

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23310092

研究課題名(和文) マイクロ流路を利用した分子の2次元配列技術

研究課題名(英文) Two-dimensional alignment technique of biomolecules using microfluidic format

研究代表者

宮崎 真佐也 (Miyazaki, Masaya)

独立行政法人産業技術総合研究所・生産計測技術研究センター・研究チーム長

研究者番号：70344231

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円、(間接経費) 4,290,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、我々が独自に開発してきたマイクロ化学デバイスを用いる多段階の酵素反応技術を開発させ、より効率的な生理活性分子合成技術として酵素反応を用いるための技術開発を最終目標とした。生体に近い効率での多段階酵素反応を行うために、生体内とほぼ同等の空間配置構築のために、ナノメートルオーダーで2次元に酵素分子を規則配置するDNAを足場とした各種分子固定化技術を開発した。これらの固定化技術を用いてマイクロ流路内に酵素分子を規則固定化したマイクロリアクタを作製して多段階の酵素反応に供与し、効率的な生理活性分子合成デバイスとしての応用の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed the multi-step enzymatic reaction technology using microchemical device to enable enzymatic reaction effectively to produce biologically active molecule. The two-dimensional alignment of molecule was enabled by using DNA as the templates. The template DNA molecules were immobilized within microchannel by using electrochemical methods or other techniques. Using this template, molecules can be immobilized and aligned on the DNA molecules. Furthermore, we developed microreactors for multi-step enzymatic reaction using these immobilized techniques. The microreactor showed possibility as an effective biologically active molecule processing device.

研究分野：ナノマイクロ科学

科研費の分科・細目：マイクロ・ナノデバイス

キーワード：マイクロ化学システム 表面 固定化 標識

### 1. 研究開始当初の背景

生体内では様々な生理活性物質が多段階の酵素反応によりオンデマンドで製造され、機能している。これを生体外で模倣できれば、究極の低環境負荷型プロセスを構築することができる。生体内では酵素分子が細胞内でナノメートルオーダーで適宜配置されて反応を行うため、非常に効率よく反応が行われており、ミリ秒単位、もしくはそれ以下の反応速度でなおかつ正確に物質生産がなされている。しかしながら、仮に生体の酵素をそれぞれ単離し、試験管内でこれを混合して反応させても生体内のように効率よく目的物を作ることは困難である。このため多段階の酵素反応を効率よく行う技術の開発が期待される。

マイクロ化学システムは次世代の反応デバイスとして期待されている反応装置であり、内外で開発が進められている。マイクロ化学システムは微小な空間で反応を行うことから、生体内の反応場を模倣できる装置として酵素反応を始め様々な生化学反応がマイクロ化学システムを用いて行われている。酵素反応プロセスにマイクロ化学システムの適用を試みる研究は、我々を始め内外の多くの機関で行われている。特に、酵素を固定化したマイクロリアクターは他の触媒反応同様マイクロ化学システムの特長を生かせるため、近年開発が進められており、我々はこの酵素固定化技術およびそれを利用したマイクロプロセス技術について先駆的な研究を行ってきた。さらに酵素固定化マイクロリアクター技術を応用し、マイクロ化学システムのもう一つの特長である機能集積化の容易さを生かして、酵素リアクターを連結したタンデム型多段階酵素反応マイクロ化学デバイスを開発しプロテオミクスや生理活性分子合成への応用を進めている。しかしながら、我々の技術を用いて生体内の生理活性物質合成反応を行っても、マクロスケールの溶液中(液相)での反応よりは効率はよいが、まだまだ生体内の反応速度には及ばない。この生体内の反応速度・効率との差を克服するには、生体内同様に分子をナノメートルオーダーで規則的に配列させ、反応に供与する事が必要と考えられる。そこで、マイクロ空間内で分子をナノメートルオーダーで規則的に固定化する技術の開発を行うこととした。

### 2. 研究の目的

本研究では、我々が独自に開発してきたマイクロ化学デバイスを用いる多段階の酵素反応技術を発展させ、より効率的な生理活性分子合成技術として酵素反応を用いるための技術開発を最終目標としている。本提案では、生体に近い効率での多段階酵素反応を行うために、生体内とほぼ同等の空間配置構築のために、ナノメートルオーダーで2次元に酵素分子を規則配置する新規の分子固定化技術を開発する。これを用いてマイクロ流路

内に酵素分子を規則固定化したマイクロリアクターを作製して多段階の酵素反応に供与し、効率的な生理活性分子合成デバイスの開発を目指す。

### 3. 研究の方法

まず基本となる DNA を用いた櫛形足場構造を構築する技術の確立を行った。横糸としては、長さが 57 $\mu\text{m}$  の T4GT7 DNA を用いることとした。環状の T4GT7 DNA を制限酵素 BssHII と BamHI で処理して鎖状にし、末端にチオールとビオチンを導入した DNA を基板上に固定した。まず、ガラス基板におおよそ 60  $\mu\text{m}$  以下の間隔で数 $\mu\text{m}$  幅の金膜を作製した。この片方にストレプトアビジンを吸着させる。これに流路を作製したポリジメチルシロキサン (PDMS) 基盤をかぶせ、この流路に作製した DNA を計算で一分子を含むよう溶液調製して金固定部分 アビジン固定部分へと流通させ、せん断により分子を伸長させることにより、それぞれ末端に導入したチオールとビオチンを介して固定化し、一本の横糸を形成した。この際には、流通させる溶液の流量が重要となるが、シリジポンプによる精密制御により、最適な流量を見だし、固定化条件を決定した。また、横糸の形成は PDMS 基盤を剥離させたのち、九州大学の原子間力顕微鏡 (AFM) を利用して確認した。

次に、これを足場として縦糸の形成を行った。縦糸としては長さがおおよそ 16.5  $\mu\text{m}$  の  $\lambda$ -DNA を用いる。 $\lambda$ -DNA を制限酵素処理した後に末端にマレイミド基を導入した。このマレイミド基に、別途合成した固定化用のペプチド核酸 (PNA: 末端に Cys 残基を導入したもの) を反応させ、縦糸用の DNA を作製した。固定化用の PNA 配列としては、T4GT7 分子中に 97 個存在した EarI の認識部位 (CTCTTC) を用いる。縦糸の固定化は、横糸となる DNA を固定化した基盤に、横糸よりも狭い幅の流路を作製した PDMS 製の基板を、左図のように横糸が横方向になるようにかぶせる。この流路に縦糸分子の溶液流通させることにより、横糸上に固定化し、縦糸を形成した。縦糸分子の濃度や流通速度・量を制御して、固定化した縦糸の本数を制御した。また、横糸同様に、縦糸および櫛形構造の形成は PDMS 基盤を剥離させたのち、九州大学の原子間力顕微鏡を利用して確認した。

さらに、簡便な櫛形構造作製方法として、遺伝子長より少し短い間隔の金電極を基板上に作製し、それに PDMS 製の流路を被せ、そこに交流電化を印加しながら遺伝子の水溶液を流通させることにより、櫛形の構造体を簡便に作製する技術の開発も行った。

### 4. 研究成果

初年度は基本となる DNA を用いた縄のれん様の足場構造を構築する技術の確立を中心に研究を行った。足場としては、長さが 57  $\mu\text{m}$  の T4GT7 DNA を用いた。環状の T4GT7 DNA

を制限酵素 BssHII と BamHI で処理して鎖状にし、末端にチオールとビオチンを導入した DNA を作製した。これを基板上に固定した。ガラス基板におおよそ 60 μm 以下の間隔で数 μm 幅の金膜を作製した。この片方にストレプトアビジンを吸着させた。これに流路を作製したポリジメチルシロキサン (PDMS) 基盤をかぶせ、この流路に作製した DNA を計算で一分子を含むよう溶液調製して金固定部分 アビジン固定部分へと流通させ、せん断により分子を伸長させることにより、それぞれ末端に導入したチオールとビオチンを介して固定化し、一本の足場構造を形成することに成功した。

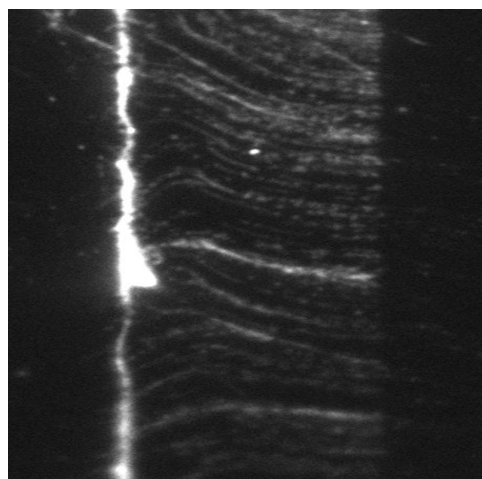
2 年目は初年度の成果を踏まえ、櫛形構造体形成技術の最適化と作製した櫛形構造体上への分子の固定化条件を検討した。初年度に開発した作製技術に加え、櫛形構造体の簡易作製技術として交流電化を印加して櫛形構造を微小電極間に形成させる技術を開発した。遺伝子長より少し短い間隔の金電極を基板上に作製し、それに PDMS 製の流路を被せた。そこに交流電化を印加しながら遺伝子の水溶液を流通させることにより、櫛形の構造体を簡便に作製することに成功した。印加する交流電圧と印加時間、ならびに流通させる DNA 量を検討して、最適な固定化条件を見いだすことに成功した。

次に、従来法ならびに交流電化を用いた新規固定化法を用いて作製した遺伝子の櫛形構造体に固定化する方法を開発した。まず、櫛形に固定化した遺伝子上の特定部位を標識する足場とするために、DNA と特異的に結合するペプチド核酸を 3 種類合成した。特異的な遺伝子配列に相補的なペプチド核酸を合成し、それに各々タグとなるペプチド配列を導入した。これを遺伝子に結合させた後、タグに特異的な抗体とそれに対応する二次抗体を蛍光波長の異なる量子ドットで標識したものをを用いて 3 種類の量子ドットを櫛形構造に固定化することに成功した。

また、二次抗体に酵素を標識したのもも作製し、その結合も解析した。上記の量子ドットと同じようにタグ付きペプチド核酸を固定化し、それを足場として酵素を固定化することに成功した。

最終年度には、上記の成果を踏まえ、櫛形構造体形成技術のさらなる最適化と作製した櫛形構造体上への分子の固定化条件の最適化を行った。これまでに開発した DNA の櫛形構造形成技術を応用し、櫛形構造体上に分子の固定化を行う方法を確立した。電極構造を最適化し、多段の櫛形構造形成を可能とした。次に、これらの櫛形に固定化した遺伝子上の特定部位を標識する足場とするために、DNA 上に結合する分子として、特異的な遺伝子配列に相補的なペプチド核酸を用い、それに各々タグとなるペプチド配列を導入してこれを遺伝子に結合させた後、タグに特異的な抗体とそれに対応する二次抗体を蛍光波

長の異なる量子ドットで標識したものをを用いて異なる種類の量子ドットを櫛形構造に固定化することに成功した。また、固定化に用いる二次抗体に酵素を標識したのもも作製し、その結合についても解析した。上記の量子ドットと同じようにタグ付きペプチド核酸を固定化し、それを足場として酵素を固定化することに成功した酵素を用いて、多段階の酵素反応を試みた。その結果、特定の流速範囲内では多段階反応が可能である事を確認した。しかしながら、高流量域では反応が進まず、分子の衝突頻度が重要である事が確認された。この点は、流路の幅・深さを小さくすることにより改善された。



図：電極間に固定化された DNA の蛍光像

以上の結果から、DNA の櫛形構造形成に基づいた分子の 2 次元配列技術の確立と、それを用いた反応技術の開発に成功した。

## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 14 件)

Atsushi Maruyama, Naotaka Sonda, Kohei Yamasaki, Masanori Hirano, Satoru Kidoaki, Naohiko Shimada, Masatoshi Maeki, Masaya Miyazaki, Cationic Comb-Type Copolymer Excludes Intercalating Dye from DNA Without Inducing DNA Condensation. *Current Nanoscience*, 査読有, 10, 2014, 185-188.

Hiroshi Yamaguchi, Masaya Miyazaki, Enzyme-immobilized reactors for rapid and efficient sample preparation in MS-based proteomic studies. *Proteomics*, 査読有, 13, 2013, 457-466.

Yuya Asanomi, Hiroshi Yamaguchi, Masaya Miyazaki, Hideaki Maeda, Enzyme-Immobilized Microfluidic Process Reactors, *Molecules*, 査読有, 16(7), 2011, 6041-6059 ;

doi:10.3390/molecules16076041

〔学会発表〕(計 18 件)

Masaya Miyazaki, Microfluidic devices for protein sequence and structure analysis, Pittcon 2014, 2014/03/03, McCormick Hall, Cigago, IL, USA

宮崎真佐也、マイクロ化学システムを用いるプロセッシング技術の開発、第 25 回化学とマイクロナノシステム研究会、2012/05/17、熊本県 崇城大学  
宮崎真佐也、マイクロ流体デバイスを用いる生体関連物質プロセッシング技術の開発、仙台マイクロナノ国際フォーラム、2011/11/08、宮城県 江陽グランドホテル

〔図書〕(計 3 件)

Masaya Miyazaki, Maria Portia Briones-Nagata, Takeshi Honda, Hiroshi Yamaguchi, Wiley-VCH, Microreactors in Organic Synthesis and Catalysis, 2nd ed. (Wirth, T.ed.), 2013, 289-372,

Hiroshi Yamaguchi, Masaya Miyazaki, Hideaki Maeda, InTech-Croatia, Integrative Proteomics (Leung E. ed), 2012, 93-110.

Hiroshi Yamaguchi, Masaya Miyazaki, Hideaki Maeda, Humana Press, Methods in Molecular Biology Vol. 815 Functional Genomics, Second Edition (Kaufmann, M. & Klinger, C. eds), 2011, 187-198.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
<https://staff.aist.go.jp/m.miyazaki/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 真佐也 (MIYAZAKI, Masaya)  
産業技術総合研究所・生産計測技術研究センター・チーム長

研究者番号：70344231

(2) 研究分担者

山口 浩 (YAMAGUCHI, Hiroshi)  
東海大学・阿蘇教養教育センター・准教授  
研究者番号：00466236