

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19831

研究課題名（和文）DNAオリガミナノ構造体を介したナノスケール膜ドメインの創出とデザイン

研究課題名（英文）Designing lipid membrane nanodomains using DNA origami

研究代表者

鈴木 勇輝（Suzuki, Yuki）

東北大学・学際科学フロンティア研究所・助教

研究者番号：50636066

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：脂質膜を人工的に作製し、操作する技術は、生体膜を反応場とした生命現象を再構成的に理解し、制御するために不可欠なものである。脂質膜は膜内における分子の拡散を可能とするだけでなく、膜ドメインの形成を通して、膜タンパクの機能に積極的に関わっていることが示唆されている。本研究では、DNAオリガミナノ構造体を介して、このような膜ドメインを人工的に創りだし、そのナノスケール形状を自在にデザインする技術の開発に挑戦した。さまざまな形状のDNAオリガミを人工脂質膜上で二次元自己集合化させることで、平坦な脂質膜面をさまざまな形状のナノスケールドメインへと区画化することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人工的に再構成した脂質二重膜は生体膜反応に関わる脂質やタンパク質の挙動を解析するためのモデルシステムとなるだけでなく、生体適合界面としても利用されており、その表面のプロセッシング及び機能付加は新規バイオデバイス・バイオマテリアルの創成につながると期待される。DNAによって仕切られた脂質膜のナノドメインは、膜タンパク質をはじめとしたさまざまな分子をデザインした周期で配列化するために利用できるほか、それらの分子の空間的配置や局所的な密度を精密制御するための基盤技術としても応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：The fluidity of the plasma membrane not only allows the diffusion of proteins and other biomolecules within the membrane but also affects the function of these molecules through the formation of membrane nanodomains. Techniques for artificially producing lipid membrane nanodomains would enable us to reconstitute biological phenomena take place on the cellular membranes. In this study, we aimed to develop a technique to design artificial membrane nanodomains using DNA origami nanotechnology. DNA origami nanostructures were self-assembled into two-dimensional lattices on a mica-supported lipid bilayer membranes, which resulted in the compartmentalization of the bilayer surface into nanoscale domains with predesigned shapes which designated by the shapes of DNA origami building blocks.

研究分野：ナノサイエンス

キーワード：DNAナノテクノロジー DNAオリガミ 脂質膜 原子間力顕微鏡 自己集合化 自己組織化 膜ドメイン

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

情報伝達・物質輸送・エネルギー変換など、生体膜を反応場とする現象の理解と制御には、その基本構造である脂質二分子膜の再構成と操作が重要な基盤技術となる。生体膜の主要構成成分であるリン脂質は流動的に膜内を拡散するだけでなく、特定の条件下においてはドメイン構造を形成することが知られている。特に、リポソームや基板支持平面膜など人工的な系においては構成脂質分子やコレステロール分子の組成比及び温度を調整することで、相分離現象により無秩序液体相、秩序液体相、ゲル相などのドメイン構造を誘起することができる。しかしながら、ここで得られる相分離ドメインは数百ナノ～数マイクロスケールの異方形あるいは円形のものであり、その形状をナノスケールで自在にデザインして創り出すことはできない。

2. 研究の目的

脂質膜を人工的に作製し、操作する技術は、生体膜を反応場とした生命現象を再構成的に理解し、制御するために不可欠なものである。脂質膜は膜内における分子の拡散を可能とするだけでなく、膜ドメインの形成を通して、膜タンパクの機能に積極的に関わっていることが示唆されている。本研究では、さまざまなナノ形状を実現できる DNA オリガミ構造を用いて、膜ドメインを人工的に創りだし、そのナノスケール形状を自在にデザインする技術の開発に挑戦する。

3. 研究の方法

(1) DNA オリガミの作製

DNA オリガミ構造は、設計ソフトウェアである caDNAno を用いて設計した。構造に合わせて配列設計した Staple DNA の混合溶液と Scaffold DNA (M13mp18 ssDNA あるいは、p8064) を緩衝溶液 (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA) 中で混合し、85°C から 15°C へと 120 分かけてアニリングすることで作製した。余剰な Staple DNA は、スピンカラムを用いたゲルろ過法で除去した。

(2) ジャイアントリポソームの作製

リポソームは静置水合法により調製した。DOPC (ジオレオイルホスファチジルコリン) または DOPC : DPPC (ジパルミトイルホスファチジルコリン) = 1 : 1 の脂質溶液 (総脂質濃度 : 2 mM) を クロロホルム : メタノール = 2 : 1 (v/v) を溶媒として調整した。この脂質溶液 20 μ L と 0.1 mM ローダミン-DHPE 2 μ L, そして、メタノール溶液に溶解した 10 mM グルコース 12 μ L をガラスチューブ内で混合したのち、アルゴンガスで乾燥させた。乾燥した脂質フィルムをさらに真空下で 3 時間以上乾燥させたのち、37°C で一晩、300 mM スクロース溶液 200 μ L 中で水和させた。

(3) マイカ基板支持脂質平面膜の作製

ベシクル融合法により、劈開したマイカ基板上に脂質平面膜を作製した。クロロホルム/メタノール溶液 (クロロホルム : メタノール = 2 : 1 (v/v)) に溶解した 2 mM の脂質溶液を、アルゴンガスを用いてガラスチューブ内で乾燥させたのち、さらに真空下で一晩乾燥させた。乾燥した脂質フィルムに 75 μ L の超純水を加えたのち、攪拌・超音波処理することで、スモールユニラメラベシクル (SUV) 溶液を調製した。マイカ基板支持脂質二重層膜 (SLB) は、SUV 溶液 2 μ L と緩衝溶液 (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA) 1 μ L を、劈開したマイカ基板上に滴下し、静置することで作製した。乾燥を防ぐために、サンプルは超純水で湿らせたキムワイプ断片を敷いた密閉容器内に静置した。室温で 30 分間静置後、基板表面を緩衝液ですすぎ、未吸着の SUV を除去した。マイカ基板面を脂質膜で完全に覆うために、SUV 溶液の滴下～すすぎまでの工程を 2~3 回繰り返した。

(4) DNA オリガミの二次元自己集積化

上述の手法で構築した SLB 面に DNA オリガミを吸着させた。上述のすすぎの直後に DNA オリガミ溶液 (10 nM) 2 μ L を SLB 上に滴下し、室温で 60 分以上静置した。

(5) 原子間力顕微鏡観察

原子間力顕微鏡 (AFM) 観察は、カスタムメイドの原子間力顕微鏡装置 (BIXAM, OLYMPUS) を用いて行った。観察は、120~150 μ L の緩衝溶液 (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA) 中で行った。

(6) 共焦点レーザー走査型顕微鏡観察

共焦点レーザー走査型顕微鏡観察は、FV3000 (OLYMPUS) を用いて行い、ローダミンと SYBR Gold のシグナルは、それぞれ 473 nm と 543 nm の励起光で励起した。

4. 研究成果

(1) 十字型 DNA オリガミの二次元自己集積化を利用した DOPC 脂質膜面のパターンニングとドメイン創出

十字型の DNA オリガミ構造を平面脂質膜上で二次元格子へと自己集積させることで、膜面を周期的な正方形のパターンへと区画化することを試みた。新たに設計した十字型 DNA オリガミの各腕は 14 本の DNA ヘリックスから構成されている。この十字型オリガミは末端間のスタッキング相互作用によって互いに結合し、二次元格子構造へと成長する。二次元格子を脂質膜面で構築することができれば、DNA に覆われなかった部分は脂質膜としてそのまま残るため、正方形の膜ドメインが周期的に並ぶこととなる。

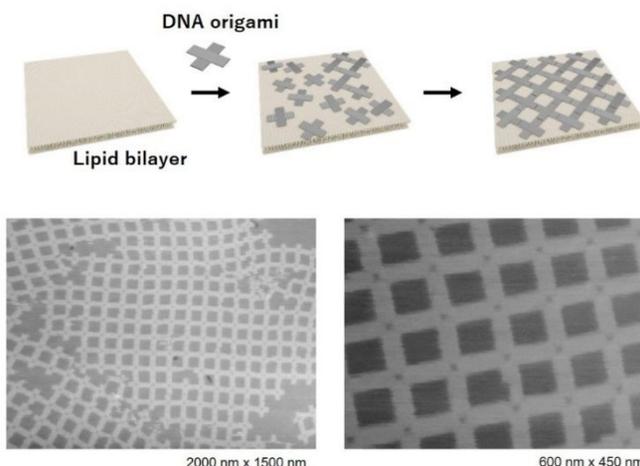


図 1 DNA オリガミの二次元自己集積化にともなった DOPC 脂質膜面のパターンニング。脂質膜面をデザインした形状パターンへと区画化することができる。

まず、DOPC からなる SLB をマイカ基板面に構築し、その膜面に十字型 DNA オリガミを吸着・濃縮させた。表面の AFM 測定を行ったところ、マイクロメートルスケールの二次元格子が観察され、75 nm × 75 nm の正方形ドメインを確認することができた (図 1)。

(2) 十字型 DNA オリガミの二次元自己集積化を利用した DPPC 脂質膜面のパターンニングとドメイン創出

上述(1)の手法によるパターンニングが他の脂質膜組成においても適用可能なのか検討するために、同様のオリガミ構造を DOPC と DPPC の二成分から成る相分離脂質膜上へ吸着させ、その表面構造を AFM により測定した。その結果、脂質のヘッドグループの化学構造が同じであっても、各相に特徴的な集積体が形成された。DOPC を主成分とする無秩序液体相 (Liquid disordered phase: Ld 相) では、規則的な二次元格子が観察されたのに対し、DPPC を主成分とする秩序固体相 (Solid ordered phase: So 相) ではランダムに堆積した DNA オリガミが観察された。

この要因は、脂質膜の流動特性や表面電荷密度の違いに起因すると考えられる。流動性の影響については、So 相の表面は熱揺らぎが小さく、ナノ粒子の吸着においてエネルギー的に有利といわれている。加えて、So 相中の脂質分子は Ld 相と比べて密であり、So 相は相対的に高い表面電荷密度を持つと考えられる。そのため、So 相上の DNA オリガミは、その表面拡散が許容されないほど膜面と強く吸着し、堆積すると考えられる。実際、共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて、DOPC/DPPC の二成分系リポソーム膜面への DNA オリガミの吸着を観察したところ、So 相への局在傾向が示された (図 2A)。

そこで、溶液の塩濃度 (NaCl 濃度) を変更し、So 相における DNA オリガミと脂質膜面との静電的相互作用を弱めることで、ランダムな集積体を秩序的な格子構造へと変化させる検討を

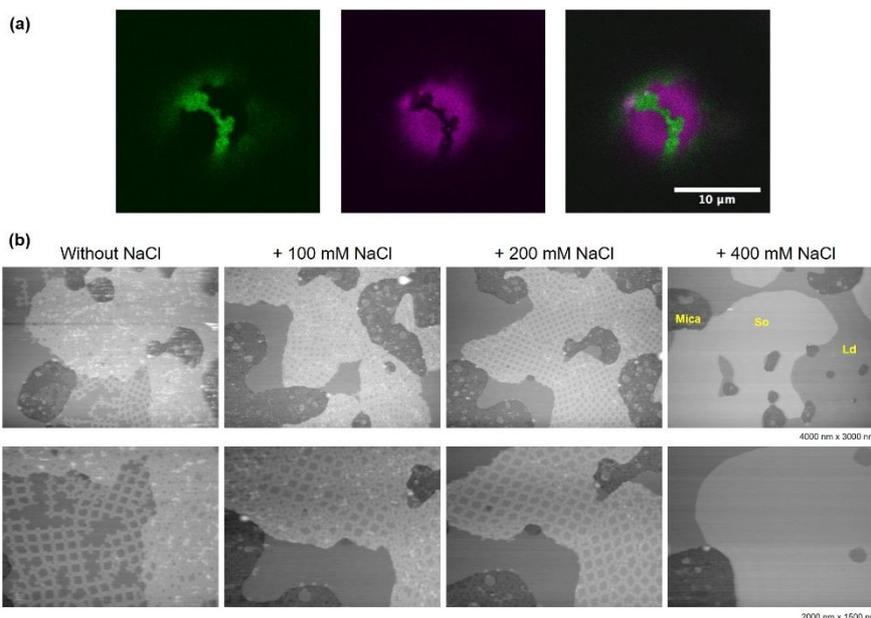


図 2. DO DNA オリガミ構造の共焦点顕微鏡画像。Ld 相および DNA ナノ構造は Rhodamine-DHPE と SYBR Gold でそれぞれ蛍光標識されている。(b) NaCl 濃度による変化。

おこなった．NaCl 濃度 100 ~ 200 mM 程度で，So 相上においても二次元格子が構築され，DPPC を主成分とした膜面を周期的な正方形のパターンへと区画化することに成功した．

(3) 自己相補的な凹凸形状を有する DNA オリガミを用いた六角形状の脂質膜ドメインの創出

上記項目(1),(2)の正方形の膜ドメインは4つの十字型 DNA オリガミが結合することで形成される．本項目では，あらかじめ六角形状の孔を有する DNA オリガミを作製し，それを配列化することで脂質膜面上に周期的な六角形状のパターンを生み出すことを試みた．

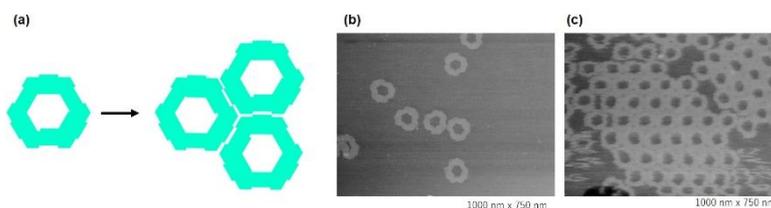


図3．六角形状のパターン形成．(a) DNA オリガミの模式図．(b) 作製した DNA オリガミの AFM 像．(c) 脂質膜面上に構築した構造．

新たに設計した DNA オリガミは，ジグソーパズルのような凹凸パターンを各辺に有しており，これらが互いにかみ合うことで大面積の結晶様構造へと成長する．上記の項目と同様の手法で，SLB をマイカ基板面に構築し，その上での二次元自己集積化を行なった．表面の AFM 測定を行ったところ，設計通りのハニカムパターンが確認され，平面脂質膜面を六角形状のドメインへと区画化することに成功した．

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Deepak Karna, Wei Pan, Shankar Pandey, Yuki Suzuki, Hanbin Mao	4. 巻 13
2. 論文標題 Mechanochemical properties of DNA origami nanosprings revealed by force jumps in optical tweezers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nanoscale	6. 最初と最後の頁 8425-8430
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0nr08605c	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Yusuke Sato, Yuki Suzuki	4. 巻 18
2. 論文標題 DNA nanotechnology provides an avenue for the construction of programmable dynamic molecular systems	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 116-126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophysico.bppb-v18.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Deepak Karna, Morgan Stilgenbauer, Sagun Jonchhe, Kazuya Ankai, Ibuki Kawamata, Yunxi Cui, Yao-Rong Zheng, Yuki Suzuki, Hanbin Mao	4. 巻 32
2. 論文標題 Chemo-mechanical modulation of cell motions using DNA nanosprings	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioconjugate Chemistry	6. 最初と最後の頁 311-317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.bioconjchem.0c00674	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Yuki Suzuki, Ibuki Kawamata, Kohei Mizuno, Satoshi Murata	4. 巻 59
2. 論文標題 Large deformation of a DNA-origami nanoarm induced by the cumulative actuation of tension-adjustable modules	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 6230-6234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201916233	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yusuke Sato, Masamune Morita, Yuki Suzuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Session 1SCA-Utilizing soft compartments/interfaces for the creation of artificial biosystems	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophysical Reviews	6. 最初と最後の頁 257-259
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12551-020-00647-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishikawa Daisuke, Suzuki Yuki, Kurokawa Chikako, Ohara Masayuki, Tsuchiya Misato, Morita Masamune, Yanagisawa Miho, Endo Masayuki, Kawano Ryuji, Takinoue Masahiro	4. 巻 58
2. 論文標題 DNA Origami Nanoplate Based Emulsion with Nanopore Function	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 15299-15303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201908392	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 鈴木勇輝, 遠藤政幸, 杉山弘	4. 巻 59
2. 論文標題 脂質膜表面におけるDNAオリガミの二次元自己集合化	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生物物理	6. 最初と最後の頁 103-105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.59.103	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yusuke Sato, Masayuki Endo, Masamune Morita, Masahiro Takinoue, Hiroshi Sugiyama, Satoshi Murata, Shin-ichiro M. Nomura, Yuki Suzuki	4. 巻 5
2. 論文標題 Environment-dependent self-assembly of DNA origami lattices on phase-separated lipid membranes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Advanced Materials Interfaces	6. 最初と最後の頁 1800437
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/admi.201800437	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yuki Suzuki, Hiroshi Sugiyama, Masayuki Endo	4. 巻 57
2. 論文標題 Complexing DNA Origami Frameworks through Sequential Self Assembly Based on Directed Docking	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 7061-7065
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.201801983	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Yuki Suzuki
2. 発表標題 Construction of DNA nanostructures exhibiting modulated structural transformation
3. 学会等名 日本生物物理学会第58回年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木 勇輝
2. 発表標題 DNAで創るさまざまな構造と機能
3. 学会等名 東京大学化学生命工学専攻 2020年度 談話会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuki Suzuki
2. 発表標題 DNA origami lattices self-assembled on lipid bilayer membranes
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuki Suzuki, Ibuki Kawamata, Kohei Mizuno, Satoshi Murata
2. 発表標題 Reversible deformation of a linear DNA origami structure through the cumulative actuation of tension-adjustable modules
3. 学会等名 Nucleic Acid Nanotechnology: from algorithmic design to biochemical applications (NANTECH 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuki Suzuki, Ibuki Kawamata, Kohei Mizuno, Satoshi Murata
2. 発表標題 Large deformation of a linear DNA origami beam via cumulative actuation of tension-adjustable modules
3. 学会等名 16th Annual Conference on Foundations of Nanoscience: Self-Assembled Architectures and Devices (FNANO19) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuki Suzuki, Ibuki Kawamata, Kohei Mizuno, Satoshi Murata
2. 発表標題 Cumulative deformation of a linear DNA origami nanoarm comprising tension-adjustable modules
3. 学会等名 Commemorative International Symposium of the Japan Society of Nucleic Acids Chemistry (CISNAC2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuki Suzuki, Kohei Mizuno, Ibuki Kawamata, Satoshi Murata
2. 発表標題 Cumulative deformation of a linear DNA origami structure consisting of tension-adjustable modules
3. 学会等名 The 45th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuki Suzuki, Kohei Mizuno, Ibuki Kawamata, Satoshi Murata
2. 発表標題 Cumulative deformation of a linear DNA origami beam consisting of tension-adjustable modules
3. 学会等名 第2回分子ロボティクス年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuki Suzuki, Kohei Mizuno, Ibuki Kawamata, Satoshi Murata
2. 発表標題 Cumulative deformation of a linear DNA origami structure consisting of tension-adjustable modules
3. 学会等名 日本化学会第99回春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木勇輝
2. 発表標題 DNAの自己集合で創る多様な構造と機能
3. 学会等名 細胞でつながる研究会-Bio. Phys. Chem. 三重点の探索- (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------