

光ファイバー型蛍光相関分光システムの研究開発と生物応用

研究代表者

北村 朗 北海道大学先端生命科学研究院 講師

共同研究者

山本 条太郎 産業技術総合研究所生命工学領域 研究員



1. 研究の背景と達成目標

生命機能の基本は生細胞内における分子間相互作用にあると申請者は考え研究を進めてきた。そのため、生きた細胞内の生体分子間相互作用を高感度（一分子感度）に且つリアルタイム（その場）に検出可能な蛍光相関分光法（FCS: Fluorescence Correlation Spectroscopy）に注目し、その研究・開発研究を進めてきた。蛍光相関分光法は先端的顕微鏡法の一つであり、顕微鏡下で形成された 1 フェムトリットル未満のごく微小な領域における蛍光強度のゆらぎから、蛍光標識された核酸やタンパク質などの生体分子の拡散速度、分子数の変化と、それらの情報を元に分子間相互作用を検出する手法であり、*in vitro*（溶液系）から単一細胞の *in vivo* まで幅広い測定範囲を持つ。しかし一方で、先端機器であるレーザー顕微鏡に基礎を置く複雑かつ大型な装置のため、単一分子感度を有し高感度であるが、動物実験へは応用困難であり、従って臨床応用・ベットサイド等への展開は不可能と考えられ、未応用の分野であった。このような問題点を改善し改良すべく、近年の光情報工学の進展に伴う様々な光ファイバー技術を駆使することで、絶対的に必要と考えていた対物レンズや分光フィルターなどの重要な部分を全て光ファイバー化した小型ハンディタイプ蛍光相関分光装置の試作とエクソソームの測定による実証応用を目指した。

2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

- ・光ファイバー光学系を用いた顕微鏡取り付け型 FCS ユニットの構築

これまで複雑な光学素子と調整を必要とした共焦点系光学系について、光ファイバー光学系を用いて実現することに成功した。本法は一点照射の FCS 測定用のものであるが、ガルバノ型スキャナーのような多点走査装置と組み合わせることで一般型共焦点蛍光顕微鏡としての応用が可能であり、多彩な検査対象に使えることから、研究及び検査機関における有用性が高いと考えられる。

3. 研究成果

半導体レーザーとレーザードライバを購入し、光ファイバー型 FCS 装置（Full-fiber-optic FCS, FF-FCS）の構築を行った。同装置と市販相関器（Flex02-01D, Correlator.com, USA）を用いて、直径 20、40、100、200 nm の蛍光ビーズの FF-FCS 測定実験を実施し、同装置による FCS 計測の可能性を実証した。

また、光ファイバー光学系を用いた顕微鏡取付型 FCS ユニット（Fiber-connected FCS: FC-FCS）についても構築を完了した。直径 20、40、100 nm の蛍光ビーズの FCS 測定実験により、FC-FCS 測定が可能なることを実証した。さらに、エクソソームを上述の方法で蛍光染色した上で FC-FCS 測定を行い、エクソソーム測定が可能なることを実証した。

さらに、ヒトがん細胞の培養液から超遠心法を用いてエクソソームを分離する方法を樹立した。さらに分離したエクソソームに対し、脂質にインターカレートする蛍光色素である PKH またはエクソソームのマーカータンパク質である CD65 を認識する蛍光標識抗体を用いて蛍光染色し、市販型の高感度 FCS 装置を用いて FCS 測定が可能なることを確認した上で、染色エクソソームを構築した FC-

FCS装置を用いて検出することに成功した。

4. 今後の展開

開発した光ファイバー光学系を用いた顕微鏡取り付け型 FCS は、簡便に持ち運ぶことができ、例えば FCS 装置を有しない研究室での測定や、フィールドワークにおける測定なども可能になると考えられる。それを踏まえ、別の産学官連携共同研究により、当該装置の市販化に着手済である。

また、多点走査スキャナーとの併用により、通常の共焦点走査型蛍光顕微鏡としての利用も可能になることから、調整フリーな高精細蛍光顕微鏡としての発展可能性がある。

さらに、FCS は粒子のサイズ変化に敏感であることから、エクソソーム測定のみならず、例えば神経変性疾患やアミロイドーシスといった疾患におけるタンパク質の凝集体検出にも有用であると考えられる。

5. 発表実績

[原著論文]

- ・ "Full fiber-optic fluorescence correlation spectroscopy.", Yamamoto J. and Kinjo M., *Optics Express*, 27, 14835-14841 (2019)
- ・ "The AAA+ ATPase/ubiquitin ligase mysterin stabilizes cytoplasmic lipid droplets." Sugihara M., Morito D., Ainuki S., Hirano Y., Ogino K., Kitamura A., Hirata H., Nagata K., *J. Cell Biol.* 218, 949-960 (2019)
- ・ "Characterization of Intracellular Crowding Environments with Topology-Based DNA Quadruplex Sensors." Takahashi S., Yamamoto J., Kitamura A., Kinjo M., Sugimoto N., *Anal. Chem.*, 91, 2586-2590 (2019)
- ・ "Multipoint fluorescence correlation spectroscopy using spatial light modulator." Yamamoto J., Mikuni s., Kinjo M., *Biomedical Optics Express*, 9, 5881-5890 (2018)
- ・ "Absolute Quantification of RNA Molecules Using Fluorescence Correlation Spectroscopy with Certified Reference Materials." Sasaki A., Yamamoto J., Kinjo M., Noda N., *Anal. Chem.*, 90, 10865-10871, (2018)
- ・ "Two-detector number and brightness analysis reveals spatio-temporal oligomerization of proteins in living cells." Fukushima R., Yamamoto J., Ishikawa H., Kinjo M., *Methods*, 140-141, 161-171 (2018)
- ・ "Analysis of the substrate recognition state of TDP-43 to single-stranded DNA using fluorescence correlation spectroscopy." Kitamura A., Shibasaki A., Takeda K., Suno R., Kinjo M., *Biochem. Biophys. Reports*, 14, 58-63 (2018)

[招待講演]

- ・ サントリー生有研シンポジウム 「蛍光相関分光法とその応用法を用いた ALS 関連細胞内凝集体形成機構の解析」 北村朗 2019/12/16

[依頼講演]

- ・ 第6回 日本細胞外小胞学会 学術集会 ランチョンセミナー (コスモ・バイオ) 「エクソソームの簡易定量に向けた簡易型蛍光相関分光装置の開発」 山本条太郎 2019/10/24