

# 研究報告書

## 「DNA セルフアセンブリによるナノシステムの創製」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成20年10月～平成25年3月

研究者: 田川 美穂

### 1. 研究のねらい

ナノテクノロジーにおける重要課題の一つとして、ナノ部品をボトムアップ的にアセンブリするためのプログラマブルな技術の開発がある。ナノ粒子等、ナノメートルサイズの物質では、バルク材料と異なる特異的な性質を示すものがある。それらの特異的な性質を利用するためには、それらナノ材料をナノ～メゾスコピックスケール、あるいはコロイド次元と呼ばれるスケール/次元でどう組み立てるかが鍵となる。これは、ナノ材料の特異的な性質が、これらのスケール/次元における構造と深く関係しているからである。本研究では、DNA 分子あるいは DNA ナノ構造体(数本の DNA 分子から成るナノ構造体)を用いたナノ材料の構造制御の可能性を追求し、ボトムアップナノテクノロジーの一手法を確立することを目指す。

「DNA ナノ構造体ガイドのDNA被覆ナノ粒子結晶化の研究(研究テーマA、B)」では、ナノ粒子を DNA 分子及びDNAナノ構造体を利用して二次元、三次元の秩序的な構造へとプログラマブルにアセンブルする方法の開発を目指す。ナノ粒子等のナノサイズのユニットは、それ自身が特異な物性を示すだけでなく、それらをどのように組み立てるかによって更に面白い物性が生まれる。本研究では、ナノ粒子間の相互作用と結合を DNA 分子及び DNA 構造体で正確に制御し、他の方法では成し得ない構造と機能を創製することが目的である。

「DNA タイルのセルフアセンブリの研究(研究テーマC-E)」では、DNA タイル(数本の DNA 分子で作られた方形状のナノ構造体)をセルフアセンブリして構築した DNA タイルアレイを足場として、ナノ部品をプログラマブルにアセンブリし、トップダウン的な微細化技術の限界を超える技術の開発を目指す。これまでの先行研究における DNA 構造体は、熱で簡単に壊れ、また外力によって簡単に変形してしまうことから、ボトムアップナノテクノロジーの手法として用いるには問題があった。本研究では、ナノ部品をアセンブリするための足場として十分に頑丈な、熱や外力に強い DNA 構造体を構築する。また、従来の DNA セルフアセンブリ技術では実現困難であった「非周期パターン(非周期アドレス)の大規模化: トップダウン技術と融合できるだけの大きさをもつ非周期パターンの足場の構築」にも挑戦する。非周期パターンは非周期構造体で作るという従来の考え方に囚われずに、生体が行っている複雑な構造をシンプルに作成する方法(タンパク合成方法)に習い、非周期パターンを周期構造体で作るという発想の転換を行う。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

ナノ粒子表面に DNA を結合させてコード化すると、DNAの相補性により粒子間の相互作用が制御され、超構造を形成する。DNAの長さや配列、ナノ粒子の大きさを変えることで、ナノ粒子超構造の結晶構造を変えることができる。しかしこの方法ではDNAの結合手の数を制御できないため、作成できる結晶構造に限りがある。そこで本研究では、ナノ粒子間の空間配置を

より精密に制御し、超構造制御の自由度を広げようと、「高融点のDNAナノ構造体を介在させたDNA被覆ナノ粒子(DNA-NP)の結晶化」という新しい方法を考え出した。DNAナノ構造体の設計自由度及びプログラマビリティを利用して結合の手の数や方向、距離、結合力等を制御することにより、従来の方法よりもさらに精密な構造制御を行った。高融点の DNA 正四面体を介在させて DNA 被覆金ナノ粒子(DNA-AuNP)を結晶化すると、ダイヤモンド構造が形成されることを示した。

DNA-AuNP の二次元結晶化の研究では、三次元で成功している DNA-AuNP の結晶化を二次元結晶化へ拡張するために、基板との静電相互作用を用いた。電荷をもつ基板の上に DNA-AuNP を吸着させた状態で拡散し、DNAの相補性を利用することにより、ナノ粒子の二次元超構造の制御を精密に行うことに成功した。

また、従来のDNA構造体は熱や外力に弱く、壊れやすかったため、例えばマイクロサイズまで成長するDNAタイルアレイを形成しても、それをさらにナノ材料をアセンブリするためのテンプレートとして利用するのは難しかった。本研究では、二次元DNAタイルアレイの構造安定化及び耐熱化にも取り組み、ナノ材料をアセンブリするためのテンプレートとして利用できる程丈夫な構造体を作成することに成功した。二次元DNAタイルアレイの構造安定化に成功したことで、周波数変調検出型原子間力顕微鏡(FM-AFM)による溶液中高分解能測定に成功し、DNA二重螺旋を直接的に画像化することができた。

タンパク合成の方法に習った DNA タイルによる二次元非周期アドレスのアセンブリの研究では、DNA タイルアレイの大きさを決めるルーラーDNA を用いることにより $6 \times N$ の固定サイズの DNA タイルアレイを形成し、更にそのタイルアレイ上に二次元アドレス空間を配置した。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A 「高融点のDNAナノ正四面体を介在させたDNA被覆金ナノ粒子(DNA-AuNP)の三次元結晶化」

四本の対称的な結合手を持つ高融点の DNA 正四面体を介在させて DNA-AuNP を結晶化することにより、DNA-AuNP のダイヤモンド構造を作ることに成功した。ダイヤモンド構造は、DNA-AuNP のみの結晶化では作成できなかった構造である。

### 研究テーマ B 「DNA被覆金ナノ粒子(DNA-AuNP)の二次元結晶化」

基板との相互作用を利用して、DNA-AuNP の二次元結晶化を行った。脂質二重膜、マイカ、ポリマーコートシリコン基板上で DNA-AuNP を表面拡散し、温度、イオン濃度等の条件を最適化することにより、二次元方向にのみ成長する結晶化条件を見出すことに成功した。

### 研究テーマ C 「光クロスリンクによる二次元 DNA タイルアレイの構造安定化」

ナノ材料をアセンブリするためのテンプレートとして利用できる二次元DNA構造体を作成した。数本のDNA一本鎖から成るDNAタイルを結晶化することにより、マイクロサイズの二次元タイルアレイが形成される。予めDNAタイルの結合部に光感受性分子の3-cyanovinylcarbazole nucleosides (CNVKs)を導入しておき、結晶化後にUV光を照射することによってタイル同士を結合した。従来のDNA構造体は軟らかく、外力や熱で簡単に壊れてしま

っていたが、本研究の光クロスリンク反応により安定化されたDNAタイルアレイは70度まで熱をかけても壊れず、また外力に対しても丈夫であることがわかった(図1)<sup>[1]</sup>。

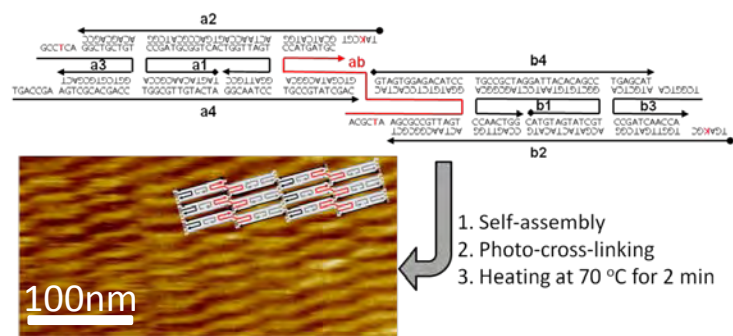


図1. 70度まで加熱しても壊れないDNAタイルアレイ

### 研究テーマ D「周波数変調検出型原子間力顕微鏡(FM-AFM)による構造安定化後の DNA タイルアレイの溶液中高分解能測定」

FM-AFMは、振幅変調型原子間力顕微鏡(AM-AFM)に比べ高分解能の像が得られることが無機材料等の固い材料表面測定で知られていたが、バイオ分子等の軟らかい材料への応用は難しかった。DNA構造体の測定においては、測定中にカンチレバーのタッピングダメージで構造体が壊れてしまう現象が起き、高分解能の測定は難しかった。本研究で光クロスリンク反応によりDNAタイルアレイを安定化させたことにより、FM-AFMの測定に耐える強度を持たせることに成功し、これまでにない高分解能測定が可能となった。図2に示す溶液中FM-AFM像は、DNA二重螺旋の主溝 (major groove) と副溝 (minor groove) までも画像化することに成功している(論文投稿中)。

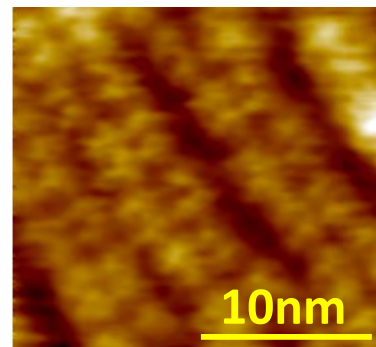


図2.DNAタイルアレイのAFM像

### 研究テーマ E「タンパク合成方法に習った DNA タイルの二次元プログラマブルアセンブリ」

タンパク合成では、mRNAにコードされた情報に従ってアミノ酸の配列が決まる。そしてアミノ酸の一次元配列が決まると自然と二次元の構造(フォールディングによる二次構造)も決まる。本研究では、一次元の配列を決めるだけで二次元の構造が決まるこのタンパク合成の方法に習い、DNAタイルのプログラマブルセルフアセンブリを行った。タンパク合成ではアセンブリのスケールを決めるルーラー分子はmRNAであるが、本研究ではmDNAをルーラー分子として、DNAタイルが一次元方向への順序で幾つつかを制御した。図3aに本研究の概念図を示す。一次元目のmDNA1で6種類のアドレスタグ配列を並べた幅92nmのDNAタイルのストリングを二次元目のmDNA2を用いて並べる実験を行い、一次元方向に92nmの幅をもつ固定サイズの周期的DNAタイルアレイ基板上に二次元の非周期アドレスタグをアセンブリした(図3b)<sup>[2]</sup>。非周期アドレスタグはそれぞれ固有の塩基配列(正規直行配列)の一本鎖DNAであり、この正規直行配列と相補的な配列を結合させたナノ材料を、このアレイ上でプログラマブルに配置することを考えている。

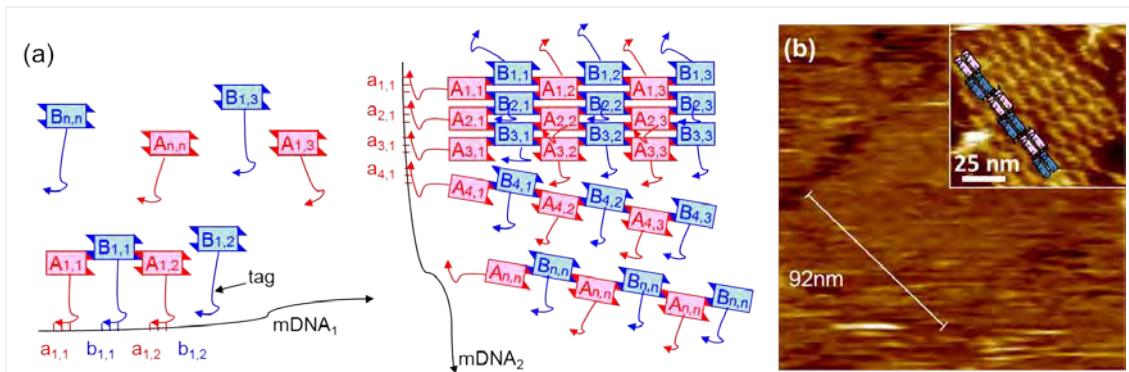
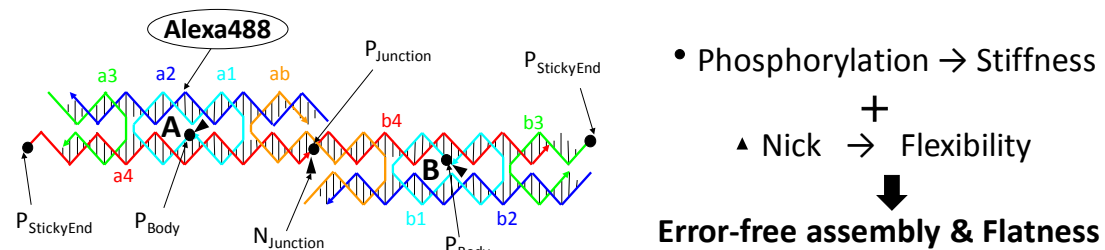


図3. (a) mDNAを用いたDNAタイルアセンブリの概念図。(b) 非周期アドレスを持つ固定サイズのDNAタイルアレイのAFM像

### 研究テーマ F「DNA 末端リン酸化が DNA タイルアレイのアセンブリに及ぼす効果」

DNA末端リン酸化が、DNAタイルアレイのアセンブリエラーを低減し、ナノスケールの規則的な構造を維持するために重要であることを発見した。またDNAタイルのどの部位をリン酸化するかにより、その効果が異なることも発見した<sup>[2]</sup>。蛍光顕微鏡及び原子間力顕微鏡により、マイクロ・ナノ両スケールで構造を観測し、リン酸化部位とアセンブリ効率の関係を明らかにした(図4、論文投稿準備中)。



$P_{\text{Junction}}$	+	+	-	-	-	+	+	-	-
$P_{\text{body}}$	+	-	+	-	-	+	-	+	-
$P_{\text{StickyEnd}}$	+	-	-	+	-	-	+	+	-
$N_{\text{Junction}}$	+	+	+	+	+	+	+	+	-
$1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$									
High resolution									
Fluorescence microscopy (Scale bar= 20μm)									

図4. DNAタイルアセンブリにおけるDNA末端リン酸化の効果

### 3. 今後の展開

光学的、触媒的、電氣的、電磁的に特異な性質をもつナノ粒子の応用は学術的にも工業的にも期待が大きいため、それらをどう組み立てるか、またその超構造をどう制御するかは重要課題である。本研究ではその課題を解決するための一手法としてDNA分子及びDNAナノ構造体を利用する方法が有効であることを示した。三次元結晶化は、例えばコロイドフォトニック結晶、メタマテリアル、超高効率量子ドット太陽電池、分子準結晶の実現手段として有効である。また、二次元結晶化は、バイオセンサ、例えばナノロッドやナノチューブ、または精密な微結晶配向制御が必要な圧電素子セラミクス結晶成長のための種結晶テンプレートとしての利用が期待できる。また、二次元結晶化方法を応用して三次元方向へ異種粒子をプログラマブルに積層する技術が開発されれば、分子ナノエレクトロニクスへの応用も考えられる。

本研究の三次元結晶化方法は、DNA 構造体を介在させることにより、他の方法に比べナノ粒子超構造制御の精度と自由度が飛躍的に高いことが特色であるだけでなく、結晶化後に更に他の粒子や分子を結合させられるという利点もある。二次元結晶化においても、今後DNAナノ構造体を介在させた構造制御の研究を行う予定である。

本研究のもう一つの特色は、ナノ粒子以外のナノ材料への応用可能性である。本手法では金ナノ粒子をはじめ様々な金属粒子や半導体粒子等、種類を問わず同じ法則で結晶化できるが、その他にも、球形以外のナノ粒子、フラレン、更にはタンパク分子等の生体分子も本研究の法則を応用して結晶化できる可能性がある。将来的には、ボトムアップナノファブリケーション技術としても期待できる。また、結晶化困難なタンパク分子の結晶化手法へ応用してX線構造解析に役立てたり、生体反応に関与する分子を本手法で結晶化し、方向の揃った状態でリアルタイム X線解析する等、バイオ分野への応用も期待できる。

### 4. 自己評価

「DNA ガイドのナノ粒子結晶化」及び「DNA タイルのセルフアセンブリ」という二つの方向から、DNA セルフアセンブリがボトムアップナノファブリケーションの一手法として有効であることを示せた。どの研究テーマも、ほかに類似研究の無い独創的で挑戦的な課題であったが、すぐに研究成果が出るかどうか分からない新しい分野開拓に挑戦できたのも、さきがけのバックアップがあったからこそである。特に高融点のDNAナノ構造体を介在させたDNA被覆ナノ粒子の結晶化の研究は、立ち上げにかなり苦労したが、自分の研究分野にナノ粒子実験や小角散乱等、未経験の分野を取り込むことにより、これまでのナノ材料アセンブリやDNAナノテクノロジーの手法では不可能であったナノ材料の超構造制御を飛躍的に発展させることに繋がった。このように、私にとってさきがけ期間は研究者としての土台を固める期間であり、すぐに成果の出る課題ではなく、敢えて成果に繋がるかどうか分からないテーマに挑戦してきたため、さきがけ期間に成果として間に合わなかった部分が多々ある(投稿中論文1本、投稿準備中3本)。ただ、テーマの独創性や研究手法の多様さ等、普通以上にしっかりした大きな土台を作ることができたため、今後のアウトプットに是非注目して頂きたい。具体的には、さきがけ期間中に間に合わなかった論文掲載や研究途中のテーマの完成、そしてさきがけ期間中に立ち上げた独自の分野の今後の発展である。

研究の本筋とは関係ないが、未知の研究分野を開拓するために渡米し、所属機関にブルックヘブン国立研究所を選んだことが本研究の「DNA 被覆ナノ粒子のダイヤモンド構造構築」の成果



に繋がった。三年間滞在したブルックヘブン国立研究所では、さきがけ研究に対する契約がなかなか成立せず、長期間にわたって関係各所に交渉したり、使用できないさきがけ予算の代わりに別の財源を確保するため、研究テーマを変更せざるを得なかったりと、大変な苦労を経験したが、この苦労なくして本成果は生まれなかった。

## 5. 研究総括の見解

ナノ材料の特異的な性質は、スケール/次元における構造と深く関係しており、それゆえにバルク材料と異なる特異的な性質を示すものがある。本研究は、DNA 分子あるいは DNA ナノ構造体(数本の DNA 分子から成るナノ構造体)を用いたナノ材料の構造制御の一手法を確立することを目指している。そのため、①「DNA ナノ正四面体を介在させた DNA 被覆金ナノ粒子 (DNA-AuNP) の三次元結晶化」 ②「DNA 被覆金ナノ粒子 (DNA-AuNP) の二次元結晶化」 ③「光クロスリンクによる二次元 DNA タイルアレイの構造安定化」 ④「FM-AFM による DNA タイルアレイの溶液中測定」 ⑤「DNA タイルの二次元プログラマブルアセンブリ」 ⑥「DNA 末端リン酸化がアセンブリに及ぼす効果」という 6 課題に取り組んだ。その結果、DNA 被覆金ナノ粒子 (DNA-AuNP) を結晶化するとダイヤモンド構造が形成されること、二次元 DNA タイルアレイの構造安定化及び耐熱化、DNA 二重螺旋を直接的に画像化、等々興味深い成果をおさめた。

ナノ粒子をどう組み立てどう制御するかは重要であり、本研究はそのための一手法として DNA 分子及び DNA ナノ構造体を利用する方法が有効であることを示した。

## 6. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

- |   |
|---|
| 1. <u>Miho Tagawa</u> , Koh-ichiroh Shohda, Kenzo Fujimoto, Akira Suyama. "Stabilization of DNA nanostructures by photo-cross-linking". Soft Matter vol.7, 22, pp10931-10934, 2011.   |
| 2. <u>Miho Tagawa</u> , Tadashi Ohtani, Koh-ichiroh Shohda, Kenzo Fujimoto, Akira Suyama. New photoligation method and strand phosphorylation to construct improved fully-addressed DNA scaffolds. Proceedings of 6th Annual Conference on Foundations of Nanoscience: Self-Assembled Architectures and Devices (FNANO09) 2009, pp41-42, Utah, USA. |
|   |
|   |
|   |

### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 1 件

1.

発 明 者: Oleg Gang, Fang Lu, Miho Tagawa

発明の名称: Rational Assembly of Nanoparticle Superlattices with Designed Lattice Symmetries

出 願 人: Brookhaven National Laboratory

出 願 日: 2012/1/18

出 願 番号: 61/587,786



(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)

学会発表:

.1. (ポスター) Miho Tagawa, Tadashi Ohtani, Koh-ichiroh Shohda, Kenzo Fujimoto, Akira Suyama. New photoligation method and strand phosphorylation to construct improved fully-addressed DNA scaffolds. Proceeding of The 6th Annual Conference on Foundations of Nanoscience. April 20th, 2009, Utah.

2. (依頼講演) 田川美穂, 陶山明, Oleg Gang. DNAセルフアセンブリによるナノシステムの創製. 第 58 回高分子討論会. 2009 年 9 月 16 日, 熊本.

3. (招待講演) Miho Tagawa. DNA-covered nanoparticle assembly mediated by DNA nanostructures. Japan-Netherlands Symposium on Crystal Growth -Theory and in situ Measurements-. July 24th, 2012, Sendai, Japan.

4. (口頭発表) Miho Tagawa, Kevin Yanger, Oleg Gang. Gold Nanoparticle Assembly mediated by DNA Nanostructures. The 39th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC2012). Nov. 17th, 2012, Nagoya, Japan.

5. (受賞) Aug. 28th, 2012. Brookhaven National Laboratory Patent Incentive Award

Oleg Gang, Fang Lu, Miho Tagawa. "Rational Assembly of Nanoparticle Superlattices with Designed Lattice Symmetries". Serial No. 61/587,786. Filed January 18, 2012.