

生体内の高分子混雑に着目した 新規の細胞モデルの創成に成功

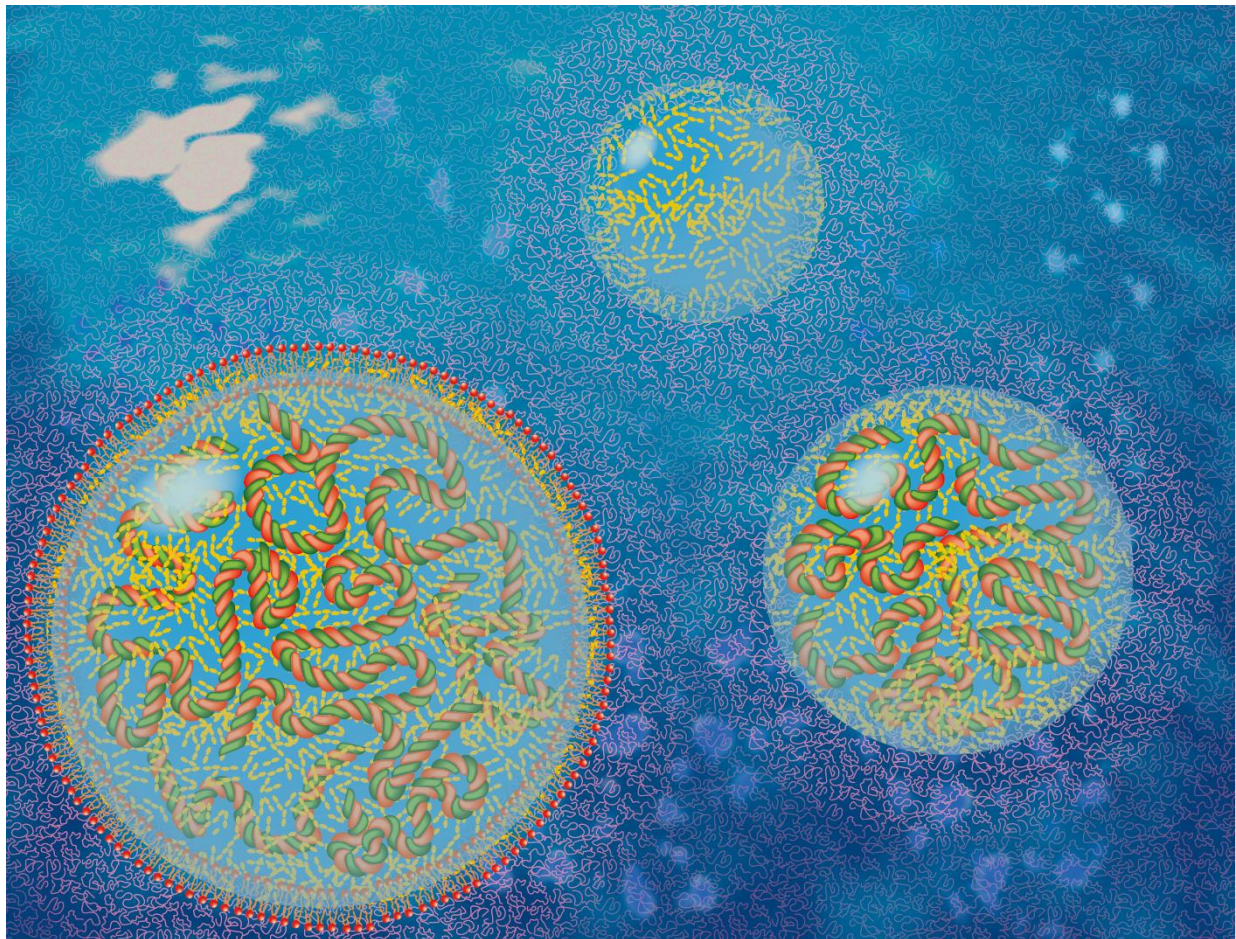
名古屋大学大学院理学研究科の 瀧口 金吾 講師、同志社大学生命医科学部の 作田 浩輝 特任助教、藤田 ふみか 大学院生、北陸先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科生命機能工学領域の 濱田 勉 准教授、法政大学生命科学部の 林 真人 教務助手、三重大学大学院工学研究科の 湊元 幹太 教授、京都大学高等研究院医学物理・医工計測グローバル拠点の 吉川 研一 特任教授 らの共同研究グループは、二種類の水溶性高分子のミクロ相分離条件下で DNA とリン脂質を共存させると、内部に DNA を取込み、リン脂質の膜で囲まれた細胞内小器官様の構造が自発的に生成することを発見しました。この発見が元になり、細胞が自律的に複雑な構造や高度な機能を生み出す機構の謎に迫る研究に発展することが期待されます。

その成果をまとめた論文が、国際科学雑誌 *ChemBioChem* 誌のオンライン版に 2020 年 7 月 15 日付けで公開されましたが、この度、Very Important Paper の 1 つに選ばれ、研究内容を紹介するイラストが *ChemBioChem* 誌の 2020 年 21 巻 23 号に掲載されました。

この研究は、平成 24 年度から始まった文部科学省科学研究費助成事業新学術領域『分子ロボティクス』プロジェクトおよび平成 31 年度から始まった日本学術振興会科学研究費助成事業『細胞結合ネットワークの構築による人工細胞モデルの組織化と集団動態発現』等の支援のもとでおこなわれたものです。

【ポイント】

- ・異なる高分子^{注1)}の混雑によって高分子同士が相分離^{注2)}を起こしてマイクロ液滴を形成している溶液にリン脂質を加えると、脂質が自発的にマイクロ液滴の界面に局在化することで、細胞内小器官（オルガネラ）^{注3)}の形成に似た区画化を起こすことを発見した。
- ・この新知見を利用することで、リン脂質によって小胞化されたマイクロ液滴の内部に、長鎖 DNA を濃縮して封入させることに成功した。
- ・本研究で見出されたマイクロ液滴のリン脂質によって区画化される小胞化は、原始生命体（細胞の起源）のモデル実験系と成り得ると同時に、人工脂質膜小胞を調製するための有力な新手法として期待される。
- ・この研究成果をまとめた論文が、国際科学雑誌 *ChemBioChem* 誌に掲載され、さらに、Very Important Paper (VIP) に選ばれた。【論文を紹介するイラスト（下図）は *ChemBioChem* 誌の 2020 年 21 巻 23 号に掲載】



【研究背景と内容】

近年、細胞内の複雑な構造が生み出される起源や、脂質膜によって区画化される多様な細胞内小器官および、顆粒などの膜によって隔てられていない領域^{注3)}などが形成・維持される機構について、相分離^{注2)}の視点から研究されています。

本研究では、液-液相分離 (LLPS)^{注2)}を示すことができる水溶性の高分子ポリマーであるポリエチレングリコール (PEG) およびデキストラン (DEX)^{注1)}の混合によってマイクロ液滴を生成させた溶液にリン脂質を加えると、マイクロ液滴の界面に脂質が自発的に集まって膜を形成することを見出しました (図1)。この脂質に覆われたマイクロ液滴が、外液の浸透圧を高張にすると、脂質二重膜でできた膜小胞と同様に破裂や穿孔、収縮をすることから (図2)、マイクロ液滴を覆う脂質が、生体膜の基本構造である脂質二重膜と同じ性質を示すことが分かりました。

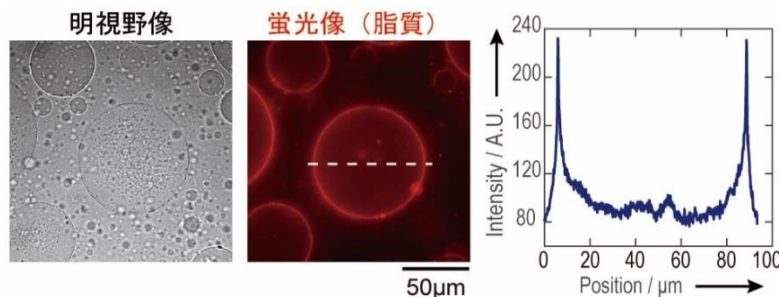


図1：マイクロ液滴の界面へのリン脂質の蓄積。
リン脂質添加後の PEG / DEX 混合溶液の顕微鏡画像 (マイクロ液滴の生成を示す明視野像とリン脂質の局在を示す蛍光像)。蛍光像 (白の破線部分) から得られた蛍光強度の空間プロファイル。

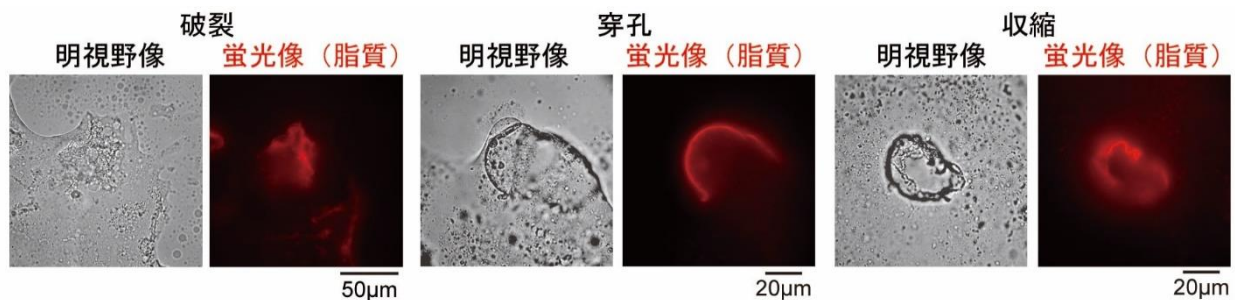


図2：高張な水溶液 (NaCl 溶液) の注入による脂質膜構造の形態変化。

外液の浸透圧が変化することによって、リン脂質に覆われたマイクロ液滴の内部から外液に向かって大量の水分子が移動しようとする結果、脂質膜の破裂や穿孔や収縮が起きる。左から、破裂後のリン脂質の凝集塊、穿孔を起こした脂質膜の残骸、収縮した脂質膜。

ところで、核酸である DNA も生体内で重要な働きをしている天然の高分子です。我々共同研究グループの先行研究から、長鎖 DNA が DEX を高濃度で含むマイクロ液滴に遍在することが明らかにされていました。長鎖 DNA を内部に濃縮して取込んだマイクロ液滴を形成している相分離溶液系にリン脂質を加えると、やはり脂質が自発的にマイクロ液滴を覆うことで、内部に DNA を含む細胞内小器官様の安定化された小胞の形成が認められました (図3)。

このマイクロ液滴からリン脂質膜で安定化された細胞内小器官様の小胞が自発的・自己組織的に創成されてくる過程は、原始の生命体の細胞の内部構造の起源を考える際の貴重な知見であり、多種類の高分子の混合によって細胞内小器官 (オルガネラ) や膜によって隔てられていない構造が自発的に形成されてくる可能性を示した研究成果です。

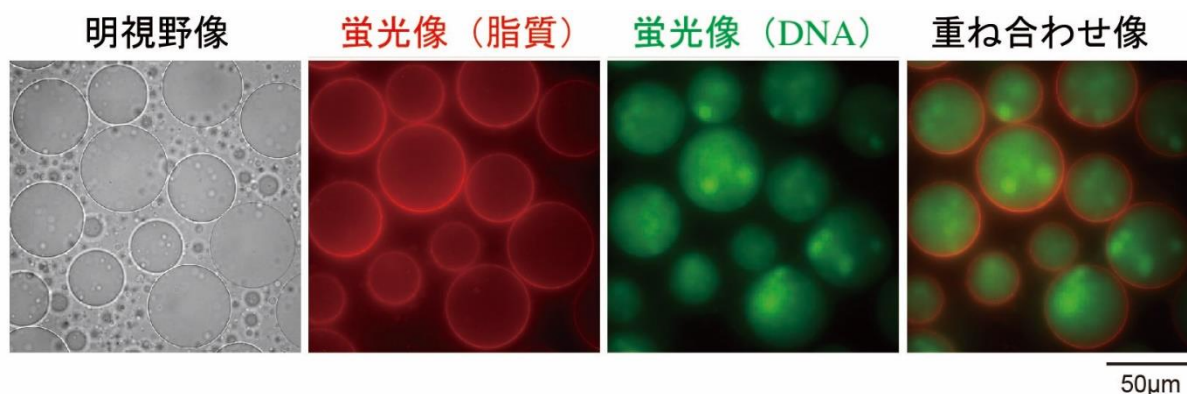


図3：リン脂質の膜で区画化・小胞化されたマイクロ液滴へのDNAの自発的なカプセル化。
長鎖DNAを含むPEG / DEX混合溶液にリン脂質を添加すると、自発的にDNAを取込んだ脂質の膜に覆われたマイクロ液滴が生成される。

【成果の意義】

本研究の発見は、多種類の高分子の混合によって生体高分子（ここでは長鎖DNA）を取込んだマイクロ液滴が自発的に生じ、これに生体膜の重要な構成成分であるリン脂質を加えると、更にマイクロ液滴の界面にリン脂質が集積して自己組織的に細胞内小器官様の小胞構造が形成されることを示した研究成果です。

この発見の特筆すべきこととして、本研究で用いられたどの成分、高分子のPEGとDEX、生体高分子の長鎖DNA、そしてリン脂質も、酵素と基質との間に観られる鍵と錠との関係のような相互作用を互いに示さないことが挙げられます。このことは、生命現象の説明や理解に必ず分子間の特異的な相互作用の存在を想定して来たこれまでの生命科学に一石を投じるものであり、非常に重要です。

細胞内では、細胞分裂の際、分離・分配された染色体が脂質の膜で覆われ核膜が再生することで2つの娘細胞の核が形成されます。また、オートファジーでは、変性したり役目を終えたりした生体因子や細胞内に侵入して来た細菌などの外敵の分解除去のため、あるいは細胞内物質のリサイクルのため、それらを取り込む様に脂質膜でできた“袋”を形成します。これらのことから、本研究で得られた知見は、非膜性の顆粒の様な細胞内領域と膜に覆われた細胞内小器官との関係に新たな視点を与えると共に、濃厚環境での生体高分子の在り様、細胞内に観察されるような重層的に区画された領域や細胞内小器官の様な特別な構造の起源の理解に迫る成果だと言えます。

【用語説明】

注1) 高分子（ポリマー）：

ある化学物質が、様々な結合を介して連なっていくことで、より大きな分子になったもの。一本の鎖状のポリマーもあれば、枝分かれしながら繋がっているポリマーもあります。

今回の研究で用いられたポリエチレングリコール（PEG）やデキストラン（DEX）は、その代表的なものです。

DNAも、ヌクレオチドが連なってできた天然のポリマーです。生体内には、様々な糖鎖やアクチン線維や微小管の様なアクチンやチューブリンと呼ばれる蛋白質が繊維状に集まってできた細胞骨格などが存在していますが、これらも天然のポリマーと考えることができます。

注2) 相分離、液-液相分離 (Liquid-Liquid Phase Separation, LLPS) :

LLPSは、複数の水溶性高分子を混合し混雑化すると(図4(a))、ある高分子が他の高分子よりも高濃度で存在する領域が水溶液中に現れる現象です。このように異なる領域に分かれていく現象を相分離と呼びます。そのようにしてできてくる領域ですが、混合の仕方によって生きた細胞や細胞内小器官と同等のサイズを持つマイクロ液滴になります。

今回の研究では、PEGが濃く存在する溶液中に、DEXが濃く存在するマイクロ液滴が生じる条件下で実験が行われました(図4(b))。

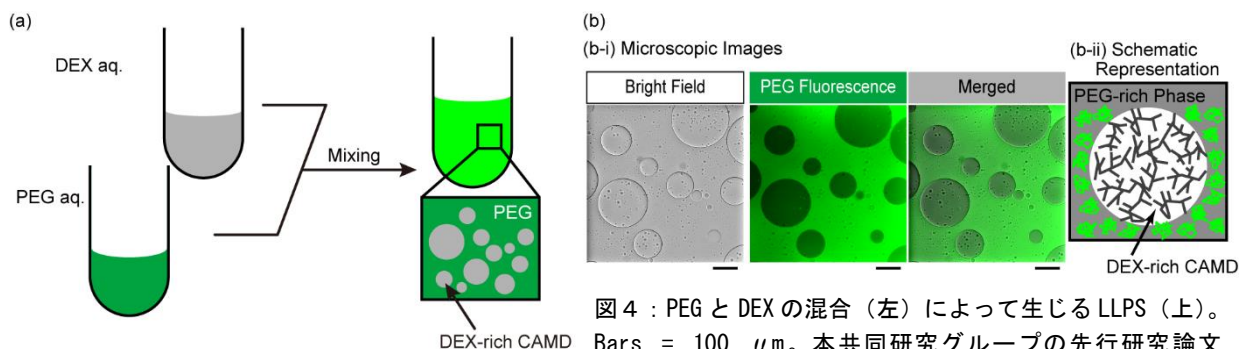


図4 : PEG と DEX の混合 (左) によって生じる LLPS (上)。Bars = 100 μ m。本共同研究グループの先行研究論文 *ChemBioChem* **2018**, *19*(13), 1370-1374 (Figure S1) より転載。

注3) 細胞内小器官 (オルガネラ) :

細胞内に存在する核やミトコンドリア、ゴルジ体などの総称。

これまで細胞内小器官は、膜によって外界から隔てられて、その構造や機能が維持されていると考えられてきました。しかし近年、膜によって外部から隔てられていない領域・顆粒(例として核小体やストレス顆粒など)が、非膜性の細胞内小器官として重要な働きを担っていることが分かってきて、それらの形成維持機構が、細胞内の複雑で階層的な構造の組織化に関連して議論される様になっていました。

【論文情報】

雑誌名 : *ChemBioChem* **2020**, *21* (23), 3323-3328.

論文タイトル : “Self-Emergent Protocells Generated in an Aqueous Solution with Binary Macromolecules through Liquid-Liquid Phase Separation.”

著者 : Hiroki Sakuta, Fumika Fujita, Tsutomu Hamada, Masahito Hayashi, Kingo Takiguchi, Kanta Tsumoto, Kenichi Yoshikawa.

論文本文 DOI: 10.1002/cbic.202000344

イラスト (Cover Feature) DOI: 10.1002/cbic.202000760

【著者所属】

名古屋大学大学院理学研究科（瀧口 金吾 講師）

同志社大学生命医科学部（作田 浩輝 特任助教、藤田 ふみか 大学院生）

北陸先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科生命機能工学領域（濱田 勉 准教授）

法政大学生命科学部（林 真人 教務助手）

三重大学大学院工学研究科（湊元 幹太 教授）

京都大学高等研究院医学物理・医工計測グローバル拠点（吉川 研一 特任教授）

【研究費】

・ 科研費 基盤研究 (A) (15H02121)

・ 科研費 基盤研究 (C) (19K06540)

・ 科研費 基盤研究 (B) (20H01877)

・ 特別研究員奨励費 (18J12947)

・ 文部科学省新学術領域研究

「アメーバ型分子ロボット実現のための要素技術開発とその統合」(24104004)

・ 文部科学省新学術領域研究

「ゆらぎと構造の協奏：非平衡系における普遍法則の確立」(25103012)

・ 文部科学省新学術領域研究

「宇宙からひも解く新たな生命制御機構の統合的理解」(18H04976)