

令和元年9月2日現在

機関番号：14301

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2014～2018

課題番号：26119004

研究課題名(和文)ODMRとin-cell NMRによる細胞内蛋白質間相互作用・動態の解析法の開発

研究課題名(英文)Development of analyzing methods for protein-protein interactions and protein dynamics by means of ODMR and in-cell NMR

研究代表者

白川 昌宏(Shirakawa, Masahiro)

京都大学・工学研究科・教授

研究者番号：00202119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 117,900,000円

研究成果の概要(和文)：ナノダイヤモンド(ND)を使った光検出磁気共鳴(ODMR)法について、ND中でセンサーとして機能する格子欠陥(NVセンター)を形成する技術、NDによる分子特異的標識技術、およびNVセンターを用いた新規ナノ計測技術を開発した。蛋白質重合体(細胞骨格等)の単量体をNDに修飾することにより、細胞内で起こる重合過程を利用した新たなダイヤモンド標識方法を確立し、その動態を追跡した。また、試料に剪断流を加えながらNMR測定ができる新たなRheo-NMR法を開発した。従来法に比べ簡便で、極低温プローブ装着のNMR装置にも適用でき、Rheo-NMR法として世界最高感度・分解能である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生細胞・生体内での生体高分子の立体構造、集合状態、ダイナミクス等を直接定量的に計測する方法を得つつある。これにより、将来的には、生物の生きた状態を生体分子がいかにか成り立っているかを、一分子レベルで、またはアンサンブルレベルで可視化・計測することが可能になる。よって、生きた状態を成り立たせる分子論的な必要条件の端緒が見つかること期待される。

研究成果の概要(英文)：Methods to create NV centers which are characterized by a crystal lattice vacancy and its adjustments are created. In addition, methods targeting the NV center containing ND to biomolecules and techniques to measure ODMR of the biomolecule-attached ND have been developed. For protein assemblies (ex. cytoskeletons), by labeling subunit of the assemblies with ND particles, it was possible to characterize the assembly states and mechanism. We also generated a method to measure NMR spectroscopy of proteins under the presence of rheologic forces --- rheology NMR. The new method is convenient, and applicable to modern NMR machine.

研究分野：生物物理学 構造生物化学 分子生物学

キーワード：ODMR in-cell NMR 細胞内蛋白質 細胞小器官 Rheo-NMR

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内は、細胞骨格や細胞小器官により微小空間に分断されており、その空間はタンパク質等の高分子濃度が 40%にも達しうる細胞質によって満たされている。そのため細胞内のタンパク質やそれらの集合体である細胞小器官は大きな Macromolecular Crowding 効果や Micro-compartmentalization 効果を受けている。したがってこれらの機能メカニズムの解明には、生きた細胞内でのタンパク質・小器官の挙動や運動性を知る必要があった。

2. 研究の目的

本研究では、細胞内タンパク質・小器官の立体構造・運動性・超分子複合体形成等を生きた細胞の中で計測する手法の開発を行った。一つは、細胞内の特定のタンパク質の高次元 NMR 測定である in-cell NMR 法であり、もう一つはダイヤモンドナノ粒子を使った光検出磁気共鳴法 (ODMR) である。

in-cell NMR では、タンパク質の原子レベルの構造情報や運動性・他分子との相互作用を詳細に観察することができる。

ODMR は、蛍光検出と磁気共鳴技術を組み合わせることにより、ダイヤモンドナノ粒子の姿勢を原理的には、 $\pm 3^\circ$ 以内で完全決定できる。そこで、ダイヤモンドナノ粒子を蛍光タグとして用いれば、細胞内におけるタンパク質・細胞小器官の一分子動態計測に応用が可能である。

準備段階として、ヒト細胞を使った in-cell NMR とダイヤモンドナノ粒子を選択的に観測する ODMR 法を開発して世界に先駆けて論文発表をしている (Inomata, et al., Nature, 2009; Igarashi, et al., 2012)。

本研究では、測定・タンパク質の標識化・細胞内ターゲティング等の手法を導入することで、細胞内の分子挙動や運動性、細胞内でのメカノトランスダクションを計測する手法の開発を行った。

3. 研究の方法

本研究では細胞内蛋白質・小器官の立体構造・運動性・超分子複合体形成等を生きた細胞の中で計測する手法の確立を目的とし、細胞内の特定の蛋白質の高次元 NMR 測定である in-cell NMR 法とダイヤモンドナノ粒子 (ND) を使った光検出磁気共鳴法 (ODMR) の開発を進めた。

(1) ODMR に関する研究では、要素技術となる①測定技術、②ナノダイヤモンドプローブ粒子の至適化と蛋白質の標識化、③細胞へのターゲティング、④得られた情報の処理と解釈について開発研究を行った。①に関しては、高感度化、低侵襲性化等を目的とした装置の改良、取り分け光学系検出器の感度向上と検出手法やソフトウェアの至適化により時間単位の感度向上を進めた。プローブ粒子の改善と安定供給についても近年格段に進歩しつつある。直径 30-100 nm 程度のナノダイヤモンド粒子が単分散で分子標識のプローブ粒子として使用できることは広く知られていた。ただし、分子の挙動を計測するためには、分子サイズの ODMR プローブ粒子 (約 5 nm 程度) を単分散にする必要がある。従って世界中でこれを試みられてきたが、5 nm 粒子のナノダイヤモンドで単分散の ODMR プローブを作成することに成功した報告はなかった。このことに世界で初めて成功したことは、本研究の大きなランドマーク的成果として挙げられる。またターゲティング手法も大きく進み、生体膜やアクチン線維に ND をターゲティングする事に成功した。特にアクチン線維へのターゲティングは、ODMR の測定により、アクチン粒子が線維長の伸縮に伴い線維軸を軸として回転すること、その運動が同一線維では同期していることを示した。これは当初に掲げた大きな目標の一つで、本研究のもうひとつのランドマーク的成果である。また磁気共鳴系においては、マイクロ波のパルス照射を可能になるようにハードウェアの改良と、それを利用した緩和時間測定の実験手法の導入とデータ処理技術の開発を進めた。さらに、測定手法・ソフトウェアの導入、改良に伴い、④のデータ処理技術も適時、改訂・開発を行った。

(2) in-cell NMR では蛋白質の細胞内の回転拡散と並進拡散を計測し in vitro の実験結果も加えて細胞内蛋白質の受ける Macromolecular crowding 効果等を精査し、蛋白質の立体構造や機能に与える影響を流体力学的観点からも解析した。また、流体力学的効果が蛋白質の立体構造や機能に与える影響を解析するため Rheo-NMR の装置を開発し、測定を行った。この方法により、安定なフォールディングから線維化する過程を実時間で検出できた。

4. 研究成果

(1) ナノダイヤモンド (ND) を使った光検出磁気共鳴 (ODMR) 法について、①ND 中でセンサーとして機能する格子欠陥 (窒素-空孔中心、NV センター) を形成する技術の開発、②ND による分子特異的標識技術の開発、および③NV センターを用いた新規ナノ計測技術、を開発した。

①については、電子線照射と高温処理による ND 中の NV センター形成条件の最適化と、表面ヒドロキシ化による NV センターの電荷安定化を実証した。特に、既存技術では分子サイズ (5 nm) の爆轟ナノダイヤモンド (DND) 中に負電荷を持つ NV センターを人工的に形成することは困難だったが、驚くべきことに、ボラン還元という極めてシンプルな化学処理で DND 中の NV センターの負電荷が安定化されることを見出した(図 1, Sotoma *et al.*, 2018)。

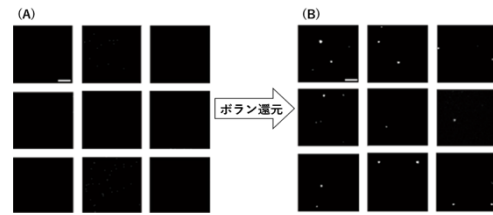


図 1 NV センター選択的イメージング：ボラン還元前(A)後(B)。ボラン還元後、負電荷に帯電した NV センターの輝点を確認することができる。

ただし、5 nm の DND は NV センター形成に必須とされてきた「アニーリング」の効果が無いとされており、量子材料の業界でも NV センターの濃縮は行えないという推定が通説になっていた。また、NV センター形成に必須なもう一つの要素である「電子線照射」により粒子間の化学結合が形成されるため、超音波破砕などの一般的な分散手法では単分散化が行えないため、NV センターが濃縮できたとしても 5 nm の ODMR プロブとして利用することは困難であるとされてきた。そこで、アニーリング無しでも電子線照射のみで DND 中の NV センターが濃縮可能であること、電子線照射で形成される粒子間の化学結合は硫酸と硝酸の混酸中で 120°C 加熱することで切断されて 5 nm の単分散 DND が得られることを見出し、「世界最小の量子センサー」と称される極小の ODMR プロブ粒子を開発することに世界で初めて成功した (Terada *et al.*, 日経新聞 2019、科学新聞 6/7)。また、今後はこの手法が端緒となり、ODMR による 1 分子レベルの計測が可能になっていくことが期待される。

②については、ND の効率的な親水化手法として、極めて簡便なワンポット親水ポリマー化技術を開発したこの手法は ND を細胞内の標的部位に送達する際に問題となる生体分子との非特異吸着を排除する効率的な方法であり、親水化後の ND はクロスリンカーが適用可能である。更にこの手法を基盤技術として、ペプチド等のターゲティング分子と親水化 ND を共有結合することで、細胞内の標的部位 (ミトコンドリアや核内など) に ND を効率的に送達する手法を確立した (Terada *et al.*, 2018)。

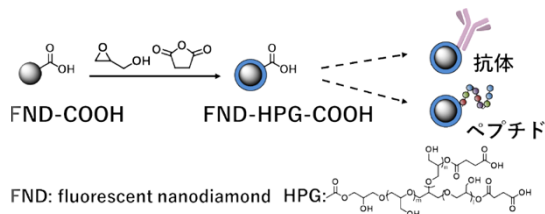


図 2 選択的分子標識法。標的部位に特異的にナノダイヤモンドをターゲティング出来る、簡便な手法を開発した。

また③については、標的部位送達した ND 中の NV センターを利用して、角度変化や温度計測など動的構造測定に関係する多様なパラメータをその場観察可能であることを実証した。特に、分子サイズ (5 nm) の ND を用いて、角度精度 1 度での回転動態計測が行えること、ナノ空間の温度計測が実施可能であること、ODMR を介して超解像イメージングとして利用可能出ることなどの原理検証を実施した (Sotoma *et al.*, 2018)。また、これとは別にミトコンドリアに送達した ND を用いた温度計測の実証などにも成功している (Terada *et al.*, 2018)。

(2) in-cell NMR では蛋白質の細胞内の回転拡散と並進拡散を計測し、巨大分子集積効果等の蛋白質の立体構造や機能に与える影響を流体力学的観点から解明する事を目指した。

例えば in-cell diffusion NMR を用いた解析の結果、得られた流体力学的効果を、in vitro での Rheo-NMR の実験で再現し定量的に解析するという流れが本研究の一つのアウトラインである。Rheo-NMR について、試料に剪断流を加えながら NMR 測定ができる新たな手法を開発した。外径 3 mm のガラス棒を外径 5 mm の NMR 管に挿入し、スピナー回転で NMR 管を回転させること

で、試料に剪断流を与えることが出来る。従来法に比べ簡便で、極低温プローブ装着のNMR装置にも適用できる(図3)。現在、本手法はRheo-NMR法として世界最高感度・分解能である。

剪断流は異常タンパク質凝集体であるアミロイド線維の形成を促進することから、Rheo-NMR法はアミロイド線維形成をリアルタイムかつ原子分解能で追跡することに有用である。筋萎縮性側索硬化症に関与するスーパーオキシドジムターゼ1(SOD1)に関して、アミロイド線維に特異的に結合するチオフラビンTを利用することで、本来溶液NMR法で解析が困難な線維前駆体および線維の形成をリアルタイムで追跡することが出来た(2017)。

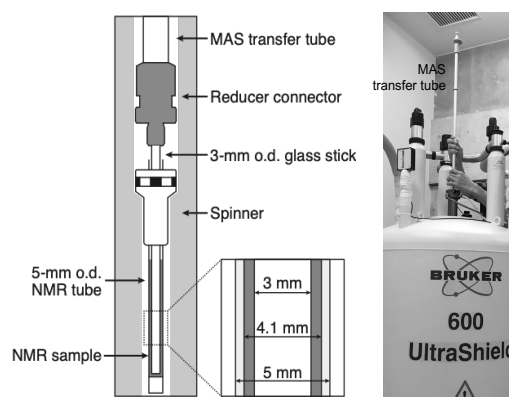


図3 スピナー装着した外径5 mm NMR管に外径3 mmのガラス棒を挿入するだけでRheo-NMR法の設置完了である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 27 件)

1. Terada D., Segawa T.F., Shames A.I., Onoda S., Ohshima T., Ōsawa E., Igarashi R., Shirakawa M. Monodisperse Five-Nanometer-Sized Detonation Nanodiamonds Enriched in Nitrogen-Vacancy Centers. *ACS Nano* in press (2019) 査読有, doi: <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b09383>
2. Terada, D., Sotoma, S., Harada, Y. Igarashi, R and Shirakawa, M. One-Pot Synthesis of Highly Dispersible Fluorescent Nanodiamonds for Bioconjugation. *Bioconj Chem* 29:2786-2792 (2018) 査読有, doi:10.1021/acs.bioconjchem.8b00412
3. Shingo Sotoma, Daiki Terada, Takuya F. Segawa, Ryuji Igarashi, Yoshie Harada Masahiro Shirakawa, Enrichment of ODMR-active nitrogen-vacancy centres in five-nanometre-sized detonation-synthesized nanodiamonds: Nanoprobes for temperature, angle and position. *Sci Rep* 8:5463 (2018) 査読有, doi: 10.1038/s41598-018-23635-5.
4. Sotoma S, Shirakawa M. Monodispersed Colloidal Solutions of Surface-modified Detonation-synthesized Nanodiamonds and Their Aggregation Resistance. *Chem Lett* 45:697-699 (2016) 査読有, <https://doi.org/10.1246/cl.160250>
5. Sotoma S, Igarashi R, Shirakawa M. Moderate plasma treatment enhances the quality of optically detected magnetic resonance signals of nitrogen-vacancy centres in nanodiamonds, *Applied Physics A* 122 :522 (2016) 査読有, DOI: 10.1007/s00339-016-0030-y
6. Sotoma S, Igarashi R, Iimura J, Kumiya Y, Tochio H, Harada Y, Shirakawa M. Suppression of nonspecific protein -nanodiamond adsorption enabling specific targeting of nanodiamonds to biomolecules of interest, *Chem Lett* 44: 354-356 (2015) 査読有, doi.org/10.1246/cl.141036

[学会発表] (計 22 件)

1. Masahiro Shirakawa, 2018 Korean Magnetic Resonance Society Symposium, “Magnetic resonance spectroscopy of single nanoparticle - a quantum sensor for molecular and cell biology”, 2018.6.28 麗水、韓国
2. 白川昌宏, 量子生命科学研究会第2回第2回学術集会 「ダイヤモンドNV中心を使った量子センシングの分子・細胞生物学への応用」 2018.5.10 東京大学弥生講堂, 東京都文京区

3. 白川昌宏, the 7th Yamada workshop on RI Science Evolution (RISE18), Cell biology using nanogyroscope by optically detected magnetic resonance (ODMR) spectroscopy, 2018.3.17 大阪大学蛋白質研究所,大阪府吹田市
4. 白川昌宏, ComBio 2017 ワークショップ, ダイヤモンド NV 中心を使った量子センシングの分子・細胞生物学への応用, 2017.12.8 神戸ポートピアホテル, 神戸市
5. 白川昌宏, 第 56 回 NMR 討論会 (2017), 光検出磁気共鳴法による生細胞における 1 分子運動の計測, 2017.11.14-16 首都大学東京, 東京都八王子市,
6. 白川昌宏, 化学研究所 NMR 国際シンポジウム 2017 : DNP-NMR ワークショップ, 光検出磁気共鳴法を使った細胞生物学の実験手法 2017.11.10, 京都大学宇治キャンパス, 京都府宇治市
7. 白川昌宏, 5th Awaji International Workshop on “Electron Spin Science & Technology” Biological and Materials Science Oriented Applications, Cell biology using nanogyroscope by optically detected magnetic resonance (ODMR) spectroscopy, 2017.6.20 夢舞台, 兵庫県淡路市
8. 白川昌宏, 第 64 回応用物理学会春季学術講演会, ダイヤモンド NV 中心を使った量子センシングの分子・細胞生物学への応用, 2017 年 3 月 25 日, パシフィコ横浜, 横浜市
9. 白川昌宏, ミニシンポジウム 生命科学・量子技術・ナノエレ・研究の融合 Interdisciplinary field : 「Life science」 - 「Quantum technology」 - 「Nano electronics」, 生細胞または生体における生体分子の量子センシング”, 2017 年 2 月 28 日, 東京工業大学, 東京都目黒区
10. 白川昌宏, 第 39 回日本分子生物学会年会, 光検出磁気共鳴法を使った高分解能イメージング, 2016 年 12 月 1 日, パシフィコ横浜, 横浜市
11. 白川昌宏, 第 55 回電子スピンスイェンス学会 (SEST2016), ナノダイヤモンド標識による蛋白質構造解析, 2016 年 11 月 11 日, 大阪市立大学杉本キャンパス, 大阪市
12. Masahiro Shirakawa, The 27th International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systemes (ICMRBS), “Cell Biology using nanogyroscope by optically detected magnetic resonance(ODMR) spectroscopy”, 2016 年 8 月 25 日, 京都国際会館, 京都市
13. 白川昌宏, 大阪大学蛋白質研究所セミナー, IRP Seminar “Protein NMR Beyond”, Actions of cellular macromolecules observed by magnetic resonance spectroscopy” 2016 年 6 月 3 日, 大阪大学蛋白質研究所, 大阪府吹田市
14. 白川昌宏, 日本学術会議 薬学委員会 化学・物理系薬学分科会、生物系薬学分科会、日本薬学会シンポジウム『新しい展開を目指す化学・物理系薬学領域の研究』, 「生体分子間の非共有結合相互作用に関する物理的化學的研究」 2016 年 5 月 20 日 東京都港区
15. 白川昌宏, 光検出時期共鳴法による細胞・生体の高分解能イメージング, 口頭, 大阪大学蛋白質研究所セミナー, 大阪大学蛋白質研究所, 2016.4.28, 大阪府吹田市,
16. Shirakawa M, 第 38 回日本分子生物学会年会, In cells and in vitro studies of ubiquitin chains and proteins attached to them 2015. 12.1, 神戸国際会議場, 神戸市,
17. 白川昌宏, 第 15 回日本蛋白質化学会年会, ダイヤモンド粒子の窒素-空孔中心 (NVC) を用いた生体・細胞のナノジャイロセンシング手法の開発, 2015 年 6 月 26 日, 徳島あわぎんホール, 徳島市,
18. 白川昌宏, 九大生医研国際シンポジウム, High-resolution imaging by using optically-detected magnetic resonance, 2015 年 11 月 13-14 日, 九州大学馬出病院キャンパス, 福岡市
19. Masahiro Shirakawa, the 16th Beijing Conference and Exhibition on Instrumental Analysis (BCEIA), Magnetic resonance study of structures, functions and dynamics of proteins in living cells, 2015.10.28, 北京, 中華人民共和国
20. 白川昌宏, 大阪大学蛋白質研究所セミナー「先端核磁気共鳴から展開する生命科学研究」, 2015.4.28, 大阪大学蛋白質研究所, 大阪府吹田市

21. 白川昌宏, 大阪大学蛋白質研究所セミナー.2014.12.19, 大阪大学蛋白質研究所, 大阪府吹田市
22. 白川昌宏, 日本薬学会医薬化学部会 第32回メディシナルケミストリーシンポジウム, DNAメチル化の構造生物学とIn-NMRによる細胞内でのタンパク質と薬剤の相互作用の観察, 神戸国際会議場, 2014.11.27, 神戸市

〔その他〕(計 2件)

1. 日本経済新聞 2019年6月3日 朝刊「最小の量子センサー 老化の仕組み解明へ」
2. 科学新聞 2019年6月7日「世界最小の量子センサー」

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 連携協力者

連携研究者氏名：朽尾 豪人

ローマ字氏名：(TOCHIO, Hidehito)

所属研究機関名：京都大学

部局名：理学研究科

職名：教授

研究者番号： 70336593

※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。