

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04201

研究課題名(和文) 生細胞表層イメージングで明らかにする核酸ナノ構造体の細胞内化機構

研究課題名(英文) Unraveling the internalization of nucleic acids nanostructures using correlated imaging of living cell surfaces

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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：人工的なナノ形状へと折りたたまれた核酸分子と生きた細胞表層との相互作用を、蛍光顕微鏡一体型のライブセル観察用高速原子間力顕微鏡(ライブセル高速AFM)を用いて可視化する手法を確立した。蛍光修飾したDNAオリガミ構造体や蛍光タンパク質融合型クラスリン分子の局在・動態情報を、高速AFMにより得られた細胞表層の連続画像と同一空間・同一時間軸上で相関させることによって、DNAオリガミ構造体がクラスリン依存的エンドサイトーシスによって細胞に取り込まれ、その内部に移行していく様子を捉えることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核酸分子を素材とした分子デバイスの開発研究が進展し、それらを細胞機能制御などへ応用しようとする動きが活性化している。しかし、人工的な形状へと折りたたまれた核酸分子が生きた細胞とどのように相互作用するのか、その原理や機構に関する研究は未だ開拓期にある。本研究課題で確立した手法では、細胞表層におけるDNAナノ構造体の局在と挙動を細胞膜そのものの微細構造変化と重ね合わせて可視化できるだけでなく、特定のタンパク質の動態とも相関させることが可能である。これによって、人工的な核酸ナノ構造体と生細胞膜との相互作用の分子機構の解明が進めば、核酸ナノテクノロジーの医学応用・薬学応用が加速されるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：The interaction between artificially-designed nucleic acid nanostructures, such as DNA origami, and the living cell surface was visualized by using high-speed atomic force microscopy combined with fluorescent microscopy. By correlating localizations of fluorescently-labeled DNA nanostructures and those of EGFP-fused clathrin molecules with morphological changes in the living cell surface obtained by high-speed AFM in the same spatiotemporal range, we have successfully monitored the internalization of DNA origami nanostructures into living cells. The sequential correlated images showed that DNA origami nanostructures were taken up into cells via clathrin-dependent endocytosis.

研究分野：生体分子工学

キーワード：DNAナノテクノロジー DNAオリガミ 細胞膜 原子間力顕微鏡 ライブセルイメージング エンドサイトーシス

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

遺伝情報の保存・継承・発現などを担う DNA や RNA の最大の特徴は相補的な塩基対形成能である。この特徴に基づいて、人工的に設計した核酸分子によって特定の遺伝子発現を制御する試みが難治性疾患などに対する新たな治療法になるものとして期待されている。近年では、遺伝子発現抑制を目的としたアンチセンス鎖や特定の生体分子と結合するアプタマーなど核酸から成る分子が核酸医薬として注目され、開発が進んでいる。一方で、核酸の塩基対形成能を巧みに利用することで、人工的に塩基配列設計した核酸分子を複雑かつ精巧な微小構造へと折りたたむ DNA・RNA ナノテクノロジー技術の進展もめざましい。この技術は、任意の形状のナノ構造体を構築可能であること、天然の核酸分子だけでなく人工核酸や核酸誘導体に対しても適用可能であること、化学修飾を介してさまざまな機能付加が可能であることなどから、細胞運命制御、細胞内治療などを指向した分子デバイス開発の基盤技術として検討されている。しかし、人工的な形状へとナノ構造化された核酸分子と生きた細胞膜との機能的・構造的相互作用については不明点が多く、DNA・RNA ナノテクノロジーの医学的・薬学的実用化には、それらの解明が不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では、DNA オリガミに代表される核酸ナノ構造体と多数の構成要素から成る生きた細胞表面との相互作用を、蛍光顕微鏡一体型のライブセル観察用高速原子間力顕微鏡(以下、ライブセル高速 AFM)を用いて可視化解析する。核酸ナノ構造体の局在と動態、生細胞表面の形態変化、そして、関連タンパク質の局在を同空間・同時間軸上で統合的に可視化解析することで、人工物である核酸ナノ構造体と生きた細胞膜との機能的・構造的相互作用を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究課題では、ライブセル高速 AFM を用いたタイムラプス相関イメージングをメインアプローチとする。実験に用いる核酸ナノ構造体は、形状・サイズ・物理的性質などを自在に設計できる DNA オリガミ法を用いて設計・構築する。各種 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、構造に合わせて配列設計したステーブル DNA の混合溶液とスキャフォールド DNA (M13mp18 ssDNA あるいは、p8064) を緩衝溶液 (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 15 mM MgCl₂, 1 mM EDTA) 中で混合・アニーリングすることで作製する。DNA ナノ構造体の形成および細胞培養液中における安定性についてはアガロースゲル電気泳動および、原子間力顕微鏡により解析する。

共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) 一体型ライブセル高速 AFM を用いた観察においては、エンドサイトーシス経路を代表する関連タンパク質(クラスリンなど)の蛍光タンパク質融合型タンパク質を培養細胞内に発現させておくことで、AFM 像で観察される細胞表面の構造が、どの経路のものなのかで特定できるようにする。この状態で、核酸ナノ構造体 (DNA オリガミ) の取り込みを直接可視化し、エンドサイトーシスにおける特徴的な細胞表面の形態・構造変化を捉える。

この際、核酸ナノ構造体側にも蛍光分子修飾を施すことで共局在解析をおこなう。核酸ナノ構造体が細胞膜表面でどのように局在し、どのようなタンパク質と関わりあうのか AFM 像と相関させる。

4. 研究成果

I: DNA オリガミ構造の構築と細胞培養環境下における安定性

細胞膜上の相関イメージングに先立ち、作製・精製した DNA オリガミ構造の形状確認および細胞培養環境下における安定性について評価した。DNA オリガミ構造を 37°C、DMEM 培地中において、最長 24 時間インキュベートし、各タイムポイントにおける構造をアガロースゲル電気泳動と原子間力顕微鏡によるナノスケールイメージングによって解析した。バンドパターンおよび AFM 像中の構造形状、いずれにおいても優位な差は認められず、細胞培養液中においてもオリガミ構造が維持されていると判断した (図 1)。

II: 生細胞表面における DNA オリガミ構造とクラスリン小胞の相関イメージング

DNA オリガミ構造が細胞内へ取り込まれる有力な経路として、クラスリン依存性エンドサイトーシスに着目し、その過程をタイムラプス相関イメージングで可視化することを試みた。クラスリンと緑色蛍光タンパク質との融合タンパク質 (EGFP-クラスリン) を発現させた培養細胞 (COS-1) に対して、TAMRA で蛍光標識した DNA オリガミ構造体を滴下したのち、細胞表面層

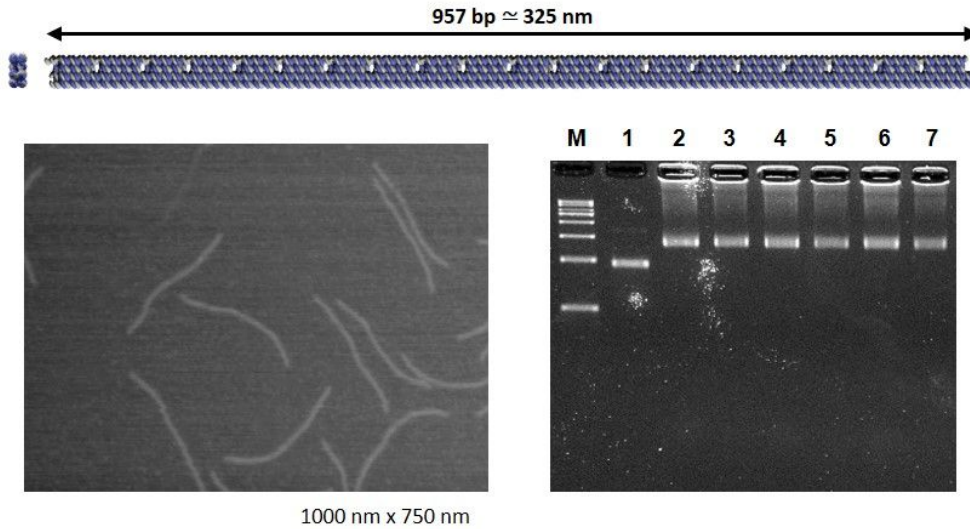


図 1 : DNA オリガミ構造と DMEM 中での安定性 . (A) 8 ヘルックスバンドルをベースとした DNA オリガミナノ構造体のデザイン (B) 作製・精製後の DNA オリガミ構造体の AFM 像 . (B) アガロースゲル (1.5%) 電気泳動の結果 . M: 1 kbp ラダーマーカー , レーン 1 : p8064 スキャフォールド ssDNA , レーン 2~7 : DMEM 中でそれぞれ 0 , 1.5 , 3 , 6 , 12 , 24 時間インキュベートした後の DNA オリガミ構造体 .

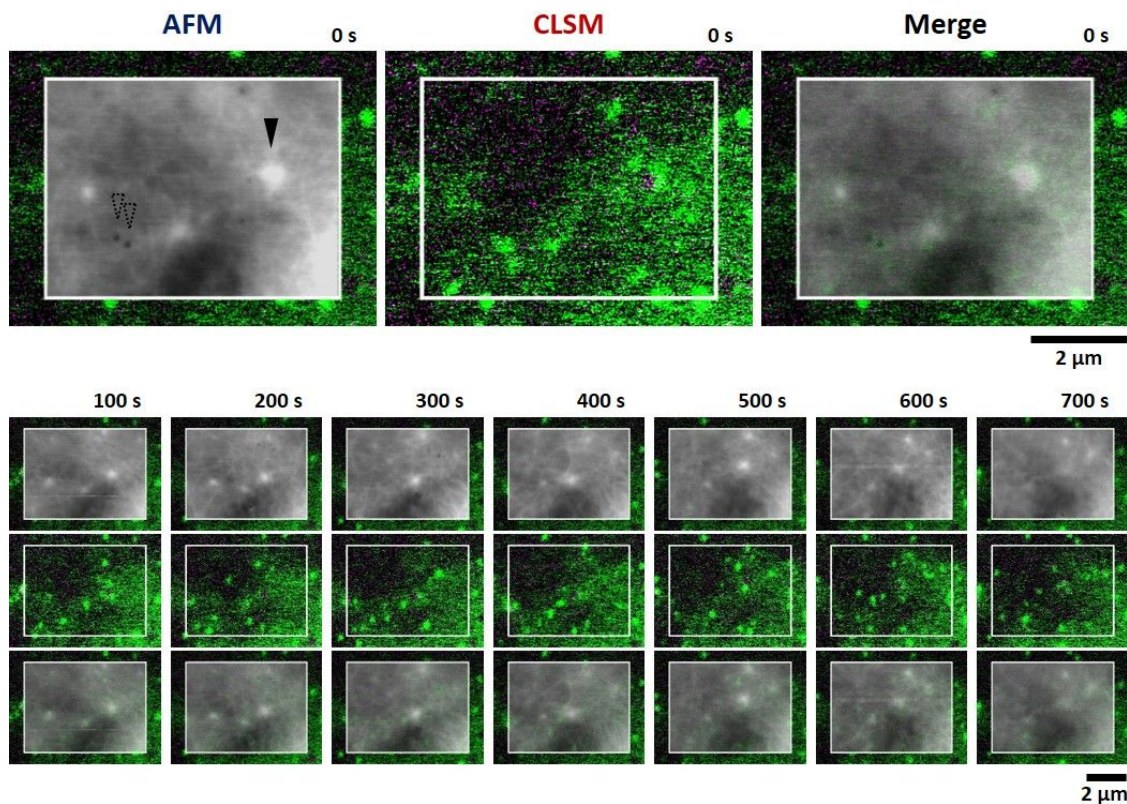


図 2 : 生細胞膜の形態像 (AFM) とタンパク質および DNA ナノ構造の局在 (蛍光) のタイムラプス相関イメージング . ピット (点線矢頭, 0 s) や膜直下の小胞 (黒矢頭, 0 s) と EGFP-クラスリン (緑) の共局在が認められる . 小胞 (黒矢頭, 0 s) と TAMRA-DNA オリガミのシグナル (マゼンタ) も重なっている . 小胞様構造の消失 (600 ~ 700 s) とともに DNA オリガミの蛍光シグナルも消失する .

を高速原子間力顕微鏡 (高速 AFM) および共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) により同時計測・同時観察した (図 2) .

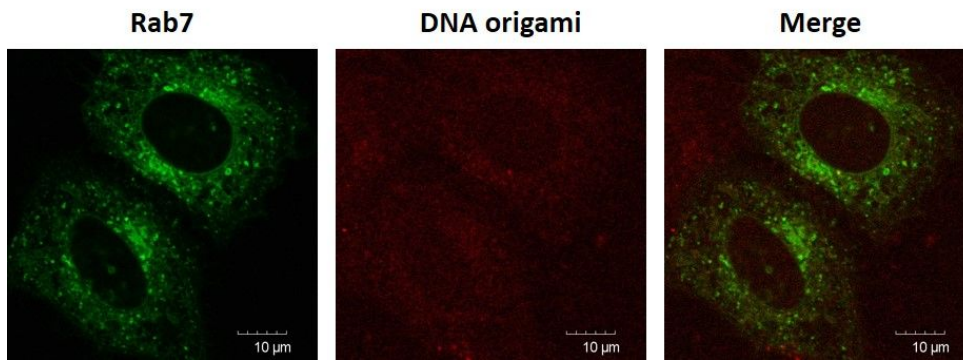


図3：EGFP-Rab7 と Cy3-DNA origami の同在．培養液中に DNA オリガミを導入後，3 時間インキュベートした後，4%PFA で固定し観察した．

高速 AFM 像と蛍光像を重ね合わせたところ，細胞表層の多様な構造のなかからクラスリン被ピットや細胞膜直下のクラスリン被覆小胞を同定することができた。加えて，TAMRA のシグナルも観察し，3 種類の画像のタイムラプス相関イメージングを行なった。DNA オリガミの蛍光シグナルとクラスリン被覆小胞が重なり，同じ動態を示したことから，DNA ナノ構造がクラスリン依存性のエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれていることが示唆された。さらに，高速 AFM 像上での小胞様構造の消失と TAMRA のシグナルの消失が同期したことから，細胞膜直下の DNA ナノ構造を内包した小胞が細胞深部へと移動していったと考えられる。以上の成果により，生きた細胞膜表層の形態変化とエンドサイトーシス関連タンパク質および DNA ナノ構造の同在情報を同一時空間上取得する観察系を確立できたと判断した。

III:DNA オリガミ構造の細胞内運命

生細胞表層における相関イメージングにおいて，エンドサイトーシスによる DNA オリガミ構造体の内在化を示唆する結果を得たため，その後の細胞内運命を追跡する目的で，後期エンドソームのマーカートンパク質である Rab7 との共同在を共焦点レーザー顕微鏡により解析した(図3)。Rab7 と緑色蛍光タンパク質の融合タンパク質 (EGFP-Rab7) を発現させた培養細胞の培養液 (DMEM) 中に Cy3 で標識した DNA オリガミ構造体を導入し，3 時間後に観察を行った。Rab7 の蛍光シグナルの一部が Cy3 のシグナルと重なったことから，エンドサイトーシスによって取り込まれた DNA ナノ構造が，エンドソームに内包され細胞内部へと輸送されることが示唆された。一方で，エンドソームに内包された DNA オリガミが，その構造を維持しているか否かについてはより詳細な検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Deepak Karna, Wei Pan, Shankar Pandey, Yuki Suzuki and 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 Yuki Mori, Hiroki Oi, Yuki Suzuki, Kumi Hidaka, Hiroshi Sugiyama, Masayuki Endo, Shigeyoshi Matsumura, Yoshiya Ikawa	4. 巻 22
2. 論文標題 Flexible Assembly of Engineered Tetrahymena Ribozymes Forming Polygonal RNA Nanostructures with Catalytic Ability	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 2168-2176
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cbic.202100109	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 Kazuki Fukushima, Kodai Matsuzaki, Masashi Oji, Yuji Higuchi, Go Watanabe, Yuki Suzuki, Moriya Kikuchi, Nozomi Fujimura, Naofumi Shimokawa, Hiroaki Ito, Takashi Kato, Seigou Kawaguchi, and Masaru Tanaka	4. 巻 55
2. 論文標題 Anisotropic, Degradable Polymer Assemblies Driven by a Rigid Hydrogen-Bonding Motif That Induce Shape-Specific Cell Responses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Macromolecules	6. 最初と最後の頁 15-25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.macromol.1c01894	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, 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 Ivana Duic, Hisashi Tadakuma, Yoshie Harada, Ryo Yamane, Katashi Deguchi, Yuki Suzuki, Shige H. Yoshimura, Hiroki Kato, Kunio Takeyasu and Takashi Fujita	4. 巻 48
2. 論文標題 Viral RNA recognition by LGP2 and MDA5, and activation of signaling through step-by-step conformational changes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 11664-11674
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkaa935	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

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, 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 SUZUKI Yuki, ENDO Masayuki, SUGIYAMA Hiroshi	4. 巻 59
2. 論文標題 Self-assembly of Two-dimensional DNA Origami Lattices on Lipid Bilayer Membranes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Seibutsu Butsuri	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 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 鈴木勇輝
2. 発表標題 DNAバンドルの変形を活用した分子デバイスの構築
3. 学会等名 学術変革領域研究 (A) 分子サイバネティクス 第2回領域セミナー (招待講演)
4. 発表年 2021年

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

〔図書〕 計1件

1. 著者名 川又生吹, 鈴木勇輝, 村田智	4. 発行年 2021年
2. 出版社 オーム社	5. 総ページ数 264
3. 書名 DNA origami入門 基礎から学ぶDNAナノ構造体の設計技法	

〔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
---------	---------