

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（A）
研究期間：2006～2008
課題番号：18201025
研究課題名（和文） 超微小溶液チャンバーを用いた生体分子 1 分子計測技術の開発
研究課題名（英文） Development of femtoliter chamber for single-molecule analysis of biological reaction
研究代表者
野地 博行 (NOJI HIROYUKI)
大阪大学・産業科学研究所・教授
研究者番号：00343111

研究成果の概要：

申請者が独自に開発した超微小溶液チャンバーを用いた 1 分子 DNA 解析技術の確立を中心に研究を行った。その結果、1 分子制限酵素反応、1 分子 DNA 増幅反応、1 分子 F1 モーター反応効率計測に成功した。また、これまでのチャンバーとは異なり、溶液の添加・回収が可能なドロプレット型のチャンバーの開発も行った。これによって、酵素反応開始や細胞培養も可能となった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	16,700,000	5,010,000	21,710,000
2007 年度	15,600,000	4,680,000	20,280,000
2008 年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
年度			
総計	40,100,000	12,030,000	52,130,000

研究分野：ナノ材料・ナノバイオサイエンス

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学・ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：(1)超微小溶液チャンバー(2)1 分子計測(3)回転分子モーター(4)1 分子 DNA 解析(5)制限酵素

1. 研究開始当初の背景

マイクロ加工技術を用いて silicon 基板上にミクロンサイズの円柱構造を作成し、これを鋳型としてシリコンゴム表面にマイクロサイズの窪みを作成した。これとガラス基板との間に溶液を封じ込めることで体積がわずかフェムトリットルしかないチャンバーアレイを開発した。これを用いて、β ガラクトシダーゼや F1 モーター逆回転時の 1 分子

活性計測に成功した。

2. 研究の目的

本研究は、この手法をさらに幅広くとることで DNA 解析等に应用することを目的とした。また、より幅広い応用を可能とするために、チャンバー内部への溶液添加や溶液回収を可能とする新しいシステムの開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 1分子 DNA 解析実験

1分子の DNA の配列特性を解析するための制限酵素反応をチャンバー内部で実施した。このとき、制限酵素による DNA 断片の長さ測定のために交流電界による DNA 伸長を行った。電界印加のために、チャンバーはこれまでの PDMS ではなく新しく Porous なアクリルアミドから作成した。また、汎用性の高いもう一つの DNA 解析技術は特異的配列を持つ DNA の増幅反応である。そこで、本研究では等温での増幅が可能な LAMP 法を 1分子単位で実施した。

(2) 1分子 F1 解析実験

以前の実験では、F1 モーターを逆回転させた際の ATP 合成能を計測したが、本研究では逆に正方向に強制回転した際の ATP 分解能を計測した。

(3) 新しいマイクロチャンバー

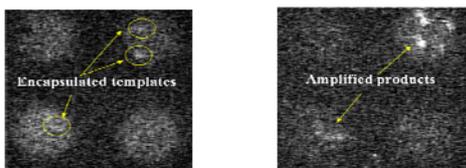
これまでのマイクロチャンバーは溶液や試料を閉じ込めることができるが、そのあとの溶液の添加や溶液の回収は不可能であった。そこで、本研究では、Water in Oil 型のドロプレットをアレイ状にしたシステムを開発した。

4. 研究成果

(1) 1分子 DNA 解析実験

1分子制限酵素反応では、ほぼ 100%の高率で反応が起こった。これは、これまで基板に固定化して行われてきた 1分子レベルの制限酵素反応よりはるかに効率が低い。本研究では DNA 分子を固定化していない効果が出ていると思われる。また、切断された DNA フラグメントの長さ計測も可能であることが実証された。

1分子 DNA 増幅実験では、約 70%の高率で DNA 増幅が行われた。LAMP 法は生成される DNA 断片長が均一ではないため、検出できなかった反応生成物もあると思われる。



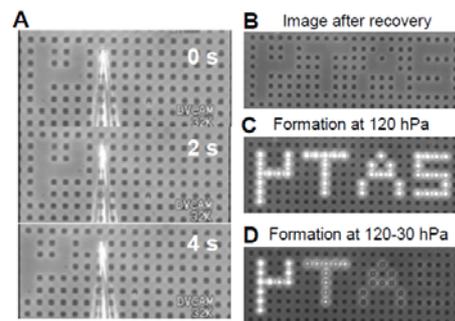
左：増幅前のチャンバー中の DNA 蛍光像。右：増幅反応後の DNA 像

(2) 1分子 F1 解析実験

自然回転速度より 10 倍高速に回転させても加水分解反応が起こることから、F1 モーターの反応速度は回転角度とともに上昇することが示された。

(3) 新しいマイクロチャンバー

アレイ作成後に酵素反応を開始することや、ドロプレット中での細菌の培養が可能となった。また、溶液添加の際に、水圧を制御することで添加体積を制御することが可能であることを見出した。



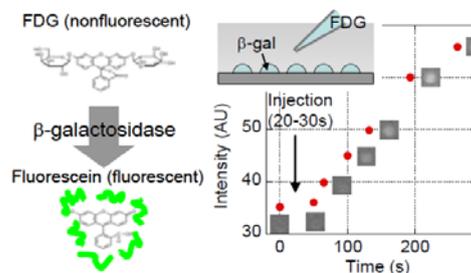
ドロプレット型のチャンバー。右は、マイクロピペットを用いた溶液回収のイメージ。右は、溶液添加のイメージ。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Okuno D, Fujisawa R, Iino R, Hirono-Hara Y, Imamura H, Noji H, Correlation between the conformational states of F1-ATPase as determined from its crystal structure



ドロプレット型のチャンバー中における酵素反応計測。時刻 0 で酵素基質 (FDG) を添加することによる反応開始を行っている。

- and single-molecule rotation, Proc. Natl. Acad. Soc. U.S.A, 105, 20722-20727、2008、有
- ② Matsumoto S, Yamaguchi S, Ueno S, Komatsu H, Ikeda M, Ishizuka K, Iko Y, Tabata KV, Aoki H, Ito S, Noji H, Hamachi I, Photo gel-sol/sol-gel transition and its patterning of a supramolecular hydrogel as stimuli-responsive biomaterials. Chemistry, 14(13), 3977-3986, 2008、有
- ③ Lam L, Sakakihara S, Ishizuka K, Takeuchi S, Arata HF, Fujita H, Noji H Loop-mediated isothermal amplification of a single DNA molecule in polyacrylamide gel-based microchamber, Biomed Microdevices, 10(4), 539-546, 2008、有
- ④ Watanabe R, Iino R, Shimabukuro K, Yoshida M, Noji H, Temperature-sensitive reaction intermediate of F1-ATPase. EMBO Rep, 9(1), 84-90, 2008、有
- ⑤ Le Pioufle B, Suzuki H, Tabata KV, Noji H, Takeuchi S, Lipid bilayer microarray for parallel recording of transmembrane ion currents, Anal Chem 7(12), 1738-1745, 2008、有
- ⑥ Lam L, Sakakihara S, Ishizuka K, Takeuchi S, Noji H, An integrated system for enzymatic cleavage and electrostretching of freely-suspended single DNA molecules, Lab Chip, 7(12), 1738-1745, 2007、有
- ⑦ Adachi K, Oiwa K, Nishizaka T, Furuike S, Noji H, Itoh H, Yoshida M, Kinoshita K Jr, Coupling of rotation and catalysis in F(1)-ATPase revealed by single-molecule imaging and manipulation, Cell, 130(2), 309-321, 2007、有
- ⑧ Arata, H.F., Low, P., Ishizuka, K., Bergaud, C., Kim, B., Noji, H. and Fujita, H Temperature distribution measurement on microfabricated thermodevice for single biomolecular observation using fluorescent dye., Sensors and Actuators, B: Chemical, 117(2), 339-345, 2006、有
- ⑨ Lee, S.W., Yamamoto, T., Noji, H. and Fujii, T., Chemical delivery microsystem for single-molecule analysis using multilaminar continuous flow, EBzyme and Microbial Technology, 39(3), 519-525, 2006、有
- ⑩ Arata, H.F., Noji, H. and Fujita, H. Motion control of single F1-ATPase rotary biomolecular motor using microfabricated local heating devices APPLIED PHYSICS LETTERS, 88, 083902, 2006、有
- [学会発表] (計 6 件)
- ① Single molecule biophysics of F1-ATPase: Mechanical modulation of reaction rate constants and equilibrium constants by F1-ATPase, 第 6 回 Asian biophysics Association Symposium, 2009/1/11 HKUST(Hong Kong)
- ② Femtoliter chamber for Single-molecule and single-cell analysis, 第 4 回 IEEE-NEMS 09, 2009/1/6 Shinsen(China)
- ③ Single molecule studies on F1-ATPase molecular motor, 第 16 回 International Colloquium on Scanning Probe Microscopy, 2009/12/13 Izu, atagawa(Japan)
- ④ Single-molecule Imaging of the transport-vesicle formation mediated by COPII system reconstituted on a planar bilayer system, 第 17 回 CDB 会議(Organizer), 2008/10/14-15 Kobe(Japan)
- ⑤ Mechanical modulation of ATP-binding and hydrolysis by single F1-ATPase molecule, MPSA2008, 2008/8/29 Sapporo(Japan)
- ⑥ Single Molecule Studies on F1-ATPase, International Symposium on Hierarchy and Holism "Bridging across Different Hierarchies in Natural Sciences", 2008/2/23 Okazaki(Japan)
- [図書] (計 2 件)
- ① 野地 博行 丸善
「超微小溶液チャンバーを利用した 1 分子バイオアッセイ」
パリテイ 2008 年 09 月 1 日 P.13-18
- ② 金原数、竹内昌治、竹内正之、野地博行
化学同人「分子マシンに新たな扉が開かれた」最新分子マシン. ナノで働く“高度な機械”を目指して (2008 年) P. 4-14

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：細胞検体の異物排出活性検出方法、及びその利用。

発明者：飯野亮太，西野邦彦，仲田昌義，榊原昇一，山口明人，野地博行

権利者名：国立大学法人大阪大学

種類：公開特許

出願番号：特願 2006-294558

出願年月日：平成 18 年 10 月 30 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野地 博行 (NOJI HIROYUKI)

大阪大学・産業科学研究所・教授

研究者番号：00343111

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし