

# 研究終了報告書

## 「三次元光散乱顕微鏡による一分子プロテオミクス」

研究期間：2019年10月～2023年3月

研究者：金水縁

### 1. 研究のねらい

人間の遺伝子の中には約 2 万種類のタンパク質にあたる遺伝情報が含まれているが、同じ遺伝情報を持っている細胞でも様々な内・外部因子によってタンパク質の発現が制御される。したがって、発現されたタンパク質の種類と量は細胞の種類や状態によって変動し、その網羅的な解析は細胞の機能と現状を理解する上に非常に重要である。しかし、核酸は PCR によって目的とするもののみを増幅できるが、タンパク質は増幅ができないため、高感度でタンパク質を検出できる新しい手法が求められてきた。

近年、一分子レベルでの質量分析を目指し、干渉光顕微鏡法 (G. Young et al., Science (2018)) やガラスナノ流路を利用した顕微撮影 (B. Spackova et al., Nat. Meth. (2022)) が報告されている。光散乱強度は体積に依存することを利用し(注:タンパク質の質量は体積に比例する)、標的分子からの散乱光とガラス基質の反射光からなる干渉光をイメージングし、様々なタンパク質の質量分析を行った。このような報告から、散乱光を効率的に観察できる顕微鏡ができれば、各タンパク質分子に対する豊富な情報を得ることができると思い、本研究の提案に至った。

本研究では、一分子感度でタンパク質の定量・定性分析ができる三次元光散乱顕微鏡の開発し、高感度プロテオーム解析に使用できる新しい分析技術を提案する。我々は、三次元一分子蛍光観察ができる独自の光シート顕微鏡(以下、PISA 顕微鏡)を利用し、今まで様々な一分子蛍光イメージングを利用したバイオ分析法を開発してきた。特に、PISA 顕微鏡の独自の光学系により、照射光を効率的に除去した状態で一分子イメージングができる。PISA 顕微鏡により得られた散乱光の強度と波長から、タンパク質の質量、タンパク質を構成する化学結合の種類、標識したタンパク質の発現量を、一分子レベルで調べることができると考えた。これらのタンパク質分子に関する豊富な情報を用い、質量分析などの従来技術では測定が困難であった微量試料中でのプロテオーム解析を行う。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究では、一分子感度でタンパク質の定量・定性分析ができる三次元光散乱顕微鏡の開発し、高感度プロテオーム解析に使用できる新しい分析技術の提案を目的とした。

一つ目の成果は、三次元散乱光撮影に特化した新しい顕微鏡(次世代 PISA)の開発である。次世代 PISA は、既存の顕微鏡の撮影時より約  $10^3$  倍弱い照射光(数 mW)および画像処理をしないままでも直径 26-nm ポリスチレン(PS)ビーズを明瞭に撮影できる。

なお、既存の PISA 顕微鏡にイメージング分光器を導入し、ラマンスペクトルの測定から一粒子分光イメージングまで行える顕微鏡システムを構築した。タンパク質溶液を用いた比較実験から、市販の共焦点ラマン顕微鏡より高感度・高速でラマンスペクトルが取得できることを判明し、今後、汎用的な高感度ラマンイメージング装置としての PISA 顕微鏡の可能性を見いだせた。

二つ目の成果は、開発した顕微鏡による一分子タンパク質の測定である。新たに構築した次世代 PISA を利用すると、一部のタンパク質の一分子イメージングができることを確認し、既存の PISA 顕微鏡より検出感度が約 5 倍以上向上したことがわかった。今後、次世代 PISA の最適化により、確実に検出限界が向上する見込みである。

三つ目の成果は、本手法の原理検証に最適な生命現象の選定である。細胞実験の結果、遺伝子発現のリプログラミングが起きる現象では SDS-PAGE でもその変化を追跡できる程、タンパク質発現が大きく変化することを確認した。その中、iPS 細胞の心筋細胞への分化過程は、その分化が比較的速く、分化前後の確認も容易であることから、本研究の原理検証のモデル系として適していると考えた。本分析技術の確立次第、iPS 細胞の一細胞実験に進行する予定である。

## (2) 詳細

### 研究テーマ1「三次元光散乱顕微鏡の構築」

#### (1) 一分子レイリー散乱光イメージングを目指して

はじめに、研究室で一分子蛍光観察用として使用している PISA 顕微鏡(以下、PISA2号機)を用い、レイリー散乱光イメージングが定量的に行えるかについて調べた。その原理検証として行ったポリスチレン(PS)ビーズを用いた実験では、直径 26 nm から 132 nm までの PS ビーズをビーズごとイメージングでき、その散乱光の強度が直径の約 5.7 乗に比例することを確認した(図1)。これは、レイリー散乱光の強度は粒子の直径の 6 乗に比例するといった理論値と一致する。つまり、PISA 顕微鏡の光学系は、1粒子の散乱光イメージングと同時にその大きさ( $\propto$ タンパク質の質量)を測定できることが示唆された。

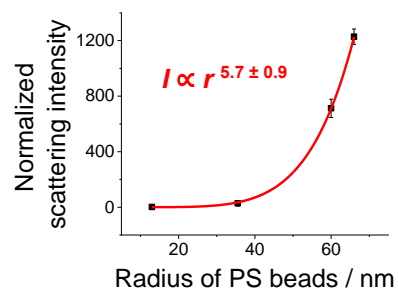


図1 PS ビーズの大きさと散乱光強度の関係。PISA 顕微鏡の光学系は、1粒子の散乱光イメージングと同時にその大きさ( $\propto$ タンパク質の質量)を測定できることが示唆された。

同時に、最新の光学部品を取り入れた PISA 顕微鏡(以下、次世代PISA)の設計および構築を行った。4年次であるつい最近(2022年10月)、次世代 PISA の構築がほぼ完了し、簡単な散乱光測定を行える状態となった。予備実験の結果、次世代 PISA は PISA2号機の性能を大きく上回ることがわかった。一例として、PISA2号機では直径 26-nm PS ビーズのレイリー散乱光イメージングに 2 W での照射およびバックグラウンドを除去するための複数の画像処理が必要であったが、次世代 PISA では以前問題となった反射光によるバックグラウンドが大幅抑えられ、数 mW での照射および生画像でもビーズを明瞭に撮影することができた。

#### (2) PISA 顕微鏡によるラマン散乱光の分光イメージング

ラマンイメージングによりイメージングされた物体が標的物質かどうかを確認するためには、そのラマンスペクトルを測定することが必須である。したがって、PISA2号機に分光器を導入し、汎用的なラマンスペクトル測定から、一粒子の分光イメージングまで可能な顕微鏡システムの構築を図った。その結果、ACT-X 研究の3年次に、分光器を傾けなくても三次元分光イメージングができる PISA 顕微鏡システムを完成した。

その後、PISA 顕微鏡による分光イメージングの性能評価を行った。Rhodamine800 色素溶液を入れた petri dish を観察すると、表面から数百マイクロメートルの上部までのラマンスペクトルが取得でき、異なる材料の化学組成を調べられることを確認した。また、比較実験から、市販の共焦点ラマン顕微鏡より高感度・高速でタンパク質溶液のラマンスペクトル測定ができることが判明した。

#### **研究テーマ2「一分子感度でのタンパク質定量・定性分析」**

次世代 PISA を利用し、タンパク質分子の散乱光イメージングに挑戦した。その結果、一部のタンパク質の一分子イメージングができることを確認した。レイリー散乱光の強度は体積( $\propto$ 質量)の二乗に比例することを考えると、次世代 PISA は PISA2 号機より検出感度が約 5 倍向上したことが示唆された。

#### **研究テーマ3「三次元光散乱顕微鏡による一細胞プロテオーム解析」**

本テーマは、今まで研究代表者が確立してきた一細胞タンパク質試料作製法を利用し、散乱光イメージングによる一細胞プロテオーム解析を行う内容である。しかし、技術基盤の準備が遅れたため、ACT-X 研究の終了時まで実践的な一細胞プロテオーム解析への応用は難しいと予想する。その代わりに、顕微鏡装置の準備が整え次第に一細胞プロテオーム解析に進行できるように、原理検証実験に最適な生命現象の模索を行った。

散乱光イメージングからは個々のタンパク質分子の質量を調べられるため、各タンパク質の質量とその発現量の情報が取得できる。つまり、レイリー散乱光による質量イメージングからは、タンパク質発現量の全体的、かつ、究極な変化を伴う生命現象が解析対象として相性が良いと考えられる。ACT-X 研究の 3~4 年次の 1.5 年間、様々な生命現象に対し全タンパク質の発現量変化を調べた。その結果、遺伝子発現のリプログラミングを伴う現象(例:がん細胞や iPS 細胞の分化過程)では SDS-PAGE でもその変化を追跡できる程、全体的なタンパク質発現が大きく変化することを確認した。その中、iPS 細胞の心筋細胞への分化過程は、その分化が比較的速く(約 2 週間)、分化前後の確認も容易であることから、本研究の原理検証のモデル系として適していると判断した。

### 3. 今後の展開

ACT-X 研究終了後 1 年以内に、次世代 PISA の最適化を終わらせ、当顕微鏡の真の検出限界を求め。一分子散乱光イメージングを応用した本分析技術が確立すれば、将来、質量分析・免疫染色より高い感度でのプロテオーム分析が必要な時、第 3 の選択地として有効であると期待する。

最後に、PISA 顕微鏡が科学研究全般に普及できるように、光学系の改良・改善を行う。これから次世代 PISA の最適化が進めば、今まで検出できないと知られていた様々な小分子の動きを撮影できる可能性が高い。1902 年、限外顕微鏡の発明により、アインシュタインのブラウン運動理論が実験的に検証できた(注:溶液中のコロイド粒子を観察、1925 年ノーベル化学賞)。その後、限外顕微鏡を使用した研究が 2 件のノーベル賞の受賞につながったように、新しい顕微鏡の発明は現代科学の発展に大きく貢献できる。私は PISA 顕微鏡にもその可能性があると信じている。今後、非染色分子の散乱光イメージングに挑戦し、溶液中にある分子の性質や挙動を調べられる顕微鏡法として展開していきたい。

## 4. 自己評価

## ・達成状況

ACT-X 研究の 4 年間、本研究の最も重要な成果である次世代 PISA を構築し、一部のタンパク質に対してレイリー散乱光による一分子イメージングに成功した。また、散乱光に関係した新たな研究テーマの構想や一細胞プロテオミクスの実施に向けての準備を行うことができた。

## ・研究の進め方

研究成果のほとんどが 4 年次に得られた。振り返ってみると、ACT-X 研究の最初の 2 年間は、ライフスタイルの変化に自身を合わせながら、効率的な研究の進め方を探る時間になったと自評する。試行錯誤の繰り返しだった 2 年間だったが、その間に得られた経験と知見をもとに、4 年次に研究を一気に進展させた。

## ・研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果

本研究で開発した次世代 PISA は、今まで測定不可であると知られてきた様々な分子に対して非染色撮影が可能となり、化学や物理現象の検証にも使用できると期待する。

また、本顕微技術によるプロテオーム分析法は、今後、質量分析・免疫染色より高い感度でのプロテオーム分析が必要な時、第 3 の選択地として有効であると期待する。次世代 PISA の光学系を小型化や重り分子の開発により、医療現場で簡単に一分子感度のバイオアッセイを行えるようになると、難病の早期診断に役立つと考える。

## 5. 主な研究成果リスト

## (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 0 件

## (2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件(特許公開前のもも含む)

## (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. (受賞) 2021 年 1 月、第 41 回日本光医学・光生物学術奨励賞 生物・化学領域  
「Single Molecule Fluorescence Gel Electrophoresis for Single Cell Proteome Analysis」
2. (招待講演) 2021 年 12 月、Pacifichem2021、オンライン  
「Ultrasensitive proteome analysis realized by 3D single-molecule imaging」
3. (招待講演) 2021 年 12 月、第 41 回キャピラリー電気泳動シンポジウム、福岡市  
「一分子蛍光電気泳動法の開発」
4. (招待講演) 2021 年 11 月、第 59 回日本生物物理学会、オンライン  
「3D single-molecule imaging-based bioanalyses towards single-cell proteomics」