

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K19918

研究課題名(和文) 外部刺激により形成・消失を制御可能な人工オルガネラの創成と分子ロボットへの実装

研究課題名(英文) Construction of stimuli-responsive artificial organelles for molecular robots

研究代表者

佐藤 佑介 (SATO, Yusuke)

東北大学・学際科学フロンティア研究所・助教

研究者番号：60830560

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)：外部刺激により形成・消失を制御可能な区画構造(人工オルガネラ)の構築を目的として、配列設計に従って液-液相分離を示すDNAナノ構造を設計した。温度変化に応じた液-液相分離により形成・消失する液体状凝集体に異種複数の酵素タンパク質を集積することに成功した。また、脂質膜の相分離に着想を得た二次元界面上でのドメイン型構造の形成も試みた。塩基配列が合理設計されたDNAナノ構造を設計することで、様々な模様の区画(パターン)を有する相分離マイクロカプセルを形成することに成功し、形成パターンの制御やカプセル構造と酵素分子との反応により、カプセル構造を消失させることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNAを利用することで、ナノ・マイクロ構造の構築にとどまらず、情報処理デバイスや刺激に応答して変形するデバイスを作ることができる。したがって、このようなDNAデバイスとDNAで形成されたオルガネラおよびカプセル構造を組み合わせることで、将来的には、刺激に応答した運動や、標的を認識してカプセルの中身を放出するなど、様々な機能を持った人工オルガネラ・カプセル構造への発展が期待され、医学、工学など多くの研究分野への寄与が見込める。

研究成果の概要(英文)：This work aimed to construct artificial organelles that can be assembled and disassembled in response to external stimulation. DNA nanostructures capable of exhibiting liquid-liquid phase separation (LLPS) were designed. The formation of the DNA droplets in response to specific DNA strands was confirmed. I succeeded in accumulating multiple functional enzymes into DNA droplets formed via LLPS at specific ambient conditions. We also attempted to construct DNA microstructures with domains, which was inspired by the domain formation of lipid bilayer via lateral phase separation. The formation of the phase-separated capsule-like structures was achieved. Regulating the formed patterns and the degradation of the capsule structures by enzymatic reactions were also demonstrated.

研究分野：分子ロボティクス, 生物物理学

キーワード：DNAナノテクノロジー 液-液相分離 分子ロボティクス パターン形成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生命システム(細胞)は、マイクロサイズの空間内・界面上で多種多様な化学反応が独立して同時並行で進行している複雑な分子システムである。細胞内小器官(オルガネラ)や脂質ラフト仮説として提唱されているような区画構造は、細胞の複雑な機能を実現する上で重要な役割を担っていると考えられている。近年の研究により、一部のオルガネラは、環境変化や外部刺激に応じた相分離現象により動的に形成・消失していることが明らかとなっている。また、人工細胞膜モデルにおいて、温度変化に応じた脂質膜の二次元相分離により、ドメインが形成されることが知られている。オルガネラの形成においては、特定の分子を必要に応じて集積し局所的に濃度を上昇させることで、高効率な化学反応が可能になることが示されている。また、細胞膜ドメインにおいても、特定の分子群を集積させることが膜を介した機能発現に関与すると考えられている。

細胞のような分子システムを人工的に構築することは、工学や生命科学における究極的な目標の一つである。人類が手にする新たなテクノロジーとして国内外で注目を集めている分子ロボティクスでは、生体分子を材料に様々な分子機械を構築・統合することにより、人工分子システム(分子ロボット)の構築が遂行されている。従来の分子ロボット研究では、脂質膜小胞(リポソーム)などの筐体に分子デバイスを封入して機能させるという手法が採用されてきた。しかし、細胞のように、機能的区画構造を外部刺激に応じて形成・消失させるという機能は、分子ロボティクスにおける課題の一つとなっていた。

2. 研究の目的

本研究では、細胞型分子ロボット(大きさ:10~50 μm)において、外部刺激に応じて形成・消失する人工オルガネラを構築することを目的とした。これを通して、生命システムに見られるような多様な機能的区画構造を自在に制御するための基本的方法論を確立し、複雑な分子システム構築の道筋を示すことを目指して研究を開始した。

3. 研究の方法

本目的を達成すべく、(1)相分離により形成される液滴型オルガネラ、および(2)脂質膜の二次元相分離に着想を得たドメイン型オルガネラの構築を検討した。両手法ともにDNAナノテクノロジーによるアプローチを採用した。DNAナノテクノロジーでは、DNAの塩基配列設計により任意形状のナノ構造を作製することができる。また、ナノ構造間の相互作用も調整可能である。そこで、過去に開発したDNAナノ構造の液-液相分離の制御技術(Sato et al., Science Advances 6, saba3471 2020)を両手法に発展させる方策をとった。

方法(1)において、液-液相分離により形成されたDNA液滴に多段階の化学反応(カスケード反応)を示す酵素群を集積させて反応効率を上昇させ、光照射による液滴形成・消失の制御を試みた。集積させたい酵素に配列設計した短鎖DNAを修飾し、配列特異的な相互作用による液滴への集積方法を試みた。また、光制御においては、光応答性人工塩基をDNAに組み込む事でDNAの二重らせん形成を制御することを試みた。

方法(2)において、液-液相分離を二次元界面上、具体的には油中水滴界面上で誘起させることで、ドメイン型オルガネラを構築することを検討した。油中水滴界面へDNAナノ構造を静電相互作用により吸着させる方法を採用した。DNAは負に帯電した高分子であるため、正に帯電した両親媒性分子を用いることで、油中水滴界面への吸着が実現されると考えた。そして、界面上でのDNAナノ構造の側方相分離により、ドメインを有するカプセル状の構造が形成されると想定した。そして、構造の形成・消失は、温度変化による形成、および酵素による分解反応を試みた。

4. 研究成果

(1)相分離により形成される液滴型オルガネラの構築と形成・消失制御

DNAナノ構造の液-液相分離をリポソーム内で形成させることに成功した(図1a)。また、相分離により形成された液滴の内部に、2種類の酵素(グルコースオキシダーゼとカタラーゼ)を集積させることにも成功した(図1b)。また、カスケード反応の進行により蛍光を発する分子を用いて検証したところ、液滴内に集積された酵素を含む溶液が活性を損なわずにカスケード反応を示すことを実証した。その一方、光(紫外光)による液滴の形成・消失を制御するための条件と酵素が活性を維持する条件を両立することが困難であることが明らかとなった。そのため、分子の反応ネットワークを設計し、分子回路を用いた制御方法を新たに検討した。分子回路から生成されるDNA分子により、液-液相分離を誘起し液滴を形成可能であることが確認された。上記の成果から、分子反応ネットワークで自律的に形成・消失を制御可能な人工オルガネラ構築

のための基礎的な知見を得ることができた。

(2) 2次元相分離に着想を得たドメイン型オルガネラの構築と形成・消失制御

配列が直交した2種類のDNA ナノ構造を油中水滴界面上に吸着させ、温度変化により液-液相分離を誘起することで、多様なドメイン(パターン)を有するカプセル型の構造を形成することに成功した。また、界面上に形成されるパターンを、DNA ナノ構造の混合比を調節することで変化させることに成功した(図 2a)。さらに、このカプセル型構造はリポソーム内側にも形成可能であることを実証し、新規な膜裏打ち構造へと発展可能なことを示した(図 2b)。そして、形成されたドメインを有するカプセル型構造は水溶液中に取り出すことが可能であり、酵素反応により消失させられることを実証した(図 2c)。以上の成果は、脂質膜の相分離で見られるようなドメイン構造を DNA という可制御性の高い分子で構築する基本的な方法論を示すものである。この点は、当初の計画では想定していなかった成果であり、機能性分子をドメイン部分に集積させることで、細胞型分子ロボットにおける新規筐体へと発展することが期待される。

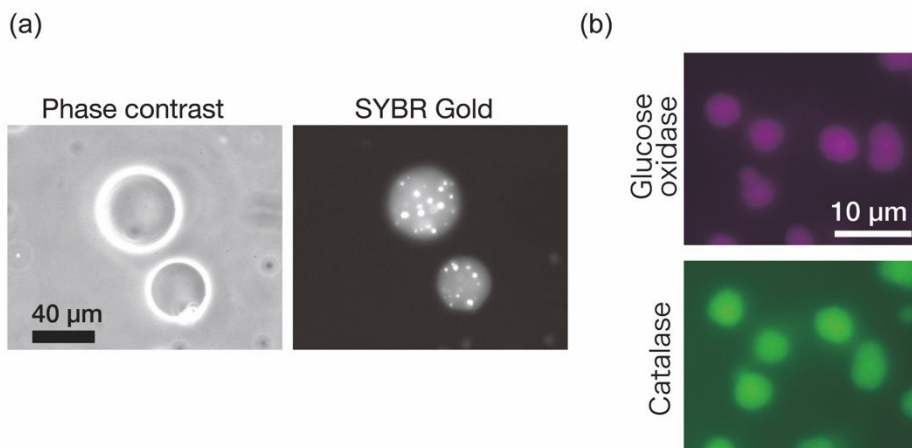


図 1 : 液滴型オルガネラ (a) リポソーム内液-液相分離により形成された DNA 液滴。(b) DNA 液滴に集積された蛍光標識酵素

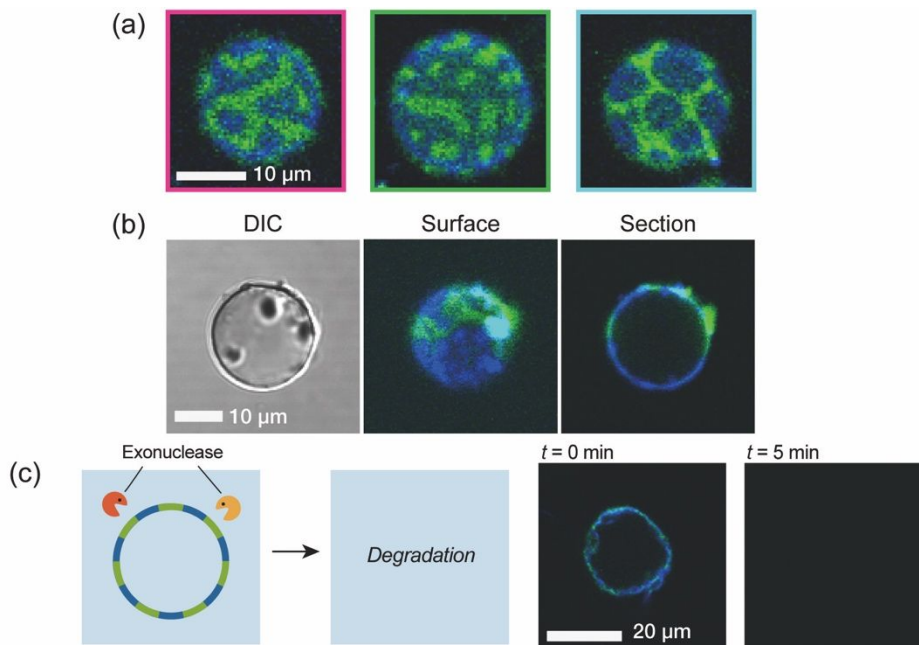


図 2 : 相分離 DNA カプセル (a) 油中水滴界面上に形成された様々なドメイン構造。(b) リポソーム内側膜上に形成された相分離 DNA カプセル。(c) 酵素反応における相分離 DNA カプセルの消失。図は Sato et al., JACS Au 2, 159-168 2022 より改変。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sato Yusuke, Takinoue Masahiro	4. 巻 140
2. 論文標題 Construction of Cell-like Molecular Robots Based on DNA Nanotechnology	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of The Institute of Electrical Engineers of Japan	6. 最初と最後の頁 582 ~ 584
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1541/ieejjournal.140.582	査読の有無 無
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 Sato Yusuke, Takinoue Masahiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Pattern Regulation of DNA Hydrogels Formed by Lateral Phase Separation of DNA Nanostructures on Water-in-Oil Droplet Interfaces	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ChemRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26434/chemrxiv.14245532.v1	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 Sato Yusuke, Suzuki Yuki	4. 巻 -
2. 論文標題 DNA nanotechnology provides an avenue for the construction of programmable dynamic molecular systems	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophysico.bppb-v18.013	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 Sato Yusuke, Takinoue Masahiro	4. 巻 2
2. 論文標題 Capsule-like DNA Hydrogels with Patterns Formed by Lateral Phase Separation of DNA Nanostructures	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JACS Au	6. 最初と最後の頁 159 ~ 168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacsau.1c00450	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Yusuke Sato, Masahiro Takinoue
2. 発表標題 Pattern formation on capsule-like DNA hydrogels induced by lateral phase separation of DNA nanostructure
3. 学会等名 The 27th International Conference on DNA Computing and Molecular Programming (DNA 27) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤佑介, 瀧ノ上正浩
2. 発表標題 DNAナノ構造の側方相分離と細胞サイズ相分離DNAベシクル
3. 学会等名 第5回分子ロボティクス年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤佑介, 瀧ノ上正浩
2. 発表標題 側方相分離が誘起するカプセル様DNAハイドロゲル表面のパターン形成
3. 学会等名 第59回生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤佑介, 瀧ノ上正浩
2. 発表標題 DNA ナノ構造の液-液相分離による液滴形成と二次元界面への展開
3. 学会等名 「細胞を創る」研究会13.0
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤佑介
2. 発表標題 Toward the construction of artificial organelles with controllability based on liquid-liquid phase separation of DNA nanostructures
3. 学会等名 第58回生物物理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Guilhem Mariette, Nicolas Lobato-Dauzier, Robin Deteix, Meihui Zhang, Shu Okumura, Yusuke Sato, Masahiro Takinoue, Teruo Fujii, Anthony J. Genot
2. 発表標題 Mapping the phase diagram of DNA hydrogels with droplet microfluidics
3. 学会等名 MicroTAS2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Emilie Belot, Yannick Tauran, Yusuke Sato, Masahiro Takinoue, Arnaud Brioude, Teruo Fujii, Anthony J. Genot
2. 発表標題 DNA hydrogels as a scaffold for organs-on-chips: Study of buoyancy and sedimentation of microbeads in DNA gels
3. 学会等名 MicroTAS2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 佐藤佑介, 瀧ノ上正浩, (白木 賢太郎 (編))	4. 発行年 2020年
2. 出版社 東京化学同人	5. 総ページ数 400
3. 書名 相分離生物学の全貌 (現代化学増刊46)	

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

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