

機関番号：11101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21870004

研究課題名（和文） 蛍光ストレインセンサーおよびイメージングシステムの開発

研究課題名（英文） Development of fluorescent strain sensor and imaging system

研究代表者

岩井 草介 (Iwai Sosuke)

弘前大学・教育学部・講師

研究者番号：40366547

研究成果の概要（和文）：

生細胞内における外力によるタンパク質変形の検出をめざして、GFPを用いた“蛍光ストレインセンサー”の改良と評価を試みた。また、開発したセンサーに適合したイメージングシステムの構築にむけて、スペクトル線形分離法の有効性に関する理論的な検討を行ったところ、最小二乗法を用いた線形分離法における2波長型センサー成分の誤差を見積もることができた。この結果は、2波長型センサーのスペクトルイメージングで得られた結果の妥当性を判断する際に有用な指標となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：

To detect external force-induced conformational changes of proteins in living cells, I improved and evaluated the GFP-based fluorescent strain sensor. Also, toward the establishment of an imaging system suitable for the sensor, I theoretically estimated the maximum errors in the ratio values of ratiometric sensors, obtained by linear spectral unmixing, which is based on the least squares regression method. The estimation would provide an useful criterion to validate the results obtained by spectral imaging of ratiometric sensors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,080,000	324,000	1,404,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,080,000	624,000	2,704,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：機能生物化学

キーワード：GFP、ストレインセンサー、スペクトル線形分離法

1. 研究開始当初の背景

“外力によるタンパク質の変形”は、弾性維持や機械刺激情報の伝達など細胞の力学応答において重要な役割を担っていることが予想されるが、実際に細胞内で起こっているかについてはまだよく分かっていない。このような、生きている細胞内におけるタンパ

ク質の変形を検出するためには、タンパク質性の“蛍光ストレインセンサー”が重要な役割を果たすと考えられる。

2. 研究の目的

生細胞内におけるタンパク質変形の検出をめざして、蛍光ストレインセンサーの改良

と評価を試みた。また、開発したセンサーに適合したイメージングシステムの構築のために、スペクトル線形分離法の有効性に関する理論的な検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 蛍光ストレイセンサーの改良

既に開発した GFP2 量体を用いた蛍光ストレイセンサーについて、感度の異なるストレイセンサーを得るために、遺伝子工学を用いて GFP の 2 量体接触面のアミノ酸を置換した変異型 GFP を作成し、蛍光スペクトル測定などによってその 2 量体形成能を調べた。また、センサーの力学特性を評価するために、センサーの N 末端にヒスチジンタグ、C 末端にビオチン化タグを付加して大腸菌で発現し、細胞内でビオチン化した後、表面およびプローブとの結合を検討した。

(2) スペクトル線形分離法の検討とセンサーイメージングシステムの構築

スペクトル成分の一つが系統誤差を含む場合、最小二乗法による混合スペクトルの線形分離法には最大でどの程度の誤差が生じる可能性があるかを理論的に見積もった。さらに、得られた見積りに基づき、ストレイセンサーのイメージングに適合した画像・スペクトル解析プログラムを作成した。

4. 研究成果

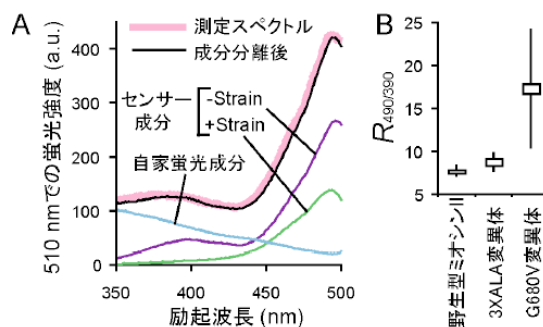
(1) 蛍光ストレイセンサーの改良

GFP2 量体の結晶構造に基づき、2 量体形成に重要と考えられるいくつかのアミノ酸の候補を決定した。遺伝子工学によってこれらのアミノ酸を置換した変異型 GFP を作成して評価を行ったものの、期待通りの蛍光特性を示すものは得られなかった。今後は、天然に存在する 2 量体型の蛍光タンパク質などを参考にアミノ酸置換の候補をさらに広げ、ストレイセンサーの感度改変を試みる。一方、センサーの力学特性評価のために、N 末端にヒスチジンタグ、C 末端にビオチン化タグを付加したセンサーを大腸菌で発現し、細胞内でビオチン化を行った。アビジンビーズの遠心法により一部のタンパク質のビオチン化を確認した。しかしながらヒスチジンタグを介して基板表面に結合させたタンパク質は、アビジンビーズによって捕捉されなかった。今後はビオチンリガーゼ発現大腸菌を用いることにより、ビオチン化効率の改善を図る予定である。

(2) スペクトル線形分離法の有効性検討とセンサーイメージングシステムの構築

スペクトル測定における“誤差スペクトル”そのものの正確な形状を予測するのは困難であるが、誤差のおおよその振れ幅は予想

できるので、“誤差スペクトル”のノルムが分かっているとして、センサー成分の 2 波長レシオ値の考え得る最大の誤差を求めることができた。得られた最大誤差の見積りを蛍光ストレイセンサーに適用することによりことにより、細胞性粘菌細胞内におけるミオシン II とアクチン繊維の結合の割合が、様々な条件で有意に変化することを明らかにした (下図)。



A 蛍光ストレイセンサータンパク質発現粘菌細胞の蛍光励起スペクトルの一例。測定スペクトルを線形分離法によりセンサーの成分 2 種と自家蛍光成分に分離した。B センサー成分の 490/390 nm 励起強度比。値が大きいほどストレイがある状態の比率が高いことを示す。箱は複数回の測定による標準偏差。線は本研究で導出した式によって算出した“考え得る最大の誤差”。野生型ミオシン II と「3XALA 変異体」の間に有意な差が見られないのに対し、「G680V 変異体」との間には有意な差があることが分かる。

最小二乗法を用いた混合スペクトルの線形分離法は生物の蛍光スペクトルイメージングなどにおいてよく用いられており、本研究の成果を応用することによって、例えば、2 波長型の蛍光センサー成分と系統誤差を含む自家蛍光成分を分離するときの 2 波長レシオ値の最大誤差を見積もることが可能になる。近年、蛍光タンパク質などを用いて多様な 2 波長型蛍光センサーが開発されており、またスペクトル顕微鏡についても長足の進歩が見られるため、この両者を用いたイメージングはますますさかんになることが予想される。本研究で得られた成果は、これらのスペクトルイメージングで得られた結果の妥当性を判断する際、有用な指標となることが期待される。

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 5 件)

- ① 岩井草介、スペクトル線形分離法における誤差を考える、バイオイメージング、査読なし、Vol. 19、No.2、2010、1-6
- ② Sosuke Iwai, Taro Q. P. Uyeda, Myosin-actin interaction in Dictyostelium cells revealed by GFP-based strain sensor and validated linear spectral unmixing. Cytometry A, 査読あり、Vol. 77A, No. 8, 2010, 743-750
- ③ 岩井草介、GFPを用いた「ストレインセンサー」でミオシン-アクチン相互作用を可視化する、生物物理、査読なし、Vol. 50, No. 5, 2010, 238-239
- ④ You Hachikubo, Sosuke Iwai, Taro Q. P. Uyeda, Photoregulated Assembly/Disassembly of DNA-templated Protein Arrays Using Modified Oligonucleotide Carrying Azobenzene Side Chains. Biotechnology and Bioengineering, 査読あり、Vol. 106, No. 1, 2010, 1-8
- ⑤ Hiroyuki Okubo, Masanori Iwai, Sosuke Iwai, Shigeru Chaen, Thermal activation energy for bidirectional movement of actin along bipolar tracks of myosin filaments. Biochemical and Biophysical Research Communications, 査読あり、Vol. 396, No. 2, 2010, 539-542

〔学会発表〕（計3件）

- ① Hiroyuki Okubo, Masanori Iwai, Sosuke Iwai, Shigeru Chaen, ミオシンフィラメント双極トラックに沿ったアクチンフィラメント滑り運動の活性化エネルギー、日本生物物理学会、2010年9月20日、東北大学
- ② 岩井草介、スペクトル線形分離法における誤差の検討、日本バイオイメージング学会、2010年9月10日、慶応義塾大学
- ③ 岩井草介、誤差を含む混合蛍光スペクトルに対するスペクトル分離の有効性の検討、日本生物物理学会、2009年11月1日、アスティとくしま

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩井 草介 (IWAI SOSUKE)

弘前大学・教育学部・講師

研究者番号：40366547