

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K22103

研究課題名（和文）簡便なタンパク質構造解析に向けた規則配列化のためのDNA規則的多孔構造創製

研究課題名（英文）Periodic porous DNA nanostructures for ordered arrangement of protein molecules and their structural analysis

研究代表者

田川 美穂（Tagawa, Miho）

名古屋大学・未来材料・システム研究所・教授

研究者番号：40512330

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：DNA修飾ナノ粒子超格子の結晶を用いて、スポンジ機能を持つ結晶作製に取り組んだ。タンパク分子などのゲスト分子の取り込み効率を向上させるため、格子定数がナノ粒子粒径よりも大きい結晶作製に取り組み、SAXS構造解析により、結晶性の良いbcc構造であることを確認した。また、封入したいタンパク分子と相互作用を持つ部位を予め結晶内に導入しておくことで、溶液内で混合するだけでタンパク分子を取り込めることを示した。ストレプトアビジン及びRNPの封入に成功し、共焦点レーザー走査型顕微鏡による結晶断面観察により、内部までタンパク分子が取り込まれていることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNA修飾ナノ粒子の結晶が、規則的な空孔にタンパク分子のような大きな分子も取り込めることを確認したことで、今後は規則配列化による構造解析のみならず、結晶内での反応制御等、様々な応用が考えられる。DNA修飾ナノ粒子の結晶が持つ光電場の増強効果を利用し、ラマン散乱等の手法を用いて封入分子の反応課程を観察する手法としても有効であると期待できる。

研究成果の概要（英文）：We worked on the fabrication of crystals of DNA-functionalized nanoparticle superlattices with sponge functionality. In order to improve the uptake efficiency of guest molecules such as protein molecules, we worked on the fabrication of crystals with lattice constants larger than the nanoparticle particle diameter. The crystals were found to have a bcc structure with high crystallinity, which was confirmed by SAXS structural analysis. Streptavidin and RNP were successfully encapsulated, and cross-sectional observation of the crystals by confocal laser scanning microscopy confirmed that the protein molecules were incorporated into the interior of the crystal.

研究分野：コロイド結晶成長

キーワード：DNA ナノ粒子 結晶成長 X線小角散乱 自己集合

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

DNA 構造体を三次元的に架橋することで「DNA ハイドロゲル」を作製することができ、非共有結合性相互作用によりその細孔内に様々な分子を取り込めること、更に細孔に取り込まれたタンパク分子は単体時よりも変性しにくいことが報告されていた[S. H. Um, et al., Nature Mater. 5, 797-801, 2006; J. B. Lee, Nature Nanotech. 7, 816-820, 2012; L. Wan et al., Biomacromolecules 17, 1543-50, 2016]. DNA ハイドロゲルは一般的なゲル同様に、構成分子がランダムに配向し、規則的でない三次元架橋構造をしているため、タンパク分子を規則配列させることはできなかつた。そこで研究代表者は、自身がこれまで研究してきた DNA を用いた規則構造体である DNA-NP 超格子を利用し、結晶性の良い規則的三次元多孔構造を持つハイドロゲルを作製することを考えた。更に、研究代表者が 2007 年に成功させた DNA ナノ構造体を形成後に光連結で共有結合する技術を用いれば、耐乾燥性・耐熱性が上がり、タンパク分子取り込み後に再熱処理しながらイオン濃度調整により格子を収縮させ、再結晶化することで規則配列化できるのではと考えた。

2. 研究の目的

本研究は、タンパク質の規則配列化のための DNA 規則的多孔構造 (DNA 結晶スポンジ) の創製を目的とする。DNA はタンパク分子と相性が良く相互作用しやすいこと、DNA 構造体は水溶液中のみで合成できるためタンパク分子の変性の心配がないこと、塩基配列設計によりナノ構造のデザイン自由度が高いことから、タンパク分子の取り込みと規則配列に適していると考えられる。本研究では、規則的多孔構造であり、また既に高品質単結晶成長に成功している DNA 修飾ナノ粒子 (DNA-NP) 超格子を水溶性の結晶スポンジとして機能させ、タンパク分子取り込み後に、溶液中のイオン濃度調整により多孔構造を収縮させながら再結晶化することで、非共有結合性相互作用でタンパク分子の規則配列化を行う。結晶化し難いタンパクを本手法で配列させられれば、立体構造解析が可能になると期待できる。

3. 研究の方法

二種類の異なる合成一本鎖 DNA を金ナノ粒子にそれぞれ修飾し、DNA 修飾ナノ粒子 (DNA-NP) を作製した。この DNA-NP を架橋 DNA と混合し、昇温、徐冷することで DNA-NP 超格子を作製した。結晶構造及び結晶性の確認は、Spring-8 の X 線小角散乱 (SAXS) により行った。さらに、走査型電子顕微鏡 (SEM) 及びを用いて乾燥状態の DNA-NP 超格子の結晶形状を観察した。DNA に蛍光色素を導入した結晶は、共焦点レーザ走査型顕微鏡 (LSCM) により水和状態の結晶形状と断面像を測定した。ストレプトアビジンの封入及び配列には、ビオチンを修飾した DNA を用いて DNA-NP 超格子を作製し、RNP (Cas9 タンパク質とガイド RNA の複合体) の封入及び配列には、Cas9 の結合配列を含む DNA を用いて DNA-NP 超格子を作製した。溶液中でビオチン修飾 DNA-NP 超格子には蛍光修飾したストレプトアビジン、RNP 結合配列を含む DNA-NP 超格子には蛍光修飾した RNP をそれぞれ混合し、封入後に LSCM により結晶断面観察を行い、内部への封入状態を確認した。

4. 研究成果

DNA-NP 超格子を用いて、スポンジ機能を持つ結晶作製に取り組んだ。タンパク分子などのゲスト分子の取り込み効率を向上させるため、格子定数がナノ粒子粒径よりも大きい結晶作製に取り組んだ。DNA 配列及び結晶化溶液の組成等の結晶成長条件を最適化することにより、結晶内のタンパク分子取り込みサイト (空隙) の大きさを約 73nm 程度まで大きくすることに成功した。SAXS 構造解析により、ビオチン修飾 DNA-NP 超格子、及び RNP 結合配列を含む DNA-NP 超格子ともに、結晶性の良い bcc 構造であることを確認した。

また、封入したいタンパク分子と相互作用を持つ部位を予め結晶内に導入しておくことで、溶液内で混合するだけでタンパク分子を取り込めることを示した。具体的には、予めビオチン分子を修飾した合成 DNA を用いて DNA-NP 超格子の結晶を作製し、溶液中でストレプトアビジンと混合することで、ストレプトアビジン-ビオチン相互作用により、ストレプトアビジン分子を封入することに成功した。RNP 封入に関しては、予め RNP 結合配列を含む合成 DNA を用いて作製した DNA-NP 超格子の結晶を作製し、溶液中で RNP と混合することで封入に成功した。LSCM により結晶断面観察を行い、内部までタンパク分子が取り込まれていることが確認できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4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 Maasa Yokomori, Hayato Suzuki, Akiyoshi Nakamura, Shigeo S. Sugano, Miho Tagawa	4. 巻 18
2. 論文標題 DNA-functionalized colloidal crystals for macromolecular encapsulation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Soft Matter	6. 最初と最後の頁 6954-6964
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D2SM00949H	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 Hayato Sumi, Noboru Ohta, Hiroshi Sekiguchi, Shunta Harada, Toru Ujihara, Katsuo Tsukamoto, Miho Tagawa	4. 巻 21
2. 論文標題 Two-step nanoparticle crystallization via DNA-guided self-assembly and non-equilibrium dehydration process	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Crystal Growth & Design	6. 最初と最後の頁 4506 - 4515
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.cgd.1c00398	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 A. Hirao, N. Tottori, M. Yokomori, M.Tagawa, S. S. Sugano, S. Sakuma, Y. Yamanishi	4. 巻 未定
2. 論文標題 Protein crystallization in microdroplets with the aid of electrically induced microbubbles	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proc. of the IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS)	6. 最初と最後の頁 未定
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -
1. 著者名 Miho Tagawa	4. 巻 2024
2. 論文標題 Crystal structure control of nanoparticle superlattices using DNA and structural analysis by small angle X-ray scattering	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 JSAP review	6. 最初と最後の頁 240401
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1109/MEMS51782.2021.9375180	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Shoko Kojima, Lidong Zhang, Chandan Kumar, Hayato Sumi, Norobu Ohta, Hiroshi Sekiguchi, Kentaro Tsuzuki, Shunta Harada, Toru Ujihara, Katsuo Tsukamoto, Miho Tagawa	4. 巻 640
2. 論文標題 The Effects of Polyethylene Glycol on the Nucleation and Growth of DNA-functionalized Gold Nanoparticles Crystals	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Crystal Growth	6. 最初と最後の頁 127740
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11470/jsaprev.240401	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 -

〔学会発表〕 計23件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 10件)

1. 発表者名 Miho Tagawa, Maasa Yokomori, Hayato Sumi, LiDong Zhang, Noboru Ohta, Hiroshi Sekiguchi, Shunta Harada, Toru Ujihara
2. 発表標題 DNA-Programmable Nanoparticle Crystallization and Structural Analysis by Small-angle X-ray Scattering
3. 学会等名 The 17th Conference of the Asian Crystallographic Association (AsCA2022) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田川美穂
2. 発表標題 DNA自己集合を利用したナノ粒子の コロイド結晶成長とX線小角散乱による構造解析
3. 学会等名 第2回マテリアル・計測ハイブリッド研究センター 若手フォーラム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 張力東, 横森真麻, 鷺見隼人, 小島瞳子, 太田昇, 関口博史, 原田俊太, 宇治原徹, 田川美穂
2. 発表標題 DNA修飾ナノ粒子の結晶成長における重水の影響
3. 学会等名 第51回結晶成長国内会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Maasa Yokomori, Shigeo S. Sugano, Noboru Ohta, Hiroshi Sekiguchi, Shunta Harada, Toru Ujihara, Miho Tagawa
2. 発表標題 DNA-functionalized colloidal crystals for encapsulating macromolecules
3. 学会等名 ICMaSS2021(International Conference on Materials and Systems for Sustainability) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Miho Tagawa, Maasa Yokomori, Yuji Maeda, Hayato Sumi, Noboru Ohta, Hiroshi Sekiguchi, Shunta Harada, Toru Ujihara
2. 発表標題 DNA-guided crystallization of nanoparticles: the effect of solvent composition on crystal structure
3. 学会等名 ICMaSS2021(International Conference on Materials and Systems for Sustainability) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Naotomo Tottori, Azusa Takao, Akiho Hirao, Akira Shinod, Akiyoshi Nakamura, Yusuke Yamada, Maasa Yokomori, Miho Tagawa, Shigeo S. Sugano, Shinya Sakuma, Yoko Yamanishi
2. 発表標題 Controlling Protein Crystallization in Nanoliter Droplets Treated by Electrically Induced Microbubbles
3. 学会等名 MicroTAS2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田川美穂, 横森真麻
2. 発表標題 DNA self-assembly によるナノ粒子の結晶化: 構造デザインとSAXS 解析
3. 学会等名 化学工学会第87年会 シンポジウム HC-12 「ダイバーシティフォーラム」
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田川美穂, 鷺見隼人, 横森真麻, 前田勇士, 太田昇, 関口博史, 原田俊太, 宇治原徹
2. 発表標題 DNAガイドのナノ粒子結晶化: 構造制御と結晶対称性を維持した収縮制御
3. 学会等名 日本物理学会第76回年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 A. Hirao, N. Tottori, M. Yokomori, M.Tagawa, S. S. Sugano, S. Sakuma, Y. Yamanishi
2. 発表標題 Protein crystallization in microdroplets with the aid of electrically induced microbubbles
3. 学会等名 The 34th IEEE Int. Conf. on Micro Electro Mechanical Systems (IEEE MEMS 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横森 真麻, 菅野 茂夫, 中村 彰良, 田川 美穂
2. 発表標題 DNAコロイド結晶を反応場として活用する試み
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横森真麻, 菅野茂夫, 中村彰良, 原田俊太, 宇治原徹, 田川美穂
2. 発表標題 分子捕捉能を有するDNA修飾金ナノ粒子結晶の開発
3. 学会等名 化学工学会第86年会
4. 発表年 2021年

1 . 発表者名 H. Sumi, T. Isogai, S. Kojima, N. Ohta, H. Sekiguchi, S. Harada, T. Ujihara, M. Tagawa
2 . 発表標題 THE OPTIMUM DESIGN OF DNA-GUIDED NANOPARTICLE SUPERLATTICES FOR DIRECT DEHYDRATION
3 . 学会等名 the 19th International Conference on Crystal Growth and Epitaxy (ICCGE-19) (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Miho Tagawa, Shoko Kojima, Hayato Sumi, Noboru Ohta, Hiroshi Sekiguchi, Shunta Harada, Toru Ujihara
2 . 発表標題 DNA-guided crystallization of nanoparticles: optimization of crystallization conditions and structure analysis
3 . 学会等名 International Conference on Materials and Systems for Sustainability (ICMaSS) 2019 (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Hayato Sumi, Noboru Ohta, Hiroshi Sekiguchi, Shunta Harada, Toru Ujihara, Miho Tagawa
2 . 発表標題 Structural stability analysis of DNA-guided nanoparticle superlattice by direct dehydration
3 . 学会等名 International Conference on Materials and Systems for Sustainability (ICMaSS) 2019 (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Shoko Kojima, Hayato Sumi, Noboru Ohta, Hiroshi Sekiguchi, Shunta Harada, Toru Ujihara, Miho Tagawa
2 . 発表標題 Effect of polyethylene glycol induced depletionattraction on DNA-functionalized nanoparticle crystalization
3 . 学会等名 Okinawa Colloids 2019 (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 田川 美穂、小島 瞳子、鷺見 隼人、西部 愛里紗、磯貝 卓巳、横森 真麻、原田 俊太、宇治原 徹、塚本 勝男
2. 発表標題 DNAガイドのナノ粒子結晶化：結晶化条件の最適化と構造解析
3. 学会等名 日本地球惑星科学連合(JpGU2019) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小島瞳子、張力東、太田昇、関口博史、原田俊太、宇治原徹、塚本勝男、田川美穂
2. 発表標題 DNA修飾ナノ粒子の結晶成長における粒子間相互作用に対するPEG添加の影響
3. 学会等名 日本結晶成長学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 張力東、小島瞳子、Karma Chandan、周幸儀、太田昇、関口博史、原田俊太、宇治原徹、塚本勝男、田川美穂
2. 発表標題 溶液の組成が DNA修飾ナノ粒子結晶の品質およびサイズに与える影響
3. 学会等名 日本結晶成長学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Lidong Zhang, Maasa Yokomori, Hayato Sumi, HsinYi Chou, Shoko Kojima, Noboru Ohta, Hiroshi Sekiguchi, Shunta Harada, Toru Ujihara, Katsuo Tsukamoto, Miho Tagawa
2. 発表標題 Effects of Sodium Chloride and Deuterium Oxide on Crystal Growth of DNA-Functionalized Nanoparticles
3. 学会等名 ICMaSS (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名	S. Kojima, L.D. Zhang, H. Sumi, N. Ohta, H. Sekiguchi, S. Harada, T. Ujihara, K. Tsukamoto, M. Tagawa
2. 発表標題	Polyethylene Glycol Additive controlled crystallization of DNA-Functionalized Nanoparticles
3. 学会等名	ICMaSS
4. 発表年	2023年

1. 発表者名	Miho Tagawa, Chandan Kumar, Sakiko Nakada, Ryugo Tero, Shunta Harada, Toru Ujihara
2. 発表標題	Lipid lateral diffusion and phase transition in supported lipid bilayers: Their influence on DNA-functionalized nanoparticle adsorbates
3. 学会等名	34th 2023 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (From Micro & Nano Scale Systems to Robotics & Mechatronics Systems)
4. 発表年	2023年

1. 発表者名	田川美穂, 張力東, 小島瞳子, 鷺見隼人, 横森真麻, 太田昇, 関口博史, 原田俊太, 宇治原徹
2. 発表標題	DNA修飾ナノ粒子の結晶化とX線小角散乱による構造解析
3. 学会等名	日本結晶学会年会 (招待講演)
4. 発表年	2023年

1. 発表者名	田川美穂, 張力東, 鷺見隼人, 原田俊太, 宇治原徹, 太田昇, 関口博史
2. 発表標題	DNA自己集合を利用したナノ粒子のコロイド結晶成長とX線小角散乱による構造解析
3. 学会等名	日本セラミックス協会第36回秋季シンポジウム (招待講演)
4. 発表年	2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 導入装置、高分子の細胞導入方法、DNAナノ粒子結晶及びDNAナノ粒子結晶封入体の製造方法	発明者 山西陽子、田川美穂、菅野茂夫、黄文敬、横森真麻	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/35332	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 ナノ粒子結晶及びその製造方法	発明者 田川美穂、横森真麻	権利者 名古屋大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-169737	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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