

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：12401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H02669

研究課題名(和文) アミロイド形成を促す脂質 蛋白質間相互作用の分子機構解明

研究課題名(英文) Elucidation of lipid-protein interaction which enhances the amyloid formation

研究代表者

乙須 拓洋 (Otosu, Takuhiro)

埼玉大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：90564948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではアミロイドベータをはじめとするアミロイド形成蛋白質のアミロイド形成が脂質二重層膜との相互作用によっていかに促進するかを定量的に解析するため、新たな分光手法の開発と応用を目的としている。本研究期間において、我々は2つの新規分光手法の開発を行った。1つは蛍光寿命の異なる複数の分子種の同時拡散計測を可能にする光退色後蛍光寿命回復法(FLRAP)であり、もう一つはパルス交差励起蛍光分光法に基づいて、膜吸着分子が膜結合した際の脂質膜中脂質の動態変化を解析する手法である。これら2つの手法の開発に成功し、生体分子の物性研究への応用を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究期間で開発を行った2つの手法はアミロイド研究において重要とされる蛋白質-脂質間相互作用を定量的に解析する手法を提供するのみならず、膜融合過程など様々な生命現象の定量的解析において有用なツールになると期待される。その点において、本研究機関における成果は十分な学術的意義を有するものであると考える。

研究成果の概要(英文)：In this project, we sought to develop new spectroscopic tools to quantitatively elucidate the amyloid formation enhanced by the presence of lipid bilayer. We then develop two fluorescence-based techniques during this project. One is called Fluorescence Lifetime Recovery After Photobleaching (FLRAP) which enables us to simultaneously analyze the molecular diffusion of multiple species having their intrinsic lifetime. Another one is the technique that analyzes the dynamical change of lipids during the period when the peripheral molecules attach on the lipid bilayer.

研究分野：生物物理

キーワード：蛍光相関分光法 光退色後蛍光回復法 脂質二重層膜

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

蛋白質は生理学的条件下において適切な高次構造, ならびに複合体形成をすることで, DNA複製やATP合成といった生物にとって必要不可欠な機能を発現している. その一方で, 蛋白質同士の強い相互作用は, 時にアミロイドと呼ばれる凝集体形成を引き起こし, それによりアルツハイマー病やパーキンソン病といった重篤な疾病がもたらされることが報告されている. この様な背景から, 蛋白質のアミロイド形成機構, ならびにアミロイドによる疾病発症機構の解明に向けた研究が現在まで精力的に行われている. これらの過去の膨大な研究により, 脂質二重層膜との相互作用による蛋白質のアミロイド形成促進が明らかになってきている. しかし, 脂質二重層膜の組成とアミロイド形成促進の関係性に関する定性的な理解が進んでいる一方で, その分子機構についてはいまだわかっていない. この“どのような脂質-蛋白質間相互作用によりアミロイド形成が促進するのか?”という問いについては適切な実験手法の欠如からいまだ未知の部分が多く, 長年の課題となっている.

### 2. 研究の目的

本研究では, アミロイド形成蛋白質をはじめとする種々の分子が脂質二重層膜と相互作用する際に誘起される脂質の物性変化, またそのような脂質物性変化が膜結合分子の物性変化にどのような影響を及ぼすかについて, 定量的な解析を可能とする新規分光計測法の開発と応用を目的とした.

### 3. 研究の方法

本研究期間で開発を行った計測手法は2つである. 1つは分子拡散計測として広く用いられている光退色後蛍光回復法 (FRAP) に蛍光寿命の情報を与えた手法である光退色後蛍光寿命回復法 (FLRAP), もう1つは分子間相互作用の定量的解析に用いられているパルス交替励起蛍光法 (PIE) を応用し, 膜結合分子が膜吸着時に生じる脂質分子のダイナミクス解析のための顕微分光法である. これらについて, 以下でその方法論, 装置について記述する.

#### (1) 光退色後蛍光寿命回復法 (FLRAP)

光退色後蛍光回復法 (FRAP) はモデル細胞膜ならびに生細胞中の分子拡散を計測する手法として長らく用いられており, 細胞生物学の分野では確立した計測手法となっている. 計測では蛍光プローブを含むサンプルの一部に強いレーザー光を短時間照射し, 照射領域の蛍光分子を退色させる. 分子が並進拡散可能な場合, 退色領域からの退色分子の流出, ならびに退色領域外からの蛍光分子の流入により退色領域の蛍光回復が観測される. この回復速度から分子拡散の情報を得る手法が FRAP である. この手法は単一分子種の拡散を簡便に定量解析可能な点で優れている一方, 複数の分子種を含む場合得られる蛍光回復曲線は全分子種の平均的な描像のみを与えるため, このような系での計測, 解析は困難となる. この点に対して, FLRAP では蛍光強度の回復のみならず, 蛍光寿命の回復を解析することで個々の分子種の拡散係数を定量的に解析可能とする.

コンセプトは以下のとおりである. サンプル内に蛍光寿命の異なる2つの分子種が存在すると仮定する. この時, サンプルから得られる蛍光減衰カーブは各分子種固有の蛍光寿命からあらわされる蛍光減衰カーブの線形結合であらわすことができる. もし両分子種の拡散係数が同一であれば, 光退色後退色領域から得られる蛍光減衰カーブは退色前と同一の減衰特性を有しているが, 両拡散係数が異なる場合, 退色直後においては拡散係数の大きな分

子が優先的に退色領域に流入してくることから、得られる蛍光減衰カーブには拡散係数の大きな分子種由来の蛍光減衰カーブが大きく寄与し、アンサンブルの蛍光減衰カーブは退色前とは異なる減衰特性を示す。この蛍光減衰カーブの退色後から変化を検出、解析することで分子種固有の拡散係数を分子種特異的に調べることが可能となる。

図1には今回構築したFLRAP装置の概略図を示す。本装置では励起光源として2つのレーザーを用い、1つは光退色用、もう一つは蛍光回復モニター用として使用した。本解析では蛍光減衰カーブの計測を行うことから、蛍光回復モニター用のレーザーにはピコ秒半導体レーザーを用いた。両レーザーはビームスプリッターを用いて同一光路としたのち、対物レンズに同軸入射した。なお、光退色用のレーザーの光路には集光レンズを導入し、対物レンズの後方で一度焦点を結んだ後対物レンズに入射することで、サンプル上の約20  $\mu\text{m}$ の領域を退色するように設計した。一方で蛍光回復モニター用のレーザーは平行光として対物レンズに入射することで、退色領域中央の約1  $\mu\text{m}$ の領域からの蛍光回復信号を検出可能な設計にした。このモニター用レーザーが形成する焦点領域からの蛍光信号は各種カラーフィルターを通したのち、単一光子検出器で検出した。これにより目的とする蛍光強度、ならびに蛍光寿命の回復同時計測が可能となった。

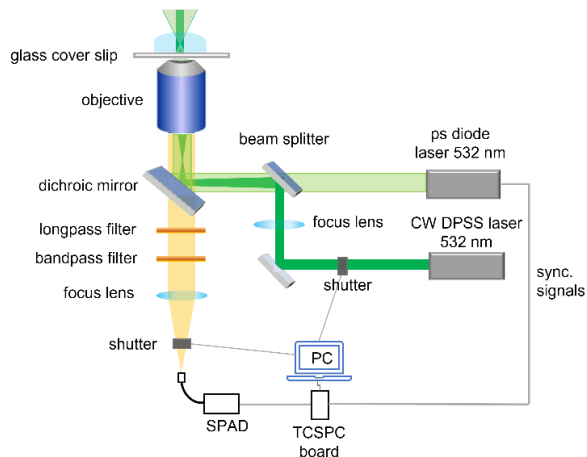


図1：構築したFLRAP装置の概略図

## (2) パルス交替励起(PIE)蛍光分光法に基づく膜結合分子結合時の脂質分子の拡散計測

PIEでは異なる2つの波長のパルス光を用い、それらを交互にサンプルに入射し、それぞれのパルス光で励起された分子由来の蛍光を定量的に解析する手法である。本研究ではこのPIE装置を応用することで、一方のパルス光（パルス1）で膜結合分子をモニター、もう一方のパルス光（パルス2）で脂質分子の動態をモニターする。これにより、焦点領域に膜結合分子が入ってきた際にパルス1由来の蛍光信号が強く検出されるため、この時のパルス2由来の信号のみを取り出すことで、膜結合分子と相互作用している領域の脂質分子の信号を選択的に抽出、解析することが可能となる。

構築した装置の概略図を図2に示す。

光源には白色パルスレーザーを使用し、目的の2波長をバンドパスフィルターで切り出し、使用した。波長の異なる2つのパルス光のうち、片方はシングルモードファイバー内を通すことで光学遅延を与えた。これにより、白色パルスレーザーの発振間隔の半分の時間で異なる波長のパルス光が交互にサンプルに入射する機構を整えた。これらのパルス光は同軸光路としたのち対物レンズに入射した。両パ

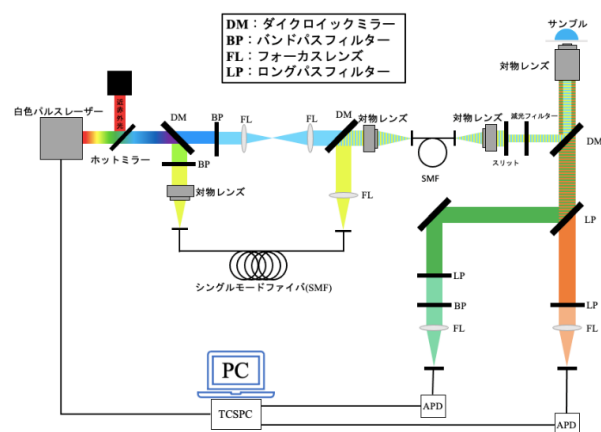


図2：構築したPIE装置の概略図

ルス光により励起された分子由来の蛍光信号は波長ごとに異なる単一光子検出器で検出したのち、単一光子係数 (TCSPC) ボードで解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) FLRAP による複数分子種の同時拡散計測開発を行った計測法の理論検証実験のため、本計測法を DNA と脂質の同時拡散計測に適用した。サンプルについて、カバーガラス上に脂質二重層膜を作成し、その後上部のバルク溶液相に DNA を添加した。それぞれ脂質二重層膜には蛍光脂質、DNA には末端に蛍光色素を付与した。これらの蛍光プローブの蛍光寿命は大きく違うため、各成分の蛍光減衰カーブは容易に識別可能である。また、溶液中 DNA の拡散は脂質二重層膜中の脂質よりも十分遅いことから、本手法の検証が可能となる。

図 3 には、光退色前、光退色直後、ならびに退色後十分な時間が経過したのちに得られたアンサンブル蛍光減衰カーブを示している。図より退色直後の蛍光減衰カーブがその他の蛍光減衰カーブよりも早く減衰していることがわかる。これは、蛍光寿命の短い種、つまり図にあるように DNA が脂質よりも早く退色領域において蛍光回復を起こしていることを意味する結果である。この点について定量的に調べるため、各時間における蛍光減衰カーブを DNA、脂質の蛍光減衰カーブでフィッティングし、各分子種の寄与から蛍光強度を見積もり退色後の時間に対してプロットした。比較として、各分子種のみで計測した結果を合わせて示しているが、図 4 より FLRAP により各分子種の蛍光回復曲線がきちんと抽出できていることが確認された。このことは本装置での複数分子種の同時拡散計測が問題なく行えることを示すものとなった。

次に本手法を脂質二重層膜を形成する 2 つの単層膜中脂質の拡散計測に適用した。脂質二重層膜は脂質単層膜が疎水基を向かい合わせにして形成しているが、各単層膜中の脂質物性を個々に抽出するのは困難である。本研究に先駆けて、我々は蛍光寿命の相関解析により単層膜選択的な拡散計測を達成している。ここでは FLRAP により単層膜選択的な拡散計測をおこない、蛍光寿命相関解析の結果との比較より本手法の有用性をさらに検証した。サンプルには先ほど同様ガラス基板上に形成した脂質二重層膜を使用した。蛍光脂質を含む脂質二重層膜を作成後、上部のバルク溶液相に蛍光消光剤としてヨウ化カリウムを添加した。ヨウ化物イオンは蛍光消光剤として古くから用いられているが、電解質は脂質膜不透過なため、バルク溶液側に親水基を向けている単層膜中蛍光脂質のみが消光作用を受ける。これにより、各単層膜中脂質の拡散を蛍光寿命の違いにより解析可能となる。図 5 に結果を示

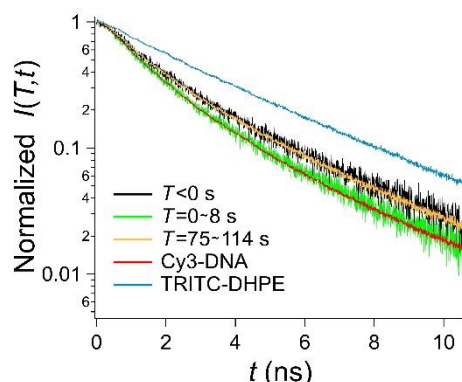


図 3：光退色前，ならびに退色後の蛍光減衰カーブ。  $T = 0$  s は退色光照射時間を表す。

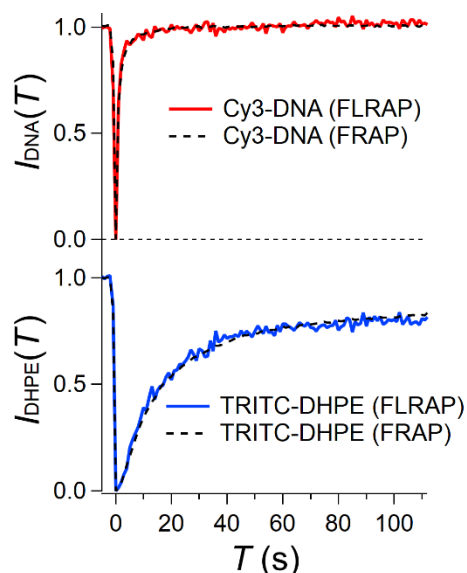


図 4：FLRAP 解析で得た各分子種の蛍光回復曲線。破線は通常の FRAP 計測で得た個々の分子の回復曲線を表す。

す。図より、ガラス側単層膜中脂質の拡散がバルク溶液側と比較して著しく遅いことがわかる。過去の我々の研究においても同様の結果が得られていることから、FLRAP においても

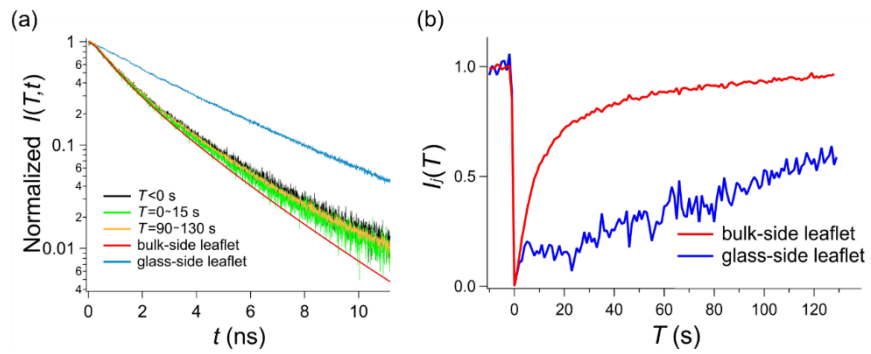


図 5 : (a) 光退色前, ならびに退色後の蛍光減衰カーブ. (b) 各単層膜中脂質の蛍光回復曲線.

単層膜選択的な拡散計測が可能であることを示すことができた。

## (2) PIE による膜間相互作用時のモデル細胞膜中脂質のダイナミクス解析

構築した PIE 装置を用いて膜間相互作用の定量的な解析を行うため、モデル細胞膜としてガラス基板に形成した脂質二重層膜である支持脂質二重層膜(SLB), モデル小胞として球状脂質二重層膜であるリポソームを用いた。それぞれの脂質二重層膜には波長の異なる蛍光脂質を少量含め、PIE 装置で使用している波長の異なる各パルス光で個別に励起、検出ができるようにした。また、SLB, リポソームには少量のビオチン化脂質を含め、ストレプトアビジンを介してモデル膜間を結合した。我々の先行研究より、このモデル系において SLB 吸着リポソームの SLB 上での拡散は極めて遅く、定点観察ではリポソームが焦点領域内を通過する様子を観測できなかったため、測定ではサンプルステージを 5 秒ごとに移動させることでリポソーム結合領域を探索した。

図 6 には得られたデータの一部を示す。図より、35 秒前後の計測時間において、リポソーム由来の蛍光信号が強く検出されていることがわかる。このことは、この時間においてリポソームが SLB に吸着した領域に焦点があたっていることを意味している。そこで、このようにリポソーム由来の信号が強く検出された時間領域における

SLB 由来の信号のみを取り出し、蛍光相関分光法による SLB 脂質の拡散解析を行った。

図 7 にはリポソーム結合時の SLB 由来蛍光データのみから解析した自己相関関数を示している。比較としてリポソーム非結合時の結果も併せて示しているが、この結果よりリポソーム結合の有無にかかわらず、SLB 中脂質の拡散に違いはなかった。今後は S/N 比の改善を行うとともに、測定条件 (リポソームサイズ, ビオチン濃度等) を検討することで脂質拡散に違いが出るかを調べていく予定にしている。

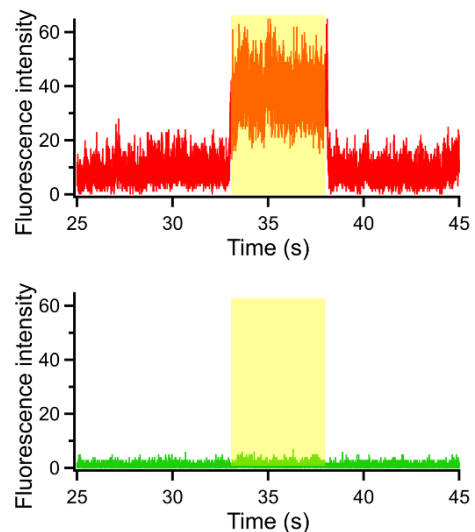


図 6 : PIE による測定結果

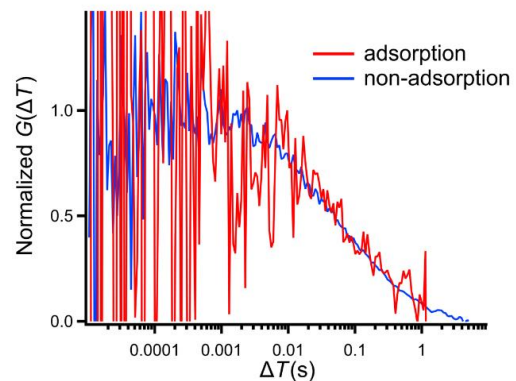


図 7 : リポソーム結合時 (赤) ならびに非結合時 (青) における SLB 中脂質の自己相関カーブ. 自己相関カーブの減衰時間が分子の拡散速度を反映する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takuhiro Otsu and Shoichi Yamaguchi	4. 巻 49
2. 論文標題 Leaflet-specific Lipid Diffusion Revealed by Fluorescence Lifetime Correlation Analyses	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 1473-1480
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.200539	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 Takuhiro Otsu and Shoichi Yamaguchi	4. 巻 151
2. 論文標題 Reduction of Glass-surface Charge Density Slows the Lipid Diffusion in the Proximal Leaflet of a Supported Lipid Bilayer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 25102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/1.5103221.	査読の有無 有
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 Takuhiro Otsu and Shoichi Yamaguchi	4. 巻 22
2. 論文標題 Effect of Electrostatic Interaction on the Leaflet-specific Lipid Diffusion in a Supported Lipid Bilayer Revealed by Fluorescence Lifetime Correlation Analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Physical Chemistry Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 1242-1249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C9CP05833H	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 塚原克浩, 山口祥一, 乙須拓洋
2. 発表標題 蛍光分光法によるタンパク質 脂質間相互作用の研究
3. 学会等名 第10回CSJ化学フェスタ2020
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 乙須 拓洋, 山口 祥一
2. 発表標題 カチオン性脂質が支持脂質二重膜中脂質の拡散特性に与える影響
3. 学会等名 第13回分子科学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 乙須 拓洋, 山口 祥一
2. 発表標題 Leaflet-specific Lipid Diffusions in Supported Lipid Bilayers
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森郁海, 坂口美幸, 山口祥一, 乙須拓洋
2. 発表標題 Fluorescence Lifetime Recovery After Photobleaching (FLRAP): Concept and application
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 Ten Miyazaki, Miyuki Sakaguchi, Shoichi Yamaguchi, Takuhiro Otsu
2. 発表標題 Liposome Diffusion on a Glass-supported Lipid Bilayer
3. 学会等名 ACS Spring 2022
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	山口 祥一  (Yamaguchi Shoichi)  (60250239)	埼玉大学・理工学研究科・教授   (12401)	

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
---------	---------