

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 7 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23657097

研究課題名（和文）：一分子蛍光観察用ライトガイド型フローセルの開発

研究課題名（英文）：Development of microfluidic cell based on light guide for the single molecule fluorescence measurements

研究代表者：

高橋 聡 (TAKAHASHI SATOSHI)

東北大学・多元物質科学研究所・教授

研究者番号：30283641

研究成果の概要（和文）：本研究では、ライトガイド型フローセルを開発し、光学基板に固定せずに、タンパク質一分子が発する蛍光を継続的に観測することを目的とした。特に、微細加工技術により、さや流型フローセルと、溶液混合型フローセルの製作を行った。後者では、一分子観察のための浅い流路に、適度な流速により溶液混合を可能にするセルの設計を行った。これにより、溶液混合後の試料の一分子観察が可能になると予想される。

研究成果の概要（英文）：We developed several flow cells for the single molecule fluorescence measurements. The first can maintain stable sheath flow. The second can mix two solutions for the kinetic measurements.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

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：一分子観察、蛍光、ライトガイド、フローセル、微細加工

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質は、アミノ酸の一次配列によって定められる構造に自発的に折り畳まれることで、生体中で機能を発揮する。タンパク質が、どのように特異的な構造に折り畳まれるのかを観察することは、タンパク質構造のデザインに通じる重要性を持っている。同様に、タンパク質が機能を発揮する過程を観察することは、タンパク質を模した機能性分子を開発するために必須の実験である。また、生体の微小試料中の特定のタンパク質の含量を定量することは、タンパク質をマーカーとした診断法に役立つ。このように、タンパク質を一分子レベルの高感度で容易に観察するための手法が求められている。

タンパク質を一分子レベルで観察するた

めに、蛍光色素をラベルして蛍光を検出する手法が開発され、数多くの実験データを生み出している。これらの実験では、蛍光を集める光学系として全反射蛍光顕微鏡か共焦点顕微鏡が用いられる。しかし、全反射蛍光顕微鏡ではタンパク質を光学基板に固定するために、しばしば特性が変化すること、オンライン型の装置に組み込んで多数の試料を自動測定する応用が不可能であることなどの欠点があった。また、共焦点顕微鏡ではタンパク質を1ミリ秒程度しか継続観察できないために、長時間特性を捉えられないという欠点があった。このため、タンパク質を光学基板に固定せずに、長時間分解能で長時間の観察を行う実験の開発が必要である。

## 2. 研究の目的

タンパク質を高感度で検出し運動性を観察する実験は、タンパク質をプローブとした診断法や、タンパク質機能を利用したデバイスの設計など、さまざまな応用に必要である。特に、一分子レベルでタンパク質を簡単に観察する手法の開発が求められている。本研究では、ライトガイド型フローセルなどのさまざまなフローセルを微細流路加工の技術を用いて開発し、タンパク質一分子が発する蛍光を効果的に観測することを目的とする。特に、一分子の長時間の観測、高時間分解能測定、一分子分別装置への応用などを旨としたフローセルを開発する

## 3. 研究の方法

### (1) ライトガイド型フローセルの製作と一分子観測

低屈折率素材を組み合わせたライトガイド型のフローセルを微細流路加工技術で開発することを試みた。このセルは、テフロン AF チューブの固定、励起レーザーの導入、試料の導入という三つの要請を達成するデザインを持っている。これにより、光学基板に固定しない一分子が発する蛍光を継続的に観測することを目標にした。

### (2) 高時間分解能の一分子観測を可能にする高流速フローセルの製作

一分子のタンパク質が発する蛍光を、高時間分解能で測定することを可能にするために、高速で分子を流すフローセルを開発した。このフローセルでは、一分子に強力な励起光を照射し、分子がブリーチする前にできるだけ多くの光子を観測することを可能とする。

### (3) 一分子ソーターへの応用を目指したさや流型セルの製作

一分子の蛍光信号を観測した後に、分子の選別を行うための流路の構築を行った。このセルでは、共焦点顕微鏡による感度の高い蛍光測定を可能にするために、さや流を作らせ、目的とする分子がかならず共焦点顕微鏡の焦点を通過するように工夫した。

### (4) 一分子の運動の測定を可能にする溶液混合型一分子観測セルの構築

数ミリ秒の時間分解能で、一分子の運動を観測するための溶液混合型フローセルの製作を行った。このセルでは、試料流の幅を極端に狭くすることで、試料流とさや流の拡散による数ミリ秒以内の混合を可能にする。

## 4. 研究成果

### (1) ライトガイド型フローセルの製作と一分子観測

研究期間の一年目は、ライトガイド型のフ

ローセルの製作を行った。そのために、共焦点型の一分子蛍光顕微鏡を製作した。また、テフロン AF チューブによるフローセルの製作を試みた。しかし、いくつかの技術的な困難点が生じ、計画したフローセルの製作を断念せざるを得なかった。

蛍光を発する分子の長時間測定のために、異なるアイデアに基づくキャピラリー型のフローセルを用いた一分子観測装置を構築し、シトクロム c の長時間測定を行った。得られた結果から、シトクロム c がいくつかの状態を経て折り畳まれることを見いだした。この結果を、Journal of American Chemical Society 誌に報告した（発表文献 [4]）

### (2) 高時間分解能の一分子観測を可能にする高流速フローセルの製作

一分子が発する蛍光を、高時間分解能で観測するには、高出力のレーザーを一分子に照射し、分子がブリーチを起こす前に十分な量の光子を検出する必要がある。そのために、一分子観測が可能な細い流路に高速で試料を流すための流路の製作を行った。このセルを用いて、BdpA と呼ばれるタンパク質の一分子レベルにおける蛍光信号を観測し、数百マイクロ秒の時間領域で、タンパク質の揺らぎ運動があることを結論した。この結果を、投稿論文としてまとめ、Scientific Reports 誌に報告した（発表文献 [1]）。

### (3) 一分子ソーターへの応用を目指したさや流型セルの製作

一分子が発する蛍光信号を基に、分子の選別を行うための一分子ソーターに必要なフローセルの開発を行った。一分子レベルの感度を得るためには、共焦点顕微鏡の小さな観測体積の中に、全ての観測分子が流れ込むためのセルのデザインが必要である。このフローセルでは、さや流の流れを構築することで、観測分子のながれる位置を固定することを目指した。特に、さや流を構築するために、「ダム構造」と呼ばれる微細加工を石英板に施したところ、良好なさや流を構築できることを見いだした。さらに、この装置を用いることで一分子レベルの観測が可能であることを確認した。この結果を、いくつかの学会にて発表した。さらに、投稿論文としてまとめるための準備を行っている。

### (4) 一分子の運動の測定を可能にする溶液混合型一分子観測セルの構築

溶液混合を引き金として一分子の速度論的な構造変化を観測するために、一分子の観測セルと高速の溶液混合装置を組み合わせる必要がある。高速の溶液混合を行うためのフローセルはこれまでも多数発表されてい

るが、一分子観察装置と組み合わせることは大変難しい。特に、一分子観察のための浅い流路を維持しながら、溶液混合を行うための十分な流量を得ることが困難である。そのため、フローセルの流れを流体力学的な考察により十分に予測し、素早い溶液混合と一分子観察を両立するためのフローセルのデザインを行った。さらに、米国のベンチャー企業に、デザインした流路の製作を依頼し、レーザー加工を用いた最新の微細加工技術による流路の製作を成功させた。現在、得られた流路の性能の評価をすすめており、実際の一分子観測への応用も行う予定である。

以上のように、本研究により当初予定したライトガイド型のフローセルの製作は断念したものの、異なる方法で一分子観察を成功させる数々のフローセルの製作と、それを使った成果を挙げることができた。このように、本研究により十分な成果を挙げることができた。

#### 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 4 件)

1. Oikawa, H., Suzuki, Y., Saito, M., Kamagata, K., Arai, M., Takahashi, S., Microsecond dynamics of an unfolded protein by a line confocal tracking of single molecule fluorescence, *Scientific Reports*, 2013, 3, 2151 doi: 10.1038/srep02151.(査読有り)
2. Nambu, S., Matsui, T., Goulding, C. W., Takahashi, S., Ikeda-Saito, M., A New Way to Degrade Heme -THE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ENZYME MhuD CATALYZES HEME DEGRADATION WITHOUT GENERATING CO, *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288, 10101-10109 (査読有り)
3. Miyashita, Y., Wazawa, T., Mogami, G., Takahashi, S., Sambongi, Y., Suzuki, M., Hydration-State Change of horse Heart Cytochrome c Corresponding to Trifluoroacetic-Acid-Induced unfolding, *Biophysical Journal*, 2013, 104, 163-172 (査読有り)
4. Kamagata, K., Kawaguchi, T., Iwahashi, Y., Baba, A., Fujimoto, K., Komatsuzaki, T., Sambongi, Y., Goto, Y., Takahashi, S., Long-term observation of fluorescence of

gree single molecules to explore protein-folding energy landscapes, *Journal of American Chemical Society*, 2013, 134, 11525-11532 (査読有り)

[学会発表] (計 12 件)

1. 鎌形清人、一分子蛍光計測によるタンパク質の折り畳みや機能ダイナミクス、日本物理学会第 68 回年次大会、2013. 3. 26-3. 29、広島市
2. 高橋聡、高速一分子蛍光追跡による柔らかなタンパク質の運動追跡、日本化学会第 93 回春季年会、2013. 3. 22-3. 25、草津市
3. Satoshi Takahashi, Microsecond-Resolved tracking of the Unfolded State of BdpA by a Line Confocal Detection of Single Molecule Fluorescence, International Symposium on Protein Folding and Its Biological Significance, 2013.3.4-3.6、岡崎市
4. Suguru Watanabe, Shion Ando, Kiyoto Kamagata, Tatsuya Nojima, Hideki Taguchi, Takahiro Hohsaka, Satoshi Takahashi, Single-molecule fluorescence and diffusion measurements of a GroEL-binding peptide, 第 85 回日本生化学会大会、2012.12.14-12.16、福岡市
5. Hiroyuki Oikawa, Yuta Suzuki, Masataka Saito, Kiyoto Kamagata, Munehito Arai, Satoshi Takahashi, Microsecond-resolved tracking of the unfolded state of BdpA by a line confocal detection of single molecule fluorescence, Indo- Japan Workshop on 'Recent Advances in Spectroscopy and Microscopy: Fundamentals and Applications to Materials and Biology, 2012.11.20-11.21, India, Hyderabad
6. Satoshi Takahashi, Microsecond-Resolved Tracking of The Unfold State of BdpA by a Line Confocal Detection of Single Molecule Fluorescence, International Symposium on Protein Folding and Dynamics, 2012.10.15-10.17, India, Bangalore
7. Seiya Takahashi, Yasuyuki Sainoo, Risa kashima, Takashi Tokino, Tadahiro Komeda, Satoshi Takahashi, Kiyoto Kamagata, Single-molecule structural

analysis of tumor suppressor p53 using scanning probe microscopes, 第50回日本生物物理学会、2012.9.22-9.24、名古屋市

8. Hiroyuki Oikawa, Yuta Suzuki, Kiyoto Kamagata, Munehito Arai, Satoshi Takahashi, Microsecond-resolved traces of protein folding by single-molecule FRET measurements, 第50回日本生物物理学会、2012.9.22-9.24、名古屋市
9. Sho Saitoh, Hiroyuki Oikawa, Kiyoto Kamagata, Satoshi Takahashi, Construction of a microfluidic system for fluorescence-based single-molecule sorting, 第50回日本生物物理学会、2012.9.22-9.24、名古屋市
10. 高橋 聡、小井川浩之、鎌形清人、新規一分子蛍光観測法による一分子蛍光観測によるタンパク質のエネルギー地形解析、第12回日本蛋白質科学会年会、2012.6.20-6.22、名古屋市
11. 鎌形清人、川口敏史、馬場昭典、三本木至宏、小松崎民樹、高橋 聡、新規一分子蛍光観測法による蛋白質の折り畳みの自由エネルギー地形の探索、第12回日本蛋白質科学会年会、2012.6.20-6.22、名古屋市
12. 小井川浩之、鎌形清人、飯島一生、芳坂貴弘、高橋 聡、マイクロ秒分解一分子FRET測定による蛋白質構造変化の追跡、第12回日本蛋白質科学会年会、2012.6.20-6.22、名古屋市

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：

番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.tagen.tohoku.ac.jp/modules/1aboratory/index.php?laboid=34>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 聡 (TAKAHASHI SATOSHI)  
東北大学・多元物質科学研究所・教授  
研究者番号：30283641

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

鎌形 清人 (KAMAGATA KIYOTO)  
東北大学・多元物質科学研究所・教授  
研究者番号：90432492