

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2009 ~ 2012

課題番号：21241031

研究課題名（和文）

光応答性 DNA を活用した光駆動型分子マシンの開発

研究課題名（英文）

Development of a photo-driven molecular machine with photo-responsive DNA

研究代表者

浅沼 浩之 (ASANUMA HIROYUKI)

名古屋大学・工学研究科・教授

研究者番号：20282577

研究成果の概要（和文）：本研究では、アゾベンゼンを導入した光応答性 DNA を用いた光駆動型分子マシンの開発を目指した。まず DNA 二重鎖の形成と解離の高効率な光制御を可能にする修飾アゾベンゼンの分子設計を行った。その結果、主鎖から遠い側にあるベンゼン環の 2 つのオルト位の化学修飾が、光制御効率の向上と *cis* 体の熱安定性の向上に有効であることを見出した。また二重鎖中でアゾベンゼンと塩基対が交互に並ぶように光応答性 DNA の配列を設計すると、アゾベンゼンの光異性化で二重鎖の形成と解離の完全な光制御が可能なることも見出した。これらの技術を利用し、1) RNA を可逆的に切断する光駆動型 DNA 分子マシン、2) 光崩壊型 DNA ナノカプセル、3) 可視光応答型アゾベンゼンとの組み合わせによるシーソー型ナノマシンの構築に成功した。

研究成果の概要（英文）：In this project, we aimed at creating new photo-driven DNA machines with photo-responsive DNA involving azobenzenes. First, we designed a newly modified azobenzene that enables efficient photo-regulation of DNA hybridization. We found that modification of a distal benzene ring at two *ortho*-positions was effective for the improvement of both photoregulatory efficiency and thermal stability of *cis*-form. Furthermore, we also clarified that the modified duplex of alternating base-pair and azobenzene residues allowed complete photo-regulation of DNA hybridization only by light-irradiation. Based on these results, we successfully constructed 1) photo-driven DNA machine that can reversibly digest target RNA, 2) photo-degradable DNA nano-capsule, and 3) DNA machine that can move like seesaw by the combination with visible light-responsive azobenzene.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	11,300,000	3,390,000	14,690,000
2010 年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
2011 年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
2012 年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
総計	36,000,000	10,800,000	46,800,000

研究分野：核酸有機化学

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：光応答性 DNA、アゾベンゼン、分子マシン

## 1. 研究開始当初の背景

核酸は優れた超分子性（対応する相補鎖と二重鎖を自発的に形成する能力）を有していることから、分子マシンを構築する材料とし

て最適であり、分子ピンセット、DNA Walker、ロジックゲート、分子コンピュータといった様々なナノマシンやナノデバイスを作り出すことができる<sup>1)</sup>。しかし、DNA ハイブリダ

イゼーションを利用した DNA ナノマシンのほとんどは、操作する際に核酸や他の分子を Fuel として加えるので、化学廃棄物を生成する<sup>2)</sup>。通常、生成した廃棄物を分子マシンのシステムから除くのが困難なため、分子マシンの効率は繰り返し操作の回数の増加に伴い徐々に劣化し、最終的に動かなくなる。また分子マシンの生体内への使用は困難であり、より簡便で、効率の良い手法が求められている。それに対し光は、反応系を汚染しない、ピンポイントの照射が可能、コントロールし易いといった長所があり、最も優れた外部刺激である。本申請者は、典型的な光応答性分子であるアゾベンゼンを化学的に組み込んだ DNA を開発し、世界に先駆けて二重鎖の形成と解離を特定波長の光照射のみで可逆的に制御することに成功した<sup>3,4)</sup>。すなわち、可視光照射では *trans*-アゾベンゼンのインターカレートによる二重鎖の安定化（二重鎖形成）、UV 光照射 (*cis*-体) では *cis*-アゾベンゼンの立体障害による不安定化（二重鎖の解離）を実現した。

## 2. 研究の目的

本申請研究では、この DNA ハイブリダイゼーションの光スイッチングを利用することで光駆動型の DNA 分子マシンを構築する。具体的には、DNA に導入したアゾベンゼンをアンテナとして光子を捕まえ、化学エネルギーに転換する際に起こるアゾベンゼンの形態変化 (*trans-cis* 異性化) により、分子マシンを駆動する。即ち、DNA 分子マシンに光応答性分子という“光子エンジン”をつけて特定波長の光子(Fuel)のみを消費し、廃棄物を全く生成せずに DNA 分子マシンを効率良く操作する。これによって、生体反応の制御や分子コンピューティングなどへの応用を探索し、新しいナノテクノロジーを創成する。

## 3. 研究の方法

化学修飾アゾベンゼンは修飾アニリンとニトロソ化合物とカップリングさせることで合成し<sup>4)</sup>、D-threoinol と縮合してアミダイト化を経て DNA に導入した。二重鎖の融解温度  $T_m$  は、260 nm における吸光度の温度変化の変曲点から算出した。アゾベンゼンの光異性化は、適切な光学フィルターを通したキセノンランプ光を 5-10 分程度照射することで行った。

## 4. 研究成果

### 4. 1 光制御能力の向上を目指したアゾベンゼンの化学修飾

光駆動型 DNA 分子マシンの高効率化には、*trans-cis* 光異性化に伴う DNA 二重鎖の融解温度の変化 ( $\Delta T_m$ ) を向上させることが有効である。そこでまずは、アゾベンゼンの化学修飾を検討した。ここでは、図 1 に示すように様々な位置にメチル基を導入した修飾アゾ

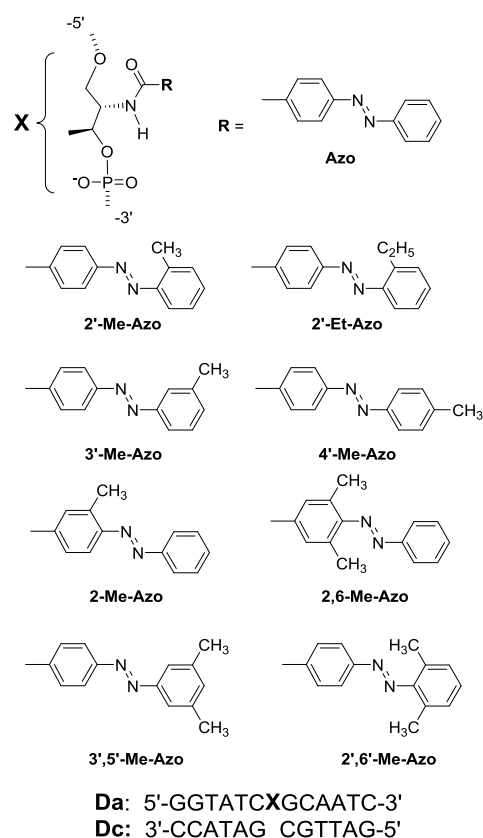


図 1 修飾アゾベンゼンの構造

ベンゼンを合成した。その結果、*p* 位 (4'-Me-Azo) 修飾は表 1 に示すように無置換体 (Azo) と比較して *trans* 体で  $T_m$  が低下した。一方 *cis* 体では逆に Azo より安定化してしまい、*trans-cis* 異性化に伴う  $T_m$  の変化 ( $\Delta T_m$ ) は小さくなった。しかし *m*、*o*-位とメチル基が主鎖に近づく程 *trans*-体で  $T_m$  が上昇し、*cis*-体で低下した。その結果 *o*-位にメチル基を 1 つ導入したアゾベンゼン (2'-Me-Azo) では *trans-cis* 異性化に伴う  $T_m$  の変化 ( $\Delta T_m$ ) が 10.6 °C と、従来型の無置換のアゾベンゼン (Azo: 5.7 °C) よりも 4.9 °C 向上した。興味深いことに二置換体では更に  $\Delta T_m$  の向上が観察された。表 1 に示すように、二つの *o*-位 (2',6' 位) にメチル基を導入した二置換アゾベンゼン (2',6'-Me-Azo) では *cis* 体において一段と不安定化し、その結果  $\Delta T_m$  は 14.6 °C と従来型 (Azo) の約 2.5 倍向上した。

アゾベンゼンを用いた光スイッチングでは、*cis*-体の熱異性化を抑制する必要がある。そこでアゾベンゼンのメチル基修飾による *cis*→*trans* 熱異性化への影響を調べた。その結果、一置換体では無置換のアゾベンゼン (Azo) と比較して熱異性化が若干促進された。しかし光制御能が最も優れていた 2',6'-Me-Azo では、興味深いことに Azo と比較して 10 倍以上熱異性化が遅くなった。しかし主鎖に近い側のベンゼン環の *o*-位修飾では (2,6-Me-Azo) そのような安定化は観察

されなかった。以上のように、2'位と6'位それぞれにメチル基を導入することで、二重鎖形成の効率的な光制御と *cis* 体の熱異性化の抑制に成功した。

表1 アゾベンゼンのメチル基修飾が、二重鎖融解温度と *cis* 体の熱安定性に及ぼす影響  
アゾベンゼン  $T_m$  (°C)<sup>a)</sup>

	<i>trans</i>	<i>cis</i>	$\Delta T_m$ (°C)
Azo	48.9	43.2(3.6) <sup>b)</sup>	5.7
4'-Me-Azo	46.8	45.4(1.4)	1.4
3'-Me-Azo	49.7	44.8(1.9)	4.9
2'-Me-Azo	50.7	40.1(2.5)	10.6
2'-Et-Azo	49.6	39.8	9.8
2-Me-Azo	48.8	39.3	9.5
3',5'-Me-Azo	49.0	44.4	4.6
2,6-Me-Azo	48.6	40.0	8.6
2',6'-Me-Azo	50.9	36.3(25)	14.6

a) Da/Dc 二重鎖 (5  $\mu$  M) の融解温度, pH 7.0(10 mM リン酸バッファー), NaCl 100 mM

b) 括弧内の値は、60 °C における Da 中の *cis* 体の半減期 (h) .

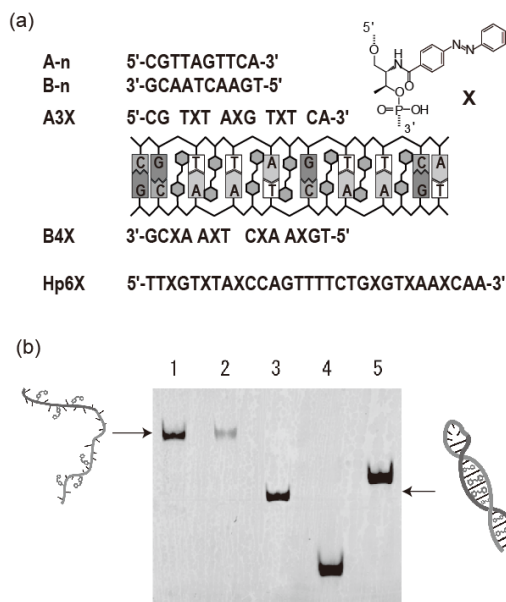


図2 (a) 設計した光応答性 DNA  
(b) 光応答性ヘアピンの開閉の光制御  
Lane 1; 30mer の一本鎖 DNA (マーカー)  
Lane 2: UV 光照射後の Hp6X,  
Lane 3: 可視光照射後の Hp6X,  
Lane 4,5; ヘアピン DNA 二重鎖 (マーカー)

#### 4. 2 アゾベンゼンの多数導入による二重鎖形成と解離の完全光制御

次に二重鎖の形成と解離の完全光制御を目指し、アゾベンゼンと塩基対が 1 : 1 の割合で交互にスツッキングする新規な DNA 二重鎖を設計した。具体的には図 2 a のように、

それぞれの DNA 鎖にアゾベンゼン残基を天然のヌクレオチド 2 残基毎に導入し、二重鎖を形成するとアゾベンゼン残基と塩基対が交互に配列するように設計した。アゾベンゼンを導入していない天然の A-n/B-n 二重鎖の  $T_m$  は 32.7 °C であったのに対し、アゾベンゼンを 7 残基含む A3X/B4X の  $T_m$  は *trans* 体で 57.3 °C と、25 °C も安定化した。一方 UV 光を照射して *cis* 体に異性化させたところ、 $T_m$  は 0°C 以下となり、広い温度領域で二重鎖の形成と解離の完全光制御の可能性が示唆された。そこでステム部位にアゾベンゼンを 6 残基導入したヘアピン型 DNA 二重鎖を設計し (Hp6X)、光照射のみで二重鎖の形成と解離の可逆的完全光制御が可能かどうか調べた。図 2b に示すように、アゾベンゼンが *trans* 体の場合にはヘアピンに対応する位置のみにバンドが現れた。このヘアピン型二重鎖に UV 光を照射したところ、このバンドが完全に消失し、ランダムコイルに対応する位置に新たなバンドが出現した。この過程は完全に可逆的で、可視光照射すると再びヘアピンの位置にバンドが出現した。このように、光照射のみで二重鎖の形成と解離を完全に光制御することに成功した。

#### 4. 3 RNA を可逆的に切断する光駆動型 DNA 分子マシンの設計

二重鎖形成と解離の完全光制御が実現したので、生体内で機能する光駆動型 DNA 分子マシンの一環として、RNA を配列特異的に切断する光駆動型 DNA エンザイムを設計した。

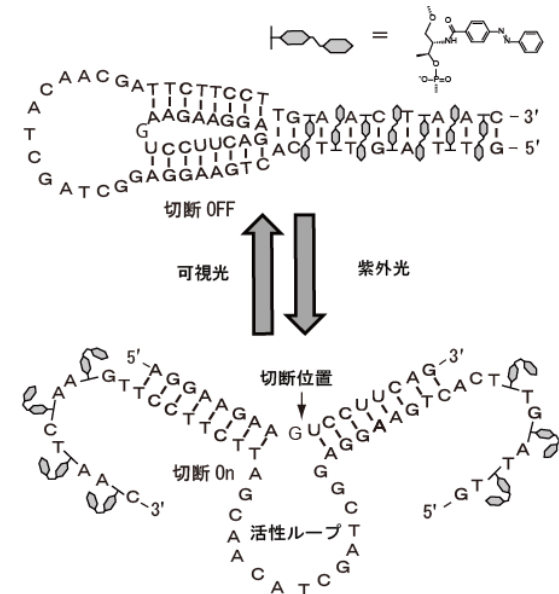


図3 光駆動型 DNA エンザイムの設計

10-23 型 DNA エンザイムは、Joyce らによって *in vitro* selection で開発された天然の DNA のみで構成される“人工酵素”であり、

図3に示すように活性部位を構成する15残基のループ部位とRNA鎖認識部位を持つ。このDNA酵素に4-2で開発した光応答性DNAを装着すれば、RNA切断の光スイッチングが可能な光駆動型DNA酵素が得られる。具体的には、図3に示すように光応答性DNAをDNA酵素の両末端に導入したヘアピン型オリゴヌクレオチドを設計した。可視光照射によりアゾベンゼンがtrans体に異性化するとヘアピンが閉じる。この状態では活性型の高次構造が取れないため、基質RNAが認識部位とハイブリダイズしてもRNAを切断することは出来ない。一方UV光照射によりcis体に異性化するとステム部分の二重鎖が解離するので、光駆動型DNA酵素は本来の活性型構造を取

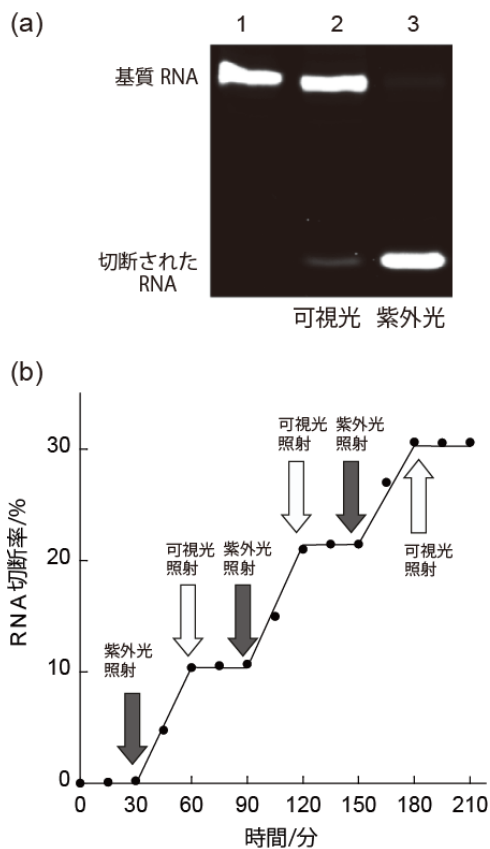


図4 光駆動型DNA酵素によるRNA切断の光制御

(a) ポリアクリルアミドゲル電気泳動による可視光および紫外光照射後(3時間後)のRNA切断の分析

Lane 1; 基質RNAのみ(マーカー)、Lane 2; 可視光照射後、Lane 3; 紫外光照射後

(b) 紫外光(黒矢印)照射および可視光(白矢印)照射に伴うRNA切断率の変化

反応条件: 50 mM トリスバッファー (pH 7.5), [NaCl] = 1M, [MgCl<sub>2</sub>] = 10 mM, 37 °C [DNA酵素] = 2 μM, [RNA] = 6 μM、DNA酵素および基質RNAの配列は図3参照

ることでRNA切断活性を取り戻すと期待される。図4aに示すように、可視光照射後は光駆動型DNA酵素のRNA切断活性はほぼ完全に抑制されたため、切断前の基質RNAのバンドのみが観察された(図4a, lane 2)。一方紫外光照射でcis体に異性化すると活性が回復し、基質RNAがほぼ完全に切断された(図4a, lane 3)。

次に可視光と紫外光を交互に照射したところ、図4bに示したようにRNA切断の可逆的なオン・オフスイッチングが実現できた。DNA酵素は天然の酵素と同様Mg<sup>2+</sup>が補因子なのでin vivoでも利用されていることから、我々の開発した光応答性DNA酵素を使用すれば細胞内で遺伝子発現の時空間的な光制御も可能である。

#### 4. 4 光崩壊型DNAナノカプセル

研究開始当初の背景でも述べたように、DNAはナノマテリアルとしても優れており、配列設計のみで様々な2D, 3Dの構造体を設計することが可能である<sup>5,6</sup>。例えば医薬を封入可能なナノカプセルを設計すれば、ドラッグデリバリーへ応用が期待できる。その際に本研究の光応答性DNAを使用すれば、光でナノカプセルを崩壊させる(=光で薬物を放出させる)光崩壊型ナノカプセルが設計でき

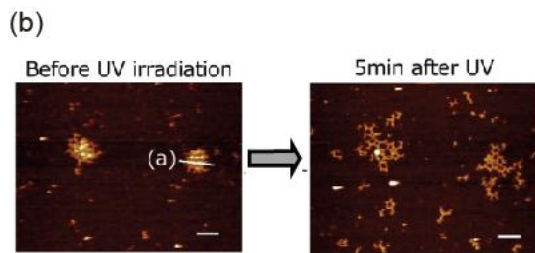
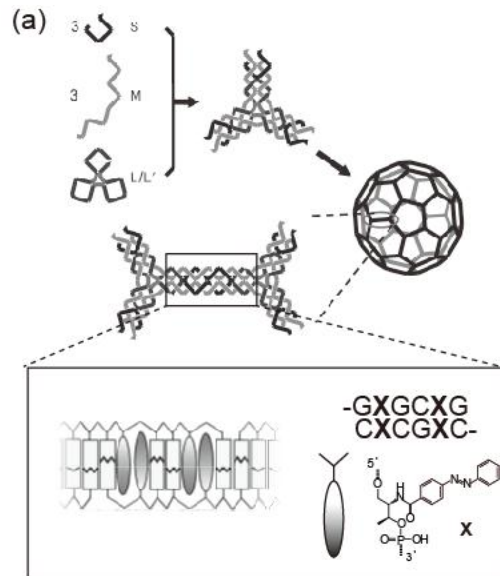


図5 (a) 光崩壊型DNAナノカプセルの設計と、(b) AFMによるナノカプセルの光崩壊過程の観察

る。そこで Mao らの DNA バッキーボールに光応答性 DNA を組み込み、光崩壊型ナノカプセルを設計した。

Mao らのバッキーボールは、配列の異なる 3 つの DNA 鎖が 3-way junction モチーフを形成し、その末端部分 (Sticky end) が更に二重鎖形成することでサッカーボール状の球形構造体 (バッキーボール) を形作るよう設計されている (図 5a 参照)<sup>6)</sup>。そこで Sticky end 部位に光応答性 DNA を使用して紫外光照射で容易に崩壊可能なナノカプセルを設計し (図 5a 下参照)、高速 AFM (AFM movie) で光照射に伴う変化を観察した。その結果、図 5b 左に示すようにアゾベンゼンが *trans* 体 (Before UV irradiation) では球対称のバッキーボールが観察されたが、これに紫外光を照射したところ設計通り速やかにバッキーボールの崩壊が起き、図 5b 右に示すように紫外光照射後 5 分で元の形を残さずに分解した。このように、光応答性 DNA を組み込むことで光崩壊型 DNA ナノカプセルの設計に成功した。

#### 4. 5 可視光応答型アゾベンゼンの設計と応用

ここまでの報告は全て、紫外光照射で *trans*→*cis* 異性化するアゾベンゼンに関するものであった。360nm の紫外光でも強い光を長時間照射すると細胞損傷を引き起こすので、より長波長の可視光領域の光のみで異性化する光応答性分子を用いる方が好ましい。そこでまずは可視光応答型アゾベンゼンを開発した。

$\pi$ → $\pi^*$ 遷移に基づく極大吸収波長の長波長化は、電子供与性基のメチルチオ基をパラ位に導入すれば可能である。しかしこのような電子供与性基によるアゾベンゼンの化学修飾は *cis* 体の熱安定性を著しく損ねる。そこで 4. 1 で述べたように *o*-位のメチル基修飾で熱異性化の抑制と高い光制御能の付与を狙った。具体的には図 6a に示した 2,6-dimethyl-4-(methylthio)azobenzene (S-DM-Azo) を合成した。この S-DM-Azo を導入した光応答性 DNA は、設計通り 400 nm の可視光照射で *cis* 体へ光異性化し、2',6'-DM-Azo と同様に無置換のアゾベンゼンと比較して 3 倍以上の  $\Delta T_m$  を示した。また *cis* 体の熱安定性も期待通り十分高い (*cis*-Azo よりも安定である) ことが判明した。

上述の可視光応答型アゾベンゼンは、異性化に紫外光を使用しないので生体系にとって優しいだけでなく、紫外光で異性化する従来型の無置換アゾベンゼン (Azo) と組み合わせれば、より複雑な制御機構を持つ DNA ナノマシンを開発することができる。図 6b に、可視光応答型 S-DM-Azo と従来型の Azo で設計した、シーソー型の動作をするナノマシン

を示す。64 塩基の DNA に対して相補的な DNA をおよそ 20 塩基ごとに三分割し、5' 末端側から L 鎖、M 鎖、R 鎖と名付ける (図 6b)。このうち M 鎖は天然の DNA であるが、L 鎖、R 鎖にはそれぞれ S-DM-Azo および未修飾アゾベンゼンが 5 分子挿入された DNA である。L 鎖と R 鎖にはそれぞれ異なるアゾベンゼンを導入しているため、照射光の波長を変えることで図 6c に示すように 4 つの状態を作り出すことが可能である。

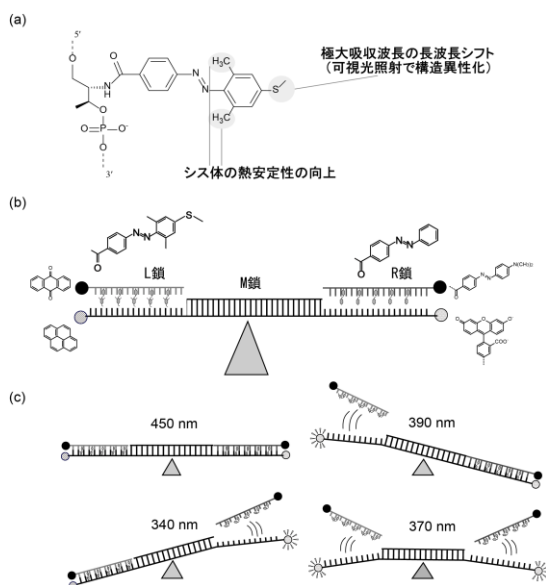


図 6 可視光応答型アゾベンゼンの設計と、二種類のアゾベンゼンを使用したシーソー型ナノマシン

- (a) 可視光応答型アゾベンゼン (S-DM-Azo) の分子設計  
(b) シーソー型ナノマシンの配列設計  
(c) 異なる波長の光照射によるシーソーの 4 状態の制御

L 鎖と R 鎖の動きを追跡するためそれぞれの鎖の末端を蛍光標識した。450 nm の光照射では S-DM-Azo および未修飾アゾベンゼンは *trans* 体となっているため R 鎖も L 鎖もそれぞれ二重鎖を形成しているが (図 6b: 450 nm)、390 nm を照射すると S-DM-Azo のみ *cis* 体に異性化し L 鎖のみが解離した様子を捉えることができた (図 6b: 390 nm)。一方、370 nm の光照射では S-DM-Azo と Azo の両方が *cis* 体となるため、L 鎖と R 鎖が解離したが (図 6b: 370 nm)、Azo のみが *cis* 体となる 340 nm を用いた場合には R 鎖のみが解離した (図 8b: 340 nm)。このように照射波長を変化させるだけで、シーソー型ナノマシンの 4 状態全てを実現できた。さらに、340 nm と 390 nm の光照射を繰り返したところ、光照射に合わせてピレンと FAM の発光が交互に観測され、L 鎖と R 鎖がシーソーのように交互にハイブリダイゼーションと解離を繰り返す様子を観

測することができた。さらに繰り返し光制御を行っても動作効率の低下が見られず、優れた光駆動型ナノマシンであることが実証できた。

(参考文献)

- 1) N.C. Seeman, P.S. Leukeman, *Rep. Prog. Phys.* **2005**, *68*, 237-270.
- 2) N.C. Seeman, *Trends Biochem. Sci.* **2005**, *30*, 119-125
- 3) H. Asanuma and X.G. Liang *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 2393-2395.
- 4) H. Asanuma *et al.*, *Nature Protocols*, **2007**, *2*, 203-212
- 5) P. W. K. Rothmund, *Nature*, **2006**, *440*, 297-302.
- 6) C. Mao *et al.*, *Nature*, **2008**, *452*, 198-201.

#### 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 4 1 件)

- 1) Photoswitch nucleic acid catalytic activity by regulating topological structure with a universal supra-photoswitch" Liang, X.G.; Zhou, M.G.; Kato, K.; Asanuma, H. *ACS Synth. Biol.* **2013**, *2*, 194-202. (査読有)
- 2) "Photon-fueled DNA nanodevice carrying two different photoswitches." Nishioka, H.; Liang, X. G.; Kato, T.; Asanuma, H. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, 1165-1168. (査読有)
- 3) "Robust and photo-controllable DNA capsules using azobenzenes." Tanaka, F.; Mochizuki, T.; Liang, X.G.; Asanuma, H.; Tanaka, S.; Suzuki, K.; Kitamura, S.; Nishikawa, A.; Ui-Tei, K.; Hagiya, M. *Nano Lett.*, **2010**, *10*, 3560-3565. (査読有)
- 4) "A light-driven DNA nanomachine for efficiently photoswitching RNA digestion." Zhou M.G.; Liang, X.G.; Mochizuki, T.; Asanuma, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2167-2170. (査読有)
- 5) "A Supra-Photoswitch Involving Sandwiched DNA Base Pairs and Azobenzenes for Light-Driven Nanostructures and Nanodevices." Liang, X.G.; Mochizuki, T.; Asanuma, H. *Small* **2009**, *5*, 1761-1768. (査読有)

[学会発表] (計 168 件)

- 1) H. Asanuma, "DNA nano-engineering for the construction of photon-fueled molecular-machine with azobenzenes as molecular engine" French- - Japanese Seminar on "Bioinspired Methods and Applications", Feb. 4-6, 2013, Tokyo, Japan (Invited)

- 2) H. Asanuma, Rational Design of photoresponsive DNA with cartridge-type nucleotide", *International Symposium on Polymer Chemistry (PC 2010)*, June 2-6 2010, Suzhou, China.(Invited)
- 3) H. Asanuma., "Azobenzene-tethered DNA for the photoregulation of DNA functions" , *International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 2010*, August 29 - September 3, 2010, Lyon, France.(Invited).

[図書] (計 4 件)

1. "Oligonucleotide Conjugates for Detection of Specific Nucleic Acid Sequences" Kashida, H.; Asanuma, H. "DNA Conjugates and Sensors" Eds. by K. R. Fox, T. Brown, *RSC Publishing*, p.242-257, (2012).
2. "カートリッジ型人工ヌクレオチドによる光応答性DNAの設計" 浅沼浩之、梁興国 "核酸化学のニュートレンド"、日本化学会編、p.56-62、*化学同人*(2011)

[産業財産権]

○出願状況 (計 5 件)

名称：オリゴヌクレオチドおよびその利用  
発明者：浅沼浩之、梁興国、他 4 名  
権利者：法人名古屋大学  
種類：特許  
番号：特願 2010-194942  
出願年月日：2010 年 8 月 31 日  
国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.nubio.nagoya-u.ac.jp/seigyol/index.html>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

浅沼浩之 (ASANUMA HIROYUKI)  
名古屋大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号：20282577

(2)研究分担者

梁興国 (LIANG XINGGUO)  
名古屋大学・大学院工学研究科・准教授  
研究者番号：60447828 (平成 23 年 5 月 1 日で中国海洋大学に教授として移動したため、平成 23 年度以降研究分担者から外れる)

(3)連携研究者なし