

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14511

研究課題名（和文）DNA 1 分子で数nm精度のDNA編集用タンパク質結合位置特定法

研究課題名（英文）Method for identifying positions of proteins bound to a single DNA molecule

研究代表者

東 直輝（Naoki, Azuma）

名古屋大学・工学研究科・助教

研究者番号：50823283

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、DNA一分子に結合したタンパク質を直接観察することで、多数分子を必要とせずにその位置を特定可能な、DNA一分子のタンパク質の結合位置特定法を実現することを目的として研究を遂行した。具体的には、微小流路内の泳動操作を用いたDNA一分子の伸長・固定と、光学的超解像法の一つである蛍光分子局在化法を用いた10 nm精度のタンパク質の結合位置特定のための二つの要素技術を開発した。DNA分子を用いた実験的検証によって、二つの要素技術の原理検証に成功し、提案するDNA一分子のタンパク質結合位置特定法の実現性を実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、これまでに実現されていなかったDNA一分子の伸長・固定および光学的手法による10 nm精度の結合位置特定を実現できる独創的な手法であり、挑戦的である。従来のゲル法のように、検出に多数の分子を必要とせず、高速かつ高感度にタンパク質の結合位置特定を実現でき、DNA編集法であるCRISPR/Cas9の評価手法として貢献できる可能性があるため、社会的意義が大きい。さらに、DNA一分子で10 nm精度の分析を可能とするため、これまでの分析法に代わるDNA一分子分析法として長さ分析や塩基配列特定に展開でき、生命科学や創薬科学への波及効果も期待できる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this research was to realize a method for identifying the positions of proteins bound to a single DNA molecule by directly observing method. We have developed two elemental technologies. One is the stretching and immobilizing a single DNA molecule using a pressure flow in a microchannel. The other is identifying the positions of proteins bound to a single DNA molecule with 10 nm accuracy using the super-localization method, which is one of the super-resolution techniques. The feasibility of the proposed method for identifying positions of proteins bound to a single DNA molecule was demonstrated through experimental validation of stretching and immobilizing method and super-localization method.

研究分野：ナノマイクロシステム、ナノ計測、バイオ計測

キーワード：DNA一分子 タンパク質結合位置特定 微小流路 蛍光分子局在化法 圧力泳動

### 1. 研究開始当初の背景

がんやダウン症などの遺伝性疾患は、ゲノム DNA の塩基配列が突然変異によって変化することで生じる。そのため、遺伝性疾患の治療の実現に向けて、DNA の塩基配列を直接的に編集する DNA 編集法が開発されてきた。特に、Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat-Cas9(CRISPR-Cas9)システムは簡便かつ高効率な DNA 編集法として開発され、ノーベル化学賞を受賞するなど期待が高まっている。CRISPR-Cas9 システムでは、人工的に塩基配列を設計した RNA 分子に基づいて、編集用タンパク質である Cas9 タンパク質を DNA の標的の塩基配列に結合させることで編集する。しかし、この方法では簡便であるがゆえに、Cas9 タンパク質が標的以外の塩基配列に結合し編集してしまう問題(オフターゲット作用)が遺伝性疾患の治療への実用化の最大の障壁になっていた[1]。

DNA 編集法の高精度化のためには、編集用タンパク質が DNA 分子の標的の塩基配列に結合しているか、もしくは、標的以外の塩基配列に結合している場合はどの塩基配列に結合しているかを特定する必要がある。これには DNA に結合したタンパク質の位置を精密に特定する方法が必要である。これまでは、ゲル電気泳動法を用いた方法が利用されてきた[2]。タンパク質を結合した DNA 分子と結合していない DNA 分子を制限酵素によってそれぞれ断片化する。タンパク質が結合した配列位置は断片化されないため、断片化してできた DNA 分子の長さ分布をゲル電気泳動法によって分析することでタンパク質の結合位置を特定できる。結合位置の特定精度は長さ分析精度で決定され、ゲル電気泳動法を用いれば数塩基精度すなわち数 nm 精度を達成できる。しかし、この方法では検出感度が低く、検出するために多数の DNA 断片が必要であるため、数%以下の低い確率で生じるタンパク質の結合を検出できないといった課題があった。

申請者は、DNA 一分子に結合したタンパク質を直接観察する DNA 一分子のタンパク質結合位置特定法を実現できれば、多数分子を必要とせず高い検出感度でタンパク質の結合位置を特定できると着想した。それには第一に、DNA 一分子はランダムコイル形状がエントロピー的に安定なため、DNA 一分子の伸長・固定が必要である。先行研究では、DNA 分子を含んだ液滴が基板面を移動する際の表面張力を用いて伸長と固定を実現した[3]。しかし、この方法では、表面張力の精密な制御が難しく、DNA 一分子の伸長度を制御するのは難しい。また第二に、編集用タンパク質は DNA 分子の数十塩基対(一塩基対の長さは 0.34 nm)の配列に結合するため、結合位置を 10 nm 精度で特定する必要がある。原子間力顕微鏡のような走査型手法は侵襲的で低速であるため、非破壊で高速測定可能な光学的手法が望まれるが、通常の光学顕微鏡では回折限界によって数百 nm の分析精度が原理限界である。本研究では、高速かつ高精度な結合位置特定をねらいとして、DNA 一分子の伸長・固定および光学的手法による 10 nm 精度の結合位置特定をいかに実現するか、を学術的な「問い」として研究を実施した。

### 2. 研究の目的

本研究は、DNA 一分子でタンパク質の結合位置特定を実現する新規手法の提案を目的とし、微小流路内の泳動操作を用いた DNA 一分子の伸長・固定と、光学的超解像法の一つである蛍光分子局在化法を用いた 10 nm 精度のタンパク質の結合位置特定の実現をねらいとした。本研究は、従来研究で達成されていなかった DNA 一分子の伸長・固定および光学的手法による 10 nm 精度の結合位置特定を実現できる独創的な手法であり、挑戦的である。従来のゲル法のように、検出に多数の分子を必要とせず、高速かつ高感度にタンパク質の結合位置特定を実現でき、DNA 編集法である CRISPR/Cas9 の実用化に貢献できるため、社会的意義が大きい。さらに、DNA 一分子で 10 nm 精度の分析を可能とするため、これまでの分析法に代わる DNA 一分子分析法として長さ分析や塩基配列特定に展開でき、生命科学や創薬科学への波及効果も期待できる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 微小流路を用いた DNA 一分子伸長・固定

微細加工技術によって深さ数  $\mu\text{m}$ 、幅数百  $\mu\text{m}$  の直線状の堀を形成し、表面処理したガラス基板を接合することで、微小流路を形成した。まず、微小流路の片側から DNA 試料を導入して圧力を印加することで、DNA 分子を微小流路内で泳動させた(Fig. 1(a))。DNA 一分子の末端は疎水性であるため、DNA 一分子は微小流路内を泳動しながら、その末端がガラス表面に結合された(Fig. 1(b))。圧力流れによって生じる表面近傍のせん断力によって DNA 一分子が伸長され、表面に固定化された(Fig. 1(c))。圧力流れによって生じるせん断力は、微小流路の高さ  $h$  と流速  $v$  を用いて  $v/h$  に比例する。そこで本研究では、微小流路の高さ  $h$  を微細加工技術における設計によって、流速  $v$  を印加する圧力値によって制御することで、DNA 一分子の伸長を制御した。

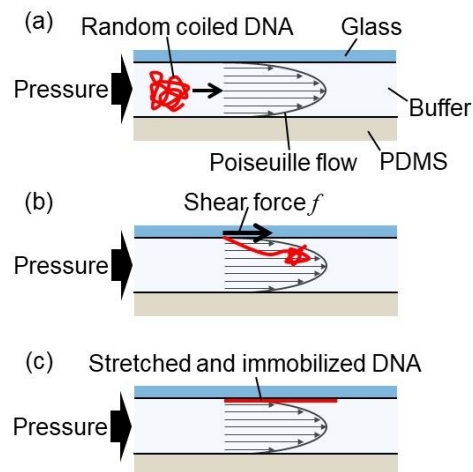


Fig. 1 Stretching and immobilizing a single DNA molecule in a microchannel

## (2) 蛍光分子局在化法を用いたタンパク質の結合位置特定

Figure 2 に蛍光分子局在化法を用いた結合位置特定法を示す。タンパク質に結合させた蛍光分子を蛍光顕微鏡によって観察する場合、回折限界によって輝度分布の幅が数百 nm となる。そこで、輝度分布にガウス分布をフィッティングすることで蛍光分子の位置を特定した。この方法によって、蛍光分子の中心位置を回折限界を越えた精度で特定できる。この方法による中心位置特定精度  $\sigma$  は、 $s$  を輝度分布の幅の標準偏差、 $N$  を輝度値、 $b$  をノイズとすると、 $\sigma = 2s/(N/b)$  で表される。したがって、輝度値の SN 比(式中の  $N/b$ )を増加するほど、中心位置特定精度  $\sigma$  を向上でき、本研究でねらいとする 10 nm 精度を達成できる。

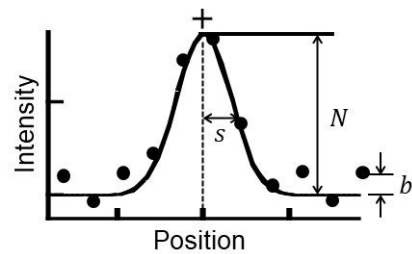


Fig. 2 Super-localization of a single fluorescence molecule

## 4. 研究成果

### (1) 微小流路を用いた DNA 一分子伸長・固定

Figure 3(a)は、微細加工技術によって作製したデバイスを示す。深さ 3  $\mu\text{m}$ 、幅 100  $\mu\text{m}$  の直線状の流路の形成を実現した。伸長・固定法の検証のため、 $48 \times 10^3$  塩基対の DNA 分子を用いた。DNA 分子に蛍光分子である YOYO-1 を結合させ、リザーバの片側から圧力印加によって微小流路内に導入した。Figure 3(b)は、圧力印加後の微小流路内を蛍光顕微鏡によって撮像した蛍光像である。この図に示すように、微小流路内の圧力泳動によって DNA 一分子を伸長・固定することに成功した。Fig. 3(b)に示すように、多くの DNA 分子の伸長・固定化に成功している一方で、DNA 分子の伸長度に大きなばらつきが生じた。この大きなばらつきには 2 つの原因があると考えられる。一つ目は、DNA 一分子内のどの疎水性部位が先に表面に固定されたかによるものである。微小流路内を泳動する DNA 一分子を直線状に引き伸ばすためには、分子の末端が先に表面に固定されることが重要である。しかし、DNA 分子のどの疎水性部位が最初に表面に固定されるかは確率的であったと考えられる。分子の末端以外の疎水性部位が先に固定されると、DNA 分子を直線状に伸長化することができないため、伸長度に大きなばらつきが生じたと考えられる。このばらつきを抑制するためには、ピオチンとアビジンの組み合わせなど、DNA 一分子の末端のみを特異的に固定化できる表面処理を行う必要がある。二つ目は、圧力流れによるせん断力によって DNA 一分子が切断された可能性がある。しかし、DNA 一分子を切断するのに必要な力は 10 nN レベルであることが知られており、圧力流れによるせん断力は計算上数 pN レベルであるため、切断される力よりも十分に小さい。したがって、多くの DNA 分子は、伸長の過程で切断されなかったと考えられる。また、試料調製時のピペット操作によって生じるせん断力によって DNA 分子が切断された可能性もあるが、伸長度のばらつきによる明確な結論は得られなかった。

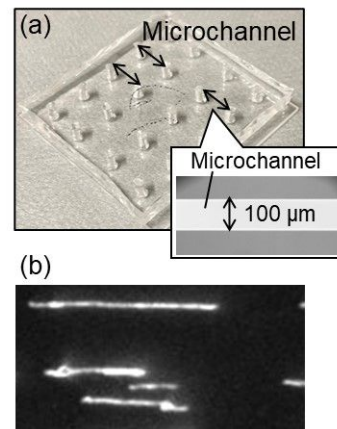


Fig. 3 (a) Fabricated microchannel  
(b) Fluorescent image of DNAs

### (2) 蛍光分子局在化法を用いた結合位置特定

DNA 分子にタンパク質を結合させた後、異なる蛍光分子で蛍光染色し、(1)で示した方法を用いて微小流路内で伸長・固定した。タンパク質は検証用として RNA ポリメラーゼを用いた。Figure 4(a)に伸長・固定された DNA 一分子の蛍光像を示す。通常のタンパク質の蛍光像では回折限界によって数百 nm の幅があったため、正確な位置特定は困難であった。そこで、タンパク質に結合した蛍光分子に対して、蛍光分子局在化法によってその中心位置を特定した結果、40 nm 精度の位置特定に成功した。

本手法では中心位置特定精度は輝度値の SN 比を増加するほど向上できるため、それぞれのタンパク質の蛍光像を重ね合わせることで、輝度値を増加させた。Figure 4(b)に複数枚の蛍光像を重ねた際のタンパク質の輝度分布を示す。枚数を増加するにつれて輝度値の SN 比が増加して中心位置特定精度も向上し、10 nm 精度の位置特定を実現した。

最後に検証として、二つのタンパク質の位置を特定して距離を算出した結果、1340 nm であった。DNA 分子の塩基配列に基づいたタンパク質の結合位置から算出される理論的な距離は 1370 nm であるため、実験結果は概ね一致した。30 nm 程度の差は、中心位置特定精度によるものと、DNA 一分子を伸長・固定する際にタンパク質の物理的な大きさや表面への吸

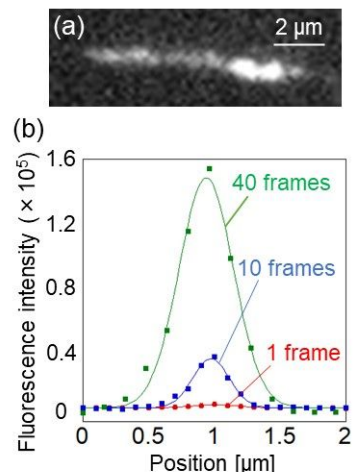


Fig. 4 Fluorescent images of (a) protein-bound DNA and (b) results of super-localization

着によって DNA 一分子の完全な伸長が妨げられたことが原因であると考えられる。

以上のように、本研究では、微小流路内の圧力泳動を用いた DNA 一分子の伸長・固定と、光学的超解像法の一つである蛍光分子局在化法を用いた 10 nm 精度のタンパク質の結合位置特定の二つの要素技術の原理検証に成功した。本研究で提案する DNA 一分子でタンパク質の結合位置特定法を確立できれば、DNA 編集法である CRISPR/Cas9 の評価手法として貢献できるだけでなく、これまでの分析法に代わる DNA 一分子分析法として長さ分析や塩基配列特定に展開でき、生命科学や創薬科学への波及効果も期待できる。

< 引用文献 >

- [1] Y. Fu et al., Nat. Biotechnol. 31, 822(2013)
- [2] D. J. Galas et al., Nucleic Acids Res. 5, 3157(1978)
- [3] A. Mikheikin et al., Nat. Commun. 8, 1665(2017)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Azuma Naoki, Fukuzawa Kenji, Itoh Shintaro	4. 巻 119
2. 論文標題 Super-localization of individual fluorophores along a DNA strand in a microchannel	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Applied Physics Letters	6. 最初と最後の頁 023701 ~ 023701
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1063/5.0046939	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Naoki Azuma, Shintaro Itoh, Kenji Fukuzawa, Hedong Zhang
2. 発表標題 Stretching and fixing DNA molecules on air-plasma-treated surface by using an air/water interface in a microchannel
3. 学会等名 The 64th International Conference On Electron, Ion and Photon Beam Technology and Nanofabrication (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryotaro Suzuki, Naoki Azuma, Kenji Fukuzawa, Shintaro Itoh, Hedong Zhang
2. 発表標題 Stretching DNA molecule using pressure flow in a microchannel and its super-resolution imaging
3. 学会等名 2022 JSME-IIP/ASME-ISPS Joint Conference on Micromechatronics for Information and Precision Equipment (MIPE2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hidetaka Ozeki, Katsuki Miki, Naoki Azuma, Kenji Fukuzawa, Shintaro Itoh, Hedong Zhang
2. 発表標題 Fluorescent image tracking of nanoparticle for obtaining fluid flow velocity profile in nanometer-sized gap
3. 学会等名 2022 JSME-IIP/ASME-ISPS Joint Conference on Micromechatronics for Information and Precision Equipment (MIPE2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木 瞭太郎, 東 直輝, 福澤 健二, 伊藤 伸太郎, 張 賀東
2. 発表標題 DNA一分子分析のための微小流路内の伸長・固定と超解像イメージング
3. 学会等名 日本機械学会2022年度年次大会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木 瞭太郎, 東 直輝, 福澤 健二, 伊藤 伸太郎, 張 賀東
2. 発表標題 一分子伸長固定と超解像光学観察による DNA 一分子上の結合タンパク質の位置特定法
3. 学会等名 IIP2023 情報・知能・精密機器部門（IIP部門）講演会（国際学会）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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
研究協力者	福澤 健二  (Fukuzawa Kenji)		
研究協力者	伊藤 伸太郎  (Itoh Shintaro)		
研究協力者	張 賀東  (Zhang Hedong)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	鈴木 瞭太郎  (Suzuki Ryotaro)		

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