

令和元年6月18日現在

機関番号：34416

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19211

研究課題名(和文) DNAオリガミ構造体を活用した革新的膜タンパク操作法の開発

研究課題名(英文) Development of innovative manipulation technology for membrane proteins

研究代表者

葛谷 明紀(Kuzuya, Akinori)

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号：00456154

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：脂質2重膜を取り込むための口の字型DNAオリガミ構造体を設計し、その形成を原子間力顕微鏡(AFM)により確認した。さらに、脂質2重膜との相互作用についても検討した。また、DNAオリガミ構造体内の疎水空間へのゲスト取り込みに関して、その低い収率を改善するための手法についても検討した。10 nm角のゲスト取り込み空間を有するDNAオリガミ構造体への金ナノ粒子の取り込みにおいて、溶液を凍結することにより100倍以上の加速効果が得られることがわかった。さらに、DNAオリガミ構造体のゲスト取り込み空間に、シクロデキストリンロタキサンを固定化し、高速AFMでリアルタイムに単分子観察することにも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で設計した口の字型DNAオリガミ構造体により、「人工ナノディスク」の構築への端緒が開かれた。また、近年注目が集まりつつある分子機械について、ほぼ世界で初めて高速AFMによるリアルタイム観察を行うことに成功した。生体分子との組み合わせにより、AFMでは観察が難しい小分子でもその存在を可視化できることを示すとともに、観察基盤としてのDNAオリガミ構造体の有用性も示すことができた。

研究成果の概要(英文)：A square-shape DNA origami motif with wide inner cavity for encapsulation of lipid bilayers has been designed and prepared. Atomic force microscopy (AFM) showed successful formation of the desired nanostructures. Selective and efficient incorporation of gold nanoparticles applying solution-freezing technique, and real-time and single-molecule observation of CyD rotaxane attached to DNA origami nanostructures using high-speed AFM were also successful.

研究分野：生体超分子化学

キーワード：DNAオリガミ DNAナノテクノロジー 脂質2重膜 ナノディスク 膜タンパク

## 1. 研究開始当初の背景

生体において膜タンパクは、環境の知覚や有用分子の取り込み、細胞間の連携など、細胞と外界との間のインターフェースとして、生命活動に欠かすことのできない重要な役割を果たしている。膜タンパクは通常、脂質2重膜に埋め込まれる非常に疎水的な部位を有しているため、一般的なタンパク質の試験管内合成法は容易には適用できないことが多く、これまで構造解析などの詳細な膜タンパク研究の大きな障害となっていた。

そのような状況において、最近注目を浴びているのが「ナノディスク」と呼ばれる複合体である。これは人工的なタンパク質をベルトのように使用し、脂質2重膜をナノメートルサイズの円盤状に切り出したものをいう。正しい条件を整えてやれば、試験管内で人工的に合成した膜タンパク質であっても、正しくフォールディングさせながら脂質2重膜内に取り込むことができるという大きな特長から、ナノディスクは膜タンパク研究の強力なツールとなりつつある。

一方で脂質2重膜を束ねるベルトとしてタンパク質を利用することは、調製が煩雑であり安定性も十分でない、さらなる機能化をはかることが容易にはできない、などの欠点も存在した。

研究代表者はこれまでに、多数の短いDNAを用いて長鎖のウイルスDNAを折り畳むことで望み通りのナノ構造体を自在に作成できる「DNAオリガミ法（*Nanoscale* **2010**, *2*, 310 など）」を活用して、様々なナノデバイスの作成に成功してきた（*Nature Commun.*, **2011**, *2*, 449 など）。その過程において、DNAオリガミ構造体中存在するDNAの疎水性末端に由来した非常に疎水的な領域をうまく活用すれば、脂質2重膜とDNAオリガミ構造体を強く相互作用させることができるのではないかと着想した。

## 2. 研究の目的

本研究は、多数のDNAを用いて長鎖のウイルスDNAを折り畳むことで望み通りのナノ構造体を自在に作成できる「DNAオリガミ法」を活用し、脂質2重膜を膜タンパクごと細胞膜などから切り取ることができるプール状のDNAナノ構造体の作成を目的とした。さらにこれを用いて、完全に設計通りに制御可能、かつ非常に均一なサイズを有し、狙った分子数だけ膜タンパクをプール内に包含、自在に連結、複合化が可能な、これまでに類を見ない次世代の「ナノディスク」を作成し、革新的な膜タンパク研究法を確立することをめざした。

## 3. 研究の方法

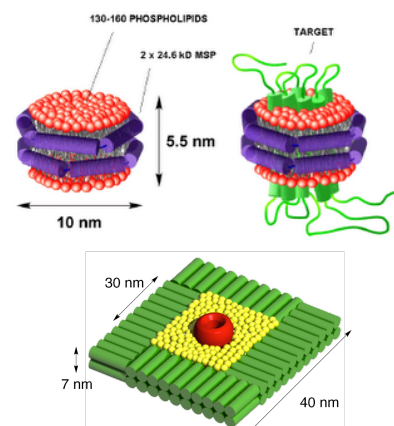
初年度はまず、脂質2重膜を取り込むための口の字型DNAオリガミ構造体の設計を行った。厚さ約8nmの脂質2重膜を束縛しなければならないため、DNAを二層重ねた特殊な構造（この場合、DNAの曲がりも影響して、厚みは5.5nm程度になる）を検討した。全体構造に十分な強度を持たせるためには、経験的に外形は縦横40nm、内部の切り抜きは30nmとするのが最適であると予想される。必要なDNA鎖を購入し、設計通りの構造が形成されていることを、原子間力顕微鏡（AFM）観察や、透過型電子顕微鏡（TEM）観察により確認した。

さらに、口の字型DNAオリガミ構造体の設計がある程度確定させた後に、脂質2重膜の取り込みによるプール状複合体の形成を検討した。蛍光標識した口の字型DNAオリガミ構造体を用意し、これをリポソームの分散液に加えた際の挙動を、共焦点レーザー顕微鏡およびフローサイトメーターで観察した。

このほか、DNAオリガミ構造体内の疎水空間へのゲスト取り込みに関して、その低い収率を改善するための手法についても検討した。

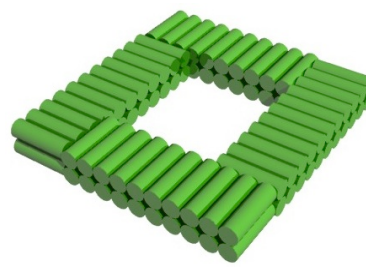
## 4. 研究成果

当初の研究計画に従い、脂質2重膜を取り込むための口の字型DNAオリガミ構造体の設計を行った。84残基からなるDNA二重らせんを10本平行に束ね、これを二層重ねた構造を一単位とした。これにより、奥行き28nm、横幅35nm、厚み7nmの長方形のブロックが形成される。さらにこれを四単位、回転対称に並べることで、中央に正方形の疎水空間をもつ、口の字型の構造体とした。研究計画当初は中央の疎水空間のサイズを30nmの固定としていたが、DNAオリ



タンパクベースのナノディスク（上）  
と筒状のDNAで脂質2重膜を囲んだ  
DNAオリガミナノディスク（下）

ガミ構造体の設計を工夫することにより、最小7 nm から最大 35 nm まで、疎水空間のサイズを可変とした。鋳型 DNA の折りたたみパターンを決定するとともに、その配列を確定した。上記に加え、研究代表者が独自にデザインした DNA オリガミ類縁体である DNA スダレ法によっても、同様の疎水空間を中央に有する構造体のデザインを行った。DNA スダレ法は、DNA 二重らせん間に任意の長さのスペーサーを挿入することにより、らせん間の距離を調節するだけでなく、その角度までも自在に操ることができることがわかっている。そこで、中央に末端の疎水部を集約するように DNA 二重らせんを放射状に並べた、円形の構造体を設計した。DNA の折りたたみパターンは上記の口の字型構造体とほぼ同様の 84 残基の DNA 二重らせん 80 本からなり、厚みも同じように 2 段構造とした。らせんの結合パターンのみを変えることにより、中央の円形の疎水空間の直径がおおよそ 80 nm、外周までの直径がおおよそ 140 nm の構造となるようにした。



作成した口の字型 DNA オリガミ構造体の概略図

ついで、設計した脂質 2 重膜を取り込むための口の字型 DNA オリガミ構造体を実際に調製した。10 nm 角の疎水空間を有する構造体を実際に作製し、原子間力顕微鏡 (AFM) により目的通りの構造が作製されていることを確認した。さらに、脂質 2 重膜との相互作用についても検討した。また、DNA オリガミ構造体内の疎水空間へのゲスト取り込みに関して、その低い収率を改善するための手法についても検討した。金ナノ粒子への DNA 修飾に際して、金ナノ粒子とチオール修飾 DNA の溶液を凍結させることにより、金ナノ粒子への DNA 分子の導入効率を飛躍的に高めたという既報の論文を参考に、10 nm 角のゲスト取り込み用の空間を有する DNA オリガミ構造体への金ナノ粒子の取り込みにおいても溶液の凍結を試みた。その結果、従来考えられていたのとは異なり、DNA オリガミ構造体の溶液を凍結しても、その構造には悪影響がでないことがはじめて明らかとなるとともに、DNA オリガミ構造体への金ナノ粒子の取り込み効率についても、100 倍以上の加速効果が得られることがわかった。さらに、DNA オリガミ構造体のゲスト取り込み空間に、シクロデキストリンロタキサンを固定化することにも成功した。高速 AFM で観察した結果、シクロデキストリン分子そのものを観察することはできなかったものの、シクロデキストリンに導入したビオチンにストレプトアビジンタンパクを結合させることにより、ナノ空間内にタンパク分子を選択的に取り込み、その運動をリアルタイムに観察することができた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Kento Matsuda, Arif Md. Rashedul Kabir, Naohide Akamatsu, Ai Saito, Shumpei, Ishikawa Tsuyoshi Matsuyama, Oliver Ditzer, Md. Sirajul Islam, Yuichi Ohya, Kazuki Sada, Akihiko Konagaya, [Akinori Kuzuya](#),\* Akira Kakugo,\* Artificial Smooth Muscle Model Composed of Hierarchically Ordered Microtubule Asters Mediated by DNA Origami Nanostructures, *Nano Letters*, 査読有, 19, 2019, in press. DOI: 10.1021/acs.nanolett.9b01201
2. Shizuma Tanaka, Shinsuke Yukami, Kazuki Fukushima, Kenta Wakabayashi, Yuichi Ohya,\* [Akinori Kuzuya](#),\* Bulk pH-Responsive DNA Quadruplex Hydrogels Prepared by Liquid-Phase, Large-Scale DNA Synthesis, *ACS Macro Letters*, 査読有, 7, 2018, 295-299. DOI: 10.1021/acsmacrolett.8b00063
3. [Akinori Kuzuya](#),\* Shizuma Tanaka, Hydrogels Utilizing G-Quadruplexes, *MOJ Polymer Science*, 査読有, 1, 2017, 33. DOI: 10.15406/mojps.2017.01.00033

[学会発表] (計 7 件)

1. [Akinori Kuzuya](#), Real-Time Observation of The Movements of DNA Origami Pinching Devices on Mica Using High-Speed AFM, 16th Annual Conference on Foundations of Nanoscience (FNANO 2019), 2019.
2. [Akinori Kuzuya](#), Single-Molecule Observation of alpha-CyD Rotaxane Incorporated into DNA Origami with Nanocavities, 15th Annual Conference on FOUNDATIONS OF NANOSCIENCE: SELF-ASSEMBLED ARCHITECTURES AND DEVICES (FNANO18) (招待講演), 2018.
3. [Akinori Kuzuya](#), PEG Hydrogels Utilizing DNA Quadruplexes as Crosslinking Points, INTERNATIONAL CONGRESS ON PURE & APPLIED CHEMISTRY (ICPAC) 2018 (招

待講演), 2018.

4. Akinori Kuzuya, Single-Molecule Observation of  $\alpha$ -CyD Rotaxane Incorporated into DNA Origami with Nanocavities, The 13th International Symposium in Science and Technology at Cheng Shiu University 2018, 2018.
5. Akinori Kuzuya, DNA Quadruplex Hydrogels: An Application of Synthetic DNA as Bulk Material, First International Conference on 4D Materials and Systems(招待講演), 2018.
6. Akinori Kuzuya, Single-Molecule Observation of  $\alpha$ -CyD Rotaxane Incorporated into DNA Origami with Nanocavities, BIONANO2018 Workshop(招待講演), 2018.
7. Akinori Kuzuya, Single-Molecule and Real-Time Observation of Cyclodextrin-Rotaxane Incorporated into DNA Origami with Nanocavities, The 45th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC2018), 2018.

[図書] (計 2 件)

1. 分子ロボティクス研究会 葛谷明紀 (分担執筆)、CBI 学会出版、分子ロボティクス概論、2019、p.211-215.
2. Akinori Kuzuya, Wiley-VCH, Weinheim, "Manipulation of Molecular Architecture with DNA" in Molecular Technology: Life Innovation, Hisashi Yamamoto & Takashi Kato, Ed., 2018, p.25-42.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等：<http://wps.itc.kansai-u.ac.jp/mol-mach/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：なし

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。