

フェムトリットル溶液チャンバーを用いた生体分子1分子計測

野地博行 大阪大学産業科学研究所

hnoji@sanken.osaka-u.ac.jp

✓ 要旨

大きさ数 μm 、体積数 $\text{f}\ell$ の、世界最小の溶液チャンバーアレイを開発した。このチャンバー中に反応溶液を閉じ込めるだけで、数少ない分子数でも濃度としては検出域に入ってくる。そのため、酵素 1 分子の触媒反応によって生成してくる分子を検出することに成功した。また、回転分子モーターである $\text{F}_1\text{-ATPase}$ 1 分子をこのチャンバー中に閉じ込め、分子を逆回転させることで、 $\text{F}_1\text{-ATPase}$ が 1 回転あたりに合成する ATP の分子数を求めることに成功した。

✓ マイクロチャンバーの作製

$1\text{f}\ell$ は、 $1\mu\text{m}$ の立方体の体積に相当する。既存の $\text{f}\ell$ の反応系として、リポソームを用いた系や、油中の液滴を用いた系などが挙げられる。しかし、これらは大きさの均一性、安定性などに著しく欠けるため、1 分子測定には利用できない。そこで、本研究では、マイクロ加工技術を用いて polydimethylsiloxane(PDMS)とよばれるシリコン樹脂の表面にミクロン単位の穴のパターンを作成し、これを微小溶液チャンバーとして利用した。今回は、1 分子酵素アッセイ用には体積 $30\text{f}\ell$ (深さ $1.5\mu\text{m}$ 、直径 $2.52\mu\text{m}$)、 $\text{F}_1\text{-ATPase}$ の実験用には体積 $6\text{f}\ell$ (深さ $1.5\mu\text{m}$ 、直径 $1.13\mu\text{m}$) の微小溶液チャンバーを用意した(図 1 上)。以降、これらをマイクロチャンバーと呼ぶ。PDMS は平滑な基板表面にファンデルワールス力だけで密着するため、顕微鏡観察用のガラススライド上に押し付けるだけで PDMS シートはガラスに密着する。そのため、ガラスと PDMS シートの間に水溶液を挟むだけで溶液をチャンバー中に充填することができた(図 1 下)。

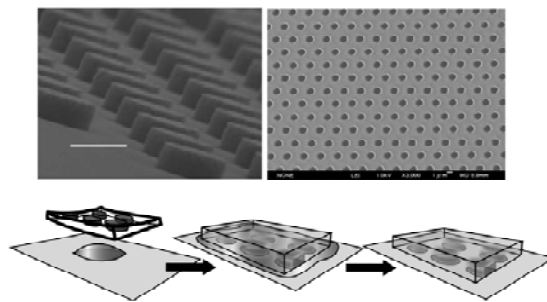


図1.マイクロチャンバー

上図.シリコン基盤上に作成したマイクロシリンダーと、これを鋳型として作成したPDMSシート。

下図.溶液をPDMSシートとガラスの間に挟み、溶液を封入。

✓ 1分子酵素アッセイの例

fL 空間にとじこめるだけで酵素の1分子活性測定が可能であることを実証するため、市販されている β -galactosidase の酵素活性の検出溶液を、マイクロチャンバーに封入した。このアッセイでは、 β -galactosidase が無蛍光の基質を加水分解するたびに蛍光色素(fluorescein)が1分子生成する。したがって、顕微鏡下において蛍光強度の上昇として酵素反応を測定することができる。酵素濃度の高い溶液をマイクロチャンバーに閉じ込めた場合、各チャンバーの蛍光強度は時間とともにほぼ均一に上昇した。次に、酵素濃度を下げることで、1チャンバーあたり酵素の分子数が1以下になるように酵素を閉じ込めた。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。実際の顕微鏡観察でも、各チャンバーごとに暗い・少し明るい、非常に明るいものが混ざった画像が得られた(図2)。図2右に、蛍光強度の1分間あたりの上昇率のヒストグラムを示す。分布は明らかに量子化されており、左から0個、1個、2個、3個の酵素分子を含むチャンバーの分布のピークが同定された。このように、この手法によって定量的に1分子の酵素活性を計測が可能であることが示された(参考文献1)。

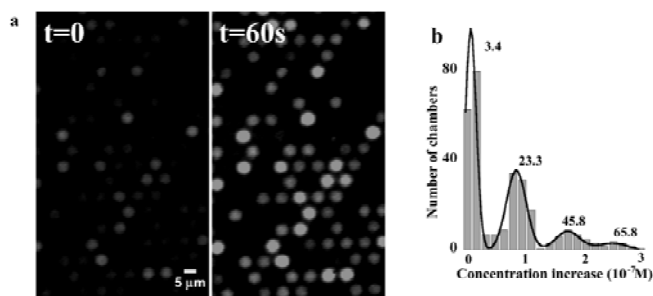


図 2. β ガラクトシダーゼの酵素反応 1 分子イメージング。酵素分子は、0,1,2,3 個と確率的にマイクロチャンバーに閉じ込められた。1 分間あたりの反応生成物からの蛍光強度のヒストグラムは量子化している。

✓ F_1 -ATPase 逆回転時の ATP 合成量の 1 分子測定

次に、私たちの本来の研究対象である F_1 -ATPase を用いた実験を紹介する(参考文献 2)。 F_1 -ATPase は、ATP 合成酵素の水溶性部分であるが、単独では強い ATP 加水分解活性をもつため F_1 -ATPase と呼ばれる。また、この酵素は、ATP 加水分解時に分子内部のサブユニットを回転させる分子モーターでもある。このモーターは、膜に埋まって機能する F_0 と結合して、ATP 合成酵素となる。 F_0 も回転分子モーターであるが、駆動力は膜の上下にかかるプロトンの電気化学ポテンシャルである。 F_0 は、その分子内部をプロトンが通過する際に、分子内部のリング構造を回転させる。この 2 つの回転モーターは、互いの回転子と固定子で結合しているが、そのトルクの向きは逆である。生理的条件下では、 F_0 がより強力なトルクを発生し、 F_1 を逆向きに回転させる。その結果、 F_1 の触媒部位で逆反応である ATP 合成反応が触媒される。 F_1 -ATPase を逆回転する際の ATP 合成反応を、 F_1 -ATPase 1 分子単位で計測した。この実験では、6fL のマイクロチャンバーに F_1 -ATPase 1 分子を閉じ込め、これを磁気ピンセットで逆回転した。 F_1 -ATPase は、ATP 加水分解時に 1 回転当たり 3 個の ATP を加水分解するとされている。ATP 合成時も 1 回転当たり 3 分子の ATP を合成すると考えると、10Hz で 1 分間回転させて合成される ATP の分子数はわずか 1800 個である。このままでは生物化学発光反応を用いても計測は不可能であるが、6fL のマイクロチャンバー中では濃度として 500nM に相当する。この濃度であれば、ATP 濃度の定量は F_1 -ATPase 分子自身の動きの観察から可能である。すなわち、

磁気ピンセットから開放された F_1 -ATPase は、自らが合成した ATP 分子を加水分解しながら回転運動する。このときの回転速度は ATP 濃度に比例するため、その速度から強制逆回転時における ATP 合成量が求まるわけである。この実験の結果、 ϵ と呼ばれるサブユニットが存在する場合、実に効率 77% という値が得られた。まだ実験誤差も大きい計測であるが、この回転分子モーターが回転と ATP 加水分解/合成を非常にタイトに共役させていることが明らかとなった。

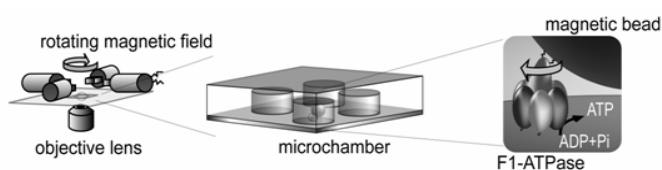


図 3. マイクロチャンバーに封入した F_1 -ATPase の逆回転実験。磁気ピンセットで、チャンバー内部の F_1 -ATPase 分子を逆回転させる。合成量は、その後ピンセットから開放された F_1 -ATPase の ATP 駆動回転速度から求める。

✓ まとめ

以上のように、超微小の空間に反応溶液を閉じ込めるだけで、触媒反応を酵素 1 分子単位で計測できるようになった。最近では、この手法を応用して、細胞 1 個あたりのタンパク質の合成反応の確率過程を解析した例も発表されている(参考文献 3)。今後、アイデア次第で、様々な反応計測が可能となるであろう。

✓ 参考文献

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 F_1 -ATPase single molecules. *Nature* **433**, 773-7 (2005).
3. Cai, L., Friedman, N. & Xie, X.S. Stochastic protein expression in individual cells at the single molecule level. *Nature* **440**, 358-62 (2006).