

科学研究費補助金（学術創成研究費）公表用資料
〔研究進捗評価用〕

平成18年度採択分

平成21年4月27日現在

研究課題名（和文）物理科学を基盤とする人工細胞モデルの構築と機能解析

研究課題名（英文） Physico-chemical approach on the construction of functional de novo cell

研究代表者

吉川 研一 (YOSHIKAWA KENICHI)

京都大学大学院・理学研究科・教授



推薦の観点：国際的に対応を強く要請される研究

研究の概要：本研究では、生命体の本質である「エネルギーや物質の流れの中での自律的システム」を理解する為に人工細胞モデルを構築し、その非平衡条件下での振る舞いを明らかにすることを通じて、生命現象の本質に迫る。実験的に生命体の要素を用いたボトムアップ方式を採用するのみならず、細胞を非侵襲・非接触に状態操作するトップダウン方式的アプローチを行い、相互に比較することにより生命現象の本質的な理解に迫る。

研究分野：数物系科学

科研費の分科・細目：物理学・生物物理・化学物理

キーワード：リポソーム・人工細胞モデル・物性基礎論・メゾスコピック系・自己組織化

1. 研究開始当初の背景

生命体は、エネルギーや物質の流れの中で、すなわち散逸条件下、自律的システムとして存在している。しかしながら20世紀には、生命体を要素に分解し、多種多様な個々の分子の構造や機能を調べるという研究が生命科学の主流を占めていた。生命の時空間の自己組織化という壮大な謎に迫るためには、個々の生体分子に関する知識を集積するだけでは不十分である。

2. 研究の目的

本研究では、モデル細胞の非平衡条件下での振る舞いを明らかにすることを通じて、生命現象の本質に迫る。そのため、具体的には次の3つの視点から研究を進める。**1) DNA 高次構造転移とその生物学的意義** DNAの高次構造転移による遺伝子群の活性の on/off スwitchングを実空間上の実験を通して実証する。これにより細胞内での自律的な遺伝子制御のメカニズムの解明を目指す。**2) 細胞サイズ小胞を用いる実空間細胞モデルの構築と微小空間特異性** リン脂質多重層から自発的に細胞サイズの小胞（リポソーム）が生成する機構を明らかにするとともに、モデル小胞内での転写・発現反応の加速のメカニズムを解明する。**3) 生命現象の階層的モデリング** 長鎖 DNA の高次構造転移と生化学反応のネットワークからなる、生命現象の階層的システムとしての特質を実験・理論の両面から究明する。以上3つの課題を総合して、細胞分化や形態形成など、生命体構築の

基本原理に迫る。

3. 研究の方法

1) DNA 高次構造転移とその生物学的意義

非特異的な環境要因による、DNAの折り畳み転移に関して、蛍光顕微鏡および、AFMによる一分子計測を主とした系統的な実験を行う。得られた結果より体系的な理論を構築し、高分子物理学に新たな流れを生み出す。

2) 細胞サイズ小胞を用いる実空間細胞モデルの構築と微小空間特異性

人工細胞モデルとしての巨大リポソームの調製手法を開発し、そのメカニズム解析を行なった。さらに、ゲノムサイズが2.1 Mbと小さく全遺伝子が特定された超好熱菌性始原菌ゲノムを用いた無細胞タンパク質発現系を確立し、細胞内遺伝子情報制御のモデル系に展開する。

3) 生命現象の階層的モデリング

上記1)、2)の課題を進展させる中で構築された理論に基づく作業仮説に従い、実空間上のモデル実験による検証を進める。また、リポソームに無細胞タンパク質合成系を封入した人工細胞モデルを創り出す。ここでは膜タンパク質の機能発現が重要な課題である。

4. これまでの成果

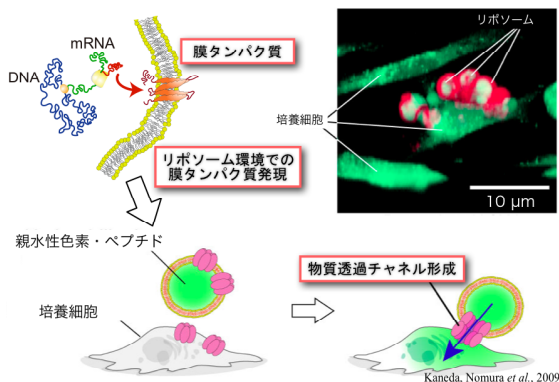
1) DNA 高次構造転移とその生物学的意義

i) イオンや非特異的分子などの環境パラメータによる、DNAの高次構造相転移のメカニズムを解明してきている。ii) 真核細胞における遺伝子群発現のロバストな on/off 制御の解

明を目指し、細胞内のクロマチンのマイクロ相分離構造の安定性を、荷電効果と関連させることにより、理論化した。iii) 長鎖 DNA に高次構造転移を起こすことにより、転写・発現の on/off 制御が可能となることを示した。さらには、実験を通して理論的なモデルの検証をすすめてきている。これらの課題全般にわたって新規性が高く、生命現象に対し興味深く示唆的な成果が得られてきている。

2) 細胞サイズ小胞を用いる実空間細胞モデルの構築と微小空間特異性 当初の予想を越えて大きく発展した研究として、油中水滴を油/水界面を介して水相に移行させることによる、細胞モデルの高効率な形成手法「界面通過法」の確立が挙げられる。世界に先駆けたこの手法の確立により、任意の組成の溶液を内包する細胞サイズ小胞の形成が可能となり、モデル細胞系の研究が飛躍的に発展しつつある。本課題ではまた、セントラルドグマの根幹を成す転写や翻訳に関わるシステムをターゲットとして、超好熱性始原菌由来システムの無細胞再構成系の構築を進めている。現在、タンパク質合成系の開発に成功し、モデル細胞に組み込む準備が整った。

3) 生命現象の階層的モデリング 特に、遺伝子群がロバスタな on/off 制御を受けることに関するメカニズムについて、理論的なモデルの構築を行った。理論に基盤を置く作業仮説に従い、実空間上でのモデル実験による検証が進行中である。また、膜タンパク質の無細胞合成・機能化リポソームの構築と、新規酵素応答性界面活性剤を用いた膜タンパク質再構成リポソームの合成手法の開発に成功したことは特筆される。



5. 今後の計画

物理科学を基盤として、構成論的に“生命現象の謎”に迫ってゆくといった研究を更に大きく発展させる。1) **DNA 高次構造転移と遺伝子群の自律的制御** 非特異的な環境パラメータによる長鎖 DNA の高次構造制御については、その物理的な機構をかなりの程度明らかにすることができてきている。今後の重点課題としては、ロバスタな遺伝子群の制御に深く関わっているクロマチン（真核細胞のゲノム）について、その高次構造と遺伝子

群の活性の相関関係を明らかにすることが挙げられる。再構成クロマチンを用いた、階層的な構造転移の研究と、真核細胞から無侵襲的に取り出したクロマチンを用いる構造と機能の研究が中核となる。2) **実空間人工細胞モデルの構築** DNA やアクチン、さらに ATP などの基質を任意の濃度で取り込んだ細胞サイズリポソームの構築手法として、液滴法を世界に先駆けて開発してきた。本手法を用いて、機能性生体高分子を内包したモデル小胞系を用いた実験を大きく発展させる。すでに、アクチンと DNA を共存させた細胞サイズ空間では、バルク溶液中とは全く異なる相転移挙動を示すことなどが明らかとなってきている。アクチンの持続長の効果を取り入れた平均場理論も構築してきており、実験・理論両面から研究を推進する。3) **生命現象の階層的モデリング** 細胞サイズ小胞中での、膜蛋白質の発現とそれに引き続く膜上での蛋白質の機能化については、既に大きな前進が得られている。この実験系を更に発展させ、受動的な輸送蛋白だけではなく、能動的なベクトル輸送を示すような人工細胞モデルの構築をめざす。さらに、細胞膜表面で物質の認識、透過、情報伝達に関わる膜蛋白質を人工細胞モデルとしてのリポソーム系に効率よく組み込む新規シャペロン技術の開発を試みる。本研究で得られた新知見を基に膜タンパク質研究やバイオテクノロジー・基礎医学への応用を試みる。

6. これまでの発表論文等

(研究代表者は太字、研究分担者は二重下線、連携研究者は一重下線)

T. Saito, T. Iwaki, and **K. Yoshikawa**, DNA compaction induced by neutral polymer is retarded more effectively by divalent anion than monovalent anion. *Biophys. J.*, **96**, 1068-1075 (2009).

M. Kaneda, **S. -i. M. Nomura**, S. Ichinose, S. Kondo, K. Nakahama, **K. Akiyoshi**, and I. Morita, Direct formation of proteo-liposomes by in vitro synthesis and cellular cytosolic delivery with connexin-expressing liposomes, *Biomaterials*, in press. (2009).

S. -i. M. Nomura, S. Kondoh, W. Asayama, A. Asada, S. Nishikawa and **K. Akiyoshi**. Direct preparation of giant proteo-liposomes by in vitro membrane protein synthesis. *J. Biotech.*, **133**, 190-195 (2008).

T. Sato, H. Atomi, and **T. Imanaka**. Archaeal Type III Rubiscos function in a pathway for AMP metabolism. *Science*, **315**, 1003-1006 (2007).

A. Yamada, M. Le Berre, **K. Yoshikawa**, and D. Baigl. Spontaneous Generation of Giant Liposomes from an Oil/Water Interface. *ChemBioChem*, **8**, 2215-2218 (2007).

T. Hamada, Y. Miura, K. Ishii, S. Araki, **K. Yoshikawa**, M. Vestergaard, and M. Takagi. Dynamic Processes in Endocytic Transformation of a Raft-Exhibiting Giant Liposome. *J. Phys. Chem. B*, **111**, 10853-10857 (2007).