

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21710119

研究課題名（和文）ゲノムサイズ長鎖 DNA の単一分子構造転移を中核とした自律的情報処理システム

研究課題名（英文）An autonomous information processing system based on the single-molecular structural transition of genome-size giant DNAs.

研究代表者

瀧ノ上 正浩（TAKINOUE MASAHIRO）

東京工業大学・大学院総合理工学研究科・講師

研究者番号：20511249

研究成果の概要（和文）：マイクロ流体工学を応用し，DNA を含む生体高分子システムへの分子的な入出力が可能となるマイクロメートルサイズ（細胞サイズ）の微小反応系の構築に成功した．この技術により，自律的な情報処理に必須となる，溶液濃度のダイナミックな制御や，開放系の反応容器の構築ができることを示した．

研究成果の概要（英文）：The construction of micrometer-sized (cell-sized) reaction systems was achieved using microfluidic technologies. The cell-sized reaction system can encapsulate biomolecular systems including DNAs, proteins, etc., and also realizes molecular input/output from/to exterior environments. As a result, the dynamic concentration control of a cell-sized reaction system required for autonomous molecular information processing has been achieved using this device.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学 ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：ナノバイオ、非平衡、非線形、DNA、マイクロ流路、自律システム

1. 研究開始当初の背景

生命システムは高度に組織化された分子情報処理システムであり，これを支えるのは自律的な振る舞いや自己組織化などのダイナミックな現象である．これらの現象をモデル化したシステムを構築することは，ナノバイオサイエンスの研究をリードしていく重要なアプローチの一つである．

分子情報処理に目を向けると，DNA/RNA を利用したナノ情報処理システムの構築が，近年大きく進展していることが分かる．DNA

会合反応を利用した自律的分子コンピュータおよび論理演算回路，RNA 転写反応を利用した論理演算など，自律的に情報を処理するナノシステムが構築され，DNA/RNA による情報処理の大きな可能性が発見されつつある．さらには，細胞サイズリポソーム（直径 10 μm 程度の脂質二重膜で細胞膜を模倣）や細胞内で動く分子情報処理システムへの本格的な発展がなされることが考えられる．将来，ダウンサイジングにより，究極的には，細胞内やナノ空間において単一分子で機能する，

ナノ情報テクノロジーへと発展することは間違いない。

実際、生命システムには単一分子レベルで情報処理を行っている部分がある。一細胞あたり一分子しか存在しないゲノム DNA からの情報の流れである。近年では、ゲノムサイズの DNA 単一分子の高次構造転移と RNA 転写活性の関わりが解明されつつある。ゲノム DNA (以下、長鎖 DNA と呼ぶ) は、小さいものでも数十 kbp 以上、全長で数十 μm 以上あり、単一の高分子としては巨大なものに属する。この長鎖 DNA は、その大きさゆえに、この長さに特有の現象である DNA 高次構造転移を引き起こす。長鎖 DNA は、周囲の溶液環境 (イオン・高分子濃度など) の影響を受け、空間的に数 μm 程度に大きく広がった「弛緩状態」と数百 nm 程度に小さく折り畳まれた「凝縮状態」の間を転移するのである (密度に換算して $10^4 \sim 10^5$ 倍も変化)。さらに、弛緩状態だと長鎖 DNA からの RNA 転写活性が ON、凝縮状態だと OFF となることも分かっている。この構造転移による転写活性の ON/OFF は DNA 単一分子で起こる非常にシャープなスイッチである。このようなダイナミックな制御が、生体内では、細胞膜や核膜といった数 μm から数十 μm の非常に小さい空間の中で行われている。この巧妙な仕組みを解明し、応用する方法放論を構築することは、今後のナノバイオサイエンスの発展に非常に重要となると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、細胞サイズの空間で、自律的に動作する DNA システムを構築するための基礎技術の開発を行うことを目的とする。特に、DNA を含む生体分子反応システムの制御を実現できる、微小な (数十マイクロメートルサイズの) 非平衡開放系システムの構築を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

ゲノムサイズ DNA を 1 分子レベルで制御するためには数十マイクロメートルサイズの反応容器が必要となる。また、ゲノムサイズ DNA の高次構造転移を引き起こすのは、ゲノムサイズ DNA の周囲の環境 (イオン濃度、高分子濃度、pH など) である。したがって、数十マイクロメートルサイズの反応容器で、かつ、容器内の溶液濃度を自在にコントロールできるようなシステムの開発が必須となる。ここでは、マイクロ加工技術により、マイクロ流路を作製し、上記を満たすシステムを開発を行った。

(1) 細胞サイズ反応チャンバーへの DNA の内包技術の開発

まず、細胞サイズ (直径数十マイクロメートル程度) の微小空間に、数マイクロメートルにおよぶゲノムサイズ DNA が効率よく内包できることを調べた。

マイクロ加工技術により、多数の細胞サイズチャンバーをマイクロ流路側面に構築し、ウィルスゲノム DNA をマイクロ流路に流して同時に内包する方法を考案した。

(2) 細胞サイズの反応チャンバーへの分子入力および反応チャンバーからの分子出力が可能マイクロ流体システムの開発

細胞サイズの反応チャンバーに内包された生体高分子システムへの分子的な入力を行い、そこで自律的に情報処理が行われた結果を出力として外に取り出す手法を考案した。

細胞サイズの反応チャンバーは、油中水滴技術によって開発し、また、入力も別の油中水滴に内包して、それらの融合・分裂によって分子のやりとりを行わせ、分子的な入出力を可能とした。自在に制御を行うために、マイクロパターン電極を作製し、油中水滴同士の融合分裂を電圧で制御する手法を考案した。

4. 研究成果

(1) 細胞サイズ反応チャンバーへの DNA の内包技術の開発

ここでは、図 1a にあるような、細胞サイズの反応チャンバーがマイクロ流路側面にアレイ化されたシステムを利用した。このマイクロ流体システムは、フォトリソグラフィを使ったマイクロ加工技術によって作製した、ポリジメチルシロキサン (PDMS) 樹脂でできた流路であり、幅 $45 \mu\text{m}$ 、高さ $4 \mu\text{m}$ である。チャンバー部分のサイズは、 $45 \mu\text{m} \times 45 \mu\text{m}$ 、高さ $4 \mu\text{m}$ である。

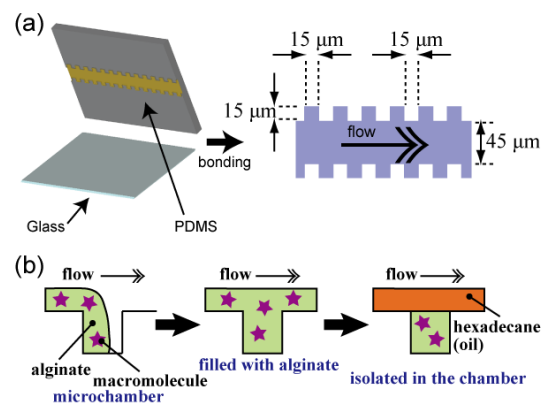


図 1: (a) マイクロ流体システムのデザイン。(b) マイクロチャンバーへの DNA 反応溶液の内包手順。

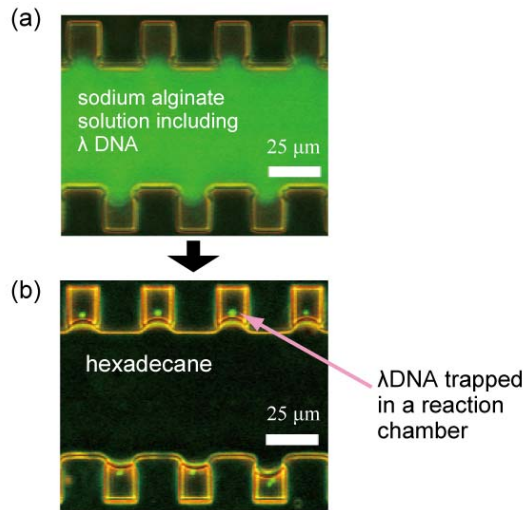


図 2: (a) 流路全体に DNA 溶液を満たした状態。DNA は SYBR Green I (蛍光色素) によって染色されているため、緑色に観測される。[DNA]=53ng/ μ L, [Sodium alginate]=2%。(b) ヘキサデカンによって蓋をされ、独立したマイクロチャンパー。チャンパー内の緑色の輝点が DNA。

この細胞サイズマイクロチャンパーへの DNA 反応溶液の内包の手順は図 1b に示されている。まず、マイクロチャンパーを含む流路全体を DNA 反応溶液で満たす。次に、流路にヘキサデカン（有機溶媒）を流す。ヘキサデカンは炭化水素のオイルであり、水溶液とは混ざらないため、図 1b 右のように、マイクロチャンパーにオイルで蓋をした状態を作れる。この方法により独立したマイクロチャンパーが多数構築できる。

実際に実験を行った結果が図 2 に示されている。図 2a は、流路全体に DNA 溶液を満たした状態を示している。ここではゲノム DNA として、ファージ(ウイルス)のゲノム DNA (λ DNA) を利用した。DNA は、49 kbps, 17 μ m の長さを持つ DNA 分子である。図 2 で、DNA は SYBR Green I (蛍光色素) によって緑色に染色されている。マイクロチャンパーの奥の方は蛍光の色が弱い、これは、DNA のサイズとマイクロチャンパーのサイズが同じくらい大きさであるため、DNA が奥の方には入り切れていないことを示唆している。図 2b は、ヘキサデカンによって蓋をされ、独立したマイクロチャンパーを示している。チャンパー内の緑色の輝点が DNA であり、全てのマイクロチャンパーに、DNA が内包されたことが観察された。

(2) 細胞サイズの反応チャンパーへの分子入力および反応チャンパーからの分子出力が可能なマイクロ流体システムの開発

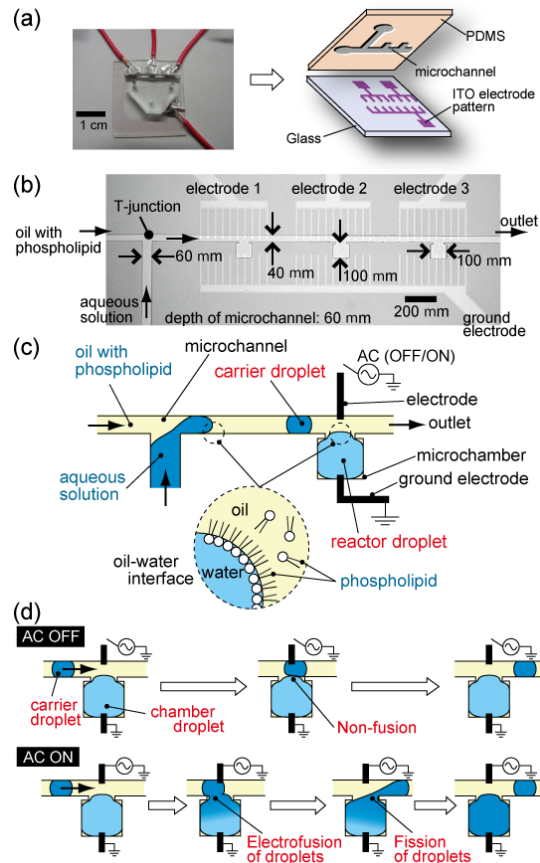


図 3: (a) マイクロ流体システムの概要。(b) 流路の顕微鏡写真。(c) 反応用細胞サイズ油中水滴チャンパーの固定とキャリア用油中水滴の生成の仕組み。(d) 電圧印加による反応用細胞サイズ油中水滴とキャリア用油中水滴の融合分裂の模式図。

ここでは、DNA・タンパク質等による生体分子システムを内包した細胞サイズのチャンパーの溶液交換を実現する手法を開発した。細胞サイズのチャンパーとして、油中水滴系を利用した。これは、(1)で作製したチャンパーと同じ方式で作られる。

図 3a・b に、この実験用に作製したマイクロ流体システムの概要と顕微鏡像を示している。メイン流路は 40 μ m の幅で、高さは 60 μ m である。メイン流路にはリン脂質分子を 0.5%含むヘキサデカン（オイル）が流れており、反応用のチャンパーはメイン流路の側面の窪みに固定されている（100 μ m \times 100 μ m \times 高さ 60 μ m）。図 3c にあるように、反応用のチャンパー（油中水滴）は、その界面にリン脂質の単分子膜が構成されており、細胞膜の内側のような状態が作られている。また、反応用の油中水滴の他に、入力分子を含むキャリアの油中水滴を流路上流で作製し、ヘキサデカンの流れに乗せて反応用油中水滴まで運ぶ。

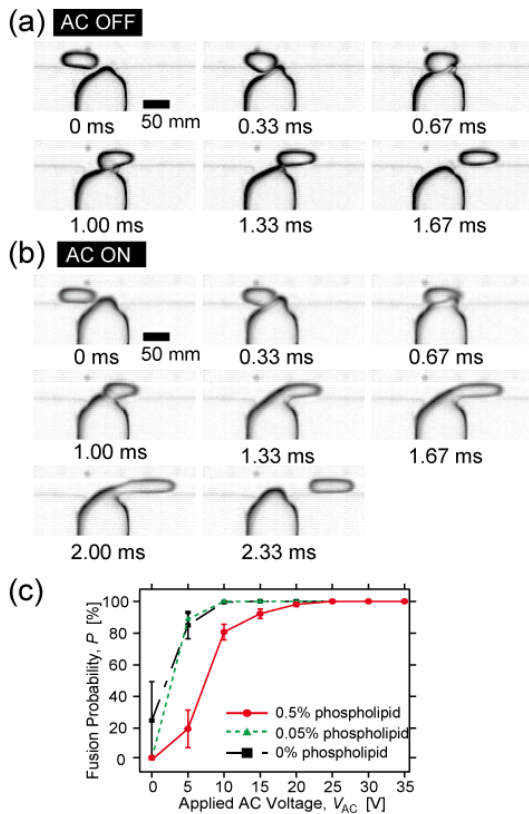


図 4: (a) 電圧を印加していない場合 . 油中水滴同士は融合しない . (b) 電圧を印加した場合 (40V) . 油中水滴同士が融合し , その直後に分裂 . (c) 印加電圧に対する油中水滴の融合確率のリン脂質濃度依存性

図 3a・b・c にあるように , 反応用の油中水滴を挟むように Indium Tin Oxide (ITO) による透明電極が配線されており , 電圧を印加した時だけ , キャリアの油中水滴と反応用チャンバーの油中水滴が融合するように設計してある (図 3d) .

図 4b は電圧を印加した際の融合分裂の様子を示している . 電圧を印加することにより油中水滴間の薄膜が不安定化し , 水滴同士の融合が起こる . 一方 , 電圧を印加していない場合は水滴間の薄膜は安定であり融合が起こらない (図 4a) . この安定性は印加電圧によって変化する . 図 4c に印加電圧に対する油中水滴の融合確率を示した . 膜の安定性は , 油中に溶解しているリン脂質の濃度にも依存する . リン脂質濃度が低い場合 (0% , 0.05%) , どの電圧でも融合する確率が高いばかりでなく , 電荷を印加していない場合でも , 融合してしまうことがある . リン脂質濃度が十分高い場合 (0.5%) , 電圧を印加していない場合は全く融合せず , 高い電圧 (25V 以上) を書けた場合は必ず融合できる . 本実験で , リン脂質濃度 , 印加電圧を適切な条件にすることで油中水滴の融合を確実に制御できることが分かった .

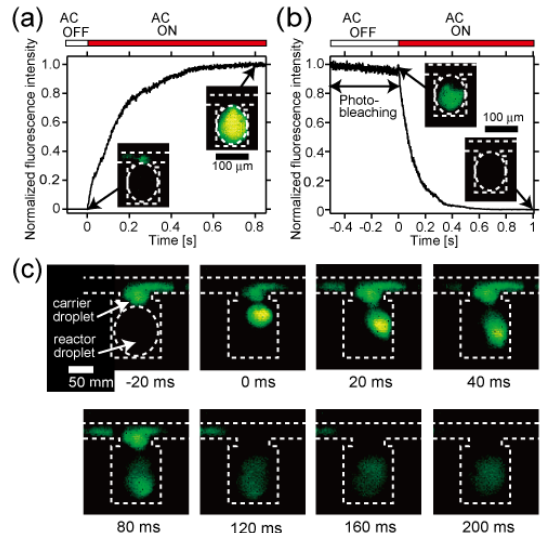


図 5: (a)(b) 融合分裂による反作用油中水滴チャンバーの溶液交換の経時計測 . (a) 蛍光分子の流入 . (b) 蛍光分子の流出 . (c) 混合の瞬間 .

図 5a・b は , 細胞サイズの反作用油中水滴チャンバーへの物質流入出の経時変化を示している . 流入 (図 5a) ・流出 (図 5b) , いずれの場合も , およそ 1 秒未満で溶液の交換が実現できる . この 1 秒の間に約 100 回の融合分裂が起きている . また , 1 回の融合分裂の際の混合の様子は , 図 5c に示されている . 流路を流れるオイルによって反応用チャンバーの中にも回転流が発生し , 混合を早めている様子が観察された .

以上により , 細胞サイズの反応チャンバーの溶液の交換を自在に行う技術が構築された . したがって , 細胞サイズのシステムで , 分子の入力・出力が制御できるということが示された .

本研究で開発された非平衡開放系システムの成果を発展させることで , DNA による自律的情報処理が可能な , 人工細胞システムを実現することが可能であると考えられる .

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

Masahiro Takinoue, Hiroaki Onoe, Daisuke Kiriya, Shoji Takeuchi, "Propelling Microobjects Using A Stationary DC Voltage", Proceedings of The 24th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS2011), pp. 1173-1176 (2011) . (査読有り・紀要)

Masahiro Takinoue, Hiroaki Onoe, Shoji Takeuchi, " Fusion and fission control of picoliter-sized microdroplets for changing the solution concentration of microreactors ", Small, vol.6, 2374-2377 (2010) (本誌の表紙としてハイライト). (査読有り・学術誌)

Masahiro Takinoue, Hiroaki Onoe, Shoji Takeuchi, " Solution concentration change of picoliter-sized microdroplet reactors ", Proceedings of The 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (microTAS 2010), pp. 1829-1831 (2010). (査読有り・紀要)

[学会発表](計 16 件)

瀧ノ上正浩, " 非平衡人工細胞モデルを目指した油中水滴エマルジョン技術 ", 第 4 回定量生物学の会, ポスター発表, No. 133, January 7-9, 2012, 名古屋

Masahiro Takinoue, " Investigation of a nonequilibrium artificial cell model based on a droplet microfluidics ", 「細胞を創る」研究会 4.0, No.P-8, October 24-28, 2011, 大阪

瀧ノ上正浩, " Microfluidic technology toward the construction of nonequilibrium artificial cells ", 日本生物物理学会 第 49 回年会, 口頭発表, No.3J1024, September 16-18, 2011, 姫路

瀧ノ上正浩, 尾上弘晃, 竹内昌治, " 非平衡人工細胞モデルのための W/O microdroplet の溶液交換 ", 第 23 回化学とマイクロ・ナノシステム研究会 Poster PA19, June 10-11, 2011, 千葉

Masahiro Takinoue, Hiroaki Onoe, Daisuke Kiriya, Shoji Takeuchi, " Propelling Microobjects Using A Stationary DC Voltage ", The 24th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS2011), poster No. 246-W, January 23-27, 2011, Cancun, Mexico

瀧ノ上正浩, 尾上弘晃, 竹内昌治, " 生命の非平衡性・自律性と細胞サイズ反応系 ", 「細胞を創る」研究会 3.0, Poster No.P-14, November 12-13, 2010, 東京

Masahiro Takinoue, Hiroaki Onoe, Shoji Takeuchi, " Solution Concentration Change Of Picoliter-sized Microdroplet Reactors ", The 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (microTAS 2010), Poster No. W26D, October 3-7, 2010, Groningen, The Netherlands

Masahiro Takinoue, " Biophysical

approach to cell-sized molecular robots ", International Conference on Bioinformatics (InCoB) Tokyo 2010, September 28, 2010, Tokyo, Japan (招待講演)

Masahiro Takinoue, Hiroaki Onoe, Shoji Takeuchi, " 融合分裂を利用したリン脂質ベースの細胞サイズ油中水滴のダイナミック濃度変換 ", 日本生物物理学会 第 48 回年会, Poster No. 2P347, September 20-22, 2010, 仙台

瀧ノ上正浩, 尾上弘晃, 竹内昌治, " ドロプレット溶液交換システム ", 第 21 回化学とマイクロ・ナノシステム研究会, Poster No. PA009, June 10-11, 2010, 東京

瀧ノ上正浩, 尾上弘晃, 竹内昌治, " 非平衡開放系マイクロチャンバー ", 第 10 回東京大学生命科学シンポジウム, Poster No. PB-049, May 1, 2010, 東京

堀内浩太, 瀧ノ上正浩, 竹内昌治, 村田智, " DNA マイクロカプセルの開発 ", 計測自動制御学会 システム・情報部門 学術講演会 2009 (SSI2009), Poster No. 3B5-5, November 24-26, 2009, 東京

Masahiro Takinoue, Shoji Takeuchi, " A cell-sized semipermeable chamber for biophysics (生物物理学のための細胞サイズ半透膜チャンバー) ", 日本生物物理学会 第 47 回年会, Poster No. 1P-274, October 30-November 1, 2009, 徳島

瀧ノ上正浩, 竹内昌治, " 細胞サイズの半透膜ケージへの生体高分子のカプセル化ー細胞サイズ非平衡開放系ー ", 「細胞を創る」研究会 2.0, Poster No. P-39, Oct. 2-3, 2009, 東京

堀内浩太, 瀧ノ上正浩, 竹内昌治, 村田智, " アルギン酸ゲルビーズを用いた DNA マイクロカプセルの構築 ", 「細胞を創る」研究会 2.0, Poster No. P-38, Oct. 2-3, 2009, 東京

Masahiro Takinoue, Sadao Ota, Satoko Yoshizawa, Aki Adachi, Shoji Takeuchi, " Formation of microcompartments surrounded by semipermeable membranes ", International Symposium: Innovative Nanoscience of Supermolecular Motor Proteins (INSMP), Poster Presentation, Poster No. P-51, September 8-10, 2009, Kyoto, Japan

[図書](計 1 件)

小宮健, 瀧ノ上正浩, 田中文昭, 浜田省吾, 村田智 (著), 萩谷昌己, 横森貴 (編), " DNA ナノエンジニアリング (ナチュラルコンピューティング・シリーズ第 2 巻) ", 近代科学社, (2011/4/30), 202

ページ, ISBN: 978-4-7649-0402-6

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.lifephys.dis.titech.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀧ノ上 正浩 (TAKINOUE MASAHIRO)

東京工業大学・大学院総合理工学研究科・

講師

研究者番号: 20511249

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし