

平成22年 5月 31日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17076007

研究課題名（和文） 創発性を示す人工モデル細胞系の構築

研究課題名（英文） Real-World Modeling of Self-Emergent Active Cell

研究代表者 吉川 研一

（ 京都大学・大学院理学研究科・教授 ）

研究者番号：80110823

研究成果の概要（和文）：非平衡開放条件下、自ら時間発展するモデル人工細胞系の構築を目的として、「試験管内における染色体再構成」、「DNA 高次構造変化制御による転写・翻訳のスイッチング」、「モデル細胞系での膜、核酸、及びタンパク質のダイナミクス特異性」の3つの課題を基軸に研究を進めた。主要な研究成果としては、細胞工学的なものとして、[1]高濃度の生体高分子や塩を封入可能な細胞サイズ Liposome 作成法の開発、[2]試験管内でのポリヌクレオソーム再構成と構造転移、[3]レーザーを用いたゲノム DNA の非接触・無侵襲マニピュレーション法の確立、などが挙げられる。一方では、基礎理学的な研究も進展した。具体的には、[1]細胞サイズ空間内の表面効果による bulk とは質的に異なるアクチンの構造転移の発見、[2]細胞サイズのモデル系において、膜に接する内外溶液の3次元粘性が等しいときに、リン脂質膜の2次元拡散係数が数倍増加することを発見、などである。

研究成果の概要（英文）：The main purpose of this project is the construction of “non-equilibrium dissipative” artificial cell models. To achieve the purpose, the following three axes are employed; (i) in vitro re-construction of chromosome, (ii) transcriptional regulation by DNA coil-globule transition, (iii) cell-sized space specificity in the dynamics of membrane, DNA, and protein. The representative results in relation to the cell engineering are as follows; (i) Establishment of the methodology to entrap bio-polymers and substrates in a cell-sized model system. (ii) Unraveling of the scenario on the higher-order structural transition of chromatin. (iii) Invention of the technique of noninvasive and noncontact manipulation of bio-macromolecules by laser. Main results on basic science are; (i) Clear experimental representation on the confined effect of cell-sized space was demonstrated. For example, actin exhibits the two-step transition in a confined space, whereas it shows single step transduction in bulk phase. (ii) Clear evidence was shown on the cross-talk between membrane fluidity and the bulk viscosity.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|------|------------|
| 2005年度 | 19,700,000 | 0 | 19,700,000 |
| 2006年度 | 19,300,000 | 0 | 19,300,000 |
| 2007年度 | 17,200,000 | 0 | 17,200,000 |
| 2008年度 | 16,100,000 | 0 | 16,100,000 |
| 2009年度 | 15,000,000 | 0 | 15,000,000 |
| 総計 | 87,300,000 | 0 | 87,300,000 |

研究分野：生命現象の物理学

科研費の分科・細目：

キーワード：リポソーム、人工細胞モデル、その場観察、DNA 折り畳み転移、自己組織化、ナノ構造制御、油中水滴、レーザーピンセット

1. 研究開始当初の背景

(1)長鎖 DNA の高次構造転移が、ATP、RNA やイオンの濃度といった細胞内の環境パラメータによって制御されること、及び高次構造転移によって遺伝子活性が on/off 的に不連続にスイッチングされることを、平成 15、16 年度実施の特定領域研究（公募研究）「DNA の折り畳み相転移と遺伝子群の発現制御」、及び平成 16、17 年度実施の特定領域研究（公募研究）「水を舞台とする DNA の高次構造転移」によって明らかにしてきた。

(2)平成 14～17 年度実施の基盤研究 B「レーザー場におけるメゾスコピック系の非線形ダイナミクス」では、①集光レーザーが形成する引力ポテンシャル場の効果、及び光子の流速による非平衡開放系としての特質を利用した長鎖 DNA 単一分子の凝縮・脱凝縮のリズミ的な変化を実現、②集光レーザーの光圧効果を利用したマイクロメートル・スケールでの回転モーターの実現、といった成果を挙げている。

2. 研究の目的

本研究は、非平衡開放条件下において自ら時間発展するモデル人工細胞系の構築を最大の目的としている。そのために、試験管内における細胞機能複合体の再構築、及びそのイメージング・ハンドリング・物理化学的測定を可能にする系の確立などの基盤的研究も平行させて行う。具体的には、ナノからセンチメートル・スケールの階層的な操作技術を活用することによる「試験管レベルにおける染色体再構成」、「DNA 高次構造変化に伴う転写・翻訳活性の制御」、「モデル細胞系を使った膜、核酸、及びタンパク質のダイナミクス」の研究を進める。

3. 研究の方法

(1)試験管内における染色体再構成

核内で染色体がどのように折り畳まれ、どのような動的秩序に基づいて存在しているかを明らかにする。そのために、まずは、精製した DNA と染色体関連タンパク質を用い、試験管内における染色体の再構成を試みる。次いで、その微細構造を、原子間力顕微鏡を用いて可視化・解析する。また、その一方で、細胞から精製した染色体を、水溶液環境下解剖し、その微細構造を明らかにする。

(2)DNA の高次構造変化に伴う転写・翻訳活性の制御

長鎖 DNA からの再構成染色体を様々な溶液条件下に置き、原子間力顕微鏡と蛍光顕微鏡によって 1 分子での構造転移を観察・測定すると共に、DNA の複製・転写機能に着目し、その高次構造と機能発現の相互関係をモニタリングする。

(3)モデル細胞系を使った膜、核酸、及びタンパク質のダイナミクス

上記(1)、(2)で得られた成果を基に、細胞サイズリポソームを反応場としたモデル細胞系を構築し、DNA からタンパク質へと至る転写・翻訳の速度過程を解析することによって、実空間における核酸、及びタンパク質のダイナミクスを理解する。その他、リン脂質膜のダイナミクスについての検討も実施する。

4. 研究成果

(1)ハンドリング手法の確立

①集光レーザーを用いたゲノム DNA 操作技術
集光レーザーの焦点近傍では、引力ポテンシャルが働く。この効果を利用して、浸透圧により破裂させた細胞内のゲノム DNA をトラップし、細胞外へ輸送し、膨潤や引き延ばしをさせるといった、一連の“その場”実験手法の開発に成功した。

②集光レーザーを用いた細胞サイズ水滴（油中水滴）の操作技術

集光レーザーの引力ポテンシャル場を利用して油中水滴をトラップし、油中水滴同士を融合させるマニピュレーション法を確立した。ここで、油中水滴とは、油水界面にリン脂質一分子膜を持つ細胞サイズ膜空間を指しており、本研究代表者らが世界に先駆けて研究を進めている、細胞サイズのモデル実験系である。望みの濃度の DNA、蛋白や基質を封入した人工モデル細胞系が構築可能である。油水界面に残存している界面張力効果により浸透圧に強いこと、一分子膜であるため膜融合が容易であること、等といった Liposome には無い長所を持つ。

(2)細胞サイズモデル空間構成技術

油中水滴を、集光レーザーでトラップして、

又は重力を利用して(Fig. 1)、油水界面を通過させることにより細胞サイズ Liposome を構築することに成功した。本手法は、油中水滴の長所を兼ね備えた細胞サイズ Liposome の構築を可能とする、人工モデル細胞系には欠かせない要素技術である。

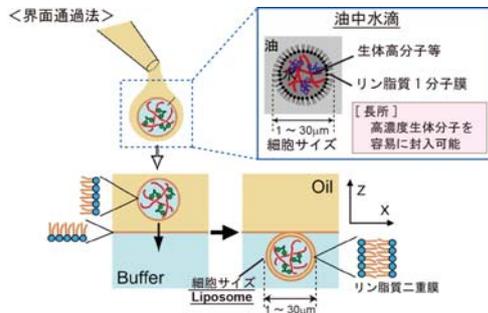


Fig. 1 吉川らによる新規な人工細胞モデル作成手法 (界面通過法)

(3) 試験管内における染色体再構成

線状 DNA、及び環状 DNA の2つの形態の異なる DNA を用いて、試験管内でヌクレオソームの再構成を実現した。また、ナノメートルスケールでの観察技術である AFM を用いて詳細にヌクレオソーム構造の観察を実現したことで、環状 DNA の方が線状 DNA よりもヌクレオソーム構造を効率的に形成可能であることも明らかとなった。これは、実際の生命系で観察される DNA の Loop 構造等がヌクレオソーム形成に優位な影響を与えている可能性を示唆する重要な結果である。

(4) DNA の高次構造変化に伴う転写・翻訳活性の制御

① PEG による DNA の液晶転移

吉川らは既に、希薄濃度条件下の DNA に PEG を添加することにより Coil-Globule 転移を起こすことを解明してきていたが、更に本研究において、重なり合い濃度以上の DNA に PEG を添加することで DNA の液晶転移が起きることを明らかにした。

② *E. coli* のゲノム DNA の高次構造と *E. coli* の増殖サイクルとの関連性

前記「集光レーザーを用いたゲノム DNA の操作技術」を用いて、対数増殖期、及び定常期にある *E. coli* からゲノム DNA を“細胞内にあったままの状態”で取り出し、ゲノム DNA の高次構造を観察した。結果、これら2つの異なる細胞の状態では高次構造が劇的に事なっていることが明らかとなり、*E. coli* の増殖 Cycle とゲノム DNA の高次構造との間には重要な関係性があることを見出すことができた。

(5) モデル細胞系を使った膜、核酸、及びタンパク質のダイナミクス

① 光感受性脂質を用いた Liposome の構造変化

光異性化反応により *Cis-Trans* 構造転移を示す光感受性脂質を設計・合成した。これを含む細胞サイズ Liposome を作成して光照射を行うことにより、可逆的な Liposome の形態変化を実現することができた。

② リン脂質の動態への内外溶液の粘性差を与える効果

モデル細胞内外の溶液の粘性が一致するときにはリン脂質膜の Mobility は高くなるが、内外の溶液の粘性差がおよそ 20cP 以上になると急激に膜の Mobility の低下が起こることを発見した。この結果は、既存の膜の Mobility に関する理論では説明不可能な知見であり、3次元粘性と膜上の2次元粘性の特異的なクロストークを実証したものとして、その意義は大きい。

③ モデル細胞内でのアクチンの特異的構造転移

アクチンは、bulk 水溶液では、繊維状の形態から、それが束状になった状態へと転移することは知られていた。細胞サイズ微小空間では、この二つの相の間に、膜表面に網目状の形態(mesh)をとるような相が現れることを、実験的に明らかにした。(Fig. 2)

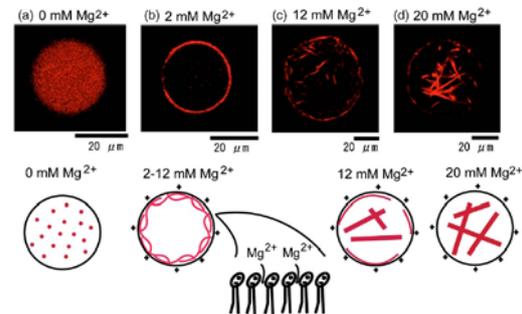


Fig. 2 細胞サイズモデル空間内での特異的なアクチンの構造転移 (Mg^{2+} 濃度を制御パラメータとしたときの結果)

④ モデル細胞内でのタンパク発現と、その反応速度解析

前記「集光レーザーを用いた油中水滴の操作技術」を用いて、封入物の異なる2つの油中水滴を融合させて、油中水滴中で生化学反応を開始させ、それを実時間観察する実験系を確立した (Fig. 3)。具体的には、一方の油中水滴には鋳型 DNA を、もう一方には無細胞転写・発現系を封入し、これらを融合させることによって、油中水滴内部での転写・複製反応を実現した。本方法を用いることで、

油中水滴の融合時点が反応開始点となるため、モデル細胞内部での反応の速度追跡・解析が初めて可能となった。

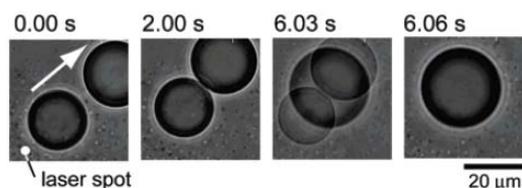


Fig. 3 細胞サイズ液滴を活用した微小反応システム（レーザーを用いる異種液滴の融合）

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 28 件）

- ① M. Negishi, T. Sakae and K. Yoshikawa, Mismatch of bulk viscosity reduces interfacial diffusivity at an aqueous-oil system, *Physical Review E*, 査読有, 81, 2010, 020901/1-4
- ② S. Araki, K. Hizume, T. Iwaki, Y. Suzuki, K. Takeyasu and K. Yoshikawa, Nucleosomal arrays reconstituted from ring and linear DNA, *Chemical Physics Letters*, 査読有, 479, 2009, 284-289
- ③ T. Saito, T. Iwaki and K. Yoshikawa, Small anion with higher valency retards the compaction of DNA in the presence of multivalent cation, *Biophysical Journal*, 査読有, 96, 2009, 1068-1075
- ④ M. Negishi, H. Kitahata and K. Yoshikawa, Emergence of superstructures from homogeneous lipid sphere, *Journal of Physical Chemistry B*, 査読有, 113, 2009, 3264-3268
- ⑤ T. Saito, T. Iwaki and K. Yoshikawa, DNA compaction induced by neutral polymer is retarded more effectively by divalent anion than monovalent anion, *Chemical Physics Letters*, 査読有, 465, 2008, 40-44
- ⑥ M. Negishi, H. Seto, M. Hase and K. Yoshikawa, How does the mobility of phospholipid molecules at a water/oil interface reflect the viscosity of the surrounding oil? *Langmuir*, 査読有, 24, 2008, 8431-8434
- ⑦ E. Shindo, K. Kubo, R. L. Ohniwa, K. Takeyasu and K. Yoshikawa, In situ analysis of the higher-order genome

structure in a single *Escherichia coli* cell, *Journal of Biotechnology*, 査読有, 133, 2008, 172-176

- ⑧ Y. Takenaka, H. Nagahara, H. Kitahata and K. Yoshikawa, Large-scale on-off switching of genetic activity mediated by the folding-unfolding transition in a giant DNA molecule: An hypothesis, *Physical Review E*, 査読有, 77, 2008, 031905/1-3
- ⑨ M. Hase, A. Yamada, T. Hamada, D. Baigl and K. Yoshikawa, Manipulation of cell-sized phospholipid-coated microdroplets and their use as biochemical microreactors, *Langmuir*, 査読有, 23, 2007, 348-352
- ⑩ M. Kojima, K. Kubo and K. Yoshikawa, Elongation/compaction of giant DNA caused by depletion interaction with a flexible polymer, *Journal of Chemical Physics*, 査読有, 124, 2006, 24902/1-4
- ⑪ M. Hase and K. Yoshikawa, Structural transition of actin filament in a cell-sized water droplet with a phospholipid membrane, *Journal of Chemical Physics*, 査読有, 124, 2006, 104903/1-6
- ⑫ M. Hase, A. Yamada, T. Hamada and K. Yoshikawa, Transport of a cell-sized phospholipid micro-container across water/oil interface, *Chemical Physics Letters*, 査読有, 426, 2006, 441-444
- ⑬ F. Luckel, K. Kubo, K. Tsumoto and K. Yoshikawa, Enhancement and inhibition of DNA transcriptional activity by spermine: a marked difference between linear and circular templates, *FEBS Letters*, 査読有, 579, 2005, 5119-5122
- ⑭ S. Araki, T. Nakai, K. Hizume, K. Takeyasu and K. Yoshikawa, Hydrodynamic radius of circular DNA is larger than that of linear DNA, *Chemical Physics Letters*, 査読有, 418, 2005, 251-255
- ⑮ T. Hamada, Y. T. Sato, K. Yoshikawa and T. Nagasaki, Reversible photo-switching in a cell-sized vesicles, *Langmuir*, 査読有, 21, 2005, 7626-7628

〔学会発表〕（計 34 件）

- ① 吉川研一, クロマチン階層構造のダイナミクス, 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009 年 12 月 12 日, パシフィコ横浜
- ② S. Araki, K. Hizume, K. Takeyasu and K. Yoshikawa, Effect of DNA architecture on the formation of nucleosome,

Workshop “Biophysics of Chromatin”,
2009年2月5日, Heidelberg

- ③ K. Yoshikawa, Novel hypothesis on the self-regulation on genetic information: Scenario form one-dimensional DNA into spatio-temporal order, The International Workshop on Complex Systems and Networks 2007, 2007年7月19日, Guilin Bravo Hotel, 桂林, 中国
- ④ K. Yoshikawa, Modeling of living cell: Autonomous motion, micro-reactor and response to the environment, 2007 IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems, 2007年10月31日, Sheraton, San Diego, CA, USA
- ⑤ 吉川研一, 生命科学と物理科学のキャッチボール: 情報・運動・制御の視点から Cross-talk between life science and physical science: DNA, Motor, Computation, etc., 分子生物学会・生化学学会合同大会, 2007年12月11日、パシフィコ横浜

[図書] (計2件)

- ① K. Takiguchi, A. Yamada, M. Negishi, M. Honda, Y. Tanaka-Takiguchi and K. Yoshikawa, Elsevier Inc., Methods in Enzymology, 2009, 31-53 (22p)
- ② A. A. Zinchenko, D. Baigl and K. Yoshikawa, American Scientific Publishers, Nano structures and organization of compacted single chains of polyelectrolytes, 2007, (38p)

[産業財産権] ○出願状況 (計4件)

名称: デオキシリボ核酸の操作方法、高分子の操作装置、及び試料セル
発明者: 吉川研一 外3名
権利者: 国立大学法人京都大学
種類: 公開
番号: 2006-296361
出願年月日: 2006年11月2日
国内外の別: 国内

名称: リポソームの製造法
発明者: 吉川研一 外3名
権利者: 国立大学法人京都大学
種類: 公開
番号: 2007-204382
出願年月日: 2006年1月31日
国内外の別: 国内

名称: リポソーム、リポソームの製造法及

び微小反応空間内での反応制御方法

発明者: 吉川研一 外1名
権利者: 国立大学法人京都大学
種類: 公開
番号: WO2007/032225
出願年月日: 2006年9月5日
国内外の別: 国外

名称: 光ピンセット装置
発明者: 吉川研一 外3名
権利者: 国立大学法人京都大学
種類: 公開
番号: 2008-241791
出願年月日: 2007年3月26日
国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他] ホームページ等
特に無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 研一 (YOSHIKAWA KENICHI)
京都大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号: 80110823

(2) 研究分担者

瀬戸 秀紀 (SETO HIDEKI)
京都大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号: 60216546

(3) 研究分担者

北畑 裕之 (KITATAHA HIROYUKI)
京都大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号: 20378532