

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12746

研究課題名(和文) DNAを用いた膜変形の制御と形状認識

研究課題名(英文) Transformation and recognition of shape of lipid membrane by amphiphilic DNA nanostructures

研究代表者

堂野 主税 (Dohno, Chikara)

大阪大学・産業科学研究所・准教授

研究者番号：60420395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：生細胞における脂質二重膜(生体膜)はその動的な形状・物性変化が制御されており、細胞内外のさまざまなプロセスに重要な役割を果たす。本研究では、脂質膜との結合性を付与したDNAナノ構造を用いて、生体膜を構成する脂質二重膜の形状や物性を制御する新しい分子技術を創成する。リン酸骨格部位に疎水性化学修飾を導入した両親媒性の人工合成DNAを合成し、適切にDNAナノ構造に組み込むことにより、脂質膜に効果的に結合する多様なDNAナノ構造を構築した。平面型、湾曲型のDNAナノ構造が脂質膜に結合することにより、リボソームの形状変化や脂質二重膜の物理的強度変化が誘導されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Lipid membranes play an important role in biological system. The lipid membranes define the boundaries of cell and various organelles, and their shape and physical properties are dynamically controlled in the living cells. We here propose a methodology to control the shape and mechanical properties of the lipid membranes by using nanoscale DNA objects made of membrane binding DNAs. We created a series of DNA nanostructures with various 2- and 3-dimensional shapes that efficiently bind to lipid membrane by introducing amphiphilic DNA strands containing hydrophobic functional groups. We demonstrated the binding of the DNA nanostructures could change a shape of liposome and mechanical properties of the lipid membranes.

研究分野：生物有機化学

キーワード：DNA DNAナノ構造 両親媒性DNA 膜変形 脂質二重膜 リボソーム

1. 研究開始当初の背景

生体膜は一様な表面形状ではなく、必要な機能と状況に応じて多様な形状を示す。さまざまな生命現象に関与する生体膜の形状変化は複雑に制御されており、その動作原理はいまだ未解明な部分が多い。膜の形状制御機構に中心的な役割をはたす膜変形を誘導・認識するタンパク質は、膜に結合する部位と、変形後の膜構造に適合する特徴的な三次構造をもつ。これらのタンパク質が、膜変形を誘導し、膜変形に応答する分子機構を明らかにするため精力的な研究が行われている。

研究代表者らは、脂質二重膜に対する結合能力をもつ疎水性官能基修飾を施した化学合成人工 DNA の開発を行ってきた。疎水性領域の大きさや配列などを適切に選択することで、DNA と膜の結合様式、親和性を制御することができ、DNA ナノ構造を膜上に構築できることを確認している。近年発展した DNA ナノテクノロジーは、DNA 配列設計からほぼ任意のナノ構造構築を可能にした。膜変形を誘起するタンパク質複合体の大きさは、一般に数十ナノメートル程度であり、構築できる DNA ナノ構造のサイズと一致している。脂質膜との結合性を有する DNA ナノ構造は、脂質膜の形状・物性を制御する新規分子ツールとして期待される。

2. 研究の目的

疎水性官能基修飾により脂質二重膜に強く結合する能力を付加したさまざまな DNA ナノ構造を構築し、DNA ナノ構造の結合がその形状に応じた脂質膜構造変形を誘導できることを実証する。平面型、湾曲型、チューブ型の DNA ナノ構造を構築し、球状脂質二重膜であるリポソームに結合させ、リポソームの形状変化を観測する。さらに、曲率をもつ DNA ナノ構造を用いて、精密な膜曲率の制御と認識を目指す。本研究を通じて DNA ナノ構造による脂質膜形状・物性制御が可能であること示し、膜変形の分子機構を探る新しいアプローチを提唱する。

3. 研究の方法

(1) 脂質二重膜に結合する疎水性修飾 DNA の創製と最適化

脂質二重膜表面に結合することにより、脂質膜の形状や性質に大きな摂動を与えることのできる、新規疎水性修飾 DNA を開発する。研究代表者らは、DNA のリン酸ジエステル部位に疎水性の官能基を導入することにより、脂質膜と高親和性をもつ DNA が得られることを既に報告しており、この知見をもとに脂質膜結合性 DNA を最適化する (図 1)。疎水性官能基 (R) の化学構造の違いや、DNA 配列中における導入位置、導入数を適切に選択することにより、結合親和性や結合様式を制御することが可能になる。二重らせんの配向に合わせ適当な間隔で疎水性官能基を導入すると、脂質膜に対して DNA が横たわる結合様式で結

合し (図 1b)、DNA の末端部に疎水性官能基を集中させると脂質膜内部に深く入り込む結合様式が期待できる (図 1c)。これらは膜結合タンパク質にみられる結合様式を模倣するものであり、本研究が指向する DNA を用いた脂質膜形状変形の基盤となる。

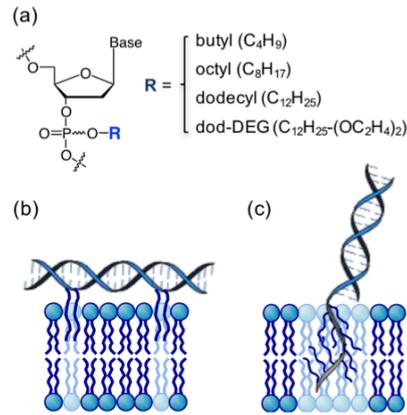


図 1. 脂質膜に結合する疎水性修飾 DNA

(2) 脂質二重膜に結合する DNA ナノ構造構築

これまでに確立されている DNA ナノ構造構築法を採用し、前項で開発した疎水性修飾 DNA を適切に組み込むことにより、脂質膜結合性の DNA ナノ構造を構築する。DNA タイル (図 2a) は、2つの単位構造の自己組織化により形成される最も単純な DNA ナノ構造の一つであり、繰り返し構造により非常に大きな平面構造が形成されることが特徴である。一方、規定の大きさや形状をもつ DNA ナノ構造を、一本鎖 DNA タイル法、DNA オリガミ法により構築した。二次元平面型の DNA ナノ構造 (図 2b)、曲率を有する DNA ナノ構造 (図 2c)、チューブ型構造をもつ DNA ナノ構造 (図 2d) をそれぞれ構築した。設計通りの構造が構築されていることを原子間力顕微鏡 (AFM)、透過型電子顕微鏡 (TEM) により確認した (図 2)。それぞれの DNA ナノ構造における脂質膜に結合する面は、疎水性修飾の導入位置により規定することができる。曲率を有する DNA ナノ構造 (図 2c) の凹面、凸面にそれぞれ疎水性修飾を導入した脂質膜結合性ナノ構造を構築した。

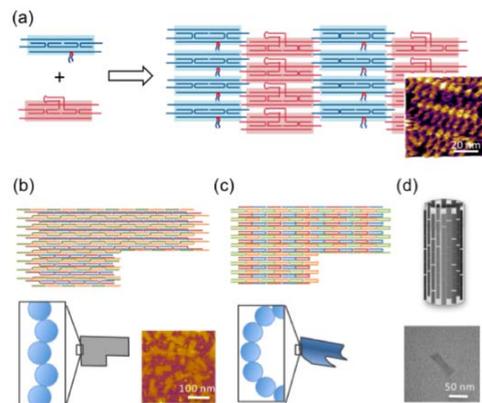


図 2. 構築した脂質膜結合性を付与した DNA ナノ構造体

(3) DNA ナノ構造による脂質膜形状変化

上記(1), (2)により構築した脂質膜結合性 DNA ナノ構造を用いて、脂質膜の形状や物性に与える影響を調査した。AFM, TEM, 蛍光顕微鏡などの観測手法を用い、DNA ナノ構造が結合する、あるいは結合しない条件下における脂質膜形状・物性変化を評価した。

4. 研究成果

(1) 脂質二重膜に結合する疎水性修飾 DNA の創製と最適化

膜結合タンパク質にみられる結合形式をもとに、脂質二重膜と強固に結合する疎水性修飾 DNA の開発を行った。研究代表者が開発したリン酸トリエステル構造をもつ DNA は、導入する疎水性官能基 R の種類と、導入位置、数などにより、脂質膜と DNA の結合形式と親和性を調節することが可能である(図 1)。脂質膜の厚みに相当する 9 つのオクチルトリエステル構造を、DNA の末端部分に導入した疎水性修飾 DNA を合成した。本人工合成 DNA は、末端部に疎水性部を集積した両親媒性 DNA である。蛍光標識した両親媒性 DNA を用いて、蛍光標識したリポソームとの蛍光共鳴エネルギー移動法(図 3a) および、蛍光顕微鏡による観測実験(図 3b) から、効率よく DNA と結合することを明らかにした。本両親媒性 DNA は、脂質膜に疎水性 DNA 部分を埋め込む形で結合する(図 1c)。また、DNA 二重らせんの回転にあわせて、同一配向になるよう疎水性修飾(dod-DEG 基)を施した DNA を合成した(図 1b, 図 3c)。表面プラズモン共鳴法による結合解析より、合成した疎水性修飾 DNA が脂質膜と結合すること、脂質膜表面上で相補鎖形成する能力を維持していることを確認した(図 3c)。本疎水性修飾 DNA は、脂質膜表面にらせん軸が横たわる形式で結合する。これら結合形式や結合親和性の異なる疎水性修飾 DNA を適宜 DNA ナノ構造に導入することにより、脂質膜結合性の DNA ナノ構造を構築することが可能である。

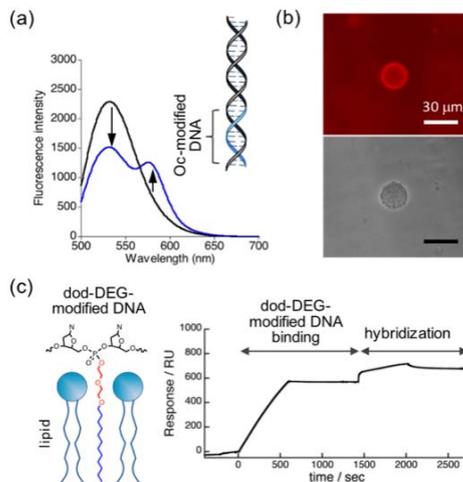


図 3. 脂質膜に結合する疎水性修飾 DNA の創製

(2) 脂質二重膜結合性を付与した平面型 DNA ナノ構造創製と脂質膜物性の変化

疎水性修飾により脂質膜との結合を付与した二次元平面型の DNA ナノ構造を構築し、その結合を精査するとともに、結合が脂質膜に与える影響について調査した。DNA タイル(図 2a) の一方の面のみに、疎水性官能基である dod-DEG 基(図 3)を導入した脂質膜結合性の平面型 DNA ナノ構造を構築した。合成した DNA タイルの脂質膜への結合能は、液中の塩濃度や、疎水性修飾の化学構造、導入密度、脂質膜の相状態(液晶相、ゲル相)に依存して大きく変化する。2つの DNA タイル単位構造のうち一方に dod-DEG 基を適切に導入することにより(82塩基対中に1ヶ所)、液晶相の POPC 二重膜に効率よく結合する DNA タイルを創製した。液晶相の POPC 膜がもつ流動性のため、DNA タイルは表面上で拡散するが、液中 AFM 測定により、膜上に約 2 nm の均等な厚みをもつ DNA 二次元構造が観測できる(図 4a)。DNA タイルの結合した POPC 膜についてフォースカーブを測定し、DNA 結合の有無における表面物性の評価を行った(図 4b)。AFM 探針により脂質膜の破壊が起こる力(図 4b 中矢印)を測定することにより、DNA タイルの結合した POPC 膜の破断には、非結合時と比べてより大きな力が必要となること、すなわち脂質膜構造の頑強性が大きくなることが明らかになった。本成果は、設計した DNA ナノ構造により脂質膜物性を調節可能であることを示す。

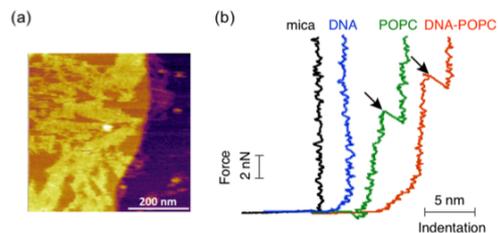


図 4. 平面型 DNA ナノ構造の結合した POPC 膜の AFM 像とフォースカーブ

(3) 曲率をもつ DNA ナノ構造の脂質膜への結合

湾曲した DNA ナノ構造を構築し、その脂質膜との結合能を評価した。構築した DNA ナノ構造は表面裏面の識別の可能な L 字型平面構造が、隣接する DNA との接合角により湾曲した構造をもつ(図 2c)。脂質膜結合能を付与するため、湾曲構造の凹面、凸面に疎水性修飾をそれぞれ導入した。液中 AFM による観測を行ったところ、未修飾 DNA ナノ構造は、脂質膜上で流動し明確な像を与えないが(図 5a)、疎水性修飾を施したナノ構造は、脂質膜上に明確な L 字型構造が確認された(図 5b)。観測される構造が L 字型か逆 L 字型であるかにより、DNA ナノ構造がいずれの面を脂質膜に向けて結合しているかを判別することができる。凸面修飾では 98%以上が凸面側(図 5b, L 字型)、凹面修飾で 79%が凹面側(図 5b, 逆 L 字型)、すなわち DNA ナノ構造が凹凸面に関わら

ず疎水性修飾面を脂質膜に向けて結合していることが確認された。湾曲した構造をもつ DNA ナノ構造では、接触面の大きい凸面から脂質膜に結合する方が圧倒的に有利である。以上の結果は、凹面に疎水性修飾を導入することにより、不利な凹面からの結合をも誘導することができることを示し、疎水性修飾 DNA ナノ構造の有用性を示すものである。

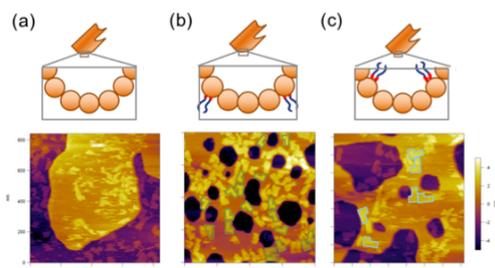


図 5. 脂質膜上に結合した湾曲 DNA ナノ構造の AFM 画像

(4) DNA ナノ構造の結合により誘起される脂質膜形状の変化

これまで、疎水性官能基を適宜導入した平面型、湾曲型 DNA ナノ構造が、脂質膜と効率よく結合することを確認した。これら脂質膜結合性を有する DNA ナノ構造を用いて、脂質膜形状の変化誘導を検討した。形状変化およびその観測が容易であると考えられるリポソームを標的となる脂質二重膜として用いた。蛍光標識リポソームの球状構造は、蛍光顕微鏡観により容易に観察できる(図 6a)。疎水性修飾を施した DNA タイルを添加すると、リポソーム形状の経時変化が観測され、球状構造が大きく乱されることが明らかになった(図 6b)。疎水性修飾をもたない DNA タイルでは、このような形状変化は観測されないことから、脂質膜に結合した DNA ナノ構造が形状変化を誘起していることが分かる。さらに内面に疎水性修飾を導入したチューブ型 DNA ナノ構造(図 2d)を添加したリポソームを透過型電子顕微鏡により観察すると、リポソームに突起状構造が誘起されていることが確認された。以上の結果は、構築した種々の疎水性修飾 DNA ナノ構造により、リポソームの形状変化を誘起できることを示唆し、DNA ナノ構造を用いた脂質膜形状・物性制御分子技術の有用性を示すものである。

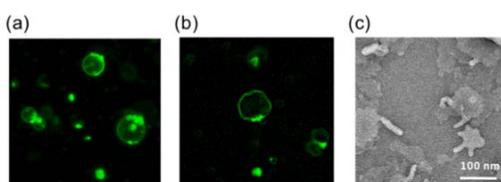


図 6. DNA ナノ構造により誘起されるリポソームの形状変化の蛍光顕微鏡および電子顕微鏡観測

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2件)

- (1) Dohno, C.*; Matsuzaki, K.; Yamaguchi, H.; Shibata, T.; Nakatani, K.*
A hybridisation-dependent membrane-insertable amphiphilic DNA, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 10117-10121. doi: 10.1039/C5OB01761K. 査読有
- (2) Dohno, C.*; Makishi, S.; Nakatani, K.; Contera, S.* Amphiphilic DNA tiles for controlled insertion and 2D assembly on fluid lipid membranes: the effect on mechanical properties, *Nanoscale.* **2017**, *9*, 3051-3058. DOI: 10.1039/C6NR07084A. 査読有

[学会発表] (計 5件)

- (1) Dohno, C.; Makishi, S.; Yamaguchi, H.; Nakatani, K.
Modulation of binding properties of DNA assemblies to lipid bilayer membrane, The international Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem2015), 2015. 12. 15, Honolulu (米国)
- (2) Yamaguchi, H.; Matsuzaki, K.; Shibata, T.; Dohno, C.; Nakatani, K.
Binding of amphiphilic DNAs with secondary structures to lipid bilayer membrane, The international Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem2015), 2015. 12. 15, Honolulu (米国).
- (3) 山内和明、堂野主税、中谷和彦、疎水性官能基を有する新規 DNA 結合リガンドの合成、日本化学会第 96 春季年会, 2016. 3. 24, 同志社大学京田辺(京都).
- (4) Dohno, C.; Makishi, S.; Yamaguchi, H.; Nakatani, K. Binding of amphiphilic DNA to lipid membrane regulated by formation of higher order structures, The 43rd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2016 年 9 月 27 日~29 日, 熊本大学(熊本市)
- (5) 山内和明、堂野主税、中谷和彦、疎水性官能基を有するリポート DNA 結合リガンドの評価、日本化学会第 97 春季年会, 2017. 3. 19, 慶應義塾大学日吉キャンパス(横浜市).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堂野 主税 (DOHNO Chikara)
大阪大学・産業科学研究所・准教授

研究者番号: 60420395

(2, 3, 4) 研究分担者、連携研究者、研究協力者

該当なし