

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K20404

研究課題名（和文）人工機械受容チャネルの創製と二次元界面における力学的精密操作

研究課題名（英文）Mechanochemical tuning of artificial mechanosensitive channels at the two-dimensional interface

研究代表者

石川 大輔 (Ishikawa, Daisuke)

東京工業大学・物質理工学院・助教

研究者番号：00722919

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）：本研究では、力の感知と細胞内シグナルへの変換機構における、力学的刺激による機械受容チャネル駆動と付随して起こる分子変換反応の人工的構築を目指した。DNAオリガミで新規作製した、四隅が柔らかく変形するDNAナノチャネルは水溶液中において柔らかく変形することが透過電子顕微鏡観察から視覚的に確認でき、したがって力学的な力によって変形し得ることが示唆された。本研究に関連して、部分的な疎水基の導入により両親媒化したDNAオリガミ構造体を油水界面集積させることで、油中水滴カプセルの形成とカプセル間のイオン輸送に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

力学的刺激の機械受容チャネルを介した生体に対する作用の解明が、「メカノバイオロジー」という学問領域として進められている。より体系的かつ物理的に力学的刺激が生体を与える影響を調査し、理学・作業療法、医学応用への科学的基盤を強固にするためには、誰にでも扱えるシンプルなモデルを無生物でin vitroに構築することが重要である。本研究で提示するDNAナノチャネルは細胞膜中の機械受容チャネルの力学応答を二次元界面膜という無生物構造体で再現することを可能にし、細胞の力覚応答機構の解明に貢献する。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to artificially construct a molecular conversion system accompanied with the drive of mechanosensitive channels by external mechanical stimuli. Using the structural flexibility of single-stranded DNA and the rigidity of the double helix, DNA nanochannels were designed and created by DNA origami. Transmission electron microscopy visually showed that the DNA nanochannels were softly deformed in aqueous solution, which suggested that it could be deformed by external mechanical force. In association with this study, the DNA nanoplates amphiphilized by the introduction of a partially hydrophobic group led to the formation of water-in-oil droplet capsules and ion transport between the capsules.

研究分野：界面科学

キーワード：DNAナノテクノロジー メカノケミストリー 機械受容チャネル 界面膜 力学的チューニング

## 1. 研究開始当初の背景

細胞は、多種多様な力学的刺激(機械刺激)を識別して応答する細胞力覚という機能を有している。力学的刺激は、細胞自体の機械特性、細胞外基質の硬さや組成、両者の相互作用などを介して細胞の成長や増殖、死を調節しており、過剰な力学的刺激による細胞の損傷は疾患や病態を引き起こす原因となる<sup>[メカノバイオロジーからメカノメディシンへ、医歯薬出版(2016)]</sup>。したがって、細胞力覚機構の解明は、生体に関する学術的探究のみならず、理学療法や創薬、再生医療などに対し物理的根拠に基づいた知見や技術を提供し得る重要な社会的意義を有している。細胞力覚発現の出発点となる機構は、力の感知と細胞内シグナルへの変換である。力の感知はメカノセンサーと呼ばれる機械受容チャネルタンパク質と非チャネル型タンパク質が担い、細胞内で互いに複雑に連結されている。印加された力学的刺激は細胞膜の伸展・圧縮や内部における引張力に変換されるが、機械受容チャネルの駆動とそれに付随する生化学反応は同時多発的に発現するため、細胞内で起こる各種反応の相関については未知の領域が非常に多く、その解明が望まれている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、二次元界面膜において、マクロな力学的刺激でナノスケールの人工機械受容チャネルの構造を精密に制御し、それが水相中触媒反応と連動する細胞様階層的機能を人工的に構築することである。具体的には、DNAの柔軟な塩基配列設計性によるナノ構造形成能(構造DNAナノテクノロジー)を駆使し、両親媒化したDNAナノ構造体の油水界面集積による構造形成と機能発現として(i)両親媒化DNAナノプレートを用いたイオンチャネル機能を有する油中水滴カプセルの開発を、またナノスケールの人工機械受容チャネルとして(ii)力学的に開閉可能なDNAナノチャネルの開発を行った。

## 3. 研究の方法

本研究の実験手順を以下に示す。

### [(i), (ii) 共通の手順]

- (1) DNAオリガミ設計ソフトcaDNAno<sup>[Nucleic Acids Res. 37, 5001 (2009)]</sup>を用いて、DNAナノ構造体(DNAナノプレートおよびDNAナノチャネル)を設計した。
- (2) 設計に基づいて合成したステープル1本鎖DNAとスキュフォールド1本鎖DNAを加熱・冷却処理(アニーリング)することでDNAナノ構造体を得た。DNAナノ構造体の形状は原子間力顕微鏡(AFM)あるいは透過電子顕微鏡(TEM)観察によって確認した。
- (3) DNAナノ構造体に両親媒性を付与するため、その片面のみに疎水基を導入した。その際、疎水基の選択的な導入を可能にするため、正規直交配列<sup>[DNA Comput. 4848, 119 (2008)]</sup>という、自身の相補鎖以外とは二重らせんを形成しない23塩基の1本鎖DNAを利用した。疎水基導入の成否はアガロースゲル電気泳動および共焦点レーザー顕微鏡観察から評価した。

### [(i) 両親媒化DNAナノプレートを用いた油中水滴カプセルの開発]

- (4) 両親媒化したDNAナノプレートを含むバッファ溶液とミネラルオイルを混合して油中水滴エマルジョンを作製した。共焦点レーザー顕微鏡によってDNAナノプレートの油水界面集積状態を蛍光観察し、またイオンチャネルの評価はハンドメイドマイクロデバイスを用いてイオン電流を測定することで行った。

## 4. 研究成果

### (i) 両親媒化DNAナノプレートを用いたイオンチャネル機能を有する油中水滴カプセルの開発

発表論文: D. Ishikawaら, *Angew. Chem. Int. Ed.* **58**, 15299 (2019).

DNAオリガミで作製したDNAナノプレートAFMで観察したところ、設計通りの形状が形成されていることが確認された(図1a,b)。また疎水基の導入をアガロースゲル電気泳動から評価したところ、疎水基の本数が増加するにつれて両親媒化DNAナノプレートのゲル中の移動が制限された。これは疎水基の本数増加によってDNAナノプレート同士が凝集し、より大きな粒子となったためと考えられる。

両親媒化した孔無しおよび孔有りDNAナノプレートの水溶液をミネラルオイルに加え、油中水滴(W/O)マイクロエマルジョンを作製し、これを共焦点レーザー顕微鏡で蛍光観察した。その結果、孔の有無にかかわらず、疎水基を含まないナノプレートは水滴中に均一に分散し、両親媒化したものは油水界面に局在することが明らかとなった(図1c,d)。また孔無しおよび孔有りいずれの両親媒化DNAナノプレートは、液滴半径の $6.2 \pm 1.5\%$ (平均±標準偏差)の厚さで油水界面近傍に局在したが、両者の水滴内部の蛍光強度には差が生じた(図1e,f)。そこで、両親媒化DNAナノプレートの油水界面への局在化の度合いを定量的に評価するために、液滴界面の蛍光強度と水滴内部の蛍光強度、両者の比(localisation value)を計算した(図1g,h)。この比が高いほど界面に局在するナノプレートの数が多く、また比が1より低い場合、DNAナノプレートは界面に局在化せず内部に分散していることを意味する。結果、両親媒性の孔無しDNAナノプレートは孔有

りのものよりも比が高く、したがって界面に局在化しやすいことが明らかとなった。これは、両方のDNAナノプレートの剛性の差によって説明され得る。すなわち、孔有りDNAナノプレート中央の大きな孔は、DNAナノプレートの剛性低下と疎水基の表面密度低下による油相への濡れ性の減少をもたらし、その結果、孔有りDNAナノプレートが凝集体を形成し、水中に分散した原因となったと考えられる。

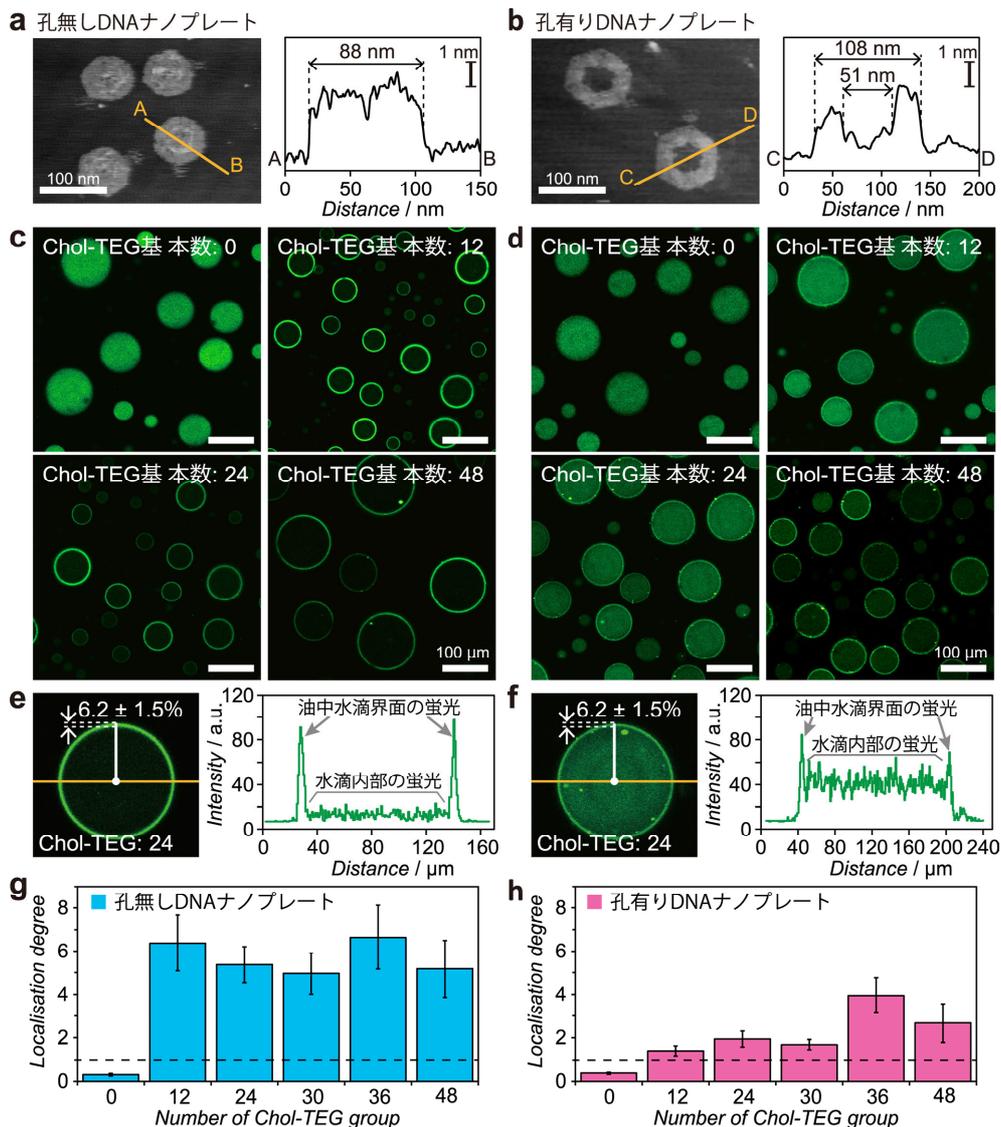


図1 (a) 孔無し(b) 孔有りDNAナノプレートのAFM像。疎水基の導入本数を変えた場合の(c), (e) 孔無しおよび(d), (f) 孔有りDNAナノプレートを含む油中水滴の共焦点レーザー顕微鏡像とその断面の蛍光強度。DNAは緑色蛍光試薬(SYBR Gold)で染色されている。(g) 孔無しと(h) 孔有りDNAナノプレート油中水滴の、平均界面蛍光強度と平均内部蛍光強度の比。この値が大きいほどDNAナノプレートが界面に局在していることを示している。

さらに、DNAナノプレートによって形成された油中水滴マイクロカプセルの機能化を実証するために、液滴安定剤およびイオンチャンネルとして孔有りDNAナノプレートを設計している。そこで、イオンチャンネル機能を検証するため、24本の疎水基を導入した有孔DNAナノプレートで2つの水滴を安定化し、両者間のイオンチャンネル電流を液滴接触法<sup>[Sci. Rep. 3, 1995 (2013)]</sup>で測定した(図2a,b)。その結果、孔有りDNAナノプレートで2つの液滴を作製し、両者を接触させたときのみ、ステップ状のイオンチャンネル電流が計測された(図2c)。一方、孔無しDNAナノプレートを2つの液滴の少なくとも1つに使用した場合、イオン電流は計測されなかった(図2d,e)。したがって、孔有りナノプレートに設けたチャンネルによって、液滴同士の接触によるイオン輸送が可能であることを明らかとなった。

ここで、イオンチャンネル電流シグナルの1つのステップが1つのナノチャンネル開口に対応すると仮定すると、ナノチャンネルの有効半径は以下のHille式<sup>[Ion Channels of Excitable Membranes, 3rd ed., pp. 347-375 (2001)]</sup>から推定することができる。また、チャンネルが各油中水滴界面上の $N$ 個の孔有りDNAナノプレート( $N$ : 自然数)の接触によって形成されたと仮定し(図2f,g),  $N=1-10$ の場合において開口し得るチャンネル径をモンテカルロシミュレーションから算出した。実験算出値とシミュレーション計算値を比較すると、 $N=7$ の場合に、約26 nm付近のマイナーピークは一致しなかったが、実験値の主なピーク(チャンネル径約20 nm以下)はほぼ計算値と一致した(図2j)。また、 $N=1, 2$ および10

の場合は、実験値と計算値は一致しなかった(図2h,iおよびk)。有意水準を1%(= 0.01)に設定し、 $\chi^2$ 検定およびMann-Whitney検定を行ったところ、 $N=1, 2$ および10の場合の $p$ 値はいずれも $p < 0.01$ であり、 $N=7$ の場合は $p > 0.01$ となった。したがって、4-10 nmのチャンネル径は、DNAナノプレートのチャンネル孔(直径約50 nm, 図1b)がおおよそ7層ランダムに累積されることによって形成されたと統計的に見積もることができる。約26 nm付近のマイナーピークは、大きいチャンネル孔が累積数の少ない箇所で開催したことを示唆している。

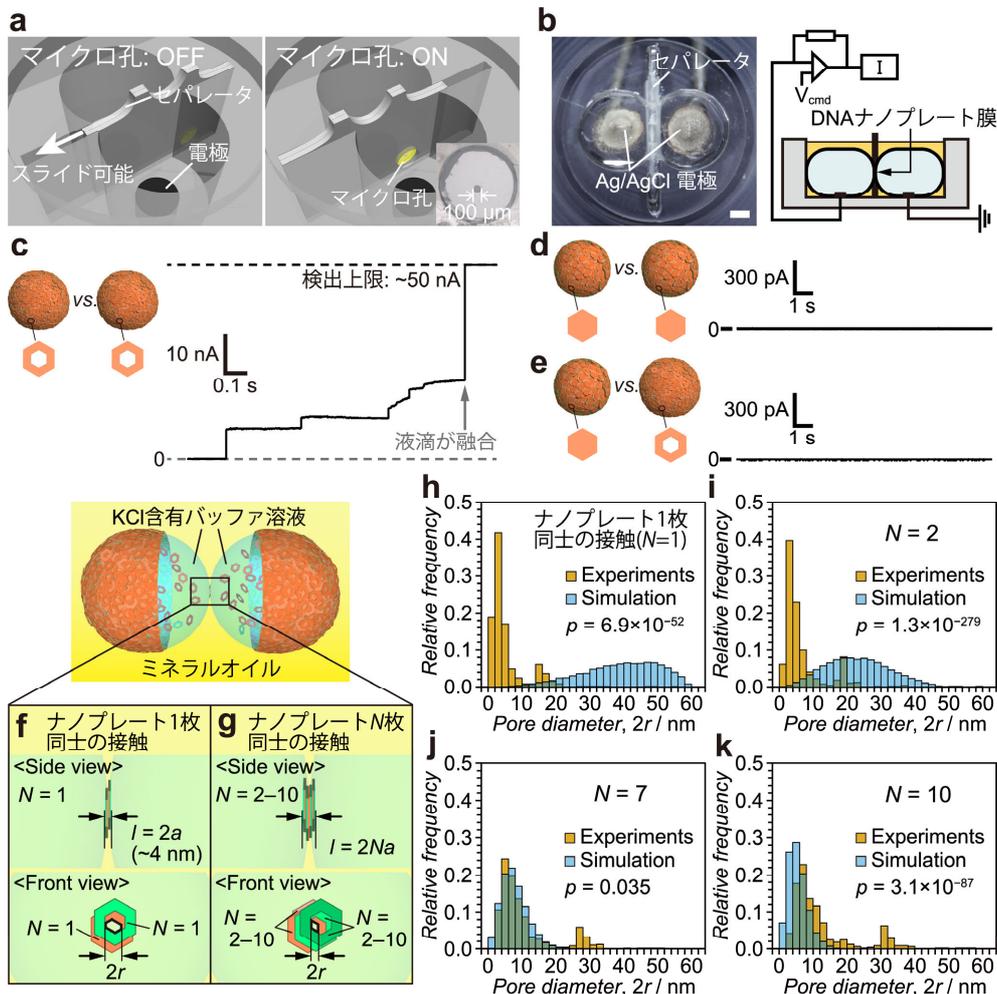


図2 (a)イオン電流計測に用いたマイクロデバイスの概略図。マイクロ孔で油中水滴同士が接触する。(b)マイクロデバイスの写真。Ag/AgCl電極が各チャンバーの底に取り付けられている。(c)孔有りDNAナノプレート同士を接触させると、ステップ状に電流値が上昇の様子が計測された。(d)孔無し同士、(e)一方を孔無しDNAナノプレートにした場合、電流は検出されなかった。(f)、(g)1つの液滴でN枚のナノプレートがチャンネルを形成する場合の模式図。(h) $N=1$ 、(i) $N=2$ 、(j) $N=7$ 、(k) $N=10$ の場合の、イオン電流値から算出したイオンチャンネル直径とモンテカルロシミュレーションによるチャンネル径分布。 $p$ 値は実測結果とシミュレーション結果に対し $\chi^2$ 検定したときの有意確率を示す。

本成果では、界面活性剤がもつ界面安定化能と、 $\alpha$ -ヘモリシンのような膜タンパク質のイオンチャンネル機能という、本来別々の機能を1つのDNAナノプレートに統合することで、両親媒化DNAナノプレートが微粒子界面安定化剤として油中水滴カプセルを形成し、また中央にあけた孔がイオンチャンネルとして機能することを示した。これは、従来細胞膜小胞の作製に用いられる脂質分子やコロイド粒子に代わり、DNAナノ構造体が新たな小胞形成素材となり得ることを示唆しており、DNAのハイブリダイゼーションを利用して小胞に付与する性質や機能がコンピュータソフトウェアのようにプログラム可能になると期待される。

### (ii) 力学的に閉鎖可能なDNAナノチャンネルの開発

一般的に、DNAオリガミ構造体作製は、二次元構造よりも三次元構造の方が形成は難しい<sup>14, Am. Chem. Soc. 131, 15903 (2009)</sup>。したがって、三次元DNAナノ構造体の形成は、DNAナノプレートのような二次元構造体よりも入念なアニリング条件(冷却速度)およびバッファ溶液中の二価、一価の塩(カチオン)濃度( $MgCl_2$ ,  $NaCl$ )の最適化が重要である。これは、DNAの二重らせん形成に基づくナノ構造体形成を、速度論的に安定な状態ではなく熱力学的に安定な状態へと導くためと、またリン酸基が有する負電荷が構造体内で反発することによって安定な構造体形成を阻害するこ

とを防ぎ、かつナノ構造体同士の凝集を避けるための最適な塩濃度が必要だからである。そこで本研究では、二価カチオン( $Mg^{2+}$ )に加えて一価カチオン( $Na^+$ )の濃度を変化させ、アガロースゲル電気泳動から、冷却速度 $-1\text{ }^{\circ}C/1\text{ h}$ 、 $Mg^{2+}$ 濃度 $20\text{ mM}$ および $Na^+$ 濃度 $10\text{ mM}$ を最適条件とした。

DNAナノチャネルの形成を視覚的に確認するため、TEM観察を行った。一般的に用いられる観察手法として、観察する対象の周囲を染色剤で固める負染色TEMや、対象を含む溶液を凍結させて観察するクライオTEMが挙げられる。DNAナノチャネル形成をTEM観察から視覚的に確認し、変形する四隅の内角の分布を定量評価するためには、より明確にDNAナノチャネルが観察される必要がある。そこで作製したDNAナノチャネルに対して、クライオTEMおよび負染色TEM観察を行い、より分解能の高い画像から内角の定量評価を行った。

2種類のTEM観察の結果、負染色TEMの方がDNA二重らせん1本を識別できるほど分解能が高く、設計した通りのDNAナノチャネルが形成されていることが明らかとなった(図3)。また、取得した負染色TEM画像からナノチャネルの内角の定量評価を行った(図4)。

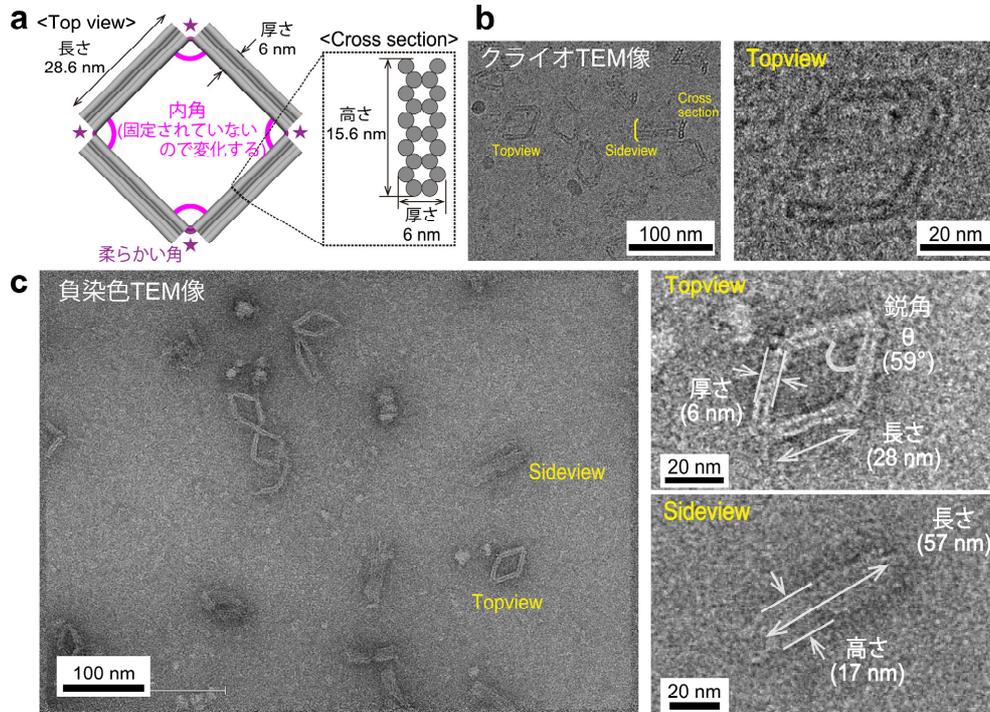


図3 (a)DNAナノチャネルの設計上サイズ. (b)DNAナノチャネルのクライオTEM像. (c)DNAナノチャネルの負染色TEM像.

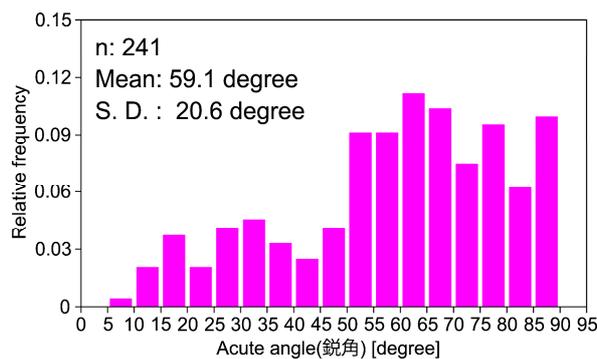


図4 負染色TEM像におけるDNAナノチャネルの形状から測定した内角の分布.

図3に示す負染色TEM像にみられるDNAナノチャネルの内角(鋭角)をフリーソフトウェアImageJ[<https://imagej.nih.gov/ij/>]を用いて計測したところ、図4に示す幅広い分布が得られた。DNAナノチャネルの内角は常温においてほぼ $90^{\circ}$ になるよう設計され、また四隅が柔らかく変形し得ることを考慮すると、 $90^{\circ}$ 寄りに偏り、かつ幅広い分布を示した結果は妥当である。この幅広い分布は、外的から印加する力学的刺激によってDNAナノチャネルが大きく変形可能であることを示唆している。

本成果は、構造DNAナノテクノロジーを利用して作製したDNAナノチャネルをマクロスコピックな力学的刺激によって駆動させるという先進的な研究の端緒である。DNAナノチャネルの内部は、特定の分子のトラップ、あるいは酵素導入などを、DNAの設計柔軟性を利用することで原理的に可能である。したがって、DNAナノチャネルでは外力の印加によって駆動するホスト-ゲストシステムや微小反応場など動的システムの構築が期待できる。

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 0件）

1. 著者名 Daisuke Ishikawa, Yuki Suzuki, Chikako Kurokawa, Masayuki Ohara, Misato Tsuchiya, Masamune Morita, Miho Yanagisawa, Masayuki Endo, Ryuji Kawano, Masahiro Takinoue	4. 巻 58
2. 論文標題 DNA Origami Nanoplate Based Emulsion with Nanopore Function	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 15299-15303
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ange.201908392	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12件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Daisuke Ishikawa
2. 発表標題 Gold nanoparticle-loaded DNA hydrogel particles for catalytic application
3. 学会等名 International Congress on Pure & Applied Chemistry (ICPAC) Yangon 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川大輔
2. 発表標題 構造化DNA粒子を構成成分とする人工細胞の創製
3. 学会等名 日本油化学会第58回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川大輔, 鈴木勇輝, 黒川知加子, 大原正行, 土屋美恵, 森田雅宗, 柳澤実穂, 川野竜司, 遠藤政幸, 瀧ノ上正浩
2. 発表標題 イオンチャネル機能を有する両親媒化DNAナノプレート集積カプセル, DNA origami nanoplate-based microcapsule with designed nanopore function
3. 学会等名 「細胞を創る」研究会12.0
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Daisuke Ishikawa, Masahiro Takinoue, Toru Murayama, Masatake Haruta
2. 発表標題 Gold nanoparticle-loaded DNA hydrogel microparticles for catalysis in aqueous phase
3. 学会等名 CBI学会2019年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川大輔, 鈴木勇輝, 黒川知加子, 大原正行, 土屋美恵, 森田雅宗, 柳澤実穂, 川野竜司, 遠藤政幸, 瀧ノ上正浩
2. 発表標題 イオンチャネル機能を備えた両親媒化DNAナノプレート集積カプセルの創製
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第40回研究会(40th CHEMINAS)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Daisuke Ishikawa, Toru Murayama, Masatake Haruta, Masahiko Hara
2. 発表標題 DNA hydrogel particle-stabilized artificial cells
3. 学会等名 日本化学会 第100春季年会 (2020)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石川大輔, 鈴木勇輝, 黒川知加子, 大原正行, 土屋美恵, 森田雅宗, 柳澤実穂, 川野竜司, 遠藤政幸, 瀧ノ上正浩
2. 発表標題 両親媒化DNAナノプレートの油水界面集積によるカプセル空間形成
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 平岡侑馬, 藤島皓介, 石川大輔, 原正彦
2. 発表標題 原子間力顕微鏡を用いたペプチド-黄鉄鉱表面の相互作用解析
3. 学会等名 2020年日本表面真空学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 増田雅子, 石川大輔, 原正彦
2. 発表標題 原子間力顕微鏡を用いたアミノ酸と 鉱物表面の吸着力相互作用
3. 学会等名 2020年日本表面真空学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 越野広大, 石川大輔, 原正彦
2. 発表標題 鉄硫黄クラスターの無生物的合成と その触媒活性の解明
3. 学会等名 2020年日本表面真空学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀之内公香, 中村振一郎, 石川大輔, 原正彦
2. 発表標題 摩擦力顕微鏡を用いた スパッタナノカーボン薄膜のsp <sup>2</sup> およびsp <sup>3</sup> 炭素分布の分析
3. 学会等名 2020年日本表面真空学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山下和誼, 石川大輔, 原正彦
2. 発表標題 二次元界面におけるDNAナノ構造体の力学的変形に関する研究
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会(2021)
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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