

階層的な細胞内分子ダイナミクスの時空間分解計測法の開発

京都大学 大学院理学研究科 助教 中曽根 祐介

1. はじめに

生命現象は、生体分子の構造変化や分子間相互作用が時間的・空間的に連鎖することで成り立っている。タンパク質や核酸などの生体高分子は、単に静的な構造体として存在しているのではなく、熱揺らぎの中で絶えず構造を変化させ、周囲の分子や細胞内環境と相互作用している。例えば、タンパク質の局所的な側鎖配向変化、ドメインの開閉運動、分子間会合・解離、さらに液-液相分離や線維状集合体形成のような高次な集合反応は、互いに異なる時空間スケールで進行する。これらの反応は独立に起こるのではなく、局所的な構造変化が高次構造変化を誘起し、それが分子間相互作用や集合状態の変化へとつながる場合が多い。

したがって、生命現象を分子論的に理解するためには、原子・分子レベルの反応だけでなく、細胞内の微小環境において分子がどのように動き、どのように相互作用し、どのように集合状態を変えるのかを階層的に捉える必要がある。特に近年、細胞内では膜をもたない分子集合体や凝縮体が重要な役割を担うことが明らかになりつつあり、生体分子の構造変化と運動性変化を細胞内で直接計測する技術の重要性が高まっている。

一方で、従来の計測法にはそれぞれ限界がある。バルク溶液を対象とした分光法は、高い時間分解能と感度を有し、生体分子の反応過程を詳細に追跡できる。しかし、測定対象は試料全体の平均情報であり、細胞内や微小領域に存在する局所的な分子環境の違いを区別することは難しい。これに対して、蛍光顕微鏡法は細胞内の空間情報を得るうえで優れているが、分子の並進拡散や回転運動

といった運動性を高速かつ定量的に測定することは容易ではない。特に、反応の進行に伴って分子の拡散係数や回転運動がどのように変化するかを、細胞内の特定領域で時間分解的に追跡する手法は限られている。

そこで本研究では、生体分子の階層的なダイナミクスを時空間分解能をもって計測するため、独自の顕微分光法の開発に取り組んだ。具体的には、分子の並進拡散や反応に伴う拡散係数変化を検出できる過渡回折格子法 (Transient Grating, TG 法) と、分子の回転運動や局所的な揺らぎを検出できる高速蛍光偏光解消法 (High-speed Fluorescence Depolarization, HS-FDP 法) を顕微鏡システムへ導入した。これにより、細胞内や微小領域における生体分子の構造変化、分子間反応、運動性変化を相補的に解析できる計測基盤の構築を目指した。

2. 方法

2.1. 過渡回折格子法 (TG 法)

過渡回折格子法では、二本の励起パルス光を試料上で交差させ、光の干渉によって周期的な励起パターンを形成する。干渉縞の明部では分子が選択的に励起され、励起分子からの熱放出、吸収スペクトル変化、部分モル体積変化などにより、試料中に周期的な屈折率変調が生じる。この屈折率変調は一時的な回折格子として働くため、別途導入したプローブ光を回折させる。得られた回折光の時間変化を解析することで、分子反応に伴う熱、体積変化、拡散過程を高感度に検出できる (Fig. 1)。

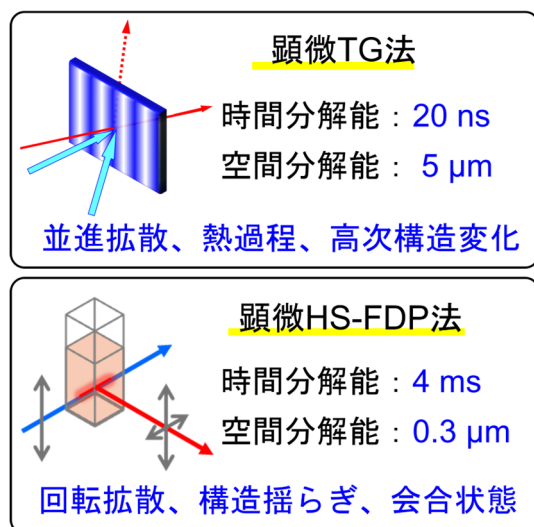


Fig. 1 顕微 TG 法と顕微 HS-FDP 法の原理図と得られる情報。両手法を組み合わせることで、細胞のような微小空間における分子運動性を相補的に計測できる。

TG 信号は、熱拡散や分子拡散によって時間とともに減衰する。この減衰過程は、形成された空間変調が時間とともに消失する過程を反映している。そのため、TG 信号の時間変化から分子の拡散係数を短時間で決定することができる。また、光反応に伴ってタンパク質の高次構造変化や分子間会合・解離が起こる場合には、反応前後で分子の大きさや形状が変化し、それに伴って拡散係数も変化する。TG 法では、この拡散係数変化を時間分解で追跡できるため、分子反応の進行を「分子の動き」の変化として直接捉えることができる (Fig. 1)。

従来の TG 法は、主にバルク溶液中での測定に最適化されており、高い時間分解能と感度を有する一方で、空間分解能は限定的であった。そのため、細胞内やマイクロ流路内のような微小空間で局所的な反応を測定することは困難であった。本研究では、顕微鏡光学系と TG 法を組み合わせ、測定スポットを微小化することで、空間分解能を

高めた顕微 TG 法の開発を進めた。特に、励起光とプローブ光の集光条件を制御することで、十分な信号強度を確保しながら、試料への光損傷を抑える光学設計を行った。

2.2. 高速蛍光偏光解消法 (HS-FDP 法)

蛍光偏光解消法では、直線偏光で蛍光色素を励起し、発生した蛍光の平行偏光成分と垂直偏光成分を検出する。励起直後の蛍光は偏光性をもつが、蛍光寿命の間に分子が回転運動を行うと、観測される蛍光偏光は時間とともに解消する。この偏光解消過程を解析することで、蛍光色素が結合した部位の局所運動や、分子全体の回転運動を評価できる (Fig. 1)。

この手法は、分子の構造揺らぎや会合状態を調べるうえで有効である。例えば、タンパク質が単量体として自由に運動している場合には比較的速い偏光解消が観測される。一方、分子が会合体や凝集体を形成すると、回転運動が遅くなり、偏光解消の速度や振幅が変化する。したがって、蛍光偏光解消法は、分子の構造変化だけでなく、集合反応や相分離に伴う運動性変化を検出するための有力な手法である (Fig. 1)。

本研究では、ストリークカメラを用いて蛍光偏光の平行成分と垂直成分を同時に検出する高速蛍光偏光解消システムを構築した。従来の逐次測定では、測定中の蛍光強度変化や光退色が解析に影響する場合があるが、本システムでは二つの偏光成分を同時に取得できるため、これらの影響を抑えた解析が可能である。また、ストリークカメラを用いることで、短時間で時間分解蛍光データを取得でき、試料の状態変化を追跡しやすい。

さらに、この HS-FDP 法を顕微鏡に組み込むことで、細胞内や微小領域における分子の回転運動を測定することを目指した。これにより、蛍光イメージングで得られる空間情報に加えて、分子運

動性に関する時間分解情報を同時に取得できると考えられる。

3. 結果

3.1. 顕微 TG 法の開発

本研究では、まず顕微鏡下で TG 信号を取得するための自作光学系を構築した (Fig. 2)。顕微 TG 法では、励起光によって形成される干渉縞とプローブ光の検出領域を正確に重ねる必要がある。また、測定スポットを小さくすると空間分解能は高くなるが、得られる信号量は減少しやすくなる。さらに、励起光を強く集光しすぎると、試料の光損傷や局所的な加熱が問題となる。したがって、顕微 TG 法の実現には、空間分解能、信号感度、試料への負荷のバランスを取る光学設計が重要であった。

この課題を解決するため、本研究では集光性の高いレンズを光学系に導入し、顕微鏡下での検出領域を微小化した。特に、プローブ光を小さく絞り込むことで、局所的な屈折率変化に由来する回折光を選択的に検出できるようにした。一方で、励起光については過度に集光せず、比較的広い領域に照射する設計とすることで、試料への光損傷や局所的な加熱を抑えた。すなわち、プローブ光の検出領域を微小化して空間分解能を高めつつ、励起光の照射密度を抑えることで、信号感度と試料への低侵襲性の両立を図った。構築した顕微 TG 光学系を用いて信号取得を行ったところ、熱信号を明瞭に観測することができた。さらに、測定条件を最適化することで、従来条件と比較して信号感度の向上が確認された。これは、プローブ光の検出領域を適切に制限したことで背景信号が抑えられ、局所的な屈折率変化に由来する回折光を効率よく検出できたためと考えられる。

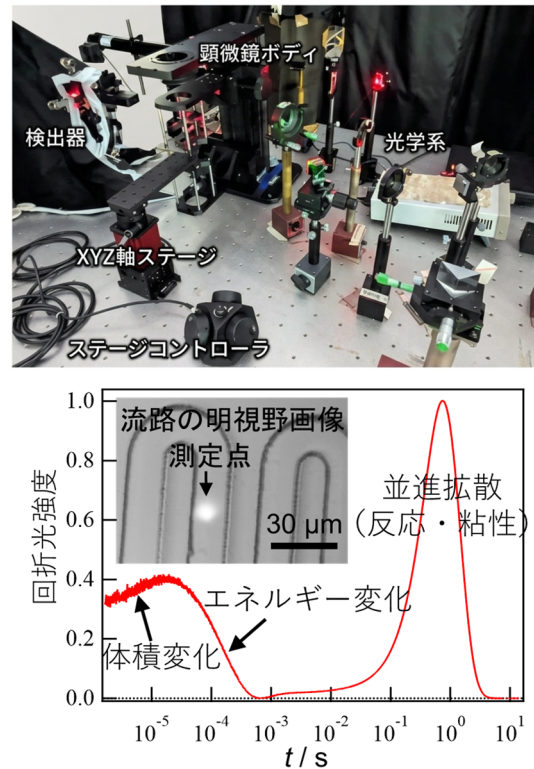


Fig. 2 空間分解測定の実証として、蛇行型のマイクロ顕微 TG 法の開発と空間分解測定。上図は、顕微鏡下で TG 信号を取得するために構築した自作光学系を示す。下図は、マイクロ流路を用いた空間分解測定の例であり、微小領域における局所的な信号取得が可能であることを示している。

空間分解測定の実証として、蛇行型のマイクロ流路を作製し、内部に光応答性タンパク質溶液を封入して測定を行った (Fig. 2)。マイクロ流路は、顕微鏡下で測定位置を制御しながら、流路内外の信号変化を評価するために有用である。実験では、ステージの座標を制御しながら TG 信号を測定し、測定位置に応じた信号強度の変化をモニターした。その結果、流路内の試料溶液から明瞭な TG 信号を検出することに成功した。

得られた TG 信号には、光励起に伴う体積変化、熱放出に由来する熱過程、さらに分子の並進拡散に伴う拡散過程など、複数の寄与が含まれていた。これらの成分は異なる時間領域に現れるため、信号の時間変化を解析することで、光応答性タンパ

ク質の反応に伴う物性変化と分子運動を評価できる。この結果は、顕微 TG 法により、微小流路内に閉じ込めた生体分子の局所的な反応信号を取得できることを示している。

3.2. 顕微 HS-FDP 法の開発

次に、分子の回転運動や局所的な揺らぎを細胞内および微小領域で検出するため、顕微 HS-FDP 法の測定系構築を進めた (Fig. 3)。

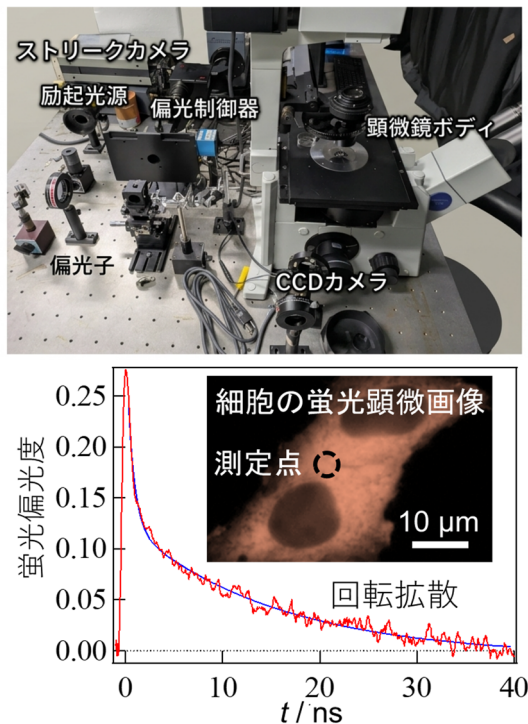


Fig. 3 顕微 HS-FDP 法の開発と細胞内測定. 上図は、蛍光偏光解消信号を顕微鏡下で取得するために構築した光学系を示す。下図は、細胞内蛍光タンパク質を対象とした測定例であり、細胞内の特定領域から時間分解蛍光偏光解消信号を取得できることを示している。

本研究では、顕微鏡下の試料から発生した蛍光を効率よく集光し、ストリークカメラへ導入するための光学系を構築した。顕微鏡から取り出した蛍光をできるだけ損失なく検出系へ導くため、リレーレンズ系および結像条件を最適化し、微小領域からの弱い蛍光信号を時間分解測定に利用で

きる構成とした。

また、蛍光偏光解消信号の取得と同時に、明視野画像を観察できる光路を導入した。これにより、細胞の形状や測定位置を確認しながら、特定領域からの蛍光信号を選択的に取得できるようになった。測定位置の情報と時間分解蛍光信号を対応づけられるため、細胞内および微小領域における局所的な分子運動性を解析するための基盤が整った。

一方、HS-FDP 法による分子運動性解析を安定に行うためには、蛍光異方性が高く、かつ十分な蛍光寿命をもつ色素を用いる必要がある。そこで本研究では、蛍光偏光解消測定に適した色素を選定し、タンパク質へのラベル方法を検討した。測定対象として、環境変化に応じて集合反応を起こす天然変性タンパク質 Pbp1 を用い、HS-FDP 測定に適した標識試料の調製条件を確立した。

標識 Pbp1 を用いた測定では、集合反応の進行に伴って蛍光異方性の時間変化が変化することを確認した。この変化は、集合状態への移行により、分子全体の回転運動や局所的な揺らぎが変化したことを反映していると考えられる。さらに、集合から線維化に至る過程では、分子運動性の低下を示す信号変化が観測された。以上の結果から、HS-FDP 法により、天然変性タンパク質の集合や線維化に伴う運動性変化を時間分解で検出できることが示された。

さらに、構築した顕微 HS-FDP システムを用いて、細胞内に発現した蛍光タンパク質を対象とした測定を行った。明視野画像により細胞の位置を確認しながら、顕微鏡下で細胞内の特定領域を選択し、その領域から蛍光偏光解消信号を取得することに成功した (Fig. 3)。これにより、精製タンパク質を対象とした運動性解析で確立した測定原理を、細胞内および微小領域の局所測定へ展開

するための基盤が整った。

3.3. 顕微 TG 法と顕微 HS-FDP 法の統合

顕微 TG 法と顕微 HS-FDP 法は、それぞれ異なる分子運動を検出する相補的な手法である。顕微 TG 法は、分子の並進拡散や反応に伴う拡散係数変化を捉えることに適している。一方、顕微 HS-FDP 法は、分子の回転運動や局所的な構造揺らぎを検出することに適している。したがって、これら二つの手法を同一の顕微鏡基盤上で利用できれば、生体分子の運動性を多角的に解析できる。

そこで本研究では、顕微 TG 法と顕微 HS-FDP 法の要素技術の開発を進めるとともに、両者を切り替えて使用できる統合型顕微鏡システムの構築に取り組んだ。具体的には、蛍光顕微鏡システムを基盤として、TG 信号を取り出すためのレンズおよびミラー系を対物レンズ切り替え用のターレット部に導入した。これにより、ターレットを切り替えることで、TG 測定と HS-FDP 測定を同一システム上で選択できる構成とした。

この統合により、同一試料に対して、並進運動と回転運動の両方を相補的に調べるための基盤が整った。例えば、分子集合体の形成過程では、分子全体の拡散は遅くなる一方で、局所的な揺らぎは残る場合がある。また、液滴状の凝縮体では、分子が集合しているにもかかわらず、内部では一定の流動性を保つ場合がある。このような複雑な状態を理解するには、並進拡散だけ、あるいは回転運動だけを見るのでは不十分であり、両者を組み合わせた解析が重要である。

4. まとめと今後の展望

本研究では、細胞内および微小領域における生体分子の階層的ダイナミクスを解析するため、顕微 TG 法および顕微 HS-FDP 法の開発を進めた。顕微 TG 法では、微小流路内に導入した光応答性

タンパク質から TG 信号を検出し、体積変化、熱過程、拡散過程を含む局所的な反応信号を取得した。顕微 HS-FDP 法では、蛍光色素の選定とタンパク質ラベル法を確立し、分子運動性の変化を蛍光偏光解消信号として検出した。さらに、細胞内蛍光タンパク質を対象として、顕微鏡下の特定領域から偏光解消信号を取得することに成功した。

また、本研究期間内には、顕微化に向けた技術開発と並行して、その基盤となる TG 法および蛍光偏光解消法を用いた生体分子ダイナミクス研究を進めた。光応答性タンパク質、光応答性 DNA、蛍光タンパク質、光制御型タンパク質放出系などを対象として、構造変化、分子間相互作用、並進拡散、回転運動に関する解析を行い、その成果を論文として発表した^[1-6]。これらの成果は、TG 法および蛍光偏光解消法が多様な生体分子系の運動性解析に有効であることを示しており、顕微 TG 法および顕微 HS-FDP 法を細胞内・微小領域測定へ展開するための基盤となる。

以上の成果により、分子の並進拡散、回転運動、局所的な揺らぎを微小領域で相補的に解析するための基盤が整った。今後は、光応答性タンパク質、天然変性タンパク質、液-液相分離系、細胞内分子集合体などへ応用し、細胞内の局所環境における分子反応や集合過程を時間分解的に解析する。これにより、細胞内で進行する生命現象を分子運動の観点から理解するための新しい顕微分光法として展開していく。

5. 参考文献

- [1] DSouza RS, Nakasone Y, Iwabe N, Tomii K, Suzuki J, Sakamaki K; c-FLIP: A pseudoprotease with emerging metal-binding activity, FEBS Journal, (2026), in press, doi: 10.1111/febs.70593.
- [2] Kinoshita Y, Nakasone Y, Terazima M, Hosoi

- H; Different dimerization affinity and orientation of fluorescent proteins eGFP and eYFP, *Physical Chemistry Chemical Physics*, (2026), in press, doi: 10.1039/d6cp01098a.
- [3] Tokashiki T, Ohata T, Tokonami S, Oda T, Terazima M, Nakasone Y; Kinetic Insights into Photoinduced Monomer-Dimer Conversion and Activation of Orange Carotenoid Protein, *Journal of Physical Chemistry B*, 130, (2026), 2331–2342.
- [4] Yoshimura M, Sasayama R, Kajiwarra T, Mori C, Nakasone Y, Inose T; Remote Silyl Groups Enhance Hydrolytic Stability and Photocleavage Efficiency in Carbamates for Protein Release, *Angewandte Chemie International Edition*, 64, (2025), e202502376.
- [5] Takekawa G, Nakasone Y, Kamiya Y, Asanuma H, Terazima M; Reaction and interaction dynamics of azobenzene-tethered DNA with T7 RNA polymerase, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 27, (2025), 3302–3312.
- [6] Nakasone Y, Murakami H, Tokonami S, Oda T, Terazima M; Time-resolved study on signaling pathway of photoactivated adenylate cyclase and its nonlinear optical response, *Journal of Biological Chemistry*, 299, (2023), 105285.

6. その他成果発表等

- 西野 晶翔, 西谷 公佑, 永井 萌土, 寺嶋 正秀, 中曽根 祐介, 微小空間内の反応解析に向けた顕微過渡回折格子法の開発, 第 19 回分子科学討論会, 広島, 2025 年 9 月 12 日 .

7. 謝辞

本研究は、公益財団法人島津科学技術振興財団の研究開発助成を受けて実施されました。貴重なご支援を賜りました同財団に深く感謝申し上げます。また、本研究の遂行にあたり、マイクロ流路を作製いただいた豊橋技術科学大学の永井萌土教授に感謝申し上げます。あわせて、実験系の構築、試料調製、測定および議論にご協力いただいた研究室の学生の皆様に感謝いたします。