

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2010

課題番号：20241029

研究課題名（和文）耐熱性周期骨格DNAアレイを用いた大規模二次元非周期パターンの構築

研究課題名（英文）Construction of large-scale two-dimensional aperiodic address-space patterns on heat-resistant periodic DNA arrays

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

研究成果の概要（和文）： DNA分子の鎖を自己集合させて構築したDNAナノ構造体は、ナノデバイスや機能性材料をつくるために、非常に小さな部品をナノスケールの精度で制御して配置するための足場として期待されている。我々は、耐熱性周期構造をもつDNAタイルアレイの上に大規模な二次元非周期のアドレス空間パターンを備えたDNAナノ構造体の足場をプログラマブルに構築する方法の開発を行った。

研究成果の概要（英文）： For the production of nano-devices and functional materials DNA nanostructures constructed by self-assembly of DNA strands are promising scaffolds to control positioning of very small parts with nanometer-scale precision. We have developed a method for programmable construction of DNA scaffolds that have large-scale two-dimensional aperiodic address-space patterns on heat-resistant periodic DNA tile arrays.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	26,300,000	7,890,000	34,190,000
2009年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2010年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
年度			
年度			
総計	38,700,000	11,610,000	50,310,000

研究分野： 生物物理学

科研費の分科・細目： ナノ・マイクロ科学 ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード： DNAナノテクノロジー、DNAデバイス、DNAアレイ、セルフアセンブリ、ナノテクノロジー、ナノデバイス

## 1. 研究開始当初の背景

相補的塩基対結合に基づくDNA分子鎖同士の結合は、その塩基配列によりかなりのところまで設計が可能である。WinfreeとSeemanらはこのことに着目して、DNA分子鎖からつくられた超微小なタイルをボトムアップに自己集合させてDNAタイルアレイを構築できることを示した。この研究が1998年にNature誌に発表されて以来、DNA分子鎖のボトムアップ的な自己集合を利用して、様々な形の

DNAナノ構造体が構築されてきた。このようなDNAナノ構造体は、センサーや電子回路などのデバイスを作る際に、ナノスケールの大きさをもつ微小な部品をボトムアップ的に配置させるための「足場(scaffold)」として有用であることが提案された。実際、十字型をした16種類のDNAタイルを自己集合させてつくった足場を用いてタンパク質分子をボトムアップ的に配置することにより、「D」と「N」と「A」という文字をナノスケール

の大きさで描くことが Park らにより行われ、2006 年に Angew. Chem. 誌に発表された。また、同じ年、Rothemund による DNA オリガミの研究が Nature 誌に発表された。これは、200 から 300 のステイプルと呼ばれる短い DNA を用いて、M13 ゲノムの一本鎖 DNA を折りたたむことにより、様々な二次元パターンをボトムアップ的に形成する技術である。これらの研究により、DNA ナノ構造体の足場を利用して自在にナノ部品をボトムアップ的に配置して、デバイスや機能性材料を作製する DNA ナノテクノロジーが大きな注目を集めることになった。

DNA タイルをボトムアップ的に自己集合させてつくる足場は、周期的に配置された格子点を基にして構成される二次元のパターンしかつくれないが、異なる種類の DNA タイルでも、粘着末端の部分を除いてかなりの部分が共通であるため、新たなパターンの足場をつくる時に新規に合成する DNA 分子鎖の数を抑えることができる利点をもつ。一方、DNA オリガミでつくる足場は、新たなパターンの足場をつくる度に多数のステイプル DNA 分子鎖を新規に合成しなくてはならないが、つくることができる二次元パターンの自由度は高い利点をもつ。しかし、いずれの方法も 100 nm を越える大きな足場をつくることは難しいと考えられた。DNA タイルの足場の場合、目的の二次元パターンの足場をつくるために、複数の種類の異なる DNA タイルを自己集合させると、粘着末端の配列が異なるために歪みが生じ、アレイの平面性が失われてしまう。実際、Park らが「DNA」の文字を描く際、隣り合う DNA タイルの歪みが互い打ち消しあうように 16 種類の DNA タイルを選別して足場をつくっている。歪みは粘着末端の DNA 配列から完全に予測できるわけではないので、多数の DNA タイルを用いて、さらに大きな足場をつくることは容易ではない。一方、DNA オリガミの足場の場合、その大きさは骨格として用いる一本鎖 DNA の長さで決まってしまう。より大きな足場をつくるためにはさらに長い一本鎖 DNA が必要であるが、M13 のゲノム DNA よりも長い一本鎖 DNA を調製することは至難の業である。

## 2. 研究の目的

工学的に有用な DNA ナノ構造体の足場は、ナノスケールの緻密さをもち、しかもマイクロメートルの広がりをもつことが求められる。足場を用いてボトムアップ的にナノ部品を配置してつくられたナノデバイスを、トップダウン的なリソグラフィによりつくられたマイクロメートルの構造体の中に組み込むことによりデバイスを作製するからである。しかし、研究の背景で述べたように、DNA タイルによる方法、DNA オリガミによる

方法、いずれの方法もこのような特質をもつ足場をつくるのが難しい。そこで、本研究では、DNA タイル、DNA オリガミ、それぞれの利点を取り入れた新しい方法を考案して、ナノスケールの緻密さをもち、しかもマイクロメートルの広がりをもつことができる、任意の二次元アドレス空間パターンでナノ部品を配置することができる DNA ナノ構造体の足場を、ボトムアップ的に構築する方法を開発する。

## 3. 研究の方法

ボトムアップ的にナノ部品を配置するための二次元パターンをつくるために、粘着末端の配列が異なる複数種類の DNA タイルを用いて足場をつくと、DNA タイルアレイの歪みの補正ができないために足場の平面性が失われ、ナノスケールの広がりをもつ足場をつくることができない。この歪みの問題を解決する一つの方法は、平面性の良い同じ種類の DNA タイルを用いて足場をつくることである。しかし、それでは任意の二次元パターンでナノ部品を配置するための足場はできない。そこで、図 1 のように、共通のタイル骨格部分と、そこから突き出した、ナノ部品を配置するための DNA タグをもつ DNA タイルを用いて足場をつくることにした。DNA タグは、ナノ部品に付けた DNA アンチタグと塩基配列特異的に結合することにより、ナノ部品の足場上の位置を指定する役割をもつ。したがって、この DNA タグの二次元配置により、ナノ部品を配置するための二次元アドレス空間パターンをつくることができる。

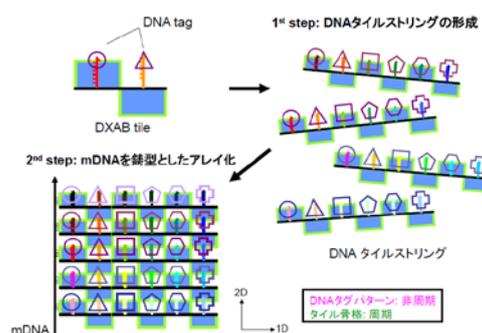


図 1

指定した二次元パターンで DNA タイルアレイ上に DNA タグが配置された DNA ナノ構造体は、図 1 のように、2 種類の mDNA を用いて DNA タイルを自己集合させることにより作製する。一次元目の mDNA は、DNA タイルが一次的に連結された DNA タイルストリングに沿っての DNA タグの順序を指定するためのものである。二次元目の mDNA は、種類の異なる DNA タイルストリングを並べる順序を指定する役割をもつ。これら 2 種類の mDNA により

DNA タグの二次元配置を指定して、任意の二次元パターンでナノ部品を配置するための足場となる DNA ナノ構造体を構築する。この DNA ナノ構造体は、骨格部分は周期構造をもつ耐熱性 DNA アレイであり、その表面に DNA タグが非周期の二次元パターンで配置された構造をもつ。

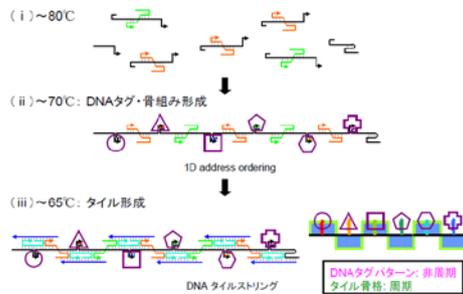


図 2

長い一本鎖の mDNA を使わないで大きな足場をつくるために、短い一本鎖 DNA を連結して長い mDNA の役割を実現する。図 1 のようにして DNA タイルや DNA タイルストリングを並べてマイクロメートルスケールの足場をつくらうとすると、塩基配列の異なる数 kb の一本鎖 DNA が必要になる。このような DNA を調製することは難しい。そこで、カスタム合成が可能な短い一本鎖 DNA だけを用いて長い mDNA をつくることにした。このような mDNA を用いて DNA タグの順序を指定して DNA タイルストリングをつくる方法を図 2 に示した。

足場の骨格となる DNA タイルとしては、Tagawa と Suyama らによって開発された、フォトライゲーション可能な DXAB タイル (Nucleic Acids Res. 2007) を用いることにした。この DXAB タイルは平面性の高い、マイクロメートルの広がりをもつ DNA タイルアレイを形成する。また、粘着末端部分に 5-carboxyvinyll-2'-deoxyuridine (CVU) を有するので、360 nm の UV を照射することにより DNA タイル同士を共有結合で連結して耐熱性を向上させることができる。DNA タグと DNA アンチタグの結合によりナノ部品を配置させる際、温度を上げる必要がある場合がある。そのような場合や小さな足場の安定性を高める上で、フォトライゲーションにより耐熱性が高められる DXAB タイルは有効である。

足場の骨格である DXAB タイルアレイの耐熱性をさらに向上させるために、粘着末端部分に 3-cyanovinylcarbazole nucleoside (CNVK) をもつ DXAB タイルを調製する。CVU を用いると、DNA 二重らせんの同じ側にある DNA 鎖同士がフォトライゲーションされる。それに対して、CNVK を用いると、DNA 二重らせんの反対側にある DNA 鎖同士をフォトクロスリンクできる。したがって、CNVK の方が CVU よ

りも大きな耐熱性の向上が期待できる。

足場の骨格である DXAB タイルアレイの構造が、ナノスケールでどの程度の緻密性と周期性をもっているかを調べるために、液中観察が可能な FM-AFM を使用した。FM モードの AFM はタッピンモードの AFM より、より高分解能の構造の観察が可能である。

#### 4. 研究成果

図 1 と図 2 に示した方法により、粘着末端に CVU を導入した DXAB タイルアレイを用いて、大きさが 100 nm 程度の足場の構築を行った。構築した足場を AFM で観察したところ、図 3 に示したように、設計した形と大きさをもつ足場の DNA ナノ構造体が観察された。しかし、多くの構造体は DNA タイルストリングの束が途中に入り込み、二次元の周期骨格構造が乱されていた。一次元目の mDNA を用いて DNA タイルストリングを形成した直後の構造を AFM で観察したところ、長さの揃った DNA タイルストリングの束と考えられる構造が多数観察されたことから、mDNA を用いた DNA タイルストリングの構築は図 2 に示した方法で実現できたと考えられる。しかし、二次元目の mDNA を用いて DNA タイルストリングを並べる反応において、実験可能な範囲で mDNA の濃度を高めても、DNA タイルストリング(あるいはストリングの束)同士が共通の粘着末端で結合する反応よりも mDNA に DNA タイルストリングが結合する反応が十分に速く進むような条件が実現できず、多くの構造体で DNA タイルストリングの束が途中で挿入されることになったと考えられる。

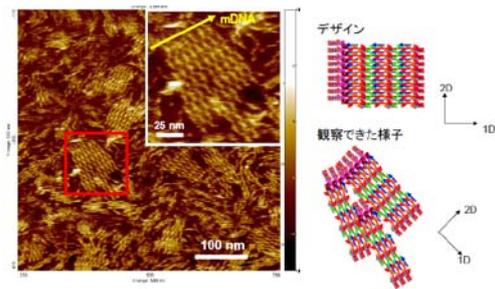


図 3

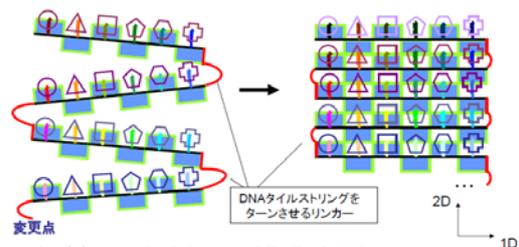


図 4

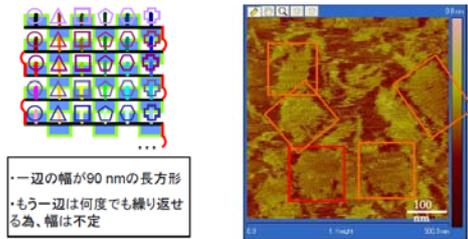


図 5

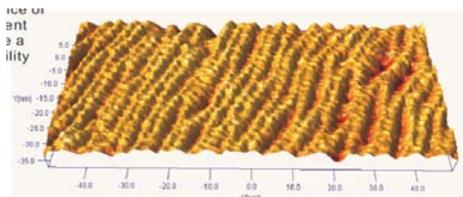


図 6

DNA タイルストリングの束が途中に入り込む問題を解決するために、タンパク質のβシートの形成過程に学び、図 4 のように、DNA タイルストリングに沿って周期的にターンを導入して、長い DNA タイルストリングを折りたたむ方法を試すことにした。形成された構造体を AFM で観察したところ、図 5 のように、ターンの周期に対応した幅をもつ DNA ナノ構造体が観察された。しかし、そのような構造体の形成収率はかなり低いことがわかった。これは、ターンの向きがランダムに近く、その向きが交互に反対向きになるわけではないからであることがわかった。mDNA を用いて DNA タイルストリングに沿って並ぶ DNA タイルの DNA タグの順序を指定できるように、ターンの向きも交互になるように DNA タイルストリングをつくることは可能である。このようにすることで、周期骨格をもつ非周期二次元パターンを足場を効率よく構築できるようになると考えられる。

粘着末端に CNVK を導入した DXAB タイルにより、足場の周期骨格である DXAB タイルアレイの耐熱性が CVU を導入したものよりさらに向上するか否かを調べた。AFM で構造を観察することにより、周期骨格が熱変性により壊れる温度を調べたところ、フォトクロスリンクされる CNVK の方が 10°C 以上、耐熱性が向上することがわかった。

FM-AFM を用いて、粘着末端に CNVK を導入した DXAB タイルからなる耐熱性周期骨格の構造を調べたところ、図 6 のように、DNA ナノ構造体中の DNA 二重鎖の像を観察することに成功し、骨格構造の詳細が明らかになった。DNA タイルのレベルでは周期性が十分によく

見える DXAB タイルの周期骨格の中に、2つの大きなドメイン構造が存在するところがわかった。このように DNA ナノ構造体の詳細な構造を観察できる FM-AFM は、今後、DNA ナノテクノロジーにおいて有力な手段になると考えられる。

## 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 6 件)

- ① M. Tagawa, K. Shoda, K. Fujimoto, A. Suyama, Rigid DNA scaffolds stabilized by photo-cross-linking reaction.、Small (to be submitted)、査読有、2011
- ② S. Tanaka, M. Tagawa, K. Suzuki, S. Kitamura, A. Suyama, AFM imaging on DNA double strands in DNA nanostructures, Nano Letter (to be submitted)、査読有、2011
- ③ Y. Yoshimura, H. Okada, K. Fujimoto、Photoreversible DNA end capping for the formation of hairpin structures, Organic & Biomolecular Chemistry、査読有、Vol.8, 1523-1526, 2010
- ④ Y. Yoshimura, H. Okada, K. Fujimoto、A new approach for reversible RNA Photocrosslinking reaction application to sequence-specific RNA selection、ChemBioChem、査読有、Vol.8, 1473-1476, 2009
- ⑤ M. Tagawa, K. Shohda, A. Suyama、Programmable self-assembly for the construction of aperiodic address space on heat-resistant periodic DNA array, Proceeding of The 5<sup>th</sup> Annual Conference on Foundation of Nanoscience : Self-assembled Architectures and Devices、査読有、152-153, 2008
- ⑥ Y. Yoshimura, K. Fujimoto、Ultrafast reversible photo-cross-linking reaction : Toward in situ DNA manipulation, Organic Letters、査読有、Vol.10, 3227-3230, 2008

[学会発表] (計 7 件)

- ① A. Suyama、Autonomous molecular computer with DNA and RNA put in the right place, 16th International Conference on DNA Computing and Molecular Programming, June 16, 2010, Hong Kong, China
- ② K. Ara, M. Tagawa, K. Shoda, K. Fujimoto, A. Suyama、Non-periodic and large-scale two-dimensional nano-patterns constructed on periodic DNA tile arrays, 第 48 回日本生物物理学会年会、2010 年 9 月 21 日、仙台
- ③ S. Tanaka, M. Tagawa, K. Suzuki, S. Kitamura, A. Suyama、AFM Imaging on Double Stranded Structures of

Algorithmically Assembled DNA Tiles in Liquid, 18th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy, 2010年12月10日、伊豆熱川

- ④ A. Suyama, Autonomous DNA computer and its application to genetic diagnosis, gene network, Ecole de Physique des Houches – Physics of DNA Assembly, May 4-8, 2009, Les Houches, France
- ⑤ 藤本健造、光応答性を有する核酸誘導体によるプログラマブルなナノシステムの創製、高分子討論会 2009、2009年9月17日、熊本
- ⑥ 田川美穂、大谷直、庄田耕一郎、陶山明、ナノ部品のプログラム可能なセルフアセンブリのための二次元 DNA アレイの構築、第46回日本生物物理学会年会、2008年12月3日、福岡
- ⑦ A. Suyama, Nanodevice gene, 4<sup>th</sup> Handai Nanoscience and Nanotechnology International Symposium, September 30, 2008, 大阪

## 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

### (2) 研究分担者

藤本 健造 (FUJIMOTO KENZO)  
北陸先端科学技術大学院大学・マテリアルサイエンス研究科・教授  
研究者番号：90293894