

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：82706

研究種目：学術変革領域研究(B)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H05156

研究課題名（和文）複数構成因子からなる細胞機能を創発する人工細胞システムの構築

研究課題名（英文）Construction of artificial cell platform consisting of multi-components

研究代表者

車 愈徹（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（超先鋭研究開発プログラム）・主任研究員

研究者番号：40508420

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 25,600,000円

研究成果の概要（和文）：細胞の自己複製能を再現するために、細胞膜の自己成長を人工細胞形で再現する実験をおこなった。具体的には試験管内でリン脂質を合成する系を構築し、これをリン脂質膜小胞の内部で反応させた。その結果、母人工細胞膜の約10%にあたる100 $\mu$ Mのリン脂質を合成することに成功した。これにより、自己成長する人工細胞の技術基盤を構築することができた。この成果をもとに、原著論文2報と共著論文1報を報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非生物である分子と遺伝子から生きた細胞を作り出す人工細胞研究は、生命システムの包括的な理解につながる研究である。また、全ての分子の種類と濃度が把握できる人工細胞系は、新たな遺伝子発現システムとしての利用価値が高い。これは多くの生命科学分野において基本的な技術になるだけでなく、創薬や物質生産などの産業に結びつくものである。今回の成果は人工細胞研究の1番の課題である、“自己複製の再現化”を解決するための、最も合理的で実現可能性の高い手法であるといえる。そのため当該研究分野を今後大きく発展させるものであるといえる。

研究成果の概要（英文）：In order to reproduce the self-reproduction ability of cells, we tried to construct an artificial cell system that can be self-growing by producing the cell membrane. Specifically, we constructed an in vitro system synthesizing phospholipids by combining a fatty acid synthesis system and a cell-free gene expression system, which synthesizes 3 membrane protein enzymes, and we performed phospholipid synthesis within phospholipid membrane vesicles. As a result, we succeeded in synthesizing 100 $\mu$ M of phospholipid, which is about 10% of the mother artificial cell membrane. This made it possible to build a technological foundation for self-growing artificial cells. Based on this result, we reported two original papers and one co-authored paper.

研究分野：合成生物学

キーワード：合成生物学 人工細胞 無細胞合成系 脂質膜 リン脂質

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質や脂質などの生体分子と遺伝子を組み合わせることで細胞機能を再現する人工細胞研究は、これまでの膨大な生化学と遺伝学の知見を、巨視的なシステムとしての理解に昇華させる役割を担うものである。無細胞タンパク質合成系やマイクロ流体デバイスなど、先端テクノロジーを組み合わせることで人工細胞実現化の見通しが近年つき始めている。細胞を丸ごと物質から再構築する試みは、初期地球環境中で誕生した細胞の様相を知るための有効な手がかりとなる学問的位置付けがある。“非生物である分子の集合体からなぜ生命現象が創発するのか”という生命科学の根源的な謎について、再現することで直接的に理解することが人工細胞研究の命題である。

我々はこれまで、光合成 (*Nat. Commun.* 2019) や細胞分裂システム (*ACS Synth. Biol.* 2018) などについて、生細胞と近似した機能を持つ人工細胞の構築に成功してきた。一方、自己複製をどのように再現するかという点は人工細胞研究の最も重要な課題である。特に細胞膜の成長と分裂については再現化に成功した例が未だ報告されていない。真に生きた人工細胞を構築し、工業的、学術的に広く応用するためには、自己複製の再現化につながる研究ブレイクスルーが必要である。

### 2. 研究の目的

- (1) リン脂質で形成された巨大膜小胞(GUV)の内部でリン脂質を合成し、膜の自己成長と分裂を促すシステムを構築する。
- (2) A01班と連携し、細胞核を模した人工膜(または油中水滴)システムを構築する。
- (3) A02班と連携し、プロトン濃度勾配を形成する人工膜小胞を構築しSecマシナリーの機能解析を行う。
- (4) C01班と連携し、人工細胞システムの分子動力学計算によるシミュレーションを行う。

### 3. 研究の方法

- (1) 脂肪酸合成酵素(FAS) 9種類をリコンビナントタンパク質として大腸菌の系で発現・精製した。これを無細胞タンパク質合成系 PURE システムと統合した。PURE システムでは、脂肪酸(FA)とグリセロール 3 リン酸(G3P)からリン脂質ホスファチジン酸(PA)を合成する3種類のアシルトランスフェラーゼ(PlsX, PlsY, PlsC)を合成した。さらにこの系に、副産物として生じる CoA を再利用するためにアセチル CoA 合成酵素(ACS)とアセチル CoA カルボキシラーゼ(ACC)を投入した。この試験管内システムを GUV に内包し、内部での PA 合成と膜局在化をおこなった。PA の膜局在化は PA 特異的に結合する Spo タンパク質に緑色蛍光タンパク質をフュージョンさせたマーカータンパク質 (GFP-Spo) の GUV 膜結合を観察することで評価した。
- (2) ヒト細胞核の核内膜局在タンパク質 LaminA と Emerin、さらに核酸結合タンパク質 BAF を PURE システムで共合成し、その可溶性度をウエスタンブロッティング法により評価した。さらに、LaminA と Emerin にそれぞれ異なる蛍光タンパク質をフュージョンしたタンパク質を GUV の内部で合成しその局在を観察した。
- (3) 当初の目的を変更し、高難度精製タンパク質である、SecDE-SecY-SecA 融合タンパク質 (SecDFYA) を PURE システムにより合成した。合成したタンパク質は SDS-PAGE により可視化した。
- (4) 膜タンパク質のトランスメンブレン領域を Alpha Fold2 (AF2) により構造予測した。

### 4. 研究成果

- (1) 再構築した脂肪酸合成系と、アシルトランスフェラーゼを合成する PURE システムを組み合わせた系に、アセチル CoA とマロニル CoA を加えて反応させたところ、反応開始後 30 分ほどで、100-200 $\mu$ M の PA の合成が確認できた。PA 合成量が頭打ちになったタイミングで NADPH と基質を段階的に追加した結果、最大 400 $\mu$ M の PA 合成量が確認できた。副産物として生じる CoA を循環させるため、ACS と ACC を加えて反応させたところ、反応開始後 30 分で約 100 $\mu$ M の PA 合成が確認できた。この場合の、PURE システムに内在する酢酸と、反応溶液中の HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> を FA 合成の炭素源として使用した。全ての反応系を GUV に内包するために、CoA と NADPH のタンパク質合成に対する影響を調べた結果、NADPH 存在下では PURE システムのタンパク質合成効率が著しく低下する結果が得られた。一方で、NADPH は GUV 膜外から膜内へ受動拡散することがわかった。そのため、GUV 内包時には NADPH 抜きで反応系を調製し、膜内のタンパク質合成後に膜外から NADPH を添加することで、膜内の脂質合成反応をドライブさせた。

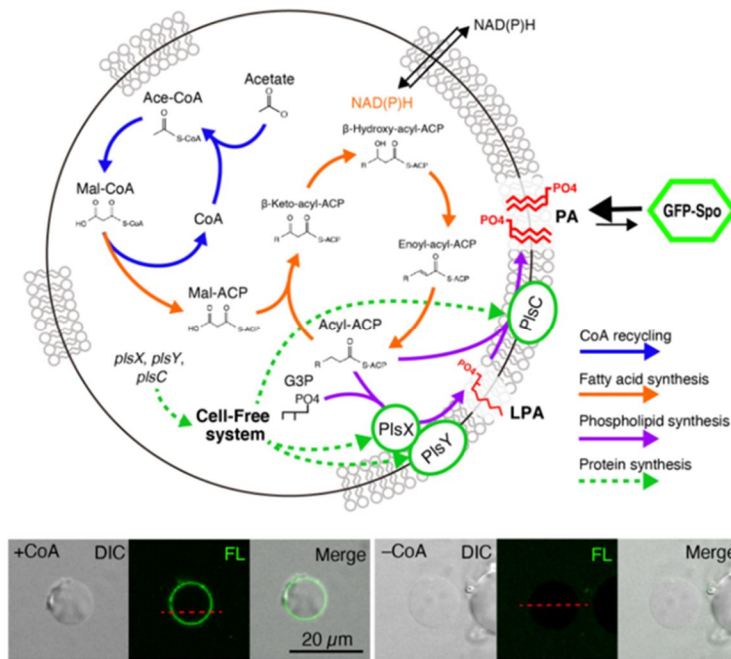


図 1. 脂質を合成する人工細胞.

反応後の GUV に GFP-Spo を反応させ、膜上の PA に依存した膜局在の有無を共焦点顕微鏡で観察した。その結果、GUV 膜上での GFP-Spo の明確な局在が観察された。アシルトランスフェラーゼを合成しない場合、CoA を欠損させた場合、NADPH を転嫁しなかった場合にはいずれも GFP-Spo の膜局在は見られなかった。これらの結果から、設計通りに人工細胞内部で脂肪酸合成とリン脂質合成が連続して行われことを証明した (図 1)。

- (2) LaminA, Emerin, BAF の遺伝子を PURE システムに加えてタンパク質合成をおこなった結果、それぞれのタンパク質の合成が確認された。しかし、遠心処理による可溶性評価では、LaminA と Emerin は 50%以下にとどまり、BAF に関してはほぼ 100%不溶化していた。次に 2 種のタンパク質を同時に合成したところ、BAF と LaminA を共合成した場合のみ LaminA がほぼ 100% 可溶化する結果が得られた。しかし、3 種同時に合成した場合には、LaminA の可溶化度は 50%以下に戻ってしまった。BAF の可溶化度には変化はなかった。これらの結果から、LaminA は BAF と結合しており、それにより可溶性を維持することがわかった (図 2)。

次に LaminA-BFP タンパク質を人工細胞内で合成したところ、合成された LaminA が膜内で凝集している様子が観察された。しかし BAF を共合成したところ、Lamin-BFP の凝集の消失と膜への局在が観察された。このことは、in vitro の結果と生合成を示すものであり、BAF が LaminA の構造維持と膜局在化に寄与することが証明された。一方 RFP-Emerin を合成した場合、良好なタンパク質合成は見られたものの、膜への局在は全く見られなかった。しかし、C 末端側に位置するトランスメンブレン領域を、独自に見出した膜局在化配列に置き換えたタンパク質を合成したところ、膜に局在する傾向が観察された。これにより人工核膜モデルの準備が進んだ。

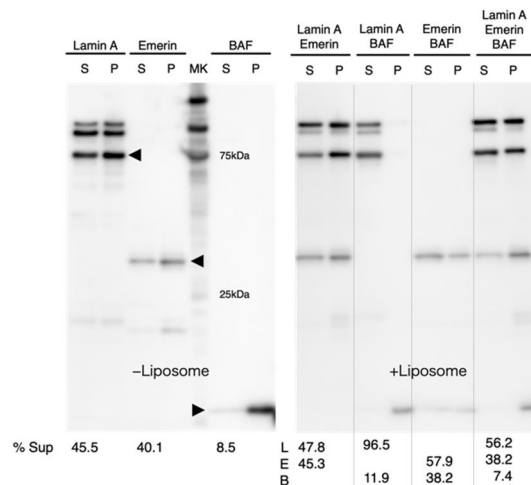


図 2. 核膜タンパク質の PURE 合成と可溶化度(%Sup). S: 上清画分, P: 沈殿画分.

- (3) SecDFYA をリポソーム存在下・非存在下の PURE システムで合成し、遠心処理により可用化度を評価した。その結果、SecDFY は膜タンパク質であるにもかかわらず、予想に反してリポソーム無しでも可溶性を維持しており、逆にリポソームを入れるほど不溶化する結果となった（図 3）。本研究は継続して行うことが困難と判断したため、この時点でペンディングした。

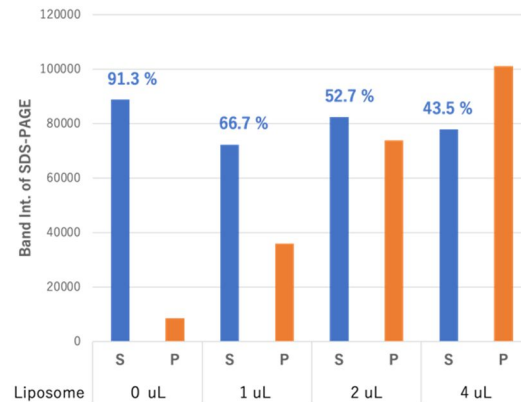


図 3. SecDFYA の合成と可溶化度の評価.

- (4) 無細胞合成系でのタンパク質合成と同時にリポソーム膜に局在化することが知られている膜タンパク質から、適当なトランスメンブレドメイン(TM)を選出し、脂質二重膜中での局在を分子動力学計算でシミュレーションする試みをおこなった。その第一段階として、モデルとなる TM の構造を AF2 で構造予測した。しかしながら C01 班森の異動に伴い、十分な共同研究の時間が確保できなかったため、本研究をペンディングすることとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Matsumoto Rena, Niwa Tatsuya, Shimane Yasuhiro, Kuruma Yutetsu, Taguchi Hideki, Kanamori Takashi	4. 巻 12
2. 論文標題 Regulated N-Terminal Modification of Proteins Synthesized Using a Reconstituted Cell-Free Protein Synthesis System	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ACS Synthetic Biology	6. 最初と最後の頁 1935 ~ 1942
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acssynbio.3c00191	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 Shimane Yasuhiro, Kuruma Yutetsu	4. 巻 10
2. 論文標題 Rapid and Facile Preparation of Giant Vesicles by the Droplet Transfer Method for Artificial Cell Construction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Bioengineering and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 873854
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fbioe.2022.873854	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 Eto Sumie, Matsumura Rumie, Shimane Yasuhiro, Fujimi Mai, Berhanu Samuel, Kasama Takeshi, Kuruma Yutetsu	4. 巻 5
2. 論文標題 Phospholipid synthesis inside phospholipid membrane vesicles	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1016
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-022-03999-1	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14件（うち招待講演 11件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 車愈激
2. 発表標題 無細胞タンパク質合成系の高度化と社会応用
3. 学会等名 第9回Yet another Artificial Cell (YAC)研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 車兪激
2. 発表標題 人工細胞システムの更なる高度化・複雑化と応用
3. 学会等名 第23回日本蛋白質科学会年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yutetsu Kuruma
2. 発表標題 Functional expression in artificial cell system composed of multi-subsystems
3. 学会等名 The 61th Annual Meeting of the BSJ（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yutetsu Kuruma
2. 発表標題 Construction of autopoietic artificial cell -toward construction of self-reproducing man-made cells-
3. 学会等名 ALIFE 2023（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 車兪激
2. 発表標題 膜内反応場で脂質を合成する人工細胞
3. 学会等名 第46回日本回分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 車 愈澈
2. 発表標題 人工細胞構築のストラテジーとその挑戦
3. 学会等名 理研ワークショップSynthetic Biology –生物学の新たな潮流（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 江藤澄江、松村るみ系、嶋根康弘、藤見麻衣、サミュエル・ベルハヌ、笠間健嗣、車愈澈
2. 発表標題 リン脂質の膜の中でリン脂質を合成する人工細胞
3. 学会等名 「細胞を創る」研究会2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 車 愈澈
2. 発表標題 膜にフォーカスした人工細胞研究
3. 学会等名 第63回 生物物理若手の会夏の学校（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 車 愈澈
2. 発表標題 無細胞リン脂質合成系の構築
3. 学会等名 第16回無細胞生命科学研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yutetsu Kuruma
2. 発表標題 Construction of artificial cell system for analysis of multi-component cellular functions
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yutetsu Kuruma
2. 発表標題 Cell-free construction of cellular functions towards artificial cell construction
3. 学会等名 Future trends and Emerging Technologies in Synthetic Biology Workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yutetsu Kuruma
2. 発表標題 Lipid synthesis in artificial cell
3. 学会等名 The 60th Annual Meeting of the BSJ (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 車 愈澈
2. 発表標題 分子と遺伝子から再構築する人工細胞とその展望
3. 学会等名 第4回分子サイバネティクス・第48回分子ロボティクス定例研究会 (招待講演)
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 車 俞澈
2. 発表標題 分子と遺伝子からビルドアップする人工細胞研究
3. 学会等名 第38回緑陰セミナー&若手交流会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------