

9 4 0 6 1
数字に見る
科学と未来
Vol.4

1枚のチップに試験管10万本 1分子解析で生命の謎に迫る

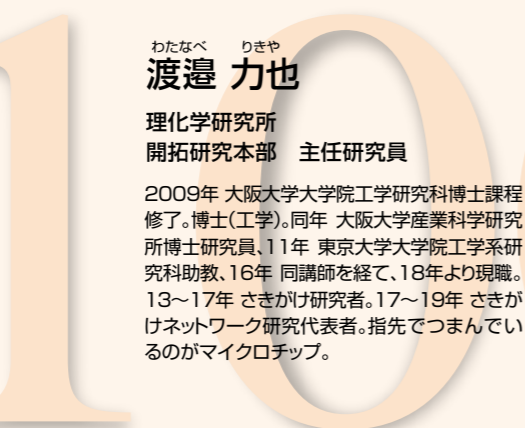
生物の体内には、さまざまな役割を担う多彩な生体分子が存在する。生命現象の解明は、これらの分子1個の機能や物性の計測が重要となる。1分子計測に不可欠なマイクロチップの開発に挑むのが、理化学研究所の渡邊力也主任研究員だ。

たんぱく質の機能解明には 微細な試験管の集積が必要

生命活動の謎を解明し、病気の治療や創薬に役立てるためには、生体内でのたんぱく質の役割を理解することが重要だ。例えば、今年のノーベル生理学・医学賞の受賞が決まった免疫機構に関わるたんぱく質の発見と機能解明は、新しいがん治療法の開発につながっている。

酵素などたんぱく質の機能を調べる際には「活性」を評価する。たんぱく質溶液とそれに反応する物質(基質)を試験管に入れ、反応生成物を検出する方法がよく用いられるが、基質の濃度を変えながら測定することで、反応速度も調べられる。試験管(ウェル)の数が多ければ同じ条件で得られるデータは多くなり、より精密なデータを少ない労力で得ることができる。一般的に96個のウェルが設けられたマイクロプレートを使用することが多いが、渡邊力也さんは小さなチップ上にさらに多数の試験管を作り込むことを考えた。その目的をこう説明する。

「従来の実験では、たんぱく質は全て均一で活性も等しいという仮定に基づき分子の集団を対象としていましたが、それでは集団の平均値しか得られません。機能の正しい理解には1分子ごとの活性を計測する必要があります。1分子の計測では、1本の試験管にたんぱく質分子1つを閉じ込める必要



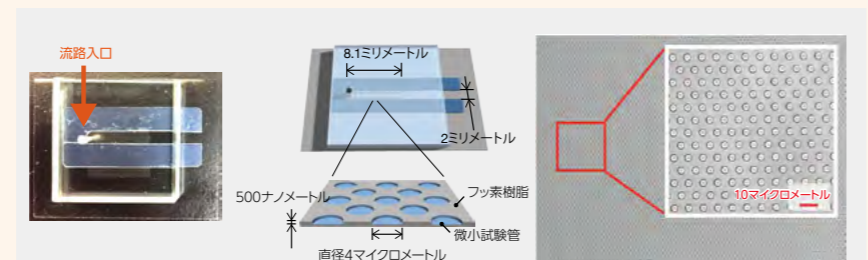
わたなべ りきや
渡邊 力也

理化学研究所
開拓研究本部 主任研究員

2009年 大阪大学大学院工学研究科博士課程修了。博士(工学)。同年 大阪大学産業科学研究科博士研究員。11年 東京大学大学院工学系研究科助教。16年 同講師を経て、18年より現職。13~17年 さきがけ研究者。17~19年 さきがけネットワーク研究代表者。指先でつまんでいるのがマイクロチップ。

があるため、微細な試験管が大量に必要なのです。開発された24×32ミリメートル角のマイクロチップには、直径4マイクロメートル、高さ500ナノメートルの微小な試験管が10万本並び(図1)。チップにたんぱく質溶液を流し込んだ時、たんぱく質が1分子だけ入る試験管は1000本に1本程度と非常に少ない。どの試験管にたんぱく質が入り、どのような活性があるのかは統計的に処理するため、必要な計測結果を集

めるには多数の微小試験管が不可欠なのだ。試験管の微細化は、活性測定の高感度化にも一役買っていると渡邊さんは言う。「1分子のたんぱく質が基質と反応して得られる生成物はごく微量です。試験管の容積が小さければ、反応生成物の濃度変化は大きくなるので、濃度変化に応答する蛍光試薬を使い蛍光強度の変化を捉えることで、生体反応を高感度、定量的に計測可能です」。



■図1 厚さ500ナノメートルのフッ素樹脂膜に、直径4マイクロメートルの微小試験管10万本を成形したマイクロチップ。チップ上に設置した幅2ミリメートル、高さ0.3ミリメートルの流路にたんぱく質水溶液を滴下する。流路入り口から8.1ミリメートルまで試験管が並び。

半導体の加工技術を活用し 生体を模した膜形成も可能に

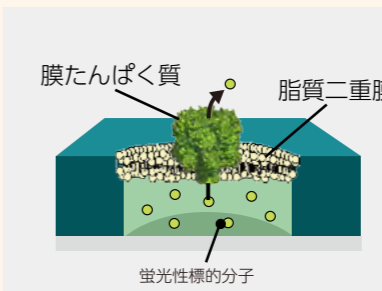
微小試験管の作り込みには、半導体の微細加工技術を活用した。しかし、基板に疎水性のフッ素樹脂を用いたこと、容積が数フェムト(1000兆分の1)リットルと小さいことから表面張力が働き、たんぱく質水溶液が入りにくいという問題が生じた。この解決にも微細加工技術が一役買った。

「底面、側面をプラズマで表面処理することで、微小試験管の内部を親水性に変えることができ、表面張力が弱まることで水溶液が試験管に入りやすくなりました。一方で、微小試験管の入り口部分は疎水性のままです。このため、脂質を含む有機溶媒(クロロホルム)を滴下し、さらに再度水を流すという2工程で細胞膜と同じ脂質二重膜を効率的に形成できます。従来の方法とは違い、膜たんぱく質を埋め込みやすくなり、より生体に近い条件を作れます」。

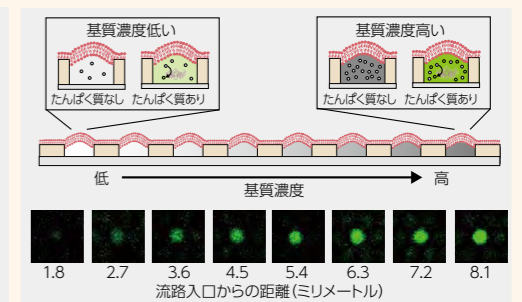
試験管の上に脂質二重膜のふたを形成することにより、物質の輸送など重要な役割を果たす膜たんぱく質を埋め込んだ実験も可能となった(図2)。これにより1分子の膜たんぱく質がどのように振る舞うのかが解明できれば、創薬などへの貢献も期待される。

実験効率の向上を 濃度勾配の利用で達成

マイクロチップの開発によって、生体に近い条件での1分子機能計測の道が開かれた。しかし、実際に使用するためには、実験効率のさらなる向上が必要だ。たんぱく質の活性は基質の濃度に依存するため、複数の濃度条件で測定するが、従来のマイクロチップでは1枚で1条件の測定しかできず、濃度ごとにマイクロチップを用意しなければならなかった。渡邊さんは、この問題に取り組んだ。



■図2 物質の輸送に関わる膜たんぱく質を脂質二重膜に埋め込むことで、細胞内外への物質の輸送を1分子単位で検出できる。毎秒2個程度の分子の輸送も定量的に検出できるほど感度が高い。



■図3 マイクロチップ上での標的物質の濃度勾配の形成。流路入り口から距離が離れるほど酵素と反応する物質(基質)の濃度が濃くなり、活性(蛍光の強さ)が強くなる。1枚のチップで試験管内の酵素の有無、基質濃度、蛍光強度の増加速度を解析し、1分子の活性を簡便に計測できる。

「流体の考え方を利用し、濃度勾配を作ることを考えたのです。たんぱく質と基質を含む水溶液で流路を満たした後に流路入り口から希釈液を一定の流速で流し込むと、流れの方向に沿って濃度勾配が作られます。川の流にインクを流すと徐々に色が薄くなっていくイメージですが、ここでは希釈液を流し込むので流路入り口から遠ざかるほど基質の濃度が濃くなります」。

流体シミュレーションでどのような勾配ができるかも検証しており、希釈液の容量、流速を制御することで濃度を定量的に変化させることも可能だ(図3)。1種類の希釈液を数秒間導入するだけで操作も簡便で、計測準備にかかる時間も短縮できる。

新薬の原料候補として数百種類ものたんぱく質を調べる創薬分野などでは、実験効率の向上が強く求められていた。渡邊さんが開発したチップと

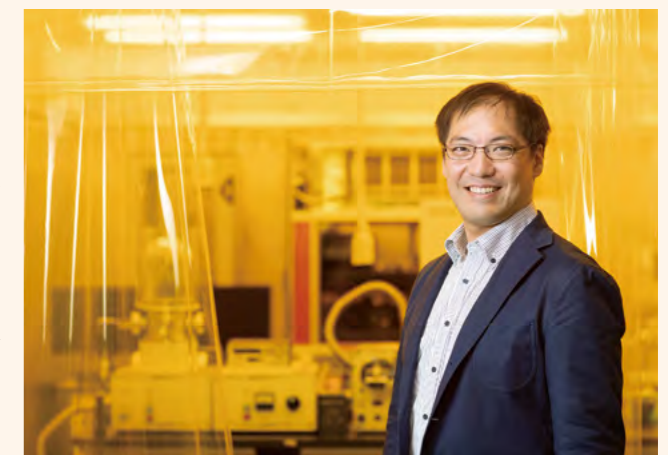
濃度勾配形成手法は、この部分に大きく貢献し得る技術だ。現在は一方の濃度勾配しか作れないが、今後は電気や磁力などを利用し、さらにさまざまな条件を1枚のチップで実現できないかを検討している。

新技術の実用化を目指す 普及に向けより使いやすく

開発した技術の実用化に向けた研究も、進行中だ。

「実際に活用してもらうには、測定できるたんぱく質の種類を増やす必要があります。また、マイクロチップの製造コストの低減や、データ解析技術の向上も重要です。実際にチップを利用する研究者の声も聞きながら改良を加え、より使いやすい技術として普及させることで、たんぱく質間の生体内での連携など、生体分子の機能解明に役立てられればと考えています」。

今後、マイクロチップが実用化されたたんぱく質1分子の効率よい解析が可能になれば、生命現象の解明に加え、新薬の開発、病気の早期発見などでの活用も期待される。技術の確立を目指して、今後も精力的な研究は続いていく。



マイクロチップを製造するクリーンルーム。試験管内のプラズマ処理までをここで行う。