マイクロ・ナノデバイスを用いた 生体分子の1分子計測と分離操作

特集 ナノバイオサイエンス

船 津 高 志*

Separation and single-molecule analysis of biomolecules using micro-and nano-devices

Functions and interactions of protein molecules are major issues in the post-genome age. Single-molecule imaging techniques for these studies and on-chip biomolecular or organelle sorter to analyze their components are introduced.

ヒトゲノムの塩基配列が明らかになり、蛋白質の機能解析と蛋白質間相互作用がポストゲノムの重要な課題となっている。本稿では、1分子蛍光イメージング法を解説し、この手法を用いた蛋白質の機能と相互作用の解析例を紹介する。また、生体分子や超分子複合体(オルガネラ)を、マイクロチップを用いて物理的に分離・回収し、分子間相互作用している生体分子を分析的に解析する試みを紹介する。

Takashi Funatsu*

key words : single molecule imaging, evanescent field illumination, fluorescence microscopy, micro sorting device, micro total analysis system

ヒトゲノムの塩基配列が明らかになり、生命科学研究は、遺伝子クローニングの競争から蛋白質機能解析、蛋白質間相互作用のネットワーク解析の競争へと質的な変化を遂げている。この競争に勝ち残るためには、重要な機能を有する未知の蛋白質の候補をより早く見つけ出し、その機能をより早く解析し、そして遺伝子組換えによる高機能蛋白質をより早くつくり出す技術を確立する必要がある。これを実現するためには、極微量の生体分子の単離・精製・機能アッセイを高速に行う技術が必須である。そのため、半導体微細加工技術と生物学技術の融合によるマイクロ化学分析システムが有効であると期待されている。

筆者らは、エバネッセント場による蛍光顕微鏡法を用いて生体分子の機能や生体分子間相互作用を1分子レベルで構成的に解析する技術を開発している。また、生体分子や超分子複合体(オルガネラ)を、マイクロチップを用いて物理的に分離・回収し、その構成成分を同定することにより、生体分子

間相互作用を分析的に解析することを試みている。両者の技術を組み合わせることにより、生体分子間相互作用の解析技術を飛躍的に向上させることを目指している。

エバネッセント場照明による蛋白質機能と 相互作用の1分子イメージング

ヒトゲノムの塩基配列が明らかになり、蛋白質の機能解析と蛋白質間相互作用がポストゲノムの重要な課題となっている。1分子蛍光イメージング法は、これらの問題を解明するための基盤技術を提供すると期待されている。すでに、1分子蛍光イメージング法を用いて、1分子の酵素反応^{1,2)}、モーター蛋白質の運動³⁻⁵⁾、蛋白質間相互作用^{6,7)}がイメージングされている。さらに、細胞表面での受容体とリガンドの結合⁸⁾などが研究されている。以下では、エバネッセント場照明を使った1分子イメージングの研究例を紹介する。

蛋白質の大きさは光の波長よりもずっと小さいので、これを検出するには特別の工夫が必要である。生体分子に蛍光色素を結合させ、蛍光によって分

* Laboratory of Bio-Analytical Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo 東京大学大学院薬学系研究科生体分析化学教室

図1 エバネッセント場を発生させる照明法

- a : ガラスと水溶液の界面でレーザーを全反射させると侵入長が約 150 nm のエバネッセント場が発生する。これを用いて界面における生体分子間相互作用を観察する。
- b : ガラス表面に厚さ 100 nm のアルミニウムを蒸着し、直径 100 nm の微小な穴を開ける。この開口にガラス側から励起光を入射し、開口内に発生するエバネッセント場を用いて生体分子間相互作用を観察する。a の場合よりも数百倍高濃度(μM)の蛍光色素が溶液中に存在しても 1 分子検出が可能である。

子の存在がわかるようにしたのが蛍光顕微鏡法である。蛍光とは、色素分子が光のエネルギーを吸収して再び光を放射する現象であり、一般に吸収した光の波長よりも放射する蛍光波長のほうが長くなる。そのため、色素をレーザー光で励起して、その励起光を光学フィルターで除いて蛍光の放射光のみを検出するようにすれば、高感度な検出が可能になる。特に、カバーガラスと水溶液の界面で“エバネッセント場”を発生させて局所励起を行うことにより、1 分子の生体分子が機能している様子をイメージングできるようになった。エバネッセント場を発生させる最も簡単な方法は、全反射を利用する方法である(図 1a)。

高屈折率の媒質(ガラス)から低屈折率の媒質(水溶液)に臨界角以上で光を入射すると全反射が起こり、低屈折率の媒質の界面近傍にエバネッセント場が生成される。エバネッセント場は、界面から深さ方向に指数関数的に減衰する局所場である。このため、波長よりも短い領域を照明することができる。エバネッセント場も伝播光と同様に、物体による散乱を受けたり蛍光色素を励起することが可能である。散乱光や蛍光のみを伝播光として検出できるので、背景光がきわめて小さく、1 分子の蛍光色素の

観察に適している。エバネッセント場は界面のごく近傍しか照明しないので、背景光を抑えられるだけでなく、蛍光標識した生体分子を局所励起できるという利点がある。

まず、1 分子イメージングによる蛋白質相互作用の研究例を、シャペロニンによる蛋白質折りたたみ機構を例として解説する。蛋白質が機能を発揮するためには、ポリペプチドが正しく折れたたまれ、ある立体構造を形成する必要がある。この折りたたみを助けているのが分子シャペロンである。さまざまな分子シャペロンのなかで、最も研究が進んでいるのが大腸菌の GroEL である。GroEL は七つのサブユニット(分子量 57 k)からなる“かご”状のリングが 2 層に重なった構造をしている。GroEL に ATP が結合すると補助因子である“ふた”状の GroES と結合して巨大な空洞を持った複合体を形成する。この空洞の中でシャペロニンの基質となる蛋白質の折りたたみが起こる。蛍光色素 IC5 で標識した GroEL をガラスに固定し、変性蛋白質と ATP 存在下で蛍光標識した GroES が GroEL に結合・解離するダイナミクスを観察した。GroEL をガラス基板に固定し、別の蛍光色素 Cy3 で標識した GroES を溶液に加え GroEL と結合・解離の様子を観察した

図2 シャペロニン GroEL-GroES の結合解離の1分子蛍光イメージング

- a : 実験方法の模式図
 b : GroEL と GroES 分子の蛍光顕微鏡写真。○は GroEL 分子の位置を示している。
 c : GroEL と GroES の結合時間のヒストグラム。実線はグラフの上に示すように中間状態を経て解離するとして求めた近時曲線である。

(図 2a)。

GroES のブラウン運動は非常に早いので、ビデオでは蛍光の輝点として観察されず背景光となるだけである。したがって、ブラウン運動する分子は見えず、結合して止まった分子だけを観察できるのである。このように、分子のブラウン運動と全反射による局所励起を巧みに組み合わせることにより、

GroEL と GroES の 1 分子間相互作用をイメージングすることが可能になった(図 2b)。GroES の結合時間を解析した結果、GroES は、ある中間状態を経てから解離する二段階反応であり、それぞれの反応の時定数は 3 秒と 5 秒と見積もられた(図 2c)。

つぎに、この中間体がどのような役割を果たしているのかを明らかにするため、シャペロニン分子内で起こる変性蛋白質の折れたたみを 1 分子イメージングした。このために、変性した GFP は蛍光を発しないが折りたたむと再び蛍光を発する性質を利用した。まず、酸変性させた GFP を GroEL の入った溶液に希釈し、変性 GFP-GroEL 複合体を作製し、スライドガラス上に固定した。その後、GroES と Caged ATP(ATP に保護基を結合させて不活化した化合物。紫外光照射により保護基が分解しミリ秒で ATP が生成される)を加え、顕微鏡下で紫外線を照射して ATP を生成し、シャペロニンの反応を開始させた。その結果、紫外線照射後、3 秒たってから GFP の蛍光があらわれた。

このようにして、1 分子の蛋白質がフォールディングするところをはじめてイメージングすることに成功し、シャペロニンによる蛋白質折りたたみに特徴的な 3 秒のタイムラグが明らかになった。新たに見つかった GroEL 中間体は、GroES と変性蛋白質を両方結合していることを示している。GroEL は、変性蛋白質、GroES と順を追って解離することで確実に基質蛋白質をみずからの空洞に閉じ込めていることが、1 分子蛍光イメージング法によって明らかになった⁷⁾。

このように、全反射によるエバネッセント照明は、ガラス近傍のみを照明するのに有効であるが、2 次的には局所励起を実現できていない。このため、ブラウン運動する蛍光分子が背景光になり、1 分子の蛍光分子を見るためには、溶液中の分子の濃度を 50 nM 以下に抑える必要があった。また、生体分子がガラスに吸着されにくい性質であることが必要条件であった。このように厳しい制約があるので、多分子系の実験を、すべて一分子系の実験に移行できるわけではなかった。しかし、ガラス基板上にアルミニウム薄膜を 100 nm 蒸着し、直径 100 nm の微小開口を配列させた構造が考案され、エバ

図3 マイクロソーターの構成

- a : ガラス基板内の貫通孔と微小流路の配置図 (単位は μm)
 b : 微小流路の分岐部の光学顕微鏡写真
 c : マイクロソーターの光学、電子機器システム構成

ネッセント場が縦、横、奥行き方向に3次的に制御できるようになった(図1b)。これを用いると、全反射型エバネッセント照明の場合よりも照射領域を1/1,000にすることができる。このため従来の濃度の限界より数百倍も高い濃度(μM)の生体分子を溶液中に漂わせながら、蛍光相関分光法や1分子蛍光イメージング法を用いて生体分子間相互作用をイメージングすることができるようになった。この技術と、DNA合成酵素が γ リン酸を蛍光標識したヌクレオチドを取り込みながらDNAを合成するのを利用して、1分子のDNAの塩基配列を解読することが試みられている⁹⁾。筆者らは、この手法を用いてGroELとGroESの相互作用を高濃度の条件でイメージングし、GroELの二つのリングがGroESを交互に結合するのか同時に結合するのかを明らかにしようと試みている。

超分子複合体を分離・回収するためのマイクロソーターの開発

生体分子のなかには、たとえばATP合成酵素のように1分子で機能を発揮するものが知られている¹⁰⁾。しかし一方、生体分子は単一分子で機能を発揮するとはかぎらず、オルガネラなどの超分子複合

図4 Mebiol gelの構造式

体を構成してはじめて機能を発揮する場合もある。超分子複合体の構成成分を明らかにするためには、超分子複合体の構造を保ったまま精製する必要がある。従来、免疫沈降法によってオルガネラの精製が試みられてきたが、この方法では細胞内の極微量のオルガネラを純度よく単離することは困難であった。そのため構成成分がいまだに同定されていないオルガネラが多い。このため、生体分子やオルガネラを物理的に高純度に単離・精製する技術の開発が必要とされている。

筆者らの研究グループでは、微細加工技術を用い

図5 Mebiol gel のレーザー加熱による分離操作の原理(a)と大腸菌の分離例(b)

て微小流路をチップ上に作製し、蛍光標識した生体試料を1分子蛍光顕微鏡にて高感度に検出し、分離するシステムの開発を行っている。このためには、微小なバルブによる流体制御が必須であるが、これを実現するため、温度感受性ハイドロゲルのゾルゲル相転移をレーザー局所加熱にて制御し、生体試料溶液を高精度に流しわける技術を開発した。以下に、その詳細を解説する。

まず、微細加工技術により、幅 $30\ \mu\text{m}$ 、深さ $5\ \mu\text{m}$ の微小流路をガラス基板に作製し(図3ab)、シリンジポンプによって生体試料溶液を送り込む。流路の形状は、入力1チャンネル、出力2チャンネル(回収チャンネルと廃棄チャンネル)のY字型をしている。試料溶液には昇温型温度感受性ハイドロゲルである Mebiol Gel を添加しておく。図4に示すように、Mebiol gel は poly(*N*-isopropylacrylamide) と poly(oxyethylene) の共重合体である。poly(*N*-isopropylacrylamide) の部分が温度の上昇に伴って疎水的になり、網目構造をとる。そのため、Mebiol gel は、室温で流動性の高いゾル状態であるが、 36°C を境に粘弾性の高いゲル状態に可逆的に相転移する性質を有している¹¹⁾。これを利用して流体

の粘性を変えたり流れを止めるバルブの役割を担わせることが可能である。

微小流路中を流れる試料の観察と蛍光検出、ならびに赤外レーザーの照射は倒立顕微鏡の同一の対物レンズを通して行う(図3c)。溶液を局所加熱するため、水の吸収波長である $1,480\ \text{nm}$ の赤外レーザーを使用し、出力チャンネルの一方に集光して加熱した。蛍光試料を観察するために顕微鏡にはイメージインテンシファイアのついた高感度 CCD カメラが搭載してある。試料を分離する場合は、流路の分岐部の上流 $80\sim 100\ \mu\text{m}$ における蛍光を光電子増倍管(PMT)によって測定し、その蛍光強度に応じてスキャナミラーの角度を調節して回収または廃棄チャンネルの一方を塞ぎ、標的物質の自動回収を実現した。分離の基本動作を図5に示す。蛍光試料がない状態では右側分岐部を加熱し、左側分岐に廃棄する(a)。蛍光試料が検出されると加熱位置を切り替え(b)、蛍光試料を右側分岐に流し込み(c)、aの状態に戻る。

このシステムの評価として、まず赤外レーザーの局所加熱によって溶液の流れを制御できることを確かめた。赤外レーザーを分岐部に集光し、共振型ガ

ルバノミラーでライン上に走査することによってゲル化させ、溶液の流れを完全に塞ぎ止められることが確認できた。加熱される領域の幅は約 $10\ \mu\text{m}$ と狭く、また照射時間も短時間のため生体試料への障害もない。加熱箇所を切り替えたときの蛍光ビーズの流れを高速カメラで $1\ \text{ms}$ ごとに測定して応答速度を測定した結果、ゾル化・ゲル化に伴うバルブ開閉速度はともに $3\ \text{ms}$ だった。つぎに、大小の蛍光ビーズ(混合比率 1:1)を $8.5\ \text{fM}$ の濃度で流し込み、大きいビーズを検出分離した(図 5 の蛍光写真)。このときの流量は $5\sim 10\ \text{nL/min}$ であり、分離後の大きいビーズの割合は 0.94 だった。また、検出・分離の 1 サイクルにかかる時間は $100\sim 150\ \text{ms}$ だった。生体試料への応用評価として、緑色蛍光蛋白質(GFP)または赤色蛍光蛋白質(DsRed)を発現している大腸菌の分離を行った。GFP を発現している大腸菌を検出し、DsRed 大腸菌を夾雑物として分離したところ、GFP 大腸菌の分離後の割合は、サンプル溶液の流速にはあまり依存せず、夾雑物である DsRed 大腸菌の濃度が濃くなるに従い低下した。夾雑物の濃度が $10^7\ \text{cells/ml}$ 以下ならば、純度 90% 、回収率 80% の分離・回収が可能だった¹²⁾。

これまでに述べた分離法では、Mebiol gel により流路の一方を完全に塞いだか、試料溶液の流れを二つの層流で挟みこむことにより、より高感度の蛍光検出と、より高速な分離が可能になった。この方式では、分岐部を流れる層流の抵抗を加熱によって変化するだけで試料の分離が可能のため $3\ \text{ms}$ の時間分解能で検出と分離・回収が可能になっている¹³⁾。これらのソーター技術を用いて実際に細胞内のオルガネラを単離し、2次元電気泳動法やクロマトグラム、質量分析器などを用いて、構成蛋白質や脂質などの同定を試みたい。また、生体分子間相互作用の 1 分子検出技術と分子ソーター技術を組み合わせることにより核酸ライブラリーのなかから有用な核酸(たとえば RNA アプタマー)を選別したり、さらに突然変異(分子進化)により機能改善や新機能分子の創製が可能になるだろう。

おわりに

本研究は、① 生体分子ソーターを用いて超分子複合体やオルガネラの構成要素を分析的に解析し、さらに、② ナノ開口を用いた 1 分子検出装置(解離定数が μM の弱い相互作用も検出可能)を用いて生体分子の結合を 1 分子解析する、という二つの手法を縦横に駆使して生体分子間相互作用を解明する点で、オリジナルなものである。

特に、ナノ開口を用いた 1 分子検出装置は 1 分子機能解析が可能であり、きわめて汎用性にすぐれている。これらの技術が実現すれば、生体分子機能の機能評価、新機能分子の創製、生体分子間相互作用の網羅的解析を飛躍的に向上させることが可能となり、生物・化学・薬学・医学領域の研究と診断に大きな貢献ができると期待される。

本研究は、吉田賢右(東京工業大)、田口英樹・多田隈尚史・上野太郎(東京大)、庄子習一・大泊巖・白崎善隆(早稲田大)氏らとの共同研究の成果を紹介したものである。以上の共同研究者に感謝する。

文 献

- 1) Funatsu T, Harada Y, Tokunaga M, Saito K, Yanagida T : Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution. *Nature* 374 : 555-559, 1995.
- 2) Lu HP, Xun L, Xie XS : Single-molecule enzymatic dynamics. *Science* 282 : 1877-1882, 1998.
- 3) Vale RD, Funatsu T, Pierce DW, Romberg L, Harada Y, Yanagida T : Direct observation of single kinesin molecules moving along microtubules. *Nature* 380 : 451-453, 1996.
- 4) Yildiz A, Forkey JN, McKinney SA, Ha T, Goldman YE, Selvin PR : Myosin V walks hand-over-hand : single fluorophore imaging with 1.5nm localization. *Science* 300 : 2061-2065, 2003.
- 5) Yamaguchi J, Nemoto N, Sasaki T, Tokumasu A, Mimori Kiyosue Y, Yagi T, Funatsu T : Rapid functional analysis of protein-protein interactions by fluorescent C-terminal labeling and single-molecule imaging. *FEBS Lett* 502 : 79-83, 2001.
- 6) Taguchi H, Ueno T, Tadakuma H, Yoshida M, Funatsu T : Single-molecule observation of protein-protein interactions in the chaperonin system. *Nat Biotechnol* 19 : 861-865, 2001.
- 7) Ueno T, Taguchi H, Tadakuma H, Yoshida M, Funatsu T : GroEL mediates protein folding with a two successive timer mechanism. *Mol Cell* 14 : 423-434, 2004.
- 8) Sako Y, Minoguchi S, Yanagida T : Single-molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells. *Nat*

- Cell Biol 2 : 168-172, 2000.
- 9) Levene MJ, Korlach J, Turner SW, Foquet M, Craighead HG, Webb WW : Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations. *Science* 299 : 682-686, 2003.
 - 10) Yasuda R, Noji H, Yoshida M, Kinoshita K Jr, Itoh H : Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F1-ATPase. *Nature* 410 : 898-904, 2001.
 - 11) Yoshioka H, Mikami M, Mori Y, Tsuchida E : A synthetic hydrogel with thermoreversible gelation .I Preparation and rheological properties. *Journal of Macromolecular Science-Pure and Applied Chemistry* A31 : 113-120, 1994.
 - 12) Shirasaki Y, Tanaka J, Makazu H, Tashiro K, Shoji S, Tsukita S, Funatsu T : On-chip cell sorting system using laser-induced heating of a thermoreversible gelation polymer to control flow. *Anal Chem* 78 : 695-701, 2006.
 - 13) Arakawa T, Shirasaki Y, Aoki T, Funatsu T, Shoji S : Three-dimensional sheath flow sorting microsystem using thermalsensitive hydrogel. *Sensors and Actuators A*, (in press).