

## 自己評価報告書

平成23年4月8日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2012

課題番号：20310069

研究課題名（和文）ナノ加工ガラスを用いた細胞膜タンパク質一分子蛍光その場観察手法の開発

研究課題名（英文）Single-Molecule Fluorescence Imaging of Cell-Membrane Protein Using Nano-Structured Glass Slide

## 研究代表者

谷井 孝至（TANII TAKASHI）

早稲田大学・理工学術院・准教授

研究者番号：20339708

研究分野：複合新領域

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分子イメージング・ナノ計測

## 1. 研究計画の概要

細胞膜上で高濃度に発現した膜タンパク質間の相互作用を、リアルタイムにその場で観察するための一分子蛍光イメージング法を開発する。我々が提案するこの新手法は、半導体微細加工技術を活用して、細胞を接着させるスライドガラスに予めナノ加工を施し、作製したナノ構造配列を通してエバネッセント場を局部的に発生させることにより、細胞膜上に高濃度に発現したタンパク質を1分子ずつ識別し、それらの間の結合・解離の様子をリアルタイムにイメージングする。このナノ加工スライドガラスの設計と作製を行い、細胞膜上のタンパク質を1分子レベルで蛍光観察する。

## 2. 研究の進捗状況

本研究は下記の5段階から成り、2010年度（5年計画の3年目）では、(4)までを完了し、残り2年間で(5)を達成する計画となっている。

## (1)細胞観察に適した構造へのナノ加工スライドガラスの改良

本研究の開始年までに、我々は水溶性タンパク質の一分子観察に成功していた。このスライドガラスの形状を細胞膜タンパク質の観察に適した構造に改良した。具体的には、テトラエチルオルソシリケート（TEOS）の気相成膜により透明なガラスを導波路内に埋め込む技術と、表面の平坦化技術を確立した。

## (2)平坦なガラス基板上での効率的なエバネッセント場の生成

試作したナノ導波路から染み出す励起光を、回折限界を超えて波長以下の長さを有する半球領域に閉じ込めることにより、膜タンパク質の一分子蛍光観察が可能となる。したがって、導波路形状と染み出し励起光体積との関係の詳細を見積もった。その結果、試作した導波路が500nmの濃度以下での一分子観察を実現することを見出した。

## (3)ナノ導波路表面へのリガンドのパターニング

特定のタンパク質（リガンド）を導波路表面に選択的かつ活性を維持した状態で固定する技術を確立した。1個の導波路の直径は約100nmを有し、この微小領域に優先的にタンパク質を固定する技術を確立した。

## (4)細胞／基板界面の設計

実細胞観察の前準備として、人工脂質二分子膜を導波路表面に堆積して観察することを試みた。脂質二分子膜を均一に成膜する手法、および導波路を通して成膜した二分子膜を蛍光観察する手法を構築した。また、細胞体、細胞突起、仮足といった、細胞の特定部位を選択的に導波路表面の励起光領域に固定する手法も確立した。

## (5)細胞膜タンパク質の一分子観察

人工脂質二分子膜および実細胞を用いて、導波路表面にあるタンパク質同士の結合・解離をリアルタイムに可視化する実験を行う。

## 3. 現在までの達成度

③やや遅れている。

2. 研究の進捗状況において(1)から(3)につ

いてほぼ計画通り完了したが、(4)についてはやや遅れている。試作すべき導波路が、予想より微細な直径でなければならないこと、および高アスペクト比な構造でなければならないことが判明し、そのために、(1)導波路の作成プロセスの試行錯誤に時間を要したためである。

#### 4. 今後の研究の推進方策

前述した通り、導波路の形状に対する要求が厳しく、これが高濃度下でのタンパク質間相互作用の単分子蛍光観察を困難にしている。これまでに申請者が実績を有する水溶性タンパク質 (1 $\mu$ M での 1 分子観察の実績あり) を、改良した導波路を用いて観察することが、結果として、より難しい細胞膜タンパク質間相互作用解析実現への近道となると考えている。

したがって、残り 2 年間で、「(5)細胞膜タンパク質の単分子観察」を完了するために、すでに実績のある水溶性タンパク質間相互作用観察も進め、この知見を活用することにより、効率的に細胞膜タンパク質の単分子観察を実現し、進捗の遅れを回復する。

#### 5. 代表的な研究成果

(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 6 件)

1. J. Wada, S. Ryu, Y. Asano, T. Ueno, T. Funatsu, T. Yukawa, J. Mizuno, T. Tanii: Fabrication of Zero-Mode Waveguide by Ultraviolet Nanoimprint Lithography Lift-Off Process, Jpn. J. Appl. Phys., in press.
2. T. Tanii, K. Sasaki, K. Ichisawa, T. Demura, Y. Beppu, H. A. Vu, H. T. Chi, H. Yamamoto, Y. Sato: Application of Organosilane Monolayer Template to Quantitative Evaluation of Cancer Cell Adhesive Ability, Jpn. J. Appl. Phys., accepted for publication.
3. T. Sameshima, R. Iizuka, T. Ueno, J. Wada, M. Aoki, N. Shimamoto, I. Ohdomari, T. Tanii, T. Funatsu: Single-molecule study on the decay process of the football-shaped GroEL-GroES complex using zero-mode waveguides, The Journal of Biological Chemistry 285 (2010) 23159.
4. M. Suzuki, T. Ueno, T. Tanii, T. Funatsu, I. Ohdomari, et al.: "Effect of the C-Terminal Truncation on the functional Cycle of Chaperonin GroEL Implication"

The Journal of Biological Chemistry 283. 23931-23939 (2008)

5. T. Miyake, T. Tanii, T. Ueno, T. Funatsu, I. Ohdomari, et al.: "Real-Time Imaging of Single Molecule Fluorescence with a Zero-Mode Waveguide for the Analysis of Protein-Protein Interaction" Analytical Chemistry 80. 6018-6022 (2008).

[学会発表] (計 13 件)

1. T. Tanii, K. Sasaki, T. Demura, K. Ichisawa, H. Yamamoto, H. A. Vu, H. T. Chi, Y. Sato: Evaluation of Cell Adhesion Using Organosilane Monolayer Template - Green-Tea Catechin suppresses cancer cell adhesion -, 23rd International Micro- processes and Nanotechnology Conference, Nov. 11, 2010, Fukuoka.
  2. J. Wada, S. Ryu, Y. Asano, T. Yukawa, J. Mizuno, T. Tanii: Fabrication of Zero-Mode Waveguide Using Ultraviolet Nanoimprint Lithography Lift-Off Process, 23rd International Microprocesses and Nanotechnology Conference, Nov. 11, 2010, Fukuoka.
  3. 青木睦子, 上野太郎, 島本直伸, 谷井孝至, 船津高志, 大泊 巖, 他: "膜タンパク質間相互作用の単分子蛍光イメージングのためのナノ加工スライドガラスの作製 II" 第 56 回応用物理学関係連合講演会. 2009 年 3 月 31 日. 筑波大学
  4. 三宅丈雄, 赤堀玲奈, 青木睦子, 谷井孝至, 船津高志, 大泊 巖, 他: "ナノ導波路を用いたリアルタイム単分子蛍光イメージング法の開発" 第 69 回応用物理学学会学術講演会. 2008 年 9 月 4 日. 中部大学
  5. 青木睦子, 三宅丈雄, 島本直伸, 谷井孝至, 船津高志, 大泊 巖, 他: "膜タンパク質間相互作用の単分子蛍光イメージングのためのナノ加工スライドガラスの作製" 第 69 回応用物理学学会学術講演会. 2008 年 9 月 2 日. 中部大学
- [その他]
1. 佐々木康祐, 山本英明, 大泊巖, 谷井孝至, Hoang Anh Vu, 佐藤裕子, 秋季第 70 回応用物理学学会学術講演会講演奨励賞, 富山大学, 富山, 2009 年 9 月