

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23651131

研究課題名(和文)一細胞ゲノム解析へ向けた高性能DNA増幅マイクロチップの開発

研究課題名(英文)Development of high-performance microchip for DNA amplification towards single-cell genome analysis

研究代表者

松浦 俊一 (MATSUURA, SHUN-ICHI)

独立行政法人産業技術総合研究所・コンパクト化学システム研究センター・主任研究員

研究者番号：80443224

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、規則性細孔を有するナノ多孔材料(メソポーラスシリカ)とDNA合成酵素を複合化することにより、ナノ空孔を反応場とした選択的かつ高感度のDNA増幅システムを構築することを試みた。本法では、シリカ細孔径の最適化によりDNA増幅効率を制御でき、従来法では増幅が困難である極微量DNAの増幅を実現した。また、酵素固定化マイクロチップによるハイスループットなDNA増幅を試み、ゲノムDNA増幅における流通式での繰り返し反応の実行可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We successfully immobilized thermostable DNA polymerase on seven types of mesoporous silicas with different pore diameters and retained enzymatic activity sufficient for amplifying target DNA. The mesoporous silica support enabled the simple, selective, and preferential immobilization of DNA polymerase and the regulation of enzymatic activity for DNA amplification from small amounts of substrate DNA by optimizing pore size. In addition, the microfluidic chip containing composites of the enzyme and mesoporous silica exhibited precise, efficient, and continuous amplification of target DNA. Thus, these data show the great potential of mesoporous silica as enzymatic reaction platforms not only for conventional DNA amplification but also for efficient DNA amplification from small amounts of sample such as several molecules of DNA.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学・ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：DNAポリメラーゼ メソポーラスシリカ 固定化酵素 DNA増幅 PCR

1. 研究開始当初の背景

地球環境レベルでは、未知の生物種による生態系の存在、特に目に見えない微生物レベルで、人工的な培養条件下では増殖不能な難培養性微生物の解析の必要性が示唆されている(Whitman WB, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 6578 (1998))。微生物のゲノム解析では、究極的には一細胞から人工的にゲノム DNA を増幅させた後に DNA 情報を解析する必要があるが、PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) 法など DNA 合成酵素を用いたバッチ式の DNA 増幅法では安定的かつ確実的な増幅が困難である。また、DNA 配列の解析に基づいた、環境試料、病気・健康、又、犯罪捜査などに向けた遺伝子診断では、対象となる試料が希少な試料であることから、極めて微量の DNA、究極的には 1 分子レベルの DNA を対象とした、迅速かつ簡便な解析法が求められており、そのような解析を可能とする極微量の核酸増幅技術の開発が必要である。すなわち、簡便な手法により、非特異的 DNA 増幅反応を抑制でき、その結果、極微量の基質 DNA の特異的かつ高感度の増幅を可能にし、更に、反応溶液中の DNA 増幅産物を容易に回収可能である、新しい技術の提案・開発が切望されていた。

上記の問題を克服する一つのブレーク・スルーとして、本研究で提案するナノ空孔材料と DNA 合成酵素の複合化技術を用いた酵素の耐環境性 (耐熱、耐薬品性) の向上および酵素周辺環境の至適化による安定かつ高感度な DNA 増幅システムの確立が挙げられる。ナノ空孔技術の酵素反応工学などバイオテクノロジーへの応用は国内外で盛んに取り組まれており、近年、チタニア系ナノ空孔材料を利用した新規の PCR 法が報告されている (Bellino MG, et al., Small, 6, 1221 (2010))。しかしながら、当技術等を、微量 DNA を対象とした DNA 増幅反応に適用した報告例は存在しない。一方、研究代表者らは、これまでにナノ空孔材料であるメソポーラスシリカの緻密な設計によって細孔直径を 2~25 nm に調節することで、ナノ空孔を足場とした酵素の高密度集積化と耐環境性を獲得した安定化酵素の調製に成功している (Matsuura S, et al., Bioconjug. Chem., 19, 10 (2008); Microporous Mesoporous Mater., 127, 61 (2010))。また、従来技術では、酵素反応の精密制御のための反応系の微小化 (マイクロチップ化) が課題となっているが、研究代表者らは、ナノ空孔技術を利用した酵素担持マイクロチップの開発に世界に先駆けて取り組み、高効率の物質生産を実証してきた (Matsuura S, et al., Mater. Lett., 63, 2445 (2009); Chem. Eng. J., 167, 744 (2011))。

本研究は、『ナノ空孔技術を利用した酵素反応場』と『マイクロチップ技術』を融合した協奏的な反応場を DNA 合成酵素による一細胞からの遺伝子増幅反応に展開するもの

である。ナノ空孔材料と DNA 合成酵素のハイブリッド材料を利用した安定な DNA 増幅反応場は、ナノ材料工学と酵素反応工学に DNA 工学が融合することによって実現できるものであり、バイオテクノロジーの新規分野の開拓が期待できる。また、これまで解析不可能であった微量の DNA 解析が可能となることで、究極的には一細胞/一分子 (一ゲノム DNA 分子) からの解析系の確立とそれによる未知生命体へのゲノム解析/ゲノム情報科学への開拓が意義として予想される。

2. 研究の目的

本研究は、規則性細孔を有するメソポーラスシリカ (ナノ空孔材料) と DNA 合成酵素を複合化することにより、ナノ空孔を反応場とした極微量 DNA の選択的かつ高効率の DNA 増幅システムを構築することを目的としている。また、ナノ空孔と DNA 合成酵素のハイブリッド材料の流通式マイクロチップ化による連続的な DNA 生産を目指し、最終的には、難培養性微生物のゲノム解析に代表されるような、一細胞のゲノム DNA からの安定な DNA 増幅法の開拓を試みる。

DNA 合成酵素として PCR 法及び MDA、LAMP (多重置換増幅) 法に適した各種 DNA ポリメラーゼを適用し、バッチ式反応におけるナノ空孔技術による高効率の DNA 増幅反応場の確立を行う。また、マイクロチップ化による流通式反応における微生物由来のゲノム DNA の増幅を行い、ゲノム解析へ適用可能な実用化レベルでの DNA 合成能を達成することを最終目標とする。

3. 研究の方法

(1) DNA 合成酵素とナノ空孔材料の複合化とバッチ法での活性評価

ナノ空孔材料には、FSM (folded-sheet mesoporous material) 型、または、SBA (santa barbara amorphous) 型のメソポーラスシリカ材料を合成して使用した。ここで、メソポーラスシリカの細孔径は、鑄型となる界面活性剤のミセル集合体の形態制御によって細孔直径 2~25 nm の範囲で適宜調整可能であるため、DNA 増幅反応における最適な細孔径について検討した。

DNA 合成酵素には、Taq DNA ポリメラーゼ、KOD DNA ポリメラーゼ (PCR 法) 及び phi29 DNA ポリメラーゼ、Bst DNA ポリメラーゼ (MDA 及び LAMP 法) を用いた。細孔直径および親疎水性の異なるナノ空孔材料に対して DNA 合成酵素の吸着量を測定することによって、複合化に最適なナノ空孔材料の検討を行った。酵素の吸着挙動は、具体的には吸着反応後の遊離酵素及びメソポーラスシリカから脱離させた酵素をポリアクリルアミド電気泳動によって解析することで評価した。

次に、ナノ空孔材料に吸着させた DNA 合

成酵素の酵素活性をバッチ法にて評価した(図1)。具体的には、ナノ空孔材料に吸着させていないDNA合成酵素のDNA増幅活性を基準にし、DNA合成酵素-ナノ空孔材料複合体の酵素活性が安定に保持されているかどうかを検討した。また、極微量の基質DNAを対象としたDNA増幅反応における複合化酵素の活性評価についても併せて実施した。

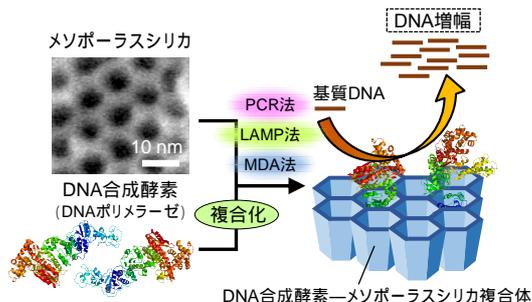


図1 メソポーラスシリカを利用したDNA増幅反応

(2)DNA合成酵素-ナノ空孔材料複合体のマイクロチップへの固定化と反応解析評価

DNA合成酵素-ナノ空孔材料複合体をマイクロチップの流路内に安定に固定化する方法には、研究代表者が平成21年度に開発したガラス基板表面への固定化法(Matsuura S, et al., Mater. Lett., 63, 2445 (2009))を適用した。本手法は、具体的には、ガラス基板表面に疎水性のポリジメチルシロキサン(PDMS)樹脂を薄層化し、ここにナノ空孔材料を埋め込み、固定化・パターンニングするものである。

次に、ここで作製したDNA合成酵素-ナノ空孔材料担持マイクロチップを用いた微生物、ウイルス等のゲノムDNAを対象としたDNA増幅反応を行い、得られたDNA産物を蛍光強度測定によって解析し、酵素活性の評価を行った。ここで、細孔内において酵素の高次構造が安定化されることに着目し、本マイクロチップによるDNA合成反応の繰り返し使用試験(連続合成評価)について併せて実施した。

4. 研究成果

(1)DNA合成酵素とナノ空孔材料の複合化とバッチ法での活性評価

ナノ空孔材料と耐熱性DNA合成酵素(Taq DNAポリメラーゼ)の複合材料を用いたバッチ式PCRにおいて、まず、100塩基対のDNAを鋳型としたDNA増幅反応を試みた。具体的には、細孔径の異なる7種類のナノ空孔材料(FSMおよびSBA型メソポーラスシリカ、細孔径:2.6、4.2、5.4、7.1、10.6、18.5、24.5 nm)を合成し、これらシリカ材料に対するPCR用DNA合成酵素(Taq DNAポリメラーゼ)の吸着挙動を解析するとともに、固定化酵素によるDNA増幅反応を評価した。その結果、DNA合成酵素は、予め酵素溶液に含まれていたウシ血清アルブミン(BSA)と

の競合吸着にもかかわらず、いずれのナノ空孔材料に対してもBSAより優先的に吸着されることが判明した(図2)。また、FSMおよびSBA型どちらの場合もシリカ材料の細孔径が小さいほどDNA増幅活性が増大することが分かった(図3)。

以上の結果から、DNA合成酵素の反応活性はナノ空孔材料の細孔径の違いによって制御可能であり、また、本酵素がDNA増幅可能な状態でナノ空孔材料に安定に固定化されていることが示唆された。

Type of mesoporous silica	FSM		SBA			SBA microsphere	
	1	2	3	4	5	6	7
Pore size (nm)	2.6	4.2	5.4	7.1	10.6	18.5	24.5

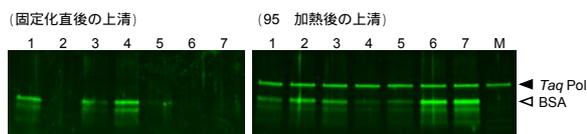


図2 メソポーラスシリカへのDNA合成酵素の吸着評価

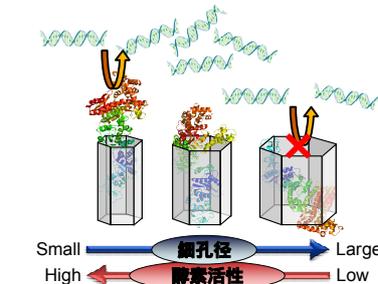
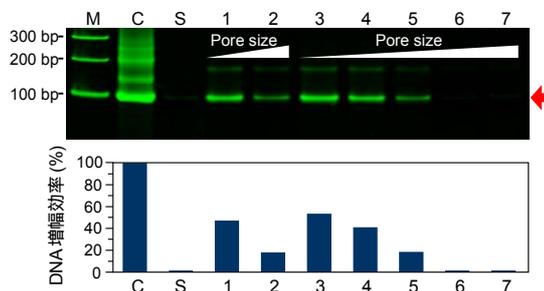


図3 DNA合成活性に与えるメソポーラスシリカの細孔径の影響

次に、616塩基対のDNAが挿入された環状プラスミドDNA(T-Vector pMD20, 0.01fg)を基質DNAとした、遊離のDNA合成酵素及び7種類のナノ空孔材料に固定化したDNA合成酵素(KOD DNAポリメラーゼ)を用いたポリメラーゼ連鎖反応(PCR法)を実施した後にDNA増幅産物(分子サイズ:約800塩基対)をアガロースゲル電気泳動で解析した(図4)。

図4より、PC(メソポーラスシリカに固定化していない遊離のDNA合成酵素の場合)及びNC(遊離のDNA合成酵素に基質DNAを添加せず、プライマーDNAを添加した場合)では、どちらも非特異的DNA増幅が示され、標的DNAの増幅が認められなかった。一方、DNA合成酵素-メソポーラスシリカ複合体では、7種類のナノ空孔材料のうち、4

種類において、数分子レベルの極微量 DNA (0.01 fg = 2.7 分子) からの特異的な増幅が認められた。具体的には、FSM-22 (中心細孔直径: 4.2 nm)、SBA-15 (中心細孔直径: 10.6 nm) また、SBA-15 microsphere (中心細孔直径: 24.5 nm) に固定化した DNA 合成酵素では、非特異的 DNA 増幅が示されなかったものの、標的の DNA 増幅産物を得ることができず、FSM-16 (中心細孔直径: 2.6 nm)、SBA-15 (中心細孔直径: 5.4 nm)、SBA-15 (中心細孔直径: 7.1 nm) また、SBA-15 microsphere (中心細孔直径: 18.5 nm) に固定化した DNA 合成酵素では、特異的な DNA 増幅産物が明瞭に示された。SBA-15 (中心細孔直径: 5.4 nm) では、標的 DNA の増幅が示されたものの、標的 DNA より下流に非特異的 DNA 増幅が示された。

以上の結果から、DNA 合成酵素 - メソポーラスシリカ複合体には、環状プラスミド DNA を鋳型とした長鎖 DNA の増幅反応において、非特異的 DNA 増幅を著しく抑制する効果が有り、この効果によって、従来の遊離酵素を用いた DNA 増幅反応で必要とされる基質 DNA 量よりも更に 100 万分の 1 の微量の基質 DNA、すなわち、数分子レベルの基質 DNA から増幅できることが分かり、メソポーラスシリカの細孔は、DNA 増幅反応における副反応抑制場として好適であることが判明した。また、各々のタイプのメソポーラスシリカにおいて、微量 DNA 増幅に最適な細孔径が異なったことから、極微量 DNA の増幅における固定化 DNA 合成酵素の反応活性はメソポーラスシリカの細孔径の違いによって制御できる可能性が示唆された。

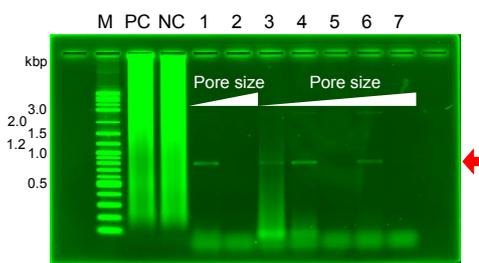


図4 極微量DNAの増幅活性におけるメソポーラスシリカの細孔径依存性

(2) DNA 合成酵素 - ナノ空孔材料複合体のマイクロチップへの固定化と反応解析評価

本研究では、ガラス製マイクロ流路の底面に SBA 型メソポーラスシリカ粒子 (細孔径: 5.4 nm) を担持した流通式のマイクロチップを作製した (図 5)。また、マイクロ流路中での DNA 合成反応を可能にするための温度制御装置の設計を行い、マイクロチップのガラス基板の背面に設置した透明導電膜への電圧印加により、マイクロ流路近傍を局所的に加熱することで温度制御を行った。

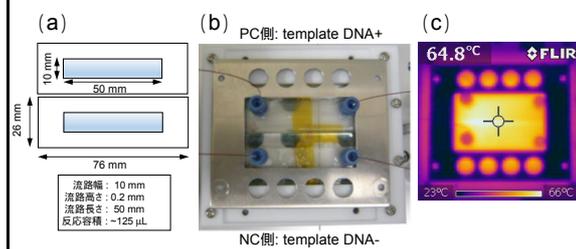


図5 DNA合成酵素 - SBA - 15 (中心細孔直径: 5.4 nm) 複合体をガラス製流路に担持したマイクロ流体チップ

(a) マイクロ流体チップの上面図及びマイクロ流路の寸法を示す図、(b) マイクロ流体チップを上面から見た時の写真、(c) マイクロ流路を加熱した場合の赤外線サーモグラフィ画像

メソポーラスシリカに固定化した鎖置換型 DNA ポリメラーゼ (phi29 および Bst DNA ポリメラーゼ) による、大腸菌細胞レベルの染色体 DNA からの増幅 (MDA 法) はバッチ反応にて困難であった。そこで、次に、Bst DNA ポリメラーゼ - SBA 型メソポーラスシリカ粒子 (細孔径: 5.4 nm) 複合体をマイクロ流路に実装し、65 での等温 DNA 増幅 (LAMP 法) における流通式での連続反応を行った (図 6)。基質 DNA には、コイヘルベスウイルス (KHV) ゲノム DNA を適用した。図 6 より、Bst DNA ポリメラーゼ - SBA 型メソポーラスシリカ複合体を固定化したマイクロチップは、9 度の繰り返し使用によっても、遊離の酵素の 2 倍以上の DNA 増幅活性を保持した。これより、マイクロチップを利用した流通式での等温 DNA 増幅 (LAMP 法) における DNA 合成酵素 - シリカ系ナノ空孔材料複合体の繰り返し使用の実行可能性が示唆された。

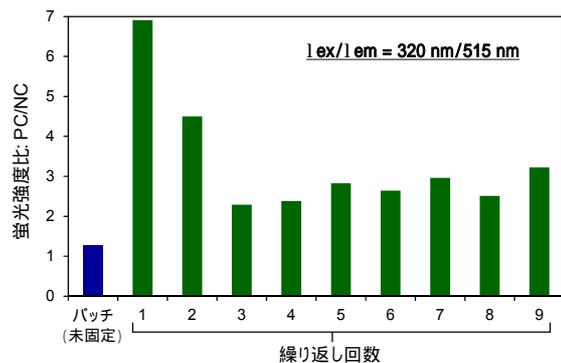


図6 コイヘルベスウイルス (KHV) ゲノム DNA を基質 DNA とした、DNA 合成酵素 - SBA - 15 (中心細孔直径: 5.4 nm) 複合体を流路に担持したマイクロ流体チップによる流通式の等温 DNA 増幅 (LAMP 法)

本研究で示したメソポーラスシリカを利用する DNA 増幅法は、国内外における初めての研究成果である。本法は、簡便な手法により、非特異的 DNA 増幅反応を抑制でき、その結果、極微量の基質 DNA の特異的かつ高感度の増幅を可能にする点で、実用面での画期的なインパクトとなり、これまでに無い、メソポーラスシリカ材料の新しい利用法になることが期待できる。

今後は、本法による極微量 DNA 増幅の再現性の確保と、実用レベルにあるかどうかの追加検証を進める方針である。また、これと

併せて、phi29 DNA ポリメラーゼを用いた難培養性微生物の一細胞ゲノム DNA 等を対象とした未知の塩基配列解析のための DNA 増幅 (MDA 法) に向けた、DNA ポリメラーゼの固定化状態及び反応条件の最適化について検証していく予定である。

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1件)

Shun-ichi Matsuura, Tomoya Baba, Manami Chiba, Tatsu Tsunoda, Nanoporous scaffold for DNA polymerase: Pore-size optimisation of mesoporous silica for DNA amplification, *RSC Adv.*, 査読有, in press, DOI: 10.1039/C4RA02725F

[学会発表](計2件)

松浦俊一、千葉真奈美、角田達朗、馬場知哉、DNA ポリメラーゼ-メソポーラスシリカ複合体を用いた DNA 増幅法の開発、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日、神戸国際展示場 (神戸市)
松浦俊一、千葉真奈美、角田達朗、馬場知哉、ナノ空孔反応場を利用した高効率 DNA 増幅システムの構築、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 日、マリンメッセ福岡 (福岡市)

[産業財産権]

出願状況 (計 2 件)

名称：極微量核酸の増幅方法
発明者：松浦俊一、千葉真奈美、角田達朗、馬場知哉
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2014-115262
出願年月日：2014 年 6 月 3 日
国内外の別：国内

名称：DNA 合成酵素 シリカ系ナノ空孔材料複合体、その製造方法及び用途
発明者：松浦俊一、千葉真奈美、角田達朗、馬場知哉
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2012-260391
出願年月日：2012 年 1 月 2 8 日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

松浦 俊一 (MATSUURA SHUN-ICHI)
独立行政法人 産業技術総合研究所・コンパクト化学システム研究センター・主任研究員

研究者番号：80443224

(2)研究分担者

馬場 知哉 (BABA TOMOYA)
大学共同利用機関法人 情報・システム研究機構・新領域融合研究センター・特任准教授

研究者番号：00338196