

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21810012

研究課題名（和文） 単一生体分子相互作用のマイクロ流体制御型リアルタイム計測法

研究課題名（英文） Real-time monitoring of single biomolecular interaction under microfluidic control

研究代表者：

小野島 大介 (ONOSHIMA DAISUKE)

名古屋大学・工学研究科・研究員

研究者番号：40510219

研究成果の概要（和文）：マイクロチャンネル流れ（マイクロ流体）による分子間相互作用解析を1分子レベルで制御することに成功した。これにより、生体内環境に近い自然な分子状態の履歴を追跡し、リアルタイムな相互作用の様子を解析することが可能となった。本計測手法を応用すれば、DNA やタンパク質の様々な機能を分子レベルで解明し、各種疾病に関連する細胞内プロセスを理解する研究が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Single-molecule, real-time intermolecular interaction analysis was achieved by microfluidic control. The method enabled tracking and analysis of biomolecules in a physiologically natural state. Further applications of our method will provide new understanding of molecular mechanisms by which DNA and protein perform their diverse biological functions in cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,030,000	309,000	1,339,000
2010年度	940,000	282,000	1,222,000
総計	1,970,000	591,000	2,561,000

研究分野：1分子生物学

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分子計測(SMD)、マイクロ・ナノデバイス、ナノバイオ、生物物理、生体分子

## 1. 研究開始当初の背景

(1) タンパク質同士あるいはタンパク質と他の生体物質との相互作用の解析は、細胞内での個々のタンパク質の作用機構や生理機能に関する知見が得られることから、生命科学のみならず医薬品開発に不可欠な要素となっている。経済産業省が「健康安心プログラム」の一環として平成19年度から開始した「創薬加速に向けたタンパク質構造解析基盤技術開発」では、創薬上重要なタンパク質及びその複合体のリアルな分子構造情報の取得を目標としている。

(2) 上記目標は、現存する極低温電子顕微鏡や核磁気共鳴装置で得られる静的な結晶構造情報に加えて、例えばリガンドと反応中のタンパク質の観察や相互作用のカイネテ

ィクスといった動的な状態解析を1分子レベルで可能にする測定手法の必要性を提示している。

## 2. 研究の目的

(1) ラボオンチップ型の新規測定セルを開発し、独自の1分子観測法とその時系列情報の解析法を確立することで、測定の高用性と1分子レベルの検出感度を併せ持つ全く新しい生体分子相互作用測定法（分子トラッキング計測法）を構築する。

(2) 本測定法の有効な実例を作るため、従来法では測定困難なプロテアーゼ等のタンパク質相互作用の状態変化を追跡し、相互作用の所要時間や反応速度に関するデータ取

得に取り組む。

### 3. 研究の方法

- (1) 「1分子観測用トラッキング色素開発」  
分子トラッキング計測では、相互作用中も安定な構造を取る標識物質を利用して、検体分子を光学的にラベル化する必要がある。この1分子ラベル化条件を検討する上で必要な材料・手法を開発する。
- (2) 「計測デバイスの最適化」  
計測対象となるタンパク質はマイクロ流体デバイス表面に固定され、チャンネルを通じて送られるラベル付分子と反応する。そこで、活性を十分に維持する固定化方法を物理・化学吸着の双方から検討する。
- (3) 「1分子時系列データ解析」  
1分子計測実験から得られるタンパク質の時系列データには時空間スケールが異なる運動が階層的に混在するため、各階層における情報を抽出し、各階層および階層間の状態空間を論じる必要がある。本研究ではマイクロ流路内の層流支配によって空間と運動を制限し、便宜上、1分子の運動に基づく時系列データの観測値に対するヒストグラムを正規分布でフィットする状態推定を行う。これにより、相互作用過程に存在する各所要時間を分子レベルで算出する。
- (4) 「ヌクレアーゼ相互作用の1分子計測」  
DNAの立体構造や塩基配列に特異的な相互作用（DNA切断反応）を示すヌクレアーゼを対象とした分子トラッキング計測を行う。また、反応の検証実験として、回収後の溶液に対して従来のゲル電気泳動実験を行う。
- (5) 「プロテアーゼ相互作用の1分子計測」  
ペプチド加水分解酵素であるプロテアーゼを対象とした分子トラッキング計測を行う。また、反応の検証実験として、回収後の溶液に対して蛍光の自己消光作用とFRETを利用した従来法による活性測定を行う。

### 4. 研究成果

- (1) 核酸分解酵素反応をベースとしながら分子トラッキング計測法の汎用化に向けた測定の詳細項目を検証した（図1）。測定の操作可能性に関わる介入実験やサンプルの統計的関連性に関わる実験のデータを新たに取得した結果、サンプルの選択・調製→実験プロセスの実行→解析・評価までの流れを確立することに成功した。これにより、本計測手法がマイクロチャンネル流れ（マイクロ流体）によってヌクレアーゼ相互作用を1分子レベルで制御・解析可能な世界初の機能を有することを実証した。さらに、マイクロ流体制御下における分子間相互作用の検出の再現性に確証を得たことから、レーザートラッ

プや微小溶液チャンバーを用いる従来の1分子計測法に比べてより生体内環境に近い自然な分子状態の履歴をリアルタイムに追跡し、同時に多数の標本を採取・回収可能なマルチ計測が可能となった。

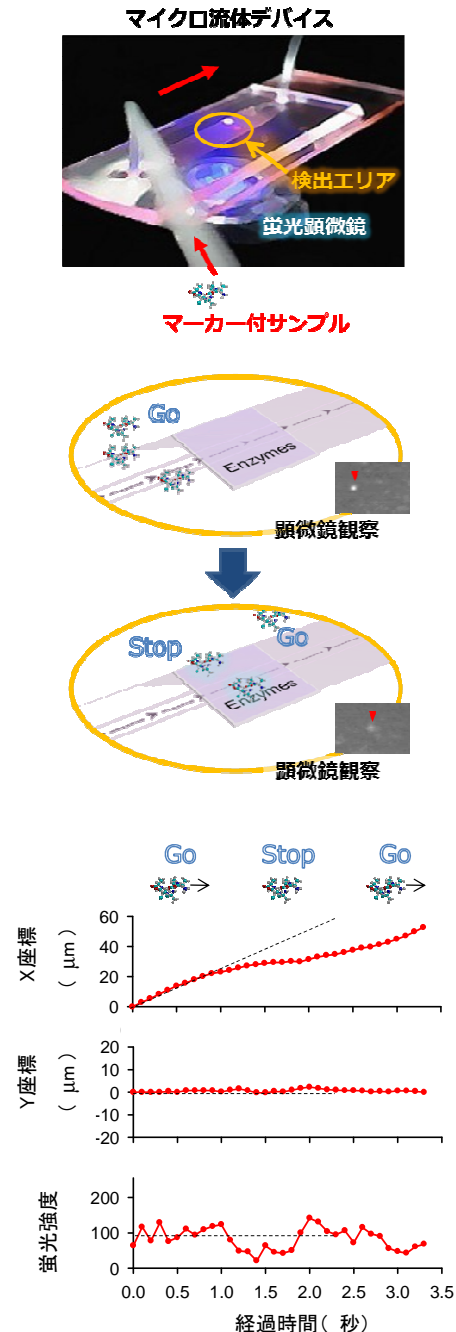


図1 計測デバイスの概要、検出エリア内で観察する相互作用の模式図及びキャプチャした分子の座標と蛍光強度解析

- (2) (1)に記述される成果は国内・海外での学術会議において口頭発表の形で公表を行い、研究の過程で開発したデバイスの製造方

法は特許として出願を行った（図2）。

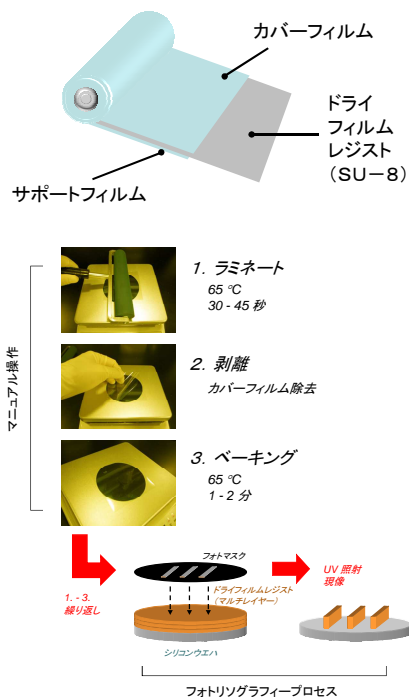


図2 デバイス作製の材料及び方法

(3) トリプシンを対象とするプロテアーゼ反応の状態変化をリアルタイムに追跡する指標として有効な蛍光色素 (FTC カゼイン) の検証実験を実施し (図3)、1分子レベルの相互作用の誘起時間や経時変化に関するデータを取得した (図4)。本計測技術は各種疾病に関連する細胞内プロセスを解析する新規ツールとして非常に有望であり、例えば細胞の情報や命令をより効果的に伝達するために一時的に結合して大きな複合体を作るタンパク質グループや、他のタンパク質を切断するプロテアーゼが細胞から切断機能を実行する命令を受ける状態の経時変化を計測する実験に応用できる。

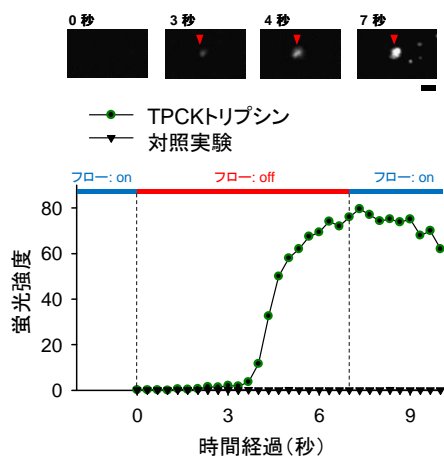


図3 トリプシンのプロテアーゼ反応の蛍光観察画像 (スケールバー: 2.5  $\mu\text{m}$ ) 及び画

像中に示す輝点の蛍光強度の経時変化

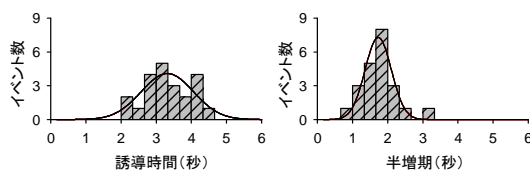


図4 蛍光検出したプロテアーゼ反応の誘導時間及び蛍光の半増期の分布

(4) (3)に記述される成果により二本の雑誌掲載論文が採択され、特にマイクロ・ナノテクノロジーの基礎からバイオ応用までの発表が寄せられる世界最大規模で最高権威の国際会議 $\mu\text{TAS}2010$ での発表は、約1,100件の発表申込中の査読順位上位約5%以内にランクされ、口頭発表に選ばれた。また、慶大・早大・東工大・東大の四大学が未開拓領域の工学研究を促進する目的で発足させたコンソーシアム (共同事業体) が主催するシンポジウムにおいて、本件に関わる招待講演が行われた。

#### 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3件)

- ① D. Onoshima, N. Kaji, M. Tokeshi, Y. Baba, Tracking Degradations of Single DNA and Protein Molecules in Fluid, *Biophysical Journal*, 査読有, Vol. 100, 2011, 151a-152a
- ② D. Onoshima, N. Kaji, M. Tokeshi, Y. Baba, TRACKING OF SINGLE DNA AND PROTEIN MOLECULES UNDERGOING ENZYMATIc DEGRADATION IN FLUID, *The Proceedings of  $\mu\text{TAS} 2010$* , 査読有, Vol. 1, 2010, 1439-1441
- ③ D. Onoshima, J. Wang, M. Aki, K. Arinaga, N. Kaji, M. Tokeshi, S. Fujita, N. Yokoyama, Y. Baba, A SIMPLE AND LOW-COST TECHNIQUE FOR FABRICATING MICROCHANNELS AND MICROSTRUCTURES WITH HIGH ASPECT RATIO, *The Proceedings of  $\mu\text{TAS} 2009$* , 査読有, Vol. 2, 2009, 1587-1589

[学会発表] (計12件)

- ① 小野島 大介、加地 範 匡、渡慶 次 学、馬場 嘉 信、マイクロ流体制御下におけるプロテアーゼ反応の分子的検出、日本化学会第91春季年会、2011年3月11日、講演予稿集
- ② D. Onoshima, N. Kaji, M. Tokeshi, Y.

- Baba, Tracking Degradations of Single DNA and Protein Molecules in Fluid, Biophysical Society 55th Annual Meeting, 2011/3/6, Baltimore Convention Center, Baltimore, Maryland, USA
- ③ 小野島大介、マイクロ流体デバイスを利用した1分子生物学への新しいアプローチ、4大学ナノ・マイクロファブリケーションコンソーシアム 拠点形成シンポジウム「グリーンイノベーション・ライフイノベーションを促進する 材料、計測、ファブリケーション、デバイス技術」2011年3月4日、川崎市産業振興会館 1F メインホール
- ④ D. Onoshima, N. Kaji, M. Tokeshi, Y. Baba, Optical Tracking of Single Biomolecules Undergoing Enzymatic Degradations, International Symposium: Advanced Science and Technology for Single Molecular Analysis of DNA and Related Molecules (ISSMA 2011), 2011/1/24, Kyoto International Conference Center (ICC Kyoto), Kyoto, Japan
- ⑤ D. Onoshima, N. Kaji, M. Tokeshi, Y. Baba, A molecular tracking of protein-DNA interactions under microfluidic control, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2010), 2010/12/15, Hawaii Convention Center, Honolulu, Hawaii, USA
- ⑥ 小野島大介、加地範匡、渡慶次学、馬場嘉信、プロテアーゼ反応の分子的リアルタイムトラッキング、第22回化学とマイクロ・ナノシステム研究会 (22nd CHEMINAS)、2010年11月18日、名古屋大学鶴舞キャンパス
- ⑦ D. Onoshima, N. Kaji, M. Tokeshi, Y. Baba, TRACKING OF SINGLE DNA AND PROTEIN MOLECULES UNDERGOING ENZYMATIc DEGRADATION IN FLUID, The 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences ( $\mu$ TAS 2010), 2010/10/6, Martiniplaza, Groningen, Netherlands
- ⑧ D. Onoshima, N. Kaji, M. Tokeshi, Y. Baba, A molecular detection of nucleolytic degradation under microfluidic control, International Symposium on Microchemistry and Microsystems 2010 (ISMM 2010), 2010/5/28, Hong Kong University of Science and Technology (HKUST), Hong Kong
- ⑨ 小野島大介、加地範匡、渡慶次学、馬場

嘉信、マイクロ流体制御下における核酸分解酵素反応の分子的検出、日本化学会第90春季年会、2010年3月27日、近畿大学本部キャンパス

- ⑩ Daisuke Onoshima, A Combination of a Single-Molecule Tracking and Microfluidic Flow System Enables an Analysis of Ongoing Processes of Enzymatic Reaction, BIT's World Congress of Gene-2009 (WCG-2009), 2009/12/05, Foshan Golden Sun Hotel (FGSH), Foshan, China
- ⑪ 小野島大介、加地範匡、渡慶次学、馬場嘉信、ヌクレアーゼ相互作用のマイクロ流体制御と1分子リアルタイム計測、第40回中部化学関係学協会支部連合秋季大会、2009年11月8日、岐阜大学工学部
- ⑫ D. Onoshima, J. Wang, M. Aki, K. Arinaga, N. Kaji, M. Tokeshi, S. Fujita, N. Yokoyama, Y. Baba, A SIMPLE AND LOW-COST TECHNIQUE FOR FABRICATING MICROCHANNELS AND MICROSTRUCTURES WITH HIGH ASPECT RATIO, The 13th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences ( $\mu$ TAS 2009), 2009/11/04, International Convention Center at Jeju Istand (ICC Jeju), Korea

〔図書〕 (計1件)

小野島大介、馬場嘉信、化学同人、浜地格・二木史朗編『化学フロンティア 22 生命現象を理解する分子ツール イメージングから生体機能解析まで』IV部19章、2010、155-161

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称：分析デバイス、分析デバイスの製造方法及び分析デバイスを用いる分析装置

発明者：小野島大介、加地範匡、渡慶次学、馬場嘉信

権利者：名古屋大学

種類：特許

番号：特願 2009-251536

出願年月日：2009年10月30日

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小野島 大介 (ONOSHIMA DAISUKE)

名古屋大学・工学研究科・研究員

研究者番号：40510219

### (2) 研究分担者 なし

### (3) 連携研究者 なし