

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2010～2014

課題番号：22220001

研究課題名(和文) DNAナノエンジニアリングによる分子ロボティクスの創成

研究課題名(英文) Development of molecular robotics based on DNA nanoengineering

研究代表者

村田 智 (MURATA, Satoshi)

東北大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10334533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 164,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、DNAナノエンジニアリングのアプローチにより、部品となる分子ひとつひとつを設計し、それをシステムとして組み立てて、さまざまな環境の変化に対し自律的に応答することのできる分子機械システム、すなわち「分子ロボット」を構築する方法の基盤を確立することを目的として、(1) 分子デバイスを格納するためのコンパートメントの作製技術 (2) コンパートメントを介して分子入出力を行うインターフェースの実装技術 (3) 分子ロボット内部の反応を制御する技術および分子ロボット間の分子通信技術 (4) 分子通信による相互作用を通じて分子ロボット群が協調するためのルール設計技術、を開発する。

研究成果の概要(英文)：In this research project, aiming at developing fundamental techniques to construct molecular robots composed of molecular devices rigorously designed from scratch, which are able to adapt to various environmental changes. The developed technologies based on DNA nano-engineering include

(1) Techniques to fabricate compartments which compose the body of molecular robot containing molecular devices, (2) Techniques to realize interface, which realizes molecular communication across the compartment, (3) Techniques to control the molecular computation in molecular robots and intra-and inter-molecular robot communication, (4) Techniques to design cooperative behaviors of swarm of multiple molecular robots.

研究分野：DNA ナノエンジニアリング

キーワード：分子ロボティクス DNAナノエンジニアリング DNAナノ構造 機能性ゲル 自律分散システム

1. 研究開始当初の背景

生物の細胞は、長い進化の歴史が生み出した究極の分子機械システムである。生物細胞の中に存在する機能部品、構造部品はおもにタンパク質分子で構成されている。タンパク質は DNA に保存された塩基配列の情報を転写、翻訳して合成されたアミノ酸の連鎖が、折り畳まれて一定の形をなしたもので、さらにそれがたくさん自己集合していろいろな構造体をつくり出している。このプロセスをまねることは今のところ難しいが、人工の分子デバイスを作り出し、それらを複数組み合わせたシステムを構築することができれば、人工の細胞として様々な利用ができる。

2. 研究の目的

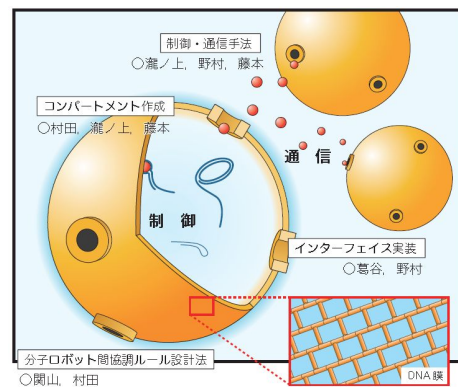
本研究では、DNA ナノエンジニアリングのアプローチ（引用文献）により、部品となる分子デバイスひとつひとつを設計し、それをシステムとして組み立てて、さまざまな環境の変化に対し自律的に応答することのできる分子機械システム、すなわち「分子ロボット」を構築する方法の基盤を確立することを目指す。

DNA ナノエンジニアリングによって、数ナノメートルから 100 ナノメートルのサイズいろいろな形状の構造体や、論理演算を行う分子デバイスを作り出すことが可能である。しかし、これまでのシステム化はすべて試験管の中の反応として行われており、部品が分子サイズであることの利点が生かせていない。DNA のハイブリダイゼーション反応は、反応空間をマイクロサイズに縮小しても試験管とほぼ同じであると考えてよく、マイクロサイズのコンパートメント（容器）を作ることができれば、その中の分子デバイス群をシステムとしてマイクロ化できる。ただし、分子ロボットが外部の環境と作用するために、コンパートメントにインターフェース機能が必要になる。本研究では、インターフェース機能を持った DNA 分子デバイスを組み込ん

だコンパートメントを作製し、分子ロボットの基本機能を実証することを目指す。

具体的には、

- (1) 分子デバイスを格納するためのコンパートメントの作製技術
- (2) コンパートメントを介して分子入出力を行うインターフェースの実装技術
- (3) 分子ロボット内部の反応を制御する技術および分子ロボット間の分子通信技術
- (4) 分子通信による相互作用を通じて、分子ロボット群が協調するためのルール設計技術を開発する。



3. 研究の方法

(1) コンパートメント作製

ゲルビーズまたはリポソームなどのマイクロサイズの球体をテンプレートとして基板成長 DNA モチーフで被覆することによりコンパートメントを作製する技術を開発する。

(2) インターフェース実装

コンパートメントに埋め込むチャンネル構造を開発する。チャンネル構造としては、2 次元 DNA オリガミ技術で開閉可能な窓構造、3 次元 DNA オリガミ技術で作製するタンパク質のチャンネル構造と類似の構造を作製する。

(3) 制御・通信手法

コンパートメント外からの分子を入力として、コンパートメント内で増幅、論理演算、記憶、分子出力を行う方法を検討する。

(4) 分子ロボット間協調ルールの設計

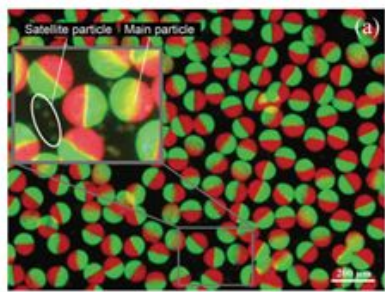
応用をイメージした課題を設定し、理論解析およびシミュレーションを行う。実際に構築

した分子ロボットにより検証実験を行う。

4. 研究成果

(1) コンパートメント作製

藤本は、耐熱性のあるコンパートメント作製を目指して、人工光クロスリンク分子シアノビニルカルバゾール (cnvK) を用いた可逆的光架橋反応を基礎とした耐熱性 DNA タイルの作製を行った。その結果、得られた DNA ナノ構造は 70 度を超える高温条件下でも安定であることを見いだした。また、村田は、光応答するカプセル様構造の実現を目指して、上述の cnvK をもちいた DNA ゲルの作製を試み、ゲル化およびゾル化が可逆的に光制御可能な DNA ゲルモチーフを開発し、照射により繰り返しゲル-ゾル遷移が可能であることを実証した。藤本は、cnvK 分子そのものの光クロスリンク反応の詳細を明らかにするために、速度論的解析や NMR による構造解析を行うとともに、さらに応答速度が大きい新規光応答性人工分子 cnvD の開発に成功した。一方、村田は、DNA ナノ構造によるカプセル製作の基盤技術として、ゲルビーズなどの帯電表面への DNA 吸着およびその基板上的成長を予測するための理論構築を行い、DNA 吸着には最小の長さのあることを見出した。また、瀧ノ上・竹内らは、遠心キャピラリーをもちいて、コンパートメント作製の鋳型として使用するためのマイクロメートルサイズのアルギン酸ハイドロゲルビーズ (球) の作製手法を確立した (下図)。

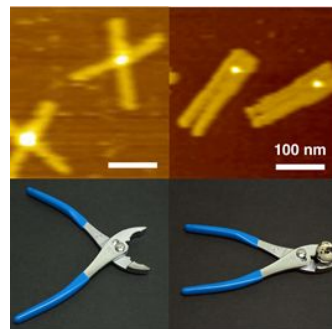


この技術により、従来の方法に比べ、非常に簡単に均一サイズのビーズを大量生産できるだけでなく、複数のコンパートメントに分かれたビーズの作製が可能になった。村田は、この方法で作製

したアルギン酸ゲルビーズをコアとして Y-motif DNA のゲル薄膜からなるコンパートメント作製技術を確立し、一定鎖長以上の DNA 単鎖を保持できることを確認した。これにより、DNA 分子計算素子をゲルビーズの中に保持することが可能であることが明らかになった。また、瀧ノ上は、油中水滴エマルションの界面をテンプレートにしたマイクロカプセルの作製についても検討し、正に帯電した界面活性剤分子で界面を覆うことにより、負に帯電した Y-motif DNA が界面に集積し薄膜をなすことを見出した。これにより DNA 薄膜ゲルによる裏打ち構造のある油中水滴の作製に成功した。また、葛谷は DNA-PEG-DNA トリブロックコポリマーを合成する系を確立し、これを用いてグアニン四重鎖や i-motif 四重鎖構造を架橋点とする新しい DNA ヒドロゲルを開発した。これによりカリウム濃度や pH に応答して溶解するゲルカプセルの作製が可能となった。

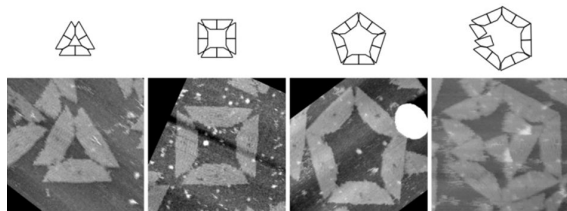
(2) インターフェース実装

葛谷はコンパートメント内部の分子を出し入れするチャンネルインターフェースのための基盤技術として、ナノスケールの構造変化がその機能に直結するナノメカニカル DNA オリガミデバイスを構築した (下図)。

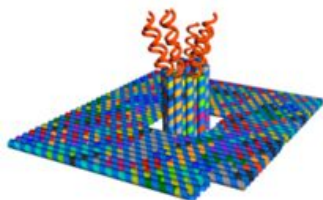


このデバイスはナノメートルサイズのペンチ状構造体で、さまざまなターゲット分子との相互作用により大きく構造変化する。これは、DNA オリガミハッチの開閉駆動に応用可能である。村田は、サイズの異なるインターフェース構築の基盤技術として、葛谷とは異なるデザインにより、可動部を有する DNA オリガミ構造体を作製し、可動部の長さを調節することで、いろいろな大きさの円環状の

集合体を作製することに成功した(下図)。



一方、葛谷は、コンパートメント構造へのチャネル構造の埋め込むための技術開発として、DNA Waffle と T-motif シートの複合体をマイカ基板上で作製し、DNA Waffle には抗体、t-motif シートにはストレプトアビジンを、それぞれ選択的に結合させることに成功した。一方、野村は、コンパートメント容器にリポソームを想定し、DNA オリガミを用いて、脂質二分子膜に局在して物質透過能を示す人工 DNA イオンチャネル(下図)を作製するとともに、それが



それが GUV (巨大単層ベシクル) に導入可能であることを示し、微弱

チャネル電流測定による評価系を構築した。

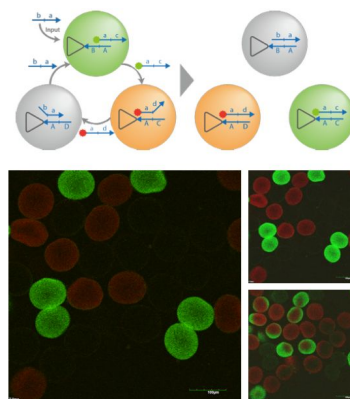
(3) 制御・通信:

藤本は、DNA 分子や RNA 分子を制御通信分子としたインターフェースを想定して、DNA および RNA 情報を位置選択的に補足し 90% 以上の効率で塩基情報を変換する手法を開発した。さらに外部刺激(光、磁場)によって、ミスマッチ DNA と目的の DNA を S/N 比 100 倍以上の高感度で正確に見分ける手法を開発した。また、瀧ノ上は、分子ロボットの内部状態遷移を引き起こす手法として、光入力をトリガーにした RNA 転写により、出力として RNA 分子を生成する手法を開発した。

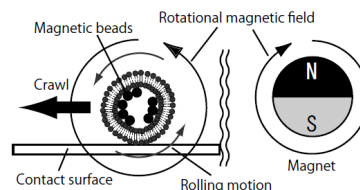
分子ロボットでは、センシング、内部状態遷移モデル、通信と相互作用、評価と選択、駆動制御などが DNA 計算に基づいた情報処理で実現される必要がある。そこで関山は、DNA ロボットの内部状態遷移を表現するモ

デルを、ペトリネットと呼ばれる離散分散システムの数学モデルで構築した。

村田は、分子ロボットの制御を想定した単純な論理回路を、前述の瀧ノ上が開発したマイクロゲルビーズに内包させた系を作製し、多分割ビーズ内の分子通信や、ビーズ間の分子通信により分子状態の遷移カスケードが実装可能であることを示した(下図)。



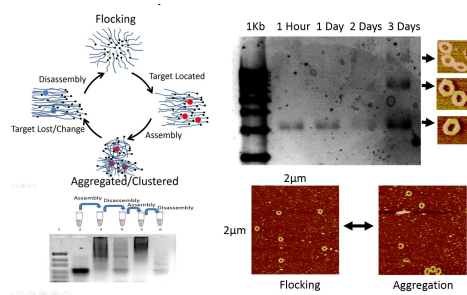
また、野村は、外部から与える磁場により空間移動が可能な回転するリポソーム・マイクロコロラを構築した。外部駆動ではあるが、すぐれた踏破性を持っており、培養細胞などの凹凸面上をころがり移動することができることを示した(下図)。



(4) 協調ルール

野村は、分子ロボットと細胞との相互作用を想定して、疎水性基を導入した X 型 DNA 分子を用いて、細胞膜およびリポソーム膜表面に付着し、かつ脂質膜上で平面拡散する DNA ナノ構造を構築、評価した。この分子は、膜上で部品(修飾 DNA)を交換したり、近傍にあるほかの細胞やリポソームへ移動したりすることが確認された。また、関山は、分子ロボットの集団行動戦略形成のモデルとして、免疫ネットワークモデルのクローン選択アルゴリズムを DNA 分子計算により実装した。さらに、DDS への応用を想定して、がん

細胞由来の miRNA を検出・分類するための決定木を DNA 分子計算系として構築し、シミュレーションおよび has-miR21 を用いた実験でその有効性を検証した。また、分子ロボット群の確率的行動選択手法として、免疫ネットワークアルゴリズムを DNA 分子計算で定式化した。また、分子ロボット構造体群が DNA のシグナルによって凝集・分離を行う実験を行った（下図）。



さらに、分子ロボット群の確率的行動選択手法として、免疫ネットワークアルゴリズムを DNA 分子計算で定式化した。

<引用文献>

[1] 小宮健, 瀧ノ上正浩, 村田智ほか, DNA ナノエンジニアリング, 近代科学社, 2011年。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 65 件 内査読付 58 件)

[1] Wibowo Adi, and Kosuke Sekiyama, “Building A Parallel Decision-Making System based on Rule-Based Classifiers in Molecular Robotics”, *International Journal On Smart Sensing And Intelligent Systems*, accepted, (2015). 査読有.

[2] Keitel Cervantes-Salguero, Shogo Hamada, Shin-ichiro M. Nomura, Satoshi Murata, Polymorphic Ring-Shaped Molecular Clusters Made of Shape-Variable Building Blocks, *Nanomaterials* 5(1), 208-217 (2015), 査読有; doi:10.3390/nano5010208

[3] Takashi Sakamoto, Yuya Tanaka, Kenzo Fujimoto, “DNA Photo-cross-linking using 3-Cyanovinylcarbazole Modified Oligonucleotide with Threoninol Linker”, *Organic Letters*, 7, 936-939 (2015). 査読有. DOI: 10.1021/acs.orglett.5b00035

[4] Hiroaki Onoe, Kiichi Inamori, Masahiro

Takinoue, Shoji Takeuchi, “Centrifuge-based cell encapsulation in hydrogel microbeads using sub-microliter sample solution”, *RSC Advances*, 4, 30480-30484 (2014). 査読有. DOI: 10.1039/c4ra02773f

[5] Takahiro Yamazaki, Jonathan Gardiner Heddle, Akinori Kuzuya, and Makoto Komiyama, Orthogonal Enzyme Arrays on a DNA Origami Scaffold Bearing Size-Tunable Wells, *Nanoscale*, 6, 9122-9126 (2014), 査読有. DOI: 10.1039/C4NR01598C

[6] Daiki Komatsu, Kei Fujiwara, Satoshi Murata, Shin-ichiro M. Nomura "Construction of a remote-controlled supramolecular micro-crawler", *ADVANCES IN ARTIFICIAL LIFE*, ECAL 2013, 208-209 (2013). 査読有. DOI:10.7551/978-0-262-31709-2-ch031

[7] Shin-ichiro M. Nomura, Yusuke Sato, Kei Fujiwara, Satoshi Murata "Molecular robotics approach for constructing an artificial cell model", *ADVANCES IN ARTIFICIAL LIFE*, ECAL 2013, 488-491 (2013). 査読有. DOI: 10.7551/978-0-262-31709-2-ch070

[8] Rizki Mardian, Kosuke Sekiyama, Toshio Fukuda, “Approaching Mathematical Model of the Immune Network based DNA Strand Displacement System”, *BioSystems*, 114, 3, 245-252 (2013), Elsevier, 査読有. DOI:10.1016/j.biosystems.2013.10.002

[9] Kenzo Fujimoto, Asuka Yamada, Yoshinaga Yoshimura, Tadashi Tsukaguchi, Takashi Sakamoto, “Details of the ultra-fast DNA photocrosslinking reaction of 3-cyanovinylcarbazole nucleoside; Cis-trans isomeric effect and the application for SNP based genotyping”, *J. Am. Chem. Soc.*, vol.135, pp.16161-16167 (2013). 査読有. DOI: 10.1021/ja406965f

[10] Shogo Hamada, Satoshi Murata, Theoretical model of substrate-assisted self-assembly of DNA nanostructures, *RSC Adv.*, 2, 7406-7412 (2012), 査読有. DOI: 10.1039/C2RA20764H

[11] Kazuki Maeda, Hiroaki Onoe, Masahiro Takinoue, Shoji Takeuchi, “Controlled synthesis of 3D multi-compartmental particles with centrifuge-based microdroplet formation from a multi-barrelled capillary”, *Adv. Mater.*, 24, 1340-1346 (2012). 査読有. DOI: 10.1002/adma.201102560

[12] Akinori Kuzuya, Yusuke Sakai, Takahiro Yamazaki, Yan Xu, and Makoto Komiyama Nanomechanical DNA Origami ‘Single-Molecule

Beacons' Directly Imaged by Atomic Force Microscopy, *Nature Communications*, 2, Article #449 (2011). 査読有 . DOI:10.1038/ncomms1452

〔学会発表〕(計 158 件 内招待講演 33 件)

[1] Satoshi Murata, "Substrate-assisted self-assembly of DNA nanostructure and its application in molecular robotics", *Foundations of Nanoscience*, April 4 (2010), SNOWBIRD, UT, USA (Invited talk).

[2] 村田 智, 「分子計算から分子ロボティクスへ」, 第 25 回人工知能学会全国大会, 2011 年 5 月 1 日, 盛岡・いわて情報交流センター (招待講演)

[3] 村田 智, 「DNA ナノ構造のためのモチーフ設計」, 日本化学会第 92 回春季大会, 2012 年 3 月 28 日, 慶応義塾大学日吉キャンパス (招待講演)

〔図書〕(計 8 件)

[1] 野村 M. 慎一郎 (竹内昌治, 上田泰己・編 分担執筆)
発行: 羊土社
書名: 細胞を創る・生命システムを創る
発行年: 2011 担当項 41-47, 総項数 220

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 5 件)

[1] 名称: 光クロスリンク能を有する光応答性ヌクレオチドアナログ
発明者: 藤本健造, 坂本隆, 田中佑弥
権利者: 北陸先端科学技術大学院大学
種類: 特許出願
番号: 特願 2013-070381
出願年月日: 2013.3.28
国内外の別: 国内

[2] 名称: 核酸ナノワイヤーの製造方法、該方法に使用される核酸、および該方法によって製造される核酸ナノワイヤー
発明者: 藤本健造, 中村重孝
権利者: 北陸先端科学技術大学院大学
種類: 特許出願
番号: 特願 2012-159889
出願年月日: 2014.2.3
国内外の別: 国内

[3] 名称: リポソームを用いた細胞内への物質導入方法
発明者: 小椋 利彦, 野村 慎一郎, 齋藤 明
権利者: 独立行政法人 科学技術振興機構
種類: 特願
番号: 2014-59898
出願日: 2015 年 2 月 25 日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 智 (MURATA, Satoshi)
東北大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号: 10334533

(2) 研究分担者

葛谷 明紀 (KUZUYA, Akinori)
関西大学・化学生命工学部・准教授
研究者番号: 00456154

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

関山 浩介 (SEKIYAMA, Kosuke)
名古屋大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号: 40293675

野村 慎一郎 (NOMURA, Shin-ichiro)
東北大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号: 50372446

藤本 健造 (FUJIMOTO, Kenzo)
北陸先端科学技術大学院大学・マテリアルサイエンス研究科・教授
研究者番号: 90293894

(3) 連携研究者

竹内 昌治 (TAKEUCHI, Shyoji)
東京大学・生産技術研究所・教授
研究者番号: 90343110

小林 聡 (KOBAYASHI, Satoshi)
電気通信大学・電気通信学部・教授
研究者番号: 50251707

川又 生吹 (KAWAMATA, Ibuki)
東北大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号: 30733977

森田 雅宗 (MORITA, Masamune)
東京工業大学・大学院総合理工学研究科・日本学術振興会特別研究員 (PD)
研究者番号: 90708504

(4) 研究協力者

浜田 省吾 (HAMADA, Shogo)
Kavli Postdoctoral Fellow, Kavli Institute at Cornell for Nanoscale Science, Cornell University
研究者番号: 90708504