

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K13644

研究課題名(和文) ナノトラックを用いたキネシンとATPの同時1分子蛍光計測

研究課題名(英文) Single-molecule fluorescence detection of kinesin and ATP using nanotracks

研究代表者

横川 隆司 (Yokokawa, Ryuji)

京都大学・工学研究科・准教授

研究者番号：10411216

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ナノスリット(LZMWs)を用いて、微小管およびキネシンの運動アッセイにおける蛍光ATPの結合・解離を1分子観察することを目標とした。電子線描画装置を利用してLZMWsデバイスを作製するとともに、有限要素法に基づいてナノスリットにおける励起光・蛍光の分布を計算し、LZMWsとしての機能を評価した。また、ナノスリットにキネシンおよび微小管を導入し、キネシンによる微小管運動とキネシンに対する蛍光ATPの結合・解離を同時に蛍光観察した。将来的には、従来のZMWsでは使用できなかったミオシンやクロマチン繊維など、繊維状の生体分子の1分子蛍光観察にこの方法を適用することも期待できる。

研究成果の概要(英文)：We developed Linear Zero Mode Waveguides (LZMWs) for simultaneous observation of kinesin and ATP under higher concentration of fluorescently labeled ATP than that used in the conventional total internal reflection microscopy (TIRFM). Single-molecule fluorescent microscopy is a promising method to analyze correlation between the mechanical displacement and hydrolysis of ATP by a kinesin molecule. However, the concentration of fluorescently labeled ATP was limited up to 10 nM in TIRFM, thus available data from experiment was limited. Proposed method enables to use ten times higher concentration of fluorescently labeled ATP by confining excitation lights in LZMWs, which are nano-slits with 100 nm in width.

研究分野：BioMEMS、MicroTAS

キーワード：マイクロ・ナノデバイス 分子モーター 生物物理 ナノバイオ 1分子計測(SMD)

1. 研究開始当初の背景

モータタンパク質(以下,モータ)は,化学反応のエネルギーを力学的仕事に変換して運動する.本研究で着目するキネシン(kinesin-1)は2つの頭部(ホモダイマー)を持ち,ATPを加水分解しながら細胞骨格である微小管上をプラス端に向かって動く.このとき,1分子のATPを加水分解するごとに,マイナス端側の頭部がプラス端側の頭部を追い越して前方に進むものと理解されている.しかし,これはキネシンの蛍光1分子計測とバッファ条件などからモデル化されたものであり,キネシンとATPを同時計測して2つの頭部がどのようなタイミングでケモメカニカルに協調しながら変位を生み出しているのかは実証されていない.より具体的には,加水分解により生じるADPの乖離がいつ起こっているのか,直接観察できていない.

一方で,1分子蛍光観察の技術は,nM程度の低濃度の蛍光分子をFIONA(Fluorescence Imaging with One Nanometer Accuracy)により数nmの空間分解能を実現してきた.これまでは,モータをnM程度にして1分子観察する一方,実時間観察のためATPは高濃度で観察してきたため,ATPの1分子計測ができなかった.1分子計測を高濃度でおこなう方法として,励起波長以下の直径を持つナノ開口であるZero-mode waveguide(ZMW)内に発生するエバネッセント場を利用して,基質濃度を下げずに酵素基質反応を1分子で可視化する方法が提案されている.しかし,円形のZMW内にはフィラメント状の微小管を配置できない.したがって,本研究においてZMWを改変して新たにLinear ZMW(LZMW)を提案し,2種類の蛍光分子の1分子同時観察を実現して,キネシン頭部の協調性を理解することは非常に重要な技術である.

2. 研究の目的

本研究の目的は,ナノトラック(以下Linear zero-mode waveguide(LZMW)とも呼ぶ)内に発生させたエバネッセント場に微小管を導入・固定し,その上を運動するキネシンの動きとそれに伴うATPの加水分解反応を蛍光1分子計測により評価することで,それらのケモメカニカルなカップリングモデルを実証することである.従来の蛍光1分子計測は,蛍光分子濃度をnM以下にして背景光を排除する必要がある.このため,低濃度のキネシン1分子の観察は可能であるが,ATPまで低濃度にしてしまうと加水分解反応の実時間観察が困難であり,キネシンとATPのケモメカニカルなカップリングを評価できなかった.そこで,観察場をLZMWにより制限することで, μM 程度のATPを用いながらキネシンとの結合乖離を1分子観察することに挑戦する.

3. 研究の方法

3.1 LZMWの作製

珪酸ガラス基板($t=170\ \mu\text{m}$, $24\times 24\ \text{mm}$, No. 1 thickness, 松浪硝子工業)をアンモニアと過酸化水素の混合溶液に浸漬し,70 \square で10分間洗浄した.純水でリンスし窒素ブローして乾燥させた基板にHexametyldisilazaneを塗布して基板表面を疎水化し,ネガ型電子線レジスト(ma-N2403)を塗布した.チャージアップを抑制する導電性高分子膜(エスペイサー-300Z, 昭和電工)を塗布したのちに,大面積高速電子線描画装置(F7000S-KYT01, アドバンテスト)を用いて電子線描画を行った.LZMWsのパターンを描画したガラス基板は純水中で60秒間リンスして導電性高分子膜を除去し,100 $\square\text{C}$ で2分間ベークした.

そののち,基板を1分間徐冷し,現像液(CD-26, MicroChem)に60秒間浸漬して電子線が露光されていない領域のレジストを除去した.現像後の基板に厚さ100nmのアルミニウムを真空抵抗熱蒸着装置で成膜し,残ったレジストとその上に成膜されたアルミニウムをアセトン中で15分間超音波洗浄してリフトオフし,LZMWsデバイスのナノスリット構造を形成した.作製したLZMWs基板は使用直前に80 $\square\text{C}$ に加熱した2% Poly(vinylphosphonic acid)水溶液中で2分間インキュベートし,アルミニウム表面を不活性化した.

3.2 蛍光顕微鏡観察系

2種類の蛍光分子を同時に励起するため,波長473nmのレーザー光源(DPBL-9050, SUWTECH)および波長640nmのレーザー光源(OBIS 640, Coherent)を利用した.蛍光画像の観察には倒立顕微鏡(IX71, Olympus)を用いた.2波長の蛍光画像を同時に観察するため,波長に応じて蛍光画像を分割する光学系(DualView, Photometrics)を介してEMCCDカメラ(iXon DU897, Andor)を接続し,画像を取得した.試料からの蛍光は光学系に設置したダイクロイックミラーによって波長560nmを境に長波長側と短波長側に分離され,それぞれの波長に対応した吸収フィルタ(ET525/50, Chroma technologyおよびBLP-01-635R, Semrock)を通過してカメラのCCDセンサー上に結像する.蛍光画像はPCに接続したカメラから,画像取得用ソフトウェア(Andor iQ, Andor)を用いてハードディスクに記録した.

3.3 タンパク質試料の調製

微小管を構成するチューブリンは豚脳から精製した.ワーリングブレンダーで破碎した豚脳にGTPおよび MgSO_4 を導入し,37 $\square\text{C}$ で静置するとチューブリンが重合し微小管が形成される.微小管を重合した溶液を遠心分離して,微小管を沈殿として回収した.その後,4 $\square\text{C}$ のバッファ中で沈殿を破碎して微小管を脱重合させたのちに再び遠心分離

し、上清に残ったチューブリンを回収した。この重合と遠心、脱重合のプロセスを2度繰り返すことで豚脳の破碎液から重合・脱重合能を保った 6 mg mL^{-1} 程度のチューブリン溶液が得られた。精製したチューブリンの一部を Alexa Fluor 488 色素および biotin で標識し、通常のチューブリン、Alexa Fluor 488 標識チューブリンおよび biotin 標識チューブリンの比率が 17:2:1 となるように混合して蛍光色素および biotin で標識された微小管を重合した。実験直前にこの微小管と表面に ストレプトアビジンが修飾された量子ドット (Qdot 525, Q10143MP, Thermo Fisher Scientific) を混合して 4°C で 15 分間静置し、ピオチン-ストレプトアビジンの結合によって量子ドットを微小管に付加した。量子ドットは通常の蛍光色素と比較して非常に強い蛍光を放つため、ナノスリット内で運動する微小管の標識として用いることができる。

また、ヒト由来の kinesin-1 をベースとしたキネシンを精製し、運動アッセイに用いた。大腸菌にヒト由来の kinesin-1 に加えて発現・精製に必要な配列を組み込んだプラスミドを導入し、培養した菌体を回収・破碎してタンパク質溶液を取得した。発現させた配列に付加されている His-tag がコバルトイオンを固定化したレジン (TALON metal affinity resin, 635501, Clontech Laboratories) と特異的に結合することを利用して、 0.4 mg mL^{-1} 程度のキネシン溶液を精製し、液体窒素中に保存した。また、1 分子蛍光観察のためにリボース環に Alexa Fluor 647 が付加された蛍光標識 ATP (A22362, Thermo Fisher Scientific) を用いた。以降の文中ではこれを蛍光 ATP と呼称する。

3.4 ナノスリットにおける実効観察体積の計算

ナノスリットに入射した励起光の強度分布およびナノスリット内から放たれる蛍光が対物レンズに到達する効率について、有限要素法を用いて計算した。まず、スリットの幅を 150 nm 、アルミニウム膜の高さを 100 nm として、波長が 640 nm で、スリットに平行な方向への直線偏光をもつ励起光が入射するという条件を設定して励起光の分布を計算した。また、同じ寸法のスリットについて、その中央部に位置する双極子が放つ蛍光がスリット内およびガラス基板を伝播する際の蛍光の強度分布を計算した。この分布から、基板下部に存在する対物レンズまで蛍光が到達する割合を計算することで、ナノスリット内の蛍光分子が放つ蛍光の観察効率を評価した。

3.5 LZMWs を利用した 1 分子蛍光観察

LZMWs 基板と $18 \times 18 \text{ mm}$ のカバーガラス (No. 1 thickness, 松浪 硝子工業) をパラフィルムで接着し、簡易流路を作製して実験に用いた。簡易流路に 0.2 mg mL^{-1} のカゼイン

を含んだバッファーで 0.1 mg mL^{-1} に希釈したキネシン溶液を導入し、非特異吸着によってナノスリット内のガラス基板にキネシンを固定した後、 500 nM に希釈した蛍光 ATP を導入し、蛍光観察を行った。

3.6 微小管・キネシンおよび蛍光 ATP の同時観察

0.05 mg mL^{-1} に希釈したキネシンを簡易流路に導入して 5 分間インキュベートし、スリット内にキネシンを固定した。流路体積の 2 倍のバッファーで流路内を洗浄したのちに褪色防止剤 ($21.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ glucose oxidase, $36 \mu\text{g mL}^{-1}$ catalase, 0.25 mM glucose, 140 mM βMe , 20 mM DTT) を含んだバッファーで微小管・通常の ATP、蛍光 ATP を希釈し、簡易流路に導入して蛍光観察を行った。得られた画像の処理には Image J (NIH) および MATLAB (Math Works) を用いた。

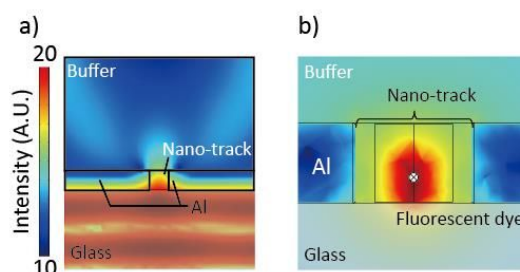


図 1 有限要素法による励起光および蛍光分布の解析。a) ナノスリットに底面から入射する励起光の断面における強度分布。b) ナノスリット内の蛍光分子から放たれ、スリット及びガラス基板を伝播する蛍光の分布。

4. 研究成果

4.1 1 分子蛍光観察に向けたナノスリット特性の評価

ナノスリットを用いることで限られた領域に存在する蛍光分子のみを励起し、高濃度の蛍光分子の存在下で 1 分子蛍光観察を行うことが可能である。ナノスリットの LZMWs としての性能を評価するためには、励起光の分布および放出された蛍光が対物レンズに到達する効率を考慮に入れて、実効的な観察体積を計算する必要がある。

シミュレーションに基づいて求めた励起光の強度分布および伝播する蛍光の分布を図 1 に示す。これらの分布とモデル式に従って、ナノスリットにおける実効的な観察効率を計算した。

1 分子観察において、実効観察体積内に観察対象以外の蛍光分子が存在することが背景シグナルの主因である。蛍光分子は溶液中をランダムに拡散し、観察領域に侵入することから、実効観察体積と蛍光分子の濃度を用いて実効観察体積内に存在する分子数の期待値を計算できる。モデル式と実験に使用した光学系の特性およびナノスリットの設計値から計算した実効観察体積 V_{eff} は $2.0 \times$

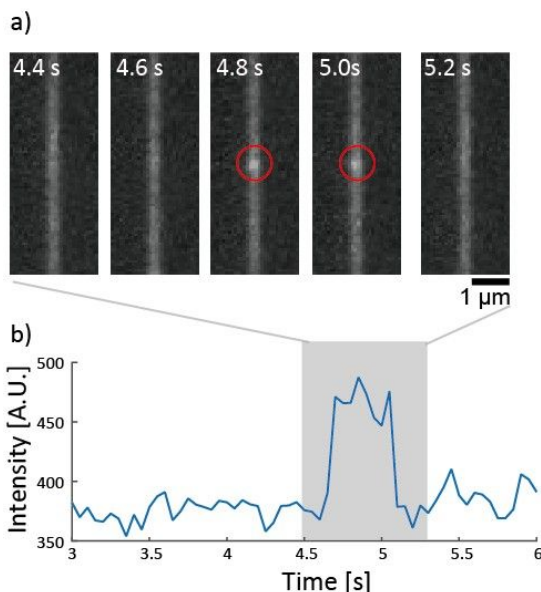


図 2 ナノスリットにおける 1 分子蛍光観察。a) 幅 150 nm のナノスリットにおける蛍光 ATP1 分子の蛍光観察像。b) a) の映像中赤丸で指定した位置における蛍光強度の時間変化。

10^{-18} L であった。この実効観察体積中に存在する蛍光 ATP 分子数の期待値が 1 となる濃度は約 $1 \mu\text{M}$ である。この濃度を 1 分子蛍光観察が可能な濃度の目安と考えることができる。同様の計算を直径 100 nm の ZMWs について行った例では、実効体積は約 1.25×10^{-19} L であり、蛍光分子の濃度が $10 \mu\text{M}$ のときに体積中に存在する蛍光分子数の期待値が 1 となることが示されている。また、全反射顕微鏡法における実効観察体積 1.25×10^{-15} L と報告されており、利用できる蛍光分子の濃度は 10 nM 程度である。これらの結果から、提案した LZMWs で利用できる蛍光分子の濃度は従来の ZMW よりも低いものの、全反射顕微鏡法よりも 10 倍程度高いことが示唆された。

4.2 LZMWs 内における蛍光 ATP の 1 分子観察

LZMWs に 500 nM の蛍光 ATP を導入し、蛍光観察した。ナノスリット内で蛍光スポットが観察された (図 2)。また、蛍光 ATP のスリット内への結合に対応して、蛍光強度が上昇している様子が確認でき、 0.5 秒程度継続して蛍光 ATP が観察されたのちに蛍光強度が背景雑音のレベルまで 1 フレームで低下した。これは、単一の分子から放たれた蛍光によって 蛍光強度が上昇しているためであると考えられる。このように、幅 150 nm のナノトラックを用いて、 500 nM の蛍光 ATP 存在下で 1 分子観察を行うことができた。同様の試料・観察系を用いて通常のガラス基板上で励起光を全反射状態にして観察した場合には、1 分子観察を行える濃度の上限が 50 nM 程度であった。これらのことから、LZMWs を用いて従来法における濃度の制限よりも高い濃度の蛍光分子を用いて 1 分子観

察が可能であることが示された。また、LZMWs で観察された濃度は、シミュレーションに基づいて計算した蛍光濃度の上限の目安とも傾向において一致しており、LZMWs による 1 分子観察を実現 できたといえる。

4.3 キネシンによる微小管運動

キネシンを導入したナノスリット内で微小管が運動する様子を観察した。微小管は安定的に運動しており、ナノスリットの壁面構造による運動が阻害されていないことがわかった。また、ATP 濃度を $100 \mu\text{M}$ としたときのナノスリット内における運動速度は $0.70 \pm 0.23 \mu\text{m s}^{-1}$ であった。一方で、コントロール実験として加工していないガラス基板上で計測した運動速度は $0.34 \pm 0.068 \mu\text{m s}^{-1}$ であった。ナノスリット内において運動速度がコントロール実験よりも高い理由として、アルミニウム膜が照射されたレーザー光の一部を吸収し、観察領域の温度が上昇したことが考えられる。室温より 10 程度温度が上昇すると、キネシンによる微小管運動速度が 2 倍程度まで上昇することが報告されている。このことから、レーザー照射によるアルミ膜の温度上昇は、ナノスリットにおける微小管の運動速度向上の原因として妥当であると考えられる。

4.4 微小管と蛍光 ATP の同時観察

量子ドットで標識した微小管と蛍光 ATP の蛍光観察画像をそれぞれ緑および赤で着色し、観察した。その結果、緑色で着色した画像からは、量子ドットによって標識された微小管が運動する様子を観察することができた。一方、赤色で着色した画像からは、蛍光 ATP を 1 分子ずつ観察できていることがわかった。2 色の画像の位置を合わせてマージし、微小管と蛍光 ATP を同時に観察した。また、1 本のナノスリットにおいて蛍光 ATP が観察された位置の空間的な分布をヒストグラムとしてプロットした。ナノスリットを微小管が存在しない領域と存在しない領域に区分すると、微小管が存在する領域において蛍光 ATP を検出する頻度がより高かった。微小管に結合しているキネシンは、そうでない状態のキネシンよりも高い頻度で ATP 加水分解を行うことがバルク溶液の計測から報告されている。詳細な議論のためにはさらに計測が必要であるが、観察された蛍光 ATP 検出頻度の増大はこの知見を 1 分子レベルでの観察結果に基づいて支持するものである。

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 2 件)
 藤本和也、森田有貴、飯野亮太、富重道雄、新宅博文、小寺秀俊、横川隆司*、
 *Linear-shaped Zero Mode Waveguides の設

計・製作とそれを用いたキネシンおよび ATP の 1 分子観察」電気学会 E 部門誌, 137, 6, 159-164, 2017.

K. Fujimoto, H. Shintaku, H. Kotera, R. Yokokawa*, "Pneumatically-driven Microfluidic Device for Evaluating Active Transport by Kinesin Motor Protein," *IEEJ Transactions on Sensors and Micromachines*, 136, 9, 384-389 2016.

〔学会発表〕(計 10 件)

K. Fujimoto, R. Iino, M. Tomishige, H. Shintaku, H. Kotera, R. Yokokawa, "Fluorescent observation of ATP binding in kinesin driven microtubule gliding using nano-slits," The 31st IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2018), pp. 432-435, Belfast, United Kingdom, 2018/01/21-25 (Poster)

K. Fujimoto, Y. Morita, R. Iino, M. Tomishige, H. Shintaku, H. Kotera, R. Yokokawa, "Linear Zero Mode Waveguides for the Study of Chemo-Mechanical Coupling Mechanism of Kinesin," The 30th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2017), pp. 64-67, Las Vegas, NV, USA, 2017/01/23-26

Y. Morita, K. Fujimoto, R. Iino, M. Tomishige, H. Shintaku, H. Kotera, R. Yokokawa, "Single-Molecule Fluorescence Imaging of Kinesin Using Linear Zero-Mode Waveguides," IEEE Sensors 2016, pp. 643-645, Orlando, FL, 2016/10/30-11/2

藤本 和也, 飯野 亮太, 富重 道雄, 新宅 博文, 小寺 秀俊, 横川 隆司, "キネシンによる微小管運動における蛍光 ATP 結合・解離の LZMWs を用いた 1 分子観察," 第 34 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 広島市, 2017 年 10 月 31-11 月 2 日.

藤本 和也, 飯野 亮太, 富重 道雄, 新宅 博文, 小寺 秀俊, 横川 隆司, "ナノスリットを用いたキネシン・微小管および蛍光 ATP の同時 1 分子観察," 第 36 回化学とマイクロ・ナノシステム学会, 3P03, 桐生市, 2017 年 10 月 4 - 5 日 .

藤本 和也, 森田 有貴, 新宅 博文, 飯野 亮太, 富重 道雄, 小寺 秀俊, 横川 隆司, "LZMW を用いたキネシンによる ATP 加水分解サイクルの可視化," 第 33 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 24pm23-C-21, 平戸, 2016 年 10 月 24-26 日.

藤本 和也, 森田 有貴, 新宅 博文, 飯野 亮太, 富重 道雄, 小寺 秀俊, 横川 隆司, "LZMW を利用した高濃度蛍光 ATP 存在下で

のキネシン運動と ATP 結合の同時蛍光 1 分子観察," 第 54 回日本生物物理学会, つくば, 2016 年 11 月 25-27 日.

藤本 和也, 森田 有貴, 新宅 博文, 飯野 亮太, 富重 道雄, 小寺 秀俊, 横川 隆司, "Linear Zero Mode Waveguide によるキネシンの ATP 加水分解サイクル 1 分子計測," 第 67 回コロイドと界面化学討論会, 旭川, 2016 年 9 月 22-24 日.

森田 有貴, 藤本 和也, 飯野 亮太, 富重 道雄, 新宅 博文, 小寺 秀俊, 横川 隆司, "R14A キネシンによるナノトラックへの微小管の固定法とその評価," 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第 34 回研究会, 千葉, 2016 年 9 月 6-7 日.

森田 有貴, 藤本 和也, 飯野 亮太, 富重 道雄, 新宅 博文, 小寺 秀俊, 横川 隆司, "キネシン 1 分子観察系構築に向けた LZMW への微小管の固定," 平成 28 年度電気学会 センサ・マイクロマシン部門総合研究会 バイオ・マイクロシステム研究会, 金沢, 2016 年 6 月 29-30 日.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.ksys.me.kyoto-u.ac.jp/ry/>

6 . 研究組織
(1) 研究代表者
横川 隆司 (YOKOKAWA, Ryuji)
京都大学大学院・工学研究科・准教授
研究者番号 : 10411216

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

飯野 亮太 (IINO, Ryota)

分子科学研究所・生命・錯体分子科学研究領

域 生体分子機能研究部門・教授

研究者番号：70403003

富重 道雄 (TOMISHIGE, Michio)

青山学院大学・理工学部・教授

50361530

(4)研究協力者

なし