

DNA タイルの高信頼セルフアセンブリ技術の研究

村田 智 (東京工業大学・大学院総合理工学研究科)

1. 研究の目的

自己組立 (Self-Assembly) を応用したナノ構造材料として, 人工的な DNA 断片を組み合わせてできる DNA タイルが提案されている. DNA タイルは, その結合末端を自由に設計できることが大きな特長で, プログラマブルな自己組立素子としてもっとも有望視されているが, DNA タイル間の結合の特異性は接着末端の配列の相補性だけに基づいており, 熱ゆらぎに支配されるため, 意図したとおりの組立が難しい. 特に, 結晶欠陥 (タイルのミスマッチによる結晶欠陥の混入) とランダム凝集 (タイルの望まない凝集) が DNA タイルの実用化におけるボトルネックになっている. 本研究では, これら 2 つの問題点を抜本的に解決できる方法として, DNA タイルを 2 層化し, 上層タイルが下層タイルの結合を制御する方式を確立する. この技術をもとに, 一定の 2 次元 DNA 構造体をセルフアセンブルする. さらに, セルフアセンブルした DNA 構造体上に, DNA 相互作用分子等の各種ナノ粒子を結合させることにより, 一定の機能をもつシステムを構築する.

2. 研究項目と役割分担

研究項目 1) 高信頼度セルフアセンブリ技術の開発

村田 智 (東京工業大学・大学院総合理工学研究科)

研究項目 2) DNA 相互作用分子による機能発現技術

柳田保子 (東京工業大学・精密工学研究所)

3. 活動状況と班内の連携状況

1) 高信頼度セルフアセンブリ技術の開発

村田 智 (東京工業大学・大学院総合理工学研究科)

【平成 15 年度】

DNA タイルを 2 層化し, 上層タイルが下層タイルの結合を制御する方式 (Layered Tile Model)の実装に向けて取り組んでいる. 15 年度は, LTM を簡略化した PTM(Protected Tile Model)と LTM の数値シミュレーションを行い, 得られるエラー低減率の精密な見積を行った. また, 実際の DNA タイルをもちいたエラー率測定を行うため, 最近開発された DNA-Origami の手法により 4 角形構造体を作成してバウンダリー構造とし, この上に調べたい DNA タイルをセルフアセンブルする実験に着手し, 従来より大きな DNA 結晶が得ることに成功した. さらに, DNA セルフアセンブリのためのマイクロ流体デバイスについて, マイクロキャピラリーポンプを利用したデバイスを開発し, 流体特性, 温度特性など, 基本的な機能の確認を行った. さらに, このデバイス中の DNA 固定化技術, 蛍光強度によるハイブリダイゼーションの測定など, DNA タイルのセルフアセンブリに向けた基礎実験を行った.

Kenichi Fujibayashi, Satoshi Murata, A method of error suppression for self-assembling DNA tiles, *Lecture Notes on Computer Science* (DNA10), 3384, 113-127, 2005

Koutaro Somei, Shohei Kaneda, Teruo Fujii, S. Murata, A Microfluidic Device for DNA Tile Self-Assembly, *Preliminary Proc. 10th International Meeting on DNA Computing (DNA11)*,

136-146, 2005

村田 智, 染井康太郎, ナノ構造物の作製装置および方法, 東京工業大学(出願人), 特願 2005 - 164203 号, 出願日平成 17 年 6 月 3 日

村田智, 染井康太郎, apparatus and method for fabricating Nanoconstruct, 東京工業大学(出願人), PCT 国際出願 JP2006/311237, 平成 18 年 12 月 17 日(国際公開日)

【平成 16 年度】

DNA タイルセルフアセンブリ体におけるエラー率の定量化に取り組んだ .DNA オリガミを結晶核としてリボン上の構造を生成し, その上に XOR 演算タイルを成長させた . これを AFM 観察し, エラー率の精密な測定を行った . また, タイル種ごとの濃度, アニールによる温度変化などの条件を考慮したシミュレーションシステムを構築し, リボンアセンブリにおける実測値と予想値を比較して良好な一致を見た . エラー抑制手法としては, SST(single stranded tile)と呼ばれるより単純な DNA モチーフに対して LTM が適用可能であることをしめした . また, マイクロ流体デバイスを用いた DNA タイルのステップワイズアセンブリ実験に成功し, 送液順序により DNA セルフアセンブリ結晶の階層構造が制御可能であることを蛍光観察実験により実証した .

Tomohiro Suzuki, Ken Komiya, Satoshi Murata, Reversible Signal Amplification by Linear Hybridization Chain Reaction, pp. 418, *Preliminary Proceedings of 12th International Meeting on DNA Computing (DNA11)*, Seoul, June 5-9, 2006.

Kotaro Somei, Shohei Kaneda, Teruo Fujii, Satoshi Murata, Hybridization in a Microfluidic Device for DNA Tile Self-Assembly, *Proc. Foundation of NanoScience (FNANO06)*, 148-152.

Satoshi Murata, Self-Assembling Systems, 9th *Japanese-American Kavli Frontiers of Science Symposium, National Academy of Sciences*, CD-ROM, Beckman Center, Irvine, Dec 8-10, 2006

Satoshi Murata, Computation by DNA Molecules, *SCIS&ISIS 2006*, invited session, 2006.9 Tokyo Tech.

Kotaro Somei, Shohei Kaneda, Teruo Fujii, Satoshi Murata, A Microfluidic Device for DNA Tile Self-Assembly, *11th International Workshop on DNA Computing, Revised Selected Papers (DNA11)*, LNCS 3892, 325-335, 2006

2) DNA 相互作用分子による機能発現

柳田保子(東京工業大学・精密工学研究所)

【平成 15 年度】

2 層化 DNA タイル構造上にナノ微粒子を位置特異的に固定化するための基礎研究を行い, ビオチン化 DNA 上にアビジン修飾ナノ微粒子を周期的に配置したナノ構造体の長鎖化に成功した . また鑄型 DNA と RecA タンパク質および一本鎖 DNA による塩基配列特異的複合体形成に適した塩基配列の決定を行なった .

DNA 構造体上に, DNA 相互作用分子等の各種ナノ粒子を結合させることにより, 一定の機能を有するシステムの構築を目指すことを目的とし, RecA タンパク質と DNA の複合体

の作成技術に関する研究を行った。(RecA はニック形成や複製の際に生じた 1 本鎖 DNA とそれに相関した 2 本鎖 DNA 間の鎖の交換を ATP の加水分解のエネルギーを使って触媒し、DNA 鎖状に 3 本鎖 DNA 構造を形成する性質をもつ。)本年度は 2 層化 DNA タイルを構成する DNA 塩基配列が周期的であることを踏まえ、繰り返し配列を有する鋳型 DNA を作成した。また RecA タンパク質と 1 本鎖プロンプ DNA 複合体による 3 本鎖領域の周期的配置構造が形成可能であることを確認した。

Yanagida Y., Mori H., Fujimori Y., Hatsuzawa T., Nano-particle positioning and bottom up structure formation on DNA strand, *Pacificchem 2005*, Honolulu, Hawaii, USA, 2005

【平成 16 年度】

2 層化 DNA タイル構造上にナノ微粒子を位置特異的に固定化するための基礎研究を行い、ビオチン化 DNA 上にアビジン修飾ナノ微粒子を周期的に配置したナノ構造体の長鎖化に成功した。また鋳型 DNA と RecA タンパク質および一本鎖 DNA による塩基配列特異的複合体形成に適した塩基配列の決定を行った。

初澤 毅, 小山内寛, 柳田保子, DNA を用いた微小粒子のナノ位置決め, 精密工学会誌, Vol.72, No.11, 1407-1410, 2006

[班内の連携状況]

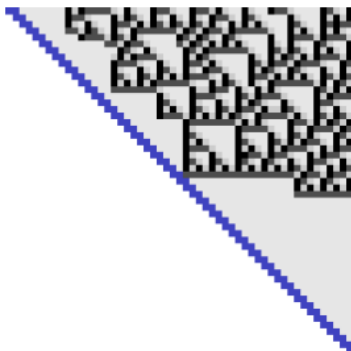
村田らによるステップワイズセルフアセンブリ実験の一環として、マイカ基板上的 DNA タイルアセンブリの AFM 観察を柳田研究室において行い、観察条件の検討を行った。他班との協力状況としては、マイクロ流体デバイスについて、村田は萩谷班の藤井の協力を得た。

4. 主要な成果

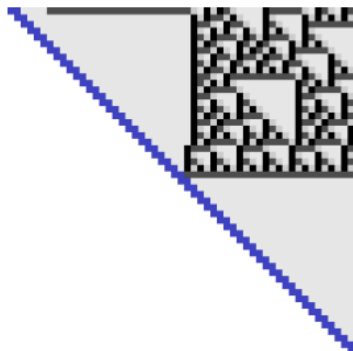
・複層化によるエラー抑制効果の定量的予測

詳細なモンテカルロシミュレーションにより複層化によるエラー率低減効果を見積もった。その結果によると、入力のみを保護する部分的なエラー抑制手法では通常の DNA タイルとエラー率はあまり変化しないが、入出力の両方を保護するタイルを付加することにより、DNA 結晶の成長速度が同じエラー率の場合通常の DNA タイルの 100 倍程度まで改善できることが示された。

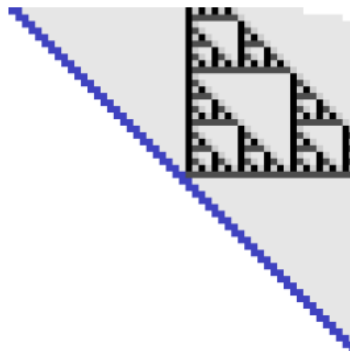
(a) $(G_{se}, G_{mc}) = (12.1, 18.4)$



(b) $(G_{se}, G_{mc}) = (33.8, 18.4)$



(c) $(G_{se}, G_{mc}) = (33.8, 18.4)$

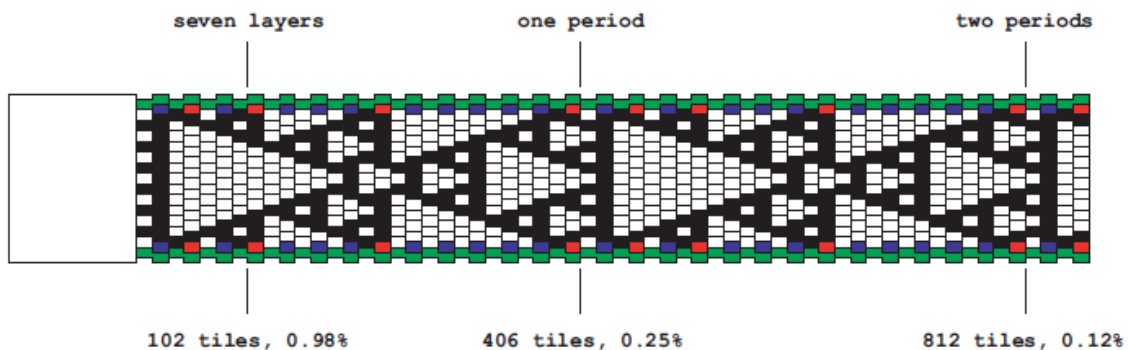


エラー抑制効果の比較 (同じ濃度, 温度条件下の比較)

(a) 通常の DNA タイル, (b) 入力だけ保護した場合, (c) 入出力を保護した場合 (LTM)

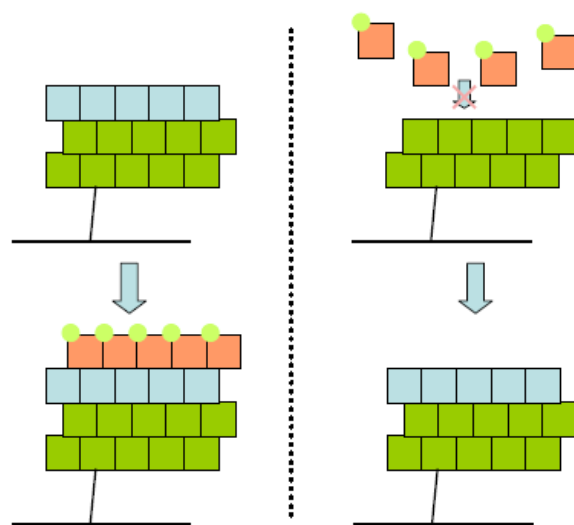
・ DNA リボン構造体によるエラー率の定量的測定

カリフォルニア工科大学ウィンフリー研究室と共同で、DNA オリガミを結晶核として、一定幅で成長するリボン構造体を作成した。DNA タイルにはシェルピンスキーパターンを生成する XOR ルールを用いた（下図にダイアグラムを示す）。これと実際に AFM 観察した DNA リボン上のパターンを比較することにより、エラー率を精密に測定し、その結果をシミュレーションと比較し、良好な一致を見た。



・ マイクロ流体デバイスを用いた固相上の階層的セルフアセンブリ

マイクロ流体デバイスにより DNA タイル結晶化の環境を直接制御することにより、従来のワンポット反応では作ることのできない DNA 構造の作成が可能となる。それを示すために、簡単なステップワイズセルフアセンブリの実験を行った。金基板上に DNA を固定化し、その周りにあらかじめ作成してリガーゼ処理により安定化した 2 カラムの DNA タイル結晶をバインドさせたものを結晶核とする。この結晶核に対して A, B2 種類の DNA 溶液を反応させるが、反応順により結晶化の制御が可能であることを蛍光修飾したタイルの結晶体への組み込みの有無により確認した。



・ 長い周期的 DNA へのタンパク質の結合とナノ位置決めへの応用

繰り返し配列をもつ DNA を作成し、粘着末端における配列を非回文配列にすることにより収率の向上がはかれることを確認した。これにより 7000bp の長鎖の作成に成功した。また、この DNA に対しビオチンを周期的に埋め込み、ストレプトアビジンをコートした金ナノ粒子を吸着させて DNA をラベルした。これを AFM で観測した結果、設計どおりの間隔で粒子が結合していることが確認できた。

5. 今後の課題

1) 高信頼度セルフアセンブリ技術の開発

タイル複層化による信頼性向上技術はまだ実装に至っていないが、その検討の過程で実

際の DNA タイルにおける精密なエラー率の測定法を確立するとともに、シミュレーションの高度化を実現できた。今後は DNA タイルの構造をより単純化することにより、タイル複層化をしないで同等のメカニズムによるエラー抑制を目指す。また、流体デバイスによる環境の直接制御により、通常のワンポット反応とは異なる結晶体が作成できることが実証できた。これについては、今後より複雑な 3 次元構造体の作成や、ステップワイズアセンブリと通常の結晶成長を組み合わせたハイブリッドアセンブリなどの方法に拡張していく予定である。

2) DNA 相互作用分子による機能発現

詳細な配列設計を施すことで更なる高次構造を有するナノ構造の形成を行うとともに、DNA 結合タンパク質の結合部位へのリアルタイム制御および DNA 構造変化のリアルタイム観察を行う必要がある。また、DNA-タンパク質複合体形成において、熱や電荷、溶液条件などの周囲環境が複合体形成に及ぼす影響について検討を行う必要がある。

6. 研究費の使用状況

本研究班では、DNA セルフアセンブリに関するシミュレーションおよび実験的研究を行っている。研究費の多くは、DNA 関連の実験設備の充実（サーマルサイクラー、低温遠心分離機（村田）、AFM(SPA40)防音カバー、顕微鏡温度管理ステージ（柳田）、いずれも平成 17 年度）、DNA オリゴ合成委託、試薬等消耗品、学生アルバイト等に充てられている。計算機類購入は小規模のパソコンのみである。また、平成 15 年度は村田の指導する博士課程学生 1 名を長期間カリフォルニア大学ウィンフリー研究室に派遣した。その他、外国出張旅費として DNA 国際会議への出張（平成 15 年度カナダ、16 年度韓国）などに使用した。