

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（A）  
 研究期間：2005～2008  
 課題番号：17201031  
 研究課題名（和文） マイクロ・ナノシステムを用いた生体分子の1分子機能解析と分子間相互作用解析  
 研究課題名（英文） Analyses of functions and interactions of biomolecules by micro- and nano-devices  
 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

## 研究成果の概要：

微小流路をチップ上に作製し、蛍光標識した生体試料を蛍光顕微鏡にて高感度に検出し、温度感受性ハイドロゲルをレーザー局所加熱にて制御し、生体試料溶液を高精度に流し分ける技術の開発を行った。その結果、1個の量子ドットに結合した生体分子を高感度に検出し、3 msの時間分解能で分離することに成功した。また、石英ガラス基板に金属薄膜を約100 nm蒸着し、これに100 nmの開口を開けてエバネッセント場を発生させた。このナノ開口を用いてシャペロニンGroELとGroESの結合と解離を観察した。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	9,700,000	2,910,000	12,610
2006年度	8,400,000	2,520,000	10,920
2007年度	10,600,000	3,180,000	13,780
2008年度	9,600,000	2,880,000	12,480
年度			
総計	38,300,000	11,490,000	49,790,000

## 研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学、マイクロ・ナノデバイス

キーワード：1分子計測、生物物理、ナノバイオ、マイクロ・ナノデバイス

## 1. 研究開始当初の背景

ヒューマンゲノム計画の終了に伴い、生命科学は、遺伝子クローニングの競争からタンパク質機能解析、タンパク質分子間相互作用のネットワーク解析の競争へと質的な変化を遂げている。特に、未知のタンパク質の機能解析は特許に関する利権がからみ、国際競争が繰り広げられている。この競争に勝ち残るためには、重要な機能を有する未知のタンパク質の候補をより早く見つけ出し、その機能をより早く解析し、そして遺伝子組換えによる高機能タンパク質をより早く作り出す技術を確認する必要がある。

これを実現するためには極微量の生体分

子の単離・精製・機能アッセイを高速に行う技術が必須である。そのため、半導体微細加工技術と生物学技術の融合によるマイクロ化学分析システムが有効であると期待されている。その理由は、研究や診断に必要な施設が研究室からガラスチップのサイズに縮小され、極微量の分析と高速化が可能になるからである。1990年代に開発されたDNAチップは、マイクロ化学分析システムのさきがけであり、遺伝子配列の解析に飛躍的な効率化をもたらした。さらに、現在では、プロテインチップも使われるようになった。しかし、これらの技術の問題点は、分離・回収技術が未成熟な点にある。未知のタンパク質の

機能を同定するためには、既知のタンパク質との結合を指標として、未知のタンパク質を回収することが必須である。

## 2. 研究の目的

(1) 生体分子や超分子複合体(オルガネラ)を、マイクロチップを用いて物理的に分離・回収し、その構成成分を同定することにより、生体分子間相互作用を分析的に解析する。

(2) ナノ開口を用いて弱い生体分子間相互作用を1分子レベルで解析する技術を開発し、生体分子間相互作用を構造的に解析する。

そして、両者の技術を組み合わせて生体分子間相互作用の解析技術を飛躍的に向上させることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) マイクロシステムによる生体分子の分離・回収

生体分子や超分子複合体などの微小な生体物質をガラスチップ内の微小流路(入り口が1つ、出口が2つの流路、流路幅 30 $\mu\text{m}$ 、深さ 5 $\mu\text{m}$ )に流し、個々の標的分子を高感度に検出し、物理的に分離することのできる生体分子ソーターを開発する。このために、キャリア溶液に、37 $^{\circ}\text{C}$ を境に高温でゲル、低温でゾルと可逆的な相転移を起こす温度感受性ハイドロゲル(メビオールゲル)を加え、生体試料とともに微小流路に流す。単離すべき生体物質を GFP(緑色蛍光タンパク質)などで蛍光標識しておき、それらが発する蛍光を1分子蛍光顕微鏡に取り付けた光電子増倍管によって検出する。赤外レーザーの局所加熱によって分岐した流路の一方にゲルによる栓(ゲルバルブ)を形成させ、その位置をスキャナーミラーを用いて切り替えることによりミリ秒の時間分解能で流れを制御し、蛍光標識した生体分子を分離する。一連の操作をコンピューターで制御し自動運転する。

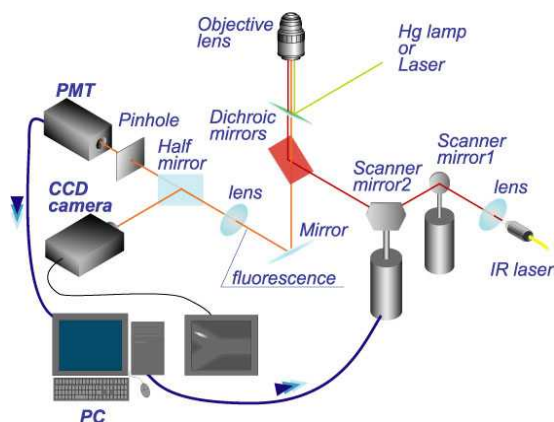


図1 生体分子ソーターの構成図

(2) ナノ開口によるタンパク質間相互作用のイメージング

超分子複合体を生体分子ソーターによって分離し、構成タンパク質の候補が同定できたら、それらが実際に相互作用(結合)することをナノ開口による1分子イメージング法を用いて検証する。石英ガラス基板に金属薄膜を約100 nm蒸着し、これに約100 nmの開口を開ける。ここにレーザー光を照射すると開口の付近にエバネッセント場が発生する。このエバネッセント場は全反射によって発生する場合よりも励起領域が狭いため、蛍光標識した生体物質が溶液中に数 $\mu\text{M}$ 存在しても1分子蛍光イメージングが可能である。ナノ開口に蛍光標識したタンパク質を固定し、溶液中に別の蛍光色素で標識した生体分子を加えることにより相互作用(結合と分離)をイメージングする(図2)。

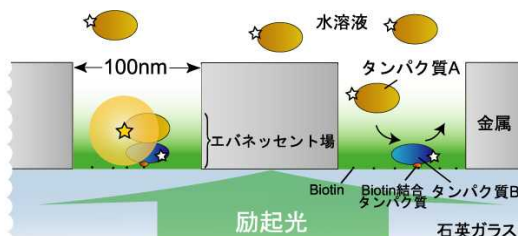


図2 ナノ開口による1分子イメージング

## 4. 研究成果

(1) マイクロシステムによる生体分子の分離・回収

シース流を利用した分子ソーターの開発  
細胞内の生命活動を担う生体分子は、単一分子で機能を発揮するとは限らず、オルガネラなどの超分子複合体を構成して初めて機能を発揮する場合もある。このため、生体分子やオルガネラを物理的に高純度に単離・精製する技術の開発が必要とされている。本研究では、微小流路をチップ上に作製し、蛍光標識した生体試料を蛍光顕微鏡にて高感度に検出し、温度感受性ハイドロゲルをレーザー局所加熱にて制御し、生体試料溶液を高精度に流し分ける技術の開発を行った。まず、微細加工技術により Poly-dimethylsiloxane (PDMS) 製のチップを作製し、この内部に幅 10  $\mu\text{m}$ 、深さ 5  $\mu\text{m}$  の試料導入流路と、それを挟む2本のキャリア溶液用流路(幅 20  $\mu\text{m}$ 、深さ 20  $\mu\text{m}$ )を作製した。3本の流路は合流した後、T型の2本の回収用と廃棄用流路に分岐する。回収側の流路の断面積を小さくすることにより抵抗を高くしてあり、加熱しない状態では試料は廃棄流路に流れ込み、廃棄流路を加熱すると廃棄側の抵抗が回収側よりも高くなり、試料が回収流路に流れ込むように設計した。図3に微小流路の設計図と分岐部の電子顕微鏡像を示す。高速で高感度な分離を行うため、試料溶液を搬送流で挟

み込んでシース流とした。その結果、試料が通過する範囲が幅 2  $\mu\text{m}$ 、深さ 4  $\mu\text{m}$  以内になり、高開口数の対物レンズを用いて 1 個の量子ドットに結合した生体分子を検出し、3 ms の時間分解能で分離することに成功した。

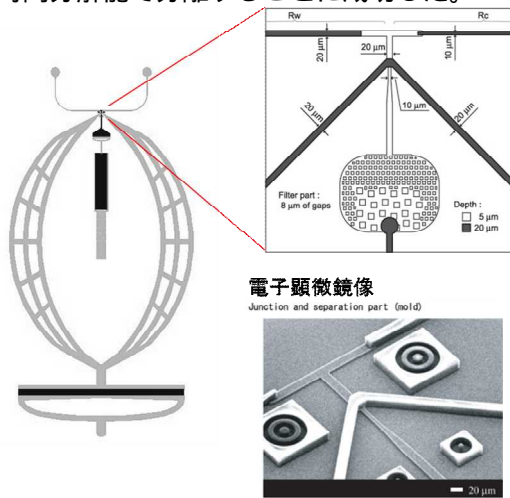


図 3 微小流路の設計図と電顕写真  
実際に蛍光ビーズを分離した例を図 4 に示す。

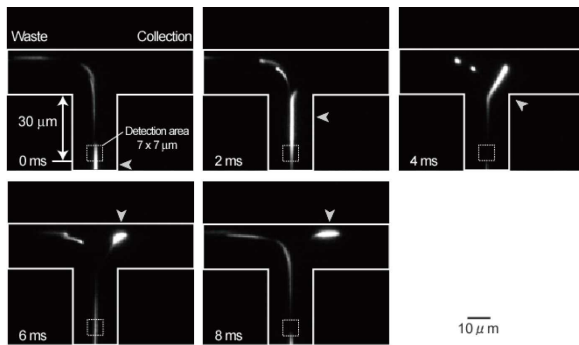


図 4 蛍光ビーズの分離例  
暗い蛍光ビーズを左へ廃棄し、明るい蛍光ビーズを右の回収路に分離した。

#### 多分岐オンチップソーターの開発

多くのオンチップソーターは 2 分岐型流路による回収・廃棄の 2 方向分離を行っているため、一度に分取できる細胞集団は 1 種類に限られている。これは細胞分離技術の多くが多方向分離への機能拡張が困難であるからであり、多分岐型の流路において細胞を分離する新規技術の開発が望まれている。そこで、図 5 に示す流体制御法を考案した。Mebiol Gel を含むバッファ溶液により、流路中央へ絞り込まれたサンプル溶液は、分離対象の検出がない場合、廃棄用の中央の分岐へ流れる (図 5 左)。分離対象を検出した際は、局所加熱により分岐点のうち四カ所において Mebiol Gel のゲル化を引き起こし、分離対象を特定の流路へと分離する (図 5 右)。Mebiol Gel の相転移は可逆的であるため、加熱が終わると再びゾル状態に戻る。マイクロ流体チップは、PDMS とガラスを材料にソフトリソ

グラフィック法により作製した。

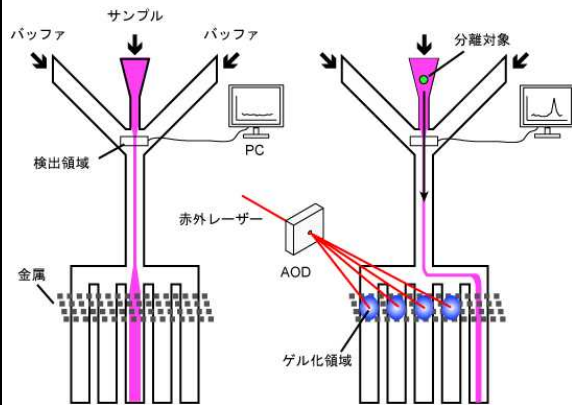


図 5 多分岐流路における流体制御法

左：分離対象の検出前、右：検出分離。

次に、蛍光を測定して赤外レーザーを照射する蛍光顕微鏡システムを構築した。分離対象からの蛍光をプリズムにより分光して 16 個の受光面を持つ光電子増倍管 (16Ch. PMT) により測定した。これにより波長域 500 ~ 800 nm の蛍光を 16 分割した蛍光スペクトルを 2 ms 毎に取得した。チップ内の 4 カ所の加熱は、音響光学偏向器 (AOD) により赤外レーザーを 4 カ所に連続照射する方法を採用した。蛍光測定から赤外レーザーの照射位置の切り替えまでの一連の動作を制御するソフトウェアを開発し、分離対象の検出分離を自動化した。構築した分離システムにより蛍光波長の異なる 4 種類の蛍光ビーズを分離し、多分岐流路における流体制御を評価した。図 6 に蛍光ビーズ (最大蛍光波長: 515 nm) を分離した時の蛍光スペクトルの経時変化とチップの蛍光像を示す。赤外レーザー照射を行わない場合、蛍光ビーズが廃棄用の流路へと流れることを確認した (図 6-b)。蛍光ビーズを検出した場合、分岐の 4 カ所に赤外レーザーが照射され、ビーズが特定の回収用流路へと流れる様子が確認できた (図 6-c)。蛍光波長の異なる他の 3 種類のビーズについても、それぞれ目的的分岐へと分離することができた。分離性能を評価したところ、赤外レーザーの照射時間が 60 ms の条件下では、標的の回収率と分離後の純度はともに 90% 以上を達成した。

次に、蛍光タンパク質を発現させた大腸菌のソーティングを試みた。EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein)、Phi-Yellow、DsRed を発現させた各大腸菌をチップに流し、異なる分岐へと分離することに成功した。蛍光ビーズのソーティングと同様に、赤外レーザーの照射時間が 60 ms の条件下では、標的の回収率と分離後の純度はともに 90% 以上だった。続いて、ソーティングが大腸菌に及ぼす影響を調べるために、ソーティング後の大腸



菌の生存率を測定した。GFPを発現させた大腸菌を多分岐ソーターによりソーティングし、ソーティング後の大腸菌をチップより取り出し、死細胞を染色する試薬である Propidium Iodide (PI) により染色した。EGFP と PI の蛍光強度より、生細胞と死細胞の細胞数を算出し、約 80% の細胞がソーティング後に生存していることが確認できた。

本研究では、今まで実現が困難であったチップ内における多色検出と多方向分離を行うシステムを開発した。4種類の蛍光ビーズと3種類の蛍光タンパク質を発現させた大腸菌を判別し、異なる分岐へと流し分けることに成功した。

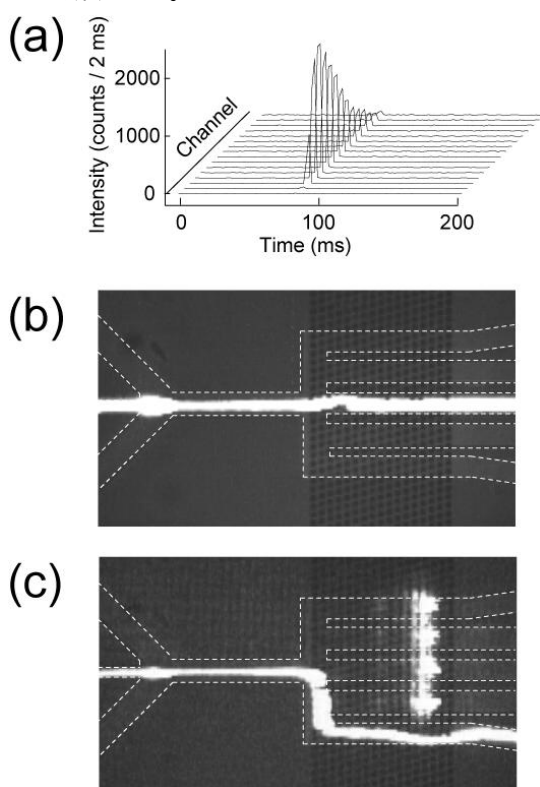


図6 蛍光ビーズのソーティング (a) 蛍光スペクトルの経時変化、(b) レーザー照射がない場合のビーズの軌跡。(c) ビーズの検出分離の様子。

## (2) ナノ開口によるタンパク質間相互作用のイメージング

ナノ開口を用いてエバネッセント場を発生させ、1分子蛍光イメージングを行った。まず、石英ガラス基板に金属薄膜を約 100 nm 蒸着し、これに 100 nm の開口を開ける。ここにレーザー光を照射すると開口の付近にエバネッセント場が発生する。このエバネッセント場は全反射によって発生する場合よりも励起領域が狭いため、蛍光標識した生体物質が溶液中に数  $\mu\text{M}$  存在しても 1 分子蛍光イメージングが可能である。蛍光色素から発

した蛍光が効率よく検出装置に届くように、ナノ開口のガラスに深さ 40 nm のエッチングを施した。ナノ開口に蛍光標識したシャペロン GroEL を固定し、溶液中に別の蛍光色素で標識した GroES を加え、両者が結合と解離を繰り返す様子をイメージングすることに成功した。両者の結合時間のヒストグラム (図7) を解析した結果、シャペロンの反応サイクル中に GroEL と GroES の中間複合体が存在し、時定数が 3 秒と 5 秒の 2 つの律速過程が存在することが明らかになった。

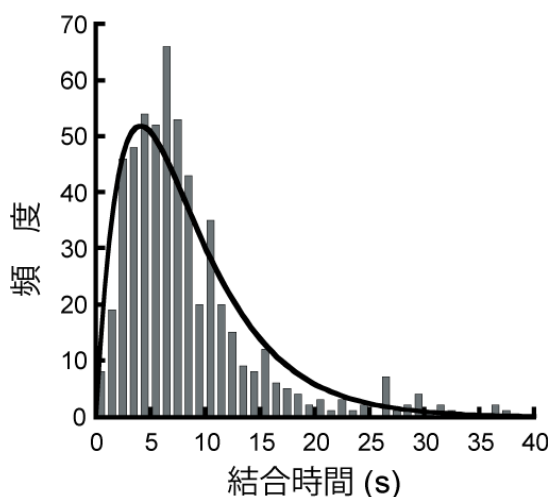


図7 GroEL と GroES の結合時間

## 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25件)

H. Sugino, K. Ozaki, Y. Shirasaki, T. Arakawa, S. Shoji, and T. Funatsu. On-chip microfluidic sorting with fluorescence spectrum detection and multiway separation. *Lab Chip* **9**:1254-60 (2009) 査読有

T. Miyake, T. Tanii, H. Sonobe, R. Akahori, N. Shimamoto, T. Ueno, T. Funatsu, and 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) 査読有

T. Arakawa, T. Sameshima, Y. Sato, T. Ueno, Y. Shirasaki, T. Funatsu, and S. Shoji. Rapid multi-reagents exchange TIRFM microfluidic system for a single biomolecular imaging. *Sensor Actuat. B-Chem.*, **128**: 218-225 (2007) 査読有

Y. Shirasaki, H. Sugino, M. Tatsuoka, J. Mizuno, S. Shoji, and T. Funatsu. On-chip Cell Sorting System Using Thermoreversible

Gelation Polymer. *IEEE J. Sel. Top. Quant. Electron.*, **13**: 223-227 (2007) 査読有

T. Arakawa, Y. Shirasaki, T. Aoki, T. Funatsu, and S. Shoji. Three-dimensional sheath flow sorting microsystem using thermosensitive hydrogel. *Sensor Actuat. A-Phys.*, **135**: 99-105 (2007) 査読有

T. Arakawa, Y. Shirasaki, T. Izumi, T. Aoki, H. Sugino, T. Funatsu, and S. Shoji. High-speed particles and biomolecules sorting microsystem using thermosensitive hydrogel. *Meas. Sci. Techn.* **17**: 3141-3146 (2006) 査読有

Y. Shirasaki, J. Tanaka, H. Makazu, K. Tashiro, S. Shoji, S. Tsukita, and T. Funatsu. On-chip cell sorting system using laser-induced heating of a thermo-reversible gelation polymer to control flow. *Anal. Chem.* **78**: 695-701 (2006) 査読有

[学会発表] (計4 2件)

H. Sugino, Y. Nara, Y. Shirasaki, T. Arakawa, S. Shoji, and T. Funatsu. High performance parallel bioparticle sorter with 3-dimensional PDMS chip. The 12th Int. Conf. on Micro Total Analysis Systems:  $\mu$ TAS2008, San Diego, California, USA, October 12-16, 2008. 査読有

H. Sugino, Y. Nara, Y. Shirasaki, T. Arakawa, S. Shoji and T. Funatsu. Parallel bioparticle sorting with TGP solution in 3-dimensional microflow system. 11th Int. Conf. on Micro Total Analysis Systems:  $\mu$ TAS2007, Paris, France, October 7-11, 2007. 査読有

T. Arakawa, T., T. Aoki, Y. Shirasaki, T. Funatsu, S. Shoji. Accurate and high speed particles and biomolecules sorting microsystem using 3-dimensional sheath flow. 10th Int. Conf. on Micro Total Analysis Systems:  $\mu$ TAS2006, Tokyo, Japan, November 5-9, 2006. 査読有

T. Funatsu. Analyses of Functions and Interactions of Protein Molecules by Single Fluorescent Molecular Imaging. International Conference on Optical MEMS and Their Applications, Big Sky, Montana, USA, August 21-25, 2006 (招待講演) 査読無

Y. Shirasaki, S. Shoji, T. Funatsu. Rapid Flow Switching with Thermo-Reversible Hydrogel in Microfluidic System. Biophysical Society Annual Meeting 2006, Salt Palace Convention Center, Salt Lake City, Utah, USA, February 18-22, 2006. 査読無

S. Watabe, M. Tatsuoka, T. Shimomae, Y. Shirasaki, J. Mizuno, T. Funatsu, and S. Shoji. Multi particles and biomolecules sorting system using thermoreversible gelation controlled by DMD. TRANSDUCERS '05, Seoul, June 6-9, 2005 査読有

## 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

三田 智文 (SANTA TOMOFUMI)  
東京大学・大学院薬学系研究科・准教授  
研究者番号：30187306  
(2005年度～2006年度)

角田 誠 (TSUNODA MAKOTO)  
東京大学・大学院薬学系研究科・講師  
研究者番号：10323453  
(2005年度)

上野 太郎 (UENO TARO)  
東京大学・大学院薬学系研究科・講師  
研究者番号：80376590  
(2005年度～2007年度)

### (3) 連携研究者

なし