

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25650057

研究課題名(和文)レクチンアレイ型微細構造観察ホルダの開発

研究課題名(英文)Development of a high-resolution sample holder with lectin and binding protein on the thin film

研究代表者

小椋 俊彦(Ogura, Toshihiko)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・上級主任研究員

研究者番号：70371028

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文): ウイルスや細菌の細胞への感染は、細胞表面の糖鎖や結合タンパク質を認識することで特異的に行われる。細胞内や細胞膜には、糖鎖を含む糖タンパク質や膜タンパク質が多数存在し、これらがタンパク質の機能発現に大きな役割を果たしており、その解析が進むことで病気の解明や治療法の発見に役立つと考えられている。本研究では、生物試料の微細構造とその糖鎖や結合タンパク質の状況を溶液中で同時に観察・解析する新たな方法を開発する。これにより、細菌やウイルス、糖タンパク質等の分析と構造変化の解析を網羅的に行うことが可能となり、生物における糖鎖や結合タンパク質の役割の解明が飛躍的に進むことが期待される。

研究成果の概要(英文): Cell infection of bacteria and virus is identified by the sugar chain and/or membrane proteins. Various sugar chains and binding proteins are located in the cell membrane, which is responsible for the important cell functions. Therefore, improving of its mechanism analysis will be helpful to various therapies. In this study, we developed a new observation method of bacteria and virus in water. This system allows for high-resolution imaging of various biological specimens with binding proteins and sugar chain under water condition. Our new method can be utilized for analysis of bacteria and virus with sugar chain and binding protein.

研究分野: ナノバイオ工学

キーワード: 細菌 ウイルス 糖鎖 液中観察

1. 研究開始当初の背景

病原体による感染症は人類にとって極めて大きな脅威である。ウイルスやバクテリアの細胞への感染は、細胞表面の糖鎖を認識することで特異的に行われる。さらに、細胞内や細胞膜には、糖鎖を含む糖タンパク質が多数存在し、これらがタンパク質の機能発現に大きな役割を果たしており、その解析が進むことで病気の解明や治療法の発見に役立つと考えられている。しかし、糖鎖を直接解析することは非常に困難であるため、まだ本質的な解明には至っていない。本研究では、生物試料の微細構造とその糖鎖状況を溶液中で同時に観察・解析する新たな方法を開発する。これにより、バクテリアやウイルス、糖タンパク質等の分析と構造変化の解析を網羅的に行うことが可能となり、生物における糖鎖や結合タンパク質の役割の解明が飛躍的に進むことが期待される。

2. 研究の目的

細胞における異物の認識や排除、結合や感染等の生物の本質的な機能発現に糖鎖は大きな役割を担っている。糖鎖は、グルコースやマンノース、ガラクトース等の単糖が複雑に鎖状に連なった構造をしており、様々な種類の糖鎖が細胞表面やタンパク質表面を修飾することで、細胞の種類や感染の入り口、さらにはタンパク質の認識等の機能発現を行う。こうした生物試料を直接高分解能で観察するためには、非染色の生物試料を大気圧化あるいは溶液中で観察する新たな方法の開発が必須となる。

従来の走査電子顕微鏡 (SEM) により生物試料を観察する場合は、真空による影響や電子線ダメージを受け、さらにはコントラストが弱い等の様々な問題がある。我々は、こうした問題を解決する新たな観察方法として間接 2 次電子コントラスト法 (ISEC) を開発した (引用文献 1)。この方法は、電子線を薄膜に一旦吸収させ、そこから発生する 2 次電子を間接的にサンプルへと照射し、サンプルを透過した 2 次電子により観察する方法である。この方法では、生物サンプルを固定・染色なしに、大気圧状態で観察することが可能である。この方法では、生物サンプルに直接電子線が照射されないため、電子線ダメージを防ぎ、高いコントラストを得ることが可能である。そのため、本方法を用いることで細胞やバクテリア、ウイルス等の多種多様なサンプルを迅速に高分解能で観察できる (引用文献 2、3)。こうした、サンプル支持膜表面に多種類のレクチンやその他の結合タンパク質を用いてアレイ状に配列することで、バクテリアやウイルスの表面を覆う糖鎖に従い、結合するレクチンの部位にそれぞれの生物試料が結合される。これによりバクテリアやウイルスの詳細な構造観察と

その表面を覆う糖鎖や結合タンパク質を同時に解析することが可能となる。この方法に加えて、溶液中の生物試料をそのまま直接観察する新たな方法の開発を進め、バクテリアやウイルスさらにはタンパク質の結合状況をより詳細に観察を行う。

3. 研究の方法

初年度は、レクチン溶液やフィブロネクチン等の結合タンパク質を窒化シリコン薄膜へと滴下し固定化する技術開発を行う。レクチンやフィブロネクチン溶液等は、SiN 薄膜に滴下後に乾燥・固定化をする予定であり、乾燥時の溶液の収縮により窒化シリコン薄膜に歪が発生し破壊されないよう、その濃度と固定化剤の検討を行う。さらに、窒化シリコン薄膜上にレクチンアレイを形成するため技術を開発する。レクチン溶液を封入したガラス微小管と窒化シリコン薄膜間に約 1000V の電圧を加えることで、窒化シリコン薄膜を壊すことなく、レクチン溶液を滴下することが可能であった。また、水溶液中の生物試料をそのままの状態ダメージ無く観察する技術を開発した。これにより、非染色・非固定の状態でバクテリアを観察する。複数のレクチン溶液からなるレクチンアレイを窒化シリコン薄膜上に形成し、水溶液中のバクテリアの結合状況や変化を観察する予定である。そのためには、レクチンアレイを形成した窒化シリコン薄膜と水溶液を封入する観察ホルダーを開発する。さらには、水溶液中を透過する電位変動の検出を、より高い SN 比で行うため、高増幅度で低ノイズのアンプに改良する。さらに、これらのシステムを高分解能 FE-SEM 内に導入することで、分解能の向上を図る。

4. 研究成果

(1) 細胞やバクテリア、ウイルスと糖鎖や結合タンパク質の相互作用を分析するためには、溶液中の生物試料をそのままの状態観察するための方法論の開発を進めた。従来の ISEC 法では、電子線を照射した薄膜下面から 2 次電子が放出され、これを間接的に試料に照射し観察を行う。しかし、この方法では、完全に溶液満たされた状態での観察は困難であった。これを克服するため、タングステン積層した窒化シリコン薄膜に電子線を入射し、電子線の電子をタングステン層で吸収させ、これに起因する電位変化を使って観察する方法を開発した。これにより、10 μ m の水の層内の生物試料や有機材料を直接観察することが可能となった。さらに、窒化シリコン薄膜層にレクチンやフィブロネクチンを積層することで、バクテリアや細胞を特異的に吸着させ観察することを可能とした。

(2) 細胞やバクテリアとレクチンやフィブロネクチン等の結合タンパクとの状態を分析するためには、より高分解能の装置が必要となる。電子線に起因する電位変化により観察する新規の方法に関して、より高分解能化を達成するため、タングステン層にバイアス電圧を加えることで、検出信号を大幅に増強させることを見出した(図1)。これにより、SN比が飛躍的に向上し、画像のコントラストや高分解能化を達成した。

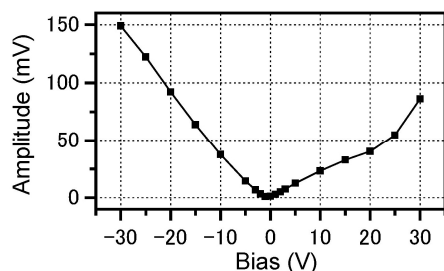


図1 電位観察法におけるバイアス電圧による信号増幅

この方法により、溶液中の非染色・非固定のバクテリアを1万倍の倍率で観察することが可能となった(図2)。

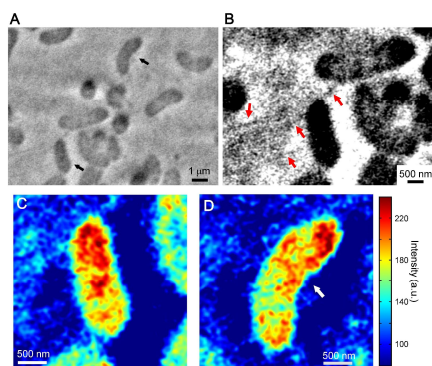


図2 薄膜に付着した液中バクテリアの変動電位透過法による直接観察

上記の方法を高分解能の電界放射型 SEM内に組み込むことで、分解能の向上をさらに進めた。図3は、本システムで観察した水溶液中の非染色・非固定のIgMタンパク質粒子の画像である。この画像から、IgMタンパク質は、IgGタンパク質が5個結合した形状であり、中央部にドーム状の形状が見られた。IgM抗体は、様々なタンパク質やウイルス、バクテリアに吸着する特性を持ち、レクチンによる吸着だけでなく、抗体による結合の分析も可能とした。

<引用文献>

Ogura, T., 2008. A high contrast method of unstained biological samples under a thin carbon film by scanning electron microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377: 79-84.

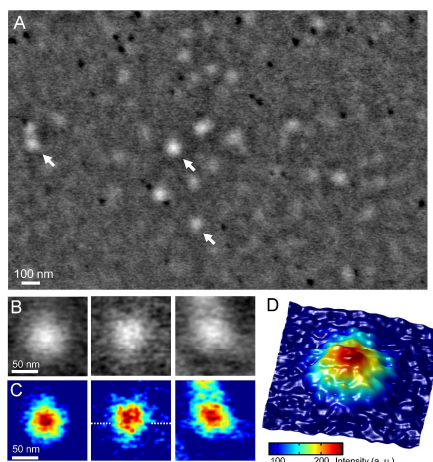


図3 IgMタンパク質の液中直接観察

Ogura, T., 2010. Direct observation of unstained biological samples by scanning-electron generation X-ray microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391: 198-202.

Ogura, T., 2012. High-contrast observation of unstained proteins and viruses by scanning electrons microscopy. *PLoS One* 7: e46904(7pp).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7件)

小椋 俊彦、誘電率顕微鏡による液中生物試料やナノ粒子の観察、*ぶんせき*, No.4, pp.126-131(2016)(査読あり)

Toshihiko Ogura, Nanoscale analysis of unstained biological specimens in water without radiation damage using high-resolution frequency transmission electric-field system based on FE-SEM” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol.459, pp.521-528 (2015) (査読有り)

DOI:10.1016/j.bbrc.2015.02.140

Manatsu Morikawa, Hiroaki Yajima, Ryo Nitta, Shigeyuki Inoue, Toshihiko Ogura, Chikara Sato, Nobutaka Hirokawa “X-ray and Cryo-EM structures reveal mutual conformational changes of Kinesin and GTP-state microtubules upon binding” *The EMBO Journal*, Vol.34, pp.1270-1286 (2015) (査読有り)

Toshihiko Ogura, Hiroaki Yajima, Ryo Nitta, Nobutaka Hirokawa, Chikara Sato, “New simulated annealing approach considering helix bending applied to determine the 8.8

structure of 15-protofilament microtubules” J. Struct. Biol., Vol. 188 pp.165-176 (2014) (査読有り)
DOI: 10.1016/j.jsb.2014.08.009

Toshihiko Ogura, “ Non-destructive observation of intact bacteria and viruses in water by the highly sensitive frequency transmission electric-field method based on SEM ” Biochem. Biophys. Res. Commun., Vol.450, pp.1684-1689 (2014) (査読有り)
DOI:10.1016/j.bbrc.2014.07.062

Toshihiko Ogura, “ Direct observation of unstained biological specimens in water by the frequency transmission electric-field method using SEM ” PLoS ONE, Vol.9 e92780 (6 pages) (2014) (査読有り)
DOI:10.1371/journal.pone.0092780

Noriya Izu, Toshihiko Ogura, Takafumi Akamatsu, Toshi Itoh, Woosuck Shin, “ Direct scanning electron microscopy based observation of dispersed core-shell-type nanoparticles in a wet state ” , Ceramic International, Vol.40, pp.16361-16364 (2014) (査読有り)
DOI: 10.1016/j.ceramint.2014.07.075

[学会発表](計 1件)

小椋 俊彦, “ 変動電位透過観察法による水溶液中の非染色・非固定ウイルスの直接観察方法 ” 日本ウイルス学会、2014年11月11日(横浜)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小椋 俊彦 (Ogura Toshihiko)

国立研究開発法人 産業技術総合研究所・上級主任研究員

研究者番号：70371028