

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14516

研究課題名(和文)自発ブリンキング能を持つ蛍光色素を用いた内在性タンパク質の細胞内1分子動態計測

研究課題名(英文)Single molecule imaging of endogenous protein in living cells using spontaneously blinking fluorophore

研究代表者

神原 丈敏(Kambara, Taketoshi)

国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・研究員

研究者番号：40451637

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内の分子混雑環境では、タンパク質の動態・反応が希薄溶液中の *in vitro* 計測と異なると予想されていたが、これまで細胞質を自由拡散するタンパク質の1分子計測が困難だったため、その直接的検証は困難だった。本研究では、ゲノム編集技術を用いた内在性タンパク質への蛍光タグ導入と、自発ブリンキング能を持つ蛍光色素を利用したストロボスコピー計測を組み合わせることで、細胞質を自由拡散する内在性タンパク質分子の1分子動態計測を行った。

研究成果の概要(英文)：It is expected that protein dynamics and protein-protein interaction in the crowded cellular environments are different from those *in vitro*. However, direct evaluation of the effect of macromolecular crowding was difficult, since the method to observe freely diffusing single molecule in the cytoplasm has not been developed. In this study, we performed single molecule imaging of freely diffusing endogenous protein in living cells using spontaneously blinking fluorophore.

研究分野：生物物理

キーワード：1分子イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

細胞内の分子混雑環境では、タンパク質の動態や反応が希薄溶液中の *in vitro* 計測と異なると予想されていたが、その直接計測は困難だった。我々は、高感度高速1分子イメージング顕微鏡を構築し、溶液中を自由拡散するタンパク質の1分子計測に成功した。これを利用して、キネシンの微小管への結合反応の速度定数 ( $k_{on}$ ) を計測し、細胞内では *in vitro* 希薄溶液中の約10倍であること、従来の分子混雑環境の *in vitro* モデル系では、むしろ希薄溶液中より  $k_{on}$  が低下し、細胞内での直接計測の重要性が再確認された。しかし、本手法は過剰発現させた標識タンパク質を用いた計測であり、しかも激しい光褪色のためスナップショット計測しか行うことが出来ず、タンパク質の動態計測には至っていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、ゲノム編集技術を用いた内在性タンパク質への蛍光タグ導入と、自発ブリッキング能を持つ蛍光色素を利用したストロボスコーピー計測を組み合わせることで、細胞質を自由拡散する内在性タンパク質分子の1分子動態計測の実現を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) ゲノム編集を用いた内在性たんぱく質の標識、計測法の確立

内在性タンパク質の標識には、ゲノム編集酵素 SuperTALEN(特願 2013-167144)を用いたノックインにより蛍光タグを導入する。

### (2) 自発的ブリッキング能を持つ蛍光色素を用いた計測手法の確立

光褪色を防いで動態計測を行うためには、間歇露光が有効である。我々は、間歇露光を実現する新しい方法として、神谷・浦野らにより開発された自発ブリッキング能を持つ新

しい蛍光色素に注目した。蛍光を発する開環状態の寿命を1ミリ秒程度、光を吸収しない閉環状態の寿命が10ミリ秒程度の色素を用いれば、光褪色を10倍遅くすることが出来る。

## 4. 研究成果

### (1) ゲノム編集を用いた内在性たんぱく質の標識、計測法の確立

我々は、改良型TALENであるSuperTALENを用いてマウス個体レベルで高効率の遺伝子ノックアウトに成功している。これを応用し、homology independent repairを用いることで高効率に目的タンパク質遺伝子のC末部分に蛍光標識を導入する方法を確立した。

内在性タンパク質のモデルとして、我々の主な研究対象であるキネシンを用い、本手法でGFPを導入して、本手法の有効性を実証した。

さらに(2)で内在性キネシンの分子動態計測を行うためにHalo-tagを導入し、自発ブリッキング能を持つ蛍光色素で標識した。

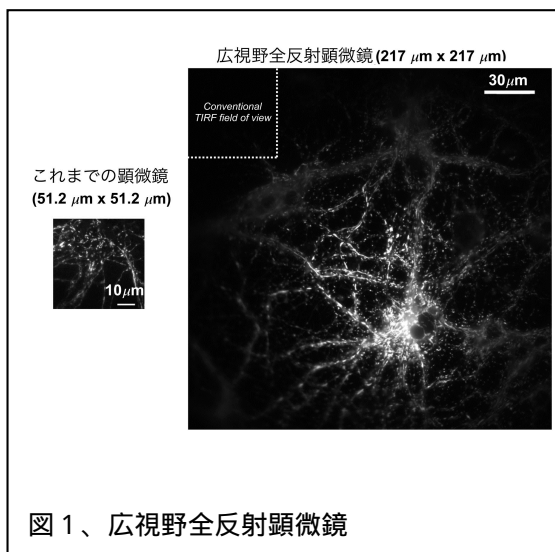
### (2) 自発的ブリッキング能を持つ蛍光色素を用いた計測手法の確立

分子内スピロ環化平衡を示すローダミン誘導体は、蛍光を示す開環体と無蛍光の閉環体の動的平衡により、確率的に明滅する。明状態の持続時間すなわち開環体の寿命は、スピロ環化反応の速度によって定まり、求核基によって50nsから300ms程度まで約7桁の時間スケールが達成可能である。一方、暗状態の持続時間すなわち閉環体の寿命は、求核基と色素部分の求電子性のバランスで定まり、開環体の寿命の1/1000から100倍程度まで5桁の時間スケールが達成されている。本研究では、細胞質中でのタンパク質の拡散速度から、明状態の持続時間が数ミリ秒、暗状態の持続時間がその10~100倍が適していると予想されたため、すでに神谷・浦野らによって作成済みの化合物の中から、この条件を満たす色素を

選抜した。さらに、これもちいて GFP 標識キネシンを標識し、高速 1 分子計測によって、本計測に最適なプリンキング能を持つ蛍光色素を選択した。

さらに、GFP を用いた高速 1 分子計測の結果と、自発プリンキングを利用した計測結果を比較し、本手法の検証を行った。

その過程で、細胞の全領域で自由拡散するタンパク質 1 分子を観察して 1 細胞内での反応速度定数の空間分布を求めることができるほどの広視野で、尚且つ、GFP と自発プリンキング蛍光色素との同時計測を可能にする顕微鏡システムの開発が必要になり、この開発を行った ( 図 1 )。



## 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 1 1 件 )

1 ) 神原丈敏、岡田康志 「生細胞内における微小管へのキネシン結合速度定数の直接計測」第 1 2 2 回日本解剖学会総会全国学術集会 2 0 1 7 年 3 月 3 0 日、長崎大学坂本キャンパス ( 長崎県長崎市 )

2 ) Taketoshi Kambara, Yasushi Okada

“ Direct measurement of the binding rate constant of kinesin to microtubules in living cells. ” 2016 ASCB annual meeting, 2 0 1 6 年 1 2 月 6 日、サンフランシスコ ( 米国 )

3 ) 神原丈敏、岡田康志 「生細胞内における微小管へのキネシン結合速度定数の直接計測」第 5 4 回日本生物物理学会年会 2 0 1 6 年 1 1 月 2 6 日、つくば国際会議場 ( 茨城県つくば市 )

4 ) 神原丈敏、岡田康志 「生細胞内における微小管へのキネシン結合速度定数の直接計測」第 6 8 回日本細胞生物学会大会 2 0 1 6 年 6 月 1 6 日、京都テルサ ( 京都府京都市 )

5 ) 神原丈敏、岡田康志 「生細胞内における微小管へのキネシン結合速度定数の直接計測」第 1 2 1 回日本解剖学会総会全国学術集会 2 0 1 6 年 3 月 2 9 日、ビッグパレットふくしま ( 福島県郡山市 )

6 ) Taketoshi Kambara, Yasushi Okada “ Direct measurement of the binding rate constant of kinesin to microtubules in living cells. ” International chemical congress of Pacific Basin Societies 2015, 2 0 1 5 年 1 2 月 1 9 日、ハワイ ( 米国 )

7 ) Taketoshi Kambara, Yasushi Okada “ Direct measurement of the binding rate constant of kinesin to microtubules in living cells. ” 2015 ASCB annual meeting, 2 0 1 5 年 1 2 月 1 4 日、サンディエゴ ( 米国 )

8 ) 神原丈敏、岡田康志 「生細胞内における微小管へのキネシン結合速度定数の直接計測」第 5 3 回日本生物物理学会年会 2 0 1 5 年 9 月 1 4 日、金沢大学 ( 石川県金沢市 )

9) 神原文敏、岡田康志「生細胞内における  
微小管へのキネシン結合速度定数の直  
接計測」第67回日本細胞生物学会大会  
2015年6月30日、タワーホール船  
堀(東京都江戸川区)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

神原 丈敏 (KAMBARA, Taketoshi)

国立研究開発法人理化学研究所・生命シス  
テム研究センター・研究員

研究者番号: 40451637

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

岡田 康志 (OKADA, Yasushi)

国立研究開発法人理化学研究所・生命シス  
テム研究センター・チームリーダー

研究者番号: 50272430

浦野 泰照 (URANO, Yasuteru)

東京大学・薬学系・教授

研究者番号: 20292956

神谷 真子 (KAMIYA, Mako)

東京大学・医学系・助教

研究者番号: 90596462

### (4) 研究協力者

( )