

課題番号 : F-17-KT-0078
 利用形態 : 機器利用
 利用課題名(日本語) : 生体分子, 細胞, 組織操作のためのマイクロ・ナノデバイス開発 II
 Program Title(English) : Micron/nano devices for engineering of biomolecules, cells and tissues II
 利用者名(日本語) : 横川隆司, 藤本和也
 Username(English) : R. Yokokawa, K. Fujimoto
 所属名(日本語) : 京都大学大学院工学研究科マイクロエンジニアリング専攻
 Affiliation(English) : Micro Engineering Dept., Graduate School of Engineering, Kyoto Univ.
 キーワード/Keyword : 電子線描画, ナノスリット, ガラス基板, 1 分子蛍光観察, 生物物理

1. 概要(Summary)

本研究テーマでは, ナノスリット構造を光学デバイスとして利用し, モータータンパク質の 1 つであるキネシンの運動に伴うアデノシン三リン酸(ATP) のキネシンに対する結合・解離の 1 分子観察を行った. これまでに, 円形のナノ開口を用いたゼロモードウェーブガイド(ZMWs) と呼ばれるデバイスが遺伝子のシーケンシングなどに広く用いられている. このデバイスは, 従来法では不可能であった高濃度の蛍光分子存在下でも十分な信号/雑音比で個々の分子を一つずつ観察することができる. しかし, タンパク質が繊維状に重合して形成される微小管は円形のナノ開口に導入できないことから, 微小管とそれをレールとして運動するキネシンの観察に ZMWs の利点を活かすことはできなかった. そこで, 我々はナノスリットデバイスを用いて微小管-キネシン系のアッセイおよび蛍光 1 分子観察を行うことを目標とした.

本年度においては, ナノハブの設備を活用して幅 100 nm 程度のナノスリット構造を効率良く作製する方法を確立するとともに, 作製したデバイスを複数の蛍光波長をもつ色素で標識した分子の蛍光 1 分子観察に用いた.

2. 実験(Experimental)

【利用した主な装置】 大面積超高速電子線描画装置

【実験方法】 大面積超高速電子線描画装置を利用してガラス基板に塗布した電子線レジストを露光し, 現像, 金属膜の蒸着及びアセトン中でのリフトオフによってナノスリットデバイスを製作した. デバイスはタンパク質の非特異吸着を防ぐ表面処理を行い, モータータンパク質アッセイに利用した.

3. 結果と考察(Results and Discussion)

作製したデバイスを用いてキネシンによる微小管運動とそれに伴う蛍光標識 ATP のキネシンへの結合を 1 分子観察した. 作成したナノスリットデバイスの電子顕微鏡写

真およびナノスリットにおける 1 分子蛍光観察の結果を Fig. 1 に示す. ナノスリットにおいて, 500 nM の蛍光分子を用いた 1 分子観察が可能であった. これは全反射顕微鏡法に比較すると 10 倍程度高い濃度である. また, 微小管・キネシンおよび蛍光 ATP を同時に 1 分子観察し, キネシンに対する ATP の結合を解析した. 結果として, 蛍光 ATP がキネシンに特異的に結合していることが示されたとともに, 微小管が存在する部分においては ATP の結合時間が短くなることがわかった.

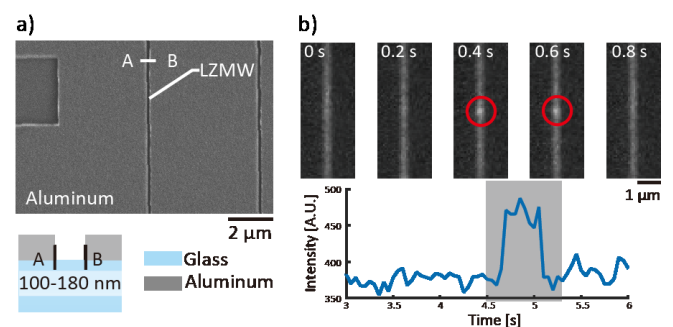


Fig. 1 a) SEM image of nano-slit after patterning, and lift-off process. b) Single molecule observation of labelled ATP in nano-slit.

4. その他・特記事項(Others)

特になし.

5. 論文・学会発表(Publication/Presentation)

- [1] 藤本和也 他, 電気学会論文誌 E 部門, 137 巻 (2017) 6 号 p. 159-64
- [2] 藤本和也 他, 日本生物物理学会, 熊本, 2017/9/19-21
- [3] 藤本和也 他, 化学とマイクロ・ナノシステム学会, 桐生, 2017/10/4-5
- [4] 藤本和也 他, 「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 広島, 2017/10/22-26,
- [5] K. Fujimoto, et al., IEEE MEMS, Belfast UK, 2018/1/21-25

6. 関連特許(Patent) なし.