

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「ゲノムスケールの DNA 設計・合成
による細胞制御技術の創出」
研究課題「電界誘起気泡及びDNAナノ粒子結晶
による長鎖DNAの導入・操作技術の研究」

研究終了報告書

研究期間 2019年10月～2025年03月

研究代表者：山西 陽子
(九州大学 大学院工学研究院 教授)

§1 研究実施の概要

(1)実施概要

本 CREST チームでは、電気・物理刺激による導入手段「電界誘起気泡」法、DNA ナノ粒子結晶技術を分野横断的に組み合わせて、長鎖 DNA を「包んで細胞に入れて徐放する」ことで細胞内での長鎖 DNA を機能させることを目指し研究を遂行している。具体的には

- ・物理スケールに非依存な電気・物理刺激による導入手段「電界誘起気泡」法
- ・様々な物理スケールの分子を封入可能な DNA ナノ粒子結晶
- ・ゲノム編集を含む分子生物学・光化学的ツール

を組み合わせて、

- (1)長鎖 DNA を DNA ナノ粒子結晶に封入するプロセス
- (2)電界誘起気泡による DNA ナノ粒子結晶の細胞への物理的導入
- (3)DNA ナノ粒子結晶による細胞内長鎖 DNA 徐放と機能発現を確立し、

長鎖 DNA を「包んで入れて徐放する」ことで物理的に脆弱な長鎖 DNA を細胞に容易に導入し、細胞内で長鎖 DNA を機能させる。

- (a)長鎖 DNA やその DNA を機能化した微細構造体を導入するために、電界誘起気泡による電気・物理的刺激による導入法である“Electromechanical Poration”を確立した。低い細胞濃度においても増粘剤添加によって同等の効果を示すことが実証された。

- (b) Electromechanical Poration 法により、DNA を機能化した微細構造体($\sim 1 \mu\text{m}$)を細胞に注入することに成功した。

(2)顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. Electromechanical Poration 法の確立(九州大学・産総研)

概要:長鎖 DNA やその DNA を機能化した微細構造体を導入するために、電界誘起気泡による電気・物理的刺激による導入法である“Electromechanical Poration”を確立した。低い細胞濃度においても増粘剤添加によって同等の効果を示すことが実証されており、今後幅広い細胞種への長鎖 DNA 導入法として期待されている。また Electromechanical Poration 法により、DNA を機能化した微細構造体($\sim 1 \mu\text{m}$)を細胞に注入することに成功した。(後述の顕著な論文[1]Lab on a chip (2022) (DOI: 10. 1039/d2lc00628f)の表紙となった)

2. DNA 修飾金ナノ粒子結晶への CRISPR-Cas9 の RNP 封入法の確立(名古屋大・産総研)

概要:金ナノ粒子の表面に DNA を修飾することで、DNA のプログラマブルな性質を利用して粒子間距離や空間配置を制御可能な、DNA 修飾金ナノ粒子結晶を新しくデザインし、結晶内の細孔にゲノム編集に用いられる CRISPR-Cas9 のリボヌクレオタンパク質 (RNP) 等の生体分子を封入することに初めて成功した。加えて、CRISPR-Cas9 の RNP を封入した結晶をパーティクルガン法により植物(シロイヌナズナ)へ導入し、実際にゲノム編集を確認できた。DNA 修飾金ナノ粒子結晶は局在表面プラズモン共鳴に基づく特異な光学特性等を発揮する材料として期待されており、また、DNA などソフトマテリアルのみから構成される材料に比べて、乾燥下でも立体構造が壊れにくいといった利点をもつ。パーティクルガン法の担体として活用は、担体を乾燥するステップを必要とするパーティクルガン法には、DNA ナノ粒子結晶の頑強性を利用した形となる。(上記の成果は後述の顕著な論文[2] Soft Matter (2022)として発刊された)

3. マイクロ流体チップを用いた細胞融合チップ法の確立(九州大学、基生研)

概要:大きなサイズの分子の細胞への導入細胞と所望の分子を入れたリポソームと融合することを目標とし、基礎研究を進めた。まずは細胞同士の融合チップを製作して評価を進めた。微小液滴への細胞封入により細胞をペアリングし、液滴を細胞の融合場として用いることで、微細構造物にて細胞をペアリングすることなく融合細胞を連続的に作製し、その後速やかに回収・観察可能とするマイクロ流体システムの構築を目指し、研究を進めた。これまでの結果として、十字流路を用いた微小液滴への細胞封入による細胞ペアリング、マイクロピラーアレイを用いた細胞封入液滴の分離、および電極配列流路を用いた細胞封入液滴への電圧印加による細胞融合を連続的に行うことを可能とするマイクロ流体システムのプロトタイプを構築し、回収した細胞封入液滴から融合細胞の確認することに成功している。(詳細は後述)

＜科学技術イノベーションに大きく寄与する成果＞

1. Electromechanical Poration 法の確立(九州大学・産総研)

概要:長鎖 DNA やその DNA を機能化した微細構造体を導入するために、電界誘起気泡による電気・物理的刺激による導入法である“Electromechanical Poration”を確立した手法を応用し、植物などへの高精度位置制御遺伝子導入パターンニング技術などの実施例を増やしている。九州大学と産総研の共同出願の特許が、各国移行のフェーズに入っており、最初の装置のユーザーは誰になるかを検討中である。最も引き合いが大きいのは藻類への導入である。実際に、当装置を藻類への使いたいという企業、研究所が複数あり、その方々に技術を届けるべく、遺伝子導入装置を販売する国内企業と交渉中である。本成果は論文[1]Lab on a chip (2022) (DOI: 10.1039/d2lc00628f)の表紙となった。

2. DNA 修飾金ナノ粒子結晶への CRISPR-Cas9 の RNP 封入法の確立(名古屋大・産総研)

概要:本研究では、金ナノ粒子の表面に DNA を修飾することで、DNA のプログラマブルな性質を利用して粒子間距離や空間配置を制御可能な、DNA 修飾金ナノ粒子結晶を新しくデザインし、結晶内の細孔にゲノム編集に用いられる CRISPR-Cas9 のリボヌクレオタンパク質(RNP)等の生体分子を封入することに初めて成功した。(上記の成果は後述の顕著な論文[2] Soft Matter (2022)として発刊された)

3. マイクロ流体チップを用いた細胞融合チップ法の確立(九州大学、基生研)

概要:大きなサイズの分子の細胞への導入細胞と所望の分子を入れたリポソームと融合することを目標とし微小液滴への細胞封入により細胞をペアリングし、液滴を細胞の融合場として用いることで、微細構造物にて細胞をペアリングすることなく融合細胞を連続的に作製し、その後速やかに回収・観察可能とするマイクロ流体システムの構築を行った。また細胞を 2 個で1つの液滴に封入する新たな液滴への細胞封入技術(仮想粒子バルブ)の構築も行い、より効率的な細胞融合システムを行った。現在論文投稿中である。

＜代表的な論文＞

1. Electromechanical Poration 法の成果論文(九州大学・産総研)

Authors: W. Huang, S. Sakuma, N. Tottori, S. S. Sugano and Y. Yamanishi

Title: Viscosity-aided electromechanical poration of cells for transfecting molecules

Journal: Lab on a chip (2022) (DOI: 10.1039/d2lc00628f)

概要:本研究では、誘電体材料で覆われた微細電極からなるコアシェル構造のマイクロバブルインジェクターを用いて、電気機械的手法で細胞に穿孔をつくり、巨大なゲノム情報を持つ大きな分子を細胞へ導入できることを達成した。電極にパルス電圧を印加することで、電極の先端にマイクロバブルが発生し、細胞に電気と機械的刺激を同時に与えることができ、特に、細胞懸濁液の粘度を高めることで導入効率が向上することを見いだした。このことは電界誘起気泡の繰り返しの膨張・収縮(振動波)によって達成されたと推定される。

2. DNA 修飾金ナノ粒子結晶への CRISPR-Cas9 の RNP 封入法の論文(名古屋大・産総研)

Authors: M. Yokomori, H. Suzuki, A. Nakamura, S. S. Sugano, M. Tagawa

Title: DNA-functionalized colloidal crystals for macromolecular encapsulation DNA-functionalized colloidal crystals for macromolecular encapsulation

Journal: Soft Matter (2022) (DOI: 10.1039/D2SM00949H)

概要:細胞内への導入が試みられてこなかった DNA 修飾金ナノ粒子結晶を、CRISPR-Cas9 の RNP のデリバリーに用いることが可能であることを証明した論文。

＜代表的な招待講演＞

1. 日本薬理学会 JST CREST・さがけ(2023 年 12 月) 発表者:山西 陽子

「ゲノムスケールの DNA 設計・合成による細胞制御技術の創出」 共催シンポジウム

ゲノム合成から創薬へ

概要:

「マイクロスケールの気液流体制御デバイスによる細胞操作とバイオメディカル応用」というタイトルで Electromechanical Poration 法とマイクロ流体チップを用いた細胞融合チップの現状と技術展開についての発表を行った。-----

2.IEEE ICRA2024Keynote 招待講演(2024 年 5 月) 発表者:山西 陽子

概要:ロボットの世界最高峰の学会である ICRA2024 において Keynote 講演の機会を得ることができた。「Emergent Functions of Electrically-induced Bubbles and Intra-cellular-CA」というタイトルで電界誘起気泡のこれまでの技術の紹介と、その結果を元にして想定できる今後の技

術の発展の形の講演を行った。ロボット界でのバイオ産業としてのインジェクターの興味の高さを知ることができた。-----

3.第 47 回日本分子生物学会内(ミニシンポ)招待講演(2024 年 11 月) 発表者:山西 陽子

概要:「電界誘起気泡による遺伝子導入技術の進展」というタイトルで、初めて生物分野における学会での招待講演を行った。「人工ゲノムを組み上げ、ゲノム動作原理を理解する」というミニシンポジウムの中での講演であり、従来の導入法とは異なる物理と電気刺激を利用した導入技術の紹介をした結果、様々な分野の研究者からの反響があった。-----

§ 2 研究実施体制

(1)研究チームの体制について

(1)山西グループ(九州大)

① 研究代表者:山西 陽子 (九州大学大学院工学研究院 教授)

② 研究項目

- ・電界誘起気泡による DNA ナノ粒子結晶の細胞への導入デバイス構築
- ・発生気泡のサイズコントロールと侵襲性評価と制御
- ・細胞導入済み DNA ナノ粒子結晶の結晶性評価手法によるダメージ評価
- ・電界誘起気泡による動物細胞 NIH/3T3 等への DNA ナノ粒子結晶導入
- ・動物細胞に導入された DNA ナノ粒子結晶に封入された DNA の徐放及び機能発現

(2)田川グループ(名古屋大 未来材料・システム研究所 教授)

① 主たる共同研究者:田川 美穂 (名古屋大学未来材料・システム研究所 教授)

② 研究項目

- ・長鎖 DNA を封入するための DNA ナノ粒子結晶の構築
- ・細胞導入済み DNA ナノ粒子結晶の結晶性評価手法によるダメージ評価
- ・可逆性 DNA 光連結反応技術を用いた結晶開裂技術の構築

(3)菅野グループ(産業技術総合研究所)

① 主たる共同研究者:菅野 茂夫 (産総研 生物プロセス部門 主任研究員)

② 研究項目

- ・長鎖 DNA を封入するための DNA ナノ粒子結晶の構築
- ・ゲノム編集技術応用による結晶開裂技術・機能発現技術の構築

(4)坪内グループ(基礎生物研究所)

① 主たる共同研究者:坪内 知美 (基礎生物学研究所幹細胞生物学研究室・准教授)

② 研究項目

- ・細胞融合効率・生存率の評価

(2)国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

領域内連携として大きなプラスミドを Electromechanical Poration により導入できるか試すために、さきがけ大関先生より頂いた alphoid DNA 配列を持つ BAC プラスミドを導入可能か試すことができた。また、さきがけの坪内研究者と共同研究で細胞融合技術のマイクロ流体チップを開発し CREST への編入へ繋がった。本 CREST 研究から研究者が繋がって発展し 18 チームから構成されるムーンショットプロジェクトへの採択を達成している。

また産業界においては、九州大学と産総研の共同出願の特許が、各国移行のフェーズに入っている。現在、実用化に向けて遺伝子導入装置を販売する国内企業と交渉中である。