

細胞内生体分子間ネットワークの

リアルタイム検出法の開発と細胞生物学的応用の検討

寺田 純雄

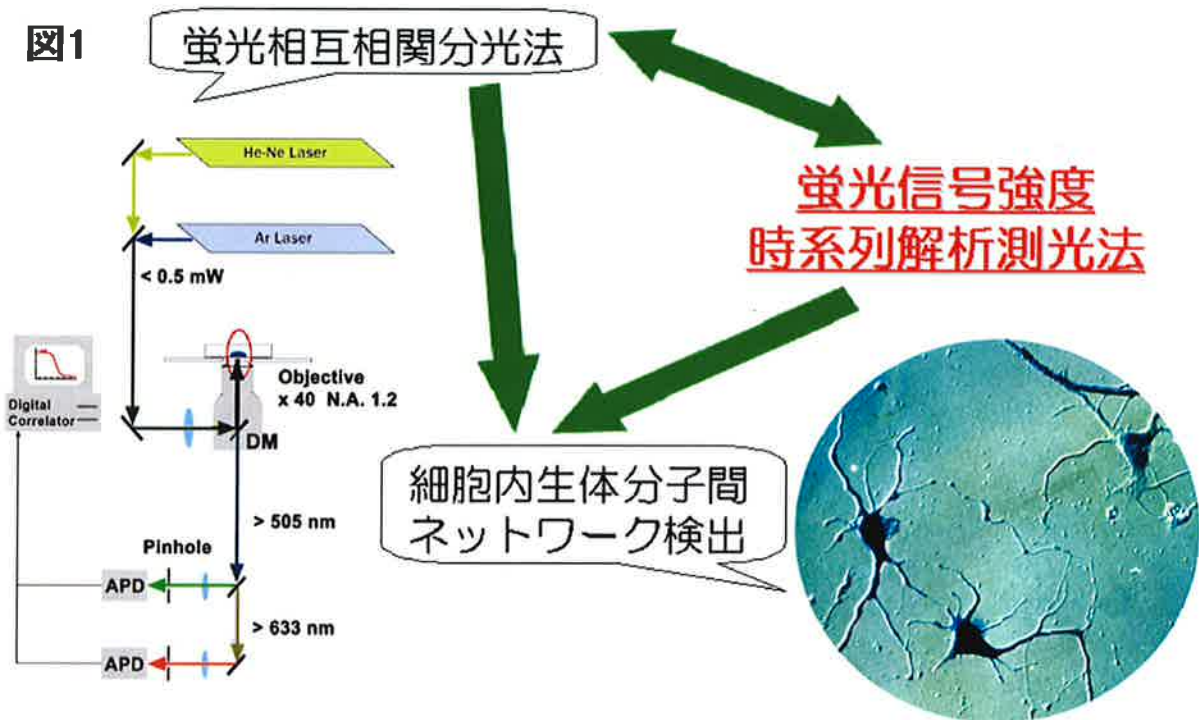
東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科

1. 研究のねらい

生体システムを構成するさまざまな機能分子（蛋白質や核酸など）間の相互関係は、一対一の対応関係や線形結合に限定されない。機能分子間の非特異的な“弱い”相互作用がシステムネットワークにおいてなんらかの機能を果たす可能性は高いが、この種の相互作用を検討するには遺伝学的手法を例外として適切な実験手法がほとんど存在しない。

そこで本研究では、まず基質特異性の低い蛋白質群の関与する複合体の、特に生体内における会合や分離を観測できる実験系の確立を目指した。実験系としては蛍光相互相関分光法と新規に開発する“蛍光信号強度時系列解析測光法”の二つを比較しながら検討した。次に“蛍光信号強度時系列解析測光法”が生体分子間相互作用の制御関係を実時間下で観測可能か否かについて、調べることを目的とした。最終的には、これらの手法の細胞生物学的応用について検討することを目標においた（図1）。

図1



2. 研究成果

基質特異性の低い蛋白質群の関与する複合体の生体内における会合、分離の観測

すでに確立した手法として知られる蛍光相互相関分光法に関して、基質特異性の低い蛋白質群の関与する複合体の生体内における会合、分離の観測の可能性について検討した。実験系として、イカ巨大軸索中の細胞質性蛋白質輸送の実時間下観測系を利用した。まず、細胞質性蛋白質の軸索内輸送のメカニズムとして、キネシンモーター複合体（キネシン重鎖二量体、軽鎖二量体からなるヘテロ四量体）が、シャペロン分子を介して様々な細胞質性蛋白質群を微小管に沿って輸送

するとする仮説を検討した（図2）。シャペロン分子とキネシンモーター複合体の結合を競合ペプチド断片混入により阻害し、細胞質性蛋白質の輸送を抑制する所見が得られたことが、仮説を支持する根拠である。仮説が正しければ、細胞質性蛋白質が輸送される際にはシャペロン分子と結合しているはずであり、またこの結合は、基質特異性が低いことが予想される。実際にイカ巨大軸索中で細胞質性蛋白質が輸送されている際、シャペロン分子が輸送される細胞質性蛋白質と“弱く”結合しているかどうか、蛍光相互相関分光法により検討した。

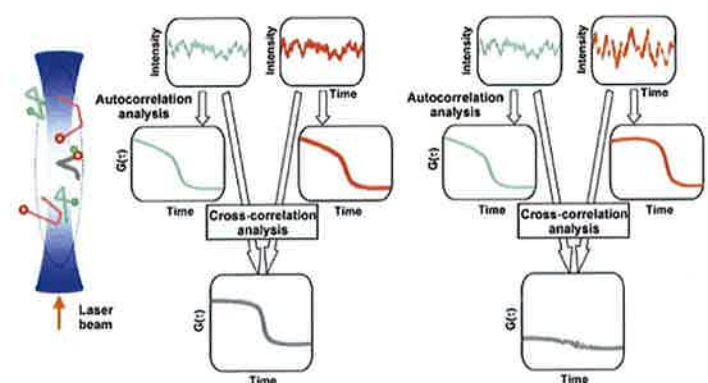
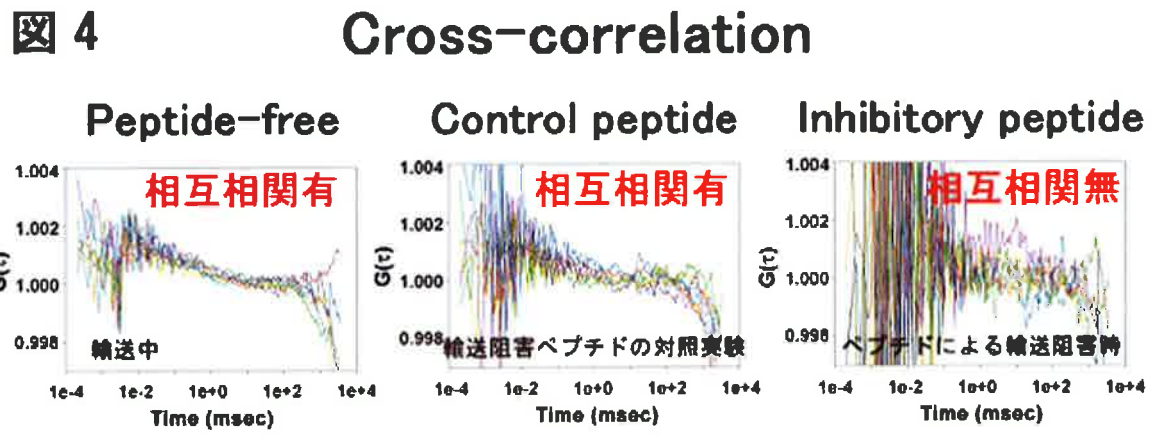


図3 蛍光相互相関分光法
 緑色標識分子と赤色標識分子の集光領域中の挙動と相互相関の関係について示す。左が両標識分子の結合が強い場合、右が弱い場合。

蛍光相互相関分光法は、蛍光信号が同期する頻度の高低を相互相関の程度で評価する手法である（図3-図に示すように、照射領域中の緑色標識分子と赤色標識分子の信号強度の時系列データ（上段）を同時に取得する。それぞれの自己相関を算出する（中段）。さらに両者間の相互相関を計算する（下段）。相互相関は、緑色標識分子と赤色標識分子の結合の程度を反映する形で現れる。）。

イカ巨大軸索中で輸送中の細胞質性蛋白質とシャペロン分子を、それぞれ異なる蛍光色素分子で標識し、両者の相互相関を計測したところ、弱いながらも明らかな相互相関信号が観察された。競合ペプチド断片を混入し、輸送を阻害した場合にはこの信号が消失し、シャペロン分子と細胞質性蛋白質との基質特異性の低い結合関係の会合、分離が、軸索内で観測可能であることが明らかとなった（図4）。シャペロン分子が細胞質性蛋白質の輸送に関与しているとする所見は、トランスジェニックマウスを使った別の実験系においても確認され、さらに研究を進展させて、キネシン複合体とシャペロン分子との結合領域が、膜器官と細胞質性蛋白質の輸送の振り分け機能をもっていることが判明するに至っている（投稿中）。



そこで蛍光相互相関分光法のセットアップを拡張する形で、新たに“蛍光信号強度時系列解析測光法”装置の開発に着手した。蛍光相互相関分光法では蛍光信号のノイズに含まれる生体システ

ムに関する情報を、相互相関関数で評価する際に一部棄却してしまう恐れがある。ノイズには、本来分子間の結合に関する空間的情報の他に分子間ネットワークの上流、下流を分ける時間的情報も含まれており、これを利用することで非特異的生体内分子間相互作用の観測を含めた新たな解析手法としての“蛍光信号強度時系列解析測光法”が創出できるのではないかと考えた。

“**蛍光信号強度時系列解析測光法**”による生体分子間相互作用の制御関係の観測可能性

“蛍光信号強度時系列解析測光法”のために、三つの異なる蛍光色素分子を同時に励起し、観測できるシステムを完成した(図5)。現在、同装置を用いて、通常の蛍光相関分光法や蛍光相互相関分光法による測定に加え、三色同時蛍光相関分光測定が可能な状態となっている。三種類の分子の会合状態を同時にモニターできる世界的にもユニークな装置であり、共同研究を含めて細胞生物学的実験・測定に進むべく準備中である。



図5 三色同時蛍光相関分光装置全景

この装置により得られた三色の蛍光信号強度の同時計測時系列データをもととして、生体分子間相互作用の制御関係の観測可能性を検討するために、まず多変量自己回帰モデルによる分析を行ったが、疎らな離散データを扱う方法としては適当ではないことが判明した。次に疎らな離散データを扱うのに使用される点過程分析法を適用した。この分析法では、時刻 t_0 で事象(光子)が観測される条件下で、時刻 $t_0 + t$ で事象(光子)が観測される確率(強度)を t の関数として表現する。

$$\lambda_0(t) = \text{Pr} \{ \text{時刻 } t_0 + t \text{ で観測} \mid \text{時刻 } t_0 \text{ で観測} \}$$

具体的には光子が n 個観測された際、 $n \times n$ の組合せで光子の到着時間の差の分布を調べる手法である。拡散の他、能動輸送等の運動、化学反応による増減、三重項等分子状態による蛍光の変化等をモデル化することにより、実際のデータを極めてよく表現することが可能で、商用の一般的な蛍光相互相関分光法装置と比較して、より短い測定時間で同等の測定パラメータを得ることに成功した。しかしながら、蛍光相互相関分光法では得られなかった分子間相互作用の制御関係を反映するパラメータは得られていない。このためには、蛍光相互相関分光法や点過程分析法以外に解析手法を考案する必要があり、現在も検討を続けている。

手法の細胞生物学的応用について

インビトロの実験段階にあり、時計遺伝子産物の反応時におけるパラメータ変化を利用して、上述の解析方法の検討を進めている。細胞内や生体中における応用の検討段階には未だ至っていないのが現状である。

3. 主な発表

論文

・ Terada et al. Alternative switching mechanism of slow/fast axonal transport by Kinesin-1 and glaucomatous optic nerve degeneration. Submitted.

招待講演

・ 寺田純雄、神経細胞における細胞質性蛋白質輸送（遅い軸索輸送）の分子機構、防衛医科大学校神経科学懇話会（2008年3月）

4. 受賞

受賞

・ 平成19年度上原記念生命科学財団研究推進特別奨励金受賞（2008年3月）