

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 20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） In-Situ Single-Molecule Fluorescence Imaging of Membrane Protein Interaction Using Nano-Structured Glass Plate

研究代表者

谷井 孝至（TANII TAKASHI）

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：20339708

研究成果の概要（和文）：細胞膜タンパク質間相互作用のリアルタイム1分子蛍光イメージングを可能にするナノ導波路を光学シミュレーションにより設計、実際にガラス基板上に作製するプロセスを構築し、導波路の形状に依存した実行可能性を評価した。掘下型導波路と埋込型導波路の2種類の作製プロセスを確立し、特に掘下型構造において従来の6倍以上のS/Nでタンパク質間相互作用を解析できることを示した。埋込型導波路については、最終目標である膜タンパク質間相互作用解析には至っていないが、要素技術を構築し、1分子蛍光を検出できることを見出した。

研究成果の概要（英文）：For in-situ single-molecule fluorescence imaging of membrane proteins, we investigated the structure of nano-waveguides using computational optics simulation, followed by fabrication of the waveguides on glass substrates. We studied the feasibility of the waveguides for real-time single-molecule imaging in relation to the waveguide structure. We have developed processes for the fabrication of both etched waveguides and planer waveguides. We showed that the protein-protein interaction can be fluorescently detected with the etched waveguide, and also that the signal-to-noise ratio of the etched waveguide is six times the conventional waveguide. Although we have not yet succeeded in observing membrane protein interaction using the planer waveguide, we constructed the elemental techniques for the observation, and have succeeded in detecting the single-molecule fluorescence using the planer waveguide.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2010年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2011年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2012年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：ナノ・マイクロ科学

科研費の分科・細目：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. 研究開始当初の背景

従来の1分子蛍光イメージング法は、タンパク質をはじめとする個々の生体分子の機

能を1分子レベルで解析することを可能にしてきた。しかしながら、全反射を利用した従来のエバネッセント証明法では、溶液中に

50 nM 以上の濃度の蛍光色素が存在すると、エバネッセント領域内のすべての蛍光分子が蛍光するため、強烈な背景光が生じて、注目する 1 分子とその他の分子を区別することができない。したがって、従来法では、細胞内に発現した高濃度のタンパク質同士の中でも、特に結合力の弱い相互作用を 1 分子レベルで可視化することは不可能であった。しかしながら、実際の細胞内では、 $\sim\mu\text{M}$ 程度の解離定数を持つ比較的弱い相互作用が重要な生体機能を果たしていることが分かっていた。

申請者らは、独自に開発した金属ナノ開口配列（ゼロモード導波路と呼ばれる導波路を改良した構造）によって、励起光を極微小領域に閉じ込められることに着目し、ガラス基板上にそのようなナノ開口配列を作製してきた。そして、ガラス基板上に作製した金属ナノ開口部に目的の酵素を 1 分子ずつ固定し、蛍光標識したリガンド（濃度： $\sim\mu\text{M}$ ）を含む水溶液中にこの基板を浸漬することによって、酵素に結合したリガンドからの蛍光（「シグナル蛍光」と呼ぶ）と、溶液中をブラウン運動しているリガンドからの蛍光（「背景光」と呼ぶ）とを、それぞれ区別して観察できることを見出していた。要するに、回折限界を超えて、励起光を極微小領域に閉じ込めることにより、励起領域内のリガンド数の時間平均を 1 より十分に小さい数にでき、励起領域内の浮遊リガンドからの背景光強度を極端に低減できる見込みを得ており、それ故、申請者が提案したナノ導波路は、高濃度の蛍光標識リガンドが存在する溶液中でも、1 分子レベルでリガンド-酵素間相互作用を可視化できるポテンシャルを有していた（図 1）。

従来の一分子イメージング法

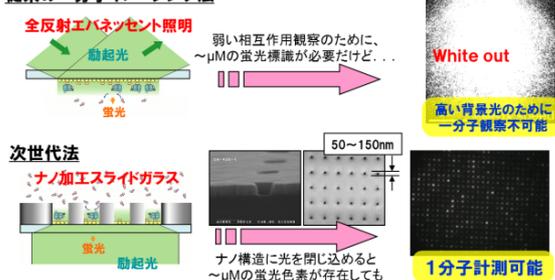


図 1 従来法と次世代法（掘下型）との比較

2. 研究の目的

本研究の目的は、上記の導波路を設計・改良し、細胞膜上に発現した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できるように高度化することである。これを達成するために、2 種類の導波路（掘下型導波路と埋込型導波路）の構造設計・試作・実行可能性評価実験を行った。

3. 研究の方法

上記の目的を達成するために、次の 5 段階の段階を経て研究を進めた。

- (1) 計算機近接場光学シミュレーションによるナノ導波路の設計
- (2) ガラス基板上へのナノ導波路の試作を通したナノ加工条件出しと設計へのフィードバック
- (3) モデルタンパク質を用いた 1 分子蛍光観察実験と実行可能性評価
- (4) 細胞/基板界面の設計
- (5) 基板固定リガンドと膜中レセプタとのリアルタイム相互作用観察

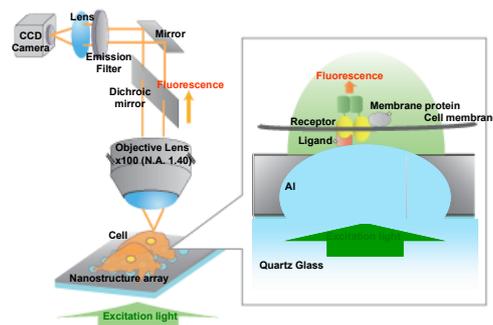


図 2 埋込型ナノ導波路の概要

導波路近傍に生成する励起光の分布、導波路上の 1 分子からの蛍光の伝搬を再現できる近接場光学シミュレーションを立ち上げ、最適な導波路構造を設計した。特に、導波路の形状に依存した、シグナル蛍光強度と背景光強度とを評価することに注力した。これにより、観察時に想定される S/N を試作前に見積もった。

次に、シミュレーションによって予測された最適構造を試作し、試作した導波路上で実際に 1 分子蛍光イメージングを行い、その構造の実行可能性を評価した。実際の観察では、シミュレーションでは再現できない構造の細部や材料の特性が大きく 1 分子蛍光強度に影響を与えることが考えられるため、1 分子蛍光観察結果をシミュレーションにフィードバックすることを繰り返して、構造の最適化を進めた。

上記の試作と同時に、ナノ構造基板上に活性を維持したまま細胞をパターンニングする手法も構築した。ガラス基板に対して比較的接着力の強いがん細胞株と、逆に接着力の弱い初代培養神経細胞とをモデル細胞として用いた。細胞接着を促進する有機膜と細胞接着を阻害する有機膜とをパターンニングすることにより、活性を維持したまま個々の細胞をナノ導波路上に配置できるプロセスを開発した。そして最終的に、構築した要素技術を統合して、モデルタンパク質を用いたタンパク質間相互作用のリアルタイム 1 分子観察を目指した。

4. 研究成果

(1) 掘下型導波路と(2)埋込型導波路の設計と実行可能性評価を行った。以下、それぞれの成果についてまとめる。

(1) 掘下型導波路に関する成果

近接場光学シミュレーションを用いて、掘下型ナノ導波路の形状の最適化を行った。特に、タンパク質間相互作用のリアルタイム観察時の S/N を、1 分子蛍光観察の実行可能性を決定する指標として採用した。シミュレーションの結果、直径 50 nm の開口部を有する導波路底部のガラスを、ドライエッチングによって 60 nm だけ掘り下げた構造において約 6 倍の S/N の向上を見込めることを見出した。シミュレーションによる詳細な解析によって、この理由が、①リガンドを励起する励起光強度が 4.1 倍に増加するだけでなく、②そのリガンドからの蛍光の検出効率も 2.1 倍に増加するためであること、③開口部の直径を 50 nm まで縮小すれば、60 nm のエッチングを施しても、小さな励起体積を維持することができ、それ故、背景光強度を低減できるためであること、が分かった。一般に優位な S/N として、シグナル強度がノイズ強度の 3 倍程度 ($S = 3\sigma$) であることが要求されるが、改良した掘下導波路では、この要求レベルの 5 倍近い S/N を達成できる (図 3)。

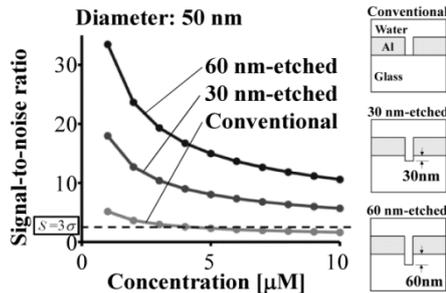


図 3 掘下型導波路の形状と S/N の関係

掘下型導波路は、金属薄膜 (Al) 表面に開口部が配列形成されており、凹凸を持つ表面であるため、膜タンパク質よりはむしろ水溶性タンパク質間相互作用観察に適している。そこで、シャペロン GroEL とコシャペロン GroES とをモデルタンパク質として採用し、GroES-GroEL 間の 1 分子蛍光観察を行った。特に、シミュレーションで得られた導波路底部のエッチングの効果を実験的に調査した。ナノ導波路上に GroEL を固定し、500 nM の蛍光標識 GroES を含む溶液にその導波路を浸漬して観察を行った。その結果、① 1 つの開口に GroEL を 1 個だけ固定できるが、開口底部だけでなく、開口部側壁などにランダムに分布して GroEL が接着するため、シミュレーションで予想されたほどのシグナル強度の増加は獲得できなかったが、それでもなお、底部エッチング (60 nm) によって、直径 50 nm の導波路で従来の 2 倍以上

のシグナル強度を達成できること、② 1 μM の GroES 存在下でも直径 50 nm の導波路で 10 近い S/N を獲得できること、③ 固定 GroEL と浮遊 GroES との結合・解離をリアルタイムに 1 分子レベルで観察できること (図 4)、④ この結合・解離が溶液中の ATP の有無に依存すること、⑤ 結合時間 (図 5 の on-time) から定量された解離速度定数が従来から知られていた値とよく一致すること、を見出した。

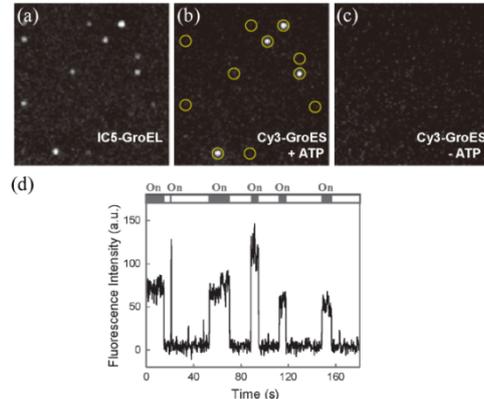
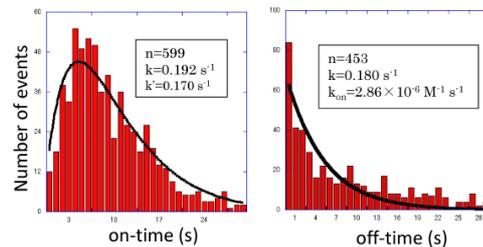


図 4 (a) ナノ導波路に固定した GroEL からの 1 分子蛍光, (b) 固定 GroEL に結合した GroES からの蛍光 (ATP あり), (c) ATP なしの場合, (d) シグナル蛍光の時間変化



構造	直径 nm		80		160		
	深さ nm		110	160	210	80	120
解離速度定数 s^{-1}	~0.56						
結合速度定数 $\times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	3.49	2.86	2.22	2.86	3.49	6.03	

図 5 GroES-GroEL 間相互作用の結合・解離速度定数測定結果

上記の結果はガラス表面にナノ構造があることによって、タンパク質間相互作用、とりわけ分子同士の結合時間に与える影響が無視できることを意味しているが、他方では、ナノ構造内に閉じ込められたタンパク質がどのような挙動を示すかについて解析することは物理化学的な見地から興味深い問題である。そこで、上記の GroES-GroEL 間相互作用観察において、導波路の形状に対して、結合頻度 (図 5 の off-time) から見積もられる結合速度定数がどのように変化するかを定量した。その結果、① ナノ導波路の開口部の直径を増大すると、結合速度定数が増大すること、② ナノ開口部の深さが深くなると、

結合速度定数は低下すること、③開口部側壁 (Al 金属表面) を親水ポリマーで被覆し、側壁への GroES の非特異的吸着を抑制すると、結合速度定数が増大すること、を見出した。これらは、構造改良によって高い S/N を達成した結果、結合速度定数の微小な変化量を定量性よく検出できること意味する。

なお、掘下型導波路を用いて GroES-GroEL 間相互作用解析を進めた結果、GroEL の GroES に対する 2 つの結合部位に対して、GroES は独立に結合できること (フットボール型結合モデル) を見出した。これは、2 つの結合部位に同時に結合する確率を十分に高められる程度にまで蛍光標識 GroES を高濃度にでき、加えて、異なる波長の蛍光色素で染め分けた GroEL と GroES がどのような順番で結合・解離するかを実時間軸上で観察できたことの結果である。

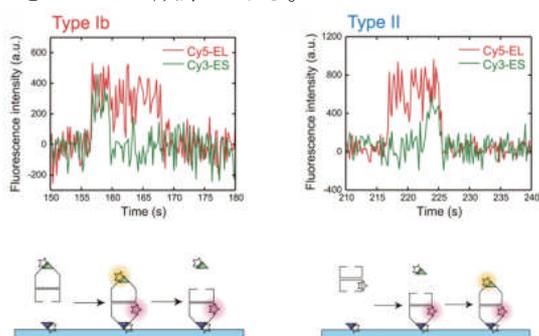


図6 GroES-GroEL 間相互作用の観察

開発段階では、掘下型導波路を電子線リソグラフィと Al の真空蒸着を組み合わせで試作したが、上記のように高い実行能力を証明できたので、半導体微細加工の専門知識がなくとも簡便に作製できるプロセスも同時に考案した。それは、比較的安価な卓上型の紫外線ナノインプリント装置と、有機溶媒でリフトオフできる紫外線硬化樹脂を用いるもので、この簡便な方法によって作製した導波路でも、リアルタイム 1 分子蛍光イメージングが可能であることを実験的に示した。

(2) 埋込型導波路に関する成果

埋込型ナノ導波路は、掘下型導波路の開口部を透明な材料で充填して導波路とし、基板表面から染み出す近接場内で 1 分子を蛍光観察するものである。開口部を充填することにより平坦な表面を有するため、細胞膜タンパク質に適用可能になる点に優位である。しかしながら、一方では、染み出し近接場領域の体積を縮小する必要があると同時に、他方では、その条件と相反して近接場の励起光強度を高くする必要がある。この条件を満たす埋込型導波路の設計と試作を行った。

また同時に、作製した導波路表面に細胞を部位特異的にパターンニングする手法も構築

した。位置合わせ露光を用いれば、導波路の直上に部位特異的に細胞をパターンニングすることも可能となる。ここでは、埋込型導波路の表面全体が SiO_x で被覆されることに着目し (図 8)、細胞パターンニングに有機シラン単分子膜を用いた。細胞接着可能領域をアミノシラン単分子膜で被覆し、残りの細胞接着阻害領域をアルキルシラン単分子膜 (またはポレチレングリコール鎖を有するシランカップリング剤) で被覆するプロセスを構築した。細胞培養液中のアルブミンが選択的にアルキルシラン単分子膜表面に吸着することにより、細胞接着が阻害されることを見出した。また、細胞接着領域のアミノ基の密度を制御することにより、図 7 に示すように、接着力の弱い神経細胞についても単一細胞レベルでパターンニングできることを確認した。なお、このプロセスを用いて、がん細胞の接着力を定量評価できる新しい細胞チップの作製や、神経細胞を素子とする局所神経回路をガラス基板上に再構築するための技術に応用できることに着想し、申請者を含む共同研究のいて新たに研究を展開している。

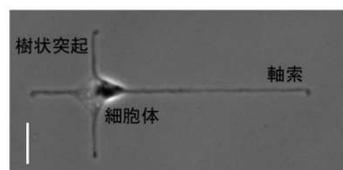


図7 神経細胞パターンニング (ラット海馬)

埋込型導波路においても、シミュレーションと実験的検証の両面から実行可能性を評価した。シミュレーションを実行した結果、ガラス基板側から励起光を照射した場合、金属開口部を伝搬する励起光の強度が指数関数的に減衰するため、シグナル強度が十分に確保できない。そこで、当初の計画にはなかったが、表面プラズモン増強を用いて励起光を増幅させる構造を採用することにした。導波路のクラッド材料 (金属) を Al から Ag に変更し、Ag 薄膜中に波長程度の間隔でナノ開口を配列形成、その後、開口部を透明材料で充填することにした。

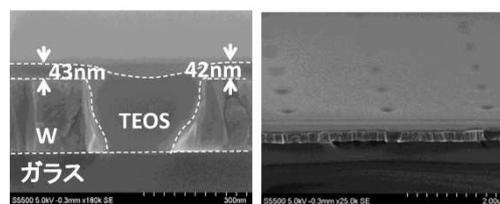


図8 試作した埋込型導波路

試作したこの埋込型導波路の表面に蛍光標識タンパク質を固定し、量子退色からシグナル蛍光強度を測定したところ、未だ十分な増幅率は得られていないものの、1 分子蛍光を捕捉可能であることが分かった。加えて、

染出近接場の体積を算出したところ、濃度 500 nM の蛍光色素存在下で 1 分子蛍光観察が可能であることが分かった。

現時点では、最終目標である膜タンパク質間相互作用観察までには至っていないが、上記のように、洗い出された問題点を克服できる構造と、それに基づく要素技術の構築を終了しており、今後継続的に構造の最適化を行へば、膜タンパク質間相互作用観察技術へと高度できると見込んでいる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 17 件)

※すべて査読あり

- ① H.Yamamoto, T.Demura, M.Morita, G.Banker, T.Tanii, S.Nakamura: Differential neurite outgrowth is required for axon specification by cultured hippocampal neurons, *Journal of Neurochemistry* 123 (2012) 904-910. DOI: 10.1111/jnc.12001
- ② H.Yamamoto, K.Okano, T.Demura, Y.Hosokawa, H.Masuhara, T.Tanii, S.Nakamura: In-situ guidance of individual neuronal processes by wet femtosecond-laser processing of self-assembled monolayers, *Appl. Phys. Lett.* 99 (2011) 163701. DOI: 10.1063/1.3651291
- ③ 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.* 50 (2011) 06GK07. DOI: 10.1143/JJAP.50.06GK07
- ④ 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.* 50 (2011) 06GL01. DOI: 10.1143/JJAP.50.06GL01
- ⑤ H.A.Vu, Y.Beppu, H.T.Chi, K.Sasaki, H.Yamamoto, P.T.Xinh, T.Tanii, Y.Hara, T.Watanabe, Y.Sato, I.Ohdomari: Green Tea Epigallocatechin Gallate (EGCG) Exhibits Anticancer Effect in Human Pancreatic Carcinoma Cells via Inhibition of both Focal Adhesion Kinase and Insulin-like Growth Factor-I Receptor, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 290516. DOI: 10.1155/2010/290516
- ⑥ 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. DOI: 10.1074/jbc.M110.122101
- ⑦ M.Suzuki, T.Ueno, R.Iizuka, T.Miura, T.Zako, R.Akahori, T.Miyake, N.Shimamoto, M.Aoki, T.Tanii, I.Ohdomari, T.Funatsu: Effect of the C-Terminal Truncation on the functional Cycle of Chaperonin GroEL: Implication that the C-Terminal Region Facilitates the Transition from the Folding-Arrested to the Folding-Competent State, *The Journal of Biological Chemistry* 283, 2008, 23931. DOI: 10.1074/jbc.M804090200
- ⑧ T.Miyake, T.Tanii, H.Sonobe, R.Akahori, N.Shimamoto, T.Ueno, T.Funatsu, I.Ohdomari: Real-Time Imaging of Single-Molecule Fluorescence with a Zero-Mode Waveguide for the Analysis of Protein-Protein Interaction, *Analytical Chemistry* 80, 2008, 6018. DOI: 10.1021/ac800726g

[学会発表] (計 39 件)

- ① 井上あゆ, 浅野祐次, 大久保幸太朗, 谷井孝至: “1 分子蛍光イメージングのための埋込型ナノ導波路の設計”, 第 60 回応用物理学関連連合講演会, (20130329) 神奈川工科大学
- ② S. Ryu, S.Higano, K.Ohkubo, Y.Asano, A.Inoue, T.Ueno, T.Funatsu, T.Tanii: “Interaction Kinetics of Proteins confined within a Nanocavity evaluated by Real-time Single-molecule Fluorescence Imaging” 25th International Microprocesses and Nanotechnology Conference, (20121101). Kobe
- ③ 日向野駿, 劉曉宇, 浅野裕次, 井上あゆ, 大久保幸太朗, 上野太郎, 船津高志, 谷井孝至: “リアルタイム 1 分子蛍光イメージング法を用いた金属ナノ開口内部でのシャペロニン GroEL とコシャペロニン GroES 間相互作用の解析” 秋季第 72 回応用物理学学会学術講演会. (20120913). 愛媛大学
- ④ 劉曉宇, 日向野駿, 浅野祐次, 井上あゆ, 上野太郎, 船津高志, 谷井孝至: “リアルタイム 1 分子蛍光イメージング法を用いたナノ孔内部でのタンパク質間相互作用の解析” 第 59 回応用物理学関連連合講演会

- 演会, (20120316), 早稲田大学
- ⑤ 谷井孝至, ライオネル ウォード, 劉 曉宇, 浅野裕次, 水野 潤, 上野太郎, 船津高志, 湯川隆生: "UVNIL リフトオフプロセスを用いた1分子蛍光観察のためのゼロモード導波路の作製" 秋季第72回応用物理学会学術講演会. (20110902). 山形大学
 - ⑥ T.Tanii, J.Wada, L.Ward1, S.Ryu, Y.Asano, T.Ueno, T.Funatsu, T.Yukawa, J.Mizuno: "Fabrication of Zero-Mode Waveguide by Ultraviolet Nanoimprint Lithography Lift-Off Process" International Conference of Photopolymer Science and Technology, (20110625) Chiba Univ.
 - ⑦ 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. (20101123). Fukuoka
 - ⑧ T.Tanii: "Single-Molecule Fluorescence Imaging Using Nanostructure Array" 2010 Taiwan-Japan Bilateral Symposium- Nanotech and Health Care. (20100924). Taiwan (招待講演)
 - ⑨ T.Tanii: "Single-Molecule Fluorescence Imaging Using Nanostructure Array" 2nd International Workshop on Nanostructure & Nanoelectronics. (20100311) Tohoku Univ. (招待講演)
 - ⑩ 谷井孝至: "細胞膜タンパク質の観察と細胞接着制御のためのナノ・マイクロ加工" 東北大学電気通信研究所共同プロジェクト研究会「ナノ・バイオの融合による新規バイオデバイスにする研究」.

- (20100115). 東北大学
- ⑪ 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1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. (2009331). 筑波大学
- ⑫ 三宅丈雄, 赤堀玲奈, 青木睦子, 上野太郎, 鮫島知哉, 島本直伸, 谷井孝至, 船津高志, 大泊 巖: "ナノ導波路を用いたリアルタイム1分子蛍光イメージング法の開発" 第69回応用物理学会学術講演会. (20080902). 中部大学
- ⑬ 青木睦子, 山岸 舞, 赤堀玲奈, 上野太郎, 鮫島知哉, 三宅丈雄, 島本直伸, 谷井孝至, 船津高志, 大泊 巖: "膜タンパク質間相互作用の1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回応用物理学会学術講演会. (20080904). 中部大学

[その他]

ホームページ等

<http://www.tanii.nano.waseda.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷井 孝至 (TANII TAKASHI)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号: 20339708

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし