

令和元年6月10日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07312

研究課題名(和文) タンパク質凝集初期過程解析のための蛍光偏光相関分光装置の開発

研究課題名(英文) Development of polarization-dependent fluorescence correlation spectroscopy for initial process analysis of protein aggregation

研究代表者

山本 条太郎 (Yamamoto, Johtaro)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：20585088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではブラウン運動するタンパク質分子のランダムな並進移動と回転の速さを解析する計測装置(偏光蛍光相関分光装置、Pol-FCS装置)を開発しました。この装置を用いることで、生きた細胞の中で細胞を生かしたまま分子のブラウン運動を計測し、分子の凝集の程度を推定できることを実証しました。さらに、同じ計測手法によって分子の向きがどれだけ揃っているか(配向性)や、溶液や細胞の中がどの程度分子で混み合っているのか(高分子混雑)を評価することも可能であることを発見し、Pol-FCSは研究開始当初想定した以上に有効な計測手法であることが分かりました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、タンパク質分子のランダムな並進移動と回転の速さを解析する計測装置(偏光蛍光相関分光装置、Pol-FCS装置)を用いることで、分子の凝集の程度や凝集している分子の方向の乱雑さを生きた細胞の中でそのまま測定できることを世界で初めて実証しました。アルツハイマー症のようにタンパク質の凝集が関連していると考えられている様々な疾患において、Pol-FCSは疾患の機序や治療法の研究の大きな手助けになります。また近年では、タンパク質をバイオ医薬品として用いられるようになっており、その凝集状態を評価可能なPol-FCSはより安定なバイオ医薬品の開発や品質管理に大きく寄与できると期待できます。

研究成果の概要(英文)：In this work, we developed a polarization-dependent fluorescence correlation spectroscopy (Pol-FCS), which analyzes translational and rotational diffusion of molecules such as proteins. Size measurement of molecular aggregation using Pol-FCS inside living cells was successfully demonstrated. In addition, we found the Pol-FCS can also estimate orientation of molecules (ordered/disordered) and degree of macromolecular crowding. Thus, the Pol-FCS was a more powerful tool than we expected. In future, we expect the Pol-FCS will be widely used in biology such as the researches about aggregation prone proteins.

研究分野：生物物理学、光学

キーワード：蛍光計測 蛍光相関分光法 タンパク質凝集 動態計測 拡散

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞内に存在しているタンパク質等の生体分子は、しばしば凝集体や封入体といった巨大な構造を形成する。この構造体は細胞にとって必ずしも毒性を持っているとは言い切れないが、死に至る重篤な神経変性疾患等でも神経細胞中に巨大な構造体が確認されている。この構造体の形成過程で、構成タンパク質が一旦オリゴマーを形成し、オリゴマー同士で凝集するとされるが、その過程を直接観察し、裏付ける実験は未だなされていない。何故なら、凝集体形成の極初期過程におけるオリゴマーは過渡的にしか存在せず、すぐに凝集を始めてしまうと考えられるためであり、この様な一時的な現象の動態の有効な解析法が待ち望まれている。

(2) 申請者は、このような凝集体形成過程を、蛍光偏光相関分光(Pol-FCS)装置によって解析可能であると着想した。Pol-FCSは、その原理自体は1975年に提案されていたが、解析すべき時間が数ナノ秒オーダーの非常に速い現象であるため、これが明確に実証されたのは2006年であった。しかし研究開始当初までのところ、Pol-FCSは半導体ナノロッドや巨大有機蛍光色素の様な人工的な試料の計測にとどまり、生体試料への応用はなされていなかった。Pol-FCSによる生細胞内回転拡散計測に成功すれば世界初の成果であり、また凝集体形成過程の初めての直接観察となることが期待された。

2. 研究の目的

本研究では、構築済みのPol-FCS装置の時間分解能を向上させ、凝集性タンパク質の凝集体形成過程の回転拡散係数計測による定量解析を実証することを目的とした。装置の高速化の後、まずは生成したタンパク質が溶液中で凝集する様子や繊維が成長する様子をPol-FCSによって解析可能であることを実証し、最終的に生細胞内での計測の実証を目指した。

3. 研究の方法

(1) 蛍光偏光相関分光 (Pol-FCS) 装置の改良

研究開始当初のPol-FCS装置で用いていたハードウェア相関器(ALV-5000)の時間分解能は12.5 nsであるのに対し、生体分子の凝集初期過程を解析するためには数ナノ秒から数十ナノ秒のオーダーの減少を解析する必要があると予想されるため、より高速な相関器を導入する。また、当時の光学系では、計測する偏光条件を変更する際に偏光板やビームスプリッタの挿抜を行うため、その都度光学系の微調整を行う必要があり、実験効率が非常に悪いという問題があった。蛍光を分岐している部分を一部ファイバ光学系に置き換えることで光学系の安定化を図ることとした。また、使用している偏光子を消光比の高いものに変更し、偏光のクロストークを最小限に抑える。

(2) 溶液試料によるPol-FCS計測の実証実験

装置の改良後、まず溶液試料によるPol-FCSの実証をおこなう。まず、現行のPol-FCSで計測が実証できている量子ロッドが問題無く計測できるか確認する。その後、現行のPol-FCSでは時間分解能が不足しているために回転拡散が計測できなかったと考えられる有機蛍光色素溶液を用いた計測を実証する。また、申請者の所属する研究室では、FCS測定の標準となるタンデムリピートEGFP(単量体~5量体)を作成している。これを用いたPol-FCS測定により、蛍光標識した凝集性タンパク質のオリゴマー化が定量解析可能であることを実証する。

(3) Pol-FCSによる生細胞内回転拡散計測の実証実験

生細胞に既知の大きさのタンパク質を蛍光タンパク質として発現させ、Pol-FCS計測を行う。計測結果がタンパク質の大きさと形状から予想される回転拡散の理論値とどの程度一致するのか、あるいは一致しないのかを検証する。生細胞内では細胞骨格やその他の構造が拡散の障壁となるため、生体分子は厳密には自由拡散ではなく、異常拡散しているという考え方がある。この場合、回転拡散についてはどのような影響があるか、動的な解析を行った例は無い。本実験により、新たな知見が得られる可能性がある。

生細胞内での生体分子の回転拡散計測が成功しない場合、細胞内に量子ロッドを導入し、量子ロッドの生細胞内計測を実施する。量子ロッドはエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれるか、マイクロインジェクションによって直接細胞内に注入する(マイクロインジェクション装置は申請者の所属研究室に既設)。蛍光タンパク質ではなく量子ロッドだったとしても、生細胞内のpol-FCS計測が成功した時点で世界初の成果である。

(4) Pol-FCSによる凝集体形成初期過程解析の実証実験

本申請研究の最終目標はタンパク質凝集体が密接に関与する疾患(筋委縮性側索硬化症(ALS)やアルツハイマー症)における凝集体形成の初期・中期過程の定量解析を実証することで、医療診断や治療研究に貢献することである。したがって、生細胞内回転拡散計測が実証できた後は、実際に凝集性タンパク質が凝集する初期過程の解析が可能であることを実証する。

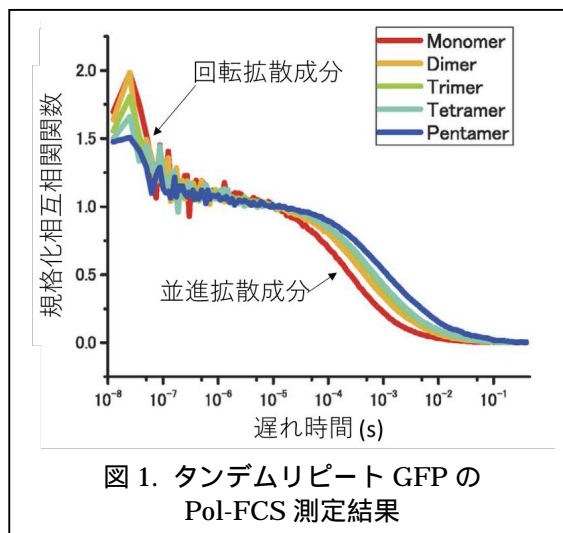
4. 研究成果

(1) 蛍光偏光相関分光 (Pol-FCS) 装置の改良

それまで用いていたハードウェア相関器 ALV-5000/FAST (ALV GmbH, Germany) を Flex02-01D (Correlator.com, USA) に変更し、時間分解能を従来の 12.5 ナノ秒から 1.56 ナノ秒に向上させた。また、蛍光フィルタの最適化と消光比の高い偏光子の導入によって検出感度を向上させることに成功した。蛍光をファイバ光学系によって 2 分岐させ光学系を簡略化することも試みたが、測定信号に不要なノイズ成分が現れたため、この案は不採用とした。このことは測定分解能や精度に影響を与える物では無いため、問題はない。

(2) 溶液試料による Pol-FCS 計測の実証

従来の装置で測定可能であった量子ロッドに加え、生物学実験で頻りに用いられる緑色蛍光タンパク質 (GFP) の回転拡散計測が可能であることを実証した。また、タンデムリピート GFP (単量体 ~ 5 量体) の溶液計測に成功し、徐々に大きくなる凝集体形成初期過程の解析が可能であることを実証できた (図 1)。また、測定結果とシミュレーションの比較検討により、Pol-FCS 測定によって単純に凝集体サイズの成長だけではなく凝集体を構成する分子の配向性を解析可能である可能性を示した。



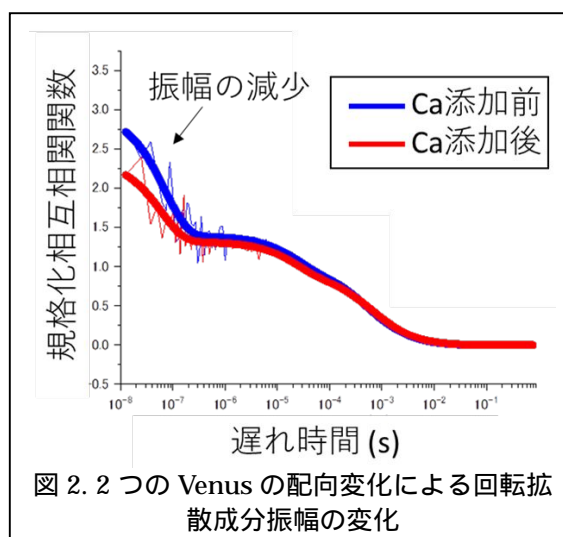
(3) Pol-FCS による生細胞内回転拡散計測の実証実験

生細胞内での蛍光タンパク質の Pol-FCS 計測は世界で初めて実現した物であった。また、並進拡散係数と回転拡散係数の比較から、細胞内構造や高分子クラウディングの影響を検証できる可能性を示した。現在のところ、高分子クラウディングの影響を定量評価することが困難であることから、当該分野における今後の応用展開が期待される。(2)および(3)の成果をまとめて、論文誌において発表した。

(4) Pol-FCS による凝集体形成初期過程解析の実証実験

蛍光タンパク質で標識した凝集性タンパク質の測定を細胞内で行う系の確立と実証を行った。試料として黄色蛍光タンパク質 (Venus) で標識した TDP43 タンパク質をマウス神経芽細胞腫細胞に発現させる系を確立した。また、TDP43 の生細胞中における凝集過程を解析するためには細胞を生かしたまま継続的に Pol-FCS 計測するため、可能な限り短時間かつ弱い励起光で測定を行うための条件決定を行った。

確立した測定条件において、生細胞中の TDP43 タンパク質の Pol-FCS 測定を行った。しかし、生細胞中の凝集体形成は個体差が非常に大きく、比較検討を行うことが困難であった。このことから、次に凝集体形成時の形状変化を模擬するため、Venus を 2 分子含みカルシウムイオンに反応して変形する蛍光タンパク質を 12 種類作成し、このタンパク質を生成した溶液に対して Pol-FCS 計測を行った。カルシウムイオン添加によってコンパクトな形状をとることで、回転拡散の緩和時間が短くなり、Pol-FCS 計測における回転拡散成分の振幅が変化することが明らかになった。さらにこの振幅は 2 つの Venus 分子の配向性によって変化し、凝集性タンパク質の凝集初期過程において、その大きさに加えて配向性をも定量評価する可能性を示すことができた。タンパク質の凝集体・封入体形成はアルツハイマー等の発症と関わりがあると知られており、凝集過程を定量評価可能とするこの研究は、これらの病気のメカニズム解明に大きく寄与できると考えられる。



< 引用文献 >

BB. Holmes, et al., *PNAS* **111** (2014) p.E4376.

JM. Tsay, S. Doose, and S. Weiss, *J. Am. Chem. Soc.* **128** (2006) p.1639.

M. Oura, et al., *Sci. Rep.* **6** (2016) 31091.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

J. Yamamoto, S. Mikuni, and M. Kinjo, "Multipoint fluorescence correlation spectroscopy using spatial light modulator," Biomed. Opt. Express, 査読有, Vol.9, No.12, 2018, pp.5881-5890

DOI:10.1364/BOE.9.005881

S. Oasa, S. Mikuni, J. Yamamoto, T. Kurosaki, D. Yamashita, and M. Kinjo, "Relationship Between Homodimeric Glucocorticoid Receptor and Transcriptional Regulation Assessed via an In Vitro Fluorescence Correlation Spectroscopy-Microwell System," Sci. Rep., 査読有, Vol.8, No.1, 2018, 7488

DOI:10.1038/s41598-018-25393-w

R. Fukushima, J. Yamamoto, H. Ishikawa, and M. Kinjo, "Two-detector number and brightness analysis reveals spatio-temporal oligomerization of proteins in living cells," Methods, 査読有, Vol.140-141, 2018, pp.161-171

DOI:10.1016/j.ymeth.2018.03.007

*M. Oura, *J. Yamamoto, H. Ishikawa, S. Mikuni, R. Fukushima, and M. Kinjo, "Polarization-dependent fluorescence correlation spectroscopy for studying structural properties of proteins in living cell," Sci. Rep., 査読有, Vol.6, 2016, 31091, *Equal contribution

DOI:10.1038/srep31091

[学会発表](計 11 件)

山本条太郎, 松井亮人, 桃崎哲, 金城政孝, 「偏光蛍光相関分光法の生物学的応用」, 第 15 回バイオオプティクス研究会, 2018, 招待講演

山本条太郎, 「蛍光のゆらぎから何が分かるか」, 第 8 回光科学異分野横断萌芽研究会, 招待講演

松井亮人, 山本条太郎, 金城政孝, "Verification of macromolecule species in intracellular macromolecular crowding condition application to cell cycle study", 第 56 回 日本生物物理学会年回, 2018

桃崎哲, 山本条太郎, 金城政孝, "Study of the orientation dependency of fraction of rotational diffusion in polarization-dependent fluorescence correlation spectroscopy", 第 56 回 日本生物物理学会年回, 2018

松井亮人, 顔総子, 福島綾介, 山本条太郎, 金城政孝, 「細胞周期における細胞内高分子クラウドイング状態の解析に向けて」, 平成 29 年度 北大細胞生物研究集会, 2018

顔総子, 山本条太郎, 金城政孝, 「偏光蛍光相関分光法によるタンパク質構造解析に向けて」, 第 3 回北大・部局横断シンポジウム, 2018

山本条太郎, "Evaluation of molecular crowding based on the rotational and translational diffusion measurement in living cells", 第 55 回 日本生物物理学会年回 シンポジウム「高分子混雑が支配する細胞の世界」, 2017, 招待講演

顔総子, 山本条太郎, 金城政孝, "Study of the structural change in protein using polarization-dependent fluorescence correlation spectroscopy", 第 55 回 日本生物物理学会年回, 2017

山本条太郎, 「偏光蛍光相関分光法による高分子混雑の評価」, 第 14 回 バイオオプティクス研究会, 2017, 招待講演

大浦真, 山本条太郎, 松本昂大, グン チェンビン, 金城政孝, 「蛍光偏光相関分光法により明らかになった生細胞内での分子混雑と回転拡散の関係」, 第 54 回日本生物物理学会年回, 2016

顔総子, 大浦真, 山本条太郎, 金城政孝, 「PoI-FCS 測定における回転拡散成分振幅の分子配向依存性の検証」, 2016 年度日本生物物理学会北海道支部総会・第 23 回ファーマサイエンスフォーラム・北海道大学創薬センター 合同シンポジウムジョイントセッション, 2017

[図書](計 0 件)

なし

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

なし

取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

北海道大学プレスリリース、http://www.hokudai.ac.jp/news/160808_sci_pr.pdf

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：北村 朗

ローマ字氏名：Akira Kitamura

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。