

# 微細加工スライドガラスを用いた次世代一分子イメージング法の開発

谷井 孝至<sup>†</sup>

<sup>†</sup>早稲田大学 理工学術院 電子光システム学科

〒169-8555 東京都新宿区大久保 3-4-1

E-mail: tanii@waseda.jp

## Single-Molecule Fluorescence Imaging Using Nano-Manufactured Glass Slide

Takashi TANII<sup>†</sup>

<sup>†</sup>Department of Electronic and Photonic Systems,

School of Fundamental Science and Engineering, Waseda University

3-4-1 Ohkubo, Shinjuku, Tokyo 169-8555

E-mail: tanii@waseda.jp

### 概要

DNAやタンパク質などの生体分子同士の弱い分子間相互作用を、1分子レベルでリアルタイムにイメージングする次世代の1分子蛍光イメージング法を開発した。本手法は、蛍光顕微鏡本体を改良するのではなく、従来、大規模集積回路を製造するために用いられてきたナノスケールの微細加工を、生体分子を固定するスライドガラスに施すことにより達成される。本研究の目的は、スライドガラスの設計仕様と加工プロセスを確立し、実際の1分子観察を通して実行可能性を調査すること、およびナノ構造形状の最適化を図ることである。モデルタンパク質としてシャペロニンGroELとコシャペロニン GroESを用い、蛍光標識したGroELとGroESの1分子同士の結合解離をリアルタイムに観察した。これらの観察を通して、(1)ナノ構造内に固定したGroELの個数を計数する方法、(2)ナノ構造内に固定したGroELからの蛍光強度分布、(3)溶液中を自由に拡散するGroESが発する背景光強度、および、(4)濃度5  $\mu\text{M}$ のGroESが溶液中に存在しても、ナノ構造内に固定した1分子のGroELと、それと結合する1分子のGroESとを、それぞれ観察できることを示す。これらの結果は、従来の観察法では不可能であった弱い生体分子間相互作用を可視化できることを意味し、1分子蛍光観察が適用できるタンパク質の種類を飛躍的に増大させる。

### 1. 背景

タンパク質の機能と分子間相互作用の解析は分子生物学の中心的な課題である。とりわけ1分子蛍光観察は、分子間相互作用の素過程を可視化できる有力な手法である。試験管中の分子全体を対象とするアンサンブル実験では、個々の分子が勝手なタイミングで結合するため、その素過程を詳細に分析することは困難であるからである [1]。

1分子蛍光イメージングはこれまで主に全反射エバネッセント照明法を用いて行われてきた。この全反射エバネッセント照明法では、生体分子を固定するガラス表面に臨界角より大きな入射角で励起光を入射し、ガラスと水溶液との界面にエバネッセント場を生成することによって、界面に固定した生体分子からの蛍光を優先的に捕捉する。この方法によりこれまでに、F1-ATPase、ミオシン、キネシンといったタンパク質の機能が1分子レベルで解析されてきた [2-4]。一方、エバネッセント照明法では、高濃度の蛍光標識分子が溶液中に存在すると、これらの蛍光分子が発する高い背景光が障害となって注目する1分子を識別できなくなることが知られており、溶液中に溶解させることのできる蛍光分子の濃度の上限が50 nMに制限されていた。しかしながら、タンパク質の解離定数は一般に $\mu\text{M}$ レベルであり、したがってこのような高い解離定数をもつ比較的弱い相互作用を観察するためには、蛍光標識分子を50 nM

より1桁から2桁高い濃度で水溶液中に溶解させておく必要がある。

蛍光分子が $\mu\text{M}$ レベルで溶液中に溶解していても1分子蛍光観察を行えるようにするために、我々はゼロモード導波路を用いた新しい蛍光顕微鏡観察系を構築した。モデルタンパク質としてシャペロニンGroELとコシャペロニンGroESを用い、ゼロモード導波路を用いてGroEL-GroES間の結合解離を1分子レベルでリアルタイムに観察した。加えて、高いS/N比の下で1分子蛍光観察が実行できるようにゼロモード導波路の形状を最適化した。本論文では、この新しい1分子蛍光イメージング法の原理、最適化された導波路形状とその作成方法、およびGroEL-GroES間相互作用の1分子蛍光観察結果について述べる。

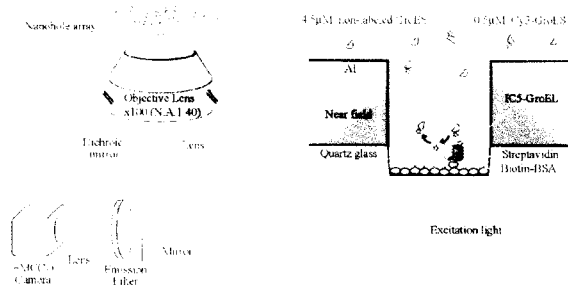


図1 ゼロモード導波路を用いた1分子蛍光イメージング法

## 2. ゼロモード導波路を用いた1分子蛍光観察の原理

図1に、GroEL-GroES間相互作用のリアルタイム1分子蛍光観察法の模式図を示す。一辺20 mm、厚さ130  $\mu\text{m}$ の熔融石英ガラスの表面に100 nm厚のアルミニウム薄膜が堆積されており、そのアルミニウム薄膜中に直径50 nmから150 nmの開口が配列形成される。この開口部はゼロモード導波路と呼ばれ、励起光の波長より小さな直径を持つ。ゼロモード導波路が作り込まれた石英ガラスは、スペーサを挟んでもう1枚のスライドガラスと対向して設置され、2枚のガラスの間のスペースに水溶液を流し込むことができる。タンパク質はこのスペースの溶液を交換することで導波路に導入される。初めに、ビオチン化したウシ血清アルブミンを流し込み、このタンパク質を開口部石英表面に吸着させる。ウシ血清アルブミンは特異的に石英表面に吸着し、GroELと結合してその活性を維持すると同時に、その後導入されるGroESが非特異的に石英表面に吸着す

ることを防ぐ役割も担う。次にストレプトアビジンを流し込むことにより、ビオチン-アビジン結合を介して、ウシ血清アルブミン表面のビオチンをストレプトアビジンで修飾する。続いてビオチン化GroELを流し込み、同じくビオチン-アビジン結合を介してウシ血清アルブミン表面にGroELを固定する。このとき、1つの開口部に固定されるGroELの個数はランダムでPoisson分布にしたがうことになるが、GroELの濃度と浸漬時間を上手に調整することにより、ほとんどの開口部には固定されないが、固定されるとすれば1開口あたり1分子のGroELが固定されるようにすることができる。最後に、一定の濃度のGroESを含むバッファを封入する。バッファには、GroEL-GroES間の結合に必要なATPや変性タンパク質に加え、活性酸素を除去し蛍光退色を防ぐ酵素系も含まれている。なお、GroELは633 nmの波長で励起するIC5蛍光色素で標識されており、他方のGroESは532 nmの波長で励起するCy3蛍光色素で標識されている。したがって分光により、GroELからの蛍光とGroESからの蛍光を区別することができる。

図1に示すように、励起光は対物レンズと石英を通してアルミニウム表面に照射され、蛍光はやはり石英と対物レンズを介して検出される。このとき、アルミニウム薄膜は入射励起光のほとんどを反射し、溶液中の蛍光色素のほぼすべてを励起光から遮蔽する。さらに、開口部の直径が励起光の波長よりも充分小さいため、励起光は開口部を通り抜けて伝搬することができず（それゆえ、ゼロモードと呼ばれる）、数十nmだけ溶液側に染み出して開口内部に閉じ込められる。したがって、この励起光によって蛍光するものは、開口底部に存在する蛍光色素のみとなる。はじめに633 nmの波長の励起光を照射して、どの開口部にGroELが固定されているかを調査する。そして、GroELが1個だけ固定された開口をマーキングする。次に励起波長を532 nmに変更してGroESからの蛍光を観察する。図1に示すように、GroESは溶液中を自由に拡散することができる。そして一定の確率で開口内部に侵入し、底部に固定したGroELと結合する。開口内部に侵入したGroESは、開口内部に閉じ込められた励起光によって照明されるため蛍光を発するが、高速かつ頻繁に出入りを繰り返すため、比較的弱い背景光を発するだけである。一方、GroESが一旦

GroELと結合すると、GroESは平均で約8秒間だけGroELと結合し、その結果、開口底部に約8秒間滞在するため、強い蛍光シグナルを発する。このようにして、開口底部に固定したGroELに特異的に結合している状態のGroESと、溶液中を自由に拡散している状態のGroESを1分子レベルで識別することができる。

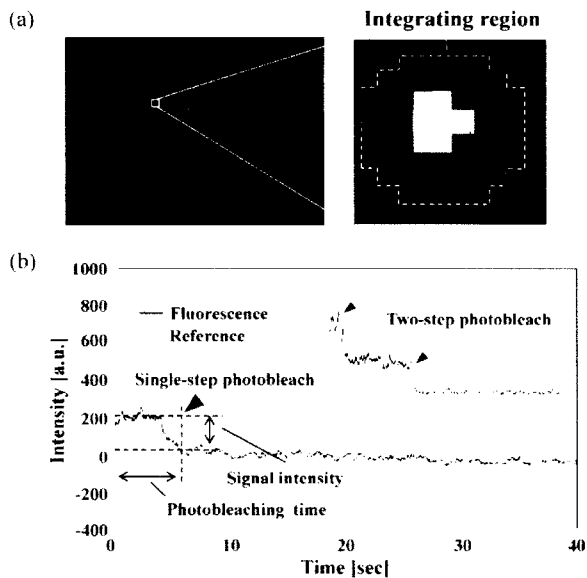


図2 ゼロモード導波路表面に固定されたGroELからの1分子蛍光

図2は開口底部に固定したGroELからの蛍光シグナルを示している。図2(a)に示すように、GroELが固定された開口部から蛍光スポットが観察される。図2(b)に示すように、1つの蛍光スポットの強度を時間軸上で観察すると、時間経過とともにある瞬間で蛍光が退色し、その後全く蛍光を発しなくなる。これは、長時間の励起光照射によって蛍光色素が退色したことによる。図2(b)のように1段階の量子退色であれば、開口部に固定されたGroELの個数が1個であることが保証される。一方、図2(b)挿入図に示されるように、退色が多段階で起こった場合には、複数のGroELがその開口部に固定されているか、もしくは1個のGroELが複数の蛍光色素分子で標識されているかのどちらかの状態と考えられる。このような多段階の量子退色が観測される場合には、解析が複雑化するため、その蛍光シグナルを解析から除外する。ただし、1開口あたりに固定されるGroELの個数はPoisson分布にしたがうので、図2に示す退色実験は固定条件を決定する最初の段階だけに限られる。

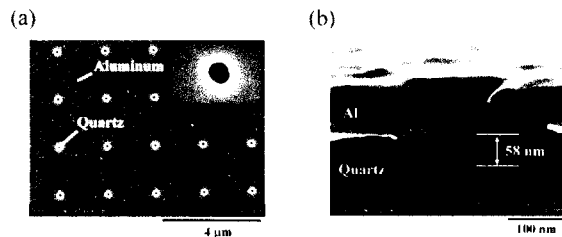


図3 石英底部を約60nmエッチングしたゼロモード導波路の走査型電子顕微鏡写真。(a)上面図、(b)断面図。

### 3. ゼロモード導波路の作成と構造最適化

ゼロモード導波路は通常の半導体微細加工プロセスを介して作製される。ただし、金属残渣など自家蛍光をもつ材料をプロセスから極力排除する必要がある。さらに蛍光色素をクエンチングする要因となる金属残渣も除去する必要がある。このため、我々は、通常のエッチングプロセスでなく、リフトオフとエッチングとを組み合わせたプロセスを採用した。初めに、石英基板を硫酸：過酸化水素水(3:1)溶液で洗浄する。次に、ヘキサメチレンジシラザン(東京応化工業)をスピン塗布し、石英表面を疎水化する。そして、その疎水性表面に、SAL601電子線ネガ型レジスト(ROHM AND HAAS)を塗布する。塗布膜厚は約300 nmである。さらに、エスパーサ(昭和電工)をスピン塗布し、電子線照射時の帯電を防止する。電子ビーム描画は50 keV、100pAの電子ビームで電子ビーム露光装置ELS-7500(Elionix)を用いて行った。電子ビーム露光後、基板をMFCD26(ROHM AND HAAS)に7分間浸漬してパターンを現像し、さらに酸素プラズマに短時間暴露することによりレジスト残渣を除去した。そして、電子ビーム蒸着装置EDX-6D(Ulvac)を用いて100 nm厚のアルミニウム薄膜を真空中で石英表面に堆積した。その後、2.3%リン酸、0.1%硝酸、0.1%酢酸の水溶液に3分間浸漬してレジストパターン周辺のアルミニウムのバリを除去し、さらに、Remover1165(ROHM AND HAAS)に25分間浸漬してアルミニウム層をリフトオフし、開口配列を形成した。最後に、再度、容量結合式反応性イオンエッチング装置RIE-10NR(Samco)を用いて酸素プラズマに3分間暴露することによりレジスト残渣を除去した。開口底部の石英をさらにエッチングする場合には、同じくRIE-10NRを用

いて、トリフルオロメタンのプラズマに基板を暴露することにより、アルミニウム層をマスクとして石英をエッチングした。

#### 4. ゼロモード導波路を用いた1分子蛍光観察結果

図3は上記のプロセスを通して作製されたゼロモード導波路の形状を示している。アルミニウム断面はリフトオフプロセスを採用することにより滑らかな表面をもち、それゆえ、分子が拡散して開口底部に入り込みやすくなっている。なお、図はアルミニウム薄膜を開口したのち、さらにアルミニウム開口部をエッチングマスクとして石英表面を約60 nmだけエッチングしたものである。

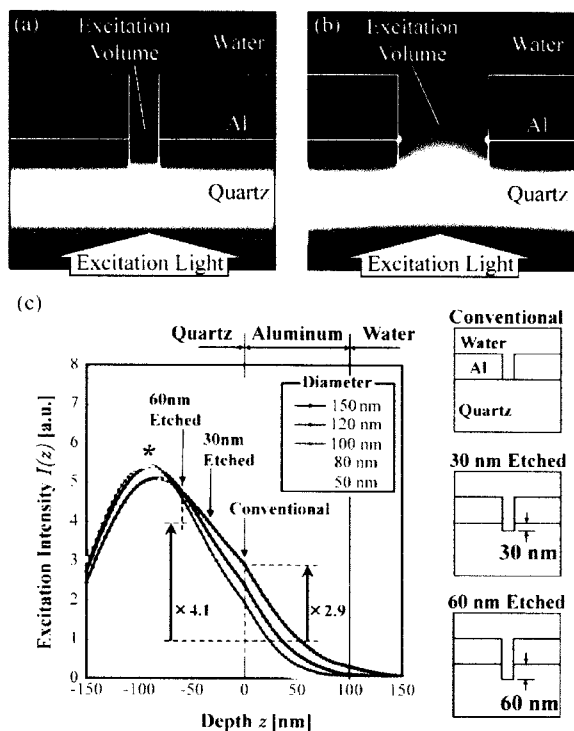


図3 入射励起光（波長：635 nm）の強度分布。

(a) 直径50 nmの導波路近傍断面、(b) 直径150 nmの導波路近傍断面、(c) 開口部の中心軸に沿った励起光強度分布

励起光は石英側から照射する。このときアルミニウム薄膜はこの励起光を反射するため、理想的な条件では、アルミニウムと石英との界面近傍に定在波が立ち、界面に沿った入射光強度はゼロとなる。そして、界面から4分の1波長分だけ石英側に入ったところが入射光強度の最大値になる（図4(c)に\*で表示）。図4は計算機シミュレーションに

よって、導波路近傍の入射光強度分布を計算したものである。確かに界面から4分の1波長分だけ石英側に入ったところに入射光のピークが現れている。そして、開口内部に侵入するにつれて強度が指数関数的に減少する。また、開口径が小さくにつれて、開口内部での励起光強度の減衰が急激になることも計算結果は示している。この結果、直径を50 nmから150 nmに増大させても励起光強度は2.9倍にしかならないが、60 nmだけ石英を掘り下げると、励起光強度は4.1倍にまで増大されることが分かる。

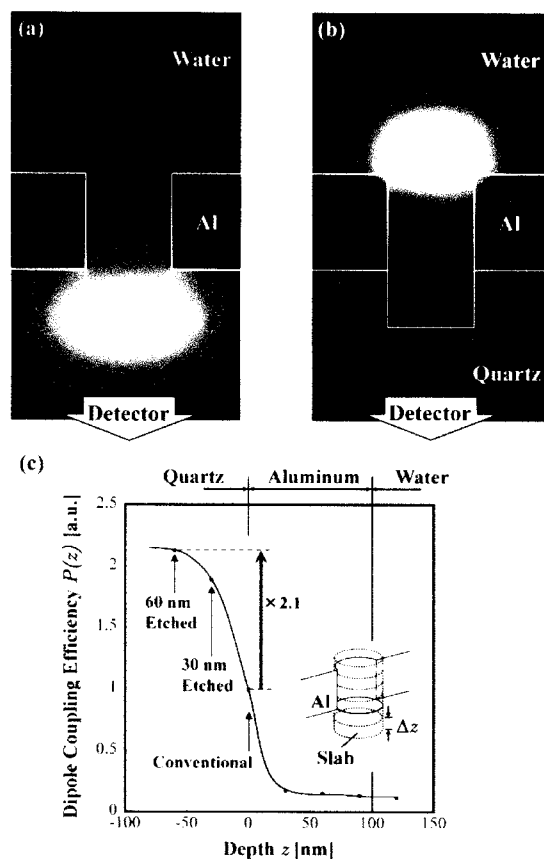


図4 蛍光（波長670 nm）強度分布。(a) 開口底部に固定された分子からの蛍光、(b) 溶液中を拡散している分子からの蛍光、(c) 開口部の中心軸にある分子から対物レンズまで伝搬する蛍光強度。

光源の強度を増大させると石英表面の温度が上昇し、タンパク質の機能活性に影響を与える。したがって、光源強度はなるべく低く抑えるのが好ましい。しかしながら、微弱な1分子蛍光を検出するためには強い励起光で励起して、強度の大きな蛍光を検出することが望ましい。両者のト

レードオフを解消するには、図3に示すように、比較的弱い励起光で効果的に蛍光分子を励起できる、60 nmだけエッチングした導波路が有用であることが分かる。加えて、図4に示すように、導波路底部のエッチングによって、分子が開口内近接場から石英を掘り下げた遠方場にまで拡散できるようになり、その結果、分子が発する蛍光も効率的に対物レンズに伝搬するようになる。図4(c)に示すように、60 nmだけ導波路底部の石英表面を掘り下げることで、対物レンズに到達する蛍光強度は2.1倍に増大する。

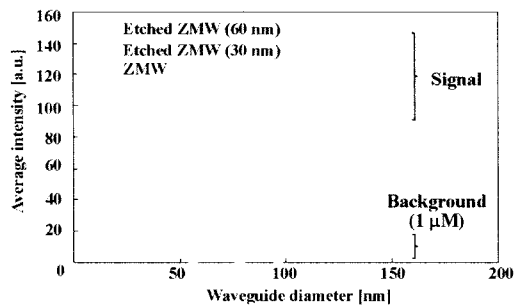


図5 導波路表に固定した1分子からの蛍光シグナル強度と溶液中に浮遊している濃度1  $\mu\text{M}$ の蛍光分子からの背景光強度

図5はゼロモード導波路表面に固定した1分子からの蛍光の平均強度を示している。前述したように、開口部の直径を増大すると、励起光強度が増大するため、蛍光シグナル強度が増加する。一方、図中には、開口底部の石英表面を30 nmだけエッチング場合と60 nmだけエッチングした場合の平均蛍光シグナル強度も示されており、石英をエッチングするとやはり蛍光シグナル強度が増大する。この蛍光シグナル強度は、あらかじめ開口底部に固定しておいた分子からの蛍光強度を表していると同時に、開口底部に固定した分子と特異的に結合している分子からの蛍光シグナルの平均強度を表していると解釈することもできる。

図5にはさらに、濃度1  $\mu\text{M}$ の蛍光分子を溶液中に浮遊させた場合にこれらの分子が発する背景蛍光強度も示している。シグナル強度と比較して、濃度1  $\mu\text{M}$ の背景光強度が十分に小さく、それゆえ、十分に高いS/N比の下で溶液中に浮遊している分子（背景光）と、開口底部に固定された分子と特異的に結合している分子（シグナル蛍光）とを識別できることを図5は示している。すなわち、ゼロモード

導波路は、回折限界を超えて励起光を近接場に閉じ込めることにより、高濃度の蛍光色素存在下で1分子同士の結合を可視化する。なお、直径96 nm、石英掘り下げ深さ60 nmの導波路で最も高いS/N比 80を獲得した。

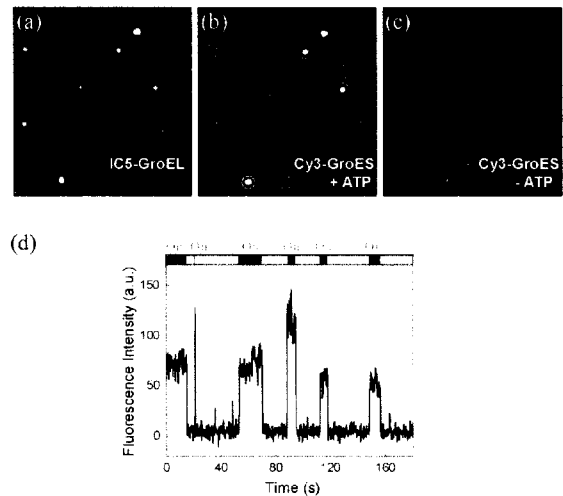


図6 Chaperonin GroEL-GroES間相互作用の1分子イメージング。(a) 開口底部に固定したGroELからの1分子蛍光、(b) 開口底部に固定したGroELと特異的に結合するGroESからの1分子蛍光。(a)の蛍光スポットに対応した導波路に円形のマーキングがされている。(c) 溶液中にATPを溶解させない場合、GroEL-GroES間の特異的結合に対応する蛍光シグナルは観測されない。(d)1つの開口から観察される蛍光シグナルの時間変化。ATPを溶解させた場合、0nと記した時間帯でGroESがGroELに結合し、それ以外では解離している。

図6は、試作したゼロモード導波路を用いてGroEL-GroES間の特異的相互作用を1分子レベルでリアルタイムに観察した結果を示している。はじめに、図6(a)に示すように、633 nmの励起波長で開口底部に固定したGroELを検出する。図に示されるように、一部の開口だけに固定されていることから、Poisson分布に基づいて、観察された蛍光スポットはほぼすべて、1分子からの蛍光であると結論できる。GroELが観察された開口には、図6(b)で示すように円形のマーキングをしておく。次に、励起光の波長を532 nmにしてGroESからの蛍光を観察する。図6(b)では、ATPを含む、GroEL-GroES間相互作用に必要な分子がすべて、溶液に含まれている。したがって、図6(b)に示すように、マーキングした開口部からのみ蛍光スポットが観

測される。一方、図6(c)に示すように、溶液中にATPが存在しない場合には、この蛍光スポットは観測されない。さらに、図6(b)中のマーキングされた1つの開口部に注目して蛍光強度の時間変化を観測すると、図6(d)に示されるようになる。蛍光スポットが明滅を繰り返し、蛍光スポットが観測されるOn時間と、蛍光スポットが観測されないOff時間とに明瞭に区別できることが分かる。図6(c)に示されるATP依存性から、この蛍光スポットの明滅は、溶液中を浮遊しているGroESが開口内部に侵入し、開口底部に固定したGroELと一定時間結合したのち解離し、そしてまた結合することに対応していると考えられる。ここで重要な点は、溶液中に0.5  $\mu\text{M}$ の蛍光標識GroESと4.5  $\mu\text{M}$ の非標識GroESが導入されており、合わせて5  $\mu\text{M}$ となっていることである。これは、細胞中で生理的に活性なGroELの濃度とほぼ等しい。しかも、0.5  $\mu\text{M}$ の蛍光標識GroESは、自由に拡散して近接場内に侵入することができ、GroELと結合していなくても蛍光を発しているにも関わらず、この背景光強度（図6(d)のベースライン）は充分小さく、GroELと特異的に結合しているときの蛍光強度(On時間の蛍光強度)と明確に区別できる。これは、図5に示したように、開口部の直径と底部石英の掘り下げ深さを最適化したことによる。なお、5  $\mu\text{M}$ のすべてのGroESを蛍光標識すると、間断なくGroESがGroELに結合して常に強い蛍光シグナルが観察されることになるため、このモデル系では敢えて、4.5  $\mu\text{M}$ の非標識GroESを導入することによって、断続的な蛍光シグナルを検出できるようにした。

## 5. まとめ

本研究では、細胞内にある場合と同じ濃度で1分子蛍光観察を行う場合に、その濃度が従来の1分子蛍光の濃度限界を大きく超過し、それゆえ、その蛍光標識分子の機能解析を困難にしていた問題について、蛍光標識分子を固定するスライドガラスに半導体微細加工を施し、スライドガラス表面にゼロモード導波路を作り込むことによって解決することを試みた。ゼロモード導波路の直径と、底部石英の掘り下げ深さを最適化することによって、開口底部に固定された分子が発する蛍光シグナル強度と、溶液中を自由に拡散する分子が発する背景光強度との比を80:1にまで

高めることに成功し、さらに、この最適化されたゼロモード導波路を用いてシャペロニンGroELとコシャペロニンGroES間の結合解離を1分子レベルでリアルタイムに検出することに成功した。

本研究の成果を基盤として、すでに、以下に示すような研究の進展があった。(1)GroEL-GroES間の結合解離を細胞内濃度で行った結果、この結合様式が、低濃度における実験結果に基づいてこれまでに提案されていたTwo-Timerモデルにしたがうこと、(2) GroESを開口底部に固定して、固定されたGroESに対して結合するGroELを観察しても全く同じ結果を得られること、(3)2色の蛍光色素でGroESを染め分け、さらに、その2色の蛍光色素とは異なる蛍光色素でGroELを標識し、開口底部に固定したGroESに対して、GroELとGroESの複合体がどのようにこの固定GroESと結合するのかをゼロモード導波路を用いて解析した結果、GroEL-GroES間の結合モデルは、いわゆるTwo-Stroke型結合モデルではなく、Football型結合モデルで説明できることを見出した[5-7]。これらのGroEL-GroES間の解析を通して得た解析技術は、より多くの異なる種類のタンパク質の分子間相互作用解析への応用を可能にした。それを踏まえて我々は現在、膜タンパク質を含む数種のタンパク質の1分子解析に、開発したゼロモード導波路を活用している。上記の結果は、これまでその解析が困難であったタンパク質の機能を解明するための有力なツールの1つとして、本研究で開発したゼロモード導波路が役立てられることを意味している。

## 謝辞

本研究は(財)高柳記念電子材料技術振興財団の助成を受けました。また、本研究は東京大学 船津高志 教授、同上野太郎 助教、早稲田大学 三宅丈雄 博士(現 東北大学)、ならびに同 島本直伸 博士(現 理化学研究所)との共同研究として進められました。深く感謝致します。

## 文献

- [1] Levene, M. J.; Korklach, J.; Turner, S. W.; Foquet, M.; Craighead, H. G.; Webb, W. W.; Science 2003, 299, 682-686.

- [2] Funatsu, T.; Harada, Y.; Tokunaga, M.; Saito, K.; Tanagida, T.: *Nature* 1995, 374, 555–559.
- [3] Nishizaka, T.; Oiwa, K.; Noji, H.; Kimura, S.; Muneyuki, E.; Yoshida, M.; Kinosita, K. Jr.: *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2004, 11, 110–112.
- [4] Lu, L. H.; Xun, L. X.; Xie, S.: *Science* 1998, 282, 1877–1882.
- [5] Miyake, T.; Tanii, T.; Sonobe, H.; Akahori, R.; Shimamoto, N.; Ueno, T.; Funatsu, T.; Ohdomari, I.; Anal. Chem. 2008, 80, 6018.
- [6] Suzuki, M.; Ueno, T.; Iizuka, R.; Miura, T.; Zako, T.; Akahori, R.; Miyake, T.; Shimamoto, N.; Aoki, M.; Tanii, T.; Ohdomari, I.; Funatsu, T.: *J. Biol. Chem.* 2008, 283, 23931.
- [7] Sameshima, T.; Iizuka, R.; Ueno, T.; Wada, J.; Aoki, M.; Shimamoto, N.; Ohdomari, I.; Tanii, T.; Funatsu, T.: *J. Biol. Chem.* 2010, in press.