

科研費  
KAKENHI

学術変革領域研究(A)

# Molecular Cybernetics NewsLetter

分子サイバネティクス ニュースレター

第5号  
vol.5

2022.03

研究最前線

リレーエッセイ

リポソームブートキャンプ報告

nano tech 2022出展報告

2022.1~2022.3 活動報告



Molecular  
Cybernetics

## 論文情報

著者: Sarah Triclin†, Daisuke Inoue†, Jérémie Gaillard, Zaw Min Htet, Morgan E. DeSantis, Didier Portran, Emmanuel Derivery, Charlotte Aumeier, Laura Schaedel, Karin John, Christophe Leterrier, Samara L. Reck Peterson, Laurent Blanchoin, Manuel Théry

タイトル: Self-repair protects microtubules from destruction by molecular motors

雑誌: *Nat. Mater.*, 2021, 20, 883-991 (DOI:0.1038/s41563-020-00905-0)

## 論文の紹介

微小管細胞骨格は $\alpha, \beta$ チューブリンが結晶格子のように規則的に並び繊維状タンパク質である。他方、生体分子モーター(キネシン・ダイニン)は、アデノシン三リン酸(ATP)を消費して、二つの微小管結合ドメインを交互に動かすことで、微小管上を2足歩行する。微小管と生体分子モーターは細胞の動力系として、細胞内物質輸送や細胞小器官のポジショニングなどを担っている。人間社会で例えると、微小管と生体分子モーターは道路と車の関係にある。車が道路を走ると、そのうち道路は摩耗していき、摩耗箇所は舗装工事により修復される。本論文では、生体分子モーターが細胞内道路である微小管を摩耗させること、その摩耗部位が自己修復され、結果的に微小管格子構造の新陳代謝が促進されていることを明らかにした(図1)。

今回の研究では、生体分子モーターが微小管の格子構造に与える影響を調べるため、キネシンまたはダイニンを固定したガラス基板上で微小管を並進運動させるIn vitro運動アッセイを行った(図2A左)。細胞内では微小管の大部分は不安定型のGDPチューブリンで構成されているため、本研究では、末端のみを安定化したGDP微小管を調製し、運動アッセイに使用した。GDP微小管を並進運動させると、いずれの生体分子モーターを使用した場合でも、微小管は15分以内に崩壊した(図2A右)。この崩壊は、微小管安定化剤であるTaxol存在下では観察されなかった。一方、安定型であるGTPチューブリンを系中に加えると、微小管は崩壊しなかった。蛍光修飾したGTPチューブリンを用いて同様の実験を行ったところ、GDP微小管の格子内にGTPチューブリンが挿入されていることが観察された(図2B)。この結果から、生体分子モーターにより微小管格子構造の破壊が促進され、遊離GTPチューブリンにより、その破壊部位が補填されている可能性が示唆された。

生体分子モーターが微小管の崩壊に直接的に影響を及ぼしていることを確かめるため、蛍光修飾した生体分子モーターを微小管に沿って歩行させ、個々の生体分子モーターの運動とGDP微小管の状態を蛍光観察した(図2C右)。生体分子モーターがGDP微小管上を運動するにつれ、微小管の格子からチューブリンが脱離する様子が蛍光強度の局所的減少により観察され、やがて微小管は運動アッセイで観察された結果と同様に崩壊した(図2C左)。微小管の崩壊は、生体分子モーターが高濃度の条件でより顕著に観察され、遊離GTPチューブリン存在下では抑制された。これらの結果から、生体分子モーターは直接微小管の格子構造を摩耗させ、遊離GTPチューブリンによって格子構造の自己修復が行われていると結論付けた。これまで、生体分子モーターは物質輸送などが主な細胞内機能だと考えられていたが、本研究により、微小管の格子構造の新陳代謝も行っていることが示唆された。

微小管と生体分子モーターは、微小な動力系として機能することから、マイクロデバイスや分子ロボットを駆動する構成要素としても期待されている。微小管・生体分子モーターを工学的に応用する際、その耐久性や寿命が懸念される。本研究により、これらの問題を解決する手段を提案できると期待される。

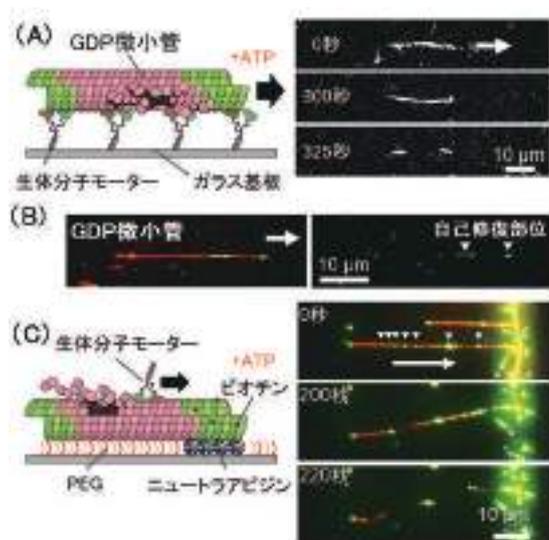


図2

(A) (左)生体分子モーター基板上におけるGDP微小管の運動アッセイの模式図および(右)崩壊する微小管の蛍光顕微鏡画像。(B) 微小管自己修復の蛍光顕微鏡画像。(C) (左) GDP微小管上を歩行する生体分子モーターの模式図、(右) 生体分子モーター(緑色のスポット)の走行とともに崩壊する微小管の蛍光顕微鏡画像。

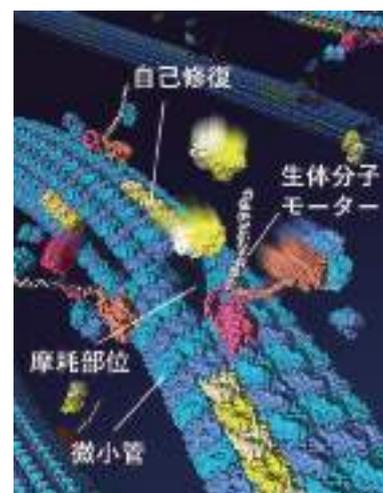


図1

生体分子モーターによる微小管格子構造の新陳代謝促進を表す模式図

## 著者情報

井上 大介

Daisuke Inoue

(九州大学大学院  
芸術工学研究院)



## 論文情報

著者: Hiroki Miyazako and Takaaki Nara

タイトル: Explicit calculation method for cell alignment in non-circular geometries

雑誌: Royal Society Open Science, Vol.9, No.1, 2022.

## 論文の紹介

近年、生物物理学や非平衡物理学の分野ではアクティブマターとよばれる能動的に自走する粒子や物質に注目が集まっている。特に、ネマチック液晶とよばれる配向性を示す棒状粒子の集団がつくる自走運動現象はアクティブネマティクスとよばれており、接着細胞や細胞骨格-分子モーター系における配向・流体現象の物理モデルとして研究されている。このような配向性を示すネマチック液晶集団にはトポロジカル欠陥とよばれる配向角度が定義できない特異点が生成されることが知られており(図1)、この欠陥がアクティブネマティクスにおける配向や流体現象を特徴づける。したがって、欠陥の位置を空間的に制御することによりアクティブネマティクスにおける配向や流体現象が制御できる可能性が考えられる。

トポロジカル欠陥の位置を制御する方法として、地形構造を用いるアプローチが考えられる。例えば、アクティブネマティクスを示す液晶集団の一例である紡錘形の接着細胞を円領域上に培養すると、細胞の増殖に伴って細胞は円の境界に沿って配向する。その結果、2個のトポロジカル欠陥が特定の位置に生じることが実験的・理論的に示されている[ G.Duclos *et al.*, *Nat. Phys.*, **13**, 58, 2017 ]。したがって、地形構造の形状を設計することで細胞集団におけるトポロジカル欠陥の位置を制御できることが期待される。しかしながら、先行研究では円領域の場合の配向角度や欠陥の生成位置の計算方法しか示されていない。そこで本論文は、任意の2次元領域における細胞集団の配向角度や欠陥の生成位置の計算法を与えることを目的とした。

本論文では、はじめに単位円板上における細胞集団の配向角度が複素対数関数によって表せることを示した。具体的には、(i)単位円内の欠陥による複素ポテンシャルと(ii)円に関して鏡像の位置に配置した欠陥による複素ポテンシャルの和で配向角度を表現することができることを示した(図2)。次に、等角写像を用いることによって単位円板に対する配向角度の計算式を円ではない閉領域における配向角度の計算式に拡張した(図3)。導出した配向角度の計算式は、欠陥の位置を表す変数や形状を表す等角写像を陽に含む一般的な計算式となっている。この公式の利点に基づき、細胞集団の配向に伴う弾性自由エネルギーやその微分値の計算式を導出し、さらに弾性自由エネルギーが極小となるような最安定な欠陥の生成位置を求める最急降下法アルゴリズムを提案した(図4)。

本論文で提案した計算法は、細胞集団における配向や欠陥位置を制御するための地形構造の設計や細胞骨格-分子モーター系を駆動源とする分子ロボットの変形運動の計算への応用が期待される。



図1  
トポロジカル欠陥の模式図

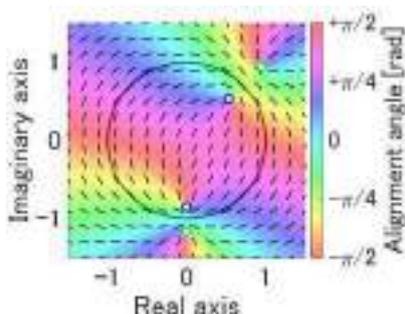
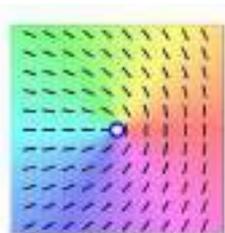


図2  
単位円板における配向角度の計算例  
(青丸と緑丸はそれぞれ単位円板内の欠陥と鏡像の位置に配置された欠陥を表す)

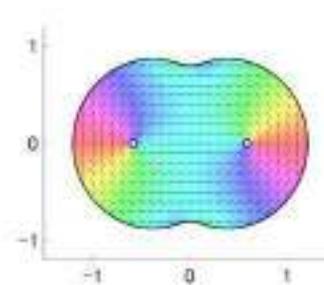


図3  
円ではない閉領域における配向角度の計算例

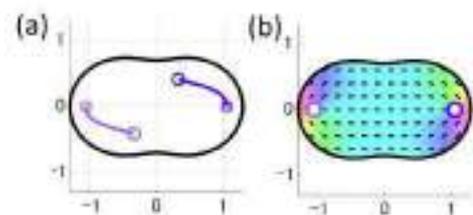


図4  
最急降下法による欠陥の生成位置の計算例  
(a) 欠陥位置の軌跡。丸印と四角印はそれぞれ初期位置と収束後の欠陥位置を表す。(b) 最安定な欠陥位置と配向角度

## 著者情報

宮廻 裕樹

Hiroki Miyazako

(東京大学大学院  
情報理工学系研究科)



## 論文情報

著者: Arif Md. Rashedul Kabir, Tasrina Munmun, Tomohiko Hayashi, Satoshi Yasuda, Atsushi P. Kimura, Masahiro Kinoshita, Takeshi Murata, Kazuki Sada, Akira Kakugo

タイトル: Controlling the rigidity of kinesin-propelled microtubules in an *in vitro* gliding assay using the deep-sea osmolyte trimethylamine *N*-oxide

雑誌: ACS Omega, 2022, 7, 4, 3796–3803. (DOI: 10.1021/acsomega.1c06699)

## 論文の紹介

生体分子モータータンパク質キネシンとそれに関連する糸状タンパク質微小管(MT)は、近年、重要なナノテクノロジーへの応用を見出しています。インビトロ滑走アッセイでキネシンモーターによって推進されるMTの剛性は、輸送、センシング、ソーティング、分子ロボティクスなどのさまざまなアプリケーションでのMTおよびキネシンの利用の成功を決定する重要な指標です。キネシン推進MTの剛性を調整することが重要でした。この作業では、*in vitro* 滑走アッセイでキネシン推進MTの剛性を調整するための簡単な戦略を報告します。天然の浸透圧調節物質トリメチルアミンN-オキシド(TMAO)を使用することにより、*in vitro* 滑走アッセイでキネシンによって推進されるMTの剛性を可逆的に調節できることを示します(Figure1)。キネシンモーターによって推進されるMTのコンフォメーションは、TMAOの存在下で「直線」から「湾曲」または「座屈」状態に変化しました(Figure2)。グライディングアッセイでTMAOの濃度を変化させることにより、MTの剛性の尺度である持続長が広範囲にわたって変調されました(Figure3)。この戦略に基づいて、1.5Mの濃度でTMAOを使用することにより、MTの持続長を約8分の1に短縮できます。さらに、キネシン推進MTの剛性の低下は、TMAOを排除することで回復できることがわかりました。*in vitro* 滑走アッセイから(Figure4)。MTの剛性のTMAOを介した変化は、TMAOの存在下でMTに沿ってキネシンによって及ぼされる力の不均一性によって説明されます。この作業は、キネシン推進MTの剛性をその場で可逆的に調節するための簡単な戦略を提供します。これにより、生体分子モーターキネシンおよびMTのさまざまな分野での用途が広がります。

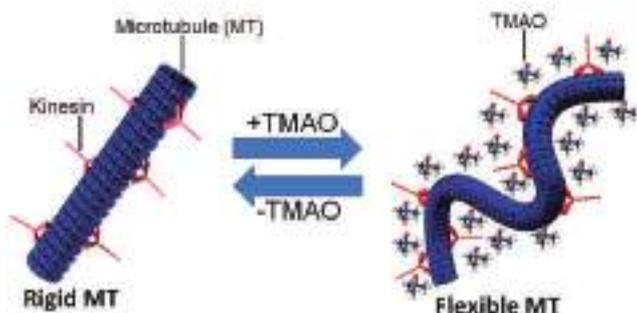


Figure 1.

Schematic representation shows reversible regulation of the rigidity of MTs using TMAO in an *in vitro* gliding assay. Here, '+TMAO' and '-TMAO' indicates the addition and elimination of TMAO to and from the gliding assay, respectively.



Figure 4.

Fluorescence microscopy images show reversible regulation of the rigidity of MTs using TMAO in an *in vitro* gliding assay on kinesin motors. MTs were straight and rigid in the absence of TMAO (left). The rigid MTs became flexible and buckled in the presence of 1200 mM TMAO (middle). Upon elimination of TMAO, the buckled, flexible MTs regained their straight conformation and rigidity (right). Scale bar: 20  $\mu\text{m}$ .

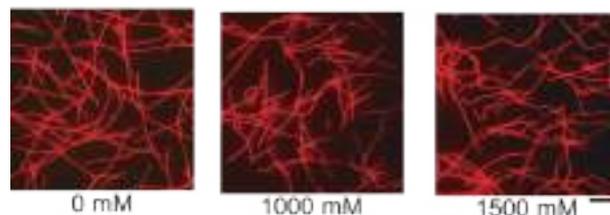


Figure 2.

Fluorescence microscopy images of MTs, propelled by kinesins in an *in vitro* gliding assay in the absence (0 mM) and in the presence (1000 and 1500 mM) of TMAO. Scale bar: 5  $\mu\text{m}$ .

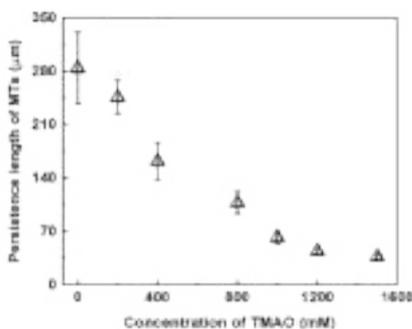


Figure 3.

Effect of TMAO on the persistence length of the MTs, propelled by kinesins, in an *in vitro* gliding assay.

## 著者情報

コビル アリフ  
ムハンマド ラセドウル

Arif Md. Rashedul Kabir

(Faculty of Science  
Hokkaido University)



## 論文情報

著者: Yusuke Takezawa,\* Shiori Sakakibara, and Mitsuhiko Shionoya\*  
 タイトル: Bipyridine-Modified DNA Three-Way Junctions with Amide Linkers:  
 Metal-Dependent Structure Induction and Self-Sorting  
 雑誌: *Chem. Eur. J.* **2021**, *27*, 16626–16633. (DOI: 10.1002/chem.202102977)  
 (selected as Front Cover)

## 論文の紹介

DNA三叉路分岐構造(3WJ)は、3本のDNA鎖からなる構造体であり、DNAナノ多面体やネットワーク構造、DNAヒドロゲルなどを構築するためのビルディングブロックとして広く用いられている。我々は金属配位を駆動力として、構造や機能を変換できる機能性DNAの構築を進めてきた。本研究では、アミドリンカーを介してビピリジン(bpy)配位子を導入したbpy修飾ヌクレオシド(U<sub>bpy</sub>)を設計・合成し、Ni<sup>II</sup>イオンに反応したDNA三叉路構造の安定化や構造変換、セルフソーティングを行った。

DNA三叉路分岐構造においては、ヌクレオシドのリボース環の2'位が分岐中央部を向いている。そこで、bpy配位子を2'位に連結した人工ヌクレオシドを設計した。先行研究(*Angew. Chem., Int. Ed.*, 2013; *Chem. Sci.*, 2016)ではクリック反応やカルバメート結合により配位子を導入したが、本研究では化学的に安定なアミド結合を介した修飾ヌクレオシドU<sub>bpy</sub>を合成した(図1)。U<sub>bpy</sub>を中央に含むDNA鎖(L1, L2, L3)を合成し、その自己集合によりbpy修飾3WJ L1L2L3を構築した。L1L2L3の熱安定性は、1当量のNi<sup>II</sup>イオンを添加すると著しく向上した(ΔT<sub>m</sub> = +17.7 °C)。これは、分岐構造中央部でNi<sup>II</sup>(bpy)<sub>3</sub>錯体を形成し、金属配位結合により3本の鎖がクロスリンクされたことによる。

次に、bpy修飾DNA鎖(L1, L2, L3)と天然相補鎖(P4, P5, P6)を用いて、金属錯体形成を駆動力としたDNA二重鎖と3WJとの間の構造変換を行った(図2)。非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果から、これらのDNA鎖の混合物は、Ni<sup>II</sup>イオン非存在下では二重鎖(L1P4, L2P5, L3P6)のみを形成することが分かった。一方、1当量のNi<sup>II</sup>を加えてアニリングすると、2種類の3WJ構造(L1L2L3-Ni<sup>II</sup>およびP4P5P6)が約80%の収率で形成することが確認された。さらに、キレート試薬(EDTA)によってNi<sup>II</sup>を除去すると、もとの二重鎖が形成した。このようにNi<sup>II</sup>(bpy)<sub>3</sub>錯体の形成に基づき、「二重鎖⇌三叉路構造」の相互変換に成功した。

さらに、bpy修飾DNA鎖(L1, L2, L3)とオリゴチミジンを付加した非修飾DNA鎖(S1', S2', S3')を用いて、金属イオンによる3WJのセルフソーティングを試みた(図3)。セルフソーティング(自己選別)とは、複数種の混合物から同種の分子同士のみが自己集合する現象である。Ni<sup>II</sup>非存在下では、電気泳動分析で少なくとも3本のバンドが見られ、0-3個のbpy配位子を含む3WJ(S1'S2'S3', S1'S2'L3, S1'L2L3など)がランダムに形成されたことが示された。1当量のNi<sup>II</sup>を添加すると、金属錯体型3WJ(L1L2L3-Ni<sup>II</sup>)と非修飾3WJ(S1'S2'S3')に帰属されるバンドのみが観測され、2種類の3WJに自己集合したことが分かった。この結果は、Ni<sup>II</sup>(bpy)<sub>3</sub>錯体形成を鋳型とした3WJのセルフソーティングが起きたことを示すものである。

以上のように、bpy配位子を導入したDNA鎖を用い、鎖間でのNi<sup>II</sup>(bpy)<sub>3</sub>錯体の形成によるDNA三叉路構造の安定化、構造変換、およびセルフソーティングを実現した。本実験では3WJの融解温度が高くアニリングが必要であったが、塩基長や配列の調整により、等温下での構造誘起も可能になると考えられる。DNAナノ構造体を構成する分岐構造にU<sub>bpy</sub>ヌクレオチドを導入することで、金属イオンに反応して構造・機能変換が可能なDNAナノ材料が開発できると期待される。今後は、DNAプロセッサ・アクチュエータの部品としても活用していきたい。

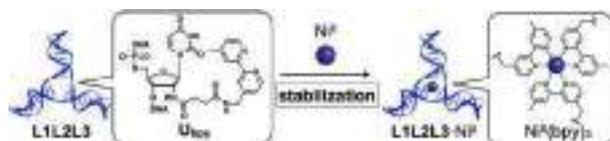


図1

Ni<sup>II</sup>金属錯体形成による bpy 修飾 DNA三叉路構造の安定化

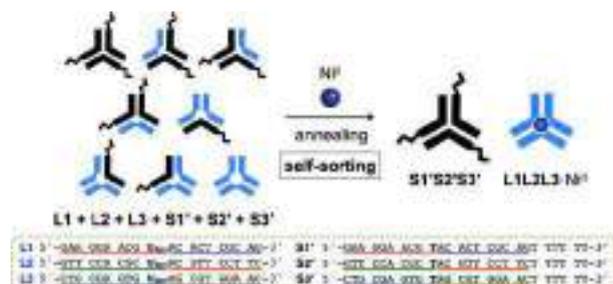


図3

Ni<sup>II</sup>(bpy)<sub>3</sub> 形成を駆動力とした DNA 三叉路のセルフソーティング

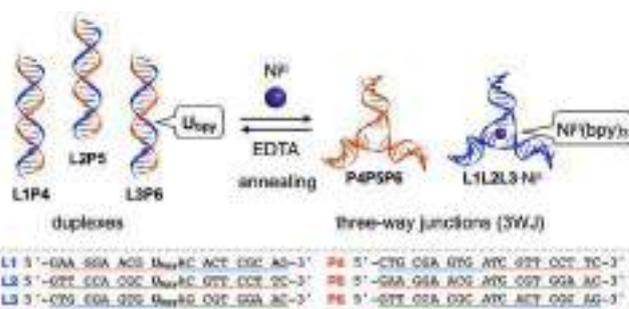


図2

Ni<sup>II</sup>(bpy)<sub>3</sub> 形成を駆動力とした DNA 三叉路の構造変換。  
 天然相補鎖 P4, P5, P6 にはミスマッチ塩基(斜体)を  
 導入し、安定性を調節した。

## 著者情報

竹澤 悠典

Yusuke Takezawa

(東京大学大学院  
 理学系研究科)



## 論文情報

著者: Yusuke Sato, Masahiro Takinoue

タイトル: Capsule-like DNA Hydrogels with Patterns Formed by Lateral Phase Separation of DNA Nanostructures

雑誌: *JACS Au*, 2022, 2, 159–168. (DOI: 10.1021/jacsau.1c00450)

## 論文の紹介

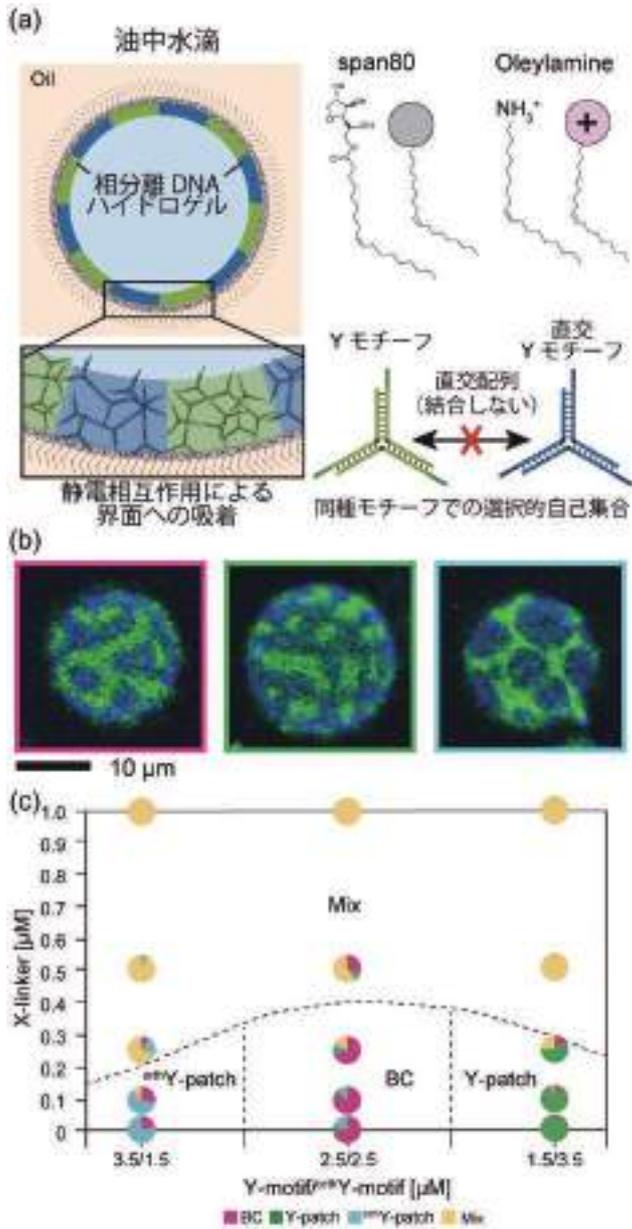
相分離とは、均質な相が複数の異なる相に分離し、物質の分布が不均一になる物理現象である。水溶性分子が水系溶媒中で示す相分離は液-液相分離(LLPS)と呼ばれ、水中に液体(あるいはハイドロゲル)のような特徴を持つ集合体の形成をもたらす。LLPSは現象として興味深いだけでなく、生体分子の抽出やパターンニングなど、技術としても活用されている。中でも生体分子のLLPSは人工細胞の構築に応用されており、油中水滴や細胞サイズ脂質ベシクル(GUV)内での転写反応など、様々な研究が報告されている。

人工細胞の研究では、細胞内部の機能に着目することが多いが、細胞内外を隔てるためのコンパートメント(カプセル)構造もまた重要である。多くの人工細胞研究では、カプセルとして油中水滴やGUVを採用してきた。生細胞のコンパートメント類似構造であるGUVでは、脂質二分子膜の側方相分離により、ラフト仮説で提唱されているような脂質膜のドメイン構造が形成される。生細胞膜でのドメイン形成は細胞膜に不均一性をもたらす、膜上分子の集積やシグナル伝達などに寄与していると考えられている。これまでに、温度や膜張力、脂質組成を変化させることで、GUV膜の側方相分離を変化させる研究が報告されている。しかし、分子デザインのアプローチによりカプセル構造表面で生じる側方相分離を制御することは、技術的に困難であった。

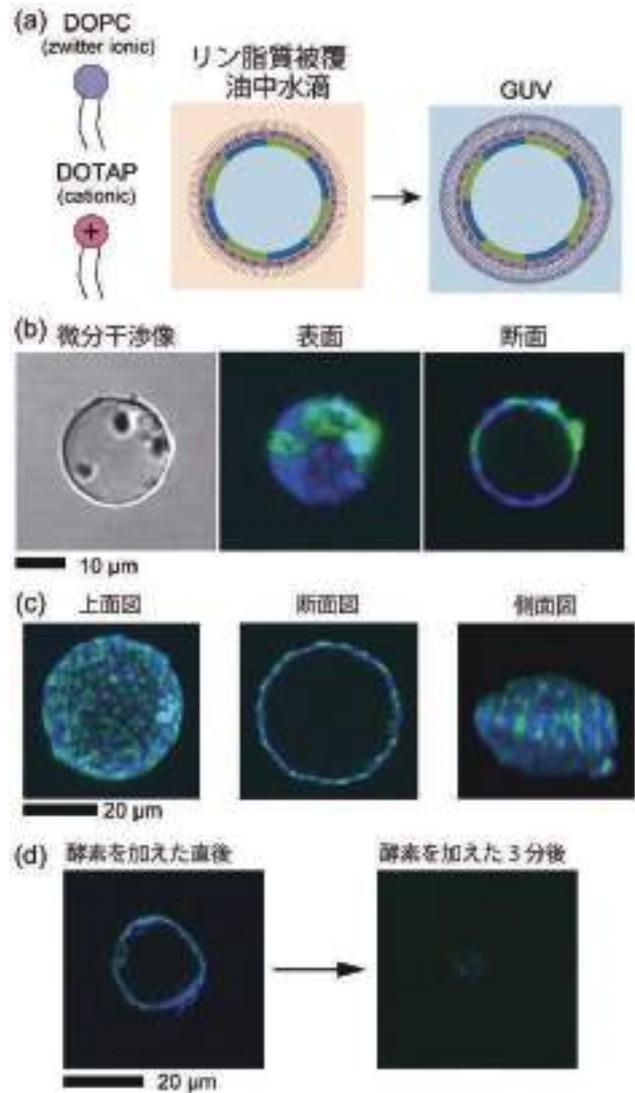
今回の研究では、配列設計DNAで構成されたカプセル構造表面の側方相分離の制御を試みた。我々は過去の研究で、DNAナノ構造がLLPSを示し、温度に応じて液体やゲル状に自己集合することを独自に見出した。また、LLPSで形成された液滴は、配列設計により選択的・排他的に融合することを報告した。これらの知見を発展させ、2次元界面上でDNAのLLPSを引き起こすことで、カプセル構造表面の側方相分離を制御できるのではないかと考えた。具体的には、マイクロサイズの油中水滴の界面を鋳型とし、界面上にDNAナノ構造を吸着させ、カプセル状のDNAハイドロゲルを形成する方策をとった(図1a)。DNAは負に帯電しているため、カチオン性(オレイルアミン)およびノニオン性界面活性剤(Span80)の混合物を用いて油中水滴を調製することで、DNAを界面に吸着させることができる。そして、互いの配列が直交した2種類のY字型DNAナノ構造(Yモチーフと直交Yモチーフ)を界面に吸着させ、界面上でLLPSを誘起させた(図1a)。DNAナノ構造を含む油中水滴をアニリングすると、側方相分離に由来するパターンを持った「相分離DNAカプセル」が形成されることが示された(図1b)。カプセル表面には、大別して3種類のパターンが形成され、直交性を解消するようなDNAナノ構造を新規に加えたり、各ナノ構造の混合比を変えたりすることで、形成されるパターンを様々に変化させられることを示した(図1c)。この成果は、細胞膜のような不均一性を持つカプセル構造を、人工的に設計・制御するための足掛かりになるものと期待できる。

さらに、相分離DNAカプセルは、油中水滴の界面だけでなく、GUVの内側膜上にも形成可能なことを示した。これは、油中水滴をカチオン性脂質(DOTAP)と両イオン性脂質(DOPC)で調製し(図2a)、界面通過法により油中水滴をGUV化することで実現された(図2b)。また、相分離DNAカプセルは油中水滴やGUVなどの鋳型から取り出すこともでき、取り出し後も中空のカプセル構造を保つことが示された(図2c)。そして、取り出されたDNAカプセルは酵素反応と組み合わせることが可能で、エキソヌクレアーゼを作用させることでカプセルを分解することができた(図2d)。この結果は、取り出された相分離DNAカプセルの表面は溶液中の分子と相互作用できることを示しており、様々な分子デバイスとの組み合わせによるカプセル構造の機能化を示唆する成果である。

本研究で構築した相分離DNAカプセルは、人工細胞・分子ロボットの研究開発における新たな筐体構造を提案するものと考えている。DNAを利用することで、ナノ・マイクロ構造の構築にとどまらず、情報処理分子デバイスや刺激に応答して変形する分子デバイスを作ることでもできる。特に、側方相分離でカプセル表面に形成されたドメインを利用することで、任意のDNA分子デバイスを集積することが期待できる。したがって、DNAデバイスと相分離DNAカプセルを組み合わせることで、将来的には、刺激に応答した異方性を持った運動や、標的を認識してカプセルの中身を放出するなど、様々な発展が期待される。



**図1**  
相分離 DNA カプセル形成の模式図と実験結果。  
(a) 実験系の模式図。  
(b) 油中水滴界面に形成された相分離 DNA カプセル表面の顕微鏡画像。  
(c) カプセル表面に形成されるパターンの相図。



**図2**  
GUV 内側膜に形成された相分離 DNA カプセルと  
鑄型から取り出されカプセル。  
(a) GUV 内 側膜上での相分離 DNA カプセル形成模式図。  
(b) 内側膜上に相分離 DNA カプセルを持つ GUV の 顕微鏡画像。  
(c) 水中に取り出された相分離 DNA カプセル。  
(d) 酵素による DNA カプセルの分解。

著者情報

佐藤 佑介

Yusuke Sato

(東北大学 学際科学  
フロンティア研究所)



## 論文情報

著者: Jun-ichi Mihara, Kenzo Fujimoto

タイトル: Photo-cross-linking of DNA using 4-methylpyranocarbazole nucleoside with thymine-base selectivity

雑誌: *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2021, 45, 9860 - 9866

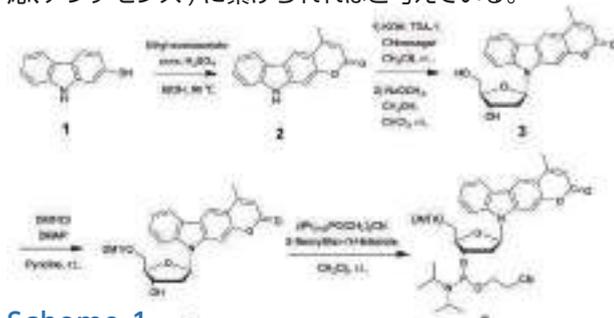
(DOI: 10.1039/D1OB01621K)

## 論文の紹介

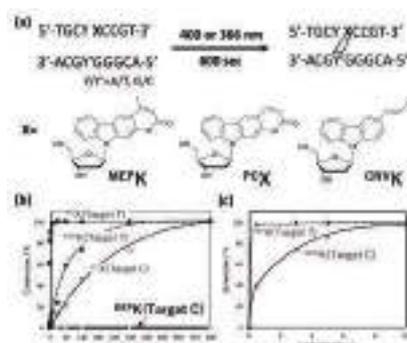
2020年のノーベル化学賞を受賞したCRISPR-Cas9技術に代表される様にゲノム操作のための新しい遺伝子工学的手法の開発は、幹細胞工学、遺伝子治療、組織や動物の疾患モデル、遺伝子組み換え植物の技術など幅広い用途・分野において新産業を産み出すかに直結している。そこで、我々はこれまで時空間制御が可能となる光化学的な核酸類操作法の開発をおこなっており、「光ライゲーション」と「光クロスリンク」という2つの方法論を開発し報告している。特に、光クロスリンク反応はDNAもしくはRNA二本鎖間を超高速で架橋することができ、代表素子であるシアノビニルカルバゾールヌクレオシド(CNVK)は約1秒の紫外光照射で相補的DNA、またはRNA鎖中のチミンおよびシトシンなどのピリミジン塩基と光架橋することができる。従来知られているソラレンやクマリンなどと比較し、高い光反応性を有していることから、CNVKは国内外で既に販売されている。この超高速光架橋能を有する人工核酸を用いた核酸類操作法の利点として①反応の制御が容易、②温度、pH、塩強度などの至適条件がなく、幅広い条件下での利用が可能、③試薬の添加が不要、という点が挙げられる。また最近では400nmの光を数秒間照射することにより、相補鎖中のピリミジン塩基と[2+2]光環化反応を介して光クロスリンクできる超高速光架橋素子ピラノカルバゾール(PCX)の開発にも成功している。

今回の研究は、もともと合成が困難であったピラノカルバゾール(PCX)の合成法の見直しから始めたところ「思いもかけない特性」を持つ光架橋素子と出会うことになったのでその経緯から紹介する。PCXの合成収率がトータルで10%と低く、反応で使用するルイス酸が目的物と錯体を形成してしまうため収率が低くなっていると推測した。また、ピラノカルバゾールはどの溶媒にも溶解しにくい物性を持っており精製が難しい問題があった。そこで、ピラノカルバゾールの4位にメチル基をもつメチルピラノカルバゾール(MEPK)であれば、一般的な芳香族骨格形成法として知られるペヒマン縮合を利用して高収率で合成できるのではと考え、実際にメチルピラノカルバゾール(MEPK)をトータル70%というかなり高収率で合成できることを見出した(Scheme1)。次にこのMEPKを用いたオリゴ核酸中での光架橋能を評価すると400nmの光を数秒間照射することにより相補鎖中のチミンと光架橋することを見出した。一方でいくら長時間光照射をしても相補鎖中のシトシンと光架橋しないという思いもよらない結果が得られた。(Figure1) この結果の一般性を確認するため、MEPKの周辺配列を変化させた16種類のオリゴ核酸を用いて光架橋能を解析したところ、チミンとは超高速(秒単位)で光架橋するのに対してシトシンとは全く光架橋しないことを見出した。これまでに開発済みのPCXやCNVKはシトシンと容易に光架橋することからMEPK固有の反応特性であることが確認された(Figure2)。なお本研究成果は*Organic & Biomolecular Chemistry*誌の表紙掲載された(Figure3)。

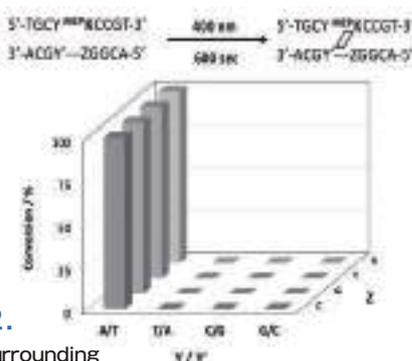
本研究で思いもかけずに開発に成功したチミン選択的な光架橋素子を用いれば、より正確な核酸操作が可能と考えられる。例えば細胞内での核酸類操作の際に問題とされているオフターゲット効果の軽減にも有効ではないかと考えられる。操作波長の長波長化・高速化により遺伝子検出の感度が高まり、RNA機能の解明や細胞内での利用、核酸医薬開発など、光クロスリンクの利用の幅がさらに広がるのではと期待している。最後に、本分子サイバネティクス領域であれば核酸情報の正確な光操作(DNA鎖交換反応、アンチセンス)に繋がればと考えている。



**Scheme 1.**  
4-methylpyranocarbazole nucleoside (MEPK)



**Figure 1.**  
Photo-cross-linking of MEPK, PCX and CNVK in dsODN. (a) Schematic drawing of the photo-cross-linking. (b) Time course of photo-cross-linking of ODN duplexes containing MEPK or PCX at 400 nm irradiation, (c) Time course of photo-cross-linking of ODN duplexes containing CNVK at 366 nm irradiation



**Figure 2.**  
Effect of surrounding nucleobases in MEPK on its photoreactivity



**Figure 3.**  
Front cover of OBC

## 著者情報

藤本 健造

Kenzo Fujimoto

(北陸先端科学技術  
大学院大学)



## 論文情報

著者: Yusuke Sakai†, Gerrit D. Wilkens†, Karol Wolski, Szczepan Zapotoczny, and Jonathan G. Heddle\* †共同筆頭著者  
 タイトル: Topogami: Topologically Linked DNA Origami  
 雑誌: ACS Nanoscience Au, 2, 1, 2022 doi: 10.1021/acsnanoscienceau.1c00027

## 論文の紹介

DNAは化学合成が容易で、自己組織化を自在に設計できるため、分子機械のプラットフォームや論理演算回路を設計・構築する素材として盛んに研究が行われている(DNAナノテクノロジー)。DNA折り紙法(DNAorigami)は「足場(scaffold)DNA」と呼ばれる長い一本鎖DNAを、多数の短い「留め具(staple)DNA」との二重鎖形成によって強制的に折りたたみ、任意のナノ構造体を自己組織化させるDNAナノテクノロジーである。数千塩基対に渡るウイルスサイズの巨大なDNA超分子を容易・高効率に設計・構築できる。scaffoldは主にM13ファージやその誘導体を用いて調製されるが、構築するDNA構造体の要請に応じて、その長さや配列をカスタマイズする方法が多数報告されている。ヤギェウォ大学マウオポルスカバイオテクノロジーセンターの酒井・Wilkens・Heddleらは、酵素的手法によってカテナン状のscaffoldを高効率に構築し、予めトポロジ的に結合されたDNA折り紙構造体「Topogami」を構築する手法を初めて報告した。コンセプトをカテナン状の靴紐で結ばれた一対の靴で表現したイラストが掲載号の表紙を飾った(図4)。

まず、図1左上に示すようなプラスミドベクター「pTopoScaf」を構築した。pTopoScafはscaffoldとなる二つのドメイン(黄・緑)に挟まれる形で、Tn3リゾルバーゼの認識配列(青矢印)を同方向(parallel)に配置している。大腸菌から抽出した超螺旋構造のpTopoScafにTn3リゾルバーゼを作用させると、Tn3認識配列同士的位置特異的なDNA組換え反応によって、カテナン化された環状DNAのペアが生成される(図1上段)。更に、Nt.BspQIニッカーゼを用いてカテナン化されたそれぞれの環状DNAに位置特異的にニック(一本鎖切断部位)を導入し、エキソヌクレアーゼによって片方の鎖を分解することによってトポロジーを維持したまま一本鎖化する(図1右)。尚、この時わずかに残った未反応のプラスミドはDNA二重鎖の両方の鎖にニックが入るため、エキソヌクレアーゼによって分解されて完全に除去される。精製されたscaffoldのカテナンをstapleと混合し、徐冷による一般的なプロトコルによって自己組織化させることで、任意の形状のカテナン化DNA折り紙構造体「Topogami」が出来上がる。

実験の結果、Tn3リゾルバーゼによるカテナン化の効率は非常に高く、基質となるpTopoScafの大部分がカテナン化されたことが制限酵素産物のアガロースゲル電気泳動や原子間力顕微鏡観察(AFM)(図2)によって確かめられた。また、一部残った未反応のpTopoScafも、続くニッカーゼ/エキソヌクレアーゼ処理の過程で除去することに成功した。

取得されたカテナン化scaffoldを用いて、通常徐冷によって長方形のDNA折り紙のペアを構築することに成功した(図3)。ただし、AFM像上において、大半が期待通りの長方形のペアとして観察された一方で、片方の長方形のみが分離しているものも一定量(完全体の半分程度)見られた(図3C)。この原因には(i)エキソヌクレアーゼ反応が十分でなく一本鎖化が不完全だった、(ii)自己組織化やAFM測定までの保管中にscaffoldが部分分解してしまった、(iii)AFM測定中に片方の構造体が基盤から遊離してしまい、観察できなかったなどの可能性が考えられる。なお、TopogamiはTn3認識配列からなるscaffold同士の二重鎖部分を持つ(図3Bの矢印)。この点については、より認識配列の短いTn3の変異体の活用や、事後的なTn3認識配列の除去などによって、Topogamiの活用の幅がより広がると見込まれる。

カテナンのようにトポロジ的に結合されたDNAナノ構造体の構築は、分子機械を構築する基盤技術として多数のグループが研究している。既報では、数百塩基程度の短いDNAをカテナン化する手法や、専用設計したDNA折り紙構造体を事後的に複合体化・解離させることでカテナン状にする手法が、繰り返し提案されてきた。本研究によって、数千塩基に渡る長さの環状一本鎖DNAのカテナン形成が初めて達成された。カテナン化されたscaffoldを用いてDNA折り紙を構築するため、カテナン化のための特別な設計や手順が不要である点が本手法の特長である。Topogamiは、DNA折り紙法を用いた複雑な分子機械を構築するための基盤として有用であり、今後の研究の展開が期待される。

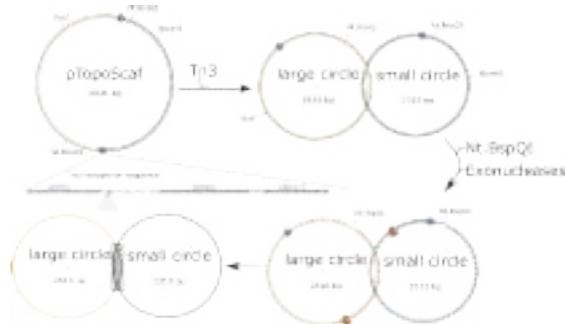


図1 Topogamiのscaffold構築スキーム (原著論文よりCC-BYライセンスに基づき再掲)

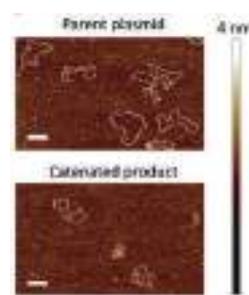


図2 Tn3リゾルバーゼ反応前後のプラスミドのAFM像。観察のため、ニック導入により超螺旋構造は弛緩されている。スケールバーは300nm。(原著論文よりCC-BYライセンスに基づき再掲)



図3 Topogamiの構築。水平方向走る二重鎖を束ねた2つの長方形がscaffoldのトポロジ的な結合によって結ばれている。なお、右の長方形は両者の識別のために中央に切れ目を持つ(A)。TopogamiのAFM像(BC)。スケールバーは100nm。(原著論文よりCC-BYライセンスに基づき再掲)

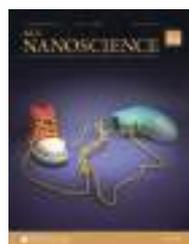


図4 掲載号(ACS Nanoscience 2022年2巻1号)の表紙。デザイン: G. Wilkens。ACSの許可を得て掲載。

## 著者情報

酒井 雄介

Yusuke Sakai

(国立研究開発法人  
理化学研究所)



(注)本紹介論文の研究はヤギェウォ大学在籍当時に行ったものです。

## 論文情報

著者: Masaaki Tamba, Keiji Murayama, Hiroyuki Asanuma, Takashi Nakakuki  
 タイトル: Renewable DNA Proportional-Integral Controller with Photoresponsive Molecules  
 雑誌: *Micromachines* **2022**, 13 (2), 193; <https://doi.org/10.3390/mi13020193>

## 論文の紹介

過去 20 年にわたる DNA ナノテクノロジーの絶え間ない進歩により、細胞サイズの極小かつ精巧な分子機械の実現が可能となった。近年、様々な分子デバイスを集積したスマートな分子システムの研究開発が盛んに行われている。代表的な例であるアメーバ型分子ロボット (文献 [10]) は、リン脂質二重膜でできたフレイムを持ち、その内部の反応場にはキネシンと微小管によるアクチュエータ機構や分子デバイスをつなぐ DNA 演算機構が実装されている。リボソーム本体は、外部からの紫外線照射刺激に応答して自律的に変形するように設計されており、システム全体は、センサ信号に基づいてコントローラがアクチュエータの動作を制御するメカトロニクスロボットのような構造になっている。分子ロボットにおける主要な制御問題は、アクチュエータの動作を所望のレベルに維持することである。そのためには、DNA 反応系に実装されたフィードバック制御器が必要となる。

分子フィードバック制御回路を設計するための有力な方法論として、触媒反応・分解反応・消滅反応の3つの基本反応を組み合わせ、擬似的な線形要素 (加減算, ゲイン, 積分要素など) を構築し、それらを組み合わせることで全体システムを設計する手法が提案されている (以後, 便宜上, 「擬似線形化手法」と呼ぶ)。擬似線形化手法を用いることで、比例積分 (PI) 制御器やスライディングモード制御器などの制御理論に基づく実用的な制御器を設計することができる。

一般に、DNA 回路の駆動時間は燃料 DNA 鎖の有限性による制約を受ける。分子フィードバック制御回路も燃料 DNA 鎖を連続的に消費しながら駆動するため、制御性能は時間経過とともに徐々に低下していく。この分子フィードバック機構に見られる現象は、「有限時間レギュレーション問題」として報告されている (文献 [16])。本論文で扱う DNA-PI 制御器も同じ問題を抱えており、反応場に十分な量の燃料 DNA 鎖が残っている限られた時間内においてしか正常に動作できない。有限時間レギュレーション問題を克服するための一つの可能な対策は、外部から DNA 回路に対して、燃料 DNA 鎖を補給することである。しかし、分子ロボットのようにリボソームで閉じられた反応場では、分子ロボットの外側から燃料 DNA 鎖を補給することは技術的に困難である。従って、閉じた反応場では、燃料 DNA 鎖の濃度を初期濃度に回復させるための何らかの方法論が必要となる。これは、DNA 回路の再生化・初期化の問題と考えることができる。本研究では、分子フィードバック制御回路を「再生可能」にする方法を確立することを目指す。

具体的に DNA 回路を再生可能にする方法として、DNA 鎖を光応答性分子アゾベンゼンで修飾し、光の照射によって順反応と逆反応の反応速度を変化させる光応答制御を採用する。アゾベンゼンは、紫外線 (UV) 照射下で DNA 鎖の二本鎖構造を不安定化させることができる。光応答制御法を用いることで再生可能な PI 制御器を設計することが原理的に可能となる。本研究では、先行研究において擬似線形化手法により設計された PI 制御器 (以下, DNA-PI 制御器) を再生可能にするための新しい設計を提案する。本研究の新規性を以下に示す。

- (1) (再生可能な DNA-PI 制御器を例題とし,) 個々の回路モジュールを再生化可能にすることで、それら要素を組み合わせる DNA 回路全体も再生可能になることを示す。
- (2) アゾベンゼンを用いた DNA 回路の再生化設計の原理検証を実験にて行う。

### 再利用化の実証実験

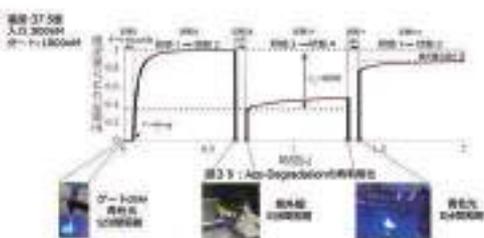
#### ・実験装置



#### ・実験内容: Degradation回路



### 実験結果



### 紫外線照射下におけるアゾベンゼンの有効率

4点の計測値を用いて実験からアゾベンゼンの有効率を算出した

反応速度は

$$k_1 = 4.0 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$$

$$k_2 = 1.45 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$$

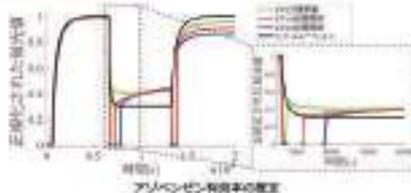
$$k_{21} = 1.35 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$$

threshold  $r$  は、3 塩基から 2.56 塩基に減少し、

有効率は  $\frac{2-2.56}{10} = 0.147$  (14.7%) 小

threshold  $s$  は、20 塩基から 3.53 塩基に増殖し、

有効率は  $\frac{3.53}{10} = 0.353$  (35.3%) 大



### 著者情報

中 荃 隆

Takashi Nakakuki

(九州工業大学大学院  
情報工学研究院)



# 研究の「意義」は後からついてくる —まずは創ったらよい—

松浦 和則 (鳥取大学)

Kazunori Matsuura

名古屋大学の瀧口さんからバトンを受け取り、リレーエッセイを書くことになった。現在、我々の研究グループでは、ペプチドの自己集合による人工ウイルス構造の創製 (化学, 2022, 77 (1), 20)、微小管内部空間に結合するペプチドによる微小管の機能制御 (Bull. Chem. Soc. Jpn., 2021, 94, 2100)、光誘起ペプチド繊維成長による走光性材料の創製 (ACS Appl. Bio Mater., 2021, 4, 5425)、細胞膜糖脂質の Turn-On 蛍光イメージングプローブの開発 (ACS Org. Inorg. Au, 2021, 1, 60) などを進めている。研究の詳細は上記にあげた総説・論文を参考にさせていただき、このエッセイでは、これらの研究を始めた動機や経緯の裏話をしていこうと思う。

いずれの研究も、生命の謎・神秘を解き明かしたいとか、人類の健康・生活の質を向上させたいとか、地球環境を良くしたいとか、SDGs の達成のために・・・というような崇高な動機ではなく、「誰もやってないから創ってみたい⇒創ったらたぶん目立つ」という単純な動機で始めたのである。15 年程前に、タンパク質の規則的な自己集合で形成される球状ウイルスのキャプシド構造を教科書で見て、「生物すごいな！⇒人工的に創ってみたい」ということで、ペプチドを分子設計して創ったのである。論文の Introduction や申請書には、「DDS やワクチンの材料に応用できるから創る」みたいなことを書くが、正直言って後付けの理由である。

微小管内部結合ペプチドの研究についても、10 年程前に、「微小管には 15nm 程の穴があるけど、なんで誰も穴にモノを入れようとしないのだろう？」と思ったのがきっかけである。2016 年に当研究室の助教として稲葉さんが着任した際に、「微小管の中に分子を内包したら、きっと面白い（どうやって入れたらいいかは知らんけど）」とけしかけて研究を開始した。紆余曲折の結果、稲葉さんが Tau 由来ペプチドを設計することで、見事に微小管内部に入る人工ペプチド・タンパク質を開拓し、微小管構造を安定化 (脱重合阻害) することにも成功した。当時、我々は不勉強で、微小管を安定化することの生物学的意義をよくわかっていなかったが、分子ロボティクス研究会でこの話をした時に、「それって、抗がん剤とか細胞制御に使えるんじゃない？」と誰かに言っていただき、なるほどと思った。それ以降は、そんなストーリーで論文を書いたりしている。最近、Microtubule Inner Proteins (MIP) が発見されつつあるが、我々の微小管内部結合タンパク質はそれを先取りして人工的に創っているのである。

光誘起ペプチド繊維成長を分子ロボティクス研究会で話した際には、瀧口さんから福井弁訛りで「それって～、アクチンコメットテールみたいな～」と教えていただき、大変勉強になった。論文では、あたかも最初から狙って「アクチンコメットテールを模倣して、走光性材料を設計した」ことにしているが、これも後付けの研究意義である。このように、「単に創ってみたい」から研究を開始し、それなりの面白い結果が得られれば、意義は後から付いてくるのだ。分子サイバネティクス領域に参加する際に、B01 班代表者の野村さんから「膜をはさんで情報伝達するようなペプチドを創ってくださいよ～」と無茶振りされたが、これもやっているうちに面白い分子が創れるだろう。その意義は、きっと後から付いてくるに違いない。

# リポソームブートキャンプ・オンラインの報告(2) ~Q&A編~

## A01 総合班 豊田 太郎 (東京大学), 章 逸汀 (東京大学)

リポソームブートキャンプとは、細胞サイズのリポソーム (ジャイアント・ユニラメラ・ベシクル, GUV) を作製できる「油中水滴エマルジョン遠心沈降法」という技術を、様々な研究者・開発者 (産学問わず)・学生さんと共有する実験イベントです。新型コロナウイルス感染拡大防止を鑑み、2021年10月13日(水)に初めてオンライン開催する運びとなりました。今号のニュースレターでは、質問受付WEBサイト「slido」に寄せていただいた質問をもとにした質疑応答の様子について、必要な情報を追加して報告いたします。リポソームブートキャンプ・オンラインに参加された方もそうでない方も、また、あらたにリポソーム研究をはじめの方も、参考にしていただけましたら幸いです。なお、必要な文献情報の詳細は、cttoyota@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp (豊田) まで直接お問合せください。可能な範囲で、よろこんで対応いたします。

### Q1 リポソームはおやつに入りますか?

**A1** 入りません。ただし、リポソームを食品だけでつくることは可能です。「簡単!合成生物学キッチンで「細胞」をつくってみた」(<https://gendai.ismedia.jp/articles/-/55034>)のレシピのうち、エタノールをスピリタスというウオッカに代えてみましょう。もちろん、お酒を飲んでも問題ない方のみが試飲してください。お酒は二十歳になってから!

**Q2**  $\alpha$ -hemolysin以外でも、細胞膜に作用するタンパク質やペプチドなら「ポアが形成されたので(リポソームは)一重膜である」としてよろしいのでしょうか。例えば、 $\alpha$ -hemolysinを使わずにmelittinやmagaininを使ってナノポアアッセイを行ってもよろしいのでしょうか。

**Q2'** W/O/Wではなくリポソームである(二重膜中に油が大量に残っており、脂質二重膜を形成している)ということを確認するための $\alpha$ -hemolysinを用いたナノポアアッセイもあるかと思うのですが、この場合はmelittinのようなペプチドを使用しても問題ないでしょうか。流路を用いたリポソーム作製の論文で読んだことがあります。

**A2** melittin や magainin は、親水性部位が  $\alpha$ -hemolysin よりも小さいため、リポソームの最外膜に突き刺さった後も、濃度勾配(外の方が濃い)にしたがって内部の膜へと移行する可能性があります(人工の両親媒性分子が多重膜リポソームの中へ伝搬していく過程を蛍光顕微鏡で追跡した報告は Toyota, T. et al., Fluorescence microscopic investigation on morphological changes of giant multilamellar vesicles induced by amphiphilic additives. *Langmuir*, 22(5), 1976-1981 (2006).)。したがって、現状では  $\alpha$ -hemolysin を用いる手法が有効といえます。もちろん、マイクロ流体デバイスで調製した GUV であることが想定される上でチェックするだけであれば melittin などのペプチドを利用することも考えられます。なお最近では、DNA 折り紙による大口径ナノポア形成の研究も活発(wabuchi, S. et al., A large, square-shaped, DNA origami nanopore with sealing function on a giant vesicle membrane. *Chemical Communications*, 57(24), 2990-2993 (2021).)なので、スタンダードが今後変わっていくかもしれません。

**Q3** ジャイアントベシクル(GV)に対して 1mM 程度の二価の金属イオン( $Mg^{2+}$ や  $Ca^{2+}$ など)を加えると膜が変形することがありますが、何か対策ありますでしょうか?

**Q3'** Mg など二価イオンはなぜ膜形成に悪影響をあたえるのでしょうか?そのメカニズムは何でしょうか?

**Q3''** 高濃度(数百 mM)の  $Na^+$ や  $Mg^{2+}$ を含む水溶液を内水相にすることは可能でしょうか。

**A3** この効果は、主に脂質二分子膜の電気二重層が減少して膜どうしが接近しやすくなるコロイド化学の観点の他にも、リン酸と二価金属イオンが水に難溶性の塩を形成しやすいことに関係していると考えられます。したがって、pH を調整して EDTA など二価金属イオンと錯体をつくる試薬(マスキングといえます)を添加する、という策が一手となります。作製法の工夫でも策はあり、電極法で GUV を生理学的条件で作製した論文が報告されていますので (Akashi, K. I. et al., Formation of giant liposomes promoted by divalent cations: critical role of electrostatic repulsion. *Biophysical Journal*, 74(6), 2973-2982 (1998).), 参考してみてください。また近年の総説 (Stein, H. et al., Production of isolated giant unilamellar vesicles under high salt concentrations. *Frontiers in Physiology*, 8, 63 (2017).) もご一読くださるとよいと思います。

**Q4** 油中水滴エマルジョン遠心沈降法において、スクアレンではなくミネラルオイルやデカンを使うことがあると思うのですが、どのように使い分けるのでしょうか?

**Q4'** 溶媒とする油脂(あるいは有機溶媒)の選択基準がありましたら教えてください。

**A4** 油性分散媒は、GV に内包したい水相の実験条件によって調整しなければならぬパラメーターになる可能性があります。ただ、他の油性分散媒を含めて、Weitz ら (Pautot, S., et al. Production of unilamellar vesicles using an inverted emulsion. *Langmuir*, 19(7), 2870-2879 (2003).) も Robinson ら (Moga, A. et al., Optimization of the inverted emulsion method for high-yield production of biomimetic giant unilamellar vesicles. *ChemBioChem*, 20(20), 2674-2682 (2019).) もあまり定量的な比較ができていないのが現状です (豊田太郎, 章 逸汀, 油中水滴エマルジョンで調製するジャイアントベシクルに対する油性分散媒の影響, 分析化学, 71, 83-89 (2022 年)). なお、マイクロ流体デバイスを用いた界面通過法は、そもそも油性分散媒とマイクロ流体デバイスの内壁とのぬれも、流れを安定にしながら GV を形成するために必要な要因になるため、油性分散媒の選定の重要性は増します (Ushiyama, R. et al., Plug-and-play microfluidic production of monodisperse giant unilamellar vesicles using droplet transfer across Water-Oil interface. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 131281 (2021).)。

**Q5** 油中水滴エマルジョン遠心沈降法において、油性分散媒として用いたスクアレンは作製後の GUV 膜にどの程度残っていますか?

**Q5'** リポソーム作製後に膜内に残っている油量を調べる方法はありますか?(なるべく二分子間に油が入っていないリポソームを作製したいです)

**A5** 現状では、定量的な測定を行った報告例はありません。定性的な議論として、水の透過速度を計測した研究例 (Sugiyama, H. et al., Perfusion Chamber for Observing a Liposome-Based Cell Model Prepared by a Water-in-Oil Emulsion Transfer Method. *ACS Omega*, 5(31), 19429-19436 (2020).) があります。また、ジェネティック法で作製された GUV については、顕微鏡ラマン分光で測定した結果、油性分散媒がのこっていない GUV とのこっている GUV とを識別できたことが報告されています (Kamiya, K. et al., Cell-sized asymmetric lipid vesicles facilitate the investigation of asymmetric membranes. *Nature Chemistry*, 8(9), 881-889 (2016).)。質量分析計での定量など、今後の課題の一つだと私は考えています。

**Q6** スクアレンに脂質を溶解した溶液は、分注して液体窒素保管でもいいでしょうか?そうすれば、半永久的に保存できますでしょうか?

**A6** 溶液状態は一般に、溶媒に溶解している微量の酸素や水の影響によって溶質が影響(ラジカル反応や加水分解)をうけるため、液体窒素保管としても長期保存には向いていないと考えます。特に、脂質を溶解する前処理として油性分散媒を事前に脱気処理(油ロータリーポンプで減圧する)・脱水処理(モレキュラーシーブス 3A を入れておく)しておく、油中水滴エマルジョン遠心沈降法の GV の出来に改善傾向がみられる、との Tips も聞いております。

**Q7** 内水相の pH はどの範囲まで可能でしょうか。内水相に利用可能なバッファの条件について教えていただければと思います。また塩濃度や pH の許容範囲をもし知っていたら教えてください。

**A7** 油中水滴エマルジョン遠心沈降法で用いる主要リン脂質であるフォスファチジルコリンの pKa は約 1 であり (Avanti Polar Lipids 社 website より, <https://avantilipids.com/tech-support/physical-properties/ionization-constants>), 豊田の経験でも pH3~11 程度では GV そのものは安定に存在します (ただし、pH 調整のための塩濃度が高すぎないようにしましょう)。ただし、pH3 にすると、フォスファチジルコリンそのものが中和されてコリン基の正電荷が優位になってくるため、負電荷のリン脂質のベシクルと融合する可能性があるため、注意しましょう (Suzuki, K. et al. Adhesion and fusion of two kinds of phospholipid hybrid vesicles controlled by surface charges of vesicular membranes. *Chemistry Letters*, 41(8), 789-791 (2012).)。塩濃度については、近年の総説 (Stein, H. et al., Production of isolated giant unilamellar vesicles under high salt concentrations. *Frontiers in Physiology*, 8, 63 (2017).) が参考になります。

**Q8** GV をプレパレート内で破裂しにくくする目的で行う、スモールベシクル分散液を用いたガラス表面被覆の文献について教えてください。

**A8** 総説 (Richter, R. P. et al., Formation of solid-supported lipid bilayers: an integrated view. *Langmuir*, 22(8), 3497-3505 (2006).) によくまとめられています。なお、この他に、きれいに洗浄したガラス基板 (Gruhn, T. et al., Novel method for measuring the adhesion energy of vesicles. *Langmuir*, 23(10), 5423-5429 (2007).), BSA で表面修飾した基板 (Rädler, J. O. et al., Fluctuation analysis of tension-controlled undulation forces between giant vesicles and solid substrates. *Physical Review E*, 51(5), 4526 (1995).) も活用できます。GV の内水相を可能な限り(外液置換などで)外水相と同じ比重にしておきましょう。

**Q9** 出来上がったリポソームは、どのくらいの時間安定に存在できるのでしょうか?例えば、冷蔵庫で保管するなどして、翌日も観察できるのでしょうか?

**A9** 豊田の過去の経験によれば、油中水滴エマルジョン遠心沈降法で調製した GV の半減期は 2 日ほど(冷蔵保存)でした。したがって、翌日も観察できます。ただし、外液置換して GV を洗みにくくしておく必要があります。なお、遠心沈降した直後のペレット状態で数日間の保存は可能です (ただし、ペレット内で膜の再配向が起こることには留意ください)。

**Q10** 「エマルジョン調製工程はできるだけ短時間が良い(内水相の成分が、リン脂質がまだ吸着していない油水界面に接触する時間を短くしたい)」についてもう一度詳しく説明していただきたいです。

**A10** 油水界面や固液界面は、バルク中にくらべると、エネルギーが高い場となっており、界面の液体ができるだけ面積を極小化するように自発的な状態変化が起こります。よって、両親媒性分子や粉体など界面のエネルギーを下げる物質が系中に存在すると、その物質が界面に吸着してゆき、界面での溶質分子の接触面積が減少するので、その方向に自発的に状態変化がおこり、吸着した物質がある程度覆いつくすと、(物質に依存しますが)吸着はとまり平衡にいたります。つまり、油相に溶けているリン脂質より界面吸着しやすい物質(疎水性部位が大きなタンパク質など)があれば、油水界面の影響をうけやすくなります。したがって、エマルジョン調製工程はできるだけ短時間の方がぞまいと考えています。

**Q11** GFP は脂質分子に比べると大きいと思うのですが、蛍光タンパク質を融合した膜タンパク質を GUV に作用させると、何かアーティファクトはありますか?

**A11** 鋭い質問をありがとうございます。タンパク質を無細胞翻訳液によって GUV 内で発現させる報告例 (最近ですと Uyeda, A. et al., Identification of conditions for efficient cell-sized liposome preparation using bioengineering available reconstituted in vitro transcription-translation system. *Journal of Bioscience and Bioengineering* (2021).) がだいぶ増えてきましたが、膜タンパク質を含め発現されたタンパク質そのものが GUV へ与えるアーティファクトについては私は見聞きしていません。むしろ、バッファによって GUV ができにくい、GUV ができやすいバッファではタンパク質側の方で最後まで成熟して機能化するものが十分量でない、といったケースが想定されます。もちろん、上記の報告例は、それらの課題を条件すり合わせで克服されたものと理解しています。

**Q12** リポソームをブラウン運動の挙動から解析することは可能でしょうか?

**A12** リポソームのブラウン運動(重心移動)と膜ゆらぎとのカップリングを考える、よい指摘だと思います。膜ゆらぎの観察は通常、基板上にリポソームを固定して行うことが多いです (Rädler, J. O. et al., Fluctuation analysis of tension-controlled undulation forces between giant vesicles and solid substrates. *Physical Review E*, 51(5), 4526 (1995).)。よって、固定していないリポソームにおいてブラウン運動と膜ゆらぎを同時に観測したときに、それらをどう分離してそれぞれ解析するか分離せずに解析するか、興味深い取り組みになると期待されます。

**Q13** リポソーム作製後にリポソーム内溶液の塩濃度や pH などを変えたい場合は何か案はありますか?

**A13** 思いのままに挙げると、①ナノポアを利用する、②pH であれば膜透過を利用する、③ケージド化合物を利用する、④分子濃縮機構 (Sugiyama, H. et al., Role of Negatively Charged Lipids Achieving Rapid Accumulation of Water-Soluble Molecules and Macromolecules into Cell-Sized Liposomes against a Concentration Gradient. *Langmuir*, 38, 1, 112-121 (2022).) を利用する。また最近、特許出願として新しい手法 (吉田裕美, 京都工芸繊維大学, イオン性化学種濃縮方法, PCT/JP2021/017165) も提案されています。

**Q14** 顕微鏡での観察時に、分散液の流れによってリポソームが視野外に流れてしまうことが多々あります(外液置換時等)。膜への機械的な影響を抑えて手軽にリポソームを固定できる方法はありますか？

**A14** この問題の解決には、外液置換をそもそも穏やかに行うか、リポソームを固定するかの選択肢があります。前者は特に山崎先生のグループの実験セットアップが参考になります(Yamazaki, M. The single GUV method to reveal elementary processes of leakage of internal contents from liposomes induced by antimicrobial substances. *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, 7, 121-142 (2008).)。リポソームを固定する場合、いくつかの方法があります。化学的に固定する場合として最もよく用いられているのがアビジン-ビオチン相互作用を利用する方法です(Sackmann, E. Supported membranes: scientific and practical applications. *Science*, 271 (5245), 43-48 (1996).)。また、強い相互作用ではないのですが、きれいに洗浄したガラス基板(Gruhn, T. et al., Novel method for measuring the adhesion energy of vesicles. *Langmuir*, 23(10), 5423-5429 (2007).)、BSA で表面修飾した基板(Rädler, J. O. et al., Fluctuation analysis of tension-controlled undulation forces between giant vesicles and solid substrates. *Physical Review E*, 51(5), 4526 (1995).)も活用できるとの報告例があります。

**Q15** リポソームを凍結乾燥し、再膨潤した場合、内包されたものは内包されたままと考えて良いのでしょうか？

**A15** これの回答はノーとなります。凍結乾燥するとリポソーム膜が断片化します。これを再度膨潤すると、内包されていたものは、一端はリポソーム外に漏れ出て、再度内包化されるというプロセスになります。

**Q16** リポソームを長期保存したい場合の方法を教えてください。

**Q16'** リポソームは1週間ほど壊れるとのことですが、脂質間差による違いや、長期保管する方法はあるのでしょうか？

**Q16''** ベシクル作製時に、グルコースとスクロース以外で比重差をつけられるものはありますか？デキストランなども使用可能でしょうか？

**A16** ナノメートルサイズのリポソームでしたら、脱酸素処理(アルゴンバスのパブリックなど)を行った水を分散媒としてリポソームを調製し、密閉できる容器にリポソーム分散液を注いで、さらに不活性ガスで容器を満たして密閉し、冷蔵庫内で避光して保存すると1~2週間は実験で使用可能と考えられます(バッファ等に依ってこの期間は変化します)。細胞サイズのリポソームとなると、上記の工夫をしても、半減期は2日ほどと見積もっておくことよいと思います。なお、内外の比重差をつけるために、本アートのキヤンパではグルコースとスクロースを用いましたが、グリセリン等も利用することが可能(Tsuji, G. et al., Production of giant unilamellar vesicles by the water-in-oil emulsion-transfer method without high internal concentrations of sugars. *Journal of bioscience and bioengineering*, 126(4), 540-545 (2018).)なので、糖による雑菌コンタミネーションが気になる場合には、試してみる価値があると考えます。

**Q17** 凝集などを極力抑えて高確率で GUV を作るための工夫やコツはありますか？

**A17** Robinson さんの報告(Moga, A. et al., Optimization of the inverted emulsion method for high-yield production of biomimetic giant unilamellar vesicles. *ChemBioChem*, 20(20), 2674-2682 (2019).)にやや詳細な記載があります。拙著の解説記事(豊田太郎, 章 逸汀, 油中水滴エマルジョンで調製するジャイアントベシクルに対する油性分散媒の影響, *分析化学*, 71, 83-89 2022 年)にて、油中水滴エマルジョン遠心沈降法に関する考察を記しましたのでそちらも参照ください。

**Q18** 流動パラフィンに、DOPC と cholesterol を溶かして 80°C で一晩保温してから使用してののですが、今回の作成した仕方とどう違いますか？

**A18** 溶解液としては基本的には変わりません。ただし、80°C で一晩静置すると流動パラフィンに溶存している酸素が DOPC など脂質と反応する結果、溶液が褐色を帯びて、油中水滴エマルジョン遠心沈降法には適さない溶液になると思われま。80°C で溶解させる場合は、溶液の状態をこまめに確認して、脂質が溶解した時点で、加温をやめて、常温に戻して次の実験に進むのがよいと考えます。

**Q19** リポソームを作製したり、取り扱ったりする際の実験部屋の湿度は、膜安定性などに大きな影響はありますか？

**A19** 湿度が高い日(梅雨の時期など)、もともとリン脂質粉体の吸湿性が高いため、サンプル瓶を開けっ放しにしたりすると劣化が早まる要因になります。保管するサンプル瓶と乾燥剤(青色乾燥シリカゲルで OK です)をビニール袋に入れて閉じておくことで、乾燥状態を心掛けることとベターです。特に、冷凍保存したものを開封する際は、乾燥剤と一緒にビニール袋に入れて常温に戻るまで待つからにしないと、開封時に空気中の水分がサンプル瓶で結露して、劣化を早める可能性が高くなります。

**Q20** リン脂質を溶かしたクロロホルム溶液を使用しており、長時間減圧乾燥しているのですが劣化に関与しますか？

**A20** クロロホルム溶液を減圧乾燥する場合、むしろ、減圧解除する際に、湿気をふくむ空気が脂質膜に触れるのは望ましくないといえます。乾燥した不活性ガス(たとえば、GE ヘルスケアが販売しているバキューガード 60 でガスを乾燥させる)を送り込んで、減圧解除できると、よりよいと考えます。

**Q21** GUV を扱った応用研究(昆虫フェロモンに応答する GUV など)で、他にも豊田先生から見て面白い研究を行っている研究機関(大学の研究室・企業の研究所)があれば教えてください。

**A21** 国外だと、Max Plank の Petra Schwille さんのグループや Kerstein Göpfrich さんのグループ、Imperial College London の Oscar Ces さんのグループ、UCSanDiego の Neal K Devaraj さんのグループは興味深いアプリケーションを多数報告しています。国内で、分子サイバネティクス研究者以外だと、JAMSTEC の車倉徹さんのグループ、慶應義塾大学の藤原慶さんのグループ、東工大の松浦友亮さんのグループです。企業の研究所では、過去に、NTT 物性科学基礎研究所にあるグループが GUV 研究に注力していました(近年はナノポアの研究に集中しているようです)。

**Q22** カーガラスをアルブミン溶液でコートする方法を詳しく教えてください(濃度、時間)。

**A22** Sackmann のグループの報告(Rädler, J. O. et al., Fluctuation analysis of tension-controlled undulation forces between giant vesicles and solid substrates. *Physical Review E*, 51(5), 4526 (1995).)のほか、山崎先生のグループの報告(Yamazaki, M. The single GUV method to reveal elementary processes of leakage of internal contents from liposomes induced by antimicrobial substances. *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, 7, 121-142 (2008).)が参考になります。前者は 5 µg/ml BSA 水溶液を基板に垂らして(もしくは浸漬)15 分間静置して、その後水で洗浄しています。後者は 0.1%BSA 水溶液をつかっています(時間は未記載)。

**Q23** エマルジョン作製の際に超音波ホモジナイザーを利用してはいけない理由の説明をもう一度お願いいたします。

**A23** 超音波は、溶液中に進行する縦波によって生じる空孔(キャビティ)の消滅で発生する衝撃波がエマルジョンを懸濁させます。キャビティ表面には OH ラジカルなども発生しており、衝撃波もラジカルも脂質をはじめ化合物の分解や劣化を促進します。したがって、超音波ホモジナイザーは適していません。

**Q24** 同じ PC でも POPC と DOPC ではどのように使い分けるのでしょうか？(POPG と DOPG も同様に)。

**A24** 現在、分子サイバネティクス研究者と一緒にこの点を議論していますが、GUV の作製や安定性の面においては、疎水性部位が 1-palmitoyl-2-oleoyl-(PO)でも dioleoyl(DO)でも大差がないという認識があります。

**Q25** ベシクルが作られた後に壊れてしまう(閉じていた環が開いてしまう)ことはあるのでしょうか？

**A25** ベシクルやリポソームは、脂質分子が水との相互作用(主に疎水性相互作用)から寄せ集まってできた二分子膜が袋状に閉じただけなので、ベシクル・リポソームそれぞれは非常に脆いものとお考えください。しかし、様々な補強をすることで脆性を改善することが可能です。例えば構成分子を高分子とする(ポリメラーソームといえます)と、ベシクルの安定性は極度に向上します。

**Q26** 電顕で GUV を評価する際に固定させて乾燥させる必要があるかと思いますが、それによってリポソームの形態が変わるようなことはないのでしょうか？

**A26** 染色する場合に、確かに、リポソーム形態はやや変わってしまいます。しかし、ちょっと鉛がでてしまったつづれかけたあんぱんのような像となり、膜厚や袋状構造を観察できるので、評価法の一つとして有効だと考えられています。フリーズフラクチャーレプリカ法や最近のクライオ電顕法では、サンプルをまず急速凍結しますので、形態はほとんど変わっていないものと考えられています。

**Q27** 懸濁の際、ポルテックスミキサーは使用できますか？

**A27** 攪拌強度が高ければ可能かもしれませんが、タッピングなどの強く短時間の攪拌を動いています。ポルテックスミキサーを使用する場合は、時折よく上下に振り混ぜると、分散しやすくなります。Robinson さんの報告(Moga, A. et al., Optimization of the inverted emulsion method for high-yield production of biomimetic giant unilamellar vesicles. *ChemBioChem*, 20(20), 2674-2682 (2019).)の Supporting Information のデータ)や四方先生らの報告(Matsushita-Ishiodori, Y. et al., Using imaging flow cytometry to quantify and optimize giant vesicle production by water-in-oil emulsion transfer methods. *Langmuir*, 35(6), 2375-2382(2019).)でも、攪拌方法を比較しています。

**Q28** 0.6mL エッペンでも作れることはできますか？

**Q28'** 試料節約のため、液量を 3分の1 もしくは、10分の1 くらいに減らしても大丈夫でしょうか？

**A28** 滝口先生のグループで、液量を抑えて PCR チューブ(容積 600 µL)をつかって油中水滴エマルジョン遠心沈降法を開発されていますので、報告例(Hayashi, M. et al., Reversible morphological control of tubulin-encapsulating giant liposomes by hydrostatic pressure. *Langmuir*, 32(15), 3794-3802 (2016).)を参考にしてください。PCR チューブを通常の卓上遠心新分離機にかけるとときは、1.5mL マイクロチューブの蓋を切り取って、それをアングルローターにはめて、そこに PCR チューブをさせばよいそうです。

**Q29** マイクロチューブの材質(PP)が耐性のない有機溶媒を利用する場合にはどのような容器を利用されていますか？

**A29** ガラス製マイクロチューブ(たとえば BMS 社のガラスチューブ 1.5mL など)を使うことが可能です。

**Q30** 溶液に緩衝液を使用しているのはなぜか理由があるのでしょうか？

**A30** 界面を通過してきた GV の膜内外で pH を変えたくないためです。

**Q31** 冷却しながら遠心しても、界面通過に影響はないのでしょうか？

**A31** この点は豊田も気になっていますが、まだ精査できていません。油性分散媒やリン脂質濃度によっては、エマルジョンがゲル化する可能性があるため、用いる試薬ごとに至適条件があるかもしれません。

**Q32** 使用できる脂質の種類は何があるでしょうか？DOPC, DPPC, コレステロールなども使用可能か教えてください。

**A32** 油中水滴エマルジョン遠心沈降法に限って言えば、エマルジョン中の全脂質に対してフォスファチジルコリンが 50% (モル比)以上であれば、他のリン脂質やコレステロールが混ざっていても GV は形成できるようです。ただし、多量のコレステロールとフォスファチジルエタノールアミンを混合してしまうと、GV が凝集しやすくなるため、10%以下にとどめておくことよいと考えています。拙著の報告(豊田太郎, 伴野太祐, 藤浪真紀, 油中水滴エマルジョンを用いたジャイアントベシクル型人工細胞の器づくり, *オレオサイエンス*, 2012 年 12 巻 2 号 p. 77-84)も参考にしてみてください。

**Q33** DNA 相にタンパク質を内包する際に特別な注意事項はありますか？

**Q33'** DNA やタンパク質を内包する際に注意することはありますか？内液に DNA や酵素を封入したリボを界面通過で作る際に濃度や浸透圧などの影響はどのくらいあるのでしょうか？

**A33** 油中水滴エマルジョン遠心沈降法では、現在のところ私が耳にしているのは、繊維状のタンパク質(例えば、チューブリンではなく微小管)を用いる場合、10 µm を超える長さでは、封入効率が下がる(ほとんど漏れ出てしまう)とのこと。野村さんのグループで微小管を封入した報告(Sato, Y. et al., Micrometer-sized molecular robot changes its shape in response to signal molecules. *Science Robotics*, 2(4), eaal3735 (2017).)では、数 µm の長さの微小管を用いたことが記載されています。また、ゲル化するタンパク質を用いる場合も、ゾル状態でエマルジョンを調製して GUV に封入して、その後ゲル化する工程を経ています。DNA の内包については、塩濃度がポイントになるとい、近年の総説(Stein, H. et al., Production of isolated giant unilamellar vesicles under high salt concentrations. *Frontiers in physiology*, 8, 63 (2017).)が参考になります。

- Q34** ベレットができた後も界面を乱さないようにするのはなぜでしょうか？下の溶液だけ取るなら問題ないかと思っていました。
- A34** エマルションと水との界面が揺動すると、そこから小さな油滴が生じて、それがベレットをふくむ GV 分散液に混在してしまうことを防ぐためです。
- Q35** アンモニウム塩型のようなカチオン性脂質を使う際もこの手法は使えるのでしょうか？
- A35** あいにく、カチオン性脂質のみで油中水滴エマルション遠心沈降法を実践した報告例を見聞きしていません。ただ、過去に豊田が試みた例(豊田太郎, 伴野太祐, 藤浪真紀, 油中水滴エマルションを用いたジャイアントベシクル型人工細胞の器づくり, オレオサイエンス, 2012 年 12 巻 2 号 p. 77-84)をふまえて、フォスファチルコリンを全脂質に対して 50 mol%以上存在している状態であれば、カチオン性脂質を混ぜて油中水滴エマルション遠心沈降法を試すことができると類推されます。
- Q36** リン脂質にPEGを加えたリポソームを作ると界面通過後に大きなベレットができるのですが、なぜでしょうか？
- A36** 興味深い情報ありがとうございます。理由は3つ考えられます。①遠心沈降したマイクロチューブ底面が PEG で被覆されてリポソームが割れにくくなっている。②PEG が脂質膜の膜張力を下げることで界面通過時に脂質膜が展延しやすくなり、その結果リポソームが生じやすくなっている。③リポソーム膜を不安定化する要因の一つである、リン脂質の極性基周囲をとりかむカチオン種が、PEG と強くイオン-双極子相互作用することで、膜表面の電気二重層厚み(デバイ長といいます)が増大して、その結果、リポソーム膜の安定性が増している。このほかにも要因があるかもしれません。
- Q37** 遠心時間が30分と長いですが、時間が長い方がベシクルを多く得られるのでしょうか？
- A37** 今回の実験での遠心沈降時間は、マイクロチューブの上から底面まで、想定された比重差をもつ GV が一定速度で沈降する時間を計算(Natsume, Y. et al., Giant vesicles containing microspheres with high volume fraction prepared by water-in-oil emulsion centrifugation. Chemistry Letters, 42(3), 295-297 (2013).)として設定しています。しかし、他の報告例(Moga, A. et al., Optimization of the inverted emulsion method for high-yield production of biomimetic giant unilamellar vesicles. ChemBioChem, 20(20), 2674-2682 (2019).)では5分以下という短時間で行っているものもあり、遠心沈降プロセスにおいて、マイクロチューブ内壁上でエマルション液滴が濡れながら界面移動して GUV が形成されていることを示唆しています。
- Q38** 観察時に見られた脂質の塊を取り除く方法はありますか？
- Q38'** 作製したリポソームを観察すると、リポソームの膜に脂質がたくさんついてしまっていることや凝集していることが多いのですが、脂質に原因があると考えた方が良いでしょうか？
- A38** 油中水滴エマルション遠心沈降法で作製されるリポソーム分散液において脂質粒子の形成が確かに認められます。GV 内に内包されている場合も、GV 外に分散している場合もあります。Weitz 教授らも、エマルションの水滴内に脂質粒子(論文中では脂質粒子はベシクルと言及しているが、それを実験的に示すデータはありませんでした)を観察し、GVの一部は入れ子型の GV となることを報告しました(Pautot, S. et al., Production of unilamellar vesicles using an inverted emulsion. Langmuir, 19(7), 2870-2879 (2003).)。これを鑑みると、観察された脂質粒子は、そのコントラストからリン脂質のみもしくはリン脂質と油とが複合した粒子と考えられます。これが形成される理由は、いくつか考えられ、エマルション調製時とベレット形成時の双方を考える必要があります(豊田太郎, 章 逸汀, 油中水滴エマルションで調製するジャイアントベシクルに対する油性分散媒の影響, 分析化学, 71, 83-89 2022 年)。脂質の劣化が一要因となることが確かですが、懸濁条件や遠心条件によって、改善する可能性があります。
- Q39** 流動パラフィンを代用しているのですが、水和対策は必須ですか？
- A39** 必須というわけではありませんが、脂質を溶解する前処理として油性分散媒を事前に脱気処理(油ロータリーポンプで減圧する)・脱水処理(モレキュラーシーブス 3A を入れておく)しておくと、油中水滴エマルション遠心沈降法の GV の出来に改善傾向がみられる、との Tips を聞いております。
- Q40** 水溶液に内包される蛍光試薬などの観察から膜多重度を判別できますか？
- A40** 判別可能であることを、石渡先生のグループから報告されました(Chiba, M. et al., Quantitative analysis of the lamellarity of giant liposomes prepared by the inverted emulsion method. Biophysical journal, 107(2), 346-354 (2014).)。ただ、膜多重度が本当に1になっているのは、別の評価法とあわせて判別するのがよいだろうと付言しておきます。たとえば山崎先生のグループの報告では、GUV 評価を蛍光像とガラスキャピラリー吸引法とで加味して行われています(Yamazaki, M. The single GUV method to reveal elementary processes of leakage of internal contents from liposomes induced by antimicrobial substances. Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes, 7, 121-142 (2008).)。
- Q41** 脂質の溶解操作について、70℃以上の加熱で脂質の劣化しやすくなるのはどういふことですか？脂質の構造が壊れてしまうのですか？論文等あれば教えてください。
- A41** 加温すると様々な化学反応の活性化エネルギーを超えた脂質が反応していきます。酸化反応(基本的にはラジカル反応(二木敏雄, 抗酸化ビタミンによる脂質酸化反応の抑制, 栄養学雑誌, 51, 115-121 (1993))), 水和反応, 加水分解などが挙げられます。
- Q42** 形状の熱ゆらぎは、水がどの程度抜けたときにおこるのでしょうか？
- A42** 実験条件によって水の抜かれ方が異なります。Dimova さんのグループから系統的に調べてある報告(Faizi, H. A. et al., Fluctuation spectroscopy of giant unilamellar vesicles using confocal and phase contrast microscopy. Soft Matter, 16(39), 8996-9001 (2020). The Supporting Information)がありますので、参考にしていただければと思います。
- Q43** 内包液に紫外線(波長 365nm 付近)と青色光(同 440nm)を数分間照射したいのですが、ベシクルは変質してしまうのでしょうか。また、どのくらい光を透過するのでしょうか？
- A43** 光の透過については、リン脂質の二分子膜の厚みが 5 nm 程度です。顕微鏡観察しながら紫外線や可視光線を照射する場合にはほぼ 100%透過すると考えてよいです。照射の時間については、特に紫外線の場合に、光量や系中に共存する分子に十分注意する必要があります。(Itri, R. et al., Membrane changes under oxidative stress: the impact of oxidized lipids. Biophysical reviews, 6(1), 47-61 (2014).)。
- Q44** 膜貫通(結合)タンパク質をリポソームの膜上に固定する際、外側のみ、あるいは、内側のみなど固定化する面をコントロールする方法はありますか？
- A44** 膜貫通タンパク質の場合、外側のみ、内側のみで固定化することは難しいと考えます(貫通した状態がタンパク質そのものの安定化に関わっているため)。ただ、挿入の方向を変えることは、油中水滴エマルション遠心沈降法で可能となっており、柳澤さんのグループからの報告例(Yanagisawa, M. et al., Oriented reconstitution of a membrane protein in a giant unilamellar vesicle: experimental verification with the potassium channel KcsA. Journal of the American Chemical Society, 133(30), 11774-11779 (2011).)が参考になります。
- Q45** GUV の表面に細胞表面に存在するような糖鎖を生やして作製することは可能でしょうか。そのような論文はございますでしょうか？
- A45** はい、できます。糖脂質であるガングリオリッド GM1 を導入した報告例は多数あります(例えば Dasgupta, R. et al., The glycolipid GM1 reshapes asymmetric biomembranes and giant vesicles by curvature generation. Proceedings of the National Academy of Sciences, 115(22), 5756-5761 (2018).)。ガングリオリッド GM3 を導入した研究(たとえば Witt, H. et al., Detachment of giant liposomes-coupling of receptor mobility and membrane shape. Soft Matter, 16(27), 6424-6433 (2020).)も GM1 に比べると少ないですが報告例があります。
- Q46** pH を変える際に H<sup>+</sup> や OH<sup>-</sup> 等のイオンは膜の内側と外側で透過しないと考えるといいのでしょうか？
- A46** いいえ、報告(Deamer, D. W. et al., Permeability of lipid bilayers to water and ionic solutes. Chemistry and physics of lipids, 40(2-4), 167-188 (1986).)や Deamer, D. W. et al., Proton-hydroxide permeability of liposomes. Proceedings of the National Academy of Sciences, 80(1), 165-168 (1983).)によると、プロトン H<sup>+</sup> の透過速度は小さいですが、H<sup>+</sup> は GV 膜を透過します(10<sup>-9</sup> cm s<sup>-1</sup> と見積もられており、温度や対イオンとの組み合わせでも変化すると報告されています)。OH<sup>-</sup> の透過速度は H<sup>+</sup> とカップリングしていると考えられています。
- Q47** 疎水性の分子を修飾した脂質で作製したリポソームにおいて、修飾した疎水性の分子が脂質の疎水基の部分に引き寄せられ、膜外に露出しないといったことは起こりえますか？
- A47** melitin や magainin など疎水性部位をもつペプチドなどは、リポソームの外側に添加すると、疎水性部位を膜に埋め込み、さらに安定化した状態へ遷移すると考えられています(Magzoub, M. et al., Cell-penetrating peptides: small from inception to application. Quarterly reviews of biophysics, 37(2), 147-195 (2004).)。その際、疎水性部位が脂質と相溶性が高い場合には膜斜直方向に配向しますが、そうでない場合は、膜平方向に配向したり相分離してポア形成したりするようです。
- Q48** 100μM 程度の高濃度のタンパクをベシクルに内包した場合、今回の方法で均一なリポソームが問題なく作れるのでしょうか？
- A48** 油中水滴エマルション遠心沈降法で均一な大きさのリポソームをつくることは現状では難しいという回答になります。近年、エマルションを冷却して氷塊にしてリポソームを作製する技術が市川先生のグループから報告されており(Sugiyama, S. et al., Novel method for obtaining homogeneous giant vesicles from a monodisperse water-in-oil emulsion prepared with a microfluidic device. Langmuir, 24(9), 4581-4588 (2008).), -4℃~-10℃の冷却に耐えるタンパク質であれば均一な大きさのリポソームを作製することが可能だと類推されます。
- Q49** 界面通過法の封入率や大きさによる内包物質濃度の違いはありますか？
- A49** はい、油中水滴エマルション遠心沈降法では内水相の濃度にばらつきができることが実験でわかっております。これは、界面通過した GV がマイクロチューブ底面で堆積してベレットが形成される際に、膜が割れたり再構成されたりすることが要因だろうと考えられています。また、ポリスチレンビーズを内包した場合には、仕込み数密度よりも高い数密度の GV が生成することがわかっています(Natsume, Y. et al., Giant vesicles containing microspheres with high volume fraction prepared by water-in-oil emulsion centrifugation. Chemistry Letters, 42(3), 295-297 (2013).)。これは、遠心力がかかっている状態でポリスチレンビーズが集合化して膜で分画化されるためだと考察されています。
- Q50** リン脂質分子の頭部-頭部間の間隔は、各相(結晶相, リップルゲル相など)で大体どれくらいなのでしょうか？
- A50** 液晶相でのフォスファチルコリン極性基の平均被占面積は 0.5 nm<sup>2</sup> 程度と知られています(Israelachvili, J. N. (2011). Intermolecular and surface forces. Academic press., Chapter 20)。結晶相やリップルゲル相についての実測値の報告例は私の手元の文献ではみつからっていませんが、シミュレーション的には脂質分子のパッキングがよくすると平均被占面積は減少することが報告されています(Lai, K. et al., High pressure effect on phase transition behavior of lipid bilayers. Physical Chemistry Chemical Physics, 14(16), 5744-5752(2012).)。
- Q51** 私の研究ではBSA をリポソームに内包させるのですが、BSA の内包はリポソーム形成にどのような影響を与える可能性がありますか？
- A51** BSA は、GV 観察の際にガラス基板を修飾するために用いるほど、脂質膜との相互作用では反発に効いてくると想像されます。ただ、藤原さんのグループから報告例(Fujiwara, K. et al., Artificial cell fermentation as a platform for highly efficient cascade conversion. ACS Synthetic Biology, 7(2), 363-370 (2018).)もありますので、参考にしていただければと思います。
- Q52** 脂質二分子膜にナノポア等を挿入する場合、一枚膜を貫通するために必要なナノポア側の最低長はどのくらいなのでしょうか？
- A52** 脂質二分子膜の厚みは、一般的に 5 nm と考えられています(Israelachvili, J. N. (2011). Intermolecular and surface forces. Academic press., Chapter 20)。α-hemolysin は膜貫通部位が 3 nm 程度になっておりますが、これまで開発されたナノポアは、膜貫通部位が 5 nm 程度になっていきます(Shoji, K. et al., Recent advances in liposome-based molecular robots. Micromachines, 11(9), 788 (2020).)。ただし、DNA 折り紙でできたナノポアでは、膜貫通部位として 10 nm 程度が最低長のようなようです(Thomsen, R. P. et al., A large size-selective DNA nanopore with sensing applications. Nature communications, 10(1), 5655 (2019).)。これは、膜貫通した状態を最安定化するために、膜平方向で土台も築いておく必要があるためと考えられます。
- Q53** 冷凍すれば糖の緩衝液も長期間保存が可能ではないのでしょうか？
- A53** 氷晶のすきままでは、そこそこ水が動いているので(Inagawa, A. et al., Fluidic grooves on doped-ice surface as size-tunable channels. Scientific reports, 5(1), 17308 (2015).)、劣化の要因となる化学反応を完全に止めるわけではなく、数か月ほどになる長期保存は適さないと考えていただくとういと思います。

# 国際ナノテクノロジー総合展・技術会議 (nano tech 2022) 出展報告

- 日時: 2022年1月26日(水)~28日(金) 東京ビッグサイト東ホール
- オンライン開催期間: 2021年11月26日~2022年2月28日
- 共同出展: 基盤研究(S)プログラム可能な動的微粒子群「オートマター」
- 出展ゾーン: 独法・公的機関 / 学校各研究室 海外パビリオン エリア  
URL: <https://www.nanotechexpo.jp/main/>

分子サイバネティクスプロジェクトにおいて、国際ナノテクノロジー総合展は、本領域の成果や参画する研究者の技術を広く社会に発信する場として重要な位置付けと考えられています。今回は、領域の紹介ポスターや8名の研究者による技術紹介動画と配布資料を展示・説明する予定でしたが、オミクロン株による感染拡大によりオンライン出展のみの参加となりました。

## ● 出展内容

- (1) 分子サイバネティクスのプロジェクト紹介 (ポスター)
- (2) DNA ナノテクノロジーを活用した診断向けナノロボットの開発 (ポスター)
- (3) 領域に参画する研究者が持つ技術の紹介 (配布資料)
- (4) 領域に参画する研究者が持つ技術の紹介 (動画 [30 秒/名])

- 浜田 省吾 (東北大学)  
「人工代謝系で駆動する分子マシンを応用した核酸のその場検出デバイス開発」
- 川又 生吹 (東北大学) 「DNA オリガミの技術紹介」
- 藤本 健造 (北陸先端科学技術大学院大学) 「超高速 DNA, RNA 光クロスリンカー」
- 齋藤 敬太 (Cranebio 株式会社) ・葛谷明紀 (関西大学)  
「DNA ナノテクノロジーを活用した診断向けナノロボットの開発」
- 安原 主馬 (奈良先端科学技術大学院大学) 「細胞膜をプラットフォームとするナノバイオ材料」
- 庄司 観 (長岡技術科学大学) 「プローブ型システムによる簡易膜形成技術」
- 平 順一 (九州工業大学)  
「情報工学部ってコンピュータの学部? 実はバイオ関連の分析技術も揃っています」
- 豊田 太郎 (東京大学) 「細胞サイズのリボソームを活用した刺激応答医療材料の提案」

=== 以下は共同出展者の出展内容 ===

- (5) オートマター計画の紹介 (ポスター・動画)
- (6) オートマター計画: 瀧ノ上グループの技術紹介 (ポスター)
- (7) オートマター計画: 清水グループの技術紹介 (ポスター)
- (8) オートマター計画: 大野・齋藤グループの技術紹介 (ポスター)
- (9) ミトコンドリア移植: 人工細胞工学 (ポスター)



科研費  
K A H E T S U

学術変革領域研究(A)

# Molecular Cybernetics NewsLetter

分子サイバネティクス ニュースレター

第5号 2022年3月28日発行

発行：学術変革領域研究(A)[分子サイバネティクス]

事務担当：葛谷 明紀(関西大学 kuzuya@kansai-u.ac.jp)

豊田 太郎(東京大学 cttoyota@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp)

広報担当：野村 M. 慎一郎(東北大学 nomura@molbot.mech.tohoku.ac.jp)

中莖 隆(九州工業大学 nakakuki@ces.kyutech.ac.jp)

領域ウェブサイトURL：<https://molcyber.org>

---

次号No.6は、6月発行予定です。