解 説

分子ロボティクス研究のはじめ方

How to Start Molecular Robotics

田 中 文 昭* *東京大学

Fumiaki Tanaka* *The University of Tokyo

1. はじめに

現在、人工合成した DNA などの生体分子を組み合わせ、複雑なシステムの構築を目指す分子ロボティクス研究が盛んに行われている。この研究分野は多大なポテンシャルを秘めている一方で、勃興して日が浅いため、まだまだ多くの研究者の参入を必要としている。この分野は、化学・生物・物理・情報科学等の境界にある融合領域であるため、多種多様な分野の専門家が知恵を共有することが重要であると考えられる。本稿は、そのような多分野の研究者が分子ロボティクス研究に参入するための手助けを目的としている。

分子ロボティクス研究に参入するのは、さほど難しいことではない。実際、この分野に従事している研究者の元々の専門分野は、化学、生物、物理、情報科学、とバラバラであり、様々な分野からの参入が可能であることが伺える。

以下では、分子ロボティクス研究を始めるに当たって必要となる基礎知識に関して簡単に説明したあと、DNA の入手方法から道具立てについて具体的に説明する。

2. 分子ロボットの素材としての DNA

DNA は通常、生体内では図 1 (a) に示すような構造を形成している。有名な二重らせん構造と呼ばれるものであり、DNA 二本鎖とも呼ばれる。この構造は、2 本の DNA 一本鎖がお互いに結合することによってできている。DNA 一本鎖は糖・リン酸・塩基が交互に並んだ分子であり、塩基には A (アデニン)、T (チミン)、C (シトシン)、G (グアニン) の 4 種類が存在する (図 1 (b))。どの DNA 分子もリン酸と糖の部分は共通しているため、塩基の並び、すなわち塩基配列によって DNA 分子を一意に定めることができる。塩基には決まった相手とのみ水素結合する性質があり、A は T とのみ (T は A とのみ)、C は G とのみ (G は C とのみ) 結合する (図 1 (c))。二つの DNA 一本鎖は、

図 1 DNA の構造

この塩基間の水素結合 (塩基対) によって、DNA 二本鎖を形成しているのである。

DNA 分子には向きがあり、それぞれの末端は、5' 末端および 3' 末端と呼ばれて区別される。通常は 5' 末端から 3' 末端へと向かう矢印として模式的に描かれる。この DNA の方向性は重要で、DNA が二本鎖を形成する際は、2 本の一本鎖 DNA の向きが互いに逆になるように結合する (図 1 (d))。

なお、塩基配列 X と (一本鎖部分のない) 完全な二本鎖を形成するような塩基配列を X の相補配列と呼ぶ。つまり、X の塩基配列の向きを逆にして、A を T に、T を A に、C を G に、G を C に変更してできた配列が X の相補配列である。例えば、5'-AAGGCTAGG-3' の相補配列は、3'-TTCCGATCC-5' である。

一本鎖 DNA 同士が水素結合によって互いに結合する反応をハイブリダイゼーションと呼ぶ。逆に、二本鎖 DNA が一本鎖 DNA に解離する反応を変性、またはデナチュレーションと呼ぶ (図 2)。DNA は、溶液中に結合できる DNA が存在する場合、室温程度の温度でハイブリダイゼーションして二本鎖を形成するが、溶液を加熱していくと、ある温度で一本鎖に変性する。二本鎖が何 °C で一本鎖に解離するかは、DNA の塩基配列や DNA の濃度、溶液中の塩濃度に依存してきまるが、90 °C 程度になると大抵の二本鎖は一本鎖に変性する。この、二本鎖 $\longleftrightarrow$ 一本鎖の反応は可逆的であり、何度でも繰り返すことが可能である。

原稿受付 2010 年 8 月 30 日

キーワード: Molecular Robotics, DNA Sequence Design, Gel Electrophoresis, Fluorescence Spectrophotometer, AFM

*〒 113-8656 文京区本郷 7-3-1

*Bunkyo-ku, Tokyo

さらに、DNA は単純な二本鎖だけではなく、塩基間の水素結合によって、各種のループ構造等を含んだかなり複雑な構造を形成することができる (図 3)。どのような構造を取り得るかは、その塩基配列に強く依存して決まる。ある塩基配列を持った DNA がどのような構造を形成するかは、各構造がエネルギー的にどれくらい安定なのかに依存しており、安定な構造ほど溶液中で形成されやすい。DNA の構造予測の問題は長く研究されてきたテーマであり、様々な構造予測プログラムが提供されている。例えば、mfold (<http://mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/dna-form1.cgi>) [1] は、最もよく知られているプログラムであり、ウェブ上のテキストボックスに塩基配列 (と塩濃度などのパラメータ) を入力すると、取り得る構造とその構造を形成したときの自由エネルギーを出力してくれる。

以上で、DNA の基礎的な化学的性質について簡単に説明したが、ロボットの素材として DNA を眺めたときには、どのような性質・利点があるのだろうか？ 簡潔には、以下のように要約できる。

- (1) DNA は非常に安定な物質であるため、生体内などの過酷な環境でも用いることができる
- (2) 任意の塩基配列を持つ DNA を安価に人工合成することができる
- (3) サイズが小さいため、ナノロボットを作る素材として適している

図 2 ハイブリダイゼーションと変性 (デナチュレーション)。2本の DNA 一本鎖は、水素結合によって結合し、二本鎖を形成する (ハイブリダイゼーション)。一方、DNA の溶液を熱すると一本鎖に解離する (変性)。この反応過程は可逆的であり、何度でも繰り返すことができる

図 3 一本鎖 DNA の二次構造。図中に示したように、特徴的な部分構造ごとに名前がつけられている

- (4) DNA 同士の結合は自律的に起こるので、溶液同士を混ぜるだけで構造体が組み上がる
- (5) 塩基配列に情報を保持しておくことが可能である

以上の性質から、DNA は分子ロボティクス研究において、最も重要な素材となっているのである。特に、上記の (2) は DNA に特有の性質であり、非常に重要である。任意の塩基配列を合成可能ということは、DNA 同士の結合を自由に決められるということを意味している。したがって、DNA の塩基配列はハイブリダイゼーションを制御するためのプログラムと見なすこともできる。DNA は最もデザインしやすい分子の一つと言えるだろう。

3. 配列設計とは？

配列設計とは、設計者の望む構造ができあがるように、DNA の塩基配列を決定する作業である。ここでは簡単な例として、図 4(a) で示した構造を形成するような塩基配列を設計する場合を考えよう。図 4(b) は好ましくない塩基配列の例である。この場合は、目標の構造以外の構造もできてしまい、場合によっては望まない構造が主生産物になってしまう。したがって、図 4(c) で示したように、構造が目的のものに定まる塩基配列を設計する必要がある。そのためには、すべての DNA の組について、結合すべきものが結合するか、結合すべきでないものが結合してしまわないかを総当たりでチェックする必要がある。上記の例の場合は 3 種類の DNA しか存在しないので、設計は非常に容易であるが、20 種類の DNA が存在する場合はどうだろうか？ この場合は、 ${}_{20}C_2 = 190$ とおりの組み合わせについてチェックする必要があり、設計は複雑になる。なお、二種の DNA が互いに結合するかどうかのチェックには、上述した自由エネルギーや塩基配列間のハミング距離などが用いられる。

図 4 塩基配列設計の例 (a) 目標とする構造 (b) 悪い配列の例 (c) 良い配列の例

また、意図しない結合を防ぐという以外にもいくつかの制約を考慮しなければならない。例えば、“AAAAA”等のように同種の塩基が連続して存在すると、DNA の構造が歪むと言われており、同種の塩基が4回以上連続するような塩基配列は避けなければならない。

設計すべき塩基配列の数が増えていくと、上記の制約を満たすように人手で設計することは非常に困難なので、通常はコンピュータプログラムを用いて設計を行う。設計したい塩基配列はケースバイケースなので、各研究者が自前の設計プログラムを作成することが多いようである。それでもいくつかの設計プログラムが提供されており、筆者らも設計プログラム“DNA-SDT”をウェブ上に公開している (<http://hagi.is.s.u-tokyo.ac.jp/~fumi95/DNASDT/>) [2]。

4. 分子ロボティクス研究の手順

それでは、いよいよ分子ロボティクス研究の手順について説明しよう。分子ロボットに限らず、ロボット研究では、1. ロボットのパーツを集め、2. それらを適切に組み合わせ、3. 正しく動くか否かその動作を検証する、というプロセスを経ることと思う。そこで、以下では上記のプロセスにそって解説を進めていく。

4.1 パーツ (DNA) の入手

分子ロボティクスの特徴は、パーツのほとんど (場合によってはすべて) が、DNA で成り立っているという点にある。DNA は、受託合成サービスを利用することによって、簡単に入手することができる。近年の分子生物学の進歩によって、極めて安価かつ大量に DNA を人工合成することが可能となった。

入手方法は簡単で、大抵どこの合成サービスでもウェブ上から発注可能なシステムを提供しているので、欲しい DNA 配列と合成量などを入力すれば、3日~1週間ほどで発注した DNA が粉末状で送られてくる。あとは適量の溶液でその粉末を溶かせば、即座に使用することができる。

4.2 パーツの組み立て (DNA の構造形成)

パーツの組み立ては、主に DNA 同士の結合によって実現される。すでに述べたように、DNA 同士は水素結合によって二本鎖を形成するが、この過程は自律的に起こる。なぜなら、水素結合を形成して二本鎖になったほうがエネルギー的に有利なためである。したがって、単なる二本鎖のような単純な構造であれば、DNA の溶液を互いに混ぜ合わせて数分~数十分程度待つだけで、自然と構造が組み上がる。本特集の解説「DNA オリガミ」や「DNA タイル」で紹介するような複雑な構造の場合は、ただ混ぜるだけでは不十分で、高温 (90°C 程度) から低温 (室温程度) へとゆっくりと冷ましてやることによって、エネルギー的に最安定の状態へと導いてやる必要がある。温度制御によって

DNA 同士を結合させることをアニーリングと呼ぶ。面白いことに、アニーリングには、お湯と発泡スチロールが使われることが多い。発泡スチロールにお湯を張り、DNA の溶液が入ったチューブを浮かべてフタをしめておくと、水温が 90°C から室温へとゆっくり下がっていく。お湯が冷めたころにはチューブの中で DNA 構造体ができあがっている、というわけである。

ここで強調しておきたいのは、DNA 構造体を組み立てるだけであれば、非常に容易いということである。DNA は受託合成サービスから安価で入手可能であり、それらを組み立てるためには、お湯に浮かべたチューブに入れておくだけでよい。

4.3 動作検証

分子ロボティクス研究で一番手間がかかるフェーズが、この動作検証の部分であろう。動作検証のためには、各種の化学実験を駆使する必要があるため、実験操作に不慣れた初学者にとって、分子ロボティクス研究に参入する最大の障壁となる。しかし、ウェブ上のリソースを有効活用することによって、この障壁をかなり下げることが可能である。例えば検索エンジンで「電気泳動 プロトコル」と検索すると、電気泳動について必要となる試薬の量から実験の手順までを記載したウェブサイトを見つかることができるだろう。また、書籍「バイオ実験イラストレイテッド シリーズ (秀潤社)」は、初学者を対象として書かれており、イラストを豊富に用いて実験方法が示されているので、おすすめである。

以下では、分子ロボティクス研究でよく用いられている実験手法のあらましに関して説明する。具体的な実験手順に関しては上記のリソースを参照していただきたい。

4.3.1 電気泳動

電気泳動は、DNA 構造体をその大きさによって分離する方法の一つであり、最もよく用いられている手法である。DNA はリン酸基によって負に帯電しているため、電圧をかけるとゲル中の DNA は陽極側へ移動する性質がある。ゲルは網目状の分子構造を形成しているが、長い DNA ほど流れにくく、短い DNA ほど流れやすいため、DNA を長さによって分離することができる (図 5)。特に、DNA が二本鎖を形成している場合には、マーカーとなる DNA と比較することによって、ほぼ正確に DNA の長さを算出することができる。一方、DNA が一本鎖の場合や複雑な構造を形成している場合には、その長さや構造体のサイズ (分子量) を正確に見積もることは難しい。しかし、定性的には大きな構造体ほどゲル中を流れにくいので、目的の構造が得られたか否かをある程度は推測することができる。

電気泳動の実験的な難易度はさほど高くなく、初めてピペットを握る初学者でもその日のうちにマスターすることができる。これが、電気泳動がよく用いられる理由の一つでもある。

図5 電気泳動の模式図。DNA は負に帯電しているため、電場に置かれると陽極側に移動する。移動度は分子量に依存するので、DNA の長さに応じて分離することができる

図6 蛍光・消光分子によるハイブリダイゼーションの観察 (a) 結合する前は蛍光分子による蛍光が観察できる (b) 二本鎖を形成すると、消光分子の働きによって、蛍光が消える

4.3.2 蛍光分光測定

蛍光分光光度計は、特定の波長の蛍光量をリアルタイムに測定する装置である。これを用いることによって、DNA 同士が結合する様子を観察することができる。以下、例を用いて説明しよう。図6の例では、一方のDNAに蛍光分子が付加されており、他方のDNAには消光分子が付加されている。ここで、蛍光分子とは、ある波長(λ_{in})の光を吸収して、異なる波長(λ_{out})の光を放出する分子であり、消光分子とは、ある特定の波長の光を吸収する分子である。この例では、DNA 同士が結合すると蛍光分子と消光分子が互いに近づき、消光分子が蛍光を吸収するので、蛍光量が減少する。このとき、蛍光の減少した量が、DNA が結合した割合に相当している。

蛍光・消光分子を利用した測定法も、よく用いられる手法である。特に、DNA の反応速度を計算するような場合には、上記の方法でリアルタイムな反応過程を観察する必要がある。

蛍光・消光分子によって修飾されたDNA配列も、受託合成サービスから入手することが可能である。

4.3.3 AFM (Atomic force microscope, 原子間力顕微鏡)

AFM (原子間力顕微鏡) は、主にDNA構造体の形状を観察する装置であり、その測定原理は以下のように比較的簡単である。測定は、カンチレバーと呼ばれる小さな針(数十 μm)を上下に振りながら、観察試料の表面をなぞっていくことで行われる(図7)。すると、表面の凹凸に応じてカンチレバーが試料表面と原子間力によって干渉しあうので、それによって生じたカンチレバーの上下方向への変

図7 AFM の原理

位を、光でこの原理で検出する。この上下方向への変位の情報から、表面の凹凸を可視化することができる。分解能は非常に高く、数 $[\text{nm}]$ ~数 $[\mu\text{m}]$ の構造体を観察することができる。本特集の解説記事である「DNA オリガミ」や「DNA タイル」中の画像は、このAFMを用いて可視化されたものである。

5. お わ り に

本稿では分子ロボティクス研究に関する基礎的な事項を簡潔に説明した。恐らく、分子ロボティクス研究への参入がさほど困難ではないということが、お分かりいただけたのではないだろうか？ 最低限、塩基配列を設計するためのパソコンと結果を解析するための電気泳動装置があれば、すぐに研究を始めることが可能である。

分子ロボティクス研究はまだ産声をあげたばかりであるが、医療、バイオ、環境等の広範な分野への潜在的応用可能性を秘めている。この可能性を実用的なアプリケーションにつなげるためには、互いに異なる分野を専門とする研究者がこの分野に参入し、知識を共有しつつシステム化を行う必要があるだろう。本稿が分子ロボティクスへ入門する一助となれば幸いである。

参 考 文 献

- [1] M. Zuker: "Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction," *Nucleic Acids Res*, vol.31, pp.3406-3415, 2003.
- [2] F. Tanaka, A. Kameda, M. Yamamoto and A. Ohuchi: "Design of nucleic acid sequences for DNA computing based on a thermodynamic approach," *Nucleic Acids Res*, vol.33, pp.903-911, 2005.

田中文昭 (Fumiaki Tanaka)

2005年北海道大学大学院博士課程修了(期間短縮), 博士(工学)。日本学術振興会特別研究員を経て、2007年東京大学助教、現在に至る。DNA塩基配列の設計や三次元DNAナノ構造の研究に従事。計測自動制御学会の会員。