

混合して、90℃程度まで温めてからゆっくりと冷ます（この操作をアニーリングという）だけで、個々のDNAは自分が二重らせんを形成する相手だけを正しく選択し、目的のDXモチーフが自発的に組み上がる。DXモチーフは二本のDNA二重らせんの複合体に相当するが、さらにもう一本のDNA二重らせんを二カ所のクロスオーバーで連結して合計三本のDNA二重らせんを平行に束ねると、Triple Crossover (TX) と呼ばれるモチーフができあがる。このようなDNA二重らせんのいかだ状のモチーフとしては、これまでに最高で12本の二重らせんを束ねたもの（全部で27本の一本鎖DNAを使用する）まで報告されている²⁾。我々も同様に、九本の二重らせんを束ねた39本のDNA鎖からなる世界最大のDNAタイルを報告している³⁾。このように構築したDNAタイルは、粘着末端同士の相互作用により、多数集積化して二次元のシート構造を形成する（図1b）。これがDNAを部材としてナノ構造体を構築できることがAFMで視覚的に確認された初めての例となった。

3. DNAオリガミ法の基本

上述の比較的短いDNA（30～50塩基ほど）を利用してDNAタイルをつくり、これらを多数集積する手法は、DNAナノテクノロジーの第一世代技術といえる。一方2006年の発明以来、特

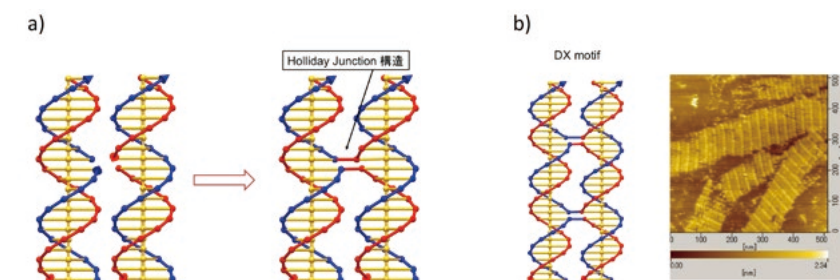


図1 (a) DNA二重らせんの隣接する部位を切断してつなぎ替えると、二本のDNA二重らせんを共有結合でつないだような構造をつくることことができる。これがDNAナノテクノロジーにおけるクロスオーバー構造 (Holliday Junction) である。(b) 二つのクロスオーバー構造で二本のDNA二重らせんを結合することで、DXモチーフが形成される。これを粘着末端同士の相互作用により多数集積したものは、AFMで明瞭に観察することができる。

に多くの研究者の注目を集めているのが、この分野の第二世代技術ともいえるDNAオリガミ法である⁴⁾。非常に長い一本鎖DNA（足場鎖と呼ばれる）を織物の横糸のように一筆書き状におりたたみ、二重らせん形成の相手となる200本以上の多数の短いDNA（英語で「ホッチキス」を意味するステーブル鎖と呼ばれる）を縦糸として、横糸を橋掛けしながら織り込んでいくことで、自在な平面ナノ構造を作成することができる（図2）。この「DNAオリガミ」という名称は、米国人の発明者が日本語の「折り紙」の意味があやふやなまま名付けてしまったもので、我々日本人にとってはむしろ、「DNAオリモノ（織物）」と呼んだ方が理解が早いかもしれない。DNAは通常、生物の体内では二重らせんとして存在しているが、一部のウイルスには、このうちの一本の鎖しか体内に所有していないものが存在する。DNAオリガミ法では、このような長鎖のウイルス一本鎖DNA（一般的には全長7,249塩基のM13mp18ファージゲノムが用いられる）を特に選び、足場鎖として利用す

る。DNAの二重らせん形成は、その配列だけで厳密に相手を規定できるので、狙ったかたちにおりたたんだ足場鎖の配置にあわせて設計したステーブル鎖を水溶液中ですべて混合し、二時間ほどの比較的短いアニーリングを行うだけで、直径100 nmのスマイリーマークやイルカなど、望みの平面ナノ構造体を、設計通りに自在に分子の自己組織化でつくることことができる（図3）。その後も様々な改良が加えられ、当初は丸太のようなまっすぐなDNA二重らせんを平行に束ねていかだ状の構造体しかつくることができなかったが、今日では比較的自由にDNA二重らせんを曲げて、ドーナツのような構造をつくることも可能である⁵⁾。

4. 三次元のDNAオリガミ構造体～箱型構造体とハニカム格子構造体（図4）

「オリガミ」という名前を聞くと、日本人の多くは紙「面」を折る行為を想像するだろう。おなじように、当初は望みの平面構造をつくるための手法として発表されたDNAオリガミ法を、三次元の立体ナノ構造体の作成に応用する試みも早い時期に行わ

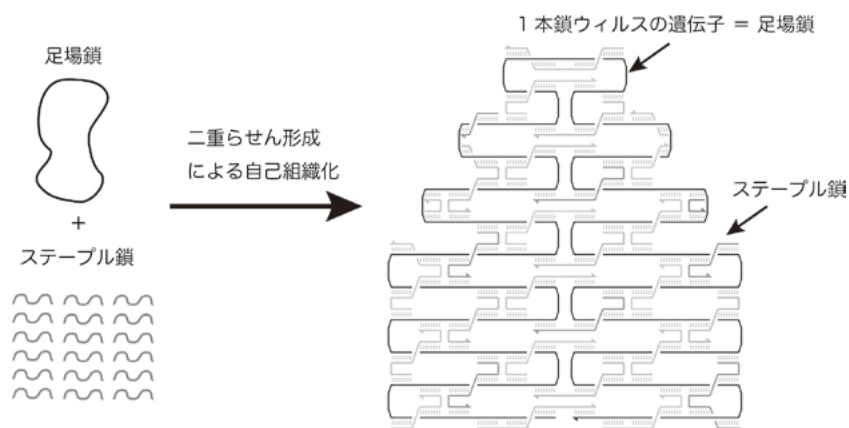


図2 DNAオリガミ法の基本

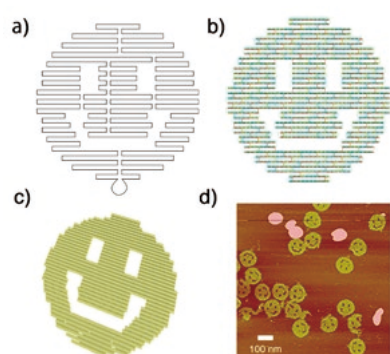


図3 スマイリーマークの足場鎖の折りたたみパターン (a) と、ステープル鎖も含めた設計図 (b)、DNA二重らせんを円柱に見立てた模式図 (c) と実際のAFM像 (d)。

られている。足場鎖として一般的な、全長7,249塩基のM13mp18ファージゲノムから立方体の展開図に相当する六面の正方形を作成すると、X線結晶解析などで精確にもとめられているB型二重らせんのピッチから、一面の大きさはおよそ40 nm角と計算される。これはウイルスのキャプシドとほぼ同じ大きさであり、内部に有用分子を取り込むことができれば、ナノキャリアやナノリアクターなどとして活用することが期待される。このような中空の立体DNAオリガミ構造体として世界ではじめて報告された箱型DNAオリガミ構造体は、40 nm角の正方形六面

を貼り合わせてできる立方体で、その一面だけが箱の蓋のように開閉できるよう、各面どうしの結合が工夫されている⁶⁾。蓋の固定は、二対の部分的に相補なDNA二重らせんで行っており、これと完全相補なDNAを加えることで、選択的に蓋を開くことができる。その他にも、「山折り」と「谷折り」を厳密に区別して設計された異なるデザインの立方体や、正四面体の構築がほぼ同時期に報告されている^{7,8)}。

専門家だけでなくも想像しやすいであろう中空のDNAオリガミ構造体に対して、今日立体DNAオリガミ構造体の構築法の主流となっているのは、「ハニカム格子」構造体と呼ばれる、中身の詰まった立体構造体の構築法である。すなわち、平面状のDNAオリガミをひだ状に折り重ね、断面を見たときにDNA二重らせんが正六角形の各頂点に位置する蜂の巣状に配置・連結していく手法である⁹⁾。その見た目から、プリーツ状のDNAオリガミ構造体、あるいはミルフィーユ状のDNAオリガミ構造体と表現されることもある。この手法でも、

重ねるクロスオーバー間の距離を適宜調整し、平面の大きさをうまく工夫すると、形成される立体構造の曲率まで制御することができる。これにより今日では、従来考えられなかったような複雑な立体ナノ構造を自在に構築できるようになった¹⁰⁾。複数のユニットをくみあわせることで、直径が数百 nm、50,000本以上のステープル鎖を含む、分子量にしてギガダルトンにもおよぶ巨大な構造体の作成まで報告されている¹¹⁾。

立体DNAオリガミ構造体の内部空間にナノ材料を内包させる試みも各所で行われているようであるが、非常に多数のリン酸ジエステルが局在化していて周囲が電気的に異常な状態になっているためか、あまりうまくいかないことのほうが多いようである。しかし、金ナノ粒子や酵素などのナノサイズのゲストを内包することに成功したという報告などは、少ないながらもなされている^{12,13)}。

5. 四次元DNAオリガミ構造体～「動く」DNAオリガミ分子デバイス(図5)

三次元DNAオリガミ構造体の次の重要な研究ターゲットとなったのは、縦、横、高さの三次元に時間軸を取り入れた四次元DNAオリガミ構造体、すなわち「動く」DNAオリガミ構造体である。前述の箱形DNAオリガミ構造体も二段階で構造変形できるため、これらも動く構造体と言えなくもないが、構造体の動作がその機能には直結していない。

動くことではじめて機能する「DNA オリガミ分子デバイス」の最初の例は、おそらく我々の開発した長さ約 170 nm の二本のレバー部から構成されるペンチ型 (DNA Pliers) および鉗子型 (DNA Forceps) の二種類のナノデバイスである¹⁴⁾。これらの構造体を構成する二本のレバーは、オリガミ形成の足場となる M13mp18 ファージゲノムの主鎖に含まれる、リン酸ジエステル結合二本でのみ連結されている。この連結部分は、上述の DNA 二重らせんが四分岐した Holliday Junction 構造に相当する。この構造は、特に Mg^{2+} 存在下では 60° に交叉した構造をとることが知られており、実際に構築した DNA Pliers をマイカ基板に吸着させて AFM 測定したところ、全体のおよそ 60% が X 字型の開いた構造として観察された。

このような DNA オリガミ分子デバイスは、その構造変化を利用して、様々な生体関連分子の存在を単分子レベルで検出することができる。例えば、ターゲット分子と強く結合するリガンドを、デバイスのレバー部に導入した切り込みにそれぞれ一分子ずつ導入しておき、これらを同時に一分子のターゲット分子と結合させる。これによりレバー間に新たな架橋構造が生まれ、通常交叉した状態にあるレバー部が平行な閉じた状態へと変型する。

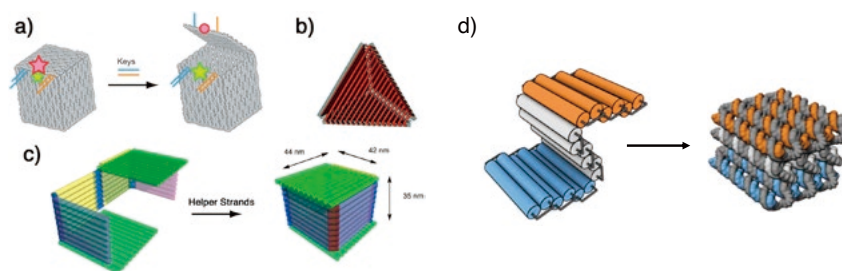


図4 さまざまな立体DNAオリガミ。(a) 世界初の箱型DNAオリガミ構造体。(b) DNAオリガミの四面体。(c) 山折りと谷折りを制御した箱型DNAオリガミ構造体。(d) ハニカム格子構造体。

このデバイス全体の構造変化を AFM で観察することにより、ターゲットの存在を検知する。レバー部をビオチンで修飾した場合、最大で四分子のビオチンと強く結合するストレプトアビジンタンパクがターゲットとなる。実際に、ビオチンで修飾した DNA Pliers に小過剰のストレプトアビジンを加えると、大多数の DNA Pliers が閉じた構造に変型し、レバー間にストレプトアビジンが一分子だけ捕獲されている様子が、AFM ではっきりとイメージされる。同様に、レバー部の修飾をフルオレセインに変え、最大で二分子のフルオレセイン抗体がターゲットとなる。形の異なる DNA Pliers と DNA Forceps をそれぞれ異なるゲスト分子で修飾し、これらを併用することで、同じ溶液内に含まれる複数のターゲットも同時に検出することができる。タンパクとリガンドの相互作用以外でも、DNA 四重鎖やミスマッチ塩基対への金属イオンの結合や小分子結合能をもつ特殊な DNA (アプタマー) への基質の結合を利用して、プロトンから抗体まで幅広い範囲の生体関連分子の単分子検出に活用するこ

とができる。

6. 細胞に作用するDNAオリガミロボット

動きを取り入れた DNA オリガミ構造体として、生きた細胞をはじめターゲットとしたのが、細胞を論理演算により認識して結合することができる「DNA ナノロボット」である¹⁵⁾。この DNA オリガミデバイスは、閉じた状態では長さ 45 nm の樽型構造をしており、差し渡し 35 nm の六角形の断面を持つ。側面には樽を縦に二分割するように切り込みが入っており、上下のユニットはワニの口のように片側で連結されている。連結部の反対側、口先にあたる部分は、細胞の分泌物を特異的に認識するアプタマーで閉じられている。この部分で、DNA ナノロボットは相手があらかじめ決められていたターゲット細胞であるかを判定する。樽の内側には、細胞と結合するための抗体断片が修飾されている。DNA ナノロボットが狙い通りのターゲット細胞に近づくと、上下のユニットを閉じていたアプタマーを含む二重らせんが解離する。これにより、樽の内側の抗体断片が呈示されることで、DNA ナノロボットはターゲット細胞のみに結合

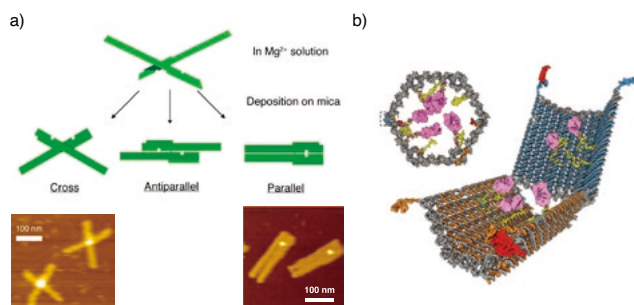


図5 動くDNAオリガミ (a) と「DNAナノロボット」(b)

する。将来的には、DNA ナノロボットに抗がん剤を修飾しておくことで、特定のがん細胞を認識して特異的に死滅させる人工免疫分子のような利用法が期待される。

7. DNAオリガミの*in vivo*への応用

DNA オリガミを生きた動物に投与する試みは、2014 年頃から報告されている。例えば、前述の細胞を認識して結合する DNA ナノロボットは、後に生きた昆虫（ゴキブリ）の体内に注入しても機能することが示されている¹⁶⁾。DNA オリガミのマウスへの投与もほぼ同時期に報告されており、その最初の例は、おそらくハニカム格子でつくった丸みを帯びた八面体 DNA オリガミをウイルスのキャプシドのように使い、その外側にエンベロープのように脂質二重膜を張ってつくった直径約 80 nm のリポソームをマウス尾静脈注射し、その血中滞留性を調査した研究だろう¹⁷⁾。その後より実践的な治療を目的として、DNA オリガミと薬品などとの複合体を動物に投与する試みもはじまり、温熱療法などを志向した金ナノロッド修飾 DNA オリガミのマウス投与¹⁸⁾、がんの塞栓療法を行

うためのトロンビンタンパクを搭載した DNA ナノロボットのマウス投与¹⁹⁾、がん抑制遺伝子 p53 と抗がん剤 DOX の二重で

バリーのための多重修飾 DNA オリガミのマウス投与などが²⁰⁾、これまでに報告されている。

8. 今後の展望

DNA オリガミ法が最初に報告されてから既に 15 年を迎え、その技術は生体関連化学のみならず、医学や分析化学など、周辺領域へと急速に普及し始めた。立体的 DNA オリガミ構造体が報告された 2009 年にはわずか 13 報だった DNA オリガミに関する原著論文は、2019 年にはその 10 倍をこえる 171 報まで増えている。当初は DNA オリガミ構造体そのものの作成法を報告するだけでも容易に論文が掲載されたが、近年は機能性分子やナノ材料とくみわせて、「いかに DNA オリガミ構造体を役立てるか」が問われるようになってきた。特に、「ロボット」を構成する三要素である「センサ」、「プロセッサ」、「アクチュエータ」のすべてを機能性分子で実現し、これらを一つの「システム」として動作させる方法論を研究する「分子ロボティクス」の分野でも、DNA オリガミは中心的な役割を果たしている²¹⁻²⁴⁾。2020 年には、「分子ロボット」を複数くみあわせて化学の原理で動作する「ケミカル AI」を実現することをめざす科学研究費補助金・学術変革領

域研究 (A)「分子サイバネティクス」領域（領域番号 20A403）が発足した²⁵⁾。ここでも、神経細胞におけるイオンチャネルや神経軸索を伸ばすための分子アクチュエータを人工的に再現するために、DNA オリガミ構造体の利用が期待されている。DNA オリガミ構造体が活躍できる分野は、今後ますます広がりそうである。

- 1) T. J. Fu, N. C. Seeman, *Biochemistry*, 32, 3211 (1993).
- 2) Y. Ke, Y. Liu, J. Zhang, H. Yan, *J. Am. Chem. Soc.* 128, 4414 (2006).
- 3) A. Kuzuya, K. Numajiri, M. Komiyama, *Angew. Chem. Int. Ed.* 47, 3400 (2008).
- 4) P. W. K. Rothmund, *Nature*, 440, 297 (2006).
- 5) D. Han *et al.*, *Science*, 332, 342 (2011).
- 6) E. S. Andersen *et al.*, *Nature*, 459, 73 (2010).
- 7) A. Kuzuya, M. Komiyama, *Chem. Commun.*, 4182 (2009).
- 8) Y. Ke *et al.*, *Nano Lett.*, 9, 2445 (2009).
- 9) S. M. Douglas *et al.*, *Nature*, 459, 414 (2009).
- 10) H. Dietz, S. M. Douglas, W. M. Shih, *Science*, 325, 725 (2009).
- 11) K. F. Wagenbauer, C. Sigl, H. Dietz, *Nature*, 552, 78 (2017).
- 12) A. Kuzuya *et al.*, *Polym. J.*, 47, 177 (2015).
- 13) H. Ijäs *et al.*, *ACS Nano*, 13, 5959 (2019).
- 14) A. Kuzuya *et al.*, *Nature Commun.*, 2, 449 (2011).
- 15) S. M. Douglas, I. Bachelet, G. M. Church, *Science*, 335, 831 (2012).
- 16) Y. Amir *et al.*, *Nature Nanotech.*, 9, 353 (2014).
- 17) S. D. Perrault, W. M. Shih, *ACS Nano*, 8, 5132 (2014).
- 18) Q. Jiang *et al.*, *Small*, 11, 5134 (2015).
- 19) S. Li *et al.*, *Nature Biotechnol.*, 36, 258 (2018).
- 20) J. Liu *et al.*, *Nano Lett.*, 18, 3328 (2018).
- 21) S. Murata *et al.*, *New Generat. Comput.*, 31, 27 (2013).
- 22) M. Hagiya *et al.*, *Acc. Chem. Res.*, 67, 1681 (2014).
- 23) J. J. Keya *et al.*, *Nature Commun.*, 9, 453 (2018).
- 24) K. Matsuda *et al.*, *Nano Lett.*, 19, 3933 (2019).
- 25) <https://molcyber.org>

(日動協ホームページ、LABIO21 カラーの資料の欄を参照)