DNA ナノマシンによる歩行動作の温度特性の検証

Experimental investigation of temperature-dependent walking behavior of a DNA nanomachine

○学 外館悠仁 (東工大・院総理) 小宮健 (東工大・院総理) 山村雅幸 (東工大・院総理)

Yuni Todate, Interdisciplinary Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology, 4259, Nagatsuta-cho, Midori-ku, Yokohama, Kanagawa, 226-8503

Ken Komiya, Interdisciplinary Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology

Masayuki Yamamura, Interdisciplinary Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Institute of Technology

In the recent years, construction of walking nanomachines that utilize the self-assembly of DNA molecules, coupled with the enzymatic reaction to cleave DNA strands in a sequence-specific manner, has been reported. However, the conventional walking DNA nanomachines have some limitations on reaction conditions due to their reaction components. For achieving the versatile nanomechanical systems that are applicable to control chemical processes, elementary DNA nanomachines are expected to work under various reaction conditions. In this study, we propose a novel type of walking DNA nanomachine, and experimentally investigated the thermal property of its elementary reaction to discuss the walking performance of the proposed DNA nanomachine.

Key Words: DNA nanotechnology, DNA nanomachine, Molecular robot, DNAzyme, Thermal property

1. イントロダクション

互いに相補的な塩基配列を持つ1本鎖のDNA分子同士が、ワトソン・クリック型塩基対の形成を通じて配列特異的に結合する特性を利用して、ナノメートルスケールの精密かつ超並列な操作を実現するDNAナノテクノロジーが、近年発展してきている(1)。1次元的な塩基配列の設計によって動作をプログラムできるDNAは、ナノサイズの構造体や機械動作をするナノマシンをつくる際の材料として有用である。これまでに、DNAの切断反応を利用して歩行動作を行う自律型のDNAナノマシンが報告されている(2, 3)。これらは、足場としてのDNAにナノマシンが結合して起こる、タンパク酵素やDNAzymeによるDNAの切断反応を介して駆動力を得ることで、足場の上を移動するように設計されている。このような、ナノメートル精度の歩幅で移動するDNAナノマシンは、従来は不可能であった化学反応の制御などへの利用が期待されるが、詳細な動作特性の検証や、より多様な溶液環境下で動作できるナノマシンの開発は行われていない。

本研究では、多様な溶液環境下で歩行動作ができるナノマシンに向けて、生理的条件下でのみ動作するタンパク酵素ではなく、酵素活性を持つDNAであるDNAzymeに着目した。従来は、DNA分子中に化学合成により導入したRNA部分を切断するDNAzymeが、DNAナノマシンの構築に利用されてきた(2)。しかし、RNAは一般にDNAと比べて化学的に不安定であるため、DNAを切断するDNAzymeを用いてナノマシンが構築できれば、化学反応の制御などを実現する上でより有用であると考えられる(4)。DNA切断型のDNAzymeに対し、ナノマシンの歩行動作の観点から行った温度特性の検証結果について報告する。

2. DNAzymeによるナノマシンの歩行動作

本節では、DNA切断型のDNAzymeを用いて構築するナノマシンの歩行動作について説明する。DNA切断型のDNAzymeは、切断を行う鎖(catalyst)と切断される鎖(substrate)の2本のDNA鎖で構成される(Fig. 1(a))。図中にDNA鎖のヌクレオチド長(nt)と形成される塩基対の数(bp)を示した。適切な金属イオンの存在下で切断反応が起こり、substrate鎖が切断される(4)。このDNAzymeを用いて、DNA鎖で組まれた足場の上を移動するナノマシンが構築できる(Fig. 1(b))。

DNAzymeのcatalyst鎖の部分を持つDNAが、substrate鎖

の部分を持つ足場DNAと結合すると、足場DNAの切断が起こる。すると、切断により生じた短鎖のDNAは安定に結合することができず、自発的に解離する。catalyst鎖の部分を持つDNAは、残った足場DNAと結合しているよりも、切断されていない隣の足場DNAと結合する方が安定であるため、短鎖DNAの解離で1本鎖となった部分を足掛かり(toehold)としてDNA鎖交換反応が進行し、隣の足場DNAに移動する。すなわち、DNAzymeの切断反応を介して駆動力を得て「切断、解離、隣の足場への移動」という一連のプロセスを繰り返し、ナノマシンの自律的な歩行動作が実現される。したがってナノマシンの歩行速度性能は、DNAzymeによる切断反応の速度と鎖交換反応の速度に依存する。

3. 材料と方法

ナノマシンの歩行動作における速度性能について議論するため、DNA切断型のDNAzymeによる反応に対して温度特

Fig. 1 (a) DNA-cleaving DNAzyme (b) Walking behavior of a DNA nanomachine

性の検証を行った。検証実験には、Sigma Aldrich Japan 社で合成および HPLC 精製された DNA を使用した。各 DNA の塩基配列は引用文献 (4) で使用されたものと同一である。

catalyst: 5' AGTCAGAAAGATAATCTAGTTGAGCTGTCTGC ATCACGAG 3',
substrate: 5' CTCGTGATGCAGACGTTGAAGGATTATCTTTC TGACT 3'.

なお、substrate 鎖には 3' 末端を蛍光色素 Carboxytetramethyl-rhodamine (TAMRA) で修飾した DNA を用いた。

DNAzyme による切断反応は、以下の手順で行った。まず、catalyst 鎖と substrate 鎖をそれぞれ 500 nM 含む 50 mM HEPES (pH7.05@23°C), 100 mM NaCl 溶液 20 μ L を調整し、サーマルサイクラー Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) 上で 90°C 2 min 加熱した後、氷上で 5 min 急冷した。その後、サーマルサイクラー上で 37-70°C の各温度に置き、同容量の 50 mM HEPES (pH7.05@23°C), 100 mM NaCl, 40 mM MgCl₂, 4 mM ZnCl₂ 溶液を加えて切断反応を行った。反応前 (0 min) および 1-40 min の各時点において、40 μ L の 120 mM EDTA 溶液を加えて反応を停止させた。反応停止後の溶液について 8 M Urea 12%変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) を行い、蛍光イメージアナライザー FLA5100 (Fujifilm) を用いて励起波長 532 nm でゲル画像をスキャンした。各バンドの蛍光強度を解析用ソフトウェア Multi Gauge (Fujifilm) で定量して解析を行った。

4. 結果

DNAzyme による切断反応を 37-70°C の各温度条件下で行い、反応時間に対する切断の進行度を変性 PAGE により検証した実験のゲル画像を Fig. 2 に示す。ゲル画像の上部に反応温度および反応時間を示した。ゲルの上部に蛍光色素 TAMRA で修飾された未切断の substrate 鎖 (40 nt) のバンドが、ゲルの下部に substrate 鎖の切断で生じた 19nt の DNA 鎖のバンドがみられる。すべての温度条件において、時間が経過するとともに上のバンドの蛍光強度が減少し、下のバンドの蛍光強度が増加しており、substrate 鎖の切断が起こったことがわかる。

ゲル画像の各レーンについて、「下のバンドの蛍光強度の値」を「上下のバンドの蛍光強度の値の和」で割り算して求めた切断効率を反応時間に対してプロットしたグラフを Fig.3 に示す。45-60°C の温度領域では 37°C よりも切断活性が高く反応が速く進行し、5 min でほぼプラトーに達しており、40 min 後には約 8 割の DNA が切断されている。65°C 以上の高温では切断される DNA の割合は低下する。

Fig. 2 Investigation of DNA cleavage by 12% denaturing PAGE

Fig. 3 Time course of fraction cleaved at 37-70°C

5. 議論

本研究では、多様な溶液環境下で歩行動作ができるナノマシンに向けて、DNA 切断型の DNAzyme について反応温度が歩行動作に与える影響を評価するため、非生理的な温度条件を含む 37-70°C の範囲で切断活性の温度特性を検証した。Fig.3 のグラフでは、5 min の時点において DNAzyme に切断される DNA の割合は、生理的温度の 37°C よりも高温の 45°C のときに最も高くなった。さらに高温の 65°C 以上では低下したが、これは、catalyst 鎖と substrate 鎖による切断に必要な構造の形成が起こりにくくなるためだと考えられる。切断反応のターンオーバーは DNA ナノマシンの歩行速度に直接関係すると考えられるが、低温条件では切断された substrate 鎖が catalyst 鎖と解離しにくいいためターンオーバーが起こりにくく、高温条件ではターンオーバーが起こりやすい。切断活性が高い構造を安定に形成する条件と、切断された substrate 鎖が解離して未切断の substrate 鎖に入れ替わるターンオーバーの条件は、トレードオフの関係にあると予想される。したがって、DNA ナノマシンの高速な歩行動作を実現する温度条件は、Fig.3 で最も速く切断が進行した 45°C の条件とは異なる可能性がある。今後、切断反応のターンオーバーについても実験を行って検証し、最適な反応条件を決定していく。

引用文献

- (1) A. V. Pinheiro, D. Han, W. M. Shih, H. Yan, "Challenges and opportunities for structural DNA nanotechnology" *Nature Nanotechnology*, 6 (2011), 763-772
- (2) Y. Tian, Y. He, Y. Chen, P. Yin, C. Mao, "A DNAzyme that walks processively and autonomously along a one-dimensional track" *Angew. Chem., Int. Ed.*, 44 (2005), 4355-4358
- (3) J. Bath, S. J. Green, A. J. Turberfield, "A Free-Running DNA Motor Powered by a Nicking Enzyme" *Angew. Chem., Int. Ed.*, 44 (2005), 4358-4361
- (4) H. Gu, K. Furukawa, Z. Weinberg, D. F. Berenson, R. R. Breaker, "Small, Highly Active DNAs That Hydrolyze DNA" *J. Am. Chem. Soc.*, 135 (2013), 9121-9129