

バイオイメージング・微量検体検出のための 新規蛍光プローブ技術-POLArIS法-

国立大学法人東京医科歯科大学
神経機能形態学分野 寺田純雄

知財担当：産学連携研究センター 美王宏之
mio.tlo@tmd.ac.jp

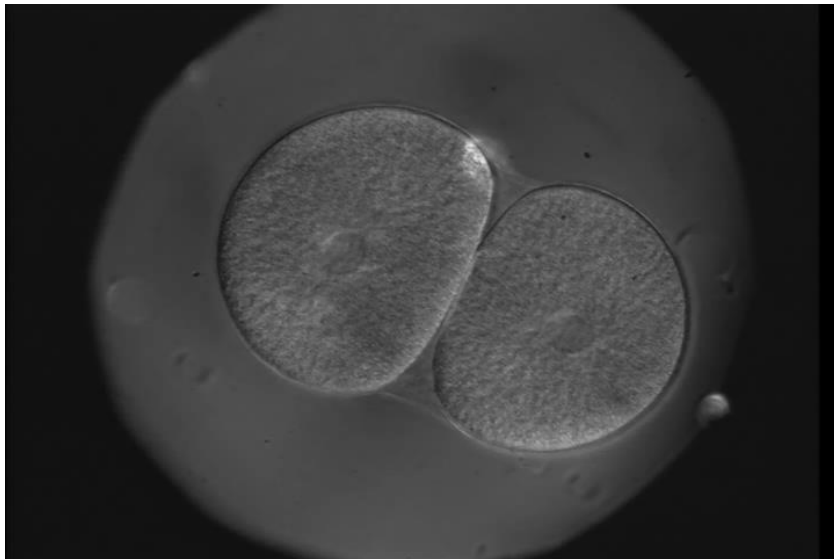
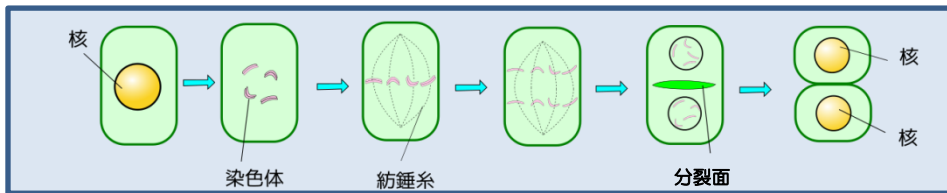
産連担当：オープンイノベーション機構 小川行平
ogawa.tlo@tmd.ac.jp



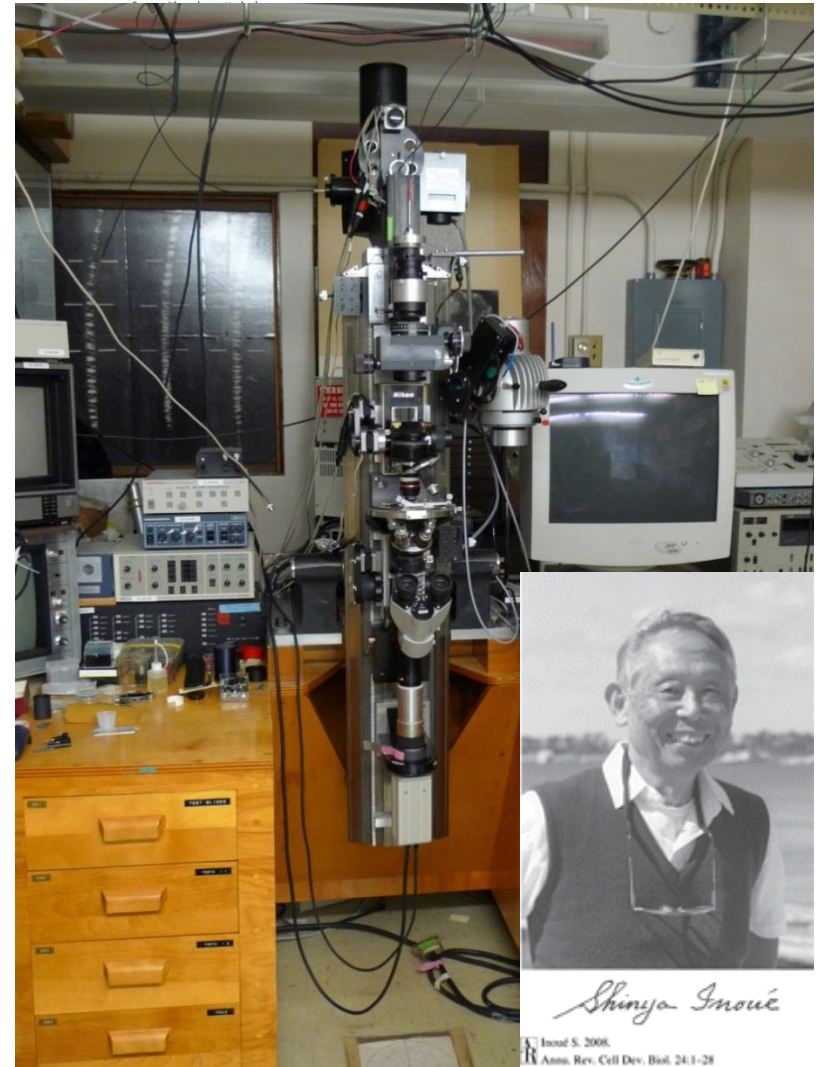
偏光顕微鏡 (透過光)

偏光顕微鏡の有用性

光学的分解能を越えた、分子の配向に関する情報が得られる (透過光で紡錘体の微小管が見える！)



利用例: 細胞分裂時の染色体の分離
ウッズホールMBL 井上信也



蛍光偏光顕微鏡とバイオイメージング

蛍光の性質とバイオイメージング等への利用

- 蛍光強度
- 蛍光スペクトル
- 蛍光寿命
- 蛍光偏光

○ 蛍光強度の利用

様々な蛍光顕微鏡、蛍光相関分光法

○ 蛍光スペクトルの利用

Förster共鳴エネルギー移動、スペクトラルアンミキシング

○ 蛍光寿命の利用

細胞内環境センサー、自家蛍光除去、gated 誘導放出抑制

● 蛍光偏光の利用

計測のための基盤技術は確立しているが、利用は限定的

蛍光偏光顕微鏡では、蛍光偏光を利用することで

蛍光分子の方向情報が取得可能

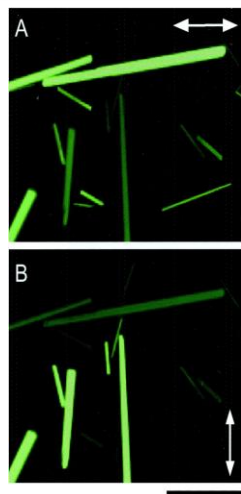
分子の方向の観察・ライブでの観察・広い視野、メソスケールでの観察

電顕では不可能

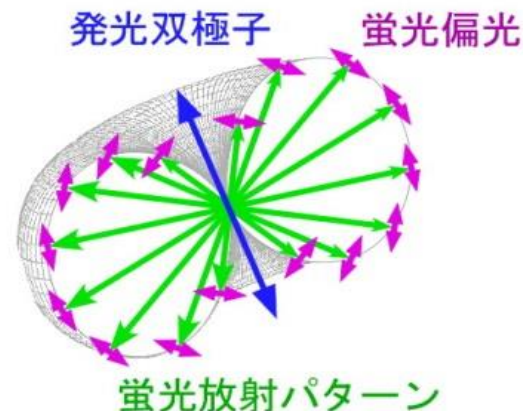
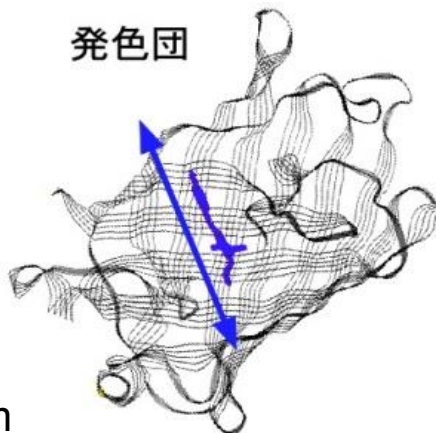
緑色蛍光タンパク質 (GFP)の蛍光偏光と蛍光偏光顕微鏡

GFPの蛍光偏光

GFPはその構造に対して一定方向の**蛍光偏光**を示す
Shinya Inoué et al. :*PNAS* **99**, 4272-4277, 2002

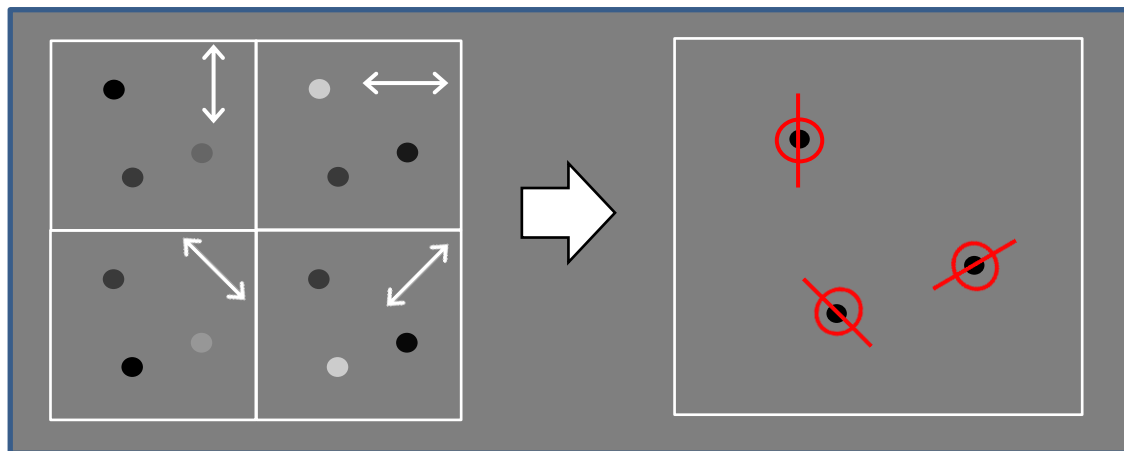
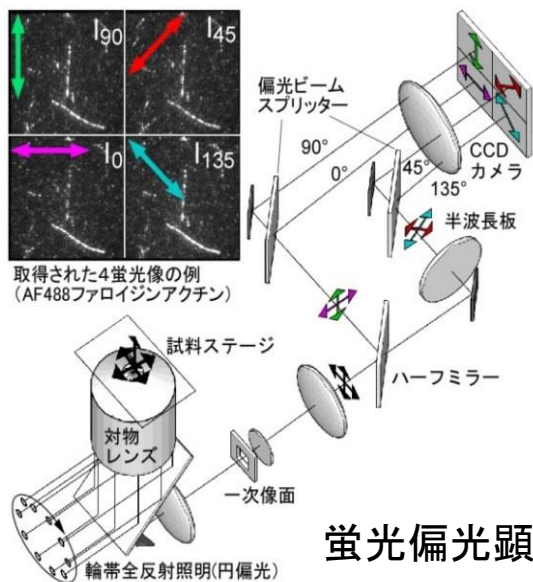


GFP結晶の偏光による観察
スケールバー: 30 μm



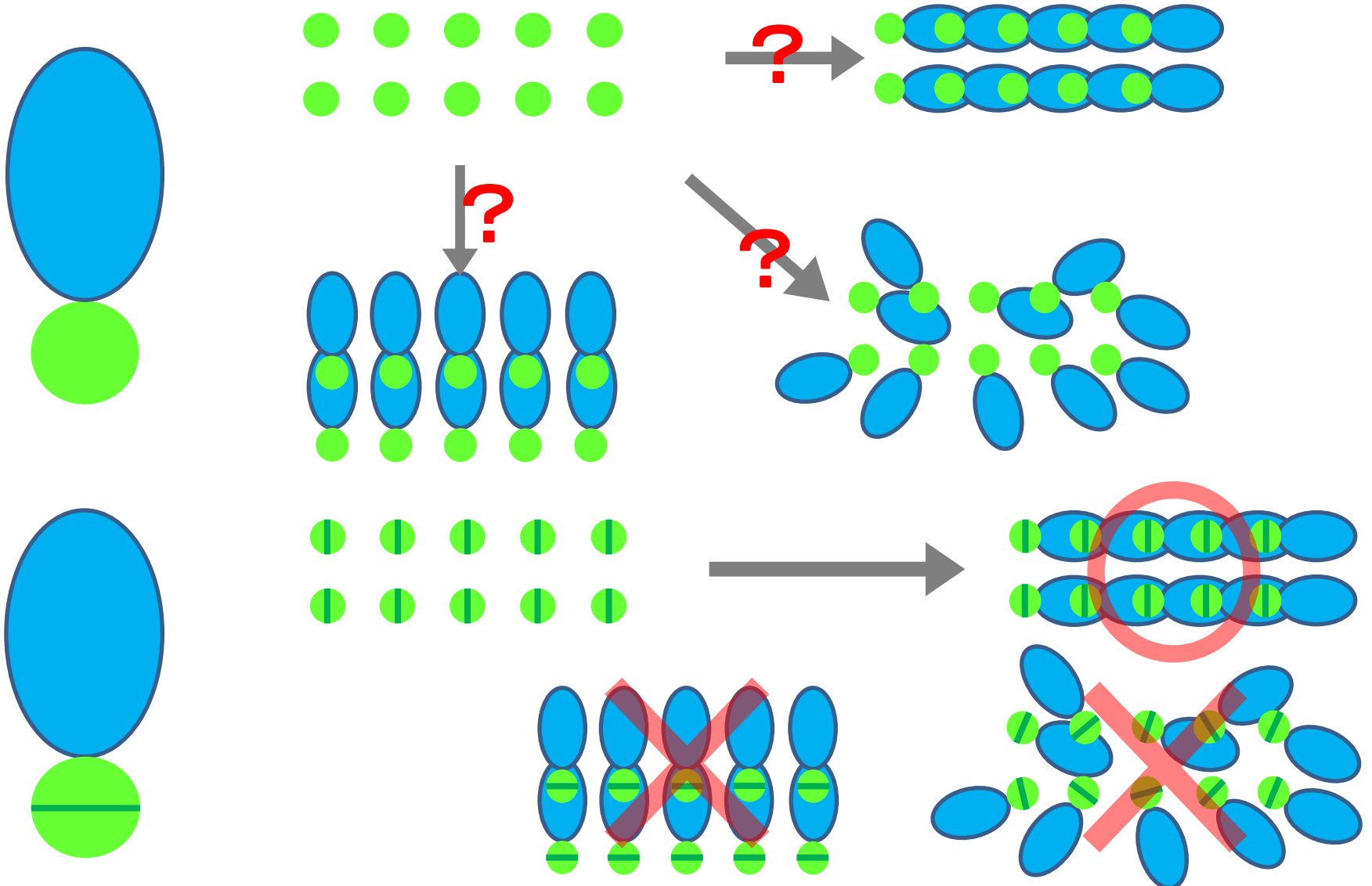
蛍光偏光顕微鏡の有用性

偏光方向から標識した**分子の方向**が分かる



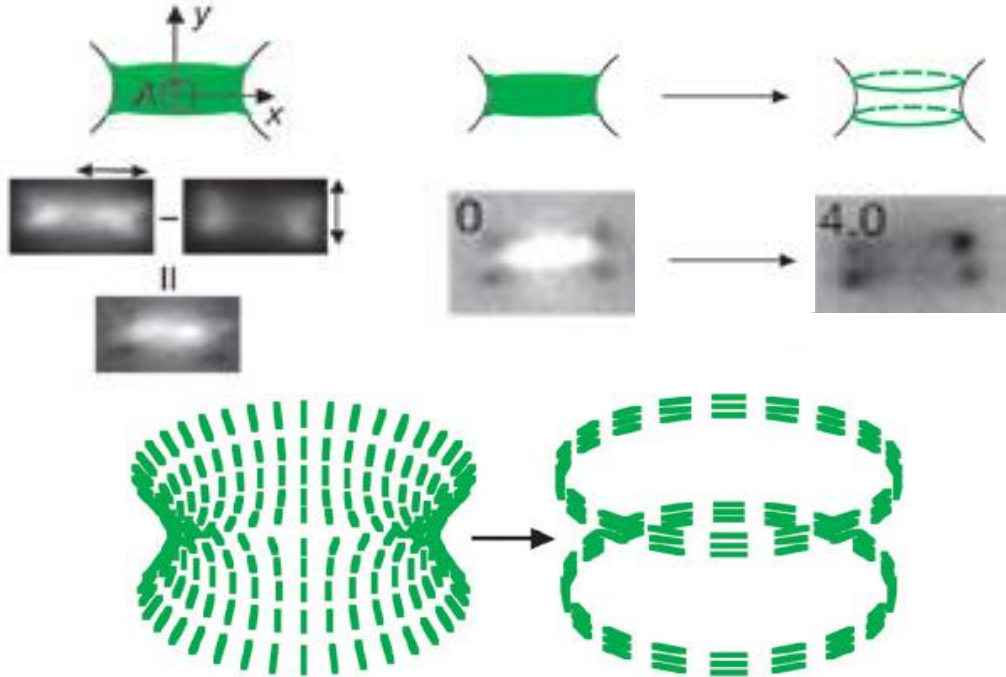
蛍光偏光顕微鏡の一例(産総研 谷研究室の四分岐系)

蛍光偏光顕微鏡観察で何がわかるか？

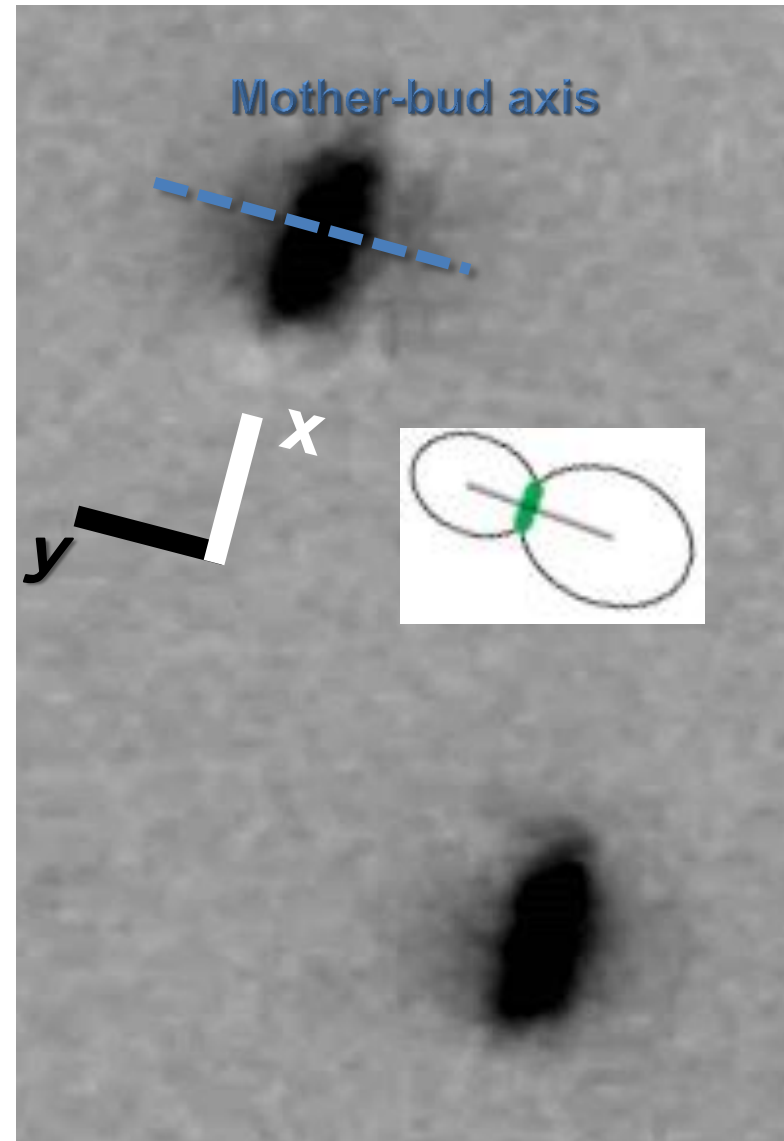


蛍光偏光顕微鏡観察の成功例

利用例: 酵母の細胞質分裂のときのセプチン分子の向きの変化の観察



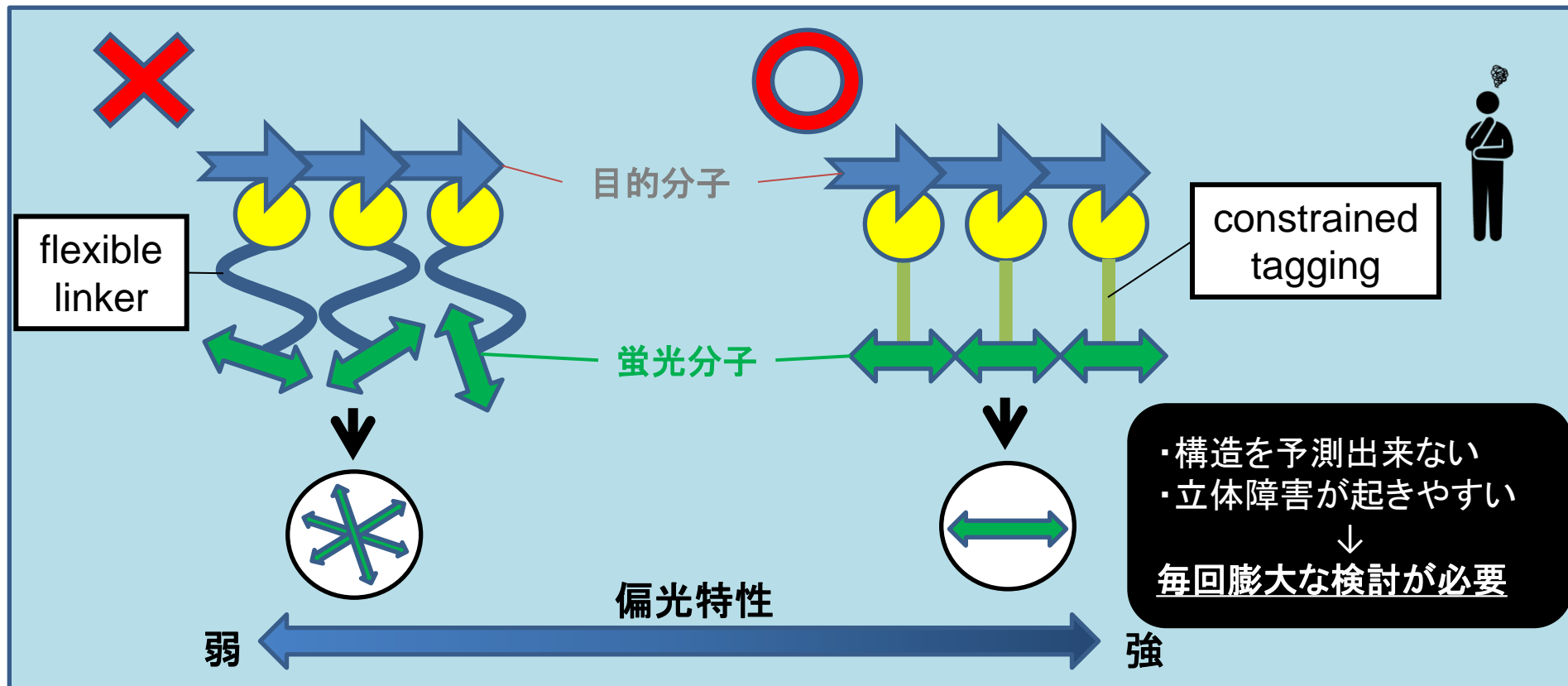
➡ 蛍光標識されたセプチン分子の向きの観測から
実時間下に細胞骨格動態の基本過程を解明できる！



POLArIS法とは (1)

蛍光偏光顕微鏡観察のための標識法

蛍光偏光タグは被標識分子と「固く」結合していなければならない
= constrained tagging

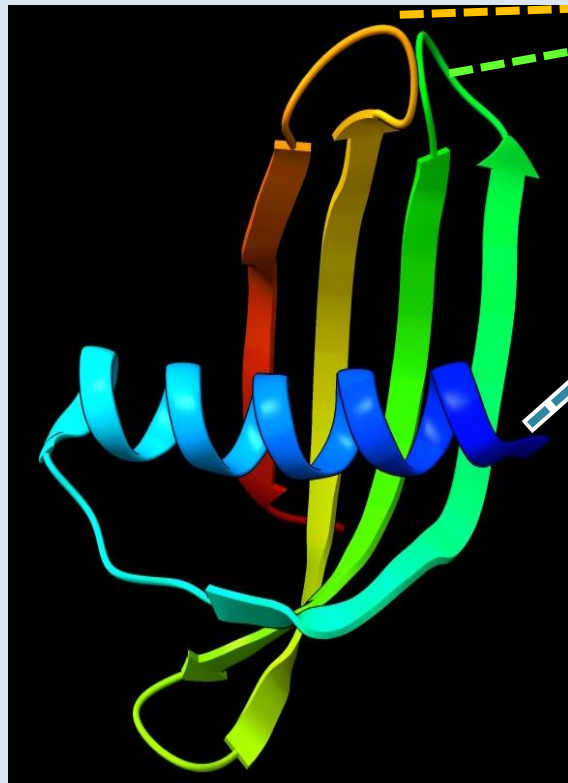


POLArIS法とは (2)

汎用的蛍光偏光プローブPOLArISの構築

⇒抗体様小分子の一つであるAffimerを利用する

- 様々な標的に強く(解離定数nMオーダー)で結合
- サイズが小さい(~12.1K)
- 構造の安定性が高い($T_m \cong 101^\circ\text{C}$)

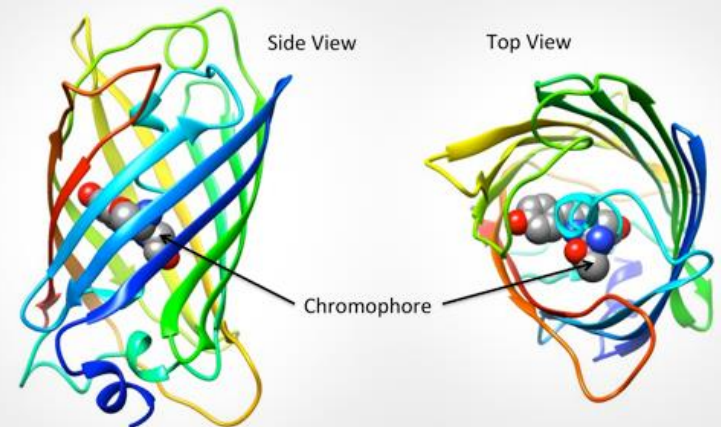


標的結合部位

ファージディスプレイ法により
特定の標的分子につく
もの取得可能

N末端

α ヘリックスが露出

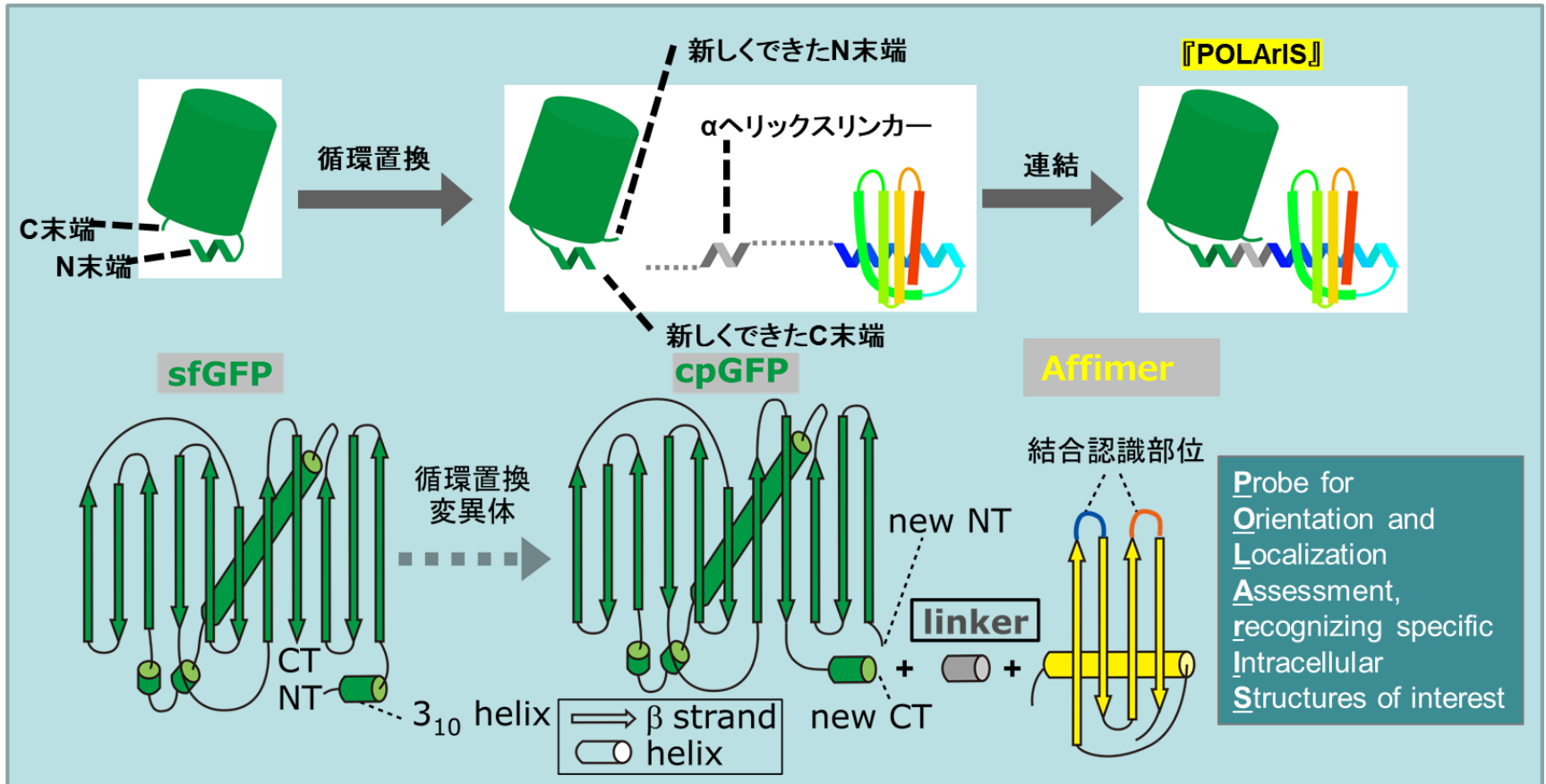


GFPのN末端は3.10ヘリックス
被標識分子の α ヘリックスに連続さ
せる形で挿入できればconstrained
となることが期待できる
⇒ SeptinはC末が α ヘリックスで
幸運なケース

POLArIS法とは (3)

汎用的蛍光偏光プローブPOLArISの構築

GFPの循環置換体がAffimerと「固く」結合した融合タンパク質を設計
Affimerを足場として様々な標的に「固く」蛍光標識が可能



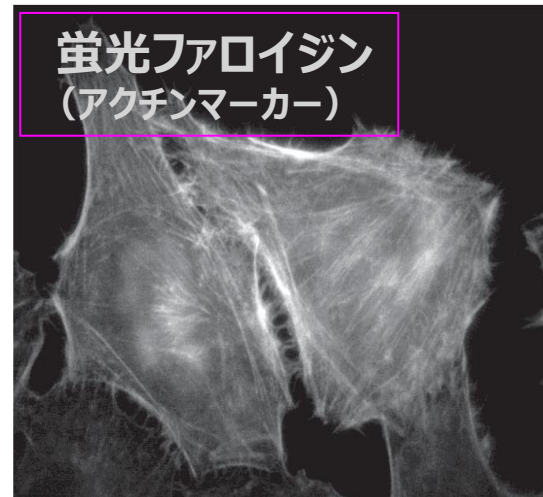
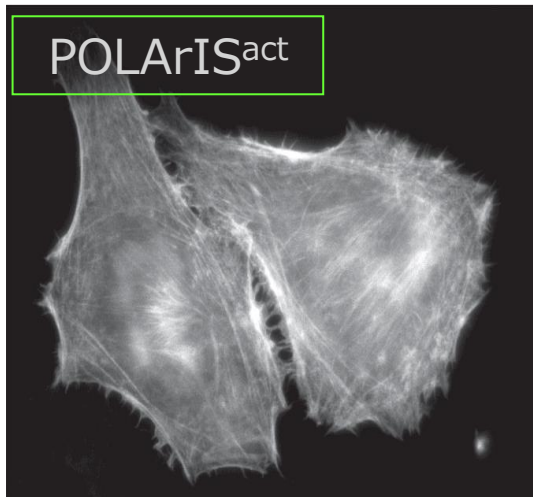
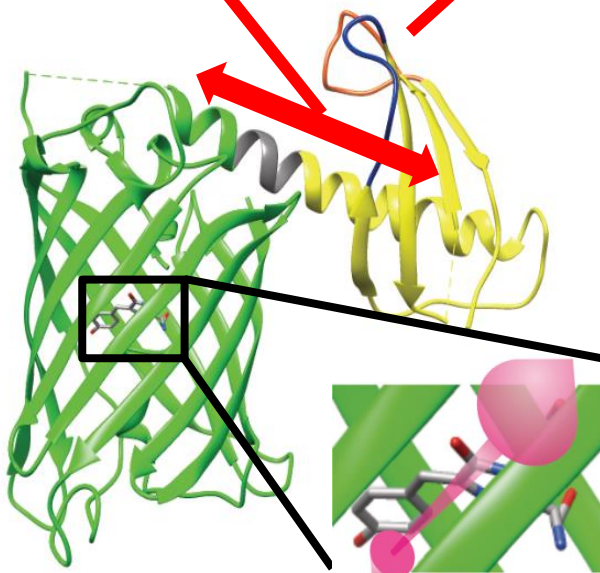
POLArIS法とは (4)

F-アクチンに結合するPOLArIS^{act}

POLArISの 結晶構造

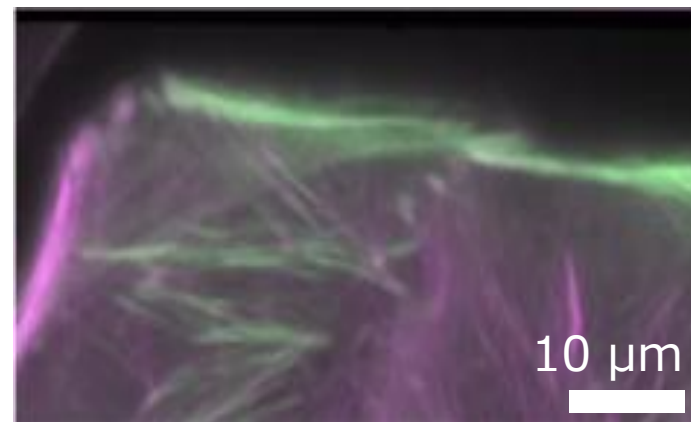
一連の α ヘリックス
になっている！

標的結合部位と
蛍光タンパク質は
互いに干渉しない
配置



横偏光
←→

縦偏光
↑↓

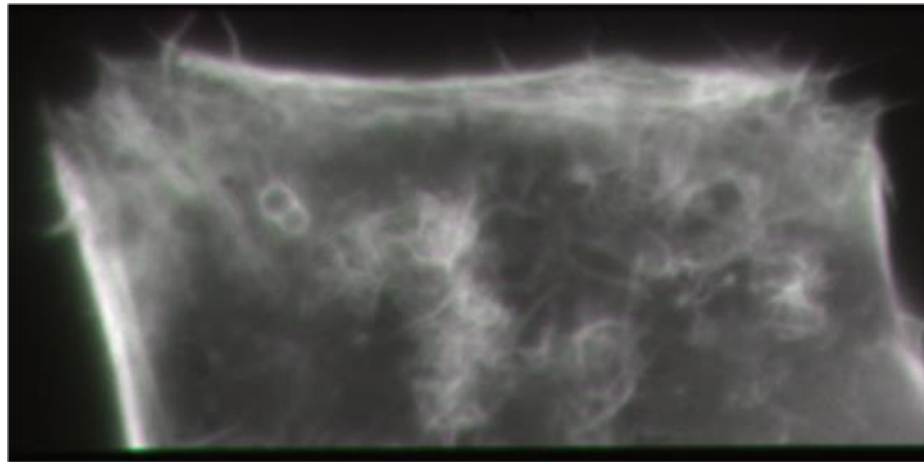


HeLa細胞にPOLArIS^{act}を発現させ蛍光偏光顕微鏡で観察

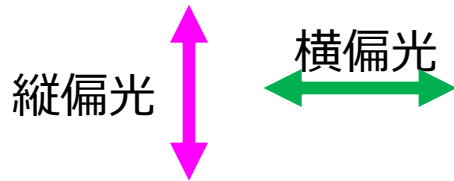
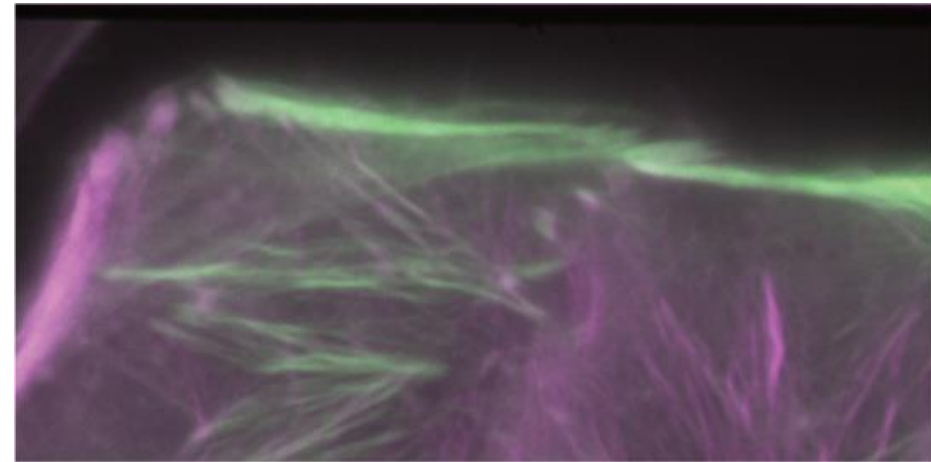
POLArIS法とは (5)

通常の標識法による 蛍光偏光顕微鏡観察例

(cpGFPとAffimerをflexible linkerで結合)



POLArIS法による 蛍光偏光顕微鏡観察例(前掲) (POLArIS^{act})



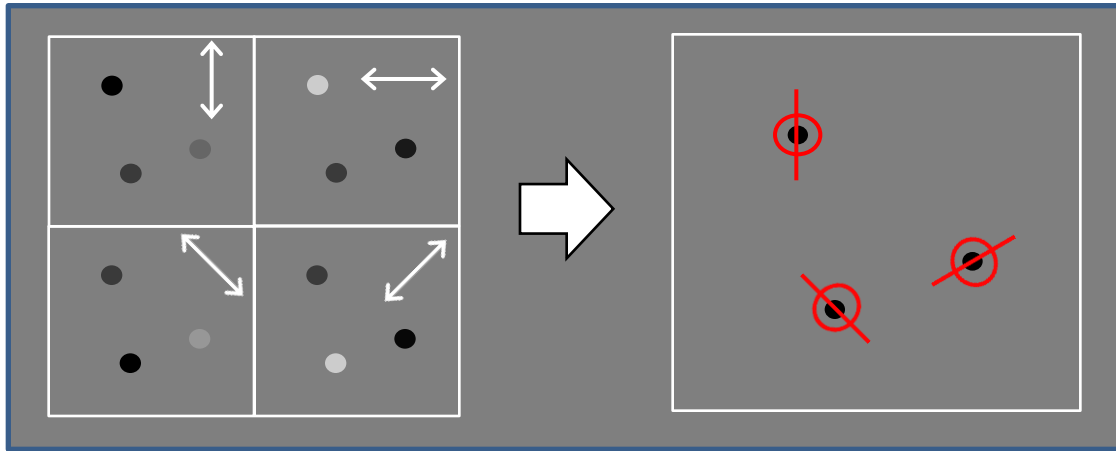
いずれもHeLa細胞に発現させ観察

10 μ m

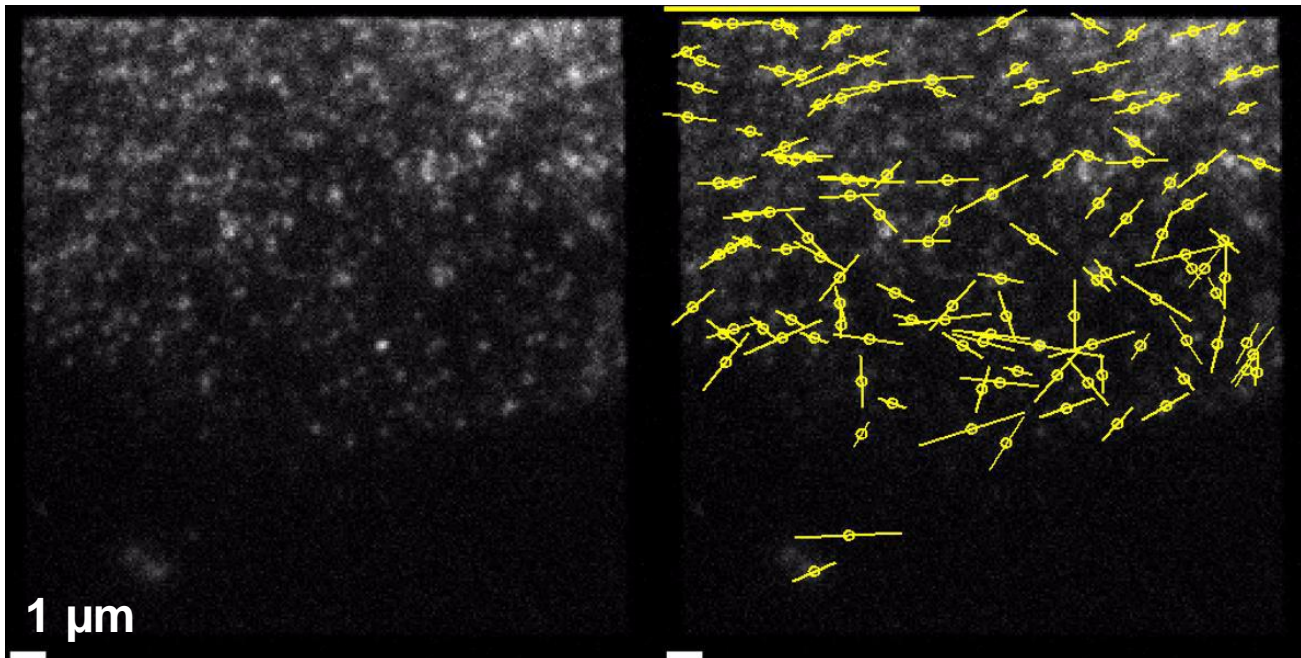
通常の標識法では、縦・横偏光の画像が一致し、F-アクチンの向きによる強度変化(蛍光異方性)が観測されない(マゼンタ色と緑色が重なり、白色にみえる)
POLArIS法ではF-アクチンの向きに応じた強い強度変化が観測できる

POLArISによる1分子観察

偏光方向の計測から標識した1分子の向きがわかる



0、45、90、135度の4つの異なる偏光軸をもつ偏光板を通して、蛍光1分子を同時に観察
偏光軸の方向による輝点の明るさの大小から蛍光1分子の向きを計算(前掲)

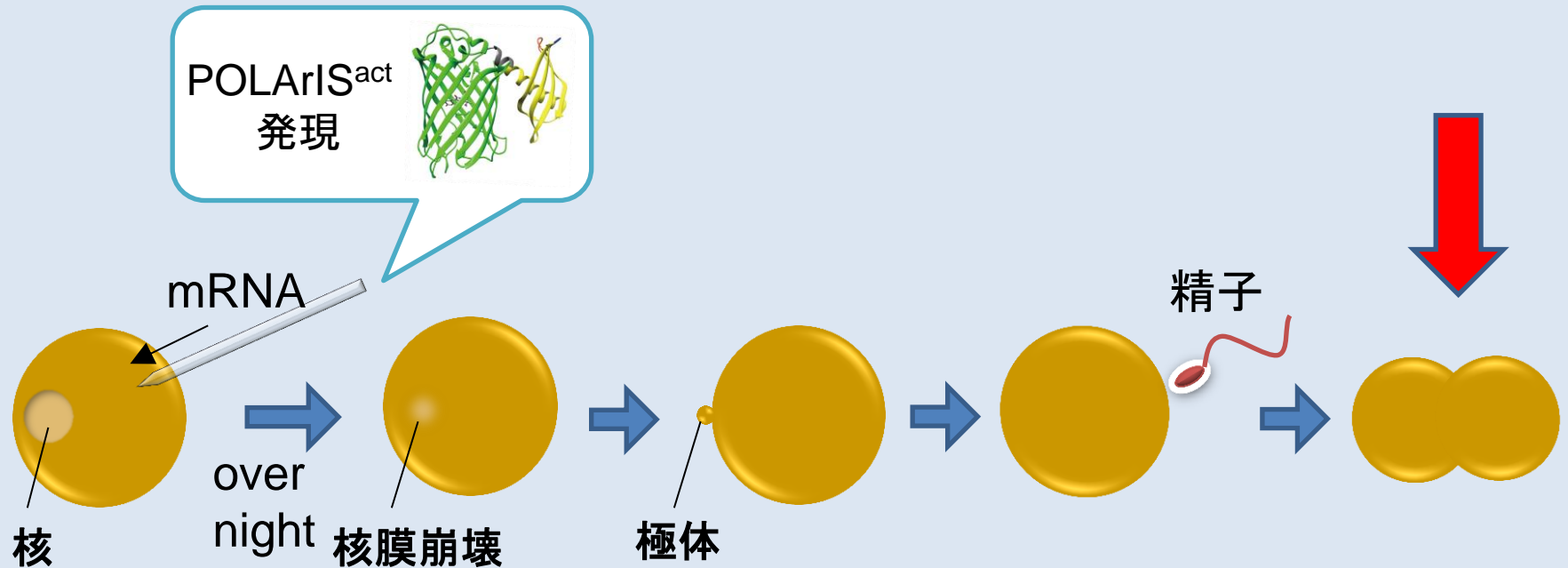


培養細胞における
1分子観察例
(XTC細胞辺縁の
アクチン動態)

POLArIS^{act}の応用 (1)

ヒトデ卵母細胞 (受精後) 卵割の蛍光偏光顕微鏡での観察

イトマキヒトデ卵母細胞におけるアクチン蛍光偏光観察



mRNA
インジェクション

1-MA(ホルモン)処理

極体放出

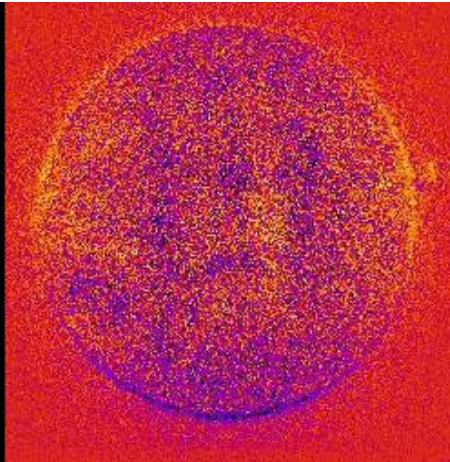
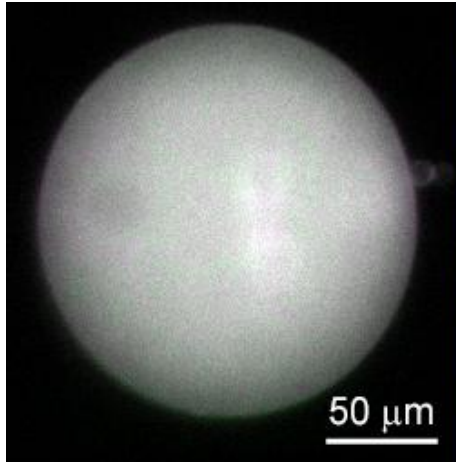
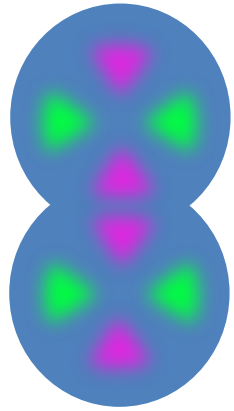
受精

卵割

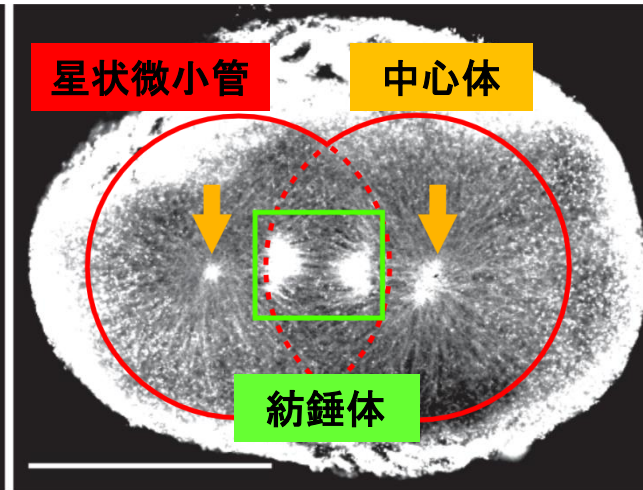
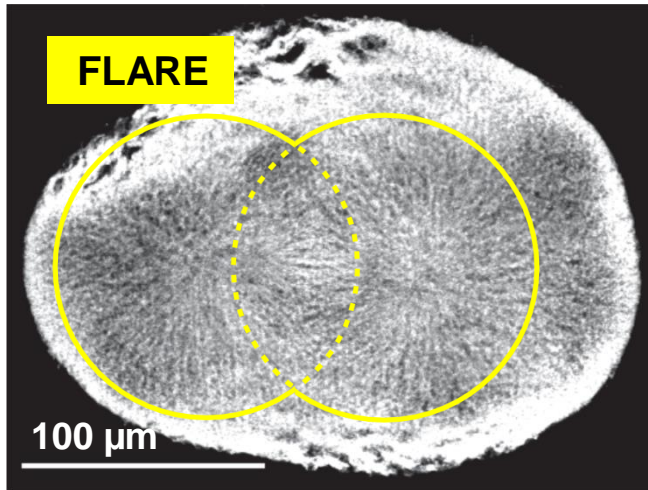
蛍光偏光顕微鏡観察

POLArIS^{act}の応用 (2)

ヒトデ卵母細胞 (受精後) 卵割の蛍光偏光顕微鏡での観察



Sugizaki et al. : *PNAS* 118, e2019071118, 2021



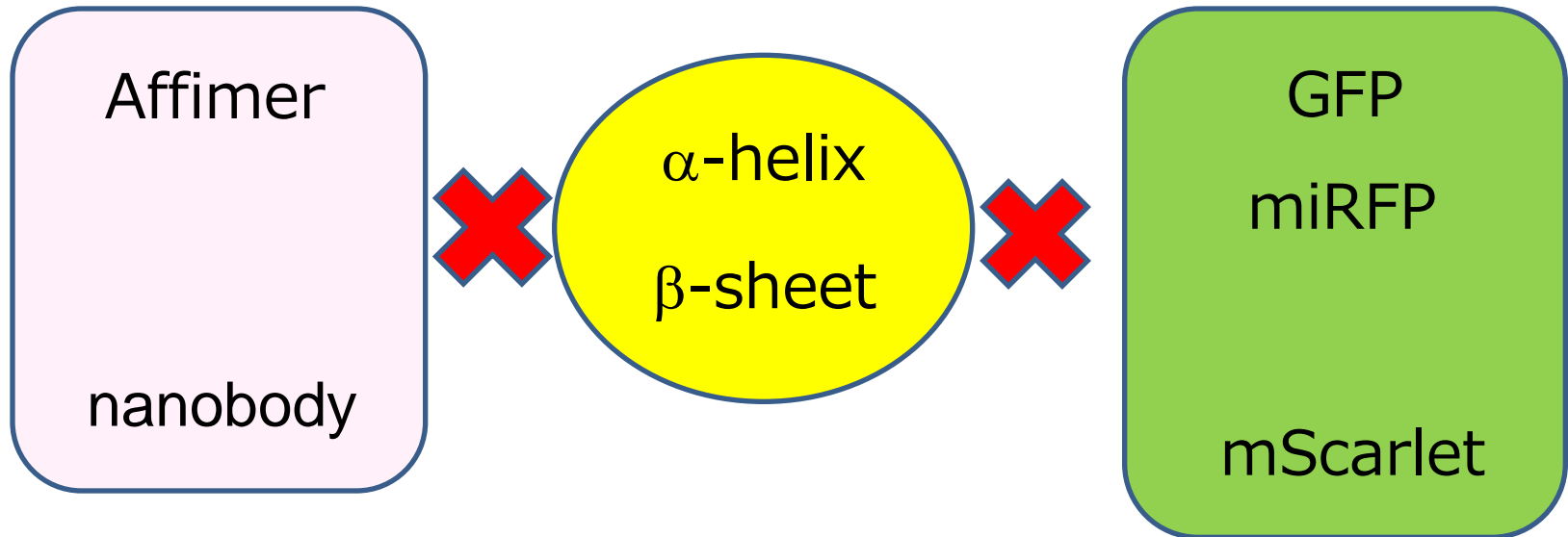
分裂のたびに中心体から放射状に広がるアクチン重合体構造の消長が繰り返されていることを世界で初めて発見
「フレア構造」と命名

POLArISの種類の特長

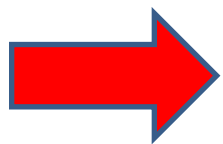
バインダ

リンカーの構造

蛍光分子（代表例）



- ・Affimer以外に複数種のバインダが使用可能 (animal immune libraryも利用可能)
- ・複数種のリンカーにより多様なつなぎ方が可能
- ・複数種の蛍光分子により複数の標的分子の多色同時観察が可能

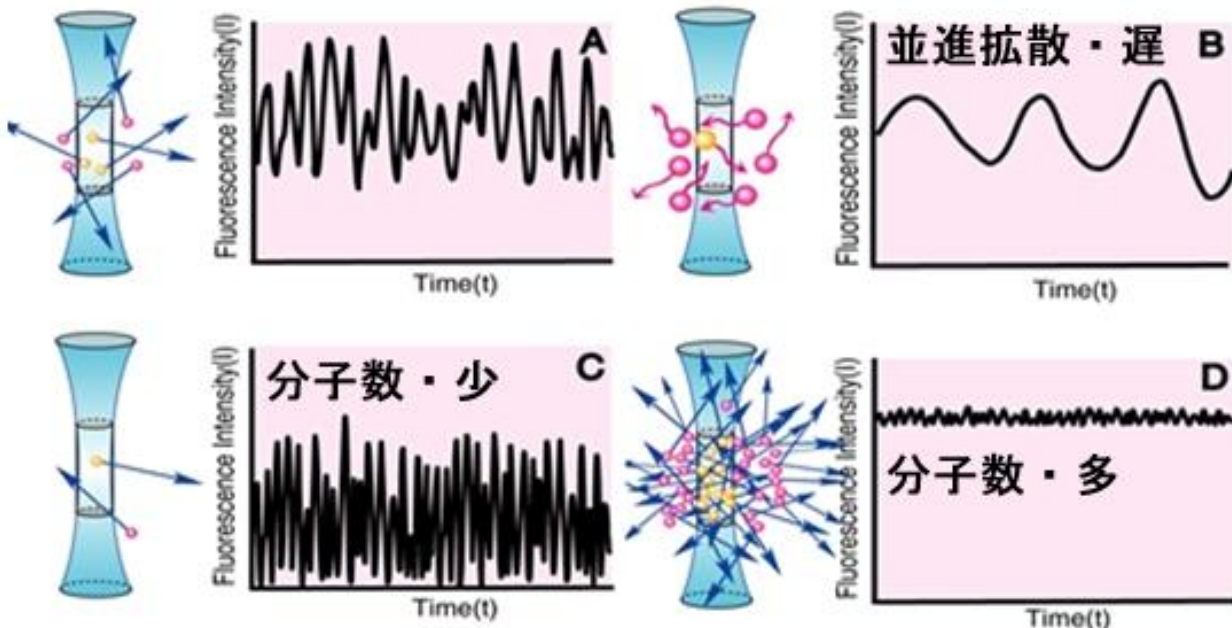


多種多様なPOLArISプローブを設計、調整可能
レパートリーが広い！

蛍光相関分光法FCS（蛍光1分子計測）の原理

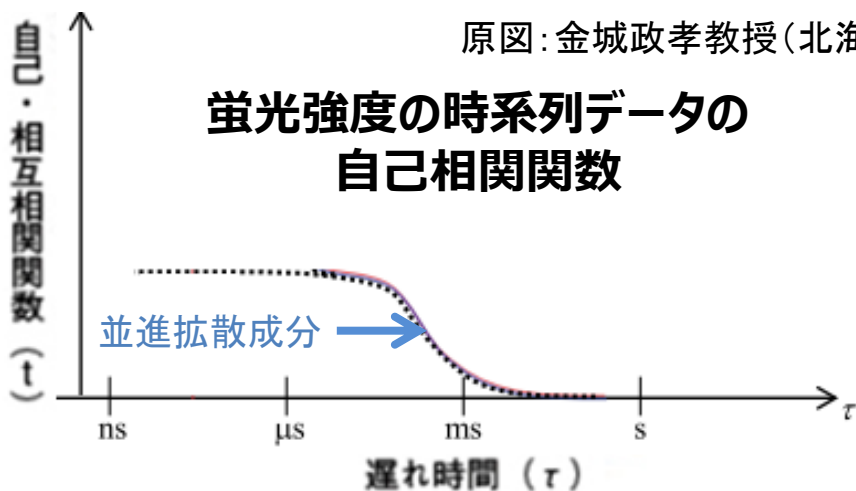
蛍光強度の揺らぎ方の計測から拡散の遅速が推定できる

焦点領域に出入りする蛍光分子と蛍光強度の揺らぎ



原図: 金城政孝教授(北海道大)

蛍光強度の時系列データの自己相関関数



原理

ゆらぎのはやさ

・・・分子の形、大きさ

⇒ **並進拡散** を反映

ゆらぎの大きさ

・・・**分子数** を反映

微量かつ希薄な
溶液中で測定

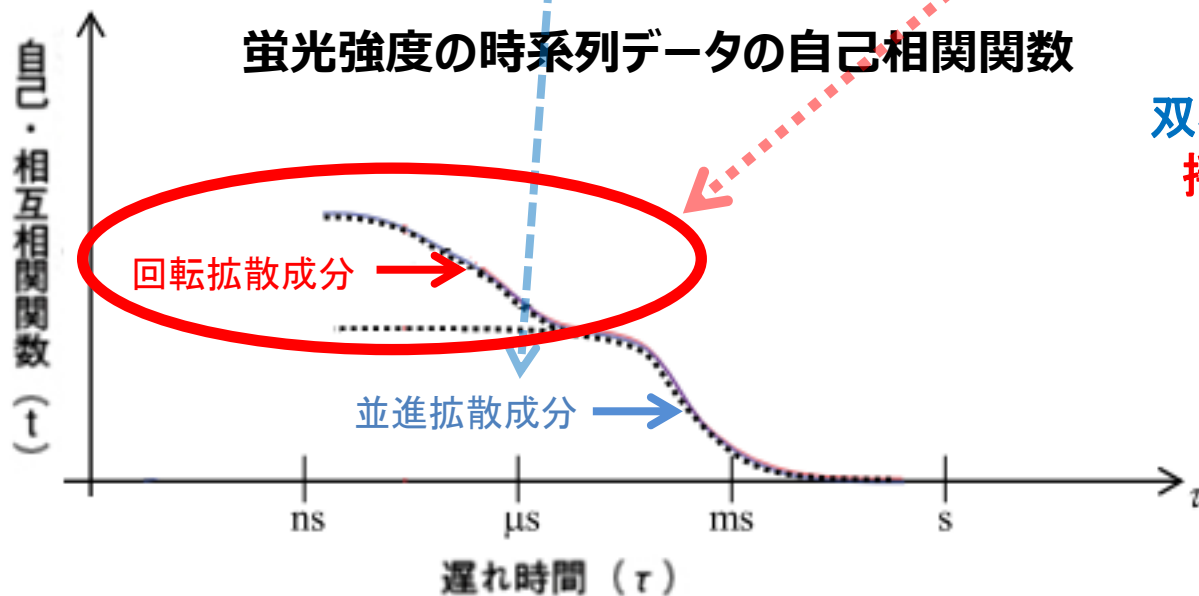
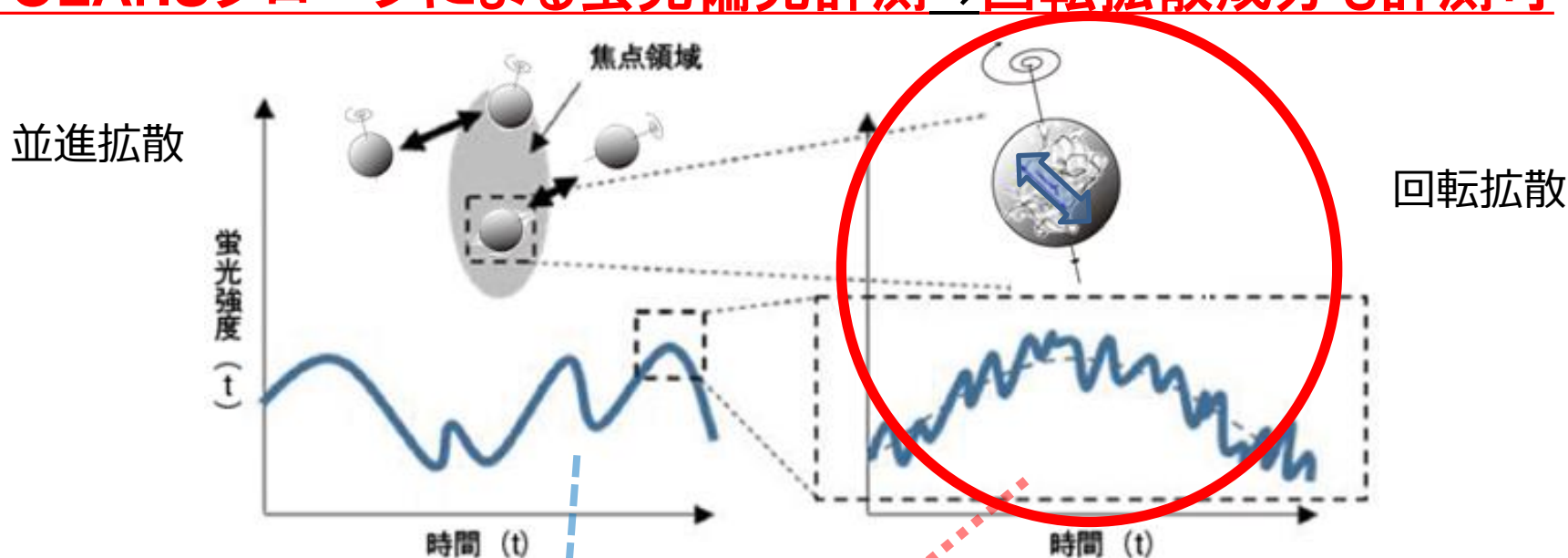
濃度μMの溶液ℓ中に
存在する分子数

⇒約600個

並進拡散と分子数は
自己相関関数により評価

POLArIS法による蛍光相関分光法の拡張 (1)

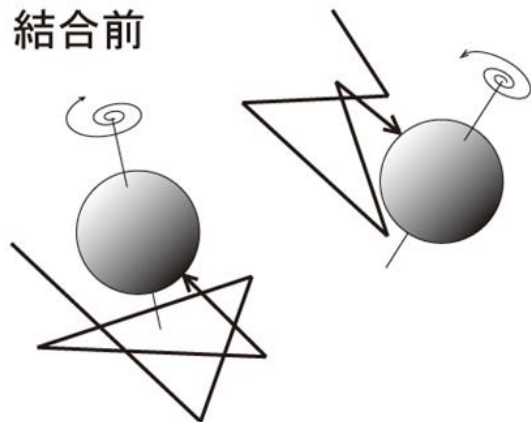
POLArISプローブによる蛍光偏光計測⇒回転拡散成分も計測可



偏光計測により
双極子モーメントの回転が
揺らぎとして観測される

POLArIS法による蛍光相関分光法の拡張 (2)

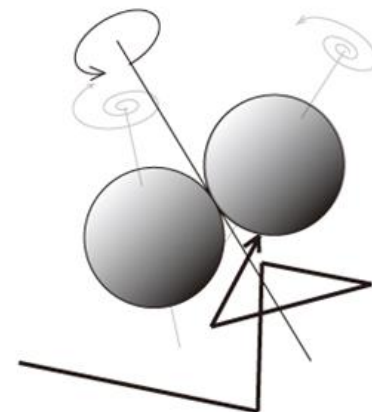
結合前



分子間結合



結合後



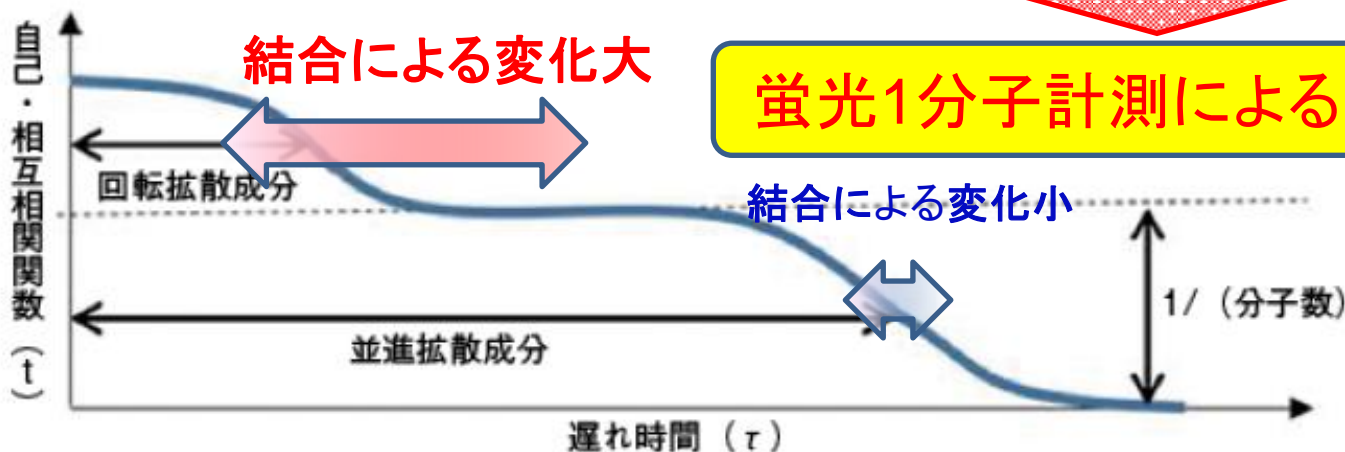
並進拡散 変化小

回転拡散 変化大

標的分子に強く結合する蛍光プローブにより、標的分子の検出を目指す場合
通常の蛍光相関分光法（並進拡散成分のみ計測）では、プローブとの結合による
並進拡散の変化が小さいため、結合の検出は困難


POLArIS法による偏光蛍光相関分光法では

回転拡散成分が**1分子レベルでプローブとの結合を鋭敏に反映**、大きく変化



蛍光1分子計測による超高感度検体検出

類似・関連技術との比較

類似・関連技術	特徴	欠点	POLARIS法偏光FCS
<p>蛍光相関分光法FCS</p>  <p>Zeiss社 ウェブ ページより</p>	<p>並進拡散の変化が大きい場合相互作用検出可能</p>	<p>× 通常変化は小さく、実際には感度が低い</p>	<p>○ 回転拡散利用で高感度化、広帯域化</p>
<p>蛍光異方性計測装置</p>  <p>HORIBA社 ウェブ ページより</p>	<p>高濃度の場合異方性検出可能</p>	<p>× 低濃度(1分子レベル)では計測不能、定量不可 × 細胞内計測不能</p>	<p>○ 1分子レベルで定量的検出が可能 ○ 細胞内で計測可</p>
<p>量子ロッド、ナノダイヤモンドによる蛍光標識</p>  <p>Sigma社 ウェブ ページより</p>	<p>標識できれば強い偏光信号を長時間計測可能</p>	<p>× 被標識分子に向きを揃えて結合させることは極めて困難 × 被標識分子の細胞内への導入が煩雑、困難</p>	<p>○ 任意の分子に「固く」向きを揃えて標識可能 ○ 遺伝子にコードさせる形で細胞内導入は容易</p>
<p>表面プラズモン共鳴法 反射型干渉分光法 水晶振動子マイクロバランス法 等温滴定型熱測定法</p>  <p>GEヘルスケア社 ウェブ ページより</p>	<p>相互作用の各種動的パラメータが取得可能</p>	<p>× 多量の検体が必要で1分子レベルでは計測不能 × 細胞内計測不能</p>	<p>○ 1分子レベルで定量的検出が可能 少量の検体で計測可 ○ 細胞内で計測可</p>

POLArIS/蛍光相関分光法を用いた微量検出の目標

島津製作所は質量分析による血中A β 関連ペプチドの測定システムを販売、アミロイドPET検査やCSF検査に代わるシステムとして期待される

C2N diagnostics社も同様の受託検査を開始、Quanterix社は高感度ELISAプラットフォームとしてSimoa Bead Assay技術を発表、同様の高感度バイオマーカー検出を標榜

⇒**微量検出技術**として**これらの諸技術の検出水準を目指す**



AMIMA
Permormance CL
島津製作所



Simoa® HD-X
Quanterix

POLArISによる偏光蛍光相関分光法によれば、同等の高感度計測を、より**安価な装置**で、より**安価な経費**で、より**容易かつ短時間の測定**で実現可能
ELISAと同様、多様なバイオマーカー検出に使用可能な**汎用性**も**特長**

共同研究における役割分担

東京医科歯科大学の役割

- ・企業実用化のサポート

企業に期待する役割

- ・偏光を利用する蛍光顕微鏡/蛍光相関分光測定装置の実用化
(顕微鏡メーカー、診断機器メーカー等)
- ・POLArIS法を用いたバイオマーカー・薬剤等測定・スクリーニングシステム
(診断薬メーカー、診断機器メーカー等)

特許： PCT/JP2020/007568

今後の展開例

