

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19824

研究課題名（和文）二次元界面でナノサイズの剛体折り紙を力学的に折りたたむ

研究課題名（英文）Mechanical folding of nano-rigid origami at a two-dimensional interface

研究代表者

石川 大輔（Ishikawa, Daisuke）

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・講師

研究者番号：00722919

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、細胞の力学的刺激の感知を担う機械受容チャネルタンパク質を人工的に構築するため、DNAナノテクノロジーの一種であるDNAオリガミ手法を利用し、剛体折り紙の折りたたみ機構に基づいて力学的に変形可能なナノチャネルを開発した。このナノチャネルを両親媒化し、脂質分子とともに気水界面で単分子膜を作製、圧縮したところ、膜中のナノチャネルが力学的に変形することを確認した。また関連して、人工細胞構成素子の開発として触媒機能を有するDNAハイドロゲル粒子の開発も行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

a細胞は、多種多様な力学的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。特に、細胞力覚発現の出発点となる力の感知を担う機械受容チャネルの駆動とその周囲の細胞膜の力学的特性との相関を、人工的に再現した系を用いて解明することは、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。

研究成果の概要（英文）：In this study, mechanically deformable nanochannels based on the folding mechanism of rigid origami were developed using the DNA origami method of structural DNA nanotechnology to artificially construct mechanosensitive channels that sense mechanical stimuli in cells. Compression of Langmuir monolayers fabricated at the air-water interface with amphiphilized nanochannels and lipid molecules showed that the nanochannels in the membrane were mechanically deformed. Relatedly, DNA hydrogel particles with catalytic functions were also developed as artificial cell components.

研究分野：界面科学

キーワード：DNAナノテクノロジー 界面膜 機械受容チャネル 折り紙

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^[曾我部正博編、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)]。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膜の力学的特性との相関は未解明である。

2. 研究の目的

本研究は、DNAナノテクノロジーを駆使してナノサイズの剛体折り紙で人工機械受容チャネルを開発し、二次元界面膜の圧縮・拡張に起因する機械受容チャネルの開閉挙動と、界面膜の力学的特性との相関を解明することを目的とする。具体的には、(i)DNAの二重らせんの剛直性と1本鎖の柔軟性を取り入れた剛体折り紙構造をもつ人工機械受容チャネルを開発した。また、関連して、DNAナノテクノロジーを駆使した人工細胞構成素子の開発として、(ii)触媒機能を有するDNAハイドロゲル粒子を開発した。

3. 研究の方法

本研究の実験手順を以下に示す。

(i) 剛体折り紙構造をもつ人工機械受容チャネル開発

- (1) DNAオリガミ設計ソフトウェアcaDNAno^[Nucleic Acids Res. 37, 5001 (2009)]を用いて、四角形ねじり折り筒状のナノチャネルという2種類のDNAナノ構造体を設計した。
- (2) 塩濃度とアニーリング(加熱と冷却)時間の条件を最適化し、目的のDNAナノ構造体を作製した。DNAナノ構造体の形状は、原子間力顕微鏡(AFM)と透過電子顕微鏡(TEM)観察から確認した。
- (3) DNAナノ構造体を両親媒化するため、2種のDNAナノ構造体の上部に疎水基を導入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DNAナノ構造体を分散させた水溶液を用いて油中水滴エマルションを作製し、これを共焦点レーザー走査型顕微鏡で蛍光観察することで確認した。
- (4) 両親媒化したDNAナノ構造体とマトリクスである脂質分子を空気/緩衝溶液の気水界面に展開し、気水界面膜の形成とその圧縮によるDNAナノ構造体の変形をAFMで観察した。

(ii) 触媒機能を有するDNAハイドロゲル粒子の開発

- (1) 3方向に伸長した二重らせんの末端に8塩基の回文配列をもつ、Yモチーフと呼ばれる3分岐DNAナノ構造を構成するための3本の1本鎖DNAを、ウェブソフトウェアNUPACK^[<https://www.nupack.org/>]で設計した。
- (2) 作製したDNAハイドロゲル粒子の形態を共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察し、またゲル粒子内部の密度を光褪色後蛍光回復法(FRAP)によって蛍光分子の拡散挙動を観察することで定量評価した。
- (3) DNAハイドロゲル粒子に担持した金ナノ粒子の形態はTEM観察から評価した。
- (4) DNAハイドロゲル粒子担持金ナノ粒子の触媒活性を、NaBH₄を用いた4-ニトロフェノールの4-アミノフェノールへの還元反応で評価した。

4. 研究成果

(i) 剛体折り紙構造をもつ人工機械受容チャネル開発

透過電子顕微鏡観察により、各々設計通りの構造体が形成されていることが確認された。次に、まずナノチャネルを気水界面に局在させるために、ナノチャネルの一部を疎水化し、アガロースゲル電気泳動および共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いた油中水滴エマルションの蛍光観察から、ナノチャネルの気水界面に集積させるための導入疎水基の本数を最適化した。そして、ナノチャネルの作製に用いた緩衝溶液を水相として、マトリクスである脂質分子、一部疎水化したナノチャネルを気水界面に展開すると単分子膜を形成し、その圧縮によってナノチャネルが閉じていくことが、転写した単分子膜のAFM観察から確認された。

この結果は、DNAの二重らせんの剛直性と1本鎖の柔軟性を活用することによって、マクロスケールの折り紙のような山折りと谷折りの設計および折り線に沿った力学的な開閉操作が、ナノスケールの構造体でも実現可能であることを示している。

(ii)触媒機能を有するDNAハイドロゲル粒子の開発

発表論文: D. Ishikawa, et al. submitted. (ChemRxiv DOI: 10.26434/chemrxiv-2024-28vsv)

ゲル内部の架橋密度を変えるために、3種の長さの異なるYモチーフをウェブソフトウェア NUPACKで設計した(図1a)。3種のYモチーフからは、いずれも6~7 μm の均一な大きさをもつハイドロゲル粒子が形成された(図1b)。DNAハイドロゲル粒子の内部密度を定量的に評価するため、FRAPによりDNAハイドロゲル粒子内における蛍光色素の拡散係数 D を算出したところ、Yモチーフの鎖長が長くなるほど拡散係数 D が大きくなる傾向が見られた(図1c)。この結果は、当初意図したとおり、Yモチーフの長さによってDNAハイドロゲル粒子の内部の密度を制御できることを示している。

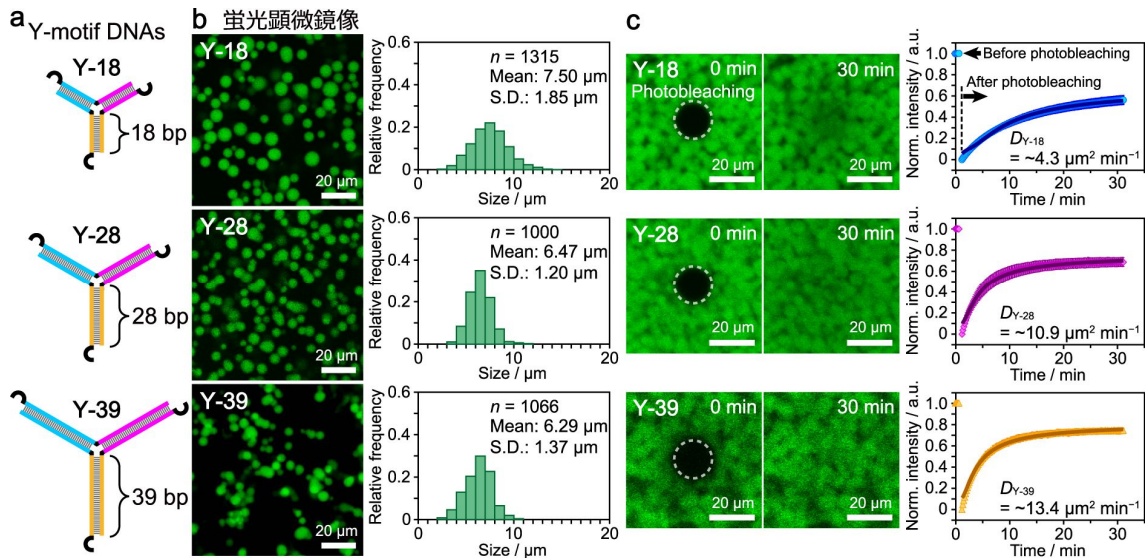


図1 (a)DNAハイドロゲル粒子の構成単位であるYモチーフの模式図、(b)3種類のYモチーフそれぞれで作製したDNAハイドロゲル粒子の蛍光像および(c)FRAP解析結果。

次に、各DNAハイドロゲル粒子を HAuCl_4 緩衝溶液に浸漬したのちに NaBH_4 で還元することで、DNAハイドロゲル粒子内と表面に金ナノ粒子を生成した。生成した金ナノ粒子のサイズをTEM観察結果から計測すると、Yモチーフの鎖長が短くなるほど金ナノ粒子のサイズが大きく、サイズ分布が多分散になる傾向が見られた(図2a)。これは、金イオンが還元されて凝集し、金ナノ粒子へと成長する際に、ハイドロゲル粒子内部の密度が高い場合はその成長が阻害され、より小さな粒子へと成長しやすいためと考えられる。

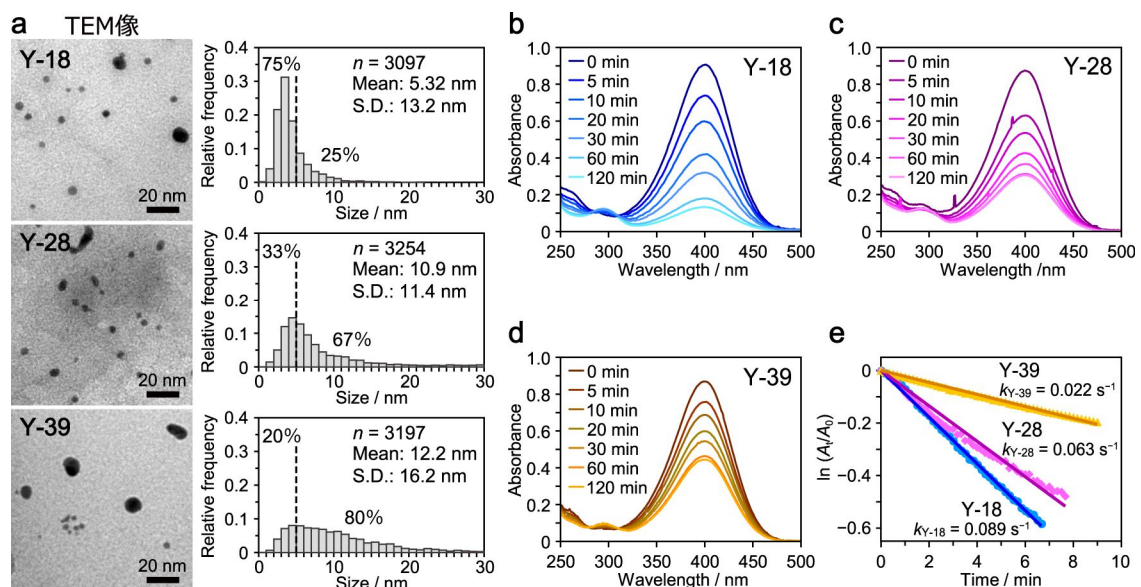


図2 (a)金ナノ粒子のTEM像、金ナノ粒子担持DNAハイドロゲル粒子(b)Y-18、(c)Y-28、(d)Y-39を用いた4-ニトロフェノールから4-アミノフェノールへの還元反応における吸収スペクトル変化および(e)擬一次プロットと速度定数。

最後に、DNAハイドロゲル粒子に担持した金ナノ粒子の触媒活性を、4-ニトロフェノールから4-アミノフェノールへの還元反応を用いて評価した。この反応では、過剰の NaBH_4 と適量の触媒の存在下、4-ニトロフェノールは擬一次反応的に4-アミノフェノールに還元され、その反応過程は4-ニトロフェノールの特徴的な400 nmの吸収波長の減少によって容易に追跡することができる。293 Kに保った4-ニトロフェノールと NaBH_4 の混合溶液に金ナノ粒子を担持した各DNAハイドロゲル粒子をそれぞれ加えたところ、400 nmの吸収が時間経過とともに減少した(図2b、2c、2d)。擬一次プロットから得られた 293 K における速度定数は、Yモチーフの鎖長が短くなるほど大きくなった(図2e)。粒径が5 nm 以下の金ナノ粒子を用いた水相でのグルコース酸化反応では、担体として用いる金属酸化物の化学種よりも金ナノ粒子の粒径が触媒活性に大きく影響することが知られている[*Angew. Chem. Int. Ed.* 47, 9265 (2008)]。DNAハイドロゲル粒子に担持された粒径5 nm 以下の金ナノ粒子の割合は、Y-18、Y-28、Y-39でそれぞれ75%、33%、20%であったため、金ナノ粒子の粒径が速度定数に直接的に影響したと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 石川大輔
2. 発表標題 小胞間シグナル伝達のための動的チャネル開発
3. 学会等名 学術変革領域研究 (A) 分子サイバネティクス公募班進捗報告会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石川大輔
2. 発表標題 DNAナノテクノロジーを駆使した人工細胞構成素子の開発
3. 学会等名 学術変革領域研究 (A) 分子サイバネティクス 第2回領域会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Daisuke Ishikawa
2. 発表標題 Abiotic synthesis and catalytic activity of iron-sulfur clusters
3. 学会等名 International Congress on Pure & Applied Chemistry (ICPAC) Kotakinabalu 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京医科歯科大学生体材料工学研究所精密医工学分野ホームページ
<https://sites.google.com/view/ikeuchi-lab/home>
researchmap
<https://researchmap.jp/ishi-d>
ResearcherID
<http://www.researcherid.com/rid/l-5303-2015>
google scholar
https://scholar.google.co.jp/citations?user=BV_C_T0AAAAJ&hl=ja&oi=ao

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