

研究課題別評価書

1. 研究課題名

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

2. 氏名

寺田 純雄

3. 研究のねらい

現代分子生物学において、生体システムはさまざまな機能分子(蛋白質や核酸など)によって構成される分子機械である、と考えられている。ゲノムプロジェクトの一応の終結をみた結果、機能分子群の種類や構成についてはある程度の知見が蓄積した。しかしながら従来の分子生物学的手法のみでは、個々の機能分子群の種類や構成に関するデータから直接生体システムの機能に迫るのは極めて困難である。最大の障害となっているのは、決して一様とはいえない機能分子間相互作用を計測、評価する手法が存在しないことである。

生体機能分子間相互関係には、酵素とその基質との間の相互作用や抗体と抗原との反応のように、特異性の高い強固なものも存在するが、全ての相互関係が、一対一の対応関係や線形結合に限定される訳ではない。シャペロン分子とその基質との相互作用にみられるように、機能分子間の非特異的な“弱い”相互作用が生体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。しかしながら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“弱い”ものから“強い”ものまで様々な分子間相互作用を生体内において観測できる実験系の確立を目指した。さらに次の段階として三者の生体分子の挙動の同時観察系を確立し、生体分子間相互作用ネットワークを測定する新規手法として“蛍光信号強度時系列解析測光法”を開発することを目標とした。これらの実験系を細胞生物学的な応用に展開することが最終的なねらいである。

4. 研究成果

生体内における分子間相互作用の観察系として蛍光相互相関分光法について検討を行った。実際に生体内において“弱い”相互作用を検出できるか、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、分離の観測を試みることにより検証した。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 1-左側は光路図、中央は照射領域を示す。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(右側上段)を同時に取得する。それぞれの自己相関を算出する(右側中段)。さらに両者間の相互相関を計算する(右側下段)。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。)。細胞内の局所における複数種の蛍光信号強度の同時計測時系列データから、標識分子間の相互作用の有無、強度に関する測定の可能性がある。

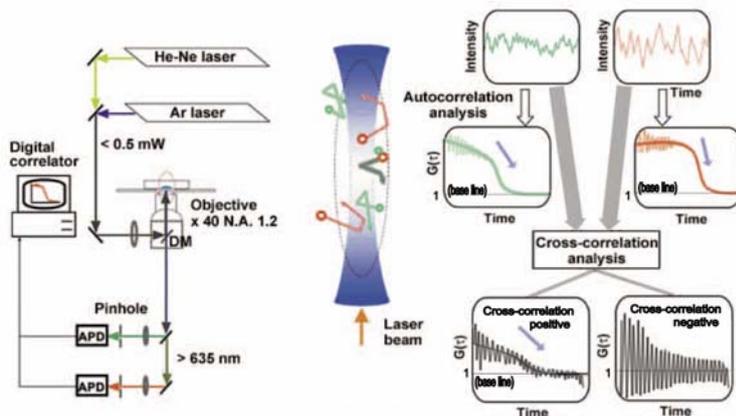


図 1

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)。



図 2

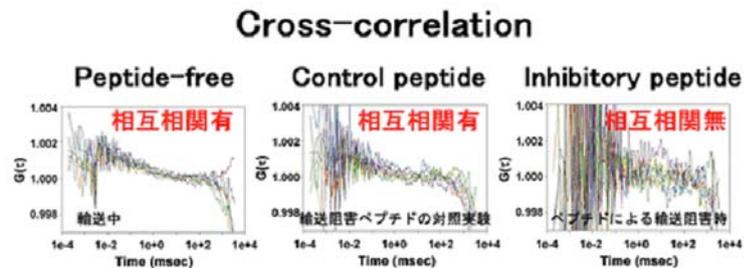


図 3

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。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 3)。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分子細胞生物学的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担っていることが判明するに至っている(投稿中)。これらの実験結果から、蛍光相互相関分光法は、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、分離の観測に成功していることが明らかになった。この種の生体内計測は、他の手法では実現困難であり、蛍光相互相関分光法測定装置の優れた応用可能性が示唆された重要な所見であると考えている。

生体分子間相互作用ネットワークを動的に測定するためには、三者の生体分子の挙動の同時観察系の確立が必要である。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、三色の蛍光分子由来の信号の同時観察系の開発を行った。試行錯誤の上、三色同時励起、観察が可能な蛍光信号強度測定システムとして新たな“蛍光信号強度時系列解析測光法”装置が完成した(図 4)。三色同時蛍光相関分光法システムとして使用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。現在、同装置を使用し、蛍光相関分光法を発展させた測定が行えないか、検討を続けている。

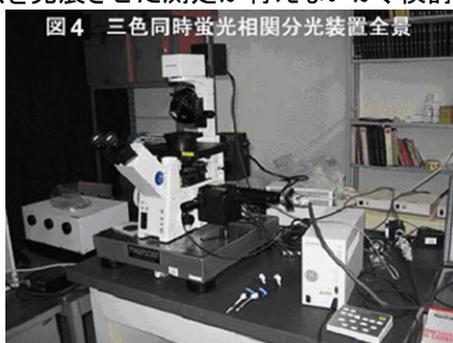


図 4 三色同時蛍光相関分光装置全景

また、この装置を用いて新たな解析法が創出できないかについても検討を続けてきた。一般に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が創出できるのではないかと考えた。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。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(投稿準備中)。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る、現在も検討を続けている。

最終的なねらいである細胞生物学的応用については、未だ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至っていない。

5. 自己評価

今般我々は、蛍光相互相関分光法により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、分離の観測に成功した。このことから蛍光相互相関分光法が、様々な分子間相互作用を生体内において観測可能な実験系であることが示唆された。次に三者の生体分子の挙動の同時観察系を確立した。装置構成上の問題点を解決し、マルチカラーの蛍光相互相関分光法装置として完成している。当初の目的は、この装置を利用して生体分子間相互作用ネットワークを測定する新規手法である“蛍光信号強度時系列解析測光法”を開発することであったが、この点に関しては目論見通りにはいかず、現在も検討を続けている。また新規手法が未完成であることから細胞生物学的な応用への展開もこれからの課題である。生体内分子間ネットワークの観測という最終目的に対しては未だ道半ばの状況であるが、観測結果の解析法についてはある程度検討が進んだ状況にあり、近未来的には将来的な方向性について目途がたつ可能性が高い段階にある。研究期間内に当初の目標を達成する成果を得るに至らなかった点は残念であり、目標の達成度としては五、六割との印象をもっているが、できるだけ早期に決着をつけたい。(研究者として独立した時期と重なり、研究室の立ち上げと並行しての研究遂行に苦心した三年間であったが、その中であって森島研究総括をはじめとする研究領域関係者の方々からのまさに物心両面にわたる御援助によって現在に至ったこと、深謝申し上げます。)

6. 研究総括の見解

生命現象解析法の未開発の一つとして複雑な生体分子間相互作用を観測する新規多(三)色同時励起蛍光相互相関分光法を試行錯誤の上開発したことは高く評価したい。基質特異性の低いタンパク質群の関わる複合体のインビトロにおける会合・解離についてのいくつかの実験例で検証している。まだ課題名に掲げられたような一般的な応用には多くの課題があるがそれらも解決に向かっている。細胞系や組織系での応用が大いに期待される。

7. 主な論文等

(A) さきがけ個人研究者が主導で得られた成果

(1) 論文(原著論文)発表 なし

(2) 特許出願 なし

(3) 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)

(4) 著書

・寺田純雄、小林靖 「神経解剖学の見方、考え方 神経系とは」 臨床神経科学 Clinical Neuroscience 27(1): 4-5, 2009

・小林靖、寺田純雄 「神経解剖学の見方、考え方 神経組織とは」 臨床神経科学 Clinical Neuroscience 27(2): 124-125, 2009

・小林靖、寺田純雄 「神経解剖学の見方、考え方 ニューロンーその概念の形成」 臨床神経科学 Clinical Neuroscience 27(3), 2009

(5) 学会発表

学会発表(国際)

・Hoshino M, Yamazoe S, Uesugi M, Terada S. Adhesamine, a newly synthesized chemical compound, is a very useful substrate for culturing mouse primary-cultured hippocampal neurons. The 48th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, San Francisco, December 13-17, 2008.

学会発表(国内)

・星野光伸、山添紗有美、上杉志成、寺田純雄 「新規有機化合物 adhesamine はマウス海馬神経細胞の初代培養用基質として有用である」 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会 神戸、2008年12月9日から12日

・星野光伸、山添紗有美、上杉志成、寺田純雄 「新規有機化合物 adhesamine はマウス海馬神経細胞の初代培養用基質として有用である」 第114回日本解剖学会総会・全国学術集会 岡山、2009年3月28日から30日

・寺田純雄、金城政孝、相原一、武井陽介、廣川信隆 「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」 理化学研究所シンポジウム 蛍光相関分光で見る生体系の情報伝達(6) Communication in biosystems as observed by fluorescence correlation spectroscopy (FCS) Part 6 埼玉、2009年3月27日

(6) 招待講演

招待講演(国内)

・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)

(B) その他の主な成果

(1) 論文(原著論文)発表

論文(国際)

・Hori H., Ozeki Y., Terada S., Kunugi H. Functional near-infrared spectroscopy reveals altered hemispheric laterality in relation to schizotypy during verbal fluency task. Prog.

Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry 32:1944–1951, 2008.

(2)学会発表

学会発表(国内)

・堀弘明、永岑光恵、曾雌崇弘、岡部繁男、寺田純雄、金吉晴、功刀浩「統合失調症 型人格傾向と語流暢課題遂行中の前頭前野賦活パターン: NIRSによる検討」第31回日本神経科学大会(Neuro2008) 東京、2008年7月9日から11日