

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02875

研究課題名（和文）最適化小分子プローブによる内在性タンパク質の超解像マッピング技術の開発

研究課題名（英文）Development of super-resolution mapping technology for endogenous proteins using optimized small molecule probes

研究代表者

浅沼 大祐（Asanuma, Daisuke）

東京大学・大学院医学系研究科（医学部）・講師

研究者番号：10611204

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,950,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、近年独自に構築してきたケミカルタグ技術のプローブの設計法を発展させることで、内在性のタンパク質の超解像マッピングを可能とする新たな分子プローブの設計法を提案した。AMPA型グルタミン酸受容体やチューブリンなどを対象にして最適化した小分子プローブの開発を行い、生細胞に応用して内在性の機能性タンパク質の蛍光イメージングを可能とした。さらに、STED顕微鏡法を利用した超解像マッピングにより、共焦点顕微鏡では解像できない微小構造を経時的に可視化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

分子イメージングは、技術の進歩と共に、多様な細胞現象を制御する分子機構を明らかにしてきた。機能性タンパク質のナノスケールでの配置が細胞機能の実現に重要であることが明らかにされつつあるが、従来の可視化技術はアーティファクトの回避の難しさなどの問題があり、新たな技術開発が強く望まれている。本研究では、近年独自に構築してきた分子タグ技術を発展させ、内在性タンパク質の超解像マッピングを可能とする手法を開発した。今後、さらなる研究展開により、正常な細胞と病的な細胞における機能の違いなどについて、従来見えずに分からなかったナノレベルの世界の詳細が明らかとなることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this research, I proposed a new method for designing molecular probes for super-resolution mapping of endogenous proteins by extending the design method of probes for chemical tag technology that I have independently developed in recent years. I developed small-molecular probes optimized for such as AMPA-type glutamate receptor and tubulin, and applied these probes to living cells to enable fluorescence imaging of endogenous functional proteins. Furthermore, microstructures that cannot be resolved by confocal microscopy were successfully visualized over time by super-resolution mapping using STED microscopy.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：超解像イメージング ケミカルプローブ

1. 研究開始当初の背景

分子イメージングは、緑色蛍光タンパク質 (GFP; 2008 年ノーベル化学賞) や超解像イメージング技術 (2014 年ノーベル化学賞) をはじめとした技術の進歩と共に、生命科学分野で多様な細胞現象を制御する分子機構を明らかにしてきた。これまでに、神経細胞の化学固定標本を対象とした超解像イメージングにより、シナプスタンパク質を中心とした数十 nm 程度の超分子集合体が可視化され、その集合体の個数が各々のシナプスの神経伝達物質の最大の放出量を決定することが明らかとなった。タンパク質とオルガネラの中間の大きさである超分子集合体は、光の回折限界で約 200 nm の空間分解能に制限される従来の光学顕微鏡法では解像できないが、超解像イメージングにより解像が可能となる。化学固定標本を対象としたイメージングから超分子集合体の重要性が明らかとなったが、次の展開として生きている細胞において機能性タンパク質のナノスケールでの配置の変容が細胞機能にどのように関わるのかを明らかにすることは極めて重要である。しかしながら、生きている細胞で超分子集合体という込み入った構造を経時的に可視化するには、従来法では実現が困難である。現行の超解像イメージング手法では、抗体を利用した免疫染色法や蛍光タンパク質や有機蛍光色素を利用したタグ手法が利用されるが、アーティファクトの回避の難しさなど、実験結果の解釈には極めて慎重な検証が必要となる。免疫染色法は化学固定標本に用いられることがほとんどであり、生きた細胞への応用例は少ない。GFP などの蛍光タンパク質は、生細胞の蛍光イメージングに頻繁に応用されるが、強力な励起光の照射が必要な超解像イメージングでは光褪色が深刻な問題となり、高い解像度を維持して連続的に観察することが極めて難しい。また、GFP の分子量が 27 kDa であるように、サイズが比較的大きい分子タグである蛍光タンパク質は、複数のタンパク質で組み入った超分子集合体の形成に障害となりがねず、タグを付す解析対象タンパク質の本来の働きを損ないかねない。一方、HaloTag や SNAP タグなどのケミカルタグ技術も生細胞に広く用いられ、蛍光タンパク質と比べて光褪色耐性に優れるローダミンなどの有機蛍光色素を利用できる点で超解像イメージングに適するが、蛍光タンパク質と同様にタグ分子のサイズの問題を排除することができない。従来法ではアーティファクトを最小化した目的分子の超解像マッピングは難しく、新たなアプローチに基づいた技術開発が不可欠であった。

2. 研究の目的

本研究は、内在性タンパク質の高精細な超解像マッピングを実現する手法を開発し、機能性タンパク質のナノスケールでの配置を可視化し、細胞機能との関係を明らかにすることを目的とした。研究代表者は近年、生きている細胞を対象にした超解像イメージングを実現するケミカルタグ技術を開発した。有機蛍光色素と消光団から構成されるプローブは、単独では消光団の作用により消光するが、タグタンパク質に結合すると消光作用が解消されて光る。一分子位置決定顕微鏡法に応用して、解析対象とするタンパク質とタグタンパク質から構成される融合タンパク質を発現させた細胞において、プローブを加えて蛍光明滅させて、各々の輝点の重心を決定してプロットすることにより超解像イメージングを実現した。本研究では、近年独自に構築してきたケミカルタグ技術のプローブの設計法を発展させ、構造展開に基づくスクリーニングを介した最適化小分子プローブにより内在性のタンパク質の超解像マッピング法の開発を目指した。

3. 研究の方法

本研究で提案する小分子プローブは、標的タンパク質への結合構造と蛍光団とが機能性リンカーを介して結合した分子である。超解像マッピング技術を開発するうえで小分子プローブに要求される特性として、高いシグナル・バックグラウンド比での蛍光イメージングを実現するため目的タンパク質に結合した際に大きな蛍光増大を示すことが求められる。分子設計の戦略としては、アンタゴニストなどのリガンド構造と機能性タンパク質との複合体の構造情報が豊富に蓄積されている Protein Data Bank を利用して構造展開の容易さを指標に含めて標的タンパク質への結合構造を選定し、蛍光増大特性を実現するように、蛍光団および機能性リンカーが小分子プローブの標的タンパク質への結合を大きく阻害せず、また、プローブが標的タンパク質に結合した際に光るように、蛍光団や機能性リンカーの種類、結合位置を展開した候補分子群を設計し、有機合成開発を行った。先のケミカルタグによる超解像イメージング技術の開発で得た知見から、蛍光団は光褪色耐性に優れるケイ素置換ローダミンを第一選択とした。合成した候補分子群を対象として、目的タンパク質のリガンド結合ドメインなどの精製タンパク質を用いて蛍光特性や結合解離キネティクスについて評価を行った。有望な小分子プローブ候補について、標的とするタンパク質を発現する培養細胞を用いて超解像マッピングへの応用の前段階として蛍光イメージングの特性を検証した。COS-7 や HeLa などの培養細胞にリポフェクションによって標的タンパク質をコードした発現ベクターを、蛍光タンパク質などのマーカー発現ベクターと共に遺伝子導入し、蛍光イメージングに供した。マーカーの蛍光を基に各々の細胞で標的タンパ

ク質の発現の有無を識別してプローブによる染色の特異性を評価し、過剰のリガンドを用いた競合実験によりプローブの標的タンパク質への結合の選択性を評価した。また、シナプス分子を標的タンパク質とするときは、ラット海馬由来の初代培養神経細胞にプローブを応用して、先と同様に選択性などについて小分子プローブの蛍光イメージング特性を評価した。非特異的染色などプローブの特性に問題がある場合は、結果をフィードバックして蛍光団の再選定を含めたプローブの分子設計を行った。蛍光イメージングで有望な小分子プローブ候補については、プローブの染色条件や撮像条件の最適化を図って、誘導放出抑制 (STED) 顕微鏡法を利用した超解像マッピングへ応用した。

4. 研究成果

提案する超解像マッピング技術の開発のため、はじめに α -アミノ-3-ヒドロキシ-5-メソオキサゾール-4-プロピオン酸 (AMPA) 型グルタミン酸受容体を可視化対象として小分子プローブ候補の開発を行った。分子設計の戦略としては、小分子リガンドと機能性タンパク質の複合体の既知の構造情報を利用して、構造展開の容易さも指標に含めてリガンド構造としてキノキサリンジオンを選定し、機能性リンカーを介して蛍光団を組み込んだ小分子プローブの候補群を設計して有機合成を行った。合成したプローブ候補群の特性評価のため、AMPA 型グルタミン酸受容体のリガンド結合ドメインの精製タンパク質を取得し、蛍光特性や結合・解離特性について評価を行った。プローブ候補群は、標的タンパク質との結合に伴って蛍光が増大し、当初の設計通りの特性を示した。しかしながら、超解像マッピングへの応用に向けて蛍光イメージングによる実験評価系を構築して基礎的な検討を行ったところ、蛍光観察においてプローブの非特異的な染色が問題となることが明らかとなった。蛍光イメージングのシグナル・バックグラウンド比を向上させるため、小分子プローブを構成する色素についてスクリーニングを行い、新規のプローブの開発、特性評価を進めた。AMPA 型グルタミン酸受容体を発現した培養細胞を用いて蛍光イメージングにより特性を検証したところ、標的受容体を発現した培養細胞を蛍光染色することが可能なプローブ候補を見出した。続いて、神経細胞 - グリア細胞の共培養系に応用した結果、余剰のプローブを洗浄することなく、神経細胞の標識が可能であった。さらに、プローブの染色条件などの最適化を図って、STED 顕微鏡法を利用した超解像マッピングへの応用を行ったところ、シナプスにおいて通常の共焦点顕微鏡では解像できない 100 nm 程度もしくはそれより小さいクラスター構造を経時的に可視化することに成功した。

本研究で提案する設計原理によるプローブ開発の汎用性を示すことも目的として、他の機能性タンパク質としてチューブリンを対象にした小分子プローブの開発も行った。機能性タンパク質との複合体の構造情報について既知のデータベースを参照して標的タンパク質への結合構造としてカバジタキセルを選定し、さらにリガンド構造と機能性タンパク質の結合を阻害しないように機能性リンカーと蛍光色素を組み込んだ小分子プローブの候補を設計して合成開発を行った。培養細胞に候補プローブを負荷して蛍光イメージングにより分子特性を検証したところ、余剰のプローブを洗い流すことなく可視化対象とする機能性タンパク質を高いシグナル・バックグラウンド比で蛍光染色できること、また、STED 顕微鏡法を利用した超解像マッピングによりダイナミックな構造変化を捉えられることを明らかにした。

さらに、内在性のシナプス分子に対して結合特性を示すケミカルタグの開発を併せて行った。ケミカルタグに対するプローブの構造展開に基づく最適化スクリーニングにより、非特異的染色を回避して蛍光イメージングの高いシグナル・バックグラウンド比を達成しつつ、生きている細胞において長時間の超解像観察を可能とするケミカルタグを開発した。従来の染色技術と比較を行ったところ、従来技術では光褪色の影響により数分で観察が行えなくなることに對して、本研究で構築した超解像マッピング手法では数十分以上にわたって通常の共焦点顕微鏡では解像できない微小クラスターの経時変化を観察することが可能であった。今後、構築した手法を応用することにより、従来観察ができなかった機能性タンパク質による微小構造と細胞機能とのかかわりを精査することで、神経伝達のみか、神経変性疾患の発症機序の解明へ貢献することが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Endo Yoshie, Asanuma Daisuke, Namiki Shigeyuki, Sugihara Kei, Hirose Kenzo, Uemura Akiyoshi, Kubota Yoshiaki, Miura Takashi	4. 巻 11
2. 論文標題 Quantitative modeling of regular retinal microglia distribution	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 22671
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-01820-3	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 浅沼大祐	4. 巻 59
2. 論文標題 高精細な蛍光イメージングのための色素分子の開発	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 光技術コンタクト	6. 最初と最後の頁 3-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石川 裕貴、並木 繁行、浅沼 大祐、廣瀬 謙造
2. 発表標題 中枢シナプス分子のライブセル超解像イメージングを実現する蛍光標識技術の開発
3. 学会等名 第147回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小林 新九郎、並木 繁行、浅沼 大祐、廣瀬 謙造
2. 発表標題 A novel single-particle tracking system that reveals molecular dynamics in intracellular nanodomains
3. 学会等名 第147回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大久保 洋平、並木 繁行、浅沼 大祐、櫻井 隆、廣瀬 謙造
2. 発表標題 脳組織内部におけるシナプス分子動態の1分子イメージング
3. 学会等名 第147回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大久保 洋平、並木 繁行、浅沼 大祐、櫻井 隆、廣瀬 謙造
2. 発表標題 脳組織内部におけるシナプス分子動態の1分子イメージング
3. 学会等名 生理研研究会：細胞システム理解のためのシグナル応答原理解明の最前線
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shinkuro Kobayashi, Shigeyuki Namiki, Daisuke Asanuma, Kenzo Hirose
2. 発表標題 A novel single-particle tracking system for precise measurement of molecular dynamics in intracellular nanodomains
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 下野 ひな子、浅沼 大祐、瀧川 健司、並木 繁行、廣瀬 謙造
2. 発表標題 マウスにおける血管内外のグルコース動態を可視化する蛍光プローブの開発
3. 学会等名 第146回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅沼大祐、並木繁行、廣瀬謙造
2. 発表標題 消光団を利用したケミカルタグ技術の開発とライブセル超解像イメージングへの応用
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林新九郎、並木繁行、浅沼大祐、廣瀬謙造
2. 発表標題 A novel method of long-lasting single-particle tracking based on regenerative fluorescent labeling
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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