

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月23日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22656179

研究課題名（和文） DNA鎖を認識素子として利用するナリアクターの反応制御

研究課題名（英文） Reaction Control of Nanoreactor by Utilizing DNA Hybridization

研究代表者

後藤 雅宏 (GOTO MASAHIRO)

九州大学・工学研究院・教授

研究者番号：10211921

研究成果の概要（和文）：

本研究では、DNA鎖のハイブリダイゼーションを駆動力としたナノオーダーの分子集合体であるベシクルの融合挙動を制御した。ベシクルの融合は、相補的なDNAのハイブリダイゼーションによって制御されるため、操作温度や塩濃度に強く依存した。ベシクルの内部に酵素を内包し、基質と反応が起こった場合にのみ蛍光が発する仕組みを構築した。その際、相補的なDNAを組み込んだベシクルのみで反応が進行することを確認した。

研究成果の概要（英文）：

We investigated DNA-directed aggregation of vesicles using DNA-surfactants. Following tethering of single-stranded DNA oligonucleotides to vesicles using DNA-surfactant, the tethered vesicles were assembled with other vesicles bearing complementary strands. The vesicle aggregation was strongly affected by the salt concentration and by temperature according to the characteristics of DNA hybridization. Restriction enzyme, which can hydrolyze the double-stranded DNA used in the present study, dissociated the vesicle aggregates. Exploration using fluorescently labeled vesicles suggested that the DNA-directed vesicle aggregation took place in a sequence-specific manner through DNA-duplex formation. Interestingly, the DNA-directed aggregation using short DNA-surfactant induced the fusion of vesicles to produce giant vesicles, resulting in an enzymatic reaction in the giant vesicle.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	0	1,900,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	390,000	3,590,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・化工物性・移動現象・単位操作

キーワード：ベシクル、ナノリアクター、分子集合体、ハイブリダイゼーション、DNA

1. 研究開始当初の背景

分子を配列、間隔および配向を制御して空間的に配置することができれば集団化によ

る新たな機能を持った高次組織体の構築が可能であると考えられる。これはまさに生命体が行っていることである。生命体は、細胞

間のコミュニケーションと集積制御により、単細胞系から多細胞系、さらに組織へと進化したと考えられている。細胞は様々な分子の自己組織体であり、分子一つではなしえなかった機能を自己組織化することによって「細胞」として発現し、さらに細胞が集合することで、単細胞ではなしえなかったより高次の機能を「組織」として発現している。

このことに着目し、本研究ではナノ分子集合体にさらに自己組織性を付与することで、より大きな構造体を作り上げることを目的に研究を始めた。上述した事柄を参考に、「ナノ構造体構築素子」として注目されている DNA を用いてリボソームに自己組織性を付与し、自発的ネットワーク形成を試みた。具体的には自己組織体としてリボソームを、その接着素子として DNA を選択し、リボソーム表面に DNA を生やした構造体 (DNA-tagged リボソーム) を調製した。これを用いることで、DNA のハイブリダイゼーションに基づくリボソームの反応制御が可能となると考えた。

2. 研究の目的

本研究では生体触媒を利用して自発的に成長する分子集合体ネットワークの構築を試みた。生体触媒として用いた DNA polymerase がリボソーム膜表面に生やした短いプライマー DNA に核酸塩基をつなぐことでネットワーク骨格が成長し、リボソーム同士をつないでいき、自発的に脂質分子集合体を組織化するというものである。これは、分子集合体の“高次”の自己組織化を生体触媒により達成した初めての例となると考えられる。また、この高次組織体は目視判別可能な大きさまで成長する。よって本系で用いた Polymerase Chain Reaction (PCR) の進行の有無を簡便に目視判定可能であり、高度分析への応用にもつながると期待される。

3. 研究の方法

3.1 DNA 界面活性剤の合成

オレイン酸 2.82 g (10 mmol) と NHS (N-hydroxysuccinimide) 1.15 g (10 mmol) を DMF 10 ml に溶解し、縮合剤 DCC (dicyclohexyl carbodiimide) 2.26 g を加えて氷冷下で 20 時間攪拌した。DCUrea を吸引濾過で除去した後、溶媒を減圧留去して NHS 化オレイン酸を得た。これを DMSO に溶解させ、1 mM に調製した。24 mer 5' 末端アミノ化 DNA を pH 8.0、100 mM の Tris-HCl 緩衝溶液に溶解させた 1 mM DNA 溶液 1.5 μ l とオレイン酸溶液 15 μ l、トリエチルアミン 0.21 μ l、滅菌水 1.29 μ l を混合し、40°C で 24 時間緩やかに攪拌しながら反応させた。1 日凍結乾燥し、これに Tris-HCl 緩衝溶液

を加えボルテックスを行い、DNA 界面活性剤溶液を得た。得られた界面活性剤溶液は液体クロマトグラフィー (HPLC) で分取・生成して使用した。相補的な DNA に対しても同様の操作を行った。なお、本研究で使用した 24 mer DNA の塩基配列は

DNA I 5' NH₂ - TTTTTCACGCGCCACAAAGAAA 3'
Mw : 7321 Tm : 70.5

DNA II 5' NH₂ - TTTCTTTGTGGCGGTGCAAAAAA 3'
Mw : 7383 Tm : 70.5

ただし Tm は塩濃度 1.0 M のときであり、それぞれの DNA の 5' 末端には炭素数 6 の直鎖アルキル鎖が結合しており、その末端にアミノ基が結合している。

3.2 ベシクル会合体の調製

任意量の POPC (1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine) をクロロホルム溶液に溶解し、エバポレーターで減圧留去後、真空乾燥した。形成された薄膜に 100 mM の Tris-HCl 緩衝溶液を加え薄膜を剥がすようにボルテックスを行ったのち、5 分間超音波照射を施した。凍結、室温融解、超音波処理 (1min) を 5 回繰り返し、得られた懸濁液を 200 nm の細孔を持つポリカーボネートを通してベシクルの大きさをそろえた。このベシクル溶液と DNA 界面活性剤溶液を任意の割合で混合し、DNA-tagged ベシクルを得た。互いに相補的な塩基配列を有する DNA-tagged ベシクル溶液を、37°C で緩やかに攪拌しながら反応させた。

3.3 選択的ベシクル会合体形成

Fluo3 (緑) と塩化カルシウム、5(6)-carboxy-X-rhodamine (赤)、何も内包していないベシクル (free) の 3 種類を準備した。なお、ベシクルのサイズは 800 nm にそろえた。緑と free のベシクルにそれぞれ相補的な塩基配列を有する 8 mer DNA 界面活性剤溶液を加えた。また、赤と free には、別の相補的な塩基配列を有する 8mer DNA 界面活性剤溶液を加えた。これら 4 種類の溶液を混合し、得られた会合体を蛍光顕微鏡で観察した。用いた 8mer 5' 末端アミノ化 DNA の塩基配列は (5' CTCGCAA 3') と (5' TTTGCGAG 3') および (5' ACAGTCTA 3') と (5' TGTCAAAT 3') である。

4. 研究成果

4.1 DNA のハイブリダイゼーションによるベシクル会合体の形成

4.1.1 ベシクル会合体の調製

ベシクル会合体の目視および透過型電子顕微鏡 (TEM) による観察結果をそれぞれ図 1 に示す。

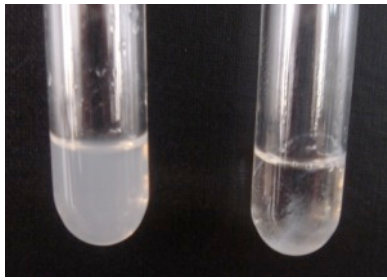


図1 リボソーム単体 (左) および
リボソーム会合体 (右) の目視による観察

図1(右)のように、遠心後もベシクルはコロイド状に分散するだけで溶液は白濁しているのに対し、ベシクル会合体(左)は沈殿し、上澄み液は透明になった。この二つの溶液を酢酸ウラニル染色を行った後TEMで観察した結果、図2に示すように200 nmスケールのベシクルおよび100~200 nmスケールのベシクルがそのナノ構造を維持したまま会合している様子が観察された。

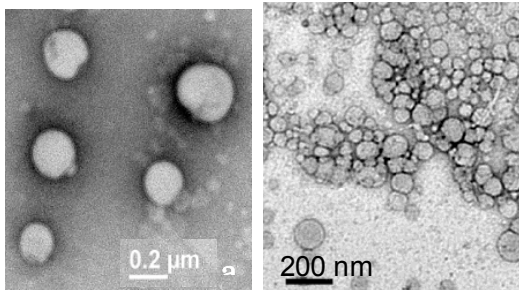


図2 リボソーム単体 (左) および
リボソーム会合体 (右) のTEM観察

1.2 選択的ベシクル会合体形成

相補鎖との特異的結合能を有するDNAが接着素子として機能し、会合体が形成される場合、蛍光顕微鏡により一画面上で緑と赤の会合体が独立して観察されることが期待された。しかし、実際の観察結果は緑と赤の会合体がくっついたような大きな構造体がみられた。これは、形成されたそれぞれの色の会合体が静止するほどの大きな会合体を形成するまでに、溶液サンプルは露光も伴って流動性を増すためであると考えられる。しかし、この大きな構造体の中で赤と緑のパートがはっきり別れていることは選択性が確実に達成されていることを示唆している。

コントロールとして緑の蛍光色素を内包したリボソームと何も内包していないリボソームからなる会合体および赤の蛍光色素を内包したリボソームと何も内包していないリボソームからなる会合体を蛍光顕微鏡

で観察した結果が図3(a), (b)である。次に、4種類のDNA-taggedリボソームを混合し得られた会合体を蛍光顕微鏡で観察した結果が図3(c)であり、大きな会合体の中で赤と緑のパートがはっきりと別れていることが分かる。単体のリボソームは800 nm前後であり、観察された会合体の大きさが数十nmであることを考えると、この結果はDNAを接着素子とすることでリボソームの選択的会合が達成されていることを示唆している。緑と赤の会合体が独立せずにくっついてさらに大きな構造体を形成している様子が観察された理由としては、それぞれの会合体が小さく、静止するまでの大きさになるまでに露光も伴ってそれぞれの会合体の流動性が増したためと考えられる。

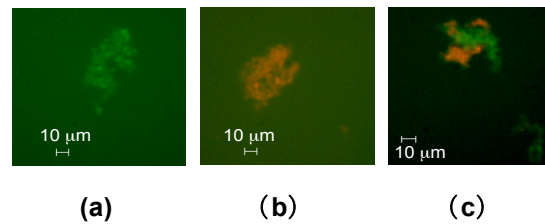


図3 選択的リボソーム会合体の蛍光顕微鏡
観察(a) 緑のみ (b) 赤のみ (c) 緑・赤混合

4.2 酵素反応によるリボソームの会合制御

制限酵素はDNA二本鎖の特異的な配列を認識・切断する酵素である。リボソーム間の結合を担うと考えられるDNAに作用する制限酵素をリボソーム会合体に添加することで、リボソーム会合体の崩壊が見られれば、酵素反応の特異性の高さからもリボソームがDNAのハイブリダイゼーションを駆動力に会合体を形成していることを強く示唆する結果となると考えられる。

さらに、制限酵素によって切断されたDNA二本鎖は修飾酵素(Ligase)をもちいることで再形成することが可能であるという特徴がある。よってリボソーム会合体を制限酵素によって崩壊したのち、Ligaseを添加し再び会合体を形成させることも可能であると考えられる(図2-10)。これは「酵素反応を用いた自己組織化」という観点から新規的かつ興味深い挑戦だと思われる。

12merDNA 加え、HhaI による切断を行ったところ、1日反応後の目視の結果、溶液中に会合体はほとんど存在しないことが確認された。HhaI 添加直後から数時間おきに会合体を光学顕微鏡で観察した結果、添加直後から5時間で会合体が劇的に小さくなる様子が観察された。しかし、それ以降は若干小さくなるだけでほとんど変化せず、24時間後も会合体が完全に消滅することはなかった。

以上の結果から、HhaI 添加によりリポソーム間の結合を担う DNA 二重鎖が切断され、リポソーム会合体は崩壊していくことが確認された。

成果のまとめ

本研究では、DNA のハイブリダイゼーションを駆動力としたリポソームの組織化に成功した。リポソーム会合体の存在は目視で確認でき、さらに TEM によってその詳細構造も観察した。また、リポソーム間の結合を担うのが DNA 二本鎖であることを証明するため、DNA 二本鎖の相補鎖との特異的結合能および酵素反応応答性といった二つの特徴に着目した。その結果 DNA 二本鎖の挙動に応じた変化がリポソーム会合体においても観察された。以前明らかとした温度応答性、塩濃度応答性と今回明らかとなった二つの結果から、DNA のハイブリダイゼーションによってリポソームが会合体を形成することが証明された。しかし、Ligase によるリポソーム会合体再形成に成功することはできず、「酵素反応による組織化」が課題として残った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. S. Egusa, S. Yokota, K. Tanaka, K. Esaki, Y. Okutani, Y. Ogawa, T. Kitaoka, M. Goto, H. Wariishi, "Surface modification of a solid-state cellulose matrix with lactose by a surfactant-enveloped enzyme in a nonaqueous medium", *J. Mater. Chem.*, 19, 1836-1842(2009) 査読有

2. M. Moniruzzaman, N. Kamiya, M. Goto, Ionic Liquid Based Microemulsion with Pharmaceutically Accepted Components: Formulation and Potential Applications, *Journal of Colloid & Interface Science*, 352, 136-142 (2010). 査読有

3. K. Minamihata, M. Goto, N. Kamiya, "Site-Specific Protein Cross-Linking by Peroxidase-Catalyzed Activation of a Tyrosine-Containing Peptide Tag" *Bioconjugate Chem.* 22, 74-81 (2011). 査読有

4. J. Shimada, T. Maruyama, M. Kitaoka, N. Kamiya, M. Goto, "DNA-enzyme conjugate with a weak inhibitor that can specifically detect thrombin in a homogeneous medium" *Anal. Biochem.*, 414, 103-108 (2011) 査読有

5. E. Toorisaka, K. Watanabe, H. Ono, M. Hirata, N. Kamiya, M. Goto, "Intestinal patches with an immobilized solid-in-oil formulation for oral protein delivery.", *Acta Biomaterialia*, 8, 653-658

(2012). 査読有

6. Uju, Y. Shoda, A. Nakamoto, M. Goto, W. Tokuhara, Y. Noritake, S. Katahira, N. Ishida, K. Nakashima, C. Ogino, N. Kamiya, "Short time ionic liquids pretreatment on lignocellulosic biomass to enhance enzymatic saccharification" *Bioresour. Technol.*, 103, 446-452 (2012) 査読有

7. J. Shimada, T. Maruyama, M. Kitaoka, N. Kamiya, M. Goto, "Microplate assay for aptamer-based thrombin detection using a DNA-enzyme conjugate based on His-tag chemistry" *Anal. Biochem.*, 421, 541-546 (2012). 査読有

8. J. Shimada, T. Maruyama, M. Kitaoka, H. Yoshinaga, K. Nakano, N. Kamiya, M. Goto, Programmable protein-protein conjugation via DNA-based self-assembly, *Chem. Commun.*, Accepted.(2012) 査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 部位特異的・共有結合的タンパク質マルチラベル化技術の開発 安倍弘喜、神谷典穂、後藤雅宏 化学工学会第 75 年会、2010 年 3 月、鹿児島

2. DNA を利用したタンパク質の連結化方法 嶋田如水、丸山達生、神谷典穂、後藤雅宏 化学工学会第 42 回秋季大会 2010 年 9 月 京都

3. トランスグルタミナーゼの新規機能性基質の探索 安倍弘喜、後藤雅宏、神谷典穂 化学工学会 第 76 年会、2011 年 3 月、東京農工大学

4. チロシン酸化反応を用いた異種タンパク質架橋体の酵素合成 南畑 孝介、後藤 雅宏、神谷 典穂 化学工学会第 76 年会 2011 年 3 月、東京農工大学

他 7 件

〔その他〕

ホームページ:

<http://www.bioeng.cstm.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 雅宏 (GOTO MASAHIRO)

九州大学・工学研究院・教授

研究者番号：10211921