

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：34416

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24350088

研究課題名(和文) ナノメカニカルDNAオリガミデバイスを活用した汎用的単分子検出技術の開発

研究課題名(英文) Development of A General Single-Molecular Detection System Utilizing Nanomechanical DNA Origami Devices

研究代表者

葛谷 明紀 (Kuzuya, Akinori)

関西大学・化学生命工学部・准教授

研究者番号：00456154

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：長さおよそ170 nmの2本の棒状構造体が一箇所の支点で連結されてできているペンチ型のナノメカニカルDNAオリガミデバイスを活用した、研究代表者による全く独自の単分子検出法に関して、その諸性質を改良するとともに、新たな機能も開発することで、より実用的な系へと発展させた。検出対象となる生体関連分子を、原理的には最も小さい水素イオンまで広げると同時に、非天然の核酸類縁体による二重らせんへのもぐりこみなど、生体分子における特殊な結合形態を可視化するツールとして応用することにも成功した。また、構造体をより剛直な筒状とすることで、一般的な研究室の機材でもDNAオリガミの構造変化を検出できるようにした。

研究成果の概要(英文)：A single-molecular detection system utilizing our original nanomechanical DNA origami devices (DNA pliers) composed of two 170-nm long stick-like components connected to each other at a fulcrum has been applied to more practical use by improving the molecular design and nanomechanical properties. DNA pliers can now detect protons, theoretically smallest substance, as well as special binding event of bio-related molecules such as PNA strand invasion. Introduction of a tubular design enabled handy detection of structure change of DNA pliers with popularly available gel electrophoresis.

研究分野：生体超分子化学、分子ロボティクス、核酸化学

キーワード：DNAオリガミ 単分子検出 生体分子 DNAナノテクノロジー 核酸化学 分子ロボティクス

## 1. 研究開始当初の背景

近年「1つの細胞の中のどの部分でどのような遺伝子、分子が働いているのか」あるいは、「1つの細胞からどのような分子がどれだけ、どこから分泌されているか」を解析する技術の開発が求められている。しかしながら、これらを担う分子の量は当然少なく、分子の数そのものを増幅する以外、既存的手法では検出することができない。さらにタンパクなど遺伝子発現の下流の産物に至っては、今日の科学では分子の数そのものを増幅することさえ不可能である。

このような問題を解決する手段として研究代表者は最近、「検出したい個々の分子を原子間力顕微鏡 (AFM) で直接イメージングする」という、これまでにない全く新しい生体分子検出法を提案している (*Nature Commun.*, 2011, 2, 449)。多数の短い DNA を使ってあたかも織物を織るように長鎖の 1 本鎖 DNA を折り畳み、自在なナノ構造体を作成する DNA オリガミ法 (P.W.K. Rothmund, *Nature* 2006, 440, 297) を活用し、長さ 170 nm のレバー 2 本からなるペンチ状の DNA オリガミデバイス (DNA オリガミペンチ) を作成した。それぞれのレバーは 6 本の DNA 二重らせんがいかだ状に束ねられてきており、ホリデイジャンクションと呼ばれる DNA の 4 分岐構造によって連結されている。ホリデイジャンクションがある程度の柔軟性を持っていることから、この部分がこの支点として機能することで、一般的なペンチが開閉するのと同様の可動性を DNA オリガミペンチに付与する。ここで、それぞれのレバーの先端にターゲット分子と相互作用するリガンドを 1 分子ずつ導入すると、それぞれのリガンドが協同的にターゲット分子を DNA オリガミペンチに結合し、結果として DNA オリガミペンチが X 字型の開いた構造から、=記号のように閉じた構造へと大きく形を変えることを見いだした。そして、この DNA オリガミペンチが 1 分子のターゲットを「摘んで」「閉じる」構造変化を AFM で観察することで、原子量数十の金属イオンから分子量 15 万の抗体分子までの幅広い生体分子を、個々の分子レベルで検出することに成功した。この構造変化は AFM 観察のみならず、個々のレバーを蛍光色素と消光団でそれぞれ標識しておけば、溶液中でリアルタイムに観察することもできる。

## 2. 研究の目的

上記の一連の成果は高い評価を受けることができたが、実際に検出を行ったターゲット分子はいずれもモデル分子の範疇を超えてはおらず、本検出法がもつ潜在能力を全て引き出すまでには至らなかった。

そこで本研究では、上述の DNA オリガミデバイスを活用した生体分子の検出法をより汎用的、かつ実用的なものへと発展させ、生体分子の単分子解析法・操作法における、

従来の手法では実現し得なかった全く新しい技術体系を構築することを目的とした。そしてこれを実現する過程で DNA オリガミ構造体の機能化に関する知見を蓄積し、次世代のナノデバイス開発に寄与することを目指した。

## 3. 研究の方法

まず、本研究で使用するナノメカニカル DNA オリガミ構造体 (DNA オリガミペンチ) の利用法の多様化をはかった。これまでの DNA オリガミペンチを使用した検出系では、ターゲットとの結合に伴う DNA オリガミペンチの構造変化をみることで、溶液中にターゲット分子が共存していることしか検知することができなかった。これに対し、DNA 二重らせんを解離させながら潜り込み、自身の相補配列と結合するペプチド核酸 (PNA) のストランドインバージョンなど、今日数多く発見されている生体分子間の特殊な相互作用を検出するための分子設計を検討した。

DNA オリガミペンチを単なる 3 つの構造に変型するデバイスと見なし、これらの構造間で自在に変型させるための制御法の開発も試みた。2 本のレバー間をつなぐ DNA 鎖の配列を厳密に設計し、たった 4 種類の DNA 鎖を組み合わせた鎖交換反応によって、構造間を行き来できる系を構築した。

さらに、検出できるターゲットの種類も増やすことを試み、原理的には最も小さな原子である水素イオンの検出に挑戦した。具体的には、弱酸性で形成される特殊な DNA 四重鎖である i-motif 構造を DNA オリガミペンチに導入して、その構造変化を観察した。

また、ナノメカニカル DNA オリガミ構造体の構造そのもののブラッシュアップも、平行して行った。従来 DNA オリガミペンチを構成する 2 本のレバー部は、DNA 二重らせんを平行に束ねた平面構造を基礎としてきたが、これらは水溶液中での剛直性に乏しく、イメージングに際して折れ曲がったものが多々観測されてきた。そこで、平面構造では無く 6 本の DNA 二重らせんをチューブ状に束ねてできる新しいレバー部の設計を行った。

## 4. 研究成果

ナノメカニカル DNA オリガミデバイスを活用した、全く独自の単分子検出法に関して、その諸性質を改良するとともに、新たな機能も開発することで、より実用的な系へとさせた。

まず、DNA オリガミペンチのレバーを閉じる DNA 二重らせんに対してストランドインバージョンすることが知られている 2 本の擬相補的 PNA 鎖を系に加えることで、DNA オリガミペンチが選択的に開くことを確かめた。これにより、これまでゲル電気泳動度の変化からしか評価をすることができなかった PNA の特殊な結合形態を、単分子レベ

ルで明確に検出する手法を確立した。

さらに、弱酸性条件で形成される i-motif 構造を形成する DNA 鎖をそれぞれのレバーに導入し、pH 6-7 の間で形状変化する機構を構築した。これまで金属イオンからタンパクまでがカバーされていた DNA オリガミペンチの検出対象を、理論的には質量数が最も小さい水素イオン（プロトン）まで広げること成功した。

同時に、DNA オリガミデバイスの形態の判別性を改善するため、より剛直な棒状構造からなる新しい分子設計を行った。AFM により、設計通りの構造体が形成されていることを確認した後に、検出デバイスとしての機能を調査した。その結果、この新しい剛直な構造体は、「ターゲット分子を 1 分子だけ掴んで閉じる」という従来の検出手法では逆に検出効率が落ちてしまうことが明らかとなった。一方で、「あらかじめ閉じておいた構造体をターゲット分子との相互作用で開く」という、もう一つの検出手法により適した構造であることが確かめられ、「一般的な研究室にも広く普及しているアクリルアミドゲル電気泳動による DNA オリガミデバイスの構造変化の観察」という、新たな分析手段の確立にもつながった。

DNA オリガミデバイスの機能の高度化についても、2 種類のターゲットとの相互作用により、2 段階で構造変化するアロステリック酵素を模倣した新しい動作機構を考案し、その機能を実証した。さらに、ペンチ型 DNA オリガミデバイスがとりうる 3 つの形態間の構造変化もより自在に行えるようになった。従来は、異なる 2 形態間を行き来することしか出来なかったのに対し、棒状構造体間をつなぐ DNA の配列を精密に設計することで、これまでに不可能だった形態間を行き来することも可能となった。これにより、3 形態を次々に形成しているサーキット状の構造変化も実現し、DNA オリガミデバイスの分子計算素子への展開の可能性も開いた。

今後は、全反射蛍光顕微鏡などの単分子観察技術やマイクロ流体デバイスと組み合わせ、ウイルスなどのより実践的な対象の単分子検出が期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

① Maia Godonoga, Ting-Yu Lin, Azusa Oshima, Koji Sumitomo, Sze Lok Marco Tang, Yee-Wai Cheung, Andrew Kinghorn, Roderick Dirkzwager, Cunshan Zhou, Akinori Kuzuya, Julian Tanner, and Jonathan Heddle, "A DNA aptamer recognizing a malaria protein biomarker can function as part of a DNA origami assembly", *Sci. Rep.*, 査読有, 6, **2016**, 21266

② Yuexing Han, Akito Hara, Akinori Kuzuya, Ryosuke Watanabe, Yuichi Ohya,

Akihiko Konagaya, "Automatic Recognition of DNA Pliers in Atomic Force Microscopy Images", *New Generat. Comput.*, 査読有, 33, **2015**, 253-270

③ Akinori Kuzuya, Masafumi Kaino, Mirai Hashizume, Kazuki Matsumoto, Takeaki Uehara, Yasutaka Matsuo, Hideyuki Mitomo, Kenichi Niikura, Kuniharu Ijiro, and Yuichi Ohya "Encapsulation of a Gold Nanoparticle in a DNA Origami Container", *Polymer J.*, 査読有, 47, **2015**, 177-182

④ Takahiro Yamazaki, Jonathan Gardiner Heddle, Akinori Kuzuya, and Makoto Komiyama, "Orthogonal Enzyme Arrays on a DNA Origami Scaffold Bearing Size-Tunable Wells", *Nanoscale*, 査読有, 6, **2014**, 9122-9126

⑤ Akinori Kuzuya, Ryosuke Watanabe, Yusei Yamanaka, Takuya Tamaki, Masafumi Kaino, and Yuichi Ohya, "Nanomechanical DNA Origami pH Sensors", *Sensors*, 査読有, 14, **2014**, 19329-19335

⑥ Akinori Kuzuya, Ryosuke Watanabe, Mirai Hashizume, Masafumi Kaino, Shinya Minamida, Koji Kameda, Yuichi Ohya, "Precise Structure Control of Three-State Nanomechanical DNA Origami Devices", *Methods*, 査読有, 67, **2014**, 250-255

⑦ Akinori Kuzuya and Yuichi Ohya, "Nanomechanical molecular devices made of DNA origami", *Acc. Chem. Res.*, 査読有, 47, **2014**, 1742-1749

⑧ Takahiro Yamazaki, Yuichiro Aiba, Kohei Yasuda, Yusuke Sakai, Yusei Yamanaka, Akinori Kuzuya, Yuichi Ohya and Makoto Komiyama, "Clear-cut observation of PNA invasion using nanomechanical DNA origami devices", *Chem. Commun.*, 査読有, 48, **2012**, 11361-11363

〔学会発表〕(計 57 件)

① Akinori Kuzuya, Shizuma Tanaka, Kazuki Fukushima, Kenta Wakabayashi, Yuichi Ohya, Smart Hydrogels Based on DNA Quadruplexes, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (PACIFICHEM2015), 2015 年 12 月 18 日, ハワイ州ホノルル (アメリカ)

② Shizuma Tanaka, Kazuki Fukushima, Kenta Wakabayashi, Akinori Kuzuya, Yuichi Ohya, Metal Ion-Responsive Biodegradable Hydrogels Made of PEG-DNA Copolymers, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (PACIFICHEM2015), 2015 年 12 月 17 日, ハワイ州ホノルル (アメリカ)

③田中静磨、福島和季、若林建汰、葛谷明紀、大矢裕二、 $K^+$ 、 $Na^+$ 応答性スマートヒドロゲルの調製、第25回日本MRS年次大会、2015年12月9日、横浜市開港記念会館（神奈川）

④田中静磨、福島和季、若林建汰、葛谷明紀、大矢裕二、PEG-DNA マルチブロック共重合体を用いたDNA四重鎖ゲルの開発、計測自動制御学会システム・情報部門学術講演会2015 (SSI2015)、2015年11月18日、函館アリーナ（北海道）

⑤田中静磨、福島和季、若林建汰、葛谷明紀、大矢裕二、PEG-DNA マルチブロック共重合体を用いた $K^+$ 、 $Na^+$ 応答性スマートヒドロゲルの調製、「細胞を創る」研究会8.0、2015年11月12日、大阪大学

⑥福島和季、田中静磨、若林建汰、葛谷明紀、大矢裕二、DNA-PEG 複合体をマクロモノマーとして利用したpH応答性i-motifゲルの開発、第37回日本バイオマテリアル学会、2015年11月10日、京都テルサ（京都）

⑦田中静磨、福島和季、若林建汰、葛谷明紀、大矢裕二、DNA-PEG-DNA トリブロック体を用いた $K^+$ 、 $Na^+$ 応答性DNA四重鎖ゲルの調製、第37回日本バイオマテリアル学会、2015年11月9日、京都テルサ（京都）

⑧田中静磨、福島和季、若林建汰、葛谷明紀、大矢裕二、PEG-DNA 共重合体を用いた $K^+$ 、 $Na^+$ 応答性ヒドロゲルの調製、第5回CSJ化学フェスタ、2015年10月15日、タワーホール船堀（東京）

⑨田中静磨、福島和季、若林建汰、葛谷明紀、大矢裕二、PEG-DNA 共重合体を用いたDNA四重鎖ゲルの調製、第64回高分子討論会、2015年9月15日、東北大学

⑩福島和季、田中静磨、若林建汰、葛谷明紀、大矢裕二、DNA-PEG-DNA 複合体を利用したDNA四重鎖ヒドロゲルの開発、第9回バイオ関連化学シンポジウム、2015年9月10日、熊本大学

⑪若林建汰、田中静磨、福島和季、葛谷明紀、大矢裕二、分岐PEG-DNA複合体を活用した金属イオン応答性ヒドロゲルの開発、第9回バイオ関連化学シンポジウム、2015年9月10日、熊本大学

⑫木越絵理奈、渡邊亮介、浜田省吾、葛谷明紀、村田智、大矢裕二、基板上成長大規模DNAナノ構造体へのDNA Origamiの組み込み、第9回バイオ関連化学シンポジウム、2015年9月10日、熊本大学

⑬葛谷明紀、田中静磨、福島和季、若林建汰、

大矢裕二、DNA液相大量合成系を活用した新規ヒドロゲル素材の開発、第25回バイオ・高分子シンポジウム、2015年7月24日、東京工業大学

⑭若林建汰、田中静磨、福島和季、葛谷明紀、大矢裕二、分岐型PEGを用いた $K^+$ 応答性ヒドロゲルの開発、第25回バイオ・高分子シンポジウム、2015年7月23日、東京工業大学

⑮ Akinori Kuzuya, Masafumi Kaino, Ryosuke Watanabe, Yuichi Ohya, Functional DNA Nanodevices Made of DNA Sudare – A Relaxed DNA Origami Derivative, 12th Annual Conference on Foundations of Nanoscience Meeting (FNANO2015), 2015年4月15日、ユタ州ソルトレークシティ（アメリカ）

⑯ 若林建汰、田中静磨、福島和季、葛谷明紀、大矢裕二、分岐型PEG-DNA複合体を活用した $K^+$ イオン応答性ヒドロゲルの開発、日本化学会第95春季年会、2015年3月29日、日本大学

⑰田中静磨、福島和季、若林建汰、葛谷明紀、大矢裕二、DNA-PEG-DNA トリブロック体を用いた $K^+$ 応答性ヒドロゲルの調製、日本化学会第95春季年会、2015年3月28日、日本大学

⑱福島和季、若林建汰、田中静磨、葛谷明紀、大矢裕二、DNA-PEG-DNA トリブロック体を用いたpH応答性ゲルの開発、日本化学会第95春季年会、2015年3月28日、日本大学

⑲葛谷明紀、核酸ナノ構造を活用したトポロジカル超分子合成技術の創成、日本化学会第95春季年会、2015年3月27日、日本大学

⑳ Akinori Kuzuya, Shizuma Tanaka, Kazuki Fukushima, Kenta Wakabayashi, Yuichi Ohya, DNA-PEG-DNA Triblock Copolymers for Smart Hydrogels, The 2015 Symposium for the Promotion of Applied Research Collaboration in Asia (SPARCA), 2015年2月10日、台北（台湾）

㉑ Akinori Kuzuya, Shizuma Kenta Wakabayashi, Tanaka, Kazuki Fukushima, Yuichi Ohya, Biodegradable Hydrogels Made of DNA-PEG-DNA Tri-block Copolymers, Polymer Networks Group Meeting & Gel Symposium 2014, 2014年11月14日、東京大学

㉒葛谷明紀、DNAを活用したナノ材料の超精密配列化によるバイオナノデバイスの創成、第4回CSJ化学フェスタ、2014年10月15日、タワーホール船堀（東京）

②③渡邊亮介、木越絵理奈、戒能誠史、葛谷明紀、大矢裕一、剛直なナノメカニカル DNA Origami デバイスのアロステリック制御、第 63 回高分子討論会、2014 年 9 月 24 日、長崎大学

②④田中静磨、福島和季、葛谷明紀、大矢裕一、DNA-PEG-DNA トリブロック共重合体を用いたヒドロゲルの調製、第 63 回高分子討論会、2014 年 9 月 24 日、長崎大学

②⑤ Akinori Kuzuya, Ryosuke Watanabe, Erina Kigoshi, Shinya Minamida, Masafumi Kaino, Yuichi Ohya, Rigid Nanomechanical DNA Origami Devices for Efficient Detection of Biomolecules, DNA20, 2014 年 9 月 22 日, 京都大学

②⑥渡邊亮介、木越絵理奈、戒能誠史、葛谷明紀、大矢裕一、剛直なナノメカニカル DNA Origami デバイスのアロステリック制御、第 8 回バイオ関連化学シンポジウム、2014 年 9 月 11 日、岡山大学

②⑦ Akinori Kuzuya, Ryosuke Watanabe, Masafumi Kaino, Yuichi Ohya, Nanomechanical DNA Origami Devices for Biomolecular Sensing, XXI International Roundtable on Nucleic Acid Chemistry, 2014 年 8 月 28 日, ポズナン (ポーランド)

②⑧ Akinori Kuzuya, Ryosuke Watanabe, Masafumi Kaino, Yuichi Ohya, Nanomechanical DNA Origami Devices for Single-Molecule Detection of Biomolecules, PETROMAT and PPC SYM 2014, 2014 年 4 月 22 日, バンコク (タイ)

[図書] (計 2 件)

①葛谷明紀 他、フロンティア出版、自己組織化マテリアルのフロンティア、2015、336 (30-38)

②葛谷明紀 他、技術情報協会、パワーアシスト・ロボットに関する材料、電子機器、制御と実用化、その最新技術、2015、590 (297-306)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称：ゲル素材及びその製造方法

発明者：葛谷明紀、大矢裕一

権利者：関西大学

種類：特許

番号：2015-166211

出願年月日：2015 年 8 月 25 日

国内外の別：国内

名称：ゲル素材及びその製造方法

発明者：葛谷明紀、大矢裕一

権利者：関西大学

種類：特許

番号：2015-035486

出願年月日：2015 年 2 月 25 日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.chemmater.kansai-u.ac.jp/kinosei/index.html>

[http://www.achem.kansai-u.ac.jp/kinosei/kuzuya\\_res.htm](http://www.achem.kansai-u.ac.jp/kinosei/kuzuya_res.htm)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

葛谷 明紀 (KUZUYA, Akinori)

関西大学・化学生命工学部・准教授

研究者番号：00456154

(2) 研究分担者

大矢 裕一 (OHYA, Yuichi)

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号：10213886