

超微小の溶液チャンバーを用いた1分子酵素アッセイ



研究ノート

野地博行*

Micron-Sized Reaction Chamber for single Molecule Enzyme Assay

Key Words : Microchamber, Single Molecule Detection(SMD)

1. はじめに

1分子ナノバイオの研究・開発分野において、1分子計測技術は重要なキーテクノロジーである。通常野の1分子計測では、AFMや特殊な光学システムなど複雑で高額の機器が利用されている。これに対し、我々は「分子を微小空間に閉じ込めて高感度検出する」という原理に基づいた1分子計測技術を開発した。実験方法、検出原理いずれもこれまでの1分子計測とは全く異なり、非常に単純であるため、今回紹介する1分子酵素アッセイだけでなく、1細胞解析や1分子DNA解析など、広く様々な応用が期待される。

2. なぜ微小空間に閉じ込めると高感度なのか?

それは、狭いところに閉じ込めて反応を行うと、反応生成物の濃度変化が大きくなるからである。例えば、一般的な酵素タンパク質は、遅くとも1秒間当たり10回程度(1分間で600回)の反応を触媒する。このような反応を通常取り扱う反応容積である $1\mu\text{L}$ 中で行っても、濃度変化は毎分 $1\text{fM}(10^{-15}\text{M})$ であり検出は不可能である。これに対して、このこの反応を 1fL の体積で行うと、1分間あたりの変化量は $1\mu\text{M}$ となる。これだけの濃度変化だったら、一般

的な生化学アッセイキットで十分に検出できる。ただし、計測対象がとても小さいので顕微鏡は必要となる。

誰でも思いつくようなアイデアであるが、このような単純な試みはこれまで成功していなかった。その主な原因は蒸発である。このくらいの小さな体積になると、水溶液は文字通りあっという間に乾燥してしまふ。例えば、インクジェットプリンターで使用されている方法でフェムトリットルサイズの液滴を噴霧する方法が確立されている。しかし、この場合は気化しにくい有機溶媒を用いており、水溶液では噴霧すると瞬時に蒸発してしまふ。それならば物理的に閉じ込めればよいだろう。体積 1fL は、 $1\mu\text{m}$ 立方に相当する。このサイズの液滴の封入は、リポソームやオイルに封入したドロップレットなどを利用した例で報告がある。しかし、これらの方法では、安定かつ均一な微小溶液を作製することは非常に困難であった。これが、水溶液を微小空間に閉じ込め際の際のもうひとつの問題点であった。

3. 超微小な溶液チャンバーの開発

そこで、我々は、マイクロ加工技術を利用した方法を開発した。まず、マイクロフォトリソグラフィ技術を利用して、シリコンウェハの表面に鋳型となる円柱構造を作製した(図1上左)。次に、これを鋳型にして、表面にミクロンサイズの窪みをもったシリコンゴムのシートを作製した。素材としては、光透過性が高く生体試料と相性が良いPDMS(polydimethylsiloxane)と呼ばれるシリコンゴムを使用した。鋳型の上に、PDMSのモノマーを塗布し、その後高温処理によって固化すると、出来上がったPDMSシートの表面には容積が数フェムトリットルの窪みが規則正しく整列する(図1上)。



* Hiroyuki NOJI
1969年9月生
1997年東京工業大学総合理工学研究所修了
現在、大阪大学・産業科学研究所、教授、理学、分子ナノバイオ、マイクロバイオデバイス
TEL 06-6879-8481
FAX 06-6875-5724
E-Mail hnoji@sanken.osaka-u.ac.jp

4. 分子酵素アッセイ

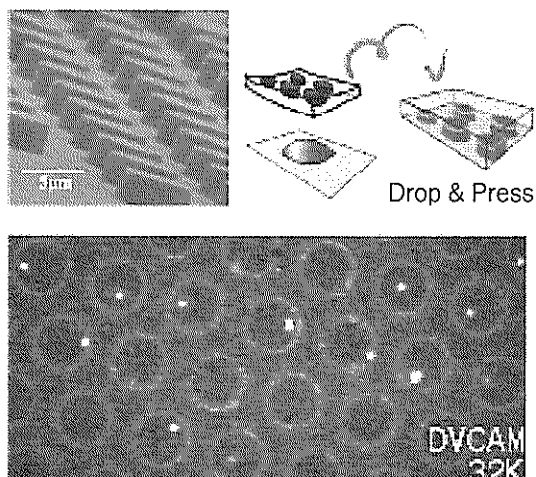


図1 超微小溶液チャンバー。
上左図は、電子顕微鏡で撮影したシリコンウエハーの鋳型。右は、溶液の封入方法。溶液をカバーガラスとの間に挟みこむだけである。下図は、チャンバー中に閉じ込められるDNA分子(明るい輝点)。

PDMSはガラスなど表面の滑らかなものに接着するとファンデルワールス力だけで密着するため、作製したPDMSシートとスライドガラスの間に試料を含む水溶液を挟みこむことで、微小チャンバー中に溶液を充填することができる。気泡や過剰な水分が残っている場合は、加圧するとこれらは取り除かれる。その結果、形状が均一な超微小体積の溶液を、簡便かつ大量に作製することができた。問題は、これらの微小溶液同士が独立していることであるが、これはチャンバー中に閉じ込めた直径10nmの量子ドットやDNA分子(図1下)の制限されたブラウン運動から確認された。また、これよりもさらに小さな化合物の封入に関しては、蛍光色素をチャンバーに充填させて蛍光消光回復が起こらないことから確認した。これらの実験結果から、PDMS製フェムトリットルチャンバーは、その内部にタンパク質サイズの物質や、基質ほどの低分子を封入ことができ、生化学反応を行うのに十分な時間(～数十分)の間、微小溶液を孤立化したまま維持できることが示された。ただし、疎水性が強く小さな化合物に関しては、PDMSのマトリックス中へ浸透してしまうことを付記する。

次に、本当に超微小溶液に酵素溶液を閉じ込めるだけで1分子計測が可能なのかを検証した¹。モデル酵素として β -galactosidaseを使用した。ここでは、顕微鏡による計測のために市販蛍光アッセイのキットをそのまま使用している。このキットで使用する基質は、フルオレセイン分子の両端に糖を結合させた化学構造をもっており無蛍光である。 β -galactosidaseが、この糖-フルオレセインの結合を切断すると、遊離したフルオレセイン分子は蛍光を発する。このため、蛍光強度の上昇として酵素活性をモニターすることが出来る。このアッセイ溶液を、容積30 fLのチャンバーに閉じ込めて反応を蛍光顕微鏡下で観察した。その結果、酵素の濃度が高い場合は、チャンバーあたり数個の酵素分子が閉じ込められており、全てのチャンバーはほぼ均一な強度の蛍光を発する。次に、チャンバーに閉じ込められる酵素分子数が1個以下となるほどの低濃度の β -galactosidase溶液を閉じ込めた。この場合、各チャンバーは0個、1個、2個、もしくは3個の酵素分子を確率的に閉じ込めることになる。その結果、チャンバーには酵素分子が確率的に閉じ込められる。この条件では蛍光強度はチャンバーごとに異なり、暗い、中間、明るいといった段階的な強度の違いを明瞭に区別することができた(図3B)。これを定量的に解析するために、各チャンバーにおける1分間あたりの蛍光上昇量(活性強度)をヒストグラムにした。その結果、4つの明瞭なピークが得られた

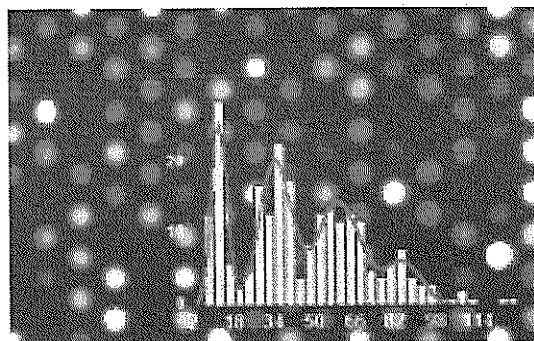


図2 一分子 β -galactosidase活性の検出。
チャンバーに閉じ込められた酵素活性の蛍光画像。インセットは、1分間あたりの蛍光上昇率のヒストグラムを示している。

(図3C). ポアソン分布から予想された酵素0個, 1個, 2個, 3個を含むチャンパーの数の分布と, 実際に観測されたチャンパーの数の分布はピッタリであったため, それぞれ0, 1, 2, 3個の酵素を含むチャンパーに対応することが確認された. さらに, このときピーク間の距離は1分子あたりの酵素活性に対応するが, 実際のピーク間距離も一定であり, 多分子計測から予想された値(20sec^{-1})と一致した. 以上の結果から, 微小反応チャンパーを用いることで定量的に1分子酵素アッセイが可能であることが確認できた. この方法は, 他の酵素アッセイにも適応可能である. 実際に, 他の酵素(Horse Radish Peroxidase)においても同様の結果が得られている.

5. まとめ

これまでの生化学におけるタンパク質機能解析では, 主に多分子を同時計測し, その集団としての振る舞いの平均化された値を解析してきた. つまり分子個々の性質はこのような平均化によって隠されている. しかし近年, 全反射型エバネッセント顕微鏡や共焦点顕微鏡といった特殊な光学システムが用いることで, 生体分子の1分子計測が精力的に行われ

ている. 本研究では, 簡単なマイクロ加工技術を利用することで, 酵素反応の1分子アッセイが可能であることを示した. しかも, 使用しているのは市販の酵素キットと蛍光顕微鏡である. 拍子抜けする簡単な方法であるが, 我々はこの単純さが重要だと考えている. それは, これによって, 他の測定デバイスや反応溶液を簡単に組み入れることができるからである. 実際, 私たちは, この手法を活用することで, 私たちの主たる研究テーマである分子モーターの効率の1分子測定にも成功することができた². アイデア次第で, 1個の細胞計測やDNAの計測など, まだまだ活用範囲が広がりそうである.

References

1. Rondelez, Y. et al. Microfabricated arrays of femtoliter chambers allow single molecule enzymology. *Nat Biotechnol* 23, 361-5(2005).
2. Rondelez, Y. et al. Highly coupled ATP synthesis by F1-ATPase single molecules. *Nature* 433, 773-7(2005).

この記事をお読みになり, 著者の研究室の訪問見学をご希望の方は, 当協会事務局へご連絡ください. 事務局で著者と日程を調整して, お知らせいたします.

申し込み期限: 本誌発行から2か月後の月末日

申し込み先: 生産技術振興協会 tel 06-6395-4895 E-mail seisan@maple.ocn.ne.jp

必要事項: お名前, ご所属, 希望日時(選択の幅をもたせてください), 複数人の場合はそれぞれのお名前, ご所属, 代表者の連絡先

著者の都合でご希望に沿えない場合もありますので, 予めご了承ください.