

平成 21 年 4 月 3 日現在

研究種目：基盤研究 (B)  
 研究期間：2006-2008  
 課題番号：18370066  
 研究課題名 (和文) 分子イメージングによるリアルタイム分子間相互作用解析法の開発  
 研究課題名 (英文) Development of real-time analysis system of molecular interactions using molecular imaging technique  
 研究代表者  
 原田 慶恵 (HARADA YOSHIE)  
 京都大学・物質-細胞統合システム拠点・教授  
 研究者番号：10202269

## 研究成果の概要：

生体分子を結合させたマイクロビーズをガラス基板上にアレイ化する技術と全反射蛍光顕微鏡を組み合わせて、生体分子間相互作用を高感度に解析できる顕微鏡システムの開発を行った。このシステムは、微量な試料で複数の生体分子間の結合・解離過程を同時に実時間解析することができる。このシステムを使って、抗原-抗体反応、タンパク質-DNA 間相互作用、低分子化合物-タンパク質間の相互作用解析だけでなく、抗体を利用し、生物試料抽出液中の特定タンパク質の濃度を結合速度から定量できることを示した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2007年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2008年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

## 研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：マイクロアレイ、全反射顕微鏡、生体分子、マイクロビーズ

## 1. 研究開始当初の背景

モデル生物での全ゲノム塩基配列の解析が進み、膨大な量の遺伝子情報が得られている。次の研究対象として、遺伝子情報の最終産物であるタンパク質の機能解析に目が向けられてきている。タンパク質は、他の生体分子との相互作用を通してその機能を発揮する。したがって、それらの相互作用の解析はタンパク質の機能を明らかにするために必須課題である。

## 2. 研究の目的

マイクロビーズアレイ化技術を基盤として、極微量のサンプルで一度に多検体の生体分子をリアルタイムに検出できる技術確立し、「リアルタイム分子間相互作用解析」および「1細胞レベルでの定量解析」に対応できる総合解析システムの開発を目指す。

## 3. 研究の方法

本研究で開発するシステムは、ガラス基板上にプローブとなる分子を高密度にアレイ化し、蛍光標識した相互作用を解析する相手分子を加え、各々のスポットでの振る舞いを

蛍光顕微鏡で観察する方法である。顕微鏡で直接観察することによって、一度に多くの試料について「相互作用する相手の分子が何であるか？」と「どのような相互作用をしているか？」を同時に解析できる。さらに、エバネッセント照明法を用いることで、リアルタイム観察時に問題となる標的分子に結合していない蛍光標識分子によるバックグラウンドを回避できる。また、アレイ化タンパク質や蛍光標識するタンパク質を *in vitro* 転写・翻訳システムを用いて合成することにより、比較的容易かつ短時間に試料が得られ、発現系に工夫をすることで様々な修飾を行ったり、目的部位への蛍光色素導入や基板固定用タグの導入が可能になる。

#### 4. 研究成果

解析する生体分子を結合させたマイクロピーズをガラス基板上にアレイ化し、蛍光標識した試料との相互作用を、全反射照明を組み込んだ蛍光顕微鏡で観察することで、微量な試料で複数の生体分子間の結合・解離過程を同時に実時間解析できる系を開発した。この系を使って、抗原-抗体反応、タンパク質-DNA間や低分子化合物-タンパク質間の相互作用解析だけでなく、生物試料抽出液中の特定タンパク質の濃度を結合速度から定量化できることなどを確認した。さらにこの系にPDMS製のマイクロウェルを組み合わせ、1個の細胞中に存在するタンパク質の定量、1細胞内の酵素活性測定、さらに1個の細胞が分泌するタンパク質の検出なども行うことができるようになった。

#### 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 5 件)

1. H. Yokota, Y.-W. Han, J.-F. Allemand, X.-G. Xi, D. Bensimon, V. Croquette, Y. Ito, and Y. Harada: Single-molecule visualization of binding modes of helicase to DNA on PEGylated surface. *Chemistry Letters* 38, 308-309 (2009)
2. Y. Sasuga, T. Iwasawa, K. Terada, Y. Oe, H. Sorimachi, O. Ohara, and Y. Harada: Single-cell chemical lysis method for analyses of intracellular molecules using an array of picoliter-scale microwells *Anal. Chem.*, 80: 9141-9149 (2008)
3. Masahito Hayashi and Yoshie Harada: Direct observation of the reversible unwinding of a single DNA molecule caused by the intercalation of ethidium bromide. *Nucleic Acids Research* 35(19), e125 (2007)
4. Yong-Woon Han, Tomomi Tani, Masahito

Hayashi, Takashi Hishida, Hiroshi Iwasaki, Hideo Shinagawa and Yoshie Harada: Direct observation of DNA rotation during branch migration of Holliday junction DNA by *Escherichia coli* RuvA-RuvB protein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103 (31), 11544-11548 (2006)

5. Yasuhiro Sasuga, Tomomi Tani, Masahito Hayashi, Hisashi Yamakawa, Osamu Ohara and Yoshie Harada: Development of a microscopic platform for real-time monitoring of biomolecular interactions. *Genome Res.* 16, 132-139 (2006)

[学会発表] (計 25 件)

1. Sasuga, Y., Tani, T., Hayashi, M., Yamakawa, H., Ohara, O. and Harada, Y.: Development of a microscopic platform for real-time monitoring of biomolecular interactions. Gordon Research Conference 2006 Single Molecule Approaches To Biology, 2006.6.17-22, New London, USA
2. Yong-Woon Han, Tomomi Tani, Masahito Hayashi, Takashi Hishida, Hiroshi Iwasaki, Hideo Shinagawa, and Yoshie Harada: Direct observation of DNA rotation during branch migration of Holliday junction DNA by *Escherichia coli* RuvA-RuvB protein complex. International symposium on Bio-nanosystems, 2006.9.1~3 仙台
3. Miki, T., Sakamoto, S., Yokota, H. and Harada, Y.: Labeling of iron-sulfur protein with a fluorescent dye to detect its conformation change in the cytochrome bc<sub>1</sub> complex. Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2006.11.12-16, Okinawa, Japan
4. Kato, Y., Yokota, H., Hayashi, M., Terada, K., Sasuga, Y. and Harada, Y.: Direct observation of T7 RNA polymerase rotation during transcription. Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2006.11.12-16, Ginowan City, Japan
5. Hayashi, M. and Harada, Y.: Direct observation of the twisting motion of a single DNA molecule caused by the intercalation of ethidium bromide. Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2006.11.12-16, Ginowan City, Japan
6. Yokota, H., Han, Y.-W., Allemand, J.-F., Xi, X., Croquette V., Bensimon, D. and Harada,

- Y.: Novel microscopy for simultaneous single molecule measurement of DNA/protein interaction. Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2006.11.12-16, Ginowan City, Japan
7. Nomura, M., Tani, T. and Harada, Y.: Live imaging of growth cone regeneration after axotomy of dorsal root ganglion neurons. Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2006.11.12-16, Ginowan City, Japan
  8. Okabe, K., Harada, Y. and Funatsu, T.: Real Time Imaging of Specific Messenger RNA in a Living Cell Using Artificial Nucleic Acids. Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2006.11.12-16, Ginowan City, Japan
  9. Sasuga, Y., Iwasawa, T., Terada, K., Sorimachi, H., Ohara, O. and Harada, Y.: Development of a microscopic platform for single-cell analyses using picoliter microwell array. Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 2006.11.12-16, Ginowan City, Japan
  10. 岩澤朋之、貴家康尋、原田慶恵: 一細胞中の酵素活性測定技術の開発  
2007 年生体運動研究研究合同班会議, 2007.1.7-9, 金沢
  11. 貴家康尋, 小原收, 原田慶恵: マイクロビーズを利用した *in vitro* 生体分子間相互作用解析法と単一細胞解析技術の開発. BMB2007 ワークショップ, 2007.12.11, 横浜 (招待講演)
  12. 薄井(青木)一恵, 貴家康尋, 岡崎規理子, 小原玲子, 原田慶恵, 小原收: マイクロ流路を利用した迅速なタンパク質相互作用検出システムの開発 BMB2007, 2007.12.11, 横浜
  13. 貴家康尋, 寺田佳代子, 大江良洋, 小原收, 原田慶恵: マイクロウェルアレイを用いた単一細胞分泌タンパク質解析法の開発. 日本生物物理学会第 45 回年会, 2007.12.21-23, 横浜
  14. Yokota, H., Han, Y-W., Allemand, J-F., Xie, X., Croquette, V., Bensimon, D. and Harada, Y.: Single-molecule Observation of DNA/helicase Interaction by Novel Microscopy. Joint Meeting of the Biophysical Society 52<sup>nd</sup> Annual Meeting & 16<sup>th</sup> International Biophysics Congress, 2008.2.2-6, Long Beach.
  15. Okabe, K., Harada, Y. and Funatsu, T.: Real Time Quantitation of an Endogenous mRNA in Single Living Cells. Joint Meeting of the Biophysical Society 52<sup>nd</sup> Annual Meeting & 16<sup>th</sup> International Biophysics Congress, 2008.2.2-6, Long Beach
  16. Yamagishi, M., Ishihama, Y., Shirasaki, Y., Kurama, H. Sasuga, Y., Terada, K., Harada, Y. and Funatsu, T.: Effect of Zipcode Sequence and Molecular Weight of mRNA on Its Subcellular Localization Revealed by Single Molecule Imaging. Joint Meeting of the Biophysical Society 52<sup>nd</sup> Annual Meeting & 16<sup>th</sup> International Biophysics Congress, 2008.2.2-6, Long Beach
  17. Yokota, H., Han, Y-W., Allemand, J-F., Xie, X., Croquette, V., Bensimon, D. and Harada, Y.: Single-molecule Observation of DNA/helicase Interaction by Novel Microscopy.. The first iCeMS Symposium, featuring mesoscopic interactions in cells and cellular membranes and the 11th International Membrane Research Forum, 2008.2.20-22, Kyoto City
  18. Yoshie Harada Single-molecule experiments on DNA motors The First iCeMS Symposium and the 11th Membrane Research Forum 2008.2.21 Kyoto.
  19. 大江良洋、貴家康尋、原田慶恵 マイクロ流路とマイクロビーズを組み合わせた新規生体分子間相互作用検出法 第 8 回日本蛋白質科学会年会 2008.6.11 東京
  20. Yoshie Harada Studies on biomolecules using single-molecule imaging and manipulation techniques 8<sup>th</sup> International Conference on Excitonic Processes in Condensed Matter (EXCON'08) 2008.6.26 Kyoto (Invited)
  21. Sasuga, Y., Iwasawa, T., Ooe, Y., Ohara, O. and Harada, Y.: A simple single-cell chemical lysis method for analyses of intracellular molecules using a picoliter-scale microwell array Gordon Research Conference
  22. 原田慶恵 マイクロビーズアレイとマイクロウェルを使った 1 細胞タンパク質解析法の開発 バイオナノ研究会 2008.9.5 宮城 青根温泉
  23. Yoshihiro Ooe, Ysuhiro Sasuga, Osamu Ohara and Yoshie Harada A novel protein array using microbeads aligned in a microfluidic chip. 日本生物物理学会 第 46 回年会 2008.12.3-5 福岡
  24. Yasuhiro Sasuga, Yoshihiro Ooe, Osamu Ohara and Yoshie Harada A simple single-cell lysis method for analyses of intracellular molecules using a picoliter-scale microwell array The 6<sup>th</sup> Asian Biophysics

- Association (ABA) Symposium 2009. 1.  
11-15 Hong Kong
25. Yoshihiro Ooe, Yasuhiro Sasuga Osamu Ohara and Yoshie Harada A novel protein array using microbeads aligned in a microfluidic chip. Biophysical Society 53<sup>rd</sup> Annual Meeting 2009.2.28-3.4. Boston USA

[図書] (計 9 件)

1. 原田慶恵、横田浩章 バイオマシン・生物分子モーター  
細胞工学 秀潤社 878-883 Vol. 25 No. 8 (2006)
2. 原田慶恵 一分子観察, 蛍光顕微鏡, 蛍光色素, 光ピンセット. ナノバイオ辞典, テクノシステム, (2007)
3. 原田慶恵 一分子蛍光法  
化学と生物 日本農芸化学会 会誌 340-346 vol. 45 No. 5 (2007)
4. 原田慶恵 DNA モーター  
生物物理学ハンドブック 353-356 朝倉書店 (2007)
5. 原田慶恵 DNA モーター非侵襲・可視化技術ハンドブック、エヌ・ティー・エス、738-747 (2007)
6. 横田浩章, 原田慶恵 光ピンセット. 生命科学のための機器分析実験ハンドブック (実験医学別冊) 第3章顕微解析 4. (羊土社), 99-104 (2007)
7. 原田慶恵 1分子イメージング. 生命科学のための機器分析実験ハンドブック (実験医学別冊) 第7章イメージング解析 3. (羊土社), 237-242 (2007)
8. 原田慶恵 1分子が見えた!. 1枚の写真館 細胞工学 27(5), 425 (2008)
9. 原田慶恵 光トラップ 分子細胞生物学辞典 第2版 東京化学同人

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

特許出願 **2007-195476** (マイクロ流路形成体を利用したマイクロビーズアレイ用チップ、マイクロビーズアレイ及びこれらを用いた被検物質を検出する方法)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

原田 慶恵

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・教授

研究者番号：10202269

### (2) 研究分担者

横田 浩章

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・特定拠点講師

研究者番号：90415547