

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 7 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23540479

研究課題名(和文)カーボンナノチューブを用いた生体分子認識能解析の試み：RecAをモデル分子として

研究課題名(英文)Biomolecular recognition ability of RecA as a model protein studied by using carbon nanotubes

研究代表者

梅村 和夫(UMEMURA, KAZUO)

東京理科大学・理学部・准教授

研究者番号：60281664

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：DNAとカーボンナノチューブ(CNT)との複合体をDNAのダミー分子と見立て、RecA、一本鎖DNA結合蛋白質(SSB)を反応させることで、蛋白質の分子認識能の寛容さを調べた。RecAはCNT表面に吸着したDNAをDNAと分子認識して結合することが分かったが、通常のDNAに結合するとき形成するらせん状のフィラメント構造を形成しなかった。SSBはCNT表面にある一本鎖DNAと二本鎖DNAを識別することが分かった。これらの知見は、DNA結合蛋白質の分子認識を検証したのと同時に、CNT表面のDNAの状態を評価した、との視点で捉えることもできる。

研究成果の概要(英文)：RecA proteins and single-stranded DNA binding (SSB) proteins were reacted with hybrids of DNA and carbon nanotubes (CNT) in order to verify biomolecular recognition ability of the protein molecules. Hybrids of DNA and CNT were assumed as dummy molecules of DNA. We found that RecA molecules could bind onto DNA molecules adsorbed on CNT surfaces. However, helical filamentous structures that are formed on bare DNA molecules were not appeared in the case of the hybrids of DNA and CNT. We also found that SSB proteins could distinguish single-stranded DNA from double-stranded DNA molecules even on CNT surface. These results basically provided helpful information to understand tolerance of biomolecular recognition ability of the proteins. Furthermore, our data is valuable to evaluate conditions of DNA molecules on CNT surfaces.

研究分野：数物系科学

科研費の分科・細目：物理学・生物物理・化学物理

キーワード：分子認識 RecA DNA カーボンナノチューブ 原子間力顕微鏡 電気泳動

1. 研究開始当初の背景

DNA がカーボンナノチューブ (CNT) の表面に吸着し、DNA-CNT 複合体を形成する現象が 2003 年に報告されて、まずは水に溶けない CNT を可溶化する技術として確立された。さらに、DNA と CNT の相互作用に関する基礎的な研究や、DNA-CNT 複合体をナノバイオデバイスとして応用するための研究が盛んに行われてきている。

一方、複合体を作製する際に超音波処理を施す手順が一般的に行われており、DNA 分子を痛めているのではないかと疑問や、DNA 吸着の理論モデルは提示されているものの、現実にはすべての DNA 分子が理論通りに吸着しているのだろうかといった疑問はなお残っていた。複合体作製の多くが一本鎖 DNA (ssDNA) と単層 CNT (SWNT) の組み合わせで行われており、二本鎖 DNA (dsDNA) と SWNT あるいは多層 CNT (MWNT) との相互作用については先行研究が少なかった。また、いったん CNT に吸着させた DNA を離脱させた研究例はなかった。

蛋白質との反応については、CNT 表面に蛋白質分子を直接的に物理吸着させる方法や、DNA 分子等を介して共有結合させる方法が提案されてきたが、生体分子認識の視点から DNA-SWNT 複合体に蛋白質を結合させた研究例はわずかだった。

2. 研究の目的

本研究では、DNA-CNT 複合体および CNT を DNA のダミー分子と捉えて、DNA 結合蛋白質である RecA や一本鎖 DNA 結合蛋白質 (SSB) をこれらダミー分子に反応させることで、蛋白質の生体分子認識の寛容さを調べることができるのではないかと考えた。もし RecA 等の分子認識が厳格であるならば、DNA-CNT 複合体に結合しない、あるいは結合しても何らかの不具合が発生するであろうし、比較的寛容であるならば、通常の DNA に対しての挙動と同じ結果になるはずである。

組成はまったく異なるものの、CNT の直径が DNA と類似している点に着目したのが本研究の独自の視点であった。DNA-CNT 複合体の研究のほとんどは何らかの応用を目指したものであり、本研究のように理学研究の目的に使うという発想は珍しいといえる。

3. 研究の方法

DNA-CNT 複合体について、ssDNA、dsDNA、複数種類の CNT を用いて DNA-CNT 複合体を作製し、原子間力顕微鏡 (AFM)、電子顕微鏡、顕微ラマン分光、紫外・可視分光等で評価した。AFM、電子顕微鏡は個々の分子の構造を評価するため、多くの試料を簡便に評価したほうが効率がよいことから、主には AFM による評価を行った。顕微ラマン分光は試料調製中に CNT の構造物性に変化がないかを確認するために用いた。紫外・可視分光は、試料

作製手順に遠心分離による精製等が含まれるため、CNT や DNA の量が変化する可能性があり、それぞれの分子の定量を行うために用いた。

通常 CNT に DNA を吸着させる場合は超音波処理を用い、これと比較するためにポリエチレングリコールで表面修飾した CNT (PEG-CNT) 等も用いた。また対照試料として、カルボキシメチルセルロース (CMC) を CNT に吸着させた複合体 (CMC-CNT) も用いた。可溶化された CNT であることに変わりないが、複合体表面の組成は DNA と CMC とでは、まったく異なるはずである。

蛋白質としては RecA および SSB を用い、基本的な反応条件は DNA で最適とされているものを参考として、濃度や反応時間を変えるなど、さまざまな条件下での反応実験を行った。蛋白質を反応させた後の評価には、AFM、顕微ラマン分光、紫外・可視分光に加え、アガロース電気泳動法を用いた。電気泳動については、DNA、CNT、蛋白質を含む試料であるため、それぞれの分子の泳動位置がわかるよう、手順を改良して行った。また、AFM 測定についても、凹凸像だけでなく、表面電位測定、水溶液中測定等を行って、より多くの情報を得ることを試みた。

AFM 画像からは、形状の比較はもとより、断面解析により CNT の直径を計測し、直径変化から DNA あるいは蛋白質の吸着状態を推定した。電気泳動画像からは、特に CNT のバンド位置に重要視し、蛋白質反応の前後で、CNT の泳動に変化が生じるかを精査した。

4. 研究成果

RecA 蛋白質を DNA-CNT 複合体に反応させた場合、AFM と電気泳動の結果から、多数の RecA 分子が DNA-CNT 複合体に結合することが明らかとなった。一方、対照試料である CMC-CNT 複合体に反応させた場合は、AFM による直径解析では複合体の直径に変化が見られず、また電気泳動でも複合体の泳動速度が遅くなる現象が見られず、RecA は結合しなかったと考えられる。蛋白質濃度や反応時間等を変化させる条件検討を行っても、矛盾する結果は得られなかった。これらの結果から、RecA は DNA-CNT 複合体に物理吸着したのではなく、CNT 表面の DNA を、DNA であると分子認識して結合したと考えられる。一方、RecA が DNA に結合して形成するらせん構造は、今回の実験では見られなかった。このことから、分子認識して結合はするものの、立体障害等により、らせんを形成するための条件を満たすことができなかったと考えられる。

SSB については、ssDNA-CNT 複合体と、dsDNA-CNT 複合体とを対比させた実験で特徴的な結果が得られた。すなわち、SSB は ssDNA-CNT 複合体にはよく結合するが、dsDNA-CNT 複合体に対しては相当に高濃度にしないうり限り結合しなかった。このことは、SSB が CNT 表面の DNA が一本鎖であるか二本鎖で

あるかまで判別していること、逆に、CNT 表面での DNA が、一本鎖、二本鎖と認められる構造を保持していることを示唆している。

これらの結果を得るまでの過程で、さまざまな周辺の知見も得られた。まず、先行研究における DNA-CNT 複合体の作製について、用いる DNA や CNT の種類や作製条件が一様でなく、得られたデータを直接比較することが難しかったため、条件を統一して複合体の作製を行って複合体の形状等にどのような違いが出るかを評価し、DNA と CNT の組み合わせによって複合体表面の凹凸に大きな違いが生じることを見出した。

DNA-CNT 複合体の安定性について、表面修飾していない CNT に対して DNA を吸着させた場合は、95 度に加熱しても DNA の明らかな離脱が見られず、安定性が高いことが分かった。一方、PEG-CNT の場合は、95 度で多くの DNA 分子が離脱することが電気泳動による評価から明らかになった。本研究では安定性の高い複合体を蛋白質の反応実験に用いたが、一方で、表面修飾 CNT を用いて可逆に DNA を吸脱着させられることを示したデータでもあり、今後の応用研究に有用な知見と考えられる。

評価方法の検討について、表面電位測定を行い、DNA-CNT 複合体、あるいは CNT について、表面電位が基板に対して正になるものと、負になるものがあることがわかった。これを利用することで、状態の異なる DNA-CNT 複合体を表面電位測定で見分けられる可能性が示された。ただし、用いる AFM プローブの状態によって結果が大きく左右されることもわかり、十分な再現性をもって定量評価に用いるには、さらなる改善が必要である。

アガロースゲル電気泳動法については、これまで CNT と DNA、CNT と蛋白質を同時に含む試料の泳動を行った報告があるものの、CNT、DNA、蛋白質の 3 種が存在する試料の評価に用いた例がなく、独自の手順を考案した。まず、CNT についてはもともと黒色であるため、泳動後に染色することなく、可視光下でバンド位置を確認することができた。DNA については、エチジウムブロマイド染色によって紫外光下で観察が可能だった。蛋白質については、泳動後にゲルをクマシーブリリアントブルーで染色するとゲル全体が染色されてしまうため、泳動前の試料に染色剤を添加する独自の手順を考案した。染色剤を加えることで試料に影響が出る可能性もあるので注意が必要ではあるが、ほかの測定法から得られた結論とは矛盾しないデータを得ることができた。

このほか、AFM 画像からの直径解析について、棒状の物体のある場所での断面を計測するだけでなく、長軸方向にすべてのピクセルを解析するプログラムを作成し、1 本の DNA-CNT 複合体の表面構造のばらつきを一画素ずつ検討することができた。

本研究の総括として、モデル分子とした

RecA、および同じく DNA 結合蛋白質である SSB を、DNA と類似点もあるが相違点も多い DNA-CNT 複合体に反応させることで、RecA や SSB の分子認識能を検証することができた。また、材料評価の手法と生体分子評価の手法を組み合わせ、当該試料に合わせた評価法を提案した。さらに、本研究の知見は、視点を変えれば DNA-CNT 複合体の評価実験とみることもでき、DNA-CNT 複合体を用いたナノバイオデバイス作製等の分野にも有益だと考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

1. Takuya Hayashida, Kazuo Umemura, "Surface morphology of hybrids of double-stranded DNA and single-walled carbon nanotubes studied by atomic force microscopy", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **101** (2013) 49-54.
DOI:10.1016/j.colsurfb.2012.06.018
(査読有)
2. Shigeyuki Hirayama, Takuya Hayashida, Kazuo Umemura, "Atomic force microscopy imaging of dialyzed single-walled carbon nanotubes dispersed with sodium dodecyl sulfate", *International Journal of Smart and Nano Materials*, **4** (2013) 119-127.
DOI:10.1080/19475411.2012.742170 (査読有)
3. Daisuke Nii, Takuya Hayashida, Kazuo Umemura, "Controlling the adsorption and desorption of double-stranded DNA on functionalized carbon nanotube surface", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **106** (2013) 234-239.
DOI:10.1016/j.colsurfb.2013.01.054
(査読有)
4. Takuya Hayashida, Takuya Kawashima, Daisuke Nii, Kazunari Ozasa, Kazuo Umemura, "Kelvin Probe Force Microscopy of Single-Walled Carbon Nanotubes Modified with DNA or Polyethylene Glycol", *Chemistry Letters*, **42** (2013) 666-668.
DOI:10.1246/cl.130121 (査読有)
5. Kazuo Umemura, Tomohiro Hirata, Takuya Hayashida, Daisuke Nii, "Fluctuation in the surface morphology of DNA-wrapped carbon nanotubes studied by continuous cross-sectional analysis of atomic force microscopy image", *Researches and Applications in Mechanical Engineering (RAME)*,

[学会発表](計 17 件)

1. Takuya Hayashida, Kazuo Umemura, “ Surface structures of DNA-SWNT hybrids ” , 7th International Conference on Biological Physics (ICBP2011), 2011 年 6 月 22-24 日, San Diego, USA.
2. Takuya Hayashida, Kazuo Umemura, “ Comparative study of different types of DNA-wrapped single-walled carbon nanotubes ” , 3rd International Conference on Smart Materials and Nanotechnology in Engineering (SMN2011), 2011 年 11 月 5-8 日, Shenzhen, China.
3. Kazuo Umemura, Takuya Hayashida, Shigeyuki Hirayama, “ Comparative study of DNA-carbon nanotube hybrids using atomic force microscopy ”, Trends in Nanotechnology International Conference (TNT2011), 2011 年 11 月 21-25 日, 2011, Tenerife, Spain.
4. 林田拓也, 梅村和夫, “ 液中 AFM 測定による DNA 単層カーボンナノチューブ複合体の直径評価 ”, 日本物理学会第 67 回年次大会, 2012 年 3 月 24-27 日, 関西学院大学.
5. 平田知宏, 林田拓也, 梅村和夫, “ AFM 画像の連続断面解析による DNA-カーボンナノチューブ複合体の表面形状評価 ”, 日本物理学会第 67 回年次大会, 2012 年 3 月 24-27 日, 関西学院大学.
6. Kazuo Umemura, Takuya Hayashida, Tomohiro Hirata, Daisuke Nii, Yuuki Yamaguchi, Shigeyuki Hirayama, “ Study of dispersed single-walled carbon nanotubes by atomic force microscopy ”, Fourth International Conference on Nano-structures SELF-Assembly, 2012 年 6 月 25-29 日, Cagliari, Italy.
7. Takuya Hayashida, Kazuo Umemura, “ Atomic force microscopy study of DNA-wrapped single-walled carbon nanotubes in aqueous conditions ” , International Conference on Nanoscience + Technology (ICN+T 2012), 2012 年 7 月 23-27 日, 2012, Paris, France.
8. Kazuo Umemura, Takuya Hayashida, Tomohiro Hirata, Daisuke Nii, Yuuki Yamaguchi, Shigeyuki Hirayama, “ Atomic force microscopy of dispersed carbon nanotubes ” , International Conference on Nanoscience + Technology (ICN+T 2012), 2012 年 7 月 23-27 日, 2012, Paris, France.
9. Daisuke Nii, Takuya Hayashida, Kazuo Umemura, “ Controllable adsorption-desorption of double-stranded DNA onto single-walled carbon nanotube functionalized with polyethylene glycol ”, 第 50 回日本生物物理学会年会, 2012 年 9 月 22 日-24 日, 名古屋大学.
10. Kazuo Umemura, Takuya Hayashida, “ DNA and carbon nanotubes in liquids studied by atomic force microscopy ” , International Conference on Surfaces, Coatings and Nanostructured Materials Asia (NANOSMAT-Asia), 2013 年 3 月 13-15 日, Wuhan, China.
11. 梅村和夫, “ ナノテクを用いた一分子・一細胞観察 ” (招待講演), 福岡大学研究推進部主催研究会, 2013 年 6 月 5 日, 福岡大学.
12. K. Umemura, D. Nii, T. Hayashida, “ Attachment and detachment of double-stranded DNA molecules on functionalized single-walled carbon nanotubes ” , 12th Asia Pacific Physics Conference, 2013 年 7 月 14 日-19 日, Makuhari Messe, Chiba.
13. Kazuo Umemura, “ Interaction of Biomolecules and Carbon Nanotubes Studied by Atomic Force Microscopy ” , The 1st East-Asia Microscopy Conference (EAMC-1), 2013 年 10 月 15-18 日, 2013, Chongqing, China.
14. 二井大輔, 林田拓也, 梅村和夫, “ Selective adhesion of single-stranded DNA binding protein to DNA-SWNT hybrids ”, 第 51 回日本生物物理学会年会, 2013 年 10 月 28 日-30 日, 国立京都国際会館.
15. Kazuo Umemura, Daisuke Nii, “ Selective adhesion of single-stranded DNA binding proteins onto hybrids of DNA and single-walled carbon nanotubes ” , Trends in Nanotechnology Japan (TNT Japan), 2014 年 1 月 29-31 日, Tokyo Big Sight, Japan.
16. Kazuo Umemura, “ Nanoscopic characterization of DNA molecules adsorbed on carbon nanotubes ”, 2014 EMN Spring Meeting (招待講演), 2014 年 2 月 27 日-3 月 2 日, Las Vegas, USA.
17. 大浦秀介, 二井大輔, 梅村和夫, “ Bio-molecular recognition of RecA proteins for the DNA-modified Single-Walled Carbon Nanotubes ”, 第 3 回日本生物物理学会関東支部研究会, 2014 年 3 月 6-7 日, 明治大学中野キャンパス.

[その他]

ホームページ等

<http://www.rs.kagu.tus.ac.jp/biophys/in>

dex_en.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

梅村 和夫 (UMEMURA KAZUO)

東京理科大学・理学部・准教授

研究者番号：60281664