

平成 21 年 5 月 19 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007 ～ 2008
 課題番号：19770124
 研究課題名 (和文) DNA 結合タンパク質の単一分子計測に向けた伸長固定化 DNA チップの作製

研究課題名 (英文) Fabrication of stretching DNA chip for a single molecule analysis of DNA binding proteins

研究代表者
 松尾 保孝 (MATSUO YASUTAKA)
 北海道大学 電子科学研究所 助教
 研究者番号：90374652

研究成果の概要：

微細な凹凸構造をもつ基板の上に DNA を伸長固定化することで DNA 結合タンパク質が自由な環境下で DNA と相互作用が可能となる DNA チップの作製を試みた。研究成果としては光リソグラフィー技術を用いたシリコン基板上への微小な凹凸構造作製、また高分子フィルム上への凹凸構造を作製することにより、様々な基板への DNA の伸長固定化条件の抽出を行った。これにより DNA と DNA 結合タンパク質の相互作用解析用基板の作製を可能にした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	2,600,000	270,000	2,870,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：1 分子計測・操作、ナノバイオ、生物物理、核酸

1. 研究開始当初の背景

DNA 結合タンパク質は遺伝子の発現調整やクロマチン高次構造形成などに関与しており、細胞機能を研究する上で非常に重要な分子である。DNA に結合するタンパク質としては DNA を複製、修復するポリメラーゼ (酵素) や遺伝子調整タンパク質などが挙げられ、DNA との結合形態については結晶構造解析などから詳細が明らかにされている。一方、DNA との相互作用ダイナミクスについては蛍光顕微鏡による 1 分子計測技術を用いることで制限酵素が DNA 上をスライディングする運動やポリメラーゼ伸長反応における DNA の回転挙動などが観察されている。しかし、タンパク質や DNA を基板上やゲル中に固定化する方法であるためにタンパク質や DNA の運動が阻害される問題点がある。光ピンセットを用いる方法も存在するが実験を進めるには技術を必要とする。そこで容易に DNA とタンパク質が自由に運動する環境で 1 分子レベルの DNA-タンパク質相互作用を観察できる分析チップを作製する

用いることで制限酵素が DNA 上をスライディングする運動やポリメラーゼ伸長反応における DNA の回転挙動などが観察されている。しかし、タンパク質や DNA を基板上やゲル中に固定化する方法であるためにタンパク質や DNA の運動が阻害される問題点がある。光ピンセットを用いる方法も存在するが実験を進めるには技術を必要とする。そこで容易に DNA とタンパク質が自由に運動する環境で 1 分子レベルの DNA-タンパク質相互作用を観察できる分析チップを作製する

ことにより研究効率の向上が期待される。

2. 研究の目的

これまでタンパク質と DNA をあらかじめ溶液中で相互作用させた複合体を蛍光観察が容易である平坦なガラス基板へ固定化し、タンパク質が結合する塩基配列解読といった静的な分析を可能にしてきた。しかし、DNA と DNA 結合タンパク質が自由な環境下で相互作用するダイナミクスの観察は不可能であった。これを解決する方法として微細な凹凸を持つ基板を利用することにより DNA を中空に浮かせた状態で伸長固定化を可能にし、DNA と DNA 結合タンパク質が容易に相互作用する環境を持つ分析チップを作製し、DNA 結合タンパク質の結合ダイナミクスが一分子レベルでの観察を可能にする。

3. 研究の方法

(1) 微細凹凸構造を持つシリコン基板の作製

申請者が所属する電子科学研究所所有の電子線描画装置とドライエッチング装置を用いることでシリコン基板表面に高さ 100nm~1 μ m、幅 100nm~1 μ m、間隔 1 μ m~10 μ m で凹凸構造を作製する。

(2) <Langmuir-Blodgett(LB)法による凹凸基板上への DNA 伸長固定化>

緩衝溶液中に LambdaDNA (塩基対 48.5kbp、長さ 16.5 μ m) を溶解する。この溶液をテフロン製の水槽に注いだ後、水面上にクロロホルムに溶解したカチオン性化合物を展開し単分子膜を作製する。その結果、溶

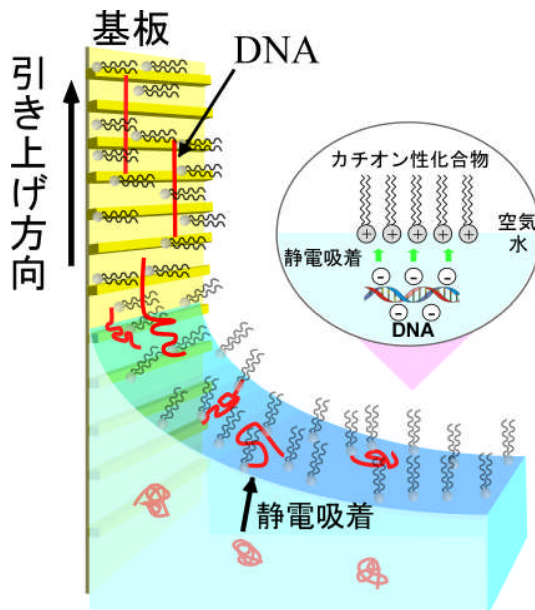


図1 LB法によるDNAの伸長固定化

液中の DNA が気液界面においてカチオン性単分子膜に静電吸着しポリイオン複合膜を形成する。ポリイオン複合膜を一定表面圧にまで圧縮し、あらかじめ溶液中に浸漬しておいた凹凸基板をリフト装置で引き上げることでポリイオン複合膜を基板上に移し取る。(図1)

引き上げ速度、気液界面の表面圧をパラメータとして DNA の伸長固定化条件について調べる。

(3) <伸長固定化 DNA と DNA 結合タンパク質の相互作用解析>

移し取ったポリイオン複合膜は DNA を蛍光色素で染色し、蛍光顕微鏡にて DNA の伸長固定化状態を観察する。

伸長固定化した DNA がタンパク質と相互作用が可能であるかを確認するために制限酵素が溶解した溶液を滴下し、蛍光顕微鏡を用いて DNA の切断状況を観察する。(図2)

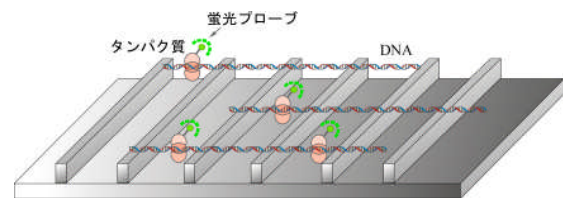


図2 伸長固定化 DNA チップによる分析

4. 研究成果

2007 年度の研究成果としては光リソグラフィを用いたシリコン基板上への凹凸構造作製を行った。ガラス基板上に蒸着されたクロムマスクを外注した。パターンとしては 1~10 μ m のラインアンドスペース、クロスラインを選択した。マスクアライナーを用いてレジスト剤を塗布したシリコン基板上にパターンを転写した。現像、ドライエッチング処理後にシリコン基板上に目的の凹凸構造を得ることに成功した。(写真1 シリコン

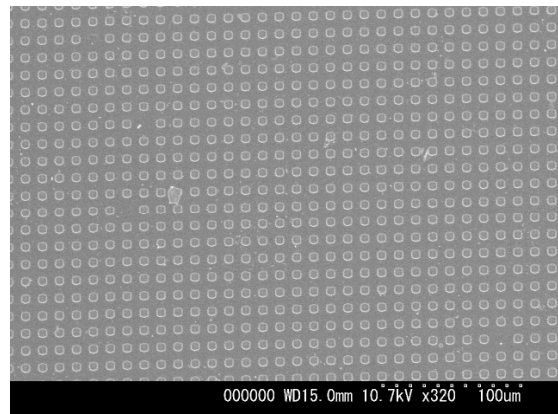


写真1 パターン化シリコン基板

基板上に作製された直径 5 μm のドット構造)ラインアンドスペースの構造にも成功した。これらの基板上に DNA の伸長固定化を試みた。平坦なシリコン基板上においては伸長固定化が可能であったが、パターン上においては DNA の固定化が観察されなかった。これはパターン化構造とエッチング操作により表面の親疎水性が大きく変化したためであることがわかった。また、DNA サイズと構造サイズがほぼ同じなために固定化が困難であったと考えられる。

そこで 2007 年度に得られた知見を元に 2008 年度の研究を進めた。2008 年度の研究成果としては光リソグラフィ技術を用いたシリコン基板上への微小な凹凸構造作製の改善を図った。フォトマスク利用から EB 露光装置の利用に変更し、より微細な構造体作製を行った。この時、エッチング過程で保護ガスの影響により基板表面が撥水状態になることがわかったため、基板表面の洗浄時間をコントロールすることにより親水状態の制御を行った。この基板を用いて Langmuir-Blodgett (LB) 法により DNA の伸長固定化を試みた。凹凸構造上では構造由来の張力が働き、平坦なシリコン基板上で DNA が伸長固定化される条件とは大きく異なった。そのため洗浄状態の制御で DNA が伸長固定化される最適な条件の抽出を行った。また、光リソグラフィは時間と複雑な工程を要することから数多くの伸長固定化基板を作製することが難しいため、一度作製したシリコン凹凸基板を高分子フィルムに転写してマスクとし、そのマスクを用いてシリコンをエッチングして凹凸構造を作製した。この基板を用いて LB 法による DNA の伸長固定化を行ったところ、凹凸構造上に伸長固定化した DNA が観察された。この DNA 伸長固定化基板を用いることによりタンパク質との相互作用を蛍光顕微鏡でリアルタイムに観察可能とし、容易で多数の DNA-タンパク質結合ダイナミクスの解析を可能とした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

① O. Haruta, Y. Matsuo, K. Ijio, Photo-induced fluorescence emission enhancement of azobenzene thin films, *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects*, 313, p595-p599 (2008) 査読有り

② O. Haruta, Y. Matsuo, Y. Hashimoto, K.

Niikura, K. Ijio, Sequence-Specific Control of Azobenzene Assemblies by Molecular Recognition of DNA, *Langmuir*, 24, p2618-2624 (2008) 査読有り

③ A. Tanaka, Y. Matsuo, K. Niikura, K. Ijio, Stabilization of DNA multiassembly by addition of a phosphate group at the 5'-sticky end, *Chemistry Letters*, 37, p758-p759 (2008) 査読有り

④ A. Tanaka, Y. Matsuo, Y. Hashimoto and K. Ijio, Sequence-specific platinum metal deposition on enzymatically synthesized DNA block copolymer, *Chem. Commun.* 36, p4270-p4272 (2008) 査読有り

⑤ 松尾保孝、居城邦治、高分子科学の最近の進歩「高分子と金属の複合化と高機能創製」、高分子 10 月号、p845-p849 (2007) 査読無し

[学会発表] (計 11 件)

① 居城邦治、田中あや、石川綾子、新倉謙一、松尾保孝、DNA を鋳型とした金属ナノ構造体の形成制御、第 57 回高分子討論会、平成 20 年 9 月 25 日、大阪市立大学

② 松尾保孝、田中あや、居城邦治、DNA の塩基配列選択的なプラチナナノワイヤーの作製、第 3 回バイオ関連化学合同シンポジウム、平成 20 年 9 月 20 日、東京工業大学

③ 石川綾子、松尾保孝、居城邦治、Synthesis of silver metallic nanoparticles complexed with DNA by photoreduction, Internatinal conference on photoexcited process and applications、平成 20 年 9 月 10 日、Sapporo

④ 佐藤壮人、石川綾子、松尾保孝、居城邦治、Silver/oligonucleotides hybrid nanoparticles prepared by photoreduction, 2007 Korea-Japan Symposium on Frontier Photoscience、平成 19 年 11 月 22 日、Gyeongju, Korea

⑤ 松尾保孝、石川綾子、佐藤壮人、居城邦治、DNA を用いた発光性銀ナノ粒子の作製とバイオイメージングへの応用、生体機能関連化学部会、平成 19 年 9 月 29 日、東北大学多元物質科学研究所

⑥ 佐藤壮人、石川綾子、松尾保孝、居城邦治、DNA でコートした銀ナノ粒子の作製と光励

起発光現象、第 59 回コロイドおよび界面化学討論会、平成 19 年 9 月 22 日、信州大学

⑦佐藤壮人、石川綾子、松尾保孝、居城邦治、オリゴヌクレオチド/銀ハイブリッドナノ粒子の発光特性解析、第 56 回高分子討論会、平成 19 年 9 月 20 日、名古屋工業大学

⑧居城邦治、佐藤壮人、新倉謙一、松尾保孝、DNA-metal hybrid nanomaterials, SPIE Optics+photonics 2007, 平成 19 年 8 月 27 日、San Diego Convention Center, San Diego, California USA

⑨ 松尾保孝、佐藤壮人、居城邦治、Photoluminescence of silver nanoparticles complexed with DNA、The 13th International Conference on Photochemistry、平成 19 年 7 月 29 日、Cologne, Germany

⑩佐藤壮人、松尾保孝、居城邦治、DNA と複合化した銀ナノ粒子の発光挙動、第 56 回高分子年次大会 平成 19 年 5 月 30 日、国立京都国際会館

⑪松尾保孝、DNA を用いた金属ナノ材料の作製、第 2 回 東北大学多元物質研究所若手講演会 (仙台) 平成 19 年 5 月 15 日、東北大学多元物質研究所

〔図書〕 (計 1 件)

①居城邦治、新倉謙一、松尾保孝、シーエムシー出版、金属・マイクロ粒子の形状・構造制御技術、第 7 章、p188-p198 (2009)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松尾 保孝 (MATSUO YASUTAKA)
北海道大学・電子科学研究所・助教
研究者番号：90374652

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし