

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：17104

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K17991

研究課題名（和文）脂質膜を貫通した疎水化DNAの自己集合による人工ナノポア構築の新技术

研究課題名（英文）Method for constructing artificial DNA nanopores by self-assembly of membrane-spanning DNA modified with hydrophobic molecules

研究代表者

佐藤 佑介（Sato, Yusuke）

九州工業大学・大学院情報工学研究院・准教授

研究者番号：60830560

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：粘着末端を有する複数のDNA二重らせんがナノポア構造に自己集合する設計を考案した。実験により、疎水分子を修飾したDNA二重らせんを細胞サイズの脂質膜小胞（リボソーム）表面に挿入し、膜貫通していることを確認した。そして、脂質膜を貫通した状態でDNA分子どうしを結合させることに成功した。さらに、6種類の異なる膜貫通DNAが、脂質膜上でナノポアを形成したことを示唆する結果を得た。加えて、疎水分子が修飾されたDNAナノ構造を精製する新技术を考案し、学術論文として報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞は物質である生体分子が自己集合・自己組織化を通して機能的な分子システムへと組み上がることで構成されている。本研究で得られた成果は、機能を持たない単量体の集合が機能的状態を創り出すための手がかりとなる可能性が期待できる。また、生体分子ナノポアはセンシングなどの工学的応用が期待されており、本研究成果は高度なセンシングデバイスを構築するための基盤技術としての発展が期待できる。

研究成果の概要（英文）：We designed multiple DNA double helices with sticky ends to self-assemble into a nanopore structure. In our experiments, we confirmed that DNA double helices modified with hydrophobic molecules localized on the surface of cell-sized lipid vesicles and penetrated the membrane. These DNAs successfully hybridized with each other on the membrane. Additionally, we observed a change in the lateral diffusion velocity of the DNA molecules before and after hybridization. Furthermore, our results suggest that six different types of membrane-penetrating DNA could form nanopores on the lipid membrane. We also developed a new method to purify hydrophobic molecule-modified DNA nanostructures.

研究分野：DNAナノテクノロジー

キーワード：DNAナノテクノロジー ナノポア 脂質膜 リボソーム 人工細胞 分子ロボット

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞のような分子システムを人工的に構築する試みが世界的な注目を集めている。先行研究の多くは細胞膜の基本構造である脂質膜からなる小胞（リポソーム）を筐体として用いており、リポソームの表面や内部にさまざまな機能性分子を導入することで人工分子システムの構築が目指されている。一方、リポソームを筐体として用いた場合の問題点として、リポソーム内外で分子のやり取りができない点がある。これは、脂質膜の高いバリア能に起因している。したがって、分子システムが外部環境をセンシングしたりエネルギーを補給したりするためには、小分子等が透過できるナノポアを脂質膜に実装することが必要である。

DNA ナノテクノロジーは DNA の配列設計によるナノ構造作製技術であり、高い設計性と拡張性から人工的な機能性分子を構築する技術として注目を集めている。2012 年の *Science* 誌での報告を皮切りに、DNA ナノテクノロジーの分野で様々な人工ナノポアの構築が行われてきた。しかし、細胞サイズリポソーム膜へのナノポア実装方法には改善の余地がある。従来の研究におけるリポソーム膜へのナノポア実装は、完成したナノポアを膜に導入するという方法を採用していた。その一方、天然で見られるナノポアタンパク質の多くは、脂質膜に局在する単量体が膜中で自己集合することでナノポア構造を形成している。したがって、DNA ナノテクノロジーにおいても膜貫通した DNA がその場で自己集合しナノポアを形成する仕組みを考案することができれば、天然のナノポアタンパク質のような高い膜挿入効率を実現したりナノポアの形成を外部刺激で制御したりなどが期待できる。

2. 研究の目的

脂質膜を貫通した複数の DNA 二重らせんが自己集合しナノポアを形成する機構を実証することを目的とする。この取り組みを通して、脂質膜中での自己集合により機能する DNA ナノ構造開発を大きく進展させることを目指す。

3. 研究の方法

(1) DNA 塩基配列の設計

ナノポアを形成可能な自己集合 DNA 群の設計には、分子設計ソフトウェアである NanoEngineer-1 を用いた。DNA 二重らせんの周期等を考慮し、6 種類の DNA 分子（以下、それぞれを区別するためにユニットと呼称する）がナノポア構造に自己集合可能な設計とした。設計したユニットの塩基配列の決定は、NUPACK ソフトウェアを用いた。この際、外部からの特定の配列をもつ核酸分子を入力として自己集合が開始できるよう、足がかり配列を介した鎖交換反応が可能となるよう配列を決定した。具体的なユニットの配列設計の際には Python の NUPACK モジュールを用いた。

(2) DNA ナノ構造の作製

DNA を Tris-EDTA buffer (TE buffer) に溶解させた。ユニットの形成に必要な DNA を緩衝液中で混合し、サーマルサイクラーを用いてアニーリングすることで作製した。ユニットの形成およびユニットの自己集合によるナノポア形成の評価は、ポリアクリルアミド電気泳動により行った。電気泳動後の核酸の染色は SYBR Gold を用いた。

(3) DNA ナノ構造の精製

疎水分子を修飾した DNA ナノ構造は、疎水相互作用による凝集のため意図しない構造形成を示すものが一定数存在する。そこで、意図しない凝集物から標的の構造のみを単離・抽出するために、界面活性剤を援用したゲル切り出し精製方法を考案した。コール酸ナトリウム (Sodium Cholate: SC) およびドデシル硫酸ナトリウム (Sodium Dodecyl Sulfate: SDS) をそれぞれナノ構造形成前後にさまざまな濃度で混合させ、精製条件の最適化を図った。なお、精製の評価に用いる DNA ナノ構造は、あらかじめナノポア構造に自己集合させた構造を用いた。

(4) リポソームの調製

リポソームは油中水滴界面通過法により調製した。クロロホルムに溶解した POPC (パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン) をガラスチューブに加え、窒素ガスで乾燥させた。乾燥させた脂質にミネラルオイルを加え、加熱超音波処理により脂質をオイル中に分散させた。その後、調製した脂質分散オイルとリポソームの内水相に用いる液体を混合し攪拌することで油中水滴を調製した。調製した油中水滴をサンプルチューブに加えたリポソームの外水相に用いる液体に重層し、チューブを遠心することでリポソームを調製した。

4. 研究成果

(1) 設計したユニットおよびユニットの自己集合によるナノポア形成

3種類の DNA (Short DNA: S, Long DNA: L, Bind DNA: B) で構成されるユニットの形成を確認するために、6通りのサンプルを調製し電気泳動により現れるバンドの位置を評価した。S, L, Bそれぞれ単独で泳動した場合は、1つのバンドのみが現れそれぞれのバンド位置は各 DNA の分子量の大小関係と一致していた。また、DNA2種類ずつを混合したサンプルでは、結合する設計とした S+L と L+B でのみ、各 DNA 単独の場合と比べてバンドシフトが観察された。そして、S, L, B 全てを混合した場合に最も分子量の大きなバンドが観察されたことから、設計した DNA が適切に結合しユニットを形成していることが確認された。つづいて、6種類のユニットの自己集合を確認した。ユニット 1-6 までを単量体, 2 量体, … 6 量体を形成するよう順に混合していき、それぞれの場合を電気泳動で評価した。3 量体までは階段状のバンドシフトが観察されたが、4, 5 量体を形成する条件では 3 量体と比してバンドシフトが観察されなかった。しかし、6 量体では顕著なバンドシフトが観察された。4, 5 量体を形成する条件でバンドシフトが観察されない要因は現在も調査中であるが、6 量体形成条件で観察されたバンドについては、あらかじめ全てのユニットを混合してアニーリングしたサンプルとのバンド位置との比較から設計通り 6 量体が形成されていることが示唆された。

リポソーム膜上でのユニットの結合は、光褪色後蛍光回復法を用いて評価した。単量体状態を保てる設計の 2 種類のユニットとそれぞれが結合可能なユニットを順にリポソーム膜に導入し静置後、それぞれのサンプルにおける拡散速度を比較した。その結果、結合可能なユニットをリポソーム膜に導入した場合に顕著に拡散が遅くなっていることが確認された。このことから、リポソーム膜を貫通したユニットが膜上で結合し分子量が増大していることが示唆される。なお、ユニットの膜貫通については、先行研究で実績のあるニトロベンゾオキサジアゾール標識脂質と亜ジチオン酸ナトリウムとの反応を利用した手法で確認した。

ユニットの自己集合がナノポアを形成できるかを確認するために、リポソーム内に封入した蛍光分子 (カルセインとスルホローダミン B) の流出を検証した。蛍光分子が持つ電氣的性質から、カルセインは DNA ナノポアを通過しづらく、スルホローダミン B は通過しやすい性質を持

つ. リポソームのみのサンプル, 1-5 ユニットのみを順にリポソーム膜に導入したサンプル, あらかじめ6つのユニットを全て結合させてからリポソーム膜に導入したサンプル, 1-6 ユニットの順にリポソーム膜に導入したサンプルの計 4 条件のサンプルを蛍光顕微鏡で観察した. 実験結果から, あらかじめ6つのユニットを全て結合させてからリポソーム膜に導入したサンプル, 1-6 ユニットの順にリポソーム膜に導入したサンプルにおいて, スルホローダミン B の流出が確認された (図 1). この実験結果より, 本研究で構築したユニット構造がリポソーム膜上でナノポア構造に自己集合している可能性が示唆された. 現在, これらの実験データの定量的な評価を行っている.

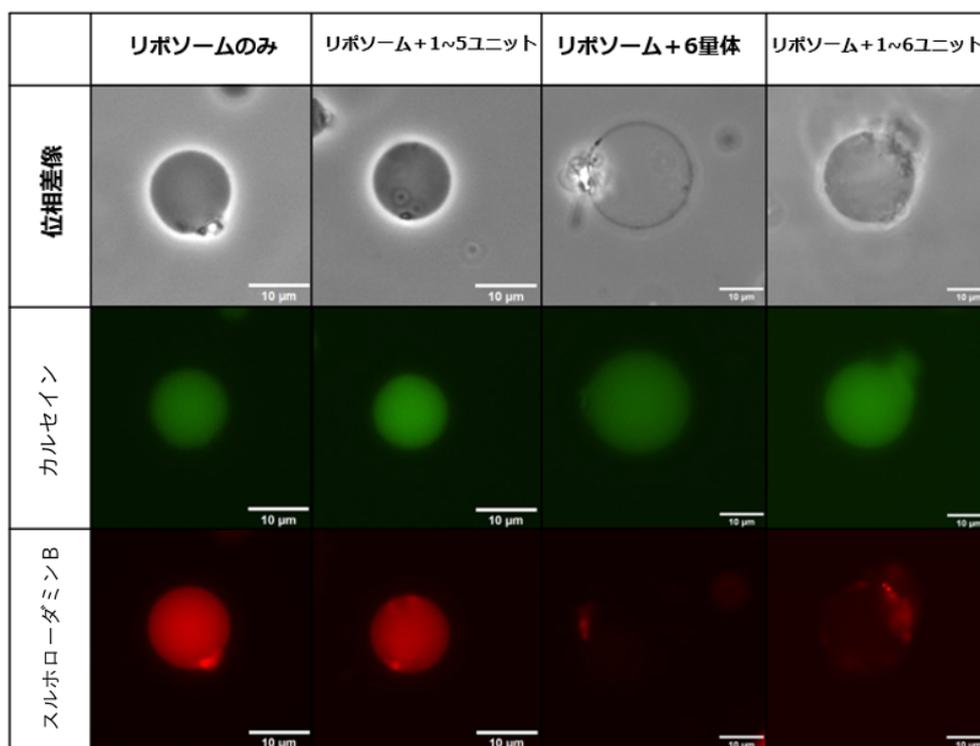


図 1 : リポソームを用いたナノポア形成の評価. リポソーム+6 量体およびリポソーム+1~6 ユニットの条件において, スルホローダミン B の流出が確認された.

(2) コレステロール修飾 DNA ナノ構造の精製方法の開発

疎水性 DNA ナノ構造体の凝集を防ぐために, SC と SDS を試料溶液に添加し, 凝集抑制効果と構造形成への影響を調査し, 最適な界面活性剤の条件を決定した. 実験により, 構造形成前に SC を 1 重量パーセント濃度で試料溶液に加える条件が, 構造形成の割合が最も高いことが明らかとなった. そして, 形成された構造を, SC を含む電気泳動で分離しゲル切り出し精製を行ったところ, 初期材料量と比較して約 45%の収率で標的構造を精製できることが明らかとなった (図 2). この収率は従来報告されている一般的なゲル切り出し精製とほぼ同等の収率であった. また, 精製された構造は脂質膜表面に結合する能力を保持し, 界面活性剤の残留がその機能に大きな影響を与えないことが確認された. この成果は ChemBioChem 誌より学術論文として報告し, 掲載号の表紙に採択された.

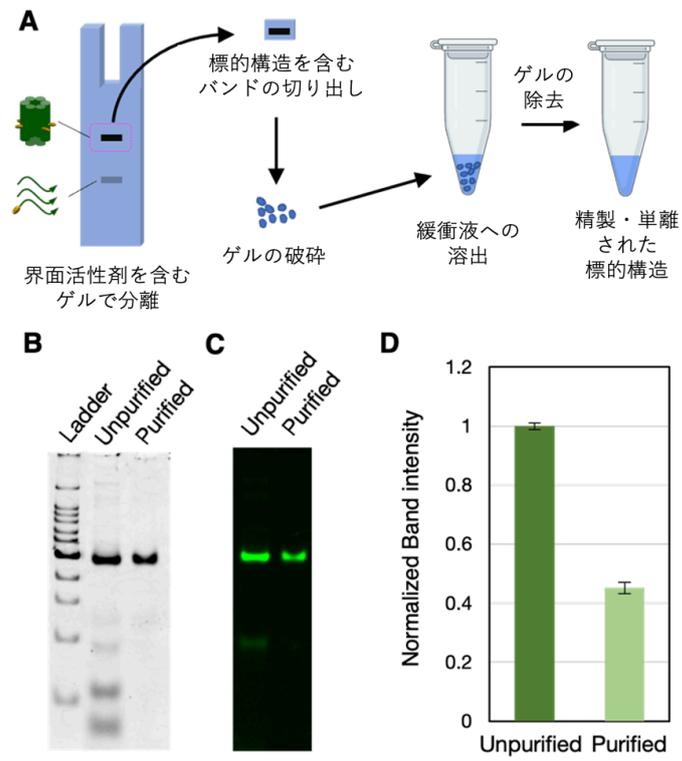


図 2 : A : 疎水分子が修飾された DNA ナノ構造の精製手順を表す模式図. B : 精製前後のサンプルを比較した電気泳動. C : 精製収率の見積もり結果.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Iwabuchi Shoji, Nomura Shin ichiro M., Sato Yusuke	4. 巻 24
2. 論文標題 Surfactant Assisted Purification of Hydrophobic DNA Nanostructures	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 e202200568
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cbic.202200568	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 Sato Yusuke	4. 巻 -
2. 論文標題 Artificial Molecular Systems for Complex Functions Based on DNA Nanotechnology and Cell Sized Lipid Vesicles	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 ChemSystemsChem	6. 最初と最後の頁 e202400021
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/syst.202400021	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 嶋田元徳, 佐藤佑介
2. 発表標題 脂質膜を貫通し自己集合した, DNAによる人工ナノポア構築
3. 学会等名 第6回分子ロボティクス年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 嶋田元徳, 佐藤佑介
2. 発表標題 脂質膜を貫通したDNAの自己集合による, 人工ナノポア構築
3. 学会等名 「細胞を創る」研究会15.0
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高木諒, 佐藤佑介
2. 発表標題 膜貫通DNAのその場自己集合によるナノポア構築技術の開発
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第48回研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yusuke Sato
2. 発表標題 Construction of bio-inspired artificial molecular systems and devices based on DNA nanotechnology
3. 学会等名 The 6th FRIS and TFC Collaboration Event “Workshop on Biosystems Design - From nanotechnology to microfluidics in biotechnology (招待講演) (国際学会)”
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

人工細胞膜上で機能するDNAナノデバイスの新たな精製方法を確立 https://www.kyutech.ac.jp/whats-new/press/entry-9698.html 研究室ホームページ https://sites.google.com/view/ysato-web/menu?authuser=0
--

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
---------	---------