

平成 21 年 5 月 13 日現在

研究種目：学術創成研究費

研究期間： 2006 ~ 2010 年度

課題番号： 18GS0421

研究課題名（和文） 物理学を基盤とする人工細胞モデルの構築と機能解析

研究課題名（英文） Physico-chemical approach on the construction of functional de novo cell

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

研究分野：数物系科学

科研費の分科・細目：物理学・生物物理・化学物理

キーワード：リボソーム・人工細胞モデル・物性基礎論・メソスコピック系・自己組織化

## 1. 研究計画の概要

本研究では、モデル細胞の非平衡条件下での振る舞いを明らかにすることを通して、生命現象の本質に迫る。そのため、具体的には次の3つの視点から研究を進めてきた。(1) DNA 高次構造転移とその生物学的意義 DNA の高次構造転移による遺伝子群の活性の on/off スwitchングを実空間上の実験を通して実証する。非特異的な環境要因による、DNA の折り畳み転移に関して、蛍光顕微鏡および、AFM による一分子計測を主とした系統的な実験を行う。得られた結果より体系的な理論を構築し、これにより細胞内での自律的な遺伝子制御のメカニズムの解明を目指す。(2) 細胞サイズ小胞を用いる実空間細胞モデルの構築と微小空間特異性 人工細胞モデルとしての巨大リボソームの調製手法を開発し、そのメカニズム解析を行う。さらに、ゲノムサイズが 2.1 Mb と小さく全遺伝子が特定された超好熱菌性始原菌ゲノムを用いた無細胞タンパク質発現系を確立し、細胞内遺伝子情報制御のモデル系に展開する。リン脂質多重層から自発的に細胞サイズの小胞（リボソーム）が生成する機構を明らかにするとともに、モデル小胞内での転写・発現反応の加速のメカニズムを解明する。(3) 生命現象の階層的モデリング 長鎖 DNA の高次構造転移と生化学反応のネットワークからなる、生命現象の階層的システムとしての特質を実験・理論の両面から究明する。上記 1)、2) の課題を進展させる中で構築された理論に基づく作業仮説に従い、実空間上でのモデル実験による検証を進める。また、リボソームに無細胞タンパク質合成系を封入した人工細胞モデルを創り出す。

## 2. 研究の進捗状況

## (1) DNA 高次構造転移とその生物学的意義

イオンや非特異的分子などの環境パラメータによる、DNA の高次構造相転移のメカニズムを解明してきている。真核細胞における遺伝子群発現のロバスタな on/off 制御の解明を目指し、細胞内のクロマチンのミクロ相分離構造の安定性を、荷電効果と関連させることにより、理論化した。長鎖 DNA に高次構造転移を起こすことにより、転写・発現の on/off 制御が可能となることを示した。さらには、実験を通して理論的なモデルの検証をすすめてきている。これらの課題全般にわたって新規性が高く、生命現象に対し興味深く示唆的な成果が得られてきている。

(2) 細胞サイズ小胞を用いる実空間細胞モデルの構築と微小空間特異性 当初の予想を越えて大きく発展した研究として、油中水滴を油/水界面を介して水相に移行させることによる、細胞モデルの高効率な形成手法「界面通過法」の確立が挙げられる。世界に先駆けたこの手法の確立により、任意の組成の溶液を内包する細胞サイズ小胞の形成が可能となり、モデル細胞系の研究が飛躍的に発展しつつある。本課題ではまた、セントラルドグマの根幹を成す転写や翻訳に関わるシステムをターゲットとして、超好熱性始原菌由来システムの無細胞再構成系の構築を進めている。現在、タンパク質合成系の開発に成功し、モデル細胞に組み込む準備が整った。

(3) 生命現象の階層的モデリング 特に、遺伝子群がロバスタな on/off 制御を受けることに関するメカニズムについて、理論的なモデルの構築を行った。理論に基盤を置く作業仮説に従い、実空間上でのモデル実験による

検証が進行中である。また、膜タンパク質の無細胞合成・機能化リボソームの構築と、新規酵素応答性界面活性剤を用いた膜タンパク質再構成リボソームの合成手法の開発に成功したことは特筆される。

### 3. 現在までの達成度

当初の計画以上に進展している。

ゲノムサイズの巨大 DNA が、活性酸素や放射線によって二本鎖切断される事は知られているが、この速度過程の定量的計測手法を新たに考案した。二本鎖切断は DNA 損傷の中でも最も重篤であり、癌や生体の死をもたらすが、メガ塩基対に一箇所程度の切断であるそれは、従来手法での定量的な計測は不可能であった。今後は、1分子計測に基づく、DNA 二本鎖切断反応の定量的計測手法を確立し、放射線生物学や放射線医学の分野での汎用が可能となるようなプロトコルを作成し、普及を計ることを予定している。

人工細胞モデル研究開始時点では、自然膨潤法を主たる実験手法として取り組んだが、極めて有力な新手法、液滴界面通過法を考案し、これの有用性を明らかになってきている。実際、DNA やアクチン、ATP などの基質を任意の濃度で封入した細胞サイズリボソームの構築が可能となっており、人工細胞モデル研究における breakthrough となっている。

### 4. 今後の研究の推進方策

物理科学を基盤として、構成論的に“生命現象の謎”に迫ってゆくといった研究を更に大きく発展させる。(1) DNA 高次構造転移と遺伝子群の自律的制御 非特異的な環境パラメータによる長鎖 DNA の高次構造制御については、その物理的な機構をかなりの程度明らかにすることができてきている。今後の重点課題としては、ロバストな遺伝子群の制御に深く関わっているクロマチン(真核細胞のゲノム)について、その高次構造と遺伝子群の活性の相関関係を明らかにすることが挙げられる。再構成クロマチンを用いた、階層的な構造転移の研究と、真核細胞から無侵襲的に取り出したクロマチンを用いる構造と機能の研究が中核となる。(2) 実空間人工細胞モデルの構築 DNA やアクチン、さらに ATP などの基質を任意の濃度で取り込んだ細胞サイズリボソームの構築手法として、液滴法を世界に先駆けて開発してきた。本手法を用いて、機能性生体高分子を内包したモデル小胞系を用いた実験を大きく発展させる。すでに、アクチンと DNA を共存させた細胞サイズ空間では、バルク溶液中とは全く異なる相転移挙動を示すことなどが明らかとなっている。アクチンの持続長の効果を取り入れた平均場理論も構築してきており、実験・理論両面から研究を推進する。(3) 生命現象の

階層的モデリング 細胞サイズ小胞中での、膜蛋白質の発現とそれに引き続く膜上での蛋白質の機能化については、既に大きな前進が得られている。この実験系を更に発展させ、受動的な輸送蛋白だけではなく、能動的なベクトル輸送を示すような人工細胞モデルの構築をめざす。さらに、細胞膜表面で物質の認識、透過、情報伝達に関わる膜蛋白質を人工細胞モデルとしてのリボソーム系に効率よく組み込む新規シャペロン技術の開発を試みる。本研究で得られた新知見を基に膜タンパク質研究やバイオテクノロジー・基礎医学への応用を試みる。

### 5. 代表的な研究成果

[雑誌論文](計62件)

T. Saito, T. Iwaki, and K. Yoshikawa, DNA compaction induced by neutral polymer is retarded more effectively by divalent anion than monovalent anion. *Biophys. J.*, 96, 1068-1075 (2009).

M. Kaneda, S. -i. M. Nomura, S. Ichinose, S. Kondo, K. Nakahama, K. Akiyoshi, and I. Morita, Direct formation of proteo-liposomes by in vitro synthesis and cellular cytosolic delivery with connexin-expressing liposomes, *Biomaterials*, in press. (2009).

S. -i. M. Nomura, S. Kondoh, W. Asayama, A. Asada, S. Nishikawa and K. Akiyoshi, Direct preparation of giant proteo-liposomes by in vitro membrane protein synthesis. *J. Biotech.*, 133, 190-195 (2008).

T. Sato, H. Atomi, and T. Imanaka, Archaeal Type III Rubiscos function in a pathway for AMP metabolism. *Science*, 315, 1003-1006 (2007).

A. Yamada, M. Le Berre, K. Yoshikawa, and D. Baigl, Spontaneous Generation of Giant Liposomes from an Oil/Water Interface. *ChemBioChem*, 8, 2215-2218 (2007).

T. Hamada, Y. Miura, K. Ishii, S. Araki, K. Yoshikawa, M. Vestergaard, and M. Takagi, Dynamic Processes in Endocytic Transformation of a Raft-Exhibiting Giant Liposome. *J. Phys. Chem. B*, 111, 10853-10857 (2007).

[学会発表](計139件)

[図書](計34件)

[その他]

ホームページ

<http://www.yklab.jp/>