

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—

国立大学法人京都大学（総長：山極壽一）は、DNA からなる平面構造体を脂質 2 重膜の表面上で自己集合化させることで、さまざまなパターンの DNA 自己集合体を作成する手法を開発しました。この成果は、メソスコピックな分子構造体の自己集合化の新たなメカニズムを提唱するもので、自在な分子の結晶化にも用いることができると期待されます。

遠藤政幸 物質-細胞統合システム拠点 (iCeMS=アイセムス) 准教授、**鈴木勇輝** 理学研究科特定研究員、**杉山弘** iCeMS・理学研究科教授の研究グループは、DNA オリガミ^{*1}と呼ばれる約 100nm² の DNA 平面構造を人工脂質 2 重膜表面^{*2}に吸着・濃縮し、2 次元自己集合化させることで、多様な空間パターンの DNA 自己集合体を設計・創出する手法を開発しました。また、DNA オリガミ構造体が脂質 2 重膜で自己集合していく過程を高速原子間力顕微鏡 (高速 AFM) ^{*3}を用いて、実時間で可視化することにも成功しました。さらに DNA オリガミの性質と集合体の周期性を利用して、あらかじめ指定した位置にタンパク質分子を規則的に配置することに成功しました。本研究の成果は、様々なボトムアップ型ナノテクノロジーの基盤技術となるもので、ナノデバイスの集積化・組織化や新規分子デバイス構築などへの展開が期待されます。

本成果は、科学技術振興機構 (JST) 戦略的創造研究推進事業 (CREST) 及び文部科学省科学研究費補助金新学術領域研究「分子ロボティクス」、基盤研究 (S)、基盤研究 (B)、挑戦的萌芽研究、若手研究 (B)、積水化学自然に学ぶものづくり研究助成プログラム、倉田記念日立科学技術財団の支援を受けて行われ、2015 年 8 月 27 日 (ロンドン時間) に、ネイチャーパブリッシンググループの電子ジャーナル「Nature Communications (ネイチャー・コミュニケーションズ)」にて公開されました。

1. 背景

分子の大きさのスケールであるナノメートルスケールの精度で、機能性分子を規則的に配置させる技術の確立は、新規高分子材料の創出につながる重要なテーマです。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 分子構造体であり、長鎖の一本鎖 DNA と構造にあわせて配列設計した相補鎖 DNA を適切な条件で加熱と徐々に冷却 (アニーリング) することで容易に作成することができます。この手法の利点として、①自己集合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、②デザインした構造体表面の任意の位置に核酸分子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ます。しかしながら、ナノスケールでの高度なデザイン性を有する一方で、DNA オリガミのサイズは一本鎖 DNA の全長に規定されるため、利用可能な空間は約 100 nm×100 nm 四方に限られています。

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 2 次元 DNA オリガミ集合体を作成する手法が提案されてきましたが、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容易ではありませんでした。

2. 研究内容と成果

本研究では、負の電荷を帯びた DNA オリガミ構造体がマグネシウムイオンを介して、静電的に脂質 2 重膜の表面に吸着されるという性質に着目しました(図 1 A)。本研究者は、脂質膜表面で 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、人工脂質膜表面に濃縮された DNA オリガミをマイクロメートルオーダーのスケールまで 2 次元自己集合化させるという独自の手法を見出し、様々な空間パターンの 2 次元の DNA 集合体の創出を試みました。

まず、格子構造を形成させるため、一辺が 100 nm の十字型の DNA オリガミ構造体(モノマー)を設計・作成しました(図 1B)。AFM 観察の基盤となるマイカ上に脂質 2 重膜を作成し、この上に十字型の DNA オリガミ構造体を静電的に吸着しました。脂質 2 重膜状では十字型のオリガミ構造体は十字構造の末端の $\pi-\pi$ 相互作用^{*4}によってモノマー同士が結合し、格子構造を形成しました。特に、オリガミ構造体の溶液中の濃度が高い状態では、数マイクロメートルの格子構造を形成することを見出しました。一方で、マイカ上では大きな格子構造が形成できないため、脂質 2 重膜上での流動性が拡張した格子構造を作るうえで重要であることがわかりました。

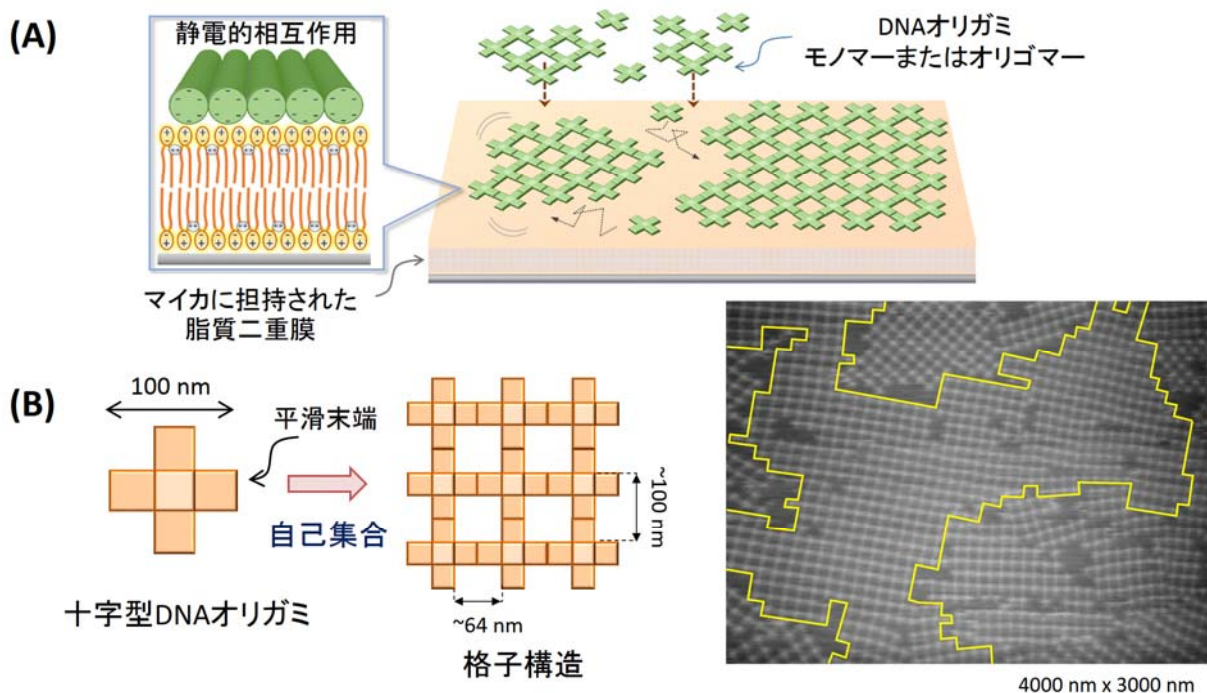


図 1. 脂質 2 重膜を利用した DNA 構造体の 2 次元自己集合化。(A) AFM の観察基盤であるマイカ上に脂質 2 重膜を作成し、静電的な相互作用によって DNA オリガミ構造体を吸着する。さらに脂質上での流動性を用いて、格子構造の大きさの拡張を図った。(B) 十字型の DNA オリガミ構造体の自己集合による格子構造の形成。右は格子構造の形成後の AFM 画像。

次に、高速液中原子間力顕微鏡（高速液中 AFM）により、この DNA オリガミを吸着させた脂質膜表面を観察しました。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を捉えることに成功しました(図2)。加えて、格子中の点欠陥が溶液中の単量体によって補填・修復される様子も観察されました。これらの動的過程の可視化は、脂質膜表面で DNA オリガミ格子構築が進行することを直接的に示すものであり、二次元自己組織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重要な知見となります。

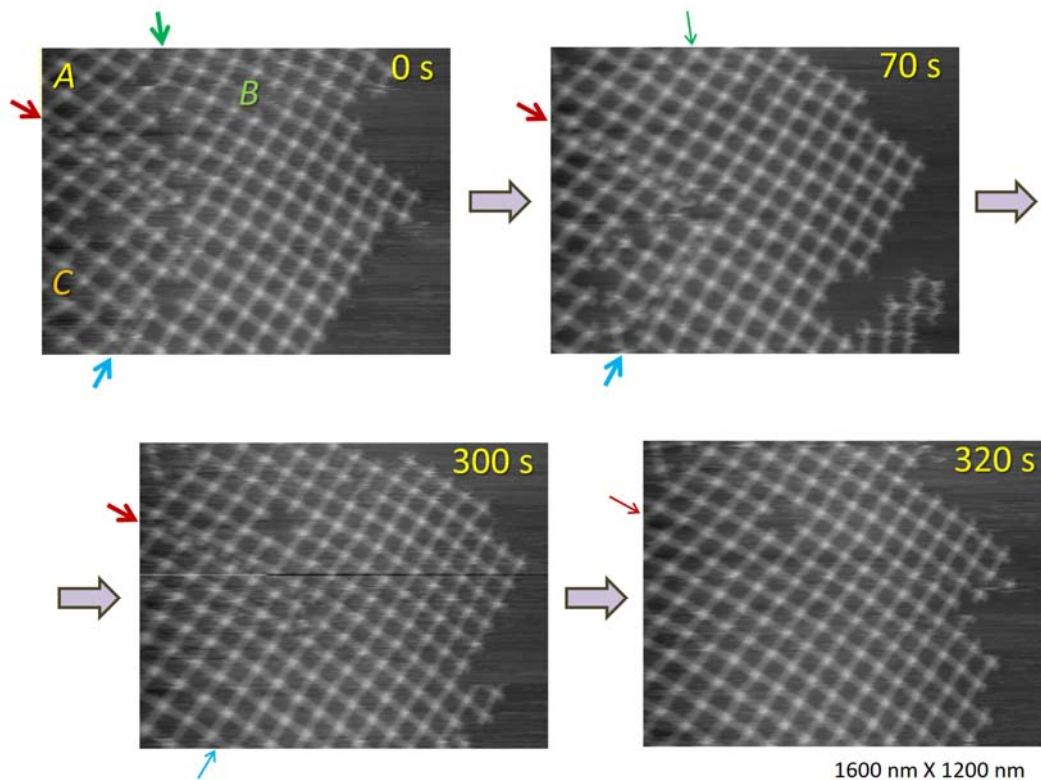


図2. 脂質膜上での十字型オリガミ構造体の格子構造形成の様子の高速 AFM による観察。十字型オリガミ構造体が自己集合した格子が複数接している状態（格子 A, B, C；図中の矢印が境界を示す）から、それらの境界が少しずつ動くことによって格子構造体が再配向し、配向がそろったより大きな格子構造体になる様子が観察された。

さらに、興味深いことに、DNA オリガミ間の π - π 相互作用を妨げた場合には、パッキング（最密充填）した自己集合体を得られることがわかりました。このパッキングは、十字型の DNA オリガミ構造体だけでなく、正三角形型、及び正六角形型のオリガミ構造においても得ることができました(図3 A)。つまり、自己集合の単位とする DNA オリガミ（モノマー）の形状や DNA オリガミ間の相互作用の様式を変更することで、多種多様な 2次元パターンの DNA 集合体を脂質膜上に作成できる可能ことが示されました。

DNA オリガミ構造体は、その表面のすべての位置で異なる位置情報を有している為、表面の任意の位置をさまざまな外来の分子で修飾することが可能です。上記手法に基づき、ビオチンで修飾した DNA オリガミ構造体の格子構造をあらかじめ作成し、高速 AFM 観察中にストレプトアビジン溶液を導入することで、実時間での位置選択的な修飾も観察しました(図3 B)。溶液導入後にストレプトアビジン分

子があらかじめ指定された位置に特異的に結合していく様子が可視化されるとともに、ビオチン修飾の位置を工夫することで、規則的にストレプトアビジン分子を格子内に配置することにも成功しました。

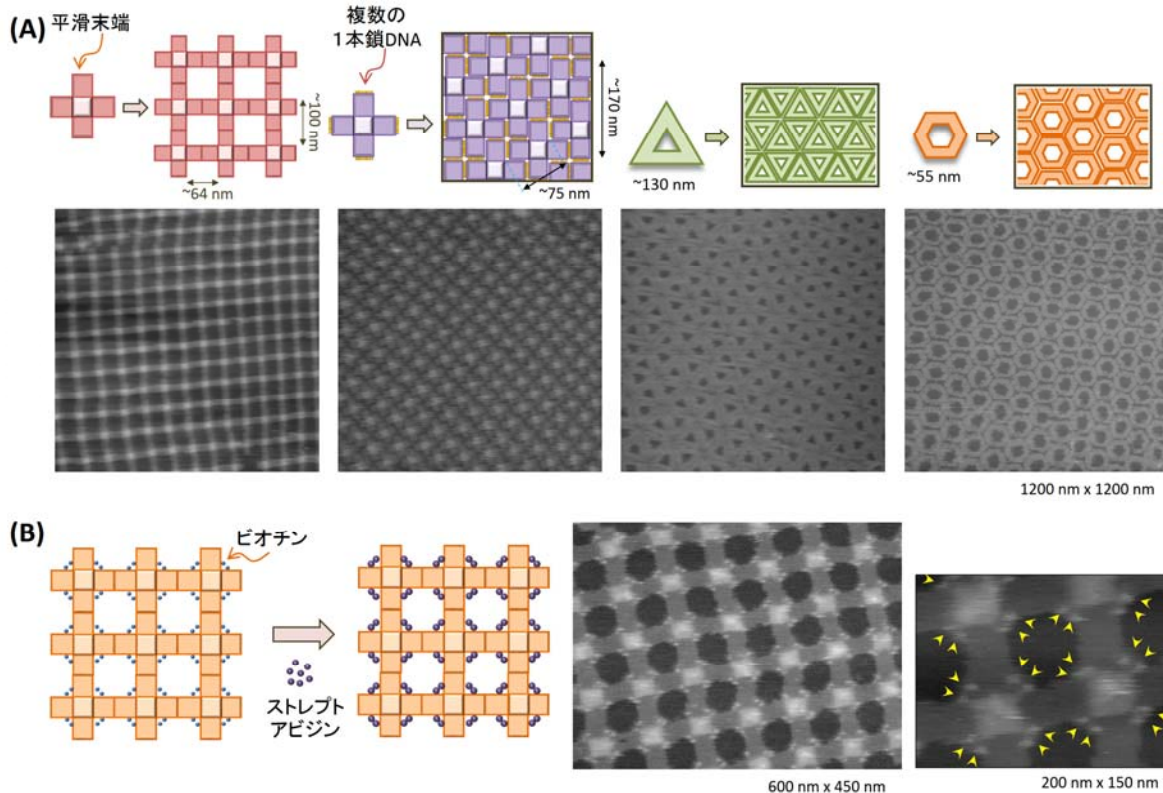


図3. 脂質2重膜上でのさまざまな2次元自己集合体の形成とそのAFM画像。(A) 平滑末端の π - π 相互作用による十字型DNAオリガミ構造体からの格子構造の形成(左)。 π - π 相互作用が働かない状態での十字構造体のパッキング(中左)。十字型にフィットしたパッキングによる構造体の規則的な集合が見られた。三角形(中右)や六角形(右)のオリガミ構造体を用いてもパッキングによる規則的な集合が見られた。(B) ビオチンを導入した十字構造体を用いて格子構造を形成後、ストレプトアビジンによる修飾を行った。あらかじめ指定した位置を修飾でき、その結合する様子も高速AFMによって観察できた。

このように、脂質2重膜表面という界面を利用することで、溶液中では困難なマイクロメートルサイズの格子構造の形成に成功しました。また、高速AFMによるイメージング技術を用いて、格子構造の成長と再配向などの様々な動的なプロセスの可視化に成功しました。このアプローチは、ナノファブリケーションのための様々な構造体を構築するための新たな方法論であり、DNA構造体の2次元結晶化などに応用も可能です。

3. 今後の期待

今回の研究では、DNA オリガミを人工脂質 2 重膜表面に吸着・濃縮し、2 次元自己組織化させることで、マイクロメートルサイズの多様な DNA 集合体を脂質膜上に作成する技術を開発しました。この技術では、自己集合に伴って、ナノスケールの空間も作成されるため、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の設計が可能であるとも言えます。この特長を活かせば、多くの薬剤の標的分子でもある膜タンパク質の規則的な配置も実現できると期待されます。また、DNA オリガミの表面には、複数種の分子を規則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を介して、新規バイオセンサーの構築等へと応用が期待できます。

用語解説・注釈

- ※ 1 **DNA オリガミ**：DNA から自己集合によって作成されるナノ構造体。2006 年にカリフォルニア工科大学のPaul Rothemund（ポール・ロスマンド）博士によって開発された。鋳型となる長い 1 本鎖DNA（7249塩基）に設計した短い相補鎖DNA を加え、加熱、ゆっくり冷却することで、あらかじめ設計したDNA ナノ構造体と同じ形に自己集合させることができる。この方法で、長方形、三角形、星型、スマイルマークなどを作成することが可能である。
- ※ 2 **脂質 2 重膜**：細胞膜の基本構造を形成するリン脂質からなる膜。リン脂質が疎水性部分を内側に、親水性部分を外側に向け隙間なく並び 2 重の層を形成する。脂質 2 重膜の性質は形成させるリン脂質の種類によって柔軟に変えることが可能である。
- ※ 3 **原子間力顕微鏡（AFM）**：走査プローブ顕微鏡の1 つ。試料と鋭い探針の間に働く原子間力を利用して、試料表面の形状を測定する。探針はカンチレバー（板状のバネ）の先端に取り付けてあり、試料との間に原子間力が働くとカンチレバーがたわむので、その変位をカンチレバー背面へのレーザー照射とその反射光の検出によって測定する。試料台に取り付けられた圧電素子の制御によって試料をナノメートルスケールで走査することが可能である。サンプルはマイカと呼ばれる平面の基板上で測定する。今回の実験で使用したAFM は最大1 秒間に10画像を取り込むことができる高速AFM (オリンパス製 BIXAM)である。
- ※ 4 **π - π 相互作用**：芳香環のように π 電子を持つ有機化合物はその分子軌道から縦方向に分子間で相互作用する。この相互作用は DNA の塩基対間にも働き、2 重らせんの安定化にもつながっている。分子同士が層状に重なることから π スタッキングともいう。

論文タイトルと著者

“Lipid-bilayer-assisted two-dimensional self-assembly of DNA origami nanostructures”

Yuki Suzuki, Masayuki Endo, Hiroshi Sugiyama

Nature Communications, 2015, 6, 8052. | DOI: 10.1038/ncomms9052

問い合わせ先

<研究内容について>

遠藤 政幸（エンドウ マサユキ）

京都大学 物質－細胞統合システム拠点（iCeMS）准教授

Tel: 075-753-9765 | endo(a)kuchem.kyoto-u.ac.jp

鈴木 勇輝 (スズキ ユウキ)

京都大学 理学研究科特定 研究員

Tel: 075-753-9770 | [ysuzukit79\(a\)kuchem.kyoto-u.ac.jp](mailto:ysuzukit79(a)kuchem.kyoto-u.ac.jp)

杉山 弘 (スギヤマ ヒロシ)

京都大学 物質－細胞統合システム拠点 (iCeMS) ・理学研究科 教授

Tel: 075-753-4002 | [hs\(a\)kuchem.kyoto-u.ac.jp](mailto:hs(a)kuchem.kyoto-u.ac.jp)

<京都大学 iCeMS について>

中植 由里子 (ナカウエ ユリコ)、相山 朋加 (アイヤマ トモカ)

京都大学 物質－細胞統合システム拠点 (iCeMS) 広報掛

Tel: 075-753-9755 | [pr\(a\)icems.kyoto-u.ac.jp](mailto:pr(a)icems.kyoto-u.ac.jp)