

学位論文題名

Study on Molecular Dynamics in Cell Membrane
by using Total Internal Reflection Fluorescence
Correlation Spectroscopy

(全反射蛍光相関分光法による細胞膜の分子動態に関する研究)

学位論文内容の要旨

細胞膜における分子間相互作用は細胞外シグナルの受容とその細胞内への情報変換を担うため、その解析は特に細胞機能の解明および創薬ターゲットの探索において重要である。

本研究は、低背景光の観察が可能な全反射蛍光顕微鏡 (total internal reflection fluorescence microscope、以下 TIRFM) 光学系と単一分子解析法である蛍光相関分光法 (fluorescence correlation spectroscopy、以下 FCS) を組み合わせた全反射蛍光相関法 (total internal reflection-fluorescence correlation spectroscopy、以下 TIR-FCS) を確立して、細胞膜における分子間相互作用の解析を中心とする細胞生物学への応用を目的として進めた。本論文では、TIR-FCS の測定法の確立、および TIR-FCS による生きた細胞の細胞膜における分子動態の解析 (Chapter 2)、シグナル伝達分子プロテインキナーゼ C (protein kinase C、以下 PKC) の TIR-FCS 解析 (Chapter 3)、および TIRFM を用いた多点型 FCS 測定法の確立とその細胞生物学への応用 (Chapter 4) についての結果をまとめた。

通常の FCS 測定は共焦点光学系を用いて集光されたレーザーと検出側の結像面に設置されたピンホールによって微小な測定領域 ($\sim 10^{-15}$ リットル) を作り出す。しかしながら、その測定領域の光軸方向の高さは $2 \mu\text{m}$ もあるため、約 10 nm の薄さしかない細胞膜を狙って FCS 測定を行なうと細胞質側からのバックグラウンドシグナルを多く検出してしまう。そこで、背景光を大幅に低減させ、細胞膜およびその近傍のみの観察が可能な TIRFM 光学系と FCS 装置を組み合わせた TIR-FCS の確立、およびこれを用いて生きた細胞の細胞膜における分子動態解析を行なうことを Chapter 2 の目的とした。

ピンホールとしての光ファイバー ($\phi 50 \mu\text{m}$)、単一光子検出器であるアバランシェフォトダイオード (avalanche photodiode、以下 APD) および相関器からなる FCS ユニットの対物レンズ型 TIRFM の検出部に接続することにより、TIR-FCS 装置を構築した。次に蛍光色素 FITC、および緑色蛍光蛋白質 (enhanced green fluorescent protein)、以下 EGFP) などのガラス表面近傍における分子拡散運動を TIR-FCS で測

定することにより、TIR-FCS装置の特性を評価した。また、蛍光色素標識脂質分子の人工平面膜における側方拡散運動もTIR-FCSで測定可能であることを確認し、TIR-FCSがリン脂質二重層膜における側方拡散運動の解析に有効であることも確認した。次に、生体膜局在配列を有するEGFPであるファルネシル化EGFP(farnesylated EGFP、以下EGFP-F)の生きた細胞の細胞膜における分子動態をTIR-FCSによって観察した。その結果、比較的早く拡散運動する分子群(第1成分)と遅く動いている分子群(第2成分)を検出した。通常の共焦点FCSと高感度CCDカメラを用いた単一分子追跡法によって、第1成分と第2成分はそれぞれ、細胞膜近傍の細胞質における三次元的拡散運動、細胞膜における側方分子拡散であることを確認した。Chapter 2において、TIR-FCSは生きた細胞の細胞膜における分子動態解析に有用であることを示した。

PKCはセリン・スレオニンキナーゼとして細胞増殖・分化などに深く関わるシグナル伝達分子である。Chapter 3にはTIR-FCSを用いてEGFP融合PKC β IIの細胞膜における動態を単一分子解析した研究結果をまとめた。ATP受容体(P2 purinergic receptors)刺激はPKCの細胞膜への局在移行を促進し、PKCを活性化することが知られている。ATP添加前後のEGFP融合PKC β IIの細胞膜における分子動態をTIR-FCSで測定することができた。ATP添加前後いずれの場合も、得られた自己相関関数は2成分モデルで解析可能であり、細胞膜近くの細胞質で拡散運動する分子群と細胞膜で側方拡散する分子群を捉えることができた。

Chapter 4ではTIR-FCSを利用する多点同時測定に関する研究結果をまとめた。TIRFMの励起光として用いるエバネッセント場はガラス表面近傍を広く照射する。したがって、TIRFM検出部の結像面に設置したピンホールの数にFCS測定領域の数になる。このように、TIRFMを用いたFCS、すなわちTIR-FCSではFCSの測定点を容易に増やすことができると考えられる。TIRFMを利用した多点同時FCS測定システムを開発して、その細胞生物学への応用を可能にした。

まず、7本のマルチモードファイバーから成るバンドルファイバー、7つの光電子増倍管、および複数の自己相関関数の同時計算が可能なマルチチャンネル相関器を用いることで多点型TIR-FCSのシステムを構築することができた。次にこの装置を用いて、水溶液中の蛍光色素の拡散運動を7点同時で測定すると7つの自己相関関数を得る事ができた。また、単量体タイプ(A206K)のEGFP-Fを発現するCOS7細胞も測定することができた。細胞膜を狙った7つの測定点で同時に得られた自己相関関数はいずれも2成分モデルでフィットできた。得られた拡散定数はChapter 2の結果と良い一致を示した。

以上のように、本論文ではTIR-FCSは生きた細胞の表面における分子動態の解析に有用であること、およびTIR-FCSは多点同時測定が可能であることを明らかにした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 矢 澤 道 生
副 査 教 授 坂 口 和 靖
副 査 教 授 村 越 敬
副 査 教 授 金 城 政 孝 (先端生命科学研究院)

学位論文題名

Study on Molecular Dynamics in Cell Membrane by using Total Internal Reflection Fluorescence Correlation Spectroscopy

(全反射蛍光相関分光法による細胞膜の分子動態に関する研究)

博士学位論文審査等の結果について (報告)

細胞膜における分子間相互作用は、細胞外シグナルの受容と細胞内シグナルへの変換を担うため、その解析は細胞機能の解明において重要であり、それゆえに創薬ターゲットの探索においても注目されている。これを達成するためには、細胞膜およびその近傍での分子間相互作用を単一分子レベルの解像度で解析する技術を開発することが望まれてきた。申請者は、蛍光標識した標的分子の細胞膜での動的な挙動を解析するために、低背景光の観察が可能な全反射蛍光顕微鏡 (total internal reflection fluorescence microscope、以下 TIRFM) 光学系と、単一分子解析法である蛍光相関分光法 (fluorescence correlation spectroscopy、以下 FCS) とを組み合わせた全反射蛍光相関法 (total internal reflection-fluorescence correlation spectroscopy、以下 TIR-FCS) 測定システムの開発と、その細胞生物学への応用を目的として研究を展開した。その結果、TIR-FCS 測定システムの構築と実用化に成功し、生きた細胞の細胞膜における分子動態の解析に世界に先駆けて成功した。本学位論文は、これらの過程についてまとめられたものである。

本論文は、Introduction (Chapter 1) に続く以下の 3 章からなる。Chapter 2 では TIR-FCS の測定法の確立、および TIR-FCS による生きた細胞の細胞膜における分子動態の解析について述べられている。通常の FCS 測定は共焦点光学系を用いて集光されたレーザーと検出側の結像面に設置されたピンホールによって作り出された微小な測定領域 ($\sim 10^{-15}$ リットル) を測定対象とする。これを約 10 nm の薄さしかない細胞膜近傍での測定に特化するために、TIRFM 光学系と FCS 装置を組み合わせ、その測定領域の光軸方向の高さを 1/200 に縮めるとともに細胞質側からのバックグラウンドシグナルを大幅に低減させ、細胞膜およびその近傍のみの観察が期待できる TIR-FCS の構築に取り組んだ。ピンホールとしての光ファイバー (ϕ 50 μm)、単一光子検出

器であるアバランシェフォトダイオード (avalanche photodiode、以下 APD) および相関器からなる FCS ユニットの対物レンズ型 TIRFM の結像面に設置して TIR-FCS 装置を構築した。装置の特性を蛍光色素 FITC、および緑色蛍光蛋白質 (enhanced green fluorescent protein、以下 EGFP) のガラス表面近傍における分子拡散運動を測定することにより評価したうえで、蛍光色素標識脂質分子の人工平面膜における側方拡散運動を測定し、TIR-FCS がリン脂質二重層膜における側方拡散運動の解析に有効であることを確認した。さらに、生体膜局在配列を有するファルネシル化 EGFP (farnesylated EGFP、以下 EGFP-F) を発現する細胞を用いて、生きた細胞の細胞膜近傍での分子動態を観察した。その結果、比較的早く拡散運動する分子群 (第 1 成分) と遅く動いている分子群 (第 2 成分) を検出し、通常の共焦点 FCS と高感度 CCD カメラを用いた単一分子追跡法による結果と比較して、第 1 成分と第 2 成分はそれぞれ、細胞膜近傍の細胞質における三次元的拡散運動、細胞膜における側方分子拡散であることを確認した。以上の結果から、申請者が構築した TIR-FCS システムは、生きた細胞の細胞膜における分子動態解析に有用であることが示された。

Chapter 3 ではシグナル伝達分子プロテインキナーゼ C (protein kinase C、以下 PKC) の TIR-FCS 解析について述べられている。PKC はセリン・スレオニンキナーゼとして細胞増殖・分化などに深く関わるシグナル伝達分子である。申請者は、EGFP 融合 PKC β II の細胞膜における動態を TIR-FCS を用いて解析した。ATP/UTP 受容体刺激は PKC の細胞膜への局在移行を促進し、PKC を活性化することが知られているが、ATP 添加前後の EGFP 融合 PKC β II の細胞膜における分子動態を TIR-FCS で測定したところ、ATP 添加前後いずれの場合も、得られた自己相関関数は 2 成分モデルで解析可能であり、細胞膜近くの細胞質で拡散運動する分子群と細胞膜で側方拡散する分子群の分布が変化することを示唆する動態を捉えることができた。

Chapter 4 では TIRFM を用いた多点型 FCS 測定法の確立とその細胞生物学への応用について述べられている。TIRFM の励起光として用いるエバネッセント場はガラス表面近傍を広く照射する。したがって、TIRFM 検出部の結像面に設置したピンホールの数が FCS 測定領域の数になり、TIR-FCS では FCS の測定点を容易に増やすことができる。申請者は、7 本のマルチモードファイバーから成るバンドルファイバー、7 つの光電子増倍管、および複数の自己相関関数の同時計算が可能なマルチチャネル相関器を用いることで多点型 TIR-FCS のシステムを構築した。この装置を用いて、水溶液中の蛍光色素の拡散運動を 7 点同時で測定し 7 つの自己相関関数を得る事ができた。また、単量体タイプ (A206K) の EGFP-F を発現する COS7 細胞の細胞膜近傍の 7 つの測定点で同時に得られた自己相関関数はいずれも 2 成分モデルでフィットでき、得られた拡散定数は Chapter 2 の結果と良い一致を示した。以上の結果から、構築した装置を用いて多点同時測定が可能であることがわかった。

以上のように、申請者は、世界に先駆けて TIR-FCS 測定システムの構築に成功し、生きた細胞の細胞膜における分子動態の解析に成功した。本論文にしめされた成果は細胞膜における分子間相互作用に始まる細胞機能の解明、それらを対象とする創薬ターゲットの探索分野の発展に対して貢献するところ大なるものがある。

よって申請者は、北海道大学博士 (理学) の学位を授与される資格あるものと認める。