

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：32641

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2015～2017

課題番号：15KT0153

研究課題名(和文) 膜とDNAが協同して増幅する人工細胞の構築

研究課題名(英文) Construction of artificial cells that can replicate membrane and DNA cooperatively

研究代表者

鈴木 宏明 (Suzuki, Hiroaki)

中央大学・理工学部・教授

研究者番号：20372427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：生命誕生初期の原始細胞が増殖するには、情報分子(核酸)と膜の複製が原始的な原理で同時進行する必要がある。本研究では、膜と核酸のみから構成される細胞モデルでも増殖可能であることを実験的に示すことを目的とした。はじめに、内封高分子の排除体積効果が膜の分裂様変形に与える程度、PEG、タンパク質、DNAに範囲を広げて検証した。超巨大分子であるゲノムDNAは低濃度でも膜曲率を顕著に増加させること、また、DNAの増幅反応を経たリポソームでも分裂様変形が生じることを示した。最後に、分子混雑環境中において巨大DNAが脂質二重膜に自発的に包みこまれる現象を発見し、これも排除体積効果で説明可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：In order to proliferate primitive cells in the early era of life, replication of information molecules (nucleic acids) and membranes need to proceed simultaneously based on the primitive principle. In this study, we aimed to demonstrate experimentally that a simple cell model consisting only of membrane and nucleic acid can proliferate. First, we examined the extent of excluded volume effect of encapsulated biopolymer (PEG, protein, and DNA) on the division-like deformation of membrane. We found that genomic DNA, which is a huge macromolecule, significantly increases the membrane curvature even at low concentrations, and that division-like deformation occurs even in liposomes that have undergone DNA amplification reaction. Finally, we discovered a phenomenon that giant DNA spontaneously was wrapped by the lipid bilayer membrane in molecular crowding environment, which can also be explained by the excluded volume effect.

研究分野：バイオMEMS

キーワード：人工細胞 DNA リポソーム 複製

1. 研究開始当初の背景

現代の細胞では、多様な特殊化したタンパク質が複雑巧妙に働き細胞分裂が達成される。しかし、生命誕生初期の原始細胞が増殖するためには、情報分子(核酸)の複製と膜構造の複製が原始的な原理により同時に進行する必要がある。そのため、人工的に作製したモデル脂質膜を用い、個別の分子から完全再構成した人工細胞の複製系を構築する試みが行われてきた。

これまでに、脂肪酸ベシクルを用いた系[Chen et al., *JACS*, 2005], および、化学合成した両親媒分子を用いた系[Kurihara et al., *Nat. Commun.*, 2011]で情報分子(核酸)と膜の複製を行う試みが行われた。前者では、脂肪酸ベシクルの膜透過率を高める膜組成を用い、内部に Mg^{2+} やリボザイム反応基質が供給されることを示した。後者では、ベシクル内部で PCR 反応を行うと、DNA が多く存在するベシクルの膜成長と分裂が促進されることが示された。このように、シンプルな物質組成からなる原始的細胞(プロトセル)においても核酸と膜構造の複製が実現可能である実験的証拠が積み上げられてきたものの、これらの現象は、特定の化学組成に依存したものであると考えられる。

申請者らは、過去に、リン脂質で構成される単層ジャイアントベシクル(GUV)が成長して自発的に分裂する物理的効果(排除体積効果)を実証した[Terasawa et al., *PNAS*, 2012]。これは、細胞系を構成する化学物質の物性に依存しないため、膜構造の複製原理としてより一般性が高い。また、この効果は、小胞内に存在する高分子のサイズや濃度に依存して起こるため、小胞内で DNA が増幅し、より大きな DNA を内封するものが分裂・増殖し、生存に有利であったというシナリオが描ける。

2. 研究の目的

以上の背景をふまえ、本研究では、DNA の等温増幅と膜の成長・分裂が協同して進行し、膜と核酸のみから構成される原始的な細胞モデルでも増殖可能であることを、実験的に示すことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、主に二つのテーマについて実験的研究を行った。2012年に *PNAS* で実証した膜分裂変形(図1)の実験では、排除体積効果を誘導する高分子として、ポリエチレングリコール(PEG)と多糖のデキストランのみを用いていた。今回は、この効果の一般性を調べるため、PEGに加えて代表的なタンパク質であるウシ血清アルブミン、および細胞内の長巨大分子であるゲノム DNA を混雑分子として用いた際に、脂質二重膜の形態に与え

る影響を精査した。次に、混雑分子としての PEG に加え、低濃度のゲノムサイズ DNA が GUV に内封された場合に、膜形態と DNA の相互作用を調べた(図2)。後者の実験において、背景で述べた原始的なゲノム DNA 分配膜分裂の存在の可能性を示唆する実験結果が得られた。

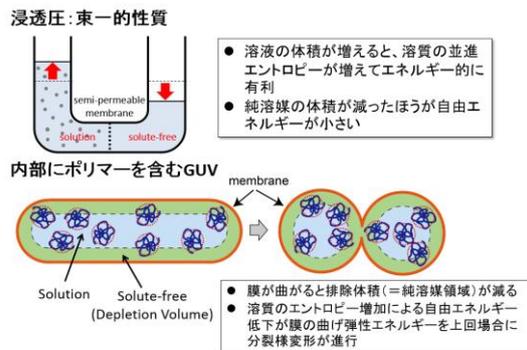


図1. (上段)一般的な浸透圧作用の説明では、溶質(ここでは高分子)を通過しない半透膜を介し、純溶媒体積が減少して溶液体積が増加する。(下段)膜に高分子が包まれた系では、立体障害により高分子が進入できない体積(排除体積)が膜近傍に生じる。排除体積は浸透圧が低い場合、この領域体積が減少するように系が変化する。この系では、膜の(正の)曲率が増加することで排除体積を減少させる。

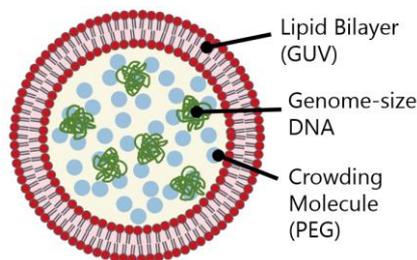


図2. 膜, DNA, PEG の三成分系から成る人工細胞系の模式図。ゲノムサイズ DNA と膜変形の関連を調べた。

どちらの実験においても、共通して、W/O エマルション界面通過法を用いて目的の内封分子を含む GUV を作製した。脂質には、常温で流動相を呈する POPC をベースとして用いた。リポソームの内部(内液)には 200 mM のグルコース(単糖)、外部の液(外液)には 200 mM のスクロース(二糖)を加えることで、内外の浸透圧を一致させつつ、比重差をつけることで重力によって沈む条件とした。作製した GUV の代表的な蛍光レーザー共焦点顕微鏡画像を図3に示す。多くのベシクルが、単層(ユニラメラ)状態にあることがわかる。作製した GUV に対し、高濃度のグルコース水溶液を外液に加え、高浸透圧状態にすることで内部の水を流出させた。この操作により、GUV が収縮し、球に対して膜面積が余剰となる。この際の膜形態および

DNA の局在化を蛍光顕微鏡を用いて観察した。

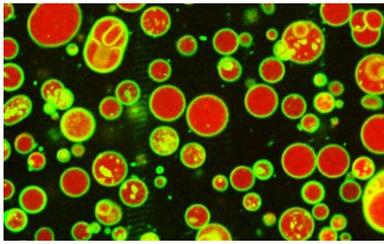


図 3. GUV の代表的な共焦点顕微鏡画像. 緑が脂質膜, 赤は内封体積.

4. 研究成果

まず, 前者の混雑分子が膜変形に与える効果を検証した際の実験結果を述べる. はじめに, 2%w/w の重量濃度で PEG を内封し, さらに浸透圧刺激を加えて体積を理論上 60% 減少させた際の顕微鏡像を図 4 に示す. 収縮前 (左上) ではほとんどの GUV が球形であったのに対し, 分子量が 400 の PEG では 3 割程度の GUV が, 局所的に陥没した Stomatocyte 形態を呈した. この変化は, PEG を封入しない条件に比べて有意な差がなかった. 一方, 分子量が 6k または 20k の PEG を封入した場合には, 重量濃度が等しいにもかかわらず形態の違いが顕著であった. PEG 6k の場合には, 多数の小さな出芽がみられた. PEG 20k の場合には, 母ベシクルからチューブ状に伸びる膜構造が比較的顕著に見られた. これらはいずれも正の大きな曲率を有する構造であり, 混雑高分子のサイズが大きいほど, また, その濃度が高いほど膜を曲げるエネルギーが大きいという, 排除体積効果理論 (図 1) と整合性がある. この三種類の PEG について, 0 ~ 12%w/w の濃度範囲で網羅的に実験を行い, 形態分類を行ったところ, 排除体積効果による膜変形が誘起される範囲と影響を明らかにした.

次に, タンパク質である BSA と核酸の巨大分子である λ ファージ由来のゲノム DNA (48502bp; 32MDa) を同様に GUV 内に内封し, 同様の浸透圧刺激実験を行った. BSA の場合には, PEG 6k に近い形態変化の傾向が得られ, この効果が高分子の化学的組成に依存しない一般的な物理効果であることが改めて検証された. これら 2 種類の高分子は溶液中での回転半径も近いいため, 類似の結果が得られたと考えられる. 一方, λ DNA を封入した場合は, 0.014%w/w という非常に低濃度において, 分裂用変形がみられた (図 5). これは, PEG 6k を用いた実験と比べ, 100 分の 1 程度の濃度である. 0.074%w/w においては, 小さな出芽やチューブ形成が見られた. 最後に, かつ最初の条件と同濃度 (0.014%) だが, 超音波処理で断片化した DNA を用いたところ, 高分子がない条件との形態の有意な違いは見られなかった (図 5). λ DNA の分子半径は約 500 nm であり, PEG 6k のそれとは

100 倍程度の違いがある. このことは, やはり内封高分子の分子サイズの影響が非常に大きいことをサポートしている.

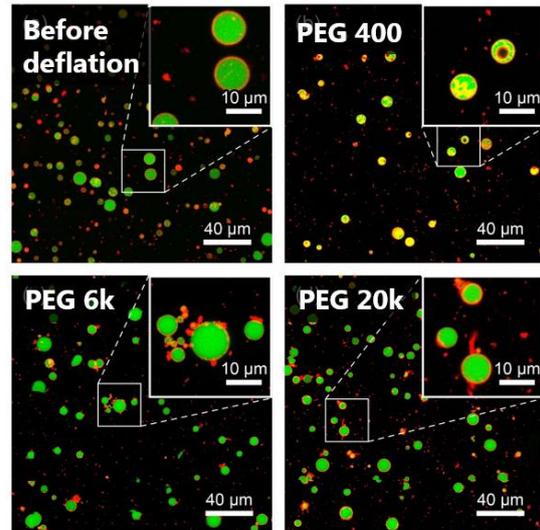


図 4. 2%w/w の PEG (分子量が異なる) を内封した GUV を浸透圧作用により収縮させた際の膜形態の変化.

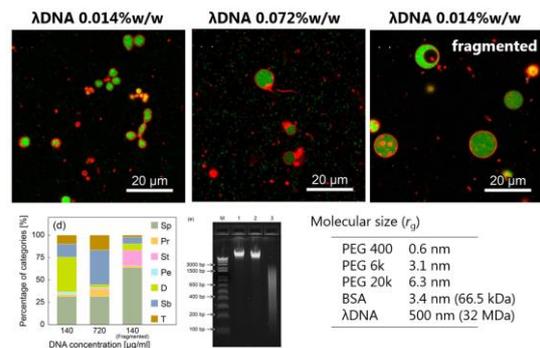


図 5 λ DNA を内封した GUV の変形.

また, ϕ 21 DNA ポリメラーゼを含む GUV を作製し, 少量のテンプレート DNA から DNA を指数増幅させることでも, 同様の膜変形形態が誘導された. このことは, 細胞内外が生理的な環境であっても, 核酸の増幅と膜の変形・分裂が共存しえたことを示唆している.

次に, 二番目の実験系である, 膜と PEG, DNA の三成分系を用いて GUV 膜の変形実験を行った. DNA としては, T4 バクテリオファージ由来のゲノム DNA (166 kbp; 以下 T4 DNA) を用いた. 分子数で 40 pM に相当する T4 DNA と 2%w/w の PEG 20k を共封入した GUV の蛍光共焦点顕微鏡像を図 6(a) に示す. この濃度条件は直径 10 μ m の球内に 12.6 分子の DNA が存在する計算になることから, およそデザインした通りの封入率が実現されていることがうかがえる. この GUV に対し, $\Delta c = 275$ mM となる浸透圧差を与えた後の

GUV 像を図 6(b)に示す。膜内部の水体积の流出に伴い、親ベシクルの表面に出芽様の膜構造が多数みられる。これは、前述の(PEG の)排除体積効果に起因するものと考えられるが、このとき、T4 DNA は出芽した膜胞内に入っていない。次に、T4 DNA の濃度は同一で、PEG 20k の濃度を 8%w/w に増加させた GUV を作製し、同様に高浸透圧差を与えた。その結果を図 6(c)に示したが、(b)の条件とはまったく異なり、T4 DNA が膜に付着して出芽構造に包まれている様子がみられた。非常に単純な分子混雑の有無で、DNA の挙動が劇的に変化したことは予想外の発見であった。

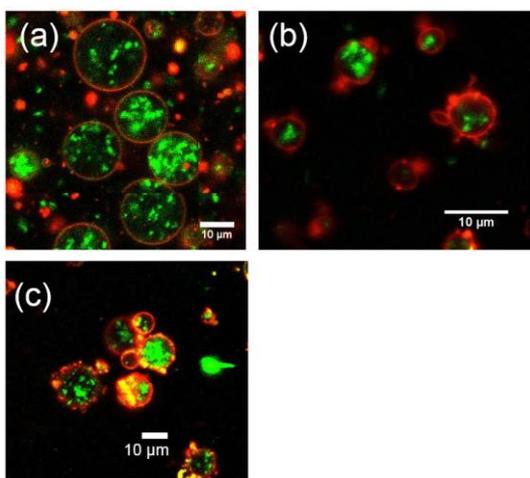


図 6 (a) T4 phage DNA を 40 pM の濃度で封入した様子。PEG 20k が 2%w/w の濃度で共封入されている。(b) (a)の GUV を浸透圧で収縮させた後の様子。(c) PEG 20k を 8%w/w の濃度で共封入した GUV を浸透圧で収縮させた後の様子。赤：脂質膜、緑：T4 DNA。

混雑分子の存在により、ゲノムサイズの DNA が自発的に脂質膜に封入されるメカニズムの仮説を図 7 に示した。まず、混雑環境下では、長鎖分子であるゲノムサイズ DNA は、ランダムフライトモデルから予測されるサイズよりもその実効サイズがずっと小さくなる。これは DNA 分子の内部より PEG 分子が排除される効果によるもので、グロービュール転移と呼ばれる。GUV の収縮により、内部の PEG 濃度がさらに上昇すると、粒子として振舞っている gDNA がその周囲の排除体積を減少させるために脂質膜の内側に付着する。膜は柔軟であるため、膜が gDNA 粒子を包み込むことで、さらに排除体積が増加する。この一連のプロセス(gDNA の膜への付着と出芽)はタイムラプス動画としても確認された。

1. Globular DNA attach to the membrane
2. DNA nucleate the membrane enveloping to reduce free energy (maximizing entropy)

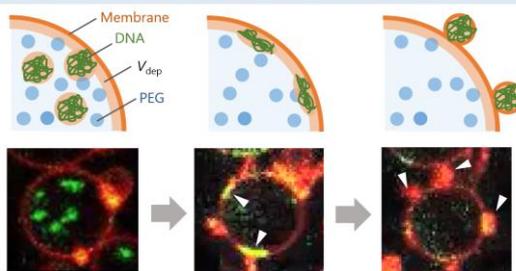


図 7 ゲノムサイズ DNA が膜に自発的に封入されるメカニズムに関する作業仮説。

以上の実験結果により、GUV 内における混雑分子の存在と、それに伴う排除体積効果が、膜の変形と巨大(ゲノムサイズ) DNA の形態や配置に大きな影響を与えることが明らかとなった。細胞は根本的に多様な高分子が高濃度で膜に包まれたものであるため、この物理現象が細胞の動態にメジャーな影響を与えている可能性が高いこと、さらには、将来の人工細胞設計において重要な設計指針となることが示唆される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① T. Okano, K. Inoue, K. Koseki, H. Suzuki, “Deformation Modes of Giant Unilamellar Vesicles Encapsulating Biopolymers,” *ACS Synthetic Biology*, 7, 739-747, 2018. (査読有)
- ② M. Tsugane and H. Suzuki, “Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction in Giant Unilamellar Vesicles,” *Scientific Reports*, 2018. (accepted) (査読有)

[学会発表] (計 26 件)

- ① 津金, 鈴木, 「リポソームを用いた RNA 検出システムの開発」, 化学とマイクロナノシステム第 37 回研究会, 筑波, May 2018.
- ② T. Okano, K. Inoue, H. Suzuki, “Shape Study of Giant Liposomes Containing Macromolecules as an Artificial Cell Mimic,” *IEEE NEMS 2018 Conf.*, Singapore, Apr. 2018.
- ③ S. Katsuta, T. Okano, H. Suzuki, “Reagent Handling and Delivery System Using Cell-Sized Liposomes,” *IEEE NEMS 2018 Conf.*, Singapore, Apr. 2018.
- ④ H. Suzuki, “Unique deformation modes and material encapsulation of giant unilamellar vesicles encapsulating biomacromolecules,” *Int. Symp. Artificial Cell Reactor Science and Technology*, Hongo, Tokyo, Apr. 2018.

- ⑤ T. Okano, H. Suzuki, “Repeated substrate supply to biochemical reactions encapsulated in giant unilamellar vesicles,” *Int. Symp. Artificial Cell Reactor Science and Technology*, Hongo, Tokyo, Apr. 2018.
- ⑥ 古関, 井上, 岡野, 鈴木, 「高分子を内封したリポソームの変形」, 精密工学会 2018 年度春季大会, 2018 年 3 月.
- ⑦ 岡野, 井上, 鈴木, 「人工細胞モデルの膜挙動」, 膜シンポジウム 2017, 富山, 2017 年 11 月.
- ⑧ 鈴木, 「バイオ・医療 MEMS (レビュー)」, 第 8 回マイクロ・ナノ工学シンポジウム, 広島, 2017 年 10-11 月. (招待講演)
- ⑨ 岡野, 鈴木, 「人工細胞モデルへの低侵襲的な繰り返し基質供給のためのマイクロ流体デバイス」, 第 8 回マイクロ・ナノ工学シンポジウム, 広島, 2017 年 10-11 月.
- ⑩ 勝田, 岡野, 鈴木, 「細胞サイズのリポソームを用いた試薬操作・徐放システム」, 第 8 回マイクロ・ナノ工学シンポジウム, 広島, 2017 年 10-11 月.
- ⑪ M. Tsugane, H. Suzuki, “Liposome-based RNA detection system,” *Proc. μTAS 2017*, pp. 1615-1616, Savannah, GA, USA (2017.10).
- ⑫ T. Okano, H. Suzuki, “Microfluidic device for selective manipulation of giant liposomes,” *Proc. μTAS 2017*, pp. 1567-1568, Savannah, GA, USA (2017.10)
- ⑬ 古関, 井上, 岡野, 鈴木, 「高分子を内封した巨大脂質ベシクルの変形」, 「細胞を創る」研究会 10.0, 京都, 2017 年 10 月.
- ⑭ 岡野, 鈴木, 「バイオリアクターへの繰り返し基質供給」, 第 36 回化学とマイクロナノシステム学会, 群馬, 2017 年 10 月.
- ⑮ H. Suzuki, T. Okano, M. Tsugane, F. Sunaga, “Engineering cell mimetic dynamic microreactor system based on liposomes,” *Flow17 Conference*, Paris, France, 2017.
- ⑯ 津金, 鈴木, 「人工脂質膜小胞内 RT-PCR 法の開発」, 第 35 回化学とマイクロナノシステム学会, 東京, 2017 年 5 月.
- ⑰ H. Suzuki, “Liposome technologies: Toward creation of artificial cell mimics,” *1st Sino-Japan Seminar on MEMS and Biomedical Applications*, Shenzhen, China, Mar. 20, 2017. (招待講演)
- ⑱ 鈴木, 「人工細胞膜システムの細胞らしい挙動」, 第 6 回生体界面研究会, 金沢, 2017 年 2 月. (招待講演)
- ⑲ 鈴木, 「人工細胞膜システムの細胞らしい挙動」, 東京理科大学イメージングフロンティアセンターシンポジウム, 千葉, 2016 年 12 月. (招待講演)
- ⑳ 鈴木, 「細胞の界面をつくる・制御する」, 日本表面化学会関東支部第 5 回セミナー, 東京, 2016 年 11 月. (招待講演)
- 21 岡野, 鈴木, 「リポソームを用いたサブピコリットル反応液への試薬供給」, 第 33 回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム, 長崎, 2016 年 10 月.
- 22 勝田, 岡野, 鈴木, 「ハイドロゲル内封ユニラメラリポソームの作製法の検討」, 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第 34 回研究会, 千葉, 2016 年 9 月.
- 23 鈴木, 「人工細胞系構築の試み」, 第 5 回生体界面研究会, 愛知, 2016 年 7 月 4-5 日. (招待講演)
- 24 鈴木, 分裂する人工細胞膜におけるゲノム DNA の分配機構」, 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第 33 回研究会, 東京, 2016 年 4 月.
- 25 K. Takahashi, T. Okano, H. Suzuki, “Liquid handling of minute volume using the hydrogel encapsulating liposomes,” *μTAS 2015*, Gyeongju, Korea, Oct. 2015.
- 26 H. Suzuki, “Distribution of genome-size DNA in the dividing model cell membrane,” *Pacificchem 2015*, Hawaii, USA, Dec. 2015. (招待講演)
- 〔図書〕 (計 2 件)
- ① 鈴木宏明, 「少数性生物学 (第 10 章 少数を分ける)」, 日本評論社, pp. 39-48, 2017. (分担執筆)
- ② 岡野太治, 鈴木宏明, 「人工細胞の創製とその応用 (2.1 人工細胞の容器としてのリポソーム)」, シーエムシー出版, pp. 81-91, 2016. (分担執筆)
- 〔その他〕
- ① 鈴木宏明, 「再構成アプローチから明らかになった生体膜の基本的性質」, 生体の科学, Vol. 69, No. 3 (特集: 生体膜のバイオロジー), 医学書院, pp. 193-197, 2018. (解説記事)
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
鈴木 宏明 (SUZUKI, Hiroaki)
中央大学・理工学部・教授
研究者番号: 20372427
- (3) 連携研究者
岡野 太治 (OKANO, Taiji)
中央大学・理工学部・助教
研究者番号: 60622082