2019年度版

分子ロボティクス概論



分子のデザインで
システムを創る

MoLecular Robotics

分子ロボティクス研究会 著　村田 智 編

eBook Series No.3 情報計算化学生物学会(CBI学会)出版 ISBN 978-4-9909076-5-5

分子ロボティクス概論

分子のデザインでシステムをつくる

分子ロボティクス研究会　著
村田　智　編

CBI 学会 eBook　第 3 巻

Introduction to Molecular Robotics
Creating a system with molecular design

Molecular Robotics Research Group
Satoshi MURATA 2018

CBI Society eBook Vol.3

「分子ロボティクス概論」刊行によせて

萩谷昌己

これまで独立で全く関係ないと考えられていたような学術分野が影響し合って，互いの進歩を加速するという考え方は，カーツワイルのシンギュラリティ思想の中心にある．いまでこそシンギュラリティ思想は広く受け入れられているが，かつては怪しい未来予想家の大予言のように思われていたのではないだろうか．しかし，技術が技術を生み出すという収穫加速の法則は，少なくとも定性的には正しい．様々な学術分野が融合して進歩が加速するという事象は，サイエンスのここかしこで頻繁に起こっている．そして，その頻度はますます高まっているように感じられる．

そのような分野融合の中でも，自律的な分子システムの設計と実装を目的とする分子ロボティクスの普遍性は，極めて高いと言わざるを得ない．少なくとも地球上の主たる自然現象は，生命現象も含めて，分子と分子が互いに反応することによって生じている．したがって，地球上のすべてのシステムは分子システムだといっても過言ではないだろう．特に生命は分子システムの極致であり，その特徴は自律性にある．生命という自律的な分子システムは，地球上の進化というプロセスによってのみ実現が可能であった．したがって，それを人為的に設計し実装しようとすることは，サイエンスにおける数々の課題の中でも，たとえば宇宙の起源を探るといった課題に匹敵するような，極めて挑戦的で根源的なものであることに間違いない．

当然ながら，そのような挑戦的な課題に臨むのは，一つや二つの学術分野だけでは不可能である．ほとんどあらゆる学術分野を総動員することが求められる．それが可能になったのは，学術分野が影響し合って互いの進歩を加速するというシンギュラリティに向かう時代に入ったからに他ならない．まさに，分子ロボティクスという学術分野は，シンギュラリティに向かう時代になってはじめて出現できた分野であると同時に，自律的な分子システムというテーマの普遍性により，サイエンスの発展の中で必然的に出現すべき分野でもあった．

実は，ここまで長々と述べたことは，本書の序章の図３に一目瞭然の体で視覚化されている．本書の第１章から第５章までには，まさに，情報学・工学・化学・生物学が融合して分子ロボティクスという学術分野が生まれる物語が書かれている．各分野がどのように影響し合って融合して来たかが具体的に語ら

れている．特に，システム工学・制御工学・計算機科学などを含む広義の情報学と，実際のものを扱う化学や生物学とが，いかに融合して来たかには，分子ロボティクスの特徴がよく表れている．情報学は分子システムを設計するためのツールを提供するだけでなく，システムを構築するための方法論，さらにいうならば，システムを構築すべき理由を教えてくれる．一方，化学や生物学は，新しい材料と実験技術を考案し，膨大な実験結果を返すことにより，情報学に対して新たな方法論の創成を迫るのである．

しかし，本書の物語は，多くの学術分野が融合して分子ロボティクスが生まれたところで終わるわけでは決してない．学術分野が融合することにより生じたエネルギーは，今度は，融合した分野から様々な新しい分野を生み出すために消費されるのである．自律的分子システムという分子ロボティクスのテーマの普遍性により，分子ロボティクスから生み出されるであろう分野を網羅することなど，とてもできない．本書の第６章では，分子ロボティクスから生まれる一つの分野として医療応用について紹介されている．いうまでもなく，一つの分野ではあるが，極めて重要な分野である．

本書の最後の第７章では分子ロボティクスの社会受容について触れられているが，これは実は冒頭のシンギュラリティの話につながっている．シンギュラリティの話を聞くと，サイエンスが収穫加速により無節操に発展してしまうという杞憂を感じる人がいるかもしれない．本書の第７章ではそれがまさに杞憂であることが述べられているのである．

本稿の最後に，本書の執筆に関わった方々に加えて，分子ロボティクス研究会および新学術領域「分子ロボティクス」に関わったすべての方々に深く感謝の意を表したい．いうまでもなく，分子ロボティクスの物語をまとめることできたのは，分子ロボティクスという新しい学術分野の創成に関わったすべての方々のお陰である．そして最後にもう一言付け加えておきたいことは，この物語は始まったばかりだということである．つまり，本書にも序章があるが，本書全体が分子ロボティクスという長く続く物語の序章なのである．

まえがき

世の中で一番複雑なシステムは何かと問われれば,やはりその答えは我々ヒトを含む生物であろう.ヒトというシステムはおよそ 40 兆個の細胞からなり,その細胞ひとつひとつにおよそ 2 万種類の遺伝子があり，それがさまざまなタンパク質に翻訳されて，あらゆる生命活動を制御している．生命活動には,代謝，つまり細胞内外の物質のやり取りから，細胞そのものの再生産，筋肉の運動から神経系による思考，捕食，生殖まで，あらゆる活動が含まれるが，いずれも元をただせば分子間の反応にほかならない.細胞という小さな袋の中で,無数の分子がうごめき，ぶつかり合い集合離散を繰り返し，新しい分子を生み出したり，不要な分子を分解したりしている．そうしたややこしい反応を詰め込んだ無数の細胞が空間を埋め尽くして,しかもその集合体の全体として意味のある振る舞いをしているというのだ.まさに想像を絶する複雑さというべきである.

分子生物学の教えるところによれば，あらゆる生物は，共通の分子，すなわち８種類の核酸（4 種類の DNA と 4 種類の RNA）および 20 種類のアミノ酸を主成分とし，そのほかには糖鎖とリン脂質だけが主な素材である．そんなわずかな種類の分子だけで，ありとあらゆる生物ができているのである．しかも，素材が共通であるだけでなく，DNA からタンパク質への複製，転写，翻訳のしくみがすべての生物で共通であり,そのひとつの枠組み(セントラル・ドグマ)の中で細菌から植物，動物までが進化してきた．それは，有限の種類の分子組み合わせから，無限の多様性を創り出してきた歴史であるといえる.

さて，工学の観点から生物を見れば，有限種類の部品から多種多様なシステムを創り出す生物のしくみは,工学にとっては,究極の原理であるはずである.分子ロボティクスの立場，すなわち,「分子レベルから」部品を設計し，合成し，それを組み合わせて，有機的に動作する「システム」をつくる，というのは，まざに生物に学ぶ工学と呼ぶのにふさわしい.

1982 年にシーマンが設計した DNA 分岐構造はわずか 64 塩基であったが,2006 年の DNA オリガミの発明により数千のオーダになり,2017 年現在は 60 万塩基を超える DNA ナノ構造が作られるに至っている．また，DNA コンピュータや，さまざまな機能分子デバイスが続々と開発され，我々の分子ロボットプロトタイプのように，それらを組み合わせた「システム」のレベルの開発が指向されるようになってきた．素材となる分子種も次第に拡がって，RNA やペプチ

ド,それらとDNAの組み合わせ,人工核酸などが加わってきている.実はまだ,こうした研究で本格的な実用に至ったものはないが,技術の進歩につれて,応用分野が広がっていくことが予想される.実際,ドラッグデリバリのための分子ロボットの研究がすでに行われており,創薬,環境モニタリング,人工光合成などへの応用も模索されている.こうした応用を見越して分子ロボティクス研究のためのガイドライン作りなど倫理面の検討も始まっている[5].

配列に基づく分子設計の工学では,あたかも生物の遺伝子型が表現型に対応するように,配列というサイバー空間の情報がそのままリアルな物質世界の実体に反映される.このままコンピュータやAIの進歩が続けば,いずれ実験によらずとも,サイバー空間で精密な分子シミュレーションを行って,それに基づいて最適な配列設計ができるようになるだろう.さまざまな分子の合成も自動化され,生物に匹敵するような複雑かつ大規模な人工の分子システムを作ることが可能になるかもしれない.そうした人工分子システムは,生物とはまた違ったやりかたで,人工物,つまり人間の社会に組み込まれていくことになるだろう.配列のバリエーションでどんなものにもなる分子のレゴは無限の可能性を秘めているのである.

本書は,分子ロボティクスの概論として,分子ロボティクスにおける重要事項から最新のトピックスまでをわかりやすく紹介することを目的として編まれたものである.

分子ロボティクスがいくつかの全く異なる学術分野が重なり合う領域に現れた分野であるために,特定の専門分野を学んできた人には,用語をはじめとして取りつきにくいと感じられることも少なくないと思う.ここでは,必要最小限の予備知識を説明したうえで,分子ロボティクスの柱となっている各項目について,わかりやすく説明している.分子ロボティクスに興味を持っていただいた方,分子ロボティクスの可能性を感じていただいた方にとって,本書が何らかの助けになれば幸いである.

2019年4月
村田　智

本書の構成

分子ロボティクスには，システム工学，制御工学，計算機科学，生化学，生物物理学，高分子化学，核酸化学，分子生物学，倫理学など，多くの学術分野が関連しており，これらを俯瞰的に眺めることによってはじめて分子ロボティクスの全体像をつかむことができる．そのため，学生や初学者にとっては，分子ロボティクスの現在進行形の拡がりがわかる日本語の教科書がぜひ必要であると考え，本書を企画した．

本書は，分子ロボットの設計理論，システム化技術，分子ナノテクノロジー，分子アクチュエータ，分子素材，医療応用，社会受容の 7 章で構成されている．それぞれの章で，理論，基盤となる技術，医療への応用から社会的な立ち位置まで，大まかな内容をつかむことができ，かつ，現在研究の前線で何が行われているかがわかるように解説している．また，数多くのコラムがあり，そこでは分子ロボティクスに関連するトピックスを紹介している．また代表的な論文等については，各項目ごとに文献リストを付した．

序章の「分子ロボティクスへようこそ」では，導入として，分子ロボットの定義，分子ロボティクスの学術的位置づけ，そして近未来応用とその課題について述べる．

第 1 章の「分子ロボットの設計理論」では，分子ロボティクスの設計について，配列，論理回路，動的回路，大規模シミュレーションの階層ごとに重要技術を解説している．論理回路ひとつとってみても数多くの方式が提案されているため，すべてを網羅することはできないが，とくに有用なものおもしろいものについては，コラムで紹介している．

第 2 章の「分子ロボットのシステム化技術」では，分子ロボットのシステム化について解説している．分子ロボットの進化シナリオで述べたように，分子ロボットのシステム化にはいくつかの段階があり，第 2 段階であるアメーバ型（人工細胞型）分子ロボットのプロトタイプ開発や，スライム型の構築原理でもあるゲル上の計算モデル（ゲルオートマトン）などについて，新学術領域の成果を中心に解説している．

第 3 章の「分子ナノテクノロジー」では，分子ロボティクスの基盤技術ともいうべき DNA ナノテクノロジーについて，最近の研究動向を中心に解説している．当初素材としては DNA がもっぱら使われていたが，近年では RNA やペプ

チドなどより機能性の高い生体高分子の配列プログラミングが可能になっており，今後はどんどんDNA・RNA・ペプチドの複合体が設計され，使われていくようになると予想される．

第4章の「分子ロボットのための分子アクチュエータ」では，生体分子モーター系として，微小管・キネシンの系，人工ペプチド重合による推進系，光駆動されるアクチン系，F1-ATPaseによる回転分子モーターを，無機分子モーターとして，BZ ゲルアクチュエータおよび無機ナノシートアクチュエータを紹介する．

第5章の「分子ロボットのための分子素材」では，分子ロボットをつくる素材の観点から，新しい技術の動向を解説する．ここでは，まず，分子ロボットの素材としてDNAゲルを考えた場合重要となる，DNAの大量合成について述べる．また，生体由来の核酸とは異なるさまざまな人工の核酸が開発されており，天然の核酸にはないさまざまな有用機能をもっている．光（紫外光や可視光）の波長に応答して結合・乖離する核酸や天然核酸とは全く相互作用しない直交核酸などは，システムあるいは回路としての分子ロボットの設計自由度を拡げるものである．

第6章の「分子ロボットの医療応用」では，分子ロボットあるいは分子デバイスの応用が期待されている医療の分野において，近い将来の応用を見据えた研究について紹介している．核酸医薬や iPS 細胞と分子ロボティクスがどのようにつながりどのような発展をたどるのを解説している．

第7章の「分子ロボットの社会受容」では，分子ロボティクスと従来の工学技術の相違点を踏まえながら，その研究開発をどのように進めるべきか，倫理，法律，社会の観点から解説している．分子ロボティクスのような新しい技術は，さまざまな波及効果が予想され，研究開発を進めると同時に，それが社会的にどのように受容されるかが重要である．ここでは，テクノロジーアセスメントや技術開発ガイドラインといった具体的な検討の枠組みを解説する．

目次

刊行によせて	i
まえがき	iii
本書の構成	v
目次	vii
序章　分子ロボティクスへようこそ	**1**
第1章　分子ロボットの設計理論	**13**
１．１　DNA の２次構造予測・配列設計技術	13
１．２　DNA 論理回路技術の動向	18
１．３　リアクティブ DNA 回路設計	25
１．４　DNA 増幅回路	26
１．５　制御理論に基づく動的反応回路の設計	29
１．６　PEN DNA Toolbox	37
１．７　化学反応ネットワークの設計	48
１．８　分子ロボティクスのための実時間分子シミュレーション	50
１．９　分子ロボットと分散システム論	56
１．１０　分子人工知能の実現へ向けて	58
１．１１　創発システムとしての分子ロボット	60
第2章　分子ロボットのシステム化技術	**63**
２．１　人工細胞研究と分子ロボティクス	63
２．２　アメーバ型分子ロボットプロトタイプ	73
２．３　ゲルオートマトンと空間を活用する分子コンピューティング	81
２．４　ゲルオートマトンの実装	88
２．５　拡散係数を変化させる分子	95
２．６　移動するゲル	97
２．７　ドロップレットマイクロ流体技術による分子ロボティクスの展開	98
２．８　ナノポアによる一分子計測と膜ゲートとしての可能性	106
第3章　分子ロボットのための分子ナノテクノロジー	**121**
３．１　DNA オリガミ技術の動向	121
３．２　脂質膜上の DNA オリガミ集積技術	131
３．３　DNA タイル・DNA ブリック技術の動向	133

３．４　細胞骨格用の DNA 構造で強化されたリポソーム　141
３．５　DNA 分子マシン　143
３．６　DNA オリガミを用いたライフサイエンス研究　152
３．７　DNA オリガミによる酵素反応の一分子観察　161
３．８　RNA ナノテクノロジーの動向　163
３．９　ペプチド・タンパク質設計技術の動向　181
３．１０　ペプチドデザインと分子ロボティクス　188
第4章　分子ロボットのための分子アクチュエータ　193
４．１　生体分子モーターを駆動系とするスワーム型分子ロボットの構築　193
４．２　ペプチドアクチュエータ　200
４．３　アクチン封入膜小胞の光制御　202
４．４　回転分子モーター　204
４．５　BZ アクチュエータ　206
４．６　無機結晶のアクチュエータ　209
４．７　DNA を使わない分子ロボット　211
第5章　分子ロボットのための分子素材　213
５．１　DNA の大量合成と環境応答性ゲルへの応用　213
５．２　DNA ゲルとその応用　215
５．３　光応答人工核酸　218
５．４　光応答性人工核酸を用いた DNA 計算　227
５．５　核酸の直交性　229
５．６　シャペロン分子による DNA 反応の制御　238
第6章　分子ロボットの医療応用　247
６．１　RNA/RNP による細胞運命の制御　247
６．２　ミセル・ベシクル・ヒドロゲルを基盤とする医療分子ロボット　263
６．３　人工的に制御可能な核酸医薬に向けて　273
６．４　分子はやぶさの夢　275
第7章　分子ロボットの社会受容　277
７．１　分子ロボット倫理の必要性と課題　277
７．２　分子ロボティクスを巡る ELSI を考えるために　283
索引　293
著者紹介　297
編集後記　300

序章
分子ロボティクスへようこそ

序章　分子ロボティクスへようこそ
～その定義，学術的位置づけ，近未来応用とその課題

はじめに

この章の目的は，分子ロボティクスという分野そのものを大きくつかんでいただくこと，そして，この分野でどのような動機により研究開発が行われているかを知っていただくことである．そのため，まずはじめに，そもそも分子ロボットとはどのように定義されるものなのかということについて述べる．次に，分子ロボティクスという学問分野が，どのような歴史的背景また必然性をもって現れるにいたったか，すなわちその学術的位置づけについて解説する．また，分子ロボティクス分野において，近い将来，どのような応用が考えられるか，またそのために解決しなければならない課題は何かについて解説する．

分子ロボットとは？

分子ロボットとは何かを考える前に，まず「ロボット」とは何かを定義しよう．ロボットというと，どんなものを思い浮かべるだろうか？ヒューマノイドのような人間型ロボット？自動車工場の溶接ロボット？空から荷物を宅配してくれるドローン？床をお掃除してくれるロボット？などいろいろ思いつく．こういったものに共通する何かがあれば，それが一般的なロボットの概念である．この際，ヒトや動物に姿や動きが似ているというようなことはロボットの本質ではない．そういった見かけ上の特徴ではなく，ロボットを構成する要素とその機能の関係，つまりシステムとしての構成に注目することによって，ロボットとは何かを定義することができる．ロボットを構成する要素とは，モータ，マイコン，センサー，バッテリーなどの部品である．これらの機能部品が，一定の構造の中に収められたものが総体としてロボットというシステムを構成する．つまり，ロボットとは，「センサーにより外部環境から情報を獲得し，コンピュータ（情報処理回路）によりその情報を処理し，その結果に応じて環

境に対して働きかけるアクチュエータ」からなるシステム，と定義できる（図１）．

では，「分子」ロボットとは何か．分子ロボットもロボットの一種であるから，上記の定義を満たしていなければならない．「分子」ロボットといった時は，ロボットの基本機能すべてを，一から，つまり分子の構造や配列から設計

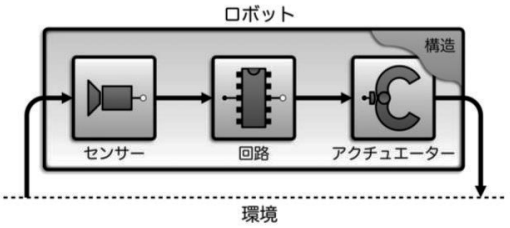


図１　ロボットとは

した分子デバイスで実現したシステムである，と定義する．そう言うと，普通のロボットだって，分子や原子からできているから分子ロボットではないかという人がいるかもしれないがそうではない．ここでは，ロボットが「分子デバイス」でつくられているというところがポイントである．普通のロボットは，金属の塊やプラスチックの塊を素材として，それを削ったり型に流し込んだりしてつくった部品でできている．こうした部品は素材の塊のもつ性質（機械的強度とか電気伝導度など）を利用しているが，そうした性質は素材を一定の形状に成型・加工することによってはじめて発現する性質である．ところが，分子デバイスという場合には，生物のタンパク質がそうであるように，一つ一つの分子そのものが特定の形状をとり，機能を発揮するものを指している．したがって，分子ロボットは，感覚をつかさどる分子デバイス（外界の物理化学的な情報を捉えるレセプター分子），知能をつかさどる分子デバイス（捉えた情報を演算処理してその結果の分子シグナルを放出する分子反応系，そして，運動をつかさどる分子デバイス（分子シグナルによって駆動される分子モータ）が組み合わさったシステムであるといえる．

分子ロボットの作り方

分子ロボットを構成するこうした分子デバイス群は，機械加工のようなマクロ（バルク）な加工ではなく，化学反応によって合成される．生物で言えば，タンパク質酵素という分子デバイスが，DNA の塩基配列から転写翻訳の過程を

へて，アミノ酸の鎖が合成される反応に相当する．本書で述べる DNA オリガミなどの人工分子デバイスの場合は，有機合成や DNA 合成などによって材料分子がつくられ，それらを混ぜ合わせることで，ひとつひとつの分子を正しい形に折り畳んだり，組み立てたりして分子デバイスを作る．こうした組み立ての過程も化学反応の一種であり，自己組織化あるいは，セルフアセンブリ（自己集合）と呼ばれている．

機械部品や電気部品は適切に組み合わせないと全体として機能しない．たとえば，歯車であれば，適切な歯数比をもった歯車を適切な軸間隔で配置しないと回転運動の伝達をすることができない．これと同じように，分子デバイスも適切に組み合わせないとシステムとしての機能を発揮することができない．分子ロボットの中では，ある分子デバイスの出力（通常は分子であることが多い）が別の分子デバイスの入力になっているというように，化学反応のネットワークがつくられていて，それがシステムとしての分子ロボットの実体である．分子ロボットには，どこまでが分子ロボットで，どこからが分子ロボットでないか，つまり分子ロボットの内外・境界を区切る構造すなわち容器が必要である．それが，これらの分子デバイス群を収める「シャーシ」として，細胞膜のようなコンパートメントということになる．

アメーバ型分子ロボットの開発

分子ロボットの内部では，分子デバイス群が，互いに一定の関連性を保ちながら有機的に動作することが必要である．一般に異なる化学反応を同一の溶液空間で組み合わせることは簡単でないが，DNA 等の生体分子を用いることでそれが可能になる．DNA 分子の断片は塩基配列特異的に他の DNA 断片と結合（ハイブリダイズ）するという性質があり，膨大な配列の組み合わせ（配列空間）を利用して複雑な形状の DNA ナノ構造や論理回路のような DNA コンピュータを作ることが可能である．現在すでに数十万塩基を超える規模のナノ構造や，数十個のロジックゲートを含む論理演算回路が実現されており，さらに複雑なシステムが構築可能になりつつある．

2012 年から 2016 年に渡って実施された科研費新学術領域「感覚と知能を備えた分子ロボットの創成（略称：分子ロボティクス）」（領域代表　萩谷昌己，東京大学）においては，センサー，知能，アメーバ，スライムという４つの計画研究班と公募研究班により分子ロボティクスにかかわる様々な研究が行われた．このうちアメーバ班とスライム班は分子ロボットのプロトタイプの開発

を担当した．アメーバ型分子ロボットは，DNA オリガミによるセンサー，DNA 増幅回路)，微小管・キネシン分子モータを，マイクロカプセル（リポソーム）内に統合したシステムであり，分子モータのすべり運動の膜面への伝達を DNA コンピューティングで制御する（DNA クラッチ）．これは，センサー→情報処理→アクチュエーションという一連の機能を，DNA という共通の情報分子で接続し，システムとして統合した初めての例である（２．２節参照）．この研究は発表と同時に世界的な反響を呼び，さまざまなメディアで取り上げられた．もうひとつのスライム班は，ゲルオートマトンと呼ばれる新しい分子計算モデルの開発に取り組んだ．ゲルオートマトンは後に述べる脳型コンピュータにつながるもので，分子コンピュータによる計算を空間に拡げたものである．

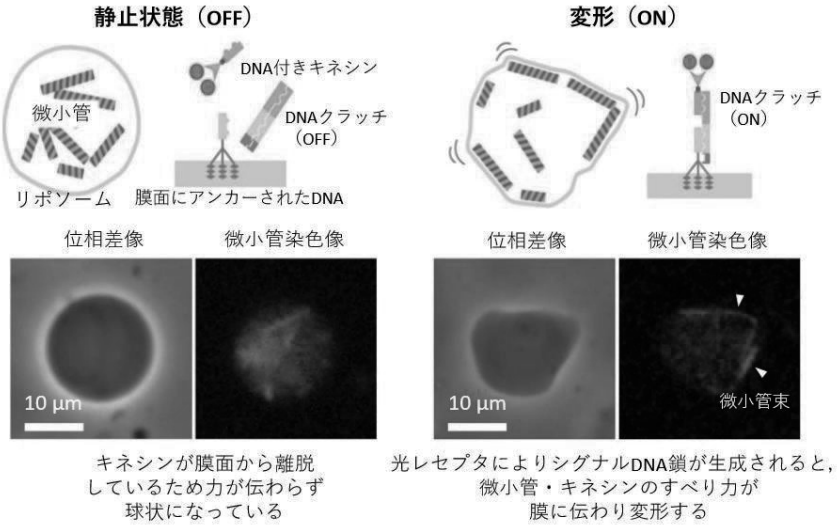


図２　アメーバ型分子ロボプロトタイプ

分子ロボティクスに至る学術の流れ

分子ロボティクスにおいては，個別の分子デバイスや要素技術だけでなく，これらを連関，統合させるシステム化技術を開発することがその主題となる．通常サイズの機械とは異なり，分子のデバイスおよびシステムの組み立ては基本的にボトムアップな化学反応・自己集合・自己組織化により行われ（つまりバルクの化学操作しか許されず），動作のプログラムや制御はすべて化学反応系のプログラムにより実現しなければならない．このことは，分子ロボティク

スが，化学，生物学，ナノテクノロジーといった既存の学問分野の枠を越え，その上の階層の学問であることを意味している．

通常のロボットを組み立てるためには，信頼性の高い電気・機械部品が必要である．ロボット工学の起源であるサイバネティクスが提唱された 1940 年代には，まだ電子計算機もなく，できることはごく限られていたが，半導体技術や精密加工技術の発達とともに飛躍的に進歩し，今では高度なロボットが作れるまでになっている．振り返って，分子ロボティクスの現状を見れば，その部品となる人工分子の設計や合成については，国武豊喜博士の人工膜，新海征治博士の分子機械に関する先駆的研究など，わが国が特に強みとする分野である．分子ロボットの設計や制御については，分子配列設計，DNA コンピュータの技術に加え，フィードバック制御理論に基づく反応系制御などが急速に進展している．また，核酸医薬や iPS 細胞を用いた再生医療の進歩は，分子ロボットが活躍 する場を用意している．つまり，分子ロボティクスは，サイバネティクスを分子レベルから再構築するものであり，まさに，既存の学問分野を超えた融合領域であると言える．分子ロボティクスの加速度的な進歩によって，大規模で複雑な分子システムが自在に作り出せるようになり，それはいずれ物質・情報・生命観のパラダイムシフトをもたらすに至ると考えられる（図３）．



図３　分子ロボティクスに至る学術の流れ

分子ロボティクスを取り巻く世界の状況・我が国の状況

近年，DNA を素材とする分子デザイン，分子デバイスの研究が世界的に活性化している．欧米を中心に研究開発が急激に進み，アジアがそれを追いかける展開となっている．関連分野の研究拠点として，ハーバード大学に Wyss 研究所が創設され，デンマークにも研究センターがつくられている．カリフォルニア工科大学，ミュンヘン工科大学，アリゾナ州立大学などにも研究拠点ができている．こうした中，米国では，大型プロジェクト Molecular Programing Project（MPP）などが相次いで実施されている．これらの中から，空間的分子計算技術，DNA オリガミによる超高分解能光学計測，DNA ロジックゲートの大規模化，DNA ブリック技術，DNA オリガミによる一分子計測技術，DNA デバイスの生体内利用，大規模な DNA ナノ構造・デバイスのシミュレーションといった新しい技術が次々と開発されている．さらに，2017 年には国際 RNA ナノテク学会が設立され，DNA ナノ技術は，DNA/RNA ナノ技術に発展している．中国の各大学は米国で活躍している中国系若手研究者を積極的にリクルートしており，今後，急速にキャッチアップしてくることが予想される．

一方，日本国内の状況については，分子ロボティクスのコンセプトは日本が提唱し，研究の先鞭をつけてはいるものの，必ずしも技術的優位性が確立しているわけではない．我が国では，2010 年に計測自動制御学会において分子ロボティクス調査研究会（主査 村田 智）が発足し，2012 年度から 16 年度にかけて前述した新学術領域「分子ロボティクス」（領域代表 萩谷昌己）を実施した．この領域には，化学，生物物理，情報系，工学系を中心に，延べ 75 名の研究者が参加し，分子ロボティクスの研究開発を精力的に推進した．また，この領域 から派生したプロジェクトとして，NEDO 次世代人工知能・ロボット要素技術開発「生体分子を用いたロボットの研究開発」（2016-9，代表 小長谷明彦），JST 人と情報のエコシステム「分子ロボット技術に対する法律・倫理・経済・教育からの接近法に関する調査」（2016，代表 小長谷明彦），科研費 基盤研究 S（1 件，代表 齊藤博英），基盤研究 A（3 件，代表 村田智，小長谷明彦，森島圭介）基盤研究 B（5 件）などが実施されている．また，公募班研究者の根本直人らは，ここで得られた成果をもとに機能性バイオ分子デザインのベンチャーを設立している（（株）Epsilon Molecular Engineering）．

わが国では，個別の分子デバイスをつくる研究もさることながら，分子デバイスを部品としてシステムの構築を目指す「分子ロボティクス」にいち早く取り組んでいることで，海外にはない独自のシステム化技術を積み上げてきてい

る．また，RNA やペプチド，人工核酸，高分子など DNA 以外の分子素材を扱うことのできる研究者の層が厚いことも特色である．このことは，今後，具体的な応用展開を目指す局面においては有利だと考えられる．

分子ロボットの進化シナリオ

新学術領域「分子ロボティクス」の立ち上げに際して，著者らは分子ロボットの発展形態としてその進化シナリオを提案した(図４)．このシナリオでは，分子ロボットの進化は，単分子に機能を盛り込む第 0 世代の分子スパイダーにはじまり，リポソームに分子デバイスを封入する第 1 世代のアメーバ型分子ロボット，ゲルに分子デバイスを分布させてスケールアップを図る第 2 世代のスライム型分子ロボット，多細胞化することで多様性を実現する第 3 世代，さらに，電子技術や生物体とのハイブリッドを目指す第 4 世代に至る．

その後の学術の進展をみてみると，これまで研究の主流だった DNA ナノテクノロジーの分野でも，「分子ロボット」を目指す研究開発が多く行われるようになっており，このシナリオの各段階に相当する研究が実際に行われるようになってきている．

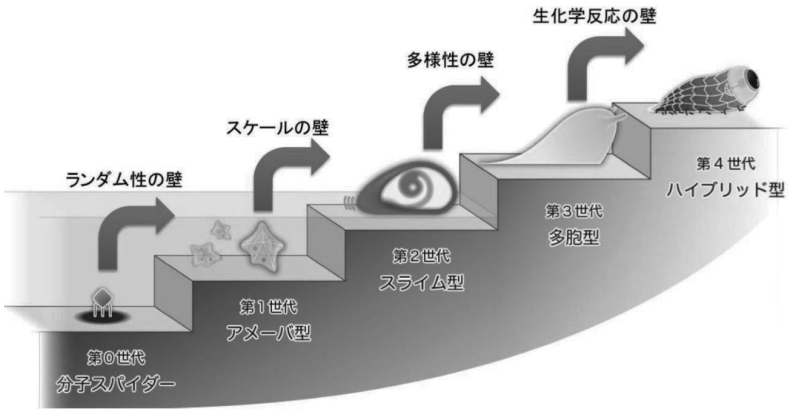


図４　分子ロボットの進化シナリオ

分子ロボティクスの未来応用

多くの読者の興味は，分子ロボティクスがこれからどういった分野で，どのように応用されるかという点にあるかと思われる．ここでは，近未来の分子ロボティクスの応用について述べつつ，本書の具体的項目との対応を示しておく．

分子ロボティクスは汎用性の高いテクノロジーであり，半導体産業に代わる次世代の産業基盤となる可能性を持つ．分子ロボティクスでは，DNA や RNA，ペプチドなどを素材とする分子デバイスとそのシステム化が主要なテーマとなっており，特に，生命と人工物が融合する分野において，さまざまな応用展開が考えられる．分子ロボティクスは急速に進展している分野であるので，その将来を見通すことは容易ではないが，これまでの発展の経緯を外挿すれば，ある程度の予想は可能である．ここでは，近未来の分子ロボットの応用として考えられているものをいくつか紹介しよう．

分子ロボットが主に核酸やタンパク質など生体分子材料でつくられているため，生体への応用，特に医療分野との親和性は高く，いろいろな応用が考えられている（図５）．すでに多くの研究がなされているドラッグデリバリの高度化がその代表的なもので，高度な診断・投薬ロジックを分子ロボットそのものにプログラムし，体内で診断・治療を行うというものである．また，近年ついに実用化段階に入った核酸医薬を，インテリジェント化するというシステム核酸医薬のコンセプトがある．これは，単一の遺伝子をターゲットにする通常の核酸医薬とは異なり，生体内に投入された人工反応回路が miRNA の発現濃度などを用いて診断（分子コンピューティング）を行い，医薬となる核酸配列を細胞内で合成するというもので，いわば「飲むお医者さん」である．生体反応系とクロストークしない直交人工核酸，診断ロジック回路の設計法，モデル生物実験による検証などが，システム核酸医薬の課題である．

また，iPS 細胞制御は，RNA タンパク複合体からなる人工オルガネラをもちいた iPS 細胞の分化制御技術で，将来的には人工臓器の作製につながるものである．分化制御機能をもつ人工オルガネラ，人工オルガネラを細胞内部に導入するためのカプセル，細胞群の パターン形成の組織制御などの技術が課題となっている．

環境分野における分子ロボティクスの近未来応用としては，さまざまなモニタリングが考えられる（図６）．分子ロボットが空間内を移動しながら，その場所場所で微量の物質を探索し，濃度や分布に関する情報を集めることが目的である．環境としては，海洋や河川などの外界から，人体，家畜，樹木などの植物体の内部などが考えられる．

分子はやぶさは，分子ロボットで行う生体内のサンプル＆リターンのコンセプトである．人体や動植物体内から分子ロボットが直接分子サンプルを持ち帰

ることにより，体内の miRNA の分布，エクソソームの情報など，他の方法では取得が困難な情報を得ることができる．具体的には，分子はやぶさとなる人工細胞に，細胞表面の分子サンプル採取のためのペプチドデバイスを実装し，持ち帰った微量の分子サンプルをナノポアシステムによって解析する．分子ロボットの内部の分子コンピュータで収集した情報を演算したり，その結果を分子に記憶したりすることも考えられる．

化学・エネルギー分野においては，分子ロボティクスを直接応用するというよりは，分子システムを構築する方法論としてどのように分子ロボティクスが

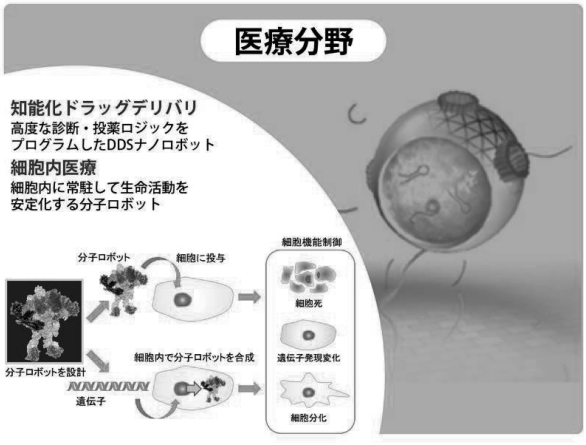


図５ 医療分野における分子ロボティクスの応用

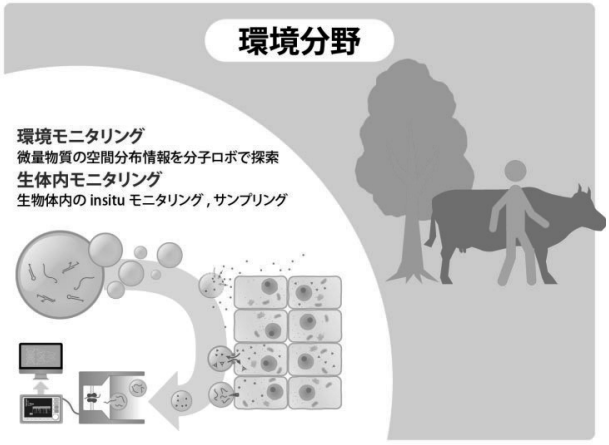


図６　環境分野における分子ロボティクスの応用

貢献できるかについて述べる（図７）．さまざまな分子デバイス，ナノ構造を組み合わせてシステムを構築する方法論として分子ロボティクスが応用できる．人工光合成は太陽エネルギーを化学エネルギーに変換する技術である．図７は，光で駆動される分子モータにより ATP を合成するシステムの構想である．光駆動分子モータと ATP 合成酵素が DNA ナノ構造の６角形セルに収められ，それぞれの回転軸が連結されている．６角形セルには蛍光分子が配置され，

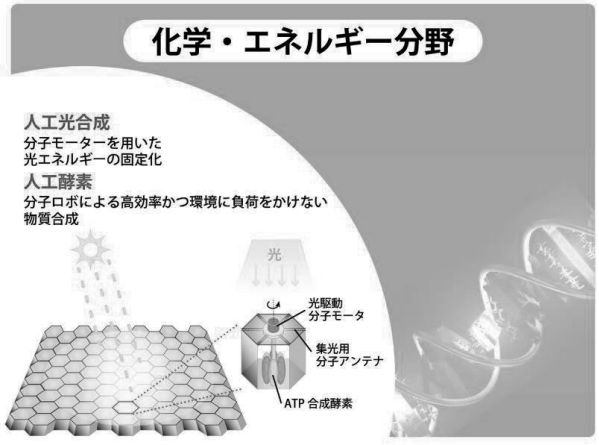


図７　化学・エネルギー分野における分子ロボティクスの応用

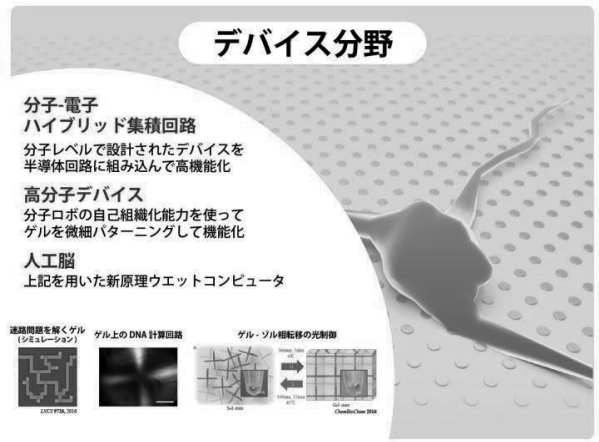


図８　デバイス分野における分子ロボティクスの近未来応用

集光レンズの役割を果たす. このような分子レベルのパーツが複雑に組み合わされたシステムは，従来のトップダウン型の技術では製造が困難であり，分子の自己組織化によりボトムアップに作製する分子ロボティクス技術が活用できる.

デバイス分野における分子ロボティクスの近未来応用はとしては, 分子デバイスによるさまざまな情報処理システムの構築が考えられる（図８）. デジタル情報処理に限れば電子技術を凌駕することは難しいが, 分子による情報処理の特性を生かすことにより, これまでにない情報処理が可能になると考えられる. たとえば，化学物質のセンシングを入力とし，化学物質の放出を最終的な出力とするような応用では, 間に電子による情報処理をはさむよりはすべてを分子で処理することのメリットがある. 分子の小ささや，超並列性，また分子の持つ非線形による複雑な反応ダイナミクスを生かした新原理コンピュータ（人工脳）も考えられる.

まとめ

この章では，いわゆるシステム論的な観点から，分子ロボットとはどのように定義されるものなのかということについて述べたあと, 分子ロボティクスという学問分野がどのようにして成立し, 発展しようとしているかについて概説した. また，分子ロボティクスの近未来の応用について，おおいに構想を交えながらその可能性を議論し, この後の章で述べられる分子ロボティクスのさまざまな側面へ移る前の動機付けとした.

第1章
分子ロボットの設計理論

1．1　二次構造予測・配列設計技術

DNA や RNA の塩基配列が与えられたとき，どのような二次構造が熱力学的に安定かを予測したい場合がある．そのような問題は二次構造予測問題と呼ぶ．配列配列設計問題はその逆問題であり，望みの二次構造が最安定となる配列を設計する問題である．本解説では DNA の場合を例題に，まず二次構造予測の手法について説明し，その後配列設計の手法について説明する．

DNA の一次構造とは塩基(A：アデニン，T：チミン，G：グアニン，C：シトシン)の単純な文字列であり，二次構造とはどの塩基がどの塩基と水素結合を作る(塩基対形成する)かを表した構造である．図 1 に一次構造と二次構造の違

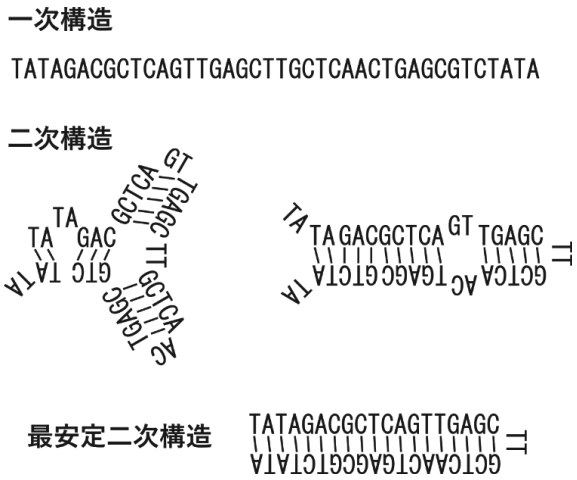


図 1　DNA の一次構造と二次構造の違い

上段に文字列として表現された一次構造を示している．その下には，同じ塩基配列を使った 3 種類の二次構造を示している．二次構造では，A と T および G と C の間の水素結合を線として表現する．

いを示す．二次構造において，原則，A は T と，G は C と塩基対を形成することができる．塩基対の組み合わせが変わることで，同じ一次構造を持つ DNA でも複数の二次構造が考えられる．

二次構造が与えられると，Nearest-Neighbor モデル(NN モデルと略す)によって，その構造が持つ自由エネルギーを計算することができる．具体的な自由エネルギーの計算は，部分構造が持つ NN モデルパラメータの単純な足し合わせによって行う．部分構造とは，塩基対の線と一次構造の骨格で囲まれた領域を意味し，例えば塩基対が二つ並んだ間の塩基対スタッキングなどがある．部分構造のパラメータとして，SantaLucia Jr.[1]や杉本[2]が実験的に求めた値が広く使われる．

考えうるすべての二次構造の自由エネルギーを求めることができると，その中で最も安定な構造を選ぶことができ，二次構造予測問題を解いたことになる．例えば図 1 の例では，一番下の構造が選ばれることになる．二次構造予測問題は，動的計画法と呼ばれるアルゴリズムを使うと効率よく解けることが知られている[3]．考えうる二次構造を網羅的に探索する際，共通の部分構造を持つ二次構造の計算をひとまとめに行うのがアルゴリズムの方針であるが，詳細は論文を参考にしてほしい．

二次構造予測を実践するには，オンラインに公開されている様々なソフトウェア[4,5,6]を使うのが一般的である．図 2 は NUPACK[7]を使った二次構造予測，「Analysis」の画面例である．一番左の入力画面では，3 種類の DNA 配

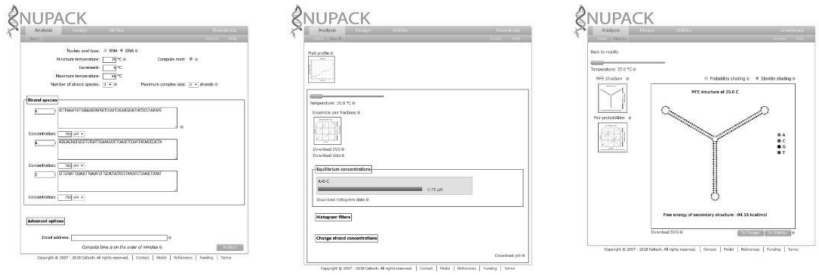


図２　NUPACK による二次構造予測のインターフェース

一番左が入力画面である．入力画面の右下にある「Analyze」ボタンを押すと計算が始まり，しばらくすると結果を表示する真ん中の画面に遷移する．さらに棒グラフをクリックすると，一番右の二次構造の画面が表示される．

列を入力している．計算を行った後，最初に表示される真ん中の結果の画面では，濃度分布が赤い棒グラフとして表示される．分布は各構造の自由エネルギーに応じて計算されるため，最も量の多い構造が自由エネルギーの観点で最安定である．棒グラフをクリックすると，一番右に示されているような二次構造が表示される

以上の二次構造予測問題は，事前に塩基配列が分かっており，溶液中でどのような構造を取るか予測したい場合に必要である．例えば遺伝子中にコードされた RNA 断片を見つけた場合，どのように機能するのかその構造から予見したい場合など，生物学的な文脈で重要になる．一方分子ロボティクスの文脈では，その逆問題，つまり目的の構造になる塩基配列を設計する問題を解く必要がある．例えば DNA タイルのように望みの形を持つ構造体を構築する場合や，DNA 計算のように DNA 同士が結合した素子を作製する場合である．単純な解決策として，ランダムに配列を決定する方法がある(相補な関係にある配列は，一方を決めると他方が自動的に決まる)．

ただしランダムに配列設計をする方法では，多くの条件を同時に考慮することができない．条件の例としては，以下のようなものがある．

・ある強さで結合する(指定した Tm を持つ)配列
・指定した GC 含量を持つ配列
・同じ塩基が連続で 4 つ以上の続かない配列
・プリン基，ピリミジン基，などが連続で 6 塩基以上続かない配列
・直交性が担保されている配列

最後の直行性を保つことは，配列を設計する際に特に重要になる．言い換えると，意図しない部分同士は結合せず，クロストークが最小に抑えられている配列の設計を目指す．直交性が不十分な場合，準安定な副産物ができてしまい，期待通りの構造ができない･期待通りに反応が進まない，という問題が起こる．上記のような条件がすべて満たされるまで，人手による試行錯誤を繰り返して良い配列を発見するのは現実的ではない．

設計したい配列の空間が小さい場合は，すでに直交性が担保されている配列セットを使う方法がある[8]．互いに干渉しない 23 塩基の DNA が事前に 37 種類与えられているため，その中から必要な配列を選択する．しかしながら，一般の問題に適用するには配列セットが小さすぎるため，汎用性に乏しい．

そこで計算機の支援により，比較的良い配列を設計する手法が多数開発された[9,10,11]．具体的な手法としては，多目的最適化問題を解く遺伝的アルゴ

リズムなどが使われる．ランダムな配列から探索を開始し，少しずつ改変を加えながら何度も二次構造予測を繰り返し，望みの条件に合致するものを選択する，というのがアルゴリズムの方針である．詳細は論文を参考にしてほしい．ソフトウェアとして公開されている配列設計アルゴリズムもいくつか存在する[12,13]．本解説ではNUPACKの配列設計機能を例に，使い方を説明する．図3はNUPACKにおける配列設計の機能，「Design」の画面例である．左側は入力画面であり，対象となる二次構造やその他の条件を入力する．右側は結果の画面であり，具体的な配列セットが何種類か出力されている．配列に付属している「Normalized ensemble defect」は，その配列がどれくらい良いかという指標であり，0に近いほど良く，100に近いほど悪い．基本的には一番上にある，最も良い配列を採用する．配列の横にある「To Analysis」ボタンを押すと，設計された配列を使った二次構造予測を改めて行うことができる．配列設計は二次構造予測の逆問題だったことを思い出してほしい．

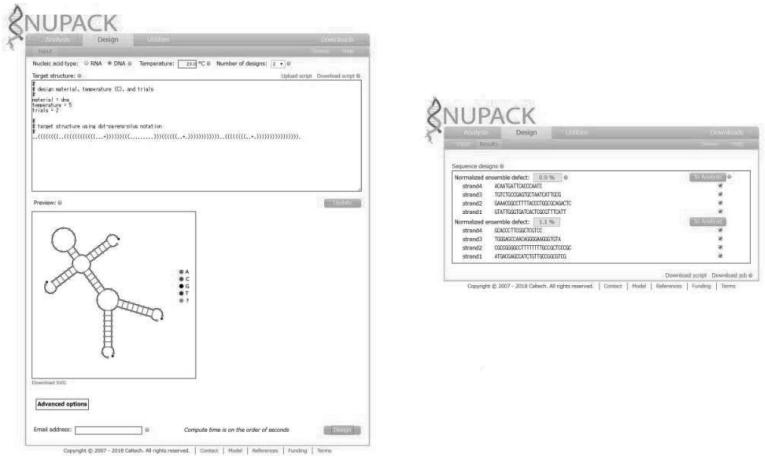


図３　NUPACKによる配列設計のインターフェース．

左は入力画面．入力画面の右下にある「Design」ボタンを押すと計算が始まり，しばらくすると結果を表示する右側の画面に遷移する．

NUPACKの「Design」に与える入力としては，核酸の種類(DNAなのか，RNAなのか)や，評価する際の温度など自明なパラメータも存在するが，二次構造の指定は難しく慣れが必要である．具体的には「Target Structure」の枠中に，ドット・ブラケット・プラス記法と呼ばれる，文字列を使った方法で二次構造を指定する．記法は図4のように，ドット「.」が水素結合していない塩基を，

対応する左括弧「(」と右括弧「)」は水素結合を行う塩基対を，プラス「+」はDNAの切れ目を表す．図の例にもあるように，複雑な構造も表現できる柔軟な記法である．その他にも様々な制約条件を設定することができるが，詳しくはNUPACKの「HELP」を読んでほしい．

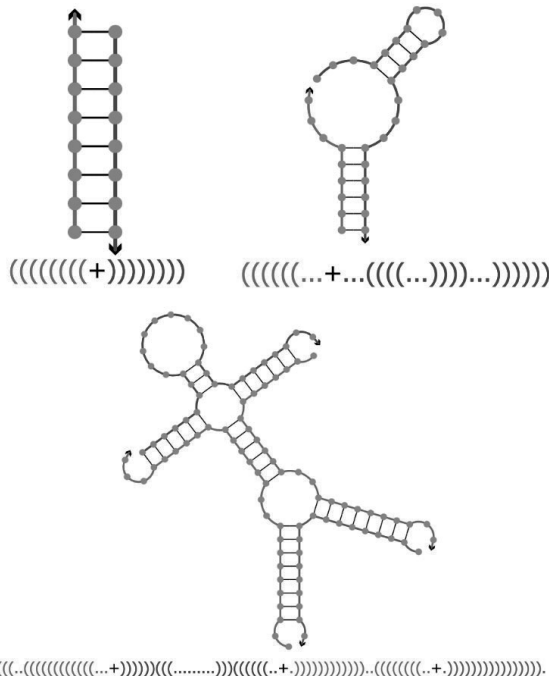


図４　ドット・ブラケット・プラス記法の例

左上は完全に結合した相補な二本鎖を表す．右上はヘアピンを含む青いDNAと赤いDNAの一部が結合した構造を表す．下側は棒人間のような二次構造を，4本のDNAで形成する場合の表現方法である．

以上のように，配列設計と二次構造予測は互いに逆問題になっており，その解を導くことは，DNAやRNAで構成される構造の解析やシステムの設計において必要不可欠な技術である．本項では，NUPACKと呼ばれるオンラインソフトウェアを中心に，実践的なアルゴリズムの利用方法を解説した．

[1] SantaLucia, J. J., A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **95**, pp. 1460, 1998.

[2] Sugimoto, N., Nakano, S.-I., Yoneyama, M., Honda, K.-I., Improved thermodynamic parameters and helix initiation factor to predict stability of DNA duplexes, *Nucleic Acids Res.*, **24**, pp. 4501, 1996.
[3] Waterman, M. S., Smith, T.F., Rapid Dynamic Programming Algorithm for RNA Secondary Structure, *Advances in Applied Mathematics*, **7**, pp. 455, 1986.
[4] Zadeh, J. N. et al., NUPACK: analysis and design of nucleic acid systems, *J. Comput. Chem.*, **32**, pp. 170, 2011.
[5] Markham, N. R., Zuker, M., DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction, *Nucleic Acids Res.*, **33**, pp. 577, 2005.
[6] Sato, K., Kato, Y., Hamada, M., Akutsu, T., Asai, K., IPknot: Fast and accurate prediction of RNA secondary structures with pseudoknots using integer programming, *Bioinformatics*, **27**, pp. 85, 2011.
[7] NUPACK http://www.nupack.org/
[8] Kitajima, T., Takinoue, M., Shohda, K., Suyama, A., Design of code words for DNA computers and nanostructures with consideration of hybridization kinetics, *Lect. Notes Comput. Sci.*, **4848**, pp. 119, 2008.
[9] Zhang, D. Y., Towards Domain-Based Sequence Design for DNA Strand Displacement Reactions, *Lect. Notes Comput. Sci*. **6518**, pp. 162,2011.
[10] Tanaka, F., Kameda, A., Yamamoto, M., Ohuchi, A., Design of nucleic acid sequences for DNA computing based on a thermodynamic approach, *Nucleic Acids Res.*, **33**, pp. 903, 2005.
[11] Shin, S.-Y., Lee, I.-H., Kim, D., Zhang, B.-T., Multiobjective Evolutionary Optimization of DNA Sequences for Reliable DNA Computing, *IEEE Trans. Evol. Comput.*, **9**, pp. 143, 2005.
[12] DNA Design toolbox http://centrosome.caltech.edu/DNAdesign/
[13] CircDesigNA https://sourceforge.net/projects/circdesigna/

（東北大学　川又生吹）

1．2 DNA 論理回路技術の動向

DNA ナノテクノロジーの分野において，DNA 論理ゲート・回路はシステムに情報処理能力・さらにはプログラム性を与える目的で広く使われている．駆動

原理の観点から，さまざまな戦略が提案されており，本解説では DNA を中心にプログラムされた論理回路技術について，酵素フリー・DNAzyme・酵素系，の 3 種類の系を紹介する．

酵素フリーのシステムでは，DNA の鎖置換反応(水素結合の交換により二重らせん形成する反応の一種)を巧みに組み合わせて論理ゲートを実装する．例えば DNA だけを使い AND ゲートを実装した研究では，二つの入力 DNA が存在する場合のみ，出力 DNA が一本鎖となることを報告した(図 1)[1]．

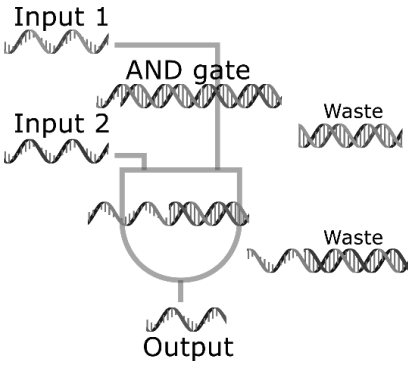


図 1　DNA から構成された酵素フリーの AND ゲートの模式図
二つの入力が与えられた時の動作を示す．(参考文献[1]をもとに作成)

同様の設計原理を用いて他の論理ゲートを設計することも可能であり，ゲートどうしを接続することで回路のような複雑化が可能であることも報告されている．図 2 ではシーソーゲートと呼ばれる DNA ゲートを丸い素子として表現し，丸い素子同士を回路のように配線することで出力 DNA と入力 DNA が対応することを表現している[2,3]．例えば[2]の論文で構成された回路は平方根を計算することが可能であり，例えば 16 を意味する DNA の組み合わせが入力されると，√16 を計算し 4 を意味する DNA が出力される．

上記のような例では，全ての分子が溶液中を自由に拡散しているため，拡散が律速となり反応速度に限界が生じる．例えば上記の平方根を計算するまでにかかる時間は 10 時間程度である．さらに，DNA どうしがリーク反応と呼ばれる予期しない反応でクロストークしてしまい，系全体が期待通り動作しないという問題も頻発する．近年の酵素フリーDNA 論理回路の研究分野では，DNA オリガミ上に DNA 論理回路を配置する試みや，精密な配列設計によって，系の高

速化・ロバスト化に関する手法が盛んに研究されている[4, 5]．今後は回路の大規模化が重要になると考えられる．

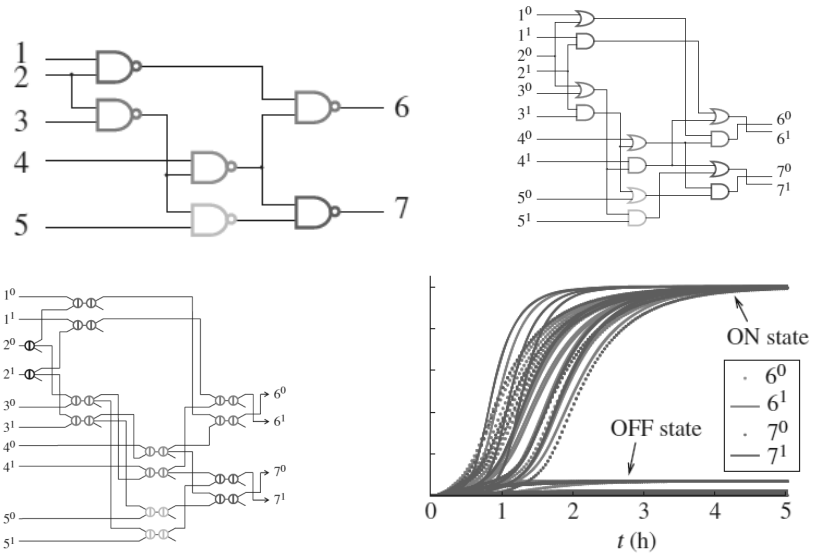


図２　酵素フリーの DNA 論理回路の模式図

左上から，対象となる論理回路，デュアルレール論理回路，シーソーゲート素子(丸に縦線)を使った DNA 回路を表現しており，右下はシミュレーション結果

(Reprinted from *Journal of The Royal Society Interface* 2011 [3])

これまで紹介した DNA の鎖置換反応を使わず，特別な DNA 配列がもつ酵素活性を活用した DNA 論理ゲート・回路も盛んに研究されている．酵素活性を持つ特別な DNA は DNAzyme と呼ばれ，鎖置換反応だけでは難しいシステムの機能化への応用が期待されている[6]．図 3 は核酸(DNA や RNA)を切断する活性を持つ DNAzyme を活用した AND ゲートの例である．やはり 2 つの入力 DNA の両方がある時だけ出力 DNA が切断されることが確認されている．

DNAzyme を使用した系でも，出力分子が次のゲートの入力分子となるように設計することで回路化することが可能である．印象的な例は，三目並べのプレーヤとなる論理回路である(図 4)[7]．人間がマス目に対応した入力 DNA を加えると，DNAzyme による計算が行われ，マス目に対応した蛍光を出力する．回

路化されているため計算結果は次の手に影響を与え，三目並べのゲームが終わるまで人間と交互にプレーが可能である．DNAzyme 回路は勝つか引き分けになるようにプログラムされている．

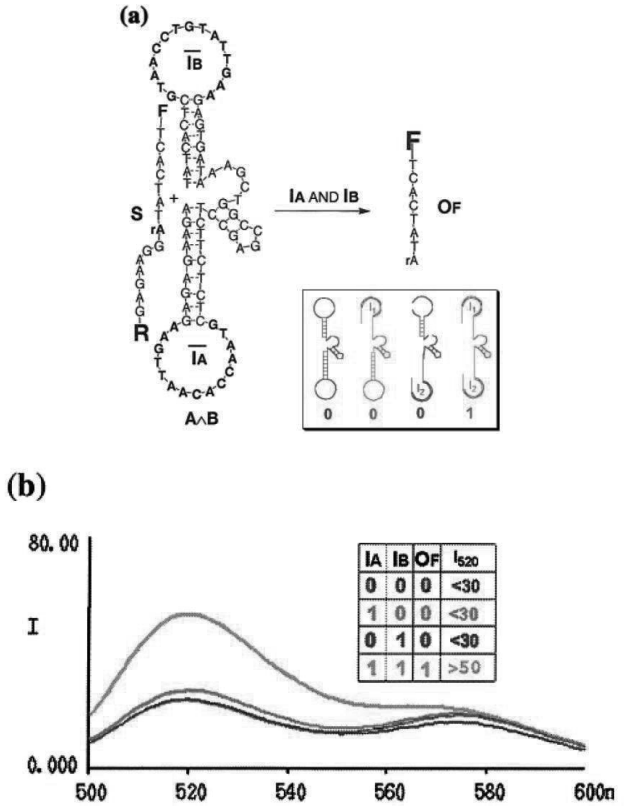


図３　DNAzyme により実装された AND 論理ゲート

ゲートを実現するために必要な DNA 配列および二次構造と実験結果

（Reprinted from *Journal of the American Chemical Society* 2002 [6]）

上記のように複雑な計算が可能なものの，DNAzyme は設計可能な塩基配列の自由度が小さく，また溶液条件に制約があるため(マグネシウムや亜鉛イオンなどが必要)，システムの複雑化や大規模化への道のりはあまりたっていない．制約が大きい中でも，例えば DNAzyme の配列をライブラリ化し，系にプログラム性を付与した研究があり[8]，DNAzyme ゲートを効率よく設計する方針とし

て利用することができる．

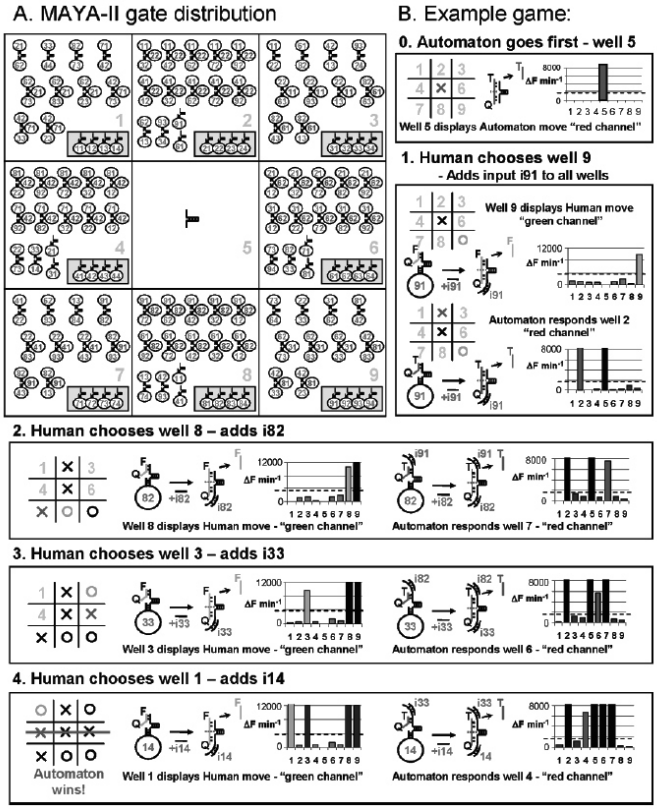


図４　DNAzyme により実装された 3 目並べのプレーヤとなる論理回路

必要なゲートの模式図と，3 目並べの例となるゲームの実験結果

（Reprinted from *Nano letters* 2006 [7]）

これまで説明した戦略とは異なり，DNA とは種類の異なる分子である酵素を用いて DNA 計算素子を実装することも可能である．酵素を活用することで核酸の合成や分解が可能になり，さらなる機能化が期待される．報告されているシステムの中でも，PEN toolbox と genelet と呼ばれる二つの研究が注目されている．PEN toolbox は別に解説記事があるため，ここでは genelet システムを紹介する．genelet では転写開始するための DNA 配列を巧みに制御し，転写のオン/オフを巧みに切り替える．例えば，トグルスイッチと呼ばれる論理素子[9]や，図 5 のような二状態回路が実装されている[10]．トグルスイッチで

は，システムは 2 つある状態の一方だけに変化するが，状態切替を意味する DNA が入力されると，他方の状態にスイッチする．

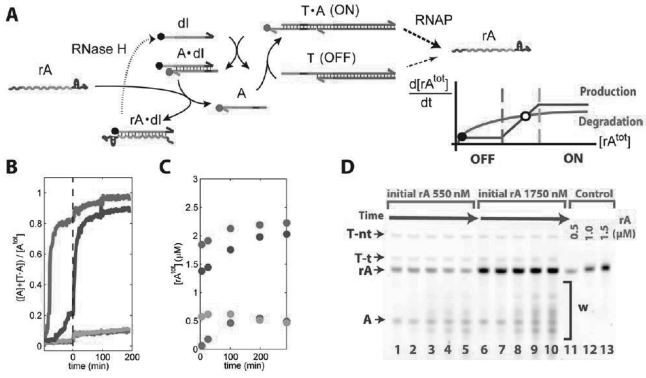


図５　genelet によって実装された二状態回路

DNA テンプレートによる RNA の合成・分解反応の模式図と，状態を観察した実験結果

（Reprinted from *ACS Synthetic Biology* 2006 [10]）

genelet ではゲートの活性と抑制を実現することができるため，システム生物学的な回路を構成することが得意である．例えば，リングオシレータのような発振回路を実装し，図 6 のように振動現象を観察することが可能である [11, 12]．

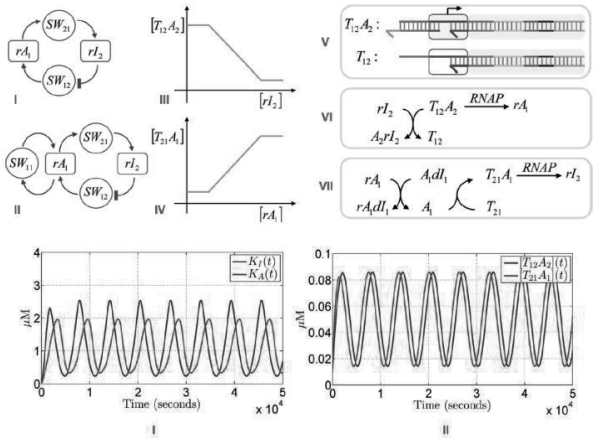


図６　genelet によって実装されたリングオシレータ

必要な DNA テンプレートの一覧と，振動をシミュレーションした結果

（Reprinted from *ACS Synthetic Biology* 2014 [12]）

様々なダイナミクスを実現できる可能性がある一方で,酵素を使った反応系は制約も多い.特に溶液中のイオン濃度や溶液温度は酵素ごとに異なる特有の条件があるため,複数の酵素を使う場合は試行錯誤により最適な条件を発見する必要がある.また試薬会社から酵素を購入した場合は,ロットごとに活性が異なるため(最低限の活性だけが保証されている),同じ分量の酵素を使っても一定の反応速度定数を示さないことが多い.条件の緩和方法の発見や,速度論的な議論の単純化が今後必要になるかもしれない.

本解説で紹介したいずれの戦略でも,単純な論理ゲートを 2〜3 種類作製し,論理回路化することはすでに可能となっている.今後は大規模化・ロバスト化・高速化・溶液条件緩和などが課題になると考えられる.本解説で紹介しきれなかった他の研究例は,レビュー論文[13, 14]などで確認してほしい.

[1] Seelig, G., Soloveichik, D., Zhang, D. Y., Winfree, E, Enzyme-Free Nucleic Acid Logic Circuits, *Science*, **314**, pp. 1585, 2006.

[2] Qian, L., Winfree, E., Scaling up digital circuit computation with DNA strand displacement cascades, *Science*, **332**, pp. 1196, 2011.

[3] Qian, L., Winfree E., A Simple DNA Gate Motif for Synthesizing Large-Scale Circuits, *Journal of The Royal Society Interface*, **8**, pp. 1281, 2011.

[4] Chatterjee, G., Dalchau, N., Muscat, R. A., Phillips, A., Seelig, G., A spatially localized architecture for fast and modular DNA computing, *Nat. Nanotechnol.*, **12**, pp. 920, 2017.

[5] Srinivas, N., Parkin, J., Seelig, G., Winfree, E., Soloveichik, D., Enzyme-Free Nucleic Acid Dynamical Systems, *Science*, **358**, pp. eaal2052, 2017.

[6] Stojanovic, M. N., Mitchell, T. E., Stefanovic, D., Deoxyribozyme-based logic gates, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, pp. 3555, 2002.

[7] Macdonald, J., Li, Y. Sutovic, M., Lederman, H., Pendri, K., Lu, W., Andrews, B. L., Stefanovic, D., Stojanovic, M., N., Medium Scale Integration of Molecular Logic Gates in an Automaton, *Nano Lett*., **6**, pp. 2598, 2006.

[8] Elbaz, J., Lioubashevski, O., Wang, F., Remacle, F., Levine, R. D., Willner, I., DNA computing circuits using libraries of DNAzyme subunits, *Nat. Nanotechnol*, **5**, pp. 417, 2010.

[9] Kim, J., White, K. S., Winfree, E., Construction of an in vitro bistable circuit from

synthetic transcriptional switches, *Mol. Syst. Biol*, **2**, pp. 68, 2006.
[10] Subsoontorn, P., Kim, J., Winfree, E., Ensemble Bayesian Analysis of Bistability in a Synthetic Transcriptional Switch, *ACS Synth. Biol.*, **1**, pp. 299, 2012
[11] Franco, E., Friedrichs, E., Kim, J., Jungmann, R.,Murray, R., Winfree, E., Simmel, F. C., Timing molecular motion and production with a synthetic transcriptional clock, *Proc. Nat. Acad. Sci*, **108**, pp. E784, 2011.
[12] Kulkarni, V., Kharisov, E., Hovakimyan, N., Kim, J., Load Capacity Improvements in Nucleic Acid Based Systems Using Partially Open Feedback Control, *ACS Synth.c Biol.*, **3**, pp. 617, 2014
[13] Benenson, Y., Biomolecular computing systems: principles, progress and potential, *Nat. Rev. Genet*., 13, pp. 455, 2012.
[14] Fu, T., Lyu, Y., Liu, H., Peng, R., Zhang, X., Ye, M., Tan, W., DNA-Based Dynamic Reaction Networks, *Trends in Biochemical Sciences*, 2018

（東北大学　川又生吹）

1．3 リアクティブ DNA 回路設計

入力の変化に対して適切に計算をしなおして出力値が正しく変更される回路をリアクティブな反応回路という．環境からの入力をセンサーによって受け取りながら動作する分子ロボットは，環境の変化を検知して動作する必要があるが，これまでに提案されている DNA を利用した回路のほとんどはリアクティブではなく．この目的を達成するには役に立たないといえよう．

リアクティブな DNA 論理回路に関する研究としては Genot らの研究がある（[1]）．この系では，入力 DNA 配列 X の濃度の増加は X を投入することで達成されるが，減少は X の相補配列の投入で達成される．系の反応がすべて可逆な反応で構成されているために，出力の濃度も入力の変化に応じて適切に変更されるように設計されている．実験によってその動作も確認されているが，非常に単純な論理関数しか実装できないのが現状である．

一方，リアクティブな DNA アナログ回路を構築しようとする試みもある（[2]）．例えば，加算を実行するアナログ回路素子は，以下のような可逆な２つの化学反応を実装すればよい．

$$\mathrm{A} \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} \mathrm{C}, \qquad \mathrm{B} \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} \mathrm{C} \qquad (1)$$

分子 C の濃度が一定になる定常状態を考えると，$k_1[A] + k_1[B] - 2k_2[C] = 0$ が成り立つので，$[\mathrm{C}] = \frac{k_2}{2k_1}([A] + [B])$ という関係が得られる．つまり，$k_2 = 2k_1$ となるように速度定数を設定できれば，$[\mathrm{C}] = [\mathrm{A}] + [\mathrm{B}]$ という加算素子が実現できる．この加算の関係式は，定常状態で成り立つので，入力が変化しても再び定常状態になれば入出力の加算関係が維持される．あとは，（１）の反応を近似的に DNA 鎖交換反応などを用いて実装することがポイントとなる．また，このようなアナログ回路素子を組み合わせて計算を行うには，定常状態における分子の流れの影響を抑えるために（１）における速度定数を幅広いスケールで柔軟に実現できることが必要である．鎖置換反応を用いた化学反応の近似実装については，Soloveichik らの研究([3])があり，反応速度定数の柔軟な設計が可能であると主張されているが，それでもまだ十分ではないのが現状である．その意味では，DNA 以外の分子を利用した回路の設計なども視野に入れるべきであろう．

[1] A. J. Genot , J. Bath , and A. J. Turberfield, Reversible Logic Circuits Made of DNA. *J. Am. Chem. Soc*., 133 (50):20080-20083, 2011.

[2] S. Kobayashi, et al., Analog DNA Computing Devices Toward the Control of Molecular Robots, *Proc. of Workshop on Self-organization in Swarm of Robotics*, 2014, CD-ROM, available online at https://ieeexplore.ieee.org/document/7468414/

[3] D. Soloveichik, G. Seelig, E. Winfree, DNA as a universal substrate for chemical kinetics, PNAS, 107(12):5393-5398, 2010.

（電気通信大学　小林　聡）

１．４ DNA 増幅回路

DNA の配列特異的な結合や，それにもとづいて起こる様々な反応を利用して，自己会合によるナノ構造の形成や，構造変化を用いた機械動作，多段階の論理演算などが実行できる．そこでは結合可能な DNA，すなわち一本鎖状態にある

DNA が，動作指令を塩基配列に符号化したシグナルの役割を果たし，汎用性のあるシグナル伝達システムが実現される．多段階のシグナル伝達では，すべての DNA 結合反応が 100%の効率と特異性で進行することは不可能であり，シグナルは徐々に減衰する．また，1 分子の入力を検知して分子モータを動かし，マクロな運動で応答する分子ロボットを作ろうとすれば，1 分子の入力が起こす反応に応じて，多数の分子モータに動作指令を伝える大量のシグナル DNA を生成する必要がある（図１）．したがって，不完全な反応で減衰したシグナルを後続のシグナル伝達に十分なレベルまで増幅したり，運動の切り換えに必要な量のシグナルを速やかに増幅したりできる「DNA 増幅回路」は，DNA ナノテクノロジーや分子ロボティクスを実現する上で必須な要素反応である．

DNA を増幅する反応といえば，高温の温度サイクル条件下で DNA ポリメラーゼを用いて反応を行う「ポリメラーゼ連鎖反応（Polymerase Chain Reaction, PCR）」が，生物学分野では一般に利用されている．しかし，PCR が増幅するのは二本鎖 DNA であるし，DNA を繰り返し解離させるために高温条件を用いるため，途中で DNA が解離しては困る反応システムには利用できない．また，タンパク質でできた分子モータは高温で変性して壊れてしまう．

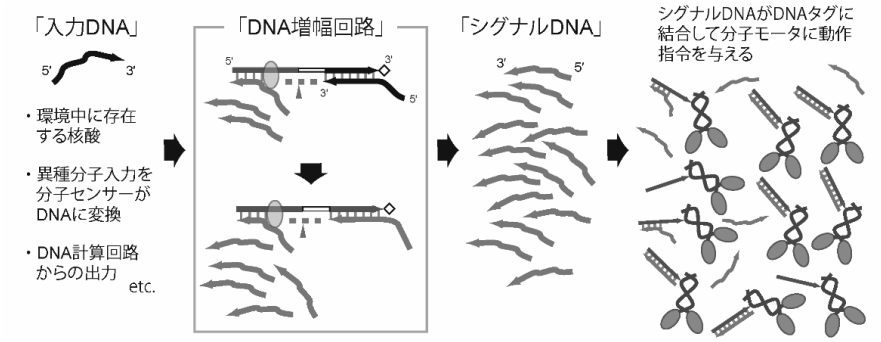


図１　DNA 増幅回路による濃度ギャップの克服

たとえば直径 20 μm の球状の人工細胞型分子ロボットが 1 分子の入力を検知し，内部にある 100 nM の分子モータそれぞれにシグナル DNA が 1 分子ずつ結合して動作を on にする場合には，およそ 25 万分子の DNA を増幅生成する必要がある．

そのため，分子ロボットに用いる DNA 増幅回路は，生理温度（37℃）もしくは室温（25℃）程度の条件下で一本鎖 DNA が増幅できなければならない．Zhang らは，DNA の鎖置換反応を用いる系において，反応前後で塩基対の数が変わら

ないエントロピー駆動型の反応を考案するなかで，DNA がある種の触媒として一本鎖 DNA を指数的に増幅する，酵素を用いない（Enzyme-free）タイプの DNA 増幅回路を考案した[1]．

1 時間程度の反応で入力量に対して数百倍の増幅が達成されたが，入力がない場合でも反応開始直後からシグナルの“漏れ（leak）”が起こり，DNA が増幅された．指数増幅系では，ごくわずかでもシグナルが生成されると高速に増幅されてしまうため，いかにして漏れを防ぐかは重要な課題である．

一方，酵素を用いる DNA 増幅反応は，検査や医療診断への応用を目的として盛んに研究されてきた．核酸を検出するだけであれば，PCR のように検出対象の核酸配列そのものを増幅する反応である必要はなく，検出シグナルとしての役割を持つ別の配列の DNA が増幅できれば良い．生理温度以下の条件で，DNA ポリメラーゼとニッキング酵素を用いて一本鎖 DNA を高倍率に増幅する反応が，2012 年頃から多数報告されている．しかし，これらの反応では不完全な DNA の結合に起因する漏れとは別に，DNA ポリメラーゼ固有の性質に由来する，鋳型やプライマーに依存しない「*ab initio* DNA 合成」と呼ばれる非特異的な DNA 増幅が起こるため[2]，その克服が大きな課題となっている．筆者らも，シグナル DNA をその融解温度（T_m）よりも低い温度条件下で増幅する「L-TEAM 反応」を，分子ロボットに適した DNA 増幅回路として 2010 年に考案し[3]，*ab initio* DNA 合成の抑制と高速な DNA 増幅の実現に取り組んでいる．今後は，必要量のシグナルを生成したら増幅を止める機構や，複数種のシグナル DNA をプログラムした順に増幅する DNA 増幅回路などの開発が望まれる．

[1] D. Y. Zhang, et al., Engineering entropy-driven reactions and networks catalyzed by DNA, *Science*, **318**, pp. 1121-1125, 2007.

[2] N. Ogata and T. Miura, Genetic information ‘created’ by archaebacterial DNA polymerase, *Biochem. J.*, **324**, pp. 667-671, 1997.

[3] 小宮 健，特願 2010-275948.

（東京工業大学　小宮健）

1．5 制御理論に基づく動的反応回路の設計

DNA 鎖置換反応を利用した DNA 回路

DNA 回路は，所望の情報処理を行う目的で，人工的に設計された DNA に関する化学反応系である[1]．DNA 回路において，DNA 鎖は情報伝達の担い手であり，情報の物理的な実態は DNA 鎖の濃度量である．電気回路においては，情報の物理的な実態は電圧であり，アナログ回路においては，電圧そのものの値が情報としての意味を持つ．また，論理回路においては，電圧の高低を閾値基準で 0（Low），1（High）に 2 値化した情報が意味を持つ．電気回路と同様に，DNA 回路も DNA 鎖の濃度量そのものに意味を持つアナログ回路[2,3]と濃度量の大小に意味を持つ論理回路[4,5]が存在する．

図 1 に DNA 回路によって実現される AND ゲート（2 入力 1 出力）の概念図を示す．AND ゲートの真理値表に従い，入力 a，b に対応する DNA 鎖の濃度が双方とも高濃度に変化したとき，出力 c に対応する DNA 鎖の濃度が高濃度に

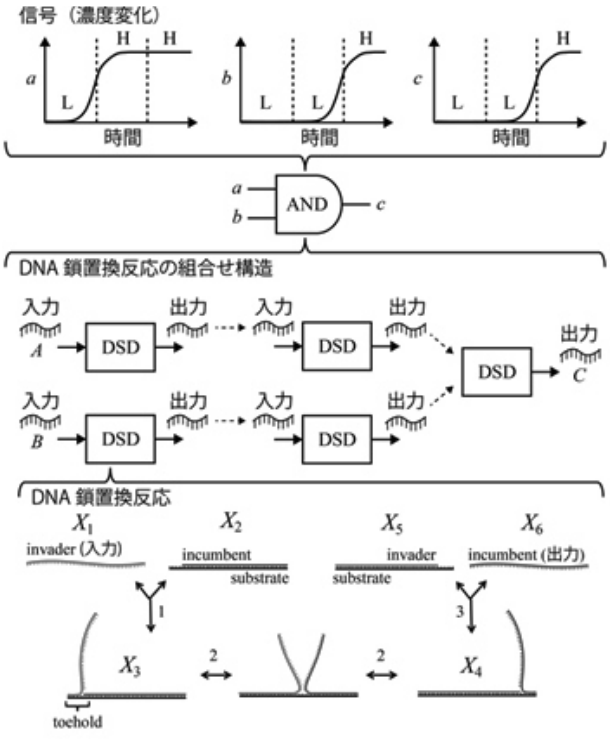


図 1　DNA 鎖置換反応を用いた AND ゲートの概念図

遷移する．DNA 回路の設計手法としては，DNAzyme・酵素を用いる方法と DNA 鎖置換反応を用いる方法[6]が存在する（1.2 節も参照のこと）．本節で主に取り扱う後者の方法において，AND ゲートは，幾つかの DNA 鎖置換反応が組み合わさった構造を持つ[5]．

これまで，多種多様な DNA 回路が DNA 鎖置換反応を用いて設計されてきた[7-9]．図 1 下に示すように，DNA 鎖置換の反応スキームは比較的単純である．入力としての invader 鎖が与えられると，substrate 鎖の toehold 領域（通常 5 塩基程度）を結合の足がかりとしながら incumbent 鎖を剥がし，最終的には invader 鎖が substrate 鎖を乗っ取る形で，incumbent 鎖が出力される．見方を変えると，DNA 鎖置換反応は，入出力を持つデバイスである．そして，このデバイスの出力を他のデバイスの入力として接続することで，より高度な機能を持つデバイスを構築することができる．このような設計原理の上に，DNA 回路の合理的設計（ボトムアップデザイン）は成り立っている．

まとめると，DNA 分子反応回路において「システム」は「化学反応系」であり，「信号」は「DNA 鎖の濃度」，回路の「接続」は，回路の入出力に対応する DNA 鎖を「結合させる（反応させる）こと」に相当する．そして，「回路設計」は「DNA 鎖置換反応のダイナミクスと組合せ構造の設計」によって達成される．

DNA 回路の数理モデリング

図 1 に示される DNA 鎖置換反応について考える．反応過程で現れる代表的な 6 種類の化学種（構造）に対して，X_1〜X_6なるラベルを付与する．DNA 鎖置換反応の詳細な反応過程については他書（例えば，文献[6]）に譲るが，各化学種の濃度をξ_1〜ξ_6で書き表すとき，反応ダイナミクスは次式の常微分方程式でモデル化される．

$$
\begin{aligned}
\dot{\xi}_1 &= -k_{f_1}\xi_1\xi_2 + k_{r_1}\xi_3 \\
\dot{\xi}_2 &= -k_{f_1}\xi_1\xi_2 + k_{r_1}\xi_3 \\
\dot{\xi}_3 &= k_{f_1}\xi_1\xi_2 - k_{r_1}\xi_3 - k_2(\xi_3 - \xi_4) \\
\dot{\xi}_4 &= k_2(\xi_3 - \xi_4) + k_{f_3}\xi_5\xi_6 - k_{r_3}\xi_4 \\
\dot{\xi}_5 &= -k_{f_3}\xi_5\xi_6 + k_{r_3}\xi_4 \\
\dot{\xi}_6 &= -k_{f_3}\xi_5\xi_6 + k_{r_3}\xi_4,
\end{aligned}
\tag{1}
$$

ここで，k_{f_i}，k_{r_i}（$i = 1,3$）は toehold 領域の塩基数や温度などの諸条件によって定まる結合，解離速度定数であり，k_2は invader 鎖と incumbent 鎖の交換

過程で生じる交叉点移動に関する状態遷移定数である（詳しくは，文献[10]を参照のこと）．(1)式は，非線形な微分方程式であるが，その非線形性は質量作用の法則による 2 次項$\xi_*\xi_*$に起因する．

前節でも述べたように，DNA 回路は，(1)式の形式で記述される DNA 鎖置換反応が直列的，あるいは，並列的に接続された構造を持つ．このとき，DNA 回路の一般系は次式で与えられる．

$$\dot{\xi} = \psi(\xi),\ \xi(0) = \xi_0, \qquad (2)$$

ここで，$\xi \in D_\xi \subset R^\zeta$は状態ベクトルであり，$\psi: D_\xi \longrightarrow R^\zeta$は 2 次項$\xi_*\xi_*$を含む非線形関数である．

一般に，DNA 鎖置換反応を利用した DNA 回路では，回路を適切に動作させるために，特定の DNA 鎖に対して，一定量以上の初期濃度を割り当てる必要がある．例えば，文献[2]では，(1)式において，DNA 鎖X_2，X_5の初期濃度を$\xi_i(0) \gg \xi_j(0)$（$\forall i = 2,5$，$\forall j = 1,3,4,6$）となるように設定することで，$\xi_6(\infty) = (\xi_5(0)/\xi_2(0)) \cdot \xi_1(\infty)$なる入出力関係を持つ増幅回路として機能することが示された．回路動作は，これら初期濃度を持つ DNA 鎖が反応場において十分量存在する条件下で保証されるため，言わば燃料としての役割を担う．一方，その他の DNA 鎖は，回路内を伝搬する信号としての役割を担う．次の定義は，DNA 鎖置換反応を利用した DNA 回路において，DNA 鎖の役割を特徴付ける．

[定義 1]（燃料 DNA 鎖と信号 DNA 鎖）
次の条件を満たすようにインデックス集合I_{fuel}，I_{signal}を定める．
（ⅰ）$\xi_i(0) \gg \xi_j(0)$（$\forall i \in I_{\text{fuel}}$，$\forall j \in I_{\text{signal}}$）
（ⅱ）$I_{\text{fuel}} \cup I_{\text{signal}} = \{1, \ldots, \zeta\}$
このとき，X_i（$i \in I_{\text{fuel}}$）を燃料 DNA 鎖，X_j（$j \in I_{\text{signal}}$）を信号 DNA 鎖と呼ぶ．

次節以降，燃料 DNA 鎖と信号 DNA 鎖が定義される DNA 回路を扱う．

DNA 回路設計における３つの問題点

要素部品としての DNA 鎖置換反応を組合せて，所望の機能を持つ DNA 回路をボトムアップに設計するというコンセプトは，合理的設計を支える屋台骨となっている．一方で，要素部品である DNA 鎖置換反応(1)式は，すでに非線形系であるため，そのような部品が相互に接続された系の取り扱いには注意が必要である．システム論的な観点から，DNA 回路の解析と設計に関して，次の 3 つの問題が存在する．

非負性：回路内の信号としての濃度量は，負の値を持ち得ないため，DNA 分子反応回路(2)式は，非負システムのクラスに属する．様々な情報処理を行う DNA 回路を設計する上で，負値をどのように処理するかについては，設計者の創意工夫が求められる．また，理論体系が整備されつつある線形非負システムに対して，非線形非負システムの理論的な特徴付けは未解決問題である．

モジュール性：例えば，AND 回路と OR 回路を接続して組合せ回路を設計する際，その動作はブール代数によって定まる真理値表に従うことが期待される．一般に，回路のボトムアップ設計においては，各回路の機能が接続によって損なわれることがないように注意が払われる．接続に伴う回路動作の独立性・恒常性を「モジュール性」と呼ぶ．図 2A に示される電気回路においては，各回路の入出力インピーダンス（R_u，$R_x^{(\mathrm{in})}$，$R_x^{(\mathrm{out})}$，R_v）を適切に調整することで，回路のモジュール性が確保される．一方，前節でも述べたように，図 2B に示される DNA 回路において，回路の接続は，入出力を担当す

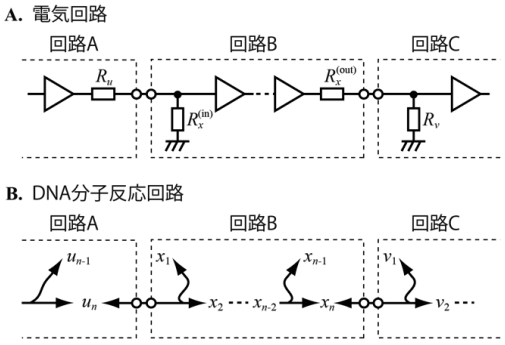


図 2 回路のモジュール性（電気回路と分子反応回路）

る DNA 鎖を反応（結合）させることで実現される．要素部品としての DNA 鎖置換反応のモジュール性は低いため[11]，モジュール性を確保した DNA 回路の設計には創意工夫が求められる．

有限性：DNA 回路は，反応場に必要十分量の燃料 DNA 鎖（[定義 1]を参照）が存在する条件下で，正常な動作が保証される．燃料 DNA 鎖に与えられた初期濃度は，信号 DNA 鎖との反応で，刻一刻と消費されるため，DNA 回路の正常な動作時間については注意が払われる必要がある．外部から燃料 DNA 鎖を補給する手段に加え，限られた燃料 DNA 鎖を効率的に利用すべく，“省エネな”回路

設計を模索する必要がある．

濃度レギュレータ回路の設計事例にみる制御理論が果たす役割

図 3 に分子ロボットのための濃度レギュレータ回路の概念図を示す．濃度レギュレータとは，特定の DNA 鎖の濃度を目標値に一致させる働きを持つ回路である．本例では，何らかの外部刺激を受けて，目標値に相当する濃度量r^*を持つ 1 本鎖 DNA（R）が受容体型センサから分子ロボット内部に放出される状況を想定している．一方，アクチュエータからは，その活動量の高低に依存的に濃度量の高低が変化する 1 本鎖 DNA（Y_p）が出力されるとする．このとき，濃度レギュレータの制御目的は，出力 DNA 鎖Y_pの濃度量（y_p）を，目標値（r^*）に一致させることである．規範 DNA 鎖Rは，濃度レギュレータ回路の入力端を担当する DNA 鎖との結合反応により消費されることを鑑みると，規範信号は，$r(0) = r^*$なる初期条件を持つ時変の信号$r(t)$と考えるべきである．

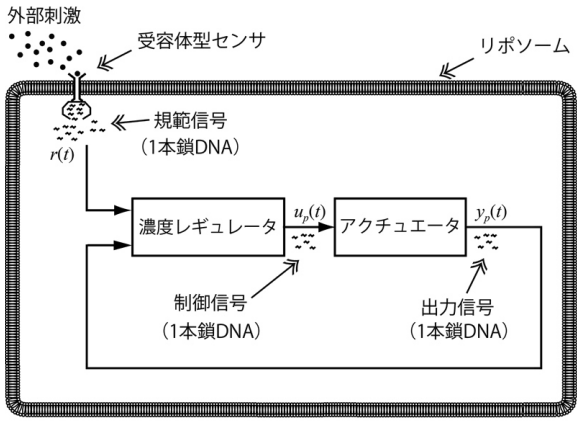


図 3 濃度レギュレータ回路の概念図

［非負性への対応］ 濃度レギュレータを実現する最も典型的な戦略は，偏差信号$e(t) = r(t) - y_p(t)$を導入し，偏差に基づいて制御信号$u_p(t)$を連続的に調整することである．しかし，（ⅰ）一般に偏差量は正負の値を持つという点，（ⅱ）DNA 回路では，未だ連続的に応答する理想的なアナログ減算器は存在しないという点から，偏差信号を生成し利用することはできない．

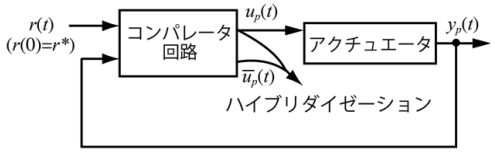


図 4 コンパレータを用いた濃度レギュレータ

そこで，制御系設計方針として，図 4 に示す DNA コンパレータ[12]を用いた濃度レギュレータを考える[11]．コンパレータ回路において，2 つの入力$r(t)$と$y_p(t)$は連続的に比較され，$r(t) > y_p(t)$の際には，制御信号$u_p(t)$が出力され，アクチュエータの活動量を上げるよう働きかける．逆に，$y_p(t) > r(t)$の際には，コンパレータ回路からは DNA 鎖U_pの相補鎖$\overline{U}_p$が放出される．このとき，相補鎖$\overline{U}_p$は，反応場内に存在する DNA 鎖U_pとハイブリダイゼーションすることで，制御信号u_pを減少させ，アクチュエータの活動量を下げるよう働きかける．すなわち，コンパレータ回路用いた濃度レギュレータは，動作点付近で制御回路のオン・オフを切り替える動作を行う．このような制御方式は，機械・電気システムにおいて広く利用されている．

［モジュール性への対応］DNA コンパレータ単体での動作検証シミュレーションでは，所望の回路動作を行うことが確認されている．しかし，

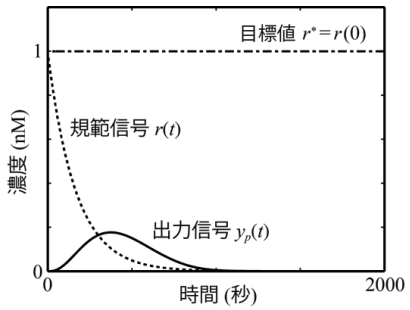


図 5 シミュレーション結果（改善前）

図 5 に示されるように，コンパレータ回路とアクチュエータを接続した濃度レギュレータ全体でのシミュレーション結果では，（ⅰ）出力信号$y_p(t)$は目標値r^*に漸近しておらず，（ⅱ）規範信号$r(t)$も初期値$r(0) = r^*$から大きく変動しており，濃度のレギュレーションは実現できていない．一般に，DNA 鎖置換

反応のモジュール性は高くないため，そのような性質を持つ DNA 鎖置換反応を直列的・並列的に接続して作られる DNA コンパレータ回路のモジュール性は低いことが報告されている[11]．DNA 回路のモジュール性の定量評価方法の詳細は文献[11]を参照されたいが，制御理論における遡及性理論を適用することで，回路が持つモジュール性の評価量が，DNA 鎖の初期濃度と反応速度パラメータによってどのように変化するかを解析することができる．

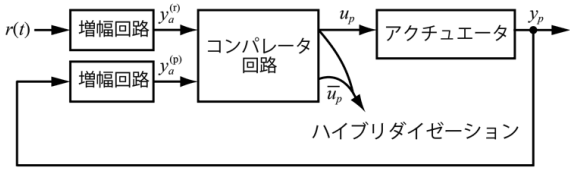


図 6 モジュール性を向上させた濃度レギュレータ

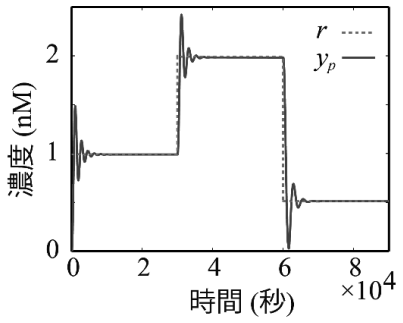


図 7 シミュレーション結果（改善後）

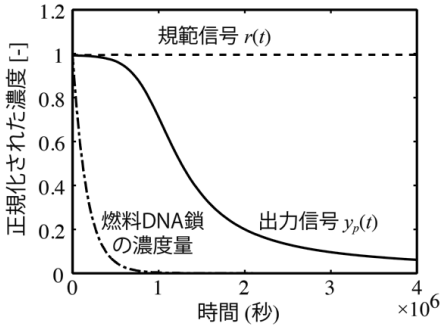


図 8 長時間のシミュレーション結果

図 6 に遡及性理論に基づく濃度レギュレータ回路の改善例を示す．自己触媒作用を持つ増幅回路（例えば，文献[5]の Seesaw ゲートなど）を絶縁素子して回路内に適切に挿入することで，各回路のモジュール性が確保される．その結果，図 7 に示されるシミュレーションのように，出力信号$y_p(t)$の目標値r^*への追従が実現する．

[有限性への対応] 濃度レギュレータを長時間に渡って動作させた際のシミュレーション結果を図 8 に示す．濃度レギュレータの駆動には燃料 DNA 鎖が必要であるが，その存在量は回路動作開始（$t = 0$）直後から急激に減少していることがわかる（一点鎖線）．燃料 DNA 鎖が枯渇し始めると，規範信号$r(t)$は目標値$r^*(= 1.0)$付近に留まるものの，出力信号$y_p(t)$は目標値へ追従し続ける

ことができなくなる. 産業界における機械・電気システムにおいては, 省エネ, 最適性に関する制御性能の改善は最重要要件の一つとなっている. 現在のところ, 制御理論に基づく DNA 回路の最適制御問題の解は得られていないが, DNA 回路においても, 回路構成・構造, 設計パラメータ（DNA 鎖の初期濃度や反応速度定数）を制御理論に基づいて最適化することで, 限られた燃料 DNA 鎖を有効に利用する回路設計が可能となることが期待される.

まとめ

本節では, DNA 回路の特徴と数理モデルについて概説し, 回路設計上存在する 3 つの問題点について述べた. また, それら問題点と制御理論に基づく解決法について, 濃度レギュレータの設計問題を例に議論した. 制御工学分野では, 18 世紀の産業革命（産業の機械化）以降, システムの安定性, 過渡特性, 定常特性, 最適性, ロバスト性に関して, 数々の実用的な解析法と設計法が生み出されてきた. 歴史的に, 制御理論は機械・電気システムを対象としてきたが, 一旦, システムがモデル化され, 微分方程式で記述されると, 数学上, 実態としての機械・電気システムと DNA 回路の間の垣根はなくなる. 機械・電気システムが持つ非線形性と DNA 回路が持つ非線形性には違いがあるため, 理論的にその溝を埋める作業は必要となるが, 制御理論と積み上げられてきた解析法と設計法を DNA 回路設計に応用する挑戦が続けられている.

[1] T. Carell, Molecular computing: DNA as a logic operator, *Nature*, 469, 45-46, 2011.

[2] S. Kobayashi, K. Yanagibashi, K. Fujimoto, K. Komiya, et al., Analog DNA Computing Devices Toward the Control of Molecular Robots, *Proc of Workshop on Self-organization in Swarm of Robots*, 2014.

[3] T. Song, S. Garg, R. Mokhtar, H. Bui, et al., Analog Computation by DNA Strand Displacement Circuits, *ACS Synth Biol*, 5, 898-912, 2016.

[4] G. Seelig, D. Soloveichik, D. Y. Zhang and E. Winfree, Enzyme-free nucleic acid logic circuits, *Science*, 314, 5805, 1585-1588, 2006.

[5] L. Qian, E. Winfree, Scaling Up Digital Circuit Computation with DNA Strand Displacement Cascades, *Science*, 332, 6034, 1196-1201, 2011.

[6] 小宮, 瀧ノ上, 田中, 浜田, 他, DNA ナノエンジニアリング（ナチュラルコンピューティング・シリーズ 第 2 巻）, 近代科学社, 2011.

[7] D. Y. Zhang, and G. Seelig, Dynamic DNA nanotechnology using strand-displacement reactions, *Nat Chem*, 3, 103-113, 2011.
[8] L. Qian, E. Winfree, J. Bruck, Neural network computation with DNA strand displacement cascades, *Nature*, 475, 368-372, 2011.
[9] L. Cardelli, Two-domain DNA strand displacement, *Math Struct Comput*, 23, 2, 247-271, 2013.
[10] D. Y. Zhang, and E. Wnfree, Control of DNA Strand Displacement Kinetics Usign Toehold Exchange, *J Am Chem Soc*, 131, 17303-17314, 2009.
[11] T. Nakakuki, and J. Imura, Molecular Governor: DNA Feedback Regulator for Molecular Robotics, *SICE J of Cont Meas and Syst Int*, 9, 2, 60-69, 2016.
[12] F. Tanaka, T. Tsuda, and M. Hagiya, Towards DNA comparator:the machine that compares DNA concentrations, *LNCS*, 5347, 11-20, 2009.

（九州工業大学　中茎　隆）

1．6 PEN DNA toolbox

はじめに

Montagne らによって開発されたポリメラーゼ-エキソヌクレアーゼ-ニッカーゼの動的ネットワーク(PEN DNA toolbox)はDNAの相互作用と酵素反応の両方によって構成される．このような枠組みにより，特徴的な機能を持つ非平衡な系を設計することが可能となる．チューリングパターンの形成から分子ロボットの制御器まで，幅広い応用が可能である．

遺伝子制御ネットワークを模倣する

生細胞では，DNA(遺伝子)をメッセンジャーRNA(mRNA)へと転写し，さらにmRNA をタンパクの合成に使うという，複数段階の過程を経る複雑な計算機構を備えている．合成されたタンパクは他の遺伝子を活性，あるいは抑制することが可能であり，結果的に複雑な遺伝子制御ネットワーク(Gene Regulatory Network，GRN と呼ぶ)を構築する．

GRN の分野では，振動[1]や記憶[2]のような複雑な挙動が設計され，また観察されている．GRN はバクテリアの制御器(例えば脳のような)として機能させることができ，さらにはマイクロロボットを制御するための計算能力を持つと

期待されている．しかしながら DNA→RNA→タンパクという過程を経るため，系は遅くなり，さらに細かな調整が難しい．Montagne らは DNA と酵素を組み合わせて，GRN 同様の仕組みを実現する戦略を思いついた[4]．

- テンプレートと呼ばれる「長い」DNA 鎖(およそ 25 塩基)が遺伝子と機能し，酵素反応により短い DNA を合成する．
- 短い DNA(一本鎖の状態)は対象となるテンプレートとハイブリダイゼーションし，その機能を活性あるいは抑制する．
- 短い一本鎖 DNA はエキソヌクレアーゼ酵素により時間の経過にともない分解されるため，系全体は動的となる．

PEN DNA toolbox の最初の枠組みが提案されてから，様々な追加モジュールが提案されている．例えば捕食者・被食者システムではシグナル鎖が他の鎖から再生されたり[5]，疑テンプレートを使って対象となるシグナル種の分解速度を増加させたり[6]，テンプレートから出力される DNA が PEN DNA toolbox とは無関係となることで他の分子プログラミングの枠組みと橋渡しを行ったり[7]，ということが可能である．

DNA テンプレートの働き

テンプレート DNA は DNA toolbox の中心的な役割を果たしており，二つのドメイン，つまり入力と出力，から構成されている．相補なシグナルが入力ドメインに結合すると，ポリメラーゼと呼ばれる酵素によって伸長される．結果的にテンプレートは完全な二重らせんになる．入力と出力を分離するために，テンプレートはニッキング酵素の認識配列を持たせてある．入力と出力は酵素によって分離し，最終的に自由になる(図 1)．

テンプレートからの出力がシグナルになる点は DNA toolbox の重要な側面である．テンプレート同士を関連付けることが可能なため，GRN のようなネットワークを構成することができる．

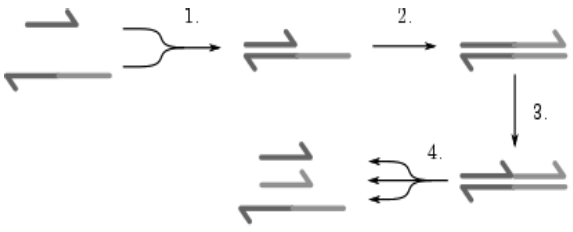


図 1　テンプレートの理想的な働き

以前の段落で述べた通り,エキソヌクレアーゼは一本鎖のシグナル鎖を分解する．しかしながらテンプレートは 5’末端付近の骨格が修飾されているため,分解作用からは守られている.

DNA toolbox におけるモジュール

DNA toolbox には，活性，自己触媒(あるいは自己活性)，抑制，の 3 つの主要なモジュールがある．図 2 にそれらの働き，挙動，グラフ表現をまとめた．これらのモジュールを表現する際，ノード(結節点)はシグナルを，矢印はテンプレートを，T 字型の矢印は抑制を表す．三つ目の抑制モジュールは，インヒビターと呼ばれる特別な DNA シグナル鎖を介して行われる．インヒビターは対象となるテンプレートのほとんどの部分と結合するように設計されている

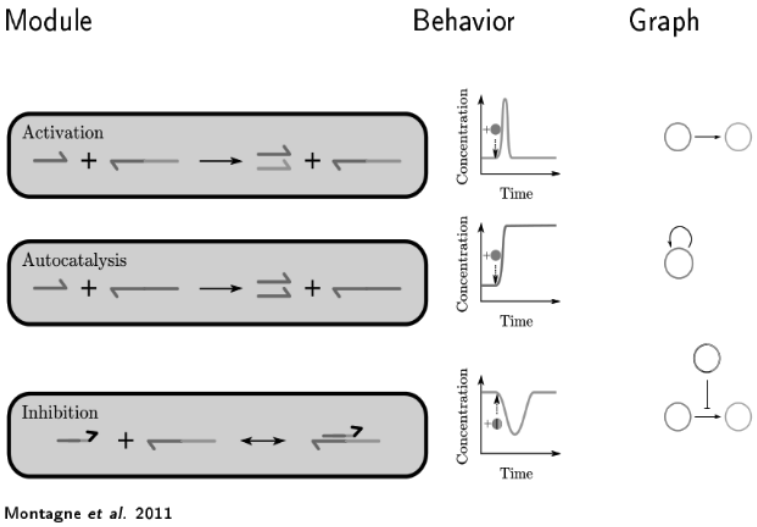


図 2 DNA toolbox におけるモジュール

が,ポリメラーゼ(ミスマッチによる)やニッカーゼ(不十分な認識配列による)による反応を引き起こさない．この仕組みにより，インヒビターが解離するまでテンプレートの働きは抑制されている.インヒビターは入力にならないことに注意されたい.

これらの戦略を使って，Montagne らは振動子(図 3)を作り[4]，Padirac らは二状態回路と二状態スイッチを作った[8]．これらの系の動作は，すべて実験的に証明されているが,より複雑なシステムを構成できることも理論的に提

案されている [9].

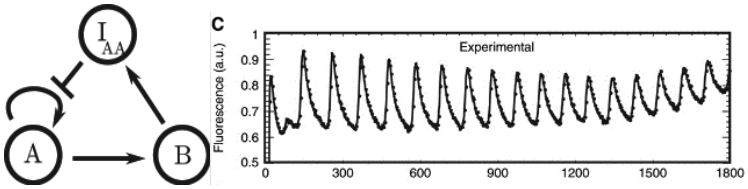


図 3 Montagne らのオリゲータと実験結果 [4] より引用

それらのモジュール間の相互作用として，PEN DNA toolbox における機能は実装される(図 4)．機能に対する入力は系へ直接注入するか，他の分子プログラムで合成する．最終的に，出力シグナルが放出される．蛍光を計測するのが，出力を観察する一般的な方法である．

単純なモデル

DNA toolbox システムは非線形なため，与えられた系の挙動を正確に予測することは困難である．最低限のモデルでは，テンプレートをブラックボックス

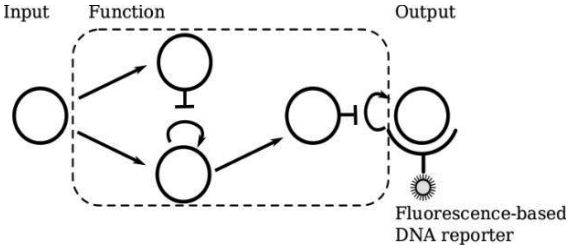


図 4 PEN DNA toolbox における機能

とみなす(図 5)．そのようなブラックボックスは，ミカエリスメンテンの反応速度に基づいた単純な変換作用がある．ハイブリダイゼーションとディネイチャレーション(相補な二本の DNA の結合と解離)は酵素反応より十分に早く平衡になると仮定されている．結果的にそれぞれの変換作用は図 5b のように表せる．系全体の数式は，システムのグラフ表現から得られるすべての分子種の式を足し合わせ，さらにエキソヌクレアーゼ反応を一次反応として近似することで(図 5d)，簡単に立てることが可能である．

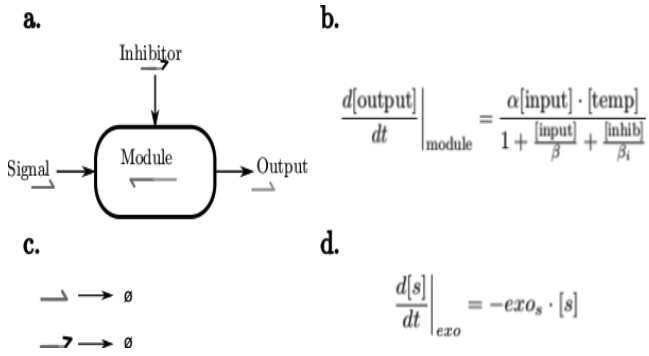


図5　ブラックボックスによる表現とDNA toolboxの数式

縦線は制約を，[.]は濃度を，αとβはパラメータをそれぞれ表す．exoはエキソヌクレアーゼの活性である．

このようなDNA PEN toolboxのモデルはPadiracらによって最初に提案された[8]．数式を単純化したため，大きな系を極めて早くシミュレーションできる．このような性質は，数千もの個別評価が必要な，複雑なDNA toolboxシステムの進化に活用されている．そのようなアルゴリズムを使って興味深いパターンが発見されている[9]．

完全なモデル：DACCAD

単純なモデルにおいてテンプレートの状態を明示しないという戦略は，大きな制約でもある．テンプレートにハイブリダイゼーションすることでエキソヌクレアーゼから守られることは考慮できない．また基質濃度が不定なため，ポリメラーゼやニッカーゼの酵素の飽和についても計算することができない．ハイブリダイゼーション-伸長-ニッキングのサイクルによる時間遅れの情報も失われる．

これらの問題を解決するため，Padiracらは，テンプレートの各ドメインへの鎖の結合を追える，完全なモデルを提案した[8]．このモデルはAubertらによって，さらに改善・拡張された．各テンプレートは，入力，出力），両方，完全二重鎖（図1の2番目の反応の後），抑制状態のテンプレート（補助的な変数），の5つの変数によってモデル化される．自由な状態のテンプレート濃度は，システムに投入されたときの全濃度から，その他の5つの変数を引いて計算されるため，微分方程式として記述する必要はない．

システム内のすべてのテンプレートについての式を記述できれば，そのテンプ

レートに関連する入力，出力，インヒビターの分子種の変動を記述することができる．

モデル中で考慮する可能性がある反応とその組み合わせが膨大なため，手作業でシミュレーションに対応することは困難である．Aubert らは設計プロセスの合理化のために，DACCAD と呼ばれるグラフィカルなインターフェースを提供した[9]．プログラムはオンラインにあり，自由に使える．

複雑なシステムへと進化させる：BioNeat

DACCAD によりシステムの複数バージョンの挙動予測を短時間で繰り返せるものの，目標となるシステムを設計するためには，設計概念を理解した人間の設計者が必要となる．しかし複雑な挙動や，基本モジュールの組み合わせとして理解するのが容易ではない挙動を目標とする場合は，この限りではなくなる．このような場合，逆問題に直面することになる．つまり，与えられたシステムの挙動を予測する（シミュレーション）のとは異なり，むしろ与えられた挙動を示すシステムを探し出す必要がある．遺伝的アルゴリズムは，そのような逆問

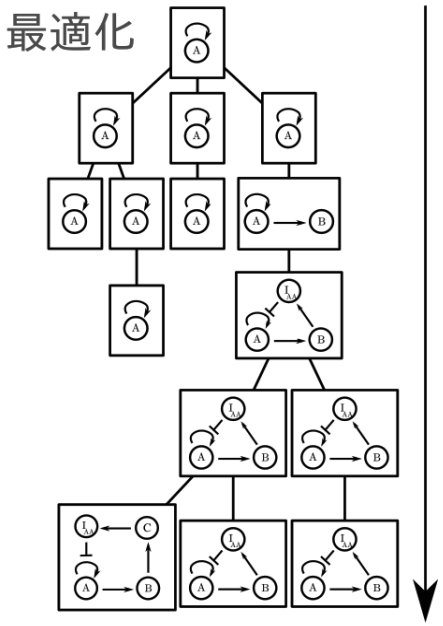


図 6　進化するロバストな振動子

題を解くための標準的な方法である．Huy らは bioNEAT と呼ばれる PEN DNA toolbox の設計を探索・最適化することに特化したアルゴリズムを提案した[10,11]．アルゴリズムの仕組みを図 6 に示す．単純なシステムの集合から始まり，システムの構造は段々とアルゴリズムによって複雑化し，目標の振る舞いに近いものが選択される．事前に決まった回数，あるいは期待される振る舞いとの誤差が一定以下になるまで，最適化は繰り返される(図 6)．

ウェットラボでの実装

システムを正確にシミュレーションできると，次は実際の DNA 配列を設計する．この一連の作業の詳しい説明は Baccouche らによって記述されている[12]．さらに論文中では，実験を実行する上で必要な基本事項や標準的なトラブルシューティングについても説明されている．

さ らに Baccouche らはマイクロドロップレットを使ったパラメータの網羅方法を提案している[13]．数万のドロップレットを作製し，3 種類を上限とするパラメータがそれぞれ異なる値を持つようにする手法である．それぞれのドロップレットは遊離の蛍光を含み，初期のパラメータ値を復元することが可能となる．この方法を使い，Padirac らの二状態回路と Rondelez と Fujii の捕食者・被食者システムの二つについて，それぞれが動作するためのパラメータ値の許容範囲を同定した．

反応拡散系

均一に混ざり合った環境でも一定の計算能力がある一方で，一般的なコンピュータと同等の計算素子とみなされる酵素の使用が競合的になっていることは，制約でもある．異なる場所で異なる計算が並列で働くような不均一な環境に変更すれば，このような制約を解決することができる．

さらに，空間的に不均一な場合，PEN DNA toolbox はパターンの形成を行うことができる．チューリングパターンと呼ばれる特定の空間的な化学反応は，シマウマの毛の縞模様や，哺乳類の指にみられるような形態形成の駆動原理であると言われている．反応拡散系を合成的に作製することは，新規素材の創発から人工臓器の発達まで，幅広い応用が可能になるであろう．

・反応拡散のモデル

空間的に不均一な化学反応は，分子の拡散も考慮する必要があるため，反応拡散系と呼ばれる．システムを記述するための常微分方程式(Ordinary

Differential Equation, ODE と略す)を拡張して，環境中を分子が拡散する項を追加する必要がある．それぞれの分子種 s について，ある座標(x,y)における導関数は

$$\frac{d[s]}{dt} = R(s) + D_s * \nabla^2(s)$$

となり，R(s)は s に関連する反応項(均一空間での，単純あるいは完全モデルの式)であり，Ds は s の拡散係数，∇^2(s)は s の(x,y)における濃度勾配(ラプラシアン)である．

このような方程式は偏微分方程式(Partial Differential Equation, PDE と略す)と呼ばれる．ODE と同様に，特別簡単な場合を除き，PDE を解析的に解くことはできない．代わりに，数値計算に頼ることになる．この手の問題を解くためのプログラムは無料で手に入る(例えば ReaDy[14])ことに注意されたい．

・一次元

最も単純な反応拡散系(RD)は,反応場の一つの次元が他の二つの次元より十分に大きい場合である．現実には，そのようなシステムは一次元とみなすことが可能である．さらにマイクロ流路技術によって，そのような反応場を作製することは容易である．

Zadorin は環境中での PEN DNA toolbox の基本的な振る舞いを確認した．自己触媒テンプレートを満たした長い反応場を最初に準備し,開始シグナル鎖を一方の端に注入した．触媒の効果により，伝達する速度は単純な拡散よりも速かった．Zadorin らは進行波の速度が理論的に予測される波[15]に似ていることを示した．さらに，逆方向に伝播する二つの異なる波は，お互いに干渉しなかった．二つの波が衝突すると，同時に発生する酵素の飽和状態が進行波の速度を若干低下させたと考えられる．

その後手法を拡張し,連続的な三つの領域を持つ標準的な反応拡散パターンを形成した[16]．彼らは自己触媒反応の境界に影響する，環境中に安定な勾配を作る「モルフォゲン」を活用した．モルフォゲンが最初の閾値を超えた場合，左側の自己触媒反応は停止する．逆にモルフォゲンが次の閾値を下回った場合，右側の自己触媒反応が停止する．これら二つの閾値を異なる値に設定し,左側がオンかオフか？左側も右側がオンか？両方がオンか？右側がオンか？，などを判定することで異なる領域を作った(図 8)．

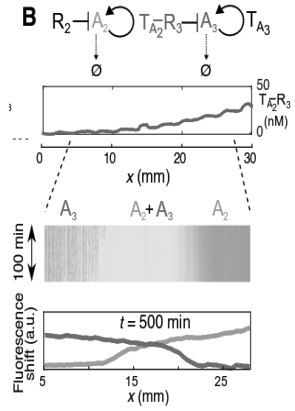


図 8　フランス国旗パターン

一番上は反応ネットワーク．二段目はモルフォゲンの濃度勾配，3 段目は安定領域のカイモグラフ，一番下は自己触媒反応の蛍光プロファイル．［16］より引用

・二次元

Padirac らは，振動子を環境中に置き，理論的な結果と似た進行波やらせん状のパターンを観察した［17］．これらの結果は BZ 反応などの他の化学振動子でも実現可能だが，PED DNA toolbox はプログラム性の観点からより柔軟である．

・分子ロボティクス

Gines らは PEN DNA toolbox におけるテンプレートを反応拡散の場面において，局在化させる戦略を提案した［18］．彼らの方法では，セファロースビーズ（アガロースビーズにストレプトアビジンが架橋したもの）によってビオチンと化学結合したテンプレートを捕獲する．大きく静的なビーズ（約 50 μm）を使ったが，環境中のシグナルを捕獲・放出することが可能である．このようなシステムはアドホックな通信ネットワークのように振る舞う．分子ロボットを作るためには，移動とアクチュエーションという二つの要素が欠けている．移動については，ビーズをブラウン運動が起きる約 5 μm にスケールダウンすることで実現可能である．アクチュエーションは PEN DNA toolbox を拡張して，二つのビーズを連結することができる特別な鎖（アンカー）を生成することで可能になる［16, 19］（図 9）．

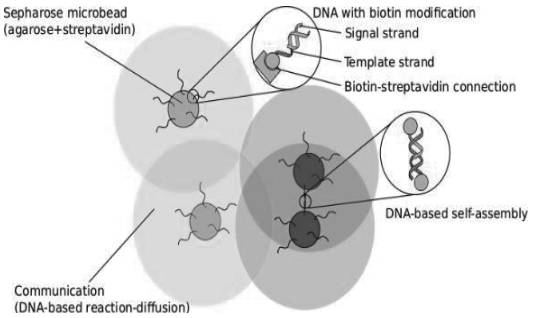


図 9　PEN toolbox がビーズに局在化し，ビーズどうしが連結する仕組み
[19]より引用

まとめ

PEN DNA toolbox はアナログ計算のための用途の広い枠組みである．モジュール性があるおかげで，in vitro で動く巨大で複雑な反応ネットワークを設計することができ，さらにソフトウェアの支援により設計の正しさを担保できる．ここ数年で，PEN DNA toolbox は単純な分子ロボットや反応拡散系のプログラムに利用されている

[1] Elowitz, M. B., & Leibler, S. (2000). A synthetic oscillatory network of transcriptional regulators. Nature, 403(6767), 335-338.

[2] Gardner, T. S., Cantor, C. R., & Collins, J. J. (2000). Construction of a genetic toggle switch in Escherichia coli. Nature, 403(6767), 339-342.

[3] Falke, J. J., Bass, R. B., Butler, S. L., Chervitz, S. A., & Danielson, M. A. (1997). The two-component signaling pathway of bacterial chemotaxis: a molecular view of signal transduction by receptors, kinases, and adaptation enzymes. Annual review of cell and developmental biology, 13(1), 457-512.

[4] Montagne, K., Plasson, R., Sakai, Y., Fujii, T., & Rondelez, Y. (2011). Programming an in vitro DNA oscillator using a molecular networking strategy. Molecular systems biology, 7(1).

[5] Fujii, T., & Rondelez, Y. (2012). Predator?prey molecular ecosystems. ACS nano, 7(1), 27-34.

[6] Montagne, K., Gines, G., Fujii, T., & Rondelez, Y. (2016). Boosting functionality of synthetic DNA circuits with tailored deactivation. Nature communications, 7,

13474.

[7] Hagiya, M., Aubert-Kato, N., Wang, S., & Kobayashi, S. (2016). Molecular computers for molecular robots as hybrid systems. Theoretical Computer Science, 632, 4-20.

[8] Padirac, A., Fujii, T., & Rondelez, Y. (2012). Bottom-up construction of in vitro switchable memories. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109(47), E3212-E3220.

[9] Aubert, N., Mosca, C., Fujii, T., Hagiya, M., & Rondelez, Y. (2014). Computer-assisted design for scaling up systems based on DNA reaction networks. Journal of The Royal Society Interface, 11(93), 20131167.

[10] Dinh, H. Q., Aubert, N., Noman, N., Fujii, T., Rondelez, Y., & Iba, H. (2015). An effective method for evolving reaction networks in synthetic biochemical systems. IEEE Transactions on Evolutionary computation, 19(3), 374-386.

[11] Aubert, Nathanael, et al. (2013). Evolution of Cheating DNA-based Agents Playing the Game of Rock-Paper-Scissors. Advances in Artificial Life, ECAL. Vol. 12.

[12] Baccouche, A., Montagne, K., Padirac, A., Fujii, T., & Rondelez, Y. (2014). Dynamic DNA-toolbox reaction circuits: a walkthrough. Methods, 67(2), 234-249.

[13] Baccouche, A., Okumura, S., Sieskind, R., Henry, E., Aubert-Kato, N., Bredeche, N., ... & Genot, A. J. (2017). Massively parallel and multiparameter titration of biochemical assays with droplet microfluidics. nature protocols, 12(9), 1912.

[14] Tim Hutton, Robert Munafo, Andrew Trevorrow, Tom Rokicki, Dan Wills. Ready, a cross-platform implementation of various reaction-diffusion systems. https://github.com/GollyGang/ready

[15] Zadorin, A. S., Rondelez, Y., Galas, J. C., & Estevez-Torres, A. (2015). Synthesis of programmable reaction-diffusion fronts using DNA catalyzers. Physical review letters, 114(6), 068301.

[16] Zadorin, A. S., Rondelez, Y., Gines, G., Dilhas, V., Urtel, G., Zambrano, A., ... & Estevez-Torres, A. (2017). Synthesis and materialization of a reaction?diffusion French flag pattern. Nature chemistry, 9(10), 990.

[17] Padirac, A., Fujii, T., Este?vez-Torres, A., & Rondelez, Y. (2013). Spatial waves in synthetic biochemical networks. Journal of the American Chemical Society, 135(39), 14586-14592.

[18] Gines, G., Zadorin, A. S., Galas, J. C., Fujii, T., Estevez-Torres, A., & Rondelez, Y. (2017). Microscopic agents programmed by DNA circuits. Nature nanotechnology, 12(4), 351.

[19] Aubert-Kato, N., Fosseprez, C., Gines, G., Kawamata, I., Dinh, H., Cazenille, L., ... & Bredeche, N. (2017, July). Evolutionary optimization of self-assembly in a swarm of bio-micro-robots. In Proceedings of the Genetic and Evolutionary Computation Conference (pp. 59-66). ACM.

（お茶の水女子大学 Aubert-Kato, Nathanael（訳　東北大学　川又生吹））

１．７ 化学反応ネットワークの設計

分子ロボットを思い通り動かすためには，センサとアクチュエータに加え，制御器と呼ばれる，センサで取得した情報を加工し，アクチュエータの指令値を作るしくみが必要である．通常，我々が思い描くようなロボットであれば，マイコン（小型のコンピュータ）がその役割を演じる．

分子ロボットの場合，マイコンを用いるのではなく，化学反応ネットワークとよばれる，複数の物質の化学反応とそれらの相互作用を利用して制御器が構成される．しかし，各物質の化学反応のダイナミクスが正確にわかっていればよいが，実際にはそれが難しく，所望の制御器を作るのは容易でない．それゆえ，制御器を化学反応ネットワークとして実現するためには，「未知の部品を用いて，いかに確かな制御器（のダイナミクス）を構成するか」が鍵となる．

そのようなことが実際にできるのか？例で考えてみよう．図１に示される３つの物質からなる化学反応ネットワークを考える．通常の矢印は，ある物質が他の物質の生成を促進すること表し，T字の矢印は，生成の抑制を示す．物質 i の存在を変数x_iで記し，時刻 t で物質 i が存在すれば$x_i(\mathrm{t}) = 1$，存在しなければ$x_i(\mathrm{t}) = 0$とする．図１のネットワークに対しては，システム全体のダイナミクスとして，いくつかの可能性が考えられるが，まずは，以下を考える．

$$x_1(\mathrm{t}+1) = \overline{x_2}(\mathrm{t}) \wedge x_3(\mathrm{t})$$
$$x_2(\mathrm{t}+1) = x_1(\mathrm{t})$$
$$x_3(\mathrm{t}+1) = x_1(\mathrm{t})$$

ここで， tは離散時刻，∧ は論理積である．また，$\overline{x_2}(\mathrm{t})$は$x_2(\mathrm{t})$ の否定であり，化学物質 2 が化学物質 1 の生成を抑制することを表す．$x_i(\mathrm{t})\ (i=1,2,3)$は，0 もしくは 1 をとるブール変数であるため，このモデルは，一般にブーリアンネットワークとよばれる．

いま，このシステムの平衡点の数を調べてみよう．たとえば，初期状態が$\big(x_1(0),x_2(0),x_3(0)\big)=(0,0,0)$の場合，状態は，1 時刻進むごとに，$(0,0,0)\rightarrow(1,0,0)\rightarrow(1,1,1)\rightarrow(1,1,1)\rightarrow\cdots$と遷移するため，$(1,1,1)$が平衡点のひとつとなる．同様にして，おのおのの初期状態(2^3 種類ある)が到達する平衡点を調べると，どの初期状態からも，状態$(1,1,1)$に到達する．つまり，図 1 の化学反応ネットワークのダイナミクスが上述のように与えられる場合，平衡点は唯一存在する．つぎに，図 1 の化学反応ネットワークが，他のダイナミクスとなる場合を考えてみよう．そこで，物質 1（x_1）の式において，論理積を論理和に入れ換える．実は，この場合も，同様の計算によって，平衡点は唯一存在することを確認できる．つまり，図 1 の化学反応ネットワークは，ダイナミクスが，論理積で定義されても，論理和で定義されても平衡点の数は変化せず，図 1 のネットワーク構造自体に，「平衡点は唯一存在」という性質が埋め込まれていることになる．したがって，各物質のダイナミクスが未知であったとしても，ある適切な仮定のもとで，図 1 のようにネットワークを構成すれば，平衡点が唯一という性質を得ることができる．

実は，ある 2 つの環状構造が一つの頂点を介してつながっているネットワーク構造の場合，

（1）一方の環状構造の長さが，もう一方の環状構造の長さの整数倍，
（2）T 字の矢印の数が，長さの大きい環状構造に奇数個含まれ，もう一方には偶数個含まれる

という条件を同時に満たすとき，論理積と論理和の交換に対して，常に平衡点が唯一であることが示せる[1]．このように，各部品のダイナミクスが未知だとしても，あるルールに従ってネットワークを構成すれば，全体のダイナミクスにある性質を埋め込むことができる．これが冒頭に示した課題へのひとつの答えである．

このような問題は，数理生物学や制御工学の分野で古くから研究がなされており，さまざまな結果が知られている．一方で，分子ロボットに特化した成果はほとんど見当たらない．今後，分子ロボットの特徴をより的確に捉えた化学

反応ネットワークの設計論の開発が期待される．

[1] S. Azuma, T. Yoshida, and T. Sugie, Structural Monostability of Activation-Inhibition Boolean Networks, *IEEE Transactions on Control of Network Systems*, Vol. 4, No. 2, pp. 179-190 (2017)

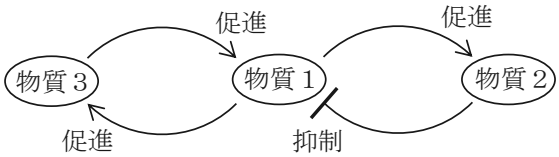


図１：３つの物質の化学反応ネットワークの例

（名古屋大学　東　俊一）

１．８　分子ロボティクスのための実時間分子シミュレーション

はじめに

分子ロボットを合理的に設計するためには，DNA オリガミのような超分子を設計するだけでは不十分であり，分子ロボットの運動の動的振る舞いを予測し，実験を再現するためのシミュレーションシステムの構築が不可欠である．　分子ロボットの運動原理として，これまでに，(1)分子モータと細胞骨格鎖の組合せによる推進[1,2]，(2)細胞骨格の液晶形成に基づく物理化学的な推進[4]，(3)リポソームの表面張力勾配を利用した推進[3]，などが報告されている．また，微小管と分子モータを用いた微小管滑走運動に関しては，多数の微小管同士の相互作用による集団運動パターンの形成が報告されている[1]．

分子ロボットに利用される推進力や運動パターンに関する現象は時間的にも分単位から時間単位と長く，また，数千，数万という多数の分子の相互作用から創発される現象を扱う必要がある．近年，GPU プロセッサの普及，メモリの大容量化，ネットワーク性能の高速化により，1000 万原子を超える分子動力学シミュレーションが可能となってきた[6]．しかしながら，分子動力学で扱える時間スケールは現状ではナノ秒からマイクロ秒程度であり，原子数を減らした場合でも高々ミリ秒が限界である．このため，分子ロボットの動的振る

舞いをシミュレーションするためには，多数の分子を「粒子」として粗視化して，多数の粒子の相互作用を長時間観測する計算プラットフォームが不可欠である．このようなプラットフォームの実現を目指して，実時間可視化粒子シミュレーションシステムを開発している[7]．実時間可視化粒子シミュレーションでは，生体分子を粒子の集合体として記述し，粒子間の相互作用をシミュレーションすることで分子マシンの動的振る舞いを創発し，その振る舞いをシミュレーションと並行して可視化する．

本稿では，微小管滑走運動を題材に微小管粒子モデリング，集団運動パターン形成，実時間可視化技術ならびに実時間高性能計算技術について述べる．微小管滑走運動は基盤上に散布された分子モータによって駆動される微小管の動作を蛍光顕微鏡で観察する実験である．分子モータは ATP をエネルギー源として微小管上を滑走（歩行）するが，分子モータの根本が基盤に固定されているため，ある範囲を超えると逆に微小管を引き戻す．この力を動力源として，逆に，微小管が分子モータ上を滑走する．微小管の表面は負電荷で覆われているため，各微小管は独立に運動するが，微小管の密度が増すと条件により，渦巻きや直線的な集団運動を創発する．

微小管粒子モデリング

微小管は極めて多数の原子から構成される高分子であり，その相互作用をシミュレーションするためには目的に応じた適切な規模での粗視化が必要となる．一般に，微小管滑走運動で使用される微小管は直径約 25nm，長さはおよそ 5μm の中空の円筒状繊維である．微小管を構成するチューブリン２量体は分子量約１１万であり，その大きさは約 8nmx5nm の回転楕円体となる．このようなチューブリン２量体が繊維状に連なった 13 本のプロトフィラメントが筒状に集まることで微小管が構成される．したがって，5μm の微小管には約 8000 個のチューブリン 2 量体があり，分子量の総和は約 9 億に及ぶ．

微小管の相互作用から運動パターンを創発するためには，最低でも 2000 本以上の微小管が必要である．微小管滑走運動シミュレーションでは多数の微小管を計算機上に実現するために，一本の微小管を約 200 個の粒子の列として表現している．一つの粒子は約 25nm の微小管に相当する．

また，微小管には分子モータからの推進力と微小管同士の相互作用により，乗り越え(overriding)や並進（snuggling）が生じる．このような相互作用を統一的に扱うために，粒子間に Lennard-Jones ポテンシャルを定義している

（図１）．粒子モデルでは粒子間に働く Lennard-Jones ポテンシャルのパラメタを調整することで，微小管同士に働く様々な相互作用を自然に創発する．

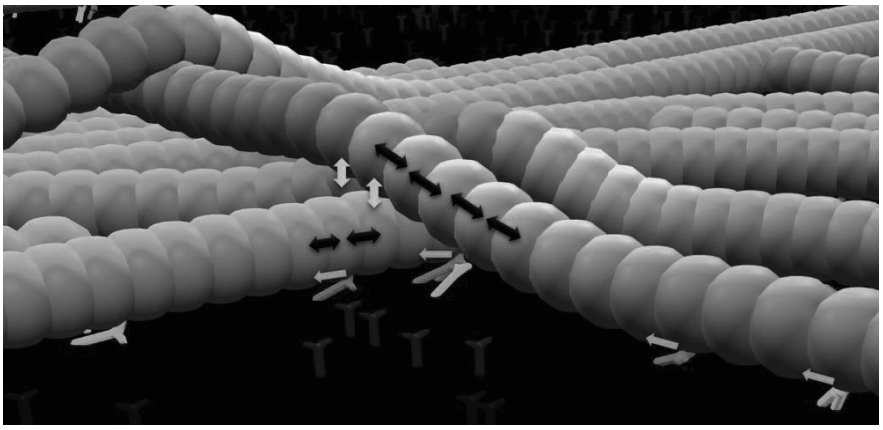


図１　粒子による微小管表現と粒子間相互作用の模式図

集団運動パターン形成

鳥や魚の大群が個体間の近接相互作用により集団運動を引き起こすことはよく知られている．集団運動では全体を制御するメカニズムは特になく，集団を形成する各個体が，局所的な制御ルール，例えば，近傍の個体との距離を一定に保とうと努力するという制御ルールに従って行動するだけで，全体の集団としての独特な回遊運動を引き起こす．このような集団運動を再現する数理モデルとして下記の式で表現される Vicsek モデルが知られている[5]．

$$\mathbf{x}_i(t+1) = \mathbf{x}_i(t) + \mathbf{v}_i(t)\,\Delta t$$

ここで，$\mathbf{x}_i(t)$と $\mathbf{v}_i(t)$は時刻 t における集団内での個体 $\mathbf{x}_i$ の位置と速度を，Δt はシミュレーションのタイムステップを表す．$\mathbf{v}_i(t)$は，集団全体の速度 v と方向転換のための角度 $\theta(t+1)$をパラメタとして持つ．ここで，各個体の時刻 t+1 の方向転換角度 $\theta(t+1)$は半径 r 以内にある他の個体の時刻 t における方向転換角度の平均値$\langle\theta(t)\rangle_r$ に$[-\eta/2,\ \eta/n]$を範囲とする一様分布から抽出したノイズ項$\Delta\theta$ を加えることで得られる．

Vicsek モデルは簡潔であるが集団運動が持つ複雑な動きを再現できることで知られている．実際，実時間粒子シミュレーションにおいて，Vicsek モデルと同様に微小管の進行方向を決定するパラメタとして近傍半径と方向転換角度範囲を導入したところ，微小管の長さに依存して様々な渦巻き模様を再現

できることを確認した（図２）.

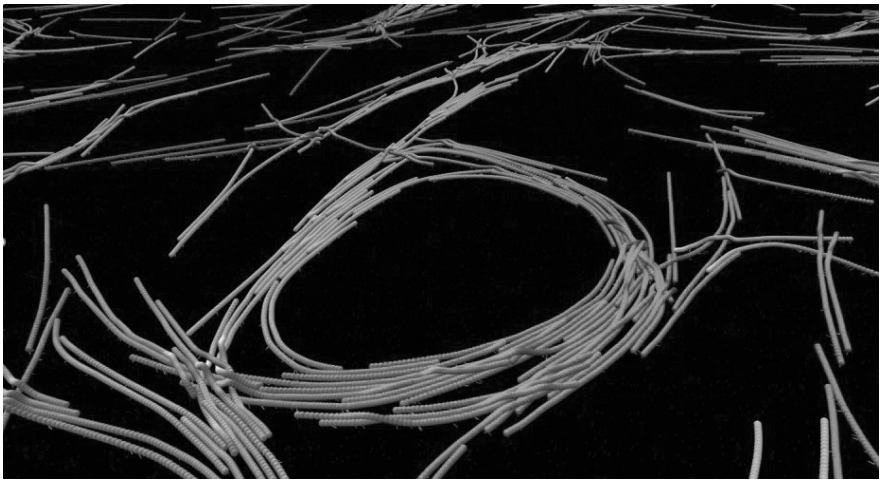


図２　微小管滑走運動における渦巻き模様の再現

実時間可視化技術

実時間可視化はシミュレーションプロセスと可視化プロセスを同時並行的に進行させるシミュレーション技術である．近年，GPU 性能の飛躍的向上により画像の描画性能が飛躍的に向上し，実時間で可視化することが可能になった．実時間可視化を実現するためには描画のためのフレームレートをキープしながらシミュレーションする必要があるため，実装上の制約は大きいが，オフライン式の可視化にはない特徴を持つ．

通常の（オフライン）可視化では数値シミュレーションをバッチで処理し，最後まで実行しないと可視化できない．実時間可視化ではシミュレーションしながら可視化するので，途中で不自然な振る舞いが生じた場合はそこでシミュレーションを中断し，モデルの修正ならびに不要な計算を避けることができる．

粒子シミュレーションでは粒子の集まり具合により局所的に特異的な振る舞いをする場合がある．実時間可視化では，全体をモニタリングしながら特定的振る舞いが生じた際に，特定領域をズームアップし，振る舞いの様子を詳しく観察することができる．これにより，モデルの設計⇒実行⇒検証のサイクルの効率化が期待できる．

実時間可視化では，実行時にシミュレーションパラメタを変化させることで

複雑な集団運動パターン（図３）を創発する条件についても容易に見つけることができる.

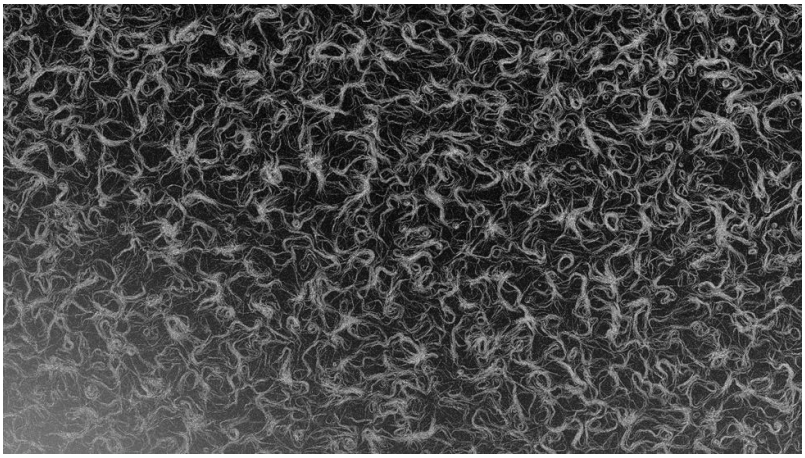


図３　微小管集団が創発する渦巻き模様状の運動パターン

実時間高性能計算技術

実時間高性能計算技術は,実時間処理と高性能計算という性質を内包した高性能計算技術である. 高性能計算は, その計算時間をいかに数値処理計算に消費し,プロセッサ間通信のオーバーヘッドを少なくするかに特化した高性能計算技術である. 一方, 実時間処理は事前に定められた時間内に必要な計算が全て終了するように計算を分割し,スケジューリングすることに特化した計算技術である.　実時間可視化粒子シミュレーションでは, 人間がみていて違和感がない動画を実時間で提示するために必要な３０フレーム/秒（平面ディスプレイの場合）の描画速度が保ったまま, 最大限の粒子数をシミュレーションするという計算技術が要求される.

近年, グラフィックプロセッサユニット（GPU）の大幅な性能向上により３次元オブジェクトの実時間での描画が容易になってきた. ３０フレーム/秒の描画速度でも DirectX の draw 関数の instancing feature を用いれば百万個以上の粒子の実時間描画が可能である.

GPU は TITAN X や P100 のような最新の GPU のコア数は 3000 を超えており, 単精度不動点少数演算性能は 10TFLOPS を超える. 粒子シミュレーションでは粒子数が百万個以上と多く, また, 粒子間の相互作用も局所的であるため, GPU

が持つ並列処理を効率よく活用することができる. 実時間可視化粒子シミュレーションでは，オーバーラップ領域を持つ空間分割法，高性能 GPU タスクスケジューラなどの技術を用いることでメモリ共有型アーキテクチャであれば１０GPU までのスケーラビリティを実現している（図４）.

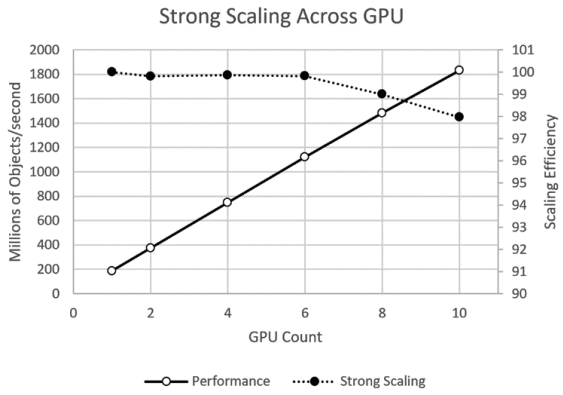


図４　実時間粒子シミュレーションの GPU スケーラビリティ

まとめ

実時間可視化粒子シミュレーションを用いることにより, 実験で観測される微小管滑走運動をほぼ忠実に再現することに成功した. 粒子シミュレーションの最大の利点は粒子間の相互作用をモデリングするだけで, 多数の粒子の集団運動が創発する複雑な振る舞いを再現できることである. このような技術は他の分子ロボットの運動にも適用可能である. 現在，様々な分子モデルを扱えるように，粒子を用いた分子の構造モデリング，仮想現実３次元可視化，操作者による仮想分子モデルの実時間操作を可能とする VR シミュレーションシステムを開発中である.

[1] Jaki Jannat Keya, et al., DNA-assisted swarm control in a biomolecular motor system, Nature Communications, 9, 453 (2018).

[2] Yusuke Sato, et al., Micrometer-sized molecular robot changes its shape in response to signal molecules, Science Robotics, 2, eaal3735 (2017).

[3] Hiroshi Inaba, et al., Light-induced propulsion of a giant liposome driven by peptide nanofiber growth, Science Report, 8, 6243 (2018).

[4] Shunske Tanaka, Kingo Takiguchi, Masahiro Hayashi, Repetitive stretching of

giant liposomes utilizing the nematic alignment of confined actin, Communications Physics, 1, 18 (2018).
[5] Tamas Vicsek, et al., Novel Type of Phase Transition in a System of Self-driven Particles, Physical Review of Letters, 75, 1226 (1995).
[6] Ryuzo Azuma, et al., All-atom molecular dynamics of film supported flat-shaped DNA origami in water, CBI Journal (submitting).
[7] Greg Gutmann, et al., Parallel Interaction Detection Algorithms for a Particle-based Live Controlled Real-time Microtubule Gliding Simulation System Accelerated by GPGPU, NGC, 35,2, pp.157-180 (2017).

（東京工業大学　小長谷明彦，　Greg Gutmann）

１．９ 分子ロボットと分散システム論

分散システムとは相互作用を行う計算主体群が協調的に創出する系の総称である．局所的な計算と相互作用から生まれる大域的な振舞いは，計算機ネットワーク，人間社会，自然界など，我々の身の回りにも発見できる．分散システム研究の目的は分散協調の可能性，不可能性を明らかにすることであり，システムの仮定（モデル）や目的とする振舞い（問題）を定式化して論じる．

分子ロボットやその構成要素となる様々な系を分散システムとして見た時に特徴的な性質は，システムの巨大性，匿名性，一様性，非同期性である．着目する系により，分子，DNA 鎖，細胞などが計算主体に対応し，各計算主体はシステムの全容を知らず，識別不能（匿名）で一様に振舞う．計算主体間の局所的な相互作用が非同期的に発生することでシステムの状態が遷移し，大域的な振舞いが現れる．このような匿名分散システムでは，計算主体群が形成する形状がシステムの機能を表す．つまり，自己組織化が重要な課題である．

分散システム研究の立場に戻れば，プログラム対象である計算主体がシステム中に分散している状況において重要な課題は，個々の計算主体がどのような能力を持てば，システムとしてどのような機能を獲得できるのかを明らかにすることである．一例として，モバイルロボット群から構成される分散システムの自己組織化に関する結果を紹介する．各ロボットは匿名な点であり，共通のアルゴリズムに従って動作する．ロボットは他のロボットの位置を観測し，観測結果をもとに移動先を計算し，移動する．この一連の観測–計算–移動をサイ

クルと呼び，サイクルごとにメモリがリセットされるロボットを無記憶であるという．ロボットどうしは明示的な通信機能を持たないが，移動と観測によって相互作用を行い，ロボット群の配置がシステムの状態を表す．ロボット群に指定した形状（点，線，円，任意の形状など）を形成させるパターン形成問題については，各計算主体が決定性アルゴリズムに従う場合は，非同期性，無記憶性に関係なく，ロボット群の初期配置の対称性が形成可能なパターンを決定することが知られている[5, 6, 7]．各ロボットにランダム性を許せば対称性を解消でき，非同期，無記憶，ランダムな匿名ロボット群は任意のパターンを形成し，自己組織化を実現する[9]．これらの結果は 2 次元空間を移動するロボット群を想定しているが，3 次元空間への拡張可能性も示されている[8]．

近年，モバイルロボット群のように汎用性の高い分散システムモデルだけでなく，自然系に由来する特徴をもつ分散システムモデルも活発に研究されている．生物群における個体間の交流に着想を得た個体群プロトコルモデル[1]，アメーバに着想を得たアメボットモデル[3]，外力に従って一斉に移動し，粒子どうしが衝突すれば接着する粒子群モデル[2]，粒子群から成る変形可能ロボットモデル[4]などが挙げられる．これらのモデルでは様々な記憶，移動，通信の機能を想定するが，概して，匿名性，一様性，非同期性，ランダム性の下で自己組織化が可能であることが示されている．

[1] Dana Angluin et al., Computation in networks of passively mobile finite-state sensors, Distributed Computing, 18, 4, pp.235-253, 2006.

[2] Aaron T. Becker et al., Tilt assembly: Algorithms for micro-factories that build objects with uniform external forces, Proceedings of ISAAC 2017, pp.11:1-11:13, 2017.

[3] Zahra Derakhshandeh et al., Universal shape formation for programmable matter, Proceedings of SPAA 2016, pp.289-299, 2016.

[4] Adrian Dumitrescu, Ichiro Suzuki, and Masafumi Yamashita, Motion planning for metamorphic systems: Feasibility, decidability, and distributed reconfiguration. IEEE Transactions on Robotics, 20, 3, pp.409-418, 2004.

[5] Nao Fujinaga, et al., Pattern formation by oblivious asynchronous mobile robots, SIAM Journal on Computing, 44, 3, pp.740-785, 2015.

[6] Ichiro Suzuki and Masafumi Yamashita, Distributed anonymous mobile robots: Formation of geometric patterns, SIAM Journal on Computing, 28, 4, pp.1347-

1363, 1999.
[7] Masafumi Yamashita and Ichiro Suzuki, Characterizing geometric patterns formable by oblivious anonymous mobile robots, Theoretical Computer Science, 411, 26-28, pp.2433-2453, 2010.
[8] Yukiko Yamauchi et al., Plane formation by synchronous mobile robots in the three-dimensional Euclidean space, Journal of the ACM, 64, 3, pp.16:1-16:43, 2017.
[9] Yukiko Yamauchi and Masafumi Yamashita, Randomized pattern formation algorithm for asynchronous oblivious mobile robots, Proceedings of DISC 2014, pp.137-151, 2014.

（九州大学　山内由紀子）

１．１０ 分子人工知能の実現へ向けて

「鈴木さん，あなたは知能班に異動になったみたいですよ.」遅れて参加した分子ロボットの会議で突然に告げられた.「さて，どうしたものか...」と考えながら，ある科学哲学者（戸田山和久 名古屋大学教授）の講演のことを思い出していた．その「人工知能と哲学」についての講演では，人工知能が知能たり得るための“条件”として「人工知能系が系そのものの目的をもつ」が呈示されていた．その目的はどんなに単純でもよいが「目的を系の外から与えてあげるのではなく，その系から自発的に生じる目的であること」の必要性が強調されていた．

この示唆にわずかな希望の光を見ながらも，人工知能を実現するという問題についてまわる，興ざめするが，避けて通れない厄介ごとが気になりだしていた．それはかつて，知能について深く考察し，計算の宇宙を開闢したアラン・チューリングが“チューリングテスト”というあだ花で指し示した「人工知能が実現されたか否かの判断は結局のところ人間の評価に依る」という古くて新しい本質である．結局のところ，人工知能をつくってみても，それが知能とみなされるか否かは人々の考え方ひとつなのである．

左はさりながら，なんとか知能をつくらねばならない．そこで，「系を維持すること（生存）」を目的とし「系を維持するための“選択能”」を知能としてみた．もし選択を誤れば，系を維持できずに消滅してしまう．そんな分子系を生存のための極限状態にまで追い込んだら，最適な選択を行う分子人工知能系

が創発しやしないかと考えたのである．

アイデアを出したり計算機シミュレーションしたりすることは造作もないことだが，それを分子系として化学的に実装するとなると，これは結構なチャレンジである．さらに，計算屋の私は分子ロボットの碩学の方々のように計算機と実験系を華麗に操ることなど到底できない．そこでこの分野でみんなが使っているシーソーゲート反応を用いることにした[2]．

シーソーゲート反応はインプット分子がゲート分子と反応することにより反応系が動く．そこで，インプット分子をいわば「分子ロボット」とみなし，この分子ロボットがゲート分子を“エサ”として，これを“摂食”することで自らを維持すると見立てた．

まず，シーソーゲート反応がきちんと動作すること，つまりエサを与えて分子ロボットが自己を維持することを確認しておいて，エサに相当するゲート分子の配列に“ゴミ”をつけてみた．ここでの“ゴミ”とはゲート分子の配列の点変異である（変異箇所が複数だとほとんど動作しなかった）．実験はプロの実験家である谷口利英氏（名古屋大学）にお願いした．

当たり前といえばそうだが，よくデザインされた反応系を好き勝手にいじると系は動かなくなる．鎖置換反応が始まる１塩基目あたりなら少々変異があってもさして問題ないが，それよりも内側の配列に変異を入れるとほとんど反応系は動かない．だが，網羅的に調べるうちに変異を入れても反応系が動く場合があることがわかってきた．谷口氏は繰り返し実験し，再現性高く動く変異の位置を数カ所特定していった．

そして次にゴミがついていない分子，つまり変異が入っていない正規のゲート分子と変異が入っているゲート分子の両方をインプット分子に与えてみた．正規の分子の濃度が同じか高い場合は当然，正規の分子が選択される．だが，ゴミつきの分子の濃度を高くしていって，正規の分子の２倍を超えるころになるとインプット分子は濃度が高い変異あり分子を選択するようになる．

インプット分子が環境適応的に動作することを確認したので，次に反応系の単純化を試みた．鎖置換反応では，鎖置換を効率よく生じさせるためにtoeholdとよばれる足場のような短い配列がある．まずtoehold部でがっちりと２本鎖結合を形成してから，おもむろに鎖置換反応を行なっていくのである．この toehold 配列を少し削ってみた．すると確かに鎖置換を完了するまでの反応時間は長くはなるが，鎖置換そのものは変わらず生じる．さらにtoeholdを削っても濃度が高ければ変異ありの配列が選択される濃度依存性は保持さ

れている．toehold配列を削っていっても反応の性質は変化せず，最終的にはtoehold配列をすべて削ってしまっても，濃度さえ高ければ変異つきの配列が選択されることを確認した．

谷口氏は慎重に実験を重ねたが toehold がなくても，変異の有無に関わらず濃度が高いゲート分子が選択される結果が何度も再現された．この反応系に関して小宮健（東京工業大学）氏からtoeholdなしの鎖置換反応に関連する研究を教えていただいた[2]．このミスマッチ配列の鎖置換反応を調べた関連研究の反応系はフルマッチとミスマッチ配列の競合系ではないが，いずれにせよ私たちの系のほうが鎖置換反応の時間がかなり早くなっているようだ．これは計測機器の違いか，はたまた似て非なる分子が「イス取りゲーム」のように結合する塩基対を奪い合うためなのか興味深い．

さて，本コラムでは生きるための分子人工知能を構想しその分子実装を行なった．この系が果たして人工知能であるか否か，それは読者の判断に依るのである．さて，いかがであろうか？

[1] L.Qian and E. Winfree, A simple DNA gate motif for synthesizing large-scale circuits, J R Soc Interface. 8(62): 1281–1297, 2011

[2] Yasuhiro Suzuki and Rie Taniguchi, Toward Artificial Intelligence by Using DNA Molecule, Yasuhiro Suzuki and Rie Taniguchi, Proc. of the 2017 International Conference on Artificial Life and Robotics, 345-347, 2018

[3] Luis P. Reynaldo, el.al., The Kinetics of Oligonucleotide Replacements, J. Mol. Biol. , 511-520, 2000

（名古屋大学　鈴木泰博）

１．１１　創発システムとしての分子ロボット

創発とは，多数の要素から構成されるシステムにおいて，要素－要素間あるいは要素－環境間の局所的な相互作用により，単純な総和以上の大域的な性質や機能が発現する現象を指す．個々の要素がもつ特性や振る舞いが単純でも集団として複雑かつ高度な機能が生み出される可能性がある．

分子ロボットは，創発システムという観点からもたいへん興味深いものとなっている．分子ロボットの場合，ロボット単体に組み込める知能は限られる．

ロボットを構成する分子の物性も含めて，広い意味でプログラマブルなシステムにすることは可能であると思われる．しかし，分子ロボットをこれまでのロボット工学の視点に基づいて「センサ・コンピュータ・アクチュエータ」で構成されるシステムとみなしたとき，コンピュータに相当する部分における複雑あるいは高次な情報処理はあまり期待できない．ロボット間あるいはロボットー環境間の相互作用をうまく活かし，システム全体として有用な機能を生み出す工夫を積極的に施していく必要がある．ここに創発システムとしての分子ロボットの面白さを見出すことができる．

分子ロボットは階層性についても新たな光をあたえることができる可能性がある．創発システムの議論ではしばしば階層性についても言及される．階層性は自然現象の中にしばしば見出すことができる現象であるが，要素集団からなる工学的なシステムにおいて階層性に具体的に踏み込む前例はきわめて少ない．従来の工学システムでは階層性を論じるに足るだけの要素を作ることが困難であった．しかし，分子ロボットの世界ではアボガドロ数あるいはそれに準じるだけの数の集団を構成することが可能である．単に数が集まればよい，ということではないにしても，その基本となる材料が現実に用意できるという点で分子ロボットが果たす役割は大きい．

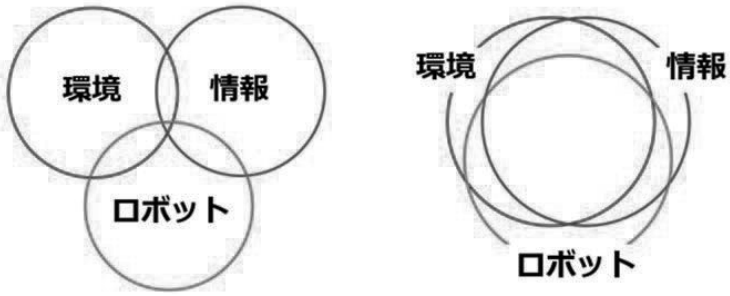


図１　分子ロボティクスではロボット・環境・情報を
不可分の状態で扱うことが求められる

分子ロボットはマクロな世界では可分な関係を不可分なものにしているという点でも画期的な存在であるといえる（図１）．従来のロボット工学ではロボット・環境・情報の区分を明確にできる場合が多い．ところが，分子ロボティクスの世界では，ロボットが分子スケールであることはいうまでもなく，それを取り巻く環境も同等の分子世界であり，情報伝達の媒体も基本的に化学シ

グナルになるはずである．ロボット・環境・情報を切り分けない・切り分けられない三位一体の関係性にある分子ロボットは，まさに創発システムそのものということもできる．創発システムを論じる上での格好の具体例になることが期待できる．

創発システムは要素還元的な理解が容易ではないことから，所望の機能が発現するために個々の要素にどのような特性を持たせればよいか，という設計困難の問題がある．創発システムの好例たりうる分子ロボットの可能性が広がっていることで，工学システムとしての設計原理に関する研究の重要性がより一層高まっているともいえよう．

（東北学院大学　菅原研）

第2章
分子ロボットのシステム化技術

2．1　人工細胞研究と分子ロボティクス

人工細胞研究の歴史は長く，多種多様な時空間構造が提案されてきた [1]．特に細胞のモデルとして，リポソームまたはベシクルと呼ばれるナノ・マイクロサイズの小胞が知られている[2]．これは両親媒性の脂質分子を水中に分散させることで自発的に組み上がるマイクロカプセル様の構造であり，最近 DNA ナノテクノロジーを用いた分子デザインとの組み合わせで注目されている．分子デザインの分野は単一分子から超分子，超分子複合体へとスケールアップが見込まれており，その足掛かりとなる脂質膜小胞の周辺を概観しよう．

はじめに

化学の源流である錬金術よりもはるか昔から，ヒトは自分の手で生命をつくり出したいと考えてきた生き物である．生物が獲得した自己複製「以外の」方法で，生命と呼べるような現象をつくり出すことが叶うなら，工学的には技術の限界点の突破であるし，理学的には生命とは何かという物事の本質に迫ることに繋がる画期的な成果である．人工細胞の研究とは，その到達点を目指した実験的研究であるといえよう．一方，本書のあちこちで述べられているように，分子ロボティクスは分子をシステム化して働かせることを目指す学問分野であり，「生き物のような機械を作ろう」という一面も持っている．人工細胞も分子ロボティクスも，語の新旧はあるものの工学の一分野である．工学は人類の文化であり，破れないルールの元でより良いものを生み出す学問である．そのルールとしては自然科学が解き明かした*ものを用いることから，自然科学分野のベン図に無理やり当てはめて描くと，図 1 のようになるだろう．

（*自然科学も同様に人類の文化であるものの，人類未踏の謎を解くという義務（呪い）においてその動機が工学とは異なる）

工学者はこのベン図全体からどの知見をピックアップして投入するかを個人のセンスで決められるという実に贅沢（かつ外すと悲惨）なポジションにある．

（図の紙面垂直方向の軸をスケールとして，たとえば表側をマクロ，裏側をミクロとすると，掘り下げて行くことで支配的となる法則が変わってゆきベン図も形を変えるので面白いだろう：例えば nm 以下に純粋な生物学は存在せず化学が広がるし，100 m 以上のスケールにも生物学は存在しない．表裏に広がるスケールを時間や温度（エネルギーレベル）にとるとそれはまた面白いことになる．僕らが知っているはずの世界は案外狭いどんな風なのか，やってみよう）．2018 年現在，生物と物質の間の工学という状況は★にあり，その中で人工細胞は生物寄り，分子ロボティクスは若干生物離れしたポジションにある**．

（**せっかく新しい名前をつけて分野を立ち上げようとする向きにはなんだか申し訳ないが，この境目を現場レベルで潰してゆくことこそ天賦のヒステリシスを持つ（プログラム不可能な）人間がおこなう研究の真髄のひとつに違いない：そして既得権益を打ち壊そうとする試みこそが新しい既得権益を産むために必須のプロセスなのだ：そいつが見えたら終わり：けれど投げ出さずにちょっとずつやっていこうナワバリバトル）

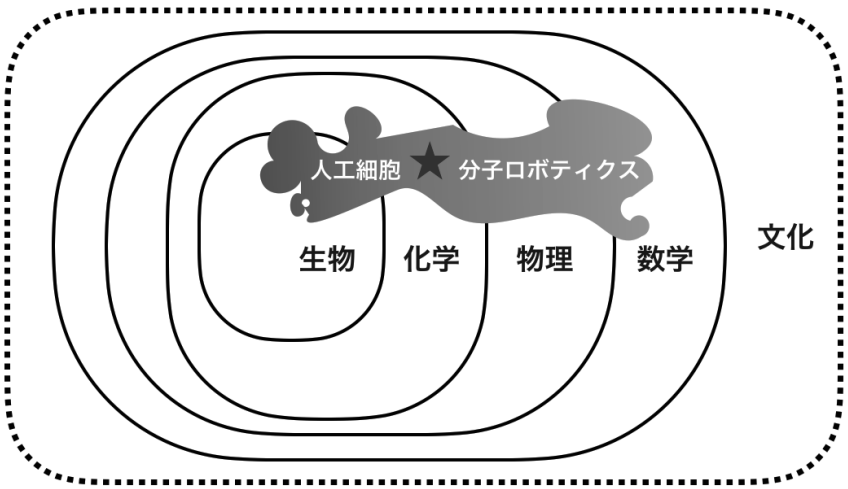


図 1　人工細胞工学と分子ロボティクスの関係

人工細胞の研究とは

では実際に，人工細胞を研究する，とはどういうことだろう．かつて SF 作家の瀬名秀明氏は「人工細胞の研究，というものはナンセンスです，〜のために

人工細胞を研究しています，というのならわかる」とコメントした．瀬名氏の「〜」に入るのは，主に下記の 3 項目である；

1)　現存の生命体の代表格である細胞を再構成する，
2)　ありうる生命モデルを実現する，
3)　地球上の生命の起源について知る．

2，3)が科学として魅力的なテーマであることに疑いはない．物質から細胞を模倣し，あわよくば本物の細胞を組み上げようという願望は，生命の起源や宇宙生物学（Astrobiology）などの問題意識と結びつき，トラウベやオパーリンに代表される様々なモデルを構築してきた．しかし生命合成のために使用できる材料とは既知宇宙に存在する全ての元素と化合物であり，その反応をシステム化しようにも組み合わせは無限にある，これは神になれという課題に等しい．設定されたゴールにたどり着くために最短ルートを考え有限のリソースを注ぎ込めと叩き込まれたエンジニアならそんな職場は選ばないだろう（その物質および経路探索自体を機械学習の援用でがんばるコンテスト Evolution2.0 Prize (https://www.herox.com/evolution2.0)など新しいアプローチが始まっている．今後の展開に期待しよう）．これらについては本書のスコープから若干外れるため割愛する．すると残るのが 1)である．生命の依り代とされる細胞が，実は物質の集合体であることは自明である．であるが，細胞と物質とをつなぐ経路は，細胞を分解すると物質になるという一方通行のみなのだ．この「対称性の悪さ」を解消する目的で，物質から細胞を作ってみること，人工細胞を作ってその挙動を確認することが行われる．すべてがプログラム次第なコンピュータ内での人工生命モデルとは異なり，実空間という制約の下で動くモデルを実現しようとすると，既に動いているものを参考にすることが安全である．「生体高分子に代表される細胞と互換性のある物質を用いて，細胞の既知の機能を再現する分子システムを組み上げることを狙う」ことが現実的な路線である．そして生命という場で，物質とそのシステムがいかに振る舞うかは，細胞の観察のみならず細胞「類似の」場所をつくってつかうことによって，操作的に明らかにできる．

少し脱線するが，ここで合成生物学という近年急速に発展している学問分野についてもごく簡単ではあるが触れておこう．この学問は，遺伝子回路として人工的な分子システム・分子回路を設計し実際に働かせることを通じて，生きた細胞を改造して天然生物に不可能であったことを可能にし，かつ生物の設計原理に迫ろうというものである．特に後者にスコープした研究は日本では構成的

生物学と呼ばれている．応用面では，最新技術でアップデートされた生物工学や農芸化学であり，エネルギー・食料・医療・住居に至るまで各方面に向け大きな期待が寄せられている．有名な例として，iPS 細胞は人工的に導入した遺伝子によって細胞を未分化状態にまでリセットさせたものである．また，人為的に設計し合成した全長ゲノムを導入した人造マイコプラズマも米国クレイグ・ベンター研究所（CVI）が誕生させており[3]，これらが人工細胞と呼ばれることもある．最近では CRISPR/Cas9 など高効率なゲノム編集技術も出現して，合成生物を生み出す技術は益々発展している．一方で，合成生物学の始祖とされる MIT 学派はその最初期に目的のひとつとして，最小セットの遺伝情報をもつ人工細胞（Minimal-cell）の構築を掲げている．ゼロから生命現象の起動（フル・スクラッチ・ビルド）を狙うボトムアップ型の人工細胞や分子ロボティクスと異なり，生きている細胞の不要な要素をどこまで削れるかを問うトップダウン型の研究と言える．そのため欠点として，依然として機能が不明な分子システムがブラックボックスとして残っている（例えば全ゲノムを合成した最小ゲノム 473 遺伝子のマイコプラズマを動かすためには用途不明の遺伝子が 149 必要であった[4]）こと，利点として優れた自己複製機構を使えることが挙げられる．詳細は成書を参照されたい[5].

最小セットの遺伝情報をもつ人工細胞を構築する上で本質的に重要になるのが，遺伝型と表現型とのリンクをきっちりと働かせることである．そのリンクとは，遺伝子 DNA からの RNA 合成（転写），RNA からのタンパク質合成（翻訳），折りたたまれたタンパク質の機能発現による代謝と個体の成立と自己複製，という一連の流れ，いわゆる「生命科学のセントラルドグマ」である（脚注 : これに遺伝子の変異と，表現系による個体の選択という 2 つの外界からの操作が加わることで生じるものが進化とよばれる）． 細胞の外での転写と翻訳については，1960 年代の細胞抽出液を用いたタンパク質合成系にはじまり，近年，清水らによってブラックボックスのないタンパク質合成に必要十分な因子のみをセットした分子システム，PURESYSTEM が報告され[6]，市販されている．さらにゲノムの複製については，試験管内 DNA 複製にはじまり，ごく最近ゲノム複製サイクルを再構成する必須因子のみをセットにして環状 DNA の指数的増幅を実現した系が末次らによって報告されている [7].

このように，細胞の必須機能を実現する分子システムを，細胞の外，つまり試験管内の溶液で再構築し，実現しようとする試みは，生化学/分子生物学の進歩によって細胞システムレベルにまで迫ろうとしている．

さて，細胞とは，その由来からして全体のうち区画化された小さなユニットである．細胞のモデルとなるマイクロカプセルを器として，前出のような細胞と互換性の高い機能性の分子システムを内包させ，細胞を構成する必須機能を実現させようという試みが，ボトムアップ式の人工細胞と呼ばれるものである．その器，ボディとして現在までに最もよく用いられているのが脂質二分子膜小胞，リポソームである．

細胞モデルとしての脂質二分子膜小胞

脂質分子とは主に両親媒性，つまり親水性と疎水性の性質をもつ官能基が結合した分子である．水中に分散すると，疎水性の分子を内側に畳み並べた集合体となる．要は水と油の境界面となる分子である．脂質分子の集合状態・形状によって，球状（ミセル），棒状（ミセル），膜状（メンブレン），板状（メンブレン）などさまざまな状態を示す．こうした共有結合に比べより弱い力で集合した一対以上の分子の組織体を取り扱う学問が超分子化学（supuramoleculer chemistry）である[8]．高分子化学，化学熱力学とならんで，

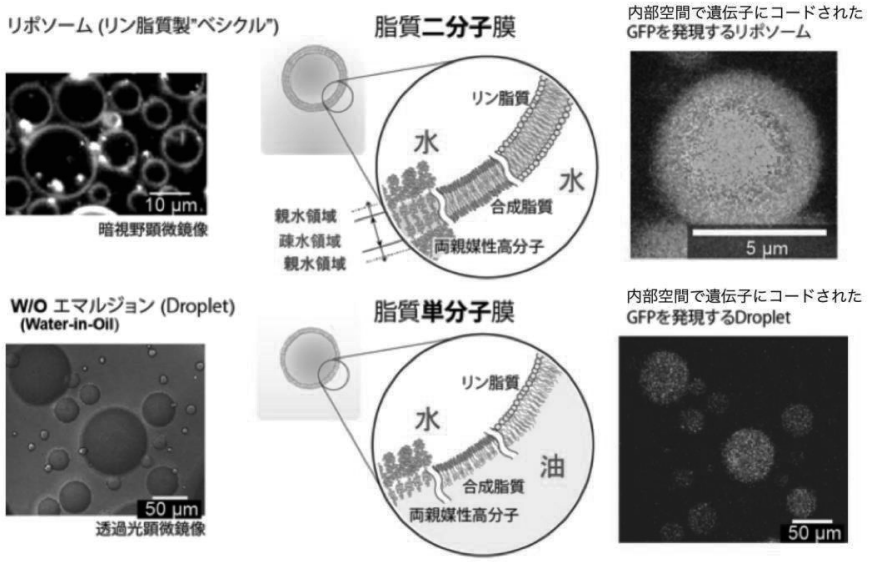


図2　人工細胞モデルとして用いられるリポソームと w/o エマルジョン

分子デザインに必須ともいえる学問分野である．その脂質集合体のうち，人工脂質膜としてよく用いられる構造が，単層膜である Langmuir-Blodgett 膜，二分子層の平面膜である黒膜，球状の油水界面に単層膜が形成された Water-in-Oil(w/o) エマルジョン，そして脂質二分子膜小胞のリポソームである．代表的な構造の模式図を図 2 に示した．

リポソームは平面を構成する脂質二分子膜の末端が閉じた小胞である．ベシクル（Vesicle）とも呼ばれ，1964 年に Bangham によりはじめて報告された．その膜は微小体積を包む疎水性のバリアとして内外の分離能に優れ，細胞膜に類似した脂質二重膜構造をもつため，生体膜モデル，化粧品や DDS（薬剤送達システム[9]），そして細胞を再構成する目的で使う人工細胞に利用するための研究が盛んに行われている[10]．リポソームには，サイズや膜の状態によって SUV, LUV, MLV, GUV などの分類がある．両親媒性の原料として，高分子（ポリマー）を用いたものはポリマーソームとよばれ，頑丈さや機能追加の容易さなどから注目されている．リポソームの中でも，直径が数マイクロメートル以上になる一枚膜（脂質二分子膜の一層だけで内外を隔てる）のリポソームは特に，Giant Unilamellar Vesicle（GUV）とよばれ，近年細胞モデルとして非常に多くの報告がなされている．リポソームを構成する脂質膜の厚さは通常 5〜7 nm であり，光の波長に比べて十分に小さいため，通常の顕微鏡では膜の有無すら観察できない．しかし 1980 年代以降，宝谷らが散乱光を利用した暗視野顕微鏡による直接観察法に先鞭をつけ，さらに蛍光ラベルした疎水性分子を用いた蛍光顕微鏡観察による高精度な観察手法も発達したことによって細胞同様に観察・操作することが可能となっている．最近では，マイクロ加工技術の進歩や先進的な工夫によって，サイズの揃った細胞サイズのリポソームも簡便に作製可能になっている．こうして，人工細胞としてリポソーム内部に生化学反応系を仕込み，追跡し，評価する試みが多数行われてきている．

人工細胞の実例

ここでは脂質の器を使った人工細胞研究の実例を挙げよう．細胞は進化する．人工細胞では，タンパク質合成による RNA の複製反応を w/o ドロップレット内に仕込み，これに外部から変異と選択律を導入することでダーウィン進化を再現する系が市橋らによって報告されている[11]．細胞は運動する．人工細胞では，瀧口らが，アクチン・モータータンパク質をリポソームに高濃度で封入して外部からの光刺激によって運動としか呼べない，大規模な変形が生じると

いう現象を見出した[12]．細胞は集合する．人工細胞では，豊田らが，両親媒性高分子の共存によって人工多細胞状態が生み出せることを示している[13]．そして細胞は自己複製する．人工細胞では，有機合成された脂質分子を用いて，触媒反応により膜分子をその場合成することのできる器を作り，膜の複製と内部での DNA の複製をカップリングさせた人工系が，菅原らによって報告されている[14]．

細胞が実際に用いる分子を用いた，細胞機能の全再構成を狙った研究の例を見てみよう．大腸菌の抽出液や先述の PUREsystem をリポソームに内包させてタンパク質合成を行わせた系[15]は，一つの転換点となった．同様に，膜の内外で物質のやりとりを担うチャネルなどの膜タンパク質を合成させて膜に埋め込み，膜内外での分子情報のやりとりを実現させたり[16]，さらにそれを推し進めて膜タンパク質によるリポソームディスプレイという形での人工細胞進化システムが松浦らによって報告されている[17]．RNA から DNA を合成する逆転写酵素反応をリポソーム内で実現する系も報告された [18]．

そして最近，リポソーム内でゲノム複製を実現したという報告が Danelon らによってなされている[19]．

これら遺伝子の複製反応と，器の複製反応とがカップリングすることで，自己複製が完成する．器の側に関しては，大腸菌を分裂させる膜タンパク質セットを内部で合成して，GUV の脂質膜を大規模に変形させることが報告された[20]．

これらのタンパク質が集合する分裂起点を規定する分子セットの再構成系や，脂質分子自体の合成を実行する系の再構成がリポソーム内無細胞合成で成功すれば，器の複製反応は実現され，遺伝子の複製とカップリングがとれることだろう．分裂する人工細胞のボトムアップ方式での完成に向けて，熾烈な競争が静かに続いている．

独立した小胞のみならず，MEMS と組み合わせることで「開いた」モデルも進歩している．人工細胞膜を貼ったチャンバーに，外膜を剥がした大腸菌を融合させてハイブリッド人工物として扱えるようにする系[21]も，報告されている．

このように，生命と物質の間を埋めにかかっている人工細胞の研究は国内外問わず盛んになっており，日本では 2005 年に「細胞を創る」研究会が発足している [http://www.jscsr.org]．米国には CVI がある他， Build-a-cell というプロジェクトも走っており，ヨーロッパではオランダを中心に BaSyC (**B**uilding **a**

Synthetic **C**ell)という大プロジェクトが走っている．我が国でも全長ゲノムを作り使うプロジェクトが走り始めており，人工細胞研究とのリンクが待たれる．

人工細胞と DNA ナノテクノロジー

最後に，分子ロボティクスの基礎技術の一つである DNA ナノテクノロジーと，人工細胞システムとの融合ともいえる最近の研究を紹介しよう．柳澤らは，Y-motif DNA を内包し，これが集合して膜表面に形成されるタイルパターンを裏打ち構造材としてリポソームの膜を強化した[22]．ダイナミックな系について，図 3 に示す．多田隅らは， DNA オリガミ上に RNA ポリメラーゼと，タンパク質をコードした DNA 配列を適切な位置に配置した遺伝子発現チップ（図 3 a）を構築した[23].

このチップを無細胞タンパク質発現溶液に加えることで，タンパク質合成が生じる．その発現効率は転写ユニット（左）と遺伝子（右）との距離 D に応じて異なる．このチップセットを w/o ドロップレット内部に導入して働かせること，そして DNA ロジックゲートを用いた特定の miRNA のセンシングが実現されている． 川野・瀧ノ上らによる DNA コンピュータを内蔵した人工細胞「システム」の概念図が図 3b である[24]．DNA 回路で AND 演算を行い，出力された RNA 分子が脂質膜上のナノ細孔を透過したことが電気化学計測によって検出された．図 3c)は，Chen らの報告した，外部のグルコース濃度上昇に応答してインシュリンを分泌する「糖尿病対策」人工細胞モデルである[25]．インシュリンを内包した小リポソーム表面に PEG が DNA の I-motif を介して結合している．大リポソーム内の pH 上昇に応答して I-motif が剥がれると，小リポソームの膜が大リポソームの膜と融合して外部にインシュリンを放出する．図 3d)は，佐藤らのアメーバ型分子ロボットである [26] GUV の脂質膜と，キネシン（モータータンパク質）とを DNA 分子のハイブリダイゼーションによって結合/分離させる「分子クラッチ」によって，停止モード（左）と運動モード（右）とが切り替わるというものである．詳細は別項目のコラムを参照されたい．

おわりに

DNA も脂質膜もリポソームも細胞も生物も，人間が触れる．つまり工作が可能な実体である．しかし生命，となると言葉であり概念である．人工細胞が生命を越えるにはどんなシステムが必要なのだろう？これを考えるのはとて

も愉しいが，人工物が生命のサブセットにとどまっている間は人類の工作技術もまだまだなのかもしれない．物理学者リチャード・ファイマンは「歯車が噛み合って回る様子を言葉で説明できるかい？」と問うた．せっかくの工学，言葉で形容し難いものをつくりだしたいものである．人工細胞と分子ロボティクスは，その材料の互換性の高さと，分子をシステムとして働かせるという目的の根幹において相性の良い研究分野である．今後も互いに刺激し合って，学問の最先端を切り拓いて行くことだろう．

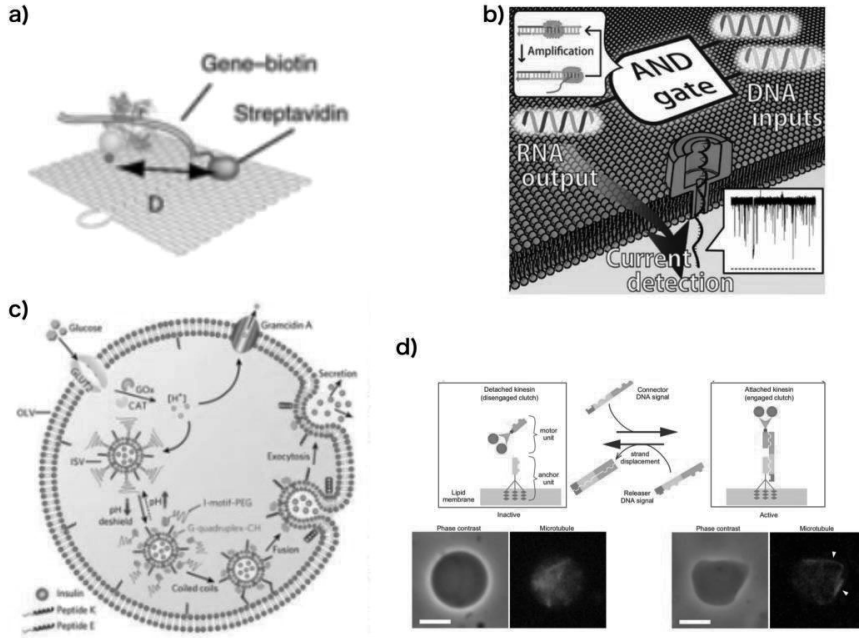


図 3　DNA ナノテクノロジーを活用した人工細胞モデルの例

a) DNA オリガミ上に配置された遺伝子発現チップ（Adapted with permission from [23]. Copyright © 2018, Springer Nature．). b) DNA コンピュータを内蔵した人工細胞システム（Adapted with permission from [24]. Copyright 2017, American Chemical Society.）．c) インシュリン分泌人工細胞モデル（Adapted with permission from [25], Copyright © 2017, Springer Nature）．d) 佐藤らのアメーバ型分子ロボット（Adapted with permission from [26]. Copyright © 2017, American Association for the Advancement of Science）．スケールバーは 10 μm.

[1] 植田充美　監修「人工細胞の創製とその応用」CMC 出版,2017 など
[2] 秋吉一成ら編集「リポソーム応用の新展開」，NTS，2005 など

[3] Gibson, D. *et al.* , Creation of a Bacterial Cell Controlled by a Chemically Synthesized Genome, Science 329, 52, 2010.

[4] Hutchison, C. A. *et al.*, Design and synthesis of a minimal bacterial genome. *Science*, *351*(6280), aad6253, 2016.

[5] 土居信英ら「合成生物学」岩波書店，2010；一般書に須田桃子「合成生物学の衝撃」文藝春秋，2018 がある．

[6] Shimizu, Y. *et al.*, Cell-free translation reconstituted with purified components, *Nat Biotechnol* 19**,** 751–755, 2001.

[7] Su'etsugu, M. *et al.*, Exponential propagation of large circular DNA by reconstitution of a chromosome-replication cycle. *Nucleic acids research*, *45*(20), 11525-11534, 2017.

[8] J.M. Lehn,「超分子の化学」化学同人, 1997 など

[9] DDS については成書多数. 例えば W. M. Saltzman "Drug Delivery: Engineering Principles for Drug Therapy", Oxford University Press, 2001 など.

[10] Fujiwara, K. *et al.*, Reconstitution of intracellular environments in vitro and in artificial cells, *BIOPHYSICS* **10,** 43–48, 2014.

[11] Ichihashi, N. *et al.*, Darwinian evolution in a translation-coupled RNA replication system within a cell-like compartment, *Nat Commun* **4,** 2494, 2013.

[12] Takiguchi, K., *et al.*, Morphological Control of Microtubule-Encapsulating Giant Vesicles by Changing Hydrostatic Pressure. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *41*(3), 288-293, 2018.

[13] Hayashi, H. *et al.,* Development of a non-blurring, dual-imaging tissue marker for gastrointestinal tumor localization. *Surgical endoscopy*, *29*(6), 1445-1451, 2015.

[14] Kurihara, K. *et al.*, Self-reproduction of supramolecular giant vesicles combined with the amplification of encapsulated DNA, *Nature Chem* **3,** 775–781, 2011.

[15] Yu, W. E. I. *et al.*, Synthesis of functional protein in liposome. *Journal of bioscience and bioengineering*, *92*(6), 590-593, 2001; Nomura, S. I. M. *et al.*, Gene expression within cell-sized lipid vesicles. *ChemBioChem*, *4*(11), 1172-1175, 2003.

[16] Noireaux, V., & Libchaber, A., A vesicle bioreactor as a step toward an artificial cell assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(51), 17669-17674, 2004; Kaneda, M. *et al.*, Direct formation of proteo-liposomes by in vitro synthesis and cellular cytosolic delivery with connexin-expressing liposomes. *Biomaterials*, *30*(23-24), 3971-3977, 2009.

[17] Uyeda, A. *et al.*, T Construction of an in Vitro Gene Screening System of the E. coli EmrE Transporter Using Liposome Display, *Analytical chemistry*, *88*(24), 12028-12035, 2016.
[18] Tsugane, M., & Suzuki, H., Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction in Giant Unilamellar Vesicles. *Scientific reports*, *8*(1), 9214, 2018.
[19] van Nies, P. *et al.*, Self-replication of DNA by its encoded proteins in liposome-based synthetic cells. *Nature communications*, *9*(1), 1583, 2018.
[20] Furusato, T. *et al.*, De novo synthesis of basal bacterial cell division proteins FtsZ, FtsA, and ZipA inside giant vesicles. *ACS synthetic biology*, *7*(4), 953-961, 2018.
[21] Moriizumi, Y. *et al.*, Hybrid cell reactor system from Escherichia coli protoplast cells and arrayed lipid bilayer chamber device. *Scientific reports*, *8*(1), 11757, 2018.
[22] Kurokawa, C. *et al.*, DNA cytoskeleton for stabilizing artificial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(28), 7228-7233, 2017.
[23] Masubuchi, T. *et al.*, Construction of integrated gene logic-chip. *Nature nanotechnology*, 1. In press. https://www.nature.com/articles/s41565-018-0202-3, 2018.
[24] Ohara, M. *et al.*, Nanopore Logic Operation with DNA to RNA Transcription in a Droplet System. ACS synthetic biology, 6(7), 1427-1432, 2017.
[25] Chen, Z. *et al.*, Synthetic beta cells for fusion-mediated dynamic insulin secretion. *Nature chemical biology*, *14*(1), 86, 2018.
[26] Sato, Y. *et al.*, Micrometer-sized molecular robot changes its shape in response to signal molecules. *Science Robotics*, *2*(4), eaal3735, 2017.

（東北大学　野村 M. 慎一郎）

2．2「アメーバ型分子ロボットプロトタイプ」

複数の分子デバイスを組み合わせ，ロボットとして，つまり一連のシステムとして動作させるにはどのような手法が考えられるだろうか？一般的な金属材料で作られたセンチメートルやメートルサイズの機械ロボットであれば，目の前にある部品を目で見て組みたて配線すれば，システムとして動作するだろう．一方，ロボットを構成するデバイスが目に見えない分子のスケールであれ

ばどうだろうか？分子デバイス間の相互作用をうまく設計すれば，それらはシステムとして動作するかもしれない．しかし，作り込んだデバイス群が試験管の中で混ぜ合わされた時にうまくシステムとして機能したとしても，それらを動作させたい環境（例えば体内）に解き放った際には，それぞれのデバイスはバラバラに散らばり，望みの機能を示すことはできなくなってしまう．では，どうすればよいだろうか．細胞を分子ロボットの見本として捉えるならば，細胞膜のような袋状の構造の中に分子デバイス群を封入し，「外部の環境と自己を隔てる」という手段は有効なアプローチの一つであろう．

タイトルにもある「アメーバ型分子ロボット」とは，人工脂質二分子膜小胞（リポソーム）の中に分子デバイスが統合されたものの総称である．アメーバ型分子ロボットは，単分子型の分子ロボット[1,2]とは異なり複数の分子デバイスを組み合わせることができることから，多様な機能を実装した分子ロボットを実現する上での有力なコンセプトだと考えられる．そして，単なるコンセプトにとどまらず，2017 年にはアメーバ型分子ロボットのプロトタイプが実際に開発された．これは，信号分子に応じて自己の振る舞いを決定する世界初の分子ロボットとして Science Robotics というロボット工学の国際学術誌より報告された[3]．本節では，アメーバ型分子ロボットの設計とその機能，そして将来の展望について解説する．

開発されたアメーバ型分子ロボットは，特定の塩基配列を持つ DNA を信号分子として認識し，その入力に応じて変形状態/静止状態を切り替え制御が可能な設計となっている（図１a,b）．アメーバ型分子ロボットは，筐体である細胞サイズリポソーム，棒状タンパク質（微小管），微小管を動かすモータタンパク質（キネシン），そして変形の開始と停止を切り替えるための制御機構（分子クラッチ）を主要素として構成されている．微小管は細胞骨格タンパク質の一種であり，骨格タンパク質の中では最も硬いとされている[4,5]．キネシンは，細胞内では ATP の加水分解による化学エネルギーを運動のエネルギーに変換する運動性を持つタンパク質である．ヘッドと呼ばれるモータードメインを利用して微小管の上を一方向に向かって歩くように移動し，細胞内では物質輸送などの役割を担っている[6]．面白いことに，キネシンのヘッド部分が上を向くようにガラスなどの基盤の上に固定することで，細胞内とは逆にキネシンを使って微小管を動かすことができる．この技術はモティリティアッセイ（あるいはグライディングアッセイ）と呼ばれ，キネシンやミオシンなどのモータータンパク質を用いた研究分野において幅広く活用されている[7]．ア

メーバ型分子ロボットではこの技術を応用し,キネシンをリポソーム内側膜上に配置しその上を微小管が動くことで,微小管が膜を押すようにして変形する設計となっている（図１d）.

そして,脂質膜上へのキネシンの局在を制御するのが分子クラッチの役割である（図１e，f）．アメーバ型分子ロボットに用いられているキネシンはビオチンで標識されており，ビオチン–アビジン結合を介してビオチン標識されたDNA と複合体，「モーターユニット」を形成する．また，リポソーム内側膜上には，疎水分子（コレステロール）が修飾されたDNA と，それら 3 つをつなぐリンカーDNA から成る「アンカーユニット」が備えられている．このアンカーユニットとモーターユニットは,特定の塩基配列を持つDNA（コネクターDNA）により結合され，結果としてキネシンが膜上にアンカーされる．キネシンがアンカーされている場合にはキネシンが微小管を動かす力が膜に伝わる,いわばクラッチが ON の状態となる．一方，コネクターDNA には足がかり配列が設けられており，ユニットどうしの結合は，別の異なるDNA（リリーサーDNA）との鎖置換反応により解除されるようになっている．つまり，モーターの力が膜に伝わらないクラッチが OFF の状態となる．以上をまとめると，コネクターDNA とリリーサーDNA それぞれが信号分子として入力されることで，キネシンの膜上への局在，すなわちキネシンの力の膜への伝達を切り替え，分子ロボット全体の変形/停止を制御可能な設計となっている．

アメーバ型分子ロボットは細胞サイズリポソームを作製する代表的な手法の一つである油中水滴界面通過法[8]を利用して調製した．モーターや DNA，燃料となる ATP など種々の分子を適切な順序，適切な濃度で混合することが肝要である．また，リポソーム膜の組成も重要なポイントの一つである．脂質膜では各々の脂質分子は流動的に互いに場所を入れ替えている.イメージとしては満員電車の中を人々が移動するようなものである．実験により，この脂質膜の流動性が脂質膜上のキネシンが微小管を効率よく動かす上で重要であることが示唆されている．作製手順や膜の流動性の寄与の詳細については文献[3]を参照されたい.

分子クラッチの機能は，信号 DNA 分子をあらかじめ内包することで検証された．図 2 はクラッチが ON/OFF それぞれの状態における分子ロボットを共焦点顕微鏡で撮影した連続画像である．クラッチが ON の場合にはコネクターDNA のみがあらかじめ分子ロボット内部に加えられており，クラッチが OFF の場合には，コネクター，リリーサーDNA 両方が加えられている．顕微鏡画像に示

されているように,クラッチが ON の場合には,微小管が膜上に局在しており,アメーバ細胞さながらに連続的に変形し続ける様子が示された（図 2a）.一方，クラッチが OFF の場合には，分子ロボットは丸いままであり（一般的にリポソームは球形状が安定），変形は示されなかった（図 2b）．これらの結果は，分子ロボットの変形/静止は，クラッチの ON/OFF の切り替えにより制御できることを示している．つまり，コネクター/リリーサーDNA を変形

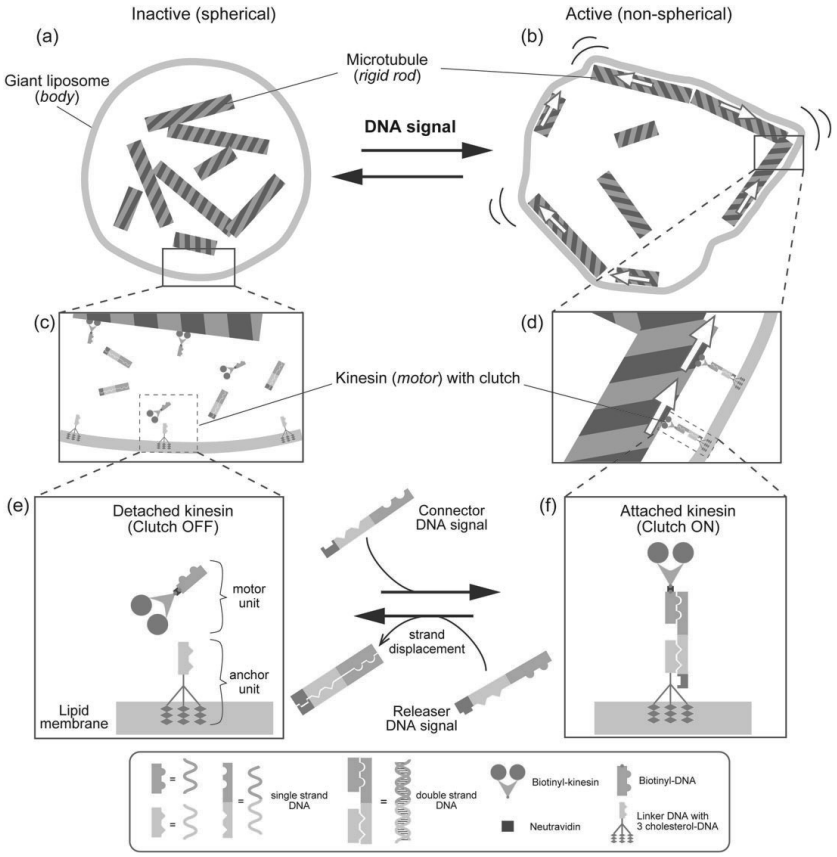


図 1　アメーバ型分子ロボットの設計

(a, b)分子ロボと全体の模式図．(c, d)脂質膜近傍の拡大模式図．(e, f)分子クラッチの模式図．キネシンの巻く上への局在を DNA 分子信号（コネクター/リリーサーDNA）に応じて切り替える．（Reprinted form *Science Robotics* 2017 [3]）.

中や静止している分子ロボットに入力することができれば,変形状態から静止状態あるいは静止状態から変形状態へと,信号の入力に応じて分子ロボットの振る舞いを切り替えることができる．しかしながら，分子ロボットが存在している溶液に，単に信号 DNA 溶液を加えたとしても分子ロボットの内部にはその信号は届かない．これは，DNA が脂質膜を通過することができないことに起因している．そのため，アメーバ型分子ロボットの内部には「光応答性 DNA 信号」が実装された．

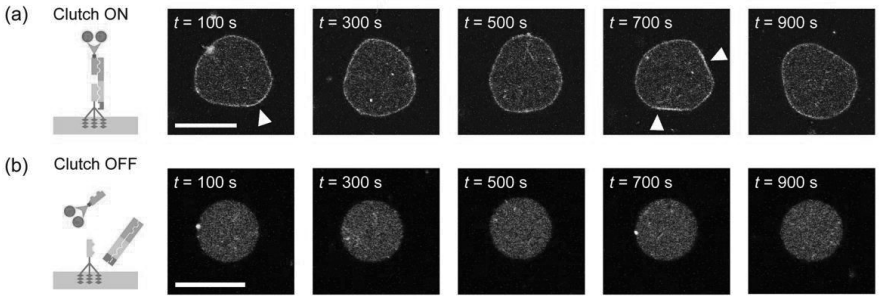


図２　クラッチ ON/OFF 時における分子ロボットの顕微鏡画像

(a)クラッチ ON 時の分子ロボット．白三角形は，膜上に局在している微小管を表す．(b)クラッチ OFF 時の分子ロボット．スケールバー：20 μm.

本節における光応答性 DNA とは，紫外光（波長 300-350 nm）に応じて切断反応が生じる photo cleavable スペーサー（PC スペーサー）[9]が組み込まれた DNA のことを指す．光応答性 DNA 信号はヘアピン形状をしており，紫外光を照射する前には信号となる塩基配列部分が覆われている（図 3a）．そして，紫外光の照射後には信号配列を覆っていた部分が断片化し剥がれ,信号配列が現れる設計となっている（図 3b）．つまり，この光応答性 DNA 信号をあらかじめ分子ロボットに内包しておくことで，光の照射によりロボット内部に信号 DNA 分子を入力することができる．クラッチを ON から OFF に切り替えるための，「光応答性リリーサーDNA」，そして OFF から ON に切り替えるための「光応答性コネクターDNA」それぞれが用いられた．実験により，変形挙動を示していた分子ロボットが光の照射後，すなわち信号 DNA が分子ロボットに入力された後に変形を停止すること，そして，静止していた分子ロボットが変形を開始することが実証された（図 3c,d）．この結果は，信号の入力からアクチュ

エーションの制御までが筐体内で一連のシステムとして機能したことを示しており,まさに分子ロボットのプロトタイプと呼ぶべき人工物が構築できたことを表している.

既存技術を組み込む対象となる「土台」がひとたびでき上がれば,プロトタイプには様々な発展が考えられる.例えば,本節で紹介した分子ロボットでは変形→静止→変形→…のような可逆的な切り替え制御は実証できていないが,アゾベンゼン修飾 DNA[10]や cnvK 修飾 DNA[11]などを分子クラッチに組み込むことで,光の波長に応じた可逆的な挙動の制御を実現できるかもしれない.

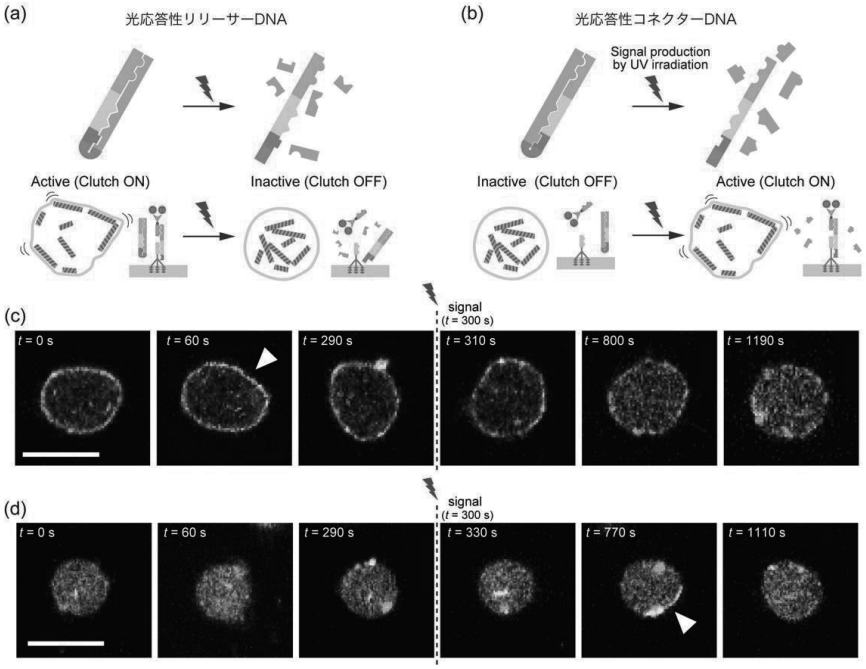


図 3　光応答性 DNA 信号を用いたアメーバ型分子ロボットの
変形/静止の切り替え制御

(a)光応答性リリーサーDNA と(b)コネクターDNA の模式図.(c)アメーバ型分子ロボットにおける変形状態から静止状態への切り替えと(d)静止状態から変形状態への切り替えの顕微鏡画像.t =300 s 時に紫外光が分子ロボットに照射されている.画像中の白三角形は,膜上に局在している微小管を表す.スケールバー:10 μm.(Reprinted form *Science Robotics* 2017 [3].一部改変).

あるいは，任意の孔径を持つ人工ナノポア[12, 13]をリポソーム膜に導入すれば，分子ロボットは外部環境にある分子を直接認識することもできるだろう．その他にも DNA の反応ネットワークを利用した情報処理機能の向上や[14, 15]，束化した微小管を用いた高出力アクチュエータの実装[16]など枚挙にいとまがない．加えて，アメーバ型分子ロボットは，凍結保存し融解したあとも変形機能を持続しており，冷凍保存した分子ロボットを輸送することも可能である．事実，東北大学から名古屋大学へ輸送された分子ロボットは，解凍（再起動後）に変形挙動を示して見せた（図 4）．これにより，各研究者それぞれが設計・開発した分子デバイスを実機にインストールしてテストする，というモデル機としての活用の道も期待できる．

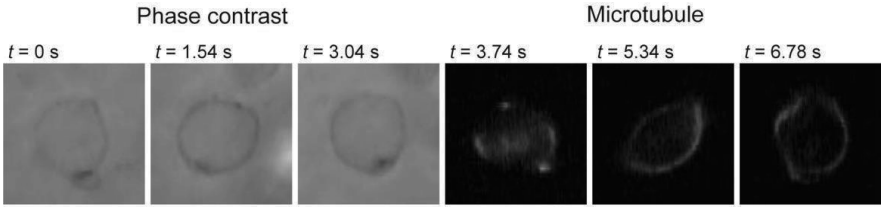


図 4　凍結後に輸送され，解凍後に観察された分子ロボットの変形挙動の連続画像．

画像は名古屋大学瀧口金吾講師，林真人博士（現：理化学研究所研究員）より提供．

様々な発展が考えられるアメーバ型分子ロボットではあるが，現状有している機能は変形の開始/停止のみである．つまり，即座に実用的な応用へと適用できる代物ではない．しかし，プロトタイプができ上がったことにより，具体的な修正を検討できる段階へと「開発」のフェーズは一段上がる．例えば，人を模したロボット開発の歴史では，まず平坦な床を二足で歩くという人間からすれば極めて単純な動きを実現することのみに注力してきた[17]．不安定かつ遅い速度ながらも二足歩行を実現したという事実が，人間の補助をするなどの実用的な機能を備えた人間型ロボット[18]の開発へと繋がっていった．分子ロボット開発においても，分子デバイスのシステム化がその実態を得たことは大きな一歩だろう．分子ロボティクスが従来のロボット工学と同様の歴史を辿るとも限らないが，アメーバ型分子ロボットが踏み出した（変形した）マイクロメートルサイズの一歩は，今後のさらなる展開へと繋がってゆくものと期待できる．

[1] S. M. Douglas, I. Bachelet, G. M. Church, *Science*, **335**, pp.831-834, 2017
[2] A. J. Thubagere et al.,A cargo-sortign DNA robot, *Science*, **357**, eaan6558, 2017.
[3] Y. Sato et al., Micrometer-sized molecular robot changes its shape in response to signal molecules, *Science robotics*, **2**, eaal3735, 2017.
[4] C. P. Brangwynne et al., Microtubules can bear enhanced compressive loads in living cells because of lateral reinforcement, *Journal of Cell Biology*, **173**, pp.733-741, 2006.
[5] M. Kikumoto et al., Flexural Rigidity of Individual Microtubules Measured by a Buckling Force with Optical Traps, *Biophysical Journal*, **90**, pp.1687-1696, 2006.
[6] K. Visscher, M. J. Schnitzer, S. M. Block, Single kinesin molecules studied with a molecular force clamp, *Nature*, **400**, pp.184–189, 1999.
[7] A. T. Lam et al., Cytoskeletal motor-driven active self-assembly *in vitro* systems, *Soft Matter*, **12**, pp.988-997, 2016.
[8] S. Pautot, B.J. Frisken, D. A. Weitz, Production of unilamellar vesicles using an inverted emulsion, *Langmuir*, **19**, pp. 2870-2879 2003.
[9] X. Tang et al., Photomodulating RNA cleavage using photolabile circular antisense oligodeoxynucleotides, *Nucleic Acids Research*, **38** pp.3848-3855, 2010.
[10] H. Asamuma et al., Photoregulation of the Formation and Dissociation of a DNA Duplex by Using the cis–trans Isomerization of Azobenzene, *Angewandte Chemie International Edition*, **38**, pp.2393-2395, (1999).
[11] Y. Yoshimura, K. Fujimoto, Ultrafast Reversible Photo-Cross-Linking Reaction: Toward in Situ DNA Manipulation, *Organic Letters*, **10**, pp. 3227-3230, 2008.
[12] S. Krishnan et al., Molecular transport through large-diameter DNA nanopores, *Nature Communications*, **7**, 12787, 2016.
[13] J. R. Burns et al., A biomimetic DNA-based channel for the ligand-controlled transport of charged molecular cargo across a biological membrane, *Nature Nanotechnology*, **11**, pp.152-156, 2016.
[14] L. Qian, W. Winfree, Scaling up digital circuit computation with DNA strand displacement cascades, *Science*, **332**, pp.1196-1201, 2011.
[15] G. Chatterjee et al., A spatially localized architecture for fast and modular DNA computing, *Nature Nanotechnology*, **12**, pp.920-927, 2017.

[16] R. Kawamura et al., Microtubule bundle formation driven by ATP: the effect of concentrations of kinesin, streptavidin and microtubules, *Nanotechnology*, **21**, 145603, 2010.
[17] A. Takanishi et al., The realization of dynamic walking robot WL-10RD, P*roceedings of International Conference of Advanced Robotics*, pp.459-466, 1985.
[18] K. Yokoyama et al., Cooperative Works by a Human and a Humanoid Robot, *Proceedings of the 2003 IEEE International Conference on Robotics & Automation*, pp.2985-2991, 2003.

（東京工業大学　佐藤佑介）

2．3 ゲルオートマトンと空間を活用する分子コンピューティング

セルオートマトン

セルオートマトンは，多細胞生物に触発された計算モデルである[1]．各々の格子点にセルと呼ばれる状態機械が置かれる．各状態機械は，自分自身の状態と，隣接する格子点の状態機械の状態にしたがって，次の状態を定める．特に同期的なセルオートマトンでは，各状態機械は同時にその状態を遷移させる．たとえば，ライフゲームは同期的セルオートマトンの高名な例である[2]．ライフゲームでは正方格子の格子点に 0 または 1 の状態を持つセルが並べられる．隣接する格子点として，上下左右の点に加えて，斜め方向の四つの点が考慮される．

一般に，隣接する格子点の集合を近傍と呼ぶ．上下左右の四つの格子点から成る近傍はノイマン近傍，さらに斜め方向も含めて八つの格子点から成る

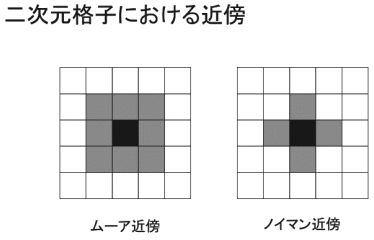


図 1　ムーア近傍とノイマン近傍

近傍はムーア近傍と呼ばれる．正方格子の場合，各格子点のセルは正方形で表示され，その色などによって状態が示される．図 1 では，黒いセルの近傍のセルが灰色で示されている．

ライフゲーム

ライフゲームでは，状態 0 はセルが死んでいることを表し，状態 1 はセルが生きていることを表す．そして，ムーア近傍のもとで，以下のようにして各セルは次の状態を定める[2]．

・現在の状態が 0 であるセルは，隣接するセルで状態 1 のものが二個か三個である場合，状態 1 に遷移する．

・現在の状態が 1 であるセルは，隣接するセルで状態 1 のものが一個以下または，四個以上ならば，0 に遷移する

・以上の場合以外，状態はそのままとなる．

図 3 では，グライダーと呼ぶパターンの変化が示されている．状態 1 のセルは黒，状態 0 のセルは白で表示されている．上左図の状況における各セルの状態遷移が，上中図に示されている．赤いセルは状態 1 から 0 へ遷移するセルであり，青いセルは状態 0 から 1 へ遷移するセルである．その他のセルの状態は変化しない．同期的な遷移の結果が上右図に示されている．上右図と同じパターンが下左図に示されており，同様にその遷移が下中図，遷移の結果が下右図に示されている．このパターンは遷移を繰り返すことにより，右下方向に移動する．すなわち，4 ステップごとに，右に 1 セル，下に 1 セルずつ進む．

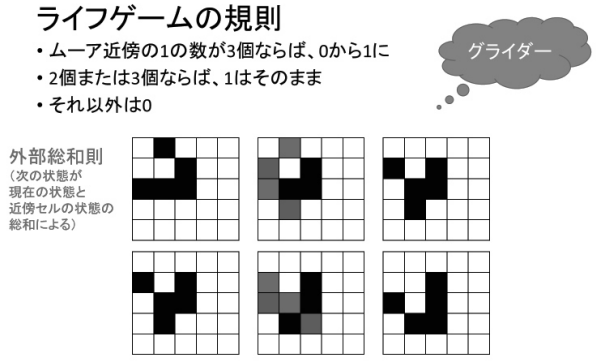


図 2　ライフゲーム

ライフゲームの遷移規則では，セルの次の状態が現在の状態，近傍セルのうち状態 0 にあるセルの数，近傍セルのうち状態 1 にあるセルの数によって定まる．すなわち，近傍セルの方向には依存しない．このような遷移規則は外部総和則と呼ばれている．

ライフゲームでは，非常に複雑な振る舞いを呈するパターンが数多く発見されている．そのようなパターンを組み合わせることにより，ライフゲームによって各種の計算・情報処理を行うことができる．具体的に，論理回路やチューリング機械のシミュレーションをライフゲームによって行うことができる[2]．この意味で，ライフゲームは計算万能であることが知られている．

ゲルオートマトン

ゲルオートマトンとは，ゲル壁と反応溶液によって実装することを想定して，各種の制約を課したセルオートマトンのことである．ライフゲームは，セルの状態遷移が近傍セルの方向に依存しないという制約を満たしていたが，ゲルオートマトンでは，さらに各種の制約が課される．これらの制約に関して詳しく説明する前に，ゲルオートマトンの実装方法について簡単に紹介しておく（詳細は２．４節を参照）．

図 3 の左にあるように，一つの方法はゲルカプセルによるもので，アルギン酸等のゲルで作ったカプセルの中に DNA 等の反応溶液を浸潤させる．有村たちによる方法では，アルギン酸の液滴をカルシウム溶液に適切な時間だけ浸すことによりゲルカプセルを作成した後，外から反応溶液を封入する．アルギン酸の液滴にマイクロビーズを懸濁しておくことにより，ゲルカプセル中にマイクロビーズを挿入することができる．外から浸潤した反応溶液中の分子のうち，マイクロビーズに固定されるものはゲルカプセル内に留まる．その他の分子や溶液の反応によって生成された分子は，ゲル壁を通って隣接するゲルカプセルに拡散することができる．

一方，図 3 の村田たちの方法では，精密金型を用いて微小な穴の開いたアルギン酸ゲル塊を作成し，微小穴に反応溶液を注入する．反応溶液中の分子のうち，アンカー分子（具体的にはポリアクリルアミド）を結合させたものはゲル壁中を拡散することができない．その他の分子や生成された分子は，ゲル壁中を拡散して隣接する微小穴に到達する．

いずれの方法においても，隣接するセルの状態は，そのセルから拡散によって到達する分子によって知ることができる．このような分子を信号分子と呼ぶこ

とにする. すなわち, 各セルは自分の状態を表す信号分子を常に生成している. 信号分子はゲル壁中を拡散して隣接セルに到達する. 各セルは信号分子を受け取ることによって隣接セルの状態を知ることができる.

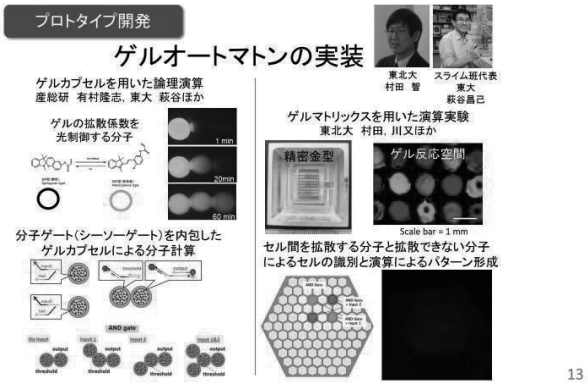


図 3　ゲルオートマトンの実装方法

なお, 本稿では詳しくは説明しないが, 萩谷たちはゲル壁の開閉によって計算・情報処理やパターン形成を行うゲルオートマトンも提案している [3].

ゲルオートマトンの制約

以上のような実装方法を想定すると, セルオートマトンに対して以下のような制約を考えることができる.

非同期性 : ライフゲームなどのセルオートマトンは同期的であり, 各セルが一斉にその状態を遷移させるが, ゲルオートマトンの場合は, すべての反応溶液を完全に同期させることは不可能である. したがって, 同期的な状態遷移を想定しないセルオートマトンが望まれる.

総和性 : ライフゲームではセルの状態遷移は, 隣接するセルのうち, 各々の状態にあるセルの数だけに依存し, その方向には依存しない. ゲルオートマトンでもこの性質は必要である. 隣接セルの状態は信号分子によって知ることができるが, 隣接するセルの方向まではわからない. 信号分子の量によって, 各々の状態にある隣接セルの数を推測することができる.

ブール総和性 : この制約は, 総和性をさらに制限したものである. 信号分子の量は各種の条件によって変動するので, その量によって隣接セルの数を正確

に推測するのが難しいと想定することも妥当である．ブール総和性は，セルの状態遷移が，隣接セルのうち，各々の状態にあるセルの有無だけによって定まることを要請する．

非迷彩性：非迷彩性は，ブール総和性をさらに制限したものである．各セルは，自分の状態を表す信号分子を生成し拡散させていると想定する．とすると，各セルの隣接セルが自分と同じ状態にあるとき，自分と同じ信号分子を生成していることになる．各セルには自分の状態に対応する信号分子が満ちているので，隣接セルから同じ分子が拡散して来ても，それを認識することはできない．したがって，セルの状態遷移は，隣接セルのうち，自分と同じ状態にあるセルには依存しないことが要請される．この要請が非迷彩性である．

状態の少なさ・状態分岐の少なさ：ゲルオートマトンでは，反応溶液の状態によってセルの状態を実現する．したがって，複数の安定状態を持つ反応系が想定される．各安定状態において高濃度で生成される分子が，信号分子として用いられる．いうまでもなく，そのような反応系を実装することは容易ではない．たとえば，PEN DNA toolbox を用いることが考えられる[4]．PEN DNA toolbox では，二状態スイッチをはじめとして，複数の安定状態を持つ反応系が実装されている．どのような反応系を用いるにしても，セルの状態の数は少ない方が実現可能性は高まる．また，セル間の遷移関係も単純な方がよい．より具体的には，状態遷移の分岐は少ない方がよい．

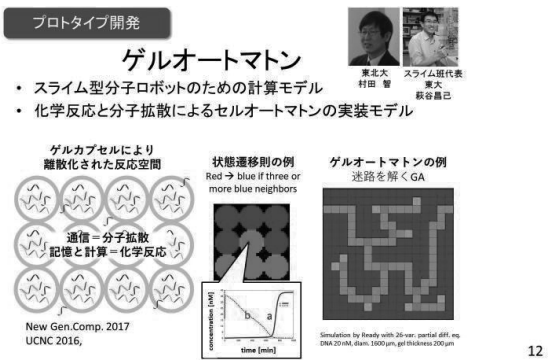


図 4　迷路のゲルオートマトン

たとえば，図 4 にある迷路を解くゲルオートマトンは総和性を満たす非同期セルオートマトンである．

ゲルオートマトンのチューリング計算万能性

磯川たちは,総和性を満たす非同期的セルオートマトンがチューリング計算万能性を持つことを示した[5]．すなわち，総和性を満たす非同期的セルオートマトンのもとで，適切な初期パターンを設定することにより，チューリング機械をシミュレートすることができる．さらに，山下たちは，非迷彩性を満たすセルオートマトンであっても，チューリング計算万能性を持つことを示した[6]．

ゲルオートマトンと分散アルゴリズム

直前に紹介したチューリング計算万能性に関する結果は，あくまで，ゲルオートマトンによる計算・情報処理の理論的な可能性を特徴付けるもので，ゲルオートマトンの現実的な将来性を示唆しているものではない．そもそも，セルオートマトンは多細胞生物における各種の現象，特に個体発生，形態形成，自己複製，自己修復に触発されたものであり，そのような現象を再現できる離散的なモデルとして提案された．したがって，その方向でゲルオートマトンの発展を探求するが適切である．

図 4 の迷路を解くゲルオートマトンはその典型であろう．このゲルオートマトンのセルは，青と赤の二つの状態を取る．赤の状態は，ノイマン近傍において隣に青の状態が三つあると，赤から青に遷移する．したがって，迷路を解くために赤の状態が木の形で広がっていると，やがて，入口と出口をつなぐ一本経路だけが赤の状態として残るようになる．この例は，非常に簡単ではあるが，ゲルオートマトンによるパターン形成の具体例となっている．

一般に，並列・分散計算の分野では，各種の問題を空間的に分散した計算エージェントが，近隣のエージェントと情報をやり取りしながら，まとまった計算を行う種々の分散アルゴリズムが研究されている．これらの分散アルゴリズムの中には，最短経路や最小木等のように，結果的に計算エージェントから成る空間の中で何らかのパターンを形成するものが多い．したがって，分散アルゴリズムのモデルに倣って，ゲルオートマトンを発展させることが考えられる．そのような方向の研究に際して，特に非同期性は重要である．同期性はセルオートマトンの数学的な理論を豊かにしたが,同期的なクロックの存在は極めて人工的である．各種の並列・分散計算のモデルにおいても，同期性は通常は仮定されない.特に分散アルゴリズムのモデルでは,非同期的な分散計算の中で，必要に応じて，同期的な処理が行われる．

ポピュレーションプロトコルは，そのような並列・分散計算のモデルの中でも最も基本的なものの一つである．計算エージェントをノードとするグラフ（インタラクショングラフという）があって，グラフ上で隣接する二つのノードが同時に遷移規則によって状態を遷移させる．二つのノードの状態遷移は同期的であるが，どの二つのノードが選ばれるかは非同期的である．
山下たちは，ゲルオートマトンによってポピュレーションプロトコルのシミュレーションが行えることを示した[7]．
分散アルゴリズムに対しては，自己安定性という重要な性質が定義されている[8]．分散アルゴリズムが自己安定的であるとは，どのような初期状態から始めても，やがて全体が安定的な状態に落ち着くということである．安定的な状態とは，静止した状態ではなくて，目的の条件を満たす状態のことであり，初期状態から始めていつかは安定な状態であり続けるようになる．このような分散アルゴリズムは，外乱によって安定性がくずれても，やがては再び安定な状態に至ることが保証される．
ゲルオートマトンによっていかにして自己安定な分散アルゴリズムを実現するかは，非常に興味深い問題であろう．

ゲルオートマトンから自己修復マテリアルへ

自己安定性は，自己組織化および自己修復性と深く関係している．空間の中に分散した計算エージェントが分子ロボットとして実現されていれば，センサーデバイスにより空間のその位置の状況を観測することができる．様々な物理量や各種の分子の濃度を観測して，その情報を交換しながら，空間の中に様々なパターンを自己組織化させることができるだろう．また，外乱によって状況が変換したならば，パターンを再構成させることができる．
ゲルオートマトンのセルは分子ロボットであることが想定される．計算エージェントを実現し，センサーデバイスによって観測を行うことに加えて，アクチュエータとして様々な効果を発揮することができる．自分自身の物性を変化させることにより，集合体全体の形態を変形させることもできるだろう．
したがって，セルの集合体は，環境を観測しながら自己組織化し，環境や自身の変化にしたがって自己修復する．一見するとまさにゲルの塊であるが，その中では各種の情報が交錯し，物性の変換と物質の生成が常に繰り返される，インテリジェントなマテリアルとなるだろう．

[1] Schiff 著, 梅尾・Peper 監訳: セルオートマトン, 共立出版.
[2] ニコニコ動画: ライフゲームの世界.
[3] Masami Hagiya, Shaoyu Wang, Ibuki Kawamata, Satoshi Murata, Teijiro Isokawa, Ferdinand Peper, Katsunobu Imai: On DNA-Based Gellular Automata, Unconventional Computation and Natural Computation, 13th International Conference, UCNC 2014, Lecture Notes in Computer Science, Vol.8553, 2014, pp.177-189. DOI: 10.1007/978-3-319-08123-6_15
[4] Montagne, K., Plasson, R., Sakai, Y., Fujii, T., and Rondelez, Y. (2011). Programming an in vitro dna oscillator using a molecular networking strategy. Molecular systems biology, 7(1):466.
[5] Teijiro Isokawa, Ferdinand Peper, Ibuki Kawamata, Nobuyuki Matsui, Satoshi Murata, and Masami Hagiya: Universal Totalistic Asynchonous Cellular Automaton and Its Possible Implementation by DNA, Unconventional Computation and Natural Computation, 15th International Conference, UCNC 2016, Lecture Notes in Computer Science, Vol.9726, 2016, pp.182-195. DOI: 10.1007/978-3-319-41312-9_15
[6] Tatsuya Yamashita, Teijiro Isokawa, Ferdinand Peper, Ibuki Kawamata, and Masami Hagiya: Turing-Completeness of Asynchronous Non-camouflage Cellular Automata, AUTOMATA 2017, Lecture Notes in Computer Science, Vol.10248, 2017, pp.187-199. DOI: 10.1007/978-3-319-58631-1 15
[7] Tatsuya Yamashita1 and Masami Hagiya: Simulating Population Protocols by Gellular Automata, SICE Annual Conference, 2018, to appear.
[8] 増澤・山下: 適応的分散アルゴリズム, 共立出版.

（東京大学 萩谷昌己）

2．4 ゲルオートマトンの実装

はじめに

ゲルオートマトンの計算能力に関する理論的な研究と並行して, ゲルオートマトンの実装に関する研究が行われている. ゲルオートマトンはゲル壁で囲われた反応溶液中の分子計算によりセルオートマトンの状態遷移を, ゲル壁を介した分子の拡散により, セル間の通信を実現する. したがって, これを実装には, セルの作製, ゲルによるセルアレイの成型, DNA 分子計算溶液の設計, ゲ

ルの壁を通した分子拡散の調整などが具体的な課題となる．以下では，ゲルオートマトンのモデルとして，ピンセットでつまめるくらいのサイズの中空ゲルビーズをつかった実装と，ミリサイズのセルアレイを金型をつかって成型したモデルによる実装を紹介する．

中空ゲルビーズモデルによる実装

マイクロあるいはミリオーダのゲルカプセルを一つの空間として離散化し，カプセル間のコミュニケーションを制御できれば，ゲルオートマトンの反応場として実装可能である．まずは，0（赤）または1（白）の離散状態をもつゲルカプセルの自己組織化に関して記す．（アルギン酸を用いた中性白色ゲルカプセル（中白）の合成法は，２．５節「拡散係数を変化させる分子」を参照．）直径約1ミリの中白をアニオン性の赤い色素（ニューコクシン，New Coccine，赤色102号）の9mM水溶液に2日間浸漬させて，アニオン性赤カプセル（アニ赤）を調製する．また，中白をカチオン性の塩化アンモニウムの9mM水溶液に浸漬させて，カチオン性白カプセル（カチ白）とする．アニ赤23個と中白23個を適量の溶媒をいれたシャーレ内でゆっくり攪拌し，何度も自己会合を試みてもカプセルのランダム集合体しか得られない（図1の左図）．他方，アニ赤6個とカチ白1個をシャーレの中でゆっくり攪拌すると，カチ白を中心に6個のアニ赤が周囲に集まった六方格子状の会合体を得ることができる（図 1 の右の赤枠内）．これは，カプセル間の静電的相互作用によるものである．本来，弱い分子間引力である静電的相互作用は，バルク中の平衡系では十分な会合力は示さないが，ゲル反応場の形成する特殊なゲル界面においては，極めて協同的に強化されることを示す[1,2]．この六方格子状の自己会合体は，さらに自己組織化し，複数の六方格子状網目構造を形成させることも可能で，反応空間の離散化方法としては有用である．

ゲルカプセル間のコミュニケーションには，閾値を有する状態遷移則の確立と同時に拡散係数を時間的に制御させることが肝要である．状態遷移則にはDNAアプタマーのブランチマイグレーションを用いる手法が有望と考えられる．又，拡散係数の精密制御には，自在に開閉可能な拡散経路が必要である．それは，光により物性を変化させる光応答分子を用いることで達成できる．ここでは，光照射によりゲルカプセル間の信号分子拡散のストップ＆フローの自由制御について記す．蛍光性信号分子 5-FAM を内包した光応答ゲルカプセル 1 個と

空の光応答ゲルカプセル 2 個を並べて設置する．室温で 1 時間以上放置しても，5-FAM はゲルカプセルからリリースされないことが蛍光顕微鏡から確

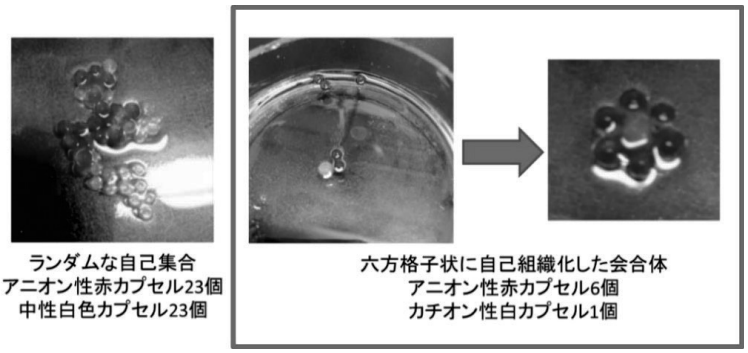


図１　ゲルカプセルの静電相互作用を介しての六方格子状自己組織体

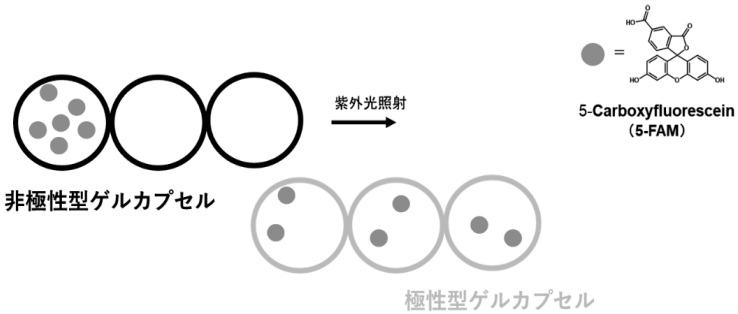


図２　光応答ゲルカプセルの信号分子拡散

認できる．紫外光をゲルカプセルに照射すると，ゲルカプセルを構成する光応答分子が非極性から極性分子に異性化することで，カプセル間に拡散経路が生じる．20 分経過すると，５－FAM が 2 個目のカプセルに拡散していることがわかり，60 分後には 3 個目にも拡散し飽和する．他方，20 分後に可視光を照射し，拡散経路を非極性に異性化させると 5-FAM の拡散がストップし，更に 40 分経過しても 5-FAM のリリースは起こらない．現在，6 個のゲルカプセル間の拡散経路を光応答分子で開閉制御できることも実証されている．（有村隆志）

セルアレイモデル

ゲルオートマトンは，ゲルできたセルのアレイ（格子）の中に，計算用の DNA 溶液を満たしたものであり，各セルが分子計算を行うとともに，周りのセルと分子を交換(通信)することで,集団としてパターンを発現するものである(２．３節参照）．セル格子の幾何学的な配置，セルで行う演算やセル間の通信，セルアレイの初期状態などにより，いろいろなパターン生成ができる．

ますはじめに，酵素反応系による分子計算（１．６節 PEN DNA Toolbox）を利用してゲルオートマトンを実装するためのモデル検討について紹介する.デモンストレーションとして迷路を解くゲルオートマトンを考える（図３）．ここでは，DNA 増幅（ポリメラーゼ反応）と切断（ニッキング反応）を組み合わせ，赤ないし青の状態において双安定な DNA 反応系を構成する．反応を担う分子はポリマーアンカーにつながれていて隣のセルには拡散できないが,一部の分子だけがゲル壁を通してとなりのセルに拡散することができると仮定する.これは，あるセルが出力した分子信号と，その隣のセルの出力した分子信号を区別するためである．この反応において，うまく反応条件を設定すると，周りのセルが３つかそれ以上青のときだけ,赤の状態が青の状態に変化するという状態遷移が実現できる．この演算をすべてのセルで実行すると，赤の状態を迷路の通路として，行き止まりになっている個所から通路が後退し，最終的には連結した通路のみが残るため，結果として迷路問題が解ける[3]．さらに同様の枠組みで，任意の 1 次元初等セルオートマトンが実装できることが理論的に示されている[4].

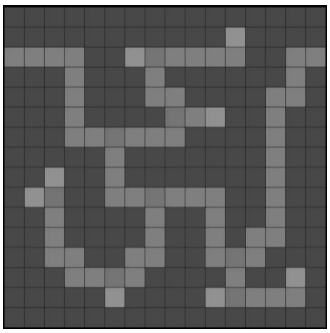


図３　迷路を解くゲルオートマトンのモデル

反応拡散系のシミュレーションソフトウェア Ready により 26 変数の偏微分方程式を数値計算した結果（途中）．枝が消えて最終的には右辺と左辺をつなぐ一本の連結経路だけが残る．

セルアレイモデルの実装

こういったゲルオートマトンを実際の物理系として実装する研究もおこなわれている．以下の実験では，ゲルの材質としてアルギン酸をカルシウムイオンによってゲル化したものを用いている．ゲルアレイの寸法は，ゲルの濃度や DNA の拡散速度をパラメータとして現実的な時間で反応が終わるように選ばれ，CAD 図面に従ってまずアルミ材を切削加工し，それを PDMS 樹脂に転写し，さらにアルギン酸ゲルに写し取るという手順で製作する（図４）．

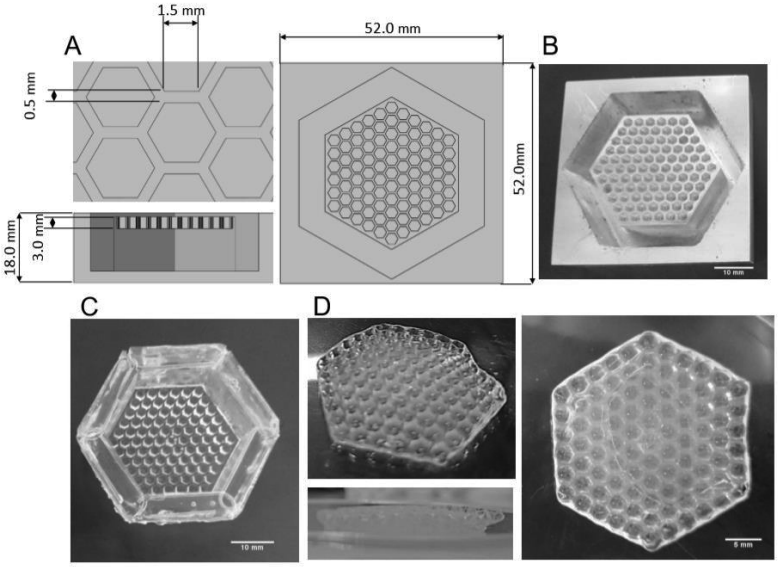


図４　ゲルアレイの作製

CAD の設計に従ってアルミの金型を切削し，それを PDMS 樹脂に転写し，その中でアルギン酸ゲルを硬化させることによりゲルアレイを作製する．A:CAD 図，B: アルミ金型，C:PDMS 型，D. 完成したゲルアレイ．

ゲルオートマトンの実装に当たっては，セル間の拡散制御が重要である．壁となるアルギン酸ゲルはアルギン酸の濃度により高分子の網目間隔を調整可能であり，一本鎖の短い DNA は自由に拡散できる．一方，セル間を拡散しては困る分子は，別途重合した長いアクリルアミド分子に，アクリダイト DNA を介して共重合させ，ゲル壁を越えられないようにする（図５）．

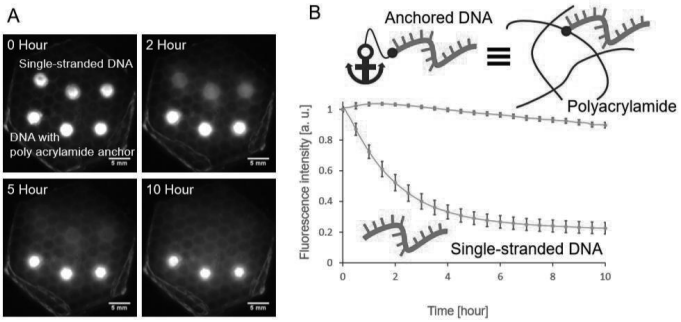


図５　高分子ポリマーを用いた拡散抑制

54nt の DNA 一本鎖に対する核酸抑制の効果．濃度を適切に調整したアクリルアミドポリマー（ゲルではなく粘稠な溶液）に DNA をアンカーリングすることにより，その DNA およびその DNA にハイブリダイズしている DNA の拡散を抑制することができる．

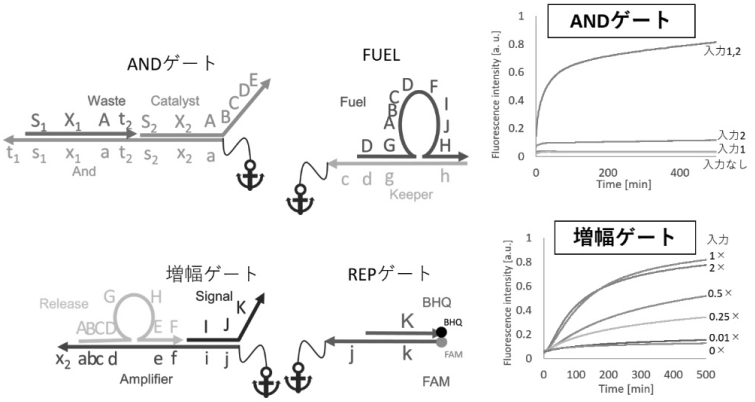


図６　セルに実装する演算反応

AND ゲート，増幅ゲートともにアクリルアミドポリマーにアンカリングされている．2 つの入力がそろったときだけ出力が出る．FUEL をもちいた増幅反応により，REP ゲートで蛍光を発する Signal 分子が出力される．

ゲルオートマトンの各セルでは論理演算と増幅反応を行う（図６）．あるセルが出力する DNA 一本鎖が隣のセルに拡散し，隣のセルの計算反応の入力分子となる．こういった系では，拡散によって常に分子が希釈されるため，計算反応に必要な濃度を維持するための増幅反応を組み合わせることが必要になる（詳細については，文献[5]を参照）．図７に示す実験では，AND ゲートと増幅ゲートの組み合わせの機能を確かめた．AND 演算の確認では，赤と緑に蛍光標

識された DNA 分子を出すセルを用意し，その周りにこれらを入力とする AND ゲートをいれたセルを並べ，赤緑の双方から近いセルから AND 出力（蛍光）が出ることが確認された（上）．また，AND ゲートと増幅ゲートを組み合わせた場合は，信号源からの距離および増幅強度により時間差をもって出力の蛍光が現れることが確かめられた（下）．

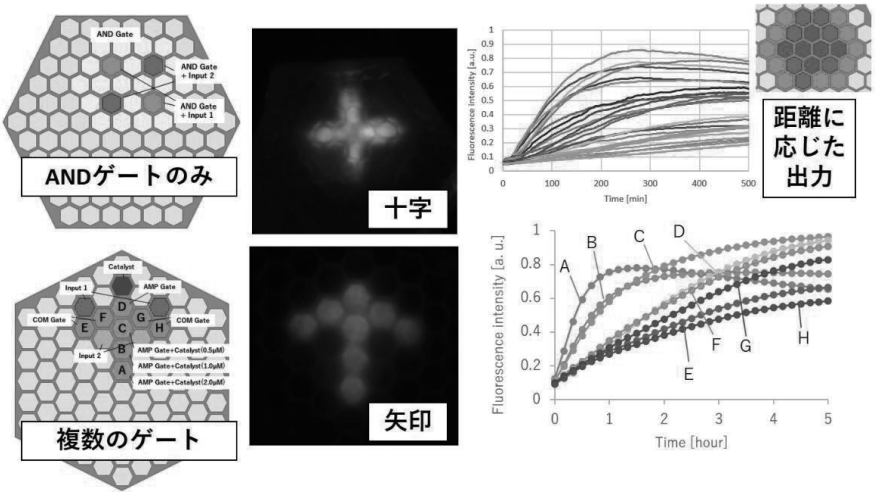


図 7　ゲルオートマトンの実装（論理演算）

赤緑の双方から近いセルから AND 出力（蛍光）が出る（上）．AND ゲートと増幅ゲートを組み合わせた場合は，信号源からの距離および増幅強度により時間差をもって出力の蛍光が現れることが確かめられた（下）．

以上，見たようにゲルオートマトンの実装技術はまだ要素技術の段階であり，これを集積してセルオートマトンの状態遷移（特に繰り返しの状態遷移）が実行できるまでには至っていない．化学反応系で実装することを考えると，一回限りの遷移しか許さないとか，通信の伝達範囲は隣接セルまでのように，一般のセルオートマトンの動作条件を制約することも考えられているが，実装する計算反応そのものにおいて，望まないリークやクロストークを減らす努力が必要である．（川又生吹，村田　智）

[1]　A.Harada et al., Macroscopic self-Assembly Through Molecular Recognition, *Nature Commun.*, **3**, pp 34-37(2011).

[2] 有村隆志（分担執筆），第 7 章第 2 節ゲル反応場における分子認識，「ゲル化・増粘剤の使い方，選び方 事例集」，㈱技術情報協会，pp 397-406, 2018.
[3] I. Kawamata, S. Yoshizawa, F. Takabatake, K. Sugawara, S. Murata., Discrete DNA Reaction-Diffusion Model for Implementing Simple Cellular Automaton, LNCS 9726, 168-181, 2016
[4] I. Kawamata, T. Hosoya, F. Takabatake, K. Sugawara, S. M. Nomura, T. Isokawa, F. Peper, M. Hagiya, S. Murata. Pattern Formation and Computation by Autonomous Chemical Reaction Diffusion Model Inspired by Cellular Automaton, 4th CANDAR, 215-221, IEEE, 2016
[5] T. Hosoya, I.Kawamata, S.M. Nomura, S. Murata, Pattern formation on discrete gel matrix based on DNA computing, New Generation Computing, https://doi.org/10.1007/s00354-018-0047-1.

（産業技術総合研究所　有村隆志，東北大学　川又生吹，村田　智）

2．5 拡散係数を変化させる分子

一般に，細胞間コミュニケーションを反応拡散モデルとして表現する場合，特定のシグナル分子のみが拡散し，細胞間の閾値を超えて，細胞内部での反応ダイナミクスと定式化される．[1] 水は，通常，細胞間を単純拡散で通過するが，透過性の高い細胞間では水を通すアクアポリンというチャンネルが形成される．チャンネルがリン酸化され極性を示すことで，多くの水分子が通過拡散することができ，リン酸基が除去され非極性になるとチャンネルは閉鎖して水分子は拡散できない．したがって，カプセル間のコミュニケーションにも，拡散経路を極性あるいは非極性に制御すると，極性分子の拡散係数を自由に変化させられると考えられる．実際，紫外光照射では極性分子，可視光照射では非極性分子に変化する光応答性分子をアルギン酸に化学修飾し，マイクロゲルカプセルを作り，これを細胞の離散化モデルとすることで可能となる．
光応答性マイクロゲルカプセル合成のプロトコルは図 1 の通りである．
①光応答分子を共有結合で化学修飾したアルギン酸ナトリウム（80-120）1wt%を塩化カルシウム水溶液（1wt%）にゆっくり滴下する．

②滴下後，20 分含侵させることにより，直径約 500μm，殻の厚さ 40～50μm のゲルカプセルが調製できる．カプセルの厚さは直径に比して，およそ 1 割程度の厚さで，カプセル内部は粘度のないゾル状態である．
③ゲルカプセルを水に短時間浸漬させる．
④拡散させる色素分子を含む溶液に，2 時間浸漬させることで，色素分子を含む光応答性ゲルカプセルが調製できる．

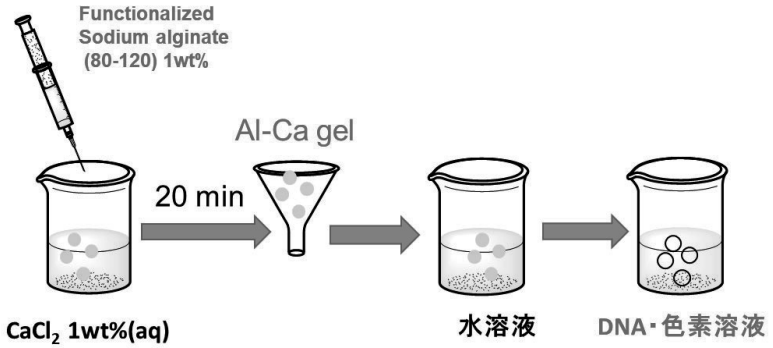


図 1　ゲルカプセル合成のプロトコル

具体例として，蛍光顕微鏡で拡散状況が把握できる色素カルボキシフルオレセイン分子(5-carboxyfluorescein: 5-FAM)を含むゲルカプセルを調製し，光照射により分子の拡散を制御した結果を記す（図 2）．
①5-FAM 含有非極性型ゲルカプセルの隣に，分子を含まない非極性型ゲルカプセルを近接させる．非極性型ゲルカプセルは黒い円，極性型ゲルカプセルは黄色の円である．
②紫外光を照射しない状態では，非極性型ゲルカプセルからは 2 時間経過しても 5-FAM のリークはない．
③紫外光照射することで，2 個のゲルカプセルは非極性型から極性型に速やかに異性化する．
④30 分経過すると，分子を含まないゲルカプセルに 5-FAM が拡散し，約 50 分で拡散が飽和に達した．5-FAM の拡散速度は，30 分で約 0.5 ミリメートルである．

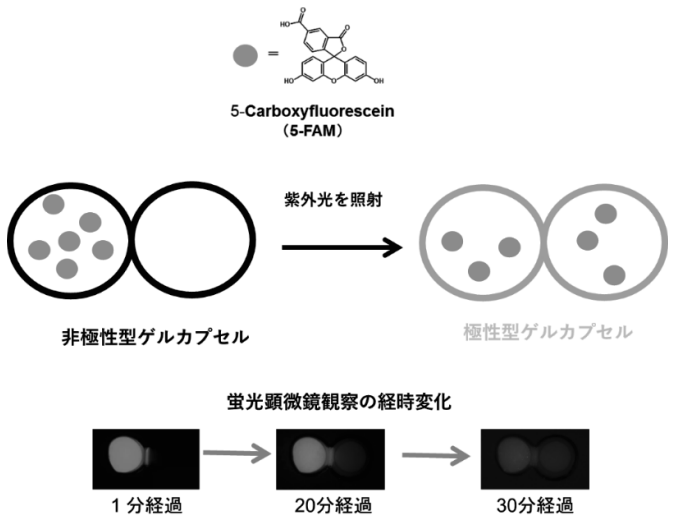


図 2　光照射による蛍光分子 5-FAM の拡散制御

[1]　A. Geirer, H. Meinherdt, A Theory of Biological Pattern Formation, Kybernetik, **12**, pp. 30-39, 1972.

（産業技術総合研究所　有村隆志）

2．6 移動するゲル

粘菌のように移動するハイドロゲルを，プログラムされた DNA 反応を使って実装した東北大学の試みを紹介する．図 1 が移動するゲルの模式図である．空間を 3 分割してゾルとゲルを配置すると，ゲルの領域は時間の経過にともない左から右へと見かけ上移動する．移動の原理として，高分子のゲル化・ゾル化を利用している．ゾル 1 とゲルの境界ではゾル化の反応が起こり，ゲルの領域は刻々と小さくなる．一方でゲルとゾル 2 の境界ではゲル化の反応が起こり，ゲルの領域は刻々と大きくなる．二つの反応が同時に起こることで，見かけの移動は実現されている．高分子としては DNA が側鎖として生えたポリアクリルアミド[1]を採用しており，DNA 二重らせんの形成・解離反応がゲル化・ゾル化とそれぞれ対応するようにプログラムされている．将来的にはセンサや

分子計算機を組み込むことで複雑化し，分子ロボットのアクチュエータとして機能することが期待されている．

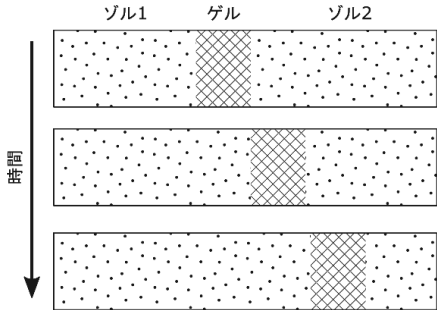


図 1　移動するゲルの模式図

ゾルは液体のような状態，ゲルは個体のような状態である．上から下へ時間が経過するにつれ，ゲルの領域が左から右へと見かけ上移動する．

[1] Yurke, B., Mechanical Properties of a Reversible, DNA-Crosslinked Polyacrylamide Hydrogel, *J. Biomech. Eng.*, **126**, pp.104, 2004.

（東北大学　川又生吹）

2．7 ドロップレットマイクロ流体技術による分子ロボティクスの展開

はじめに

近年，化学合成ポリマーや DNA・タンパク質・脂質などのバイオポリマーを用いて，ゲル・ベシクル・エマルションといったソフトマター分子システムの構築と機能制御が盛んに行われている．これらは，化学リアクタや環境応答/適応性のあるインテリジェントマテリアルなどから，分子ロボットや人工細胞の構築まで，様々な分野での発展がある．特に，分子ロボティクスや人工細胞工学においては，細胞スケール，つまりマイクメートルスケール（数μm〜数百μm）でのソフトマターの構造や機能の制御が必要になってくる．DNA に関しては，塩基配列によってボトムアップ的に構造を制御できる DNA ナノテクノロジーが発展しているが，この技術だけでは，マイクメートルスケールの構造の制御はさすがに大きすぎて難しいという問題がある．そこで，トップダウ

ン的な手法としてドロップレットマイクロ流体工学[1]と呼ばれる，マイクメートルスケールの液滴を制御する技術が利用されている．本節では，ドロップレットマイクロ流体工学の分子ロボティクスへの応用について解説する．

ドロップレットマイクロ流体工学は,マイクロメートルオーダーの幅を持つ流路（図 1a）に液体を流し，数μｍ～数百μｍの直径を持つ液滴を生成し，それを化学反応やゲル・ベシクル構築などに応用する技術である．フローフォーカス型と呼ばれる十字型流路（図 1b）や T 字型流路（図 1c）に液体を流して，マイクロ油中水滴を生成する方法などがよく利用されている．また，ガラスキャピラリーに遠心力を印加して空気中でマイクロ水滴を生成する方法（図 1d）も開発されている．

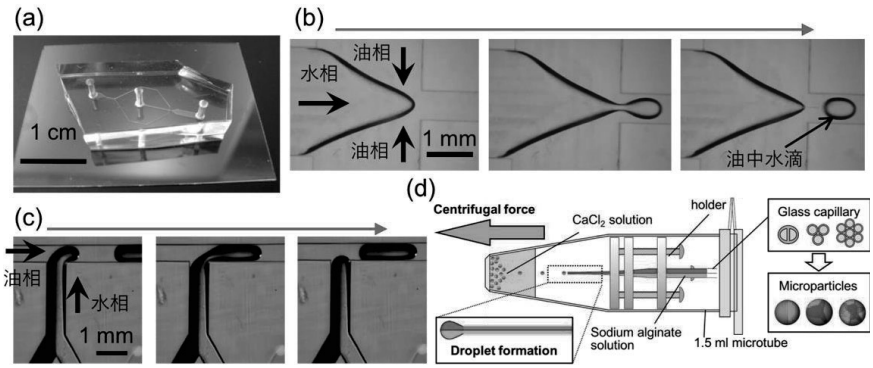


図１　ドロップレットマイクロ流体デバイス

(a)PDMS-ガラス製マイクロ流体デバイス．(b)フローフォーカス型（十字型）マイクロ流路，および，(c)T 字型マイクロ流路による油中水滴生成．(d)遠心キャピラリーマイクロデバイスによる水滴生成．

分子ロボティクス分野におけるマイクロ油中水滴の利用としては，DNA コンピューティング反応を含む非線形化学反応のための微小リアクタがある[2,3,4]．マイクロ油中水滴を利用することで，大規模な解析や反応のコンピュータ制御などを行う方法が提案されている．

図 2 は，DNA 振動反応の大規模なマッピングによる高分解能な分岐解析を実現する方法である[2]．マイクロ流路では様々な分子濃度条件のマイクロ油中水

滴が自動的に生成される（図 2a）．生成時に分子濃度を反映した蛍光分子も導入されているので，蛍光色を分析するだけで水滴内の分子濃度条件が分かる．したがって，水滴中での反応の観察後に，どの条件でどのような反応が起こったかということが分かり，分岐図にマッピングすることができる（図 2b）．マイクロ油中水滴を使えば 1 万個オーダーの分子濃度条件を同時に実施することができるため，1 万条件での高分解能で分岐図を作成することができる．

図 3 は，マイクロ油中水滴の融合・分裂を利用した非平衡開放系リアクタで，非線形化学反応やバクテリアの培養等をコンピュータ制御することができる[4,5]．動的なシステムを維持する上では，リアクタへの反応基質の供給が必要であり，これに加えて，反応生成物の一部が徐々に散逸することも必須である．Prigogine の散逸構造理論で定式化されているように，反応基質によるエネルギー供給に加え，反応物の散逸によってエントロピーの増大を防ぎ，動的な秩序を形成させることができる．図 3 のシステムは，人工細胞として用いる油中水滴ベースのマイクロリアクタと，人工細胞と融合することで，化学物質を供給したり排出したりする輸送用油中水滴からなる．人工細胞リアクタはマイクロ流路中（図 3a）に固定され，反応基質を内包した輸送用油中水滴はマイクロ流路上流で生成されて，マイクロ流路を通って人工細胞まで到達する．人工細胞用油中水滴も化学物質輸送用油中水滴も，界面活性剤によって油相中で安定化されているため，化学物質輸送用油中水滴が人工細胞に接触しただけ

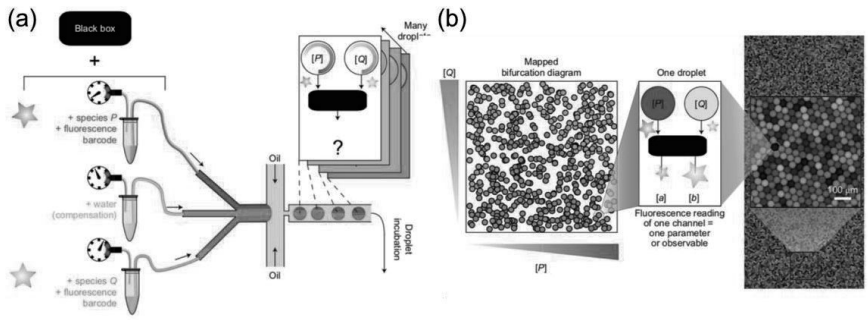


図 2　マイクロ油中水滴を利用した DNA 振動反応の
大規模なマッピングによる高分解能な分岐解析．

(a) 分子濃度条件を反映した蛍光分子を導入したマイクロ油中水滴の生成．(b) 油中水滴の蛍光色で導入した分子濃度から，反応後に分岐図にマッピング．（Reprinted from Nature Chem. 2016 [2]．一部改変）

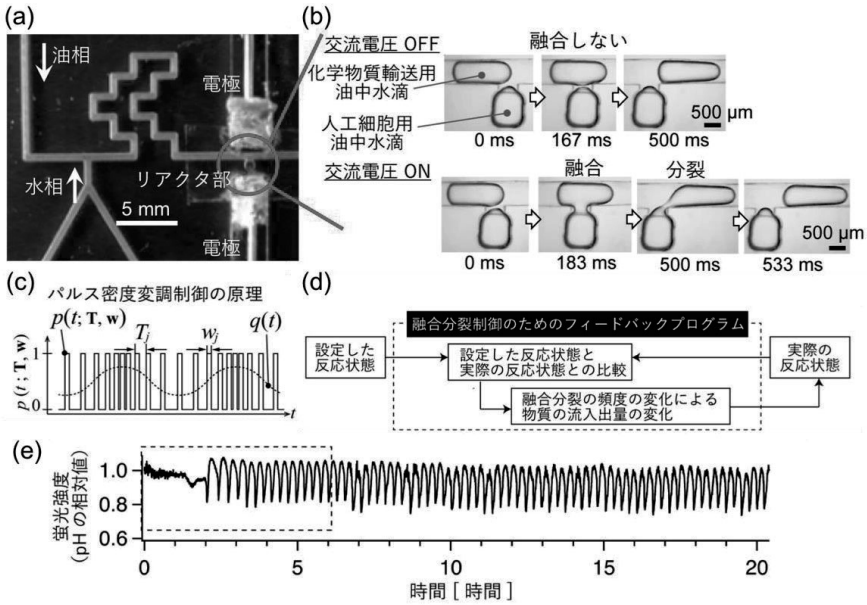


図 3　マイクロ油中水滴の融合・分裂を利用した
コンピュータ制御された非平衡開放系リアクタ

(a)マイクロ流体デバイス．(b)人工細胞用油中水滴と化学物質輸送用の油中水滴の融合・分裂．(c)パルス密度変調制御の原理．パルス波 p によって，時間変化する物質流入出速度 q を実現する．パルスの密度が高いところでは物質流入出速度が大きくなる．Tはパルスの周期，wはパルスの幅．(d)人工細胞リアクタ内での化学反応のフィードバック制御の概要．(e) フィードバック制御によって pH 振動反応(リズム反応)が発生するような実験条件を自動的に探索し維持．(Reprinted from Nature Commun. 2016 [4]．一部改変)

では融合しない．流路中には，人工細胞を挟む形で電極が配置されており，交流電圧を印加した状態で，化学物質輸送用油中水滴が人工細胞に接触すると，両者は融合する（図 3b）．流路中は油相の流れがあるため，融合した化学物質輸送用油中水滴は，　流れの応力によって人工細胞から引きちぎられるように分裂する（図 3b）．化学物質の流入出の速度の高度な制御を実現するために，理論的な定式化を行い，化学物質の流入出をパルス密度変調制御の方法で考える事ができることを示した（図 3c）．簡潔に言うと，図 3c の点線のので描いた $q(t)$のような時間に依存する関数の化学物質の流入出速度を実現したいとすると，$p(t;T,w)$のような 0 または 1 の値のみをとるパルス波のパターンによ

ってそれを近似することができ，パルス波 $p(t;T,w)$ の 0 が融合していない状態，1 が融合した状態となるように，コンピュータで制御して電圧を ON/OFF すれば良いということになる．つまり，化学物質の流入出の速度を融合・分裂の頻度で制御できるということである．これを用いると，フィードバック制御（図 3d）を行うことができる．つまり，設定した反応状態（たとえば，振動状態およびその周期など）に合うように，融合・分裂の頻度を微調整しながら実際の反応状態を変化させていくことができる．図 3e が実際に行ったフィードバック制御の実験であり，最初振動していなかった bromate-sulfite-ferrocyanide（BSF）pH 振動反応[6]を，融合分裂頻度を変化させて行くことで，設定した周期である 15 分周期になるように変化させ，設定値になったあとはそれを長時間維持することができている．小胞を利用した物質輸送方法は，単純拡散に比べると，区画化（カプセル化）されていることによって，物質の濃縮効果，反応のマスキング（反応クロストークの低減），反応のパラレル化などの様々な大きな利点をもたらす．

液滴を用いたものではないが，このような観点のマイクロ流体工学の研究は他にもある． たとえば，シリコン基板上に形成したマイクロ流路に DNA を固定して，流路を介して化学物質の流入出を実現できるマイクロチップ人工細胞などがある[7]．化学物質の流入出は，メインの流路から人工細胞リアクタ部までをつなぐ細い流路中の物質拡散によって実現されるため，流路の太さによって，化学物質流入出の速度を制御する．

次に，マイクロドロップレットを成型し，非対称構造マイクロゲル粒子，マイクロファイバー，リポソーム（脂質二重膜小胞）などを構築する技術について紹介する．一般に，ドロップレットマイクロ流体技術によって作られたマイクロ水滴は，生成後にダブルエマルションと呼ばれる水相-油相-水相(water-in-oil-in-water(W/O/W)）のような多重化したカプセルにしたり（図 4a）[8]，リポソームを作製したり（図 4b）[9,10,11,12]，ゲル化させて粒子として取り出したり（図 5）[13,14]といった応用が可能である．これらは，分子ロボットのボディの構築や，人工細胞の構築などに利用されている．

図 5 は，遠心キャピラリーマイクロデバイス（図 1d）を用いたゲルやリポソームの作製について示している．図 5a にあるようにキャピラリはプラスチックの固定具によって市販の 1.5 mL のマイクロチューブに固定されており，キャピラリの中にはゲル化させる前のゾル水溶液（アルギン酸ナトリウム水溶液），マイクロチューブの底にはゲル化剤（塩化カルシウム）が入れられてい

る．遠心力をかけることによって，キャピラリ先端からゾルが水滴となって吐出されゲル化剤に到達するとゲル粒子となる（図 1d）．内側が複数の壁で仕切られたガラス管が市販されており，それを利用すると，図 5b 左のように，複数のコンパートメントを持つマイクロゲル粒子を作ることができる[14]．コンパートメントを複数種類のゲルで作っておいて，一部のゲルだけ溶解させれば，図 5b 右にあるように，球形以外のマイクロゲル粒子も作ることができる[14]．また，遠心力をかける時に，公転だけでなく，マイクロチューブの軸（つまりキャピラリ）を中心とした自転を加えることができる自転公転遠心機（planetary centrifuge）を使い，さらにキャピラリ先端をゲル化剤に浸して水滴ではなく水柱が生成するようにすれば，図 5c のような多重らせん構造をもつマイクロファイバーを作ることができる[15]．また，マイクロチューブの底にあるゲル化剤を脂質の溶けた油相と水相に変更して水滴を吐出すれば，油中水滴の界面通過法によるリポソームの生成も実現できる（図 5d）[11]．このように，分子ロボットのボディとして使える複雑なマイクロ構造や小胞の生成が可能となる．

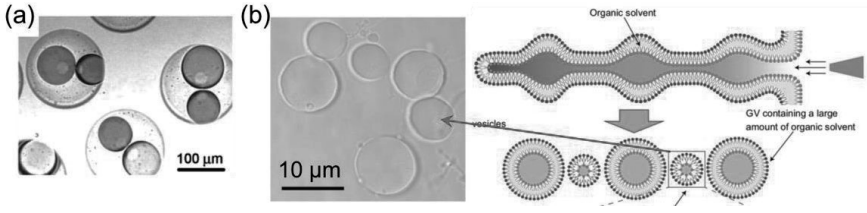


図 4　ドロップレットマイクロ流体技術によって
生成されたマイクロ水滴の応用

(a) ダブルエマルション．(b) ジェット流によるリポソーム生成．（Reprinted from (a) Langmuir 2004 [8]; (b) Nature Chem. 2016 [12]．一部改変）

まとめ

ドロップレットマイクロ流体工学は分子ロボティクスに親和性が高く，自律駆動する分子ロボットのボディの構築[16]から分子コンピューティングのためのリアクタなど様々な融合研究が考えられる．たとえば，ゲルオートマトン[17]，DNA コンピューティング[18]，DNA ゲル・DNA カプセルの構築[19,20,21]などである．今後もさらなる技術展開が期待できる．

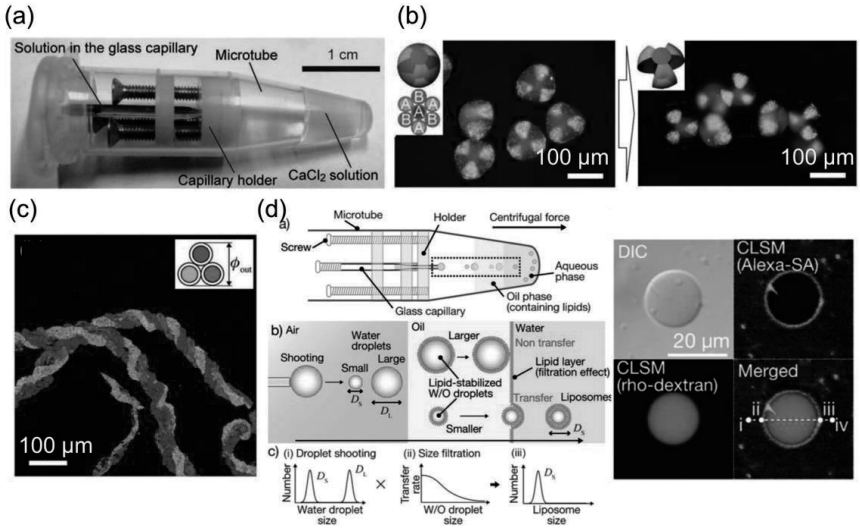


図 5　遠心キャピラリーマイクロデバイスによるゲル・リポソーム生成

(a) 遠心キャピラリーマイクロデバイス外観．(b) (a)によって作製したマルチコンパートメントゲル粒子（左）と非球形プロペラ型マイクロゲル粒子（右）．(c) (a)に自転・公転同時遠心（planetary centrifuge）をかけて生成できる多重らせんマイクロゲルファイバー．(d) (a)を応用して生成できるリポソーム．（Reprinted from (a), (b) Sci. Rep. 2016 [14]; (c) Soft Matter 2017 [15]; (d) ChemBioChem 2015 [11]．一部改変）

[1] M. Takinoue, S. Takeuchi, Droplet microfluidics for the study of artificial cells, *Anal. Bioanal. Chem.*, **400**, pp.1705-1716, 2011.

[2] J. Genot et al., High-resolution mapping of bifurcations in nonlinear biochemical circuits, *Nature Chem.*, **8**, pp.760-767, 2016.

[3] M. Weitz et al., Diversity in the dynamical behaviour of a compartmentalized programmable biochemical oscillator, *Nature Chem.*, **6**, pp.295-302, 2014.

[4] H. Sugiura, M. Ito, T. Okuaki, Y. Mori, H. Kitahata, M. Takinoue, Pulse-density modulation control of chemical oscillation far from equilibrium in a droplet open-reactor system. *Nature Commun.*, **7**, 10212, 2016.

[5] M. Ito, H. Sugiura, S. Ayukawa, D. Kiga, M. Takinoue, A bacterial continuous culture system based on a microfluidic droplet open reactor. *Anal. Sci.*, **32**, pp.61-66, 2016.

[6] E. C. Edblom, Y. Luo, M. Orban, K. Kustin, I. R. Epstein, Kinetics and mechanism of the oscillatory bromate-sulfite-ferrocyanide reaction. *J. Phys. Chem.*, **93**, pp.2722-2727, 1989.

[7] E. Karzbrun, A. M. Tayar, V. Noireaux, R. H. Bar-Ziv, Programmable on-chip DNA compartments as artificial cells. *Science*, **345**, 6198, pp.829-832, 2014.

[8] S. Okushima, T. Nisisako, T. Torii, T. Higuchi, Controlled production of monodisperse double emulsions by two-step droplet breakup in microfluidic devices. *Langmuir*, **20**, 23, pp.9905-9908, 2004.

[9] M. Abkarian, E. Loiseau, G. Massiera, Continuous droplet interface crossing encapsulation (cDICE) for high throughput monodisperse vesicle design. *Soft Matter*, **7**, pp.4610-4614, 2011.

[10] L. R. Arriaga et al., Ultrathin shell double emulsion templated giant unilamellar lipid vesicles with controlled microdomain formation, *Small*, **10**, 5, pp.950-956, 2013.

[11] M. Morita et al., Droplet-shooting and size-filtration (DSSF) method for synthesis of cell-sized liposomes with controlled lipid compositions, *ChemBioChem*, **16**, pp.2029-2035, 2015.

[12] K. Kamiya, R. Kawano, T. Osaki, K. Akiyoshi, S. Takeuchi, Cell-sized asymmetric lipid vesicles facilitate the investigation of asymmetric membranes, *Nature Chem.*, **8**, pp.881-889, 2016.

[13] Y. Morimoto, W.-H. Tan, Y. Tsuda, S. Takeuchi, Monodisperse semi-permeable microcapsules for continuous observation of cells, *Lab Chip*, **9**, pp.2217-2223, 2009.

[14] M. Hayakawa, H. Onoe, K. H. Nagai, M. Takinoue, Complex-shaped three-dimensional multi-compartmental microparticles generated by diffusional and Marangoni microflows in centrifugally discharged droplets, *Sci. Rep.*, **6**, 20793, 2016.

[15] S. Yasuda, M. Hayakawa, H. Onoe, M. Takinoue, Twisting microfluidics in a planetary centrifuge, *Soft Matter*, **13**, pp.2141-2147, 2017.

[16] M. Hayakawa, H. Onoe, K. Nagai, M. Takinoue, Influence of asymmetry and driving forces on the propulsion of bubble-propelled catalytic micromotors, *Micromachines*, **7**, pp.211-229, 2016.

[17] M. Hagiya et al., On DNA-based gellular automata, *Lect. Notes Compt. Sc.*, **8553**, pp.177-189, 2014.
[18] M. Ohara, M. Takinoue, Ryuji Kawano, Nanopore logic operation with DNA to RNA transcription in a droplet system, *ACS Synth. Biol.*, **6**, pp. 1427–1432 (2017).
[19] C. Kurokawa et al., DNA cytoskeleton for stabilizing artificial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, pp.7228-7233, 2017.
[20] D. Ishikawa, et al., Self-Assembled Microcapsule of Amphiphilic Janus DNA Nanoplates at the Water-Oil Interface, *Proc. microTAS 2016*, pp.116-117, 2016.
[21] M. Morita, et al, Formation of DNA micro-skeleton structures in water-in-oil microdroplets, *Proc. microTAS 2017*, pp.159-160, 2017.

（東京工業大学　瀧ノ上正浩）

２．８　ナノポアによる一分子計測と膜ゲートとしての可能性

はじめに

分子ロボットを構築するためには 3 つの要素－1) 知覚，2) 思考・判断，3) 運動－が必要である．リポソーム型ロボットの場合，外界の化学物質を知覚する装置として生物と同様に膜タンパク質受容体，もしくは人工的に作製した膜ゲートの利用が考えられる．膜タンパク質では，特定物質と結合すると下流にシグナル伝達をする G タンパク質共役受容体などの複雑なシステムを持つものの他に，膜電位を感受してイオンを流す電位依存性イオンチャネル，単にポアを形成し物質の輸送を行うナノポアタンパク質がある．それらの輸送様式として，ATP などのエネルギーを使う能動輸送，濃度や電位勾配に従った物質移動による受動輸送がある．ナノポアタンパクは膜中に比較的大きな孔を形成し，サイズ選択的に物質のやりとりを行うことができ，他の膜タンパク質と比較し高い安定性，膜への再構成が容易などの利点があることから分子ロボットの膜ゲート開発の端緒となりうる．このナノポアタンパクとして主に用いられている α-hemolysin (αHL)はナノポア計測と呼ばれる一分子計測にも用いられ，一分子 DNA の検出，DNA シーケンスへの応用研究が行われている．またこの DNA 分子とナノポアのサイズマッチングが高い性質を利用し，DNA コンピューティングや DNA ナノテクノロジーと組み合わせた分子ロボットの構築がで

きると期待する．本項ではナノポアタンパク質，ナノポア計測の基本原理，および最近の DNA コンピューティング技術と組み合わせた応用研究について概説する．

ナノポア計測の原理

１）ナノポア計測とは

ナノポア計測とは，1940 年代後半に Coulter が提唱した電気的検知帯法(コールター原理)をもとに，それをナノスケールに拡張させたものだと考えることができる．人工細胞膜(脂質二分子膜)中にチャネルを形成する膜タンパク質(ナノポア)を再構成させ，膜の両側に電圧を印加する．これにより，電気泳動によってナノポアを通過する分子を一分子レベルでリアルタイムに観測することが可能になる．

チャネルを形成する膜タンパク質としては，従来，toxin チャネルとして知られる αHL が広く用いられてきた．その理由として，αHL は直径 1.4 nm のポアを安定に形成することから，直径約 1 nm の一本鎖 DNA (ssDNA)の検出や配列シーケンスに適していることが挙げられる．その他に Mycobacterium smegmatis porin A (MspA)や Aerolysin など，主に直径 1-2 nm 程度の膜貫通チャネルがナノポア計測に使用されてきた(図 1)．膜タンパク質以外にも，固体材料にナノ孔を形成する固体ナノポア[1]や，最近では DNA origami で作製したナノポアが報告されている[2].

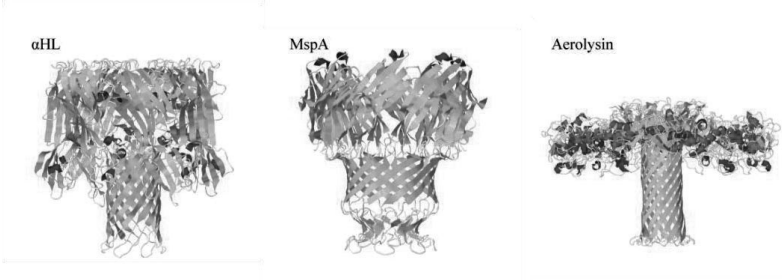


図 1　αHL, MspA, Aerolysin の PDB 構造データ

２）ナノポア計測のセットアップ

ナノポア計測においては，二つのウェルにそれぞれ電極(一般的に Ag/AgCl 電極を使用)を設置し，ウェル内を電解質溶液(主に塩化カリウム溶液)で満たしたのち，その境界面に安定な脂質二分子膜を作製することが求められる．その

ため，脂質には室温で高い安定性を示す人工脂質である diphytanoyl phosphatidylcholine (DPhPC)が用いられることが多い．電極として Ag/AgCl が使われる理由としては, 電極表面で銀と塩化銀の間で常に酸化還元反応が起こり，電位が常に一定に保たれる（平衡電位）ため分極が起きず電極間に任意の電位勾配が形成できるためである. 電解質としては塩化カリウムが一般に用いられる．これは，溶液内での塩化物イオンとカリウムイオンの移動度がほぼ等しく正負のコンダクタンス差が小さいためである．

平面脂質二分子膜作製法に関しては複数あるが, その一つに, 1972 年に Montal と Mueller により発表された Montal-Mueller (MM)法[3]が挙げられる．MM 法では，接触面の一部が開口している二つのウェルに水溶液を滴下し，気液界面に脂質の単層膜を広げたのち, 水面を上下させることで開口部に二分子膜を作

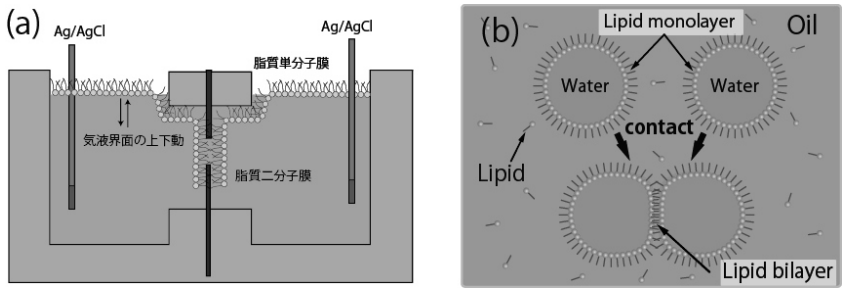


図 2　平面脂質膜作製法の一つである MM 法の概要

(a) 気液界面の上下動により脂質膜が形成される (Reprinted from *生物物理* 2015 [4]).

(b) 液滴接触法の概要．二つの油中水滴を接触させることで境界面に脂質二分子膜が形成される(Reprinted from *Sci. Rep.* 2013 [5]).

製する(図 2a)．他にも，脂質溶液を直接穴に塗布することで脂質二分子膜を形成する Painting 法があるが，これらの作製法は習得に時間がかかる他，膜の安定性においても課題があった．これを受けて 2006 年に Funakoshi らによって新たに提唱されたのが液滴接触法[6]である．液滴接触法では，疎水性の円形のウェルに脂質溶液と水溶液を順に滴下する．このとき，脂質溶液は円形のウェルの側面に広がり，外側に疎水性尾部を向ける．この状態で二つの液滴を接触させると接触面に平面脂質二分子膜が作製される(図 2b)．筆者らは，これをさらに発展させ, 液滴の接触面積を小さくすることで膜の安定性を飛躍的に向上させ，およそ二週間の膜の保持を可能にした[5].

３）チャネル電流の見方と解析法

上記のようにして平面膜を作製したのち, 脂質二分子膜にナノポアが形成さ

れると，イオン由来の電流が流れる．この微小電流をパッチクランプアンプにより増幅することで図 3a のような電流シグナルが得られる．このとき，電流の上昇幅のコンダクタンス(電流/電圧)とポアの全長，イオンの抵抗率から，Hille の式を用いて，形成されたポアの直径を算出することができる[7]．また，このナノポア内をイオンより大きな物質が通過すると，イオンの流れが一時的に阻害され，電流値が減少する(図 3b)．このときの阻害電流の，阻害時間と阻害率を 2 次元プロットによりグラフ化すると，通過する物質の大きさや特性に応じてその分布が変わる(図 3c)[8]ことから，通過分子の同定を統計的に行うことができる．

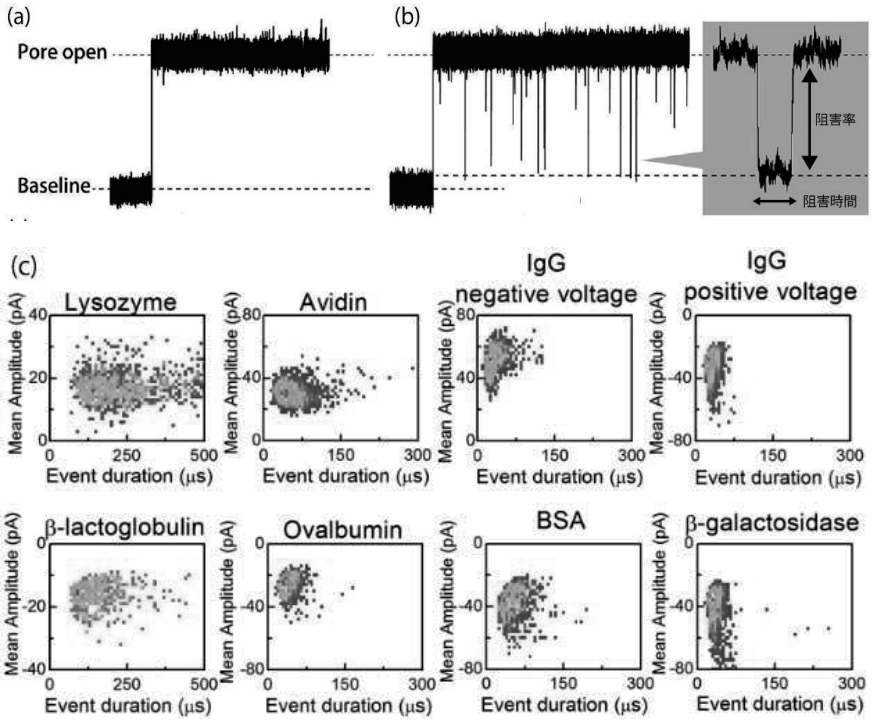


図 3 ナノポアを流れる電流

(a) ナノポアが形成されると電流値が上昇する．(b) ナノポア内を分子が通過すると阻害電流が観察される (Reprinted from *Anal. Chem.* 2017 [9]). (c) 阻害率(阻害電流値)と阻害時間の関係を示したスキャッタプロット．通過分子の違いにより分布に差異がみられる (Reprinted from *ACS Nano* 2013 [8]).

また，ナノポア自体の性質に関しても電流計測で評価できることが知られて

いる．ポアにかけた電圧とポアを流れる電流値の関係をプロット(*I-V* curve)したとき, ポア形状が対称的であるほどそのプロットに線形性がみられることがわかっている[10]. ナノポア上下の塩濃度に勾配をつけて *I-V* curve を作成すると，ナノポア自体のイオン選択性を評価できることも報告されている[11].

ナノポア計測の応用:DNA シーケンス

１）DNA シーケンスの歴史

第一世代のシーケンサではイギリスのフレデリック・サンガーが発明したサンガー法が用いられている．1977 年に発表されたサンガー法は，配列を特定したい DNA を鋳型として DNA の構成材料であるジデオキシヌクレオチド (dNTP)を加え様々な長さの DNA 断片を合成し，配列を決定した[12]．1990 年に始まった「ヒトゲノム計画」では，このサンガー法を利用し，2003 年に全配列の解読に成功した．しかし，処理スピードが遅く，ヒト 1 人分のゲノムを解読するのに数年を要した. そこで処理スピードを向上させるために様々な技術開発が行われ，2005 年には第二世代のシーケンサが登場した．第二世代シーケンサでは大量の DNA 断片を並列して読むことを可能とし，従来の 100～1 千倍の解読速度を達成した．しかし第二世代までのシーケンスでは DNA の増幅が必須であり, エラー増幅等のリスクが生じた．そこで第三世代や第四世代と呼ばれる DNA の増幅を必要としない一分子シーケンサが登場した．

第三世代では，蛍光検出を利用し，ナノウェル基盤に固定された 1 分子の DNA とポリメラーゼに対して，塩基を取り込ませ放出された蛍光分子をモニタすることで一分子シーケンスを可能とした(Zero-Mode Waveguide)．その後，電気検出を用いることで酵素反応を必要とせず DNA を直接検出できるナノポアシーケンサが登場した．その一つである Oxford Nanopore 社の MinION は，USB ほどの小型でありながら高い精度とロングリードを実現した．これらの一分子シーケンサの登場でこれまで莫大な費用を要していたゲノム解析コストを大幅に低下させ (図 4)，ヒトゲノムを$1000 で解析することを実現した[13].

２）ナノポアシーケンスの歴史

ナノポアによるシーケンスの可能性は, 1996 年, Kasianowicz らにより PNAS 誌によって初めて報告された[14-15]．この論文では，ナノポアと呼ばれるナノサイズの孔を 1 本鎖 DNA が通過する際に塩基の種類によりイオン電流値が変化することで DNA の塩基配列が決定できる可能性があると報告されていた．

ナノポアシーケンサには膜タンパク質の一種である αHL や MspA といった DNA を通過させることが可能なナノポアが用いられている．しかし，ナノポア内の DNA 通過速度が速すぎることから一塩基ごとに異なるイオン電流の計測が難しく，解読エラーなどの課題が挙げられた[16]．そのため溶液の粘性増大や電圧の調節など物理的条件の検討が行われてきた．様々な検討が行われ

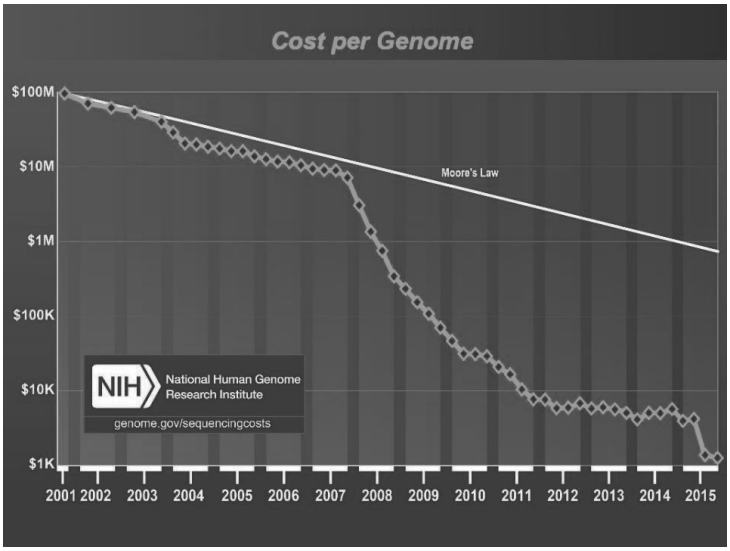


図 4 ゲノムシーケンスのコスト推移

(Reprinted from *National Human Genome Research Institute* [17])

た結果, ナノポアにヘリカーゼのようなモータータンパク質を結合させることで DNA の通過速度が制御された．具体的には読みたい配列の末端にモータータンパク質が付いたアダプター配列を付加することでポア通過時にモータータンパク質により 2 本鎖が 1 本鎖となりゆっくりと DNA がポア内を通過する(図 5)．現在，Oxford Nanopore Technologies 社から発売されている DNA シーケンサ MinION (図 6)は，小型かつ$1000 という低価格を実現し，ナノポアで読み取った塩基データをリアルタイムに解析することができる. また読み取り精度も 97.4%を超えており, 感染症等のウイルスや細菌類のその場診断が期待されている．またナノポアシーケンサでは，DNA の増幅や合成を必要としないため DNA や RNA にアダプターを付加することで直接シーケンスが行える．そのため抽出した DNA や RNA のフラグメントの長さに依存したリード長を得ることが可能であり，800 kb を超える長鎖の DNA シーケンスも報告されて

いる[14].

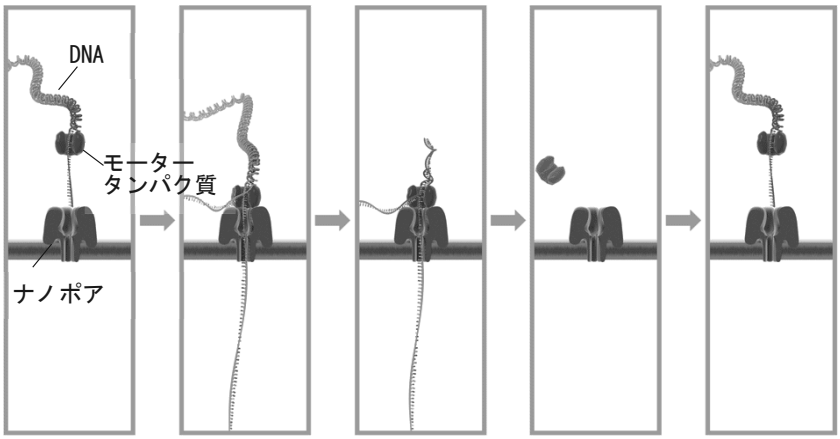


図 5 ナノポアによる DNA の解読 (Reprinted from *F1000Research* 2017 [18])

ナノポア計測の応用：核酸以外の分子

1）低分子化合物

前述のナノポアシーケンスのように，ナノポア計測においては，ポアの直径と標的分子のサイズが近い必要がある. ポアの大きさに対して標的分子のサイズが小さすぎると，分子のポア内通過が速すぎて阻害電流(図 3b)が得られない. そのため，核酸以外の分子，とりわけ低分子化合物といったサイズの小さな分子の検出においては，ナノポア内に修飾を施し，そのポア径を調整することで検出をする手法が用いられた．その例として，1999 年には Gu らが変異 αHL 内にシクロデキストリンを挿入・留置することで，ポア径を狭め，有機分子の検出を行った[19].

その後，同様の方法を用いて，二種類以上の金属イオンの同定[20]や，薬物の光学異性体の判別[21]も報告されている．これらの研究では αHL ポア部分のアミノ酸に変異を加え，標的分子との相互作用を調整することで，より標的分子の同定を簡単にしている．他にも筆者らは αHL を用いたコカインの検出を報告している[22]．コカイン特異的に結合する DNA アプタマーをポア内に挿入することで，一分子の選択的検出を可能にし(図 7a)，300 ng/mL の濃度のコカインを 60 秒以内に検出することに成功した．このように，ナノポア内環境を変化させることで，より特異的かつ高感度な検出が可能になる．

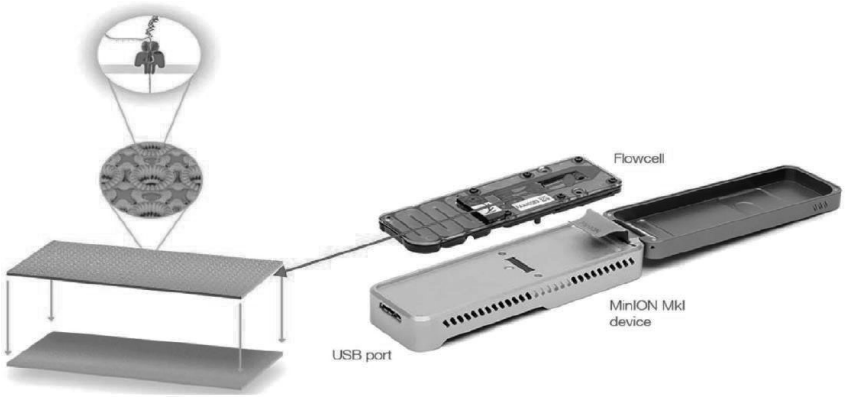


図 6　小型シーケンサ MinION　(Reprinted from *Biotechnol. J.* 2018 [23]).

2）高分子化合物

ナノポアで計測できるのは低分子だけではない．2007 年には，Robertson らが αHL 内に大きさの違うポリエチレングリコールを挿入し，阻害電流の大きさから質量分析が行えることを報告した(図 7b)[24]．また，後述する固体ナノポアを用いた，ポリスチレンなどの高分子ナノ粒子の検出も行われている[25]．質量や大きさが既知の高分子を用いた測定を可能にしたことで，ナノポア計測が溶液中の分子のリアルタイム・非破壊での特性決定に有用であることが示唆された．

3）タンパク質

従来用いられてきた αHL などの膜タンパク質ナノポアは，そのポアサイズが 1-2 nm 程であることから，それより大きな物質を検出することができない．そのため，タンパク質分子など数 nm 以上のサイズをもつ分子や粒子を検出する際は，一般的に，固体ナノポアとよばれる，固体材料に人工的に孔を形成したナノポアを用いることが多い．この固体材料としては，窒化ケイ素膜やグラフェンなどが使われ，TEM で電子線を当て細孔を形成する．これらの固体ナノポアを用いて，BSA[26]やアビジン[27]，プロテアーゼ[28]など様々なタンパク質の検出が報告されてきた．固体ナノポア以外にも，筆者らは従来用いられてきた膜タンパク質よりも大きなナノポアタンパク質の再構成を試みており，実際に Perforin を用いた GranzymeB の検出を報告している[9]．

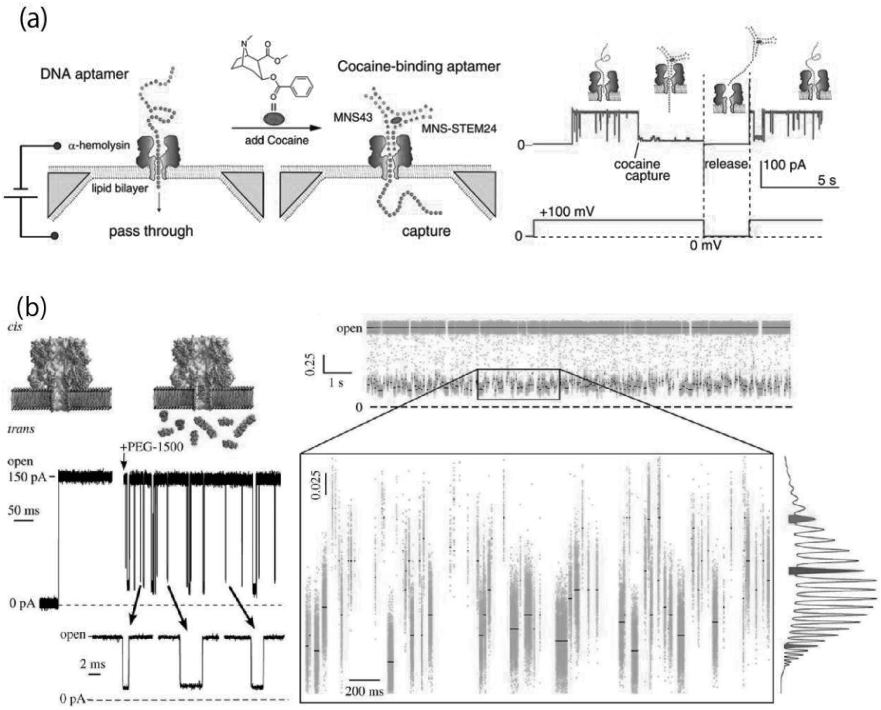


図 7　ナノポア 一分子計測

(a) DNA アプタマーを用いたナノポア一分子計測．コカイン分子存在下では DNA と複合体を形成しポアを塞ぐ (Reprinted from *J. Am. Chem. Soc.* 2011　[22]).　(b) αHL を用いた PEG の質量分析．実際の MS(右下)同様，分子量特異的な阻害電流値(右上)が得られた (Reprinted from *J. R. Soc. Interface* 2018 [29]).

ナノポア計測の応用:microRNA

１）microRNA とは

microRNA(miRNA)は 21~25 塩基程度からなるノンコーディング RNA の一種であり，真核生物において遺伝子の転写後発現調節に関与している．miRNA は，まずヘアピン構造を持つ pri-miRNA として転写され,その後 RNA 分解酵素 Drosha により中間産物 pre-miRNA に変換される．Pre-miRNA はさらに Dicer によって切断され二本鎖の miRNA となり，その片方もしくは両方が miRNA となり遺伝子発現調節を行う(図 8) [31]．miRNA は細胞や器官・臓器の分化への関与だけではなく，癌細胞からの過剰発現や癌の転移や浸潤に関係している

と報告されている．そのため miRNA をバイオマーカーとした診断システムの構築や miRNA の異常発現を抑制する治療薬の研究が行われている．

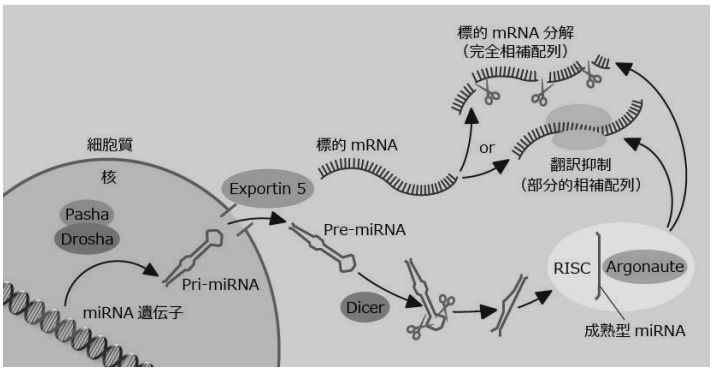


図 8　miRNA 生合成経路 (Modified *Circ. Heart. Fail. 2014* [31]).

２）一般的な miRNA の検出法

miRNA の検出にはマイクロアレイ法や定量的逆転写 PCR 法が用いられている．マイクロアレイ法はプローブを用いて miRNA を検出する手法であり，ガラス基板上に数千から数万種類のプローブを結合させることで，それらに対応した miRNA を同時に検出することができる．しかし，低濃度の miRNA に対しては感度が低く，精製が必要となることや，標的 miRNA の数だけプローブを用意する必要があることからコストの増大が課題として挙げられる．一方，定量的逆転写 PCR は，miRNA を鋳型として cDNA を作製し，PCR により増幅を行うことで発現量を定量することができる．しかし，短鎖の miRNA を増幅するための前処理や逆転写反応といった操作の煩雑さのため検出までに時間を要することが課題として挙げられる[32].

３）ナノポアによる miRNA 計測：miRNA 発現パターン認識

ナノポア計測による miRNA の検出は，迅速，ラベルフリー，電気的検出といういくつかの利点がある．ナノポアセンシングを用いることでこれまで必要とされていた逆転写反応や PCR 反応を介することなく直接 miRNA を検出することが可能である．ここでは，ナノポアを用いた癌特異的に過剰発現する miRNA の検出について紹介する．Wang らは，肺癌特異的に過剰発現する miR-155 をプローブとハイブリダイズさせ，ナノポアで検出を行うことで miRNA 単体やプローブ単体に比べて長時間の電流阻害を示すことを見出した．これを利用し，実際の肺癌患者の血漿サンプルで miR-155 の検出を行ったところ健常者よりもこのシグナルが多く観察されたと報告されている[33]．しかし，癌

になった時に異常発現を示す miRNA は 1 種類ではなく，異なる癌で異なる

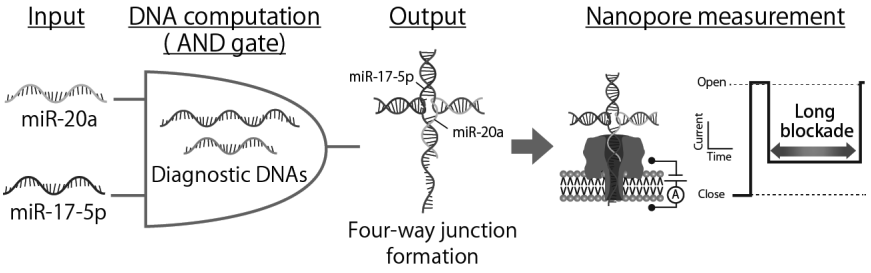


図 9　AND ゲートによる miRNA 発現パターン認識

(Reprinted from *Anal.Chem.* 2018 [33])

miRNA の発現パターンを示すことが報告されている．

そのため，癌特異的な miRNA 発現パターンの認識が求められている．筆者らはナノポアセンシング技術と DNA コンピューティング技術を組み合わせることで癌特異的 miRNA 発現パターンの認識システムの構築を行っている．DNA コンピューティング技術とは，DNA 分子を用いて計算を行うシステムである．この一つである AND 演算を利用することで発現パターンの認識に成功している．具体的には，小細胞肺癌において過剰発現する二種類の miRNA を入力分子とし，この二つが同時に発現する場合のみ DNA と miRNA が四つ叉構造を作るように設計した．これを出力分子としてナノポアにより阻害時間として出力を行うことで発現パターンの認識を可能とした(図 9) [34]．さらに小細胞肺癌から分泌される miR-20a が存在すると認識し，小細胞肺癌の腫瘍抑制を行うアンチセンス核酸医薬を自律的に合成し放出する「セラノスティクス（therapy＋diagnosis）」系の構築にも成功している[35]．実際の診断に利用する場合には miRNA の濃度が問題とされるが miRNA を等温増幅反応により検出可能な濃度にまで増幅することで低濃度からの検出にも成功している[36]．この技術を用いると 1 フェムトモルの miRNA からでも検出が行えるため，体液から直接検査する簡易診断への応用が期待される．

おわりに

ナノポアタンパクは脂質膜にナノ孔を形成し，サイズ選択的に物質を受動輸送する．このナノポアを用いた計測は電気的，ラベルフリー，迅速に一分子レベルの測定が可能である．このナノポア計測により膜ゲートとなる膜タンパク質や人工膜ゲートの機能評価－ポアサイズ，分子選択性など－が可能になる．

またDNAコンピューティング技術との組み合わせにより，分子ロボットの感覚と知能の機能を付与することができると考えている．例えば前述したようなセラノスティクスのシステムをリポソーム型ロボットに搭載し，腫瘍近傍に近づくと，高濃度に分泌された癌マーカーmiRNAがナノポアを介しリポソーム内に入る．すると内部でアンチセンス薬剤を合成し，高浸透圧によりリポソームを自律的に崩壊させ薬剤を放出する，というような診断と治療を同時に行う分子ロボットが造れるのではないだろうか．

[1] Wanunu, M. Nanopores: A journey towards DNA sequencing. *Phys. Life Rev.* **9,** 2**,** 125–158, 2012.

[2] Howorka, S. Building membrane nanopores. *Nat. Nanotechnol.* **12,** 7**,** 619–630, 2017.

[3] Montal, M. & Mueller, P. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **69,** 12**,** 3561–3566, 1972.

[4] Kawano, R. 液滴型人工細胞膜を用いた膜タンパク質計測. 生物物理 **55,** 2**,** 077–080, 2015.

[5] Kawano, R. *et al.* Automated parallel recordings of topologically identified single ion channels. *Sci. Rep.* **3,** Dcm**,** 1–7, 2013.

[6] Funakoshi, K., Suzuki, H. & Takeuchi, S. Lipid bilayer formation by contacting monolayers in a microfluidic device for membrane protein analysis. *Anal. Chem.* **78,** 24**,** 8169–8174, 2006.

[7] Hille, B. Ion channels of excitable membranes. Sunderland, MA. 2001.

[8] Li, W. *et al.* Single protein molecule detection by glass nanopores. *ACS Nano* **7,** 5**,** 4129–4134, 2013.

[9] Watanabe, H. *et al.* Analysis of Pore Formation and protein translocation using large biological nanopores. *Anal. Chem.* **89,** 21**,** 11269–11277, 2017.

[10] Patricio Ramírez, Pavel Yu Apel, J. C. and S. M. Pore structure and function of synthetic nanopores with fixed charges: tip shape and rectification properties. *Nanotechnology* **19,** 31**,** 315707, 2008.

[11] Rollings, R. C., Kuan, A. T. & Golovchenko, J. A. Ion selectivity of graphene nanopores. *Nat. Commun.* **7,** 1–7, 2016.

[12] 西村尚子．シークエンシングの新たな時代．Nature Japan 特集記事 2007 at: https://www.natureasia.com/ja-jp/jobs/tokushu/detail/57.

[13] 谷口正輝. 1分子シークエンサーの現状と可能性. 化学と生物 **54,** 6**,** 396–402, 2016.

[14] 実験医学 2018年1月号 Vol.36 No.1 どこでも 誰でも より長く ナノポアシークエンサーが研究の常識を変える！. 9, 12–15,

[15] D., D. D. W. Characterization of individual polynucleotide molecules using a membrane channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93,** November**,** 13770, 1996.

[16] Feng, Y. *et al.* Nanopore-based fourth-generation DNA sequencing technology. *Genomics, Proteomics Bioinforma.* **13,** 1**,** 4–16, 2015.

[17] National Human Genome Research Institute. The Cost of Sequencing a Human Genome. Available at: https://www.genome.gov/27565109/the-cost-of-sequencing-a-human-genome/.

[18] de Lannoy, C., de Ridder, D. & Risse, J. A sequencer coming of age: De novo genome assembly using MinION reads. *F1000Research* **6,** May**,** 1083, 2017.

[19] Gu, L. Q. *et al.* Stochastic sensing of organic analytes by a pore-forming protein containing a molecular adapter. *Nature* **398,** 6729**,** 686–690, 1999.

[20] Braha, O. *et al.* Simultaneous stochastic sensing of divalent metal ions. *Nat. Biotechnol.* **18,** 9**,** 1005–1007, 2000.

[21] Kang, X. F. *et al.* Stochastic detection of enantiomers. *J. Am. Chem. Soc.* **128,** 33**,** 10684–10685, 2006.

[22] Kawano, R. *et al.* Rapid detection of a cocaine-binding aptamer using biological nanopores on a chip. *J. Am. Chem. Soc.* **133,** 22**,** 8474–8477, 2011.

[23] Kawano, R. Nanopore Decoding of Oligonucleotides in DNA Computing. *Biotechnol. J.* **13**, 12, 1800091, 2018.

[24] Robertson, J. W. F. *et al.* Single-molecule mass spectrometry in solution using a solitary nanopore. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104,** 20**,** 8207–8211, 2007.

[25] Lan, W. J. *et al.* Nanoparticle transport in conical-shaped nanopores. *Anal. Chem.* **83,** 10**,** 3840–3847, 2011.

[26] Han, A. *et al.* Sensing protein molecules using nanofabricated pores. *Appl. Phys. Lett.* **88,** 9**,** 1–4, 2006.

[27] Firnkes, M. *et al.* Electrically facilitated translocations of proteins through silicon nitride nanopores: Conjoint and competitive action of diffusion, electrophoresis, and electroosmosis. *Nano Lett.* **10,** 6**,** 2162–2167, 2010.

[28] Waduge, P. *et al.* Nanopore-based measurements of protein size, fluctuations, and conformational changes. *ACS Nano* **11,** 6**,** 5706–5716, 2017.

[29] Misawa, N. *et al.* Membrane protein-based biosensors. *J. R. Soc. Interface* **15**,

141, 1472-5689, 2018

[30] **臨床・創薬利用が見えてきた** microRNA (**遺伝子医学**MOOK 23 号). 214–215, 2012.

[31] Melman, Y. F., Shah, R. & Das, S. MicroRNAs in heart failure is the picture becoming less miRNA *Circ. Hear. Fail.* **7,** 1**,** 203–214, 2014.

[32] 保皓大, 平谷萌恵 & 川野竜司. ナノポアを用いたマイクロRNAの迅速診断技術と応用展開. *Pharm stage* **17,** 1**,** 62–65, 2017.

[33] Wang, Y. *et al.* Nanopore-based detection of circulating microRNAs in lung cancer patients. *Nat. Nanotechnol.* **6,** 10**,** 668–674, 2011.

[34] Hiratani, M. and Kawano, R. DNA Logic operation with nanopore decoding To recognize microRNA patterns in small cell lung cancer. *Anal. Chem.* 2018. doi:10.1073/pnas.0611085104

[35] Hiratani, M., Ohara, M. & Kawano, R. Amplification and quantification of an antisense oligonucleotide from target microRNA using programmable DNA and a biological nanopore. *Anal. Chem.* **89,** 4**,** 2312–2317, 2017.

[36] Zhang, H. *et al.* MicroRNA detection at femtomolar concentrations with isothermal amplification and a biological nanopore. *Nanoscale* **9,** 42**,** 16124–16127, 2017.

（東京農工大学　高井なつみ，多田あすか，竹内七海、川野竜司）

第3章
分子ロボットのための分子ナノテクノロジー

3．1　DNA オリガミ技術の動向

はじめに

DNA を望みの二次元/三次元ナノ構造へと折りたたんでいく DNA オリガミ技術．2006 年に発表されて以降，その発展と普及はめざましく，今やすっかり DNA ナノテクノロジーにおける定番技術となっている．ここでは，その設計原理と進歩を振り返りながら，動向を整理していきたい．

二次元の DNA オリガミ

DNA オリガミはスキャフォールド鎖と呼ばれる長鎖一本鎖 DNA を多数の短鎖一本鎖 DNA（ステープル鎖）によって望みの形状へと折りたたむことで得られるデザイン可能な DNA ナノ構造である（図 1）[1].

DNA オリガミの設計は，まず，目標とする形状を実現するようなスキャフォールド鎖の経路（パス）を描くところから始まる．一般には，平行に並んだ走査線に沿って環状一本鎖を一筆書きの要領でジグザクに折りたたんでいく．（厳密には制約が異なるが,）日本人の感覚としては,「折り紙」よりも「あやとり」に近いかもしれない．スキャフォールド鎖は一本の紐なので，そのままでは形状は固定されない．そこで，折りたたんだ形状を固定するように，相補鎖としてステープル鎖をあてがい, 構造を形づくるすべての鎖で二重らせんを形成させる．この際，スキャフォールド鎖の離れた三ヶ所を抱き合わせ，平行に隣り合わせていくようにステープル鎖の配列を設計する．

2006 年に Rothemund が発表した二次元 DNA オリガミであるが，もともとはダブルクロスオーバー（DX）タイルなどのモチーフのアセンブリから発展してきている．二次元 DNA オリガミにおいては，構造を形づくるすべての二重らせんが同一平面上に並ぶように, 一定周期ごとにクロスオーバーを配置していく必要がある．具体的には，1.5 ターンごとにらせんの反対側にクロスオーバーが位置するようにスキャフォールド鎖とステープル鎖の経路を調整し

ていく（図 1b）．B 型 DNA の構造周期（10.5 bp）に基づくと，この 1.5 ターンは約 16 塩基に相当する．通常，ステープル鎖は 16 塩基ごとにらせんを乗り越えていくように配置され，前のらせんと反対側の次のらせん，それぞれにおいて 8 bp ずつ二本鎖を形成するように設計される．したがって，各ステープル鎖の配列長は 32(=8+16+8)塩基が目安となる．

DNA オリガミの作製に必要なステープル鎖の本数は，スキャフォールド鎖の全長やサイズに依存する．例えば，7249 nt の M13mp18 ssDNA（詳細後述）をスキャフォールド鎖とし，100 nm×100 nm 程度の DNA オリガミを作製する場合には，約 230 種程度のステープル鎖が必要となる．ステープル鎖は望みの形状に合わせて配列設計され，同じ塩基配列のスキャフォールド鎖を利用したとしても，ステープル鎖のセットを変更すれば，別の形状が構築される．

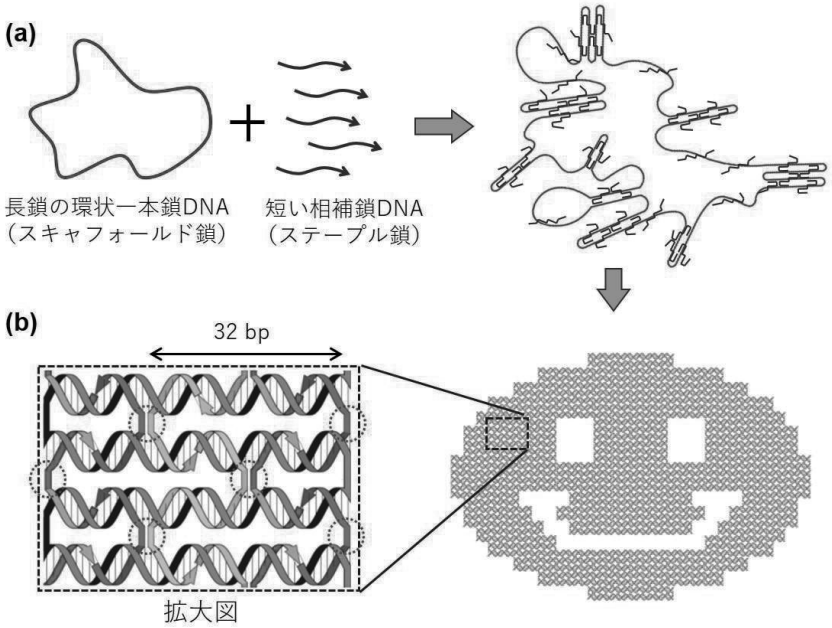


図 1　DNA オリガミ作製の流れ

（a）長鎖環状一本鎖 DNA（スキャフォールド鎖）を構造に合わせて配列設計した多数の短い相補鎖（ステープル鎖）によって望みの形状へと折りたたんでいく．通常，スキャフォールド鎖と必要なステープル鎖の混合溶液を加熱・徐冷（アニーリング）することで，DNA の自己集合により設計したナノ構造が構築される．(b)二次元 DNA オリガミにおいては二重らせんが同一平面に並ぶように，クロスオーバーの間隔を調整する．

DNA オリガミ技術が急速に普及した一因として，この汎用性の高さがあげられるだろう．

三次元の DNA オリガミ

三次元の DNA オリガミは，二次元における設計アプローチを拡張することで作製できる．2009 年には，世界各国の研究グループからさまざまな 3 次元 DNA オリガミが相次いで報告された[2-5]．作成方法は大きく分けて二種に大別できる．ひとつは，二次元のオリガミ平面を中空状の多面体構造へと折りたたむ手法である（図２）[2,4,5]．この手法では，まず，一本のスキャフォールド鎖を用いて多面体の展開図となる二次元平面の DNA オリガミを設計する．ここへ，各面の端同士を指定の接続関係で繋ぎとめるような配列を導入し，三次元的に組み立てていくことで目的の多面体構造を構築する．Anderson らが作製した DNA オリガミボックスは，立方体の一面が開閉できるよう設計されており，DNA 鎖の鎖置換反応により開け閉めが制御されている[2].このような開閉機構を備えた中空構造の魅力は，何といっても内部にさまざまな分子を閉じ込められる点であろう．もちろん，閉じ込めた分子を特定の刺激で放出させることも可能であり，金ナノ粒子やタンパク質をカーゴとした例において実証されている[6].

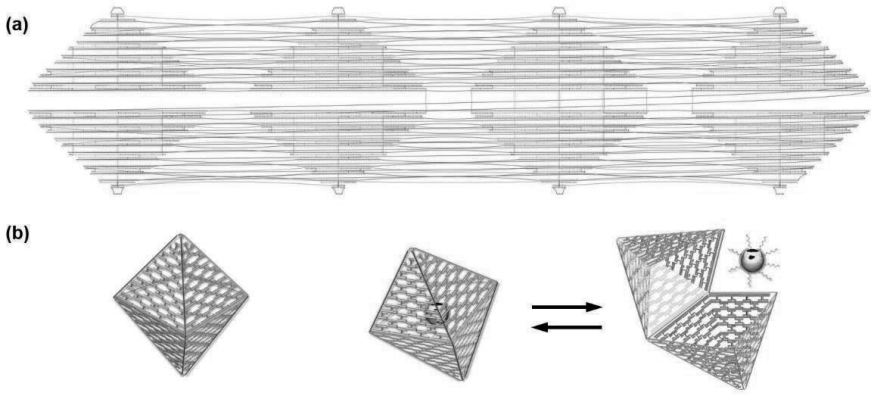


図２　二次元の DNA オリガミを組み立てることによって構築される三次元構造

（a）正八面体 DNA オリガミカプセルの展開図．（b）金ナノ粒子を導入した DNA オリガミカプセル．光反応と鎖置換反応によって，カプセルの開閉と金ナノ粒子の放出操作が可能 [6].

三次元 DNA オリガミ構造を作製するもう一つの手法は，Douglas らにより開発された[3]. B 型 DNA は 21 bp で 2 ターンするため, 7 bp ごとに 2/3（240°）ターンすることになる．これらの間隔でクロスオーバーを配置し，DNA 二重らせんを隣接させていくと，120°の角度で DNA の二重らせんがブリーツ（折りひだ）状に並んだシートを設計することができる．これを層状に折りたたんでいくと，断面に DNA の二重らせんが蜂の巣（ハニカム）状に配置された三次元構造を構築できる．断面の特徴にちなんで，ハニカム DNA オリガミとも呼ばれる．

このハニカム型の手法で作製した三次元 DNA オリガミにねじれや曲げを導入する手法も考案されている[7]. ハニカム状の DNA バンドルを形成する DNA 鎖の一部だけをクロスオーバー間隔の基準となる 7 bp より短く，あるいは長くすると，その変化を解消する向きにトルクが発生する．このことを利用し，

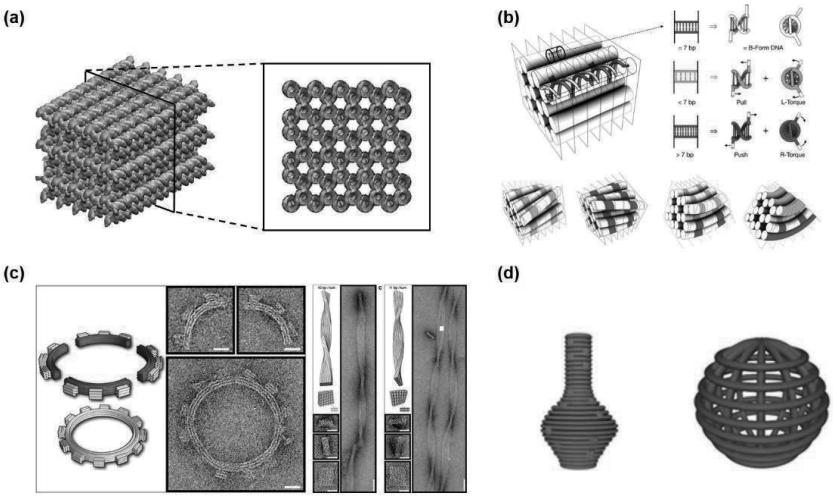


図 3　さまざまな三次元 DNA オリガミ

（a）ハニカム DNA オリガミの模式図．断面には DNA 二重らせんが蜂の巣（ハニカム）状に並ぶ．（b）曲げとねじりの導入方法．ハニカム状に並んだバンドルを 7 bp ごとのセクションに区切り，その一部を基準となる 7 bp から変化させる．(Reproduced with permission from ref [7], 2009 American Association for the Advancement of Science (AAAS).)（c）曲げやねじれを導入したハニカム DNA オリガミの例．(Reproduced with permission from ref [7], 2009 AAAS.)（d）曲率を持った中空三次元 DNA オリガミ. (Reproduced with permission from ref [9], 2014 American Chemical Society (ACS).)

全体の形状を考えながらバランス良く部位ごとの塩基数調整をしていくと，構造の曲げやねじれを変化させることができる．二重らせんそのものの柔軟性とハニカム状のバンドルの堅牢さが上手くバランスすることで成立している技巧ともいえるだろう．一見では，とても DNA からできているとは思えない複雑な形状が Dietz らによって実現されている．

もともとはハニカム DNA オリガミに対して考案された曲げる手法であるが，同様の考え方を従来の DNA オリガミに適用すると，バリエーションに富んだ形状が作製可能となる．DNA 鎖が同心円状に並んだ二次元 DNA オリガミや球状や壺状など曲面を持った中空の三次元 DNA オリガミが Yan らによって報告されている[8,9].

ここまで紹介してきた DNA オリガミ法は，いずれの場合も設計の基本は二重らせんを平行に束ね，クロスオーバーで繋げていくことにあった．近年では，スキャフォールド鎖を，二重らせんを梁としたワイヤーフレーム状のナノ構造体へと折りたたんでいく手法も考案されている[10-12]. 従来のオリガミ法とは異なる新しい設計手法の登場によって，DNA ナノ構造の構築の幅はさらに広がりをみせていると言えるだろう．

スキャフォールド鎖の選定と工夫

DNA オリガミのスキャフォールド鎖としては，塩基配列が既知の一本鎖 DNA を用いる．通常は，M13 というファージ由来の環状一本鎖 DNA（M13mp18 ssDNA，7249 nt）を使用する．この M13mp18ssDNA は塩基配列が比較的ランダムであり，かつ分子内二次構造を取りにくいことが知られている．これらの性質が規定の位置へのステープル鎖の結合を保証しており，DNA オリガミの高収率作製を可能としている．今日では，M13mp18 ssDNA を改変し，長くした p8064(8064 nt)や p7560(7560 nt)といった一本鎖 DNA も，DNA オリガミ用のスキャフォールド鎖として市販されている．（8064 も 7560 も，７と８の公倍数になっていることに注目してほしい．8064 は 21 と 32 の公倍数でもある．）

実際の DNA オリガミ作製において，上述のスキャフォールド鎖の塩基を余すところなくすべて使用することはむしろ珍しい．目的の大きさの形状に必要な領域のみをステープル鎖と結合させ，余った領域は一本鎖 DNA のループとして構造体の邪魔にならない位置へ逃すのが通例である．しかし，望みのオリガミ構造が極端に小さい場合は一本鎖 DNA 領域が大きくなりすぎてしまい，

どちらが構造の主体かわからなくなってしまう．このような場合は，M13mp18 ssDNA を制限酵素で切断することで，適切な長さのスキャフォールド鎖を用意する[13]．切り出した一本鎖 DNA は線状のまま用いても良いが，ライゲーションにより環状にすることで，末端からの分解を防ぐことができる．Endo らの研究グループは，この手法で用意したスキャフォールド鎖からサイズの異なる DNA オリガミナノケージを作製し，微小空間における DNA の四重鎖構造の安定化の検証実験に利用している[14].

ステープル鎖のアドレス性と化学修飾

あるオリガミ構造を作製するために用意されたステープル鎖のセットは，すべて互いに異なる配列を有している．そのため，形成された DNA オリガミは座標がアドレス可能な構造となる．設計上では，ステープル鎖の末端が設計図の表面にくるのか，裏面にくるのかまで決定される．この「アドレス性」は DNA オリガミの特筆すべき特徴であり，ステープル鎖の末端延長あるいは化学修飾を介して，DNA オリガミの「特定の面」の「（ほぼ）任意の位置」にさまざまな分子を導入することができる．DNA オリガミの応用研究の多くは，この利点に基づいている．

もっとも研究が盛んなものは，ナノ反応場としての応用であろう．タンパク質酵素群を規定の位置関係で配置し，多段階の反応（カスケード反応）をナノスケールで再構築することで，位置関係依存的な生反応効率を検証するといった試みがなされている[15-16]．DNA 鎖を任意のパターンに配置することも可能である[1]．これらはただ模様を描くだけでなく，DNA ウォーカーに代表される分子マシンが移動するための線路（鎖置換反応の足場）としても利用されている[17,18]．（詳細は３．６節，３．７節を参照）

DNA オリガミの多量体化・集合化

DNA オリガミのサイズは，必然的にスキャフォールド鎖の長さに制限されてしまう．そのため，より大きな構造を作製したい場合は，スキャフォールド鎖そのものを長くする，あるいは，オリガミ同士を連結し多量体化するといったアプローチがとられる．前者においては，大きいもので約 50000 nt のスキャフォールド鎖から作製した DNA オリガミが報告されている[19,20]．ところが，M13mp18 等を用いた場合と比べて，収率が低いことや，一つの構造に必要なステープル鎖の量が膨大になるなど課題も多く，これまでのところあまり利用

されていない．一方で，後者のアプローチは非常に研究が盛んであり，2006 年以降，急速な発展を見せている．

DNA オリガミの多量体化・集合化において，基本となるのは，DNA の塩基対形成能に基づいて連結していく手法であろう（図 4a, b）．この場合，DNA オリガミの端に位置するステープル鎖の一部を延長し，目標とする位置関係でオリガミ間を接続できるように配列を設計する．接続の方式としては以下の二つが考えられる．

(a) 延長したステープル配列が接続相手となるオリガミのステープル配列の一部として機能する．（すなわち，延長したステープル配列は接続相手となるスキャフォールド鎖と塩基対を形成する．）

(b) 接続相手のオリガミからもステープル配列を延長し，延長した配列同士が相補的な塩基対形成により二本鎖を組む[21].

いずれの場合においても，延長するステープル鎖の配列や本数，並び方を調整することで，結合の強さやオリガミ同士の位置関係を規定する．（b）の場合は，他のステープル配列との配列直行性にも注意を払う必要がある．派生的・応用的なものとして，複数個のオリガミを一本のスキャフォールド鎖を介して連結していく手法[22]や，連結部に鎖置換反応や光応答性，ｐＨ応答性のオリゴヌクレオチドを導入することで，集合/解離を可逆的に制御する手法[23-25]も提案されている．

相補鎖間の塩基対形成に加え，平滑末端間のスタッキング相互作用を利用することも多い[26]．一般的な DNA オリガミは二重らせんが平行（あるいは多層）に並ぶことで形づくられているため，スキャフォールド鎖が折り返す端部分は二重らせんの平滑末端塩基が密に並んだ状態となる．この構造的性質に基づくと，複数の DNA オリガミを平滑末端間の π-π スタッキング相互作用によって連結することができる．ここでも，結合に寄与する平滑末端の数や平滑末端を構成する塩基を設定・選択することで結合の強さを調整することが可能である．

上述の相互作用に加えて，接触辺/面に形状相補性を設計することで接続の特異性をさらに向上させることができる[26-28]（図 4c, d）．形状のデザインが可能な DNA オリガミならではのストラテジーといえるだろう．最新の研究例では，接触辺の形状相補性を考慮しながら，各辺の内部に突出末端と平滑末端を巧みに配置することで，64 ピースのオリガミを規定の位置関係で階層的に組み上げ，モナリザ像などを描き出すことに成功している[29]（図 4d）．ジ

グソーパズルやレゴブロックのように「かみ合わせ」を介して形状を組み合わせていく手法は，直感的にも分かりやすく，汎用性も期待できる．

まとめと今後の展望

DNA オリガミ技術の急速な発展により，任意の形状の二次元・三次元の DNA ナノ構造体をほぼ自在に設計し，創り出せる時代になりつつある．DNA 分子そのものの自己集合能に加え，デザインした構造の形状相補性に基づいたプログラマビリティも洗練されてきた．しかしながら，形状の異なるさまざまな DNA オリガミ構造体を「部品」として利用し，メゾスケール（数百～数千

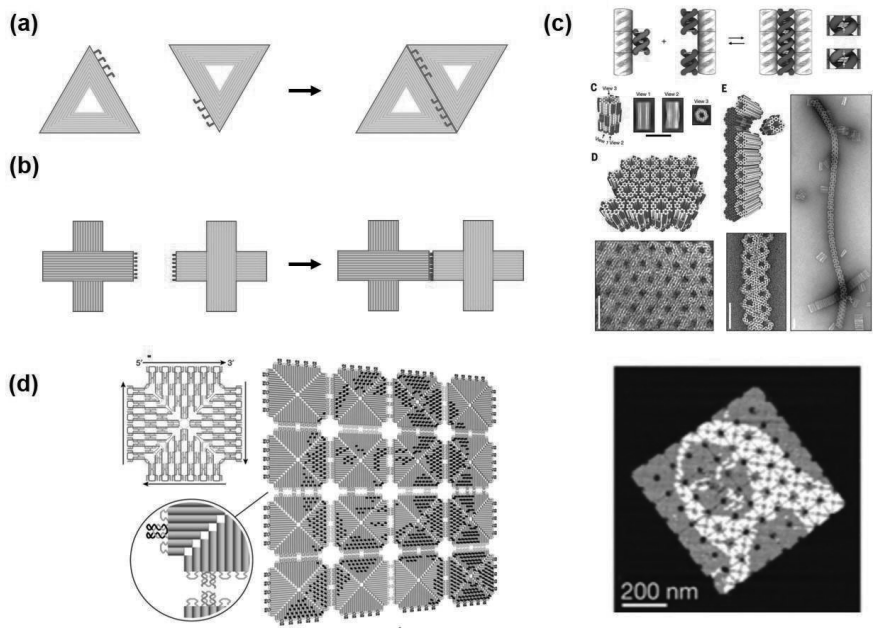


図 4　さまざまな DNA オリガミの集合体

（a）延長したステープル鎖と接続相手のスキャフォールド鎖が塩基対形成することで得られる二量体の例．（b）延長したステープル鎖間の塩基対形成によって得られる二量体の例．（c）形状相補性と平滑末端のスタッキング相互作用に基づいて自己集合する三次元オリガミ構造．(Reproduced with permission from ref [28], 2015 AAAS.)（d）複数のオリガミを指定の位置関係で接続することで描き出されるモナリザ像．(Reproduced with permission from ref [29], 2017 Nature

Publishing Group.)

ナノメートル）～巨視的スケールにおいて，思い通りの構造へと確実に複合化・組織化させるための方法論は未だ開拓途上にある．今後は分子のプログラマビリティに基づいたナノスケールでの構造制御だけでなく，トップダウン技術を利用した反応場や反応空間の制御がキーとなってくるであろう．

[1] Rothemund, P. W. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature* **440**, 297-302 (2006).

[2] Andersen, E. S. *et al.* Self-assembly of a nanoscale DNA box with a controllable lid. *Nature* **459**, 73-76 (2009).

[3] Douglas, S. M. *et al.* Self-assembly of DNA into nanoscale three-dimensional shapes. *Nature* **459**, 414-418 (2009).

[4] Endo, M., Hidaka, K., Kato, T., Namba, K. & Sugiyama, H. DNA prism structures constructed by folding of multiple rectangular arms. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 15570-15571 (2009).

[5] Kuzuya, A. & Komiyama, M. Design and construction of a box-shaped 3D-DNA origami. *Chem. Commun.* 4182-4184 (2009).

[6] Takenaka, T. *et al.* Photoresponsive DNA nanocapsule having an open/close system for capture and release of nanomaterials. *Chem. Eur. J.* **20**, 14951-14954 (2014).

[7] Dietz, H., Douglas, S. M. & Shih, W. M. Folding DNA into twisted and curved nanoscale shapes. *Science* **325**, 725-730 (2009).

[8] Han, D. *et al.* DNA origami with complex curvatures in three-dimensional space. *Science* **332**, 342-346 (2011).

[9] Zhang, F., Nangreave, J., Liu, Y. & Yan, H. Structural DNA nanotechnology: state of the art and future perspective. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 11198-11211 (2014).

[10] Han, D. *et al.* DNA gridiron nanostructures based on four-arm junctions. *Science* **339**, 1412-1415 (2013).

[11] Zhang, F. *et al.* Complex wireframe DNA origami nanostructures with multi-arm junction vertices. *Nat. Nanotechnol.* **10**, 779-784 (2015).

[12] Benson, E. *et al.* DNA rendering of polyhedral meshes at the nanoscale.

Nature **523**, 441-444 (2015).

[13] Said, H. *et al.* M1.3--a small scaffold for DNA origami. *Nanoscale* **5**, 284-290 (2013).

[14] Shrestha, P. *et al.* Confined space facilitates G-quadruplex formation. *Nat. Nanotechnol.* **12**, 582-588 (2017).

[15] Fu, J., Liu, M., Liu, Y., Woodbury, N. W. & Yan, H. Interenzyme substrate diffusion for an enzyme cascade organized on spatially addressable DNA nanostructures. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 5516-5519 (2012).

[16] Nguyen, T. M., Nakata, E., Saimura, M., Dinh, H. & Morii, T. Design of Modular Protein Tags for Orthogonal Covalent Bond Formation at Specific DNA Sequences. *J. Am. Chem. Soc.* **139**, 8487-8496 (2017).

[17] Lund, K. *et al.* Molecular robots guided by prescriptive landscapes. *Nature* **465**, 206-210 (2010).

[18] Wickham, S. F. *et al.* A DNA-based molecular motor that can navigate a network of tracks. *Nat. Nanotechnol.* **7**, 169-173 (2012).

[19] Zhang, H. *et al.* Folding super-sized DNA origami with scaffold strands from long-range PCR. *Chem. Commun.* (2012).

[20] Marchi, A. N., Saaem, I., Vogen, B. N., Brown, S. & LaBean, T. H. Toward larger DNA origami. *Nano Lett.* **14**, 5740-5747 (2014).

[21] Liu, W., Zhong, H., Wang, R. & Seeman, N. C. Crystalline two-dimensional DNA-origami arrays. *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 264-267 (2011).

[22] Zhao, Z., Liu, Y. & Yan, H. Organizing DNA origami tiles into larger structures using preformed scaffold frames. *Nano Lett.* **11**, 2997-3002 (2011).

[23] Yang, Y., Endo, M., Hidaka, K. & Sugiyama, H. Photo-controllable DNA origami nanostructures assembling into predesigned multiorientational patterns. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 20645-20653 (2012).

[24] Wu, N. & Willner, I. pH-Stimulated Reconfiguration and Structural Isomerization of Origami Dimer and Trimer Systems. *Nano Lett.* **16**, 6650-6655 (2016).

[25] Wang, J., Zhou, Z., Yue, L., Wang, S. & Willner, I. Switchable Triggered Interconversion and Reconfiguration of DNA Origami Dimers and Their Use for Programmed Catalysis. *Nano Lett.* **18**, 2718-2724 (2018).

[26] Woo, S. & Rothemund, P. W. Programmable molecular recognition based on the geometry of DNA nanostructures. *Nat. Chem.* **3**, 620-627 (2011).
[27] Rajendran, A., Endo, M., Katsuda, Y., Hidaka, K. & Sugiyama, H. Programmed two-dimensional self-assembly of multiple DNA origami jigsaw pieces. *ACS Nano* **5**, 665-671 (2011).
[28] Gerling, T., Wagenbauer, K. F., Neuner, A. M. & Dietz, H. Dynamic DNA devices and assemblies formed by shape-complementary, non-base pairing 3D components. *Science* **347**, 1446-1452 (2015).
[29] Tikhomirov, G., Petersen, P. & Qian, L. Fractal assembly of micrometre-scale DNA origami arrays with arbitrary patterns. *Nature* **552**, 67-71 (2017).

（東北大学　鈴木勇輝，京都大学　遠藤政幸）

3・2 脂質膜上のDNAオリガミ集積技術

DNA モチーフ（DNA タイル，Y-モチーフ，T-モチーフなど）を構成要素とした 2 次元アセンブリの多くは，支持体となるマイカ基板上に吸着・濃縮した DNA モチーフを，固 - 液界面で自己集合させていく基盤成長法（Surface-assisted self-assembly）によって構築されている．この手法のキモのひとつは，構成要素となる分子（この場合は DNA モチーフ）の基板表面における二次元拡散を許容するような「弱すぎず強すぎない」吸着条件を設定することにある．

多くの DNA オリガミは Mg^{2+}を 10〜20 mM 程度添加した緩衝溶液（pH 7.5〜8.3）中で作製される．ところが，このような溶液中では，DNA オリガミはマイカ基板表面へ強く吸着し，二次元拡散を示さない．そのため，DNA オリガミを構成要素とした二次元アセンブリを実現しようとした場合，数百 mM 程度の NaCl を溶液に加えるなどして適度に吸着を弱める必要がある．このアプローチによって，Aghebat らや Woo らはマイカ基板上に DNA オリガミを二次元集積化させることに成功してい[1,2].

一方で，溶液条件をそのままに，支持体そのものを変えてしまうというアプローチもある．そこで注目されているのが，生体適合界面でもある脂質二重層膜である．なかでも，マイカ基板支持脂質二重層膜（mica-supported lipid bilayer）は平坦な膜面を供するうえ，脂質分子の組成を調整することで，目的にあわせて流動性や表面電荷を変更できるといった利点がある．これらの性質を活用すると，膜面へ濃縮した DNA オリガミを格子状構造や最密充填構造などさまざ

まな二次元パターンへと自己集積化させることができる[3,4]．もちろん，得られた自己集積化構造の表面や内部に，タンパク質分子や金属ナノ粒子，他の核酸ナノ構造体などを周期的に配置し，機能化・複合化していくことも可能である（図１）[4,5]．ステープル鎖の疎水基修飾を介して，DNA オリガミと膜面との接触関係を指定できる点も強みとなる．

リポソームのような三次元的に曲率を持った膜面で DNA オリガミを集積化させる試みも盛んになってきている．これまでのところ，膜変形や膜融合に関わるタンパク質の構造と機能を DNA オリガミで模倣しようという合成生物学的な目的が主流となっている．実際に，膜面で集積化することによって，リポソームの変形を促すようなオリガミ構造が報告されている[6-8]．

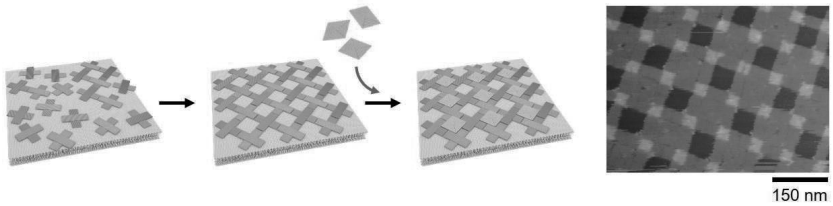


図１　脂質膜上における DNA オリガミ二次元集積化 [5]

[1] Aghebat Rafat, A., Pirzer, T., Scheible, M. B., Kostina, A. & Simmel, F. C. Surface-assisted large-scale ordering of DNA origami tiles. *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 7665-7668 (2014).

[2] Woo, S. & Rothemund, P. W. Self-assembly of two-dimensional DNA origami lattices using cation-controlled surface diffusion. *Nat. Commun.* **5**, 4889 (2014).

[3] Kocabey, S. *et al.* Membrane-assisted growth of DNA origami nanostructure arrays. *ACS Nano* **9**, 3530-3539 (2015).

[4] Suzuki, Y., Endo, M. & Sugiyama, H. Lipid-bilayer-assisted two-dimensional self-assembly of DNA origami nanostructures. *Nat. Commun.* **6**, 8052 (2015).

[5] Suzuki, Y., Sugiyama, H. & Endo, M. Complexing DNA Origami Frameworks through Sequential Self-Assembly Based on Directed Docking. *Angew. Chem. Int. Ed.* **57**, 7061-7065 (2018).

[6] Czogalla, A. *et al.* Amphipathic DNA origami nanoparticles to scaffold and

deform lipid membrane vesicles. *Angew. Chem. Int. Ed.* **54**, 6501-6505 (2015).
[7] Franquelim, H. G., Khmelinskaia, A., Sobczak, J. P., Dietz, H. & Schwille, P. Membrane sculpting by curved DNA origami scaffolds. *Nat. Commun.* **9**, 811 (2018).
[8] Grome, M. W., Zhang, Z., Pincet, F. & Lin, C. Vesicle Tubulation with Self-Assembling DNA Nanosprings. *Angew. Chem. Int. Ed.* **57**, 5330-5334 (2018).

（東北大学　鈴木勇輝）

3．3 DNA タイル・DNA ブリック技術の動向

はじめに

原子や分子のような粒子の単位が規則正しく周期的に配列することにより構成された固体を結晶とよぶ．DNA ナノ結晶とは，DNA 分子で構成されるある単位が繰り返し周期的に並んだものと定義できる．この単位をモチーフと呼び，DNA タイルや DNA ブリックはモチーフの例である．DNA ナノ結晶には，平面的な 2 次元の結晶と，立体的な 3 次元の結晶がある．

DNA ナノ結晶は，あるモチーフが繰り返し配列した構造であるが，モチーフの並べ方によるバリエーションもある．例として，すべてのピースが同じ形のジグソーパズルを考えてみよう．ピースに色や図柄がなければ，このパズルはどこを取っても同じモチーフだけが繰り返され全体は均質である．しかし，ピースの色に白と黒の 2 種類があったとすると，白の列，黒の列が交互に並ぶ縞状パターンや，白黒が市松模様に並ぶパターンなど，それらの並べ方にはいろいろなものが考えられる．縞の幅や市松の大きさなど，繰り返しの単位を変えてもよいので，無限の周期的パターンが存在する．さらに，後で述べるように，モチーフの並べ方は一定の規則に従っているものの，結果として現れるパターンには周期性がないものも存在する．こうしたものはアルゴリズミック・セルフアセンブリと呼ばれ，自然界の結晶にはみられない DNA ナノ構造ならではの結晶構造になっている．以下では DNA ナノ結晶について，DNA タイルと DNA ブリックをモチーフとするものを中心に解説する．

DNA タイル

DNA ナノ結晶の代表的なモチーフのひとつが，DNA タイルである．DNA タイ

ルはジグソーパズルのピースに相当し,それで作られる結晶は平面結晶である.DNA タイルは複数の DNA 二重らせんがくみ合わさってできた構造である.ジグソーパズルは,いろいろな種類の凸凹があって,そのかたちの相補性でもってどのピース同士が結合するかが決まるが,DNA タイルの場合は粘着末端と呼ばれる一本鎖部分の塩基配列の相補性がその役割を果たす.ジグソーパズルは,パズルを組み立てる人がひとつずつピースをはめていくが,DNA タイルの場合は,溶液中で自由に運動する無数のタイル同士がランダムに衝突する過程において,相補的な粘着末端どうしがハイブリダイゼーションすることで,同時並行的に結晶構造が組み立てられていく.無数のタイルがひとりでに集まって結晶化するこの過程を自己集合（Self-Assembly）という（図１）.



図１　ジグソーパズルと DNA タイル

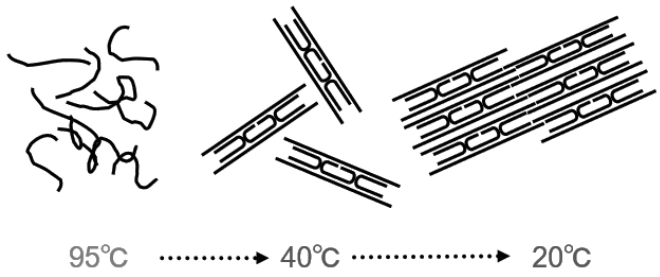


図２　DNA タイルの作製プロセス(アニーリング)

自己集合の過程は,熱力学的に安定な状態,すなわち,一本鎖 DNA の塩基間に水素結合がなるべくたくさん形成され,より長い二重らせんができた状態になる過程である.より欠陥の少ない結晶をつくるために,実際の DNA タイルの作製においては,溶液をアニーリング（除冷）することが行われる（図２）.沸点に近い温度まで水温を上げると,どんなに長い DNA の二重らせんでも乖

離して 1 本鎖になる．そこで，DNA タイルを構成する何本かの一本鎖 DNA を個別に化学合成し，それらを一本の試験管で混ぜ合わせ，95℃付近からアニーリングすると，冷却の過程で一本鎖の DNA 分子がまずタイルを形成し，さらにそのタイル同士が粘着末端で結合し，二次元結晶をつくる．このプロセスは DNA ナノ構造には共通のもので，DNA オリガミでも後に述べる DNA ブリックでも同じである．

DNA タイルは数本の一本鎖 DNA を組み合わせて分岐構造をつくり，その末端に粘着末端をつけたものである．DNA タイルの中でもっとも代表的なものが，DX（ダブルクロスオーバー）分子と呼ばれるものである[1]．DX 分子では，分岐構造として反平行クロスオーバー分岐が用いられている．強い負電荷を帯びた DNA 同士がもつ静電的な反発をおさえるように Mg^{2+}イオンなどを加えて調製したバッファー中では，DNA のクロスオーバー分岐は，閉じたコンフォメーションをとる．ただ，この状態では分岐を蝶番にして DNA2 重らせんの回転を許してしまうため，らせん間の角度を一意に定めることはできない（図３a）．

そこで図３b のように分岐を２つ並べることで，二本の二重らせんを並行な角度に固定することができる． DX 分子では，タイル間の二重らせんの位相に矛盾が出ないように長さ（塩基数）を調整したうえで，末端に一本鎖の粘着末端をつけたものである．粘着末端同士が接続されることで，二次元平面状にタイルが連なった平面構造がつくられる．結果としてできるナノ結晶は，二重らせんをすだれのように並べた構造となる．

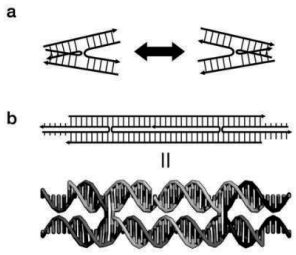


図３　DNA タイル（DX 分子）

DNA タイルのバリエーションとして，二重らせんを三本束にして並べたモトリプルクロスオーバー(TX)タイル（図４a）[2]，四つ又分岐状に並べたクロス・タイル （図４b）[3]，回転対称性を持つ n-point star（図４c）[4]なども提案されている．著者らが開発した T-モチーフ図５[5]は， T 字型分岐という，

クロスオーバー分岐とは異なる分岐構造を基本とするモチーフである．マイカなどの基板上に弱く吸着しながら自己集合するという性質をもつため，大面積で欠陥の少ない平面結晶をつくることができる．

アルゴリズミック・セルフアセンブリ

DNA タイルの粘着末端が一種類の相補塩基配列のペアだけであれば，おなじタイルが単純に繰り返される二次元の平面構造ができるだけである．しかし，

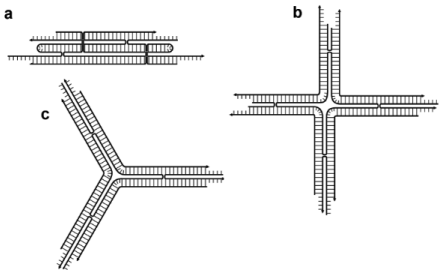


図４　いろいろな DNA モチーフ
a　TX タイル[2]，b クロスタイル[3]，c 3-point star タイル[4]

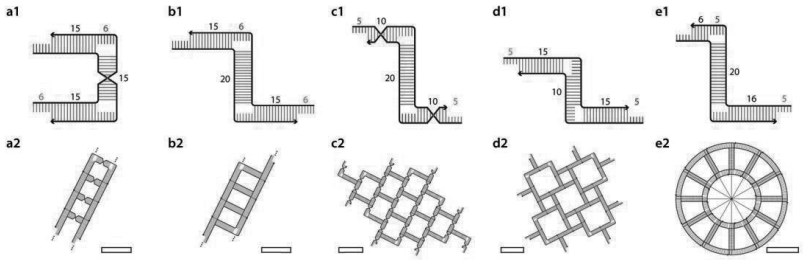


図５　T-モチーフタイル（上）とその結晶体(下)
(Reprinted from Angewandte Chemie Int. Ed. 2009 [5])

粘着末端のペアが複数あれば，いろいろなタイルの並べ方が可能になる．たとえば，1 と 0 というラベルをつけた二種類の粘着末端の配列を用意して，タイル A の右端はタイル B の左端と配列 1 で結合し，B の右端は A の左端と 0 で結合ようにすると，これらのタイルが自己集合した構造は，…A-1-B-0-A-1-B-0…のように A と B が交互に並んだ縞模様になる．

粘着末端の配列の種類（ラベルの種類）と，それを使ったタイルの種類を増

やすことにより，より複雑なパターンを作ることができる．たとえば，1 と 0，二種類の粘着末端の配列を，図６に示すような 4 種類のタイルに割り当てる．タイルの左側を２つの入力，タイルの右側は共通の出力とみると，タイルがひとつ結合するごとに，排他的論理和の計算をしていることになる．一か所だけ 1 がある初期ビット列を種結晶（初期状態）として，このタイルセットを自己集合させていくと，シェルピンスキー・トライアングルとよばれる三角形のフラクタル模様を持ったパターンができる［6,7］．このように，タイル間の結合ルールを定めることで，さまざまな模様を作ることが可能である．結合ルールは任意に設計できるため，初期構造を DNA オリガミなどで設定することで，さまざまなパターンをもつ 2 次元結晶を作ることが可能である．

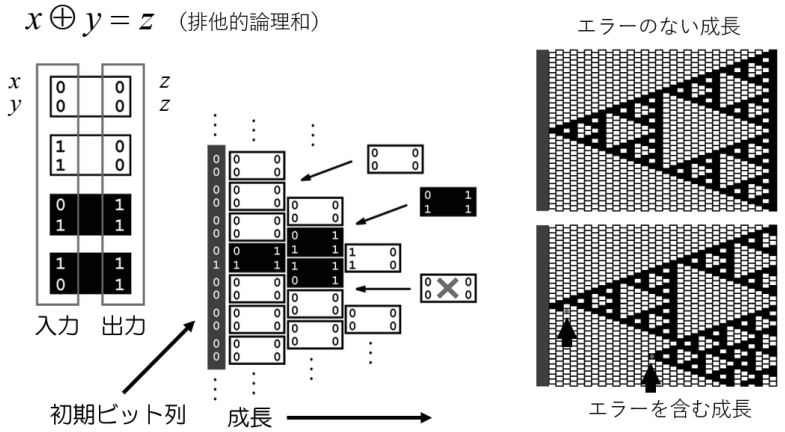


図６　アルゴリズミック・セルフアセンブリの原理

DNA タイルの自己集合プロセスは１次元のセルオートマトンと等価であることが知られている．すなわち DNA タイルの 2 次元結晶の横の並びがある時刻の 1 次元セルオートマトンの状態を表し，縦の並びが時間的な遷移を表している．このように，粘着末端の特異性を利用した自己集合によりある種の計算をおこなうことを，「アルゴリズミック・セルフアセンブリ」とよんでいる．1 次元セルオートマトンは計算万能であるので，DNA タイルの無欠陥結晶を作ることができれば，DNA タイルも計算万能であるということができる．しかし，図６で示したように，成長の途中で，粘着末端がマッチしないタイルが紛れ込んでしまうと，その後の計算結果は間違いになってしまう．こうしたタイルの

ミスマッチは，ある一定の確率で起こることが避けられない．そこで，DNA タイルによりつくられる結晶の欠陥をいかにして低減するかという研究がおこなわれている[8,9]．

DNA ブリック

DNA タイルの中で，最も単純なものは SST(シングルストランドタイル)と呼ばれるものである．これは文字通り 1 本の DNA でタイルを構成するもので，ヘアピン状の一本鎖を 4 つのセグメントに分け，これらを粘着末端としたものである．SST によるリボン状やチューブ状の周期構造がつくられている[10]．

SST の粘着末端の種類を極限まで増やして，すべての粘着末端のペアに異なる配列を割り当てることにより，タイル同士の相対的な位置関係を一意に定めることができる．これを「DNA ブリック」とよぶ．ひとつの DNA ブリックは 32nt で，8nt ずつの４つのドメインに分かれており，一つのブリックがそれぞれ別の 4 つのブリックと結合するようになっている．はじめはブリックが 2 次元の長方形に集合する「DNA キャンバス」が研究された[11]．さらにそれを 3 次元化し，10×10×10 のブリックで直方体をつくり，その中から特定のブリックを取り除くことにより，望みの形状を作ることができるようになった[12]．その後の研究により，基本的設計を変えずに，ブリックの長さを 52nt(13nt のドメイン×4)または 74nt(18nt のドメイン×４)にすることにより，作ることの構造体のサイズを大きくでき，収率も向上している[13]．この方法では最大 30,000 ブリックからなる直方体（分子量 500MDa）がつくられている（図７）．

DNA ブリックの利点は，あらかじめすべてのブリックの配列を合成したライブラリを作っておけば，そこから適当な配列を選び出して混ぜるだけで好きな形状が作ることができることである．DNA オリガミと比べると，たくさんのブリック配列を用意するのはコストがかかるが，ソフトウェアによる設計支援やピペッティングロボットを活用した実験の自動化などと組み合わせることにより汎用性の高い技術として期待されている．

DNA オリガミタイルの段階的組み立て

DNA オリガミの項でも紹介されているが，正方形の DNA オリガミをタイル（モチーフ）として，任意のパターンをもつ 2 次元結晶を作る方法が開発されている．通常の DNA タイル，DNA ブリックでは，すべてのストランドを 1 本の試験管で混ぜてアニーリングするワンポットアニーリングが行われるが，この

方法では，少ないストランドで任意のパターンを作るために，別々の試験管をつかって段階的に組み立てを進める．たとえば 8×8 のオリガミを集めた正方形の結晶を作るとき，第 1 段階では，64 種の DNA タイルのアニーリングを 64 本の試験管で行う．第 2 段階では第 1 段階で組み立てたオリガミを使って 2×2 のタイルを 16 本の試験管でアニーリングし，第 3 段階ではそれを 4 つ集めて 4×4，第 4 段階で 8×8 というように集合体を 4 倍ずつ大きくしていく．次の段階では前の段階より低い温度でアニーリングする必要があるため，粘着末端の配列や本数を工夫していることがポイントである．DNA オリガミタイルに

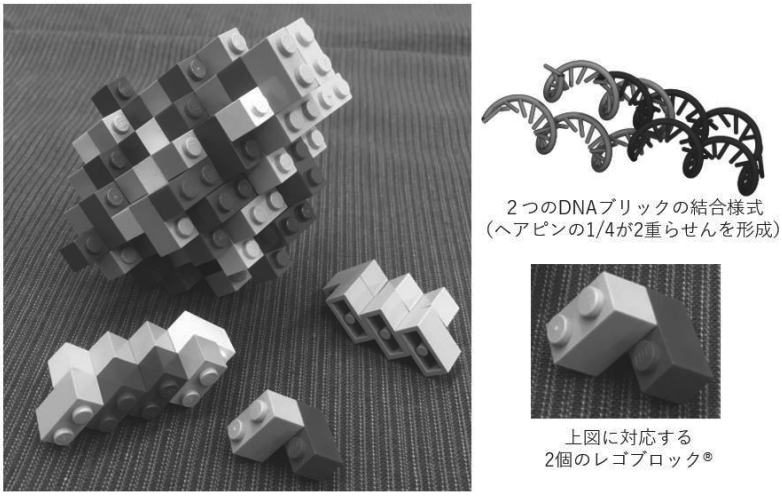


図 7　DNA ブリックの模式図

適当な描画（突起）を施すことにより，モナリザ像のような複雑な絵をオリガミ集合体の上に描くことが可能である[14]．

まとめ

DNA タイル・DNA ブリックの研究の方向性としては，均質な巨大結晶をつくる，タイルの種類を増やすことにより大きくて複雑な形状をつくる，タイルそのものを複雑化するなど，さまざまである．DNA ナノテクの世界でこういった研究が連綿と行われているのは，これらが分子がひとりでに望みの形に集合する「セルフアセンブリ」を最も直接的に実現する方法論だからである．

[1] Winfree, E., Liu, F., Wenzler, L. A., Seeman, N. C., Design and self-assembly of two-dimensional DNA crystals, Nature 394(6693) 539-544 (1998).

[2] LaBean, T. H., Yan, H., Kopatsch, J., Liu, F., Winfree, E., Reif, J. H., Seeman, N. C., Construction, Analysis, Ligation, and Self-Assembly of DNA Triple Crossover Complexes, J. Am. Chem. Soc. 122(9) 1848-1860 (2000).

[3] Yan, H., Park, S. H., Finkelstein, G., Reif, J. H., LaBean, T. H., DNA-templated self-assembly of protein arrays and highly conductive nanowires, Science. 301(5641) 1882-1884 (2003).

[4] He, Y., Chen, Y., Liu, H., Ribbe, A. E., Mao, C., Self-Assembly of Hexagonal DNA Two-Dimensional (2D) Arrays, J. Am. Chem. Soc. 127 (35) 12202-12203 (2005).

[5] Hamada, S., Murata, S., Substrate-assisted assembly of interconnected single-duplex DNA nanostructures, Angewandte Chemie International Edition. 48(37), 6820–6823 (2009).

[6] Rothemund, P. W. K., Papadakis, N., Winfree, E., Algorithmic Self-Assembly of DNA Sierpinski Triangles, PLoS Biology, 2(12), e424. (2004).

[7] Fujibayashi, K., Murata, S., Precise Simulation Model for DNA Tile Self-Assembly, IEEE Transactions on Nanotechnology 8, 3, 361 – 368 (2009).

[8] Fujibayashi, K., Zhang, D. Y., Winfree, E., Murata, S. Error suppression mechanisms for DNA tile self-assembly and their simulation Natural Computing, 24, 589–612 (2008).

[9] Evans, C.G., Winfree, E., Physical principles for DNA tile self-assembly (Review Article), Chem. Soc. Rev., 46, 3808- 3829 (2017).

[10] Yin, P., Hariadi, R. F., Sahu, S., Choi, H. M. T., Park, S. H., LaBean, T. H., Reif, J. H., Programming DNA Tube Circumferences, Science, 321 (5890) 824-6 (2008).

[11] Wei, B., Dai, M., Yin, P., Complex shapes self-assembled from single-stranded DNA tiles, Nature 485, 623–626 (2012)

[12] Ke, Y., Ong, L.L., Shih, W.M., Yin, P., Three-Dimensional Structures Self-Assembled from DNA Bricks, Science 338-6111,1177-1183, (2012)

[13] Ong, L.L., Ke, Y., Yin, P. et al., Programmable self-assembly of three-dimensional nanostructures from 10,000 unique components, Nature 552, 72–77 (2017).

[14] Tikhomirov, G., Petersen, P., Qian, L., Fractal assembly of micrometre-scale DNA origami arrays with arbitrary patterns, Nature 552, 67–71 (2017)

（東北大学　村田　智）

3．4 細胞骨格様の DNA 構造で強化されたリポソーム

細胞膜の基本構造はリン脂質二重膜であり，これを人工的に模倣したものがリポソームと呼ばれる．リポソームは細胞膜の物性を理解する材料や，薬のカプセルとして利用されてきている．リポソームの膜は半透膜の性質を持つため，生体で起こりうる浸透圧変化のもとでは，急激な脱水や膨潤に伴い崩壊してしまう．こうした性質は，思ってもいない場所で壊れてしまうことを意味し，薬であれば患部に到達する前に壊れてしまうという問題があった．こうした問題を解決するために，高分子ゲルを入れることで硬くする試みや，殻のように膜表面を高分子ネットワークで覆うことによる強化がなされてきた．前者は，薬が高分子ゲル中に閉じ込められてしまうため，カプセルの膜崩壊を介した薬の放出制御が不可能である．後者は，表面の高分子が生細胞と意図しない相互作用を引き起こし，思ってもいない反応が起こりうる．

こうした背景から，DNA ナノテクノロジーを活用し，細胞の中にある補強構造（細胞骨格）を模倣することでリポソームの安定化に挑戦した．本研究では，図 1a に示す 3 種類の DNA を用いる．これらの DNA は，図 1 b に示すように高温では互いにバラバラの状態であるが，温度低下に伴い，対となる DNA の塩基部位同士が互いに二重らせんを組み，Y の形をしたナノ構造（Y-motif）になる．更なる温度低下により，末端の未結合部位（sticky-end）が互いに結合することで，やがて細胞骨格のようなネットワーク構造を構築する．

DNA は負の電荷を示すことから，正の電荷をもつ脂質膜を用いることにより，上記の DNA ネットワーク構造を膜の直下に局在させることができる．我々はこの DNA で構築された人工的な細胞骨格を「DNA 細胞骨格」と名付けた．DNA 細胞骨格は，約 1 マイクロメートル程度と非常に薄い厚みであるが，リポソームの強度をヒトの赤血球とほぼ同等の硬さにまで上昇させた．通常のリポソームがほぼすべて膜崩壊してしまう高張条件において，DNA 細胞骨格を備えたリポソームは，全体の約 80%が崩壊せずに維持し続けた．それゆえ，膜直下に形成された DNA 骨格が，実際の細胞骨格のように膜の崩壊を防ぐ機能を十分に果たしていることを示している [1].

DNA 細胞骨格のような DNA 構造に由来した補強は，二重らせん構造に依存しているため，塩基配列を適切に設計することにより，温度や外部イオン環境を介して自由に補強の強さを制御できる．また，DNA 細胞骨格は酵素によって容易に分解できるため，たとえば間違って食べてもきちんと消化され，体に害をなさないと考えられる．また，他章で述べられているような DNA の構造変化を機能創発に利用することも容易である．例えば，特殊な光を当てることで DNA 構造が崩壊するように設計すれば，狙ったタイミングで任意の場所にリポソーム内に閉じ込めた薬を放出されることもできるだろう（図 2）．このように，我々がくみ上げた DNA 細胞骨格は，耐久性を向上させただけではなく，リポソームに様々な機能を付与する可能性を広げ，今後は医薬品や化粧品の開発など，様々な分野での発展が期待される．

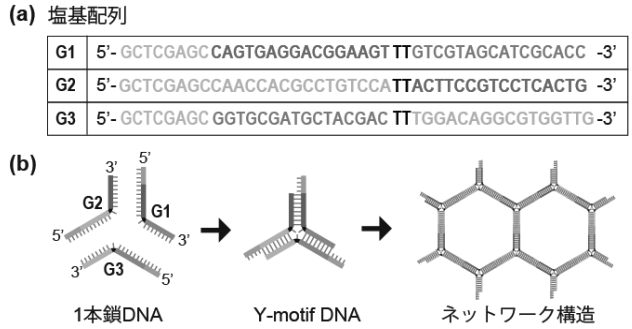


図 1　DNA ナノ構造

(a) 著者らが考案した DNA ナノ構造体の配列と (b) DNA のネットワーク化を示す模式図．高温で存在する一本鎖 DNA は，温度低下より互いに二重らせん構造をつくり，分岐を備えた Y-motif DNA を形成する．その後，sticky-end と呼ばれる三末端部分（水素結合をしていない部分）が互いに結合しネットワーク構造となる．

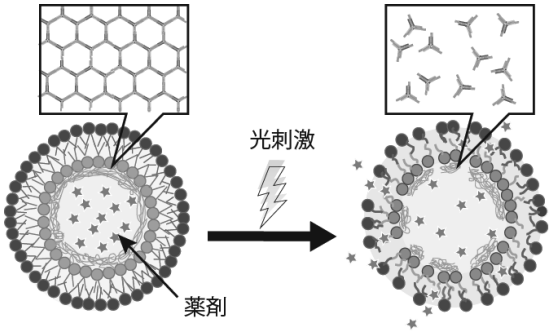


図 2　DNA 骨格を備えたリポソームの
ドラッグデリバリーへの応用例を示す模式図

[1] Kurokawa, C. et al., DNA cytoskeleton for stabilizing artificial cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 114, 7228-7233, 2017.

（東京農工大学　柳澤実穂，慶應義塾大学　藤原慶）

3．5　DNA 分子マシン

はじめに

「DNA」と「分子マシン」は一見接点がないように思われるかもしれない．DNA は遺伝情報を司る生体高分子であるが，分子レベルで２つの優れた性質を持っている．１つは塩基対形成による配列特異的な二本鎖 DNA の形成であり，もう１つは周期的な二重らせん構造である．DNA は塩基配列によってその分子集合を制御でき，形成される構造もあらかじめ予測できる極めて優れた分子システムである．その一方で，DNA の二本鎖形成は塩基対の水素結合によりなされるため，加熱・冷却によって解離と結合を可逆的に操作することができる．つまり，DNA 鎖の分子集合は動的に操作可能である．DNA 間での塩基対形成の熱力学的なパラメーターはすでに決定されているので，どのように DNA 鎖を組ませるかはあらかじめ配列でデザインできる．これを応用することで，DNA の結合と解離を動的な ON/OFF として分子マシンに活用できる．また，合成可能な DNA には様々な生体分子・機能性分子やナノ材料などを結合することが可能であり，分子・材料を DNA 構造体に位置特異的に配置して新たな機能の創出もできる．本章では，動的な分子マシンと静的な DNA 構造体を連結した新たな分子システムの最近の研究について解説する．

DNA 分子マシンと DNA ナノ構造体

1）動的な分子マシンとしての DNA

DNA によって構成される分子マシンは，生体に見られる分子マシンから発想を得たもので，歩行運動，往復運動，回転運動など多種多様なものが考案されている[1]．DNA 分子マシンは，DNA 構造自体のコンフォメーション変化を利用するものと選択的な DNA 鎖の添加と除去によって操作するものがある．特に多様で複雑な動きを操作するには，後者を用いた研究が盛んに行われている．この目的にはトーホールドと呼ばれる余分な DNA 配列（のりしろ部分）の付いた DNA 鎖が使われる．のりしろ部分を含む相補鎖を加えれば，あらかじめ形成している二本鎖 DNA から等温で DNA 鎖の交換を操作できる（鎖交換反応）（図 1a）．つまり，DNA 鎖のハイブリダイゼーションによる安定化エネルギーの差を「燃料」として利用して熱力学的に安定な方向へ動かすことができる．この

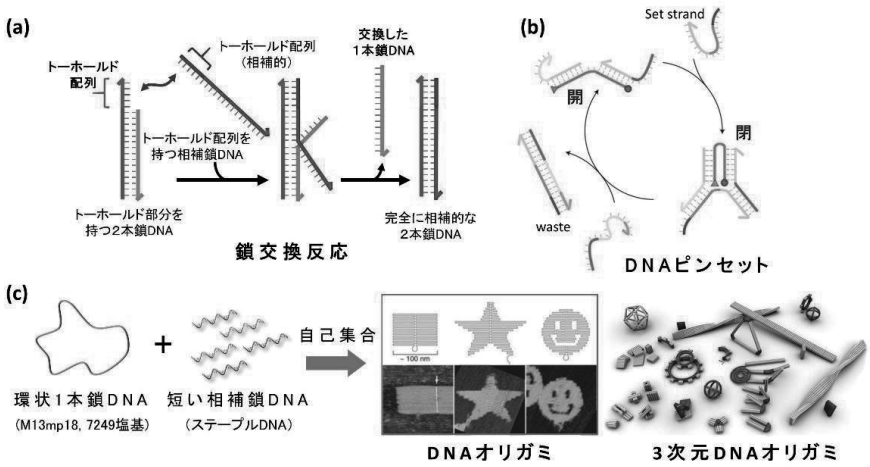


図 1　DNA 分子マシンの操作と DNA オリガミ法による構造体の作成

(a) DNA マシンの操作に使われるトーホールド配列を介した DNA 鎖交換反応．(b) 鎖交換反応を利用した DNA ピンセット．Set strand とそれを取り除く DNA 鎖によって，緑色の DNA 鎖が開閉する．(c) DNA オリガミ法を用いたナノメートルスケールの構造体の作成方法．長鎖の一本鎖 DNA と短い相補鎖 DNA(ステープル DNA)をアニーリングすることで作成させる．設計した DNA オリガミと形成された DNA オリガミ構造体の AFM イメージ及び 3 次元 DNA オリガミ構造体..

(Reproduced from Nature 2000 [4] , Nature 2006 [2])

方法によって，DNA 鎖の結合と解離を制御し，連続的に開閉できる DNA ピンセ

ットが構築された(図１b) [2]．さらに運動方向を制御可能な 2 本の足を使った DNA ウォーカーや酵素の切断によって自律的に進む DNA モーターなどの DNA 分子マシンが構築されている[1]．

２） 静的な構造体としての DNA

一方で DNA はナノスケールの正確な構造体を作成する上でも優れた材料となっている．DNA に特徴的な塩基配列の相補性による二本鎖形成と DNA の二重らせん構造の周期性を使ってナノスケールの構造体を作成する技術の開発が行われてきた．近年では DNA オリガミ法が開発され，自由な二次元ナノ構造体の設計と作成が可能となり，機能化などの面からも活発に研究が行われている[3,4]．DNA オリガミは，デザイン可能な 2 次元及び３次元 DNA 構造体である．この方法では，長鎖の一本鎖 DNA（M13mp18）と構造にあわせて配列設計した相補鎖 DNA(ステープル DNA)を混合し，加熱・徐冷（アニーリング）することで自己集合によって設計どおりの構造体を作成できる（図１c)(詳細は 3.1 節参照)．また，形成された DNA オリガミ構造体には，すべての位置に異なるステープル DNA が用いられているため，平面構造上の任意の位置に一本鎖 DNA や分子を配置することが可能である．つまり，分子マシンを作成する基板として DNA オリガミ構造体を使用することができる．

DNA ナノ構造体上での分子マシンの操作

１）DNA ナノ構造体上での分子マシン

Seeman らは最も初期に DNA 構造体と分子マシンを結び付けた研究を行っている．B-Z 転移と呼ばれる二本鎖 DNA が右巻き(B 型 DNA)から左巻き(Z 型 DNA)に移行するコンフォメーション変化を使って，DNA ナノ構造体に反復する回転運動を与えた[5]．また，PX-JX_2 デバイスと呼ばれる 2 本の隣接する二本鎖 DNA の末端を DNA 鎖の結合と除去によって 180° 回転可能な分子マシンを開発している[6]．DNA オリガミ上にこのデバイスを 2 個導入し，それぞれの回転操作で 4 つの一本鎖末端の配列特異性で三角形の DNA ナノ構造を捕捉することに成功した[7]．この方法では 4 種類の PX-JX_2 のパターンを特異的な DNA 鎖によって動かすことができ，4 種類のナノ構造体の捕捉が可能である．

さらに，Seeman らは，DNA オリガミ上で DNA ウォーカーを操作し，複数の金粒子を結合させる組み立てラインを作成した(図 2a) [8]．3 個の PX-JX_2 デバイスを配置し，決められたトラック（経路）を移動する DNA ウォーカーを操作した．すべてデバイスの動きと DNA ウォーカーの動きは特異的な DNA 鎖によっ

て制御されている．PX-JX_2 デバイスには異なる大きさと個数の金粒子を乗せ，DNA ウォーカーを近づけたときに回転運動で受け渡しを行った．つまり，DNA ウォーカーがトラック上の 3 箇所を 1 方向に制御されて動き，かつ PX-JX_2 デバイスによって金粒子の受け渡しが制御され，DNA ウォーカーに金粒子が受け渡されることになる．この方法で順番に操作を行うと最終的に 3 種類の金粒子が結合した DNA ウォーカーは 43%の収率で得られた．PX-JX_2 デバイスは金粒子を渡す ON-OFF を特異的な DNA 鎖によって制御することが可能なため，生成物が高収率(90%以上)で得られ，エラー率を極めて低く(1%)抑えることが可能である．また，PX-JX_2 デバイスの ON-OFF 操作で 3 個の PX-JX_2 デバイスから計 8 通りのパターンで DNA ウォーカーに金粒子を結合できた．

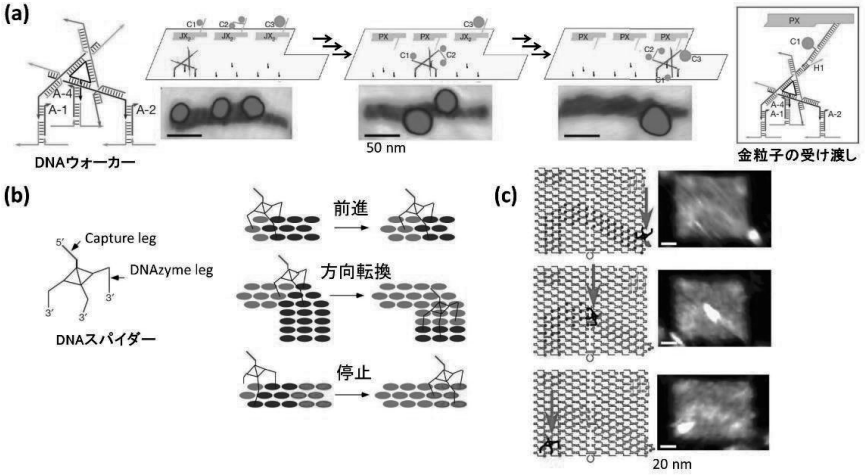


図 2 DNA ウォーカーによる金粒子を結合する組立てラインと
DNA オリガミ上のレールを歩行する DNA スパイダー分子

(a) DNA ウォーカーは 3 本の足で DNA オリガミ上の DNA 鎖に結合し，3 本の手で金粒子を回収する．DNA オリガミ上の三つの場所で停止し，DNA の回転(PX-JX_2 構造変換)によって金粒子(C1, C2, C3)の受け渡しを行う． DNA オリガミ上での操作と対応する AFM 画像． (b) 3 本の DNA 鎖の足が DNA オリガミ上に配置した一本鎖 DNA(切断部位は RNA)に結合する．3 本の足には RNA を切断する配列が導入してある．RNA 部位を切断しながら前進する．切断前後の DNA 鎖（茶色と薄茶色の丸）と 停止用の DNA 鎖(赤丸)．スタートから前進，停止まで DNA オリガミ上の経路にプログラムしてある．(c) DNA オリガミの経路上を歩行していく DNA スパイダー分子の AFM 画像．上から，スタート，歩行中，停止の様子．(Reproduced from Nature 2010 [8] [9])

Yan らは，3 本の DNA 鎖の足と 1 本の捕捉 DNA 鎖(capture leg)からなる DNA スパイダーと呼ぶ DNA 分子マシンを使って，DNA オリガミ上に作成したさまざまな経路パターンを歩行させた(図 2b) [9]．DNA スパイダーの 3 本の足には RNA を加水分解できる DNA 酵素 (DNAzyme leg) が組み込んである．DNA オリガミ上には切断可能な RNA 部位を含んだ一本鎖 DNA をトラックとしてならべてある．DNA オリガミ上の特異的な位置に DNA スパイダーを捕捉 DNA 鎖で固定し，そこから解離させてスタートさせる．DNA スパイダーはオリガミ上の一本鎖 DNA と結合し，DNAzyme 部位で結合した DNA 鎖の RNA 部位を切断し，次の一本鎖 DNA に移動しながら自律的に前進する．決められたトラックにしたがって進み最後は DNA オリガミ上の一本鎖 DNA に RNA 部位がないものを用いれば切断できずに停止する．この方法でスタート，トラック上の歩行，停止のすべてが実行できた．超解像顕微鏡で DNA スパイダーの DNA オリガミ上での位置を測定すると 3 nm/min の速度で移動することもわかった．

２）トラック上を歩行する DNA モーター

筆者らは，DNA オリガミ上に 17 本の一本鎖 DNA を配置したトラック(約 100 nm)を作成し，DNA モーター鎖と呼ぶ相補鎖の一本鎖 DNA を加えて酵素反応させることで,1 方向に連続してモーター鎖を運動させることを検討した(図 3a) [10]．DNA モーターの動作原理は，図 3ｂに示すように DNA オリガミに配置した一本鎖 DNA とモーター鎖が二本鎖形成し，切断酵素 Nt.BbvCI がトラック上の DNA 鎖を切断する．この結果，短く切断された DNA 鎖が解離して，モーター鎖は隣接する同じ配列の DNA 鎖に移動する．これを分岐移動という．トラック上には同じ配列の一本鎖 DNA が一列に等間隔で配置してあるため，DNA 鎖の切断と分岐移動が自律的に進行する．トラックの末端にモーター鎖を導入し，酵素反応に伴うモーター鎖の位置を測定すると，時間経過に伴って，モーター鎖は一方向に移動することが分かった．さらに，モーター鎖がトラック上を移動する様子を高速 AFM によって実時間で観察した.この結果,AFM の走査中に DNA モーターが運動している様子が直接観察できた．その運動を 1 分子解析すると中間状態である DNA モーターの分岐移動の様子が捉えられ，トラック上の一本鎖 DNA を介して段階的に移動していくことが明らかとなった（図３ｃ）．

さらに，ナノスケール下で分子の移動を精密に制御するため，DNA モーターを使って DNA オリガミ上に構築した複雑な経路を制御して動かすことを検討した[11]．DNA オリガミ上に 3 箇所分岐したトラックを作成し，分岐点の両側にゲートを設けて，DNA モーターの進行方向の制御を行った．ゲートはあらか

じめブロック鎖で閉じており，鎖交換反応で取り去ると DNA モーターが進行できるようになる．酵素反応をおこない，DNA モーターの位置を AFM による解析と蛍光消光実験で検討した結果，ゲートの開いた方向に DNA モーターは進み，4 つの指定された終着点に移動させることができた．このように，複雑に分岐した経路を DNA 構造体上に作成し，DNA モーターの進行方向の制御を可能とする分子システムの開発に成功した．

一方で，酵素反応を利用した系だけでなく，光化学反応を利用した光駆動型 DNA モーターも構築できる[12]．光で駆動する DNA モーターの歩行とその観察を DNA オリガミ構造上で検討した．ピレンを導入した DNA モーターとジスルフィド結合を含む 4 本の一本鎖 DNA 鎖を二次元 DNA オリガミ上に配置した．UV 光照射によるピレンからの電子移動で，ジスルフィド結合の切断を誘導し，

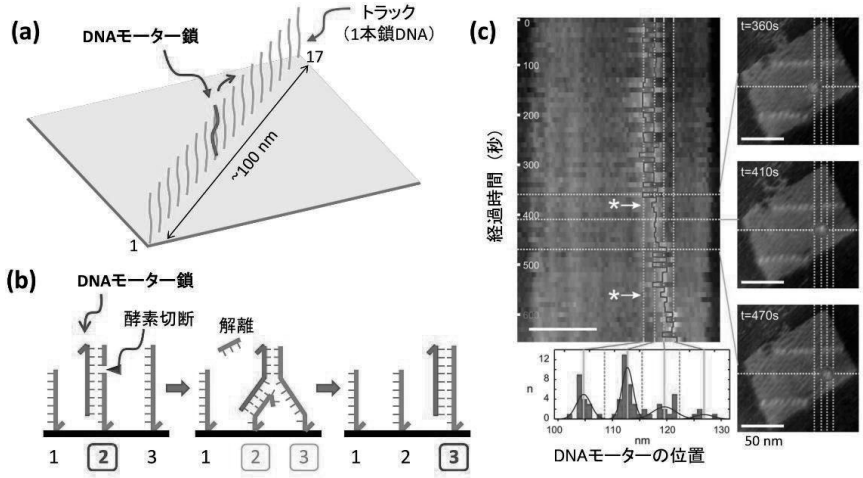


図 3　DNA オリガミ構造体上に作成したトラックを移動する DNA モーター

(a)長方形の DNA 構造体上に構築した 17 本の一本鎖 DNA（緑色）からなるトラック．酵素反応によって DNA モーター鎖（赤色）はこのトラック上を 1 方向に移動する．(b)分岐移動を用いた DNA モーターシステムの動作原理．DNA 構造体上の一本鎖（緑色）に結合した DNA モーター鎖が酵素切断によって，中間状態を経て，次の同じ配列の DNA 鎖に移動する（分岐移動）．(c)高速 AFM による DNA モーター鎖の 1 分子可視化とその運動の解析．DNA モーターはトラック上の一本鎖 DNA を介して段階的に移動し，分岐移動の中間状態も可視化できた．(Reproduced from Nat. Nanotechnol. 2011 [10])

それによって DNA モーターが DNA タイル上の一本鎖 DNA に沿って最後の一本鎖 DNA に到達するまで連続的に移動した．DNA モーターの移動する過程は，光照射時間によって，DNA モーター鎖の位置をタイル上の 4 つの一本鎖 DNA の位置で決め，その分布から 1 ステップごとの反応速度を見積もった．また，DNA モーターの移動する過程は，UV 照射下で高速 AFM を用いて実時間で直接観察できた．

4）外部刺激に応答して可動する DNA オリガミ構造体

DNAナノテクノロジーの分野では，メカニカルなデバイスとなる構造体が作成されてきている．開閉を伴う機械的なDNAオリガミ構造体として，2次元のハサミ型構造体が開発され，特定の分子に応答して構造の開閉が行えた[13]．オリガミ構造体が特定の分子を捕捉すると，2つのアームが閉じて分子を挟み，これを用いて標的分子を1分子検出できる．また，DNAオリガミの技術を使えば，剛直な3次元構造体を作成でき，様々な機械的な運動を行えるオリガミ構造体

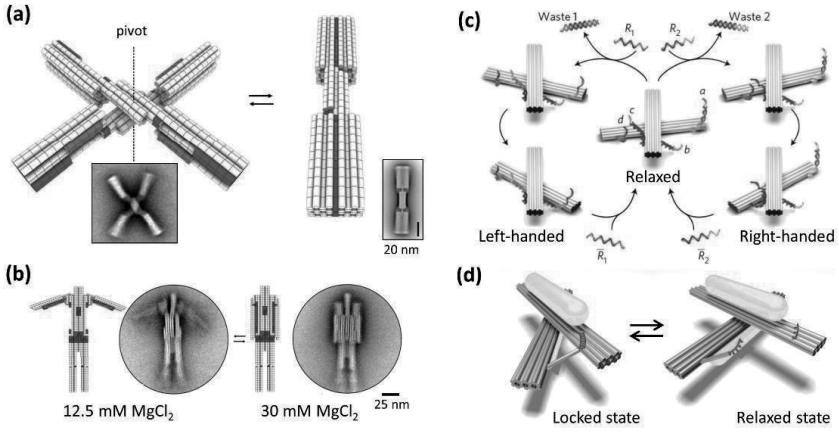


図 4　外部刺激に応答して構造を変える動的な DNA オリガミ構造体

(a) 2 つのユニットからなり中心の軸で回転できるようになっている．高温では開いた構造となり，低温で閉じた構造となる．温度に応答して可逆的に開閉する．(b)塩濃度に応答して腕を開閉する分子ロボット．(c)鎖交換反応によって操作できる回転構造体．DNA 鎖に応じて右巻きと左巻きに回転が可能．(d)金ナノロッドを結合した回転構造体．光に応答してロックした状態とリラックスした状態が生じ，それに応じて金ナノロッド間のプラズモン相互作用から分光学的に読み出しができる．(Reproduced from Science 2015 [15], Nat. Mater. 2014 [16], Nat. Commun. 2016[17])

も構築できる[14]．水溶液中の塩濃度や温度に応答して3次元構造を変える構造体も開発された．原理は，二本鎖DNA末端同士の塩基対の間に働くπ―π相互作用と形状のフィットを利用している．中心で回転でき，開閉可能な2本の差し違い棒からなる構造体を構築し，塩濃度に応じて開いたX型の構造体が，形状のフィットによって閉じて棒状になる設計である（図4a）[15]．開閉を蛍光検出することで，温度の昇降による構造体の開閉を千回以上繰り返しても構造体は壊れることなく動作し，メカニカルなデバイスとしても優れた性能を示した．さらに集合化することで，マイクロメータースケールの可動な格子集合体を構築できた．デモンストレーションとして，この可動部位と組み合わせて「人型」を作ることで，塩濃度に応じて腕を開閉するナノスケールのロボットも構築されている（図4b）．

また，中心で回転可能な2本の棒状構造体を利用して，金ナノロッドを結合した構造体の回転制御をDNA鎖交換または光反応によって行い，2個の金ナノロッド間のプラズモン相互作用を制御するデバイスの構築もおこなわれた（図4cd）[16, 17]．金ナノロッド間の回転角に応じて，DNAのキラリティーから生じる円二色性（CD）スペクトルのピーク形状の反転と強度の変化が見られた．これらの回転できる構造体デバイスの動的なコンフォメーション変化を分光学的に読み出すことが可能である．

まとめと今後の研究

DNAナノテクノロジーの進展によって，さまざまな平面構造や立体構造をデザイン・作成する技術が開発されてきた．特にDNAオリガミの技術を用いれば，生体分子や機能性分子の精密な配置とその操作が可能であり，分子の反応や観察空間の構築も可能である．これらの研究では，静的な構造体の構築と動的な分子操作を組み合わせることで分子マシンの構築やその動作の観察が達成されてきた．また，DNA構造体上に経路を設定し，分子マシンを動かす技術や複雑に分岐した経路で進行方向を決められるゲートを使い，特定の場所に1個の分子を移動させる技術が開発された．さらに，分子や光などの外部環境に応答する分子スイッチを３次元構造体に組み込むことで，その運動を制御可能なメカニカルなデバイスも構築されてきている．これによって時間や空間を制御した分子の輸送や放出なども可能となる．また，細胞をターゲットとし，機能の制御を行う分子ナノロボットも実現されてきている．［18］（詳細は3.6章参照）．ナノスケールの精密さで分子の動きをコントロールする技術は発展

段階であり，多くの情報を認識・処理して高い機能性を発揮する「分子ロボット」へ展開していく可能性を秘めている．

[1] Bath, J. Turberfield, A.J. DNA nanomachines. *Nat. Nanotechnol.,* **2**, 275-284 (2007).

[2] Yurke, B., Turberfield, A.J., Mills, A.P., Jr., Simmel, F.C. and Neumann, J.L. A DNA-fuelled molecular machine made of DNA. *Nature,* **406**, 605-608 (2000).

[3] Rothemund, P.W. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature*, **440**, 297-302 (2006).

[4] Hong, F., Zhang, F., Liu, Y. and Yan, H. DNA Origami: Scaffolds for Creating Higher Order Structures. *Chem. Rev.*, **117**, 12584-12640 (2017).

[5] Mao, C.D., Sun, W.Q., Shen, Z.Y. Seeman, N.C. A nanomechanical device based on the B-Z transition of DNA. *Nature*, **397**, 144-146 (1999).

[6] Yan, H., Zhang, X., Shen, Z. and Seeman, N.C. A robust DNA mechanical device controlled by hybridization topology. *Nature*, **415**, 62-65 (2002).

[7] Gu, H., Chao, J., Xiao, S.J. Seeman, N.C. Dynamic patterning programmed by DNA tiles captured on a DNA origami substrate. *Nat. Nanotechnol.*, **4**, 245-248 (2009).

[8] Gu, H., Chao, J., Xiao, S.J. Seeman, N.C. A proximity-based programmable DNA nanoscale assembly line. *Nature*, **465**, 202-205 (2010).

[9] Lund, K., *et al.*, Molecular robots guided by prescriptive landscapes. *Nature*, **465**, 206-210 (2010).

[10] Wickham, S.F.J., *et al.*, A.J. Direct observation of stepwise movement of a synthetic molecular transporter. *Nat. Nanotechnol.*, **6**, 166-169 (2011).

[11] Wickham, S.F.J., *et al.*, A.J. A DNA-based molecular motor that can navigate a network of tracks. *Nat. Nanotechnol.*, **7**, 169-173 (2012).

[12] Yang, Y., *et al.*, Direct Visualization of Walking Motions of Photocontrolled Nanomachine on the DNA Nanostructure. *Nano Lett.*, **15**, 6672-6676 (2015).

[13] Kuzuya, A., *et al.*, Nanomechanical DNA origami 'single-molecule beacons' directly imaged by atomic force microscopy. *Nat. Commun.*, **2**, 449 (2011).

[14] Marras, A.E., Zhou, L.F., Su, H.J. Castro, C.E. Programmable motion of DNA origami mechanisms. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 713-718 (2015).

[15] Gerling, T., Wagenbauer, K.F., Neuner, A.M. Dietz, H. Dynamic DNA devices and assemblies formed by shape-complementary, non-base pairing 3D components.

Science, **347**, 1446-1452 (2015).

[16] Kuzyk, A., *et al.*, Reconfigurable 3D plasmonic metamolecules. *Nat. Mater.*, **13**, 862-866 (2014).

[17] Kuzyk, A., *et al.*, A light-driven three-dimensional plasmonic nanosystem that translates molecular motion into reversible chiroptical function. *Nat. Commun.*, **7**, 10591 (2016).

[18] Douglas, S.M., Bachelet, I. Church, G.M. A logic-gated nanorobot for targeted transport of molecular payloads. *Science*, **335**, 831-834 (2012).

（京都大学　遠藤政幸）

3．6　DNA オリガミを用いたライフサイエンス研究

はじめに

DNA ナノテクノロジーのターゲットの一つには，生体や細胞機能の制御への応用がある．このために，DNA 構造体を使用した薬物デリバリーシステムの開発が行われている[1]．DNA ナノテクノロジーでは，構造体の構築や特異的な機能を導入した分子スケールのデバイスの構築が可能である．この技術を使うことで，薬物やリガンド，他の機能を 1 つのナノ構造体に集約し，これを自己集合のみで作成でき，直接，薬物デリバリーに使用できる．つまり，DNA ナノ構造体は様々にカスタマイズが可能であるため，それぞれの機能をモジュールとして複合化したデバイスを作成できる大きな利点がある．また，一般的に DNA オリゴマーを細胞に導入する場合は，細胞膜を透過するためにカチオン性の複合化試薬が必要となる．これに対して，DNA をナノ構造化することによって，構造体自体がエンドサイトーシスを経て細胞に取り込まれやすくなる．これらの利点から，DNA ナノ構造体が利用され始めている．DNA ナノ構造体を使った細胞に対する研究では，研究のターゲット，構造体，導入する機能など以下のように集約される．

I.　ターゲット：薬物デリバリー，細胞機能の制御（転写の阻害，RNA 干渉，ゲノム編集），アポトーシス（細胞死）の誘導，免疫応答の制御，癌治療など．

II.　ボディ：（１）構造体：DNA の小規模なアセンブリー（四面体構造など），DNA オリガミ，DNA ブリックなど；（２）構造の変換機能：分子や環境に応

答した開閉機構など.

III. モジュール：（1）ターゲット用モジュール：小分子，抗体，核酸アプタマーなど（細胞表面に特異的な受容体やタンパクの分子認識）；（2）機能制御用モジュール：抗癌剤，生理活性分子，免疫応答用分子，干渉用 RNA，ゲノム編集用 Cas9 など酵素類；（3）環境応答モジュール：pH，温度，塩濃度，光など.

DNA ナノ構造体の細胞機能の制御への応用

1）DNA ナノ構造体を用いた細胞内への導入と機能制御

小規模な DNA のアセンブリーから DNA ナノ構造体を作成，細胞への導入や機能制御を行う研究が行われている．DNA オリゴマーからなる四面体構造や枝分かれした構造体を使った細胞への導入が研究されている．これはエンドサイトーシスを経て細胞内に取り込まれると考えられている．例えば，免疫応答を増強させるための Toll 様受容体 9（TLR9）をターゲットとした分子 CpG が頂点に導入された四面体フレーム型 DNA 構造体を用いて，細胞内への導入とサイトカインの産生が増加することを確かめた[2]．また，枝分かれした DNA オリゴマーに CpG 配列を結合することで細胞内への導入と免疫応答の増強が見られた[3]．この四面体構造を用いることで，細胞内の分子検出とイメージング，RNA 干渉による遺伝子発現の抑制などにも使用されている．

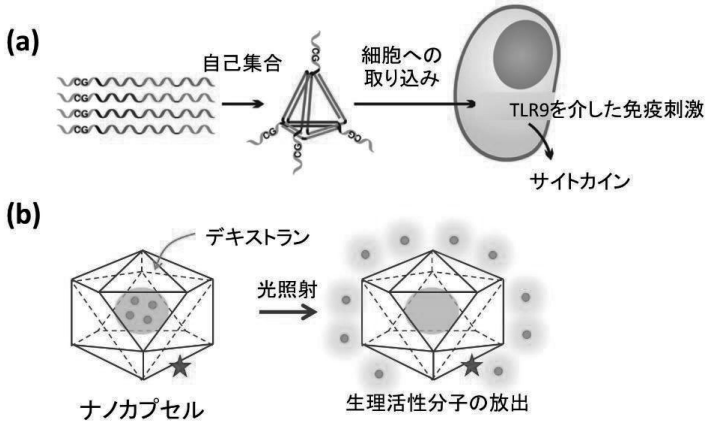


図 1　DNA ナノ構造体の分子デリバリーへの利用.

(a) 四面体構造の頂点に CpG 配列を導入し，細胞へ取り込ませ，サイトカインの産生の増強が見られた．(b) DNA オリゴマーからなる二十面体ナノカプセル内に

蛍光分子や生理活性物質を結合したデキストラン（ポリマー）を閉じ込め，光照射でそれらの分子を放出する．((a) Reproduced from ACS Nano 2011 [2], (b) Reproduced from Nat. Nanotechnol. 2017 [4])

外部刺激による生理活性物質の放出と機能制御

生体内の指定された細胞で，空間的および時間的に高精度で小分子を放出することは大きな課題である．DNA オリゴマーより二十面体構造の DNA ナノカプセルを作成し，その内部に光照射によって分子を放出できる光応答性ポリマーを充填した複合体を構築した（図 1b）[4]．光照射によってエンドソームの大きさの空間分解能で細胞質内へ小分子の放出を行った．この技術は，光照射後に放出される小分子の動きをモニターでき，分子の放出が起こった位置についても正確にわかる(図 2b)．この技術を適用して，神経新生とニューロンの生存を促進する神経ステロイド(デヒドロエピアンドロステロン:DHEA)使って，DNA ナノカプセルからの DHEA の光照射と放出を行い，DHEA による神経活性化を時空間的に追跡した（図 2cd)．また，DNA カプセル内に DHEA を隔離しておくことで，光ケージされた DHEA が神経細胞を不用意に活性化するのを防ぐことができる．この方法論は，多様な神経刺激分子についても使用でき，分子デリバリーと時空間制御した分子の活性化について汎用性がある．

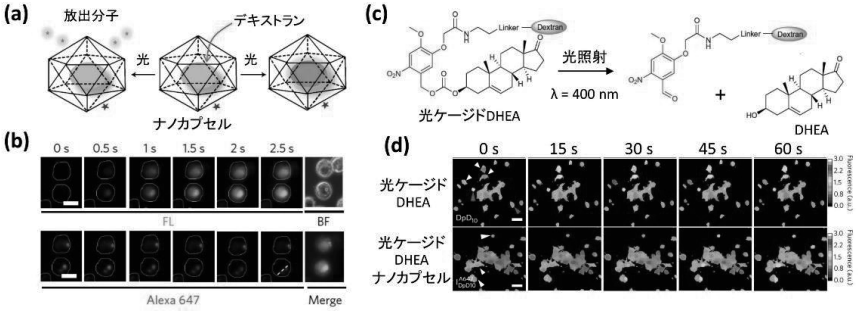


図 2　外部刺激による生理活性物質の放出

DNA オリゴマーからなる二十面体ナノカプセル内に蛍光分子や生理活性物質を結合したデキストラン（ポリマー）を閉じ込め，光照射でそれらの分子を放出する．(b)光照射後にナノカプセル（下図，赤色）から蛍光分子（上図，緑色）が時間を追って細胞質内に放出される様子．(c)光ケージ分子を介してデキストランと結合した DHEA は光照射によって放出される．(d)DHEA 放

出による神経細胞の活性化．カプセルがないと光照射前から活性化されるが，カプセル内にあるとそれが抑制され，光照射のみによって活性化できる．(Reproduced from Nat. Nanotechnol. 2017 [4])

DNA オリガミ構造体の細胞導入と機能発現

１）DNA オリガミ構造体の細胞内への導入と機能発現

DNA オリガミ構造体を使い，新たな薬物キャリアシステムと分子デリバリー法が研究されている．この方法では，蛍光ラベルした通常の DNA オリガミを培養細胞に加えるもので，細胞内への効率的な導入が確認されている．さらに，薬物のキャリアとして，抗癌剤であるドキソルビシン(Dox)をインターカレーションによって結合した DNA オリガミ構造体を作成した（図 2a）[5]．DNA オリガミ構造体には，高い濃度で薬物を導入でき，細胞内への効率的な導入と顕著な細胞毒性が見られた．DNA オリガミ薬送輸送システムは，癌細胞に対して有効で,生体適合性のある薬物キャリアシステムとデリバリーの開発に役立つこと示している．さらに，生体に対しても DNA オリガミを使用したデリバリーが検討されている．DNA オリガミを使用して，マウス体内の腫瘍のターゲッティングと腫瘍部位での薬物の持続性を調べた[6]．DNA オリガミは，特異的な腫瘍への蓄積を示し，抗癌剤 Dox を DNA オリガミ構造体へ導入することで，腫瘍へのデリバリーと顕著な抗腫瘍効果を示した．

また，タンパク質の発現を抑制する RNA（siRNA)を DNA オリガミ構造体に結合することで腫瘍の増殖を抑制した[7]．アポトーシスを抑制するタンパク Bcl2 の siRNA を結合した DNA オリガミ構造体を細胞内に導入することで，RNA 干渉によって Bcl2 の発現が抑えられ，癌細胞の増殖が抑制され，マウスの腫瘍の成長も抑えられた．

２）DNA オリガミに特徴的な性質を使った薬物放出

3 次元オリガミ構造体を使い，抗癌剤ドキソルビシンを塩基対間にインターカレートさせ,細胞内に導入後,徐々に薬物を放出させる方法が開発された[8]．3 次元オリガミ構造体は，二重らせんのピッチ（らせん 1 回転の塩基対数で表す）が異なる 2 種類を作成し，塩基対間のゆるみが異なるように設計してある（図 2b）[9]．ナノ構造体のピッチを 1 回転当たり標準型 10.5 塩基対と緩んだ 12 塩基対に設計することで，緩い 12 塩基対の構造体では標準型に対して Dox の結合量が 33%増加し，数時間かけてゆっくりと放出できるように調整できることが分かった．細胞内にも効率的に取り込まれ，DNA オリガミ構造体

が Dox の効率的なデリバリーに有効であることが確かめられた．癌細胞でのアポトーシス（細胞死）の誘導の効果を調べた結果，細胞内に保持され，癌細胞でのアポトーシスの誘導が効果的に行われた．程度の異なるねじれを持つように構造を設計することで，薬物の放出速度を制御し，調整することができる DNA オリガミに特徴的な方法である．

３）脂質による構造体の被覆

DNA 構造体を生体に使用する上で，生体内環境での DNA 構造体の不安定性と免疫系の活性化は，生体への適用の障害となっている．このため，生体内のヌ

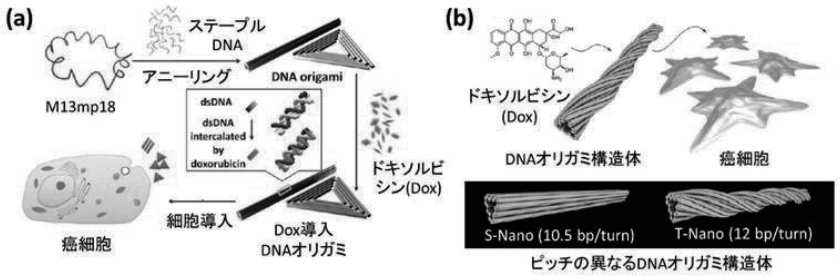


図 3　DNA オリガミ構造体の細胞へのデリバリーと機能制御

(a) 作成した DNA オリガミ構造体に抗癌剤ドキソルビシン (Dox) をインターカレートさせ，細胞に導入する．(b) ピッチの異なる DNA オリガミ構造体 (10.5 及び 12 塩基対) を用いて Dox の結合量と放出速度を制御する．(Reproduced from J. Am. Chem. Soc. 2011 [5], ACS Nano 2011 [8])

クレアーゼに対する DNA 構造体の分解耐性と免疫活性化の抑制が必要である．ウイルスなど天然にある粒状構造体は，タンパク質でできた空間構造が脂質によって覆われることで，感染中の免疫認識を回避できる仕組みを持っている．

Shih らは分解を防ぎマウスの血中を循環させるため，八面体フレーム型 DNA オリガミ構造体 (直径約 50 nm) を脂質二重膜で覆った複合体デバイスを作成した（図 3）[10]．PEG（ポリエチレングリコール）修飾した脂質二重膜で被覆することで DNA デバイスは，ヌクレアーゼによる分解に対する耐性を示した．免疫活性化は，被覆していない構造体に対して大幅に（2 桁）低下した．これらの構造体をマウスに投与すると，脂質で覆われていない構造体は速やかに排出される（38 分で半減）のに対して，脂質で覆われている構造体は体内に長く保持され（370 分で半減），マウスに投与後，血中によく保持されることが分かった（図 3b）．

さらに，Shih らは，カチオン性のポリマーを用いて，3 次元 DNA オリガミ構造体を覆うことで，低塩濃度中や培地中で安定に存在することを確かめた(図4c)［11］．特に PEG を使ったカチオン性ポリマーで覆うことによって，マウスの体内に 24 時間など長期にわたって安定に存在できることが分かった．このように，生体応用に適した設計方法を確立することで，医学的に応用可能な基盤となる DNA デバイスが開発されている．

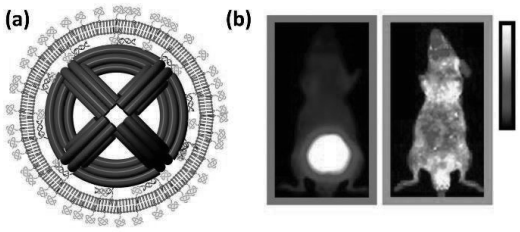


図 3　(a)八面体プレーム型 DNA オリガミ構造体を脂質二重膜と PEG で覆った DNA デバイス．(b)DNA デバイスのマウス体内での保持（２時間後）．左：被覆なし．膀胱内に蓄積している．右:被覆あり。全身に分布している．(Reproduced from ACS Nano 2014 [10])

医療用 DNA ナノロボット

１）動的な機構を持つナノロボット

DNAを用いた分子マシンの一つの目標に細胞の機能制御への応用がある．「DNAナノロボット」と命名されたもので，細胞表面の生体分子を認識して立体構造を変化させ，細胞選択的に機能制御することができる[12]．ここでは，筒状構造が二つに割れた構造体を使い，その一方の末端を結合して開閉できるように設計してある（図4）．最初は閉じた筒状構造体で，目的の生体分子が結合すると二本鎖DNAの解離により，構造体が開く仕組みにしてある（図5a）．ここにはターゲット分子がアプタマーと呼ばれるDNA鎖に結合すると二本鎖DNA部分が解離する機構を備えてある（図4b）．標的の細胞表面にあるターゲット分子を認識し，結合して，筒状構造体は開く（図4c）．２種類のターゲット分子で筒が開くようにしておけば２種類のターゲット分子が表面に存在する細胞だけに結合することが可能となる（図5d）．構造体の内部には抗体が結合してあって，筒状の構造体が開いて，この抗体が細胞表面のタンパク質に結合する．これによって，細胞にシグナルを送り，指令通りに細胞死や細胞分裂

の制御を細胞に働きかけられる．つまり，細胞の目印を見つけることで癌細胞などを死滅させることができる．あらかじめ分子によってプログラムできる革新的な医療ロボットになる可能性がある．

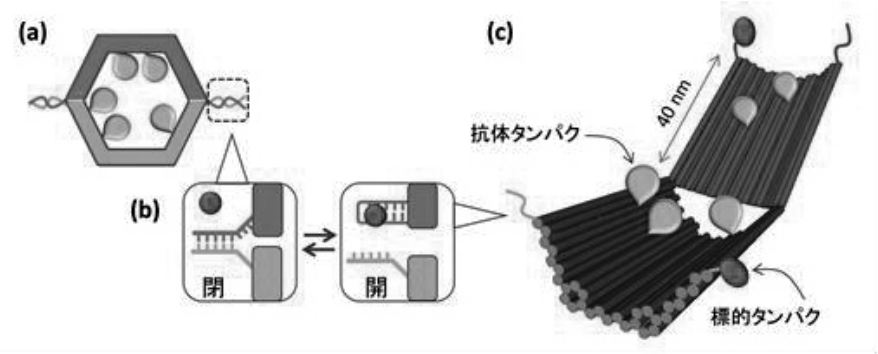


図 4　細胞を認識する DNA ナノロボット

(a)閉じた状態のナノロボット．筒状の内部に抗体を導入してあり，「鍵」となる DNA 鎖によって閉じられている（破線四角）．(b)　「鍵」の開く仕組み．標的分子(赤丸)は青色の DNA 鎖(アプタマーDNA)に結合し，もとの二本鎖 DNA が解離する．(c)開いた状態のナノロボット．内部の抗体が細胞特有の抗原に結合する．(d)2 種類の標的分子でナノロボットが開くようにすれば，2 つが存在したときのみ，細胞表面に結合する．論理ゲート的な細胞の識別ができる．
(Reproduced from Science 2012 [12])

2）生体内の腫瘍をターゲットとしたナノロボット

動的な機構を持つナノロボットは，ターゲット分子をトリガーとして応答する高性能な薬物デリバリーシステムとして大きな可能性を持っている．DNA オリガミ構造体を使って，分子に応答するようプログラムした DNA オリガミ構造体を構築し，腫瘍に効果がある分子を提示できるように設計した（図 6）[13]．ナノロボットは，外部に腫瘍に発現するタンパクに結合する DNA アプタマー，その内部に血液凝固プロテアーゼであるトロンビンで機能化した．腫瘍細胞のターゲットタンパクに応答するアプタマーは，DNA ナノロボットがメカニカルに開くための錠前として機能する．ナノロボットが開くことで，内部に導入したトロンビンは，露出され，腫瘍部位で血液凝固を促進する．腫瘍をもつマウスモデルを用いて，血中に導入した DNA ナノロボットは，トロンビンを腫瘍関連血管に特異的にデリバリーし，血管内血栓症を誘発して，腫瘍の壊死と腫瘍の増殖を阻害できることを実証した．また，ナノロボットは生体中で免

疫学的に不活性であった．このことは，DNA 構造体を機能化したナノロボットが，癌治療を行う上で正確な薬物デリバリーのための有望な手法になり得ることが示された．

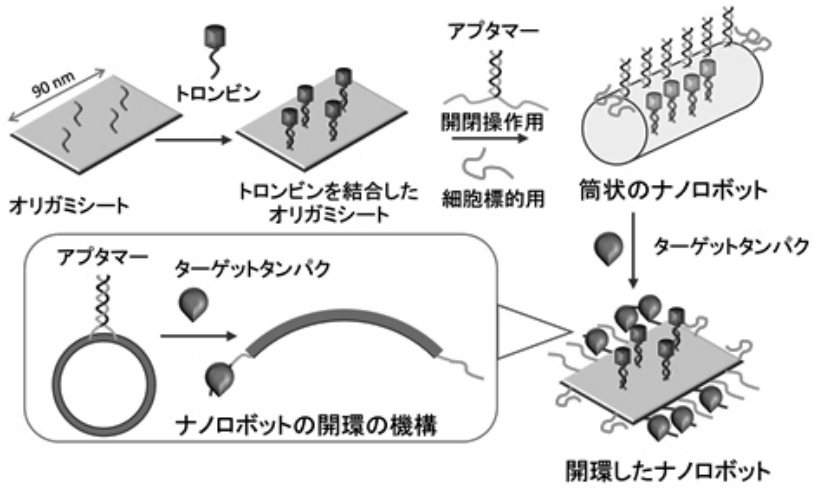


図 5　生体内の腫瘍をターゲットとしたナノロボット

内部にトロンビンを持ち，アプタマーによって筒状に閉じられている．腫瘍のターゲットタンパクを認識して開環する．トロンビンが腫瘍部位の血液凝固を行う．（Reproduced from Nature Biotechnol. 2018 [13]）

まとめと今後の研究

DNA ナノテクノロジーの最大の特徴である構造体の設計と自由に分子を導入できる技術を基盤に，細胞機能の制御や生体への応用が行われてきている．特に，DNA オリガミ技術使うことで，構造体の構築や目的の機能を導入したナノスケールのデバイスの構築が可能である．この技術を薬物デリバリーに応用するために，薬物の導入、リガンドや他の機能を 1 つのナノ構造体に集積でき，これを自己集合のみで作成できる．このように，DNA 構造体は様々にカスタマイズが可能であるため，それぞれの機能をモジュールとして複合化したデバイスを作成できる．また，動的な構造体を作成できるので，薬物デリバリーシステムと組み合わせて，ナノロボットのような目的分子を内部に格納したデバイスが分子を認識して応答するといった機械的な動きも実現できる．さらに生体内の腫瘍を見つけ出して，治療するナノロボットも実現されてきている．こうした分子ロボットが治療を行うナノメディシンへの展開が，今後医療を大

きく変革する可能性を秘めている.

[1] Hu, Q., Li, H., Wang, L., Gu, H. Fan, C. DNA Nanotechnology-Enabled Drug Delivery Systems. *Chem. Rev.* in press (2018)

[2] Li, J., *et al.* Self-assembled multivalent DNA nanostructures for noninvasive intracellular delivery of immunostimulatory CpG oligonucleotides. *ACS Nano*, **5**, 8783-8789 (2011).

[3] Mohri, K., *et al.* Design and development of nanosized DNA assemblies in polypod-like structures as efficient vehicles for immunostimulatory cpg motifs to immune cells. *ACS Nano*, **6**, 5931-5940 (2012).

[4] Veetil, A.T., *et al.* Cell-targetable DNA nanocapsules for spatiotemporal release of caged bioactive small molecules. *Nat. Nanotechnol.*, **12**, 1183-1189 (2017).

[5] Jiang, Q., *et al.* DNA origami as a carrier for circumvention of drug resistance. *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 13396-13403 (2012).

[6] Zhang, Q., *et al.* DNA origami as an in vivo drug delivery vehicle for cancer therapy. *ACS nano*, **8**, 6633-6643 (2014).

[7] Rahman, M.A., *et al.* Systemic Delivery of Bc12-Targeting siRNA by DNA Nanoparticles Suppresses Cancer Cell Growth. *Angew. Chem. Int. Ed.* **56**, 16023-16027 (2017).

[8] Zhao, Y.X., *et al.* DNA origami delivery system for cancer therapy with tunable release properties. *ACS nano*, **6**, 8684-8691 (2012).

[9] Dietz, H., Douglas, S.M. Shih, W.M. Folding DNA into twisted and curved nanoscale shapes. *Science*, **325**, 725-730 (2009).

[10] Perrault, S.D. Shih, W.M. Virus-inspired membrane encapsulation of DNA nanostructures to achieve in vivo stability. *ACS Nano*, **8**, 5132-5140 (2014).

[11] Ponnuswamy, N., *et al.* Oligolysine-based coating protects DNA nanostructures from low-salt denaturation and nuclease degradation. *Nat. Commun.*, **8**, 15654 (2017).

[12] Douglas, S.M., Bachelet, I. Church, G.M. A logic-gated nanorobot for targeted transport of molecular payloads. *Science*, **335**, 831-834 (2012).

[13] Li, S., *et al.* A DNA nanorobot functions as a cancer therapeutic in response to a molecular trigger in vivo. *Nat. Biotechnol.*, **36**, 258-264 (2018).

（京都大学　遠藤政幸）

3．7 DNA オリガミによる酵素反応の一分子観察

分子ロボットは，生物材料と電子材料を含む様々な材料からなる部品で構成されると考えられる．生物材料の代表の一つである，酵素(蛋白質や核酸からなる)は，スマホ等を形作っている電子部品等と比べた時，特徴的な性質がいくつかある．その一つが，エネルギー消費の少なさである．例えば，多くの電子機器が基本としているシリコンベースの半導体では，シリコンのバンドギャップは約 1.1 eV(300K にて．約 45k_BT．k_Bはボルツマン定数)である．一方，生物が機能している際に利用している熱揺らぎは，約 0.025 eV(k_BT 程度)である．効率の良い分子部品である酵素の仕組みが詳細にわかれば，人工の材料を用いた分子部品の開発に有用であると考えられる．

酵素の仕組みを調べる際，多数分子の平均値を測るよりも，1 分子計測で 1 個 1 個の分子の活性を測った方が有用である．これは，多数の分子の中には，例えば，不活化している分子がいる可能性もあるからである．1 分子計測では，そのような不活化している分子は，その不活化具合を評価したり，あるいは，データから排除したりすることができるので，実際の活性をより詳細に調べる事が可能である．

酵素が働く際は，多数の分子が協同して働く場合が多い．例えば，細胞内では，小胞が輸送されているが，その輸送を担っている分子モーター(例えば，微小管レールの上を動くキネシンやダイニン)は，複数種類が協調して働く事が知られている．しかし，従来の手法(例えば，プラスチックビーズにモーター蛋白質を吸着させる方法)では，輸送複合体における分子の数や配置，といったパラメーターを制御ができなかった．一方，DNA や DNA オリガミでは，DNA1 塩基対間の距離が 0.34nm であるので，ナノメートル精度の分子配置が可能であり，その分子機構を詳細に調べる事が可能である([1]，[2])．また，DNA オリガミでは，生物材料だけではなく，様々な材料を集積化できるので，生物では実現できない機能を実装化できると考えられる(例えば，文献[2]では，光による運動制御が実現されている)．

DNA や DNA ナノ構造を用いた研究は，輸送モーターだけに留まらない．興味深い事に，最近の研究では，いくつかの酵素において，DNA ナノ構造上での酵素活性が，通常の溶液中とは異なっている例が報告されている．今後の詳細な検討が必要ではあるが，これは，負電荷を帯びた DNA ナノ構造表面では，水の状態や pH が通常の溶液環境と異なるからではないかと仮説されている([3]，

[4]). このような性質を上手く利用すれば, 生物を超えた性能を実現できるかもしれない.

分子ロボットの応用先として期待される分野に, 医療がある. 細胞は, 設計図であるゲノム DNA から, 状況に応じて, 必要な酵素を作成している(遺伝子発現). この遺伝子発現を自由自在に操れれば, 細胞の運命を制御できると考えられる(斉藤博英先生の項を参照). 我々は, 最近, 遺伝子発現(転写)に関わる酵素(DNA から RNA を作る RNA ポリメラーゼ(RNAP))と標的遺伝子を DNA オリガミ上に集積化し(転写ナノチップ), その活性を 1 分子レベルで評価する事に成功した(図 1. [5]). 油中水滴に閉じ込めた 1 個のナノチップの活性を, 従来の手法(溶液を漂う酵素と溶液を漂う遺伝子を用いた反応拡散系)と比較すると, 1 個のナノチップ(酵素は 1 つだけ載っている)が多数の酵素に匹敵する活性を持っている事が明らかになった. これは, 酵素(RNAP)と標的遺伝子の近接化によって, 高い実効濃度が実現できたためと考えられる(我々の見積では, 酵素(RNAP)と標的遺伝子が 50nm の距離にある時, 遺伝子濃度は 2μM 以上に相当). また, センサーを組み込む事で, 検出・演算・出力を 1 分子で実現する自律チップである事も示した. 更に, 前述のように, DNA ナノ構造上には, 様々な材料を集積化できるので, 光応答機能も実装化でき, 論理回路の書き換えも実現できた(3 入力 AND スイッチから, 多数決スイッチに書き換え). 今後, この技術が発展すれば, 高性能な分子ロボット実現の一助となる可能性があると期待される.

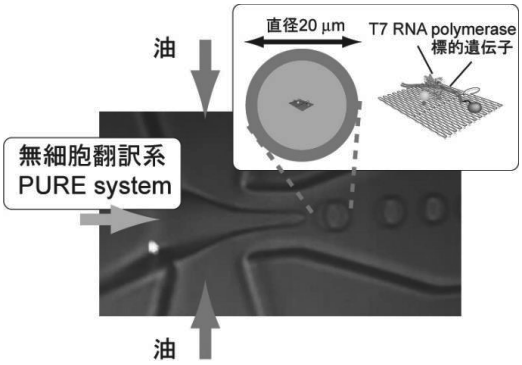


図 1　油中水滴を用いた, 1 分子酵素活性測定.

20μm の油中水滴の中に, 0.4pM の濃度で DNA オリガミチップを封入すると, 1 分子測定が可能となる.

[1] Miyzaono, Y. et al., Strain through the neck linker ensures processive runs: a DNA-kinesin hybrid nanomachine study. *EMBO J*. 29(1): 93-106 (2010)

[2] Derr, N. D. et al. Tug-of-war in motor protein ensembles revealed with a programmable DNA origami scaffold. *Science* 338, 662-665 (2012).

[3] Zhao, Z. et al. Nanocaged enzymes with enhanced catalytic activity and increased stability against protease digestion. *Nature Communication*. 7, 10619 (2016).

[4] Zhang, Y., Tsitkov, S., & Hess, H. Proximity does not contribute to activity enhancement in the glucose oxidase-horseradish peroxidase cascade. *Nature Communication*. 7, 13982 (2016).

[5] Masubuchi, T. et al., Construction of integrated gene logic-chip. *Nature Nanotechnology* in press.

（大阪大学　多田隈尚史）

3．8「RNA ナノテクノロジーの動向」

RNA とは

RNA（リボ核酸：ribonucleic acid）は，核酸塩基および糖，リン酸基からなるヌクレオチドを単位として，それがひも状に長くつながった，DNA と良く似た分子である（表）．DNA との違いは，糖がデオキシリボースではなく 2’位に

	DNA	RNA
糖	2’ - デオキシリボース	リボース
塩基	A（アデニン） C（シトシン） G（グアニン） T（チミン）	A（アデニン） C（シトシン） G（グアニン） U（ウラシル）
塩基対	Watson-Crick 型	Watson-Crick 型 ＋非 Watson-Crick 型
二重らせん	B 型	A 型
機能	遺伝情報の保存	タンパク質合成（翻訳） 遺伝子発現の制御
生物学的安定性	比較的安定 （DNase には感受性）	比較的不安定
化学的安定性	pH 6 ～ 12 で安定	高 pH で不安定 （pH 3 ～ 9 で安定）
合成法	化学合成 PCR	化学合成（低収率・高コスト） 試験管内転写反応

水酸基を持つリボースであること,およびチミンの代わりにウラシルを使用していることである．ウラシルは，アデニンに対しチミンと同様の水素結合を形成し，塩基対を形成する．

DNA が生体内で遺伝情報の保管に利用されているのに対して,RNA は DNA の遺伝情報をもとにタンパク質を合成する遺伝子発現において中心的な役割を果たしている．代表的なものは，DNA 上の遺伝情報をコピーした mRNA（messenger RNA），遺伝暗号に基づいて塩基配列とアミノ酸を対応させるアダプターとしての tRNA（transfer RNA），アミノ酸を連結させてタンパク質を合成する酵素の主要構成要素である rRNA（ribosomal RNA）である．その他にも，相補的な塩基配列を持つ mRNA を分解してタンパク質発現量を調節しているマイクロ RNA や，RNA 鎖を分解したり連結したりする酵素活性を持つリボザイム（RNA 酵素）なども存在する．このような生体内での RNA の多様な働きや，DNA やタンパク質と同様の自己集合能が注目され，RNA を材料として新奇な機能性分子を作り出そうという RNA ナノテクノロジーという分野が台頭しつつある[1-3]．本稿では，ナノスケールの構造体構築に注目して，RNA ナノテクノロジーの動向を紹介する．

RNA 固有の構造モチーフに基づく RNA ナノテクノロジー

RNA 構造生物学の進展に伴って，リボザイムの一つであるグループ I イントロンのような RNA 分子や，リボソームやスプライソソームといった RNA―タンパク質複合体まで，天然の RNA 分子の立体構造が次々に決定されてきた．その結果，RNA 分子がしばしば，タンパク質のように三次元的に複雑に折りたたまれ，込み入った立体構造を有していることが明らかになってきた．その構造の基礎となるのはワトソン―クリック型の塩基対だが，RNA 分子の立体構造中にはその他にも様々な様式の塩基―塩基間相互作用や塩基―リボース間相互作用に基づくヌクレオチド間相互作用が見られた[4]．そのような相互作用を含む，通常の（A 型）二重らせんとは異なる特徴的な立体構造パターンが，様々な RNA 分子の中に多数見つけられてきた．ここでは，それら構造パターンを RNA 構造モチーフと呼ぶ．代表的なものとして，GNAR テトラループや UNCG テトラループ，キンクターン[5]，A-minor モチーフや Ribose zipper などが知られている[6]．複雑な立体構造を有する天然の RNA 分子はこれらの RNA 構造モチーフが組み合わさって形成されているため，RNA 構造モチーフを適切に組み合わせれば，新奇な立体構造を持つ人工の RNA 分子を

作製することもできるはずである．

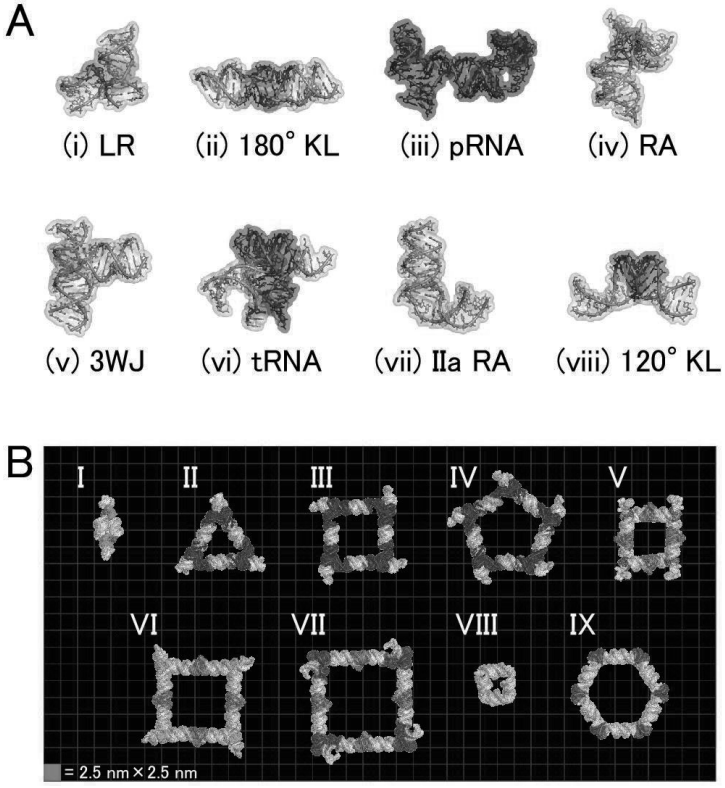


図 1 RNA 構造モチーフを利用して作られた RNA ナノ構造体

（A）様々な RNA 構造モチーフの三次元構造モデル．（B）RNA 構造モチーフを利用して作られた RNA ナノ構造体．

RNA 構造モチーフを構造モジュールとして利用し RNA ナノ構造体を構築した最初の例は，Jaeger らによる tectoRNA である[7]．そこで使用された RNA 構造モチーフは，RNA 酵素であるグループ I イントロン中に見つかった LR（Loop-receptor）モチーフである（図 1A, i）．4 ヌクレオチドからなるループ中の塩基が，レセプターと呼ばれるインターナルループ中の塩基と相互作用しており，二本の RNA 二重鎖を平行に結合させることができる．Jaeger らは，二重鎖中にこの LR モチーフを二つ挿入し，二分子間で会合する RNA（tectoRNA）を作製した（図 1B, I）．LR モチーフ単独での解離定数は数 100 nM であるが，立体構造的に適切な配向で LR モチーフを挿入した tectoRNA 分

子間の解離定数は数 nM と，約 100 倍強い結合親和性を示した[8]．彼らは，H 字型の RNA 分子中に 4 つの LR モチーフを導入し，平面的に連続して結合させマイクロメートルスケールの長いひも状の構造体を作製したり[7,9], 任意の複数の RNA 分子を束ねて筒状の複合体を形成できる tectoRNA[10]なども構築している．

tectoRNA と同じ頃，180° KL（Kissing loop）モチーフを利用した構造体が発表されている[11,12]．このモチーフは，ヒト免疫不全ウイルスのゲノム RNA 中の二量体化開始部位に存在し，二つの二重鎖が末端のループ部位を介して 180 度に連結している（図 1A, ii）．ループ同士は，6 ヌクレオチドの相補的な塩基対形成によって結合しているため, このループ部位の配列を変更することで，結合ペアを自在に変更することができる．原田らは，二つの 180° KL モチーフを一本鎖リンカーでつなぎ, ループ部の塩基配列を適切に設計することによって，RNA の多量体形成パターンを制御し，環状の二量体や三量体，四量体，直鎖状の多量体を作製した．彼らは，これらの構造体を RNA LEGO と呼んでいる．tectoRNA も RNA LEGO も，目的の構造体が形成されたことは，ゲル電気泳動によって複合体の形成を確認したのみで, 分子の形状を直接観察してはいなかった．

原子間力顕微鏡（AFM: Atomic Force Microscope）による RNA 構造体の直接観察は, Guo らによって行われた[13]. 彼らが使用した RNA 構造モチーフは，ϕ29 バクテリオファージ由来の pRNA である（図 1A, iii）．この pRNA は，ファージの複製の際にゲノム DNA をキャプシドに詰め込むためのパッケージング装置を構成している．pRNA は他分子との相互作用に関わる二つのループを持っており，ループ部位の相補的な配列を利用して多量体を形成できる．Guo らは，このループ間の相互作用を利用して複数の分子を会合させ，二量体[13,14]や三量体[13,15]，多数の pRNA が直鎖状につながった構造体[13]を，また pRNA が持つ 3WJ（3-way junction）モチーフを利用して三叉状構造体[16-18]や樹状に分岐したデンドリマー[19]，3WJ モチーフを頂点に使用した三角形[20]や四角形[21], 五角形構造体[22]など, 様々な形状のものを作製してきた（図 1B, II-IV）．平面的なものだけでなく，pRNA 中の 3WJ モチーフを頂点に使用した正四面体状のワイヤーフレーム構造体も作製している[23]．pRNA を利用した立体的な構造体については，別のグループである Hao らによる例もある[24]．彼らは pRNA のループ間相互作用を利用し，三角形および四角形状の三量体および四量体を作製した．さらにそれらを 3WJ 部からのびる二重鎖部分

で相補的に会合させることで, 三角柱や四角柱状のワイヤーフレーム構造体を作製した.

しかし, 初期の Guo らの研究は, pRNA をほぼそのまま使用しており, pRNA の三次元的な分子の立体構造を考慮した設計というよりも, むしろループ部位の塩基配列という一次構造レベルの設計によるものであった．天然の RNA 分子から抽出した RNA 構造モチーフを複数種類組み合わせた構造体を三次元構造レベルで設計し，実際にその形状を直接観察した初めての例は，Chworos らによる RNA ジグソーパズルである[25]（図 1B, V）．彼らは，RNA 二重鎖が 90 度に曲がったリボソーム RNA 由来の RA（right angle）モチーフ（図 1A, iv）を頂点に，180° KL（Kissing loop）モチーフをその両端に持つ RNA 分子を 1 つの単位として，それらが 4 分子会合することで正方形状になる構造体を設計・構築し，その形状を AFM で確認した．この RNA ジグソーパズルは，RNA 構造モチーフをブロックとして三次元的に組み合わせることで任意の形状の分子を作れることを示したほか, 辺の長さを変えるだけで形状はそのままに容易にサイズを変えられることや, 正方形を繋ぎ合わせることで任意の二次元的なパターンを持つ大きなサイズスケールの構造体を作れることも示すなど, ナノテクノロジーの材料としての RNA の可能性を広く提示した画期的な研究であった.

Severcan らは，RA モチーフに加えてリボソーム RNA 由来の 3WJ モチーフ（図 1A, v）と tRNA 由来の tRNA モチーフ（図 1A, vi）を使用して RNA ジグソーパズルと同様の正方形状の構造体を作製し（図 1B, VI および VII），それらのモチーフも 90 度の構造部品として利用できることを示した[26].

tRNA モチーフは，3 方に枝分かれしているので，多面体の頂点にもなりうる．そこで Severcan らは，8 つの tRNA モチーフを使って，四角柱状のワイヤーフレーム構造体を作製した[27]．tRNA モチーフに含まれる 3 本の二重鎖間の角度は 70 度，90 度および 120 度であるため，この四角柱はねじれた形になっている．

他に，90 度に曲がった構造モチーフとして，C 型肝炎ウイルスの IRES 中に存在するドメイン IIa バルジが挙げられる（図 1A, vii）．Dibrov らは，このモチーフを使い，正方形状の構造体を作製した[28] （図 1B, VIII）.

Grabow らは，ループ間が 120 度の角度で結合する 120° KL モチーフ（大腸菌のプラスミドにコードされた転写産物に由来する RNAI/IIi kissing-loop：図 1A, viii）を使い，六角形状の構造体を作製した[29]（図 1B, IX）．両端にループ

を持つ RNA が 6 つ会合することで，このモチーフを頂点とする六角形ができる．RNA 分子の物理的な柔軟性のため，6 量体だけでなく，5 量体や 7 量体も形成されるが，このモチーフにおけるループ間の相互作用もワトソンークリック型の相補的な塩基対形成によるため，ループ部位の配列を変えることで，結合パターンを自在にプログラムでき，形成する構造体を 6 量体のみにする，あるいは 5 量体のみにするといったことも可能である．

ここまで挙げてきた RNA 構造体は，比較的短い RNA からなる単位が複数自己集合して何らかの構造体を形成するというものであった．一方，Cody らは，600 nt を超える長鎖の RNA からなるタイル構造を作製した[30]．彼らはそれを ssRNA（Single-stranded RNA）オリガミと呼んでおり，一見，二重鎖を平行に並べた DNA オリガミに外形的に似ているものの，いわゆる DNA オリガミとは異なる方法論で作製されている．彼らは，ステープル鎖を使わずに，長い一本の RNA 鎖のみを折りたたんで，この RNA オリガミを作製している．それを可能にするために，彼らは平行に並んだ二重鎖をつなぐ“dovetail seam”と呼ぶ分岐とループモチーフを適切に配置し，RNA 鎖が結び目を作ったり交差したりしないような二次構造を設計した．ループモチーフの一部には 180° KL モチーフを使用することによって，局所的な分子内折りたたみ構造間が連結され，1 枚の台形状や平行四辺形状の構造体を形成する．このような設計のおかげで，600 nt を超える長さにもかかわらず，熱変性やアニーリングといった操作は必要とせずに，試験管内で転写されながら設計通りのタイル構造へと折りたたまれることが可能となっている．このタイルの設計法やフォールディング様式は，今後細胞内での RNA 構造体の構築を行う際に，大いに参考になるであろう．

天然の機能性 RNA 分子は，しばしばタンパク質と複合体（RNP 複合体：RNA-protein complex）を形成しており，より複雑な構造や高度な機能を有している．複合体の種類によっては，タンパク質は RNA の特定の配列や立体構造を認識して結合している．筆者らは，そのような RNA とタンパク質が特異的に相互作用する部位をまとめて一つの構造モチーフ（RNP 構造モチーフ）と見なし，RNA 構造モチーフと同様に，RNP 構造モチーフもナノスケールの構造体構築に利用できると考えた．RNP 構造モチーフを使えば，RNA のみでは作れない複雑な構造体を作ることもできるかもしれない．この着想をもとに，筆者らは box C/D-L7 モチーフを利用してナノ構造体の構築を試みた[31]（図 2A）．RNA 二重鎖がインターナルループ部分で折れ曲がった kink-turn モチー

フ[5]の一種である box C/D RNA と，そこに結合するリボソームタンパク質の一つである L7 タンパク質が複合体を形成するこの RNP 構造モチーフ中では，L7 タンパク質の結合により RNA の屈曲角度が約 60 度に固定される[32]（図 2A 左）．この特徴的な立体構造を利用して，筆者らは正三角形状の構造体を設計した（図 2A 右）．この複合体を AFM で観察したところ，L7 タンパク質が無い場合には不定形の粒子が見られたのに対し，L7 タンパク質存在下では正三角形状の構造体が見られた．3 つの L7 タンパク質が一つずつ結合することによって，RNA の形状が円状から正三角形上へと変化していく過程は，その後の高速 AFM によるリアルタイム観察によってより明瞭に確認できた[33].

筆者らはまた，別の RNP 構造モチーフである rRNA-L1 モチーフを使った構造体も作製した[34]（図 2B）．リボソーム中のタンパク質 L1 とその結合 RNA モチーフからなるこのモチーフにおいても，L1 タンパク質との結合により RNA の屈曲角度が固定される[35]．その角度は約 90 度であったため，このモチーフを頂点部分に使用して正方形状の構造体を作製した．

このように，天然に存在する RNA 構造モチーフや RNP 構造モチーフを利用することで，様々な形状の RNA 構造体を構築できることが示されてきた．天然の RNA 分子や RNP 複合体中には，人工的な分子の構築において未だ使用されていない多くの構造モチーフが存在している．それらを使うことで，より複雑な形状を持つ多様な分子を作製できると考えられる．

DNA と同様の方法論に基づく RNA ナノテクノロジー

RNA も，DNA と同様にワトソン―クリック型の塩基対を形成し，相補的な塩基配列を持つ RNA 鎖同士は会合して安定な二重らせん構造を形成できる．そのため，ワトソン―クリック型の塩基対に基づく DNA ナノテクノロジーの方法論は基本的に RNA にもそのまま適用することができる．しかしながら，DNA 二重らせんと RNA 二重らせんの立体構造には違いがあるため，注意が必要である（図 3A）．DNA は通常，10.5 塩基対を 1 周期とする B 型二重らせんを形成する（図 3A 左）．一方，RNA が形成する二重らせんは A 型であり，11 塩基対を 1 周期とする（図 3A 右）．RNA のような生体分子は物理的な柔軟性を具えているため，ある程度のズレは許容されるかもしれないが，より精密な構造体作りのためには，DNA との立体構造の違いに合わせて，連続する二重鎖の長さやジャンクションの位置などを調整する必要がある．

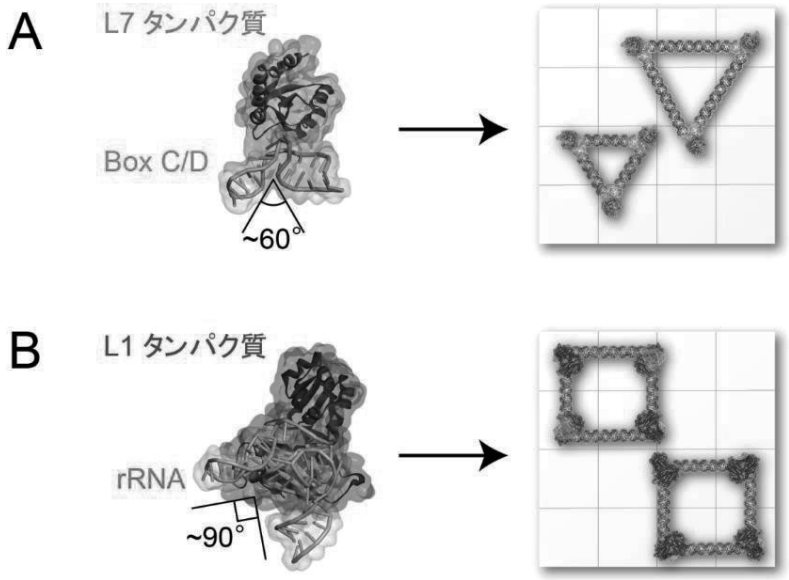


図 2 RNP モチーフを利用したナノ構造体

（A）Box C/D-L7 モチーフを利用した三角形構造体.（B）rRNA-L1 モチーフを利用した四角形構造体.

DNA ナノテクノロジーと同様の方法論に基づいて作製された最初の RNA ナノ構造体は，Afonin らによる立方体状のワイヤーフレーム構造体である[36]. DNA ナノテクノロジー黎明期における Seeman の一連の多面体状ワイヤーフレーム構造体[37]（図 3B-i）や Turberfield のグループによる正四面体状のワイヤーフレーム構造体[38]（図 3B-ii）と同様に，複数の RNA 鎖をハイブリダイズさせることで，立方体が形成される（図 3B-iii）．ここでは，1 辺の長さは 10 塩基対であり，約 13 nm の粒径の立方体が作られている．Hoiberg らも同様の方法で 1 辺が 12 nm の正八面体状のワイヤーフレーム構造体を作製している[39]．平面的な構造体ではあるが，Bui らによる多角形の作製も同様の作り方とみなせる[40]（図 3B-iv）．彼らは，多角形の各辺を構成する二重鎖を”UUUU”の 4 ヌクレオチドでつなぐことで, RNA 鎖を効率良くフォールディングさせ，1 辺が 22 塩基対からなる三角形，四角形，五角形および六角形までの多角形を作製している．

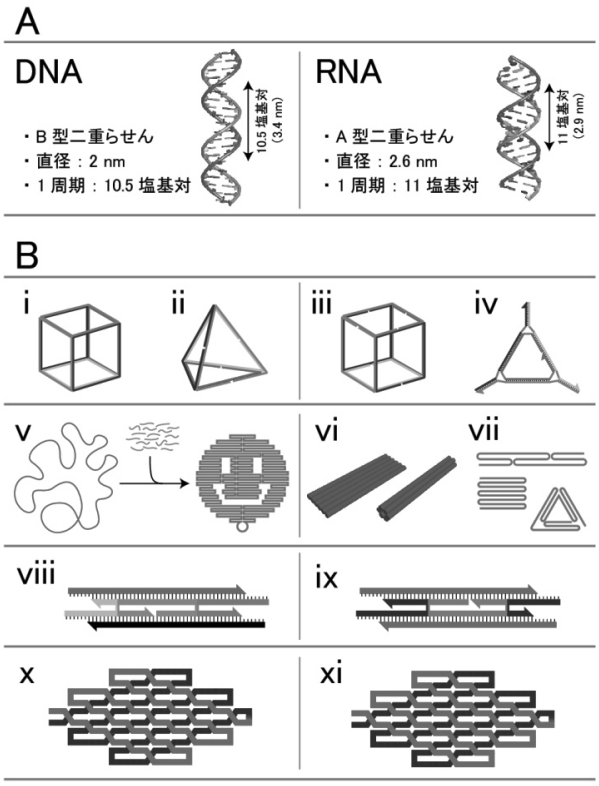


図 3　DNA ナノテクの方法論による RNA ナノテク

（A）DNA と RNA は異なる二重らせん構造を示す．（B）DNA ナノテク（左）とその RNA への応用（右）．

1 本の長い DNA 鎖に多数の短いステープル鎖をハイブリダイズさせて任意の形状を作らせる，Rothemund によって開発された DNA オリガミ[41]（図 3B-v）の方法論を RNA に適用した例は，遠藤らおよび Wang らによって報告されている[42,43]．両方のグループとも，長鎖に RNA（それぞれ，717 nt および 1,071 nt）を，ステープル鎖には DNA を使用し，それぞれ，長方形状のタイルとチューブ[42]（図 3B-vi），リボンと長方形，三角形状のタイルを作製した[43]（図 3B-vii）．遠藤らは後に，ステープル鎖にも RNA を使用した長方形状のタイルおよびチューブを作製し，DNA オリガミの完全な RNA 化にも成功している[44]．Yu らは，平面状 DNA タイル[45]の作製に使用された T-ジャンクションを三次元的に組み合わせ，8 個のユニットから成る，四角柱状のワイヤーフレーム構造を作製した[46]．Stewart らは，DX (Double crossover) タイル[47]

（図 3B-viii）を RNA に適用し，RNA タイルを作製した[48]（図 3B-ix）．Stewart らは後に，そのタイルを末端部分で他のタイルと連結させ，リボンをねじったような巨大な管状構造体も作製している[49]．Han らは最近，長鎖の一本鎖 DNA からなる新たなタイプの DNA オリガミ技術を発表した[50]．そこでは，DNA 二重鎖間の分岐・連結に PX モチーフ（parallel crossover あるいは paranemic crossover [51,52]とも）を使用することで，長鎖 DNA 中に結び目を生じさせずに任意の形状へと折り畳ませることに成功している（図 3B-x）．彼らはまた同論文中で，その技術を RNA にも適用し，6,000 nt を超える 1 本鎖 RNA からなるひし形状のタイルも作製している（図 3B-xi）．

このように，様々な DNA ナノテクノロジーの方法論を利用した RNA ナノ構造体作りが行われてきたが，DNA bricks[53]や一本鎖から成る多面体ワイヤーフレーム構造[54]など，RNA への適用が行われていないものも多い．He らによる多面体ワイヤーフレーム構造体[55]のように，一部の鎖を RNA に変え DNA/RNA ハイブリッドにするにとどまっているものもある[56]．それらの構築原理・方法論も容易に RNA にも適用できるはずであり，それら DNA ナノテクノロジーの方法論や知見を取り込むことで，RNA ナノテクノロジーの可能性はさらに広がると期待される．

その他の RNA ナノテクノロジー

ここまで紹介してきたナノ構造体は，構築すべき分子の形状が三次元的に定義された形状として設計されたものである．そのような意味での“形の設計”はなされていない，RNA を利用した微視的な構造体も報告されている．

Lee らは，環状化した DNA を鋳型として用い，そこからヘアピン構造が連続する長鎖 RNA を試験管内転写反応により合成した．この RNA は，溶液中で自発的に凝集して繊維状の構造へ，繊維状のものが集まってシート状に，そしてそのシートが折りたたまりながら凝集することで最終的に襞に富んだ球状構造体を形成した．彼らは，直径数 μm のこの構造体をマイクロスポンジと呼んでいる[57]. Lee らのグループはまた，同様の方法で作製した RNA を 37℃で乾燥させることで数 mm スケールの大きさを持つ膜状の構造体を作製したり[58]，その膜を超音波処理して 1 マイクロメートル以下のナノシートを作るといったことも行っている[59].

Huang らは，RNA からハイドロゲルを作ったことを報告している[60]．彼らは当初，特定の分子に結合する RNA であるアプタマーを用いたパーキンソン

病のような認知症の治療法の開発を行っていた．そのために AMPA 受容体を標的とするアプタマーを試験管内進化法によって取得したところ, そのアプタマーがゲルを形成することを発見した. アプタマーの詳細な生化学的解析などは行われていないものの, アプタマー分子間ネットワークの形成によってゲル化が起こること, そのために重要な配列モチーフがあることなどを明らかにしている．

次は，細胞内におけるゲル状構造体の例である．真核生物の細胞内には，グラニュールと呼ばれる，膜で仕切られていない RNA とタンパク質が凝集した構造が存在している. ストレス顆粒やP-ボディなどの様々なグラニュールは，mRNA の輸送や貯蔵に関わり遺伝子発現を制御していると考えられている．Nakamura らは，ゲルを形成する能力のあるタンパク質間結合ドメインを持つタンパク質に，ポリアデニン RNA 結合モチーフをタンデムに 3 つ導入した．このタンパク質を哺乳類細胞中で発現させることで，RNA とタンパク質からなる人工 RNA グラニュールを作製することに成功した[61]．これは，天然の RNA グラニュールの物理化学的な性質や構築原理，生物学的な役割の理解に役立つとともに, 新たな遺伝子発現制御ツールの開発において何らかのヒントを与えてくれるかもしれない．

他に, 環状の一本鎖 RNA で作られた, 三葉結び目や, 環状 DNA と環状 RNA が絡み合ったボロミアンリング（三輪違）といった，トポロジー的な構造体が発表されている[62].

RNA ナノ構造体の応用

ここまで述べてきた様々な RNA ナノ構造体の応用として，機能性分子を保持させるためのキャリアとしての利用が研究されている．

最も良く行われているのが，標的遺伝子の発現を抑制する RNAi（RNA interference）を起こすための，標的 mRNA の配列に相補的な 20 数 nt の siRNA の導入である．ナノ構造体と siRNA を融合するシンプルな方法は，3WJ や構造体末端の二重鎖部分を延長して，そこに siRNA として機能する配列を導入することである. 導入された siRNA に相当する部分は, 細胞内に存在する Dicer という RNA プロセシング酵素によって切り出され，siRNA として作用する．上で紹介した DX タイルや[48]，多角形[40]，pRNA を利用した構造体[14-16,18,21]などが，この方法で siRNA を導入できており，ヒト細胞中あるいはマウスにおいて標的遺伝子の抑制効果が確認されている．

そのような二重鎖末端を持たない構造体の場合には, 構造体の二重鎖上にニックあるいはジャンクションを設定し, そこに siRNA 配列を連結させている. 120° KL 六角形[29,36]や, 立方体ワイヤーフレーム[36], 長田らの RNP 三角形[33]などがこれにあたる.

Hoiberg らは, 八面体状のワイヤーフレーム構造体を形成する辺を siRNA として利用している[39]. 彼らは, 八面体の辺部分に, Dicer による認識に必要な 2 nt の 3'突出末端を設置したところ, Dicer による辺部分の切り出しが可能になることが in vitro で確認できた. 実際にこの八面体状の構造体をヒト培養細胞に導入すると, 通常の siRNA と同程度に標的遺伝子の発現を抑制する効果を示した. 以上は, Dicer によって構造体上の二重鎖 RNA が切り出されることで siRNA が生成していたが, その他にも, 鎖交換反応によって siRNA が放出される機構なども作られている[63]

特定の分子に結合する RNA 分子であるアプタマーも, ナノ構造体の末端あるいは途中に挿入するだけで簡単に導入できる. 例えば, 色素分子に結合することで蛍光を発するアプタマーが立方体[36]や 120° KL 六角形[64], pRNA 構造体[20,21], RNP 四角形[34]などに導入され, 蛍光による検出を可能にしている. 特定の受容体に対する結合能を持つアプタマーも利用されており, その受容体を発現している標的細胞に選択的なナノ構造体のデリバリーも試みられている[18,64]. 他にも, ある種の乳がん細胞特異的な細胞表面抗原に結合するペプチド[33]や, がん細胞特異的なデリバリーのための葉酸[16], 免疫活性化のための CpG オリゴ DNA[22], RNA 酵素であるリボザイム [16,20,21]などが導入されている.

ナノ構造体をキャリアとして使うことで, ここで紹介したような様々な分子の機能を合わせ持った複合体を容易に作製できる[21,64]. 一般に RNA は生体内では不安定であるとされているが, 上で紹介したような構造体を形成することで, 熱安定性[20]や分解酵素に対する耐性[33,34]が向上することが知られている. 構造体の形状やサイズの違いによって生体内での動態が変化すること[65,66]なども利用すれば, 好ましい薬物動態プロファイルを示す効果的なドラッグキャリアの開発につながるかもしれない.

RNA ナノ構造体の今後の課題

これまでに様々な形状の RNA ナノ構造体が作製されてきたが, そのほとんどはサイズが小さく, 天然の RNA 分子に比べると非常に単純な形状のものばかりであった. 今後 RNA ナノテクノロジーの可能性を広げるためには, 作製

できる分子のサイズや形状のバリエーションを広げる必要がある. そのためには，DNA ナノテクノロジーの方法論を取り入れ，より大きなサイズの構造体を作製できるようにするとともに, 小さなサイズスケールにおいて複雑な構造を作製できるよう，部品として利用可能な RNA 構造モチーフの種類を増やす必要がある.

RNA 構造体の機能性を向上させるために，RNA 以外の材料とのハイブリッド化も進めたい. RNA 構造体は，直鎖状の一本鎖 RNA に比べれば安定性は高いものの, 生体内でのドラッグキャリアとしての利用を考えると不十分なことも多い．また，細胞種によっては RNA の導入によって，外来核酸に対する防御機構である免疫応答が惹き起され，強い細胞毒性を示すことがある．これらは，DNA とのハイブリッド化や RNA の化学修飾によって制御できることが示唆されている[40,63,67,68]．また，タンパク質は核酸に比べはるかに多彩な機能を持っている．RNP モチーフを利用すれば，RNA とタンパク質を直接結び付けることができるため[31,33,69]，タンパク質の機能を RNA 構造体に容易に導入できる．Omabegho らは Kt-L7 モチーフを利用して，アクチン－ミオシンからなるタンパク質系と鎖交換による二次構造変化を行う RNA-DNA 系を統合し，2 つの独立した動作系を持つ分子モーターを作製している[70]．このように，他の生体分子と組み合わせることによって，RNA のみでは実現が困難な機能も持たせることができる.

生体分子を利用した分子ロボットの創製に向けて，また，細胞の機能制御といった生命科学・医学分野での応用のために，これらの諸課題を解決し，多様なサイズ・形状の分子を自在に設計・構築できるようになることが望まれる.

[1] Guo P, The emerging field of RNA nanotechnology, *Nat Nanotechnol*, 5, 12, pp. 833-842, 2010.

[2] Shukla GC, et al., A boost for the emerging field of RNA nanotechnology, *ACS Nano*, 5, 5, pp. 3405-3418, 2011.

[3] Jasinski D, et al., Advancement of the emerging field of RNA nanotechnology, *ACS Nano*, 11, 2, pp. 1142-1164, 2017.

[4] Leontis NB, Stombaugh J, Westhof E, The non-Watson-Crick base pairs and their associated isostericity matrices, *Nucleic Acids Res*, 30, 16, pp. 3497-3531, 2002.

[5] Huang L, Lilley DM, The kink-turn in the structural biology of RNA, *Q Rev Biophys*, 51, e5, 2018.

[6] Hendrix DK, Brenner SE, Holbrook SR, RNA structural motifs: Building blocks of a modular biomolecule, *Q Rev Biophys*, 38, 3, pp. 221-243, 2005.

[7] Jaeger L, Leontis NB, Tecto-RNA: One-dimensional self-assembly through tertiary interactions, *Angew Chem Int Ed Engl*, 39, 14, pp. 2521-2524, 2000.

[8] Jaeger L, Westhof E, Leontis NB, TectoRNA: Modular assembly units for the construction of rna nano-objects, *Nucleic Acids Res*, 29, 2, pp. 455-463, 2001.

[9] Nasalean L, et al., Controlling RNA self-assembly to form filaments, *Nucleic Acids Res*, 34, 5, pp. 1381-1392, 2006.

[10] Novikova IV, et al., Engineering cooperative tecto-RNA complexes having programmable stoichiometries, *Nucleic Acids Res*, 39, 7, pp. 2903-2917, 2011.

[11] Horiya S, et al., RNA LEGO: Magnesium-dependent assembly of RNA building blocks through loop-loop interactions, *Nucleic Acids Res Suppl*, 2, pp. 41-42, 2002.

[12] Horiya S, et al., RNA LEGO: Magnesium-dependent formation of specific RNA assemblies through kissing interactions, *Chem Biol*, 10, 7, pp. 645-654, 2003.

[13] Shu D, et al., Bottom-up assembly of RNA arrays and superstructures as potential parts in nanotechnology, *Nano Lett*, 4, 9, pp. 1717-1723, 2004.

[14] Guo S, et al., Specific delivery of therapeutic RNAs to cancer cells via the dimerization mechanism of phi29 motor pRNA, *Hum Gene Ther*, 16, 9, pp. 1097-1109, 2005.

[15] Khaled A, et al., Controllable self-assembly of nanoparticles for specific delivery of multiple therapeutic molecules to cancer cells using RNA nanotechnology, *Nano Lett*, 5, 9, pp. 1797-1808, 2005.

[16] Shu D, et al., Thermodynamically stable RNA three-way junction for constructing multifunctional nanoparticles for delivery of therapeutics, *Nat Nanotechnol*, 6, 10, pp. 658-667, 2011.

[17] Rychahou P, et al., Delivery of RNA nanoparticles into colorectal cancer metastases following systemic administration, *ACS Nano*, 9, 2, pp.1108-1116, 2015.

[18] Binzel DW, et al., Specific delivery of miRNA for high efficient inhibition of prostate cancer by RNA nanotechnology, *Mol Ther*, 24, 7, pp.1267-1277, 2016.

[19] Sharma A, et al., Controllable self-assembly of RNA dendrimers, *Nanomedicine*, 12, 3, pp. 835-844, 2016.

[20] Khisamutdinov EF, Jasinski DL, Guo P, RNA as a boiling-resistant anionic

polymer material to build robust structures with defined shape and stoichiometry, *ACS Nano*, 8, 5, pp. 4771-4781, 2014.

[21] Jasinski DL, et al., Physicochemically tunable polyfunctionalized RNA square architecture with fluorogenic and ribozymatic properties, *ACS Nano*, 8, 8, pp. 7620-7629, 2014.

[22] Khisamutdinov EF, et al., Enhancing immunomodulation on innate immunity by shape transition among RNA triangle, square and pentagon nanovehicles, *Nucleic Acids Res*, 42, 15, pp. 9996-10004, 2014.

[23] Li H, et al., Controllable self-assembly of RNA tetrahedrons with precise shape and size for cancer targeting, *Adv Mater*, 28, 34, pp. 7501-7507, 2016.

[24] Hao C, et al., Construction of RNA nanocages by re-engineering the packaging RNA of phi29 bacteriophage, *Nat Commun*, 5, 3890, 2014.

[25]Chworos A, et al., Building programmable jigsaw puzzles with RNA. *Science*, 306, 5704, pp. 2068-2072, 2004.

[26] Severcan I, et al., Square-shaped RNA particles from different RNA folds, *Nano Lett*, 9, 3, pp. 1270-1277, 2009.

[27] Severcan I, et al., A polyhedron made of tRNAs, *Nat Chem*, 2, 9, pp. 772-779, 2010.

[28] Dibrov SM, et al., Self-assembling RNA square, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 16, pp. 6405-6408, 2011.

[29] Grabow WW, et al., Self-assembling RNA nanorings based on RNAI/II inverse kissing complexes, *Nano Lett*, 11, 2, pp. 878-887, 2011.

[30] Geary C, Rothemund PW, Andersen ES, A single-stranded architecture for cotranscriptional folding of RNA nanostructures, *Science*, 345, 6198, pp. 799-804, 2014.

[31] Ohno H, et al., Synthetic RNA-protein complex shaped like an equilateral triangle. *Nat Nanotechnol*, 6, 2, pp. 116-120, 2011.

[32] Moore T, et al., Molecular basis of box C/D RNA-protein interactions; cocrystal structure of archaeal L7Ae and a box C/D RNA, *Structure*, 12, 5, pp. 807-818, 2004.

[33] Osada E, et al., Engineering RNA-protein complexes with different shapes for imaging and therapeutic applications, *ACS Nano*, 8, 8, pp. 8130-8140, 2014.

[34] Ohno H, Inoue T, Designed regular tetragon-shaped RNA-protein complexes with

ribosomal protein L1 for bionanotechnology and synthetic biology, *ACS Nano*, 9, 5, pp. 4950-4956, 2015.

[35] Nikulin A, et al., Structure of the L1 protuberance in the ribosome, *Nat Struct Biol*, 10, 2, pp. 104-108, 2003.

[36] Afonin KA, et al., In vitro assembly of cubic RNA-based scaffolds designed in silico, *Nat Nanotechnol*, 5, 9, pp. 676-682, 2010.

[37] Chen JH, Seeman NC, Synthesis from DNA of a molecule with the connectivity of a cube, *Nature*, 350, 6319, pp. 631-633, 1991.

[38] Goodman RP, et al., Rapid chiral assembly of rigid DNA building blocks for molecular nanofabrication, *Science*, 310, 5754, pp. 1661-1665, 2005.

[39] Hoiberg HC, et al., An RNA origami octahedron with intrinsic siRNAs for potent gene knockdown, *Biotechnol J*, e1700634, 2018.

[40] Bui MN, et al., Versatile RNA tetra-U helix linking motif as a toolkit for nucleic acid nanotechnology, *Nanomedicine*, 13, 3, pp. 1137-1146, 2017.

[41] Rothemund PW, Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns, *Nature*, 440, 7082, pp. 297-302, 2006.

[42] Endo M, et al., RNA-templated DNA origami structures, *Chem Commun (Camb)*, 49, 28, pp. 2879-2881, 2013.

[43] Wang P, et al., RNA-DNA hybrid origami: Folding of a long RNA single strand into complex nanostructures using short DNA helper strands, *Chem Commun (Camb)*, 49, 48, pp. 5462-5464, 2013.

[44] Endo M, et al., Preparation of chemically modified RNA origami nanostructures, *Chemistry*, 20, 47, pp. 15330-15333, 2014.

[45] Hamada S, Murata S, Substrate-assisted assembly of interconnected single-duplex DNA nanostructures, *Angew Chem Int Ed Engl*, 48, 37, pp. 6820-6823, 2009.

[46] Yu J, et al., De novo design of an RNA tile that self-assembles into a homo-octameric nanoprism, *Nat Commun*, 6, 5724, 2015.

[47] Winfree E, et al., Design and self-assembly of two-dimensional DNA crystals. *Nature*, 394, 6693, pp. 539-544, 1998.

[48] Stewart JM, et al., Programmable RNA microstructures for coordinated delivery of siRNAs, *Nanoscale*, 8, 40, pp. 17542-17550, 2016.

[49] Stewart JM, Subramanian HKK, Franco E, Self-assembly of multi-stranded RNA motifs into lattices and tubular structures, *Nucleic Acids Res*, 45, 9, pp. 5449-5457,

2017.
[50] Han D, et al., Single-stranded DNA and RNA origami. *Science*, 358, 6369, 2017.
[51] Shen Z, et al., Paranemic crossover DNA: A generalized holliday structure with applications in nanotechnology, *J Am Chem Soc*, 126, 6, pp. 1666-1674, 2004.
[52] Afonin KA, Cieply DJ, Leontis NB, Specific RNA self-assembly with minimal paranemic motifs, *J Am Chem Soc*, 130, 1, pp. 93-102, 2008.
[53] Ke Y, et al., Three-dimensional structures self-assembled from DNA bricks, *Science*, 338, 6111, pp. 1177-1183, 2012.
[54] Kocar V, et al., Design principles for rapid folding of knotted DNA nanostructures, *Nat Commun*, 7, 10803, 2016.
[55] He Y, et al., Hierarchical self-assembly of DNA into symmetric supramolecular polyhedra, *Nature*, 452, 7184, pp. 198-201, 2008.
[56] Ko SH, et al., Synergistic self-assembly of RNA and DNA molecules, *Nat Chem*, 2, 12, pp. 1050-1055, 2010.
[57] Lee JB, et al., Self-assembled RNA interference microsponges for efficient siRNA delivery, *Nat Mater*, 11, 4, pp. 316-322, 2012.
[58] Han D, et al., Self-assembly of free-standing RNA membranes, *Nat Commun*, 5, 4367, 2014.
[59] Kim H, Lee JS, Lee JB, Generation of siRNA nanosheets for efficient RNA interference, *Sci Rep*, 6, 25146, 2016.
[60] Huang Z, et al., An RNA aptamer capable of forming a hydrogel by self-assembly, *Biomacromolecules*, 18, 7, pp. 2056-2063, 2017.
[61] Nakamura H, et al., Intracellular production of hydrogels and synthetic RNA granules by multivalent molecular interactions, *Nat Mater*, 17, 1, pp. 79-89, 2018.
[62] Liu D, et al., Synthesizing topological structures containing RNA, *Nat Commun*, 8, 14936, 2017.
[63] Afonin KA, et al., Triggering of RNA interference with RNA-RNA, RNA-DNA, and DNA-RNA nanoparticles, *ACS Nano*, 9, 1, pp. 251-259, 2015.
[64] Afonin KA, et al., Multifunctional RNA nanoparticles, *Nano Lett*, 14, 10, pp. 5662-5671, 2014.
[65] Guo S, et al., Size, shape, and sequence-dependent immunogenicity of RNA nanoparticles, *Mol Ther Nucleic Acids*, 9, pp. 399-408, 2017.
[66] Jasinski DL, Li H, Guo P, The effect of size and shape of RNA nanoparticles on

biodistribution, *Mol Ther*, 26, 3, pp. 784-792, 2018.

[67] Halman JR, et al., Functionally-interdependent shape-switching nanoparticles with controllable properties, *Nucleic Acids Res*, 45, 4, pp. 2210-2220, 2017.

[68] Johnson MB, et al., Programmable nucleic acid based polygons with controlled neuroimmunomodulatory properties for predictive QSAR modeling, *Small*, 13, 42, 2017.

[69] Fujita Y, et al., Cell-surface receptor control that depends on the size of a synthetic equilateral-triangular RNA-protein complex, *Sci Rep*, 4, 6422, 2014.

[70] Omabegho T, et al., Controllable molecular motors engineered from myosin and RNA, *Nat Nanotechnol*, 13, 1, pp. 34-40, 2018.

（京都大学　大野博久，齊藤博英）

3．9 ペプチド・タンパク質設計技術の動向

分子ロボットを創製する際に，生体分子の自己集合を利用してナノ構造を自発的に組み上げる手法がとられる．現在，DNA オリガミに代表される DNA ナノテクノロジーによって，様々なナノ構造体を自由自在に設計・構築できるようになっている．近年，ペプチド・タンパク質の自己集合を合理的に設計することで，ペプチド・タンパク質からなるナノ構造構築も盛んに研究されてきている[1]．本稿では，それらの設計技術の動向について概説する．

多くの場合，タンパク質の自己集合によるナノ構造体は，タンパク質–リガンド間相互作用，あるいはタンパク質–タンパク質相互作用を利用することで構築されている．例えば，林らはヘムタンパク質の補因子ヘムとヘムポケット間の相互作用を利用して，*Cyt* b_{562} などのヘムタンパク質の一次元および二次元集合体を構築している（図 1A）[2]．Wagner らは，人工的に二量化させたジ

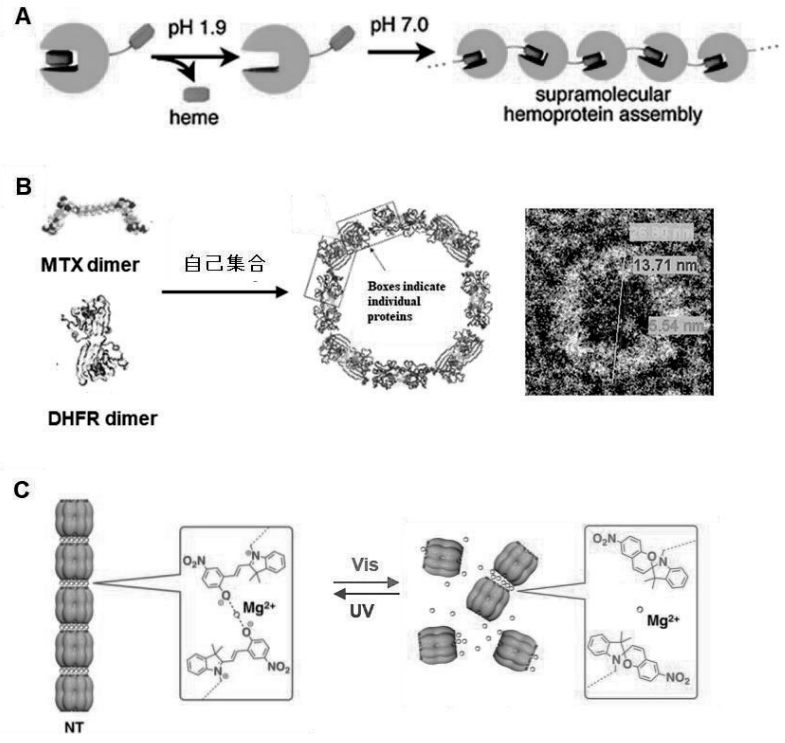


図 1．タンパク質自己集合によるナノ構造体の構築の例．（Reprinted from Chem. Commun. 2012 [2], J. Am. Chem. Soc. 2006 [3], J. Am. Chem. Soc. 2013 [4]）

ヒドロ葉酸還元酵素とその阻害剤(MTX)の二量体を相互作用させることで, 直径 8-20 nm のタンパク質ナノリングを創製することに成功している（図 1B）[3].

相田らは, 分子シャペロンとして知られる筒状の 14 量体タンパク質 GroEL にスピロピラン/メロシアニンを導入し, 光異性化によりチューブ状タンパク質集合体の形成・解離を制御できることを示した（図 1C）[4]. メロシアニンの酸素アニオンと Mg^{2+}イオンの相互作用によりチューブ状集合体が形成されるが, 光異性化により電荷の無いスピロピランとなるとで, 集合体が解離される. このタンパク質ナノチューブには, 緑色蛍光タンパク質 GFP が内包でき, 光異性化により GFP を放出することにも成功している.

二量体および三量体を形成するタンパク質サブユニットを連結した融合タンパク質とすることで, 三回対称軸を有するタンパク質ナノカプセルを構築することができる. Yeates らは, インフルエンザウイルスの二量体 M1 マトリッ

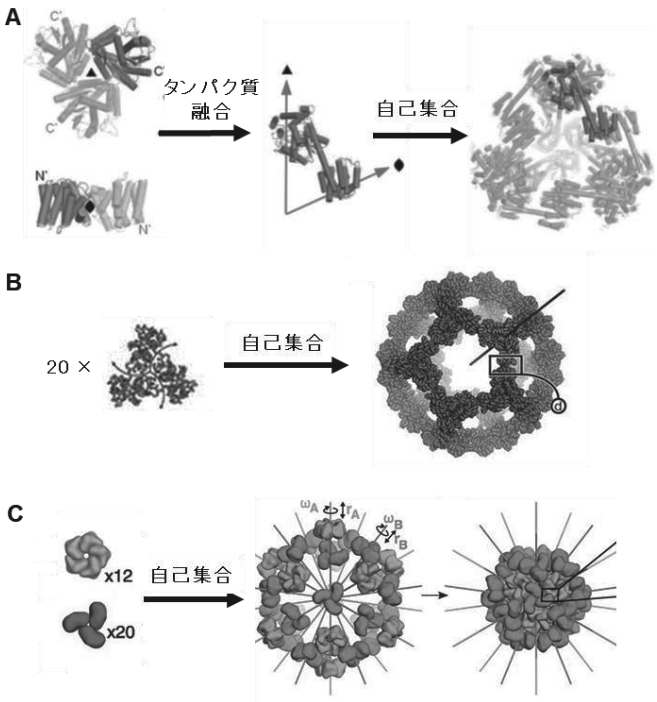


図 2.　対称性を利用したタンパク質の自己集合によるタンパク質ナノカプセルの構築の例.

クスタンパク質と三量体ブロモペルオキシダーゼを連結した融合タンパク質を創製し，これらが自己集合することで，約 15 nm の四面体構造を構築することに成功している（図 2A）[5, 6]. 最近 Baker らは，人工設計した三量体タンパク質の自己集合により直径 25 nm の正 20 面体対称性ナノカプセルを構築することに成功した（図 2B）[7]. さらに，5 量体タンパク質と 3 量体タンパク質の自己集合により 120 個のタンパク質からなる正 20 面体対称性ナノカプセルも構築している（図 2C）[8]. これらの構造は，球状ウイルスキャプシドの集合原理と類似しており，大変興味深い構造である.

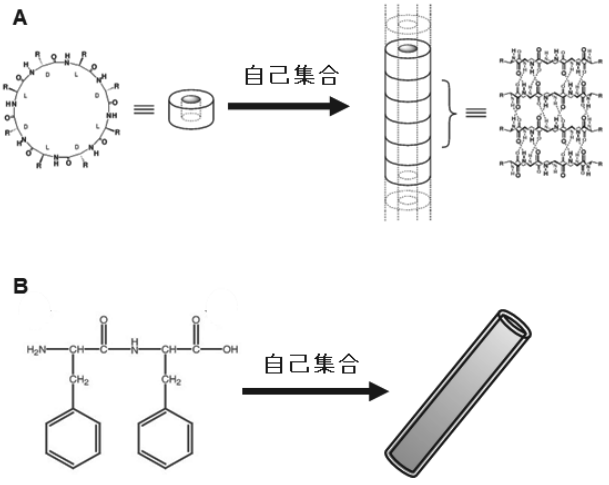


図 3. ペプチド自己集合によるナノチューブの構築の例

タンパク質の部分構造であるペプチドを合理的に設計し，ナノ構造を構築する研究も盛んに行われている．1990 年代から，Ghadiri らの環状ペプチドの水素結合によるペプチドナノチューブの創製の研究が知られている（図 3A）[9]. また，Gazit らのジペプチド Phe-Phe が水溶液中で自己集合して形成されるペプチドナノチューブも有名である（図 3B）[10]. 最近では，α-ヘリックス

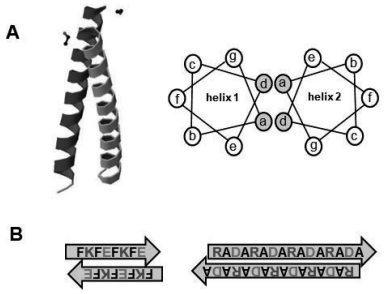


図 4. コイルドコイル(A)および *β*-シート形成ペプチド(B)の設計例.

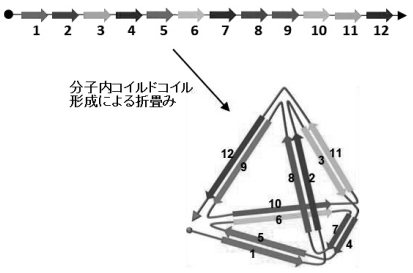


図 5. コイルドコイル形成によるペプチド折り紙.

のコイルドコイル構造やβ-シート構造などの二次構造を設計することで, 多様ナノ構造形成も可能となってきている. コイルドコイル構造は, α-ヘリックスのホイール図で疎水性アミノ酸や静電相互作用するアミノ酸を適切に配置することで分子設計できる（図 4A）. また, β-シート構造は, 親水性と疎水性のアミノ酸を交互に配置し, 静電相互作用するアミノ酸を適切に配置することで設計できる（図 4B）. Jerala らは, 二量体コイルドコイルを形成するペプチドを 12 本連結したポリペプチドを合成し, それが分子内で折り畳まれることで, 一辺が約 7 nm の正四面体構造を形成した（図 5）[11]. 彼らはこの戦略を「ペプチド折り紙」と呼んでいる.

β-シートやコイルドコイルを形成して自己集合するペプチドを三叉路状に配置することで, ナノカプセルを構築することができる. 筆者らは 2005 年に, 三叉路状ペプチドコンジュゲートの自己集合によりウイルス様ナノカプセルの創製に世界で初めて成功した（図 6A）[12]. 三叉路状の逆平行β-シートペプチドコンジュゲート Trigonal-$(FKFE)_2$ を合成し, それが水中で自己集合することにより直径 20 nm のナノカプセルを形成することを示した. この粒径は, コンジュゲートが逆平行β-シートにより正 12 面体構造を形成した場合の直径に近い値である. また筆者らは, トリプトファンジッパー形成ペプチド KTWTWTE を三叉路状に配置したコンジュゲートが, 中性水溶液中で約 30 nm の球状集合体を形成するのに対し, 酸性水溶液では集合体が解離するという pH 応答性を示すことも報告している[13]. さらに筆者らは, 単純な天然トリ

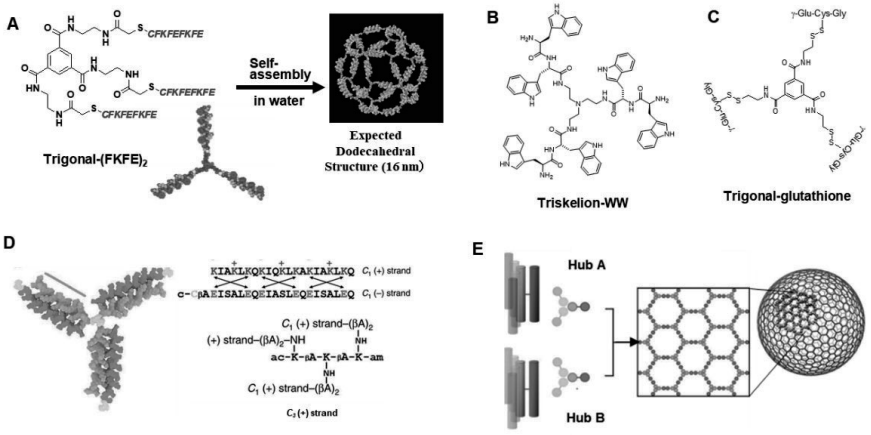


図 6. 自己集合により球状ナノカプセルを形成する三叉路状ペプチドコンジュゲートの例.

ペプチドであるグルタチオンを三叉路状に配置したコンジュゲートも水中で自己集合し，100-250 nm 程度のナノカプセルを形成することを見出している（図 6C）[14, 15]．筆者らの最初の報告の 2 年後に Gazit らは，ジペプチド Trp-Trp を三叉路状に配置したコンジュゲートが，メタノール-水混合液中で 200-500 nm の球状集合体を形成することを報告している（図 6B）[16]．同様の戦略で，Ryadnov らは，カチオン鎖とアニオン鎖のヘテロコイルドコイル構造を形成する三叉路ペプチドコンジュゲートを設計・合成し，抗菌活性を示す約 20 nm の人工キャプシド構造を構築している（図 6D）[17]．また Woolfson らは，ホモ三量体コイルドコイルを形成するペプチドをコアとして，それにヘテロ二量体コイルドコイルを形成するペプチドを連結した Hub A と Hub B を設計・合成し，これらが互いに相補的な二量体コイルドコイル形成により自己集合し，粒径約 100 nm のナノカプセルを形成することを示している（図 6E）[18]．

筆者らは 2010 年に，植物ウイルスの一種であるトマトブッシ―スタントウイルス(TBSV)の正十二面体の骨格構造形成に関与している三回対称性のβ–Annulus 構造モチーフに着目し，これをビルディングブロックとしたペプチドナノカプセル（人工ウイルスキャプシド）の創製に世界で初めて成功している（図 7A）[19]．24 残基のβ–Annulus ペプチドを Fmoc 固相合法により合成し，水に溶解させると，30-50 nm の球状構造体が形成されていることが動的光散乱(DLS)測定や (TEM 観察により確認された．また，放射光を用いた小角 X 線散乱(SAXS)測定により，中空ナノカプセル構造であることが明確に示された．この人工ウイルスキャプシドの内部空間には様々な分子を内包できることがわかってきている．人工ウイルスキャプシドのζ電位の pH 依存性から，β–Annulus ペプチドの C 末端側がキャプシド外表面に，N 末端が内部に配向しており，中性 pH において内部はカチオン性であることが示唆されている．そのため，アニオン性の M13 ファージ DNA が，静電相互作用により人工ウイルスキャプシドに内包される[20]．人工ウイルスキャプシドへのアニオン性蛍光粒子（CdTe ナノ粒子）の内包挙動を，蛍光相関分光(FCS)法により解析することも可能である[21]．さらに，内部に配向するβ–Annulus ペプチド N 末端を Ni-NTA 錯体で修飾することで，His-tag 化した緑色蛍光タンパク質(His-tag GFP)を内包することも可能である（図 7B）[22]．一方，外表面に配向するβ–Annulus ペプチドの C 末端を任意の機能性分子で修飾することで，表面に機能性を付与した人工ウイルスキャプシドを創製できる．これまでに，金ナノ粒子[23]，一本鎖 DNA[24]，コイルドコイル突起[25]，およびヒト血清アルブミ

ン(HSA)で表面修飾した人工ウイルスキャプシドの創製に成功している.

このように，ペプチドナノカプセルなどの多様な機能性ナノ構造体を自在に分子設計し，構築する技術が発展してきている．今後，ペプチド・タンパク質ナノ構造体を用いることで,様々な分子ロボットを開発することが期待できる.

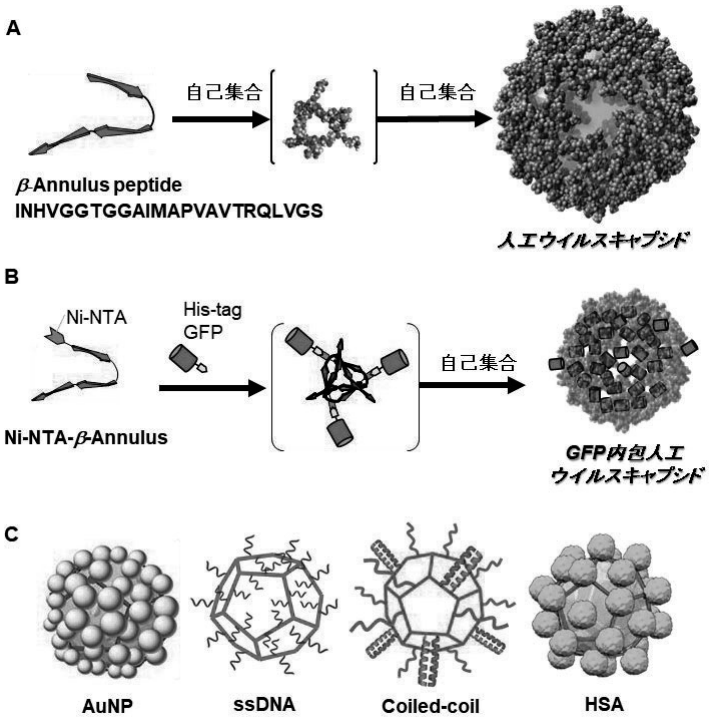


図 7. (A) トマトブッシースタントウイルス由来 β-Annulus ペプチドの自己子集合による人工ウイルスキャプシドの構築. (B) 人工ウイルスキャプシドへの His-tag GFP の内包. (C) 人工ウイルスキャプシドの表面修飾.

[1] K. Matsuurua, Rational design of self-assembled proteins and peptides for nano- and micro-sized architectures, *RSC Adv.*, **4**, 2942-2953, 2014.

[2] K. Oohora, A. Onoda, T. Hayashi, Supramolecular assembling systems formed by heme–heme pocket interactions in hemoproteins, *Chem. Commun.*, **48**, 11714-11726, 2012.

[3] J. C. T. Carlson, S. S. Jena, M. Flenniken, T. F. Chou, R. A. Siegel, C. R.Wagner,

Chemically Controlled Self-Assembly of Protein Nanorings, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 7630-7638, 2006.

[4] T. Sendai, S. Biswas, T. Aida, Photoreconfigurable Supramolecular Nanotube, *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 11509-11512, 2013.

[5] J. E. Padilla, C. Colovos, T. O. Yeates, Nanohedra: Using symmetry to design self-assembling protein cages, layers, crystals, and filaments, *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*., **98**, 2217-2221, 2001.

[6] Y. T. Lai et al., Structure of a designed protein cage that self-assembles into a highly porous cube, *Nat. Chem.*, **6**, 1065-1071, 2014.

[7] Y. Hsia et al., Design of a hyperstable 60-subunit protein icosahedron, *Nature*, **535**, 136-139, 2016.

[8] J. B. Bale et al., Accuratedesign of megadalton-scale two-component icosahedral protein complexes, *Science*, **353**, 389-394, 2016.

[9] M. R. Ghadiri et al., Self-assembling organic nanotubes based on a cyclic peptide architecture, *Nature*, **366**, 324-327, 1993.

[10] M. Reches, E. Gazit, Casting metal nanowires within discrete self-assembled peptide nanotubes, *Science*, **300**, 625-627, 2003.

[11] H. Gradišar et al., Design of a single-chain polypeptide tetrahedron assembled from coiled-coil segments, *Nat. Chem. Biol.*, **9**, 362-366, 2013.

[12] K. Matsuura, K. Murasato, N. Kimizuka, Artificial peptide-nanospheres self-assembled from three-way junctions of β-sheet-forming peptides, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 10148-10149, 2005.

[13] K. Matsuura et al., Trigonal tryptophane zipper as a novel building block for pH-responsive peptide nano-assemblies, *Chem. Commun.*, **47**, 265-267, 2011.

[14] K. Matsuura et al., Spontaneous self-assembly of nanospheres from trigonal conjugate of glutathione in water, *Soft Matter*, **5**, 2463-2470, 2009.

[15] K. Matsuura et al., Self-assembly of conformation-regulated trigonal-glutathiones in water, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **83**, 880-886, 2010.

[16] S. Ghosh et al., Bioinspired design of nanocages by self-Assembling triskelion peptide elements, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46, 2002, 2007.

[17] E. De Santis et al., Antimicrobial peptide capsids of de novo design, *Nat. Commun.*, **8**, 2263, 2017.

[18] J. M. Fletcher et al., Self-assembling cages from coiled-coil peptide modules,

Science, **340**, 595-599, 2013.
[19] K. Matsuura et al., Self-assembled synthetic viral capsids from a 24-mer viral peptide fragment, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 9662-9665, 2010.
[20] K. Matsuura et al., Guest-binding behavior of peptide nanocapsules self-assembled from viral peptide fragments, *Polymer J.*, **45**, 529-534, 2013.
[21] S. Fujita, K. Matsuura, Encapsulation of CdTe quantum dots in synthetic viral capsids, *Chem. Lett.*, **45**, 922-924, 2016.
[22] K. Matsuura et al., Self-assembly of Ni-NTA-modified β-annulus peptides into artificial viral capsids and encapsulation of His-tagged proteins, *Org. Biomol. Chem.*, **14**, 7869-7874, 2016.
[23] K. Matsuura, G. Ueno, S. Fujita, Self-assembled artificial viral capsid decorated with gold nanoparticles, *Polymer J*., 47, 146-151, 2015.
[24] Y. Nakamura et al., DNA-modified artificial viral capsids self-assembled from DNA-conjugated β-annulus peptide, *J. Pept. Sci.*, **23**, 636-643, 2017.
[25] S. Fujita, K. Matsuura, Self-assembled artificial viral capsids bearing coiled-coils at the surface, *Org. Biomol. Chem.*, **15**, 5070-5077, 2017.

（鳥取大学　松浦和則）

3・10　ペプチドデザインと分子ロボティクス

DNA はこの宇宙で最高傑作の分子かもしれない．研究をすればするほど，究めれば究めるほどその見事さに感服してしまう．だから DNA を用いて分子ロボットを作ろうとするのはもっともなことだ. その昔（といっても 30 年前），DNA は遺伝情報を担う分子として特別な存在だった．しかし，1992 年に 1 本鎖 DNA は配列に基づいて RNA やタンパク質のように様々な 3 次構造を形成し抗体のように標的タンパク質に結合することがわかった（これを DNA アプタマーとよぶ）[1]．どうも生体高分子というものは構成要素（核酸かアミノ酸か）によって機能が制限されているとは限らないらしい．そう思っていた矢先に，今度は Breaker らによって 1994 年に DNA が酵素にもなるという論文[2]が発表された．いわゆる DNAzyme というものである．そもそも酵素はタンパク質の専売特許であると思われていたが，1983 年に Cech らによって RNA の酵素機能が発見[3]（これを Ribozyme という）されてからほぼ 10 年のことで

ある．これでますます DNA,RNA タンパク質の垣根がなくなって生体高分子として共通する普遍性が表にでてきたことになる．しかしながら，DNA は基本的に二重らせん構造が売りである．タンパク質のような 4 次構造を形成して高機能化するような裏技はないであろうと思っていたら，Rothemund が DNA origami[4]を開発したことでこの予想もにわかに怪しくなってきた．現に，分子ロボティクス研究者は DNA と様々な材料と組み合わせて興味深いナノデバイスを作製しつつある[5].

このようなわけで今さらペプチドもないでしょう．DNA だけで十分ではないかと思われる読者も多いのではないかと思う．確かにそうなのだが，生命の進化を考えた際に次のような疑問が生じてこないであろうか．なぜ生物は RNA ワールドから翻訳機構という難しいシステムを開発してタンパク質を利用する RNP ワールド（RNA と Protein を用いる世界）に移行したのだろうか？という疑問である．すでに見てきたように RNA や DNA も酵素としての働きもあれば抗体のような結合能もある．わざわざアミノ酸を用いるポリペプチドにコード化する必要があるのだろうか．確かに DNA,RNA は 4 種類に塩基からのみできているが，タンパク質は 20 種類のアミノ酸からできている．多様性の点で有利なことは明らかである．さらに，生命の起源研究から初期の地球誕生の頃はアミノ酸が生成されやすい一方，そもそも核酸の材料となる塩基やリン酸が地球上で合成されにくいといわれている．

さて，ここで細胞を考えてみよう．細胞膜の材料となる脂質はおそらく初期から地球上に存在していたと思われる．そこでペプチドや脂質は細胞の誕生以前から何かしら相互作用していた可能性もあるかもしれない．そして，生命が細胞という形態をとるうえで何かしらの重要な役割をしていたかもしれない．そもそも現在の細胞膜には多種類の膜タンパク質が埋め込まれており，これらの膜タンパク質の存在なしには細胞としての機能を発揮できそうもない．そこで，二重脂質膜とペプチドはどのような関わり合い（相互作用）が可能かを知りたいと思った．

筆者はもともと進化分子工学という様々な配列のペプチドやタンパク質を無細胞翻訳系によって試験管内で合成し，これらの膨大な配列集団（ライブラリという）から特定の機能分子を選択し，進化させる技術（試験管内進化）を用いて分子進化の実験をしている（進化分子工学によって分子デザインしている）．そこで，人工の脂質膜であるリポソームに対してランダムな配列を有するペプチドライブラリから図 1 のように選択系を考案してリポソームに結合

するペプチドの取得を試みた．興味深いこと実験の結果，天然にはない配列のリポソームに強く結合するペプチドが取得できた[6].

天然では起こりえない単純化した条件下で実験することで，未知の分子の振る舞いを見つける作業は面白い．単純でも今までの組み合わせにないものであれば新しい発見がある．そうやって新しい分子の組合せで生物らしい分子ロボットができれば，それは地球型生命とは異なるもう一つの「自然」に出会えたことになる．その出会いを楽しみにしている．

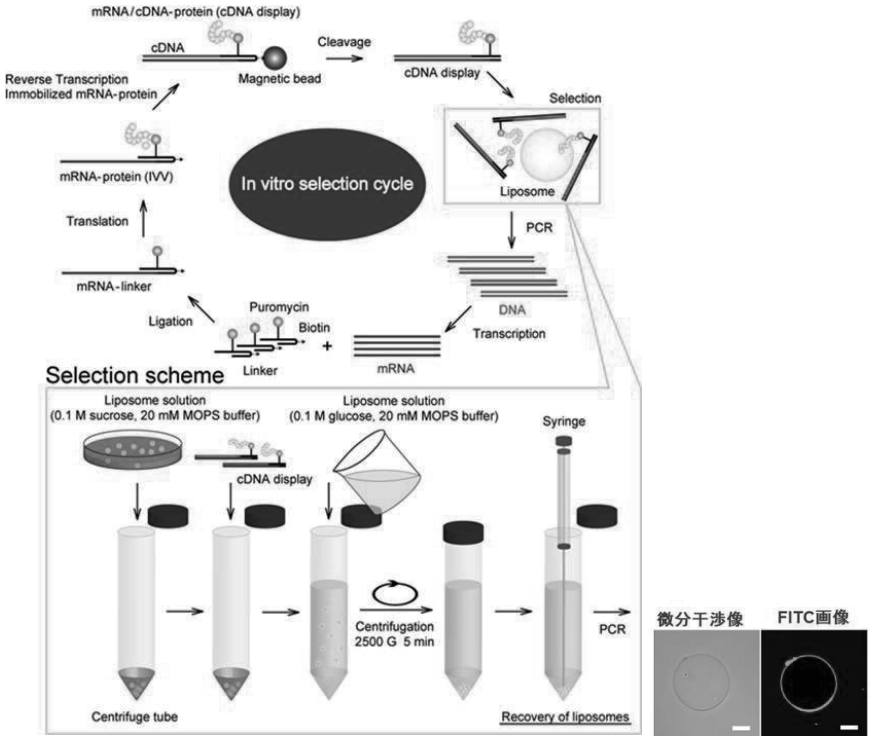


図 1　リポソーム結合ペプチドの選択系と取得したペプチド（FITC 蛍光修飾）のリポソームへの結合

[1] Bock, L.C., *et al*., Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature*. **355**, 6360, pp.564-566, 1992

[2] Breaker, R.R., Joyce, G.F., A DNA enzyme that cleaves RNA. *Chem Biol.*, **1**, 4, pp.223-229, 1994

[3] Zaug, A.J., Grabowski, P.J., Cech, T.R., Autocatalytic cyclization of an excised intervening sequence RNA is a cleavage-ligation reaction, *Nature*, **301**, 5901, pp.578-583, 1983

[4] Rothemund, P.W., Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature*, **440**, 7082, pp.297-302, 2006

[5] 瀧ノ上 正浩, 生体内で働く分子ロボットの実現へ; 情報媒体としてのDNA分子とDNAコンピューティング, *情報管理*, **60**, 9, 629-640, 2017

[6] Kobayashi, S., et al., In vitro selection of random peptides against artificial lipid bilayers: a potential tool to immobilize molecules on membranes. *Chem Commun (Camb)*, **53**, 24, pp.3458-3461, 2017

（埼玉大学　根本直人）

第4章
分子ロボットのための分子アクチュエータ

4．1　生体分子モーターを駆動系とするスワーム型分子ロボットの構築

はじめに

人工知能（AI）が急速に発展するなか，AI がヒトの知能を超える「技術的特異点（シンギュラリティ）」が話題に上るようになった[1]．一方，2016 年度ノーベル化学賞の受賞テーマになるなど「ナノマシン（分子機械）」も注目を集めており，人知を超えた AI がナノマシンを制御することで，社会に計り知れない変化をもたらすと予測されている．AI は情報科学分野の研究対象であるが，ナノマシンは化学や工学などの応用科学分野に属しており，AI によるナノマシンを制御するには，両分野にまたがる新しいアプローチが必要となる．このような背景から，従来のロボット工学の手法に倣って，分子サイズの部品から分子ロボットを組み上げる新しい学術分野「分子ロボティクス」が創成されてきた．当研究グループは，ロボット工学で最も注目される研究対象の 1 つである「群ロボット」を，主に生体由来の材料をビルディングブロックとした分子システム（分子ロボット）で実現することを目指している．以下にこれまでの取り組みを紹介する．

群れ（スワーム）とは？

自然界では様々な構造体が自己組織化によって作り上げられている．その自己組織化において，構成要素の間の局所的な相互作用が重要な役割を果たしている．印象的な例として，鳥や魚，細胞やバクテリアなどの生き物が作り出す“群れ（＝スワーム）”が挙げられる．これらの群れには，統括役的なリーダーが存在しないにもかかわらず，近接する個体から受ける情報（相互作用）を読み取って群の形やサイズを協調的に変化させることができる．なぜ生き物は群れるのだろうか？“群れ”を作ることで作業の分担といった“並列性”，また作業を確実に実行させる“頑健性”，さらに状況に合わせて瞬時に対応する“柔軟性”など，1 個体では成し得なかったことが可能になるからだと考えら

れている．このような“群れ”の持つ特性に注目し“集団で機能する機械的

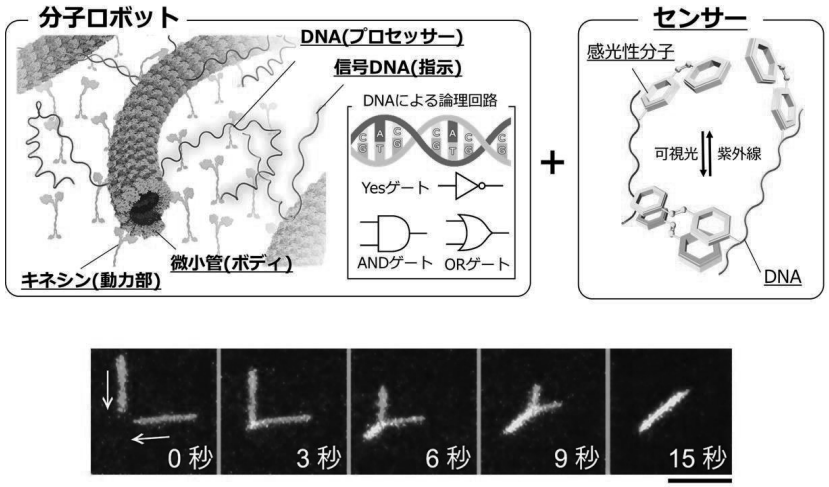


図 1　スワーム型分子ロボット

（上）概略図．ボディである微小管は動力のキネシンによって駆動する．微小管には知能・制御系として DNA を搭載させている．DNA がもつ特異的な分子認識能を利用することで，コンピューターのような論理回路を組むことができる．DNA にはセンサーとして感光性分子を導入している．（下）実際に運動して合体する分子ロボットの蛍光顕微鏡写真．スケールバー：5μm.

システム（群ロボット）”の研究・開発がロボット工学の分野で進められてきた．その群ロボット研究が抱える課題として，個体の「サイズ」と「数」があります．群ロボットを構成する個体のサイズを小さくすればするほど，また数が増えれば増えるほど様々な規模に応じ柔軟に対応する“拡張性”が得られることになる．これまでに，その基本ユニットのサイズはセンチメートル単位まで，数は 1024 体まで達成されている．これらの「サイズ」と「数」をさらに向上させるにはどうしたらよいのだろうか？この問いに対し，著者らは「分子ロボット」の開発を通して取り組んできた．これらの分子素子をボトムアップ的な方式で微小なシステムへと統合することで“群れる分子ロボット”を開発した[3]．数ある機能性分子のなかから，1）アクチュエーターには“生体分子モーター”を，2）プロセッサーには“DNA 演算素子”を，そして 3）センサーには“感光性分子”を選択した（図 1）．

2）分子ロボットを構成する三要素の特徴

分子ロボットの動力源となる生体分子モーターは，実働する分子機械として

は最小クラスのもので，バイオテクノロジー技術で合成される．生体分子モーターは，化学的なエネルギーを力学的な仕事へと変換する機構を有しており，優れたエネルギー変換効率（〜80%）および高い比出力特性（〜10kW/kg：一般的な電磁モーターの 20 倍）を有している．そのため生体分子モーターを動力源としたナノデバイスやバイオアクチュエーターの研究開発が各国で盛んに行われてきた．DNA は，塩基配列情報に基づく高度な分子認識能を有する遺伝子情報の記憶媒体である．DNA の化学合成が可能になり様々な用途への応用に期待が寄せられている[4]．現在まで複雑なナノ構造体（DNA 折り紙）やデジタルデータの記録，また数学的問題を解くことのできる DNA コンピュータ（計算機）なども構築されている．この DNA により構築される演算素子が分子ロボットを制御するプロセッサーとして機能する．感光性分子は DNA 演算素子に光スイッチング機能を付加することができる[5]．感光性分子としてアゾベンゼン誘導体を DNA 演算素子に組み込むことにした．紫外光照射下では演算素子を OFF に可視光照射により ON への切り替えが可能になる．感光性分子は，分子ロボットの視覚的なセンサーとしての役割を果たす．

３）三要素の統合

生体分子モーターにはリニア型の運動素子であるマイクロチューブル(微小管)/キネシン系を用いている．分子ロボットの基本ユニットは，マイクロチューブル（φ25nm×〜5μm）と演算子の書き込まれた DNA 鎖とを化学的な手法（銅イオンフリークリック反応）により複合化することで得らる（図２）．さらにアゾベンゼン誘導体を DNA 側鎖に導入することで光応答性を組み込みんだ．統合化された分子ロボットの運動特性はキネシンがコートされた基板上で評価することができる．マイクロチューブルの単量体となるチューブリンと DNA 鎖の複合比（2：1）および DNA 鎖長（16bp）を最適化することで 85%の運動特性（600nm/sec）を保持した分子ロボットの基本ユニットを作製することが可能になった．

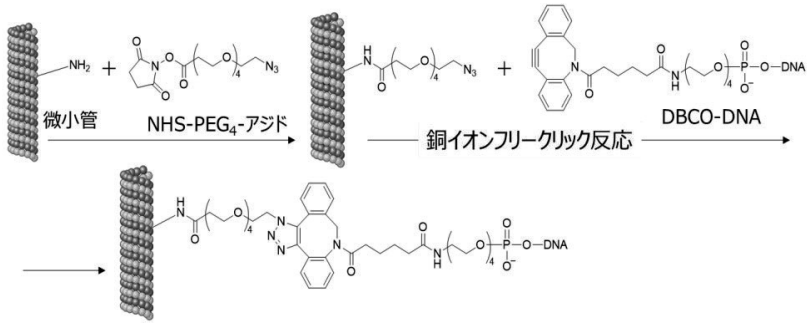


図２　マイクロチューブル（微小管）と DNA 鎖との複合化に用いた銅イオンフリークリック反応

分子ロボットによる群れの実演

１）DNA 演算素子による群れの実行

冒頭で述べたように群れの形成には局所的な相互作用が重要な役割を果たす．分子ロボットの群れは，DNA の持つ分子認識能を局所的な相互作用に変換することで実現することができる．実際に DNA を入力信号として，キネシン上で滑走する約 500 万体の分子ロボットに群れを形成させることに成功した．入力される DNA 鎖は，分子ロボット間に相互作用をもたらすよう設計されている．群れの中ではどの個体も方向性（マイクロチューブルの極性）を揃えて滑走する．群れの形成だけでなく解消も DNA を入力信号として実行することができる．群れの解消を指示する入力信号は，分子ロボット間に相互作用をもたらす DNA 鎖を鎖置換反応により無効化することで設計できる．

２）分子ロボットによる論理演算

DNA 演算素子を搭載した分子ロボットに，適切なプログラミングを与えると論理演算を実行することも可能である．入力した複数の命題（DNA 入力信号）に対して，いずれも真であることを示す理論積（AND ゲート）や，いずれか少なくても一つが真であることを示す理論積（OR ゲート）に対応した演算結果を，1（真）か 0（偽）で出力する．出力結果（アウトプット）は分子ロボットの群れの形態変化から，あるいは赤色（ローダミン）/緑色蛍光（フルオレセイン）が修飾された分子ロボットが群れることで得られる混色（黄色）から視覚的にも得ることができる．

３）群れの形態制御

分子ロボットによる群れの形態は，DNA を介して導入される局所的な相互作用だけでなく，基本ユニットの骨組みとなるマイクロチューブルの長さや剛性により多様化させることも可能である．例えば曲げ剛性 60×10^{-24}Nm^2 のマイクロチューブルで合成された分子ロボットは，紡錘状の群形態を形成し，並進性の高い群行動を示す．一方，剛性を約 1/2 程度に下げると，環状の群形態を形成し，渦巻状の群行動へと変化していく）．マイクロチューブルの剛性は，単量体であるチューブリンの重合条件で制御した．このような群れの形態変化は，分子ロボットの運動持続長（Path-Persistent-length）と関連することが明らかになっている（図３）．

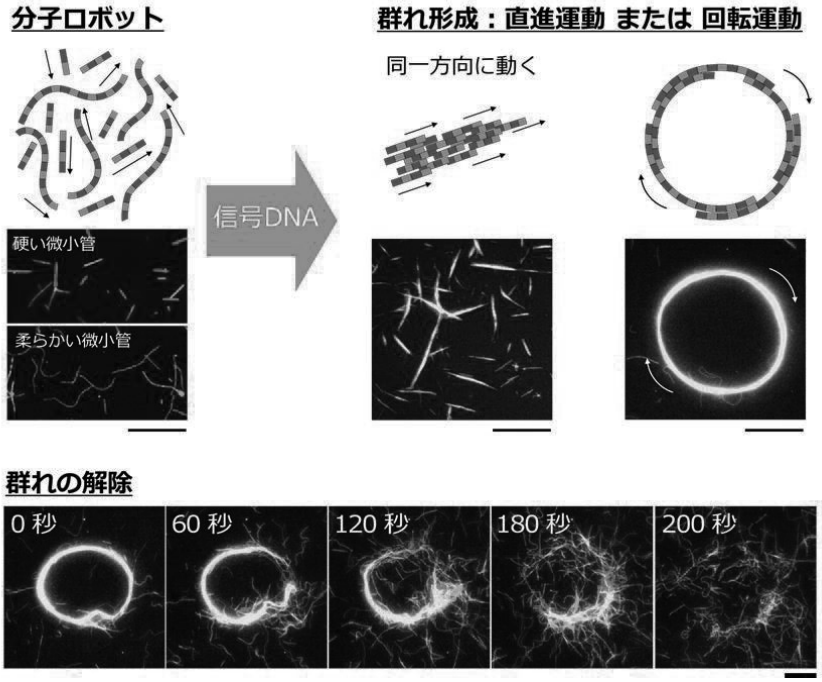


図３　群れの形成と解除

（上）入力した信号 DNA を認識し，群れを形成する分子ロボット．群れは微小管の硬さによって，方向の揃った直進運動または回転運動する．スケールバー：25μm.（下）別の信号 DNA を入力すること

4）分子ロボットの直交性

DNA の高度な分子認識能は，入力信号を混信させることなく，目的とする分子にのみ伝えることができる．このような DNA の直交性を利用することで，分子ロボットの群形成を独立に制御することが可能になる．例えば 2 種類の DNA 入力信号，即ち 1 本は剛性の高い分子ロボットに，2 本目は剛性の低い分子ロボット用に設計する（この DNA には群れを形成させる情報がエンコードされる）．それにより，並進する群れ，回転する群れ，あるいは並進および回転の両群れを同時にかつ独立して実行することができる．

5）光による群れの ON-OFF スイッチング

感光性分子（アゾベンゼン）を DNA 演算素子に組み込むことで，分子ロボットによる群れの形成/解消を光により制御することも可能である．紫外光（λ=365nm）照射下では，DNA 演算素子は OFF の状態にあり群れは形成されない．可視光（λ=480nm）を照射すると，DNA 演算素子は ON となり群れの形成

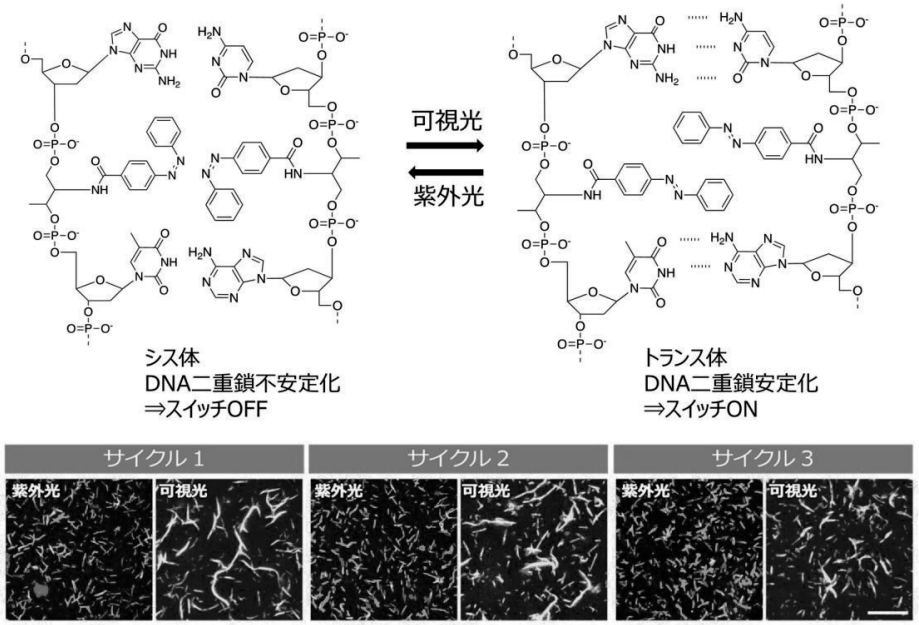


図 4　光照射による分子ロボットの群れ形成・解除のコントロール

感光性分子（アゾベンゼン）を導入した DNA を搭載した分子ロボットを用いている．スケールバー：20 μm.

が始まる．群れの形成・解消だけでなく上述のように分子ロボットの物理特性を調整することで並進性や回転性などの群れの行動も光で制御することが可能になっている（図４）．

おわりに

群ロボット開発における個体の「サイズ」と「数」の問題に対し，著者らは生体分子モーター，DNA 演算素子，感光性分子を統合することで解決の糸口を探ってきた．現在のところ，サイズはこれまでのセンチメートルからナノメートルまでスケールダウンし，数は千から数百万体までボリュームアップさせることに成功している．このような情報を処理，保持，発信することのできる分子ロボットにはさまざま用途が期待できそうである．[6]．例えばマイクロサイズの「人工筋肉」や，化学的・物理的な刺激に応じて分子ロボットの群れが変形することで自在に画像を描きだす「画像素子」，また感知した遺伝情報を，分子ロボットが画像を描き出し視覚的に表示する「遺伝子診断キット」，分子ロボットによるナノ部品の組み上げ工程や化学プラントなどの「マイクロリアクタ」などを挙げられるかと思う．以上，本誌では，数ある機能性分子のなかからある組み合わせを選択・統合したシステムを紹介した．今後，より複雑な機能あるいは全く新しい骨組みをもった分子ロボットが，開発されてくるものと期待している．

[1] R. Kurzweil 著，小野木明恵，野中香方子，福田 実 訳，井上 健 監修，『シンギュラリティは近い人類が生命を超越するとき』，NHK 出版（2012）．

[2] Hagiya, M.; Konagaya, A.; Kobayashi, S.; Saito, H.; Murata, S. Acc. Chem. Res. 2014, 47, 1681–1690.

[3] Keya, J.J.; Suzuki, R.; Kabir, A.M.R; Inoue, D.; Asanuma, H.; Sada, K.; Hess, H.; Kuzuya, A.; Kakugo, A. Nat. Commun. 2018, 9, 453.

[4] Kuzuya, A.; Sakai, Y.; Yamazaki, T.; Xu, Y.; Komiyama, M. Nat. Commun. 2011, 2, 449.

[5] Asanuma, H.; Liang, X.; Nishioka, H.; Matsunaga, D.; Liu, M.; Komiyama, M. Nat. Protoc. 2007,2,203–212.

[6] Inoue, D.; Nitta, T.; Kabir, A.M.R.; Sada, K.; Gong, J.P.; Konagaya, A.; Kakugo, A. Nat. Commun. 2016, 7, 12557.

（北海道大学　角五彰）

4. 2 ペプチドアクチュエータ

ペプチドのβ-シート構造形成を光や pH, 酸化還元などの刺激に応答させることができれば, 自己集合性ペプチドナノファイバーの形成と解離を動的に制御できるようになる. 中でも光刺激は, 比較的短時間でペプチドの構造変化を誘起でき, ペプチドナノファイバーの自己集合のタイミングを制御することが可能である. 筆者らは, 光応答性ペプチド–DNA コンジュゲートを開発し, 光によるペプチドナノファイバー形成の時空間制御に成功した[1]. まず, 光開裂性アミノ酸を介して DNA(dA_{20})とβ-シート形成ペプチド(FKFEFKFE)を連結したコンジュゲート **1** を開発した（図 1A）. DNA 部位は, 静電反発によりペプチドの自己集合を抑制するだけでなく, DNA ハイブリダイゼーションにより自己集合空間を指定するという役割を有している. 水溶液中でコンジュゲート **1** はナノファイバー形成しないが, 365 nm の光照射により, ペプチド主鎖が切断され, FKFEFKFE ペプチドが遊離し, 自己集合してナノファイバーを形成することが TEM により確認された. また, dA_{20} と相補的な dT_{20} を固定したガラス基板上にコンジュゲート **1** をハイブリダイゼーションさせた後, 光照射すると, 基板上にナノファイバーが形成された（図 1B）. 一方, 非相補的な DNA を固定した基板上ではナノファイバー形成されなかった.

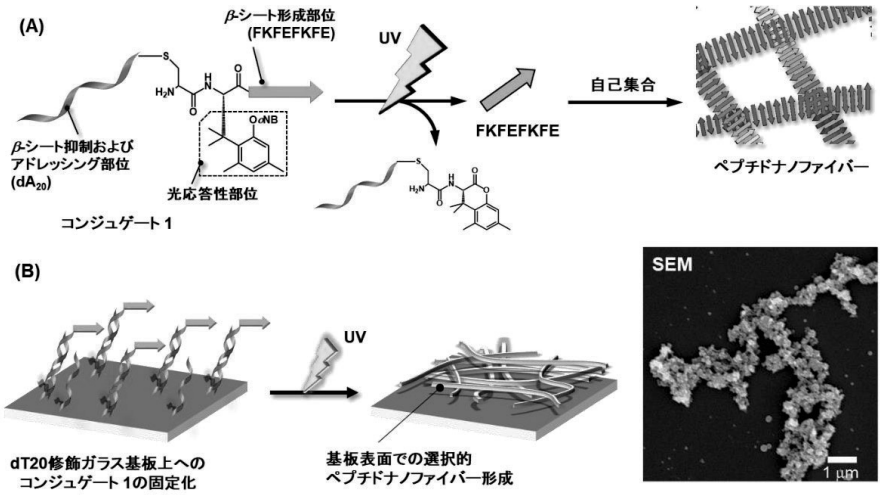


図 1　光開裂によるペプチドナノファイバー成長システム(A)と
dT_{20} 核酸修飾ガラス基板上での光誘起ペプチドナノファイバー形成(B).

筆者らは最近，より迅速に光切断されるコンジュゲート **2** を相分離ジャイアントリポソーム上の片側（DOPC 相）に修飾し，光照射によりリポソームの並進運動が加速されることを見出した（図 2）[2]．コンジュゲート **2** を修飾したリポソームに光照射すると，未修飾リポソームに光照射した場合や，コンジュゲート **2** に光照射しない場合と比較して約 6 倍の運動加速が見られた．これは，光照射によりジャイアントリポソームの片側周辺のみでペプチドナノファーバーが成長することで，リポソームの界面張力が非対称になり，マランゴニ対流が生じているためと考えられる．このようなナノファイバー成長による並進運動は，赤痢菌やリステリア等の細菌における片面でのアクチンファイバー形成（アクチンコメットテール）を推進力とした並進運動と類似した現象であると思われる．これらの知見は，分子ロボットの光制御アクチュエータの設計指針となり，適切な分子設計を施すことで，光照射方向に応じて運動方向が変わる「走光性」を付与することができると期待できる．

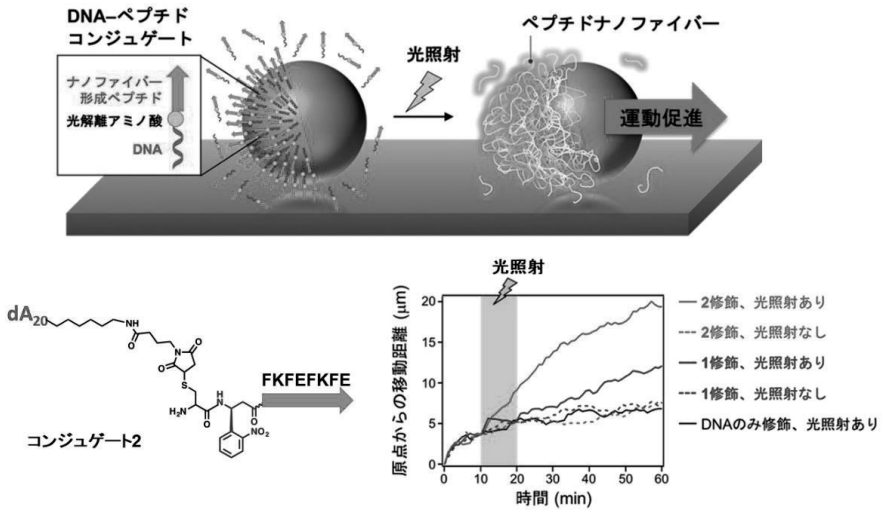


図 2　光誘起ペプチドナノファイバー成長システムによる
ジャイアントリポソームの運動促進

[1] M. Furutani et al., A photoinduced growth system of peptide nanofibres addressed by DNA hybridization, *Chem. Commun.*, **51**, 8020-8022, 2015.

[2] H. Inaba et al., Light-induced propulsion of a giant liposome driven by peptide

nanofibre growth, *Sci. Rep.*, **8**, 6243, 2018.

（鳥取大学　松浦和則）

4．3 アクチン封入膜小胞の光制御

生きた細胞が見せる多様で複雑な運動の発生機構を真に理解し，またそれを模倣再現するには，ボトムアップの構成論的な「自らの手で作ってみる」アプローチが不可欠である．その第一歩として，細胞骨格を内部で再構成した細胞サイズの人工脂質膜小胞（リポソーム）の利用を足掛かりに，変形・運動する人工細胞モデルの構築が多くの研究グループによって試みられ[1]，運動の再現成功の報告が増えつつある[2,3]．その殆どは，細胞骨格として脱重合阻害剤で安定化された微小管と，発現精製が比較的容易な分子モーター，キネシンを用いている．しかし，細胞内では微小管と共にアクチン線維も働く．また細胞骨格は，分子モーターとの共同だけでなく，自らが重合脱重合し伸長短縮する事でも力を発生する．従って，アクチンの使用や，重合脱重合出来る細胞骨格の利用も有力なアプローチである．そして何より，細胞に見られるような繰返し行われる運動の実現化も非常に重要な課題であった[4]．

ここでは，アクチン線維を封入したリポソームを用いて成功した反復変形について紹介する．近年，目的物質を含む油中水滴を油水界面通過させる手法によって，高頻度高再現性でリポソームを得られる様になり[4,5]，細胞質と同程度の高濃度（100 μM 以上）でもアクチンが封入可能になった．高濃度のアクチン線維は，ネマティック液晶化を示し，配向が揃う．その結果として，リポソームが紡錘形に変形した（図１，上段一番左の写真）[6]．この変形の極めて重要な点は，分子モーターの活性に必要な ATP の供給系の実装も，細胞骨格の配置の固定化に繋がる架橋因子の添加も不要なことである．

ところで以前から，蛍光標識されたアクチン線維が，励起光を強く照射すると切断される事が知られていた．そこで，変形したリポソームに蛍光顕微鏡の励起光を強く照射すると，紡錘形が球形に戻り（図１），両端から膜突起が伸長して来る（図２，黄矢印）[6]．なおアクチン線維は切断後自発的に再伸長するが（図１，下段），照射後，リポソームは紡錘形に復帰し，突起は短縮した．この変形は繰返しが可能で，光照射の ON/OFF によって反復出来る（図１）．特にこの膜突起に関し，偶然短縮中に突起の途中部分が

基質に付着すると，リポソーム本体の方へ短縮する替わりに，逆に細胞サイズの本体を引き寄せる様子が観察された（図２）．これらの結果は，分子ロボットに実装する駆動部として，DNA origami 等の他の技法やアプローチに加えて，長さが可変な繊維状高分子の利用も有力な事を示している．

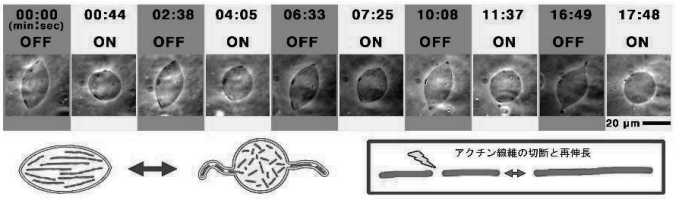


図１　紡錘形リポソームの反復変形（位相差像と模式図）

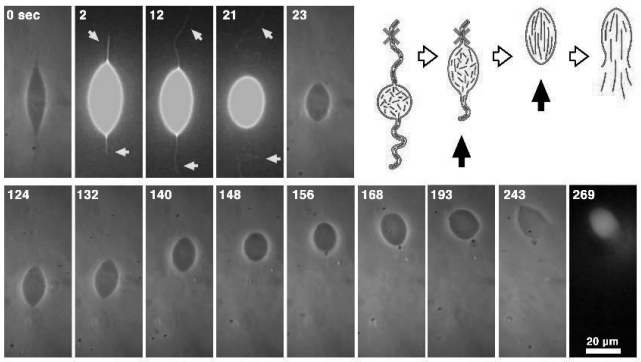


図２　膜突起の短縮時に観察されたリポソーム本体の移動（位相差像（一部蛍光像を含む）および移動の模式図）

[1] Hagiya, M. et al. Molecular Robots with Sensors and Intelligence. *Acc. Chem. Res.* 47, pp. 1681–1690, 2014.

[2] Keber, F. C. et al. Topology and Dynamics of Active Nematic Vesicles. *Science* 345, pp. 1135–1139, 2014.

[3] Sato, Y. et al. Micrometer-Sized Molecular Robot Changes its Shape in Response to Signal Molecules. *Science Robotics* 2, eaal 3735, 2017.

[4] Hayashi, M. et al. Reversible Morphological Control of Tubulin-Encapsulating Giant Liposomes by Hydrostatic Pressure. *Langmuir* 32, pp. 3794–3802, 2016.

[5] Natsume, Y., Toyota, T. Giant Vesicles Containing Microspheres with High Volume Fraction Prepared by Water-in-Oil Emulsion Centrifugation. *Chem. Lett.* 42, pp. 295–297, 2013.

[6] Tanaka, S., Takiguchi, K., Hayashi, M. Repetitive Stretching of Giant Liposomes Utilizing the Nematic Alignment of Confined Actin. *Comm. Phys.* 1, Article number 18, 2018.

（名古屋大学　瀧口金吾）

4．4 回転型分子モーター

F_1-ATPase（F_1 モーター）は，これまで自然界で見つかっている中で最小の回転分子モーターである（図１）．たんぱく質の複合体であり，固定子リングで燃料の ATP を ADP とリン酸（P_i）に加水分解しながら，中心のγ軸を一方向に回転する．軸に微小粒子などのプローブを接着し，固定子をガラス上に固定することで，光学顕微鏡で回転を観察できる［1］．

このような 1 分子観察技術が原動力となり，回転機構がほぼ明らかになっている（図 1b）．固定子のβサブユニットはヒンジ様の構造で，ATP を噛みこんで屈曲する．３つのβは異なる化学状態（ATP 結合，ADP・リン酸結合，空）をとるのだが，空のβへの ATP 結合が引き金となって，化学状態が 120° シフ

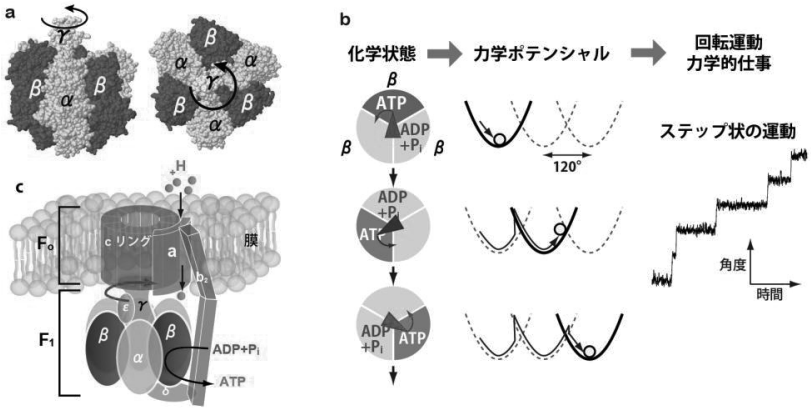


図１　F_1-モーター

a，F_1 モーター（$\alpha_3\beta_3\gamma$）．**b**，化学状態が変化することで，γ軸が固定子から感じる力学ポテンシャルが 120° シフトし，ステップ状の運動を生じる．**c**，細胞内では，F_o モーターと複合体を作り，γ軸が逆方向に回されて ATP を合成する．F_o モーターは，膜に埋め込まれ，プロトンの流れを利用して回る電気モーターである．

トする．これにより，β の屈曲状態も 120° 回転し，γ 軸を 120° 回転させる．

さて，F_1 モーターは，地球上のほぼすべての生物の細胞の中で回っている．何のためだろうか？実は，細胞内では「電気モーター」である別の Fo モーターと複合体を作り，γ 軸が逆方向に強制回転されている（図 1c）．この時，F_1 モーターは ATP を分解するのではなく合成する．我々の生命活動に必要な ATP のほとんどが，この可逆な力学−化学エネルギー変換機構により合成されている．そして，その変換効率がほぼ 100%であることが実験により明らかになっている［2，3］．熱力学の法則を破るわけではないが，このような高効率のモーターが自然界に存在して重要な役割を担っているのは驚異的である．たとえば，キネシンの効率は 20%程度にとどまる［4］．F_1 モーターの役割はエネルギー変換であり，変換効率を最大化するように進化したのであろう．

マクロなモーターは，速く動かすと摩擦が生じて効率が下がってしまう．摩擦熱は，ミクロな自由度を通して散逸する無駄な熱である．しかし，分子モーターはそれ自体がミクロであり，k_BT のエネルギースケールで熱の流れを「見て制御できる」可能性がある．実際，F_1 モーターは熱揺らぎに応じて巧みに化学状態を変化させることで，高効率を実現していることが示唆されている［5］．熱揺らぎというのは方向性がない．F_1 モーターは，硬い構造と柔らかいヒンジを絶妙に組み合わせた機構で，揺らぎを上手く整流しているようだ．

キネシンなどのリニアモーターはレールからたまに外れるが，F_1−モーターは，固定子と回転子が結合した状態を常に保ち，安定である．一方，他の回転モーターであるバクテリアのべん毛モーターは，負荷に応じて固定子が動的に結合・脱着してトルクを調節する「オートマ」仕様である．生物の造り出した精巧な機構には圧倒される．分子ロボティックスの発展のために，分子モーターから学ぶことはまだまだ沢山ありそうだ．

[1] H. Noji, R. Yasuda, *et al.*, Direct observation of the rotation of F_1-ATPase, *Nature* 386, 299-302, 1997

[2] S. Toyabe *et al.*, Thermodynamic efficiency and mechanochemical coupling of F_1-ATPase, *PNAS* 108, 17951-6, 2011

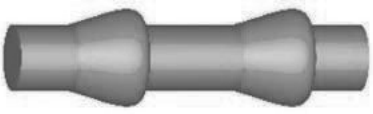
[3] S. Toyabe *et al.*, Nonequilibrium Energetics of a Single F_1-ATPase Molecule, *Phys. Rev. Lett.* 104, 198103, 2010

[4] T. Ariga, M. Tomishige, and D. Mizuno, Nonequilibrium Energetics of Molecular Motor Kinesin, arXiv:1704.05302 (2017)

[5] S. Toyabe, H. Ueno, and E. Muneyuki, Recovery of state-specific potential of molecular motor from single-molecule trajectory, *EPL* 97, 40004, 2012

（東北大学　鳥谷部祥一）

4．5 BZ ゲルアクチュエータ

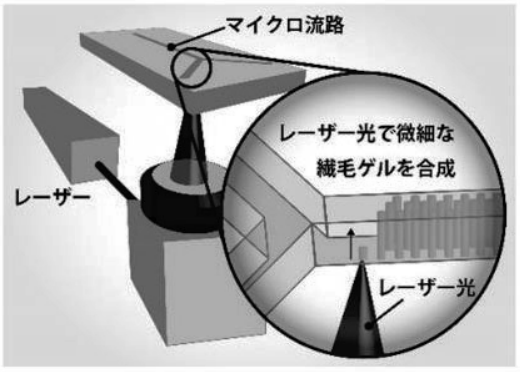


自励振動ゲルアクチュエータ

我々，人間を含めた生命体は，エネルギー源である物質を分解した時に取り出したエネルギーを直接的に力学的なエネルギーに変換して駆動している．言い換えれば，化学的なエネルギーをシステム内部で直接的に力学的なエネルギーに変換して駆動する，エネルギー効率が極めて良いシステムだといえる．このようなアクチュエータシステムを人工的に作り出すことを目標として，研究開発が進められているのが BZ ゲルアクチュエータである．

ゲルは高分子の網目中に水を多く内包させることができ，何らかの外部刺激や，ゲル内部で起こる化学反応によって含水率を変化させることが可能である．膨潤時と収縮時の含水の変化率は，ゲルを構成する高分子鎖の分子設計によりコントロールすることできる．また，ゲルがどのような外部刺激（温度，pH，光，電場など）に応答するか，また内部で起こる化学反応によってどのような機構で膨潤と収縮をするかについても，ゲルを構成する高分子鎖の分子設計次第で決定することができる．BZ ゲルアクチュエータは，ゲル内部に存在する水を化学反応場として利用し，生体のように外部の刺激によらず膨潤収縮運動を起こすことができる．

BZ ゲルアクチュエータが自励振動を起こすことが可能なのは，Belousov-Zhabotinsky（BZ）反応と呼ばれる振動反応をゲル内部で起こしていることに起因する．BZ 反応は，臭素酸ナトリウムなどの酸化剤，マロン酸などの有機酸，硝酸や硫酸などの強酸とルテニウムビピリジン錯体などの金属錯体を混合



レーザー光を用いた微細な
ゲルアクチュエータの合成技術

するだけで起こすことができる．その振動反応は，金属触媒の自励的な酸化反応と還元反応の周期的な色変化によって，確認することが可能である．BZ ゲルアクチュエータは，BZ 反応の金属触媒であるルテニウムビピリジン錯体を高分子主鎖の中に含んでおり，BZ 反応中で触媒部位が周期的に酸化状態と還元状態に変化する．その金属触媒部位の周期的な変化の過程で，金属触媒部位の水との親和性が周期的に変化するため，それがトリガーとなりゲルの膨潤率が変化する．

ゲル内部で起こる BZ 反応を駆動源として，BZ ゲルアクチュエータは外部制御や電源を必要とせず，例えばシャーレの中に入れれば心筋細胞のように膨潤と収縮運動を繰り返す．駆動速度は，温度や BZ 基質濃度（臭素酸ナトリウムやマロン酸などの濃度）によってコントロールすることが可能で，現状では最大で 2Hz（1 秒間 2 回）の振動を起こすことができている（筋肉は 10Hz 程度まで出せる）．また，BZ ゲルアクチュエータは大きくしても駆動させることができるが，筋肉同様にスケール普遍性を持つため，サイズを非常に小さく（1 ㎜^{3}以下）しても駆動させることができる（過去の研究で，分子一本でも駆動することが確認されている）．このような利点を活かして，マイクロ流路中の液体を送液するためのポンプとしても活用されている．近年ではマイクロ流路内部で鋳型を用いずゲルを合成する手法として，レーザーを用いた合成技術の開発も進められている．BZ ゲルアクチュエータは，電源や外部制御装置が必要ない利点を活かして，場所を選ばず利用可能な分析システムへの活用や，大空を飛ぶはばたき型ロボットの動力源などとしての活用が期待されている．

[1] T. Ishiwatari, et al., J. Polym. Sci. Polym. Chem. 22, 2699–2704 (1984).

[2] R. Yoshida et al., *J. Am. Chem. Soc.* 118 (21), 5134-5135 (1996).

[3] Y. Hara et al., *J. Phys. Chem.B* 118(2), 634-638 (2014).

[4] Y. Hara et al., *J. Phys. Chem.B* 118(24), 6931-6936 (2014).

[5] Y. Hara et al., *Chem. Lett.* 43(6), 6931-6936 (2014).

[6] Y. Ito et al., *J. Phys. Chem.B* 110(11), 5170-5173 (2006).

[7] Y. Hara et al., *J. Phys. Chem.B* 117(46), 14351-14357 (2013).

（産業技術総合研究所　原　雄介）

4．6　無機結晶のアクチュエーター

分子ロボットを物理的に動かすための部品である「アクチュエーター」には，ゲルの膨潤収縮を利用したものや，キネシンなどのモータータンパク質を流用する方法などが，現在のところの主に考えられている．しかし，アクチュエーターには，速い速度，大きなトルク，大きな変位，異方性，耐久性，などさまざまな性能が求められる．したがって，現存のものとは全く異なるタイプのアクチュエーターが開発できれば，これらの性能を向上させるブレークスルーの可能性が広がる．本コラムでは，無機層状結晶と呼ばれる物質を利用した，一風変わったアクチュエーターを紹介する．

無機層状結晶とは，極薄の無機結晶（ナノシート）が積層した構造を持つものである．ナノシートの厚さは 1 nm しかないので，1mm の厚さの層状結晶の中にはなんと 100 万枚ものナノシートが積層している．層状結晶としては，雲母やグラファイトはよく知られているが，他にも様々なものを合成したり，天然から採取したりすることができる．

その中で，層状鉄チタン酸と呼ばれる物質が面白い性質を示す事が分かった．この物質は，電子顕微鏡像（図１a）から分かるように，厚さ数 μm，幅数十 μmほどの板状結晶である．この結晶を水に分散していれておき，ジメチルアミノエタノール（DMAE）という試薬を僅かに加えた（図２a-e）．すると，板状だった結晶が一瞬のうちに，アコーディオンのように一次元的に膨らんだ．この間，わずか 1 秒もかからない．さらに，この膨らんだ結晶に塩酸を加えると，今度は，また一瞬のうちに，元の板状結晶に戻った（図２e-g）．

小角Ｘ線散乱という方法で調べると，もともと約 1 nm の間隔で積層していたナノシートの間隔が，膨らんだ状態では，約 90 nm にまで拡大して

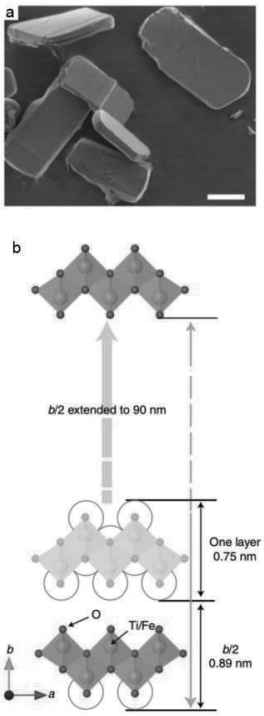


図 1 層状鉄チタン酸の(a)電子顕微鏡像と，(b)膨潤前後での構造模式図
スケールバーは 10μm．
(Reprinted from *Nature Commun.* 2013 [2])

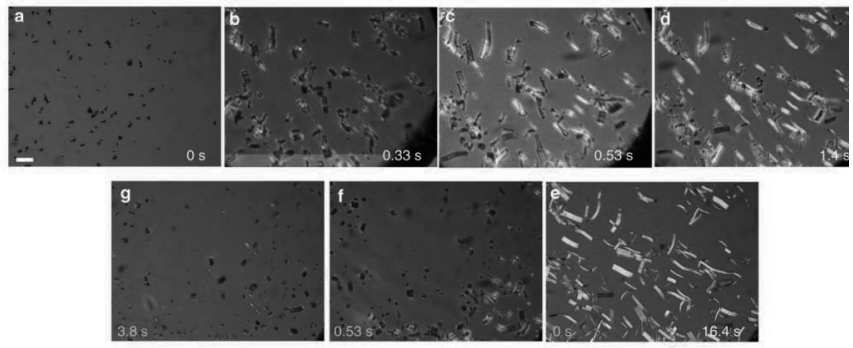


図 2　層状鉄チタン酸結晶の可逆的な大変形の顕微鏡観察

(a)は最初の状態．(b)-(e)は DMAE を入れてから 0.33~16.4 秒後の変化．さらに，その後 HCl を加えると，(f)0.53~3.8 秒後で元に戻る．スケールバーは 100 μ m．（Reprinted from *Nature* Commun. 2013 [2]）

いることが分かった（図 1b）．この変化の割合は，結晶全体の変形の割合と対応しているので，DMAE が大量の水を引き連れて全ての層間に入り込んでいったものと考えられた．これだけ層と層の間が広がると，結晶は壊れてナノシートがバラバラに分散してしまいそうなものであるが，これがバラバラにならずにアコーディオンのような形状を保っているのが，非常に珍しい．

このような，速くて，大きく，１次元的な形の変化をうまく利用すれば，新しいタイプのアクチュエーターとして利用できるはずである．さらに，この物質は固い無機物質であり，耐久性も期待できる．最近の研究では，この鉄チタン酸以外にも，類似の挙動を示す系が幾つか見つかっており，この現象の詳細も明らかとなってきた[3]-[5]．今後の応用研究が期待される．

[1] 日本化学会編「二次元物質の科学: グラフェンなどの分子シートが生み出す新世界(CSJ カレントレビュー25) 」，化学同人，2017

[2] Geng, F. *et al.* Reversible, Instant, and Unusually Stable ~100-Fold Swelling of Inorganic Layered Materials. *Nature Commun.* **4:1632**, 2013.

[3] Geng, F. *et al.* Gigantic Swelling of Inorganic Layered Materials: A Bridge to Molecularly Thin Two-Dimensional Nanosheets. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, pp. 5491–5500, 2014.

[4] Song, Y. *et al.* Accordion-like swelling of layered perovskite crystals via massive

permeation of aqueous solutions into 2D oxide galleries. *Chem. Commun.* **51**, pp.17068-17071, 2015.

[5] Song, Y. *et al.* Massive hydration-driven swelling of layered perovskite niobate crystals in aqueous solutions of organo-ammonium bases. *Dalton Trans.* **47**, pp. 3022-3028, 2018.

（福岡工業大学　宮元展義）

4．7　DNA を使わない分子ロボット

これまでに報告されている「分子ロボット」は，そのほとんどが DNA や DNA ナノ構造体を利用しているが，最近 DNA を全く使わない「分子ロボット」が報告された[1]．ワンポットの連続的な操作により，α, β-不飽和アルデヒドに対するチオールとアルケンの付加反応の立体規則性の制御をプログラミングできる「世界初の分子ロボット」の概略は以下の通りだ（図１）．

開発された構造体（**1**）は，剛直なプラットフォームに配された pH 依存性の回転スイッチ（緑色部）を中央にもち，その両側には，活性部位として互いに鏡像体となるプロリノールシリルエーテル（青色部）が，２ユニット結合されている．回転スイッチの先には基質（結合部位・赤色部）を結合するためのアームがつづく．

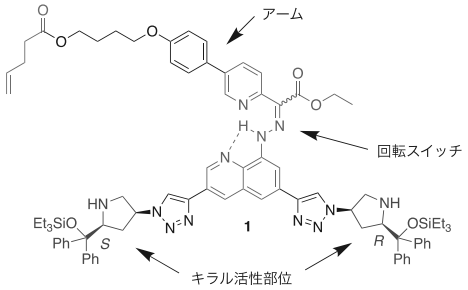


図１　「分子ロボット」の基本構造[**1**]

一連の反応はまず，クロスオレフィンメタセシスにより，アームにエステル結合で導入された基質結合部位に，アセタール保護されたα, β-不飽和アルデヒドを導入するところからはじまる（図２，**2**）．酸によりアセタールを脱保護した後，さらに過剰の酸を作用させると回転スイッチが回転し，E-**3**($2H^+$)と Z-

3(3H$^+$)の２つの異性体をつくり分けることで，反応プログラムを分岐させることができる．ついで，マイケル付加による SR_1 の導入，アルドール反応による R_2 の導入を行っていくが，ここでも回転スイッチの回転を適宜はさみこむことで，４種類のジアステレオマー（(2*R*, 3*R*)-**4**，(2*S*, 3*R*)-**4**，(2*R*, 3*S*)-**4**，(2*S*, 3S)-**4**）の全てがつくりわけられる．反応中の回転反応の収率は，実際にはあまり高くないようで，産物の立体的な純度は 70%程度である．

外部から反応試薬を加えることでプログラムを稼働させていることから，自律動作にはまだ多くの工夫が必要だと思われるが，「分子機械」から「分子ロボット」への動きは，有機化学の分野でも注目を集めはじめたようだ．

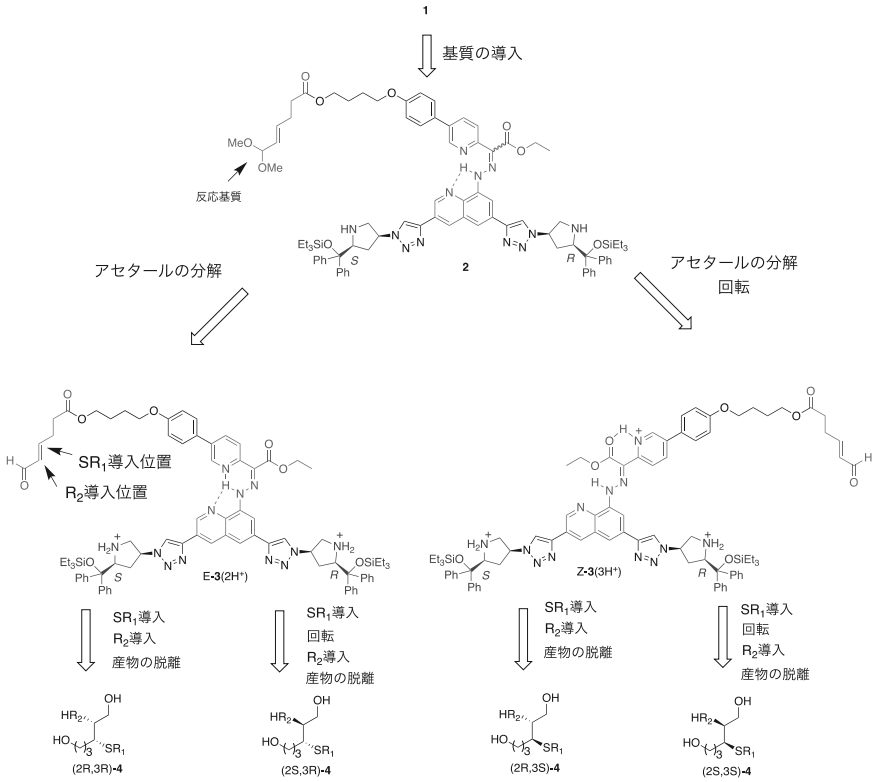


図２　「分子ロボット」の動作プログラム

[1] S. Kassem et al. "Stereodivergent synthesis with a programmable molecular machine", *Nature* **549**, 7462, pp. 274-248, 2017.

（関西大学　葛谷明紀）

第5章
分子ロボットのための分子素材

5．1 DNA の大量合成と環境応答性ゲルへの応用

「DNA ゲル」は一般的に，DNA の相補的二本鎖形成を「物理的な（＝可逆な）」架橋点として利用することで，ゲルの主成分（DNA 二重鎖もしくは合成高分子）による３次元ネットワークを構築している．これらはいずれも，DNA の合成に通常のホスホロアミダイト固相合成を利用しているため，通常は mm 単位のミニチュアサイズのゲルが研究に用いられる．一方，Bonora らが開発した「PEG を活用する液相 DNA 大量合成法」[1]を活用すれば，DNA 二重鎖以外の特殊構造を活用した，バルクサイズの DNA ヒドロゲルを得ることもできる．その代表例が，グアニン塩基４分子からなる G カルテット構造を活用した「グアニン四重鎖ゲル」である（図１）[2]．

ここでは，「PEG を活用した DNA 液相大量合成法」において，mPEG ではなく，両末端に OH 基を有する通常の未修飾の PEG を担体として用いる．デオキシグアノシン（dG）基だけを３もしくは４塩基伸張すれば，PEG の両末端に dG が対称的に結合した dGn-PEG-dGn トリブロック複合体を，実験室レベルでも数十グラム単位で得ることができる．Na^+ や K^+が存在する環境では，フーグスティーン塩基対により４分子のグアニンが環状の複合体を形成することが知られており，特にグアニンが３塩基以上連続している配列では，４本の鎖が互いに１残基ずつの

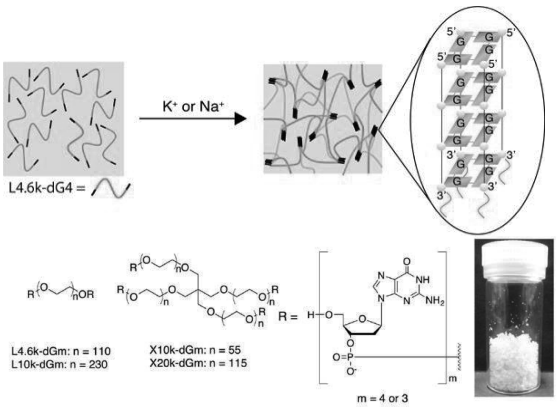


図１　dG_4-PEG-dG_4 複合体によって形成されるグアニン４重鎖ゲル[2]

グアニンを提供することで，非常に安定な四重鎖が形成される．同様に，5wt%以上の濃度の dG_4-PEG-dG_4 の水溶液に数十 mM の Na^+や K^+を加えると，溶液は瞬時に固化し，非常に安定かつ強固なヒドロゲルが得られる．PEG の構造によりヒドロゲルの諸特性を調整することができ，４分岐構造をもつ PEG 誘導体を担体を使用すれば，得られるヒドロゲルは 70°C 以上に温めても融けることがない．このような高い安定性は，グアニン四重鎖そのものが二本鎖と比較して安定なことに加え，DNA セグメント濃度にして 10〜30 mM という，化学合成 DNA としては考えられなかった超高濃度の DNA 溶液を調製できたことによると考えられている．

この材料の最も特筆すべき性質は，Na^+をゲル化のトリガーとして利用できることである．生理食塩水が 140 mM のを Na^+含んでいるように，ヒトの体液は多かれ少なかれ Na^+を含んでいる．これまで調査した中では，血清，人工汗液，涙液，唾液のいずれを使っても体温の 37°C 以上でも安定なヒドロゲルが得られている．DNA と PEG のみからなる，究極の体にやさしい体内打ち込み材料への応用が期待される．

人工イクラとしてよく紹介されるアルギン酸ゲルのように，金属イオン水溶液にポリマー溶液を滴下すれば，容易にゲルビーズも作成できる．このようなゲルビーズを DNase を含む水溶液中に加えると，酵素が存在するときのみビーズが消失することから，このグアニン四重鎖ゲルは生分解性である．DNA 部の dG の連続配列の先にさらに５塩基程度の１本鎖を伸張しておくと，その部分を toehold とする鎖交換反応により，一塩基のミスマッチを認識する厳密さでゲルを選択的にゾル化させることもできる．DNA が本来もっているインテリジェント性を保ちつつ，さらにグアニン四重鎖の可逆性に基づく自己修復性も兼ね備えていることが確かめられており，これまでの DNA コンピューティング，DNA ナノテクノロジーの分野で蓄積されてきた膨大な研究成果を，バルク材料の世界に展開するための起爆剤となることが期待される．

ポリマー希薄条件で Na^+を加えれば粒径 100 nm 程度のナノゲル，マイクロ流体デバイスを使えば μm スケールのマイクロゲルビーズ化できることがわかっており，それぞれポリマーミセル同様の DDS キャリアや，細胞 3D プリンティングの基材等と，医療分野への応用の検討も既にはじめられている．

グアニン四重鎖以外にもう一つ核酸化学の分野でよく研究されている DNA 四重鎖に，i-motif がある．これは，C が連続した配列に見られる特殊構造で，シトシンとプロトネーションしたシトシンとのあいだの $C\text{-}C^+$非天然塩基対が

つらなってできている．構造から予想されるとおり，ちょうど半量のシトシンがプロトネーションできる pH４−５の限られた弱酸性 pH 領域でのみ形成される，鋭敏な pH 依存性を示す．この i-motif も，PEG を活用した DNA 大量合成法と組み合わせれば，pH 応答性のヒドロゲル素材（i-motif ゲル）へと応用できる（図２）[3]．例えば，PEG を担体として dC を５塩基両端に伸張した dC_5-PEG-dC_5 は，上記の dG_4-PEG-dG_4 同様に大量合成が可能であり，10wt%前後の水溶液を調製すれば，この溶液は室温では pH 3.5-5.5 の範囲でのみゲル化する．ゲル化は完全に可逆であり，PEG に分岐構造を持たせることで，力学強度やゲル化 pH 領域などの物性をさらに高めることもできる．このような i-motif ゲルの形成 pH 領域は，ちょうど清涼飲料水や，ヒトの健康な肌とほぼ重なっており，これらが関係する産業分野への応用が模索されている．

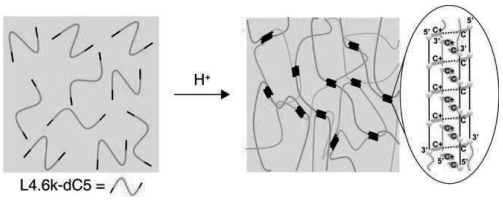


図２　d C_5-PEG-dC_5 複合体によって形成される i-motif ゲル[3]

[1] G. M. Bonora, S. Zaramella, F. M. Veronese, *Biol. Proced. Online* **1**, pp. 59–69, 1998.
[2] S. Tanaka, et al. "Intelligent, biodegradable, and self-healing hydrogels utilizing DNA quadruplexes", *Chem. Asian J.*, **12**, pp.2388-2392, 2017.
[3] S. Tanaka, et al. "Bulk pH Responsive DNA Quadruplex Hydrogels Prepared by Liquid-Phase, Large-Scale DNA Synthesis", *ACS Macro Lett.*, **7**, pp.295-299, 2018.

（関西大学　葛谷明紀）

５．２ DNAゲルとその応用

DNA を材料としてつくる「分子素材」のなかでも，溶液中に DNA のネットワークを構成することでつくられた構造が DNA ハイドロ(ヒドロ)ゲルである．この手法を利用することで，マイクロスケールからミリ，センチメートルといったメゾスケール，さらにはマクロスケールの構造を直接 DNA 分子からつくることができる．DNA 分子の特性やそれによって実現される機能を内部で保持

しつつも，全体としては，我々が直接操作しやすいサイズの構造を実現した素材といえる．

DNA ゲルの設計と作製

持続長[1]よりもはるかに大きなスケール下では，DNA はもはや「剛直な棒」という近似では扱うことができず，高分子として振る舞う．そのため，高分子化学における一般的なゲルの分類にならい，DNA ハイドロゲルについても，架橋の方法によって物理ゲルと化学ゲルの２種類に分類できる．

化学ゲルとは，共有結合で架橋された構成のゲルのことを指す．DNA ゲルの場合，一般にこれはモチーフベースの設計によって実現される．粘着末端をもった X 字や Y 字などの DNA 分岐モチーフをアニーリングしたのち，酵素のひとつであるリガーゼを用いてバックボーンを接続することで，モチーフ同士を共有結合でつないだネットワーク構造が構成される(図 1a)[1]．また，可逆的に共有結合のスイッチングが可能な人工塩基をモチーフに組み込むことで，繰り返しゲル/ゾル化を行える DNA ゲルも開発されている[2]．

もうひとつの分類が物理ゲルである．物理ゲルは，その架橋が共有結合以外でなされたものを指す．DNA ゲルの場合，水素結合，および物理的なからみあいによってネットワークが形成された構造となる．たとえば，先の例と類似したモチーフを利用して物理ゲルを作成することができる[3]．このとき，化学ゲルのようにリガーゼによる処理を行なわず，粘着末端のハイブリダイゼーションのみで架橋することで，可逆的なゲル化が実現できる．さらに，DNA に加えて，他の高分子と組み合わせて物理ゲルを作成した例も報告されている[4]．一方で，いずれも化学合成した DNA を用いた上記の例とは異なり，酵素反応を利用して物理ゲルを作成するアプローチもある(図 1b)[5]．DNA ポリメラーゼのひとつ，Phi29 DNA ポリメラーゼと呼ばれる酵素は，その優れたプロセッシビティ[2]と強力な鎖置換活性で知られている．これを利用して長鎖 DNA を大量に合成し，それら同士の物理的な絡み合いや水素結合による架橋によってその場でゲルをつくる，というのがおおまかな戦略である．この手法により，きわめて簡便かつ安価に，任意の配列をもつ DNA ゲルが作成できるようになった．

---

[1] 二本鎖 DNA の持続長は 50nm である．そのため，マイクロ/メゾスケールでは棒の近似は成立しない．
[2] 酵素の結合から解離までに連続して行える反応の度合い．DNA ポリメラーゼの場合，一度の結合につき，いくつのヌクレオチドが DNA に取り入れられたか（どれくらい長い DNA が合成されたか）で定義される．

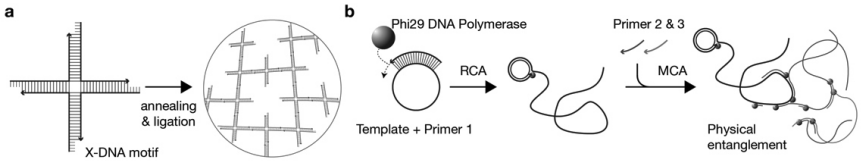


図1　DNAハイドロゲル

a）化学ゲル．モチーフを接続し構造をつくる．b）酵素反応を利用した物理ゲル．環状のテンプレートDNAと短いプライマー1から構成される種構造からポリメラーゼ反応を開始し，途中，追加のプライマー2,3 も加え，絡み合った大量の長鎖DNAを合成することでゲルをつくる．

DNAゲルの応用

DNAゲルは，扱いやすいマクロな素材でありながらも，ナノスケールでみたときには，通常のDNAと同じ二本鎖（もしくは一本鎖）構造をとっているのがその特徴といえる．この特徴の直接的な応用のひとつといえるのが，ゲルからの無細胞タンパク質合成である[6]．リガーゼを利用して，プラスミドなど，遺伝子配列を含む DNA そのものをゲルの一部分に組み込むことができる．ここからタンパク質合成をおこなったところ，通常の溶液からの合成と比較して300 倍の効率で目的のタンパク質が生産できたことが確認されている[7]．ゲルに組み込まれたことによる構造の保護や濃度上昇，拡散係数の低下による転写反応の効率向上，といった複数の要因がこれに寄与していると考えられている．また，マイクロ流路をつかい，油中水滴のなかで作成した均一サイズのDNAマイクロゲルを利用し，ここからタンパク質を合成，できあがったタンパク質をそのゲル内に捕えることで，DNAゲルを媒体として遺伝子型と表現型の１対１対応を実現する系の構築にも成功している[8]．さらに近年では 3D プリント技術と組み合わせ，DNAゲルをその場で任意の形状に形成する技術も開発されている[9]．また，医薬以外の他分野応用を見据え，例えば建築材料に分子レベルでの情報や機能を付与することを将来的な目標として，セラミック素材にDNAゲルを塗布するといった試行も行われはじめている[10]．

DNAゲルには，マクロな構造と，分子レベルでの機能という，スケールをまたいだふたつの側面がある．いくつかの例からもわかるように，この両者をいかに効果的に連動させるか，という点が今後の応用の鍵となる．将来的には，人工的に構築した分子システム，とりわけゲル型の分子ロボットにおいて，ふたつの異なるスケールを物理的につなげるインターフェイスとしての役割をDNAゲルは果たすことになるだろう．

[1] S. H. Um *et al.* Enzyme-catalysed assembly of DNA hydrogel, *Nature materials*, vol. 5, no. 10, pp. 797–801, Oct. 2006.
[2] D. Kandatsu *et al.* Reversible Gel–Sol Transition of a Photo-Responsive DNA Gel, *Chembiochem*, **17**, 12, pp. 1118–1121, Jun. 2016.
[3] Y. Xing *et al.* Self-Assembled DNA Hydrogels with Designable Thermal and Enzymatic Responsiveness, *Adv. Mater.*, **23**, 9, pp. 1117–1121, Dec. 2010.
[4] S. Nagahara and T. Matsuda, Hydrogel formation via hybridization of oligonucleotides derivatized in water-soluble vinyl polymers, *Polymer Gels and Networks*, **4**, 2, pp. 111–127, 1996.
[5] J. B. Lee *et al.* A mechanical metamaterial made from a DNA hydrogel, *Nature Nanotechnology*, **7**, 12, pp. 816–820, 2012.
[6] N. Park *et al.* A cell-free protein-producing gel, *Nature materials*, **8**, 5, pp. 432–437, 2009.
[7] N. Park *et al.* High-yield cell-free protein production from P-gel, *Nat Protoc.*, **4**, 12, pp. 1759-1770, 2009.
[8] J. Kahn *et al.* DNA Microgels as a Platform for Cell-Free Protein Expression and Display, *Biomacromolecules*, **17**, 6, pp. 2019-2026, 2016.
[9] C. Li *et al.*, Rapid Formation of a Supramolecular Polypeptide–DNA Hydrogel for In Situ Three-Dimensional Multilayer Bioprinting, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **54**, 13, pp. 3957-3961, 2015.
[10] D. Rossenwasser *et al.* POLYBRICK 3.0: Live Signatures Through DNA Hydrogels and Digital Ceramics, *Journal of Rapid Manufacturing*, **7**, 2-3, pp. 203-218, 2018.

（コーネル大学　浜田省吾）

5．3 光応答性人工核酸

DNA はアデニン(A)，チミン(T)，グアニン(G)，シトシン(C)の 4 つの塩基から構成されており，ワトソンクリック則に従い二本鎖構造を形成している[1]．それらを配列設計することにより，ナノスケールで制御された DNA ナノ構造体構築[2]や分子計算[3]が可能となる．現在，100 塩基程度の DNA 鎖は化学合成することが可能であり，任意の配列を容易に入手できる．一方，天然には存

在しない機能を持った機能性人工核酸に関する研究も盛んに行われている．新たな機能を DNA に付与することができ，核酸類の操作・検出・制御といった観点から有用な人工核酸がいくつも報告されている．特に，光により制御可能な光応答性人工核酸は光照射のタイミングや位置により反応を時空間的に操作することが可能である．そのため，分子ロボットに光応答能を付与し，それを望みのタイミング・位置で発現させることも可能となる．本章では，これまで報告されてきた様々な光応答性人工核酸の中からいくつか紹介するとともに，現在，藤本研究室で開発している光応答性人工核酸を用いた核酸類操作法を紹介する．

Psoralen は古くから知られている光応答能を有する分子であり，DNA 中のチミンと紫外光照射により[2+2]光環化反応を介して光架橋すること可能である(図 1)[4]．DNA 合成技術の発展に伴い，ソラレン誘導体を DNA 鎖中の任意の位置に導入することが可能となり，様々なアプリケーションへの応用が考えられてきた．光刺激により DNA もしくは RNA に対する結合能を制御できるため，アンチセンス核酸としての機能化[5]や DNA ナノ構造体の安定性制御[6]などにも用いられている．

アゾベンゼンは 300 nm – 400 nm の波長の光照射により，トランス体からシス体へ，400 nm 以上の光照射によりシス体からトランス体へと変化するユニークな性質を有している(図 2)[7]．トランス体では平面構造を有しているため DNA にアゾベンゼンを挿入した場合も DNA 二本鎖を形成することが可能である．

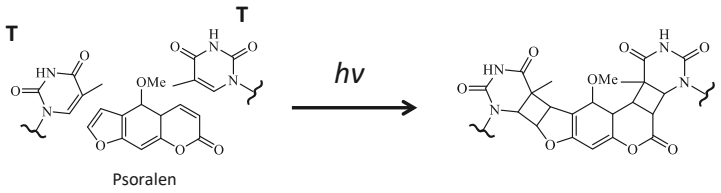


図 1 ソラレンを用いた DNA 光架橋反応

一方，シス体は立体的な構造をしており，DNA に導入場合には立体的な障害のため，二本鎖を形成出来ない[8]．この性質の違いを利用し，光照射による二本鎖形成能を制御することが可能であり，複数回の光照射による可逆的な二本鎖形成の制御が可能となった．本技術は分子モータの光制御[9]や DNA ナノ構

造の光制御[10]を可能としており，分子ロボット構築に向けてなくてはならないツールの一つである．

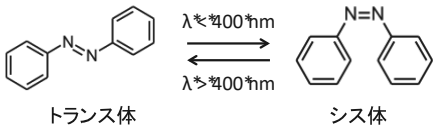


図 2　アゾベンゼンの光異性化

我々は光応答性人工核酸である 3-cyanovinylcarbazole(^{CNV}K)を報告しており，^{CNV}K を含むオリゴ DNA(ODN)は数秒の光照射により相補的 DNA もしくは RNA 中のピリミジン塩基と光架橋することができる(図 3)[10]．チミンに対して，366 nm の光照射を 1 秒行なうことにより，90%程度反応が進行する．さらに，312 nm の光を照射することにより光開裂反応を誘起することが可能であるため，光照射時の波長により光架橋反応を可逆的に操作することできる．従来素子と比べ，高い光反応性を有しているため，^{CNV}K 特有の特徴も見つかりつつある．

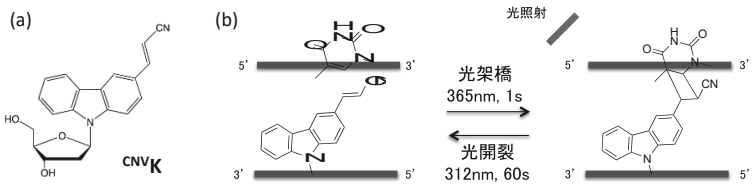


図３　^{CNV}K を用いた光架橋反応(a)光応答性人工核酸 (b)光架橋反応スキーム

同じく当研究室で開発された 5-Carboxyvinyldeoxyuridine(^{CV}U)は ^{CNV}K とは異なり，DNA 二本鎖間を連結するのではなく，隣り合うピリミジンと光架橋することができる(図４)[12]．リガーゼという酵素と同様の機能を光で制御でき，さらに 1 分程度の光照射で完了する．その他にもこれまで様々な光応答性人工核酸が報告されており，stilbazole[13]や anthracene[14]などの光応答性人工核酸も報告されている．

当研究室ではこのような光応答性人工核酸を用いることにより，核酸類の光操作を可能としている，特に ^{CNV}K などを用いた超高速光架橋反応(Ultra-Fast photo-Cross-linkinh: UFC)を用いることにより，光刺激により DNA や RNA な

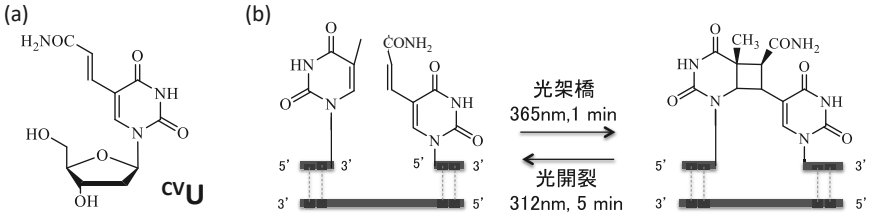


図 4. CVU を用いた光ライゲーション

どの核酸類を操作することが可能となりつつある．従来，酵素を用い，DNA 同士の連結，切断，増幅などを行ってきた．しかし，至適条件の最適化，酵素の失活などを考慮する必要があり，極めて最適化された条件(酵素に添付された buffer 使用時)での使用に制限されていた．一方，光応答性人工核酸を用いた核酸類操作法は①幅広い条件下で利用可能，②高い操作性(時空間制御，照射エネルギー・波長)，③酵素法とも組み合わせ可能といった利点を有している．これらは分子ロボットの操作性を高める上で有用なツールであると考えられる．特に光応答性人工核酸は有機化学の知識を基に，設計・合成されている．そのため，構造や置換基の僅かな違いにより，その反応性は大きく異なる．そのため，設計次第では，様々な機能・反応性を有する光応答性人工核酸を造り出すことが可能である．図 5 に示している 5 種類の光応答性人工核酸は類似の構造をしているものの反応速度は異なり，最も速いものと遅いものの間には一次反応速度にして 10 倍近い差がある．CNVK 同様シアノビニルカルバゾール骨格を有しつつ，リボース部分を D-トレオニノールに変更した CNVD[15]はリボースよりも自由度が高いため，光架橋反応を高速化することに成功している．一方，その異性体である L-トレオニノールを用いた CNVL を用いることにより光架橋反応速度を遅くすることもできる．その他，炭素鎖を短くした CNVGr, CNVGs では架橋速度が大きく遅くなる．従来酵素を用いた場合にはこのような反応速度を制御することは非常に困難であった．しかし，光応答性人工核酸はこのような分子レベルでの精密な制御が可能となり，分子ロボットの各機能を最適化していく上で非常に重要である．

これら分子レベルでの精密な制御により可能となる応用例の一つとして，DNA 鎖交換反応速度の光制御に関する例を紹介したい．生体分子を用いた情報処理機構の構築は分子ロボットにおける大きな要素である．それを担う分子として DNA が考えられており，現在酵素を用いない様々な論理回路が報告さ

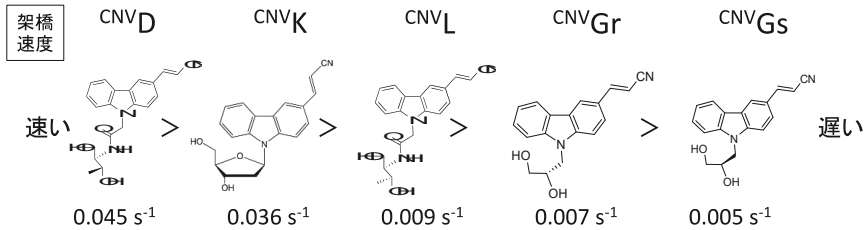


図 5　反応性の異なる光応答性人工核酸ライブラリー

れている．AND gate[16]や増幅回路[17]，Seesaw gate[18]のような比較的大規模なものまで様々なものが報告されているが，それら回路は DNA 鎖交換反応を組み合わせることにより構築されている．DNA 鎖交換反応は Toehold へのアクセスと branch migration と呼ばれる多段階の平衡反応にわけることができ，branch migration が反応速度のボトルネックとなっている(図 6a)．そこに光架橋

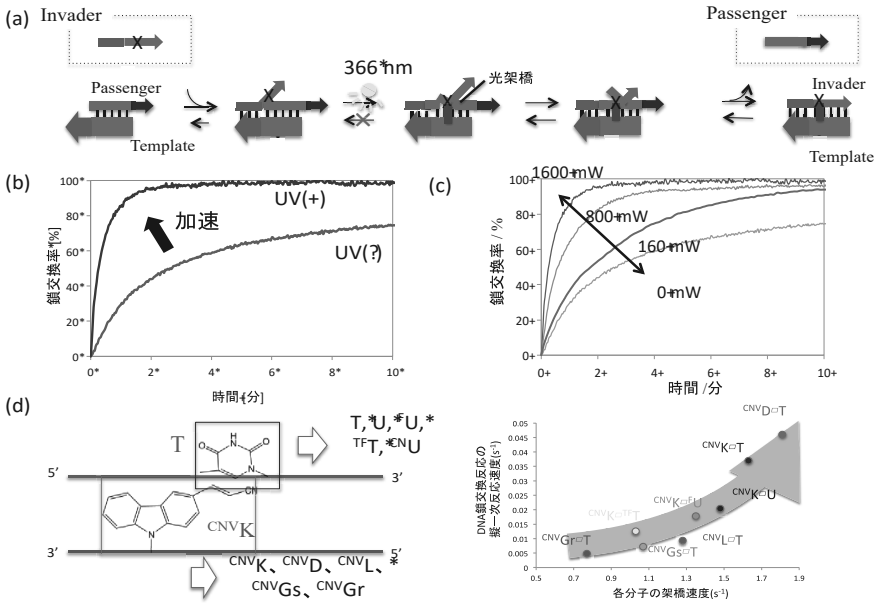


図 6　超高速光架橋反応(UFC)を用いた DNA 鎖交換反応速度制御

(a) DNA 鎖交換反応 (b) 光架橋反応による DNA 鎖交換反応の加速 (c) 光照射エネルギーによる反応速度制御 (d) 架橋素子の組み合わせによる反応速度の精密制御

反応を用いることにより，逆反応を阻害し，branch migration を加速することが可能である．本光架橋反応を用いることにより，DNA 鎖交換反応を 21 倍加速することに成功している(図 6b)[19]．また，本 DNA 鎖交換反応は各熱力学パラメータが調べられており，シミュレーションすることが可能である．光架橋反応を用いた場合には光架橋素子の光架橋速度を導入することにより，その加速効果を予測できることも見出している(図 6c)．本シミュレーション結果から，光架橋速度を変化させることにより，DNA 鎖交換反応速度を制御できることが示されたため，光照射エネルギーや光架橋素子を変化させることにより，様々な DNA 鎖交換反応速度を実現することが可能である(図 6d)．

さらに UFC により可能となるアプリケーションのひとつとして光化学的脱アミノ化反応を誘起することが可能である．通常シトシンからウラシルへの変換には数百年の年月を必要とするが，図 7 に示した様に超高速光架橋反応を用いることにより，3 時間の 90°C 加熱で反応を誘起することが可能である[20]．近年注目されているゲノム編集技術などと同じように塩基変換が可能であり，分子ロボットとして遺伝子治療への応用が考えられる．しかし，90°C 加熱は生体内では利用不可能であり，生体内応用を目指し，様々な検討を行った．その結果，標的となるシトシン周辺構造の最適化により 37°C での脱アミノ化反応に成功した[21]．シトシンの対合塩基としてイノシン[22]，光架橋素子として親水性の置換基[23]を有する光架橋素子を用いた場合に脱アミノ化反応が 14 倍加速していることを見出した．本反応は周辺構造の化学構造を最適化するこにより 37°C での脱アミノ化反応に成功し，分子ロボットの治療応用として有用なアウトプットとなると考えられる．

さらに UFC は高い光反応性故に細胞内でも利用することが可能である（図８）．標的 DNA もしくは RNA と共有結合を介し，非常に安定な二本鎖を形成できることから，mRNA を光架橋することにより，翻訳を阻害するアンチセンス法への応用が可能である．GFP-HeLa 細胞内に ^{CNV}K を含むアンチセンス核酸をリポフェクション法により導入した．その後，光照射を 10 秒行なった後，共焦点顕微鏡による GFP 蛍光量の定量を行なった．その結果，光照射により GFP 蛍光が大きく減少していることが確認された[24]．共有結合の形成により翻訳を大きく阻害していると考えられる．また，従来光架橋素子として用いられて来た psoralen，^{CNV}K よりも高い光応答能を有する ^{CNV}D を用い，それぞれのアンチセンス効果を検証したところ，^{CNV}D は 90%程度の遺伝子発現

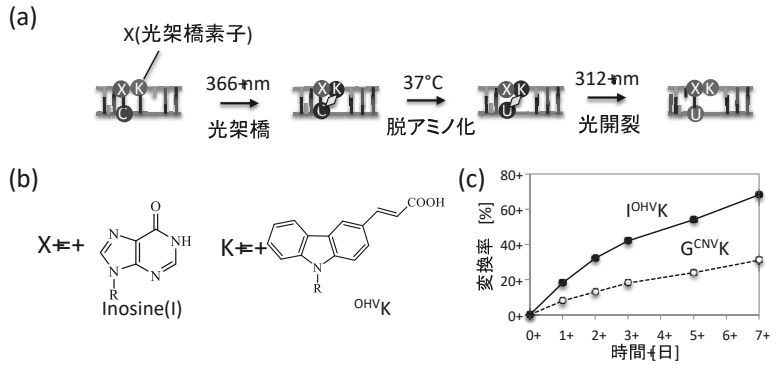


図 7 超高速光架橋反応(UFC)を用いたシトシンからウラシルへの変換

(a)反応スキーム(b)各化合物の化学構造 (c)経時変化

抑制効果を有していた. また, 光を用いる利点として操作性の高さが挙げられるが, 細胞内ににおける遺伝子発現制御も光照射のタイミングで制御することが可能である. 図 8 に示すように, 光照射を行った直後に GFP mRNA の量が減少しており, 光照射のタイミングで遺伝子発現を時間的に制御することに成功した.

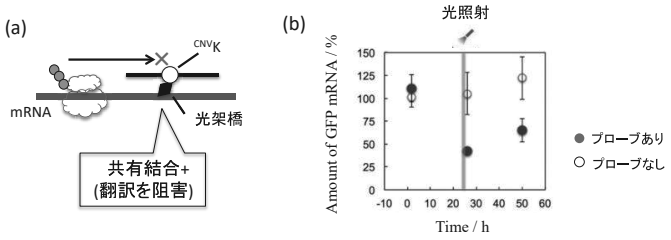


図 8 超高速光架橋反応(UFC)を用いた細胞内アンチセンス効果の光制御

(a)アンチセンス効果の光制御 (b)qRT-PCR 解析結果

まとめ

DNA 合成技術の進歩の伴い, 任意の配列の DNA を容易に入手できるようになった. それに伴い, 機能性人工核酸の研究開発が進み, 分子ロボットにおいても様々な機能の実現に成功している. 光という操作性の高い刺激による操作は分子ロボットにける制御と関連づけることができ, 今後の分子ロボットの進化を支えていく一つの重要な技術になると期待している.

[1] Watson, J. D., Crick, F. H., Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid, *Nature,* 171, 4361, pp 964-967, 1953.
[2] Seemman, N. C., Nucleic acid junctions and lattices, *J. theor. Biol*., 99, 2, pp 237-247, 1982.
[3] Aldeman, L., Molecular computatuin of solutions to combinational problems, *Science*, 266, pp 1021-1024, 1994.
[4] Chatterjee, P. K., Cantor, C. R., Photochemical production of psoralen – DNA monoadducts capable of substituent photocrosslinking, *Nucleic Acid Res*., 36, pp 3619-3633, 1978.
[5] Gasparro. F. P., Edelson, R. L., O'Malley, M. E., Ugent, S. J.,et al., Photoreactable antisense DNA supression of ampicillin resistance in normally resistance Escherichia coli, *Antisense Res. Dev.,* 1, pp 117-140, 1991.
[6] Rajendran, A., Endo, M., Katsuda, Y., Hidaka, K., et al., Photo-cross-linking-assisted thermal stability of DNA origami structures and its application for higher-temperature self-assembly, *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 37, pp 14488-14491, 2011.
[7] Zimmerman, G., Chow, L. Y., Pail, U. J., The Photochemical Isomerization of Azobenzene, *J. Am. Chem. Soc.*, 80, pp 3528-3531, 1958.
[8] Asanuma, H., Ito, T., Yoshida, T., Liang, X., et. al., Photoregulation of the Formation and Dissociation of a DNA Duplex by Using the cis-trans Isomerization of Azobenzene, A*ngew. Chem. Int. Ed Engl*., 38, 16, pp 2393-2395, 1999.
[9] Keya, J. J., Suzuki, R., Kabir, A. M. R., Inoue, D., et. al., DNA-assisted swarm in a biomolecular motor system, *Nat. Chem.*, 9, 453, 2018.
[10] Kamiya, Y., Yamada, Y., Muro, T., Matsuura, K., et. al., DNA microcapsule for photo-triggered drug release system, *ChemMedChem*, 12, pp 2016-2021, 2017.
[11] Yoshimura, Y., Fujimoto, K., Ultrafast Reversible Photo-Cross-Linking Reaction: Toward in Situ DNA Manipulation, *Org. Lett.*, 10, 15, pp 3227-3230, 2008.
[12] Yoshimura, Y., Okamura, D., Ogino, M., Fujimoto, K.,Highly selective and sensitive template-directed photoligation of DNA via 5-carbamoylvinyl-2'-deoxycytidine, *Org. Lett.*, 8, 22, pp 5049-5051, 2006.
[13] Kashida, H., Doi, T., Sakakibara, T., Hayashi, T., et. al., p-Stilbazole Moieties As Artifical Base Pair for Photo-Cross-Linking of DNA Duplex, *J. Am. Chem. Soc*., 135, pp7960 – 7966, 2013.
[14] Ihara, T., Fuji, T., Mukae, M., Kitamura, Y., et. al., *J. An. Chem. Soc.*, 126, pp

8880-8881, 2004.
[15] Sakamoto, T., Tanaka, Y., Fujimoto, K., DNA photo-cross-linking using 3-cyanovinylcarbazole modified oligonucleotide with threoninol linker, *Org. Lett.*, 17, 4, pp 936-939, 2015.
[16] Seeling,G., Soloveichik, D., Zhang, D. Y., Winfree, E., Enzyme-free nucleic acid logic circuit, *Science*, 314, 5805, pp1585-1588, 2006.
[17] Komiya, K., Yamamura, M., Cascading DNA Generation Reaction for Controlling DNA Nanomachines at a Phosiological Temperature, *New Generation Computing*, 33, pp 213-229, 2015.
[18] Qian, L., Winfree, E., Scalling up digital circuit computation with DNA strand displacement cascades, *Science*, 332, 6034, pp1196-1201, 2011.
[19] Nakamura, S., Hashimoto, H., Kobayashi, S., Fujimoto, K., Photochemical acceleration of DNA strand displacement using ultrafast DNA photo-cross-linking, *ChemBioChem*, 18, 20, pp 1984-1989, 2017.
[20] Fujimoto, K., Konishi-Hiratsuka, K., Sakamoto, T., Yoshimura, Y., Site-specific photochemical RNA editing, *Chem. Commun*., 46, pp 7545-7547, 2010.
[21] Sethi, S., Nakamura, S., Fujimoto, K., Study of Photochemical Cytosine to Uracil Transition via Ultrafast Photo-Cross-Linking Using Vinylcarbazole Derivatives in Duplex DNA, *Molecules*, *23*, 4, pp 828-937, 2018.
[22] Sethi, S., Ooe, M., Sakamoto, T., Fujimoto, K., Effect of nucleobase change on cytosine deamination through DNA photo-cross-linking reaction via 3-cyanovinylcarbazole nucleoside, *Mol. BioSyst*, 13, pp 1152 – 1156, 2017.
[23] Sethi, S., Takashima, Y., Nakamura, S., Fujimoto, K., Effect of substitution of photo-cross-linker in photochemical cytosine to uracil transition in DNA, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 27, 16, pp 3905-3908, 2017.
[24] Sakamoto, T., Shigeno, A., Ohtaki, Y., Fujimoto, K., Photo-rregulation of construction gene expression in living cells by using ultrafast photo-cross-linking oligonucleotides, *Biomatter. Sci*., 2, pp 1154-1157, 2014.

（北陸先端科学技術大学院大学　藤本健造）

5．4 光応答性人工核酸を用いた DNA 計算

分子ロボットにおいて各デバイス間の情報伝達をになう分子として DNA がその候補として考えられる．Adleman らが情報素子としての DNA の特徴[1]に注目し，DNA の連結・増幅を用いた計算手法が考案された(図 1a)．一方，非酵素的論理回路として DNA 鎖交換反応を利用した論理回路[2]も報告されている．また，Winfree のグループは Seesaw gate と呼ばれる複数のゲート素子をカスケード化した論理回路を実装した[3]．これら非酵素的論理回路は鎖交換反応を介し，情報のやり取りが行われる．二本鎖 DNA から飛び出した一本鎖部分(toehold)を足掛かりとして，別の一本鎖 DNA がハイブリダイゼーションし，branch migration を経て，最終的に安定な二本鎖を形成し，出力鎖が放出される(図 1b)．しかし，回路の大規模化に伴い，計算時間の短縮，入力の同期などが必要である．

我々は光応答性人工核酸を用いた DNA 計算の実現に向け，光ライゲーション反応を用いた光駆動型二進計算に成功し，Full-adder 回路の構築に成功した[4]．また光架橋素子である 3-cyanovinylcarbazole を組み込んだ際には DNA 鎖交換反応を約 21 倍に加速できることを報告している(図 1c)[5]．また，光照射

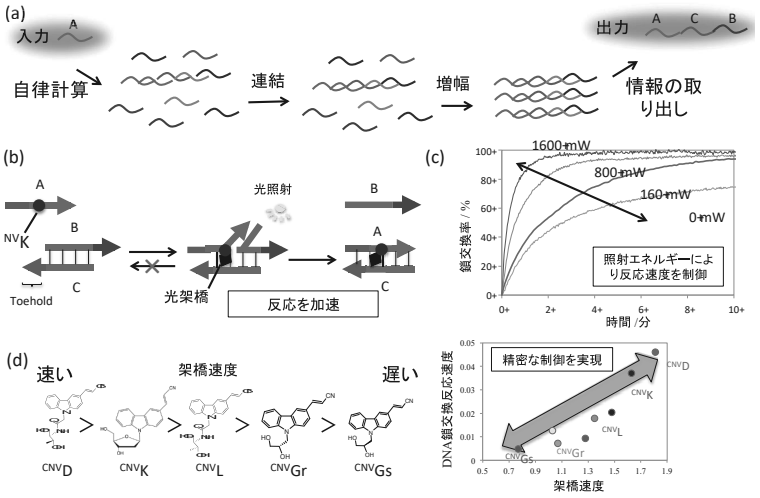


図 1　DNA 計算と光応答性人工核酸の応用

(a) DNA 計算 (b)DNA 鎖交換反応　(c) 光エネルギーによる DNA 鎖交換反応の加速 (d) 光応答性人工核酸を用いた DNA 鎖交換反応速度制御

エネルギーを変化させることにより DNA 鎖交換反応速度を制御できることを見出している．さらに我々が開発してきた光応答性人工核酸である ^{CNV}D や ^{CNV}L などを用いることにより，同一系内でも光照射により様々な反応速度を持つ DNA 鎖交換反応を実現でき(図 1d)，それらをカスケード化することにより，計算時間の短縮や各入力の同期などが実現できると考えられる．

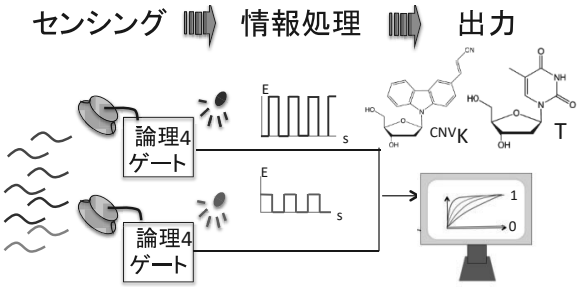


図 2　DNA 計算の展開

DNA を用いた分子計算が提唱され約 30 年を経た今，分子ロボットの情報処理機構として様々な応用が期待されている．光応答性人工核酸は DNA 計算の基礎反応である DNA 鎖交換反応の速度を制御できるため，従来にない新たな計算モデルや制御が可能となる．分子ロボットの内部に回路を持ち，入力に従い出力をする(変化する)．さらに光照射の有無により挙動が異なる．このような考え，動く分子ロボットの構築に向け，光応答性人工核酸を用いた DNA 計算は新たな技術として幅広く利用できるのではないか．

[1] LM. Adleman, Molecular computation of solutions to combinatorial problems, *Science,* 266, 5187, pp1021-1024, 1994.
[2] G. Seeling, D. Soloveichik, DY. Zhang, E. Winfree, Enzyme-free nucleic acid logic circuit, *Science,* 314, 5805, pp1585-1588, 2006.
[3] L. Qian, E. Winfree, Scalling up digital circuit computation with DNA strand displacement cascades, *Science*, 332, 6034, pp1196-1201, 2011.
[4] S. Ogasawara, T. Ami, K. Fujimoto, Autonomous DNA Computing Machine based on Photochemical Gate Transition, *J. Am. Chem. Soc*., 130, 31, pp10050-10051, 2008.
[5] S. Nakamura, H. Hashimoto, S. Kobayashi, K. Fujimoto, Photochemical acceleration of DNA strand displacement using ultrafast DNA photo-cross-linking,

ChemBioChem, 18, 20, pp1984-1989, 2017.

（北陸先端科学技術大学院大学　藤本健造）

5．5　核酸の直交性

DNAの直交性(orthogonality)

数学では内積がゼロになる二つのベクトルの関係を，直交性と定義する．そこから派生し，現在では互いに干渉（相互作用）しない一連の要素群の関係を，学問分野を問わずに直交性（orthogonality）と表現する．例えば有機化学における直交性とは，同じ官能基に対する異なる保護基がそれぞれ特定の条件下のみで選択的に脱保護されるような，高い基質選択性を意味する[1]．核酸分野でもDNAコンピューティングという概念が一般化してから，DNAやRNAの配列特異性を直交性と表現することが多くなった．DNAやRNA鎖は完全に相補的な配列と最安定な二重鎖を組むが，ミスマッチの数にほぼ対応して不安定化し，ランダム配列とは全く二重鎖を形成しない．このようにDNAやRNAは配列の相補性に基づいた“直交性”を有し，その直交性を活用することで様々な分子演算や論理回路が実現している．例えばDNAやRNAの配列特異的検出が可能なモレキュラービーコンは，DNAの直交性を利用した簡便な分子マシンの一つである．配列が短ければわずか1塩基ミスマッチでも二重鎖の安定性は劇的に低下するので，配列の僅かな相違でも十分な直交性が担保される．しかし配列が短いと二重鎖の十分な安定性が確保できず，また識別可能なDNAやRNAの鎖長が限られてくる．より複雑で安定な分子回路を設計しようと鎖長を長くすると直交性の確保が難しくなり，意図しないクロストークによる誤作動の問題が出てくる．またDNAのみを用いて配列を工夫するだけでは設計可能な分子回路に限界があり，DNAコンピューティングの進化には直交性を拡張できる人工核酸が必要である．

人工核酸による直交性の拡張

近年有機合成化学の進歩により，天然には存在しない様々な人工核酸の合成が可能になった．人工核酸の多くは，ヌクレアーゼ耐性（酵素耐性）を付与することが目的で設計されたため，天然のヌクレオチドの一部を化学修飾した

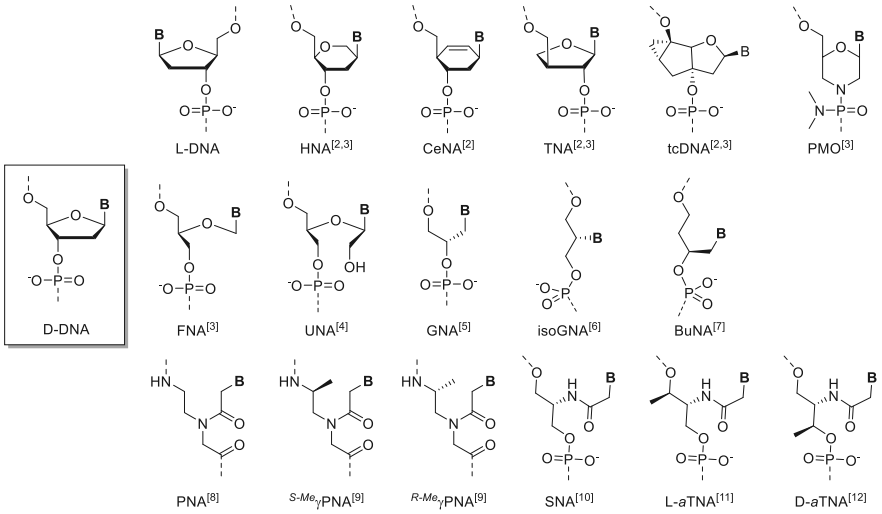


図 1　天然の D-リボースを使用しない人工核酸

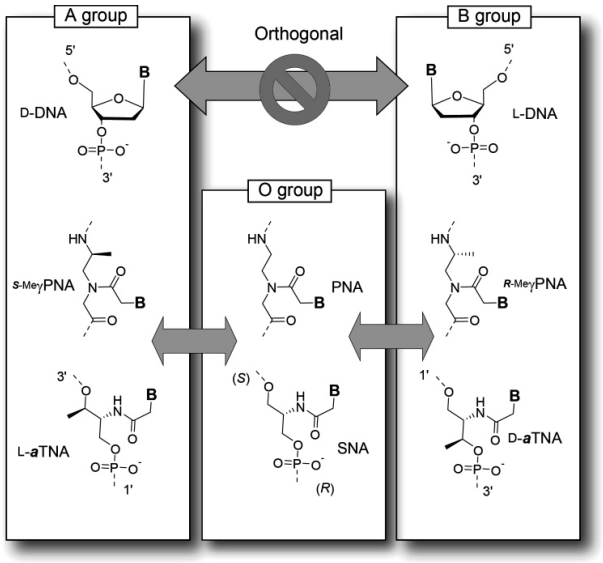


図 2　直交性で分類した（人工）核酸

A 群：天然の DNA(D-DNA)と二重鎖可能な（人工）核酸群、

B 群：A 群と直交している人工核酸群

O 群：A 群 B 群とも二重鎖形成可能な人工核酸群

ものがほとんどであった．その一方で，なぜ遺伝子の骨格として D-リボースが使用されたのかという Prebiotics 的観点からも，D-リボース骨格を改変した様々な人工核酸が合成され（図 1），その中から直交性を拡張させる人工核酸群が見出されてきた．

図 2 の A 群は，右巻きらせんを好むキラルな骨格を持つ人工核酸群で，いずれも天然の DNA(RNA)と二重鎖形成が可能である．すなわち A 群の人工核酸間では，DNA(RNA)と同様の配列のみに基づいた直交性を持つ．一方の B 群は骨格が A 群のエナンチオマーであるため，左巻きらせんを誘発する．また，B 群の人工核酸間でも A 群と同様の配列に基づいた直交性を持つ．しかし右巻きと左巻きでは“反り”が合わないので，A 群と B 群の間では相補的な配列であっても二重鎖形成ができない．すなわち従来の配列依存的な直交性とは別次元の直交性が実現する．ただし A 群と B 群とが互いに一切干渉しないのであれば，これらをどのように組み合わせても，拡張された直交性を活かした分子演算や回路の設計は不可能である．そこでアキラルな骨格を持つ人工核酸群（O 群）を，A 群と B 群の間で情報交換を可能にするインターフェースとして使用する．O 群の人工核酸は，骨格がアキラルなためらせんの向きを相手に合わせることができ，右巻きの A 群と左巻きの B 群どちらとも配列依存的に二重鎖形成する．すなわち A 群と B 群が直交していても，O 群の人工核酸を介在させれば互いにコミュニケーションが可能になる．例えば B 群の人工核酸でシグナル増幅回路を設計した場合，A 群に属する天然の DNA や RNA で回路は起動しない．しかし O 群の人工核酸をインターフェースに用いれば，DNA や RNA の配列情報を B 群の人工核酸の配列情報に変換することができるため，シグナル増幅回路を起動させることが可能となる．実サンプル中には様々な夾雑 DNA や RNA が存在するが，B 群の人工核酸で回路を設計すれば夾雑 DNA(RNA)で誤作動することのないロバストなシグナル増幅回路が設計できる．この増幅回路と直交している標的 DNA(RNA)を検出するためには，インターフェース核酸で標的 DNA(RNA)入力を B 群の人工核酸に変換し，回路を起動すればよい．すなわち人工核酸で直交性を拡張することで，分子認識はインターフェース核酸が担い，シグナル増幅は直交性人工核酸で行うという，一種の機能分離が実現できる．以下の節で，Winfree らの開発した，DNA や RNA を配列特異的に検出するシグナル増幅回路の一種である Seesaw gate で説明する[13].

DNA と D-*a*TNA の直交性

A 群側の核酸として天然の DNA を, それと直交する人工核酸として D-*a*TNA を使用して，それぞれ同じ配列の Seesaw gate を設計した．まずは Seesaw gate によるシグナル増幅の原理を以下に示す.

初期状態(図 3(a))では, あらかじめハイブリダイズさせておいた Output/Gate 二重鎖と Fuel 鎖が存在する．Output と Gate の末端はそれぞれ蛍光色素と消光色素でラベルされている. また Fuel は末端に消光色素が無いことを除けば Output と全く同じ配列だが, Gate のオーバーハング部位と二重鎖形成する部位が Fuel に存在しないので，Fuel と Output の交換は起きない．Input は Gate のオーバーハング部位と相補的な配列を持つので，極少量でも Input が添加されると toehold exchange 反応により Output との交換反応が起き（図 3 (b)），Output が Gate から引き剥がされることで蛍光シグナルを出す（図 3(c)）．生成した Gate と Input の二重鎖は, 大過剰に存在する Fuel との toehold exchange ((d)から(e)) によって Gate/Fuel 二重鎖（Waste）が生成するとともに Input 鎖が再生する.

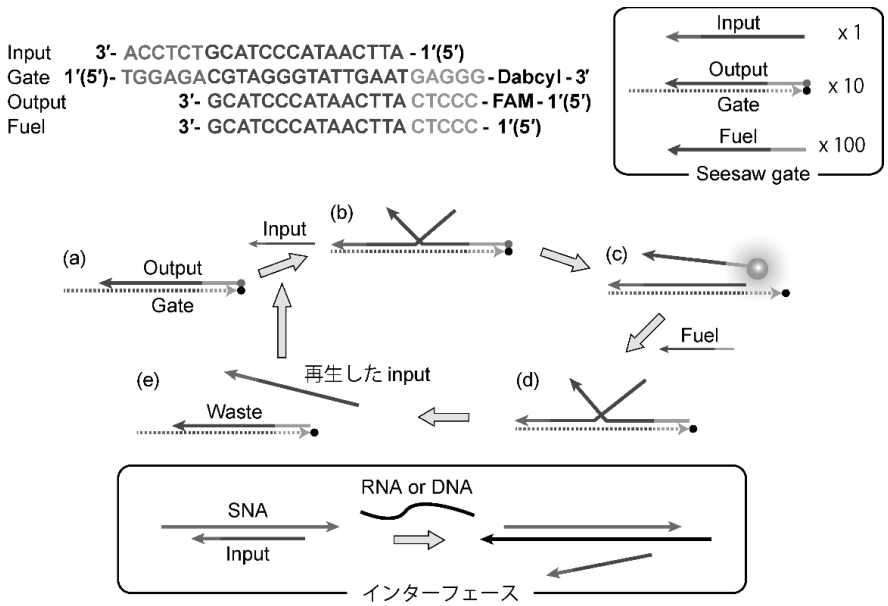


図 3　Seesaw gate によるシグナル増幅の原理

(Partially modified and reprinted from *ChemistrySelect* 2017 [14])

再生された Input は，大過剰に存在する Output/Gate と再び toehold exchange 反応を起こす．すなわち Output/Gate 二重鎖と Waste がほぼ同量になるまでこの回路が作動し，Output を出力（すなわち蛍光増強）し続ける．このように，DNA のみで構成された Seesaw gate は，DNA や RNA を配列特異的に蛍光増幅により検出できる．

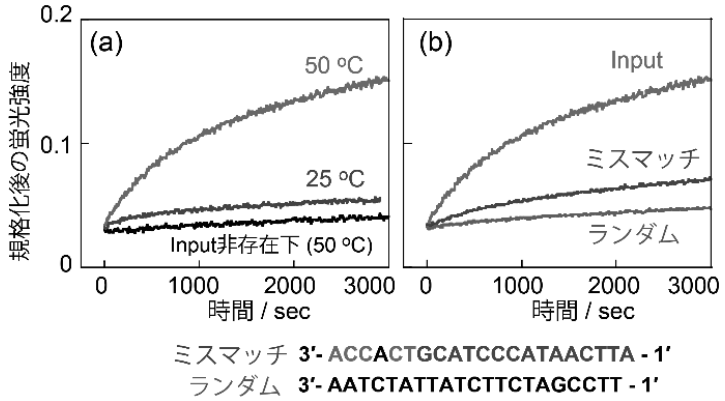


図４　Input 添加による D-*a*TNA seesaw gate の起動

(a) 温度の影響 (b) 配列の直交性 (Partially modified and reprinted from *ChemistrySelect* 2017 [14])

まずは人工核酸 D-*a*TNA のみで設計した Seesaw gate が DNA と同様に起動するか確認した[14]. DNA で設計した場合は 25℃で回路が起動したのに対し，ホモ二重鎖が DNA より安定な D-*a*TNA で設計した回路は，50℃で起動した（図 4a）．また配列特異性を調べたところ，フルマッチの Input 添加では蛍光増幅が起きたが，ミスマッチやランダム配列ではほとんど起きなかった（図 4b）．このように D-*a*TNA でも DNA と同様に Seesaw gate は機能し，配列に基づく十分な直交性を有していることが分かる．

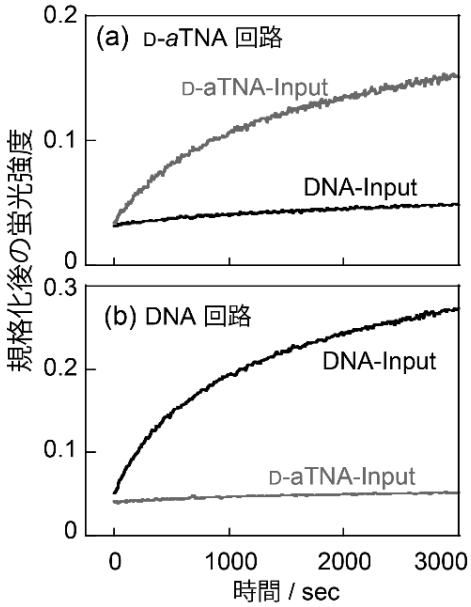


図 5 (a) D-*a*TNA 回路と(b) DNA 回路間の，直交性

それぞれの回路には, 回路を構成する核酸と同一の Input を添加した場合のみ起動する. (Partially modified and reprinted from *ChemistrySelect* 2017 [14])

次に DNA と D-*a*TNA seesaw gate 間で直交性が維持されているか, 互い Input を添加して検証した．2 つの Input は骨格が異なっているが，全く同じ塩基配列を持っている．図 5a に示すように，DNA の Input を添加しても D-*a*TNA 回路は起動しなかった．同様に D-*a*TNA の Input を添加しても DNA 回路は起動しなかった（図 5b）．このよう二つの回路は完全に直交しており，同一核酸のフルマッチの Input でのみ起動する．

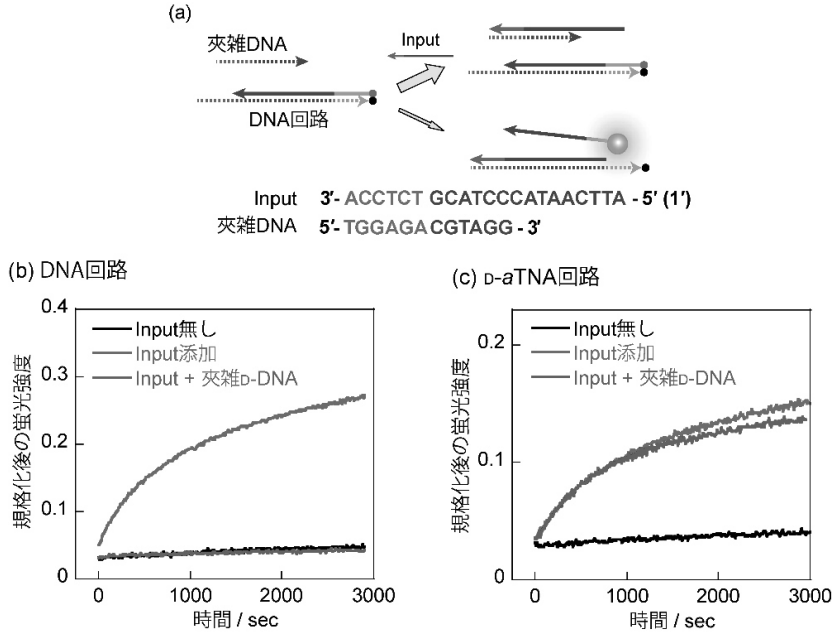


図 6　夾雑 DNA の Seesaw gate への影響

(a) 夾雑 DNA の Seesaw gate への影響のモデル図 (b) DNA 回路の，夾雑 DNA の存在下での挙動 (c) D-*a*TNA 回路の，夾雑 DNA の存在下での挙動．(Partially modified and reprinted from *ChemistrySelect* 2017 [14])

そこで Gate の一部分と同じ配列をもつ DNA を夾雑 DNA として添加し，その Seesaw gate への影響を調べた．図 6a に示すように，DNA 回路では Gate よりも優先的に夾雑 DNA が Input に結合してしまうため，Input を添加しても増幅回路は起動しない．つまり DNA 回路は夾雑 DNA により容易に“ショート”してしまう．一方 D-*a*TNA 回路では夾雑 DNA と直交しているので，その影響を受けずに D-*a*TNA の Input 添加で増幅回路が起動する．このように D-*a*TNA で回路設計すれば，直交性に基づいた夾雑 DNA(RNA)の影響を受けないロバストなシステム設計が可能となる．

SNA インターフェースによる RNA→D−*a*TNA 変換

D-*a*TNA 回路を天然の DNA あるいは RNA 入力で起動させるためには，DNA（RNA）配列情報を D-*a*TNA に変換する必要がある．O 群に属する SNA が

DNA（RNA）と D-*a*TNA の両方と配列特異的に二重鎖を組むという特徴を生かし，toehold exchange で D-*a*TNA を出力するようなインターフェースを設計した．ここでは，細胞内に微量存在するマイクロ RNA の一種である miR21 を標的とした．図 7a に示すように，Input(D-*a*TNA)のオーバーハングを含む部位を覆い，かつ SNA 配列全てが標的 RNA と相補的になるよう，インターフェース SNA を設計した．系内には D-*a*TNA seesaw gate と共に，あらかじめ Input(D-*a*TNA)をハイブリダイズさせておいた SNA インターフェースを共存させておく．この状態では Input(D-*a*TNA)が存在しても，Gate との反応の足がかりになる toehold 部分がインターフェース SNA と二重鎖形成しているので，回路が起動することは無い．一方で標的 RNA が入力されると，toehold exchange により SNA と二重鎖形成することで Input(D-*a*TNA)が出力され，D-*a*TNA seesaw gate が起動して蛍光増幅する．なお SNA は RNA より D-*a*TNA への親和性が高いので，D-*a*TNA よりも標的 RNA に対して長めに二重鎖形成するよう，SNA インターフェースを設計した．測定の結果，図 7b に示すように miR21(RNA)非存在下では蛍光増幅が起きなかったが，標的 RNA を添加したところ，期待通り蛍光増幅が起こり，D-*a*TNA seesaw gate の起動が確認できた．SNA インターフェースなしでは標的 RNA を加えても蛍光増幅が起きなかったことから，設計通りに SNA がインターフェースとして機能していることが確認された．

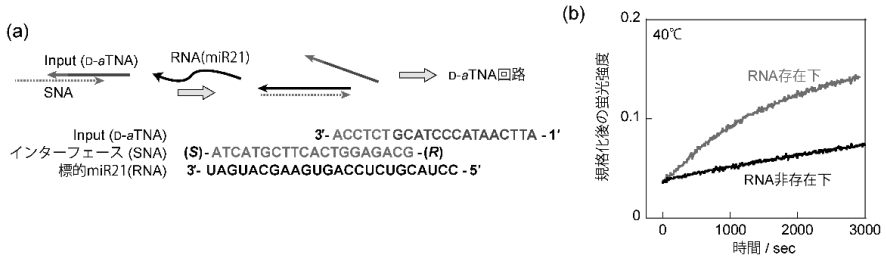


図 7　RNA(miR21)添加に伴う SNA インターフェースを介した D-*a*TNA seesaw gate の起動

(a) SNA インターフェースの作用機序の模式図 (b) 標的 RNA(miR21)添加に伴う蛍光増幅．(Partially modified and reprinted from *ChemistrySelect* 2017 [14])

以上のように，直交性人工核酸とインターフェース人工核酸を組み合わせることで，新たな分子演算が可能なことを示した．このようなシステムの直接的

な応用は，細胞内や実サンプルにおけるマイクロ RNA のような微量 RNA の蛍光増幅検出である．これまでに様々な増幅回路が開発されており [15]，Seesaw gate と同様に B 群の人工核酸で増幅回路を設計してインターフェースに用いれば，実用性のある夾雑物の影響を受けない微量 RNA の蛍光検出系が設計できる．

[1] G. Barany, R. B. Merrifield, A New Amino Protecting Group Removable by Reduction. Chemistry of the Dithiasuccinoyl (Dts) Function, *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 7363-7365 (1997).
[2] C. J. Leumann, DNA Analogues: From Supramolecular Principles to Biological Properties, *Biorg. Med. Chem.*, **10**, 841-854 (2002).
[3] D. D'Alonzo, A. Guaragna, G. Palumbo, Exploring the Role of Chirality in Nucleic Acid Recognition, *Chem. Biodivers.*, **8**, 373-413 (2011).
[4] N. Langkjaer, A. Pasternak, J. Wengel, UNA (unlocked nucleic acid): A flexible RNA mimic that allows engineering of nucleic acid duplex stability, *Bioorg. Med. Chem*. **17**, 5420-5425 (2009).
[5] L. Zhang, A. Peritz, E. Meggers, A Simple Glycol Nucleic Acid, *J. Am. Chem. Soc*., **127**, 4174-4175 (2005).
[6] P. Karri, V. Punna, K. Kim, R. Krishnamurthy, Base-Pairing Properties of a Structural Isomer of Glycerol Nucleic Acid, *Angew. Chem. Int. Ed*. **52**, 5840–5844 (2013).
[7] V. Kumar et al., Design, synthesis, biophysical and primer extension studies of novel acyclic butyl nucleic acid (BuNA), *Org. Biomol. Chem*. **11**, 5853-5865 (2013).
[8] P. E. Nielsen et al., Sequence-Selective Recognition of DNA by Strand Displacement with a Thymine-Substituted Polyamide, *Science*, **254**, 1497-1500 (1991).
[9] I. Sacui et al., Gamma Peptide Nucleic Acids: As Orthogonal Nucleic Acid Recognition Codes for Organizing Molecular Self-Assembly, *J. Am. Chem. Soc*., **137**, 8603-8610 (2015).
[10] H. Kashida et al., Control of the Chirality and Helicity of Oligomers of Serinol Nucleic Acid (SNA) by Sequence Design, *Angew. Chem. Int. Ed*., **50**, 1285-1288 (2011).
[11] K. Murayama, H. Kashida, H. Asanuma, Acyclic L-Threoninol Nucleic Acid (L-*a*TNA) with Suitable Structural Rigidity Cross-pairs with DNA and RNA, *Chem. Commun*., **51**, 6500-6503 (2015).

[12] H. Asanuma et al., Unexpectedly stable artificial duplex from flexible acyclic threoninol, *J. Am. Chem. Soc*., **132**, 14702-14703 (2010).
[13] D. Y. Zhang, E. Winfree, *J. Am. Chem. Soc*., **131**, 17303–17314 (2009).
[14] K. Murayama, R. Nagao, H. Asanuma, D-*a*TNA Circuit Orthogonal to DNA Can Be Operated by RNA Input via SNA, *ChemistrySelect*, **2**, 5624-5227 (2017).
[15] R. M. Dirks, N. A. Pierce, Triggered amplification by hybridization chain reaction, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 15275-15278 (2004).

（名古屋大学　浅沼浩之，村山恵司）

5．6 シャペロン高分子による DNA 反応の制御

シャペロン高分子とは

酵素や抗体など，生体高分子は正しく高次構造（Native structure）を形成しはじめてその固有の機能を発現する．生体高分子が高次構造を形成する過程を折りたたみ（フォールディング，Folding）と呼んでいる．一方，本来の高次構造から変性（ディネイチャー，Denature）すると機能を発現することは出来なくなる．変性した生体高分子も，何らかの処理をすることで正しい構造に巻き戻すことができる．これを再生（リフォールディング，Refolding またはリナチュレーション，Renaturation)と呼んでいる．多くの生体高分子では，自由エネルギー的に最安定な構造が，Native な構造となる．したがって，原理的には細胞内で合成されタンパク質は自発的に正しい構造に折りたたまれるはずであるが，長い高分子鎖である生体高分子では，多様な構造に折りたたまれてしまう可能性も高い．それが最安定な構造で無くても，ひとたび折りたたまれてしまうと，正しい構造へのリフォールディングが困難になる．同様に，熱や pH などの環境変化により，生体高分子は変性するが，変性した高分子は自発的に Native な構造には戻らないケースが多い．変性状態がエネルギー的には準安定でも，再安定な状態に移行するためのエネルギーバリアーが高いためである．特に変性タンパク質は多分子凝集しやすく，これがリフォールディングをより困難にする．生体系では，生体分子の正しいフォールディングやアッセンブリングを促す役割を果たす，分子シャペロンタンパク質が存在する．分子シャペロンとして始めて文献に述べられたのは，ヌクレオソーム形成を促す Nucleosome assembling factor(NAF)である[1]．ヌクレオソームは，ゲノム DNA

と塩基性タンパク質であるヒストンからなる複合体であり，ヒストン 8 量体の回りに整然と DNA が巻きついた規則構造からなる．しかし，ヒストンタンパク質と DNA を試験管内で混合してもヌクレオソームは形成されず凝集体となる．核酸とヒストンの静電的な相互作用が過剰に働き，正しい折りたたみが阻害された結果である．NAF は，この静電的な相互作用を緩めて正しい折りたたみを促す役割を果たす．

さて，核酸の正しい構造形成を促す核酸シャペロンも生体に存在する[2]．核酸を利用したナノ組織体やナノマシン，分子コンピューターでは，核酸の配列相補性に基づく自己組織化が鍵となる．さらに自己組織化の速度の制御が機能の向上に直結する．したがって，核酸の正確な構造形成を促す核酸シャペロン活性は核酸ナノテクの基盤要素となる．著者らは，正電荷を有するカチオン性くし型高分子（図１）と核酸との相互作用を解析する過程で，幸運にもくし型高分子が高い核酸シャペロン様の活性を発現することを見いだした．核酸は負電荷を多く持つため，静電的な反発が自己組織化に不利に働く．反対電荷を持つくし型高分子は核酸と結合し，負電荷を遮蔽することで，核酸の自己組織化を促す．例えば，くし型高分子は，1）核酸の二重らせん形成を顕著に促進し，安定化する．また，2）核酸ナノマシンやコンピューティングの素反応として

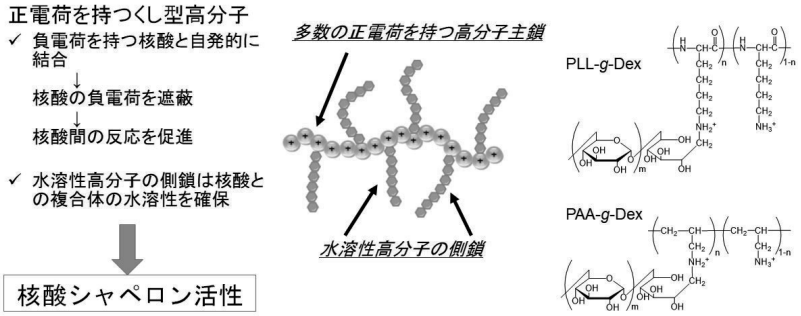


図１　核酸シャペロン活性を有するカチオン性くし型共重合体

利用される核酸鎖交換反応を 3 桁以上加速する．さらに，3）通常形成されにくい二重らせんや四重らせん構造などを安定化する．本節では，こうしたくし型高分子（以下，シャペロン高分子）に見いだされた知見を，核酸ナノテクに活用した例について紹介する．

シャペロン高分子で DNA ナノマシンやコンピューターを高速化

核酸分子は配列特異的に相補鎖とハイブリダイゼーションする. この厳密な配列特異性を用いて様々な DNA ナノ構造体が構築されている．また，駆動型構造体である DNA ナノマシンも開発されている．最も簡単な DNA ナノマシンであるステム-ループ型 DNA は相補的な核酸を添加した時，ステム部位の開裂を伴う鎖交換反応によって直鎖状に形状が変化する. 蛍光基と消光基を持つステムステム-ループ型 DNA は分子ビーコンと呼ばれ，ターゲット核酸の検出に使われている．しかし，ステム部位が熱力学的に安定なため鎖交換反応が非常に遅く, ターゲット核酸の検出には一時間以上の反応時間が必要であった．この遅い反応系に対してシャペロン高分子を加えると，鎖交換反応の高速化によって検出は 1 分で完了した[3]（図 2）.

さらに複雑な DNA ナノマシンである DNA tweezers(ハサミ) [4]も鎖交換の速度が遅いため動作が緩慢であった．ここに，シャペロン高分子を加えると，非常に高速かつ繰り返し良く動作した[5].

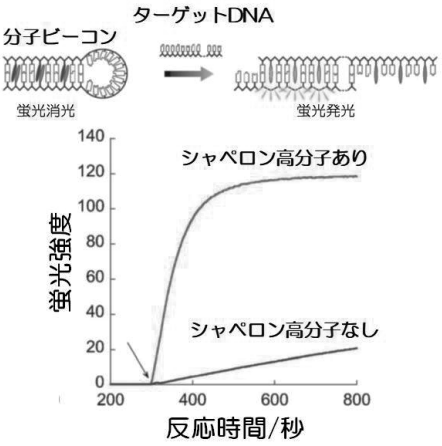


図 2　分子ビーコンのターゲット核酸検出のシャペロン高分子による高速化（Partially modified and reprinted from *Chem. Commun.* 2012 [3]）

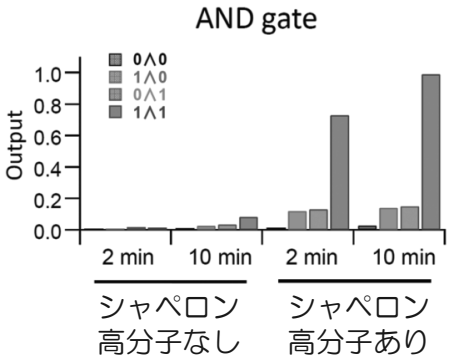


図３　シャペロン高分子による DNA コンピューターの高速計算（Partially modified and reprinted from *Adv. Funct. Mater.* 2018 [6]）

DNA の配列多様性と厳密なハイブリダイゼーション特性を生かして，DNA のみで構成された論理演算子が開発されている．この DNA 論理演算子を組み合わせた DNA コンピューターは省スペースかつ並列演算ができるだけでなく，シリコンコンピューターでは困難であった生体内を含む様々な環境下で使用できるメリットがある．DNA 論理演算子の多くは複数の鎖交換反応がカスケード的に進行することで，演算が行われるように設計されている．しかし，簡単な計算ですら数時間の演算時間が必要であり，さらに体内などに存在する核酸分解酵素によって DNA 分子が分解され，演算が破綻してしまう等の問題点があった．ところが，既存の低速な DNA 演算子にシャペロン高分子を加えるだけで，数時間の演算時間を数分に短縮することに成功した[6]（図３）．さらに，シャペロン高分子は核酸分解酵素耐性を付与できることから，核酸分解酵素が存在する環境下においても DNA 分子の分解を抑制し，正常かつ高速な演算を可能にした．

核酸ナノマシン[7]やコンピューティング[8]では，酵素活性を有する核酸である DNAzyme や Ribozyme を利用するものもある．そこで，シャペロン高分子による核酸酵素に対する効果を検討した．DNAzyme は基質である RNA を切断するが，切断後の基質の解離と新たな基質の結合過程からなるターンオーバーが非常に遅いという問題点がある．このターンオーバー過程の遅さは鎖交換反応速度が遅いことに起因している．シャペロン高分子の添加でこのターンオーバーを促し、数十倍活性が向上した[9] （図４）．さらに，DNAzyme に核酸検出用のセンサーアームを有するように設計された (Multi-component nucleotide acid enzyme) MNAzyme の活性もシャペロン高分子によって大幅に上昇し，核酸検出感度を数百倍向上させることに成功した[10].

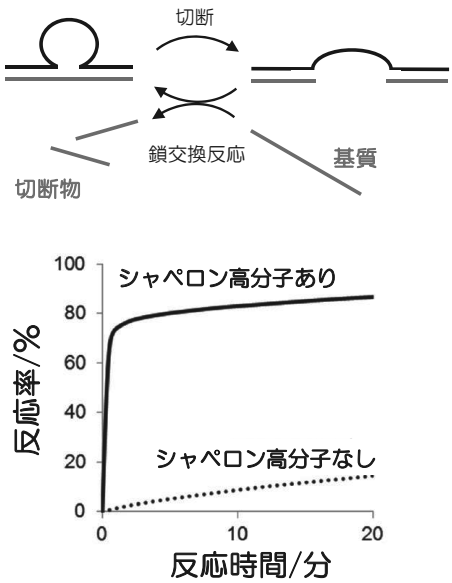


図４ シャペロン高分子による DNAzyme 反応の加速（Partially modified and reprinted from *Biomater. Sci.,* 2015 [9]）

シャペロン高分子で核酸構造と機能をスイッチング

シャペロン高分子は通常では取りにくい三次構造へ DNA を転移させることもできる．通常 DNA 二重鎖は右巻きの B 型構造を取ることが知られている．プリン-ピリミジンの繰り返し配列を有する DNA である poly(dG–

dC)・poly(dG–dC)もB型構造を形成しているが，正電荷を有するポリリシンを主鎖にもつシャペロン高分子である PLL-*g*-Dexを添加すると左巻きのZ型構造に転移した[11] （図5A）．これは，ポリリシンとDNAのリン酸基との静電的相互作用に加え側鎖のデキストランが与えるDNA周りのミクロ環境の変化がB型からZ型の構造転移を促したものと考えられる．

主鎖骨格がポリアリルアリルアミンである PAA-*g*-Dex を添加するとB型DNAはA型構造へ転移した[12] （図5B）．PLL-*g*-Dex の添加ではこの転移は観測されなかった．リシン骨格よりもより疎水性の高いアリルアミン骨格がDNA周りの脱水和を促した結果，A型を安定化したと推察される．正電荷を有するシャペロン高分子によって構造転移したこれらのDNAは，負電荷を有するアニオン性高分子の添加によりすみやかに元のB型構造に戻った．アニオン性高分子によりDNA/シャペロン高分子複合体が解離した結果である．つまり，シャペロン高分子の活性をオン−オフ制御することで，核酸の構造を可逆的に制御することが出来る．

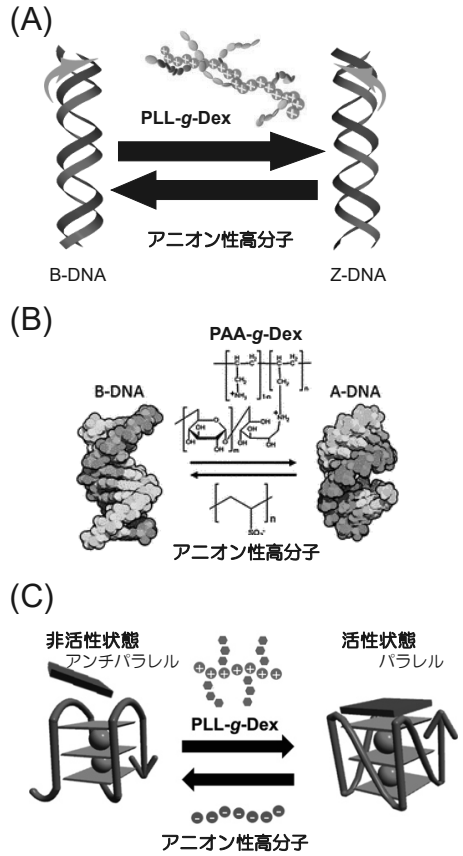


図5　シャペロン高分子によるDNAの二次構造制御（Partially modified and reprinted from *Chem.Commun.,* 2016 [12] and Biomacromolecules, 2018[13]）

いくつかの四重鎖 DNA は K^+イオン存在下において，鉄錯体のヘミンと結合し，ペルオキシダーゼ活性を発現することが知られている．ペルオキシダーゼ活性の発現には，四本のDNA鎖が平行に並んだパラレル構造を形成が必要

であるが，一般的な生理的条件である Na^+イオン存在下では，鎖が逆平行に並び活性がほとんど示されないことが課題であった．一方で，シャペロン高分子を添加すると活性が数十倍向上し，ほぼ K^+イオン存在下と同等な活性が得られた．[13] （図 5C）．これは，シャペロン高分子が非活性型のアンチパラレル構造から活性型のパラレル構造へと構造転移させたためであった．シャペロン高分子によって付与された高活性状態はアニオン性高分子の添加によって本来の低活性に戻すことができた．このように機能性核酸の活性はシャペロン高分子とアニオン性高分子を用いることで酵素活性を自在に制御できることがわかった．

シャペロン高分子の可能性

核酸シャペロン活性を発現するカチオン性くし型共重合体が，DNA コンピューターやナノマシンの機能向上に有効であることをいくつかの実例で紹介した．いずれも核酸の自己組織化を速度論的に促進する点が鍵である．これまで核酸の機能を高めるため，様々な修飾核酸や人工核酸が設計されてきたが，速度論的に自己組織化を促進するものはほとんど無い．さらに，シャペロン高分子の特筆すべき点は，少量添加するのみで，簡便に使用すること出来る点である．

一方で，シャペロン高分子の機能をオン・オフ制御することで，機能性核酸の新たな制御が可能になることも示された．そもそも生体内を考えれば，核酸の機能は核酸結合性のタンパク質により制御されている．核酸を利用したナノテクノロジーでも，生体内のタンパク質の役割を肩代わりする材料を利用することで，応用範囲を広げたり活性を高めたりすることが出来よう．

[1] R.A.Laskey, B. M. Honda, A.D. Mills, J. T. Finch, Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA. *Nature* **275**, 5679, pp. 416-420, 1978

[2] A. Rein et al., Nucleic-acid-chaperone activity of retroviral nucleocapsid proteins: significance for viral replication, *Trends Biochem. Sci.*, **23**, 8, pp. 297-301, 1998

[3] H. Asamuna et al., A polycation-chaperoned in-stem molecular beacon system, *Chem. Commun.*, **48**,12, pp. 1760–1762, 2012

[4] B. Yurke et al., A DNA-fuelled molecularmachine made of DNA, *Nature*, **406**, 10, pp. 605-608, 2000

[5] S.W. Choi et al., Cationic comb-type copolymers for boosting DNA-fueled nanomachines, *Nano Lett.*, **7**, 1, pp. 172-178, 2006
[6] N. Shimada et al., DNA computing boosted by a cationic copolymer, *Adv. Funct. Mater.*, **28**,17, pp. 1707406, 2018
[7] Y. Tian et al., A DNAzyme that walks processively and autonomously along a one-dimensional track, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **117**, 28 pp.4429-4432, 2005
[8] J. Elbaz et al., DNA computing circuits using libraries of DNAzyme subunits, *Nat. Nanotechnol.* **5,** 6, pp. 417–422, 2010
[9] J. Gao, N. Shimada, A. Maruyama, Enhancement of deoxyribozyme activity by cationic copolymers, *Biomater. Sci.*, **3**, 2, pp. 308-316, 2015
[10] J. Gao, N. Shimada, A. Maruyama, MNAzyme-catalysed nucleic acid detection enhanced by a cationic copolymer, *Biomater. Sci.*, **3**, 5, pp. 716-720, 2015
[11] N. Shimada, A. Kano, A. Maruyama, B-Z DNA transition triggered by a cationic comb-type copolymer. *Adv. Funct. Mater.*, **19**, 22, pp. 3590-3595, 2009
[12] N. Yamaguchi et al., A reversible B–A transition of DNA duplexes induced by synthetic cationic copolymers, *Chem. Commun.*, **52**, 47, pp. 7446-7449, 2016
[13] H. Sato, N. Shimada, T. Masuda, A. Maruyama, Allosteric control of peroxidase-,mimicking DNAzyme activity with cationic copolymers, *Biomacromolecules*, **19**, 6, pp. 2082–2088, 2018

（東京工業大学　嶋田直彦，丸山厚）

第6章
分子ロボットの医療応用

6．1　RNA/RNP による細胞運命の制御

はじめに

本節では，筆者らのグループの成果を中心に，人工的な RNA/RNP（RNA-タンパク質複合体）システムによる細胞の機能制御について紹介する．そこでは，3 章で述べた RNA ナノテクノロジーの分子構築技術や，モジュール工学的なシステム設計，細胞内在のタンパク質や RNA を入力とする論理回路など，ロボティクス的な考え方やアプローチが利用されている．

スイッチ mRNA による遺伝子発現制御

細胞は，遺伝子の発現―遺伝子にコードされたタンパク質の産生―を通してその機能や運命が制御されている．したがって，細胞を自在に制御するということは，遺伝子発現を自在に制御することであり，それはこれまで主に DNA から mRNA を発現する転写の段階を人為的に制御することで行われてきた．複雑な遺伝子発現パターンをプログラムした遺伝子回路なども，転写段階での制御を組み合わせたものが主体であった．しかし，天然の細胞内では，遺伝子発現は転写の段階だけではなく，翻訳の段階でも制御を受けている．そのような機構としては，特定の分子存在下で翻訳を促進する，あるいは阻害する mRNA 内のシス因子であるリボスイッチ[1]や，相補配列を持つ mRNA を分解，あるいは翻訳を抑制してタンパク質発現を負に調節するマイクロ RNA[2]などが知られている．このような翻訳段階での制御が，転写段階での制御と重層的に行われることで，より精密な遺伝子発現の制御が可能となっている．そこで，筆者らのグループは，細胞内に存在する標的分子に応じて，遺伝子発現を翻訳段階で制御できるツールの開発を行った．

最初に作製したのは，特定のタンパク質存在下でレポーター遺伝子の翻訳が抑制される，タンパク質応答性 OFF スイッチ mRNA である（図 1A）[3]．ヒトゲノムの解析からヒトには数万種類のタンパク質が存在すると推定される

が，その発現パターンは細胞の種類や細胞周期，環境からの刺激に応じてさまざまに異なる．したがって，特定の標的タンパク質の存在を検知して翻訳を制御できるシステムを作製できれば，細胞の状態に応じた翻訳制御が可能になる．そのために用いたのは，好熱性古細菌のリボソームタンパク質の一つである L7 タンパク質と，それが特異的に結合するキンクターンと呼ばれる RNA 構造モチーフである[4]．このキンクターンモチーフをレポーターmRNA の上流部に挿入した．L7 タンパク質が存在しない時には，通常通り mRNA は翻訳され，レポータータンパク質が発現される（ON 状態：図 1A 左）．一方，L7 タンパク質が存在する場合には，L7 タンパク質が mRNA 上のキンクターンモチーフに結合し，リボソームの機能を阻害することで翻訳がなされない（OFF 状態：図 1A 右）．この OFF スイッチ mRNA を実際にヒト培養細胞内で発現させたところ，L7 タンパク質の発現量に応じて，レポータータンパク質の発現量

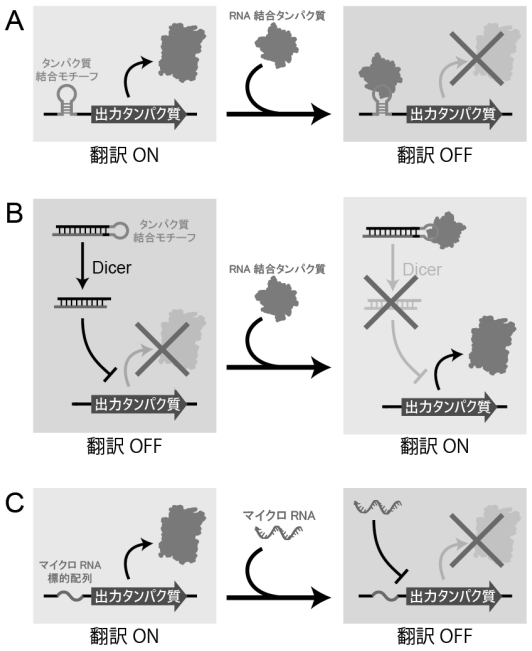


図 1　スイッチ mRNA による遺伝子発現制御の仕組み

(A) タンパク質応答性 OFF スイッチ．(B) タンパク質応答性 ON スイッチ．

(C) マイクロ RNA 応答性 OFF スイッチ．

を制御できることが確認できた．この OFF スイッチ mRNA のキンクターンモチーフ部分を任意のタンパク質に結合する RNA 配列に変更することで，任意のタンパク質に応答する OFF スイッチ mRNA を作製することができる．実際にその後，筆者らのグループでは，ヒト細胞で内在的に発現している複数のタンパク質に応答するスイッチの開発に成功している[5].

筆者らは，翻訳を ON にするシステムの開発も行った（図 1B）[6]．ここでは，特定のタンパク質が存在しない時に翻訳を OFF にするために，相補配列を持つ mRNA を分解する shRNA（short hairpin RNA）を利用した．shRNA は，細胞内に存在する RNA プロセシング酵素である Dicer による切断を受け，成熟 siRNA（small interference RNA）となったのち，相補配列を持つ mRNA を切断し分解する．この shRNA に，特定の標的タンパク質に結合する RNA 構造モチーフを挿入し，標的タンパク質と結合すると Dicer による shRNA のプロセシングを受けないようにした．この shRNA をヒト細胞に導入したところ，標的タンパク質が存在しない場合には，shRNA が機能してレポーター遺伝子の mRNA が分解され遺伝子発現が OFF になった（図 1B 左）．しかし，標的タンパク質を発現させると，shRNA のプロセシングが阻害され，レポータータンパク質の発現を ON にすることができた（図 1B 右）．レポータータンパク質として細胞死関連タンパク質を使用することで, 標的タンパク質の存在によって細胞死を引き起こす細胞運命制御システムを構築することができた[6]．このタンパク質応答 ON スイッチも，標的タンパク質に応じた結合 RNA 構造モチーフを shRNA に導入することで，様々なタンパク質に応答するシステムとすることができた[7].

筆者らはまた，マイクロ RNA に応答するスイッチ mRNA の作製も行った．マイクロ RNA は，約 20 ヌクレオチドの短い RNA であり，相補的な配列を持つ mRNA を分解することでその翻訳を抑制している．ヒトには 2,500 種類を超えるマイクロ RNA が存在すると推定されており，その発現パターンは細胞種や増殖・分化の過程によって異なっている[8]．そのため，マイクロ RNA も細胞種を識別するための分子として有用であると考えられる．遠藤らは，特定のマイクロ RNA による分解の標的となりうる相補配列を mRNA の非翻訳領域に挿入することで，マイクロ RNA 応答性 OFF スイッチ mRNA を作製した（図 1C）．また，マイクロ RNA 応答 OFF スイッチ mRNA の下流にタンパク質応答 OFF スイッチ mRNA を組み合わせることで，マイクロ RNA に応答する ON スイッチ mRNA も作製できた.

このように，細胞内のタンパク質やマイクロ RNA に応答して翻訳を制御できる各種スイッチを開発できたため，次にそれらのスイッチを組み合わせて，複雑な翻訳ベースの遺伝子回路の開発を試みた．その結果，標的細胞に特異的に発現しているマイクロ RNA を検出することで，がん細胞特異的に細胞死を誘導する遺伝子回路および，3 つのスイッチ mRNA を直列に並べた多段階接続回路，相互に抑制し合う 2 つのスイッチ mRNA からなる，2 種類のタンパク質の発現をスイッチする回路の作製に成功した[9].

人工分子足場による生体分子の局在制御

細胞はその機能を発現するために，転写や翻訳のみならず，翻訳後の段階での制御も行っている．その方法の一つに，タンパク質の細胞内局在の制御が挙げられる．細胞内分子の空間分布を制御することは，細胞内の特定の場所に集積させることで分子間相互作用を促進したり，細胞内に局在させることで非特異的な分子との相互作用を防ぎ，反応の特異性を高めることにつながる．このような目的のために，細胞はしばしば分子足場を利用している[10,11]．もしそのような分子足場を人工的に作製できれば，細胞内分子の局在や分子間相互作用を制御できることになり，転写や翻訳段階の制御と組み合わせて，より精密な細胞の機能制御が実現できるはずである．そのような考えに基づき，RNA や RNP を利用して人工分子足場を構築する試みが行われてきた．

RNA で作製した人工的なナノ構造体を分子足場として実際の生物に利用した最初の例は，Delebecque らによる大腸菌を用いた研究である[12]．彼らは，バクテリオファージ MS2 およびバクテリオファージ PP7 のコートタンパク質（MS2CP および PP7CP）とそれらが結合する RNA モチーフを利用し，これら 2 種類のタンパク質が結合する分子足場 RNA を作製した（図 2A）．この RNA は，1 分子のみで存在するもの（図 2A-i），一次元的に連結していくもの，および二次元的に連結するもの（図 2A-ii）が設計され，試験管内でそれぞれ設計通りの構造を形成することが確認された．次に，電子伝達系を通じて水素の産生を行うフェレドキシンとハイドロゲナーゼを，MS2CP または PP7CP と融合させて大腸菌内で発現させた．融合タンパク質のみを発現させた場合と比べて，1 分子のみで存在する分子足場 RNA を共発現させた場合には，水素産生量が 4 倍に増加した．さらに，一次元的に連結する足場 RNA を発現させた場合には 11 倍に，二次元的に連結する足場 RNA の場合には 48 倍にまで水素産生効率が増加した．このような分子足場は原核生物の様々な代謝系の制御に

応用できると期待され，同グループの Sachdeva らはその後，別の 2 種類の酵素を分子足場 RNA 上に集積させてペンタデカンを効率良く合成させたり，3 種あるいは 4 種の酵素を集積させてスクシニル酸の合成効率を高めるなどしている[13].

一方，藤田らは，真核生物において分子足場の利用を試みた（図 2B）[14]. 制御する対象は, 細胞膜上に存在する受容体タンパク質である. 細胞膜上には, 特定のリガンド分子との結合によって, 他受容体と複合体を形成して自己リン酸化のような反応を生じ，特定の細胞内シグナルを発生・伝達させる種々の受

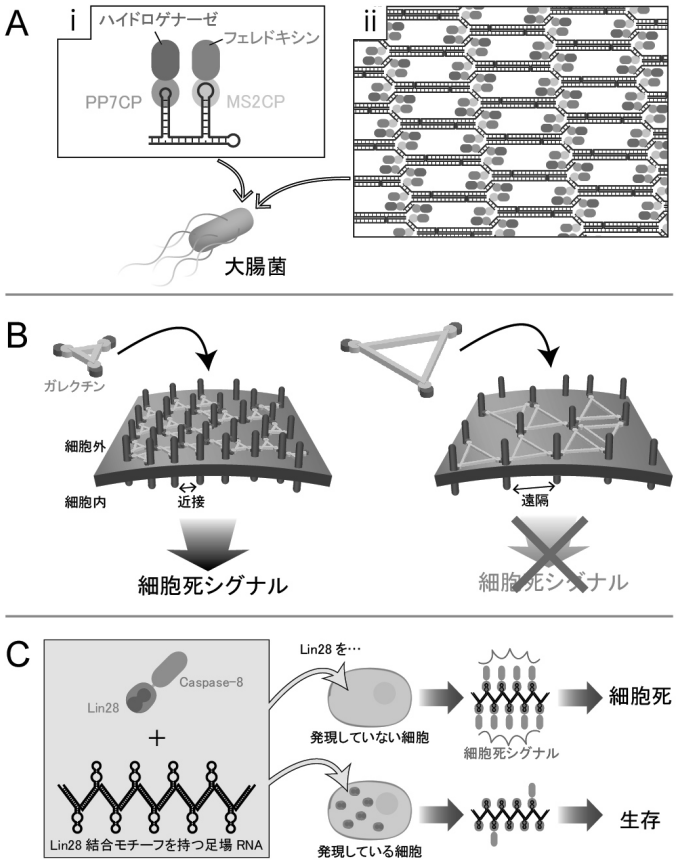


図 2　RNA を利用して作製された分子足場

(A) 酵素を RNA 上に(i)，または平面的に(ii)多数集積することで, 大腸菌における酵素反応効率の改善が実現できた. (B) 三角形状の RNA 構造体を利用した細胞膜上受容体間距離の制御. (C) 内在タンパク質を検知して細胞死シグナルの発生を制御する足場 RNA.

容体が存在している．藤田らは，リガンドであるガレクチンタンパク質の結合によって，細胞膜上で自己集合を起こし，細胞死シグナルを発生させる受容体に注目した[15]．ガレクチンタンパク質と L7 タンパク質を融合させ，それを BoxC/D モチーフを持つ三角形状 RNA に結合させることで，ガレクチンタンパク質を頂点部分に持つ RNP 構造体を作製した．三角形状 RNA として，一辺の長さが 10 nm ほどの小さなものを使用した場合，作製した RNP 構造体をヒト細胞に作用させると，細胞死が起こった（図 2B 左）．これは，ガレクチンに結合する細胞表面受容体を集合させて相互作用を促進し，細胞死シグナルが効率良く発生したからだと考えられる．使用する RNA のサイズを大きくしていくと，細胞死を起こす細胞の割合は減少し，一辺が 30 nm を超える大きな三角形 RNA を使用した場合には，細胞死が起こらず，さらにガレクチンタンパク質を加えても細胞死は起こらなかった（図 2B 右）．これは，RNP 構造体によって，ガレクチン受容体が近接できない距離に隔離されて受容体間の相互作用が阻害され，細胞死シグナルが生じなかったためと考えられる．このように，RNP 構造体を利用することで細胞表面に存在する受容体間の距離を制御し，それらの相互作用や生理的機能を制御することができた．

筆者らのグループは，真核生物の細胞内で機能する分子足場の構築にも成功している[16]．柴田らは，細胞死制御系のカスパーゼタンパク質の一つ，Caspase-8 の細胞内集積を制御する系を作製した．Caspase-8 は他の細胞死シグナル分子を介して，オリゴマーを形成して自己触媒的に活性化し，細胞死を引き起こす．柴田らは，この Caspase-8 を L7 タンパク質と融合させたタンパク質（L7-Casp8）をコードする mRNA を作製した．また，Box C/D-L7 モチーフを介してこの融合タンパク質を集積させるための，複数の Box C/D モチーフを持つジグザグ状の RNA 構造体を作製した．ヒト細胞に，L7-Casp8 融合タンパク質をコードした mRNA と RNA 構造体を導入し，細胞内で RNP 複合体を形成させたところ，RNA 構造体中に含まれる RNP モチーフの数に比例して細胞死を誘導する効果が見られた．次に，この RNP 分子足場系をもとに，内在のタンパク質に応答して細胞死の誘導を制御するシステムも作製した[16]．幹細胞で発現している RNA 結合タンパク質 Lin28[17,18]と Caspase-8 を融合させたタンパク質（Lin28-Casp8）をコードした mRNA を作製し，また，ジグザグ状 RNA 構造体には Box C/D モチーフの代わりに Lin28 結合モチーフを導入した（図 2C 左）．これらの RNA を，Lin28 を発現していない細胞に導入すると，Lin28 を介してジグザグ RNA 上に Caspase-8 が集積し，細胞死シグナルが生

じ，細胞死が引き起こされた（図 2C 右上）．一方，Lin28 を発現している細胞の場合には，内在性 Lin28 がジグザグ RNA 上に結合することで，Lin28-Casp8 融合タンパク質の RNA 上への集合が競合的に阻害され，細胞死は起こらなかった（図 2C 右下）．

このように，RNA や RNP を用いることで，細胞表面や細胞内の分子の局在・集合を制御できる人工的な分子足場を作製することが可能であり，それを通した細胞の機能や運命の制御が可能となる．

CRISPR/Cas システムによる細胞機能制御

近年，最も注目を集めている RNP システムが CRISPR/Cas システムである．一度感染した外来のウイルスやファージのゲノム配列の一部を記録しておき，その配列を持つ DNA が細胞に侵入した場合に切断する，細菌や古細菌が持つ獲得免疫系である．CRISPR/Cas システムは，DNA 切断活性を担う酵素である Cas タンパク質と，切断する標的配列を相補的に認識するガイド RNA からなっている（図 3A）．この CRISPR/Cas システムの DNA 切断活性が，哺乳類を含む幅広い生物種の細胞内においても働くことから，ゲノムの特定部位の切断による遺伝子の破壊や，DNA 切断後の相同組み換えによる任意の遺伝子の導入といった，ゲノム編集技術の新たな選択肢として利用されることとなった．特に，既存のタンパク質ベースの人工 DNA 切断酵素の場合には，切断したい標的 DNA 配列に合わせて，アミノ酸配列を変更したタンパク質を作製する必要があったのに対し，CRISPR/Cas システムでは，標的に合わせてガイド RNA の標的認識配列を変更するだけで良いため，手軽にゲノム編集が行えるようになり，その利用範囲は急速に広がっている [19,20].

また，Cas タンパク質の活性中心部位に変異を導入し，DNA 切断活性をなくした dead Cas（dCas）タンパク質を使うことで，任意の標的 DNA に結合させるツールとなりうる．これを利用して，ガイド RNA を介してあるいは dCas タンパク質に直接蛍光タンパク質を導入し，目的の配列領域を細胞内で可視化した例が報告されている（図 3B）[21,22]．同様に，dCas タンパク質やガイド RNA に転写因子を導入して標的配列近傍の遺伝子発現を増進させたり（図 3C）[23-25]，塩基やヒストンの修飾・脱修飾を行う酵素を融合させてエピゲノム制御を行ったり（図 3D）[26-30]，塩基修飾酵素を融合させて標的部位の塩基を別の塩基に置換するなど（図 3E）

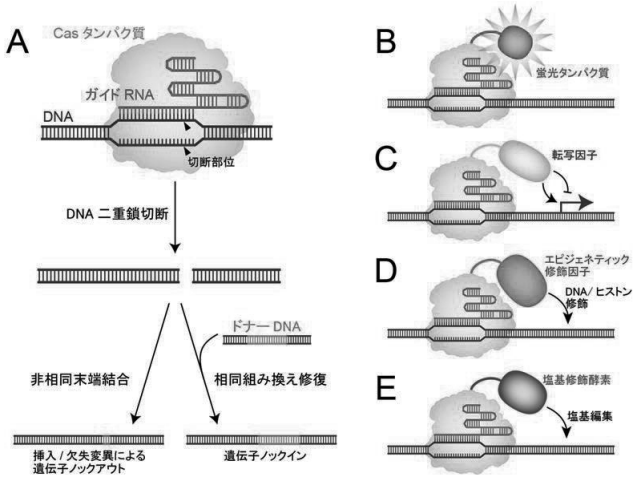


図 3 CRISPR/Cas システムの応用例

(A) DNA 切断活性を持つ Cas タンパク質と, 標的配列の認識を担うガイド RNA からなる CRISPR/Cas システムを利用することで, ゲノム上の任意の遺伝子をノックアウトさせたり遺伝子を導入することができる. また, DNA 切断活性を失わせた Cas タンパク質変異体に様々なタンパク質を融合させることで, (B) ゲノム上の任意の領域を標識したり, (C) 遺伝子発現の制御, (D) DNA やヒストンの修飾といったエピジェネティクス制御, (E) 塩基の書き換えなどにも利用できる.

[31-33], 様々な細胞の機能制御が行われている. Cas タンパク質には, DNA ではなく RNA を標的とするものも見つかっており[34], それを利用して, RNA に対しても塩基編集を行った報告がなされるなど[35], CRISPR/Cas システムは生命科学研究において様々な細胞の機能制御を可能にするツールとして利用されている[36].

とはいえ, CRISPR/Cas システムにもいくつかの解決すべき課題が存在する. その最たるものは, 標的特異性と切断効率の改善である. 上で述べたように, 標的 DNA の認識はガイド RNA による相補鎖形成に基づいて行われる. そのため, ガイド RNA と対象 DNA との間に数塩基のミスマッチが存在していても, その配列によっては切断してしまうことも多い. また, DNA 切断活性が標的遺伝子の配列や細胞種, 生物種によって大きく低下することも知られている. 特異性に関しては, Cas タンパク質をタンパク質工学的に改変することで, 標的特異性を高める試みがなされている[37-39]. また, 活性の向上に関しては, Cas タンパク質とガイド RNA をコードした DNA を

導入するのではなく，試験管内で Cas タンパク質とガイド RNA の複合体を形成させてからそれを直接導入したり[40,41]，導入するガイド RNA の末端を化学修飾することで分解酵素に対する抵抗性を高めるといった方法[42]が開発されている．筆者らのグループは，CRISPR システムの正確性を向上させるために，細胞種特異的に発現しているマイクロ RNA に応答して Cas タンパク質の発現を制御するスイッチ mRNA を開発した[43]．これを使えば，目的細胞のみでゲノム編集を起こすことができ，標的外細胞における非特異的な DNA 切断を抑制することができる．

iPS 細胞研究における RNA/RNP の利用

人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell）とは，特定の役割を持つ体細胞へと分化してしまった細胞に，山中因子と呼ばれる四種類の遺伝子を発現させることで，様々な細胞に分化する能力を持った未分化の状態へとリプログラミングさせた，人工的に作製された幹細胞の一種であり，略して iPS 細胞と呼ばれる．受精卵から得られる胚性幹細胞と異なり，倫理的な問題を有しないため，細胞や臓器の移植といった再生医療分野や，病態モデル細胞の作製による創薬研究など，幅広い応用が期待されている[44,45]．
そのような iPS 細胞研究における，最も大きな問題の一つは，細胞種の正確な識別である．iPS 細胞を目的の細胞へと分化させる際に，その効率を 100% にすることは難しく，どうしても目的と異なる細胞や未分化の iPS 細胞が残存してしまう．混入した iPS 細胞は腫瘍化してしまう恐れがあるため，臓器や細胞移植に使う場合には深刻な問題となる．また，病態モデル細胞を使用した創薬研究においても，標的外細胞が混入していると，薬剤の効果を正確に評価することができなくなる．

現在，細胞種の識別は主に，細胞表面に発現している抗原の違いを，抗体を用いて検出することで行われている．しかし，抗体や，抗体の結合を検出し細胞を選別する装置（セルソーター）のような高価なシステムが必要であり，細胞種によっては特異的な細胞表面抗体が知られていないなど，万能な方法とはなりえていない．そのため，既存法よりも，安価で簡便，確実な細胞の識別・選別法の開発が望まれている．

筆者らのグループは，前述のマイクロ RNA 応答スイッチ mRNA を利用して，iPS 細胞から分化させた細胞の識別・選別を行うことを考えた（図 4）[46]．心臓疾患は世界的にも最も多い死因の一つであり，iPS 細胞を利用し

た治療法の開発が期待されている．しかし，心筋細胞を見分けるための特異的な抗体は知られておらず，iPS 細胞から分化誘導して作製した心筋細胞のみを高純度に選別することは困難だった．そこで，三木および遠藤らは，心筋細胞とその他の細胞のマイクロ RNA 発現プロファイルを調べ，心筋細胞特異的に発現しているマイクロ RNA を 3 種類同定した．それらのマイクロ RNA に応答するスイッチ mRNA を作製し，レポーターとなる蛍光タンパク質が発現していない細胞を選別したところ，95%を超える高い効率で心筋細胞を選別することができた（図 4A 右上）．さらに，レポータータンパク質を細胞死誘導タンパク質 Bim に変更することによって，標的マイクロ RNA を発現していない細胞では細胞死が引き起こされて除去され，心筋細胞のみが残るという，自動的な細胞純化システムをも構築できた（図 4A 右下）．

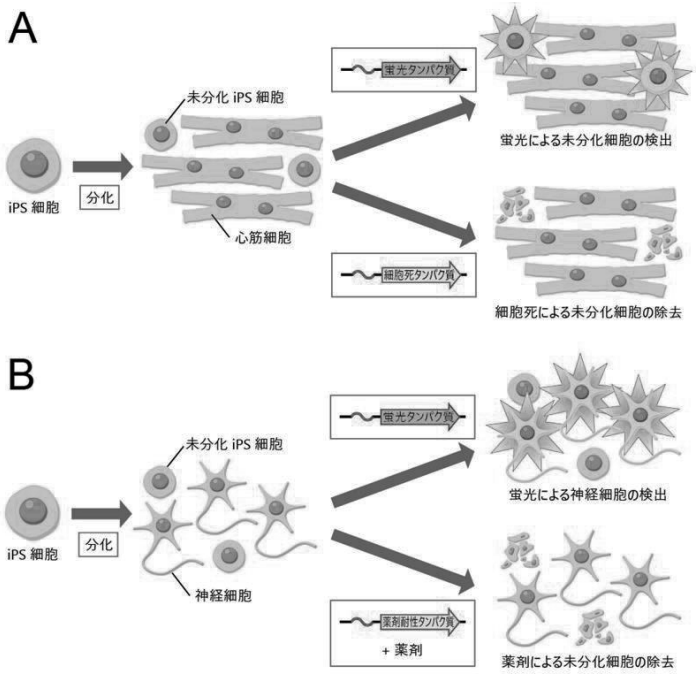


図 4　スイッチ mRNA を利用した細胞種選別

(A) 心筋細胞で特異的に発現しているマイクロ RNA に応答するスイッチ mRNA を利用することで，心筋細胞を特異的に選別したり，未分化細胞のみを特異的に除去することができた．また，(B) 未分化 iPS 細胞で特異的に発現しているマイクロ RNA に応答するスイッチ mRNA を利用することで，分化した神経細胞を検出したり，薬剤と組み合わせて未分化細胞のみを特異的に除去することができた．

このシステムを使えば，従来の方法のようにセルソーターのような高価な機器も必要とせず，細胞内状態に基づく高い精度での細胞の識別が可能になる．同様に，細胞種特異的なマイクロ RNA 応答性スイッチ mRNA を用いて，内皮細胞や肝細胞，インスリン産生細胞といった他の種類の細胞の選別も試みた結果，いずれの場合も高い精度で目的細胞を選別することができた．このように，マイクロ RNA 応答性スイッチ mRNA は容易に他の細胞種にも適用できる，高い汎用性を持っている．

Parr らは，miRNA 応答スイッチ mRNA を使って，iPS 細胞の検出とドーパミン産生神経細胞の選別を行った（図 4B）[47]．iPS 細胞では発現しているが，ドーパミン産生神経細胞では発現していないマイクロ RNA として，miR-302 がある．そこで，miR-302 と相補的な配列を持つスイッチ mRNA を作製した．まずは，レポーター遺伝子として蛍光タンパク質を使用し，iPS 細胞からドーパミン産生神経細胞に分化すると，蛍光が検出できるようにした（図 4B 右上）．このスイッチ mRNA を使用すると，抗体によって細胞種を識別する従来法よりも感度よく細胞を識別することができた．次に，レポーター遺伝子として薬剤耐性遺伝子を持つスイッチ mRNA を作製した．神経細胞では薬剤耐性遺伝子が発現するが，iPS 細胞では miRNA-302 により薬剤耐性遺伝子の発現が抑えられる．そのため，分化後の細胞集団を薬剤処理すると，分化できなかった iPS 細胞は死滅し，神経細胞のみを自動的に選別することができた（図 4B 右下）．

中西らは，このようなマイクロ RNA 応答スイッチ mRNA をコードした遺伝子を作製して，ゲノムに組み込むあるいは細胞内で自律的に増幅されるプラスミドベクターに挿入して，iPS 細胞に導入した[48]．それによって，細胞の増殖・分化の過程を通して継続的に，マイクロ RNA 応答スイッチ mRNA を細胞内で発現させることができるようになった．実際にこの仕組みを使って，心筋細胞特異的に発現しているマイクロ RNA の細胞内状態を可視化し，iPS 細胞から心筋細胞への分化の過程を観察することができた．

タンパク質応答スイッチ mRNA や RNP 分子足場においても，幹細胞マーカーとして知られるタンパク質 Lin28[17,18]とそれに結合する RNA からなる RNP モチーフを使用することで，Lin28 の発現を検出したり，Lin28 を発現していない細胞に対して選択的に細胞死を誘導することに成功している[5,16]．このように，様々な RNA/RNP システムを使うことで，マイクロ RNA やタンパク質の発現量をもとに細胞の種類や状態を識別し，それに応じて自

動的に細胞機能や運命を制御することが可能となる．これらの技術は，再生医療において重要な細胞種の識別・選別のみならず，自律的な細胞分化の制御といったより高度な課題の解決にもつながると期待される．

今後の課題と展望

上で見てきたように，RNA や RNP からなる人工的なシステムを利用して，様々な細胞の制御が行われてきた．しかし，今後より精密かつ多様な細胞の制御を実現するためには，解決しなければならない課題も多い．

タンパク質応答スイッチ mRNA は，現在効果的に検出できる標的タンパク質の種類が限られている．より広い応用のためには，細胞種や細胞状態のマーカーとなりうるタンパク質を同定するとともに，それら内在性の標的タンパク質を高い感度と特異性で検出できるスイッチを開発する必要がある．また，6.1.1 で紹介したような，複雑な遺伝子回路を構築する際には，その情報処理過程において細胞に内在するシステムに影響を与えない，直交性の（オルソゴナルな）RNP システムを使用することがふさわしい．このように，各種タンパク質に応じたスイッチ mRNA の開発が望まれる．しかしながら，RNA とタンパク質の相互作用様式は RNP モチーフごとに大きく異なっているため，スイッチ mRNA の設計は一様には行えず，これまでは RNP モチーフごとに個別に最適化がなされてきた．各種のスイッチ mRNA を効率的に拡充させるためにも，新たな設計手法・方法論を開発・確立する必要がある．

マイクロ RNA 応答スイッチ mRNA においては，その応用範囲を広げるためには，生物種や細胞種，発生段階や細胞イベントごとの，マイクロ RNA 発現プロファイルの解明・データベース化が必要である．また，多様な細胞の種類を正確に識別するには，1 種類のマイクロ RNA のみではなく，多種類のマイクロ RNA の発現量から総合的に判断する方がより好ましい．そこで，現在筆者らの研究室では，2 種類のマイクロ RNA の発現量を入力情報としてさまざまな種類の論理計算を行い，プログラムされた出力をレポータータンパク質として発現する二入力マイクロ RNA 応答性遺伝子回路の構築を進めている．今後，より多種類のマイクロ RNA の発現情報をもとに，より複雑な計算処理を行う遺伝子回路の開発を行い，細胞内状態の差異を精度良く検出できるシステムの確立を目指す．

標的分子を局在化または集積させ，それら分子間の相互作用を制御するこ

とは，細胞内において分子足場としてはたらく RNA やタンパク質の例に見られるように[49,50]，細胞の機能を制御する重要な方法の一つである．しかしながら，人工的な分子足場を実際に細胞で使用した研究例はまだ少なく，その原因の一つとして，分子間の距離や配向を精密に制御できる人工的な分子足場を細胞内で構築することの困難さが考えられる．RNA をベースとした構造体は，タンパク質からなる構造体よりも容易に設計できるうえ，形状を維持させたままサイズを変えることも容易に行える[14]．また，DNA からなる構造体と異なり，細胞内で転写により作製させることもできる．今後，このような RNA 構造体の特性を活かした効果的な分子足場を開発するには，使用可能な RNP モチーフの拡張による標的分子の多様化や，構造体の大型化や複雑化による標的分子の配置の多様化が必要である．

これまで，細胞の制御は主に，転写段階での制御を通したタンパク質の発現制御によって行われてきた．しかし我々は，ここで紹介してきたように，翻訳段階を制御する技術や，翻訳後の段階であるタンパク質の細胞内空間分布を制御する技術の開発に成功している．また，mRNA のスプライシングパターンを制御できる RNA デバイスなど[51]，他の遺伝子発現段階を制御するツールの開発も行われている．これらの技術・ツールを利用することで，今後，ゲノムの編集から転写，転写後 RNA のプロセシングや修飾，翻訳，タンパク質の翻訳後修飾や細胞内局在，他分子との相互作用の制御といった，あらゆる段階・階層での遺伝子発現制御が可能になると期待される．そのような多層的な制御は，精密な細胞機能・運命の制御を可能とし，再生医療や創薬分野から基礎的な生命科学分野まで，幅広い研究分野において有用な技術を提供すると考える．

また，始めに述べたように，本節で紹介した RNA/RNP システムには，工学的・ロボティクス的な概念が多分に含まれており，分子ロボティクス研究の進展は，細胞の機能制御技術の発展のために不可欠である．同時に，RNA/RNP システムは生体分子を用いた分子ロボット（特にタンパク質の生産を伴うシステム）を構築する上で，その機能を制御する多様なモジュール・デバイスにもなりうると期待している．

[1]　Mandal M, Breaker RR, Gene regulation by riboswitches, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 6, pp. 451-463, 2004.

[2]　Ameres SL, Zamore PD, Diversifying microRNA sequence and function, *Nat*

Rev Mol Cell Biol, 14, 8, pp. 475-488, 2013.

[3] Saito H, et al., Synthetic translational regulation by an L7Ae-kink-turn RNP switch, *Nat Chem Biol*, 6, 1, pp. 71-78, 2010.

[4] Huang L, Lilley DM, The kink-turn in the structural biology of RNA, *Q Rev Biophys*, 51, 2018

[5] Kawasaki S, et al., Synthetic mRNA devices that detect endogenous proteins and distinguish mammalian cells, *Nucleic Acids Res*, 45, 12, e117, 2017.

[6] Saito H, et al., Synthetic human cell fate regulation by protein-driven RNA switches, *Nat commun*, 2, 160, 2011.

[7] Kashida S, Inoue T, Saito H, Three-dimensionally designed protein-responsive RNA devices for cell signaling regulation, *Nucleic Acids Res*, 40, 18, pp. 9369-9378, 2012.

[8] Shenoy A, Blelloch RH, Regulation of microRNA function in somatic stem cell proliferation and differentiation, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15, 9, pp. 565-576, 2014.

[9] Wroblewska L, et al., Mammalian synthetic circuits with RNA binding proteins for RNA-only delivery, *Nat Biotechnol*, 33, 8, pp. 839-841, 2015.

[10] Good MC, Zalatan JG, Lim WA, Scaffold proteins: Hubs for controlling the flow of cellular information, *Science*, 332, 6030, pp. 680-686, 2011.

[11] Chen R, et al., Biomolecular scaffolds for enhanced signaling and catalytic efficiency, *Curr Opin Biotechnol*, 28, pp. 59-68, 2014.

[12] Delebecque CJ, et al., Organization of intracellular reactions with rationally designed RNA assemblies, *Science*, 333, 6041, pp. 470-474, 2011.

[13] Sachdeva G, et al., In vivo co-localization of enzymes on RNA scaffolds increases metabolic production in a geometrically dependent manner, *Nucleic Acids Res*, 42, 14, pp. 9493-9503, 2014.

[14] Fujita Y, et al., Cell-surface receptor control that depends on the size of a synthetic equilateral-triangular RNA-protein complex, *Sci Rep*, 4, 6422, 2014.

[15] Hsu DK, Yang RY, Liu FT: Galectins in apoptosis. *Methods Enzymol*, 417, pp. 256-273, 2006.

[16] Shibata T, et al., Protein-driven RNA nanostructured devices that function in vitro and control mammalian cell fate. *Nat Commun*, 8, 1, 540, 2017.

[17] Shyh-Chang N, Daley GQ, LIN28: Primal regulator of growth and metabolism in stem cells, *Cell Stem Cell*, 12, 4, pp. 395-406, 2013.

[18] Carmel-Gross I, et al., Lin28: A stem cell factor with a key role in pediatric tumor formation, *Stem Cells Dev*, 25, 5, pp. 367-377, 2016.

[19] Sander JD, Joung JK: CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol*, 32, 4, pp. 347-355, 2014.

[20] Barrangou R, Doudna JA: Applications of CRISPR technologies in research and beyond. *Nat Biotechnol*, 34, 9, pp. 933-941, 2016.

[21] Chen B, et al., Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system, *Cell*, 155, 7, pp. 1479-1491, 2013.

[22] Ma H, et al., Multiplexed labeling of genomic loci with dCas9 and engineered sgRNAs using CRISPRainbow, *Nat Biotechnol*, 34, 5, pp. 528-530, 2016.

[23] Mali P, et al., Cas9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering, *Nat Biotechnol*, 31, 9, pp. 833-838, 2013.

[24] Zalatan JG, et al., Engineering complex synthetic transcriptional programs with CRISPR RNA scaffolds, *Cell*, 160, 1-2, 339-350, 2015.

[25] Konermann S, et al., Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex, *Nature*, 517, 7536, pp. 583-588, 2015.

[26] Hilton IB, et al., Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers, *Nat Biotechnol*, 33, 5, pp. 510-517, 2015.

[27] Amabile A, et al., Inheritable silencing of endogenous genes by hit-and-run targeted epigenetic editing, *Cell*, 167, 1, pp. 219-232, 2016.

[28] Liu XS, et al., Editing DNA methylation in the mammalian genome, *Cell*, 167, 1, pp. 233-247, 2016.

[29] Morita S, et al., Targeted DNA demethylation in vivo using dCas9-peptide repeat and scFv-TET1 catalytic domain fusions, *Nat Biotechnol*, 34, 10, pp. 1060-1065, 2016.

[30] Kwon DY, et al., Locus-specific histone deacetylation using a synthetic CRISPR-Cas9-based HDAC. *Nat Commun*, 8, 15315, 2017.

[31] Komor AC, et al., Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage, *Nature*, 533, 7603, pp. 420-424, 2016.

[32] Nishida K, et al., Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems, *Science*, 353, 6305, 2016.

[33] Gaudelli NM, et al., Programmable base editing of A*T to G*C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 551, 7681, pp. 464-471, 2017.

[34] Abudayyeh OO, et al., RNA targeting with CRISPR-Cas13. *Nature*, 550, 7675, pp. 280-284, 2017.

[35] Cox DBT, et al., RNA editing with CRISPR-Cas13, *Science*, 358, 6366, pp. 1019-1027, 2017.

[36] Adli M, The CRISPR tool kit for genome editing and beyond, *Nat Commun*, 9, 1, 1911, 2018.

[37] Slaymaker IM, et al., Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity, *Science*, 351, 6268, pp. 84-88, 2016.

[38] Kleinstiver BP, et al., High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects, *Nature*, 529, 7587, pp. 490-495, 2016.

[39] Chen JS, et al., Enhanced proofreading governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy, *Nature*, 550, 7676, pp. 407-410, 2017.

[40] Kim S, et al., Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins, *Genome Res*, 24, 6, pp. 1012-1019, 2014.

[41] Liang X, et al., Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection, *J Biotechnol*, 208, pp. 44-53, 2015.

[42] Hendel A, et al., Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells. *Nat Biotechnol*, 33, 9, pp. 985-989, 2015.

[43] Hirosawa M, et al., Cell-type-specific genome editing with a microRNA-responsive CRISPR-Cas9 switch. *Nucleic Acids Res*, 45, 13, e118, 2017.

[44] Cherry AB, Daley GQ, Reprogrammed cells for disease modeling and regenerative medicine, *Annu Rev Med*, 64, pp. 277-290, 2013.

[45] Inoue H, et al., iPS cells: A game changer for future medicine. *EMBO J*, 33, 5, pp. 409-417, 2014.

[46] Miki K, et al., Efficient detection and purification of cell populations using synthetic microRNA switches, *Cell Stem Cell*, 16, 6, pp. 699-711, 2015.

[47] Parr CJ, et al., MicroRNA-302 switch to identify and eliminate undifferentiated human pluripotent stem cells. *Sci Rep*, 6, 32532, 2016.

[48] Nakanishi H, et al., Monitoring and visualizing microRNA dynamics during live cell differentiation using microRNA-responsive non-viral reporter vectors.

Biomaterials, 128, pp. 121-135, 2017.
[49]　Zappulla DC, Cech TR, Yeast telomerase RNA: A flexible scaffold for protein subunits, *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 27, pp. 10024-10029, 2004.
[50]　Malleshaiah MK, et al., The scaffold protein Ste5 directly controls a switch-like mating decision in yeast, *Nature*, 465, 7294, pp. 101-105, 2010.
[51]　Vogel M, et al., A small, portable RNA device for the control of exon skipping in mammalian cells, *Nucleic Acids Res*, 46, 8, :e48, 2018.

（京都大学　大野博久，齊藤博英）

6．2　ミセル・ベシクル・ヒドロゲルを基盤とする医療分子ロボット

はじめに

医療ロボットと呼ばれる新しい医療技術の進展が近年著しい. 医療ロボットとは, 医師の治療行為を支援する装置であり, 中でも手術支援ロボット da Vinci は，低侵襲手術である内視鏡下手術において，患者体内でサブミリメートルの精度で可動制御されたロボットアームにより精細な臨床手術を可能とする装置として世界で普及し始めている[1]．さらに，微細加工技術の発展から，生体内ではたらく微小な医療ロボットの開発も現実になってきた[2]．しかし，これらは長期使用の際，メンテナンスや動力源確保が問題となり，短期使用であっても生体から取り出す施術が必要となることが課題となっている．

これに対し，プログラム化された施術をロボットではなく，遺伝子レベルで制御された微生物や生物（その一部）で行うという研究が合成生物学の新潮流として注目されるようになり，ベンチャー企業等も含め活気を帯びている[3]．体内に導入された遺伝子改変微生物は，その機能と滞留性を失えば（免疫系からの防御機構を失えば）体外に排出されると期待されている．しかし，遺伝子操作で獲得された機能が患者体内でどのような反応を引き起こすか, 安定に機能が持続するか等，未知な部分は数多く残されている．

そこで，生体内での自律的・能動的な機能発現と，時期がきたら機能を失い生体外へ排出が可能となる性質を併せ持ち, 患者に影響を及ぼしにくい素性のわかった有機分子・高分子のみでつくられた医療用バイオマテリアル―ここでは「医療分子ロボット」と呼ぶ―が今後，第３の医療技術として重要性を増すだろう. 医療用バイオマテリアルの開発当初は, 人工血管や人工関節において，

生体に影響を及ぼしにくい（相互作用しにくい）性質をもった材料が工業材料から転用され，ポリエチレンオキシド（PEO），ポリビニルアルコール（PVA），シリコーンゴム，テフロンなどが利用されてきた．近年では，治療効果の増大を目指して，むしろ生体に対して積極的に相互作用する機能性有機分子・高分子が続々と生み出されている[4]．本節では，それら分子が組み合わさった医療分子ロボットのうち，臨床試験が行われ始めている研究例や，生体に適用された画期的な先端研究例を紹介する．

「魔法の弾丸」型の医療分子ロボット

「魔法の弾丸」とは，人体には無害だが，微生物には有効な化学薬品（いわゆる抗生物質）を称するために，ドイツの Ehrlich が 1900 年代に使用した言葉である．現在では，標的指向型医薬やプロドラッグなども含まれるこの概念は，いまや抗生物質に限らず，抗がん剤や分子標的薬にまで及んでいる．近年，薬剤を内包したカプセルをキャリア（運搬体）とし，さらにサイズをナノメートル領域まで小さくして脈管系に導入し，ターゲットの領域で薬剤放出させる最新医療が活況となっており，薬物送達システム（ドラッグデリバリーシステム；DDS）と呼ばれる．DDS のキャリアは，薬剤を内包したまま能動的もしくは受動的なモビリティーをもち，周囲環境をセンシングして，内包する薬剤を放出することが求められる．すなわち，モビリティーの精緻な機序，選択性の高いセンシング機構，放出タイミングと放出量の厳密な制御機構が，副作用を抑制して効果的な治療に結びつけるための最重要課題となる．広く研究されている DDS のキャリアの一つに，高分子を利用したキャリアがある．高分子を利用した DDS の設計思想は，Ringsdorf による先駆的な概念提唱に端を発してい

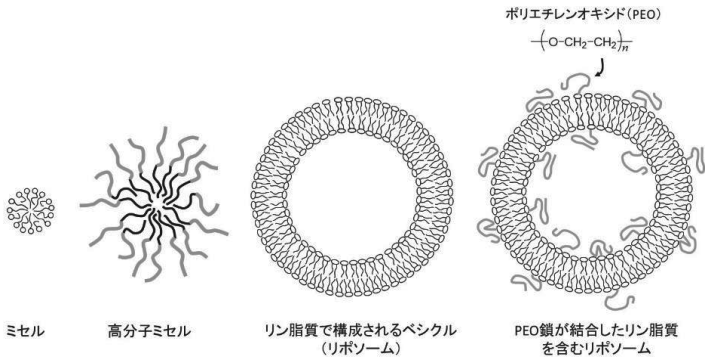


図 1　ミセルやベシクルの模式図（断面を表す）

る[5]．この分野では現在，世界的にも Kataoka らの研究グループが，高分子で形成されるミセル（図 1）を基盤にして DDS キャリア開発を先導している[6]．この高分子ミセルは，脈管系に導入されて体内を循環している間に，ターゲット細胞に取り込まれることによる環境変化を入力，薬物放出を出力とする体内循環型の医療分子ロボットといえる．

例えば，Kataoka らは，白金抗がん剤を内包した高分子ミセルを用いてターゲット腫瘍の増大を効果的に抑制できることを報告した[7,8]．白金抗がん剤（シスプラチンや(1,2-diaminocyclohexane) platinum(II)など）のようにヘテロ原子と原理上 2 箇所以上で配位結合可能な金属錯体は，カルボキシ側鎖をもつ高分子をミセルコアで架橋できる（図 2）．架橋によってミセルの安定性を高める一方，エンドサイトーシスで細胞内に取り込まれると，その小胞体内で高濃度に存在する化物イオンとの配位子交換反応を経て白金抗がん剤がミセルから放出される．また，放出に伴ってミセルコアが解架橋されるため，ミセルを構成する高分子がミセルから遊離しやすくなり，さらに放出が促進される．すなわち，このシステムは有機金属錯体と分子集合体の応答を高度に融合させた薬物放出機構といえる．ナノキャリア社のパイプラインとして開発が進められ，特にシスプラチン内包型ミセル型医療分子ロボットは Phase III まで進んでいるため実用化目前となっている[9]．

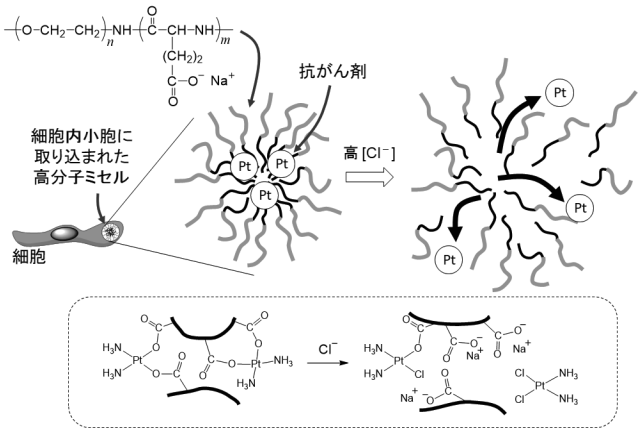


図 2 細胞内で抗がん剤を放出するミセル型医療分子ロボット[7]

リン脂質で構成される袋状二分子膜（ベシクル）であるリポソームをキャリア基盤とする DDS は，抗真菌薬を内包した AmBisome®や抗がん剤を内包し

た DOXIL®などがすでに臨床で用いられている[10]．リポソームは，コアが疎水的であるミセルと異なり，内部に水相をもち，水溶性の薬剤を内包可能である（図 1）．AmBisome®や DOXIL®は，表面に PEO 鎖を担持しており，患者の体内に導入された後に腫瘍の特定の幅や隙間をもつ脈管系に受動的に捕捉され，リポソーム膜分子の解離や分解によって薬剤放出する．

最近，このような従来のリポソーム型 DDS とは全く異なる，入れ子型リポソームを用いた糖尿病治療の医療分子ロボットに関する研究が発表された（図 3）[11]．まず，酸性条件下で解離・構造変化する二本鎖 DNA を結合部位として PEO 鎖（親水性部位）とコレステロール（疎水性部位）とが結合した両親媒性分子と，アルキル化膜融合ペプチドとが配合されたリポソーム（Inner リポソーム，粒子径数百 nm）を作製し，インスリンを内包させておく．pH が低下すると，二本鎖 DNA がほどけて一本鎖 DNA がそれぞれ 2 次構造をつくることで，この Inner リポソームの表面から PEO 鎖が遊離し，表面上に膜融合ペプチドがあらわになる．次に，この Inner リポソームをグルコースオキシダーゼ及びカタラーゼとともに巨大リポソーム（Outer リポソーム，粒子径数μm）に包む．この Outer リポソームの膜には，アルキル化膜融合ペプチド，グルコース輸送タンパク質，および，グラミシジン A というペプチドからなるイオンチャネルが組み込まれている．周囲のグルコース濃度が上昇すると，グルコース輸送タンパク質を介して Outer リポソーム内部にグルコースが取り込まれ，グルコースオキシダーゼの酵素反応によって内水相の pH が低下する．これにより，インスリン内包 Inner リポソーム表面上であらわになった膜融合ペプチドを介して膜融合が起こり，その結果，Inner リポソームに内包されていたインスリンが Outer リポソームから放出される．低下した pH は，グラミシジン A を介して水素イオンが Outer リポソーム外に排出されることで，元の値に戻る．この入れ子型巨大リポソームの分散液を，ヒドロゲル支持体とともに I 型糖尿病モデルマウスに打ち込むと，マウスの血糖値は正常値に繰り返し戻ることを研究グループは明らかにした．多成分でありながら協調的に機能する極めて精巧な本医療分子ロボットは，血糖値の上昇に伴いインスリンを血中に放出する膵臓の β 細胞を模倣したものと言え，世界中から注目を集めている．

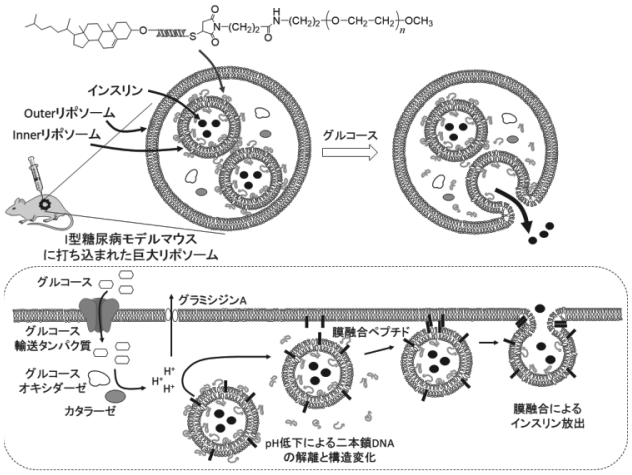


図 3　β 細胞を模倣したインスリン放出医療分子ロボット[11]

局所滞留型のヒドロゲル医療分子ロボット

上記の巨大リポソームは, 粒径が数十〜数百ナノメートルのリポソームとは異なり，生体組織に導入するとその場で滞留しやすい[12]ことから，血液中の物質に応答し体内全体に薬物を放出する局所滞留型医療分子ロボットに適用可能である. 血糖値上昇に応答してインスリンを放出する医療分子ロボットは, それ自体がターゲット組織へのモビリティーを必要としないため, 皮下や体内の適切な位置に埋め込むセンチメートルスケールのヒドロゲルを用いた開発も盛んである[13]．例えば，Matsumoto らは，PEO で表面修飾した孔あきカテーテルの内部に，3-フルオロフェニルボロン酸を側鎖末端にもち，インスリンを含浸で取り込ませた高分子ヒドロゲルを導入した（図 4）[14]．カテーテルの孔を通じて血中のグルコースがゲル内部に浸透すると, ヒドロゲルを構成する高分子の側鎖の 3-フルオロフェニルボロン酸部位がグルコースとエステル結合を形成し，中性から負電荷をもつ．その結果，ヒドロゲルが一層水和し，高分子ネットワークがほどけることでインスリンが拡散によりカテーテル孔から放出される仕組み[15]である．血中のグルコース濃度が低下すると，エステルが加水分解する方向に平衡が移動して，負電荷を失った元の状態に戻り，脱水が進行して再度ゲルネットワークが密になることで, インスリンの拡散が抑制される．このカテーテルを糖尿病モデルマウスに導入すると，血糖値が低下することが示された．

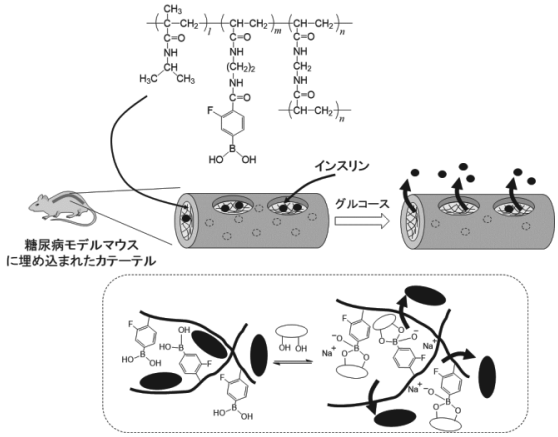


図 4 カテーテルとヒドロゲルによるインスリン放出医療分子ロボット[14]

がんの治療において腫瘍位置が特定できている場合には, 外科手術により取り除き，さらに再発を防ぐため抗がん剤をその周囲に注入することがあるが, 薬剤が即座に拡散してしまって治療効果が薄れると同時に, 周囲の正常組織への副作用もあらわれるという問題がある．この場合も，ヒドロゲルによる医療分子ロボットは有効である．2018 年，Gu の研究グループはヒドロゲル型の抗がん治療薬放出医療分子ロボット（図 5）を報告した[16]．彼らは活性酸素種 (Reactive oxygen species；ROS)に応答して溶解する高分子ヒドロゲルに低分子の抗がん剤と免疫チェックポイント阻害抗体を搭載し, 多段階でがんの治療効果を狙った．代表的な ROS である過酸化水素によって切断反応が進むフェニルボロン酸からなる架橋分子と PVA から合成した高分子ヒドロゲルは，腫瘍で発生した ROS の酸化によって網目構造が疎になり内包していた治療薬を徐放できる．実際に，抗がん剤と免疫チェックポイント阻害抗体を含ませたこのヒドロゲルを，担癌マウスの腫瘍周囲でその場(*in situ*)合成したところ，腫瘍で発生した ROS によってゲルから放出された抗がん剤が癌細胞に直接作用するのみならず，その抗がん剤の作用で免疫原性が上昇したがん細胞を，遅れて放出される抗体による腫瘍免疫活性化によって攻撃できることが明らかにされた．これにより，腫瘍周囲の副作用を抑えながら腫瘍への化学療法と免疫療法を適切なタイミングで作動できる可能性があり, 術後のがんの再発や転移を抑制できる可能性を示した．

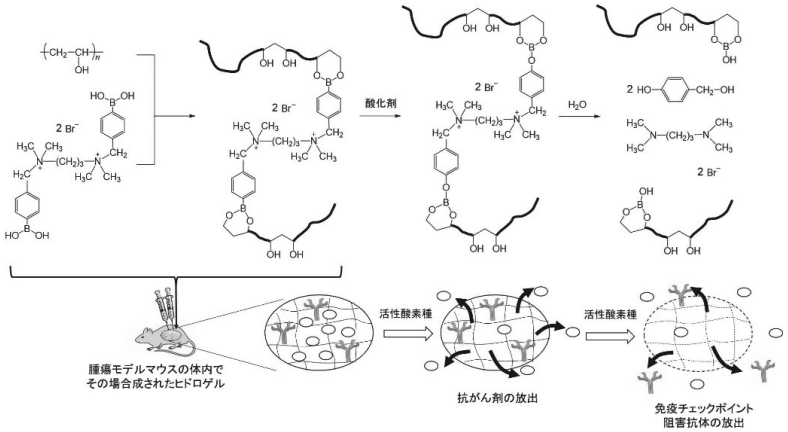


図 5 その場合成高分子ヒドロゲルによる治療薬徐放医療分子ロボット[16]

高分子ヒドロゲルのみならず，低分子による超分子ヒドロゲルも，環境変化という入力に対して，薬剤等を放出できる機能を発揮できる医療分子ロボットとなる[17]．ゲル構成分子が低分子なので，体内の酵素の基質として利用できれば，サイズが大きくて比表面積の小さなヒドロゲルでも速やかな薬物放出を実現でき，ゲル材料も体内に残りにくいことが利点である．例えば，米国食品医薬品局（FDA）の GRAS（食品添加物に与えられる安全基準合格証）リスト内にあるアルコルビン酸と高級脂肪酸とのエステル化合物は，水中でファイバー状に自己集合するため，抗炎症薬を包埋したヒドロゲルを形成できる[18]．このヒドロゲルのファイバーは表面が負電荷を帯びているため，表面が正電荷を帯びやすい大腸炎症部位に静電的にひきあう．そこで，大腸炎症部位の上皮近傍にこのヒドロゲルを付置すると，大腸上皮の酵素がゲル構成分子を分解するようになり抗炎症薬がゲルから放出され，炎症を鎮める効果が認められた．Gajanayake らは，同じく GRAS リスト内の低分子の中から，抗炎症剤を内包したままヒドロゲルを形成する脂肪酸エステルを丁寧に選定し，同様の方針で，ラットモデルに対する血管柄付き複合組織同種移植時に使用すると抗炎症効果が表れ，移植手術の成功率の向上につながる可能性を示した[19]．

化学反応で駆動・変形する医療分子ロボット

能動的なモビリティー，つまり，環境中の化学物質から力を得て，動いたり変形したりして，特定の領域に到達してから薬物を放出する医療分子ロボット

の研究も進んでいる[20,21]．Joseph らは，両親媒性のブロックコポリマー2 種で構成される異方形状のベシクルにグルコースオキシターゼ（およびカタラーゼ）を配合させることで，グルコース濃度勾配に逆らって駆動するナノメートルサイズのキャリアを開発した（図 6）[22]．これの駆動力は，キャリア周囲のグルコース消費で形成される不均一濃度場で引き起こされる一方向的な泳動（自己拡散泳動と呼ばれる）だと考えられている[23]．この研究グループは，さらに血液脳関門（脳の組織液と血液との間の物質交換機構）に到達する DDS 技術に向けて，このキャリア表面に血液脳関門で強く発現される受容体の基質となるペプチドを結合させ，血中のグルコース濃度勾配に応答してラット体内の血液脳関門へ到達する革新的な駆動型「魔法の弾丸」を創出した．

最後に，周囲環境の刺激によって変形する，ミリメートルからセンチメートルサイズの医療用バイオマテリアルについても，今後の革新的医療分子ロボットとして紹介したい[24,25]．変形機構は，構造体の形状に依存した非対称な熱膨張や形状記憶機能によるものが多い．その中でも，Bassik らは，酵素に応答

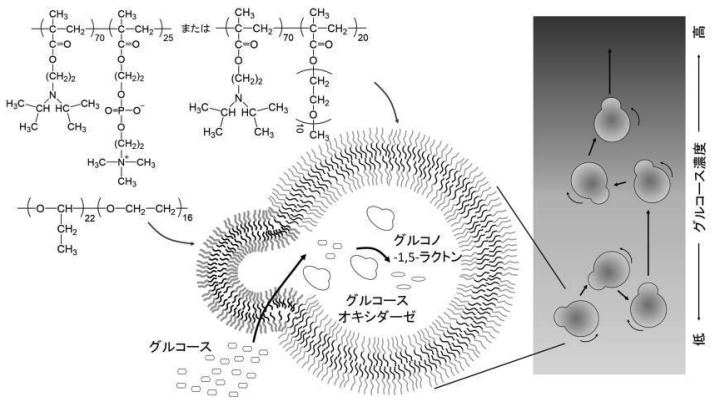


図 6 グルコースに応答して脳まで血中を駆動する医療分子ロボット[22]

して分解する高分子を組合せ，分解に応じて開閉する医療応用を目指したクリップ（図 7）を開発した[26]．クリップの可動部分に，ゼラチンおよびカルボキシメチルセルロースのヒドロゲルを用いて，その片面を金属薄膜で覆うことで，酵素による刺激で分解して膨張収縮が非対称になり，可動部位が反るように設計した．このクリップが，ゼラチンを分解する酵素のもとで構造物をはさみ，続いてカルボキシメチルセルロースを分解する酵素のもとで，はさんでい

た構造物を放出するという一連の変形プロセスを，ヒトの消化管系モデルで実証した．このように分子デザインのボトムアップアプローチと構造体デザインのトップダウンアプローチが組み合わさることで新しい医療分子ロボットが生まれつつある．

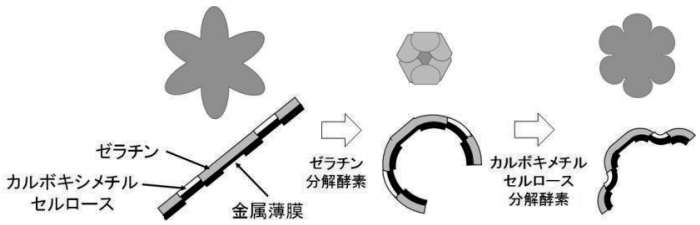


図 7 開閉クリップ型医療分子ロボット[26]

まとめ

水中で自己集合する有機分子や高分子などの人工分子の化学と生体分子の化学の相乗的発展は，各階層のバイオマテリアルの共存性や応答性の限界と適応性を見極め，拡張することを可能にし，洗練した医療分子ロボットの創製につながる．DNA コンピューター（演算の高次化）や核酸/ペプチドアプタマー（選択性の向上）が発展し，それらが医療分子ロボットへ搭載されることになれば，同一の機序で様々な組織別の疾患に対応できるようになったり，センシングするバイオマーカーによって放出する薬剤の種類やタイミングをその場で変えたりすることができる，次世代の基盤的医療技術へ展開可能な医療分子ロボットが誕生するのではないかと大いに期待される．

[1] B. S. Peters et al., Review of emerging surgical robotic technology, *Sur. Endosc.*, **32**, pp. 1636–1655, 2018.
[2] M. Sitti et al., Biomedical applications of untethered mobile milli/microrobots, *Proc IEEE Inst Electr Electron Eng.*, **103**, 2, pp. 205–224, 2015.
[3] A. S. Khalil, J. J. Collins, Synthetic biology: applications come of age, *Nat. Rev. Gene.*, **11**, pp. 367–379, 2010.
[4] 赤池敏宏（2008），バイオマテリアルワールドへの招待，テクノネット社.
[5] H. Ringsdorf, *J. Polymer Sci.: Symposium*, **51**, pp.135–153, 1975.
[6] H. Cabral, K. Kataoka, Progress of drug-loaded polymeric micelles into clinical studies, *J. Control. Release*, **190**, pp.465–476, 2014.

[7] N. Nishiyama, et al., Novel cisplatin-incorporated polymeric micelles can eradicate solid tumors in mice, *Cancer Res.*, **63**, 24, pp.8977–8983, 2003.
[8] M. Murakami, et al., Improving drug potency and efficacy by nanocarrier-mediated subcellular targeting, *Sci. Transl. Med.*, **3**, 64, 64ra2, 2011.
[9] http://www.nanocarrier.co.jp/research/pipeline/02.html
[10] B. S. Pattni, V. V. Chupin, V. P. Torchilin, New developments in liposomal drug delivery, *Chem. Rev.*, **115**, pp.10938–10966, 2015.
[11] Z. Chen, et al., Synthetic beta cells for fusion-mediated dynamic insulin secretion, *Nat. Chem. Biol.*, **14**, pp.86–93, 2018.
[12] H. Hayashi et al., Development of a non-blurring, dual-imaging tissue marker for gastrointestinal tumor localization, *Surg. Endosc.*, **29**, 6, pp. 1445–1451, 2015.
[13] K. M. Bratlie et al., Materials for diabetes therapeutics, *Adv. Healthcare Mater.,* **1**, pp.267–284, 2012.
[14] A. Matsumoto et al., Synthetic “smart gel” provides glucose-responsive insulin delivery in diabetic mice, *Sci. Adv.*, **3**, 11, pp. eaaq0723, 2017.
[15] D. Shiino et al., *Biomaterials*, **15**, 2, pp. 121–128, 1994.
[16] C. Wang et al., *In situ* formed reactive oxygen species–responsive scaffold with gemcitabine and checkpoint inhibitor for combination therapy, *Sci. Transl. Med.,* **10**, 429, pp. eaan3682, 2018.
[17] X. Du et al., Supramolecular hydrogelators and hydrogels: From soft matter to molecular biomaterials, *Chem. Rev.,***105**, pp.13165–13307, 2015.
[18] S. Zhang, et al., An inflammation-targeting hydrogel for local drug delivery in inflammatory bowel disease, *Sci. Transl. Med.*, **7**, 300, pp. 300ra128, 2015.
[19] T. Gajanayake, et al., A single localized dose of enzyme-responsive hydrogel improves long-term survival of a vascularized composite allograft, *Sci. Transl. Med.*, **6**, 249, pp. 249ra110, 2014.
[20] F. Peng, Y. Tua, D. A. Wilson, Micro/nanomotors towards *in vivo* application: cell, tissue and biofluid, *Chem. Soc. Rev.*, **46**, pp.5289−310, 2017.
[21] J. R. Baylis, et al., Self-propelled particles that transport cargo through flowing blood and halt hemorrhage, *Sci. Adv.*, **1**, 9, pp. e1500379, 2015.
[22] A. Joseph, et al., Chemotactic synthetic vesicles: Design and applications in blood-brain barrier crossing, *Sci. Adv.*, **3**, 8, pp.e1700362, 2017.
[23] G. Volpe, S. Gigan, G. Volpe, Simulation of the active Brownian motion of a

microswimmer, *Am. J. Phys.*, **82**, pp.659−664, 2014.
[24] S. -J. Jeon, et al., Shape-Morphing Materials from Stimuli-Responsive Hydrogel Hybrids, *Acc. Chem. Res.,* **50**, 2, pp.161−169, 2017.
[25] C. L. Randall, E. Gultepe, D. H. Gracias, Self-folding devices and materials for biomedical applications, *Trends Biotechnol.*, **30**, 3, pp. 138−146, 2012.
[26] N. Bassik, et al., Enzymatically Triggered Actuation of Miniaturized Tools, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 46, pp.16314–16317, 2010.

（東京大学　豊田太郎，岐阜大学　池田 将，東京大学　本多 智）

6．3 人工的に制御可能な核酸医薬に向けて

分子ロボットの目指す先の一つに生体内での医療応用が挙げられる．自立的に考え，行動可能する分子ロボットは生体内の情報をセンシング・処理した後，診断結果の出力や治療へ直接繋げることができる．本コラムでは，分子ロボットに内包する薬剤の候補である核酸医薬と分子ロボットが可能とする医薬品応用の可能性について記述する．近年，オリゴヌクレオチドを直接医薬品として用いる核酸医薬の研究が盛んに行われている．アンチセンス法[1]やアンチジーン法[2]など標的核酸と結合し，転写や翻訳を阻害することによりその薬効を発揮する(図 1a)．核酸の高い配列特異性を利用し，副作用の少ない薬剤

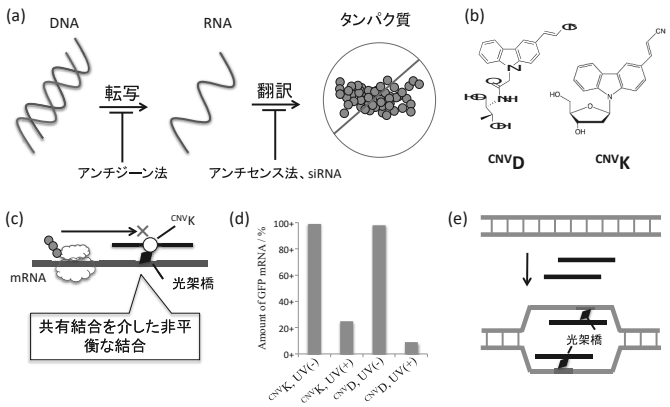


図 1　(a)核酸医薬　(b)光応答性人工核酸 (c)光応答人工核酸を用いたアンチセンス効果 (d)遺伝子発現抑制効果 (e) Photo-induced double duplex

が実現可能となる．遺伝子疾患に対して有用な治療法だと考えられるため，分子ロボティクスの目指す医療応用の際，核酸医薬は重要なアウトプットの一つである．

核酸医薬では標的核酸との結合力が強いほど，転写もしくは翻訳の阻害効果が高い．藤本研究室で開発された超高速光架橋反応(Ultra-Fast photo-Cross-linking：UFC)を用いれば数秒の光照射により標的核酸と光架橋可能であるため，高効率な遺伝子発現抑制が可能である(図 1b,1c)．GFP-HeLa 細胞内に光応答性人工核酸を含むアンチセンス核酸をリポフェクション法により導入し，光照射を行った[3]．その結果，10 秒の光照射により GFP 遺伝子の発現を 90%近く抑制することに成功した(図 1d)．また，光操作法の利点でもある光照射のタイミングで反応を制御可能なため，光照射のタイミングにより遺伝子発現を抑制することが可能である．一方，二本鎖 DNA に対して架橋可能な光操作技術はアンチジーン法へ応用可能である．現在，光応答性人工核酸である 3-cyanovinylcarbazole の他，5-cyanouridine を用いることによる二本鎖 DNA に対する光架橋技術(Photo-induced double duplex: PIDD)の開発に成功しており[4]，今後アンチジーン法への応用が期待できる(図 1e)．

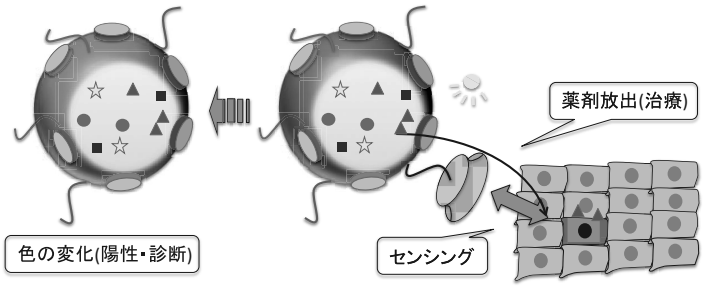


図２　分子ロボット用いた遺伝子治療

分子ロボットの一つの目標は検出・診断・治療まで一連の流れを全て行える分子ドクターだと私は考える．これまではドクターが診断し，治療(薬剤投与)を行なってきた．それは分子に「自立的に考える」という機能が備わっていないためである．しかし，分子ロボットは自立的に考えることが可能である．分子ロボットによる核酸医薬治療は従来の抗体医薬や低分子医薬にはない，新たな治療として発展すると考えられる．

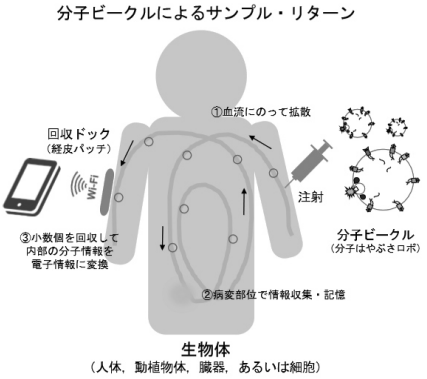
[1] B. Weiss, G. Davidkova, LW. Zhou, Antisense RNA gene therapy for studying and modulating biological processes, *Cell. Mol. Life. Sci.*, 55, 3, pp 334-358, 1999.
[2] KM. Nagel, SG. Holstad, KE. Lsenberg, Oligonucleotide Pharmacotherapy: an antigene strategy, *Pharmacotherapy*, 13, 3, pp 177-188, 1993.
[3] T. Sakamoto, A. Shigeno, Y. Ohtaki, K. Fujimoto, Photo-regulation of constitutive gene expression in living cells by using ultrafast photo-cross-linking oligonucleotides, *Biomatter. Sci.*, 2, 9, pp 1154-1157, 2014.
[4] S. Nakamura, H. Kawabata, K. Fujimoto, Double duplex invasion of DNA induced by ultrafast photo-cross-linking using 3-cyanovinylcarbazole toward for antigene method, *Chem. Commun*., 53, pp 7616-7619, 2017

（北陸先端科学技術大学院大学　藤本健造）

6．4　分子はやぶさの夢

近未来の分子ロボティクスの応用のひとつとして，人工衛星はやぶさが小惑星イトカワのサンプルを地球に持ち帰ったように，分子ロボットをもちいた生体内のサンプル＆リターン探査（分子はやぶさ）が考えられている．分子ロボットが生体奥深く分け入って分子のサンプルを持ち帰ることで，普通の診断技術ではわからないような健康状態の精密なチェックや病気の診断ができることが期待される．

分子はやぶさの具体的な手順は次のようになる．微生物サイズの分子ロボットがたくさん含まれる注射液を血管に注射すると，分子ロボットは血流にのって体内の隅々まで運ばれていく．それぞれの分子ロボは流れていった先で特定の分子が存在するかどうかといった情報をあつめる．つまり分子ロボ表面のレセプターに特定分子が結合すると，それが分子ロボ内部に伝わり，分子計算回路がその分子が存在したことあるいはその濃度を記憶する．それだけでなく，周囲の環境が特定の条件を満たすと判定された場合は，その場所の分子サンプルを採取する．たとえば，特定のガンマー



カー分子の濃度が高いとき，分子ロボットは近くの細胞表面の分子をはぎ取って内部に取り込む．分子ロボには自ら泳ぐ能力はないが，体内にいきわたっているので，ごく少数ではあるが，回収ドック（血液採取パッチ）で回収することができる．回収されなかったビークルは血液中の酵素により自然に分解される．分子ロボが回収ドックに持ち帰った微量のサンプルを濃縮し，ナノポアを通すことにより，そのときの微弱な電流パターンから，サンプル分子の一分子単位の情報を得ることができる．それをバイオインフォマティクス解析することで，精密な診断を行うというものである．

分子はやぶさを実現するためには，特定の分子を捉えるレセプター，分子サンプルを取得する分子デバイス，分子入力を記憶する反応回路，微量分子の解析技術や高度なバイオインフォマティクスなどさまざまな技術開発が必要になる．　図１　分子はやぶさのコンセプト

（東北大学　村田　智）

第7章
分子ロボットの社会受容

7．1　分子ロボット倫理の必要性と課題

はじめに

分子ロボットは，生体分子を主たる材料とし，感覚と知能と運動というロボットの三要素を備えた人工物である．従来型の電子機械式ロボットと違い，細胞と同じリポソーム，微小管，分子モータ，DNA といった生体高分子から構成されているので人体との親和性が高いという点が分子ロボットの大きな特徴の一つとなっている[1]．

分子ロボットを人体に投与するためには医薬品と同様に，ガイドラインを遵守し，品質・有効性・安全性を証明し，関係省庁からの許認可を受けなくては臨床試験を始めることはできない．2018 年時点では分子ロボットに関する医薬品ガイドラインは定められていないので，分子ロボットを人体に投与してよいかどうかを判定することはできない．そもそも，それ以前に，人体に分子ロボットのような異物を投与することが倫理的に許されるのかという課題に関して十分な社会的コンセンサスを得ることが先である[2]．

このような背景から，JST「人と情報のエコシステム」事業の一貫として，2016 年度に「分子ロボット技術に対する法律・倫理・経済・教育からの接近法に関する調査」という倫理調査研究プロジェクト[3]が始まった．2017 年度からは，さらに，「分子ロボット ELSI 研究とリアルタイム技術アセスメント研究の共創」[4]および「情報技術・分子ロボティクスを対象とした議題共創のためのリアルタイム・テクノロジーアセスメントの構築」[5]という分子ロボット倫理に関する共創研究プロジェクトが開始された[6]．

分子ロボット倫理調査研究プロジェクトでは，半年間に２回の研究会と国際シンポジウムを開催し，分子ロボットが社会に受容されるために，社会技術の観点から議論すべき課題ついて議論した[7]．倫理・法律・社会的課題(ELSI)の観点からは，分子ロボット技術の ELSI と合成生物学などの他の分野の ELSI との違いについて，テクノロジーアセスメント(TA)の観点からは，将来的に社

会・経済・政治・環境に大きなインパクトをもたらすことが期待される萌芽的科学技術の一つとして注目を集めた[8]．これを受けて，分子ロボット倫理研究プロジェクトでは，2018 時点で下記の 4 つのテーマに注力している．

・分子ロボットの倫理法律社会的課題(ELSI)
・分子ロボットのテクノロジーアセスメント(TA)
・分子ロボットガイドラインの策定
・国際学生コンテスト BIOMOD での ELSI の展開

分子ロボットの倫理法律社会的課題(ELSI)

倫理的法的社会的課題(ELSI)とは，1990 年にアメリカでヒトゲノム計画が始まった際に，ゲノム配列解析の研究を推進するだけでなく，生命の尊厳，差別の抑止，情報保護，知る権利など，その結果生じる倫理的(Ethical)，法的(Legal)および社会的課題(Social Implication)についても多角的に研究するために造られた用語である[9]．その後，ライフサイエンス分野および医学分野を中心に大型プロジェクトでは先端的研究開発とその ELSI 研究を同時に進めることが一般化した．

分子ロボット ELSI を考える上でもっとも参考になるのが「合成生物学」の動向調査並びに「環境リスク評価・管理フォーラム」の議論動向調査に関する報告書[10]である．この報告書には，2013 年時点における合成生物学の研究開発動向の調査研究に加え，合成生物学の社会的影響，法規制，今後検討すべき課題が簡潔にまとめられている．合成生物学と分子ロボットとの差異に注目することで，合成生物学 ELSI を出発点として分子ロボット ELSI を議論することが可能となる．

分子ロボットと合成生物学はどちらも「人工細胞」を目指すという点では共通目標を持ち，DNA 配列や人工核酸を用いて生体分子システムを制御するという手法も共通している．しかしながら，合成生物学の成果物は「生物」の範疇にとどまるのに対し，分子ロボットは「非生物」の範疇に属する点が根本的に異なる．すなわち，分子ロボットは生体分子から構成され，生物のように振る舞うが，あくまでも人工物（非生物）であるという点が ELSI を考える上での原点となる．

法制面に関しては，生物か非生物かという違いは，分子ロボットを「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」（通称「カルタヘナ法」）で規制できるかどうかという，法的解釈問題を引き起こす

可能性を持つ．カルタヘナ法はあくまでも生物を対象としているため，合成生物はこの範疇に入ると解釈されているが，分子ロボットを文字通り解釈すると対象外となる．ただ，ウイルスやファージもカルタヘナ法の対象とされているので，分子ロボットをどのように位置づけるかの議論が必要である．

この他，バイオセーフティに関しては，環境生残性，不測性質の創発，リスク評価上の課題，社会的影響に関しては，デュアルユース，テロ対策，生命倫理など合成生物学と同様な倫理的懸案事項を持っており，さらなる議論が必要である．

分子ロボットのテクノロジーアセスメント(TA)

テクノロジーアセスメント(TA)とは，従来の研究開発・イノベーションシステムや法制度に準拠することが困難な先進技術に対し，その技術の早期段階において将来のさまざまな社会的影響を予期し，技術や社会のあり方についての問題提起や意思決定を支援する制度や活動を指す[11]．TA に続く社会科学的方法論としては，リアルタイム・テクノロジーアセスメント(RTA)および責任ある研究とイノベーション(RRI)が知られている．RTA は回顧的に技術を評価するのではなく，社会科学や政策研究を自然科学的発見や工学的発明に最初から関与させることで「リアルタイム」に技術評価を技術開発にフィードバックすることを目指している[12]．一方，RRI は ELSI のように道徳的根拠で技術発展を抑制するのではなく，イノベーションの早期段階で正と負の規範的課題を扱うことで社会的に望ましいイノベーションに導くことを目指している[13]．以下，分子ロボットとこれらの活動との関わりについて述べる．

リアルタイム・テクノロジーアセスメントに関しては，現在，JST「情報技術・分子ロボティクスを対象とした議題共創のためのリアルタイム・テクノロジーアセスメントの構築（代表標葉隆馬，成城大学)」[5]との共創で，分子ロボットを題材とした議題共創プラットフォーム(NutShell)を構築中である．NutShell はインターネット上に情報を公開することにより，研究者，技術者，ジャーナリスト，政策決定者だけでなく一般市民を含む多様なステークホルダー（利害関係者）から技術開発へのフィードバックを得ることを目的としている．これにより，研究コミュニティーの外に置かれた大多数の人々からの意見を吸い上げ，研究開発に迅速にフィードバックすることが期待されている．

責任ある研究とイノベーションに関しては，2018 年 2 月に「分子ロボット ELSI/RRI 洞察ワークショップ(東工大田町 CIC)」を開催し，総勢 38 名の分子

ロボット研究者，倫理研究者およびジャーナリストが集まり，分子ロボットに関して「起きてほしい未来」と「起きてほしくない未来」を議論した．４つのグループに分かれ，①近い未来から遠い未来へという軸，②個人から社会・制度へという軸，③自己決定から社会決定へという軸，④まだない・実現する・営利から，すでにある・実現しない・福祉へという軸で討議を行った．このような多方面から未来洞察を行うことで，分子ロボット研究において，起きて欲しい未来としては「学際的研究への進化」や「医療への応用」，起きて欲しくない未来としては「研究の停滞」，「軍事利用」，「制御不可能」という未来洞察が浮かび上がった．詳しくは分子ロボット倫理サイトで公開中である[2]．

分子ロボットガイドラインの策定

分子ロボットガイドラインは法体系と同様に，根本となる原理・原則・基準をどう定めるかが重要となる．JST「分子ロボットELSI研究とリアルタイム技術アセスメント研究の共創(代表小長谷明彦，東工大)」では，分子ロボット原則，基礎研究ガイドライン，医薬品ガイドラインの策定を目指している[4]．2017年には九州大学河原直人特任講師を中心に，下記の分子ロボット原則「案」を定め，分子ロボティクス年次大会において提示した．分子ロボット倫理サイトでも公開しており，広く意見を募集中である[2]．

【前文】　モノづくりが進化し，これまでになかったデバイスやシステムが次々と現れる一方で，分子ロボット技術の倫理的課題も多岐に及ぶ．現在，わが国の分子ロボット技術は，感覚，運動，知能が重要な要素として捉えられ，それぞれの要素技術を活かした研究開発が進められているところである．将来的に，分子ロボット技術は，より複雑な構成が実現可能になるとともに，情報学，工学，化学，生物学の分野はもとより，医学・医療などにも応用されることが予想される．これらの技術開発の進展に伴い，新しい物質・情報・生命観を想起し，倫理の枠組みを社会の中に確立させていくことは重要な課題といえよう．このような背景において，私たちは，以下の倫理綱領を定めるとともに，分子ロボット技術に携わるすべての者にその遵守を求めるものである．

１．リスク・ベネフィットの総合評価　(Comprehensive assessment of risk and benefit)

▸分子ロボティクス技術に携わる者は，その技術の複雑化とともに，人間・

環境への負担ならびに予測されるリスク及び利益についての総合的な評価を行うとともに,それらの負担及びリスクを最小化させ得る対策を講じなければならない.

２．安全と環境への配慮　(Consideration for safety and environment)

▶分子ロボティクス技術に携わる者は，環境に影響を及ぼし得るものの拡散防止のための措置，安全の確保に向けた取組を行う必要がある．これは，将来世代に対する責任と配慮を含む.

３．セキュリティとデュアルユース問題への留意（Paying attention to security and dual-use issues)

▶分子ロボティクス技術に携わる者は，物理的・人的な観点のみならず，輸送や材料管理,情報の観点も考慮したセキュリティ対応を検討するべきである．併せて，デュアルユースに関する問題にも注意を払う必要がある.

４．説明責任と透明性の担保（Ensuring accountability and transparency)

▶分子ロボティクス技術に携わる者は，社会正義に根ざした研究開発を進展させるにあたり,公共への説明責任と透明性を担保しなければならない.

BIOMOD での分子ロボット ELSI の展開

分子ロボット倫理は ELSI や TA を研究するだけでは不十分であり，ELSI の考え方を分子ロボット研究コミュニティーにいかに浸透させ,未来の分子ロボット開発にフィードバックさせることが最大の課題である.

この課題を実践するために，分子ロボット国際学生コンテスト BIOMOD[14]を活用した分子ロボット ELSI の啓蒙と実践を推進している.具体的には，分子ロボット国際学生コンテストの運営に ELSI の立場から参画し，自分たちの研究テーマに関連した ELSI を WIKI で発信させるようにすることで，学生およびメンターとなる若手研究者が ELSI の重要性を認識する機会を設けた.遺伝子組換え技術を基本技術とする合成生物の国際学生コンテンスト(iGEM)[15]においても ELSI の啓蒙は浸透するのに3年以上要しており，BIOMOD での ELSI についても継続して実施することが重要と考えている.

まとめ

分子ロボット倫理について，ELSI，テクノロジーアセスメント，ガイドライン策定および BIOMOD での ELSI の実践の観点から，現状と課題について述べた.分子ロボット技術は社会に大きな変化をもたらす可能性のある萌芽的な技

術として, 倫理およびテクノロジーアセスメントを含む社会技術研究者から注目を集めている. このような萌芽的研究の初期の段階から社会技術研究者と共創することにより, 社会に受容される望ましい分子ロボット技術に発展させることができるのか. 分子ロボットを題材に一つの社会実験が始まっているといえよう.

[1] 新学術領域「分子ロボティクス」: http://www.molecular-robot.org/
[2] 分子ロボット倫理サイト：http://molecular-robot-ethics.org
[3] JST 分子ロボット技術に対する法律・倫理・経済・教育からの接近法に関する調査：https://ristex.jst.go.jp/hite/community/project000062.html
[4] JST 分子ロボット ELSI 研究とリアルタイム技術アセスメント研究の共創: http://ristex.jst.go.jp/hite/community/project000270.html
[5] JST 情報技術・分子ロボティクスを対象とした議題共創のためのリアルタイム・テクノロジーアセスメントの構築: http://ristex.jst.go.jp/hite/community/project000268.html
[6] JST RISTEX 人と情報のエコシステム(HITE)インタビュー「開発しながら協議する，生体分子ロボット」2017.08.07: http://ristex.jst.go.jp/hite/topics/265.html
[7] Go Yoshizawa, Daisuke Yoshinaga, Mikihito Tanaka, Ryuma Shineha, Akihiko Konagaya: The social implication of molecular robotics (in submitting).
[8] 標葉隆馬，田中幹人，吉澤剛，小長谷明彦：分子ロボティクス研究の現状と ELSI に関する検討：今後のテクノロジーアセスメントに向けて，科学技術振興機構（JST）社会技術研究開発センター（RISTEX）「人と情報のエコシステム（HITE）」領域委託研究プロジェクト報告（発行中）.
[9] Jean E. McEwen, Joy T. Boyer, Kathie Y. Sun, Karen H. Rothenberg, Nicole C. Lockhart and Mark S. Guyer: The Ethical, Legal, and Social Implications Program of the National Human Genome Research Institute: Reflections on an Ongoing Experiment, Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 15:481–505 (2014).
[10] 経産省委託事業平成 25 年度環境対応技術開発等（バイオインダストリー安全対策事業）報告書，第 II 編生物多様性関連の遺伝子組換え技術の国際交渉等に係る対応〜「合成生物学」の動向調査並びに「環境リスク評価・管理フォーラム」の議論動向調査〜，一般財団法人バイオインダストリー協会，平成 26 年 3 月 27 日

[11] 吉澤剛：日本におけるテクノロジーアセスメント－概念と歴史の再構築，社会技術研究論文集，vol.6, pp.42-57 (2009).
[12] David H. Guston, Daniel Sarewitz: Real-time technology assessment, Technology in Society, 24, 93-109 (2002).
[13] 吉澤剛:責任ある研究・イノベーション-ELSI を超えて-，研究技術計画,28(1),106-122 (2013).
[14] BIOMOD: http://biomod.net
[15] iGEM: http://igem.org/Main_Page

（東京工業大学　小長谷明彦）

7．2　分子ロボティクスを巡る ELSI を考えるために

はじめに

分子ロボティクス分野の発展は，多くの科学的知見と幅広いインパクトをもたらすことが予想される．その際，様々な倫理的・法的・社会的含意（Ethical, Legal, and Social Implications: ELSI）や社会とのコミュニケーションのあり方を考える必要が同時に生じてくる．このような分子ロボティクス分野を巡る ELSI を検討する上で，過去の知見を見ていくことは，今後の議論の土台作りの一助となること期待できる．本稿が今後の議論の活発化に貢献できれば幸いである[i]．

遺伝子組換え生物（GMO）事例から

科学技術を巡る ELSI を検討する上で，遺伝子組換え生物（Genetically Modified Organisms: GMO）を巡る議論は重要な参照点となる．誰もがその技術の大きな可能性を認めつつ，同時に数多くの ELSI が指摘され続けてきた事例であるためだ．その議論蓄積の中でもここではイギリスで行われた GMO を巡る対話取組みから得られた教訓について触れておきたい．イギリスでは，1990 年代における BSE 問題を契機として，科学に関わる専門家や行政における不振の問題に直面してきた．GM Nation はそのような逆風の中で行われた大規模なコミュニケーションの取組みであり，その過程で科学技術を巡る ELSI とコミュニケーションの取組みについて様々な反省的教訓が引き出されている．その知見の概要をまとめるならば，おおよそ以下のようになる［1-7］．

・人々の持つ多様な不安：食品や環境への安全性といった科学的・技術的な側面に限らず，社会的・政治的課題まで含めた懸念に目を向ける必要がある．
・リスク - ベネフィットの理解：ベネフィットを知ると同時に，リスクへの関心もまた高まる（特に長期的な観測が必要なリスクへの関心の高まり）．
・安易な商業化に対する反発：より多くのテスト，しっかりとした規制の枠組み，（生産者だけでなく）広く社会へのベネフィットの提示が要求されている．
・政府・多国籍企業への不信感：GM Nation 自体がただのアリバイ作りで結果は無視されてしまうのではないか，また多国籍企業の利益が優先されるのではないかといった危惧（実際のところ，多くの参加者は総論としての遺伝子組換え作物の利点は認めていた．しかし多国籍企業への疑念は払拭されなかった）．
・更なる情報提供と試験研究：信頼できる情報源からのより多くの情報提供と，更なる試験研究の必要性を認めている．
・発展途上国の事情に対する特別な関心：食糧増産などの形で，遺伝子組換え作物は発展途上国に貢献し得るという認識がなされている．しかし同時に，公平な貿易，より良い食料分配システムの構築，収入や当該国の地位向上といった開発全体の推進が重要であるという認識も提示されている．
・議論に対する歓迎と価値：対話・議論への参加は歓迎されており，また自身の意見表明のみならず，専門家も含めた他者の意見を聞き議論できる機会が尊重されている．

これらの示唆に加えて，GM Nation における最大の教訓の一つは「とにかく早い段階から継続的に発信・コミュニケーションを行うことの重要性」であると指摘されている．すなわち，GMO が論争化する以前からの情報と議論の共有が，当該技術を巡るより良い社会的議題構築のための前提条件であったのではないかと考えられている[ii]．

翻って日本の状況を見るならば，GMO を巡る社会的議論はどのような経緯をたどったのだろうか．日本における GMO を巡る議論は，1990 年台半ばからの GM 食品利用の進展と安全性評価制度の構築に伴い，急速に政治・社会的な文脈で話題に上るようになった．その中で，GM 食品利用に関するネガティブな反応が色濃く登場し，今もなおその忌避感は根強いという状況がある[8]．

このような中で，北海道では風評被害などへの懸念から，2005 年 3 月 31 日に「北海道遺伝子組換え作物の栽培等による交雑等の防止に関する条例」が交

付されている．この条例では，GM 作物の野外栽培試験に対して国の基準よりも遥かに厳しい基準が設定されており，研究者側からも研究の阻害などを懸念する声が上がることとなった．北海道の条例に対する研究者側からの声でもっとも大きな動きの一つは，2005 年 1 月に出された植物科学関連 6 学会合同による提言：「遺伝子組み換え植物の社会における適切な受容を進める体制を求む」[iii]であろう．

しかしながら，この 6 学会合同提言は，残念ながら北海道の条例施行の直前に公開されており（そして無論，条例に関する議論はそれよりも前からスタートしていた），またそのときには既にマスメディアにおける関心のピークも過ぎた後であった[iv]．加えて，GMO を巡る報道は，最初からネガティブなトーンであったわけではなく，1990 年代半ばまでは医療・産業応用への強い期待感を持ったポジティブなトーンの記事が多い[9][v]．これらの状況を踏まえて敢えて言うならば，（勿論それだけが要因ではなく，また研究者側の発信の努力も早期から無かった訳ではないものの）GMO の議論の例は，研究者側がメディアにおける議題設定・構築のプロセスに参加できなかった例として捉えることもできる．

合成生物学事例から

分子ロボティクスを巡る ELSI を洞察する上で，合成生物学分野における議論は見逃せない参照点であろう．合成生物学を巡る議論では，GMO を巡る苦い経験と教訓を糧として，研究領域の形成当初から ELSI や政策に対する関心と注意が払われ，国内外の研究者コミュニティで積極的な議論が行われてきた特徴がある．例えば合成生物学の国際学生コンペである iGEM においても ELSI のセッションが行われるなどの積極的な議論の場の構築が試みられている．また国内では，「細胞を創る」研究会においても，ELSI を巡る発表や議論が初期から行われてきた経緯がある．

このような中で，合成生物学分野に関して指摘されてきた主な ELSI と科学政策上の論点には GMO を巡る議論を参照点としてきた経緯もあり，前節でまとめた論点と似たものも多く見られる．ここでは，GMO の論点と含めて通覧できる形にするべく，表としてまとめている（表 参照のこと）［1-7，10-12］[vi]．

また合成生物学に関する一般の人々の意識についての知見も指摘されている．例えば Hart Research Associate が公表した米国の調査例では，「合成生物学」というキーワードの認知自体は年々上昇傾向にあるものの，リスクとベ

表 分子ロボティクスをめぐるELSIを考えるために: 他の萌芽的科学技術における論点整理とそこからの示唆

	遺伝子組換え（GMO） 主に1990年代～	合成生物学 主に2000年代～		分子ロボティクスELSIへの示唆
人々の懸念と関心	食品や環境への安全性といった科学的・技術的な側面に限らず、社会的・政治的課題まで含めた幅広い懸念と関心 試験研究の必要性は認知されている	コントロールできない条件での環境放出のリスク バイオテロの潜在的可能性、安全保障 人工的な生命/生物体との向き合い方	→	倫理的・社会的・政治的課題とは何か？ Dual Use問題への配慮のあり方
リスクーベネフィットの理解	ベネフィットを知ると同時に、リスクへの関心もまた高まる（特に長期的な観測が必要なリスクについての関心の高まり）	潜在的な可能性をどのように理解・把握するのか 慎重あるいは判断保留の態度 予防原則との兼ね合い TAの限界	→	健康や環境などへの中長期の影響把握をどのように行い、また体制構築するか？
商業化	安易な商業化への反発／適切な規制の枠組み 生産者だけでない広く社会へのベネフィットの提示		→	（応用が見えてきた段階で）幅広い層へのベネフィット提示をどのように行いうるか？
富の公正な分配（社会正義）	発展途上国への関心	技術貿易の問題 研究をめぐるインフラと環境整備	→	先端技術を巡る南北問題への幅広い視座獲得をどう行うか？
知的財産権	生物特許を巡る様々な議論の発生	知的財産権の扱い オープンソースイノベーションのあり方	→	知的財産権や標準化を巡る議論の必要性
社会との信頼関係の構築	権力への不信感 ELSIはただのアリバイ作りで、その議論が無視されるのでは？ 公平性・透明性の確保 信頼できる情報源からのより多くの情報提供の希求	ガバナンスと規制 リスクマネジメントの政策的位置付け 技術の管理責任と情報公開の透明性	→	公平性・透明性の確保の方策の検討 →幅広い情報アクセシビリティをどのように担保するか？
コミュニケーションと反射性	市民にとって以下が歓迎されていると感じられるか →対話・議論への参加 →自身の意見の表明 →専門家も含めた他者の意見を聞き議論できる機会	キーワードの認知は上昇傾向 合成生物学の今後や活用の未来シナリオについての理解の欠如	→	多様なステークホルダーの参加スキームの確保 シナリオ共創をどのように行っていくか？
学術コミュニティの動き	研究が阻害されるという懸念，危機感 研究者らの社会的議題構築への乗り遅れ	国際学生コンペ iGEMでのELSIセッション 「細胞を創る」研究会でのELSI議論	→	分子ロボティクス研究者の自治の発揮（ELSI議論の活発化と積極的な発信）をどのように行っていくか？
メディア関心	当初は医療・商業応用への期待感が強いポジティブな記事が多かったが、その後は食品利用におけるネガティブな記事の顕在化		→	どのようなテーマに似た語られ方をするのか？ 海外状況も含めた早期の把握と警鐘

ネフィットの関係については慎重あるいは判断保留の態度が認められている[11，13]．

社会とのコミュニケーションにおける課題-再生医療の事例から

先端研究が社会との間で行うコミュニケーションでは，どのような点に注意が必要となるのだろうか．ここでは，日本再生医療学会が文部科学省リスクコミュニケーションモデル形成事業の一環として行った調査から得られた知見を見ていくことにしたい．この調査では，日本再生医療学会の会員 1115 名，調査会社における一般モニター回答者 2160 名から得られた結果を元に，再生医療関係者と一般の人々の間におけるコミュニケーションにおける関心事項の差異が検討されている．

当該調査の結果から，一般の人々の「知りたい事柄」と再生医療学会員の「伝えたい事柄」の間のギャップが指摘されている．再生医療学会員側が科学研究や医療応用の科学的妥当性やメカニズムを強調する傾向にある一方で，一般の人々はリスク，実際にかかる治療費，万が一の事態における対応方策，責任体制などむしろ技術の実現後の事柄について関心を抱く傾向にあることが見出されている[14][vii]．また再生医療研究に対する全体的な肯定感・許容度の高さに比して，ヒト動物キメラの作製については一般モニターの忌避感が強いことが見出されている．つまり新規技術に肯定的な人であっても，技術の内容によっては忌避感を感じる場合があることが示唆されている．そのため生体資料を収集するような研究の場合，用途によっては，インフォームドコンセントの取得などに際して十分な注意が必要となる[15]．

いずれにせよ，研究開発プロセスの出来る限り上流の段階から，その技術が実装された後の社会像を想起・共有し，専門家と一般の人々の間にある関心の差異を念頭においたコミュニケーション活動[viii]を行う必要がある．

責任ある研究・イノベーション

ここまでに分子ロボティクス分野における ELSI や社会とのコミュニケーションを洞察する上で重要と思われる事例を概観してきた．このような過去の知見にもとづき，ELSI に関する適切な配慮をもって分子ロボティクスの可能性を引き出す環境・制度の構築が求められる．既に始まりつつある分子ロボティクス倫理を巡る議論では[ix]，当該分野にどのような ELSI がありうるか，医療応用や工業化・標準化・品質保証の課題はどのようなものか，医療者・医療倫理

の専門家・行政関係機関との議論の積み重ねといった論点が意識され，社会的な議題構築に向けたコミュニケーションの重要性が指摘されている．また，デュアルユース問題や優生学に関わる論点，ワーストケースシナリオの検討などの課題も指摘されている．

このように研究開発の上流段階から，可能性であった技術が実現した時の社会の姿を想像し，その ELSI に対する洞察を進めることで，社会に対して適切なケアを行うイノベーションの形は，「責任ある研究・イノベーション（Responsible Research and Innovation: RRI)」[x]と呼ばれ，欧州委員会の Horizon 2020 などの科学技術政策枠組みにおいて注目されつつある．分子ロボティクス分野における RRI はどのように実現しうるのか，またそのために必要な視点や教育とはどのようなものなのかについて，試行錯誤を重ね，学術コミュニティ内部からの議論と発信が必要となってくる[xi]．

このような取組みは，RRI を巡る政策的議論においても重要な先駆的事例となるものといえる．GMO の事例に立ち戻るならば，GMO を巡る各国の規制や指針の源流には，アシロマ会議に代表されるような科学者たちの自発的議論がある．アシロマ会議が持つ早期からの自発的議論とその発信というアプローチの重要性は，分子ロボティクス分野においても変わることはない．

[1] Hails, R, and Kinderlerer, J. The GM public debate: context and communication strategies," *Nature Reviews Genetics*, **4**(10), pp.819-825, 2003.

[2] Barbagallo, F, and Nelson, J. Report: UK GM dialogue - Separating social and scientific issues, *Science Communication*, **26**(3), pp. 318-325, 2005.

[3] Pidgeon, NF. et al. Using surveys in public participation processes for risk decision making: The case of the 2003 British GM nation? Public debate, *Risk Analysis*, **25**(2), pp.467-479, 2005.

[4] Rowe, G. et al. Difficulties in evaluating public engagement initiatives: reflections on an evaluation of the UK GM Nation? Public debate about transgenic crops, *Public Understanding of Science*, **14**(4), pp.331-352, 2005.

[5] Horlick-Jones, T et al. On evaluating the GM Nation? Public debate about the commercialisation of transgenic crops in Britain, *New Genetics and Society*, **25**(3), pp.265-288, 2006.

[6] Horlick-Jones, T, Rowe, G, and Walsh, J. Citizen engagement processes as information systems: the role of knowledge and the concept of translation quality,

Public Understanding of Science, **16**(3), pp.259-278, 2007.

[7] 平川秀幸.「科学技術の社会的問題をめぐる公共的議論 遺伝子組換え作物の問題を例に」『蛋白質 核酸 酵素』**53**(10), pp. 1299-1305, 2008.

[8] 消費者庁『平成 28 年度食品表示に関する消費者意向調査報告書―遺伝子組換え食品の表示に関する事項（抜粋版）』<http://www.caa.go.jp/policies/policy/food_labeling/information/research/2016/pdf/information_research_170426_0002.pdf>（最終アクセス 2018 年 5 月 30 日）

[9] Shineha, R, Hibino, A, and Kato, K. Analysis of Japanese Newspaper Articles on Genetic Modification, *Journal of Science Communication*, **2**, pp.1-8, 2008.

[10] Balmer, A, and Martin, P. *Synthetic Biology: Social and Ethical Challenges*. 2008. <http://www.synbiosafe.eu/uploads/pdf/synthetic_biology_social_ethical_challenges.pdf>（最終アクセス 2018 年 2 月 17 日）

[11] Pauwels, E. Public Understanding of Synthetic Biology, *BioScience*, **63**(2), pp.79-89, 2013.

[12] Marris, C, Jefferson, C, and Lentzos, F. Negotiating the dynamics of uncomfortable knowledge: The case of dual use and synthetic biology, *BioSocieties*, **9**(4), pp.393-420, 2014.

[13] Hart Research Associates. *Awareness & Impressions of Synthetic Biology A Report Of Findings Based On A National Survey Among Adults*, 2013. <https://www.cbd.int/doc/emerging-issues/emergingissues-2013-07-WilsonCenter-SynbioSurvey-en.pdf>（最終アクセス 2017 年 3 月 4 日）

[14] Shineha, R. et al. Comparative Analysis of Attitudes on Communication toward Stem Cell Research and Regenerative Medicine between the Public and the Scientific Community, *Stem Cells Translational Medicine*, **7**(2), pp.251-257, 2018.

[15] Inoue, Y, Shineha, R, and Yashiro, Y. Current Public Support for Human-Animal Chimera Research in Japan Is Limited, Despite High Levels of Scientific Approval, *Cell Stem Cell*, **19**(2), pp.152-153, 2016.

[16] 総合研究大学院大学.『ヒトゲノム解読の現状とＥＬＳＩに関する検討報告：今後のテクノロジーアセスメントに向けて』2014. <https://ir.soken.ac.jp/?action=repository_action_common_download&item_id=4755&item_no=1&attribute_id=24&file_no=1>（最終アクセス 2018 年 5 月 30 日）

[16] 小林傳司.『トランス・サイエンスの時代―科学技術と社会をつなぐ』NTT 出版, 2007.

[18] Bauer, Martin. W. Controversial medical and agri-food biotechnology: a cultivation analysis, *Public Understanding of Science,* **11**(2), pp.93-111, 2002.

[19] Gutteling, Jan M. et al. Media coverage 1973-1996: trends and dynamics, in M. Bauer, Gaskell, G. (ed), *Biotechnology. The Making of a global controversy*, Cambridge University Press, pp. 95-128, 2002.

[20] Ten Eyck, Toby, A., Williment, Melissa. The National Media and Things Genetics Coverage in the New York Times (1971-2001) and the Washington Post (1977-2001), *Science Communication*, **25**(2), pp.129-152, 2003.

[21] Bauer, Martin. W., Gutteling, J, M. Issue Salience and Media Framing over 30 Years, in M. Bauer & G. Gaskell (ed), *Genomics & Society: Legal, Ethical, and Social Dimensions*, EARTHSCAN, pp.113-30, 2006.

[22] Shineha, R. et al. Science communication in regenerative medicine: implications for the role of academic society and scientific policy, *Regenerative Therapy*, **7**, pp.89-97, 2017.

[23] Sumner Petroc.et al. The association between exaggeration in health related science news and academic press releases: retrospective observational study, *BMJ*, **349**, pp. 1-8, 2014

[24] Stilgoe, J., Owen, R., Macnaghten, P. Developing a framework for responsible innovation, *Research Policy*, **42**(9), pp.1568-1580, 2013.

（成城大学　標葉隆馬）

---

[i] 生命科学分野における ELSI の TA 事例としては，総合研究大学院大学の研究グループによるゲノム研究を対象とした試みがある [16].

[ii] 早期の発信・コミュニケーションを行いさえすれば論争が解決するわけではないが，そのような取組みなしに良い社会的議題構築の実現は困難であると認識されていると言える．なお，日本国内で行われた GMO を巡る対話取組み例として例えば北海道庁が主体となって行われたコンセンサス会議が実施されている．そこで行われた議論内容においても，GM Nation と類似の論点が数多く見られる．この点については，例えば[17]などを参照のこと．

[iii] 日本植物生理学会，日本農芸化学会，日本育種学会，日本植物細胞分子生物学会，園芸学会，植物化学調節学会の 6 学会合同での提言声明である．
https://jspp.org/16appeal/teigen2005.html（2018 年 5 月末現在アクセス切れとなっているが，Internet Archive の Wayback Machine に URL を入力することで読むことが出来る）．また，この 6 学会合同提言の前にも日本植物整理学会による声明や研究者個人によるブログでの言論活動などの努力はなされていた．しかしながら，6 学会合同提言のような組織的に行われた社会発信は例外的であった．

[iv] メディア報道のピークは 2000 年前後であり，この時は食品利用を巡る不安やリスクなどに注目が集まった報道がされていた[9].

[v] 日本に限らず，GMO を巡る議論は，医療・産業応用の文脈ではポジティブなトーンで語ら

れることが多いのに対して，食品利用では特に欧州においてネガティブなトーンで語られてきた [18-21].

[vi] 合成生物学を巡る議論事態が GMO を参照点として行われることが多いこともあり，共通の論点も多く見られる点には留意が必要である．

[vii] 日本再生医療学会が三井住友海上保険と共同で行っている「再生医療等臨床研究補償制度」は，通常の臨床研究のための保険からさらに踏み込み，医師・医療機関に法律上の賠償責任がない場合も補償対象とし，また再生医療等安全性確保法では定めのない患者に対する補償にも対応するなどが盛り込まれている．http://www.mskhoken.com/dantai/jsrm/index.html（最終アクセス 2018 年 2 月 17 日）

[viii] 研究者のコミュニケーションや情報発信参加に際しては，とりわけ，時間・場所・評価システムなどについての環境改善，研究者が持つ負担感についての配慮や制度的支援が重要となる[22]．また医療分野の事例では，メディアと研究活動の関係において，研究者・研究所側が出すプレスリリースになんらかの誇張が入ると，メディア報道でもかなりの割合で誇張が入ることになる．一方で，プレスリリースが抑制的に書かれている場合は，メディア報道において誇張が入る割合が 5 分の 1 程度に抑制されることが見出されている[23]．コミュニケーション活動においてはこのような状況を踏まえた展開が必要となる．

[ix] 2017 年 1 月 22 日，2017 年 2 月 11 日に行われた分子ロボティクス／JST 分子ロボット倫理合同研究会における議論内容を元に記述している．

[x] 「RRI は，現在における科学とイノベーションの集合的な管理を通じた未来に対するケアを意味する」と表現されている[24].

索引

アルファベット

Ag/AgCl 電極 108
BIOMOD 281
BioNeat 42
BZ ゲル 206
^{CNV}K 220
CRISPR/Cas 253
DACCAD 41
D-aTNA 232
DNAzyme 20
DNA ウォーカー 145
DNA 演算素子 194
DNA オリガミ 121, 126
DNA キャンバス 138
DNA コンパレータ回路 35
DNA 細胞骨格 141
DNA シーケンス 107, 110
DNA スパイダー 146
DNA 増幅回路 26
DNA 大量合成 213
DNA タイル 133
DNA ナノ構造の細胞導入 153
DNA ハイドロゲル 215
DNA ピンセット 144
DNA ブリック 138
DNA 分子マシン 143
DNA 論理回路 18
DX 分子 135
ELSI 278, 283
Evolution 2.0 Prize 65
F_1-ATP 合成酵素 204
genelet 23
GPU 50
iGEM 285
iPS 細胞 255
Kissing Loop (KL)モチーフ 166
L 7 タンパク質 169
M13mp18 122
MinION 111
miRNA 114, 247
Nearest-Neigbor モデル 14
NUPACK 14
p8064/p7560 125
PCR 27
PEN toolbox 22, 37, 91
pH 振動反応 102
PURE System 66
RNAi(RNA 干渉) 173
RNA 構造モチーフ 164
RNA ジグソーパズル 167
RNA ナノテクノロジー 163
RNP(RNA-Protein)複合体 168, 252
RRI 279, 287
shRNA 249
Single Strand Tile (SST) 138
siRNA 173
SNA 235
ssRNA オリガミ 168
tectoRNA 165
Vicsek モデル 52
w/o エマルジョン 67
Z 型 DNA 243

α-hemolysin (αHL) 106

あ行

アクチンコメット 201
アクチンの光応答 202
アゾベンゼン 198, 219
アニーリング 134
アメーバ型分子ロボット 3, 73
アルゴリズミック
・セルフアセンブリ 136
一分子観察/一分子計測 161
一分子酵素活性測定 162
遺伝子組み換え生物 283
遺伝子制御ネットワーク 37
遺伝子発現制御 247
遺伝子発現チップ 70
移動するゲル 97
医療応用 8
医療分子ロボット 263
医療用バイオマテリアル 263
医療用分子ロボット 157
入れ子型リポソーム 266
遠心キャピラリーデバイス 102

か行

回転型分子モーター 204
化学・エネルギー応用 9
化学反応ネットワークの設 48
核酸医薬 273
拡散係数を変化させる分子 95
拡散抑制 93
カチオン性くし形共重合体 239
カルタヘナ法 278
環境応用 8
基盤成長法 131
局所滞留型医療分子ロボット 267
グアニン 4 重鎖ゲル 214
鎖交換反応の加速 222, 240
鎖置換反応 30
クリック反応 196
クロスオーバー分岐 135
血中駆動型医療分子ロボット 270
ゲルオートマトン（GA) 83
光学的脱アミノ化反応 223
抗がん剤 265
合成生物学 65, 278, 285

さ行

再生医療 287
細胞死 252
細胞種判別 256
細胞を創る研究会 69
三位一体の関係性 62
シーソーゲート 19, 59, 227, 232
シェルピンスキー
・トライアングル 137
自己修復マテリアル 87
脂質 2 分子膜 67,131
持続長 197, 216
実時間可視化技術 53
実時間分子シミュレーショ 50
シャペロン高分子 238
集団運動パターン形成 52
自励振動 206
進化分子工学 189
シンギュラリティ i

心筋細胞 255
人工ウイルスキャプシド 185
人工核酸 229
人工細胞 63, 100
人工脳 11
人工分子足場 250
振動回路 39
振動反応 101
スイッチmRNA 247
スキャフォールド鎖 121
スケーラビリティ 55
スタッキング相互作用 127
ステープル鎖 121
スワーム（群れ） 193
制御理論に基づく
　動的反応回路設計 29
セルアレイモデル 91
セルオートマトン（CA) 81, 137
創発システム 60
遡及性理論 35
ソラレン（Psoralen) 219

た行

ターンオーバー 242
チャネル電流 109
中空ゲルビーズ 89
チューリング計算万能性 86
チューリングテスト 58
超高速光架橋反応（UFC) 274
直交性（核酸の） 229
治療薬除放分子ロボット 269
テクノロジー
　アセスメント（TA) 279
デバイス応用 10
糖尿病 71, 266
ドーパミン産生神経細胞 257
トーホールド 144
ドキソルビシン（Dox) 155
ドット・ブランケット
　・プラス記法 16

な行

ナノカプセル 181
ナノシート 209
ナノチューブ 183
ナノポア計測 106
ナノポアシーケンス 110
二次構造予測 13
粘着末端 135
濃度レギュレータ 33

は行

配列設計 13
ハニカム DNA オリガミ 124
反応拡散系 43
光応答ゲルカプセル 90
光応答性人工核酸 77, 218
光応答性ペプチド 200
光架橋技術（PIDD） 274
光架橋反応 219
光ライゲーション 74
微小管/キネシン系 51, 74, 195
非負性 32
分散システム論 56
分子クラッチ 74
分子人工知能 58

分子デリバリー 154
分子はやぶさ 8, 275
分子ロボットガイドライン 280
分子ロボットの進化シナリオ 7
分子ロボット倫理 277
分子ロボティクスとは 2
平衡点 49
ペプチド/タンパク質設計 181,188
ペプチドアクチュエータ 200
ポリマーソーム 68
ポリメラーゼ
・エキソヌクレアーゼ
・ニッカーゼ（PEN) 37

ま行

マイカ基板支持脂質
2 分子膜（MLB) 131
マイクロスポンジ 172
マイクロ流体デバイス 99
魔法の弾丸 264
ミセル型医療分子ロボット 265
無機結晶アクチュエータ 209
無細胞タンパク質合成 217
迷路問題 86, 91
メカニカルデバイス 149
モジュール性 32
モティリティアッセイ 74

や行

薬物送達システム（DDS) 264
有限性 32

ら行

ライフゲーム 82
リアクティブ DNA 回路 25
リボスイッチ 247
リポソーム 67, 74,
141, 203

わ行

ワイヤーフレーム型
DNA オリガミ 125

著者紹介（50 音順）

浅沼浩之　名古屋大学　工学研究科　生命分子工学専攻　教授
　一言：光る個性のある研究を追求しています！
東　俊一　名古屋大学　工学研究科　機械システム工学専攻　教授
　一言：分子制御×ロボット制御≠分子ロボットの制御
有村隆志　産業技術総合研究所　上級主任研究員
　一言：uncanny valley を超える chemistry を目指してます.
池田　将　岐阜大学　工学部　化学・生命工学科　教授
　一言：はたらく分子.
遠藤政幸　京都大学　理学研究科　化学専攻　特定准教授
　一言：DNA ナノテクノロジーと化学の融合で分子アーキテクトを目指します.
大野博久　京都大学　iPS 細胞研究所　特定研究員
　一言：分子ロボティクスの今後の発展に期待しています.
角五　彰　北海道大学 理学研究院 化学部門　准教授
　一言: 力を合わせれば可能性は無限大！
　　分子ロボットクリエーターとして人類に貢献したい.
川又生吹　東北大学 工学研究科 ロボティクス専攻 助教
　一言：DNA オリガミ講習会はじめました.
川野竜司　東京農工大学　工学研究院　生命機能科学部門　准教授
　一言：面白いことをやりましょう！
葛谷明紀　関西大学　化学生命工学部　教授
　一言：画期的な分子ロボット（ナノマシン）を開発して世界を変える（ことになる）未来の科学者が，この教科書で学んでくれていたら素敵だなあ...
小宮　健　東京工業大学　情報理工学院　助教
　一言：ほしいものがなかったらつくりましょう.
小長谷明彦　東京工業大学　情報理工学院　教授
　一言：分子ロボティクスと分子ロボット倫理の２足わらじで前進しています.
小林　聡　電気通信大学　情報理工学研究科　ネットワーク・通信工学専攻　教授
　一言：異分野融合型の分野は面白いですよ.
齊藤博英　京都大学　iPS 細胞研究所　教授
　一言：分子ロボティクスでの RNA/Protein 分子の活用に興味があります.

佐藤佑介　東京工業大学　情報理工学院　日本学術振興会特別研究員（SPD）
　一言：想像力と創造力を磨く！
標葉隆馬　成城大学　文芸学部　マスコミュニケーション学科　准教授
　一言：萌芽的／先端的な科学技術と社会のより良い関係について考えています.
菅原　研　東北学院大学　教養学部　情報科学科　教授
　一言：分子ロボットをドラえもんやアトムのようなお友達ロボにできるかな？
嶋田直彦　東京工業大学　生命理工学院　助教
　一言: 毎日を楽しく過ごそう.
鈴木泰博　名古屋大学　大学院情報学研究科　准教授
　一言：アルゴリズム（モノコトの順序）が「再現性のある自然現象」をつくる.
鈴木勇輝　東北大学 学際科学フロンティア研究所　新領域創成研究部
　一言：一生修行
高井なつみ　東京農工大学　工学研究院　川野研究室　博士前期課程
　一言：考える前に動く！
竹内七海　東京農工大学　工学研究院　川野研究室　博士前期課程
　一言：みかんは飲み物
多田あすか　東京農工大学　工学研究院　川野研究室　博士前期課程
　一言：目標はコツコツ続けること.
多田隈尚史　大阪大学　蛋白質研究所　助教
　一言：一緒に分子ロボットを盛り上げていきましょう
瀧ノ上正浩　東京工業大学　情報理工学院　准教授
　一言：DNA は不思議な物質だと思います.
瀧口金吾　名古屋大学 理学研究科 生命理学専攻 講師
　一言：誰ですか？生命が負のエントロピーを食ってるなんて言ったのは！
鳥谷部祥一　東北大学　工学研究科　応用物理学専攻　准教授
　一言：生体分子モーターを参考に人工分子モーターの実現を目指しています！
豊田太郎　東京大学　大学院総合文化研究科　広域科学専攻　准教授
　一言：「生命らしさ」を創る化学を,誰もがやってみて感動する文化へと,
　　私たちと一緒に育ててみませんか？
中茎　隆　九州工業大学　情報工学研究院　システム創成情報工学研究系　准教授
　一言：分子ロボティクスのための制御理論を築きたい！
根本直人　埼玉大学　理工学研究科　物質科学専攻　教授
　一言：最近は研究すればするほどわからなくなってきて,そして,楽しくなってい

ます.

野村慎一郎　東北大学　工学研究科　ロボティクス専攻　准教授

一言：普遍的生命科学はまず分子ロボット工学から.

萩谷昌己　東京大学　情報理工学系研究科　コンピュータ科学専攻　教授

一言：ゲルの塊が計算することに魅せられて来ました.

浜田省吾　コーネル大学　Dept. of Biological and Environmental Engineering　講師

一言：千里の道も一歩から！

原　雄介　産業技術総合研究所　機能化学研究部門　知能材料G　研究グループ長

一言：産総研で開発した技術の普及を目指して,ベンチャー企業を創業しました.

藤本健造　北陸先端科学技術大学院大学　先端科学技術研究科
マテリアルサイエンス系　教授

一言：異分野間の研究交流が分子ロボの醍醐味ではないでしょうか？

藤原　慶　慶応義塾大学　理工学部　生命情報学科　専任講師

一言：細胞を真似つつ細胞を超える.

本多　智　東京大学　大学院総合文化研究科　広域科学専攻　助教

一言：有機・高分子とその集合体のかたちに着目し，新物性・機能を示す物質・材料の創製に挑戦している.

松浦和則　鳥取大学 学術研究院工学系部門 応用化学講座　教授

一言： 化学で生命システムを創る！（マジシャンじゃないけど）

丸山厚　東京工業大学　生命理工学院　教授

一言: はさみも合成高分子も使いよう.

宮元展義　福岡工業大学　工学部　生命環境科学科　准教授

村田　智　東北大学　工学研究科　ロボティクス専攻　教授

一言： ものを創る喜び，純粋工学，ガラス玉演戯.

村山恵司　名古屋大学大学院　工学研究科　生命分子工学専攻　助教

一言： 面白く価値のある研究を目指します！

柳澤美穂　東京農工大学　工学研究院　先端物理工学専攻　特任准教授

一言： 細胞モデルで生命現象を物理的に読み解く

山内由紀子　九州大学　大学院システム情報科学研究院　准教授

一言： 本分野に参加し，視野は広くと常に心がけています.

Greg Gutman　東京工業大学　情報理工学院　助教

Aubert-Kato, Nathanaël　お茶の水女子大学 情報科学科 助教

一言： I hope this book will help foster the next generation of Molecular Roboticists.

編集後記

分子ロボティクスを一言で表現することは難しい．2010 年に分子ロボティクス研究会を始めた時，さまざまな分野から集まった研究者たちがそれぞれの分子ロボットのイメージを持ち，それぞれが異なる方法論でアプローチしようとしていた．そういう場での議論は非常に活気があって大変おもしろいのであるが，しばしばコミュニケーションの困難さに直面する．ある分野で常識であることが，別の分野では全く知られていないというのは当たり前であるし，同じ言葉が分野により違う意味やニュアンスで使われているために，議論がいつまでもかみ合わないというようなこともよくあった．そもそも，何をしたいか，何が大切か，という価値観が分野ごとに全く違うのである．それでも，皆が分子ロボティクスを立ち上げたいという気持ちは共有しており，遠慮なく意見をぶつけ合う中から新学術領域「分子ロボティクス」をはじめとするいくつものプロジェクトが実行され，しだいに分子ロボットの研究者コミュニティというものができあがってきた．すると，今度は，学生たちや企業の方から，分子ロボティクスって何？どんなことを研究するの？何に使えるの？これからどうなっていくの？など，いろいろな質問を受けることになる．そうした問いかけに答えるために，この分野の面白さや可能性をわかりやすく伝える一冊の教科書を作ることにした．この本を読めば，2018 年時点での分子ロボティクスの全容がほぼわかるようになっている．

この本の執筆陣は若手を中心に分子ロボティクス研究会，新学術領域「分子ロボティクス」メンバー，JST「分子ロボット倫理」メンバーからそれぞれのトピックに最もふさわしい方々にお願いした．2018 年 1 月末の呼びかけかけにご賛同いただき，多忙を合間を縫って原稿をお寄せいただき，1 年余りの間に刊行にこぎつけることにできたのは，ひとえにご執筆各位の多大なご協力によるものである．ここに謝意を表したい．

（編集　村田　智）

分子ロボティクス概論
　分子のデザインでシステムを作る

著者　分子ロボティクス研究会
編者　村田　智

本著作物の著作権は著者にあり，CBI 学会出版は本著作物に対する複製，配布，改変，再出版の権利をもつ．

ISBN 978-4-9909076-5-5

分子ロボティクス概論