

令和元年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：2016～2018

課題番号：16K05861

研究課題名(和文) 1分子からのDNA増幅を可能にする酵素のナノ空間への精密配置

研究課題名(英文) Precise enzyme immobilization in the nanopores for single-molecule DNA amplification

研究代表者

松浦 俊一 (Matsuura, Shun-ichi)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・材料・化学領域・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) 3,800,000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空間材料(メソポーラスシリカ等)にDNA増幅酵素を固定化することにより、ナノ空間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、酵素固定化担体のハンドリング性の向上を図るためにメソポーラスシリカ粉末を含んだ新規の多孔質成形体(ペレット状、中空糸等)を開発し、LAMP法に適用した結果、ゲノムDNA増幅における固定化酵素反応の実行可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

精密なナノ空間空隙制御による1分子からの高効率の核酸増幅反応が実現すれば、従来のDNA増幅やRNA検出の他、ゲノムDNAを対象としたDNA増幅(LAMP法など)への活用が期待できる。具体的には、従来技術では達成不可能であった、1細胞レベルの核酸情報の高精度の解析が可能になるため、高感度の遺伝子診断への利用の他、難培養性の環境微生物等のゲノム解析を達成できるようになる。また、ナノ空間材料のバイオ分野での新たな利用価値を見出すことにもつながる。

研究成果の概要(英文)：We successfully immobilized thermostable DNA polymerase on 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 porous compact containing the mesoporous silica powder exhibited precise, efficient 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：酵素工学

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 1分子PCR ナノ空間 反応制御 多孔質材料

## 1. 研究開始当初の背景

現在、DNA 増幅技術は社会のあらゆる場面で日常的に用いられていると言っても過言ではない。例えば、遺伝子 (DNA) 診断では検体 (被験者からの血液、組織片など) の一部から微量の DNA を抽出し、それを DNA 増幅技術のポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法などを用いて診断対象となる DNA 領域を増幅した上で調べるのが一般的である。さらに、犯罪捜査や貴重な試料 (化石など) における遺伝子解析では、非常に微量の DNA しか得られないことが多く、高感度かつ高精度の DNA 増幅技術が求められている。PCR 法は理論的には 1 分子の DNA からの増幅が可能であるが、実際の反応においては  $10^3$  分子以上の標的の DNA 分子が存在しなければ正確な DNA 増幅は困難である場合が多い。その理由として、反応系において標的の DNA 分子が極度に減少すると、増幅反応に必須のプライマーと呼ばれる本来は標的の DNA 配列の一部に特異的に結合する人工合成の短い 1 本鎖のオリゴヌクレオチド分子が標的以外の DNA (バックグラウンド DNA) にも非特異的に結合し、結果的に非特異的な DNA 増幅が増大する点が挙げられる。したがって、現在の DNA 増幅技術が関係する遺伝子診断および解析における感度、精度、コストなどは、DNA 増幅反応における標的 DNA の分子数がボトルネックとなっている。この課題の克服には、より微量の標的 DNA 分子であっても、増幅酵素 / 標的の DNA 分子 / プライマー、これら間での特異性を高度に維持できる反応場の確立が不可欠である。

研究代表者らは、増幅対象の標的 DNA のみの特異的かつ高感度の核酸増幅を実現するための新規の技術として、ナノ空間材料 (メソポーラスシリカ) の規則性細孔に DNA 増幅酵素を集積することで酵素周辺の反応環境を至適化する手法を提案している (RSC Adv., 4, 25920-25923 (2014)) (図 1)。

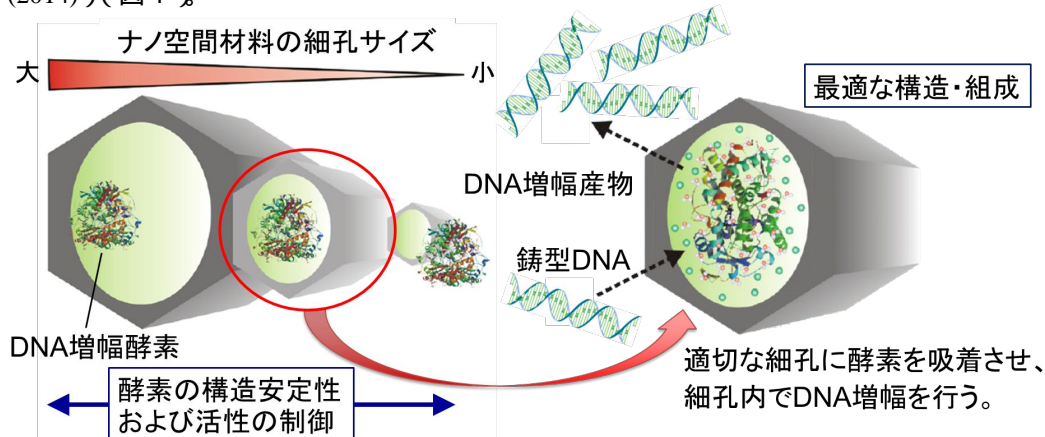


図 1 ナノ空間利用による DNA 増幅酵素の安定化と活性制御の概念図

## 2. 研究の目的

遺伝子の精密診断では、数分子レベルの極微量の核酸分子 (DNA) からの迅速かつ簡便な DNA 増幅法の開発が求められるが、従来法では、標的 DNA の選択的な増幅が標的以外の DNA に起因した非特異的 DNA 増幅により阻害される点に課題があった。我々はこの課題解決に向け、ナノ空間材料 (メソポーラスシリカ) への DNA 増幅酵素の固定化による反応制御技術を検討しているが、反応時の固定化支持体からの酵素の脱離や標的 DNA の増幅長さの制約に課題が残っており、より吸着安定性に優れた固定化材料を開発する必要がある。そこで本研究提案では、材料表面の親疎水性を高度に制御した新規のナノ空間材料を開発し、酵素の安定的かつ持続的な固定化の実現をめざす。さらに、精密なナノ空間空隙制御により酵素を精密に配向・集積させることで酵素の反応環境を至適化し、微量の標的 DNA の選択的かつ高感度の増幅を図る。

ナノ空間への DNA 増幅酵素の精密配置と反応制御の実現により、究極的には 1 分子レベルの極微量 DNA からの増幅を可能にする技術開発を目的としている。

## 3. 研究の方法

ナノ空間材料には、FSM (folded-sheet mesoporous material) 型、SBA (santa barbara amorphous) 型、または、MCM (Mobil Crystalline Material) 型のメソポーラスシリカ材料を使用した。また、メソポーラスシリカとは親疎水性の程度が異なるメソポーラスカーボンや独自に開発したナノ空間材料 (高アルミニウム含有メソ多孔体および両親媒性有機 - 無機ハイブリッド多孔体) を用い、DNA 増幅酵素の固定化および極微量の基質 DNA を対象とした DNA 増幅反応における固定化酵素の DNA 増幅活性の比較検討を行った。DNA 増幅酵素には、KOD DNA ポリメラーゼ (PCR 法) および *Bst* DNA ポリメラーゼ (LAMP 法) を適用した。

本研究では、メソポーラスシリカの細孔への酵素の吸着メカニズムの解明の一環として、固体核磁気共鳴(SS-NMR)および示唆熱・熱重量(TG-DTA)測定装置を用いて、DNA 増幅酵素を固定化したメソポーラスシリカの局所構造を詳細に解析し、表面(細孔内壁面)組成を推定した。

また、メソポーラスシリカを利用した従来の酵素固定化技術では、粉末状シリカが使用されてきたが、バッチ式及びフロー式反応におけるハンドリング性に欠けるため、本研究では、粉末状シリカと有機高分子バインダーを融合した新規の多孔質成形体(ペレット状、中空糸状)の作製を試みた。さらに、DNA 増幅酵素 - 多孔質成形体から成る複合体をウイルスのゲノム DNA を対象とした DNA 増幅反応(LAMP 法)に使用し、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。

#### 4. 研究成果

本研究では、まず、各種ナノ空間材料への DNA 増幅酵素の固定化および活性評価を行った。具体的には、6 種類のナノ空間材料(FSM、SBA、MCM 型メソポーラスシリカ、メソポーラスカーボン、高 Al 含有メソ多孔体(C16-meso)、両親媒性有機-無機ハイブリッド多孔体(KCS-2))に固定化した DNA ポリメラーゼ(KOD)を用いて、数十分子~数百分子の DNA からの増幅(PCR 法)を試みた。その結果、メソポーラスシリカを用いた場合のみ、標的 DNA の特異的な増幅が認められ、その他の材料では反応阻害の傾向が示された(図 2)。その理由としては、メソポーラスカーボン等の材料には反応液中の核酸(基質 DNA、プライマー等)は吸着せずに酵素を選択的に吸着可能であったが、酵素の吸着時に酵素活性が低下することが推察された。

そこで、酵素の吸着メカニズムの解明の一環として、固体核磁気共鳴(SS-NMR)および示唆熱・熱重量(TG-DTA)測定装置を用いて、2 種類のメソポーラスシリカ(FSM および SBA 型)、また、KOD を固定化したシリカの局所構造を詳細に解析し、表面(細孔内壁面)組成を推定した。その結果、メソポーラスシリカの種類によってシリカ表面近傍の吸着水の分布や末端シラノール基(Si-OH)の分布に違いが見られ、表面親水性に違いがあることが判明した。さらに興味深いことに、PCR 用 Tris 緩衝液で処理したサンプルでは表面末端の隣接するシラノール基同士が縮合していることが判明した。このことは、緩衝液の影響によってシリカの表面性状がより疎水的に変化することを意味する。

以上の結果より、PCR 法においてはメソポーラスシリカの細孔が酵素の安定な固定化場および極微量 DNA の増幅反応場として好適であり、また、緩衝液の作用による表面性状の変化が酵素の固定化状態や反応性に影響することが示唆された。

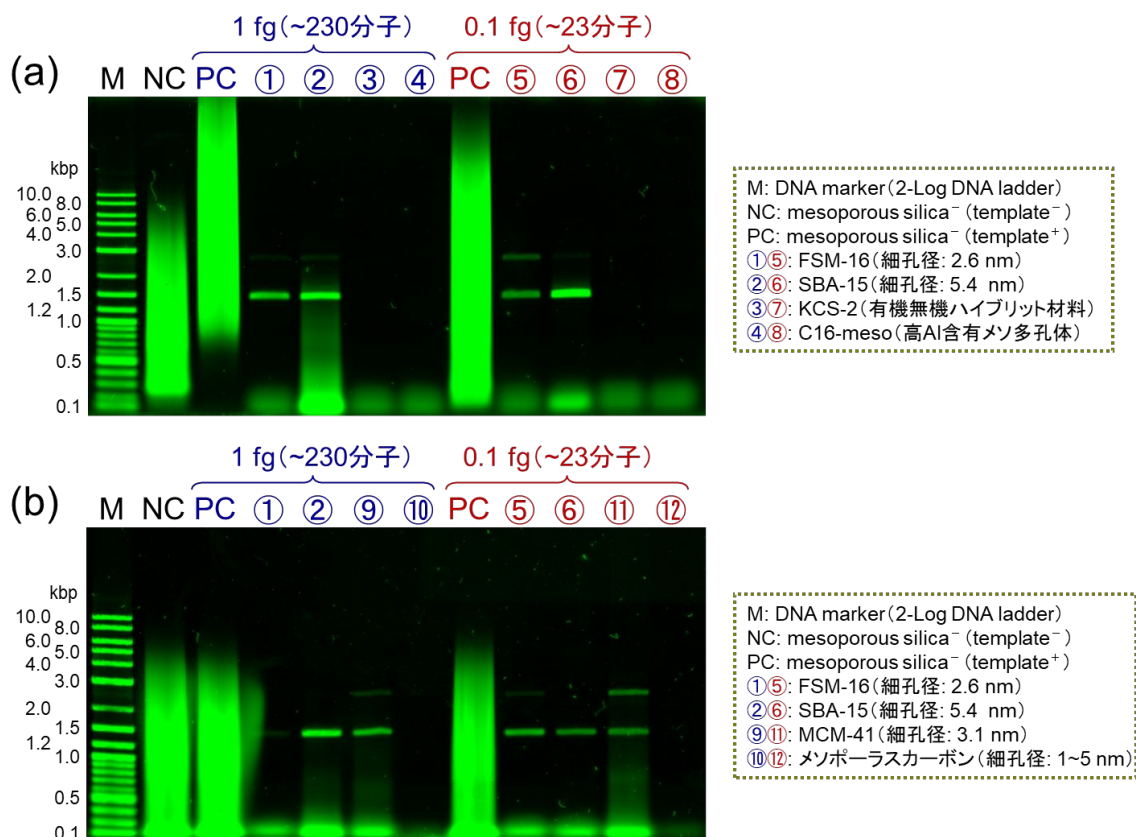


図2 各種メソ多孔体に固定化した DNA 増幅酵素による極微量 DNA の増幅 (PCR 法)

次に、DNA 増幅反応におけるナノ空間材料のハンドリング性の向上を図るために、メソポーラスシリカ粉末を含んだ多孔質成形体（中空糸状、ペレット状）の開発を行った。比較的親水性の高い有機高分子をバインダーとして適宜の形状に成形した結果、メソポーラスシリカ本来の細孔構造を維持した状態で成形体化することに成功した（図3）。

従来法において有機高分子をバインダーとして用いる方法や焼結（融着）により得られた成形体は、有機高分子や焼結温度の影響によってメソポーラスシリカの規則性細孔が潰され、本来の細孔サイズや表面積の維持が困難となることが最大の問題点であった。一方、本研究において作製した新規の成形体は、有機高分子をバインダーとしているにもかかわらず、メソポーラスシリカ本来の物性（細孔サイズ、細孔容積、表面積）をほぼ維持しているため、酵素の固定化担体として粉末状シリカと同様の効果を発揮することが期待できる。

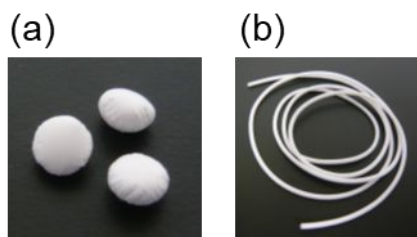


図3 メソポーラスシリカ粉末を含んだ多孔質成形体（a: ペレット状, b: 中空糸状）

続いて、5種類の粉末状のナノ空間材料（FSM型及びSBA型メソポーラスシリカ、メソポーラスカーボン、高Al含有メソ多孔体(C16-meso)、両親媒性有機-無機ハイブリッド多孔体(KCS-2)）に固定化した等温DNA増幅反応用の鎖置換型DNA増幅酵素（*Bst* DNAポリメラーゼ）を用いてDNA増幅（LAMP法）を試みた。基質DNAには、コイヘルペスウイルス（KHV）ゲノムDNAを適用した。その結果、メソポーラスカーボンでは反応阻害の傾向が示されたが、その他の材料では陽性反応が認められた。

そこで次に、メソポーラスシリカ粉末（FSM型、SBA型、MCM型、細孔径：2.6～4.5 nm）を含んだ3種類のペレット状成形体（図3a）およびMCM型メソポーラスシリカ粉末（細孔径：3.1 nm）を含んだ中空糸状成形体（図3b）を*Bst* DNAポリメラーゼを用いたDNA増幅（LAMP法）に適用した。その結果、メソポーラスシリカ粉末を含んでいない成形体では陰性コントロールと同等の反応が示されたが、メソポーラスシリカ粉末を含んだ成形体ではより高い反応活性が示された（図4）。

以上の結果より、LAMP法においてはバックグラウンドDNA増幅の影響が大きいものの、成形体におけるメソポーラスシリカ等の規則性細孔がDNA増幅酵素の安定な固定化場および高効率のDNA増幅反応場となり得る可能性が示唆された。

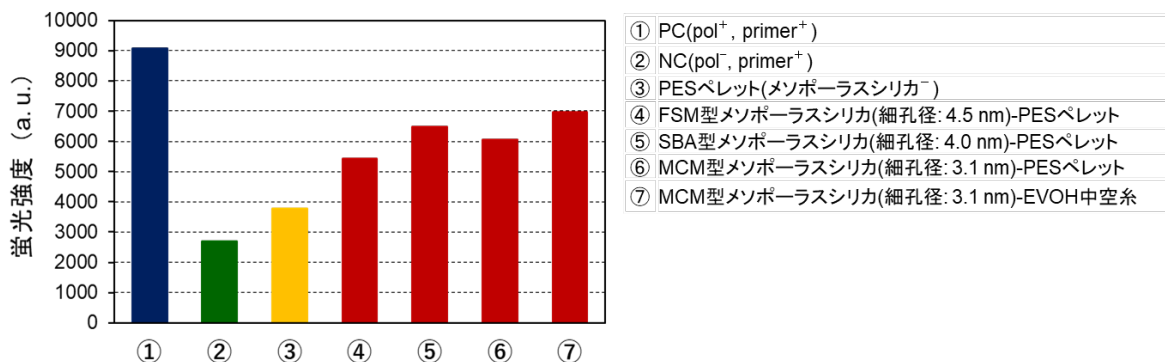


図4 各種多孔質成形体に固定化したDNA増幅酵素によるゲノムDNAの増幅（LAMP法）

本研究で示したメソポーラスシリカ等の多孔体および多孔質成形体を利用するDNA増幅法（極微量DNAを対象にしたPCR法、および、LAMP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、多孔質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増幅酵素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

### 〔雑誌論文〕(計 11 件)

Tetsuji Itoh, Shun-ichi Matsuura, Tracy T. Chuong, Osamu Tanaike, Satoshi Hamakawa, Tetsuhide Shimizu, Successful mesoporous silica encapsulation of optimally functional EcDOS, a heme-based O<sub>2</sub>-sensing phosphodiesterase, *Anal. Sci.*, 査読有, **35**, 329–335 (2019)

DOI: 10.2116/analsci.18P449

Ikeda Takuji, Nakaoka Takuma, Yamamoto Katsutoshi, Synthesis, crystal structure and physicochemical properties of organic-inorganic compounds KCS-3 and KCS-4, *Microporous Mesoporous Mat.*, 査読有, **284**, 16–24 (2019)

DOI: 10.1016/j.micromeso.2019.04.010

Katsutoshi Yamamoto, Takuji Ikeda, Yusuke Tsukamoto, Takuma Nakaoka, Novel crystalline organic-inorganic hybrid silicate material composed of the alternate stacking of semi-layered zeolite and microporous organic layers, *RSC Adv.*, 査読有, **9**, 2641–2644 (2019)

DOI: 10.1039/c8ra09908a

Shun-ichi Matsuura, Manami Chiba, Tatsuo Tsunoda, Aritomo Yamaguchi, Enzyme immobilization in mesoporous silica for enhancement of thermostability, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 査読有, **18**, 104–109 (2018)

DOI: 10.1166/jnn.2018.14580

Shunsuke Takahashi, Shinya Motooka, Shohei Kawasaki, Hirofumi Kurita, Takeshi Mizuno, Shunichi Matsuura, Fumio Hanaoka, Akira Mizuno, Masahiko Oshige, Shinji Katsura, Direct single-molecule observations of DNA unwinding by SV40 large tumor antigen under a negative DNA supercoil state, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 査読有, **36**, 32–44 (2018)

DOI: 10.1080/07391102.2016.1269689

Katsutoshi Yamamoto, Takuji Ikeda, Chiaki Ideta, Koji Watanabe, Takuma Nakaoka, Synthesis and crystal structure analysis of a novel microporous barium-containing silicate AES-20, *Microporous Mesoporous Mat.*, 査読有, **243**, 239–246 (2017)

DOI: 10.1016/j.micromeso.2017.02.034

Takuji Ikeda, Takahiro Yamada, Hisanori Yamane, Unusual helical disorder of Na atoms in the tunnel structure of thermoelectric compound Na<sub>2+x</sub>Ga<sub>2+x</sub>Sn<sub>4-x</sub> at high temperature, *J. Phys. Chem. C*, 査読有, **121**, 20141–20149 (2017)

DOI: 10.1021/acs.jpcc.7b05727

### 〔学会発表〕(計 27 件)

池田 拓史 他、Crystal structures of organic-inorganic hybrid compounds KCS-3 and KCS-5、International Symposium on Zeolites and Microporous Crystals (ZMPC) 2018 (2018)

山本 勝俊 他、有機シランの自己組織化による有機-無機ハイブリッド型多孔体合成、第 48 回石油・石油化学討論会 (2018)

松浦 俊一 他、両親媒性を有する有機-無機ハイブリッド多孔体の酵素反応への応用、第 69 回日本生物工学会大会 (2017)

松浦 俊一 他、規則性ナノ空孔材料を含んだ多孔質成形体の開発とバイオプロセス応用、第 69 回日本生物工学会大会 (2017)

馬場 知哉 他、南極湖沼における細菌ゲノムの構造特性、生命科学系学会合同年次大会 (ConBio)2017 (2017)

### 〔図書〕(計 2 件)

松浦 俊一、池田 丈、黒田 章夫、株式会社シーエムシー出版、細胞・生体分子の固定化と機能発現、2018、294 (83–91)

松浦 俊一、馬場 知哉、千葉 真奈美、角田 達朗、山口 有朋、公益社団法人日本生物工学会、第 68 回日本生物工学会大会トピックス集、2016、40 (9–10)

### 〔産業財産権〕

出願状況 (計 3 件)

名称：ミクロないしメソポーラス微粒子の多孔質成形体、酵素担持用担体、その酵素複合体及びこれらの製造方法

発明者：長瀬 多加子、松浦 俊一、角田 達朗、松浦 和佳子、佐藤 剛一、清住 嘉道

権利者：産業技術総合研究所

種類：特許

番号：特開 2018-090767

出願年：2017

国内外の別：国内

名称：異種酵素とメソポーラスシリカとの複合体  
発明者：松浦 俊一、角田 達朗、千葉 真奈美、山口 有朋  
権利者：産業技術総合研究所  
種類：特許  
番号：特開 2018-33452  
出願年：2017  
国内外の別：国内

名称：Si-tag 融合異種酵素とメソポーラスシリカとの複合体  
発明者：松浦 俊一、角田 達朗、千葉 真奈美、山口 有朋、黒田 章夫、池田 丈  
権利者：産業技術総合研究所、広島大学  
種類：特許  
番号：特開 2018-33451  
出願年：2017  
国内外の別：国内

#### 取得状況（計 1 件）

名称：DNA 合成酵素 シリカ系ナノ多孔材料複合体、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：産業技術総合研究所、情報・システム研究機構  
種類：特許  
番号：特許第 6152554 号  
取得年：2017  
国内外の別：国内

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：馬場 知哉  
ローマ字氏名：Baba, Tomoya  
所属研究機関名：国立遺伝学研究所  
部局名：先端ゲノミクス推進センター  
職名：特任准教授  
研究者番号（8 桁）：00338196

研究分担者氏名：池田 拓史  
ローマ字氏名：Ikeda, Takuji  
所属研究機関名：国立研究開発法人産業技術総合研究所  
部局名：材料・化学領域  
職名：主任研究員  
研究者番号（8 桁）：60371019

研究分担者氏名：山本 勝俊  
ローマ字氏名：Yamamoto, Katsutoshi  
所属研究機関名：公立大学法人北九州市立大学  
部局名：国際環境工学部  
職名：教授  
研究者番号（8 桁）：60343042

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、研究者個人に帰属されます。