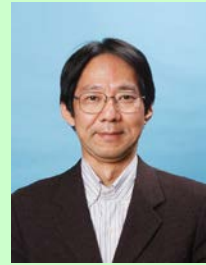


多点時空間相関解析法による細胞内分子複合体研究

Study of molecular interaction of molecular complexes in live cell using multipoint temporal and spatial correlation spectroscopy analysis

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



研究の概要

生細胞を測定対象とした一分子感度を有し多点で同時に蛍光相関分光測定が可能なシステムの構築を行い、生体機能解析に利用する。多点測定に必要な励起光源は空間光変調素子を利用することにより、自由に作成できることが実証された。構築したシステムを用いて細胞においても空間的に自由に多点蛍光相関測定が可能であることが実証された。

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学 ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：一分子科学、一分子生体情報科学、バイオイメージング、

1. 研究開始当初の背景

蛍光相関分光法(fluorescence correlation spectroscopy, FCS)はフェムトリットル(10^{-15} L)程度の極微小な観察領域における分子の動きに由来する蛍光強度のゆらぎから、分子の大きさや形、ならびに分子数を解析し、それに基づいたダイナミックな分子間相互作用を単一分子レベルで解析可能な手法である。しかし、FCS測定を生細胞へ応用する場合の基本的な問題点として、細胞内の特定の1点でしか測定出来ないことが挙げられた。

2. 研究の目的

そこで本研究は、細胞機能を普遍的且つ一分子レベルで解析するために3次元多点同時測定FCSの構築を行い、細胞内の任意の場所における分子複合体の形成・タンパク質相互作用解析が可能なシステムの構築を目指している。

3. 研究の方法

本研究では、多点同時蛍光相関装置(MP-FCS)の試作と、それを利用した生細胞内での分子間相互作用の解析を目指している。構築するMP-FCS装置の主たる光学系として空間光変調素子によるホログラム回折を利用したレーザー光源の分岐、および検出系としての共焦点光学系の構築を行う。さらに検出装置の高度化を平行して行い、2色の蛍光色素を利用するFCCS (fluorescence cross-

correlation spectroscopy)の構築を合わせて推進し、相互作用の検出効率を上げることを目指している。

また、研究対象とする細胞内分子間相互作用はこれまで申請者らが研究を進めてきた核内転写因子の一つであるグルココルチコイドレセプターなどの細胞質-核間移行タンパク質を主とするが、これに縛られることなく広く細胞内における機能性分子の相互作用検出を対象とする。

4. これまでの成果

装置の構築

励起光側に位相ホログラムのフーリエ変換強度パターンを作成しそこにレーザー光を照射することで7点の光スポットが形成されるようにした。検出器部分に7本の光ファイバーと光電子増倍管を設置し、7点のスポットによって励起された蛍光は、マルチコアファイバーの端面へ結像され、ピンホールの役割を果たすそれぞれのコア開口を通して、光電子増倍管アレイの各チャンネルで検出される。その蛍光強度の揺らぎを自己相関関数によって評価し、動態を決定する。多点FCSシステムを検証するため、濃度 10^{-7} MのRhodamine 6Gを用いて測定を行った。その結果全てのチャンネルにおいて等価な自己相関関数が得られたことにより、多点FCSシステムの動作を実証した。

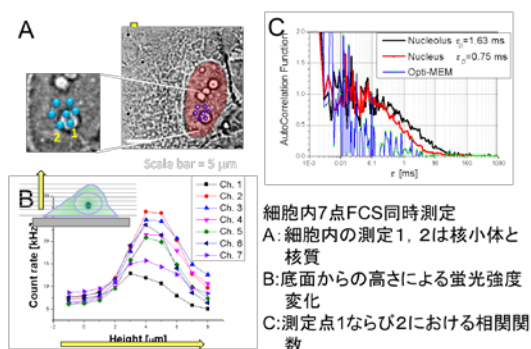
位相ホログラムの作成においては、まず各一本のファイバーに蛍光を導入するパター

ンを作成し、各々のホログラフィックパターンを乗算する手法を用い、さらに詳細にシミュレーション演算を繰り返すことで達成した。

さらに溶液中の蛍光色素、緑色蛍光タンパク質(GFP)並びに蛍光標識 DNA(500bp)の拡散時間の測定を行い、分子量または分子の長さに応じて、相関関数がシフトすることを確認し、十分な感度を有することを実証した。

生細胞多点 FCS 測定

次にモデル系として生細胞内における GFP の拡散速度の測定に成功し、構築した多点同時蛍光相関分光装置(MP-FCS)が生細胞測定に応用可能であることを実証した。細胞質ならびに核を区別し(図 A)、生細胞 GFP 測定においてはガラスと細胞の接着面から 0.5 ミクロンおきに蛍光強度変化が検出できることを確認し同時 7 点測定が可能であることを実証した(図 B)。その時の細胞質での拡散速度はこれまで報告された値よりやや大きいものの形状ファクターは 5 程度であることから十分な精度と感度を有していることが分かった。さらに核内において核質と核小体を区別して FCS 測定を行ったところ、核質より核小体での GFP の拡散が遅いことが確かめられた(図 C)。このことは構築した MP-FCS の各点が共焦点光学系を有しており、且つ、xy 面のみならず、z 軸方向にも十分な空間分解能を有することを実証し、MP-FCS 装置の実証実験として成功したことを示した。



次に核内受容体の一つであるグルココルチコイドレセプターについて、リガンド刺激後における細胞質から核内への移動速度の解析を行った。MP-FCS のうち、1 点を核外、すなわち細胞質、また他の点を核内に配置するようにして、核膜を境にして GFP または GFP-GR の輸送解析を行った。細胞質、細胞核内部での GR の数、拡散係数の時間変化と、GR の核内輸送速度を 10 秒程度の測定から同時に解析することが可能であることを確認した。さらに、多点同時に FCS 計測を行うことで、リガンドを添加しながら、細胞質と細胞核内部における生体分子の動態を解析可能になっただけでなく、2 点間のシグナ

ルの相互相関解析を行い、空間相互相関関数を得ることも可能であった。

5. 今後の計画

これまで利用してきた光電子増倍管(PMT)もマルチチャンネル化を行って、7 チャンネル装置の構築を行なった。同じ手法で PMT を増設し、それに応じて光ファイバーを増設することも原理的には可能であるが、CMOS 等の利用を検討し、安定性、簡便性などの比較を行う。

本研究において新規に構築した装置からのデータを利用して、MP-FCS による全測定点のシグナル間の関連性を明らかにする。これにより、すべての点間の相互作用マップが作成できる。

種々の GR 変異体を利用し比較することなどにより輸送機能・生理活性の解明に繋げる。

6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

- (1) Strömquist J, Johansson S, Xu L, Ohsugi Y, Andersson K, Muto H, Kinjo M, Höglund P, Widengren J. A modified FCCS procedure applied to Ly49A-MHC class I cis-interaction studies in cell membranes. *Biophys J*. 2011 Sep 7; 101(5): 1257-69.
- (2) Ohyanagi T, Nagahori N, Shimawaki K, Hinou H, Yamashita T, Sasaki A, Jin T, Iwanaga T, Kinjo M, Nishimura S. Importance of sialic acid residues illuminated by live animal imaging using phosphorylcholine self-assembled monolayer-coated quantum dots. *J Am Chem Soc*. 2011 Aug 17; 133(32): 12507-17.
- (3) Matsumura S, Shinoda K, Yamada M, Yokojima S, Inoue M, Ohnishi T, Shimada T, Kikuchi K, Masui D, Hashimoto S, Sato M, Ito A, Akioka M, Takagi S, Nakamura Y, Nemoto K, Hasegawa Y, Takamoto H, Inoue H, Nakamura S, Nabeshima Y, Teplow DB, Kinjo M, Hoshi M. Two distinct amyloid β -protein (A β) assembly pathways leading to oligomers and fibrils identified by combined fluorescence correlation spectroscopy, morphology and toxicity analyses. *J Biol Chem*. 2011 Apr 1; 286(13): 11555-62
- (4) Sasaki A, Kinjo M. Monitoring intracellular degradation of exogenous DNA using diffusion properties. *J Control Release*. 2010 Apr 2; 143(1): 104-11.
- (5) 金城 政孝 「蛍光相関法によるタンパク質の機能解析」 *生化学* 82(12), 1103-1116(2010)

ホームページ等

<http://www.lfsci.hokudai.ac.jp/labs/infmcd/index.html>