

平成21年5月15日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19350002

研究課題名（和文）マイクロ流動配向による生体高分子複合体の構造解析

研究課題名（英文）Structural Analysis of Biomolecular Assemblies by Flow Orientation in Micro-channels

研究代表者

竹内 英夫（TAKEUCHI HIDEO）

東北大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：30111454

研究成果の概要：

生体高分子複合体を極めて細い溝の中を高速で流すことにより配向させる新たな方法（マイクロ流動配向法）を開発し、偏光顕微ラマン分光法と組み合わせることにより、生体高分子複合体の構造解析のための新しい測定法の開発を行うことを目的とし、そのための技術的な諸問題の検討と解決を行い、必要な装置のプロトタイプを作製した。その結果、この新規構造解析法を実用化できる見通しが立った。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	13,100,000	3,930,000	17,030,000
2008年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
年度			
年度			
年度			
総計	18,000,000	5,400,000	23,400,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・物理化学

キーワード：流動配向、ラマン分光、生体分子の構造

## 1. 研究開始当初の背景

繊維状高分子の溶液を狭い隙間に高速で流すと、分子の長軸は流れの方向に沿って配向する（図1）。

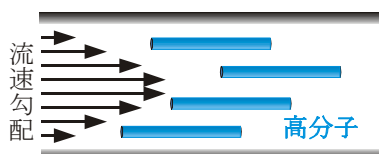


図1. 流速勾配による高分子の配向

このように、流速勾配を利用して細長い分子や分子集合体を配向させる方法を流動配向法と呼び、配向させた繊維状高分子に、異なる向きの偏光を照射して吸収スペクトルの二色性を測定するなど、高分子の構造解析に利用されてきた。流動配向法を用いれば、タンパク質や核酸など多種の発色団を有する生体高分子およびそれらの複合体も配向させることができる。しかし、生体高分子のような複雑な試料の場合、各発色団の電子遷移による吸収帯は互いに重なり合い、個々の発

色団の構造を吸収スペクトルだけから解析することは極めて困難である。一方、分子振動に由来する赤外吸収やラマン散乱スペクトルでは、分子の各部分の構造に特有な振動が、比較的幅の狭いシグナルを与え、それらが互いに重なる確率は低い。従って、振動分光法は、多成分からなる試料の構造解析に適しているといえる。振動分光法のこのような利点を流動配向法と組み合わせることにより、これまでにない新しい構造情報を得ることが可能になるとの着想から、本研究者は、世界に先駆けて、二重円筒型回転セルを用いて、流動配向-偏光ラマン分光法を開発してきた。

これまでの流動配向の実験では、1~0.25 mm (1,000~250  $\mu\text{m}$ ) の間隙が用いられ、300 nm (0.3  $\mu\text{m}$ ) 程度より長い繊維状粒子 (高分子複合体) を配向させることに成功している。しかし、それよりも短い粒子は回転緩和が速いため配向させることができない。このような制限を克服し、より小さな粒子をも配向させるためには、より大きな流速勾配を発生させる必要があり、そのためには、間隙を更に小さくしたり、流速や回転数を大幅に高めたりすることが必要である。例えば、生体内にも存在し、生命科学的に重要な 100nm 程度以下の比較的短い繊維状高分子を配向させるためには、間隙を一桁以上小さくするか、または、流速や回転数を一桁以上大きくすることが必要である。しかし、流速や回転数は、現状でもほぼ技術的限界に近く、大幅に上昇させることは困難である。有力な解決策として、間隙を狭くすることが残されている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、最近急速に発展したマイクロチップ技術を活用し、溶液を流す間隙を 10  $\mu\text{m}$  程度までに狭めることにより、これまでは配向させることのできなかった多種多様な生体高分子複合体を配向させ、その偏光ラマンスペクトルを測定・解析する方法を確立することである。より具体的には、以下のことを目的とした。1) マイクロチップ技術を用いれば、比較的容易に樹脂 (ポリジメチルシロキサン、PDMS) 上に  $\mu\text{m}$  オーダーの溝を刻むことができることを利用し、生体高分子の流動配向のためのデバイスを開発する。2) 配向試料が流れているマイクロチップの溝の上から、顕微鏡対物レンズを用いて偏光ラマンスペクトルを測定することができるようにする。3) 顕微ラマンスペクトルの測定点を流れに沿って移動させることにより、複合体形成後の構造変化を、時間を追って追跡できるようにする。4) 以上のような特徴を有するマイクロ流動配向-偏光ラマン分光装置を製作し、それをアルツハイマー病の原因の一つと考えられているアミロイド  $\beta$  タ

ンパク質の繊維伸長機構と繊維への薬物結合様式の解明などの研究に応用する。

## 3. 研究の方法

本研究の目的を達成するためには、1) タンパク質などの生体高分子を 10  $\mu\text{m}$  程度の極めて狭い間隙の間を高速で流し、流速勾配を利用して効率よく配向させること、2) 生体高分子同士または生体高分子と薬物との複合体をマイクロ流路内で効率よく形成させた後配向させ、複合体形成後の時間変化を追跡できるようにすること、3) 配向させた生体高分子にレーザー光を照射し、散乱されて来るラマン光を効率よく集光することが不可欠である。そのため、以下の方針で研究を進めた。

(1) 生体高分子のマイクロ流動配向に最も適した溝の幅および深さを系統的に検討するために、数種類の幅、深さの組み合わせを有する溝を PDMS 樹脂上に刻んだマイクロチップを作製する (図 2 参照)。

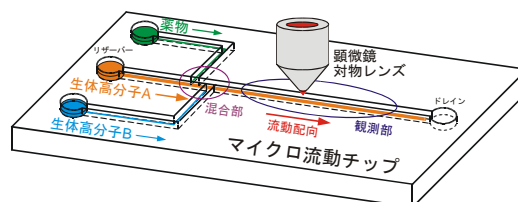


図 2. マイクロ流動チップの模式構造

液は、左のリザーバから右のドレインに向かって流し、観測部において、顕微鏡下レーザー光を照射し、配向した試料からのラマン散乱を観測する。

(2) 高分子溶液を流す方法としては、リザーバ側から圧力をかける、ドレイン側から吸引する、およびその両者を協奏的に行なうことが考えられる。どの方法が流動配向を最も効率よく達成するのに適しているかを、マイクロチップ上で検証する。

(3) マイクロチップ基板の素材である PDMS 樹脂は親水性が高く、生体高分子が溝の底面や側面に吸着することが予測されるため、溝の内側を疎水性の高いコーティング剤などでコートし、吸着を抑えることを試みる。溝壁面の親水性・疎水性と流動配向の効率との関係を系統的に検討し、最適なコーティング剤とコーティング方法を検討する。

(4) 偏光顕微ラマンスペクトルの測定には、可視光励起専用の高性能顕微ラマン分光計を購入し、顕微流動配向測定用に一部改良を加える。顕微鏡対物レンズとしては、通常の対物レンズの他に油浸型レンズを用い、各々の特徴に応じて使い分けることを検討する。

(図 3 参照)

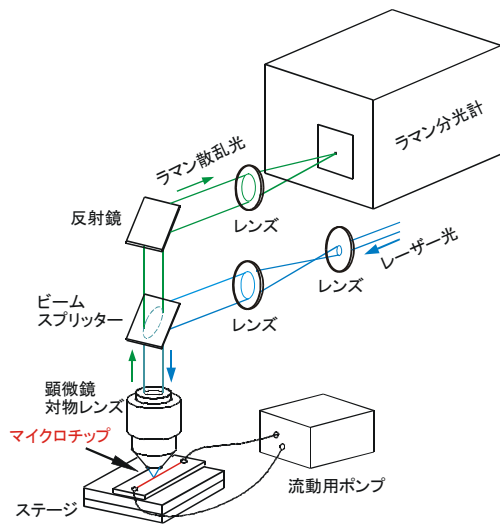


図3. マイクロ流動顕微ラマン分光装置の概略

(5) マイクロ流路の中を液体を流す場合、流速勾配が最も大きいのは壁面近くである。従って、壁面近傍にレーザー光を照射し、そこからラマン散乱光を集光することが必要である。そのためには、 $1\sim 2\mu\text{m}$  の位置分解能が望ましく、対物レンズの倍率は  $100\sim 50$  倍とする。また、開口数の大きなレンズの方がラマン散乱の集光効率も高くなるが、散乱光の取り出し角が大きくなり、測定された偏光ラマンスペクトルの強度から、特定の原子団の配向方向を求める方法が複雑になる。顕微鏡を用いることの利点と欠点の兼ね合いを調整し、最適の対物レンズは何かを検討する。

(6) 顕微ラマンスペクトルの測定において、深さ方向の位置分解能を上げるためには、共焦点方式で測定することが不可欠である。収差のより少ないレンズや適切なサイズのピンホールを用いて、共焦点方式の利点を最大限に生かすように測定系の検討・改良を行う。

(7) マイクロ流動配向-偏光ラマン分光法の基礎技術を確認するために、具体的な応用を行いながら、マイクロチップや顕微ラマン分光装置の更なる改良を行う。

#### 4. 研究成果

生体高分子のマイクロ流動配向に最も適した溝の幅および深さを系統的に検討するために、種々のマイクロチップを作製した。その結果、最適な溝の幅や深さは、その中を流す溶液の粘度に強く依存することが分かり、最適な溝の幅・深さは、試料の種類毎に異なることが推察された。そこで、幅  $50\mu\text{m}$ 、深さ  $15\mu\text{m}$  の溝を作製し、比較的粘度の低い試料を流動配向させる条件を検討することとした。高分子溶液を狭い溝の中を流す方法としては、リザーバー側から圧力をかける

方法、ドレイン側から吸引する方法、およびその両者を協同的に行なう方法が考えられる。どの方法が流動を円滑に行うことに適しているかを検討した結果、加圧と吸引を協同的に行う方が、比較的安定な流動を得ることができることが分かった。電荷を有する試料の場合は、電場勾配を掛けて流動させる方法も考えられるが、本研究では、より一般性の高い、圧力による流動方式を採用した。圧力による流動の場合、脈流が生じないように加圧・吸引することは決して容易ではないが、適当な容積のバッファー容器を介して加圧・吸引することにより、脈流が大幅に押さえられることが分かった。

生体高分子複合体の溶液を狭い溝の中を流す場合、その複合体が溝の壁面に吸着・沈着し、流れを乱す可能性がある。そのため、吸着を押さえる方法を検討した。対象とする生体高分子複合体のサイズは  $0.1\mu\text{m}$  程度であるため顕微鏡下で個々の複合体を観察することはできないが、多数の複合体が凝集し、 $1\mu\text{m}$  程度以上にできれば、顕微鏡下でその様子が観測される。マイクロチップ基板の素材である PDMS 樹脂は親水性が高く、親水性の高い（特に電荷を有する）生体高分子は溝の壁に吸着する可能性が高い。このような吸着を防ぐために、マイクロチップの溝の内側を疎水性の高いコーティング剤でコートし、吸着を抑えた。

溝の中を流れる高分子複合体の構造を偏光ラマン分光法で解析するために、可視光励起顕微ラマン分光装置を購入した。極めて狭い溝の中を流れる試料からのラマン散乱光を効率よく集光するために、 $20$  倍および  $100$  倍の対物レンズを使用し、できるだけ少ない光学素子で構成されている高感度・高分解能分光計を選択した。購入した顕微ラマン分光計に流動配向用マイクロチップを設置し、試料からのラマン散乱が効率よく検出できるようにインターフェイス部分の調整を行った。その結果、流動配向用の顕微ラマン分光装置として利用できるシステムを組み上げることができた。以上のように、マイクロ流動配向-偏光ラマン分光法を確立するために必要な技術について基礎的な検討を行い、実用化に必要な成果を得た。

作製したマイクロ流動配向-偏光顕微ラマン分光装置を、実際の生体分子複合体の構造解析に応用するために、適切な大きさの生体分子複合体の作製を行った。対象とした生体分子は、その凝集がアルツハイマー病の原因として考えられているアミロイド  $\beta$  ペプチドである。アミロイド  $\beta$  ペプチドは、凝集して自己会合体を作りやすい分子であり、形成される凝集体としては、数分子が会合したオリゴマーレベルの凝集体と、より多数の分子が会合した繊維状の凝集体に大別される。本

研究では、最近、アルツハイマー病との関連がより深いと考えられているオリゴマー凝集体に先ず着目し、それにマイクロ流動配向法を適用して構造解析を行うことを目指した。オリゴマー凝集体の生成を確認するために、凝集過程を蛍光法および円偏光二色性分光法を用いて追跡した結果、繊維化の過程において、モノマー状態における不規則構造や線維化後の状態における $\beta$ シート構造とは異なる二次構造を有する中間体が形成されることを見出した。この中間体は、数十から数百 nm 程度の大きさで推察され、マイクロ流動配向法の対象として適しているものと考えられた。しかし、オリゴマー凝集体は、より大きな凝集体である線維形成の途中段階に中間体として生成する不安定なものであり、この中間体を適切に補足し、流動配向-偏光顕微ラマン分光法で構造解析するためには、更なる工夫が必要であることも分かった。現在、中間体の安定な分離精製の方法について鋭意検討しており、その目処がつき次第、流動配向による構造解析を行う。

アミロイド $\beta$ ペプチドの線維は、長期間経過すると顕微鏡下で観察可能な大きさの凝集体となり、沈殿してしまうが、線維が形成されたばかりの段階では、可溶性であり、線維の長さも数百~数千 nm 程度であると思われる。このような線維の染色用色素として、コンゴレッドが知られているが、コンゴレッドがアミロイド線維に結合する際には、線維の特定方向に配向して結合するものと考えられる。コンゴレッドは可視部に吸収を有するため、可視レーザー光を照射すると共鳴効果により、ラマン散乱光の強度が著しく増大するため、コンゴレッドの分子振動を観測することが容易になる。アミロイド線維自身は可視部に吸収を持たないため、このような共鳴効果は期待できない。すなわち、コンゴレッドをアミロイド線維の構造を調べるためのプローブとして用いれば、アミロイド線維の伸長が進行しにくくなる極めて低濃度のアミロイド量でも、その構造（線維の伸長方向など）をラマン分光法で解析することが可能となる。そこで、まず、コンゴレッドの共鳴ラマンバンドがどのような分子振動に由来するか、また、アミロイド線維に結合したときに、それらの分子振動にどのような変化が生じるかを調べた。その結果、アミロイド線維への結合とその後のアミロイド線維の形状変化を反映して、コンゴレッドのラマンスペクトルが変化することが分かり、今後の偏光ラマン分光を用いる解析に役立つ基礎的データを蓄積することができた。

本研究では、マイクロ流動配向法の基礎技術について検討を加え、また、偏光顕微ラマン分光法との組み合わせのための技術的な

検討もを行い、マイクロ流動配向-偏光顕微ラマン分光装置のプロトタイプの作製に成功した。今後、装置や測定法の改良を行い、実用化のレベルにまで到達させる見通しがついた。マイクロ流動配向-偏光ラマン分光法を用いれば、これまでは配向させることのできなかった比較的短い生体高分子およびその複合体の構造、さらに、複合体形成に伴う構造変化の動的過程を詳しく解析することが可能になる。繊維状高分子複合体中の特定の部位が高分子の長軸に対してどのような方向を向いているか、また、それが薬物結合などに伴いどのように変化するかなどの情報は、配向法を活用することにより初めて得られるユニークな情報である。特に、アルツハイマー病などの神経変性疾患におけるアミロイド繊維の伸長機構とその阻害に関する研究は、新しい治療薬開発に繋がる重要な課題である。マイクロ流動配向-偏光ラマン分光法の実用化により、生体高分子複合体が関与する疾病の原因解明と治療法開発に大きな進歩がもたらされると期待される。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹内 英夫 (TAKEUCHI HIDEO)  
東北大学・大学院薬学研究科・教授  
研究者番号：30111454

### (2) 研究分担者

三浦 隆史 (MIURA TAKASHI)  
東北大学・大学院薬学研究科・准教授  
研究者番号：30222318  
平松 弘嗣 (HIRAMATSU HIROTSUGU)  
東北大学・大学院薬学研究科・助教  
研究者番号：90419995

### (3) 連携研究者