

平成 29年 5月 30日

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名 : (日本語) 医療分野研究成果展開事業 先端計測分析技術・機器開発プログラム
(英語) AMED-SENTAN Program

研究開発課題名 : (日本語) 細胞内化学反応解析のための超高速光計測システムの開発
(英語) Development of high-speed FCS system for detection of
biochemical processes in the cell

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人大阪大学大学院生命機能研究科生命機能専攻 教授 平岡泰
所属 役職 氏名 : (英語) Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University
Professor Yasushi Hiraoka

実施期間 : 平成25年10月 1日 ~ 平成29年 3月31日

分担研究 (日本語) 生細胞における超高速光計測システムの実証実験
開発課題名 : (英語) Verification of high-speed FCS system in living cells

研究開発分担者 (日本語) 平岡 泰
所属 役職 氏名 : 国立大学法人大阪大学 大学院生命機能研究科 教授
(英語) HIRAOKA, Yasushi
Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University
Professor

分担研究 (日本語) 高速相関器および相関ソフトウェアの製作
開発課題名 : (英語) Development of a high-speed correlator system

研究開発分担者 (日本語) 岡田 公太郎
所属 役職 氏名 : 株式会社知能情報システム 開発部 エンジニア
(英語) OKADA, Koutaroh
Chinou Jouhou Shisutemu Inc., Engineer

分担研究 (日本語) 可視波長域高感度 SSPD の製作
開発課題名: (英語) Development of visual-wavelength high-sensitive SSPD
研究開発分担者 (日本語) 寺井弘高
所属 役職 氏名: 国立研究開発法人情報通信研究機構 上席研究員
(英語) TERAJ, Hirotaka
National Institute of Information and Communications Technology
Executive Researcher

分担研究 (日本語) SSPD と高速相関器の FCS 顕微鏡への実装
開発課題名: (英語) Implementation of SSPD and correlator in an FCS microscope
研究開発分担者 (日本語) 北村朗
所属 役職 氏名: 国立大学法人北海道大学 大学院先端生命科学研究院 助教
(英語) KITAMURA, Akira
Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University
Assistant Professor

II. 成果の概要 (総括研究報告)

本研究においては、超伝導単一光子検出器 (Superconducting Single Photon Detector; SSPD) を FCS 顕微鏡に実装し、生細胞内で化学反応を検出するための要素技術として超高速の光計測システムを開発を行った。SSPD はもともと量子暗号通信のために開発されたもので 1550 nm の赤外光に最適化していたが、FCS 顕微鏡に利用するためには可視光の波長帯で光検出できる必要があり、本研究では、まず可視波長域 (400-700 nm) で高感度な SSPD の開発を行った。また、当初は SSPD の出力速度に対応できる相関器が無かったので、高速コリレーター (相関器) の開発を行った。これらの要素技術を基盤として、蛍光顕微鏡への組み込みを行い、SSPD と相関器の基本的な性能評価を行った。まず、蛍光色素であるローダミンの水溶液中での挙動を測定し、SSPD の低ノイズ性がどの程度測定結果に反映されるか、従来の APD や光電子増倍管 (PMT) と比較しながら評価・検討した。次に、開発した可視波長域高感度 SSPD および高速相関器をレーザー共焦点蛍光顕微鏡に実装し、溶液中における蛍光色素の蛍光相関測定を行い、十分な性能があることを確認したので、さらに生細胞での蛍光相関測定を行った。

可視波長域高感度 SSPD の製作は、寺井弘高 (国立研究開発法人情報通信研究機構・上席研究員) らのグループが行い、高速相関器および相関ソフトウェアの製作は、岡田公太郎 (株式会社知能情報システム開発部) が行った。開発された可視波長域高感度 SSPD と高速相関器の FCS 顕微鏡への実装は、北村朗 (北海道大学大学院先端生命科学研究院・助教) らのグループが行った。溶液内での計測をもとに、平岡泰 (大阪大学大学院生命機能研究科・教授) らのグループが生細胞における超高速光計測システムの実証実験を行うとともに、研究全般を統括し、論文発表や特許申請などを進めた。

平成 28 年度は、SSPD の開発においては、これまでに開発してきた可視光領域 SSPD をもとに、感度と動作速度の両立を目指して、4 ピクセル SSPD アレイの開発を行った。4 ピクセルアレイの構成としてインターリーブ型を採用し、また 4 ピクセル SSPD アレイからの信号を処理する技術として SFQ 回路を開発することにより、検出効率と動作速度の両立を実現した。可視光域で 検出効率 70% の SSPD

を実現するとともに、動作速度として 100MHz を実現した。相関器とアルゴリズムの開発においては、SSPD が高速化したことに対応して、最小相関時間 5 ナノ秒以下の高速相関器を実用化した。高速性と感度を兼ね備えた可視波長域高感度 SSPD および SSPD の高速性能に対応できる高速相関器の開発によって、高速での FCS 計測が可能になった。溶液中および生細胞中での実証実験のテストケースとして、形状が分かっている非生体物質である Q-rod (4nm x 20nm) を使って計測した結果、細長い Q-rod の回転拡散を高い精度で検出することに成功した。さらに、蛍光性タンパク質である GFP をペプチドリンカーにより融合し 1, 3, 5 量体としたタンDEM多量体 GFP を用いて、溶液中および細胞内での FCS 計測を行い、回転拡散の計測によりタンDEM多量体の識別が可能であることを実証した。これにより、回転拡散を測定すれば 2 量体や 3 量体のように細長い形をしたタンパク質を検出できる可能性が出てきた。そこで、神経変性疾患の直接原因と考えられる凝集性タンパク質を用いて、高速 FCS 測定システムの実証実験を行うことにした。そのために、アルツハイマー病の原因として知られているアミロイド β ペプチドの凝集体や、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の原因と考えられている SOD1 タンパク質や TDP43 タンパク質の凝集体溶液を試料として蛍光相関の測定を行った。その結果、生細胞内でこれら凝集性タンパク質の低度多量体の検出可能性を評価し、病態の超初期診断に応用できる可能性を示した。

In this research project, we implemented superconducting single-photon detector (SSPD) in a FCS microscope and developed ultra high-speed optical measurement system for detecting chemical reaction in living cells. SSPD was originally developed for communication and was optimized for infrared light at 1550 nm. In order to use it for FCS microscope, it is necessary to detect light in visible wavelengths. Thus, we first developed a highly sensitive SSPD in the visible wavelength region (400-700 nm). Also, initially there was no correlator that can correspond to the output speed of SSPD, so we developed a high-speed correlator. Based on these element technologies, we incorporated them into a fluorescence microscope and carried out evaluation of SSPD and correlators. First, we measured the behavior of rhodamine as a fluorescent dye in an aqueous solution and evaluate the low-noise property of SSPD in measurements, compared with conventional APD and photomultiplier tube (PMT). Next, we implemented the developed visible-wavelength high-sensitivity SSPD and high-speed correlator on a laser confocal fluorescence microscope and measured the fluorescence correlation of the fluorescent dye in solution and confirmed that it had sufficient performance. Then, FCS measurements were carried out also in the cells.

Production of the visible-wavelength high-sensitivity SSPD was carried out by a group of Hiroaki Terai in National Institute of Information and Communications Technology. Production of the high-speed correlator and correlation software was carried out by a group of Kohtaro Okada in Chinou Jouhou Shisutemu Inc. Implementation of the developed visible-wavelength SSPD and high-speed correlator into FCS microscope was carried out by a group of Akira Kitamura in Hokkaido University. Based on measurements in solution, Yasushi Hiraoka (Graduate School of Biological Sciences, Osaka University) carried out experiments FCS measurements in living cells, and supervised the overall research for publications and patent applications.

In the fiscal year 2016, in the development of SSPD, based on the visible-wavelength SSPD developed, we developed 4 pixel SSPD array aiming at compatibility of sensitivity and operation speed. We adopted the interleaved configuration as a 4 pixel array configuration and improved compatibility between detection efficiency and operation speed by developing SFQ circuit as a technique for processing signals from

4 pixel SSPD array. We realized SSPD with detection efficiency of 70% in the visible wavelength and 100 MHz operating speed. In the development of correlators and algorithms, a high-speed correlator with a minimum correlation time of 5 nanoseconds was put into practical use in response to the high speed of SSPD. Development of high-speed correlator that can cope with high-speed outputs of SSPD in combination with high-speed visual-wavelength SSPD have enabled FCS measurements at high speed. As a test case of experiments in solution and in living cells, we measured Q-rod with a known shape (4 nm x 20 nm), and successfully detected the rotational diffusion of Q-rod. Furthermore, we carried out FCS measurements of tandem multimeric GFP in solution and in the cells, and demonstrated that multimeric GFP can be identified by measuring the rotational diffusion. Thus, we decided to carry out experiments of high-speed FCS measurements using proteins that are considered to be a direct cause of neurodegenerative diseases. Therefore, aggregates of amyloid β peptide known as a cause of Alzheimer's disease and aggregates of SOD 1 protein and TDP 43 protein which are considered to be a cause of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) were tested for FCS measurements. Results showed the possibility of detecting the low multimer of these aggregating proteins in living cells, raising the possibility of application to the diagnosis of diseases.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 5件）

1. Kitamura A, Nakayama Y, Shibasaki A, Taki A, Yuno S, Takeda K, Yahara M, Tanabe N, Kinjo M. Interaction of RNA with a C-terminal fragment of the amyotrophic lateral sclerosis-associated TDP43 reduces cytotoxicity. *Scientific reports*. 2016, 6, 19230.
2. Oura M, Yamamoto J, Ishikawa H, Mikuni S, Fukushima R, Kinjo M. Polarization-dependent fluorescence correlation spectroscopy for studying structural properties of proteins in living cell. *Scientific Reports*, 2016, 6, 31091.
3. Yamashita T, Waki K, Miki S, Kirkwood RA, Hadfield RH, Terai H. Superconducting nanowire singlephoton detectors with non-periodic dielectric multilayers. *Scientific Reports*. 2016, 6, 35240.
4. Oura M, Yamamoto J, Jin T, Kinjo M. Investigation of pH-dependent photophysical properties of quantum nanocrystals by fluorescence correlation spectroscopy. *Optics Express*, 2017, 25(2), 1435-1443.
5. Kitamura A, Yuno S, Muto H, Kinjo M. Different aggregation states of a nuclear localization signal-tagged 25 kDa C-terminal fragment of TAR RNA/DNA-binding protein 43 kDa. *Genes to Cells*, 2017年3月27日受理済.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 蛍光イメージング法による神経変性疾患関連ミスフォールドタンパク質の凝集形成機構解析, 口頭, 北村朗, 生化学若手の会・生物物理若手の会合同企画「蛍光イメージングセミナー～基礎

- から応用まで」, 2016/07/01, 国内.
2. 蛍光イメージング手法を用いた ALS 関連 TDP43 凝集形成機構の解析, 口頭, 北村朗, 第 7 回 ALS フォーラム, 2016/07/30, 国内.
 3. U6 snRNA の発現は TDP43 の機能損失により引き起こされる細胞死を阻止する, 口頭, 矢原真郎, 北村朗, 金城政孝, RNA フロンティアミーティング 2016, 2016/09/01, 国内.
 4. ALS 関連変異型 Optineurin の封入体形成機構の解明, 口頭, 田辺尚貴, 北村朗, 金城政孝, RNA フロンティアミーティング 2016, 2016/09/01, 国内.
 5. 大腸菌組み換え TDP43 精製系の確立—ALS 関連変異型 TDP43 の構造解析に向けて—, 口頭, 竹田佳世, 北村朗, 柴崎愛, 金城政孝, RNA フロンティアミーティング 2016, 2016/09/01, 国内.
 6. Superconducting nanowire single-photon detectors with non-periodic dielectric multilayers for optimized spectral sensitivity, 口頭, Taro Yamashita, Kentaro Waki, Robert Kirkwood, Shigehito Miki, Robert H. Hadfield, Hiroataka Terai, Applied Superconductivity Conference (ASC2016), 2016/09/08, 国外.
 7. 位相ホログラムを用いた二光子励起多点蛍光相関分光装置の開発, ポスター発表, 山本条太郎, 北村直樹, 金城政孝, 第 77 回 応用物理学会秋季学術講演会, 2016/09/15, 国内.
 8. 高速蛍光相関分光法による量子ドットの物性解析, ポスター発表, 大浦真, 山本条太郎, 金城政孝, 第 77 回 応用物理学会秋季学術講演会, 2016/09/15, 国内.
 9. FCS and FCCS in living cells, Kitamura A, 口頭, Course Functional Fluorescence Microscopy Imaging (fFMI) in Biomedical Research, 2016/11/08, 国外.
 10. 蛍光偏光相関分光法により明らかになった生細胞内での分子混雑と回転拡散の関係, ポスター発表, 大浦真, 山本条太郎, 松本昂大, 龔劍萍, 金城政孝, 第 54 回 日本生物物理学会年会, 2016/11/25, 国内.
 11. Researches towards bio-molecular dynamics mapping in cell, 口頭, 山本条太郎, 第 54 回日本生物物理学会年会シンポジウム「新しい視点が創る光学顕微鏡技術」, 2016/11/26, 国内.
 12. FRAP/FCS を用いた分子動態解析を用いた神経変性疾患原因研究の最前線, 口頭, 北村朗, 第 39 回 日本分子生物学会年会 Leica ランチョンセミナー, 2016/11/30, 国内.
 13. ALS 関連変異型 TDP-43 の生細胞内構造変化と凝集性の解析, 口頭およびポスター発表, 北村朗, 油野祥子, 柴崎愛, 竹田佳世, 顔総子, 大浦真, 山本条太郎, 金城政孝, 第 39 回 日本分子生物学会年会, 2016/12/01, 国内.
 14. 多走査速度ラスタ走査画像相関分光法, 口頭, 山本条太郎, 第 13 回バイオオプティクス研究会, 2016/12/02, 国内.
 15. Wide-field 光学系 FRAP を用いた生細胞内拡散係数の測定検討, ポスター発表, 北村朗, 金城政孝, 第 7 回光塾, 2016/12/17, 国内.
 16. 生細胞内における Optineurin の分子動態解析, 口頭, 田辺尚貴, 北村朗, 金城政孝, 第 2 回北大イメージング研究会, 2017/01/27, 国内.
 17. TDP-43 カルボキシル末端にある凝集形成促進領域の同定, 口頭, 森谷香南, 北村朗, 金城政孝, 平成 28 年度 北大細胞生物研究集会, 2017/03/10, 国内.
 18. Shot noise free number and brightness 解析法による生細胞内 Glucocorticoid Receptor 二量体化過程の時空間分布解析, 口頭, 福島綾介, 山本条太郎, 金城政孝, 2016 年度 日本生物物理学

会北海道支部例会・第 23 回ファーマサイエンスフォーラム・北海道大学創薬センター 合同シンポジウムジョイントセッション, 2017/03/16, 国内.

19. Pol-FCS 測定における回転拡散成分振幅の分子配向依存性の検証, 口頭, 顔総子, 大浦真, 山本条太郎, 金城政孝, 2016 年度 日本生物物理学会北海道支部例会・第 23 回ファーマサイエンスフォーラム・北海道大学創薬センター 合同シンポジウムジョイントセッション, 2017/03/16, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. TDP43 に潜在する非古典的核内輸送シグナル配列の同定と, 細胞質における神経細胞毒性低減機構の解明, 北村朗, 一般社団法人 日本 ALS 協会・平成 28 年度総会・研究授与式, 2016/05/28, 国内.
2. グアニン四重鎖 RNA による ALS 関連 TDP43 蛋白質凝集阻止と神経細胞死抑制機構の解明, 北村朗, 公益財団法人 秋山記念生命科学振興財団・平成 28 年度研究助成金贈呈・表彰式, 2016/09/07, 国内.

(4) 特許出願 無し