

令和 2 年 9 月 8 日現在

機関番号：12608

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2017～2019

課題番号：16KK0161

研究課題名（和文）自己複製型人工細胞の構築による原始細胞の実証研究（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Experimental study for primordial cell by construction of self-reproducing artificial cell (Fostering Joint International Research)

研究代表者

車 兪徹 (Kuruma, Yutetsu)

東京工業大学・地球生命研究所・その他

研究者番号：40508420

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,700,000円

渡航期間： 5ヶ月

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脂質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。本プロジェクトに対し、英ニューカッスル大に滞在し、脂質の過剰生産によりイレギュラーな増殖をするL-formバクテリアの研究に触れ、脂肪酸合成酵素の細胞内局在を可視化した。また、米ハーバード大医学部に滞在し、脂肪酸供給による脂質膜小胞の形態変化観察を行った。これにより研究背景の基盤を固めて国際的な人脈形成を行った。

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。分子と情報を組み合わせて生命現象を再現する試みは人工細胞研究と呼ばれ、今世紀以降大きく注目されている。自己複製を人工系で再現することは究極的には生命を創造することになり、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。そのため、学術的社会的なインパクトが大きい。本研究成果により、自己複製の再現化に大きく資する研究結果が得られた。

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. Regarding this project, I visited to Newcastle Univ. (UK) to study the L-form bacteria which have irregular proliferation system overproducing lipids. I also did in vivo visualization of the fatty acid synthesis enzymes. In Harvard Medical Univ., I studied about protocell, which is thought to have been existed before emerging the modern cells, and its evolutionally meaning. I also performed and observed the vesicle morphological change by supplying fatty acid from outside of vesicles. These overseas experiences solidified the scientific background of my research and brought international human network.

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

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

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言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行えるため、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。例えばメタゲノムデータ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、生物を使用しない生物学の台頭につながると予想される。

人工細胞研究の基盤技術として、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だけで *A* というタンパク質を人工的に数時間のうちに合成することができる。無細胞系の多くは、何かしらの細胞抽出液をベースとしているが、本研究で使用する無細胞系は転写・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、副反応が全く起こらず、極めて純化された状態で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任意の分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を模倣しただけに過ぎず、未だ生命とは呼べない。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まず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合成する人工細胞の構築を行った。

2. 研究の目的

本研究課題は、研究代表者が行う若手 A「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」を基課題とした国際共同研究加速基金である。海外の著名な研究室に滞在し研究生活を共にすることで、学術的研究背景や国際的人脈形成をエンカレッジすることを目的としている。具体的には、イギリス・ニューカッスル大学の Jeff Errington 研究室に滞在し、FtsZ リングの狭窄に依存しない原始的細胞分裂機構を持つ L-form バクテリアについて勉強し、モダン細胞の誕生前に存在していたと考えられる初期細胞の増殖について議論・考察する。また、モダンバクテリアの持つ II 型脂肪酸合成酵素 (FASII) について細胞内局在の観察実験を行う。さらに、アメリカ・ハーバードメディカルスクールの Jack Szostak 研究室に滞在し、化学進化の時代に存在しモダン細胞誕生の起点になったと考えられているプロトセルについて勉強し、特に脂質膜の視点に立った細胞分裂メカニズムの誕生について議論・考察する。また、外部からの脂肪酸供給による脂質膜小胞の形態変化観察を行う。

3. 研究の方法

【FASII の細胞内局在観察 (イギリス)】

枯草菌の FASII 酵素 10 種 (FabD、FabF、FabG、FabHA、FabHB、FabI、FabL、YwpB、YcsD、AcpP)、AcyI-CoA 合成酵素 2 種 (IcfA、IcfB)、リン脂質合成酵素 1 種 (PlsY) について、それぞれ遺伝子上流または下流に多量体を形成しない蛍光タンパク質 (mNeonGreen) を配置したクローンを作製した。これらを枯草菌ゲノムに導入し、細胞内局在を共焦点顕微鏡で観察した。

【脂肪酸の供給による巨大膜小胞の形態変化観察 (アメリカ)】

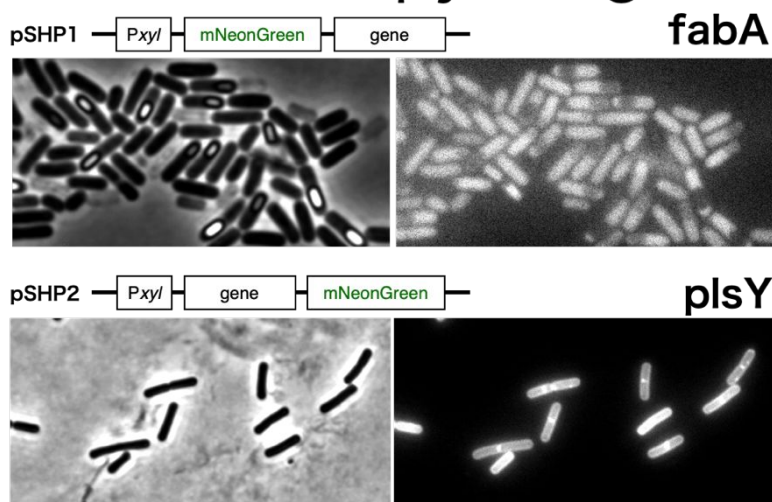
リン脂質 POPC を用いてエマルジョン沈降方法により直径 10–50 μm の巨大膜小胞 (GUV) を調製した。これに 100mM の脂肪酸 (オレイン酸 (C18:1)) を外環境から供給し GUV の形態変化を共焦点顕微鏡でリアルタイム観察した。また、オレイン酸と蛍光リン脂質 (NDB-PC) を一緒に供給し、その GUV 膜への取り込みを観察した。

4. 研究成果

【FASII の細胞内局在観察 (イギリス)】

脂質合成に関わる 13 種の遺伝子全てについてその上流 or 下流に蛍光タンパク質の遺伝子を配置させたクローンを計 26 種作製した。これらを枯草菌のゲノムに導入し、定常状態での遺伝子発現レベルにおける各酵素の細胞内局在を観察した。その結果、脂肪酸合成に関わる 10 種の酵素については、遺伝子上流下流どちらに蛍光タンパク質を配置した場合でも、細胞質に一樣に局在している様子が観察された (下図の fabA)。一方、リン脂質合成酵素である PlsY (遺伝子下流に蛍光タンパク質) は細胞膜に局在している様子が観察された (下図の plsY)。

Microscopy image

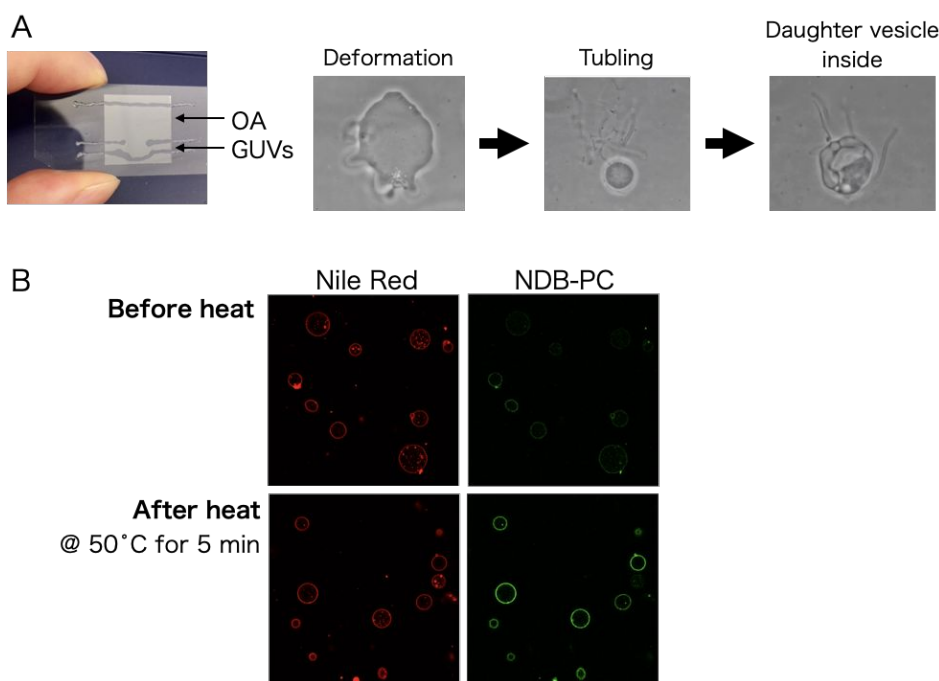


帰国後に行った試験管内脂肪酸合成実験では、脂肪酸 (オレイン酸) 存在下での脂肪酸合成量が著しく低下する結果が得られた。この系ではペリプラズムタンパク質である TesA を共存させることで、合成された脂肪酸をアシルキャリアープロテイン (ACP) から強制的に乖離させている。しかし最終産物の脂肪酸がタンパク質である酵素に付着し不活性化させることで脂肪酸合成活性を低下させていることが示唆された。このことは脂肪酸という分子自体がタンパク質社会である細胞質内では毒であり、細胞はそのリスクを内在した状態で脂質を合成していることを意図している。一方細胞内では、TesA が存在しておらず脂肪酸合成後は細胞膜に局在する PlsY に受け渡され、速やかにリン脂質に変換されて細胞膜に取り込まれる。これによって、細胞質タンパク質の不活性化というリスクを回避し、且つ非常に高効率でプロダクトを細胞膜に輸送している。これらの知見は、基課題の進捗に大きく役立つものであった。

【脂肪酸の供給による巨大膜小胞の形態変化観察（アメリカ）】

POPC を用いてエマルジョン沈降法により GUV を調製した。この手法で調製した GUV は単一層膜から形成されるため、外部から取り込んだ脂肪酸の影響が顕著に現れる。調製した GUV を顕微鏡で観察しつつ脂肪酸を供給したところ、GUV が急速に形態変化を示した。形態変化は主に、GUV のバブリングによる deformation 化、膜の一部がチューブ化することによるメルティング、チューブ化した膜の球状化と mother GUV によるその取り込みと段階的に変化した（下図 A）。これらの結果により、リン脂質膜に異種分子である脂肪酸を供給すると膜が融解し成長しないこと、GUV 膜の表面積の増加スピードと GUV 内体積の増加スピードが釣り合わない場合、余剰膜が GUV 膜の不安定化を引き起こしその後チューブ化すること、さらにチューブ化した膜が球状化し親 GUV の表面積-体積間の不釣り合いからくるストレスを緩和するために内部に取り込まれることがわかった。

脂肪酸ではなく同じリン脂質を供給した場合にどうなるのかを観察するため、脂肪酸の中に蛍光ラベルしたリン脂質を混合し GUV に加えてみた。その結果、GUV 膜へのリン脂質の取り込みを示す蛍光がほとんど見られなかった。このことは、リン脂質は脂肪酸と異なり臨界ミセル濃度が極端に低いため、準安定状態の GUV 膜に移行しないことを示す。さらにこの状態で温度を室温から 50 度まで上昇させ観察したところ、顕著な蛍光が GUV 膜から観察された（下図 B）。このことは、温度上昇により脂質分子の挙動を活発化され、外部のリン脂質が GUV 膜に取り込まれやすくなったことを示す。



このアメリカで得られた結果から、脂肪酸の内部合成による人工細胞の自己成長ではなく、リン脂質まで内部合成する必要があること、また合成だけではなく GUV 膜へ挿入する仕組みも必要であることがわかった。そのため帰国後、研究計画を変更し、PIsY と PIsX によるリン脂質合成系膜挿入系とカップルさせることにした。

ハーバードメディカル大に滞在していた時に知り合った Szostak Lab の Dr. Anna Wang とは帰国後も連絡を取り合い人工細胞やプロトセルの自己複製メカニズムに関して議論を重ねている。その一環として、国際共同研究グラントである Human Frontier Science Program (HFSP) の 2020 年リサーチグラントに採択された（代表 PI: 車）。

現在これらの研究成果をまとめた論文を作成中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3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） https://doi.org/10.1038/s41467-019-09147-4	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） https://doi.org/10.1038/s41598-018-37809-8	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） https://doi.org/10.3390/challe10010028	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 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 4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

〔図書〕 計0件

〔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、車愈澈	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、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〕

<p>website of yutetsu kuruma https://members.elsi.jp/%7Ekuruma/</p>

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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	エリントン ジェフ (Errington Jeff)	ニューカッスル大学・Center for Bacterial Cell Biology・Professor	
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	シヨスタック ジャック (Szostak Jack)	ハーバード大学・Harvard Medical School・Professor	