

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：82706

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H06156

研究課題名(和文) 自律的自己複製を目指した代謝を創発する人工細胞の構築

研究課題名(英文) Construction of self-reproducing artificial cell

研究代表者

車 兪徹 (Kuruma, Yutetsu)

国立研究開発法人海洋研究開発機構・超先鋭研究開発部門(超先鋭研究プログラム)・研究員

研究者番号：40508420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 24,700,000円

研究成果の概要(和文)：細胞が自己成長し分裂する機能は増殖に必須な生命の基本的な特徴である。これを人工的に形成した膜小胞の内部で脂質合成を行うことで再現する試みを行っている。本プロジェクト実施中に、脂肪酸合成系の試験管内再構築を行い、人工膜小胞内部での脂肪酸合成を観察した。またこれをさらに発展させリン脂質合成まで行うよう、脂肪酸合成酵素であるPlsXとPlsYタンパク質をCell-free系を内包した膜小胞内部で合成した。Cell-free合成したPlsXYは脂肪酸合成系と組み合わせることで協働し、最終合成産物であるリゾリン酸の合成に成功した。現在これらの研究結果をまとめた論文を執筆中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自己複製は最も生命らしい特徴であり生命と非生命を隔てる最後の壁である。本研究の学術的意義は、自己複製を人工系で再現することで究極的には生命を創造することにつながり、我々の持つ生命への価値観を大きく変えることになる可能性がある。また、初期地球環境中で生命が如何に誕生したのかを知るための大きなヒントになると考えられる。社会的な意義としては、細胞機能を任意に設計し駆動させる人工細胞系を利用することで、薬剤生産型スマート人工細胞の構築や、絶滅生物の再生など、新たな産業を生み出すことが期待できる。本研究で得られた成果により、自己複製をする人工細胞系の具現化に大きく近づいた。

研究成果の概要(英文)：Self-growing and -division are most fundamental feature of cell for undertaking proliferation. I am trying to reproduce this phenomenon by synthesizing lipid molecules inside the lipid membrane vesicle. In this project, I reconstructed an in vitro fatty acid (FA) synthesis system by assembling 10 kinds of purified FASII enzymes that capable to synthesize 300 micro M fatty acids from acetyl- and malonyl-CoA. Although we could synthesize de novo FA in vesicle, we found that FA inactivate FAS enzymes. Thus we redesigned our system to synthesize phospholipid through FA synthesis. The responsible enzymes, PlsX and PlsY, were synthesized inside vesicles by encapsulating cell-free system. We confirmed that so synthesized PlsXY were maintaining their activity to synthesize lysophosphatidic acid. Now, we are performing this whole reactions inside vesicles to see the vesicle morphological change. We have published one Nat. Commun. and some other artificial cell research papers.

研究分野：合成生物学

キーワード：人工細胞 生命の起源 脂質膜 膜タンパク質 Cell-Free

## 1. 研究開始当初の背景

分子と遺伝子を組み合わせることで生きた細胞を再構築し、生命現象を再現しようとする研究が合成生物学の分野で注目を浴びている。このような bottom-up 的アプローチは、生命システムに必須な最小限の遺伝子や機能を構成的に規定できるという学術的意義がある。また、生命誕生前の初期地球環境中で、生物がどのように無生物から誕生したのかを理解するための重要なヒントになる可能性がある。技術的な観点では、転写翻訳から始まるすべての細胞内反応を試験管内で再現できるため、ライフサイエンスの新たなツールとしての利用が期待できる。例えばメタゲノム解析から得られた遺伝子の機能について調べる際、ホストの細胞が培養できない、あるいはモデル生物での発現が難しい場合においても、人工細胞技術を用いることでゲノム情報から直接 *in vitro* 解析することができる。そのため人工細胞技術は将来、電子情報としての DNA 配列情報と細胞の生命機能をシームレスにつなげる基盤となることが予想される。

人工細胞研究の基礎技術として、無細胞系と膜小胞技術がある。無細胞系は試験管内で転写と翻訳反応を行うものであり、例えば *a* という遺伝子を投入すると数時間に *A* というタンパク質が合成される。本研究で使用する無細胞系は、何かしらの細胞抽出液をベースとしている他の無細胞系と違い、転写・翻訳に関わるすべての酵素や因子を精製し統合した完全再構築系である。そのため、遺伝子発現以外の副反応が全く起こらず、極めて純化された状態で遺伝子産物の諸反応を解析することができる。この無細胞系を細胞と同じマイクロメートルサイズの膜小胞に内封することで、規定された微小空間内部で遺伝子発現を行うことができる。膜小胞はリン脂質から形成されるカプセル状の脂質二重膜であり、その調製法によって目的の分子や遺伝子を内封することができる。つまりこの無細胞系と膜小胞技術の組み合わせにより、あたかも細胞と同じ振る舞いを再現することが可能である。これを人工細胞と呼んでいる。

しかし、現在の人工細胞はあくまでも実際の細胞のある一部の反応を再現しただけに過ぎず、未だ生命と呼ぶに至っていない。また、技術的にも産業応用に足る段階に至っていない。その大きな理由の一つは、生物の最も生物的な特徴である自己複製をすることができないからである。細胞が自己複製を完結するためには、内部のゲノム情報のコピーを作り、さらに細胞が2つ以上に分裂しなければならない。前者のゲノムのコピーについてはこれまでにいくつかの実験的な研究成果が報告されているものの、後者の分裂の再現化は未だ難しく、化学的なアプローチによる成果のみ2、3報告されている。分裂を行うためには膜を形成するリン脂質の分子数が2倍以上に増える必要がある。リン脂質の合成過程はまず脂肪酸の合成とそれに続く、グリセロール3リン酸への結合により最初のリゾリン脂質が合成される。もし、これらの生化学的プロセスが膜小胞内部で行われた場合、人工的な膜小胞が自己成長し分裂するのではないか。この仮説を実証すべく、本研究ではリン脂質を内部合成することで自律的に膜の成長と分裂を促す人工細胞の構築を行った。

## 2. 研究の目的

本研究では、「膜小胞内環境における脂肪酸の合成系の再構築」と、「膜小胞の脂質二重膜上で起こるリン脂質合成系の再構築」を行う。さらに最終的には、それら関係酵素を全て無細胞翻訳系で内部合成し、遺伝子発現から脂質合成代謝の創発を行い、人工細胞の自己複製を目指す。

## 3. 研究の方法

### 【膜小胞内環境における脂肪酸の合成系の再構築】

脂質酸の合成を触媒する8種のFab酵素とACP (acyl carrier protein)、TesAの計10種の酵素を全て精製し、acetyl-CoAとmalonyl-CoAを基質として脂肪酸を合成する *in vitro* システムを構築する。合成された脂肪酸をLCMSにより定量解析し、先行研究の結果を参考に十分量の脂肪酸が合成されていることを確認する。また、系を最適化することにより高効率に脂肪酸を合成する条件を見出す。

構築した脂肪酸合成系をエマルジョン沈降法によりGiant unilamellar vesicle (GUV)内へ封入する。GUVの形成はPOPCを主成分とするが、必要に応じて混合脂質を用いる。調製したGUV内部で脂肪酸合成反応を行い、GUVの形態変化を顕微鏡により観察しタイムラプス撮影を行う。形態変化を見せた場合、ADE (Area-difference-elasticity) モデルなどを参考にし、脂質膜上で

どのような脂質ダイナミクスが起こっているのか、物理的・化学的な解析を行う。

#### 【膜小胞の脂質二重膜上で起こるリン脂質合成系の再構築】

リン脂質合成反応の初段階を担う PlsX と PlsY を GUV 内部で合成する。PlsX と PlsY は膜局在型タンパク質であるため、精製の過程で界面活性剤を使用する。そのため、脂肪酸合成系のように、精製評品を GUV に内封し反応させるといった手法が使えない。この問題を解決するために、PlsX と PlsY の遺伝子を Cell-free 系と一緒に GUV に内封し、内部で量タンパク質を合成し機能させる。ここで使用する cell-free 系は転写翻訳に必須な因子のみから再構築した PURE system を使用する。あらかじめ、PlsX と PlsY の遺伝子に GFP 遺伝子を繋げた鋳型 DNA を用意し、GUV 内部での合成語の膜局在を観察する。その後、PlsX と PlsY を PURE system で合成し、acyl-ACP を基質としてリン酸を合成する活性が保たれているかを検証する。acyl-ACP、PlsX、PlsY による LPA の合成が確認できた後は、これらの反応を全て GUV 内部で行い、内部でのリン脂質合成による GUV の形態変化観察を行い解析する。

#### 4. 研究成果

##### 【膜小胞内環境における脂肪酸の合成系の再構築】

II 型脂肪酸合成系に関する酵素 10 種類を Ni-NTA カラムとイオン交換カラムを用いて高純度に精製し in vitro 脂肪酸合成系を構築した。これらのタンパク質と基質である Acetyl-CoA と Malonyl-CoA、電子供与体と混合することで脂肪酸を合成することに成功した。合成された脂肪酸は、C12 から C18 までの鎖長を持っていた。この段階では合成産物のほとんどが高度に Sticky な飽和脂肪酸であるため、脂肪酸合成系の構成因子の存在比を変えることで全体の約 80%以上が不飽和脂肪酸になるよう改変した。しかしながら試験管内で脂肪酸合成を行っていたところ、反応液が濁る現象が観察された。これは脂肪酸合成反応に依存する現象であったため、必須因子である ACP 存在・非存在下で反応を行い、反応後に遠心処理することで凝集体と上清を分け、SDS-PAGE により解析したところ、脂肪酸合成に応じて FabZ が高度に凝集していることがわかった。これらの結果から、合成産物である脂肪酸が脂肪酸合成酵素なんらかの影響を及ぼしていることが示唆された。また、系内にリポソームを添加して合成したところ合成量が 1.5 倍上昇した。

##### 【膜小胞の脂質二重膜上で起こるリン脂質合成系の再構築】

脂質膜小胞内でリン脂質合成を行うため、PlsX と PlsY を PURE system により合成した。GFP 結合型の PlsX の鋳型 DNA を用意し GUV 内で発現したところ内部での合成と膜への局在が確認できた。同じく GUV 内で PlsY-GFP を合成したところ合成と膜局在が観察された。PURE system により合成された PlsXY が機能を維持しているかを検証するために、リポソーム存在下でタンパク質合成し、基質と混合し反応を行なったところ、反応産物である LPA の合成を確認した。このことは、cell free 系で人工的に合成した膜タンパク質酵素が膜上で活性を持つことを示している。現在 One Pot で反応が起こるよう、定量解析と系の調整を進めており、GUV 内部で反応を行うよう研究を進めている。

本研究課題実施中に人工細胞研究として、研究代表者を責任著者とした Nature Communication1 報と、他数報の共著の原著論文を報告した。また、国内外を含む多くの招待講演やアウトリーチ活動、グラント獲得（2018 年 JST さきがけ採択）に成功した。さらに、現在所属する海洋研究開発機構においてテニュアトラックポジションを獲得した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Berhanu Samuel, Ueda Takuya, Kuruma Yutetsu	4. 巻 10
2. 論文標題 Artificial photosynthetic cell producing energy for protein synthesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1325
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1038/s41467-019-09147-4">https://doi.org/10.1038/s41467-019-09147-4</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sawasato Katsuhiko, Sato Ryo, Nishikawa Hanako, Imura Naoki, Kamemoto Yuki, Fujikawa Kohki, Yamaguchi Toshiyuki, Kuruma Yutetsu, Tamura Yasushi, Endo Toshiya, Ueda Takuya, Shimamoto Keiko, Nishiyama Ken-ichi	4. 巻 9
2. 論文標題 CdsA is involved in biosynthesis of glycolipid MPLase essential for membrane protein integration in vivo	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1372
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1038/s41598-018-37809-8">https://doi.org/10.1038/s41598-018-37809-8</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Jia Tony Z., Kuruma Yutetsu	4. 巻 10
2. 論文標題 Recent Advances in Origins of Life Research by Biophysicists in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Challenges	6. 最初と最後の頁 28 ~ 28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.3390/challe10010028">https://doi.org/10.3390/challe10010028</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Rampioni Giordano, D' Angelo Francesca, Messina Marco, Zennaro Alessandro, Kuruma Yutetsu, Tofani Daniela, Leoni Livia, Stano Pasquale	4. 巻 54
2. 論文標題 Synthetic cells produce a quorum sensing chemical signal perceived by Pseudomonas aeruginosa	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 2090 ~ 2093
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C7CC09678J	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Furusato Takumi, Horie Fumihito, Matsubayashi Hideaki T., Amikura Kazuaki, Kuruma Yutetsu, Ueda Takuya	4. 巻 7
2. 論文標題 De Novo Synthesis of Basal Bacterial Cell Division Proteins FtsZ, FtsA, and ZipA Inside Giant Vesicles	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACS Synthetic Biology	6. 最初と最後の頁 953 ~ 961
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssynbio.7b00350	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Luisa Damiano, Yutetsu Kuruma, Pasquale Stano	4. 巻 148
2. 論文標題 What can synthetic biology offer to artificial intelligence (and vice versa)?	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biosystems	6. 最初と最後の頁 1-3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biosystems.2016.09.005	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 金森崇, 杉本(永池)崇, 車兪澈, 網藏和晃, 上田卓也	4. 巻 89(2)
2. 論文標題 総説: 無細胞タンパク質合成系の高度化と合成生物学への展開	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Japanese Biochemical Society	6. 最初と最後の頁 211-220
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2017.890211	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 車 兪澈, 上田卓也	4. 巻 56 (3)
2. 論文標題 膜タンパク質の無細胞合成法	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 生物物理	6. 最初と最後の頁 162-164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.56.162	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 12件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 車 愈 激
2. 発表標題 膜に焦点を置いた人工細胞の構築と生命の起源研究
3. 学会等名 極限環境生物学会 第19回シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 車 愈 激、江藤澄恵、笠間健嗣、藤見麻衣
2. 発表標題 ミニマル代謝の構築によりますます初期生命に近づく人工細胞
3. 学会等名 「細胞を創る」研究会 11.0（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 車 愈 激
2. 発表標題 試験管内で人工的に合成するトランスポーター膜タンパク質
3. 学会等名 第3回トランスポーター研究会関東部会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yutetsu Kuruma
2. 発表標題 Reconstruction of functional cell membrane based on cell-free system
3. 学会等名 Cell-free Synthetic Biology Workshop（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yutetsu Kuruma
2. 発表標題 Construction of a Model Cell Membrane Applicable to the Protocell Study
3. 学会等名 International Symposium on Fluctuation and Structure out of Equilibrium 2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yutetsu Kuruma
2. 発表標題 Construction of an artificial cell for the study of early cells
3. 学会等名 International Conference The Origin of Life - Synergy among the RNA, Protein, and Lipid Worlds (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yutetsu Kuruma
2. 発表標題 Next approach to formulation of artificial membrane
3. 学会等名 Origins of Life (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yutetsu Kuruma
2. 発表標題 Construction of Minimal Cell Based on Cell-Free System,
3. 学会等名 Okazaki Institute for Integrative Bioscience (OIIB) Summer School (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Yutetsu Kuruma
2. 発表標題 Construction of artificial cell based on cell-free syetem
3. 学会等名 , EON International Workshop “Synthetic Approach for The Study of Origin of Life” (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Yutetsu Kuruma, Taku Oshima
2. 発表標題 “Next approach to formulation of artificial membrane”
3. 学会等名 Origin of Life a workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yutetsu Kuruma
2. 発表標題 “Construction of Artificial Cell for the Origin of Cells” ,
3. 学会等名 The Annual Meeting of Japanese Society for Cell Synthesis Research 9.0 (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Yutetsu Kuruma
2. 発表標題 “Construction of Artificial Cell Containing Lipid Synthesis Metabolism” ,
3. 学会等名 Workshop #3 in 18th Annual Meeting of the Society of Evolutionary Studies Japan (招待講演)
4. 発表年 2016年



## 〔図書〕 計2件

1. 著者名 車兪激	4. 発行年 2017年
2. 出版社 CMC出版	5. 総ページ数 215
3. 書名 “無細胞タンパク質合成系とベシクルによる人工細胞の構築”，「人工細胞の創製とその応用」	

1. 著者名 車兪激, 上田卓也	4. 発行年 2016年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 139
3. 書名 「実験医学」 “クローズアップ実験法：PUREシステムを用いた膜タンパク質の無細胞合成”，	

## 〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 光依存的にタンパク質生産可能な人工細胞系の構築	発明者 上田卓也、サミュエル・ベルハヌ・レンマ、車兪激	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-10844	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

## 〔取得〕 計0件

## 〔その他〕

車HP <a href="https://members.elsi.jp/%7Ekuruma/index_e.html">https://members.elsi.jp/%7Ekuruma/index_e.html</a> ELSI HP <a href="http://www.elsi.jp/">http://www.elsi.jp/</a> Website of Yutetsu Kuruma <a href="https://members.elsi.jp/%7Ekuruma/">https://members.elsi.jp/%7Ekuruma/</a> Earth-Life Science Institute <a href="http://www.elsi.jp/">http://www.elsi.jp/</a> YUTETSU KURUMA website <a href="http://gncd.jp/yk_test/index.html">http://gncd.jp/yk_test/index.html</a>
--

## 6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----