

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月7日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23700361

研究課題名（和文） 人工細胞を用いた反応場サイズと内部反応の関係性の解明

研究課題名（英文） The effect of compartment size on the intracompartamental reaction.

## 研究代表者

松浦 友亮（MATSUURA TOMOAKI）

大阪大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：50362653

## 研究成果の概要（和文）：

細胞のサイズは内部の反応にどのような影響を与えているのだろうか？本研究では、既知分子のみを用いて、大きさの異なる微小反応場にタンパク質合成反応を内包した、「人工細胞」を再構成した。次に、これを用いて内部のタンパク質合成反応に反応場サイズが与える影響を調べた。その結果、反応場が小さいほど早く進行する反応の存在を見出し、そのメカニズムを明らかにした。反応場が小さいことが有利に働く一例を実験的に示すことに成功した。

## 研究成果の概要（英文）：

The cell contents are encapsulated within a compartment, the volume of which is a fundamental physical parameter that may affect intracompartamental reactions. However, there have been few studies to elucidate whether and how volume changes alone can affect the reaction kinetics. Here, we prepared artificial cell-like compartments with different volumes, and encapsulated the in vitro protein synthesis system. The effect of the compartment size on the protein synthesis reaction was investigated. We found a reaction that proceeds faster in smaller compartments and revealed the mechanism of the acceleration. This result provided an example of how small compartment can be beneficial for the intracompartamental reactions.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

## 研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：情報学・生体生命情報学

 キーワード：無細胞翻訳系、人工細胞、エマルション、ガラクトシダーゼ、グルクロニダーゼ、  
 蛍光検出、速度論、PURE system

## 1. 研究開始当初の背景

細胞は一般に  $\mu\text{m}$  スケールのサイズを有している。なぜ  $\mu\text{m}$  サイズなのか？サイズが大きすぎても、小さすぎても細胞増殖にとって不利な状況では、適したサイズが存在しうることになる。理論研究では、古くからこうした議論がなされているが [Koch, *Annu Rev Microbiol*, 1996]、実態としてどのようなパラメータがサイズの影響を受けているのかはわかっていない。これを明らかにするため

には、反応場サイズと内部反応ダイナミクスの関係性を解明する必要がある。

実験により、細胞サイズの影響を調べる一つの方法は、サイズだけが異なる細胞を用意し、内部反応のサイズ依存性を調べることである。一方で、生細胞は、この目的のためには構成成分が多すぎて解析が困難であるうえに、サイズを変えることも難しい。また、生体分子を個々に取り出して調べても、反応場サイズと内部反応の関係性はわからない。

つまり、反応場サイズと内部反応ダイナミクスとの関係性を理解することは既存の研究手法では難しい。このためには、反応場サイズ、内部成分組成が任意に調整でき、さらには内部反応ダイナミクスが観測可能な新たな実験系が必要である（図1）。

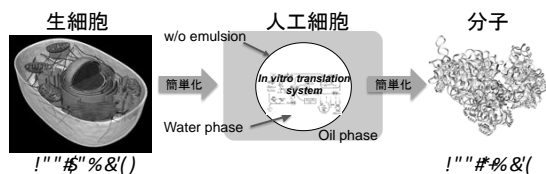


図1：生細胞は反応ダイナミクス解明には複雑すぎ、取り出された分子ではダイナミクスは観測できない。人工細胞は、既知成分のみから再構成されており、反応場サイズ、構成成分の種類、濃度が任意に調節可能である。本研究では、人工細胞を用いて、「内部反応に最適な反応場サイズが存在する」ことを実験で実証することを目的とした。

## 2. 研究の目的

μmスケールの反応場を提供しかつ、そのサイズを容易に調整することが可能なwater-in-oil (w/o) emulsionを用い、その内部に完全再構成無細胞翻訳系 (PURE system [Shimizu *et al.*, *Nat Biotechnol.*, 2001]) を封入した人工細胞を構築することを目指した。さらに、この人工細胞内の反応を計測することで、反応場サイズと内部反応ダイナミクスの関係性を明らかにすることを目的とした。

これまでに、我々を含むいくつかのグループが微小反応場に蛋白質合成系を封入した「人工細胞」を構築している [Noireaux *et al.*, *PNAS*, 2004; Tawfik *et al.*, *Nature Biotechnol.*, 1998 など]。一方で、これらは膜蛋白質生産、進化分子工学等に用いられており、本研究のような反応場サイズと内部ダイナミクスの関係性の解明を目指した研究は世界でも類を見ない研究課題である。さらに、我々の構築する人工細胞は、上記の類似研究と異なり、既知物質のみから構成され、反応場サイズ、反応液組成などが実験的に操作可能である。ゆえに、データのモデル化 (定量的理解、数理解析) が容易であることが期待される。

## 3. 研究の方法

無細胞翻訳系 PURE system は、我々の以前の論文に記載された方法を使って調製したものを用いた (Matsuura *et al.*, *Mol Syst Biol.*, 2009)。

タンパク質合成反応を可視化するために、レポーター酵素である beta-galactosidase (GAL) と beta-glucuronidase (GUS) の合成

を行った。また、それぞれの PURE system 反応液中の合成反応を可視化するために、蛍光基質 TG-bgal と TG-GlcU を用いた。

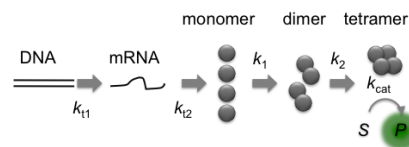
w/o emulsion は、oil 層には decan、界面活性剤には、tween80, span80, AbilEM90 の3種を用いて調製した。w/o emulsion のサイズの調製は、vortex による攪拌強度を調整する方法と 2μm 程度のポアを持つ膜を通過させる方法の2つを用いて行った。

## 4. 研究成果

### (1) GUS, GAL 合成反応の速度論解析

本研究では、反応場サイズと内部反応ダイナミクスの関係性を明らかにすることを目的とした。そのために、内部反応として、再構成型無細胞翻訳系 PURE system による GAL, GUS 酵素合成反応を用いた。

ホモ 4 量体である β-グルクロニダーゼ (GUS) と β-ガラクトシダーゼ (GAL) の合成反応は、それぞれの酵素の蛍光基質を PURE system に加えることで定量化した。GUS, GAL は共に、単量体が会合して 4 量体となって初めて酵素活性を発現する。すなわち、4 量体のみが蛍光基質を加水分解し、蛍光シグナルが生成する (図2)。



	Reaction order	$k_1$ ( $M^{-2}s^{-1}$ )	$k_2$ ( $M^{-3}s^{-1}$ )
GAL	First-order	$2.2 \pm 1.8 \times 10^5$	$1.2 \pm 0.03 \times 10^5$
GUS	Fourth-order	$5.7 \pm 0.8 \times 10$	$5.4 \pm 1.8 \times 10^2$

図2：GAL, GUS 合成反応の模式図。2つの反応ともに DNA から転写・翻訳により、酵素の単量体がまず生成する。この単量体は、2量体、4量体と会合してゆく。2つの酵素共に4量体になって始めて酵素活性を発現する。よって、蛍光基質の加水分解は、4量体酵素が生成して始めて起こる。

我々は、まず bulk での、GUS, GAL 合成反応の速度論解析を行った。これにより、bulk での反応特性を明らかにすることにした。具体的には、反応次数解析や 2 量体、4 量体の会合速度を定量化した。その結果、GAL, GUS は、共に 4 量体を形成する酵素であるが、速度論的には大きくその性質が異なり、GUS 合成反応は 4 次の反応であるのに対し、GAL 合成反応は 1 次であることがわかった。その違いは、GUS は 4 量体形成が、GAL は転写・翻訳反応が反応律速段階であることに起因することもわかった (Matsuura *et al.*, *J Biol Chem.*, 2011)。

(2) GUS、GAL 合成反応の w/o emulsion 内での反応の検出

次に、w/o emulsion 内蛋白質合成系を確立した。具体的には、w/o emulsion 内でのレポーター蛋白質である  $\beta$ -グルクロニダーゼ (GUS) と  $\beta$ -ガラクトシダーゼ (GAL) を用いた合成反応の検出系を構築した。oil 層には decan を使い、界面活性剤として、tween80、span80、Abilem90 の 3 種を様々な濃度で混合して emulsion を作成した。調製した emulsion のうち、合成反応が阻害されず、また、emulsion が 24 時間程度は安定に存在する条件を探索した。その結果、GAL、GUS 合成反応が DNA 濃度の高いところでは、emulsion の液滴のサイズに依存せず、安定的に計測可能な条件を見いだした (図 3)。これにより、サイズの異なる emulsion 内での GUS、GAL 合成反応のリアルタイム検出が可能となった。

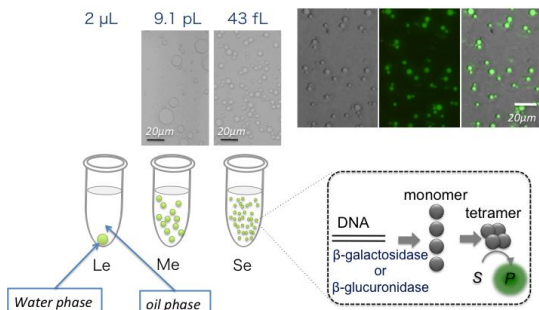


図 3 : w/o emulsion 内での GAL、GUS 合成反応の模式図。2つの反応ともに DNA から転写・翻訳・会合反応を経て生成する 4 量体により蛍光が生成する。我々は、vortex による攪拌強度を調整する方法と 2 $\mu$ m 程度のポアを持つ膜を通させる方法の 2 つを用いて、3 つの異なる平均サイズの w/o emulsion (2  $\mu$ L, 9 pL, 43 fL) を調製した。また、その内部に、GAL、GUS 合成反応を内包した人工細胞を調製した。図の顕微鏡写真は、GUS 合成反応の結果、蛍光基質が加水分解され緑色蛍光が emulsion 内に生成している様子を示している。

(3) GUS、GAL 合成反応の反応場サイズ依存性の解明

最後に、サイズの異なる w/o emulsion における GUS と GAL 合成反応のダイナミクス解析を行った。DNA 濃度を 1 nM から 3 pM まで段階的に下げていき、3 種類のサイズの異なる emulsion 内での蛍光強度の時間変化を計測した (図 4)。反応液量はいずれの emulsion サイズでも合計 2  $\mu$ L であるが、異なるサイズに区画化されている。

その結果、GUS 合成反応は、反応場サイズが小さいほど 4 量体の会合反応が加速され、一方で、GAL ではそのようなサイズ依存性は

見られなかった (図 4)。このように、反応場サイズと内部反応ダイナミクスの関係性を定量的に明らかにすることに成功した。

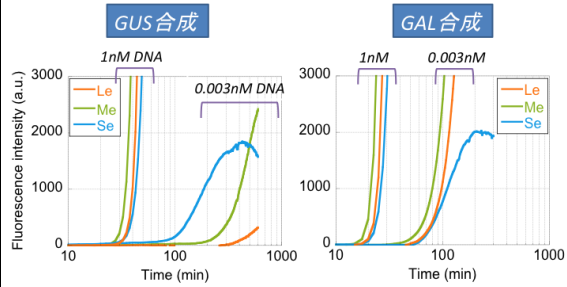


図 4 : w/o emulsion 内での GAL、GUS 合成反応のリアルタイム検出。2つの反応ともに生成した 4 量体酵素が蛍光基質を加水分解することで、初めて蛍光産物が生成する。GUS 合成反応では、DNA 濃度が高いところでは、反応のタイムコースは emulsion のサイズに依存せずほぼ同じであるが、DNA が低いところでは大きく異なる。反応場サイズが小さいほど、早く蛍光上昇が観測されている。GAL では、DNA 濃度の高い、低いに関わらず、同程度のタイミングで蛍光上昇が観測されることがわかる。

GUS 合成反応だけが反応場が小さいほどに、蛍光上昇タイミングが早くなっていた。この結果は、GUS、GAL 合成反応の速度論モデルから予想される結果と合致していた (Matsuura *et al.*, *J Biol Chem*, 2011)。すなわち、GUS 合成反応は、4 量体形成が反応律速になっているのに対して、GAL では 4 量体形成が十分に早く転写・翻訳反応が律速段階になっていることがわかっていった。よって、GUS では、反応場が小さいほど 4 量体形成が早く進行することが予想され、それにより反応場サイズ依存性が生じていると考えられた。

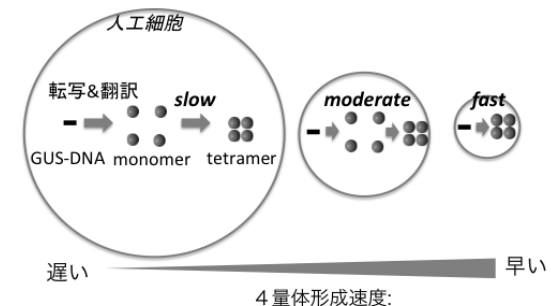


図 5 : GUS 合成反応加速メカニズムの模式図。サイズの異なる区画に 1 分子の DNA が封入された場合、合成される 4 量体は反応場サイズが小さいほど速くなることが予想される。

この仮説をさらに検証するために、数理モデルを構築して、これを実験データと比較し

た。その結果、モデルと実験結果は、定量的に一致していたことが明らかになり、GUS 合成反応の加速メカニズムが妥当であることが示唆された (Matsuura *et al.*, *ACS Synth Biol*, 2012)。

#### (4) 今後の展開

近年我々は、ガラスマイクロチャンバーを開発し、これを使うことで fL サイズの微小反応場において、1 分子レベルの DNA からの転写翻訳反応をパラレル化でき、かつ高精度 (CV<5%) で測定可能なことを示した (Okano *et al.*, *Lab Chip*, 2012)。これにより、反応場サイズを厳密に定義した上で、それが内部反応のダイナミクスに与える影響の詳細な解析が可能となった。今後、チャンバー内で、本研究で用いたような再構成系をより高度化してゆくことで生命システムの設計原理をより詳細に理解できると期待される。

#### 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 5 件)

① Okano T, Matsuura T, Kazuta Y, Suzuki H, Yomo T. Cell-free protein synthesis from a single copy of DNA in a glass microchamber. *Lab Chip* 2012, **12**(15): 2704-2711.

② Matsuura T, Hosoda K, Kazuta Y, Ichihashi N, Suzuki H, Yomo T. Effects of compartment size on the kinetics of intracompartamental multimeric protein synthesis. *ACS Synth Biol* 2012, **1**(9): 431-437.

③ Matsuura T, Hosoda K, Ichihashi N, Kazuta Y, Yomo T. Kinetic analysis of beta-galactosidase and beta-glucuronidase tetramerization coupled with protein translation. *J Biol Chem* 2011, **286**(25): 22028-22034.

[学会発表] (計 3 件)

① 松浦友亮、「細胞サイズの微小反応場における無細胞蛋白質合成技術の確立」、第 7 回「バイオものづくり」シンポジウム、理化学研究所 (和光)、2012 年 3 月 8 日

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: インビトロ膜タンパク質進化分子工学的手法

発明者: 四方哲也、松浦 友亮、曾我遥、渡 邊

肇、藤井聡志

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2012-145795

出願年月日: 2012 年 06 月 25 日

国内外の別: 国内

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

松浦 友亮 (Matsuura Tomoaki)

大阪大学大学院工学研究科・准教授

研究者番号:

(2) 研究分担者

該当無し ( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

該当無し ( )

研究者番号: