

整理番号	H - J -	報告者氏名	横田 浩章
------	---------	-------	-------

研究課題名

ダイヤモンドナノ粒子を用いた蛍光プローブの開発と 1 分子バイオイメージングへの応用

<代表研究者> 機関名：光産業創成大学院大学 職名：准教授 氏名：横田 浩章

<共同研究者> 機関名： 職名： 氏名：
 機関名： 職名： 氏名：
 機関名： 職名： 氏名：
 機関名： 職名： 氏名：

<研究内容・成果等の要約>

本研究では、従来のバイオイメージングに使用されてきた蛍光物質（蛍光色素、蛍光タンパク質、半導体超微粒子 (Qdot) など）と異なり、褪色や明滅（ブリンキング）を示さないという大きな特長をもち、また特殊な蛍光-磁気共鳴カップリングを有する蛍光ダイヤモンドナノ粒子を用いて、従来の蛍光プローブでは達成できなかった様々な高精度 1 分子計測の実現を目指した。具体的には、DNA 結合タンパク質 1 分子の運動の観察の実現に向けて、ダイヤモンドナノ粒子の表面修飾、DNA 結合タンパク質への標識、磁気共鳴-蛍光 1 分子イメージング顕微鏡の構築を行った。

(1) 蛍光ダイヤモンドナノ粒子の調製と表面修飾

特異的な結合を介してタンパク質に標識をするため、市販の蛍光ダイヤモンドナノ粒子（直径 10nm・20nm・100nm）の表面修飾を行った。我々はポリエチレングリコール (PEG) を基盤とした基板表面コーティング法の改良によってガラス基板上へのタンパク質の非特異吸着を 1 分子蛍光イメージングで使われている従来法より 1/10 に抑制する表面コーティング法を開発している (*Chem. Lett.* 2009)。この表面コーティング技術を応用し、蛍光ダイヤモンドナノ粒子へのタンパク質の非特異吸着を劇的に減少させ、ビオチン-アビジンの特異的な結合を介してタンパク質に標識できるように、アビジン PEG 蛍光ダイヤモンドナノ粒子を作製した。

(2) 蛍光ダイヤモンドナノ粒子の DNA 修復タンパク質への標識

すでに発現・精製が終了している部位特異的にビオチンを修飾した DNA 修復タンパク質（大腸菌のヌクレオチド除去修復で損傷 DNA を切除する UvrD）に、(1) で作製した蛍光ダイヤモンドナノ粒子を特異的に標識することに成功した。

(3) 磁気共鳴-蛍光 1 分子イメージング顕微鏡の構築

顕微鏡本体・励起レーザー・超高感度カメラなどからなる蛍光 1 分子イメージング顕微鏡に光検出磁気共鳴の発生に必要な高周波発生関連の装置を組み込み、磁気共鳴-蛍光 1 分子イメージング顕微鏡を構築した。そして光検出磁気共鳴スペクトルを得た。

<研究発表（口頭、ポスター、誌上別）>

【口頭】

1. **横田浩章**・平野美奈子、光学顕微鏡と基盤とした生体分子 1 分子計測技術の研究開発、京都美術工芸大学との包括的連携・協力に関する協定書調印式（光産業創成大学院大学、2014 年 11 月）
2. **横田浩章**・平野美奈子、光学顕微鏡と基盤とした生体分子 1 分子計測技術の研究開発、イノベーション戦略推進本部 CD 研修会（光産業創成大学院大学、2014 年 12 月）
3. **横田浩章**、DNA 結合タンパク質の蛍光 1 分子イメージング 第 19 回生命分子ダイナミクスセミナー（東北大学多元物質科学研究所、2015 年 7 月、招待講演）
4. **横田浩章**、蛍光 1 分子バイオイメージングにおける蛍光プローブとナノ光学、一蛍光ダイヤモンドナノ粒子と近接場照明を中心に、先進理工学研究科セミナー（電気通信大学、2015 年 7 月）
5. **横田浩章**、タンパク質の 1 分子動態計測～1 分子直視と 1 分子顕微鏡開発～、第 12 回バイオオプティクス研究会（TKP 浜松アクトタワーCC（浜松市）、2015 年 11 月、招待講演）
6. **横田浩章**、蛍光 1 分子イメージング技術に基づいた高精度蛍光顕微鏡法の開発、【ワークショップ】細胞機能を解析し創る新技術：1 分子から時間空間制御、日本分子生物学会第 38 回年会（神戸ポートアイランド（神戸市）、2015 年 12 月、招待講演）
7. 深澤宏仁、奥野大地、平野美奈子、大西幸子、一ノ瀬純也、井出徹、**横田浩章**、生体分子の 1 分子動態計測～高速・高精度計測を目指した研究開発～、第 13 回バイオオプティクス研究会（前橋テルサ（前橋市）、2016 年 12 月、招待講演）

<研究の目的、経過、結果、考察>

【背景・目的】

近年登場した光学顕微鏡をベースとした 1 分子計測技術によって、生体分子 1 分子を集団平均することなく実時間で追跡することができるようになり、生体分子のダイナミクスの理解が進んでいる。タンパク質の蛍光 1 分子直視はタンパク質のダイナミクスを直接理解する道筋を与えてくれるが、その感度や精度は標識する蛍光プローブの性質に大きく左右される。現在、1 分子観察用の蛍光プローブとして蛍光色素、蛍光タンパク質、半導体超微粒子 (Qdot) が一般的に使われているが、どれも 3 つの本質的な限界を有している。3 つの本質的な限界とは、発光安定性、選択観察、細胞毒性である (表 1)。

これに対し、ダイヤモンドナノ粒子中に存在する窒素-格子空隙中心は、発光安定性が高く、無褪色、無ブリンキングの特性をもっている (表 1)。その特殊な蛍光-磁氣的性質により、蛍光ダイヤモンドナノ粒子を生体分子に標識できれば、生体分子の長時間 1 分子イメージングが可能になるばかりではなく、従来の方法では検出することができなかった生体分子のダイナミクスが高空間分解能で検出可能になる (*J. Nanosci. Nanotechnol.* 2015) など、従来の蛍光プローブでは達成できなかった幅広い応用が可能と考えている。本研究では、その実現に向けてダイヤモンドナノ粒子の表面修飾及び DNA 結合タンパク質への標識を行い DNA 結合タンパク質 1 分子の運動の観察につなげることを目的とした。

表 1：蛍光プローブの特性比較

	蛍光ダイヤモンド ナノ粒子	蛍光色素	半導体超微粒子 (Qdot)	蛍光タンパク質
光褪色耐性	+++	++	+++	+
ブリンキング耐性	+++	++	+	+
選択観察	+++	+	++	+
細胞毒性	無毒	有毒	非常に有毒	無毒
磁気共鳴による蛍光変調	可	不可	不可	不可

【経過・結果・考察】

(1) 蛍光ダイヤモンドナノ粒子の調製と表面修飾

ダイヤモンドナノ粒子は疎水性なので、表面を親水的にしないと水溶液中ではまったく分散しない。また、適切な表面修飾を行わなかった場合、大量のタンパク質が非特異的にダイヤモンドナノ粒子表面に吸着することを見いだしている。

そこで、まず、市販のダイヤモンドナノ粒子を用いて、その表面状態の改変に取り組んだ。550°C (空気中) で表面を酸化し、その後硫酸/硝酸 (9:1) 溶液、0.1 N の水酸化ナトリウム水溶液、0.1 N の塩酸で処理することで、ダイヤモンドナノ粒子の表面に親水的なカルボキシル基を形成させた。こうすることによって、水溶液中で分散できるようにした。さらに、グリシドールと無水コハク酸を反応させ、次に述べる PEG による表面修飾に用いるカルボキシル基の表面密度を上げた。実際、これらの反応により、蛍光ダイヤモンドナノ粒子の水への分散性が飛躍的に向上した。

次に、特異的な結合を介してタンパク質に標識をするため、市販の蛍光ダイヤモンドナノ粒子 (直径 10nm・20nm・100nm) の表面修飾を行った。我々はポリエチレングリコール (PEG) を基盤とした基板表面コーティング法の改良によってガラス基板上へのタンパク質の非特異吸着を 1 分子蛍光イメージングで使われている従来法より 1/10 に抑制する表面コーティング法を開発している (*Chem. Lett.* 2009)。この表面コーティング技術を応用し、蛍光ダイヤモンドナノ粒子へのタンパク質の非特異吸着を劇的に減少させ、ビオチン-アビジンの特異的な結合を介してタンパク質に標識できるようにすることを目指した。

具体的には、蛍光ダイヤモンドナノ粒子の表面のカルボキシル基を架橋剤でアミノ基がついたビオ

チン PEG で反応させ (図 1)、そのビオチンにアビジンをコートすることでアビジン PEG 蛍光ダイヤモンドナノ粒子を作製した。この表面修飾が機能していることは、ビオチン PEG あるいは PEG で表面コーティングしたガラス基板を使って確認した (図 2)。

本研究では、蛍光ダイヤモンド

ナノ粒子の水溶液中での分散性の改善と、タンパク質への特異的標識に向けた PEG による表面修飾を行った。市販の蛍光ダイヤモンドナノ粒子は、粒子径が一様でない。今回は粒子径の大小にかかわらず、表面修飾が機能していることを確認したが、超遠心分離によって粒径の小さい蛍光ダイヤモンドナノ粒子のみ選別する必要性が出てくるであろう。

(2) 蛍光ダイヤモンドナノ粒子の DNA 修復タンパク質への標識

すでに発現・精製が終了している部位特異的にビオチンを修飾した DNA 修復タンパク質 (大腸菌のヌクレオチド除去修復で損傷 DNA を切除する UvrD) に、(1) で作製したストレプトアビジン PEG コート蛍光ダイヤモンドナノ粒子 (直径 100nm および 20nm) を特異的に標識した。標識の確認は、蛍光ダイヤモンドナノ粒子と DNA 修復タンパク質に標識した色素 Cy5 を同時に蛍光 1 分子イメージングすることで行った。図 1 にその例を示す。Cy5 の褪色が 4 段階で起こったことから、4 分子の DNA 結合タンパク質が蛍光ダイヤモンドナノ粒子に標識されていることが示唆される (図 3)。

本研究により、ビオチン-アビジン相互作用を利用して DNA 修復タンパク質に特異的に蛍光ダイヤモンドナノ粒子を標識することができた。今後は、(1) で述べた粒径の小さい蛍光ダイヤモンドナノ粒子のみ選別を行い、タンパク質と蛍光ダイヤモンドナノ粒子の混合比を変化させて、1:1 に標識する条件を決めることが求められる。この標識には DNA 結合タンパク質に標識されていない蛍光ダイヤモンドナノ粒子を除くことが有効で、DNA 結合タンパク質のアフィニティクロマトグラフィーが使用できると考えている。この未標識の蛍光ダイヤモンドナノ粒子の除去、蛍光ダイヤモンドナノ粒子標識した DNA 結合タンパク質と DNA との 1 分子間相互作用の観察にも有効である。

一方、モータータンパク質であるアクチンフィラメントに蛍光ダイヤモンドナノ粒子を標識した (図 4)。そして、この蛍光ダイヤモンドナノ粒子



図 1: 凍結乾燥中の表面を PEG 修飾した蛍光ダイヤモンドナノ粒子。

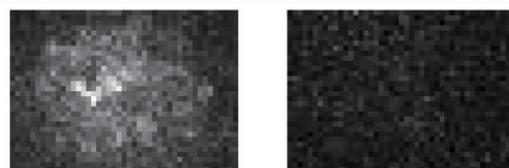


図 2: 直径 20nm のアビジン PEG 蛍光ダイヤモンドナノ粒子のビオチン結合能の確認。ビオチン PEG で表面を修飾した基板のみに多数の吸着が見られた。

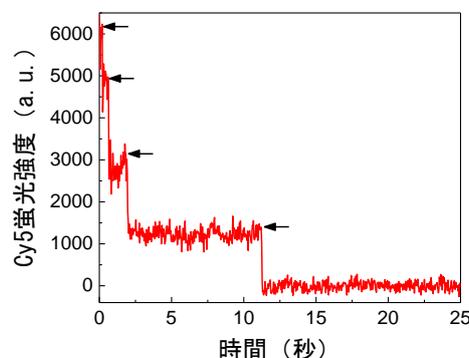


図 3: 蛍光ダイヤモンドナノ粒子 1 個に結合した DNA 修復タンパク質分子数の 1 分子定量。蛍光ダイヤモンドナノ粒子と蛍光色素 Cy5 で標識した DNA 修復タンパク質の同時蛍光 1 分子イメージングを行った。グラフは Cy5 の蛍光強度の時間変化を示す。Cy5 の褪色が矢印で示す 4 段階で起こっていることから 4 分子の DNA 修復タンパク質が蛍光ナノダイヤモンドに特異的に結合していることが示唆される。

アクチンフィラメント
(テトラメチルローダミン
ファロイジン標識)



蛍光ダイヤモンドナノ粒子



図 4: 蛍光ダイヤモンドナノ粒子のアクチンフィラメントへの標識。ガラス基板に固定したビオチン化アクチンをまばらに含むアクチンフィラメント (テトラメチルローダミンファロイジンで標識・上画像) に、黄色の矢印で示す蛍光ダイヤモンドナノ粒子 (下画像) が標識されていることがわかる。アクチンフィラメントと蛍光ダイヤモンドナノ粒子は、デュアルビュー光学系で同一視野を同時観察した。

標識アクチンフィラメントのミオシン上での滑り運動を観察した (図5)。この結果は蛍光ダイヤモンドナノ粒子が *in vitro* 系での蛍光1分子イメージングにも有効であることを示している。

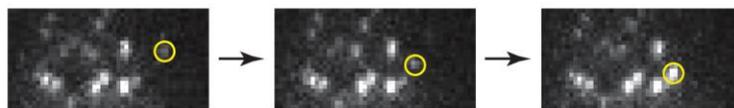


図5: 直径 20nm の蛍光ダイヤモンドナノ粒子で標識したアクチンフィラメントのミオシン上での滑り運動. ○で示す蛍光ダイヤモンドナノ粒子の左下方向への運動を観察した。

(3)磁気共鳴-蛍光1分子イメージング顕微鏡の構築

顕微鏡本体・励起レーザー・超高感度カメラなどからなる蛍光1分子イメージング顕微鏡に光検出磁気共鳴の発生に必要な高周波発生関連の装置を組み込み、磁気共鳴-蛍光1分子イメージング顕微鏡 (図6, 7) を構築した。この顕微鏡を用い、実際に光検出磁気共鳴スペクトルを得た (図8)。

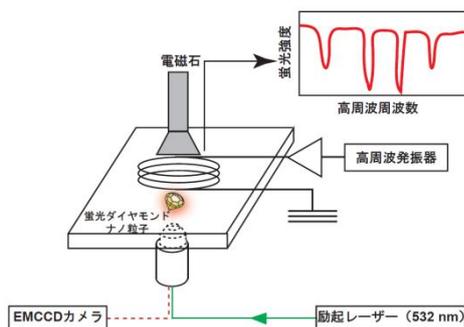


図6: 磁気共鳴-蛍光1分子イメージング顕微鏡の模式図。

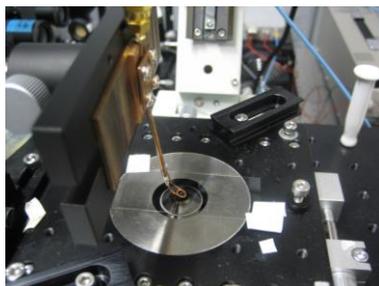


図7: 磁気共鳴-蛍光1分子イメージング顕微鏡のステージ付近の写真。中央に見えるのが銅線で作製した高周波印加用のコイル。

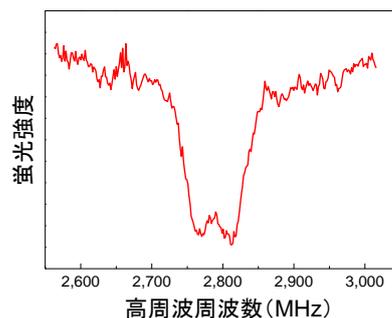


図8: 光検出磁気共鳴スペクトル. 2,790MHz 付近の高周波の印加による蛍光強度の減少をイメージングした。

【まとめ】

本研究では、蛍光ダイヤモンドナノ粒子を用いて、従来の蛍光プローブでは達成できなかった様々な高精度1分子計測の実現を目指した。具体的には、DNA結合タンパク質1分子の運動の観察の実現に向けて、ダイヤモンドナノ粒子の表面修飾、DNA結合タンパク質への標識、磁気共鳴-蛍光1分子イメージング顕微鏡の構築を行った。

現時点では、蛍光ダイヤモンドナノ粒子で標識したタンパク質1分子の運動の高精度イメージングの報告はない。また、本研究の対象としたDNA結合タンパク質については、DNA上での運動、特に実際起っているとされる回転運動について、1分子直視された報告がない。このDNA結合タンパク質のDNA上での回転運動を、本研究を発展させて検出できればDNA結合タンパク質のDNA状の運動がDNAらせんに沿った運動かどうかを判別できメカニズムを理解する上で画期的である。我々は、大腸菌のDNA修復タンパク質である非六量体型ヘリカーゼUvrDの結合モードの違いをクリアに1分子観察し (*Chem. Lett.* 2009 等)、二量体あるいは三量体でDNAを巻き戻していることを明らかにしている (*Biophys. J.* 2013)。これは1分子直視によってヘリカーゼの結合分子数を直接定量した初めての例である。また、ヒトのDNA修復で損傷を認識するタンパク質複合体がDNA上での1次元拡散運動をしていることを見いだしている。

本研究の内容は、DNA結合タンパク質のみならず、様々な生体分子の高精度長時間1分子イメージングに応用可能である。本研究および、本報告書でも紹介したアクチンフィラメントなどの他のタンパク質の高精度長時間1分子イメージングを並行して推進していきたい。

【謝辞】

本研究に関して助言をくださった京都大学大学院工学研究科の五十嵐龍治博士と外間進悟博士および、本研究課題に助成していただいた泉学技術振興財団の皆様に、この場を借りて厚く御礼申し上げます。