

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26860660

研究課題名(和文) 振動分光技術を用いた非標識 α -シヌクレインのin vivo定量的測定法の開発

研究課題名(英文) Development of label-free vibrational spectroscopy to quantify and visualize alpha-synuclein molecules in vivo

研究代表者

長島 優 (Nagashima, Yu)

東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・特任研究員

研究者番号：20635586

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)：本研究では、パーキンソン病で脳に蓄積する α -シヌクレインを、非標識下に生きた細胞・組織中で定量的に検出する方法論の開発を行った。成果として、培養細胞や組織標本を対象に、安定してラマン分光画像を測定する測定系を開発できた。これを用いて、試験管内で作成した α -シヌクレイン凝集体、培養細胞中に形成した α -シヌクレイン凝集体のラマン分光画像を測定し、化学構造を反映したラマンシフトの空間分布を解析した。 α -シヌクレイン凝集体のラマンスペクトル波形には、非凝集状態では認められない特徴的なラマンシフトが存在し、この波形が α -シヌクレイン凝集体の分子特異的マーカーとして、生体内で機能する可能性が示唆される。

研究成果の概要(英文)：Alpha-synuclein plays an important role in the development of Parkinson's disease. In this study, we developed a novel method to quantify and visualize aggregated alpha-synuclein molecules using Raman microspectroscopy. Using this, we obtained Raman spectroscopic image of alpha-synuclein aggregates formed in vitro and in the culture cells. Vibrational spectra obtained using Raman spectroscopy provides vibrational information characteristic of chemical groups in a molecule. Measuring vibrational spectra enables us to locate and quantitate alpha-synuclein within tissues in a molecular specific manner. The alpha-synuclein aggregates formed in both conditions showed identical Raman spectroscopic patterns and they are different from those of monomeric alpha-synuclein. As Raman spectroscopy is label-free technique, the Raman shifts which is specific to aggregated alpha-synuclein molecules will work as a molecular specific marker within a physiological condition in vivo.

研究分野：神経内科学

キーワード：シヌクレイン パーキンソン病 ラマン分光法

1. 研究開始当初の背景

脳内での凝集タンパク質の蓄積は、定性的には Parkinson 病を始めとする神経変性疾患の発症原因や診断に深く関わり、定量的にはその病勢評価の際に重要なマーカーとなり得る。凝集過程で出現する凝集タンパク質 oligomer が、神経毒性を直接担う可能性も提唱されており、凝集反応の詳細は、神経変性疾患の根本的治療の標的の一つとしても重要な事象である。将来の神経変性疾患の根本的治療の実現を視野に入れると、その効果判定の為に、神経組織中での凝集タンパク質の凝集過程を、可能な限り直接的に、定量的に観測できる方法論の開発が求められている。

2. 研究の目的

Parkinson 病で脳に蓄積する α -シヌクレインを、非標識下に生きた細胞・組織中で定量的に検出する顕微鏡の開発を目標とする。開発した顕微鏡を用いて、凝集タンパク質 α -シヌクレイン凝集体内外における α -シヌクレインの物質量の空間分布・時間変化を、生きた細胞中・組織中で測定し、可視化できる方法論の開発を行う。

3. 研究の方法

一般に分子の振動スペクトルは分子特異性を持ち、分子の識別に使用できる。振動スペクトル測定は、観測対象の分子そのものが散乱する光を測定することで、非標識・非染色の真の生理的条件下での分子の振る舞いを明らかにする方法論を実現する。またその散乱光強度は物質と厳密な相関関係を持つ。細胞や組織中で標的となる凝集タンパク質の振動スペクトルを測定することで、特定の分子の存在判定と定量が行える。このことは、振動スペクトル測定技術が、現在の分子計測技術の標準である蛍光顕微鏡の弱点を克服できる可能性を示している。

神経変性疾患の凝集タンパク質の研究では、従来、蛍光タンパク標識や、凝集タンパク質に高効率で結合する蛍光色素を用いた間接的な測定が多く行われてきた。これらの方法は凝集タンパク質の挙動を直接捉えておらず、また標識分子が並存するため測定環境が生理的でない。さらに蛍光標識は褪色する為、蛍光強度は物質量の大小の目安でしかない。本研究で採用する分子の振動スペクトル測定技術は、非修飾の分子自体が散乱する光を観測することで、非標識・非染色の真の生理的条件下での分子の挙動を調べられる。また分子からの散乱光の信号強度は、物質量

と厳密に比例するため、顕微分光法と組み合わせることで物質量の厳密な空間分布を取得できる。

α -シヌクレイン凝集体に分子特異性の高い振動スペクトル波形を測定し、特徴的なパターンを選定すれば、それは「分子の指紋」として機能し、分子特異的なマーカーとして生体内での分子の同定に利用できる。

4. 研究成果

4-1. 非線形ラマン分光装置の開発

CARS (coherent anti-Stokes Raman scattering) スペクトルの測定系を新たに製作した。まず、装置の光源となるチタンサファイアレーザー(800nm, 25fs, 600mW, 80MHz)を製作した。次に、チタンサファイアオシレータで発生した単一のフェムト秒パルス、バンドパスフィルターを用いたマイケルソン干渉計に導き、広帯域なポンプ光と狭帯域なプローブ光とに一旦分離、その後再度共軸化し試料に集光する。まず試料中の分子に広帯域なポンプ光が当たることにより、分子の複数の振動準位が同時に励起される。ここに同時に照射される狭帯域なプローブ光の高速位相変調に応じて非共鳴 CARS 光に生じる変調成分を抽出することで、multiplex な CARS スペクトルが取得できる。干渉計であらかじめ狭帯域光に大きな遅延を与えておけば、非共鳴 CARS 信号を抑制できるのがメリットである。本測定系のテストとして、クロロホルムの 263cm^{-1} , 369cm^{-1} , 669cm^{-1} のラマンシフトを観測した。

4-2. *in vitro* での α -シヌクレインの振動スペクトル測定

recombinant α -シヌクレイン (Tris-HCl buffer 溶液の凍結乾燥後粉末) の振動スペクトルを測定した。別に測定しておいた Tris-HCl の振動スペクトルのうち、主要なピークは recombinant α -synuclein で測定した振動スペクトル中でも認められた。Tris-HCl 由来と考えられるピークを減算することで、 α -synuclein タンパク質本来のラマンスペクトルを導出することができた(図 1(a))。他の神経変性疾患で脳に沈着が認められるポリグルタミン (Huntingtin-Q98) や Amyloid β と同様に、タンパク質凝集体で頻出する 1000cm^{-1} , 1440cm^{-1} , 1650cm^{-1} のピークが明確に存在することを確認できた。

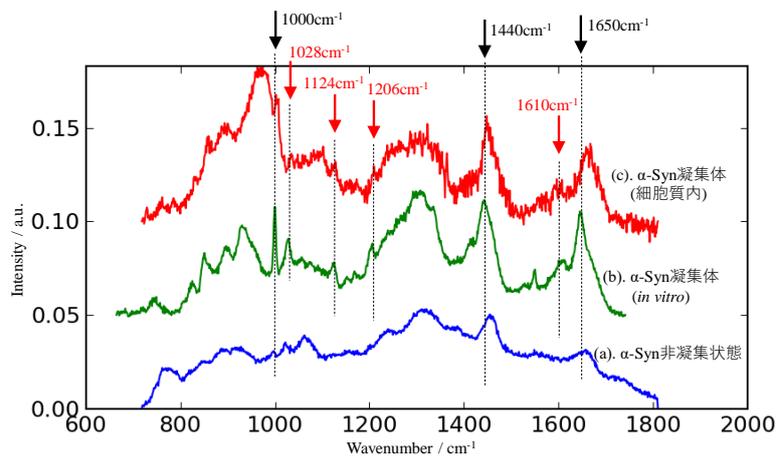


図1. α -シヌクレインの凝集状態によるラマンスペクトルの違い

4-3. *in vitro* で形成した α -シヌクレイン凝集体の振動スペクトル測定

大腸菌に作らせた組み換え α -シヌクレインをリン酸緩衝液中で振盪しながらインキュベートすることで、 α -シヌクレイン凝集体を *in vitro* で作成した。次に、ラマン分光顕微鏡を用いて、*in vitro* で作成した α -シヌクレイン凝集体のラマン分光画像を測定し、凝集体中の化学結合に由来するラマンシフトの空間分布を調べた。*in vitro* の α -シヌクレイン凝集体には、非凝集状態の recombinant の α -シヌクレイン同様に、一般的なタンパク質のスペクトルに認められる 1000cm^{-1} 、 1440cm^{-1} 、 1650cm^{-1} などのラマンシフトを認めた。さらにこれらのピークに加えて、*in vitro* の α -シヌクレイン凝集体では、 1028cm^{-1} 、 1124cm^{-1} 、 1206cm^{-1} 、 1610cm^{-1} などのラマンシフトを認めた。特に β シート構造の存在を示唆する 1610cm^{-1} のラマンシフトの存在は、タンパク質の凝集状態を反映すると考えられた。(図 1(b))。図 2 に、これら凝集体特異的なラマンシフトの凝集体内部での空間分布を示す。

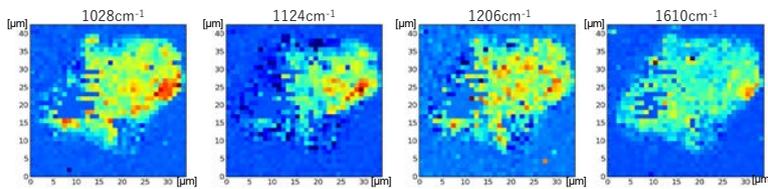


図2. *in vitro* で作成した α -シヌクレイン凝集体内のラマンシフト強度分布

次に、SNCA 遺伝子を組み込んだレンチウイルスベクターを用いて α -シヌクレインを定常発現させた HeLa 細胞に、別途作成した α -シヌクレイン凝集体を超音波破碎したものを seed として加え、24 時間培養することで、培養細胞内に α -シヌクレイン凝集体を形成した。この凝集体を含む培養細胞標本を蛍光標識した抗 α -シヌクレイン抗体で免疫染色し、蛍光信号と共局在するラマンシフトを調べたところ、*in vitro* で作成した α -シヌクレイン凝集体と同様のラマンスペクトル波形が観測された(図 1(c))。このことは、測定

されたラマンスペクトル波形が、凝集状態にある α -シヌクレインの分子特異的なマーカーとして、培養細胞内においても機能する可能性を示している。すなわち、この波形を手掛かりに、生体組織中での α -シヌクレイン凝集体の非染色条件下での分子同定と定量が可能である。図 3 に、この培養細胞標本で作製した α -シヌクレイン凝集体の内部における振幅の大きなラマンシフトの空間分布を示す。

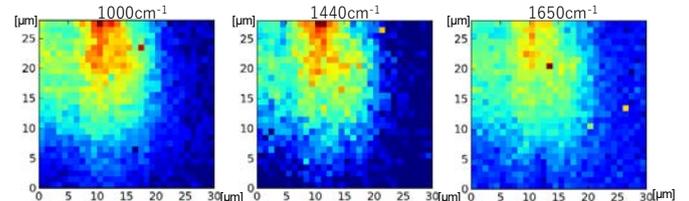


図3. HeLa細胞の細胞質中の α -シヌクレイン凝集体内のラマンシフト強度分布

4-4. 組織中での振動スペクトル測定技術の開発

ヒト剖検脳中での Lewy 小体(シヌクレイン凝集体)の振動スペクトルを取得するためには、非染色試料で振動スペクトル画像を取得した後に、免疫染色を行って Lewy 小体を同定し、Lewy 小体のある画素での振動スペクトルを同定する、という手続きが必要である。振動スペクトルの測定と免疫染色画像の撮影の間に、免疫染色操作が入るため、二つの測定を同じタイミングで連続して行うことはできない。このような実験を確実に行うためには、先に振動スペクトル測定した部位と同じ標本上の場所を、免疫染色後に定位するための位置あわせの技術が必要になる。本研究では、この問題を解決するために、明視野画像から自動で検出した細胞の輪郭を免疫染色前後で比較し、互いに superimpose することで、免疫染色後にはじめて確認できる Lewy 小体の位置を、振動スペクトル画像上で特定する画像処理プログラムを製作した。

4-5. モデルマウス脳・患者脳での α -シヌクレイン凝集体の観察

本研究期間中には、 α -シヌクレイン凝集体を形成したマウス脳切片、パーキンソン病患者の脳切片のラマン分光画像を測定することはできなかった。

今後、マウス脳に形成したレビー小体のモデルとしての α -シヌクレイン凝集体、パーキンソン病患者脳のレビー小体を対象に、脳組織切片中の α -シヌクレイン凝集体のラマン分光画像の測定を進めていく。

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 6 件）

- ① 長島 優, 「非線形ラマン分光およびフォトニック構造を用いた診断技術の開発」, 日本物理学会, 2017.
- ② Yu Nagashima, Atsushi Iwata, “Spatial distribution of Raman spectra within amyloid beta aggregates *in vitro*”, 第 7 回新潟大学脳研究所共同研究拠点国際シンポジウム, 2017.
- ③ Yu Nagashima, Atsushi Iwata, “Spatially localized Raman shifts within amyloid beta aggregates *in vitro*”, 分子分光国際シンポジウム, 2016.
- ④ Yu Nagashima, Atsushi Iwata, “Spatial distribution of Raman shifts within amyloid beta aggregates *in vitro*”, Society for Neuroscience, 2016.
- ⑤ 長島 優, 岩田 淳, 辻 省次, 「ラマン分光法によるポリグルタミン封入体の観測」, 平成 26 年応用物理学会 量子エレクトロニクス研究会, 2014.
- ⑥ 長島 優, 岩田 淳, 辻 省次, 「ラマン分光法によるポリグルタミン凝集タンパク質の非染色・非標識での検出法の開発」, 第 55 回日本神経学会, 2014.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

なし。

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長島 優 (Nagashima, Yu)

東京大学・大学院理学系研究科・特任研究員

研究者番号：20635586

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()