

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： 遺伝子デリバリーシステムとしての人工細胞核の創製

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

原口 徳子 (独立行政法人情報通信研究機構 主任研究員)

主たる共同研究者

松影 昭夫 (日本女子大学理学部 教授)

3. 研究内容及び成果

3 - 1. 研究課題全体の研究内容

真核生物の細胞核は、遺伝子 DNA を細胞から細胞へ、親から子へと伝える確実に効率の良い天然の遺伝子デリバリーシステムである。この仕組みを利用・操作することによって、特殊な機能を持つ細胞核を細胞内に人工的に作り、正確で効率の良い遺伝子搬送システムを実現することが目標である。言うまでもなく、その技術とこの研究で開発された生きた細胞のイメージング技術は将来医療技術として多用されると考えられる。そればかりでなく、細胞の中核にあたる核、核膜の生成、消滅のメカニズムの理解はそれ自体生物機能の理解に大きく貢献すると同時に、医療においてプロジェリア(早老症)や Emery-Dreifuss 型進行性筋ジストロフィー、リポジストロフィーなど一連の核膜病の理解にも貢献するものとなる。

具体的な研究内容としては、主に(1)生細胞での核膜形成機構の解明、(2)人工細胞核の形成、(3)遺伝子デリバリーシステムの構築、の3つに分けて研究を進めてきた。

3 - 2. 各グループの研究成果

原口グループは、全期間に渡って当プロジェクトの全項目を担当し当研究を推進した。特に、「イメージング法の開発による核膜形成機構の解明」と「人工細胞核の形成」の研究項目に力を入れて研究を行ってきた。核膜形成機構を解明するために、主にヒト培養細胞を用いて、細胞分裂の終期で起こる核膜再形成過程に焦点を絞って解析を進めた。当グループは、生細胞イメージング技術には定評があり、研究開始当初から順調に研究を進めることができた。研究開始から3年目で live CLEM 法の開発に成功し、必要な解像度で膜構造などの細胞構造が解析可能となり、人工細胞核形成の研究に本格的に着手している。

生きた細胞内に人工細胞核を形成させる実験では、核の「タネ」となる材料の選択、導入法の選択、解析方法の選択など、設定すべきパラメータが多く、プロジェクトの推進は困難を極めた。突破口となったのは、細胞内に導入した微小ビーズはオートファジーを引き起こすことが分かったことである。そこで逆の発想で、オートファジーを効率よく誘導できる方法の開発を行った。その結果、非生物素材だけで効率よくオートファジーを誘導できる実験系を作製することに成功した。

次に、「遺伝子デリバリーシステムの構築」の研究項目では、人工細胞核の形成の延長として、ビーズに DNA を結合させたものを細胞核の「タネ」として用い、「タネ」となる DNA の周りで自己集合的に細胞核が形成するか検討した。この研究によって、細胞内に核構造を作り出すのに成功した。しかし、これは天然の細胞核と異なりオートファジーによって除去される。目的である人工細胞核を細胞内につくるためには、このオートファジーを回避する能力を持たせることが不可欠である。細胞核認識機構の解明のために機能と構造の異なる2種類の細胞核を持つテトラヒメナでの研究を行った。テトラヒメナは2つの細胞核を明確に区別し減数分裂の過程で、小核の選択的な消失が起こることが知られており、特定の核を認識し除去する仕組みを調べることができ、この

問題に対する答えが得られやすいと判断したからである。この研究で2つの細胞核が核膜孔複合体の構成蛋白質が一部異なる構造的な違いによって識別されることを発見した。この発見は、今後の発展につながる大きな成果といえる。

松影グループは、電子顕微鏡によるイメージング法の開発を担当した。高い電子顕微鏡技術によって、当プロジェクトに重要な大きな貢献した。具体的には、電子顕微鏡法全般を担当したが、特に、光学顕微鏡と電子顕微鏡観察を合わせた live CLEM 法の電子顕微鏡画像取得を担当した。Live CLEM 法以外の電子顕微鏡観察としては、分裂酵母細胞やテトラヒメナ細胞の固定法の検討を行い、膜構造などの細胞内微細構造をきれいに保持する方法の開発を行い、一定の成果をあげた。当グループは、最後の2年間のみの参加であった。比較的短期間の参加であったためか、研究内容に関しては当初の計画を変更することなく遂行した。このグループの参加によって、当プロジェクトの計画を円滑に進めることができた。

4. 事後評価結果

4 - 1. 外部発表、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

外部発表件数

論文発表		著作物		招待講演		口頭発表		ポスター発表		特許	
国内	国際	国内	国際	国内	海外	国内	海外	国内	国際	国内	国際
0	36	24	5	19	7	36	6	42	32	2	1

この課題は、核膜形成というシステムとしては数段高いレベルの系を分子機構として理解した上で、その再構成、応用まで目指すという他に例を見ない非常に挑戦的、独創的なものである。人工細胞核の創製という課題の最終目標には至っていない。しかしながら総合的な能力の高いこのグループの力が発揮され研究の過程で多くの重要な問題を見つけ、その幾つかに回答を与えた。また独自の観察技術開発、特に機能因子の動態に注目した計測技術という点で大きな成果を挙げた。また、発表論文も国際的にも高い評価を得た独創的なものが幾つかある。

1) 核膜形成機構の解明

蛍光顕微鏡による動態観察と電子顕微鏡法を組み合わせた live CLEM イメージング法など、生きた細胞内の分子動態を解析するための様々の生細胞分子イメージング法を開発した。これらの方法を用いて、生きた細胞内でおこる BAF 依存的な核膜形成の仕組みを明らかにした。

2) 人工細胞核の形成

細胞内に人為的に核を作りだすために、特殊な条件でビーズを細胞内に入れると高頻度・高効率にオートファジーを誘導できることを発見した。ビーズの代わりに DNA ビーズを細胞内に導入すると、BAF 依存的に「核もどき」が形成されることを発見した。但し、この「核もどき」は不安定であり、時間が経つにつれて分解されてしまうことが分った。このような生体反応はウイルスや細菌などの異物の侵入でおこる生体反応と類似しており、非生物材料を用いた実験手法として、安全に「感染実験」を行うことができる点で今後特に有用になると期待できる。

3) テトラヒメナ細胞をモデル生物とした、2核を識別する分子機構の解析

ゲノム DNA を含み転写活性の低い小核と、ゲノム DNA の一部しか含まないが転写活性の高い大核という2つの核を識別し、使い分ける仕組みを検討した。この2つの核の構造的な違いに着目して核膜孔複合体構造を調べ、構成蛋白質が一部異なっていることを発見した。

成果として計測法、この研究による新しい知見に基づく国内外の3件の特許出願、及びオートファジー制御、計測技術に関する申請準備中のものが2件ある。今後の方針としては、これらの研究成果を応用開発者にデータベース等として情報発信し、そこから基礎研究から応用に向けた研究開発テーマが生まれ、特許化に貢献する努力をすべきである。

本課題の掲げた人工細胞核創製は達成されていないが、研究の過程で得られた核膜形成についての知見は、国際的にも高い評価が得られている。オートファジーはウイルスや細菌などの異物の侵入でおこる生体反応と類似しており、ここでのビーズを用いた研究は、世界的にみてユニークな試みであり、細菌、ウイルス感染時の細胞応答の分子機構解明に道を開く可能性がある。エメリンの異常によって起こる Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィーの病態が、Btf の機能を介して起こることを示したが、核膜形成には他にも多くの病態が関連しており、その点で医療への応用に繋がる基礎研究として今後の展開が期待される。

4 - 3 . その他の特記事項

(1)他の研究事業への展開

本研究で開発した生細胞イメージング技術は、文部科学省特定領域研究「細胞核ダイナミクス」の研究代表者として資金提供を受けることにつながった。

(2)実用化に向けた展開

特許が認められた「生物試料を高精度に測定する方法」は、協同インタナショナル社への技術移転の話が進行している。

(3)人材育成

期間中、定期的に9回の細胞生物学ワークショップを開催し、毎回20名から30名あまりの研究者に最先端の蛍光顕微鏡技術に関する実習の場を提供している。