

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22760604

研究課題名（和文）

生物時計由来素子を用いた人工時計細胞デバイスの創製

研究課題名（英文）

Creation of artificial cell clock devices by the biological clock element

研究代表者

小嶋 勝 (KOJIMA MASARU)

名古屋大学・工学研究科・特任助教

研究者番号：00533647

研究成果の概要（和文）：試験管内再構成が可能なシアノバクテリア生物時計由来素子であるナノサイズ時計タンパク質 KaiA, KaiB, KaiC を油中におけるリン脂質被覆ドロプレット中に封入し、その活性検出に成功した。その結果、周期は 35 時間の長周期となっていた。蛍光標識による格タンパク質の局在の観察から、この長周期化の原因は Kai タンパク質の局在が均一でないため、濃度バランスが通常の状態と異なるために引き起こされている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We encapsulated nano-sized clock protein KaiA, KaiB, KaiC, which are elements derived from the biological clock of cyanobacteria, in phospholipid-coated microdroplets. And then, we have successfully detected its activity. As a result, the period length became 35 hr. From the observation of protein localization by fluorescence-label, it is suggested that this long-period was caused by Kai protein localization.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：生物物理学、マイクロ・ナノシステム工学

科研費の分科・細目：プロセス工学、生物機能・バイオプロセス

キーワード：生物物理、生物・生体工学、ナノバイオ、分子機械、生体機能利用

1. 研究開始当初の背景

高等動植物から原核生物に至る自然界で広く見られる、約 24 時間周期の生物リズムは生物時計により制御されている。生物時計は、工学系の時計と同様に振動体を中心であり、その振動体をコントロールする入力系と振動体が発するシグナルを増幅する出力系を基本構造にもつ。シアノバクテリア（図 3 左上）は光合成を行う細菌で、生物時計を備える。その一番の特徴は、生物時計の発振機構が、わずか3種類のタンパク質 KaiA, KaiB, KaiC と ATP(アデノシン三リン酸)による生化学反応によって、試験管内再構成することができることである（図 1）。時計遺伝子群 kaiABC がクローニングされた当初 (Ishiu

et al. Science, 281, 1519 (1998))、他の生物と同様に遺伝子の発現制御がリズムを発生させると考えられたが、その後の研究により (Nakajima et al. Science, 308, 414 (2005)) 生化学的反応が振動体の実体であることが明らかとなっている。

このように、最先端の研究により実体が明らかになりつつあり、その応用が期待されていた。

本研究は、以上の特徴を持つシアノバクテリア生物時計由来素子であるナノサイズ時計タンパク質を脂質二重膜小胞による微小空間内に封入し、制御性を高めることでボトムアップによりナノ・マイクロサイズの新規デバイス「人工時計細胞デバイス」を創出、

「人工生体クロック」として応用可能な基盤を確立することを目指した (図 2)。

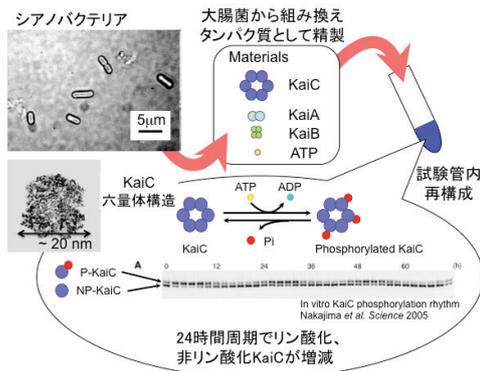


図 1 シアノバクテリア生物時計の再構成

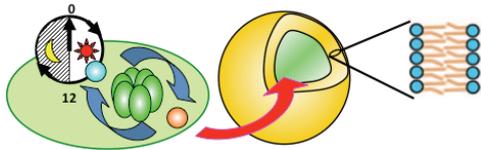


図 2 人工脂質二重膜小胞中に時計タンパク質を再構成し、ナノ・マイクロサイズの人工時計細胞デバイスを創出、基礎・応用に役立つ。

2. 研究の目的

唯一、試験管内再構成が可能なシアノバクテリア生物時計由来素子であるナノサイズ時計タンパク質を世界で初めて微小空間内に封入し、制御性を高めたナノ・マイクロサイズの人工時計細胞デバイスを生み出す。さらに人工時計細胞デバイスをクロック発振器「人工生体クロック」として世界に先駆けて応用し、効果時間を制御した薬剤輸送機構の開発や、他の生体由来素子の制御を目指す。この人工生体クロック制御を用いて、異なる生体由来素子間での同期を可能にすることは、より高度・複雑なシステム構築を実現する。これにより、現在、単純な反応のみが可能な生体分子反応応用技術にブレイクスルーをもたらすことを目的とする。

これまでに申請者は原核生物、特に細菌に関する研究を推進してきた。その成果として、まず、細菌べん毛モータの研究に関する、べん毛モータタンパク質の機能的再構成及び制御機構の解析が挙げられる。前者の研究において、膜タンパク質であるべん毛モータタンパク質を脂質二重膜中に再構成し、その機能を計測・評価した。その結果、モータタンパク質の脂質二重膜中への再構成技術向上をもたらした。この脂質二重膜中への再構成実験経験を生かし、唯一再構成を行うことが可能な生物時計、シアノバクテリア生物時計の再構成を実現したい興味を持ち、試験管内

再構成系に改良を加えることで新たな実験系を考案し、シアノバクテリア細胞中の現象に近い条件で、再構成された生物時計の振舞いを調べた。そして、時計を正確に維持することを可能にする合成、分解量を見積もることに成功した。この見積もりから、時計を維持するための細胞分裂速度の限界も推測することができ、分裂速度の速すぎる原核生物では時計を維持できない可能性を示した。この次の段階として、生物時計再構成系の改良を進め、生体内の現象を明らかにする方向性の他に、過去の研究背景を生かし、生物時計分子を細胞膜中で再構成することで生物時計をデバイスとして利用することが可能になるのではないかと考え、人工時計細胞デバイス創出を目標とする本研究計画を立案した。

まずは再構成技術開発の前段階として、油中におけるリン脂質被覆ドロプレット中での時計タンパク質の再構成とその活性検出を試み、この研究を発展させ、油中から水中の脂質二重膜中再構成に切り替えることで人工時計細胞デバイス創出を実現する。

3. 研究の方法

KaiA, KaiB, KaiC と ATP を油中水滴法を用いて人工膜小胞中に再構成し、時計としての活性を保持しているかを確認する。各タンパク質濃度、人工膜小胞の大きさ、人工膜小胞構成に使用する脂質といった条件を検討し、活性を保持するのに最適な条件を探索し、人工時計細胞デバイスとしての基盤を築く。次に、時計タンパク質に蛍光標識を行い、膜小胞中での動的変化を明らかにする。また、人工膜小胞の大きさを制御することで再構成された時計分子の数を制御し、時計構成に必要な分子の最小数を見積もる。この試みと並行してナノ・マイクロスケールの人工膜小胞制御技術を確認する。さらには、時計タンパク質を封入した膜小胞の応用も目指す。

(1) 油中水滴法を用いた人工膜小胞への生物時計タンパク質再構成系の確立
大型人工膜小胞の形成には既存の方法として静置水和法などがあげられるが、この方法では ATP を加えるときに必須である Mg^{2+} が膜小胞形成を阻害してしまう問題を抱えている。そこで本研究では、最近開発され、ATP 駆動型分子モータータンパク質の封入に成功した実績のある油中水滴法を用いて再構成を試みる (図 3B) (Takiguchi et al. Langmuir, 24, 11323 (2008)).

油中水滴法は内液組成にかかわらず膜小胞を形成することができるため、ATP を駆動力とする生物時計を再構成するのに適した方法である。

さらに、油中でリン脂質で被覆されたドロ

ップレットを形成しそこから脂質二膜小胞を形成するため、リン脂質被覆ドロップレット内での再構成実験を行った後、その実験系をそのまま利用してさらに実験を進めることができる。

まずはミリスケールのチャンバー中(図3 A)で再構成を行い膜小胞の大きさにはこだわらず、生物時計活性が維持される再構成系を構築する。活性の評価は KaiC のリン酸化リズムとして検出できるため、ウエスタンブロッティングによって検出する。再構成された膜小胞を高効率で得るため、膜小胞を形成する脂質組成なども検討する。

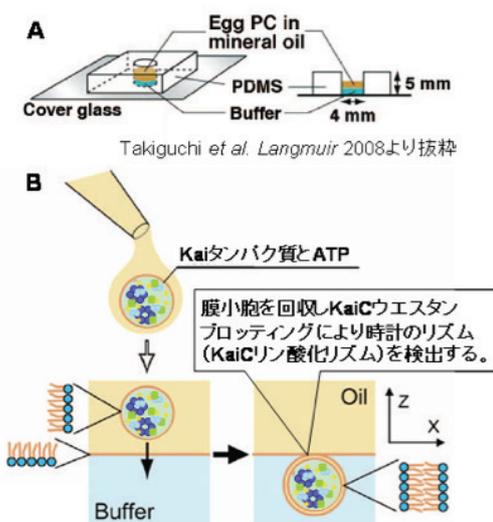


図3 油中水滴法の模式図

(2) 人工膜小胞中での蛍光標識時計タンパク質の動的変化の観察

(1)の研究結果から得られた安定して時を刻む条件下で時計タンパク質の膜中での動的な変化を観察する。強い蛍光を発することができる蛍光標識のうち、Kai タンパク質に利用可能な蛍光色素のいくつかは既に明らかになっている。そこで、KaiA, KaiB, KaiC を異なる蛍光色素で蛍光標識し、時間変化に伴う膜小胞中での各分子の動的な変化を蛍光顕微鏡を用いて観察する。特にシアノバクテリア細胞中で KaiB は生物時計の刻んでいる時間によって細胞質中から膜へと局在を大きく変化させている可能性が示唆されているため(Kitayama et al. EMBO J. 22, 2127 (2003))、人工膜小胞中で同様の現象が起こるかを確認する。

まずはラベル化の手法が確立している KaiB, KaiC に関して動的な変化を確認する。KaiA に関しては適した蛍光標識がないためこれらタンパク質の結果を確認した後、動的変化の確認を試みることにした。

なお、これらの実験は油中におけるリン脂

質被覆ドロップレット中で行った。

(3) ナノ・マイクロスケールの人工膜小胞制御技術の開発

マイクロチャンバー、ナノピペットによる微量インジェクション技術を利用することにより大きさを制御した膜小胞を作成するシステムを開発する。

特にマイクロフルイディクスを応用したチップデバイスを作成することで、均質なドロップレットの形成が可能な環境を生み出す。

4. 研究成果

唯一、試験管内再構成が可能なシアノバクテリア生物時計由来素子であるナノサイズ時計タンパク質 KaiA, KaiB, KaiC を微小空間内に封入し、制御性を高めたナノ・マイクロサイズの人工時計細胞デバイスを生み出すことを目的として本研究を推進した。

(1) 油中水滴法を用いた人工膜小胞への生物時計タンパク質再構成系の確立

時計タンパク質を人工膜小胞中に再構成し、時計としての活性を保持しているかの確認を行う前段階として、油中におけるリン脂質被覆ドロップレット中での時計タンパク質の再構成とその活性検出を試みた(図4)。その結果、再構成された時計タンパク質は24時間周期ではなく35時間の長周期となっていたが、少なくとも4日間、時計として機能することが確認された(図5)。人工脂質膜中での時計タンパク質の再構成と活性評価は世界に先駆けた初めての試みであり、この結果から人工時計細胞デバイス創製の可能性が示された。

(2) 人工膜小胞中での蛍光標識時計タンパク質の動的変化の観察

何が原因となって長周期化が起こっているのかを明らかにするために、時計タンパク質に蛍光標識を行い、膜小胞中での動的変化を明らかにすることを試みた。蛍光標識による Kai タンパク質のドロップレット内の局在を観察した結果、KaiC がドロップレット膜近辺へ局在していることが確認された。一方、KaiB タンパク質は一様に分布することが確認され、これらの局在は変化しないことが確認された(図6)。このため、長周期化の原因は KaiC が膜近辺へ局在することで、局所的な KaiC タンパク質濃度が上昇し、Kai タンパク質の濃度バランスが通常の状態と異なるために引き起こされている可能性が示唆された。この局在の違いはタンパク質の特徴により引き起こされるのか、物理的な要因によるものなのかは今後明らかにしていく必要がある。

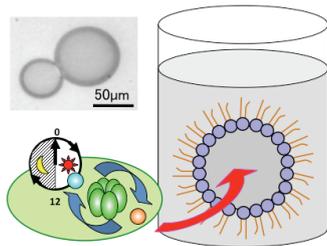


図 4 光学顕微鏡観察による油中リン脂質被覆ドロップレットとドロップレットへの生物時計再構成模式図

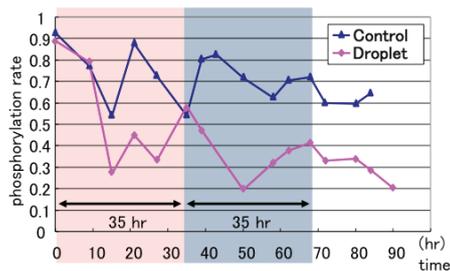


図 5 ドロップレット封入時計タンパク質の機能検出結果

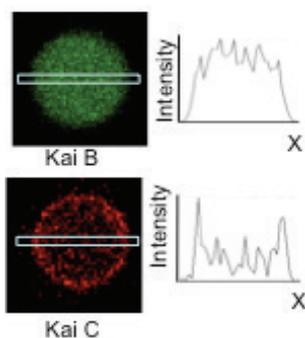


図 6 蛍光観察によるドロップレット内での格タンパク質の局在確認

(3) ナノ・マイクロスケールの人工膜小胞制御技術の開発

ナノピペットを埋め込んだマイクロチップを形成することで、マイクロ流路中に均一なドロップレットを作製することに成功した。しかしながら、大きさの制御派手は至らず、今後、微量インジェクション技術を応用することで大きさを自由に制御した均質なドロップレットの形成が可能な環境を生み出す必要がある。

これらの結果から、Kai タンパク質の混合比率を操作することで、時計の周期が制御できる可能性が示された。これらの成果は生物時計の応用への土台となるだけでなく、より細胞に近い膜小胞中再構成における生物時計の新たな振る舞いを明らかにし、新しい知

見をもたらす成果である。

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 0 件)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 小嶋 勝, Evaluation of Nano Biological Clock Activity Capsulated by Lipid Layer, IEEE- 10th International Conference on Nanotechnology, 2010.8.18, 韓国 ソウル KINTEX
- ② 小嶋 勝, Reconstitution of Biological Clock into Microdroplet, 第 48 回日本生物物理学会, 2010.9.21, 東北大学川内キャンパス
- ③ 小嶋 勝, リン脂質被覆小胞にカプセル化された生物時計活性の評価, ナノ・バイオメディシンシンポジウム, 2011.2.21, 名古屋大学野依学術交流館
- ④ 小嶋 勝, Evaluation of Biological Clock Activity Capsulated by Lipid Mono Layer, 2012 IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems, 2011. 9. 26, アメリカ・サンフランシスコ
- ⑤ 小嶋 勝, Control of Biological Clock Activity Capsulated by Lipid-mono-layer, 2012 IEEE International Conference on Robots and Automation, 2012. 5. 16, アメリカ・セントポール

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小嶋 勝 (KOJIMA MASARU)
名古屋大学・工学研究科・特任助教
研究者番号：00533647

(2) 研究分担者なし

(3) 連携研究者なし