

## 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 4 月 30 日現在

機関番号 : 34416

研究種目 : 若手研究 (B)

研究期間 : 2010~2011

課題番号 : 22750144

研究課題名 (和文)

DNA ナノ構造体を活用したタンパク分子のナノアレイ化と酵素反応の単分子解析

研究課題名 (英文)

Nanoarraying of Proteins on DNA Nanostructures and Single-Molecule Observation of Enzymes

研究代表者

葛谷 明紀 (KUZUYA AKINORI)

関西大学・化学生命工学部・准教授

研究者番号 : 00456154

研究成果の概要 (和文) : 世界に先駆けてペンチのような形状をしたナノメートルサイズの動く道具「DNA 折り紙ペンチ」を作成した。これら「DNA 折り紙ペンチ」は、普段は×のような開いた形状をしているが、タンパクを始めとする標的分子を見つけると、これを 1 分子だけ摘んで閉じ、= のような構造へと自発的に変化する。この構造変化を原子間力顕微鏡で観察することで、分子数の増幅を一切行わなくても、標的分子の存在を正確に検出することに成功した。

研究成果の概要 (英文) : We have developed versatile sensing systems for a variety of chemical and biological targets at molecular resolution. We have designed functional nanomechanical DNA origami devices that can be used as "single-molecule beacons", which consist of two levers approximately 170 nm long connected at a fulcrum. Various single-molecule inorganic/organic targets ranging from metal ions to proteins can be visually detected on AFM by a shape transition of the origami devices.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野 : 化学

科研費の分科・細目 : 複合化学・生体関連化学

キーワード : DNA、DNA ナノ構造体、単分子解析

## 1. 研究開始当初の背景

今日までの医学、生物学研究の発展により、転写因子や短鎖 RNA など、細胞の中で生命活動の調節を担っている様々な生体分子の働きが明らかとなってきた。今後はこれらの調節機構が如何に作用しているか、特に個々の細胞に関して調べていくことが重要とな

ると予想される。しかしながら PCR で増幅することができる核酸を調べる場合を除き、検出感度の制限から、これまでの研究の対象はどうしても多数の細胞からなる集団とせざるを得なかった。同じような問題は医療の分野でもある。診断に際し、患者への負担をできるだけ減らすためには、検査に使用する

検体の量は少なければ少ない程よい。このように、単分子レベルでの生体分子検出技術の開発が急務となっていた。幸い MEMS の発達とマイクロ流体デバイス研究の飛躍的な進展により、上述のような極微量の検体を採取し、処理する基礎技術は今日までに十分整っていると見える。しかしながら、処理した極微量サンプル中に単分子レベルの検出対象を検知するディテクターとなり得るデバイスに関しては、未だ決定的なものは開発されていなかった。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、AFM によるイメージングを利用して単分子レベルのタンパクを始めとする生体分子の存在や、酵素反応を単分子レベルで解析できる、新しい解析系を構築することを目的とした。研究代表者が以前開発したナノメートルサイズのウェルを組み込んだ DNA ナノ構造体を利用して、酵素分子を単分子ずつナノメートル間隔で配列化したナノアレイの作成をめざした。このアレイ上における酵素の反応産物の析出などを利用して、AFM により酵素反応を可視化する。単分子の酵素反応のみならず、酵素分子間のカスケード反応も、その間隔、配置をナノメートルレベルで一次元、二次元に正確に制御しながら解析できる系の構築をめざした。

グルコースセンサーなどでグルコースオキシダーゼが用いられるように、酵素反応は生体分子のディテクターとしての親和性が非常に高い。特に単分子レベルの超高感度を行うために、酵素分子が単分子ずつナノメートル間隔で並べられた、単分子ナノアレイを応用し、その活性をイメージングすることも検討の視野に入れた。

## 3. 研究の方法

酵素を固定化するための足場となる DNA ナノ構造体として、DNA オリガミ技術を活用した。これは、約 7000 塩基の長鎖の 1 本鎖ウイルス DNA を補助的な 200 本以上の短い DNA で橋かけしながら、望みの形状に折り畳んでナノ構造体を自在に作成する技術である。研究代表者がこれまでに作成したナノメートルサイズのウェルを一行に組み込んだ DNA オリガミ構造体(DNA Nanostick)を足場として利用し、酵素や金ナノ粒子を単分子ずつウェルに取り込んでアレイ化する方法を検討した。酵素に関しては既に取り込みに成功しているストレプトアビジンを活用し、免疫測定などで一般的に利用されてい

るストレプトアビジン/horse radish peroxidase (HRP) コンジュゲートやストレプトアビジン/alkaline phosphatase (AP) コンジュゲートを使用して酵素を固定化することを検討した。さらにカスケード反応解析に向けて、複数種の酵素の固定化法も検討した。具体的には、段階的にビオチン化 DNA を DNA オリガミに結合する方法や、あるいは研究代表者がすでに確立している DNA オリガミから特定の短鎖橋かけ DNA を抜き取る技術を活用し、異なるウェルに単分子ずつ酵素を結合していくことを検討した。さらには AP と同時に金ナノ粒子をアレイ化し、一つの AP から生じた還元剤による金表面への銀の無電解メッキを行った。酵素自体は単分子しか含まないカスケード反応のモデル系として、アレイ内に導入した金属ナノ粒子のサイズ変化を観察し、酵素反応活性を解析した。

## 4. 研究成果

まず異種の酵素を固定化する基盤として、9つの DNA ウェルを一直線に組み込んだ DNA Nanostick に加え、DNA ウェルを 3x3 に配置した新しいナノ構造体 (DNA Waffle) を設計し、その形成を AFM で確認した。この構造体には、加える DNA の種類を適宜洗濯することで、DNA ウェルの大きさをヘリックス 4 ターン分 (14 nm) から 2 ターン分 (7 nm) までおのおの調節できるという特長を新たに付与した。これにより、大きさの違うタンパクを効果的に固定化することが可能となった。大きさを種々変えた DNA ウェルを単分子の DNA Waffle 内に同時に組み込み、タンパク固定化の収率と選択性を検討した結果、直径 5 nm のストレプトアビジンの固定化には、7 nm の DNA ウェルが最も適していることが判明した。これよりも大きい DNA ウェルの場合、二分子以上のストレプトアビジンがしばしば取り込まれた。一方で、ターゲットのタンパクを IgG とした場合、DNA ウェルの大きさは IgG の取り込み効率に直接的に影響し、二分子以上のタンパクが取り込まれた DNA ウェルは、いずれの大きさでもほとんど観察されないことが明らかとなった。以上の成果により、ストレプトアビジン—ビオチン相互作用に加え、抗原—抗体反応も DNA オリガミへのターゲット分子の固定化に利用することが可能となり、異種の酵素を単分子の DNA オリガミ上に固定化する基礎的手法を確立した。

さらに当初の計画通り、DNA Nanostick に酵素単分子と金ナノ粒子 4 粒子を決まっ

た配列に並べ、酵素から生成した産物を還元剤として用い、金ナノ粒子上で無電解メッキができることを、実際に AFM で可視化して確認することに成功した (図 1)。

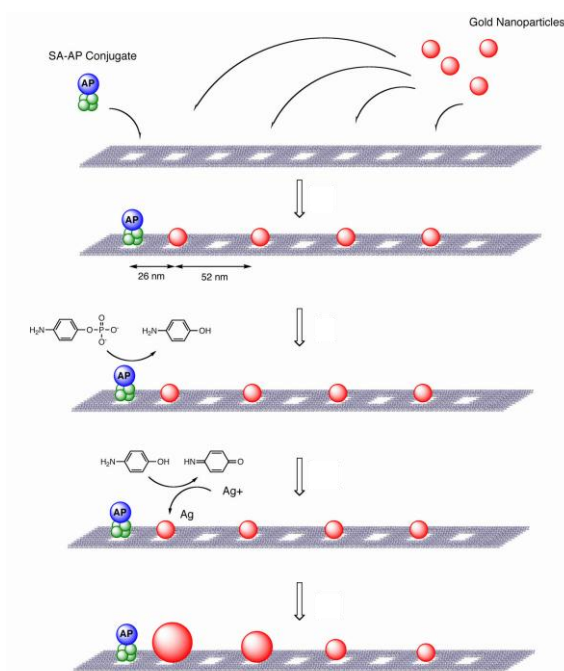


図 1 DNA Nanostick 上に固定化した一分子の酵素における反応で生じた産物を用いた金ナノ粒子の距離依存的無電解メッキ

上記に加え、本研究で培った知見に基づき、DNA オリガミ法を活用して真に機能するナノメカニカルデバイスの構築することにも世界に先駆けて成功した。まず、長さ約 170 nm のレバー二本が支点で結合されたペンチのような形状のナノメカニカルデバイスを設計、作成した。それぞれのレバー先端部にターゲットと相互作用するリガンドを結合しておくことで、二本のレバーが協同的にターゲット分子を捕捉し、開いたペンチ形状から閉じたペンチ形状へと全体構造を選択的に変形させることに成功した。原子間力顕微鏡を用いてこの変化をイメージングすることにより、ターゲットの存在を一分子ずつ分子レベルで視覚的に検出することができた。レバー部に導入するリガンドを種々変えることで、原子量数十の金属イオンから分子量数万のタンパクまで、幅広いターゲット分子をただ一つのナノメカニカルデバイスを使って単分子レベルで検出することに成功した。

また一段階の構造変化しか観察しなかった初期の系では、抗体-抗原反応のような強

い結合を作るターゲットしか一分子捕捉による検出対象とすることができなかった。この問題を解決するために、二段階での構造変化を誘起する系も構築した。二種類目のターゲットを用いてあらかじめペンチを閉じておき、本来のターゲットのリガンドを近接させておくことで、弱い相互作用しかできない分子でも一分子のみでペンチを閉じておくことに成功した。

## 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 3 件)

- ① Akinori Kuzuya, Yusuke Sakai, Takahiro Yamazaki, Yan Xu, and Makoto Komiyama, “Nanomechanical DNA origami ‘single-molecule beacons’ directly imaged by atomic force microscopy”, *Nature Commun.* **2011**, 2, 449. 査読有
- ② Akinori Kuzuya, Keita Tanaka, Hitoshi Katada, and Makoto Komiyama, “Enzyme Treatment-Free and Ligation-Independent Cloning Using Caged Primers in Polymerase Chain Reactions”, *Molecules*, **2011**, 17, 328-340. 査読有
- ③ 葛谷明紀, 「DNA オリガミ」, 日本ロボット学会誌, **2010**, 28-10, 7-9. 査読有

[学会発表] (計 12 件)

- ① Akinori Kuzuya, “Nanomechanical DNA Origami Devices as “Single-Molecule Beacons””, Workshop on DNA Nanotechnology: From Structure to Function, 2012.3.18, 中国上海
- ② Akinori Kuzuya, Takahiro, Yamazaki, Kohei Yasuda, Yusuke Sakai, Yusei Yamanaka, Yan Xu, Yuichiro Aiba, Yuichi Ohya, Makoto Komiyama, “Nanomechanical DNA Origami Devices as Versatile Molecular Sensors”, IEEE NEMS2012, 2012.3.7, 京都大学
- ③ Akinori Kuzuya, Yusuke Sakai, Takahiro Yamazaki, Yusei Yamanaka, Yan Xu, Yuichi Ohya, Makoto Komiyama, “Nanomechanical DNA Origami Devices as ‘Single-Molecule Beacons’”, The 38th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry (ISNAC2011), 2011.11.9, 北海道大学
- ④ Akinori Kuzuya, Sakai Yusuke, Takahiro Yamazaki and Makoto Komiyama, “Nanomechanical DNA Origami Devices as Single-Molecular Visual Detectors for Various Chemical/Biochemical Targets”, DNA17, 2011.9.22, カリフォルニア工科

- 大学
- ⑤ 葛谷明紀・酒井雄介・山崎貴裕・古志直弘・山中優誠・大矢裕一・小宮山眞, 「ナノメカニカルDNAオリガミデバイスのアロステリック構造制御による高感度単分子検出」, 第5回バイオ関連化学シンポジウム, 2011.9.12, つくば国際会議場
  - ⑥ 葛谷明紀・酒井雄介・山崎貴裕・徐岩・小宮山眞, 「単分子ビーコンとして機能するナノメカニカルDNAオリガミデバイス」, 第21回バイオ高分子シンポジウム, 2011.7.26, 関西大学
  - ⑦ 山崎貴裕・葛谷明紀・小宮山眞, 「異種のタンパク質-リガンド相互作用によるDNAオリガミ上でのヘテロタンパク質ナノアレイの構築」, 第21回バイオ高分子シンポジウム, 2011.7.25, 関西大学
  - ⑧ 葛谷明紀・酒井雄介・古志直弘・山崎貴裕・小宮山眞, 「アロステリック酵素を模倣した可動式DNAオリガミによる高感度単分子検出」, 日本化学会第91春季年会, 2011.3.28, 神奈川大学
  - ⑨ 葛谷明紀・酒井雄介・山崎貴裕・小宮山眞, 「単分子検出デバイスとしての可動式DNAオリガミ」, 日本化学会第91春季年会, 2011.3.28, 神奈川大学
  - ⑩ 葛谷明紀, 「ナノメカニカルDNAオリガミデバイスは“単分子”ビーコンとして機能する」, 第13回生命化学研究会シンポジウム(冬季), 2011.1.7, 東北大学
  - ⑪ 葛谷明紀・酒井雄介・山崎貴裕・徐岩・小宮山眞, 「タンパク一分子を捕まえる Nanomechanical DNA Origami」, 細胞を創る会シンポジウム 3.0, 2010.11.12, 東京大学
  - ⑫ 酒井雄介・葛谷明紀・山崎貴裕・小宮山眞, 「DNA Origamiの構造変化に基づく非共有結合形成の単分子検出」, 第4回バイオ関連化学シンポジウム, 2010.9.25, 大阪大学

[図書] (計1件)

- ① 葛谷明紀、小宮山眞, 「DNA ナノテクノロジー」, CSJ カレントレビュー06 「核酸化学のニュートレンド」, 佐々木茂貴、杉本直己、中谷和彦編、化学同人、2011年7月

[その他]

ホームページ等

<http://www.chemmater.kansai-u.ac.jp/kinosei/>

日本学術振興会、科研費 NEWS 最近の研究成

果トピックス「DNA折り紙法の活用によるナノメカニカルデバイスの構築」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

葛谷明紀 (KUZUYA AKINORI)

関西大学・化学生命工学部・准教授

研究者番号: 00456154