

細胞内小器官の改変、人工小器官の作製技術

小林昇平

我々の研究グループでは、半導体チップ等の人工デバイスが小型化・高集積化した先に想定される新たな研究領域として、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、研究を進めている。本稿では、細胞 ICT 研究の第一歩として、細胞内に導入した人工素材を用いて、細胞機能を司る細胞内小器官の形成を人為的に誘導する手法の開発を目指した研究について紹介する。

1 まえがき

来たるべき高度情報社会へ向けて、高速な情報処理を実現する光・電子デバイスだけでなく、それらを相補し、時には凌駕するような、バイオインスパイアード ICT 技術の開発が期待されている^[1]。近い将来、半導体チップなどの人工素子の小型化・高集積化が進み、マイクロメートルオーダーの大きさで十分な性能を発揮できるようになると予測されていることを考え合わせると、今後、生命の最小機能単位である「細胞」(大きさ数 μm ~ 100 μm 程度)を対象とした ICT 研究、すなわち“細胞 ICT 研究”の重要性が急速に高まってくると思われる。実際に、2011 年には、従来の ICT の枠を越えて「医療と ICT との融合」という観点での研究の重要性が国内においても唱えられている^[2]。

このような流れに先立って、バイオ ICT 研究室生物情報グループでは、これまでに、生命の最小機能単位である「細胞」に様々な性状の人工素材を導入し、それによって引き起こされる細胞応答を調べることにより (図 1a)、細胞内に人為的に細胞内小器官を作製する方法の開発を行ってきた^[3]。細胞内に埋め込んだ人工素材を用いて、細胞機能を司る細胞内小器官の形成を自在に制御することができれば、細胞内あるいは細胞間で起こる情報伝達の制御 (図 1b) や、それに基づく細胞 (集団) の機能制御法の開発等に繋がるため有用である。特に、単に導入する人工素材そのものの性質を利用するだけでなく、細胞特有の性質 (自律性、自己組織化能など) を利用して細胞内環境において人工素材に特殊な機能を付与できるようになれば、細胞 ICT 研究において非常に強力なツールになると思われる。

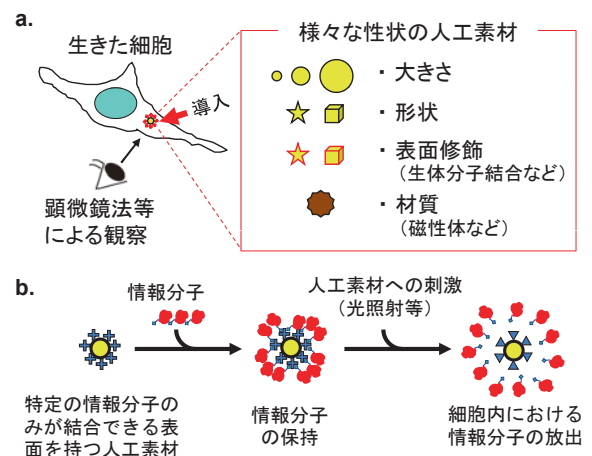


図 1 人工素材の細胞への導入と細胞機能制御
a. 細胞への人工素材の導入と細胞応答解析
b. 人工素材を用いた細胞内情報制御のイメージ

2 人工素材を用いた細胞内小器官の形成誘導

生きた細胞に導入した人工素材を用いて細胞機能を制御する方法の開発は、細胞と人工素材とのコミュニケーションに必要な要件、すなわち細胞が、外部から導入された人工素材のどのような性状を「情報」として認識するかというルール探索とも換言できる。細胞への物質導入については、これまでにドラッグデリバリー分野において盛んに研究されて来たが、導入物質の多くは薬剤を患部へと到達させて機能させることを意図して設計されたものであり、その大きさは 50 ~ 200 nm 程度に限られている。しかも、この大きさは通常の蛍光顕微鏡の空間分解能よりも小さいため、導入した物質が細胞内でどのような運命を辿るのかについてはブラックボックスとなっているのが現状である。また、直径 1 μm を越える人工素材については、貪食細胞 (マクロファージのような、食作用を専門とする細

胞) 以外では細胞内に取り込ませること自体が困難であるため、そのような物質に対して細胞がどのように応答するかについては、これまでにほとんど研究が行われていなかった。

そこで、筆者等はこれまでに、非貪食細胞である HeLa 細胞 (ヒト培養細胞の一種) に、大きさや表面性状の異なる様々な人工素材を導入し、それによって引き起こされる細胞応答を解析することで、細胞が人工素材を認識するためのルールを探ってきた (図 1a)。以下では、直径 1 μm を越えるポリスチレンビーズ (人工ビーズ) を細胞に導入する方法、および、導入された人工ビーズの周囲における特殊な細胞内小器官の形成に焦点を絞って、これまでの成果と今後の展開について述べる。なお、各実験の詳細については、原著論文^[4] および解説記事^[5]等を参照して頂きたい。

2.1 生きた細胞への人工ビーズ導入法

一般に、生きた細胞への物質導入方法は2つに大別される。1つは、マイクロインジェクション法やエレクトロポレーション法のように細胞膜に物理的に穴を開けて物質を細胞内に直接注入する「物理的方法」であり、もう1つは、リポソーム法に代表されるように、導入したい物質の表面を特殊な脂質でくるむことにより、細胞が元来持つ物質取り込み機構(エンドサイトーシス)を介して細胞内に物質を取り込ませる「化学的方法」である。これらの方法には一長一短あるが、特殊な装置を必要としない上に、再現性が高く、導入できる物質の大きさに制限が少ないことから、我々は化学的方法を用いている。具体的には、カチオン性脂質を含むトランスフェクション試薬 (細胞への DNA の導入に汎用されている試薬) をビーズ表面にまぶし、それを培養ディッシュ上に生育した細胞に振りかける。すると、ビーズはエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれる。エンドサイトーシスによって細胞に導入された人工ビーズは、当初、図 2 のように脂質膜

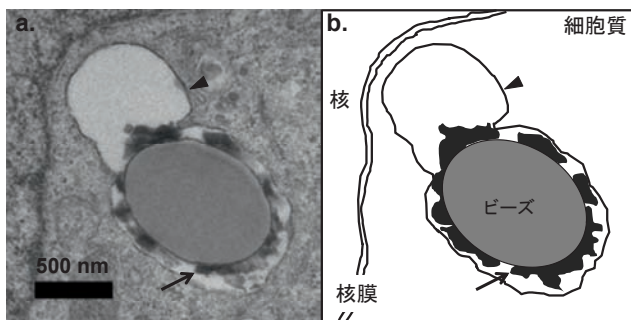


図 2 エンドサイトーシスによってヒト培養細胞に取り込まれたビーズの電子顕微鏡写真 (a) とその模式図 (b) ビーズ周りに見える電子密度の高い物質 (矢印) は、細胞へのビーズ導入時に使用した脂質。矢尻はエンドソームの膜を示す。

(細胞膜が細胞内に向かって陥入してできた膜)に囲まれたエンドソームと呼ばれる空間に存在する。細胞へのビーズ導入効率は、用いる細胞、ビーズ、トランスフェクション試薬の組み合わせによって決まる。この方法を用いることで、我々はこれまでに、従来までは直径 1 μm 以上の物質の導入が難しいとされていた非貪食細胞の場合でも、直径 3 μm までの人工ビーズを細胞内に効率良く導入できることを示した^[4]。

このようにして細胞内に導入した人工素材は、その性状に応じて異なる運命を辿ることになるのだが、次項以降ではそのうち最も研究が進んでいるオートファジーについて述べる。

2.2 細胞が持つ分解機構：オートファジー (自食作用)

オートファジー (自食作用)^[6]は細胞が持つ分解機構の1つである。細胞は、オートファジーによって不要となった細胞内因子を分解し、必要な成分を再利用することによって、細胞の恒常性維持や周囲の環境変化 (栄養飢餓等) へと対応している。オートファジーの概要を図 3 に示す。まず、栄養飢餓等による刺激に応じて、細胞質内に隔離膜と呼ばれる特殊な膜構造が形成される。次に、隔離膜が伸長して標的となる領域を取り囲むことでオートファゴソームと呼ばれる二重膜構造 (細胞内小器官の一種と見なせる) が形成され、最終的にはオートファゴソームの外膜が、加水分解酵素を含む胞であるリソソームと融合する (オートリソソーム) ことにより、オートファゴソームの内膜およびオートファゴソーム内に隔離されていた物質が分解される。このように、オートファジーは「細胞内小器官 (ここではオートファゴソーム) の新生」を伴って特定の機能 (ここでは分解) を実現する、特殊な機構である。しかし、従来までの栄養飢餓等による方法では、細胞内のどこで、いつ、オートファジーが誘導され始めるかが分からないため、単一のオートファゴソームの形成から終焉 (リソソームとの融合) までの一連の過程を詳細に解析することは困難であった。

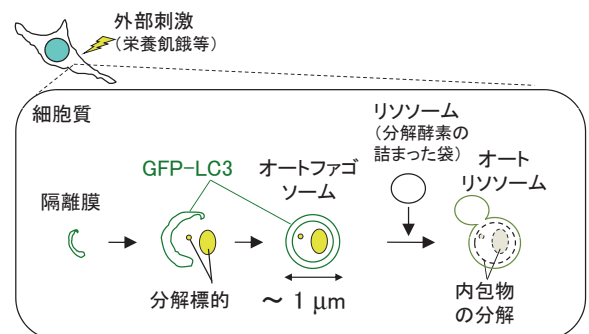


図 3 オートファジー機構の概要

2.3 人工ビーズを用いたオートファジー誘導法

筆者らは、オートファゴソーム膜に特異的に出現するタンパク質である LC3 と緑色蛍光タンパク質との融合タンパク質 (GFP-LC3) を安定発現する HeLa 細胞^[7] を用いて、人工ビーズによるオートファゴソーム形成を解析した^[4] (図 4)。ビーズを用いた方法では、観察対象領域をビーズの周囲に限定することができるため、ビーズ周囲で起こる GFP-LC3 シグナルの集積の様子 (オートファゴソームの形成) を詳細に解析することができる。まず、カチオン性脂質を含む市販のトランスフェクション試薬 (Effectene など) を表面にまぶしたビーズを上記の HeLa 細胞に振りかけると、ビーズはエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれる (図 4)。エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれたビーズは、最初、エンドソーム膜に包まれている。このときエンドソーム内の pH は酸性 (pH5 ~ 6 程度) に保たれているため、酸性環境でのみ赤色蛍光を発する pH 指示蛍光マーカーを予めビーズ表面に結合させておけば、エンドソーム内にあるビーズのみを赤色に確認することができる (図 4a)。次に、このようにして細胞に取り込まれたビーズについて生細胞蛍光タイムラプス観察を行ったところ、時間の経過とともに、ビーズの周囲に GFP-LC3 のシグナルが顕著に集積する様子が観察された (図 4b)。さらに、生細胞蛍光観察したのと同じ場所を電子顕微鏡で観察する方法 (live imaging-associated correlative light and electron microscopy; live CLEM^[8]) を用いて、GFP-LC3 陽性となったビーズの周囲の様子を電子顕微鏡で観察したところ、GFP-LC3 の蛍光と対応する位置に、オートファジーに典型的な膜構造 (オートファゴソーム) が観察された。また、より詳細な解析の結果、ビーズ周囲におけるオートファゴソーム形成は、pH 指示マーカーの蛍光消失 (ビーズ周囲のエンドソーム膜が崩壊し、周囲の pH と同化したことを意味する) 後、約 5 分が経過した後に始まる現象であることが分かった。

このように、細胞に人工ビーズを導入することにより、ビーズ周囲に特定の細胞内小器官 (オートファゴソーム) の形成を時間的・空間的に限定して誘導することに成功した (図 4c)。特筆すべき点としては、人工ビーズを用いることによって、エンドサイトーシス経路によって細胞内に取り込まれた物質が、いつエンドソームを脱出して細胞質へと到達し、その後どのような運命を辿るかを詳細に解析できるようになった点が挙げられる。今後、ビーズの大きさや、ビーズ表面に結合させる生体分子の種類・量などを変更して同様の実験を行うことにより、オートファジーを回避するために必要なビーズの性状を明らかにしたいと考えている。

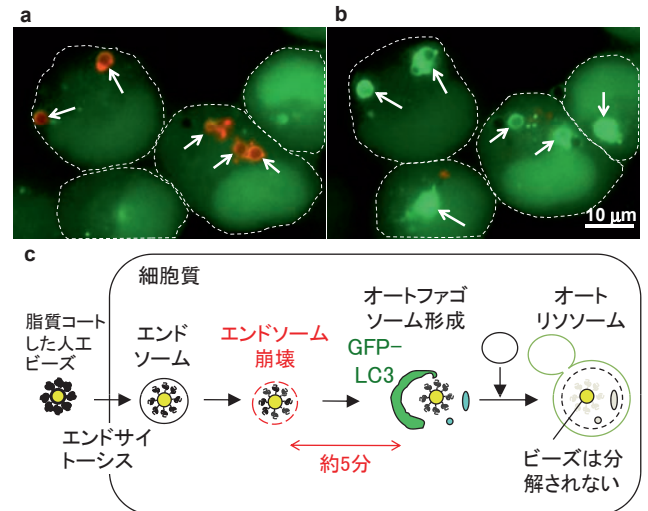


図 4 人工ビーズ周囲に誘導されたオートファジー
 a. ビーズ (矢印) を導入してから約 1 時間後の細胞の様子。緑色はオートファジーのマーカータンパク質 (GFP-LC3)。赤色はビーズ表面に結合させた pH 応答性色素 (pHrodo) 由来の蛍光。pHrodo は酸性環境でのみ強い赤色蛍光を発する。エンドソーム内は酸性、細胞質および培地は中性であるため、pHrodo の蛍光の有無によりビーズがエンドソーム内にあるかどうか判定できる。
 b. a から約 30 分後の細胞の様子。エンドソームを脱出したビーズ (赤色シグナル消失) の周囲にオートファジーが誘導されている。
 c. 人工ビーズを用いたオートファジー誘導法の概要。重要な点として、オートファゴソーム形成に先だってエンドソーム崩壊が起こっている点、および、ビーズ周囲に限定してオートファゴソーム形成が誘導されている点が挙げられる。

3 むすび

本稿では、「細胞が外来の人工素材と出会った時に何が起こるか」という、細胞 ICT 研究の根幹に位置する研究の現状について紹介した。今後、本研究をより大きく発展させて行くためには、大きく分けて 2 つのアプローチ方法が必要である。1 つ目は、細胞のことをより深く理解するという、細胞生物学的アプローチである。今回、人為的な形成誘導に成功したオートファゴソームは細胞が持つ分解機構に関わるものであるため、この機構を回避できる方法を明らかにすることができれば、生きた細胞の内部に、人工素材を分解されない状態で安定に保持させられるようになる。また、今回用いたのと異なる人工素材を用いることによって、例えば細胞核のような、より複雑な機能を有する細胞内小器官を人為的に作製することができれば、その細胞内小器官の成り立ちを明らかにできるだけでなく、細胞機能の人為操作や細胞状態のモニタリングなどにも応用できるため有用である。2 つ目のアプローチは、人工素材を用いた細胞応答計測法の高度化である。たとえば、人工素材の材料として様々な物質を選択的に保持できる中空ビーズや、磁場による位置制御が可能な磁性体、時間の経過とともに分解されていく生分解性素材といった機能性材料を用いることで、研究の範

3 生体機能の利用技術

囲は大きく広がると考えられる。また、エンドサイトーシスによって導入したビーズがエンドソームを脱出して細胞質に到達するタイミングの制御や、蛍光-電子相関観察の高度化などによる、時間的・空間的な分解能の向上もこれに含まれる。以上を実現するためには、生物学だけでなく、ナノテクノロジーや有機・無機合成化学といった他分野との融合研究が重要になってくると思われる。

【参考文献】

- 1 澤井秀文 編著, “生命と情報通信 ～情報通信技術に生命機能を吹き込む～,” オーム社, 2009.
- 2 JST-CRDS編, “科学技術未来戦略ワークショップ報告書[細胞ICT],” CRDS-FY2011-WR-09, 2011.
- 3 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, No. 381, pp. 7-8, 2009.
- 4 Kobayashi S., Kojidani T., Osakada H., Yamamoto A., Yoshimori T., Hiraoka Y., and Haraguchi T., “Artificial induction of autophagy around polystyrene beads in non-phagocytic cells,” *Autophagy* 6, 36-45, 2010.
- 5 小林昇平, 原口徳子, “人工ビーズを用いてオートファジーを視る,” 顕微鏡, Vol. 45, No. 2, pp.78-82, 2010.
- 6 Mizushima N. and Komatsu M., “Autophagy: renovation of cells and tissues,” *Cell* 147, 728-741, 2011.
- 7 Kabeya, Y., et al., “LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing,” *EMBO J.* 19, 5720-5728, 2000.
- 8 Haraguchi T., Kojidani T., Koujin T., Shimi T., Osakada H., Mori C., Yamamoto A., and Hiraoka Y., “Live cell imaging and electron microscopy reveal dynamic processes of BAF-directed nuclear envelope assembly,” *J. Cell Sci.* 121, 2540-2554, 2008.



小林昇平 (こばやし しょうへい)

未来 ICT 研究所バイオ ICT 研究室主任研究員
博士 (工学)
細胞生物学
skobayashi@nict.go.jp