

令和元年5月20日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14427

研究課題名(和文) 光捕捉によるアミロイド集合体の時空間形成と蛍光解析によるそのダイナミクス解明

研究課題名(英文) Spatiotemporal formation of amyloid assembly by optical trapping and fluorescence analysis of its dynamics

研究代表者

柚山 健一 (Yuyama, Ken-ichi)

北海道大学・電子科学研究所・助教

研究者番号：20786355

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：部分的に変性したタンパク質を光捕捉することにより、アミロイド集合体を時空間的に制御して作製することに成功した。顕微蛍光分光を用いてその形成過程を調べることにより、タンパク質の集合とアミロイド線維化の二段階で集合体形成が進むことを明らかにした。前半に形成する集合体の構造は、一本の繊維状の構造体が丸まっていることを見出した。アミロイド形成に至る前の中間体のようなタンパク質が集合した場合も、アミロイドのような線維状の構造をとりうるということが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アミロイドは、様々な疾患と関係している不溶性のタンパク質凝集体である。確率的に起こるアミロイド核形成を溶液中で時空間制御することは難しく、溶液全体のアンサンブル測定を通してその形成過程が調べられてきた。本研究で示した新しいアミロイド集合体形成手法は、一集合体レベルでの解析を可能にし、アミロイド線維形成メカニズムの解明に大きく貢献できると期待される。

研究成果の概要(英文)：We successfully demonstrated spatially- and temporally- controlled formation of an amyloid assembly by optical trapping of partially unfolded proteins in solution. The fluorescence analysis during the trapping process revealed that the formation of an amyloid assembly proceeds in two steps; aggregation of proteins and their amyloid fibrillation. It was found that the assembly formed in the first step consists of the entangled single fibrillar structure. Thus, it was implied that intermediate proteins prior to amyloid nucleation can form the fibrillar structure like amyloid during their assembling process.

研究分野：光物理化学

キーワード：光ピンセット 光圧 アミロイド タンパク質 顕微分光 顕微イメージング レーザー

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

1. 研究開始当初の背景

集光レーザーの光圧を利用した光マニピュレーションは、非接触かつ非破壊的に溶液中の微小物体を操作する手法として様々な分野で革新的な役割を果たしてきた。化学研究においては、ナノ粒子や半導体量子ドット、ミセルなどが光捕捉対象として用いられてきた。光捕捉現象は分子系においても報告され、高分子やタンパク質、アミノ酸などの光捕捉による分子集合体の時空間形成が実証されてきた。さらに、光圧による局所濃縮現象を結晶核形成や結晶成長に応用する研究が展開されてきた。特に、タンパク質の結晶化・結晶成長制御は非常に重要な研究テーマであり、それらを目指したタンパク質の光捕捉研究が複数のグループにより進められてきた。このような背景のもと、研究代表者は、結晶と並ぶ重要なタンパク質集合体であるアミロイドに注目した。正常なタンパク質が三次元的に配列した集合体が結晶であるのに対し、変性したタンパク質が一次的に配列した集合体がアミロイドであり、様々な疾患と関係している。ドメインスワッピングにより形成したシトクロム *c* ダイマーを光捕捉すると、アミロイドが形成することを見出した (Angew. Chem. Int. Ed., Vol.56, 2017, pp.6739-6743)。しかしながら、その形成ダイナミクスはよくわからないままであった。

2. 研究の目的

上記の背景のもと、異なるタンパク質の光捕捉においても同様のアミロイド集合体形成が起こることを実証し、さらにその形成ダイナミクスをイメージングや分光などの顕微蛍光分析を用いて明らかにすることを目的とし、下記の研究を計画した。

3. 研究の方法

(1) 蛍光イメージング・分光が可能な光捕捉装置の構築

波長 1064 nm の連続発振レーザーを倒立顕微鏡に導入し、光捕捉装置を構築した。1/2 波長板と偏光ビームスプリッターを光路に組み込み、近赤外レーザーの強度を調整できるようにした。さらに波長 405 nm の紫外レーザーを近赤外レーザーと同軸で顕微鏡に導入した。レンズを用いて対物レンズの前に紫外レーザーのみを集光することにより、サンプルの広視野照明を実現した。蛍光スペクトルを測定するために、顕微鏡のサイドポートに光ファイバーを設置し、分光器と接続した。蛍光色素がドープされた直径 100 nm のポリスチレンナノ粒子の光捕捉実験を行い、捕捉されたナノ粒子の蛍光イメージ、蛍光スペクトルを取得することにより、装置の光捕捉性能と顕微計測の性能を確認した。

(2) 酸性条件下でのニワトリ卵白リゾチームの光捕捉と蛍光分析

ニワトリ卵白リゾチーム (HEWL) をサンプルとして用いた。HEWL のアミロイド形成条件は、次の論文 (The effect of concentration, temperature and stirring on hen egg white lysozyme amyloid formation, Soft Mater, Vol.9, 2013, pp.9692-9701) に報告されている。HEWL を酸性条件下で加熱すると、アミロイドが形成する。報告された条件を基に、サンプル (HEWL; 30 mg/mL, NaCl; 0.3 mol/L, ThT; 20 μ M, solvent; 0.1 % HCl) を調製した。変性を促進するために NaCl を加えた。ThT は、アミロイドセンサーとして知られている色素である。アミロイドが形成していない状態では、蛍光を示さない。一方、アミロイドが形成すると、蛍光を発するようになる。このサンプルを 55 で加熱するとことにより、自発的なアミロイド形成過程を調べた。サンプル溶液を加熱すると、ThT に特徴的な 490 nm にピークを持つ発光バンドが現れた。蛍光強度の変化には閾値が観測され、加熱 5 分後から蛍光強度の増加が始まった (図 1)。この結果は、加熱 5 分までは、アミロイドの核形成が起こらないことを示している。この結果を基に、55 で 2 分間加熱したサンプル溶液を光捕捉実験に用いた。

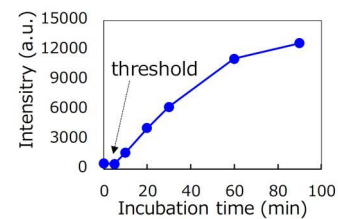


図 1. サンプル加熱時の ThT 蛍光強度の時間変化

4. 研究成果

55 で 2 分間加熱したサンプル溶液の液中に波長 1064 nm のレーザーを集光することにより、リゾチームを光捕捉した。集光点において、タンパク質集合体を形成することに成功した。光捕捉中の集光点近傍の顕微透過像を図 2a に示す。照射数分後から円状のパターンが観察され、時間と共に円状パターンのコントラストが強くなった。さらにレーザーを照射すると、10~15 分後からパターンの形状が変形し、集光点の外側に集合体が成長する様子が見られた。集合体形成中に測定された ThT からの蛍光スペクトルと強度の時間変化を図 2b, 2c に示す。照射 12 分後までは ThT の蛍

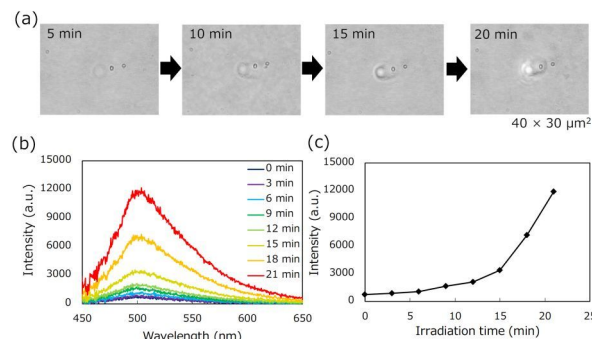


図 2. (a) 光捕捉中の集光点近傍の顕微透過像 (b, c) 光捕捉中の ThT の蛍光スペクトルと強度の時間変化

光強度は緩やかに増加し、その後急激に増加した。この蛍光強度変化は透過像の変化と一致している。蛍光強度の急激な増加は、アミロイド形成を意味している。このように、部分的に変性した HEWL においても、光捕捉を用いることによりアミロイド集合体を時空間的に制御して作製することに成功した。

蛍光イメージング・分光測定により、集合体形成が二段階で進むことが明らかとなった。一段階目の集合体形成に注目し、光捕捉実験を行った。光捕捉中の集光点近傍の顕微透過像を図 3a に示す。顕微透過像の集光点に丸いパターンが現れ、パターンの形状を保ったまま、コントラストが照射時間と共に強くなった。この透過像の変化は、集光点においてタンパク質集合体が形成し時間と共に成長することを示している。対物レンズと顕微鏡ステージを操作することにより、ガラス基板の上に集合体を付着させてその構造を観察したところ (図 3b) 集合体は幅 1 μm 以下、長さ 6~7 μm の一本のヒモ状構造体が丸まって形成していることが明らかとなった (図 3c)。光捕捉の時間を短くするとヒモ状構造体の長さは短くなり、透過像観察から予想される結果とよく一致した。一方、この集合体形成過程では、ThT の増加は観測されない。すなわち、このヒモ状集合体はアミロイド線維ではない。アミロイド形成に至る前の中間体のようなタンパク質が集合した場合も、アミロイドのような線維状の構造をとることが明らかになった。このように、光捕捉を用いることにより時空間的にアミロイド集合体を形成できることを実証し、一集合体レベルでのアミロイド形成過程の解析の可能性を示した。

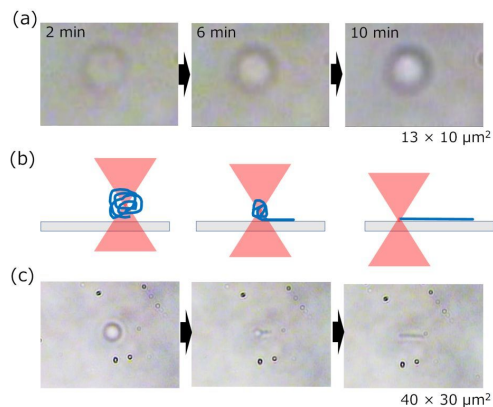


図 3 . (a) 光捕捉中の集光点近傍の顕微透過像 (b) 集合体の光操作手順 (c) 光操作中の集合体の形状変化

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

1. Jim Jui-Kai Chen, Ken-ichi Yuyama, Teruki Sugiyama, Hiroshi Masuhara, "Bubble Generation and Molecular Crystallization at Solution Surface by Intense Continuous-Wave Laser Irradiation", Applied Physics Express, 査読有, Vol.11, 2018, pp.85502, DOI:10.7567/APEX.11.085502
2. Chi-Shiun Wu, Pei-Yun Hsieh, Ken-ichi Yuyama, Hiroshi Masuhara, Teruki Sugiyama, "Pseudopolymorph Control of L-Phenylalanine Achieved by Laser Trapping", Crystal Growth & Design, 査読有, Vol.18, 2018, pp.5417-5425, DOI:10.1021/acs.cgd.8b00796
3. Ken-ichi Yuyama, Md Jahidul Islam, Kiyonori Takahashi, Takayoshi Nakamura, Vasudevanpillai Biju, "Crystallization of Methylammonium Lead Halide Perovskites by Optical Trapping", Angewandte Chemie International Edition, 査読有, Vol.57, 2018, pp.13424-13428, DOI:10.1002/anie.201806079
4. Ken-ichi Yuyama, Ding-Shiang Chiu, Yen-En Liu, Teruki Sugiyama, Hiroshi Masuhara, "Crystal Growth and Dissolution Dynamics of L-Phenylalanine Controlled by Solution Surface Laser Trapping", Crystal Growth & Design, 査読有, Vol.18, 2018, pp.7079-7087, DOI:10.1021/acs.cgd.8b01233
5. Ken-ichi Yuyama, Kai-Di Chang, Jing-Ru Tu, Hiroshi Masuhara, Teruki Sugiyama, "Rapid Localized Crystallization of Lysozyme by Laser Trapping", Physical Chemistry Chemical Physics, 査読有, Vol.20, 2018, pp.6034-6039, DOI:10.1039/C7CP06990A
6. Tsung-Han Liu, Ken-ichi Yuyama, Takato Hiramatsu, Naoki Yamamoto, Eri Chatani, Hiroshi Miyasaka, Teruki Sugiyama, Hiroshi Masuhara, "Femtosecond-Laser-Enhanced Amyloid Fibril Formation of Insulin", Langmuir, 査読有, Vol.33, 2017, pp.8311-8318, DOI: 10.1021/acs.langmuir.7b01822

[学会発表](計 13 件)

1. 柚山健一, イスラムジャヒダール, ビジュヴァスデヴァンピライ, "光トラッピングによる混合ハロゲン化物ペロブスカイトの結晶化", 日本化学会第 99 春季年会, 2019
2. 柚山健一, イスラムジャヒダール, ビジュヴァスデヴァンピライ, "界面での光捕捉によるハロゲン化鉛ペロブスカイトの合成と改変", 第 66 回応用物理学会春季学術講演会, 2019
3. Ken-ichi Yuyama, Md Jahidul Islam, Vasudevanpillai Biju, "Crystallization of Methylammonium Lead Halide Perovskites Controlled by Laser Trapping at Solution Surface", 10th Asian Photochemistry Conference, 2018
4. Ken-ichi Yuyama, Md Jahidul Islam, Vasudevanpillai Biju, "Laser Trapping of Hen Egg-White Lysozyme under Acidic Conditions", The 19th RIES-Hokudai International Symposium, 2018

5. 杉山輝樹、柚山健一，“光圧によるアミノ酸、タンパク質の結晶成長制御”，第47回結晶成長国内会議，2018
6. Ken-ichi Yuyama, Md Jahidul Islam, Vasudevanpillai Biju, “Crystallization of Methylammonium Lead Halide Perovskites Spatiotemporally Controlled by Optical Trapping”, 18th International Symposium on Advanced Organic Photonics (ISAOP-18), 2018
7. 柚山健一，イスラムジャヒダル，ビジュヴァスデヴァンピライ，“酸性条件下でのニトリ卵白リゾチームの光捕捉挙動”，2018年光化学討論会，2018
8. 柚山健一，ビジュヴァスデヴァンピライ，“気液界面への連続発振レーザー集光照射による有機無機ハイブリッドペロブスカイト化合物の結晶化”，日本化学会第98春季年会，2018
9. 柚山健一，ビジュヴァスデヴァンピライ，“集光レーザーの光圧を用いたペロブスカイト前駆体溶液表面での光捕捉”，「光圧によるナノ物質操作と秩序の創生」第2回公開シンポジウム，2018
10. Ken-ichi Yuyama, Vasudevanpillai Biju, “Crystallization of $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{PbBr}_3$ by Optical Trapping at Solution Surface”, The 18th RIES-Hokudai International Symposium, 2017
11. 柚山健一，ビジュヴァスデヴァンピライ，“界面での半導体ナノ材料の光トラッピング”，2017年光化学討論会，2017
12. 柚山健一，ビジュヴァスデヴァンピライ，“集光レーザーの放射圧を用いたタンパク質の光捕捉とアミロイド集合体形成”，第5回アライアンス若手研究交流会，2017
13. 柚山健一，“集光レーザーの放射圧を用いた分子・ナノ粒子集合体の時空間形成”，第33回ライラックセミナー・第23回若手研究者交流会，2017

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://bijulab.main.jp/en/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

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。