

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02774

研究課題名(和文)人工分子デバイス援用による新世代人工細胞

研究課題名(英文) Developing DNA / RNA molecular devices for constructing a new generation of artificial cells.

研究代表者

野村 慎一郎 (NOMURA, Shin-ichiro)

東北大学・工学研究科・准教授

研究者番号：50372446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、DNA/RNAを用いて機能性分子デバイスを開発し、新規機能を示す新世代人工細胞の実現を目指した。人工分子デバイス群のデザインと機能評価を行い、さらにデバイスを実際に細胞内に導入するための手法の開発を行った。その結果、人工RNP(RNAとタンパク質の複合体)ナノ構造体を哺乳類細胞内で構築し機能させるという目標を達成した。また、脂質膜との連結をON/OFF制御するDNA複合体分子システム(分子クラッチ)を用いて、運動と静止が切り替わる人工細胞を構築した。その他構築された分子デバイスの成果も論文にて公表しており、本課題の成果は新世代の人工細胞構築に向けた基礎として利用されるだろう。

研究成果の概要(英文)：In this project we developed functional molecular devices using DNA / RNA. It would lead to the realization of new generation artificial cells showing new functions in the future. We performed design and functional evaluation of artificial molecular device group and developed a method to actually introduce the device into the cell. As a result, we achieved the goal of constructing artificial RNP (complex of RNA and protein) nanostructures in mammalian cells, and controlling the cell fate. In addition, artificial cells that switch between motive-state and stationary-state were constructed using DNA complex molecular system (molecular clutch) that controls on / off linkage with lipid membrane. In addition, all the results of the molecular devices we constructed were also published in the journal papers. The results of this project will be used as a basis for constructing a new generation of artificial cells.

研究分野：人工細胞工学，分子ロボティクス

キーワード：人工細胞 分子ロボティクス RNAナノテクノロジー DNAナノテクノロジー DNAコンピュータ

1. 研究開始当初の背景

本テーマは、細胞と協調動作して一過性の特異的な機能を与える機能性分子セットを開発し、これらの導入によって本来細胞が有しない新規機能を示す新世代人工細胞の実現を目指す、というものである。人工細胞とは細胞の機能を再現し、細胞には不可能な機能を実装可能にする人工物である。近年、生物学的・応用的側面からみた「人工細胞」の実現に向けた進歩が著しい。人工遺伝子回路の導入による新規機能の発現、標準化された遺伝子パーツ、体細胞リプログラミング、合成ゲノム導入による人造マイコプラズマ、CRISPER/Cas9等ゲノム編集ツール、酵母染色体合成など枚挙に遑がない。他方、生命とは何か、生命現象の最小セットとはどのような構造か、という問いに物質科学的見地から答えを求める研究もまた「人工細胞」という実体を得て進歩している。細胞サイズリポソーム(GUV)内での遺伝子発現、大腸菌内溶液のGUV封入、人工進化系のリポソーム内進行、自己複製するベシクルなど報告が続いている。その流れの中、本研究代表者野村は、遺伝子発現する人工細胞を構築し、これを用いた生細胞へのDDS(薬剤送達システム)という生物学と物質科学との橋渡しを行ってきている。そして最近、DNA/RNAを構造材料に用いる分子デバイスの構築が注目を集めている。生物材料である核酸の塩基配列をデザインすることによって望みの二次元/三次元構造を高収率で実現するこの技術は、作成方法の簡便さ、CADや安定性解析などのソフトウェアの進展に加えてオリゴ核酸の価格低下と迅速な提供によって研究が進んでいる。Harvard大のDouglasらによる閉閉式六角柱Molshipは細胞表面の分子をANDゲートで認識して構造を開き、内包した抗体を露出させる機構で高い選択性を示している。生体材料である核酸を用いた人工分子デバイスは、生体/細胞環境ではたらくことが期待される一方で、その殆どは抗がん剤キャリアの微粒粒子として用いられており、自在な設計が可能である利点は殆ど生かされていない。本研究分担者の齊藤博英らは、積極的に細胞内で働かせることを前提にして人工RNA-protein複合体構造を形成し、リボスイッチで細胞の運命制御を実現してきている。以上のような状況から、申請者らはデザインされたDNA/RNAナノデバイスを、生きた細胞本来の機能と連携動作させて新規機能を覚醒させることにより新型人工細胞を創出する、という考えに至った。

2. 研究の目的

本研究では、新世代人工細胞の構築に向けた基盤技術として、DNA/RNAナノテクノロジーによる新規な分子デバイスを設計して細胞に導入し、本来細胞が有しない新規機能を付与することを目指した。

3. 研究の方法

以下4種の人工分子デバイス群のデザインと機能評価を行い、これらデバイスを実際に細胞内に導入するための手法の開発を行った。具体的には、1)膜チャネル: デザインされた人工DNAチャネルについて、その構造に依存したチャネル電流のON/OFF挙動が確認された。2)座標制御デバイス: 齋藤グループで新規な立体構造を示すRNAナノデバイスの設計と開発を進め、構造の評価を行った。3)膜造形: DNAオリガミ製デバイス単体での改良では変形挙動が予想より小さく、脂質膜の変形効果を得るために強固なデザインへと変更を行った。4)膜リンカー: リポソームを用いた脂質膜内外からの合体デバイスを構築し、その評価を行った。そして、これら開発中の分子デバイスを一括して生きた細胞内部に導入可能とする手法として、GUV-細胞融合法の開発を進めた。GUVに内包させたマイクロメートルサイズにおよぶ人工物質を、生きた細胞内に導入するための条件として、その物理化学的特性と受け手の細胞側の条件を調査した。

4. 研究成果

1)膜チャネル: デザインされた人工DNAチャネルについて、その構造に依存したチャネル電流のON/OFF挙動が確認された。さらにGUV膜に埋め込んで物質透過能を測定したところ、選択性が期待される結果が得られたため、論文投稿準備中である。

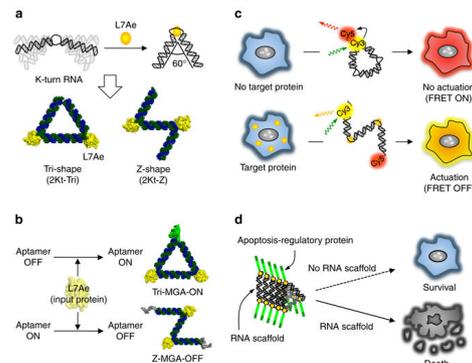


図1. 哺乳動物細胞内で機能するRNAナノデバイスの概略図(論文8)。

2)座標制御デバイス: 齋藤グループで新規な立体構造を示すRNAナノデバイスの設計と開発を進め、構造と機能の評価を行った。具体的には細胞内タンパク質の集積を制御するために、人工RNP(RNAとタンパク質の複合体)ナノ構造体を哺乳類細胞内で構築するという目標を達成し、論文発表と特許申請を行った。また、標的細胞内でナノサイズの人工RNP構造体を構築し、この細胞内で発現する特定のタンパク質をRNA構造体上に精密に集積・活性化させることで、シグナル伝達を特異的に制御する技術の実証を行い、論文にて報告した(図1)。

3)膜造形: DNAオリガミ製デバイス単体での改良では変形挙動が予想より小さく、他のデバイスに注力するものとした。この知見は、次

項目・膜リンカーの構築に生かされている。また、形状を平面様に設計変更したものに関して **GUV** の相分離膜の特定の構造に選択的に吸着するという挙動が確認され、その塩濃度依存性も示された。これらの結果をまとめた論文が受理されて現在印刷中である。

4)膜リンカー: 脂質膜を連結させる DNA 複合体デバイスを構築し、その評価を行った。その改良版を **GUV** 内部に導入し、タンパク質製分子モーターを強固にリポソーム膜内側にリンクすることを試みた。その結果、**GUV** 全体が運動性を示す構造を得ることが出来た。さらに膜リンカーの結合を **ON/OFF** する分子システム (分子クラッチ) を DNA によって組み上げ、実際に働くことを示した。これらを用いることによって、DNA 信号によって運動と静止を切り替えることのできる人工細胞が構築され、その成果を論文に発表した。

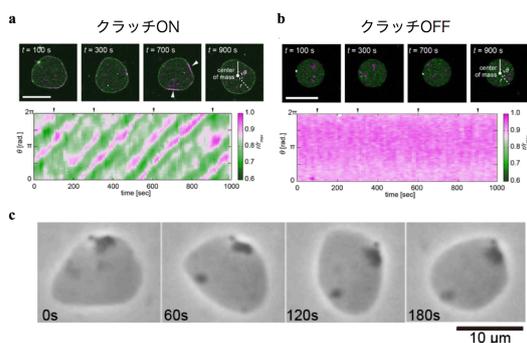


図 2. DNA 信号によって分子クラッチの **ON/OFF** を行い、運動と静止を切り替えることのできる人工細胞 (論文 10).

以上の他に、オリガミのねじり構造の違いによって重合度数が変化し、長軸長さを制御可能とした柱状超分子構造ユニットや、ステップモーター機構を DNA オリガミで設計し、これが設計通りに働くこと、梯子様 DNA 高次構造が部品の連続生産によって大量に構築されうることなどを示して論文発表を行った。

これらの人工分子デバイスを一括して細胞内部に導入可能とする **GUV**-細胞融合法の開発を進めた。当初予想しなかった展開として、ミトコンドリアの細胞への導入に利用できる可能性を実証し、特許申請を行った。また、人工分子デバイスのモデルとして、破壊によって蛍光強度の増大を示す DNA オリガミ構造を構築し、細胞内に導入して分解される時間を見積もった。分解のメカニズムについてより詳細な調査が必要であることから、引き続きモデルを用いた評価を行う予定である。

以上まとめると、本課題では、種々の DNA/RNA ナノデバイスの開発に取り組み、その知見を用いて運動制御が可能な人工細胞モデルを構築した。さらに培養細胞の機能を制御可能な核酸デバイスの実証実験を行った。これらの成果を論文として報告した。本課題を通じて、新規な人工細胞モデルの構築に向けて、要素技術・実装技術の両面から進展が

あったものと確信している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 17 件, 断りがなければ査読あり)

- 1) Kageyama Ryo, Kawamata Ibuki, Tanabe Kaori, Suzuki Yuki, Nomura Shin-ichiro M., Murata Satoshi, Construction of T-Motif-Based DNA Nanostructures through Enzymatic Reactions., *ChemBioChem*, 19(8), 873-876(2018). DOI:10.1002/cbic.201700682
- 2) Kurokawa Chikako, Fujiwara Kei, Morita Masamune, Kawamata Ibuki, Kawagishi Yui, Sakai Atsushi, Murayama Yoshihiro, Nomura Shin-ichiro M., Murata Satoshi, Takinoue Masahiro, Yanagisawa Miho, DNA cytoskeleton for stabilizing artificial cells., *PNAS*, 114, 7228-7223 (2017). DOI: 10.1073/pnas.1702208114
- 3) Fujiwara Kei, Sawamura Tsunehito, Niwa Tatsuya, Deyama Tatsuki, Nomura Shin-ichiro M., Taguchi Hideki, Doi Nobuhide, In vitro transcription-translation using bacterial genome as a template to reconstitute intracellular profile., *Nucleic Acids Research*, 45, 11449-11458 (2017). DOI: 10.1093/nar/gkx776
- 4) Uchida Takeo, Abe Keita, Endo Yuma, Ichiseki Shosei, Akita Satoru, Liu Shiyun, Aradachi Sho, Saito Masataka, Fukuchi Akihiko, Kikkawa Taiyo, Dammaretz Theo, Kawamata Ibuki, Suzuki Yuki, Nomura Shin-ichiro M., Murata Satoshi, Revolving Vernier Mechanism Controls Size of Linear Homomultimer., *Small*, 13, 1702158(2017). DOI: 10.1002/smll.201702158
- 5) Takahiro Tomaru, Yuki Suzuki, Ibuki Kawamata, Shin-ichiro M Nomura and Satoshi Murata, Stepping operation of rotary DNA origami device., *Chem.Comm.*, 53, 7716-7719(2017). DOI: 10.1039/C7CC03214E
- 6) Keitel Abraham Cervantes-Salguero, Ibuki Kawamata, Shin-ichiro M Nomura and Satoshi Murata, Unzipping and Shearing DNA with Electrophoresed Nanoparticle in Hydrogel., *Phys.Chem.Chem.Phys.*, 19, 13414-13418(2017). DOI: 10.1039/C7CP02214J
- 7) 佐藤祐介, 川又生吹, 野村慎一郎, アメーバ型分子ロボットの可能性, *医療と検査機器・試薬*, 40(3)190-194(2017), 査読なし.
- 8) Shibata Tomonori, Fujita Yoshihiko, Ohno Hirohisa, Suzuki Yuki, Hayashi Karin, Komatsu Kaoru R., Kawasaki Shunsuke, Hidaka Kumi, Yonehara Shin, Sugiyama Hiroshi, Endo Masayuki, Saito Hirohide, Protein-driven RNA nanostructured devices that function in vitro and control mammalian cell fate., *Nat. Commun.*, 8, 540(2017). doi: 10.1038/s41467-017-00459-x
- 9) Kawasaki S, Fujita Y, Nagaike T, Tomita K, Saito H., Synthetic mRNA devices that detect endogenous proteins and distinguish mammalian cells., *Nucleic Acids Res.*, 45(12), e117(2017). DOI: 10.1093/nar/gkx298

- 10) Yusuke Sato, Yuichi Hiratsuka, Ibuki Kawamata, Satoshi Murata, Shin-ichiro M. Nomura, Micrometer-sized molecular robot changes its shape in response to signal molecules, *Science Robotics*, 2, eaa13735 (2017), DOI : 10.1126/scirobotics.aal3735
- 11) Daisuke Kandatsu, Keitel Cervantes-Salguero, Ibuki Kawamata, Shogo Hamada, Shin-Ichiro M Nomura, Kenzo Fujimoto and Satoshi Murata, Reversible Gel-Sol Transition of Photo-Responsive DNA Gel., *ChemBioChem*, 17, 1118-1121(2016), DOI:10.1002/cbic.201600088
- 12) 佐藤 佑介, 瀧ノ上 正浩, 野村 M. 慎一郎, BIOMOD: 分子ロボティクスの次世代育成大会, *生物物理*, 56(5), 290-292(2016), DOI: 10.2142/biophys.56.290
- 13) Ohno, Hirohisa and Saito, Hirohide, RNA and RNP as Building Blocks for Nanotechnology and Synthetic Biology., *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, 139, 165-185(2016), DOI: 10.1016/bs.pmbts.2015.12.004
- 14) Ohno H, Osada E, Saito H, Design, assembly, and evaluation of RNA-protein nanostructures., *Methods in molecular biology*, 1297, 197-211(2015).
https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-4939-2562-9_14
- 15) Shibata T, Suzuki Y, Sugiyama H, Endo M, Saito H, Folding RNA-Protein Complex into Designed Nanostructures., *Methods in molecular biology*, 1316, 169-179(2015)
https://link.springer.com/protocol/10.1007%2F978-1-4939-2730-2_14
- 16) Morita M, Onoe H, Yanagisawa M, Ito H, Ichikawa M, Fujiwara K, Saito H, Takinoue M, Droplet-Shooting and Size-Filtration (DSSF) Method for Synthesis of Cell-Sized Liposomes with Controlled Lipid Compositions., *Chembiochem*, 16.14, 2029-2035(2015), DOI: 10.1002/cbic.201500354
- 17) 大野博久, 齊藤博英 「RNA/RNP ナノテクノロジーの生物学的応用」*生物物理*;56:23-6 (2016), DOI: 10.2142/biophys.56.023
- [学会発表] (計 30 件, 招待講演のみ記載)
- 1) Shin-ichiro M. Nomura, Molecular Robotics: yet another artificial cell, The Active Matter Workshop, 2018.
- 2) 齊藤博英, Synthetic RNA technologies to program cells, The SPIRITS INTERNATIONAL SYMPOSIUM, 2018.
- 3) Shin-ichiro M. NOMURA, Molecular Robot: An artificial molecular system constructed by integration of molecular machines, ICRA2017 workshop, 2017.
- 4) 野村 慎一郎, 物質転送ベシクル:細胞内への大規模物体導入法, 第 69 回日本細胞生物学会大会, 2017.
- 5) 野村 慎一郎, アメーバ型分子ロボットの構築, バイオ高分子研究会, 2017.
- 6) 野村 慎一郎, 物質転送ベシクル:細胞内への大規模物体導入法, ミトコンドリアサイエンスワークショップ, 2017.
- 7) Yusuke Sato, Yuichi Hiratsuka, Ibuki Kawamata, Satoshi Murata and Shin-ichiro M. Nomura, Non Natural Tiny-wet Machine: Molecular Robot, International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, 2017.
- 8) NOMURA M. Shin-ichiro, Molecular Robot with Switching Molecular Motors, International Symposium on Nanomedicine, 2017.
- 9) 齊藤博英, Synthetic RNA switch technologies to purify and program target cell types, 14th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems, 2017.
- 10) 齊藤博英, RNA ナノデバイスによる細胞プログラミング, 第 30 回 バイオエンジニアリング講話会, 2017.
- 11) 齊藤博英, Synthetic RNA-protein nanostructured devices that function in vitro and in cells, 生物物理学会, 2017.
- 12) Yusuke SATO, Yuichi HIRATSUKA, Ibuki KAWAMATA, Satoshi MURATA and Shin-ichiro M. NOMURA, Motility control of amoeba type molecular robot by DNA devices and molecular motors, FNANO, 2017.
- 13) Nomura M. Shin-ichiro, Sato Yusuke, Hiratsuka Yuichi, Kawagishi Yui, Ogura Toshihiko, Kawamata Ibuki, Murata Satoshi, Molecular robots under construction: amoeba-type artificial cell model., 第 64 回応用物理学会春季学術講演会, 2017.
- 14) 野村 M. 慎一郎, 自動人工アメーバ型マイクロ分子ロボット, NI-SIGNAC-CSS 合同研究会, 2017.
- 15) Shinichiro Nomura, Molecular robotics approach for creating artificial cells, The 6th Conference on Exploring Next-Generation Materials Science and Nanoscience (6NGMSNS), 2017.
- 16) Y. Sato, Y. Hiratsuka, I. Kawamata, S. Murata, S. M. Nomura, Robotic Vesicle: Motility Control of Microcapsule by DNA devices and Molecular Motors, Thirteenth International Conference on Flow Dynamics, 2016.
- 17) 野村 M. 慎一郎, 細胞様構造をつくる分子ロボットのデザイン, アストロバイオロジーネットワーク 2016 年年会, 2016.
- 18) Hirohide Saito, Development of Molecular Sensor and Device for Intelligent Molecular Robots, IEEE-NEMS, 2016.
- 19) Hirohide Saito, Synthetic RNA switches & nanostructures: programming mammalian cell fate, special bioengineering seminar in Caltech, 2016.
- 20) Hirohide Saito, Synthetic RNA switches & nanostructures that Identify and control target mammalian cells based on intracellular information, FIBER International summit for nucleic acids, 2016.
- 21) Hirohide Saito, Protein-driven nanostructures: Controlling mammalian cell fate, RNA Nanotechnology Conference, 2016.
- 22) 野村 M. 慎一郎, アメーバ型分子ロボットのデザインと構築, 11th Beyond'x Robotics 研究

- 会, 2016.
- 23) Hirohide Saito, Synthetic RNA Switches and Nanostructures to Detect, Purify, and Control Target Mammalian Calls, SBE's 6th International Conference on Biomolecular Engineering, 2016.
- 24) Hirohide Saito, Synthetic RNA Switches and Circuits to Detect and Purify Target Live Cells, UC San Diego Kyoto University joint Symposium, 2016.
- 25) NOMURA M. Shin-ichiro, SAITO Hirohide, TAKINOUE Masahiro, FUJIWARA Kei, OHNO Hirohisa, RNA membrane vesicle: micro compartment made by designed RNA molecules, PacifiChem, 2015.
- 26) Akira C. Saito, Toshihiko Ogura, Satoshi Murata, and Shin-ichiro M. Nomura, Electrofusion of Cell-GUV enables micrometer-sized artificial objects transfer into live cells, 10th European Biophysics Congress, 2015.
- 27) NOMURA M. Shin-ichiro, 合成細胞生物学ツールとして活用する GUV 人工細胞モデル, 第 53 回日本生物物理学会, 2015.
- 28) Satoru Yoshizawa, Ibuki Kawamata, Shin-ichiro M. Nomura, Satoshi Murata, Molecular information processing in micro gel beads with entrapped DNAs, DNA21, 2015.
- 29) Kazuki Hirahara, Ibuki Kawamata, Satoshi Murata, NOMURA M. Shin-ichiro, Designing an Artificial Membrane Channel From DNA origami, FNANO15, 2015.
- 30) Hirohide Saito, Synthetic RNA technologies to detect, purify, and control live cell populations, Paris Symposium on Integrated Cell-Material Sciences, 2015.

[図書] (計 1 件)

齊藤博英 「ナノテクノロジーが拓く 未来の医療」(第 3 章, 3-1) 丸善プラネット, 2017.

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: 生きた細胞内へのミトコンドリア導入法

発明者: 小椋利彦, 野村 慎一郎, 齋藤明
権利者: 国立研究開発法人科学技術振興機構
種類: 特許

番号: 特願 2015-18505 8

出願年月日: 2015 年 09 月 18 日

国内外の別: 国内

名称: RNA-タンパク質複合体とその使用

発明者: 齊藤博英, 柴田 知範

権利者: 同上

種類: 特許

番号: PCT/JP2016/071029

出願年月日: 2016 年 07 月 16 日

国内外の別: 外国

[その他]

運動制御型人工細胞 (アメーバ型分子ロボット) について:

・プレスリリース

<http://www.tohoku.ac.jp/japanese/2017/03/press20170228-02.html>

・IEEE spectrum

<http://spectrum.ieee.org/the-human-os/biomedical/devices/celllike-robot-programmable-with-dna>

(日経その他新聞, 各国語記事多数)
細胞内でタンパク質を検出して運命制御できる「RNA ナノマシン」の構築について:

[http://www.cira.kyoto-](http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/presrelease/news/170915-080000.html)

[u.ac.jp/j/presrelease/news/170915-080000.html](http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/presrelease/news/170915-080000.html)

骨格型人工細胞について:

・骨格で支えられた人工細胞の形成に成功
薬用カプセルや化粧品などの応用に耐える補強が実現

<https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2017/06/press20170626-02.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

齋藤 博英 (SAITO Hirohide)

京都大学・iPS 細胞研究所・教授

研究者番号: 20423014