

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07293

研究課題名(和文)人工細胞システムによる細胞情報クロストークの実現と細胞動態解析

研究課題名(英文)Artificial cell systems for modeling of cell-information cross-talk and cell dynamic analysis

研究代表者

湊元 幹太 (Tsumoto, Kanta)

三重大学・工学研究科・准教授

研究者番号：80362359

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞情報や細胞骨格に関連する膜タンパク質受容体などを、細胞膜を模倣して作製した人工細胞膜へ再構成する手法を開発し、さらに、例えば、細胞動態のモデリングに繋げるための解析実験法提案することを、めざして行った。顕微鏡で直接観察が可能である界面通過法(張り合わせ法)で作製した巨大ベシクルGUVへGPCR等組換え膜タンパク質をバキュロウイルス出芽粒子(budded virions, BVs)の膜融合で取り込ませた。細胞様マイクロコンパートメントを狙い、新規にGUV大量調製法を考案し、また細胞骨格タンパク質を効率的に封入するためのマイクロな水性分離技術も研究した。以上により人工細胞システムの改良を図った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

複雑な細胞機能を、現代のオープンバイオリソースを活用しながらモデル化された実験系の上に実現することは、細胞生命現象の別角度からの理解に役立つとともに、そこで得た知見が工学的なイノベーションの種となることも、期待される。細胞内では多種多様なプロセスが併存して機能しているが、研究に人工細胞モデルを用いる意義は、シンプルな経路として取り出すことのほか、プロセスの並行を可能とする本質に、眼前で実現することで実験科学的に迫ることである。今回、人工細胞膜へ組換え膜受容体を構成できること、多量高密度の人工細胞ベシクルを広い条件で作れること、細胞骨格タンパク質を高濃度で区画に封じ込めること、をそれぞれ実証した。

研究成果の概要(英文)：In this project, we tried to study and develop how to incorporate proteins related to cell signal transduction and cell motility into artificial lipid bilayer systems mimicking actual membranes of living cells. In addition, through realization of such model systems, we would like to believe we can invent a novel analytical protocol for artificial cellular dynamics.

In this study, we demonstrated the following results: reconstitution of recombinant membrane proteins like GPCRs into giant unilamellar vesicles (GUVs) through membrane fusion with baculovirus budded virions (BVVs), high-yield preparation of GUVs with high density, and apparently selective accumulation of the biomacromolecules cytoskeletal proteins like filamentous actin into aqueous microcompartments.

研究分野：分子生物学

キーワード：人工細胞 細胞情報 プロテオリポソーム 膜タンパク質 細胞骨格 脂質二分子膜 GUV マイクロコンパートメント

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞・生命現象において、細胞膜は外界の刺激を受容し内部へその刺激情報を伝える界面となっている。細胞外からの刺激は、ホルモン分子や匂いや味の分子(物質)や、光、細胞、細胞外マトリクス、力、温度など、種々、知られている。それらは、たいてい、細胞膜に存在する膜タンパク質が受容体となって、細胞質側(細胞内)へ受容情報が伝達されると考えられている。分子細胞生物学の最近の進展によって、その詳細な機構、とくに遺伝学的なパスウェイ、構造機能的な相互作用、などについて、分子生物学的・生化学的解析によって、明らかになってきている。同時に、ヒトをはじめとする代表的な生物種について、各遺伝子の配列情報がデータベースから入手できるため、それらの cDNA を分譲するバイオリソース機関、再販する代理店、さらに通常のタンパク質の遺伝子配列程度の長さの遺伝子について安価に人工合成する企業等を通じて、比較的簡単にターゲットとするタンパク質の cDNA を用意することができる状況となっていた。

バイオ研究の環境が上述のように整ってきているのと合わせて、合成生物学、構成(的)生物学、などが広く行われるようになって来ていた。多様なアプローチが、各研究者によってユニークに選ばれているなかで、実際の細胞の持っている仕組みの一部を、ウエットな人工細胞モデルの実験系で、再構成することを試みる研究も盛んに行われている。

このような背景と、研究代表者のグループが、これまで利用してきた実験手法である、細胞サイズリポソーム (cell-sized liposome) 調製法と、任意の組換え膜タンパク質を人工脂質膜へ導入することが可能な組換えバキュロウイルス (baculovirus) の出芽ウイルス粒子 (budded virions, BVs) と脂質膜とを膜融合させる技術とを組み合わせて展開していく中で、遺伝情報を用いてタンパク質を再構成した人工細胞モデルを創出することを目指す研究を提案した。また、研究分担者の方との研究分担・連携を通じ、細胞動態を発現させることを狙って、いくつかの細胞情報経路に加えて、細胞骨格タンパク質の取り込みにもチャレンジすることを想定した。

2. 研究の目的

本研究では、膜受容体である GPCR から始まる経路を再構成し、その刺激場をチャンネル開放、細胞骨格系タンパク質と膜等の相互作用の変化へと連絡することを試みていた。その際、代表者のグループがこれまでに開発に関わってきた、組換えバキュロウイルス/リポソーム膜融合によるプロテオリポソーム作製法と、近年よく利用されてきていた界面通過法(張り合わせ法)によるリポソーム調製法を、基盤技術として用いながら、新しい人工細胞モデル実験を行う実験系を開発すること、組換えバキュロウイルスを用いる再構成法を改良すること、細胞サイズリポソームである巨大ベシクル (giant unilamellar vesicles, GUVs) の作製法の開発を進めること、上述の基盤技術では効率よく行うことが難しい非膜タンパク質である細胞質タンパク質のマイクロコンパートメントへの取込方法の検討、を行うことを実験の目標とした。組換えバキュロウイルスを用いる方法では、チャンネル膜タンパク質の導入とその後の解析が可能となる系とするため、それに適した内容物組成を自由に選べる方法により、人工細胞のベースとなる細胞サイズリポソーム GUV を作製することとした。最後の項では、細胞外マトリクス受容体のインテグリンと細胞骨格との連絡タンパク質(ここでは FERM タンパク質の1つ)、さらにアクチンタンパク質について取り込むことを計画していた。

3. 研究の方法

上記の目的を果たすために、次の方法で実験を行った。本研究課題において基盤となった技術を中心に触れ、個別の研究成果に関係する研究方法については、次項で詳しく触れることにする。

(1) 組換えバキュロウイルスによる人工脂質膜への膜タンパク質の導入法 (Fukushima H, Mizutani M, Imamura K, Morino K, Kobayashi J, Okumura K, Tsumoto K, Yoshimura T, J Biochem (2008) 144, 763-770; Tsumoto K, Yoshimura T, Methods Enzymol (2009) 465, 95-109): 目的の膜タンパク質の cDNA を入手しバキュロウイルスのゲノムへ組み込むことで、昆虫培養細胞 (Sf9 細胞等) によりタンパク質を産生する系が市販されている。目的のタンパク質の遺伝子を持つウイルスに感染させた昆虫細胞の培養上清には、バキュロウイルス粒子 BVs が放出されるが、この BVs のエンベロープ膜に、組換え遺伝子産物が膜タンパク質であるとき、その産物が取り込まれていることから、BVs をショ糖密度勾配超遠心法等の常法で回収することで、組換え膜タンパク質を得ることができることが報告されている。私たちは、この BVs が本来の感染の経路において、弱酸性条件で細胞の膜成分(主としてエンドソーム内膜)に膜融合することから、人工的な脂質二分子膜の小胞であるリポソーム膜に対して膜融合を起こすことを明らかにし、さらに、それにより、目的の組換え膜タンパク質を人工のリン脂質二分子膜へ膜融合により導入できることを見出している。膜融合には、弱酸性条件で活性化されるウイルスの糖タンパク質 GP64 と、融合を受ける脂質膜には酸性のリン脂質(ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール等)が必要である。一般には、別に調製したリポソーム懸濁液と BVs とを、弱酸性 pH の酢酸/酢酸ナトリウム緩衝液等を含む容器中で混合して膜融合させる。本研究では、内容物の選択性が良いと報告のある界面通過法(張り合わせ法)により調製した GUV に対し膜融合を検討した。この方法では、顕微鏡ステージ上で膜融合を起こさせる点が、これまでの方法と異なっている。そのため、その融合途中を経時的に観察することも可能となっている(宇野、西上ら、学会発表)。

(2) 細胞サイズリポソームの調製：細胞サイズのリポソームである GUV には、エレクトロフォーメーション法や静置水和法といった種々の方法が知られている（例えば、Tsumoto K, Matsuo H, Tomita M, Yoshimura T, *Colloids Surf B Biointerfaces* (2009) 68, 98-105）。近年、内容物や膜の組成を比較的随意に設定でき、かつ、調製に用いる緩衝液の条件から影響を受けにくい方法として、ダブルエマルジョンの手法を用いる、界面通過法（張り合わせ法）の利用が多く報告されている。私たちもこの方法を利用して、GUV を調製した。シリコンゴム板に小孔を穿ちカバーガラス上に密着させ、ウェルを設ける。BVs を含む緩衝液を下層（水相）に敷き、その上へ、リン脂質と内水相に相当する水溶液を含み形成した油中水（water-in-oil, W/O）マイクロ液滴を含むミネラルオイルを載せ上層（油相）とする。油相と水相の界面には、リン脂質の単分子膜が形成され、一方、マイクロエマルジョンの液滴表面にも同様の膜が形成される。自重で下がる W/O マイクロ液滴が上下相の界面を通過するとき、両方の単分子膜が張り合わされ、2 分子膜となるとともに、下相側へ突き出した細胞サイズのベシクルが出現する。倒立型蛍光顕微鏡によりウェルの底面からウイルスとの相互作用を観察することができる（図 1 に模式図を示す）。

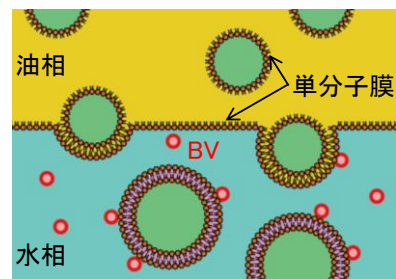


図1: 界面通過法

油相と水相の界面には、リン脂質の単分子膜が形成され、一方、マイクロエマルジョンの液滴表面にも同様の膜が形成される。自重で下がる W/O マイクロ液滴が上下相の界面を通過するとき、両方の単分子膜が張り合わされ、2 分子膜となるとともに、下相側へ突き出した細胞サイズのベシクルが出現する。倒立型蛍光顕微鏡によりウェルの底面からウイルスとの相互作用を観察することができる（図 1 に模式図を示す）。

(3) 水性二相分配法：水性の高分子溶液が二相に分離する系で aqueous two-phase system (ATPS) と呼ばれている、生体の巨大分子などを穏和に分離する古典的な技術として知られている（水性二層分配法、アルバートソン、1972 年、東京大学出版会）。近年、それを用いた水性マイクロ相分離による液滴が細胞サイズマイクロコンパートメントとして生体分子を効率的に捕捉可能であることため技術的にも再び注目されている（実験例として Tsumoto K, Arai M, Nakatani N, Watanabe SN, Yoshikawa K, *Life (Basel)* (2015), 5, 459-466 等）。水溶性高分子のポリエチレングリコール (PEG) とデキストラン (DEX) からなる ATPS により、比較的高張る細胞質タンパク質をマイクロコンパートメントへ濃縮できる。

4. 研究成果

本研究課題に関連する研究成果については、現在本課題をさらに発展させた科研費研究を進めていることから、そのうち論文発表を既に行っているその内容について、主に報告することとする。

(1) 顕微鏡で直接観察が可能である界面通過法（張り合わせ法）で作製した巨大ベシクル GUV へ GPCR 等組換え膜タンパク質をバキュロウイルス出芽粒子 (budded virions, BVs) の膜融合で取り込ませた (Nishigami M, Mori T, Tomita M, Takiguchi K, Tsumoto K, *Colloids Surf B Biointerfaces* (2017) 155, 248-256) : この手法で作製した GUV は本課題研究の目的に適しており、その利用性を検証し、その後、目標である GPCR の組込みを行った。野生型 BV のエンベロープ膜を脂溶性色素 R18 で染色し、上述のような手法により、界面通過法で中性リン脂質 (DOPC) と酸性リン脂質 (DOPG) から作製した GUV へ接触させた。GUV 内水相には水溶性蛍光色素のカルセインを封入した。GUV への R18 色素の移行より膜融合を共焦点顕微鏡で評価したところ、pH 4~5 において膜融合が起こることが示された。膜融合の有無と内水相のカルセインの蛍光強度と比べると、膜融合により内水相の漏洩が一部起こる（内水相の傾向の減少がある）一方、完全に漏洩することは無く、膜融合の機構から予想される通り内容物は保持された。

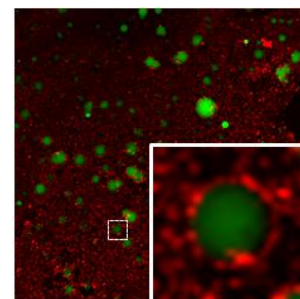


図2: CRHR1-TagRFP/GUV 受容体(赤)と内水相(緑)

本条件を用いて、GPCR である CRHR1 (CRF 受容体) を導入した。赤色蛍光タンパク質を融合した CRHR1-TagRFP を提示する組換えバキュロウイルス BV を GUV 膜へ膜融合により導入されることを示した (図 2)。

(2) 新規に GUV 大量調製法を考案した (Tsumoto K, Hayashi Y, Tabata J, Tomita M, *Colloids Surf A Physicochemical and Engineering Aspects* (2018) 546, 74-82) : 上述の方法によりダブルエマルジョンをベースとする界面通過法による GUV 膜へ組換え BV により膜タンパク質が導入されることを見出した。本研究において、リン脂質条件、内水相条件、および調製緩衝液を比較的自由に選べ、かつ、高い数密度で得ることが可能となることは必要であり、そのため、GUV の新しい形成過程を考案した。本手法は、リポソーム研究の初期に考案され現在も用いられているサブマイクロサイズの単層膜リポソーム (large unilamellar vesicles, LUVs) の作製法として知られている逆相蒸発法 (reverse-phase evaporation method) のプロセスをヒントに、細胞サイズのベシクルを破壊することなく水溶液中に残せるよう、溶媒除去を蒸発から遠心分離に置き換えたため逆相遠心法 (reverse-phase/centrifugation method) と呼んでいる。各操作の工夫

から、最終の懸濁液には非常に高密度のGUVが得られることが分かった(図3)。GUVの組成を変えマイクロドメインの形成が起きたことから、得られたベシクルの単層二分子膜性が確認されている。

また、この方法は適切に溶媒を選べば酵素反応(カルボキシエステラーゼ)を内水相へ封入することができる。生細胞活性の測定で利用される膜透過性カルセイン-AMの取込分解で内水相から生じた蛍光により、封入酵素の活性が保持される。本方法で作製したGUVに対するBV融合による組換えタンパク質の高効率の導入に関する研究は現在さらに進展中である。

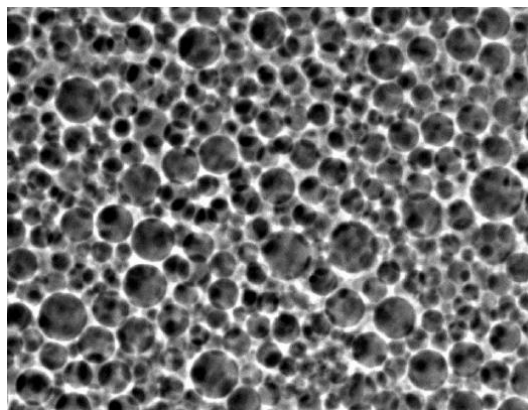


図3: 逆相遠心法: 高密度のGUV

(3) 細胞骨格タンパク質の効率的なマイクロコンパートメントへの分配方法 (Nakatani N, Sakuta H, Hayashi M, Tanaka S, Takiguchi K, Tsumoto K, Yoshikawa K, ChemBioChem (2018) 19, 1370-1374) : PEG/DEXのATPSを混合攪拌することでDEXに富むミクサイズの水性液滴が生成する。液滴の外相はPEGに富んでいるため、比較的高張るDEXのように、柔軟な高分子鎖のPEGにより排除されてしまう生体高分子は、DEXに富むマイクロ液滴に追い出されるため、非常にクリアな分配傾向を示す。細胞骨格タンパク質であるアクチンは、単量体のアクチン(G-actin)では両相に分配するが、細胞骨格機能を発現するアクチン繊維(F-actin)はDEX液滴へ局在する。本研究では、同様に嵩高い長鎖dsDNAの局在挙動も示している。この成果は膜タンパク質の導入にウイルスを用いる方法を補完する方法と期待される。

(4) 組換えバキュロウイルス出芽粒子の膜融合能保持 (Nakanishi K, Tomita M, Tsumoto K, Biosci Biotechnol Biochem (2020) 84, 686-694) : 本研究を遂行するにあたり、調製したウイルス出芽粒子BVの膜融合能を損なうことなく長期間保存する条件を見出すことは、必要であった。前記の方法により培養上清を得て、そこから超遠心分離により回収・精製したBVは、氷上で保存すれば、膜融合能を損なわずに保管できるが長期の保存には適していない。グリセロール等の不凍液を用いることは膜融合実験において脂質膜に影響する恐れがある。長期保存のため凍結保存する場合、意図せず凍結融解が繰り返されることが、ウイルス粒子のダメージになっている。このようなことを考慮して、トレハロースをBV懸濁液に含ませることが、凍結保存安定性を劇的に高めることを、リポソームを用いた膜融合アッセイ、組換えBVを用いた細胞感染能の評価、並びにネガティブ染色透過電子顕微鏡観察によるBV形態の評価、によって明らかにした。BVの膜融合能および感染能は、BVの正常な形態保持と強く相関し、トレハロースは複数回の凍結融解を行ってもBVの形態損傷をよく抑制することが分かった。

なお、本研究では、上記に加えて、リポソーム膜の脆弱性を補うためにシリカ粒子等の球状固体の表面を用いたタンパク質の提示を行った実験成果も学会等で発表してきている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nakanishi Kohei, Tomita Masahiro, Tsumoto Kanta	4. 巻 84
2. 論文標題 Membrane fusion and infection abilities of baculovirus virions are preserved during freezing and thawing in the presence of trehalose	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 686 ~ 694
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2019.1704396	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakatani Naoki, Sakuta Hiroki, Hayashi Masahito, Tanaka Shunsuke, Takiguchi Kingo, Tsumoto Kanta, Yoshikawa Kenichi	4. 巻 19
2. 論文標題 Specific Spatial Localization of Actin and DNA in a ² Water/Water Microdroplet: Self-Emergence of a Cell-Like Structure	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 1370 ~ 1374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.201800066	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 Nishigami Misako, Mori Takaaki, Tomita Masahiro, Takiguchi Kingo, Tsumoto Kanta	4. 巻 155
2. 論文標題 Membrane fusion between baculovirus budded virus-enveloped particles and giant liposomes generated using a droplet-transfer method for the incorporation of recombinant membrane proteins	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Colloids and Surfaces B: Biointerfaces	6. 最初と最後の頁 248 ~ 256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.colsurfb.2017.04.027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsumoto Kanta, Hayashi Yuki, Tabata Jin, Tomita Masahiro	4. 巻 546
2. 論文標題 A reverse-phase method revisited: Rapid high-yield preparation of giant unilamellar vesicles (GUVs) using emulsification followed by centrifugation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects	6. 最初と最後の頁 74 ~ 82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.colsurfa.2018.02.060	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計33件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 13件）

1. 発表者名 宇野勇気, 西上美佐子, 富田昌弘, 湊元幹太
2. 発表標題 界面通過法により作製したGUVによるカルシウムイオン膜透過性評価
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中西航平, 西上美佐子, 富田昌弘, 湊元幹太
2. 発表標題 インテグリンを再構成した巨大組換えプロテオリポソームの調製
3. 学会等名 第89回日本生化学会大会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究 分担者	瀧口 金吾 (Takiguchi Kingo) (20262842)	名古屋大学・理学研究科・講師 (13901)	
連携 研究者	木戸秋 悟 (Kidoaki Satoru) (10336018)	九州大学・先導物質化学研究所・教授 (17102)	