

科学研究費補助金研究成果報告書

平成22年 6月11日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20750054
 研究課題名 (和文) 局在プラズモン共鳴散乱分光を利用したタンパク質の反応・構造変化計測法の開発
 研究課題名 (英文) Measurement of chemical reaction and structural change of a protein molecule by means of localized surface plasmon resonance scattering spectroscopy.
 研究代表者
 藤原 一彦 (FUJIWARA KAZUHIKO)
 秋田大学・工学資源学部・助教
 研究者番号：10375222

研究成果の概要 (和文)：

金ナノ粒子の示す LSPR による共鳴光散乱を利用したタンパク質-タンパク質相互作用測定法および、タンパク質構造変化計測法の開発を行った。前者に対してはポンプ、インジェクタおよび検出光学系を備えた装置を作成し、ナノ粒子を固定化した測定チップにより抗原抗体反応を観測することができた。後者においてはタンパク質をナノ粒子間に挟み込んだ複合体を作成し、散乱強度の時間変化を測定することでタンパク質の動的な構造変化の観測を検討した。

研究成果の概要 (英文)：

A protein-protein interaction measurement technique using localized surface plasmon resonance (LSPR) scattering spectroscopy was exploited. An apparatus which consists of a flowcell, pump, total-internal reflection illumination and light detection system was constructed. A gold nanoparticle deposited sensor chip was also fabricated and used for immuno-affinity measurements between IgG and anti-IgG molecule.

An observation method for structural change of protein molecules based on plasmon coupling of gold nanoparticle was also investigated in this study. For this purpose, gold nanoparticle dimer conjugated with a protein was fabricated on glass substrate surface, and resonance light-scattering intensity was monitored. It was found that structural change rate of Heat shock protein 70 was increased in the presence of ATP.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：生体分析, ナノバイオ, 金ナノ粒子, 局在表面プラズモン共鳴

1. 研究開始当初の背景

地球上のあらゆる生命体の全遺伝子が解読されつつある現在、生命活動の更なる詳細を明らかにするため、タンパク質の機能解明が重要視されている。特定の反応を触媒したり、他のタンパク質の正確なフォールディングを補助したりと、タンパク質の機能は多種多様であるが、いずれの場合にも反応を起こす準備段階として、特定の化合物と結合したり、タンパク質間で複合体を形成する機会が多い。

生体内に膨大な種類のタンパク質が存在するため、その網羅的な解析は将来的にはマイクロアレイのようなデバイスを用いることが予想される。一方、単一のアレイ上の様な微小な領域において、タンパク質が生体内と同様の機能・構造を持つかは未開の領域である。従って、単一アレイ以下のマイクロ・ナノ領域におけるタンパク質の反応・構造変化を明らかにする必要がある。申請当初までに研究代表者は、金属ナノ粒子の示す局在表面プラズモン共鳴 (LSPR) に着目し、その生体分子相互作用解析への応用を中心に研究を行ってきた。

2. 研究の目的

金属ナノ粒子の形状、大きさに基づいた分光学的な特性は明らかにされつつあったが、単一のナノ粒子レベル、もしくは数個のナノ粒子からなる複合体によるマイクロ・ナノ領域での生体分子認識デバイスとしての機能開拓は未だ成されていなかった。本研究では単一ナノ粒子の LSPR 分光測定、タンパク質を伴うナノ粒子との複合体形成を中心に研究を行う。ナノ粒子をベースにした分子認識ナノデバイスの構築を目的として行った。より具体的には(1)LSPR 光散乱分光法による生体分子相互作用測定法の開発、(2)プラズモンカップリングを利用したタンパク質構造変化計測法の開発、の2項目を中心に行った。

3. 研究の方法

(1) LSPR 光散乱分光法による生体分子相互作用測定法の開発

①LSPR 光散乱測定用センサチップの作成

図1にはチップ作成手順の模式図を示す。金ナノ粒子を固定化する十分に洗浄したものを使用した。まず、ガラス基板表面を3-アミノプロピルトリメトキシシランで処理し、表面をアミノ化した後、クエン酸還元法により合成した金ナノ粒子(粒子径 30nm)分散液を滴下した。この操作により、金ナノ粒子はガラス表面の陽電荷を持ったアミンと粒子

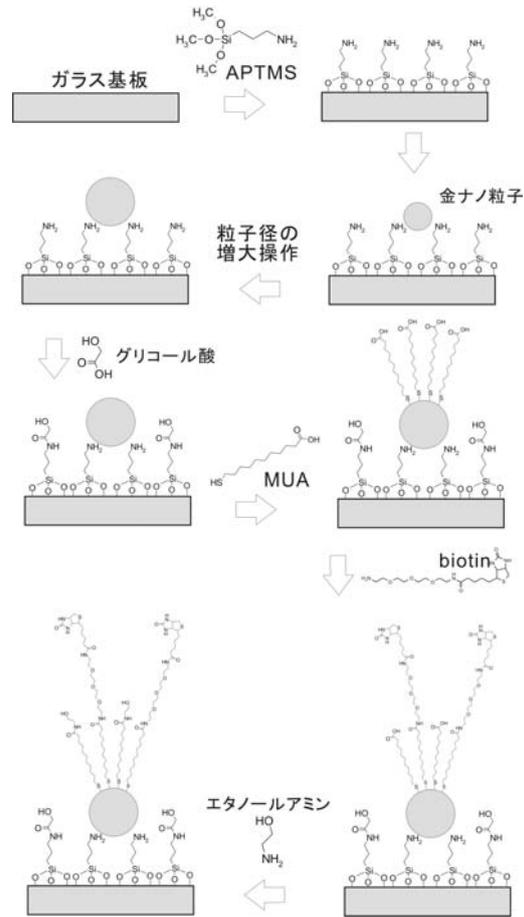


図1. センサチップ作成の模式図

表面の負電荷により、静電相互作用を介して粒子はガラス基板上へ固定化される

これまでの研究結果より、光散乱効率と屈折率変化に対する感度の増加には、粒径 90nm 付近としてナノ粒子を用いることが理想的な条件であることが分かっている。しかしながら、均一な粒径 90nm 付近の粒子を直接合成することは非常に困難であるため、無電解メッキと類似の手法により金を還元析出させることでガラス基板上の金ナノ粒子の粒径を制御した。基板上での平均粒子径は 80-90nm となることを原子間力顕微鏡像により確認した。

粒子径を増大した後、チップは 11-メルカプトウンデカン酸(MUA)エタノール溶液をに浸漬し、金ナノ粒子表面に MUA による自己組織化単分子膜(SAM)を形成させた。末端がカルボキシル基となるため、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミドと N-ヒドロキシコハク酸イミドを用い、アミノ基を有する化合物を結合することができる。図中では例として Biotin を示しているが、実

験では主にグルタチオン-S-トランスフェラーゼ, ヒト IgG などを測定ターゲットとして用い, 粒子表面へは対応する抗体を粒子表面に結合した. 未反応のカルボキシル基は 1-エタノールアミンによりブロッキングした.

②センサチップの分光特性の評価

暗視野顕微鏡(Orimpus BX51)をベースとした顕微散乱分光装置を作成し, チップ表面のナノ粒子による LSPR 光散乱特性の評価を行った. 作成した装置の模式図を図 2 に示す.

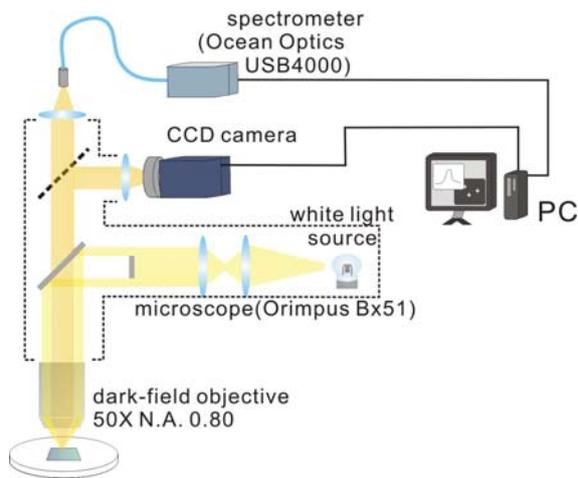


図 2. チップ評価用顕微分光測定装置

照明光の照射及び散乱光の捕集は暗視野対物レンズ(50X, N.A. 0.8)により行った. 測定箇所の画像観測は CCD カメラにより行い, スペクトル測定はマルチチャンネル分光器により行った. また測定に際しては乾燥によりチップ表面のナノ粒子が凝集するのを防ぐため, チップには緩衝液を滴下した後カバーガラスを被せて測定を行った.

(2) プラズモンカップリングを利用したタンパク質構造変化計測法の開発

①ガラス表面におけるナノ粒子複合体の作成

項目(1)と同様の方法で金ナノ粒子の合成, 固定化, MUA による表面修飾, タンパク質の結合およびブロッキングを行った. しかしながらこの項目においては観測領域に存在する粒子数が数個~数十個と比較的に少ない密度であることが望ましいと考えられた. そこで全項目のような粒子径の制御は行わずにあらかじめ粒子径が 50nm の粒子を調製し用いた.

図 3 にはナノ粒子複合体の模式図を示している. 複合体作成にはあらかじめ MUA より被覆されたナノ粒子を調製し用いた.

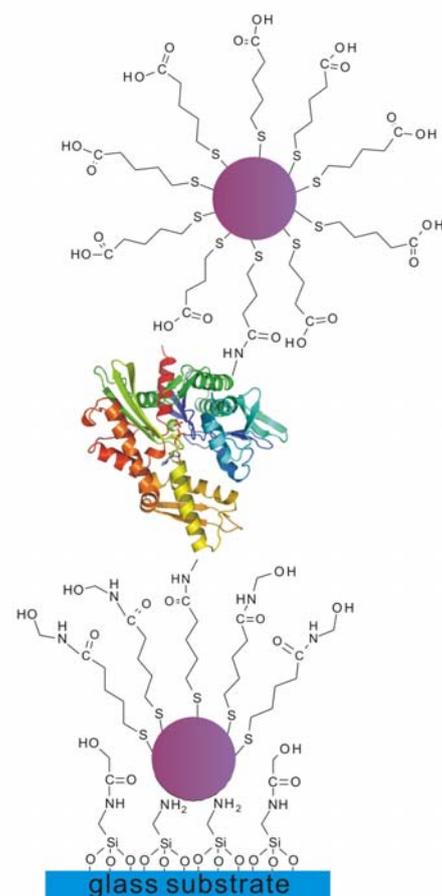


図 3. 金ナノ粒子-タンパク質複合体の模式図

②散乱スペクトルの測定

作成した複合体のスペクトル測定は倒立顕微鏡をベースとした装置を構築し用いた. 模式図を図 4 に示す. 光源からの白色光は斜め方向から入射し, 暗視野の状態にしてスペクトル測定を行った. また, (1)とは異なり観測領域の粒子数が大幅に少なくなるためスペクトル測定においては冷却 CCD 素子を備えた高感度検出器を使用した. 測定サンプルは反応溶液に浸した状態で測定できるようにサンプルホルダも作成した.

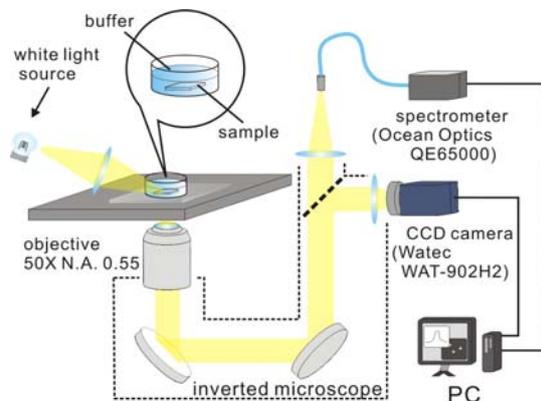


図 4. 顕微散乱スペクトル測定装置

(1) LSPR 光散乱分光法による生体分子相互作用測定法の開発

①新規 LSPR 光散乱測定装置の作成

試料導入形にダブルプランジャーポンプとインジェクターを、検出系にはロックインアンプを備えた測定装置を新たに構築した。装置の模式図を図 5 に示す。

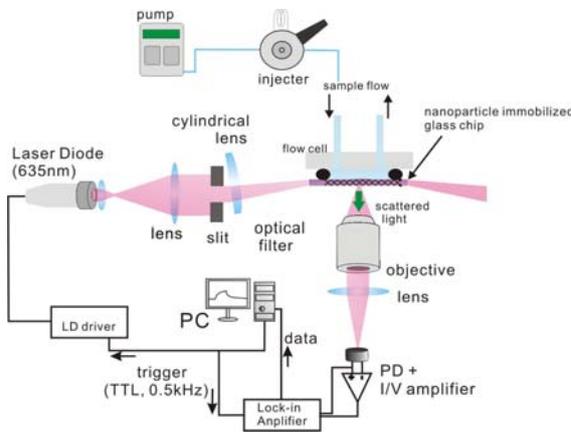


図 5. LSPR 光散乱測定装置の模式図

光源には半導体レーザーを使用し、ガラスの端面からチップ内を導波路として通過させることで、背景光を押さえた状態でチップ表面のナノ粒子に対して全反射照明を照射することができた。作成した装置に対して粒子を固定化したのみの測定チップを作成し、スクロース溶液を使用して測定試行を行った。その結果を図 6 に示す。

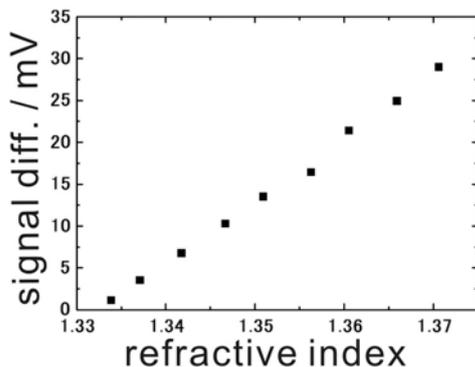


図 6. 送液した試料の屈折率に対する強度変化

この際スクロース濃度は 1%-24% とし、対応する屈折率に対してプロットした。散乱光強度の変化は試料の屈折率に対して直線的に増大することが分かった。また、これまでの検討で得られた旧型の測定装置と比較したところ、S/N 比が約 60 倍向上したことが確認できた。

②抗原抗体反応測定の検討

粒子表面へ抗ヒト IgG 抗体を固定化した測定チップを作成し、ヒト IgG を使用して抗原抗体反応の観測を試みた。図 7 には IgG 溶液

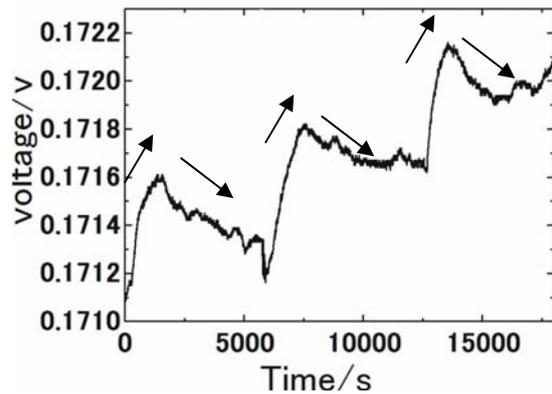


図 7. IgG の結合に対するセンサグラム

送液する濃度を 0.023, 0.046, 0.23mg/ml と増大させながら連続的に導入したところ、センサチップ表面の抗体に対する結合に対応するシグナルの上昇と、脱離に対応するシグナルの減少が観測された。また、センサチップ表面に結合したままの IgG は高濃度のグリシン溶液を送液することで完全に脱離することも確認できた。このことはセンサチップが再生され繰り返し使用可能であることを示している。

③(1)のまとめ

LSPR の屈折率応答に基づいた新規な分子間相互作用測定装置を構築し、実際に抗原抗体反応の観測が可能であることを示した。この項目では装置の構築からセンサチップの最適化などの化学的な検討に至るまで詳細に行った。近年 LSPR を利用した結合反応の測定に関する報告は増えつつあるが、本研究のように装置の構築まで行っている例はほとんどない。加えて散乱光の測定により高感度な測定法とした例は皆無であり、世界的にもきわめてオリジナリティーの高い研究であるといえる。

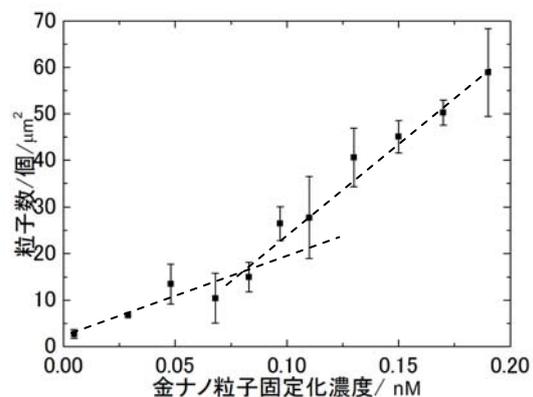


図 8. 固定化時の濃度に対する基板表面のナノ粒子密度

(2) プラズモンカップリングを利用したタン

パク質構造変化計測法の開発

①基板表面の粒子密度の検討

まず観測領域内への粒子密度の散乱スペクトルへの影響を検討した。図8には固定化時の金ナノ粒子分散液濃度に対する基板表面の粒子密度を示す。この時固定化時間は2時間とした。濃度の上昇とともに密度は増大するが、固定化時の濃度が0.1nMとなる周辺からその傾きが変化していることが分かる。すなわちこの濃度の前後で粒子密度が急激に変化することが予想される。

一方、固定化時の濃度を0.83nMとして粒子を固定化した場合の散乱スペクトルを図9に示す。

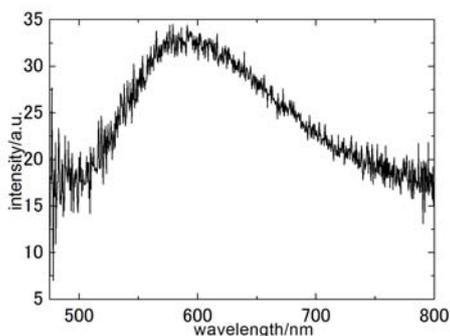


図9 固定化時の濃度を0.83nMとして粒子を固定化した場合の散乱スペクトル

スペクトルのピーク位置より基板表面に存在する粒子間の相互作用の有無が判断できるため、図8の場合と同様に固定化時の濃度に対してピーク波長を観測したところ、流行0.1nM周辺から大幅にピークのシフトが起こることが分かった。

本研究は図3に示す複合体のナノ粒子間の距離が変化することをスペクトルのピークシフトとして観測することを本来の目的としている。したがって基板表面で結合していないナノ粒子同士が相互作用する状態で実験を行うのは望ましくないと考えられる。そこで上記の結果から0.1nMを横方向で粒子が相互作用する固定化時の濃度の閾値であると考えた。しかしながら、濃度が低すぎる場合はスペクトルの観測が困難になることから、固定化時の濃度を0.6-0.8nMが適した濃度であると考え、次の項目を検討した。

②タンパク質-ナノ粒子複合体の作成とタンパク質構造変化測定の検討

図10にはタンパク質を介して複合体を形成する前後の散乱スペクトルを示す。これは図3で説明すると最上部のナノ粒子が結合する前後に対応している。

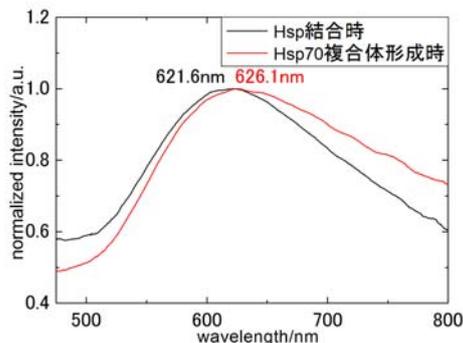


図10. 複合体形成前後の散乱スペクトル

ピーク位置の判別を容易にするためスペクトルはスムージング処理を施したものを示しているが、スペクトルの形状がほとんど変わることなくピーク位置がシフトしていることから、図3に示すようなナノ粒子複合体が平均的に形成しているものと予想される。

また、ここでは分子量70kDaのタンパク質であるHsp70を使用して実験を行った。HspはHeat Shock Proteinの略でありATP存在下で分子構造が変化することで、タンパク質のフォールディングを介助すると考えられている。

実際の測定において、高時間分解にピーク位置を観測することは困難である。そこでピークより長波長側の領域の強度変化がピーク位置の変化と連動することを利用して、640-660nmの領域のスペクトル変化を時間に対して観測することで構造変化の観測を試みた。また、観測領域には複数の複合体が存在するが、それぞれが個々に繰り返し構造変化を起こすとすれば、時間に対する強度変化はそれぞれの散乱強度変化が重畳したデータとして観測されるはずである。そこで、散乱強度の径時変化をフーリエ変換することで構造変化周期を得られるかを検討した。

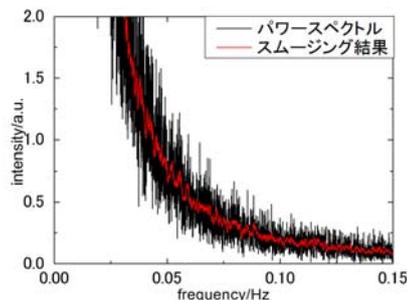


図11. ATP1mMの時のパワースペクトル

図11には散乱強度の径時変化に対してフーリエ変換を行って得たパワースペクトルを示す。この時散乱強度の測定間隔は1ミリ

秒として観測した。スムージングによりデータにはいくつもピークが観察されることが分かる。そこでこのピーク数をカウントしたのち、周期に換算してヒストグラムを作成して解析を行った。結果を図12に示す。

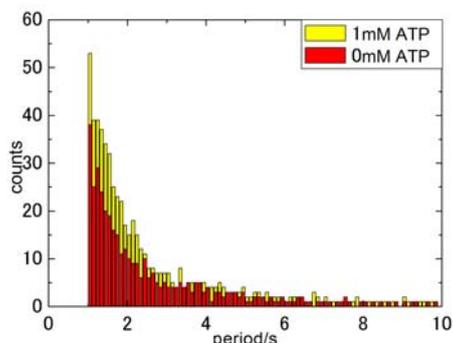


図12. 散乱強度変化周期のヒストグラム

コントロールに対して ATP 濃度を増大させた場合には4秒以内で起こる強度変化周期のカウント数が増大していることが分かる。

これまでに一分子蛍光測定によってなされた Hsp90 の構造変化観測においては、定常的に構造変化が生じているが ATP 存在下でその速度定数が増大することが報告されている (Micker et al Nat. Struct. Mol. Biol., 2009, 16, 281)。すなわち本研究で得られた結果はこの報告と極めて類似していることが分かる。

③(2)のまとめ

ガラス基板表面へ金ナノ粒子-タンパク質-金ナノ粒子で構成される複合体を構築する手法を開発した。また、散乱スペクトル強度の時間変化より複体内に存在するタンパク質の動的構造変化を観測する手法について検討を行った。その結果 ATP 存在下では Hsp70 の構造変化周期は ATP 存在下で増加する傾向にある事を示し、一分子計測で得られた既報の結果と同様の傾向にある事が分かった。

このようにプラズモンカップリングを微小距離を計測するルーラー(ものさし)として応用する研究は近年始まったばかりであり、タンパク質の動的な構造変化計測に適用した例は本研究を除いて皆無である。

(3)今後の方針

(1)においてはハード面の検討により大幅な感度向上を行うことができた。今後はセンサチップ表面の最適化による本法の高感度化を重点的に行っていく。

(2)においては提案した手法は今後、一分子測定法と二者択一な手法として発展していくことが予想される。本法で得られた結果の妥当性を確認するため、今後は一分子蛍光法等の従来法により確認を行っていく。

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7件)

① 藤原 一彦

金ナノ粒子を用いたバイオチップの開発-局在表面プラズモン共鳴による感度増幅と高感度検出-光アライアンス, 依頼論文 Vol.20 2009, 56-60

② Kazuhiko Fujiwara, Hidehiro Kasaya, Nobuaki Ogawa,

Gold Nanoparticle Monolayer Formation on a Chemically Modified Glass Surface Analytical Sciences, 査読有 Vol.25 2009, 241-248

③ 藤原 一彦

金ナノ粒子を用いたバイオチップの開発 光技術コンタクト 依頼論文 Vol.46, 2008, 11-18

[学会発表] (計11件)

① 藤原一彦 金ナノ粒子の細胞内導入における粒子サイズおよび表面修飾の効果の検討 第71回分析化学討論会 2010.5.15 島根大学

② 藤原一彦 レーザー光源を利用した局在表面プラズモン共鳴光散乱測定の高感度化 第71回分析化学討論会 2010.5.16 島根大学

③ 藤原一彦 Resonant light scattering imaging of protein functionalized gold nanoparticle in a biological cell, 5th international symposium on medical, bio- and nano-electronics 2010.2.24 東北大学(依頼講演)

[その他]

ホームページ等

<http://www.lifescience.eng.akita-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 一彦 (FUJIWARA KAZUHIKO)

秋田大学・工学資源学部・助教

研究者番号: 10375222