.....

論 文

分子組立の鋳型としての1本鎖 DNA の伸長固定 小林琢也¹, 鷲津正夫 (2004年8月23日受付,2004年11月24日受理)

Stretching and Positioning of Single Stranded DNA as a Template for Molecular Construction

Takuya KOBAYASHI¹ and Masao WASHIZU

((Received August 23,2004; Accepted November 24,2004)

The high-specificity self-assembling nature of DNA makes the molecule a candidate for the template for the construction of molecular devices. In order to construct a functional device, the template must be positioned onto a predetermined site on a substrate to allow external connections, and the components must be properly aligned onto the template. A key factor is the high yield of binding, especially when the device consists of many components. Such high yield requires that the bases of the template DNA be exposed so that its counterpart can interact freely, and the template be stretched to avoid folding or coiling that hampers the interaction. For this purpose, we have developed a method, by which a single-stranded DNA is stretched and immobilized bridging over an electrode pair, with the molecular ends anchored while the middle part is left free to interact with foreign molecules. We expect that these stretch-and-positioned DNA with accessible base-pairs will lead to the high-yield molecular construction.

1. はじめに

DNA は、4 つの塩基(A,T,C,G)が 0.34nm の間隔で並んだ 構造を持ち、A は T と、G は C と特異的に結合する性質を持 つ.

Seeman ら¹⁾は、この性質を利用して、特定の配列を持つ DNA を合成し、自己集合によりナノ構造体を作成する技術を 開発した.しかしながら、このような手法により得られるナ ノ構造は、一般に収率が極めて低く、また、その産物は溶液 として得られるため、望みの位置に分子を組み立てるといっ た用途には不向きである.一方、DNA をメタライゼーショ ンして配線素子として利用する・DNA 上に単電子トランジス タを形成するなどのアイデアが提案されているが²³⁾、これら においても、DNA を特定の位置に配列するという基本技術が 未解決のまま残されている.

もし,図1に示すように,DNA を固定しておき,ここにオ リゴヌクレオチド(短い1本鎖DNA)でラベルした分子を結 合させれば,任意の分子を,任意の順序で,0.34 nm の分解 能で,基板上の特定の位置に配列することができるであろう ⁴⁾.このような技術には,図1に例として描いた分子エレク

キーワード: DNA, template, self-assembly, electrostatic field 東京大学工学系研究科機械工学専攻(113-8656 東京都文京 区本郷 7-3-1)

Department of Mechanical Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan.

¹ kobayashi@washizu.t.u-tokyo.ac.jp

トロニクス素子の配列による回路構成や,電子伝達系等の機 能性分子の配列による機能性分子ユニットの構築などの応用 が考えられる. DNA は,化学的に安定であり,任意の塩基配 列を容易に合成できるので,このような分子組立の鋳型(テ ンプレート)として最もふさわしい材料と考えられる.

上述のような自己集合による分子組立を実現するためには, 次の2点が要求される.

- テンプレート DNA が, 基板上の予め定められた位置(た とえば図1の場合には2つの電極間)に、外来オリゴヌ クレオチド(以下プローブ DNA)が結合できる形で固 定されること。
- 2) テンプレート DNA とプローブ DNA が高い収率で結合 できること.

1 つのプローブ DNA がテンプレート DNA と結合する確 率を η とすると,N 個の素子が結合する確率は $\eta_N = \eta^N$ である. 非現実的に高い $\eta = 90\%$ という仮定のもとでも、10 個の素子



図1 DNA を鋳型とした分子組立の概念図

Fig.1 Conceptual sketch of DNA-based molecular construction.

からなるシステムが構築される確率は 0.3, 100 個の素子な ら 0.00002 にしかならない.

オリゴヌクレオチドの DNA への結合を利用する従来技術 としては、FISH (Fluorescence In Situ Hybridization)がある. こ の手法は、変性させて 2 本鎖を開裂したゲノム DNA に蛍光 ラベルしたオリゴヌクレオチドを結合させ、顕微鏡下で直接 観察することにより特定配列の位置を検出するものである. しかしながら、このような手法においては、2 本鎖が開裂し てオリゴヌクレオチドが結合できるように塩基が露出する確 率は低く、かつ、オリゴヌクレオチドが結合したとしても、 開裂した DNA が元の2本鎖に戻るプロセスとの競合になる. 従って、2 本鎖 DNA をそのままテンプレートとして用いるの では、本質的に高い収率を得ることはできない.

この観点からは、塩基が対を形成していない 1 本鎖 DNA がテンプレートとして望ましいと考えられる.しかしながら、 一般に 1 本鎖 DNA は persistent length⁵⁾が短く、コイル状の形 態を取りやすい.もしコイル状に丸まってしまうと、外来分 子が塩基にアクセスしにくくなる上に、鎖内で対合を作るな どして、プローブ DNA の結合を妨害することになる.従っ て、テンプレート DNA は直線状に引き伸ばされた形である ことが求められる.直線状の形態は、さらに、直線上の形態 には、a) 分子配列の評価がしやすい、b) たとえば図 1 のよ うな分子素子回路の場合には回路の短絡を防ぐ、といった利 点もある.

これらの点に鑑み,今回の研究では,1本鎖DNAを直接伸 長固定する方法を開発し,ここへのオリゴヌクレオチドの結 合の観察を試みたので,ここに報告する.

2. 2 本鎖 DNA の静電伸長固定

我々の研究室では2本鎖 DNA の伸長固定技術をすでに開
発している⁶. その原理を図2に示す.

2本鎖 DNA は 2nm の直径, 3kbp あたり約 1 µm の長さを 持つ. このような長いひも状分子は水溶液中では熱運動によ りランダムコイル状になっている. 微細加工により形成され た電極を持つ基板上に DNA 水溶液を置き,1MHz 1MV/m の高 周波・高電界を印加すると,DNA は分極し,外部電界との相 互作用により直線状に引き伸ばされる. この時,電極は厚さ 数十 nm と薄く,電極エッジに強い電界集中が生じているの で,DNA は,誘電泳動により,電極エッジに分子端が接する まで引き寄せられる. アルミニウムのように電気化学的に活 性な金属を電極材料として用いた場合には,電極と接触した 分子端は電極に永久的に固定されることになる.



図2 二本鎖 DNA の静電伸長固定

Fig.2 Electrostatic stretch-and-positioning of double-stranded DNA.

3. 1 本鎖 DNA の蛍光標識

2本鎖 DNA の分極は, DNA のリン酸基に引き寄せられた カウンターイオンの移動により生ずる. 従って, 1本鎖 DNA においても静電伸長が可能であると考えられる. しかしなが ら, 2本鎖 DNA は塩基対のために比較的曲がりにくい構造を 持つのに対し, 1本鎖 DNA は,背骨周りの回転自由度があ り,鎖内塩基対合や折り畳みを形成しやすいため,コイル状 の形態を取りやすい. 従って, 1本鎖 DNA の伸長には, 2本 鎖 DNA よりも高い電界強度が必要であることが予想される.

1本鎖DNAの静電伸長の観察を行う際の1つの技術的問題 は、2本鎖 DNA の場合のインターカレータ色素のような、1 分子観察を可能にするほど十分な蛍光強度を持つ色素が無い ことにある. そこで, まず, 1本鎖 DNA の蛍光標識法の開発 を行った.その手法を図3に示す.適当なプライマーを用い, 2本鎖 DNA の特定の領域を PCR により増幅する. この PCR の過程において、蛍光標識されたモノマー(Alexa dUTP)を混 入しておけば、 蛍光が DNA 鎖に組み込まれる. しかしなが ら、このプロセスにより得られるものは、互いに相補的な1本 鎖 DNA の 50% ずつの混合物であるので、ある確率で互いに 結合して 2 本鎖 DNA に戻ってしまうことになる. 従って, 純粋な1本鎖 DNA の静電伸長を観察するためには、ここで 得られた 2 つの 1 本鎖 DNA のうちのいずれかを完全に取り 除く必要がある. そこで, ここでは, アビジン-ビオチン結合 を用いてこの除去を行った. すなわち,図3a)に示すように, PCR を行う際のプライマーの一方として、5端にビオチンを 持つものを用いる. PCR を行い (図 3 b),得られた DNA を アビジン固定化した磁気ビーズに固定する(図3c). 上澄み



図3 一本鎖 DNA の蛍光標識

Fig.3 Fluorescence labeling of single-stranded DNA.

に残る未結合 DNA を洗い流した後,0.1Mの NaOH で変性させ,解離してきた1本鎖 DNA を回収する(図3d).

このプロセスにより得られた1本鎖 DNA の純度を,1本鎖 DNA のみを消化する Mung Bean nuclease (TAKARA)を用い て測定した.1本鎖 DNA を Mung Bean で消化 (5 Unit, 23 度, 10分)した場合,1本鎖 DNA は完全に消化され,2本鎖 DNA は検出限界以下しか含まれていないことが確認された.比較 のために2本鎖 DNA に対しても同条件下で同じ実験をした ところ,2本鎖 DNA は消化されないことが確認された.従っ て,図3の手法により,可視化観察を行うのに十分な純度で 1本鎖 DNA が得られたと考えられる.



図4 電界強度一伸長長さの関係 (a) 二本鎖 DNA, (b) 一本鎖 DNA Fig.4 Field strength v.s. stretched length for (a) double-stranded (ds-) and (b) single-stranded (ss-) DNA.

なお,この方法により得られる蛍光標識 DNA のサイズの 上限は, PCR の収率により決まり,最大で約 10kbp であった.

4. 1 本鎖 DNA の静電伸長

このようにして得られた蛍光標識 1 本鎖 DNA を用いて, 静電配向の観察を行った.一般に,薄膜電極を電源に接続し て電圧を印加すると,電極エッジ尖端において EHD 対流が 生じるが,このような対流があると,DNA の伸長が静電伸長 によるものか流体力学的伸長によるものかがわからなくなっ てしまう.そこで,以下の実験では,対流の影響を受けにく いフローティングポテンシャル電極⁷を用いて,実験を行っ た.

図4は、電極エッジに片端固定された DNA の、電界強度 に対する伸長長さの測定結果を、2本鎖 DNA(a)と1本鎖 DNA (b)についてプロットしたものである. DNA はいずれも 10kb である. 図中で、矢印は、電圧を増加・減少させた時の時間 経過を示している. 図4 a)の2本鎖DNAの場合,電界強度Eを増加させるに従って,伸長長さは増加し,約3.4 µmで飽和した.これは10kbpの2本鎖DNAの理論長さ(DNAの塩基の間隔0.34 nm×10kb)と一致する.Eを減少させていくと,伸長長さは,Eを増加させていった時の曲線を逆にたどって小さくなった.なお, E=0で長さが0にならないのは,光学測定の分解能が0.5 µm 程度しかないからである.

一方,図4 b)の1本鎖 DNA の場合には,伸長するにはより 大きな電界強度が必要であるが,伸びた状態を保つにはより 少ない電界強度ですむという,明確なヒステリシスを示した. これは,1本鎖 DNA においては,部分的な鎖内塩基対合の形 成あるいは疎水性相互作用などの鎖内の相互作用が大きく, 電界強度を上げていく時には,これらの相互作用を引き離す ためにより大きな力が必要であることに起因しているものと 考えられる.この場合にもEが大きいところで伸長長さが飽 和するが,この長さは,2本鎖 DNA の約2/3 程度であった.

5. 1 本鎖 DNA の伸長固定

このように伸長した 1 本鎖 DNA を分子組立のためのテン プレートとして用いるためには、電界を取り去った後でも DNA が伸長されたままでなければならない.また、伸長され た DNA が電極間の基板に吸着してしまうと、外来分子が結 合できなくなる.このような条件を満たす固定を実現するも のとしては、フローティングポテンシャル電極系が開発され ている⁷⁾.図5は、この電極系を用いて行った1本鎖 DNA の 伸長固定の写真で、ギャップ長 2 µm の電極を橋絡する形で 多数の1本鎖 DNA が固定されているのが見える.これらの 固定された DNA は、溶液の流れによって湾曲する様子が観 察されたことから、DNA は基板に吸着されていないことが確 認された.



図 5 フローティングポテンシャルに両端が身長固 定された一本鎖 DNA, 電極ギャップ = 2 μm Fig.5 Stretched single-stranded DNA anchored at both ends onto the floating-potential electrode; gap length = 2 μm.

6. 1本鎖へのハイブリダイゼーション

このように伸長固定された1本鎖テンプレート DNA に対 する1本鎖プローブ DNA の結合の動態観察を試みた. この 実験では、テンプレート DNA とプローブ DNA を別個に観察 するため、両者を異なる蛍光色素でラベルした. すなわち、

- a) テンプレート: 10kb の1本鎖 DNA. Alexa488 (B 励起, 励起波長 490nm, 蛍光波長 520nm) でラベル.
- b) プローブ DNA: テンプレート DNA の中央付近と相補 的な配列を持つ, 5kb の1本鎖 DNA. Alexa564 (G 励起, 励起波長 575nm, 蛍光波長 600nm)でラベル.

を図3の方法を用いて作った.

実験手順は以下で,温度条件が特に記されていない限り室 温で行なった.

- i) テンプレート DNA を完全に解離させるため、94 度で2 分,0 度で2 分インキュベートした後,2 µm のギャップを 持つフローティングポテンシャル電極に両端固定.
- ii) プローブ DNA の吸着防止のために Bovine serum albumin (10mg/mL)を導入、ガラス表面を覆う.
- iii) プローブ DNA を導入しハイブリダイズさせる.

図6は純水中でテンプレートDNA とプローブDNA のハイ ブリダイゼーションを試みた結果で,(a)が B 励起で見たテン プレート DNA,(b)が G 励起で見たプローブ DNA である. 図 a)とb)では,ステージを動かさずに励起光を切り替えるこ とにより,同じ位置を見ているが,a)のテンプレート DNA が 見えている位置には,b)のプローブ DNA は全く見えていな い. すなわち,テンプレートとプローブのハイブリダイゼー ションは生じなかったものと思われる.

この原因は, DNA の背骨がリン酸基のために負に帯電して いるため,静電反発力によりプローブ DNA がテンプレート DNA に近づけなかったことにあると考え, 溶液の塩濃度を上 げて, この静電相互作用を弱めることとした. 使用したバッ ファーは Tris-HCl (pH 7.0), 100 mM, NaCl 1 M, EDTA 10 mM である. EDTA を入れているのは, 2 価の陽イオンによって DNA 同士が非特異的な吸着をおこし, ハイブリダイゼーショ ンと区別できなくなるのを防ぐためである.

図7が実験の結果である.図 a)でテンプレート DNA が存 在する位置に、図 b)でプローブ DNA が存在しており、テン プレート DNA のない位置にはプローブ DNA がいないことか ら、プローブ DNA がテンプレート DNA に結合していると判 断される.しかしながら、その結合位置は、相補配列のある テンプレート DNA 中央付近に必ずしも限定されるものでは なかった.また、結合の動態の経時観察によれば、プローブ DNA が一旦テンプレート DNA に接触すると、その位置で結



(a) Blue excitation (template DNA)



(b) Green excitation (probe DNA)

- 図 6 純粋中でのテンプレート DNA とプローブ DNA のハイブリダイゼーション
- Fig.6 Hybridization of the DNA template and the probe in pure water.

合してしまい,解離したり,移動したりする様子⁸⁹⁾は観察されなかった.

7. 議論

以上の結果を解釈するにあたっては、まず、テンプレート DNA が、プローブ DNA の結合が可能なように固定されてい るかが問題となろう。もしDNAの背骨が直線状になるまで1 本鎖 DNA が伸長されれば、2 本鎖 DNA の約2 倍の長さを持 つはずである。実際, 文献¹⁰⁾においては, 1本鎖化した自然 長16 µm のλDNA が流体力を用いて20 µm 以上に伸長された ことが報告されている。しかしながら、このようなオーバー ストレッチングは、塩基のスタッキング構造を破壊し、相補 的な DNA の結合を困難あるいは不可能にしてしまう。すな わち, ハイブリダイゼーションのためには, 2本鎖 DNA の自 然長以上に1本鎖DNAを伸長することは有害である。また, 塩基のスタッキングのπ結合や塩基間の疎水相互作用は,塩 基間の引力となるはずなので、これらの結合が破壊されない 程度の適度な力を加えて伸長した場合には,1本鎖 DNA の伸 長長さは2本鎖 DNA の場合よりも若干短くなることすら考 えられる。



(a) Blue excitation (template DNA)



(b) Green excitation (probe DNA)

- 図 7 バッファー中でのテンプレート DNA とプロー ブ DNA のハイブリダイゼーション
- Fig.7 Hybridization of the DNA template and the probe in a buffer.

図4 b)において,さらに電界を上昇させてもこれ以上の伸 長が見られなかった事実は,電気力は塩基のスタッキングを 引き剥がすほど強くないことを示唆しているものと思われる。 従って,1本鎖 DNA が2本鎖 DNA の2/3 程度の長さにまで 伸長された図4 b)の結果から,もし1本鎖 DNA の中で鎖内 塩基対合が生じているとしても一部のみであろう。実際,伸 長固定1本鎖 DNA にインターカレータを添加しても弱い蛍 光しか観察されないという事実は,このことの傍証である。 かつ,もし鎖内塩基対を形成しているとしても,あるいは塩 基間の相互作用によって部分的に凝集しているとしても,そ れがたとえば数+base 以上の長い領域でない限り,プローブ DNA が競合的に結合できるものと思われる。

これらのことから、本研究で得られた伸長固定1本鎖DNA は、プローブ DNA との相互作用を観察するためのテストベ ッドとして十分に利用可能なものであると考えている。

このようなテンプレートを用いて行った図7の観察結果は, プローブをテンプレート上の相補配列に効率良く結合させる ための一つの示唆を与えるかもしれない。すなわち, RNA ポ リメラーゼ⁸⁾や制限酵素⁹は,その結合すべき配列を探索す るため,1) プローブがテンプレート上の任意の位置にまず弱

く非特異的に結合し,2)そこからテンプレート上を1次元拡 散(スライディング)することにより目的の配列に到達し、 3) 最終的に特異的な結合を形成する、といった過程を経ると されている。この過程は、単なる3次元拡散により目的の配 列を偶然にヒットすることを期待するより、はるかに効率的 なはずである。プローブ DNA がテンプレート DNA に結合す るためにも、このような非特異結合による中間体を経るプロ セスを利用できればより効率的であることは言うまでもない。 非特異結合後の1次元拡散が, RNA ポリメラーゼや制限酵素 の場合のようなスライディングであるか、近距離で結合・解 離を繰り返すホッピングであるか、塩基相互作用に基づく DNA walk¹¹⁾のようなものであるかは今後の研究に待たざる を得ないが、いずれにせよ、非特異結合が弱すぎれば、すぐ にはずれてしまい、有効な移動ができないし、逆に、非特異 結合が強すぎれば、やはり移動ができなくなるであろう。従 って、最終的な特異的結合の収率を高めるためには、移動を 効率よく生じさせるような最適な非特異結合の設計が重要で あると考えられる。

この視点から見て,図7で相補配列への結合がほとんど見 られなかったことは、プローブ DNA が長すぎて多数のラン ダムな塩基対や疎水結合などが生じたため、上記の非特異結 合が強すぎたことが原因ではないかと考えている。今後、短 いプローブを用いる・温度や塩濃度の最適化を行うなどの方 策により、この非特異結合の強度を制御し、効率のよいハイ ブリダイゼーションを目指して行く予定である。

なお、本研究を通じて得られた分子結合過程に関する知見は、DNA チップや FISH の高効率化や、それらの手法に定量

性を付加することにも役立つと思われるので、この面からの 研究も進めて行きたい.

本研究を通じて,東京大学の小穴英廣講師・木村祐史博士, (株)アドバンスの黒澤修氏,(株)ソニーの松本沙世子氏には, 貴重な御議論・ご助力を賜りました.本研究は,生研センター 新事業創出研究開発事業「遺伝子の分子レベル操作技術の開 発」,および(株)ソニーの助成を受け行われたものです.ここに 謝意を表します.

参考文献

- 1) J. Chen and N.C. Seeman: Nature 350 (1991) 631
- 2) W. Fritzsche ed.: American Institute of Physics Conference Proceedings 640 (2003)
- 3) W. Fritzsche ed.: American Institute of Physics Conference Proceedings 725 (2004)
- M. Washizu, Y. Kimura, T. Kobayashi, O. Kurosawa, S. Matsumoto and T. Mamime: *American Institute of Physics Conference Proceedings* 725 (2004) 67
- S. B. Smith, Y. Cui and C. Bustamante: Science 271 (1996) 795
- M. Washizu and O. Kurosawa: IEEE Trans. IA 26 (1990) 1165
- T. Yamamoto, O. Kurosawa, H. Kabata, N. Shimamoto and M. Washizu: IEEE Transaction IA, 36 (2000) 1010
- H.Kabata, O.Kurosawa, I.Arai, M.Washizu, S.A.Margarson, R.E.Glass and N.Shimamoto: Science 262 (1993) 1561
- H. Kabata, W. Okada and M. Washizu: Jpn. J. Appl. Phys. 39 (2000) 7164
- A. M.van Oijen, P. C.Blainey, D. J.Crampton, C. C. Richardson, T. Ellenberger and X.S. Xie: SCIENCE 301 (2003) 1235
- L. P. Feng, S. H. Park, J. H. Reif and H. Yan: Angew. Chem. Int. Ed. 42 (2003) 4342