

■受領No.1342

力学的刺激に応答する二相界面動的代謝システムの構築

代表研究者

石川 大輔

首都大学東京 都市環境科学研究科 特任助教



1. 研究目的

生体内における細胞のような、分子スケールからマイクロスケールにおよぶ階層的なシステムが動的に結びついたシステムを人工的に創ることは、学術的に究極的な目標の一つである。細胞の存続に欠かすことができない代謝システムに着目すると、特定の物質に対し極めて特異的かつ高効率の化学変換を可能にする天然酵素を人工的に全合成することは非常に難しく、そのため人工天然酵素を基にした細胞様代謝システムの実現には現状程遠い。

一方、天然由来の微生物や細菌、酵素を利用した有用物質生産は、発酵産業として世界中に根付いている。さらに、極限環境微生物と呼ばれる地球上の極端な環境に適応して生息している細菌からは、温度、pH、圧力などに耐性を有する酵素を抽出することができ、これらを利用した人工代謝システムによる化学物質生産、創薬研究がすでに盛んに行われている。しかし、事実上すべての細胞が応答するという機械刺激、すなわちメカニカルストレスを受けて柔らかい空間が摂動する動的代謝システムの構築は未だ為されていない。

この大きな要因は、酵素を一種のソフトウェアとみなすならば、これを導入するハードウェアが確立されていないため、と申請者は考えている。一般的に、酵素は水溶液中において単体で扱われており、水相というバルクがハードウェアの役割を果たしている。しかし、水相空間内で微小なエ

ネルギーによる摂動を酵素に精確に与えることは現実的に不可能である。この現状を大きく打開するためには、外部からの微小な摂動に応答可能な柔らかい空間を有し、かつ酵素を選択的に導入・確実に固定できる場の開発・利用が必要である。

本研究の目的は、有機溶媒相と水相の二相界面において力学的な動作(メカニカルストレス)によって変形可能な柔らかい空間を開発し、低温で進行する動的触媒システムを構築することである。目的達成のため、具体的に以下の目標を設定した。

〔目標 1〕精密に設計できる触媒反応場構築：DNA をサブナノオーダーの精度で加工できる超高精度高分子素材と見なし、その塩基配列設計によるプログラマビリティおよび 1 本鎖 DNA のもつ構造柔軟性と DNA 二重らせん構造のもつ剛直性を利用し、有機溶媒耐性酵素や金ナノ触媒の導入が選択的に可能、かつ力学的に形状変形可能な DNA ナノ反応場を作製する。

〔目標 2〕触媒反応場における基質の変換反応実現：〔目標 1〕で得た DNA ナノ反応場に有機溶媒耐性酵素および金ナノクラスター触媒を固定し、これを有機相中水滴(油中水滴)の界面に集積させて界面膜リアクターを作製し、有機相中基質の化学変換を行う。

以上の目標の達成から得た知見を融合し、力学的刺激に応答可能な動的低温触媒反応場を構築する。

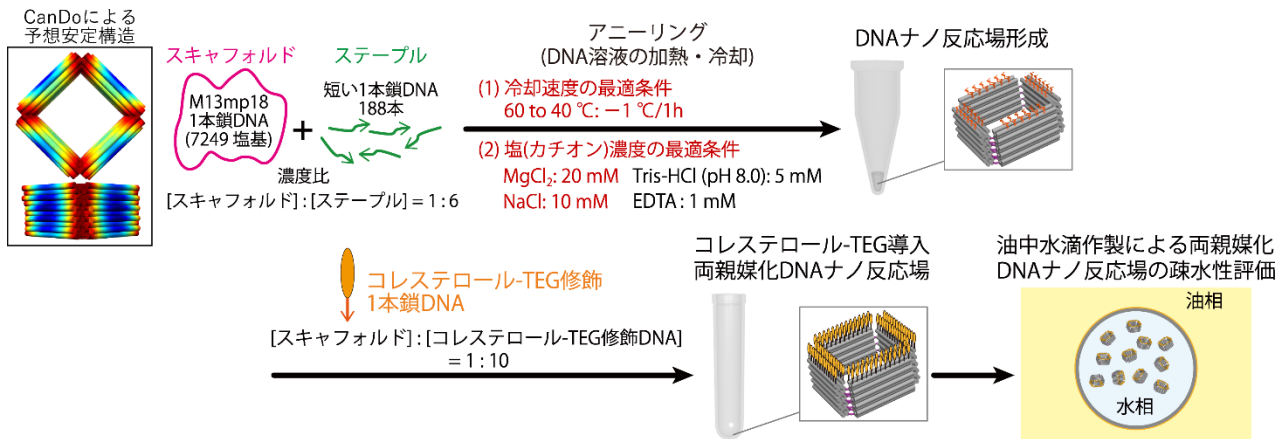


図 1 研究実施内容

2. 研究内容

本研究期間において、[目標 1]および[目標 2]の一部を遂行した。

2.1 両親媒性 DNA ナノ反応場の設計と作製(図 1)

2.1.1 コンピュータソフトウェア(caDNAno)を利用した DNA ナノ反応場の設計

報告者は DNA オリガミ法^[P. W. K. Rothemund, Nature 440, 297 (2006)]を用いて、DNA ナノ反応場の設計を行った。DNA オリガミ法とは、DNA の塩基配列がその相補鎖とのみハイブリダイゼーションするという特有の性質を活かしたナノ構造体形成手法であり、ナノスケールの二次元および三次元 DNA ナノ構造体がこれまでに多数報告されている。このような DNA オリガミ法によるナノ構造体設計は、caDNAno^[S. M. Douglas, et al. Nucleic Acids Res. 37, 5001 (2009)]というフリーソフトウェアを用いて誰でも実施することが可能である。

本研究では研究目的上、DNA ナノ反応場が常温において開いた四角形の構造をとる必要がある。そこで設計した DNA ナノ反応場の熱力学的安定構造を、ウェブソフトウェア CanDo^[https://candodna-origami.org/]から予測した。

この結果、図 1 に示す予想安定構造を得た。DNA ナノ構造体は 7249 塩基をもつ環状 1 本鎖 DNA(M13mp18)と 188 本の短い 1 本鎖 DNA から作製した。

2.1.2 DNA ナノ反応場の作製・作製条件最適化

二次元(平面状)の DNA ナノ構造体の作製は比較的容易であるが、三次元(立体状)構造体の作製は綿密な(1)アニーリング条件と(2)塩濃度条件の設定が不可欠である。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必要があり、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る安定な構造体形成の阻害を防ぎ、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、過去の報告^[J. P. J. Sobczak, et al. Science 338, 1458 (2012), S. M. Douglas, et al. Nature 459, 414 (2009)]に基づき、DNA ナノ反応場作製における(1)アニーリング条件(特に冷却速度)と(2)塩(カチオン)濃度の最適化を行った。

2.1.3 DNA ナノ反応場形成の視覚的確認(図 2)

DNA ナノ反応場の形成確認とその内角の定量評価を、負染色 TEM を用いて行った。本研究における DNA ナノ反応場は、四隅が柔らかく変形するため、内角は様々な値をとると予想した。これを TEM 観察から視覚的に確認し、内角の分布を定量評価するためには、より明確に DNA ナノ反応場が観察される(可能ならば 1 本の DNA 二重らせん構造が観察されるほどの分解能が)必要がある。そこで作製した DNA ナノ反応場に対して、クライオ TEM および負染色 TEM 観察を行い、より分解能の高いほうの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 ナノ反応場が形成されていることが明らかとなった(図 2b)。また、取得した負染色 TEM 画像から DNA ナノ反応場の内角の定量評価を行った。

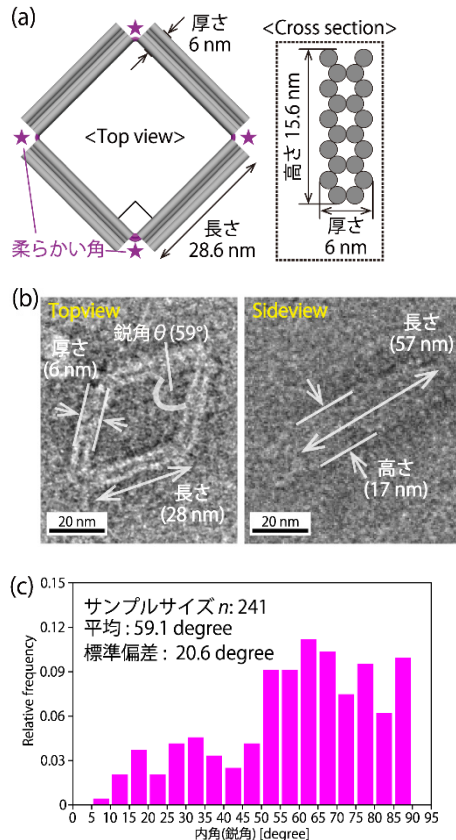


図2 (a) DNA ナノ反応場の設計上のサイズ。
(b) 負染色 TEM 像。(c) 測定した内角の分布。

観察されたDNAナノ反応場(図2b)の内角をフリーソフトウェアImageJ[<https://imagej.nih.gov/ij/>]を用いて測定したところ、図7に示す分布が得られた。DNAナノ反応場は常温において内角がほぼ90°であり、四隅が柔らかく変形することを考慮すると、90°寄りに偏り、かつ幅広い分布を示した図2cは妥当な結果である。この幅広い分布は、界面に構築したDNAナノ反応場膜の一時軸方向からの力学的圧縮・拡張によって、DNAナノ反応場が大きく変形可能であることを示唆している。

2.2 両親媒性 DNA ナノ反応場の油水界面集積観察 (図3)

両親媒化DNAナノ反応場で有機溶媒相-水相の界面に膜を形成するためには、油中水滴を作製して油水界面にDNAナノ反応場が集積することを確認する方法が容易である。そこで、作製した疎水基導入DNAナノ反応場を含む水溶液とミネラルオ

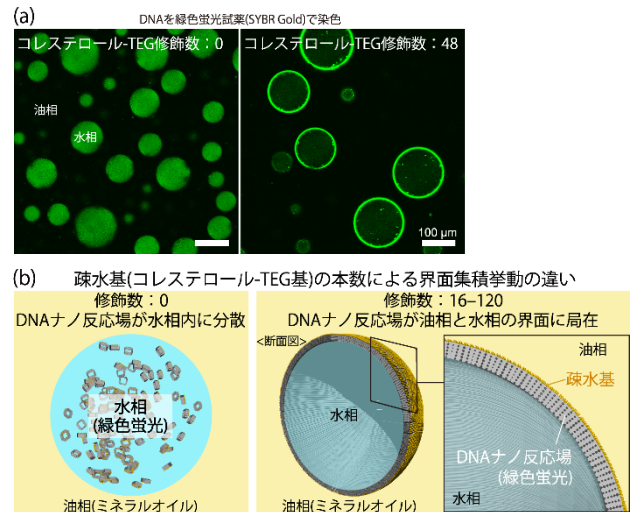


図3 (a) 疎水基導入 DNA ナノ反応場を含む油中水滴の蛍光像。(b) DNA ナノ反応場の水滴中分散状態と界面集積状態の模式図。

イルを混ぜて油中水滴エマルションを作製することで、DNAナノ反応場の油水(疎水相-親水相)界面への集積を共焦点レーザー走査型顕微鏡から確認した(図3a)。集積状態を簡単に観察するためDNAを緑色蛍光試薬(SYBR Gold)で染色した(図3b)。結果、DNAナノ反応場は、疎水基を導入していない場合水滴中に均一に分散し、一方導入した場合は油水界面に局在することが明らかとなった。これは両親媒化したDNAナノ反応場で疎水相-親水相界面で集積膜を形成可能であることを示している(図3b)。また疎水基の導入数によって水滴内部および界面の蛍光強度が異なっており、これらの蛍光強度比(界面平均蛍光強度/内部平均蛍光強度)を顕微鏡像から算出することで、疎水性を付与するための必要十分な疎水基数が48本と決定した。

以上より、当初設定した2つの目標のうち[目標1]である両親媒性DNAナノ反応場の開発に成功した。今後は未達成である、[目標2]および[目的]に該当する研究を遂行する。

3. 発表 (研究成果の発表)

(1) 石川大輔、瀧ノ上正浩、村山 徹、春田正毅、“DNAゲル粒子の金触媒担体および人工細胞構成素材への利用”、第2回分子ロボティクス年次大会、東京工業大学大岡山キャンパス、2019年3月。