

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23655156

研究課題名(和文) 出芽・分裂を起こす人工細胞創成のための de novo デザイン

研究課題名(英文) De Novo Design for Creation of Artificial Cells Performing Budding and Fission

研究代表者

菊池 純一 (KIKUCHI, Jun-ichi)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・教授

研究者番号：90153056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000 円、(間接経費) 930,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞の分裂現象の重要性に着目し、生体系とは異なる原理を用いて出芽と分裂を自在に制御できる人工細胞の de novo デザインについて研究を行った。その結果、蛍光性の親水性有機分子や非二分子膜構造を形成できる人工脂質を化学シグナルに用いると、脂質二分子膜ベシクルの分裂を誘起できることを見出した。また、両親媒性分子を界面に配置したマイクロ液滴からなる人工細胞は、加水分解反応により両親媒性分子へ変換される脂質分子を共存させることで、等分裂あるいは不等分裂を選択的に誘導できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)： Cell division is one of the most important phenomena in biological system. In this work, we investigated on de novo design of artificial cells which perform budding and fission through the mechanism different from the biological cell division. Synthetic cell divisions of lipid bilayer vesicles were induced by chemical signals such as a fluorescent hydrophilic organic molecule or a nonbilayer-forming synthetic lipid. Equal and unequal divisions were controllable for the artificial cells formed with liquid micro particles having amphiphiles on the surface in the presence of hydrolytically active lipid molecules.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：自己組織化 超薄膜 超分子化学 分子認識 脂質

1. 研究開始当初の背景

生体膜の分裂や融合は、生物が生命機能を発現する上で重要かつ不可欠な現象である。何故なら、これら膜の動的形態変化は、細胞にとっては受精や分化などの生命現象に直接関っており、また細胞内小器官の間で起こる膜小胞による物質輸送や情報伝達、いわゆるメンブレントラフィックを達成するための基本的化学プロセスでもあるからである。このような膜の分裂や融合は、生命機能の理解にとどまらず、工学的利用の観点からも極めて意義深い。例えば、膜融合に関しては、人工的な膜融合系がこれまでに多数開発されてきており、医療分野を初めとして様々な科学技術分野での応用が検討されている。これに対して、人工膜の系で出芽を伴う分裂現象を観測した例は、世界的に見てもこれまで多くなく、一本鎖型の界面活性剤を共存させたリン脂質ベシクル系の例などがいくつか知られているに過ぎない。

最近我々は、ある化学シグナルの分子認識にもとづいて人工細胞膜が出芽ならびに分裂を起こすという極めて興味深い系を偶然に見出した(Z. Wang, K. Yasuhara, H. Ito, M. Mukai, J. Kikuchi, *Chem. Lett.*, Vol. 39, No. 1, 2010, pp. 54-55.)。本研究は、この発見を契機に立案したもので、精密な分子認識にもとづいて膜の分裂現象を人為的に制御可能な人工細胞系を創出することを目指した。

2. 研究の目的

本研究では、細胞の分裂現象の重要性に着目し、生体系とは異なる原理をもちいて、出芽と分裂を自在に制御できる人工細胞のde novo デザインについて研究を行った。すなわち、人工細胞膜を形成する脂質との精密分子認識が可能な化学シグナルを用いることで、膜の出芽と分裂を超分子化学的手法によって制御できる系の創出を目指した。

具体的には、まず、(1)人工細胞膜系において、出芽・分裂を起こすための物理化学的因子を探索する。それにもとづいて、(2)出芽・分裂を起こす人工細胞膜のde novo デザインの指針を提示するとともに、その検証を行う。さらに、(3)人工細胞膜の融合や分裂などの動的挙動を制御することによって、高次の物質輸送や情報伝達が可能な人工メンブレントラフィックシステムの開発を目的とした。

3. 研究の方法

人工細胞膜が出芽・分裂を起こすための物理化学的因子を探索するために、グリセロリン脂質の一つであるジミリスチルホスファチジルコリンから形成される脂質二分子膜ベシクルを用いた。化学シグナルには、蛍光性のアニオン性分子であるピラニンを選択したが、この分子は脂質二分子膜ベシクルの分裂を誘起できることを我々は既に見出している。この化学シグナルとの静電相互作用が可能なカチオン性の人工脂質を合成し、

これを脂質二分子膜に組み込んだ。

この化学シグナル存在下の膜の動的挙動を、膜表面での化学シグナルの認識挙動、化学シグナルの結合によって誘起される膜の相分離挙動、その結果観測される出芽・分裂挙動の3つの素過程に分けて定量的に評価した。測定には、蛍光スペクトル法、示差走査熱量分析法、位相差ならびに蛍光モードによる光学顕微鏡観察等を用いた。

以上の検討にもとづいて、膜分裂を起こす人工細胞膜のde novo デザインの指針を提示し、その検証を行った。検証実験には、膜分裂を誘起する化学シグナルとして、タンパク質のシトクロムcを水溶性シグナルに、非二分子膜形成能をもつペプチド脂質を疎水性シグナルに用いた。さらに、モデル細胞として、両親媒性分子共存下に有機溶媒中で形成されるw/o型の液滴微粒子を利用し、これに加水分解活性をもつ脂質分子を化学シグナルとして添加した際の分裂挙動についても検討した。

以上の知見にもとづいて、膜の動的挙動制御にもとづく人工メンブレントラフィックシステムの構築についても検討した。具体的には、人工細胞膜上での分子情報の変換・増幅システムや、細胞への遺伝子デリバリーシステムを対象として、膜の動的挙動制御によってもたらされる効果を評価した。

4. 研究成果

(1)人工細胞膜の出芽・分裂を支配する因子

双性イオン型リン脂質とカチオン性人工脂質を混合して作製した脂質二分子膜ベシクルは、蛍光性の化学シグナルであるピラニンの添加によって膜分裂を起こした。この人工細胞膜系の膜分裂を支配する物理化学的因子を明らかにするために、膜分裂に至る素過程を3つに分けて詳細に評価した。

第一の過程は、化学シグナルの膜表面との相互作用である。ここで用いた化学シグナルは蛍光性であり、一方、脂質膜は無蛍光性のため、両者の相互作用は蛍光スペクトル法ならびに蛍光顕微鏡観察によって容易に評価できる。その結果、化学シグナルは主に静電相互作用によって膜表面に結合すること、化学シグナルとカチオン性人工脂質の複合体の化学量論は1:4であること、化学シグナルの膜への結合は水相のイオン強度を調整することで制御できることがわかった。

第二の過程は、膜表面への化学シグナルの結合によって誘起される膜の相分離である。化学シグナル不在下では、2種類の脂質はほぼ均一な混合状態にあるが、化学シグナルの膜表面への結合は、脂質の相分離を誘起することが、蛍光顕微鏡観察と示差走査熱量分析から明らかになった。この相分離挙動は、膜の相状態に敏感であり、イオン強度と温度の二つに因子によって制御可能であることもわかった。

第三の過程は、脂質の相分離によって引き

起こされる膜の出芽と引きつづく分裂である。蛍光顕微鏡観察の結果、膜の出芽は化学シグナルが結合したカチオン性脂質リッチなドメインから起こることが明らかになった。これは、カチオン性脂質の頭部が化学シグナルとのイオン対形成をすることによって脱水和が促進され、脂質の膜内での充填形態がシリンダー型から脂質頭部が小さいコーン型に変化することでおこる膜表面での摂動が、出芽構造の安定化に寄与している可能性を示唆するものである。また、この出芽は膜のゲル - 液晶相転移温度付近で有効に起こることから、膜の流動性、すなわち脂質膜層のマイクロ粘度が出芽現象の支配因子の一つであることもわかった。また、脂質膜の相分離が出芽挙動を誘導することから、水相のイオン強度も出芽挙動の支配因子となる。さらに、膜の出芽から分裂に至る過程は、膜の揺らぎを反映してある確率でしか起こらないが、膜分裂も出芽と同様に、膜流動性の高いゲル - 液晶相転移温度付近で有効に起こることがわかった。

(2)人工細胞分裂システム的设计指針とその検証

上述の膜分裂システムについての詳細な検討にもとづいて、出芽・分裂を起こす人工細胞をデザインするための指針を、以下のよう提示することができる。

脂質二分子膜ベシクルから構成される人工細胞を分裂させるには、膜の一部がくびれた出芽構造を安定に形成させることが必要である。そのためには、二分子膜構造を形成している脂質分子の膜内での充填形態に摂動を与え、シリンダー型からコーン型への変換が可能な分子間相互作用を導入すればよい。上述の系では、この相互作用は化学シグナルと脂質頭部との静電的多点相互作用であった。しかし、この分子間相互作用は、他の様々な相互作用に置き換えることができよう。また、出芽構造を安定化させるには、膜内で脂質の充填形態の異なるドメインを形成させる方が有利であろう。

以上のことから、二種類以上の混合脂質で脂質二分子膜ベシクルを形成し、この膜内の脂質の充填形態に摂動を与えて相分離を誘起する分子間相互作用を導入すれば、膜分裂現象を引き起こすことが可能であろう。また、その際には、膜の相状態が大きく影響することから、温度やマイクロ粘度が重要な制御因子となる。このような設計指針にそって、つぎに示す膜の動的挙動制御系を構築した。

生体系において電子移動に関与するシトクロム c は、ポリカチオン性のタンパク質である。これを化学シグナルに用いて、アニオン性リン脂質であるホスファチジルグリセロールを含むジミリスチルホスファチジルコリンの脂質二分子膜ベシクルに相互作用させた。その結果、膜表面との強い静電相互作用を示すドメインスワップしたシトク

ロム c のオリゴマーにおいて、膜の形態変化が誘起された。

頭部に4つの水酸基をもつキナ酸残基を導入したペプチド脂質は、脂質頭部間の水素結合効果によってコーン型の充填形態をとるため、単独では非二分子膜構造を形成する。このペプチド脂質を化学シグナルとして用い、ジミリスチルホスファチジルコリンの脂質二分子膜ベシクルに組み込むと、膜の相転移温度領域で相分離に誘起される膜の出芽と分裂が観測された。

モデル細胞として、両親媒性分子共存下に有機溶媒中で形成される w/o 型の液滴微粒子を用いた。これに、加水分解活性をもつ脂質分子として長鎖の *p*-ニトロフェニルエステルを化学シグナルとして添加した際の分裂挙動についても検討した。この系では、化学シグナルの加水分解に伴い分裂挙動が観測されたが、温度や粘度を調整することで、等分裂と不等分裂の制御が可能になった。

(3)人工メンブレントラフィックシステム

脂質二分子膜ベシクルに人工受容体と酵素を集積させて、受容体と酵素間のメディエーターに金属イオンを用いると、酵素による化学シグナルの変換・増幅を受容体のシグナル認識によって制御する人工シグナル伝達系が構築できることを、我々は既に明らかにしている。ここでは、この系にさらに膜融合プロセスを組み合わせることで、膜融合によってシグナル伝達をスイッチングできる超分子システムを構築した。

細胞への遺伝子デリバリーは、遺伝子治療や再生医療のための基盤技術として重要である。これまで遺伝子キャリアーにはウイルスがよく用いられてきたが、安全性の高い非ウイルス型キャリアーの一つとしてカチオン性の脂質二分子膜ベシクルが有望視されている。しかし、従来型の脂質二分子膜ベシクルでは遺伝子とのリポプレックス形成時に膜融合がおこり、高い遺伝子導入効率を得られないという問題があった。本研究では、膜融合に対して高い耐性をもち、かつ細胞毒性も低いセラソームを用いることで、遺伝子導入が一般に難しいといわれている神経細胞への遺伝子導入が有効に起こることを明らかにした。

本研究で明らかになった膜分裂系と膜融合系を組み合わせることで、人工細胞分子情報を伝搬できる人工メンブレントラフィックシステムの構築も可能である。

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 7 件)

F. Hao, K. Tahara, J. Kikuchi, *Chem. Lett.*, 査読有, Vol. 43, No. 6, 2014, pp. 811-813.

DOI: 10.1246/cl.140081

S. Junedi, K. Yasuhara, S. Nagao, J. Kikuchi, S. Hirota, *ChemBioChem*, 査読有, Vol. 15, No. 4, 2014, pp. 517-521.
DOI: 10.1002/cbic.201300728
Y. Sato, K. Yasuhara, J. Kikuchi, T. N. Sato, *Sci. Rep.*, 査読有, Vol. 3, No. 3475, 2013, pp. 1-5.
DOI: 10.1038/srep03475
田原圭志朗, 菊池純一, *ドージンニュース*, 査読無, No. 142, 2012, pp. 1-6.
<http://www.dojindo.co.jp/dojinnews/>
Unique Concentration Dependence on the Fusion of Anionic Liposomes Induced by Polyethyleneimine, K. Yasuhara, M. Tsukamoto, Y. Tsuji, J. Kikuchi, *Colloid Surf. A*, 査読有, Vol. 415, 2012, pp. 461-467.
DOI: 10.1016/j.colsurfa.2012.01.024
Fusion-Triggered Switching of Enzymatic Activity on Artificial Cell Membrane, M. Mukai, Y. Sasaki, J. Kikuchi, *Sensors*, 査読有, Vol. 12, No. 5, 2012, pp. 5966-5977.
DOI: 10.3390/s120505966
菊池純一, バイオ・ナノハイブリッドマテリアルの創成と分子通信デバイスとしての可能性, *化学工業*, 査読無, Vol. 63, No. 3, 2012, pp. 182-187.
<http://www.kako-sha.co.jp/>

〔学会発表〕(計 9 件)

F. Hao, 菊池純一, 人工細胞膜の動的形態変化を誘起する化学シグナルの役割, 第 7 回バイオ関連化学シンポジウム, 2013 年 9 月 28 日, 愛知県名古屋市.
田原圭志朗, 森内昂文, 津久井未来, 廣田顕, 前野貴則, 鳥山道則, 稲垣直之, 菊池純一, 有機-無機ハイブリッドベシクルによる初代神経細胞への遺伝子導入, 日本化学会第 93 春季年会, 2013 年 3 月 25 日, 滋賀県草津市.
津久井未来, 田原圭志朗, 森内昂文, 廣田顕, 前野貴則, 鳥山道則, 稲垣直之, 菊池純一, 遺伝子キャリアー「セラソーム」が及ぼす培養海馬神経細胞の分化への影響, 日本化学会第 93 春季年会, 2013 年 3 月 24 日, 滋賀県草津市.
田原圭志朗, 森内昂文, 廣田顕, 前野貴則, 鳥山道則, 稲垣直之, 菊池純一, セラミック層を被覆した人工膜ナノキャリアーによる培養海馬神経細胞への遺伝子導入, 第 6 回バイオ関連化学シンポジウム, 2012 年 9 月 6 日, 北海道札幌市.
菊池純一, 生体に学ぶ: バイオミメティックマテリアルの創成と未来材料としての可能性, バイオミミクリ研究会, 2012 年 8 月 22 日, 大阪府守口市.
菊池純一, 分子通信: 生物に学ぶ次世代型情報通信, 日本真空学会関西支部・日本表面科学会関西支部合同セミナー2012, 2012 年 7 月 6 日, 兵庫県神戸市.
田原圭志朗, F. Hao, 菊池純一, 安原主馬,

分子シグナルが誘起する人工細胞膜の萌芽・分裂挙動, 日本化学会第 92 春季年会, 2012 年 3 月 27 日, 神奈川県横浜市.

F. Hao, K. Tahara, K. Yasuhara, J. Kikuchi, Roles of a Chemical Signal Which Induces Budding and Fission of Binary Lipid Vesicles, 12th International Symposium on Biomimetic Materials Processing, 2012 年 1 月 26 日, 愛知県名古屋市.

菊池純一, 安原主馬, 田原圭志朗, 白岩彩, 分子シグナルが誘起する脂質ドメインの形成と膜分裂挙動, 第 60 回高分子討論会, 2011 年 9 月 29 日, 岡山県岡山市.

6. 研究組織

(1)研究代表者

菊池 純一 (KIKUCHI, Jun-ichi)
奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・教授
研究者番号: 9 0 1 5 3 0 5 6

(2)研究分担者

安原 主馬 (YUSUHARA, Kazuma)
奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・助教
研究者番号: 9 0 5 4 5 7 1 6

田原圭志朗 (TAHARA, Keishiro)
奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・助教
研究者番号: 5 0 6 2 2 2 9 7