

# 京都大学教育研究振興財団助成事業 成 果 報 告 書

平成31 年 4月 26日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会 長 藤 洋 作 様

所 属 部 局 理 学 研 究 科

職 名 特 定 准 教 授

氏 名 遠 藤 政 幸

助 成 の 種 類	<b>平成30年度 ・ 研究活動推進助成</b>		
申請時の科研費 研究 課 題 名	ナノ空間での生体分子の1分子物性測定と空間一分子間相互作用の解明		
上記以外で助成金を 充 当 した 研 究 内 容			
助成金充当に関 わる共同研究者	(所属・職名・氏名)		
発表学会文献等	<p>(この研究成果を発表した学会・文献等)</p> <p>1. G. Raghavan, K. Hidaka, H. Sugiyama, <u>M. Endo</u>, Direct observation and analysis of the dynamics of the photoresponsive transcription factor GAL4. <i>Angew. Chem. Int. Ed.</i> in press (2019).</p> <p>2. T. Tohgasaki, Y. Shitomi, Y. Feng, S. Honna, T. Emura, K. Hidaka, H. Sugiyama, <u>M. Endo</u>, A Photocaged DNA Nanocapsule for Controlled Unlocking and Opening inside the Cell. <i>Bioconjugate Chem.</i> in press (2019).</p> <p>3. X. Xing, Y. Feng, Z. Yu, K. Hidaka, F. Liu, A. Ono, H. Sugiyama, <u>M. Endo</u>, Direct observation of the double-stranded DNA formation through metal ion-mediated base pairing in the nanoscale structure. <i>Chem. Eur. J.</i> 25, 1446-1450 (2019).</p> <p>4. 遠藤 政幸, S. Jonchhe, S. Pandey, 江村 智子, 日高 久美, H. Mohammad, P. Shrestha, 杉山 弘, H. Mao, 「制限された空間でのグアニン四重鎖とi-モチーフ構造の物性の解明」 第12回バイオ関連化学シンポジウム、大阪大学吹田キャンパス、吹田、2018年9月11日</p> <p>5. <u>M. Endo</u>, P. Shrestha, S. Jonchhe, T. Emura, K. Hidaka, H. Sugiyama, H. Mao, Physical property of G-quadruplex in a confined DNA origami nanocage. International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids (IRT2018), UC San Diego, CA, USA, Aug. 27, 2018.</p>		
成 果 の 概 要	<b>研究内容・研究成果・今後の見通しなどについて、簡略に、A4版・和文で作成し、添付して下さい。(タイトルは「成果の概要／報告者名」)</b>		
会 計 報 告	交付を受けた助成金額	1,000,000 円	
	使用した助成金額	1,000,000 円	
	返納すべき助成金額	0 円	
	助成金の使途内訳	費 目	金 額
		消耗品	205,750
旅費		438,517	
その他		355,733	
当財団の助成に つ い て	<p>(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。)</p> <p>海外での研究発表や論文の投稿関連で活用させていただきました。ありがとうございました。</p>		

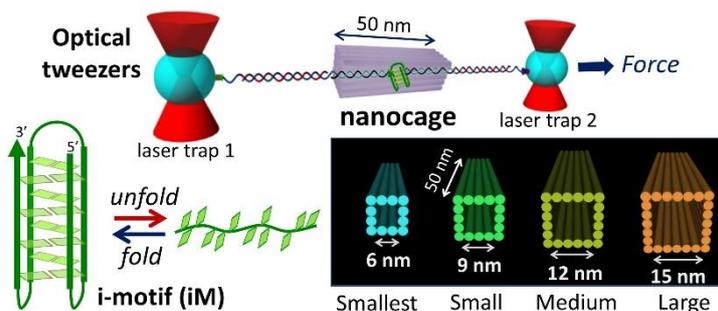
## 研究成果の概要 / 遠藤政幸

タンパクや酵素の持つ数ナノメートルの狭小空間（例としてシャペロニン）では生体分子の安定性や折り畳みなどの物性が変化することが知られている。この現象に対して、本研究者は DNA によって作成したナノ空間を使って、その内部で生体分子の熱力学的安定性や折り畳みの速度を測定する方法を開発し、環境要素の一つである空間が生体分子の物性に与える影響を見出した(*Nature Nanotechnology*, 2017, 12, 582)。本研究では、このナノ空間で新たに見出した「空間—分子間相互作用」に関して、空間のサイズ、形状、内部の化学修飾をシステムティックに行い、空間内での生体分子のアンフォールディングの1分子力測定からその物性と相互作用を調べる。また、基質も多様な生体分子を検討する。これによって、「空間—分子間相互作用」の一般性や拡張性を明らかにし、ナノ空間によって生体分子反応を制御する分子システムの構築について検討する。DNA によって様々なナノ空間を設計・構築し、その空間内で1分子の物性の計測と反応の制御を通じて、環境要素の一つである空間が生体分子の物性に与える影響と空間内と分子間に働く相互作用を解明する。

実験として、DNA によって作成した直方体筒状の中空なナノ空間「ナノケージ」を用いて、その内部に生体分子を導入し、その安定性や折り畳みの速度を光ピンセットによる1分子力測定によって観測した。本研究では、「空間と分子間の相互作用」に関して、空間のサイズ、形状、内部の化学修飾を行い、ナノケージ内でのグアニン四重鎖構造、i-モチーフ構造、ヘアピン構造のアンフォールディングの検討からその物性の変化と空間との相互作用を調べた。これによって、「空間と分子間の相互作用」の一般性や拡張性、またナノケージによって生体分子反応を制御する分子システムの構築について検討した。

### 1. 生体分子の安定性に対するナノ空間のサイズとの相関の検討

ナノ空間のサイズに対するグアニン四重鎖及び i-モチーフ構造の安定性と折り畳みの速度を測定し、空間のサイズと形状に対する分子の物性への影響を調べた。筒状の中空なナノケージを DNA オリガミ法によって設計・作成した。50 nm の長さで、6, 9, 12, 15 nm の空間を持つナノケージ内部に、グアニン四重鎖構造及び i-モチーフ構造を導入し、ナノケージの両側から長鎖の DNA 鎖をつなぎ、その末端に光ピンセット用のビーズを取り付け、1分子力測定を行った。構造は AFM によって観察し、それぞれの構造体の形成を確認した。光ピンセットを用い、ナノケージ内で i-モチーフ構造の機械的アンフォールディングを行い、アンフォールド時の変位と係る力の1分子計測を行った。その結果、9 nm のナノケージを使用すると、i-モチーフ構造が内部で形成され、比較的中性に近い pH でも安定に形成された。次に、4 つ



のサイズのナノケージを使うことで、i-モチーフ構造の機械的および熱力学的安定性がナノケージのサイズに対する影響を検討した。最小の 6 nm のナノケージでは、i-モチーフ構造の形成が見られなかった。これは空間のサイズが狭小すぎ

nanocage	$\Delta G_{\text{unfold}}$ (kcal/mol)	Water activity $a_{\text{H}_2\text{O}}$
no cage	7.10 ± 0.48	0.99
15 × 15 nm (large)	7.78 ± 0.80	0.98
12 × 12 nm (medium)	8.50 ± 0.91	0.95
9 × 9 nm (small)	11.3 ± 0.99	0.88

るため、i-モチーフ構造が折り畳まれていないと考えられる。他の 3 つのナノケージに対しては、サイズの減少とともに安定性が増加することを見出した (表 1)。さらに、ナノケージのサイズに対してアンフォールド時の水の活量を求めるとサイズが減少するとともに水の活量も減少することを明らかにした。このことから、ナノケージ中でのグアニン四重鎖構造及び i-モチーフ構造の安定性は水の活量の減少と相関することを明らかにした。

## 2. ナノ空間内部の環境に対する生体分子への影響の検討

ナノ空間のサイズと同時にナノ空間内部の化学修飾による環境の調整を検討した。空間内部の環境を変えるため、ポリエチレングリコール(PEG)を使ったクラウディング環境を構築した。特徴的な環境を再現することで、ケージ内部に導入したグアニン四重鎖構造の物性に対する影響を観測した。作成方法は、上記と同様で、PEG で化学修飾した DNA 鎖を用いて、ケージ空間内部の修飾と構造体の形成を行った。この構造体については現在、物性の測定を行っている。

以上のように、DNA オリガミによって作成したナノ空間を用いることで、その空間内での生体分子の挙動を観測する系の構築を行った。狭小空間の内部では、生体分子は機械的・熱力学的に安定化され、フォールディングがより速く進行することが分かった。また、空間のサイズが小さくなるほど、その効果が大きくなることが分かった。特に空間内部の環境から受ける影響については内部の水分子の性質に大きく依存することが分かった。今後も引き続き、作成した系を使って、多様な生体分子の検討と空間のデザインや化学修飾を通じて、「空間と分子間の相互作用」を明らかにしていく。