

DNA ナノ構造体を用いたウイルスの単粒子捕獲と無毒化法の開発

平成 24 年度関西大学若手研究者育成経費研究成果報告書

研究代表者：葛谷 明紀（関西大学化学生命工学部）

研究分担者：新倉 謙一（北海道大学電子科学研究所）

川崎 英也（関西大学化学生命工学部）

中井 美早紀（関西大学化学生命工学部）

【研究成果の概要】

iPS 細胞の開発とともに、分化・誘導の研究が注目を集めているように、近い将来、「1つの細胞の中のどの部分でどのような遺伝子、分子が働いているのか」あるいは、「1つの細胞からどのような分子がどれだけ、どこから分泌されているか」という情報が必須になると予想される。しかしながらこのような情報を担う分子の量は当然少なく、分子の数そのものを増幅する以外、既存の手法では検出できない。さらにタンパクなど遺伝子発現の下流の産物に至っては、今日の科学では分子の数そのものを増幅することは不可能である。

このような問題を解決する手段として研究代表者は、個々の分子を原子間力顕微鏡 (AFM) で直接イメージングすることにより、あらゆる生体化合物を検出するというこれまでにない全く新しい生体分子検出法を提案している。長鎖の 1 本鎖 DNA を、あたかも織物を織るように折り畳んで自在なナノ構造体を作成する DNA オリガミ法 (P. W. K. Rothemund, *Nature* **2006**, *440*, 297-302.) を活用し、長さ 170 nm のペンチ状の DNA ナノデバイス (DNA ペンチ) を作成している (A. Kuzuya *et al.* *Nature Commun.* **2011**, *2*, 449)。DNA ペンチが一分子のターゲットを「摘んで」「閉じる」構造変化を AFM で観察することで、原子量数十の金属イオンから分子量 15 万の抗体分子までの幅広い生体分子を、個々の分子レベルで検出することに成功している。

しかしながら、これまでに単分子検出に成功したのはあくまでモデル化合物であり、医療や農学等での応用が期待されるような実用的なターゲットの検討はまだまだ手つかずであった。

そこで本申請課題では、検出できるターゲットの大きさの上限に挑戦し、これまでに単分子検出が確認されたタンパクよりもさらに大きいターゲットとして、特に社会的な貢献も期待されるウイルス粒子（およそ直径 40 nm 程度）の単粒子検出をめざした。これに加えて、やはり研究代表者が以前開発した 3 次元の箱形 DNA オリガミ構造体を、ウイルスを捕獲するための「檻」として利用することも検討した。

研究代表者の葛谷と分担者の北海道大学新倉は、3 次元の箱形 DNA オリガミ構造体への金属ナノ粒子の取り込みについて検討した。そのために、葛谷がこれまでに開発している、各辺約 40 nm の箱型 DNA オリガミである DNA origami Box (A. Kuzuya and M. Komiyama, *Chem. Commun.* **2009**, 4182-4184) を使用した。その模式図 Figure 1 に示す。Scaffold DNA である M13mp18 ファージの一本鎖 DNA ゲノムに対して、計 232 本の短い DNA を Staple

DNA として使用し、構造体を形成させる。ゲスト内包を志向して、DNA origami Box は、開いた形状 (OM) と閉じた形状 (CM) の 2 形態間を、溶液に加える DNA をコントロールすることで、完全に制御できるように設計してある。すなわち、立方体を構成する 12 本の辺の内、7 辺をあらかじめ貼り合わせておくことで、まず Figure 1 上に示す開いた構造体 (OM) を形成させる。次いで残りの 5 辺を貼り合わせ、Figure 1 下に示す閉じた箱形 (CM) へと選択的な構造変化を誘導する。この構造体のもう一つの特長として、辺の山折り谷折りを厳密に制御することにより、箱の表面、裏面を設計図上で完全に規定することもできる。

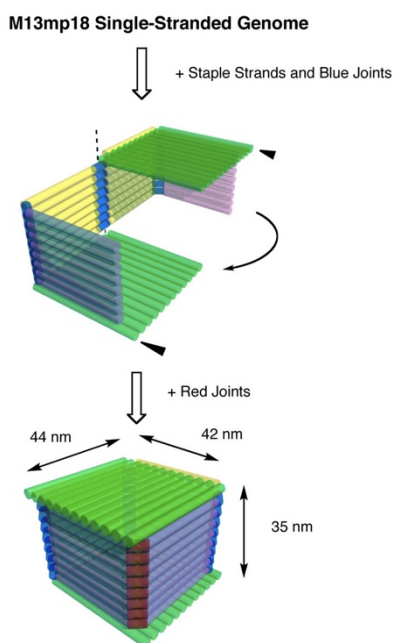


Figure 1. DNA origami Box の模式図

これまでの研究で、DNA origami Box が正しく形成されており、設計どおりに開閉させられることまでは確認されていたが、ゲスト内包の可否は確かめられていなかった。そこで本研究では、DNA origami Box に内包させる材料として金ナノ粒子 (AuNP) を選択した。あらかじめ形成させておいた OM に対して、箱の内側に相当する面に選択的に、直径 10 nm の AuNP を一粒子だけ結合させた。その後、所定の DNA を加えて DNA origami Box を CM へ形態変化させることで、AuNP を内包した DNA origami Box の構築を試みた。

まず、OM を構成している最も広い面のうちの 1 つの面の中心部分に AuNP を結合させることとした。AuNP に修飾した DNA と結合させるジョイントとして、TTG の繰り返し配列を末端に付加した Staple DNA を別途合成し、通常の DNA オリガミ形成と同様の手法で、ジョイントを有する OM を調製した。また、結合させる 10 nm の AuNP には、OM に導入したジョイントと相補的となる、AAC の繰り返し配列を有するチオール修飾 DNA を、本数制御せずに導入した。得られた AuNP-DNA 複合体と OM を混合し、比較的低い温度

条件でアニーリングを繰り返し、両者を複合化させた。続いて、OM の残った辺を結合するための DNA を溶液に加え、さきほどと同様にアニーリングを繰り返すことで、CM へと形態変化させた。アガロースゲル電気泳動により複合体の切り出し精製を行った後、原子間力顕微鏡 (AFM)、透過型電子顕微鏡 (TEM) により得られた構造体を観察した。

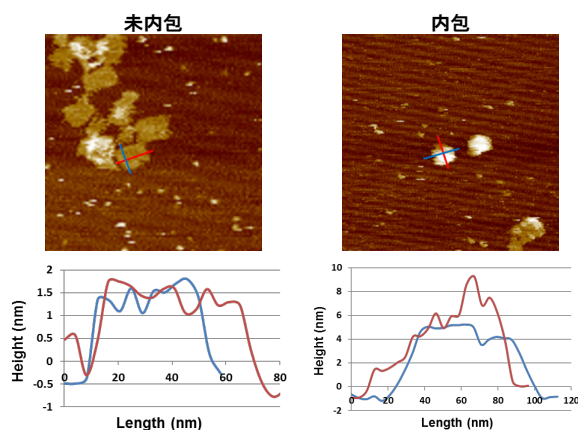


Figure 2. DNA origami Box および AuNP 内包 DNA origami Box の AFM 観察像

CM-AuNP 複合体が含まれていると思われる溶液のアガロースゲル電気泳動を行った結果、OM と結合しなかった過剰の AuNP-DNA 複合体のバンドに加えて、AuNP に特徴的な色は非常に薄いものの、可視光吸収を示す新たなバンドが観察された。DNA を蛍光染色した結果、このバンドは、CM のバンドと比較してわずかに移動度が高いことが明らかとなった。このバンドを切り出して成分を抽出した後、マイカ上での AFM 観察を行った結果、通常の CM と比較して顕著に高さの高い構造体が多数観察された。また、同じサンプルをポジティブ染色して TEM 観察をしてみると、染色された CM が顆粒状に見える中に、AuNP が明瞭に観察される複合体が多数観察された。以上の結果により、設計通りに AuNP を DNA origami Box に内包させることができたことが確認された。

同様の方法で AuNP だけでなく酵素なども内包できると予想される。ナノリアクター等としての今後の応用が期待される。

一方川崎は、ゲストとして使用できる金属ナノ粒子の効果的な調製法を検討した。その結果、タンパク質であるオボアルブミンを使用することで、近赤外領域で発光する金ナノ粒子を調製することに成功した。この金属ナノ粒子の発光は、 H_2O_2 に鋭敏に反応して消光する。そこで、グルコースオキシダーゼによるグルコースの酸化反応と、それに伴う H_2O_2 の生成を利用して、効果的なグルコースセンサーの開発に成功した。

中井は並行して、DNA と金属錯体の相互作用について検討を行った。その結果、DNA 二重らせんの AT リッチな配列に結合し、高いヌクレアーゼ活性を示す二種類のルテニウム錯体を開発した。

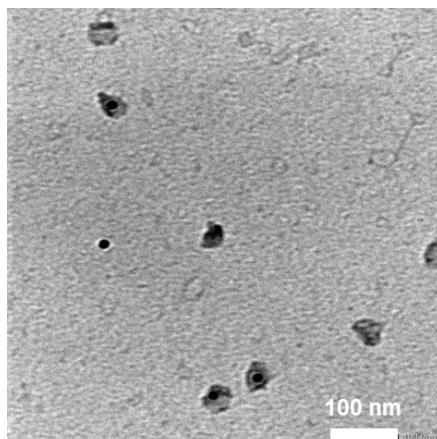


Figure 3. AuNP 内包 DNA origami Box の TEM 観察像

【各論文の概要】

1.

表題： Encapsulation of a gold nanoparticle in a DNA origami container

著者： Akinori Kuzuya, Masafumi Kaino, Mirai Hashizume, Kazuki Matsumoto, Takeaki Uehara, Yasutaka Matsuo, Hideyuki Mitomo, Kenichi Niikura, Kuniharu Ijiro, Yuichi Ohya

雑誌名： Polymer Journal

巻号ページ： 47 (2) 177-182.

発表年： 2014

要旨：開閉可能な 40 nm 角の箱型三次元 DNA オリガミ構造体を使用して、直径 10 nm の金ナノ粒子を厳密に一粒だけ内包することができるナノコンテナを開発した。この金ナノ粒子は、チオール修飾した DNA で被覆されており、これと相補的な DNA をあらかじめ導入してある開いた形状の箱型三次元 DNA オリガミ構造体の決まった面に選択的に結合する。ついで箱型三次元 DNA オリガミ構造体を閉めるための DNA を添加することで、金属ナノ粒子を内包した閉じた箱型三次元 DNA オリガミ構造体を得られる。蛍光修飾したステップ DNA を用いた検討により、目的の DNA オリガミコンテナの形状変化を効果的に行うためには、ヒンジ部の柔軟性が重要であることが明らかとなった。金ナノ粒子を内包した目的形状は、原子間力顕微鏡および透過型電子顕微鏡観察により、明確に確認された。

2.

表題： Microwave-assisted Synthesis of Near-infrared-luminescent Ovalbumin-protected Gold Nanoparticles as a Luminescent Glucose Sensor

著者： Junya Yoshimoto, Naoki Tanaka, Mitsuru Inada, Ryuichi Arakawa, Hideya Kawasaki

雑誌名： Chemistry Letters

巻号ページ： 43, 793-795.

発表年：2014

要旨：645 nm における蛍光量子収率が 9.3% という、非常に強い発光特性を有するオボアルブミン被覆された金ナノ粒子を開発し、グルコースセンサーとして応用した。この発光は、粒子表面に存在する金-チオール複合体に由来し、酵素反応に伴って生成する H_2O_2 により効果的に消光される。これを利用して、 1.0×10^{-4} から 1×10^{-2} M の範囲でグルコース濃度を定量することに成功し、検出限界は 1.0×10^{-5} M であった。

3.

表題： DNA binding behaviors and nuclease activities of novel mixed-ligand ruthenium(II) complexes

著者： Naho Iizuka, Sho-ichi Motoki, Misaki Nakai, Yasuo Nakabayashi

雑誌名： Inorganic Chemistry Communications

巻号ページ： 46, 145-148.

発表年：2014

要旨： $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{CIL}]^+$ および $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2\text{L}_2]^{2+}$ の二種のルテニウム (II) 錯体を合成し、これらと DNA 二重鎖との相互作用を調査した。その結果、 $\text{cis-}[\text{Ru}(\text{bpy})_2(1,6\text{-dahx})_2]^{2+}$ は DNA 鎖と水素結合能を示し、AT 配列に優先的に結合、高いヌクレアーゼ活性を有する事が明らかとなった。

【謝辞】

本研究の一部は、平成 24 年度関西大学若手研究者育成経費において、研究課題「DNA ナノ構造体を用いたウイルスの単粒子捕獲と無毒化法の開発」として研究費を受け、その成果を公表するものである。