



## 光学顕微鏡を用いた分子の回転ダイナミクス解析によってタンパク質の形状と配向を生きている細胞内で推定できることを発見 —神経変性タンパク質研究への応用の道を拓く—

### 研究成果のポイント

- ・新規開発した光学顕微鏡により緑色蛍光タンパク質（EGFP）の回転速度の細胞内での計測に成功。
- ・分子の回転が分子の構造及び配向に関係していることを発見。
- ・生体分子の配向性を検出するための簡便かつ迅速な手法となることが期待できる。
- ・タンパク質凝集体の検出が可能となり、神経変性タンパク質研究への応用展開が期待される。

### 研究成果の概要

北海道大学の金城政孝教授らは、溶液及び細胞内部のタンパク質の回転拡散<sup>[1]</sup>を計測することに成功しました。

従来の蛍光顕微鏡に、カメラの代わりに開発した装置を接続するという簡便な手法を用いることにより、従来方法では得られなかったブラウン運動によるランダムな分子の回転の速さ「回転拡散係数」を測定することができます。回転拡散は分子のサイズ変化を敏感に感知するため、分子の多量体化の検出に有用であると考えられていますが、この手法を用いた研究はほとんど行われていません。今回、検出器を複数使用する手法を用いることで、従来は検出器によるノイズに隠されて測定が難しかった数十ナノ秒程度の時間領域で緩和される回転拡散まで検出することに成功し、緑色蛍光タンパク質（EGFP）<sup>[2]</sup>の詳細な回転拡散の測定に初めて成功しました。また、多量体タンパク質の測定から、この手法を用いた回転拡散計測がタンパク質等分子の構造や配向を細胞内で測定することができることが示唆され、シミュレーションにより裏付けられました。この成果は、今回提案する手法が構造生物学や分子分光学において、簡便かつ生体内での測定ができる技術として非常に有力なものとなりうることを示しています。

本研究成果は、北海道大学大学院先端生命科学研究院細胞機能科学研究室において、大浦 真修士 課程 2 年生、山本条太郎特任助教を中心とした研究チームにより行われたものであり、Scientific Reports 誌に掲載されました。

なお、本研究は、日本学術振興会科学研究費助成事業（学術研究基金助成金）基盤研究 C、若手研究 B、及び国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）医療分野研究成果展開事業先端計測分析技術・機器開発プログラムの助成により行われました。

## 論文発表の概要

研究論文名：Polarization-dependent fluorescence correlation spectroscopy for studying structural properties of proteins in living cell. (生細胞内でタンパク質の構造情報を研究するための蛍光偏光相関分光法)

著者：大浦 真<sup>(1)§</sup>, 山本 条太郎<sup>(2)§</sup>, 石川 英人<sup>(1)</sup>, 三國 新太郎<sup>(2)</sup>, 福島 綾介<sup>(1)</sup>, 金城 政孝<sup>(2)</sup>

1) 北海道大学大学院生命科学院生命融合科学コース, 2) 北海道大学大学院先端生命科学研究院細胞機能科学分野, §) 共同筆頭著者

公表雑誌：Scientific Reports (Nature publishing group)

公表日：英国時間 2016年8月4日(木) (オンライン公開)

## 研究成果の概要

### (背景)

細胞内部における分子の運動は、現在まで、主に蛍光相関分光法<sup>[3]</sup>という分子分光手法を用いて計測されてきましたが、その対象は並進運動(並進拡散)<sup>[4]</sup>に限られており、ナノ秒という非常に速い時間領域で起こる現象である分子の回転運動(回転拡散)は、装置の性能不足や計測可能な試料が少なかったことから、あまり行われてきませんでした。したがって、これまでの回転拡散の研究では核磁気共鳴法、一分子計測法などの大掛かりな装置を必要とし、かつ細胞内での応用が難しい手法を用いたものに限られていました。

しかしながら、回転拡散は分子が徐々に凝集して成長する神経変性疾患<sup>[5]</sup>タンパク質等のタンパク質凝集体の成長過程を明らかにするために、分子の重合数の変化に対してその計測感度が高いことが理論的に立証されています。したがって、新規に測定手法を提案することは重要であると考えました。そこで研究チームは、非常に高速な回転拡散を定量的に測定するために、検出器を2台導入して信号どうしのノイズを消去する手法を用い、タンパク質の回転拡散の定量を細胞内で試みました。

### (研究手法)

共焦点蛍光顕微鏡に偏光<sup>[6]</sup>光学素子を導入して偏光蛍光相関分光法(Pol-FCS)装置を構築し、ノイズ信号を除去するため蛍光検出器として2台のアバランシェ・フォトダイオードを利用しました。高速領域の蛍光のゆらぎを測定するために、高速で信号解析を行うことができるハードウェア関連器を実装し、各試料の測定を行いました。また、タンパク質の多量体形成のモデルとしてEGFPが複数個連なったタンパク質(EGFP多量体)を新しく設計し、それぞれにおいて回転拡散の計測を行いました。

今回は蛍光励起光源として連続発振レーザー(CWレーザー)を用いており、従来のパルス発振レーザーを用いた時間分解蛍光測定に比べ、コストの面でも安価かつ高速に測定できる手法です。

### (研究成果)

精製及び細胞破碎液内、生きている細胞内で蛍光タンパク質EGFPの回転拡散が計測できることを世界で初めて実証し、更にタンパク質多量体化モデルである多量体EGFPの計測に成功しました。EGFPは非常に明瞭に回転拡散をとらえることができ、他の生体分子との融合タンパク質をつくることで生体内での分子回転拡散をとらえられる基礎となります。

また、多量体EGFPの計測では、多量体の量体数が増えるにしたがって回転拡散成分の現れ方が変化する現象が確認されました。研究チームでは、この現象の原因が多量体EGFPに含まれる個々のEGFPの向いている方向の乱雑さに関係すると予想し、その実証のためにモンテカルロ法を用いてコンピューターシミュレーションを行ったところ、実際に分子の配向が乱雑になるとPol-FCSにおける回転拡

散成分の現れ方が変化することが実証されました。

#### (今後への期待)

回転拡散は分子の多量体化に対する感度が従来の計測手法で得られる並進拡散より高いため、その高感度さを利用して、神経変性疾患関連タンパク質の多量体化や外部刺激によるレセプターの多量化を高感度にし、生きている細胞内で計測できることが期待されます。この試みにより、生体分子の *in situ*<sup>[7]</sup>での状態をより正確に議論できるデータが得られると考えられます。また、分子配向と回転拡散の関係が今回初めて明らかになったため、現在まで光が当たってこなかった細胞内でのタンパク質の構造、配向情報が簡便かつ高速に得られることが示唆されました。

本研究チームは既に、大阪大学、情報通信機構との共同研究で超伝導ナノワイヤ単一光子 (SSPD) の開発にも成功しています (プレスリリース, 2015 年 12 月 22 日)。今後、これらを組み合わせることで、さらに簡便・高感度なタンパク質の回転拡散の検出方法を開発していく予定です。

#### お問い合わせ先

所属・職・氏名：北海道大学先端生命科学研究院細胞機能科学分野

教授 金城 政孝 (きんじょう まさたか)

TEL : 011-706-9006 FAX : 011-706-9045 Email : kinjo@sci.hokudai.ac.jp

ホームページ: <http://altair.sci.hokudai.ac.jp/infmcd/index.html>

#### [用語説明]

##### [1] 回転拡散

分子の角度分布が平均化される拡散現象。非常に高速に生じる。

##### [2] 緑色蛍光タンパク質 (EGFP)

オワンクラゲ由来の緑色の蛍光を発するタンパク質。

##### [3] 蛍光相関分光法

微小な観察領域中の蛍光分子のゆらぎから分子の拡散の特徴を解析する手法。

##### [4] 並進拡散

粒子が粒子位置を変化させる拡散。

##### [5] 神経変性疾患

中枢神経の特定の細胞が細胞死を起こす疾患。患者の神経細胞からは、それぞれの病気に特徴的なタンパク質の凝集体がみられる。

##### [6] 偏光

光の電場及び磁場が規則的な方向に振動している光。釣り用の眼鏡などに偏光の技術が用いられている。

##### [7] *in situ*

本来の場所で、という意味。培養細胞での測定ではなく、マウスなど本来タンパク質が存在しているところでの測定が行えると期待される。

[参考図]

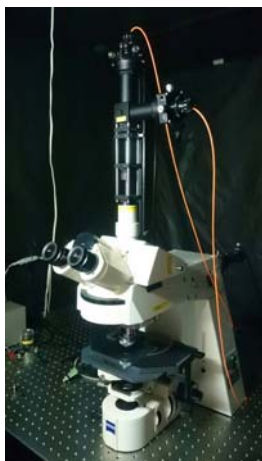


図1 開発した顕微鏡

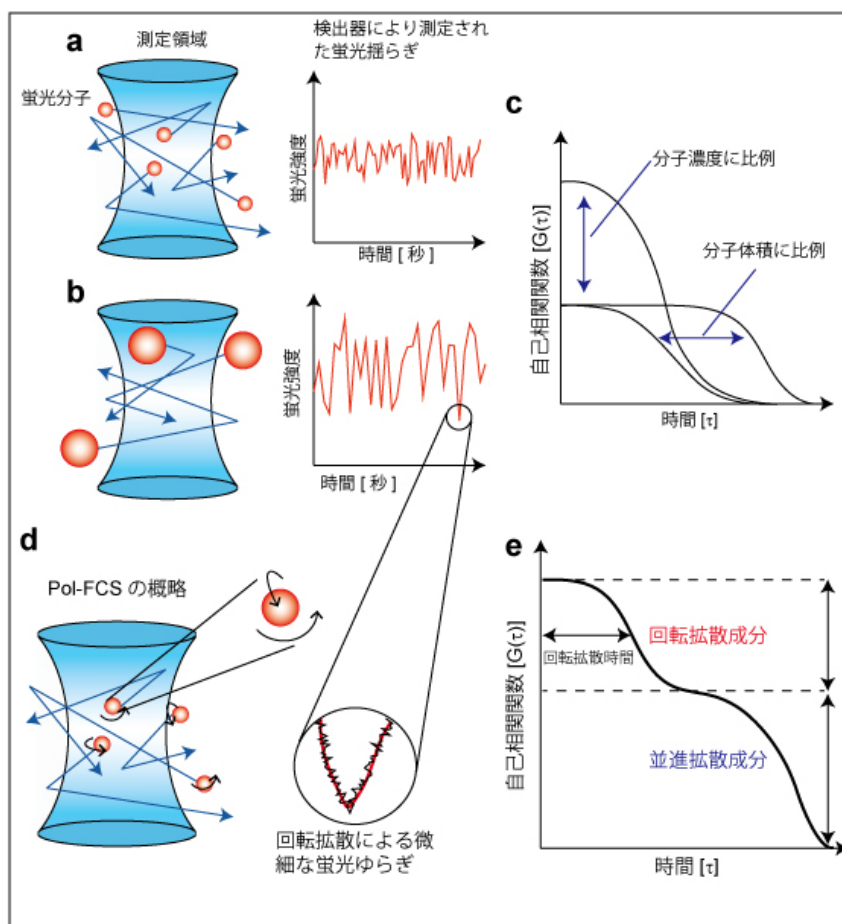


図2 蛍光相関分光法, Pol-FCSの概略

a) 小分子の拡散, b) 大分子の拡散では, 得られる蛍光のゆらぎの大きさが異なり, 蛍光相関分光法ではこのゆらぎの自己相関解析から分子の大きさ, 濃度を求めることができる。c) 蛍光強度の揺らぎから計算・変換された自己相関関数の曲線と, その変化と分子数と分子の大きさの関係。

一方, d) Pol-FCSでは, 分子の回転拡散情報が加わり, e) のように回転拡散の成分が新たに確認できる。この回転拡散成分が, EGFPの量体数に関係していることを発見した。