

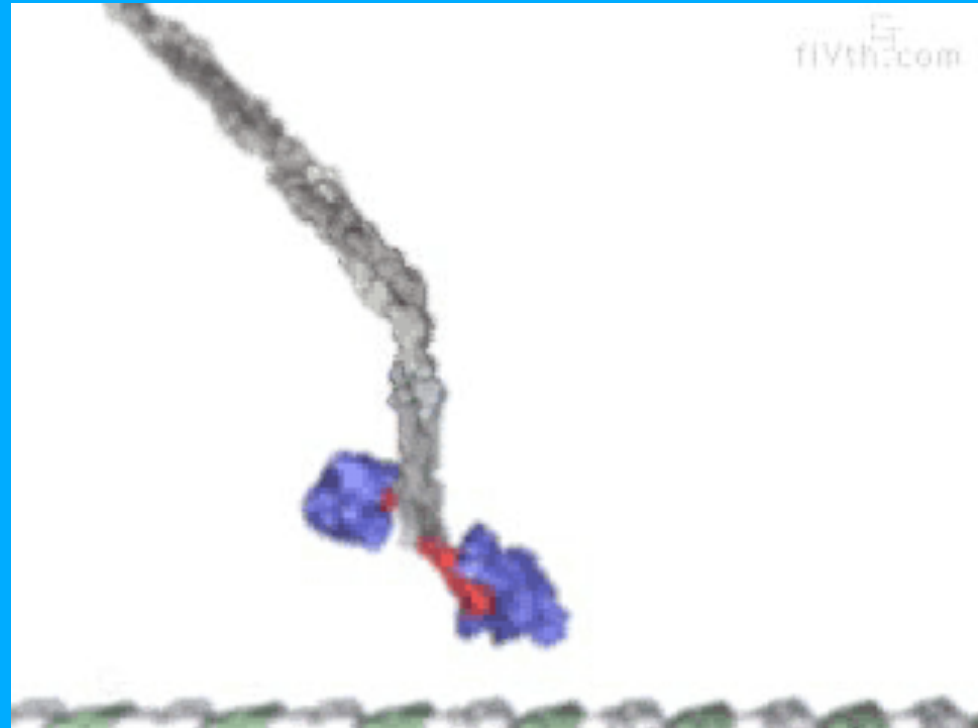
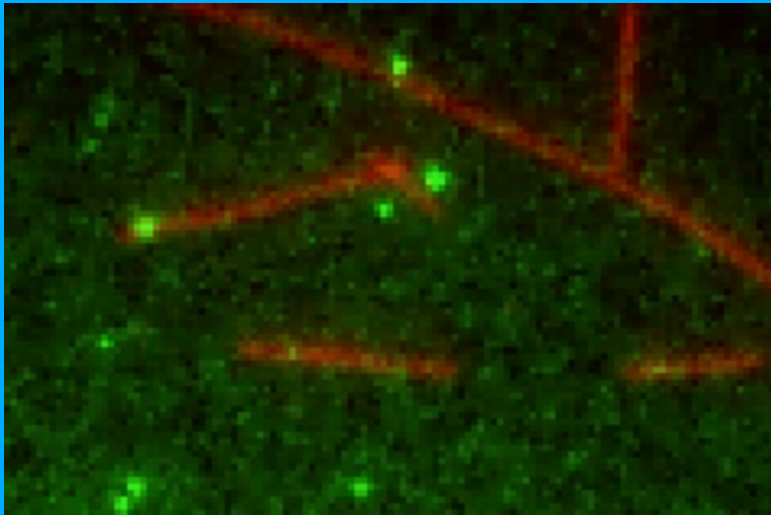
1分子計測技術による ナノバイオテクノロジー

野地博行

東京大学・工学研究科・応用化学専攻



リニアモーター



赤：微小管（線路）

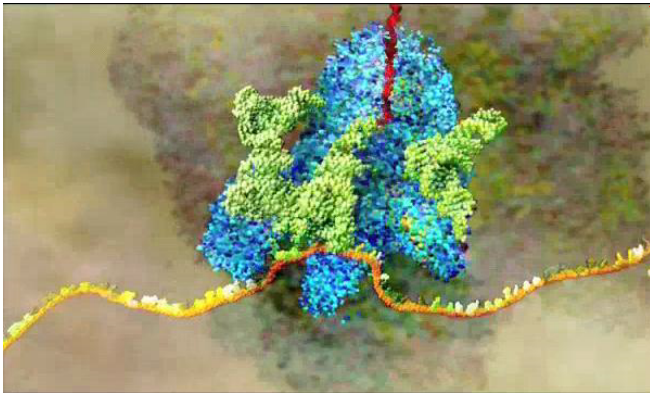
緑：キネシン（モーター）

Ron Vale lab. @ UCSF

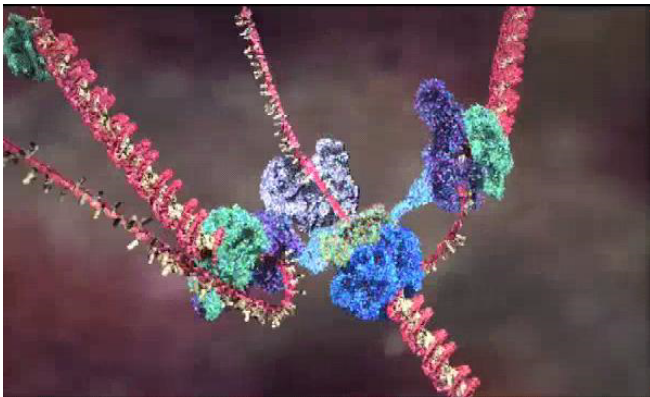
生き物の中は分子機械でいっぱい

大腸菌

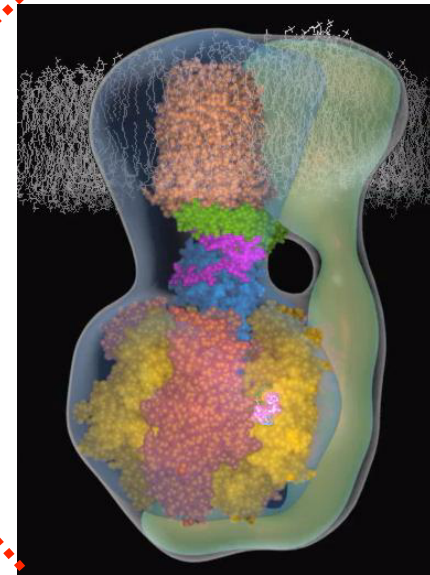
リボソーム



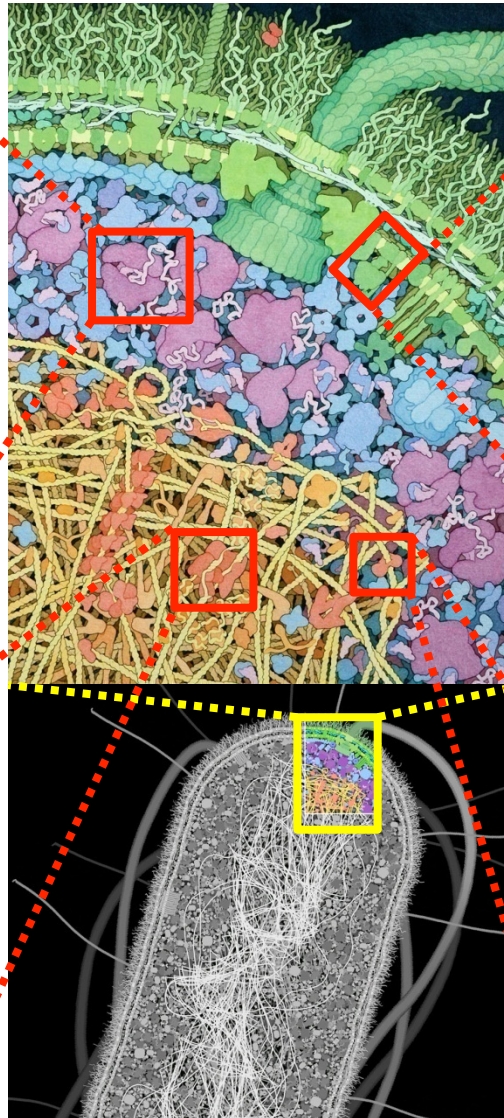
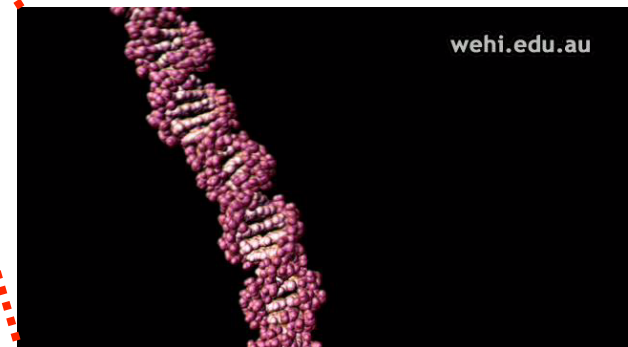
DNAポリメラーゼ



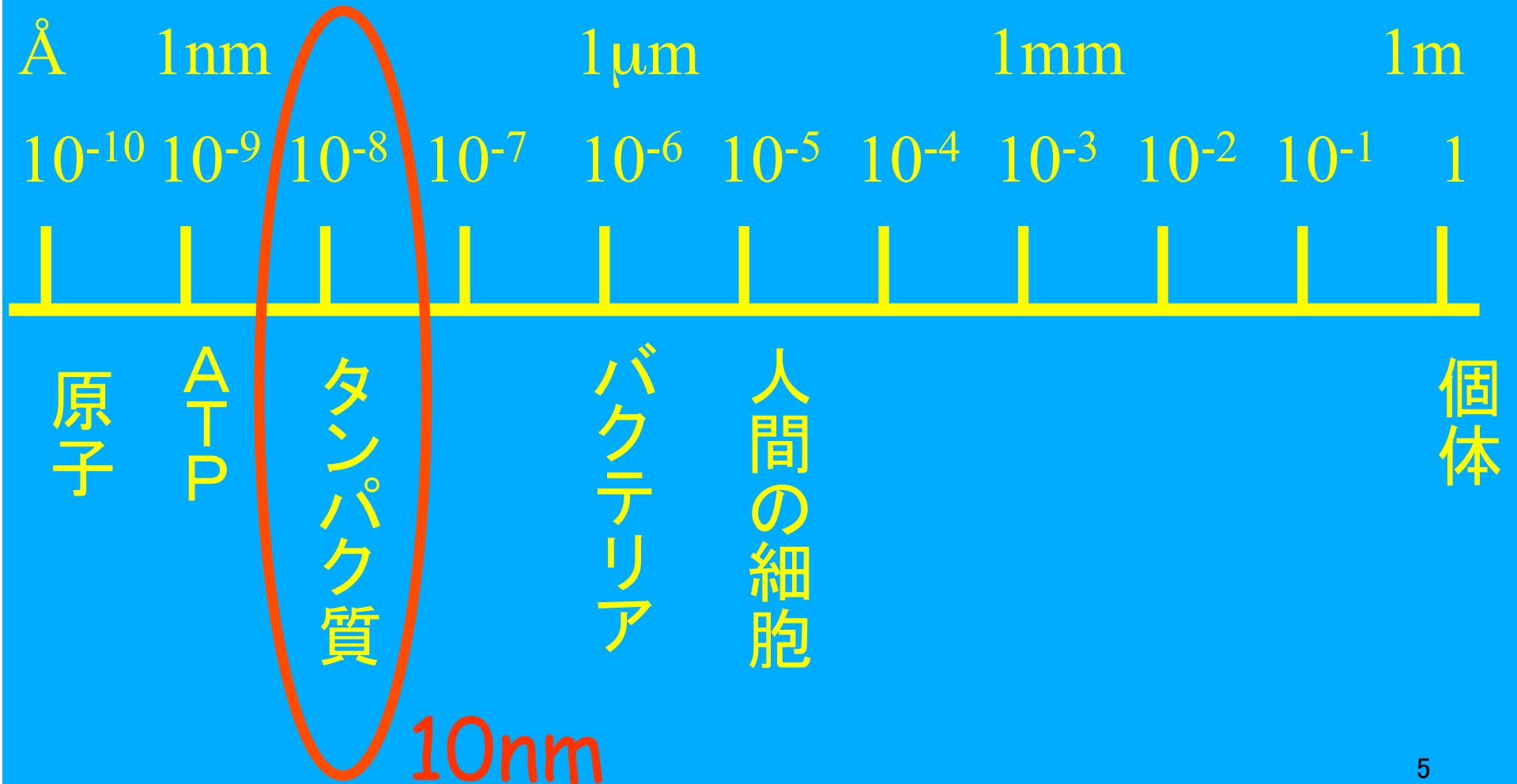
ATP合成酵素



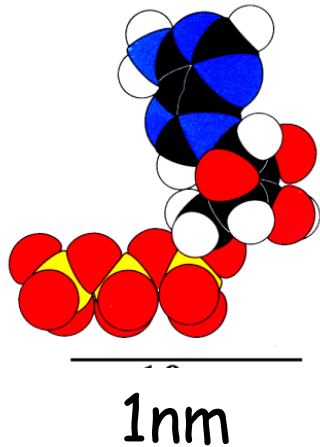
制限酵素



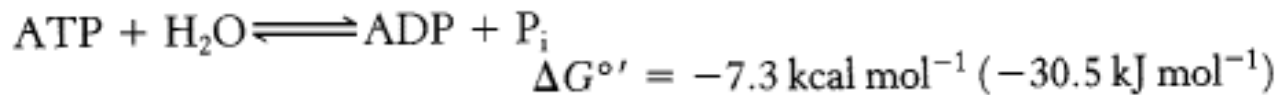
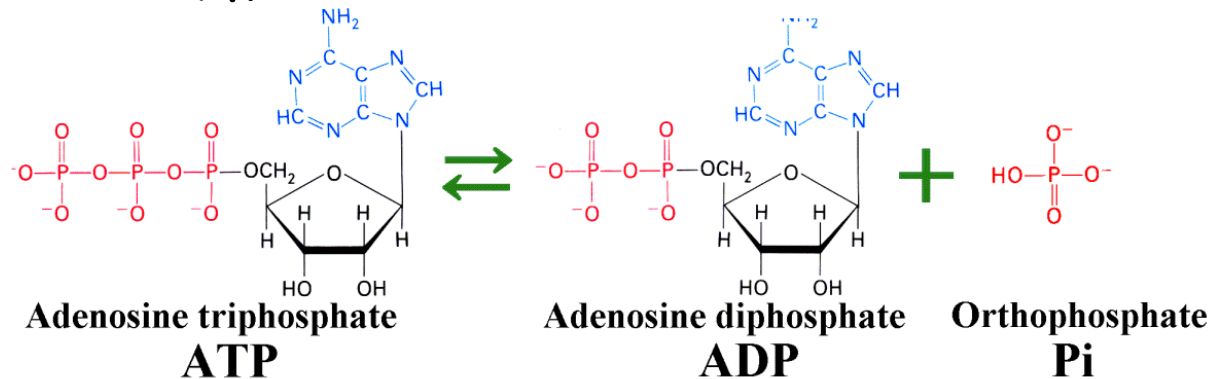
分子モーターの大きさ



細胞のエネルギー通貨 ATP



ATP
(Adenosine triphosphate)
*A universal currency
of energy in the
biological world*



$$\Delta G \text{ in the cell} = -80 \times 10^{-21} \text{ J/モル}$$

$$= -80 \text{ pN} \cdot \text{nm/分子} (20 k_B T)$$

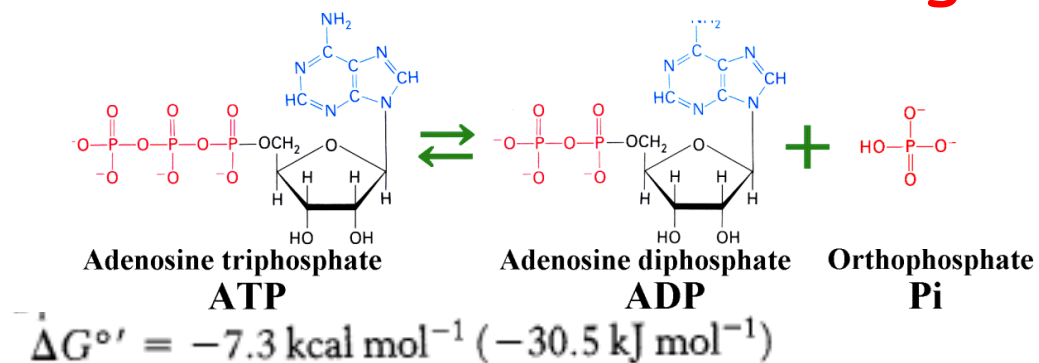
ご飯のエネルギーはATPになる



一日の摂取カロリー—1500~2000

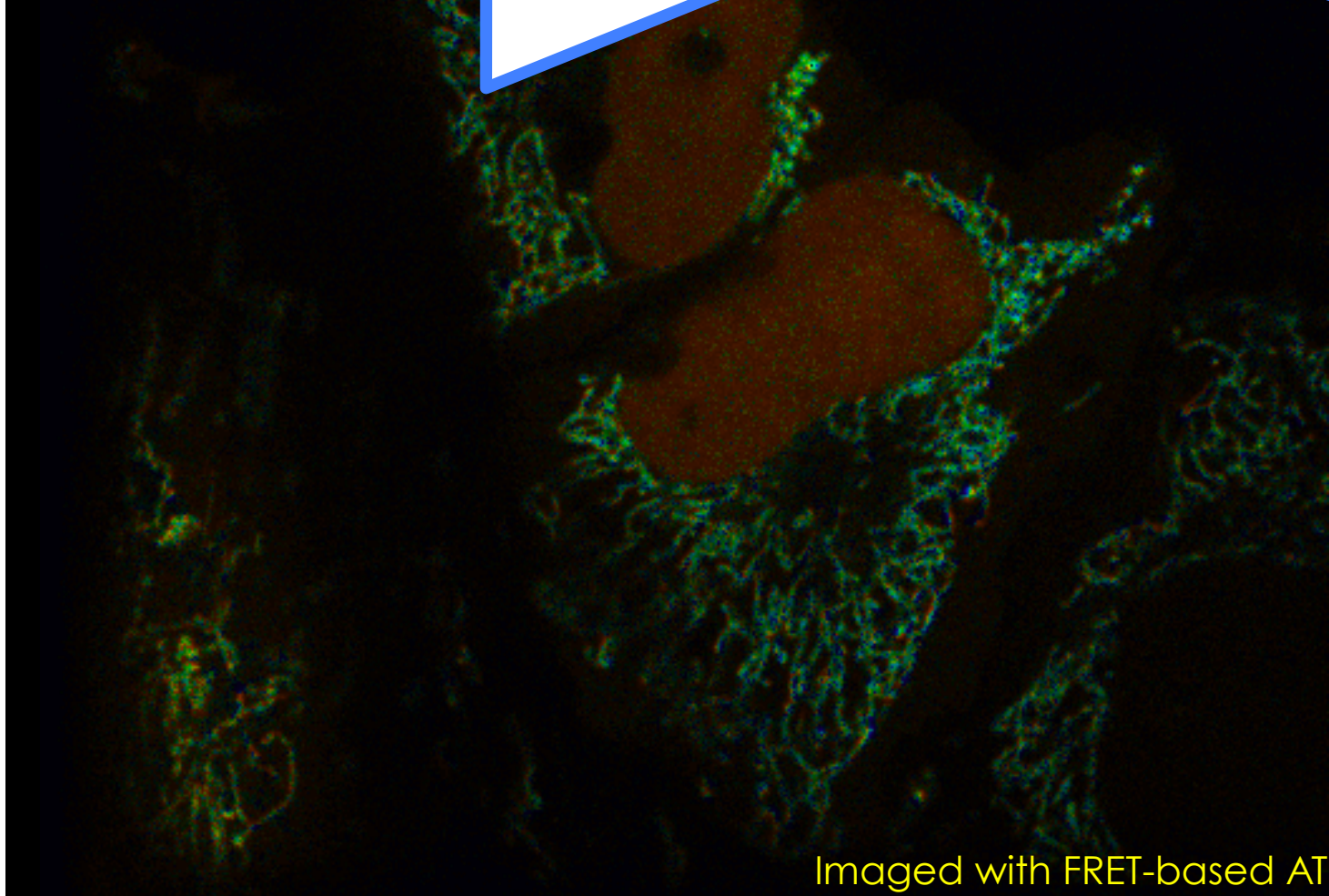
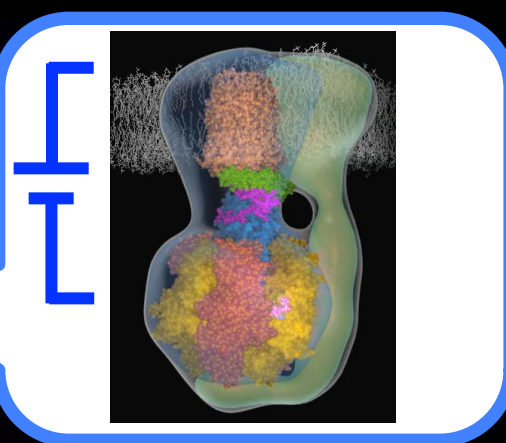
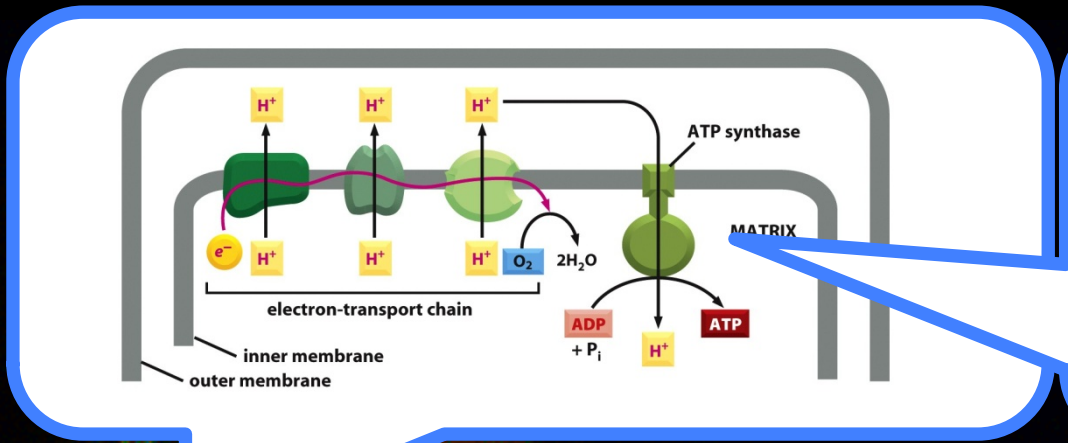


一日のATP合成量30~40 kg



一日のATP消費量 30~40 kg

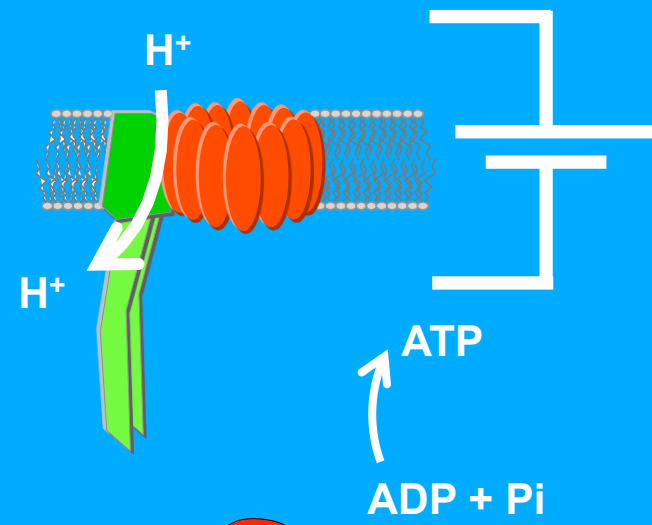
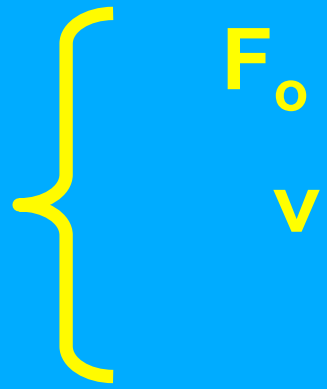
(細胞の膜電位、筋収縮、DNA・タンパク質合成)



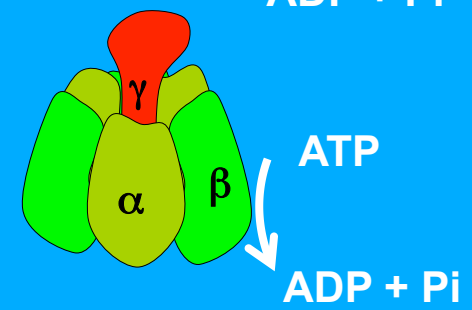
Imaged with FRET-based ATP sensor (PNAS 2009)

ATP合成酵素を構成するF₁ と F_o。

ATP
合成酵素



F₁-ATPase



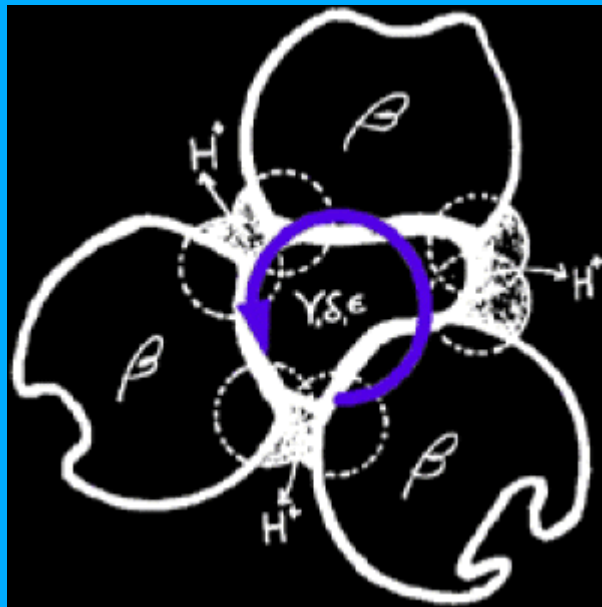
Red: rotor parts
Green: stator parts

1990年代の大問題

どうやって水素イオンの流れと
ATP合成が結びついているのか？

「ATP合成酵素は回転モーター。エネルギー伝達はシャフトの回転による」 by P. Boyer

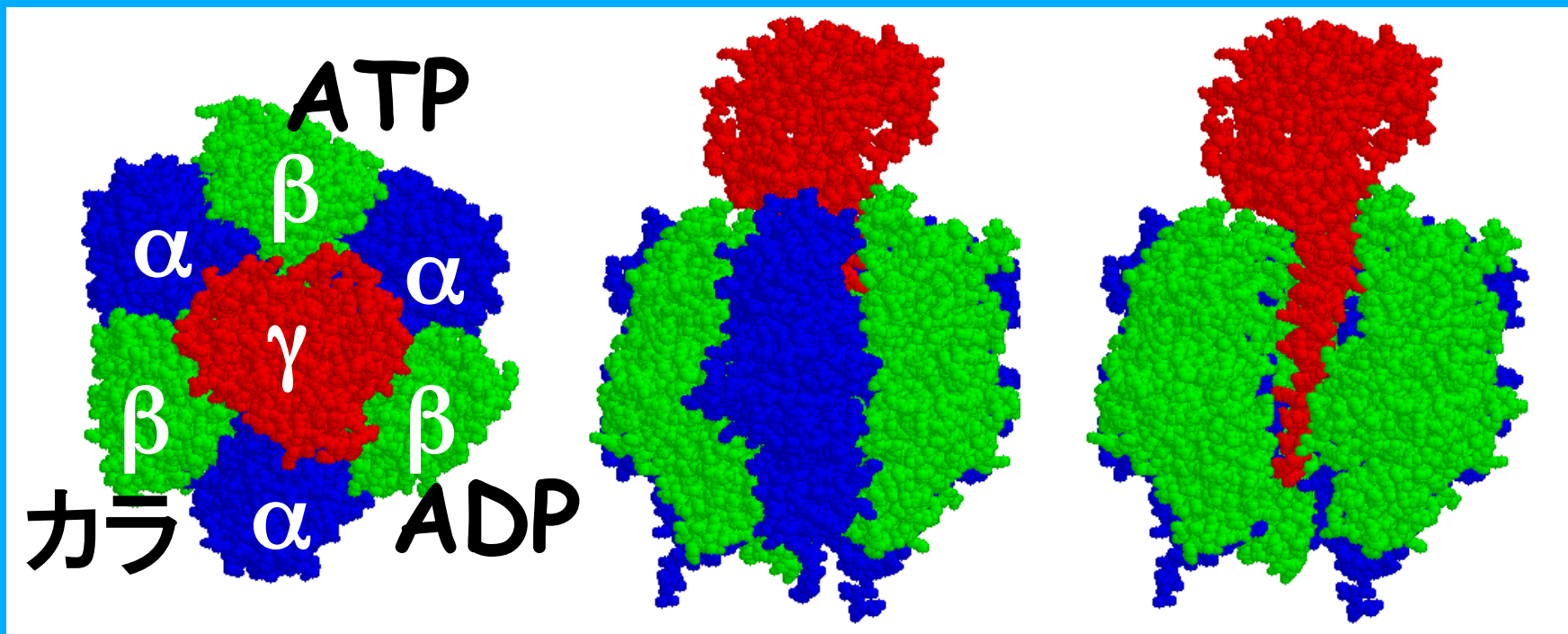
でも、ほとんどの研究者の感想は
「ほんとお？」



F₁ の結晶構造はまさにBoyerの想像したとおりだった！

Top View

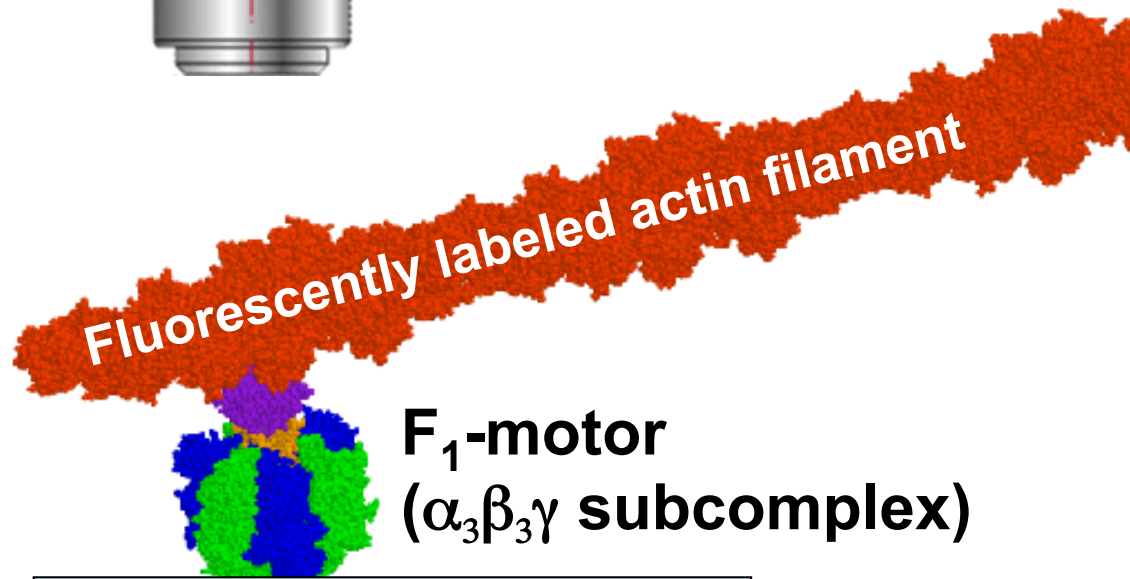
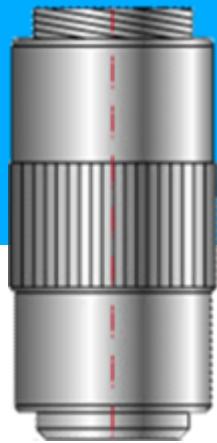
Side Views



10 nm

私の博士課程の実験

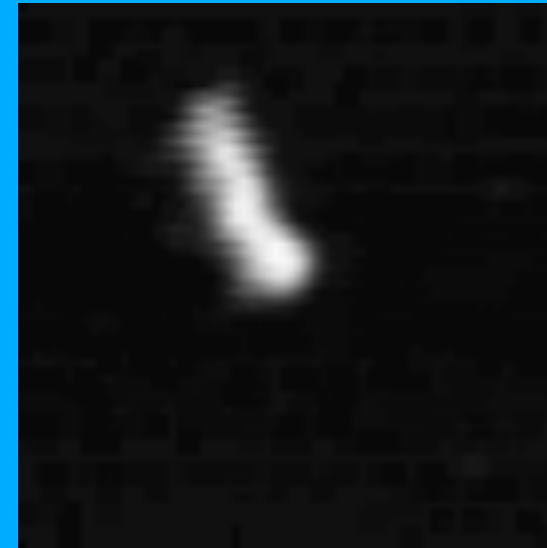
1分子計測による F_1 の回転の実証



Fluorescently labeled actin filament

F_1 -motor
($\alpha_3\beta_3\gamma$ subcomplex)

NTA-coated Cover slip



Torque: 40 pNm
Step size: 120°

Noji H, et. al
Nature 1997

1997 ノーベル化学賞

"for their elucidation of the enzymatic mechanism underlying the synthesis of adenosine triphosphate (ATP)"

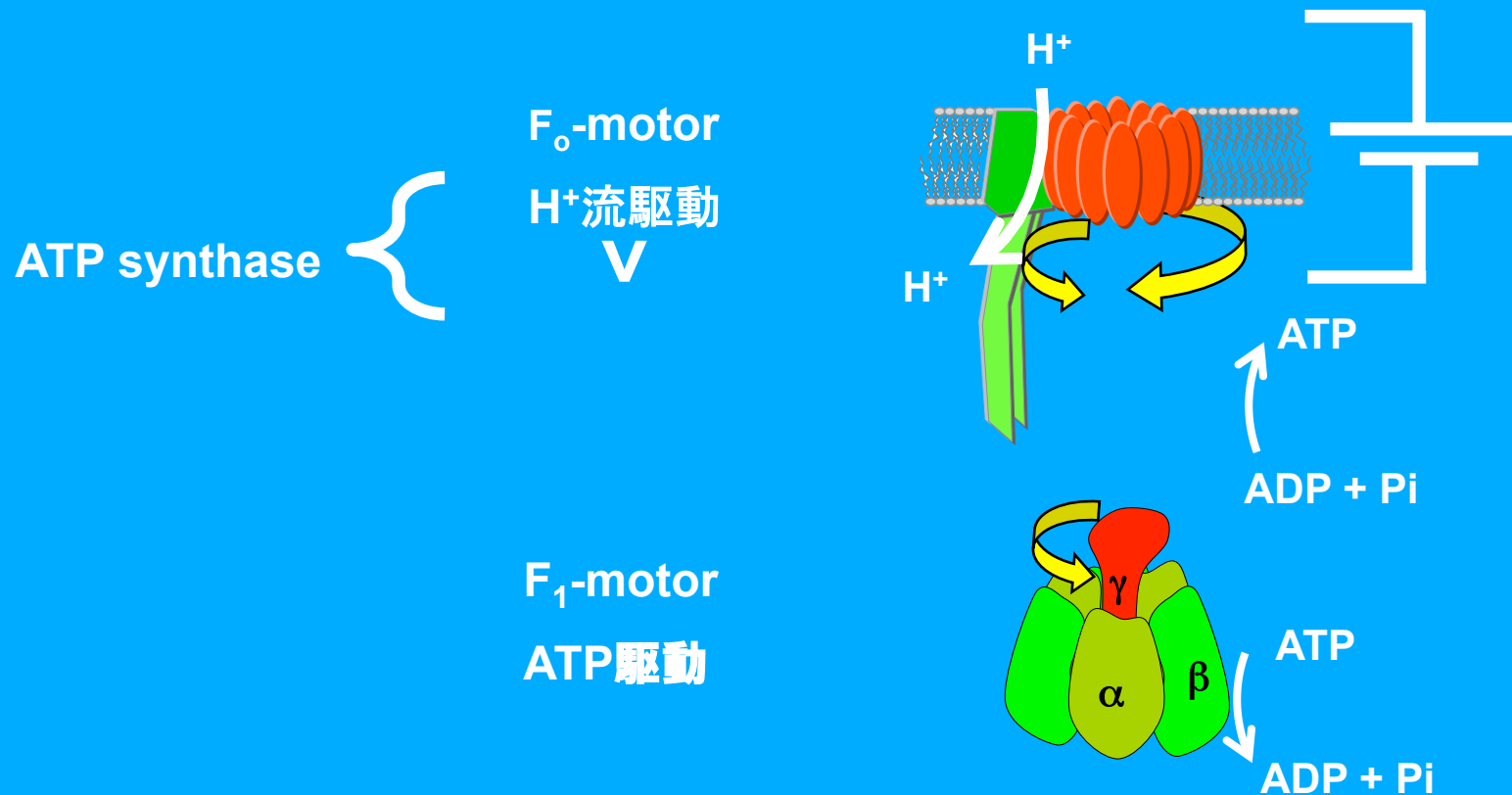


P. Boyer (UCLA, US)
Binding-Change Mechanism
=Rotary Catalytic Model



J. Walker (MRC, UK)
Structural Studies
=DNA seq., Crystal structure

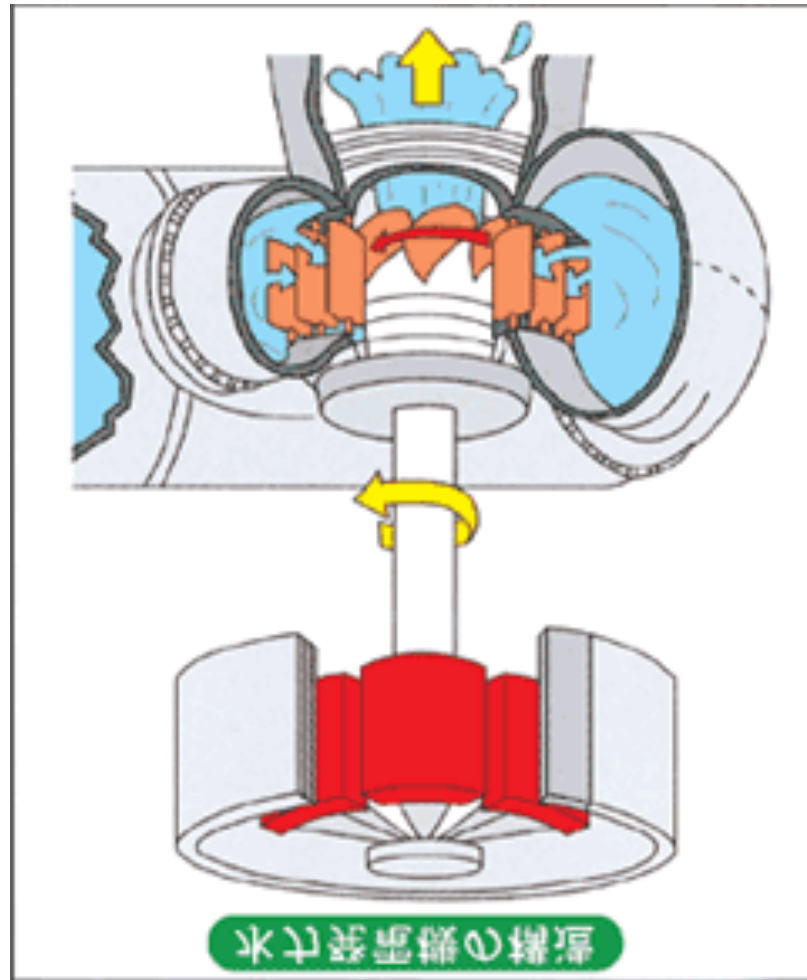
ATP合成酵素は2つの回転分子モーターから構成される。



Red: rotor parts

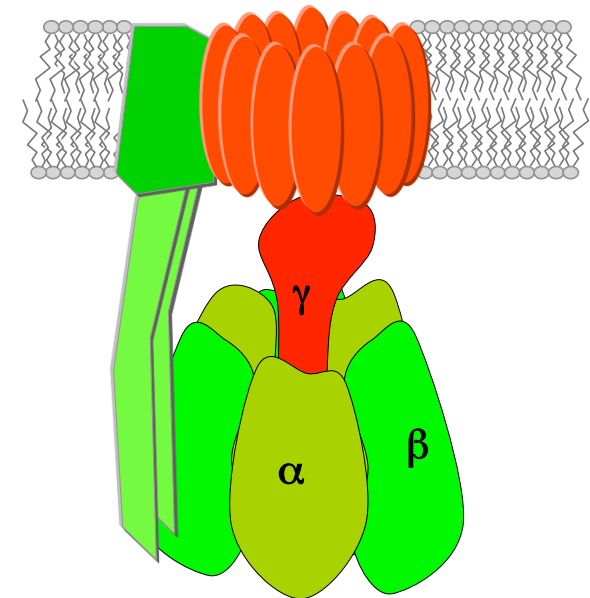
Green: stator parts

ATP合成酵素は水力発電機に似ている



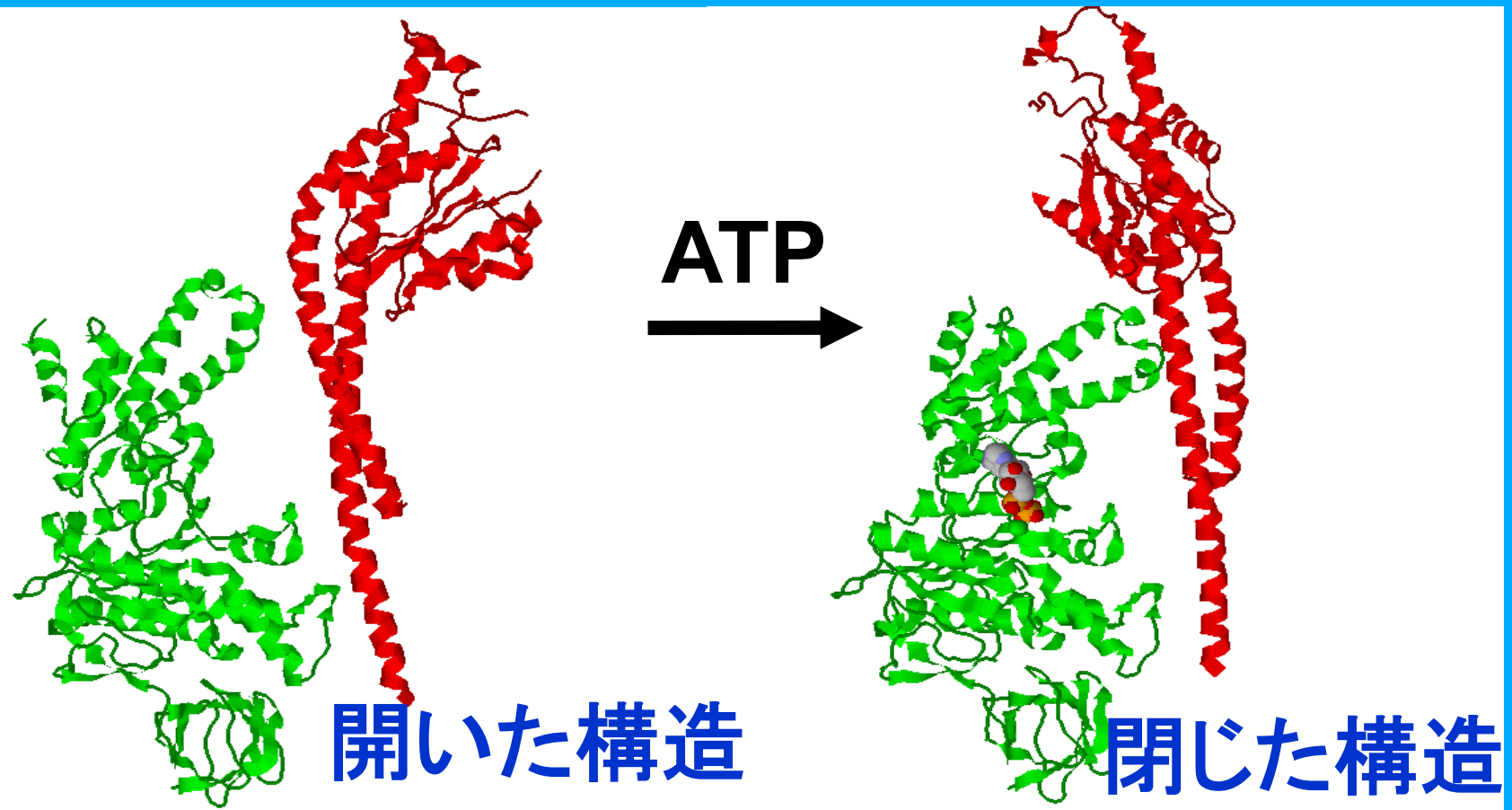
電気モータ
(=F₁)

タービン
(=F₀)

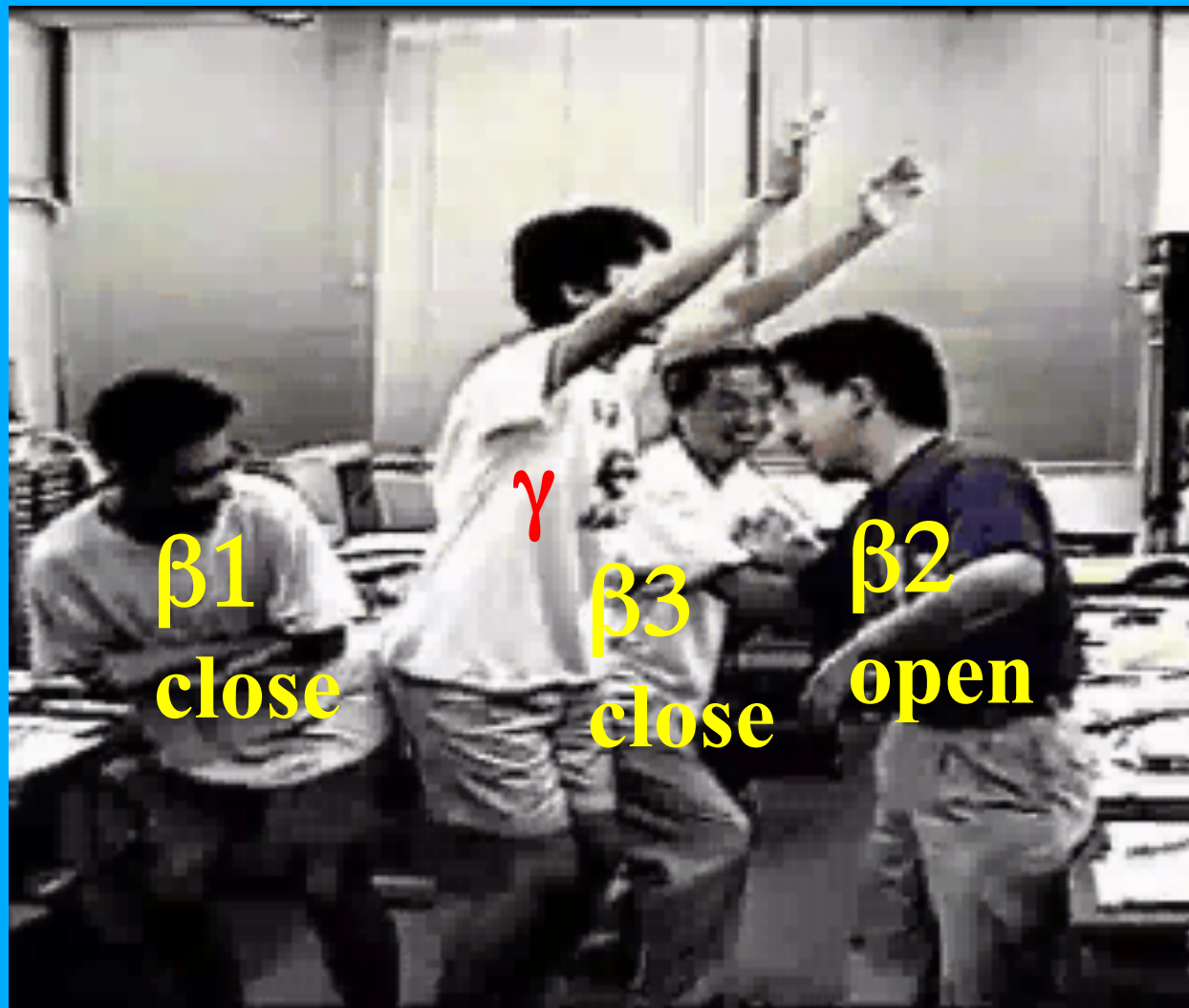


どうやって力を出すの？

β の構造変化がトルクを発生する

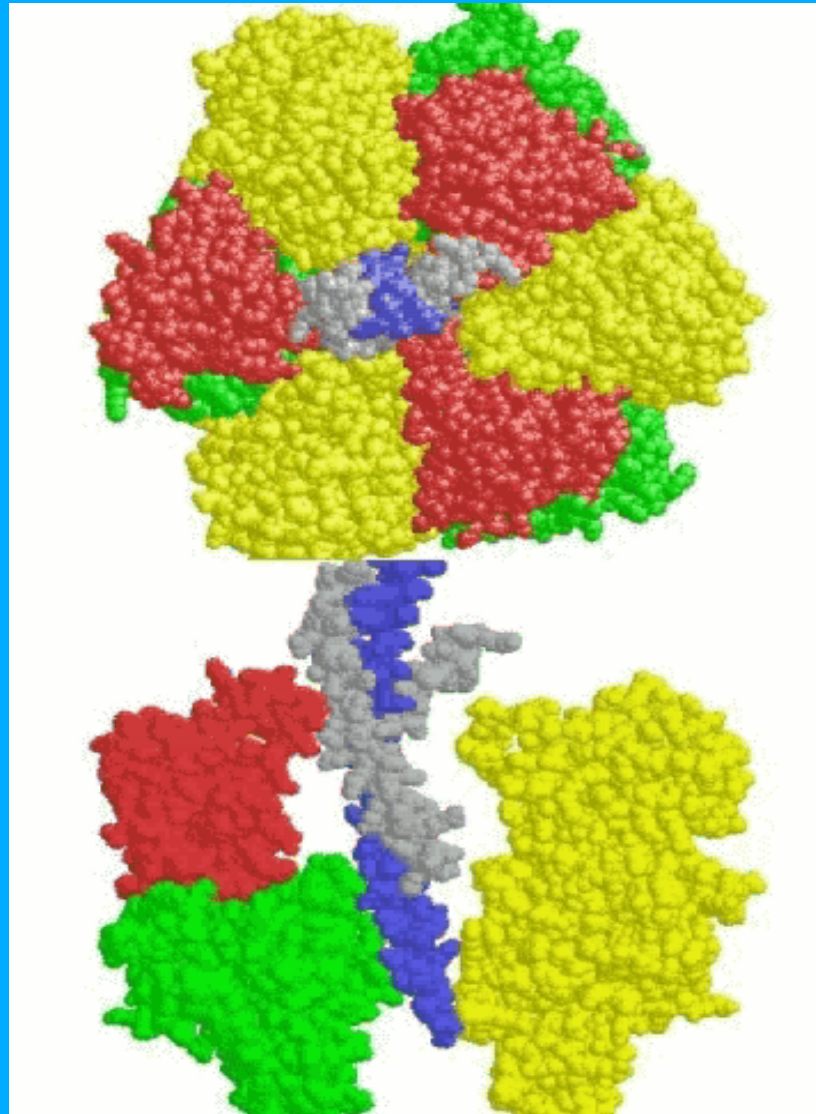


シミュレーション



From 'THE CELL'

アニメ by Oster (UC Berkely)

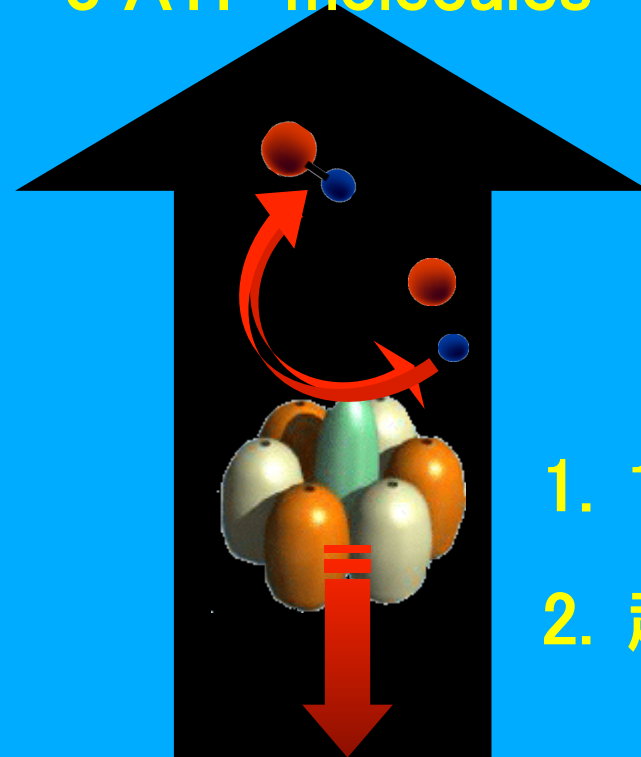


しかし、より重要なのはATP合成反応

本当に逆に回してATPは合成されるのか？

されるとしたら1回転あたり何分子合成されるのか？

3 ATP molecules



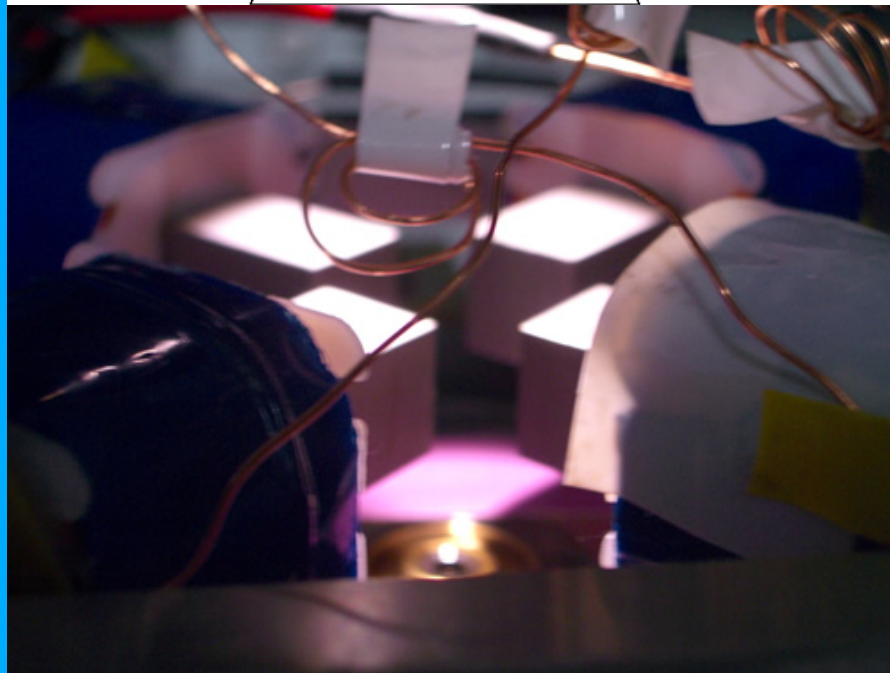
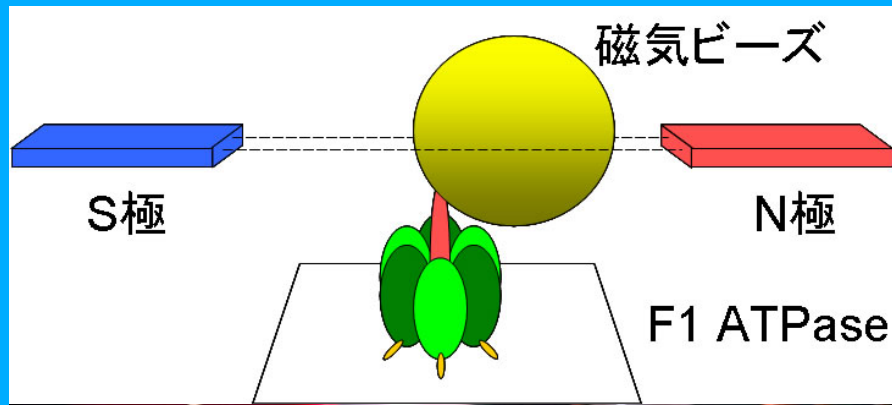
1. 1分子操作

2. 超微量のATPの検出

One turn

磁気ピンセット

F_o モーター(turbine)の役割



問題はATPの検出

- ☒ 3 ATP / turn
 - ☒ 10 turns / sec
 - ☒ 1 minute
- } 1800 ATP molecules

$$1800 \text{ ATP} = 3 \times 10^{-21} \text{ Moles}$$

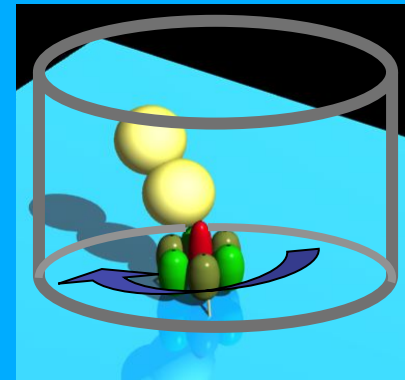
それまでの技術では検出不能！

本当の問題は「体積」

6 フェムトリットル (= $1.8 \mu\text{m}^3$),

1800 molecules = $0.5 \mu\text{M}$.

こらなら検出できる

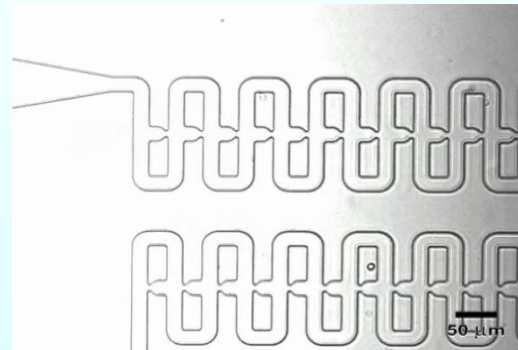


しかし、そんなに小さな試験管を
作ることができるのか？

あ、それ、たぶんできますよ。

2001年

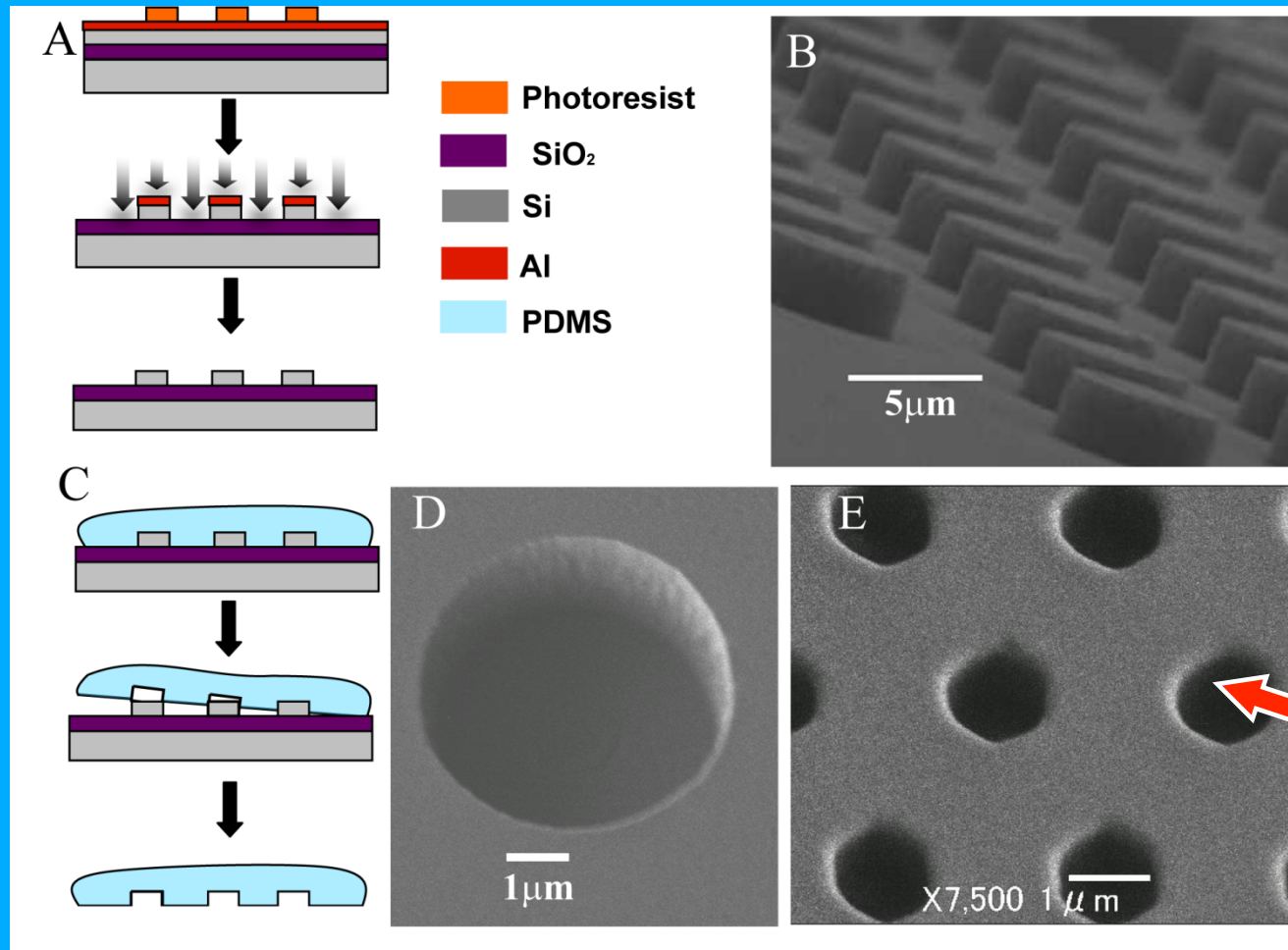
新任教官健康診断にて



PNAS, 2007.

東大生産研 竹内先生「Think hybrid!」

半導体技術を転用した微細加工技術

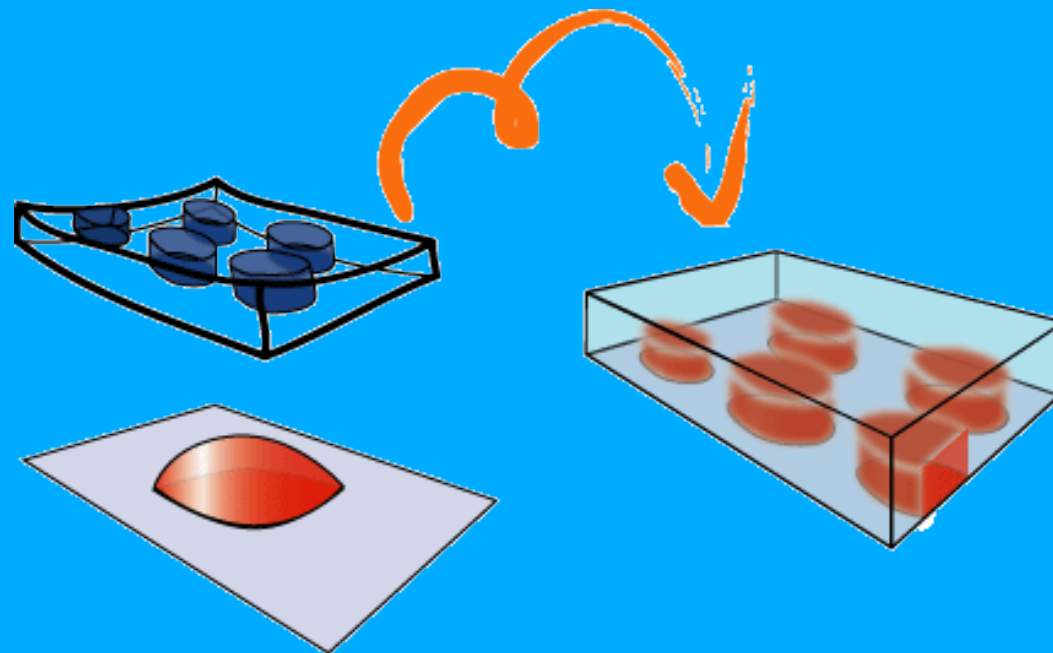


1 fL

10^5 chambers per mm²

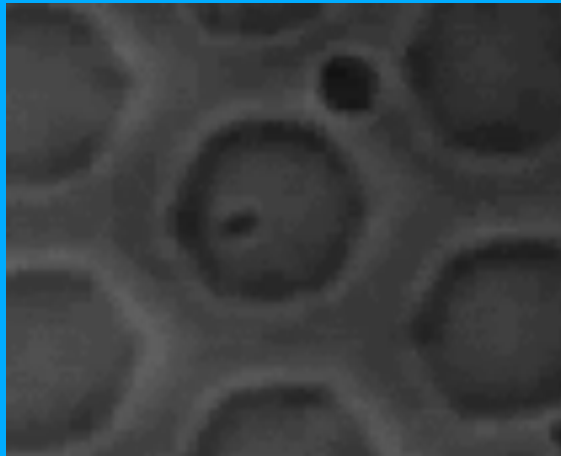
でも、どうやったら水を閉じ込められるの？

そんなん、手でおしゃいいんすよ。

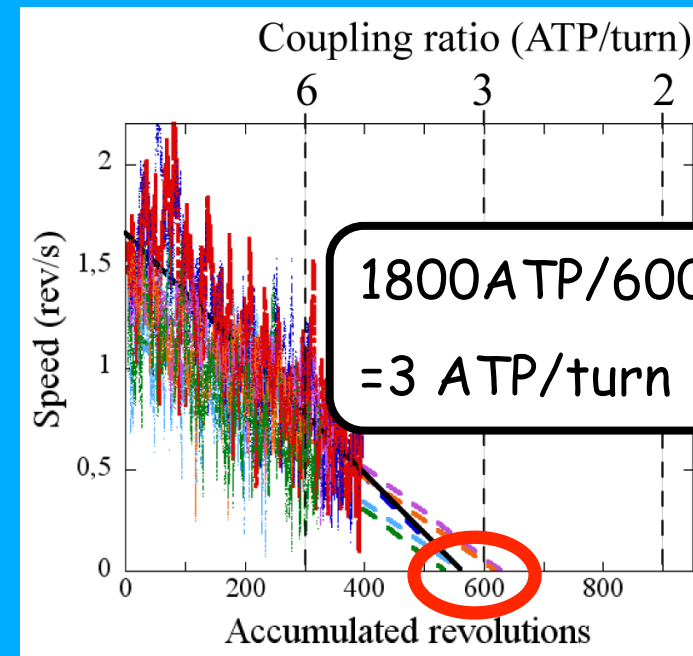
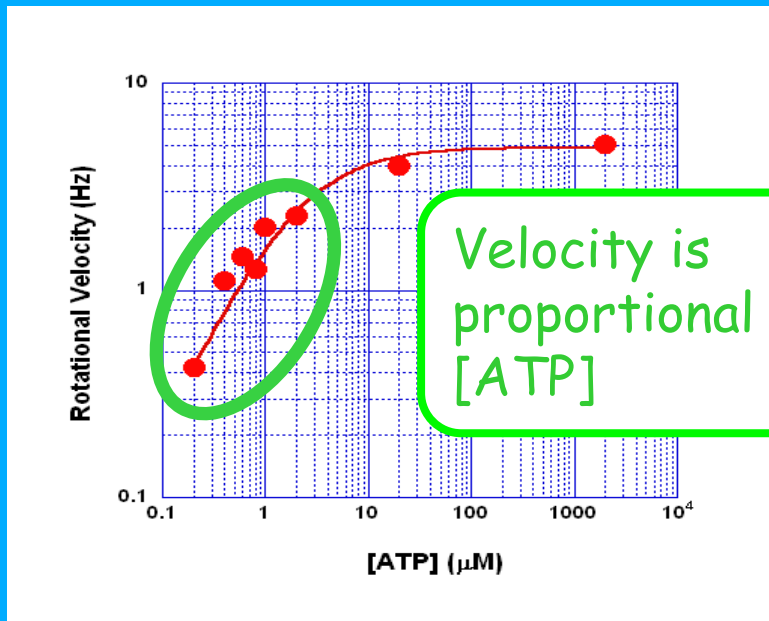
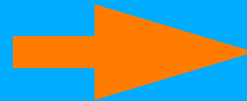


Food master 田端助教

1分子のF₁ モーターも閉じ込められる



5 min

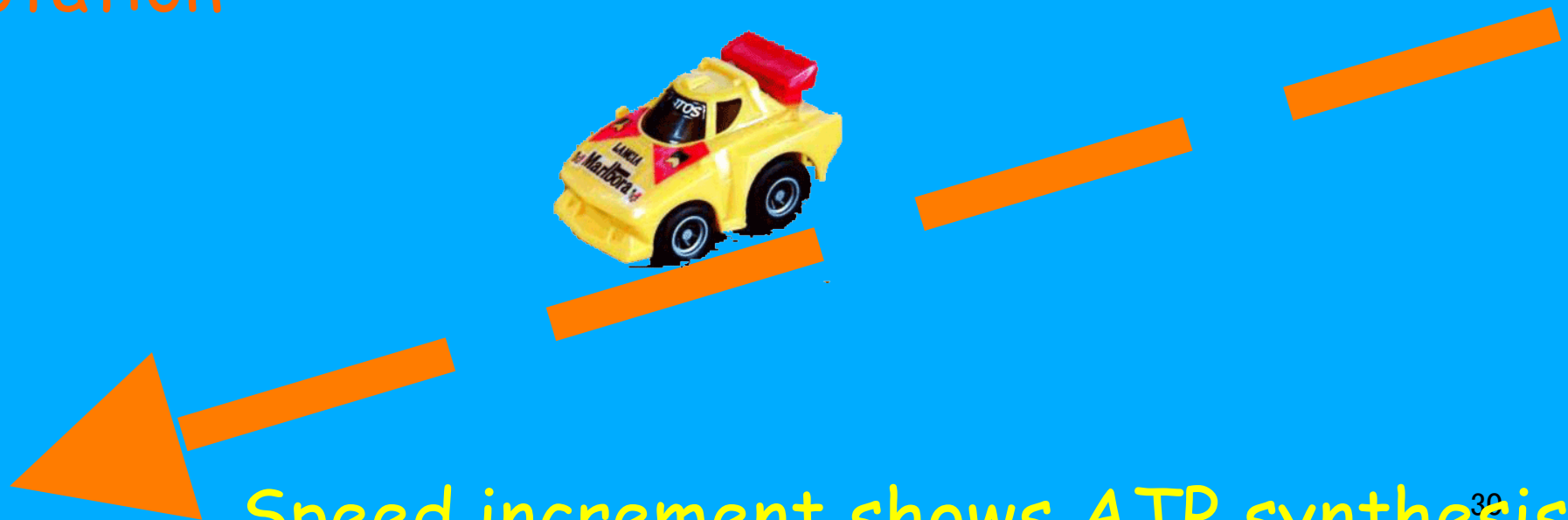


分子チヨ口Q

'Wind-Up' = Reversed-rotation

'Energy storing' = Entrapment of ATP

'Release' = Let the motor make faster rotation

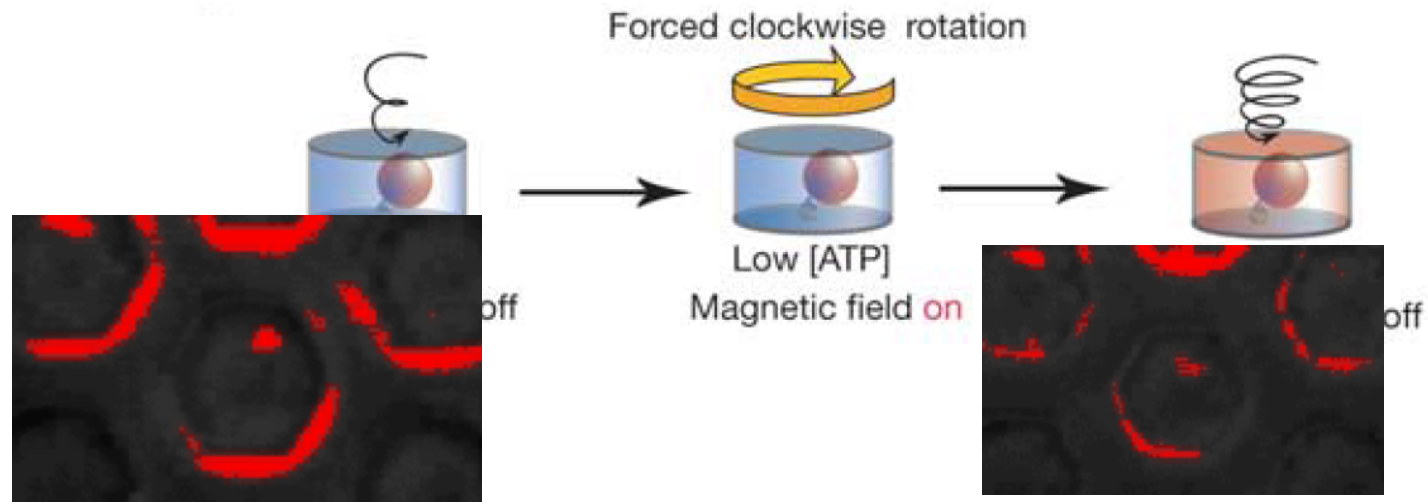
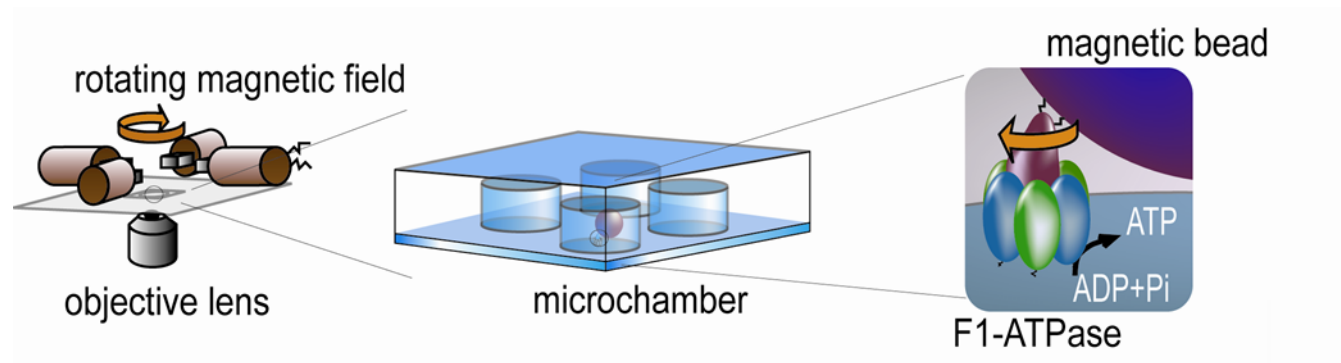


Speed increment shows ATP synthesis.

Nature 433, 773-777 (2005)

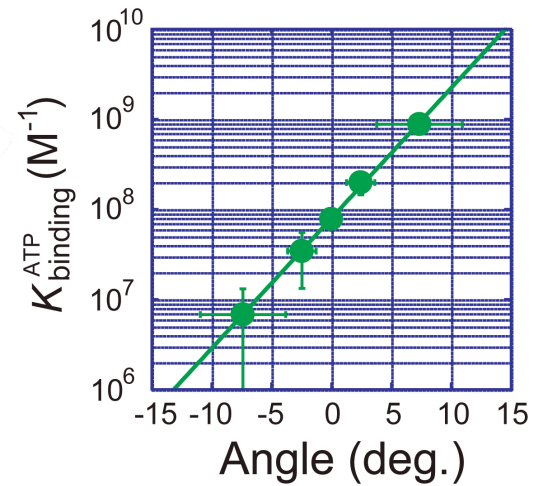
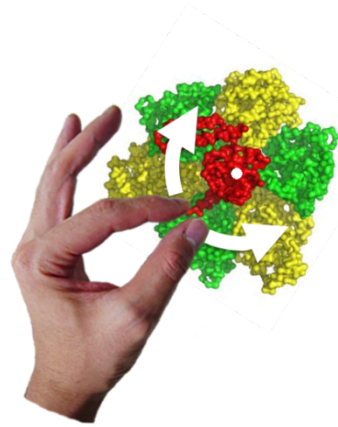
Highly coupled ATP synthesis by F₁-ATPase single molecules

Yannick Rondelez^{1,2}, Guillaume Tresset^{1,2}, Takako Nakashima²,
Yasuyuki Kato-Yamada³, Hiroyuki Fujita⁴, Shoji Takeuchi⁴
& Hiroyuki Noji²

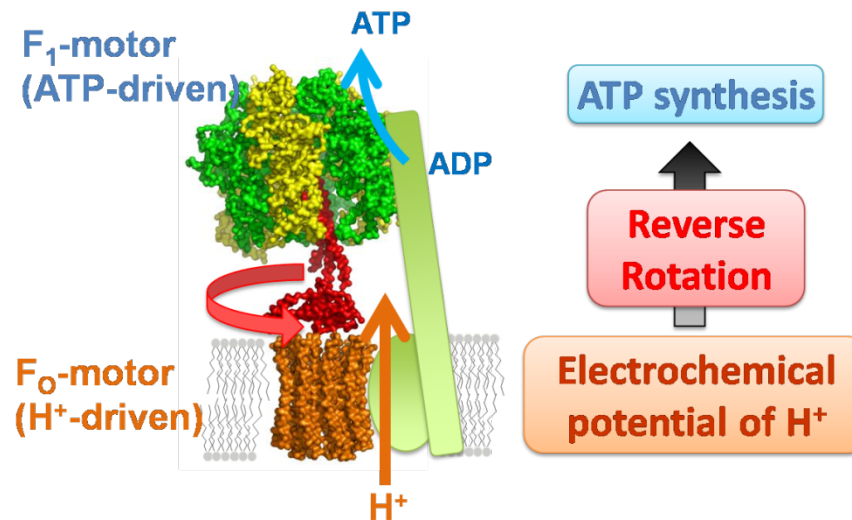


学んだこと

- 力学的に化学反応を制御できること

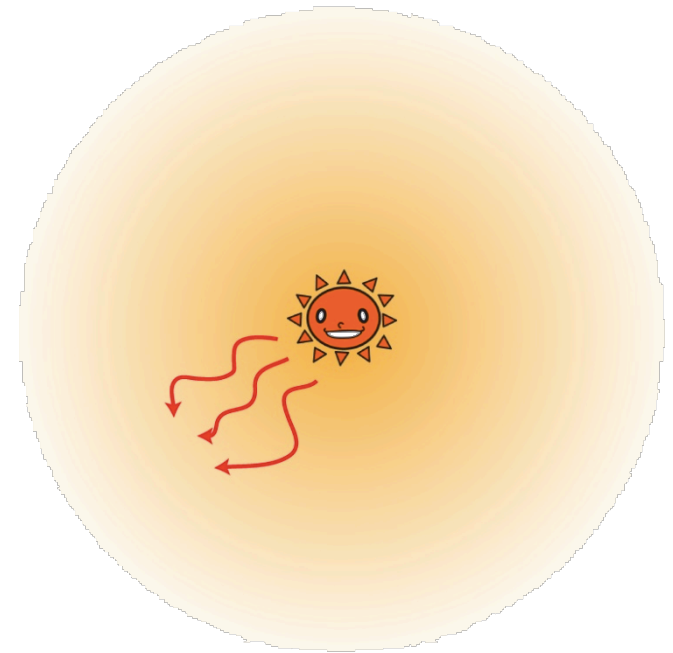
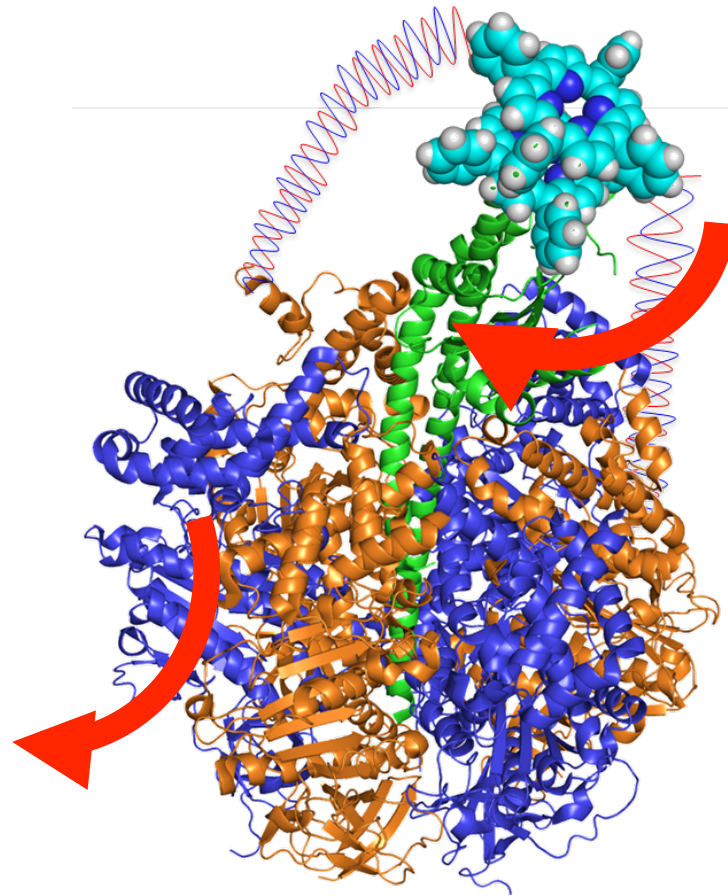


- 2種類のモーターを接続したエネルギー変換



光合成分子機械

化学合成



光駆動分子モータ

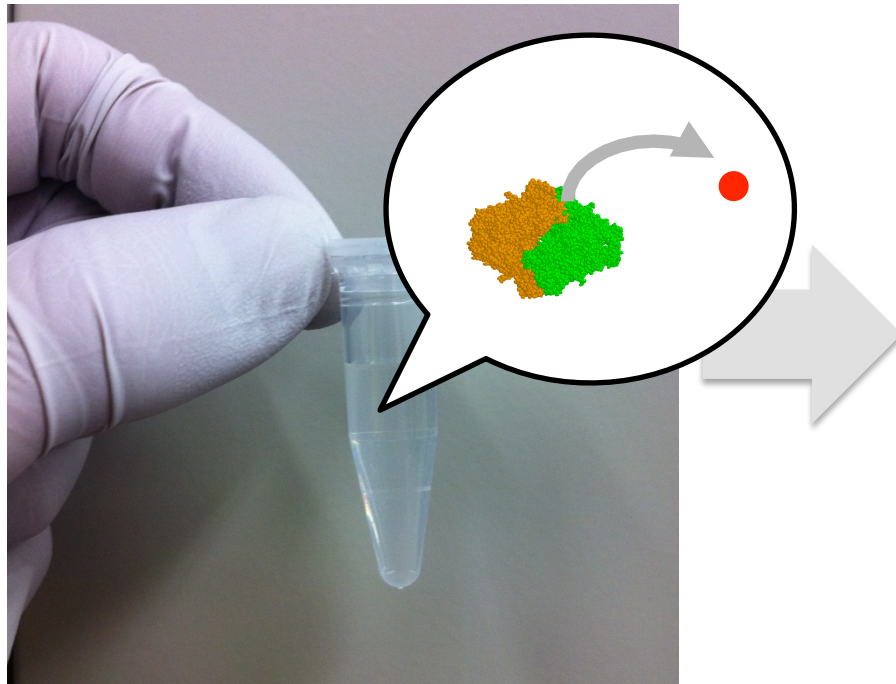
+

化学駆動モータ

私の技術の応用

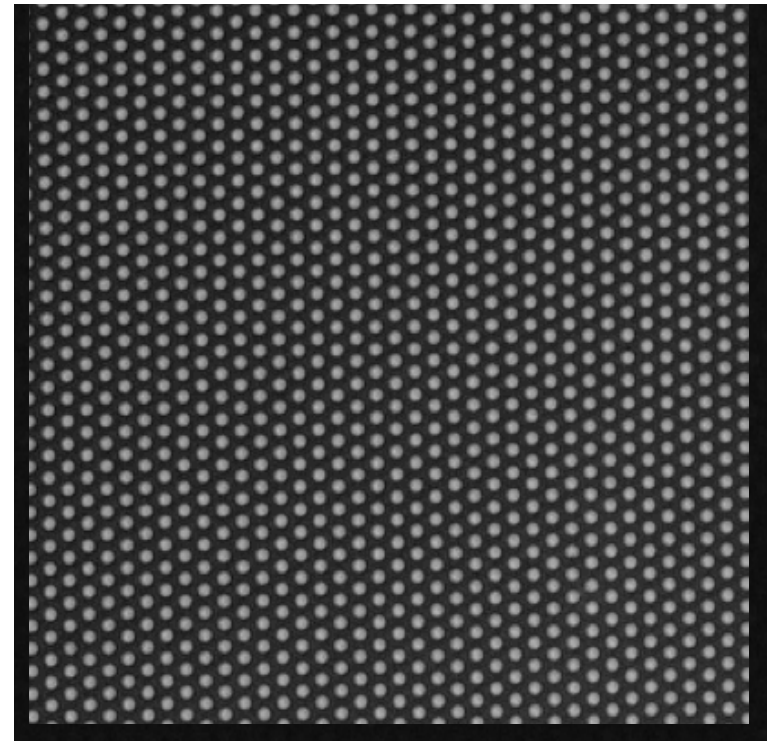
Single-molecule enzyme assay in fL reactor

In mL tube



600 molecules/min
1 zM/min in 1 mL (1 cm^3)

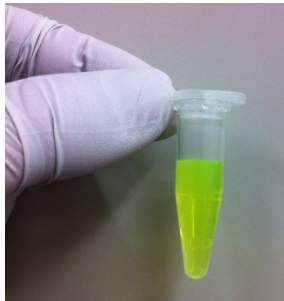
In fL chambers



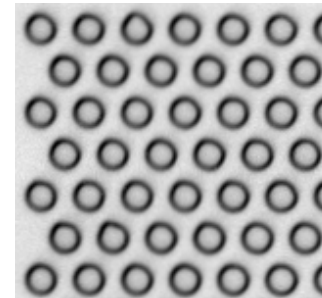
1 μM /min in 1 fL ($1 \mu\text{m}^3$)

Partitioning into ultra-small compartments

Milli-liter (10 mm)



Femto-liter (1-10 μm)



Tokyo Dome

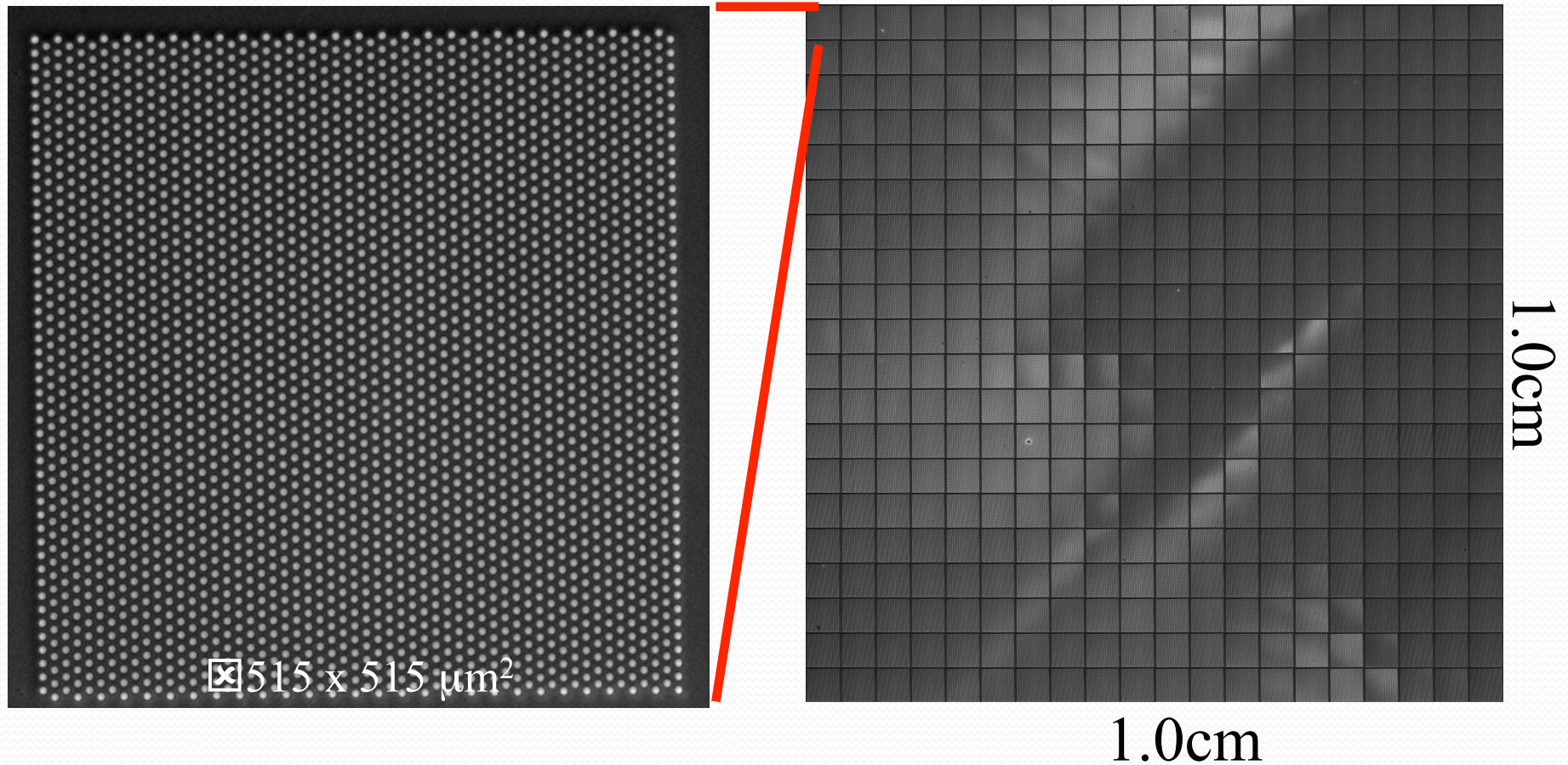


Petbottle

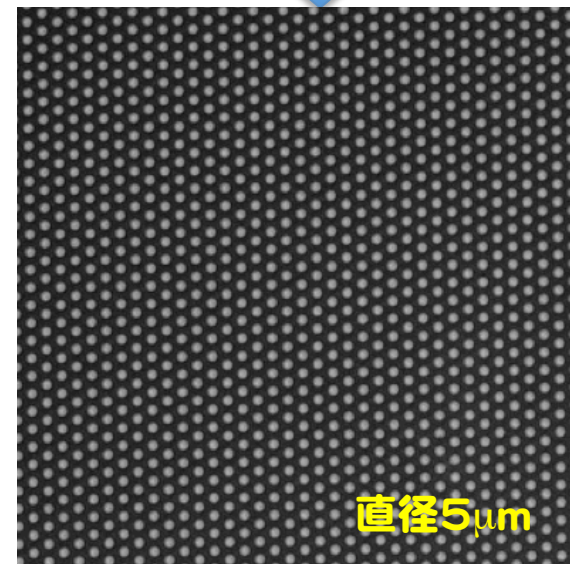
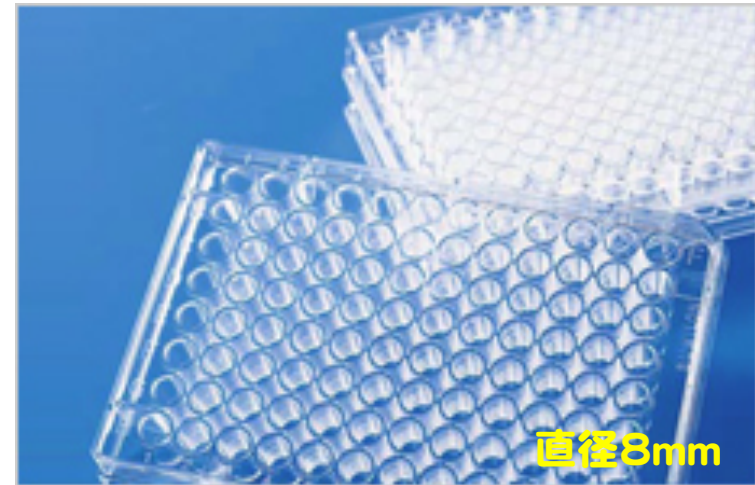
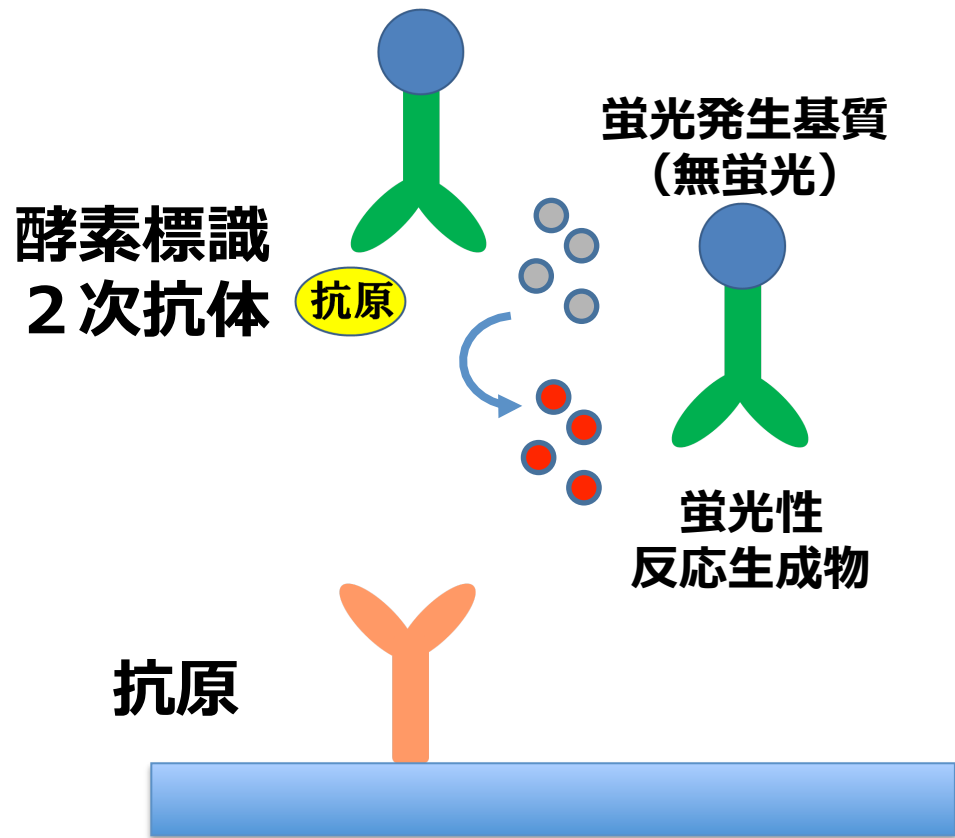


Million droplets at one time

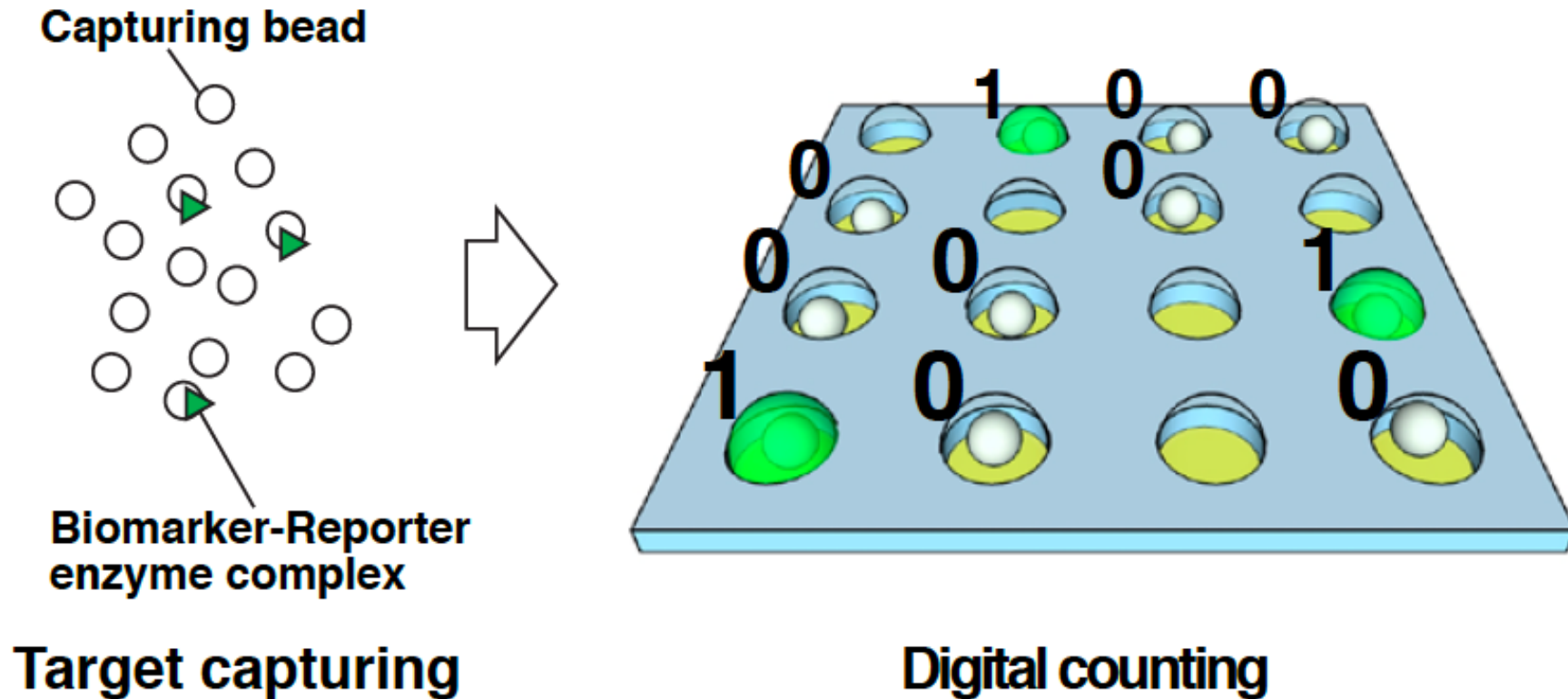
2744 droplets/screen X 400 screen=1097600 droplets



酵素結合免疫吸着反応(ELISA)を1分子計測する

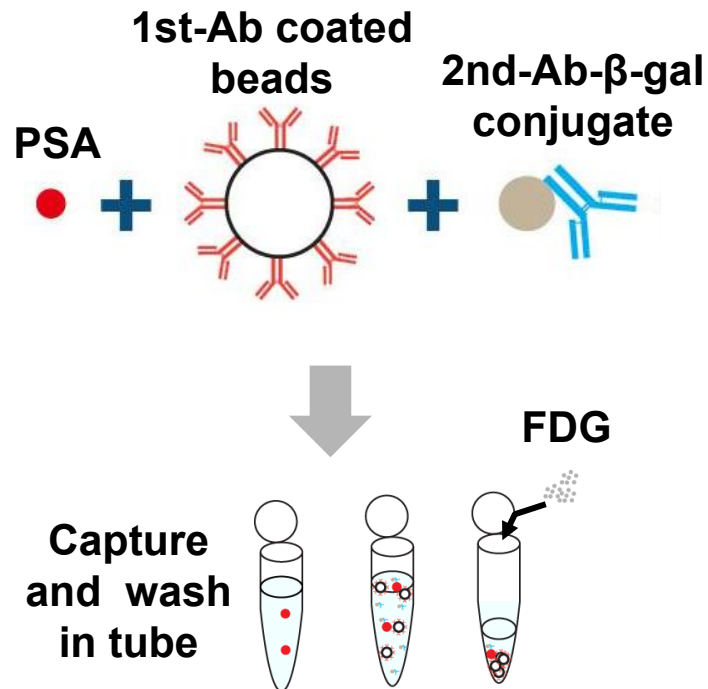


Concept of digital counting

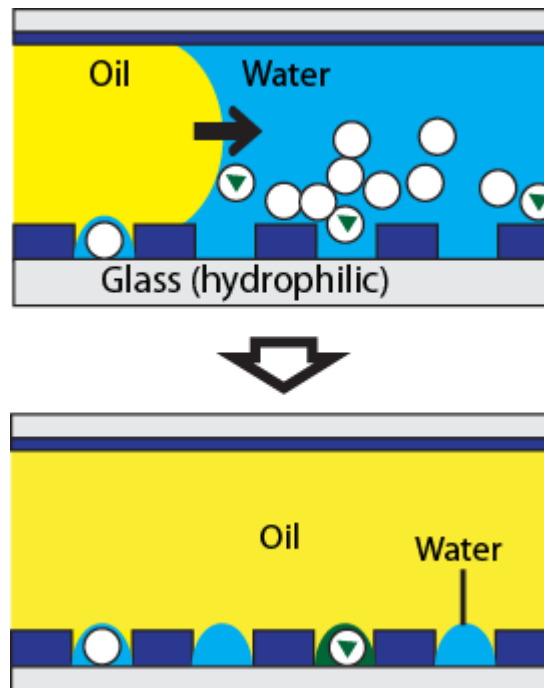


Procedure of Digital ELISA for prostate tumor marker (PSA)

1. Target capture



2. Bead enclosure



3. Digital counting

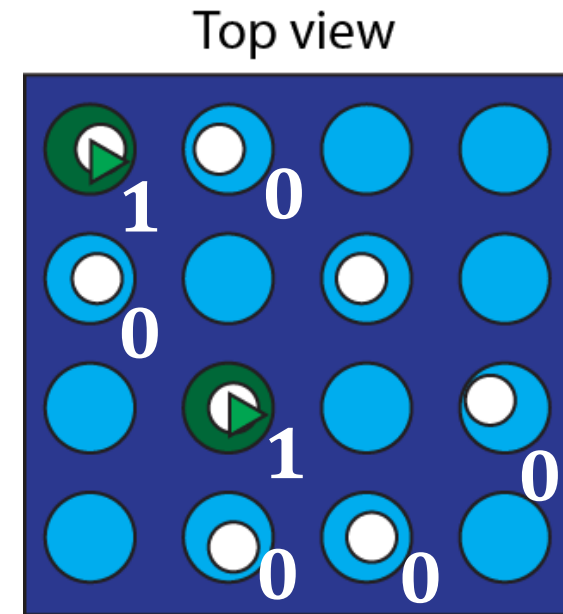
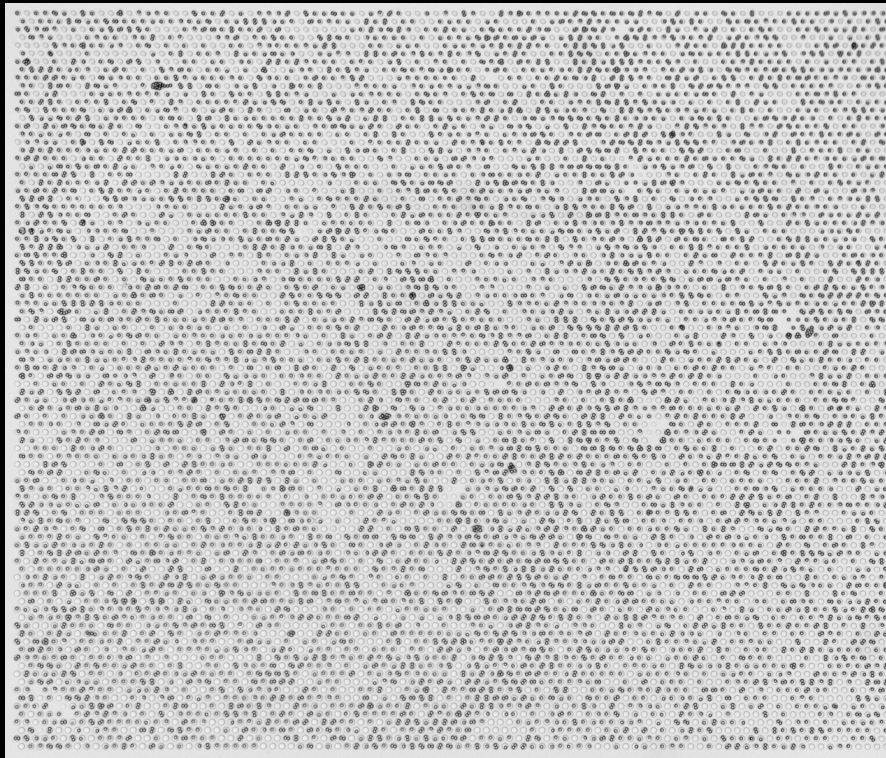


Image data of digital ELISA

Bright field



Fluorescent



[PSA] = 200 aM

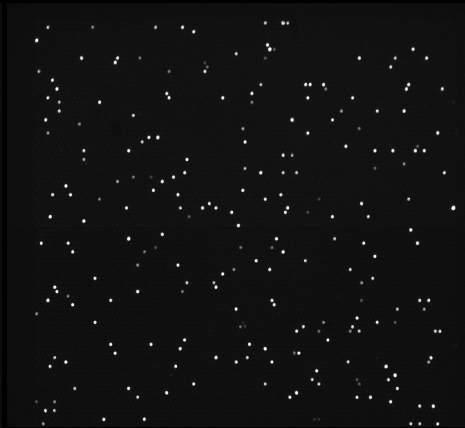
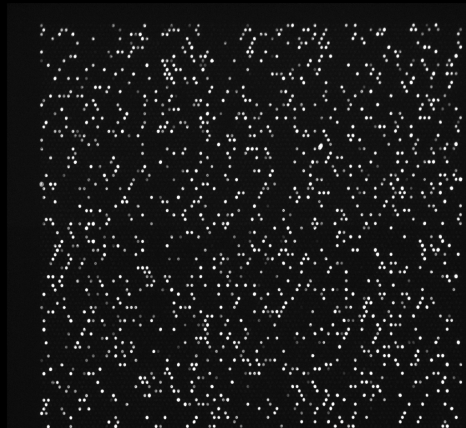
Signal vs [PSA]

[PSA] = 2 fM

[PSA] = 200 aM

[PSA] = 20 aM

[PSA] = 0 M

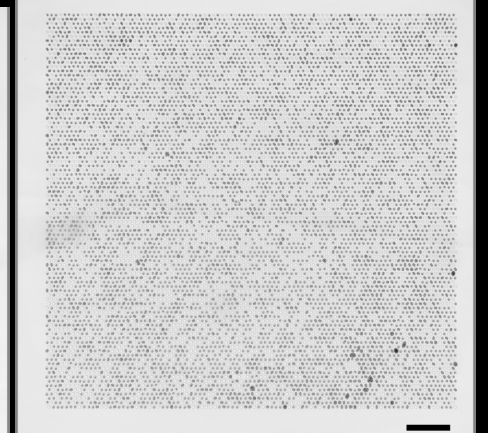
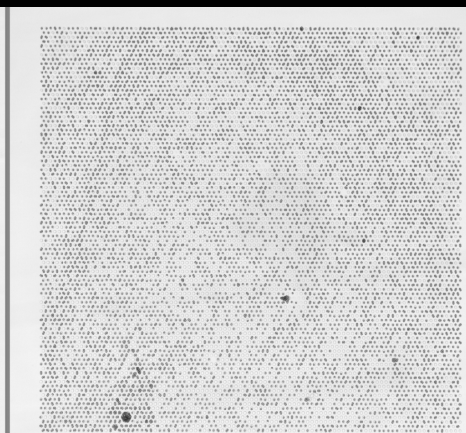


蛍光ドロップレット
総数 : 1399

230

40

17



ビーズ総数 : 7553

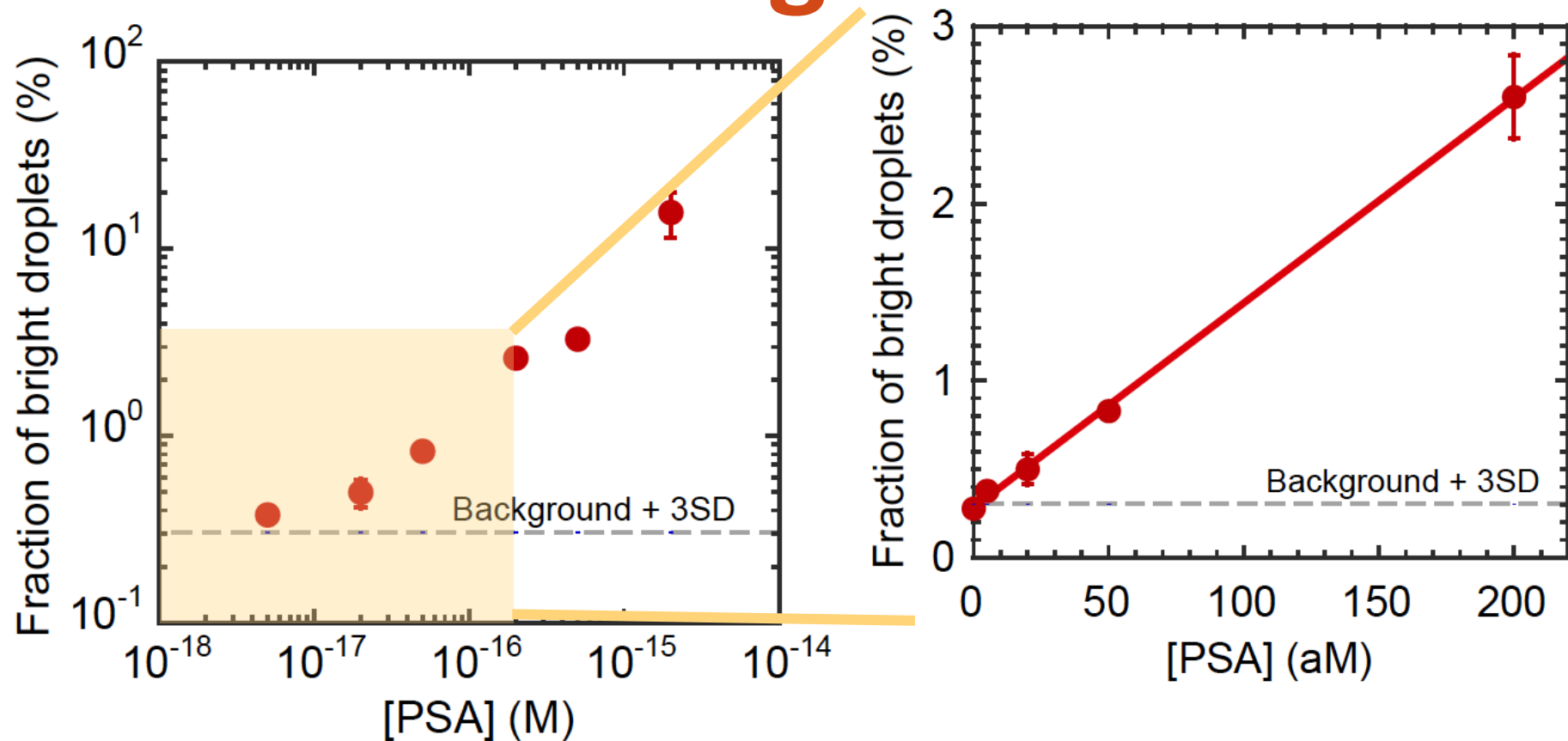
8462

8505

7677

100 μm

LOD of digital ELISA



L.O.D. = 2 aM
 10^6 times better than conventional ELISA; 14 pM

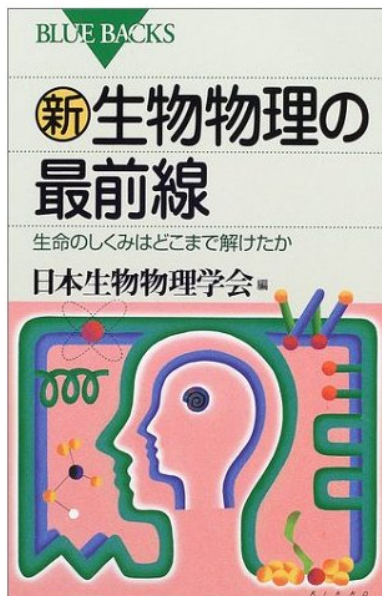
Future direction



**for single-molecule
diagnostic analysis**

まとめ

- 大学の「生物」は分野の垣根を越えた学際領域である。
- 「おもしろい」を究めると「役に立つ」技術や知識を生み出す。



メディア報道と若手研究者の表彰

- 読売新聞 (2012年9月1日第2面)
- 日本経済新聞 (2012年9月4日第14面)
- 日経産業新聞 (2012年9月4日第10面)
- マイナビニュース (2012年9月4日)
- 学新聞 (2012年9月14日第4面)

英国王立化学会(RSC)東京国際カンファレンスBest Poster賞
(PD. Kim)

がん検出感度100万倍

東大チーム
新技術開発

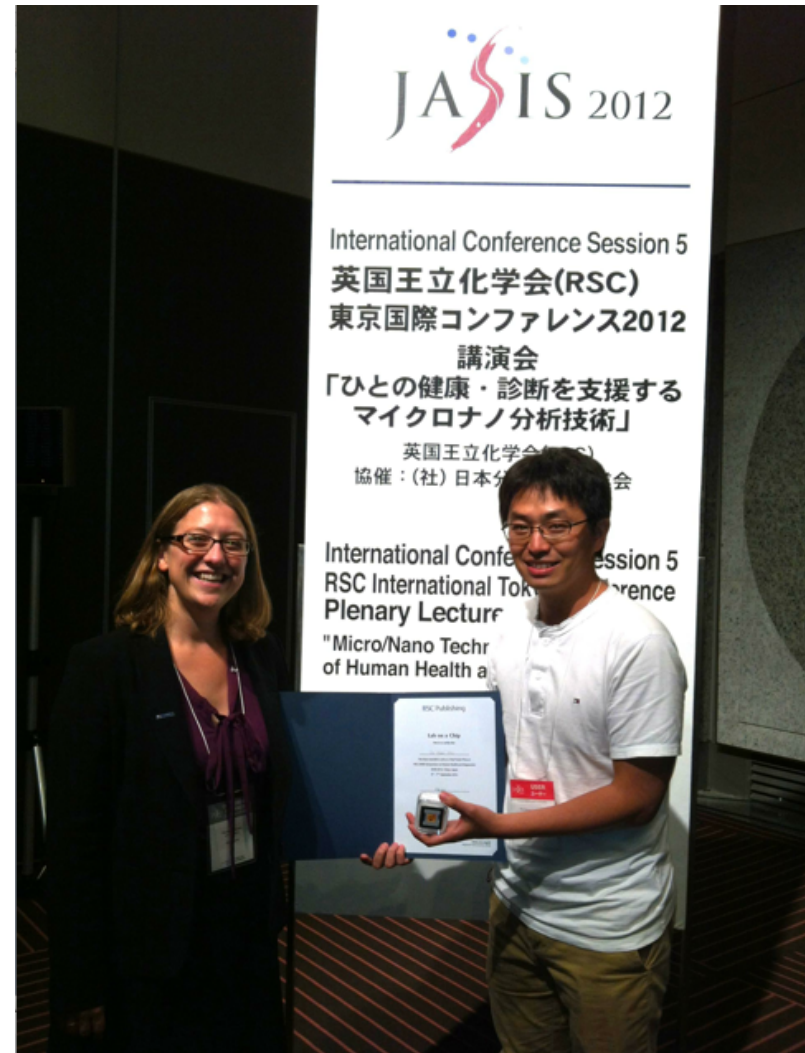
微細加工技術を使い、がん細胞やインフルエンザウイルスの検出感度を、これまでの100万倍以上まで高める技術を東京大の野地博行教授(応用化学)らのチームが開発した。病気の早期発見につながる成果で、英科学誌に掲載される。

研究チームが着目したの

は、血中にあるがん細胞やウイルスが作り出す特異的なたんぱく質(抗原)と、結びつきやすいたんぱく質(抗体)の反応「抗原抗体反応」を利用した検査法。これまでは小型試験管の中で検査するため濃度が薄められて、感度が悪かった。

チームは、半導体を作る技術を応用し、1センチ四方のガラスに100万個の小さな穴を開け、そこに抗原抗体反応でできた分子を流し込み、1個ずつとらえられるようにした。前立腺がんの指標「PSA(前立腺特異抗原)」の有無を調べると、従来法より100万倍薄い濃度でも検出できた。野地教授は「現在は高感度カメラ、顕微鏡が必要だが、小型のセンサーで検査でき、持ち運べるキットを開発したい」と話す。

読売新聞



Easy & reproducible bead trapping

