

タンパク質分析用蛍光イメージャー

Fluorescence Imager for Protein Analysis

渡邊 由紀夫* 川向 良平* 田中 優紀* 岡橋 哲秀* 北村 和也*

Yukio Watanabe Ryohei Kawamuki Masaki Tanaka Tetsuhide Okahashi Kazuya Kitamura

タンパク質分析用の蛍光イメージャーを開発した。全反射を利用した新規の対物レンズを作製し、幅広い角度に放射する蛍光を効率的に捕集することで蛍光検出の高感度化をはかりつつ、最小5 μm となる高精細な画像生成を可能とした。さらに、蛍光検出に用いる部材を一体化することで配置スペースを省略し、ユーザーから要望の多いコンパクトな測定装置を実現した。今後、本イメージャーを活用することで、プロテオミクスの研究において、より詳細な分析が可能になり、タンパク質の機能解明や新規の製薬開発などへの貢献が期待される。本稿では、蛍光イメージャーの装置構成、光学系の特長と、本機によって実施したタンパク質サンプルの測定結果について報告する。

We have developed the new fluorescence imager for protein analyses using the two-dimensional electrophoresis. The users can obtain high-sensitivity and high-resolution images. The new objective lens has been designed for this imager to realize efficient fluorescent light collection and a small spot (5 μm) of excitation light. In addition, by using the newly designed optical module which contains all optical components, this imager has more compact body comparing to the conventional systems. This imager will contribute to the research in the field of protein science and drug discovery. This paper describes the outline of the new fluorescence imager and several measurement results.

1. はじめに

現在、タンパク質を対象とするプロテオミクスに注目が集まっており、研究が盛んにおこなわれている。ヒトが生命活動を行う上で実際に機能を担っているのは、DNAの情報をもとにつくられるタンパク質であり、タンパク質の機能を調べることで、病気のメカニズムや投薬の効果の解明にとって重要だと考えられている¹⁻²⁾。一方でヒトの体内でつくられるタンパク質は、数千から数万種類あると言われており、これらの機能を研究する上では、個々のタンパク質を分離することが必要となる。二次元電気泳動はタンパク質を分離する手法の一つとして広く用いられており、当社からも既に二次元電気泳動装置 (Auto2D) が商品化されている³⁾。本製品は、これまで人手で行っていた作業を自動化することで、省力化・時間短縮がはかられているのに加え、タンパク質分離の分解能が高いという特長を備えており、ある種のタンパク質のリン酸化による微小な変化も検出可能となっている²⁾。

今回我々はこの分野の研究で用いられる分析装置の一つである蛍光イメージャーを開発した。本装置は媒質中に形成されたDNAやタンパク質分離パターンを画像化

するスキャナ装置であり、通常、電気泳動装置と一体的に使用される。本論文で紹介する蛍光イメージャーは、当社の二次元電気泳動装置との連携を高めた特長を備えており、検出感度が高く、高精細なタンパク質分離パターンの画像が生成可能であるとともに、装置全体サイズも他社製品と比較して小型化を実現した (図1)。

本稿では、上記蛍光イメージャーの画像化方式の原理と装置構成および上記特長を実現するための光学技術を中心に述べ、最後に本装置による測定例を示す。



図1 蛍光イメージャー外観

Fig. 1 fluorescence imager for protein analysis

*生産技術開発本部 検査システム開発センター

2. 蛍光検出・画像化の原理

はじめに、蛍光検出による画像生成の原理について説明する。本装置で測定対象となる媒質中に含まれるタンパク質には蛍光体で標識されていることが前提となる。このとき蛍光体の励起スペクトルに合致した波長の光が蛍光体に照射されると、励起光の波長に対して長波長の成分を含む光（蛍光）が発生する。この光を検出することで、間接的にタンパク質の有無が確認できる。

開発した蛍光イメージャーでは、画像化の方式として、二次元スキャンを採用している。本方式では、励起光をサンプル上の一点に照射し、その一点から発生する蛍光を検出することが基本となるが、励起光の照射位置を変化させながら各点毎の蛍光強度を記録し、それらのデータを後段の画像処理ソフトで並びかえることで、サンプル内のタンパク質分離パターンを画像化する。その他の画像化の方式としては、サンプルの全領域一面に光を照射することで蛍光体を一括励起し、冷却CCDなどを用いて長時間露光して撮像するカメラ方式⁴⁾や、線状に励起し、ラインセンサを用いて検出する一次元スキャン方式⁵⁾があるが、採用した二次元スキャン方式は広い領域を高精細に画像化できる点で他方式に対して有利である。得られる画像の解像度は励起光のスポットサイズとスキャンピッチに依存し、スポット径が狭いほど高精細な画像を得ることができる。

3. 装置構成

3.1 全体構成

装置の全体構成を図2に示す。大きく分けると蛍光を

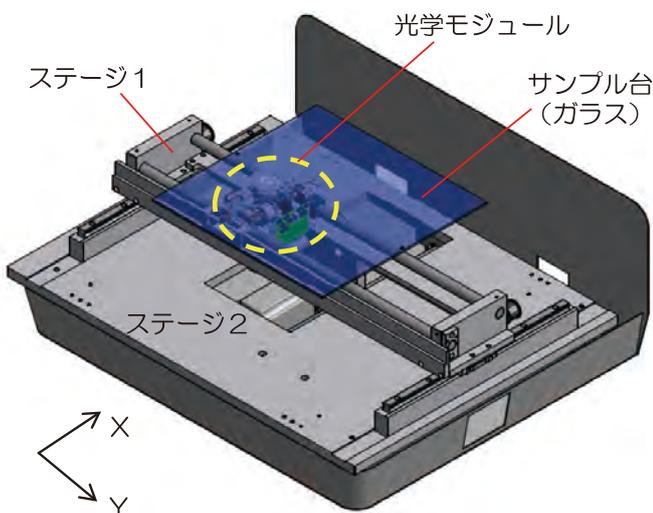


図2 蛍光イメージャーの構成
Fig. 2 inner configuration of fluorescence imager

検出する光学モジュール、光学モジュールを走査する走査部、サンプルを設置するガラスステージ部（図ではサンプル台となるガラスのみ表示）から構成される。走査部はさらに光学モジュールを図のY方向に高速に走査する第一走査部と、その第一走査部をX方向に狭ピッチで駆動する第二走査部から構成される。測定を行う際には、第一走査部と第二走査部を交互に駆動することで二次元スキャンを実現する。第二走査部の最小のスキャンピッチは $5\mu\text{m}$ であり、この解像度での高精細な画像を得ることができる。また、Y方向の走査速度については 2m/sec 以上が可能であり、ミニゲルサイズ（約 $100\times 100\text{mm}$ ）、測定ピッチ $10\mu\text{m}$ の場合、15分程度で測定できる。最大の測定範囲はラージゲル1枚分をカバーする $320\times 240\text{mm}$ とした。筐体を含めた装置サイズは $700\times 620\times 320\text{mm}$ であり、他社製品に対してコンパクトな装置となっている。

検出器で受光した信号は光学モジュールの基板からフラットケーブルを経由して装置本体の基板に伝送され、A/D変換される。さらに変換されたデータは走査方向の1ラインごとにUSBケーブルを経由してPCに送信されメモリ内に保存される。本方式では、検出される信号のサンプリングレートは一定であるのに対し、Y方向に走査する光学モジュールの位置の時間変化は、加減速動作の影響で一定ではないため、検出器からの信号をそのまま配列させると歪んだ画像となる。このためY方向における光学モジュールの位置を、第一走査部側面に設置したリニアスケール（分解能 $1\mu\text{m}$ ）によって検出し、

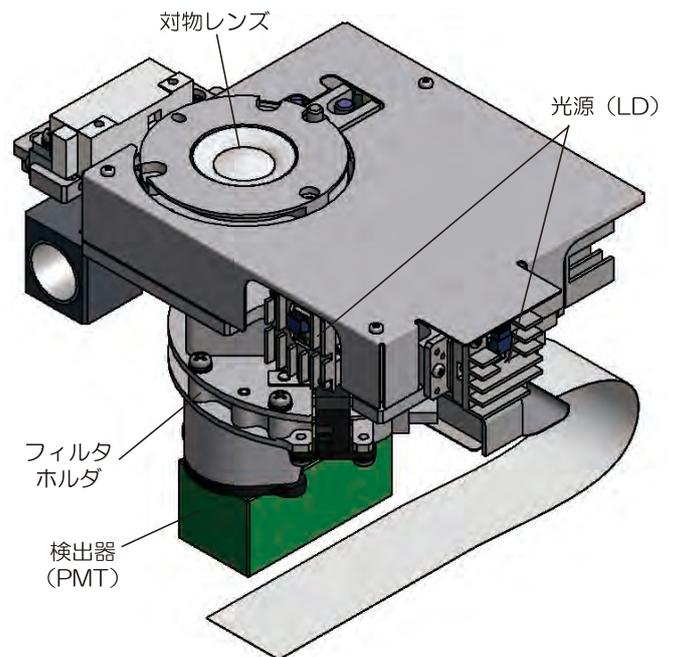


図3 光学モジュール
Fig. 3 optical module of fluorescence imager

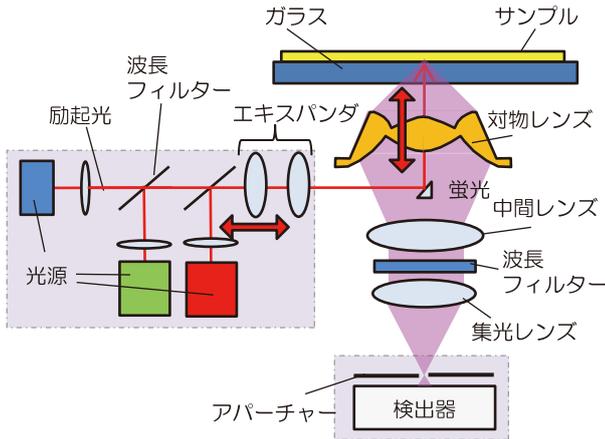


図4 蛍光検出光学系
Fig. 4 optical system of fluorescence detection

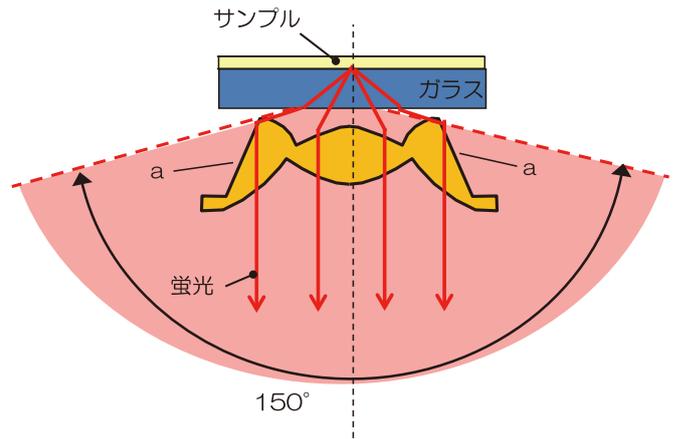


図5 対物レンズの形状と機能
Fig. 5 cross section surface of objective lens

リニアスケールからの信号に同期した信号のみ抽出することで、配列時に一定間隔のデータとなるようにしている。

3.2 光学モジュール

光学モジュールの外観を図3に示す。光学モジュールは蛍光体を励起し、発生した蛍光を検出するために必要な光源・光学素子・検出器などの光学関連の部材を全て備えており、さらにレンズ駆動用のステッピングモーターやレーザードライバーなどを搭載した基板もあわせて一体化されている。他社の二次元スキャン装置では、光学系の一部を筐体周辺部に固定して配置する構成もみられるが、図3のようにモジュール化することで、筐体部分に余分のスペースを設ける必要がなくなり、装置全体のコンパクト化に寄与している。

本モジュールの光学系の概略を図4に示す。励起光源として、632nm, 532nm, 472nmの3種類の波長の光源(LD)を搭載している。それぞれの光路は波長フィルターを利用して途中から共通化している。励起光はエキスパンダレンズを通過後、反射ミラーでサンプル方向に立上げられ、対物レンズでサンプル上に集光される。励起光照射により発生した蛍光は蛍光体のまわりに等方的に放射されるが、そのうち、対物レンズに入射した一部の蛍光は、中間レンズ、波長フィルター、集光レンズ、アパーチャを経由して検出器に導かれる。波長フィルターと検出器前に配置したアパーチャは、励起光の散乱に起因する迷光をカットする役割を果たす。発生する蛍光の信号強度は励起光強度に対して非常に弱いため、光電子増倍管(PMT)を検出器として用いている。

3.3 光学系の特長

本システムの特長は検出感度が高く、高精細な画像を

作製できる点にある。これを実現するための光学系の特長を次に述べる。

本モジュールで採用している対物レンズは高感度化を実現するために、今回、新たに設計しており、図5にその形状と機能を示す。高感度化のポイントは、等方的に放射される蛍光に対して、できるだけ幅広い放射角度の光を捕集できるよう形状を工夫している点にある。

本レンズに入射した蛍光の光路は、中央部と外周部で大きく異なる。まず、中央の両凸レンズ形状の部分に入射した光は屈折による作用のみを受けて検出器方向に射出される。一方、外周部に入射した光は入射・射出時の屈折による作用以外に、レンズの側面(図のa面)での反射による作用を受けることで光路が大きく変えられた後、検出器方向に射出される。a面での反射は、光がレンズの内部から外部に抜けようとする際に生じる全反射を利用しており、a面の角度はこの面に入射する蛍光の光線角度が全て全反射の角度となるように設計している。図に示すように本レンズで取り込める放射角度はガラス外部に射出される蛍光のうち約150°の角度をカバーする。このとき、同様の放射角度の光を通常のレンズで捕集しようとする、大型のレンズが必要となるうえ、放射角度の大きな光は表面反射の影響で効率よく取り込めない問題もあるが、図のように全反射を利用した方法を用いることで、レンズのサイズを大きくすることなく、光の捕集効率を高めることが可能となる。

また、対物レンズはステッピングモーターで光軸方向に位置を変更できるようになっており、測定サンプルの保持形態に応じて励起光の最適な集光位置(蛍光を捕集するポイント)に調整することができる。例えば、ゲル測定の場合には、電気泳動用のケースから取りだしてサンプル台に直接乗せて測定するほか、電気泳動用のケースにいたまま測定することも想定されるが、このと

き両者間で生じるケースの厚み分（約1~3mm）に相当する最適位置の変化はこのレンズの位置調整で補正する。なお、このレンズの位置変化によって生じる光学系の収差は、対物レンズの曲率と中間レンズの形状を工夫することで低減している。

このほか、対物レンズから射出された光を収束光としてビーム径を狭めることで、中間レンズや波長フィルターなどの後段の光学素子の大型化を抑制している。これにより光学モジュールの小型化と軽量化を図っている。以上は発生した蛍光を検出器まで導くまでの検出光学系の特長である。

一方、LDからサンプルまでの励起光学系に関しては、集光位置のスポット径を変化させる調整機構を備えることが特長となる。このスポット径調整を実現するために、光路を共通化した部分にエキスパンダレンズを設けている。エキスパンダレンズは2枚の凸レンズで構成しており、そのうち一つをステップモーターで光軸方向に駆動してレンズの相対位置を変えることで、励起光の焦点位置を調整する。この調整は、対物レンズと独立しているため、波長による集光位置のずれや経時変化によるずれの補正をこれにより行うことができる。また、測定ピッチが粗い場合には、この機構を利用して測定ピッチに応じた最適なスポット径に広げることで、測定領域のぬけがない、効率的・網羅的な測定が可能になる。

4. 測定結果

次にいくつかのサンプルに対する測定結果を示す。
図6は蛍光ビーズを対象とした測定結果を示す。サン

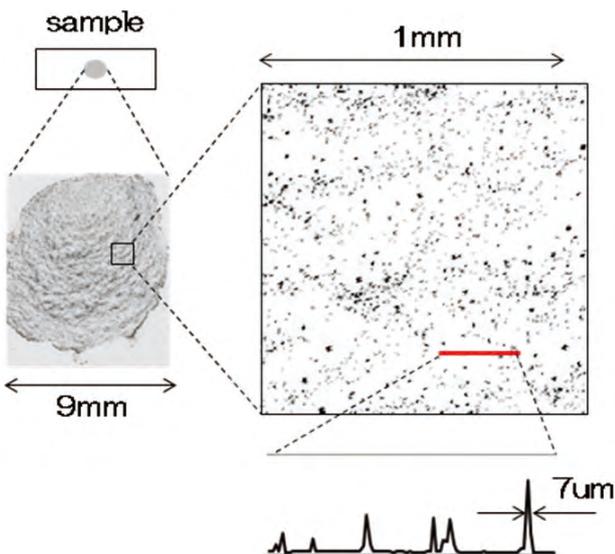


図6 蛍光ビーズの測定
Fig. 6 result of fluorescence beads

プルは4µmのビーズ径を含んだ懸濁液をスライドガラス上に滴下し約10mm程度の大きさに広げたのち、乾燥させて作製した。ビーズを滴下した側をサンプル台側に配置して、励起波長488nm、測定ピッチ5µmで測定した。図6の下に画像の断面図（一部）を示す。蛍光ビーズの径に対して、測定ピッチと集光スポットの径が大きいためピーク強度にばらつきがあるが、1個の蛍光ビーズに対応するピークの半値幅は7µm程度であり、ビームスポットサイズとほぼ同等となっていることが確認できた。また、他社製品と比較した結果でも解像度での優位性を確認している。

図7はゲルサンプルの測定結果を示す。試料としては、希釈率の異なるアルブミンを電気泳動後、蛍光色素で標識して作製したものをを用いた。最も濃いライン（12.8ng/10µL）に対して、1/2の濃度となるように順次希釈している。測定ではサンプル台にゲルを直接置き、励起光の焦点位置はガラス面上に合わせている。図7の下のグラフは図7の実線のラインの断面を表示したものである（1度スムージングしている）。信号とバックグラウンドの比（S/B）は4程度の値が得られている。比較として行った他社製品による測定結果はS/B：1程度となっており、本機により、バックグラウンド成分が少ないコントラストの高い画像が得られることを確認した。

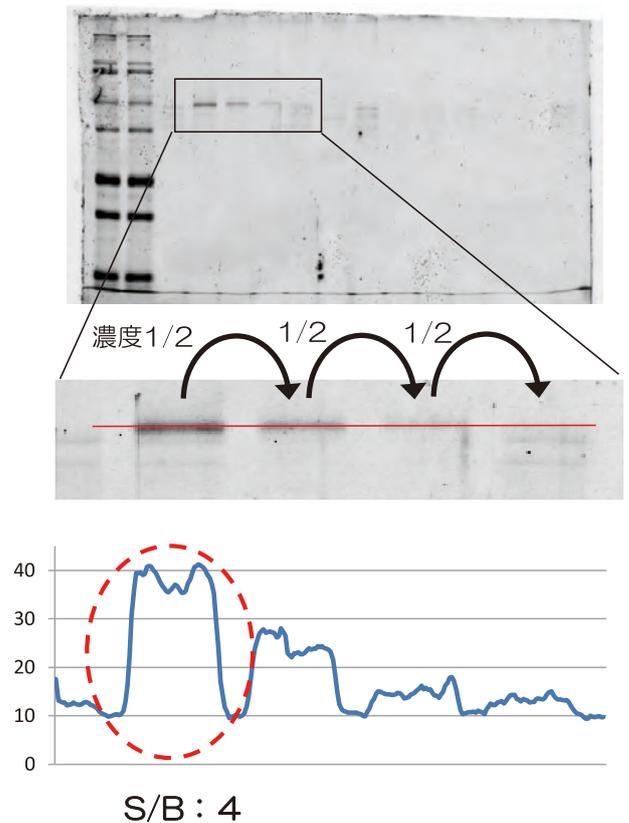


図7 ゲルサンプルの測定
Fig. 7 result of sample gel



図8 転写膜サンプルの測定
Fig. 8 protein pattern in membrane sheet

図8に多孔質膜にタンパク質を転写させたサンプルの測定結果を示す。本サンプルは一旦ゲルで電気泳動しタンパク質を分離した後、そのタンパク質を膜に転写している。使用波長632nm、測定ピッチ50 μ mの条件で測定した。結果、他社製品と同等程度で、再現性のよいパターンが得られることを確認した。転写膜の場合、膜の素材自体が白色のため、散乱成分が多く迷光が多くなり易いが、フィルターおよびアパーチャーで迷光が十分カットできていることが確認できた。

5. まとめ

検出感度が高く、高精細な画像生成を特長とする新規

のタンパク質分析用小型蛍光イメージャーを開発した。全反射を利用した新規の対物レンズを中心とする光学技術により上記特長を実現した。また、光学関連の部材を一体化することで配置スペースを省略し、ユーザから要望の多いコンパクトな測定装置を実現した。今後、本イメージャーを活用することで、タンパク質の微小な変化を高感度で検出することが可能となり、タンパク質の機能解明や製薬開発などへの貢献が期待される。

本開発はシャープマニファクチュアリングシステム株式会社 新規事業推進室、および、新規事業推進本部 健康医療事業推進センター 第二技術部と協力して推進し、高感度・高精細画像生成を特長とする蛍光イメージャー (BM-A100LD) の発売に至った。

参考文献

- 1) 高橋克佳 他. “タンパク質分析のための全自動二次元電気泳動システムの開発”. シャープ技報. 2006, 第94号, 52 - 56.
- 2) 丸尾祐二. “タンパク質分析装置 (二次元電気泳動の完全自動化)”. シャープ技報. 2011, 第103号, 4 - 8.
- 3) シャープHP. “タンパク質解析の二次元電気泳動を自動化”. <<http://www.sharp.co.jp/sms/release/bm-100/bm-100.html>>, (2013-04-19).
- 4) 伊神盛志. “新しいライフサイエンス解析システム ルミノイメージアナライザ LAS-3000 multi color の開発”. 富士フイルムR&D. 2005, No50, 39 - 44.
- 5) 大房 他. “改良型フラットベッド蛍光スキャナの性能評価”. JHUPO. 2008, p38.