

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「ゲノムスケールの DNA 設計・合成
による細胞制御技術の創出」
研究課題「長鎖 DNA 合成と自律型人工細胞創出
のための人工細胞リアクタシステム」

研究終了報告書

研究期間 2019年10月～2025年03月

研究代表者:野地 博行
(東京大学 大学院工学系研究科
教授)

§ 1 研究実施の概要

(1)実施概要

研究項目: ①「均一系微小リアクタの開発および操作技術」、②「人工細胞リアクタの生化学反応の定量計測」、③「自律分裂型人工細胞モデルの創出」、④「脂質膜・LLPS 機能化のための合成分子開発」、⑤「界面安定化技術の開発および LLPS 型リアクタを用いた進化実験 (2023 年度より)」に取り組んだ。

①「均一系微小リアクタの開発および操作技術」: 当初計画では liposome の系および LLPS droplet の系を予定していた。liposome 系では、均一径 liposome の開発 (Soga et al. *ACS Nano* 2020)などの成果があがったが、予備的研究において自己成長型 liposome の開発の技術的難易度が判明したため、2020 年度には LLPS droplet、中でも Dex/PEG 溶液中の Dex ドロプレットを微小リアクタとする人工細胞系の開発にリソースを集中させることを決定した。その結果、DNA による相分離の安定化効果の発見、天然変性タンパク質ドロプレットとの統合によるコアシェル型ドロプレットの発見に繋がった。それぞれ、本プロジェクトの中核的成果となる自己成長型人工細胞の開発・人工核を持つ人工細胞の開発の基礎となり、初期の戦略的方向転換は妥当であったと考える。そのほか、オリゴ DNA を濃縮する特殊な IDP ドロプレット技術の開発に成功した。

②「人工細胞リアクタの生化学反応の定量計測」: 主に i) 微小空間における 1 分子 DNA の複製反応の効率計測、ii) 微小空間における 1 分子 DNA からの転写・翻訳の定量計測 (ノイズ解析)、iii) 微小空間における各種性化学反応の定量計測 (デジタルバイオ分析) を実施した。i) に関しては、油中液滴中での再構成系ゲノム複製系 (末次 G が開発した RCR) の反応効率計測を行い、20kbp 以下の DNA であれば反応開始効率および系ヌクレオチドの利用効率いずれも 80% を超える高効率であることを見出した (Ueno et al. *ACS Synth Biol* 2021)。ii) デジタル遺伝子発現に関しては、計測は成功し解析も終了しているが、結果を説明するモデル化に難航している。現在、考えうる単純かつ合理的なモデルでは説明がつかない点が多々ある。この原因は、無細胞翻訳系に見られる未だ不明な特徴が支配要因となっていると考えられるが、そのような特徴を含めた数理モデル化は今後の課題となる。iii) に関しては、多数の成果が上がった。初期の結果としてはインフルエンザ粒子の粒子間個性の観察結果が挙げられる (Honda et al. *Anal. Chem.* 2021)。後期の成果としては、「分子間個性の多様性が進化のバロメーターとなりうる」という酵素進化理論に重要な発見が挙げられる (Sakuma et al. *JACS* 2023)。この発見は、人工細胞の進化能にも通じる内容となることが期待される。今後、進化能を有する人工細胞系の作成に成功した場合、「細胞間個性の多様性が進化のバロメーターになる」という仮説の検証に取り組みたい。

③「自律分裂型人工細胞モデルの創出」: 「自律成長能を有する人工細胞」「自律分裂能を有する人工細胞」に取り組んだ。「自律成長能を有する人工細胞」では、内部に DNA 複製系を再構成した Dex ドロプレットの系を開発し、初期体積から 10 倍以上も増幅する自律成長型人工細胞の開発に成功した。その後、転写・翻訳と共役した DNA 増幅による自己成長も達成した。加えて、単なる DNA 増幅ではなく、再帰的な DNA 複製反応との共役にも成功し、今後の進化実験への道筋をつけた (Minagawa & Yabuta et al., *Nat. Commun.* 2025)。「自律分裂型人工細胞」に関しては、当初は内部 DNA 構造による Dex ドロプレットの変形を目指したが、ドロプレットの界面エネエルギーを超えるエネルギーを DNA 構造によって与える条件が見つからなかった。そのため、現在は摂動を与える系を検討している。分裂の条件を明らかにすることで、内部反応駆動の分裂への糸口が見つかると考えている。また、当初計画にはなかったが、Dex ドロプレットの系に天然変性タンパク質を添加することで、天然変性タンパク質 (IDP) ドロプレットを内包したコアシェル型のドロプレットが形成されることを発見した。この発見に基づき、IDP を人工核とみなした転写と翻訳が空間的に分離された人工細胞の系の開発にも成功した (Tomohara et al., *Nat. Commun.* 2025)。

④「脂質膜・LLPS 機能化のための合成分子開発」: 本項目は主として村岡 G が担当した。liposome および Dex ドロプレットの界面に大きな摂動を与える合成分子の開発に取り組んだ結果、超分子ナノファイバーの状態変化による Dex ドロプレットの融合促進技術の開発に至っ

た。これは、細胞とウイルスの感染制御実験として成功した。また、liposome のエンドサイトーシスを誘導する人工分子開発にも成功し、ウイルス安定化に有効であることを実証した (Uchida et al., *JACS* 2023)。これは、村岡 G を代表する成果である。本項目は探索的に様々な合成分子を作成したが、人工細胞系への導入に資する「ドロプレットを分裂させる合成分子」として、光異性化する化学基を導入した PEG 分子を見出している。

- ⑤ 「界面安定化技術の開発および LLPS 型リアクタを用いた進化実験」これは、2023 年度より合流した水内 G が担当した。Dex ドロプレットを安定化するために、ある大きさの liposome およびタンパク質のアミロイド線維の組み合わせが有効であることを見出した。さらに、村岡 G が開発した連結型 Dex-PEG 分子を用いると、想定していなかった相分離現象が発見された。これは、今後の反応空間を区画化した人工細胞系への基礎となることが期待される。これと並行して、Dex ドロプレット Q β ファージの RNA 複製系を用いた進化実験を実施した。その結果、進化可能な反応条件が見出され、現在その最適化および進化解析を行なっている。水内 G が合流して 2 年しかなかったが、この連携によって進化実験に着手できたと考える。

(2) 顕著な成果

< 優れた基礎研究としての成果 >

1. 「自律成長型の人工細胞創出」 (*Nature Communications* 2025)

概要: Dex ドロプレットに、DNA にエンコードした自己複製系を導入し、内部における DNA 増幅・複製反応によって体積膨張する人工細胞系の開発である。これまで、人工細胞の自己成長は極めて限定的なものしか報告がなかった。例えば、liposome 系では脂質合成のための触媒添加の例、LLPS の系においても構成成分の添加やカチオン添加による成長の例しかなく、内部反応特に遺伝子増幅反応と共役した例は報告例が無い。本研究は、初めて内部の DNA 増幅反応によって直接駆動される自己成長型の人工細胞の開発である。査読者からは技術的な指摘がされているが、LLPS 安定化に着眼した発想および達成された成長機能などを高く評価されており、本プロジェクトを象徴する成果である。

2. 「人工核を有する人工細胞モデルの創出」(*Nature Communications* 2025)

概要: Dex/PEG 系の相分離溶液に、RGG と呼ばれる天然変性タンパク質 (IDP) を添加したところ IDP ドロプレットが Dex ドロプレット内部に形成されることを見出した。この発見に基づき、DNA および RNA 合成酵素を IDP に濃縮し、ribosome などの翻訳因子を Dex 相に濃縮することに成功した。その結果、転写は IDP droplet、翻訳は Dex 相と反応を空間的に区画化した新しい人工細胞系の創出に成功した。この成果は、CREST 提案当初は全く想定していなかったものであったが、担当した博士学生の努力によって本プロジェクトを代表する成果の一つとなった。

3. 「脂質二重膜を变形する分子論の創出」(*J. Am. Chem. Soc.* 2023)

概要: 光でエンドサイトーシスを誘起する初めての分子材料の開発に成功した。エンドサイトーシスは、細胞内物質取込みを担う普遍的な生命現象である。架橋型アゾベンゼンを主骨格とする人工脂質を用いることで、青色光照射によってベシクル内部へ陥入するエンドサイトーシス様膜変形を実現した。核酸やファージなどの生体高分子、集合体を膜内へ効率的に封入する技術として有用であるとともに、細胞内への物質光輸送へも応用可能な、膜変形に関連する基礎研究としてインパクトを持つ成果である。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1. 「Dex ドロプレットを用いたオンチップ濃縮能を有するリアクタ技術」(Minagawa et al. *ACS Nano* 2023, 特願 2022-166631)

概要: 本プロジェクトにおける自律成長型人工細胞の開発の過程で、Dex ドロプレットが DNA や RNA のみならず各種タンパク質を濃縮することを見出した。さらに、Dex 濃縮のタグの開発

にも成功した。また、CREST 以前から開発していた微小リアクタ技術を用いて、Dex ドロプレットが並んだデバイス技術の開発にも成功した。これらの成果に基づき、外力を必要としない自律的にターゲット分子を濃縮する微量リアクタ技術の開発に成功した。その結果、通常のアッセイと比較して 100 倍高感度なデジタルバイオ分析法の確立を達成した。本成果は、すでに企業との共同研究に発展している。

2. 「分子個性の多様性が酵素の進化能のバロメーターとなる」(Sakuma et al. *JACS* 2023)

概要: デジタルバイオ分析法により、酵素分子には個性があり分子間でばらつきがあることを見出した。このバラツキが大きいほど、非天然基質に対する反応性が高いことも見出した。非天然基質への反応性の高さは、酵素が新しい機能を獲得する指標になると考えられているため、この発見は「分子間個性の多様性」が進化のバロメーターとなり得ることを意味する。これは酵素科学としてだけではなく、「進化学実験を行う前に、適切な初期配列を選別する」ための新しい工学技術になり得る。この仮説の検証にはさらなる研究が必要であるが、中長期的に見た時、本発見は極めて大きな工学的価値の可能性がある。

3. 「ドロプレットの安定化や変形を制御する分子材料の開発」(特願 2022-066542、特願 2022-073764、特願 2023-181844、PCT/JP2023/016741)

概要: ドロプレットは、微量物質を濃縮し、自在に出し入れ可能な微小リアクタとして有用な材料である。しかしその不安定性から、リアクタとしての十分な利用には至っていない。代表的なドロプレット材料である Dex/PEG 系において、マイクロメートルサイズのドロプレット構造を 24 時間以上安定化する材料や、融合を時空間制御する光制御方法、分裂を駆動する光応答性分子材料の開発に成功した。ドロプレットの利用性を飛躍的に高める分子技術と位置づけられる。

< 代表的な論文 >

1. Self-growing protocell models in aqueous two-phase system induced by internal DNA replication reaction

Y. Minagawa, M. Yabuta, M. Su'etsugu, H. Noji

Nature Communications 2025, **16**, 1522. (Biorxiv <https://doi.org/10.1101/2024.07.01.599542> にプレプリントを公開)

概要: 内容は、上述している「自律成長型の人工細胞モデル」に関するものである。

2. Artificial cells with all-aqueous droplet-in-droplet structures for spatially separated transcription and translation

K. Tomohara, Y. Minagawa, H. Noji

Nature Communications 2025, **16**, 627. (Biorxiv <https://doi.org/10.1101/2024.06.11.598395> にプレプリントを公開)

概要: 内容は、上述した人工核を有するコアシェル型の人工細胞研究である。

3. Endocytosis-Like Vesicle Fission Mediated by a Membrane-Expanding Molecular Machine Enables Virus Encapsulation for In Vivo Delivery

N. Uchida, Y. Ryu, Y. Takagi, K. Yoshizawa, K. Suzuki, Y. Anraku, I. Ajioka, N. Shimokawa, M. Takagi, N. Hoshino, T. Akutagawa, T. Matsubara, T. Sato, Y. Higuchi, H. Ito, M. Morita, T. Muraoka

J. Am. Chem. Soc. 2023, **145**, 6210–6220.

概要: 生理的条件下でエンドサイトーシスを駆動する初めての人工分子を開発した。青色光にตอบสนองしてリポソーム膜を内側に陥入させる。エンドサイトーシスを利用し、ウイルスを効率的かつ活性を維持した状態でリポソーム内部に封入することに成功した。ウイルスの膜封入によって、ウイルスを安定化できることを実証した。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 「野地」グループ

研究代表者: 野地 博行 (東京大学大学院工学系研究科 教授)

研究項目

- ・均一系微小リアクタの開発および操作技術
- ・人工細胞リアクタの生化学反応の定量計測
- ・自律分裂型人工細胞モデルの創出

② 「村岡」グループ

主たる共同研究者: 村岡 貴博 (東京農工大学グローバルイノベーション研究院 教授)

研究項目

- ・脂質膜・LLPS 機能化のための合成分子開発

③ 「水内」グループ

主たる共同研究者: 水内 良 (早稲田大学先進理工学部 専任講師)

研究項目

- ・界面安定化技術の開発および LLPS 型リアクタを用いた進化実験

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

- ・ 人工細胞リアクタ技術をもとに、Toppan holdings co.によって東京大学内に社会連携講座「次世代デジタルバイオ分析」講座を 2023 年に設置した。3年間の予定である。内容は「人工細胞リアクタ技術を利用した次世代のデジタルバイオ分析法」であり、まさに本 CREST の成果に基づく。
- ・ 2024 年度より、総合研究奨励会 (東大工学系研究科の外部 NPO) に、「人工細胞リアクタ工学会」を設置し、研究・技術調査研究会を発足した。日本を代表する総合メーカー、化学メーカー、製薬メーカーなど企業 10 社から構成される。野地が幹事を務める。これも、本 CREST の成果に基づくものである。今後、ここから新しい産学連携プロジェクトを生み出したい。
- ・ UK-Japan 交流プロジェクト。野地が代表となり、現在 JST ASPIRE UK-Japan プロジェクトに採択。このチームの組織化において、イギリスの合成生物学者のチームと連携し進行中。
- ・ 韓国との交流プログラム。2024 年に野地が韓国の生物工学会に招待されたのを契機に、無細胞合成生物学に関する日韓の交流事業を計画している。韓国側の代表は、Prof. Taek Jin KANG (Dongguk University, Korea)である。