

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24年 6月13日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22750064

研究課題名（和文） ナノ粒子のプラズモンカップリングによるタンパク質構造変化計測

研究課題名（英文） Protein conformational dynamics probed by plasmon-coupling of nanoparticle

研究代表者

藤原 一彦 (FUJIWARA KAZUHIKO)

秋田大学・工学資源学研究科・助教

研究者番号：10375222

研究成果の概要（和文）：暗視野照明下で金ナノ粒子間のプラズモンカップリングを観測可能な、高感度 CMOS カメラを備えた顕微鏡測系を構築した。それぞれの金ナノ粒子に対して異なるタンパク質を結合させ、そのプラズモンカップリングの観測を検討したところ、観測シグナルは時間に対して二値的に変動した。したがって、単一分子レベルでの分子の挙動を観測可能であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：A measurement technique for reaction dynamics of proteins by an electronic coupling of localized surface plasmon resonance (LSPR) of individual gold nanoparticle was exploited. An apparatus which consists of dark-field microscope equipped with high-sensitive CMOS camera was constructed and employed for the measurements. A plasmon-coupling between single pairs of gold nanoparticles, which were modified with some proteins, was examined. The Light-scattering signal attribute to plasmon-coupling was digitally modulated with the observation time, which indicates the observed phenomena correspond to single-molecule events.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	960,000	4,160,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

生命活動はタンパク質の代謝物輸送機能、反応触媒機能に大きく依存している。すなわちタンパク質はDNAを設計図とした生体内の機動部隊であると言える。地球上のあらゆる生命体の全遺伝子が解読されつつある現在、生命活動の更なる詳細を明らかにするため、タンパク

質の機能解明が重要視されている。タンパク質の機能は多種多様であるが、いずれの場合にも反応を起こす準備段階として、特定の化合物と結合したり、タンパク質間で複合体を形成する場合が多い。

X線結晶構造解析法やNMR法の近年の発展により、薬物結合後のタンパク質の構造変化や

タンパク質複合体形成が詳細に明らかにされるようになってきており、このことは医学・創薬へ多大な寄与をもたらしている。しかしながら、リボソームやプロトンポンプなどのタンパク質複合体は、ATPの加水分解により供給されたエネルギーを利用した構造変化を伴いながらその機能を発現させることから、複合体形成後の機能解析に対しては結晶のような結合後の静止した状態ではなく、時系列的によりダイナミックな情報が必要となる。

2. 研究の目的

金・銀などで構成されるナノ粒子は局在表面プラズモン共鳴(LSPR)により発色し、プラズモン吸収帯の波長の光を強く散乱する性質を有している。このため、暗視野照明下で比較的容易に単一粒子レベルの分光観測が可能である。また粒子ごく近傍に粒子が存在した場合には粒子間距離に応じて光散乱波長を著しく変化させる。この分光応答の変化は、粒子内伝導電子の振動(プラズモン)が粒子間で結合(カップリング)することに起因し、プラズモンカップリングと呼ばれる。従って、プラズモンカップリングに伴うナノ粒子の光散乱応答の観測は、ナノ粒子間の距離を見積もるためのルーラー(ものさし)として利用することができる。加えて、ナノ粒子の光散乱応答は蛍光色素のように退色することが無い。すなわち、二つのナノ粒子の間にタンパク質分子を挟み込んだ構造のナノ粒子二量体を化学的に制御しながら作成することで、高感度かつ長時間観測が可能なタンパク質構造変化ダイナミクスの追跡法が構築できる。本研究は、タンパク質の構造変化および相互作用をはじめとした反応ダイナミクスを、金ナノ粒子の光散乱分光特性を利用して分光化学的に検出・可視化することを目的として行った。

3. 研究の方法

溶液中においては反応がランダムに起こってしまうため、精密にナノ粒子-タンパク質-ナノ粒子の順に結合した複合体を生成させることは難しい。そこで固液界面を利用して反応方向を規制し、タンパク質を挟み込んだナノ粒子二量体の作成を検討した。特に本研究ではGroELおよびESが特異的に結合することに着目し、プラズモンカップリングによるその単一分子レベルの相互作用を検討した。

4. 研究成果

①金ナノ粒子表面へのGroEL結合

クエン酸還元法により金ナノ粒子を合成し、1-アミノプロピトリエトキシシランにより処理したガラス基板上へ金ナノ粒子を固定化した。ガラス基板上でのナノ粒子の表面密度は走査型プローブ顕微鏡により観察し、固定化の際の密度最適化を行った。固定化したナノ粒子の表面へは11-メルカプトウンデカン酸(MUA)により自己組織化膜(SAM)を形成させた。ここではGroEL

の配列内のシステイン残基を利用して金ナノ粒子に対してGroELを付与するため、金ナノ粒子のSAM末端にエチレンジアミンおよびN-(6-Maleimidocaproyloxy)succinimide (SM(PEG)₆)を順に反応させることでマレイミド基を導入した。その後、GroELとの反応により、ガラスチップ表面に固定化した金ナノ粒子とGroELを結合させた。

②金ナノ粒子表面へのGroESの結合

GroESはその溶液に対して金ナノ粒子分散液を混合したのち遠心分離を行い、非特異吸着によって金ナノ粒子に対して結合させた。粒子周囲の屈折率の増大によるピークのレッドシフトから金ナノ粒子とGroESの結合を確認した。

③プラズモンカップリングによるタンパク質相互作用ダイナミクスの観測

光学フィルタにより照射する光の波長領域を620~670nmに制限した暗視野照明を備えた顕微鏡に対して、高感度CMOSカメラ(HAMAMATSU ORCA-Flash 2.8)を取り付けた観測系を構築した。この顕微鏡下においてGroELを結合したガラス基板を設置し、GroES結合金ナノ粒子の分散液を滴下してカバーガラスで蓋をして観察を行った。ナノ粒子は観測が送内においては輝点として観察されるが、プラズモンカップリングが生じる際には散乱光の増強が予想されたため、輝点の輝度の時間プロフィールを解析することとした。

一定の時間観察を行ったところ、散乱強度はいったん上昇したのちに元の強度に戻るイベントが複数回観測された。これは粒子が近接した際には散乱光強度が増大し、離れることで強度が低下し元に戻っている減少に対応していると考えられた。したがって、強度の上昇中はGroELとGroESが結合しており、この増加-減少のサイクルはこの2者のタンパク質の反応(結合-脱離)サイクルに対応していると考えられる。

結合時間に対して0.5s秒間隔でヒストグラムを作製したところ、既報(H. Taguchi, T. Ueno, H. Tadakuma, M. Yoshida, T. Funatsu. *Nature Biotechnology*, **19**, 861-865 (2001))の単一分子観測法による結果と対応した結果が得られた。すなわち、本法により単一分子レベルのタンパク質の反応ダイナミクスの観測が可能であることが確認できた。

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6件)

① Fujiwara, K., Ogawa, N.

Aggregate Domain Growth of Gold Nanoparticle on Chemically Modified Glass Surface, Journal

of Nanoscience and Nanotechnology 査読有, 印刷中 2012

②Li, H., Kikuchi, R., Kumagai, M., Amano, T., Tang, H., Lin, J.-M., Fujiwara, K., Ogawa, N. Nondestructive estimation of strength deterioration in photovoltaic backsheets using a portable near infrared spectrometer, Solar Energy Materials and Solar Cells, 査読有, Vol. 101, 2011 166-169

③橋本卓, 藤原一彦, 伊藤英晃, 小川信明 表面プラズモン共鳴法による薬剤-タンパク質相互作用測定におけるセンサ表面へのタンパク質固定化状態の効果の検証, 素材物性学雑誌, 査読有, 2012, Vol. 24, No.1, 2012 20-24

④李華, 菊地良栄, 熊谷昌則, 天野敏男, 藤原一彦, 林金明, 小川信明 近赤外分光分析法による五味子の産地判別および薬効成分の定量, 分析化学, 査読有, 2011, Vol. 60, No.10, 2011, 813-817

⑤竹山舞子, 高橋朋也, 菊地良栄, 熊谷昌則, 天野敏男, 藤原一彦, 小川信明 ポータブル近赤外分光分析装置を用いる米菓の水分測定, 分析化学, 査読有, Vol. 60, No.1, 2011, 33-38

⑥ Yamamoto, S., Nakano, S., Owari, K., Fujiwara, K., Ogawa, N., Otaka, M., Kubota, H., Itoh, H. Gentamicin inhibits HSP70-assisted protein folding by interfering with substrate recognition FEBS Letters, 査読有, Vol. 584, No.4, 2010, 645-651

[学会発表] (計 10 件)

① 藤原一彦 細胞内へ導入した金ナノ粒子の共焦点光散乱顕微観察 平成 23 年度化学系学協会東北大会 2011.9.18 東北大学 (依頼講演)

② 兒玉高遠・藤原一彦・伊藤英晃・小川信明 プラズモンカップリングと単一ナノ粒子計測を組合せた分子間相互作用観測 平成 23 年度化学系学協会東北大会 2011.9.17 東北大学

③ 日登圭宣・藤原一彦・伊藤英晃・小川信明 チオール基を有する 5 残基ペプチドで修飾した金ナノ粒子の細胞内導入効率の検討 平成 23 年度化学系学協会東北大会 2011.9.17 東北大学

④ 兒玉高遠・藤原一彦・伊藤英晃・小川信明

プラズモンカップリングと単一ナノ粒子計測を組合せたタンパク質相互作用観測 日本分析化学会第 60 年会 2011.9.14 名古屋大学

⑤ 日登圭宣・藤原一彦・伊藤英晃・小川信明 チオール基を有する 5 残基ペプチドで修飾した金ナノ粒子の細胞内導入と共焦点顕微観察 日本分析化学会第 60 年会 2011.9.14 名古屋大学

⑥ Fujiwara, K., Sato, K., Yamamoto, S., Itoh, H., Ogawa, N. Confocal Imaging of a Cellular Protein by Resonance Light Scattering of an Antibody-tagged Gold Nanoparticle IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011 (ICAS2011) 2011.5.25 京都国際会議場

⑦ Kudo, Y., Kikuchi, R., Fujiwara, K., Shibata, M., Sakaida, H., Kakiuchi, T., Ogawa, N. Measurement of pH of Low Ionic Strength Solutions Using a Combination-type Glass pH Electrode Equipped with Ionic Liquid Salt Bridge IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011 (ICAS2011) 2011.5.23 京都国際会議場

⑧ Fujiwara, K., Sato, K., Yatsurugi, Y., Yamamoto, S., Itoh, H., Ogawa, N. Resonant light scattering imaging of protein functionalized gold nanoparticle in a biological cell Pacificchem2010 2010.12.17 ハワイコンベンションセンター

⑨ Sato, K., Fujiwara, K., Yatsurugi, Y., Yamamoto, S., Itoh, H., Ogawa, N. Targeting of an intracellular protein by confocal light scattering imaging of antibody-tagged gold nanoparticle Pacificchem2010 2010.12.17 ハワイコンベンションセンター

⑩ 工藤陽太・菊地良栄・藤原一彦・芝田学・野村聡・垣内隆・小川信明 降水の pH 測定に用いるイオン液体型ジャンクションを備えた pH 電極の開発 日本分析化学会第 59 年会 2010.9.15 東北大学

⑪ 佐藤健太郎・藤原一彦・山本聡・伊藤英晃・小川信明 金ナノ粒子の共焦点光散乱イメージングによる癌細胞 EGFR 可視化の検討 日本分析化学会第 59 年会 2010.9.15 東北大学

⑫ 藤原一彦 界面およびナノ粒子表面を計測する分光分

析手法の開発とその応用 日本分析化学会
第59年会 2010.9.15 東北大学

[その他]
ホームページ等
<http://www.lifescience.eng.akita-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 一彦 (FUJIWARA KAZUHIKO)

秋田大学・工学資源学部・助教

研究者番号：10375222