

課題番号 : F-14-KT-0003
 利用形態 : 機器利用
 利用課題名(日本語) : ナノ開口を使った生体分子間相互作用の解析
 Program Title (English) : Analysis of Biomolecules Interaction using Zero Mode Waveguides
 利用者名(日本語) : 韓 龍雲¹⁾, 中尾 公子¹⁾, 多田隈 尚史¹⁾, 原田 慶恵^{1),2)}
 Username (English) : Y.-W. Han¹⁾, K. Nakao¹⁾, H. Tadakuma¹⁾, Y. Harada^{1),2)}
 所属名(日本語) : 1) 京都大学物質—細胞統合システム拠点, 2) 京都大学大学院生命科学研究科
 Affiliation (English) : 1) WPI-iCeMS, Kyoto University, 2) Graduate School of Biostudies, Kyoto University.

1. 概要(Summary)

金属フィルムに作製した光の波長以下の大きさのナノ開口を用いることで、数百ナノモルから数マイクロモル程度の高濃度下で蛍光色素の1分子観察が可能になる。本研究では、このナノ開口を用いた1分子イメージング法を用いて、生体分子の相互作用の1分子観察を行い、その機能を明らかにする。

2. 実験(Experimental)

利用した主な装置の名称

高速高精度電子ビーム描画装置、厚膜フォトリソ用スピンドコーティング装置、ウェハスピン洗浄装置、真空蒸着装置、超高分解能電界放出形走査電子顕微鏡

実験方法

石英ガラス上でのナノ開口製作の概要はFig. 1と箇条書きされた下記の通りである。

石英基板洗浄→脱水ベーク→EB レジストコーティング→エスパーサーコーティング→EB 照射→エスパーサー除去→ベーク→現像→アルミニウム蒸着→リフトオフ→プラズマクリーニング

ナノ開口基板作製後、蛍光分子の石英ガラス表面への非特異吸着を抑え、且つ Holliday 構造 DNA をナノ開口基板内に固定化させるため、ポリエチレングリコールと Biotin 標識されたポリエチレングリコールとの混合溶液により石英ガラス表面をコートした。そして、Holliday 構造 DNA を固定させ、蛍光色素である Cy5 で標識された Cy5-RuvB 蛋白質を加えて、ナノ開口基板上での Cy5-RuvB の挙動を観察した。

3. 結果と考察(Results and Discussion)

Fig. 2 に示すようなナノ開口基板を安定して作製する事が可能となった。Holliday 構造 DNA をナノ開口基板に固定後、Cy5-RuvB を加えたところ、ADP または ATP アナログで加水分解しにくい ATP γ S 存在下で、Cy5 からの蛍光が観察された。また、ADP や ATP γ S 等のヌクレオチド非存在下では Cy5 からの蛍光スポットの個数が少なかった。ADP や ATP γ S 等のヌクレオチド存在下で RuvB の Holliday 構造 DNA への結合を促進させる事が示唆さ

れた。(2)

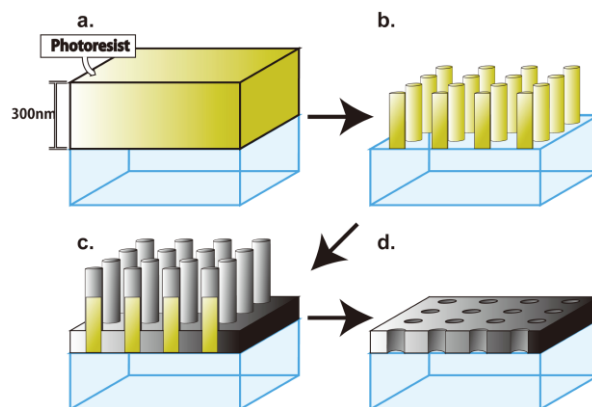


Fig. 1. Schematic diagram of Zero Mode Waveguides fabrication. (a) Photo resist coating. (b) Fabrication of the resist pattern by electron beam lithography. (c) Vapor deposition of aluminum. (d) Removal of the resist film.

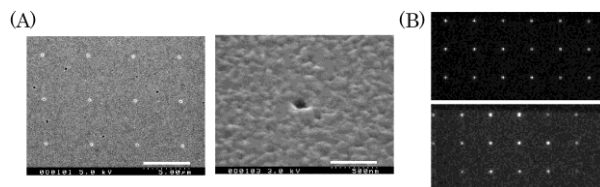


Fig. 2. Electron microscopic and fluorescent microscopic images of ZMWs. (A) Images by Scanning electron microscopy. Scale bars indicate 5 mm (left panel) and 500 nm (right panel). (B) Fluorescent microscopic images. Transmitted light from halogen lamp (top panel) and fluorescence from Cy3 (bottom panel).

4. その他・特記事項(Others)

・参考文献 (1) M. J. Levene et al., Science **299** (2003) 682.

5. 論文・学会発表(Publication/Presentation)

(2) Y.-W. Han, T. Iwasa, R. Hiramatsu, H. Yokota, R. Yokokawa, T. Ono, Y. Harada, the Biophysical Society 59th Annual Meeting, 平成 27 年 2 月 8 日.

6. 関連特許(Patent)

なし。