

細胞内タンパク質の動きを調べる新たな計測手法を開発 ～アルツハイマー病などの原因となる凝集性タンパク質形成の初期診断に期待～

【ポイント】

- 顕微鏡カメラとして超伝導単一光子検出器を利用することで分子の回転拡散運動の計測に成功
- 細胞内あるいは溶液中のタンパク質の凝集状態が測定可能に
- アルツハイマー病などの原因となる凝集性タンパク質の初期診断に道を拓く

国立研究開発法人情報通信研究機構(NICT、理事長: 坂内 正夫)、国立大学法人北海道大学(総長: 山口 佳三)、国立大学法人大阪大学(総長: 西尾 章治郎)は、溶液中の蛍光分子の回転拡散運動を計測する方法の開発に成功しました。

これは、独自開発した検出器(超伝導ナノワイヤ単一光子: SSPD^{*1})を蛍光相関分光顕微鏡(FCS)^{*2}のカメラとして使うことで、従来はノイズに隠れて検出できなかった「回転拡散^{*3}」成分を検出することに成功したものです。従来法では、1 台のカメラではタンパク質の回転拡散運動を計測することができず、そのため、その形状を同定することは困難でしたが、今回の開発で、タンパク質分子の回転拡散が測れるようになり、プリオン等の凝集性タンパク質^{*4}が凝集体を形成する初期段階、すなわち、タンパク質が 2 量体^{*5}や 3 量体になったことを、その形状から簡易に同定することが可能となります。

したがって、今回の開発は、凝集性タンパク質が原因となるアルツハイマー病やプリオン病などの神経変性疾患の初期段階を超早期に診断するのに極めて有効な手法となる可能性があります。また、今回の成果により、これまで主に通信分野で利用されてきた SSPD カメラの医療分野への応用が期待されます。

本研究成果は、12 月 14 日付けの米国科学誌 Optics Express に掲載されました。なお、本成果の一部は国立研究開発法人科学技術振興機構(H25-26)及び国立研究開発法人日本医療研究開発機構(H27)の支援によるものです。

【背景】

蛍光相関分光法(FCS)は、蛍光の自己相関^{*6}を利用して、細胞内タンパク質の拡散係数や分子間相互作用を簡便に求めることができるため、細胞生物学の分野で広く利用されています。従来の FCS では検出器としてアバランシェ・フォトダイオード(APD)^{*7}が使われてきましたが、1 μ s 以下の時間領域の信号は APD に特有のアフターパルス^{*8}と呼ばれる雑音に埋もれて観測できませんでした。1 μ s 以下の時間領域を高精度に計測することが可能になれば、回転拡散による信号からタンパク質分子の形状を同定することができるため、タンパク質 2 量体や 3 量体といったプリオンタンパク質の初期段階を検出できる可能性があり、凝集性タンパク質に起因した疾患の初期診断に極めて有効な手法となります。2013 年に NICT は、通信波長帯(1550 nm)でシステム検出効率 80%を超える超伝導ナノワイヤ単一光子検出器(SSPD)の開発に成功し、量子暗号通信^{*9}への適用を進めてきました。

SSPD のアフターパルスのない極めて低雑音という特長は、FCS においても極めて有望であることから、NICT は、FCS 応用のために必要となる可視波長領域^{*10}で高い検出感度を有する SSPD を開発し、2013 年から北海道大学、大阪大学と共同で FCS システム(右図)での性能評価を進めてきました。

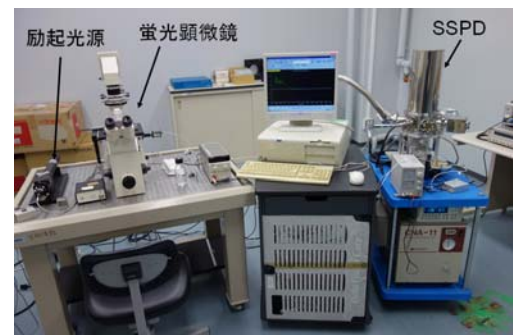
これまでに、635 nm でシステム検出効率 76%を持つ SSPD を開発し(補足資料 図 1)、ローダミン^{*11}水溶液を用いた実験で、SSPD により、1 μ s 以下の時間領域まで理想的な自己相関曲線が得られることを確認していました。

【今回の成果】

今回、この蛍光顕微鏡用に開発した SSPD を用いて、回転拡散による信号の検出に世界で初めて成功しました。

今回用いた測定試料は、Qrod^{*12}と呼ばれる直径約 7 nm、長さ 22 nm の棒状分子で、この Qrod が回転しながら拡散する様子を、SSPD を組み込んだ蛍光偏光相関分光法(pol-FCS)により観測しました(補足資料 図 2)。

今回用いた Qrod の回転拡散による信号は、その分子形状から 1 μ s 付近に現れることが予想されますが、従来の APD では、アフターパルスによる雑音に埋もれて観測できませんでした(補足資料 図 3(a))。



超伝導ナノワイヤ単一光子検出器を組み込んだ蛍光相関分光システム

そこで、今回、この蛍光顕微鏡用に開発した SSPD を用いることで、1 μs 付近に Qrod の回転拡散による信号を観測することができました(補足資料 図 3(b))。得られた信号の理論曲線によるフィッティングから求めた分子形状は Qrod の形状とほぼ一致することから、SSPD により観測した信号が Qrod の回転拡散によるものであることが裏付けられました。

今回の成果は、NICT が可視波長 SSPD の高性能化と測定試料の作製を、北海道大学は可視波長 SSPD を組み込んだ FCS システムの構築と測定及びデータ解析と測定試料の作製、そして、大阪大学は FCS システムの構築と測定試料の作製の役割分担を行い、本成果に至ったものです。

【今後の展望】

今回行った実験は、Qrod という回転拡散を観測するために人工的に合成した棒状分子ですが、今後は、実際にタンパク質多量体を用いて実験を行う予定です。また、今回の SSPD は、マルチモードファイバとの高効率な結合を実現するため比較的大きな受光面積(35 μm 径の円形受光面)を持ち、そのため、不感時間^{*13}が 0.3 μs 程度でしたが、今後、SSPD を多ピクセル化することで不感時間を短縮し、1 μs 以下の計測精度を更に改善していく予定です。

このような SSPD の性能改善により、今後は、FCS の高機能化、医療分野への普及展開を推進してまいります。

<掲載論文> 2015 年 12 月 14 日付け

Optics Express (Vol. 23, Issue 25, pp. 32633-32642 (2015))

電子版: <http://dx.doi.org/10.1364/OE.23.032633>

掲載論文名: Rotational diffusion measurements using polarization-dependent fluorescence correlation spectroscopy based on superconducting nanowire single-photon detector

著者: Johtaro Yamamoto, Makoto Oura, Taro Yamashita, Shigehito Miki, Takashi Jin, Tokuko Haraguchi, Yasushi Hiraoka, Hirotaka Terai, and Masataka Kinjo

<参考論文>

Optics Express (Vol. 22, Issue 18, pp. 21167-21174 (2014)) **2014 年 9 月に掲載済み**

電子版: <http://dx.doi.org/10.1364/OE.22.021167>

掲載論文名: Multimode fiber-coupled superconducting nanowire single-photon detector with 70% system efficiency at visible wavelength

著者: Dengkuan Liu, Shigehito Miki, Taro Yamashita, Lixing You, Zhen Wang, and Hirotaka Terai

Optics Express (Vol. 22, Issue 23, pp. 28783-28789 (2014)) **2014 年 11 月に掲載済み**

電子版: <http://dx.doi.org/10.1364/OE.22.028783>

掲載論文名: Fluorescence correlation spectroscopy with visible-wavelength superconducting nanowire single-photon detector

著者: Taro Yamashita, Dengkuan Liu, Shigehito Miki, Johtaro Yamamoto, Tokuko Haraguchi, Masataka Kinjo, Yasushi Hiraoka, Zhen Wang, and Hirotaka Terai

<過去のプレスリリース>

2013 年 11 月 5 日発表

「検出効率 80%以上の「超伝導ナノワイヤ単一光子検出器」を開発 ～従来の 3 倍のシステム検出効率を達成！～」

<http://www.nict.go.jp/press/2013/11/05-1.html>

< 本件に関する問い合わせ先 >

情報通信研究機構
未来 ICT 研究所
寺井 弘高(てらい ひろたか)、
原口 徳子(はらぐち とくこ)
Tel: 078-969-2191, 2241
E-mail: terai@nict.go.jp

北海道大学
大学院 先端生命科学研究院
金城 政孝(きんじょう まさたか)
Tel: 011-706-9005
E-mail: kinjo@sci.hokudai.ac.jp

大阪大学
大学院 生命機能研究科
平岡 泰(ひらおか やすし)
Tel: 06-6879-4620
E-mail: hiraoka@fbs.osaka-u.ac.jp

< 広報 >

情報通信研究機構
広報部 報道担当
Tel: 042-327-6923
Fax: 042-327-7587
E-mail: publicity@nict.go.jp

北海道大学
総務企画部広報課
Tel: 011-706-2610
Fax: 011-706-2092
E-mail: kouhou@jimuhokudai.ac.jp

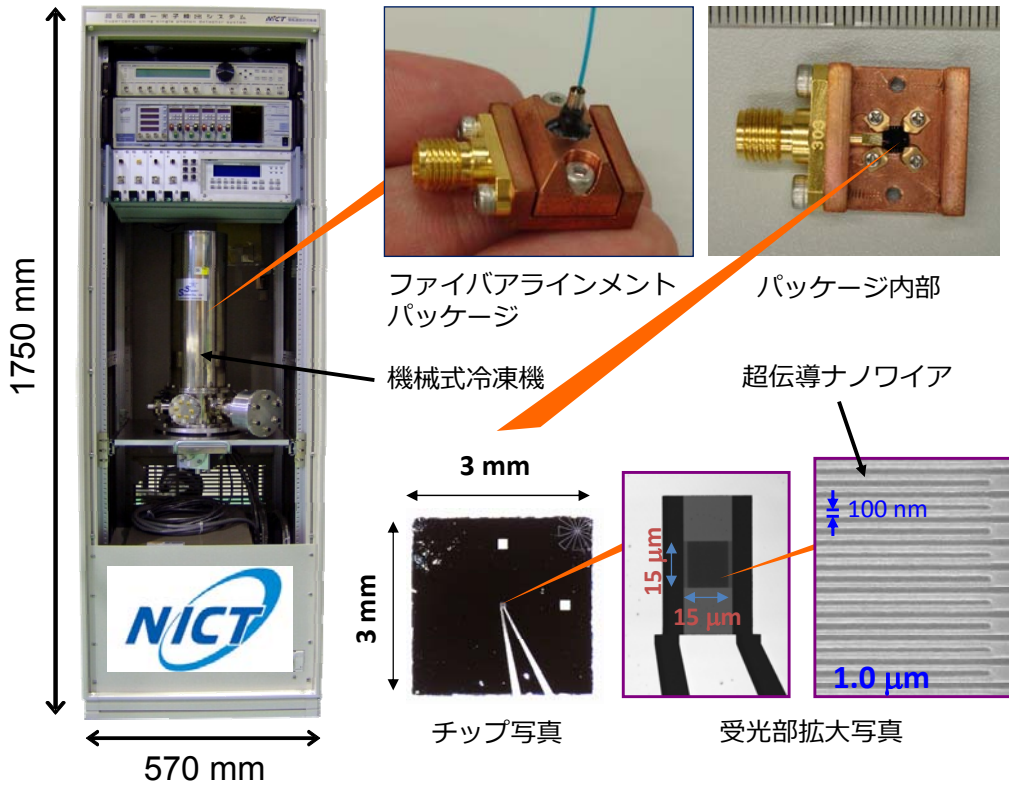
大阪大学
生命機能研究科庶務係
Tel: 06-6879-4692
Fax: 06-6879-4420
E-mail: seimei-syomu@office.osaka-u.ac.jp

<用語解説>

*1 超伝導ナノワイヤ単一光子検出器(SSPD: Superconducting Nanowire Single-Photon Detector)

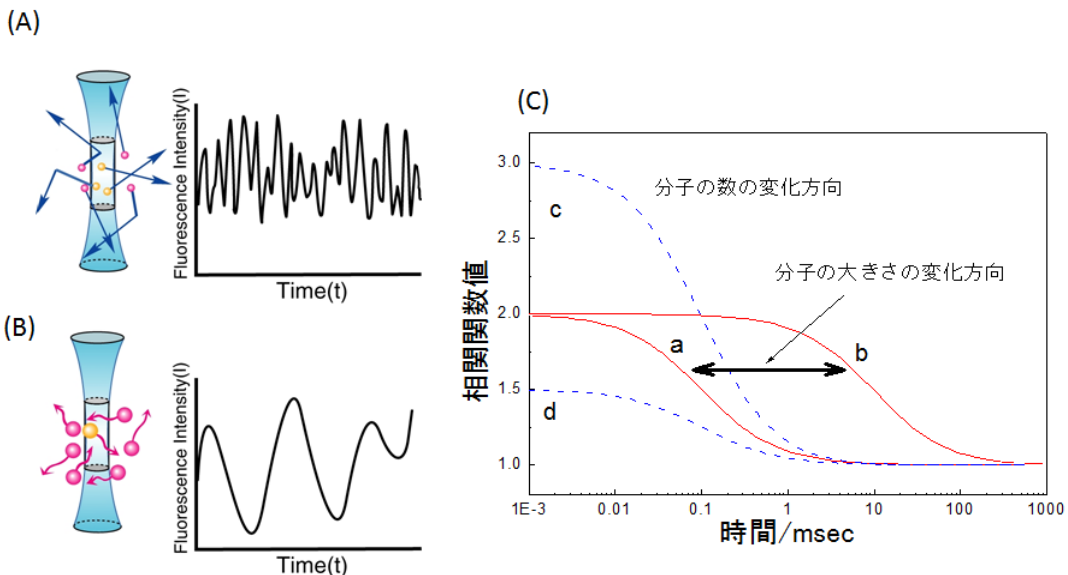
厚さ 10nm 以下、幅 100nm 程度の超伝導細線(超伝導ナノワイヤ)を受光面全体にメアンダ状(ジグザグ上に曲がりくねった形状)に敷き詰めた構造の光子検出器。電流バイアスした超伝導細線が光子を吸収すると、光子のエネルギーにより超伝導状態が局所的に壊れスパイク状の電圧パルスが発生する。この電圧パルスをモニターすることにより、光子を検出する。

光子検出原理として利用している超伝導現象は、ある温度以下で物質の電気抵抗が消失する現象で、物質により超伝導状態に転移する温度が異なる。



*2 蛍光相関分光法(FCS: Fluorescence Correlation Spectroscopy)

蛍光物質の分子運動を調べるために用いられる方法の一つ。共焦点光学系によって形成された微小な焦点領域を蛍光物質が入り出すときの蛍光強度の変化(ゆらぎ)を測定することによって、その蛍光物質の「動く速さ」と「数」を見積もる方法。動く速度から、その蛍光物質の「大きさ」を推定することもできる。細胞内の目的分子を蛍光色素で標識し同様の測定をすることで、目的分子の「動く速さ(大きさ)」と「数」を検出することができる。目的分子の挙動を連続的に観察することで、ダイナミックな「分子間相互作用」を単一分子レベルで検出することができる。



(A) 共焦点領域を通過する小さな分子の早い蛍光強度の変化、(B) 共焦点領域を通過する大きな分子のゆっくりした蛍光強度の変化、(C) 自己相関関数の変化と分子数、分子の動きの関係

*3 回転拡散

粒子の配向の角度分布を平均化させるように起こる回転運動のこと。

*4 凝集性タンパク質

変性して凝集体を作るタンパク質。凝集体を作ることにより、様々な病気の原因になる。プリオン病やアルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、ハンチントン病などの神経変性疾患は、原因タンパク質が凝集体を作ることによって起こる。

*5 タンパク質 2 量体

タンパク質 2 分子が化学的あるいは物理的な力で結合したもの。

*6 自己相関

信号がそれ自身を時間シフトした信号とどれだけ良く整合するかを測る尺度。

*7 アバランシェ・フォトダイオード(APD: Avalanche Photodiode)

半導体の p-n 接合に大きな逆バイアス(数 10~200 V)を印加することにより、わずかなキャリアの移動によって次々にキャリアが生成され、加速度的に電流が増大するなだれ(アバランシェ)効果を利用した高感度のフォトダイオード。

*8 アフターパルス

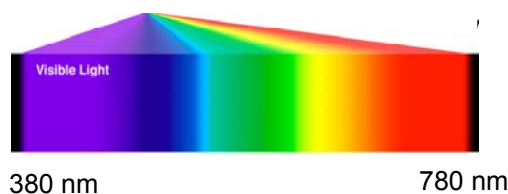
APD において、光子を検出したことによる正規のアバランシェに続けて、誤ったアバランシェ増幅が起こり、誤信号が出力される現象。

*9 量子暗号通信

ワンタイムパッド(送信者と受信者で共有する伝送情報量と同じ長さの秘密鍵)を、光子を利用して安全に送信するシステム。現在広く使われている公開鍵暗号は、公開鍵(2つの素数の積)の解読に膨大な計算時間がかかることにより安全性が保証されているが、技術の進歩(例えば量子コンピュータの実現)により計算時間が短縮されると解読されてしまう。量子暗号システムは、安全性が計算量ではなく量子力学という物理の基本法則に基づいていることが特徴である。

*10 可視波長領域

人の目で見えるおよそ 380~780 nm の光波長領域。



*11 ローダミン

蛍光性のある鮮紅色の塩基性染料で、蛍光色素や色素レーザーとして用いられる。

*12 Qrod

細長い形をした量子ドットのこと。量子ドットは、2~10 nm 程度の大きさの半導体結晶で、サイズや構造を変えることによって、様々な波長の蛍光を発光する。

*13 不感時間

検出器がある信号を検出した後、次の信号を検出できるまでに状態が戻るまでの時間。

今回開発した計測手法について

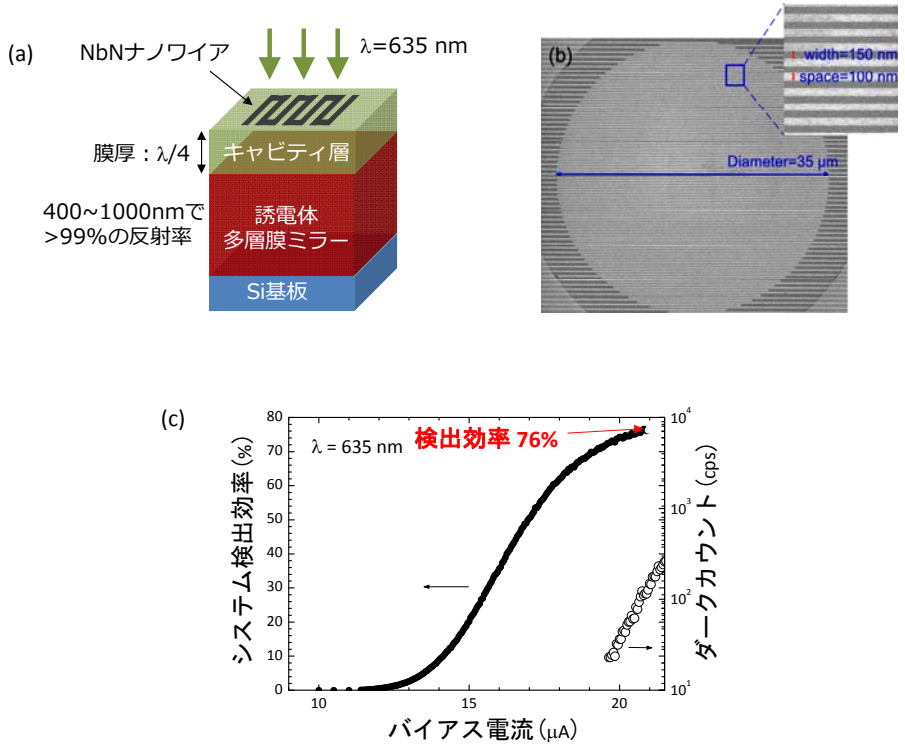


図 1 可視波長 SSPD の構造とシステム検出効率

- 通信波長 SSPD では、熱酸化膜付きのシリコン(Si)基板の上にナノワイヤを作製し、基板の裏面から光子を入射していましたが、可視波長帯では Si 基板の光吸収率が高いために、Si 基板裏面側からの光子入射を適用できません。そこで、可視波長用の SSPD では、可視波長領域で反射率が 99%以上となる誘電体多層膜を反射層として採用し(図 1 (a))、Si 基板表面側から光子入射することで、635 nm で 95%を超える高い光吸収効率を実現しました。
- FCS では、試料からの蛍光信号をコア径 50 μm のマルチモードファイバを用いて検出器まで伝送します。コア径 10 μm のシングルモードファイバと結合する通信波長 SSPD では、受光面は 15 μm x 15 μm でしたが、可視波長 SSPD では、マルチモードファイバとの高効率な結合を実現するため、直径 35 μm の円形受光面を採用しました(図 1 (b))。マルチモードファイバの先端に GRIN(グレーデッドインデックス)レンズを装着し、受光面で直径 28 μm まで集光することで、ほぼ 100%のファイバ結合効率を実現しました。
- 可視波長用のキャビティ構造の採用、マルチモードファイバとの高効率な結合を実現した結果、635 nm の光子に対して 76%のシステム検出効率を達成しました(図 1 (c))。

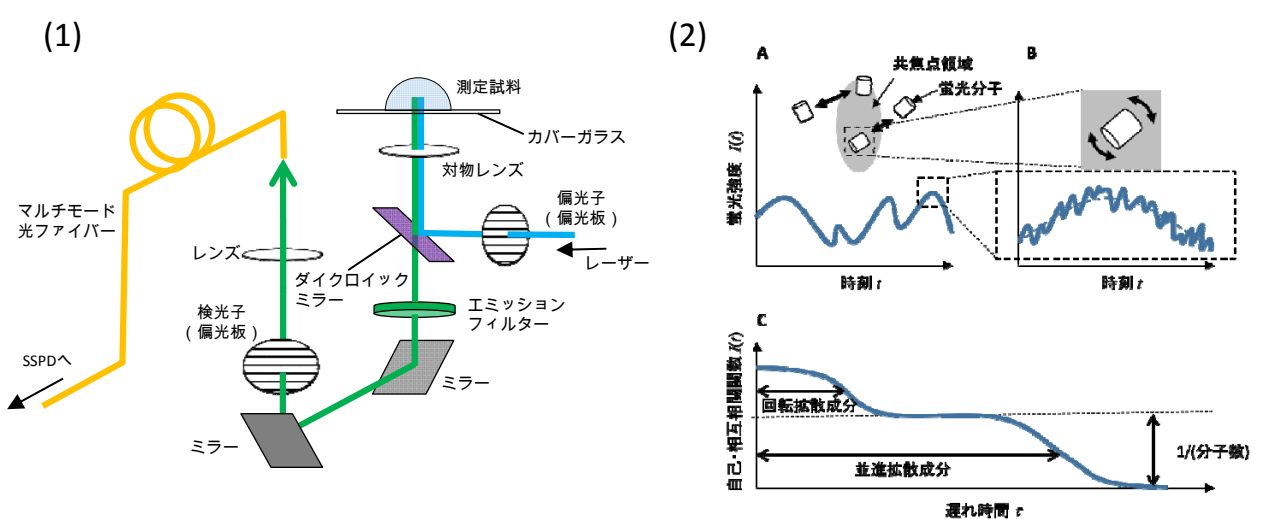


図 2 蛍光偏光相関分光法(pol-FCS)、(1) 測定系、(2) 測定原理

- 蛍光分子が共焦点領域を出入りすることによる蛍光強度のゆらぎ(図 2 (2)A: 並進拡散)のほかに、蛍光分子が回転することによって蛍光の偏光が変化します(回転拡散)。検光子(偏光板)を通して蛍光強度を測定することで、回転拡散によっても蛍光強度がゆらぎます(図 2 (2)B)。回転拡散によるゆらぎは、並進拡散のゆらぎよりも速いため、自己相関関数において速い成分として現れます(図 2 (2)C)。

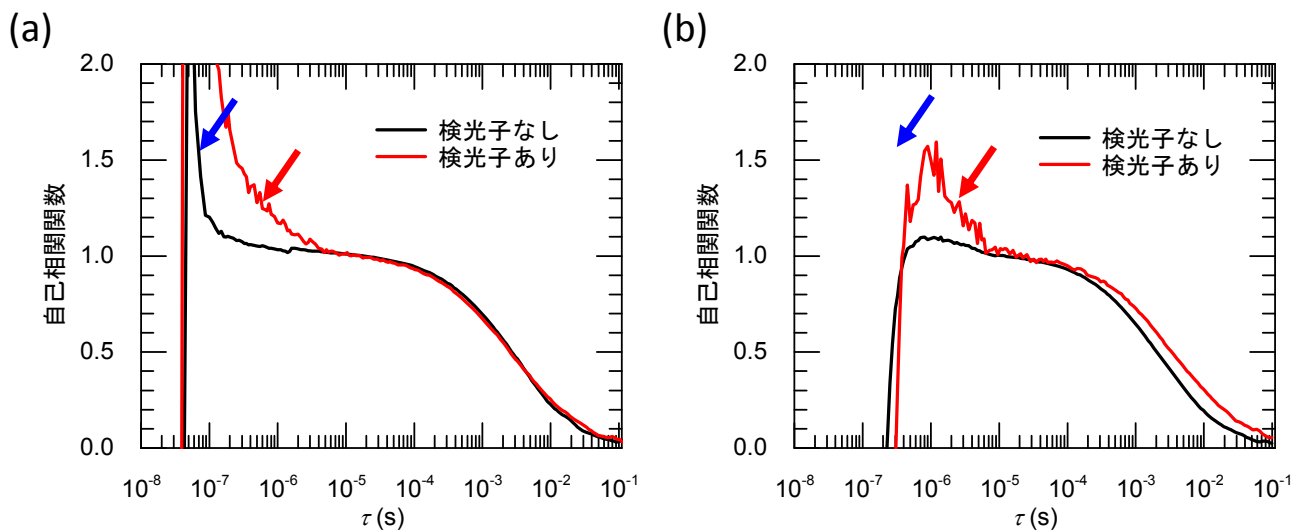


図 3 蛍光偏光相関分光計測結果

- ・検出器としてアバランシェフォトダイオード (APD) を使用した場合、アフターパルスによる雑音成分 (青矢印) に埋もれて、偏光依存のゆらぎによる信号 (回転拡散成分) を観測できません (図 3 (a))。超伝導ナノワイヤ単一光子検出器 (SSPD) を使用した場合、アフターパルスによる雑音成分がないため、検光子 (偏光板) を通して観測した信号が回転拡散成分によるものであると同定できません (図 3 (b) の赤矢印)。SSPD を用いて測定した自己相関曲線のフィッティングから算出した分子形状は、Qrod の形状を反映した値となり、観測した信号が回転拡散成分であることが裏付けられました。