

平成22年4月23日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2007～2011

課題番号：19058001

研究課題名（和文） 相関分光法を用いた凝集体タンパク質の品質評価の確立

研究課題名（英文） Study of membrane binding protein complex using total internal reflection fluorescence correlation spectroscopy.

研究代表者

金城 政孝 (KINJO MASATAKA)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・教授

研究者番号：70177971

研究代表者の専門分野：生物物理

科研費の分科・細目：生物化学・生物物理

キーワード：生物物理、生体分子、蛍光測定、分子集合体、1分子検出

1. 研究計画の概要

細胞の中では構造体を支える分子が活発に動き回り、相互作用をしながらこれらの構造を支え、細胞の機能を発現している。タンパク質の凝集体構造もある条件下では脱凝集を行うなど、細胞質内にある多くの分散しているタンパク質と交換していることが分かってきた。その過程を調べるためには凝集体の構造やサイズを明らかにしなければ、タンパク質の凝集体と深い関係があるシャペロン機能や品質管理のメカニズムと生物学的意義の解明は達成されないと考える。本研究は、このような凝集体や複合体の形成をいち早く検出するために元となる分子の挙動を細胞内で高感度に検出するシステムの構築を行う。これまで申請者は細胞膜中でのタンパク質の動態を高感度に検出する全反射型蛍光相関分光法を開発してきた。これらの方法をさらに発展し同時多点測定可能なシステムの構築を行い、細胞膜や細胞内でのタンパク質の凝集や局在の変化をリアルタイムで検出する方法を開発する。

2. 研究の進捗状況

(1) 生細胞内におけるタンパク質凝集検出システムの構築：

生細胞内における通常の光学顕微鏡で観察可能な大きな凝集体だけではなく、細胞毒性の実態であると考えられる光の波長より小さな 100nm 以下のミクロな凝集体の検出ならびに解析方法を蛍光相関法により確立することを旨とした。そのため多成分解析法を中心に研究を行った。この方法を用いてモデル系として DNA 分解反応と溶液系での凝集体タンパク質の評価可能であることを実証した。

また、生きた細胞膜内でタンパク質の動態をリアルタイムで捉えるためのシステムとして全反射型蛍光相関分光装置があったが、本研究において、さらに7点同時測定可能な装置（多点全反射型蛍光相関分光装置）として構築した。実際に細胞膜結合性タンパク質の拡散速度と分子数分布を一分子レベルで可能であることを証明した。

(2) プリオンタンパク質複合体数評価法の確立：

牛海綿脳症 (BSE) を引き起こす、プリオンタンパク質 (PrP) 等の凝集初期におけるミクロな凝集体が生体機能を阻害する可能性が注目されている。われわれは希薄な SDS 濃度条件下におけるモデル実験系を確立して、凝集初期、例えば、3量体から10量体程度までの凝集過程を詳細に検出・定量する方法として、一分子あたりの蛍光強度と、立体構造を認識する抗体を用いて、評価した。その結果、3量体を細小ユニットとして、6量体、9量体が形成されることがわかった。また、そのときにプリオンタンパク質の C 末ならびに N 末領域とも立体構造変化があることが分かった。これらの結果からプリオンタンパク質の新規の凝集体モデルを提唱した。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

タンパク質凝集体検出に関して拡散速度と一分子あたりの蛍光強度を比較することで可能であることを示した。また細胞内測定においても装置の高感度化を行い、一細胞測定も可能としているなど、おおむね順調に進展している。

4. 今後の研究の推進方策

これまでの研究に引き続き、細胞内タンパク質凝集体形成過程の解析のために蛍光相関(FCS)・蛍光相互相関分光法(FCCS)の測定手法の展開を行う。さらに生きた細胞の中での凝集体形成を蛍光強度の変化や散乱に影響を受けずに解析する方法のひとつとして蛍光寿命測定法を組み込み、凝集体形成やタンパク質複合体の生細胞内における新たな定量的評価法の確立を目指し、タンパク質社会の研究に貢献する。また細胞内測定に関しては研究領域の各研究者と密接に連携して、対象となる細胞やタンパク質の選定を行う。特に、これまで申請者の研究室で進めてきたシャペロン系タンパク質の相互作用解析として新たに出芽酵母のHsp104を対象とする。Hsp104はSup35タンパク質の凝集・脱凝集を司る因子として知られているが、実際の酵母細胞内での挙動は明らかではない。そこで、蛍光相互相関法を用いて種々の条件化でのSup35・Hsp104タンパク質の相互作用条件を明らかにする。凝集体会合状態を評価するために分布関数を用いた解析方法を検討する。一部のパラメーターを自動化・省略するなどして簡便に利用できる手法の確立を目指す。

5. 代表的な研究成果

(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 26 件)

- ① Sasaki A, Kinjo M. 'Monitoring intracellular degradation of exogenous DNA using diffusion properties.' *J Control Release*. 143(1):104-11 (2010) 査読有
- ② Kawai-Noma S, Pack CG, Tsuji T, Kinjo M, Taguchi H. 'Single mother-daughter pair analysis to clarify the diffusion properties of yeast prion Sup35 in guanidine-HCl-treated [PSI] cells.' *Genes Cells*. 14(9): 1045-54 (2009) 査読有
- ③ Ohsugi Y, Kinjo M. 'Multipoint fluorescence correlation spectroscopy with total internal reflection fluorescence microscope.' *J Biomed Opt*. 14(1):014030. (2009) 査読有
- ④ Nagaya H, Tamura T, Higa-Nishiyama A, Ohashi K, Takeuchi M, Hashimoto H, Hatsuzawa K, Kinjo M, Okada T, Wada I. 'Regulated motion of glycoproteins revealed by direct visualization of a single cargo in the endoplasmic reticulum.' *J Cell Biol*. 180(1):129-43 (2008) 査読有
- ⑤ Fujii F, Horiuchi M, Ueno M, Sakata H, Nagao I, Tamura M, Kinjo M. 'Detection of prion protein immune complex for bovine spongiform encephalopathy diagnosis using fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence cross-correlation spectroscopy.' *Anal Biochem*. 370(2):131-41 (2007) 査読有
- ⑥ Kabayama K, Sato T, Saito K, Loberto N,

Prinetti A, Sonnino S, Kinjo M, Igarashi Y, Inokuchi J. 'Dissociation of the insulin receptor and caveolin-1 complex by ganglioside GM3 in the state of insulin resistance.' *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(34):13678-83 (2007) 査読有

[学会発表] (計 21 件)

- ① 金城 政孝 「蛍光相関分光によるGF Pの細胞内ダイナミックイメージ」, 第115回日本解剖学会総会・全国学術集会, 盛岡市, 2010.3.29
- ② 金城 政孝 「多点蛍光相関分光法による細胞機能解析」, 第6回 バイオオプティクス研究会, 札幌市, 2009.12.4
- ③ Masataka Kinjo 'Membrane-binding proteins analyzed by multipoint total internal reflection fluorescence correlation spectroscopy.', International Symposium "Frontier-Immuno-Imaging", Osaka, JAPAN, 2009.5.11
- ④ Masataka Kinjo 'Dynamic Aspects of Protein in Living Cell Investigated by Total Internal Reflection Fluorescence Correlation Spectroscopy', International Congress on Cell Biology, Seoul, KOREA, 2008.10.9

[図書] (計 5 件)

- ① 佐々木 章, 金城 政孝, シーエムシー出版, 「シングルセル解析の最前線」 '蛍光相関分光法による単一細胞内生体分子の定量解析', 2010, 186-193.
- ② M. Kinjo, H. Sakata, S. Mikuni, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 「Live Cell Imaging」 'First Steps for Fluorescence Correlation Spectroscopy of Living Cells.', 2010, 229-235.
- ③ 金城 政孝, 共立出版, 蛋白質核酸酵素 54, '蛍光ゆらぎ測定による細胞の機能解析～蛍光相関イメージング 夜明け前', 2009, 1218-1223.
- ④ 金城 政孝, 共立出版, 蛍光相関分光法(FCS)の基礎「生細胞蛍光イメージング顕微鏡コースブック」, 2007, 101-109.
- ⑤ 齋藤 有香, 金城 政孝, シーエムシー出版, 「動物実験代替のためのバイオ・マテリアルデバイス」 '蛍光相関分光法による細胞内ならびに生体内シグナル解析' 2007, 302-314.

[その他]

- ①研究室 HP
<http://www.lfsci.hokudai.ac.jp/labs/infmed/index.html>
- ②NHK サイエンス・ゼロに出演 (金城, 北村, 三國) 2009年2月14日(土曜日) タンパク質凝集を生細胞で測定するための意義と、病気との関連について解説した。