

## DNAナノ構造体を足場にしたナノ材料の精密配列化

著者	葛谷 明紀
雑誌名	理工学と技術 : 関西大学理工学会誌 = Engineering & technology
巻	18
ページ	67-70
発行年	2011-11-22
その他のタイトル	Precise Arraying of Nanomaterial on DNA Nanostructures
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10112/5866">http://hdl.handle.net/10112/5866</a>

# DNA ナノ構造体を足場にしたナノ材料の精密配列化

葛谷 明紀\*

## Precise Arraying of Nanomaterial on DNA Nanostructures

Akinori KUZUYA

### 1. はじめに

遺伝子の発現解析などで今日利用されているマイクロアレイは、おおよそ10  $\mu\text{m}$  径のスポットに数 ng ( $\sim 10^{10}$ 個の分子に相当する) のターゲット分子を固定して、多数のサンプルの網羅的な解析を可能としている。しかし微細加工技術が今後さらに進歩していけば、ターゲットの個々の分子が一分子ずつナノメートル間隔で配列化した「単分子ナノアレイ」が、いずれアレイ技術の最終的な到達点として実現すると予想される(図1)。このようなナノアレイをつくるための足場材料としての利用が期待されているのが、DNA を用いて作成したナノ構造体である<sup>1,2)</sup>。たとえば我々はこれまでに、九本の DNA を平面状に束ねて U 字型のタイルをつくり、これを一次元方向に数珠つなぎに配列化してできる、ナノメートルサイズのウェルを等間隔に組み込んだテープ状の構造体を開発している<sup>3)</sup>。さらにこれらのウェルの両側の壁から二分子のピオチンを生やしておく、それぞれのウェルにちょうど一分子ずつストレプトアビジン四量体を取り込まれ、ストレプトアビジンナノアレイを作製できることが明らかになっている。ウェルのサイズを二倍にするとしばしば二分子のストレプトアビジンがウェル内に取り込まれてくることから、ウェルへのゲストの取り込みがサイズ選択的なことが明らかとなっている(図2)。

このように DNA でつくったウェルを利用することがナノアレイの作成に有効であることが確認されているが、小さな DNA タイルを自己集積化して作る一次元のナノ構造体は、(1) 形成する構造体の長さを制御

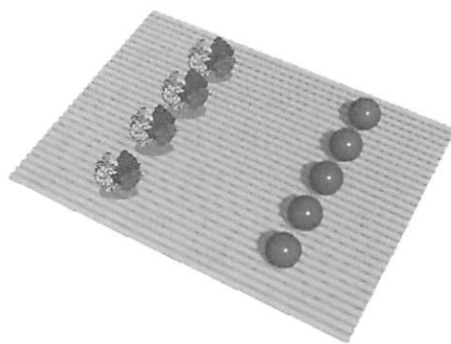


図1 ターゲット分子が一分子ずつナノメートル間隔で配列化した単分子ナノアレイのイメージ

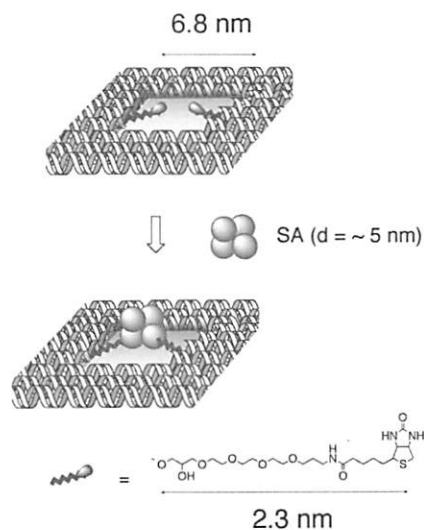


図2 DNA で作ったナノメートルサイズのウェルへのストレプトアビジンのサイズ選択的取り込み

することができない、(2) それぞれのウェルを区別することが困難、などの不都合も存在した。そこでこれらの問題点を解決するために、次世代の DNA ナノ構

原稿受付 平成23年9月21日

\*化学生命工学部 化学・物質工学科 准教授

造体作成技術である DNA origami 法に着目した<sup>4,5)</sup>。これは、長鎖の一本鎖ウイルス DNA を多数の短い一本鎖 DNA (一般に staple strand と称される) を使用して一筆書きの要領で折りたたみ、任意の平面ナノ構造を作製する技術である。DNA origami の手法を利用し、ナノメートルサイズのウェルを組み込んだ新たな DNA ナノ構造体の構築することにより、様々なナノ材料を一分子ずつ自在に配列化することが可能となった<sup>6)</sup>。

## 2. ナノメートルサイズのウェルを組み込んだ DNA Origami の設計と確認

設計した DNA origami の構造を図 3 に示す。足場となる環状 DNA ウイルス M13mp18 の 7249 塩基の一本鎖ゲノムを、構造を固定するための 267 本の staple strand を用いて一筆書き状に折りたたみ、長さ約 280 nm の 10 本の DNA 二重らせんが平行に束ねられた棒状の構造体とした。内部には、DNA 二重らせんの周期 2 つ分 (6.8 nm) の幅を持つウェルが、9 つ組み込んである。必要な DNA 鎖を購入し、1xTAE/Mg<sup>2+</sup> (12.5 mM) 緩衝液中ですべての構成 DNA を混合、90℃ から 25℃ まで徐冷 (-1℃/min) することで実際の構造形成を行った。この溶液をマイカ基板上に滴下して、溶液中で AFM 測定した結果が図 4 である。長さ約 270 nm、幅約 30 nm、高さ約 1.4 nm のほぼ均一な棒状分子が多数観察された。これらの構造体の中には、

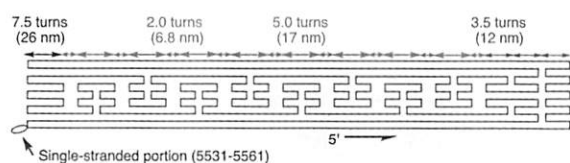


図 3 9 つのウェルを組み込んだ DNA origami を形成する主鎖の折りたたみパターン

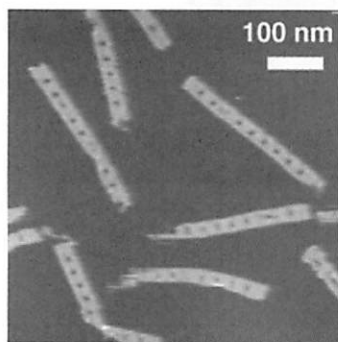


図 4 作成した DNA origami の AFM イメージ

約 24 nm の間隔で規則的に切り抜き状の穴が 9 つ観察され、狙った通りのウェルが正しく形成されていることが確認できた。

## 3. ウェルへの単分子取り込みを利用したストレプトアビジンナノアレイの作成

次いで、導入した各ウェルへのストレプトアビジンのサイズ選択的な取り込みを検討した。まずは全てのウェルの左右両側の壁面に位置する合計 18 本の staple strand を、5' 末端に biotin-TEG 残基を結合した修飾 DNA と入れ替えることで、origami 本体のビオチン修飾を行った。通常通りの温度プロファイルで、ビオチン修飾 DNA を含む staple strand を使って origami を形成させ、次いでウェルに対して 3 等量のストレプトアビジンを溶液に加えることで、一分子ずつストレプトアビジンをウェルに取り込ませた。溶液の AFM 観察により、それぞれのウェルに高さ 5 nm のストレプトアビジンが正しく一粒ずつ内包されていることが確認できた (図 5)。540 個のウェルを確認したところ、ストレプトアビジン取り込みの収率はおよそ 99% だった。

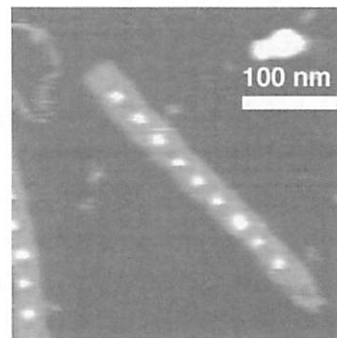


図 5 一次元のストレプトアビジンナノアレイ

従来の系のように DNA の U 字型タイルを一次元配列化した場合と異なり、origami 中のウェルは全て staple strand の配列で区別することができる。そこで一部のウェルだけにビオチン修飾を施したところ、狙った位置の狙ったウェルにのみ、選択的に一分子ずつストレプトアビジンを取り込むことに成功した。さらに、片方の origami は奇数番目のウェルのみ、もう一方の origami では偶数番目のウェルのみと、異なるパターンでビオチン修飾した 2 種類の origami 分子をあらかじめ用意しておき、これらを平行につなぎ合わせることで、ジグザグに配置した二次元ナノアレイの作成にも成功した (図 6)。

DNA ナノ構造体の盛んな研究により、今日では DNA ナノ構造体を形成する多数の DNA 鎖から任意の鎖だけを引きはがすことができるようになってい

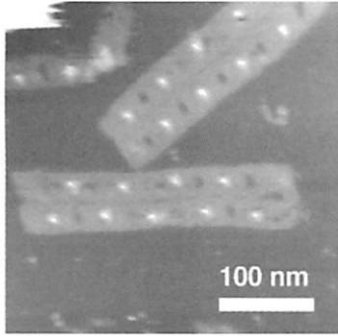


図6 二次元ストレプトアビジンナノアレイ

る。この技術を活用してビオチン修飾 DNA を引きはがしたり再導入したりすることで、ウェルへのストレプトアビジンの選択的な取り込みも可逆的に行うことができる<sup>7)</sup>。さらには数多く市販されているアルカリフォスファターゼをはじめとする酵素とストレプトアビジンとの複合体を利用して、酵素を一分子ずつ並んだ酵素活性を有するナノアレイを作成することもできた<sup>8)</sup>。

#### 4. ウェルへの単分子取り込みを利用した金ナノ粒子アレイの作成<sup>9)</sup>

ナノテクノロジーでよく用いられる重要な材料の一つに、金のナノ粒子が挙げられる。ナノメートルレベルで距離を制御しながら金微粒子を配置することができれば、表面増強ラマン散乱など、バルクの系では評価が難しい特異な物理現象をより詳細に解析することが可能となり、将来新たなデバイスへと応用することが期待される。これまでウェルへの取り込みを行ってきたストレプトアビジンは直径がおよそ5 nmであり、一般的に用いられている金ナノ粒子とほぼ同じ大きさである。そこで origami に導入したウェル内に、金ナノ粒子を取り込むことを検討した。金とチオールは比較的強固な結合を作ることが知られているため、ビオチン修飾の代わりにチオール修飾した staple strand を用意し、ストレプトアビジンを固定するのと同様、ナノ粒子を取り込ませたいウェルの両側から二分子のチオールが生えている DNA origami を調製した。ストレプトアビジンと異なり、十分な取り込み取率を得るためには一晩以上の反応が必要であったが、ターゲットが金ナノ粒子であっても、狙ったウェル内に必ず一粒子ずつ取り込まれることが明らかとなった。タンパク同様、無機ナノ粒子でもサイズ選択が機能していると推測される。

ウェルに取り込まれるゲストの種類は、ウェルに施した化学修飾の種類によって完全にコントロールされており、たとえばビオチン修飾(奇数ウェル)とチオー

ル修飾(偶数ウェル)を交互に施してやれば、ストレプトアビジンと金ナノ粒子が交互に並んだナノアレイを作成することも可能である(図7)。AFM像では大きさが同じストレプトアビジンと金ナノ粒子を区別することができないが、このナノアレイ上で無電解メッキを行って金の粒子サイズを成長させることで、正しく偶数番目のウェルのみに金が含まれていることを確認できた。

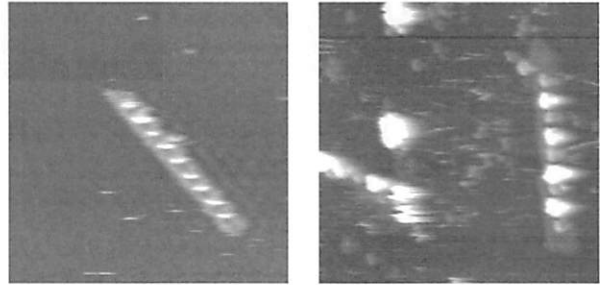


図7 ストレプトアビジン/金ナノ粒子交互ナノアレイ(左) (右)は金の無電解メッキ後

これまでにも DNA ナノ構造体を足場にした金ナノ粒子のアレイ化は数例報告されているが、そのいずれも、まずチオール修飾 DNA を一本だけ結合した金ナノ粒子を別途調製、精製し、これを DNA ナノ構造体に結合するという手順をとっている。本系はチオール修飾した DNA origami の溶液に未修飾の金ナノ粒子を加えるだけで、狙ったウェルのみに自動的に一粒子ずつが取り込まれる。金ナノアレイの非常に簡便な作成法を構築できた。

#### 5. 異なるゲスト固定法の直接比較

DNA ナノ構造体上に固定化したゲストの解析を行うには、AFMによるイメージングが欠かせない。しかしながら AFM で鮮明なイメージを得るためには、AFM プローブの個体差や日々のサンプル状態などの様々な要因に応じ、測定ごとにその都度パラメーターを微調整することが必須となっている。このような理由から、従来の系では異なる方法で固定されたゲストの諸性質を完全に同一の条件で比較することは非常に困難であった。一方 DNA origami を用いた系では、同じ一つの構造体上で複数のゲスト固定法を同時に利用でき、さらにそれらを origami 上の位置情報から厳密に区別しながら、一度の測定で両者の性質を直接比較することができる。本研究ではこの特長を活かし、これまでに提案されている DNA ナノ構造体へのタンパク固定法を、一つの origami 上で直接対決させることを試みた(図8)。Origami 中のウェルごとに異なった方法でストレプトアビジンを結合し、取率や固定されたゲストの安定性を一つの構造体上で検討する。ま

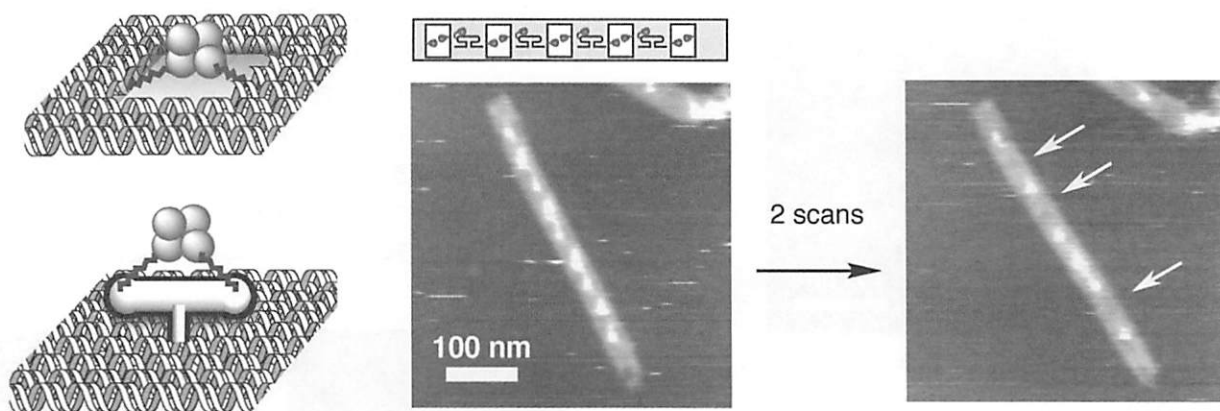


図8 ウェルに取り込んだストレプトアビジン（奇数ウェル）と origami 表面に固定したストレプトアビジン（偶数ウェル）の安定性の直接比較

ず我々が提唱するウェルの中にタンパクを取り込む方法と、最も一般的に行われている DNA ナノ構造体の表面にタンパクを結合する方法を比較した。9つあるウェルのうち偶数番目に位置するウェルを短い DNA で埋めてしまい、かわりに origami の片方の面に直角に突き出すかたちでダンベル型のヘアピン構造を導入した。さらにこのダンベルの両側にもしくは二分子のビオチンを修飾した。AFM 測定ではどちらのダンベルもストレプトアビジンを一分子結合したが、これらのストレプトアビジンは数回のスキャンを行っている間に全て脱落してしまった。次いで、ウェルの内部に取り込むためのビオチンの数についても検討した。二分子のビオチンで固定したストレプトアビジンは十数回のスキャンにも耐えたのに対し、一分子のビオチンしか修飾されていないウェルに取り込まれたストレプトアビジンは、2、3回のスキャンで容易に脱落してしまった。以上の実験から、DNA で囲まれたウェル内に二本のリンカーで固定する手法が最も効果的にタンパクを固定化できることが確認された。

## 6. おわりに

本研究により、ナノメートルサイズのウェルへのゲスト取り込みは、タンパクなどの有機分子、金ナノ粒子などの無機ナノ粒子にかかわらず、いずれもサイズ選択的に行うことができることが明らかとなった。DNA origami を足場に用いれば、狙った数だけ、狙った位置に、狙った種類のナノ粒子を、自在に配列化することが可能である。本研究ではビオチン/ストレプトアビジン相互作用および金/チオール結合を利用したが、ゲストを DNA ナノ構造体へ結合する手法はもちろんこれに限定されるものではない。近年の核酸化学研究の進展により DNA への化学修飾の技術は飛躍的に進歩しており、今日 DNA に導入することができ

る官能基にはほぼ制限がないところまで到達している。今後のさらなる応用が期待される。なお本研究は、東京大学先端科学研究センター小宮山真研究室にて、科研費（20750126）および新化学発展協会研究奨励金の助成のもと行われた。

## 参考文献

- 1) N. C. Seeman, *J. Theor. Biol.*, **99**, 237 (1982).
- 2) T. H. LaBean, H. Li, *Nano Today*, **2**, 26 (2007).
- 3) A. Kuzuya, K. Numajiri, M. Komiyama, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **47**, 3400 (2008).
- 4) P. W. K. Rothemund, *Nature*, **440**, 297 (2006).
- 5) A. Kuzuya, M. Komiyama, *Nanoscale*, **2**, 310-322 (2010).
- 6) A. Kuzuya, M. Kimura, K. Numajiri, N. Koshi, T. Ohnishi, F. Okada, M. Komiyama, *ChemBioChem*, **10**, 1811 (2009).
- 7) K. Numajiri, M. Kimura, A. Kuzuya, M. Komiyama, *Chem. Commun.* **46**, 5127-5129 (2010).
- 8) K. Numajiri, T. Yamazaki, M. Kimura, A. Kuzuya, M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 9937-9939 (2010).
- 9) A. Kuzuya, N. Koshi, M. Kimura, K. Numajiri, T. Yamazaki, T. Ohnishi, F. Okada, M. Komiyama, *Small* **6**, 2664-2667 (2010).