

平成 21 年 12 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2006～2008

課題番号：18207010

研究課題名（和文） 全反射型蛍光相関分光測定による生体膜結合性分子複合体の研究

研究課題名（英文） Study of membrane binding protein complex using total internal reflection fluorescence correlation spectroscopy

研究代表者

金城 政孝（KINJO MASATAKA）

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・教授

研究者番号：70177971

研究成果の概要（和文）：

我々は新規に構築した多点全反射型蛍光相関分光装置を用いて細胞膜表面におけるタンパク質分子の拡散速度の多点測定を行った。装置は7本の光ファイバーを利用して全反射面におけるエバネッセント面からの7点の蛍光シグナルを受け、蛍光相関測定が可能である。蛍光強度の揺らぎは光電子増倍管で検出を行い、新規にこの研究で構築した相関器で解析した。実際の細胞測定においては膜結合性の蛍光タンパク質（GFP-F）を発現させ、その拡散速度を7点同時に測定を行った。7点各々の拡散速度はほぼ同じであったが、分子数が各点で異なり、細胞膜表面におけるコンパートメントの存在が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We studied simultaneous determination of diffusion coefficients at different points of a cell membrane using a multipoint fluorescence correlation spectroscopy (FCS) system. A system carrying seven detection areas in the evanescent field is achieved by using seven optical fibers on the image plane in the detection port of an objective-type total internal reflection-FCS (TIR-FCS) system. Fluctuation of fluorescence intensity was monitored and evaluated using seven photomultiplier tubes (PMTs) and a newly constructed multichannel correlator. We demonstrated simultaneous-multipoint FCS, with a 3- $\mu$ s time resolution, to investigate the heterogeneous structures such as cell membranes and membrane-binding molecular dynamics near glass surfaces in live cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	15,800,000	4,740,000	20,540,000
2007年度	11,600,000	3,480,000	15,080,000
2008年度	9,100,000	2,730,000	11,830,000
年度			
年度			
総計	36,500,000	10,950,000	47,450,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：バイオイメージング、分子集合体

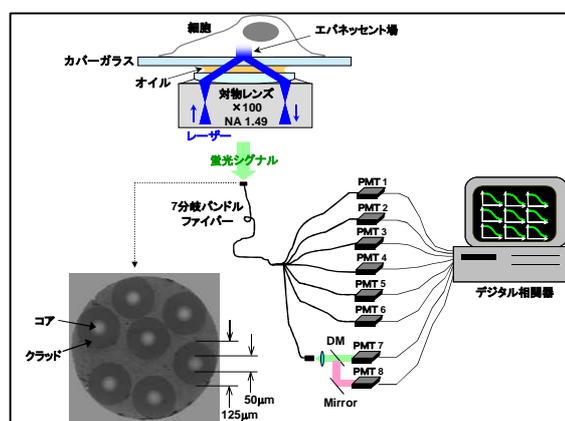
1. 研究開始当初の背景  
 プロテオミクスやゲノムプロジェクトの進展により、細胞内の生体分子が網羅的に理解されるようになってきた。実際、細胞の中ではこれら多くの分子がダイナミックに動き回り、離合集散しながら、細胞機能を担っている。これまで生化学的解析から常時結合していると思われていた分子同士でさえ、生体内ではダイナミックに離合集散を繰り返していると考えられるようになってきていた。また一方では1種類もしくは数種類の蛋白質が集合して様々な大きさの複合体や凝集体を形成し、それが細胞や生体の機能に関係していることが分かってきた。例えば生殖細胞内における蛋白質の凝集体である生殖顆粒が生殖細胞の持つ全能性や不死性と結びつく可能性や、アミロイドβ蛋白質やプリオン蛋白質の異常蓄積が神経や脳の疾患と結びつくなどが示されている。また、生体膜上でもドメイン形成や、ラフトなどのリン脂質やリン脂質-蛋白質複合体が細胞機能に直接関与していることが分かってきた。しかしこれらの研究の多くは試験管内の実験に基づいた結論であり、実際の生体でそのような凝集体や複合体がいつどのように形成されるかに関しては明らかにされていない。

2. 研究の目的  
 生きた細胞内でタンパク質の凝集体や複合体の形成をいち早く検出するためには、元となる分子の挙動までを細胞内で高感度で検出するシステムの構築が急務である。この目的のために、本申請グループは、生体膜結性分子複合体の挙動を生きている細胞の生体膜上で動的に捉えることを試みた。また生体膜でも測定場所での違いが大きく反映されるために、正しい評価を行うためには多数の点で FCS 測定を行い、画像情報として分子の「動き」や「結合」の情報を得る必要がある。これらの研究を行うために、全反射光学系を採用し、細胞膜上の多数の場所で同時に FCS 測定を行うことができる測定システムの開発を目指した。全反射型 FCS 測定装置は既に我々の研究室で研究開発を行い、細胞膜表面におけるタンパク質の拡散測定に有効であることが分かっていた。そこでこの装置を基本として、発展させることを目指した。

3. 研究の方法  
 (1) 多点全反射蛍光相関装置の開発  
 これまで我々は全反射型蛍光相関分光装置 (Total Internal Reflection Fluorescence Correlation Spectroscopy, TIR-FCS) の試作と生体膜結合性蛋白質の動態の研究を行ってきた。そこで生体膜上の多点での分子間相互作用を検出可能とするために既設の装

置に検出器 (アバランシェフォトダイオード, APD) を増設し (4 台)、測定箇所を複数化を行うために、検出部分にバンドル化した光ファイバーの設置と検出器の設定を行う予定であった。しかし、測定装置の安定性と構築の面から1点を6個の円で囲む構造が安定であるとの判断から測定点を一挙に7点へ拡大することをを行った(図1)。このようにシンプルな構造であるが、光ファイバーを用いて多点 (Multi-point) 全反射 FCS 計測により生体膜上での膜結合性分子の検出が可能となると予測した。また多点からの信号を同時に計測できる小型マルチチャンネルカウンタ装置を利用することで蛍光相関測定の同時解析を実現する。

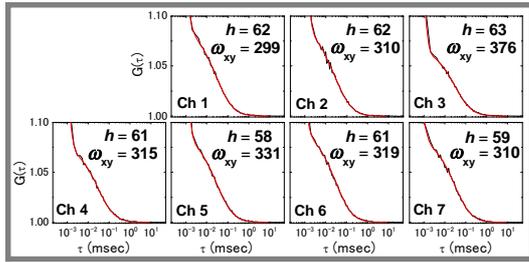
4. 研究成果  
 (1) 装置作成



(図1) 装置の概観

実際の装置の構成は、対物レンズ型全反射蛍光顕微鏡を基本として、検出器として7本のマルチモードファイバーから成るバンドルファイバー、7つの光電子増倍管、および複数の自己相関関数の同時計算が可能なマルチチャンネル相関器を用いることで多点型 TIR-FCS のシステムを構築した。検出器は APD から PMT へ変更を行った。予算的に4台の検出器の購入予定が7台になったための処置であり、感度的には半分程度になるが、十分な検出感度が予想されたためである。この装置を用いて、水溶液中の蛍光色素 (FITC) の拡散運動を7点同時で測定し7つの自己相関関数を得る事ができた(図2)。測定結果は各蛍光相関関数の値はほぼ等しく、またフィッティング式から得られた観測領域の大きさも (容量) ほぼ等しく約 0.2 フェムトリットルであった。すなわち、測定領域は均等であり、濃度や拡散速度の測定に補正などが必要ないことを示した。また時間分解能は3マイクロ秒であった。これは蛍光色

素が水溶液中で拡散する時間より短く、ほとんどすべてのタンパク質に対して十分な時間分解能があることを示した。

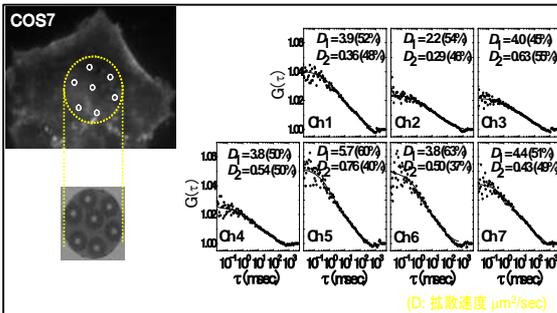


(図2) 100nM FITC 溶液の蛍光相関測定

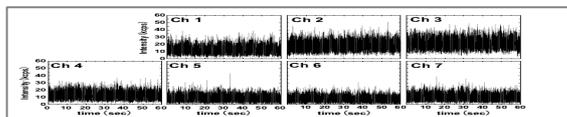
## (2) 膜結合性タンパク質の拡散測定

次に膜結合性タンパク質のモデル系として生体膜局在配列を有するファルネシル化EGFP (farnesylated EGFP、以下 EGFP-F) を発現する細胞を用いて、生きた細胞の細胞膜近傍での分子動態を観察した。膜結合性 GFP の単量体タイプ EGFP-F (A206K) を発現する COS7 細胞の細胞膜近傍の 7 つの測定点で同時に得られた自己相関関数はいずれも 2 成分モデルでフィットでき、得られた拡散定数はこれまでの結果と良い一致を示した。構築した MP-TIR-FCS 装置を用いて多点同時測定が可能であることを証明した。

7 点測定した拡散時間を比較するとほぼ同じ



値を得た。一方で 7 点において蛍光相関関数の強度 (Amplitude) の大きさが異なり、蛍光分子数が異なることが分かった。分子数が



異なることは蛍光強度の揺らぎからも確認することができた(図4)。これらの結果は生体膜上が均一な分布をしているのではなく、ラフトや微小区間に分かれていると言うモデルを支持する結果と考えている。

(図3) 右 細胞膜表面における GFP-F の蛍光相関曲線。左 COS7 細胞と測定点を示す

(図4) 7 点 FCS 測定時の蛍光強度の時間変化

以上の結果から、構築した装置を用いて生細胞を対象とした多点同時測定が可能であることがわかった。現在、MP-TIR-FCS を用いて膜結合性タンパク質である、ナトリウムポンプタンパク質などの機能解析を行っている。

## 5. 最後に

我々は全反射光学系を用いて、7 点同時蛍光相関測定が可能であり、生体分子に応用可能であることを実証した。

しかし全反射光学系を利用している以上、測定はガラス界面すなわち、多くの場合、細胞膜上に限られてしまう。細胞は核を始め細胞質内に多くの機能を有している。現在、細胞機能を普遍的且つ 1 分子レベルで解析するために細胞全体を対象として 3 次元多点同時測定 FCS の構築が必須だと考え、新規のシステムを構築することを計画し着手・研究を進めている。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 35 件)

- ① Ohsugi Y, Kinjo M. 'Multipoint fluorescence correlation spectroscopy with total internal reflection fluorescence microscope.' J Biomed Opt. 2009 Jan-Feb; 14(1):014030. (査読有)
- ② Muto H, Kinjo M, Yamamoto KT. 'Fluorescence cross-correlation spectroscopy of plant proteins.' Methods Mol Biol. 2009; 479:203-15. (査読有)
- ③ Shimi T, Pflughaar K, Kojima S, Pack CG, Solovei I, Goldman AE, Adam SA, Shumaker DK, Kinjo M, Cremer T, Goldman RD. 'The A- and B-type nuclear lamin networks: microdomains involved in chromatin organization and transcription.' Genes Dev. 2008 Dec 15;22(24):3409-21. (査読有)
- ④ Takahashi Y, Nishimura J, Suzuki A, Ishibashi K, Kinjo M, Miyawaki A. 'Cross-talk-free fluorescence cross-correlation spectroscopy by the switching method.' Cell Struct Funct. 2008; 33(1):143-50. (査読有)
- ⑤ Noda Y, Horikawa S, Kanda E, Yamashita M, Meng H, Eto K, Li Y, Kuwahara M, Hirai K, Pack C, Kinjo M, Okabe S, Sasaki S. 'Reciprocal interaction with G-actin and tropomyosin is essential for aquaporin-2 trafficking.' J Cell Biol. 2008 Aug 11;182(3):587-601. (査読有)
- ⑥ Park H, Pack C, Kinjo M, Kaang BK. 'In vivo quantitative analysis of PKA subunit interaction and cAMP level by dual

color fluorescence cross correlation spectroscopy.' Mol Cells. 2008 Jul 31; 26(1): 87-92. Epub 2008 Jun 11.

⑦ Nakabayashi T, Nagao I, Kinjo M, Aoki Y, Tanaka M, Ohta N. 'Stress-induced environmental changes in a single cell as revealed by fluorescence lifetime imaging.' Photochem Photobiol Sci. 2008 Jun; 7(6):671-4. Epub 2008 Apr 30.

⑧ Fujii F, Kinjo M. 'Detection of antigen protein by using fluorescence cross-correlation spectroscopy and quantum-dot-labeled antibodies.' Chembiochem. 2007 Dec 17;8(18):2199-203. (査読有)

⑨ Nomura Y, Nakamura T, Feng Z, Kinjo M. 'Direct quantification of gene expression using fluorescence correlation spectroscopy.' Curr Pharm Biotechnol. 2007 Oct;8(5):286-90. (査読有)

⑩ Jin T, Fujii F, Yamada E, Nodasaka Y, Kinjo M. 'Preparation and characterization of thiacalix[4]arene coated water-soluble CdSe/ZnS quantum dots as a fluorescent probe for Cu<sup>2+</sup> ions.' Comb Chem High Throughput Screen. 2007 Jul;10(6):473-9. (査読有)

「他 25 件」

〔学会発表〕(計 26 件)

国際

① Kinjo M, "Study of Membrane-Binding Protein Dynamics with Fluorescence Correlation Spectroscopy", The Annual Meeting of the Spectroscopical Society of Japan, Sendai JAPAN, 2008.11.20 (invited)

② Kinjo M, "Dynamic Aspects of Protein in Living Cell Investigated by Total Internal Reflection Fluorescence Correlation Spectroscopy", International Congress on Cell Biology, Seoul KOREA, 2008.10.9 (invited)

「他 9 件」

国内

① 金城 政孝, 「多点全反射蛍光相関装置による細胞測定」, 第 5 回バイオオプティクス研究会, 浜松, 2008.12.19 (招待講演)

② 金城 政孝, 「FCS と FCCS」, 第 4 回ライブセルイメージング講習会, つくば, 2008.10.7 (招待講演)

③ 金城 政孝, 「蛍光相関分光法を用いた生命システムの解析」, 日本物理学会 2008 年秋季大会, 盛岡, 2008.9.22 (招待講演)

「他 12 件」

〔図書〕(計 5 件)

① 金城 政孝 (2007) 「生細胞蛍光イメージング」, 共立出版

② 金城 政孝 西村 吾朗 (2006) 「4 章蛍光相関分光法」(蛍光分光とイメージングの手法, 御橋廣真編) 学会出版センター 133-160.

「他 3 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://www.lfsci.hokudai.ac.jp/labs/infmcd/index.html>

新聞記事

BTJ(Biotech Japan)ジャーナル 08 年 4 月号  
<http://biotech.nikkeibp.co.jp/btjjn/#btjj0804>

報道関係

NHK サイエンス・ゼロに出演 (金城, 北村, 三國) 2009 年 2 月 14 日 (土曜日)  
タンパク質凝集を生細胞で測定するための意義と, 病気の解明につながることを解説した。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金城 政孝 (KINJO MASATAKA)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・教授

研究者番号: 70177971

(2) 研究分担者 (2006~2007)

連携研究者 (2008)

神 隆 (JIN TAKASHI)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任教授

研究者番号: 80206367

藤井 文彦 (FUJII FUMIHIKO)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教

研究者番号: 40374657