

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K05611

研究課題名(和文) マイクロカプセルにおけるDNAの動的な高次構造変化および機能の解明

研究課題名(英文) DNA conformational behavior and functions in microcapsules

研究代表者

ジンチェンコ アナトーリ (Zinchenko, Anatoly)

名古屋大学・環境学研究科・准教授

研究者番号：00432352

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：真核細胞内では、1メートル以上の長さのDNA高分子は高密度に折り畳まれており、数 μm 大きさの空間の中に存在している。細胞内におけるDNAの高次構造および挙動を説明するため、人工的な実験モデルが必要とされている。本研究では、長さの異なったDNAを数 μm 大きさの高分子カプセルに閉じ込める方法を確立して、新しい人工細胞モデルを構築した。この人工細胞モデルを用いることにより、細胞大きさの空間に閉じ込めたDNAの物理学的特徴を明らかにし、外部刺激によるカプセル内でのDNAの高次構造変化をコントロールできることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核酸のカプセル化は、遺伝子送達、ゲノム保護などの応用を対象とする重要な技術である。これまでのカプセル化の技術により短いDNAまたはオリゴマーDNAのカプセル化が示されたが、カプセルの大きさより数倍～数十倍ほど長いゲノムDNAのカプセル化が困難であった。本研究で開発した人工細胞モデルの構築方法を用いて、長鎖DNAのカプセル化はほぼ100%効率で成功した。この技術、細胞内での長鎖DNAの状態を明らかにするための使用に加えて、バイオ・医療分野においても応用できると期待される。

研究成果の概要(英文)：In eukaryotic cells, DNA macromolecules with a length exceeding 1 meter are densely folded and exist in cells with a size of several μm . Artificial experimental models are needed to explain the higher order structure and behavior of DNA in cellular-like environment. In this study, we constructed an "artificial cell model" method for encapsulating very long genomic DNA in polymer capsules of several μm size. Using this experimental model, we made clear the behavior of DNA confined in the cell-sized space. The experimental methodology proposed in this study is promising for gene delivery and related biomedical applications.

研究分野：生物物理・化学物理・ソフトマターの物理

キーワード：DNA カプセル DNA折り畳み 人工細胞モデル

1. 研究開始当初の背景

真核細胞内では、1メートル以上の長さの DNA 高分子が高密度に折り畳まれており、DNA 高次構造と機能は多くの要因にコントロールされている。タンパク質との相互作用、イオン強度、高分子混雑などに加えて、 μm 大きさ細胞サイズ閉じ込めは DNA の状態へ大きな影響を与えている。これらの要因により細胞内での DNA 挙動を解明するには、さまざまな人工細胞モデル (artificial cell model) システムが提案なされている。その中に細胞サイズの空間を作り出すのに、水-油系エマルジョン (図 1 A)、リポソームやベシクル系 (図 1 B) が多用されている DNA 水溶液から従来の乳化法で調製できる。

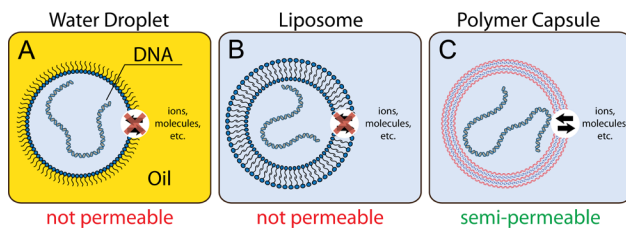


図 1 人工細胞モデルの 3 例 A. 油中水マイクロ液滴 B. ベシクル C. 本文で詳しく触れるモデル。

2. 研究の目的

これまで発表された図 1 A-B のような人工細胞モデルでは、閉じ込め空間の内部と外部の間に物質の出入りができないため、細胞サイズ空間における DNA の動的変化の検討が困難であり、新しい人工細胞モデルが求められている。そこで、本研究は、DNA を高分子の膜でカプセル化した人工細胞モデルを構築することを目的として、内外の物質のやり取りが可能な構造を持った区画に DNA を閉じ込めた細胞モデルとして開発した。この高分子積層膜は、水溶性分子が通過できるため、細胞や核のような形態を示し、物質の内外の交換能を有する実験系として確立して、カプセル内の長鎖 DNA および短鎖 DNA の高次構造および挙動を明らかにした。

3. 研究の方法

本研究で提案した人工細胞モデルの構築方法は図 2 に示す。本研究で用いた全長 $60\ \mu\text{m}$ の bacteriophage DNA は非常に長いので、テトラアミン (スペルミン) と反応させて DNA を凝縮させた (図 2A)。 Na_2CO_3 と CaCl_2 の反応溶液で凝縮した DNA を共沈させることで、粒径がおよそ $10\ \mu\text{m}$ CaCO_3 ビーズの固相内にトラップした (図 2B)。次に、ビーズの表面上へ、ポリスチレンスルホン酸ナトリウム (PSSNa) とポリ(アリルアミン) (PAH) の高分子から多層高分子膜を析出させた (図 2C)。最後に、キエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) で CaCO_3 の芯を溶かして、DNA をカプセル内に開放された (図 2D)。以上の調製により得られた人工細胞モデルにおいて DNA の高次構造および外部刺激による高次構造変化を蛍光顕微鏡で観察した。

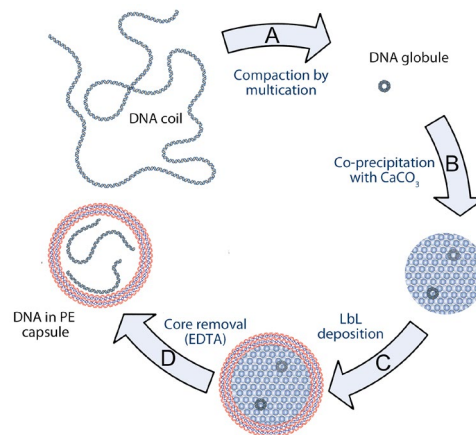


図 2 本研究での人工細胞モデルの構築方法

4. 研究成果

(1) ゲノムサイズ DNA のカプセル化

図 2 に示した方法を用いて、 $60\ \mu\text{m}$ 長さの DNA を約 $10\ \mu\text{m}$ サイズの半透の高分子カプセル内に閉じ込めることに成功した。人工細胞モデルの構築においての各段階を蛍光顕微鏡で観察した画像は図 3 に示す。スペルミンにより折り畳んだ長鎖 DNA は CaCO_3 のビーズにトラップされ、ビーズ内に固定されている (図 3A)。アニオン性とカチオン性高分子を繰り返して析出させると、 CaCO_3 のビーズ上に多層薄膜 (赤) が形成される (図 3B)。 CaCO_3 を EDTA により溶かした後、高分子積層膜によって包まれたカプセル内の空間へ DNA が開放され、固相にトラップされていたグ

ロビュール状の DNA が、再びコイル状態に戻る (図 3C)。図 2 に示した方法において DNA トラップ率はほぼ 100%であることを示した。カプセル化したほとんどの長鎖 DNA 分子にはカプセルの膜に固定されている特徴があり、カプセル内でブラウン運動をする DNA 分子の割合が少ないことが分かった。

(2) 短鎖 DNA および無機ナノ粒子のカプセル化との比較

(1) で構築した実験モデルにおいて、DNA がカプセル膜に接着する原因を明らかにするため、短鎖 DNA (数百 bp) および直径 70nm~500nm 大きさのアニオン性シリカナノ粒子のカプセル化を行った。シリカナノ粒子をカプセル化すると、カプセル内で自由に運動したシリカ粒子と膜に固定したシリカ粒子が共存して、ナノ粒子のサイズ減少および塩濃度の上昇によって膜に固定したシリカ粒子の割合が高くなることがわかった。同様の方法で短鎖 DNA がカプセル化された場合、カプセル内の一部の DNA がカプセル膜に集合するが、カプセル内の空間を全体的に占有している DNA の量も大きい (図 3D)。以上の結果から、カプセル化したオブジェクト (粒子や高分子) によってそのカプセル内での分配が大きく異なる。特に数万 bp の長鎖 DNA の場合は、DNA のカプセル膜との引力的な相互作用は支配的であることを明らかにした。

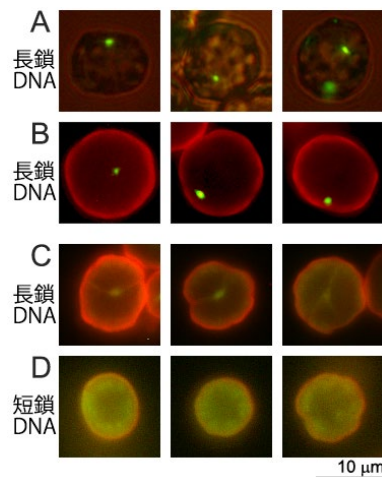


図 3 本研究で開発した人工細胞モデルの各段階での蛍光顕微鏡写真 A. CaCO_3 ビーズにトラップした長鎖 DNA グロビュール (緑) B. 表面上に高分子膜 (赤) を析出したビーズ C. カプセル内の空間へ開放した長鎖 DNA コイルの蛍光顕微鏡像 D. カプセル内の空間へ開放した短鎖 DNA コイルの蛍光顕微鏡像

(3) カプセル内における長鎖 DNA の高次構造変化

(1) 本研究で構築した人工細胞モデルにおいて、長鎖 DNA がカプセル膜に固定しているため、イオン濃度変化やカチオン性バインダーの付加により、カプセル内での大きな DNA 構造変化が見られなかったが、DNA がカプセル膜付近に集合することが観察された。個数の少ないカプセルの中でブラウン運動する DNA に対してスペルミンの影響を調べて、カプセルの溶液にスペルミンを加えることにより、カプセル内でのコイル状態の DNA がグロビュール状態へ折り畳むことが確認できた。しかし、DNA 折り畳み転移に伴い、当初ブラウン運動をしていた DNA が膜に吸着して固定される。DNA の高次構造変化を及ぼすスペルミンは、負電荷のカプセル膜と負電荷の DNA との間に引力的相互作用を引き起こして、DNA を膜に吸着させる効果を示すと考えられる。

(4) DNA のカプセル膜への固定を防ぐためのカプセル膜のデザイン

長鎖 DNA のカプセル膜への固定現象により、本研究の実験モデルの応用性を限られているため、長鎖 DNA がカプセル膜への吸着しないように、高分子膜の構築の検討を続けていた。そのため、低電荷のポリアクリル酸 (PAA) とポリ (アリルアミン) (PAH) 高分子を用いて、異なった pH と塩濃度の条件で PAA と PAH の電離度をコントロールして、DNA カプセル化を行った。そこで、NaCl 1 mM, pH 6 の条件下で構築した 3 層のカプセル内で多数のコイル状態の DNA がブラウン運動している状態を実現できた (図 4)。しかし、カプセル膜を構成する高分子の間の静電的相互作用が弱まるため、カプセル膜の分解やカプセルの凝集などの問題が生じる。また、低い pH 値の溶液中に CaCO_3 ビーズ上で高分子膜を調製すると、 CaCO_3 ビーズが溶解し、カプセルが崩壊することもある。DNA とカプセル膜との間の相互作用を調整する際、カプセルの構築過程にも大きな影響があることが明らかにした。

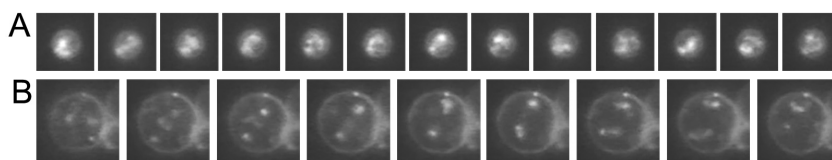


図 4 数 μm 高分子カプセル内における長鎖 DNA 分子のブラウン運動のタイムラプス蛍光顕微鏡像 ($\Delta t \sim 0.3 \text{ s}$, scale bar = $7 \mu\text{m}$)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Zinchenko A., Inagaki E., Murata S.	4. 巻 4
2. 論文標題 Encapsulation of Long Genomic DNA into a Confinement of Polyelectrolyte Microcapsule: A Single-Molecule Insight	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 458-464
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.8b02865	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 Zinchenko A., Berezhnoy N., Chen Q., Nordenskiöld L.	4. 巻 114
2. 論文標題 Compaction of Single Molecule Megabase-Long Chromatin under the Influence of Macromolecular Crowding	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biophys. J.	6. 最初と最後の頁 2326-2335
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bpj.2018.04.012	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 Zinchenko A., Berezhnoy N.V., Wang S., Rosencrans William M., Korolev N., van der Maarel Johan R.C., Nordenskiöld L.	4. 巻 46
2. 論文標題 Single-molecule compaction of megabase-long chromatin molecules by multivalent cations	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 635-649
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkx1135	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 該当する
1. 著者名 Zinchenko A., Sergeev V.G.	4. 巻 59
2. 論文標題 DNA-based materials as chemical reactors for synthesis of inorganic nanoparticles	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Polymer Science C	6. 最初と最後の頁 18-28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1134/S1811238217010155	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 Zinchenko A., Chen Q., Berezhnoy N., Wang S., Nordenskiöld L.	4. 巻 16
2. 論文標題 Compaction and Self-Association of Megabase-Sized Chromatin is Induced by Anionic Protein Crowding	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Soft Mater	6. 最初と最後の頁 4366-4372
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0SM00162G	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 Zinchenko A., Hiramatsu H., Yamaguchi H., Kubo K., Murata S., Kanbe T., Hazemoto N., Yoshikawa K., Akitaya T.	4. 巻 116
2. 論文標題 Amino Acid Sequence of Oligopeptide Causes Marked Difference in DNA Compaction and Transcription	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	6. 最初と最後の頁 1836-1844
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bpj.2019.04.010	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

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 1件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Zinchenko A., Inagaki E., Murata S.
2. 発表標題 Encapsulation of Long DNA into Polyelectrolyte Capsules
3. 学会等名 The 45th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Zinchenko A.
2. 発表標題 Encapsulation of Biomacromolecules and Small Particles into Polyelectrolyte Capsules
3. 学会等名 第68回コロイドおよび界面化学討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Zinchenko A.
2. 発表標題 Unimolecular Compaction of Megabase-Long Chromatin
3. 学会等名 International Workshop Polyelectrolytes in Chemistry, Biology and Technology 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Zinchenko A.
2. 発表標題 Compaction of DNA and Chromatin under Influence of Neutral and Anionic Crowding
3. 学会等名 Okinawa Colloids 2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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