

「プロセスインテグレーションによる機能発現ナノシステムの創製」
平成 22 年度採択研究代表者

H25 年度 実績報告

野地 博行

東京大学 大学院工学系研究科(工学部)
教授

生体分子 1 分子デジタル計数デバイスの開発

§1. 研究実施体制

A. 「デジタル計数法開発」グループ

- ① 研究代表者: 野地 博行 (東京大学工学系研究科、教授)
- ② 研究項目
 - ・デジタル ELISA 法の開発
 - ・1細胞生体分子デジタル計数法の確立
 - ・化学発光法によるウイルスの 1 粒子検出
 - ・膜輸送体活性のデジタル計数法の開発
 - ・ナノロッド粒子の回転拡散運動イメージング技術の確立
 - ・ラマン分光を用いたデジタル計数法の開発

B. 「デジタル計数用 CMOS システム開発」グループ

- ① 主たる共同研究者: 笹川 清隆 (奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学研究科、助教)
- ② 研究項目
 - ・蛍光計測用 CMOS センサシステムの開発

§2. 研究実施の概要

A. 「デジタル計数法開発」グループ

感染や疾病の検査・診断に汎用されているイムノアッセイ法である ELISA (酵素結合免疫吸着法) の感度を 100 万倍以上改善した 1 分子デジタル ELISA を開発した。さらに 1 分子デジタル ELISA の実用化に向けたターゲット分子の多様化、デバイス作製工程の簡略化、量産化に取り組んだ。また、1 細胞生体分子デジタル計数法の確立、化学発光法によるウイルス 1 粒子の低ノイズ検出、脂質膜アレイチップによる膜輸送体活性の 1 分子デジタル計数法、ナノロッドやラマン分光を用いたデジタル計数法の開発に取り組んだ。

B. 「デジタル計数用 CMOS システム開発」グループ

レンズレス CMOS イメージングシステムについて、電子冷却を行うことによってノイズ低減を行うとともに、画像処理手法を改善することによって、10 μM のフルオレセイン水溶液から成る微小液滴の蛍光観察を実現した。また、マイクロチャンバアレイに蛍光基質 FDG (Fluorescein di- β -D-galactopyranoside) と調製した酵素溶液 β -gal (β -galactosidase) を導入し、酵素アッセイ実験を行なった。試作デバイスによってマイクロチャンバ内に生成された Fluorescein の蛍光検出に成功していることがわかる。蛍光を示すチャンバ数から算出された検出濃度は、試料の β -gal 濃度と一致し、0.3 pM までの検出に成功した。また、イメージセンサ部については、積層フォトダイオード搭載イメージセンサを試作し、フィルタレス構造による蛍光検出の可能性を示した。

§3. 成果発表等

論文詳細情報(国際)

A-1 Watanabe R, Tabata KV, Iino R, Ueno H, Iwamoto M, Oiki S, Noji H, Biased Brownian stepping rotation of F_0F_1 -ATP synthase driven by proton motive force, Nature Communications, 4, Article number:1631, 1-6, 2013 (doi: 10.1038/ncomms2631)

A-2 Tsuyama T, Kishikawa J, Han YW, Harada Y, Tsubouchi A, Noji H, Kakizuka A, Yokoyama K, Uemura T, Imamura H, In vivo fluorescent ATP imaging of Drosophila melanogaster and Caenorhabditis elegans by using a genetically encoded fluorescent ATP biosensor optimized for low temperatures, Anal Chem, 85, 7889-7896. 2013 (doi: 10.1021/ac4015325)

A-3 Toei M and Noji H, Single-molecule analysis of F_0F_1 -ATP synthase inhibited by N,N-dicyclohexylcarbodiimide, J Biol Chem, 288: 25717-26. 2013 (doi: 10.1074/jbc.M113.482455)

A-4 Daichi Okuno, Masayoshi Nishiyama and Hiroyuki Noji, Single molecule analysis of the rotation of F_1 -ATPase under high hydrostatic pressure, Biophysical Journal, 105, 1635-1642, 2013 (doi: 10.1016/j.bpj.2013.08.036)

A-5 Yoshihiro Minagawa, Hiroshi Ueno, Mayu Hara, Yoshiko Ishizuka-Katsura, Noboru Ohsawa, Takaho Terada, Mikako Shirouzu, Shigeyuki Yokoyama, Ichiro Yamato, Eiro Muneyuki, Hiroyuki Noji, Takeshi Murata, and Ryota Iino, Basic properties of rotary dynamics of the molecular motor *Enterococcus hirae* V₁-ATPase, *J. Biol. Chem.*, 288, 45, 32700-32707, 2013 (doi: 10.1074/jbc.M113.506329)

A-6 Watanabe R, Hayashi K, Ueno H and Noji H, Catalysis-enhancement via rotary fluctuation of F₁-ATPase, *Biophys. J.*, 105, 2385-2391, 2013 (doi: 10.1016/j.bpj.2013.09.050)

A-7 Kioka H, Kato H, Fujikawa M, Tsukamoto O, Suzuki T, Imamura H, Nakano A, Higo S, Yamazaki S, Matsuzaki T, Tkafuji K, Asanuma H, Asakura M, Minamino T, Shintani Y, Yoshida M, Noji H, Kitakaze M, Komuro I, Asano Y and Takashima S, Evaluation of intra-mitochondrial ATP levels identifies G0/G1 switch gene 2 as a positive regulator of oxidative phosphorylation, *PNAS*, 111: 273-8, 2014 (doi: 10.1073/pnas.1318547111)

A-8 Kim SH, He X, Kaneda S, Kawada J, Fourmy D, Noji H and Fujii T, Quantifying genetically inserted fluorescent protein in single iPS cells to monitor Nanog expression using electroactive microchamber arrays, *Lab on a Chip*, 14: 730-6 2014 (doi: 10.1039/c3lc51086g)

A-9 Tanaka T, Nagashima K, Inagaki N, Kioka H, Takashima S, Fukuoka H, Noji H, Kakizuka A and Imamura H, Glucose-stimulated single pancreatic islets sustain increased cytosolic ATP levels during initial Ca²⁺ influx and subsequent Ca²⁺ oscillations, *J Biol Chem.* 289: 2205-16, 2014 (doi: 10.1074/jbc.M113.499111)

A-10 Watanabe R and Noji H, Timing of inorganic phosphate release modulates the catalytic activity of ATP-driven rotary motor protein, *Nature Communications* accepted, 2014

A-11 Osaki T, Kamiya K, Kawano R, Iino R, Noji H, Takeuchi S, Uniform-sized proteoliposome formation by using electrospray for microscopic membrane protein assays, *Proceedings of 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μTAS2013)*, 1: 1698-1700, 2013

A-12 Watanabe, R., Fujita, D., Tabata, KV., Yamauchi, L., Soga, N., Kim, SH., Suga, H & Noji, H. High throughput formation of sub-million lipid membrane arrays for measuring membrane protein activities, *Proceedings of 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μTAS2013)*, 1: 1314-1316, 2013

B-1 Hironari Takehara, Kazuya Miyazawa, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Soo Hyeon Kim, Ryota Iino, Hiroyuki Noji and Jun Ohta, "A CMOS image sensor with stacked photodiodes for lensless observation system of digital

enzyme-linked immunosorbent assay”, Jpn. J. Appl. Phys. , vol. 53, No. 42, 04EL02, 2014 (doi:10. 7567/JJAP. 53. 04EL02)

B-2 Kiyotaka Sasagawa, Soo Hyeon Kim, Kazuya Miyazawa, Hironari Takehara, Toshihiko Noda, Takashi Tokuda, Ryota Iino, Hiroyuki Noji and Jun Ohta, “Dual-mode lensless imaging device for digital enzyme linked immunosorbent assay”, Proc. SPIE, vol. 8933, 89330N, 2014 (doi:10. 1117/12. 2039948)

B-3 Sasagawa K, Kim SH, Miyazawa K, Takehara H, Noda T, Tokuda T, Iino R, Noji H, Ohta J, Lensless CMOS-based imaging device for fluorescent femtoliter droplet array counting, Proceedings of 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS2013). 1: 1565-1567, 2013

(3-2) 知財出願

- ① 平成 25 年度特許出願件数(国内 1 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 3 件)