

令和元年5月31日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2015～2018

課題番号：15KT0081

研究課題名(和文) 形と流動性の再現から読み解く生命システムの秩序原理

研究課題名(英文) Order principle of living cell homeostasis depicted by mimicking shape and fluidity of cells

研究代表者

藤原 慶 (FUJIWARA, Kei)

慶應義塾大学・理工学部(矢上)・講師

研究者番号：20580989

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、人工的に構成した細胞(人工細胞)に、生命で機能する部品のグループを導入することで生じる物理的・化学的な変化を、「流動性・生命機能・空間形状」という3つのキーワードを軸に追求しました。結果、細胞が示す空間形状が内部の物質の移動や生命機能に与える影響や、流動性が生命機能の発現を変化させる仕組み、流動性が空間形状変化を制御する可能性など、通常の生命科学ではアクセスしづらい現象の発見やメカニズムの解明に至りました。また、生命機能の模倣による形状の安定化や、硬い生体適合ゲル合成など、研究成果が材料科学にも結び付くことを実証しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、細胞膜や細胞サイズ空間が示す物理的・化学的な特徴は生化学反応モデルに導入されていないことが大半でした。この理由は、定式化の難しさだけでなく、どのような物理的・化学的な効果が存在しているかが明確でないことに由来します。本研究の成果により、細胞膜や細胞サイズ空間が生命機能とどのようにリンクしているかの描像が見えてきました。こうした描像は細胞生理の深い理解につながり、将来的には生命とは何か、といった問いかけに対する答えや、新しい医学・薬学の視点提供につながることを期待されます。

研究成果の概要(英文)：In this research, we investigated the physical and chemical changes caused by introducing a group of components that function in life into artificially constructed cells (artificial cell), based on the 3 physicochemical parameters: Function, Fluidity, and Spatial shapes". As a result, we have discovered phenomena that are difficult to access in ordinary biochemistry and molecular biology, such as the effects of boundaries of cells on the movement of molecules and its biological functions, the mechanism which fluidity changes the expression of biological functions, and the possibility that fluidity controls deformation of spatial shape. We also demonstrated that our research results are able to be applied to material science by creating DNA cytoskeleton to stabilize artificial cells and stiff biocompatible gels.

研究分野：合成生物学

キーワード：合成生物学 ソフトマター 細胞再構成 人工細胞 反応拡散 細胞変形

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内における代謝依存的な物質拡散(Parry BR, et al., Cell 2014, 156:183-94)、細胞内のマクロ構造の運動集積によるアクティブな物質拡散(Guo M, et al. Cell, 2014, 158: 822-32)など、生体分子が細胞内の流動性を制御している証拠が出始めていた。申請者らは、生体並みの高分子濃度(300 mg/mL)の細胞抽出液を含む人工細胞内の構築(藤原ら、ACS synthetic biology, 2014, BIOPHYSICS, 2014, 10:43)とタンパク質拡散速度の解析から、代謝と膜タンパク質を失った細胞質は物質拡散速度が生体の 1/100 以下となることを見出した(生物物理学会若手招待講演 2013)。この事実から、人工細胞を用いて流動性と機能の因果関係を解明が期待された。

ただし、細胞のような閉鎖系で流動性を議論する上では、細胞の形状による影響も考慮しなくてはならない。たとえば、膜の曲率と生体高分子の分布は強い相関を持ち、分子の局在は内部の局所的な濃度変化を生む(Int. Rev. Cell Mol. Biol. 2014, 307: 175)。さらに、高分子濃度変化は流動性を大きく変え、流動性の差が人工細胞形状の変化に与える影響も明らかになってきていた(柳澤ら、PNAS 2014, 藤原&柳澤 ACS synthetic biology 2014)。これらの事実と、よく知られるアクチンなどの骨格タンパク質と細胞形状の相関なども踏まえると、生命機能、流動性、形状はそれぞれ複雑な相関を持つことが考えられた。しかし、生命そのものの解析ではこれらを変化させることが困難であった。一方、人工細胞を用いた生命システムの再構成系であれば機能・流動性・形状のいずれもパラメータを調整することが可能であり、ソフトマター物理学の視点からお互いの因果や相関を解析できる状況であった。

2. 研究の目的

細胞恒常性の秩序原理に迫るためには、人工細胞のような閉鎖系における流動性、形状、生命機能の非線形的な因果関係を解析する必要があるが、通常の要素還元論的手法では困難である。そこで合成生物学の立場から生命システムを再構築した人工細胞を創成し、その性状をソフトマター物理学の視点から解析することで、「生命機能と形状・流動性の因果関係」と「細胞サイズ閉鎖空間の形状と流動性の因果関係」を解明することを目的とした(図1)。

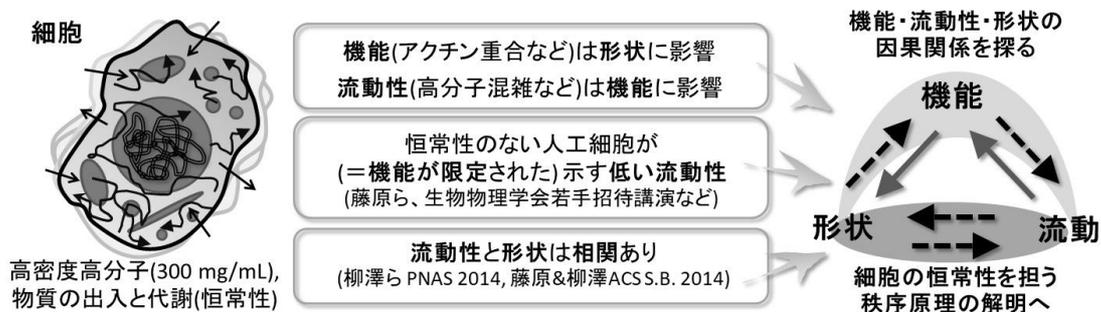


図1. 本研究の背景 機能・流動・形状間の点線は「示唆はあるが未解明」

3. 研究の方法

生命機能、細胞形状、流動性を軸に、それぞれの因果関係に迫った。合成生物学による組み上げと、ソフトマター物理学による解析が両輪かつ軸となるため、それぞれの分野の専門家である藤原と柳澤が共同研究により研究を進めた。人工細胞に再構成された生命機能と形状・流動性の因果関係は代表者の藤原が、ソフトマター物理学的にも課題である細胞サイズ閉鎖空間の形状と流動性の因果関係については分担者の柳澤が担当した。研究は、(1)流動性による形状の変化、(2)形状による流動性の変化、(3)流動性による機能の変化、(4)機能による流動性の変化、(5)機能による細胞形状の変化、(6)細胞形状による機能の変化、について解析を行った。

4. 研究成果

(1)流動性による形状の変化

単一脂質成分からなるリボソームを用いた解析を行った。リボソームの内部流動性変化が、浸透圧処理に伴う面積・体積比変化にカップルした形状変化に及ぼす影響を定量的に解析した。我々の先行研究から、BSA と細胞抽出液は高分子濃度に対する流動性の振る舞いが異なること、同濃度の BSA と細胞抽出液を内包したリボソームでは、浸透圧処理後の変形パターンが異なることが示されていた。そこで、BSA と細胞抽出液の濃度を振り、内部粘性と変形パターンとの関係を解析した。結果、いずれの場合も一定の流動性を境に安定な変形パターンが転移することが示された。(Fujiwara K & Yanagisawa M, Soft Matter 2017)

流動性が細胞形状の変形パターンの運命を変化させるという研究内容を発展させ、ゲル化と相分離の時間発展に伴い座屈が、細胞の内部構造に強く由来して変化する現象を見出し、Langmuir 誌に報告した。この成果は雑誌内カバーとして取り上げられた。(Koyanagi K et al., Langmuir 2019)

(2)形状による流動性の変化

本研究開始前までに光褪色後蛍光回復法(FRAP)による人工細胞内の流動性の解析法は確立していた。しかし、研究の進展にともない、生体分子が機能的な流動性が高い状態での分子拡散に迫るため、蛍光相関分光法(FCS)による人工細胞内での流動性を測定する系を新たに立ち上げた。結果、内包した高分子による異常拡散が存在することを突き止めた。この現象は試験管中では観察されないため、形状と流動性に対する新しい視点を提供するものである。(Watanabe C & Yanagisawa M, PCCP 2018)

(3)流動性による機能の変化

バクテリアの細胞分裂決定システムである Min システムを題材に、人工細胞中で生命機能が流動性に与える影響を解析する系を立ち上げることができた。Min システムにおいては、MinD と MinE というタンパク質が、ATP の加水分解を利用して細胞内で極を往復移動する。人工細胞内で Min システムを再構成し、高分子混雑剤による初期流動性によって運動パターンが変化することを確認した。

(4)機能による流動性の変化

流動性が生命機能に与える影響について解析を行うために、(3)で確立した FCS を用いた人工細胞内拡散速度の測定系をさらに高度化し、細胞膜からの距離や細胞形状と拡散の相関関係まで解析可能とした。しかし、生命機能を担う要素群を人工細胞内に投入した系では、明確に拡散速度を変化させる要素の同定には至らなかった。この理由は本研究で想定していた探索空間が小さいことに由来する可能性と、その他の物理的な要因により生じている可能性があった。そこで人工細胞形状を変更させた系での測定を行ったところ、細胞のように高分子混雑した人工細胞内では、その分子拡散が細胞形状によって変化することを示唆するデータを得た。

(5)機能による細胞形状の変化

人工細胞内部にアクチンを内包することで、その機能により人工細胞の形状を変化可能であることはすでに報告されていた。そこで、本研究では人工的な分子によるメカニカルな機能と細胞形状の関係について追及した。DNA ナノテクノロジーにより形成したゲルによって人工細胞内部を細胞骨格のように覆い、その産物の機械刺激や浸透圧に対する応答を観測した。結果、DNA の二本鎖形成エンタルピーに依存して機械的な安定化が観察された。すなわち、人工分子によって膜近傍の流動性を下げること、細胞骨格を保持した細胞膜のように安定性を付与することが可能であることを見出した。(Kurokawa C, et al., PNAS 2017)

(6)細胞形状による機能の変化

人工細胞形状が内部の動的な因子に与える影響を解析した。キャピラリーにより引き延ばした油中水滴内におけるバクテリア細胞内の動的な反応拡散波(Min 波)のパターンを解析したところ、十分に大きな空間の場合、スパイラル様のパターンが現れることを見出した。

細胞サイズ閉鎖空間特異的な機能の創発として、大きな膜表面積・体積比ゆえに、細胞膜との相互作用が弱いタンパク質の膜局在が強化される現象と、競合的な要素によるその解除を発見した。この効果は Min 波の創発において重要であることを示した。(revision 投稿中)

人工細胞中でゲル化したゼラチンの弾性を解析することで、脂質膜が最終的なゲル化の弾性に大きな影響を与えることが明らかになった。さらに CD や IR などの spectrum 解析やチオフラビン T 結合活性を解析したところ、人工細胞内ゲル化が引き起こす弾性転移はランダムコイル部分がシートへと転換する二次構造転換に由来することが示唆された。(Sakai A, et al., ACS Central Science 2018)

(7)総括

細胞内部の流動性が細胞全体の形状変化における重要因子であることを示した。FCS を用いた系を人工細胞に適用可能とすることで、細胞形状が流動性を変化させようという新規物理現象を見出した。Min 波を題材に、流動性と生命機能の共役が新しい秩序を生み出すことを示した。機能による細胞内流動性の変化は本研究の範囲内では見出せなかった。機能による細胞形状の変化を応用し、薬剤送達系にも利用可能な人工細胞の安定化システムを確立した。細胞形状や膜面積体積比により特異的に生じる機能の変化を見出し、生体適合性の高いゼラチンマイクロゲルの粘弾性制御への応用に成功した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

1. Sol-Gel Coexisting Phase of Polymer Microgels Triggers Spontaneous Buckling
K Koyanagi, K Kudo, M Yanagisawa
Langmuir, 35 (6), 2283-2288 (2019), 査読有
2. Single micrometer-sized gels: Unique mechanics and characters for applications
M Yanagisawa*, C Watanabe, K Fujiwara
Gels, 4(2), 29, (2018); doi:10.3390/gels4020029, 査読有
3. Increasing elasticity through changes in the secondary structure of gelatin by gelation in a micro-sized lipid space
A Sakai, #Y Murayama, #K Fujiwara, T Fujisawa, S Sasaki, S Kidoaki, M Yanagisawa*
(#: contributed equally to this work), ACS Central Science, 4(4), pp.477-483 (2018), 査読有
4. Cell-size confinement effect on protein diffusion in crowded poly (ethylene) glycol solution
C Watanabe, M Yanagisawa
Physical Chemistry Chemical Physics 20 (13), 8842-8847 (2018), 査読有
5. Liposomal internal viscosity affects the fate of membrane deformation induced by hypertonic treatment
#K Fujiwara*, #M Yanagisawa* (#: contributed equally to this work)
Soft Matter, 13, pp. 9192-9198 (2017), 査読有
6. DNA cytoskeleton for stabilizing artificial cells.
C Kurokawa, K Fujiwara, M Morita, I Kawamata, Y Kawagishi, A Sakai, Y Murayama, S M. Nomura, S Murata, M Takinoue*, M Yanagisawa*
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 114(28), pp. 7228-7233 (2017), 査読有

[学会発表](計 23 件)

1. 不均一なマイクロ弾性体の自発的座屈とその原理
小柳佳介, 工藤和恵, 柳澤実穂、第 5 回サイボウニクス研究会、2018 年
2. 細胞内混雑環境の再現から異常拡散の解明に向けて
春澤香苗, Johanna Muliany, 渡邊千穂, 柳澤実穂、第 5 回サイボウニクス研究会、2018 年
3. Cell-size confinement effect on protein diffusion in crowded poly (ethylene) glycol
光山隼史、吉田葵、土居信英、藤原慶、第 13 回無細胞生命科学研究会、2018 年
4. FtsZ-mts の添加により誘起される人工細胞内における Min 反応拡散波のパターン変化
光山隼史、義永那津人、柳澤実穂、土居信英、藤原慶、細胞を創る研究会 11.0、2018 年
5. 細胞サイズ空間による細胞内反応拡散波の発生制御
藤原慶、第 41 回日本分子生物学会年会 (招待講演)、2018 年
6. PURE system を用いた Min システムの再構成
吉田葵、光山隼史、土居信英、藤原慶、第 41 回日本分子生物学会年会、2018 年
7. 細胞を創る: 細胞分裂面決定機構の人工細胞内再構成
藤原慶、第 91 回日本生化学会大会 (招待講演)、2018 年
8. Buckling of polymer blend microgels via phase separation and gelation
K. Koyanagi, K. Kudo, M. Yanagisawa、The 12th SPSJ International Polymer Conference (IPC2018)、2018 年
9. 蛍光相関分光法を用いた多糖類溶液中の分子拡散及び濃度依存性
春澤香苗, 渡邊千穂, 柳澤実穂、第 17 回 関東ソフトマター研究会、2018 年
10. 不均一構造を備える高分子マイクロ液滴の buckling 現象
小柳佳介, 工藤和恵, 柳澤実穂、第 17 回 関東ソフトマター研究会、2018 年
11. ゲル弾性と界面張力のバランスによる高分子液滴の buckling 現象
小柳佳介, 工藤和恵, 柳澤実穂、日本物理学会 2018 年秋季大会、2018 年
12. 細胞サイズの微小液滴表面における Min タンパク質波の特異的な振る舞い
藤原慶、第 69 回コロイドおよび界面化学討論会 (招待講演)、2018 年
13. 細胞を壊し、細胞を創る: 創ることによる生命の理解
藤原慶、第 58 回 生物物理若手の会 夏の学校 (招待講演)、2018 年
14. 生命のように振る舞う人工細胞を創る・使うための基盤研究
藤原慶、細胞を創る研究会 10.0、2017 年
15. マイクロサイズ空間によって変化する Min 反応拡散波の発生条件
光山隼史、義永那津人、柳澤実穂、土居信英、藤原慶、関東ソフトマター研究会、2017 年

16. 無細胞タンパク質合成システムを用いた Min システムの挙動解析
吉田葵、光山隼史、土居信英、藤原慶、ConBio2017、2017 年
17. PURE system を用いた Min システムの人工細胞内発現
吉田葵、光山隼史、土居信英、藤原慶、第 12 回無細胞生命科学研究会、2017 年
18. 生体模倣で細胞再構成に迫る
藤原慶、第 12 回無細胞生命科学研究会、2017 年
19. 微生物学・分子生物学と人工細胞研究の接点
藤原慶、第 14 回 21 世紀大腸菌研究会、2017 年
20. 自律的な細胞分裂機構の再現に向けた大腸菌型人工細胞の構築
光山隼史、土居信英、藤原慶、第 3 回サイボウニクス研究会、2016 年
21. 細胞サイズ液滴内における高分子溶液の拡散とその空間閉じ込めの影響
渡邊千穂、柳澤実穂、第 54 回日本生物物理学会年会、2016 年
22. Artificial biomembrane with skeleton network of designed DNA gel
C. Kurokawa、K. Fujiwara、M. Morita、S. Murata、M. Takinoue、M. Yanagisawa、
4th International Soft Matter Conference、grenoble, France、2016 年
23. Membrane deformation determined by intracellular viscosity
K. Fujiwara & M. Yanagisawa、Pacifichem2015, Hawaii Convention Center, Honolulu,
USA, Dec 2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://user.keio.ac.jp/~kfujiwara/index.html>

<https://sites.google.com/g.ecc.u-tokyo.ac.jp/yanagisawa-lab/>

<https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/2018/3/16/28-43078/>

<https://www.keio.ac.jp/ja/press-releases/2017/6/27/28-21726/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：柳澤 実穂

ローマ字氏名：(YANAGISAWA, miho)

所属研究機関名：東京大学

部局名：大学院総合文化研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁)：50555802

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。