

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670086

研究課題名(和文)革新的蛍光相関分光装置の開発

研究課題名(英文)Development of a fluorescence correlation spectroscopy for rotational diffusion measurements

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：蛍光相関分光法を分子間相互作用検出に利用する際の大きな問題点の一つとして、計測される並進拡散が分子間相互作用検出に関して必ずしも敏感な尺度とはならないことが挙げられる。この問題を解決するために、蛍光偏光を利用し、分子間相互作用の変化に応じてより鋭敏に反応する回転拡散計測を行う、新たな蛍光相関分光装置を開発した。また高速に広い計測レンジで多チャンネルの信号の同時取得を安定して行える解析プログラムの構築にも成功した。更にこの手法の汎用化の為に重要性が明らかとなってきた蛍光標識法開発に注力し、独自の蛍光タンパク質変異体を使用することにより、新規蛍光標識技術を確立した。

研究成果の概要(英文)：As rotational properties sensitively reflect molecular interactions and intracellular environment, polarization-dependent fluorescence correlation spectroscopy can be a promising method to analyse various cell biological events. We constructed both new polarization-dependent fluorescence correlation spectroscopy and an analysis program for this purpose. In addition, we could develop new methods to label proteins of interests for our analysis.

研究分野：解剖学、細胞生物学、生物物理学

キーワード：顕微鏡技術 生体分子間相互作用ネットワーク

1. 研究開始当初の背景

蛍光相関分光法 (FCS) は局所における蛍光標識分子由来の蛍光信号の時系列データを自己相関関数により解析し、測定領域における蛍光標識分子の数と、蛍光標識分子の動きやすさ (並進拡散定数) を評価する手法である。2 色同時にこの計測を行い、両者の時系列データを相互相関関数により解析するものは、蛍光相互相関分光法 (FCCS) と呼ばれ、2 種類の蛍光標識分子それぞれの数と動きやすさの情報に加え、両者の局所における相互作用の有無を測ることができる。FCCS は細胞内局所において時間的もしくは空間的に「弱い」分子間相互作用を「弱い」相関として実時間下に検出可能な恐らく唯一の手法であり、広く普及してきている。我々は一般的な細胞質性タンパク質輸送において、Hsc70 が、細胞質性タンパク質と、輸送を駆動するモーター分子であるキネシン 1 複合体をつなぐ足場タンパク質として働いていることを解明した (EMBO J 29:843-854, 2010)。この細胞内過程において、シャペロン分子である Hsc70 が輸送される細胞質性タンパク質と「弱く」結合することを FCCS により解析することに成功している。生体内には酵素-基質間のような強い相互作用もあれば、シャペロン分子-基質間のような弱い相互作用もあり、それぞれが独自に時間的な変動を呈している。細胞内分子間相互作用ネットワークを動的に評価するためには、単に特定時刻における分子間結合の静的なマップをつくるだけでは不十分で、各相互作用の強弱やその時間的な揺らぎを評価する必要がある。

FCS を分子間相互作用検出に利用する際の大きな問題点の一つとして、並進拡散が分子間相互作用検出に関して必ずしも敏感な尺度とはならないことが挙げられる。球形の分子の場合、仮に分子間結合に際して分子量が 8 倍と大きく変化しても並進拡散定数は半分にしかならない。分子量の著しく異なる分子どうしや特殊な形状の分子以外では、相互作用による並進拡散の大きな変化は期待できない。この問題を解決するために、蛍光偏光を利用し、分子間相互作用の変化に応じてより鋭敏に反応する回転拡散計測を行う、新たな FCS を開発することを企図するに至った。

2. 研究の目的

蛍光偏光測定を利用した新たな高次蛍光相関分光法を確立し、生体分子間ネットワークの動態観測を行うことを目標とした。具体的には以下の 3 項目について装置の構築とデータ取得、解析を目標とした。

- (1) 蛍光相関分光法の分子間相互作用の感度の飛躍的増大を図るため、蛍光偏光観測を導入し、分子の回転拡散を検知する測光装置を製作する。
- (2) 複数の異なる蛍光標識生体分子に対し蛍光偏光を利用した蛍光偏光相関

分光法による同時観測を行う。

- (3) 蛍光偏光相関分光計測による生体分子間ネットワークの動態検出の可能性を検討する。

3. 研究の方法

以下の項目について装置の構築を行い、実サンプルの計測を目指した。

- (1) 研究室に既存の FCS の光路を改造し、直交する 2 方向の偏光軸について偏光計測可能な蛍光偏光相関分光装置を構築する。
- (2) 蛍光偏光高次相関分光法用解析プログラムを開発する。
- (3) 高濃度のタンパク質溶液中における蛍光偏光相関分光計測を可能とするために全反射照明等の励起光照射領域を絞り込むセットアップを用意する。
- (4) 複合体を構成するタンパク質群を蛍光色素により蛍光標識する。もしくは蛍光タンパク質を利用し、これと被標識タンパク質の相互の位置関係が固定された状態で「固く」連結されるように、特別に工夫した方法で融合タンパク質を設計し、これを細胞内で発現させる。
- (5) 完成した蛍光偏光高次相関分光装置により計測、解析を目指す。

4. 研究成果

(1) 蛍光偏光相関分光装置構築

教室既存の FCS の光路を改変し、直交する 2 方向の偏光軸について独立に蛍光強度可能なシステムを構成し、両者の比の時系列データを測定できるようにした。セットアップに際し、別途共同研究を行っている米国ウッズホール海洋生物学研究所・谷知己研究員と協力しつつこれを構築した。



回転拡散は並進拡散と比較して極めて速く、数十ナノ秒オーダーで起こる現象である。従って、それを見るためには、最低 10 ナノ秒以上の時間分解能を持つ計測が必要である。上図に示すように、複数の入力チャンネルで、高速測定の出来る光学系を組み上げる形でこれに対応した。計数ボードは高速にデータ取得可能な多チャンネル対応可能なものを選定、使用した。

(2) 蛍光偏光相関分光法用解析プログラムの開発

最も注力し、完成を見たのが解析用プログラムである。相関解析は、特に次数が増えると演算量が急激に増大し、通常のコンピュータでは計算時間が長くなり過ぎて実用に耐え

なくなるといった問題があった。コンピュータの画面表示、画像データ処理に従来使われていたグラフィックスプロセッシングユニット(GPU)は、小型演算プロセッサを多数組み合わせることで、高速並列演算を行う装置である。この GPU を相関解析に活用して、高速のデータ処理を行う可能性を検討する等の様々な工夫を行い、データ処理の高速化の実現を志向した。近接場の関与するモデルと全反射照明の関与するケースを並行して構築した。当初の試みにより、時間スケールで 10 の 3 乗のレンジで相関解析が可能となったが、更にこれを拡大するため、時間レンジの短い領域と長い領域を分けて扱い、それぞれを別途に区別して解析するプログラムを構築することに成功した。また、多チャンネルの信号の同時取得をより明るい信号で行うため、計測ボードの様々な試験を行い、高い信号頻度での動作がより安定するように、修正、改善を加えた。実用レベルの水準に到達している。

(3) 高濃度のタンパク質群に関する蛍光相関分光測定のための励起光照射環境整備

細胞内の分子間相互作用は、molecular crowding とよばれる極めて高濃度の環境下で生成している。このため、蛍光相関計測を行うためには励起光の照射領域を絞る必要があった。教室に別途全反射照明装置を有する顕微鏡が導入され、比較的高濃度のタンパク質群に関する蛍光相関分光測定のための励起光照射環境は整備された。

(4) 被計測タンパク質群の蛍光標識

in vitro の実験用のタンパク質群について、その生理的機能を保持した状態を保ちつつ精製し、更に蛍光標識を行った。条件検討を繰り返し至適な方法を決定した。これまでに相関計測の実績のある、MAP キナーゼ経路の Ste5 や Ste7、ILK、PINCH 等で標識に成功した。

また開発する測定法の汎用化のためには、細胞内での測定を考慮する必要があり、その場合、蛍光タンパク質により被標識タンパク質を「固く」かつその機能を阻害しないように融合させる必要がある。装置開発と並行して、標識技術開発の重要性が明らかになってきたため、最終年度は特に、標識手法の開発に注力した。これまで蛍光偏光観測のためのユニバーサルな標識手法は知られていなかったが、独自の蛍光タンパク質変異体を使用することにより、遺

伝子にコードされる形でこの種の蛍光標識が可能となることが明らかとなった。テストケースとしてアクチンを対象に標識を行い、細胞中で 1 分子計測に成功した(米国ウッズホール海洋生物学研究所・谷知己研究員の協力による)。成果の一部は国内学会にて発表した(後述)。

- (5) 相関解析用プログラムの構築、検証、遺伝子にコードされる形で蛍光標識法の開発に注力し、期間内に実例を発表するには至っていない。しかしながら、開発に成功した解析プログラムと標識法は、汎用性の高い基盤技術であり、国内外において類をみないものである。蛍光相関分光法に限定せず、広く蛍光偏光を利用した観測法への展開の糸口となるもので、ウッズホール海洋生物学研究所の研究者を初めとして共同研究を開始する端緒となった。

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 0 件)

[学会発表](計 1 件)

佐藤文哉、谷知己、寺田純雄、
PANDIA: a novel marker for fluorescence polarization microscopy of actin dynamics in living cells,
第 122 回日本解剖学会全国学術集会、2017 年 3 月 28 日~30 日、長崎大学坂本キャンパス (長崎県長崎市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
該当なし。

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

齊藤 健太 (SAITO Kenta)
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：60374659

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

(3) 連携研究者

谷井 孝至 (TANII Takashi)
早稲田大学・理工学術院・教授
研究者番号：20339708

近藤 孝男 (KONDO Takao)
名古屋大学・理学研究科・教授
研究者番号：10124223

神 隆 (JIN Takashi)
理化学研究所・生命システム研究セン
ター・チームリーダー
研究者番号：80206367

(4) 研究協力者

谷 知己 (TANI Tomomi)
米国ウッズホール海洋生物学研究所・
研究員

金城 政孝 (KINJO Masataka)
北海道大学・先端生命・教授