

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25610117

研究課題名(和文)細胞小器官の組み込みによる人工細胞モデルの構築

研究課題名(英文)Towards constructing artificial cell model with cellular components

研究代表者

野村 慎一郎(NOMURA, Shin-ichiro)

東北大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50372446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、細胞サイズリポソーム(GUV)内に細胞内小器官を導入する手法を基盤として、新規な人工細胞モデルの創出を目的とした。その過程で、さまざまなマイクロサイズの物質を生細胞内部に導入できるGUV-細胞電気融合法を確立した。GUVと細胞を特定の電場条件で融合させることで、GUV内の物質(直径1μmまでの蛍光ビーズ、磁気ビーズ、プラスミド、DNAオリガミや混合物)がまとめて高効率に細胞内に導入された。本法の利点として、物質の化学修飾が不要であり、エンドソーム脱出の経路を考えなくてもよい点がある。本成果は、細胞の機能改変や細胞の全機能再構成モデルの構築に貢献するものと考え研究を続けている。

研究成果の概要(英文)：This project aims to construct a cell model by using giant unilamellar vesicle (GUV) with extracted live cell components. During the project, we developed the novel method for introducing micro objects (~1μm) into live cells, by using electrofusion with GUVs. Briefly, dispersed cells and GUVs were placed into an electrofusion chamber, and were exposed to an AC field to align cells-GUVs, and were also exposed DC pulse to induce transient electrofusion. The processed cell reached confluence with entrapping specified sizes of fluorescent beads. The transfer efficiency was evaluated by using fluorescence microscopy and flow cytometry. Delivering magnetic beads, DNA origamis, plasmids were also implemented. Introduction of artificial objects into live cells is an important topic in biotechnology. We expect that our novel method will be used for elucidation of cell mechanisms and creation of artificial cell which consists of cellular components.

研究分野：人工細胞工学, 分子ロボティクス

キーワード：人工細胞モデル リポソーム

1. 研究開始当初の背景

近年、生体分子やネットワークを「人工的に創る」作業を通して生命システムの理解を目指す「合成生物学」が発展しつつある。本分野の大きな目標の一つとして、人工細胞の創成が挙げられる。たとえば Venter らのチームは、化学合成した DNA をバクテリアの「殻」に導入することで、複製能をもつ「人工細胞」の合成に成功したと報告した。しかし、細胞の「膜」とそれに内包される代謝系ネットワークなどゲノム DNA 以外すべてを包括するような人工細胞モデルは構築されておらず、これが実現することで細胞の理解と利用は飛躍的に進歩することが期待されている。代表者・野村は、細胞サイズリポソームを用いた人工細胞工学を専門とし、転写/翻訳系を内包し膜タンパク質を合成・機能させる人工細胞モデルの構築に成功している。さらに、細胞抽出液のみならず核・ミトコンドリアに代表される細胞小器官を巨大リポソーム内に導入している。これらの技術を融合することで、全く新しい機能性人工細胞モデルの構築を目指す。

2. 研究の目的

本研究で我々は、(1) 哺乳細胞から抽出された細胞小器官を内包した人工細胞モデル及び、(2) 哺乳細胞抽出液を内包した細胞サイズの人工細胞膜小胞を構築し、(3) 両システムを融合することで、哺乳細胞と類似の構造を示し、細胞内小器官が機能しうる准人工細胞モデルの構築を目指す。本研究により、従来の研究では達成できていない、*In vitro* 実験の結果を包括的に検証可能とする、新しい人工細胞モデルシステムが提供されるものと期待した。

3. 研究の方法

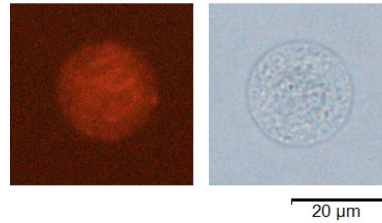
細胞内小器官を機能させうる人工細胞モデルを構築するため、以下三つの課題を掲げて研究を行った。

(1) 細胞内小器官を導入可能な細胞サイズリポソームの構築方法を確立する。すでに Droplet 法により部分的に成功しているが、収率向上および物性の評価を行う。(2) 細胞内小器官、特にミトコンドリアと核に着目して、そのリポソーム内で測定可能な活性測定手法を確立する。ミトコンドリアの融合、エネルギー産生を測定する。核については、紡錘体状態のものをリポソーム内に導入することを試みる。(3) リポソーム内に導入したミトコンドリアと核との相互作用を測定し、細胞骨格および無細胞タンパク質発現系との協調動作可能性を検討する。以上の研究から、細胞内小器官を連携的に駆動可能な、哺乳細胞の実空間モデルの構築を目指した。

4. 研究成果

細胞内小器官を導入可能な細胞サイズリポソームの構築方法を確立した(下図: ミト

コンドリア導入リポソームの例)。そして、本研究の過程において、「GUV-細胞電気融合法」の開発に成功した。これによって、細胞の内部空間にさまざまな人工物質を送り込めることが明らかになった。交流電場によ



て整列させた GUV と培養細胞に対して、パルス電場を印加することによって細胞膜とリポソーム膜を一時的に融合し、形成される孔を介して人工物が導入される。蛍光ビーズと HeLa 細胞を用いて、導入される物質のサイズ依存性をレーザー共焦点顕微鏡、フローサイトメータを用いて調べ、直径 1μm までの物質が細胞内部に導入されることがわかった。またサイズが合えば磁気ビーズやプラスミド、DNA オリガミ、およびこれらの混合物がまとめて導入されうることを明らかにした。本法の利点として、人工物質を、ペプチドタグや正電荷脂質などの化学的なモディファイなしにそのまま細胞内(サイトゾル)に導入できる点、外膜突破やエンドソーム脱出の経路を考えなくてもよい点、等が挙げられる。これについて特許申請を行い、論文に報告した(PLoS ONE 誌)。本件は他の生理活性物質の導入について試験を進めており、PCT 出願を準備中である。この成果は、遺伝子導入を伴わない細胞の機能改変や、細胞の機能再構成に大きく貢献するものと考えられる。本法を用いて、実際に駆動する人工細胞モデルの研究を引き続き行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Akira C. Saito, Toshihiko Ogura, Kei Fujiwara, Satoshi Murata, Shin-ichiro M. Nomura*

“Introducing Micrometer-Sized Artificial Objects into Live Cells: A Method for Cell-Giant Unilamellar Vesicle Electrofusion”

PLoS ONE, 9(9), 2014, e106853, 査読有。

2. Kei Fujiwara, Miho Yanagisawa and Shin-ichiro M. Nomura

“Reconstitution of intracellular environments *in vitro* and in artificial cells”

BIOPHYSICS, 10, 2014, 43-48, 査読有。

3. 齋藤 C. 明, 野村 M. 慎一郎

“細胞のメカノトランスダクション研究の新技法提案: リポソームから細胞内への「巨大」人工物導入法”

細胞工学, 33(9), 2014, 928-933, 査読無.

4. Shin-ichiro M. NOMURA, Yusuke Sato, Kei Fujiwara

“Molecular robotics approach for constructing an artificial cell model”
ADVANCES IN ARTIFICIAL LIFE, 2013, 488-491, 査読有.

5. Daiki Komatsu, Kei Fujiwara, Shin-ichiro M. Nomura

“Construction of a remote-controlled supramolecular micro-crawler”
ADVANCES IN ARTIFICIAL LIFE, 2013, 208-209, 査読有.

6. Kei Fujiwara, Keita B. Aoi, Shin-ichiro M. Nomura

“A bacterial salt sensor created by multiplying phenotypes of GroE-depleted *Escherichia coli*”
Analytical Methods, 5, 2013, 5918-5922, 査読有.

7. Kei Fujiwara, Tsutomu Katayama, Shin-ichiro M. Nomura

Cooperative working of bacterial chromosome replication proteins generated by a reconstituted protein expression system
Nucleic Acid Research, 41(14), 2013, 7176-7183, 査読有.

[学会発表](計 27件)

1. 田中 義明, 平塚 祐一, 野村 M. 慎一郎
自律移動型人工アメーバの構築

細胞を創る研究会 7.0, 2014年11月13-14日
東京大学弥生会館, 東京

2. Kazuki Hirahara, Ibuki Kawamata, Satoshi Murata, Shin-ichiro M. Nomura

Designing an Artificial Ion Channel From DNA origami
CBI学会2014年大会, 2014年10月28-30日,
タワーホール船堀, 東京

3. Ban Okabayashi, Ibuki Kawamata, Shin-ichiro M. Nomura, Satoshi Murata

Single-molecular Activity Measurement of Enzymes Attached to DNA origami
CBI学会2014年大会, 2014年10月28-30日,
タワーホール船堀, 東京

4. Akira C. Saito, Toshihiko Ogura, Satoshi Murata, and Shin-ichiro M. Nomura

Introduction of DNA nanostructures and multiple μm -sized objects into live cells by a novel cell-GUV electrofusion method
CBI学会2014年大会, 2014年10月28-30日,
タワーホール船堀, 東京

5. 野村 慎一郎, 田中 義明, 平塚 祐一, 藤原 慶, 村田 智
分子アメーバの構築に向けて

第6回マイクロ・ナノ工学シンポジウム,
2014年10月21日, くびきメッセ, 島根

6. 齋藤 明, 小椋 利彦, 野村 慎一郎

細胞-GUV電気融合法による複数種 μm サイズ人工物の同時導入

第3回生命医薬情報学連合大会(IIBMP2014)
2014年10月2-4日, 仙台国際会議場, 宮城

7. 齋藤 明, 小椋 利彦, 藤原 慶, 村田 智, 野村 M. 慎一郎

Introducing micro-meter size objects into live cells mediated by cell-GUV electro fusion

第52回日本生物物理学会年会, 2014年9月25-27日,
札幌コンベンションセンター, 北海道

8. 田中 義明, 平塚 祐一, 藤原 慶, 村田 智, 野村 M. 慎一郎

Toward creating an autonomous mobile artificial amoeba

第52回日本生物物理学会年会 2014年9月25-27日,
札幌コンベンションセンター, 北海道

9. 野村 M. 慎一郎, 田中 義明, 平塚 祐一, 藤原 慶, 村田 智
自律移動型人工アメーバの構築に向けて

第63回高分子討論会, 2014年9月24日, 長崎大学, 長崎

10. Akira C. Saito, Toshihiko Ogura, Kei Fujiwara, Satoshi Murata, Shin-ichiro M. Nomura

Simultaneous and efficient introduction of multiple μm -sized objects into live cells by a novel cell-GUV electrofusion technique
IUPAB 2014 International Biophysics Congress, August 3-7, 2014, Brisbane, Australia

11. NOMURA M. Shin-ichiro

Molecular Robotics: Toward Creating an Autonomous Artificial Amoeba
ALIFE14, 30 July 2014, NY, USA.

12. Shin-ichiro M. NOMURA, Hirohide SAITO, Masahiro TAKINOUE, Kei FUJIWARA, Hirohisa OHNO

RNA membrane vesicle: micro compartment structure made by designed RNA molecules

Open Questions on the Origin of Life, July 12-13, 2014, IIAS, Kyoto

13. A.C. Saito, T. Ogura, S. Murata, S.i. M. NOMURA

Introducing Large DNA Nanostructures Into Living Cells mediated by Cell-GUV Electrofusion
FNANO14, April 14-17, 2014, Snowbird, USA

14. D. Komatsu, A.C. Saito, K. Fujiwara, S. Murata, S.i. M. NOMURA

Cellcrawler: Giant Magnetoliposome Controlled by External Rotating Magnetic Field
FNANO14, April 14-17, 2014
Snowbird, USA

15. 野村 M.慎一郎, 藤原慶

「ミドルアウトと分子ロボティクスの両アプローチによる人工細胞モデル構築」
第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 3 日-6 日, 神戸国際会議場, 兵庫

16. 野村 M.慎一郎, 青井啓太, 藤原慶, 田中敦

「哺乳細胞の全再構成への試み 2 : 細胞内小器官を内包した人工細胞モデルの構築」
細胞を創る研究会 6.0, 2013 年 11 月 14 日-15 日, 慶応義塾大学鶴岡タウンキャンパス, 山形

17. 田中義明, 平塚祐一, 野村 M.慎一郎

「自立移動型人工アメーバの構築」
細胞を創る研究会 6.0, 2013 年 11 月 14 日-15 日, 慶応義塾大学鶴岡タウンキャンパス, 山形

18. 齋藤明, 小椋利彦, 村田智, 野村 M.慎一郎

「細胞と GUV の電気融合法による人工物導入」
細胞を創る研究会 6.0, 2013 年 11 月 14 日-15 日, 慶応義塾大学鶴岡タウンキャンパス, 山形

19. 藤原慶, 片山勉, 野村 M.慎一郎

「再構成型無細胞翻訳系を用いたゲノム型 DNA 複製システムの発現」
細胞を創る研究会 6.0, 2013 年 11 月 14 日-15 日, 慶応義塾大学鶴岡タウンキャンパス, 山形

20. 齋藤明, 小椋利彦, 野村 M.慎一郎

「人工物の細胞内導入: 生細胞と GUV の電気融合法」
第 51 回日本生物物理学会, 2013 年 10 月 28 日-30 日, 国立京都国際会館, 京都

21. 藤原慶, 西澤賢治, 柳澤美穂, 野村 M.慎一郎, 水野大介

「生細胞に極限まで近い内包物を持つ人工

細胞の構築と解析」

第 51 回日本生物物理学会, 2013 年 10 月 28 日-30 日, 国立京都国際会館, 京都

22. 遠藤将弘, 藤原慶, 村田智, 野村 M.慎一郎

「デザインされた DNA 高次構造体の環境安定性評価」
第 51 回日本生物物理学会, 2013 年 10 月 28 日-30 日, 国立京都国際会館, 京都

23. 小松大貴, 藤原慶, 野村 M.慎一郎

「回転磁場による磁性粒子接着リポソームのクロール運動の観察」
第 51 回日本生物物理学会, 2013 年 10 月 28 日-30 日, 国立京都国際会館, 京都

24. 野村 M.慎一郎, 藤原慶

「分子ロボティクス指向の人工細胞構築」
第 51 回日本生物物理学会, 2013 年 10 月 28 日-30 日, 国立京都国際会館, 京都

25. 小松大貴, 藤原慶, 野村 M.慎一郎

Construction of a remote-controlled supramolecular micro-crawler
12th European Conference on Artificial Life, 2013 年 9 月 2-6 日, タオルミナ, イタリア

26. 野村 M.慎一郎, 佐藤佑介, 藤原慶

Molecular robotics approach for constructing an artificial cell model
12th European Conference on Artificial Life, 2013 年 9 月 2-6 日, タオルミナ, イタリア

27. 野村 M.慎一郎

Exchange of chemicals between artificial cells and natural cells via synthetic junction (招待講演)
What can Synthetic Biology offer to Artificial Intelligence?
Perspectives in the Bio-Chem-ICT and other scenarios. (Satellite Meeting at 12th European Conference on Artificial Life), 2013 年 9 月 2-6 日, タオルミナ, イタリア

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称: リポソームを用いた細胞内への物質導入方法

発明者: 小椋利彦, 野村慎一郎, 齋藤明

権利者: 独立行政法人 科学技術振興機構

種類: 特願

番号: 2014-59898

出願年月日: 2014 年 3 月 24 日

国内外の別： 国内

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.molbot.mech.tohoku.ac.jp>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

野村 慎一郎 (NOMURA, Shin-ichiro)

東北大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：50372446