

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26390035

研究課題名(和文) 生体分子間相互作用を網羅する新型1分子蛍光イメージング法の開発

研究課題名(英文) Development of novel techniques for single-molecule fluorescence imaging of various biomolecules

研究代表者

谷井 孝至 (TANII, Takashi)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：20339708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：生体分子間の結合・解離を時間軸上で解析できるゼロモード導波路(ZMW)を用いたリアルタイム1分子蛍光イメージング法を高度化するために、ZMWと蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)とを組み合わせた新しい1分子蛍光イメージング法が高い実行可能性を評価した。さらに本手法を拡張するための要素技術の開発 - DNAアプタマを用いたセンサ応用、DNA切断イベントの1分子計測、細胞の特定部位のアライメント法の開発 - にも取り組んだ。

研究成果の概要(英文)：In order to enhance the ability of single-molecule fluorescence imaging (SMFI) that enables to detect binding and dissociation events of bio-molecules in real time using zero-mode waveguides (ZMWs), we propose a novel technique to combine fluorescence resonance energy transfer (FRET) and SMFI with ZMWs, and proved experimentally that the proposed method is feasible. We also tried to extend the ability of this technique by demonstrating SMFI of individual DNA aptamers for sensing application, SMFI of DNA strand scission by endonuclease, and in-situ cell patterning.

研究分野：分子ナノ工学

キーワード：1分子イメージング 蛍光観察 FRET ナノ構造

1. 研究開始当初の背景

リアルタイム 1 分子蛍光イメージング法は、生体分子間の結合・解離を時間軸上で解析できる強力な手法である。タンパク質の機能解析には、いつ、どの分子が、どの順番で、そのタンパク質と結合したかを同定する必要がある。溶液中では、ランダムなタイミングで分子同士が結合するため、これら多数分子のアンサンブル平均を解析しても個々の分子の機能は頭わにならない。溶液中の特定のタンパク質 1 分子に着目してはじめて結合・解離を時間軸上で解析できる。

注目する 1 分子からの蛍光を、溶液中の多数の分子からの蛍光と区別して検出するには、その 1 分子のみにスポットが当たるように励起光を閉じ込める必要がある。汎用的な閉じ込め方法は全反射エバネッセント照明法(TIRFM)で、ガラス/水溶液界面に励起光を閉じ込めることができる。さらなる閉じ込めには光の回折限界を超える必要があり、申請者らが開発したゼロモード導波路(ZMW)の活用が有効である[1]。開口部の直径が光の波長より小さいため、深さ方向だけでなく面内方向にも励起光を閉じ込めることができる。この方法により、DNA ポリメラーゼ[2]、リボソーム[3]、分子シャペロン[4]といった重要なタンパク質の機能解析が行われてきた。

しかしながら、例えば細胞内に存在する多数分子からの蛍光(背景光, 自家蛍光)を排除し、注目する 1 分子からの蛍光だけを抽出するには、ナノ開口内部に励起光を閉じ込めるだけでは不十分で、より近距離(10 nm 以下)で機能する仕掛けが必要になる。この目的に合致するのが、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)である。

2. 研究の目的

ヒトのほぼすべての酵素の相互作用を可視化できる新しいリアルタイム 1 分子蛍光イメージング法を構築する。このために、まず、申請者らが開発した改良型のゼロモード導波路(ZMW)と、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)とを融合する。実験を通して、従来計測不可能とされていた、高い解離定数を持つ酵素・リガンド間の弱い相互作用をリアルタイムに解析できる新手法を構築する。さらに、ナノホール内での生体分子間相互作用の結果、DNA 切断イベントのリアルタイム 1 分子蛍光イメージングの実行可能性に関する実験的評価を行った。また、実細胞を用いた 1 分子蛍光イメージングへの拡張を鑑みて、細胞の特定部位の接着部位を制御できる細胞パターンニング法の開発にも併行して取り組む。

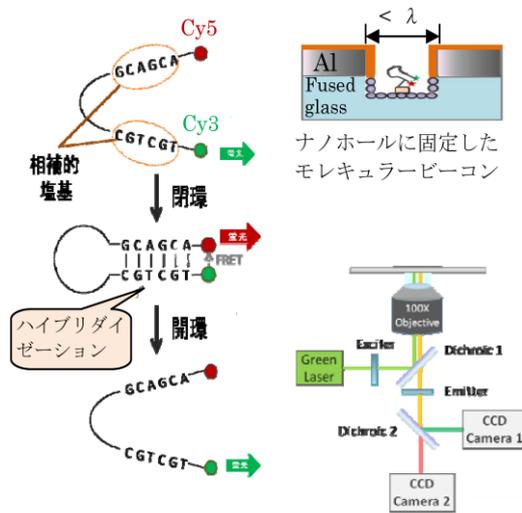
3. 研究の方法

ゼロモード導波路(ZMW)と、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)との融合による 1 分子蛍光イメージングの実行可能性を評価するために、ZMW 内部にモレキュラービーコン

(MB)を構成し、相補的な 1 本鎖 DNA 両端の開閉を制御しながら、導波路内での FRET 効率を計測する。加えて、微細加工を駆使して導波路構造を最適化し、FRET 効率の向上を目指す。また、この 1 分子 FRET 系を MB から DNA アプタマに拡張し、DNA アプタマの配列にグアニンカルテット構造を組み込むことで、K イオン濃度依存的に DNA アプタマの構造が変化することを、FRET を介して読みだすことにも挑戦する。K イオンは心臓血管系や神経伝達系で重要な役割を果たすため、これらに関係する病理につながり、細胞内の K 濃度を測定できるセンサへと拡張できる。これらの新型 1 分子蛍光イメージング法の構築と併行して、細胞の特定部位を位置選択的にパターンニングする手法の構築も試み、将来的に ZMW 直下に細胞の特定部位をアライメントできるようにすることで、細胞内での 1 分子イメージングへと拡張できるようにする。

4. 研究成果

図 1 に、ZMW に固定した MB とその FRET 計測系の概要を示す。



モレキュラービーコンの開閉 FRET 計測のための光学系

図 1 MB を用いた ZMW-FRET 融合系

ナノホールに固定した MB からの 1 分子蛍光をイメージングした。図 1 に示すように、開環状態の MB は FRET を生じず、Cy3 からの蛍光を発するのに対し、閉環状態の MB では FRET が生じて Cy5 からの蛍光が観察される。このとき、これらの蛍光分子からナノホールが配列形成された Al 薄膜への電荷の移動が FRET 効率を低下させることが懸念された。本実験の最初の目的は、このための実験的評価と、ZMW の構造改良の必要性の評価にある。相補的な塩基を持つ DNA を ZMW に固定された MB とハイブリダイゼーションさせることや、上記 FRET 系の温度制御により、MB の開閉を人為的に制御できる。いずれの結果においても、300 nm の直径を有する ZMW では、FRET 効率の低下は見ら

れなかった。また、図1に示すように、フッ素系プラズマを用いてZMW底部の石英表面を60 nm程度掘り下げた構造においても、FRET効率の低下は見られなかった。

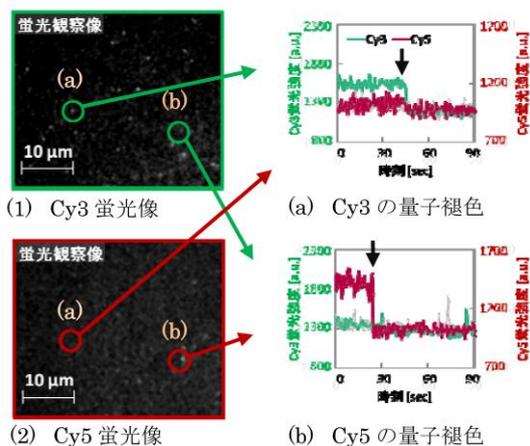


図2 MBを用いた1分子FRET計測

次に、DNA アプタマ部位にグアニンカルテット(図3の塩基配列の下線部)を組み込んでKイオン濃度依存的にMBの開閉を制御することを試みた。ZMW底部にこのDNAアプタマを固定するために、同時にDNAアプタマの末端をビオチンで修飾し、ZMW底部の石英表面に、ビオチンで修飾したBSAを吸着させ、ストレプトアビジンを介して、このBSAにDNAアプタマを結合させた。温度およびK濃度を制御しながらDNAアプタマの開閉に伴う1分子FRET計測を実行したが、いずれの場合にも、開環状態と閉環状態のDNAアプタマの比が50:50となり、組み込んだグアニンカルテットが機能していない結果となった。DNAアプタマの設計に加え、ZMW表面への非特異的吸着が原因と考えられ、全体的な見直しが求められる。

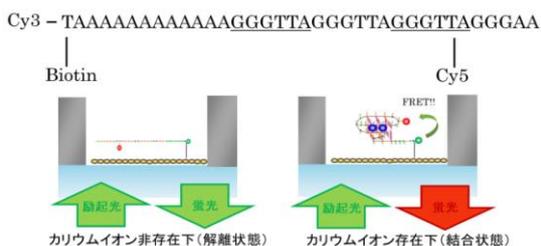


図3 DNAアプタマ観察系

生体分子間の結合・解離に加え、その相互作用を介して構造変化や化学反応を起こすことにより特異な機能を発現するタンパク質もある。ここでは、そのような例としてインフルエンザ由来のエンドヌクレアーゼ(PAN)による1本鎖DNA(ssDNA)の切断イベントを1分子蛍光観察によって捕捉できるかどうかの実行可能性を評価した。ssDNAの5'末端をCy5で標識し、3'末端をビオチンで標識して、ビオチン標識BSAとストレプトアビジンを介してssDNAをZMW底部に

固定した。一方、PANはGFPで蛍光標識され(PAN-GFP)、バッファ中に濃度2 μMで、濃度1 mMのMnCl₂とともに添加された。PAN-GFPによるssDNAの切断イベントは、Cy5からの蛍光の消滅を捕捉することで検出できる。一方、ZMW内でのssDNAへのPAN-GFPの結合はGFPからの蛍光シグナルにより検出できる。

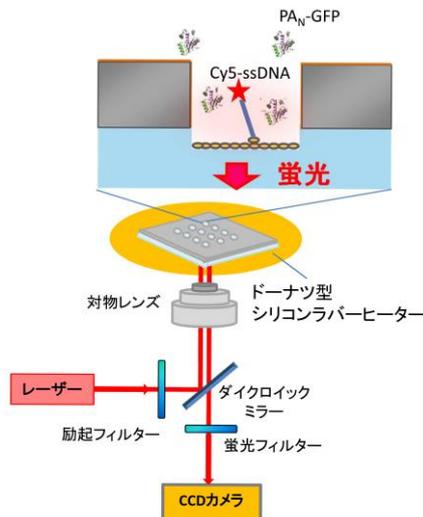


図4 PAN-GFPによるssDNA切断イベントの1分子蛍光イメージング

37°Cにおいて2時間、ssDNAとPAN-GFPを反応させたところ、ssDNAが固定されていたZMWのうちの約半数でssDNAの切断が認められた。その間、これらのZMWにおけるGFPからの蛍光強度の時間変化を解析したところ、PAN-GFPのssDNAへの結合と考えられる蛍光シグナルが捕捉された。これらの結果は、PANによるssDNAの切断イベントを高濃度条件かつ1分子レベルで観察できることを示唆する。しかしながら、そのためには、Cy5およびGFPからの蛍光を同時に観察できる光学系と、高い時間分解能を有する蛍光検出系が必要となると考えられる。

<引用文献>

[1] 特許出願 2006-015559, “微小開口膜、生体分子間相互作用解析方法及びその装置”, 谷井孝至, 島本直伸, 大泊巖, 上野太郎, 船津高志 (2006年1月24日).
 [2] J. Eid, et al: Science 323 (2009) 133.
 [3] S. Uemura, et al: Nature 464 (2010) 1012.
 [4] T. Tanii, et al: Phys. Rev. E 88 (2013) 012727.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計8件)
 [1] T. Matsuzaki, K. Ito, K. Masuda, E. Kakinuma, R. Sakamoto, K. Iketaki, H. Yamamoto, M. Suganuma, N. Kobayashi, S. Nakabayashi, T. Tanii, H. Yoshikawa:

Quantitative Evaluation of Cancer Cell Adhesion to Self-Assembled Monolayer-Patterned Substrates by Reflection Interference Contrast Microscopy, *J. Phys. Chem. B* 120 (2016) 1221. (査読有)

[2] R. Sakamoto, E. Kakinuma, K. Masuda, Y. Takeuchi, K. Ito, K. Iketaki, T. Matsuzaki, S. Nakabayashi, H. Y. Yoshikawa, H. Yamamoto, Y. Sato, T. Tani: Quantitative comparison of cancer and normal cell adhesion using organosilane monolayer templates: An experimental study on the anti-adhesion effect of green-tea catechins, *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Animal* 52 (2016) 799-805. (査読有)

[3] 山本英明, 平野愛弓, 谷井孝至, 庭野道夫: 光触媒作用を用いた液中表面改質による培養神経細胞の操作, *表面科学* 37 (2016) 224-229. (査読有)

[4] H. Yamamoto, S. Kubota, Y. Chida, M. Morita, S. Moriya, H. Akima, S. Sato, A. Hirano-Iwata, T. Tani, M. Niwano: Size-dependent regulation of synchronized activity in living neuronal networks, *Phys. Rev. E* 94 (2016) 012407. (査読有)

[5] S. Kono, H. Yamamoto, T. Kushida, A. Hirano-Iwata, M. Niwano, T. Tani: Live-cell, label-free identification of GABAergic and non-GABAergic neurons in primary cortical cultures using micropatterned surface, *PLOS ONE* 11 (2016) e0160987. (査読有)

[6] H. Yamamoto, T. Demura, K. Sekine, S. Kono, M. Niwano, A. Hirano-Iwata, T. Tani: Photopatterning Proteins and Cells in Aqueous Environment using TiO₂ Photocatalysis, *Journal of Visualized Experiments* 104, 10.3791/53045 (2015). (査読有)

[7] H. Yamamoto, T. Demura, M. Morita, S. Kono, K. Sekine, T. Shinada, S. Nakamura, T. Tani: In situ modification of cell-culture scaffolds by photocatalytic decomposition of organosilane monolayers, *Biofabrication* 6 (2014) 035021. (査読有)

[8] K. Sekine, H. Yamamoto, S. Kono, T. Ikeda, A. Kuroda, T. Tani: Surface modification of cell scaffold in aqueous solution using TiO₂ photocatalysis and linker protein L2 for patterning primary neurons, *e-Journal of Surface Science and Nanotechnology* 13 (2015) 213. (査読有)

[学会発表] (計 23 件)

[1] 古澤昂平, 河野翔, 藤城翔偉, 山本英明, 谷井孝至: 可視光応答酸化チタン薄膜の光触媒能を利用した細胞の液中パターンニング, 第 64 回応用物理学会春季学術講演会, 2017 年 3 月 16 日, 神奈川, 横浜.

[2] 山本英明, 守谷哲, 井手克哉, 松村亮佑, 秋間学尚, 久保田繁, 谷井孝至, 佐藤茂雄, 庭野道夫, 平野愛弓: モジュール構造型培養神経回路の計算論的モデリング, 第 64 回応用物理学会春季学術講演会, 2017 年 3 月 16 日, 神奈川, 横浜.

[3] S. Kono, K. Furusawa, S. Fujishiro, H. Yamamoto, T. Tani: A computational study on spontaneous activity of a single neuron, The 5th RIEC International Symposium on Brain Functions and Brain Computer, 2017 年 2 月 27 日, 宮城, 仙台.

[4] S. Kono, K. Furusawa, S. Fujishiro, H. Yamamoto, T. Tani: In situ modification of cell-culture scaffolds by photocatalysis of visible-light-responsive TiO₂ film, The 5th RIEC International Symposium on Brain Functions and Brain Computer, 2017 年 2 月 27 日, 宮城, 仙台.

[5] K. Hattori, S. Kono, H. Yamamoto, T. Tani: The 5th RIEC International Symposium on Brain Functions and Brain Computer, 2017 年 2 月 27 日, 宮城, 仙台.

[6] 山本英明, 平野愛弓, 谷井孝至, 庭野道夫: 表面マイクロ改質技術を活用した培養神経細胞/回路の構造制御, 第 35 回表面科学学術講演会, 2016 年 12 月 1 日, 茨城, つくば.

[7] H. Yamamoto, A. Hirano-Iwata, T. Tani, M. Niwano: Structure-function Relationships in Living Neuronal Networks: a Surface Engineering Approach, 10th Anniversary International Symposium on Nanomedicine (ISNM2016), 2016 年 11 月 25 日, 茨城, つくば.

[8] 河野翔, 藤森壮也, 山本英明, 谷井孝至: 有機単分子膜パターンにより細胞間接続を制御した 2 細胞神経回路の構築と解析, 第 77 回応用物理学会秋季学術講演会, 2016 年 9 月 13 日, 新潟, 新潟.

[9] K. Sekine, H. Yamamoto, S. Kono, S. Fujishiro, T. Ikeda, A. Kuroda and T. Tani: Laser-Scanning Photocatalytic Lithography of Organosilane Monolayers for Fabrication of Artificial Neuronal Circuits, 28th International Microprocesses and Nanotechnology Conference, 2015 年 11 月 13 日, 富山, 富山.

[10] Y. Takeuchi, R. Sakamoto, H. Wakabayashi, H. Yamamoto, Yuko Sato, T. Tani: Identification of Normal-Cancer Cells by the Difference in their Adhesion on Organosilane Monolayer Templates: A Feasibility Study, 28th International Microprocesses and Nanotechnology Conference, 2015 年 11 月 12 日, 富山, 富山.

[11] 河野翔, 榎田昂歳, 山本英明, 谷井孝至: マイクロパターン上での培養による興奮性-抑制性神経細胞の非標識判別 II, 第 76 回応用物理学会秋季学術講演会, 2015 年 9 月 15 日, 愛知, 名古屋.

[12] S. Kono, T. Kushida, H. Yamamoto, T. Tani: Live-cell, label free identification of excitatory-inhibitory neurons on micropatterned surfaces, 8th International Conference on Molecular Electronics and Bioelectronics, 2015年6月22日, 東京, 江戸川.

[13] T. Kushida, S. Izumi, H. Yamamoto, T. Tani: Single-molecule FRET measurements using molecular beacon, The 5th International Symposium on Advanced Materials, 2015年6月9日, 東京, 文京.

[14] 和泉聡志, 大久保幸太朗, 榎田昂歳, 山本英明, 谷井孝至: モレキュラービーコンを用いた1分子FRET計測系の構築, 第62回応用物理学会春季学術講演会, 2015年3月12日, 神奈川, 横浜.

[15] 竹内祐子, 柿沼瑛介, 坂本留美, 山本英明, 佐藤裕子, 谷井孝至: 有機シラン単分子膜パターン基板への接着差を用いた癌細胞の選別, 第62回応用物理学会春季学術講演会, 2015年3月12日, 神奈川, 横浜.

[16] R. Sakamoto, E. Kakinuma, Y. Takeuchi, H. Yamamoto, T. Tani: Adhesibility-Dependent Cell Sorting Using Organosilane Monolayer Template and Green-Tea Catechin, The 5th International Symposium on Advanced Materials Development and Integration of Novel Structured Metallic and Inorganic Materials (AMDI-5), 2014年11月19日, 東京, 千代田.

[17] S. Kono, H. Yamamoto, Kohei Sekine, T. Tani: In Situ Modification of Cell-Culture Scaffolds by Photocatalytic Decomposition of Organosilane Monolayers on Titanium Dioxide, The 5th International Symposium on Advanced Materials Development and Integration of Novel Structured Metallic and Inorganic Materials (AMDI-5), 2014年11月19日, 東京, 千代田.

[18] H. Yamamoto, S. Kono, T. Kushida, A. Hirano-Iwata, M. Niwano, T. Tani: Optimization of micropattern geometry for

long-term culture of isolated neurons and identification of excitatory-inhibitory cell types, Neuroscience 2014, 2014年11月18日, Washington, USA.

[19] S. Kono, T. Kushida, H. Yamamoto, T. Tani: Fabrication of micropatterned substrate for live-cell, label free identification of excitatory-inhibitory neurons, The 7th International Symposium on Surface Science, 2014年11月4日, 島根, 松江.

[20] K. Sekine, H. Yamamoto, S. Kono, T. Ikeda, A. Kuroda, T. Tani: Surface modification in aqueous solution using TiO₂ photocatalysis and a linker protein L2 for patterning primary neurons, The 7th International Symposium on Surface Science, 2014年11月3日, 島根, 松江.

[21] 石原広識, 藤森壮也, 山本英明, 谷井孝至: 有機シラン単分子膜パターン基板を用いたモジュール構造型培養神経回路の構築, 第75回応用物理学会秋季学術講演会, 2014年9月19日, 北海道, 札幌.

[22] 大久保幸太朗, 榎田昂歳, 和泉聡志, 山本英明, 谷井孝至: ナノスリット導波路を用いた細胞内生体分子のリアルタイム蛍光イメージング, 第75回応用物理学会秋季学術講演会, 2014年9月18日, 北海道, 札幌.

[23] 河野翔, 榎田昂歳, 山本英明, 谷井孝至: マイクロ加工基板を用いた興奮性/抑制性神経細胞判別法の開発, 第37回日本神経科学大会, 2014年9月13日, 神奈川, 横浜.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷井 孝至 (TANI, Takashi)
早稲田大学・理工学術院・教授
研究者番号: 20339708

(2) 研究分担者

山本 英明 (YAMAMOTO, Hideaki)
東北大学・学際科学フロンティア研究所・助教
研究者番号: 10552036