進拡散とは異なるバイアスが出ることになる。(右図は同一サンプルを測定した一例で、測定時間が長い場合(青)は理論に沿った相関函数になるが、測定時間を短くすると(赤)歪んだ曲線になる。)測定時間を延ばしにくい要因の一つとして、溶液中に生じる蛍光分子の凝集体の問題がある。凝集体は、強い相関を持ったノイズを出すため、それを含むデータは解析から外さざるを得ず、結果的に測定時間を切るになってしまう。



この測定データの長さの制限に対処するため、有限時間の測定データからの回転拡散の推定のバイアスの出方を調べて補正法を求めた。現在、論文発表に向けて準備を進めている。

(3) 測定対象の分子の形状、状態野返歌による、推定とノイズへの影響について

測定の試験を続ける中で、出て来た課題のもう一つは、測定対象の分子の形状の問題である。FCS の解析では、実測値から推定した自己相関函数を理論と比較することになるが、多くの場合、理論としては、球形の粒子の拡散動態を想定したものが使われる。これは、通常の球形の蛋白分子を扱う上では適当であるが、細胞骨格のように重合して長い構造を作り得る分子の場合、実際の拡散動態との差異を生じる。

通常理論式で用いられる球形から大きく外れた形状の分子の拡散動態も考慮する必要がある。回転拡散の推定の時に、並進拡散とは異なるノイズの出方を正しく評価しないと、測定対象の分子の形状、状態の変化による回転拡散の変化を過大、或いは過少に評価してしまうおそれがある。この問題に対処するため、球形から大きく外れた分子の拡散動態を調べ、その回転拡散の変化を検出するための種々の条件を求め、現在論文発表に向けて準備を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Iwasaki Yuko, Kawagishi Masahiko, Takase Hiroshi, Ohno-Matsui Kyoko	4. 巻 10
2. 論文標題 Discrimination of dissociated lymphoma cells from leukocytes by Raman spectroscopy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15778
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-72762-5	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 -

1. 著者名 Sugizaki Ayana, Sato Keisuke, Chiba Kazuyoshi, Saito Kenta, Kawagishi Masahiko, Tomabechi Yuri, Mehta Shalin B., Ishii Hirokazu, Sakai Naoki, Shirouzu Mikako, Tani Tomomi, Terada Sumio	4. 巻 118
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	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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 寺田 純雄, 川岸 将彦	4. 巻 -
2. 論文標題 軸索	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 脳科学辞典	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14931/bsd.5399	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 -

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 Takase Hiroshi, Arai Ayako, Iwasaki Yuko, Imai Ayano, Nagao Toshikage, Kawagishi Masahiko, Ishida Tomoka, Mochizuki Manabu	4. 巻 90
2. 論文標題 Challenges in the diagnosis and management of vitreoretinal lymphoma ? Clinical and basic approaches	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Progress in Retinal and Eye Research	6. 最初と最後の頁 101053 ~ 101053
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.preteyeres.2022.101053	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 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 岩崎優子、川岸将彦、高瀬博、大野京子
2. 発表標題 ラマン散乱光解析による悪性リンパ腫細胞と正常リンパ球の鑑別能
3. 学会等名 2019年度日本分光学会年次講演会
4. 発表年 2019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 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繊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126回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 啓介, 杉崎 綾奈, 千葉 和義, 齊藤 健太, 川岸 将彦, Shalin B. Mehta, 白水 美香子, 谷 知己, 寺田 純雄
2. 発表標題 ユニバーサル分子配向プローブPOLARISの開発と生細胞内アクチン動態解析への応用
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 啓介, 杉崎 綾奈, 千葉 和義, 齊藤 健太, 川岸 将彦, Shalin B. Mehta, 白水 美香子, 谷 知己, 寺田 純雄
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2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nakai Nori, Sato Keisuke, Tani Tomomi, Kawagishi Masahiko, Ka Hiromasa, Saito Kenta, Terada Sumio
2. 発表標題 Expanded repertoire of polaris, a versatile fluorescent probe for molecular orientation
3. 学会等名 66th Biophysical Society Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中井紀, 佐藤啓介, 谷知己, 川岸将彦, 夏博正, 齊藤健太, 寺田純雄
2. 発表標題 Nanobody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Nanobody-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 佐藤 啓介, 杉崎 綾奈, 千葉 和義, 齊藤 健太, 川岸 将彦, Shalin B. Mehta, 白水 美香子, 谷 知己, 寺田 純雄
2. 発表標題 ユニバーサル分子配向プローブPOLArISの開発と生細胞内アクチン動態解析への応用
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 門脇 (中井) 紀, 佐藤 啓介, 谷 知己, 川岸 将彦, 夏 博正, 齊藤 健太, 寺田 純雄
2. 発表標題 分子配向プローブNanobody-based POLArISの開発と、それによる多色/多標的の分子配向イメージング
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nori Nakai-Kadowaki, Keisuke Sato, Tomomi Tani, Masahiko Kawagishi, Hiromasa Ka, Kenta Saito, Sumio Terada
2. 発表標題 蛍光色や偏光方向を選択可能な汎用的分子配向プローブ Nanobody-based POLArIS の開発
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 K. Sato, N. Nakai-Kadowaki, A. Sugizaki, K. Chiba, K. Saito, M. Kawagishi, Y. Tomabechi, S. B. Mehta, H. Ishii, N. Sakai, H. Ka, M. Shirouzu, T. Tani, S. Terada
2. 発表標題 Development of POLArIS, a versatile probe for multi-color/multi-target orientation imaging in living cells
3. 学会等名 Cell Bio 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 Fusion protein of antigen-binding protein and fluorescent protein or fluorescence-labeled tag protein	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、PCT/JP2020/007568	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2021-502288	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------