

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370061

研究課題名(和文) ナノスリットを用いた生体分子の1分子機能解析

研究課題名(英文) Single-molecule analysis of functions of biomolecules by linear zero-mode waveguides

研究代表者

船津 高志 (Funatsu, Takashi)

東京大学・薬学系研究科・教授

研究者番号：00190124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、定常状態においてアクチンの重合がどのようなメカニズムで行われているのかを明らかにすることを目的とした。ナノスリット内に固定したCy3標識アクチンの端を観察領域と定め領域内におけるBODIPY-FL標識アクチンの蛍光強度変化を観察した。伸長過程と定常状態においてアクチンの重合をリアルタイムイメージングした結果、定常状態では伸長過程よりも検出されるシグナルの強度が上昇し、2分子や3分子の会合体に相当するアクチンが結合する様子が観察された。これより、定常状態ではG-アクチン1分子ではなく複数分子が重合していることが示された。

研究成果の概要(英文)：Actin dynamics contribute to many cellular processes, while the detail mechanism of actin polymerization is unknown. In this study, single molecule imaging of actin polymerization was performed to answer this question.

As critical concentration of actin is >100 nM, it is not possible to observe actin polymerization at single molecule level by total internal reflection fluorescence microscopy. Hence, we applied a linear zero-mode waveguide (ZMW), which has a 100-nm wide slit structure, allowing single molecule imaging at higher concentrations.

We found that single BODIPY-FL-labelled actin was observed in a linear ZMW at 100 nM. F-actin was immobilized in a linear ZMW. Actin elongated in a linear ZMW at a similar elongation rate on a cover glass. Actin polymerization at a single molecule level in a linear ZMW is now under investigation.

研究分野：生物物理学

キーワード：1分子生理・化学 1分子イメージング ナノ計測

1. 研究開始当初の背景

actin は全ての真核生物に存在するタンパク質である。生体内では主に筋繊維中や細胞内に存在している。筋繊維中ではフィラメントとして存在しており、ミオシンと協同して力を生み出している。細胞内では actin は様々な構造を形成している。例えば Arp2/3 と共役して枝分かれ構造を生み出すことにより、仮足が前進する駆動力を生み出している。他にも細胞の形を維持するなど、細胞にとって必須の機能を担っている。actin は monomer actin (G-actin) が重合し actin filament (F-actin) を形成し、可逆な重合脱重合により細胞内運動などの細胞内の様々な機能に関わっている。actin の重合は G-actin が核を形成する核形成過程から始まる。安定な核が形成された後、F-actin が伸長する伸長過程へと移行する。最終的に F-actin への重合・脱重合が等速度となり、F-actin の長さが一定になる定常状態に達する(図1)。

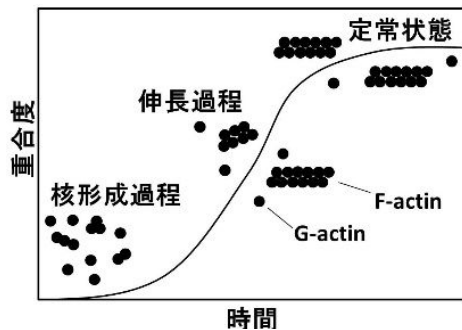


図1 actin の重合

actin の重合脱重合の先行研究として全反射照明蛍光顕微鏡 (TIRFM; Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy) を用いて F-actin 1 本の長さ変化を測定した事例がある。これまで溶液系で報告されていたトレッドミル過程が初めて 1 本の F-actin 上で観察された。さらに興味深い結果として、定常状態では伸長過程と比較して重合速度定数が 30-40 倍大きく、重合脱重合が平均 6 個の G-actin を単位として行われていることが示唆された(引用文献)。このメカニズムとして、ほぼ 6 量体のアクチンが単位になって結合するメカニズム、あるいは 1 個の G-actin が重合すると他の G-actin が重合しやすくなる協同性によるメカニズムなどが考えられるが、詳細は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、actin の重合過程を 1 分子レベルでリアルタイムイメージングすることにより、定常状態と伸長過程で重合・脱重合速度定数が異なる原因を明らかにする。そして、伸長過程と定常状態における重合メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

actin 重合の臨界濃度は 100 nM である。1 分子蛍光イメージングで通常用いられている TIRFM においては蛍光分子濃度をおよそ 50 nM 以下に抑える必要があるため、actin の重合過程を 1 分子レベルで観察することが出来ない。

TIRFM の限界を超えて 1 分子蛍光イメージングを行うために開発された方法として zero-mode waveguides (ZMW) がある(引用文献)。ZMW はカバーガラス上にアルミニウムを蒸着させ、数十 nm 程度のナノ開口を設けた基板である。これにより、レーザーで励起される領域が TIRFM よりも小さくなり、数 μM という高濃度での 1 分子蛍光イメージングが可能となる。これまでに ZMW を用いた報告として塩基を蛍光ラベルし DNA polymerase の活性を研究したもの(引用文献)、GroES と GroEL の相互作用を研究したもの(引用文献)などがある。

しかし、これまで用いられてきた ZMW は全て断面が円形をした開口の構造であり、重合反応などの観察対象の形態が伸長するもののイメージングは行うことが出来なかった。そこで本研究では actin 重合過程を観察するため、数十~数百 nm の幅のスリット構造の開口を設けたナノスリット基板を用いることにした(図2)。励起される領域を制限することが可能なため、臨界濃度 100 nM 以上での蛍光 actin 存在下で重合過程を 1 分子蛍光観察することが可能となる。

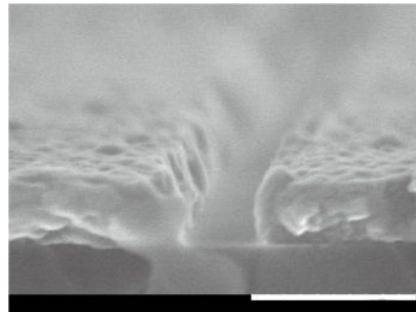


図2 ナノスリット基板断面の SEM 画像(スケールバー:200 nm)

4. 研究成果

(1)分子蛍光イメージングを行うためのナノスリットの幅の条件検討

ナノスリットの幅を狭めることで励起される領域を狭めてノイズを減少させることが出来るので、シグナルとノイズの比 (S/N 比) が上昇することが予想される。BODIPY-FL 標識した actin を用いてナノスリットの幅 50 ~ 130 nm において S/N 比を算出した。図3に示すように、幅を狭めることで S/N 比が上昇することが確認された。1 分子蛍光イメージングを行う際は S/N 比が 1 番大きい幅 50 nm のスリットを用いることにした。

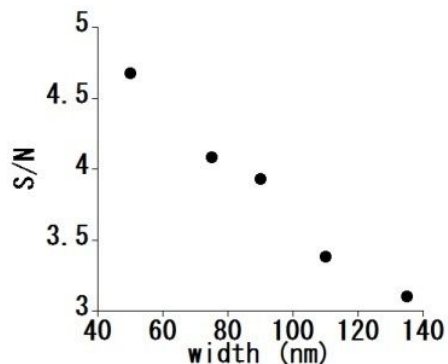


図3 ナノスリットの幅に対する S/N 比の変化

(2) ナノスリット基板上における actin の伸長

次にナノスリット内において actin が重合するか否かを確認した。重合の核となる Cy3 標識 F-actin をスリット内に固定させ、BODIPY-FL 標識 actin を加えて重合を観察した (図 4)。

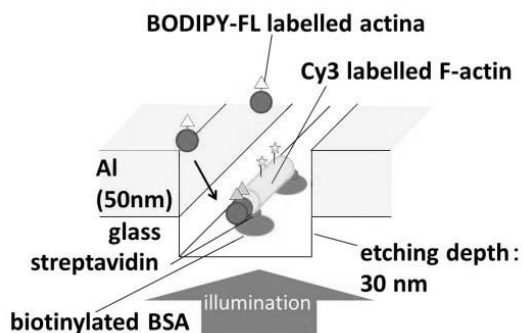


図4 ナノスリット内における actin の重合の模式図

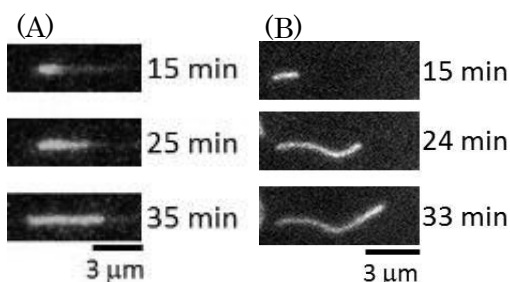


図5 actin の伸長
(A)ナノスリット内 (600 nM)
(B)カバーガラス上 (250 nM)

BODIPY-FL 標識 actin の伸長を観察したところ、ナノスリット内で伸長する actin を観察出来た (図 5 A)。重合速度は 0.16 ± 0.01 ($\mu\text{m}/\text{min}$) (mean \pm S.D.) となり、ナノスリット内での重合速度定数は 0.16 ± 0.01 ($\times 10^7/\text{M}/\text{sec}$) (mean \pm S.D.) と見積もることが出来た。カバーガラス上でも同様の実験を行った結果 (図 5 B)、重合速度定数は 0.54 ± 0.04 ($\times 10^7/\text{M}/\text{sec}$) となった。重合速度定数

がカバーガラスよりもナノスリット内で小さい原因としては基板上への BODIPY-FL 標識 actin の吸着により実効濃度が減少していること、ナノスリットの立体構造により actin の Brown 運動が妨げられてしまっていることなどが考えられる。

(3) actin の重合のリアルタイムイメージング

図 6 A のようにナノスリット内に固定した Cy3 標識 actin の端を観察領域と定め領域内における BODIPY-FL 標識 actin の蛍光強度変化を観察した。伸長過程と定常状態において actin の重合をリアルタイムイメージングした結果、定常状態 (図 6 C) では伸長過程 (図 6 B) よりも検出されるシグナルの強度が上昇することが観察された (矢印の箇所)。これより、定常状態では G-actin 1 分子ではなく複数分子が重合していることが示唆された。

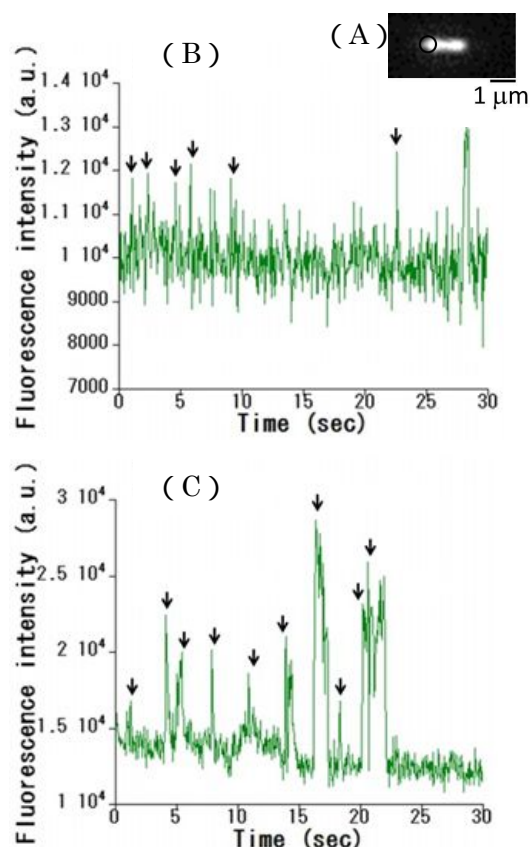


図6 actin 重合のリアルタイムイメージング
(A) Cy3 標識 F-actin 上の観察領域
(B) 伸長過程 (C) 定常状態

<引用文献>

Fujiwara, I., S. Takahashi, H. Tadakuma, T. Funatsu, S. Ishiwata. Microscopic analysis of polymerization dynamics with individual actin filaments. Nat. Cell Biol. 4: 666-673 (2002)

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. *Anal. Chem.* 80: 6018-6022 (2008)

Eid, J. et al., Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science.* 323:133-8 (2009)

Sameshima, T., 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. *J. Biol. Chem.* 285: 23159-23164 (2010)

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)

Zhuohao Yang, Ryo Iizuka, Takashi Funatsu. Nascent secM chain outside the ribosome reinforces translation arrest. *PLoS ONE* 10(3):e0122017 (2015). 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0122017

Yoshitaka Shirasaki, Masayasu Tatsuoka, Mai Yamagishi, Jun Mizuno, Shuichi Shoji, and Takashi Funatsu. Integrated channel selector for directing fluid flow using thermoreversible gelation controlled by a digital mirror device. *J. Sens.* 2013: Article ID 436492, 6 pages (2013). 査読有 DOI: 10.1155/2013/436492

Yodai Takei, Ryo Iizuka, Taro Ueno, and Takashi Funatsu. Single-molecule observation of protein folding in symmetric GroEL-(GroES)₂ complexes. *J. Biol. Chem.* 287: 41118-41125 (2012). 査読有 DOI:10.1074/jbc.M112.398628

[学会発表](計 18 件)

Takashi Funatsu "Analyzing the functions and interactions of protein molecules by micro- and nano-devices" 31st International Conference of Photopolymer Science and Technology (ICPST-31), July 8-11, 2014, University Convention Hall, Chiba University, Chibashi, Japan

船津高志「マイクロドロップレットの生命科学研究への応用」第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 11 日～13 日、パシフィコ横浜、横浜市、神奈川県

船津高志「マイクロ・ナノデバイスを用いた生体分子の機能と相互作用の解析」第 48 回構造生物応用研究会、2013 年 5 月 18 日～19 日、アークホテル仙台青葉通り、仙台市、宮城県

船津高志「生体分子の機能と相互作用の 1 分子蛍光イメージング」日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 27 日～30 日、パシフィコ横浜、横浜市、神奈川県

船津高志「シャペロニン GroEL-GroES の反応サイクルに対する再検討」大阪大学蛋白質研究所セミナー「分子シャペロンの機能発現の新展開と細胞制御」2012 年 11 月 15 日～16 日、大阪大学吹田キャンパス蛋白質研究所 1 階講堂、吹田市、大阪府

Kohki Okabe, Seiichi Uchiyama, Noriko Inada, Yoshie Harada, Takashi Funatsu "Imaging of temperature distribution in a living cell" 第 50 回日本生物物理学会年会、2012 年 9 月 22 日～24 日、名古屋大学東山キャンパス、名古屋市、愛知県

岡部弘基、船津高志「生細胞イメージングによる生命機能解明」日本バイオイメージング学会第 21 回学術集会、2012 年 8 月 27 日～28 日、国立京都国際会館、京都市、京都府

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~funatsu/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

船津 高志 (FUNATSU, Takashi)

東京大学・大学院薬学系研究科・教授

研究者番号：00190124

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし