

修飾核酸塩基-金属イオン相互作用を介して集合するメ タロ DNA ナノチューブの創製

東京大学 大学院理学系研究科化学専攻

竹澤 悠典

1. はじめに

DNA 分子は、アデニン(A)、チミン(T)、グアニン(G)、シトシン(C)の 4 種類の核酸塩基が連なった生体高分子であり、核酸塩基の配列として遺伝情報をコードしている。A-T および G-G が相補的な水素結合を介した塩基対を形成することで、DNA 鎖は配列特異的に会合して二重らせん構造を形成する。近年、DNA 分子の配列特異的な二重鎖形成を利用して、様々なナノスケールの構造体を構築する「DNA ナノテクノロジー」が発展している¹。核酸塩基の配列情報として構造情報をプログラムする点が特徴であり、ボトムアップのナノ材料構築法として注目されている。

なかでも、「DNA ナノチューブ」と呼ばれる DNA ナノ構造体は、5 本の DNA 鎖からなる「DNA タイル」と呼ばれる単位構造が自己集合した直径 10 nm 程度の中空のチューブ状構造体であり²、ナノスケールの分子集積基盤³や細胞骨格を模倣したナノバイオ材料⁴として注目されている (図 1a)。DNA タイル構造の四隅には、粘着末端と呼ばれる一本鎖部分があり、互いに相補的な塩基配列になっている。この粘着末端(a-a'および b-b')が二重鎖を形成することで、DNA タイルが自己集合し、ナノチューブ構造体となる。DNA ナノチューブの高機能化においては、外部刺激に応答して形成・分解する DNA ナノチューブの設計が重要な課題となっている。

これまでに我々は、金属配位子を導入した人工 DNA 鎖を合成し、金属錯体形成を駆動力とした DNAzyme (DNA 酵素)のアロステリック制御や DNA 超分子の可逆な構造変換を報告してきた⁵⁻⁷。そこで本研究では、粘着末端部分に金属配位性の核酸塩基を導入した DNA タイルを設

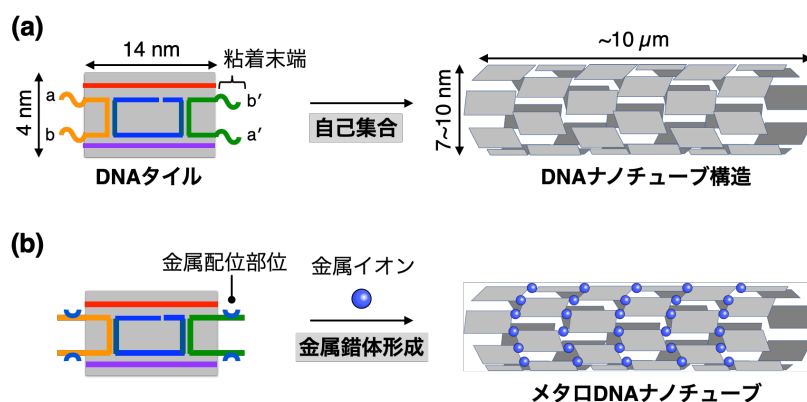


図 1 (a) DNA タイルの自己集合による DNA ナノチューブ構造体の構築。太線は DNA 鎖を示している。(b) 金属配位部位を導入した DNA タイルの金属錯体形成に基づくメタロ DNA ナノチューブの構築 (本研究)。

計し、鎖間での金属錯体（金属錯体型人工塩基対）の形成により粘着末端の二重鎖形成を誘起することで、金属イオンに応答して形成・分解するメタロ DNA ナノチューブ構造体の開発を行った（図 1b）。将来的には、金属配位による DNA ナノチューブの熱的安定性・剛直性の向上や、DNA ナノチューブの造形変換を達成し、ナノバイオ材料や分子マシンへの応用を目指している。

2. メタロ DNA ナノチューブの分子設計

特定の金属イオンの存在下で形成するメタロ DNA ナノチューブ構造体を構築するために、「のりしろ」となる粘着末端部分の塩基配列を変更した DNA タイル構造を設計した（図 2）。具体的には、Winfree らが報告した DNA タイル構造²の塩基配列をもとに、5 塩基長の粘着末端の中央に金属イオンに結合する核酸塩基を導入した。

たとえば、天然のシトシン(C)塩基は、Ag(I)イオンの存在下で 2:1 錯体を形成し、DNA 二重鎖中で金属配位係合を介した非天然塩基対（金属錯体型塩基対）C-Ag(I)-C を形成することが知られている⁸。そこで、Ag(I)イオン結合サイトとして C 塩基を導入した DNA タイル（Tile-C および Tile-2C）を設計した。同様に、修飾核酸塩基である 4-チオチミン(sT)が 2 個の Ag(I)イオンを介した金属錯体型塩基対 sT-Ag(I)₂-sT を形成することに着目し、粘着末端部に sT 塩基を導入した DNA タイル(tile-sT)も設計した。いずれも粘着末端部にミスマッチを含むため、Ag(I)非存在下では自己集合せず、Ag(I)イオン存在下でのみ DNA タイルが会合し、DNA ナノチューブ構造体が形成すると期待した。

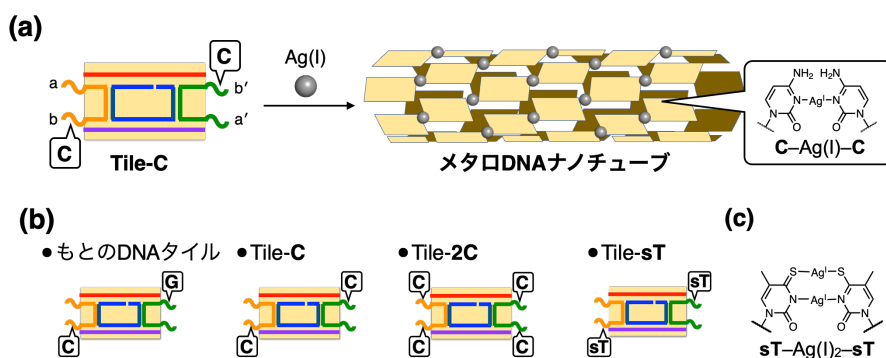


図 2 (a) 金属錯体型 C-Ag(I)-C 塩基対の形成に基づく DNA ナノチューブ構造体の構築。太線は DNA 鎖を示す。(b) 金属配位部位を導入した DNA タイルの設計。論文未発表のため、具体的な塩基配列は伏せている。(c) 4-チオチミン(sT)塩基と Ag(I)イオンにより形成する sT-Ag(I)₂-sT 塩基対。

3. Ag(I)イオン添加によるメタロ DNA ナノチューブの形成

5 本の DNA 鎖をアニーリングして調製した DNA タイルに対し、さまざまな条件下で Ag(I)イオンを添加し、DNA ナノチューブの形成を蛍光顕微鏡およびアガロースゲル電気泳動によって評価した。その結果、pH 7.0 の緩衝溶液中で tile-C (1.0 μM)に対して 2 当量の Ag(I)イオンを添加すると、DNA ナノチューブの形成が誘起されることが明らかとなった。

(図 3a)。一方、tile-2C では Ag(I)イオン存在下でも集合構造は観察されず、一方 tile-sT では凝集構造の形成が確認された。そこで、tile-C に関して詳細な解析を行った結果、24 時間後にはナノチューブの長さが最大 30 μm に達することがわかった。予備的な解析によれば、平均の長さは約 10 μm であり、約 5,000 個の tile-C が自己集合して構成されていると見積もられた (図 3b)。

続いて、粘着末端部分に C-C ミスマッチの代わりに C-A または C-T ミスマッチを導入した DNA タイルを用いた対照実験を実施した。蛍光顕微鏡による観察の結果、これらのタイルでは Ag(I)イオンを添加してもナノチューブ構造の形成は見られなかった。このことは、Ag(I)イオン添加による DNA ナノチューブの形成が C-Ag(I)-C 錯体の形成に基づくことを示唆している。

さらに、C 塩基の代わりに蛍光性塩基であるピロロシトシン(pC)を導入した DNA 鎖を用いてチューブ形成実験を行った。pC 塩基は、Ag(I)イオン存在下で金属錯体型塩基対 pC-Ag(I)-C を形成し、その錯体形成に伴い蛍光強度が減弱することが知られている⁹。まず、粘着末端部分に pC 塩基を含む DNA タイルを調製し、Ag(I)イオン存在下でナノチューブを形成することを蛍光顕微鏡により確認した。続いて、Ag(I)イオン添加による pC 塩基の蛍光変化を測定した (励起波長 350 nm)。その結果、Ag(I)イオン添加後に 470 nm 付近の蛍光強度が減少したことから、pC-Ag(I)-C 錯体が形成されたことが示された。

以上の結果から、Ag(I)イオンの添加による DNA ナノチューブの形成は、DNA 鎖間における C-Ag(I)-C 錯体 (金属錯体型塩基対) の形成により、tile-C の自己集合が誘起されたためだと確認された。

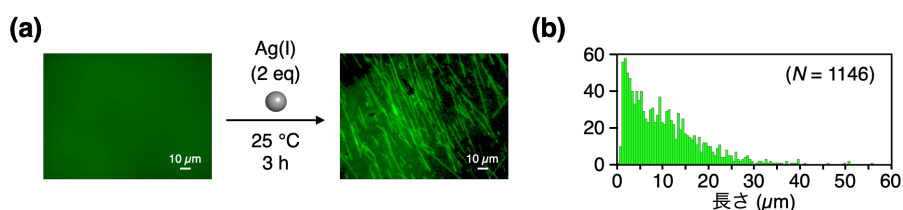


図 3 (a) tile-C に Ag(I)イオンを添加したときの蛍光顕微鏡画像。tile-C は蛍光色素 Cy3 で標識し、試料を 5 倍に希釈して観察した。[tile-C] = 1.0 μM , [AgNO₃] = 2.0 μM (2 eq) in TAMg buffer (40 mM Tris-AcOH, 12.5 mM Mg(OAc)₂, pH 7.0), 25 °C. (b) Ag(I)イオン(2 当量)存在下で形成したメタロ DNA ナノチューブの長さの分布。

4. Ag(I)イオン添加・除去によるメタロ DNA ナノチューブの形成・分解の制御

Ag(I)イオン存在下で形成されたメタロ DNA ナノチューブは、Ag(I)イオンを除去することで分解されると期待された。そこで、チオール基を有するグルタチオンを添加し、蛍光顕微鏡観察およびアガロースゲル電気泳動による評価を行った。その結果、2 当量のグルタチオンを加えてインキュベートしたところ、蛍光顕微鏡下では集合構造が消失し、ナノチューブは観察されなくなった (図 4a)。さらに、アガロースゲル電気泳動においても、移動

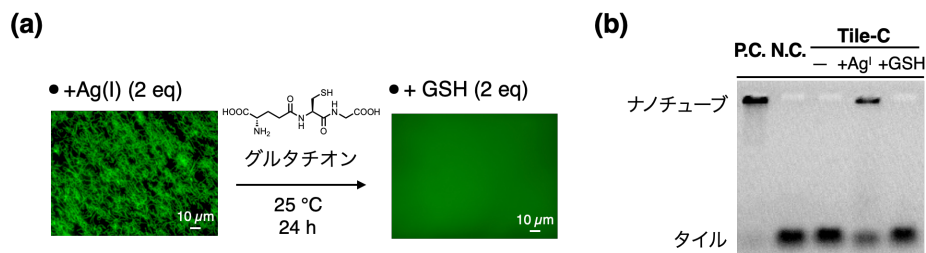


図 4 (a) Ag(I)イオン存在下で形成したメタロ DNA ナノチューブに対し、グルタチオン(GSH)を添加したときの蛍光顕微鏡観察の結果。(b) アガロースゲル電気泳動による評価。P.C.: ポジティブコントロール (DNA ナノチューブ構造)、N.C.: ネガティブコントロール (ナノチューブを形成しない配列の DNA タイル)。

度の小さいナノチューブに対応するバンドは消失し、DNA タイルに帰属されるバンドのみが検出された (図 4b)。

以上の結果から、Ag(I)イオンの添加および除去によって、DNA ナノチューブの形成と分解を可逆的に制御可能なシステムを構築できたことが示された。

5. まとめ

本研究では、粘着末端部分に C-C ミスマッチを導入した DNA タイル構造を設計し、Ag(I)イオンの添加による C-Ag(I)-C 錯体形成に基づく自己集合によって、最大 30 μm に達するメタロ DNA ナノチューブ構造体の構築に成功した。さらに、Ag(I)イオンを除去することで、形成されたメタロ DNA ナノチューブを可逆的に分解できることも実証した。

現在は、金属イオンの添加および除去に伴うメタロ DNA ナノチューブの形成・分解過程の速度論の解析や、得られた DNA ナノチューブの熱的安定性の評価を進めている。加えて、他の金属配位性の修飾核酸塩基を用いた、金属イオン応答性 DNA ナノチューブの開発にも取り組んでいる。今後は、複数種類の DNA タイルを組み合わせて構造を非対称化し、金属イオンを外部刺激とした伸縮や屈曲の制御が可能な DNA ナノ材料の構築を目指す予定である。これにより、分子マシンや分子アクチュエータへの応用展開を考えている。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人天野工業技術研究所から多大なご支援をいただきました。また、本研究は技術補佐員の方々の協力により遂行することができました。ここに記して謝意を示します。

参考文献

- 1) N. Jonoska, E. Winfree (eds.), “Visions of DNA Nanotechnology at 40 for the next 40: A Tribute to Nadrian C. Seeman”, Springer, 2023.

- 2) P. W. K. Rothemund, A. Ekani-Nkodo, N. Papadakis, A. Kumar, D. K. Fygenson, and E. Winfree, “Design and Characterization of Programmable DNA Nanotubes”, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 16344–16352.
- 3) A. Kuzyk, R. Schreiber, Z. Fan, G. Pardatscher, E.-M. Roller, A. Högele, F. C. Simmel, A. O. Govorov, and T. Liedl, “DNA-based self-assembly of chiral plasmonic nanostructures with tailored optical response”, *Nature*, **2012**, *483*, 311–314.
- 4) P. Zhan, K. Jahnke, N. Liu, and K. Göpflich, “Functional DNA-based cytoskeletons for synthetic cells”, *Nat. Chem.*, **2022**, *14*, 958–963.
- 5) Y. Takezawa, “Rational Design of Metal-Responsive Functional DNA Supramolecules”, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, **2024**, *104*, 349–369.
- 6) T. Nakama, Y. Takezawa, D. Sasaki, and M. Shionoya, “Allosteric Regulation of DNAzyme Activities through Intrastrand Transformation Induced by Cu(II)-Mediated Artificial Base Pairing”, *J. Am. Chem. Soc.*, **2020**, *142*, 10153–10162.
- 7) Y. Takezawa, K. Mori, W.-E. Huang, K. Nishiyama, T. Xing, T. Nakama, and M. Shionoya, “Metal-Mediated DNA Strand Displacement and Molecular Device Operations Based on Base-Pair Switching of 5-Hydroxyuracil Nucleobases”, *Nat. Commun.*, **2023**, *14*, 4759.
- 8) A. Ono, S. Cao, H. Togashi, M. Tashiro, T. Fujimoto, T. Machinami, S. Oda, Y. Miyake, I. Okamoto, and Y. Tanaka, “Specific interactions between silver(I) ions and cytosine–cytosine pairs in DNA duplexes”, *Chem. Commun.*, **2008**, 4825–4827.
- 9) K. S. Park, J. Y. Lee, and H. G. Park, “Mismatched pyrrolo-dC-modified duplex DNA as a novel probe for sensitive detection of silver ions”, *Chem. Commun.*, **2012**, *48*, 4549–4551.

学会発表

1. 竹澤 悠典, 戸田 翔太, 大西 雄登, 森 圭太, 塩谷 光彦, 「金属錯体形成を介して形成する DNA ナノチューブ構造体の構築」, 第 22 回ホスト・ゲスト・超分子化学シンポジウム, 東京, 2025 年 6 月.