

DNAオリガミ

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	25
ページ	49-54
発行年	2018-12-20
その他のタイトル	DNA Origami
URL	http://hdl.handle.net/10112/16480

DNA オリガミ

葛谷明紀*

DNA Origami

Akinori KUZUYA

1. はじめに

生命の営みを担う生体高分子はいずれも、水溶液中ではたらく相互作用を最大限に活用してその機能を発現している。なかでも遺伝情報の保持と次代への伝達を司る DNA は、その有名な右巻き二重らせん構造と機能を維持するために、水溶液中ではたらく相互作用を総動員しているといってもよい。たとえば二重らせん構造の中心を貫く核酸塩基の積み重なり（スタッキング）は、主に疎水性相互作用によるものである。また、各残基間をつなぐ主鎖のリン酸ジエステル結合間にはたらく静電反発は、遺伝情報の読み出し・複製に支障が出ないよう、二重らせんの安定性を適度に保つ重要な役割を果たしている。そして DNA の最も重要な機能といえば、A、T、G、C の 4 種の核酸塩基の配列情報を維持・伝達することであろう。すなわち、核酸塩基間の相補的塩基対形成で利用される水素結合こそ、DNA を DNA たらしめる、最も重要な相互作用といえる。

近年、DNA をモノマー配列が自在に制御できる高分子材料ととらえ、これを部材としてナノ構造体を自在に構築する「DNA ナノテクノロジー」と呼ばれる研究分野が発展しつつある。DNA の二重らせんを太さ 2 ナノメートルの丸太のように見立て、その構成する DNA 鎖を様々に連結することにより、ナノスケールのいかだやログハウスを組み立てようという技術である。その中でも特に、ここ数年間で分野を席卷している新しい技術が、DNA オリガミ法である^[1,2]。

2. DNA オリガミ法の基礎

2006年の発表以来、数多くの研究者を惹きつけてきた DNA オリガミ法は、我々日本人にとっては、むしろ「DNA オリモノ（織物）」と呼んだ方がイメージしやすいかもしれない。DNA オリガミ構造体を構成する要素はたったの二種類、スキヤフォールド（scaffold）鎖と呼ばれる長鎖の一本鎖 DNA と、ステープル（staple）鎖と呼ばれる多数の短鎖の一本鎖 DNA だ（図 1）。スキヤフォールド鎖はその名の通り、構造形成の足場となる鎖で、通常は 7,249 塩基の環状一本鎖 DNA である M13mp18 ssDNA が使用される。これは M13 という大腸菌に寄生するファージウィルスのゲノムで、生物由来のために非常に均一なもの入手できる。このファージウィルスを使うと、任意の DNA を一本鎖に調製できるため、現行の DNA シークエンサーが開発される以前は、DNA の配列解析に使うツールとして広く使用されていた。このため、今日でもリーズナブルな価格で、バイオ系の試薬会社から購入できるのだ。M13mp18 ssDNA は、通常、環状のままで使用される。酵素で切断して直鎖状にして使うこともできるが、切断が定量的に進まない場合、オリガミ構造体の形成も不完全になってしまうため、あまり推奨されない。同様に、より大きな DNA オリガミ構造体を作成するために、M13mp18 ssDNA 以外のスキヤフォールド鎖（例えば λ ファージゲノムの断片）を使う試みも報告されている。しかしながら、やはりできあがりの均一性は、M13mp18 ssDNA にかなわないようだ。

このスキヤフォールド鎖を織物の横糸のように一筆書き状に折りたたみ、狙い通りの平面構造に固定する

原稿受付 2018年10月29日

*化学生命工学部 化学・物質工学科 教授

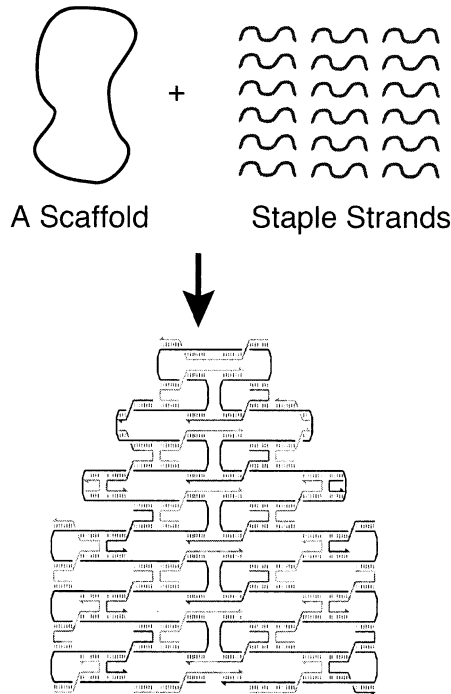


図1 DNA オリガミ法の基本原理

役割を果たすのがステープル鎖だ。「ホッチキスの針」あるいは「かすがい」を意味する名を持つこのステープル鎖は、通常32塩基の長さで設計する。DNA オリガミ構造体を形成させるためには、DNA 二重らせんを平行に、いかだ状に束ねていく必要がある。これを実現するために、DNA ナノテクノロジーの分野では、二重らせんを形成する二本の DNA のうち、一本の鎖の配列を厳密に設計して、二重らせんを何本も乗り換えていくように使用する。このような乗り換え位置は、一般的に「クロスオーバー」と呼ばれる。DNA オリガミ構造体を形成させる場合には、一本目と二本目のらせんを結合するクロスオーバーから数えて、らせんを1.5周進んだ位置に、二本目のらせんと三本目のらせんをつなぐ次のクロスオーバーを配置していけば良い。B型DNA 二重らせんの周期は10.5塩基対なので、これは $10.5 \times 1.5 = 15.75$ 塩基に相当する。しかしながら、小数点以下の塩基数は扱いにくいので、通常は16塩基と近似する。すなわち、DNA オリガミ構造体内では、16塩基ごとにステープル鎖がらせんを乗り越えていくことになる。32塩基中の16塩基はこの「二本目のらせんと相補的な部分」に由来するが、ステープル鎖はさらに一本目と三本目のらせんとも結合しなければならない。そこで、一本目のらせんと相補的な八塩基と三本目のらせんと相補的な八塩基がさきほどの16塩基に追加されて、合計32塩基になるわけだ。このように、DNA オリガミの設計図の中では、ステープル鎖はS字やZ字型に折れ曲がって、スキヤフォールド鎖と結合することになる。どちらでも同じに見えるかもしれないが、らせんには巻きの向きが関係してくるため、ステープル鎖をS字型で設定するかZ字型で設定するかも大きな違いが生じるので注意が必要だ。すなわち、ステープル鎖をS字型に配置した場合には、ステープル鎖の末端はいずれも設計図の裏側に向かって一番奥に配置されるのに対し、Z字型に配置した場合には、いずれも設計図の表側になることになる。ステープル鎖にさらにDNA鎖をぶら下げる必要があるときにはよく注意しよう。さて、32塩基のステープル鎖で7,249塩基のスキヤフォールド鎖を折りたたむには、単純計算でも $7,249 / 32 = 226.5$ 本のステープル鎖が必要になる。M13mp18ゲノムの配列は基本的にはランダムであると見なせるので、二百数十本の全て異なる配列のDNA鎖が必要になるわけだ。

正しく設計ができていて、ステープル鎖全てが手に入れば、DNA オリガミ構造体の作成はとても簡単だ。DNA ナノテクノロジーで一般的に使われている $1 \times \text{TAE}/\text{Mg}^{2+}$ 緩衝液 (40 mM Tris, 20 mM 酢酸, 2 mM EDTA, 12.5 mM Mg^{2+} が含まれている) にスキヤフォールド鎖と過剰のステープル鎖 (通常5等量程度) を溶かして、90°Cから25°Cまでゆっくり冷ます (これをアニリングという) だけで、ステープル鎖は自身と相補的なスキヤフォールド鎖の所定の位置を見つけ、望み通りの形状にスキヤフォールド鎖を折りたたむ。ここで肝心なのは、溶液中に必ず二価の陽イオン (通常は Mg^{2+}) を加えることだ。DNA鎖は、リン酸ジエステル結合のせいで大量の負電荷を帯びており、そのままでは静電反発でDNAオリガミのようならせんが密集した構造は取りえない。これを中和してらせん同士を橋かけしてくれるのが、二価の陽イオンというわけだ。

この二価の陽イオンは、DNA オリガミの観察にも欠かせない。薄い平面構造をもつ二次元のDNAオリガミ構造体は、原子間力顕微鏡 (AFM) で観察するのが一般的だ。極めて平坦な構造をしている劈開直後のマイカ (雲母) に上記のDNAオリガミ溶液を滴下すると、マイカ表面の負電荷とDNAオリガミの負電荷を二価の陽イオンが橋かけしながら中和し、結果としてDNAオリガミがマイカの表面にきれいに貼り付けてくれる。この結合は、AFMの探針が叩いても容易にDNAオリガミがはがれにくいくらい強固だ。全てがうまくいっていればこのようにして、DNA二重らせんの太さである2 nmの厚みを持った、狙い通りのオリガミ構造体が観察される (図2)。

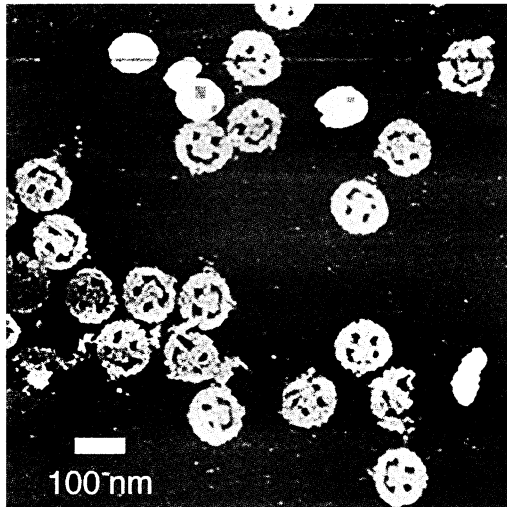


図2 スマイリーマークの形状に設計した DNA オリガミの AFM 像

3. 三次元 DNA オリガミ

発表当初は平面のシート状構造体しか得られなかった DNA オリガミ法だが、すぐにこれを応用して様々な形状の三次元構造体が構築されるようになった。これまでに報告されている三次元 DNA オリガミは、大きく分けて二つに分類することができる。

そのうち最も初期に作られたのは、平面を組み立ててできる中空の多面体 DNA オリガミ構造体で、2009 年にはほぼ同時に四種類の構造体が発表された^[3-6]。そのうちの二つは箱型 DNA オリガミ構造体で、これらはどちらもナノコンテナとしての応用を志向して、「箱の開け閉め」を人為的に制御できる仕組みが施されている（残りの構造体は、それぞれ正四面体とプリズム型である）。「世界初の箱型 DNA オリガミ」である Anderson らの構造体は、おおよそ 40 nm 角の立方体をしており、その一面だけが箱の蓋のように開閉できるよう、各面どうしの結合が工夫されている^[3]。蓋の固定は、二対の部分的に相補な DNA 鎖で行っており、これと完全相補な DNA を加えることで、選択的に蓋を開くことができる。彼らは、蓋を固定する DNA 鎖のペアを「錠前」、蓋を開けるための DNA 鎖を「鍵」と呼んでいる。Anderson らは後に、同じメカニズムで動作する、より小さな箱型構造体も作成している^[7]。

我々が別個に製作した最初期の「DNA オリガミ分子機械」も、おおよそ 40 nm 角の正方形六面からなる箱型 DNA オリガミ構造体であるが、その動作メカニズムは上記の例とは少々異なる(図3)^[4]。この構造体は、当初は互いに直交する三つの面からなるユニットが二つ、ヒンジ部でつながった「開いた構造体」に組み上

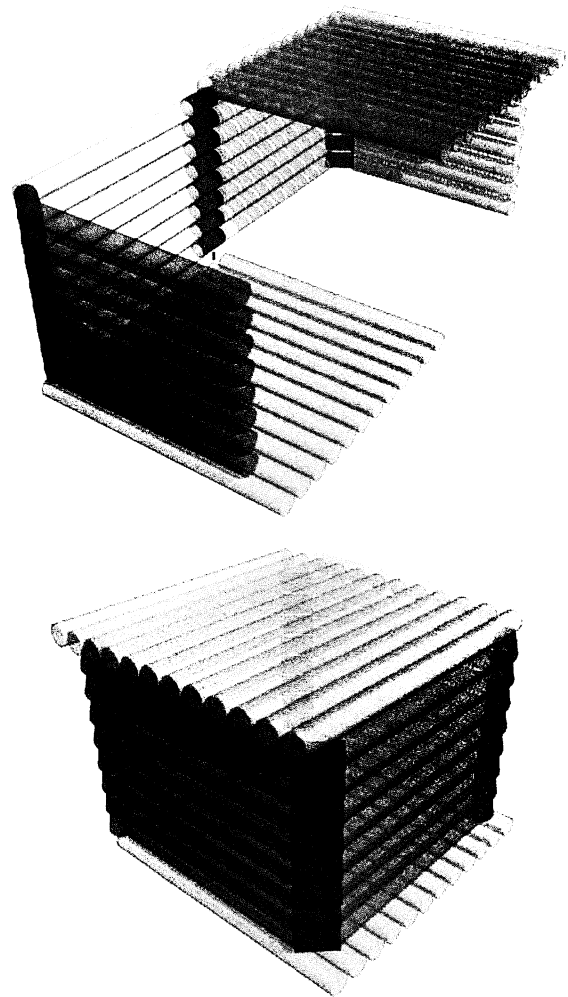


図3 箱型 DNA オリガミ分子機械。開いた形状(上)と閉じた形状(下)。

がる。ここへさらにトリガーとなる DNA 鎖を加えることで、箱型の「閉じた構造体」へと変型する。最近では内部に直径 10 nm の金ナノ粒子を選択的に一粒子だけ取り込み、ナノキャリアへと応用することにも成功している^[8]。また、開閉する箱型 DNA オリガミ構造体への金ナノ粒子の選択的な取り込みは、京都大学の杉山らによっても報告されている^[9]。こちらの系では、DNA オリガミ構造体の固定に光反応性の特殊塩基を使うことにより、光刺激をトリガーとした構造変化を実現している。

前記の箱型構造体はいずれも、開状態ではオリガミ構造体を固定する部分を有しない。そのため、これらの構造体が開くための駆動力は、水溶液中における自由運動によるものである。積極的な駆動力をもって DNA オリガミ構造体を構造変化させた例としては、Firrao らの研究例が挙げられる。彼らはチューブ状の DNA オリガミ構造体に DNA の二本鎖形成によって駆動される同様のハッチを設け、その開閉動作を確

認している。

中空の三次元 DNA オリガミ構造体には、DNA オリガミ中で DNA を曲げる技術を利用して、曲面も利用することができる^[10]。Yan らはこれにより、壺型の構造体や、球体 DNA オリガミの構築に成功している。

三次元 DNA オリガミ構造体のもう一つのカテゴリーが、DNA 二重らせんを断面が蜂の巣状になるように120°の角度でらせんを束ねていく「ハニカム三次元 DNA オリガミ」だ^[11]。中空の DNA オリガミ構造体の場合、DNA そのものは非常に柔らかいため、水溶液中での実際の構造には、かなりのゆらぎがあると推定されている。一方で、平面状のオリガミをひだ状に折り重ね、中身がつまった立体構造を形成するハニカム三次元 DNA オリガミでは、このような問題を考えなくて良い。この方法を用いると、構成する DNA の長さをうまく調節しながら異なる面積の平面を重ねることで、形成される立体構造には曲がりやねじれまで導入することまでできる^[12]。今日ではこのような曲がった構造体を複数組み合わせ、鳥かご状の巨大構造など、従来考えられなかったような複雑な立体ナノ構造体が自在に構築できるようになっている。最近では、リボソームに穴を開けるイオンチャンネルの機能を持つ構造体なども作られている^[13]。

4. DNA オリガミ上で DNA 分子マシンを動かす

DNA ナノテクノロジーの分野では、DNA オリガミの他にも、DNA ウォーカーなどの様々な分子マシンが開発されている。DNA オリガミ上で初めて DNA 分子マシンを動かすことに成功したのは DNA 分子マシンの先駆者である Seeman らで、2009年に彼らの回転運動マシンを DNA オリガミ内に固定化し、その構造変化を AFM で可視化することに成功している^[14]。彼らはさらにこの系を発展させて、DNA オリガミ上にナノメートルサイズの組み立て工場を再現した^[15]。すなわち、DNA オリガミ上に一本鎖 DNA の足場を生やし、その上を三角形の DNA ウォーカーに歩かせる。さらに横からは三カ所の回転アームを組み込み、DNA ウォーカーが自身の前に歩いてきたときに、金ナノ粒子の受け渡しができるようにしたのである。いかにも複雑な系であるが、彼らは AFM や電子顕微鏡測定などを駆使して、DNA ウォーカー上に狙ったとおりの金ナノ粒子が積まれていることを見事に証明した。

同じように、DNA オリガミ上で DNA ウォーカーを歩かせたもう1つの例が、Lund らによる「DNA スパイダー」の系である^[16]。「DNA スパイダー」とは、

ストレプトアビジンというタンパクから、RNA 切断活性を持った特殊な DNA の足を三本生やしたもので、DNA オリガミ上に多数生やした RNA の足場を徐々に分解しながら、自発的に移動することができる。

一方 Turberfield らは、やはり一本鎖 DNA を DNA オリガミ上に並べたトラックを作成し、その上で彼らの酵素反応を利用した DNA ウォーカーを走らせている^[17]。この系で特長的なのは、DNA ウォーカーの動きを1画像/秒で撮像できる高速 AFM を用いて解析していることである。これにより、彼らは DNA ウォーカーが動いている動画を世界で初めてとらえることに成功した。さらに彼らはトラック上に分岐点を設け、DNA ウォーカーが歩く方向を DNA 鎖のインプットにより制御することにも成功している^[18]。

5. DNA オリガミ分子機械

DNA オリガミそのものを動かして「オリガミ分子機械」を構築しよう、という取り組みもなされている。構造変化が実用的な機能に直結した世界初の DNA オリガミ分子機械として、我々は長さ約170 nm の二本のレバー部が支点一カ所で結合された、ペンチ型の可動式 DNA オリガミ構造体 (DNA ペンチ) を作成した (図4)^[19-22]。DNA 二重らせん六本が束ねられて形成されるこれらのレバー部は、Holliday Junction からなる支点を中心に自在に回転でき、水溶液中では主に内角60°の X 字型の構造をとっていると予想されている。実際に、DNA ペンチをマイカに吸着させて AFM 測定を行うと、X 字型に開いた構造物が多数観察される。これに対して、レバー部に様々な化学修飾を施すことにより、ターゲット分子との相互作用を利用してレバー間に第二の結合点を形成させることができれば、DNA ペンチを X 字型の閉じた構造体へと構造変化させることができる。例えば、前述のビオチン修飾をレバー部に施せば、ストレプトアビジンタンパクを一粒だけ摘まんでペンチを閉じることが可能である。これを AFM で単分子イメージングすれば、ターゲットタンパクを単分子レベルで検出できたことになる。このように可動変形する DNA オリガミデバイスを活用することで、質量数が最も小さい1である水素イオンから、分子量数百の小分子、さらには分子量数万のタンパクまでの幅広いターゲットを、単一の系で同時検出できる単分子検出系が実現した。これらの構造変化は、AFM による単分子イメージングに限らず、一般的な生化学系の研究室でも容易に実施できるゲル電気泳動を用いても明瞭に判別することができ、今後広く応用されることが期待される。

ターゲットとの相互作用により DNA オリガミデバ

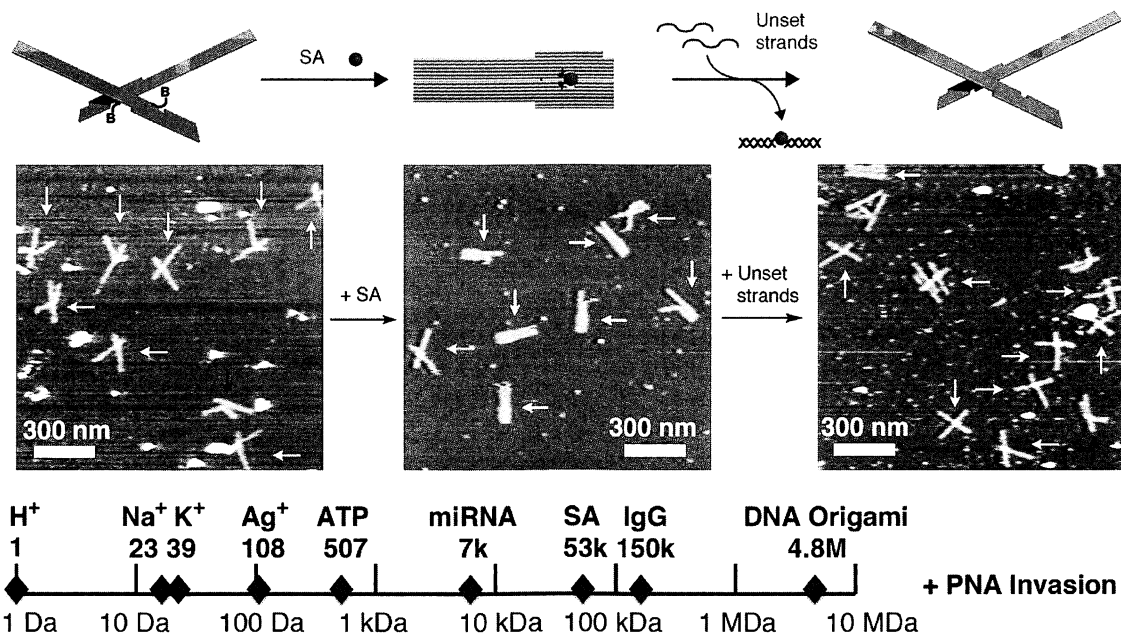


図4 一分子のターゲット (SA: ストレプトアビジン) を掴んで閉じる DNA ペンチ。

イスの構造変化を誘起し、これをターゲットの検出に利用したその他の例としては、光ピンセットを活用したタンパク質の検出系がMaoらによって報告されている^[23]。彼らは七枚の長方形が対角の位置で数珠つなぎになったDNAオリガミ構造体を構築し、ターゲットタンパクと特異的に結合する核酸配列(アプタマー)の相互作用により、隣り合った長方形間で構造変化が起こるようにした。このDNAオリガミ構造体の両端に結合したビーズ間に、光ピンセットで10–25 pNの力をかけておくと、ターゲット一分子の結合に伴う約15 nmの構造変化を検出できる。このシステムを使って筆者らは、10 pMという極低濃度の血小板由来成長因子(PDGF)を、10分以内に検出することに成功している。

6. DNAオリガミロボット

DNAオリガミの構造変化を機能と結びつけたもう一つの例として、Douglasらは、ターゲットとなる細胞を論理演算により認識して結合する「DNAナノロボット」を報告している^[24]。このDNAオリガミデバイスは、閉じた状態では差し渡し35 nmの六角形の断面を持つ、長さ45 nmの樽型構造をしている。側面には樽を縦に二分割するように切り込みが入っており、全体がワニの口のように開くように、上下のユニットが片側で連結されている。反対側は、細胞の分泌物を特異的に認識するアプタマーで閉じられており、この部分で相手があらかじめ設定されたターゲット細胞で

あるかを判定する。狙い通りのターゲットであった場合には、上下のユニットを閉じていたアプタマーを含む二重らせんが解離し、樽の内側に生やしておいた抗体断片が呈示されることで、DNAナノロボットはターゲット細胞に結合する。この場合、特定のがん細胞を認識して、特異的に死滅させる人工免疫分子のような利用法が期待される。Amirらは後に、同様のDNAナノロボットを生きたゴキブリ中に注入し、機能を証明することまで成し遂げている^[25]。

DNAオリガミを直接使った研究ではないが、我々もDNAと微小管・キネシン分子モーター系を組み合わせ、「群れをつくる分子ロボット」の構築に成功している^[26]。DNAナノテクノロジー分野の研究者の多くが分子ロボットの開発に取り組み始めており、今後も優れた系がいくつも報告されるに違いない。

7. おわりに

近年では、ノーベル化学賞候補の筆頭に挙げられるのが恒例となったDNAナノテクノロジーとDNAオリガミ法であるが、毎年数多くの基礎研究の論文が発表されているものの、未だに実用化されるような決定的な活用が見いだされていないのも事実である。DNAオリガミ分子機械を活用した検出法などは最もそこに近いはずであり、一日も早いより実践的な系の検討が望まれよう。

参考文献

- [1] P. W. K. Rothemund, *Nature* **2006**, *440*, 297.
- [2] A. Kuzuya, M. Komiyama, *Nanoscale* **2010**, *2*, 310.
- [3] E. S. Andersen, M. Dong, M. M. Nielsen, K. Jahn, R. Subramani, W. Mamdouh, M. M. Golas, B. Sander, H. Stark, C. L. P. Oliveira, J. S. Pedersen, V. Birkedal, F. Besenbacher, K. V. Gothelf, J. Kjems, *Nature*, **2010**, 459, 73.
- [4] A. Kuzuya, M. Komiyama, *Chem. Commun.*, **2009**, 4182.
- [5] Y. Ke, J. Sharma, M. Liu, K. Jahn, Y. Liu and H. Yan, *Nano Lett*, **2009**, *9*, 2445.
- [6] M. Endo, K. Hidaka, T. Kato, K. Namba and H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 15570.
- [7] R. M. Zadegan, M. D. E. Jepsen, K. E. Thomsen, A. H. Okholm, D. H. Schaffert, E. S. Andersen, V. Birkedal, J. Kjems, *ACS Nano*, **2012**, *6*, 10050.
- [8] A. Kuzuya, M. Kaino, M. Hashizume, K. Matsumoto, T. Uehara, Y. Matsuo, H. Mitomo, K. Niikura, K. Ijio, Y. Ohya, *Polym. J.*, **2015**, *47*, 177.
- [9] T. Takenaka, M. Endo, Y. Suzuki, Y. Yang, T. Emura, K. Hidaka, T. Kato, T. Miyata, K. Namba, H. Sugiyama, *Chem. Eur. J.*, **2014**, *20*, 14951.
- [10] D. Han, S. Pal, J. Nangreave, Z. Deng, Y. Liu and H. Yan, *Science*, **2011**, *332*, 342.
- [11] S. M. Douglas, H. Dietz, T. Liedl, B. Hogberg, F. Graf, W. M. Shih, *Nature*, **2009**, *459*, 414
- [12] H. Dietz, S. M. Douglas, W. M. Shih, *Science*, **2009**, *325*, 725.
- [13] M. Langecker, V. Arnaut, T. G. Martin, J. List, S. Renner, M. Mayer, H. Dietz and F. C. Simmel, *Science*, **2012**, *338*, 932.
- [14] H. Gu, J. Chao, S.-J. Xiao, N. C. Seeman, *Nature Nanotech.*, **2009**, *4*, 245.
- [15] H. Gu, J. Chao, S.-J. Xiao, N. C. Seeman, *Nature*, **2010**, *465*, 202.
- [16] K. Lund, A. J. Manzo, N. Dabby, N. Michelotti, A. Johnson-Buck, J. Nangreave, S. Taylor, R. Pei, M. N. Stojanovic, N. G. Walter, E. Winfree, H. Yan, *Nature*, **2010**, *465*, 206.
- [17] S. F. J. Wickham, M. Endo, Y. Katsuda, K. Hidaka, J. Bath, H. Sugiyama, A. J. Turberfield, *Nature Nanotech.*, **2011**, *6*, 166.
- [18] S. F. J. Wickham, J. Bath, Y. Katsuda, M. Endo, K. Hidaka, H. Sugiyama, A. J. Turberfield, *Nature Nanotech.*, **2012**, *7*, 169.
- [19] A. Kuzuya, Y. Sakai, T. Yamazaki, Y. Xu, M. Komiyama, *Nature Commun.*, **2011**, *2*, 449.
- [20] T. Yamazaki, Y. Aiba, K. Yasuda, Y. Sakai, Y. Yamanaka, A. Kuzuya, Y. Ohya, M. Komiyama, *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, 11361.
- [21] A. Kuzuya, R. Watanabe, M. Hashizume, M. Kaino, S. Minamida, K. Kameda, Y. Ohya, *Methods*, **2014**, *67*, 250.
- [22] A. Kuzuya, R. Watanabe, Y. Yamanaka, T. Tamaki, M. Kaino, Y. Ohya, *Sensors*, **2014**, *14*, 19329.
- [23] D. Koirala, P. Shrestha, T. Emura, K. Hidaka, S. Mandal, M. Endo, H. Sugiyama, H. Mao, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, *53*, 8137.
- [24] S. M. Douglas, I. Bachelet, G. M. Church, *Science*, **2012**, *335*, 831.
- [25] Y. Amir, E. Ben-Ishay, D. Levner, S. Ittah, A. Abu-Horowitz, I. Bachelet, *Nature Nanotech.*, **2014**, *9*, 353.
- [26] J. J. Keya, R. Suzuki, A. M. R. Kabir, D. Inoue, H. Asanuma, K. Sada, H. Hess, A. Kuzuya, A. Kakugo, *Nature Commun.*, **2018**, *9*, 453.