

2-5 生体 – 非生体ハイブリッド素子を用いた細胞活動の理解と人為制御

2-5 *Understanding and Control of Cellular Functions Using a Biological-non-biological Hybrid Device*

小林昇平

KOBAYASHI Shouhei

生物に見られる自然の「知」(自然知)に学んで新たな情報通信技術 (ICT) を創出するためには、分子や細胞、個体といった生物の様々な階層を対象とする研究の進展が必要である。我々の研究グループでは、生命の最小機能単位である「細胞」が持つ情報処理能力や通信能力を利用した新たな ICT パラダイムの創出に向けて、細胞機能の計測・制御技術の研究開発を進めている。本稿では、細胞がどのようにして外界からの情報を検知し、それに対する柔軟な対応を行っているかについて、生体–非生体ハイブリッド素子を用いた独自の計測技術を使うことで初めて明らかとなった知見を紹介する。

Our research group aims to create a new ICT paradigm using the information processing and communication capabilities of the cell, the smallest functional unit of life by carrying our research and development into technology for measuring and controlling cellular functions. This paper focuses on what has been clarified for the first time regarding how cells obtain information on external environment, and how they respond flexibly to it, by an original measuring technique using a biological-non-biological hybrid device.

1 まえがき

生きた細胞 (生細胞) は、分子を情報媒体とした通信 (分子通信) によって様々な情報を外界とやりとりしながら生きている。分子通信は、生体親和性を有する、水環境でも使用できる、低消費エネルギーで駆動し得るなどの優れた特性を持つため、新しい情報通信パラダイムの一つとして、概念提唱以来、様々な研究が行われている [1]–[4]。生細胞が持つ分子通信システムを人為的に再構成し、制御できるようになれば、既存の情報通信技術 (ICT) の適用が難しい環境下における化学物質情報の検出や処理など、新たな ICT の創出につながると期待される。しかし、これまでのところ、分子や細胞等を直接取り扱って行う実験に基づいたバイオ研究の側から分子通信にアプローチした研究例はまだほとんどない。そこで、我々の研究グループでは、細胞が得意としている分子通信の ICT 分野における利活用を実現するため、生命の最小機能単位である細胞を対象とした ICT 研究“細胞 ICT 研究”に着目し、研究を進めてきた [5]–[7]。本稿では、生細胞が持つ外来物質認識機構の解析や、その結果をヒントにして進めてきた、生細胞内における機能性微小空間の人為創製

に関する研究開発の現状について報告する。

2 生体 – 非生体ハイブリッド素子を用いた細胞 ICT 研究の狙い

細胞が行う分子通信の仕組みを理解し、人工的に制御できるようにするためには、単に生命活動を顕微鏡法等によって詳細に観察するだけでなく、細胞に対して積極的に人為刺激を与え、それに対する細胞応答を調べるという研究アプローチが重要である。そこで我々は、生細胞が行う分子通信を解析し人為制御するための方法論として、生細胞の中に、人為的な操作が可能な人工物を埋め込み、人為的な刺激に対する細胞応答を詳細に解析できる実験システムを構築しようと考えた (図 1 a)。この実験システムの最大の特徴は、生細胞と直接接触して化学反応を起こさせる役割を担う“生体”分子を、人為的な設計や操作が可能な“非生体”物質の表面にコーティングした、“生体–非生体ハイブリッド素子”を用いる点である。生体–非生体ハイブリッド素子は、実験目的に応じてその性状 (大きさ、材質など) を容易に変更可能なため、細胞が行う外来物質認識機構の理解や、それに基づいた細胞機能

2 バイオ材料の知に学ぶ

の人為制御において、非常に有用なツールになると考えられる。これまでに我々は、生体-非生体ハイブリッド素子のモデルとして、望みのDNAやタンパク質等の生体分子を結合させた微小なプラスチックビーズ(人工ビーズ)を作製し、これを生細胞の中に導入して、細胞応答を調べる実験手法の開発を進めてきた。以降では、これまでに得られた成果のうち代表的なものを紹介する。

ズ(人工ビーズ)を作製し、これを生細胞の中に導入して、細胞応答を調べる実験手法の開発を進めてきた。以降では、これまでに得られた成果のうち代表的なものを紹介する。

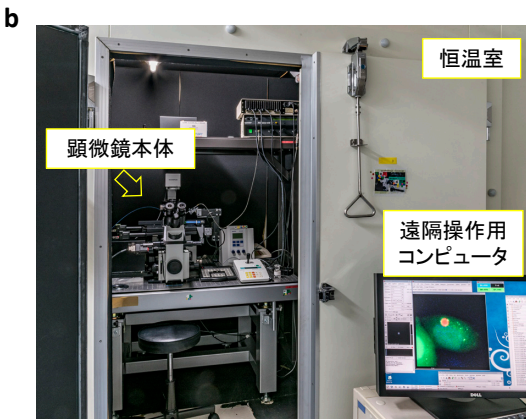
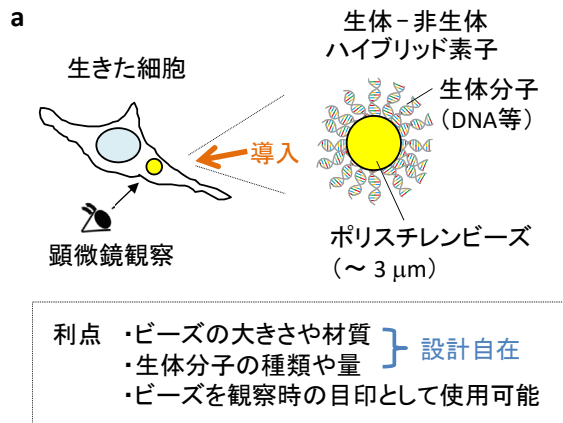


図1 生体-非生体ハイブリッド素子を用いた細胞応答計測技術の概要
a. 実験系の概要と利点。 b. 生細胞観察に用いる高解像度蛍光イメージングシステム。観察条件を安定に保つため、顕微鏡は恒温室内に設置。参考文献 [7] を一部改変して転載。

2.1 オートファジーによる人工ビーズの捕捉

細胞の生存にとって、外界から細胞内へ侵入してくる物質への対処は重要である。例えば、細胞にバクテリア等の病原体が侵入した場合、細胞は何らかの形でそれを検出・認識し、それに応じて適切に対処している。これら一連の過程において、細胞は分子を介した情報伝達を行っているはずであるが、個々の分子は非常に小さいため、通常の場合、それを顕微鏡観察法などによって可視化することは難しい。特に、外来物質がいつ、細胞内のどこに侵入し、また、侵入直後にその場所で何が起きているかを可視化することは難しく、従来までブラックボックスとなっていた。

そこで我々は、生細胞が行う分子通信の理解と制御へ向けた研究の第一歩として、種々の人工ビーズを細胞に取り込ませることで、「細胞はどのようにして外界からの情報を検知しているか」という問題を明らかにしようと考えた。具体的には、生きた培養細胞(HeLa細胞)の中に生体分子を結合させたポリスチレンビーズを導入し、その周囲で起こる細胞応答を生細胞蛍光イメージング法(図1b)及び蛍光観察したのと同じ場所を電子顕微鏡で観察する手法(Live CLEM法[8])で解析した。この方法では、トランスフェクション試薬と呼ばれる脂質を用いることで、エンドサイトーシスによってビーズを細胞に取り込ませる。エンドサイトーシスは細胞が元来備えている物質取り込み機構で

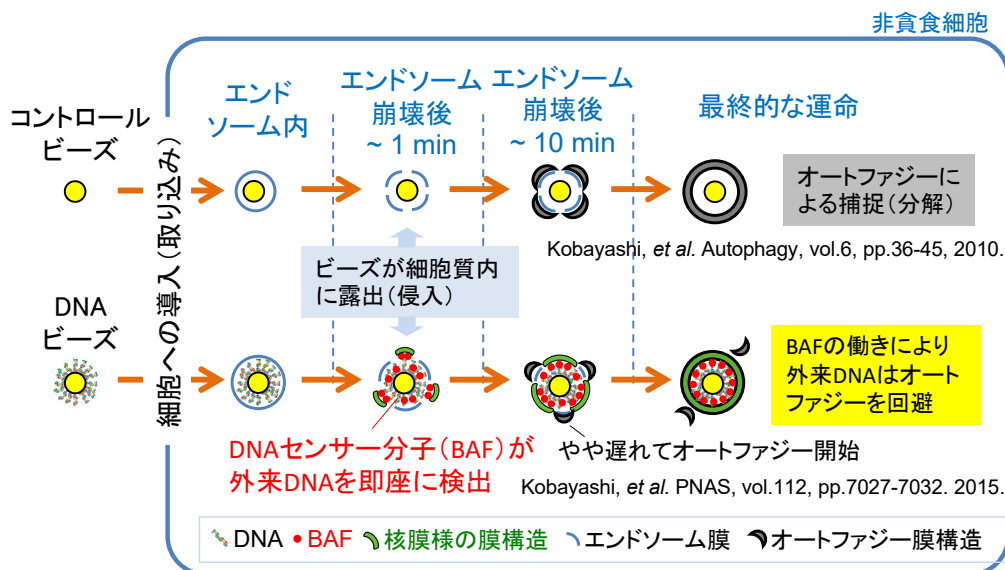


図2 生体-非生体ハイブリッド素子を用いた実験で明らかとなった細胞による外来物質認識機構のまとめ
参考文献 [7] より転載。

あり、エンドサイトーシスによって取り込まれたビーズは、当初、エンドソームと呼ばれる、細胞質とは膜で隔てられた空間内に存在する。この状態では、ビーズはまだ本当の意味で細胞内(細胞質内)に入ったとは言えないが、エンドソーム内の酸性化が進んだある時、トランスフェクション試薬の効果によってエンドソーム膜が破れ、ビーズが細胞質内へ侵入する。すると、これをきっかけとして、細胞はオートファジー反応を開始しビーズを捕捉することが分かった(図2、コントロールビーズ)[9]。オートファジーは細胞が持つ分解機構の一種であるため、このビーズの表面に結合させた生体分子は分解されることになるが、ビーズ自体は分解されないため、ビーズを観察時の目印とすることで、エンドサイトーシスによる取り込みから最終的に分解の場であるリソソームへと運ばれるまでのビーズの細胞内動態を追跡観察することができる。この成果は、人工ビーズを使って、オートファジーという細胞応答を狙った位置(ビーズ周囲)に限定して誘導できたという点で、非常に画期的であった。

2.2 外来 DNA をオートファジーから回避させる仕組みの発見

では、細胞内に侵入した外来物質はすべてオートファジーによって捕捉・分解されるのだろうか。我々の最近の研究から、少なくとも二本鎖 DNA は、オートファジーによる分解をある程度回避できることが分かっている(図2、DNA ビーズ)[10]。

生細胞への外来 DNA の導入は、生細胞蛍光イメージングや遺伝子治療をはじめとする様々な分野に欠かせない技術である。これまでにトランスフェクション試薬を用いた化学的導入法等、様々な DNA 導入法が開発されているが、実際に細胞質内に侵入した外来

DNA を細胞がいつ、どのように検知し、どのように対処しているかについては、観察対象が小さい等の問題のためよく分かっていなかった。

そこで我々は、二本鎖 DNA を結合させたビーズを細胞内に取り込ませて、外来 DNA の侵入時に起こる細胞応答を解析した。その結果、BAF (barrier-to-autointegration factor の略) と呼ばれる DNA 結合タンパク質が、侵入した外来 DNA を即座に検出し、その後、約 10 分の間に、外来 DNA の周囲に核膜に類似した膜構造が形成されることが分かった(図3、核膜に類似した膜構造)。一方、オートファジーの膜はビーズを取り囲むことができず、最終的にビーズから離れた位置にのみ観察された(図3、オートファジー)[10]。この過程を明らかにできれば、効率的な(細胞にとって副作用の少ない)外来 DNA の導入法の開発につながる。

これまでの知見と考え併せると、オートファジーは外来異物そのものというよりは、異物の侵入(エンドソーム膜の崩壊)の方を検知して反応を開始しているように見える(図2上段)。これは、異物の種類によらず対応できるという点で、とても優れたやり方である。一方、DNA センサー分子である BAF は、侵入した外来 DNA を直接検知し、オートファジー膜よりも先に核膜様の膜構造をビーズ周囲に形成させることにより、ビーズをオートファジーによる分解から回避させていると考えられる(図2下段)。

以上のように、細胞が持つ柔軟な外来物質認識機構の理解が進み、それに学んで、望みの物質を生細胞に導入し、安定に機能させる技術を開発できれば、細胞が行う分子通信の人為制御に大きく貢献するものと期待できる。なお、ここで紹介した DNA ビーズを使った細胞応答解析法は、細胞へのビーズ導入条件を最適化することで、HeLa 細胞だけでなく、マウス繊維芽

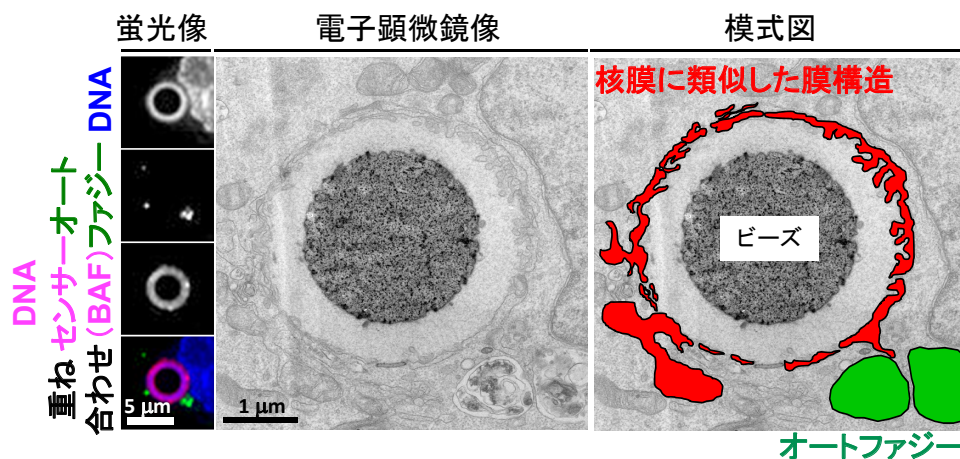


図3 細胞内に導入してから1時間後のDNA結合ビーズの様子
蛍光像で見えているのと同じビーズを電子顕微鏡で観察した。核膜に類似した膜構造がビーズ周囲に形成されており(模式図、赤色)、オートファジー(緑色)を回避している様子が分かる。参考文献[7]より転載。

2 バイオ材料の知に学ぶ

細胞やマウス受精卵等の他の細胞種に対しても適用可能である [11] [12]。

2.3 生細胞内における特定タンパク質の機能解析

前項までの研究成果から、細胞に人工ビーズを導入する際、ビーズ表面に結合させる生体因子をうまく選ばば、人工ビーズを分解から回避させ細胞内に安定に保持させられることが分かった。そこで次に我々は、人工ビーズを用いた実験法をより汎用性の高いものとするため、特定のタンパク質を結合させたビーズを使って、オートファジーを回避しつつ、そのタンパク質の細胞内での機能を解析する手法の開発に挑んだ。これが実現すれば、例えば、BAF タンパク質のみでもオートファジー回避を引き起こせるのかどうかや、BAF 以外のタンパク質でも同様の効果が得られるか等の問いに対する答えを得ることができると考えたからである。

一般的に、タンパク質結合ビーズを作製するためには、大腸菌を用いたタンパク質大量発現系等を利用して目的タンパク質を大量に調製し、それをビーズ表面に結合させる必要がある。しかし、タンパク質の大量発現や精製には、個々のタンパク質の物理化学的性質に合わせた実験条件の最適化が必要であるため、大変な労力を要する。また、タンパク質は DNA 等に比べて環境変化に弱いため、仮にタンパク質結合ビーズを上手く作製できたとしても、細胞に導入する過程でビーズ表面に結合させたタンパク質が失活してしまうという問題点が考えられる。

そこで我々は、生細胞内環境において特定タンパク質の機能解析を実現する新たな手法として、抗体結合ビーズを用いた実験法（抗体ビーズ法）の開発を行った [10]。この方法の最大の特徴は、事前に目的分子を結合させたビーズを作製するのではなく、抗原-抗体反応を利用して生細胞内環境で特定分子結合ビーズを作製することで、上記の問題点を回避するという点である（図 4 a）。これは、抗体は pH 変化等に対して比較的安定な物質であるため、エンドサイトーシス経路で細胞質内に導入した場合に起こるエンドソーム内の酸性化が起こった場合でも、抗体が失活せずに抗原への結合能力が保持されると考えたからである。実際に、トランスフェクション試薬を用いて GFP-BAF を発現する HeLa 細胞へ抗 GFP 抗体結合ビーズを取り込ませたところ、細胞質にあるビーズの表面に GFP-BAF 由来の蛍光シグナルの顕著な集積が認められた（図 4 b）。これは、細胞質内に導入したビーズの表面にある抗 GFP 抗体が細胞質に存在する GFP-BAF と結合し、GFP-BAF 結合ビーズが形成されたことを意味する。

次に、GFP-BAF 陽性となってから 1 時間後に細胞を固定し、CLEM 観察を行ったところ、ビーズ周囲には核膜様の膜構造が形成されており、ビーズがオートファジーを回避していることがわかった（図 4 c、上段）。一方、コントロール実験として GFP 発現株に抗体ビーズを導入した場合には、ビーズ周囲にオートファジーに典型的な膜構造が観察された（図 4 c、下段）。これらの結果から、BAF がビーズ表面に集積したビーズは、オートファジーを回避できることが分かった。BAF は元々、ウイルスが細胞に感染した際に、ウイルスゲノムが宿主のゲノムに組み込まれるのを助ける細胞内因子として同定されたタンパク質であるが [13]、その BAF を表面に結合させるだけで人工ビーズをオートファジーによる分解から回避させられるという点は、正に、細胞が行う分子通信の仕組みに学んだ生体-非生体ハイブリッド素子の利活用技術の一例だと言える。

以上のように、抗体ビーズ法では、生細胞内において目的タンパク質を特異的にビーズ表面に集積させ、

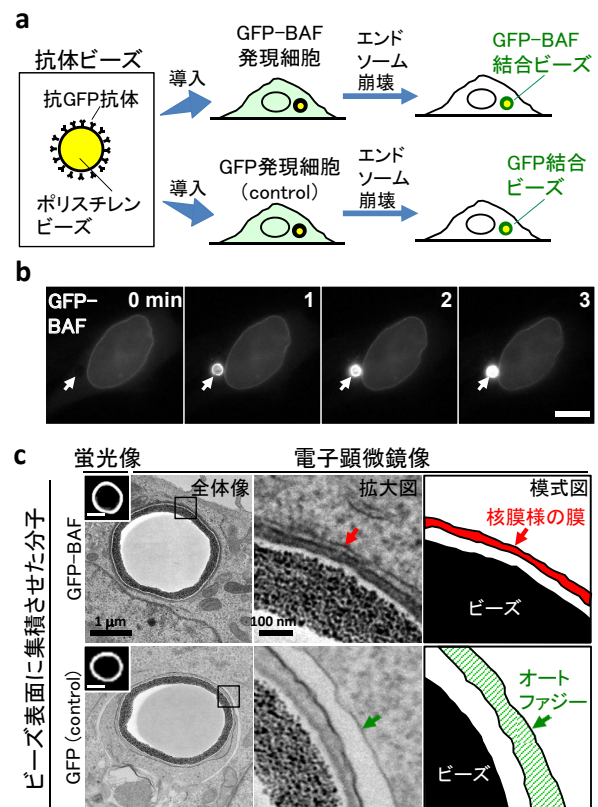


図 4 生体-非生体ハイブリッド素子を用いた生細胞内における特定タンパク質の機能解析
a. 抗体ビーズを用いた実験系の概要。エンドソーム崩壊後、細胞質に露出したビーズの表面に、細胞内の GFP 融合タンパク質が集積する。
b. ビーズ表面への GFP-BAF の集積のタイムラプス観察像。矢印はビーズの位置を示す。ビーズの右側に見えているのは細胞核。
c. ビーズ周囲に形成された膜構造の蛍光-電子相関観察法による観察結果。BAF を集積させたビーズの周囲には核膜様の膜構造が形成されており、オートファジーを回避している様子が分かる。

それに対する細胞応答を詳細に調べることができる。抗体ビーズ法の詳細な解説は参考文献 [14] を、抗体ビーズ法を用いて、HeLa 細胞内において人工ビーズの周囲に細胞核膜を人為形成させた研究成果については参考文献 [15] をご参照いただきたい。

3 むすび

生体 - 非生体ハイブリッド素子を使った実験法により、従来、ブラックボックスとなっていた外来物質侵入時の細胞内の様子を、高い時空間分解能で解析できるようになった。特に、外来物質が細胞内での分解を逃られる仕組みの一端を明らかにしたことは、生体 - 非生体ハイブリッド素子を用いた細胞機能の人為制御法の確立に向けて大きな前進である。今後は、光照射により素子が細胞内へ侵入するタイミングを制御する技術や、複数種の生体分子を結合させた素子の作製・利用、磁場による位置制御を可能とする磁性体等の機能性材料の利用等、生体 - 非生体ハイブリッド素子を使った細胞機能の計測・制御技術の更なる高度化を進めることで、細胞が行う分子通信を人為制御する技術を確立していきたいと考えている。

謝辞

本稿で紹介した研究の進捗にあたっては、情報通信研究機構未来 ICT 研究所フロンティア創造総合研究室生物情報プロジェクトの皆様及び共同研究者の皆様にご多大なるご協力を頂きました。また、研究成果の一部は、日本学術振興会科学研究費助成事業による助成を受けて得られたものです。ここに記し、謝意を表します。

【参考文献】

- 1 S. Hiyama, et al., "Molecular Communication," NSTI Nanotechnology Conference, vol.3, pp.392-395, 2005.
- 2 S. Hiyama, et al., "Autonomous loading, transport, and unloading of specified cargoes by using DNA hybridization and biological motor-based motility," Small vol.4, pp.410-415, 2008.
- 3 T. Nakano, et al., "Molecular Communications," Cambridge University Press, 2013.
- 4 T. Suda and T. Nakano, "Molecular Communication: A Personal Perspective," IEEE Transactions on Nanobioscience, vol.17, pp.424-432, 2018.
- 5 小林昇平, "生きた細胞を用いた新しい分子通信解析手法の開発～人為的に制御可能な素子を埋め込んだ細胞をつくり、利用する～," NICT NEWS, vol.381, pp.7-8, 2009.
- 6 小林昇平, "細胞内小器官の改変、人工小器官の作製技術," NICT 季報, vol.59, pp.37-40, 2013.
- 7 小林昇平, "生きた細胞が持つ外来異物認識機構の解析," NICT NEWS, vol.470, pp.8-9, 2018.
- 8 T. Haraguchi, et al., J. Cell Sci., vol.1, pp.2540-2554, 2008.
- 9 S. Kobayashi, et al., "Artificial induction of autophagy around polystyrene beads in non-phagocytic cells," Autophagy, vol.6, pp.36-45, 2010.
- 10 S. Kobayashi, et al., "BAF is a cytosolic DNA sensor that leads to

exogenous DNA avoiding autophagy," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.112, pp.7027-7032, 2015.

- 11 M. Tsuchiya, et al., "p62/SQSTM1 promotes rapid ubiquitin conjugation to target proteins after endosome rupture during xenophagy," FEBS Open Bio, vol.8, pp.470-480, 2018.
- 12 Y. Suzuki, et al., "Nuclear formation induced by DNA-conjugated beads in living fertilised mouse egg," Sci. Rep., vol.9, 8461, 2019.
- 13 M. S. Lee, R. Craigie, "A previously unidentified host protein protects retroviral DNA from autointegration," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.95, pp.1528-1533, 1998.
- 14 小林昇平, "生細胞内環境における特定分子の機能解析を実現する人工ビーズ実験法," ケミカルエンジニアリング, vol.65, pp.32-37, 2020.
- 15 S. Bilir, et al., "Roles of Nup133, Nup153, and membrane fenestrations in assembly of the nuclear pore complex at the end of mitosis," Genes to cells, vol.24, pp.338-353, 2019.



小林昇平 (こばやし しょうへい)

未来 ICT 研究所
フロンティア創造総合研究室
研究マネージャー
博士(工学)
分子細胞生物学、バイオ ICT