

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06175

研究課題名(和文) 分子輪投げによる環状DNA1分子の直接リアルタイム解析

研究課題名(英文) Single molecule studies of circular DNA using molecular ring toss technique

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・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)：本研究課題においては、環状DNA1分子を「輪」の状態を観察し、直接リアルタイム解析可能な手法を達成することを目的とした。従来は直鎖のDNA1分子観察により様々な発見や現象の解明が成されてきた。しかし、生体内でもう一つの重要なゲノムDNAの構造である「環状」DNAについては、その1分子観察手法自体が開発されていない状況である。本研究課題では、独自の分子輪投げデバイスにより、環状DNA1分子を輪投げの要領でマイクロピラーに引っ掛け「輪」の状態を捕捉し観察する手法を提供する。これにより、周囲溶液環境等との相互作用など、環状DNAの構造・形態変化のダイナミクスについてリアルタイム観察の達成を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、DNAを1分子レベルでリアルタイムに観察する技術の発展により、これまで未知であった生体内の働きや現象について、新たな発見をもたらしている。ただ、この観察技術は直鎖状のDNA分子にしか適用できていないのが現状である。生体内のゲノムDNAにはもう一つの構造があり、その「環状」のDNA構造は、直接的・間接的に生体内で重要な働きを担っているものの1分子解析ができなかった。そこで本研究課題では、環状DNAの1分子リアルタイム観察を実現するため、半導体微細加工技術を用いて作製した新規デバイスにより環状DNA1分子を分子輪投げの要領で捕まえて「輪」の状態を、且つリアルタイムに観察可能な手法を確立した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research project was to observe single molecules of circular DNA in a "ring" state and to achieve a method that enables direct real-time analysis. Conventionally, various discoveries and elucidation of phenomena have been made by observing single molecules of linear DNA. However, for "circular" DNA, which is another important genomic DNA structure in the living body, the single molecule observation method has not been developed. In this research project, we will provide novel method for capturing and observing single circular DNA molecules in a "ring" state by hooking it on a micropillar in the manner of ring-toss using a unique microfluidic device. Through this, we aim to achieve real-time observation of the dynamics of structural and morphological changes in single molecular level for circular DNA, such as interaction with the ambient solution environment.

研究分野：ナノバイオテクノロジー

キーワード：ゲノム DNA 直鎖 環状 1分子 マイクロ流体デバイス 分子輪投げ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体 1 分子を直接観ることにより、分子集団の平均ではなく、1 分子レベルの個性について解析が可能となる。これは最小の構成単位を解析することで科学が発展してきたことを科学史が示しているように、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。また 1 分子を直接かつリアルタイムに計測することは、予測に対する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ため、1 分子研究が世界的に飛躍的な広がりを見せている。

直接リアルタイム観察における DNA 1 分子計測の分野では、直鎖 DNA 1 分子の末端にポリスチレンや磁気ビーズを結合させて、光ピンセットや磁気により捕捉する手法が用いられており、原田慶恵らによる RNA ポリメラーゼの転写時に於ける DNA 回転の直接観察などがある (Nature 409, 113-115, 2001)。しかし、これまでの直接リアルタイム観察における DNA 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がなされていない。それ故に、環状 DNA 1 分子に対する核酸酵素の機能解析と DNA 形態変化の同時計測・ダイナミクスなどいまだ多くの詳細な解明が未解決のまま残されている。

これまで環状 DNA 1 分子の直接リアルタイム観察 (一般に蛍光顕微鏡が用いられる) が行われてこなかった最大の原因は、環状 DNA 1 分子を解析するための固定方法がないためである。直鎖状 DNA 分子は、末端にビオチンなどを修飾することで基板やビーズへ固定化することが容易であるし、固定化されていない反対側の末端はフリーのため生化学的反応 (酵素など) への影響はほぼ問題がない。しかし、一方の環状 DNA は 1 箇所を化学修飾するのが難しい上に、仮に固定化できてもそもそも末端が存在しない環状 DNA を固定すれば、環状 DNA の本来の構造的性質を損ねてしまい解析に適さなくなってしまう。そのため、天然の環状 DNA 1 分子を修飾することなしにリアルタイムに直接観察することが可能な手法が確立されれば、一気に環状 DNA 1 分子解析の道が開ける。

2. 研究の目的

本研究課題では環状 DNA 1 分子をリアルタイムに直接観察することが可能な分子輪投げデバイスを確認し、環状 DNA と周辺環境等との相互作用など解析する。これにより、将来的に環状 DNA の構造・形態変化のダイナミクスその他、DNA のねじれ (トポロジー) そのものや生体イベントとの関連性をリアルタイム観察により 1 分子レベルで明らかにし、また直接観察により予測等に対する直接的なエビデンスを示すことを目的としている。

3. 研究の方法

これまでマイクロ流体デバイスのフロー中に於ける環状 DNA 1 分子を「輪」として観察する技術は存在しなかった。そこで、半導体微細加工技術により独自の分子輪投げデバイスを考案し、環状 DNA 1 分子のトラップと「輪」状態での観察を世界で初めて実現した。マイクロ流体デバイスの流路内にマイクロピラー (μm サイズの微小な柱) の構造体を配置し、そこへ環状 DNA 溶液を通液させ、マイクロピラーへ輪投げの要領で環状 DNA 分子を引っ掛ける手法である。この方法を用いれば、DNA 修飾を必要とせず「輪」の状態で捕捉・直接観察が可能となる。またマイクロ流体デバイスのフロー中で観察が可能ことから、マイクロ流体デバイスの特徴である迅速な溶液置換により DNA 溶液から所望の解析溶液へ置換し相互作用をリアルタイムで観察することが可能となった。

4. 研究成果

これまでマイクロ流体デバイスのフロー中に於ける環状 DNA 1 分子を「輪」として観察する技術がそもそも存在しなかった故に、前例がなく、基礎的な条件検討を含め分子輪投げを実現する新規デバイスの作製に時間を要した。マイクロ流体のシミュレーションを基にデバイスデザインを設計した。マイクロ流路内に構成するマイクロピラー構造は、約 $2\mu\text{m}$ ~ 約 $7\mu\text{m}$ の範囲で検討し、約 $2\mu\text{m}$ が捕捉できる環状 DNA の効率が良いことが判明した。また、ピラーや流路の高さにおいても、種々の高さのデバイスを作製して検討した結果、いずれも $5\mu\text{m}$ が至適であることが判明した。また分子輪投げによりマイクロピラーに捕捉された環状 DNA 1 分子は、「輪」の状態で捕捉できており、環状 DNA 1 分子を直接リアルタイムで観察が可能であることが実証できた。捕捉された環状 DNA 1 分子は、流速に比例して伸張することが判明した。マイクロ流体デバイスやマイクロピラーは、半導体微細加工技術で作製しているため、その利点を活かし、マイクロピラーをアレイ化して、多数の環状 DNA 1 分子を捕捉するアレイデバイスも作製可能となった。アレイ化により、1 度にかつ同一条件で多数の分子を同時にリアルタイム観察することが可能となることから、相互作用等の現象の計測に於いて、統計解析が容易となる利点を得た。

1 分子観察が可能となった環状 DNA 1 分子との相互作用の解析例として、スペルミンによる DNA 凝縮のリアルタイム計測を行った。環状 DNA 1 分子の凝縮特性を直接リアルタイムにより計測す

ることが可能であり。またその凝縮特性は直鎖のものと比較して効率的に成されていることを示唆する結果を得ることができた。DNAの環状構造は、ねじれと形態が密接に結び付いた重要な構造である。ねじれは転写・複製やゲノム折り畳みにも関与し、また環状構造は微生物のゲノム構造というだけでなく、局所的にヒト染色体上のループ構造などにも見られ、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、環状DNAとねじれは重要な意味を持っている。また、環状DNA 1分子が実際に生体内でどのように形態や構造の変化をしているかをリアルタイムで直接観たことはないため、本研究により直接環状DNA 1分子を観ることで直接的なエビデンスを得たことは、今後環状DNAに係る未解決の課題を明らかにする事が期待され、意義があり、特色のある研究になるとと思われる。

参考文献

- (1) Dohi, D., Hirano, K.*, Terao, K.*: Molecular ring toss of circular BAC DNA using micropillar array for single molecule studies. *Biomicrofluidics* 14 (1): 014115 (014115-1~014115-8) (2020). IF= 2.961 (doi: 10.1063/1.5142666).
- (2) 平野 研 : 1分子DNAの操作・解析 - 静電気力・レーザー光圧力とマイクロ・ナノ流体デバイスが織りなす新技術 - . 静電気学会誌 Vol. 42, No. 4, pp.156-159 (2018).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2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 -

1. 著者名 Hirano, K., Iwaki, T., Ishido, T., Yoshikawa, Y., Naruse, K., Yoshikawa, K.	4. 巻 149
2. 論文標題 Stretching of single DNA molecules caused by accelerating flow on a microchip	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Chem. Phys.	6. 最初と最後の頁 165101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/1.5040564	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 平野 研	4. 巻 42
2. 論文標題 1分子DNAの操作・解析 - 静電気力・レーザー光圧力とマイクロ・ナノ流体デバイスが織りなす革新的技術	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 静電気学会誌	6. 最初と最後の頁 156-161
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Takahashi Koki, Kamiya Shogo, Takao Hidekuni, Shimokawa Fusao, Terao Kyohei	4. 巻 11
2. 論文標題 Stainless microfluidic probe with 2D-array microapertures	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 AIP Advances	6. 最初と最後の頁 015331 ~ 015331
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/5.0014119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Inukai Ryo, Takao Hidekuni, Shimokawa Fusao, Terao Kyohei	4. 巻 14
2. 論文標題 Capture and elongation of single chromosomal DNA molecules using optically driven microchopsticks	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomicrofluidics	6. 最初と最後の頁 044114 ~ 044114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/5.0017727	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3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Hirano, K.
2. 発表標題 DNA stretching induced by polymer stream tube in 1um channel
3. 学会等名 MicroTAS2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平野 研、土肥大輝、寺尾京平
2. 発表標題 分子輸送による環状DNA1分子のトラップ
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平野 研
2. 発表標題 1分子解析のためのマイクロピラー構造等を用いたマイクロ流体デバイスの開発
3. 学会等名 第3回広島大学・山口大学・香川大学・FAIS合同ナノテクノロジープラットフォームシンポジウム
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 暮らしと人を見守る水センシング技術研究調査委員会	4. 発行年 2019年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 222
3. 書名 暮らしと人を見守る水センシング技術	

〔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
研究 分担 者	寺尾 京平 (Terao Kyohei) (80467448)	香川大学・創造工学部・准教授 (16201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------