

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23687022

研究課題名(和文) 低収量生体分子の時間分解計測を目指したマイクロ流体ミキサーの開発

研究課題名(英文) Development of microfluidic mixer for time-resolved spectroscopy applicable to low-yield biomolecules

研究代表者

木村 哲就 (Kimura, Tetsunari)

独立行政法人理化学研究所・放射光科学総合研究センター・研究員

研究者番号：70506906

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,900,000円、(間接経費) 6,570,000円

研究成果の概要(和文)：生体分子反応がどのようなメカニズムで起こっているかを明らかにするためには、その反応を実時間で観察し、生体分子のダイナミクスを明らかにしなければならない。しかし、調製できるタンパク質の量には限りがあり、多くの場合マイクログラムからミリグラム程度であるため、このような低収量生体分子のメカニズムを明らかにする研究は進んで来なかった。本課題では新規の計測系を構築することで、低収量生体分子が起こす反応の時間分解計測を可能にした。

研究成果の概要(英文)：To understand the molecular mechanism of biomolecular reactions, the dynamics of the molecules along the reaction have to be revealed by the real-time measurements. However, the yield of protein is usually very low, ug-mg, and the time-resolved measurements is hard to apply for many biomolecular reactions because of the relatively large consumption. In this research, the time-resolved spectroscopy applicable to the low-yield protein samples were developed and applied to observe the folding, membrane transport and enzymatic reactions.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学、生物物理学

キーワード：マイクロ流路 フォールディング 膜タンパク質 フローセル ストップ・フロー

1. 研究開始当初の背景

生体分子の自己組織化あるいは機能発現の分子機構を明らかにするためには、そのコンフォメーション変化を高い時間分解能で実時間観察することが重要である。特に反応の初期段階に起こる変化は、その後が続いて起こるイベントに大きな影響があると考えられ、反応機構全体を理解するためには必須の情報である。そのため、反応の早い時間領域を観察するために光トリガー・温度/圧力ジャンプ・迅速溶液混合といった種々の手法が開発されてきた。迅速溶液混合は溶媒を急激に変化させることで反応を開始させる方法であり、様々な実験条件を容易に実現できるという特長をもつ。さらに、種々の分光学的手法と比較的に組み合わせることができることから、生体反応を追跡する場合に最も汎用性が高い手法であるといえる。しかし、一般に販売されているストップ・フローミキサーの時間分解能は数ミリ秒が限界であり、より早い時間領域で起こる興味深い構造変化を実時間で捕らえることは不可能であった。本研究代表者は独自に開発した連続フローミキサーを用いて、ストップ・フロー法では観察することができなかった100 μ s から数ミリ秒の時間領域の実時間観察を可能にし、球状蛋白質のフォールディング反応に適用することでその分子機構を明らかにしてきた。

連続フロー法では混合点から観測点までの距離が反応時間に対応することから、観測点を移動することによって容易に時間分解計測が可能になる。また、観測点における焦点幅が時間分解能に対応することから、焦点を小さくする、あるいは流路を流れる溶液の速度を上げることによって高い時間分解能を実現できる。申請者が独自に開発したT字型連続フローミキサー(乱流型ミキサー)は二液を効率よく混合するために乱流を引き起こすようにデザインしており、混合時間は最速で50 μ sを達成できる。しかし、この乱流型ミキサーには解決すべき2つの問題点がある。1つ目は開発当時(2002年頃)の加工技術の限界(流路サイズが最小100 μ m)から、時間分解能が最大で50 μ sであり、100 μ s以前に起こる変化をとらえられない点、2点目は乱流を引き起こすために流速を ~ 10 m/sまで高めなければならず、検出法によっては数gもの蛋白質試料が必要となる点である。したがって、限られた量しか取れない低収量の生物試料に関する時間分解測定を行うためには、これらの問題点を解決した新規の手法の開発が必須であった。

2. 研究の目的

本申請研究は、マイクロ流体力学に基づいた液体の“流体力学的絞り込み(Hydrodynamic Focusing)”を利用したマイクロ流体連続フローミキサーを開発し、低収量生物試料や非常に速い反応への時間分解計測を可能にすることを目的とする。加えて、

これまで観察することのできなかった以下の3つの現象を実時間観察することによって、開発したミキサーの性能評価を行い、生体反応の分子機構を解明するための汎用性の高い手法として確立することを目的としている。

(1) 膜蛋白質の機能発現に伴うコンフォメーション変化の観察

多くの生命体において同定される遺伝子のうち約30%が膜蛋白質をコードしていることが知られており、膜蛋白質は生命活動を担う重要な機能を有している。現在精力的な研究により膜蛋白質の構造が明らかにされつつある。しかし、その機能発現に伴うダイナミクスは、試料の調製が困難で低収量であるために未解明のままである。そこで、従来のストップ・フロー法や乱流型連続フロー法で問題となってきた試料の消費を100倍以下に抑えたマイクロ流体ミキサーの開発を行い、少量しか取れない膜蛋白質の時間分解測定を可能にしていく。本研究では新型ミキサーの性能評価も含めて、まず、塩化物イオンポンプであるハロロドプシン(pHR)の陰イオンの取り込み・放出に伴う構造変化を実時間測定する。その後、KcsAなど他の膜蛋白質の機能発現機構をダイナミクスの直接観察によって解明していきたい。

(2) 球状蛋白質のフォールディング反応の初期段階(数 μ s-100 μ s)に起こる収縮過程の観察

研究代表者はこれまで乱流型ミキサーを用いて、水溶性球状蛋白質のフォールディング機構が100 μ s以内に起こる『ポリペプチド鎖の収縮』とその後に起こる『相互作用ペアの探索』によって記述できることを提案してきた^[5,7,8,11]。しかし、収縮の過程は時間分解能が十分でなかったため直接観察はできていない。そこで、数 μ s-100 μ sという生体分子反応の初期段階を観察するための連続フローミキサーの開発を行い、数 μ sの時間分解能を持つ測定系を組み立てる。これを用いて、数 μ s-100 μ sの時間領域で起こる拡散運動に伴う収縮を直接観察し、球状蛋白質のフォールディング機構の解明を目指す。

(3) 膜蛋白質の*in vitro*フォールディング機構の解明

膜蛋白質の安定性やフォールディング機構を明らかにすることは膜蛋白質の機能を理解し、アミノ酸配列の相違がどのような機能の違いに反映されているのかを明らかにしていく上で必須の条件である。加えて、脂質二重膜の物理化学的な性質が構造に大きな影響を与えることから、膜蛋白質の脂質二重膜への挿入機構の解明なしに、フォールディング機構を議論することはできない。そこで、開発した2種類のミキサーを用いて、膜蛋白質が脂質二重膜へ挿入され、フォールディングする過程を初期段階から

観察し、膜蛋白質の *in vitro* フォールディング機構の解明を目指す。この研究を足掛かりにシャペロンの介助も含む膜蛋白質のフォールディング、あるいは蛋白質複合体の自己組織化の分子機構を明らかにする研究への展開を考えた。

3. 研究の方法

乱流型連続フロー法で問題となる試料の消費を 1/1000 以下に抑えながら、混合に要する時間を数 μs まで向上させた新規のマイクロ流体連続フローミキサーを開発する。独自に開発するミキサーと顕微分光法を組み合わせることによって、マイクロ秒の時間分解能を達成する新規の時間分解計測系を構築する。これらの測定系を用いて、膜蛋白質 *pHR* のイオン取り込みに伴う構造変化、球状蛋白質 ACBP および膜蛋白質 OmpA のフォールディング反応の実時間観察を行い、測定系の性能を詳細に評価し、低収量生体試料の自己組織化あるいは機能発現の分子機構の解明が可能な、汎用性の高い手法として確立する

【マイクロ流体連続フローミキサーの開発】

本申請研究では、最新の加工技術によって製作できるマイクロ流体デバイスを用い、“流体力学的絞り込み (Hydrodynamic Focusing)” による溶液混合を実現する。図 2A のような対照的なデザインによって上下の入口から溶媒を導入し、中心左の入口から生体高分子を含んだ溶液を導入すると、流体力学的絞り込みによって流路の水平中心に試料溶液が局在しながら流れることになる。ここで、この層流の幅がサブマイクロからマイクロメートル単位になると、分子拡散により、特に低分子量の分子の交換が進み、溶液が混合される。マイクロ流体ミキサーの製作は分子科学研究所装置開発室の協力を得て行う。

以下のコンセプトに立脚して、2 種類の異なるマイクロ流体ミキサーを作成する。

(1) 試料の消費を 1/1000 に抑え、ミリ秒以降の反応を観察するための低速ミキサー
低収量の生体分子試料に適用できるように、サンプルの消費量を 1/1000 以下に抑え、数ミリ秒以降の反応を容易に追跡できるミキサーを開発する。数 mm/s という遅い流速で溶液混合を実現するために、流体力学的絞り込みを利用した混合流路と観測流路 (幅 $70\mu\text{m}$ ・深さ $10\mu\text{m}$) から構成されるマイクロ流体デバイスを作成する。例えば、幅 $10\mu\text{m}$ ・深さ $10\mu\text{m}$ の混合流路の場合、1ms 以内に低分子量の反応物は壁に到達して拡散するため、この混合流路が $50\mu\text{m}$ 程度の長さあれば分子の拡散に十分な時間を提供でき、溶液混合が完結する。観測流路へ排出された混合溶液に関して、流速・観測点を変えることによって、反応開始から数ミリ秒以降の時間分解測定が可能になる。

(2) 生体分子反応の初期段階(数 μs -100 μs)を観察するための高速ミキサー

反応の初期段階 (数 μs -100 μs) を観察するためにも流体力学的絞り込みを用いる。幅 $20\mu\text{m}$ ・深さ $10\mu\text{m}$ ・長さ $200\mu\text{m}$ 程度 (図 2C) の専用ミキサーを作成し、中心を流れる生体試料を含んだながれ層流の幅を流体力学的絞り込みによってサブマイクロ-マイクロメートルまで絞る。同時に試料溶液の流速を m/s のオーダーまで上げると、混合時間を数マイクロ秒にまで向上させることが可能である。流速は乱流型ミキサーと同程度まで上昇するものの、ミキサーのサイズが 2 桁小さいため、試料の消費量を 1/1000 以下 ($\sim 500\mu\text{L/s}$ 100nL/s) に抑えながら時間分解能の大幅な向上が可能になる。

【構造変化の詳細な実時間観察を実現する顕微分光法】本研究で開発するミキサーにおいて生体試料はサブマイクロからマイクロメートルオーダー幅の層流として存在するため、焦点を絞った微小領域の観察が必要となる。また、高い時間分解能を実現するためにも焦点を極力小さくする必要があることから、顕微分光法を用いる。研究代表者は乱流型ミキサーと顕微赤外分光器を組み合わせた実績があり、連続フローミキサーを顕微分光法に適用する技術を確認している。

用いる分光法は、生体分子の構造変化を直接的に観察できるものを選択する必要がある。赤外・ラマン分光法は原子レベルでの情報を与える鋭敏な分光法であり、蛋白質分子や補欠分子の構造変化や水分子も含んだ水素結合ネットワークの変化を追跡できる。また、脂質二重膜と相互作用する特異的な側鎖に関する情報も得られる。一方、蛋白質分子のグローバルな構造変化をとらえるためには、蛍光寿命測定を用いる。蛍光供与体-受容体(D-A)を標識した試料における蛍光エネルギー移動を利用し、その寿命測定から D-A 間の距離とその分布関数が算出できる。具体的にはピコ秒の時間分解能をもつ時間相関単一光子計数法を用いた顕微型蛍光寿命測定装置を構築する。

【*pHR*】*pHR* は 7 回膜貫通型ヘリックスで構成される光駆動型の塩化物イオンポンプであり、塩化物イオンの取り込みはイオン輸送機構の解明に重要な役割を果たす。そこで、 Cl^- フリーの *pHR* と Cl^- 溶液を混合し、 Cl^- の取り込みに伴う *pHR* の構造変化を時間分解計測する。

【ACBP】球状蛋白質の初期収縮を観察するために、4 本のヘリックスで構成される ACBP というヘリックスバンドル蛋白質を D-A で二重標識し、蛍光エネルギー移動によって D-A 間距離をモニターする。効率的な二重標識法は研究代表者がカリフォルニア工科大学在籍時に確立している。

【OmpA】膜蛋白質フォールディングの研究対象として、大腸菌由来の外膜に存在し、 β バレル構造をした膜貫通ドメインをもつ OmpA (Outer membrane protein A) を選択する。過去の研究から、高濃度変性剤存在下で変性

した OmpA 溶液と脂質二重膜溶液を混合すると、自発的に脂質二重膜に挿入されフォールディングが起こることが知られているがその挿入機構およびフォールディング機構は未解明である。変性した OmpA と脂質二重膜を開発したマイクロミキサーによって混合し、そのフォールディングを数 μs という初期段階から追跡し、分子機構を明らかにする。現在、科学研究費研究活動スタート支援 (H22-23 年度) のもとで、発現系の構築を行っている。

4. 研究成果

(1) マイクロ流体連続フローミキサーの開発とフォールディング反応への応用

連続流体絞リ現象を利用したマイクロ流体連続フローミキサーを開発した。作成方法は以下の通りである。

シリコン基板をピラニア洗浄。

スピコートによりフォトレジストを塗布。

フォトマスクを介して紫外線をフォトレジストに照射することで、マスクパターンをレジストに転写。

現像液に浸けることで、感光部以外のレジストを除去 (今回はネガ型を使用)。

硬化剤を混ぜたゲル状の PDMS を流し込み、ゴム状に硬化させる (75、1 時間程度)

PDMS を型からはがし、コネクタ接続のための穴を加工したスライドガラスを、PDMS 平面側に接着。

PDMS にポンチで穴をあける。

PDMS パターン側をスライドガラスに接着させる。コネクタは上側のスライドガラスに接着剤で接着。

以上の操作によって、異なる流路形状をもった 2 種類のミキサーを作製した。図 1 には試料の消費を 1/1000 に抑え、ミリ秒以降の反応を観察するための低速ミキサーの顕微鏡画像を示す。このミキサーに PEEK チューブを

PDMS パターンの光学顕微鏡画像
~混合部分長さ:30 μm ~
120906-02-01

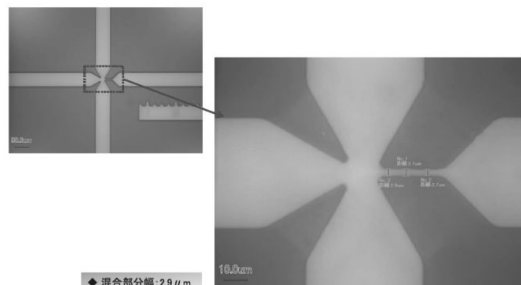


図 1. 3 方からの溶液供給を行い、溶液混合を行うマイクロ流路ミキサーの光学顕微鏡画像。流路幅は中心から右に流れる混合部分で約 10 μm 程度になっており、ここで分子拡散によって混合が起こる。

つなげることで溶液供給を可能にした。このミキサーを倒立型蛍光顕微鏡にマウントし、

Ca^{2+} との結合によって蛍光強度を増大させる Ca-Green を図の左側からと Ca^{2+} を含んだ緩衝溶液を図の上下方向から供給し、右側へ排出したところ強度変化が観察され、1 ms 以内に溶液混合が完結していることが明らかとなった。

このミキサーを用いて、2 重標識した ACBP のフォールディング反応を追跡したところ、D-A 間距離がフォールディングに伴って近づき、20 ms 程度で完結することが明らかとなった。また、蛍光強度の時間変化乱流型ミキサーと比較して、試料消費を約 1/500 に抑制することに成功した。抑制量が当初の計画の半分にとどまったことについては、より高感度の検出器、そしてカバーガラスの自家蛍光を抑えることでより高い S/N 比での計測を行えるようにすることによって改善されると考えられる。また、5 本の溶液供給流路と一本の観察流路を持つミキサーに関しても同様の性能評価を行い、ACBP のフォールディング初期過程 (30-50 μs) の観察を行うことに成功した。これらの成果については現在論文執筆中である。

(2) マイクロ流路を用いた溶液交換 ATR-FTIR 計測系構築

本研究で目的とする、タンパク質消費量の低減という観点から、ATR-FTIR は試料タンパク質を 4 mm^2 程度のダイヤモンド基板上に積層させることで計測が可能になることから、少量のタンパク質での計測が可能になる手

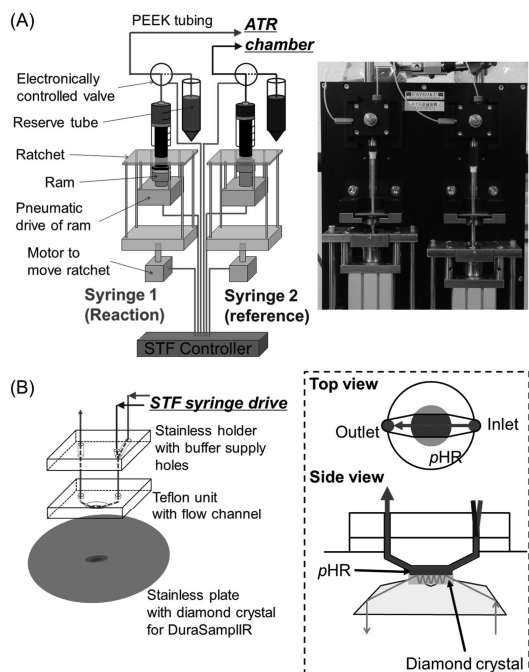


図 2. ATR-FTIR ストップ・フロー法の概略図。(A) ストップ・フロー部分。(B) ATR セル部分であり、マイクロ流路が揺らされたテフロン部品によってダイヤモンドセル上に溶液交換流路が形成される。法である。特に脂質二重膜に再構成された膜タンパク質研究における有用性が高い。そこ

で、積層したタンパク質の上に存在する緩衝溶液を急速に交換することで反応を開始させることができると考え、ストップ・フロー法と組み合わせた溶液交換の系を構築した。脂質二重膜に再構成した pH_R をダイヤモンドにはり付け、緩衝溶液を塩化物イオンのある場合とない場合を交互に計測することによって、pH_R への塩化物イオンの結合過程を追跡した。その結果、10ms 以内に溶液交換が完結できる系の構築に成功した。本成果は *Biophysics* 誌へ投稿し、査読後掲載された。

(3) ケージド化合物を利用したマイクロフローセル反応系の構築

研究期間中の異動に伴い、新たにケージド化合物を利用したマイクロ流路フローセル中で酵素反応の時間分解計測を行える系の構築を行った。幅 200 μm, 光路長 20 μm, 長さ 15 mm の流路を加工したステンレス板を 2 枚の CaF₂ 板で挟むことによってマイクロフローセルを作製した。このフローセルを自作の可視吸収スペクトル計測系に組み込み、流路に対して CO を結合したミオグロビンを導入し、532 nm の NdYAG レーザーを照射することで、CO の再結合反応を追跡することに成功した。これに要するタンパク質量は約 2nL であり、大幅な試料抑制に成功した。

さらに、caged NO を 337.1 nm の窒素ガスレーザーで励起し、放出された NO の還元型ミオグロビンへの NO 結合反応を追跡した結果、NO の結合が約 1ms の時定数で起こり過去の文献値と良い一致を示した。現在はこれを一酸化窒素還元酵素の NO 還元過程の時間分解計測に応用している。

以上のように、本申請課題では、低収量の生体分子の時間分解計測系の構築を目指し、当初予定していたミキサのみならず、溶液交換ストップ・フロー法やケージド化合物とマイクロ流路フローセルを用いた新たな手法開発を行い、当初の目的よりも小さな容量での時間分解計測が可能になる系の構築に成功した。

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)

古谷祐詞、木村哲就、岡本基士 (2014) 「急速緩衝液交換法による時間分解全反射赤外分光法の開発」*生物物理、印刷中* [査読有]

Inokuchi, Y.*, Mizuuchi, T., Ebata, T., Ikeda, T., Haino, T., Kimura, T., Guo, H., Furutani, Y. (2014) “Formation of Host-Guest Complexes on Gold Surface Investigated by Surface-Enhanced IR Absorption Spectroscopy”, *Chem. Phys. Lett.*, **592**, 90-95 [DOI: 10.1016/j.cplett.2013.12.026] [査読有]

Furutani, Y.*, Kimura, T., Okamoto, K. (2013) “Development of a rapid Buffer-exchange system for time-resolved ATR-FTIR spectroscopy with the step-scan mode”, *Biophysics*, **9**, 123-129 [DOI: 10.2142/biophysics.9.123] [査読有]

Guo, H., Kimura, T., Furutani, Y.* (2013) “Distortion of the amide-I and -II bands of an α -helical membrane protein, *pharaonis* halorhodopsin, depends on thickness of gold film utilized for surface-enhanced infrared absorption spectroscopy”, *Chem. Phys.*, **419**, 8-16 [DOI: 10.1021/jz301287n] [査読有]

Furutani, Y.*, Fujiwara, K., Kimura, T., Kikukawa, T., Demura, M. and Kandori, H. (2012) “Dynamics of Dangling Bonds of Water Molecules in *pharaonis* Halorhodopsin during Chloride Ion Transportation”, *J. Phys. Chem. Lett.* **3**, 2964-2369 [DOI: 10.1021/jz301287n] [査読有]

Zhang X, Lam VQ, Mou Y, Kimura T, Chung J, Chandrasekar S, Winkler JR, Mayo SL, Shan SO. (2011) “Direct visualization reveals dynamics of a transient intermediate during protein assembly.” *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 6450-6455 [DOI: 10.1073/pnas.1019051108] [査読有]

[学会発表](計 10 件)
木村哲就、久保稔、當舎武彦、城宜嗣「酵素反応の時間分解分光解析を実現するマイクロ流路フローフラッシュ法の開発」日本生物物理学会第51回年会、2013年10月28-30日、国立京都国際会館(京都市)

木村哲就、古谷祐詞「低収量生体分子の時間分解分光計測を目指した新規溶液交換・混合装置の開発」日本生物物理学会第50回年会、2012年9月21-23日、名古屋大学(名古屋市)

木村哲就、道喜慎太郎、石谷隆一郎、濡木理、古谷祐詞「全反射赤外分光法によるMg²⁺輸送体MgtEのイオン選択およびゲーティング機構の解析」第39回生体分子科学討論会、2012年6月8-9日、東北大学片平さくらホール(仙台市)

木村哲就「生体分子反応の実時間観察を可能にする溶液混合装置の開発と応用例」分子科学研究所技術課セミナー『フォトリソグラフィ技術の基礎と応用』、2012年3月26日、岡崎カンファレンスセンター(岡崎市)

Kimura, T., Kandori, H., and Furutani, Y. “Stepwise conformational changes upon anion pumping during the *pharaonis* halorhodopsin photocycle revealed by H/D unexchangeable amide-A vibrations” 5th

International Symposium on Nanomedicine
(ISNM2011), 2012年3月15-17日, 名古屋大
学ESホール (愛知県)

Kimura, T., Douki, S., Ishitani, R., Nureki, O.,
Furutani, Y. "Ion-selective mechanism of
Mg²⁺ transporter MgtE studied by attenuated
total reflection FTIR spectroscopy" 4th
Japan-Korea Seminar on Biomolecular
Sciences, 2012年1月9-11日, 東大寺文化セ
ンター (奈良県)

〔図書〕(計 1 件)

Takahashi, S. and Kimura, T., (2011) "Watchi
ng Dynamicsl Events in Protein Folding in th
e Time domain from Submilliseconds to Seco
nds: Continuous-Flow Rapid-Mixing Infrared
Spectroscopy." in *Protein Folding and Misfold
ing: Shining Light by Infrared Spectroscopy.* (
eds. Fabian, H., Naumann, D.) pp. 91-116

6 . 研究組織

(1)研究代表者

木村 哲就 (Kimura Tetsunari)

独立行政法人理化学研究所・放射光科学総
合研究センター・研究員

研究者番号 : 70506906