

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26650044

研究課題名(和文)細胞と同等の成分を持つ人工細胞の高機能化による生命構成の必要条件解明

研究課題名(英文)Elucidation of the way to reconstruct living cells through functionalization of artificial cells having components equivalent to cells

研究代表者

藤原 慶 (Fujiwara, Kei)

慶應義塾大学・理工学部(矢上)・助教

研究者番号：20580989

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では人工細胞を生細胞に近づけその性質を解析することで、生命を構成するために必要な条件を明らかにするための基盤を構築することを目的とした。この試みを通し、細胞分裂面を決定するタンパク質局在波の人工細胞内における起動条件を見出した。また、生細胞と同様に多種多様の膜タンパク質を保持した人工細胞の構築を目的とした新規人工細胞融合法の開発と、ゲノムDNAを無細胞系によって機能的に転写翻訳する系の確立、ゲノムを転写する人工細胞の構築を行った。本研究で開発された手法や得られた知見は、生細胞のように振る舞う人工細胞を創成するための重要な基盤となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to establish fundamental technologies for realizing reconstruction of living cells from biomolecules. Through this study, we found the condition for emergence of a bacterial protein localization wave, which determines the cell division plane, in fully confined lipid spaces. We also developed a novel fusion method for artificial cells to introduce a large variety of membrane proteins to lipid membrane on artificial cells as well as living cells. Furthermore, we established an in vitro transcription-translation system for genomic DNA, and successfully detected mRNA transcribed from genome in artificial cells. The findings and methods developed in this study are expected to be an important platform for creating artificial cells behaving like living cells.

研究分野：合成生物学

キーワード：合成生物学 人工細胞 膜タンパク質 ゲノム 無細胞転写翻訳 細胞再構成

1. 研究開始当初の背景

生命科学の知見が膨大になるとともに、2000年頃から細胞を創るという試みが国内外で盛んになってきている。その中で、物質から生命に迫る研究として、脂質二重膜小胞(リポソーム)とタンパク質合成系を用いた人工細胞構築の試みがある。しかし、現存する人工細胞系では高分子が生細胞内の1/30の濃度しか内包されておらず、細胞内のように高分子濃度が30%を超えるような系では混雑効果により生化学反応が希薄系と異なった振る舞いをするため、この状況は解決すべき課題であった。

我々は、バクテリア細胞である大腸菌を少量の超純水添加条件で超音波破砕することにより、細胞同様に機能的な細胞抽出液の調製に成功した(藤原 & 野村 2013 PLoS ONE)。さらにこの『無添加』細胞抽出液をリポソームに封入し、生細胞内と濃度・成分が同等である人工細胞(Life-mimicking artificial cells, L-MAC)の構築に成功(藤原ら、原著はACS Synth. Biol. 2014, 論文1に総説を发表)している。この材料は現存する人工細胞の中で最も生細胞に近いが、一定濃度以上ではタンパク質合成が機能しない、生細胞に比べて物質拡散が格段に遅い、という一種の死細胞のような状態であった。この原因として、現在のL-MACには膜タンパク質やゲノムDNAが欠けていることが挙げられた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、膜タンパク質やゲノムのような構造体の、攪拌や濃度勾配のような物理場等の導入を通し、L-MACが生命に漸近するために必要な条件を生物物理学的視点から解析することで、生命と物質の本質的な違いを明確にすることを目的とした。

3. 研究の方法

人工細胞に様々な生命機能、L-MACsをより生命へと近づける基盤を創成する。そのために、(1)攪拌因子候補の人工細胞内再構成、(2)大腸菌内膜タンパク質群を保持した人工細胞の創成、(3)ゲノムの転写翻訳と人工細胞への導入、を行った。

4. 研究成果

(1) 攪拌因子候補の人工細胞内再構成

バクテリアにおける細胞分裂面決定システムであるMinシステムは、タンパク質の局在移動波を形成し、細胞の極から極へと移動する。このようなタンパク質集団の移動は攪拌物質として作用するのではないかと考え、Minシステムの人工細胞内における再構成を試みた。先行研究で平面膜上においてMinシ

ステムの構成要素(MinD、MinE)が局在波を形成することが知られていた。そこで、大腸菌の極性脂質を用いて作製した油中水滴に、これらの要素をATPとともに封入し、その挙動を観察した。しかし平面膜では通常に機能する条件であるのにも関わらず、人工細胞内では全く波としての挙動を示さなかった。この問題はタンパク質の精製方法や塩濃度や塩の種類を検討しても解決しなかった。

そこで高分子混雑が反応と拡散の両方に影響を与えることに着目し、MinD、MinE、ATPとともに高濃度の高分子混雑剤を混合した。結果、人工細胞中を往復する振動モードや、膜面を順次移動する移動モードが観察された(図1)。MinDと相互作用するMinCを投入した場合にも同様の結果が得られた。しかし、高分子混雑剤を細胞抽出液に置換した場合はMin局在波が動かず、そのためにL-MACsの機能化にMinシステムが関与するかの解析には成功していない。しかし、構築したMinシステムの人工細胞内再構成は、Min研究分野や反応拡散機構を解析する物理分野に対し大きな寄与をする成果である。

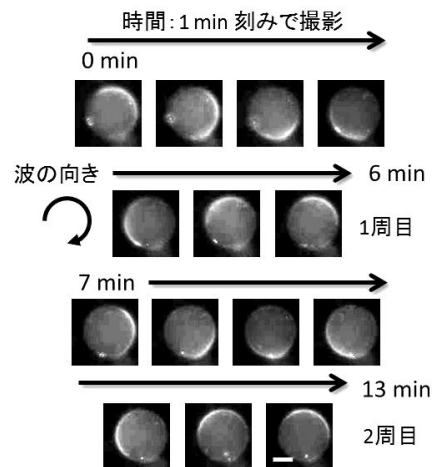


図1. 人工細胞中におけるMinDE局在波の再構成

蛍光像はMinDを蛍光タンパク質で標識したものをタイムラプス撮影したものである。スケールバー: 10 μm

(2) 大腸菌内膜タンパク質群を保持した人工細胞の創成

細胞の表層には体積分率で50%を占める膜タンパク質が存在する。細胞の膜タンパク質は極めて種類が多く、単純な生命体である大腸菌においても千種類にもものぼる。これまでに数種のタンパク質を人工細胞膜上に再構成する研究は数多くなされてきたが、生細胞に存在する膜タンパク質群をまとめて人工細胞に導入する方法は知見が乏しかった。そこで先行研究を参考に、大腸菌の内膜成分をまるごとナノサイズの小胞として精製し、その後マイクロメートルサイズの人工細胞と

融合させる手法を検討した。融合は膜小胞に存在するタンパク質に蛍光標識を行うことによって評価した。

まず、研究途中で別グループによって報告された凍結融解による融合手法を検討した。結果、人工細胞表層に融合を示唆する蛍光シグナルを検出することができたが、凍結融解前と比較し内部のタンパク質成分が漏出していることが確認された。

次に、伝統的な手法であるカチオンやポリエチレングリコールを組み合わせた融合を試みた。結果、凍結融解と比較し、非常に効率よく細胞同士が融合することが観察された(図2)。また、融合途上でのタンパク質成分の漏出はほとんど観察されなかった。この手法においても、内膜から精製した小胞と人工細胞が融合していることが確認できた。

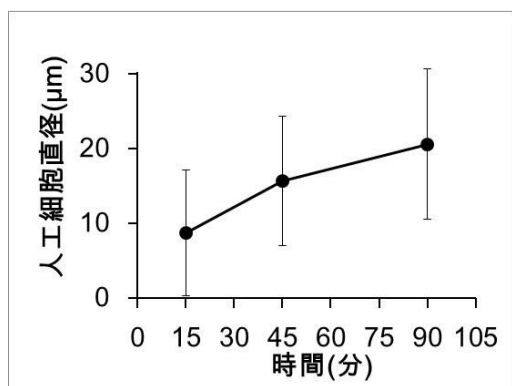


図2 .本研究で開発した人工細胞融合手法を用いた場合の人工細胞直径の変化

約100個の人工細胞の直径平均値と標準偏差を表示している

(3) ゲノムの転写翻訳と人工細胞への導入

ゲノムは生命の遺伝子を全てコードするが、その物理的実体は非常に長い紐状の物質である。それゆえ、せん断力による切断や多価カチオンによる凝集を示し、無細胞転写翻訳系で用いられるサイズのプラスミドDNAとは物性が大きく異なる。それゆえに試験管内でMbpサイズのゲノムを転写翻訳可能であるかは謎であった。

本研究では、高度好熱菌 *Thermus* 属細菌のゲノムを鋳型とし、高効率な転写翻訳を行う大腸菌の無細胞転写翻訳系と混合することで、転写や翻訳が生じることを確認することとした。本研究では大量の大腸菌細胞抽出液を用いる必要があったが、研究環境におけるセットアップにおいて、既存の手法では転写翻訳可能なグレードの抽出液を安定して得ることは困難な状況であった。そこで新たにLOFT法と名付けた、リゾチーム処理、浸透圧処理、凍結融解を組み合わせた新規な細胞抽出液調製法を確立した(論文2、図3)。この

手法により、以後の研究に活用可能な抽出液の安定的な用意が可能となった。

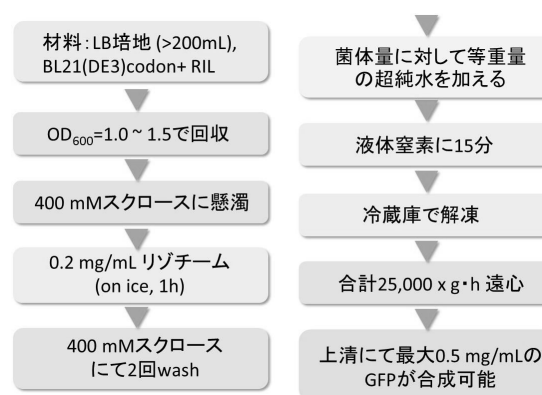


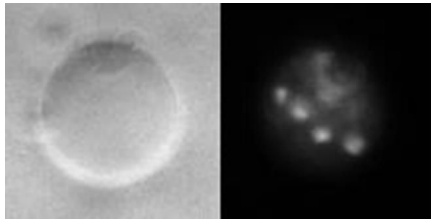
図3 . LOFT法プロトコール

*Thermus*ゲノムとLOFT法で調製した細胞抽出液を混ぜ、転写翻訳が起きることを最終産物であるタンパク質の解析によって行った。そのために高感度ウエスタンブロッティングや銀染色、nano LC-MS/MSを行った。結果、複数のタンパク質がゲノムから発現していることが確認された。ただしその量は微量であり、細胞内における発現量と定量的に比較することは困難であった。

そこで微量でも高感度かつ定量的に検出可能であるRNA成分に着目した。ゲノムを転写後にqRT-PCRによって複数の遺伝子の発現量を解析した。結果、細胞内で1コピーから1000コピーのレンジで転写されるmRNA量と非常によく相関する発現プロファイルが得られた。遺伝子がゲノム中に分散し、発現量に差が見られる解糖系に着目したところ、定常期の細胞から回収したゲノムを試験管内で転写した場合、対数増殖期の細胞内とよく相関した量のRNAが発現することが確認された。

次にゲノムを人工細胞に導入する手法を検討した。本研究で人工細胞を形成する手法として用いている界面通過法は内包物に対する許容性が高く、途中段階で作製する油中水滴に内包できるものは概ね全て人工細胞であるマイクロサイズリボソーム中に封入可能である。そこで、安定して形成可能な油中水滴に着目し、ゲノムが封入される条件を検討した。低分子や高分子成分を検討した結果、非常に効率的にゲノムDNAを油中水滴内に封入することが可能になった。また、試験管内同様に転写反応を行ったところ、確かにRNAが合成されることが確認できた。

このゲノムを含む油中水滴を脂質が溶けた油と水の界面を通過させリボソームへと変換させたと、ゲノムを封入した人工細胞の形成が確認された(図4)。



**図4．大腸菌ゲノムを封入した
20 μm 直径のリボソーム**

左：透過構造

右：DNA 染色像ゲノムを封入した人工細胞

(4)総括

以上のように、細胞分裂面決定因子、内膜タンパク質群、ゲノム DNA を保持した人工細胞を創成するための手法を確立した。当初の目的ではこれらの因子を活用し、L-MAC の高機能化に寄与するかを解析することが目的であったが、いずれも新規手法や重要な理学的知見の蓄積を伴って初めて達成できる状況であったため、基礎技術の開発に注力した。本研究で開発された手法や得られた知見は、生細胞のように振る舞う人工細胞創成に向けた重要な基盤となることが期待される。

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 2 件)

- 1) K Fujiwara & N Doi, 査読有
Biochemical preparation of cell extract for cell-free protein synthesis without physical disruption
PloS one, 11(4), e0154614, 2016 年,
- 2) K Fujiwara, M Yanagisawa, S.M. Nomura, 査読有, Reconstitution of intracellular environments in vitro and in artificial cells,
BIOPHYSICS, 10, pp.43-48, 2014 年

〔学会発表〕(計 13 件)

- 1) 澤村経人, 土居信英, 藤原慶, ゲノム DNA を鋳型とした無細胞タンパク質合成, 第 39 回日本分子生物学会, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市), 2016/12/01
- 2) 上口裕介, 土居信英, 藤原慶, 大腸菌の内膜タンパク質群を保持する人工細胞の創成, 細胞を創る研究会 9.0, 早稲田大学(東京都, 新宿), 2016/11/21-22
- 3) 澤村経人, 出山達貴, 土居信英, 藤原慶, ゲノム DNA を転写翻訳する人工細胞創成への挑戦, 細胞を創る研究会 9.0, 早稲田大学(東京都, 新宿), 2016/11/21-22
- 4) S Kouyama, K Fujiwara, N Doi, Reconstitution of Min System in Artificial Cells, Pacifichem2015,

Hawaii Convention Center, Honolulu, USA. 2015/12/18

- 5) 植木明日香, 藤原慶, 土居信英, 進化システム工学に向けた耐熱性 DNA ポリメラーゼの改変, 細胞を創る研究会 8.0, 大阪大学(大阪府、吹田市), 2015/11/12-13
- 6) 藤原慶, 生細胞の模倣から細胞再構成に迫る, 細胞を創る研究会 8.0, 大阪大学(大阪府、吹田市), 2015/11/12
- 7) 藤原慶, Creating Life-mimicking Artificial Cells toward re-building living cells, 第 53 回生物物理学会年会, 金沢大学(石川県、金沢市), 2015/09/15
- 8) 光山隼史, 土居信英, 藤原慶, 細胞内振動を示すタンパク質の液滴内挙動, 第 8 回関東ソフトマター研究会, 慶應義塾大学(神奈川県・横浜市), 2015/08/08
- 9) 藤原慶, 物質の混合による細胞まるごと再構成研究の現状, 第 12 回 21 世紀大腸菌研究会, 琵琶湖グランドホテル(滋賀県、大津市), 2015/06/05
- 10) 光山隼史, 土居信英, 藤原慶, 人工細胞内における Min システムの再構成, 「細胞を創る」研究会 7.0, 東京大学弥生講堂(東京都文京区), 2014/11/13-14
- 11) 柳澤実穂, 藤原慶, 粘弾性流体を内包したリボソームの膜変形, 生物物理学会第 52 回年会, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市), 2014/09/25
- 12) K Fujiwara, M Yanagisawa, SM Nomura, Bad properties of molecular crowding for the beginning of life: A deduction from an in vitro reconstitution of physiological molecular crowding, Open Question of Origin of Life, 国際口頭研究所(京都府木津川市), 2014/07/12
- 13) 藤原慶, 大腸菌と同等の成分を内包する人工細胞の構築と解析, 第 11 回 21 世紀大腸菌研究会, ホテル大観(岩手県盛岡市), 2014/06/06

〔図書〕(計 1 件)

- 1) 藤原慶 他, CMC 出版, 『人工細胞の創製とその応用』, 2016、214、pp.134-142 の執筆

〔産業財産権〕

- 出願状況(計 0 件)
取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://user.keio.ac.jp/~kfujiwara/>

6．研究組織

(1)研究代表者

藤原慶 (FUJIWARA, Kei)
慶應義塾大学・理工学部(矢上)・助教
研究者番号: 20580989