

# 階層的人工細胞の構築に向けた単分散巨大リポソーム内での DNA 凝集体の形成制御

Controlled generation of DNA condensates within monodisperse giant vesicles toward construction of hierarchical artificial cells

精密工学専攻 69号 米山遼太郎

Ryotaro Yoneyama

## 1. 緒言

人工細胞研究の初期(2000年代)には、細胞が持つ代謝反応系や核酸の複製系など、多数の要素から構成される反応系を巨大リポソーム(GUV)中に封入する研究がなされてきた。最近では、生きた細胞の複雑な機能を再現するために、階層的な内部構造を構築する研究が盛んに行われている<sup>(1)</sup>。生細胞内のオルガネラのうち、ストレス顆粒やリボ核タンパク質粒子などは、生きた細胞における液滴状の微小構造の重要性が認識されている<sup>(2, 3)</sup>。これらは主に、生体高分子が特定のアフィニティによって集合し、凝集体を形成するもので、これらの液滴は液液相分離(LLPS)現象によって可逆的に形成され、特定の分子の局在を制御している。これらのオルガネラを模倣し、GUV内で人工的にLLPSの生成や消滅を制御することは、階層構造と機能分担を精密に制御可能な人工細胞の創生につながる。

数多くあるLLPS系の中で、DNA凝集体(DNAゲルやDNA液滴)は、その物性や動的挙動を制御できる点で注目を集めている<sup>(4)</sup>。このDNA凝集体は、配列設計や分子修飾、塩濃度などの環境の制御により、物性や分子認識能の詳細な制御ができるため、標的分子の検出<sup>(5)</sup>やタンパク質合成の足場<sup>(6)</sup>、さらには細胞骨格の形成<sup>(7)</sup>など、細胞が持つ機能のボトムアップ再構成への応用が期待されている。

これまでに、DNA凝集体を、人工細胞を模擬したマイクロ容器の中で形成させる試みもいくつか報告されている<sup>(8, 9)</sup>。これらの研究では、DNA凝集体の前駆体となるオリゴDNAを含む水溶液を区画内に封入した後、60°C以上に加熱してDNAを均一にばらした状態から、ゆっくりと温度を下げることで、凝集体を生成させている。しかし、高温度化を伴う温度変化は、脂質膜や内封タンパク質に破壊的な影響を与える可能性がある。さらに、人工細胞は均一であることが望ましいが、均一なリポソーム内でDNA凝集体の形成を示した例はまだない。

本研究では、マイクロ流体工学によって作製された均一なGUV内での、熱アニーリングを伴わないDNA凝集体の形成手法を確立し、そのダイナミクスを詳細に調べた。

## 2. 単分散 GUV 内の単一 DNA 凝集体の形成

### 2.1 マイクロ流路を用いた均一 GUV の作製

Fig. 1 にマイクロ流路の模式図を示す<sup>(10)</sup>。本研究で使用したマイクロ流路は、シリコンウェハ上に厚膜フォトレジスト(SU-8 3025)を塗布し、ソフトリソグラフィ技術によって造形した鋳型構造を、PDMSへ転写することで作製した。PDMS流路とスライドガラスに、酸素プラズマ処理を施して接合した後に、圧力ポンプを用いて、二種類の水溶液(GUV

の内液・外液)と脂質溶液を送液した。GUVの内液には、3分岐ナノスター(Y-motif)を形成するように設計された3本の一本鎖DNA(ssDNA)が含まれている<sup>(4)</sup>。フローフォーカシング法と界面通過法によって形成された薄いオイル膜をもったWater in oil in water droplet(W/O/W droplet)は、時間経過とともに逆濡れ現象(dewetting現象)が生じ、脂質二重膜を持つGUVに変換される。また、回収したGUVは倒立顕微鏡または共焦点顕微鏡で観察した。

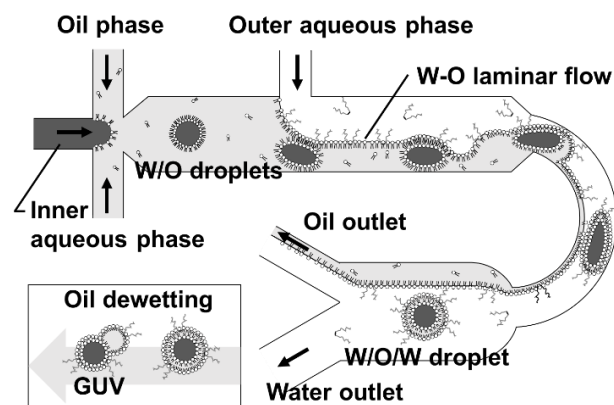


Fig. 1 Schematic of the production of monodisperse GUVs in the microfluidic channel by W/O droplet transfer followed by oil dewetting.

### 2.2 GUV 内での DNA 凝集体形成

実験系の模式図を Fig. 2 に示す。GUV 形成時には、各 DNA オリゴを 1  $\mu$ M、NaCl は 35mM で封入した。この条件では、DNA の stem の相補結合(16 nt)により Y-motif を形成するが、凝集体は生じない。外側に、高濃度の糖・塩を含む溶液を加えることで、脂質二重膜を介して浸透現象が生じ(水が外側に移動)、GUV が収縮する。これにより、内封された Y-motif および塩の濃度が増加する。アーム末端に存在する粘着末端(SE)の相補的な結合は、SEの濃度と塩濃度に依存し、これらが増加することでSEの結合が促進され、DNA凝集体が形成される。

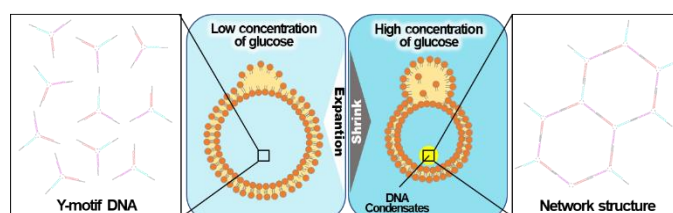


Fig. 2 Schematic diagram of the formation process of DNA condensates induced by internal fluid concentration associated with osmotic shrinkage and expansion of GUV.

Fig. 3 に、流路出口から実際に回収した直後と 2 時間後の W/O/W droplet の共焦点三次元再構築画像を示す。作製直後の W/O/W droplet は、1.5  $\mu\text{m}$  程度の比較的厚いオイル膜につつまれていた。その後、10-30 分後に dewetting 現象が起こり、余分なオイルと脂質がオイルポケットとして GUV の上方に形成された。2 時間後には、単一の DNA の凝集体が GUV の内水相内に発生していた。

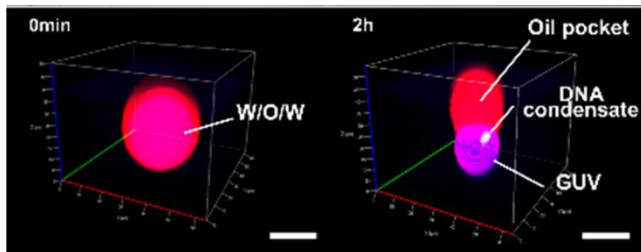


Fig. 3 3D images of W/O/W droplet before shrinkage and GUV after the dewetting phenomenon. Scale bar = 20  $\mu\text{m}$ .

GUV の浸透圧収縮によって、GUV 内で形成された DNA 凝集体のサイズを定量評価した。未収縮の直径がおおよそ 40  $\mu\text{m}$  の GUV が、外液グルコース溶液置換の高濃度化に伴い、直径がおおよそ 20  $\mu\text{m}$  まで収縮し、内液に封入したマーカー（蛍光デキストラン（青））の蛍光強度が増加した (Fig. 4 a)。

GUV の収縮により、膜透過性がない分子が濃縮されていることが確認できる。共焦点顕微鏡から観察される GUV の最大直径から、内水相が球形状であることを仮定して比体積を求めると、糖と塩の濃度差から推定される目的収縮率と実測収縮率がほぼ一致した (Fig. 4 b)。また、各収縮条件における GUV の実測収縮率の標準誤差が小さいことから、均一な大きさに収縮したとわかる。これらの結果は、設計した糖・塩を含む外液の置換によって、全ての GUV を均一サイズ、かつ容易に制御し、内封物を濃縮できることを示している。

GUV の収縮に伴う内液物質の高濃度化に伴い、DNA 凝集体が形成され始め、その大きさが徐々に大きくなった。また、形成される DNA 凝集体の形成のタイミングやサイズは、封入されている DNA 濃度、及び NaCl 濃度が高いほど、早く大きく、低い収縮率でも形成がみられた (Fig. 4 c)。この結果は、DNA 凝集体形成には塩を必要とし、NaCl の濃度が DNA 凝集体の形成のしやすさに影響していることを反映している。さらに、各収縮条件における DNA 凝集体サイズの標準誤差が小さいことから、凝集体が単独の GUV 内に均一サイズに形成されていることがわかる。

本システムにおいては、単分散な GUV 内に均一サイズの単一 DNA 凝集体を形成させることができること、また、初期 DNA、NaCl 濃度、及び GUV の収縮率を変更することによって、容易に目的 DNA 凝集体サイズを得ることが示された。

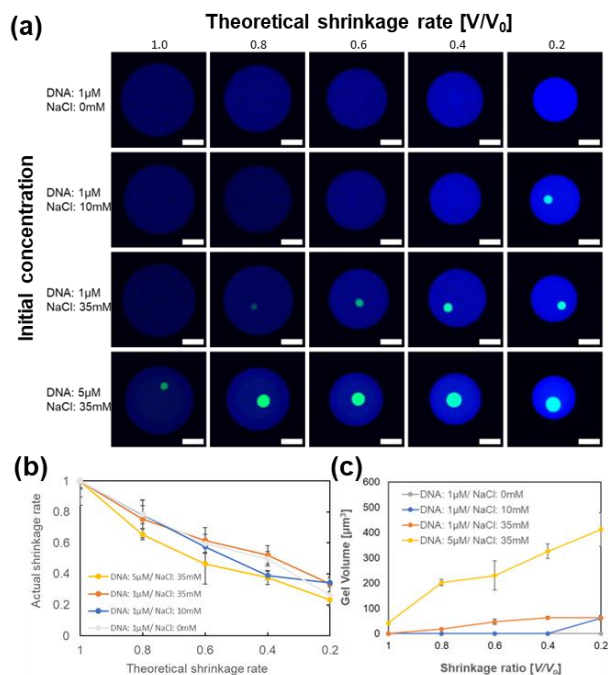


Fig. 4 (a) Confocal images of GUVs containing Y-motif DNA subjected to osmotic shrinkage. (b) The changes in GUV volume and (c) volume of DNA condensate formed in GUVs as a function of volume ratio. Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ . Error bars represent standard deviations of 10 GUVs in each condition.

### 2.3 DNA 凝集体の可逆的形成

LLPS 凝縮体の形成は、生細胞内において可逆的に制御されている。そこで、本実験システムにおいて、DNA 凝集体形成の可逆性を検証した。すなわち、収縮による Y-motif DNA (4nt SE) の濃縮に伴って形成させた DNA 凝集体が、GUV の膨張により再度消滅するかを確かめた。マイクロ流路での W/O/W droplet 形成時に、外液に高い糖・塩濃度を使用し、流路出口から排出され W/O/W droplet を含む液を灌流デバイスに直接導入した。灌流デバイスには、流路の上面にマイクロウェルアレイが設けてあり、オイルポケットの浮力によって、GUV がその中にトラップされる。外液が高浸透圧であるため、dewetting 直後に収縮し、2 時間後には単一の DNA 凝集体が形成された (初期 DNA = 1  $\mu\text{M}$ , NaCl 35mM) (Fig. 5 left)。次に、シリンジポンプを用いて灌流デバイスに低い濃度のグルコース溶液を 50  $\mu\text{L/h}$  の流量で 3 時間流し、GUV の膨張を促した。ウェルへのトラップにより、灌流を行っても、GUV はウェル内にとどまり、同一の GUV を連続的に観察することができた。GUV の膨張に伴い、内液マーカーの蛍光は弱まり、内液物質が希釈されたことがわかる (Fig. 5 right)。このとき、灌流前に形成されていた DNA 凝集体は灌流後に消滅していた。この結果より、DNA 凝集体の形成は、GUV の収縮・膨張に伴う濃度変化により可逆的に変化させられることが示された。これは GUV 膨張により内液に存在した DNA、及び塩濃度が希釈され、SE が一本鎖の状態が占める比率が高まったからと考えられる。

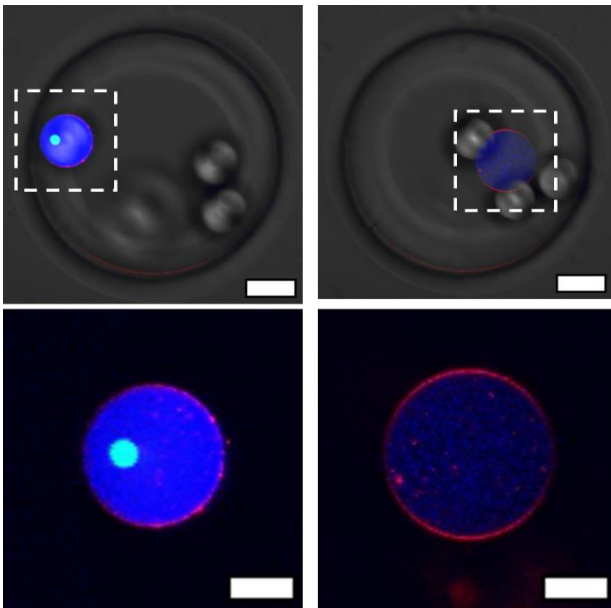


Fig. 5 Confocal microscope images of trapped GUVs before and after perfusion (Scale bar = 20  $\mu\text{m}$ ) and enlarged views. (Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ ).

### 3. 単分散 GUV 内での複合 DNA 凝集体の形成

#### 3.1 単分散 GUV 内での直行 DNA 凝集体の形成

生細胞に存在する様々なオルガネラを模倣し、より複雑な階層的細胞環境の構築に向けて、複数の DNA 凝集体の形成制御を試みた。具体的には、均一 GUV の中で、直行性を持つ（配列が異なり相補結合しない）2 種類の SE (6nt) を有する Y-motif (Orth Y-motif) を内封し、2 種類の DNA 凝集体を GUV 内で生成する実験を行った。なお、GUV の内液相、外液相との間に濃度差を設け、浸透圧収縮により内液相が 5 倍に濃縮されるように設計した。Fig. 6 に、収縮後の時間経過に伴う DNA 凝集体形成の様子を示す。収縮後 15 分以内に、多分散で歪な形状の凝集体が形成された。時間経過とともに、形成された凝集体同士が融合していき、2 時間経過後に 2 つの凝集体が種類ごとに 1 つにまとまった。6 時間後には、球形をした DNA 凝集体 2 つが共存していた。以上の結果より、GUV の収縮により、2 種類の Y-motif の濃度が同時に増加するが、それらが独立に凝集体を形成することを確認した。

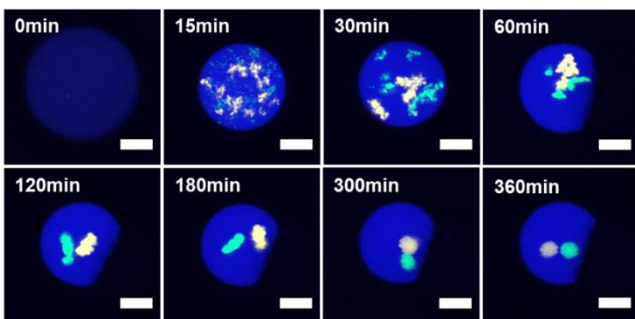


Fig. 6 Sequence of confocal microscope images of a GUV during DNA condensate formation. Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ .

#### 3.2 DNA 濃度に基づいた DNA 凝集体のサイズ制御

次に、それぞれの Y-motif の封入濃度を変化させて、2 種類の DNA 凝集体のサイズを個別に制御できるかを検証した。マイクロ流路で GUV を作製する際に、一方の（緑色でマークした）Y-motif DNA 濃度は変化させず、もう一方の（黄色でマークした）Orth Y-motif DNA 濃度を変化させた。Fig. 7 に、個別にサイズ制御した 2 種類の DNA 凝集体の顕微鏡写真および画像から見積もった体積のプロットを示す。初期 DNA 濃度が一定の DNA 凝集体（緑）のサイズは同じであった。一方、初期 DNA 濃度を変化させた DNA 凝集体は、初期濃度が大きいほど DNA 凝集体サイズが大きくなった。この結果は初期 DNA 濃度の比によって DNA 凝集体のサイズの比を変えられることを示している。

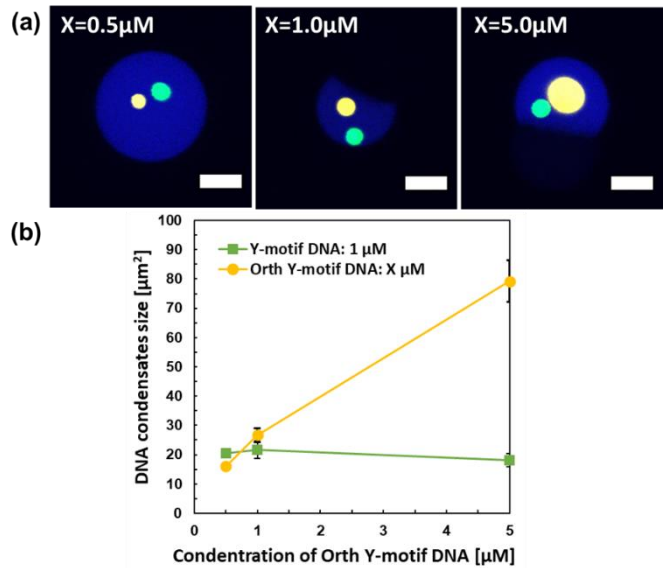


Fig. 7 (a) Confocal microscopy images showing the different sizes of Orth Y-motif condensates. Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ . (b) Quantitative evaluation of the size (projected area) of condensates as a function of input concentration of Orth Y-motif.

#### 3.3 ヤヌス DNA 凝集体の形成

最後に、複数の直行 Y-motif の SE を持つリンカーを添加することで、直行 DNA 凝集体の合一や分離を制御し、ヤヌス型 DNA 凝集体の形成を試みた。ヤヌス粒子とは、2 種類以上の表面化学や組成を持つコロイド粒子であり、従来の等方的な粒子とは異なる振る舞いが注目されている。本研究では、ヤヌス型 DNA 凝集体を発生させるためのリンカー-DNA の濃度条件検討を行なった。Y-motif および Orth Y-motif の SE に対応する 2 種類の SE を持つリンカー-DNA (S-motif) は、両 motif のクロスブリッジに関与し、2 種類のモチーフ間の直交性を調節することができる。この S-motif の濃度を変更することで 2 種類の直行性を部分的に制御し、ヤヌス型 DNA 凝集体の形成を試みた。

Fig. 8 に、収縮から 24 時間経過後の GUV 内に形成された DNA 凝集体の様子を示す。 $V/V_0=0.2$  となるような収縮後、すなわち、5 倍濃縮された各 Y-motif の想定濃度が  $5 \mu\text{M}$  で、S-motif 濃度が  $0 \mu\text{M}$  の時、3-1 節と同様に Y motif と Orth Y motif はそれぞれの凝集体に相分離した (Fig. 8 左列)。同じ motif からなる凝集体間では融合現象が観察されたが、異な

るモチーフの凝集体間では起こらなかった。一方、収縮後の S-motif 濃度が 0.05  $\mu\text{M}$  の条件では、複数の Y-motif 由来の DNA 凝集体 (緑) が Orth Y-motif 由来の DNA 凝集体 (赤) の周囲に接合した構造が得られた (Fig. 8 中央列)。収縮後の S-motif が 0.5  $\mu\text{M}$  の時、単一の Y-motif 由来の DNA 凝集体 (緑) と Orth Y-motif 由来の DNA 凝集体 (赤) が、同一の界面を共有しながら隣接した構造が得られた。S-motif の濃度ごとに得られた DNA 凝集体の蛍光画像から、各蛍光の輝度プロファイルプロットすると、緑蛍光と赤蛍光が高輝度の場所が異なっている。この結果は、両 SE を有する S-motif が Y-motif 由来の DNA 凝集体と Orth Y-motif 由来の DNA 凝集体の直行性を部分的に排除させ、両凝集体を接合させる働きがあることによっている。以上の結果から、ヤヌス型 DNA 凝集体の形成には、S-motif 濃度が重要なパラメータであり、その濃度によって、形成ダイナミクスが変化することが分かった。さらに、均一サイズの巨大リポソーム内でヤヌス型 DNA 凝集体を形成させることで、単一のヤヌス型 DNA 凝集体を得ることができた。

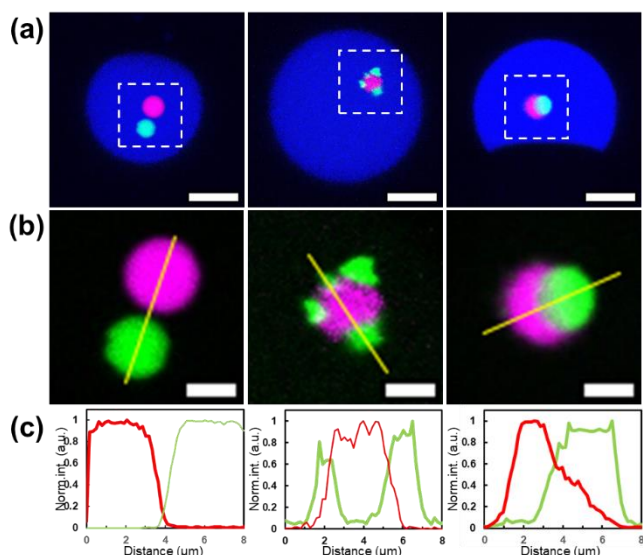


Fig. 8 (a) Confocal microscopic images of Janus-type DNA condensates formed in GUVs. Red and green show Y-motif and Orth Y-motif DNA condensates, respectively. (b) Magnified view of Janus-type DNA condensates. Scale bar = 3 $\mu\text{m}$  (c) Line intensity profiles along the lines shown in (b).

#### 4. 結言

本研究では、マイクロ流路で形成させた均一 GV の浸透現象を用いた内部溶液の濃縮、膨張によって DNA 凝集体の形成の制御を行った。

その結果、浸透圧作用によって誘起される GUV の体積変動を利用して、形成ダイナミクス、最終サイズ、可逆的な形成/解離、配列設計に基づく異なる機能を持つ複数の凝縮体を高度に制御できることを実証した。また、形成制御した DNA 凝集体に高度な機能を付加させる一例として、モデル系内での転写翻訳機能の組み込みへの基盤を整えた。本アプリケーションは、均一サイズの微小閉鎖空間内で形成するため、DNA 凝集体を均一サイズに形成することができる。また、DNA 凝集体形成に熱による操作を必要としないため、酵素

やタンパク質などの組み込み熱変性の恐れがない。これらの技術は、生きた細胞における LLPS 関連現象をモデル系内で再現するための基礎となる。現在、人工核モデルとしての DNA の凝集体に蛍光タンパク質の遺伝子を組み込み、それをもとにタンパク質の合成を行う階層性人工細胞の構築を進めている。

#### 5. 参考文献

- (1) J. Shin, B. Cole, T. Shan, and Y. Jang, Heterogeneous Synthetic Vesicles toward Artificial Cells: Engineering Structure and Composition of Membranes for Multimodal Functionalities, *Biomacromolecules*, **23-4** (2022), pp. 1505-1518.
- (2) B. Treeck, D. Protter, T. Matheny, A. Khong, C. Link, and R. Parker, RNA self-assembly contributes to stress granule formation and defining the stress granule transcriptome, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **115-11** (2018) pp. 2734-2739.
- (3) M. Michaela, and K. Neugebauer, How cells get the message: dynamic assembly and function of mRNA-protein complexes, *Nat. Rev. Genet.*, **14-4** (2013) pp. 275-287.
- (4) Y. Sato, T. Sakamoto, and M. Takinoue, Sequence-based engineering of dynamic functions of micrometer-sized DNA droplets, *Sci. Adv.*, **6-23** (2020).
- (5) J. Gong, N. Tsumura, Y. Sato, and M. Takinoue, Computational DNA Droplets Recognizing miRNA Sequence Inputs Based on Liquid-Liquid Phase Separation, *Adv. Funct. Mater.*, **32-37** (2022).
- (6) N. Park, S. H. Um, H. Funabashi, J. Xu and D. Luo, A cell-free protein-producing gel, *Nat. Mater.*, **8-5** (2009) pp. 432-437.
- (7) Y. Sato and M. Takinoue, Capsule-like DNA Hydrogels with Patterns Formed by Lateral Phase Separation of DNA Nanostructures, **2-1** (2022) PP. 159-168.
- (8) M. Tran, R. Chatterjee, Y. Dreher, J. Fichtler, K. Jahnke, L. Hilbert, V. Ziburdaev, A DNA Segregation Module for Synthetic Cells, **19-13** (2022).
- (9) Q. Zhao, F. Cao, Z. Luo, W. Huck, N. Deng, Photoswitchable Molecular Communication between Programmable DNA-Based Artificial Membraneless Organelles, **61-14** (2022).
- (10) R. Ushiyama, K. Koiwai, and H. Suzuki, Plug-and-play microfluidic production of monodisperse giant unilamellar vesicles using droplet transfer across Water-Oil interface, *Sens. Act. B Chemical*, **355-131281** (2022).