

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007年度～2008年度  
 課題番号：19560091  
 研究課題名（和文）バイオ分子の自己組織化によるマイクロ・ナノ構造形成ダイナミクス  
 研究課題名（英文）Micro/Nanoscale Structure Dynamics of Self-assembling Biomolecules

研究代表者  
 安達 泰治（ADACHI TAIJI）  
 京都大学・大学院工学研究科・准教授  
 研究者番号：40243323

## 研究成果の概要：

本研究では、DNA を用いたボトムアップ型微小構造物の作製において重要となる環状一本鎖 DNA の作製過程において、Precursor DNA と Template DNA の塩基長が、最終的な構造に及ぼす影響を明らかにした。同一の Prec.DNA に対しては、長い Temp.DNA を用いることで、直列の多量体環が産生されることが示され、適切な一本鎖 DNA の長さとの組み合わせの選択により、単量体環と多量体環の産生比率を制御できる可能性を示した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

## 研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械材料・材料力学

キーワード：マイクロ・ナノバイオメカニクス、生体分子、DNA、自己組織化、ナノ・バイオ工学、一本鎖 DNA

## 1. 研究開始当初の背景

ナノテクノロジー分野において、分子認識と自己組織化を活用したボトムアップアプローチが注目を集めており、特に、これらの現象を最も巧みに利用している生体分子の工学的応用が期待されている。その中でも、4種類の塩基が特異的に水素結合を形成し、二重らせん構造を安定化させている DNA は、その塩基配列の設計可能性ゆえに、ボトムアップアプローチの有望な候補と期待されている。

熱変性による得られる一本鎖 DNA は、一般にはランダムに凝集するが、再び 100°C 近くまで加熱した後に徐冷すると、解離していた相補鎖同士が自発的に二重らせん構造を再生する。このハイブリッド形成現象を活用することで、DNA を用いた微小構造物の構築に関する研究が報告され始めた。本研究では、DNA による微小構造物の構築過程において、中間体の役割をなす一本鎖 DNA (Single-strand DNA, 以下 ssDNA) の環状構造に着目した。

## 2. 研究の目的

環状 ssDNA を作製する手法として、環状構造の本体となる直鎖 ssDNA (Precursor, 以下 Prec. DNA) を、相補的な塩基配列を持つ直鎖 ssDNA (Template DNA, 以下 Temp. DNA) と結合させ、閉じた環構造を形成する方法を用いた。このとき、一本の Prec. DNA からなる環状構造以外に、多数の Prec. DNA が連なった直鎖や環状の構造が生じることが知られている。

そこで本研究では、これら種々の構造の産生量の制御を目指し、複数の Prec. DNA と Temp. DNA を用いて環状化実験を行い、単量環状体と多量環状体の産生量について比較検討を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 一本鎖 DNA の環状化

環状 ssDNA の作製は、図 1 に示すように、まず、Prec. DNA と Temp. DNA をハイブリッド形成させ、その後に Prec. DNA の 3' 末端と 5' 末端を酵素 Ligase により連結する。

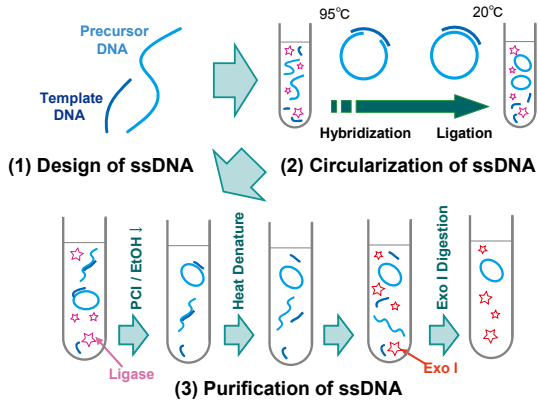


図 1: 環状化一本鎖 DNA 作製手順の概要

そこで、本実験における環状化の第一段階では、Prec. DNA と Temp. DNA が、両末端で水素結合を形成し、閉じた環構造とるように塩基配列を設計した。本実験では、Dolinnaya ら [Nucl. Acids Res. 1993] が用いた 14 塩基からなる Temp. DNA (T14 と呼称) の他に T20 を、Prec. DNA として P28 と P50 を新たに設計し、合成・精製した。両 Prec. DNA が自身で形成する二次構造予測の結果を図 2 に示す。

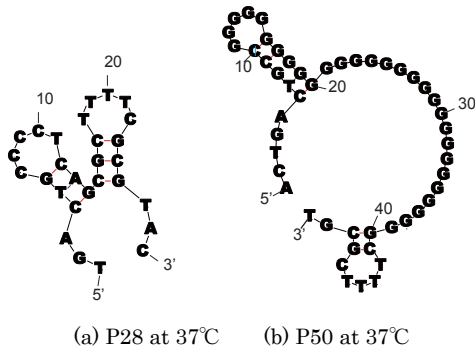


図 2: 予想された二次構造

### (2) 直鎖 ssDNA の環状化の検証

環状化の有効性と Prec. DNA および Temp. DNA の塩基長が生成する環の大きさに及ぼす影響について検討するため、2 種の Prec. DNA および 2 種の Temp. DNA を設計し、計 4 通りの組み合わせで環状化実験を行った。

電気泳動の際、既知の塩基長を持つ DNA 片を同時に泳動し、注目すべき試料の塩基長の目安とする泳動マーカーには、10bp DNA Step Ladder (Promega) と 25bp DNA Step Ladder (Invitrogen) を併せて用いた。また、各段階における反応の成否を検証するため、最終反応を終えたサンプルの他、未反応の Prec. DNA を超純水で希釈したサンプル、未反応の Temp. DNA を超純水で希釈したサンプル、および、Exonuclease I (以下 Exo. I) 反応時に酵素の代わりに超純水を加えたサンプルを別に準備し、同時に電気泳動に供した。各 Prec. DNA-Temp. DNA の組み合わせで環状化を行った溶液の電気泳動 (8.3M Urea 15% 変性 PAGE) 結果を図 3 に示す。

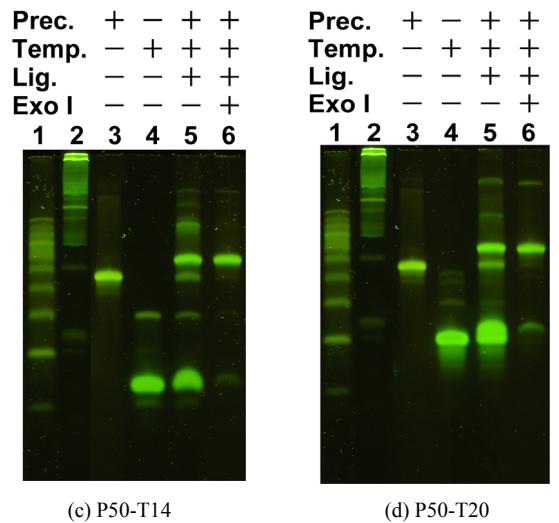
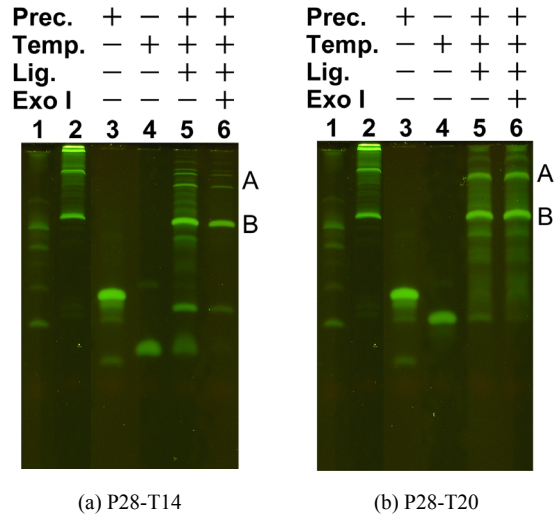


図 3: 電気泳動による DNA 生成物の比較

#### 4. 研究成果

##### (1) 共通する結果：

1. Prec. DNA および Temp. DNA を単体で電気泳動したレーンにおいて、階段状のバンドが検出された。これらの階段状のバンドは、いずれも、非常に強い一本のバンドと、その短鎖側および長鎖側に広がるやや弱い数本のバンドからなっていた。
2. Exo. I 未反応後のレーンにおいては、Prec. DNA や Temp. DNA 単体とは異なる位置に複数の階段状のバンドが確認された。これは、Prec. DNA が連結することにより生じた新しい DNA であると考えられる。
3. Exo. I 反応後のレーンでは、Exo. I 未反応のレーンに比べバンドの数は減少するものの、依然として幾つかのバンドが残存した。これらの残存したバンドは、末端を有さない環状一本鎖 DNA であると考えられる。いずれの組み合わせにおいても複数のバンドが残存していることから、本実験の操作では、Prec. DNA が単体で環をなす単量体のみではなく、多数の Prec. DNA が集合して環をなす多量体も生成することが確認される。

##### (2) 各組み合わせに特徴的な結果：

P28-T14 の組み合わせでは、Exo. I 作用後、低分子量側 (図下方) から高分子量側 (図上方) に至る全領域において、複数の強いバンドが認められた。一方、P28-T20 の組み合わせでは、強いバンドは比較的長鎖側のみに認められた。特に、P28-T14 では単鎖側に認められたバンドが、P28-T20 には認められないことは、単量体が P28-T20 では生成しないことを示唆する。また、長鎖領域においては、図 3(a),(b)中のバンド A や B など、両組み合わせに共通するバンドも確認されたが、一方の組み合わせにしか認められないバンドも存在した。Lane 6 の階段状のバンドは、それぞれ連結数の異なる環状一本鎖 DNA を示していると考えられるため、一方の組み合わせに特異的なバンドが存在することは、Temp. DNA の塩基長によって特定連結数の多量体生成が妨げられうることを示唆する。

本実験で用いた変性 PAGE は、DNA の水素結合を解離させた状態で電気泳動を行うため、直鎖 DNA については、分子内水素結合によって形成される二次構造の影響を排除でき、塩基長のみに関する情報を得ることが出来る。しかし、環状一本鎖 DNA については、分子内水素結合によって形成される二次構造の影響は排除できるものの、結び目などの位相幾何学的な相違の影響は排除できない。従って、上述したバンドの特異性は、Prec. DNA の連結数だけではなく、位相幾何学的な相違も反映している可能性がある。

Exo. I 作用後の P50-T14 および P50-T20 では、P50 単体の最も強いバンドより少し長鎖側の強いバンドをはじめ、主に長鎖領域にお

いて、階段状のバンドが出現した。しかし、P28 に比してバンドの数は少なく、またその出現パターンの相違も少なかった。このことから、P50 から産生する環状一本鎖 DNA は連結数 1 のものが多く、その比率は組み合わせによる影響を受けにくいことが示唆された。一方、短鎖側の領域においては、Temp. DNA 単体に相当する位置の付近に一本の強いバンドが検出された。このバンドについては、Exo. I の働きが十分でなかったために Temp. DNA が残存した可能性が疑われるが、Temp. DNA 単体のバンドに比べ、長鎖側に広がりを持って検出された理由を特定するためには、ゲル切り出しなどによる詳細な分析が必要であると考えられる。

##### (3) DNA の連結数に関する解析結果：

1. Prec. DNA 単体の最も強いピークの位置を参考に、Exo. I 後の輝度分布における単量体のバンドを特定し、その輝度分布に正規分布をフィッティングし、分散 $\sigma$ を求めた。
2. 単量体のバンドより長鎖側  $2\sigma$ を閾値とし、全領域を短鎖側 (単量体領域) と長鎖側 (多量体領域) に分割した。
3. 単量体領域の積分値を全領域の積分値で除し、この値を単量体率と定義し、比較を行った (図 4)。ただし、P28-T20 については、単量体のバンドが認められなかったため、同一の電気泳動で得た P28-T14 の単量体のバンドの位置から閾値を決定した。

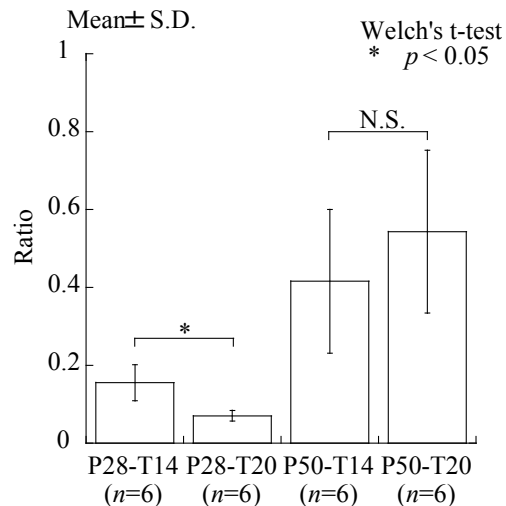


図 4: 多量構造に対する単量構造の比率

図 4 に示すように、単量体率は、P28 よりも P50 の方が高くなる傾向が見取られた。また、Prec. DNA が P28 の場合には、P28-T14 に比べ P28-T20 の単量体率は有意に低かった ( $p < 0.05$ )。すなわち、P28 に対しては、T14 は T20 よりも単量体を産生する傾向が高いことが確認された。一方、Prec. DNA が P50 の場合には、単量体率は T14 の方が T20 より低い傾向が見られたものの、二者の間に有意差は認められなかった。

以上のことから、Prec. DNA と Temp. DNA を用いて環状 ssDNA を作製する場合、単量体の比率を高めるためには、Prec. DNA の塩基長は長いほうが好ましいことが示唆された。また、短い Prec. DNA からなる小さな環状 ssDNA を産生させる必要がある場合には、長い Prec. DNA に比べると効率は低下するものの、短い Temp. DNA を用いることで、単量体の比率を高められることが示唆された。

#### (4) まとめ：

微小構造の構築に DNA を用いる試みは、未だその緒に就いたばかりである。本研究では環状構造を効率よく生み出すための方法を提案し、また、その関係性の背後にある DNA の剛直性が、DNA 部品の組み立て時に、塩基対間の水素結合形成と並ぶ重要な因子になり得ることを示唆した。このように、DNA 部品の組み立て過程を、DNA の高分子的性質を考慮したモデルで理解することは、自己組織化の制御を精密化するためには必要不可欠な課題であると考えられる。今後は、DNA 鎖の性質をより自然に表現できる分子動力学等のモデルによるシミュレーションを行い、その結果を塩基配列の設計則に反映させることが望まれる。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- ① Yoshitaka Shimada, Taiji Adachi, Yasuhiro Inoue, and Masaki Hojo, Coarse-grained Modeling and Simulation of Actin Filament Behavior Based on Brownian Dynamics Method, Molecular and Cellular Biomechanics, (2009), in press. 査読有。
- ② Taiji Adachi, Kennedy O. Okeyo, Yoshimichi Shitagawa, and Masaki Hojo, Strain Field in Actin Filament Network in Lamellipodia of Migrating Cells: Implication for Network Reorganization, Journal of Biomechanics, 42-3 (2009) 297-302. 査読有。
- ③ Taiji Adachi, Katsuya Sato, Norio Higashi, Yoshihiro Tomita, and Masaki Hojo, Simultaneous observation of calcium signaling response and membrane deformation due to localized mechanical stimulus in single osteoblast-like cells, Journal of Mechanical Behavior of Biomedical Materials, 1-1 (2008) 43-50. 査読有。

〔学会発表〕(計 7 件)

- ① 紀平佑毅, 安達泰治, 須長純子, 北條正樹, 一重鎖 DNA の環状化過程における塩基長の影響, 日本機械学会 2008 年度年次大会, No. 08-1 (2008) 267-268, 横浜市。

- ② Taiji Adachi, Yoshitaka Shimada, Yasuhiro Inoue, and Masaki Hojo, Coarse-grained modeling and simulation of actin filament dynamics: Polymerization, depolymerization and severing, 8th World Congress on Computational Mechanics, (2008), Venice.
- ③ 紀平佑毅, 安達泰治, 須長純子, 北條正樹, ハイブリッド形成による環状一本鎖 DNA 作製手法の検討, 帝人 21 世紀フォーラム, (2008) 40, 裾野市。
- ④ 丸岡有記子, 安達泰治, 須長純子, 北條正樹, アクチンフィラメントとリポソームの *in vitro* 再構成条件の検討, 日本機械学会バイオフィロンティア講演会, 講演論文集, 07-35 (2007) 87-88, 福岡市。
- ⑤ 紀平佑毅, 安達泰治, 須長純子, 北條正樹, ハイブリッド形成による環状一本鎖 DNA 作製手法の検討, 日本機械学会バイオフィロンティア講演会, 講演論文集, 07-35 (2007) 79-80, 福岡市。
- ⑥ Taiji Adachi, Biomechanics of Actin Cytoskeleton: In vitro and in silico studies, The 2<sup>nd</sup> International Conference on Mechanics of Biomaterials & Tissues (2007), Keynote Speaker, Hawaii.
- ⑦ 植田充彦, 丸岡有記子, 安達泰治, 須長純子, 北條正樹, ジャイアントリポソーム内でのアクチンタンパク質の機能発現, 日本機械学会関西支部第 82 期定時総会講演会講演論文集, 74-1 (2007) 7-16, 大東市。

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：単量体環状一本鎖 DNA および多量体環状一本鎖 DNA の形成比率を制御する方法  
発明者：安達泰治, 須長純子, 紀平佑毅, 安室 怜, 北條正樹

権利者：独立行政法人理化学研究所

種類：特許

番号：特願：2008-092415 (2008.3.31)

国内外の別：国内

### 6. 研究組織

(1)研究代表者

安達 泰治 (ADACHI TAIJI)

京都大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：4 0 2 4 3 3 2 3

(2)研究分担者

北條 正樹 (HOJO MASAKI)

京都大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：7 0 2 5 2 4 9 2