

ゲノムサイズの DNA が自発的に膜に包まれる現象を実証

～ 細胞内外で核酸が膜でつつまれた構造が多く生じる基本的な物理原理を提案 ～

学校法人 中央大学

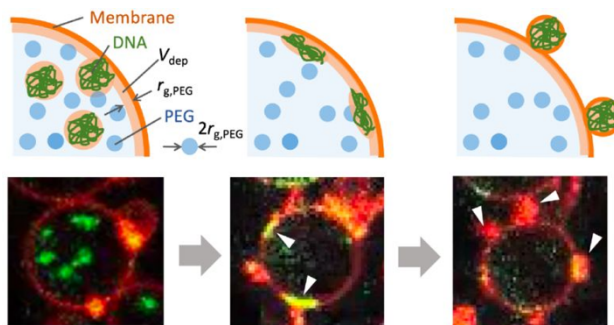
概 要

中央大学理工学部 教授 鈴木宏明、共同研究員 津金麻実子の研究グループは、細胞を模擬した巨大一枚膜小胞（ジャイアントユニラメラベシクル、GUV）^{注1} 内に封入されたゲノムサイズの DNA が、分子混雑の環境下で自発的に脂質二重膜^{注2} に包まれる物理現象を発見し、実証しました。

ゲノム DNA が細胞の区画である脂質二重膜にくるまれた分子構造は、あらゆる細胞システムにおいて普遍的にみられます。この事実から、DNA が柔らかい界面である脂質二重膜につつまれる、特定のタンパク質の分子機構に依存しない物理的なメカニズムが存在することが予想されました。

本研究グループは、細胞モデルとしての GUV（細胞膜の主要構成分子であるリン脂質のみから再構成された疑似細胞膜）を用い、この内部に封入したゲノムサイズの DNA 分子が、細胞内の環境を模擬した分子混雑環境下（高分子が高濃度で存在する環境下）において、自発的に膜に付着し、かつ包まれるという物理現象を予測し、実験的に実証しました。また、この現象が、高分子の排除体積効果と呼ばれる物理現象に由来するものであることを示しました。

この現象は、特定の遺伝子の制御に依存しない、細胞環境で生じる普遍的な DNA の膜区画封入のメカニズムが存在し得ることを示しています。生物界には、具体的な制御メカニズムが不明な膜区画封入現象が多く存在しますが、本研究成果は、それらの現象の解明の糸口となることが期待されます。また、得られた分子構造は、ウィルスや微生物がもつ分子構造に類似しており、人工的に制御可能な巨大 DNA のデリバリー等、新たなバイオテクノロジーへの応用も期待されます。



分子混雑により DNA が脂質二重膜に包まれて出芽する現象の模式図（上）とその蛍光顕微鏡画像（下）

【注意事項】 本内容については、すぐに報道していただけます。

【研究者】 鈴木 宏明 中央大学理工学部 教授（精密機械工学科）
津金 麻実子 中央大学理工学部 共同研究員（精密機械工学科）

【発表（雑誌・学会）】 雑誌名：ACS Synthetic Biology (Published online:)
論文タイトル：“Elucidating the Membrane Dynamics and Encapsulation Mechanism of Large DNA Molecules under Macromolecular Crowding Condition Using Giant Unilamellar Vesicles”
論文リンク：<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acssynbio.0c00360>

【研究内容】

1. 背景

生命の情報を保存する重要な分子である DNA や RNA が、細胞の区画である脂質二重膜内に高密度で封入された構造は、生物界に普遍的に存在します。真核生物では、ゲノムをコードする非常に長い DNA 分子が、ヒストンによって核膜内に密に詰め込まれています。バクテリアでは、比較的小さなサイズの細胞膜内に、単一の長い DNA 分子がこれも高密度で入っています。真核細胞においても、バクテリアにおいても、マイクロベシクル(MV)と呼ばれる小さな小胞が出芽によって分泌され、外界とコミュニケーションする役割を担っています。また、ウイルスは DNA や RNA がタンパク質や脂質膜のカプセルに包まれただけの単純な構造を持った微粒子ですが、それができあがるメカニズムが不明なものも多く残されています。

本研究グループは、細胞モデルとしての巨大脂質膜小胞(GUV)を用い、内封した DNA が脂質膜内に高密度で自発的にくるまれる物理現象を予測し、再構成実験^{注3}により実証しました。

2. 研究内容と成果

本研究では、界面通過法^{注4}を用い、ゲノムサイズの DNA (166kb, 長さにして 57 μ m) と細胞内の分子混雑環境を模擬した高分子を封入した球形の GUV を作製しました(図1a)。GUV の外環境を、糖分子を高濃度で溶解させた高浸透圧溶液に置換すると、塩水につけた野菜がしおれるのと同様に、浸透圧によって GUV 内の水分子が脂質膜の外に移動することで収縮し、様々な形態に変形します。このとき、GUV の内部に、分子量が大きい(6kDa 以上)モデル混雑分子(ポリエチレングリコール、PEG)が比較的高濃度(初期濃度で 2mg/ml 以上)存在するときに、GUV の収縮に伴って DNA 分子が膜に吸着し、そのまま膜に包まれる物理現象を発見しました(図1b)。

本研究グループは、2012年と2018年に、同様のモデル混雑分子が GUV に内封されている場合、出芽に似た膜変形が生じやすいことを報告していました^{注5}。本研究では、この系に加えて巨大 DNA 分子が存在する場合、DNA がその出芽構造の中に取り込まれることを新しく示しました。

この現象は、高分子の排除体積効果と呼ばれる物理現象によって駆動されていると考えられます。溶液中に、比較的大きな分子や粒子と、ナノメートルサイズの高分子(混雑分子)が共存する場合を考えましょう。溶液中の高分子の重心は、立体障害により、それ自身の分子半径よりも近くに比較的大きな粒子に近づくことができません。その結果、大きな粒子の周囲は、高分子の濃度が薄い領域ができます(図 2a)。この領域は、高分子が排除されているという意味で、排除体積と呼ばれます。また、ここで、中学や高校の理科で習う、浸透圧の説明を考えてみましょう(図 2b)。ここでは、半透膜を介して純溶媒と溶質を含む溶媒(溶液)が接しています。その結果、溶質側の水位が上昇し、圧力が増加します。この現象は、溶液側の体積が増えると、溶質が存在できる空間が増える、すなわち、「エントロピー」が増加するために起こるのです。ここで、図2aの排除体積の説明に戻ると、排除体積は図 2b 中の純溶媒に、周囲の混雑分子がある空間は溶液に相当します。従って、系は、排除体積(純溶媒)が減少し、周囲の高分子領域(溶液)の体積が増加する方向に変化します。

さて、この原理を、DNA と混雑分子を含む GUV の系に適用してみましょう。浸透圧による収縮によって GUV 内の混雑分子濃度が増加すると、DNA が凝集します(coil-globule transition)(図 3a)。この変化は、DNA が凝集することで周囲の混雑分子のエントロピーが増加するために起こります。次に、凝集した粒子状の DNA は、壁としての脂質二重膜に付着します(図 3b)。これは、粒子の周

囲と壁の表面近傍にある排除体積が重なる(オーバーラップする)ことで、排除体積の合計が減少し、そのかわりに混雑分子を含む溶液の体積が増えるために起こります。最後に、脂質二重膜の片側のみに混雑分子が存在する場合、脂質二重膜が曲がります(図 3c)。これも、膜が曲がることで、膜の片側に生じた単位膜面積当たりの排除体積がほんの少しですが減少するために起こります。これら 3 つの現象が連続的に起こり、DNA の膜への封入が起こったと考えられます(図 3d)。

3. 今後の展開

本研究では、普遍的に存在する生物学的プロセスである、脂質膜による DNA のカプセル化が、特定の分子認識や曲率誘導タンパク質のない非常に単純な系でも容易に起こり得ることを実証しました。この結果は、バクテリアの細胞外小胞形成や巨大ウィルスの自己組織化など、遺伝的制御下でない核酸内封小胞の生合成に対し、新しい物理メカニズムの候補を提案するものであると考えています。また、このカプセル化現象は、核酸を高密度で含む膜構造が、生物の進化過程を通じて保存されてきたメカニズムの仮説にもつながります。さらには、元の GUV から放出された DNA と膜の複合体は、新しいバイオテクノロジー用途に使用できる可能性もあります。この複合体は、長鎖 DNA 分子を含む大きなウィルス粒子に似ています。ウィルスはその遺伝物質を宿主細胞内に移送することができるため、この複合体は長鎖 DNA の効率的なドラッグデリバリーシステム(DDS)の開発に役立つ可能性があります。

4. 謝辞

この研究は、科学研究費補助金(文部科学省)新学術領域研究(少数性生物学、26115713)、基盤研究 C(特定領域 構成的システム生物学 15KT0153)、基盤研究 B (19H02576)、基盤研究 C (18K04908)、基盤研究 A (19H00901)、内閣府革新的研究開発推進プログラム(ImPACT)、および武田科学振興財団研究助成からの助成を受けて行われました。

【お問い合わせ先】

＜研究に関すること＞

鈴木 宏明 (スズキ ヒロアキ)

中央大学理工学部 教授 (精密機械工学科)

TEL : 03-3817-1827

E-mail: suzuki@mech.chuo-u.ac.jp

＜広報に関すること＞

矢ヶ崎 大地 (ヤガサキ ダイチ)

中央大学 研究支援室

TEL 03-3817-1679, FAX 03-3817-1677

E-mail: kkouhou-grp@g.chuo-u.ac.jp

【用語解説】

注1) 巨大一枚膜小胞 (ジャイアントユニラメラベシクル、GUV)

細胞膜の主成分であるリン脂質から再構成された、脂質二重膜の袋状構造。リポソームとも呼ばれる。直径が $1\mu\text{m}$ 以上のものは、ジャイアントと呼ばれ、人工的に再構成した細胞モデルの区画として用いられている。

注2) 脂質二重膜

リン脂質が疎水的相互作用によって平面状に並び、膜を構成した分子配列構造。リン脂質の疎水基が向かい合って2層に並ぶため、二重膜と呼ばれる。

注3) 再構成実験

合成生物学の分野において、細胞の部分的な性質を調べたり、利用したりするために、細胞そのものを利用するのではなく、要素分子を人工的に組み合わせて細胞の機能を疑似的に作り出す実験。

注4) 界面通過法

油の中に多数の微小な水滴を多く含む、Water-in-Oil エマルションを作製し、この水滴を遠心力によって、もう一つの油水界面を通過させて GUV を得る方法。界面にはリン脂質が並んでおり、界面通過時に液滴のリン脂質層がもう一つのリン脂質層で包まれ、脂質二重膜が形成される。

注5) 参考文献

T. Okano, K. Inoue, K. Koseki, H. Suzuki “Deformation Modes of Giant Unilamellar Vesicles Encapsulating Biopolymers,” ACS Synth. Biol., 7(2), 739-747, 2018.

H. Terasawa, K. Nishimura, H. Suzuki, T. Matsuura, T. Yomo, “Coupling of the fusion and budding of giant phospholipid vesicles containing macromolecules,” Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 109(16), 5942-5947, 2012.

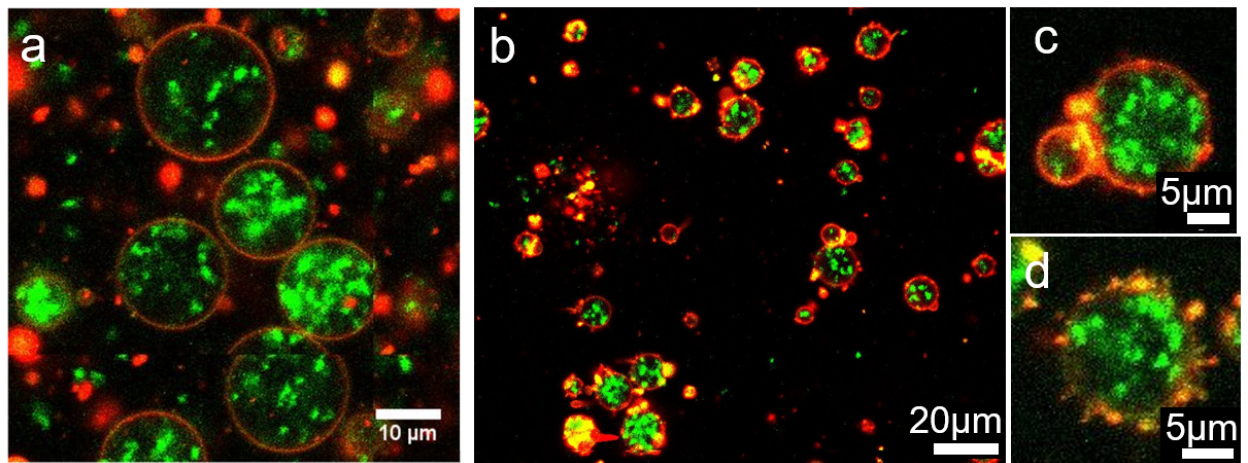


図1 ゲノムサイズ DNA と混雑分子 (PEG) を内封した GUV の蛍光顕微鏡写真。DNA は緑、脂質二重膜は赤で染色されている。a 初期状態の GUV。形状はほぼ球体である。b 浸透圧によって収縮させた後の GUV。サイズが縮むとともに、表面に多くの出芽（突起）がみられる。c, d 収縮後の GUV の拡大画像。出芽構造は、DNA と脂質膜が共存しているため、緑と赤が重なって黄色になっている。

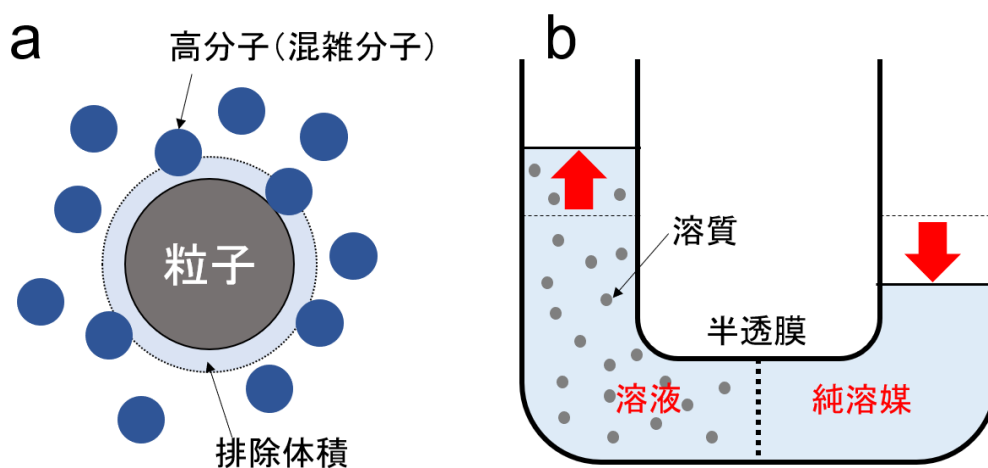


図2 a 粒子の周囲に高濃度の高分子（混雑分子）が存在する系の模式図。粒子の周囲に、高分子の半径と同じ厚みの排除体積が形成される。b 理科で習う浸透圧の説明図。純溶媒の体積が減少し、溶液の体積が増加するが、この変化はエントロピー増大の法則（熱力学第二法則）によって駆動される。

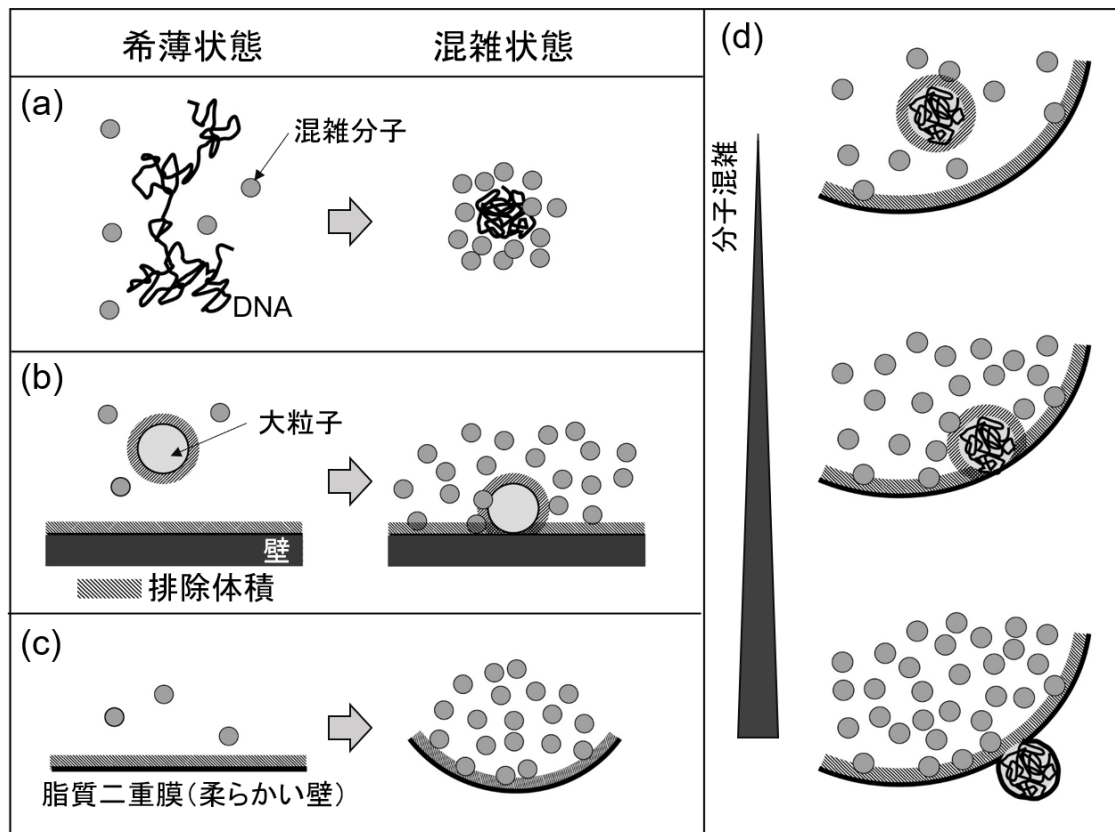


図3 DNA と脂質二重膜を含む GUV の系において働く排除体積効果の模式図。高分子濃度が高いとき、すべての変化は、排除体積が減少する方向に駆動される。(a) 長鎖 DNA が凝集し球状粒子になる。(b) 球状粒子が壁に付着する。(c) 柔らかい脂質二重膜が曲がる(曲率を持つ)。(d) (a)から(c)の変化が同時に起こると、GUV の内部にある球状になった DNA が壁である脂質二重膜の内側に付着し、膜が曲がることで包み込まれる。