

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20750126

研究課題名（和文）RNA の単分子発現解析をめざしたナノ構造体の構築と AFM 観察

研究課題名（英文）Construction of DNA Nanostructures for Single Molecule Expression Analyses

研究代表者

葛谷 明紀 (KUZUYA AKINORI)

東京大学・大学院工学系研究科・助教

研究者番号：00456154

研究成果の概要（和文）：長鎖の一本鎖 DNA を折りたたんで自在な二次元ナノ構造体を作成する DNA Origami の技術を応用し、ナノメートルサイズのウェルが複数組み込まれた 200 nm x 35 nm の棒状ナノ構造体の作成を行った。ウェルの中にデオチンを 2 分子修飾することで、構造体内の全てのウェルを区別しながら、望みの位置、数のウェルのみToStrеп्टアビジンを取り込み、従来にない精密、かつ強固なタンパクナノアレイの作成に成功した。

研究成果の概要（英文）：We have designed and prepared a stick-like DNA origami with 9 periodical nanoscale wells that can accommodate exactly one guest molecule such as proteins per well, and successfully prepared streptavidin nanoarrays of desired patterns.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：DNA・ナノ構造体・タンパク・ナノアレイ・ストレプトアビジン・ナノテクノロジー

## 1. 研究開始当初の背景

今日までの医学、生物学研究の発展により、転写因子や短鎖 RNA など、細胞の中で生命活動の調節を担っている様々な生体分子の働きが明らかとなってきた。今後はこれらの調節機構が如何に作用しているか、特に個々の細胞に関して調べていくことが重要となると予想される。しかしながら PCR で増幅することができる核酸を調べる場合を除き、

検出感度の制限から、どうしてもこれまでの研究の対象は多数の細胞からなる集団とせざるを得なかった。同じような問題は医療の分野にも存在し、診断に際して患者への負担をできるだけ減らすためには、検査に使用する検体の量は少なければ少ない程よいと考えられる。このように、単分子レベルでの生体分子検出技術の開発が急務となっていた。

## 2. 研究の目的

DNA 2重らせんを複数本束ねて、ナノメートルオーダーのシート状の構造を自在に組み上げることができる DNA ナノテクノロジーの技術を活用して、RNA を一分子レベルで検出する技術の開発を目指す。特に長鎖の一本鎖 DNA を折りたたんで自在な二次元ナノ構造体を作成する DNA Origami の技術を利用する。

## 3. 研究の方法

まず DNA Origami の技術を活用したナノ構造体の設計法およびその調製、さらには AFM によるイメージング法を習得、確立するため、ナノメートルサイズのウェルが複数組み込まれた 200 nm x 35 nm の棒状ナノ構造体の作成を行った。これまで当研究室の研究により、9本の DNA を束ねた U字型のタイルを作成し、これを一次元に配列化させることで幅約 40 nm のテープ状のナノ構造体の中に 10 nm 角のウェルを等間隔に作成することに成功している。さらにこのウェルの中にビオチンを 2分子修飾するとサイズ選択的にちょうど 1分子のストレプトアビジンタンパクが取り込むことができ、タンパクナノアレイの作成が可能であることが確認されている。このナノ構造体を DNA Origami に置き換えることで、構造体内の全てのウェルを区別し、望みの位置、数のウェルのみにもストレプトアビジンを取り込み、従来にない精密、かつ強固なタンパクナノアレイの作成を目指した。加えて、ウェル内で RNA/2'-OMe RNA 2本鎖を形成させることで、ウェルに RNase H を結合させ、このタンパクを AFM でイメージングすることにより、特定の RNA の存在を検知するシステムを検討した。

また RNA の配列選択的切断技術に関しても、さらに改良をすすめた。

## 4. 研究成果

作成した 9つのナノメートルサイズのウェルを有する DNA Origami に関して、ウェル内部へのナノメートルサイズのゲストの取り込みと、ナノアレイ化を検討した。まず狙ったウェルだけにビオチン修飾を施したところ、これらのウェルにのみ選択的にストレプトアビジンを一分子ずつ取り込むことに成功した。さらに、異なるパターンでビオチン修飾した 2種類の Origami 分子をつなぎ合わせることで、ストレプトアビジンの二次元アレイの作成にも成功した。ウェルの内部に取り込むことができるゲストはタンパクにとどまらず、ウェルの両末端をチオール修飾することで、5 nm の金微粒子を一つずつウェルの中に取り込むことにも成功した。ウェルごとに施す化学修飾を変えることで、タンパクと金微粒子が交互に並んだヘテロナノアレ

イの構築にも成功した。また、ビオチン修飾を施した DNA に toehold と呼ばれる突出部を設けることで、選択的な鎖置換反応を介して、狙ったストレプトアビジンをナノアレイから抜き取ることも成功した。ウェル内での RNA 観察については、RNase H との結合が十分でなかったためか、はっきりとした AFM 像を確認することはできなかった。

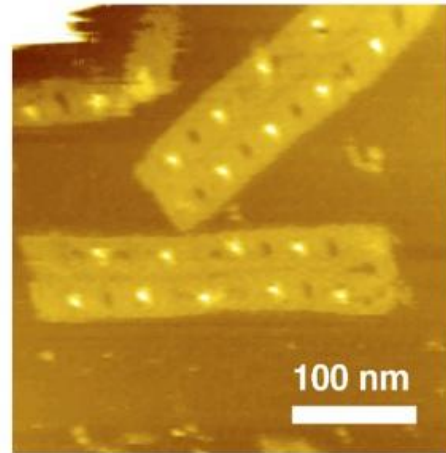


図1 DNA Origami 上に作成した 2次元ストレプトアビジンナノアレイ

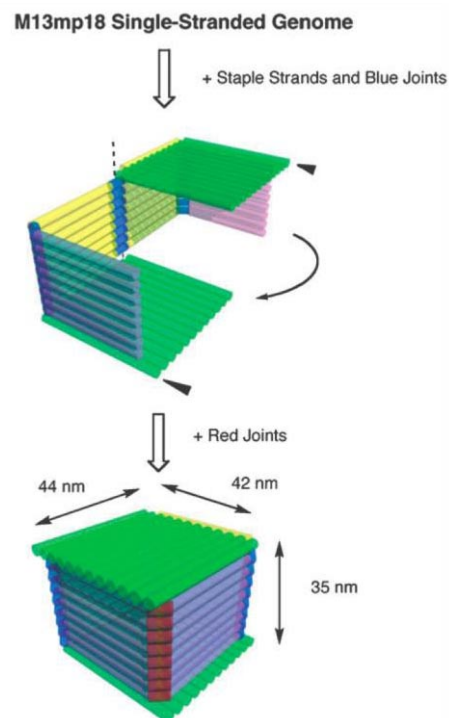


図2 DNA Origami で作成した箱形三次元ナノ構造体のデザイン。将来的なゲスト分子の内包を指向して、まず一段階目で開いた構造を形成し、適切な DNA 鎖をあとから加えることで、閉じた箱形に変化するような工夫を施した。

また三次元の DNA Origami の作成について

も検討し、2段階で箱形に折りたたまれる DNA Origami のデザインと実際の作成を行った。AFM 観測により、開いた構造、閉じた構造の両方が確認され、設計通り2段階の折りたたみ機構が動作していることが明らかとなった。この研究はほぼ同時に発表された世界初の立体 DNA origami の1つとして、Chemical Communication 誌の Hot Paper に選ばれ、英国王立化学会の Highlights in Chemical Science 誌で採り上げられた。

RNA 切断に関しては相補的 DNA に結合したアクリジンによる RNA の活性化機構が、プロトネーションした環内窒素による酸触媒効果によるという過去の知見に基づき、3-位にニトロ基を有するアクリジンを基礎に7位の置換基を様々に変えたところ、従来高い RNA 活性化能を示していたメトキシ基よりも、さらにかさ高いイソプロトキシ基やエトキシ基がより RNA を活性化することを見だし、より迅速な RNA の配列選択的切断活性の実現に成功した。

#### 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. Akinori Kuzuya, and Makoto Komiyama, "DNA Origami: Fold, Stick, and Beyond", *Nanoscale*, **2010**, 2, 310-322. 査読有
2. Akinori Kuzuya, Fuminori Okada, and Makoto Komiyama, "Precise Site-Selective Termination of DNA Replication by Caging The 3-Position of Thymidine and Its Application to Polymerase Chain Reaction", *Bioconjugate Chem.*, **2009**, 20, 1924-1929. 査読有
3. Akinori Kuzuya, and Makoto Komiyama, "Design and Construction of a Box-Shaped 3D-DNA Origami", *Chem. Commun.*, **2009**, 4182-4184. 査読有
4. Akinori Kuzuya, Mayumi Kimura, Kentaro Numajiri, Naohiro Koshi, Toshiyuki Ohnishi, Fuminori Okada, and Makoto Komiyama, "Precisely Programmed and Robust 2D Streptavidin Nanoarray Using Periodical Nanometer-Scale Wells in DNA Origami Assembly", *ChemBioChem*, **2009**, 10, 1811-1815. 査読有
5. Akinori Kuzuya, Yun Shi, Keita Tanaka, Kenzo Machida, and Makoto Komiyama, "Efficient Site-selective RNA Activation and Scission Achieved by Geometry Control of Acridine Intercalation in RNA/DNA Heteroduplex", *Chem. Lett.* **2009**, 38, 432-433. 査読有
6. Akinori Kuzuya, Kentaro Numajiri, Mayumi Kimura, and Makoto Komiyama, "Single-Molecule Accommodation of Streptavidin in Nanometer-Scale Wells Formed in DNA Nanostructures", *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **2008**, 52, 681-682. 査読有

[学会発表] (計8件)

1. 葛谷, 明紀, DNA Origami による箱形三次元 ナノ構造体の作成、日本化学会第90春季年会、2010.3.29、近畿大学
2. 葛谷, 明紀, DNA origami を足場にした機能性ナノマテリアルの選択的固定化、計測自動制御学会 システム・情報部門学術講演会 2009、2009.11.26、東京工業大学
3. 葛谷, 明紀, DNA ナノ構造体に組み込んだナノメートルサイズのウェルへのゲスト分子の選択的取り込み、第58回高分子討論会、2009.9.18、熊本大学
4. 葛谷, 明紀, DNA origami によるナノメートルサイズの箱の作製、第24回生体機能関連化学シンポジウム、2009.9.14、九州大学
5. 葛谷, 明紀, ナノメートルサイズのウェルを組み込んだ DNA origami の構築とゲスト分子のサイズ選択的取り込み、第24回生体機能関連化学シンポジウム、2009.9.13、九州大学
6. KUZUYA, Akinori, Streptavidin nanoarray formed on a tape-like DNA nanostructure equipped with nanometer-sized wells, FNANO2010、2009.4.22、Snowbird, Utah, USA

7. 沼尻, 健太郎、DNA で作ったナノメートル空間内におけるストレプトアビジンの選択的 DNA 修飾、日本化学会第 89 春季年会、2008.3.30、日本大学理工学部
8. 葛谷, 明紀、ナノメートルサイズのウェルを複数組み込んだ DNA Origami の構築とタンパクナノアレイ作成への応用、日本化学会第 89 春季年会、2008.3.30、日本大学理工学部

[その他]

ホームページ等

<http://www.mkomi.rcast.u-tokyo.ac.jp/member/kuzuya.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

葛谷 明紀 (KUZUYA AKINORI)  
東京大学・大学院工学系研究科  
研究者番号：00456154

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：