

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2012～2016

課題番号：24104002

研究課題名（和文）核酸ナノ構造を活用した多元分子情報変換デバイスの創成

研究課題名（英文）Construction of multi-molecular information conversion devices by employing nucleic acid nanostructures

研究代表者

齊藤 博英（Hirohide, Saito）

京都大学・iPS細胞研究所・教授

研究者番号：20423014

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 145,600,000円

研究成果の概要（和文）：「感覚機能」を備えた分子ロボットを作製するため、様々な入力シグナルを1分子レベルで検知し、目的の内部情報へと自在に変換できる「多元分子情報変換デバイス」を構築することを目指し、研究を行った。まずは、人工受容体センサーの開発により、分子ロボットの感覚を実現した。また、センサーを搭載できる非対称・複雑形状のボディの開発や、ノイズリダクションのための少数分子化学反応系の理論の研究も行った。さらに、細胞内の情報をセンスする分子情報変換デバイス・分子ロボットとしてRNA型分子ロボットの構築も行った。以上により、本新学術領域研究の課題解決に成功した。

研究成果の概要（英文）：To realize molecular robots with 'sensor functions', our group studied the construction of 'multilevel molecular information conversion devices', which can detect various molecular input signals at the level of a single molecule and can convert them to intended internal information. We first constructed an artificial receptor-type molecular sensor device and then achieved a 'sense' of molecular robots. In addition, we constructed asymmetric complex-shaped bodies for molecular robot that can load molecular sensor devices. Furthermore, we studied theoretical research of chemical reactions with small number of molecules for noise reduction in molecular information sensing. To apply molecular sensor devices to in vivo systems, we constructed RNA-type molecular robots that can detect molecular information and convert it in cells. As a result, these studies contributed to the aim of this Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas, Molecular Robotics.

研究分野：生命工学

キーワード：分子ロボティクス DNAナノ構造 RNA/RNPナノ構造 分子センサー・人工レセプター リボソーム 人工細胞モデル 自律性 少数分子化学反応

1. 研究開始当初の背景

近年、核酸やタンパク質などの生体高分子を設計し、目的の機能構造体を作製する分子デザイン技術の開発が世界的に進展している。しかしながら、これらデザインした分子集合体をシステムとして組み上げ、様々な環境変動に応答して望みの動的挙動を実現する「分子ロボット」の創成には至っていない。本研究では、「感覚機能」を備えた分子ロボットを作製するため、様々な入力信号を1分子レベルで検知し、目的の内部情報へと自在に変換できる「多元分子情報変換デバイス」を構築することを目的とする。

2. 研究の目的

本研究では、「多元分子情報変換デバイス」の構築に向けて、以下の(1)~(4)のシステムの開発・確立を目的とした。

(1) 細胞内外で駆動する RNA 型分子ロボット

研究代表者である齊藤は班内外の研究者と協力し、RNA を材料として分子情報変換デバイス・分子ロボットの構築を目指した。RNA は DNA と同様に相補的な塩基対を形成できる他、多様な分子内相互作用に基づく複雑な立体構造も形成できる。その中にはリガンドの結合依存的に構造変化を起こすことが知られているものもある。そのような天然の RNA 分子の構造を参考にして、入力信号となる分子の結合によって構造が変化し、出力となる機能が変化するシステムの構築を目指した。

また、RNA の情報担体としての機能に注目し、生細胞における翻訳(タンパク質合成)レベルを制御する、異なる機構に基づく情報変換システムの開発を目指した。

(2) 分子ロボットの感覚となる人工受容体センサーの開発

分担者の遠藤は班内外の研究者と協力し、分子ロボットの感覚として脂質二重膜小胞(リポソーム)で仕切られた外部の情報を内部へ伝達する人工レセプター(受容体)を開発し、分子ロボット内部での反応を人工レセプターから伝達された情報を使って活性化分子システムの構築を目指した。これによって、構築した人工レセプターを介して、外部の分子情報や環境情報をセンシングし、リポソーム内部に導入した生化学反応回路を活性化する方法を確立することを目指した。さらに、構築した分子システムを種々の分子回路や分子ロボットの動きに連動するアクチュエータにつなげることにした。

(3) 分子ロボットのセンサーを搭載するためのボディの開発

分担者の瀧ノ上は班内外の研究者と協力し、分子ロボットのセンサーを搭載させるためのボディを効率よく生成し、分子センサーを機能させるための技術開発を目指した。特に、分子ロボットが機能を創発するために必要な非対称な形状を有したボディの開発や、ボディの機能化を目指し、センシングした情報

を自律運動につなげる基礎をつくることを目指した。

(4) 少数分子反応系の特性を用いたノイズリダクションを行う反応系の設計

分担者の鈴木は班内外の研究者と協力し、ノイズリダクションに関わる理論的研究を目指した。一般にノイズリダクションは音声処理(フィルタリング)により行われるが、かかる音声処理を化学反応系に単に移植するのではなく、DNA の動力的校正反応や生物・細胞内での少数分子の化学反応の特徴に学び、それら生物系の智慧を化学反応系の設計に応用することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 細胞内外で駆動する RNA 型分子ロボット

まず、RNA 型分子ロボットの構造的基盤となる RNA ナノ構造体の構築方法及びその解析方法を確立した。天然の RNA 分子の立体構造モチーフを構造部品として利用し、三次元的な分子設計を行うことで構造体を設計した。構築した RNA 構造体は、高速原子間力顕微鏡を用いてナノメートルレベルで詳細に解析した。構造体の構築に成功した後、特定のタンパク質に結合する RNA 構造モチーフといった機能性モジュールを構造体に導入し、入力信号となるタンパク質の結合によって形状や機能が変化するシステムを構築した。

また、細胞内のマイクロ RNA やタンパク質分子を入力信号として検出し、任意のタンパク質分子を出力する、上記構造体とは異なる機構による分子情報変換も試みた。具体的には、出力タンパク質の遺伝子を持つ mRNA 中に特定の分子が結合する配列を組み込むことによって、細胞内の特定の分子に応答して出力タンパク質合成の ON/OFF を制御するシステムを構築した。

(2) 分子ロボットの感覚となる人工受容体センサーの開発

まず、分子ロボットの感覚としてリポソームの外部の情報を内部へと伝達する人工レセプターを開発するため、DNA オリガミ技術を利用し、3 次元的な DNA ナノ構造(十字型 DNA オリガミ構造体)を構築した。次に、リポソームと DNA ナノ構造体の相互作用を検証するために、脂質二重膜上での DNA ナノ構造の高速 AFM 観察を利用することとした。最終的には、この人工レセプターの DNA ナノ構造を通して、リポソーム内部への情報伝達ができることを確認するために、リポソーム内部での反応とのカップリングを試みた。

(3) 分子ロボットのセンサーを搭載するためのボディの開発

まず、細胞サイズの水滴をテンプレートにして、細胞サイズの分子ロボットのボディを構築するためのマイクロ流体デバイスの構築を行った。ここでは、微量なサンプルから効率よく水滴滴を生成できる遠心型マイクロ流体デバイスを応用した。

細胞サイズの水滴をテンプレートにして、リ

ポソーム、非対称構造マイクロゲル、油中水滴エマルジョンなどの様々な構造・材料でボディとして使えるシステムを構築することを目指した。また、センサーに加えて運動機能の付与も試みた。

(4) 少数分子反応系の特性を用いたノイズリダクションを行う反応系の設計

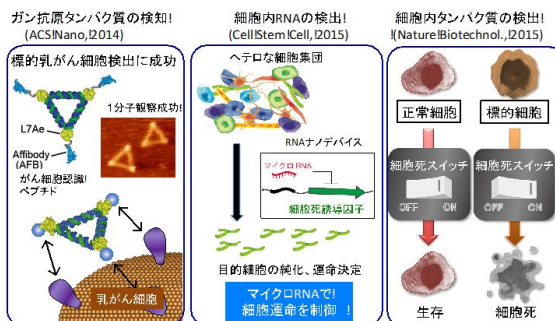
少数分子の化学反応系は従来法ではアプローチできないため、化学反応速度論の確率過程系と計算代数のハイブリッドな計算系（離散-連続系をつなぐ）を用いることとした。また生化学反応系にみられる自己組織化現象として Belousov-Zhabitskii 反応、ベシクル系、細胞内シグナル伝達系などマルチスケールの反応系の計算論的性質を調査した。そしてこれらを基盤として、ノイズリダクションを行う反応系の設計を行った。

4. 研究成果

(1) 細胞内外で駆動する RNA 型分子ロボット

代表者の齊藤らは RNA 構造モチーフを部品として使い、種々の RNA ナノ構造体を作製することに成功した（図 1）。遠藤らによって、それら構造体の構築過程や解離の様子を、高速原子間力顕微鏡を用いて 1 分子レベルでリアルタイム観察することにも成功した。作製した RNA 構造体を基に、特定タンパク質の結合によって形状が変わるタンパク質検出システムや、導入したペプチドや siRNA といった機能性分子によって特定の細胞表面受容体を持つ細胞のみを識別したり特定遺伝子の発現を制御できるシステムといった、有用な RNA デバイスの開発にも成功した。

また、細胞内のマイクロ RNA やタンパク質を検出して出力タンパク質発現の ON/OFF を切り替えるスイッチの開発にも成功した。細胞内情報を検出・認識できるこの技術を使えば、細胞の種類や分化段階を精密に識別できる。さらに、出力として細胞死誘導タンパク質を使うことで特定細胞のみに細胞死を引き起こすといった細胞の運命制御も可能となる。実際に、開発したスイッチを利用して、混在する未分化細胞を除去し目的とする特定の分化細胞のみを純化できることを示した。



!!細胞内外でシグナルを検知する機能するRNAナノ構造体の構築!

図 1. RNA ナノデバイスの設計と細胞運命の制御。RNA デバイスは細胞表面の抗原や細胞内 RNA を検出して駆動することができる。

(2) 分子ロボットの感覚となる人工受容体センサーの開発

分担者の遠藤らは、分子ロボットの感覚としてリポソームの外部の情報を内部へと伝達する人工レセプターを開発し、リポソーム内部の生化学反応回路を活性化する分子システムの構築を行った（図 2）。分子ロボットのセンサーとなる 2 種類の人工レセプター構造体の構築を行った。第一に、脂質膜を貫通する針状構造を持つ十字型 DNA オリガミ構造体を設計・構築した。リポソームと DNA ナノ構造体の相互作用は、脂質二重膜上での格子構造の構築と高速 AFM による格子構造の形成過程の可視化に成功した (Suzuki, Y et al., Nature Commun. 2015)。次に、この構造体がリポソーム表面に結合することを確かめ、DNA 増幅系を含むリポソームを使用することで、構造体の存在下でリポソーム内部での DNA 増幅反応の活性化に成功した。第二に、2 つのドメイン間にセンサー部位を導入した DNA オリガミ構造体を構築した。センシングする分子（外部刺激）に対して構造変化を起こすためのセンシング部位と先端が脂質膜を貫通するため DNA 鎖がバンドルした 3 次元 DNA オリガミ構造体を設計・構築した。特異的な DNA 鎖に対して構造変化の誘導（開閉）できることに成功し反応を誘導できることを見出した。

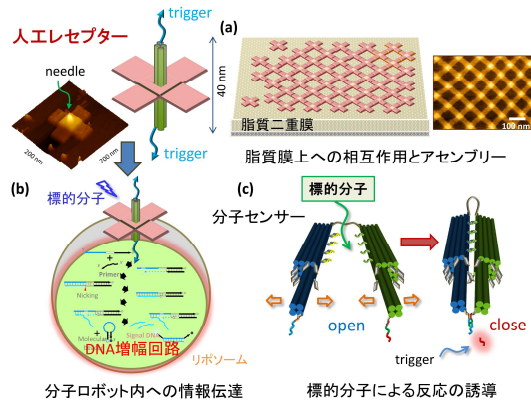


図 2. 人工レセプターの構造と脂質膜上でのアセンブリー (a)、分子ロボットへの導入 (b)、分子センサーを導入した人工レセプター (c)。

(3) 分子ロボットのセンサーを搭載するためのボディの開発

分担者の瀧ノ上らは、まず、非対称マイクロ構造を生成できる遠心性マイクロ流体デバイスを開発した。遠心力により複数の流路を持つガラス管からマイクロ液滴を滴下しゲル化させ 2 種類のゲルから成る球形ゲルを作製した。液滴内に非平衡な流れを生成し形状を複雑化できることも見出した。ゲル化後に一部を溶解し、複雑形状ゲル粒子を得ることに成功した。自転・公転を加えることで通常の流路では不可能ならせん構造のような非対称構造の生成にも成功した。また化学反応エネルギーを利用して自律運動する複雑形状ゲルの構築にも成功した（図 3）。

次に、上記遠心性マイクロ流体デバイスに

よって、細胞型分子ロボットのボディとなる均一サイズを有する細胞サイズリポソームの作製方法を開発した。さらに、得られたリポソームへの膜タンパク質の挿入による膜内外の分子の流入出、膜表面上でのドメイン形成、リポソームの内外層の非対称構造形成、リポソーム内部への分子の封入など、齋藤らと協力し、より細胞に近い構造を有したリポソームの作製にも成功した(図3)。

また、DNA型分子ロボットの作製に向けて、DNAのゲル化によるカプセル型DNAマイクロ構造体及び多孔型DNAマイクロ構造体の形成に成功した。柳澤・村田・野村らと協力し、カプセル型はリポソームの人工細胞骨格(裏打ち構造)になることを見出した。多孔型DNAマイクロ構造体に外部から刺激を加えることで、構造を保持したままサイズを収縮させることを見出し、環境情報をセンスし、構造を制御することが可能であることを見出した。さらに、遠藤・川野・柳澤らと協力し、DNAナノ構造体の界面自己組織化に基づくマイクロカプセルの開発を行った。板状DNAナノ構造体の片面だけを疎水基で修飾することによって両親媒性DNAナノ構造体を作製し、これを油中水滴に分散させることで、油-water界面において水滴を覆うように自己組織化させ、結果DNAマイクロカプセル(人工細胞)を作製することに成功した。このDNAナノ構造体では任意の形状を設計・作製でき、板状構造体の中央に開けたナノポアがイオンと分子を通過させるチャンネル(センサー)として機能させることが可能であることも示した(図3)。

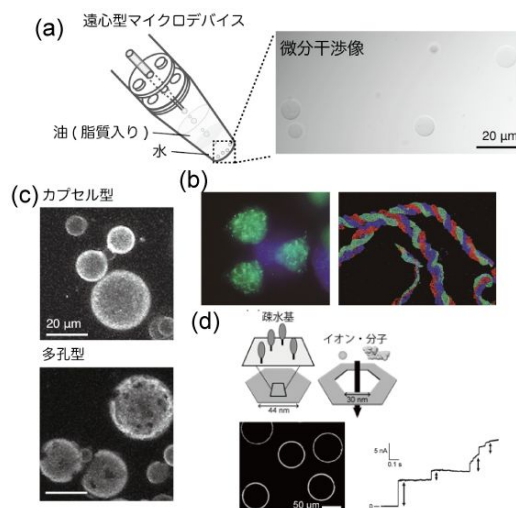


図3. (a)遠心型マイクロ流体デバイスとリポソーム生成。(b)非対称複雑ゲル粒子とらせんマイクロファイバー。(c)DNAゲルカプセル。(d)DNAマイクロカプセル。

(4)少数分子反応系の特性を用いたノイズリダクションを行う反応系の設計

分担者の鈴木らは、化学反応のハイブリッド計算モデルである Abstract Rewriting System on Multisets, ARMS を用い少数分子による化学反応系の性質について数理的な

特徴づけを行い、大数系(従来の力学系的な解析)では生じ得ない挙動が生じる場合があることを確認した。また、自己組織化現象を呈する生物・化学反応系の計算論的な特徴解析から、かかる反応系では中間生成物が「情報」の役割をもち、かかる情報分子の媒介により自己組織化現象を示していることを確認した(情報の散逸)。次に以上の成果をノイズリダクション反応系に応用する研究を行い「情報の散逸を生じさせる少数分子の化学反応系では低濃度の分子を増幅させる性質がある」ことを発見し、この性質を用いることで低濃度のターゲット分子をセンシングする化学反応系が実現可能であることを示した(図4)。

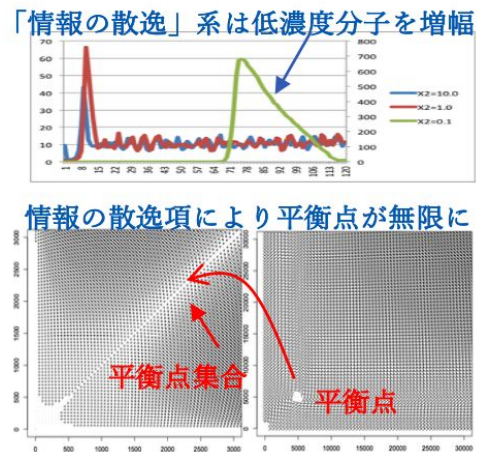


図4. 情報の散逸項を加えると平衡点が無限化(下左)。この系は低濃度分子を増幅させる性質がある(上)。

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120件、内査読有113件)
 C. Kurokawa, K. Fujiwara, M. Morita, I. Kawamata, Y. Kawagishi, A. Sakai, Y. Murayama, S.-i. M. Nomura, S. Murata, M. Takinoue, M. Yanagisawa, “DNA cytoskeleton for stabilizing artificial cells”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 査読有, in press
 M. Hirose, Y. Fujita, P. Callum JC, K. Hayashi, S. Kashida, A. Hotta, W. Knut, H. Saito, “Cell-type-specific genome editing with a microRNA-responsive CRISPR-Cas9 switch”, Nucleic acids research, 査読有, in press
 S. Kawasaki, Y. Fujita, T. Nagaike, K. Tomita, H. Saito, “Synthetic mRNA devices that detect endogenous proteins and distinguish mammalian cells”, Nucleic acids research, 査読有, in press

P. Shrestha, S. Jonchhe, T. Emura, K. Hidaka, M. Endo, H. Sugiyama, H. Mao, "Confined Space Facilitates G-quadruplex Formation", *Nature Nanotechnology*, 査読有, Vol.12, 2017, DOI:10.1038/NNANO.2017.29

S. Yasuda, M. Hayakawa, H. Onoe, M. Takinoue, "Twisting microfluidics in a planetary centrifuge", *Soft Matter*, 査読有, Vol.13, 2017, 2141-2147, DOI:10.1039/C6SM02695H

K. Endo, K. Hayashi, H. Saito, "High-resolution Identification and Separation of Living Cell Types by Multiple microRNA-responsive Synthetic mRNAs", *Scientific reports*, 査読有, Vol.6, 2016, 21991, DOI: 10.1038/srep21991

M. Hayakawa, M. Takinoue, "Complex-shaped three-dimensional multi-compartmental microparticles generated by diffusional and Marangoni microflows in centrifugally discharged droplets", *Scientific Reports*, 査読有, Vol.6, 2016, 20793, DOI:10.1038/srep20793

K. Miki, K. Endo, S. Takahashi, S. Funakoshi, I. Takei, S. Katayama, T. Toyoda, M. Kotaka, T. Takaki, M. Umeda, C. Okubo, M. Nishikawa, A. Oishi, M. Narita, I. Miyashita, K. Asano, K. Hayashi, K. Osafune, S. Yamanaka, H. Saito, Y. Yoshida, "Efficient Detection and Purification of Cell Populations Using Synthetic MicroRNA Switches", *Cell stem cell*, 査読有, Vol.16, 2015, 699-711, DOI: 10.1016/j.stem.2015.04.005

Y. Suzuki, M. Endo, H. Sugiyama, "Lipid bilayer-supported two-dimensional self-assembly of DNA origami nanostructures", *Nature Communications*, 査読有, Vol.6, 2015, 8052, DOI:10.1038/ncomms9052

K.H. Nagai, H. Masayuki, M. Takinoue, "Self-propelled particle with rotationally asymmetric shape", *Current Physical Chemistry*, 査読有, Vol.5, 2015, 1-9, DOI: 10.2174/1877946805999150430123824

M. Endo, S. Yamamoto, T. Emura, K. Hidaka, N. Morone, J. E. Heuser, H. Sugiyama, "Helical DNA origami tubular structures with various sizes and arrangements", *Angewandte Chemie, International Edition*, 査読有, Vol.53, 2014, 7484-7490, DOI: 10.1002/anie.201402973

E. Osada, Y. Suzuki, K. Hidaka, H. Ohno, H. Sugiyama, M. Endo, H. Saito,

"Engineering RNA- protein complexes with different shapes for imaging and therapeutic applications", *ACS Nano*, 査読有, Vol.8, 2014, 8130-8140, DOI: 10.1021/nn502253c

Y. Suzuki, M. Endo, Y. Yang, H. Sugiyama, "Dynamic Assembly/Disassembly Processes of Photoresponsive DNA Origami Nanostructures Directly Visualized on a Lipid Membrane Surface", *Journal of the American Chemical Society*, 査読有, Vol.136, 2014, 1714-1717, DOI:10.1021/ja4109819

Y. Suzuki, "Harness the Nature for Computation", *Proceedings in Information and Communications Technology*, 査読有, Vol.6, 2013, 44-49

K. Endo, K. Hayashi, T. Inoue, H. Saito, "A versatile cis- acting inverter module for synthetic translational switches", *Nature Communications*, 査読有, Vol.4, 2013, 2393, DOI: 10.1038/ncomms3393

A. Rajendran, M. Endo, K. Hidaka, H. Sugiyama, "Direct and real-time observation of rotary movement of a DNA nanomechanical device", *Journal of the American Chemical Society*, 査読有, Vol.135, 2013, 1117-1123, DOI: 10.1021/ja310454k

J. A. Stapleton, K. Endo, Y. Fujita, K. Hayashi, M. Takinoue, H. Saito, T. Inoue, "Feedback Control of Protein Expression in Mammalian Cells by Tunable Synthetic Translational Inhibition", *ACS Synthetic Biology*, 査読有, Vol.1, 2012, 83-88, DOI: 10.1021/sb200005w

[学会発表](計 188 件, 内招待講演 86 件)

Hirohide Saito, "microRNA switches that identify and isolate target cells in high-resolution", *ISSCR*, 2016.6.22-25, San Francisco (US) (招待講演)

Hirohide Saito "Synthetic RNA Switches and Nanostructures to Detect, Purify, and Control Target Mammalian Cells", 6th ICBE, Grand Hyatt Singapore, 2106.1.4-8, Shingapore(招待講演)

Masayuki Endo "High-speed AFM imaging of synthetic molecules and nanostructures" Ten Years of DNA Origami, California Institute of Technology, Pasadena, CA, USA, March 15, 2016 (招待講演)

Masayuki Endo "Single-molecule imaging of photoresponsive molecular system constructed in the DNA nanostructures"

601. Wilhelm und Else Heraeus-Seminar,
DNA Nanotechnology Meets Plasmonics,
Physikzentrum, Bad Honnef, Germany,
December 10, 2015 (招待講演)

〔図書〕(計2件)

Masayuki Endo, Springer Verlag, RNA
Technologies (V. A. Erdmann, S. Jurga,
J. Barciszewski Eds.) Modified Nucleic
Acids in Biology and Medicine Volume 7,
2016, 24

齊藤博英, 他 57 名, エヌ・ティー・エス,
「RNA 進化分子工学・分子デザインを活用
した翻訳 細胞運命制御」, 進化分子工学:
高速分子進化によるタンパク質・核酸の開
発, 2013, 466(243-252)

〔産業財産権〕

出願状況(計7件)

名称: 細胞内在性タンパク質の識別方法

発明者: 齊藤博英, 川崎俊輔

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2015 - 236040

出願年月日: 2016 年 12 月 02 日

国内外の別: 国内

名称: 細胞特異的にヌクレアーゼを制御す
る方法

発明者: 齊藤博英, 弘澤萌

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2016-126944

出願年月日: 2016 年 6 月 27 日

国内外の別: 国内

名称: miRNA の発現にตอบสนองして蛋白質遺伝
子を発現させる方法

発明者: 齊藤博英, 藤田祥彦

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2016-126982

出願年月日: 2016 年 6 月 27 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: 特願 2015 - 142315

出願年月日: 2015 年 07 月 16 日

国内外の別: 国内

名称: RNA-タンパク質複合体及びこれによ
る RNA およびタンパク質のデリバリーシ
ステム

発明者: 齊藤博英, 長田江里子

権利者: 京都大学

種類: 特許

番号: 特願 2014 - 141431

出願年月日: 2014 年 07 月 09 日

国内外の別: 国内

名称: 液滴製造デバイス 液滴の製造方法,
リポソームの製造方法, 固定具及び液滴製

造キット

発明者: 瀧ノ上正浩, 森田雅宗, 山下仁義

権利者: 東京工業大学

種類: 特許

番号: 特許 PCT/JP2015/057113

出願年月日: 2015 年 03 月 11 日

国内外の別: 外国

名称: miRNA の発現を指標として所望の細
胞腫を判別する方法

発明者: 齊藤博英, 遠藤慧

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2014 - 00372

出願年月日: 2014 年 01 月 10 日

国内外の別: 国内

取得状況(計1件)

名称: 液滴製造デバイス 液滴の製造方法,
リポソームの製造方法, 固定具及び液滴製
造キット

発明者: 瀧ノ上正浩, 森田雅宗, 山下仁義

権利者: 東京工業大学

種類: 特許

番号: 特許第 6031711 号

出願年月日: 2015 年 03 月 11 日

取得年月日: 2016 年 11 月 4 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齊藤 博英 (SAITO, Hirohide)

京都大学・iPS細胞研究所・教授

研究者番号: 20423014

(2) 研究分担者

遠藤 政幸 (ENDO, Masayuki)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・
特定拠点准教授

研究者番号: 70335389

瀧ノ上 正浩 (TAKINOUE, Masahiro)

東京工業大学・情報理工学院・准教授

研究者番号: 20511249

鈴木 泰博 (SUZUKI, Yasuhiro)

名古屋大学・情報科学研究科・准教授

研究者番号: 50292983

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()