

ナノスコピック顕微システムによるゲノム機能情報の解析

●民谷 栄一

北陸先端科学技術大学院大学

研究の目的と進め方

申請者らは、ナノ領域の観測を可能とする近接場顕微鏡を駆使し、細胞内や表層で発現する GFP 分子や細胞表面に局在するレセプター分子などを高空間分解能でイメージングするナノプローブ顕微鏡システムや近接場観測技術とチップ技術と連携したリアルタイムイメージングシステムを開発し、最終的にはゲノム情報にもとずいた細胞内で発現する生化学ネットワークの解析を可能とするシステムの構築をめざす。

2001 年度の研究の当初予定

(1) ナノ空間イメージングシステムによる生体解析

光ファイバプローブ先端の微小開口近傍に形成される近接場のエバネッセント光や共焦点顕微測定を基礎として蛍光分子の局所領域の状態を解析することが可能となる。測定対象とする細胞内発現プローブ分子としてターゲットサイトに融合タンパクとして発現させた GFP 分子を用いた。具体的には、枯草菌や酵母菌で発現させた GFP 分子をイメージングし、発現の空間プロファイルを作製する。

(2) リアルタイムナノスコピック顕微システムの構築

上記のシステムは、空間分解能に優れた測定装置であるが、プローブを走査する時間を要するため、イメージングに分オーダーを要し、リアルタイム測定には向かない。そこで、細胞での局在情報をリアルタイムに測定する方法として新たに全反射型の蛍光顕微システムを試作する。これにより、エバネッセント励起が可能なナノ領域のみの化学情報が得られるだけでなく、ミリ秒単位でイメージングが可能となる。これを用いて DNA やプロテインのライブラリーを集積配置したチップ上における動的挙動の解析を検討する。

2001 年度の研究成果

(1) GFP を細胞表層蛋白質として発現させた *Saccharomyces cerevisiae* を用いてグルコース添加後の時間経過ごとの蛍光変化より細胞内部から細胞表層へ GFP 融合表層タンパク質の発現の様子を観察した。次に SNOAM (走査型近接場光 / 原子間力顕微鏡) を用いて観察したところ、酵母細胞の 3 次元形状と細胞の蛍光像の同時観測に成功した。

(2) DnaB-GFP および YqeH-GFP を導入した *Bacillus subtilis* (小笠原研から供与) の GFP 発現の時間経過のイメージングを可能とした。

(3) 1,000-10,000 チャンネルを有するマイクロチャンバアレイと近接場光顕微鏡を連携したシステムを構築し、DNA のハイブリダイゼーションや抗原抗体反応をリアルタイムに測定することを可能とした (図 1)。

国内外での位置づけ

3 次元形状と蛍光情報をナノメートルスケールで同時観測できる SNOAM を用いた細胞解析は、世界的にみても申請者らのグループが独創的に研究展開をしている。また、チップ技術と連携したリアルタイムチップイメージング技術の開発についてもきわめて独創的に進めている。

達成できなかったこと、予想外の困難、その理由

SNOAM を用いた高空間分解の測定や溶液中での測定が、完全には達成されておらず、細胞イメージングに課題が残っている。しかし、リアルタイムチップイメージング技術を新たに開発し、遺伝子や蛋白を用いたリアルタイム測定を可能とした。

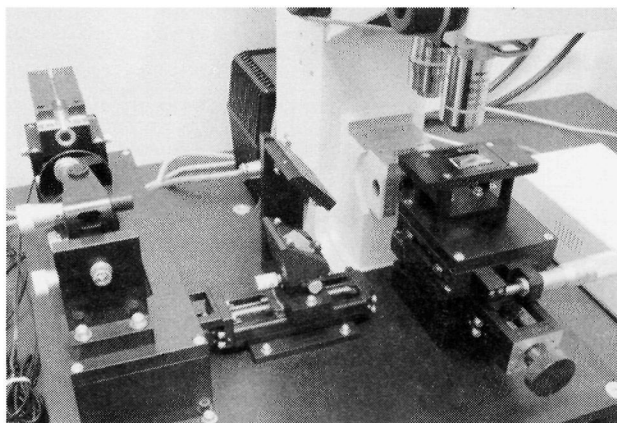
今後の課題

(1) 細胞ナノイメージングについては、GFP プローブの細胞発現分布の高空間分解を達成するための試料作製法の検討や時間経過測定を可能とする溶液内観測セルの開発を検討する。

(2) 近接場リアルタイムチップイメージング技術を用いて細胞内ネットワーク解析につながる遺伝子、蛋白解析を検討する。

成果公表リスト

・特許出願中「バイオチップ、バイオチップアレイおよびそれらを用いたスクリーニング方法」特願 2001-356971。



試作した DNA / プロテインチャンバアレイ用エバネッセント顕微システム