

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21093

研究課題名(和文) 脂質膜表面を介したDNA構造体の自己組織化と機能創出

研究課題名(英文) Lipid-bilayer-assisted self-assembly of DNA origami arrays and their functionalization

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、DNAオリガミナノ構造体を脂質二分子平面膜上へと濃縮し、二次元結晶状の構造へと自己集合化させる手法を確立した。自己集合の構成単位とするDNAナノ構造体の形状やDNAナノ構造体間の連結様式を変更することで、様々な二次元パターンのDNA集合体を脂質二分子平面膜上に構築できることを実証した。構築した自己集合構造は異種分子で修飾することが可能であり、タンパク質分子や他のナノ構造体等を規則的に配置するための足場として利用可能である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we established a method to self-assemble DNA origami nanostructures into two-dimensional crystalline structures on planar lipid bilayer membranes. By changing the shape of DNA nanostructures and designing interactions between the DNA nanostructures, various two-dimensional crystalline structures were constructed. The self-assembled structures can be modified with heterogeneous molecules and be used as a scaffold for periodic arrangement of protein molecules and other 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 DNAオリガミ 脂質二分子膜 自己集合化 自己組織化 ボトムアップ技術 原子間力顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

生体機能性分子の空間的な配置をナノレベルの精度で制御することは、新規バイオデバイスの創製に直結する基盤的な課題である。DNA オリガミはデザイン可能な 100 nm 程度の二次元/三次元 DNA ナノ構造体であり、長鎖の一本鎖 DNA と構造にあわせて配列設計したステイブル鎖と呼ばれる相補鎖 DNA を適切な条件でアニーリングすることで得られる。このナノ構造の利点として、「構造体の形状だけでなく、DNA に囲まれたナノ空間の設計が可能であること」、「デザインした構造体表面の任意の位置にステイブル鎖の修飾を介してタンパク質や金属粒子等を結合できること」が挙げられる。しかしながら、ナノスケールでの高い設計柔軟性を有する一方で、DNA オリガミ構造体のサイズは、足場となる一本鎖 DNA の全長に規定されるため、約 100 nm × 100 nm 程度に限られていた。これまでに、溶液中で DNA オリガミ同士を連結させることで、より大きな二次元 DNA オリガミ集合体を作成する手法が提案されてきたが、集合体サイズをマイクロメートルスケールまで成長させることは困難であった。

2. 研究の目的

本研究では、DNA オリガミナノ構造をビルディングブロックとした自己集合化を脂質平面膜上でを行い、二次元の秩序構造を構築する。これにより、DNA オリガミが持つ「形状・空間の設計性」と「表面修飾性」を拡張し、機能性分子をマイクロスケールの空間にナノスケールの精度で規則的に配置・結合させるための技術を確立する。本研究者は脂質二分子平面膜上において DNA オリガミ構造の拡散を許容する程度の吸着系を設定することで、DNA オリガミ構造の二量体化を制御することに成功している (*J. Am. Chem. Soc.*, 2014, 136, 1714-7)。この技術と DNA オリガミの設計柔軟性を活用することで、DNA ナノ構造体の形状デザインに基づく秩序構造の設計・構築を実現し、構造の間隙空間や部位特異的な表面修飾を利用した機能性分子の規則的配置へと応用展開する。

3. 研究の方法

様々な DNA オリガミナノ構造体を設計・構築し、それらを基板上に作製した人工脂質二分子平面膜上で自己集合化させることで、二次元結晶状の構造を構築する。自己集合化に際しては、DNA 鎖の平滑末端間のスタッキング相互作用や粘着末端間の相補鎖形成、静電的相互作用などを検討する。

加えて、あらかじめ化学修飾を施した DNA オリガミを二次元自己集合化のビルディングブロックとすることで、タンパク質分子などを精密に配置させるための足場を構築する。

自己集合化のビルディングブロックとなる DNA オリガミナノ構造はサーマルサイクラ

ーを用いたアニーリングにより作製し、電気泳動実験や原子間力顕微鏡 (AFM) により評価する。二次元自己集合構造やその表面修飾は高速 AFM により直接可視化し、解析・評価する。

4. 研究成果

(1) 脂質平面膜上における DNA オリガミの二次元自己集合化

脂質膜上で DNA オリガミが拡散できる程度の適度な吸着条件を探ることで、緩衝溶液と脂質膜の界面に濃縮された DNA オリガミをマイクロスケールの結晶状構造へと二次元自己集合化させることに成功した。本研究では、負の電荷を帯びた DNA オリガミ構造体が、双性イオン性の脂質二分子膜表面にマグネシウムイオンを介して静電的に吸着されるという性質に着目した。具体的には、マイカ基板上に作製した 1,2-ジオレオイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホコリン (DOPC) の脂質二分子平面膜に、十字型の DNA オリガミ構造体を吸着させ、その平滑末端間のスタッキング相互作用により格子構造へと成長させた。同じ溶液条件でも、ソリッドなマイカ基板上や流動性の低い膜領域上では規則的な格子構造が得られないことから、本手法において、脂質二分子膜の流動性が拡張した格子構造の形成を促す重要な要因であることが示唆された。

加えて、平滑末端や粘着末端を導入せずとも、形状の自己相補性に基づいて、パッキング (最密充填) した自己集合体が見出されることも見出した。十字型だけでなく、正三角形型や正六角形型の DNA オリガミ構造においても同様の現象が確認された。以上から、自己集合の構成単位とする DNA オリガミの形状や DNA オリガミ間の相互作用の様式を変更・調整することで、多種多様な二次元パターンの DNA 集合体を脂質平面膜上に構築できることが示された。

(2) 二次元自己集合化過程の可視化解析

脂質膜上での二次元自己集合化の過程を明らかにするため、高速 AFM による直接可視化に取り組んだ。特に、DNA オリガミ間の連結にスタッキング相互作用を利用した場合においては、単量体、及び数個～数十個程度からなる多量体が膜上で互いに結合と解離を繰り返しながら、大型の格子構造へ成長していく様子が観察された。加えて、格子中の点欠陥が溶液中の単量体によって補填・修復される様子も捉えられた。これらの動的過程の可視化は、二次元自己集合化のメカニズム理解、及び高効率・高収率な格子形成を実現する上で基礎的な知見になると期待される。

(3) 二次元自己集合構造の表面および間隙空間への分子配置

DNA オリガミの材料となるステイブル鎖の

修飾を介して、二次元自己集合構造上へタンパク質分子を周期的に配置していくことを試みた。具体的には、あらかじめビオチン標識を施した DNA オリガミを二次元結晶状の構造へと自己集合させ、その表面にストレプトアビジン分子を結合させた。高速 AFM によりこの過程を直接可視化することで、標識位置に対する特異的結合を評価した。解析の結果、約 90% の標識位置へストレプトアビジン分子が結合していることが確認された。同様に、二次元自己集合構造が有する周期的な間隙への分子配置も検討した。モデルシステムとして、(1) の手法で自己集合させた二次元格子構造の間隙に対して相補的な形状を有する DNA オリガミを新たに設計・作製した。これを、あらかじめ脂質平面膜上に構築した格子構造へと組み込んでいくことで、単一形状をビルディングブロックとした自己集合化では得られないパターンを階層的に構築できることを見出した。格子の構築に関しては、配列設計が異なる二種の十字型 DNA オリガミを交互に並べる手法も検討し、その間隙に対して第三の DNA オリガミ構造体をプログラマブルに配置することに成功した。

脂質膜上で DNA オリガミを二次元結晶状の構造へと自己集合化させる本研究の手法では、DNA 構造体によって仕切られた脂質膜のコンパートメントを設計・構築することが可能である。この特長を活かせば、膜タンパク質の規則的な配置も実現できると考えられる。また、DNA オリガミの表面には、複数種の分子を部位特異的に配置することも原理的に可能であり、分子間の協調や多酵素によるカスケード反応を利用した表面機能の創出が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Takahiro Tomaru, Yuki Suzuki, Ibuki Kawamata, Shinichiro M. Nomura and Satoshi Murata. "Stepping operation of rotary DNA origami device". *Chem. Commun.* 2017, *in press*. DOI: 10.1039/c7cc03214e. (査読有)
2. Yuki Suzuki, Masayuki Endo and Hiroshi Sugiyama. "Lipid-bilayer-assisted two-dimensional self-assembly of DNA origami nanostructures". *Nat. Commun.* 2015, 6, 8052. DOI:10.1038/ncomms9052. (査読有)
3. Yuki Suzuki, Masayuki Endo, and Hiroshi Sugiyama. "Mimicking membrane-related biological events by DNA origami nanotechnology". *ACS Nano* 2015, 9(4), 3418-3420.

doi: 10.1021/acsnano.5b01723.
(Perspective) (査読無)

〔学会発表〕(計 9 件)

1. Yuki Suzuki, Masayuki Endo, Hiroshi Sugiyama, Ibuki Kawamata, Satoshi Murata, "Self-assembly of two-dimensional DNA origami lattices on lipid membranes" 14th Annual Conference on Foundations of Nanoscience: Self-Assembled Architectures and Devices (FNANO17), April 10-13, 2017, Snowbird, (U.S.A.). (Invited)
2. Yuki Suzuki, "Organizing DNA origami components into crystalline structures at the lipid/aqueous solution interface" 第 54 回日本生物物理学会年会, 2016 年 11 月 25 日-27 日, つくば国際会議場 (茨城県・つくば)
3. Yuki Suzuki, Ibuki Kawamata, Satoshi Murata "Organizing three-dimensional DNA origami objects into crystalline structures having periodic cavities" The 43rd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC2016), September 27-29, 2016, Kumamoto (Japan).
4. Yuki Suzuki, Hiroshi Sugiyama, Masayuki Endo. "Filling cavities of lipid-bilayer-supported two-dimensional DNA origami arrays". The 22nd International Conference on DNA Computing and Molecular Programming (DNA22), September 4-8, 2016, Munich (Germany).
5. 鈴木 勇輝, 遠藤 政幸, 杉山 弘「脂質膜上における DNA オリガミナノ構造体の二次元自己集合化」, 日本顕微鏡学会第 72 回学術講演会, 2016 年 6 月 14 日-16 日, 仙台国際センター (宮城県・仙台).
6. Yuki Suzuki, Masayuki Endo, Hiroshi Sugiyama. "Lipid-bilayer-assisted 2D self-assembly of DNA origami nanostructures". *Pacificchem* 2015, December 15-20, 2015, Honolulu, (U.S.A.).
7. Yuki Suzuki, Masayuki Endo, Hiroshi Sugiyama. "DNA origami nanotechnology at membrane-solution interfaces" 「細胞を創る」研究会 8.0, 2015 年 11 月 12-13 日, 大阪大学 (大阪府・吹田). (Invited)

8. Yuki Suzuki, Masayuki Endo, Hiroshi Sugiyama. "Formation of two-dimensional crystalline DNA origami lattices on lipid bilayer surfaces". The 42nd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC 2015), September 23-25, 2015, Himeji (Japan).
9. Yuki Suzuki, Masayuki Endo, Hiroshi Sugiyama. "Lipid-bilayer-assisted two-dimensional self-assembly of DNA origami nanostructures". The 21st International Conference on DNA Computing and Molecular Programming (DNA21), August 17-21, 2015, Boston/Cambridge (U.S.A.).

〔その他〕

ホームページ等

DNA オリガミの2次元自己集合化に成功 - ナノ~マイクロ空間での自在な分子配置も可能に -

http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2015/150827_1.html

6. 研究組織

(1) 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