

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月29日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570167

研究課題名（和文）1分子追跡用新規蛍光ナノ粒子の開発と、クラスリン被覆ピットのシグナル機構の解明

研究課題名（英文）Development of single-molecule tracking using fluorescent silicon nanoparticles and its application to signaling mechanisms in clathrin-coated pits

研究代表者

藤原 敬宏（FUJIWARA TAKAHIRO）

京都大学・物質－細胞統合システム拠点・特定拠点講師

研究者番号：80423060

研究成果の概要（和文）：

全く退色とブリンキングのない蛍光性のシリコンナノ粒子で、細胞膜上の受容体を特異的に標識し、クラスリン被覆ピットから細胞内に取り込まれる瞬間を1分子レベルで可視化することに成功した。より多種のターゲット分子をナノ粒子で標識するために、酵素タグに対するリガンドによる表面修飾法の開発をおこなった。ミリ秒オーダーの受容体間の会合や、シグナル分子との複合体形成の素過程を検出するための、高感度・高速カメラを開発し、0.1ミリ秒時間分解能でのシグナル受容体の1分子運動追跡に成功した。

研究成果の概要（英文）：

Single receptor molecules in the plasma membrane were specifically labeled with fluorescent silicon nanoparticles without blinking or photobleaching, making it possible for the first time to visualize individual internalization events through clathrin-coated pits. A method for conjugating ligands for enzyme-based protein tag to nanoparticle surface was developed, so that the versatility of the probe was enhanced. A new camera system was further developed, allowing us to detect each elementary process of receptor association and signaling complex formation at a 0.1-ms resolution.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：1分子追跡、蛍光プローブ、細胞膜、受容体

1. 研究開始当初の背景

（1）生細胞中での1蛍光分子観察は、さまざまな実験上の制約や背景蛍光のため、非常に困難であった。従来の蛍光プローブであるGFP、有機蛍光色素は、1分子観察条件では数秒から数十秒で退色する。その点、量子ドットは退色しにくい、ブリンキングが非常に頻繁であり、追跡が中断してしまう問題が

あった。そのため、生細胞中で、1分子追跡を数10秒以上続けて行えるような蛍光プローブは、それまで存在しなかった。当時、申請者のグループでは、これらの問題を解決できる、全く退色とブリンキングのない蛍光性のシリコンナノ粒子の単純な作製法（ケミカルエッチングのみ）を開発し、さらに、蛍光顕微鏡下で、生細胞上の受容体に結合させ

たシリコンナノ粒子の1分子追跡に成功していた。

(2) 申請者は生細胞上での蛍光1分子追跡で成果を挙げてきた。細胞膜上でのGFPの1分子追跡に世界で初めて成功したのをはじめ(Iino et al., Biophys. J. 80: 2667-2677, 2001)、リン脂質の1分子追跡によるホップ拡散の発見(Fujiwara et al., JCB 157: 1071-1081, 2002)、異なるカメラで撮影した画像を正確に(精度約10 nmで)重ね合わせて異分子間の共局在を検出する方法(Koyama-Honda et al., Biophys. J. 88: 2126-2136, 2005)、1分子蛍光共鳴エネルギー移動法をもちいて生細胞内でのシグナル分子の活性化を1分子ごとに見る方法(Murakoshi et al., PNAS 101: 7317-7322, 2004)など、世界最先端の1分子ナノバイオロジー手法の開発と応用を推進してきた。

2. 研究の目的

本研究では、以上の背景をもとに、以下の2つを目的とした。

(1) シリコンナノ粒子の親水性表面処理と生体分子への結合方法を改善し、その物性を解析することによって、1分子追跡のプロープとして確立すること。

(2) この新規プロープを利用して、申請者の1分子観察技術、1分子運動の解析技術の開発をさらに推進し、シグナル伝達受容体の作動機構、および、それらがリクルートを受ける、受容体ナノドメインとしてのクラスリン被覆ピット(Clathrin-Coated Pit = CCP)の形成機構を、1分子レベルで明らかにすること。

3. 研究の方法

(1) シリコンナノ粒子の親水性表面処理と生体分子への結合方法を改善し、その物性(蛍光の安定性、生体分子の活性維持、ターゲット分子への結合特異性)を評価する。

従来は、粒子表面の水素原子が他の官能基で置換されると、蛍光強度が減少することがほとんどだったため、粒子表面の水酸基にシラン系化合物を結合させて、表面を親水化していた。さらに、これにメルカプトシランを混ぜて、チオール基(-SH)を利用して、タンパク質分子に粒子を結合させていた。しかし、予備実験の結果、アリルアミンで粒子表面の水素原子を置換しても、蛍光強度が変わらないことが示唆された。この方法だと、表面にアミノ基(-NH₂)を導入できるので、これを利用した生体分子の汎用標識法として、Haloタグ融合タンパク質にナノ粒子を結合する手法の確立を目指した。

(2) 細胞膜上のシグナル伝達受容体(特に、Gタンパク質共役受容体; GPCR)を特異的に蛍光プロープで標識し、1分子追跡をおこな

う。それにより、細胞膜上の運動制御機構、シグナル伝達の作動機構、クラスリン被覆ピットの形成機構を明らかにする。

4. 研究成果

以下に研究目的(1)、(2)に対する主要な研究成果を示す。

(1)-① ケミカルエッチングの条件と、シリコンウエハーからの粒子の回収方法(ソニケーション法)を最適化し、粒子の収量を大幅に改善した。トランスフェリン分子(トランスフェリン受容体に対するリガンド)に結合させた赤色ナノ粒子(直径4nm)の水中での蛍光強度は、9時間経過しても80%維持されること、受容体への結合特異性は、少なくとも6時間経過しても失われないこと、を確認した。

(1)-② ナノ粒子標識トランスフェリンがトランスフェリン受容体に結合し、しばらく細胞膜上を拡散し、CCPに一時的に停留した後、細胞内へ取り込まれる過程(図1)の1分子運動(約15秒)の可視化に成功した。

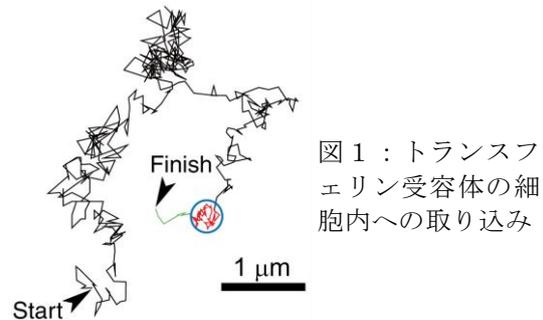


図1: トランスフェリン受容体の細胞内への取り込み

(1)-③ Haloタグ融合タンパク質を特異的に標識するためのHaloリガンドを、表面をアミノ基修飾した粒子に共有結合させ、精製した(図2)。Haloリガンドを結合後の蛍光の安定性を確認したところ、結合後4時間で90%、20時間経過しても70%以上のナノ粒子の蛍光強度が維持されることを確認した。これにより、細胞膜上のHaloタグ融合受容体をターゲットとした、より多くの種類の生体分子の特異的標識が可能になった。CHO-K1細胞に発現させたHaloタグ融合GPIアンカー型タンパク質を特異的に標識し、1分子追跡できることを確認した。

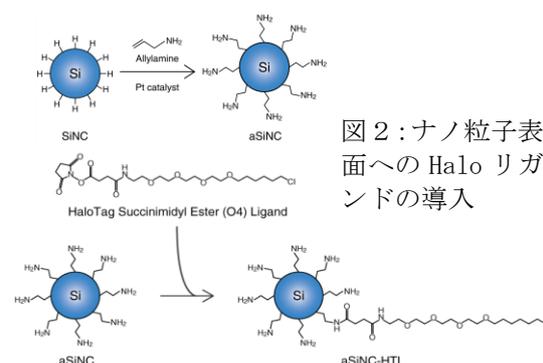


図2: ナノ粒子表面へのHaloリガンドの導入

次に、GPCR の特異標識を試みたが、細胞外に Halo タグを融合した状態で細胞膜に発現させることが非常に困難であり、ナノ粒子による 1 分子追跡には至らなかった。Halo タグは分子量が 33 kDa と比較的大きいので、これを ACP タグ (9 kDa) などの、より分子量の小さいタグに交換することにより、今後、この問題が解決できるのではないかと期待している。

(2)-① 細胞膜上における GPCR 間の結合/解離 (ダイマー形成) のダイナミクスは、そのシグナル伝達能に重要な役割を果たしていると考えられている。そこで、有機蛍光色素 (Alexa594) を結合したリガンドで GPCR (フォルミルペプチド受容体) を標識し、モノマー/ダイマー 2 次元平衡定数、および受容体間の結合/解離の時定数を 1 分子蛍光イメージング法で定量する方法を確立した (発表論文 4; 図 3)。

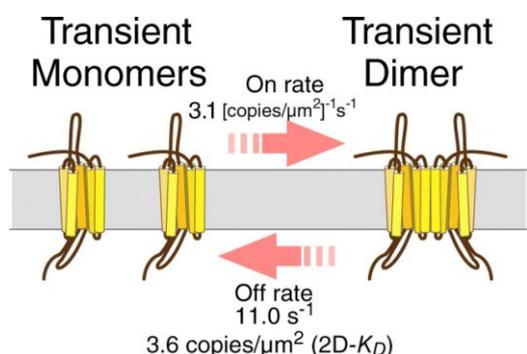


図 3: フォルミルペプチド受容体の動的モノマー/ダイマー平衡

解離の時定数は約 90 ミリ秒と非常に短いこと、また、刺激後のシグナル分子のリクルート時間も 100 ミリ秒程度以下の短時間であることが予想されたことから、受容体会合の素過程の検出には、サブミリ秒時間分解能での 1 蛍光分子追跡を可能にする装置開発、運動の定量解析のための手法の開発が必要であることがわかった。

(2)-② 申請者は、0.1 ミリ秒時間分解能での 1 蛍光分子追跡を可能にする、高感度・高速 CMOS カメラを開発した。その結果、有機蛍光色素 (Cy3, TMR) で標識したシグナル受容体 (GPI アンカー型タンパク質 Thy1, EGF 受容体) の、0.1 ミリ秒時間分解能における 1 分子追跡に成功した (世界初)。細胞膜上の受容体分子は、細胞膜直下のアクチン膜骨格で仕切られた領域 (コンパートメント) を次々と飛び移って長距離の拡散をおこなう (ホップ拡散; 図 4)。

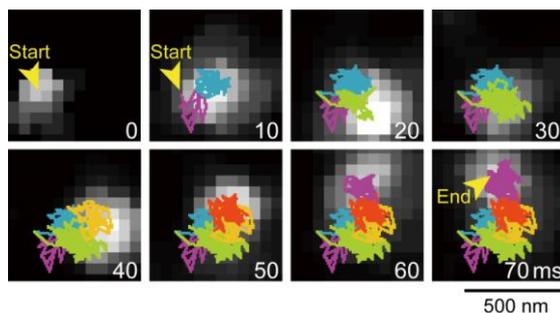


図 4: 0.1 ミリ秒時間分解能で追跡した蛍光標識受容体の 1 分子運動

EGF 受容体に関して、リガンド (EGF) 刺激前後でのコンパートメントあたりの滞在時間の変化を定量したところ、刺激後は、シグナル複合体形成により、コンパートメントあたりの滞在時間が、刺激前の約 1.5 倍に長くなることがわかった。この技術は、ミリ秒オーダーで起こる短時間のシグナル伝達の素過程の理解を劇的に進展させるものであり、今後、シグナル受容体が細胞膜上を拡散してシグナル複合体を形成し、最終的に CCP へ集積する過程を解くための、非常に重要な基盤技術となることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. A. C. E. Shibata, T. K. Fujiwara, L. Chen, K. G. N. Suzuki, Y. Ishikawa, Y. L. Nemoto, Y. Miwa, R. Chadda, K. Naruse, and A. Kusumi. Archipelago architecture of the focal adhesion: Membrane molecules freely enter and exit from the focal adhesion zone. Cytoskeleton in press (2012) DOI: 10.1371/journal.pone.0032948 (査読有)
2. Z. Kalay, T. K. Fujiwara, and A. Kusumi. Confining domains lead to reaction bursts: Reaction kinetics in the plasma membrane. PLoS ONE 7, e32948 (2012) DOI: 10.1371/journal.pone.0032948 (査読有)
3. A. Kusumi, K. G. N. Suzuki, R. S. Kasai, K. Ritchie, and T. K. Fujiwara. Hierarchical mesoscale domain organization of the plasma membrane. Trends in Biochemical Sciences 36, 604-615 (2011) DOI: 10.1016/j.tibs.2011.08.001 (査読有)
4. R. S. Kasai, K. G. N. Suzuki, E. R.

- Prossnitz, I. Koyama-Honda, C. Nakada, T.K. Fujiwara, and A. Kusumi. Full characterization of GPCR monomer-dimer dynamic equilibrium by single molecule imaging. *Journal of Cell Biology* 192, 463-480 (2011) DOI: 10.1083/jcb.201009128 (査読有)
5. A. Kusumi, Y.M. Shirai, I. Koyama-Honda, K.G. Suzuki, and T.K. Fujiwara. Hierarchical organization of the plasma membrane: Investigations by single-molecule tracking vs. fluorescence correlation spectroscopy. *FEBS Letters* 584, 1814-1823 (2010) DOI: 10.1016/j.febslet.2010.02.047 (査読有)

[学会発表] (計 7 件)

1. 藤原敬宏「膜骨格の仕切りによる細胞膜の組織化：高速 1 分子追跡による研究」第 4 回 JSBi 応用システムバイオロジー研究会「細胞環境の測定とモデリング」ワークショップ, 2011 年 11 月 7 日, 神戸理研計算科学研究機構
2. T.K. Fujiwara, Z. Kalay, S. Shibutani, K.P. Ritchie, S. Takeuchi, K.G.N. Suzuki, and A. Kusumi 「Enhanced confinement of activated EGF receptor in the plasma membrane compartments revealed by ultra high-speed single-molecule tracking」第 49 回日本生物物理学会年会, 2011 年 9 月 17 日, 兵庫県立大学・姫路書写キャンパス
3. T.K. Fujiwara, S. Takeuchi, Y. Nagai, K. Hanaka, K. Iwasawa, K.G.N. Suzuki, and A. Kusumi 「Super-speed single fluorescent-molecule imaging directly revealed intercompartmental hop diffusion of membrane molecules」APRU リサーチシンポジウム "Interface Between Molecular Biology and Nano-Biology", 2010 年 11 月 25 日, 京都大学
4. T.K. Fujiwara, S. Takeuchi, Y. Nagai, K. Hanaka, K. Iwasawa, K.G.N. Suzuki, and A. Kusumi 「Direct observation of hop diffusion of membrane molecules by developing ultra high-speed single fluorescent-molecule imaging」第 48 回日本生物物理学会年会, 2010 年 9 月 20 日, 東北大学
5. T. Fujiwara 「Hop diffusion of membrane lipids and proteins in the plasma membrane as directly observed by high-speed single fluorescent-molecule tracking」13th

- International Membrane Research Forum, 2010 年 1 月 29 日, ホテルフジタ京都
6. T. Fujiwara, S. Takeuchi, Y. Nagai, K. Hanaka, K. Iwasawa, K. Suzuki, and A. Kusumi 「Compartmentalization of the plasma membrane by actin-based membrane skeleton as revealed by high-speed single fluorescent-molecule tracking」第 82 回日本生化学会大会, 2009 年 10 月 21 日, 神戸ポートアイランド
7. 藤原敬宏「超高速 1 蛍光分子追跡法による、コンパートメント化された細胞膜内でのリン脂質のホップ拡散の検出」第 61 回日本細胞生物学会大会 ランチョンセミナー, 2009 年 6 月 2 日, 名古屋国際会議場

[図書] (計 2 件)

1. 木下専, 藤原敬宏「トランスポートゾームの組織化における細胞骨格系の役割」トランスポートゾームの世界—膜輸送研究の源流から未来へ—, 京都廣川書店 (2011) 380-387.
2. 楠見明弘, 藤原敬宏「ランダムな運動に法則を見出す」*Math Stories* 変化をとらえる (高橋陽一郎編集), 東京図書 (2009) 238-247.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 敬宏 (FUJIWARA TAKAHIRO)
京都大学・物質—細胞統合システム拠点・
特定拠点講師
研究者番号：80423060

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし