

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25790030

研究課題名(和文) ナノチップによる巨大環状DNA 1分子の実時間ダイナミクス解析

研究課題名(英文) Single-molecule studies of circular DNA using nanomicrofluidic device in real-time

## 研究代表者

平野 研 (Hirano, Ken)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・主任研究員

研究者番号：80392653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体内で重要なDNAの形態である環状DNA1分子をリアルタイムに直接イメージングを行うためにナノ・マイクロ流体チップを開発し、生化学反応や周囲環境、熱力学的要因によって、環状DNA1分子の構造・形態変化のダイナミクスを新規に解析した。当該チップを用いて環状DNA1分子レベルでの凝縮をリアルタイムに観察して重要な知見を得ることに成功し、またDNA1分子レベルでDNA損傷を高感度に計測できることに成功し、先駆けてDNA1分子を輪の状態が生体ダイナミクスのイメージングに基づく解析を達成した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a nano- and microfluidic chip in order to perform the imaging of single circular DNA molecules directly in real time for dynamics studies based on biochemical reactions, the surrounding environment effect and thermodynamics. To observe the single circular DNA molecules directly, we success the technique for imaging and measuring in real time with developing nano- and microfluidic chip. By using the chip, for instance, the condensation of single circular DNA molecules and single-strand-damage of the DNA in real time were able to measure and image in high sensitivity.

研究分野：ナノバイオサイエンス

キーワード：1分子 DNA 環状DNA 1分子解析 ナノ流体チップ マイクロ流体チップ リアルタイム

## 1. 研究開始当初の背景

生体 1 分子を直接観たり操作することにより、分子を集団としての平均的な振るまいとしてではなく、1 分子レベルの個性について解析することが可能となり、また直接的なエビデンスを得ることが可能となり、それにより新しい発見や知見が得られることで、1 分子研究が世界的に飛躍的な広がりを見せている。また分子の個を理解することは、上層の集団などの性質を理解する上で重要な課題である。

そのような背景のもと、これまでに DNA 1 分子計測のためのリアルタイム直接観察を行ってきており、光ピンセット法を中心に DNA 1 分子の操作技術の開発とそれを用いた解析 (Hirano et al. Appl. Phys. Lett. 2002, Hirano et al. Anal. Chem. 2008 等) やマイクロ流体チップを用いた DNA 1 分子凝縮の物理的制御因子の解明 (Hirano et al. Nucleic Acids Res. 2012) などを行ってきた。その他、国内外で DNA 1 分子計測によって、直鎖状 DNA を用いた凝縮解析や RNA ポリメラーゼとの相互作用、張力やねじれを機械的に導入した解析などが行われ、生体のメカニズムが分子レベルで詳細に解明されてきている。

しかし、これまでの蛍光顕微鏡を用いたリアルタイム直接観察による 1 分子計測では、直鎖状の DNA 分子を扱っているのがほとんどである。そのため、環状 DNA は生体内に存在する重要な DNA 形態であるにも関わらず、環状 DNA 1 分子については、ほとんどリアルタイム直接観察とそれによる 1 分子計測がなされていない。それ故に、環状 DNA を基にした核酸酵素の機能解析や DNA 形態変化のダイナミクスなどの生体内でのメカニズムの詳細が未解決のまま残されている。また、生命科学に留まらず高分子分野においても、顕微鏡でリアルタイム直接観察できるような巨大環状ポリマーを化学合成することは難しいため、顕微鏡で観察できるような巨大環状ポリマーである環状 DNA を解析することで、環状高分子の性質やダイナミクスも明らかにすることができる (DNA の高分子の性質が与える生命現象との関わりも明らかにできる)。

## 2. 研究の目的

環状 DNA 1 分子をリアルタイムで解析を行うためには、直鎖状 DNA 1 分子の解析でも行われているように DNA 分子を観察するために形態を制御する必要がある (例えば端を固定し溶液の流れ等で伸長させて観察できる状態にする)。しかし、我々の過去の知見から、直鎖状 DNA 1 分子とは異なり、通常は溶液中でブラウン運動している天然の環状 DNA 1 分子を目的の位置で捕捉して輪の状態に形態制御するのは困難である (Hirano et al. Appl. Phys. Lett. 2002; Anal. Chem. 2008, Nucleic Acids Res., 2012)。そ

こで、本研究では、以下のようにまず環状 DNA 1 分子のリアルタイム観察手法を確立し、当該観察手法の開発の進展に応じて環状 DNA 1 分子のダイナミズムについてできる限り解析を進めて行くことを目的とする。

(1) 環状 DNA 1 分子をリアルタイム直接観察する技術を確立する。ひとつは、ナノチップを用いて「輪」の状態を観察する 2 次元観察技術であり (図 1 参照)、他方はナノチャンネルを用いて、環状 DNA をナノチャンネル中で一次的に伸張させて安定的に計測する 1 次元観察技術の確立である。

(2) トポイソメラーゼ反応について、超らせん弛緩型反応の酵素反応速度論的解析やねじれ数変化を 1 分子解析で明らかにし、生物種間の比較も加味して、酵素機能の未知の知見の取得を行う。

(3) 環状 DNA 分子を取り巻く環境や熱力学的要因が与える環状 DNA の構造や形態変化のダイナミクスについて研究し、環状ポリマーとしての高分子物理学的見地との相関性を調べる。

(4) DNA 損傷による超らせん弛緩型への変化を利用し、DNA 鎖への損傷の検出技術として検討し、DNA 損傷に関わるメカニズムの DNA 1 分子解析を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 環状 DNA 1 分子のリアルタイム直接観察法の確立

研究計画を達成するために環状 DNA 1 分子をリアルタイム観察する 2 種類の手法を検討した。

「輪」で観察する方法の確立 (2 次元観察法の確立)

溶液中では、通常環状 DNA 1 分子はブラウン運動の影響で、糸球状になっている。この状態では輪の状態として環状 DNA として識別ができない。そこで、溶液の厚さをこの糸球の直径よりも小さくすることで、ボールを押しつぶすイメージで、糸球状の環状 DNA 1 分子を押し広げ、輪の状態として観察する。完全な輪を得るためには、DNA の高分子としての柔軟性の性質を示す Kuhn 長まで溶液の厚みを薄くすることで輪として疑似 2 次元的に環状 DNA 1 分子を観察できると考えた。そのために、ナノメートルサイズの高さのチャンネルを有するナノ流体チップを作製し、1 分子計測に好適な流路デザインも併せて検討し、環状 DNA 1 分子を「輪」としてリアルタイム観察する手法を行った。

マイクロ流体チップで伸張させる方法の確立 (1 次元観察法の確立)

基板固定のために巨大環状 DNA 1 分子中の一カ所にビオチン等の化学修飾を施すのは収率の上でも困難である。そこで、流路幅が 100 nm 程度のナノチャンネルを用いると、上記 Kuhn 長により環状 DNA が流路内で一直線にほぼ完全長で伸張できることが期待できる。この手法では環状 DNA への化学修飾や基板への

固定も必要とせず、天然のサンプルをそのまま扱うことが可能となる新たな環状 DNA 1 分子観察法となる。また、マイクロ流路内に微小構造体を設け環状 DNA 1 分子を片端固定する手法を併せて検討する。

#### (2) トポイソメラーゼによる DNA 形態・酵素機能の解析

トポイソメラーゼによる DNA 形態変化と酵素機能・性質を 1 分子計測により明らかにする。ナノチップによる 1 分子観察法を用いて、トポイソメラーゼ反応によるねじれの導入・解消に基づいた環状 DNA の形態変化のダイナミクスを 1 分子リアルタイム計測から明らかにする。酵素反応を 1 分子レベルで明らかにするのに加え、超らせん弛緩型の中に位置する形態なども解析する。中間体は電子顕微鏡や高分子理論予測により、同じねじれ数を導入しても取り得る形は複数存在すると予想され、toroidal 型と interwound 型や分岐した超らせん (H 型) も存在すると考えられている。実際に酵素によりねじれをリアルタイムで導入し、実際にどのような過程と条件で超らせんが形成され、そしてどれがよく取り得る形なのか、電顕観察での議論や裏付けを含め明らかにする。またねじれを解消するトポ やトポ のダイナミクス解析も行う。

#### (3) 環状 DNA の周囲環境および熱力学的要因による構造・形態変化の解析

これまでに直鎖 DNA を用いて、マイクロ流路による溶液交換で周囲環境を変えることで、溶液環境が DNA 凝縮速度を決めていることを明らかにしてきている。環状 DNA でも環境要因 (塩濃度等) や熱力学的性質によりねじれ数が変化することが知られている。このような構造・形態変化を巨大環状ポリマーの性質として捕らえ、解析することで高分子物理学的な新たな知見を得る。これにより、さまざまな環境要因について環状 DNA の形態や相転移について、環状ポリマーとしても高分子物理学的な性質からの解釈も考察する (ポリマーとしての性質も生命現象に影響すると考えられるが、その視点での実験的研究は少ないため、本研究の手法を用いて新たな知見取得も目指す)。

#### (4) DNA 損傷の検出手法への応用

超らせん弛緩の変化をナノチャンネルで計測することで、数 100kbp 以上に 1 つしか起きないようなレアな損傷も、片鎖と両鎖の損傷を区別して検出できる高感度な解析技術となり得る。そこで、超らせん弛緩の変化を伸長した環状 DNA 1 分子長の変化として計測し、DNA 損傷の高感度計測を試みる。

### 4. 研究成果

#### (1) 環状 DNA 1 分子のリアルタイム直接観察法の確立

「輪」で観察する方法の確立 (2 次元観察法の確立)

環状 DNA を輪としてリアルタイムでのダイ

ナミクスを観察するための 2 次元観察法を構築するために、ナノメートルの厚みを持つマイクロ流体チップ (以下、ナノチップ) の構造による 2 次元観察の有用性について実験的な確認を行った。厚みを 400nm 以下としたナノチップ流路を作製し、検討した結果、環状 DNA を輪の状態でもリアルタイムに 1 分子観察が可能となった。溶液厚さをナノメートルのオーダーまで小さくすることで、巨大環状 DNA の 1 分子を輪の状態でもリアルタイムでイメージングする手段として有効であることが実証できた。ただ、流路高さが 400nm 以下であるため環状 DNA 1 分子が上下のチャンネル壁に接触をしており、溶液によっては基板への吸着が見られた。とくに下記トポイソメラーゼの酵素反応溶液では吸着が生じる為、今後はナノチャンネル内の吸着防止の表面コーティングを検討することで、環状 DNA 1 分子のダイナミクス解析の応用範囲が広がると期待できる。また、流路高さをさらに薄くすることで、より完全な輪の状態でも観察できることが期待できる成果を得た。

#### マイクロ流体チップで伸張させる方法の確立 (1 次元観察法の確立)

流路幅が 200nm、高さ 200nm のナノ流路を用いて DNA 1 分子の伸長でき、伸長観察することが可能となった。しかし、上記と同様に溶液によっては基板への吸着が見られたため、今後の展開としてナノチャンネル内の吸着防止の表面コーティングを検討することで、より観察手法を確立できることが期待できる。また、マイクロ流体チップ中で環状 DNA 1 分子を伸張させリアルタイム観察を行う 1 次元観察手法を構築も試みた。線形 DNA 分子とは異なり、ピオチンなどの化学修飾を施すのは困難であるため、非修飾 (天然の状態の) 環状 DNA 1 分子をそのまま基板へ円周上の 1 箇所のみを固定する技術について検討を行った。突起物構造を持つ生体タンパク質等で作製した環状 DNA 分子の 1 箇所にするについて、流路内に微細加工した突起物を作製し、環状 DNA の輪を突起構造に引っ掛ける要領で固定化することに成功した。

#### (2) トポイソメラーゼによる DNA 形態・酵素機能の解析

トポイソメラーゼによる DNA 形態変化と酵素機能・性質を 1 分子計測により明らかにするために、酵素の発現精製と上記観察手法により観察を試みた。発現精製により酵素を調製したが、上記のとおり思わぬ酵素反応溶液によるナノ流路内での環状 DNA 1 分子の非特異的吸着の問題により、酵素反応を計測することができなかった。今後の展開として、ナノチャンネル内の吸着防止の表面コーティングを検討することで、環状 DNA 1 分子のダイナミクス解析が達成できることが期待できる。

#### (3) 環状 DNA の周囲環境および熱力学的要因による構造・形態変化の解析

熱力学的要因による構造・形態変化につい

て、今回用いたゲノムレベルでの環状 DNA 分子の性質については現象がよく知られていない。そこで環状 DNA 1 分子と線形 DNA 1 分子の流体力学的半径を経時的に解析した結果、その緩和時間が 1 桁異なる事を見出した。巨大な環状ポリマーとして高分子物理学的な性質からのシミュレーションとも結果が一致しており、生体内では線形 DNA 分子と環状 DNA 分子とは溶液中での流体力学的な挙動が異なっており、立体構造への影響による生体イベントへの関わりが示唆された。また、周囲環境による構造・形態変化の解析では、ポリアミン等による凝縮剤により環状 DNA 1 分子レベルでの凝縮過程をリアルタイムに観察し、線形 DNA 1 分子との差異についての重要な知見を得ることに成功し、また凝縮系を例に先駆けて DNA 1 分子を輪の状態での生体ダイナミクスイメージングを達成した。

#### (4) DNA 損傷の検出手法への応用

超らせん 弛緩の変化を流路中で計測し、溶液中で光化学的に発生したラジカルにより超らせん DNA 1 分子が片鎖損傷により弛緩し、開環状 DNA へと変換されるリアルタイム計測を達成した。1 箇所の損傷でも弛緩が生じる為、従来の分子生物学的な手法（数 kbp サイズのプラスミドを用いた電気泳動解析）よりも高感度な損傷検出も可能になると期待される。今後の展開としては、種々の DNA のラジカル損傷と抗酸化物質解析、放射線損傷の解析などが考えられる。

遺伝子がどのように機能し、調節されているのかを理解する上で、DNA のねじれは重要な意味を持っている。しかし、環状 DNA が実際に溶液中や生体内でどのように形態や構造の変化をしているかを直接観たことはいないため、実験よりも理論が先行し、今日得ているのは、何が起きているのかを示す間接的な証拠だけである。故に未知な点も多く、また様々な理論モデルが提唱され収束されていないため、本研究により直接的エビデンスを得ることは、これら未解決の課題を明らかにする上で、必要であり、意義がある。本報告では、環状 DNA 1 分子をリアルタイムに直接観察できることを示しており、これにより上述の直接的証拠を得て、明らかにできれば、遺伝子調節など、高分子物理学的な性質の解明とその関わり合いを含めて、極めて重要な生命現象の解明に寄与できることが期待できる。また、環状 DNA 1 分子観察により、高感度な DNA 損傷検出手法等への応用展開も期待できる。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Iwaki, T., Ishido, T., Hirano, K., Lazutin, A. A., Vasilevskaya, V. V., Kenmotsu, T., Yoshikawa, K., "Marked difference in conformational fluctuation between giant DNA

molecules in circular and linear forms", J. Chem. Phys., 142(14), 145101 (2015). (査読有り)

2. Hirano, K., Ishido, T., Yamamoto, Y. S., Murase, N., Baba, Y., Itoh, T., "Plasmonic imaging of Brownian motion of single DNA molecules spontaneously binding to Ag nanoparticles", Nano Lett., 13(5), 1877-1882 (2013). (査読有り)

### 〔学会発表〕(計 5 件)

1. 平野 研, 市川正敏, 吉川研一, マイクロ流路を用いた 1 分子 DNA の凝縮転移のリアルタイム解析, 電気学会 E 部門第 32 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 朱鷺メッセ(新潟市) 2015/10/30.
2. 岩城貴史, 石堂智美, 平野研, Alexei Lazutin, Valentina Vasilevskaya, 剣持貴弘, 吉川研一, 線状/環状 DNA 分子の動的構造揺らぎの解析, 日本物理学会 2015 年秋季大会, 関西大学千里山キャンパス(大阪府吹田市) 2015/9/16.
3. (招待講演)平野 研, DNA1 分子・単一細胞のマニピュレーションと解析, 2015 年度ナノ・バイオ静電気工学シンポジウム, 東京工業大学(目黒区) 2015/03/20.
4. (招待講演)平野 研, DNA1 分子のリアルタイムイメージングと操作・解析, 2014 年第 1 回静電気学会研究会, 東京大学(文京区), 2014/03/06.
5. 石堂智美, 山本裕子, 市川正敏, 吉川研一, 馬場嘉信, 伊藤民武, 平野 研, 銀ナノ粒子のプラズモン共鳴光散乱による 1 分子 DNA ダイナミクスイメージング, 第 37 回静電気学会全国大会, 千葉工业大学(千葉市), 2013/09/10.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

平野 研 (HIRANO, Ken)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・

生命工学領域 健康工学研究部門・

主任研究員

研究者番号: 80392653