

細胞機能のボトムアップデザインとシステム化

庄司 観¹・川野 竜司²

はじめに

細胞は生命の最小ユニットであり、厚さ約5ナノメートルの脂質二分子膜に覆われた数マイクロメートルサイズの空間内に、さまざまな分子が精緻な構造を構築し高度な機能を発現している。さらに、それぞれの細胞同士が互いにコミュニケーションを取り合うことで、さまざまな生命現象が引き起こされている。

近年、これらの生命システムの構造や仕組みを理解するために、生体分子をボトムアップ的なアプローチで再構築し、人工的に細胞構造・機能を構築する人工細胞¹⁾・人工細胞膜²⁾に関する研究が合成生物学の分野において活発に行われている。さらに、医学・創薬・環境科学・エネルギー工学など、さまざまな分野において実用的なアプリケーションを目指した、人工細胞型マイクロロボット工学に関する“分子ロボティクス”のコンセプトが提案されている³⁻⁶⁾。分子ロボットは、DNAナノテクノロジー、合成生物学、高分子化学、電気化学、ロボット工学など、さまざまな技術を組み合わせ、ボトムアップ的なアプローチによって構築させる。

筆者らのグループでは、マイクロ微細加工技術を用いることで安定、かつ再現性の高い人工細胞膜の作製手法を提案してきた^{7,8)}。これまでに、脂質単分子膜に覆われた油中水滴を接触させ、人工細胞膜を形成する「液滴接触法 (Droplet Contact Method)」(図1a)を開発し、人工細胞膜に再構築したイオンチャネルなどの膜貫通ペプチド・タンパク質の電気生理学実験を効率良く行うことが可能となっている⁹⁻¹²⁾。本稿では、筆者らが最近取り組んでいる、液滴接触法の原理を応用したプローブ型の人工細胞膜形成手法、ボトムアップ的配列設計により構築した人工イオンチャネル、分子ロボットの開発を目指した人工細胞の駆動技術に関して紹介する。

プローブ型人工細胞膜システム

筆者らのグループでは、マイクロデバイスを用いることで人工細胞膜の安定的な形成に成功しており、これまでポア形成膜タンパク質・ペプチドの活性評価⁹⁻¹²⁾、ナノポアセンシングによるバイオセンサ¹³⁻¹⁵⁾に関する研究を行ってきた。人工細胞膜に再構築したポア形成膜タ

ンパク質を用いたナノポアセンシングは、高感度、高時間分解能で一分子レベルの計測が可能である。そこで筆者らは、液滴接触法のストラテジー (図1a)を応用し、マイクロ・ナノ電極の先端に人工細胞膜を形成し、ポア形成膜タンパク質を再構築した生体ナノポアプローブを開発することで、ナノポアセンシングによる局所的なケミカルセンシング、およびハイスループットナノポアセンシングの実現を目指している。

まず、マイクロ・ナノ電極を用いた脂質二分子膜の形成手法について説明する。筆者らのグループでは、高分子で修飾した金ナノニードル電極¹⁶⁾、およびガラス管内包された銀/塩化銀マイクロ電極¹⁷⁾を用いた生体ナノポアプローブの開発に成功している。どちらの手法においても、電極を脂質溶液と水溶液が層となった浴溶液に挿入し、電極先端に形成される脂質単分子膜と溶液界面に形成される脂質単分子膜を接触させることで脂質二分子膜を形成することが可能である (図1b)。

生体ナノポアプローブによる局所センシングの可能性を実証するために、H型マイクロ流路内に形成される化学

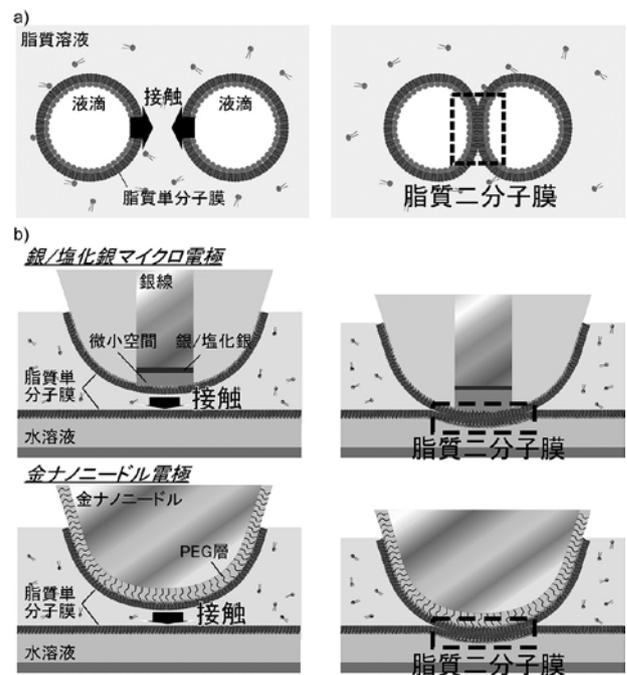


図1. a) 液滴接触法による人工細胞膜形成の原理図。 b) マイクロ・ナノ電極を用いた人工細胞膜の作製手法。

著者紹介 ¹長岡技術科学大学 産学融合トップランナー養成センター (産学融合特任講師) E-mail: kshoji@mech.nagaokaut.ac.jp
²東京農工大学大学院工学研究科生命機能科学部門 (教授) E-mail: rjkawano@cc.tuat.ac.jp

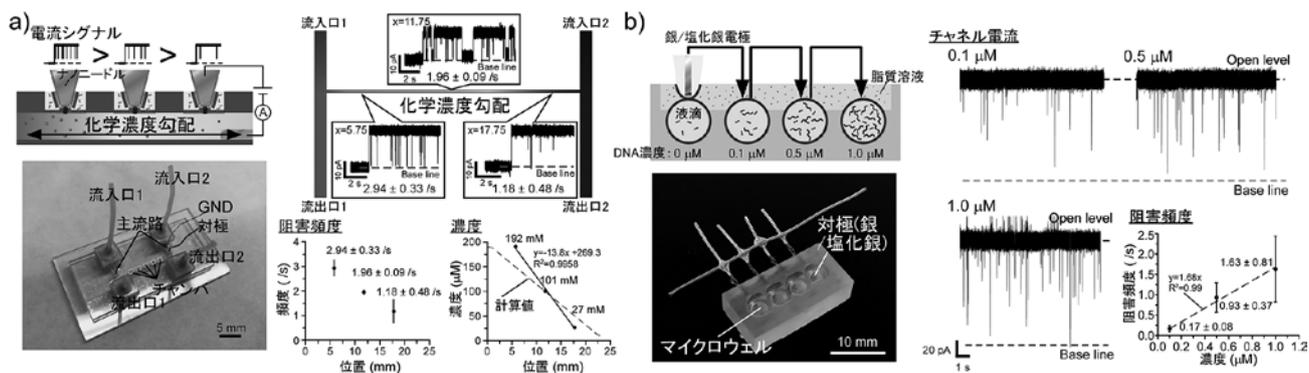


図2. a) 金ナノニードル電極生体ナノポアセンサを用いたマイクロ流体デバイス内の濃度勾配計測。得られた阻害頻度を解析することで流路内の局所的な化学物質濃度を測定した。その結果、流体シミュレーションによる計算値と同様な直線的な濃度勾配が得られた。b) 銀/塩化銀マイクロ電極生体ナノポアプローブを用いた簡易・ハイスループットナノポアセンサ。3Dプリンタを用いて作製したチャンバを用いて液滴を形成、プローブを移動させることにより、異なるサンプルのナノポアセンシングを連続で行うことに成功した。

濃度勾配の計測を行った。マイクロ流路内に金ナノニードルを用いた生体ナノポアプローブを挿入し、ナノポアセンシングによる化学物質の濃度を計測した結果、流体シミュレーションによって計算された値と同様な濃度勾配が形成されていることが確認でき、生体ナノポアプローブを用いた局所ケミカルセンシングを実現した(図2a)¹⁶⁾。

さらに、銀/塩化銀マイクロ電極生体ナノポアプローブを用いた簡易ナノポアセンシングプラットフォームを開発した。本生体ナノポアプローブは、プローブの上下動のみで脂質二分子膜形成を制御することが可能であるため、簡易・ハイスループットなナノポアセンサを構築することが可能である。3Dプリンタを用いてドロップレット形成するマイクロウェルが連なったチャンバを作製、電極を移動させることで異なるサンプルのナノポアセンシングを連続で行うことに成功した(図2b)¹⁷⁾。

以上のように、プローブ状の人工細胞膜システムを開発することで、「局所的な化学物質センサ」および「簡易・ハイスループットナノポアセンサ」の開発に成功している。

De novo デザインペプチドによる人工イオンチャンネル

近年、天然に存在するタンパク質をモデルとして模倣した、人工タンパク質だけではなく、一からアミノ酸配列をデザインして構築した *de novo* 人工タンパク質が、数多く提案されている。特に、ワシントン大学の Baker らのグループは、タンパク質の構造予測アルゴリズムである Rosetta を用いて、βバレル構造を有する光活性タンパク質¹⁸⁾やαヘリックス構造による膜貫通タンパク質¹⁹⁾などさまざまな人工タンパク質を提案している。

筆者らのグループも *de novo* 人工タンパク質のナノポアセンシングへの応用を目指し、ボトムアップ配列設計による人工イオンチャンネルの開発を行っている。現在、ナノ

ポアセンシングには一定サイズのポアを再現性良く形成することが可能なαヘモリシン(αHL)や *Mycobacterium smegmatis* porin A (MspA) などの自然界に存在するポア形成膜タンパク質が用いられているが、それぞれポア直径が1.4, 1.2 nmと小さく、タンパク質などの巨大分子を計測することは困難である。また、直径5 nm以上の巨大なポアを形成する天然ポア形成膜タンパク質も存在するが、得られるポアサイズの制御が困難であること、検出可能な分子サイズがポアサイズに依存することから、天然ポア形成膜タンパク質を巨大分子のナノポアセンシングに応用することは困難である。そこで筆者らは、αHLなどの堅牢なポアを形成するポア形成膜タンパク質が有するβシート構造から構築されるβバレル構造に着目し、従来の天然ポア形成膜タンパク質に比べ巨大なサイズのポアを再現性良く構築可能な人工イオンチャンネルの開発を試みた²⁰⁾。

βバレル構造を有した人工イオンチャンネルを構築するために、以下の三つの設計概念に基づいてペプチドのアミノ酸配列をデザインした(図3a)。

1. 両親媒性βシートモチーフの形成によるβバレル構造体の構築 脂質二分子膜中においてペプチド同士が水素結合により強固な相互作用を形成しβバレル構造を構築するために、親水性アミノ酸である Ser と疎水性アミノ酸である Val を交互に配列し、βシートのそれぞれの面が親水性・疎水性に分かれるようになる。

2. シュノーケリング効果による膜貫通ペプチド構造体の安定化 リン脂質のグリセリン部分と Tyr が水素結合することにより、脂質二分子膜の親水層と疎水層の界面においてアンカーとして機能し、膜貫通ペプチドが脂質二分子膜内で安定して存在することが可能となる。

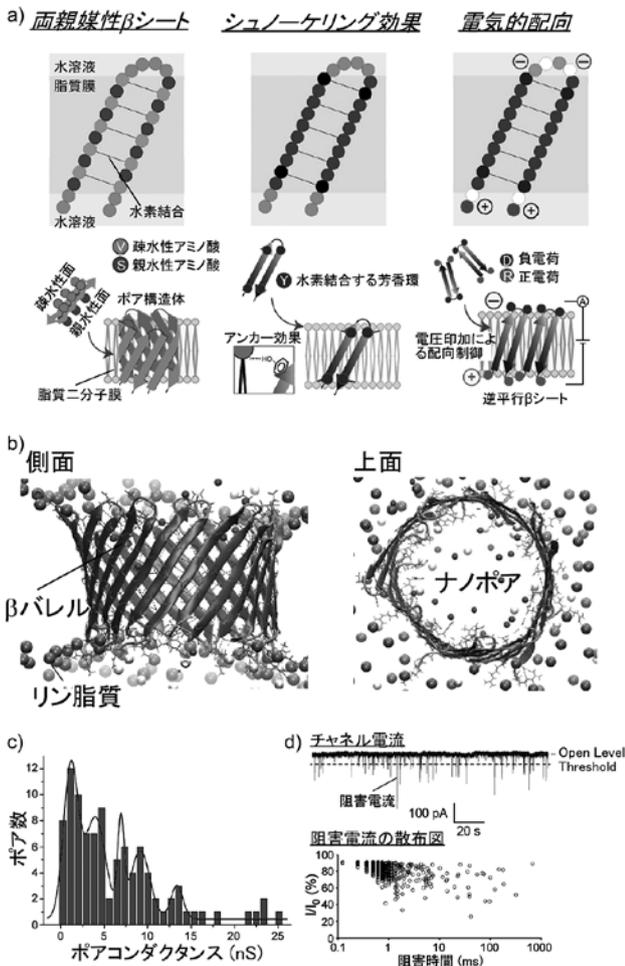


図3. *De novo*デザインペプチドによる人工イオンチャネル. a) *De novo*ペプチドの設計概念. b) MDシミュレーションによるポア形成の確認. c) 電流計測によって得られた人工イオンチャネルのポアコンダクタンスのヒストグラム. d) 人工イオンチャネルを用いた二本鎖DNAのナノポアセンシング.

3. 極性アミノ酸によるβシートモチーフの電氣的配向 βシートモチーフが脂質二分子膜内で逆平行に配向し、それぞれのペプチド同士が水素結合により強固な相互作用を形成するために、βシート構造体の両端に正と負に帯電したアミノ酸を配置した。ナノポアのチャネル電流計測では、脂質二分子膜を介して電圧を印加するため、βシート構造体が脂質二分子膜中で一方向に配向すると考えられる。

上記の設計概念を満たすペプチド構造体として28のアミノ酸によって構築されるSV28ペプチドを設計した²⁰⁾。本ペプチドによって構築されるポア形状をMDシミュレーションにより確認したところ、脂質二分子膜中で安定したβバレル構造を持ったナノポアが形成されることが確認できた(図3b)。

次に、イソアシルジペプチド法²¹⁾を用いてSV28を合

成し、液滴接触法を用いたチャネル電流計測により、SV28によって構築されるナノポアの評価を行った。その結果、7から18のSV28モノマーによって形成される、直径1.6から6.2 nmの堅牢なナノポアが形成されていることが確認できた(図3c)。さらに、本ナノポアのナノポアセンシングへの応用を試みた。その結果、従来の天然由来のポア形成膜タンパク質を用いたナノポアセンシングでは検出が困難であった長鎖二本鎖DNAのポア通過を電氣的に検出することに成功し、*de novo*デザインナノポア構造体を用いたナノポアセンサ開発の可能性を示すことができた(図3d)。

浸透圧エンジンによる分子ロボットの駆動

分子ロボットは、ボトムアップ的なアプローチによって生体分子により構築された「センサ」「知能」「アクチュエータ」が一つのコンパートメントに集積化された微生物様マイクロロボットである。現在、巨大リボソームをコンパートメントとした分子ロボットのアクチュエータとして、微生物を模倣した分子モーターによる駆動メカニズム^{22,23)}が検討されているが、微生物や細胞のように分子モーターを複雑、かつ精密に配列させることが困難であるため、分子モーターによる駆動力をロボットの移動に変換し、本体を一方向に移動させることには成功していない。

そこで筆者らのグループは、細胞の遊走メカニズムの一つである浸透圧エンジン²⁴⁾を応用した分子ロボットの駆動メカニズムを提案している²⁵⁾。浸透圧エンジンは、脂質二分子膜を介した浸透圧流によって移動力を発生させる。巨大リボソームにおいては、水は通過させるがイオンは通過させない脂質二分子膜の半透膜性によって、浸透圧差による浸透圧流が発生する。巨大リボソームの前後を塩濃度の異なる溶液で満たし、それぞれの膜に浸透圧差を作り出すことで、低塩濃度側から高塩濃度側へ浸透圧流が発生する。その結果、溶液の体積変化により膜が低塩濃度側に変形、膜変形に伴う、せん断力により巨大リボソームが移動する(図4a)。

筆者らは、巨大リボソームを捕捉し、捕捉された巨大リボソームの前後に塩濃度の異なる溶液を流すことが可能なマイクロ流体デバイスを開発、巨大リボソームの浸透圧エンジンによる駆動実験を行った。その結果、巨大リボソームが低塩濃度側へマイクロ流路内を一方向に駆動していることを確認し、分子ロボットのアクチュエータとして浸透圧エンジンを用いた駆動メカニズムの可能性を示すことができた(図4b)。しかしながら、本結果は浸透圧流から概算される巨大リボソームの移動速度に

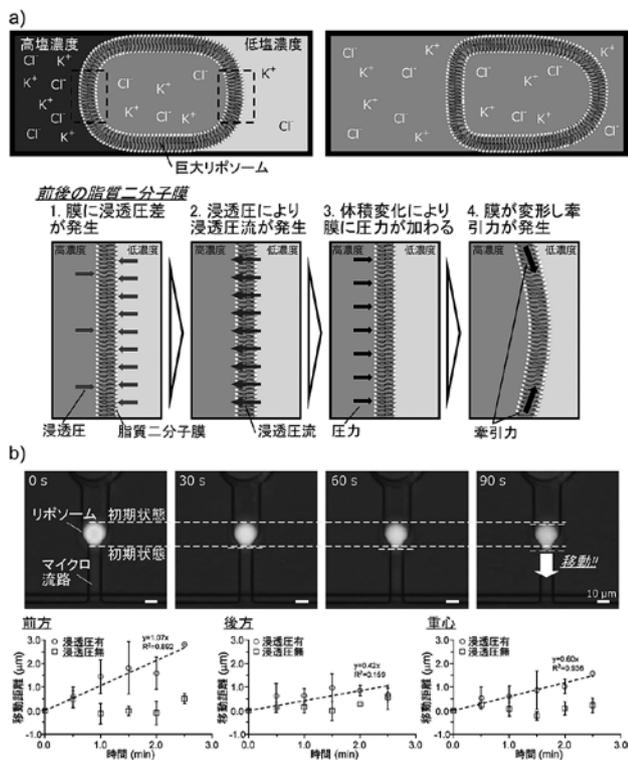


図4. 浸透圧エンジンによる巨大リポソームの駆動実験。a) 浸透圧エンジンによる駆動メカニズム。b) マイクロ流路内を移動する巨大リポソーム。

比べ10倍程度遅い速度しか得られなかった。今後は流路形状やリポソームと流路壁面の接着力を最適化することで、リポソームの変形による牽引力を効率良くリポソームの移動に変換することが可能なシステムの開発を目指す。

おわりに

本稿では、筆者らのグループで行っている「人工細胞膜」「人工イオンチャネル」「分子ロボティクス」に関する最近の研究成果について概説した。ボトムアップ的なアプローチによって構築されるこれらのシステムは、微細加工技術、ペプチド工学、マイクロ流体制御技術など

を用いることで、従来のシステムに比べ、シンプルなデザイン・簡易な手法で構築することが可能である。そのため、これらの技術を用いることで生体材料を用いたバイオデバイスの実用的な応用を幅広い分野において実現可能となると確信している。

今後は、筆者らのグループでこれまでに開発してきたナノポアセンシングによるDNAコンピューティングのデコーディング技術等と組み合わせることで、より高度な診断手法・ロボット技術・プローブ顕微鏡など本手法を応用した新たなシステムの創製を目指す。

文献

- 1) Buddingh, B. C. and van Hest, J. C. M.: *Acc. Chem. Res.*, **50**, 769 (2017).
- 2) Kansy, M. *et al.*: *J. Med. Chem.*, **41**, 1007 (1988).
- 3) Murata, S. *et al.*: *New Generat. Comput.*, **31**, 27 (2013).
- 4) Hagiya, M. *et al.*: *Acc. Chem. Res.*, **47**, 1681 (2014).
- 5) Kawano, R.: *ChemPhysChem*, **19**, 359 (2018).
- 6) Shoji, K. and Kawano, R.: *Micromachines*, **11**, 788 (2020).
- 7) Funakoshi, K. *et al.*: *Anal. Chem.*, **78**, 8169 (2006).
- 8) Kawano, R. *et al.*: *Sci. Rep.*, **3**, 1995 (2013).
- 9) Tsuji, Y. *et al.*: *Anal. Chem.*, **85**, 10913 (2013).
- 10) Watanabe, H. *et al.*: *Anal. Chem.*, **89**, 11269 (2017).
- 11) Sekiya, Y. *et al.*: *Analyst*, **143**, 3540 (2018).
- 12) Sekiya, Y. *et al.*: *ACS Appl. Bio Mater.*, **2**, 1542 (2019).
- 13) Hiratani, M. *et al.*: *Anal. Chem.*, **89**, 2312 (2017).
- 14) Ohara, M. *et al.*: *ACS Synth. Biol.*, **6**, 1427 (2017).
- 15) Hiratani, M. and Kawano, R.: *Anal. Chem.*, **90**, 8531 (2018).
- 16) Shoji, K. *et al.*: *ACS Nano*, **13**, 2606 (2019).
- 17) Shoji, K. *et al.*: *Anal. Chem.*, **92**, 10856 (2020).
- 18) Dou, J. Y. *et al.*: *Nature*, **561**, 485 (2018).
- 19) Lu, P. L. *et al.*: *Science*, **359**, 1042 (2018).
- 20) Shimizu, K. *et al.*: *ChemRxiv*, DOI: 10.26434/chemrxiv.12286337.v2. (2020).
- 21) Sohma, Y. *et al.*: *Chem. Commun.*, **124** (2004).
- 22) Sato, Y. *et al.*: *Sci. Robot.*, **2**, eaal3735 (2017).
- 23) Tanaka, S. *et al.*: *Commun. Phys.*, **1**, 1 (2018).
- 24) Stroka, K. M. *et al.*: *Cell*, **157**, 611 (2014).
- 25) Shoji, K. and Kawano, R.: *Lab Chip*, **19**, 3472 (2019).