

令和 2 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19922

研究課題名（和文）光制御DNAナノロボットの構築と細胞の物理特性測定への応用

研究課題名（英文）Construction of optically-controlled DNA nano-robot and its application to cell measurement

研究代表者

小倉 裕介（Ogura, Yusuke）

大阪大学・情報科学研究科・准教授

研究者番号：20346191

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）：物理特性を計測可能な光制御DNAナノロボットのための技術基盤を開発した。光によって伸縮する構造をもつDNAナノロボットを設計・作製し、光照射実験により、繰り返し駆動することを確認した。空間局所的に駆動させることも可能であった。また、ナノロボットを効率的に活用するための手法として、光によるDNAゲルの形成・分解操作を実証した。DNAゲルのパターン化や、ゲル内物質の移動性変調など、ナノロボットの配置制御への適用可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ナノロボットは細胞などの生体解析・制御のツールとして期待されている。本研究の手法は、外部からの光信号に従った刺激を対象に与えながら、その応答を計測できる可能性があり、物理特性に基づく細胞スクリーニングの精度向上などに資すると考えられる。また、伝搬光のサイズはサブ μm に制限されるが、自律性や分子選択性を持つナノロボットの介在によりナノ領域の計測・制御を行うアプローチは光の利用方法の新しい方向性を提示する。

研究成果の概要（英文）：We developed fundamental techniques to construct optically-controlled DNA nano-robots for measuring physical characteristics. A DNA nano-robot which can expand and contract was designed and fabricated. Repeated or local drives by light irradiation was confirmed. We also demonstrated the synthesis and decomposition of DNA hydrogels according to light signals. Experimental results suggest that some techniques, such as patterning of DNA hydrogels and control of object mobility in the hydrogels, are applicable to arrangement of DNA nano-robots.

研究分野：光DNA計算，情報フォトンクス

キーワード：ナノロボット 光制御 DNAゲル 消光分子

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

DNAは選択特異的な反応特性に基づく自己組織化能力や自律的反応能力を有している。また、様々な分子とのインタラクションが可能なることから、ナノロボットの材料として注目されている。DNAナノロボットの研究はDNAピンセット[1]と呼ばれるDNAナノマシンが発表されたことを端緒として活発になった。2017年には、二本足二本腕で荷物としての分子を運搬するDNAロボットが報告されている[2]。これは、歩くこと、運ぶことなど複数の機能を集積したことが特筆される。しかし、このような複数機能のDNAナノロボットはまだ少なく、特に、ナノロボットの動作により発生する力で細胞を刺激し、その物理特性を計測することに焦点を当てた研究はなかった。

研究代表者は伝搬光を用いてナノスケールの分子情報を取得・処理する技術(フォトニックDNAコンピューティング)の開発を進めてきた。これは、フォトニクス技術とDNA技術の連携により、ウェットな環境内で分子情報の取得・処理・行動を可能にするスキームである。DNAスキップホルド(足場)論理はその代表例であり、DNA足場上への蛍光分子の精密配置と、フェルスター共鳴エネルギー移動(FRET)を利用して、DNAを入力、蛍光を出力とする論理演算を実行する[3]。一方、DNAナノマシン[4]やDNA放出制御[5]など、光でDNA構造変化を誘導する手法も開発してきた。DNA構造変化を力学的刺激の源として捉え、生体情報取得手法と組み合わせることにより、細胞に対して能動的に刺激を与えながら物理特性を計測するアクティブな手法を構築できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、細胞の物理特性を計測可能な光制御DNAナノロボットの技術基盤を構築することを目的とする。その特性や性能を示すとともに、技術課題を明らかにする。

光制御ナノロボットはDNA構造体で構成される。細胞に対して物理的刺激を与え、細胞からの応答を捉える。また、その応答に応じて、蛍光信号の送出や分子の放出などの行動を起こす。その特徴は、ナノロボットの構成、操作、分解などの指定やナノロボットが得た情報の発信に光を利用することにある。この方式により、ナノロボットと外部(マクロ世界)との情報通信やエネルギーの供給が実現される。したがって、並列、局所的、遠隔的に所望のタイミングでナノロボットへのアクセスが可能となり、時空間制御が容易に行える。

光を用いた分子制御手法は多数の例が報告されているが、刺激・検出・判断・行動などの機能を集積した光制御DNAナノロボットの作製にまで高めた例はない。本研究では、構成法や制御様式などを検討することで、生体の計測、制御のためのナノロボット構築へつながる手法の獲得をめざす。

3. 研究の方法

本研究の内容は、(1)ナノロボットの作製と評価、および、(2)ナノロボット高密度配置のための技術開発に大別される。

(1)ナノロボットは、細胞へ力学的刺激を与える機能を得るため、単位構造体の協調的な遷移により力を発生させるDNA構造とする。具体的にはヘアピン形状のDNAを用いて、その開閉によりバネのように伸縮させる。刺激に対する応答は蛍光強度の変化として計測する。これらの機能を得るためのナノロボットの構成材料となるDNAの配列を設計する。溶液中で光による構造変化を確認するとともに、繰り返し制御性などの特性を検証する。次に顕微鏡観察下での実験を実施し、光を用いた局所的な制御能力などを実証する。

(2)ナノロボットを効率的に活用するためには、測定対象となる細胞へナノロボットを高密度で配置する必要がある。そこで、ナノロボットを包含したパターン化DNAゲルを作製し、目的の位置へ運搬した後に、DNAゲルを分解してナノロボットを取り出すことを想定する。DNAゲルの作製と分解は光応答性分子によるDNA結合制御手法を適用する[5]。まず、光の照射パターンに応じてDNAゲルの作製と分解が行われることを確認する。さらに、ゲルゾルの変化に伴って粘性を変化させることにより、捕捉した物質の移動性制御などが行えることを示す。

4. 研究成果

(1) ナノロボットの作製と評価

対象に力学的作用を与えることを狙った光制御DNAナノロボットを設計した。これは4種類の一本鎖DNAから構成される。そのうちの一つは、ヘアピン形状をもつヘアピンDNAである。ヘアピンDNAのループ構造は特定の塩基配列を持ったDNAの有無によって開閉される。これは構造の伸縮につながり、力学的作用がもたらされると期待される。また、消光分子であるBlack Hole Quencher (BHQ)を修飾したDNAを組み入れている。BHQに励起光を照射すると熱に変換される。光による局所的なDNA反応制御が可能となり、空間制御性が得られる。

実験では、BHQ励起光としてBHQの最大吸光波長534nmと合わせ、波長532nmの半導体励起固体レーザー(DPSSレーザー: Cobolt 04-01 SeriesSamba 532nm, 出力100mW)を使用した。試料面における光パワー密度は 1.5×10^9 (W/m²)である。ナノロボットの構造検出には、フェルスター共鳴エネルギー移動(FRET)を利用する。ドナーとアクセプタの蛍光分子として、Alexa405とAlexa488をそれぞれ用いた。蛍光信号は光ファイバ(Oceanoptics, P400-2-SR)を通し、分光器(B&W TEK, Exemplar LS)によって計測した。

まずは光による BHQ 付き DNA の結合・解離制御を検証した。BHQ 付き DNA を加える前と後のそれぞれについて、BHQ 励起光を照射する前後の蛍光信号を測定した。その結果、BHQ 付 DNA を加える前は、励起光の照射の有無に関わらず蛍光強度がほぼ一定であったのに対して、BHQ 付 DNA を加えた後は励起光の照射によって蛍光強度が変化した。これは、BHQ 付き DNA の結合が BHQ 励起光の照射によって制御されていることを示している。

次に、この構造変化が繰り返し生じることを確認するため、BHQ 励起光の照射と停止を反復し、蛍光信号の時間変化を計測した。結果を図 1 に示す。蛍光強度が BHQ 励起光照射により上昇していることが読み取れる。この蛍光上昇は FRET によるものであり、ナノロボットが短縮構造に遷移したことを示す。また励起光停止中の蛍光低下は FRET 信号の消失を表しており、伸長構造化したことを表している。この蛍光変化は光照射するごとに生じており、光により DNA ナノロボットが駆動されていることを確認できた。

また、DNA ナノロボットの局所的駆動を確認するため、蛍光顕微鏡に BHQ 励起光照射系を導入し、蛍光観察を行なった。具体的には、ナノロボットを含む溶液をスライドガラスに滴下し、その一部分に BHQ 励起用の光スポットを照射して蛍光観察を行なった。その結果、励起光照射位置付近でのみ蛍光強度に変化が見られた。これにより、光制御 DNA ナノロボットが空間制御可能であることを確認できた。

(2) ナノロボット高密度配置のための技術開発
 ナノロボットの配置に利用するための、光制御可能な DNA ゲルを作製・検証した。DNA ゲルは Y 型 DNA 構造体 (Y-DNA) と直線型 DNA (L-DNA) が連鎖結合することによって形成される。これらの結合は別の 1 本鎖 DNA (C-DNA) によって制御する。さらに、光により DNA ゲルの形成と分解を誘起するため、消光分子を DNA に修飾している。消光分子を励起することによって熱が発生し、その部分の DNA が解離することで形成や分解の反応が開始される。DNA ゲルの形成・分解は励起光の空間的強度分布に依存するため、DNA ゲルの μm スケールでのパターン化が可能である。これらを実現する反応系を設計した。

DNA ゲル分解の実験では、BBQ-650 (吸光ピーク波長: 650nm) を L-DNA に修飾し、波長 660nm のレーザーを用いて励起した。光を励起光として DNA 溶液に照射した。また、観察のために 2 本鎖 DNA に対して特異的に結合する蛍光分子 DAPI (励起ピーク波長: 360nm, 蛍光ピーク波長: 460nm) を DNA 溶液に混合した。図 2 に DNA 溶液に照射した光パターンと、各光パターンで形成された DNA ゲルの蛍光観察像を示す。照射パターンに対応して蛍光強度が変化しており、局所的に DNA ゲルが分解されていることがわかる。なお、DNA ゲルのパターンは μm オーダーで制御することが可能であった。一方、これまでに同様の方法で、DNA ゲルの形成が行えることを示している。そこでこれら 2 つを組み合わせ、2 つの消光分子を利用した DNA ゲルゾルの可逆変換反応系を設計し、その機能を確認した。この手法により、ナノロボットを閉じ込め、必要に応じて取り出して利用することが可能になる。

ゲル変換に伴って粘性が変化するため、捕捉物質の移動度を制御することができる

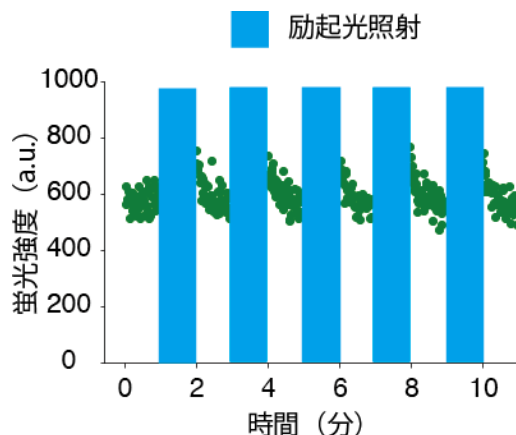


図 1 繰り返し制御における応答。

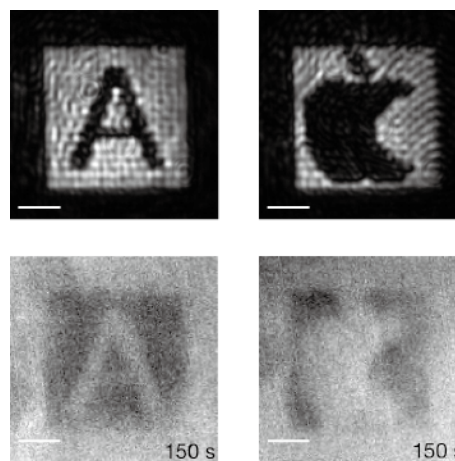


図 2 パターン化 DNA ゲルの形成。上：光パターン，下：DNA ゲル。スケールバー：10 μm 。

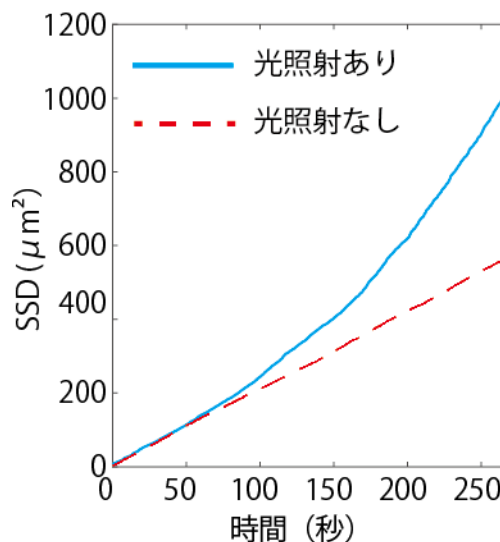


図 3 ビーズ移動距離の時間変化。

と考えられる。そこで、直径 $1\ \mu\text{m}$ のポリスチレンビーズをゲルに内包させ、ゲルの分解によるビーズの移動度変化を計測した。励起光強度を変化させた時のビーズの移動距離の二乗和 (Sum of Squared Displacements; SSD, 移動度の指標) を図 3 に示す。光照射によって移動度が増加している。光強度による変化も確認された。この結果は光パターン設計により、ゲル内の物質の移動を制御できることを示唆している。

当初は上で述べた技術を統合することで細胞の物理特性測定への挑戦を想定していたが、研究期間中に実施することができなかった。しかし、ナノロボットの駆動や、配置のための基礎技術などを開発することができた。DNA ナノロボットにおける外部光信号の活用の方法を提示している観点からも本成果は大きな意味を持つ。刺激と計測の機能を集積した DNA ナノロボットへの一歩が踏み出された。

参考文献

- [1] B. Yurke et al., *Nature* 406, 605 (2000).
- [2] A. J. Thubagere et al., *Science* 357, eaan6558 (2017).
- [3] T. Nishimura et al., *Appl. Phys. Lett.* 101, 233703 (2012).
- [4] Y. Ogura et al., *Appl. Phys. Express* 2, 025004 (2009).
- [5] Y. Ogura et al., *Biomed. Opt. Express* 7, 2142 (2016).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Suguru Shimomura, Takahiro Nishimura, Yusuke Ogura, Jun Tanida	4. 巻 9
2. 論文標題 Optical decomposition of DNA gel and modification of object mobility on micrometre scale	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19858
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-56501-z	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9件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Suguru Shimomura, Takahiro Nishimura Yusuke Ogura, Jun Tanida
2. 発表標題 Object movement change in optical decomposition of DNA gels
3. 学会等名 The 9th Korea-Japan Workshop on Digital Holography and Information Photonics（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuke Ogura, Riki Yamada, Takahiro Nishimura, Yosuke Tamada, Takashi Murata, Jun Tanida
2. 発表標題 Superresolution bioimaging by subdiffraction-limit pattern illumination
3. 学会等名 The 9th Korea-Japan Workshop on Digital Holography and Information Photonics（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuke Ogura, Jinya Inoue, Suguru Shimomura, Takahiro Nishimura, Jun Tanida
2. 発表標題 Integration of DNA and Photonics for Computing, Sensing, and Fabrication
3. 学会等名 15th International Conference on Polymers and Advanced Materials (ICFPAM2019)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田理己, 小倉裕介, 西村隆宏, 玉田洋介, 村田隆, 谷田純
2. 発表標題 サブ回折限界光スポット走査に基づく超解像ライブイメージング
3. 学会等名 Optics & Photonics Japan 2019 (OPJ2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田理己, 西村隆宏, 小倉裕介, 谷田純
2. 発表標題 光熱駆動DNAナノマシンの空間光制御
3. 学会等名 第80回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小倉裕介
2. 発表標題 ホログラフィによるサブ回折限界スポット生成とバイオイメージング応用
3. 学会等名 第2回極みプロジェクトシンポジウム / 第6回イメージング数理研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 下村優, 西村隆宏, 小倉裕介, 谷田純
2. 発表標題 光によるDNAゲルの形状制御とDNAマイクロマシンへの展開
3. 学会等名 第19回情報フォトンクス研究グループ研究会 (秋合宿)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山田理己, 西村隆宏, 小倉裕介, 谷田純
2. 発表標題 無輻射失活過程に基づく光駆動型DNAナノマシン
3. 学会等名 情報フォトニクス研究グループ第17回関西学生研究論文講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Suguru Shimomura, Takahiro Nishimura, Yusuke Ogura, Jun Tanida
2. 発表標題 Patterning of DNA hydrogels by photodecomposition with visible light
3. 学会等名 Microfluidics, BioMEMS, and Medical Microsystems XVII, SPIE BIOS 2019 (国際学会)
4. 発表年 2018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
研究 分担者	山田 憲嗣 (Yamada Kenji) (70364114)	大阪大学・医学系研究科・招へい教授 (14401)	
研究 分担者	西村 隆宏 (Nishimura Takahiro) (10722829)	大阪大学・工学研究科・助教 (14401)	