

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650157

研究課題名(和文)タンパク質翻訳機構を模したプログラマブルな動的ナノ反応場の創製

研究課題名(英文)Construction of a programmable and dynamical reaction field inspired by biosynthesis

研究代表者

小宮 健(Komiya, Ken)

東京工業大学・総合理工学研究科(研究院)・助教

研究者番号：20396790

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は、DNAの自己会合と酵素反応を組み合わせることで構築した自律歩行型のDNAウォーカーを利用し、多段階の重合反応を自律的に実行する動的ナノ反応場を実現することを目的とする。初年度には、吸光度測定や蛍光観測、電気泳動実験などにより、適切なDNA配列長や、DNAウォーカーの歩行性能を向上させる酵素等についての知見を得た。二年度目は、合成の効率や汎用性を向上させる上で、DNAzymeを用いてより柔軟な反応条件下での動作が可能であることを示した。今後これらの成果を融合し、塩基配列で動作をプログラムできる汎用の動的ナノ反応場の構築を行っていく。

研究成果の概要(英文)：In this research project, construction of a dynamical reaction field at a nano-meter scale was investigated by taking advantage of an autonomous walking device, consisting of a set of DNA strands and an enzyme, for achieving autonomous implementation of a multi-step polymerization reaction. We revealed the optimal length of DNA sequences and the appropriate enzymes that could improve the walking performance of the device, via absorbance measurement, fluorescence measurement and electrophoresis. In addition, we revealed the use of DNAzyme is preferable for improving the efficiency and flexibility in synthesis reaction. Currently, construction of a programmable and dynamical reaction field at a nano-meter scale is under further investigation by integrating the obtained knowledge.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：情報学・生体生命情報学

キーワード：DNAコンピュータ DNAナノテクノロジー ナノマシン ナノ反応場 ニッキング酵素 DNAウォーカー DNAzyme

1. 研究開始当初の背景

(1) DNA 分子が配列特異的にハイブリダイゼーションする能力を利用して、活性化した反応物を 1 分子ずつ鋳型 DNA 上で接近させて実効濃度を高め、選択的かつ高収率な合成反応を実現する「DNA 鋳型有機合成 (DNA-Templated Organic Synthesis)」と呼ばれる手法が開発されている (X. Li *et al.*, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2004)。この手法を用いれば、非特異的には重合反応が起こらない低濃度の反応物の溶液中で、DNA の塩基配列により指定した組み合わせの反応物間でのみ重合を行わせることができる。DNA 鋳型有機合成によれば、従来手法では必須である、反応を行う前に保護基で修飾してから反応を行わせて反応後に再び脱保護するという、多大な労力を要する上に環境負荷の大きな試薬を用いるルーチン作業を行う必要がなく、精密な重合反応を行うことができる。

(2) しかし、反応物の接近を多段階に行うための方法論が存在しないため、現状は 3~4 段階の重合反応を行うのが限界となっている。研究代表者はこれまで、DNA のハイブリダイゼーションを酵素反応と組み合わせることで、DNA 構造体に多段階の構造変化を行わせる DNA ナノマシン研究を行ってきた。そのなかで、動作を塩基配列でプログラムできる自律歩行型の「DNA ウォーカー」を開発した (Sekiguchi *et al.*, *Natural Computing*, 2008)。この DNA ウォーカーを移動するナノ反応場として用いることで、複数の反応物を指定した順で多段階に接近させて、多段階の重合反応を精密に実行する合成反応場が実現できることに思い至った。

2. 研究の目的

(1) 多段階に動作し、その動作を塩基配列でプログラムできる動的な合成反応場を創製して、従来の有機合成手法では実現できない、保護基を用いずに行える環境低負荷な多段階重合反応の実現を目的とする。また、本研究のナノ反応場により、異なる重合順を指定する塩基配列を持った DNA 分子を投入すれば、同じ反応物を含む溶液に対し、同一の様式で異なる分子を自動的に合成できることを明らかにする。その結果、生物の合成機構のように環境低負荷で精密な多段階重合を、分子が自動的に行う汎用の合成手法の実現を目指す。

(2) 本研究は、生物の合成機構に着想を得て、反応物の実効濃度を制御することで多段階の精密な重合反応を実現するものである。申請者が開発した DNA ウォーカーを、移動するナノ反応場として用いるというアイデア、すなわち反応物ではなく合成が起こる反応

場の方が移動するという独創的なアイデアによって、生物の合成機構に匹敵する高度な機能を備えた反応場の創製に挑戦する。実際に構築する動的ナノ反応場は、分子の相互作用にもとづいて機能性システムを一から組み上げる研究としては、他に類をみないレベルの複雑な多段階動作の実現を目指すものである。

(3) これまで、単純な動作を行う分子デバイスは数多く報告されているが、それらをシステム化して複雑な動作をさせるための方法論は確立されていなかった。本研究では、他の機能性システムの構築にも活用できる方法論の確立に資するため、DNA という配列特異的かつ同一の様式で結合する特性を持った分子を用いてシステム構築を行う。

3. 研究の方法

(1) 本研究のポイントは、DNA の配列特異的なハイブリダイゼーションを利用してシステムを構築することで、配列 (遺伝型) とシステム機能 (表現型) を対応づけていることである。この着想によって、配列を変更するだけでシステムの動作を任意に変更することを可能にしており、多段階の重合反応を塩基配列という「デジタルな情報」でプログラムすることができる。溶液中に膨大な個数存在する分子が行う反応を、あらかじめ配列でプログラムすることで制御するという新しい原理により、複雑な動作を分子に自律的に実行させるシステムを実現するものである。これまで生物にしかできないと思われていた高度な動作を、分子を用いて人工的に構築したシステムによって実現できることを実証する。

(2) 従来の有機合成手法では不可能な、精密に制御された多段階重合を行う生物の合成機構の本質を再現するため、次の要件をみだす反応システムを設計する。反応物を適切な順番で配置するための鋳型を利用する。鋳型には反応物の配置を指定する配列があり、アダプターを介して反応物を精密に配置する。鋳型上に配置された反応物をナノマシンが接近させることで重合反応が起こり、その生成物をナノマシンが輸送してさらに次の反応物に接近させることで次段階の重合反応が起こる、というプロセスを繰り返す。

(3) 上記の要件をみだす合成用のナノ反応場を、「鋳型 DNA」、反応物を連結した「アダプター-DNA」、アダプター-DNA を鋳型 DNA に結合するための「固定子 DNA」、および DNA ウォーカーと DNA ウォーカーの歩行に必要なニッキング酵素を用いて構築する。ニッキング酵素によって切断反応が起こると、切断されたアダプター-DNA の二本鎖部

分の安定性が下がって一部が解離する。すると、DNA ウォーカの本鎖として露出した部分に、隣接するアダプターDNA が結合して鎖置換反応が始まる。その際に、アダプターDNA に連結した反応物が接近して重合反応が起こり、DNA ウォーカは中間生成物を輸送して隣のアダプターDNA へと移動する。以上のプロセスを繰り返して、多段階の重合反応による合成を実行する。

(4) 以下、具体的な研究の方法を述べる。初年度にはまず、鑄型 DNA、アダプターDNA、固定子 DNA の配列を設計する。本研究のナノ反応場は、鑄型 DNA 上に配列にしたがって固定子 DNA がハイブリダイゼーションし、そこにさらに反応物が結合したアダプターDNA がハイブリダイゼーションすることで、反応物を正確に配置する必要がある。そのため、使用する DNA 配列には高い結合特異性が求められる。研究代表者は DNA ナノマシン研究において同様の配列設計を行ってきており、熱力学的パラメータを予測して適切な DNA 配列を設計する。反応物の配置にしたがった順番で多段階の重合反応が進行するナノ反応場の構築に向けて、重合反応の段数に応じた数の鑄型 DNA およびアダプターDNA の配列を設計する。なお、固定子 DNA とアダプターDNA の結合部位については、鑄型 DNA と結合させる前にあらかじめ結合させて用いることで、共通の配列を利用する計画である。設計した配列を持つ DNA のセットを用いてハイブリダイゼーションさせ、「鑄型 DNA-固定子 DNA-アダプターDNA 複合体」が正しく形成されることを、蛍光修飾基の間で起こる消光などを観測して確認する。

(5) また、DNA ウォーカの自律歩行にともなう多段階重合による合成反応を行うのに適した、DNA ウォーカの歩行性能について検討を行う。研究代表者は、アダプターDNA を切断しながら自律歩行する DNA ウォーカを既に開発している。本研究課題では、高効率な合成反応を実現するために、DNA ウォーカの適切な歩行速度等を検討する。歩行速度は溶液の組成や使用するニックング酵素の種類や濃度、および DNA ウォーカとアダプターDNA が結合する部分の配列長などの反応条件によって調整することができる。はじめに 3 段階程度の歩行実験を行い、得られた生成物の収率や選択性を定量的に評価し、適切な歩行速度を実現する反応条件を確定する。

(6) 二年度目には、初年度の知見にもとづいてより詳細な実験を行い、反応の効率化や高速化に取り組む。特に、歩行反応に用いる酵素と重合反応が互いに阻害しないための条件を検討し、多様な合成反応を可能にするために、より柔軟な反応条件下でのシステム動

作を可能にする手法を考案する。以上の検討により、DNA 配列によって反応物の並び順を変えたナノ反応場では、同一の反応物を含む溶液に対してそれぞれ異なる生成物が合成され、多段階重合反応のプログラミングができることを実証し、配列とシステム機能を反映した合成物が対応づけられる、汎用の合成用反応場を実現する。

4. 研究成果

(1) 初年度には、DNA の塩基配列でプログラムできる人工の動的ナノ反応場において、鑄型 DNA 等の配列がみたすべき要件を明らかにし、その知見を設計に活用する目的で、動的な反応システムを構築する検討実験を実施した。その結果、適切な配列長や使用する酵素について、DNA ウォーカの歩行性能を向上させるための知見を得た。また、鑄型とアダプターを結合させる固定子の配列について、複数の配列セットをソフトウェアを用いて DNA ナノマシン研究と同様に設計し、生理的な温和な条件での検討実験を実施した。DNA をハイブリダイゼーションさせて、「鑄型 DNA-固定子 DNA 複合体」が正しく形成されることや、高い結合特異性と安定性が実現できることを、温度を変化させる条件のもとで行った吸光度の測定や、ハイブリダイゼーションにともなう蛍光修飾基の間で起こる消光の観測、電気泳動などの実験により確認した。

(2) 二年度目は、DNA ウォーカの歩行速度向上のための検討を実施した。前年度はナノ反応場の構築にニックング酵素を用いる設計を想定していたが、DNA ウォーカの自律歩行にともなう多段階重合によって合成反応を行うナノ反応場について、より柔軟な反応条件下での動作を可能にし、歩行速度や合成の効率および汎用性を向上させて高効率な合成反応を実現するため、DNAzyme を用いた設計に変更した。その結果、歩行の要素反応が幅広い反応条件で行えることおよび適切な条件について、電気泳動などによる実験で確認して明らかにした。また、生物の合成機構を模した高効率な人工反応システムを試験管内に実現する上で、最適な溶液環境を明らかにすることは重要である。細胞環境と類似した環境を提供すると考えられるハイドロゲルを、直鎖状ポリマーの架橋部分に導入した DNA のハイブリダイゼーションによって作成することで、本研究のナノ反応場と適合性の高い DNA 架橋ハイドロゲルを構築した。より細胞に近い環境を再現するため、マイクロサイズの DNA 架橋ハイドロゲルを作成する手法を開発した。

(3) 以上の成果は、従来の有機合成手法では不可能な、生物のように高効率な合成反応が

行える人工のナノ反応場を試験管内で再構築する上で重要な知見である。ただし、二年という短期間の検討であったため、断片的な知見を統合して目的を達成する必要がある。今後は、DNA ウォーカーのアダプター-DNA への結合・切断・解離の効率を向上させる初年度に開発した新規技術を、二年度目の成果と融合するなどして、同一反応容器中で環境低負荷な多段階重合を高効率に行える、汎用の合成用ナノ反応場の構築を行っていく。

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 0 件)

[学会発表](計 11 件)

K. Komiya,

“ Implementation of in vitro intelligence for real-time operation of molecular robots ”

第 52 回日本生物物理学会年会, 札幌市, 2014 年 9 月 27 日 (招待講演)

小宮健,

“ VEAM: 研究者と市民をつなぐ科学知識の視覚化 ”

「細胞を創る」研究会 6.0, 鶴岡市, 2013 年 11 月 14 日

北島貴司, 小宮健, 早川雅之, 森田雅宗, 瀧ノ上正浩, 山村雅幸

“ 血小板模倣システムに向けた DNA 架橋ハイドロゲルの作成 ”

「細胞を創る」研究会 6.0, 鶴岡市, 2013 年 11 月 14 日

T. Kitajima, K. Komiya, M. Hayakawa, M. Takinoue and M. Yamamura,

“ Introduction of DNA nanodevices into a hydrogel for achieving its stimuli-responsive behavior ”

第 51 回日本生物物理学会年会, 京都市, 2013 年 10 月 30 日

K. Komiya,

“ Implementation of in vitro intelligence for controlling molecular robots ”

第 51 回日本生物物理学会年会, 京都市, 2013 年 10 月 28 日 (招待講演)

T. Kitajima, K. Komiya, M. Hayakawa, M. Takinoue and M. Yamamura,

“ Construction of a DNA-based stimuli-responsive microhydrogel ”

Nineteenth International Meeting on DNA Computing and Molecular Programming (DNA19), pp. 83, Tempe, 24-25 September 2013

小宮健,

“ 分子ロボットの知能 ”

システム・情報部門 学術講演会 2012

(SSI2012), 名古屋市, 2012 年 11 月 23 日 (招待講演)

星健介, 厚美佑輔, 齋藤健, 山下仁義, 松戸里紗, 番匠康雄, 小長谷明彦, 木賀大介, 山村雅幸, 小宮健, 瀧ノ上正浩,

“ Biomolecular Rocket ”

「細胞を創る」研究会 5.0, 横浜市, 2012 年 11 月 21 日~11 月 22 日

小宮健,

“ 加法的な視覚化による科学的知識への関心の喚起 ”

「細胞を創る」研究会 5.0, 横浜市, 2012 年 11 月 21 日~11 月 22 日

小宮健,

“ 分子ロボットの実現に向けた DNA 論理ゲートの現状と課題 ”

人工知能学会合同研究会 第 51 回分子生物情報研究会 (SIG-MBI), 横浜市, 2012 年 11 月 15 日 (招待講演)

K. Komiya, A. Kobayashi and M. Yamamura,

“ Construction of a nucleic-acid-responsive DNA synthesis system for diagnostic DNA-based computing ”

第 50 回日本生物物理学会年会, 名古屋市, 2012 年 9 月 22 日

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://bio-inspired.chemistry.jpn.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小宮 健 (KOMIYA, KEN)

東京工業大学・大学院総合理工学研究科・助教

研究者番号: 20396790

(2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：