

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：12601
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2015～2016
課題番号：15K13312
研究課題名（和文）DNA三次元ナノプリンター

研究課題名（英文）DNA 3D nano-printer

研究代表者

陶山 明（SUYAMA, Akira）

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号：90163063

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：DNAナノ構造体は、一本鎖DNAの自己会合によりつくられた超分子構造体である。材料科学、生命科学、医療などの分野で、利用が期待されている。大きな三次元DNAナノ構造体の構築を困難にしている原因の一つがL3乗問題である。この問題は、三次元プリンターの原理である積層造形法を利用すると解決できる。本研究では、三次元DNAナノ構造体を構築するための、ナノスケールの積層造形法の開発を行った。相補的なDNA配列をもつアダプタが特異的に結合する2つのポートを、大きな二次元アレイを形成するDXABタイルの構造に導入することにより、ナノスケールの積層造形法で必要とされる性質を満たすDNAインクの開発に成功した。

研究成果の概要（英文）：DNA nanostructures are supramolecular structures made by self-assembly of DNA single-strands. They are expected to be used in fields such as material science, life science, medicine and so on. One of the causes that make it difficult to build large three-dimensional DNA nanostructures is the L-cubed problem. This problem can be solved by using the layered modeling method, which is the principle of a three-dimensional printer. In this study, we developed a nano-scale layered modeling method for constructing three-dimensional DNA nanostructures. By introducing two ports, to which the adapters with complementary DNA sequences bind specifically, into the structure of the DXAB tile forming a large two-dimensional array, we succeeded in developing DNA inks that satisfy the properties required for the nano-scale layered modeling method.

研究分野：生物物理学

キーワード：DNAデバイス ナノテクノロジー 自己会合 3Dプリンター 積層造形法

1. 研究開始当初の背景

DNA ナノ構造体は、DNA の鎖からつくられた、ナノメートルからサブマイクロメートルの大きさをもつ超分子構造体である。構造の骨格は、DNA 鎖の A と T、および G と C との間の特異性の高い相補的塩基対結合によって決まる。そのため、DNA 配列を設計することにより、DNA ナノ構造体の形状を設計することができる。DNA 配列にしたがってプログラブルに DNA 鎖が自己会合し、目的の形状をもつ構造体が形成されるのである。

DNA ナノ構造体は、材料科学、生命科学、診断・医療などの分野での利用が期待されている。たとえば、量子ドット、カーボンナノチューブ、酵素タンパク質などの超微小部品を、ナノスケールの位置精度でボトムアップ的に配置するための足場として利用できる。また、イオンチャンネル、バイオセンサー、分子モーター、細胞骨格、ドラッグデリバリーのための容器などへの利用も報告されている。

さまざまな利用が期待されている三次元 DNA ナノ構造体の構築を困難にしている原因の一つに、L3 乗問題がある。構造体中のそれぞれの DNA 鎖の空間位置は、その鎖の DNA 配列で決定される。したがって、構造体の一辺の長さを L とすると、構造体の体積、すなわち、 L^3 乗に比例する数の異なる DNA 配列が必要となる。配列の数が増すと、正しい相補配列以外の配列をもつ DNA 鎖と誤って会合してしまう、ミスハイブリダイゼーションが起こる危険性が急激に増大する。そのため、目的の構造体が形成されなくなったり、形成されても収率が非常に低くなったりする問題が発生する。これが L3 乗問題である。数百ナノメートルを超える三次元 DNA ナノ構造体を確実に収率よく構築できるようにするためには、L3 乗問題を解決できる構築法の開発が求められる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、三次元プリンターでもちいられている積層造形法を、DNA でつくられたインク(以下、DNA インクと呼ぶ)をもちいて実現する方法を開発することである。別の言い方をすれば、研究目的は DNA 三次元プリンターを実現することであるともいえる。本研究により L3 乗問題が解決され、任意の三次元形状をもつ DNA ナノ構造体を、確実かつ収率よく構築できるようになる。

積層造形法をもちいると、三次元 DNA ナノ構造体の構築に必要な、異なる DNA 配列の数を L^2 乗に比例する数に減らすことができる。積層造形法では、立体の断面形状を一層ずつ積層して、目的の三次元構造体をつくる。この積層造形法を DNA インクをもちいて実現すると、DNA 配列で指定する DNA 鎖

の位置は三次元空間内の位置ではなく、二次元断面内の位置で足りる。したがって、必要な DNA 配列の数は L^3 乗に比例する数から L^2 乗に比例する数に減り、L3 乗問題が解決される。

3. 研究の方法

積層造形法にもいろいろな種類がある。それらの中で光造形法を参考にして、DNA インクをもちいた積層造形法(以下、DNA 積層造形法と呼ぶ)を開発することにした。

開発の鍵となるのは、使用する DNA インクの開発である。その開発を行うために、まず使用する DNA インクに必要なとされる性質を検討した。その後、必要な性質を満たす DNA インク分子の構造と DNA 配列の設計を行った。設計した DNA インク分子を実際に調製し、その性質を実験により調べた。実験には、形成曲線・融解曲線の測定、蛍光顕微鏡によるマイクロメートルの分解能での構造体観察、原子間力顕微鏡によるナノメートルの分解能での構造体観察などをもちいた。実験による評価結果を基に、さらに DNA インク分子の構造と DNA 配列の改良を行い、DNA 積層造形法で使用する DNA インクの開発を行った。

4. 研究成果

(1) DNA 積層造形法

本研究で考案した DNA 積層造形法は、DNA インクをもちいた、ナノスケールの積層造形法である。その工程は、マクロスケールの積層造形法の一つである光造形法と類似している(図 1)。

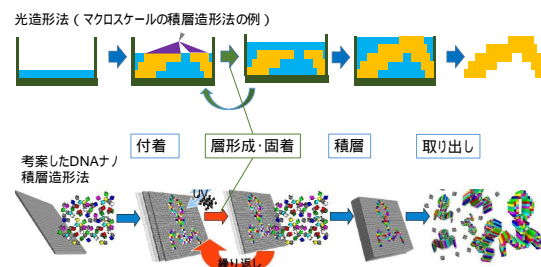


図1 光造形法とDNA積層造形法

DNA 積層造形法では、構造体の断面形状をもつ薄い層(以下、断面層と呼ぶ)を一層ずつ積み重ねて三次元 DNA ナノ構造体をつくる。その工程は、DNA インク分子の付着、層形成、固着工程と、それら3つの工程を繰り返す積層工程と、最後の取り出し工程からなる。

付着工程では、最上段の断面層の表面に、DNA インク分子を分散させた DNA インクを添加する。そして、断面層表面の指定した位置に DNA インク分子を付着させる。層形成工程では、隣接して付着した DNA インク分子同士

を接着させ、DNA インク分子からできた薄い層をつくる。形成された層は、新しい最上段の断面層となる。

固着工程では、最上段の断面層内で断面形状部分にある DNA インク分子を、上下左右同士で共有結合させる。この固着により、目的の構造体に含まれる DNA インク分子同士が共有結合で結ばれる。固着は、最上段の断面層の表面全体に 366nm 付近の UV 光を照射して行う。断面形状部分に付着した DNA インク分子は、DNA 配列の一部にカルボキシビニルウラシル(cvU)をもつ DNA 鎖を含んでいる。UV 光を照射すると、cvU は隣接する DNA 鎖のピリミジン塩基と共有結合を形成する。その反応により、断面形状部分に付着した DNA インク分子のみが、上下左右の DNA インク分子と共有結合で結ばれる。

積層工程では、付着、層形成、固着の工程が多数回繰り返され、断面形状の薄い層が積み重ねられる。その後の取り出し工程では、固着されなかった DNA インク分子のみを高温の溶液で洗い流す。固着された DNA インク分子同士は共有結合で結ばれているので洗い流されない。その結果、共有結合で結ばれた DNA インク分子からつくられた三次元 DNA ナノ構造体を得られる。

(2) DNA インクに必要とされる性質

DNA 積層造形法の各工程を実現するためには、使用する DNA インクに、分散性、位置依存的付着性、層形成能、位置依存的固着性、固着熱耐性の 5 つの性質が求められる。

分散性と位置依存的付着性は、付着工程で必要となる性質である。分散性は、付着前の DNA インク分子は互いに会合しないという性質である。一方、位置依存的付着性は、DNA インク分子が指定した位置にのみ付着する性質である。また、層形成能は層形成工程で必要となる性質である。互いに接着した DNA インク分子が薄い一層の平面構造を形成する性質である。

固着工程で必要となる位置依存的固着性は、付着した DNA インク分子を固着させるか否かを、付着した位置によって選択できる性質である。断面形状部分に付着した DNA インク分子のみが、上下左右の DNA インク分子と共有結合で結ばれて固着される。

固着熱耐性は、取り出し工程で、目的の三次元 DNA ナノ構造体を壊さずに取り出すために必要となる性質である。取り出しは、付着しただけの不要な DNA インク分子を高温洗浄により取り除くことで行う。固着した DNA インク分子からつくられた構造体が十分な熱耐性をもつなら、それが壊れないように不要な DNA インク分子を取り除くことができる。

(3) DNA インク分子の構造と機能

DNA 積層造形法で使用する DNA インクに必

要とされる 5 つの性質(分散性、位置依存的付着性、層形成能、位置依存的固着性、固着熱耐性)を備えた DNA インク分子の構造と DNA 配列の設計を行った。

DNA インク分子は、7 本の DNA 一本鎖からなるボディと、2 本の DNA 一本鎖からなるアダプタから構成される(図 2)。ボディには、アダプタが結合する 2 つのポートがある。

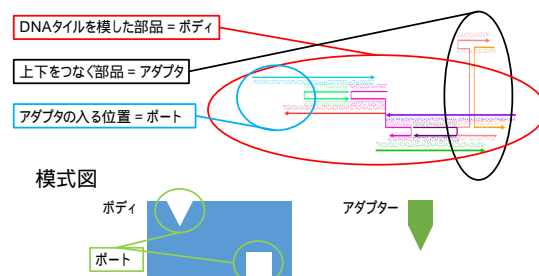


図2 DNA インク分子の構造

ポートにアダプタが結合すると、ボディは構造変化を起こす。2 つのポートの両方にアダプタが結合すると、ボディの構造は DXAB タイルと呼ばれる DNA タイルの構造とほぼ同じになる。DXAB タイルは、粘着末端部分の相補的塩基対結合により互いに接着してアレイ化する。そして、10 マイクロメートルを超える広がりをもつ、厚さ 2nm の薄いシートを形成する。

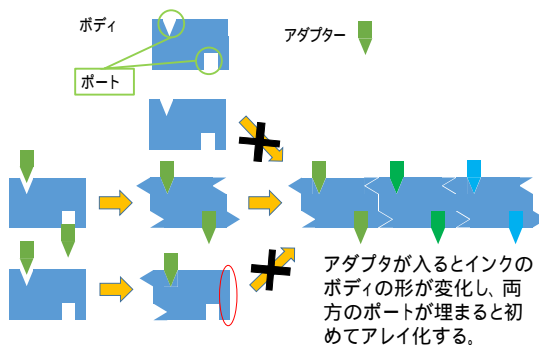


図3 インクボディの構造変化とアレイ化

1 つのポートにのみアダプタが結合した DNA インク分子をもちいると、次のようにして、分散性、位置依存的付着性、層形成能、位置依存的固着性、固着熱耐性の性質を実現できる。1 つのポートにしかアダプタは結合していないので、DNA インク分子同士の接着は起こらず、分散した状態が保たれる。ポートには相補的 DNA 配列をもつアダプタしか結合できない。このポートとアダプタの相補性により、DNA インク分子は最上段の断面層表面の相補的アダプタが存在するところに特異的に付着する。付着すると、2 つのポートにアダプタが結合した状態になるので、隣接する DNA インク分子同士が粘着末端で接着し

てアレイ化し、新しい層が形成される。断面形状部分にある DNA インク分子だけが粘着末端とアダプタの DNA 配列に cvU を含むようにすると、UV 光の照射により、断面形状部分に付着した DNA インク分子は上下左右の DNA インク分子と共有結合で結ばれる。共有結合で結ばれた DNA インク分子同士は、相補的塩基結合で接着した DNA インク分子同士よりも熱耐性があり、高温にしても分離しにくい。こうして固着熱耐性が実現される。

(4) DNA インクの性質の実験による確認

設計した DNA インク分子を含む DNA インクが、DNA 積層造形法に必要とされる 5 つの性質をもつことを調べる実験を行った。

最初に SYBR Green I をもちいて形成曲線と融解曲線を測定し、DNA インク分子のボディの形成・融解が 50 から 70 の範囲で起こることを明らかにした。さらに、DNA 鎖の 1 本を Alexa Fluor 488 で修飾したボディをもつ DNA インク分子をもちいて、アレイ化する温度を蛍光顕微鏡観察により調べたところ、35 付近の狭い温度範囲でアレイ化が起こることがわかった。これらの情報を基に、付着、層形成、固着、積層工程のための温度範囲を決定した。

付着工程では、上ポートのみにアダプタを結合させた DNA インク分子を使用する。そのような DNA インク分子の分散性を蛍光顕微鏡観察により調べたところ、分散性を有していることが確認された。

DNA インク分子の位置依存的付着性を、相補的なアダプタを配置した表面と、非相補的なアダプタを配置した表面をもちいて調べた。相補的なアダプタを配置した表面にのみ DNA インク分子が付着することが、蛍光顕微鏡観察により確認された(図 4)。

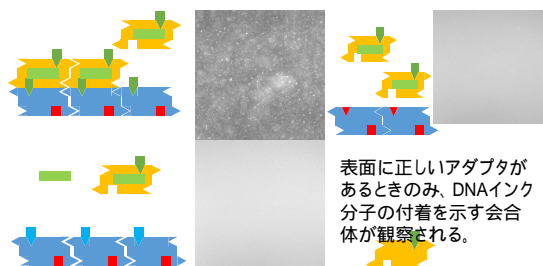
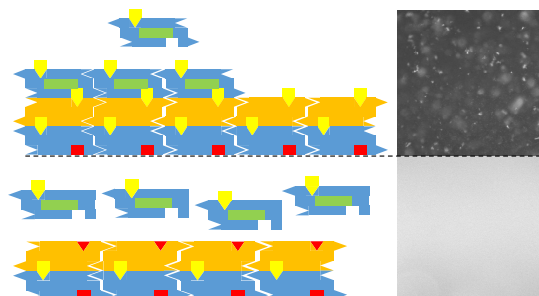


図 4 DNA インク分子の付着特異性

DNA インク分子の層形成能と、形成された層の積層を、蛍光顕微鏡観察と原子間力顕微鏡観察により調べた。DNA インク分子のボディの 2 つのポートのすべてに、アダプタ(突出部のない止栓プラグを含む)が結合している場合、アレイとみられる大きな構造体の形成が蛍光顕微鏡で観察された。また、その会合体を原子間力顕微鏡で観察すると、アレイ状の構造が観察された。したがって、DNA イ

ンク分子は層形成能を有していることが確認された。さらに、形成された層の上に新たな層を積層できることを、蛍光顕微鏡観察をもちいた実験により確認した(図 5)。



2層目に正しいアダプタがあると、3層目のDNAインク分子が付着したことを示す会合体が観察される。

図 5 DNA インク分子の積層

DNA インク分子の位置依存的固着性は、基本的に位置依存的付着性により担保される。固着にともなう熱耐性の向上は、DNA インク分子のボディの原型である DXAB タイルアレイをもちいて調べた。温度を変えて原子間力顕微鏡でアレイ構造の変化を観察したところ、固着により 20 以上の熱耐性の向上がみられた。この大きさの熱耐性の向上があれば、高温洗浄により固着されていない DNA インク分子のみを取り除き、固着された DNA インク分子からつくられた目的の三次元 DNA ナノ構造体を取り出すことができる。

(5) 成果のまとめと今後の課題

本研究により、DNA 積層造形法をもちいた DNA 三次元ナノプリンターの実現にとって鍵となる、DNA インクの開発に成功した。今後の課題は、開発した DNA インクをもちいて、いろいろな形状の三次元 DNA ナノ構造体をつくることを行い、開発した DNA インクの性能を詳しく評価することである。その結果に基づいて、DNA インクのさらなる改良を行い、三次元 DNA ナノ構造体を高い精度と効率でつくれるようにする。そして、生物学的あるいは医学的利用が期待される、いろいろな三次元 DNA ナノ構造体をつくることである。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

陶山 明 (SUYAMA, Akira)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号：90163063