



## 細胞サイズの人工膜小胞を可逆的に繰返し変形させられることに成功(生体運動マシナリーを使った分子ロボット構築の可能性を実証)

この度、京都大学物質-細胞統合システム拠点の西山 雅祥（にしやま まさよし）特定准教授（白眉センター）・原田 慶恵（はらだ よしえ）教授、および名古屋大学の林 真人（はやし まさひと）研究員・滝口 金吾（たきぐち きんご）講師、および、東京大学の風山 祐輝（かざやま ゆうき）大学院生（当時）・豊田 太郎（とよた たろう）准教授らの共同研究グループは、細胞骨格微小管を封入した細胞サイズの人工脂質膜小胞を、圧力や温度の変化を利用して、可逆的に繰返し形態変化させることに世界で初めて成功し、生命が創り出したナノメートルサイズの「運動マシナリー」を利用することで、生きた細胞のように人工細胞を繰返し変形させることを実証できました。

この化学物質も遺伝子操作も使わない新しい手法を活用することで、生きた細胞・組織をコントロールできる新しい医療技術などを開発できると期待されます。

この研究成果は、平成28年3月29日付（米国東部時間）全米化学会（American Chemical Society）の公式ウェブ上の電子速報版にて掲載されました。

### 【ポイント】

- 内部に実装した生体高分子の状態を繰返し操作することで、細胞と同じサイズを持つ人工脂質膜小胞の形状を繰返し変化させることに成功。
- 分子で作ったマイクロメートルサイズのロボットを自在に運動させるために必要な、可逆的に繰返し行える変形が、蛋白質やリン脂質といった身近な分子を用いて実現可能なことを実証。
- 高圧力顕微鏡の基礎的な生物学と生物材料を応用した工学の分野の垣根を越えた使用と、人工脂質膜小胞の新しい調製方法の有効性を証明。

## 【研究背景と内容】

現在、段階的な機能拡充を通して複雑な分子ロボットを創製する方法論(分子ロボット進化)の一環として、細胞骨格と分子モーターを細胞サイズの人工脂質膜小胞内で再構成した第一世代の分子ロボットのプロトタイプの実現を目指した研究が行われています。生体運動を司る細胞骨格や生体分子モーター(アクチン/ミオシンや微小管/キネシン系など)は、分子ロボットの動力素子として理医薬工学の基礎研究から技術開発までの幅広い分野で注目を集めており、これらを利用した高効率で働くナノメートルサイズの分子デバイス創製に向けた研究が近年盛んに行われています。特に半導体微細加工材料とこれらの生体分子を組み合わせたハイブリッド型分子デバイスはプロトタイプ化まで進んでいます。

しかし、これまでに開発された分子ロボットは、細胞にみられるような自律的な運動はできません。これまでに、ロボットとして働く分子デバイスの構築は世界的にも数例が報告されているのみです。それもすべてON/OFF制御で、従来型薬物送達システム(DDS)の範疇を出ておらず、一連の動作を1回限り行える様な単純なものに限られていました。生きている細胞のように、何度も動作を繰り返して行うことで運動する分子ロボットを構築するためには、これまで行われてきたようなトップダウンで分析論的なアプローチだけでは不十分であり、ボトムアップで構成的なアプローチに基づく「モノ作りによる検証や実証」が不可欠となります。

そこで本研究では、複雑な分子ロボットを段階的な機能拡充を通して創製する方法論(分子ロボット進化)の一環として、細胞サイズの人工脂質膜小胞の内部に細胞骨格を再構成した第一世代の分子ロボットの研究開発に取り組みました。

その成果として、生物から単離精製した蛋白質チューブリンを細胞と同じ大きさの膜小胞内に封じ込め、小胞の外部から実験系の圧力を操作することで、チューブリンから微小管への重合反応と、その逆反応である微小管からチューブリンへの脱重合反応を繰り返すことで、世界で初めて膜小胞を“可逆的”に“繰り返して”変形させることに成功しました(図1)。これは、分子からマイクロメートルサイズのロボットを構築し、運動させるための方法論を確立して行く上で、小さな、しかし非常に大事な一歩となるものです。

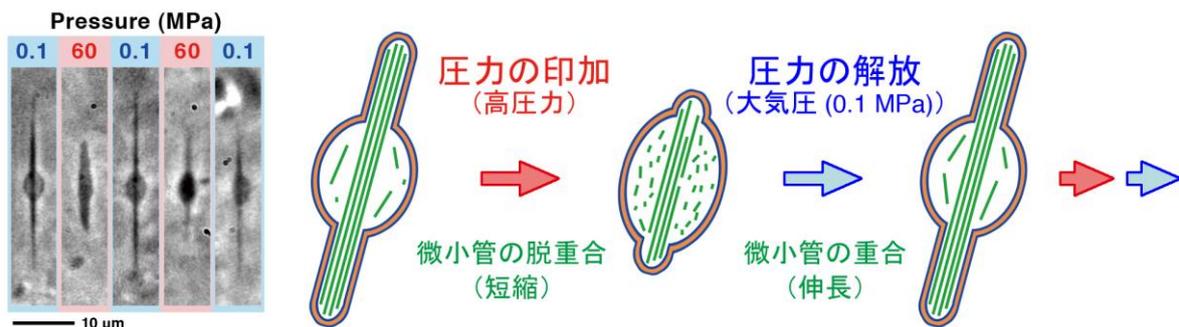


図1：細胞と同等サイズの人工脂質膜小胞の繰り返し変形。

例えば、神経細胞の樹状突起や軸索の様な構造は、同様な原理で構築されていると考えられています。

©2016 American Chemical Society

しかも本研究で測定された人工脂質膜小胞の変形速度は、溶液中での観察から報告されている一本一本の微小管が重合脱重合の際に見せる伸長短縮の速度よりも、生きた細胞が見せる形態変化や運動の速度の方と同程度でした(図2)。これは膜小胞というマイクロメートルサイズの有限の空間内に、何本もの微小管が再構成された事による効果だと考えられます。

なおこの研究は、京大、名大、東大の研究グループの共同研究で、新学術領域「運動マシナリー」からの支援を受けて行われました。

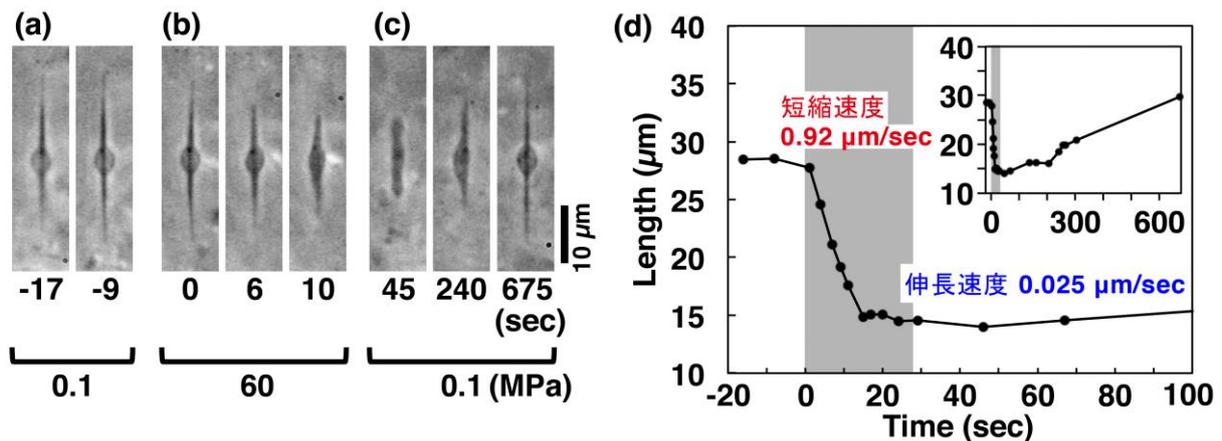


図2：リアルタイム観察から測定された人工脂質膜小胞の変形速度。  
 高圧力下での短縮は素早く、大気圧下での伸長はゆっくり起きる。なお短縮速度は印加した圧力に依存し、  
 高圧力程速く短縮します。 ©2016 American Chemical Society

### 【成果の意義】

これまでにも、私達を含む幾つもの研究グループが、溶液中に存在する核酸を、DNA-オリガミを使って様々に変形させる、あるいは、人工脂質膜小胞の中に生体由来の高分子や人工の高分子を封入し、その状態変化を利用して人工脂質膜小胞を変形させる、などの例がありました。しかしながら前者は、“動力源”を“機体”に実装するよりも前の段階に相当し、後者は、一度限りの変形で、変形を繰り返す積み重ねて行くことで初めて実現できる真の意味での“運動”とは程遠いものです。この様に、“可逆的に繰り返す”変形させることに関しては、原理上、可能とされていただけで、実際に実証してみせた研究はありませんでした。従って、本研究で得られた成果は、分子からマイクロメートルサイズのロボットを構築し、運動させるための方法論を確立して行く研究過程における、小さな、しかし非常に大事な一歩となるものです。私達の体内にある細胞は、変形を“可逆的に繰り返す”ことで運動し生命活動を営んでいます。本研究の成果を利用すれば、細胞を模倣したマイクロメートルサイズの分子ロボットの構築が期待できます。

なお、今回の私達の研究では、新しい調製方法を用いることで目的の人工脂質膜小胞を大量に生産し、その変形を観察して実証してみせました。さらに、高圧力顕微鏡を使って外部から膜小胞に、高圧力を加えたり大気圧に戻したり、温度を上げ下げしたり、と身近な物理的パラメーターを変えることで実証してみせました。これらの方法論に関する事項も、今後この研究成果を発展させ、応用範囲を広げて行く上で重要なポイントになります。

実際に、変形を何度も繰り返すことで運動していくことが出来る分子ロボットを創り出すことは、

生命とは何かという問いを超えて、あらたな工学技術発展の対象となるフロンティアの創出にも繋がります。私達研究グループが挑戦している分子ロボットの構築が、この領域における先駆けになることが期待されます。

また今回、研究に用いた実験系は、圧力や温度を変化させながら試料の様子を顕微鏡でリアルタイムで観察できる優れた長所を持っています。従って、浸透圧ストレスの様な外部刺激や深海の様な高圧力極限環境などに対して生物がどのような戦略を用いて適応進化してきたのかを解明するための研究に応用することも期待できます。

### 【用語説明】

**分子ロボット**：例えば蛋白質や核酸などの分子から作られた、大きさがマイクロメートル(メートルの 1000 万分の 1)からナノメートル(メートルの 10 億分の 1)の非常に小さなロボット。分子デバイスとは、分子ロボットを構成する部品。

**人工脂質膜小胞**：ベシクル (vesicle) またはリポソーム (liposome) の名でも呼ばれます。例えば親水性部分と疎水性脂肪鎖の両方を持つ分子、リン脂質が水溶液中に存在すると、その疎水性部分が水溶液に対して露出しないように親水性部分を外側に向けて自己集合して脂質二重膜を形成します。さらに脂質二重膜は自然に閉じて袋状の膜小胞を形成します(図

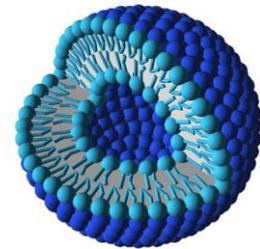


図 3：人工脂質膜小胞の模式図

3)。このようにして形成されてくるものを人工脂質膜小胞と呼び、古くから生体膜の最も単純化したモデルとして多くの実験研究に使われてきました。近年、医薬品や化粧品の素材の1つとして、応用面でも注目され始めています。今回の研究で使われている膜小胞は直径が数ミクロンから数十ミクロンもあり、巨大な人工脂質膜小胞、巨大リポソームとも呼ばれます。これは生きた細胞とほぼ同じサイズで、しかも光学顕微鏡で直接観察できる利点を持っています。

私たちはこの細胞サイズの人工脂質膜小胞を利用することによって、膜が持つ様々な性質や生体高分子との相互作用機構を解明してきました。また人工膜小胞を使った薬剤運搬システムや分子ロボットの構築に必要な膜の制御機構についての研究も行っています。

**細胞骨格**：重合して線維形成する蛋白質群の総称。特にアクチン線維と微小管が有名でよく研究されています。アクチン線維は分子モーターであるミオシンと共同して働くことにより、筋肉や心臓はもとより、腸の蠕動などその他の内蔵の運動も担います。細胞レベルでも細胞の形態形成や形態維持、逆に形態変化や運動まで担っており、細胞が分裂する際には収縮環を形成して細胞質分裂に関与します。一方、微小管は分子モーターのダイニンやキネシンと共同して、例えば神経軸索内では神経伝達物質などのスムーズな運搬に関与し、また真核生物の鞭毛や繊毛運動を担い、細胞が分裂する際には紡錘体を形成して染色体、即ち遺伝子の均等分配に関与します。

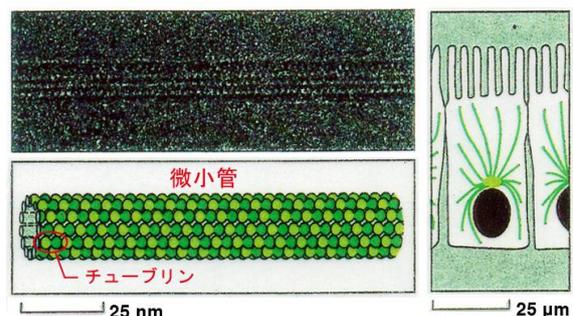


図 4：微小管の電顕像と模式図。

Molecular and Cellular Biology より改変

**微小管とチューブリン:**微小管は細胞骨格の1つです。チューブリンと呼ばれる蛋白質が互いに集まり重合して出来る線維です(図4)。細胞内では様々な調節系が存在し、その調節の下、微小管の重合と脱重合、即ち伸長と短縮が制御されています。

**高圧力顕微鏡:**高圧力チャンバーに実験サンプルを封入し圧力をかけながら、チャンバー内部を常圧力のと看と変わらぬ解像度で顕微鏡観察できる性能が備わっています(図5)。高圧ハンドポンプの操作により、チャンバー内の圧力は、地球上で最も深い場所であるマリアナ海溝最深部(約 10,000 m)の静水圧、即ち~100 MPa 以上に上げることができます。なおこの装置は共著者の西山らによって開発されました。

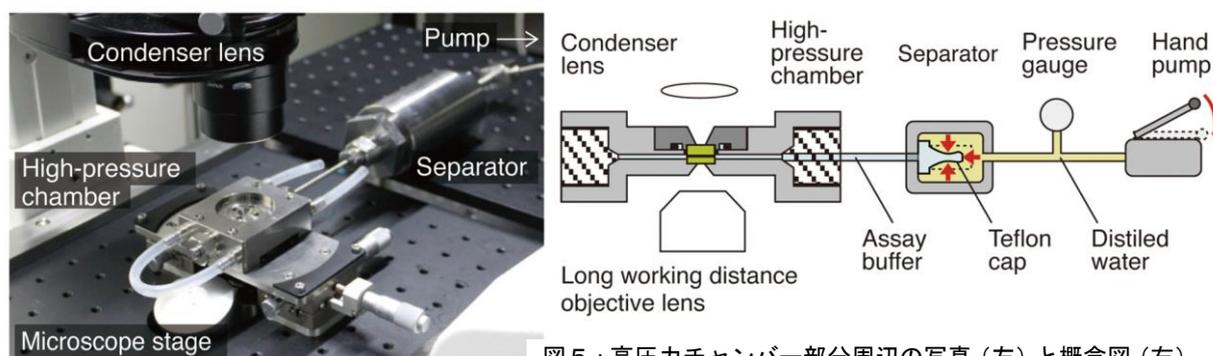


図5：高圧力チャンバー部分周辺の写真(左)と概念図(右)  
©2016 American Chemical Society

### 【論文名】

掲載雑誌: Langmuir (全米化学会(American Chemical Society)発行)

論文タイトル:

Reversible Morphological Control of Tubulin-Encapsulating Giant Liposomes by Hydrostatic Pressure.

著者名:

Hayashi, M.; Nishiyama, M.; Kazayama, Y.; Toyota, T.; Harada, Y.; Takiguchi, K.

DOI: 10.1021/acs.langmuir.6b00799