

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19786

研究課題名（和文）海水中、大気中で作動するリポソーム型分子ロボットの開発

研究課題名（英文）Development of liposome-typed molecular robots that will work in air and sea water

研究代表者

川野 竜司（Kawano, Ryuji）

東京農工大学・工学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：90401702

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本課題では海水中と大気中で作動するリポソーム型およびシャボン玉型分子ロボットの開発を試みた。PDMS流路で作製したリポソームは、細胞サイズのものが作製可能で、界面張力の比率を最適化することで安定なリポソームの作製に成功した。現在海水中での安定性を評価している（査読付き国際会議採択、Micromachines 2023）。大気中で作動するシャボン玉型分子ロボットは、界面活性剤や溶液粘度を最適化し、流路の内・外を空気とし、その間にシャボン液を入れた流路により比較的均一サイズのシャボン玉の作製に成功した（査読付き国際会議採択）。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分子ロボットは、分子でできた部品をアSEMBルして任意の仕事を行う細胞サイズのロボットと定義された次世代の生体模倣型ロボットである。リポソーム型分子ロボットは脂質二分子膜でできたカプセルで、脂質膜中に膜タンパク質や疎水性分子、内部に水溶性の様々な機能性分子を内包でき高度な機能の埋め込みが可能であることから、申請者はこのリポソーム型の分子ロボットの開発に取り組んでいる。これまで分子ロボットの研究のほとんどが生体内や単純バッファー中での検討しか行われていたため自然環境中や大気のような脱水環境での使用が望まれると考え、本研究を推進し、海水中・大気中で作動可能な分子ロボットのプロトタイプの開発を行った。

研究成果の概要（英文）：The researchers aimed to develop cell-sized molecular robots that can operate in natural and dehydrated environments. Liposome and soap bubble types were attempted using PDMS flow and glass capillary channels. Stable liposomes were produced by optimizing the ratio of interfacial tension, while soap bubbles were produced using a channel with air and soap bubble liquid. Hydrodynamic simulations are underway to create micro-sized soap bubbles. The findings have shown promising results, but challenges remain such as improving the stability of liposomes in seawater and fabricating smaller soap bubbles.

研究分野：マイクロ分析化学

キーワード：脂質二分子膜 リポソーム マイクロ流路 分子ロボット

1. 研究開始当初の背景

分子ロボットは、分子でできた部品(例えば分子モーターなど)をアSEMBルして任意の仕事を行う細胞サイズ($< 100 \mu\text{m}$)のロボットである。分子ロボットの定義として、次の3つの要素を持つものが分子ロボットであると提案されている: 1) 外部を認識可能なセンサを有す。2) 情報処理ができる。3) (自律的に)動くことができる。分子の部品としての例を挙げる。1)のセンサは匂いや味覚を受容する膜タンパク質や光に応答する分子がセンサとなる。2)の情報処理は、生体内では酵素反応や電子反応のカスケードにより行われるが、分子ロボットではDNA コンピューティングを用いた情報処理が利用されている。3)動きは様々な方法が提案されており、細胞骨格タンパクであるアクチンの重合や、高分子ゲルの体積相転移を利用する方法がある。

分子ロボットの骨格として主に高分子ゲルとリポソームが用いられている。リポソーム型分子ロボットは脂質二分子膜でできたカプセルで、脂質膜中に膜タンパク質や疎水性分子、内部に水溶性の様々な機能性分子を内包でき高度な機能の埋め込みが可能であることから、申請者はこのリポソーム型の分子ロボットの開発に取り組んでいる。これまでリポソームは、細胞・小胞体モデルやドラッグデリバリーの担体として研究が進んでいるため、生理環境での使用以外ほとんど検討されていなかった。

分子ロボットも同様に研究のほとんどが生体内や単純バッファー中での検討しか行われていないが、今後、実際にロボットとしての実用的な動作を考えると、自然環境中や大気のような脱水環境での使用が望まれると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、自然環境中で作動可能な細胞サイズ分子ロボットのプロトタイプを開発することである。具体的には海水中と大気中で作動するリポソーム型およびシャボン玉型分子ロボットを開発する。

本研究では 1) 海水中で動作するリポソーム型分子ロボット、2) 空気中で動作するシャボン玉型分子ロボットのプロトタイプ開発を行う。1)海水中で動作するリポソーム型分子ロボット: 海水は NaCl を主成分とし、他に Mg、Ca、 SO_4 、 HCO_3 イオンが含まれている。また実際の海水には、これらのイオンに加え有機物(アミノ酸、糖類)やプランクトンなどの微生物が存在する雑多な塩水溶液である。このような環境中でも十分に仕事ができる、安定なリポソームの作製法を確立する。これまでの予備検討により、内部浸透圧を疑似海水溶液と等張になるように多糖で調整したリポソーム作製したところ、疑似海水溶液中でも細胞サイズリポソームとして形状保持が可能なことがわかった。2) 空気中で動作するシャボン玉型分子ロボット: これまでリポソーム型・ゲル型、どちらの分子ロボットも水中での使用しか考慮されてこなかった。申請者は水中から脱出し空気中でも作動する細胞サイズの分子ロボットを造るため、シャボン玉に着目した。シャボン玉はリポソームの脂質二分子膜構造を反転した膜構造を持ち、両親媒性分子の疎水側を空気側、親水側を膜内側に向けることで、空気-水-空構造を形成する。このシャボン玉の水相に DNA コンピュータを封入し、空気中から取り込んだ分子の情報を処理する細胞サイズのシャボン玉型分子ロボットの開発を目指す。

3. 研究の方法

各研究項目における研究方法について述べる。

1) 海水中で動作するリポソーム型分子ロボット

海水は NaCl を主成分とし、他に Mg、Ca、SO₄、HCO₃ イオンが含まれている。また実際の海水には、これらのイオンに加え有機物（アミノ酸、糖類）やプランクトンなどの微生物が存在する雑多な塩水溶液である。このような環境中でも十分に仕事ができる、安定なリポソームの作製法を確立する。これまでの予備検討により、内部浸透圧を疑似海水溶液と等張になるように多糖で調整したリポソーム作製したところ、疑似海水溶液中でも細胞サイズリポソームとして形状保持が可能ながわかった。そこで本課題では、1-1) 脂質膜の強靱化：コレステロール添加、脂質組成の最適化、の二つの小課題に取り組み、また 1-2) 均一サイズリポソームが作製可能なマイクロ流路を用いて検討を行う。また安定性の高いリポソーム作製法が確立した場合、海水リポソーム中での無細胞タンパク合成にも挑戦する。

2) 空気中で動作するシャボン玉型分子ロボット

これまでリポソーム型・ゲル型、どちらの分子ロボットも水中での使用しか考慮されてこなかった。申請者は水中から脱出して空気中でも作動する細胞サイズの分子ロボットを造るため、シャボン玉に着目した。シャボン玉はリポソームの脂質二分子膜構造を反転した膜構造を持ち、両親媒性分子の疎水側を空気側、親水側を膜内側に向けることで、空気-水-空気 (air/water/air, A/W/A) 構造を形成する。このシャボン玉の水相に DNA コンピュータを構築し、空気中から取り込んだ分子の情報を処理する細胞サイズのシャボン玉型分子ロボットの開発を目指す。これまでの予備検討で、先端をマイクロサイズに加工したガラスピペットを用い、およそ 50 ~ 400 μm のシャボン玉を作ることに成功している。しかしながら、その安定性は主に溶液の揮発により不十分となっており、また空気中での飛行の定量的評価方法を確立する必要がある。そこで、本課題では 2-1) 安定な細胞サイズシャボン玉の作製：界面活性剤の検討、難揮発性溶液（イオン液体、水溶性高分子等）を用いた作製法の検討、2-2) 飛行の定量的評価法の確立および DNA 反応の組み込み：高速度カメラを用いた画像解析、蛍光分子による DNA 論理演算の構築・評価、の二つの小課題に取り組む。

4. 研究成果

各研究項目における研究方法について述べる。

1) 海水中で動作するリポソーム型分子ロボット

1-1) 脂質膜の強靱化

予備検討により、内部浸透圧を疑似海水溶液と等張になるように多糖で調整したリポソーム作製したところ、疑似海水溶液中でも細胞サイズリポソームとして形状保持が可能ながわかった。しかしながら通常のバッファー溶液と比べその経時安定性は著しく低かった。海水中に存在する塩に関して一種類ずつリポソームの安定性のどのような影響を及ぼすのかを調べたところ、Ca²⁺ と Mg²⁺ の 2 価の塩が存在するとリポソームが短時間で割れてしまうことが分かった。また短鎖のペプチド類があると膜の破裂や変形が起こることが分かった。¹⁾そこで、脂質膜に影響を及ぼす分子の接近を妨げる目的で、PEG-lipid を膜に添加したところ、2 価の塩が存在する溶液において経時安定性が著しく向上することが分かった。また実際に三浦海岸で海水を採取し、リポソーム実験を行ったところ、追加の条件検討を経て、海水中でも安定にリポソームを保持することに成功した（論文投稿中）。

1-2) マイクロ流路によるリポソーム作製と反応系の付与

マイクロ流路による均一サイズリポソームの作製は、既報の octanol-assisted liposome assembly (OLA)法を用いた。この方法では、マイクロ流路中を親水・疎水性の異なる表面処理を行い、WOWの三層界面の界面張力のバランスを利用して dewetting 現象により WOW エマルジョンからリポソームを作製する。はじめに海水を用いてリポソーム作製を試みたが、流路でのリポソーム形成は難しかった。そこで次に通常の溶液条件でリポソームを作製し、海水に置換したところ、ほとんどのリポソームが割れてしまった。そこで(1-1)条件で、海水中で安定な PEG を含む脂質組成でリポソーム形成を試みた。種々の条件検討を経て、PEG 脂質入りの膜においても均一リポソームの形成に成功したが、海水に置換したところリポソームはその形状を維持することができなかった。現在さらなる条件検討を行っているところである。

2) 空気中で動作するシャボン玉型分子ロボット

シャボン玉はリポソームの脂質二分子膜構造を反転した膜構造を持ち、両親媒性分子の疎水側を空気側、親水側を膜内側に向けることで、空気-水-空気(air/water/air, A/W/A)構造を形成する。この構造を構築するために、新たにリポソームをガラスキャピラリーで作製する手法を考案した。リポソームの場合、外液/脂質-有機溶媒/内液の三種の溶液を、キャピラリーを利用して同時にフローする。これを模倣し、外空気/シャボン液/内空気となるようにキャピラリーデバイスを設計し、下記の課題に取り組んだ。

2-1) 安定な細胞サイズシャボン玉の作製

安定なシャボン玉を形成するために、種々の界面活性剤を検討した。詳述は避けるが、非イオン性、両性、カチオン性、アニオン性の界面活性剤を詳細に検討し、アニオン性の界面活性剤がサイズの小さいシャボン玉の形成に適しているのではないかと考えている。このアニオン性界面活性剤を用いて作製したキャピラリーデバイスで、最小約 800 μm のシャボン玉の作製に成功した。また連続的なシャボン玉生成、及び飛行に成功した。

2-2) シャボン玉飛行の定量的評価法の確立および DNA 反応の組み込み

キャピラリーデバイスからシャボン玉を飛ばすことに成功したので、次に飛行しているシャボン玉の評価を行った。背景を淡色にした壁に光を当てながら高速度カメラを用い、散乱光での評価を試みたが像のブレ等により定量評価が困難であった。そこでシャボン玉飛行後のシートに付着し割れたシャボン玉痕からそのサイズの評価を行った。その結果飛行しているシャボン玉の直径は約 1000-2000 μm 程度であることが分かった。次のこのシャボン玉に蛍光色素を導入し、DNA 反応後の出力を蛍光検出できるのかについて検討した。蛍光色素には水溶性で、毒性が低く比較的安価なものを選択した。濃度条件などの最適化を行った後、キャピラリーデバイスを用いシャボン玉を作製し、飛行しているシャボン玉に励起光を充てたところ、緑色の蛍光が確認できた。現在蛍光検出可能な DNA の反応系の導入を進めている(国際会議投稿中)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ushiyama Ryota, Koiwai Keiichiro, Suzuki Hiroaki	4. 巻 355
2. 論文標題 Plug-and-play microfluidic production of monodisperse giant unilamellar vesicles using droplet transfer across Water/Oil interface	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sensors and Actuators B: Chemical	6. 最初と最後の頁 131281 ~ 131281
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.snb.2021.131281	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 小祝敬一郎、和泉佳弥乃、川野竜司	4. 巻 76
2. 論文標題 分子でつくるロボットーリボソーム型分子ロボットの開発	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 化学	6. 最初と最後の頁 70-71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Izumi Kayano, Saito Chihiro, Kawano Ryuji	4. 巻 14
2. 論文標題 Liposome Deformation Induced by Membrane-Binding Peptides	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 373 ~ 373
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/mi14020373	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Izumi Kayano, Koiwai Keiichiro, Kawano Ryuji	4. 巻 122
2. 論文標題 Long-term survivable liposomes in seawater	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	6. 最初と最後の頁 82a ~ 82a
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bpj.2022.11.650	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Rina Takagi, Sotaro Takiguchi and Ryuji Kawano	4. 巻 1
2. 論文標題 Toward Operation of Molecular Robot in the Air: Glass Capillary-based Generation of Reproducible Soap Bubble	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of MicroTAS	6. 最初と最後の頁 1091-1092
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Izumi Kayano, Mijiddorj Batsaikhan, Saito Chihiro, Kawamura Izuru, Kawano Ryuji	4. 巻 1
2. 論文標題 Peptide Structure: Electrophysiological Analysis, Nuclear Magnetic Resonance Analysis, and Molecular Dynamics Simulation of Direct Penetration of Cell Penetrating Peptides through Bilayer Lipid Membranes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Penetrating Peptides	6. 最初と最後の頁 109 - 140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/9783527835997.ch8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Izumi Kayano, Koiwai Keiichiro, Kawano Ryuji
2. 発表標題 Long-term survivable liposomes in seawater
3. 学会等名 BPS2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高木里菜, 滝口創太郎, 小祝敬一郎, 鈴木宏明, 川野竜司
2. 発表標題 ガラスキャピラリーによる均一サイズリボソームの作製
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第44 回研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Rina Takagi, Sotaro Takiguchi and Ryuji Kawano
2. 発表標題 Toward Operation of Molecular Robot in the Air: Glass Capillary-based Generation of Reproducible Soap Bubble
3. 学会等名 MicroTAS2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川野竜司
2. 発表標題 人工細胞膜システムを創る
3. 学会等名 細胞を創る研究会15.0 (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Satoshi Murata	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 296
3. 書名 Molecular Robotics: An Introduction	

1. 著者名 Makoto Oba, Yosuke Demizu	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Wiley VCH GmbH	5. 総ページ数 403
3. 書名 Cell Penetrating Peptides: Design, Development and Applications	

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京農工大学 川野研究室
<http://web.tuat.ac.jp/~rjkawano/index.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小祝 敬一郎 (Koiwai Keiichiro) (10867617)	東京海洋大学・学術研究院・助教 (12614)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	ジョンズホプキンス大学		