総説

DNAオリガミを使った1分子解析

遠藤政幸^{1,3}, 杉山 弘^{1,2,3}¹京都大学物質-細胞統合システム拠点(WPI-iCeMS)²京都大学大学院理学研究科³JST CREST

The dynamic behaviors of the enzymes and DNA structural changes were visualized using the designed DNA origami structures and high-speed AFM. The movement and the reactions of DNA methyltransferase, DNA repair enzymes, and RNA polymerase were observed by introducing the substrate double-stranded DNAs (dsDNA) to the DNA nanostructures. For the formation and disruption of G-quadruplex and double-stranded DNA, the two dsDNA incorporated in the DNA frame can amplify the small structural change to the global structural change, which enable the visualization of the reactions. The stepwise strand migration of a DNA nanomachine was visualized and analyzed on the DNA track constructed on the DNA origami surface.

DNA origami / high-speed atomic force microscopy / single-molecule observation / enzyme reactions / DNA structural change / DNA nanomachine

1. はじめに

DNAは塩基配列特異的な分子集合や明確で周期的な構造などを併せ持つ優れた生体超分子である。このDNAに特徴的な分子集合のプログラム性と構造の規則性を使って様々なナノスケールの構造体を作製する技術の開発が行われてきた¹⁾。特に、近年発表されたDNAオリガミ法によって、自由な2次元ナノ構造体の設計と作製が可能となり、機能化などの面からも活発に研究開発が行われている^{2), 3)}。また1分子観察の観点から分子の振る舞いを直接捉えることができるならば、生命現象を理解するうえで多くの情報を得ることが可能である。高速原子間力顕微鏡(AFM)の登場により、分子を捉える空間分解能と動画として解析するためのビデオレートに近い実時間測定が可能となってきた⁴⁾。本総説では、筆者らが開発したDNAオリガミ構造体と高速AFMによる新規な1分子観察法とその応用について解説する。

DNAオリガミは、100 nm程度のデザイン可能な2次元DNA構造体で、その構築方法は2006年にカリフォルニア工科大学のRothemundによって開発された²⁾。この方法では、長鎖の1本鎖DNA(M13mp18,

7,249塩基)と、構造にあわせて配列設計した相補鎖DNA(多くは32量体で**ステープルDNA**と呼ばれる)を混合し、85°Cから室温まで1時間程度で徐冷(アニーリング)することで自己集合によって構造体ができあがる(図1)。その形成過程でそれぞれのステープルDNAはまず長鎖の1本鎖DNAの指定された配列と相補的に結合し、その後2次元構造に折りたたむと考えられる。その構造はAFMで測定でき、ほぼ設計どおりの構造体が形成できる。また、形成されたDNAオリガミ構造体のそれぞれの位置には異なるステープルDNAが用いられているため、2次元平面上の任意の位置に1本鎖DNAやヘアピンDNAを配置することが可能である。ステープルDNAに機能を持つ分子や粒子を結合して構造体を形成させれば、それらを構造体上に自由に配置することができる³⁾。このことから、DNAオリガミによって形成された2次元構造は単なる形だけではなく、その構造のすべての位置にDNA配列の情報(アドレス)を持っている。この点がDNAオリガミの特筆すべき性質であり、従来にはなかった100 nm程度のスケールで精密な自己集合体が構築でき、自由な構造のデザインと分子の配置ができる点で大きなブレイクスルーとなった¹⁾。

Single-molecule Analysis Using DNA Origami Nanostructures

Masayuki ENDO^{1,3} and Hiroshi SUGIYAMA^{1,2,3}¹Institute for Integrated Cell-Material Sciences (WPI-iCeMS), Kyoto University²Graduate School of Science, Kyoto University³CREST, JST

※図1-図4は、電子ジャーナル(<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/biophys/-char/ja/>)ではカラー版を掲載しています。

図 1

DNA オリガミの構築方法. (a) 長鎖の 1 本鎖 DNA と配列設計した短い相補鎖 DNA をアニーリングし自己集合させると設計した形のナノ構造体ができあがる. (b) DNA オリガミ構造体とその AFM イメージ (文献 2 より改変).

筆者らは、DNA オリガミ法で作製した DNA ナノ構造体に酵素や DNA などの生体分子を相互作用させることで、反応のコントロールとその振る舞いを直接観察する方法を確立した. DNA によって直接 1 分子を観察する空間を構築することで、観察上の利便性に加え、分子に対して様々な制御や操作も可能となる.

2. 酵素反応の 1 分子観察への応用

筆者らはフレーム状の 2 次元 DNA 構造体を作製し、その内部に 2 本鎖 DNA を張ることで、DNA メチル化酵素の挙動を直接観察でき、DNA 鎖の張力が酵素反応に影響することを実験的に示した (図 2)⁵⁾. DNA 修飾酵素の多くは特異的な位置で 2 本鎖 DNA を折り曲げ、反応を進行させることが複合体の構造解析から示唆されている. このため、2 本鎖 DNA を折り曲げられる状態と折り曲げられない状態を人工的に作製できれば、構造上から酵素反応の制御を行える. これを実験的に確かめるため、長さの異なる 2 本鎖 DNA を固定するための空間 (40 × 40 nm) を有する 2 次元構造体「DNA フレーム」構造を設計し、その中に空間と同じ長さの 64 bp (塩基対) と緩んだ状態の 74 bp の 2 本鎖 DNA を導入した (図 2b). 導入した DNA には、DNA 鎖に EcoRI メチル転移酵素 (M.EcoRI) に特異的な配列が導入してある. M.EcoRI は DNA 鎖を約 60° 折り曲げることでメチル化反応を行う. M.EcoRI の DNA 鎖への結合では 64 塩基対と 74 bp の 2 本鎖 DNA とともに結合し、その DNA 鎖上での酵素の挙動を高速 AFM によって捉えた (図 2c). それぞれの 2 本鎖 DNA へ

図 2

DNA ナノ構造内での EcoRI メチル転移酵素の反応性の制御. (a) DNA フレーム構造. (b) DNA フレーム構造への 2 本の異なる 2 本鎖 DNA の導入. (c) M.EcoRI の DNA 鎖への結合とスライディングの高速 AFM による直接観察. 1 イメージ/秒で測定.

のメチル化反応の効率は M.EcoRI で反応後、EcoRI で切断し、メチル化されて切断されなかった 2 本鎖 DNA 配列をリアルタイム PCR で定量した. その結果、メチル化された DNA 鎖の初期濃度から、74 bp の DNA が EcoRI の切断を受けにくく、AFM で観察された切断の結果との一致が見られた. このことは、緩く張った 74 bp の DNA ではメチル化反応が、64 bp の配列に対してはるかに起こりやすいことを示している.

この方法を使い、8-oxoguanine glycosylase (hOgg1) と pyrimidine dimer glycosylase (PDG) を用いてこれらの DNA 修復酵素の反応が DNA の張力に対して影響を受けるか検討した⁶⁾. これらの DNA 修復酵素は、2 本鎖 DNA を 60-70° 折り曲げ、損傷塩基を除去する. このため、DNA フレーム内に反応基質を中心を持つ 64 bp と緩んだ 74 bp の 2 本鎖 DNA を導入し、酵素による DNA 鎖切断と中間体と酵素との還元による結合によって、その反応性の違いを見た. 反応の直接観察を AFM によって行った結果、緩みの大きい 74 bp の DNA 鎖がどちらの反応とも効率が高かった. また、高速 AFM による酵素 1 分子の動的挙動を DNA フレーム内で観察し、酵素の結合、スライディング、切断、解離が直接観測された. つまり、酵素反応の全過程とそれに伴う酵素 1 分子の挙動をそのままの状態でも高速 AFM によって捉えることができた.

筆者らは、DNA オリガミ構造体を観察基盤にして RNA ポリメラーゼと転写の 1 分子観察を検討した⁷⁾. 転写反応は生命現象の根幹であり、その分子レベルで

の動的な観察が必要である。プロモーター領域を含む鋳型2本鎖DNAを導入したDNAナノ構造体を作製し、精製後、導入した2本鎖DNAの動きを確かめた。このDNAナノ構造体にT7 RNAポリメラーゼ (RNAP) を加えると、RNAPが鋳型DNA上をスライディングする様子が観察され、その運動を解析した。さらにヌクレオシド3リン酸を加え、高速AFMによって転写反応を観察すると、鋳型DNA上をRNAPが一方向へ動き、それに伴って合成されたRNAが直接観察された。この観察系では、RNAPの鋳型DNAへの結合、スライディング、プロモーターへの結合、RNA合成、RNAPの鋳型DNAからの解離といった転写に伴う一連のRNAPの挙動の可視化が可能である。

これらの結果は、反応機構をもとに、基質となる2本鎖DNAを様々な形でDNAオリガミ構造体へ導入することで多種多様の観察を行え、酵素1分子の挙動と反応を実時間に近い状態で直接観測できることを示している。

3. DNA 構造変化の1分子観察への応用

DNAフレーム構造体を用いて、グアニン4重鎖構造の動的な形成と解離を検出する系の構築とその1分子観察を行った⁸⁾。このためにグアニン4重鎖構造の形成によってDNAフレーム構造内に導入した2本鎖DNAの構造変化を誘導し、その動きを高速AFMによって観察した。分割した[3+1]グアニン4重鎖の配列を中心にそれぞれ含む2本の2本鎖DNAを中空なDNAナノ構造内に固定した(図3a)。自己集合後にその構造をAFMで観測すると、2本鎖DNAが並んだ構造が

観察された。この構造体にカリウムイオンを添加すると2本鎖DNAが中心で結合したX型のナノ構造が観察された。次に、グアニン4重鎖構造の形成をカリウムイオン存在下で高速AFMによって実時間で観察した。その結果、カリウムイオンを含む観察用の溶液中で、AFM走査中にX型構造を形成するものが観察された(図3b)。また、グアニン4重鎖をカリウムイオン非存在下で高速AFMで観察すると、走査中にX型の形状から解離した2本鎖DNAに変化する様子が観察された。このことから、DNAナノ構造体を用いて、2本鎖DNAの構造変化からグアニン4重鎖の形成と解離を動的に1分子観測できる系の構築に成功した。

次に、2本鎖DNAの解離と形成を1分子観察する系を構築した⁹⁾。観察するDNA鎖には光応答性のアゾベンゼンが導入してあり、UV光と可視光の照射によって、2本鎖の解離と形成をそれぞれ制御できる。この光応答性DNAを2本の2本鎖DNAに結合し、DNAフレームに導入した。光照射前、光応答性DNAは2本鎖を形成し、DNAフレーム内でX型の構造を形成するが、UV光照射を行うと光応答性DNAからなる2本鎖は解離し、DNAフレーム内に2本鎖DNAが並んだ構造が観察された。さらに、可視光を照射すると再び2本鎖の形成が行われ、X型の構造が観察された。これらの可逆的な2本鎖の解離と形成を高速AFM上で光照射を行いながら1分子観察すると、2本鎖の解離と形成のスイッチングがUV光と可視光の照射に応じて連続的に観察された。

DNAフレーム構造体を1分子観察系に利用することでDNA構造の形成や解離を操作でき、その動的な変化を実時間観察することが可能となった。

4. DNA 分子機械の移動システムへの応用

DNAはその配列特異的な分子集合によって、分子を動的に操作することが可能であり、DNAによって構成される分子機械は、その運動をDNA鎖の結合と解離でプログラムの操作できる¹⁰⁾。筆者らは、DNAを用いた移動可能な分子機械(DNAモーター)をDNAオリガミ上に作製したトラック(経路)を使って移動させ、高速AFMによってその運動を可視化、解析した¹¹⁾。DNAオリガミ上に17本の1本鎖DNAを配置したトラック(約100 nm)を作製し、DNAモーター鎖と呼ぶ相補鎖の1本鎖DNAを加えて酵素反応させることで、1方向に連続してモーター鎖を運動させることを検討した(図4a)。図4bに示すように、DNAオリガミに配置した1本鎖DNAとモーター鎖

図3 グアニン4重鎖構造の動的な形成と解離の1分子観察。(a) DNAフレーム構造内の2本の2本鎖DNAの中心にグアニン4重鎖構造を形成する配列を導入し、形成されれば2本鎖DNAはX型の構造をとる。(b) グアニン4重鎖構造形成の高速AFMイメージ。

図 4 DNA 運搬システムと DNA モーター 1 分子の運動. (a) DNA 構造体上に導入した 1 本鎖 DNA のトラック (緑色) と DNA モーター鎖 (赤色). 酵素反応によってモーター鎖が移動する. (b) DNA モーターの酵素反応による分岐移動の原理. (c) 高速 AFM によるモーター鎖の移動の 1 分子観察とその運動の解析.

が 2 本鎖形成し、切断酵素 Nt.BbvCI がトラックの DNA 鎖を切断するとその DNA 鎖が短くなるので、モーター鎖は隣接する DNA 鎖に移動する (分岐移動). トラック上には同じ配列の 1 本鎖 DNA が 1 列に等間隔で配置してあるため、DNA 鎖の切断と分岐移動が自律的に進行する. トラックの末端にモーター鎖を導入し、酵素反応に伴うモーター鎖の位置を測定すると、時間経過に伴って、モーター鎖は 1 方向に移動することがわかった. さらに、モーター鎖がトラック上を移動する様子を高速 AFM によって実時間で観察した. この結果、AFM の走査中に DNA モーターが運動している様子が直接観察でき、その運動を 1 分子解析すると DNA モーターの分岐移動の様子とトラック上の 1 本鎖 DNA を介して段階的に移動していくことが明らかとなった (図 4c).

さらに、ナノスケール下で分子の移動を精密に制御するため、DNA モーターを使って DNA オリガミ上に構築した複雑な経路を制御して動かすことを検討した¹²⁾. DNA オリガミ上に 3 ヵ所分岐した経路を作製し、分岐点の両側にゲートを設けて、DNA モーターの進行方向の制御を行った. ゲートはあらかじめブロック鎖で閉じており、鎖交換反応で取り去ると

DNA モーターが進行できるようになる. 酵素反応を行い、DNA モーターの位置を AFM による解析と蛍光消光実験で検討した結果、ゲートの開いた方向に DNA モーターは進み、4 つの指定された終着点に精密に移動させることができた. このように、複雑に分岐した経路を DNA 構造体上に作製し、分子の進行方向のナノスケールでの制御を可能とする分子技術の開発に成功した.

また、最近、DNA オリガミ上にトラックを構築し、連続的な DNA 分子機械の運動を制御でき操作する研究が報告された^{13), 14)}. DNA オリガミを使うことで分子機械の挙動や運動を行える経路がプログラム可能であるため、ナノスケールでの複雑な分子機械の運動の制御と操作や分子の運搬が実現できる.

5. 3 次元 DNA 構造体の構造変化の直接観察

2 本鎖 DNA は周期的なジオメトリーを持つため、2 本鎖 DNA 間の立体配置を工夫すれば、2 次元構造から 3 次元構造へ拡張することも可能である¹⁾. 中空な柱状構造 (プリズム構造) を形成させ、高速 AFM によって走査を続けることで、形成されたプリズム構造を開環でき、その過程を実時間で観察できる¹⁵⁾. このことは、DNA ナノ構造体の立体構造の変換が AFM による物理的な操作で可能であることを示している. また、筆者らは 3 次元構造の変換の操作を外部から導入した DNA 鎖による鎖交換反応を用いて行い、閉じたチューブ構造から開環することで、内部に導入した鋳型 DNA から転写を開始できる構造変換を用いた分子スイッチを作製した¹⁶⁾. これらの構造変換技術を基盤として、ナノ空間への分子の閉じ込めやその放出を利用した機能性材料への展開も可能である.

6. おわりに

筆者らは、DNA オリガミ法で作製した DNA ナノ構造体に酵素や DNA などの生体分子を相互作用させることで、反応のコントロールとその振る舞いを直接観察する方法を確立した. また、DNA によって直接 1 分子を観察する空間を構築することで、分子に対して様々な制御や操作を行えることを示した. これらは、設計されたナノ空間で生体分子の挙動と反応を動的にかつ直接観察できるナノスケールの 1 分子解析システムとして広く応用可能である. 自在にナノスケールの構造体を作製できる DNA オリガミ法は、様々な 1 分子観察系を構築するうえで有用な手法を提供するものと考えられる.

文 献

- 1) Endo, M., Sugiyama, H. (2009) Chem. Bio. Chem. **10**, 2420-2443.
- 2) Rothmund, P. W. K. (2006) Nature **440**, 297-302.
- 3) Rajendran, A. *et al.* (2012) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **51**, 874-890.
- 4) Ando, T. *et al.* (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**, 12468-12472.
- 5) Endo, M. *et al.* (2010) J. Am. Chem. Soc. **132**, 1592-1597.
- 6) Endo, M. *et al.* (2010) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **49**, 9412-9416.
- 7) Endo, M. *et al.* (2012) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **51**, 8778-8782.
- 8) Sannohe, Y. *et al.* (2010) J. Am. Chem. Soc. **132**, 16311-16313.
- 9) Endo, M. *et al.* (2012) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. **51**, 10518-15822.
- 10) Bath, J., Turberfield, A. J. (2007) Nat. Nanotechnol. **2**, 275-284.
- 11) Wickham, S. F. *et al.* (2011) Nat. Nanotechnol. **6**, 166-169.
- 12) Wickham, S. F. *et al.* (2012) Nat. Nanotechnol. **7**, 169-173.
- 13) Gu, H. *et al.* (2010) Nature **465**, 202-205.
- 14) Lund, K. *et al.* (2010) Nature **465**, 206-210.
- 15) Endo, M. *et al.* (2009) J. Am. Chem. Soc. **131**, 15570-15571.
- 16) Endo, M. *et al.* (2012) J. Am. Chem. Soc. **134**, 2852-2855.

遠藤政幸

遠藤政幸 (えんどう まさゆき)

京都大学准教授

2008 年より物質-細胞統合システム拠点

研究内容: DNA ナノテクノロジー

連絡先: 〒 606-8501 京都市左京区吉田牛ノ宮町

E-mail: endo@kuchem.kyoto-u.ac.jp

URL: [http://www.icems.kyoto-u.ac.jp/j/ppl/grp/](http://www.icems.kyoto-u.ac.jp/j/ppl/grp/sugiyama.html)[sugiyama.html](http://www.icems.kyoto-u.ac.jp/j/ppl/grp/sugiyama.html)

杉山 弘

杉山 弘 (すぎやま ひろし)

京都大学教授

2003 年より大学院理学研究科

研究内容: ケミカルバイオロジー

連絡先: 〒 606-8501 京都市左京区北白川追分町

E-mail: hs@kuchem.kyoto-u.ac.jp

URL: <http://kuchem.kyoto-u.ac.jp/chembio/index.html>