

# 金触媒内包 DNA ゲル粒子を用いた細胞様小胞反応場の構築

所属：東京工業大学 物質理工学院 応用化学系

助成対象者：石川 大輔

共同研究者：無し

## 概要

細胞は特定の分子を認識・透過し、代謝系と連動させるという、複雑かつ洗練された動的システムを有している。その人工的な実現として、人工細胞と呼ばれる脂質二重膜で構成される小胞を用いて分子透過と化学反応が行われているが、人工的な細胞様小胞の膜構成素材における設計性と拡張性の限界のため、分子の透過速度と反応性の調整は非常に困難である。本研究では、分子透過性と触媒による化学変換能を同時発現可能なDNAハイドロゲル粒子を開発し、これを界面膜の構成素材とする人工細胞を構築することを目的として研究を行った。

## abstract

Cells have a complex and sophisticated dynamic system that recognizes and permeates specific molecules and links them with the metabolic system. Recently, artificial construction of molecular permeation and chemical reaction using a microspace composed of a lipid bilayer membrane called an artificial cell has become popular. However, it is very difficult to adjust the permeation rate and reactivity of molecules in the membrane due to the limited design and expandability of the constituent materials of artificial cell-like microspaces. The purpose of this study was to develop DNA hydrogel particles capable of simultaneously expressing molecular permeability and catalytic chemical conversion ability, and to construct artificial cells using these as constituent materials of interface membranes.

## 研究内容

### ■ 研究背景

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。これまでに、細胞の材質・構造の模倣など、人工的な細胞様小胞の構築が多角的に試みられているが、特定の分子の認識・透過、代謝システムなど、生命のような動的システムの構築は現状極めて困難である。

細胞様システムの人工的構築に対して、細胞の個々の機能を (1)分子透過・認識, (2)生化学反応, (3)細胞の変形・運動に分類し,アプローチする方法論がある [M. Hagiyaら, *Acc. Chem. Res.* **48**, 1681 (2014)]. このうち(1) 分子透過・認識は, 他2つを駆動させる第一の要素であるためにその機能発現が注力されてきた。しかし, 一般的には人工細胞の筐体である脂質二重膜に天然膜タンパク質チャネルを用いて分子透過が行われており, その透過速度の人工的な調整は非常に困難である。まして, 生体膜に局在する膜結合酵素によって促進される生化学反応はいまだに人工的に実現されていない。

### ■ 解決すべき課題

上記現状の大きな要因として, 人工細胞の構成素材の設計性と拡張性の限界が挙げられる。従来, 人工細胞の作製に用いられる脂質分子やコロイド粒子では, 小胞形成後の膜自体の性質を変えることは不可能であり, 機能を担う重要な部位は膜タンパクなどの改変不可能な個々の構造体に依存している (図1a)。この現状を大きく打開するためには, 人工細胞に付与する性質や機能を自在に設計可能な性質をもつ物質を構成素材とする必要がある。

### ■ 研究目的

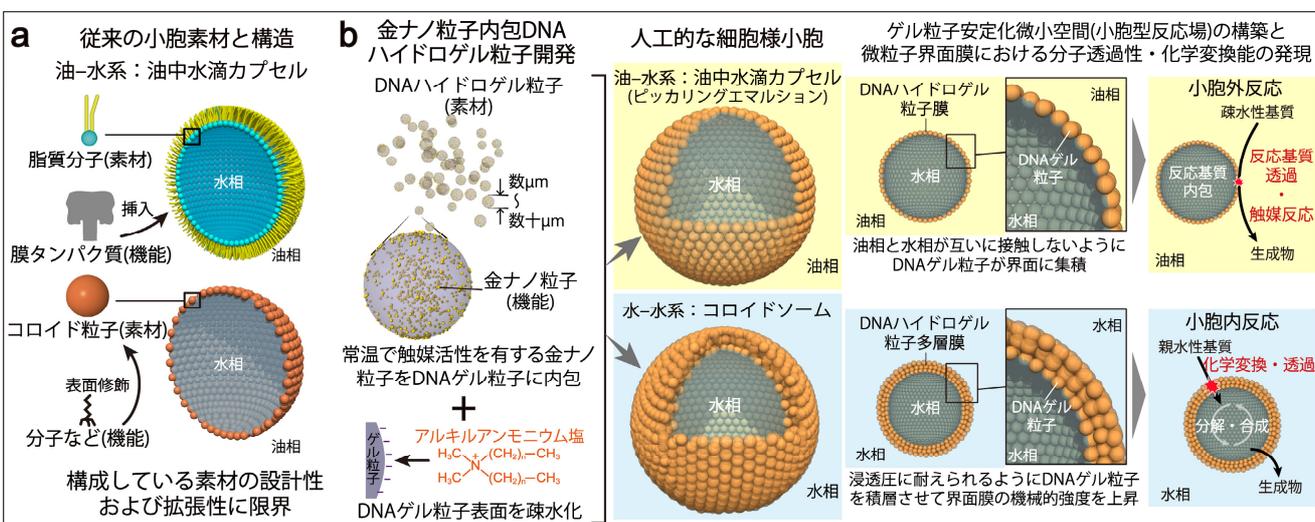


図1 研究の全体像

本研究は、DNA特有の柔軟な塩基配列設計性にに基づき、内部の架橋密度の調整と金(Au)ナノ粒子触媒の内包が可能なDNA水ドロゲル粒子を開発する。そしてこれを構成素材として、生体膜で発現する生化学反応を模した分子透過性(センサ)と化学変換能(知能・制御)を同時発現可能な細胞様小胞を構築することを目的とする(図1b)。

### ■ 研究期間内の設定目標

目的達成のため、当初以下3つの目標を設定した。

[目標1] DNA水ドロゲル粒子内における金ナノ粒子のサイズ調整

[目標2] DNA水ドロゲル粒子内部の密度調整

[目標3] DNA水ドロゲル粒子安定化人工細胞様小胞における常温金触媒反応の実施

[目標1]の実験実施中に、DNA水ドロゲル粒子がその形成過程における温度設定によってゲル内部の密度が変化することを発見した。そこで、まずその温度設定による金ナノ粒子のサイズ調整と密度調整を試み、その後金ナノ粒子を担持させたDNA水ドロゲル粒子の触媒活性を調査した。そして[目標3]のDNA水ドロゲル粒子表面を疎水化することによる油中水滴カプセルの形成を確認した。

### ■ 結果[目標1,2] DNA水ドロゲル粒子内における金ナノ粒子のサイズとゲル密度の調整

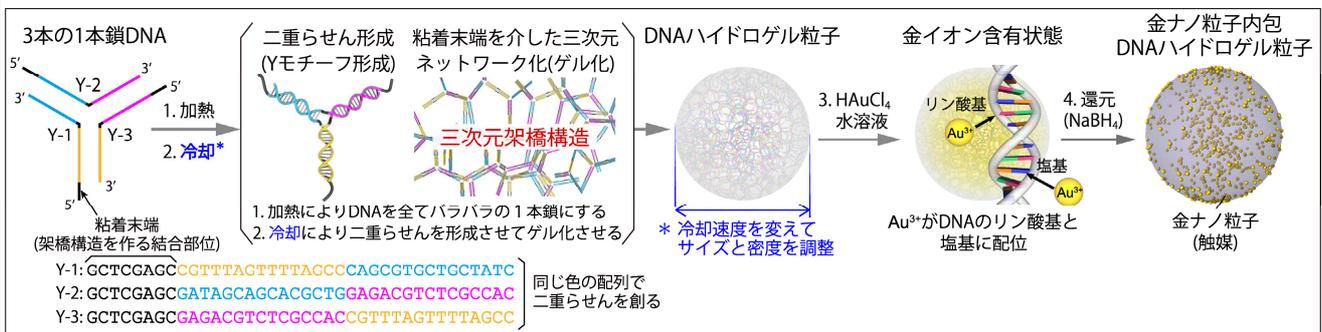


図2 [目標1,2]の実験手順

実験の手順を図2に示す。まずDNA水ドロゲルの構成単位である、Yモチーフと呼ばれるDNAナノ構造体を設計した。Yモチーフは、粘着末端と呼ばれるゲルのような三次元架橋構造を形成するための部位と、互いに二重らせんを形成するための部位をもった3本の1本鎖DNAで構成される。このYモチーフをウェブソフトウェアNUPACK[<http://www.nupack.org/>]で設計し、適切な塩濃度の緩衝溶液中で加熱、冷却することでDNA水ドロゲル粒子を形成した。作製したDNA水ドロゲル粒子を緑色蛍光試薬で染色し共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、その粒径が形成過程における冷却速度に大きく依存することが明らかとなった。そこで冷却速度を4つ設定してDNA水ドロゲル粒子を作製し、それぞれを塩化金酸(HAuCl<sub>4</sub>)緩衝溶液に浸漬した後にNaBH<sub>4</sub>で還元して金ナノ粒子を形成させたところ、DNAハ

イドロゲルの粒径が大きいほどゲル内部の金ナノ粒子の粒径が小さくなる傾向が見られた(図3). この結果から, DNA水ドゲル粒子を形成するときの冷却速度が低いほどゲル粒子形成時の架橋密度が高くなり, 金ナノ粒子の形成が阻害されると仮説を立てた.

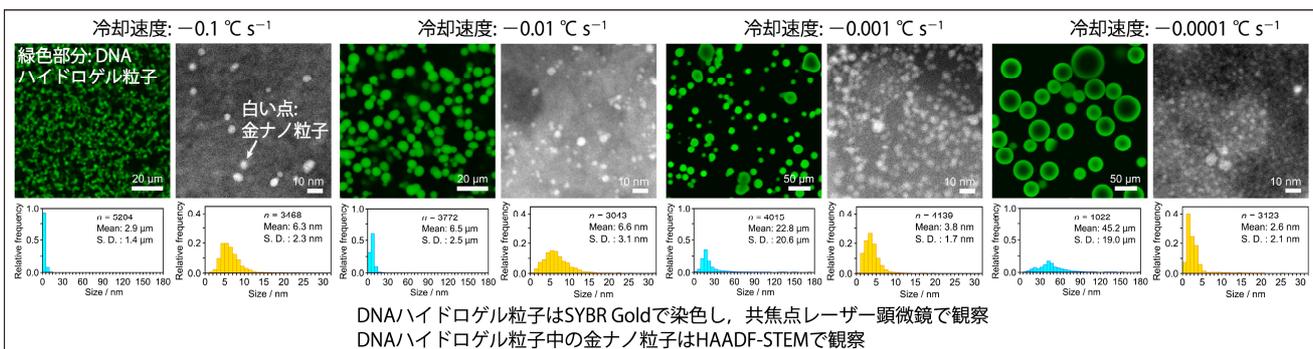


図3 DNA水ドゲル粒子の蛍光観察像と金ナノ粒子のHAADF-STEM像

上記仮説を検証するため, DNA水ドゲル粒子内における蛍光染色分子の拡散速度を評価した. 拡散速度は蛍光染色したDNA水ドゲル粒子の一部をレーザー照射で褪色させ, その周囲からの蛍光分子の二次元拡散による褪色部位の蛍光強度回復過程を測定する光褪色後蛍光回復法(FRAP)を用いて拡散係数を算出することで決定した. その結果, 冷却速度が低く, DNA水ドゲルの粒径が小さいほどゲル内部における蛍光分子が拡散しにくいことが明らかとなった(図4). したがって, 上記の仮説が立証され, DNA水ドゲル形成時の冷却速度によってその粒径だけではなく架橋密度を調整できることがわかった.

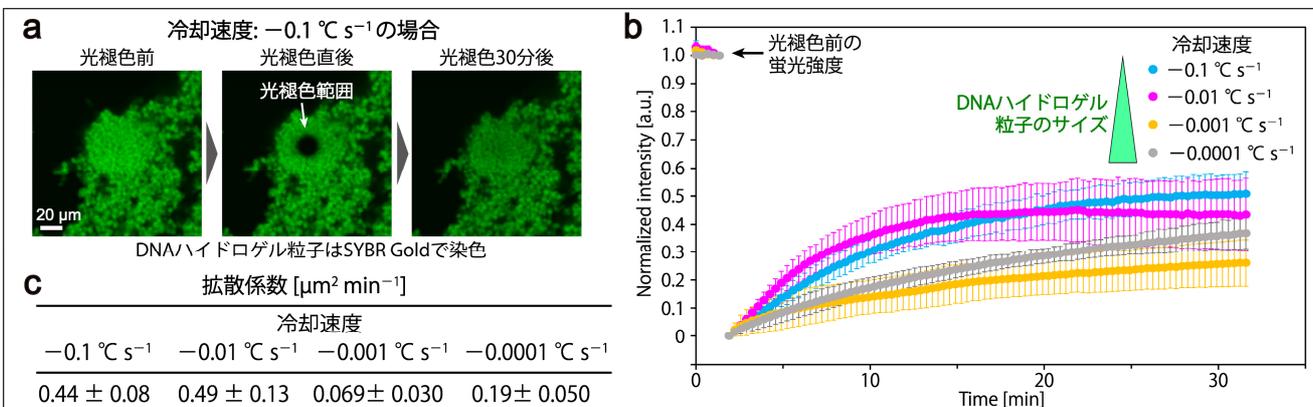


図4 DNA水ドゲル粒子内における蛍光分子の拡散速度解析

### ■結果[目標3] DNA水ドゲル粒子の常温金触媒反応の実施と油中水滴カプセルの形成

[目標1, 2]で作製した4種のDNA水ドゲル担持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 $\text{NaBH}_4$ による還元反応から評価した. この還元反応は, 反応生成物が4-アミノフェノールのみであるため擬一次反応とみなすことができ, かつ水溶液中で容易に実施できることから, 様々な金属触媒あるいは金属酸化物触媒のベンチマーク試験として利用されている[T. Adityaら, *Chem. Commun.* **51**, 9410 (2015)]. 本研究では, 常温水相内におけるカプセル空間内での金触媒反応を目標にしているため, この反応

系はDNAヒドロゲル担持金ナノ粒子の触媒活性を評価するために適している。

金ナノ粒子触媒の活性評価は、20 °Cに設定した恒温槽中に静置した4-ニトロフェノールの溶液に還元剤であるNaBH<sub>4</sub>を加えて攪拌子、ここにサイズの異なる4種のDNAヒドロゲル粒子をそれぞれ加えた直後から紫外可視吸収スペクトルを測定することで実施した。4-ニトロフェノールは400 nmに極大吸収波長が見られ、4-アミノフェノールへの還元反応が進行するとともにその吸収波長が顕著に減少したため、400 nmの吸光度の経時変化を追って還元反応の進行を調査した(図5a)。その結果、金ナノ粒子を内包したDNAヒドロゲルの粒径が小さいほど還元反応は早く進行し、その速度定数は大きくなることが明らかとなった(図5b)。本研究では、DNAヒドロゲル粒子内部を触媒反応空間として利用することを構想していたが、ゲル粒径が大きい場合は図4で示したようにゲル内部の架橋密度が高くなるため反応基質のゲル内部における拡散速度が低くなり、この拡散過程が律速段階として速度定数に影響したと考察した。詳細な拡散係数と速度定数の関係の解明は今後の課題である。

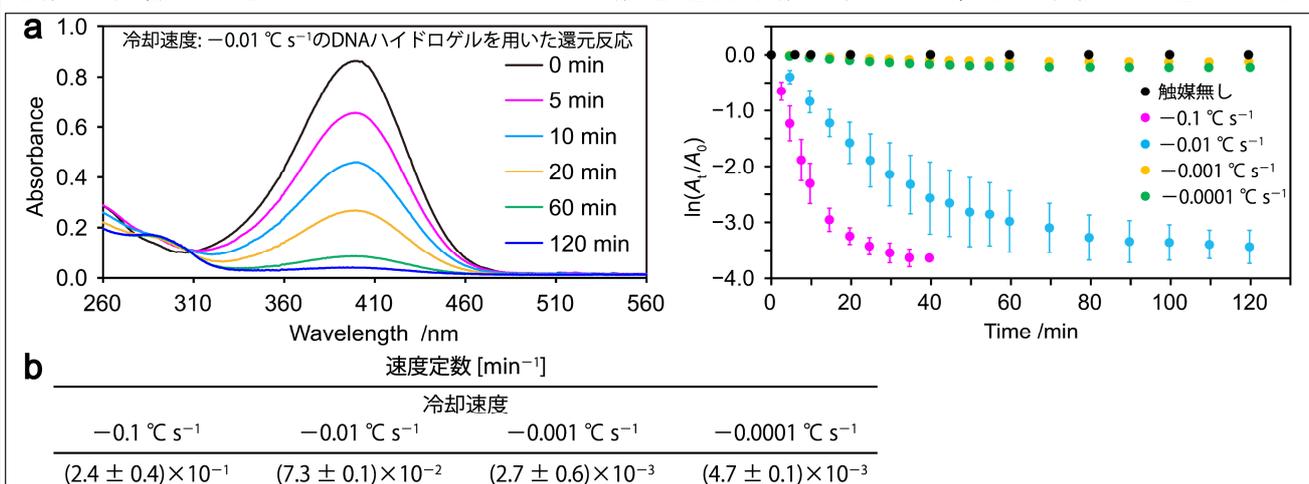


図5 DNAヒドロゲル担持金ナノ粒子の触媒活性評価

DNAヒドロゲル粒子で油中水滴カプセルを形成するため、長鎖アルキル基をもつ4級アンモニウム塩でゲル粒子表面の疎水化を行った。DNAはリン酸基に由来する負電荷を高密度で有するポリアニオンであり、正電荷をもつ4級アンモニウム塩との静電相互作用によってその表面の修飾が可能である[W. Chenら, *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 12884 (2015)]。そこで本研究では、DNAヒドロゲル粒子にジドデシルジメチルアンモニウムブロミド水溶液を加えてゲル粒子の表面を疎水化し、アンモニウム塩を除去した後のDNAヒドロゲル粒子の緩衝溶液とミネラルオイルで油中水滴エマルションを作製することで、水滴中におけるDNAヒドロゲル粒子の分散、集合挙動を共焦点レーザー顕微鏡で観察した(図6a)。結果、表面を疎水化していない場合は水滴中にゲル粒子が均一に分散したのに対し、疎水化処理を行った後は水滴とミネラルオイルの界面にゲル粒子が集合した状態が観察された(図6b)。

したがって、当初の構想通り、DNAハイドロゲル粒子の表面疎水化によって油中水滴カプセルの形成に成功し、新たな人工細胞構築へ向けた知見を得ることができた。DNAハイドロゲル粒子を用いたコロイドソーム作製と小胞内常温金触媒反応は現在実施中である。

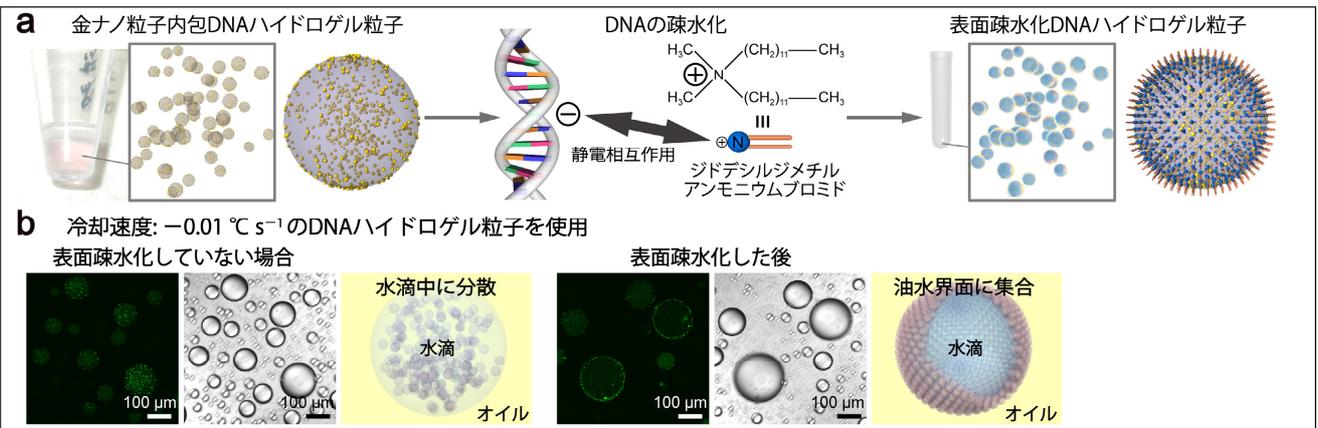


図6 DNAハイドロゲル粒子表面の疎水化と油中水滴カプセルの形成

### ■ 今後の展望

研究期間中には、DNAハイドロゲルの粒径と内部架橋密度がゲル粒子形成時の冷却速度に依存することを見出し、またDNAハイドロゲル担持金ナノ粒子の触媒活性の確認およびDNAハイドロゲル粒子の表面疎水化によって油中水滴カプセル形成に成功した。今後の展望として、DNAハイドロゲル粒子内部の分子の拡散速度と触媒反応速度の関係解明、コロイドソーム作製と小胞内常温金触媒反応の実施による、分子透過性と化学変換能を併せ持ったDNAハイドロゲル粒子を界面膜とする細胞様小胞の構築を目指す。

### ■ 謝辞

共焦点レーザー顕微鏡を用いたDNAハイドロゲル粒子の蛍光観察およびFRAP解析において、東京工業大学情報理工学院情報工学系の瀧ノ上正浩准教授に多大なご協力をいただきました。心より感謝申し上げます。

### ■ 本助成に関わる成果物

[論文発表]

無し

[口頭発表]

無し

[ポスター発表]

無し

[その他]

無し