

---

## 空間の広さに影響され変化する生体分子の性質を実測 —デザインした空間を使いタンパク質などの物性の探索が可能に—

京都大学 物質—細胞統合システム拠点 (iCeMS=アイセムス) の遠藤政幸 (えんどう・まさゆき) 特定拠点准教授、杉山弘 (すぎやま・ひろし) 教授 (兼 理学研究科教授) とケント州立大学のハンビン・マオ (Hanbin Mao) 教授は、DNA 鎖で囲まれたナノスケールの立体空間を作成し、その空間の中に、染色体の末端に存在し細胞の癌化などに関与している DNA 構造の1つ「グアニン四重鎖構造<sup>\*1</sup>」を配置することで、この構造体が熱力学的に極めて安定した性質を示すことを見出しました。特定のサイズのナノスケールの空間に閉じ込められた生体分子が、機械的・熱力学的に極めて安定化され、構造体が折り畳まれたりほどけたりする速度が極めて増大することが明らかとなりました。

細胞内で合成される核酸(DNA や RNA)やタンパク質、酵素などの生体分子は、固有の立体構造に折り畳まれることで機能を持つようになります。そのため、その折り畳みやほどけるメカニズムが分子のおかれる環境によってどのように異なるかを解明することは、それらの生体分子の反応の多様性について理解することにつながります。

今回研究グループは、生体分子の立体構造の形成に、分子が置かれた空間の広さがもたらす影響に着目しました。「DNA オリガミ<sup>\*2</sup>」と呼ばれる、DNA 鎖を折り曲げてナノスケールの構造体を作る手法で作成した数ナノメートルの角筒状の構造体 (ナノケージ) を使い、その中にグアニン四重鎖構造を配置することで、ナノ空間に閉じ込められた分子を再現しました。分子を空間的に操作できる光ピンセット<sup>\*3</sup>を用いて、グアニン四重鎖構造を両方向から引っ張ることで、その構造がほどけたり、再び折り畳まれたりする過程を1分子レベルで測定しました。この結果、特定のサイズのナノケージ内に導入したグアニン四重鎖構造は、構造的・機械的・熱力学的に極めて安定化され、構造体の折り畳みやほどける速度が大きく増大することが明らかとなりました。このことにより、これまでは計算科学のシミュレーションによって推定されていた反応メカニズムが実験的に確かめられました。

本成果は、空間の広さを制限することによって生体分子がどれくらい安定化するかを実測した初めての例で、DNA 構造体を使いデザインできる空間を使っているため、タンパク質や酵素などのもつ反応性と空間の関係性を探索する手段として活用できます。今後は、ナノ空間内で、より複雑な RNA 構造体やペプチド、タンパク質の安定性や折り畳みについても知見が得られてくることが期待されます。

本成果は、英国時間 2017 年 3 月 27 日 (月) 午後 4 時 (日本時間 28 日午前 0 時) にネイチャーパブリッシンググループの電子ジャーナル「Nature Nanotechnology (ネイチャー・ナノテクノロジー)」にて公開されました。

---

## 1. 背景

---

タンパク質や酵素が、サイズが制限された（周りを取り囲まれた）ナノスケールの空間の中に取り込まれることで、折り畳みに影響を受けることが、知られています。報告されている例では、「シャペロニン」と呼ばれる空洞を持つタンパク質が、そのままでは生体に有害であったり機能しない間違った形に折り畳まれたペプチドやタンパク質をその空洞に取り込み、正しく折り畳み直して放出することが知られています。また、このようなナノスケールの空間では折り畳まれた生体分子の構造の安定性が増加することが、これまでの計算科学のシミュレーションで示唆されています。空間の大きさが制限されていることが、閉じ込められた分子の構造や反応性に影響を与えていると考えられますが、それを明確に実証するための方法がありませんでした。

本研究では、DNA オリガミによって作成した角筒状の構造体（ナノケージ）を利用して、分子サイズに大きさの制限された空間内での DNA 構造の 1 つであるグアニン四重鎖の安定性や形成に対する効果を検討しました。実験では、ナノケージをそのままの構造に保ちながら、グアニン四重鎖構造に機械的な力を加え、ナノケージ内での安定性と折り畳みやほどける過程への影響を調べました。

## 2. 研究内容と成果

---

本研究では、グアニン四重鎖構造がほどけて 1 本鎖 DNA になる現象（アンフォールディング）と 1 本鎖 DNA がグアニン四重鎖構造に折り畳まれる現象（フォールディング）を DNA オリガミで作成したナノサイズの「ケージ」に入れ、大きさの制限されたナノスケール空間を実験的に再現し、その中でグアニン四重鎖構造の安定性と反応性について検討しました。実験方法は光ピンセット<sup>\*3</sup>でナノケージ内に入れたグアニン四重鎖構造を両側から引っ張ることで、アンフォールディングした時の変位（DNA 鎖の伸びの距離）とかかる力を測定していきました。

（次頁につづく）

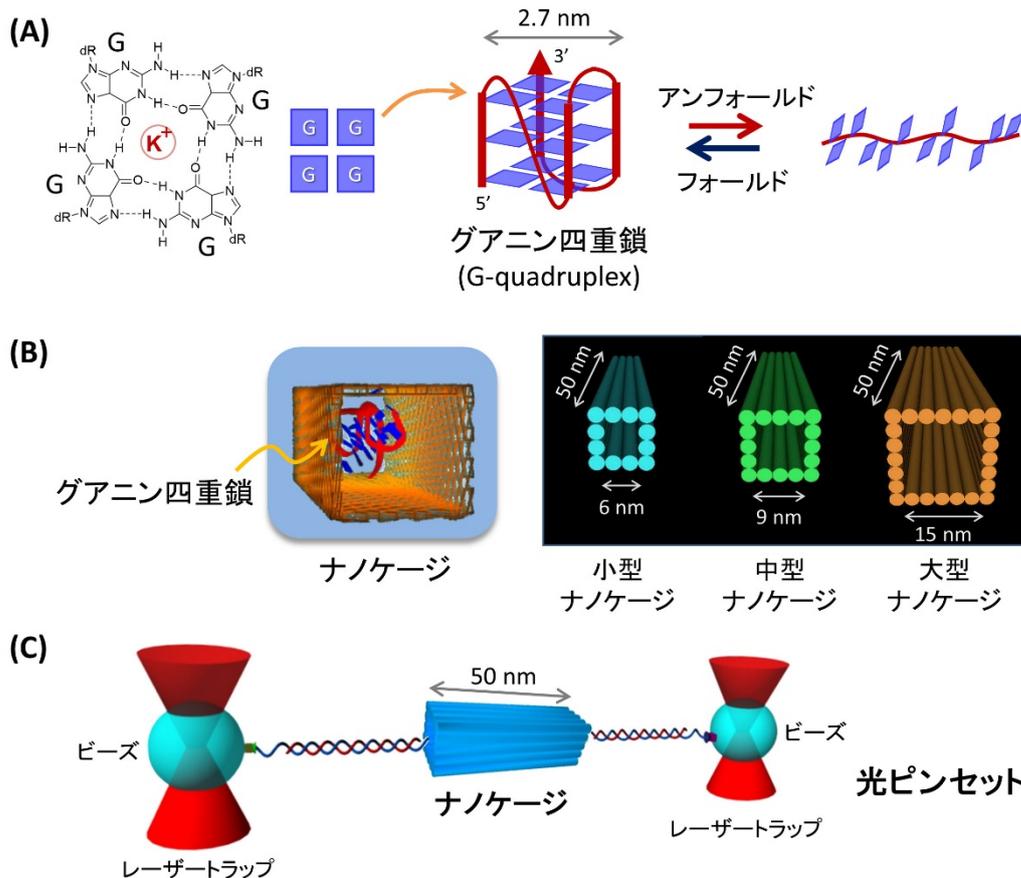


図1. (A) 4つのGuaninから形成されるGuaninカルテット (左)。中心にカリウムイオンを配位している。Guaninカルテットが3個重なって形成されるGuanin四重鎖構造。実験ではGuanin四重鎖の1本鎖DNAへのほどけ (アンフォールディング) と折り畳み (フォールディング) を観察する。(B) 角筒状のナノケージ内に置かれたGuanin四重鎖構造。実験に使用したナノケージは図の三種類のサイズ。(C) 光ピンセットと測定系。ケージ内に配置したGuanin四重鎖の両側に長鎖の2本鎖DNA鎖を結合し、さらにビーズを結合することで、光ピンセットの集光点に固定した。ビーズを移動させることで、ナノケージ内部のGuanin四重鎖を引っ張り、ケージ内でのGuanin四重鎖のアンフォールディング・フォールディングを操作し、それに伴う力測定を行った。

### 1. ナノケージ内へのGuanin四重鎖の導入と測定系の構築

まず、この研究のポイントとなるサイズの異なるナノケージをDNAオリガミ法によって3種類デザインしました (図1B)。ナノケージの構造は長さが50 nmの角筒状の中空構造で、ここでは、小型ナノケージ、中型ナノケージ、大型ナノケージと呼び、それぞれ内側の1辺は6 nm、9 nm、15 nmです。これらのナノケージ内に、両側からDNA鎖を出した形でGuanin四重鎖構造を導入します。

図2のようにして、Guanin四重鎖をDNAナノケージ内に配置します。まず、DNAオリガミ法で作成した半開のナノケージ構造体の内側のDNA鎖に、Guanin四重鎖配列を含むDNA鎖を結合させます。次に、ナノケージを閉じ、角筒の両端からDNA鎖がはみ出した構造体を作成しました (AFM画像上)。さらに両側に長鎖の2本鎖DNAを結合し (AFM画像下)、この先端にポリスチレンビーズを取り付けることで、光ピンセットのレーザーによる2つの集光点に2つのビーズをトラップした状態を作ることができます。この光ピンセットのレーザーの集光点を動かすことで、DNAケージ内に配置したGuanin四重鎖を引っ張る操作をすることができます。

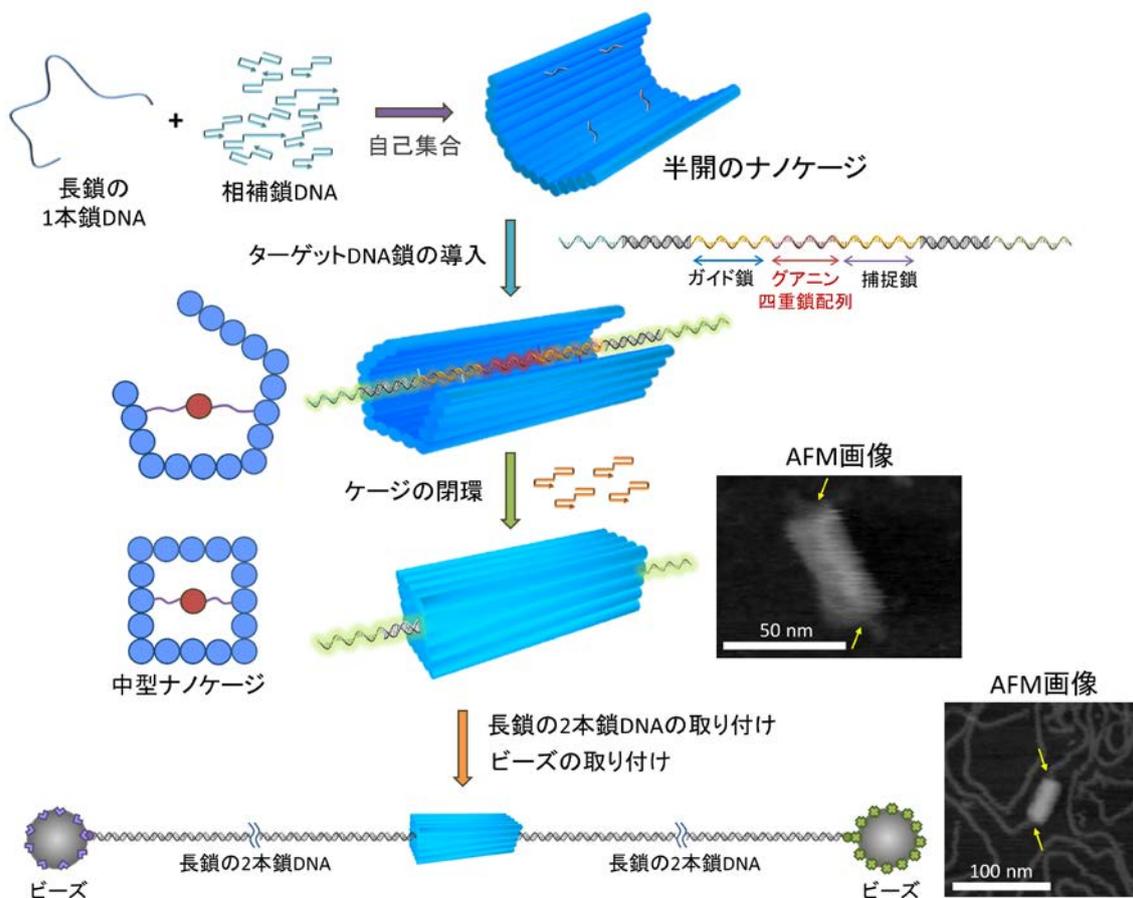


図2. グアニン四重鎖が導入されたナノケージの作成方法。DNA オリガミ法で長鎖の1本鎖DNAと相補鎖DNAを自己集合させ半開のナノケージを作成。次に、その内部にグアニン四重鎖を含むターゲットDNA鎖を結合。相補鎖DNAでケージを閉じる。最後にDNA鎖の両端に長鎖の2本鎖DNAを結合し、末端に光ピンセット用のビーズを結合する。ターゲットDNA鎖を導入したナノケージ(原子間力顕微鏡(AFM)画像上)と長鎖の2本鎖DNAを結合した構造体(AFM画像下)。矢印はナノケージ両端に出たDNA鎖。

## 2. ナノケージ内でのグアニン四重鎖構造の安定性の測定

この測定法では、ビーズの位置の変位(DNA鎖の伸び)に対してターゲット分子にかかる力を測定でき、力-変位曲線を得ることができます。この方法を用いてグアニン四重鎖1分子にかかる力と変位を測定し、そのデータを集めます。

ナノケージを用いずに測定した場合、折り畳まれた状態のグアニン四重鎖をアンフォールディングするのに必要な変位は8.3 nm、必要な力が20.7 pN(ピコニュートン)であったのに対し、グアニン四重鎖を中型のケージに入れた場合は、アンフォールディングに必要な変位は8.2 nm、必要な力が38.6 pNと測定できました。アンフォールディングの変位はほぼ同じであることから、中型のナノケージ内では「ハイブリッド型」と呼ばれるナノケージ無しの場合と同じ標準的な大きさのグアニン四重鎖を形成していることがわかりました。一方で、中型ケージ内で折り畳まれているグアニン四重鎖をアンフォールディングさせるとき、ケージがない場合に比べると、引っ張る力の強さが2倍近く必要で、中型のケージに入ることによって、グアニン四重鎖の機械的な(物理的な力に対する)安定性が約2倍に増加したことを示しています。

次に、小型のナノケージと大型のナノケージ中でのグアニン四重鎖の形状と安定性を測定しました。まず、大型のナノケージ中では、中型のナノケージやケージがない状態のグアニン四重鎖のアンフォ

ールディングと同様に 8.2 nm の変位が見られました。これは、中型のナノケージと同様にハイブリッド型のグアニン四重鎖を形成していることを示しています。一方で、小型のナノケージ内では変位が 6.9 nm で「バスケット型」と呼ばれるコンパクトな構造をとることが分かりました。この実験条件（カリウムイオン存在下）の水溶液中で、空間が限られていない場合では、このバスケット型のグアニン四重鎖構造は形成されないことから、これは狭いナノ空間内で特異的に形成された構造であると考えられます。つまり、狭いナノ空間そのものがグアニン四重鎖構造の形成に直接影響を及ぼしたことになります。

同時に、アンフォールディングに必要な力の測定も行いました。大型のナノケージ内では 27.9 pN と中型ナノケージ (38.6 pN) とケージのない状態 (20.7 pN) の中間であることが分かりました。このことは、ナノケージのサイズによって、内部のグアニン四重鎖の機械的な安定性が変化し、より狭いケージの中ではグアニン四重鎖構造の安定性が増すことが分かりました。中型のケージによって安定化されるエネルギーは 7.1 kcal/mol と非常に大きく、ナノ空間に置かれるだけでグアニン四重鎖は極めて熱力学的に安定化されることが分かりました。一方で、バスケット型のグアニン四重鎖構造をとる小型のナノケージ内でもアンフォールディングに必要な力は 35.9 pN と、ケージがない場合に比べて機械的な安定性が大きく増大することが分かりました。

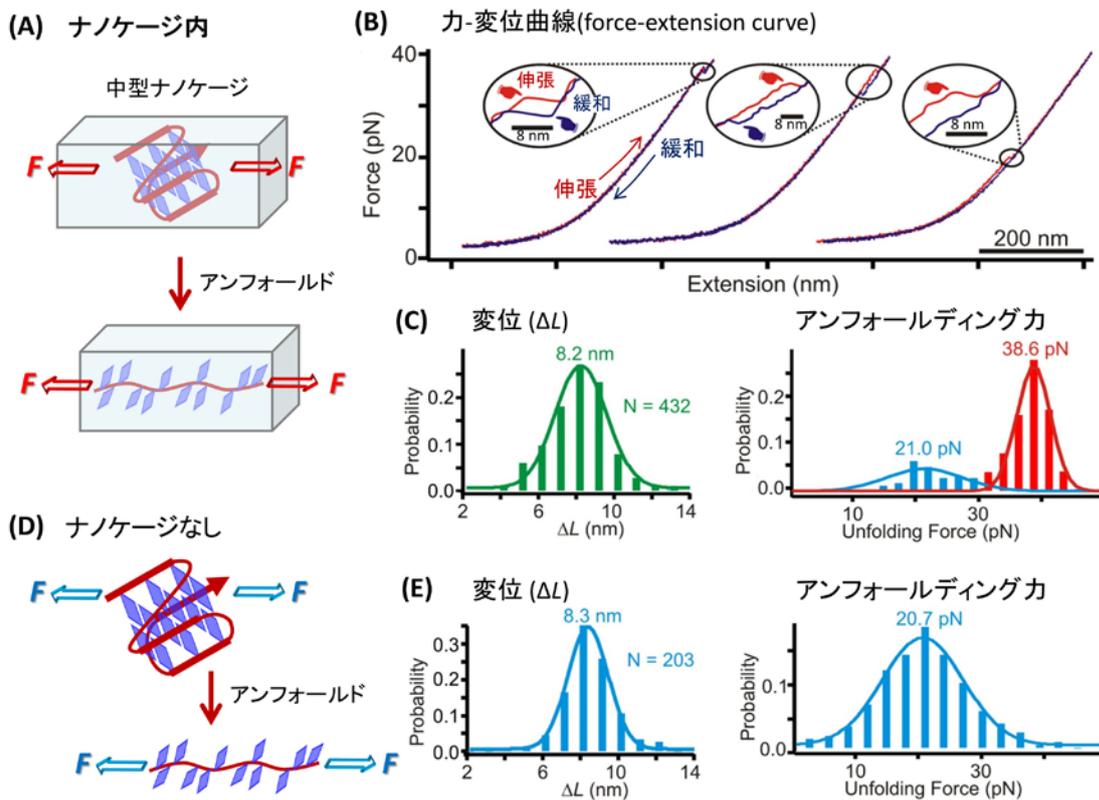


図3. (A) ナノケージ内に導入したグアニン四重鎖構造のアンフォールディング。(B) 光ピンセットを使った力-変位曲線の測定。DNA鎖を伸張していくことで、ある力がかかるときにアンフォールディングが起こり、その時の変位を実測する。また力を緩和していくとグアニン四重鎖は再びフォールディングする。(C) 変位とアンフォールディング時にかかる力のヒストグラム。中型ナノケージ内でのアンフォールディング時にかかる力は赤のヒストグラムに相当する。(D) (E) ナノケージなしのグアニン四重鎖構造の変位とアンフォールディング時の力のヒストグラム(水色)。

### 3. ケージ内でのグアニン四重鎖の折り畳みの速度

もう一つの物性の変化として、グアニン四重鎖のアンフォールディングとフォールディングの速度を測定しました。これまでの計算科学によるシミュレーションによると、ナノ空間内では生体分子のこれらの速度が増加することが示唆されています。実際に、ナノケージ内でグアニン四重鎖のアンフォールディングとフォールディングを観察すると、小型と中型のナノケージでは、力を緩和すると速やかに再フォールディングすることが分かりました。一方で、大型のナノケージでは再フォールディングが遅くなる傾向が見られました。また、アンフォールディング時にかかる力のヒストグラムの分布から求められる計算式を適用することで、アンフォールディングの速度定数と活性化エネルギーを求めることができました。これらの結果から、グアニン四重鎖のアンフォールディングの活性化エネルギーが小型と中型のナノケージ中では、大きく増加し、一方で、再フォールディングの速さもケージなしに比べて2桁増加することが分かりました。

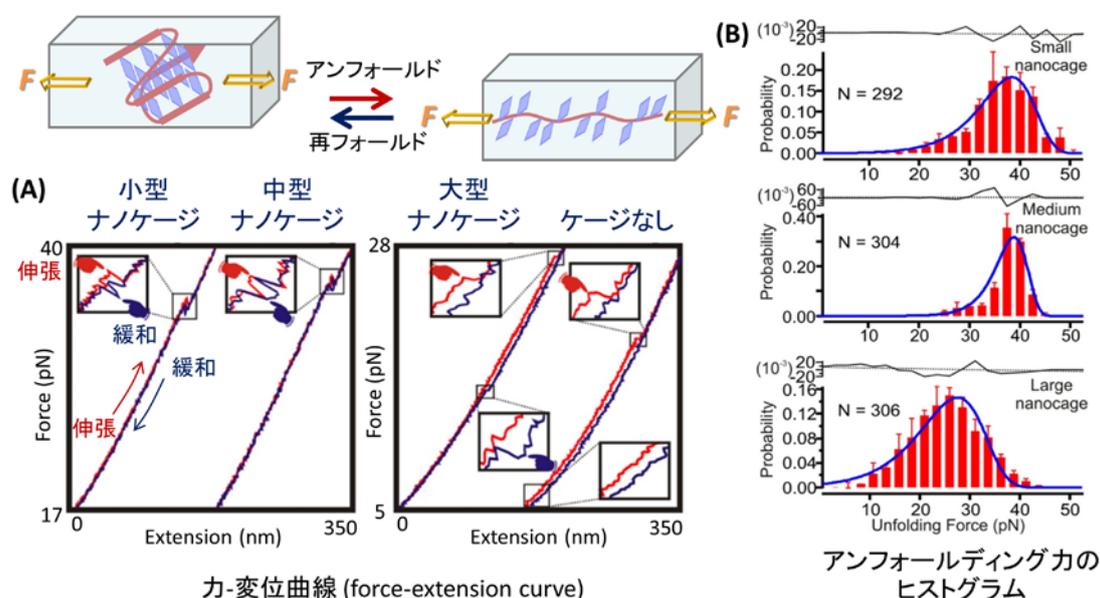


図4. (A) 3種類のナノケージとケージなしでのグアニン四重鎖のアンフォールディングと再フォールディングの力-変位曲線。(B) 3種類のナノケージ内でのグアニン四重鎖のアンフォールディング時の力のヒストグラムとそのフィッティング曲線（青の曲線）。

以上の結果をまとめますと、ナノケージ内部でのグアニン四重鎖の機械的及び熱力学的安定性は、ケージのサイズが小さくなるにしたがって大幅に増大することが分かりました。サイズが制限された空間でのグアニン四重鎖のフォールディングの速度は、ケージのない状態に比べて100倍高速であることも分かりました。このことは、DNAまたはRNAポリメラーゼ内部でのグアニン四重鎖が複製あるいは転写の過程で、酵素内の空間（例えば出口にある空間）を使って素早くフォールディングを行う可能性を示唆しています。

### 3. 今後の展開

本研究成果は、iCeMSが創設以来追求してきた「自由にデザインできるメソスケール構造体のもつナノ空間」を使った、分子の物性や反応性を調べる最先端の研究であり、ナノ空間内での生体分子の振

---

る舞いを解き明かす突破口となりました。なぜ生体中の酵素が高速かつ高効率で触媒反応をできるのか、また、なぜ生成した生体分子が高速で折り畳まれるのかなど、分子クラウディングなどでは不十分であった知見が実験的に実証されました。今後は、ナノ空間内で、より複雑な RNA 構造体やペプチド、タンパク質の安定性や折り畳みについても知見が得られてくることが期待されます。近年ではカーボンナノチューブ内に閉じ込められた水分子が 100 °C でも固体であるといった現象が見出されています (Nature Nanotechnology, 2017, in press)。こうした自由に設計・構築できる分子サイズのナノ空間を使うことで、今まで思いもよらなかった現象がこれからも発見されてくるでしょう。

#### 4. 用語解説

---

- ※1 **グアニン四重鎖 (G-quadruplex)** : グアニン塩基の繰り返し配列からなり、グアニン 4 塩基が水素結合を介して平面に結合する構造 (G カルテット) で、金属イオンを介して G カルテットが数個重なった構造をとる。染色体の末端に存在しテロメラーゼによって配列が伸長され、がん化に関連している。今回の研究ではヒトテロメア配列(GGGTAA)<sub>4</sub>を使用している。
- ※2 **DNA オリガミ (DNA origami)** : DNA の自己集合によって作成されるナノ構造体。2006 年にカリフォルニア工科大学の Paul Rothemund (ポール・ロスムンド) 博士によって開発された。鋳型となる長い 1 本鎖 DNA (7249 塩基) に設計した短い相補鎖 DNA を加え、加熱、ゆっくり冷却することで、あらかじめ設計した DNA ナノ構造体と同じ形に自己集合させることができる。この方法を使うことで様々な 2 次元・3 次元構造体を作成することが可能である。
- ※3 **光ピンセット (optical tweezers)** : 光を回折限界まで収束させることで、水溶液中でその集光点に微粒子を捕捉する方法で、その集光点を移動させることで微粒子を 3 次元に操作することができる。通常レーザーを光源に用い、集光点に微粒子を捕捉するため、レーザートラッピングとも呼ばれる。

#### 5. 研究プロジェクトについて

---

本研究は、独立行政法人日本学術振興会 (JSPS) の国際共同研究事業 国際化学研究協力事業、および、文部科学省科学研究費助成事業の新学術領域研究「分子ロボティクス」、基盤研究(S)、基盤研究(B)、挑戦的萌芽研究の支援を受けて行われました。

#### 6. 論文タイトル・著者

---

“Confined space facilitates G-quadruplex formation”

(制限された空間がグアニン四重鎖の形成を促進する)

著者 : Prakash Shrestha, Sagun Jonchhe, Tomoko Emura, Kumi Hidaka, Masayuki Endo,\* Hiroshi Sugiyama,\* Hanbin Mao\*

Nature Nanotechnology | DOI: 10.1038/NNANO.2017.29

---

## 7. iCeMS について

---

京都大学 物質－細胞統合システム拠点 (iCeMS=アイセムス) は、文部科学省「世界トップレベル研究拠点 (WPI) プログラム」に平成 19 年度に採択された拠点です。iCeMS では、生物学、物理学、化学の分野を超えて新しい学問を作り、その学問を社会に還元することを目標に活動している日本で唯一の研究所です。その新しい学問からは、汚水や空気の浄化といった環境問題の解決、脳の若返りといった医療に役立つ可能性を秘めたとてつもないアイデアが次々と生まれています。

詳しくはウェブサイトをご覧ください。 <http://www.icems.kyoto-u.ac.jp/>

## 8. 世界トップレベル研究拠点プログラム (WPI) について

---

WPIは、平成19年度から開始された文部科学省の事業です。WPIでは、世界トップレベルの研究に取り組むことはもちろんのこと、従来の大学のシステムでは成しえない研究組織・研究環境・事務体制の国際化を目指しています。これらは短期間で実現できるものではないため、10年という実施期間が設けられており、各拠点はこれまで様々な取り組みを行ってきました。その結果、拠点長のリーダーシップのもと、拠点内の公用語を英語としたり、研究者の外国人比率30%を達成するなど先進的な取り組みを行っているほか、現在までに、採択拠点からノーベル賞受賞者を2名（山中伸弥先生、梶田隆章先生）輩出するなど、高い成果を挙げています。

詳しくはウェブサイトをご覧ください。 <https://www.jsps.go.jp/wpi/>