

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03412

研究課題名(和文)新規蛍光偏光イメージング法の確立と細胞生物学的応用

研究課題名(英文)Development of a novel fluorescence polarization imaging method and its cell biological applications

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)：蛍光偏光の利用により、生体分子の向きと位置の両者について、1分子レベルの詳細な解析を可能となる。私たちは蛍光偏光を利用した観察のための新規標識手法の開発に成功し、細胞骨格を標的とするプローブを作成し、その細胞生物学的有用性を検討した。特にアクチンに対するプローブにより、ヒトデの卵母細胞における、従来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。またプローブの改良、多色化により、プローブの汎用化の基盤形成にも成功した。並行して顕微鏡側の改善、改良も実施している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規開発に成功した標識法は、本研究計画の成果である多色化等の改良により、汎用性が向上し、将来的に蛍光偏光を利用した生命科学領域におけるイメージングや計測の応用可能性が拡張された。また、細胞骨格分子を標的とした私たちのグループの応用例の成果から明らかなように、学術的意義を有する知見の蓄積が期待できる。細胞生物学、生物物理学、発生生物学の他、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。

研究成果の概要(英文)：Fluorescence polarization allows detailed analysis of both orientations and positions of biomolecules at a single molecule level. We have developed a novel labeling method for fluorescence polarization imaging and investigated its usefulness in cell biology. We have successfully discovered previously unknown dynamics of actin-related structures in starfish oocytes by using a probe for actin. We also succeeded in improvements of the probe for multicolor imaging along with modifications of microscope settings.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：蛍光偏光 細胞骨格

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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、生体分子の位置と向きの方について同時に 1 分子レベルの詳細な解析を可能とする。しかしながら観察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) が極めて困難であった為に、この種の観察は普及してこなかった。

私たちのグループは、当初チューブリン-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 (PNAS 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 末にヘリックス領域が存在すればこの種の標識は容易であるが、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。

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 法として POLArIS (Probe for Orientation and Localization of Arbitrary Intracellular Structures) 法の開発に成功した。この手法は被標識分子ごとにプローブを設計するのではなく、足場として抗体様小分子を利用し、この分子を介して間接的に constrained tagging を行う。蛍光分子と抗体様種分子を「固く」結合させるように一度分子設計を行えば、あとはファージディスプレイに代表される進化分子工学的なスクリーニングにより、プローブを被標識分子に間接的に「固く」結合させることができる。この手法の応用拡張の為に、プローブ汎用化・性能向上、観測手法の改良等が必要であることが判明したことから (1) 汎用化基盤の確立、(2) 細胞内蛍光偏光イメージング技術の確立、(3) 応用例の提示・未解明の生命現象の解析を目的として研究を開始した。

3. 研究の方法

(1) プローブ汎用化の為に技術的基盤の確立の為に、プローブ作成時に使用する人工抗体様小分子の種類を拡張を図り、同時に結晶化等の構造情報をもとに蛍光タンパク質等の配向双極子の配置検証を計画した。また、蛍光タンパク質の多色化、色変換型プローブ、蛍光偏光強度増強型プローブの開発も行った。また (2) 観測機器側の構築・改良として、スピニングディスク共焦点蛍光偏光顕微鏡の改変・最適化と Field Synthesis 蛍光偏光顕微鏡のセットアップを目指した。また (3) 手法の応用例の提示としてアクチンをはじめとする細胞骨格分子をターゲットとして細胞分裂時や培養神経細胞内の細胞骨格動態追跡の実験を計画した。

4. 研究成果

(1) 蛍光偏光顕微鏡観察のためのプローブである POLArIS プローブの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。

(2) 観測機器側の改変として、スピニングディスク共焦点蛍光偏光顕微鏡の構築・最適化を行った。分光器を構築、高輝度光源を導入し、顕微鏡側のセットアップ・性能検証はほぼ終了した状態であるが、更なる観測条件改善のために蛍光偏光強度増強等、プローブ側の改良 ((1) -) を進めている。また、詳細な性能検証の議論から、もう一つの顕微鏡開発計画として予定していた Field synthesis 蛍光偏光顕微鏡のセットアップは、ライトシート蛍光偏光顕微鏡構築に計画を変更し、設計・構築を実施した。COVID-19 の影響による一部の機材納入の遅延による計画遂行の遅れがあったが、構築を終了し、稼働開始直前の状態にある。

(3) 細胞生物学・発生生物学への応用として、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。

5. 主な発表論文等

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

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 4件/うち国際学会 1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 |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2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 岸将彦 | 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 岸将彦 | 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 |

〔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・講師 (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) | |

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 | 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) | | |
| 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 | CZ Biohub | |