

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2017～2021

課題番号：17H06355

研究課題名（和文）夾雑を制御するための細胞融合デバイス開発

研究課題名（英文）Development of bacterium fusion device to control multi molecular crowding environment in cytosol

研究代表者

田端 和仁（Tabata, Kazuhito）

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・准教授

研究者番号：50403001

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 88,970,000円

研究成果の概要（和文）：細胞内夾雑環境が生命機能に与える影響を調べるため、人工的な夾雑環境の構築、制御のためのデバイス開発を実施した。まずは、細胞内夾雑環境の制御を目的にマイクロチャンパー内に大腸菌を融合させたデバイスを作成し、その転写翻訳活性を細胞質の希釈の程度に対して調べたが、それらに相関は見られなかった。続いて、人工的な夾雑環境をオスモライト分子により作成し、in vitro転写翻訳系の活性と相関を調べたところ、複数のタンパク質においてその効果が認められた。また、マイクロチャンパーデバイスで連続的に溶液交換可能なシステムを開発し、チャンパー内とチャンパー外の溶液を変えて浸透圧変化を起こす系の開発にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで細胞内夾雑環境に関する研究はたくさんの細胞を対象としたバルクでの研究が多く、全体の平均としての結果しかわからなかった。今回、1細胞を対象に研究を進めたところ、それぞれ異なる反応を示し、分布を形成していることがわかった。また、細胞内に大量に存在する低分子オスモライトが、タンパク質の転写翻訳に影響を与えていることもわかった。さらには、細胞内夾雑環境を積極的に制御するための手法として、浸透圧を利用し、融合細胞のサイズを変える方法も開発している。これらの成果は細胞内夾雑環境と生命活動が密接に関わっていることを示唆しており、今後の研究につながる成果となっている。

研究成果の概要（英文）：In order to investigate the effect of intracellular multimolecular crowding environment on biological functions, we developed devices to construct and control artificial multimolecular crowding environment. First, we prepared a device in which *E. coli* was fused into a microchamber to control the intracellular multimolecular crowding environment, and examined its transcriptional and translational activities against the degree of cytoplasmic dilution, but no correlation was found between them. An artificial multimolecular crowding environment was subsequently prepared by osmolyte molecules and correlated with the activity of the in vitro transcription-translation system, and the effect was observed for several proteins. We also developed a system that enables continuous solution exchange in a microchamber device, and succeeded in developing a system that changes osmolarity by changing the solution in and out of the chamber.

研究分野：生物物理学

キーワード：マイクロチャンパー オスモライト micro-TAS

1. 研究開始当初の背景

細胞内部は数千種に及ぶタンパク質や巨大な DNA 分子であるゲノム、様々な RNA 分子と言った高分子が非常に高い濃度で存在している。タンパク質だけの濃度でも数百 mg/ml とほぼ固体と言えるような密度と濃度である。このような異常とも言える環境において、細胞は様々な生化学反応を精緻に行い、人類にとって有益な二次代謝産物の生産や発酵を行っている。これらを理解し制御するには、細胞内夾雑環境における様々な反応を理解する必要がある。そのため、夾雑環境を模倣した実験が行われ、通常の溶液系である希薄溶液での実験と異なり、生化学反応の効率やタンパク質のフォールディング効率が大きく異なっていることが明らかにされている (Ellis, R. Jら, Nature 2003)。つまり、夾雑環境は細胞内の様々な代謝反応や生化学反応に大きく影響を及ぼしていることが伺われる。しかしながら、実験における夾雑環境は PEG のような人工の高分子で再現されており、数千種に及ぶタンパク質などで構成される非常にヘテロな細胞内環境とは大きく異なる。一方、実際のヘテロな細胞内夾雑環境を模倣するため、細胞抽出液を濃縮する試みも行われている (Kei Fujiwara ら, BIOPHYSICS 2014)。この実験では、細胞抽出液を減圧下で濃縮を行い、高分子全体で 270mg/ml とほぼ細胞内と同じ濃度にまで到達させることに成功している。この濃厚溶液を利用し、GFP の転写翻訳反応を行ったところ、抽出液濃度の増加と共に、GFP の合成量が低下するという結果になった。この結果は、上記の酵素活性が上昇するという結果と反するが、PEG 等を用いた実験においても同様の結果が得られており (Ge, X. ら, PLoS One 2011)、夾雑環境が影響を与えていると考えられる。このように、複数分子が関わるような複雑な反応が実際の細胞内夾雑環境下でなぜ起きるかは未だ不明な部分が多く、その理解には至っていない。

2. 研究の目的

細胞内夾雑環境をマイクロデバイスによって再現し制御することで、細胞内で起こっている夾雑環境が必要な反応を再構成し理解することを目的とする (図 1)。細胞内夾雑環境は 1000 から 2000 種類の細胞質タンパク質を数百 mg/ml と高濃度を含んでいることが知られている。このようなヘテロな細胞内夾雑環境は人工的に実現できない。そこで、体積が一定のマイクロチャンバーと細胞を

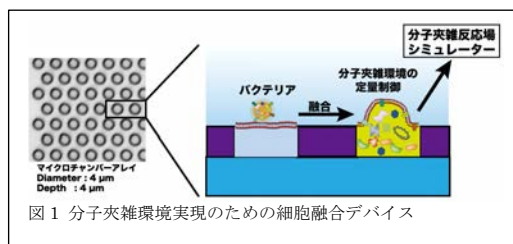


図 1 分子夾雑環境実現のための細胞融合デバイス

融合し融合細胞を作成することで、細胞内夾雑環境を制御できる細胞融合デバイスの開発を目指す。本デバイスは一定の体積をもったマイクロチャンバーと、その開口部を脂質二重膜で覆った構造を持つ。この脂質二重膜に対して細胞を融合することでチャンバー内に細胞質成分の全てを取り込ませることが出来る。このとき細胞の大きさが分かれば、どの程度細胞質が希釈されたかが分かる。これまで不可能であった細胞内夾雑環境をチャンバー内に再現しその影響を定量的に評価出来るようになる。すでに我々は細胞融合デバイスと細胞の融合には成功しており、その中に DNA やタンパク質などを取り込ませることも成功している。今後はデバイス内の夾雑環境を定量的評価するためのタンパク質濃度計測法を開発する予定である。これらの技術によって、A01 班や A02 班と共同で様々な細胞内夾雑環境を再現し、タンパク質合成反応のような複数分子が変わる細胞内反応を指標に評価を行う。夾雑環境を制御し、理解するための方法を提供することで、夾雑環境を積極的に利用した化学反応リアクターなどの開発につなげる。

3. 研究の方法

① マイクロチャンバーデバイスを用いた細胞内夾雑環境の再構成と評価

これまでの研究において、私たちが開発した融合細胞は、図 1 に示すように、マイクロチャンバーアレイを用いて作成する。このチャンバーアレイに脂質二重膜を張り、プロトプラスト化した細菌を融合させる (図 2)。これによって、細菌の細胞質はすべてチャンバー内に放出される。チャンバーの体積は、細菌の体積と近いので、細胞質の濃度は数倍しか希釈されることはない。つまり、細胞内夾雑環境を維持した状態で計測が可能となる。申請者らは、すでに細菌を融合させることに成功しており、チャンバー内に導入したプラスミドからタンパク質発現が起きることも確認

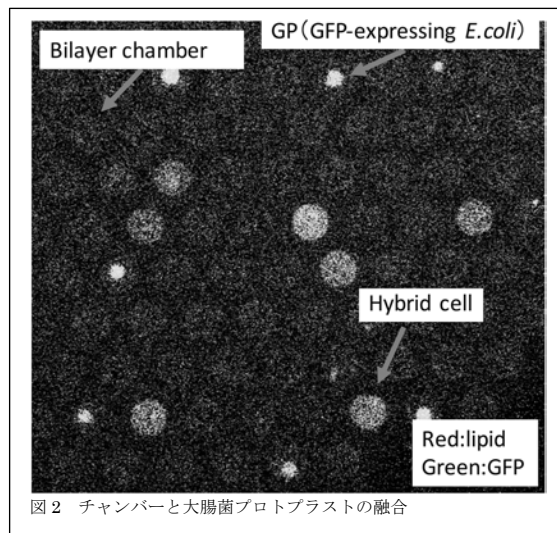


図 2 チャンバーと大腸菌プロトプラストの融合

している (図 3)。このように、融合細胞におけるタンパク質発現を計測する系は開発できているため、この実験系を用いて、細胞内夾雑環境を変化させたときのタンパク質転写翻訳活性の評価を実施した。具体的には、融合する大腸菌プロトプラストの大きさを見積もり、チャンパー体積から細胞質がどの程度希釈されたかを見積もり、タンパク質合成活性との相関を調べた。また、積極的に細胞内夾雑環境を変化させるため、融合細胞に対して外液を変化させることで浸透圧変化を生じさせ、脂質二重膜の変形による体積変化を引き起こすための実験系開発にも取り組んだ。

② 人工的な夾雑環境下における *in vitro* 転写翻訳反応

シンプルな系において夾雑環境が細胞内システムにどのような影響を与えるかを調べるため、*in vitro* タンパク質合成系である PURE system を用い、夾雑環境がタンパク質合成に及ぼす影響を調べた。また、夾雑環境を実現する物質として、今回はオスモライトと呼ばれる低分子化合物に着目した。この物質は、細胞内の代謝中間産物で細胞の浸透圧調整に関わっていると言われている物質で細胞内に高濃度で存在することが知られている。今回は 4 種類のタンパク質合成に対して 2 種類のオスモライトの影響を調べた。

4. 研究成果

① マイクロチャンパーデバイスを用いた細胞内夾雑環境の再構成と評価

今回の研究において、融合細胞を使用し、細胞内夾雑環境と細胞機能の関係に関して報告を行った。具体的には、融合細胞の状態でのタンパク質発現が確認できることから、タンパク質合成活性と細胞質の希釈状態の関係を調べて評価を行った。図 4 に示すようにマイクロチャンパー内に蛍光色素を入れて融合細胞の作成前後を観察することで融合による体積の変化を知ることができる。図 5 は体積の増加による蛍光強度の減少を調べることで融合した細胞の細胞質がどの程度希釈されたかをヒストグラムとしてプロットしている。これにより、融合細胞の 20% がタンパク質合成活性を示したが、細胞質の希釈倍率とタンパク質合成活性の相関は見られなかった。この原因として、そもそもタンパク質合成活性を示す融合細胞の割合が低いことがあげられる。これは、マイクロチャンパー内の表面吸着などで、タンパク質の活性が失われてしまったことに起因すると考えられ、表面吸着の低減が問題としてあげられる。これらは *Sci rep* (2018) において報告している。一方、大腸菌プロトプラストを巨大化し、そのサイズ依存的なタンパク質合成活性や分裂能も調べた。大腸菌プロトプラストを細胞壁合成阻害剤存在下で培養するとその体積が増加し、培養開始後 8 時間で体積は 1000 倍程度まで増加する。このことは、体積が 1000 倍大きくなって内部の代謝が続いていることを示している。一方で細胞分裂は体積が 460 倍程度増加すると起きなくなった (図 6)。これらは、FtsZ のような細胞分裂装置が機能する上限を示していると示唆される。また、細胞内における代謝システムはそれよりロバストであることがわかったが、その夾雑なシステムも

1000 倍以上の体積増加で破綻することがわかった。これらの成果も *Life* (2019) に報告している。つづいて、融合細胞の体積変化を積極的に行うことで細胞内夾雑環境を変化させる実験系の開発に取り組んだ。具体的には hybrid cell 内外の浸透圧を変化させることで、その体積を変化させ内部の密度を変える方法を思い立った (図 7)。しかしながら、浸透圧を変化させるために

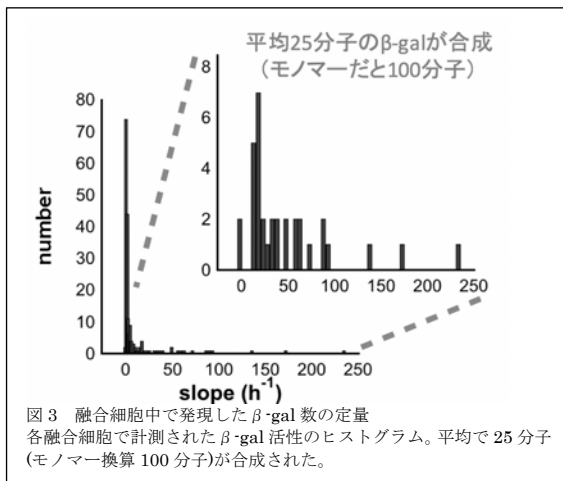


図3 融合細胞中で発現したβ-gal数の定量
各融合細胞で計測されたβ-gal活性のヒストグラム。平均で25分子(モノマー換算100分子)が合成された。

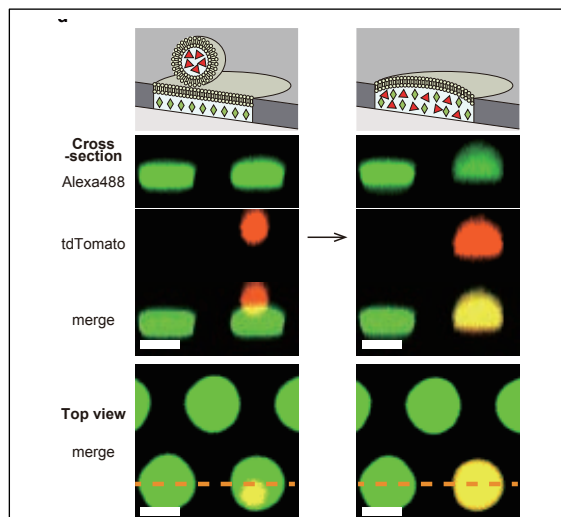


図4 バクテリア融合によるチャンパー体積の変化
左:融合前。右:融合後。マージ画像においてチャンパーの形状が膨らむように変形している。

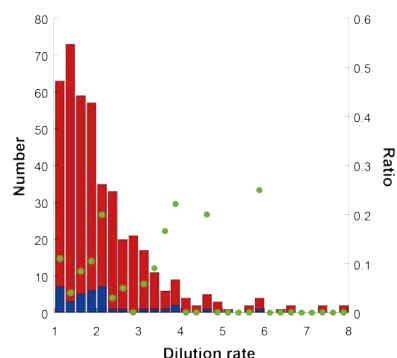


図5 融合細胞作成による細胞質希釈とタンパク質合成活性
赤のヒストグラムは作成された融合細胞における希釈倍率をプロットしたもの。青のヒストグラムは赤のうちタンパク質合成活性を示したものの。緑の点は赤と青の割合を示す。

は hybrid cell 外部の溶液を変化させる必要がある。また、実験的には、繰り返し溶液を変化させて再現性などを確認する必要もある。そのため、今回私たちは、マイクロチャンバーデバイスを用いて繰り返し溶液交換出来る実験系の開発を実施した。マイクロチャンバーデバイスでの溶液交換を検証したところ、30 回以上の溶液交換が可能であり、ほぼ完全に交換出来ることがわかった。このシステムを用いて溶液交換を効果的に示す実験として 1 分子酵素やウイルス粒子の酵素活性を外部溶液を変えながら連続的にモニターする実験を実施した。溶液に含まれる基質濃度を連続的に変化させることで注目する 1 分子酵素のミカエリスメンテンプロットの作成や、注目するウイルス 1 粒子に対する抗ウイルス薬 (Oseltamivir) の阻害濃度 (IC₅₀) を決定することに成功した (図 8)。これらの成果は *Anal. Chem.* (2021) に掲載された。一方、このシステムを用いて、マイクロチャンバー開口部に作成した脂質二重膜を、その浸透圧変化によって変形させたところ、変形はみられるが、それに伴う体積変化は 1.3 倍程度しか見られなかったため、より大きな体積変化を引き起こすための方法の検討が必要であることがわかった。

② 人工的な夾雑環境下における *in vitro* 転写翻訳反応

よりシンプルなシステムに対する夾雑環境の影響を調べるため、*in vitro* タンパク質転写翻訳系である pure system に対して osmolyte とされる低分子化合物を加えて、細胞内のような夾雑環境を実現しその影響を調べた。今回の研究では、TMAO とベタインという 2 種類の化合物の添加に対して、4 種類のタンパク質合成活性への影響を調べた。その結果、すべてのタンパク質合成に対して 2 種の化合物は活性を向上させる効果があることがわかった。また、電気泳動などの解析からタンパク質合成量そのものが向上していることがわかった (図 9)。Pure system のような *in vitro* 合成システムは合成生物学分野において、その需要が近年高まっている。本結果は、安価な低分子を加えるだけでその活性を向上させることを見いだした初めての結果であり、合成生物学分野への貢献は大きい。これらの研究は、A02 班との領域内共同研究として実施され、合成生物学分野における専門誌 *ACS Synth Biol.* (2019) に掲載された。

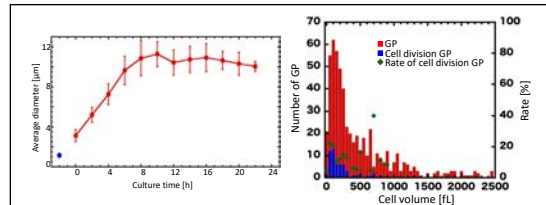


図 6 巨大化大腸菌から大腸菌への再生
左:培養時間に対する大腸菌プロトプラストサイズ。右:巨大化大腸菌の体積ヒストグラム。赤は巨大化大腸菌のサイズを表し、青はそのうち分裂した巨大化大腸菌のサイズを示す。

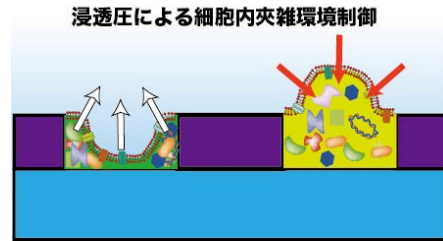


図 7 浸透圧による膜変形と体積変化

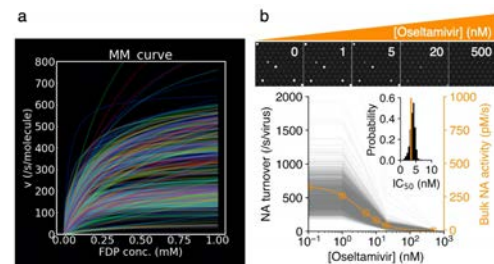


図 8 連続的な溶液交換による 1 分子酵素パラメータの測定
a アルカリフォスファターゼ 1 分子のミカエリス-メンテンプロット。1 つのラインが同一の 1 分子の酵素に相当する。b インフルエンザウイルス 1 粒子に対する oseltamivir の IC₅₀ 決定。上段は同一視野の顕微鏡画像。グラフのラインがそれぞれ同一のウイルス 1 粒子に相当する。インセットは得られた粒子ごとの IC₅₀ のヒストグラム。

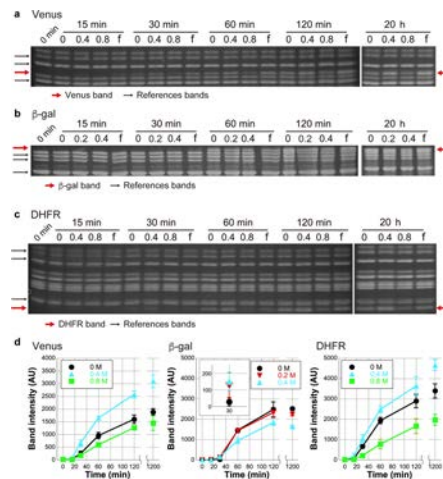


図 5 オスマライト添加によるタンパク質合成活性の向上
電気泳動は、各タンパク質におけるオスマライト濃度依存的タンパク質合成を示す。グラフはそれぞれのタンパク質におけるバンド強度を定量してプロットしている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Muraoka T, Noguchi D, Kasai RS, Sato K, Sasaki R, Tabata KV, Ekimoto T, Ikeguchi M, Kamagata K, Hoshino N, Noji H, Akutagawa T, Ichimura K, Kinbara K.	4. 巻 11
2. 論文標題 A synthetic ion channel with anisotropic ligand response.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 2924
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-16770-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ueno H, Kato Y, Tabata KV, Noji H.	4. 巻 91
2. 論文標題 Revealing the Metabolic Activity of Persisters in Mycobacteria by Single-Cell D20 Raman Imaging Spectroscopy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anal Chem.	6. 最初と最後の頁 15171-15178
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.analchem.9b03960	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Zhang Y, Minagawa Y, Kizoe H, Miyazaki K, Iino R, Ueno H, Tabata KV, Shimane Y, Noji H	4. 巻 5
2. 論文標題 Accurate high-throughput screening based on digital protein synthesis in a massively parallel femtoliter droplet array.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science adv.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.aav8185.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 *Tabata KV, Sogo T, Moriizumi Y, Noji H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Regeneration of Escherichia coli giant protoplasts to their original form.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Life	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/life9010024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Moriizumi Y, *Tabata KV, Miyoshi D, Noji H.	4. 巻 8
2. 論文標題 Osmolyte-Enhanced Protein Synthesis Activity of a Reconstituted Translation System.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Synth Biol.	6. 最初と最後の頁 557-567
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssynbio.8b00513	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Moriizumi Y, *Tabata KV, Watanabe R, Doura T, Kamiya M, Urano Y, Noji H.	4. 巻 8
2. 論文標題 Hybrid cell reactor system from Escherichia coli protoplast cells and arrayed lipid bilayer chamber device.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-30231-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yaginuma, H., Ohtake, K., Akamatsu, T., Noji, H., *Tabata, K.V.	4. 巻 22
2. 論文標題 A microreactor sealing method using adhesive tape for digital bioassays	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Lab on a chip	6. 最初と最後の頁 2001-2010
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D2LC00065B	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ueno, H., Sawada, H., Soga, N., Sano, M., Nara, S., Tabata, K.V., Suetsugu, M., *Noji, H.	4. 巻 10(9)
2. 論文標題 Amplification of Over 100 kbp DNA from Single Template Molecules in Femtoliter Droplets	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Synthetic Biology	6. 最初と最後の頁 2179-2186
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssynbio.0c00584.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Honda, S., Minagawa, Y., *Noji, H., *Tabata, K.V.	4. 巻 93
2. 論文標題 Multidimensional Digital Bioassay Platform Based on an Air-Sealed Femtoliter Reactor Array Device	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 5494-5502
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.0c05360	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計10件(うち招待講演 10件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 田端 和仁
2. 発表標題 Single virus measurements -Highly sensitive detection and distribution of virus populations-
3. 学会等名 2nd WPI-NanoLSI Special Seminar -Frontiers in Chem-Bio- (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田端和仁
2. 発表標題 マイクロデバイスにバクテリアを融合する
3. 学会等名 第92回日本生化学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田端和仁
2. 発表標題 マイクロチャンバーでつくとはかる
3. 学会等名 日本分析化学会第68年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田端和仁
2. 発表標題 デジタルアッセイが生み出す技術革新
3. 学会等名 2019年度第2回バイオマイクロナノテク研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田端和仁
2. 発表標題 バクテリアを微小容器に再構成する
3. 学会等名 第13回日本ゲノム微生物学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田端和仁
2. 発表標題 細胞内夾雑環境をマイクロデバイス内に作り込む
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuhiro V. Tabata
2. 発表標題 Toward reproduction of a bacterium from hybrid cell
3. 学会等名 Artificial Cell Reactor Science and Technology（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuhiro V. Tabata
2. 発表標題 High sensitive measurement system and bacterium reconstitution by microchamber
3. 学会等名 JSSB seminar (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuhiro V. Tabata
2. 発表標題 Bacterium reconstitution in microchamber towards genome transplantation and high sensitive detection of flu virus.
3. 学会等名 JCVI seminar (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuhiro V. Tabata
2. 発表標題 Single-virus measurement reveals virus populations
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 酵素反応生成物の検出方法	発明者 田端和仁	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-037085	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	野地 博行 (Noji Hiroyuki) (00343111)	東京大学・大学院工学系研究科・教授 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関