

# 研究報告書

## 「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」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成24年10月～平成28年3月

研究者: 葛谷 明紀

### 1. 研究のねらい

合成高分子は通常、単なるひも状構造として合成される。より複雑なものといっても、分岐構造に基づいたグラフト体などが作られる程度である。しかしながら近年、カテナンやロタキサンといったインターロックド化合物を始めとして、結び目(ノット)等を含めた高次のトポロジーをもつ超分子化合物が、その特異な物理的性質などから注目されるようになった。シクロデキストリンのロタキサンを利用した環動ゲルのように、既に実用化されているトポロジカル超分子も出てきている。この様に一定の成果をあげている既存のトポロジカル超分子であるが、その合成法は原料化合物の比較的単純な自己組織化に頼っている。例えばポリロタキサンの合成においては、軸分子を貫通させる環状分子の数や向きを厳密に制御することは、非常に困難である。

本研究はこれに対し、配列のプログラミングによってトポロジー構造から二次元、三次元構造までを自在に、かつ精密に制御することができる核酸(特に DNA)に注目した。トポロジカル超分子の合成に際し、DNA を使って望み通りに構築したナノ構造体を足場や鋳型として活用する。これにより、構成要素の自己組織化のみに頼った従来法では成しえない、複雑なトポロジーを有する高分子の新しい合成法の創成を目指した。

具体的には、1. DNA の固相合成技術を応用したシクロデキストリンロタキサンの精密合成する分子技術、2. DNA を用いて作成したカテナンやノットなどのトポロジーを PEG に代表される合成高分子へと転写する分子技術、3. DNA オリガミ構造体を利用したメゾスケールのインターロックド化合物の作成とナノメカニカルデバイス(DNA オリガミシャトル)への応用、等を検討した。

### 2. 研究成果

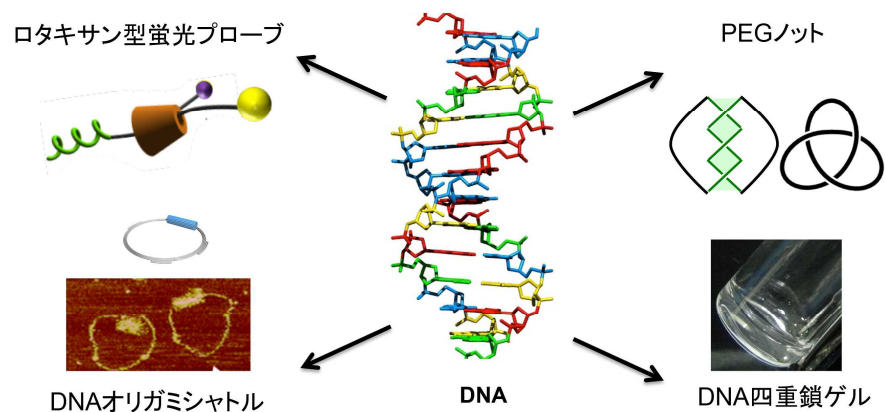
#### (1) 概要

厳密な配列認識に基づいて直径約 2 nm の非常に整った右巻き二重らせん構造を形成する DNA は、今日では様々な3次元ナノ構造体を設計通りに組み上げることが可能となっている。本研究では、分子レベルで精密に構造を制御できる DNA を、合成高分子のトポロジカルな立体構造を操るためのインターフェースとして利用し、「合成高分子の立体構造を自在に操る分子技術」の開発を行った。また、この分子技術をバルク材料の操作にも適用するために、従来は極微量にしか得ることのできなかった DNA 化学合成法を、大幅にスケールアップすることも検討した。

合成高分子の具体的なターゲットとしては、主鎖骨格中に特別な官能基を一切持たないポリエチレングリコール(PEG)を選択した。PEG の片側に DNA が担持されたジブロック体をはじ

めとして、DNA-PEG-DNA トリブロック体、さらには DNA と PEG が交互につながったペンタブロック体を、DNA 化学合成法により調製した。ジブロック体に対して DNA の固相合成法、および分離、精製手法を適用することで、軸を貫通する分子の数や向きが完全に揃ったロタキサンを得ることができ、類例の無い機構に基づいた蛍光プローブの開発へと応用した。トリブロック体は、これまで顧みられることの少なかった DNA 液相大量合成法を用いて合成し、DNA の相互作用を活用した新規のヒドロゲル素材を、従来法からは考えられなかった高い収量で構築することに成功した。また、ペンタブロック体中の DNA の長さ、および配列を厳密に設計することにより、結び目の入った PEG を合成し、その特異な熱的性質を見いだした。

以上のように、PEG を基盤とした種々のトポロジカル超分子の構築に成功し、DNA の分子マニピュレーターとしての新規な利用法を確立した。



#### 本さがけ研究で獲得した分子技術

得られるトポロジー	機能材料の開発	応用例
ロタキサン	シクロデキストリンの数と向きが完全に揃ったロタキサン	機械的結合に基づく蛍光プローブ
ノット(結び目)	結び目の入った PEG	高分子物性の理解
カテナン	DNA オリガミカテナンシャトル	生体分子の一分子観察
3次元ネットワーク	様々な物理刺激に応答する PEG ゲル	インテリジェント DDS キャリア

#### (2) 詳細

##### 研究テーマ A 「DNA 液相大量合成系を活用した DNA ヒドロゲル材料の開発」

まず、DNA を合成高分子と複合化することによりバルク材料への展開をはかる手段として、従来ほとんど顧みられることの無かった DNA の液相大量合成系に着目し、PEG を担体として反応を行うことで、DNA-PEG 複合体をグラムスケールで安価、かつ効率よく合成する手法を確立した。

さらにこの手法を活用して、DNA の四重鎖形成に基づくヒドロゲル素材の開発に成功した(出願特許 1,2)。PEG の両末端からデオキシグアノシン(dG)を3もしくは4塩基伸張させることで得られる DNA-PEG-DNA トリブロック体は、G カルテット構造に基づく四重鎖形成により、K<sup>+</sup>

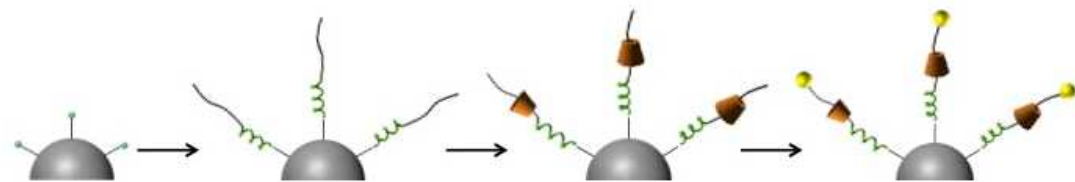
イオンや、生理食塩水に含まれる  $\text{Na}^+$  イオンの添加に伴って、瞬時にゲル化することが確かめられた。既報の DNA のみからなるヒドロゲルと比較して 10 倍以上の力学強度を示しながら、ミリグラム程度の産物しか得られない DNA 自動化学合成とは比較にならないサイズのヒドロゲルを調製することができる。直鎖状の PEG のかわりに四分岐 PEG を担体として使用すると、力学的強度がさらに数倍増すとともに、熱的安定性も大幅に向上した。最も安定な 4-armPEG-dG<sub>4</sub> は、60°C に至るまで融解することは無かった。

KCl 水溶液にマクロモノマー水溶液を滴下することで、アルギン酸ゲル同様にゲルビーズを容易に作成することもでき、これらのゲルビーズが、直径およそ 100 nm 程度のゲストを安定して保持し続けることも確認された。DNA の配列情報を利用して、相補鎖の添加により選択的にゲルビーズを溶解させる系の構築にも成功し、インテリジェントな DDS 材料への応用の可能性を開いた。

また、dC の繰り返し配列によって形成されるもう一つの四重鎖 (i-motif 構造) を利用することで、pH 変化にตอบสนองしてゲル化するマクロモノマーの構築にも成功した。

#### 研究テーマ B 「D DNA の固相合成技術を活用したシクロデキストリンロタキサンの精密合成技術の開発」

数ナノメートルサイズのトポロジカル超分子制御技術として、DNA-PEG ジブロック体を用いたシクロデキストリンロタキサンを対象として選択し、軸分子である PEG 部を貫通する  $\alpha$  シクロデキストリンの数、向きが完全に制御されたロタキサンを厳密に合成する手法を開発した。DNA 自動化学合成で固相担体上に合成した DNA の末端に、さらに軸分子となる PEG を結合した。ついで、DNA を固相担体からの切り出しを行う前に、反応カラム中に  $\alpha$  シクロデキストリンの水溶液を通じることで、 $\alpha$  シクロデキストリンと PEG-DNA 複合体との擬ロタキサン形成を行った。最後に、活性化したキャップ分子を同様に反応カラム中に導入して、ロタキサン構造を固定化した。通常の DNA 合成の手順で DNA 鎖を担体から切り出し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動および HPLC で精製することで、軸分子を貫通する  $\alpha$  シクロデキストリンの数、向きに応じて、DNA-ロタキサン複合体を完全に分離することに成功した。化学修飾したシクロデキストリンを使用することにも成功し、従来にない機構で動作する新たな蛍光プローブへの応用が期待される。

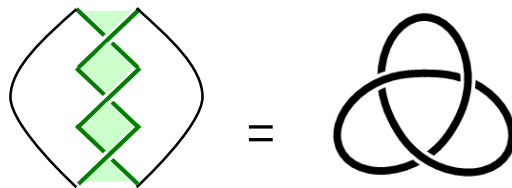


#### 研究テーマ C 「DNA の二重らせん形成を利用した PEG ノット(結び目)の形成技術の開発」

PEG そのもののトポロジー制御技術として、PEG ノット(結び目)の形成を試みた。三葉結び目は鎖が三回交叉することによって形成されることを応用し、DNA-PEG-DNA-PEG-DNA のペンタブロック体设计了。これを用いて、末端同士が PEG で結合され、DNA 鎖が二重らせん上で三回交叉する 1.5 周期の長さを持つ、PEG 複合化分子内 DNA 二重らせんを作成し

た。エキソヌクレアーゼ活性が無くなることでその存在を証明できる天然型の環状 DNA 構造と異なり、DNA と PEG の結合部をもつ DNA-PEG ノットについては、直鎖型 DNA と同じように酵素に分解され、従来の手法では環状構造を証明できないことが研究の過程で明らかとなった。そこで、「蛍光修飾したジヌクレオチド三リン酸を伸張する」という、これまでに無い手法を開発し、この問題を解決した。

得られた DNA-PEG ノットについて DNA 二重らせん部の熱安定性を計測した結果、二重らせんの顕著な不安定化と、通常の二重らせんには見られない大きなヒステリシスが観測された。これは分子内に強いひずみが生じていることを示し、結び目構造が目的通り形成されていることを強く示唆する結果が得られた。DNA と PEG の結合パターンを変え、結び目の無い単なる環状構造をとる誘導体の合成にも成功し、ゲル電気泳動におけるバンドの移動度など、諸物性が異なることも示すことができた。



#### 研究テーマ D 「DNA オリガミ構造体を利用したメソスケールのインターロックド化合物の開発」

メソスケールの超分子トポロジーの制御技術として、複数の DNA オリガミ誘導体を絡めたインターロックド化合物の構築も行った。ここでは、長鎖の一本鎖 DNA を多数の短い DNA で望みの形に折り畳む DNA オリガミ構造体に加えて、我々がこれまでに開発した、DNA オリガミ二重らせん間にスペーサーを挿入することで柔軟性を高めた「DNA Sudare」構造体を活用した。

直径 200 nm の環状 DNA オリガミ構造体の周りに筒状の DNA Sudare 構造体を巻き付けることで、環状のレール上を自在に移動する「DNA オリガミシャトル」を作成した。原子間力顕微鏡 (AFM) および透過型電子顕微鏡 (TEM) で構造を確認するとともに、レール上に設定した 2箇所の「ステーション」への DNA オリガミシャトルの固定化を、ステーションに修飾した蛍光色素の蛍光共鳴エネルギー移動を計測することで証明した。これにより、新たなナノメカニカル DNA オリガミデバイスを利用した単分子検出系 (原著論文 1-5) を構築した。

### 3. 今後の展開

本研究において、合成スケールの壁を越えることに成功して開発した DNA 四重鎖ゲルは、既に医薬品等で使用されている PEG と誰もが体内に有している DNA のみからなっており、生体適合性が非常に高いことが期待される。また、マクロモノマーの水溶液からヒドロゲルへの相転移も、生理食塩水の添加のみで瞬時に行うことができる。これらの特長から、薬剤の徐放を目的とした、注射器で体内に注入できる埋め込み材料としての応用が期待される。

### 4. 評価

## (1) 自己評価

### (研究者)

生体材料として、目に見えない量でしか取り扱うことのできないことが当然であったDNAを、実際に目で見て、手で触れることができるバルク材料へと展開するという、当初の目的は達成することができた。本研究の成果により、DNA の取扱サイズの壁が取り払われたことは、DNA 研究に一種のパラダイムシフトを引き起こすことが期待される。すなわち、化学物質としてのDNAを対象とした研究は、その化学合成法が確立した1980年代から盛んに行われており、ターゲット分子を特異的に認識するアプタマーなどの特殊なDNAの配列や、DNAへの効果的な化学修飾法など、社会には様々な研究成果が蓄積されている。しかしながら、製造コストその他の制限から、実用化へと結びついたものは数えるほどである。本研究の成果は、これらの成果を再びよみがえらせると同時に、新たな価値を付与することができるかもしれない。

一方で、DNAトポロジーの合成高分子への転写技術に関しては、その解析法を確立するまでには至ったものの、バルク材料まで構築してその特性を解析するという当初の目標までは到達することはできなかった。この課題に関しては、今後も他の研究資源を活用しながら、取り組みを継続していきたい。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

### (研究総括)

葛谷研究者は、特異な物理特性が注目されるトポロジカル超分子化合物の新しい合成法、ならびに、その構造を自在に制御し設計できる技術の確立を目指した。研究は①DNAの固相合成技術を応用した精密合成分子技術開発、②DNAを用いて作成したトポロジーを合成高分子へと転写する分子技術開発、③DNAオリガミ構造体を利用したメソスケール化合物の作成とナノメカニカルデバイス(DNAオリガミシャトル)への応用を目標として進められ、PEGを基盤とした種々のトポロジカル超分子構築の成功、DNAの分子マニピュレーターとしての新規な利用法を確立などの成果を得ている。具体的には、類例の無い機構に基づいた蛍光プローブの開発、新規のヒドロゲル素材を従来法では考えられない高収量での手法開発、結び目の入ったPEGの特異な熱的性質の発見である。

これらの成果を基に、JST戦略研究推進部の“SciFoS(Science for Society)活動プロジェクト”に参加し研究成果の出口を模索している。その結果は、特許出願、企業での実用化研究開始などに結びついている。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. 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”, *Polym. J.* **2015**, *47*, 177-182.

2. Akinori Kuzuya, and Yuichi Ohya, "Nanomechanical Molecular Devices Made of DNA Origami", *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 1742–1749.
3. Akinori Kuzuya, Ryosuke Watanabe, Yusei Yamanaka, Takuya Tamaki, Masafumi Kaino and Yuichi Ohya, "Nanomechanical DNA Origami pH Sensors", *Sensors*, **2014**, *14*, 19329–19335.
4. Akinori Kuzuya, Ryosuke Watanabe, Mirai Hashizume, Masafumi Kaino, Shinya Minamida, Koji Kameda, and Yuichi Ohya, "Precise Structure Control of Three-State Nanomechanical DNA Origami Devices", *Methods*, **2014**, *67*, 250–255.
5. Takahiro Yamazaki, Jonathan Gardiner Heddle, Akinori Kuzuya, and Makoto Komiyama, "Orthogonal Enzyme Arrays on a DNA Origami Scaffold Bearing Size-Tunable Wells", *Nanoscale*, **2014**, *6*, 9122–9126.

(2)特許出願

(3)その他の成果(主要な学会発表, 受賞, 著作物, プレスリリース等)

出版物

1. 葛谷明紀, 「DNA オリガミで作る単分子機能デバイス」, 高分子, 64, 99–100 (2015).
2. 葛谷明紀, 「自己組織化マテリアルのフロンティア」, 中西尚志他編, pp. 30–38, フロンティア出版(2015).

学会発表

Akinori Kuzuya, Shizuma Tanaka, Kenta Wakabayashi, Kazuki Fukushima, and Yuichi Ohya, "Intelligent Biodegradable Hydrogels Made of DNA-PEG-DNA Tri-Block Copolymers", International Science & Nature Congress (ISNaC) 2015 (招待講演)  
他, 国際学会 8 件, 国内学会 27 件.