

超高感度蛍光検出法の応用技術開発

誌名	業務報告 / 滋賀県工業技術総合センター
ISSN	13438417
著者名	白井, 伸明 岡田, 俊樹
発行元	滋賀県工業技術総合センター
巻/号	32号
掲載ページ	p. 105-107
発行年月	2018年10月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



超高感度蛍光検出法の応用技術開発

食品分析などに活用するためのFCS測定法の応用技術開発(第2報)

白井 伸明* 岡田 俊樹*
SHIRAI Nobuaki* OKADA Toshiki*

要旨 蛍光相関分光(FCS)測定法は、レーザー光源と共焦点光学系をもちいて溶液中の蛍光分子の運動をマイクロメートルサイズの観察空間に絞った測定を行う技術である。測定結果を数学的に解析することで蛍光分子の溶液中での運動速度を求め、分子サイズを知ることが出来る。我々は、このFCS測定装置を利用し、タンパク質やペプチドが抗体を結合した際の見かけ上の分子サイズの変化を調べ、最終的には食品中の微生物が生産する分子を検出するための技術開発を行うための技術検証を行った。

1 はじめに

食品成分検査や環境分析などの分野では、特定の有用成分の検査や安全性の評価に新しい分析技術が活用されるようになってきている。例えば、HPLCのようにクロマト分析法を利用して目的成分を分離、検出する際に色素や蛍光物質を検出対象の成分にラベルし、吸光や蛍光検出することで高感度化する方法には多くの成功例がある¹⁾。また、近年では質量分析装置について、分子サイズの測定精度、検出感度の向上が急速に進んでおり超高感度での検出が可能な対象が増えている^{2), 3)}。さらに、高性能なクロマト分析機器では溶媒やカラムの安定化や分離最適化、測定後の洗浄操作、測定結果の解析などを自動化することが出来るようになってきている。

大学などの研究機関での食品分析や環境計測の分野では、クロマト分析法以外の高感度微量分析技術として、目的成分に特異的に結合する抗体を用いるELISA法が一般的に利用される。様々な抗体が市販されていることから、ELISA法を導入することは比較的簡単である。一般的には96穴プレートを使用するため0.1~0.2mLの少量のサンプルで多検体を同時に測定できる。しかし、ここでの課題は約半日から1日程度の操作時間が必要で、しかも自動処理装置を導入しない限りある程度の熟練を要する多くの手作業があり、測定者による分析精度に影響が表れる。

また抗体を利用する別の手法としてイムノクロマト法も一般的であり、特に装置を必要としない簡易検査法として臨床現場などで実用化例が増えている。例えば、インフルエンザウイルスの治療薬を処方する前に鼻や喉からのぬぐい液にウイルスが存在することを調べる検査が行われている。しかし、感度が十分でないために低濃度のウイルスしか存在しない場合に、誤った陰性結果を示すことがある。我々は、より少量のサンプルでも高感度でウイルス検出することに成功している。

ライフサイエンスや医療分野では高感度で安定な分析技術が求められる場面は多いが、食品や環境の安全管理などを行う現場では簡便で短時間の操作で微量のサンプルから目的物質の測定が出来る方法のニーズが高い。

本研究で利用する蛍光相関分光(FCS; Fluorescence correlation spectroscopy)測定技術の歴史としては1972年から理論的に基礎をなす論文報告があり^{4, 5, 6)}、その後共焦点光学系の導入により微小空間での測定が可能となり、PMT(光電子倍增管)やコンピュータの高性能化・低価格化により測定感度が高く、短時間での実用的な測定が達成され、近年になり分析技術として様々な応用が可能となっている⁷⁾。本研究では最終的には、抗原抗体反応や酵素-基質の結合を小型のFCS測定装置を利用した超高感度な分析技術を開発するための基本的な技術検討を行った。ここで、必要な材料としてタンパク質あるいは、ペプチドに蛍光分子を結合した材料を調製し、FCS測定条件や測定データの解析方法の検討を行った。

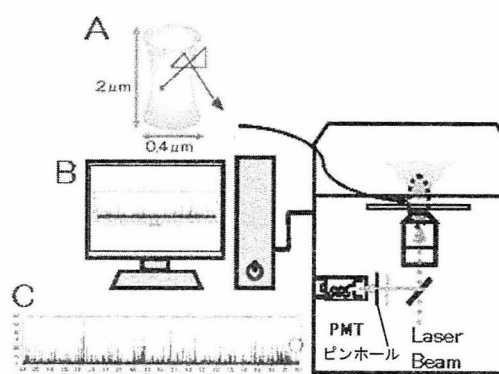


図1 蛍光相関分光(FCS)測定系の構成と高感度な蛍光分子の検出、測定のための基本的なポイント 固体レーザー光源、ダイクロイックミラー、対物レンズ、カットオフフィルター、ピンホールとPMT(光電子倍增管)から構成される共焦点光学系(B)により、対物レンズ近くのサンプル中の共焦点領域(A)を通過する1分子の蛍光発光を超高感度に測定する。

* 有機材料係

2 実験材料・操作

2.1 材料

実験に用いた蛍光化合物は Alexa Fluor®488 succinimidyl ester (Thermo Fisher Scientific社、米国MA) を使用し、緩衝液の調整には Na₂HPO₄、NaH₂PO₄、Triton X-100 (和光純薬工業㈱、大阪)、Tween®20 (東京化成工業㈱、東京)、NaCl (ナカライテスク㈱、京都) を使用した。

蛍光化合物は DMSO (dimethyl sulfoxide) あるいは EtOH (ethanol) の分光分析用を用いて 1 mg/ml に溶解した後、蒸留水か 1×PBS (phosphate buffered saline, Sigma-Aldrich, Co., 米国 Mo) に添加して吸光度を測定し各蛍光物質のモル吸光計数から濃度決定した。さらに 10⁻⁷M 以下の低濃度に希釈する際には、試験管などの容器、分注器具、測定用ガラス材の壁面などへの吸着を防ぐため Tween 20 などの界面活性剤を 0.01~0.05% 添加し、低濃度蛍光化合物溶液として FCS 測定に供した。

2.2 蛍光相関分光 (FCS) 測定装置と解析

蛍光相関分光 (FCS) 測定装置は、試料溶液中の共焦点領域を蛍光化合物が平均 1 分子ずつ通過する際の蛍光強度の変化をマイクロ秒以下の時間分解で測定した。測定結果は、横軸に時間、縦軸に蛍光強度 (検出されたフォトン数) としたグラフに表すと図 1c となりピーク状のシグナルが蛍光分子の観察空間の通過を意味する「蛍光ゆらぎ」を得る。蛍光分子の溶液中で移動は、拡散によるものであり次のストークス・アインシュタインの式によりあらわされる。

$$\overline{x^2} (\text{平均到達距離}) = \frac{K T}{3 \pi \eta r} t (\text{時間}) \dots (\text{式})$$

測定法としては、この蛍光強度の時間変化を自己相関関数と呼ばれる解析法を行うことで、並進拡散時間 (DT; Diffusion Time) を求める^{6, 7, 8)}。FCS 測定と解析法とその利用については金城らの総説に明解な解説があるので参照されたい。

本研究では、小型 FCS 測定装置 (浜松ホトニクス) を使用し、その共焦点光学系と高感度な蛍光検出システムを利用して「蛍光 1 分子検出」技術と「抗原-抗体反応」による見かけの分子サイズの変化を調べるための条件検討を行った。まず、蛍光相関分光法 (FCS) 測定装置のシステムと原理を概説すると、図 1 のようにレーザー光が対物レンズを通して少量の溶液中に照射され、加えてダイクロイックミラーとカットオフフィルター、ピンホールから構成される共焦点光学系により極めて小さな空間 (図 1A 共焦点領域) に存在する蛍光分子から発生するフォトンレベルの蛍光を光電子増倍管 (PMT) により増幅し高感度でなおかつ、高い時間分解能で連続的に測定するものである。通常 FCS 測定では、得られた時系列の蛍光強度の変化が自己相関関数によって解析され、微小な時間差でシグナルがどれだけ変化するかを相関性を求めるグラフを画く。その関数式から並進拡散時間 (DT) を求め、蛍光分子が共焦点領域を通過する平均時間、つまり分子の大きさを調べること

になる^{7, 8)}。共焦点領域に注目した観察では、溶液中で分子はブラウン運動により高速で動き回り、微小時間で微小領域を観察した場合のみ、この出入りを観察できる。

溶液中の共焦点領域の大きさは、レーザー光源からの共焦点光学系に対応して円柱状になる。今回のシステムでは、そのサイズは直径が 0.4 μm 程度、軸長が 2 μm 程度 (図 1A)、したがって容積はフェムトリットル以下の大きさとなる。例えば、溶液に含まれる蛍光色素の濃度が 10 nM、共焦点領域の測定体積を 0.1 フェムトリットルとすると平均 0.6 個が存在する計算となり^{7, 8)}、これより低濃度では分子 1 個が通過する状況となる。

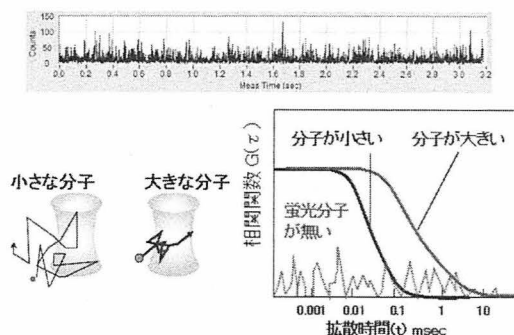


図 2 小型 FCS 装置を用いて一定濃度の蛍光溶液を FCS 測定した「蛍光ゆらぎ」を自己相関関数により解析を行うことで、蛍光分子が小さい場合、大きい場合、あるいは蛍光分子が存在しない場合が判別できる。また、自己相関関数から求められる並進拡散時間 (DT) は、共焦点観察領域を蛍光分子が通過する平均時間となる。

具体的な測定手順は、まず対物レンズの上に蒸留水を 1 滴置いた上に底面ガラス板厚 0.15mm のマイクロウェルスライド (A10657-01、浜松ホトニクス) を設置し、測定対象の低濃度の蛍光化合物溶液を 10~30 μL 滴下したのちに 2 分間程度静置した後、3 秒あるいは 10 秒の FCS 測定を 1 回の測定として、同じサンプルで数回の連続測定を行った。

2.3 蛍光結合タンパク質の調製

タンパク質 (抗体 IgG) あるいはペプチド (分子サイズ 2.3k) に一定数の蛍光分子を結合した材料を調製した。 (図 3)。各試料の濃度および 1 分子に結合した蛍光分子の数を求めるため以下の操作を行った。緩衝液 D-PBS (ナカライテスク㈱、京都) あるいは蒸留水に完全に溶解した 50 μg/ml 程度の溶液として吸光度 (495nm) を測定し蛍光色素 (Alexa488) のモル吸光計数 (ε = 71000) から溶液濃度を求めた。更に低濃度でのサンプルでは、蛍光分光光度計 (日立 F-7000) により FCS 測定装置と同じ光源波長 (473nm) で蛍光スペクトルの測定を行い、蛍光強度から溶液濃度を求めた。次にタンパク質濃度の測定には、BCA 法 (Pierce BCA Protein Assay, Thermo Scientific 社) のエンハンス法を利用した。検量線用の標準タンパク質はウシ血清アルブミン (BSA, Thermo Scientific 社) を使用した。

3 結果と考察

3.1 蛍光ラベル分子の調製と測定条件

本研究を最終的に食品や環境、臨床検査の分析技術として応用する為には、使用する蛍光分子は水溶液中で十分発光し、安定なことが条件となる。現在、光学顕微鏡観察用の蛍光組織染色やフローサイトメトリー分析用の細胞ラベルなどのために多くの蛍光化合物が開発、販売されるようになっているが、これまでの検討から、FCS測定装置での検出にはAlexa Fluor®488を利用することとした。FCS装置の測定条件を一定にするため、図1のピンホール位置を正確に調節する“校正”が必要であり、これにはAlexa Fluor488を 10^{-8} Mから 10^{-9} Mまでとなるように0.02%のTween20を含む蒸留水に希釈したものを用いた。FCS装置は、対物レンズ水浸40倍(NA=1.15)、レーザー光源(波長473nm、出力1mW)を持つ。測定時には、レーザー光強度はNDフィルターを置いて $35\text{--}100\ \mu\text{W}$ とし、蛍光化合物が平均1分子ずつに通過する際の蛍光強度の変化を200nsecの時間分解で測定した。結果、 10^{-8} Mから 10^{-9} Mまでの一定濃度での比較を行う事が安定に分子サイズの比較を行う条件となる事が確認できた。

3.2 蛍光結合タンパク質、ペプチドのFCS測定

FCS測定のためモデルとなるタンパク質IgGとペプチドに蛍光分子を結合した材料を調製した。タンパク質とペプチドのアミノ基に蛍光物質Alexa488を結合させ、蛍光光度計による定量によりタンパク質とペプチドに平均1-2分子の蛍光分子が結合したサンプルを調製した。余剰の蛍光分子の除去には、遠心による膜分離法と透析膜を用いた方法を検討したが、時間がかかるが透析法が得られるモデル蛍光ラベル化合物は良好であった。タンパク質およびペプチドと特異抗体との混合後にFCS測定と「共焦点空間の平均通過時間」をあらわすDTを求める解析を行った。抗体-蛍光タンパク質の結合による見かけ分子サイズの差は、いずれも有意差のある評価が可能であった。また、測定原理から予想されるように、ペプチド-抗体での測定がより良好であることも確認することができた(図3)

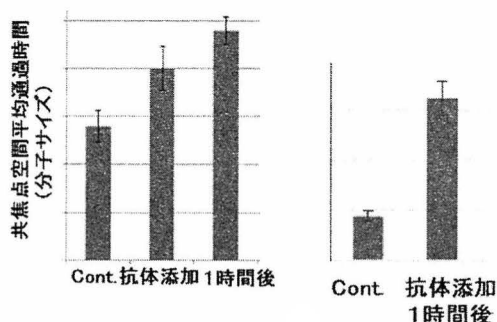


図3 小型FCS装置を用いた測定により、蛍光結合タンパク質と抗体との結合の検出(左)および蛍光結合ペプチドと抗体との結合の検出(右)は、自己相関関数の解析から共焦点空間を通過する平均時間を求め、抗体との結合により見かけの分子サイズが大きく測定されることで判定できる。

3.3 FCS測定データ中のノイズの課題

今回の測定は約3秒の測定を10回程度繰り返したものを1セットとしている。複数の測定セットの平均値、バラつきを同じサンプルで何度も測定してみると、共焦点空間の平均通過時間が異常に大きくなるなど、解析上のバラつきが見られた。現在、異常測定が起きる原因の検討とともに、平均値と標準偏差から異常値データを解析から除去できるかについての検討をおこなおうとしている。

4 まとめ

本研究では、小型FCS(蛍光相関分光法)測定装置を用いてタンパク質、ペプチドが特異抗体と結合することを高感度、微量、迅速、簡便に検出する技術開発を目指した材料の調製と測定条件の基礎検討を行った。小型FCS測定装置での測定に必要なサンプル調製、測定時の材料および測定条件を検討し、昨年度までの抗体をモデルタンパク質とした場合に比べ、ペプチドでは、抗原-抗体の結合が明確に検出できることが確認された。これは、図2で概説した測定原理から想定されるとおりであるが、今後、統計的な有意差を確認しながら、簡便な測定のためのキット試作などを行うこととしたい。測定のなかで食品抽出物などを使うと必ずノイズが検出される点については、ノイズ自体の低減と測定・解析方法での工夫も必要であると考えている。

参考文献

- 1) 高速液体クロマトグラフィーハンドブック改訂2版 日本分析化学会関東支部編、丸善出版事業部(2000)
- 2) 小川茂, GC/MS, LC/MSのための誘導体化:ぶんせき, 7, 337(2008)
- 3) 宮野博, 新保和高:細胞工学, 25, 1410(2006).
- 4) Magde D, Elson EL, Webb WW. Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization. Biopolymers. 1974,13(1):29-61.
- 5) Ehrenberg M, Rigler R. Fluorescence correlation spectroscopy applied to rotational diffusion of macromolecules. Quarterly reviews of biophysics, 1976, 9(1):69-81.
- 6) Koppel DE, Axelrod D, Schlessinger J, Elson EL, Webb WW. Dynamics of fluorescence marker concentration as a probe of mobility. Biophys J. 1976, 16(11):1315-29.
- 7) 坂田啓司, 藤井文彦, 田村守, 金城政孝. 蛍光相関分光法(FCS)を用いた抗原抗体反応解析および検体検出. BIO INDUSTRY, 2004, 21(4), 52-59
- 8) 金城政孝 蛍光相関法によるタンパク質の機能解析 生化学, 第82巻 第12号, p1103-1116, (2010)