

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：32702
研究種目：基盤研究(B)
研究期間：2011～2013
課題番号：23350060
研究課題名(和文) 繰り返し自己生産するベシクル型人工細胞の構築

研究課題名(英文) a

研究代表者

菅原 正 (Sugawara, Tadashi)

神奈川大学・理学部・教授

研究者番号：50124219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,400,000円、(間接経費) 3,420,000円

研究成果の概要(和文)：1) 光学顕微鏡観察およびフローサイトメトリによるベシクル集団解析のデータより、ベシクル内でのDNAの自己複製とベシクルの分裂が連動するダイナミクスを解明した。2) 親ベシクルの自己生産で生じる娘ベシクルに、枯渇したヌクレオチドを包みこんだ運搬ベシクルを融合させることで、娘ベシクルに自己増殖能を獲得させた。3) ベシクル型人工細胞には、外的および内的刺激に対して、それぞれ選択的に活性化される4つのステージ(摂取、複製、成熟、分裂)があること、さらに、各ステージでの内部的变化が、ベシクルを次のステージへと駆動していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：1) Linkage between self-replication of DNA and self-reproduction of giant vesicles (GVs) was revealed on the basis of observation by optical microscopy and the populational analysis of groups of GV. Although daughter GV produced from the mother GV, were depleted with dNTP (deoxyNucleoside TriPhosphate), they adhered conveyer GV filled with dNTP and fused with each other under the acidic condition. Hence daughter GV acquired recursive ability; they were able to self-replicate DNA and self-divided after addition of the precursor of a membrane lipid. They also gave birth to granddaughters according to the same procedure. 3) It was found that this self-reproduction cycle consisted of four stages (Ingestion, Replication, Maturity, and Division), and each stage was promoted to the next by events which occurred in GV.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基盤研究B

キーワード：膜・集合体 ベシクル

1. 研究開始当初の背景

研究を始めた時点で、前生物的(prebiotic)物質を用いる構成的アプローチ(Constructive Approach)で人工細胞を構築する研究としては、Luisi らのオレイン酸ベシクル内で RNA を複製し、その後でベシクルの自己生産を行なうという先駆的研究成果があった[Luisi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **207**, 250 (1995)]. また、Szostak らは、情報分子(DNA)の非酵素的複製と、それらの反応系をくみ込むベシクルの分裂について報告していた[Szostak, *Nature* **454**, 122 (2008)]. しかしこれらの研究では、いずれも両ダイナミクスは独立に進行しており、現実の細胞分裂に見られる情報分子の増幅が、細胞分裂のトリガーとなるといった因果律はない。一方、著者らは、カチオン性膜分子を含むベシクルの自己生産系において、世界で初めて、二つのダイナミクスに明確な因果律が存在する系を提示したが、まだ学術論文を出すまでの完成度にはなかった。

2. 研究の目的

21 世紀の自然科学の最大の課題である生命の起源の分子論的解明を目指し、超分子化学的手法を駆使して人工細胞の構築を行う。本研究では、情報分子(ポリアニオンである DNA)と相互作用しうる親水部に電荷をもつ膜分子、およびその前駆体を種々合成し、内部で情報分子の自己複製が進むと、それと連動して反応容器に当たるベシクル(両親媒性分子で出来た袋状の二分子膜)の自己生産が起こり、内部に情報をもったベシクルが増殖する反応系の構築を行なう。さらに、ベシクル融合を用いた分子輸送系で成分を補強することで、自己生産が繰り返し起こる「人工細胞」の実現を目指す。

3. 研究の方法

繰り返し自己生産するベシクル型人工細胞の実現に向け、求心力のある研究を展開する。第二世代のベシクルに、運搬ベシクルを利用し枯渇したヌクレオチドを摂取させ、再び自己増殖を可能にする(回帰性の獲得)。ベシクル膜の成分である両親媒性分子の親

水部の電荷、ポリアニオンである DNA の最適化、あるいは代替となりうる人工ポリアニオンの探索についても検討し、安定した自己増殖が繰り返し可能となる条件を確立する。

4. 研究成果

1) 回帰性をもつベシクル型人工細胞の構築

a) ベシクル内でのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)条件の最適化により、高い頻度で DNA 複製を達成し学術論文として発表した[*Soft Matter* **7**, 3750(2011)]. また、世界初の DNA の複製とベシクルの自己生産が連携する人工細胞を構築し、顕微鏡によりその膜ダイナミクスを観察すると共に、フローサイトメトリーによる自己生産ダイナミクスの統計的解析を行い、それらの成果を学術論文として発表した[*Nature Chem.* **3**, 775 (2011)].

b) 膜組成として2種のリン脂質(POPC,POPG)を異なる比率で保有する、標的ベシクルおよび運搬ベシクルを用意し、混合分散液を酸性(pH=3)にすると、それぞれのベシクル膜表面が反対の電荷を帯び、ベシクル接合とそれに引き続くベシクル融合が起こり、コンペイヤベシクルに内封された化学物質が輸送されることを見出した。[*Chem. Lett.*, **41**, 789 (2012)].

c) この方法を用いて、ヌクレオチドを内封した運搬ベシクルを、原料が枯渇した自己生産後のベシクルに融合させ、融合後のベシクルにポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を施したところ、融合したベシクル内で DNA が増幅したことを内封した蛍光プローブの発光により確認した。ベシクル型人工細胞の自己生産ダイナミクスが回帰性を獲得したことになる。さらに、このベシクル分散液に、膜分子前駆体を添加すると、ベシクルの分裂が起こることも確かめられた。以上の結果より、繰り返し自己生産するベシクル型人工細胞の基盤が確立した。

d) 自己生産ベシクルは、外的および内的刺激[pHジャンプ、温度昇降、DNA-C(触媒)複合体の膜侵入、膜分子前駆体添加]に対し

て、それぞれ選択的に活性化される4つのステージ (摂取、複製、成熟、分裂) があること、さらに、各ステージでの内部的变化が、ベシクルを次のステージへと駆動していることが明らかになった。これは細胞周期にも通じるものであり、ベシクル型人工細胞として「生きている状態」を現出したともいえる。今後の人工細胞の研究にとって重要な成果である。

2) ベシクル型人工細胞における膜分子および内封DNAの調律

a) ポリエチレングリコール (PEG) 鎖を親水部に持つ脂質(DSPE-PEGn: 重合度22,113) をベシクル膜に約1mol%程度添加することで、DNAと膜との相互作用を立体的かつ電子的に穏やかに阻害した。その結果、これまでパディングのみであった膜の変形の様相が異なり、優先的にパーシング様の変形が起こることを見出した。

b) 上記の膜組成を持つベシクルに、鎖長の異なる鑄型DNA (374,1164,3200 塩基対) を内封し、増幅した。その後、膜分子前駆体を添加し、共焦点レーザー走査型顕微鏡観察により、ベシクルの分裂ダイナミクスの違いを詳細に観測した。その結果、DNA鎖長が自己生産ダイナミクスに明確な影響を与えることを見出した。この結果は、DNAの遺伝子型とベシクルの形質型としての自己生産ダイナミクスの相関を検討する上での恰好の成果である。

3) 自己複製系のベシクル膜の表面電荷の多様化

本課題研究では、将来的に、より安定に繰り返し自己生産するベシクル型人工細胞を見出すための布石として、カチオン性膜分子以外の膜分子の合成と、それをを用いたベシクルの自己生産能についても研究を遂行した。新規双イオン性膜分子を合成し、その膜分子で形成したベシクルの膜電位をゼータポテンシオスタットで測定し、膜電位の特異なpH依存性を見出した[学会発表

済]。また、親水部にリン酸基をもつ新規アニオン性膜分子の合成法を確立した[学会発表済]。カチオン性膜分子からなるベシクルに、各種DNAを外水相から添加し、カチオン性ベシクル膜への付着能をゼータポテンシオスタットの測定から評価する手法を確立したので、本申請研究期間終了後も、DNAの機能を担いうる人工ポリカチオンの探索を継続する予定である。

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・総説](計 13 件)

- [1] K. Shohda, M. Tamura, Y. Kageyama, K. Suzuki, A. Suyama, T. Sugawara, Compartment size dependence of performance of polymerase chain reaction inside giant vesicles, *Soft Matter*, **7**, 3750-3753 (2011)
DOI:10.1039/C0SM01463J
- [2] T. Tomita, T. Sugawara, Y. Wakamoto, Multitude of Morphological Dynamics of Giant Multilamellar Vesicles in Regulated Nonequilibrium Environments" *Langmuir*, **27**, 10106-10112 (2011)
DOI:10.1021/la2018456
- [3] K. Kurihara, M. Tamura, K. Shohda, T. Toyota, K. Suzuki, T. Sugawara, Self-reproduction of supramolecular giant vesicles combined with the amplification of encapsulated DNA, *Nature Chemistry*, **3**, 775-781 (2011)
DOI:10.1038/nchem.1127
- [4] K. Suzuki, R. Aboshi, K. Kurihara, *T. Sugawara, Adhesion and Fusion of Two Kinds of Phospholipid Hybrid Vesicles Controlled by Surface Charges of Vesicular Membranes, *Chem. Lett.* **41**, 789-791 (2012)
DOI:10.1246/cl2012.789
- [5] K. Suzuki, K. Kurihara, Y. Okura, T. Toyota, *T. Sugawara, pH-Induced Switchable Vesicular Aggregation of Zwitterionic Phospholipids and Anionic Phospholipids, *Chem. Lett.* **41**, 1084-1086 (2012) DOI:10.1246/cl2012.1084
- [6] H. Sato, S. Ushiyama, M. Sogo, M. Aoki, K. Shudo, T. Sugawara, S. Yanagisawa, Y. Morikawa, S. Masuda, Local electronic properties at organic-metal interfaces:

thiophene derivatives on Pt (III), *Phys. Chem. Chem. Phys.* **14**, 15412-15420 (2012)
DOI:10.1039/c2cp42700a

[7] M. Iwasaka, Y. Miyashita, Y. Mizukawa, K. Suzuki, T. Toyota, T. Sugawara, Bi-axial alignment control of guanine crystals by diamagnetic orientation, *Appl. Phys. Exp.* **6**, 037002-1-4 (2013).

DOI: /10.7567/APEX.6.037002

[8] 庄田耕一郎, 栗原謙輔, 菅原正, 人工細胞 (原始細胞モデル)との化学的構築, 遺伝: 生物の科学, **66**, No4, 365-373 (2012)

[9] Y. Kageyama, N. Tanigake, Y. Kurokome, S. Iwaki, S. Takeda, K. Suzuki and T. Sugawara, "Macroscopic motion of supramolecular assemblies actuated by photoisomerization of azobenzene derivatives", *Chem. Commun.*, **49**, 9386-9388 (2013). [裏表紙に採用](#)

DOI:10.1039/C3CC47786J

[10] K. Takakura, T. Yamamoto, K. Kurihara, T. Toyota, K. Ohnuma and T. Sugawara, "Spontaneous transformation from micelles to vesicles associated with sequential conversions of comprising amphiphiles within assemblies", *Chem. Commun.*, **50**, 2190-2192 (2014)

DOI:10.1039/C3CC43488E

[11] T. Mochida, Y. Funasako, K. Takazawa, M. Takahashi, M. M. Matsushita, T. Sugawara, "Chemical Control of the Monovalent-Divalent Electron-Transfer Phase Transition in Biferrocenium-TCNQ Salts", *Chem. Commun.*, **50**, 5473-5475 (2014)

DOI:10.1039/c4cc01296h

[12] 菅原正, 鈴木健太郎, 栗原謙輔, 豊田太郎, 分子システムとしてつくる人工細胞, 豊田研究報告, **67**, 63-70 (2014)

[13] 菅原正, 鈴木健太郎, 自らが増殖する人工細胞の化学構築, 高分子, 6月号, No.6, 382-384 (2014)

{学会発表(招待講演のみ)}(計 19 件)

(1) International Conference "Engineering of Chemical Complexity" (4-8 July 2011, Harnack House, Berlin) Mini-symposium 6: "Nonequilibrium soft matter", "Self-Reproduction of Giant Vesicle Combined with Amplification of Encapsulated DNA."

(2) 14th International Symposium on Novel Aromatic Compounds (ISNA-14) (2011年7月24 - 29日), Plenary Lecture "Cross- π -conjugated TTF-based Donor Radical as a Building Block of Molecular Spintronics"

(3) Special Seminar, "Chemical Approach Towards a Protocell Model" (29 July 2011, Minnesota University, Minneapolis)

(4) Symposium on "Inorganic Biology and Protocells: Engineering Artificial Life", University of Glasgow (13 September 2011, UK)

(5) The 11th European Conference of Molecular Electronics (ECME 2011) (in Barcelona 9月7-10日, 2011). "Manipulating Molecular Electronics Composed of Redox of Redox-active π -systems"

(6) 第84回日本生化学会、菅原正, 特別講演「脂質生化学の新展開 脂質機能に迫る新しい構成論的アプローチ」ベシクル型人工細胞への構成的アプローチ」2011年9月24日、国立京都国際会館

(7) International Association of Colloid and Interface Scientists, Conference (IACIS2012), Japan, T. Sugawara, K. Kuriharara, T. Toyota, K. Suzuki, Invited Lecture, "Vesicular transport of depleted ingredients to a self-reproduced model protocell", May, 13-18, 2012 Sendai

(8) 第123回東北大学金属材料研究所講演会, 仙台, 菅原正, 招待講演「構成的アプローチによる生命システムの再構築」2012年5月23日、東北大学金属材料研究所

(9) 第23回基礎有機化学討論会、京都、菅原正, 招待講演「分子システムとしてみた生体機能 - 自己複製、自己生産、自律運動 - 」2012年9月21日、京都コルサ

(10) 2nd Discussion Symposium on Artificial Life and Biomimetic Functional Materials, Japan, T. Sugawara, et al., Keynote lecture, "Proposal of an Evolvable Protocell", Dec. 11, 2012, Sapporo.

(11) 第35回日本分子生物学会年会, 福岡, 菅原正, 招待講演, セッション「自己組織化と生命: 分子と生命をつなぐ架け橋 (Self-organization in life: the essence to

- build up life from molecules)」"Sustainable Model of Giant Vesicle-based Protocell", T. Sugawara, K. Kurhara, T. Toyota, K. Suzuki, Dec. 14, 2012, Fukuoka
- (12) 2012 Exchange Symposium for Kanagawa University –National Taiwan University, Taiwan, T. Sugawara, "Giant Vesicle-based Sustainable Ptoocell", National Taiwan University, Dec., 29, 2012, Taipei.
- (13) "Approach to Evolvable Protocell", T. Sugawara, International Workshop "From Soft Matter to protocell" September 18-20 (2013), Sendai, Japan.
- (14) "Artificial Cell Viewed as a Molecular System", T.Sugawara, Okazaki Institute for Integrative Bioscience, Summer School 2013 "Bioorganization" August 22–24 (2013), Okazaki, Japan.
- (15) "Emergence of Active Site for Self-reproducing Dyanmics in Vesicle-based Protocell", T. Sugawara, The 2nd International Symposium on Dyanmical Ordering of Biomolecular Systems for Creation of Intergerated Functions, January 11-12 (2014), Kyoto, Japan.
- (16) "分子システムとしてみた人工細胞", 菅原正, 第4回 CIMoS(Research Center of Integrative Molecular Systems: 分子科学研究所)セミナー 2013年07月22日
- (17) "Artificial Cell Constructed as a Molecular System" T. Sugawara, 第7回分子科学討論会, 京都テルサ, 2013年9月24-27日
- (18) "分子システムとしての人工細胞", 菅原正, 公益財団法人 豊田理化学研究所第13回フェロー研究報告会 2013年12月11日
- (19) "外的刺激により繰り返し自己増殖するベシクル型人工細胞", 菅原正, 第2回 NINS Colloquium 自然科学の将来像 セッション3 新物質と新機能 - インテリジェントマテリアル - 2013年12月16日
- 〔図書〕(計 5 件)
- (1) 菅原正 他, 羊土社, 実験医学 増刊: 細胞を創る・生命システムを創る、第1章 1「生体膜モデルから増殖型人工細胞へ—膜分子設計からのアプローチ」2011、221、PP26-40

- (2) 濱田嘉昭、菅原正 編、NHK 出版、現代化学、2013、293
- (3) T. Sugawara, K.Kurihara, K.Suzuki, World Scientific, Constructive Approach Towards Scientific, Constructive Approach Towards Protocells" in Engineering of Chemical Complexity, World Scientiffc Lecture Notes in Complex Systems (Eds, A.S. Mikhailov, G.Ertl) 2013, pp359-374
- (4) T.Sugawara, A. Miyazaki, Pan Stanford Pub. "Magnetism Conductivity" in Multifunctional Molecular Materials (Ed .L., Ouahb)、2013、PP-160,
- (5) 菅原正、木村榮一編、超分子の化学、裳華房、2014、211

〔その他〕

ホームページ等

神奈川大学理学部化学科の教員紹介
<http://www.chem.kanagawa-u.ac.jp/detail/id213/html>

東京大学大学院複雑系生命システムセンター
<http://rcis.c.u-tokyo.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅原正 (神奈川大学理学部化学科 教授)

研究者番号: 50124219

(2) 研究分担者

高倉 克人 (鈴鹿工業高等専門学校 准教授)、平成23年度のみ

研究者番号: 60396843