

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 5月29日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23710145

研究課題名（和文） タンパク質機能を融合した光駆動ナノバイオ加工ツールの実現とゲノム分子解剖への展開

研究課題名（英文） Development of optically-driven tool for nano-bio processing and its applications in molecular dissection of genomic DNA

研究代表者

寺尾 京平（TERAO KYOHEI）

香川大学・工学部・准教授

研究者番号：80467448

研究成果の概要（和文）：本研究は、生体分子を加工するツールを開発し、新たなゲノム解析技術へ応用することを目指す。本研究期間を通じて、光駆動微小構造体作製技術の確立と、微小構造へのタンパク質の固定化に取り組んだ。その成果として、自家蛍光を調節可能な微細構造の作製法を開発し、蛍光顕微鏡下で視認性の高い操作を実現した。また、光駆動微小構造体の基礎的な操作特性の把握を行い、作製効率や、光トラップによる発生力について新たな知見を得た。タンパク質の固定化に関して、表面プラズモン共鳴センシングによりマイクロ/ナノ構造へのタンパク質の固定化とタンパク機能の維持を実証した。

研究成果の概要（英文）：In this research project, we developed a novel nano/micro-fabricated tool for processing single biomolecule for the application in the research field of genome analysis. The technique for fabricating nano/micro structures was developed, which enables us to control the visibility of the structures under a fluorescence microscope. Their characteristics including the yield of fabrication and the trapping force were evaluated. We also verified the immobilization of proteins on their surface by surface plasmon resonance sensing. The results suggest the successful protein immobilization and the functionalization for a protein-modified nano/micro tool.

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	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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 ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：分子マニピュレーション、分子加工

1. 研究開始当初の背景

これまでの生物学分野における様々な研究から、遺伝子の発現調節にはゲノムの立体構造が重要な役割を担っていることが示されている。その一方で、具体的な核内における染色体 DNA の微細構造は現在も未解明な点が数多く残されており、新たな解析技術の実現が求められている。従来法では分子集団を対象として様々なゲノム分子の平均値から立体構造を構築しているために、個々の細胞毎、染色体分子毎の情報が埋没していた。

そこで、本研究では染色体 DNA を1分子レベルで解析する新たな技術を確立することにより、個々の細胞のゲノムの立体構造を明らかにすることを目標とした。そのためには、ゲノムを1分子レベルで扱うことを可能にする基盤的な実験用のツールを開発することが必須であると考え、上記の目標のもとに、本研究助成により、光学顕微鏡下で DNA、RNA、タンパク質等の生体分子を1分子レベルで操作し・分子加工する実験ツールの開発に取り組むこととした。

分子加工とは、ここでは、分子鎖の切断、化学修飾、分子除去（消化）、固相への固定化・解離といった操作を1分子レベルで行うことを意味している。現在の技術では、これらの操作は試験管内で化学反応として行われるため、分子集団に対して非特異的に反応が生じる。したがって、特定の分子あるいは1分子の特定の部位に対してピンポイントに加工を行うことはできない。

研究代表者は、これまで、光ピンセットによってナノ・マイクロ構造体をトラップし操作する手法を考案し、これまで操作できなかった脆い生体分子に対しても分子配向や配置などの物理的操作を実現してきた[1]。

この構造体にタンパク質（酵素）を固定化し光ピンセットで操作することにより、生体分子にピンポイントにタンパク質を作用させるという手法である。本分子加工ツールが実現すれば、生体分子を物理的に操作することができると同時に分子に対して狙った位置で加工を行うことが可能になることが期待される。

[1] K. Terao et al. *Lab Chip* 8, 1280-4, 2008.

2. 研究の目的

本研究は、これまでに行ってきた生体分子の物理的操作の成果をふまえ、タンパク質機能を付加することで、ピンポイントな分子加工ツールを実現し、ゲノムの分子レベルの操作と加工に応用することを目的とする。

具体的には、光駆動構造体に対して、タンパク質を構造体表面に固定化しタンパク質機能を付加することによって、特定の分子の特定部位を光学顕微鏡下でピンポイントに分子加工するツールを実現する。そのために、微細構造の作製プロセスの確立や操作特性の把握などの要素技術、及び周辺技術の開発と評価を行った。

3. 研究の方法

以下の7項目の研究開発に取り組んだ。

- (1) ナノマイクロ構造体の設計・製作
- (2) 構造体の作製効率評価
- (3) 構造体の視認性の向上
- (4) 光ピンセット光学系の構築
- (5) 光トラップ力の評価
- (6) タンパク質の表面固定化と機能確認

4. 研究成果

- (1) ナノマイクロ構造体の設計・製作

ナノマイクロ構造は図1に示す方法によって製作した。まずクロムを蒸着した石英基板を用いて電子線描画装置によりクロムパターンを形成する。その後、基板に紫外線感光性樹脂SU-8を厚さ5 μmで塗布し、基板背面から紫外線を照射する。このときクロムパターンがフォトマスクとなってSU-8にパタ

ーンが転写される。現像後、表面を鋭利なガラス薄板によって擦ることで、物理的にSU-8構造を基板から剥離させ、純水中に回収する。

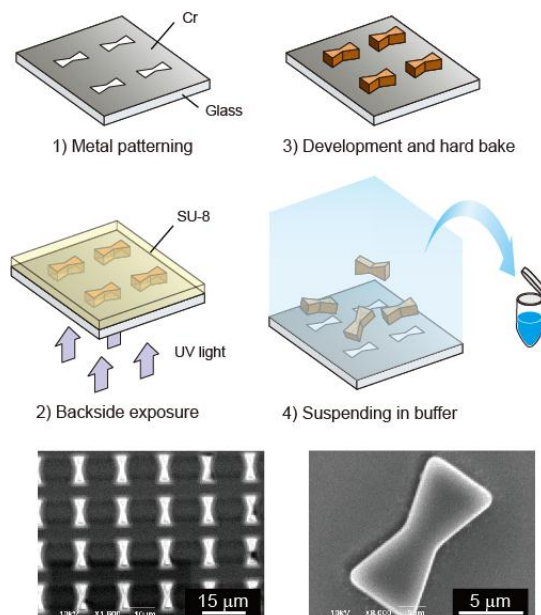


図1. ナノマイクロ構造体の作製プロセス及び作製結果

結果として、基板上に10万個オーダーのマイクロ構造体を作製し、液中に回収することに成功した。

(2) 構造体の作製効率評価

本作製法によるナノマイクロ構造体の作製効率について評価するため、純水中に回収した構造体の個数・濃度について血球計算盤を利用して計測し、パターンニングした構造の数と回収した構造体の数の割合から回収率を算出した。その結果、基板にパターンニングした個数に対して、10%程度が純水中に回収されていることが分かり、その割合は数回の試行でほぼ一定であった。残りの構造体は剥離せずに基板上に残留したものや、ガラス薄板に付着したと考えられる。濃度としては 1.95×10^5 個/ml であり、その後の操作実験を行う上では十分な濃度を確保することが可能であった。

表1. ナノマイクロ構造体の作製効率

	Concentration [$\times 10^5$ units/ml]	Quantity (20 μl solution) [$\times 10^4$ units]	Yield [%]
1	9.00	1.80	10.8
2	9.50	1.90	11.4
3	10.5	2.10	12.6
4	9.85	1.97	11.8
5	10.0	2.00	12.0
ave.	9.77	1.95	11.7
s.d.	0.56	0.11	0.7

(3) 構造体の顕微鏡下における視認性の向上
 蛍光染色した染色体 DNA を蛍光顕微鏡下で観察しながら、構造体を操作するため、構造体の自家蛍光強度が重要となる。構造体が DNA と比較して蛍光輝度が弱いと構造体を画像的に認識することが困難であり、一方で蛍光強度が極端に強いと、DNA の観察を妨げる原因となる。したがって、DNA 観察条件に応じて蛍光強度を調節する必要がある。それに対して、本研究では SU-8 の自家蛍光がプロセス時のバーク時間によって変化することを見出し、バーク時間の調節によって蛍光強度を調節する方法を考案した。

SU-8 パターニング後に、150°Cでのハードバークを行い、0 - 60 分間でバーク時間について条件をふり、B 励起光における自家蛍光の変化を計測した (図 2)。自家蛍光がバーク時間の増加と共に増大することが確認された。それらの関係を示したグラフを図 3 に示す。本研究では、本結果を下にハードバーク時間を 10 - 30 分間で調節し構造体の視認性を向上させ、染色体操作実験に用いた。

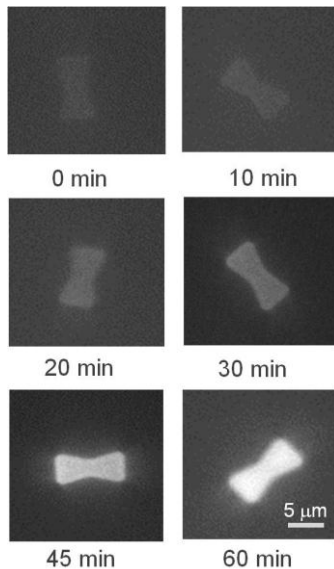


図 2. バーク時間 (0 - 60 分間) による SU-8 構造体の自家蛍光の変化

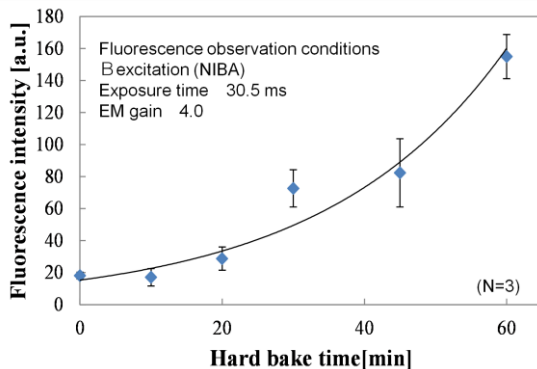


図 3. バーク時間と自家蛍光強度の関係

(4) 光ピンセット光学系の構築

構造体の操作のため、Yb ファ이버レーザー (1024 nm CW) を用いた光ピンセットの光学系を構築し、温度調節・CO₂ 濃度調節が可能なチャンバーを有した倒立顕微鏡による制御された環境下での DNA 蛍光観察と、光ピンセットによる操作を両立させた。DNA の観察には以前代表者が開発した電気浸透流を用いた DNA 伸長デバイスを利用し、顕微鏡ステージ上に設置した。

光ピンセットの光学系は研究開発当初、1 軸の固定光学系を構築し、ステージ側を移動することで光トラップ位置を操作した。その後、より複雑な操作と複数の同時トラップ操作を可能にするため、ビームスプリッターによりレーザーを 2 分割し、一方をガルバノミラーにより操作する 2 軸光学系の構築を行った。

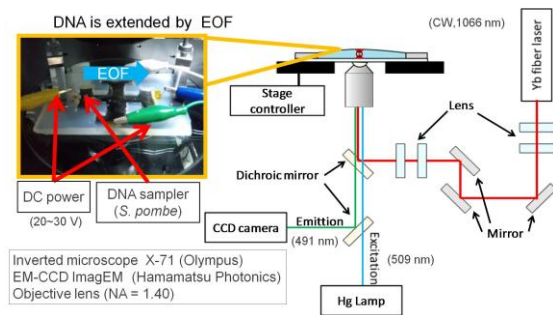


図 4. 光ピンセット光学系 (1 軸トラップ) および DNA 伸長デバイス

(5) 光トラップ力の評価

構築した光ピンセット光学系を用いて構造体のトラップ力を計測した。方法は、純水中でトラップした構造体を操作し、トラップから外れた際の構造体の移動速度と粘性抵抗の関係からトラップ力を見積もった。

比較対象として、同等のサイズをもつ、光ピンセット操作で広く用いられるラテックスマイクロビーズを計測した。

結果、レーザーパワーに対して線形にトラップ力が増加し、マイクロビーズと比較して、若干トラップ力が強いという結果が得られた。本光学系で発生する最大のトラップ力は 80 pN という結果が得られ、これは DNA のエントロピー弾性より高く、DNA の 2 本鎖を切断する力よりも弱い。したがって、本実験系は DNA を操作するのに十分な力を発生することが確かめられた。

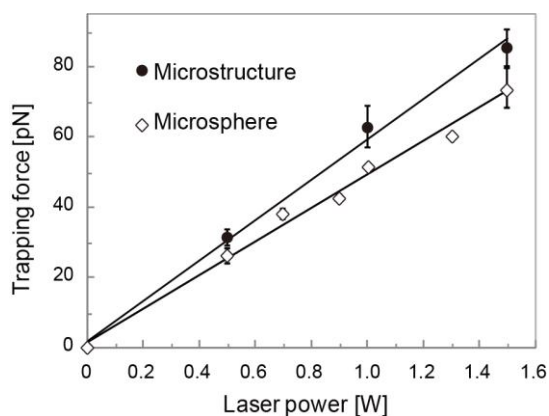


図5. 光駆動構造体とマイクロビーズ(直径5 μm)のトラップ力比較

(6) タンパク質の表面固定化と機能確認

構造体へのタンパク質の固定化を行うため、まず固定化プロトコルの検討と固定化量の評価について行った。固定化には金-チオール結合を利用した方法を採用した。また、固定化タンパク質の結合量評価と機能性維持の確認については、表面プラズモン共鳴センシング技術を用いた。

金基板の上にSAM膜を形成し、NHS/EDCにより表面を活性化した後、抗BSA抗体を導入し、結合させた。その後、ブロッキング処理を行った。固定化タンパク質(抗BSA抗体)が結合能を維持しているか評価するため抗原であるBSAを導入し、結合量を計測した。

結果を図6に示す。SPRシグナルが増加しており、抗BSA抗体が固定化できていることが確認された。また抗原のBSAが結合しシグナルが上昇していることから機能を維持していることが確認された。

さらに、本手法を発展させるため、タンパク質の固定化量の増加に取り組み、金膜上に20 nm程度の金ナノ構造を電気めっき法による形成し、修飾する表面積を増加することによって約2倍の固定化量の増加を達成した。

今後、確立した固定化プロトコル、金ナノ構造作製技術をベースに分子操作用の構造体への部分的な金パターンニングと表面修飾に取り組み、光操作と分子修飾を両立するプロセス技術の開発に取り組む。

研究期間内にタンパク質を固定したナノマイクロ構造体による分子操作まで到達することはできなかったものの、それぞれの要素・基盤技術の開発に成功した。ここで開発した技術は、提案する新たな分子加工ツールに必須の技術群であり、今後、それら融合することで分子加工の実現とゲノム解析への応用に向けて取り組む考えである。

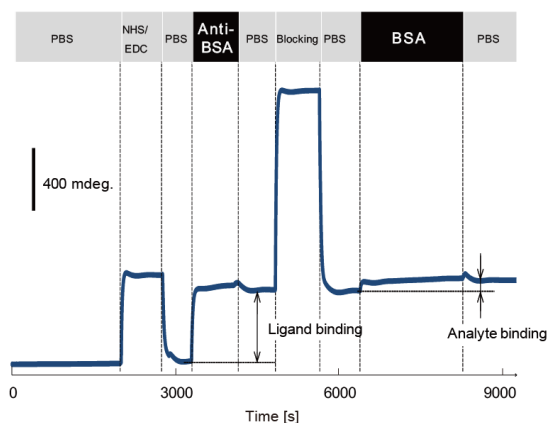


図6. SPRセンシングによるBSA抗体の固定化とBSA抗体の捕捉の計測(金ナノ構造基板を用いた計測)

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) N. Nagase, K. Terao, N. Miyanishi, N. Tamai, N. Uchiyama, T. Suzuki, H. Takao, F. Shimokawa, F. Oohira, "Signal Enhancement of Protein Binding by Electrodeposited Gold Nanostructures for Application in Kretschmann-Type SPR Sensor", *Analyst*, 査読有, vol.137, 2012, pp. 5034-5040

DOI: 10.1039/C2AN35574D

(2) K. Terao, K. Shimizu, N. Miyanishi, S. Shimamoto, T. Suzuki, H. Takao, F. Oohira, "Size-Exclusion SPR Sensor Chip: Application to Detection of Aggregation and Disaggregation of Biological Particles", *Analyst*, 査読有, vol.137, 2012, pp. 2192-2198

DOI: 10.1039/C2AN16010B

(3) K. Terao, A. Okonogi, A. Fuke, T. Okitsu, T. Suzuki, M. Washizu, H. Kotera, "Localized substance delivery to single cell and 4D imaging of its uptake using a flow channel with a lateral aperture", *Microfluidics and Nanofluidics*, 査読有, vol.12, 2012, pp. 423-429

DOI: 10.1007/s10404-011-0885-3

(4) K. Terao, C. Kakita, N. Nagase, N. Miyanishi, T. Suzuki, H. Takao, F. Shimokawa, F. Oohira, "Evaluation of Electrodeposited Gold Nanostructures for Applications in QCM Sensing", *Analytical Sciences*, 査読有, vol.28, 2012, pp. 291-294

DOI: 10.2116/analsci.28.291

〔学会発表〕(計6件)

(1) C. Masuda, K. Terao, H. Oana, M. Washizu, T. Suzuki, H. Takao, F. Shimokawa, F. Oohira, “Optically-Driven Microstructures for Manipulating Single DNA Molecule under Fluorescence Microscope”, 38th International Conference on Micro and Nano Engineering (MNE2012), 2012年9月16-21日, Toulouse, France

(2) K. Terao, M. Gel, A. Okonogi, T. Suzuki, F. Oohira, M. Washizu, H. Kotera, “Single Cell Stimulation Assay: Microfluidic Substance Delivery to a Laterally Trapped Cell”, The ASME-JSME-KSME Joint Fluids Engineering Conference2011 (AJK2011-FED), 2011年7月24-29日, 浜松, 日本

(3) K. Terao, Y. Kitazawa, R. Yokokawa, H. Kotera, M. Washizu, F. Oohira, “Open-Access and Multi-Directional Electroosmotic Flow Chip: Handling Single Cells and Single DNA Molecules”, The 6th International Conference on Microtechnologies in Medicine and Biology (MMB2011), 2011年5月4-6日, Lucerne, Switzerland

(4) K. Terao, M. Gel, A. Okonogi, A. Fuke, T. Okitsu, T. Suzuki, F. Oohira, M. Washizu, H. Kotera, “Intracellular Response of a Pancreatic Beta Cell to Localized Glucose Stimulation”, The 6th International Conference on Microtechnologies in Medicine and Biology (MMB2011), 2011年5月4-6日, Lucerne, Switzerland

(5) 増田千洋, 寺尾京平, 鈴木孝明, 高尾英邦, 下川房男, 小穴英廣, 鷲津正夫, 大平文和, “DNA1分子操作に用いる光駆動微小構造体の特性評価”, 第24回化学とマイクロ・ナノシステム研究会, 2011年11月17-18日, 大阪府立大, 大阪

(6) 寺尾京平, 北沢裕子, 横川隆司, 大平文和, 鷲津正夫, 小寺秀俊, “電気浸透流を用いた開放型流路内における流体制御と生体試料操作への応用”, 第28回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 2011年9月26-27日, タワーホール船堀, 東京

〔その他〕

研究室ホームページ

<http://www.bntech.org/doku.php/index>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺尾 京平 (TERAO KYOHEI)

香川大学・工学部・准教授

研究者番号: 80467448

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

小穴 英廣 (OANA HIDEHIRO)

東京大学・大学院工学系研究科・准教授

研究者番号: 20314172

大平 文和 (OOHIRA FUMIKAZU)

香川大学・理事

研究者番号: 80325315