

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：12608

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：24104004

研究課題名(和文)アメーバ型分子ロボット実現のための要素技術開発とその統合

研究課題名(英文)Research and Development of Amoeba-type Molecular Robots

研究代表者

小長谷 明彦(Konagaya, Akihiko)

東京工業大学・情報理工学院・教授

研究者番号：00301200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 247,000,000円

研究成果の概要(和文)：アメーバ班および他班が持つ各種分子ロボット要素技術を統合し、DNA情報を用いて形状を制御できるアメーバ型分子ロボットを開発した。分子アクチュエータとして、微小管と巨大リポソームとの着脱を制御する分子クラッチ、ペプチド鎖の集積で巨大リポソームを並進運動させる光誘起ペプチド繊維成長システム、圧力に応じて可逆的にリポソームの伸張収縮を繰り返す細胞骨格制御システム、カルシウム濃度に依存して形状を変化させる微小管ネットワークを開発した。微小管に付与された光応答性DNAを用いて微小管集団運動パターンを動的に変化させる分子制御機構ならびに分子集団運動パターンを計算機上で再現する実時間シミュレータを開発した。

研究成果の概要(英文)：The joint project between the amoeba robot team and other teams developed a giant liposome based amoeba-type molecular robot prototype whose shape can be changed by DNA signals by means of integrating various element technologies including molecular actuators and molecular control systems. As for the molecular actuators, the team developed (1) molecular crutch which control the connection between giant liposome and molecular motors, (2) photo-induced growth system of peptide nanofibers propelling giant liposomes with comet tail-like mechanism, (3) reversible morphological control system of tubulin-encapsulating giant liposomes by hydrostatic pressure, and (4) calcium concentration dependent morphological changing microtubule networks. As for the molecular control systems, the team developed (5) photo-sensitive DNA strands attached on microtubules, (6) microtubule motion pattern controlling system, and (7) particle-based real-time simulation system to reproduce the motion pattern.

研究分野：知能情報学

キーワード：分子ロボット 分子アクチュエーター 分子集団運動制御 人工筋肉 実時間シミュレーション

1. 研究開始当初の背景

- (1) モータータンパク質と微細加工技術を組み合わせてトップダウン的に作製するマイクロマシンや数種類の分子から構成される微小アクチュエータの開発が進んでいた。しかしながら、生物のように生体分子をボトムアップに組み立ててロボットのように動作させる技術はなかった。(野村、平塚)
- (2) 巨大リポソームを作る技術はあったが、それを可逆的に動作変形させたり、並進運動させる技術はなかった(瀧口、松浦、豊田)
- (3) 分子モーターと微小管を組み合わせたアクチュエータの研究はあったが、微小管の動作を分子レベルで制御する技術はなかった。(角五、葛谷)
- (4) 微小管の運動をシミュレーションする研究はあったが、数万本の微小管の相互作用を再現するようなシミュレーション技術はなかった。(小長谷)

2. 研究の目的

- (1) 巨大リポソームに細胞骨格と分子モーターを封入した第一世代分子ロボット(アメーバ型分子ロボット)のプロトタイプの実現を目的とした。特に、DNA 制御による形態変化の実現を目指した。(野村、平塚)
- (2) 細胞骨格を封入した巨大リポソームに、外部刺激を加え可逆的な形態変化を行わせることを目的とした。(瀧口、豊田)
- (3) 巨大リポソームに光刺激により方向制御可能な走光性を付与するを目的とした(図1)。(松浦)
- (4) 微小管と分子モーターからなる分子アクチュエーター群の運動パターンを人工核酸で制御する機構の実現を目的とした。(角五、葛谷)
- (5) 外部信号により形態変化する細胞骨格構造の実現を目的とした。(平塚)
- (6) 生体分子を粒子で表現し、実時間で可視化するシミュレーションシステムの実現を目的とした。(小長谷、角五)

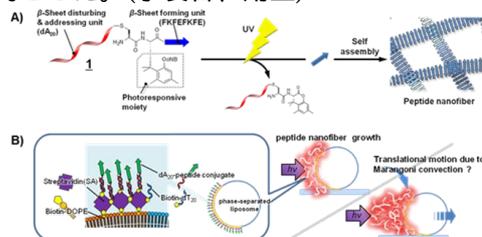


図 1. A) 光誘起ペプチド繊維成長システムの模式図, B) 光誘起ペプチド繊維成長システムを実装した「走光性」リポソーム。(松浦)

3. 研究の方法

- (1) 巨大リポソームにキネシン・微小管からなる分子アクチュエータを封入し、巨大リポソームと分子アクチュエータとの接続を DNA で ON/OFF 制御する分子クラッチを設計し、巨大リポソーム内に実装した。エネルギー再生系や力伝達効率の向上のための膜組成、DNA 信号の光応答出力など数多くの条件設定に際し、班内だけでなく班間の研究協力を得てデザインと実装を行なった。(野村、平塚)
- (2) 細胞内と同等となる高濃度の微小管やアクチンをリポソーム内に封入し、温度・圧力変化や光照射を行い、リポソームの形態変化を観察した。(瀧口、豊田)
- (3) 光応答性のベータシート形成ペプチドと DNA 配列をコンジュゲートしリポソーム表面に修飾した。光照射によりペプチドが遊離し、ベータシートを形成することでリポソームが走化することを観察した。(松浦)
- (4) 光応答性の一本鎖人工核酸を微小管に修飾し、分子モーターで駆動される微小管の運動パターンを DNA ハイブリダイゼーション反応の特異性を用いて制御した。(角五、葛谷)
- (5) 外部刺激によりキネシン 4 量体を動的に形成させる制御機構を開発し、細胞骨格である微小管のネットワーク構造をキネシン 4 量体で滑走させることで細胞骨格の変形運動を観察した。(平塚)
- (6) 複数の GPU を用いて実時間でレンダリング処理とシミュレーション計算を実行し、結果を表示するシステムを開発した。(小長谷、角五)

4. 研究成果

- (1) アメーバ班および他の班が個々に開発していた要素技術の統合を行なった。巨大リポソームにおいて、特定の配列からなる DNA 断片を入力信号とする人工分子クラッチの働きにより、内包した分子モーター群の働きで連続的に変形する状態と球形に静止した状態とをスイッチするアメーバ型分子ロボットを構築した(図2)。本機をプロトタイプキットとして班員に配布し、その動作が確認された。成果は学術論文として ScienceRobotics 誌に掲載され[3]、IEEE Spectrum, PopularScience をはじめ各国の科学技術系メディア等で取り上げられた。(野村、平塚)

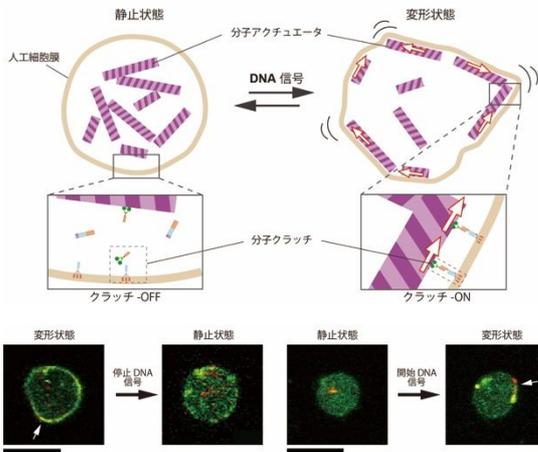


図 2 アメーバ型分子ロボットのプロトタイプ . スケールバーは 20 μ m .

(2)細胞骨格をリポソーム内部に封入し、その重合・脱重合ダイナミクスをリポソーム外部からの刺激・操作によって繰返し変化させることで、リポソームの形態変化を可逆的に繰返させることに成功した(引用文献[13]、図3)(瀧口、豊田)

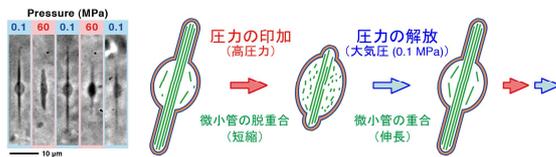


図 3 リポソームの伸張収縮

(3)光応答性ペプチド-DNA コンジュゲートを修飾したリポソームに光照射したところ、リポソーム周辺にファイバー状の構造体が生成されることを TEM にて観察した。さらに、コンジュゲート修飾リポソームをガラス基板上に乗せて光照射したところ、照射方向に沿ってリポソームが数十 μ m 移動したことがわかった(図4)。また、光切断速度を速くした改良版では、さらに速くリポソームが運動した(平均速度 150 μ m/h)。一方、コンジュゲートの代わりに DNA 配列を固定したリポソームでは、光照射してもほとんど動かなかった。(松浦)

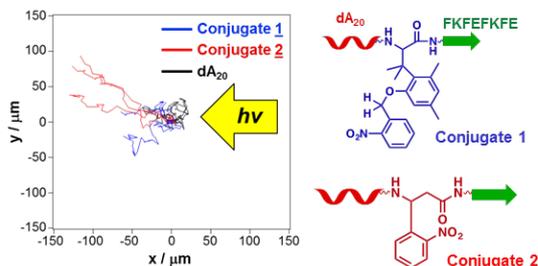


図 4 走光性リポソームの運動軌跡 .

(4) 生体分子モーターの集団運動を制御す

るシステムの確立するという目標に対し、DNA の配列情報を付与した生体分子モーターの創製に成功し、さらに入力した DNA 配列情報に基づき生体分子モーター同士を結合・解離させることに成功した。さらに光応答性 DNA を導入することで光刺激により生体分子モーターの運動モード(並進運動 回転運動)を制御する方法論を構築した。(角五、葛谷)

(5) カルシウム濃度によりキネシンを 4 量体に連結できる人工キネシンとそのコアユニットを作製した。人工キネシンと微小管を組み合わせたシステムにおいて、カルシウム濃度依存で微小管ネットワーク構造を変化させることが可能となり、当初の計画通り微小管ネットワーク構造の放射状化に成功した。また、同様メカニズムを用いて DNA 配列特異性を利用した微小管ネットワーク構造の制御も可能となった。さらに想定外の成果として、本研究の知見を元に、微小管ネットワーク構造をファイバーとして収縮させることが可能となり、人工筋肉の開発に繋がった。(平塚)

(6) DNA の配列に関しては、三残基の繰返し配列を 5 回程度結合したものが効果的であり、導入法は DBCO を用いた銅フリークリック反応が優れていることを見いだした。また DNA ヒドロゲルに関しては、Na⁺や K⁺、pH の変化に応答して瞬時にゲル化する「DNA 四重鎖ゲル」という新たなカテゴリーの DNA ヒドロゲルの確立に成功した。DNA と微小管との複合体を使って人工サルコメア構造が設計できるようになり、人工筋肉の開発に繋がった。(葛谷)

(7) 4 台の GPU を用いて微小管 4 万本(600 万粒子)、分子モーター 100 万個(400 万粒子)から構成される微小管-分子モーター相互作用の実時間可視化シミュレーションを行い、図 5 に示すように実験で観測される複雑な運動パターンの再現に成功した。DNA と微小管との相互作用のシミュレーションが可能となり人工筋肉の開発に繋がった。(小長谷、角五)

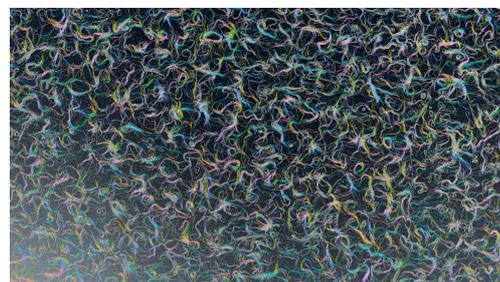


図 5 実時間シミュレーションを用いた微小管運動パターンの創発

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 30 件)

1. Md. Sirajul Islam, Kaori Kuribayashi-Shigetomi, Arif Md. Rashedul Kabir, Daisuke Inoue, Kazuki Sada, Akira Kakugo "Role of Confinement in the Active Self-organization of Kinesin-driven Microtubules" *Sensors & Actuators: B. Chemical* accepted 査読有
2. Ai Saito, Tamanna Ishrat Farhana, Arif Md. Rashedul Kabir, Daisuke Inoue, Akihiko Konagaya, Kazuki Sada, Akira Kakugo "Understanding the emergence of collective motion of microtubules driven by kinesins: role of concentration of microtubules and depletion force" *RSC Advances* in printing (2017) DOI: 10.1039/C6RA27449H 査読有
3. 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*, 01 Mar 2017: Vol. 2, Issue 4; DOI: 10.1126/scirobotics.aal3735. 査読有
4. Arif Md. Rashedul Kabir, Masaki Ito, Kyohei Uenishi, Shizuka Anan, Akihiko Konagaya, Kazuki Sada, Miwa Sugiura, Akira Kakugo; "An ATP generation system for *in vitro* motility assay" *Chemistry Letters*, 46(2) (2017) DOI: <http://dx.doi.org/10.1246/cl.160903> 査読有
5. Nishigami M., Mori T., Tomita M., Takiguchi K., Tsumoto K. Membrane fusion between baculovirus budded virus-enveloped particles and giant liposomes generated using a droplet-transfer method for the incorporation of recombinant membrane proteins. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 155: 248 – 256 (2017) 査読有 DOI:10.1016/j.colsurfb.2017.04.027
6. Kobayashi S., Terai T., Yoshikawa Y., Ohkawa R., Ebihara M., Hayashi M., Takiguchi K., Nemoto N. In vitro selection of random peptides against artificial lipid bilayers: A potential tool to immobilize molecules on membranes. *Chem. Commun.* 53: 3458-3461 (2017) 査読有 DOI: 10.1039/C7CC00099E
7. Masaki Ito, Takumi Ishiwata, Shizuka Anan, Kenta Kokado, Daisuke Inoue, Arif Md. Rashedul Kabir, Akira Kakugo, Kazuki Sada. "Construction and Gilding of Metal-Organic Frameworks and Microtubule Conjugates" *Chemistry Select*, 2016, 16, 5358-5362; DOI: 10.1002/slct.201601431. 査読有
8. Daisuke Inoue, Takahiro Nitta, Arif Md. Rashedul Kabir, Kazuki Sada, Jian Ping Gong, Akihiko Konagaya, and *Akira Kakugo "Sensing Surface Mechanical Deformation Using Active Probes Driven by Motor Proteins" *Nature communications*, 2016, 7:12557; DOI: 10.1038/ncomms12557 (2016). 査読有
9. Masaki Ito, Arif Md. Rashedul Kabir, Md. Sirajul Islam, Daisuke Inoue, Shoki Wada, Kazuki Sada, Akihiko Konagaya, *Akira Kakugo "Mechanical Oscillation of Dynamic Microtubule Rings" *RSC Advances*, 73, 69149-69155; DOI: 10.1039/c6ra16613j. (2016) 査読有
10. Gregory Gutmann, Daisuke Inoue, Akira Kakugo, and *Akihiko Konagaya "Particle-based Live Controlled Microtubule Gliding Assay Simulation with the Lennard-Jones Potential on GPU" *New Generation Computing*, Vol. 13 (2) :108-116 (2016) 査読有
11. Gregory Gutmann, Daisuke Inoue, Akira Kakugo, *Akihiko Konagaya, "Real-time 3D Microtubule Gliding Simulation Accelerated by GPU Computing" *International Journal of Automation and Computing*, 2 (2016), 1-9 査読有
12. Yamada S., Isogai T., Tero R., Tanaka-Takiguchi Y., Ujihara T., Kinoshita M., Takiguchi K. Septin interferes with the temperature-dependent domain formation and disappearance of lipid bilayer membranes. *Langmuir* 32: 12823-12832 (2016) 査読有 DOI: 10.1021/acs.langmuir.6b03452
13. Hayashi M., Nishiyama M., Kazayama Y., Toyota T., Harada Y., Takiguchi K. Reversible morphological control of tubulin-encapsulating giant liposomes by hydrostatic pressure. *Langmuir* 32:3794-3802 (2016) 査読有 DOI:10.1021/acs.langmuir.6b00799.
14. Oda Y., Sadakane K., Yoshikawa Y., Imanaka T., Takiguchi K., Hayashi M., Kenmotsu T., Yoshikawa K. Highly concentrated ethanol solutions: Good solvents for DNA as revealed by single-molecule observation. *ChemPhysChem* 17:471 – 473 (2016) 査読有 DOI:10.1002/cphc.201500988.
15. Nishiyama M, Takiguchi K., Hayashi M. High-pressure microscopy for controlling microtubule dynamics. *顕微鏡 (日本顕微鏡学会)* 51:118 – 121 (2016) 査読無し http://microscopy.or.jp/jsm/wp-content/uploads/publication/kenbikyoku/51_2/contents.html 査読有
16. 松浦和則, 人工ペプチドによる自己集合

- 性材料 ウイルスキャプシドと光誘起
ナノファイバー, *生物物理*, Vol. 324,
94-97 (2016). DOI:10.2142/biophys.56.094
査読有
17. Daisuke Inoue, Bulbul Mahmot, Arif Md. Rashedul Kabir, Tamanna Ishrat Farhana, Kiyotaka Tokuraku, Kazuki Sada, Akihiko Konagaya, and *Akira Kakugo "Depletion Force Induced Collective Motion of Microtubules Driven by Kinesin" *Nanoscale* 7, 18054-18061, (2015). (表紙に採用) 査読有
 18. Arif Md. Rashedul Kabir, Daisuke Inoue, Yuri Kishimoto, Jun-ichi Hotta, Keiji Sasaki, Noboru Kitamura, Jian Ping Gong, Hiroyuki Mayama, and Akira Kakugo*; "Drag force of μm -sized objects with different surface morphologies in flow with small Reynolds number" *Polymer Journal* 47, 564-570 (2015) 査読有
 19. Shoki Wada, Arif Kabir, Masaki Ito, Daisuke Inoue, Kazuki Sada, *Akira Kakugo, "Effect of length and rigidity of microtubules on the size of ring-shaped assemblies obtained through active self-organization" *Soft matter* 11, 1151-1157 (2015). 査読有
 20. Shoki Wada, Arif Kabir, Ryuzo Kawamura, Masaki Ito, Daisuke Inoue, Kazuki Sada, *Akira Kakugo, "Controlling the Bias of Rotational Motion of Ring-Shaped Microtubule Assembly" *Biomacromolecules* 12;16(1):374-8 (2015) 査読有
 21. Kato N., Ishijima A., Inaba T., Nomura F., Takeda S., Takiguchi K. Effects of lipid composition and solution conditions on the mechanical properties of membrane vesicles. *Membranes* 5: 22-47 (2015) 査読有
DOI: 10.3390/membranes5010022.
 22. M. Furutani, A. Uemura, A. Shigenaga, C. Komiya, A. Osaka, K. Matsuura, A photoinduced growth system of peptide nanofibres addressed by DNA hybridization, *Chem. Commun.*, Vol. 51, 8020-8022 (2015). DOI: 10.1039/C5CC01452B 査読有
 23. Akira C. Saito, Toshihiko Ogura, Kei Fujiwara, Satoshi Murata, Shin-ichiro M. Nomura, "Introducing Micrometer-Sized Artificial Objects into Live Cells: A Method for Cell-Giant Unilamellar Vesicle Electrofusion", *PLoS ONE* 9(9): e106853 (2014, Sept.). DOI: 10.1371/journal.pone.0106853 査読有
 24. Gregory Gutmann, Daisuke Inoue, Akira Kakugo, Akihiko Konagaya: Real-time 3D Microtubule Gliding Simulation, Life System Modeling and Simulation, *Communications in Computer and Information Science*, vol. 461, pp.13-22 (2014) 査読有
 25. Masaki Ito, Arif Md Rashedul Kabir, Daisuke Inoue, Takayuki Torisawa, Yoko Toyoshima, Kazuki Sada, *Akira Kakugo "Formation of Ring-Shaped Microtubule Assemblies through Active Self-Organization on Dynein" *Polymer Journal*, (2013) doi:10.1038/pj.2013.89 査読有
 26. Daisuke Inoue, Arif Md. Rashedul Kabir, Hiroyuki Mayama, Jian Ping Gong, Kazuki Sada and *Akira Kakugo "Growth of Ring Shaped Microtubule Assemblies through Stepwise Active Self-Organisation" *Soft-Matter*, 9, 7061-7068 (2013) (Emerging Investigators Issue). 査読有
 27. Takiguchi K., Negishi M., Tanaka-Takiguchi Y., Hayashi M., Yoshikawa K. Specific transformation of assembly with actin filaments and molecular motors in a cell-sized self-emerged liposome. *Orig. Life Evol. Biosph.*, 44: 325-329 (2014) 査読無
DOI: 10.1007/s11084-014-9395-0
 28. Takahashi T., Nomura F., Yokoyama Y., Tanaka-Takiguchi Y., Homma M., Takiguchi K. Multiple membrane interactions and versatile vesicle deformations elicited by melittin. *Toxins* 5: 637-664 (2013) 査読有
DOI:10.3390/toxins5040637
 29. Tanaka-Takiguchi Y., Itoh T., Tsujita K., Yamada S., Yanagisawa M., Fujiwara K., Yamamoto A., Ichikawa M., Takiguchi K. Physicochemical analysis from real-time imaging of liposome tubulation reveals the characteristics of individual F-BAR domain proteins. *Langmuir* 29: 328-336 (2013) 査読有
DOI:10.1021/la303902q
 30. Susumu Aoyama, Masahiko Shimoike, Yuichi Hiratsuka, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS), 110 (41), 16408-16413 (2013)doi: 10.1073/pnas.1306281110 査読有
- [学会発表](計 60 件)
1. Afrin T., Kabir AMR., Sada K. Kakugo A., 「Mechanical deformation induced modulation of biochemical functions of microtubule」 「第6回ソフトマター研究会」(2016年10月24-26日・札幌)
 2. 田中駿介, 林 真人, 瀧口金吾, 「アクチン線維封入リポソームの光形態制御～ロボ・ロクロクビムシの創成～」 2017年生体運動合同班会議、2017年1月6日、神戸国際会議場(神戸市)
 3. 松浦和則, 植村明仁, 中原正彦, 古谷昌大, 重永章, 小宮千明, 大高章, 光誘起ペプチドナノファイバー成長の時空間

制御、第 65 回高分子学会年次大会、2016 年 5 月 25 日、神戸国際会議場・展示場(神戸市)

4. Yuichi Hiratsuka, Takahiro Nitta, 第 6 7 回コロイドおよび界面化学討論会 2016/9/24 旭川教育大学(招待講演)(他 多数)

〔図書〕(計 4 件)

1. 小長谷明彦 「アメーバ型分子ロボット」現代化学、DNA ナノテクノロジー最終回(2016) 77
2. 佐々木廉、角五 彰 「自己組織化マテリアルのフロンティア」第 1 章 エキゾチック自己組織化「生体」材料、6 節 生体分子モーターを基盤とした自己組織化システムの創成(2015) 336
3. 上西 恭平、井上 大介、佐田 和己、角五 彰、「ATP 駆動型運動素子」、新版ゲルテクノロジーハンドブックシーエムシー出版、第 1 編、第 5 章、2 節(2014) 908
4. Daisuke Inoue, Arif Md. Rashedu Kabir, Kazuki Sada, Jian Ping Gong, Akira Kakugo “Soft Actuators: Materials, Modeling, Applications, and Future Perspectives, Chapter 36. ATP-Driven Bio-Machine”, Springer, (2014) 507

〔産業財産権〕

出願状況(計 3 件)

名称:人工脂質膜小胞の小スケール作製方法
発明者:林 真人、瀧口金吾
権利者:国立大学法人名古屋大学
種類:特許
番号:特願 2016-184948
出願年月日:平成 28 年 9 月 2 2 日
国内外の別:国内

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:独立行政法人 科学技術振興機構
種類:特許
番号:特願 2015-185058
出願年月日:2015 年 9 月 18 日
国内外の別:国内

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:特許
番号:特願 2014-59898
出願年月日:2014 年 3 月 24 日
国内外の別:国内

取得状況(計 1 件)

名称:リポソームの製造方法
発明者:野村慎一郎

権利者:科学技術振興事業団

種類:特許

番号:特願 2010-108505

取得年月日:2014 年 12 月 2 日

国内外の別:国内

〔その他〕

ホームページ 分子ロボティクス:

<http://www.molecular-robotics.org/>

成果に関する報道

1. 2017 年 3 月 7 日付けで IEEE Spectrum による記事がアメーバ型分子ロボットの論文 Sato et.al, Science Robotics が紹介された。
<http://spectrum.ieee.org/the-human-os/biomedical/devices/celllike-robot-programmable-with-dna>
2. 2016 年 10 月 31 日付け日刊工業新聞「深層断面」欄でアメーバ型分子ロボットに関して紹介された。
3. 2016 年 4 月 12 日付け中日新聞(愛知県版)朝刊にて、Hayashi 他 Langumuir 2016 の研究成果についての紹介された。

6. 研究組織

(1)研究代表者

小長谷 明彦 (KONAGAYA, Akihiko)

東京工業大学・情報理工学院・教授

研究者番号:00301200

(2)研究分担者

角五 彰 (KAKUGO, Akira)

北海道大学・理学研究院・准教授

研究者番号:10374224

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

瀧口 金吾 (TAKIGUCHI, Kingo)

名古屋大学・理学研究科・講師

研究者番号:20262842

野村 慎一郎 (NOMURA, Shinichiro)

東北大学大学院・工学研究科・准教授

研究者番号:50372446

平塚 祐一 (HIRATUSKA, Yuichi)

北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・准教授

研究者番号:10431818

松浦 和則 (MATSUURA, Kazunori)

鳥取大学・工学研究科・教授

研究者番号:60283389

(3)連携研究者

豊田 太郎 (TOYOTA, Taro)

東京大学大学院・総合文化研究科・准教授

研究者番号:80422377

(4)研究協力者

林 真人 (HAYASHI, Masahito)

名古屋大学・大学院理学研究科・研究員

研究者番号:40356259