

課題番号 : F-16-KT-0169
 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 3
 Program Title (English) : Analysis of Biomolecules interaction using Zero Mode Waveguides 3
 利用者名(日本語) : 韓 龍雲¹⁾, 中尾 公子¹⁾, 多田隈 尚史²⁾, 原田 慶恵²⁾
 Username (English) : Y.-W. Han¹⁾, K. Nakao¹⁾, H. Tadakuma²⁾, Y. Harada²⁾
 所属名(日本語) : 1) 京都大学物質—細胞統合システム拠点, 2) 大阪大学蛋白質研究所
 Affiliation (English) : 1) WPI-iCeMS, Kyoto Univ., 2) Institute for Protein Research, Osaka Univ.

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

大面積超高速電子線描画装置、厚膜フォトレジスト用スピコーティング装置、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はFig. 1に示した通りに行い、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 を固定した。Holliday 構造 DNA に結合する RuvA の様子を観察するため、蛍光色素 Cy3 で標識された Cy3-RuvA 蛋白質を作製した。

3. 結果と考察(Results and Discussion)

Fig. 1に示すような手法で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、RuvA との結合解離の様子を観察するため蛍光標識 RuvA を作製した。作製した Cy3-RuvA についてはストップフロー法と呼ばれる生体分子複合体形成を計測出来る装置を利用して評価したところ、RuvA と Holliday 構造 DNA の結合速度は RuvA と RuvB との結合速度に比べて非常に速いという結果が得られた(Fig. 2)。また、以上の結果を日本生物物理学会で発表した(1)。

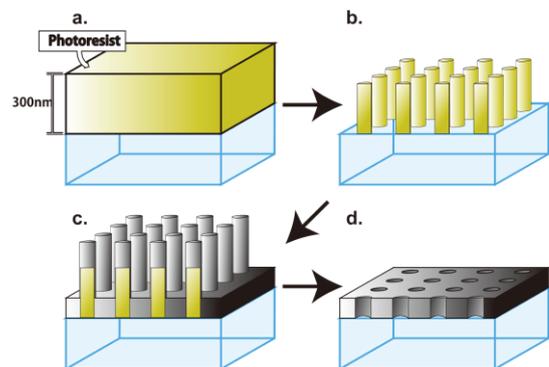


Fig. 1. Schematic diagram of Zero Mode Waveguides fabrication. (a) Photo resist coating. (b) Fabrication of the resist pattern by electron beam lithography. (c) Vapor deposition of aluminum. (d) Removal of the resist film.

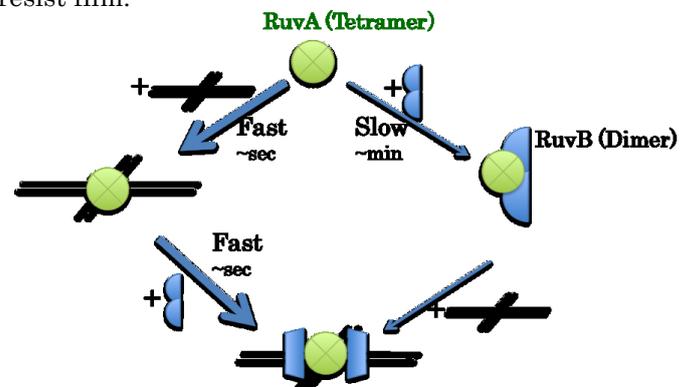


Fig. 2. RuvA-RuvB-Holliday junction DNA complex formation model.

4. その他・特記事項(Others)

・参考文献

M. J. Levene et al., Science **299** (2003) 682.

5. 論文・学会発表(Publication/Presentation)

(1) Y.-W. Han, R. Yamamoto, K. Nakao, H. Tadakuma, Y. Harada, 第54回日本生物物理学会, 平成 28 年 11 月 26 日.

6. 関連特許(Patent)

なし。