

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24656472

研究課題名(和文) 指向性タグを有するナノリアクター反応システムの構築

研究課題名(英文) Design of Nano-reactor Programmed by Synthesized DNA

研究代表者

後藤 雅宏 (Goto, Masahiro)

九州大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10211921

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)：DNAは遺伝情報を司る生体高分子である一方で、ボトムアップ型のナノデバイス材料としても魅力的である。DNA-タンパク質複合体を利用することで、共役タンパク質を配列させ、高活性なカスケード反応を達成した例も報告され、DNAを足場とする研究が近年注目されている。本研究では、DNAをタンパク質の捕捉および配列設計図とするテンプレートとして利用することで、タンパク質を連結化させる新たな方法論の確立を目的としている。今回は、thrombinの連結化後の活性評価やMS測定による多量化の検証を行った。また、本方法論を抗体修飾へ応用したところ、IgE-thrombin複合体の作製成功を示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：We present the covalent protein-protein conjugated nanoreactor, which is programmed by synthesized DNA. To demonstrate the concept, we chose thrombin as a model protein for the protein conjugation and designed four different single-stranded DNA. One of them is a template of a DNA scaffold for the arrangement of the thrombin-binding aptamers and three of them are thrombin-binding aptamers with different sticky ends that can hybridize with the DNA template (aptamer unit). By self-assembling these oligonucleotides, they should form a comb-like structure (termed DNA scaffold) composed of both the linear chains due to the DNA double-strands and the branched arms (the flexible DNA aptamer units). Thrombin molecules can get close to each other by the binding of the thrombin molecules with the aptamer units. Then, the addition of a chemical cross-linker induces the neighboring thrombin molecules on the DNA scaffold to easily cross-link each other.

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：ナノリアクター アプタマー 自己組織化 タンパク質 DNA

1. 研究開始当初の背景

自然界において、ある反応を行う際、そこに必要なタンパク質は互いに複合化し、活性サイトを互いに近接させることで、効率的な触媒反応や物質輸送を行っている。近年、それらを模倣して、タンパク質を連結・複合化させ、タンパク質自体の機能の強化（協同効果による親和性の向上）や別のタンパク質機能を付与することが可能であるため、バイオセンシングやバイオ燃料電池など生体内外への応用が報告されている。タンパク質の複合・連結化方法は、主に遺伝子組み換え操作、もしくは有機化学的な方法がこれまでに報告されている。しかし、遺伝子組み換え操作においては、タンパク質活性は宿主に依存したり、大きなタンパク質は発現が困難になること、有機化学的な方法では、タンパク質の個数や並び方を制御することは困難である。そこで、本研究では、宿主を用いないタンパク質を連結し、ナノリアクターを構築する方法論の確立を目的として、DNA を指向性タグとして利用する新たな方法論を提案した。

2. 研究の目的

DNA は遺伝情報を司る生体高分子である一方で、ボトムアップ型のナノデバイス材料としても魅力的である。というのも、DNA は Watson-Crick 塩基対により相補鎖を認識し、剛直な二本鎖を形成することは周知の事実である。近年、核酸技術の発展により、人工的に DNA の塩基配列を設計・合成でき、DNA を基にした様々な形状のナノ構造体が報告されている[4-5]。また、DNA に対して金属ナノ粒子やタンパク質を複合化させることで、正確かつ自在に分子を DNA 上に配列させられるため、ナノ配線の設計やタンパク質間相互作用解析など、より詳細な情報が取得できる。また、DNA-タンパク質複合体を利用することで、足場となる DNA 上に二本鎖形成能を利用して、共役タンパク質を配列させ、高活性なカスケード反応を達成した例も報告され、DNA を足場とする研究が近年注目されている。一方で、DNA は相補鎖を認識するだけでなく、塩基配列によっては、ある特定の分子と特異的に結合する機能を有する。そのような結合性を有する DNA を aptamer といい、有機小分子からタンパク質、細胞といった広範囲な対象分子と特異的に結合する。Aptamer は、抗体と同等の強固な結合力を有し、人工的に取得可能であるため、抗体代替物として非常に有用である。これまでに、Aptamer を利用することで、タンパク質を一本鎖 DNA 上に一次元状に配列させた例、タンパク質ワイヤーを作成した例が報告され、DNA がテンプレートとし

て有効であることが証明されている。

本研究では、そのような DNA の機能をテンプレートとして利用する、新規タンパク質連結化方法論の確立を目的とした。鋳型となる DNA を設計することで、事前にタンパク質の配列を設計する。タンパク質を添加すると、Aptamer とタンパク質の特異的な相互作用により、DNA 上に密にタンパク質が配列化する。DNA 上に配列したタンパク質同士は非常に近接しているため、架橋剤を添加することで容易に架橋可能であると期待される。本方法論の大きな特徴は、鋳型 DNA の塩基配列によってタンパク質同士を近接させるため、連結させる個数を制御できる点があげられる。また、Aptamer は、タンパク質の活性中心に結合するものが多いため、Aptamer が架橋時の活性中心保護にも有効であるとも期待される。

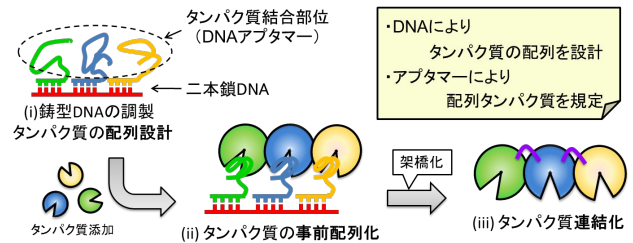


図1 DNAを介するナノリアクター調整

3. 研究の方法

【実験操作】

1. DNA を利用した thrombin の連結化

4種類のDNA (Base DNA, No.1~3 apt) を、HB 緩衝液 (20 mM HEPES, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂, pH 7.5,) 中で等モル濃度で混合した。その水溶液を 95 °C で 5 分加熱後、3 時間かけて 20 °C まで温度を下げることで、鋳型となる DNA 複合体を形成させた。Thrombin (終濃度 3.0 μM) と DNA (終濃度 1.0 μM) を混合し、2 時間静置することで DNA-thrombin 複合体を調製した。DNA-thrombin 複合体水溶液に、架橋剤 bis[sulfosuccinimidyl] suberate (BS³, 60 μM, Fig. 2) を添加し、2 時間静置することで、隣接 thrombin を架橋した。1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) の添加により、架橋反応を停止させ、7.5% アクリルアミドゲル非還元 SDS-PAGE を行い、銀染色により、thrombin 連結体の評価を行った。

2. DNA を利用した IgE-thrombin 連結化

4種類のDNA (Base DNA, No. 1 IgE, No. 2 apt, No. 3 apt) を上記同様に混合し、アニーリングさせた。Thrombin (2.0 μM) を

IgE (1.0 μ M) とテンプレート DNA (1.0 μ M) を混合し、2 時間静置することで DNA-thrombin-IgE 複合体を調製した。DNA-thrombin-IgE 複合体水溶液に、架橋剤 (BS³) (60 μ M) を添加し、隣接 thrombin、IgE を架橋した。解析は 5.0% アクリルアミドゲル非還元 SDS-PAGE を行い、銀染色により、評価を行った。

4. 研究成果

1. Thrombin 連結体の調製

鋳型となる DNA を調製後、thrombin を添加し、架橋剤により thrombin を架橋した結果を Fig. 5 に示した。鋳型 DNA がある場合、thrombin (約 37kDa) は二量体 (約 74kDa)、三量体 (約 111kDa) と考えられる分子量バンドが観測された。一方で、鋳型 DNA がない場合、thrombin 二量体、三量体と考えられるバンドはほとんど観測されず、鋳型による近接効果が十分に機能していることが示唆された。しかし、前回同様、非還元 SDS-PAGE の結果、三量体と考えられるバンドが 100kDa あたりに二本観測されていた。この原因としては、直線状に連結した thrombin 連結体と環状 (トライアングル状) に連結した thrombin 連結体であることが考えられる。

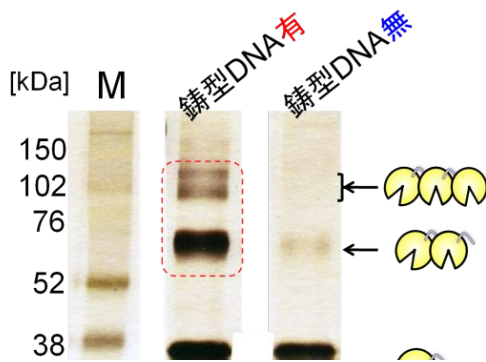


図 2 鋳型 DNA の有無による thrombin 連結化 SDS-PAGE

2. 連結後の thrombin 活性

Thrombin 連結後に DNaseI 処理を行い、限外濾過により、濃縮・分離した thrombin 連結体の thrombin 活性を測定した。コントロールとして、thrombin のみ、鋳型 DNA なしの架橋 thrombin の活性を測定し、thrombin のみを基準とした相対活性を Fig. 7 に示した。Thrombin 単量体で濃度換算した結果、いずれの条件においても thrombin 活性の低下は観測されず、架橋剤が thrombin に与える影響 (構造や活性中心) は少ないことが示唆された。

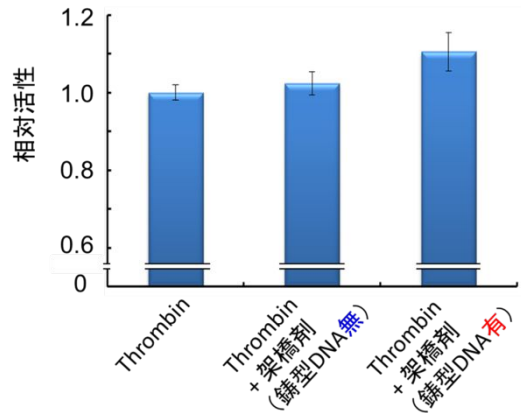


図 3 thrombin 連結後の相対活性

3. DNA を利用した IgE-thrombin 複合体の調製 (抗体修飾への応用)

ここでは、DNA をテンプレートとした thrombin-IgE 複合体の調製を行った。これまでに、thrombin における 3 量化が可能であること、位置による thrombin の反応性評価を行った。IgE は非常に大きなサイズ (200 kDa) を持つ分子であるため、今回は、末端の No. 1 の位置に IgE が結合するように塩基配列を調製した。実験操作に従い、DNA-thrombin-IgE 複合体を架橋することで、thrombin-IgE 連結体を調製した結果を図 4 に示した。鋳型 DNA が存在することで、新たなバンドが観測され、IgE と thrombin の連結化に成功したことが示唆された。

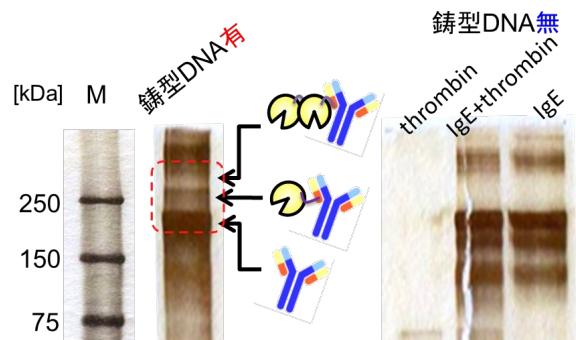


図 4 DNA によるナノリアクターの調製

成果のまとめ

鋳型 DNA を利用することで、thrombin 連結体を創製することに成功した。また、連結した thrombin は活性を十分に保持しており、アプタマーの位置によるタンパク質の反応性制御の可能性が示唆された。さらに、抗体修飾への応用を行ったところ、鋳型 DNA が存在する場合においてのみ、新たなバンドが観測されたことから、IgE-thrombin 複合体

の調製に成功したことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

1. 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

2. J. Shimada, T. Maruyama, M. Kitaoka, H. Yoshinaga, K. Nakano, N. Kamiya and M. Goto, Programmable protein protein conjugation via DNA-based self-assembly., Chem. Commun., 48, 6226-6228 (2012).査読有

3. M. Kitaoka, M. Mitsumori, K. Hayashi, Y. Hiraishi, H. Yoshinaga, K. Nakano, K. Miyawaki, S. Noji, M. Goto, N. Kamiya, Transglutaminase-mediated in situ hybridization (TransISH) system: A new methodology for simplified mRNA detection., Anal. Chem., 84, 5885-5891 (2012).査読有

4. K. Minamihata, M. Goto, N. Kamiya, 'Control of a tyrosyl radical mediated protein cross-linking reaction by electrostatic interaction.' Bioconjugate Chem., 23, 1600-1609 (2012)査読有

5. Y. Mori, R. Wakabayashi, M. Goto, N. Kamiya, "Protein supramolecular complex formation by site-specific avidin biotin interactions" Org. Biomol. Chem., 11, 914-922 (2013).査読有

6. M. Takahara, K. Hayashi, M. Goto, N. Kamiya, 'Tailing DNA aptamers with functional proteins by two-step enzymatic reaction' J. Biosci. Bioeng., 116, 660-665 (2013) □.査読有

〔学会発表〕(計11件)

1. M. Goto

Directed Aggregation and Fusion of Vesicles Induced by DNA Surfactants
AIChE Meeting(2014) (招待講演)

2. 安倍弘喜、若林里衣、後藤雅宏、神谷典穂、Split Spy0128 のバイオコンジュゲーションツールとしての利用 □ □ 酵素工学会 第 68 回講演会(2012)

3. 森山幸祐、後藤雅宏、神谷典穂 □, 酵素反応を利用した高分子-タンパク質ハイブリッドゲルの作製, □ 化学工学会第 44 回秋季大会 (2012)

4. H. Abe, M. Goto, N. Kamiya □, Lipid Modification of Proteins Catalyzed by Transglutaminase, □ 2nd International Conference on Molecular & Functional Catalysis (ICMFC-2), (2012)

5. Y. Mori, M. Goto, N. Kamiya □, Functional protein assemblies by site-specific avidin-biotin interactions, □ 12th Japan-China-Korea Joint Symposium on Enzyme Engineering, (2012)

6. 古賀未佳、若林里衣、神谷典穂、後藤雅宏 ペプチド集合体の形態制御と細胞培養基材への展開, 第 50 回化学関連支部合同九州大会(2013)

7. 若林里衣、古賀未佳、神谷典穂、後藤雅宏 □ ペプチド集合体のナノ構造制御と三次元細胞培養基材への応用, □ 日本化学会第 93 回春季年会 (2013)

8. Y. Mori, R. Wakabayashi, M. Goto, N. Kamiya, Fabrication of Higher-Order Protein Supramolecular Complexes, IGER International Symposium on Cell Surface Structures and Functions (2013)

9. 若林里衣、古賀未佳、神谷典穂、後藤雅宏, 自己集合ペプチドのナノ構造制御と細胞培養基材への応用, 化学工学会第 45 回秋季大会(2013)

10. 古賀未佳、若林里衣、神谷典穂、後藤雅宏, 酵素応答性ペプチドハイドロゲルのネットワーク形成制御, 日本化学会第 7 回バイオ関連化学シンポジウム(2013)

11. R. Wakabayashi, M. Koga, N. Kamiya, M. Goto, Nanostructured Peptide Amphiphile Assemblies for Bioactivity Control, 8th International Symposium on Macrocyclic and Supramolecular Chemistry (8-ISMSC), (2013)

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

(2) 研究分担者

久保田 富生子 (KUBOTA FUKIKO)

九州大学・工学研究院・助教

研究者番号: 60294899