

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2011～2014

課題番号：23240044

研究課題名(和文)生命現象の階層ダイナミクスの実空間モデリング

研究課題名(英文)Real-World Modeling on the Hierarchical Dynamics of Living System

研究代表者

吉川 研一 (Yoshikawa, Kenichi)

同志社大学・生命医科学部・教授

研究者番号：80110823

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,500,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノムDNA、細胞、細胞集団の、各階層での生命現象の特質を明らかにするため、実空間上のモデル系を構築することが中心的な研究課題。当初の予想を上回る成果が得られてきている。1) 遺伝子活性のスイッチングについては、光感受性の界面活性剤により、DNAの高次構造転移を引き起こすことにより、複数の遺伝子のスイッチングを起こすことに成功している。2) 細胞サイズ小胞の形成手法の確立および、細胞サイズ空間での生化学反応(遺伝子発現など)の特異性の実証など、この課題は大きく進展した。3) 網羅的なヒト遺伝子の発現解析により遺伝子群が特異的な大域的ドメインを形成していることを明らかにし、理論モデルを構築した。

研究成果の概要(英文)：We studied the dynamical aspects of life accompanied by the development of physical consideration, by considering the hierarchical structure: 1) On-off switching of large number of genes embedded in genomic DNA. Biological significance of the discrete nature of the conformational transition was theoretically discussed in relation to robust on/off switching of large number of genes on the process of cell-differentiation. 2) Field hypothesis on living cell. It was shown that unique physic-chemical properties emerge in micro systems, which may concern with the life activity of living cells. 3) Novel non-Turing scenario of body-organization during development was proposed and simple theoretical modeling was successfully achieved.

研究分野：生命物理学

キーワード：時空間秩序 生命物理学 ゲノムDNA 人工細胞モデル 形態形成のモデル DNA二本鎖損傷 DNA高次構造 細胞サイズ小胞

1. 研究開始当初の背景

分子(ゲノム DNA)、細胞、細胞集団(多細胞・個体)の、各階層での生命現象についての学問の発展段階について述べる。

1)ゲノム DNA の高次構造相転移と遺伝情報の自律的制御

申請者(吉川)は、およそ15年前、数千キロ塩基対(kbp)以上の大サイズの DNA は、著しく不連続(all-or-none)な折り畳み転移を示すことを、世界に先駆けて明らかにした。数千 kbp よりも小さな DNA では、この転移は起きない。これまでの分子生物学的方法論では、蛋白質による数千 kbp までの局所的相互作用による構造変化解析が限界で、大きなゲノム DNA 分子自身が示すこのような基本物性が知られることなく研究されてきていた。

2)実空間上のモデル細胞構築による細胞機能の理解

同一の遺伝情報であっても、細胞は環境や履歴に応じて異なった形態・機能を示す。癌化も細胞全体のシステム異常として捉えなければならないことが共通認識になっている実験可能な人工モデル細胞を構築し、実空間上での仮説・理論の検証を行うことが緊要である。吉川らは、細胞サイズのリン脂質小胞をつくり、その微小内部で遺伝子発現とその制御に世界で最初に成功してきている。

3)多細胞系における時空間秩序の自己形成

形態形成理論としては、Turing モデルがよく知られているが、これは抑制因子のみの結合を前提としたもので、空間が実数の密度で連続であるとする枠組みの上での理論である。一方、実験技術の発展に伴い、発生過程の時間履歴や境界条件への鋭敏性を報告する研究結果が続々と現れてきており、Turing モデルの問題点、限界が明らかになってきている。

2. 研究の目的

本研究では、生命現象の動作原理を解明することを目標に、**分子・細胞・細胞集団の階層ごとの理論研究と、各階層に対応する実空間での人工モデル系構築による実験研究を進める。**さらにその発展として、生命・非生命の枠を超えた、本質的に非平衡開放系である自然界の一般法則を見出すこともめざしている。

1)ゲノム DNA の高次構造・機能の on/off スイッチング制御を行う

遺伝子の活性を、厳密に on/off 制御できるモデル実験系を確立する。on/off スイッチには、長鎖 DNA 側の高次構造転移を引き起こす環境因子(光照射、ATP 濃度変化など)が直接関与すると期待される。

2)実空間上にモデル細胞を構築し細胞機能の物理学基礎を追究する

外部刺激に応答し遺伝子活性を自己調節する能力、環境の中で自らが規定した方向への運動が可能な自走能力、などを有する人工細胞モデルの構築を目標とする。

3)多細胞系での時空間ダイナミクスの原理究明

生命科学領域の研究者と実空間上の実験を中心に据えた共同研究をすすめ、多細胞系での時空間構造の自己発展のメカニズムに迫る。

3. 研究の方法

分子(ゲノム DNA)、細胞、細胞集団(多細胞・個体)の、各階層での生命現象の特質を明らかにするため、実空間上のモデル系を構築する。これにより、現実の生物実験と数理モデル研究との間を繋ぎ、非線形・非平衡物理学の立場から本質・原理を抉り出す。1) Mbp を超える大サイズ1分子 DNA の高次構造操作による部分相分離構造に基づき、遺伝子群活性の on/off 制御が可能なゲノムモデル系を構築する。2)細胞サイズ小胞作製法“界面通過法”を用いて、実空間上にモデル細胞を構築、膜蛋白質の発現と配向制御、微小空間遺伝子制御、細胞様運動の再現を行う。3)多細胞系では、体節形成における進行波・定在波の実験と数理モデルとの比較、発生過程での時空間秩序形成のモデル構築を重点課題とする。

4. 研究成果

上記の3課題共に、当初の予想を上回る成果が得られてきている。具体例として、1)の遺伝子活性のスイッチングについては、光感受性の界面活性剤により、DNA の高次構造転移を引き起こすことにより、複数の遺伝子のスイッチングを起こすことに成功している。2)細胞サイズ小胞の形成手法の確立および、細胞サイズ空間での生化学反応(遺伝子発現など)の特異性の実証など、この課題は大きく進展した。3)については、網羅的なヒト遺伝子の発現解析により遺伝子群が特異的な大域的ドメインを形成していることを明らかにし、理論モデルを構築した。以下は、そのような研究成果の中でも主要なものについて概略を説明する。

1)ゲノム DNA の高次構造相転移と機能

(i)混雑環境下にあるゲノム DNA の高次構造と機能

細胞内にあり、遺伝情報を担っているゲノム DNA は、ヒストン蛋白やポリアミンなどの陽イオン性の化学種と相互作用して、凝縮状態をとっているとすることが、これまでの生命科学分野での常識であった。一方、細胞や核内には、各種のたんぱく質(多くが負の荷電を示す)、RNA(負に帯電)などの水溶性の高分子が存在し、その濃度は、1 ml あたり 0.3-0.5g と、極めて混雑する環境となっている。そこで、混雑した環境下での、ゲノム DNA の振る舞いを簡単なモデル実験を構築して研究を進めた。

(ii) 負に帯電したシリカの nanoparticle (直径 10-50nm)を、2 重量%程度水溶液に加えると、DNA 分子が凝縮転移を示すことを、

蛍光顕微鏡で見出した。これと関連して、私たちは、中性条件化アルブミン(負に帯電)存在下でも、DNAの折り畳み転移が生じることをすでに報告している。DNAの折り畳み転移に伴う、nanoparticleとの複合体について、電子顕微鏡での測定を進めた。興味深いことにDNAは20-30nm程度のループを形成していることが分かった。これまでに、ポリアミンなどの多価陽イオン性の化学種により、DNAの折り畳み転移では、直径が70-90nm程度(これはKuhn長程度に対応しており、bendingによる歪が無視できるほど小さくなる長さとなっている)のトロイドが生じることが知られている。このことは、負に荷電したnanoparticleの混雑環境によるDNAの折り畳みでは、DNA分子に歪のかかった状態で凝縮が引き起こされていることが示唆される。興味深いことに、nanoparticleによるDNAの凝縮体は、helix-coil転移の転移温度が低くなることも明らかにした。

2) 実空間上のモデル細胞構築と細胞機能

(i) 膜によるDNAの局在化

細胞内の混雑環境下での、高分子や細胞顆粒の自発的な分離について、モンテカルロ法による計算を援用して、理論的な考察をおこなった。細胞内の状態に関する簡単なモデルとして、一つの大球と多数の小球を球状の容器に入れて、揺らぎをあたえて、大球、小球の位置の分布を調べた。硬い膜に囲まれた場合は、小球が膜近傍に位置し、大球は中央部分に存在するようになる。膜が柔らかくなると、大球が膜表面に接触する配置を取るようになる。これまでも、細胞サイズの小胞中では、リン脂質膜の状態やMgイオンの濃度などの変化に応じて、DNAがbulkと膜表面での局在化状態をスイッチし、これが転写活性とも相関することなども報告してきている。今後、実際の細胞での観察と対比させて研究をすすめることが求められている

(ii) 界面透過の理論モデル

このような界面の透過を伴うリポソーム構築手法について、その速度過程について理論的なモデルを考案した。液滴の移行に伴い、油相中の単分子膜の界面が減少し、水相中の二分子膜界面が増大する。換言すると、単分子膜の状態と二分子膜の状態が双安定であり、その間には自由エネルギー障壁が存在すると考えられる。そこで、液滴界面のミクロスケールでの自由エネルギー $g(u)$ は、膜の状態を表すパラメータ u の4次関数で表されることになり、液滴周りの界面全体での自由エネルギーは次のように書ける。

$$F = \int dr \left[g(u) + \frac{K}{2} |\nabla u|^2 \right]$$

このとき、系の時間発展は

$$\frac{\partial u}{\partial t} = -L \frac{\delta F}{\delta u} = f(u) + D \nabla^2 u$$

となる。ここで L は定数であり、 $f(u) = -Lg'(u)$ 、 $D = LK$ である。以下、 u_1 、 u_2 、 u_3 がそれぞれ安定(二分子膜)、不安定、安定(単分子膜)な状態に対応していると見なす。液滴表面の球面座標系で u_3 、 u_1 と変化する波面の進行解を求めると、波面の進行速度 c は

$$c(r, \theta) = a(u_1 + u_3 - 2u_2) - \frac{D}{r^2 |\tan \theta|}$$

となる。 a は定数、 r は液滴半径である。この結果から、進行速度 c は、液滴のサイズが大きいほど大きくなるのがわかる。重要な結果として、液滴のサイズに関わらず、液滴はその大半が水相に移行した時点で、その上部が界面にピン止めされる傾向を示すことが、この理論モデルからわかる。また、単分子膜部分と二分子膜部分の相対的な安定性が移行の速度過程に決定的な影響を与えることが予想できる。界面透過法は、今後多様な生体高分子や基質を生体濃度で封入して、細胞サイズのリン脂質膜小胞を構築する汎用的な方法論へと発展してゆくものと期待される。

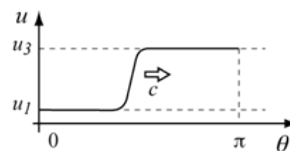


図1. 波面の進行解の模式図

3) 多細胞系における時空間秩序の自己形成

(i) Invaginationの理論モデル

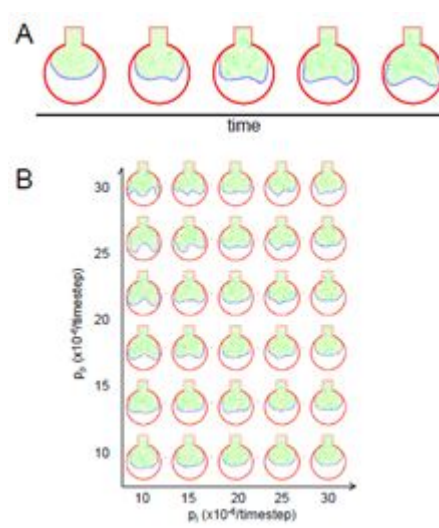


図2 Invaginationの数理モデル

形態形成のなかでも invagination は重要な役割を担っていることが減少論的には明らかになっている。吉川らは、空間の特定の位置に化学的なシグナルの発生源を考えるとといった、これまでに多く報告されている数理モデルではなく、力学的な相互作用をとりいれるだけで、自発的に invagination が生じることを、多細胞系のモデルを用いることにより明らかにしている。

(ii) レーザーと高分子枯渇相互作用を活用した細胞の3次元組織体形成の手法
レーザーピンセットと高分子混雑環境を活用した、人工的な基盤に依存しない任意構造に3次元細胞集団を構築できる手法を見出している。具体的には水溶性高分子を細胞培養用の培地で希釈した高分子溶液中で細胞をレーザー遠隔操作し、バルク中で任意構造の3次元細胞集合体を構築するといった手法である。更に、細胞接触の維持を引き起こすために必要な水溶性高分子の濃度についても実験的に見出している。重要な発見として、高分子溶液中で数分の接触を維持した細胞が高分子を取り除いた通常の細胞培養用の培地環境下でもその接触を維持できる事も見出した。このような安定な細胞接着が生じるためには、重なり濃度 c^* 近傍で細胞同士を接触させることが、実験操作上のポイントとなっている。一方、 c^* を大きく上回る濃度では溶液の粘度が高まり、レーザー遠隔操作が困難となる。さらに本研究では、高分子混雑環境下で引き起こされる細胞同士の接触維持のメカニズムを朝倉大沢理論(枯渇相互作用)を参考にして、理論的な考察を行っている。本研究で明らかになった最も重要な点は高分子混雑環境下で接触を数分間程度の短時間維持した細胞集団は、高分子を取り除いた環境でもその状態を維持できるという点である。枯渇相互作用のもとでは、相対する細胞膜は nm 程度の距離を隔てて接触しており、数分程度の時間で、細胞膜上のタンパクや糖脂質が接着性を引き起こすような方向に膜内で流動し、これが、いわゆる接着因子の発現を待つことなく、安定な細胞組織体の形成を引き起こす主因となっていると論じている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計23件)

Daigo Yamamoto, Chika Nakajima, Akihisa Shioi, Marie Pierre Krafft, Kenichi Yoshikawa, The evolution of spatial ordering of oil drops fast spreading on a water surface, Nature Communications, 査読有、6巻、2015、7189
DOI: 10.1038/ncomms8189

Yoshitsugu Kubo, Shio Inagaki, Masatoshi Ichikawa, Kenichi Yoshikawa, Mode bifurcation of a bouncing dumbbell with chirality, Phys. Rev. E, 査読有、91巻、

2015、052905

DOI: 10.1103/PhysRevE.91.052905

Takafumi Iwaki, Tomomi Ishido, Ken Hirano, Alexei Lazutin, Valentina V. Vasilevskaya, Takahiro Kenmotsu, Kenichi Yoshikawa, Marked difference in conformational fluctuation between giant DNA molecules in circular and linear forms, Journal of Chemical Physics, 査読有、142巻、2015、145101、
DOI: 10.1063/1.4916309

Yongjun Chen, Shun N. Watanabe, Kenichi Yoshikawa, Roughening Dynamics of Radial Imbibition in a Porous Medium, J. Phys. Chem., 査読有、119巻、2015、12508-12513
DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b03157

Kanta Tsumoto, Masafumi Arai, Naoki Nakatani, Shun N. Watanabe, Kenichi Yoshikawa, Does DNA Exert an Active Role in Generating Cell-Sized Spheres in an Aqueous Solution with a Crowding Binary Polymer?, Life, 査読有、5巻、2015、459-466
DOI: 10.3390/life5010459

Chwen-Yang Shew, Kenichi Yoshikawa, A toy model for nucleus-sized crowding confinement, J. Phys. Cond. Matt., 査読有、27巻、2015、064118、
DOI: 10.1088/0953-8984/27/6/064118

Shio Inagaki, Hiroyuki Ebata, Kenichi Yoshikawa, Steadily oscillating axial bands of binary granules in a nearly filled coaxial cylinder, Physical Review E, 査読有、91巻、2015年、010201
DOI: 10.1103/PhysRevE.91.010201

Anatoly A. Zinchenko, Kenichi Yoshikawa, Compaction of Double-Stranded DNA by Negatively Charged Proteins and Colloids, Interface Science, 査読有、20巻、2015年、60-65
DOI: 10.1016/j.cocis.2014.12.005

Rastko Joksimovic, Shun N. Watanabe, Sven Riemer, Michael Gradzielski, Kenichi Yoshikawa, Self-organized patterning through the dynamic segregation of DNA and silica nanoparticles, Scientific Reports, 査読有、4巻、2014年、3660
DOI: 10.1038/srep03660

Tomohiro Yanao, Kenichi Yoshikawa, Chiral symmetry breaking of a double-stranded helical chain through bend-writhe coupling, Physical Review E, 査読有、89巻、2014年、062713
DOI: 10.1103/PhysRevE.89.062713

Anatoly A. Zinchenko, Kanta Tsumoto, Shizuaki Murata, Kenichi Yoshikawa, Crowding by Anionic Nanoparticles Causes DNA Double-Strand Instability and Compaction, The Journal of Physical Chemistry B, 査読有、118巻、1256-1262、2014年、1256-1262

DOI:10.1021/jp4107712

Kenji Yoshida, Naoki Ogawa, Kagawa Yukihiro, Hiraku Tabata, Yoshiaki Watanabe, Takahiro Kenmotsu, Yuko Yoshikawa, Kenichi Yoshikawa, Effect of low-frequency ultrasound on double-strand breaks in giant DNA molecules, Applied Physics Letters, 査読有、103 巻、2013 年、063705

DOI: 10.1063/1.4818125

Hiroaki Ito, Toru Yamanaka, Shou Kato, Tsutomu Hamada, Masahiro Takagi, Masatoshi Ichikawa, Kenichi Yoshikawa, Dynamical formation of lipid bilayer vesicles from lipid-coated droplets across a planar monolayer at an oil/water interface, Soft Matter, 査読有、9 巻、2013 年、9539-9547

DOI: 10.1039/C3SM51766G

Tomo Kurimura, Masatoshi Ichikawa, Masahiro Takinoue, Kenichi Yoshikawa, Back-and-forth micromotion of aqueous droplets in a dc electric field, Phys. Rev. E, 査読有、88 巻、2013 年、042918

DOI: 10.1103/PhysRevE.88.042918

Yuko T. Sato, Shun N. Watanabe, Takahiro Kenmotsu, Masatoshi Ichikawa, Yuko Yoshikawa, Jun Teramoto, Tadayuki Imanaka, Akira Ishihama and Kenichi Yoshikawa, Structural change of DNA induced by nucleoid proteins: Growth phase-specific Fis and stationary phase-specific Dps, Biophysical Journal, 査読有、2013 年、105 巻、1037-1044

DOI: 10.1016/j.bpj.2013.07.025

Masatoshi Ichikawa, Fumi Takabatake, Keitaro Miura, Takafumi Iwaki, Nobuyuki Magome, Kenichi Yoshikawa, Controlling negative and positive photothermal migration of centimeter-sized droplets, Physical Review E, 査読有、2013 年、88 巻、012403

DOI: 10.1103/PhysRevE.88.012403

Shunsuke F Shimobayashi, Takafumi Iwaki, Toshiaki Mori and Kenichi Yoshikawa, Probability of double-strand breaks in genome-sized DNA by γ -ray decreases markedly as the DNA concentration increases, Journal of Chemical Physics, 査読有、2013 年、138 巻、174907

DOI: 10.1063/1.4802993

Yongjun Chen, Kosuke Suzuki, Hitoshi Mahara, Kenichi Yoshikawa, Tomohiko Yamaguchi, Self-organized Archimedean Spiral Pattern: Regular Bundling of Fullerene through Solvent Evaporation, Applied Physics Letters, 査読有、2013 年、102 巻、041911

DOI: 10.1063/1.4789906

Tsutomu Hamada, Kenichi Yoshikawa,

Cell-Sized Liposomes and Droplets: Real-World Modeling of Living Cells, Materials, 査読有、2012 年、11 巻、2292-2305
DOI:10.3390/ma5112292

Marcel Hörning, Seiji Takagi, Kenichi Yoshikawa, Controlling activation site density by low-energy far-field stimulation in cardiac tissue, Physical Review E, 査読有、2012 年、6 巻、061906
DOI: 10.1103/PhysRevE.85.061906

② Marcel Hörning, Satoru Kidoaki, Takahito Kawano, Kenichi Yoshikawa, Rigidity Matching between Cells and the Extracellular Matrix Leads to the Stabilization of Cardiac Conduction, Biophysical Journal, 査読有、2012 年、102 巻、379-387

DOI: 10.1016/j.bpj.2011.12.018

② Ayako Kato, Miho Yanagisawa, Yuko Sato, Kei Fujiwara, Kenichi Yoshikawa, Cell-Sized confinement in microspheres accelerates the reaction of gene expression, Scientific Reports, 査読有、2012 年、2 巻、283

DOI: 10.1038/srep00283

③ Miho Yanagisawa, Naofumi Shimokawa, Masatoshi Ichikawa and Kenichi Yoshikawa, Micro-segregation induced by bulky-head lipids: Formation of characteristic patterns in a giant vesicle, Soft Matter, 2012 年、査読有、8 巻、488-495

DOI: 10.1039/c1sm06381b

[学会発表](招待講演 計16件)

吉川研一、ゲノム DNA の二本鎖切断 - 超音波・ガンマ線・光励起の比較、電子情報通信学会、超音波・応用音響研究会、2015 年 1 月 29 日、同志社大学(京都府京田辺市)

Kenichi Yoshikawa, A working hypothesis on the self-control of whole genome, Stem Cells and Devices International SPIRITS Symposium, 2014 年 10 月 2 日、京都大学(京都府京都市)

Kenichi Yoshikawa, Phase-transition of genomic DNA, Graduate School of Biostudies & iCeMS Joint Symposium, 2014 年 9 月 22 日、京都大学(京都府京都市)

吉川研一、混雑するミクロ環境下で働くゲノム DNA、細胞生物学会、2014 年 6 月 11 日、京都大学(京都府京都市)

Kenichi Yoshikawa, Real-world Modeling of Living System with Surfactant: Self-organized Structure and Dynamic Function, 20th International Symposium on Surfactants in Solution, 2014 年 6 月 22 日、Coimbra (SPAIN)

Kenichi Yoshikawa, Real-World Modeling on Exotic Aspects of Living Cell, Symposium: Three Domains of Life, "From molecule to organism", 2014 年 3 月 29 日、

京都大学（京都府京都市）
Kenichi Yoshikawa, Unveiling Intrinsic Characteristics of Genomic DNA, International SPIRITS Symposium, “Novel, Integrated Clinicopathologic Diagnosis of Cancer”, 2014年3月18日、京都大学（京都府京都市）

〔産業財産権〕
出願状況（計3件）

名称：固体物体を運動させる方法、及び、送液ポンプ
発明者：山本大吾、塩井章久、吉川研一、山本亮太、田中政輝
権利者：同上
種類：特許
番号：PCT/JP2015/61985
出願年月日：2015年4月20日
国内外の別：国外

名称：レーザーを用いて細胞を配列する方法及び装置
発明者：吉川研一、谷口浩章、太田太恵子、橋本周、米田晋一郎、吉田葵
権利者：同上
種類：特許
番号：PCT/JP2015/075695
出願年月日：2015年9月9日
国内外の別：国外

名称：上皮間葉転換阻害剤及び癌転移治療剤
発明者：吉川研一、谷口浩章、橋本周、太田太恵子
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2015-053282
出願年月日：2015年3月17日
国内外の別：国内

取得状況（計2件）

名称：内包物質に耐熱性を与えたりポソーム及びその製造法
発明者：市川正敏、吉川研一、石崎昭彦、中部屋恵造
権利者：同上
種類：特許
番号：2012-204133
取得年月日：2012年10月10日
国内外の別：国外

名称：複数の被内包リポソームを内包するリポソーム及びその製造方法
発明者：市川正敏、吉川研一、石崎昭彦、中部屋恵三
権利者：同上
種類：特許
番号：2012-204134
取得年月日：2012年10月10日
国内外の別：国外

〔その他〕
ホームページ
<http://dmpl.doshisha.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 研一 (YOSHIKAWA, Kenichi)
同志社大学生命医科学部・教授
研究者番号：80110823

(2) 研究分担者

湊元 幹太 (TSUMOTO, Kanta)
三重大学工学研究科・講師
研究者番号：80362359

元池 育子 (MOTOIKE, Ikuko)
東北大学情報学研究科・准教授
研究者番号：70347178

市川 正敏 (ICHIKAWA, Masatoshi)
京都大学理学研究科・講師
研究者番号：40403919

(3) 連携研究者

()

研究者番号：