

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19886

研究課題名（和文）細胞由来微粒子迅速測定のための蛍光と散乱光測定の融合

研究課題名（英文）Combination of fluorescence and scattered light measurements for rapid determination of cell-derived microparticles.

研究代表者

金城 政孝（Kinjo, Masataka）

北海道大学・先端生命科学研究院・名誉教授

研究者番号：70177971

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：液-液相分離現象に基づく膜を持たないオルガネラやタンパク質凝縮体などが認知症や神経変性疾患の伝達要因と考えられている。その検出に蛍光標識抗体を用いると、対応する表面抗原を有する粒子は高感度に検出可能であるが、それ以外は検出されない。一方、散乱測定からは、粒子全体のプロファイルが分かるが、特定の機能を有する粒子の判断がつかない

申請代表者は蛍光測定法の中でも蛍光相関分光法（Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS）は光散乱測定と同じく、粒子や分子の拡散運動に由来するダイナミックな性質を反映する手法であることに注目し、散乱と蛍光測定の融合の可能性を研究した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体由来の微粒子やタンパク質凝縮体の測定方法には大きく蛍光測定と散乱測定がある。蛍光測定は特異性が高いが微弱光測定であり、試料や測定に繊細な調整が必要である。一方、散乱測定は特異性は低いものの、散乱光シグナルは蛍光比較して強く検出はやや容易であり、多くの粒子の情報を得ることが可能である。この二つの同時測定を融合することで、特異的なシグナルと網羅的な情報を得ることで、新規の生体微粒子解析法の開発を目指した。両方測定可能な励起光を見つけることは困難であったが、同じ装置の光路で測定が可能であることは示すことができた。今後、試料の調整条件などを検討することで、同時測定が達成されると考える。

研究成果の概要（英文）：Membrane-free organelles (membraneless organelles) and protein condensates based on liquid-liquid phase separation phenomena have been considered as transmitters of dementia and neurodegenerative diseases. When fluorescence-labelled antibodies are used for their detection, particles with the corresponding surface antigens can be detected with high sensitivity, but others remain undetected and invisible. Scattering, on the other hand, gives a profile of the whole particle, but does not allow determination of particles with specific functions

The Principal Investigator focused on the fact that Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS), like light scattering, is a method that reflects the dynamic properties derived from the diffusive motion of particles and molecules, and investigated the possibility of combining scattering and fluorescence measurements. The possibility of combining scattering and fluorescence measurements was studied.

研究分野：生物物理

キーワード：蛍光測定 光散乱測定 相互相関関数 微粒子 蛍光微粒子

## 1. 研究開始当初の背景

細胞内の新規構造体として、液-液相分離現象に基づく膜を持たないオルガネラやタンパク質凝縮体が認知され、機能的役割を担っていることが明らかになりつつある。一方、細胞外に放出される細胞外微粒子にはナノからマイクロメートルサイズに至る様々なものが存在し、その中には新規の細胞間情報伝達機能を有するエクソソームや、認知症や神経変性疾患の伝達要因と考えられている凝集タンパク質など、その構造やサイズも多岐に渡る。それら細胞内外の微粒子状構造は形成過程や生理的な意義等についてはその多くが未解明であるが、通常のタンパク質よりは大きく、細胞内小器官よりは小さい。その多岐に渡るサイズに注目して、申請者等はそのような構造を『細胞由来微粒子』と呼んだ。細胞由来微粒子の検出には蛍光測定法に基礎を置く特異的検出法と光散乱法に基礎を置く網羅的検出法が現在でも知られている。

蛍光標識抗体を用いると、対応する表面抗原を有する粒子は高感度に検出可能であるが、それ以外は検出されず、見えないことになる。一方、散乱からは、粒子全体のプロファイルが分かるが、特定の機能を有する粒子の判断がつかない。しかしながら、簡便性や研究初期に散乱測定を主体とした散乱検出器(ナノサイトなど)の市販機器が現在でも多く使われているが、散乱測定の弱点として100nm以下の粒子の検出効率は低下することが知られている。

申請代表者は蛍光測定法の中でも蛍光相関分光法(Fluorescence Correlation Spectroscopy, FCS)は光散乱測定と同じく、粒子や分子の拡散運動に由来するダイナミックな性質を反映する手法であることに注目し、散乱と蛍光測定の融合の可能性に着想した。

申請者等は蛍光と散乱光を組み合わせることで、放出される細胞外微粒子の総量から細胞活性を評価し、そこに含まれる特異的微粒子量の割合から、特異的機能の割合を同時に評価可能となることに着想した。

## 2. 研究の目的

これまで申請者等は光ファイバー型蛍光相関分光装置(Optical-fiber Based FCS, OB-FCS)の開発研究(Yamamoto & Kinjo. *Opt. Express* 2019)を通して2色蛍光相互相関分光装置(F Cross CS)の小型化を達成した。作成した装置は、不等分割ファイバーが励起ダイクロイックミラーの替りとなり、毎回の測定毎に必要なとされた光軸・ピンホール調整等の微調整やキャリブレーションは一切不要となり、小型で長期安定な蛍光測定装置として利用でき、広い拡張性を有する。その拡張性一つに検出側の蛍光分光ダイクロイックミラーをハーフミラーに交換することで蛍光と散乱光の同時測定の可能性に注目した。本申請では特に細胞由来微粒子の中でもガン診断の指標等として注目されているエクソソームの検出・同定法の確立を通してその実証を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1), 光ファイバー型蛍光相関分光装置(FCS)の試作と改良(北大・金城)

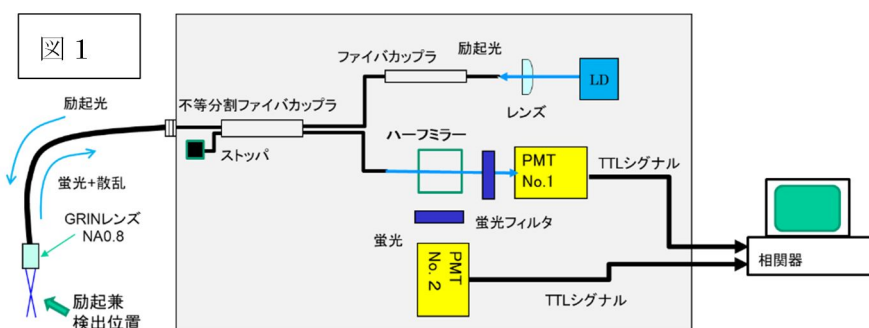
申請代表者らはこれまでに蛍光顕微鏡と対物レンズを利用したFCCSを開発し、蛍光色素、蛍光粒子やエクソソームの大きさと濃度が定量可能であることを示した。今回、まず安定測定に必要なため、不等分割型FCCS装置の構築を行った。

(2), 次にFCCS装置を蛍光・散乱同時測定のため、蛍光分光ダイクロイックミラーをハーフミラーに交換することで散乱測定可能とする。

(3), またシングルモード光ファイバーの先端をレンズ状に加工したレンズ付きファイバーを利用し、高感度のまま小型化とし、且つ次の動的散乱測定(DLS, Dynamic Light Scattering)との融合を試みる。試料溶液中における励起光の集光とその焦点領域で生じた蛍光の取り込みシステムの性能評価を行う。特にファイバー先端のレンズの形状が蛍光並びに散乱測定における集光に影響を与えるために、種々のレンズ付きファイバーやGRINレンズ等を検討して散乱測定の準備を行う。

## 4. 研究成果

### (1) 光ファイバー型蛍光相関分光装置 (FCS) の試作と改良



まず、構築したのは図1の不等分割光ファイバーを利用した FCCS 装置を構築し、さらにダイクロミックミラーまたはハーフミラーを除き、光電子増倍管1 (PMT No.1) による蛍光検出とした通常の FCS 装置である。

この装置の基本性能である蛍光色素の拡散時間並びに分子数測定を行い、通常必要とされるピッチ調整を1週間以上にわたり放置したままでも、測定性能の低下などがないことを確認した。Fluorescein の測定結果 (図2) の中で、A: 観察視野の大きさと、B: 視野の半径の大きさの変化をそれぞれ示す。いずれも1週間にわたり、ほぼ変化がないことが示され、非常に安定であることが分かった。

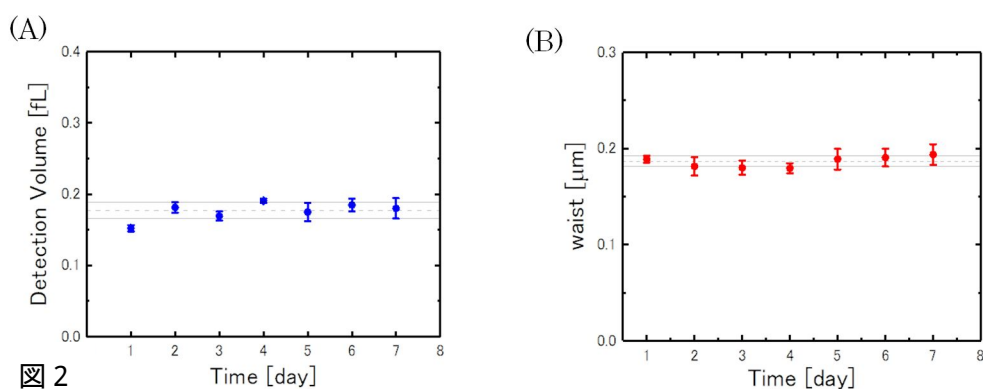


図2

また、エクソソームの粒子サイズに比例して相関関数の変化が検出されるかを検討するために、種々のサイズの蛍光ビーズの測定を行い、粒子サイズと拡散時間の関係を調べた。

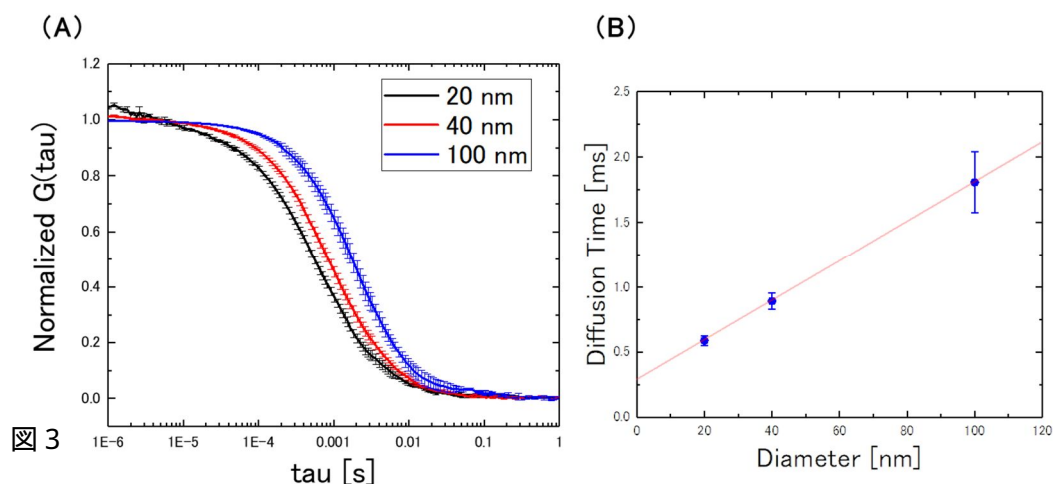


図3

図3に示すように、粒子サイズを20, 40, 100nm と変化させるとそれに従い相関関数もシフトし (A), 拡散時間も増加し (B), きれいな比例関係を示した。

以上のように、構築した光ファイバー型蛍光相関分光装置は比較的簡単な構造にも関わらず、安定的にエクソソームサイズの蛍光粒子を検出することが可能であることが分かった。

(2) 光ファイバー型蛍光相関分光装置による散乱光測定。

図1のハーフミラー部分にハーフミラーを装着することにより、散乱と蛍光の同時測定を計画したが、簡便にFCSの光路上の蛍光フィルターを取り除くことでPMT No.1による直接検出を試みた。これは光軸がFCSの測定により調整・保証されているためである。

励起光強度を通常の蛍光測定の $10^{-5}$ 程度にして測定した散乱光の測定結果が図4(A)である、また、その時の相関関数を図4(B)に示す。

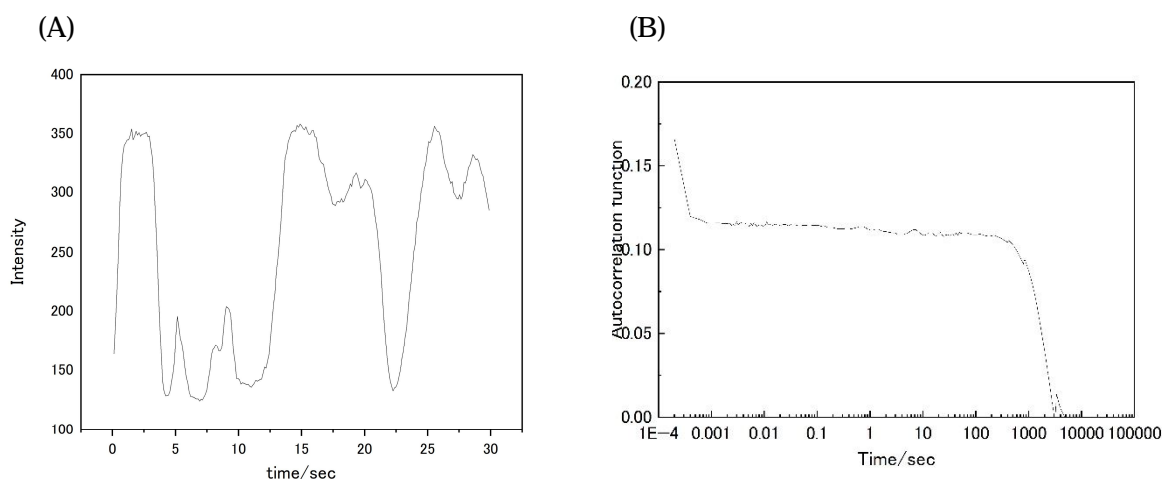


図4

散乱光が大きく揺らいでいるのがわかる。そのため相関関数に大きな揺らぎに依存した相関時間の長い結果となった。

さらに励起光強度を1/10の $10^{-6}$ に低下させて測定した結果を図5に示す。

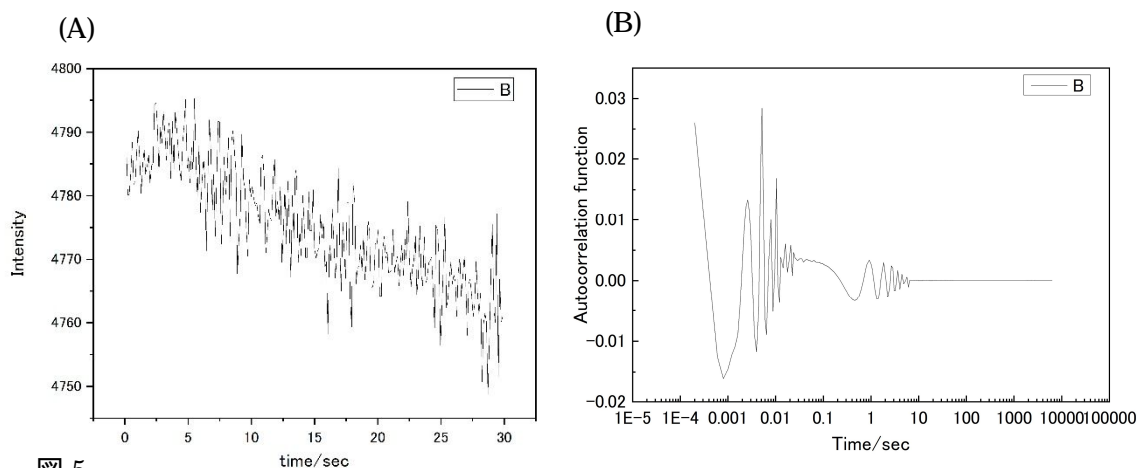


図5

散乱光強度がやや安定し(図5A)、大きな揺らぎは少なくなったものの、相関関数には周期的な揺らぎが見えてきた(図5B)。

図4の結果からは励起光強度(レーザー光強度)が強い時には、散乱光強度に大きな揺らぎが見えており、おそらくは反射光等による励起光源(レーザー光)の発振が不安定化が起こったものと推察される。一方でさらにその1/10程度に低下されると(図5)、レーザー光源の不安定化は無くなり安定化したものの、散乱光強度も低下して、周囲の迷光等の揺らぎが観察されてきたものと推察する。今後の改善方法としてはレーザー照射末端をAPC(Angled Physical Contact)化することで、レーザー装置に直接レーザー光が戻ることなど工夫をすることで可能となることが期待される。今回の研究では蛍光と散乱光強度の同時測定までは達成できなかったものの蛍光測定装置による散乱測定の問題点と改善点が判明したものと考え、次の研究へ繋がることを期待する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kitamura Akira, Oasa Sho, Kawaguchi Haruka, Osaka Misato, Vukojevi? Vladana, Kinjo Masataka	4. 巻 13
2. 論文標題 Increased intracellular crowding during hyperosmotic stress	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11834
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2022.12.30.522363	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kitamura Akira, Yuno Sachiko, Kawamura Rintaro, Kinjo Masataka	4. 巻 24
2. 論文標題 Intracellular Conformation of Amyotrophic Lateral Sclerosis-Causative TDP-43	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5513 ~ 5513
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms24065513	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kitamura Akira, Tornmalm Johan, Demirbay Baris, Piguet Joachim, Kinjo Masataka, Widengren Jerker	4. 巻 51
2. 論文標題 Trans-cis isomerization kinetics of cyanine dyes reports on the folding states of exogeneous RNA G-quadruplexes in live cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 e27 ~ e27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkac1255	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Masataka Kinjo, Riku Ando, Akira Kitamura
2. 発表標題 タンパク質間相互作用検出のための 4 チャンネル偏光蛍光相関分光装置の構築と検証 Construction and verification of 4ch polarization-dependent fluorescence correlation spectroscopy for detection of protein interaction
3. 学会等名 第61 回日本生物物理学会年会 2023 年11月16日
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 金城 政孝
2. 発表標題 偏光蛍光相関分光法の開発と今後の進展
3. 学会等名 第19回バイオオプティクス研究会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 金城政孝
2. 発表標題 蛍光相関分光法の開発と今度の進展
3. 学会等名 新領域開発課題 「一分子の科学」研究報告会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Ai Fujimoto , Masataka Kinjo , Akira Kitamura
2. 発表標題 GGGCC-RNA は、TDP43 およびそのカルボキシ断片の凝集を抑制する
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Riku Ando , Johtaro Yamamoto, Akira Kitamura , Nori Nakai , Sumio Terada , Masataka Kinjo
2. 発表標題 回転拡散と並進拡散の解析による凝集性タンパク質の検出
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuta Hamada , Masataka Kinjo , Akira Kitamura
2. 発表標題 Size determination of cytoplasmic condensates of optineurin using spatial image correlation spectroscopy (SICS)
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Rintaro Kawamura , Soya Uetsuki , Takehito Tanzawa , Takayuki Kato , Masataka Kinjo
2. 発表標題 Optineurin の E50K 緑内障変異はオリゴマー粒径を増大させる
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金城政孝
2. 発表標題 Pol-FCS回転拡散測定による抗原抗体反応検出
3. 学会等名 第18 回バイオオプティクス研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>蛍光明滅を利用したRNA立体構造検出に成功  <a href="https://www.hokudai.ac.jp/news/2023/01/rnarna.html">https://www.hokudai.ac.jp/news/2023/01/rnarna.html</a></p>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	北村 朗  (Kitamura Akira)  (10580152)	北海道大学・先端生命科学研究院・講師    (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関