

平成30年 4月26日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14033

研究課題名（和文）DNAオリガミシートを使った分子デリバリーシステムの構築

研究課題名（英文）Development of two-dimensional DNA origami structure for construction of molecular delivery system

研究代表者

遠藤 政幸（Endo, Masayuki）

京都大学・理学研究科・特定准教授

研究者番号：70335389

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、細胞膜を貫通するDNAナノ構造体の構築と分子デリバリーへの応用を目指した技術開発を目的とした。脂質膜を貫通できる針状の部位を持つ2次元DNAオリガミ構造体を設計・構築し、脂質二重膜と相互作用し格子状の集合体を形成することを高速AFMで動的に観察した。細胞のモデル系であるリポソームを用いることで、針状部位が脂質膜を貫通し、ターゲット分子のリポソーム内への導入と内部の生化学反応を開始することに成功した。この構築した系を用いて、細胞に対して目的分子を細胞表面から導入できる新たな系へと発展させる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to develop new strategy by constructing DNA nanostructures which can penetrate the cell membrane and application to molecular delivery system. We designed and constructed a DNA origami structure having a needle-like portion that can penetrate the lipid membrane, and observed that it interacts with the lipid bilayer membrane and forms a lattice assembly by high-speed AFM. By using liposome which is a model system of the cell, the target molecule was successfully introduced into the liposome and biochemical reaction was initiated by penetrating the lipid membrane. Using this system, we develop a new system that can introduce the target molecule from the cell surface into the cell.

研究分野：生物有機化学

キーワード：DNAナノテクノロジー DNAオリガミ リポソーム 脂質膜 原子間力顕微鏡 デリバリーシステム 細胞機能制御

1. 研究開始当初の背景

本研究では、DNA によって構成されるシート状 2 次元集合体を設計・機能化し、ナノサイズの針状部位を細胞膜に貫通させ、分子のデリバリーと細胞応答の制御へと応用するための基礎技術の開発を目指す。本研究者は、現在まで、DNA によって任意のナノスケールの構造体や空間を設計することで、分子の閉じ込めや 1 分子レベルの観察を行う手法を開発してきた。とりわけ、これらの設計したナノ構造体を用いて、実時間に近い観察ができる高速原子間力顕微鏡 (AFM) を使用し、動的な状態で分子を可視化する方法を世界に先駆けて開発した (*Acc. Chem. Res.* 2014, 47, 1645; *Chem. Rev.* 2014, 114, 1493)。本研究者はこれらの独自に蓄積してきた DNA 分子テクノロジーの技術を基盤として、十字型及び多角形 DNA 構造体とシート状の集合体を構築してきた。これを応用し、生体分子のデリバリーに使用可能な分子システムを開発し、細胞の機能制御を目指す。一方で、DNA 構造体がシート状集合体を形成するため、従来の小分子を使った細胞へのアプローチとは根本的に異なる未知の領域も開拓する。

2. 研究の目的

本研究では、DNA 構造体を使った脂質膜を貫通する DNA 構造体及び集合体の構築と分子デリバリーへの応用を目指した技術開発を目的とする。現在までに申請者が蓄積してきた DNA によるナノテクノロジーの技術を基盤として、DNA によって様々な構造体を設計・機能化し、マイクロメートルサイズに DNA 構造体を集合させ、細胞に対して機能制御できる分子システムを開発する。脂質膜を貫通できる針状の部位を持つ DNA ナノ構造体を設計・構築し、針状 DNA 部位を細胞のモデル系であるリポソームの脂質膜を貫通させる系を構築する。これによって、ターゲット分子のリポソーム内への外部からの導入を行う。

本研究では、以下の項目を計画した。(1) 多角形 DNA 構造体の設計・構築と 2 次元シート状への集合化を行う。格子状の集合体を構築し、脂質二重膜との相互作用を高速 AFM で動的に観察する。(2) 針状部位へ目的とする 1 本鎖 DNA を結合し、光照射による分子の放出の制御を行い、リポソームを使って貫通した針状部位からの内部への分子の放出を検討する。(3) これらの構築した構造体及び集合体と細胞との相互作用を検討し、細胞表面からのターゲットとなる DNA や RNA の細胞内への導入法を検討する。

3. 研究の方法

本研究では、DNA オリガミ構造体を使った脂質膜を貫通する DNA 構造体及び集合体の構築と分子デリバリーへの応用を目指した技術開発を目的とする。DNA オリガミ構造体の設計は caDNAno を使用し、DNA 構造体と中心に針状構造体を導入した構造体の設計を行

った。鋳型となる 1 本鎖 DNA (M13mp18) と設計した相補鎖 DNA を自己集合させ、AFM によって構造を確認した。脂質上での動的な挙動は高速 AFM によって検討した。蛍光ラベルした構造体とリポソームとの相互作用、生化学反応系を含むリポソームの反応の観察を蛍光顕微鏡によって行った。

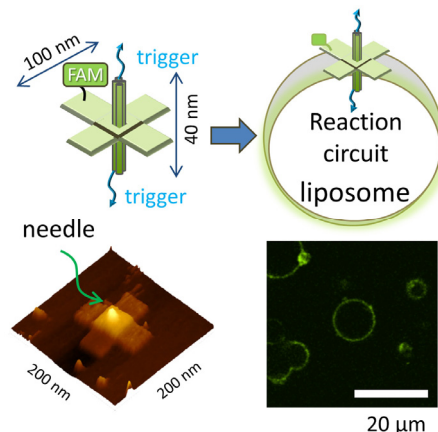
4. 研究成果

(1) 針状構造を持つ DNA 構造体の構築と脂質との相互作用

DNA 集合体の構築を行うため、その設計を行った。設計は DNA オリガミ法を用いて、DNA 構造体に脂質二重膜を貫通する針状構造体を中心に垂直に導入した。針状構造体の形成は AFM によって確認した。構造体を自己集合すると構造体の中心に高さのある針状構造物が導入されているのが AFM によって確認できた。マイカ上に作成した脂質二重膜上に DNA 構造体は吸着され、脂質と問題なく相互作用することが確かめられた。次に、末端が $\pi-\pi$ 相互作用で結合できるようにした十字型構造体が、脂質膜表面に吸着し集合化することで、マイクロメートルサイズの格子集合体を形成することを高速 AFM によって可視化した。

(2) 針状構造を持つ DNA 構造体によるリポソーム内部への分子の導入

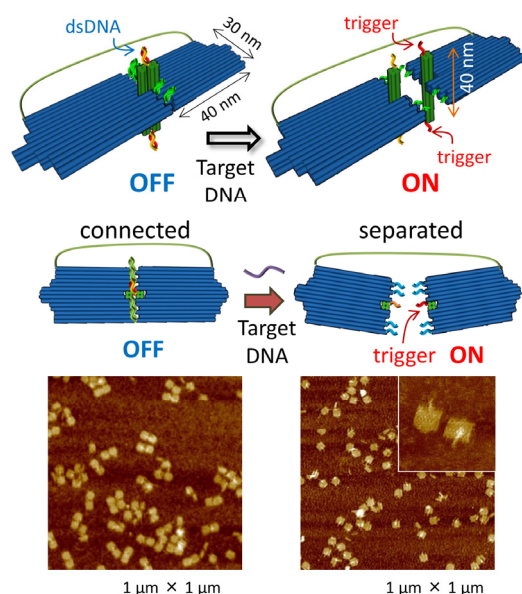
DNA 構造体に導入した針状構造体によってリポソームの脂質二重膜を貫通し、リポソーム内部に導入した反応系を動作させる系の構築を行った。作成した DNA 構造体を DOPC からなるリポソームとインキュベートすることで、リポソーム表面に構造体が結合することを蛍光顕微鏡観察によって確認した。これらをアSEMBルすると 20 個程度のモノマーが含まれた格子集合体の形成が見られた。次に針状構造の先端に DNA 増幅反応を開始する DNA 鎖を導入し、DNA 増幅反応系を導入したリポソーム内部で反応を開始する系を構築した。その結果、針状構造の先に反応を誘導する DNA 鎖を導入した十字型構造体をリポソームに結合させることで、リポソーム内部の DNA 増幅系が動作することが分かった。一方で、反応を誘



導する DNA 鎖がない針状構造のみでは増幅が見られないことから、針状構造部分が脂質膜を貫通し、リポソーム内に導入されたターゲット分子から反応が開始されることが示唆された。このことから、これら DNA 構造体を用いることで、反応開始に必要な DNA 鎖をリポソーム内部に送り込み、目的とした DNA 増幅反応を開始することに成功した。

(3) シグナルに応答して集合化する構造体の構築と機能

外部からのシグナルとなる分子に応答して構造変換し機能する DNA 構造体の設計と構築を行った。設計は、針状構造体を中心に導入した十字型の DNA 構造体の方針を踏襲した。DNA 構造体は DNA オリガミ法によって設計し、シグナル分子に応答して 2 つの平面なドメインが解離する動的なものである。構造体の 2 量化部位に針状構造体を導入してあり脂質二重膜を貫通できる。特異的な配列の DNA 鎖を加えることで結合していた 2 つのドメインが切り離されることが AFM 観察とゲル電気泳動によって確認された。これに伴って、針状構造の先端に導入した DNA 増幅反応を開始する DNA 鎖が切り離されることが確認された。



本研究では、針状構造を持つ十字型の DNA 構造体と 2 つの平面構造からなる DNA 構造体設計・作成した。十字構造体はリポソーム表面と相互作用し、脂質二重膜を貫通して、リポソーム内部に導入し、内部の DNA 増幅系を動作させることに成功した。もう一方の 2 つの平面構造からなる DNA 構造体は、シグナル分子となる特異的な DNA 鎖に応答して、構造体の構造変換を誘導できるため、外部操作によってリポソーム内部に反応開始分子を生じさせるこ

とができる。今後、リポソーム内部の反応の誘導と細胞への応用を検討する。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 18 件)

1. Y. Suzuki, H. Sugiyama, M. Endo, Complexing DNA origami frameworks through sequential self-assembly based on directed docking. *Angew. Chem. Int. Ed.* 57, in press (2018).
2. T. Kurokawa, S. Kiyonaka, E. Nakata, M. Endo, S. Koyama, E. Mori, N. H. Tran, H. Dinh, Y. Suzuki, K. Hidaka, M. Kawata, C. Sato, H. Sugiyama, T. Morii, Y. Mori, DNA Origami Scaffolds as Templates for Functional Tetrameric Kir3 K⁺ Channels. *Angew. Chem. Int. Ed.* 57, 2586-2591 (2018).
3. A. Lee, M. Endo, J. Hobbs, C. Wälti, Direct Single-Molecule Observation of Mode and Geometry of RecA-Mediated Homology Search. *ACS Nano*, 12, 272-278 (2018).
4. L. Azéma, S. Bonnet-Salomon, M. Endo, Y. Takeuchi, G. Durand, T. Emura, K. Hidaka, E. Dausse, H. Sugiyama, J.-J. Toulmé, Triggering Nucleic Acid Nanostructure Assembly By Conditional Kissing Interactions. *Nucleic Acids Res.* 46, 1052-1058 (2018).
5. E. M. Willner, Y. Kamada, Y. Suzuki, T. Emura, K. Hidaka, H. Dietz, H. Sugiyama, M. Endo, Single-Molecule Observation of the Photoregulated Conformational Dynamics of DNA Origami Nanoscissors. *Angew. Chem. Int. Ed.* 56, 15324-15328 (2017).
6. Y. Kobayashi, O. Misumi, M. Odahara, K. Ishibashi, M. Hirono, K. Hidaka, M. Endo, H. Sugiyama, H. Iwasaki, T. Kuroiwa, T. Shikanai, Y. Nishimura, Holliday-junction resolvases mediate chloroplast nucleoid segregation. *Science*, 356, 631-634 (2017).
7. P. Shrestha, S. Jonchhe, T. Emura, K. Hidaka, M. Endo, H. Sugiyama, H. Mao, Confined Space Facilitates G-quadruplex Formation. *Nature Nanotechnology*, 12, 582-588 (2017).
8. T. Shibata, Y. Fujita, H. Ohno, Y. Suzuki, K. Hayashi, K. R. Komatsu, S. Kawasaki, K. Hidaka, S. Yonehara, H. Sugiyama, M. Endo, H. Saito, Protein-driven RNA nanostructured devices that function in vitro and control mammalian cell fate. *Nature Communications*, 8, 540 (2017).
9. Y. Yang, R. Tashiro, Y. Suzuki, T. Emura, K. Hidaka, H. Sugiyama, M. Endo, A Photoregulated DNA-Based Rotary System And Direct Observation of Its Rotational Movement. *Chem. Eur. J.* 23, 3979-3985 (2017).

10. J. J. Keya, D. Inoue, Y. Suzuki, T. Kozai, N. Koder, T. Uchihashi, A. Md. R. Kabir, M. Endo, K. Sada, A. Kakugo, High-Resolution Imaging of a Single Gliding Protofilament of Tubulins by HS-AFM. *Sci. Rep.* 7, 6166 (2017).
11. H. Oi, D. Fujita, Y. Suzuki, H. Sugiyama, M. Endo, S. Matsumura, Y. Ikawa, Programmable formation of catalytic RNA triangles and squares by assembling modular RNA enzymes. *J. Biochem.* 161, 451-462 (2017).
12. M. H. Ráz, K. Hidaka, S. J. Sturla, H. Sugiyama, M. Endo, Torsional Constraints of DNA Substrates Impact Cas9 Cleavage. *J. Am. Chem. Soc.* 138, 13842-13845 (2016).
13. Y. Yamagata, T. Emura, K. Hidaka, H. Sugiyama, M. Endo, Triple Helix Formation in a Topologically Controlled DNA Nanosystem. *Chem. Eur. J.* 22, 5494-5498 (2016).
14. A. Kuzyk, Y. Yang, X. Duan, S. Stoll, A. O. Govorov, H. Sugiyama, M. Endo, N. Liu, A light-driven 3D plasmonic nanosystem that translates molecular motion into reversible chiroptical function. *Nature Communications*, 7, 10591 (2016).
15. P. Shrestha, T. Emura, D. Koirala, K. Hidaka, W. Maximuck, M. Endo, H. Sugiyama, H. Mao, Mechanical Properties of DNA Origami Nanoassemblies are Determined by Holliday Junction Mechanophores. *Nucleic Acids Res.* 44, 6574-6582 (2016).
16. A. Saha, S. Kizaki, D. De, M. Endo, K. K. Kim, H. Sugiyama, Examining cooperative binding of Sox2 on DC5 regulatory element upon complex formation with Pax6 through excess electron transfer assay. *Nucleic Acids Res.* 44, e125 (2016).
17. Y. Takeuchi, M. Endo, Y. Suzuki, K. Hidaka, G. Durand, E. Dausse, J.-J. Toulmé, H. Sugiyama, Single-molecule observations of RNA-RNA kissing interactions in a DNA nanostructure. *Biomater. Sci.* 4, 130-135 (2016).
18. Y. Nishida, S. Ohtsuki, Y. Araie, Y. Umeki, M. Endo, T. Emura, K. Hidaka, H. Sugiyama, Y. Takahashi, Y. Takakura, M. Nishikawa, Self-assembling DNA hydrogel-based delivery of immunoinhibitory nucleic acids to immune cells. *Nanomedicine*, 12, 123-130 (2016).
- [学会発表] (計 21 件)
1. 遠藤 政幸「狭小空間での分子の振る舞い」第 1 回分子ロボティクス年次大会、東北大学、2018 年 3 月 5 日
2. 遠藤 政幸「DNA オリガミを使った 1 分子の観察」(招待講演) 静岡ライフサイエンスシンポジウム、静岡大学、2018 年 3 月 4 日
3. Masayuki Endo "High-speed AFM imaging of synthetic nanomachines and nanostructures" (招待講演) The SPIRITS International Symposium 2018 Multidisciplinary Approach for Cell Control, Kyoto University, February 27, 2018.
4. M. Endo, P. Shrestha, S. Jonchhe, T. Emura, K. Hidaka, H. Sugiyama, H. Mao, "Observation of biophysical property of G-quadruplex in a confined nanospace" The 44th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, Tokyo, Nov. 14, 2017.
5. Y. Kamada, E. Willner, Y. Suzuki, T. Emura, K. Hidaka, H. Dietz, H. Sugiyama, M. Endo, "Direct observation of photoresponsive DNA nanodevice and its self-assembly" The 44th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, Tokyo, Nov. 14, 2017.
6. M. Endo, P. Shrestha, S. Jonchhe, T. Emura, K. Hidaka, H. Sugiyama, H. Mao, "Biophysical property of G-quadruplex caged in a confined DNA nanospace" DNA23: The 23rd International Meeting on DNA Computing and Molecular Programming, University of Texas, Austin, USA, September 24-28, 2017.
7. 遠藤 政幸, Prakash Shrestha, Sagun Jonchhe, 江村 智子, 日高 久美, 杉山 弘, Hanbin Mao 「制限された空間でのグアニン四重鎖の物性」 第 11 回バイオ関連化学シンポジウム、東京大学、2017 年 9 月 8 日
8. 鎌田 佑, Elena Willner, 鈴木 勇輝, 江村 智子, 日高 久美, Hendrik Dietz, 杉山 弘, 遠藤 政幸 「光応答性を持つ DNA 分子デバイスの構築とその自己集積化」 日本ケミカルバイオロジー学会 第 12 回年会、北海道大学、2017 年 6 月 8 日
9. Masayuki Endo "High-speed AFM imaging of synthetic nanomachines and nanostructures" (招待講演) Unconventional Computation and Natural Computation 2017 (UCNC 2017), University of Arkansas, Fayetteville, AR, USA, June 5, 2017.
10. M. Endo, P. Shrestha, S. Jonchhe, T. Emura, K. Hidaka, H. Sugiyama, H. Mao, "Observation of single biomolecule properties in a DNA nanospace" 14th Conference on the Foundations of Nanoscience 2017, Snowbird, UT, USA, April 13, 2017.
11. Michael H. Ráz, 日高 久美, Shana J. Sturla, 杉山 弘, 遠藤 政幸 「DNA 鎖の拘束による Cas9 切断への影響」 日本化学会第 97 春季年会(2017)、慶応大学日吉キャンパス、2017 年 3 月 18 日

12. 鎌田 佑, 竹内 洋祐, 竹中 友洋, 江村 智子, 杉山 弘, 遠藤 政幸「コンフォメーション変換により化学反応を誘導する DNA ナノ構造体の構築」日本化学会第 97 春季年会(2017)、慶応大学日吉キャンパス、2017 年 3 月 18 日
13. Masayuki Endo "Observation of single-molecule behavior in the DNA nanospace" (招待講演) The 3rd SPIRIT international symposium, Light Opening up Frontier of DNA and Nanocrystal Superstructures, Kyoto, February 2, 2017.
14. 遠藤 政幸 「ナノ空間での 1 分子の振る舞い」(招待講演) ケミカルバイオロジー Mini-symposium at KIT、京都工芸繊維大学、2017 年 1 月 16 日
15. Masayuki Endo "Chemically controllable nanosystems constructed in the nanostructures" (招待講演) 日本生物物理学会 第 54 回年会、つくば、2016 年 11 月 27 日
16. M. Endo, X. Xing, X. Zhou, T. Emura, K. Hidaka, B. Tuesuwan H. Sugiyama, "Direct observation of the duplex formation and dissociation in the G-quadruplex-/i-motif-forming site" The 43rd International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, Kumamoto, Sept. 28, 2016.
17. Masayuki Endo "AFM-based single-molecule imaging of biomolecules and synthetic molecules in the DNA origami nanostructures" (招待講演) Department of Health Sciences and Technology, ETH Zürich, Switzerland, September 13, 2016.
18. Y. Yang, R. Tashiro, Y. Suzuki, T. Emura, K. Hidaka, H. Sugiyama, M. Endo, "Photoregulated DNA-based rotary nanomachine and direct visualization of the rotational movement" DNA22: The 22nd International Meeting on DNA Computing and Molecular Programming, Ludwig-Maximilians-Universität München, Germany, September 4-9, 2016.
19. Y. Suzuki, H. Sugiyama, M. Endo, "Filling cavities of lipid-bilayer-supported two-dimensional DNA origami arrays" DNA22: The 22nd International Meeting on DNA Computing and Molecular Programming, Ludwig-Maximilians-Universität München, Germany, September 4-9, 2016.
20. Masayuki Endo "High-speed AFM imaging of biomolecules and synthetic molecules in the DNA origami nanostructures" (招待講演) Department of Chemistry and Biochemistry, Kent State University, Kent, OH, USA, July 7, 2016.
21. Masayuki Endo "Photo-controlled mobile DNA nanosystems constructed in the DNA nanostructures" (招待講演) 13th Conference on the Foundations of Nanoscience 2016, Snowbird, UT, USA, April 11, 2016.
- [図書] (計 5 件)
1. M. Endo, H. Sugiyama, "Direct observation of dynamic movement of DNA molecules in DNA origami imaged using high-speed AFM" *Nanoscale Imaging: Methods and Protocols*, (Yuri L. Lyubchenko Ed.), *Methods in Molecular Biology*, in press (2018).
 2. 遠藤 政幸「DNA から作るナノスケールの構造体—そのデザインと作成—」*化学と教育*、Vol. 66, no. 2, 88-91 (2018).
 3. 遠藤 政幸、杉山 弘「DNA 分子マシン」日本化学会編『CSJ カレントレビュー 分子マシンの展開』*化学同人* pp140-148 (2017).
 4. 遠藤 政幸「DNA オリガミの応用 構造から機能へ」*現代化学*、No. 544, 40-45 (2016).
 5. M. Endo, "Single-Molecule Visualization of Biomolecules in the designed DNA Origami Nanostructures Using High-Speed Atomic Force Microscopy" *RNA Technologies (V. A. Erdmann, S. Jurga, J. Barciszewski Eds.) Modified Nucleic Acids in Biology and Medicine*, Springer, Volume 7, pp 403-427 (2016).
- [その他]
ホームページ等
http://kuchem.kyoto-u.ac.jp/chembio/top_page_j.html
6. 研究組織
(1) 研究代表者
遠藤 政幸 (ENDO, Masayuki)
京都大学・理学研究科・特定准教授
研究者番号：70335389