

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 8 月 22 日現在

機関番号：82704

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K17454

研究課題名(和文) 膜タンパク質進化学によって人工細胞の捕食能を獲得する

研究課題名(英文) Predation of artificial cells by membrane protein engineering

研究代表者

藤井 聡志 (Fujii, Satoshi)

公益財団法人神奈川科学技術アカデミー・人工細胞膜システムグループ・研究員

研究者番号：60619005

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、既知因子のみから生細胞様の人工細胞を構築し、人工細胞同士の融合(捕食)反応を導入することで細胞の成長や栄養の供給技術の開発を目指した。具体的には融合活性を持つキメラ膜タンパク質を人工細胞内部で遺伝子発現により合成した。キメラ遺伝子は膜タンパク質骨格とコイルドコイルドメインと呼ばれるペプチドを結合させて合成した。このタンパク質を合成した人工細胞は互いに融合することが明らかとなった。遺伝子による融合反応の駆動に成功した初の例であり、遺伝子駆動であるが故に、膜タンパク質進化学手法によって、融合活性の人為的な改変や向上が可能なプラットフォーム技術が確立された。

研究成果の概要(英文)：I developed an artificial cells which fuses each together, enabling the “growth” and “predation” of artificial cells. In the present system, the fusogenic activity is encoded in a chimeric gene, by combining a scaffold membrane protein, and a coiled coil domain. This gene was encapsulated in artificial cells and expressed by cell-free translation systems. The expressed proteins were integrated on lipid bilayer, and formed a heterodimer with the protein on the other artificial cells. Consequently, the artificial cells fused together, and the inner content was mixed. As the fusogenic activity is encoded in the gene information, this activity can now be modified by using the in vitro membrane protein evolution techniques.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：人工細胞 リポソーム 膜タンパク質

### 1. 研究開始当初の背景

生命の動作原理を分子レベルで理解し、生命の起源の理解や有用資源の効率的生産を目的とし、「人工細胞」と呼ばれる再構築型の研究が近年になり注目されている。代表的な例として、人工的に合成したゲノムのみによって駆動する細胞をアメリカのクレイグ・ベントナー氏が発表しており、生命をデザインする技術力が急速な発展を遂げていることがうかがえる。

細胞構造として、脂質二重膜小胞（リポソーム）を用いた研究が広く展開されている。これは、脂質二重膜を介して細胞の内外を区画化しており、天然の生細胞を模倣した構造であることから、人工細胞の基本構造として適していると考えられているからである。これまでに、リポソームを用いて生命現象の再構築を試みた例が複数報告されている。例として細胞が分裂・成長する機構やリポソーム内部で外部環境に応じてシグナルが伝播する反応が報告されている。他にも、細胞の「上下左右」を決定する極性決定のメカニズムや、遺伝子の複製反応、更には複製した遺伝産物が分裂後に娘細胞に均等に分配されるために遺伝子産物同士を両極に輸送する仕組みなど、遺伝情報を制御することで増殖する人工細胞の構築を試みる研究も報告されている。

ところが、多くの研究は個々の人工細胞の機能発現に限られた反応を再構築しており、複数の細胞同士の相互作用機能を持つ人工細胞は構築されていない。一部、リポソームに精製した膜タンパク質を導入することでリポソーム同士の物質輸送や結合を再現した例はあるが、それらは人工細胞の持つ遺伝情報に依存した反応ではなく、外部から人為的に機能分子を供給しているため、一過的な機能発現に留まっている。一方で、人工細胞の内部に遺伝情報を封入し、その発現産物によって機能発現するリポソームは、より生細胞に近い仕組みを再現でき、遺伝子駆動の人工細胞として注目されている。遺伝情報がリポソーム内部に封入されていることで、個々のリポソームが個々の遺伝情報に基づいて個性をもったリポソーム集団を形成することが可能となる。この仕組みで構築した人工細胞は、タンパク質進化学手法により、その機能を進化・向上させることが可能である。すなわち、細胞同士の相互作用を持つ人工細胞の進化を試験管内で再現し、生命が個々の細胞から集団化した細胞集団になる過程の理解に迫れると期待される。しかし、人工細胞同士の相互作用を遺伝情報にコードした例はなく、相互作用の詳細な解明には至っていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、遺伝子によって駆動する細胞間相互作用 (cell-cell communication) を試験管内で再構築することを目的とする。これ

により、個々の人工細胞内での生命現象の再構築とは異なり、集団内での人工細胞同士の相互作用が生物にもたらす利点を議論できる技術的プラットフォームを作成する。

本目的の人工細胞間相互作用は、リポソーム内部の遺伝子によって駆動する仕組みを構築する。このため、無細胞翻訳システムを利用し、人工的にデザインした膜タンパク質遺伝子を発現し、リポソーム膜上に機能性タンパク質を組み込む必要がある。次にこの機能性タンパク質が異種リポソームと結合する活性を精密に測定する実験系を構築する必要がある。また、リポソームの溶液環境や脂質組成を検討し、より人工細胞の相互作用を効率良く再現できる条件を探索する必要がある。以上の技術開発により、自身の遺伝情報によって自身とは別の人工細胞と相互作用する機構を構築し、将来的にその相互作用活性を人工進化させることが可能な基盤技術を開発する。

### 3. 研究の方法

人工細胞の“器”にはリポソームを用いる。リポソームは遠心沈降法によって作成し、天然の細胞サイズに近い  $1\ \mu\text{m}$  サイズのリポソームを作成する。本手法で形成すると内部に無細胞翻訳系を高効率で封入可能なため、タンパク質合成効率が高い。また、脂質二重膜は単層であり、複数の二重膜が多層構造になっていないことが分かっているため、膜タンパク質を組み込んで機能発現するにも適した手法である。

膜タンパク質合成には、PURE system と呼ばれる大腸菌由来の無細胞翻訳系を用いる。封入された無細胞翻訳系に、例えば GFP 遺伝子を混合しておくことで、リポソーム内部で GFP タンパク質が合成されることが確認されている。更に、膜タンパク質であるアルファヘモリシンを合成するとリポソーム膜にアルファヘモリシンが組み込まれ、小孔を形成して内外の物質の輸送を可能にすることも確認しており、膜タンパク質の機能発現に適したプラットフォーム技術である。

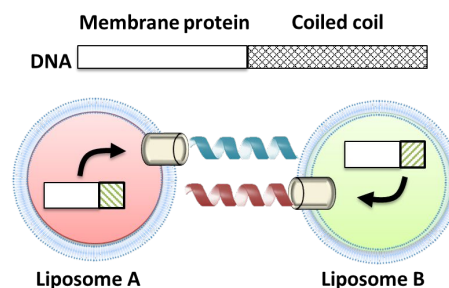


図1. 人工細胞の相互作用を再構築するためにデザインした人工キメラ膜タンパク質。リポソーム膜に組み込む膜タンパク質に、2種のアルファヘリックスによってヘテロ2量体を形成するコイルドコイルドメインを結合した。

まずはリポソーム同士の相互作用活性を持つ膜タンパク質の遺伝子を人工的に作成する(図1)。膜タンパク質は事前研究により脂質膜に組み込まれやすい遺伝子を選別した。この膜タンパク質に、コイルドコイルドメインを人工的に連結した遺伝子を作成する。コイルドコイルドメインは、2種の配列からなるアルファ-ヘリックス構造がお互いに近接すると結合して2量体を形成することが知られている。この活性を有するペプチドをリポソームの表面に呈示させることで、2種のリポソーム同士の結合を再現し、人工細胞の相互作用を再構築する。

リポソーム同士の相互作用は具体的には、結合と融合の頻度に注目し、フローサイトメータを用いて解析する。フローサイトメータは顕微鏡では解析し切れない大量のリポソーム(10万個/s)をハイスループットに解析可能であり、集団内で相互作用した人工細胞の比率を正確に測定することが可能となる。フローサイトメータは個々のリポソームが有する蛍光を測定するため、リポソームを識別するための蛍光標識を施しておく。このとき、2種類のリポソームが結合した場合には、2種蛍光物質の両方を有するリポソームとして測定される。また、リポソームが融合して2種リポソームの内容物が混合した場合に、新たに3種類目の蛍光物質が励起される仕組みを考案する。これは、タンパク質をスプリットし、それらが組み合わさることで初めて機能発現する技術(コンプリメンテーション法)を応用して構築する。これにより、リポソームが融合した場合には、合計3種類の蛍光物質を有するリポソームがフローサイトメータで検出されることになる。

以上、キメラ膜タンパク質を合成し、フローサイトメータで人工細胞同士の相互作用を観察可能にすれば、その活性に影響を及ぼす溶液条件を探索する。古くから脂質膜同士の相互作用には金属イオンが影響することが知られており、カルシウムを用いたリポソーム融合法も開発されている。本研究では、微量の金属イオンを入れることで膜タンパク質によるリポソーム相互作用を促進できる環境を探索する。また、リポソーム同士の相互作用には脂質組成が影響すると考えられるため、脂質組成の検討も行う。

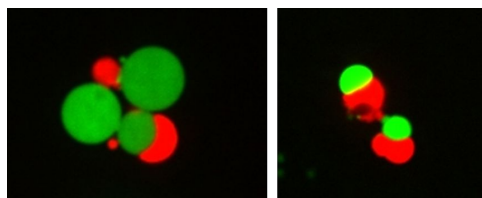


図2．人工的に合成したキメラ膜タンパク質をリポソーム内部で合成し、インキュベートした後の顕微鏡写真。リポソーム同士の結合がみられる。

#### 4．研究成果

はじめにリポソーム同士の結合及び融合能を持つ膜タンパク質の新規デザインを行った。大腸菌の膜タンパク質をリポソーム内部で合成すると、配列によっては膜タンパク質がリポソーム膜に組み込まれることが知られている。はじめに、EmrEやToICをはじめ、複数の膜タンパク質を人工細胞技術によって合成し、リポソーム膜上に目的の膜タンパク質が組み込まれていることを確認した。これらの膜タンパク質の末端にコイルドコイルドメインを持つアルファ-ヘリックスをコードする遺伝子配列を結合した。コイルドコイルドメインは、既存の報告をもと選定した。この配列は2種類のアルファ-ヘリックスから成り、これらがヘテロに2量体を形成することが知られている。これにより、膜タンパク質の構造を利用することでコイルドコイルドメインをリポソーム膜の外部に呈示できる条件を探索した。

2種類のコイルドコイルドメインはそれぞれ同一の膜タンパク質に結合され、キメラ膜タンパク質遺伝子として構築した(図1)。この遺伝子をリポソーム内部に導入し、無細胞翻訳系を用いてタンパク質を合成したところ、図2のように、リポソーム同士の結合が見られた。この現象は、初めて遺伝子駆動によるリポソームの結合(相互作用)を再構築した例となる。この時点ではリポソーム同士の結合反応は見られたが融合反応を確認するには至らなかった。

次にリポソーム集団をフローサイトメータで解析することを試みた。リポソームは、アルファヘリックス2種に対応して2種類作成した。このそれぞれに、緑色蛍光、赤色蛍光の蛍光標識を施した。次に、halotagと呼ばれるペプチドを中央部分で切断して2断片にし、それぞれ2種のリポソーム内部に封入した。この2種の断片化されたペプチドは混合されると結合してもとのhalotagを形成し、橙色蛍光検出することが可能となる。実際に測定したところ、フローサイトメータにより、

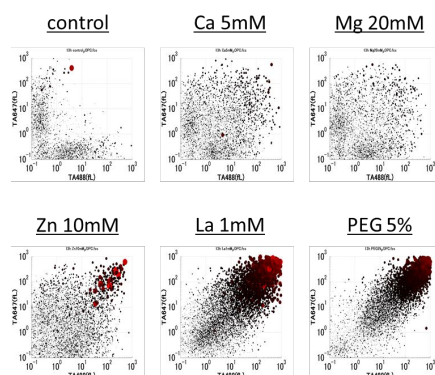


図3．フローサイトメータでリポソームの相互作用を各種金属イオン存在下で測定した。中央部に見られるドットは結合(2種蛍光を保有) 赤色のドットは融合(3色の蛍光を保有)を表す。

結合および融合したリポソームが検出可能であることが明らかとなった(図3)。以上、3色の蛍光輝度を指標とし、結合と融合反応を測定することにした。

この測定系を構築した後、まずは金属イオンを複数種検討し、結合や融合条件に与える影響を評価した(図3)。金属イオン不在下、Ca5mM, Mg20mM, Zn10mM, La1mM,に加えてリポソーム相互作用を活性化すると知られるPEG5%を加えた条件で測定した。LaイオンとPEGが最も効果的にリポソーム同士の融合を促進することが判明した。Caなどが2価であるのに対し、Laは3価のカチオンであるため、電荷の強さと脂質分子との相互作用に相関が示された。

次に、脂質組成の検討を行った。脂質は人工細胞において膜タンパク質が機能する足場であり、その構造が膜タンパク質の機能発現に強く影響することは古くから知られている。本研究では、POPC, EggPC, POPC+POPE, POPC+cardiolipin, POPC+lysoPC, POPC+cholesterolの6条件について結合と融合の活性測定を行った(図4)。結果、POPEを含む場合に最も融合頻度が高く、ついでCholesterolを含む場合に結合頻度が高いことが分かった。反面、cardiolipinを含む脂質では融合頻度が減少することが判明した。Cardiolipinは大腸菌などの単細胞生物の脂質膜に多く含まれるが、単細胞生物では細胞間相互作用が少ないため、cardiolipinによって不要に細胞間接着が起こらないように脂質が最適化されている可能性が示唆された。

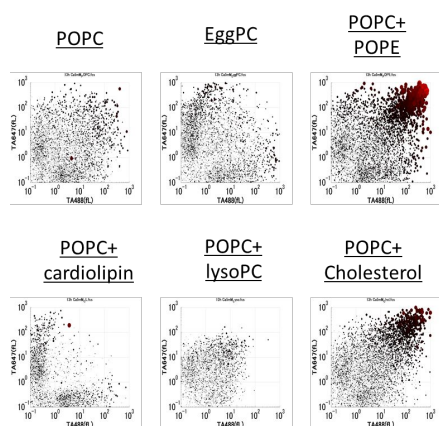


図4. フローサイトメータでリポソームの相互作用を各種脂質条件で測定した。中央部に見られるドットは結合(2種蛍光を保有)、赤色のドットは融合(3色の蛍光を保有)を表す。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4件)

- 1) Fujii, S.; Nobukawa, A.; Osaki, T.; Morimoto, Y.; Kamiya, K.; Misawa, N.; Takeuchi, S. Pesticide vapor sensing using an aptamer, nanopore, and agarose gel on a chip *Lab on a Chip* 2017, DOI: 10.1039/C7LC00361G  
査読有
  - 2) Tsuji, G.; Fujii, S.; Sunami, T.; Yomo, T. Sustainable proliferation of liposomes compatible with inner RNA replication *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2016, 113 (3), 590-595.  
査読有
  - 3) Fujii, S.; Osaki T.; Misawa, N.; Kamiya, K.; Takeuchi, S. Spiral channel for fast and noise-free microRNA detection *Proc. MEMS 2017*, 406-407  
査読有
  - 4) Fujii, S.; Kamiya, K.; Osaki T.; Misawa, N.; Takeuchi, S. Lipid Bilayer-based Noise-free MicroRNA Detection *Proc. MicroTAS 2016*, 112-113  
査読有
- [学会発表](計 19件、抜粋して記載)
- 1) Fujii, S.; Kamiya, K.; Osaki T.; Misawa, N.; Takeuchi, S. Lipid Bilayer-based Noise-free MicroRNA Detection *The 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2016)* 2016/10/11 (Dublin, Ireland)
  - 2) Misawa, N.; Fujii, S.; Kamiya, K.; Osaki, T.; Miyama, Y.; Takaku, T.;

- Takahashi, Y.; Saito, K.; Takeuchi, S.  
Odorant Sensor Using An Insect  
Olfactory Receptor Reconstructed In  
Artificial Cell Membrane  
The 20th International Conference on  
Miniaturized Systems for Chemistry  
and Life Sciences (MicroTAS 2016)  
2016/10/10 (Dublin, Ireland)
- 3) Fujii, S.; Osaki T.; Misawa, N.; Kamiya,  
K.; Takeuchi, S.  
Spiral channel for fast and noise-free  
microRNA detection  
The 30th IEEE International  
Conference on Micro Electro  
Mechanical Systems (MEMS 2017)  
2017/1/22-26 (Las Vegas, USA)
- 4) Misawa, N.; Fujii, S.; Kamiya, K.;  
Osaki, T.; Takeuchi, S.  
Highly efficient formation of droplet  
interface bilayers by using a  
microperforated separator  
The 30th IEEE International  
Conference on Micro Electro  
Mechanical Systems (MEMS 2017)  
2017/1/22-26 (Las Vegas, USA)
- 5) Osaki T.; Kaminski T.; Kamiya K.; Fujii  
S.; Misawa N.; Garstecki P.; Takeuchi  
S.  
Lipid bilayer at vertically aligned  
nanoliter droplets generated by  
two-layered microfluidic channels  
The 30th IEEE International  
Conference on Micro Electro  
Mechanical Systems (MEMS 2017)  
2017/1/22-26 (Las Vegas, USA)
- 6) Kamiya, K.; Osaki, T.; Nakao, K.; Fujii,  
S.; Misawa, N.; Takeuchi, S.  
Crude Planar Cell Membrane On A  
Chip  
The 20th International Conference on  
Miniaturized Systems for Chemistry  
and Life Sciences (MicroTAS 2016)  
2016/10/10-14 (Dublin, Ireland)
- 7) Tsuji, Gakushi, Sunami Takeshi, Fujii,  
Satoshi, Yomo Tetsuya.  
Protein synthesis with liposome fusion  
and fission by using the freeze-thaw  
method.  
ALIFE 2016 2016/7/4-8 (Cancun,  
Mexico)
- 8) Satoshi Fujii, Aiko Nobukawa,  
Toshihisa Osaki, Nobuo Misawa,  
Koki Kamiya, Yuya Morimoto, Shoji  
Takeuchi  
Biomimetic chemical vapor sensor  
using agarose gel as mucus  
17th International Symposium on  
Olfaction and Taste (ISOT2016)  
2016/6/5-9 (pacifico yokohama  
(yokohama), Japan)
- 9) Gakushi Tsuji, Satoshi Fujii,  
Takeshi Sunami, Tetsuya Yomo  
Reconstitution of artificial cell  
growth by coupling the RNA  
replication and propagation in  
liposomes using a freeze-thaw  
method  
「細胞を創る」研究会 8.0  
2015/11/12-13 (大阪大学、大阪)
- 10) 村瀬由樹、藤井聡志、市橋伯一、角南  
武志、四方哲也  
人工細胞創造を目指した 16S rRNA の  
進化分子工学的改良  
「細胞を創る」研究会 8.0  
2015/11/12-13 (大阪大学、大阪)

11) 泉大雅、藤井聡志、市橋伯一、角南武志、四方哲也リポソーム膜上に再構成された EstA の FACS を用いた活性測定

「細胞を創る」研究会 8.0

2015/11/12-13 (大阪大学、大阪)

12) 津田宗一郎、藤井聡志、鈴木宏明、四方哲也

単層膜ベシクルへの PEG 脂質の取り込みにおける曲率依存性と閾値

「細胞を創る」研究会 8.0

2015/11/12-13 (大阪大学、大阪)

13) Gakushi Tsuji, Satoshi Fujii,

Takeshi Sunami, Tetsuya Yomo

Freeze thaw method for supply small nutrients to the liposome by inducing liposome fusion

第 53 回日本生物物理学会

2015/9/13-15 (金沢大学 石川)

〔図書〕(計 2 件)

1) 藤井聡志、竹内昌治 膜タンパク質と DNA を用いたバイオセンサ

化学工業 (化学工業社) 2017, 2 月号,

Vol. 68 No. 2, 55-62

2) 藤井聡志、神谷厚輝、竹内昌治 人工細胞膜を利用した 1 分子検出

現代化学 (東京化学同人) 2016, 8 月号, No. 545, 53-57

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 核酸の検出方法及び検出装置

発明者: 藤井聡志、神谷厚輝、大崎寿久、三澤宣雄、竹内昌治

権利者: 神奈川科学技術アカデミー

種類: 特許

番号: KP16 - 1011

出願年月日: 2016 年 10 月 7 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 聡志 (FUJII Satoshi)

神奈川科学技術アカデミー・人工細胞膜

システムグループ・研究員

研究者番号: 60619005