

研究課題別評価書

1. 研究課題名

タンパク質 1 分子モーションキャプチャー技術の開発

2. 氏名

谷 知己

3. 研究のねらい

タンパク質の働きには、そのかたちの変化が密接に関係すると考えられている。タンパク質の形やその変化を知ることは、タンパク質がはたらく原理を理解する上で重要であるが、同時に、タンパク質が働くさまを見るよい手がかりともなるはずである。観察対象となるタンパク質を蛍光色素や蛍光タンパク質で標識し、蛍光顕微鏡で観察すると、ひとつひとつの分子が輝点として観察出来る。この蛍光像から得られる情報には、その位置や明るさ、波長などがあるが、驚くべきことに、この像には蛍光分子の向きに関する情報も含まれている。本研究では、観察対象となるタンパク質を GFP や蛍光色素で標識し、これらの分子の方向を1分子単位で観察することにより、生きたタンパク質の機能にともなう構造変化を生きた細胞内で観測する計測技術を開発することを、その最終目標としている。

4. 研究成果

蛍光タンパク質1分子の向きを観察する全反射励起光学系の開発

細胞内で蛍光1分子を観察するためには、励起用の1本のレーザー光を開口数 1.4 以上の対物レンズの周縁から導入してガラス相と水相の界面で全反射させ、水相側の界面近傍に形成されるエバネッセント場を励起光とすることが多い。しかしながら、このエバネッセント場の偏光方向には偏りがある。励起光の偏光方向が入射光と反射光を含む平面に対して平行な場合、全反射界面で発生するエバネッセント場の偏光は全反射面に垂直な方向に大きく偏っている(図1A)。このため、このような条件では、吸収双極子が全反射面に対して垂直な蛍光分子が選択的に励起される。一方、励起用のレーザー光の偏光方向が、入射光と反射光を含む平面に対して直交する場合、全反射面で発生するエバネッセント場の偏光方向は、入射光と反射光を含む平面に垂直で、全反射面に平行である(図1C)。このような条件では、吸収双極子が全反射面に対して平行で、入射・反射光を含む平面に垂直な蛍光分子が選択的に励起される。このような現象は実際に、蛍光タンパク質を焦点位置から $1\mu\text{m}$ 以内の範囲でずらしたデフォーカス像から確認することが出来る。蛍光分子の発光双極子が観察光軸(Z 軸)に対して平行な場合、その蛍光1分子のデフォーカス像は図1B のようにドーナツ状となる。蛍光分子の発光双極子が観察光軸に直交する場合、蛍光1分子のデフォーカス像は、発光双極子方向が黒く抜けた図1D のようなパターンとなる。吸収双極子と発光双極子が平行な蛍光分子では、図1A の励起条件では主に図1B のデフォーカス像が、図1C の励起条件では主に図1D のデフォーカス像が観察される。この理由は、これらの特定の方向を向いた分子が選択的に励起されているからである。そこで本研究ではまず、どのような方向を向いた蛍光分子も同様に観察することが出来る全反射照明法を開発した。この方法では、励起光を

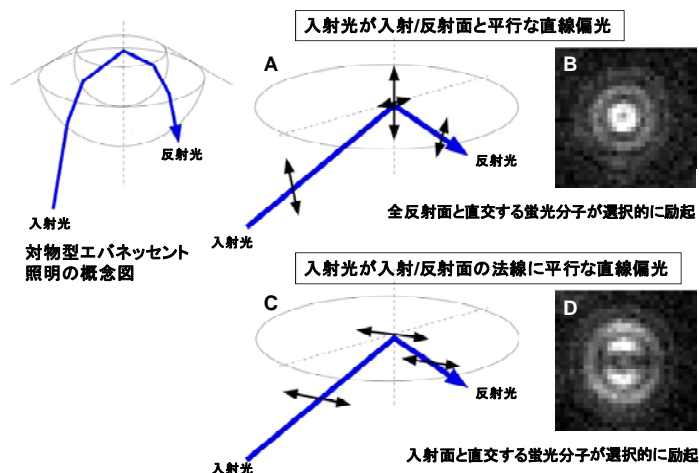


図1 エバネッセント場の偏光と励起分子の方向

偏光ビームスプリッターによって2光路にわけ、各々の入射・反射光路を含む平面が直交する様に対物レンズに導入する。これらの偏光方向を光路中におかれた波長板によって調整することにより、X軸、Y軸およびZ軸方向に平行な吸収双極子を持つ蛍光分子を等しく励起することが出来る。このような条件で観察した蛍光タンパク質1分子のデフォーカス像を図2に示す。様々な向きの1分子デフォーカス像が得られている。

蛍光分子の方向を3次元的に定量する蛍光偏光観察光学系の開発

以上に述べた方法で励起した蛍光分子が発する光は、あらゆる方向に等方的に放射されるのではなく、その蛍光の放射方向にはある偏りが存在する。蛍光分子から放射される光は、その発光双極子に直交する方向に最もよく放射され、発光双極子に平行な方向には決して放射されることはない。このように発光双極子から放たれる光の方向に偏りがあるために、そのデフォーカス像の空間パターンは蛍光分子の方向を反映したものとなる。さて、このような蛍光1分子のデフォーカス像から分子の向きを計測する試みは1990年代後半に始まり、画像のパターンマッチング法を用いた定量法が Enderlein らによって報告されている。しかしながら、この方法は発光双極子と観察光軸方向がなす角度の定量性や、1分子像が得られない高濃度の観察対象には適用できない問題がある。これらの理由から、本研究では新しい光学的計測法の開発をおこなった。

対物レンズを通じて、観察光軸に対して平行な発光双極子を持つ蛍光分子を観察した場合、対物レンズ後焦点面における蛍光の偏光方向は光軸を中心として放射状に並んでいる。一方、観察光軸に直交する発光双極子を持つ蛍光分子を同様に観察した場合、対物レンズ後焦点面における蛍光の偏光方向は、発光双極子の方向にほぼ平行となっている。そこで本研究では、その偏光透過軸が光軸を中心として放射状となった偏光子と、偏光透過軸が光軸を中心として同心円状となった偏光子を組み合わせることにより、対物レンズ後焦点面を通過する蛍光偏光の軸対称性を定量する光学系を構築した(図3)。蛍光1分子から発した光は無偏光ビームスプリッターによって2分割され、それぞれ放射偏光子および同心円偏光子を通過した後、電子増倍型 CCD 上に結像される。観察光軸(Z軸)に平行な発光双極子をもつ蛍光分子から発した光は、放射偏光子を通過することは出来るが、同心円偏光子を通過することが出来ない。この偏光子を通る蛍光の大部分は、発光双極子が観察光軸と直交するXY平面に平行な蛍光分子に由来する。さらに、偏光ビームスプリッターを用いて、同心円偏光子を通過する光をさらに直交する2つの偏光成分(X軸成分およびY軸成分)に分離することも出来る。このような光学系によって、蛍光分子が持つ発光双極子モーメントのZ軸成分、Y軸成分およびX軸成分を定量することが出来る。例として図4に、ガラス表面上に固定した GFP の蛍光を

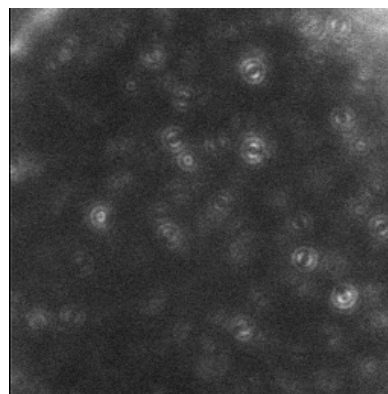


図2 新たに開発した全反射励起光学で得られた GFP1 分子のデフォーカス像

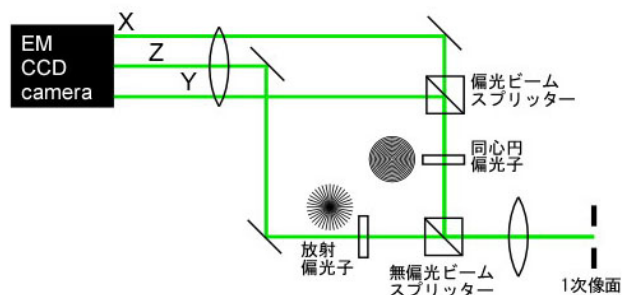
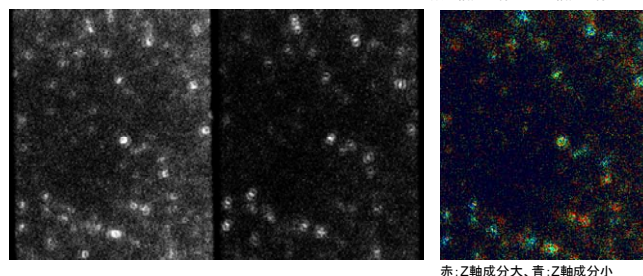


図3 発光双極子モーメントを3D計測する光学系

放射偏光子を透過した蛍光像 同心円偏光子を透過した蛍光像 放射偏光子像/同心円偏光子像のratio像



赤:Z軸成分大、青:Z軸成分小

図4 GFP 発光双極子のZ軸成分定量

2 分し、それぞれ放射偏光子と同心円偏光子を通過して得られた像を示した。これらの蛍光強度比(図4右端)は GFP 発光双極子の Z 軸成分を反映したものとなっている。

タンパク質 1 分子の向きの変化を生きた細胞内で 3 次元計測するーその応用

本研究では細胞機能に関わるタンパク質の、機能にともなう構造変化を生きた細胞内で検出することを目標としたが、このような計測で問題となる現象のひとつは、観察するタンパク質自体の拡散運動である。本研究では、細胞膜タンパク質や細胞骨格系タンパク質など、細胞内での拡散運動がある程度制限されたタンパク質をモデルとした。

神経細胞の軸索伸長を活性化する神経成長因子 NGF の受容体 TrkA はチロシンキナーゼ型受容体である。NGF との結合にともない、受容体はホモ2量体を形成し、その細胞質ドメインにあるチロシンがリン酸化される。X 線結晶構造解析から、チロシンキナーゼ型受容体では、このリン酸化にともなって細胞質ドメインに大きな構造変化が生じることが明らかとなっている。本研究では TrkA の細胞質ドメインを GFP で標識し、GFP 発色団分子の向きを時々刻々と観測することにより、NGF との結合にともなう TrkA 細胞質ドメインの構造変化を1分子単位で観察することを目指した。この受容体は一回膜貫通型であり、膜と平行な軸を中心とする回転拡散運動は制限されているので、タンパク質の構造変化に由来するこの方向への回転運動は比較的検出が容易であると考えられる。細胞膜がカバーガラスと平行に広がる場合、この構造変化は蛍光標識の Z 軸成分変化として検出される。そこで本研究では、神経成長因子受容体 TrkA の構造変化が見られると予想される細胞質ドメインの C 末端に GFP をつなげて、末梢神経様細胞株 PC12 細胞に発現させた。このような TrkA-GFP を 1 分子単位で観察し、NGF 投与後に観察される発光双極子方向の変化、特に Z 軸方向の成分について計測をおこなった(図5)現在のところ、NGF 投与に伴う明確な構造変化は

検出出来ていない。GFP と受容体細胞質ドメインとの連結が 1 本のポリペプチド鎖であるために、GFP が比較的自由に回転している可能性が原因として考えられる。GFP と TrkA 細胞質ドメインとの連結を 2 点でおこなうことにより、GFP 自体の拡散運動が抑制されることにより、受容体そのものの構造変化が検出される可能性がある。

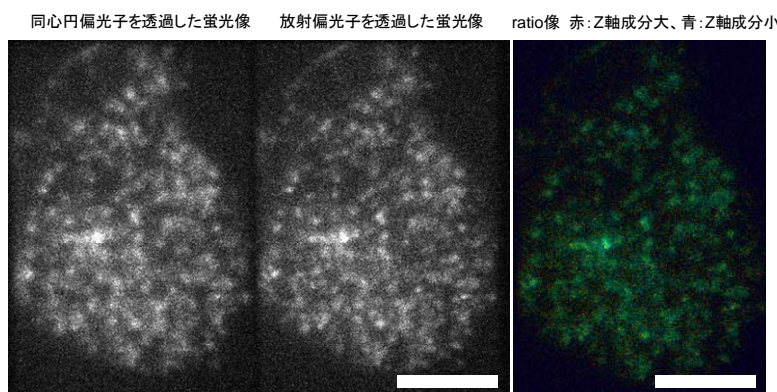


図5 TrkA-EGFP を発現した PC12 細胞 バー、5 μm

5. 自己評価

(1)分子の向きを可視化する光学顕微鏡技術の開発について

これまで蛍光 1 分子観察ではあまりとりあつかわれることのなかった“分子の向き”に着目し、観察対象とするタンパク質に付加した蛍光マーカー分子の向きの変化から、観察対象となるタンパク質の構造変化やその機能を観察する試みは、光学顕微鏡技術の開発という点から見ればほぼ完成に近づいたと考えている。本研究で導入した軸対称偏光素子は、本来レーザー発振など、光学顕微鏡技術とはかけはなれた応用光学の分野で用いられているものであるが、この素子が蛍光顕微鏡観察における蛍光 1 分子の向きの検出に用いられることを世界ではじめて示したことは大きな成果と考えている。

(2)構造変化を可視化する蛍光マーカー分子の導入法について

本研究で観察対象として選んだ膜タンパク質の構造変化を生きた細胞中、1 分子単位で観察する目標には到達出来ていない。その大きな障壁となったのが、観察対象の構造変化をうまく反映するマーカー分子の付加法である。通常蛍光タンパク質標識によってあるタンパク質の細胞内動態

を可視化するには、蛍光タンパク質と観察対象となるタンパク質を、グリシンやセリンを多く含むフレキシブルなポリペプチドでつなぐことが多い。これは、フレキシブルなリンカーによって、蛍光タンパク質の付加が、観察対象となるタンパク質の機能の負荷とならないようにする工夫である。しかしながら本研究では、観察対象となるタンパク質の構造変化を出来るだけ反映するように蛍光タンパク質を付加することが目標となるため、従来の発想とは異なるリンカーの設計をおこなう必要があった。この問題は現在においても大きな課題として残っている。

(3)細胞内タンパク質と特異的に結合する蛍光標識小分子を用いる試みについて

蛍光タンパク質の利点のひとつは、細胞内で発現する特定のタンパク質を、比較的容易に蛍光標識出来る事である。特定のタンパク質と結合する小分子を有機系蛍光色素で標識したプローブを用いることによっても、細胞内の特定のタンパク質を蛍光標識することが可能である。さきがけ研究の最終年度では、細胞内のアクチン線維と特異的に結合する小分子ファロイジンを蛍光色素ローダミンで標識したローダミンファロイジンを細胞内に導入することで、細胞内アクチン線維を蛍光標識し、さまざまな向きを向いた細胞内アクチンの配向を生きた細胞内で観察することに成功した。このことは、観察対象となるタンパク質と特異的に結合する小分子蛍光標識した分子が、観察対象となるタンパク質の構造変化をモニターするよいプローブとなる可能性を示している。また、ローダミンファロイジンを細胞内に導入するために用いたビーズローディング法は、膜透過能を持たない蛍光標識小分子を極めて簡便に細胞内に導入出来る方法であることが明らかとなった。

6. 研究総括の見解

蛍光分子の配向を時空間的に計測出来る新しい光学顕微鏡を開発したことは高く評価出来る。このイメージ技術は光学理論・実験両面から丁寧な検討がなされている。しかしながら、タンパク質の揺らぎなど動的挙動について何が新しく分かったかについては明瞭な説明が欲しいところだ。今後、膜タンパク質や細胞内の1分子の配向変化を機能とどのように関連させるかが課題となろう。

7. 研究成果リスト

A. さきがけ個人研究者が主導で得られた成果

(1)学会発表

学会発表(国際)

・Tomomi Tani, Single molecule analysis of NGF and the receptor trafficking on growth cones EMBO Conference Series on Spatial Dynamics of Intracellular Signaling 2009.3, Jerusalem (Maale Hachmisha), Israel

学会発表(国内)

・谷知己・斉藤健太・永井健治 リガンド結合にともなう神経成長因子受容体 TrkA の構造ダイナミクスを可視化する試み 日本生物物理学会年大会 2007.12 横浜 (パシフィコ横浜)

・Tomomi Tani, Kenta Saito and Takeharu Nagai Trapping single molecules of GFP-tagged nerve growth factor receptor via ligands immobilized on a solid surface 第46回日本生物物理学会年会 2008.12 福岡 (福岡国際会議場)

(2)招待講演

招待講演(国際)

・谷知己 Single-molecule analysis of membrane receptor activation during axonal growth of living neurons. 10th Hokudai-SNU Joint Symposium, Seoul, 2008 年 1 月

招待講演(国内)

・谷知己 ひとつひとつの生体分子を生きたまま観察してわかること FUJI FILM 先端研究所

セミナー 足柄 2008 年 6 月

・谷知己 情報伝達する分子同士の向きを見るー蛍光偏光からのアプローチ 2 分子計測
ワークショップ 東京 2008 年 12 月

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

(1) 論文(原著論文)発表

論文(国際)

・Zhou, X., Babu, J. R., da Silva, S., Shu, Q., Graef, I. A., Oliver, T., Tomoda, T., Tani, T., Wooten, M. W. and Wang, F. Unc-51-like kinase 1/2 mediated endocytic processes regulate filopodia extension and branching of sensory axons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104, 5842-5847, 2007

・Saito K., Kobayashi K., Tani T. and Nagai T. A mercury arc lamp-based multi-color confocal real time imaging system for cellular structure and function. Cell Structure and Function 33, 133-141, 2008

・Tomosugi W., Matsuda T., Tani T., Nemoto T., Kotera I., Saito K., Horikawa K. and Nagai T. An ultramarine fluorescent protein with increased photostability and pH insensitivity. Nature Methods 6, 351- 353, 2009

(2) 学会発表

学会発表(国内)

・野村真未・原田慶恵・谷知己 切断された神経軸索の再生における神経成長因子の作用
日本生物物理学会年大会 2007.12 横浜 (パシフィコ横浜)

・Mami Nomura, Takeharu Nagai, Yoshie Harada and Tomomi Tani Nerve growth factor-induced translocation of TrkA-GFP expressed on PC12 cells 第46回日本生物物理学会年会 2008.12 福岡 (福岡国際会議場)

(3) 招待講演

招待講演(国内)

・谷知己 成長円錐における神経軸索伸長シグナルの1 分子生理学 日本比較内分泌学会
年会 シンポジウム 札幌 2006 年 11 月

・谷知己 神経軸索の伸長と再生に関わる分子のふるまいを可視化する 日本整形外科学
会学術集会 浜松 2007 年 10 月