

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：16201

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K18837

研究課題名(和文) 酵素固定化ナノマイクロ構造体を用いた生体分子機械加工技術の創出

研究課題名(英文) Mechanical processing platform for single molecules using enzyme-functionalized nanotools

研究代表者

寺尾 京平 (TERAO, KYOHEI)

香川大学・創造工学部・准教授

研究者番号：80467448

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、従来の試験管実験では困難であった、生体分子1分子レベルの機械加工システムの実現に取り組んだ。分子加工ツールと加工台となるマイクロ流体デバイスを組み合わせた1分子加工システムを開発し、DNA1分子切断加工によって、本システムの実証実験を行った。その結果、ピンポイントなDNA加工及び、基礎的な解析を行うことを達成した。本システムによってピンポイントな分子加工が可能になることで、生体分子の1分子レベルでの解析といった生化学分野における新たな技術になると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体分子は生物学における主要な研究対象であり、1分子レベルでの解析と機能の理解が求められている。本研究は、酵素固定化ナノマイクロ構造体を工具として使い、これまで非特異に生じていた化学反応を空間的に限定された領域で生じさせ生体分子を加工することで、ナノテクノロジー分野に新たな方法論を確立するものである。これまでの分子集団を対象にしてきた様々な化学反応が1分子の解像度で処理できるようになれば、生体分子の分子毎の差異や1分子動態の解明など、分子生物学における新たな方法論の確立、さらに新原理に基づく生体分子分析システムの実現につながる可能性があり、学術的・社会的に意義がある。

研究成果の概要(英文)：This research aims to develop a machining system for processing single biomolecules, which conventional technologies process in a bulk solution. We integrated molecular processing tool with a microfluidic device (microfluidic workbench), and demonstrated on-site cutting of single DNA molecule using the system. The results shows successful molecular processing as well as the analysis of the performance of the processing system. The system developed in this project will allow pin-point processing of single biomolecules in a controlled manner in terms of the space and time resolution, bringing novel technologies for bioanalysis in the fields of biochemistry and molecular biology.

研究分野：マイクロ・ナノ工学

キーワード：単一分子加工 光ピンセット 微細加工技術 マイクロ流体デバイス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

DNA、RNA、タンパク質などの生体分子は分子生物学における主要な研究対象であり、1分子レベルでの解析と機能の理解が求められている。また近年、生体分子を利用して3次元ナノ構造や、ナノロボット、ナノ回路、ナノバイオセンサを作製する革新的な技術が提案されている(V. Linko et al., Curr. Opin. Biotechnol. 2013)。これらの研究において、酵素の触媒機能を利用した化学反応が一般的に利用される。しかし、バルク溶液中で分子集団を扱うために、狙った分子の狙った領域を加工することはできず、集団平均化された計測結果、ばらばらに散在するナノロボットを得ることに限られている。

一方で代表者は独自技術としてミリメートル長の巨大な DNA 分子を非侵襲に1分子ずつ液中で操作することに成功している(Terao et al., J. Phys. 2006, Lab Chip 2008)。その研究過程で、物理操作に利用するナノマイクロ構造に酵素を固定することで工具として利用し、化学反応をピンポイントに生じさせる、つまり、生体分子1分子を機械加工するという着想に至った(図1)。

酵素固定化ナノマイクロ構造体を工具として使い、これまで非特異に生じていた化学反応を空間的に限定された領域で生じさせ生体分子を加工することで、ナノテクノロジー分野に新たな方法論を確立する。つまり、機械加工技術の進展が、様々な機械の微細化・高機能化を実現させてきたことを、生体分子の領域にまで拡張できるようになる。これまでの分子集団を対象にしてきた様々な化学反応が1分子の解像度で処理できるようになれば、生体分子の分子毎の差異や1分子動態の解明など、分子生物学における新たな方法論の確立、さらに新原理に基づく物理量センサ、生体分子分析システム、分子ロボットなどの高度な分子機械システムがナノ領域で実現できる可能性が生まれる。基本的な加工に関する技術であり、酵素は膨大な種類があることから、固定する酵素を変えることで膨大な分子加工工具ライブラリを作製することが可能である。

これまで分子生物学や分子機械の開発において、化学反応として利用してきた酵素処理を、よりピンポイントに正確な位置で1分子をターゲットにすることで、生体分子1分子の機械加工技術となる。本機械加工技術により生体分子1分子の様々な処理が達成されることから、それらを基礎研究実験で高頻度に利用する分子生物学分野・ナノマイクロデバイス分野にもたらす学術的な意義は大きいと考えられる。

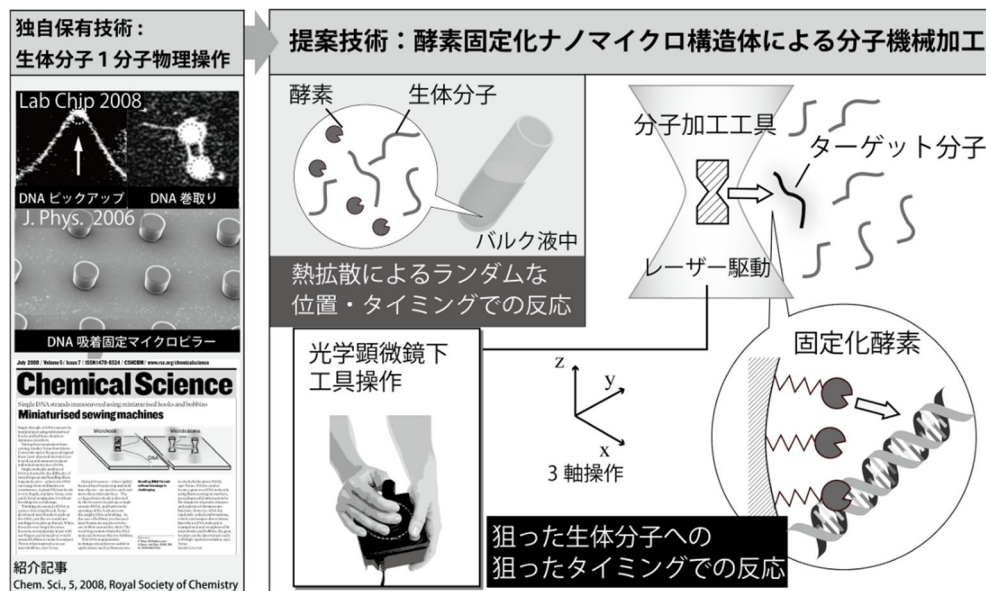


図1. 生体分子機械加工技術の概念

2. 研究の目的

機械加工とは工具や工作機械を用いて素材を加工することである。本研究は素材としてこれまでの機械加工の概念になかった生体分子1分子をターゲットにした機械加工技術の実現を目標とする。代表者の有する光駆動ナノマイクロ構造体による生体分子1分子の物理操作技術をベースに、ナノマイクロ構造体表面に様々な化学反応を触媒する酵素を固定することで、分子加工用の工具として利用する。研究期間内に本提案原理を実証するため、具体的にはDNA分子1分子へのピンポイントな分子鎖切断に取り組んだ。

酵素が触媒する化学反応はナノ領域の視点で見れば分子の切断や接合など機械加工と相似した処理を行なっている。しかし、通常はバルク溶液内で行うため、1分子レベルで見ると、分子集団に対して非特異的かつランダムなタイミングで生じている。本課題で実現を目指した技術は狙った生体分子に狙ったタイミングで化学反応を生じさせるものであり、分子生物学分野・ナノマイクロデバイス分野に新たな加工の方法論を提供する。これは、機械加工技術の進展が様々な機械の微細化・高機能化を実現してきたことを、生体分子の領域に拡張する試みである。本技術の実現により分子毎の解析、分子動態の解明だけでなく、生体分子分析システム、分子ロボッ

トなどの生体分子を利用した高度なシステムがナノ領域で実現できる可能性が生まれ、将来的に広範な領域でブレークスルーをもたらすことが期待される。

3. 研究の方法

本研究は、半導体微細加工技術によって作製したナノマイクロメートルサイズの微小構造体に対して、表面に様々な酵素を固定することで微小工具として利用する(図1)。この微小工具はレーザーによりトラップされ(光ピンセット)、溶液中で自在に操作できる。構造体が接触した生体分子はその位置でピンポイントに酵素が触媒する化学反応により加工される。構造体の形状は任意に作製することができ、対象となる生体分子のサイズや形状、周囲環境に合わせてデザインすることができる。固定する酵素は、膨大な種類が存在し、分子鎖の切断、接合、置換など、現在分子生物学で用いられるあらゆる酵素処理が分子機械加工に利用できる可能性がある。

本研究では期間内の具体的なターゲット分子として、これまでも物理操作の実績があることに加えて、生物学分野での重要な解析対象であることから DNA 分子を機械加工することとした。構造体は電子線描画装置によるナノ加工と UV リソグラフィによるマイクロ加工を組み合わせで作製した。構造体への酵素固定化には代表者がこれまでに開発したプラズマ処理とクロスリンク処理を組み合わせた手法を利用した。機械加工には DNA 切断酵素 DNase による DNA 切断を実施することとした。また、研究を遂行する上で、工具となる微小構造体だけでなく、工作台となる加工するスペースの微小環境をコントロールする必要が生じた。そこで、マイクロ流体デバイスを開発し、分子加工を行うためのプラットフォーム技術として統合したシステムを発展的に構築した。

4. 研究成果

研究開発を行った項目毎に以下に示す。

(1) 酵素固定化微小構造体の作製：プラズマ処理とアミノ基を介したクロスリンクで DNA 切断酵素を固定化した微小構造体を作製し、試験したところ DNA 単体を加工することが可能なことが示された。しかし、酵素固定化時に生じる残存アミノ基が原因と思われる微小構造体と DNA の吸着が高頻度に発生し、加工効率が極めて低かった。そこで、それを解決するため、次の世代の構造体として、ドライプロセスによって SU-8 表面に生成したカルボキシル基を利用した新たな固定方法を検討した。オゾン・RF/LF 酸素プラズマを使用し、構造体にカルボキシル基を導入し、蛍光たんぱく質の固定化量から、最も酵素固定化に適した処理方法を決定した。蛍光強度測定結果を図1に示す。この結果から、蛍光強度が高く、固定化量の多いオゾン処理(UVO)を使用する方法を採用した。

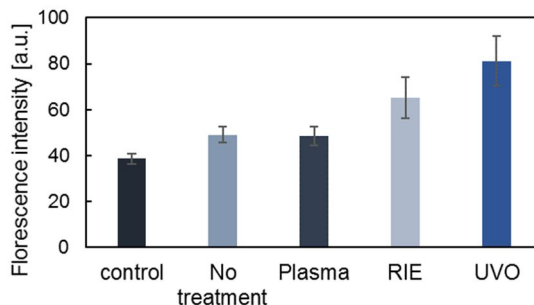


図1 蛍光タンパク質固定量の比較

(2) 分子加工台となるマイクロ流体デバイスの開発：本研究では、効率的な DNA1 分子加工を目指し、代表者が以前開発した環状 DNA トラップデバイスを改良した、ツールストック型 DNA トラップデバイスを提案した(図2 a)。本デバイスは、DNA をトラップできる微小ピラーを配置(図2 a左)し、流路の両側にはツールをストックするチャンバーを設置している(図2 a右)。加工ツールをチャンバーに収容することで(図2 b)、実験の効率化が期待でき、用途に応じて種類の異なるツールを選択し、使用することも可能となる。そして DNA を微小ピラーでトラップすることで、伸長した状態の DNA を加工することができる(図2 c)。

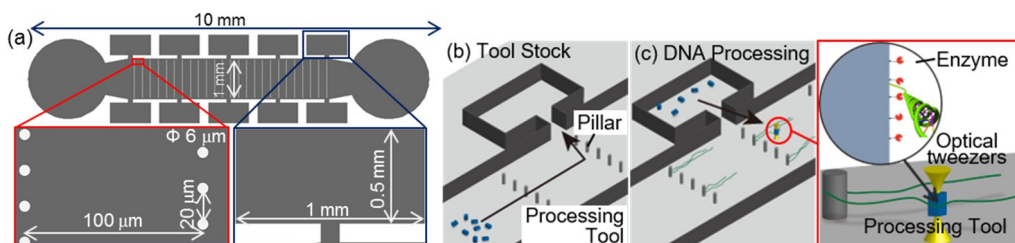


図2 DNA1 分子加工プラットフォーム

ツールストックチャンバーへの加工ツール收容実験を行った。デバイス材料である PDMS はガス溶解性を有しており、事前に脱気を行ったデバイスに加工ツールを投入することでチャンバー内の気体吸収と同時に加工ツールが流入し、收容できる。脱気したデバイスに加工ツールを投入すると、ツールストックチャンバーにトラップされた気泡が PDMS によってされると同時にチャンバー内に加工ツールが流入し、收容できていることを確認した。また、導入時のツールの個数密度が下がっていくほど收容数も減っているが、加工実験を行うにはツールは 10 個程度あれば可能であるため、十分な数のツールを收容できていることが確認された。また、被加工対象には分裂酵母染色体 DNA を用い、確率的なピラーへのトラップによって DNA 分子が加工実験に用いるのに十分な数が懸架され、流体力によって伸長された。

(3) DNA 分子切断加工実証：DNA 分解酵素 DNaseI と DNaseII を固定化した加工ツールと酵素無固定ツールをそれぞれ收容したデバイスを用いて DNA1 分子加工実験を行った。DNA とツールが触れた時の挙動を図 3 に示す。また、DNA と構造体が接触した際の挙動について、切断・吸着・反応無しの割合を示す(図 4)。反応無しの時は 180 秒以上 DNA と接触させた。酵素無固定ツールでは反応無しが 84% で、切断が 2 回、吸着は 1 回のみであった。切断した時はどちらも 90 秒以上経って DNA が流れて行っていたことから励起光による損傷かピラーのトラップが外れたためと考えられる。酵素を固定化したツールで切断した時は、DNaseI が接触しておよそ 1 秒、DNaseII がおよそ 26 秒であった(図 5)。酵素無固定と比較すると固定化していた酵素の作用によって DNA を切断したことが実証された。また固定する酵素種によって加工時の挙動が異なることが示された。今後、分子加工を他の酵素種に展開する上で、固定方法だけではなく酵素種を選択が重要であると考えられる。

DNaseI の切断確率は 80%、DNaseII は 46% であり、切断に要した時間と切断確率に大きな差が生じていた。これは、酵素作用を引き起こす活性部位の構造による差や固定時の 3 次元的な酵素構造に起因するものと考えられる。これらの結果から、分子加工ツールによる DNA 切断を実証することができ、また 2 種類の同じ作用を持つ酵素を固定化したツールの反応を比較することで、酵素作用の違いを観察することができた。

本研究では DNA1 分子加工システムを実現するために、光ピンセットで操作可能な微小構造体に酵素を固定化した分子加工ツールと、ツール收容チャンバーを設置した DNA トラップデバイスを開発した。そして加工ツールとデバイスを組み合わせた DNA1 分子加工システムを用いた DNA 加工実験によって、酵素作用によるピンポイントな DNA 加工及び、固定化した酵素による DNA との分子相互作用の基礎的な解析を行うことができた。

本システムによってピンポイントな酵素作用が可能になることで、DNA など生体分子のより詳細な加工、処理から、酵素作用の分子レベルでの解析といった生化学分野における新たな技術になると期待される。上記のように、当初計画していた DNA 分子加工の実証を達成でき、さらに加工プラットフォームとして展開できたことから、十分に研究目標を達成できたと考えられる。

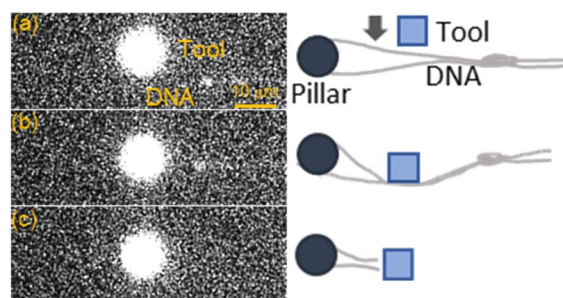


図 3．微小工具による DNA 切断加工

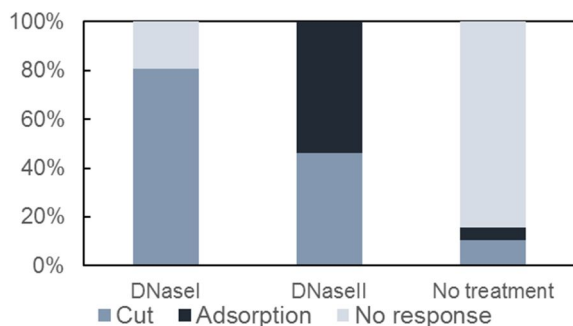


図 4．DNA 切断実験時の挙動比較

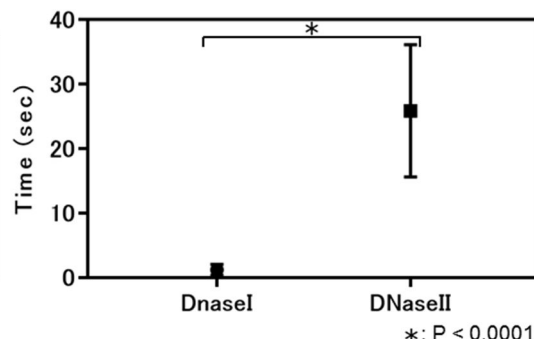


図 5．固定酵素の違いによる DNA 切断時間の比較
*: P < 0.0001

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Dohi Daiki, Hirano Ken, Terao Kyohei	4. 巻 14
2. 論文標題 Molecular ring toss of circular BAC DNA using micropillar array for single-molecule studies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomicrofluidics	6. 最初と最後の頁 014115 ~ 014115
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1063/1.5142666	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kyohei Terao, Hamizah Cognart, Jean Louis Viovy, Catherine Villard
2. 発表標題 Cancer cell deformation and recovery within microvascular in vitro constriction model
3. 学会等名 Cancer Cell on Chip (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松井祐樹, Muhammad Thaqif Iqbal Bin Mokhtar, 平野勝也, 高尾英邦, 下川房男, 石塚裕己, 寺尾京平
2. 発表標題 余剰受容体の直接定量解析に向けた単一細胞薬剤刺激デバイスの開発
3. 学会等名 電気学会第35回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 増田晃士, 石塚裕己, 高尾英邦, 下川房男, 寺尾京平
2. 発表標題 ツールストック型トラップデバイスを利用したDNA1 分子加工システムの開発
3. 学会等名 電気学会第35回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Taro SHIOMI, Mamoru HIRAFUJI, Hiroki ISHIZUKA, Hidekuni TAKAO, Fusao SHIMOKAWA, Mamoru HIRAFUJI, and Kyohei TERA0
2. 発表標題 Spatial Dissection of Biosamples using Si Blade Array Device
3. 学会等名 22th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考