

博士論文

人工細胞の遺伝子発現活性に対する
分子クラウディング環境が及ぼす影響

森泉 芳樹

第 1 章	序論.....	6
1.1	生命システムの試験管内再構成.....	6
1.1.1	生命科学における <i>in vitro</i> 再構成技術の役割.....	6
1.1.2	<i>In vitro</i> 技術の進化.....	6
1.2	無細胞タンパク質合成系とその応用.....	8
1.2.1	二種類の無細胞タンパク質合成系.....	8
1.2.2	無細胞タンパク質合成系を用いたタンパク質合成反応の解析.....	9
1.2.3	無細胞タンパク質合成系を用いた進化分子工学や、その他の応用研究.....	10
1.3	微小容器への <i>in vitro</i> 再構成 –人工細胞–.....	11
1.3.1	人工細胞研究の意義.....	11
1.3.2	人工細胞の「中身」と「器」.....	11
1.3.3	タンパク質合成機能を持つ人工細胞とその応用.....	13
1.3.4	自律的に増殖する「生きた」人工細胞の作製に向けて.....	15
1.4	生きた細胞と人工細胞の違い.....	17
1.4.1	なぜ人工細胞から生命は生まれないのか.....	17
1.4.2	分子クラウディング効果と、 <i>in vitro</i> 再構成系に与える影響.....	18
1.4.3	クラウディング剤として働く浸透圧調整物質「オスモライト」.....	21
1.5	本研究の目的と概要.....	22
第 2 章	大腸菌と微細加工デバイスの融合による Hybrid 型人工細胞の開発.....	24
2.1	背景.....	24
2.1.1	生きた細胞に限りなく近い人工細胞を生み出すためには？.....	24
2.1.2	微細加工デバイス ALBiC の開発.....	24
2.1.3	バクテリアのプロトプラスト化.....	26
2.1.4	本章の目的.....	27
2.2	大腸菌と ALBiC チャンバーの融合.....	28
2.2.1	蛍光タンパク質と蛍光色素を用いた融合現象の可視化.....	28
2.2.2	融合確率の評価.....	30
2.2.3	プロトプラストの膜成分の融合.....	31
2.3	Hybrid cell の遺伝子発現活性の評価.....	33
2.3.1	ALBiC への DNA 導入によるタンパク質翻訳活性の測定.....	33
2.3.2	精製された β -gal を用いた合成量の評価.....	37
2.3.3	ALBiC への mRNA 導入によるタンパク質翻訳活性の測定.....	38
2.4	細胞質の希釈割合と遺伝子発現活性の相関.....	38
2.5	Hybrid cell の膜変形現象の調査.....	42
2.6	Hybrid cell 内への大腸菌の導入.....	43
2.7	大腸菌破裂型人工細胞の開発.....	45

2.8	本章の考察と展望.....	47
2.8.1	ALBiC チャンバーとプロトプラスト型大腸菌の融合確率.....	47
2.8.2	Hybrid cell の細胞膜機能の評価.....	47
2.8.3	Hybrid cell の遺伝子発現活性の評価.....	48
2.8.4	Hybrid cell の細胞分裂能と、L-form バクテリアの利用.....	50
2.8.5	大腸菌破裂型人工細胞の可能性：細胞質の濃縮とゲノム導入技術.....	50
2.8.6	本章の総括.....	52
第 3 章	オスモライトと無細胞タンパク質合成系を用いた分子クラウディングの評価.....	54
3.1	背景.....	54
3.1.1	本章の目的.....	54
3.2	蛍光タンパク質発現に対するオスモライトのクラウディング効果.....	55
3.2.1	オスモライト存在下での蛍光タンパク質 Venus の合成.....	55
3.2.2	オスモライト存在下での蛍光タンパク質 tdTomato の合成.....	58
3.3	オスモライト存在下における β -galactosidase の発現.....	60
3.3.1	タンパク質合成反応と酵素反応の同時計測による評価.....	60
3.3.2	タイムラプスサンプリング法による、 β -gal 合成反応の評価.....	62
3.4	異なる DNA 濃度からのタンパク質発現におけるオスモライトの影響.....	64
3.5	mRNA をテンプレートとしたタンパク質発現におけるオスモライトの影響.....	66
3.6	SDS-PAGE を用いた、翻訳反応に与えるオスモライトの影響の評価.....	67
3.7	人工細胞の遺伝子発現活性に対するオスモライトの分子クラウディング効果.....	73
3.8	本章の考察と展望.....	79
3.8.1	オスモライトの分子クラウディング効果の評価と、先行研究との比較.....	79
3.8.2	オスモライト効果の温度依存性.....	79
3.8.3	TMAO とベタインの分子構造的比較.....	80
3.8.4	遺伝子発現反応の各過程におけるオスモライトの影響.....	80
3.8.5	オスモライトが翻訳反応を活性化させる仕組みと、タンパク質の種類によるオスモライト効果の違いに関する考察.....	81
3.8.6	微小な人工細胞チャンバー内での遺伝子発現におけるオスモライト効果.....	83
3.8.7	今後に向けた改良点：オスモライト物質を含んだ PURE システムの調製.....	83
3.8.8	本章の総括.....	84
第 4 章	総括.....	85
付録 1	実験手法.....	87
S-1.1	各種生化学実験操作.....	87
S-1.1.1	大腸菌の培養.....	87
S-1.1.2	プラスミド抽出（アルカリ融解法）.....	88

S-1.1.3	制限酵素処理とアガロース電気泳動.....	89
S-1.1.4	形質転換 (Transformation)	90
S-1.1.5	In-Fusion Cloning.....	90
S-1.1.6	DNA 塩基配列の解読.....	92
S-1.1.7	タンパク質精製.....	94
S-1.2	微細加工デバイスの作製.....	95
S-1.2.1	微細加工用フォトマスクの作成.....	95
S-1.2.2	マイクロ膜チャンバー「ALBiC」の作製.....	101
S-1.3	大腸菌と ALBiC チャンバーの融合による Hybrid cell の構築.....	103
S-1.3.1	使用した大腸菌の菌株と蛍光タンパク質発現用プラスミド DNA の調製.....	103
S-1.3.2	大腸菌のプロトプラスト化.....	104
S-1.3.3	Hybrid cell の作製.....	105
S-1.3.4	共焦点顕微鏡による顕微鏡観察.....	107
S-1.3.5	大腸菌の細胞膜の染色と、ALBiC チャンバーへの融合.....	108
S-1.3.6	Hybrid cell の遺伝子発現反応.....	109
S-1.3.7	Hybrid cell 内大腸菌の作製.....	110
S-1.4	無細胞タンパク質合成系とオスモライトを用いた遺伝子発現反応.....	111
S-1.4.1	使用したオスモライト試薬.....	111
S-1.4.2	遺伝子発現反应用テンプレート遺伝子の調製.....	111
S-1.4.3	無細胞タンパク質合成系 PURE システムを用いた遺伝子発現反応.....	112
S-1.4.4	プレートリーダーを用いた蛍光の時間変化の測定.....	112
S-1.4.5	SDS-PAGE を用いた遺伝子発現反応の定量.....	113
S-1.4.6	人工細胞デバイスの遺伝子発現活性の測定.....	116
付録 2	補足データ.....	119
S-2.1	ALBiC チャンバーの膜上に乗るプロトプラストの個数の評価.....	119
S-2.2	クロロホルムを溶媒とする脂質溶液を用いて作製された Hybrid cell.....	120
S-2.3	大腸菌破裂型人工細胞の遺伝子発現活性の評価.....	121
S-2.4	プロトプラストの大きさの分布.....	123
S-2.5	オスモライト存在下での人工細胞内 Venus 発現反応の解析について.....	123
S-2.5.1	蛍光強度の定量に利用した Fiji アルゴリズム.....	123
参考文献	126
謝辞	136

略語一覽

ATP	Adenosine triphosphate
AU	Arbitrary unit
bp	Base pair
BSA	Bovine serum albumin
β -gal	β -galactosidase
CFP	Cyan fluorescent protein
Da	Dalton
DHFR	Dihydrofolate reductase
DMSO	Dimethyl sulfoxide
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FDG	Fluorescein di- β -D-galactopyranoside
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
mRNA	messenger RNA
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polyethylene glycol
PURE system	Protein synthesis Using Recombinant Elements system
SAM	Self-assembled monolayer
SD	Standard deviation
TMAO	Trimethylamine <i>N</i> -oxide
tRNA	transfer RNA

第 1 章 序論

1.1 生命システムの試験管内再構成

1.1.1 生命科学における *in vitro* 再構成技術の役割

この 100 年間で大きく進化した生命科学の歴史において、生命システムの試験管内再構成、いわゆる *in vitro* 再構成技術は欠かすことのできない大きな役割を担ってきた。1950 年代、ワトソンとクリックは、DNA が複製される原理を推察したが¹、それを証明したのは、コーンバーグらによる遺伝子複製因子の試験管内再構成実験であった。遺伝子複製に重要と予測される複数の因子を抽出し、それを試験管内に再構成することで、DNA 複製を担う DNA ポリメラーゼが特定された^{2,3}。これを機に確立されていった遺伝子工学技術は、まさに遺伝子に関連する反応を試験管内で再構成させる技術であり、いまや生命科学のあらゆる研究分野において必要不可欠な技術である。

生細胞の観察から機能を解析する研究手法 (*in vivo*) とは相補的な関係にある *in vitro* 再構成は、注目する生命現象に関係する要素のみを試験管内に再構成し、その特性を理解する目的で行われる。*In vitro* 再構成の利点・特長は以下の点で説明される⁴；(i) 細胞内の複雑な反応ネットワークの中から対象の反応を取り出すことで、その反応のみを着目でき、反応機構や分子的メカニズムをより詳しく調べることができる。(ii) 既知の物理的性質、あるいは生化学的相互作用のみで制御されたシンプルな系を作ることで、予想外の挙動を示す可能性がある。そしてそのような現象を理解することで、反応の新たな知見を得ることにもつながる。(iii) 反応系の空間や時間をコントロールでき、関連するパラメータ数も少なくなるため、反応の数値モデル化が容易になる。

生命現象を理解するという目的の一方で、対象の生体反応系を再現性良く、容易に再現できることを理由に、*in vitro* 再構成技術は産業界でも有効活用されている。*In vitro* 再構成で作られた反応溶液キットの製品化や、医薬品や抗体の生産⁵、あるいは大規模な反応溶液系を利用したバイオ生産⁶のように、*in vitro* 技術は応用研究や産業界でも欠かせないものとなっている。

1.1.2 *In vitro* 技術の進化

試験管内における遺伝子分子の自在な切り貼りを可能にした遺伝子操作技術は、*in vitro* 再構成技術の代表例である。今やあらゆる生命科学の分野において必要不可欠なツールである PCR 増幅反応もその一つと言える。この技術を活用することで、Venter らを始めとするいくつかの研究チームによって、バクテリアのゲノムサイズの巨大な DNA 分子が人工的に合成された⁷⁻¹¹。これらの研究では、人工合成した短い DNA 鎖を宿主細胞内に導入し、その中で一本の大きな DNA 分子につなげている。宿主細胞内での反応と増殖をベースとした技術であるため、実験手法の難しさや膨大な時間がかかる点が、産業界等への応用を難しくしている。一方、宿主細胞を利用せずに、巨大環状ゲノム DNA 複製システムを *in vitro* 再構成することに成功した報告もある¹²。この驚くべきシステムでは、遺伝子複製のために必要な 25 のタンパク質を精製し、組み合わせる

ことで、試験管内で複製反応が実現する系を構築した（図 1-1）。その再現性は非常に高く、実験操作も簡便であるため、キットの製品化にも成功し、産業界への貢献も期待されている。

遺伝子工学関連以外の *in vitro* 再構成技術の中では、細胞を用いないタンパク質合成系、いわゆる無細胞タンパク質合成系（Cell-free protein synthesis）が最も確立された技術である。タンパク質合成に必要な要素を全て含んだ溶液系に、目的タンパク質をコードした遺伝子を添加するだけで、容易に目的タンパク質を得ることができる。その用途に応じて、様々な種類の溶液系が存在し、その多くが反応キットとして製品化されており、学術的、産業的な応用研究は数多い（後述）。

この他にも、細胞機能を *in vitro* 再構成させる研究は数え切れない程多い。例えば、細胞の動きや形態変化を人工的に再現するために、細胞骨格であるアクチンの再構成による細胞運動機能の再現¹³や、有糸分裂紡錘体の再構成¹⁴、細菌の細胞分裂において重要な役割を担うタンパク質である FtsZ¹⁵⁻¹⁷ や MinD・MinE¹⁸ の再構成などの研究が行われてきた。また、細胞内の代謝反応の *in vitro* 再構成も古くから生化学の分野などで行われてきた。特に、細胞内エネルギーを合成する役割を担う ATP を生産する電子伝達系や、そこに含まれる ATP 合成酵素は、顕微鏡観察下での *in vitro* 再構成を介して、一分子計測の研究対象としても有名である^{19,20}。最近では、より細胞内に近い状態での機能解析を行うために、ATP 合成酵素を顕微鏡上で人工膜に再構成し、一分子計測するような報告もある^{21,22}。

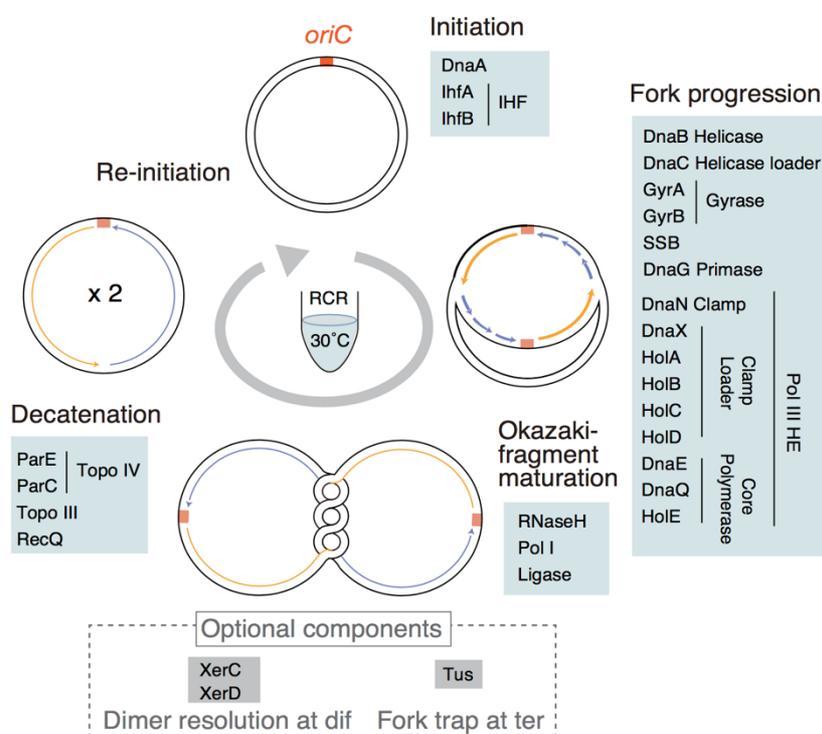


図 1-1 巨大環状 DNA の *in vitro* 複製系「Replication-Cycle Reaction (RCR) システム」

Su'etsugu, et al., *Nucleic Acids Res.* (2017)より引用¹²。

このように、*In vitro*再構成技術は今や、細胞内で行われるあらゆる反応を人工的に試験管内再構成できると言っても過言ではなく、さらには、生きた細胞そのものを人工的に創り出すことも実現に近づきつつある。実際、「微小な試験管内」に各種生体分子を導入することによって、細胞に類似した環境での *in vitro*再構成を行う研究が多く報告されるようになった。このような系は「人工細胞」と呼ばれ、近年最も活発な研究分野の一つである^{23,24}。人工細胞が大きく注目されている一つの要因が、生きた細胞を人間の手で創り出すという、生命科学における究極のゴールが根底にあるからであろう。これはつまり、Louis Pasteur によって唱えられた「生物は生物からしか生まれぬ」という破られたことのないドグマに挑む挑戦である（1.3 項参照）。

1.2 無細胞タンパク質合成系とその応用

1.2.1 二種類の無細胞タンパク質合成系

最も確立された *in vitro*再構成技術である、無細胞タンパク質合成系は、反応の容易さや反応性の良さなどから、人工細胞研究を含め、数多くの応用研究で用いられてきた。無細胞タンパク質合成系には、一連の遺伝子発現反応に必要なタンパク質、核酸分子、基質などが全て含まれている。その調製方法は、大きく分けて二種類ある。一つは細胞抽出液を用いる方法で、もう一つが、個々の構成分子を細胞から分離精製し、組み合わせる方法である。

前者の細胞抽出液を用いて *in vitro*再構成された無細胞タンパク質合成系は、以前から数多く報告されている方法である。生きた細胞の破碎によって得られた細胞抽出液に、テンプレートとなる DNA を加えることで、タンパク質を合成させる。使用される細胞の種類は、大腸菌、小麦胚芽、ウサギ網赤血球など多岐に渡っていて²⁵⁻²⁸、市販のキットとして製品化されているものも多い。系の反応効率を上げるための研究も数多く行われており²⁹、現在は、長時間持続する高効率な反応が実現している。

もう一つの無細胞タンパク質合成系は、細胞から分離精製したタンパク質や、人工的に合成された基質などの低分子化合物を集めて組み立てられた系である。その代表例が、清水らによって開発された、大腸菌由来のタンパク質で構成された無細胞タンパク質合成系 Protein synthesis Using Recombinant Elements (PURE) システムである^{30,31}。このタイプの無細胞タンパク質合成系では、細胞抽出液型よりも各要素のコントロールが可能であるため、タンパク質合成反応の数理モデル化や、パラメータ探索に適している^{32,33}。

これらの無細胞タンパク質合成系は、従来の細胞内でのタンパク質合成と比較して、構成要素が化学的に既知である点、宿主細胞自身の成長や増殖に依存せず、迅速なタンパク質合成が実現する点、そして非天然化合物を組み込んだタンパク質合成ができる点などの特長から、様々な応用研究に用いられてきた³⁴⁻³⁶。

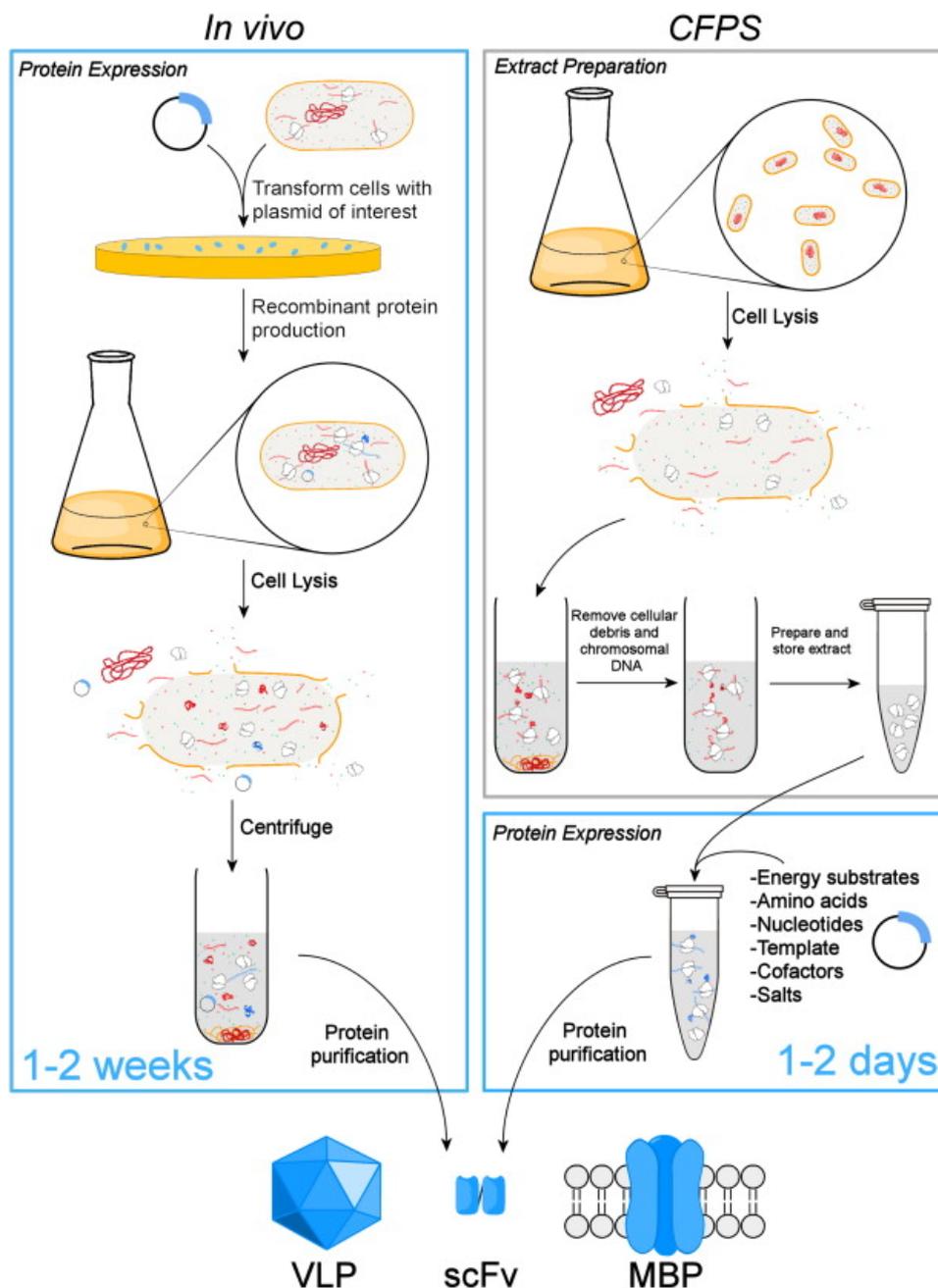


図 1-2 *In vitro*無細胞タンパク質合成系と、*In vivo*タンパク質合成系の比較

宿主細胞を用いたタンパク質合成と、細胞抽出液由来の無細胞タンパク質合成系を用いたタンパク質合成の比較。Carlson, *et al.*, *Biotechnol. Adv.* (2012)より引用³⁶。

1.2.2 無細胞タンパク質合成系を用いたタンパク質合成反応の解析

無細胞タンパク質合成系、特に PURE システムのような、一つ一つのタンパク質を精製し組み立てたものは、系を構成する要素が既知である点や、各条件を自由にコントロールできる点を理由に、遺伝子発現反応の数値モデル化による解析に適している。松浦らは、PURE システムの各要素の濃度を変動させた際の遺伝子発現活性の変化を評価することで、遺伝的な Epistasis 現象を定量的にモデル化した³²。彼らはその他にも、PURE システムを用いた酵素の合成から、多

量体会合プロセスの速度論的な解析も行っている³³。

また、無細胞タンパク質合成系は、翻訳反応における分子機構の解明にも役立てられている。田口らのグループは、無細胞タンパク質合成系に分子シャペロンである GroEL や GroES を添加することで、タンパク質合成の効率が上昇したことを報告している³⁷⁻³⁹。近年では、リボソームによるタンパク質翻訳時の伸長反応中に計画的に起こる停止現象⁴⁰や、細胞内イオン濃度変化への適応のために利用される、リボソームの計画的不安定化⁴¹の定量的解析が、無細胞タンパク質合成系によって実現している。

1.2.3 無細胞タンパク質合成系を用いた進化分子工学や、その他の応用研究

酵素活性の向上や、機能的ポリペプチドの探索などに用いられる進化分子工学は、2018年のノーベル化学賞を与えられたことから、その重要性が強調されている。優れたタンパク質の進化分子工学技術には、幅広い遺伝子変異ライブラリー、表現型と遺伝子型の適切なカップリング、そしてハイスループットなスクリーニング法を有する技術が必要とされる³⁶。従来の遺伝子変異型ライブラリーを宿主細胞に形質転換する方法や、ファージディスプレイ法^{42,43}などと比較して、無細胞タンパク質合成系を用いた進化分子工学は多くの優位性を持つ；(i) ハイスループットなタンパク質合成が可能のため、ライブラリーのサイズが大きい。(ii) 時間がかかる細胞の培養プロセスを必要としない。(iii) タンパク質の結合能以外で酵素活性や蛍光などの指標を用いたスクリーニングに適している。(iv) 細胞にとって有害な物質の発現も可能である。(v) コドンの改変など、遺伝暗号を改造した翻訳系を用いることができる。

無細胞タンパク質合成系を用いた進化分子工学技術の一つとして、リボソームディスプレイ法が挙げられる^{44,45}。表現型と遺伝子型をカップリングさせるために、リボソーム上で翻訳反応を一時停止させることで、mRNA・リボソーム・合成されたポリペプチドの複合体が得られる。また、mRNA ディスプレイと呼ばれる方法では、テンプレートとなる mRNA の 3'末端側に、tRNA 類似構造を持つ翻訳阻害剤ピューロマイシンを結合させ、翻訳されたタンパク質と mRNA をピューロマイシンとの共有結合を介してカップリングさせている⁴⁶。こうして作製された遺伝子とタンパク質の複合体を、抗原抗体反応などを用いて選別し、遺伝子を解析し、それを基にして再び変異遺伝子ライブラリーを作製する。この一連の反応を繰り返すことで、分子を進化させる戦略である。

細胞状の微小な閉鎖空間内に遺伝子と発現タンパク質を閉じ込めることで、変異型と遺伝子型のカップリングを実現する方法は、*in vitro* ディスプレイ法と呼ばれる。近年注目されているのが、Water-in-Oil ドロップレットに封入させる方法である⁴⁷⁻⁴⁹。これらの技術は、フローサイトメトリー (Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)) の技術と組み合わせることで、スクリーニングのスループット性の飛躍的な向上が実現している。フローサイトメトリーとは、大量の細胞や小胞を含む溶液を高速で流路中を流し、個々の蛍光などの光情報を高速で取得できる装置のことで、狙った特性を持つ個体のみを分取することも可能であるため、スクリーニングに適している。*In vitro* ディスプレイ法を発展させた例としては、リボソーム内に封入した無細胞タンパク質合成系に膜タンパク質を発現させることで、膜タンパク質の分子進化に成功した例も

ある⁵⁰。近年では、野地らが微細加工デバイス内に PURE システムを封入することで、一分子 DNA からの酵素発現を実現し、その系を用いて進化分子工学実験を構築した。この研究は 2015 年、内閣府による「革新的研究開発推進プログラム (ImPACT)」に採択されたことから、このような進化分子工学が産業界から集める注目の大きさが象徴されている。

この他の無細胞タンパク質合成系を利用した応用研究としては、例えば、遺伝暗号を改変した翻訳システムにおけるタンパク質合成⁵¹⁻⁵⁶や、膜タンパク質のような、宿主生物にとっては毒性を持つタンパク質の合成など⁵⁷⁻⁶²が、報告されてきた。

1.3 微小容器への *in vitro* 再構成 –人工細胞–

1.3.1 人工細胞研究の意義

学術的にも産業的にも欠かすことのできない *in vitro* 再構成技術であるが、その技術の発展に伴い、細胞と同等に微小な反応容器への *in vitro* 再構成も可能となった。このようにして作製された *in vitro* 系は「人工細胞」と呼ばれ、近年多くの関連研究が報告されている。その中には、生きた細胞を人工的に作り出し、そこから生命の本質とは何か、どのようにして生命は誕生したのか、という疑問を解き明かすことを目的としている研究もあれば、ゲノムの人工合成技術や、ハイスループットなスクリーニング技術と組み合わせることで、産業で用いられるバクテリアの合成を目指す研究もある。あるいは、人工細胞を創る試みの過程で生まれる新たな知見や技術的進化に大きな価値を見出している研究者もいる。人工細胞研究は、多様なモチベーションを背景に持ち、多岐に渡るアプローチ方法で取り組まれているからこそ、世界中で注目を浴びているのだろう。

それでは、微小反応容器への *in vitro* 再構成はどのようにして行われ、その結果どのような人工細胞の研究が行われているのだろうか。以下では人工細胞に関する様々な先行研究を、その技術的側面に注目しながら紹介していく⁶³。

1.3.2 人工細胞の「中身」と「器」

人工細胞研究の実験手法に注目する場合、再構成させる「中身」と、反応容器である「器」に分けて考えることができる。人工細胞にとっての「中身」は、再現したい生命現象に応じて様々な *in vitro* 反応溶液が用いられる。例えば、タンパク質合成が可能な人工細胞を作る場合は、無細胞タンパク質合成系を、遺伝子複製反応を起こす人工細胞を作りたい場合は、遺伝子複製に関するタンパク質や核酸分子を再構成する。これらは主に、細胞抽出液か精製タンパク質を組み合わせた溶液系で構成される (1.2.1 項参照)。

一方、人工細胞の「器」は、それぞれの研究で異なる独自の技術が用いられている場合が多く、そのため、研究のオリジナリティが象徴されているとも言える。微小な閉鎖空間である「器」に *in vitro* 再構成することの利点や意義は、主に以下のように説明される⁶³；(i) 細胞の内外の環境を分け、細胞内反応に必要な物質と不必要な物質の差別化によって高効率な反応が実現できる。

(ii) 複数の遺伝子をひとまとめにし、さらにそこから発現される phenotype も一まとめにすることで、複雑な遺伝子ネットワークの実現や Darwinian 進化が実現できる。このように、「器」は重要な役割を持つため、求める実験系に適した「器」をどのように作るかが、活性の良い人工細胞を作る上で重要なポイントである。

天然の細胞にとっての「器」は細胞膜である。細胞膜は主にリン脂質で構成されており、分子内の親水基と疎水基の相互作用によって、脂質二重膜構造が取られている (図 1-3c)。この細胞膜には流動性があるため、細胞機能を制御する上で重要な膜タンパク質も自由に二次元拡散できる。また、ほとんどの水溶性物質は膜を透過することはできないが、一部の塩や疎水性低分子は自由に膜を介して移動できる。この性質は、細胞内外での物質交換を可能にし、様々な外的環境の変化にも対応できる仕組みを実現している。人工細胞でも同様に、リポソームと呼ばれるリン脂質二重膜でできた小胞を用いる研究が多い。安定性が高い点や、再現性が高くハイスループットな作製方法が数多くある点が特徴である^{64,65}。また、リポソーム内への生体分子の封入や、膜タンパク質の再構成が可能であることから、生きた細胞に近い機能を持つ人工細胞の器として重宝されている。

リン脂質でできたリポソームには、安定性という長所の一方、その形態が変化しにくく、細胞分裂のようなダイナミックな膜の挙動を起こしにくいという短所もある。この点に着目し、脂肪酸でできた小胞を器とする人工細胞も報告されている。脂肪酸膜は、カルボキシル基 (ヘッドグループ) の pKa 付近の pH 条件下で脂質二重膜の状態になるが、他の pH ではミセル化、あるいは可溶化状態になる (図 1-3b)^{63,66,67}。また、外から加えられた脂肪酸分子や、隣接する他の小胞から脂肪酸を容易に吸収し、小胞のサイズが大きく成長する⁶⁸⁻⁷¹。以上のような特長から、細胞分裂のような膜の形態変化の再現に用いられている^{72,73}。

Water-in-Oil ドロップレットは、細胞膜を持たない小胞であるが、大量に作製することが容易であるため、高いスループット性が求められる人工細胞システムで用いられている (図 1-3a)^{47,48,74,75}。

生体分子とは異なる物質を器とする人工細胞も報告されている。微細加工技術 (MEMS : Micro Electro Mechanical Systems) で作製されたマイクロメートルオーダーの反応容器内に *in vitro* 再構成し、人工細胞として活用する研究例も多い⁷⁶⁻⁷⁸。例えば、マイクロ流路内に無細胞タンパク質合成系を流し、その中でタンパク質を合成させるような研究がある。このタイプの反応容器では、流路をコントロールする仕組みを備えることで、物質の流れをコントロールするような反応系を作ることができる。

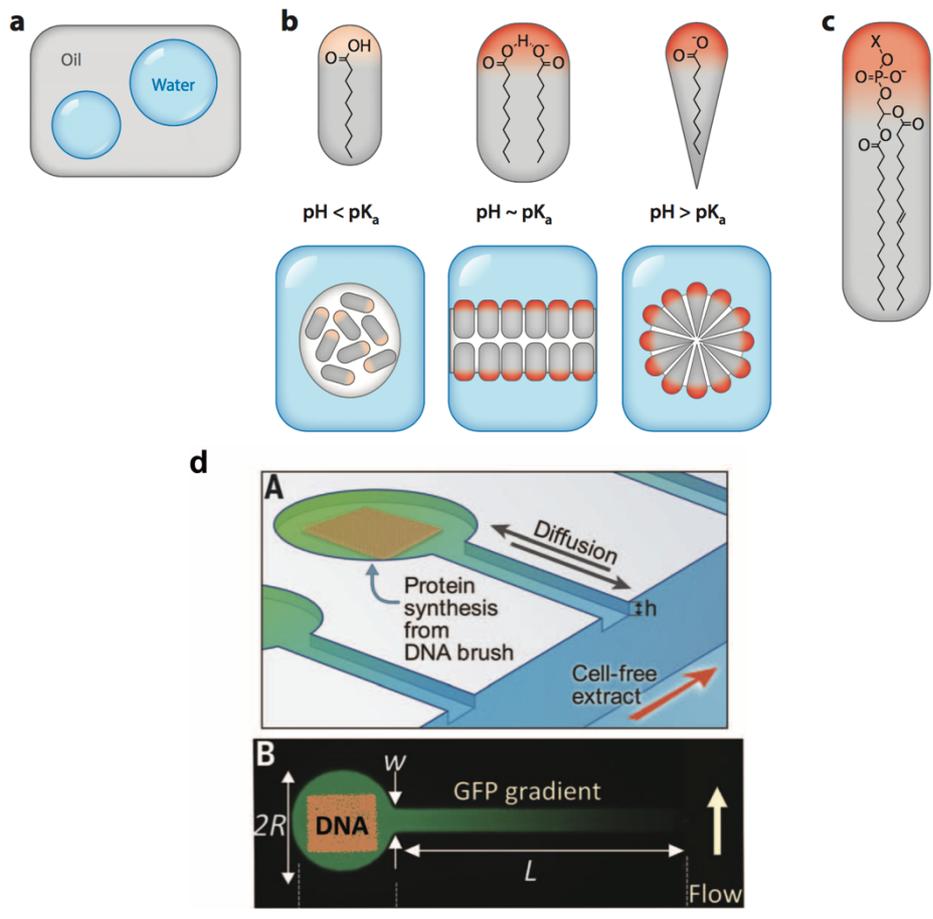


図 1-3 様々な人工細胞の器

(a) Water-in-Oil ドロプレット、(b) 脂肪酸分子、(c) リン脂質分子の模式図。(d) Karzbrun らによって開発された、微細加工技術で作製された反応容器とする人工細胞。(上図) 人工細胞の概要図。円形反応容器の底にテンプレート DNA が修飾されていて、大流路から流れてきた無細胞タンパク質合成溶液と反応して GFP が合成される。円形の容器の直径は 100 μm 、流路の長さは 300 μm 、流路の深さ h は 2 μm 。(a) ~ (c) : Blain and Szostak, *Ann. Rev. Biochem.* (2014)より引用⁶³、(d) : Karzbrun, *et al.*, *Science* (2014)より引用⁷⁶

1.3.3 タンパク質合成機能を持つ人工細胞とその応用

人工細胞の「中身」と「器」には数多くのバリエーションがあり、再現したい反応に応じて適切な系が構築されてきた。中でも、無細胞タンパク質合成系を細胞状の容器内に封入することで、遺伝子発現が可能な人工細胞の作製は、数多くの研究グループによって行われてきた。この場合、反応容器からの物質透過を防ぐ目的や、容器の大きさに再現性を持たせる目的で、リン脂質製のリポソームが用いられることが多い。例えば、リポソーム内に細胞抽出液^{79,80}や PURE システム⁸¹を導入することで、蛍光タンパク質などのタンパク質を合成できる人工細胞が開発された。また、リポソーム内に封入したプラスミドと細胞抽出液で T7 ポリメラーゼを発現させ、そのポリメラーゼによってさらに別の種類のプラスミドから遺伝子発現を起こす、より複雑な多段階のカスケード型遺伝子発現にも成功している⁸²。リポソームの特長を活かした人工細胞として

は、Noireaux らの研究が興味深い⁸³。彼らは、リポソーム内でのタンパク質合成反応の効率を上げるために、低分子化合物が通過できる膜チャンネルタンパク質をリポソームに再構成し、外界との物質交換機能を持たせた。その結果、当初は最長10時間しか持続しなかった合成反応が、4日間も持続するようになった(図1-4)。この結果は、反応基質や栄養物質を取り込み、不要な反応副産物を排出する物質交換システムが、人工細胞において重要であることを示唆している。このように物質交換が可能な人工細胞は他にも複数報告されている^{84,85}。

物質交換機能を持つ人工細胞を開発するためには、微細加工デバイスの活用が有効である。例えば、無細胞タンパク質を封入した反応容器に複数の流路をつなげ、それによって物質交換の流れをコントロールし、その結果高い反応効率を備えた人工細胞が構築できている⁸⁶⁻⁸⁹。また、微細加工デバイスの基盤表面にDNA分子を修飾するDNAチップ技術を用いた人工細胞も報告されている。Karzbrun らは、細長い流路を反応容器につなげることで、低分子化合物を拡散由来の遅い物質移動で外界と交換しつつ、一方で、固定されたDNAと分子量の大きな反応産物(蛍光タンパク質)は容器内に保ったままの人工細胞系を構築した(図1-3d)⁷⁶。この研究では、複数の遺伝子からなる遺伝子ネットワークを導入することで、細胞内と同様なタンパク質の合成・分解の代謝回転や振動発現を実現しており、シンプルな物質交換の重要性がより強調されたことになる。

この他にも、タンパク質合成反応を再現した人工細胞を用いることで、進化分子工学実験(1.2.3項参照)^{47,48,50}に利用した例や、W/Oドロップレットに遺伝子回路を導入することで振動発現を再現した人工細胞も報告されている^{90,91}。

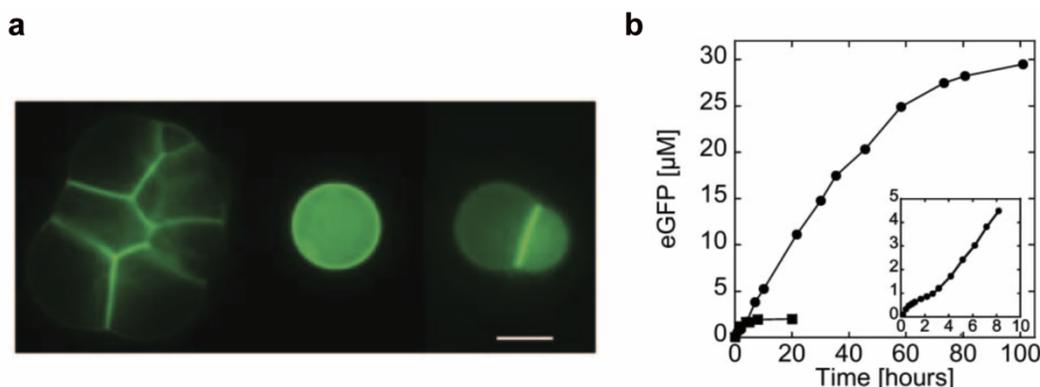


図 1-4 タンパク質合成活性を持つリポソーム型人工細胞

(a) Noireaux らによって作製された、リポソーム内に細胞抽出液由来の無細胞タンパク質合成系を封入した人工細胞。膜タンパク質 α ヘモライシンに緑色蛍光タンパク質 GFP を fusion させたタンパク質を発現させた。それぞれ、(左)複数のリポソームが融合した状態、(中)単一リポソーム、(右)2つのリポソームが融合した状態を撮影した(スケールバーは20 μ m)。(b) リポソーム内でのタンパク質発現のタイムコース。黒四角: GFP のみの発現、黒丸: α ヘモライシンと GFP の fusion タンパク質の発現。 α ヘモライシンの発現によって、反応時間は大きく延長した。Noireaux and Libchaber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2004) より引用、一部改変⁸³。

1.3.4 自律的に増殖する「生きた」人工細胞の作製に向けて

遺伝子発現反応以外では、遺伝子複製機能や自己複製機能は細胞にとって必要不可欠な機能であるため、これらの機能を持つ人工細胞の開発も多く報告されてきた。

遺伝子複製能を持つ人工細胞は、酵素をリポソーム内に封入するシンプルな方法で開発されている。例えば、PCR 反応のリポソーム内での再現⁹²や、リポソーム内への RNA 複製酵素封入による RNA 複製反応の再現⁹³、Q β RNA レプリカーゼと呼ばれる RNA 複製酵素のリポソームへの封入による、RNA 複製反応の再現^{94,95}などがある。このような技術を応用し、エラープローン PCR (変異が入りやすい PCR 増幅反応) の技術を組み合わせることで、その RNA レプリカーゼの分子進化を実現した報告もある⁴⁷。

一方、人工細胞の自己複製は、ダイナミックな膜の成長と形態変化を再現性良く、継続的に引き起こす必要があるため、遺伝子発現反応や遺伝子複製反応と比べても人工細胞での再現が難しい。形状の安定性が特長のリン脂質製リポソームに対して、形状変化が起きやすい脂肪酸製の小胞は、自己複製現象の再現に頻繁に用いられている。Szostak らは、脂肪酸製小胞を含む溶液に脂質分子を追加すると、小胞がそれらを取り込みながら成長する性質を用いて^{70,96}、自己複製反応の再現に取り組んでいる。小胞が成長し続けると、糸状に細長いマルチラメラ小胞状態となる。ここに外からせん断応力の刺激⁹⁷や、光化学的刺激⁹⁸、あるいは溶液の濃縮に伴う脂質分子濃度の上昇などの変動を与えると⁷³、糸状マルチラメラ小胞から娘細胞 (小胞) が分裂する現象を観察することができた (図 1-5)。このような分裂現象が自発的に起こることから、Szostak らは、原始の細胞は脂肪酸で構成されていたのではないかと考えている。その一方で、現代の細胞の主成分であるリン脂質でできた小胞でも、自己複製反応を再現できるはずである。四方らのグループは、高分子量のポリマーをリン脂質製リポソーム内に封入し、リポソーム同士の融合で膜を成長させると、その結果、排除体積効果 (後述、1.4.2 項参照) 由来のリポソームの自発的分裂が起きたことを報告した⁹⁹。この他にも、リポソーム内に脂質合成酵素を発現させることで細胞膜を成長させ、それに伴う細胞分裂の再現を目指した研究¹⁰⁰や、エステル結合の加水分解酵素ホスホリパーゼ A₂ をリポソーム内に封入することで、小胞の出芽現象や分裂を観察した研究¹⁰¹も報告されている。

遺伝子発現、遺伝子複製、そして自己複製の三つの機能を人工細胞に備えさせることができれば、単純な系でありながらも、自律的に成長と増殖を繰り返す生きた人工細胞となりうる (図 1-6)⁷²。例えば、先に説明した自己複製可能な脂肪酸製小胞に RNA や RNA 複製酵素を導入することで、自己複製と遺伝子複製を同時に起こす系の開発が行われている⁶⁸。この系では、内部で RNA が増幅されるほど、浸透圧の関係で、小胞の成長速度が大きくなる性質を再現できたが、細胞分裂現象の再現には至らなかった。菅原らは、合成脂質分子で構成された小胞内に DNA とポリメラーゼを封入し、外から脂質分子前駆体を添加することで、PCR 反応による遺伝子複製と小胞の成長、そして分裂現象を再現することに成功した^{102,103}。この系は、遺伝子複製と自律的な細胞増殖が組み合わされた、限りなく生きた細胞の人工合成近い例と言えるが、現象の起きる確率の低さなどの課題は残る。

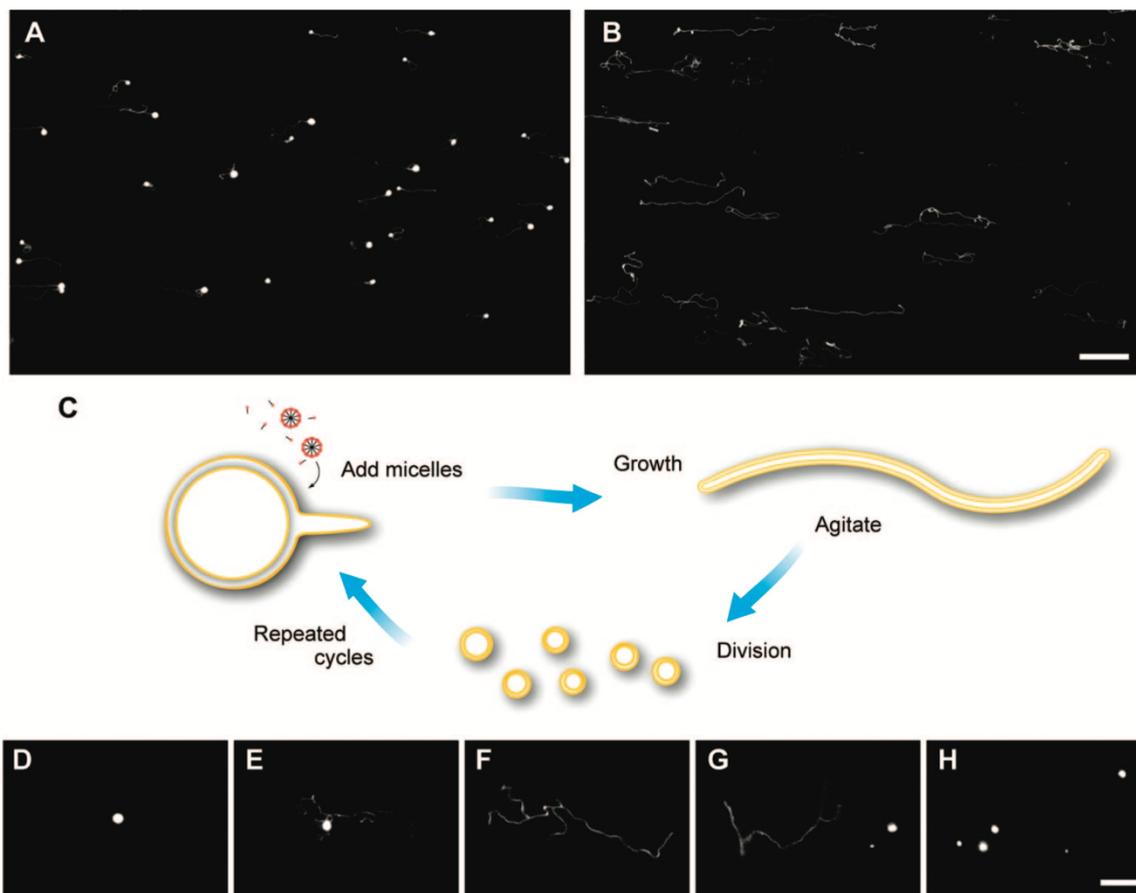


図 1-5 脂肪酸小胞の細胞分裂状現象

脂肪酸製小胞を用いた自己複製反応の再現。外側から脂質分子を添加すると、小胞はそれを取り込んで成長し、最終的には糸状の構造を取り、そこから小胞が分裂していく。Zhu and Szostak, *J. Am. Chem. Soc.* (2009) より引用⁹⁷。

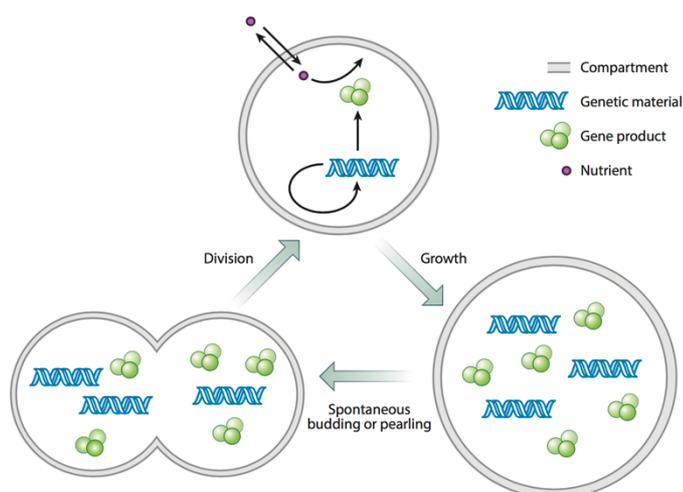


図 1-6 モデル人工細胞の成長、遺伝子複製、自己複製プロセスのサイクル

Szostak らによって定義された、人工細胞の遺伝子発現、遺伝子複製、自己成長と複製のプロセスのサイクル。Blain and Szostak, *Ann. Rev. Biochem.* (2014) より引用⁶³。

1.4 生きた細胞と人工細胞の違い

1.4.1 なぜ人工細胞から生命は生まれないのか

今日まで数多くの *in vitro* 再構成実験と、それを発展させた人工細胞の開発が行われてきた。それらによって、細胞の生命機能を高い精度で再現できるようになったものの、自律的に遺伝子を複製し続け、何世代にも渡って増殖し続けるような、生きた人工細胞の *in vitro* 再構成には至っていない。

生きた細胞と全く同じ機能を持つ人工細胞を作るためには、細胞が必要とする全ての構成要素を再構成しなければならない。細胞が生きるために必要な最小の遺伝子数は、生きているバクテリアの遺伝子ノックアウト実験によって評価されており、その数はおよそ 100 ~ 200 であると見積もられている^{104,105}。これら全ての遺伝子やタンパク質を一つずつ分離精製し、組み合わせて *in vitro* 再構成することは、非常に困難である。この点を考慮すると、細胞抽出液を用いた人工細胞では、既に細胞に必要な要素はすべて入っているため、全要素を封入する目的には適しているように考えられるが、それでも生きた細胞は生まれない。

もう一つの原因として挙げられるのが、*in vitro* 再構成によって構築された溶液系が、生きた細胞質よりも大きく希釈された希薄溶液である点だ。細胞内は DNA、タンパク質、その他低分子化合物を含めた質量濃度が 300 mg/mL にも達するような、非常に混み合った環境にある（図 1-7）¹⁰⁶。一方で、無細胞タンパク質合成系のような、一般的な *in vitro* 溶液系の生体分子濃度は最大でも 20 ~ 30 mg/mL 程度である^{31,107}。たとえ、反応に関わる生体分子の濃度は変わらなくても、その他の生体分子が高濃度で存在する環境がないと、再構成した生命機能の活性は低くなってしまう。また、脂質分子でできたりポソームを用いた人工細胞の場合、内部が生体分子などで混み合っている方が、小胞の膜の形態変化や分裂現象が起きやすい報告もある⁹⁹。したがって、生きた細胞と同等に濃密な溶液系で *in vitro* 再構成をすることができれば、より生きた細胞に近い人工細胞の構築にもつながると考えられている。

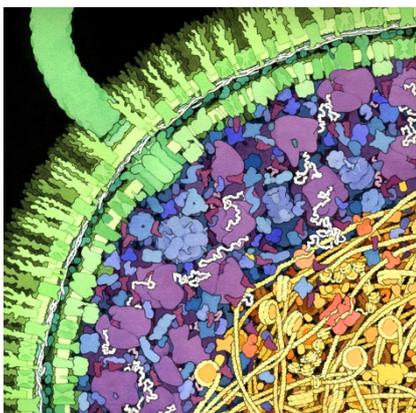


図 1-7 大腸菌の細胞質が生体分子で非常に混み合った様子

Goodsell のホームページより引用。

1.4.2 分子クラウディング効果と、*in vitro*再構成系に与える影響

細胞質の中で生体分子が極めて高濃度にある状態は、具体的にどのような点で希薄溶液と異なっているのだろうか。細胞質内のように、様々な分子が極めて高濃度で存在する状態は、分子クラウディング状態と呼ばれている。この分子クラウディング状態の存在によって、細胞質が通常の希薄溶液とは異なる物性を持つことになり、そのおかげで細胞の複雑な生態ネットワークが実現していると考えられている¹⁰⁶。その詳細な物性については、生化学や物理化学の観点から様々な研究がなされてきた¹⁰⁸⁻¹¹¹。まず、個々の生体分子が存在できる体積が減少する「排除体積効果」の影響で、生体分子の反応速度が上昇する。一方で、巨大分子の影響で溶液の粘性が上昇し、それにとまって物質拡散速度が低下する。この現象は、分子同士が出会う確率を低下させることで、結合反応などの反応速度の低下につながる。また、水以外の分子が大量に存在することで、生体分子の水和環境が変わり、タンパク質の folding 環境が希薄溶液と異なるものになる、というような特徴などが挙げられる¹¹²。

細胞内と同等に濃密な *in vitro* 溶液系を作るために、様々な研究が行われてきた。希釈の問題を直接的に解決するために、細胞抽出液などの無細胞タンパク質合成系を蒸発乾燥によって物理的に濃縮した例が報告されている¹⁰⁷。これによって、一般的な無細胞タンパク質合成系よりも生体分子濃度が濃い溶液系が作製されたものの、タンパク質合成活性は大きく低下してしまった。ここで注目したいのは、細胞抽出液が細胞質に近い濃度にまで濃縮されると、粘性の極めて高い

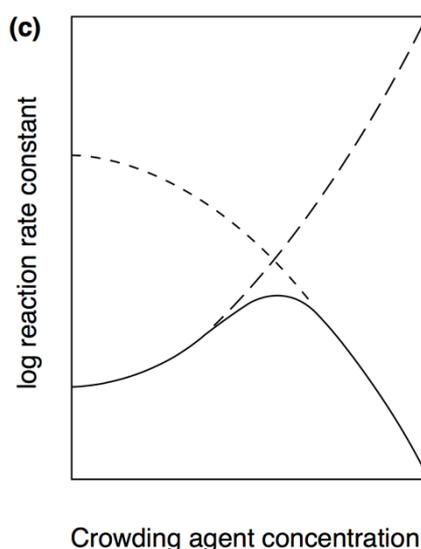


図 1-8 分子クラウディング効果による酵素反応の活性化に関するモデル

縦軸にクラウディング剤の濃度、縦軸に酵素反応の活性を示している。短い点線は、反応が物質の拡散律速である場合、長い点線は反応の遷移状態への移行が律速である場合の相関を表している。実線はそれらの足し合わせによる、見かけ上のクラウディング効果と酵素活性の相関を示しており、クラウディング剤が低濃度の場合には遷移状態律速、高濃度の場合には拡散律速になることを示している。Ellis, *Curr. Opin. Struct. Biol.* (2001) より引用¹¹⁰。

ガラス状態になってしまったことである（図 1-9）¹¹³。このようなガラス状態では、内部での物質拡散がかなり低くなってしまい、生体反応の速度が大きく減少してしまうことが予測される。この点が、タンパク質合成反応を低下させた原因の一つかもしれない。実際、細胞質のガラス化現象は、生きた細胞に代謝阻害剤を添加した際にも起きており、細胞質が適切な状態を保つために代謝が重要な役割を担っていることが示唆されている（図 1-10）¹¹⁴。よって、代謝反応などの生理機能が維持された濃密な細胞質のまま、*in vitro* 再構成を行うことで、生理機能が高い状態での *in vitro* 再構成ができるかもしれない。

濃縮とは異なり、既存の *in vitro* 再構成系へ物質を添加することで分子クラウディング効果を再現し、その影響を調べる研究も多く報告されている。この時添加される、細胞内の機能に悪影響を当てないような物質はクラウディング剤と呼ばれ、ポリエチレングリコール（PEG）、ウシ血清アルブミン（BSA）、Ficoll などがその代表例である。特に、分子量が大きいクラウディング剤を用いて、*in vitro* 再構成系に与える影響を調べた研究はこれまでに多く行われてきた。高分子クラウディング剤の添加による排除体積効果の影響で、リボソームタンパク質の会合が促進されるという報告¹¹⁵や、DNA 結合タンパク質と DNA の結合が促進されるという報告¹¹⁶がある。さらに、DNA 複製時に働く DNA ポリメラーゼの活性が向上することも確かめられている¹¹⁷。

より具体的な生理活性を評価した例として、無細胞タンパク質合成系に PEG や BSA を添加し、転写活性や翻訳活性を向上させた報告も存在する。例えば、PEG を大腸菌の細胞抽出液に加えることで、タンパク質合成活性を上昇させた研究¹¹⁸、PEG を小麦胚芽由来の細胞抽出液に加えることで、遺伝子転写活性を向上させた研究¹¹⁹、そして BSA を PURE システムに加えることで、タンパク質合成活性を向上させた研究¹²⁰ などが報告されてきた。この他にも遺伝子回路など様々な方法によって、クラウディング剤が *in vitro* タンパク質合成系に与える影響を調べた例が報告されている¹²¹⁻¹²⁴。一方で、高分子のクラウディング剤を添加することで、酵素活性が低下する場合もある¹²⁵。この原因は、クラウディング剤の添加によって、物質の拡散速度が低下したことに由来している。この他にも、PEG のような高分子の添加によって、DNA の二重螺旋構造は不安定化してしまうという報告もある^{126,127}。したがって、高分子のクラウディング剤の添加は、多くの *in vitro* 系の反応活性を向上させるが、反対に活性を低下させてしまう場合もある。その条件は、クラウディング剤の種類や添加する濃度、扱う反応やタンパク質の種類によって、大きく異なり、クラウディング剤の添加が常に *in vitro* 再構成系の活性を向上させるわけではないと言える。

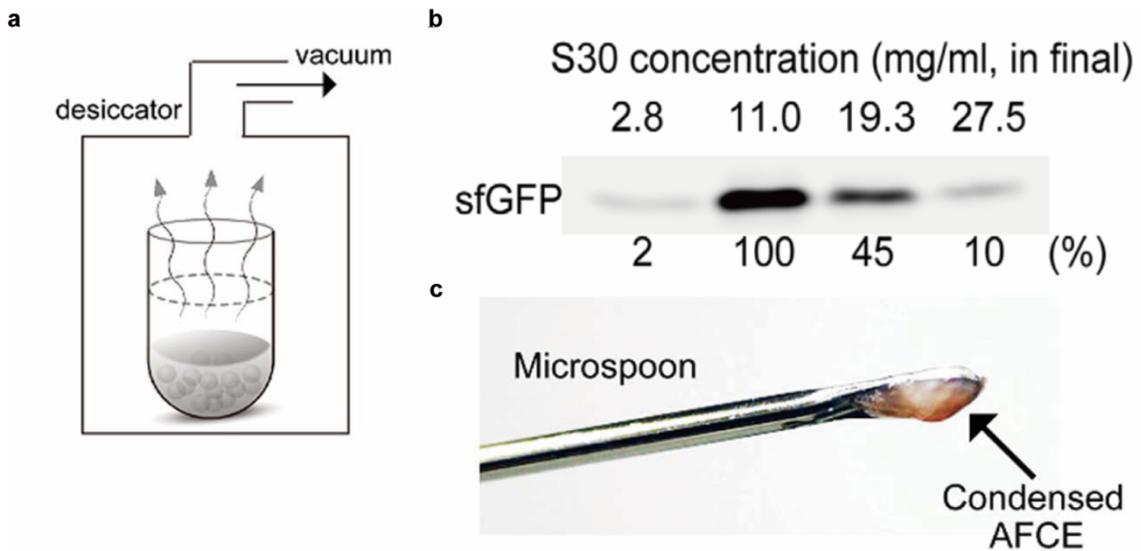


図 1-9 蒸発乾燥によって濃縮された無細胞タンパク質合成系の構築

(a) Fujiwara らによる、細胞質抽出液（大腸菌 S30）の蒸発乾燥による濃縮。(b) (a) の方法で調製された細胞抽出液のタンパク質合成活性の評価。濃縮の度合いが高すぎると、合成されたタンパク質（sfGFP）の収量が低くなった。(c) (a) の方法で調製された細胞抽出液（AFCE）の画像。溶液をスプーンに乗せてひっくり返してもこぼれない程粘性が高い。Fujiwara, and Nomura, *PLOS ONE* (2013), Fujiwara, Yanagisawa, and Nomura, *BIOPHYSICS* (2014)より引用、一部改変^{107,113}。

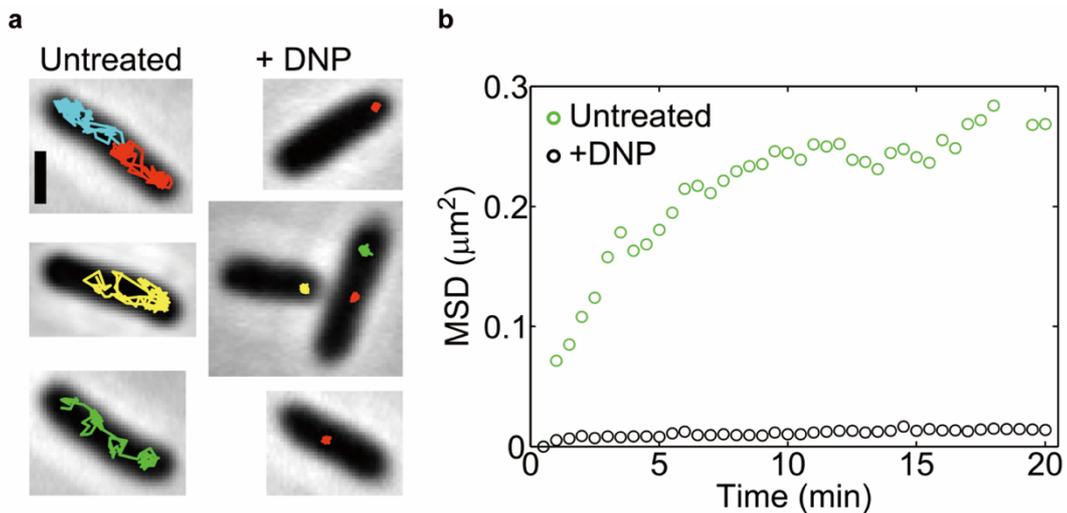


図 1-10 バクテリアの代謝反応と細胞質のガラス化の関係

(a) 大腸菌の細胞質における、GFP をラベルした低コピー数プラスミドの拡散運動。通常の培養状態では、プラスミドが細胞の中を自由に拡散していることがわかるが（左）、2,4-dinitrophenol (DNP) という酸化リン酸化の脱共役剤を添加して、細胞内の ATP と GTP を枯渇させると、拡散運動は停止した（右）。(b) (a) の拡散運動における、平均二乗変位 (MSD) の時間変化。MSD を比較することで、DNP を添加した大腸菌の細胞質では物質拡散が起きなくなっていることがわかる。これらの現象を基に、Parry らは、細胞質の代謝反応を止めると、細胞質は、物質拡散が起こらない程粘性の高いガラス状態に転移すると結論付けている。Parry, *et al.*, *Cell* (2014)より引用、一部改変¹¹⁴。

1.4.3 クラウディング剤として働く浸透圧調整物質「オスモライト」

高分子のクラウディング剤に関する研究が多い一方で、他のクラウディング剤として働く物質もある。それが、浸透圧調整物質であるオスモライトだ。バクテリアや細胞は、外界から受ける様々な種類のストレスに対して、自らを守るための機能を備えている。外界の浸透圧変化もその外的ストレスの一種である。もし細胞外の浸透圧が高い状況となった場合は、細胞外に細胞質の水分子が流出してしまい、細胞の収縮や、それに伴う原形質分離が起きてしまう¹²⁸。これを防ぐために、オスモライトと呼ばれる低分子の化合物が細胞内に数百 mM 単位で蓄積される¹²⁸⁻¹³¹。バクテリアの場合は、少量のオスモライトが細胞内で合成される以外は、主に膜タンパク質によって外界から取り込まれる¹³²。オスモライト化合物は、非電荷か双性イオン (zwitterion) の性質を持ち、高濃度で細胞内に存在しても、他の生体分子の機能を阻害しない特徴を持つ¹³³。そのため、オスモライトとして働く化合物は種類が限られており、主に多糖、アミノ酸、尿素、そしてメチルアミン系化合物が当てはまる。これらオスモライトの中には、タンパク質を安定化させる働きを持つものもあり、特にメチルアミン系化合物は、タンパク質の folding やタンパク質-核酸分子間の会合を促進させる性質^{127,133-135}と、酵素活性を向上させる性質¹³⁶を持つと報告されている。メチルアミン系化合物の代表例が、trimethylamine-*N*-oxide (TMAO) とベタインであり、多くの研究でその性質が調べられてきた (図 1-11)。ベタインは、バクテリアから哺乳類細胞まで様々な種類の生物が持っている、大腸菌は 10 ~ 200 mM のベタインを細胞内に蓄積する¹³²。TMAO は主に海洋生物の細胞内に最大約 200 mM 存在している^{135,137}。哺乳類の腎臓にも存在し、同じくオスモライトである尿素のタンパク質変性を相殺する効果が知られている^{135,138}。両者とも、分子内に正電荷と負電荷を持つ極性分子で、正に帯電した N 原子に 3つのメチル基が結合していることから、正電荷の周りを疎水基が取り囲むような構造を取っている。この特徴がタンパク質の安定化に寄与していると報告する研究も多いが、メチルアミン系オスモライトがタンパク質を安定化する分子機構は様々な議論があり、その結論は未だに出ていない^{135,139-143}。

オスモライトによるクラウディング効果がタンパク質の状態に与える影響を調べる研究は多く報告されている一方で、無細胞タンパク質合成系などの *in vitro* 再構成系に与える影響を評価した研究は少ない。Brigotti らは、ウサギ網赤血球抽出液由来の無細胞タンパク質合成系にベタインを加え、タンパク質合成活性の変化を調べた¹⁴⁴。この報告によると、ベタインの添加によって、グロビンの合成活性が約 1.6 倍上昇することがわかった。しかし、他のタンパク質の合成時にも効果があるかどうか、他の無細胞タンパク質合成系でも効果があるかどうか、そして類似した構造を持つ TMAO にも活性化効果があるかどうか、といった疑問は未だに残っている。

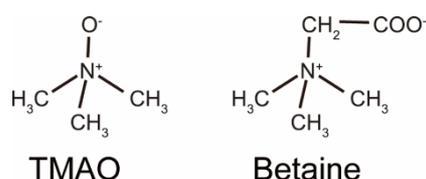


図 1-11 メチルアミン系化合物 TMAO とベタイン

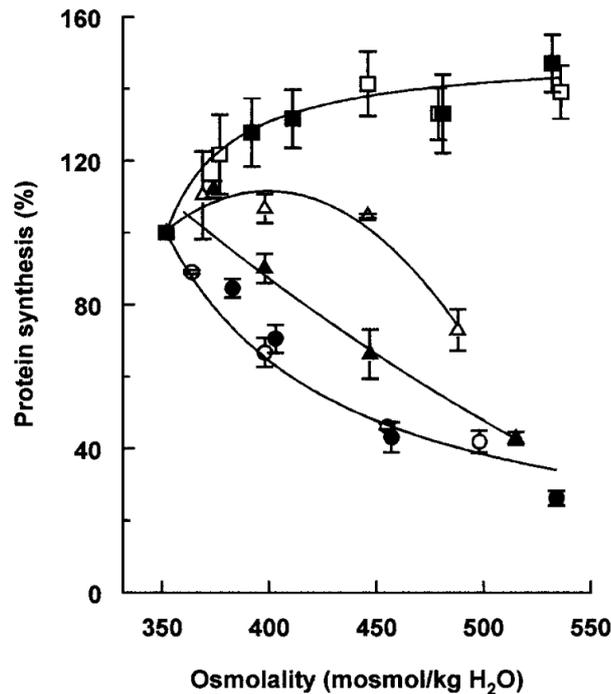


図 1-12 ベタインを用いた無細胞タンパク質合成活性の関数の評価

ベタインをウサギ網赤血球細胞抽出液由来の無細胞タンパク質合成系に添加した際のグロビン合成活性の変化。20 ~ 150 mM のベタイン (■) が添加されている。横軸は、物質添加によって生じる浸透圧を、縦軸はグロビンタンパク質の合成量を示している。添加物を加えないときの合成量を 100% としている。ベタイン添加時に、グロビン合成量が上昇していることがわかる。その他のプロットは、KCl (▲)、NaCl (●)、CH₃CO₂K (△)、CH₃CO₂Na (○)、*myo*-inositol (□) を添加した際のデータ。Brigotti, *et al.*, *Biochem J.* (2003) より引用¹⁴⁴。

1.5 本研究の目的と概要

人工細胞を始めとする、*in vitro* 再構成技術は、一般的な細胞質よりはるかに生体分子濃度が希薄な溶液でできているため、細胞の複雑な反応ネットワークを再現するために必要な分子クラウディング効果が再現されていない。細胞と同じような分子クラウディング効果が維持された人工細胞を作製することができれば、生きた細胞の細胞質に近い環境を人工細胞内に再現できると期待されている。本研究では、「細胞質を希釈させずに直接再構成する方法」と「オスモライトと無細胞タンパク質合成系を組み合わせる」という異なる二つの方法で、細胞内クラウディング環境を再現した人工細胞の作製を試み、その生理活性、特に遺伝子発現活性の評価を行った。そして、ここで得られた知見から、*in vitro* 再構成系や人工細胞における分子クラウディングの役割について議論した (図 1-13)。

分子クラウディング効果を維持した人工細胞を創り、
遺伝子発現活性に与える影響を評価する

微細加工デバイスへの
細胞質の直接導入

遺伝子発現システムへの
オスモライト物質の添加

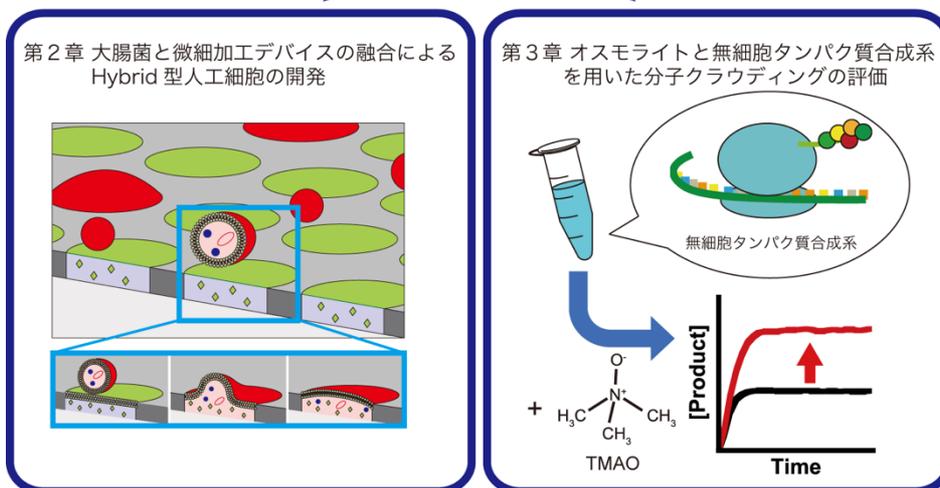


図 1-13 本研究の概要

第 2 章 大腸菌と微細加工デバイスの融合による Hybrid 型人工細胞の開発

2.1 背景

2.1.1 生きた細胞に限りなく近い人工細胞を生み出すためには？

生きた細胞のあらゆる機能を維持した細胞質を再構成することは、多くの生命科学の分野や産業界で期待されている。これを困難にしているのは、1.4.1 項で議論されたように、細胞の全要素を再構成することが難しい点と、細胞質が希釈されてしまう点にあると考えられている。また、一度希釈すると、細胞質の機能は死んでしまうことが予測され、その後濃縮しても生理活性は復活しない¹⁰⁷。

したがって、生きた大腸菌の細胞質を、抽出や希釈による生理機能の低下を経ることなく微小反応容器に再構成することができれば（1.4.2 項参照）、細胞を構成するあらゆる要素をまるごと *in vitro* 再構成し、かつ細胞質の希釈は最小限に留めることで、生きた細胞の細胞質に近い状態の人工細胞を作ることができると我々は考えた（図 2-1）。

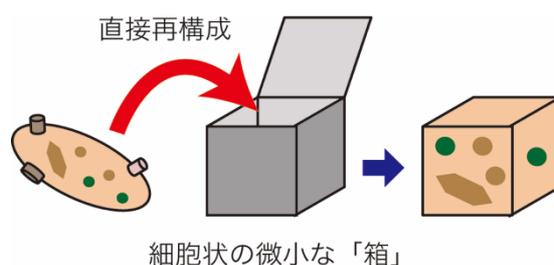


図 2-1 本研究における人工細胞開発のコンセプト

2.1.2 微細加工デバイス ALBiC の開発

2000 年代以降、野地らは微細加工技術によって、微小な反応容器を並列化したマイクロデバイスを作り、その中で様々な生化学測定を行ってきた。2005 年、PDMS 製でフェムトリットルサイズの微小容器内に ATP 合成酵素を閉じ込め、世界で初めて酵素一分子による ATP 合成反応の計測に成功した¹⁴⁵。同様のデバイスを使用して、様々な酵素の一分子計測にも成功している¹⁴⁶。近年では、フォトリソグラフィーの技術を応用して（図 2-2）、ガラス基板上にコートしたフッ素製の疎水性樹脂 CYTOP に百万個以上のマイクロメートルサイズの反応容器（チャンバー）をアレイ化したデバイスを構築した。CYTOP 表面の疎水性と、ガラスの親水性を利用することで、各チャンバーに微小な Water in Oil ドロップレットを作ることができ、それによって、より操作が単純な一分子酵素活性測定^{147,148}、バクテリア一匹単位での薬剤排出活性測定¹⁴⁹、さらには高感度化 ELISA システムの構築に成功している^{150,151}。

この CYTOP を用いた微細加工技術を応用して開発されたのが Arrayed Lipid Bilayer Chambers (ALBiC) である（図 2-3）²²。CYTOP の強い疎水性を利用して、各チャンバーの開

口部に蓋をする形で脂質二重膜を張ることができる。この脂質二重膜には、様々な膜タンパク質を再構成することができるため、チャンバーの微小な体積を活用した一分子単位での膜タンパク質活性測定が実現した。この ALBiC はさらに開発が進められていて、より微小な体積を持つ ALBiC の作製¹⁵²、脂質二重膜に電圧を印加することによる膜電位存在下での膜タンパク質の活性計測¹⁵³、天然の細胞膜で起きているフリップフロップ現象（膜の内側と外側の脂質分子が入れ替わる現象）の計測¹⁵⁴、さらにはこれを活用したスクランブラーゼの一分子活性測定¹⁵⁵、など多くの応用研究が報告されている。

我々は人工細胞を構築するための系として、この ALBiC に着目した。ALBiC のチャンバーは細胞と同等の体積の閉鎖空間を持ち、さらに細胞にとって重要な役割を担う脂質二重膜を備えているため、細胞内要素をまるごと再構成した人工細胞を作製できる可能性がある。

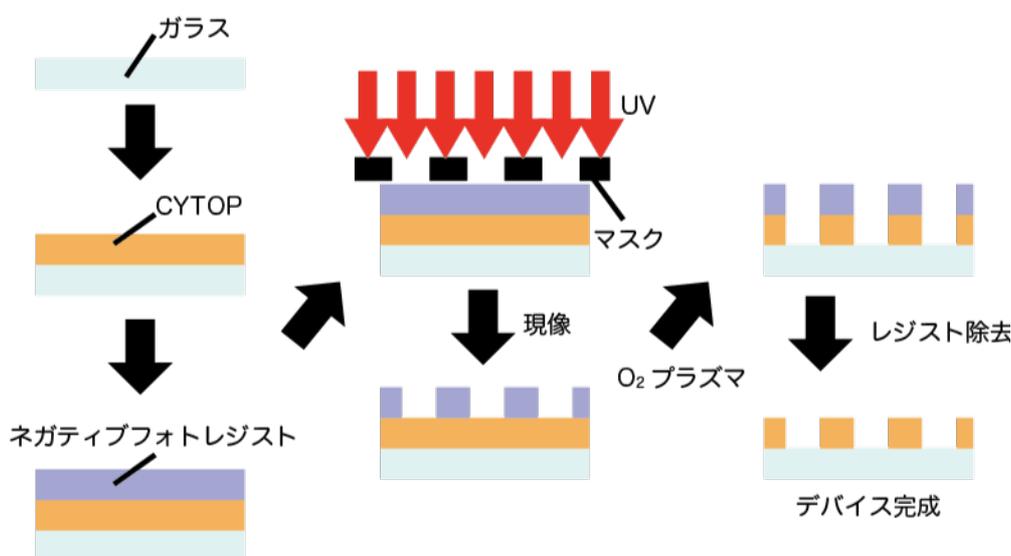


図 2-2 フォトリソグラフィーを用いたマイクロデバイスの作成方法
 微細加工デバイスの作製方法の概要図。詳細は S-1.2.2 項参照。

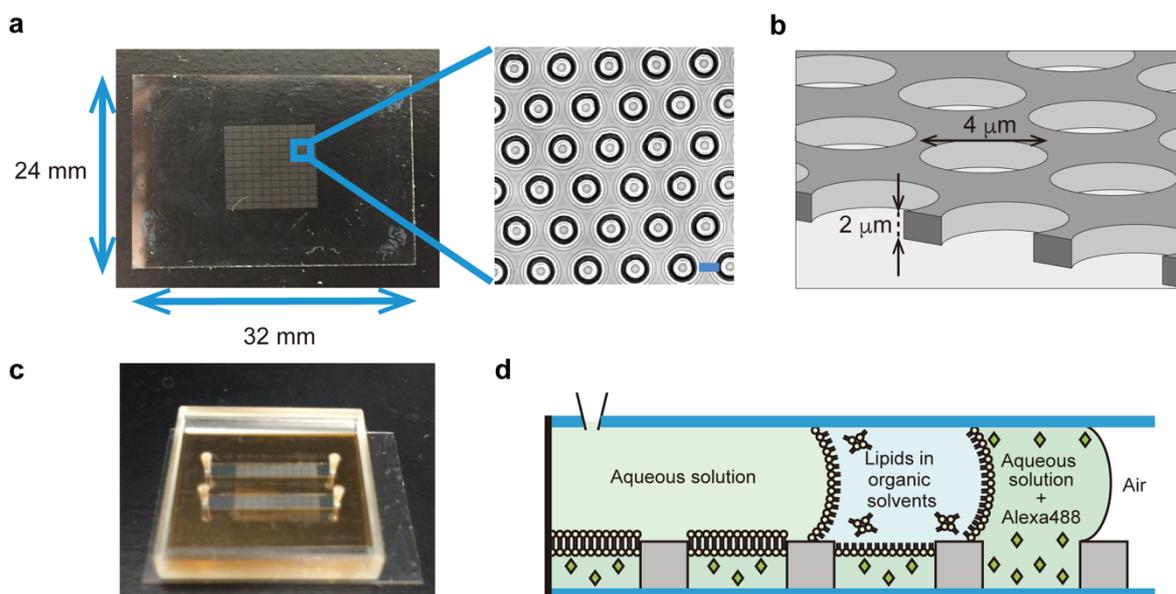


図 2-3 脂質二重膜が再構成されたマイクロデバイス「ALBiC」

(a) ALBiC を上から撮影した画像と、顕微鏡で撮影されたチャンバーの拡大図。スケールバーは $4\ \mu\text{m}$ を示す。(b) ALBiC の構造の概要図。ALBiC のチャンバーサイズは調整でき、様々なタイプがある。本研究では、図に示された直径 $4\ \mu\text{m}$ 、深さ $2\ \mu\text{m}$ のデバイスと、直径 $4.5\ \mu\text{m}$ 、深さ $3\ \mu\text{m}$ のデバイスを用いた。前者の体積は $25\ \text{fL}$ 、後者は $48\ \text{fL}$ である。(c) ALBiC デバイスの組み立て。デバイスにスペーサーとなるオレンジ色の両面シールを貼り、その上からガラスの蓋を貼り付ける。デバイス、シール、ガラス蓋で囲まれた空間が、ALBiC の流路となる。ガラス蓋にはインレット・アウトレット用の穴が空いており、そこから溶液を注入する。(d) ALBiC チャンバーへの膜の再構成方法。流路内に、水溶液（本研究では主に SP buffer (S-1.3.2 項参照)）、脂質分子を溶解させた有機溶媒（本研究ではヘキサデカン）、再び水溶液、の順に溶液を流すことで、疎水性を持つデバイス表面の CYTOP に膜が再構成される。図では、膜の状態を可視化するために、最初の水溶液に緑色蛍光色素 Alexa488 を混ぜている (2.2.1 項参照)。

2.1.3 バクテリアのプロトプラスト化

天然のバクテリアの中で、生命科学実験で最も頻繁に利用されているのが大腸菌である。大腸菌は取り扱いや培養が容易であり、また、その遺伝子発現システムが単純で理解し易いため、昔から遺伝子工学など様々な研究において頻繁に扱われている。

バクテリアはその細胞膜と細胞壁の構造の種類に応じて、グラム陽性菌とグラム陰性菌に分類される。大腸菌はグラム陰性菌に属しており、細胞質の外側は二重の細胞膜（内膜と外膜）に覆われているが、その間にペプチドグリカンという物質でできた細胞壁が存在する。多糖であるペプチドグリカンは、Lysozyme という糖分解酵素で分解することができる。すると、外膜の一部と細胞壁が分解され、細胞膜（内膜）のみの状態となり、その結果、桿状 (rod shape) の大腸菌は球状になる。この状態はスフェロプラスト状態と呼ばれる。この状態で、培地の浸透圧を細胞内部と同等に高くすると、次第に残った外膜もはがれて内膜のみに覆われたプロトプラスト状態となることが知られている (図 2-4)¹⁵⁶。プロトプラスト状態のまま、細胞壁合成を阻害する ampicillin を添加し、培養を続けると、菌自体は成長し続けるものの、細胞壁が存在しないために細胞分裂ができず、その結果大腸菌は膨張し続ける。その大きさは、最大で約 $10\ \mu\text{m}$ 程になる。この巨大化されたプロトプラスト大腸菌内においても、細胞内部では DNA やタンパク質の

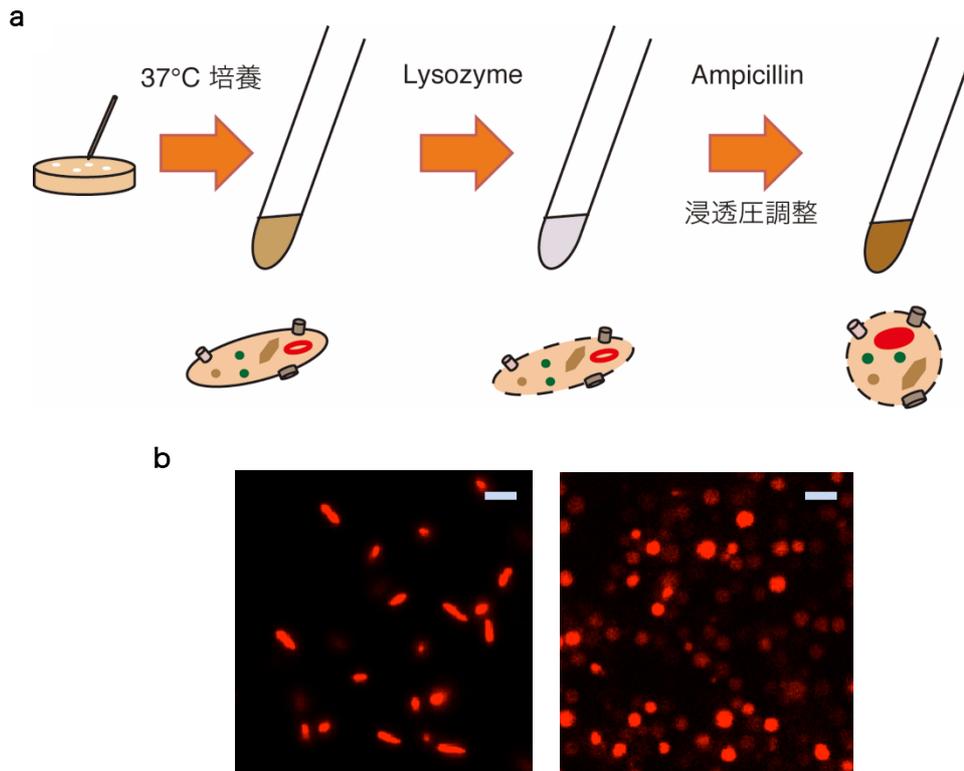


図 2-4 大腸菌のプロトプラスト化

(a) 大腸菌のプロトプラスト化の過程の概要図。培養された大腸菌に lysozyme を添加することで細胞壁を取り除き、浸透圧を調整した状態で培養を続ける。これによって、球状の菌体が得られる。詳細は S-1.3.2 項参照。(b) プロトプラスト処理前 (左) と処理後 (右) の tdTomato 発現大腸菌の顕微鏡画像。スケールバーは 5 μm 。

合成が確認されたことから、このような状態でも細胞内部の生命機能はある程度維持されていることが示唆されている。

2.1.4 本章の目的

細胞の機能に欠かせない細胞膜が再構成された微細加工デバイス ALBiC と、プロトプラスト化した大腸菌を利用し、我々は以下のような人工細胞の開発を行った。プロトプラスト化した大腸菌を ALBiC に流し込み、細胞膜がむき出しになっているプロトプラストと ALBiC の脂質二重膜を膜融合させる。正しく融合が起これば、各チャンバー内に大腸菌の細胞質が入りこみ、その結果、生きた細胞を構成する生体分子を全て ALBiC のチャンバー内に移植できる (図 2-5)。このように細胞質を直接反応容器に再構成することで、2.1.1 項で述べられた、細胞質の希釈が小さい *in vitro* 再構成が実現する。さらに、細胞膜が ALBiC 膜に融合するため、大腸菌に存在する膜タンパク質も全て再構成できる。我々はこの人工細胞を、「人工物と生命体のハイブリッド」という意味に由来して、Hybrid cell と呼ぶ。本章では、融合現象の詳細や、人工細胞としての遺伝子発現活性などを調べた。そして、細胞質の希釈を最小限に留めることで再現された分子クラウディング効果と、人工細胞の生理活性の相関について考察した。

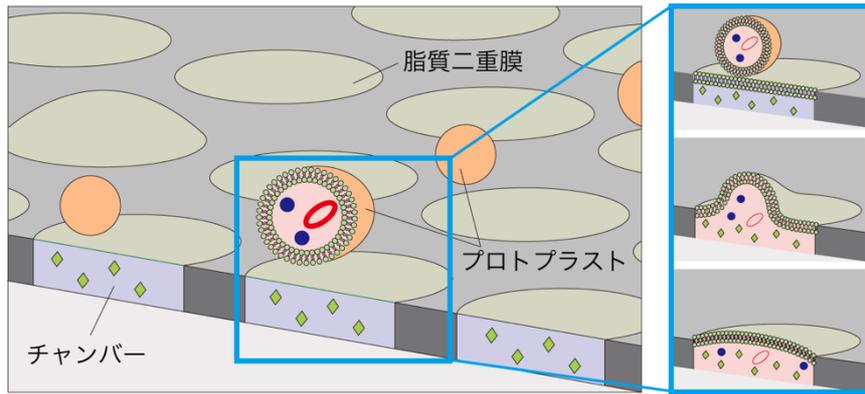


図 2-5 Hybrid cell の構築

大腸菌と ALBiC のチャンバーの融合の概要図。チャンバーの膜部分に大腸菌が触れると、一定の確率で膜融合が起こり、その結果、細胞質がチャンバー内へ移植される。

2.2 大腸菌と ALBiC チャンバーの融合

2.2.1 蛍光タンパク質と蛍光色素を用いた融合現象の可視化

まず、大腸菌と ALBiC のチャンバーが融合している様子を観察した。ALBiC への膜の再構成は、デバイスの流路内に、水溶液、脂質分子を溶解させた有機溶媒、そして再び水溶液、の順に溶液を流す方法で実現する²²。Hybrid cell 作製時は、最初に流す水溶液として、Tris バッファーと浸透圧調整のための高濃度スクロースを含む SP buffer を、最後に流す溶液として、プロトプラスト培養時に利用する特殊な培地である GP buffer を利用した（詳細は S-1.3.2 項、S-1.3.3.1 項参照）。最初に流す SP buffer に、膜を透過しない緑色蛍光色素 Alexa488 を混ぜることで、各チャンバーに Alexa488 を封入できる（図 2-6）。もし脂質二重膜が割れれば、色素が外に出るため、蛍光の有無で膜が張れているかどうか判断できる。ここに、赤色蛍光タンパク質 tdTomato を発現させたプロトプラスト（図 2-4）を流すと、膜の上にプロトプラストが乗ったチャンバーが見つかった。そのようなチャンバーをタイムラプス撮影で長時間観察すると、いくつかのチャンバーにおいて、プロトプラストの赤い蛍光が消え、同時にその蛍光がプロトプラストの乗っていたチャンバー内に移動した（図 2-7）。この現象は、大腸菌とチャンバーが融合したことを示唆している。より詳細に調べるために、チャンバーの断面図を融合前後で撮影すると、融合後に緑蛍光と赤蛍光がチャンバー内に局在していることがわかった（図 2-8）。つまり、膜が割れることなく、大腸菌の細胞質がチャンバー内の溶液と混ざっていることを確かめることができた。また、融合が起きたチャンバーでは、細胞質の融合によって、チャンバー内の溶液の体積が増加し、膜が盛り上がっている様子も観察された。一方で、チャンバーの底面が融合後に上がっている様子も観察された。この現象は、脂質分子を溶解させていた溶媒の一部が、融合現象の拍子に、チャンバーの底面に流れていったことに起因している可能性がある。

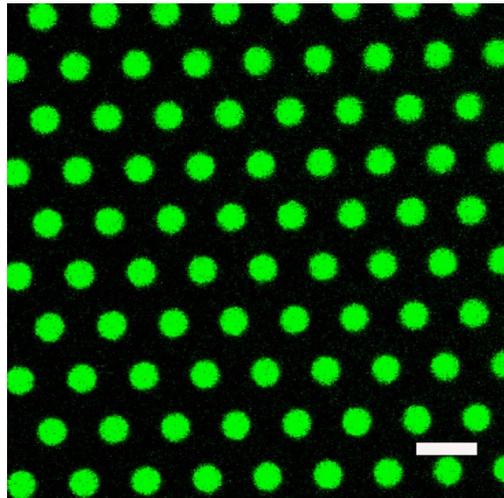


図 2-6 蛍光色素を用いた ALBiC の脂質二重膜の状態の可視化

緑色蛍光色素 Alexa488 (10 μ M) を ALBiC チャンバーに封入し、脂質二重膜を再構成した。脂質二重膜が割れると、色素は流路に流出してしまうため、蛍光シグナルが局在している箇所は膜が張れているチャンバーを示している。スケールバーは 8 μ m。

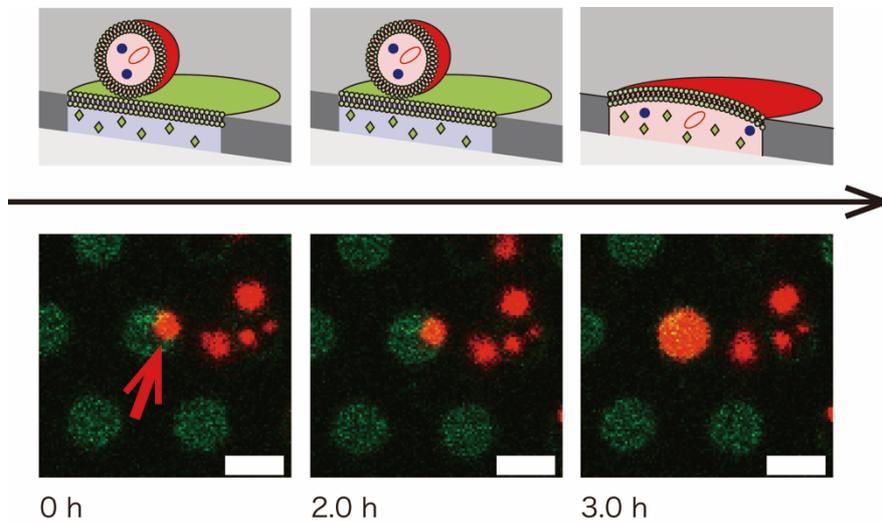


図 2-7 プロトプラストとチャンバーの融合現象

上段は現象の概要図を示し、下段が共焦点顕微鏡によって上から撮影された画像。赤く見える小さな丸い物体が tdTomato 発現プロトプラストを、緑色の大きな丸が Alexa488 の封入されたチャンバーを示す。赤矢印で示されたプロトプラストが、2～3 時間経過後にチャンバーの大きさに広がっているように見える。これは細胞質がチャンバー内に移動したことを表している。スケールバーは 4 μ m を示す。

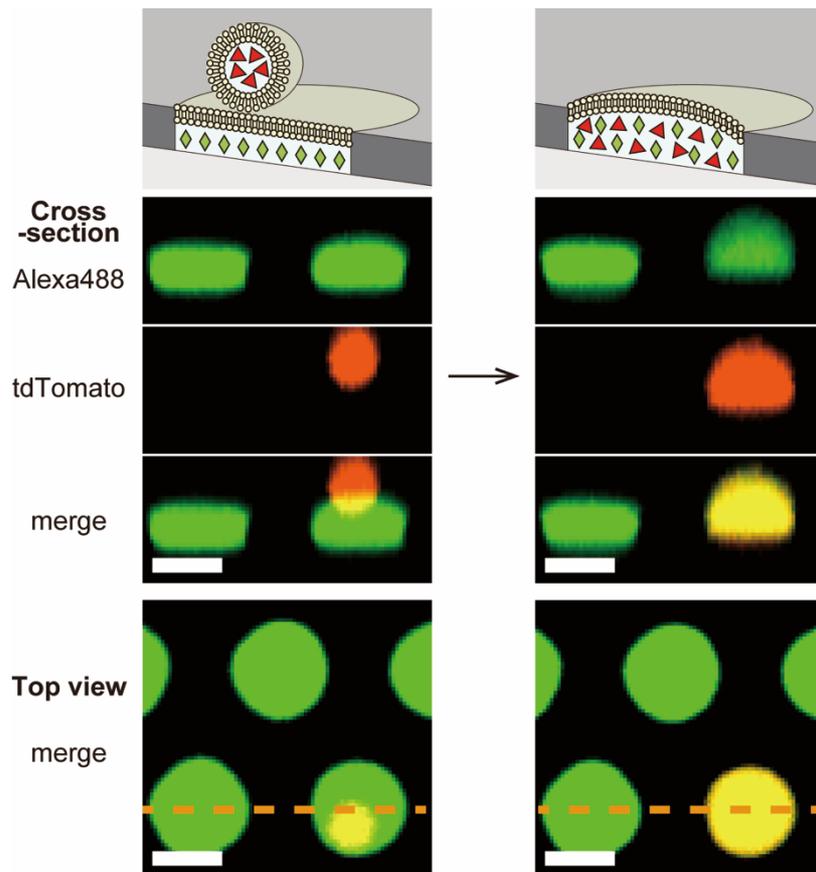


図 2-8 共焦点顕微鏡で撮影された、Hybrid cell の立体画像

共焦点顕微鏡によって撮影された、プロトプラストの融合前(左)と融合後(右)の断面画像(Cross-section、中段)と上から見た平面図(Top view、下段)。平面図上に点線で示された箇所の断面を撮影した。Alexa488とtdTomatoの光学系で撮影した各画像と、それらをマージさせた画像を載せた。スケールバーは4 μm を示す。向かって右側のチャンバーでプロトプラストが融合し、チャンバー内の溶液と細胞質が混合している様子が示されている。

2.2.2 融合確率の評価

Hybrid cellはデバイスの流路あたり、およそ20～100個発見されたが、各流路あたり16万個のチャンバーが存在していることから、その融合現象は確率的に起きていると言える。融合現象が起こる確率を速度論的に評価するために、プロトプラストとALBiCチャンバーのインキュベーション時間を変えながら融合の個数を数えた。プロトプラストをALBiC流路に注入後、指定された時間で流路内に存在する余剰のプロトプラストを洗い流すことで、それ以上融合が起こらないようにし、その上でHybrid cellの個数を数えた(図2-9)。その結果、融合現象は最初の30分間で既に完了しており、インキュベーション時間を増やしても個数は大きく変化しなかった。その平均個数は、流路あたり約40個であった。インキュベーション中、チャンバーの上に乗ったプロトプラストの個数はおよそ12,000個と見積もられるため(S-2.1項参照)、その0.3%のプロトプラストが融合するという、極めて低い確率で膜融合現象が起きていた(図2-10)。

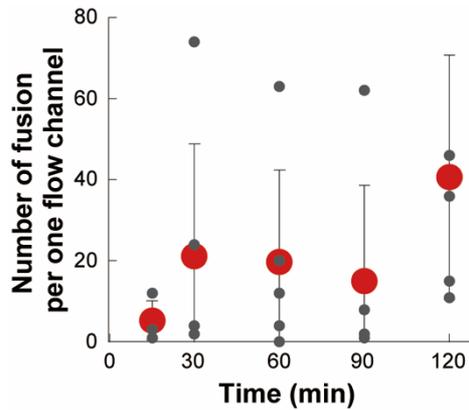


図 2-9 融合個数の時間変化

t = 0 (h) をデバイスにプロトプラストを注入した時間とし、指定の時間で余剰のプロトプラストを洗い流す。その後、融合が起きた個数を数えた。実験はそれぞれ3～5回行われ、各試行時の融合個数を黒点で示し、その平均を赤い丸で示した。エラーバーは標準偏差を表す。

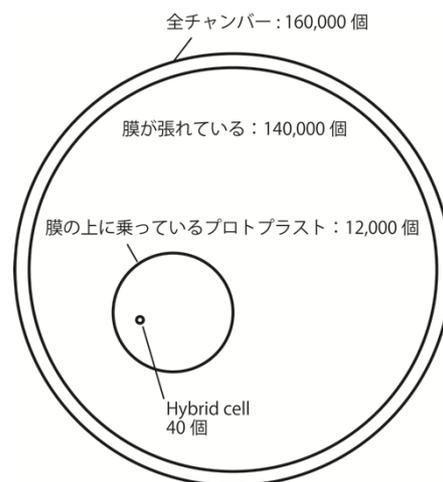


図 2-10 全チャンパーの個数、膜に乗ったプロトプラストの個数、Hybrid cell の個数
それぞれ見積もられた要素数の関係性をベン図で表した。

2.2.3 プロトプラストの膜成分の融合

他の人工細胞系とは異なる、Hybrid cell 独自の特長の一つとして、生きた細胞の全膜成分を膜融合によって再構成できている点が挙げられる。プロトプラスト化大腸菌の膜成分が ALBiC 膜に再構成されていることを確かめるために、プロトプラスト化大腸菌の細胞膜を蛍光染色し、チャンパーと融合させた (図 2-11)。プロトプラスト化大腸菌の膜を染めるために、蛍光標識された脂質分子である、1-palmitoyl-2-(dipyrrrometheneboron difluoride)undecanoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine (TopFluor-PS) をプロトプラストに取り込ませ^{157,158}(図 2-11a)、ALBiC に注入した。TopFluor-PS は緑蛍光を発するため、ALBiC 内には青蛍光を発する Alexa405 を封入し、赤蛍光タンパク質である tdTomato をプロトプラストに発現させた。

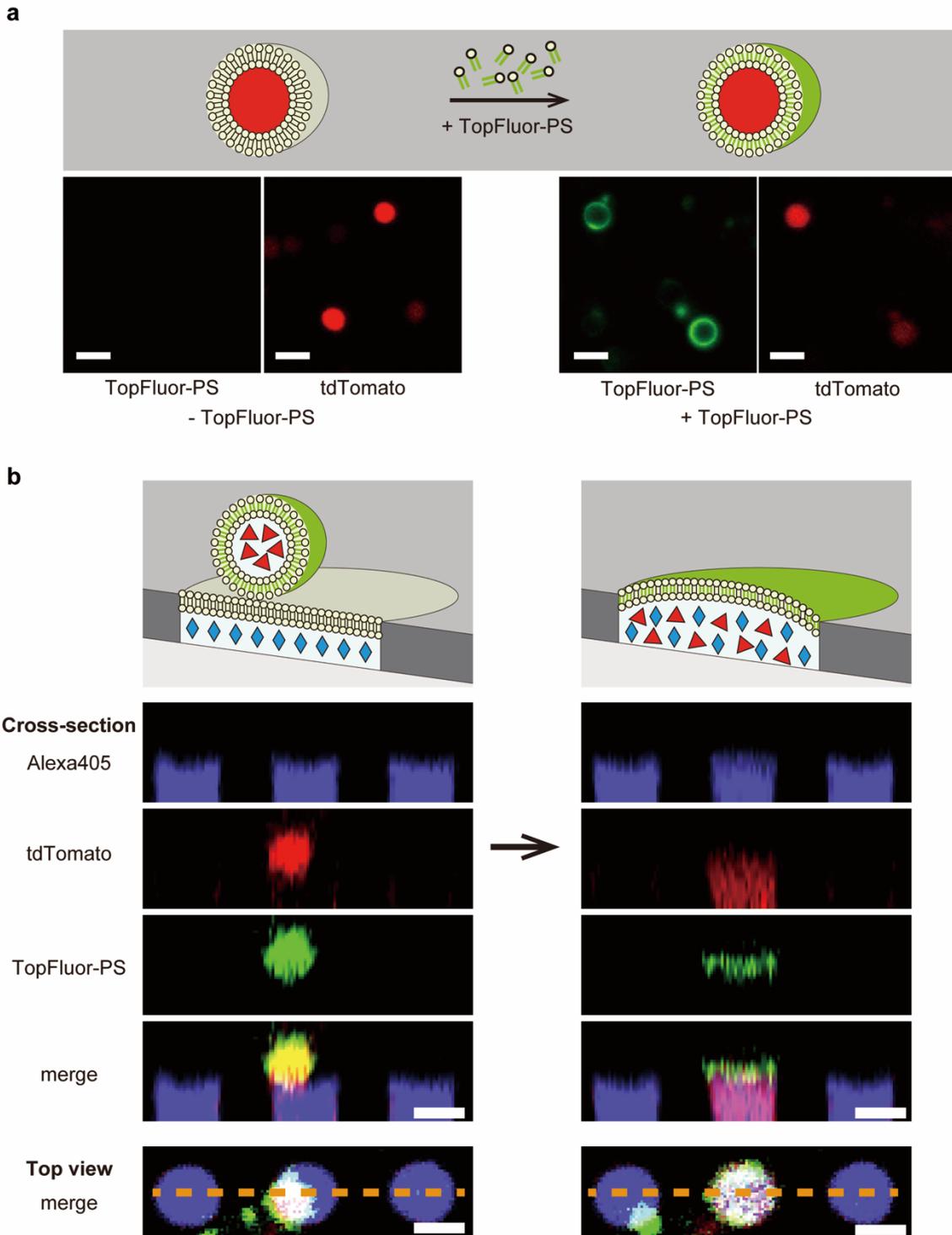


図 2-11 プロトプラストの細胞膜の染色と、その膜と ALBiC チャンバーの融合

(a) TopFluor-PS で膜が染色されたプロトプラスト大腸菌。発現された tdTomato の赤蛍光と TopFluor-PS の緑蛍光を、TopFluor-PS の非添加時と添加時で、それぞれ共焦点顕微鏡で撮影した。スケールバーは 4 μm 。(b) 膜を蛍光染色したプロトプラストの融合。共焦点顕微鏡によって撮影された、プロトプラストの融合前 (左) と融合後 (右) の断面画像 (Cross-section、中段) と上から見た平面図 (Top view、下段)。平面図上に点線で示された箇所を撮影した。Alexa405、TopFluor-PS、tdTomato の各光学系で撮影した各画像と、それらをマージさせた画像を載せた。スケールバーは 4 μm 。

TopFluor-PS は、ALBiC の膜成分にも取り込まれてしまうため、プロトプラストと反応させた後の TopFluor-PS は遠心によって洗い流され、菌の懸濁液も 50 倍に希釈された状態で ALBiC 内に注入された。そのため、融合現象の個数は大きく減少したものの、いくつかのチャンバーで Hybrid cell が見つかった (図 2-11b)。すると、プロトプラストの膜に局在していた TopFluor-PS 由来の緑蛍光が、融合と同時に ALBiC 膜に局在した。これは、プロトプラスト型大腸菌の膜成分が ALBiC の膜成分に移植されたことを示しており、Hybrid cell が、生きた細胞の細胞膜成分を保持していることが確かめられた。

さらに、Hybrid cell の膜タンパク質が正常に機能しているかどうかを調べるために、Hybrid cell の膜電位の測定を試みた。呼吸鎖伝達系に含まれるトランスポーター膜タンパク質 cytochrome *bo* がプロトンを送ることで生じる膜電位は、エネルギー物質で ATP の合成に用いられるため、膜電位は細胞が活着しているかどうかを調べる上でも重要な指標になる。膜電位感受性色素である Tetramethylrhodamine (TMRM) は、膜電位が存在すると細胞膜の内側に取り込まれるため、膜内への蛍光の局在から膜電位の有無を判定できる。この TMRM を Hybrid cell に添加し、さらに、cytochrome *bo* の基質である水溶性のユビキノール-1 を添加した。しかし、TMRM の蛍光はデバイス表面などの疎水性部分に非特異的に結合してしまい、Hybrid cell の膜への局在は観察できなかった。異なる種類の膜電位プローブである DiBAC4(3) も Hybrid cell の膜電位計測を行うために試されたが、同様にデバイスへの吸着が見られ、膜部分への局在は観察されなかった。

2.3 Hybrid cell の遺伝子発現活性の評価

2.3.1 ALBiC への DNA 導入によるタンパク質翻訳活性の測定

Hybrid cell 内の生理機能が維持されているかどうかを確かめるために、遺伝子発現活性を評価した。融合後にタンパク質を合成させるために、予め融合前に、目的タンパク質をコードしたプラスミド DNA を封入し、融合後にタンパク質が合成されているかどうかを計測する。合成させる目的タンパク質として、本実験では β -galactosidase (β -gal) を用いた。 β -gal は糖のグリコシド結合を加水分解する酵素で、遺伝子工学や生化学計測などで広く用いられている。 β -gal 遺伝子である *lacZ* をコードした DNA 領域の上流に *lac* プロモーターを配置し、融合させるプロトプラスト大腸菌として、*lacZ* と *lacI* がノックアウトされた Top10 株を使用した。これによって、融合前には β -gal を発現しない大腸菌が、融合後に *lacZ* をコードしたプラスミドを取り込むことによって、発現誘導なしでタンパク質合成をスタートさせるように設計した。

β -gal の活性を測るための基質として、Fluorescein di- β -D-Galactopyranoside (FDG) が頻繁に用いられる。FDG は緑色蛍光色素であるフルオレセインに糖が結合した構造を取っており、 β -gal によって加水分解されると、フルオレセインが生成され、蛍光で酵素活性を評価できる仕組みになっている。しかし、フルオレセインは膜透過性が高いため、ALBiC チャンバー内に局在しにくく、本実験には適していない (図 2-12)。そこで本研究では、代替りの基質として、Spiro-based immobilisable diethylrhodol- β Gal (SPiDER- β Gal) を使用した (図 2-13)¹⁵⁹。この基質が β -gal によって分解されると、周囲のタンパク質に結合し、その後蛍光を発する。そのため、FDG と違い、生成された蛍光物質に膜透過性がなく、チャンバー内にも局在しやすいことが

期待される。分解される前の SPiDER- β Gal は膜を透過するので、ALBiC の流路内に SPiDER- β Gal を含む培地を流すことで、チャンバー内に SPiDER- β Gal を入れることができる。SPiDER- β Gal が Hybrid cell 内のタンパク質の働きを阻害してしまうことを懸念し、基質 SPiDER- β Gal は大腸菌が融合後 3 時間経過してから添加するように設定した。

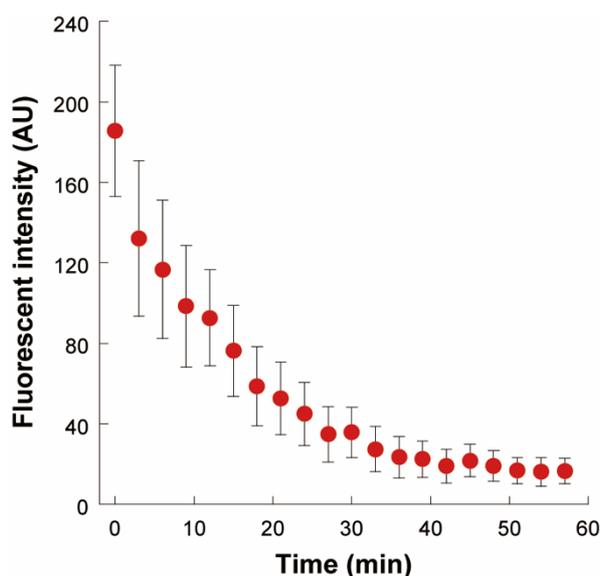


図 2-12 ALBiC チャンバー内に封入したフルオレセインの蛍光の減少

10 μ M のフルオレセインを SP buffer に溶解させ、ALBiC 内のチャンバー内に封入し、タイムラプス撮影によって、蛍光の時間変化を観察した。約 200 個のチャンバーの蛍光強度を計測し、その平均と標準偏差をプロットした。その結果、時間が経つに連れて強度が減少しており、フルオレセインが外に漏れ出していることが示された。

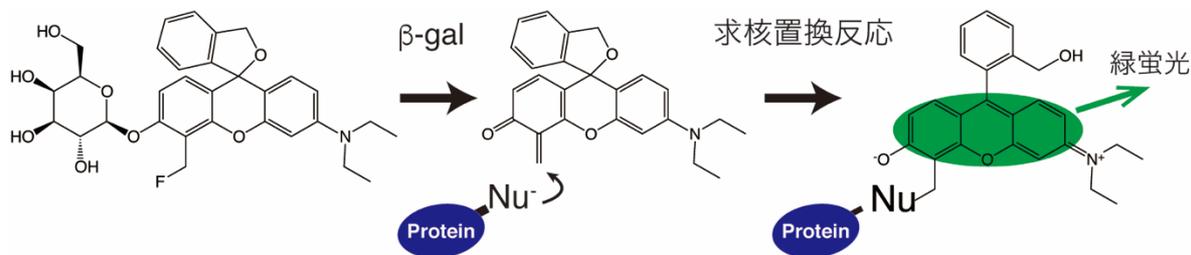


図 2-13 Spiro-based immobilisable diethylrhodol- β Gal (SPiDER- β Gal) の反応¹⁵⁹

以上の系を用いた実験操作は以下の通りになる (図 2-14a)。β-gal をコードしたプラスミドを ALBiC のチャンバーに封入して膜を再構成する。膜を再構成する前に流す SP buffer 内にプラスミド DNA を混ぜることで、それを封入させる。各チャンバーに 2.73×10^2 個のプラスミドが封入されるように、30 ng/μL (8.8 nM) の DNA 濃度を ALBiC のチャンバー内に注入した。このプラスミドの個数は、ハイコピープラスミドが大腸菌内に存在する個数よりも多いため、タンパク質発現には十分な遺伝子量であると考えられる。PURE システムのような無細胞タンパク質合成系を用いる場合でも、この DNA 濃度は反応に十分な量にあたる。そこに、*lacZ* がノックアウトされた Top10 株大腸菌のプロトプラストを流す。Hybrid cell を識別するために、このプロトプラストは青色蛍光タンパク質 mseCFP を発現させている。1 時間インキュベートし、その後余剰のプロトプラストを洗い流し、タンパク質発現に要する反応時間を確保するために、30 °C で 3 時間インキュベートする。その後、300 μM の SPiDER-β Gal を含む GP 培地を ALBiC 内に注入し、同時に、見つかった複数の Hybrid cell を共焦点顕微鏡でタイムラプス撮影した。すると、全 Hybrid cell の内のいくつかで、SPiDER-β Gal 由来の緑色蛍光がチャンバー内から観察された (図 2-14b、c)。

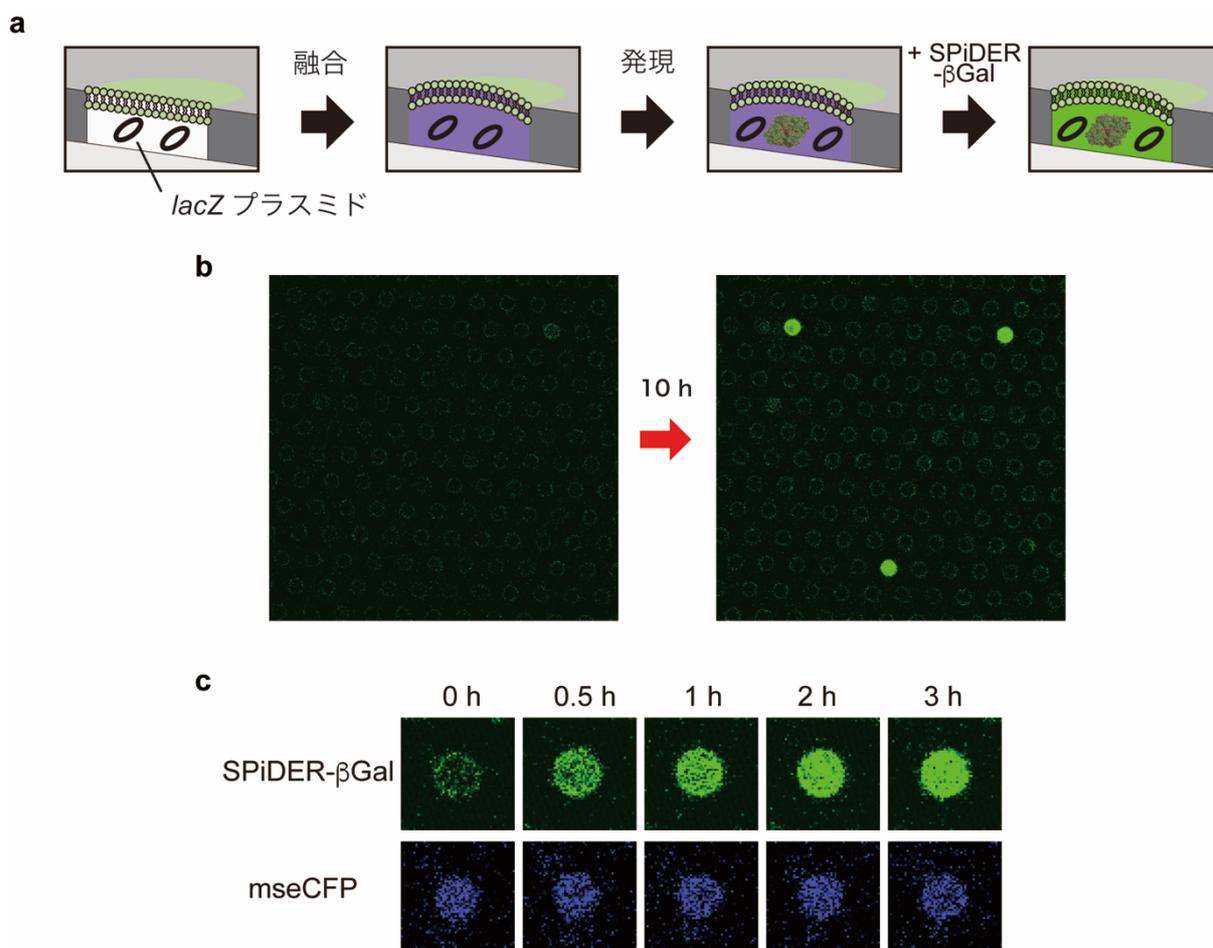


図 2-14 SPiDER-β Gal を用いた、Hybrid cell の遺伝子発現活性の測定

(a) 実験操作を表す模式図。本文参照。(b) ALBiC のいくつかのチャンバーで SPiDER-β Gal の蛍光が上昇した。(c) Hybrid cell の SPiDER-β gal の蛍光と (上段)、mseCFP の蛍光を撮影した画像。mseCFP は融合したプロトプラストが発現していた青色蛍光タンパク質。

Hybrid cell における β -gal の発現量を評価するために、全 Hybrid cell について、SPiDER- β Gal の蛍光のタイムコースを測定し (図 2-15a)、各時間変化の時間に対する傾きを求め、ヒストグラムを作成した (図 2-15b 上段)。このデータをコントロール実験と比較するために、タンパク質の翻訳領域を持たない空のプラスミドベクター pET9a を Hybrid cell に封入して、同様の実験・解析を行った。さらに、*lacZ* をコードしたプラスミドを封入し、タンパク質合成を阻害する抗生物質であるクロラムフェニコールを添加した Hybrid cell についても同様の実験・解析を行った。これら二条件では、緑蛍光は観察されず、その傾きは最大 8.0 AU/h であった (図 2-15b 中・下段)。この値を、 β -gal が発現している Hybrid cell としていない Hybrid cell の傾きの閾値と定義した。その結果、*lacZ* プラスミドを封入した場合、全体の 20.9% の Hybrid cell が β -gal を合成していたことがわかった。

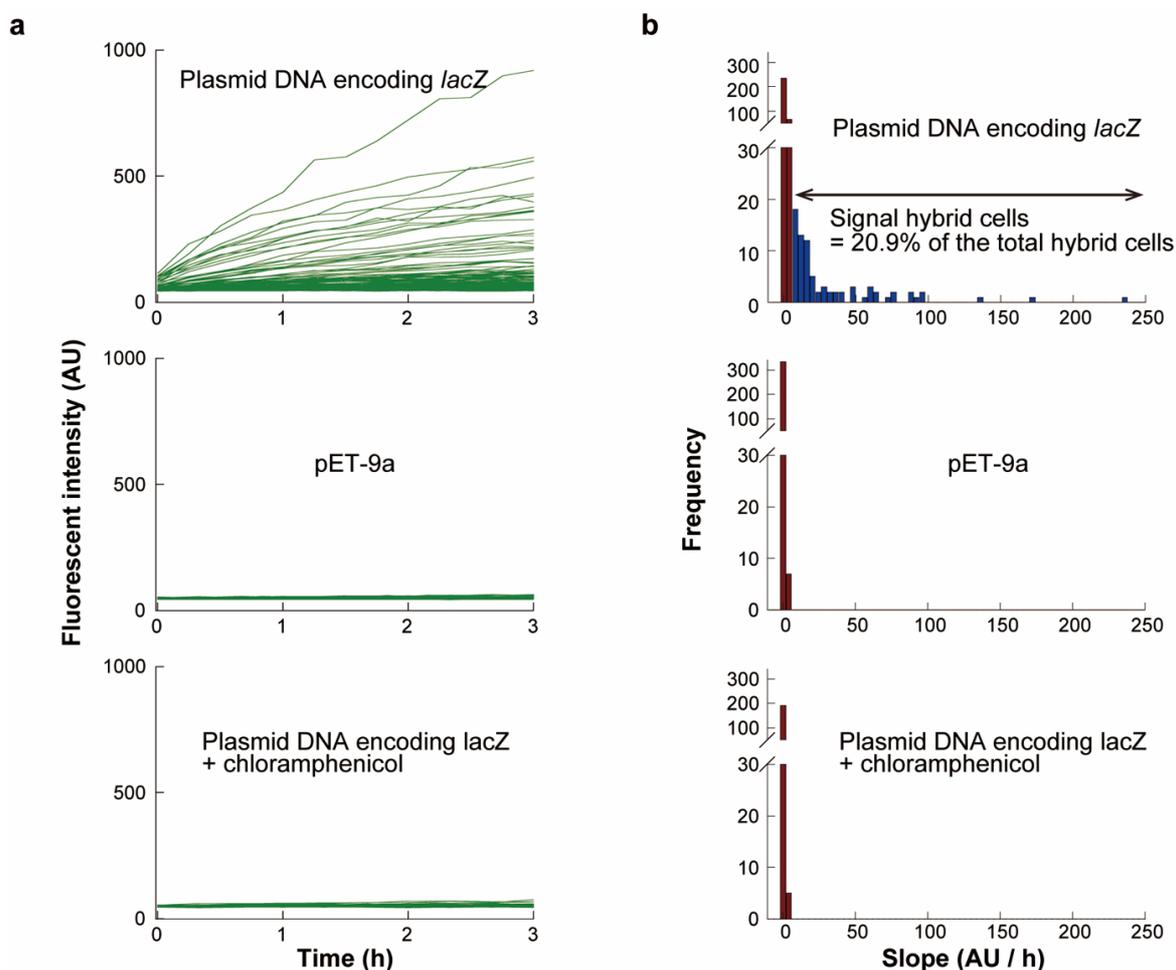


図 2-15 Hybrid cell 内に封入した DNA からの β -gal の合成活性の測定

(a) 全 Hybrid cell の SPiDER- β Gal の蛍光のタイムコース。それぞれ、(上段) *lacZ* をコードしたプラスミドを封入した Hybrid cell、(中段) タンパク質をコードしていない空のプラスミドを封入した Hybrid cell、(下段) *lacZ* をコードしたプラスミドを封入し、タンパク質合成活性を阻害する抗生物質クロラムフェニコールを添加した Hybrid cell の時間変化を載せた。横軸に時間、縦軸に蛍光強度を表す。(b) (a) における全 Hybrid cell のタイムコースについて、それぞれ時間に対する傾きを求めてヒストグラム化した。横軸は傾き (AU/h)、縦軸が頻度 (Hybrid cell の個数) を表す。pET9a の条件やクロラムフェニコール添加条件における傾きから、 β -gal が存在していない Hybrid cell における蛍光の時間変化の閾値が 8.0 AU/h と見積もられた (赤棒グラフ)。ここから、*lacZ* をコードしたプラスミドを封入した場合に β -gal が合成された Hybrid cell の数を定量すると、全 Hybrid cell の 20.9% で β -gal が合成されていることがわかった (青棒グラフ)。

2.3.2 精製された β -gal を用いた合成量の評価

Hybrid cell によって合成された β -gal の分子数を見積もるために、精製された β -gal を封入した Hybrid cell を作製し、その酵素活性を調べた。封入する精製 β -gal の濃度を変えることで、チャンバー 1 個あたりに封入される β -gal 分子数を変えながら、SPiDER- β Gal の蛍光強度を解析した (図 2-16a)。各タイムコースについて、時間に対する傾きを求め、チャンバーあたりの β -gal 分子数に対する検量線を作成した (図 2-16b)。得られた検量線と図 2-15 における傾きを照合させると、Hybrid cell 内では平均約 25 分子の β -gal が合成されていることと見積もられた。この値は、大腸菌内で合成されるタンパク質の分子数よりも極めて小さく、封入した遺伝子の分子数よりも少ない。封入したプラスミドの個数の条件などは生きた大腸菌とは異なるため、厳密な比較はできないが、Hybrid cell のタンパク質合成活性は、生きた大腸菌よりも小さいことが示唆された。

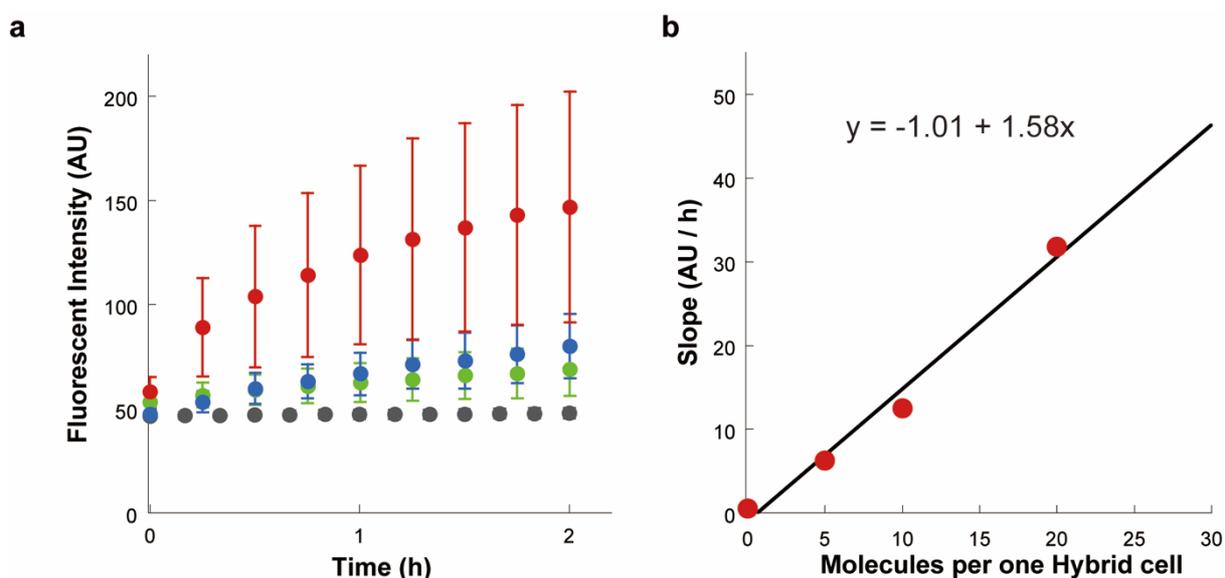


図 2-16 封入された精製 β -gal の物質質量に対する SPiDER- β Gal の蛍光強度の関係

(a) 異なる濃度の個数の β -gal 分子を Hybrid cell に封入した際の、SPiDER- β Gal との反応のタイムコース。黒、薄緑、青、赤の点はそれぞれ分子数が 0 分子、5 分子、10 分子、20 分子のデータを示している。エラーバーは標準偏差を示す。(b) Hybrid cell 内の β -gal 分子数と、(a) の各タイムコースの時間に対する傾きの相関。横軸に各 Hybrid cell に封入された β -gal 分子数、縦軸に蛍光変化の傾き (AU/h) としてプロットし、直線近似した。得られた数式から、図 2-15 において Hybrid cell 内で合成された β -gal の分子数を見積もると、約 25 分子となった (本文参照)。

2.3.3 ALBiC への mRNA 導入によるタンパク質翻訳活性の測定

2.3.1 項では、酵素 β -gal をコードしたプラスミド DNA を Hybrid cell に封入することで、Hybrid cell のタンパク質合成活性を評価した。次に、酵素 β -gal をコードした mRNA を Hybrid cell 内に導入し、同様にタンパク質合成活性を評価することで、翻訳反応と転写反応の活性を比較する。2.3.1 項のプラスミド DNA 導入実験時と同様に、mRNA を ALBiC チャンバー内に封入して脂質二重膜を再構成する。翻訳反応を十分進ませるために、大腸菌内に存在する mRNA 数 (mRNA は大腸菌内に数千個存在するが、同一 mRNA は数コピーしか存在しない) よりも過剰量の mRNA (1.44×10^3 分子、95 nM) をチャンバー内に封入した。ここに、*lacZ* がノックアウトされ、青色蛍光タンパク質 mseCFP を発現している Top10 株大腸菌のプロトプラストを流す。1 時間のインキュベート後、余剰のプロトプラストを洗い流し、さらに 30 °C で 3 時間インキュベートする。その後、300 μ M の SPiDER- β Gal を含む培地を ALBiC 内に注入し、複数の Hybrid cell を共焦点顕微鏡でタイムラプス撮影した。結果、プラスミド DNA 導入実験の時と同様、いくつかの Hybrid cell で SPiDER- β Gal 由来の緑色蛍光が観察され、 β -gal の発現が確認されたので (図 2-17a)、各タイムコースの時間に対する傾きを求め、そのヒストグラムを作成した (図 2-17b)。タンパク質の翻訳領域がない空のプラスミド pET-9a を Hybrid cell に封入した際の蛍光強度の時間に対する傾きと比較することで、 β -gal が発現している Hybrid cell を特定すると、全 Hybrid cell の 23.4% のチャンバーで発現が起きていることが確かめられた。この確率は、プラスミド DNA を封入した際の発現確率と同等であることから、Hybrid cell 内における遺伝子発現反応のボトルネックは、転写反応ではなく翻訳反応であることが示唆された。

2.4 細胞質の希釈割合と遺伝子発現活性の相関

Hybrid cell における分子クラウディング効果を評価するために、融合時に細胞質がどの程度希釈されているのかを見積もりたい。しかし、使用しているプロトプラストの大きさはばらついているため、それぞれの Hybrid cell における細胞質の希釈の度合いは異なっている。そこで、個々の Hybrid cell において、どれくらい細胞質が希釈されたのかを見積もることで、その希釈度合いと、遺伝子発現活性に相関があるかどうか調べた。その方法として、プロトプラストが蛍光色素を封入したチャンバーと融合した際に、チャンバー内の蛍光色素の蛍光強度が減少する現象を利用する (図 2-18)。これは細胞質がチャンバー内に追加されたことで、チャンバーの溶液が増加していることに起因しているため、体積が異なるプロトプラストでも細胞内高分子濃度が一定であると仮定した場合、チャンバー内蛍光色素の強度の減少の度合いを調べれば、Hybrid cell にどのくらいの大きさのプロトプラストが融合したかを見積もることができ、細胞質がどのくらい希釈されているかを見積もることができると考えた (図 2-18)。なお、蛍光物質が極めて高密度の生体分子溶液中に存在する際、蛍光が退色 (クエンチ) してしまう現象が知られているが、Water-in-Oil ドロップレットチャンバー内で大腸菌を破裂させた実験 (後述、2.7 項参照) において、大腸菌破裂の前後で封入しておいた Alexa405 の蛍光強度が変化しなかったことから (図 2-23)、この現象によって蛍光強度が退色している可能性は低い。

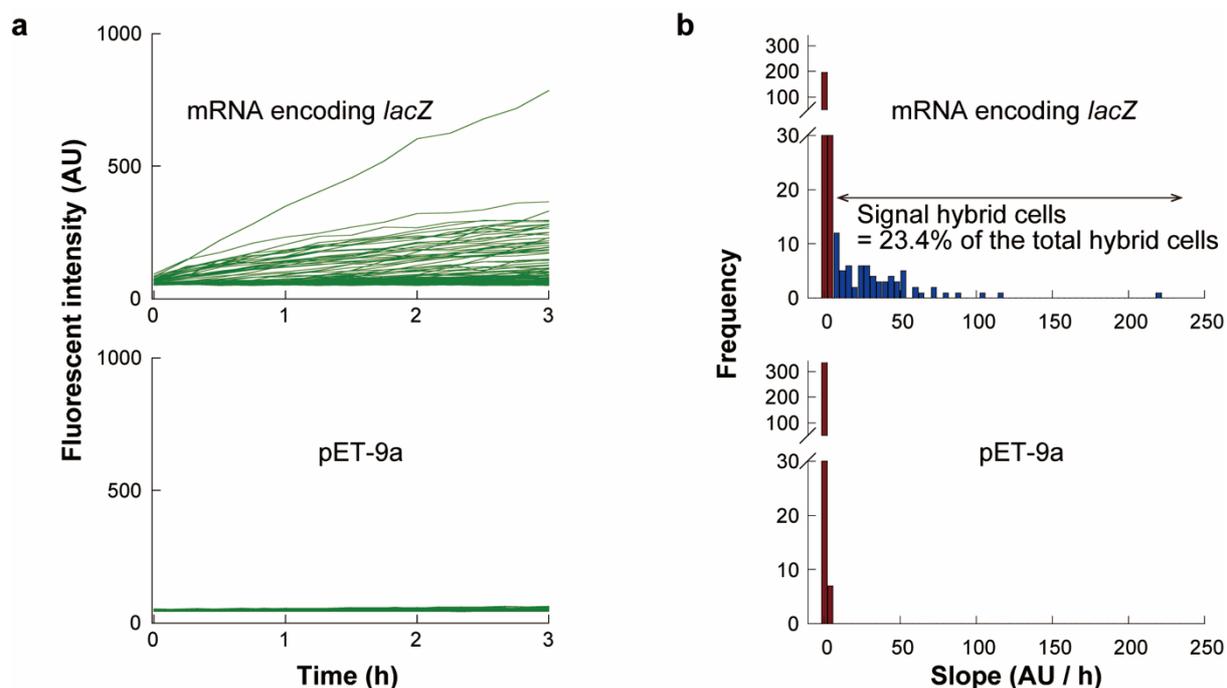


図 2-17 Hybrid cell 内に封入した mRNA からの β -gal 合成活性の測定

(a) 全 Hybrid cell の SPiDER- β Gal の蛍光のタイムコース。それぞれ、(上段) *lacZ* をコードした mRNA を封入した Hybrid cell と、(下段) タンパク質をコードしていない空のプラスミドを封入した Hybrid cell (下段、図 2-16 と同じデータ) の時間変化を載せた。横軸に時間、縦軸に蛍光強度を表す。(b) (a) における全 Hybrid cell のタイムコースについて、それぞれ時間に対する傾きを求めてヒストグラム化した。横軸は傾き (AU/h)、縦軸が頻度 (Hybrid cell の個数) を表す。pET9a の条件における傾きから、 β -gal が存在していない Hybrid cell の傾きの閾値が 8.0 AU/h と見積もられた (赤棒グラフ)。ここから、*lacZ* をコードした mRNA を封入した場合に β -gal が合成された Hybrid cell の数を定量すると、全 Hybrid cell の 23.4% で β -gal が合成されていることがわかった (青棒グラフ)。

各 Hybrid cell における細胞質の希釈の割合は、蛍光強度の減少の割合から以下の計算の通り求めた。希釈の割合は「融合後の Hybrid cell の体積 \div 融合前のプロトプラストの細胞質体積」の値を指標とした。この値は「細胞質が〇〇倍に希釈された」という指標を表すことになる。融合前のチャンバーの体積とプロトプラストの体積を $V_{chamber}$ 、 $V_{protoplast}$ 、融合後の Hybrid cell の体積を $V_{Hybrid\ cell}$ と記す場合、希釈の割合は $(V_{Hybrid\ cell} / V_{protoplast})$ と表される。各体積値と、チャンバー内に封入されている Alexa405 の物質質量 n と、融合前後のチャンバー内の Alexa405 の蛍光強度 Int_{before} と Int_{after} の間には、次の関係式が成り立つ。

$$\frac{Int_{after}}{Int_{before}} = \frac{\frac{n}{V_{Hybrid\ cell}}}{\frac{n}{V_{chamber}}} = \frac{V_{chamber}}{V_{Hybrid\ cell}} = \frac{V_{chamber}}{V_{chamber} + V_{protoplast}} \quad (1)$$

この関係式は融合前後で Alexa405 がチャンバー外に流出しないことが前提となる。この式 (1) を変形することで、求める希釈の割合 $(V_{Hybrid\ cell} / V_{protoplast})$ は以下の式で表される。

$$\frac{V_{\text{hybrid cell}}}{V_{\text{protoplast}}} = \frac{1}{\frac{V_{\text{protoplast}}}{V_{\text{chamber}} + V_{\text{protoplast}}}} = \frac{1}{1 - \frac{V_{\text{chamber}}}{V_{\text{chamber}} + V_{\text{protoplast}}}} = \frac{1}{1 - \frac{Int_{\text{after}}}{Int_{\text{before}}}} \quad (2)$$

このように、Alexa405 の強度の減少割合から、プロトプラストの細胞質が何倍に希釈されたかを評価できる。

希釈割合と遺伝子発現活性の相関を求めるために、Alexa405 と *lacZ* をコードしたプラスミドをチャンバー内に封入した状態で脂質二重膜を再構成し、その ALBiC デバイスに緑色蛍光タンパク質 GFPuv を発現するプロトプラストを注入した。注入後 1 時間インキュベートし、余剰のプロトプラストを洗い流した後、融合が起きたチャンバーを探し、そこにおける Alexa405 の強度を計測した。プロトプラストを洗浄してから 3 時間後、 β -gal の基質である SPiDER- β Gal を ALBiC デバイス内に流し、 β -gal の酵素反応を開始させた。同時に、タイムラプス撮影を開始し、蛍光強度の時間変化を計測した。なお、ここで測定した SPiDER- β Gal の蛍光は、GFPuv と重ならないように長波長側の蛍光を計測した (S-1.3.4 項参照)。以上の測定より、Hybrid cell ごとの Alexa405 の減少割合から細胞質の希釈の度合い ($V_{\text{Hybrid cell}} / V_{\text{protoplast}}$) を、SPiDER- β Gal のタイムコースから遺伝子発現活性を求め、その相関を調べた。求められた各 Hybrid cell の細胞質の希釈の度合いは、およそ 1.0 倍から 20 倍まで幅広く分布した (平均: 3.0、SD: 5.89) (図 2-19a)。発現活性が確認された Hybrid cell の割合は 8.5% となり、図 2-15 の結果よりも小さな値となった。この原因は判明していないが、蛍光色素 Alexa405 が Hybrid cell 内に封入されたことで、Hybrid cell の遺伝子発現活性が弱まってしまった可能性が考えられる。細胞質の

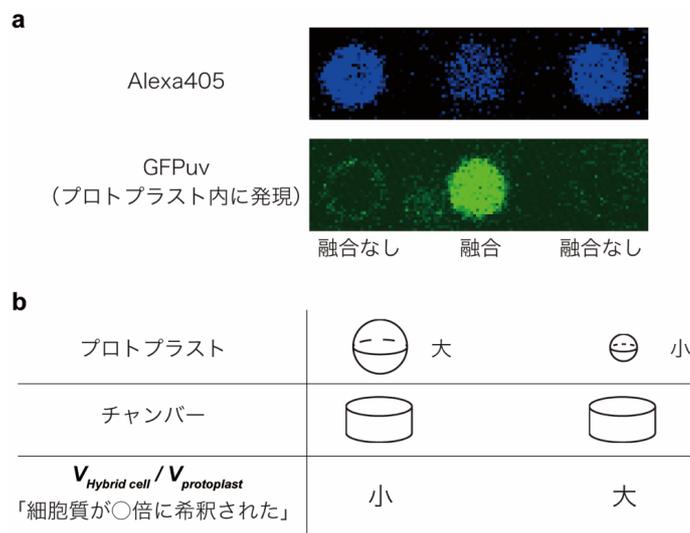


図 2-18 Hybrid cell 内の蛍光色素を用いた、細胞質の希釈割合の評価

(a) Alexa405 を封入した ALBiC チャンバーと、緑色蛍光タンパク質 GFPuv の融合の画像。真ん中のチャンバーにプロトプラストが融合しており、そのチャンバーのみ、Alexa405 の蛍光強度が下がっている。(b) 融合するプロトプラストの大きさと、細胞質の希釈度合いを表す $V_{\text{Hybrid cell}} / V_{\text{protoplast}}$ の値の関係を表現した模式図。 $V_{\text{Hybrid cell}} / V_{\text{protoplast}}$ が小さいほど、大きなプロトプラストが融合したことになり、細胞質はあまり希釈されていない。一方、この値が大きいくほど、小さなプロトプラストが融合したために、細胞質は大きく希釈されていることを示している。

希釈の度合いと、遺伝子発現活性が起きる割合の関係を調べると、統計的に十分な数のデータが得られた 1.0 ~ 2.0、2.0 ~ 3.0、3.0 ~ 4.0 の間では、両者に大きな相関はなく、一定の確率値を持つことが示された (図 2-19b)。したがって、Hybrid cell が遺伝子発現活性を維持する確率の低さは、細胞質の希釈の度合いに由来するものではなく、他の要因が影響している可能性が考えられる。

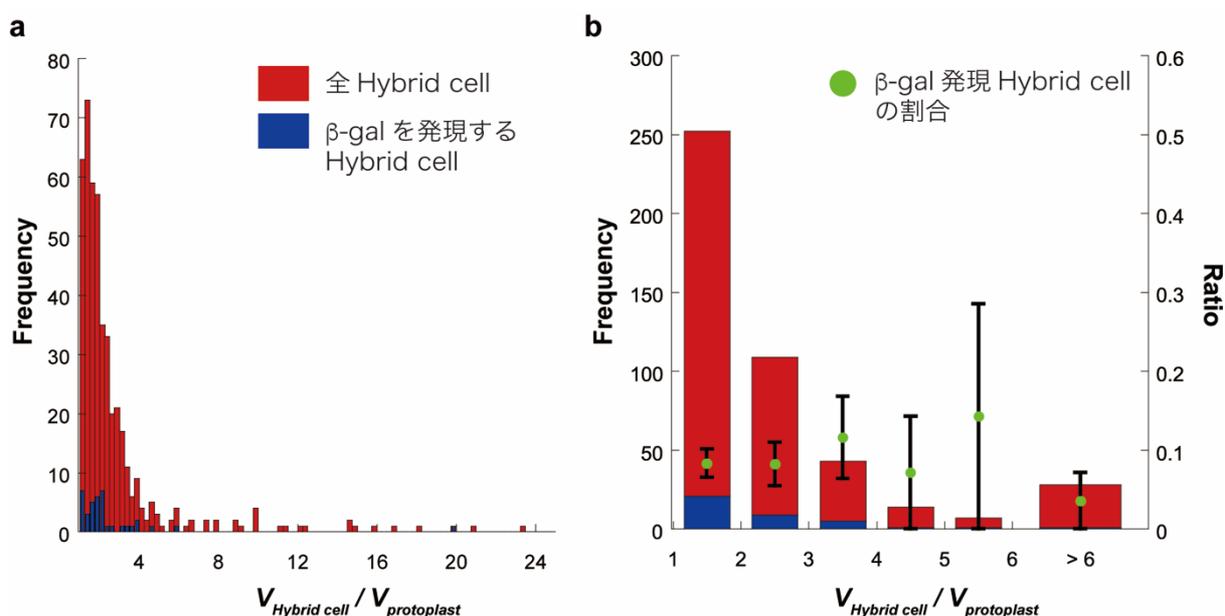


図 2-19 細胞質の希釈度合いと、Hybrid cell の遺伝子発現活性の関係

(a) 各 Hybrid cell における細胞質の希釈の度合いを表したヒストグラム。x 軸は「融合後の Hybrid cell の体積 ÷ 融合前のプロトプラストの体積」($V_{Hybrid\ cell} / V_{protoplast}$) の値、y 軸は頻度 (Hybrid cell の個数) を示す。赤と青の棒グラフはそれぞれ、全 Hybrid cell のデータと、その中で β -gal が発現していると判定された Hybrid cell のデータを示している。(b) (a) の図の x 軸の範囲を拡大し、ビン幅を大きくしたヒストグラム。緑丸印は、各希釈度合い値の範囲における、 β -gal が発現していると判定された Hybrid cell の個数の割合を示している。エラーバーは標準偏差を示す。

2.5 Hybrid cell の膜変形現象の調査

細胞が生きていることを示す上で重要な生命機能の一つが、細胞の成長と膜の変形、それに伴う分裂である。そこで、Hybrid cell を長時間観察し、これらの現象が起きるかどうか調べた。脂質二重膜が張れていることを確かめるために、ALBiC チャンバー内に Alexa405 を封入し、そこに GFPuv を発現する大腸菌を融合させ、Hybrid cell を構築した。その後、15 ~ 20 時間連続でタイムラプス撮影した。数回の試行を通じて、合計 434 個の Hybrid cell について観察を行ったが、膜部分の成長や分裂現象を観察することはできなかった。つまり、プロトプラストの膜成分を再構成した Hybrid cell でも、膜の成長や分裂機構を再構成することはできていない可能性が高い。

なお、チャンバー内に蛍光色素を封入せずにプロトプラストを融合させた場合、極めて少ない確率ではあるが、Hybrid cell の膜部分で膜が大きく成長する現象が見られた (図 2-20)。この現象は、細胞壁を持たないバクテリアの形態である L-form バクテリアの細胞分裂の様子に類似

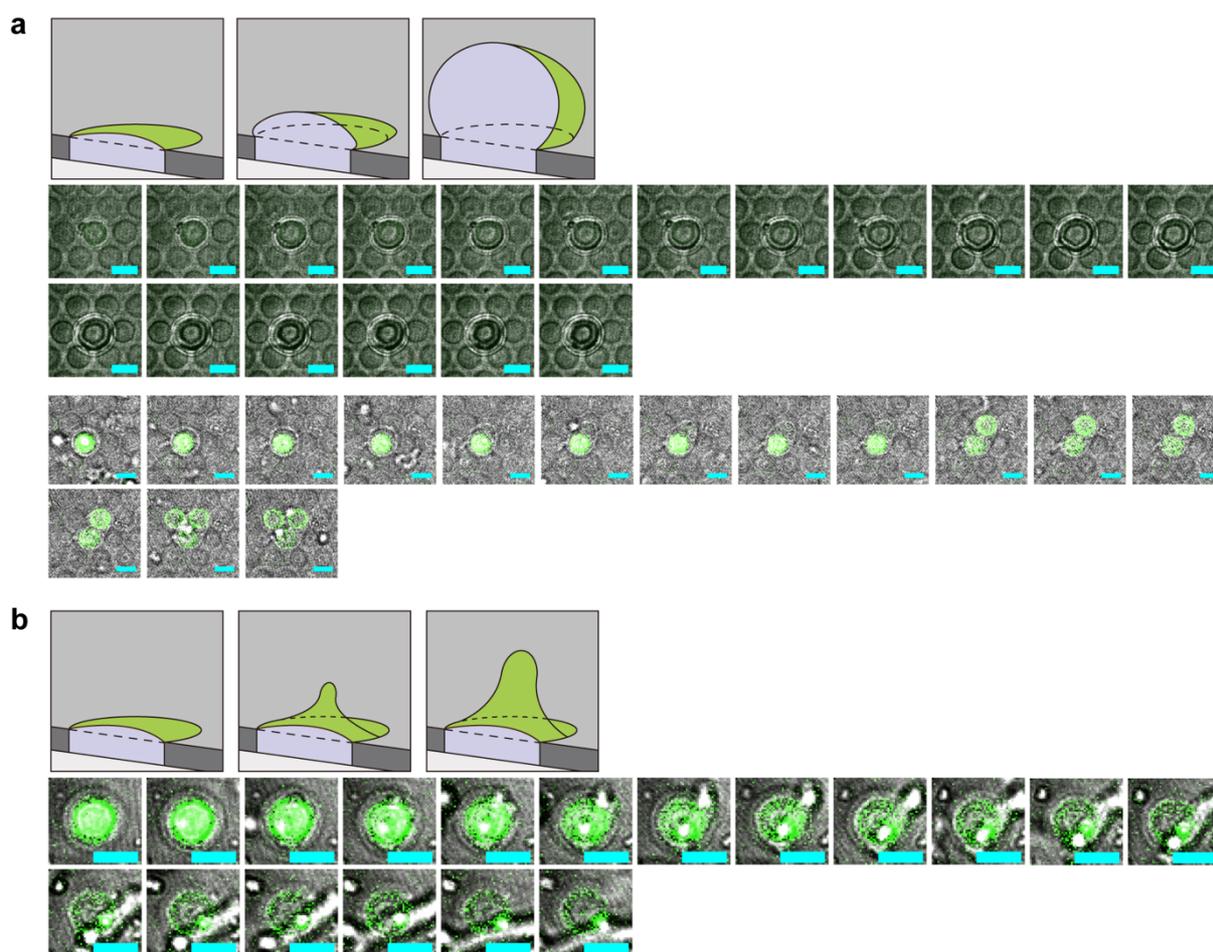


図 2-20 Hybrid cell の膜成長現象

Hybrid cell の長時間観察におけるタイムラプス画像の内、膜成長のような現象が観察された例。各画像は明視野画像と GFPuv の蛍光画像をマージさせたもの。(a) Hybrid cell の膜が大きく広がるような現象が観察された二例。二つ目では、大きく広がった結果、隣のチャンバーにも融合している様子が見える。(b) 膜から小胞のような物体が出芽している現象の例。画像は 5.5 分間毎に撮影された。エラーバーは 5 μm を示す。詳細は本文参照。

していたため¹⁶⁰⁻¹⁶³、細胞壁を持たない Hybrid cell の成長とそれに伴う細胞分裂を反映した現象である可能性もある。しかし、Hybrid cell 内に蛍光色素を封入していないことから、Hybrid cell の膜の状態を可視化できておらず、そのため、Hybrid cell の近傍やその上に乗っていたプロトプラストが分裂現象を起こした可能性や、膜が破れたチャンバー内にすっぽり入ってしまったプロトプラストの分裂現象を撮影してしまっている可能性も否定できない。

2.6 Hybrid cell 内への大腸菌の導入

Hybrid cell の利点として、内部に様々な物質を導入できる点が挙げられる。一般的に、大腸菌のようなバクテリア内に物質を導入することは困難であり、可能なのは DNA などの小さな物質のみである。同様に、これまで報告されてきた人工細胞も、内部に大きな物質を導入することは容易ではなかった。一方、Hybrid cell では、ALBiC チャンバーに封入できる大きさ（数マイクロメートル程度）の物質であれば、Hybrid cell の内部に取り込ませることが容易である。実際、これまでの実験によって、蛍光色素、プラスミド DNA、mRNA のような、数百 Da ~ 1000 kDa までの分子量の物質が導入できることは示された。そこで、より大きな物質が導入できることを示すために、Hybrid cell 内への生きた大腸菌の導入を試みた。

赤色蛍光タンパク質 tdTomato を発現する大腸菌を含んだ SP buffer を調製し、ALBiC チャンバー内に封入して、脂質二重膜を再構成した。ここでは、各チャンバー内に一個以下の大腸菌が封入されるように、大腸菌を低濃度に希釈した。そこに、GFPuv を発現するプロトプラストを融合させた。すると、確率的に、tdTomato 発現大腸菌が封入されたチャンバーに融合が起き、その結果、大腸菌を内部に含む Hybrid cell が構築された（図 2-21）。その後、しばらく観察を続けると、いくつかの Hybrid cell 内大腸菌は細胞分裂現象を示した（図 2-21a）。Hybrid cell 内で分裂が起きた大腸菌の個数を数えると、全 Hybrid cell 内大腸菌の内、30.4%の大腸菌が分裂した（図 2-22）。一方、プロトプラストが融合していない ALBiC チャンバー内に封入された大腸菌の分裂確率は、9.1%であった。この場合、チャンバー内に予め封入されている SP buffer は栄養物質を含まないため、大腸菌は分裂しないはずである。したがって、プロトプラストが融合することで、プロトプラストの細胞質に含まれていた栄養物質が、チャンバー内の細胞分裂を促進させたと考えられる。なお、栄養物質は低分子化合物であるため、ALBiC の脂質二重膜をある程度透過すると考えられる。そのため、プロトプラストが融合しないチャンバーでも少数ではあるが細胞分裂が起きたと考えられる。

Hybrid cell 内大腸菌の一部が細胞分裂を起こした一方で、17.4%の Hybrid cell 内大腸菌が破裂し、細胞質がチャンバー内に充満する現象も観察された（図 2-22b）。この現象は、プロトプラストが融合しなかったチャンバーでも発生した。その確率は、23.3%であったため、破裂の原因はプロトプラストの融合とは関係なく、デバイス表面との相互作用が原因と考えられる（2.7 項参照）。

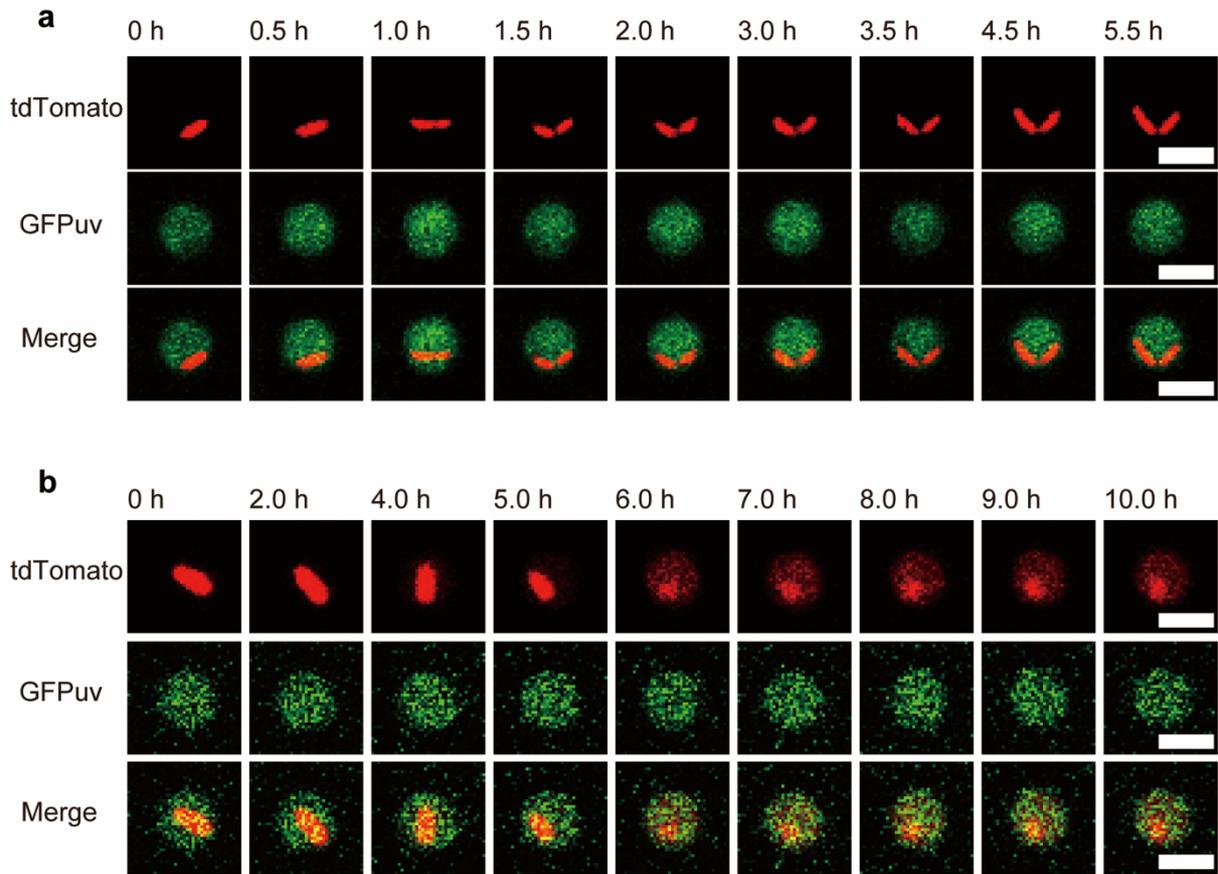


図 2-21 Hybrid cell 内大腸菌の状態変化の様子

Hybrid cell 内に封入された大腸菌の長時間観察の様子。画像はそれぞれ、封入された大腸菌に発現している赤色蛍光タンパク質 tdTomato の蛍光（上段）、融合させたプロトプラストに発現している緑色蛍光タンパク質 GFPuv の蛍光（中段）、それらをマージさせた画像（下段）。(a) 細胞分裂を起こした大腸菌。(b) チャンバー内で破裂し、細胞質がチャンバー内に充満した大腸菌。エラーバーは 4 μm を示す。

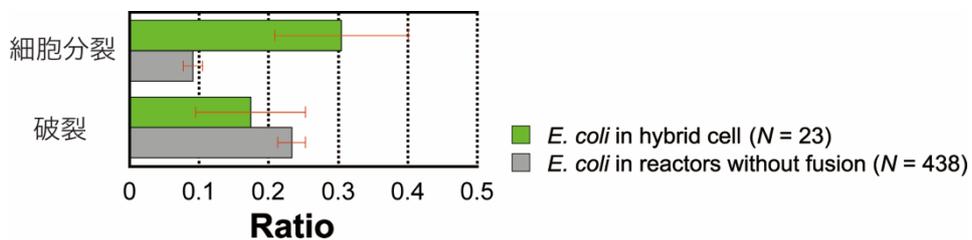


図 2-22 Hybrid cell 内大腸菌の状態変化が起きる確率

Hybrid cell 内に封入された全大腸菌（23 個）の内、細胞分裂が起きた確率と破裂が起きた確率を緑色棒グラフで、プロトプラストが融合していない ALBiC チャンバー内の全大腸菌（438 個）の内、細胞分裂が起きた確率と破裂が起きた確率を灰色棒グラフで示した。エラーバーは標準偏差を示す。

2.7 大腸菌破裂型人工細胞の開発

2.6 項における大腸菌封入実験において、チャンバー内に封入された大腸菌が破裂する現象を発見した。これを活用することで、大腸菌の細胞質をチャンバー内に効率よく再構成できる、新たな人工細胞システムを構築できると考えた。

最初に、大腸菌の破裂の再現性と原因を探るために、様々な条件でチャンバー内に大腸菌を封入し、その状態変化を調べた。ここでは、脂質二重膜を再構成させずに、デバイス表面の親水性-疎水性パターンを利用した Water-in-Oil ドロップレットを形成し^{149,150}、その中に大腸菌を封入する。この方法では、脂質二重膜を再構成するよりも歩留まりよく、微小空間を形成できる（図 2-23a）。ここに、通常の桿状大腸菌と、プロトプラスト化した大腸菌を封入することで、破裂しやすさを比較した。両大腸菌は、蛍光色素 Alexa405 を含んだ SP buffer で懸濁され、チャンバー内へ封入した。すると、期待通り、Water-in-Oil ドロップレットで封入した場合も、多くの大腸菌が破裂した（図 2-23b）。複数のチャンバーをタイムラプス撮影し、破裂した菌数の変化を見積もることで大腸菌が破裂する確率を評価すると（図 2-24）、最も多くの大腸菌が破裂した条件は、プロトプラストを Water-in-Oil ドロップレット内に封入する方法で、約 8 割の菌が破裂した。また、野生型の桿状大腸菌とプロトプラスト型大腸菌を比較すると、やはりプロトプラス

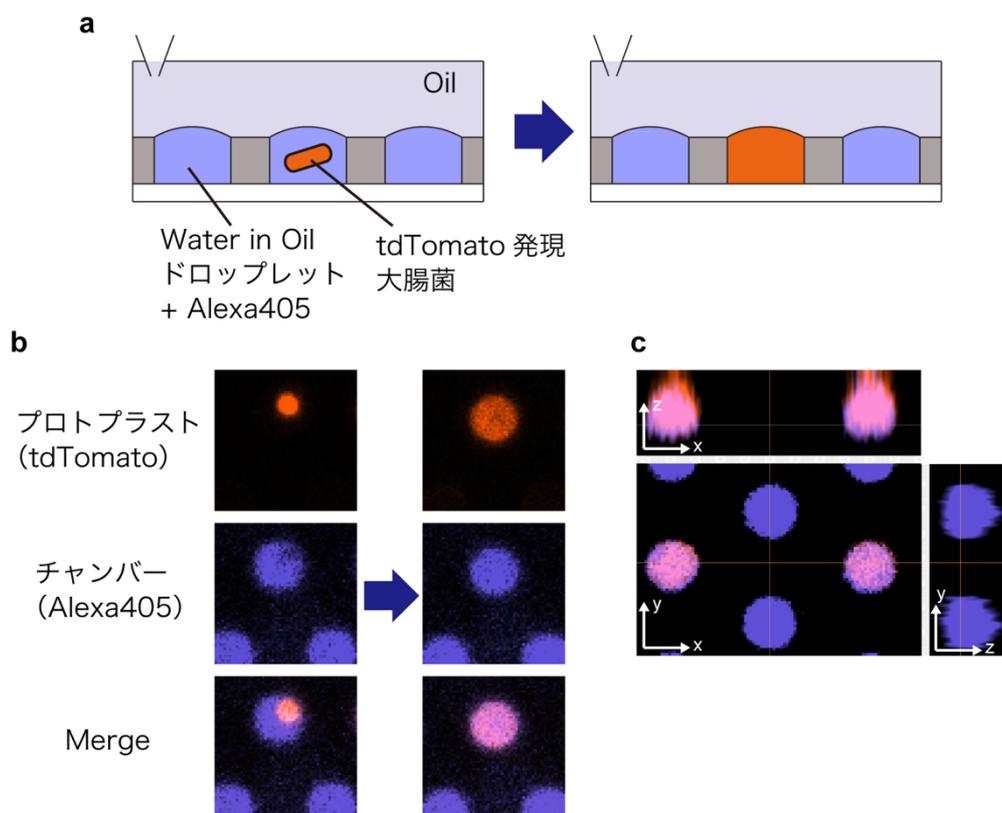


図 2-23 大腸菌破裂型人工細胞

(a) 大腸菌破裂型人工細胞の概要図。本文参照。(b) チャンバーに封入したプロトプラスト型大腸菌が破裂する前（左列）と破裂後（右列）を撮影した画像。プロトプラストは赤色蛍光タンパク質 tdTomato を封入しており、チャンバー内には青色蛍光色素 Alexa405 が封入されている。それぞれの光学系で撮影された画像とそれらをマージした画像を載せた。(c) 共焦点顕微鏡によって撮影された、大腸菌が破裂したチャンバーの立体画像。Alexa405 の青色蛍光と tdTomato の赤色蛍光がマージされた画像。

ト大腸菌の方が割れやすいことがわかった。一方で、オイルによる封入を行わずにデバイス上にプロトプラストを撒くだけでも、約3割の菌が破裂した。なお、割れた菌の数の違いは、必ずしも割れやすさを表しているわけではない点に注意したい。ドロップレットの場合、割れた菌は細胞質がチャンバー内に充満されるため判定しやすいが、デバイス表面に撒くだけでは、菌の破裂と、菌のデバイス表面からの脱着を見分けることは難しいため、後者では菌の破裂現象を少なく見積もっている可能性がある。少なくとも、デバイス表面へ吸着した大腸菌は、ある確率で破裂してしまうことがわかった。

この現象によって、Hybrid cell と同様、細胞質の希釈を経ることなく、直接チャンバー内へ封入することに成功した。Hybrid cell とは異なり、細胞膜成分を再構成することはできないが、全大腸菌の8割近い菌で破裂が起きるため、収率は破裂型の方が極めて高い。今後の展望として、この破裂型人工細胞の遺伝子発現活性を評価するパイロット実験を行ったところ、わずかではあるが、遺伝子発現活性が存在することが示唆され、人工細胞系としての有用性が見出された(2.8.5項考察、S-2.3項付録参照)。

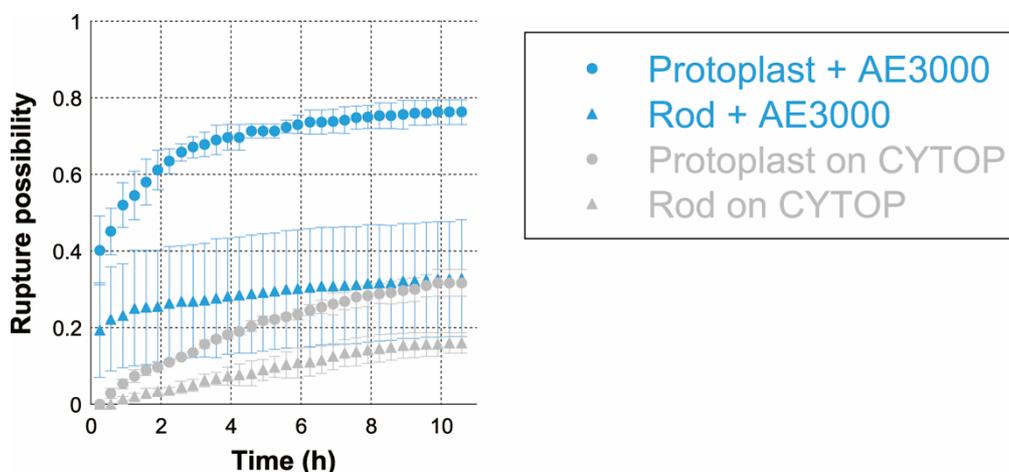


図 2-24 大腸菌破裂条件の探索

様々な条件で大腸菌をチャンバー内に封入、あるいはデバイス表面に吸着させた状態で、時間毎に破裂した大腸菌の数を数え、その割合を求めた。青丸印：プロトプラスト化した大腸菌を有機溶媒 AE3000 でチャンバー内に封入した。青三角印：野生型桿状の大腸菌を有機溶媒 AE3000 でチャンバー内に封入した。灰色丸印：プロトプラスト化した大腸菌をデバイスに流し、表面に吸着させた。灰色三角印：野生型桿状の大腸菌をデバイスに流し、表面に吸着させた。各計測は三回ずつ行われ、エラーバーはその標準偏差を示す。

2.8 本章の考察と展望

2.8.1 ALBiC チャンバーとプロトプラスト型大腸菌の融合確率

細胞質をまるごと微小反応容器内に再構成するために、本研究では、細胞膜でむき出しになったプロトプラストと、脂質二重膜が張られた ALBiC チャンバーを融合させた (図 2-7)。融合が起きた確率を定量すると、ALBiC の膜の上に乗った全プロトプラストに対して、0.3%のプロトプラストが融合を起こした。一見、極めて低い確率であるが、一枚の ALBiC デバイスに大量のチャンバーが並んでいるため、一枚のデバイスの観察で数十個の融合現象を観察することが可能になっている (図 2-9)。

そもそも、リポソーム同士、あるいはリポソームと平面膜の膜融合に関する先行研究によると、融合を促進させる polyethylene glycol (PEG) などの化合物の添加や、電圧の印加をしない場合、このような膜融合現象はほとんど起こらない^{164,165}。その確率は最大でも $100 \mu\text{m}^2$ あたり数個のリポソームが融合する程度である¹⁶⁶⁻¹⁷⁰。ちなみに、本研究でのプロトプラストと ALBiC チャンバーの融合確率を同じように換算すると、 $100 \mu\text{m}^2$ あたり $1.5 \sim 2.3 \times 10^{-2}$ 回であり、同等の低さであった。プロトプラスト同士の融合は、リポソーム同士の融合よりも極めて起きにくく、その確率は最大でも 0.07% であり¹⁷¹、細胞膜表面に存在する多数の膜タンパク質が融合の立体障害となっている可能性がある。本実験系と類似している、プロトプラストとリポソームの融合確率を定量している報告はなかったが、上記プロトプラスト同士の融合よりは起こりやすいことが予想される。このように、本研究における融合確率 0.03% は、先行研究と比較しても、大きく変わらない値であった。

融合確率を上昇させるためには、融合を促進させる化合物である PEG を添加する方法が考えられるが、パイロット実験において、PEG を添加しても融合確率は変わらなかったことを確認した。今後、考えられる融合促進方法としては、細胞内小胞同士の融合を促進させる役割を持つ膜タンパク質 SNARE¹⁷² を再構成する方法や、チャンバー内外に電極を組み込み、膜付近に電圧を印加できる ALBiC デバイス¹⁵³ を用いる方法などが挙げられる。

2.8.2 Hybrid cell の細胞膜機能の評価

Hybrid cell の特長として、生きて大腸菌の細胞膜 (内膜) をまるごと人工細胞に再構成できる点が挙げられる。この現象は、細胞膜を蛍光染色したプロトプラストの融合からも確かめることができた (図 2-11)。

一方、大腸菌の内膜に存在する膜タンパク質が Hybrid cell に再構成され、正しく機能しているかどうかを調べることは、Hybrid cell に適切な物質交換機能や、エネルギー合成に必須な呼吸鎖電子伝達系の機能が働いているかどうかを確かめる上で重要である。我々は、膜電位感受性色素である Tetramethylrhodamine (TMRM) を用いて Hybrid cell の膜電位の測定を試みたものの、TMRM はデバイス表面や余剰の有機溶媒に非特定的に吸着・局在してしまったため、Hybrid cell の膜電位は確認できなかった (2.2.3 項)。今後は異なる方法で、膜タンパク質の活性を測定する必要がある。

膜機能を再現するためには、本実験の系を改良する必要があると考えている。本実験における脂質二重膜は、ヘキサデカンを溶媒とする脂質溶液を用いて張られている。しかし、粘性の高い

ヘキサデカンを用いる場合、脂質二重膜の間に溶媒が残留してしまう可能性があり、薄い脂質二重膜にならないことがある。一方、先行研究によると、揮発性が高く、粘性が低いクロロホルムを溶媒とする脂質溶液を用いて再構成された脂質二重膜の方が、薄い脂質二重膜を再構成しやすく、膜タンパク質の機能分析には適していることがわかっている²²。そこで、クロロホルムに溶かした脂質溶液を用いて脂質二重膜を再構成し、そこにプロトプラスト型大腸菌を加えたところ、すぐに全チャンバーの膜が破れてしまった。これは、薄い脂質二重膜は非常に割れやすく、プロトプラストの密度が濃い懸濁液を注入することで、プロトプラストから漏れ出したタンパク質由来の浸透圧や、培地に含まれる界面活性剤が悪影響となったことが予想された。プロトプラスト溶液を大きく希釈し、観察を何度か繰り返すことでようやく数個の融合が発見されたが(S-2.2 項参照)、融合現象の再現性は非常に低く、TMRM 添加による膜電位の計測や、遺伝子発現活性などを評価することはできなかった。今後、各種条件検討によって、クロロホルム利用時の融合現象の再現性を高めることが、膜タンパク質機能の評価につながる。

2.8.3 Hybrid cell の遺伝子発現活性の評価

Hybrid cell 内での生理活性を確かめるために、チャンバー内に封入したプラスミド DNA や mRNA からの遺伝子発現活性を調べた(図 2-15 ~ 図 2-17)。いずれの条件でも、全 Hybrid cell のおよそ 20%の Hybrid cell が遺伝子発現活性を維持していたことがわかった。このとき合成された β -gal の分子数は平均 25 分子(β -gal は四量体なので、100 回の翻訳反応に相当する)であった。生きた大腸菌は、mRNA 一分子からおよそ 10 ~ 1000 個のタンパク質を合成しているため¹⁷³、Hybrid cell の遺伝子発現活性は生きた大腸菌よりも弱い。

この遺伝子発現活性の低さの原因を探る上で、プロトプラスト融合時における細胞質の希釈の度合いについて考察する。プロトプラストの細胞質を直接微小容器に導入したことで、Hybrid cell は他の人工細胞よりも濃縮な細胞質を維持しているはずである。実際、作製されたプロトプラストの大きさの平均(直径約 1.96 μm 、S-2.4 項参照)と大腸菌細胞質の密度 300 mg/ml¹⁰⁶から、Hybrid cell 内の平均生体分子濃度を見積もると、約 50 mg/ml であり、一般的な無細胞タンパク質合成系の 20 ~ 30 mg/ml よりも濃縮されている¹⁰⁷。しかし、プロトプラストの大きさは大きくばらついているため、その希釈の度合いも各 Hybrid cell で異なる。そこで、Hybrid cell 毎に細胞質が希釈された度合いを評価し、その希釈倍率と遺伝子発現活性に相関があるかどうか調べたが、明確な相関はなかった(図 2-19)。

以上の結果を考慮すると、遺伝子発現反応以外に原因がある可能性もある。細胞がタンパク質を合成するためには、エネルギー物質やアミノ酸などの基質が必要である。例えば、エネルギー物質 ATP は大腸菌内における様々な化学反応に用いられるため、3.5 mM/sec の速度で消費されている¹⁷⁴。したがって、ATP を枯渇させないためには、継続的に ATP を合成する必要がある。このように、細胞内の遺伝子発現反応を実行するためには、他の多くの反応を必要としている。Hybrid cell では、大腸菌の細胞機能がまるごと再構成されているため、生きた細胞と同様、他の生体反応が正常に機能していないと、遺伝子発現が正常に機能しない可能性が高い。つまり、Hybrid cell が濃縮された細胞質を持ち、分子クラウディング効果が再現されているにも関わらず遺伝子発現活性が低い原因は、遺伝子発現反応のボトルネックが、それ以外の反応活性の低さに

あると考えている。これを解決する方法として、例えば、エネルギー物質合成の反応溶液系を Hybrid cell 内に封入させる方法が考えられる。ピルベートキナーゼ (PK) によるフォスホエノールピルビン酸 (PEP) からピルビン酸への代謝反応では、ADP から ATP が生成されるため、この反応系は ATP 再生系として *in vitro* 系で頻繁に用いられている。これを Hybrid cell 内に予め封入しておくことで、遺伝子発現に十分な量の ATP を継続的に合成できる可能性がある。

また、2.8.2 項で述べたように、膜タンパク質の機能の再構成を改良させることも、Hybrid cell の活性を向上させるための方法の一つである。膜タンパク質の機能は、エネルギー合成や基質の取り込みなどにおいて重要な役割を担うため、膜機能の再構成が上手くいっていなければ、遺伝子発現反応の活性も弱くなるだろう。これに対して、クロロホルムを溶媒とする脂質溶液を用いて Hybrid cell を再現性よく作製する方法は一つの解決策となりうる。

その他の考えられる原因として、デバイス表面への生体分子の非特異的吸着がある。ALBiC のチャンバー内において、底面は親水性のガラスであるが、側面は疎水性の強い CYTOP であるため、各種生体反応において重要な生体分子が吸着してしまっている可能性がある。実際に、CYTOP をコートしたガラス製流路内に BSA 溶液を流し、吸光度の変化からタンパク質の吸着量を見積もったところ、30 分間で 10 nm^2 あたり約 3 分子の BSA が吸着することがわかり、CYTOP 表面にタンパク質が非特異吸着しやすいことがわかっている。この吸着の問題は、チャンバー内を親水性ポリマーなどで修飾することで解決できるかもしれない。実際、当研究室における他研究において、チャンバー表面に PEG 修飾をすることによって基板へのタンパク質の非特異吸着を防ぐことに成功した報告があるため (図 2-25)、このデバイスの利用によって、吸着を低減し、活性の向上が期待できる。なお、余剰な脂質溶液がチャンバー内部に入り込み、デバイスの表面を覆い、内部表面での非特異吸着を防いでいる可能性も示唆されている。非特異吸着の程度を知るためにも、今後、PEG 修飾した Hybrid cell を作り、遺伝子発現活性を調べる実験の遂行が期待される。

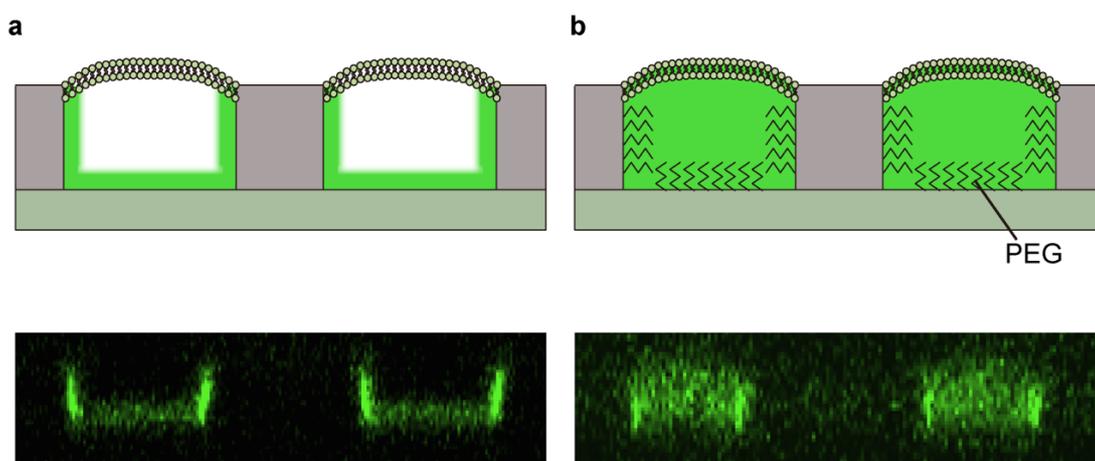


図 2-25 チャンバー表面へのタンパク質の非特異吸着防止のための PEG 修飾

(a) 蛍光タンパク質を封入した ALBiC チャンバーの断面図を共焦点顕微鏡によって撮影した。上図が概要イラスト、下図が蛍光画像。緑色蛍光がデバイスの側面と底面に局在しており、蛍光タンパク質の非特異吸着を示唆している。(b) ALBiC のチャンバーに PEG 修飾を施し、(a) と同様に蛍光タンパク質を封入した。チャンバー表面への蛍光の局在は大きく減少し、非特異吸着が低減したことが示唆された。野地研究室所属芦川裕樹君のデータを引用、一部改変。

2.8.4 Hybrid cell の細胞分裂能と、L-form バクテリアの利用

Hybrid cell を長時間観察し続けたところ、非常に低い確率ではあるものの、Hybrid cell の膜部分から、膜が大きく形態変化する現象や、細胞状の小胞が出芽していくような様子が観察されたが（図 2-20）、これが Hybrid cell の増殖現象であることを確かめることができず、融合できなかったプロトプラストの分裂現象を観察している可能性も高い。

いずれにせよ、Hybrid cell の膜の成長現象や、それに伴う分裂現象を観察することができれば、生きた状態に近い人工細胞が形成できたと言える。膜の形状が変化しやすい菌体を融合させて Hybrid cell を作製することは、分裂現象を引き起こす要因となるかもしれない。例えば、L-form という、細胞壁を失ってしまった後も確率的に細胞分裂できるバクテリアの形態がある¹⁶⁰⁻¹⁶²。この L-form バクテリアの分裂は、細胞壁や、細胞分裂に必須なタンパク質 FtsZ を利用せずに、不規則な細胞分裂現象を起こすことができる（図 2-26）¹⁷⁵。特殊な条件下では、プロトプラストも分裂できるという報告もあるが（Tabata, *et al.*, *submitted*）、L-form の場合、膜成長に有利な遺伝子変異が起きていることがわかっており、プロトプラストよりも分裂しやすい¹⁶³。したがって、この L-form を融合させた Hybrid cell を作ることで、通常のプロトプラストを用いる場合よりも分裂現象が起こりやすくなることが期待される。このシステムの利用が、分裂現象の実証につながるだろう。

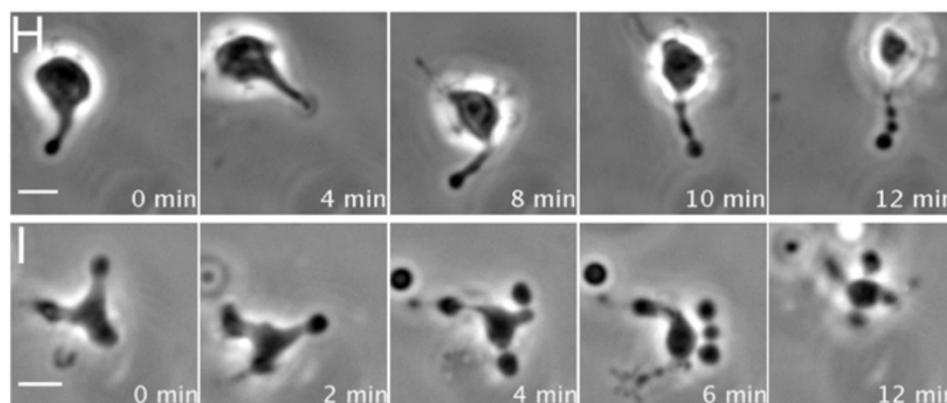


図 2-26 L-form バクテリアの分裂の様子

L-form 枯草菌の細胞分裂の様子（二例）。エラーバーは 3 μm を示す。Mercier, Kawai, and Errington, *Cell* (2013)より引用¹⁶³。

2.8.5 大腸菌破裂型人工細胞の可能性：細胞質の濃縮とゲノム導入技術

本章における各種実験を行っている間に、チャンバー内に封入したプロプラスト型大腸菌が比較的容易に破裂し、それによって、細胞質を微小容器内に充填することができることを発見した。こうして作製された人工細胞システムは大腸菌破裂型人工細胞と呼んでおり、Hybrid cell とは異なる観点で非常に興味深い技術となりうる。

Hybrid cell よりも優れている点として挙げられるのが、収率の良さである。膜融合が起きる確率は 0.3%であったが、破裂は約 8 割の大腸菌で起きた。また、途中で膜が破れることもある Hybrid cell とは異なり、一度作製されたドロップレットは長時間安定である。さらに、一つのチ

チャンバー内に複数の大腸菌を封入し、破裂させることも可能であるため、Hybrid cell よりも濃縮された細胞質を持つ人工細胞を創ることができる。Hybrid cell では低かった遺伝子発現活性も、大腸菌破裂型人工細胞では活性が向上するかもしれない。

もう一つの利点として、大腸菌破裂現象は、巨大ゲノム DNA をチャンバー内に格納する技術として活用できる点が挙げられる (図 2-27)。ゲノム DNA の全長は非常に長いため、抽出などの操作が非常に難しい。しかし、大腸菌、あるいは他種バクテリアをチャンバー内に封入し破裂させることができれば、そのゲノムを微小反応容器に取り出すことができる。実際、DNA 感受性色素を大腸菌と共に封入したところ、破裂と同時に蛍光が観察されたことから、破裂時に DNA 分子がチャンバー内に出てきていることが示されている (図 2-28)。例えば、そこに PURE システムなどの無細胞タンパク質合成液を流せば、ゲノム由来の無細胞タンパク質合成が可能になり、ゲノムスクリーニング技術にも活用できる可能性もある。

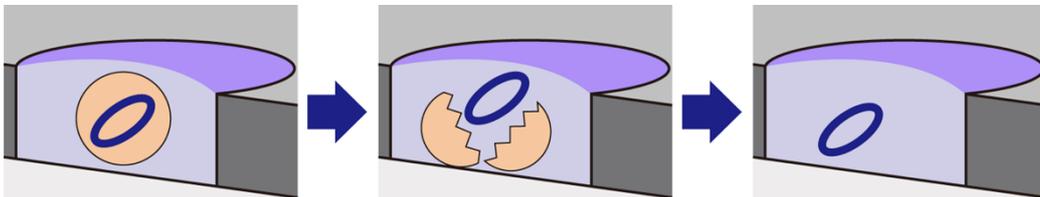
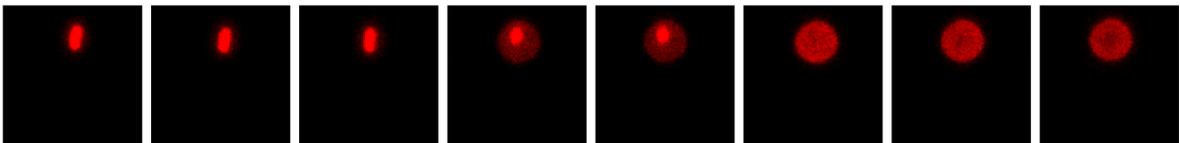


図 2-27 大腸菌破裂現象を用いた、チャンバー内への巨大ゲノム格納方法
薄橙色の丸がプロトプラスト型大腸菌を、青い円がゲノム DNA を表している。

tdTomato (大腸菌)



YOPRO-1 (DNA)

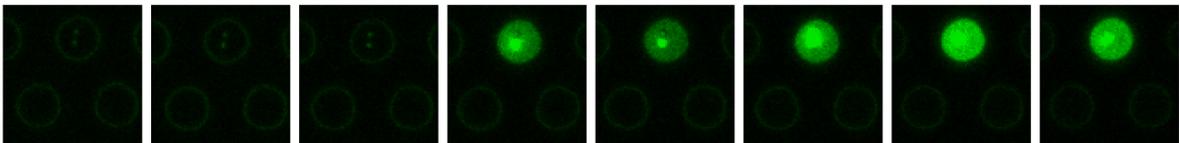


図 2-28 大腸菌破裂時に細胞内から出てくる DNA の可視化

大腸菌破裂現象について、大腸菌内に発現する tdTomato の蛍光 (上段) と、チャンバーに封入された DNA 染色剤 YOPRO-1 の蛍光 (下段) を同時にタイムラプス撮影した (左から右へ時間が経過している)。大腸菌の破裂と同時に、YOPRO-1 の蛍光が急激に上昇したため、大腸菌の破裂によって外に出てきた、ゲノム DNA やプラスミド DNA と YOPRO-1 が反応したことを示している。また、最初に大腸菌の下半分が破裂し、その次に上半分も破裂した様子が観察された。各画像は 30 分間毎に撮影された。

2.8.6 本章の総括

本章では、微細加工技術を用いて作製された ALBiC の微小チャンバーに、プロトプラスト型大腸菌を膜融合させることによって、直接細胞質を再構成した人工細胞 Hybrid cell を作製した。Hybrid cell は、外部から導入された遺伝子に対しても遺伝子発現活性を持っていたため、細胞質の機能を正常に *in vitro* 再構成できたことがわかった。しかし、その遺伝子発現活性は低く、さらに Hybrid cell 内の分子クラウディング効果との間に明確な相関はなかった。これは、遺伝子発現以外の細胞内反応が正常に働いておらず、ボトルネックとなっている可能性が高い (図 2-29)。

今後の展望としては、より生体機能活性を向上させた Hybrid cell の開発が期待される。遺伝子発現反応以外の機能を向上させるため、さらには、分裂現象を引き起こすために、膜機能を正しく再現した Hybrid cell を作製したい。脂質溶液の溶媒などの条件検討や、デバイスの改良によって、より膜機能が再現されやすい系の構築を目指す。

また、Hybrid cell 内に封入した野生型大腸菌が分裂したことによって、大腸菌の細胞質内における大腸菌培養が実現した。このような「バクテリア内バクテリア」を実現できる技術は多くない¹⁷⁶。細胞質環境でのバクテリアや菌の培養は、細胞内共生の理解にもつながるため、Hybrid cell 内で様々なバクテリアや菌を大腸菌内環境で培養することで、このような応用研究にもつながるだろう。さらには、巨大な物体でも Hybrid cell 内に導入できる特長を活かし、Hybrid cell 内へのゲノム DNA の導入も実現できる (第 4 章 総括参照)。このように、Hybrid cell は様々な分野への応用研究の可能性を秘めた、画期的な人工細胞となった。

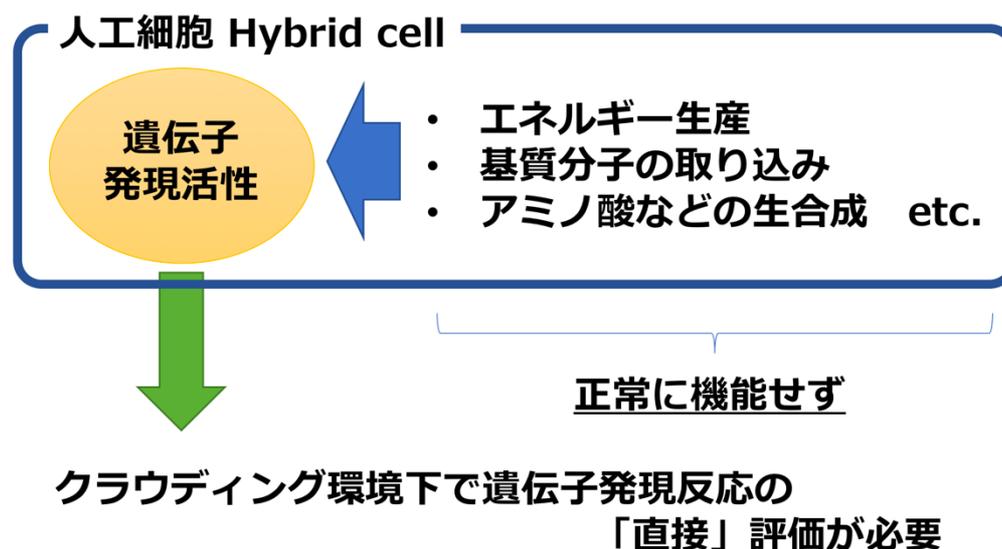


図 2-29 Hybrid cell での分子クラウディング効果の評価に関する総括

本章における研究内容は、学術論文として *Scientific Reports* にて発表された。
Yoshiki Moriizumi, Kazuhito V. Tabata, Rikiya Watanabe, Tomohiro Doura, Mako Kamiya, Yasuteru Urano, and Hiroyuki Noji, “Hybrid cell reactor system from *Escherichia coli* protoplast cells and arrayed lipid bilayer chamber device”, *Scientific Reports*, **8**, 11757 (2018)

第 3 章 オスモライトと無細胞タンパク質合成系を用いた分子クラウディングの評価

3.1 背景

3.1.1 本章の目的

第 2 章では、細胞を丸ごと再構成した人工細胞を作製し、遺伝子発現活性の再現に成功した。しかし、得られた遺伝子発現活性は低く、融合時に起こる細胞質の希釈の度合いとの相関もなかった。この原因は、細胞における遺伝子発現活性は、エネルギー生産などの他の様々な反応の影響を受けており、それらが再構成できていないことにあったと考えた。そこで本章では、遺伝子発現反応のみを注目するために無細胞タンパク質合成系を用い、ここに分子クラウディング効果を与えるクラウディング剤を添加することで、遺伝子発現反応と分子クラウディング効果の相関を直接評価する。このような無細胞タンパク質合成系にクラウディング剤を添加する研究は、これまでに複数報告されてきた¹¹⁸⁻¹²⁰。これらの研究では、主に、ポリエチレングリコール (PEG) や牛血清アルブミン (BSA) など、分子量が大きな物質がクラウディング剤として用いられている。これらによって、特定のクラウディング剤の添加がタンパク質合成反応を促進させることがわかっている (1.4.2 項参照)。一方、分子量が小さく、タンパク質安定化効果を持つことが知られている浸透圧調整剤オスモライト化合物が無細胞タンパク質合成系に与える影響を調べる研究は少なく¹⁴⁴、特に TMAO を用いた研究は報告されていない (1.4.3 項参照)。

本章では、メチルアミン系オスモライトであるベタインと TMAO の高濃度存在下における無細胞タンパク質合成系 PURE システムの遺伝子発現活性を調べた (図 3-1、図 3-2)。これらのオスモライトを様々な濃度で PURE システムに添加し、複数種類の蛍光タンパク質や酵素を合成させることによって、オスモライトによって生じる分子クラウディング効果が遺伝子発現反応に与える影響と、その普遍性について評価した。さらに、微細加工デバイス内に無細胞タンパク質合成系を封入した人工細胞を作製し、一分子 DNA からの遺伝子発現反応系を構築し、そこに対してオスモライトがどのような影響を与えるかどうか調べた。

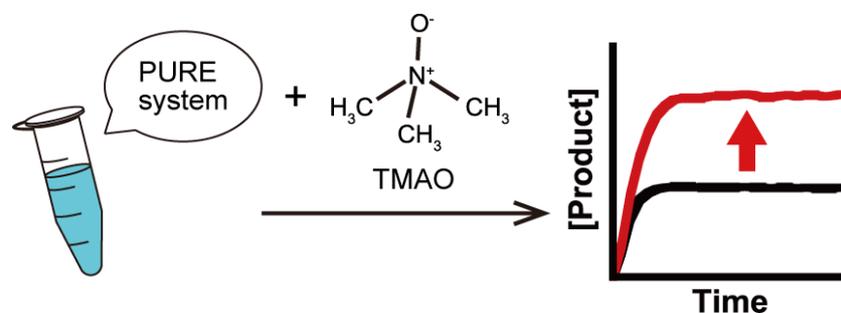


図 3-1 本章の概要

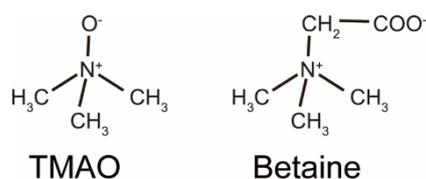


図 3-2 メチルアミン系化合物 TMAO とベタイン

3.2 蛍光タンパク質発現に対するオスモライトのクラウディング効果

3.2.1 オスモライト存在下での蛍光タンパク質 Venus の合成

PURE システムは、遺伝子の転写反応と翻訳反応がカップリングされた *in vitro* 反応系である。目的タンパク質がコードされたテンプレート DNA 鎖を添加することで、反応がスタートし、目的タンパク質が合成される。本研究では、市販されている PURExpress (New England Biolabs, Inc., MA, USA) を利用して実験を行った。

最初に、PURE システムを用いて黄色蛍光タンパク質である Venus を発現させ、そこに高濃度のベタインと TMAO を加えた際の発現量の変化を調べた。Venus を発現させるために、Venus の遺伝子をコードしたテンプレート DNA を最終濃度で 2 nM 添加し、タンパク質合成反応に適した温度である 37 °C でインキュベートした。反応溶液の蛍光の時間変化は、プレートリーダーによって計測された (図 3-3a、b)。また、オスモライトを加えない場合のコントロール実験として、オスモライト溶液と同体積の Tris バッファーを加えた場合の蛍光変化も計測した。その結果、TMAO とベタインを添加した際に、観察される Venus の蛍光強度がより大きいことがわかった。より詳細に解析するために、各オスモライト濃度における、Venus の最終蛍光強度値と、反応初期における蛍光強度の最大増加速度を計算した (図 3-3c、d)。TMAO 存在下では、最終的な蛍光強度と最大増加速度の両方が、オスモライト非添加時よりも上昇した。特に、0.4 M の TMAO を添加した際に、その増加の割合が最も大きく、0 M 時の約 2 倍の値であった。一方、ベタインを添加した場合は、最終強度が少し増え (最大でも 0.5 M ベタイン添加時に約 1.3 倍)、反応初期の最大増加速度は増加しなかった。TMAO とベタインの両方において、過剰な量を添加すると蛍光強度は大きく減少した。同様の計測を、反応温度を 26 °C に変更して行ったところ、同様に TMAO を添加した際に Venus の合成量が大きく上昇した (図 3-4) が、37 °C の条件時とは異なり、最も合成量を上昇させた TMAO 濃度は 0.2 M であった。

この時、オスモライトが蛍光タンパク質の発現量を増加しているのではなく、蛍光タンパク質の蛍光を直接増強している、という可能性を排除するために、精製された Venus の溶液にオスモライトを添加し、その蛍光強度の時間変化を計測した (図 3-5)。その結果、TMAO とベタインのいずれを加えた場合でも、精製 Venus の蛍光強度は上昇しなかった。これによって、Venus 蛍光の上昇が、Venus 発現量の増加を反映していることが示された。

以上の結果より、オスモライト、特に TMAO を添加すると Venus 発現活性が上昇することがわかった。

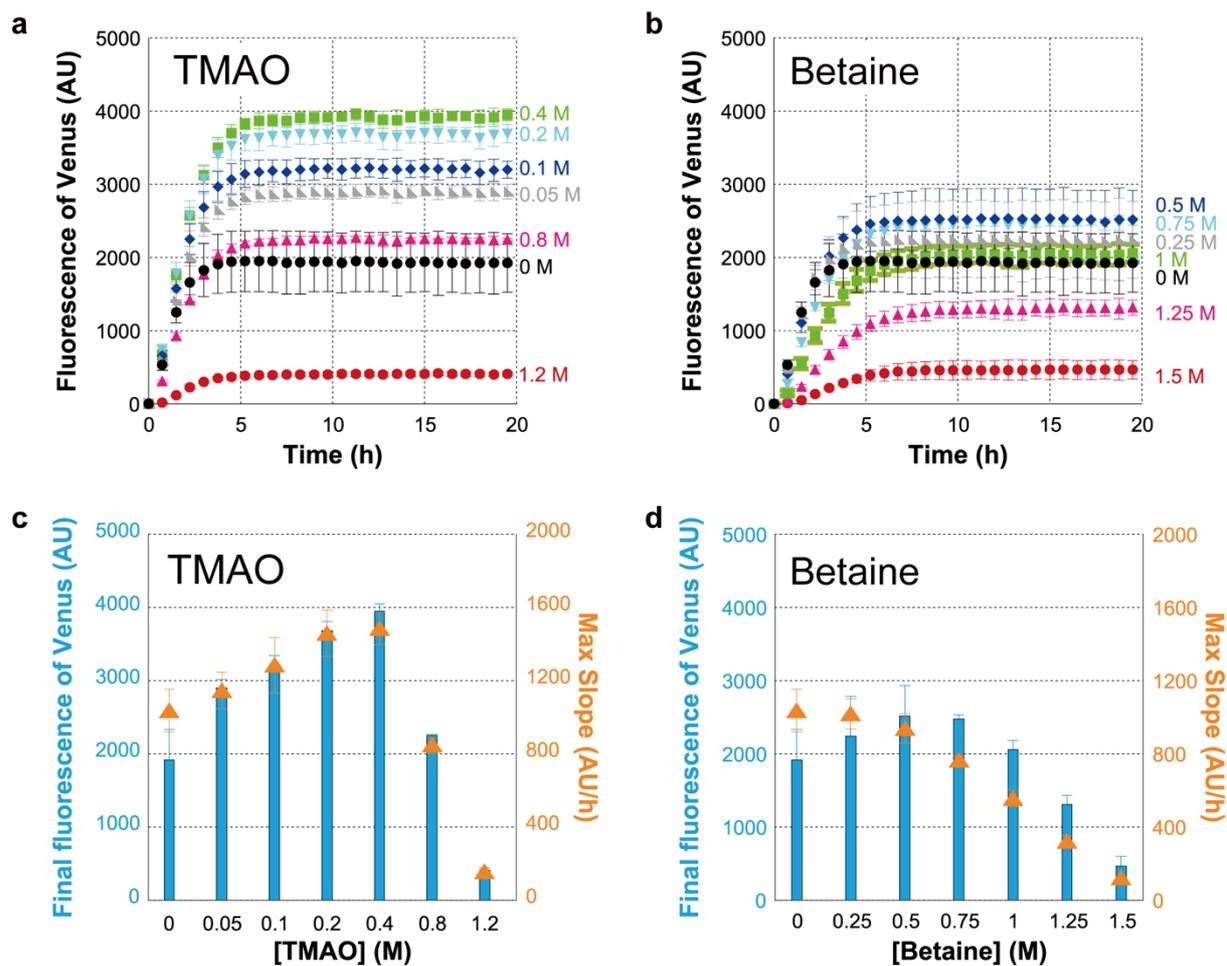


図 3-3 オスモライト存在下における、蛍光タンパク質 Venus の無細胞タンパク質合成反応 (37 °C)

(a) TMAO 存在下における、Venus 発現量の時間変化。x 軸は反応時間を、y 軸は Venus の蛍光強度を表している。各数字は添加した TMAO の濃度を示す。(b) ベタイン存在下における、Venus 発現量の時間変化。各数字は添加したベタインの濃度を示す。(c) (a) のグラフにおける、各 TMAO 濃度に対する最終蛍光強度 (青棒グラフ、左 y 軸) と、反応初期における蛍光強度の最大増加速度 (橙三角、右 y 軸)。(d) (b) のグラフにおける、各ベタイン濃度に対する最終蛍光強度 (青棒グラフ、左 y 軸) と、反応初期における蛍光強度の最大増加速度 (橙三角、右 y 軸)。いずれの遺伝子発現反応でも 2 nM のテンプレート DNA が添加されている。各計測は合計三回行われ、エラーバーはその標準偏差を示す。

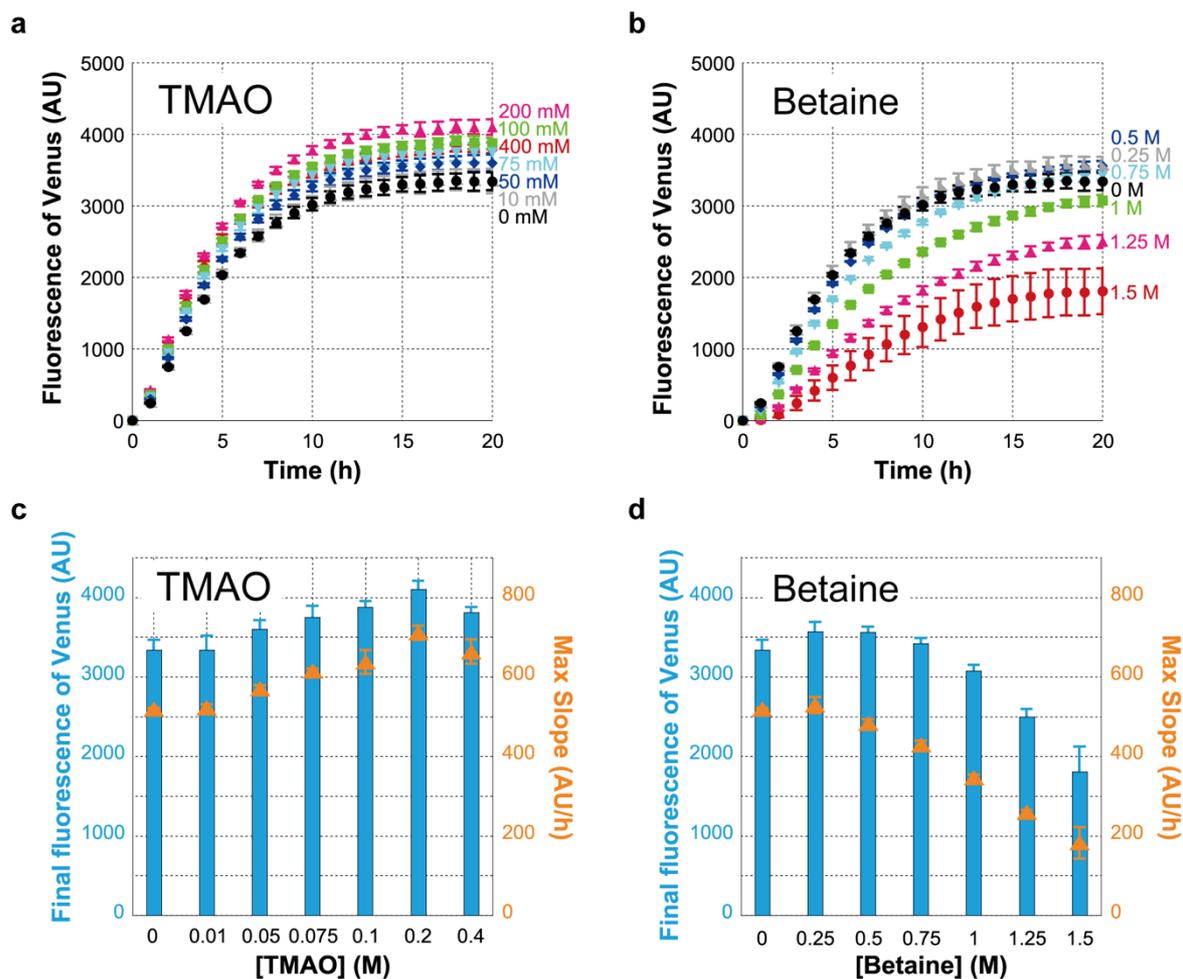


図 3-4 オスモライト存在下における、蛍光タンパク質 Venus の無細胞タンパク質合成反応 (26 °C)

(a) TMAO 存在下における、26 °Cでの Venus 発現量の時間変化。x 軸は反応時間を、y 軸は Venus の蛍光強度を表している。各数字は添加した TMAO の濃度を示す。(b) ベタイン存在下における、Venus 発現量の時間変化。各数字は添加したベタインの濃度を示す。(c) (a) のグラフにおける、各 TMAO 濃度に対する最終蛍光強度 (青棒グラフ、左 y 軸) と、反応初期における蛍光強度の最大増加速度 (橙三角、右 y 軸)。(d) (b) のグラフにおける、各ベタイン濃度に対する最終蛍光強度 (青棒グラフ、左 y 軸) と、反応初期における蛍光強度の最大増加速度 (橙三角、右 y 軸)。いずれの遺伝子発現反応でも 2 nM のテンプレート DNA が添加されている。各計測は合計三回行われ、エラーバーはその標準偏差を示す。

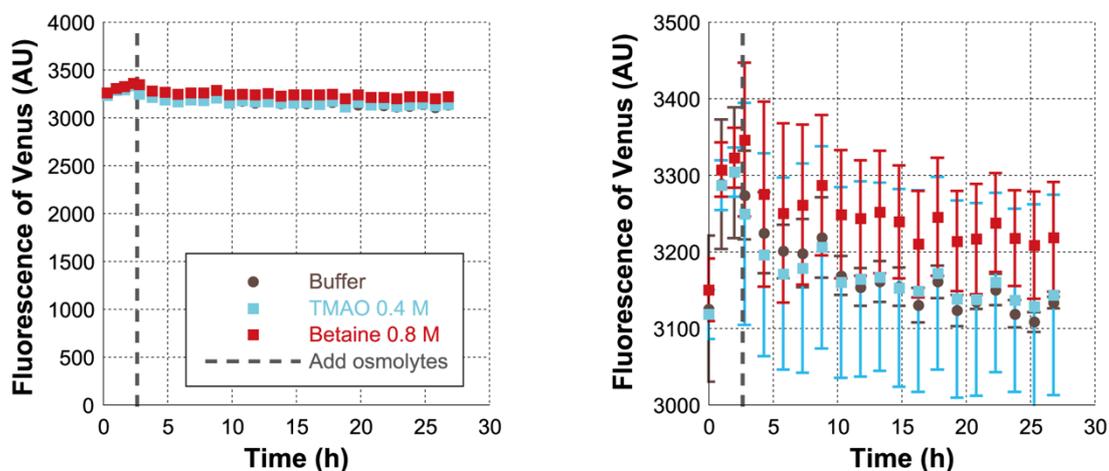


図 3-5 精製された蛍光タンパク質 Venus の、オスモライト存在下での蛍光の時間変化

1.5 μ M の精製 Venus を含む溶液にオスモライトを添加し、プレートリーダーで蛍光の変化を測定した。最初はオスモライトを含まない状態で計測を開始し、測定値が安定するまでインキュベートした。2~3 時間後 (点線)、最終濃度 0.4 M の TMAO (水色四角)、最終濃度 0.8 M のベタイン (赤色四角)、Tris buffer (灰色丸) をそれぞれ添加し、その後の蛍光強度の時間変化を測定した。右図はタイムコースを拡大した図。計測は 37 $^{\circ}$ C で行われた。計測は合計三回行われ、エラーバーはその標準偏差を示す。

3.2.2 オスモライト存在下での蛍光タンパク質 tdTomato の合成

オスモライトの添加によって遺伝子発現活性が上昇した現象が、他のタンパク質の合成時でも起きるかどうかを確かめるために、赤色蛍光タンパク質である tdTomato 合成時の、オスモライト添加の影響を調べた。PURE システムに tdTomato をコードしたテンプレート DNA 鎖を加え、様々な濃度の TMAO とベタインを添加して 37 $^{\circ}$ C で反応させたところ、Venus 発現時と同様に、0.4 M の TMAO を添加した際に tdTomato の最終合成量が 2.8 倍に、最大合成速度が 2.9 倍に上昇した (図 3-6a, c)。ベタイン添加時も、最終合成量が 1.6 倍上昇した (図 3-6b, d)。つまり、オスモライトの添加によって、tdTomato の合成も活性化された。

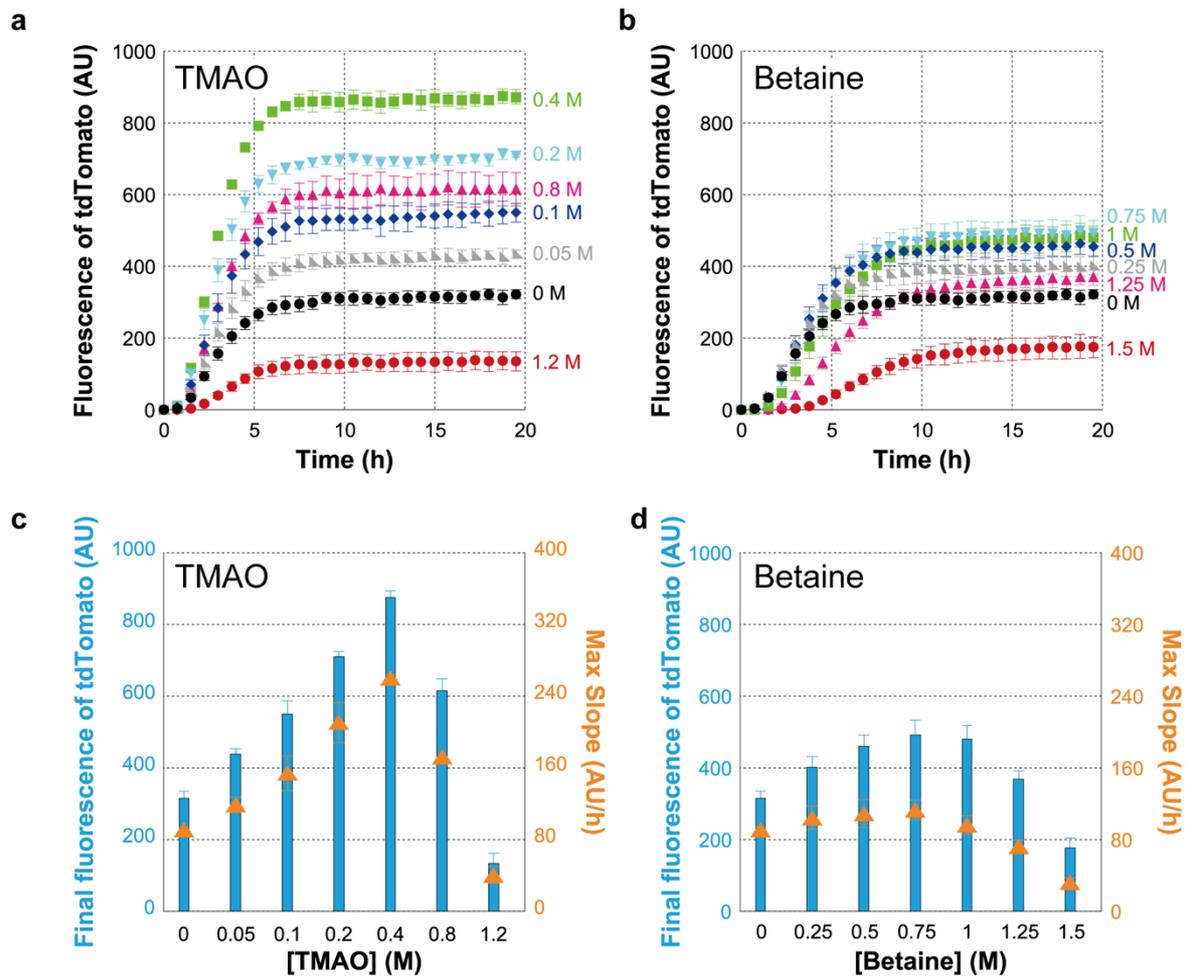


図 3-6 オスモライト存在下における、蛍光タンパク質 tdTomato の無細胞タンパク質合成反応 (37 °C)

(a) TMAO 存在下における、tdTomato 発現量の時間変化。x 軸は反応時間を、y 軸は tdTomato の蛍光強度を表している。各数字は添加した TMAO の濃度を示す。(b) ベタイン存在下における、tdTomato 発現量の時間変化。各数字は添加したベタインの濃度を示す。(c) (a) のグラフにおける、各 TMAO 濃度に対する最終蛍光強度 (青棒グラフ、左 y 軸) と、反応初期における蛍光強度の最大増加速度 (橙三角、右 y 軸)。(d) (b) のグラフにおける、各ベタイン濃度に対する最終蛍光強度 (青棒グラフ、左 y 軸) と、反応初期における蛍光強度の最大増加速度 (橙三角、右 y 軸)。いずれの遺伝子発現反応でも 2 nM のテンプレート DNA が添加されている。各計測は合計三回行われ、エラーバーはその標準偏差を示す。

3.3 オスモライト存在下における β -galactosidase の発現

3.3.1 タンパク質合成反応と酵素反応の同時計測による評価

二種類の蛍光タンパク質の合成反応において、オスモライトを添加することによって、遺伝子発現反応が活性化された。この効果が、蛍光タンパク質以外のタンパク質合成時にも起きるかどうかを調べるために、酵素 β -galactosidase (β -gal) の合成時のオスモライトの影響を調べた。 β -gal によって分解されると、緑色蛍光色素フルオレセインを生じる基質 fluorescein di- β -D-galactopyranoside (FDG) を、PURE システムの反応溶液に加え、さらにテンプレート DNA とオスモライトを添加し、37 °C で反応させた。この系では、 β -gal が合成され次第、FDG 分解反応が起こる。したがって、酵素活性由来の蛍光強度の上昇を計測することで、 β -gal の合成速度を見積もることができる。様々な濃度のオスモライトを添加して計測を行ったところ、ほとんどの条件で蛍光が上昇し、 β -gal が合成されていることが示唆された (図 3-7)。蛍光の上昇が開始した時点に着目すると、TMAO を 0.2 ~ 0.4 M 含む条件ではオスモライト非添加時よりも早いタイミングで蛍光が上昇した (図 3-7a、緑四角印や青三角印)。TMAO を含まない条件では $t = 0.5 \sim 0.6$ h の時点で蛍光が上昇し始めたのに対し、0.2 ~ 0.4 M の TMAO を含む条件では $t = 0.2 \sim 0.3$ h の時点で蛍光が上昇し始めた。したがって、これらの濃度の TMAO を添加することによって、最初に β -gal を合成するまでにかかる時間がおよそ二分の一に短縮されたことになる。一方で、反応の初期段階以降 ($t = 0.5 \sim 0.75$ (h) 付近) における蛍光強度の増加速度は、オスモライト非添加時の速度より遅くなっており、この時点までに合成された β -gal の量は、オスモライト非添加時の方が多いことが示唆された。また、0.8 ~ 1.2 M などの高い濃度では、反応の開始やその後の蛍光増加速度が遅くなっていた。ベタインを含む条件では、いずれの濃度条件でも、蛍光上昇の開始と最大蛍光上昇速度が非添加時よりも遅くなっていた (図 3-7b)。

この TMAO による β -gal 合成の活性化効果の温度依存性を調べるために、26 °C 条件下で同様の実験を行った (図 3-8)。37 °C の時と同様に、TMAO を含んだ PURE システムの反応系では、蛍光の上昇開始が早まった。その現象が起きた TMAO の濃度域は、37 °C の場合よりも低い、0.1 ~ 0.4 M であった。この濃度の TMAO を添加した際は、 $t = 0.5 \sim 0.7$ h の時点で蛍光の上昇が開始したのに対し、TMAO を含まない条件では、 $t = 1.7 \sim 1.8$ h の時点で蛍光が上昇したため、最初に β -gal を合成するまでにかかる時間がおよそ三分の一に短縮したことになる。つまり、反応時間が二分の一に短縮された 37 °C 条件よりも、より大きく活性化されたことがわかった。

オスモライトの添加が、 β -gal の酵素活性自体を活性化していないことを確かめるために、オスモライト存在において、精製された β -gal と FDG の反応を計測した。その結果、オスモライトの有無で蛍光の上昇速度はほとんど変わらなかったため (図 3-9)、オスモライトは β -gal の酵素活性を活性化していないことが確かめられた。以上の結果をまとめると、特定の濃度の TMAO の添加によって、 β -gal の合成速度が上昇したが、その効果はあくまで反応初期でのみ確認された。

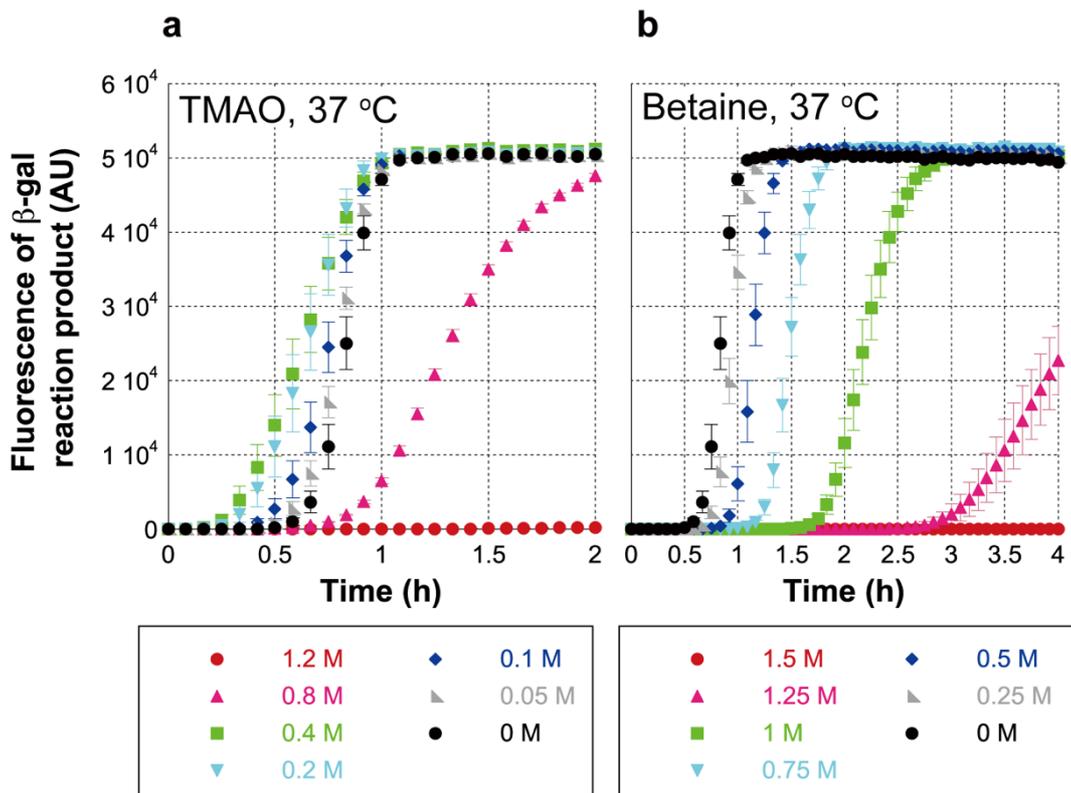


図 3-7 様々なオスモライト条件下における β -gal の合成反応 (37 °C)

β -gal の FDG 分解反応によるフルオレセインの蛍光の時間変化。それぞれ様々な濃度の TMAO (a) とベタイン (b) を含む条件で計測された。測定は 37 °C で行われた。FDG の濃度は 5 μ M。凡例はそれぞれのオスモライトの濃度を示している。各計測は三回ずつ行われ、エラーバーはその標準偏差を示す。

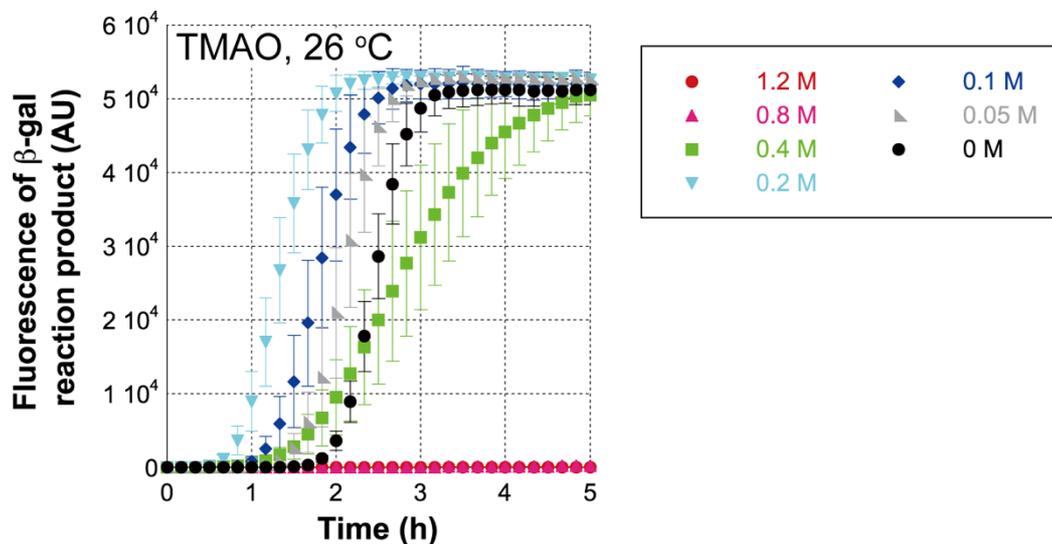


図 3-8 様々なオスモライト条件下における β -gal の合成反応 (26 °C)

26 °C で計測された、 β -gal の FDG 分解反応によるフルオレセインの蛍光の時間変化。様々な濃度の TMAO を含む条件で計測された。凡例は TMAO の濃度を示している。FDG の濃度は 5 μ M。各計測は三回ずつ行われ、エラーバーはその標準偏差を示す。

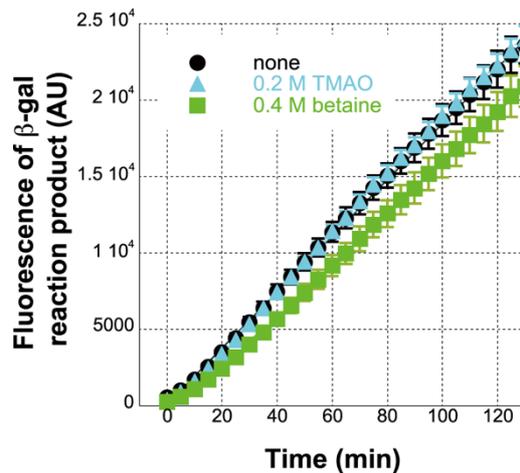


図 3-9 精製された β -gal のオスモライト存在下での反応

精製 β -gal の FDG 分解反応によるフルオレセインの蛍光の時間変化を、様々な濃度のオスモライトを含む条件下で計測した。 β -gal と FDG の濃度はそれぞれ、2.8 nM と 5 μ M。測定は 37 °C で行われた。凡例はそれぞれのオスモライトの濃度を示している。各計測は三回ずつ行われ、エラーバーはその標準偏差を示す。

3.3.2 タイムラプスサンプリング法による、 β -gal 合成反応の評価

TMAO 存在下での β -gal 合成反応をより詳細に調べるために、異なる方法で β -gal 合成反応を定量した。まず、FDG を加えずに、PURE システムで β -gal の合成を開始させる (37 °C)。決められた時間が経過したら、PURE システムの反応溶液から一部の溶液をサンプリングし、-20 °C に保存することで反応を止める。これを段階的に繰り返すことで、各反応時間で合成された β -gal 溶液が得られるので、その溶液に FDG を加えて酵素活性を計測することで、 β -gal の量を定量できる (図 3-10a)。以下ではこの方法を「タイムラプスサンプリング法」と呼ぶ。図 3-7 の結果で最も活性化効果のあった 0.2 M と 0.4 M TMAO の存在下において、タイムラプスサンプリング法を用いて、各反応時間における β -gal 発現量を調べた。予測通り、合成反応の初期である 30 min の時点において、TMAO を含む条件の方が FDG の分解活性が高かった (図 3-10b)。つまり、TMAO を添加することによって、反応初期でより多くの β -gal が合成されたことが示された。その一方で、60 min や 120 min の時点では、TMAO を含む条件では β -gal の合成量が TMAO 非添加時と同等、あるいは低いことが示され、この点でも図 3-7 と同様の結論が得られた。

同様の実験を 26 °C 条件で行ったところ、TMAO 添加時の合成量の上昇の度合いがより大きくなった (図 3-11)。TMAO が含まれない条件では、1.5 h の反応時間が経過した場合でも、蛍光がほとんど上昇しないのに対して、0.4 M の TMAO を含む場合は 1 h でも蛍光が上昇しており、この時点で十分な量の β -gal が合成されていることが示された。

以上の結果から、0.4 M の TMAO の添加によって、 β -gal 合成の初期段階における合成速度が上昇したことが確かめられた。一方で、反応時間が十分に経過した時点での合成速度は TMAO を添加していない場合の方が速かった。この活性化効果は 26 °C の条件でより顕著になることも判明した。

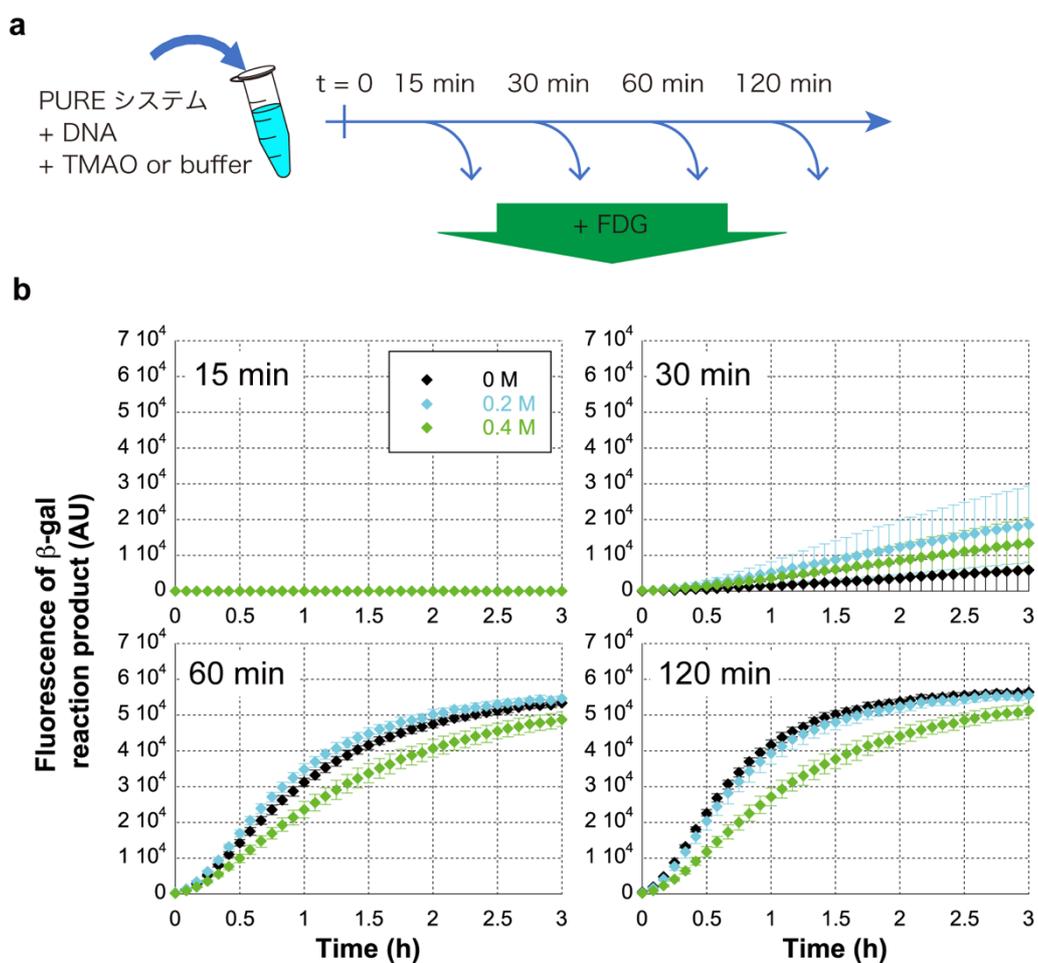


図 3-10 タイムラプスサンプリング法による、TMAO 存在下での β -gal 合成反応の評価 (37 °C)

(a) 実験方法の概要。(b) 各反応時間における PURE システムの反応産物に 5 μ M FDG を加え、FDG 分解反応の蛍光時間変化を計測した。なお、PURE システムの反応時には各条件で異なる濃度の TMAO が含まれていたが、FDG との酵素反応時には TMAO の濃度が揃うように、TMAO を適宜添加することで調整した。タンパク質合成反応と酵素活性の測定はいずれも 37 °C で行われた。凡例はそれぞれの TMAO の濃度を示している。各計測は三回ずつ行われ、エラーバーはその標準偏差を示す。

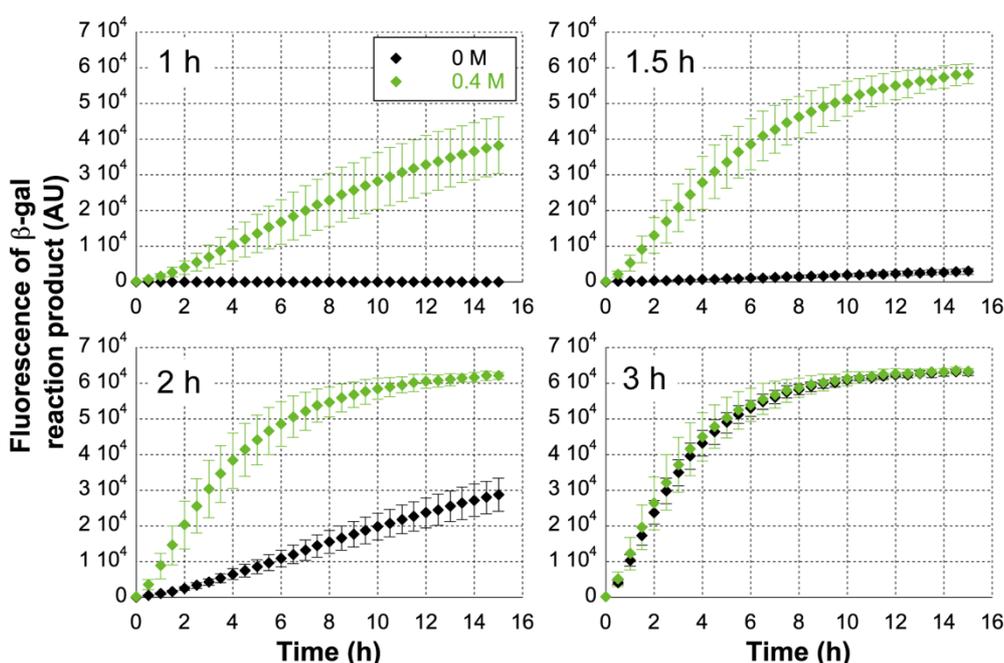


図 3-11 タイムラプスサンプリング法による、TMAO 存在下での β -gal 合成反応の評価 (26 °C)

26 °Cで反応させた β -gal の合成反応に関して、各反応時間における反応産物に 5 μ M FDG を加え、FDG 分解反応の蛍光時間変化を計測した。なお、PURE システムの反応時には各条件で異なる濃度の TMAO が含まれていたが、FDG との酵素反応時には TMAO の濃度が揃うように、TMAO を適宜添加することで調整した。タンパク質合成反応と酵素活性の測定はいずれも 26 °Cで行われた。凡例はそれぞれの TMAO の濃度を示している。各計測は三回ずつ行われ、エラーバーはその標準偏差を示す。

3.4 異なる DNA 濃度からのタンパク質発現におけるオスモライトの影響

PURE システムを用いた遺伝子発現反応では、用いるテンプレート DNA の量を変えると、発現量も変動することが知られている。そこで、異なる濃度の DNA テンプレートから Venus を発現させた場合でも、オスモライトによる発現の活性化が起きるかどうか調べた。ここでは、これまでの測定で最も発現活性を上昇させた 0.4 M TMAO 存在下において、テンプレート DNA の濃度を 1 nM、2 nM、10 nM、20 nM と変えながら Venus の合成反応を計測し (図 3-12a)、それぞれの条件における Venus の最終合成量と、反応初期における最大合成速度を計算した (図 3-12b、c)。TMAO の有無に関わらず、DNA 濃度が大きくなるにつれて合成量と最大合成速度は増加したものの、2 ~ 10 nM 以上の領域では飽和した。これは、DNA 濃度が 1 nM 付近では、全体の遺伝子発現反応の中で mRNA への転写反応が律速段階となっていて、一方、2 ~ 10 nM 以上では転写反応以外が律速段階となっていることを示唆している。これらのいずれの条件においても、TMAO 添加によって合成量と合成速度が上昇した。1 nM のテンプレート DNA を用いた反応時には、TMAO 添加による反応活性化の効果が最も大きく、非添加時に比べて、合成量が 3.8 倍に上昇することがわかった。

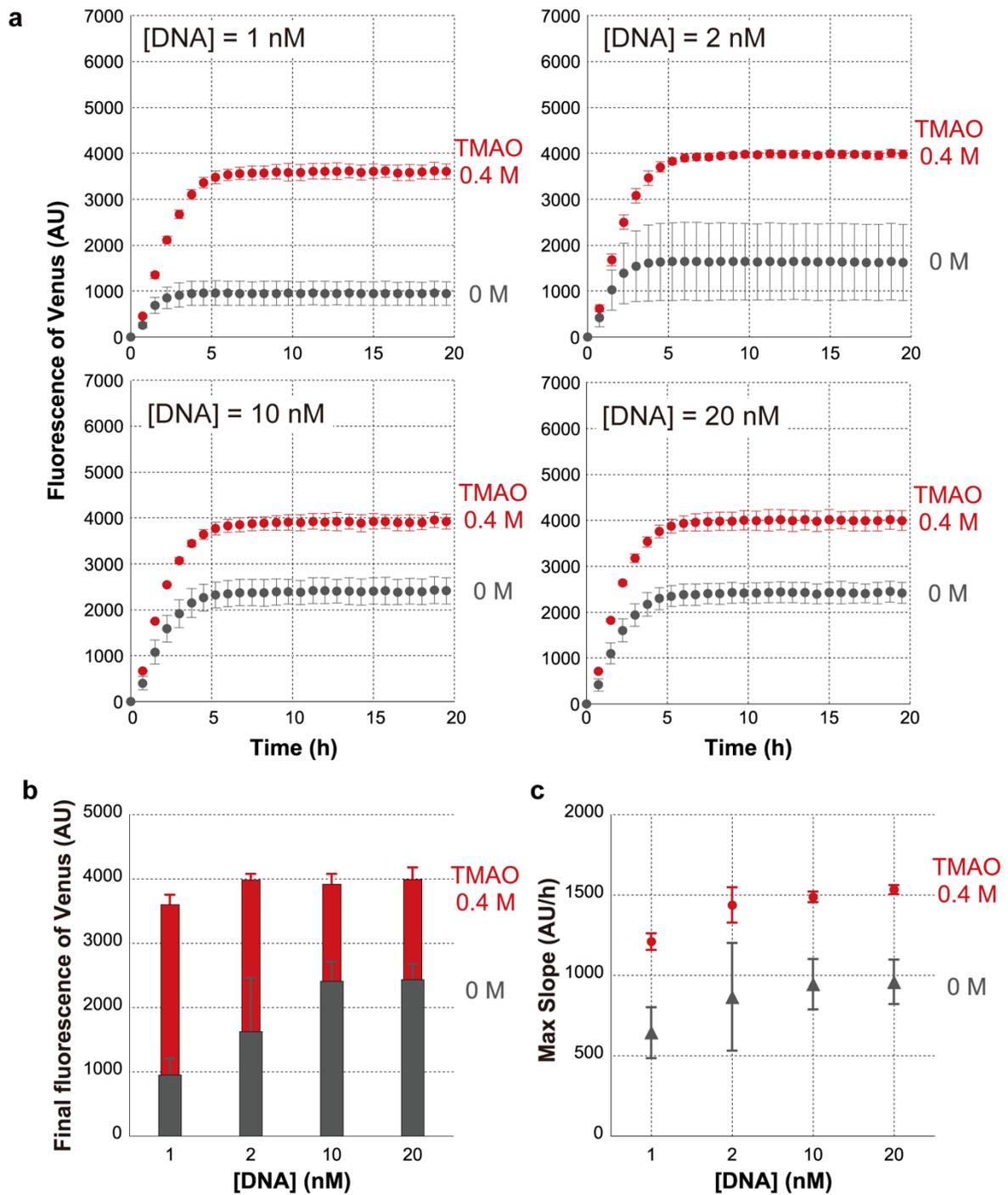


図 3-12 異なる濃度の DNA からの蛍光タンパク質 Venus の発現と、それに対するオスモライトの影響

(a) 0.4 M TMAO 添加時 (赤) と TMAO 非添加時 (黒) における Venus 発現反応の蛍光時間変化。グラフ中の数字は、テンプレート DNA 鎖の濃度を示す。(b) 各 DNA 濃度における、Venus 発現の最終蛍光強度。赤棒グラフは TMAO 添加時、黒棒グラフは TMAO 非添加時のデータを示す。(c) 各 DNA 濃度における、Venus 発現の最大合成速度。赤丸は TMAO 添加時、黒丸は TMAO 非添加時のデータを示す。各計測は 37 °C で行われた。それぞれ合計三回ずつ行われ、エラーバーはその標準偏差を示す。

3.5 mRNA をテンプレートとしたタンパク質発現におけるオスモライトの影響

これまでの計測では、DNA のテンプレートを利用した遺伝子発現反応であったため、合成されたタンパク質量は、転写反応と翻訳反応を総合した収量を反映していた。これらの反応過程の内、どちらの過程がオスモライトによって活性化されたかを調べるために、mRNA をテンプレートとした PURE システムの遺伝子発現反応を行うことで、翻訳反応のみの収量を計測し、それに対するオスモライトの影響を調べる。Venus をコードした DNA から、*in vitro* 転写反応キットを用いて mRNA を調製し、最終濃度が 300 nM となるように PURE システムに加えた。そこに、各種オスモライトを加え、37 °C の条件下で蛍光の時間変化を計測し (図 3-13a)、Venus の最終蛍光強度と、反応初期における最大蛍光増加速度を計算した (図 3-13b)。結果、オスモライトを添加することで、Venus の合成量が増加した。最も合成量が増加したのは、DNA からの発現時と同様に (図 3-3)、0.4 M TMAO を含む条件で、オスモライト非添加時よりも 3.1 倍上昇した。これは、DNA からの遺伝子発現反応での増加率と同等に高い値である (図 3-3、図 3-12)。また、0.5 M ベタインを加えた際は、合成量が 1.4 倍に上昇したものの、最大合成速度は上昇しなかった。以上の結果は、DNA からの遺伝子発現反応と同様の結果となったため、TMAO は遺伝子発現反応における翻訳反応以降の過程、つまり翻訳反応かフォールディング (マチュレーション) のいずれか、あるいは両方を活性化していることが示された。

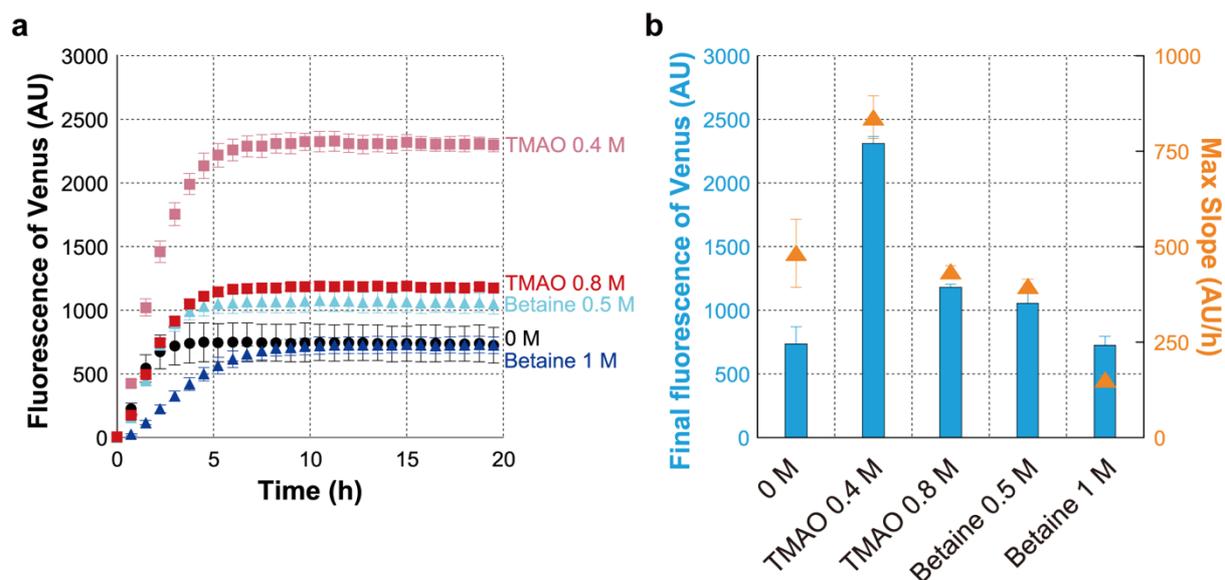


図 3-13 mRNA をテンプレートとした蛍光タンパク質 Venus の発現と、それに対するオスモライトの影響

(a) 各種オスモライト存在下における、mRNA をテンプレートとした Venus 発現反応の蛍光時間変化。各数字は添加されたオスモライトの濃度を示す。(b) 各条件における、最終蛍光値 (青棒グラフ、左 y 軸) と、反応初期における蛍光強度の最大増加速度 (橙三角、右 y 軸)。各計測は合計三回行われ、エラーバーはその標準偏差を示す。

3.6 SDS-PAGE を用いた、翻訳反応に与えるオスモライトの影響の評価

3.5 項における実験によって、オスモライトによる遺伝子発現反応活性化の効果が、翻訳反応か、フォールディングに効いていることが示唆された。翻訳反応が活性化されているかどうかを調べるために、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) を用いて遺伝子発現反応を定量した。この方法では、PURE システムの反応溶液中の合成されたタンパク質の物質を変性させた状態で定量できるため、翻訳後に起こるタンパク質のフォールディング過程や、蛍光タンパク質のマチュレーション過程の影響を除外することができる。

この実験では、オスモライト存在下における、Venus と β -gal の遺伝子発現活性と、これらに加えて、PURE システム利用時に頻繁に用いられるモデルタンパク質 Dihydrofolate reductase (DHFR) の遺伝子発現活性も調べた。各タンパク質をコードしたテンプレート DNA を添加した後、3.3.2 項と同様のタイムラプスサンプリング法で段階的に反応溶液をサンプリングし、まとめて泳動する (図 3-10a)。添加するオスモライトとして、これまでの実験において遺伝子発現を最も大きく活性化した 0.4 M TMAO と (図 3-3)、その倍の 0.8 M TMAO を添加した。ただし、 β -gal の合成時は、蛍光計測実験でより効果的であった 0.2 M TMAO (図 3-10、図 3-11) と、その倍の 0.4 M TMAO を添加した。各反応時間、各オスモライト濃度の反応溶液を一枚の SDS ゲルにまとめて泳動した (図 3-14 ~ 図 3-16)。タンパク質を精製せずに、PURE システムごと泳動しているため、目的タンパク質のバンド以外にも多くのバンドが出てくるが、今回用いたタンパク質のバンドは、いずれも PURE システム由来のバンドとは重ならない位置に出現したため、定量は可能である (図中赤矢印)。なお、希釈されていない PURE システムのコントロールとして、TMAO も buffer も加えない場合の遺伝子発現反応産物も同様に泳動した (図 3-14 ~ 図 3-16 における “f” マーク) (3.8.7 項 考察参照)。得られた電気泳動結果から、バンドの濃さを定量し、それを基にタンパク質発現量の時間変化をまとめた (図 3-17)。各バンドの濃さは画像解析ソフトを用いて定量した (S-1.4.5.3 項実験手法参照)。この時、各レーンで PURE システム要素の物質量は同じであるため、目的バンド近傍の 3 つの PURE システム要素のバンドを参照バンド (Reference bands) として濃さを計算し、目的バンドの濃さの値を割ることで規格化した。

SDS-PAGE の結果、0.4 M TMAO が Venus の発現量を大きく増加していることがわかった (図 3-17)。この結果は、蛍光測定で得られた結果と合致している (図 3-3)。一方、0.8 M TMAO の添加時は、蛍光計測の場合は発現量の上昇は見られなかったものの、SDS-PAGE による定量的な場合では、発現量が上昇した。 β -gal の発現に関しては、蛍光計測時と同様に、反応初期の合成量が TMAO 添加によって上昇した (図 3-17 における β -gal グラフの 30 min 時点)。また、DHFR の合成に関しても、Venus 合成時と同様、0.4 M TMAO の添加によって、合成量が増加した。

さらに、異なるテンプレート DNA の濃度からの Venus 発現反応や、mRNA からの Venus 発現反応に対して、同様に SDS-PAGE を用いた定量を行った。その結果、いずれの条件でも TMAO 添加時に合成量が増加した (図 3-18)。以上の結果より、TMAO の添加によって、遺伝子発現反応における翻訳反応が直接活性化されていることが示された。

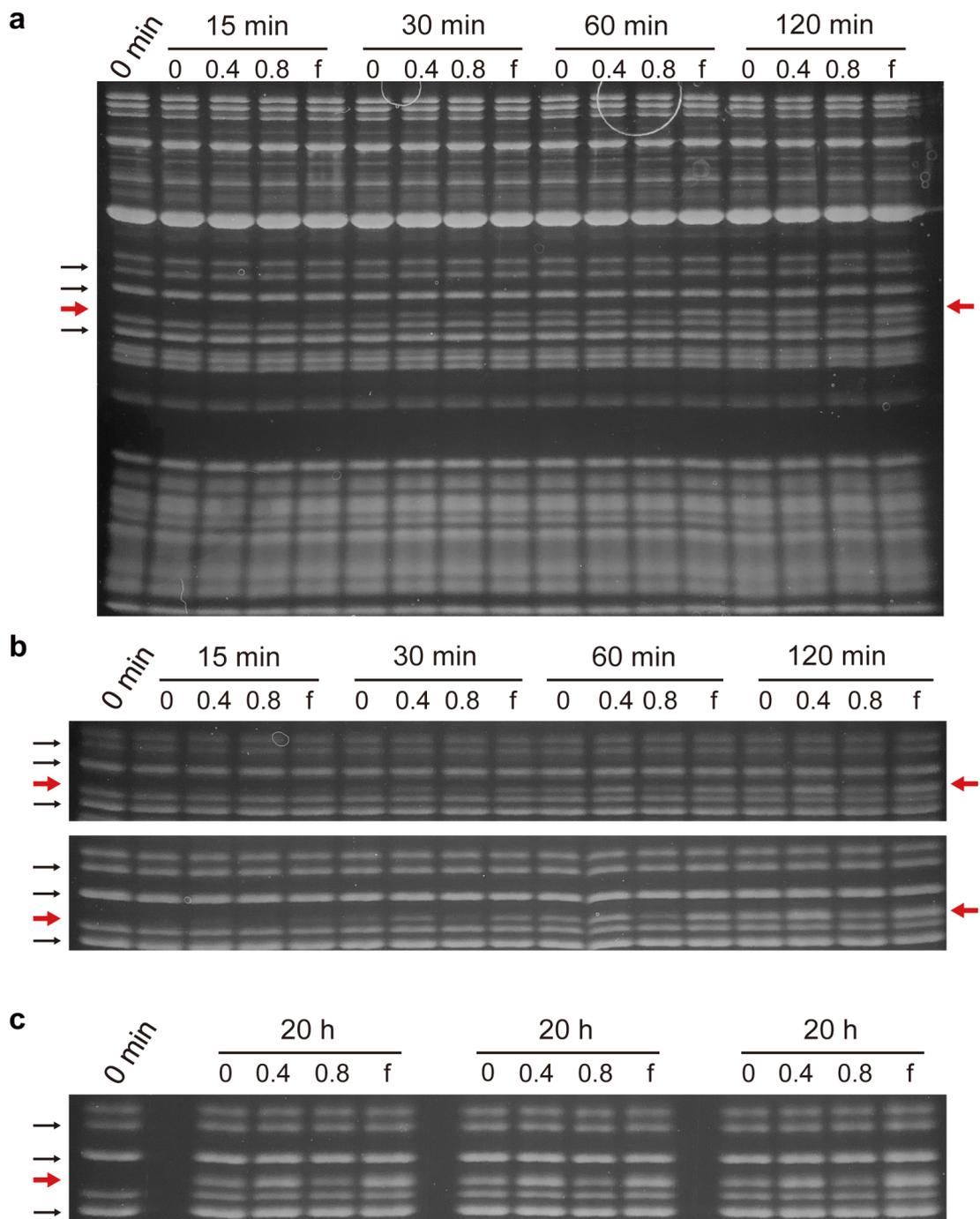


図 3-14 SDS-PAGE による、Venus 発現の定量

(a) Venus 合成反応産物を泳動した SDS ゲル。各レーンに合成反応時間と、TMAO 濃度が記されている。「f」は希釈していない PURE システムの反応産物（本文参照）。赤矢印は Venus のバンドを示し、黒矢印は定量時に用いた参照バンドを示す。(b) 同条件で行われた残り二回の試行におけるゲル画像。注目領域を切り抜いた。(c) 反応時間が 20 h におけるゲル画像。三回の試行の反応溶液をまとめて泳動した。

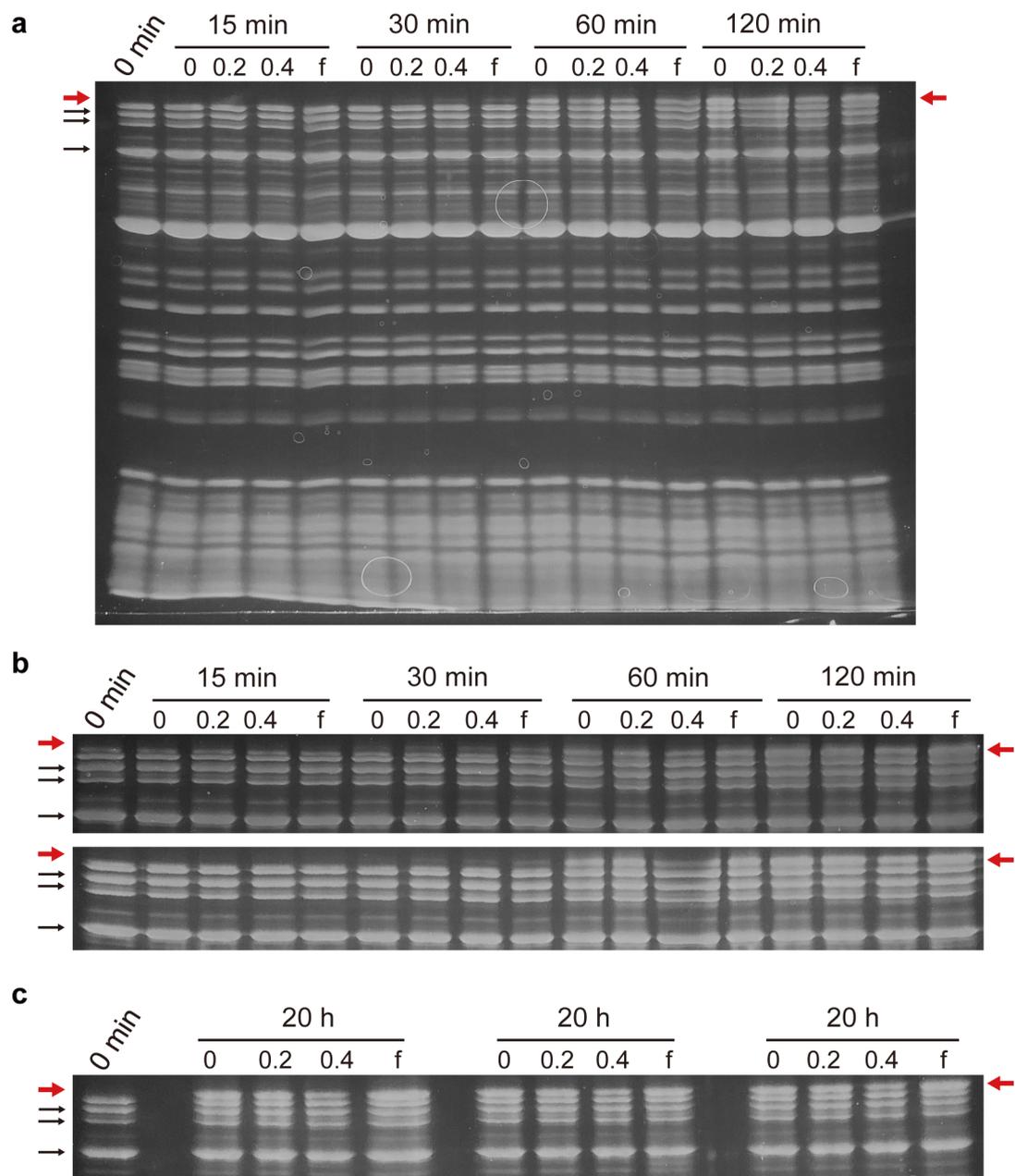


図 3-15 SDS-PAGE による、 β -gal 発現の定量

(a) β -gal 合成反応産物を泳動した SDS ゲル。各レーンに合成反応時間と、TMAO 濃度が記されている。f は希釈していない PURE システムの反応産物 (本文参照)。赤矢印は β -gal のバンドを示し、黒矢印は定量時に用いた参照バンドを示す。(b) 同条件で行われた残り二回の試行におけるゲル画像。注目領域を切り抜いた。(c) 反応時間が 20 h におけるゲル画像。三回の試行の反応溶液をまとめて泳動した。

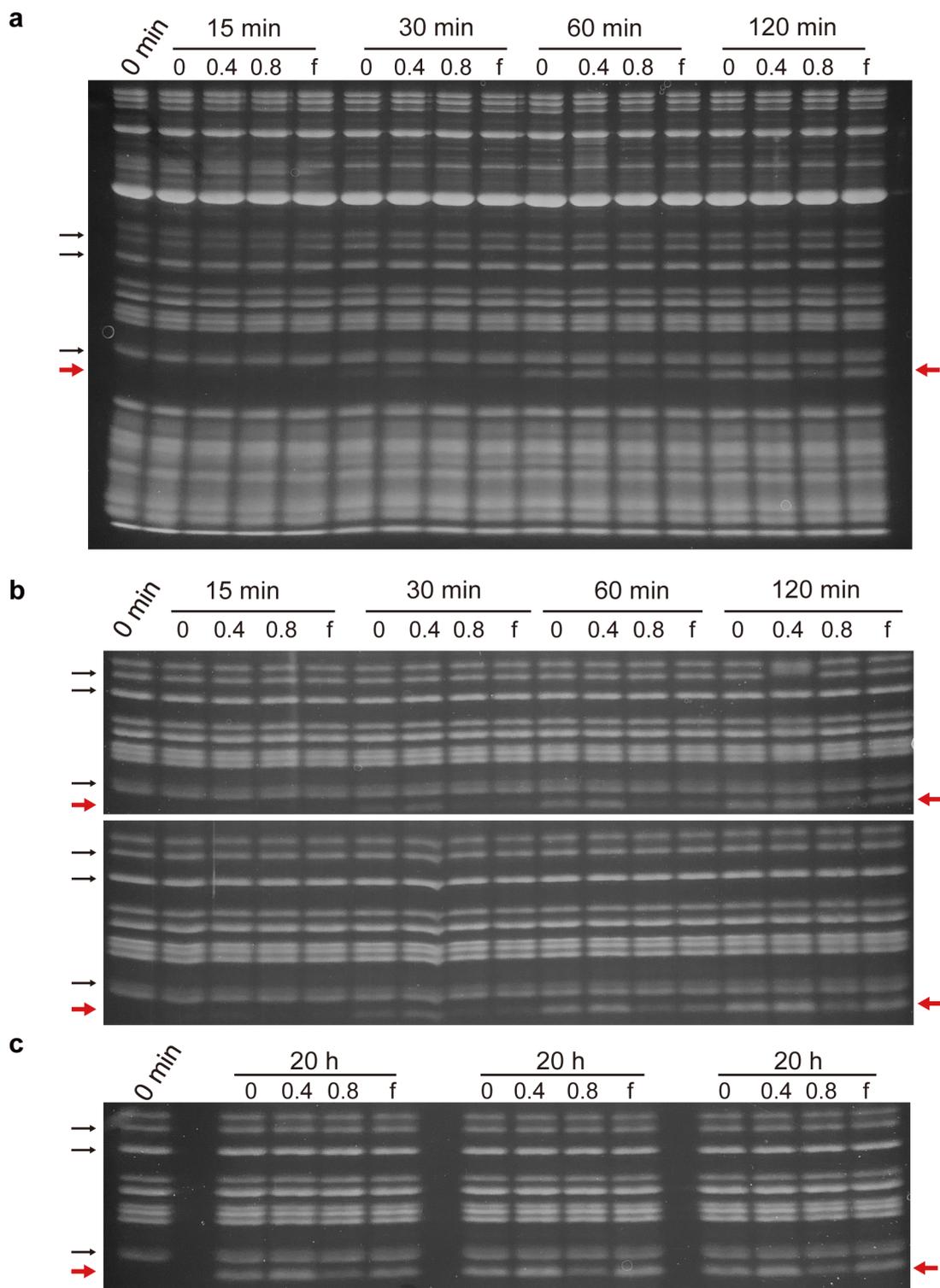


図 3-16 SDS-PAGE による、DHFR 発現の定量

(a) DHFR 合成反応産物を泳動した SDS ゲル。各レーンに合成反応時間と、TMAO 濃度が記されている。f は希釈していない PURE システムの反応産物 (本文参照)。赤矢印は DHFR のバンドを示し、黒矢印は定量時に用いた参照バンドを示す。(b) 同条件で行われた残り二回の試行におけるゲル画像。注目領域を切り抜いた。(c) 反応時間が 20 h におけるゲル画像。三回の試行の反応溶液をまとめて泳動した。

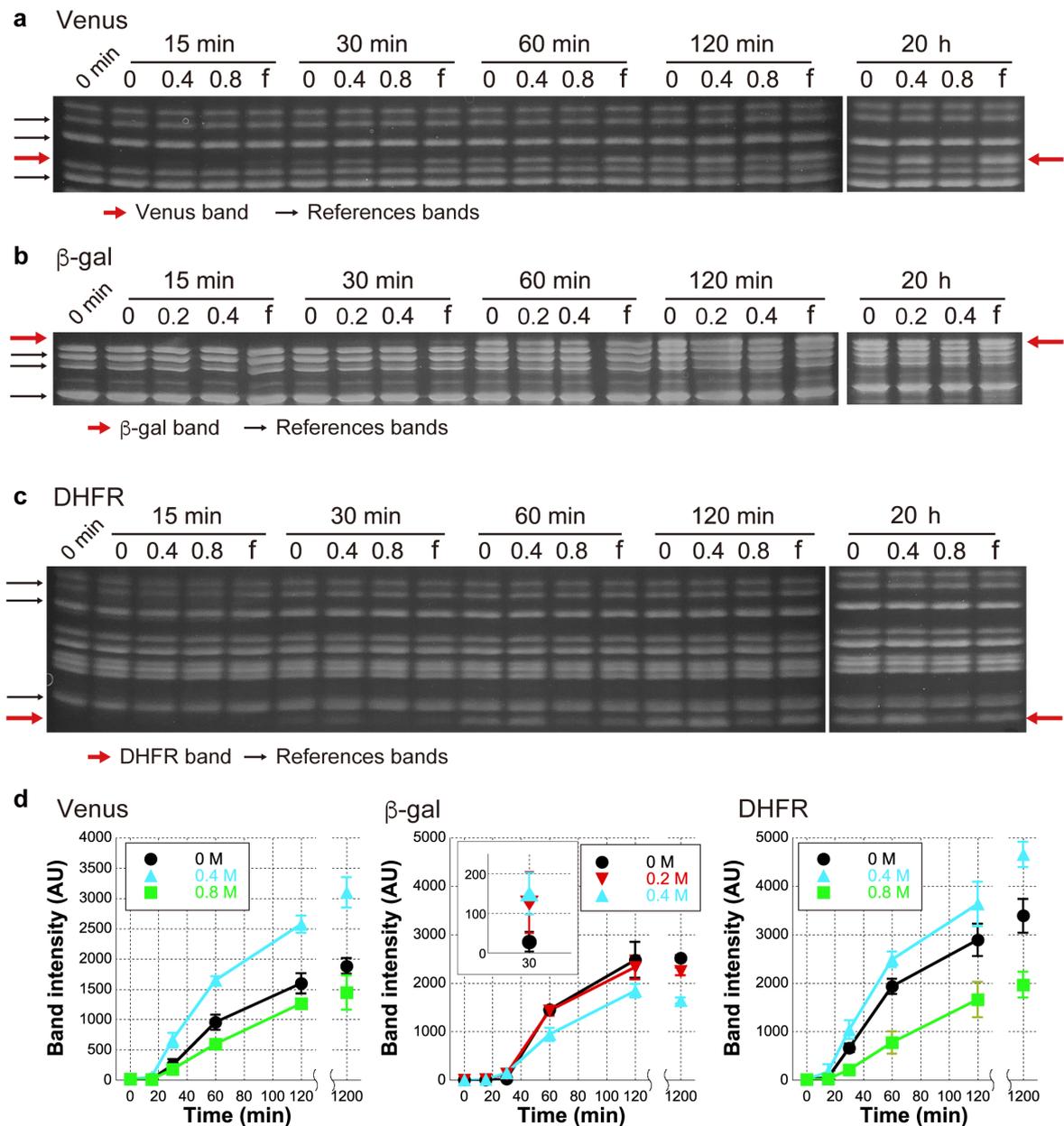


図 3-17 SDS-PAGE による、オスモライト存在下におけるタンパク質翻訳活性の評価

(a) ~ (c) Venus、β-gal、DHFR の SDS 電気泳動の結果。それぞれ図 3-14b、図 3-15b、図 3-16b と同じ画像を載せた。(d) SDS-PAGE で定量された、Venus、β-gal、DHFR の合成反応の時間変化。縦軸には目的タンパク質のバンドの濃さが表されている。β-gal のグラフにおけるインセットは、30 min の時点のデータの拡大図。各合成反応は、テンプレート DNA を 2 nM 含み、37 °C 条件で行われた。各計測はそれぞれ三回行われ、エラーバーはその標準偏差を示す。

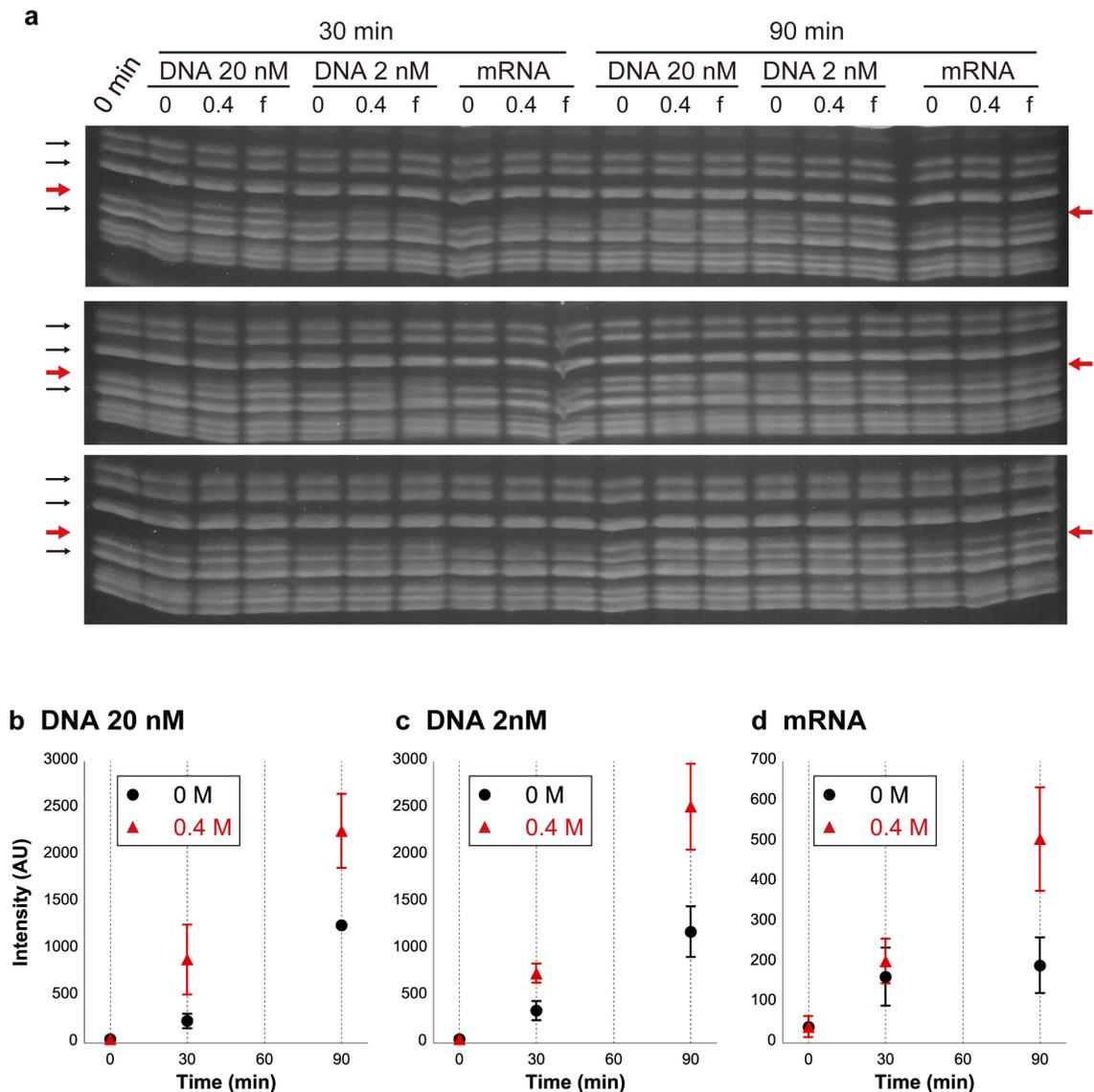


図 3-18 SDS-PAGE を用いた、異なる濃度のテンプレート DNA や mRNA からの Venus 発現反応の定量

(a) 20 nM DNA、2 nM DNA、300 nM mRNA を用いた Venus 発現反応産物の SDS-PAGE のゲル画像。同条件で行われた三回の試行におけるゲル画像の注目領域を切り抜いて載せた。各レーンに反応時間と、TMAO 濃度が記されている。f は希釈していない PURE システムの反応産物 (本文参照)。赤矢印は Venus のバンドを示し、黒矢印は定量時に用いた参照バンドを示す。(b) ~ (d) 電気泳動結果から定量された、各条件における合成量の時間変化。凡例は TMAO の濃度を示している。定量方法は本文参照。各計測は 37 °C で三回ずつ行われ、エラーバーはその標準偏差を示している。

3.7 人工細胞の遺伝子発現活性に対するオスマライトの分子クラウディング効果

これまでの実験によって、オスマライトの分子クラウディング効果が、無細胞タンパク質合成系の反応活性を向上させることがわかった。次に、微小容器内に無細胞タンパク質合成系を再構成することで、人工細胞デバイスを構築し、その中でオスマライトの分子クラウディング効果が遺伝子発現活性に影響を与えるかどうか調べる。

ALBiC と同様のフッ素樹脂 CYTOP 製の微細加工デバイスを用いることで、ガラス表面の親水性パターンと疎水性パターン由来の Water-in-Oil ドロップレットを作ることができる (図 3-19) ^{147,150}。この方法によって、体積が均一な数十 fL の微小ドロップレットを数十万個作ることができるため、精度の高い酵素活性計測に用いられてきた。このドロップレット内に PURE システムの反応溶液を流し、オイルで蓋をすることで、遺伝子発現可能な人工細胞が完成する。この時、1 チャンバーあたり一分子以下の DNA が入るような低濃度 DNA 濃度にするすることで、確率的に一分子 DNA からの遺伝子発現反応を観察することも実現する。

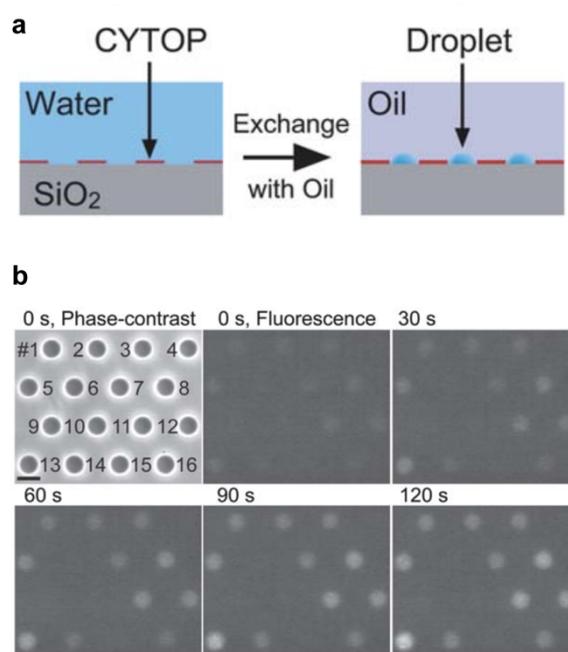


図 3-19 CYTOP 製微細加工デバイスを用いた Water-in-Oil ドロップレットの作製

(a) Water-in-Oil ドロップレット作製の概要。(b) 作製された Water-in-Oil ドロップレット内における、 β -gal と FDG を用いた一分子酵素活性測定。Sakakihara, *et al.*, *Lab Chip* (2010)より引用、一部改変 ¹⁴⁷。

まずは、PURE システムに Venus をコードしたテンプレート DNA を添加し、その反応溶液を微細加工デバイスに封入した。各チャンバー内に DNA が平均 0.38 分子存在するように DNA 濃度を決めて添加した。デバイスを室温でインキュベートしながら、顕微鏡でタイムラプス撮影したところ、いくつかのチャンバーの蛍光が上昇したため (図 3-20)、ドロップレット毎に確率的に封入された DNA から Venus の発現が起きていることが確認された。撮影した全チャンバーの蛍光強度を計測すると、およそ 5 ~ 6 時間でその蛍光強度は飽和した (図 3-21)。反応の 10 時間後の全チャンバーの蛍光強度をヒストグラム化すると、蛍光強度が低い領域に一つの大きなピークが生じた (図 3-22 の TMAO 0 M のヒストグラム)。ここに当てはまるのは、蛍光が観察されていないチャンバーである。したがって、このピークを正規分布として近似し、(平均値) ± (標準偏差 (σ)) の 4 倍) 以内の蛍光強度を示すチャンバーを、Venus 非発現チャンバー、それ以上を Venus が発現しているチャンバーと定義した。

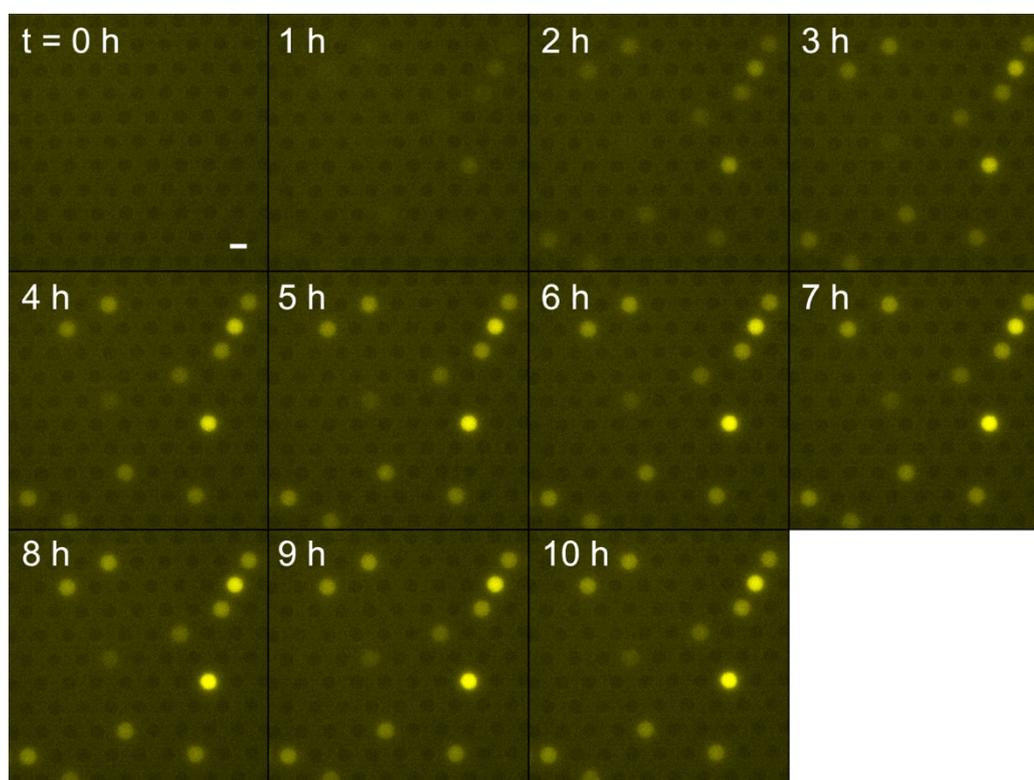


図 3-20 微細加工デバイスを用いた人工細胞デバイス内での Venus の発現
微細加工デバイスの複数チャンバーをタイムラプス撮影した画像。スケールバーは 5 μ m を示す。

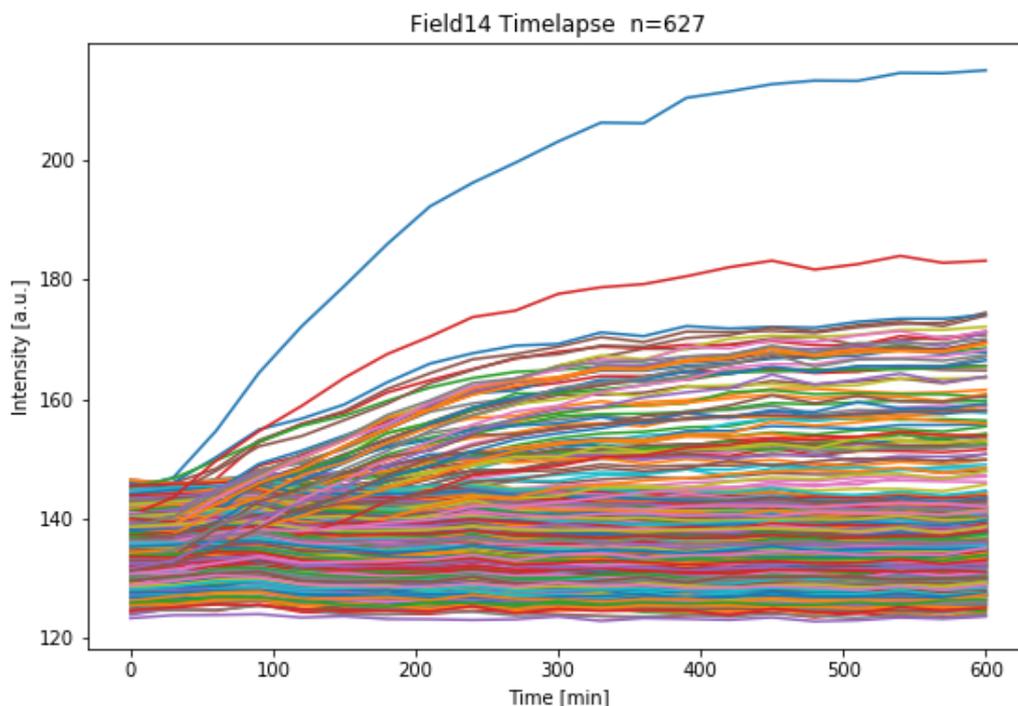


図 3-21 人工細胞デバイス内における Venus 発現の時間変化

例として、TMAO 非添加時の条件において、ある視野における 627 チャンバーの蛍光時間変化をプロットした。縦軸が Venus の蛍光強度を示す。

この人工細胞を用いた Venus 発現実験を、様々な濃度の TMAO を含む条件で行い、遺伝子発現活性を比較した。ここでは、最終濃度で 0 M、0.2 M、0.4 M、0.8 M となるように TMAO を反応溶液に添加し、同一デバイス上に 4 本の流路をすることで、この 4 種類の TMAO 濃度条件を同時に観察した。その結果、TMAO 0.2 ~ 0.4 M 存在下では、Venus が発現したチャンバーの数が多く観察された (図 3-22)。再現性を確認するため、この試行を合計 4 回行い、それぞれ Venus が発現していると判定されたチャンバーの蛍光強度を積算し、その時間変化を求めた (図 3-23 上段)。蛍光強度の平均値ではなく積算値を求めた理由としては、各条件で Venus 発現チャンバーの数も変化したため、その現象を表現する上で積算値が適していると判断したからである (図 3-24)。さらに、各測定で撮影されたチャンバーの合計数で積算値を割ることで値を補正した (図 3-23 中段)。最後に、TMAO 非添加時の値と比較するために、試行毎に TMAO 0 M、 $t = 10$ (h)での蛍光強度の値で各データを規格化した (図 3-23 下段)。4 回の試行における各条件のデータの平均値を比較すると、図 3-22 の結果と同様、TMAO 0.2 ~ 0.4 M 存在下において、TMAO を含まない条件よりも Venus の発現活性が向上していることがわかる (図 3-25)。試行間で Venus が発現したチャンバーの数の絶対値にばらつきが出た影響で、得られた蛍光積算値のエラーバーが大きくなったが、いずれの試行でも TMAO 存在時の方が高い蛍光強度が計測されたため、TMAO 添加が、人工細胞内での一分子 DNA からの Venus 発現活性を向上させていることが示唆された。試行間における、PURE システムの蛍光タンパク質発現量のばらつき

が大きい現象は、より精度の高い定量測定系を構築する上で重要な課題であり、デバイスや封入オイルなどの条件検討による改良が今後期待される。

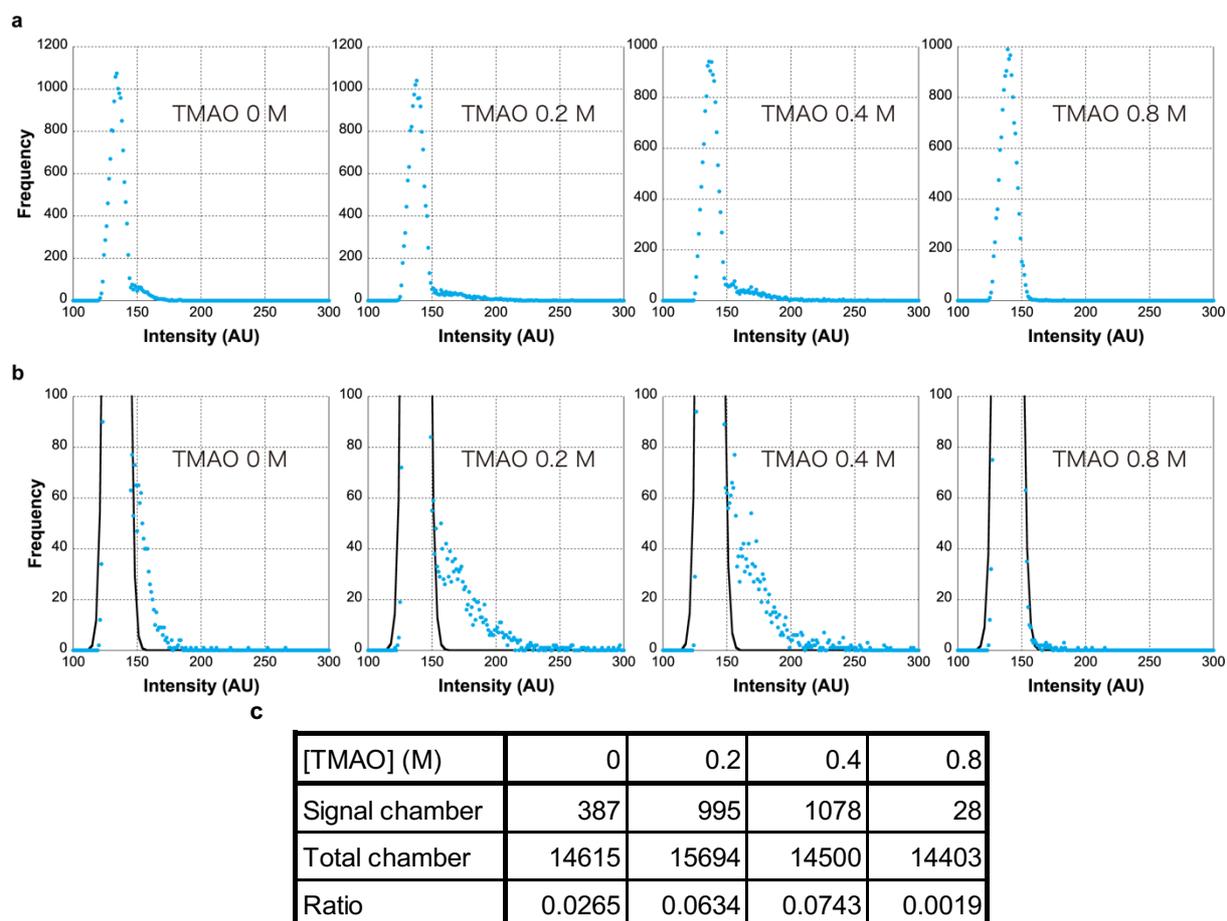


図 3-22 人工細胞デバイス内での Venus 発現量の比較

(a) 様々な濃度の TMAO 存在下において、Venus 発現反応の 10 時間後の全チャンバーの蛍光強度をヒストグラム化したもの。単一デバイスに四本の流路を構築し、上記 4 条件を同時に測定した。横軸はチャンバー毎の蛍光強度、縦軸は頻度（チャンバーの数）を示している。(b) (a) のヒストグラムの縦軸を拡大したヒストグラム。黒線は、Venus 非発現チャンバーのピークを Gaussian 近似した結果。(c) (a) の結果から算出された、Venus を発現しているチャンバーの数、観察された全チャンバー数、そして発現チャンバー数の比率を示した。

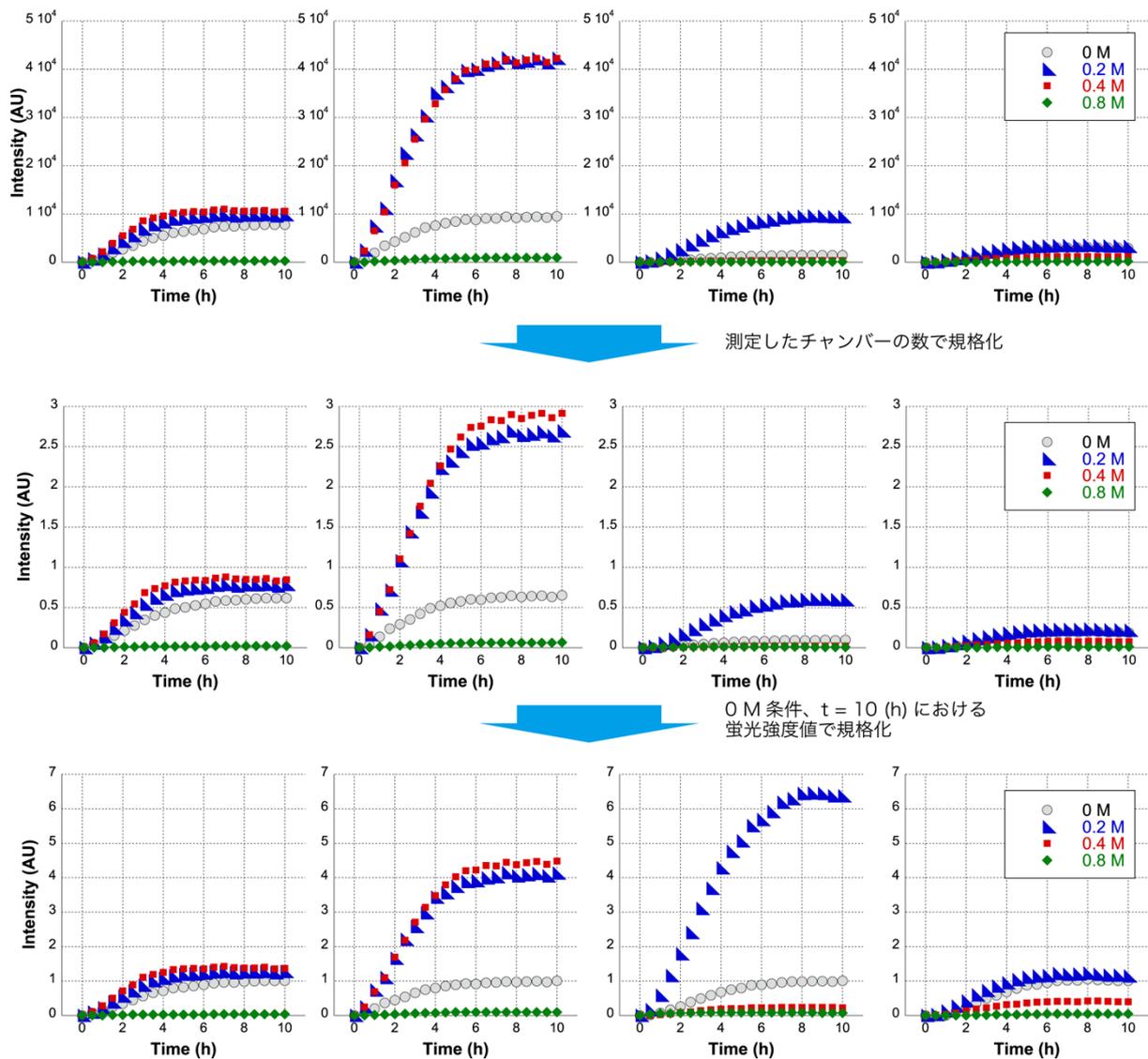


図 3-23 人工細胞デバイス内での Venus 発現の時間変化とその規格化

様々な濃度の TMAO 存在下で、人工細胞デバイスにおける Venus 発現反応を観察し、シグナルが計測されたチャンバーの蛍光強度の積算値の時間変化をプロットした。(上段) 計4回の試行を行い、それぞれの結果を並べた。(中段) 各試行において計測されたチャンバーの数は少しずつ異なるため、それぞれの蛍光強度の積算値をチャンバー数で割ることで補正した。(下段) 各時間変化を、TMAO 0 M 条件での蛍光強度 (t = 10 h) の値で規格化した。

[TMAO] (M)	0	0.2	0.4	0.8
Signal ratio 1st (%)	2.48	3.68	3.45	0.07
Signal ratio 2nd (%)	2.65	6.34	7.43	0.19
Signal ratio 3rd (%)	0.22	1.10	0.06	0.03
Signal ratio 4th (%)	0.60	0.55	0.17	0.03
Average (%)	1.49	2.92	2.78	0.08
SD	1.26	2.66	3.48	0.08

図 3-24 人工細胞デバイス内における Venus 発現チャンバーの割合

各 TMAO 濃度条件下で、Venus が発現したチャンバーの個数の割合 (%)。各試行におけるデータ、その平均値、標準偏差 (SD) を計算した。

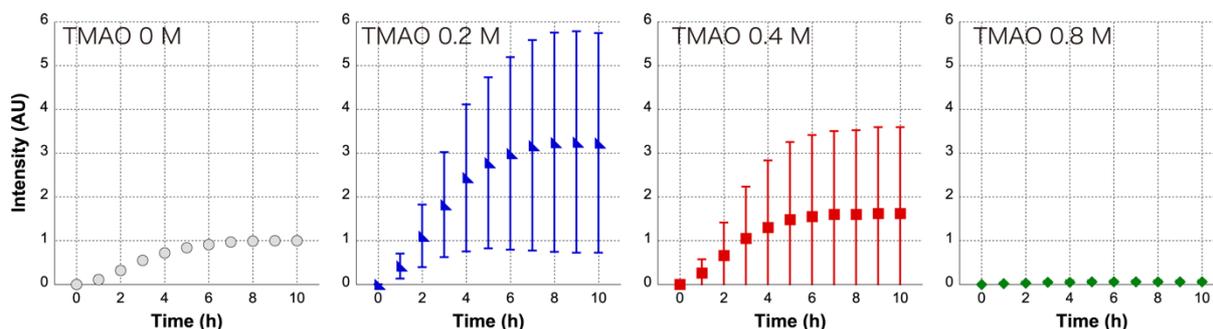


図 3-25 人工細胞デバイス内における TMAO 存在下での Venus 発現

様々な濃度の TMAO 存在下で、Venus 発現反応における蛍光の時間変化をプロットした。図 3-23 下段の結果を平均化した。エラーバーはその標準偏差を示している。

3.8 本章の考察と展望

3.8.1 オスモライトの分子クラウディング効果の評価と、先行研究との比較

本章では、二種類のメチルアミン系オスモライト TMAO とベタインを無細胞タンパク質合成系である PURE システムに添加し、それによって生じる遺伝子発現活性の変化について調べた。我々が調べた限りで、唯一メチルアミン系オスモライトと無細胞タンパク質合成活性の相関を調べている Brigotti らの先行研究¹⁴⁴では、ベタインをウサギ網赤血球抽出液由来の無細胞タンパク質合成系に加え、グロビンの合成活性の変化を調べている。それに比べて本研究では、ベタインだけではなく、TMAO の影響も調べている点、様々な濃度のオスモライトの影響を調べている点、複数の異なる種類のタンパク質を利用している点、反応時の温度を変えて測定した点などにおいて、より網羅的な調査によってオスモライト効果の普遍性を確かめることができた。

本章における実験を通して、TMAO が遺伝子発現活性を向上させることがわかった。37 °C 条件下では、0.2 ~ 0.4 M TMAO が全タンパク質合成時に効果的であった。ベタインも遺伝子発現活性を向上させていたが、その効果が確認されたのは蛍光タンパク質の合成時のみで、その活性化の度合いも、最大で 1.6 倍程度であった。この値は、Brigotti らが先行研究で評価した、ベタインを用いた場合の活性化の度合い (1.3 ~ 1.6 倍) と矛盾しない (図 1-12)¹⁴⁴。

いずれのオスモライトを用いた場合でも、最も効果的であった濃度域より低い濃度では、濃度の上昇とともに活性が上昇し、それよりも高い濃度域では反対に、濃度が上がれば上がるほど活性は低下した。このような傾向は、PEG や BSA など高分子クラウディング剤の無細胞タンパク質合成系への影響を調べた先行研究^{119,120} や、その他の分子クラウディング効果に関する先行研究で報告された性質と合致している¹¹⁰。一般的に、クラウディング剤が過剰に高濃度になると、溶液の粘性が上がることで物質の拡散速度が遅くなり、生体分子同士の結合が起こりにくくなる。同時に、クラウディング効果の上昇によって物質同士の結合状態が安定化させるため、反対に生体分子の解離が起こりにくくなる。この二つの現象が、酵素活性を低下させると考えられている。本研究のような翻訳反応の場合、数多くの分子の結合や解離を通じて反応が進行するため、解離速度の低下は発現量の低下につながる。そのため、高濃度クラウディング剤を添加した場合の遺伝子発現活性の低下は、主に解離速度の低下が原因であると考えられる^{119,120}。さらに、本研究で用いられているオスモライトは、PEG や BSA よりも分子量が小さいため、本実験での濃度条件下では、粘性は上昇しにくい。よって、やはり物質の拡散速度の低下よりも、解離速度の低下が原因であると考えられる。

3.8.2 オスモライト効果の温度依存性

本章では、反応時の温度を変えて、オスモライト効果を評価した。37 °C 条件下において、0.4 M TMAO が合成活性の向上に効果的であったのに対して、26 °C では、より低い濃度で効果的であった。例えば、Venus 発現反応では、37 °C では 0.4 M TMAO が最も効果的であった一方で、26 °C では 0.2 M TMAO が最も効果的であった (図 3-4)。β-gal 合成時、37 °C では 0.4 M、26 °C では 0.2 M が合成活性を最も向上させた (図 3-7、図 3-8)。TMAO よりも活性化の度合いは小さいが、ベタインを用いた Venus 発現時でも、26 °C の方が、より低い濃度で効果的になるという結果となった (図 3-4)。

以上の結果から、酵素反応に適した 37 °C と室温の 26 °C の両方において、オスモライトは遺伝子発現反応を活性化させることがわかった。その理由を検討する上で、オスモライトの pH について考慮する。TMAO とベタインの pKa はそれぞれ 4.7 と 2.4 であるため¹⁷⁷、各オスモライトは pH7.6 の Tris-HCl (75 mM) に溶かしストック溶液とした。本実験で用いられた Tris-HCl (75 mM)、TMAO (0.4 M)、ベタイン (1 M) の 26 °C/37 °C における pH を実測すると、それぞれ、7.6/7.2、7.6/7.3、7.7/7.3 であった。なお、PURExpress の反応溶液に混ぜて pH を測定すると、7.4/7.4、7.5/7.5、7.6/7.6 であり、温度による pH の違いは小さくなった。したがって、温度による活性化効果の違いを、pH の変化のみで説明することはできない。そもそも、この温度依存性が、オスモライトのタンパク質安定効果の温度依存性なのか、それとも遺伝子発現反応の温度依存性なのかは不明であるため、それらの詳細な調査も必要となる。

3.8.3 TMAO とベタインの分子構造的比較

TMAO とベタインの効果を比較すると、TMAO の方が遺伝子発現活性を大きく向上させた。TMAO とベタインの安定化の性能を比較した先行研究はいくつか存在し、タンパク質の融解温度、溶媒間移行自由エネルギー、尿素存在下での酵素活性などを調べた研究が報告されており、それらによると、TMAO は、ベタインを含む他のメチルアミン系オスモライトよりも高い安定化効果を持つ^{133,139}。したがって、本研究における結果はこれらの先行研究の結果と合致している。しかし、メチルアミン系オスモライトがタンパク質を安定化する分子機構は、これまで数多くの研究が報告されているものの、未だに結論には至っておらず、したがって TMAO がベタインよりも安定化効果が強い理由もわかっていない。いくつかの研究報告では、オスモライトとタンパク質の主鎖骨格の間の unfavorable な相互作用が、タンパク質の構造の安定化に寄与しているという説が唱えられている^{135,178,179}。その一方で、他の研究では、オスモライトが溶液中の水分子と積極的に結合し、タンパク質-水間の水素結合が弱められることが、安定化の最大の要因であると結論付けられている^{178,180,181}。その他の研究では、そもそも TMAO の安定化の仕組みはベタインなどの他のオスモライトとは根本的に異なっており、TMAO は直接タンパク質の主鎖骨格に結合することでタンパク質の unfolded 状態に作用しているという新しい説が主張されている¹⁴¹。これらの研究はいずれも、溶液系の熱力学的性質の評価や、分子動力学を用いてシミュレーション (MD) などの計算で得られた結果を基に、分子機構を考察している。それに対して本研究は、オスモライトが生理機能に与える影響を直接評価している。今後、ここで得られた知見が、オスモライトの安定化効果を解明する手助けとなるかもしれない。

3.8.4 遺伝子発現反応の各過程におけるオスモライトの影響

mRNA をテンプレートとした遺伝子発現反応と、SDS-PAGE を用いた定量実験において、オスモライトの添加が目的タンパク質の合成量を増加させていたことが判明したことから、一連の遺伝子発現反応の中でも、翻訳反応がオスモライトによって活性化されていることがわかった。この結論は、先に述べた Brigotti らの先行研究¹⁴⁴や、オスモライト存在下で核酸分子とタンパク質の複合体が安定化されるという報告とも合致している¹²⁷。

しかし、本研究はあくまで、翻訳反応がオスマライトによって活性化されていることを示しており、転写反応とフォールディング過程も活性化されている可能性はある。3.5 項の mRNA をテンプレートとした遺伝子発現反応は、TMAO によって最大 3.1 倍活性化されており (図 3-13)、DNA からの発現における最大 3.8 倍の活性化 (図 3-12) と単純に比較すると、DNA → mRNA の転写過程での見かけ上の活性化効果はほとんど無いように見える。しかし、mRNA からの発現実験では過剰量の mRNA を使用しているため、DNA からの発現実験との単純比較はできない。また、リボソームによるペプチド鎖は、全長が翻訳される前からフォールディングし始めることが知られている。つまり、翻訳速度とフォールディング過程は密接に関連しているため、フォールディングの活性化が結果的に翻訳速度を速めている可能性もある。今後、各過程におけるオスマライトの活性化効果を厳密に調べるためには、個々の反応過程の *in vitro* 再構成系にオスマライトを添加することで、別々に活性化効果を評価する必要がある。

3.8.5 オスマライトが翻訳反応を活性化させる仕組みと、タンパク質の種類によるオスマライト効果の違いに関する考察

オスマライトが翻訳反応を活性化させている分子機構について考察することで、オスマライトの役割のより詳細な理解が期待される。しかし、翻訳反応は様々なタンパク質や核酸分子が絡み合う複雑な反応過程であるため、PURE システムを用いたとしても、速度論的解析は難しい³²。オスマライトの作用機構を考察する上で、TMAO 存在下における β -gal 発現の結果は興味深い。蛍光計測と SDS-PAGE 定量の両方において、 β -gal 合成反応の初期段階では TMAO 添加時の発現量の方が大きかったが、反応時間が十分経過した後は、オスマライト非添加時の発現量の方が大きかったことが判明した (図 3-7、図 3-10、図 3-11、図 3-15)。この現象は、Venus、tdTomato、DHFR のいずれの発現時にも見られなかった。この要因を考察する上で、 β -gal が他のタンパク質と異なる点を考えると、分子量がそれに当たる。Venus、tdTomato、DHFR、そして β -gal の分子量はそれぞれ、27 kDa、54 kDa、18 kDa、そして 120 kDa であり、 β -gal が最も大きい。それに伴い、タンパク質のアミノ酸配列も最長であるため (図 3-26)、リボソームが mRNA を読み取りながらペプチド鎖を合成する伸長過程 (図 3-27) は、 β -gal が最も長くなることが予想される。

この β -gal 合成時の結果は、以下のいくつかの仮説で説明できる。一つ目の仮説として、アミノ酸の数が小さいタンパク質であれば、翻訳の開始・伸長・終結の 3 ステップの内、開始が律速過程となる。オスマライトを添加してもアミノ酸数の多い β -gal 合成のみが活性化されなかったことから、オスマライトは開始の過程を促進しているという仮説が立てられる。この仮説は、先行研究における、TMAO の添加で S30 リボソーム複合体の会合が大きく促進された報告¹⁸² や、PURE システムによる合成反応の律速が、主にリボソームの開始反応であること¹⁸³とも合致している。

一方で、リボソームは伸長反応中に確率的に停止してしまうことが知られている⁴⁰。その確率がアミノ酸長に比例すると仮定すると、ペプチド鎖の長さが長くなるほど停止現象は増え、ペプチド鎖の合成にかかる時間は長くなる。オスマライトはタンパク質と核酸分子の複合体を安定化することを考慮し、オスマライトが停止中のリボソーム複合体を安定化する仮説を立てると、翻

訳サイクルが増えるに連れて停止時間が長くなり、全長ペプチド鎖の伸長にかかる正味の時間は遅くなる。以上の原因によって、分子量の大きいβ-galの合成量が低下したとも考えられる。

あるいは、翻訳されたペプチド鎖が大きいほど、翻訳終結のタイミングでリボソームからペプチド鎖が外れにくくなることが予想される。β-galの合成量が増加しなかったのは、翻訳過程の終結部分が遅くなってしまったことで、次のペプチド鎖の翻訳が起これにくくなったことに原因がある可能性もある。

今後、より詳細に検証するためには、poly(U)遺伝子を用いた翻訳伸長速度の直接的な測定^{144,184-186}や、リボソームの開始複合体の定量¹⁴⁴を行う必要がある。

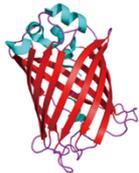
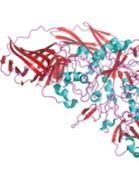
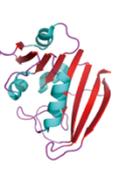
	Venus	tdTomato	β-gal	DHFR
分子構造		 * 単量体の構造		
分子量 (単量体あたり)	27 kDa	54 kDa	120 kDa	18 kDa
アミノ酸配列 の長さ (単量体あたり)	245	476	1024	159
単量体 or 多量体	単量体	単量体 (タンデム構造)	四量体	単量体

図 3-26 発現させたタンパク質の構造的比較

分子構造は PDB ファイルを用いて描画した (1MYW、1ZGO、6DRV、7DFR)。

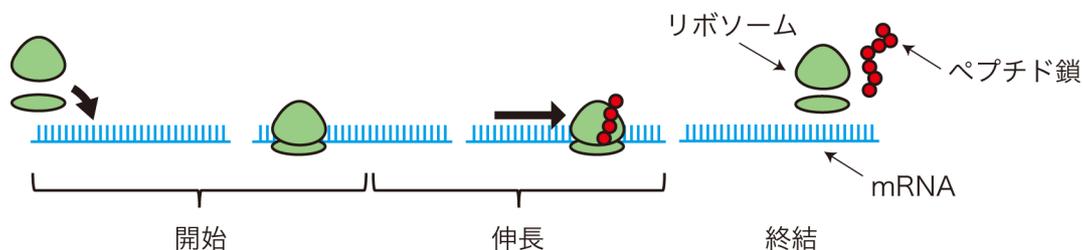


図 3-27 翻訳反応時のリボソームの反応過程

3.8.6 微小な人工細胞チャンバー内での遺伝子発現におけるオスモライト効果

体積が 20 μL 前後の PURE システム溶液を用いた計測によって、オスモライトが無細胞タンパク質合成反応を活性化することが判明した。この効果が人工細胞内での遺伝子発現反応にも有効かどうか調べるために、PURExpress 反応溶液を微細加工デバイスに封入することで、DNA 一分子からの遺伝子発現反応を計測し、そこでのオスモライト効果を調べた(図 3-22 ~ 図 3-25)。その結果、0.2 ~ 0.4 M のオスモライトを添加することによって、Venus を発現するチャンバーの数が約 2 ~ 3 倍に増加した。発現が起きたチャンバーの蛍光を積算し、オスモライトの有無で比較したところ、0.2 M ~ 0.4 M のオスモライトが存在するときに発現量が上昇した。この現象は溶液系におけるオスモライト添加の効果と同様であるため、人工細胞における一分子 DNA からの遺伝子発現も、オスモライトによる分子クラウディング効果によって活性化された。

一方で、この人工細胞を用いた実験系では、分子クラウディング効果以外の要因で反応が活性化された可能性もある。Anandらは、アルカンチオール自己組織化単分子膜 ($\text{CH}_3\text{-SAM}$ 膜) を形成した疎水性基板上に TMAO 溶液を添加すると、TMAO 分子が $\text{CH}_3\text{-SAM}$ 膜上に結合することで、タンパク質の基板上への非特異吸着が低減されることを発見した¹⁸⁷。この現象は、オスモライトがタンパク質の主鎖骨格と unfavorable な相互作用を持つことに由来している。一方、本研究における CYTOP デバイスも、生体分子が非特異的に吸着しやすいことが知られている。TMAO が CYTOP 面に結合できるかどうかは不明であるものの、もし、本実験系でも、TMAO が生体分子の非特異的吸着を防いでいるとすれば、反応に必要なタンパク質や DNA のデバイス表面への非特異吸着が起こりにくくなったことで、Venus 発現チャンバーの数が増加した現象が説明できる。

このように、デバイス表面への非特異吸着を低減させることが、反応を活性化させた可能性も考えられた。この点も、微細加工技術を用いた人工細胞を構築する上では重要な要素である。いずれにせよ、オスモライトが人工細胞の遺伝子発現系の活性化に有効であることを示唆する結果を得ることができた。

3.8.7 今後に向けた改良点：オスモライト物質を含んだ PURE システムの調製

本研究では、PURExpress にオスモライトを添加する際に、PURExpress 溶液を希釈してしまっている。20 μL の反応溶液中、8 μL がオスモライト溶液であることから、PURE システムは 60% に希釈されていることになる。オスモライト非添加条件 (TMAO 0 M やベタイン 0 M 条件) でも、オスモライト溶液と同体積の Tris バッファーが加えられているため、PURE システムの希釈は起きている。PURE システムは希釈によって、遺伝子発現活性が大きく低下することが知られており、今回の 60% の希釈によって活性はおよそ 3 分の 1 ~ 5 分の 1 に低下している。この値は、SDS-PAGE 実験における希釈なし PURE システムによる遺伝子発現活性の定量 (f と記述されているレーン) から見積もられた (図 3-14 ~ 図 3-16)。今回は、市販品である PURExpress を利用したため、オスモライトを添加する以上、PURE システムの希釈は避けられなかった。今後、予めオスモライトを含む PURE システムを自作できれば、希釈による活性の低下を避けることによって、PURE システムの活性をより大きく向上させられるだろう。

3.8.8 本章の総括

本章では、メチルアミン系オスモライトである TMAO とベタインを無細胞タンパク質合成系である PURE システムに添加することで、オスモライトが引き起こす分子クラウディング効果が遺伝子発現活性に与える影響を調べた。その結果、適量の TMAO の添加によって遺伝子発現が活性化されることがわかった。合成するタンパク質によって活性化の度合いは異なっていたものの、オスモライトの効果はある程度普遍的に起こることを確かめることができた。このような活性化効果は、微小反応容器内での一分子 DNA からの遺伝子発現時にも見られたことから、より生理活性の高い人工細胞の開発を目指す上で、オスモライトの添加が有効であることを示す結果となった。

本章における研究内容は、学術論文として *ACS Synthetic Biology* にて発表された（以下は 2019 年 2 月 15 日時点での情報）。

Yoshiki Moriizumi, Kazuhito V. Tabata, Daisuke Miyoshi, and Hiroyuki Noji, “Osmolyte-Enhanced Protein Synthesis Activity of a Reconstituted Translation System”, *ACS Synthetic Biology*, *In press* (2019)

第 4 章 総括

本研究では、生きた細胞と同等に高い活性を持つ人工細胞を作製することを目的とし、*in vitro* 再構成された反応溶液の分子クラウディング効果に着目した。一般的な *in vitro* システムや人工細胞は、細胞質よりはるかに生体分子濃度が希薄な溶液で構成されているため、様々な生体分子が極めて高い濃度で存在することで生じる分子クラウディング効果が再現されていない。細胞と同じように活性の高い反応を再現するためには、この分子クラウディング効果が維持された人工細胞を作製することが重要であると考え、異なる二種類の方法を用いて人工細胞を作製し、分子クラウディング効果が与える影響の評価を試みた。

第二章では、生きた細胞の細胞質を、希釈せずに反応容器に再構成するために、プロトプラスト型大腸菌を微細加工デバイス ALBiC に膜融合させた。これによって、細胞膜成分も含めた、細胞の全要素が再構成された人工細胞 Hybrid cell を作製した。その結果、Hybrid cell は遺伝子発現活性を持っており、細胞機能の適切な再構成が確認された。一方で、その遺伝子発現活性は低く、細胞質の希釈の度合いとの相関もなかった。この原因は、遺伝子発現活性に必要な他の生体反応（エネルギー合成など）が正常に再構成されておらず、それらの影響で指標であるタンパク質合成活性が低減したと考えた。

第三章では、分子クラウディング効果存在下での遺伝子発現活性を直接評価するために、無細胞タンパク質合成系である PURE システムを利用した。この系では、反応に必要なエネルギー物質や基質が過剰に含まれているため、他の反応がボトルネックになることはない。分子クラウディング効果を再現するために、タンパク質を安定化させる効果を持つメチルアミン系オスモライトを用いた。様々な濃度の TMAO とベタインを、異なる種類のタンパク質の合成反応溶液に添加することで、遺伝子発現活性に与える影響を調べた。その結果、特定の濃度の TMAO が存在する条件では、タンパク質の合成反応が活性化されることがわかった。オスモライトは微細加工チャンバー内に PURE システムを封入することで構築された人工細胞デバイスの遺伝子発現も活性化した。遺伝子発現活性化の仕組みは、リボソームの会合による翻訳開始がオスモライトによって促進されたことに由来すると予想したが、その確証を得るためには様々な検証実験が必要となるだろう。

以上のように、希釈の小さい細胞質による分子クラウディング効果と、オスモライト化合物による分子クラウディング効果が生理活性に与える影響に着目した実験を行ってきた。前者では、生細胞の細胞質が持つ分子クラウディング環境に限りなく近い溶液系を構築できたものの、人工細胞全体の生理活性を高めることはできなかった。一方で、後者の、遺伝子発現反応に特化した無細胞タンパク質合成系にオスモライトの分子クラウディング効果を与えた実験では、オスモライトが遺伝子発現を活性化させることがわかった。濃密な細胞質環境を人工細胞に *in vitro* 再構成することで細胞の機能全てが活性化されるのではなく、個々の細胞内反応を活性化させるためには、それぞれ異なる種類のクラウディング効果が必要なかもしれない。

今後の展望としては、Hybrid cell の生理活性の向上と、オスモライト効果のさらなる調査が挙げられる。その上で、これら二つの技術の組み合わせることで、より優れた活性を持つ人工細胞の構築が期待できる。例えば、Hybrid cell の内部にオスモライト化合物を封入することで、

Hybrid cell の生理機能を向上させる方法や、反対に、PURE システムを封入した人工細胞内にプロトプラストを入れ、破裂させることで、極めて濃縮された細胞質の分子クラウディング効果を PURE システムに与える方法が考えられる。

また、本研究で得られた技術から派生する新たなテクノロジーとして、巨大ゲノム DNA を導入した人工細胞の開発も期待される。近年、ゲノム合成技術は急速に進化しているが、大きなゲノム DNA を生きた細胞内に導入する技術は未だに困難とされている。Hybrid cell は大きな生体分子の導入も比較的容易であるため、他種バクテリアのゲノム DNA、人工合成ゲノム、あるいは *in vitro* 巨大環状 DNA 複製システム¹² を導入することで、人工的にゲノムをデザインした人工生命体を生み出すことも可能だ。これが達成されれば、物質生産に有用なバクテリアを人工的に創り出すことにつながる。本研究の成果は、学術的にも産業的にも大きなインパクトを与えるポテンシャルを持つ技術・知見となる。

付録 1 実験手法

S-1.1 各種生化学実験操作

以下では、本研究で用いられた基礎的な生化学実験の手法について説明する。

S-1.1.1 大腸菌の培養

S-1.1.1.1 培地の調製

(A) LB 培地

Bacto Tryptone	3.0 g
Bacto Yeast Extract	1.5 g
NaCl	3.0 g
MilliQ	300 mL

上記試薬を耐熱ビンに入れ、オートクレーブで滅菌する。

(B) LB プレート

Agarose	3.0 g
Bacto Tryptone	2.0 g
Bacto Yeast Extract	1.0 g
NaCl	2.0 g
MilliQ	200 mL

- 1 上記の試薬をスターラーと共に三角フラスコ（大）に入れ、栓をし、オートクレーブで滅菌する。
- 2 その後、密閉状態のままスターラーで攪拌しながら人肌くらいの温度になるまで冷ます。
- 3 冷めたらクリーンベンチ内で抗生物質を加える（Ampicillin の場合は final 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように加える）。
- 4 スターラーでしばらく攪拌し、完全に冷め切る前におよそ 20 mL ずつ静かにシャーレへ注ぐ。
- 5 室温で静置。固まったら 4 $^{\circ}\text{C}$ で保存。

S-1.1.1.2 培養（プレカルチャー）

- 1 滅菌された試験管に LB 培地を 1.5 mL 注ぎ、大腸菌の抗生物質耐性マーカーに該当する抗生物質を加える。
- 2 プレートに生えているコロニーをつまようじやマイクロピペッターのチップでつつき、そのまま試験管内に入れる。
- 3 試験管を 37 $^{\circ}\text{C}$ のシェイカーで 10 時間以上培養させる。

S-1.1.2 プラスミド抽出（アルカリ融解法）

大腸菌からプラスミドを抽出する操作を、アルカリ融解法、アルカリ Prep、ミニ Prep などと呼ぶ。プラスミドは、染色体とは独立に自己複製を行う核外遺伝子であり、多くは環状 DNA である。このプラスミドを切断したり修飾したりすることで遺伝子操作が行われる。今日では、容易にプラスミドを抽出できる様々なキットが市販されており、当研究室でも多くの場合キットを用いたプラスミド抽出を行っている。以下では、原理の確認の意味も含めて、従来のアルカリ融解法の操作方法を説明する。

原理は、大腸菌を強アルカリと界面活性剤（SDS）によって破壊し、その後 pH を中性に戻すことでプラスミドを会合させる。遠心分離によってプラスミドは上清で回収されるので、そこからフェノール/クロロホルム抽出によってプラスミドを精製する。

1 試薬調製・準備

Solution I : D-グルコース 50 mM、Tris-HCl (pH 8.0) 25 mM、EDTA 10 mM となるように milliQ に溶かしオートクレーブで滅菌。4°C で保存。

Solution II : NaOH 水溶液 0.2 N、SDS 1%

（ただし Solution II は要時調製なので NaOH と SDS はそれぞれ 2 倍の濃度で作っておき、使う直前に 1:1 で混ぜるようにする。）

Solution III : 酢酸カリウム 3 M、酢酸 2 M となるように milliQ に溶かしオートクレーブで滅菌。

Sol. I と Sol. III は使用直前まで氷上で冷やしておく。

- 2 目的のプラスミドを含む大腸菌の培養液を用意し、1 mL を 15000 rpm, 4 °C, 1 min で遠心分離する。
- 3 上清を捨て（培地を完全に取り除く）、Sol. I を 100 µL 加えてピペティングで懸濁させる。
- 4 Sol. II を 200 µL そっと加えて、ゆっくりと転倒攪拌し、5 min 氷上で冷やす。
- 5 Sol. III を 150 µL そっと加えて、ゆっくりと転倒攪拌し、5 min 氷上で冷やす。
- 6 遠心機で 15000 rpm, 20 °C, 5min 遠心する。白色沈殿を取らないように注意しながら上清を別のチューブへ移す。
- 7 500 µL のフェノール / クロロホルムを加え、ボルテックスでしっかりと混合させる。
- 8 5min 室温で静置後、遠心機で 15000 rpm, 20 °C, 5 min 遠心する。下層に触れないようにマイクロピペッターで上層を吸い取り、別のチューブへ移す（下層はクロロホルム廃液へ捨てる）。
- 9 当量の 2-プロパノールを加え、ボルテックスでしっかりと混合させ、10 min 以上室温で静置する。
- 10 遠心機で 15000 rpm, 20 °C, 5 min 遠心する。沈殿を吸い取らないように注意しながら上澄みを捨てる。
- 11 沈殿を 70%エタノール 500 µL で 2 回ほど洗浄し、エタノールを完全に抜くために、真空遠心機で 10 min 遠心する。
- 12 RNase 50 µg/mL を含む TE buffer (milliQ でもよい) 50 µL を沈殿に加えて懸濁させる。得られた溶液が遺伝子溶液となる。

S-1.1.3 制限酵素処理とアガロース電気泳動

制限酵素は二本鎖 DNA の 3 ~ 8 塩基配列からなる特異的配列（サイト）を認識して、二本鎖 DNA を切断する酵素である。この酵素は DNA を切ったり貼ったりする遺伝子工学において必要不可欠なものとなっている。以下では、制限酵素を用いて実際に DNA 鎖の一部分を切り出す方法について述べた。2 種類の制限酵素と相性の良い buffer を選択して酵素処理すると、それぞれに対応するサイトに挟まれた領域が切断される。切断された DNA 断片はアガロースゲルを用いた電気泳動によって確認する。

- 1 以下の組成で試薬をエッペンチューブで混合する。制限酵素は高温で死んでしまうので、使用直前に冷凍庫から取り出し、氷の中に入れて移動させること。また組成はプラスミド濃度によって調整するとよい。

DNA 溶液（プラスミド）	8 μ L
制限酵素 A	1 μ L
制限酵素 B	1 μ L
10 \times buffer	2 μ L
MilliQ	8 μ L

- 2 37 $^{\circ}$ C で 30 min インキュベートさせる。その後 10 \times Loading buffer 2 μ L 加える。
- 3 遺伝子のカットチェックにはアガロースゲルによる電気泳動を利用する。
確認したい遺伝子断片の長さによってゲルの濃度は決定する。一般的に、100 ~ 2000 bp の断片は 2%アガロースゲルを、それ以上は 0.8%アガロースゲルを用いる。
 - i プラスチックビーカーに以下の試薬を混合させる。

	2.0%	0.8%
アガロース	0.44 g	0.16 g
1 \times TAE	20 mL	20 mL

※ 50 \times TAE

Tris	242 g
EDTA \cdot 2Na	18.6 g
酢酸	57.1 mL
MilliQ	1 L にメスアップ

ビーカーの口をラップで軽く閉じ、電子レンジで加熱する。

- ii 沸騰したら取りだし、スターラーを入れて攪拌する。およそ人肌の温度まで冷めたら、攪拌しながら SYBR Safe 2 μ L を加えて染色させる。
- iii 溶液が完全に冷める前にゲルの型に（プラスチックケースを置いた状態で）流し込

む。アルミホイルで遮光しながら室温で放置し固まるのを待つ。

- 4 ゲルが完成したらコームをゆっくりと抜き、泳動層にプラスチックケースごと移す。
- 5 制限酵素処理した遺伝子溶液と泳動用の遺伝子マーカーをそれぞれレーンに流し、スイッチをオンにして泳動を開始する。
- 6 泳動端がゲルの端まで達したら、スイッチを切り、ゲルを取り出す。蛍光ライトとフィルターを用いて撮影する。もしバンドの色が薄ければ、SYBR Safe 入り TAE で染め直しすると良い。

S-1.1.4 形質転換 (Transformation)

目的 DNA 断片を大腸菌に導入する操作。実験目的に応じて適した大腸菌株を選択する必要がある。

- 1 Chemical Competent Cell 110 μL を室温で融かす。
 - 2 プラスミド溶液およそ 10 μL を Competent Cell にゆっくり加え（ピペティングしない）、氷で 30 min 冷却する。
 - 3 42 $^{\circ}\text{C}$ のブロックインキュベータで 1 min 加熱する。その後すぐに氷に戻し 2 ~ 3 min 冷却させ、SOC 培地または LB 培地を 800 μL 加える。
 - 4 37 $^{\circ}\text{C}$ のシェイカーで 1 時間以上インキュベートする（Ampicillin 耐性の場合この操作は省いてよい）。
 - 5 このままだと溶液が多すぎるので、遠心機で 15000 rpm, 1 min 遠心し、上清 700 μL を捨てる。残った溶液をピペティングで懸濁させる。
 - 6 溶液をプレートに撒き、コンラージュ棒でよくならす。
 - 7 37 $^{\circ}\text{C}$ で over night 培養。
- ※ 生えたコロニーの数が多すぎる場合は適宜溶液を希釈してから撒くとよい。

S-1.1.5 In-Fusion Cloning

In-fusion Cloning 法は、Clontech 社によって開発されたクローニング方法で、制限酵素切断や平滑末端処理、リガーゼ反応などを行うことなく、1 ステップの反応で PCR 断片を任意のベクターにクローニングできる。つなぎ合わせたい各 DNA 断片の末端 15 塩基が相同であれば、In-Fusion 酵素がそれらの DNA 断片を融合することができる。したがって、適切なプライマー設計を行えば、制限酵素サイトがなくても、任意の位置でクローニングすることが可能である。

S-1.1.5.1 概要・プライマー設計の方法

In-Fusion におけるクローニングは、DNA 断片の末端 15 塩基の相同配列組み替えによって行われる。使用する任意のベクターの末端配列を利用できるため、あらゆるベクターが使用可能で、余分な配列が一切付加されない点で優れている。まず、プライマーを設計し、それを用いて PCR でインサート用 DNA 断片とベクター用 DNA 断片を増幅させる。そして酵素とともに混合させることで変異プラスミドが完成し、それを形質転換させて目的変異大腸菌を得る。注意点と

して、長過ぎるベクター鎖を PCR で増幅させると、意図しない変異がエラーとして入ってしまう可能性があるため、全長プラスミドを制限酵素で切ることによってベクター鎖を作製する方がより適切な方法とされている。

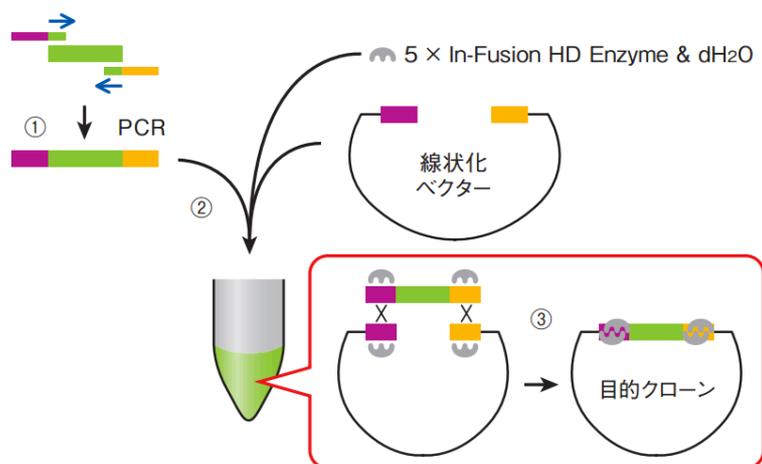


図 S 1-1 In-Fusion Cloning 操作の概要

タカラバイオホームページより引用。

S-1.1.5.2 DNA 断片の PCR 増幅

- 1 プライマーの DNA 溶液 10 μ M に、テンプレートとして用いるプラスミド溶液を約 1~2 ng/ μ L に希釈する。それぞれの溶液と PCR 用酵素を以下の組成で混合し、反応液とする。

	final	
PrimeSTAR [®] Max	1 \times	25 μ L
プライマー Fw	0.2~0.3 μ M	1 μ L
プライマー Re	0.2~0.3 μ M	1 μ L
テンプレプラスミド	約 1 ng	1~2 μ L
milliQ		21~22 μ L
Total		50 μ L

- 2 PCR サイクルを設定し、PCR サーマルサイクラーで反応を開始させる。PrimeSTAR[®] Max の場合、伸長反応は 1kbp あたり 5 sec で設定する。

98 $^{\circ}$ C	10 sec	(熱変性ステップ)
55 $^{\circ}$ C	5 sec	(アニールステップ)
72 $^{\circ}$ C	5 sec /1 kbp	(伸長反応ステップ)
×30 cycles		

- 3 PCR 産物が正しく増幅されたかどうかをアガロース電気泳動で確認する。DNA 断片が正しい長さで増幅されていること、そして泳動結果がバンド 1 本のみ (シング

ルバンド) か、それとも目的バンドの他に副生成バンドが存在するのかどうかを確認する。シングルバンドの場合、PCR 産物である溶液をそのままインサートの DNA 溶液として用いることができ、副生成物があればゲルを切り出して生成する必要がある。

4 (シングルバンドである場合)

Cloning Enhancer 処理によって DNA 精製を行う。以下の組成で反応液とし、37°C で 15min→80°C で 15min インキュベートさせる。これによって酵素を機能させた後、高温で失活させることができる。

PCR 反応液	5 μ L
Cloning Enhancer	2 μ L
Total	7 μ L

5 (副生成物が見られた場合)

目的バンドのみを切り出し、スピнкаラム精製を行う。

6 以上の方法でインサートとベクターの溶液をそれぞれ準備する。

S-1.1.5.3 Cloning 反応・形質転換

1 以下の組成で溶液を混合させ、反応液とする。

5xIn-Fusion HD Enzyme Premix	2 μ L
ベクター	2 μ L
インサート	4~6 μ L
milliQ	0~2 μ L
Total	10 μ L

2 50°C で 15min インキュベートさせて反応を開始させる。

3 反応させた溶液を JM109 などのコンピテントセルへ形質転換する。

4 プレートにストリークし、一晚培養。生えてきたコロニーからプラスミドを回収するか、コロニーPCR によって、目的 DNA が増えているか確認する。

S-1.1.6 DNA 塩基配列の解読

現在、当研究室では、作製した DNA の配列解読は外注サービスによって行っているが、以前は当研究室所有の全自動シーケンサーを用いて行っていた。以下では、その方法を説明する。

S-1.1.6.1 ステップ1：目的 DNA の PCR 増幅

- 1 解読したい DNA の配列を含む領域を PCR で増幅させる。DNA 配列表を見ながら読みたい領域がカバーされるようにプライマーを設計する。1 プライマーの長さは約 20 bp にし、1 プライマーで約 500 bp の配列を読めるが、プライマーの直後の 100 bp ほど

は不安定なデータとなるので、読みたい領域の 100 bp ほど前の地点にプライマーを設計する。読みたい配列が長ければ 500 bp ごとに複数のプライマーを設計すると良い。

- 2 以下、BigDye Terminator を用いた方法で行った。外注したプライマーを 10 μ M に希釈する。テンプレートとなるプラスミドは約 200 ng/ μ L 前後が良い。
- 3 以下の組成で反応液を調製し、PCR を走らせる。

BigDye®	1.0 μ L
5×buffer	1.5 μ L
テンプレプラスミド	2.0 μ L
プライマー (10 μ M)	1.6 μ L
MilliQ	3.9 μ L
Total	10 μ L

PCR 条件		
98 °C	10 sec	(熱変性ステップ)
55 °C	5 sec	(アニールステップ)
60 °C	4 min	(伸長反応ステップ)
×25 cycles		

S-1.1.6.2 ステップ 2：シーケンス反応

- 1 PCR 生成物を取り出し、それぞれのチューブに SAM Solution 22.5 μ L と Termination 5 μ L を加える。後者はビーズ溶液なので、使う直前にボルテックスで懸濁させ、測り取るときは専用の広口チップを用いる。
- 2 パラフィルムでチューブの口をしっかりと閉じた後、ボルテックスで 20 min 混合する。
- 3 その後卓上遠心機で 1 min ほど遠心し、上清 20 μ L を新しい 0.5 mL エッペンチューブに移す。チューブのふたを切り取り、専用のゴムキャップを装着する。
- 4 シークエンサーの扉を開け、チューブホルダーをシーケンサーにセットする。正しく設置されたことを確認し、扉を閉じる。
- 5 パソコンで測定設定を入力する。“310 Data Collection Software” を起動し、“file” > “new” > “sample sheet 48”と選択し、各チューブのサンプル名を記入し、ファイルを保存する。
- 6 同様に“file” > “new”から先程記入した Data sheet を選択する。Condition を入力する。変更箇所は次の通り。Inj sec : 5 sec, Inj kV : 2.0 kV, Runtime : 23 sec
- 7 Run を押す。
- 8 正しく配列が解読されれば、電気泳動の波形とそこから配列のテキストデータが出力される。

S-1.1.7 タンパク質精製

本研究では、蛍光タンパク質 tdTomato や Venus の精製時に用いられた。精製するタンパク質の種類によって、その方法は大きく異なる。以下では、単純な蛍光タンパク質の精製方法について説明する。

- 1 目的タンパク質がコードされたプラスミドを JM109 DE3 (T7 プロモーターの下流のタンパク質を IPTG 誘導によって発現してくれる) に形質転換させ、LB 培地+所定の抗生物質プレートに植菌する。37 °Cで一晩培養する。
- 2 コロニーを 2、3 個ピックアップし、50 mL の LB 培地+抗生物質に入れ 37 °Cで本培養する。
- 3 IPTG 添加による発現誘導を行う。培養時の OD (600 nm)が 0.6 ~ 0.8 付近にまで増殖したら IPTG を加える。その後 4 時間程培養させてから集菌する。なお、適切な OD、IPTG 濃度、IPTG 添加後の培養時間は発現させたいタンパク質や菌の種類によって異なるため、その都度条件検討による最適化が必要である。
- 4 遠心分離 (7000G、10 min、4 °C) で集菌する。正しく蛍光タンパク質が発現していれば、この時点で色の付いたペレットが得られる。
- 5 上清を捨てた後、リン酸 buffer① (0.1 M KPi buffer (pH = 8.0)、0.2 M NaCl、10 mM Imidazole) 40 mL で懸濁し、プロテアーゼインヒビター半錠を加えてソニケーターで細胞破碎する。条件は、「出力 50、on : off = 1 sec : 4 sec、total 1.5 min (on)」。
- 6 遠心分離 (10000 rpm、60 min、4 °C) して上清を回収する。
- 7 Ni-NTA カラム (8 mL) を用意する。予めリン酸 buffer①で平衡化しておく。
- 8 上清をカラムにアプライし、リン酸 buffer①を 40 mL × 3 回加えることでカラムを洗浄する。
- 9 溶出用リン酸 buffer② (0.1 M KPi buffer (pH = 8.0)、0.2 M NaCl、200 mM Imidazole) を用意し、5 mL × 6 回カラムに加える。これによってカラムに吸着した蛍光タンパク質が溶出されるので、異なるチューブに回収する。
- 10 回収されたフラクションの内、蛍光タンパク質の色が最も濃く付いているものを選択し、Amicon (QUEEN の場合 10 K) を用いて 1 mL まで濃縮する。
- 11 高速液体クロマトグラフィーで精製する。カラムは superdex 200 を使用し、予め HPLC 用 buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、1 mM EDTA) で平衡化しておく。
- 12 最も濃く蛍光シグナルが得られたフラクションを回収し、分注後-80 °Cで冷凍保存する。

S-1.2 微細加工デバイスの作製

S-1.2.1 微細加工用フォトマスクの作成

本実験で用いられた ALBiC デバイスは、フォトリソグラフィーを活用した微細加工技術で作られている (図 S 1-2)。光感光性フォトレジストを UV 照射することで、目的の形状のみを硬化させる技術がベースであるため、目的のパターンのみを照射するためのフォトマスクが必須である (図 S 1-3)。

フォトマスクを作るためには専用の装置が必要である。現在、当研究室ではマスク描画装置を所持しているため、それを用いてマスクの生産が行われている。しかし、以前は武田先端知ビルのスーパークリーンルーム内にある共用の電子線描画装置を用いてフォトマスクを作製していた。以下では、その方法を説明する。

S-1.2.1.1 画像ファイルの作成とファイル転換・転送

まずは、フォトマスクの形状を CAD ファイルで作成する。研究室のパソコン (共通機器室) で作成したファイルを、武田先端知ビルのサーバーへ転送する。

- 1 CAD ファイルで描画パターンを作成する。研究室のパソコンを用いる場合は、ソフト Layout Editor で作成する。右から二番目のアイコンを選択し、セル配列で各レイヤーの図を描く。左から二番目のアイコンで円を描ける。
- 2 名前を付けて保存する。拡張子は.GDS にする (デフォルトのレイヤーは 1 番)。

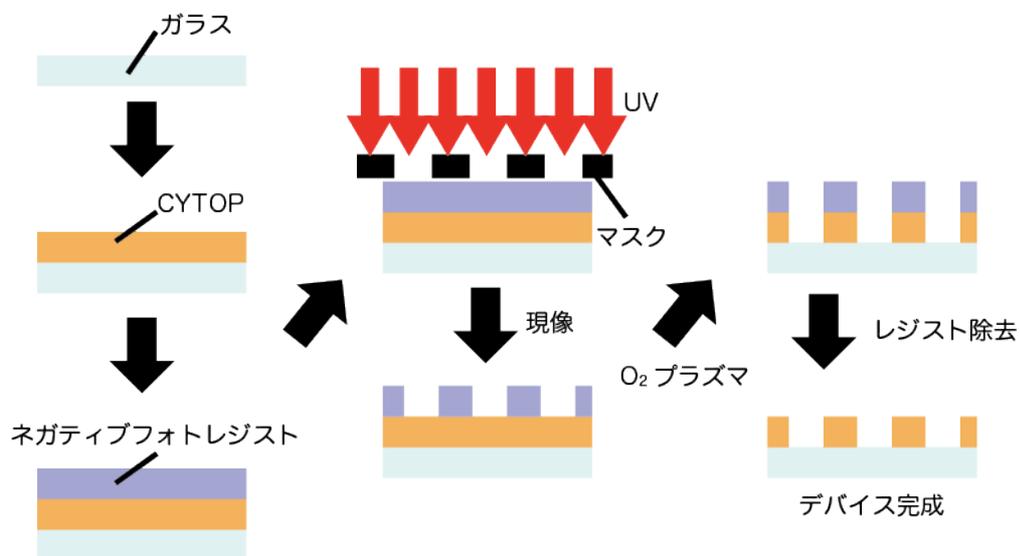


図 S 1-2 フォトリソグラフィーを用いた微細加工

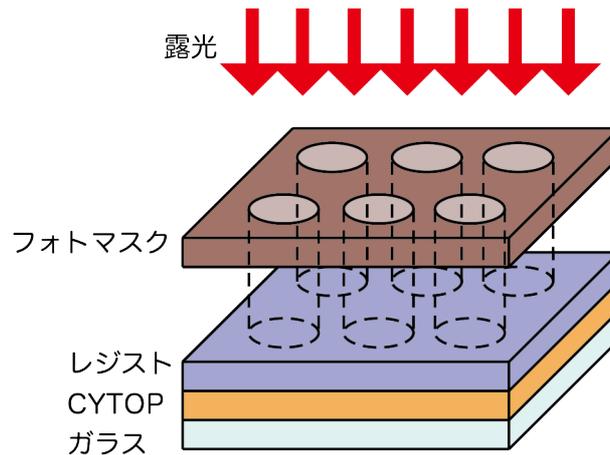


図 S 1-3 フォトマスクの役割

- 3 CAD ファイルで描画パターンを作成する。研究室のパソコンを用いる場合は、ソフト Layout Editor で作成する。右から二番目のアイコンを選択し、セル配列で各レイヤーの図を描く。左から二番目のアイコンで円を描ける。
- 4 名前を付けて保存する。拡張子は.GDS にする（デフォルトのレイヤーは 1 番）。
- 5 ファイルを武田先端知ビルに内のサーバーへ転送する準備をする。まず『WinSCP』を起動する。野地研究室用のサーバー-qd03004~をダブルクリックする。開いたファイルに保存したファイルをドラッグすることで転送が行われる。
- 6 続いてファイルの変換作業を行う。
Xming 起動、Putty 起動、userll 選択して open。login name 「QD03004」 入れて、パスワードを入れる。
「Source .bexelwin」 (スペースを含める)、Enter
「bexelwin &」、Enter
これで bexelwin が起動する。
- 7 トップをクリックして、左下アイコン「Hierarchical Schematic」
Edit でさっき決めたレイヤー名を選択する（白黒反転を行う場合は二枚を〇〇+〇〇
というように入力する）。
（白黒反転させる場合は※参照）
DATA OUTPUT、TOPSTRUCTURE
FILE SAVE
INPUT GDS FILE で作成した GDS ファイルを入力
EXPORT GDS FILE で先程のファイル名に「〇〇〇_」または「〇〇〇_in（白黒反転
させた場合）」と入力する。
FILE SAVE
戻って OK ボタン、OK、NORMAL END
- 8 GDS TO BEF > FILE SELECT で gds to bef.lc > file edit > file name of

management でファイル名と拡張子決める。武田のクリーンルームでサーバーを操作した時に、どのファイルかがわかるようにする。野地研では、ファイル名に目的であるパターンの概要、拡張子に作成者の名前を入れることが多い。

FILE SAVE

戻って、INPUT GDS FILE で「○○○_gds」選択。

OUTPUT BEFE FILE で「○○○_bef」と入力。

OK で実行。

- 9 DECOMPOSITION > file select で decomposition.ac 選択

OUTPUT で「○○○_dec.bef」と入力。

- 10 bexelwin のトップ画面に戻り、右下を選択。

file open kind bef から、先程のファイルを選択する。その後、OK、OK、OK。

set 塗りつぶし選択して、UP で拡大し、作成した形状が表れているかどうか確認する。

確認できたら bexelwin を閉じる。

- 11 WinSCP を開き、yamauchi@eb3 選ぶ。ここに先程の bef ファイルをコピーすれば完了である。

S-1.2.1.2 武田先端知ビルクリーンルームの概要

本項は、東京大学武田先端知ビルスーパークリーンルーム利用マニュアルを参考にして記述した。

クリーンルームは武田先端知ビルの地下 1 ~ 3 階に設置されている。ここでは我々のようなフォトマスクの作成用途以外にも、半導体デバイス作製時に使用されている（そちらの用途の方が圧倒的に多い）。クリーンルーム内では空気中における浮遊微粒子・浮遊微生物が限定された清浄度レベル以下に管理され、またその空間に供給される材料、薬品、水などについても要求される清浄度が保持され、必要に応じて温度・湿度などの条件についても管理が行われている。デバイス作製時には、あるサイズ以上の粒子が空間中に存在しては困るため、このようなクリーンルーム内で作業が行われる。武田クリーンルームは 3 つの部屋に分かれており、それぞれクラス 1、クラス 100、クラス 1000 のクリーンルームとなっている。クラス 1 は 0.5 μm 以上の粒子が 1 立方フィート内の空気内に 1 個以下しか存在しえないことを意味し、クラス 100 では 100 個、クラス 1000 では 1000 個以下である（アメリカの FED-209D 規格による）。このようにクリーンルーム内は厳しい清浄度が保たれているため、使用者全員が「排除すべき粒子を持ち込ませない、内部で発生させない万が一発生したら排除する」というルールを守らなければならない。

このクリーンルームを使用するためには、毎年行われる入室講習会を受け、登録した者でなければ使用できない。また、その中の EB 装置を使用するためには、使用経験者と共に 3 回以上使用することでその利用方法を学んでから、使用ライセンスを申請しなければならない。

入室時にはさらに以下の手順を踏まなければならない。

- 1 武田クリーンルーム前に来たら、名札、あるいは名簿に記名後、学生証をカードリーダーに読み込ませて入室する。入室する全員が必ずカードリーダーで読み込ませる必要が

- ある。なお、部屋を出る際も、全員が必ずカードリーダーを使用する必要がある。
- 2 更衣室でクリーンスーツに着替える。
最初に手を洗い、乾燥させたら、ラテックス手袋を着用し、備え付けの使い捨てマスクを着用する。
 - 3 クリーンスーツは、帽子・コート・靴から構成される。それぞれにバーコードが付いており、それによって着用回数が管理されている。10 回以上使用するとクリーニングに出さなければならない。クリーンスーツを取り出したら、着る前にバーコード読み取りを行う。これによって、スーツ着用回数が管理されている。もし 10 回以下であれば、そのまま着用可能。10 回目であれば、使用後に控室の回収ボックスに入れる。もし今回が 11 回である場合は、すぐに回収ボックスに入れ、控室にある新品を取り出す。
 - 4 バーコード登録が終わったら、クリーンスーツを帽子、コート、靴の順に着用する。地面に落とさないように着る。肌や衣服が外に出ないように着用する。
 - 5 着替えたら再び手袋ごと手を洗い、表面のビーズを落とす。持ち込む必要があるものについては、イソプロピルアルコールでしっかり拭いておく。
 - 6 クリーンルームに入室する。クリーンルーム手前にエアシャワー用個室があるため、体についた埃を十分落としてから入室する。

S-1.2.1.3 EB 装置によるマスクへの電子線描画作業

- 1 EB 装置が一番奥のクリーンルームにある。
まずは装置の脇にあるサーバーパソコンで、予め転送しておいた CAD ファイルを、さらに EB 装置に転送する。
デスクトップにコマンドを入力していく。
Enter > yamauchi > pass ○○○○ > startx
- 2 xterm の画面から、
ftp w、enter (w のサーバーを参照している)
eng、enter
eng、enter
cd NOJI_LAB、enter (チェンジディレクトリ)
put ファイル名.bef、enter (転送)
quit、enter
exit、enter
exit、enter
- 3 続いて、描画するフォトマスクを準備する。
EB 装置付近に、既に準備されている共通マスクが置いてある。ガラスの片面にクロムが塗布してあり、さらにその上にレジスト ZDMAC が塗ってある。ここから一枚とって、サーバー脇の作業台に置く。なお、ここでの作業ではラテックス手袋の上からさらにサニメント手袋を着用すること。
- 4 台の下の引き出しから、0.725 のウェハーを取り出し、そこにマスクを固定させる。電子線を描画すると、表面は金属のクロムであるため、帯電が起こる。その電荷を外に逃

- がすために、ウェハに設置されている針をアースとしてクロム面に乗せる。失くしやすいので注意。ねじで周囲をしっかりと固定したら、EB 装置後側の扉を開いて（カセット交換要求ボタン）ウェハごと中に入れる。ドアを閉めて再びボタンを押して完了。
- 5 次に、描画装置のコンピューターから操作する。
複数のウィンドウの中から、下のウィンドウで VDEC、enter と入力し、使用するウェハを入力する。基本的に 2 番を入力する。
 - 6 util 画面から「DATA の BEF」を選択し、root > VDEC > Noji_lab > ファイル > 読み込み > *の前に/NOJI_LAB/と入力して enter
先程転送したファイルがあるはずなので、一つずつ選択し、確定する。この作業には時間がかかる可能性があるため、その待ち時間にウェハをセットしてもよい。
 - 7 WEC の作成をする。
以前に作成された WEC データが残っているはずなので、どれかを開いた後、別名保存することで、前回の設定を呼び出すことができる。
ウェハのタブを選択して、エリアピッチを設定する（座標の最少単位）。
 - 8 BEF の中心座標を決める。ここでは A, B, …のグループ内に一つ一つの BEF を割り当て、その後座標上に A や B をプロットすることで、その点を目的の BEF の中心座標として設定できる。また、異なる 2 つの BEF ファイルを重ねて設定することも可能である。その際は、BEF の追加を選択することでグループ内の項目を増やすことができる。ただし、二つのファイル内の図形が重なってしまうとエラーとなり、描画途中で装置が止まってしまうので、CAD ファイルを作る時点で慎重に設計すべきである。
 - 9 正確に描画するために、描画前にマスクのフォーカス合わせが行われる。フォーカスのタブを選び、座標中でフォーカス合わせを行うたい場所を指定し、選択していく。目安としては、各 BEF の中心とその周り 4~5 くらいを指定すれば十分である。
全て完了したら、保存する。
 - 10 バッチを作成する。root の中にすでに noji lab バッチファイルがあるので、そのタイトルをダブルクリックする。先程作成した WEC ファイルを選択する。その後、バッチ番号の選択を指示されるので、適当な番号を決めて選択する。
 - 11 露光データを選び、決めたバッチ番号を入力する。準備ができたのであれば露光開始ボタンを選択する。少し待つと再び確認を求められるので、OK を押す。
 - 12 露光が開始されると、およその終了時刻が確認できる。ファイルの容量が重い場合や、描画領域が広すぎる場合は、かなり時間がかかるので、注意する。
 - 13 画面に現在の進行状況が表示されるので、時折チェックすること。
 - 14 描画が終了すると、画面に表示が出る。その後扉を開け、ウェハを取り出す。丁寧にウェハからマスクを取り外し、ウェハは引き出しに戻す（アースの針を落とさないように注意すること）。

S-1.2.1.4 フォトマスクの現像作業

1 「現像」

EVG 装置で現像を行う。まず壁のブレーカー二ヶ所を ON にし、装置裏のチラーとポンプを ON、装置左隣のチラーを ON、装置右下の N₂ ボンベを開け、装置下の扉を空け

- て中のツマミスイッチを ON、左の押しスイッチを ON で起動できる。
- 2 画面の EVG をクリック。vdec user でログイン。パスは 123456。
 - 3 ファイル > open > vdec、Job > start > recipe で、127×127 ZEP7000 standard が選択されていることを確認する。
 - 4 開始すると扉を開けるよう指示が出るので、扉を開け、中央の台にマスクをはめる。扉を閉めてスタートさせる。
 - 5 終了したら扉を開けて、マスクを取り出す。その後全ての画面を閉じ、画面下の方を適当にタッチすることで shutdown が選択できるようになる。シャットダウンさせたら、起動時とは逆にスイッチを切ること、装置を完全に落とす。
(Tank の項目を選んで、装置内の試薬量の残りをチェックしておくこと)
 - 6 「アッシング」
クラス 1000 クリーンルームで次のアッシング作業を行う。赤いバルブ (給水・排水) を同時に開け、真ん中の O₂バルブを開ける。本体の裏のスイッチ、表のスイッチを ON にする。
 - 7 ON にすると、真空ポンプが動いて、反応室内が真空に引かれていくので、適当に進んだところで Reset ボタンを押して止める。
 - 8 ブザーがなったら蓋を開けて真ん中にマスクをセットする。下の操作パネルで秒数を 8 秒にセット。GV2 のランプが店頭しているのを確認したら start
 - 9 終わったらマスクを取り出し、再び閉める。反応室内がある程度真空の状態装置を OFF にしたいので、start を押し、気圧のメモリが 10Pa 程度になったら強制的に表のスイッチを OFF にする。その後、起動時と逆順にスイッチを切り、バルブを閉める。
 - 10 「エッチング」
ブレーカー・PURE N₂バルブ・CDA バルブ・純粋バルブを全て ON にする。表のメインスイッチを ON にし、システムスイッチを ON にする。勝手に扉が開くので、すぐ start を押し、中の乾燥を始めさせる。
 - 11 Program map を選択して Enter、22 を選択。パスは 123456。
 - 12 Enter を何回か押し、Step5 が 65 sec になっていることを確認したら、再び Enter を押していき、recipe completed まで進める。最後に Ins を押す。
 - 13 Run program を 22 番にして Enter。扉が開いたらマスクを中の台にしっかり固定し、start。
 - 14 終わったらマスクを取り出し、再び start を押すことで内部のリンスが行われる。
 - 15 リンスが終わったら skip を押し、すぐに start を押すことで扉がしまり乾燥が始まる。終わったら表のスイッチニヶ所を切って、バルブを閉め、ブレーカーを OFF にする。
 - 16 「レジスト落とし」
最後に、マスク表面に残ったレジストを落とす。
クラス 1 のルームに戻り、ドラフトの明かり・ファンをつけ、ヒーターを 80 °C にセットしておく。
 - 17 別室から ZDMAC 用と書かれたアルミバットを 4 つ持ってくる。ZDMAC と IPA について試薬使用前登録しておく。その後 1 つめのバットに ZDMAC、残り 3 つに IPA を、

マスクがひたひたになるくらいの高さまで注ぐ。ZDMAC のバットをヒーター上で温めておく。

- 18 マスクを ZDMAC に浸し、80 °C 10 分間加熱させる。その間に試薬の使用後登録をする。
- 19 その後マスクを取り出し、IPA バットに浸し軽く震盪させて wash する。これを 3 回行う。
- 20 バットから取り出してエアダスターで乾燥させればマスクは完成。バット内の溶液を廃液に捨て、バットを水でよく洗ってから元の乾燥棚に戻し、乾燥器を 6 くらいにセットしておく。ドラフト等を OFF にする。
- 21 最後に、今日使用した EB 装置・ドラフト・現像エッチングアッシングに関して、クラス 1 の近くの扉脇にある ipod touch を使って登録する。
- 22 なお、作製されたマスクのサイズは大きすぎてマスクアライメント装置に設置できないので、ダイサーを用いて四つに切断する。

S-1.2.2 マイクロ膜チャンバー「ALBiC」の作製

ALBiC の作製はイエロークリーンルーム内で行う。ガラス上に疎水性のフッ素性樹脂 CYTOP (Asahi-Glass, Tokyo, Japan) を塗布し、そこに無数の微小な穴を空ける (図 S 1-2)。CYTOP コーティング時の条件などによって、デバイスの厚みや穴の直径を変えられる。本実験では、厚さ 2 μm 、直径 4 μm のデバイスと、厚さ 3 μm 、直径 4.5 μm のデバイスを用いており、以下では、厚さ 2 μm 、直径 4 μm の ALBiC デバイスを作製する手順について説明する。

- 1 24 mm \times 32 mm のガラスを一晩 10 N KOH に浸けておく。
- 2 ガラスをガラス立てごと KOH から取り出し、イオン交換水で 10 回洗浄して表面の KOH をしっかりと落とす。洗浄後、エアダスターを使ってよく乾かす。
- 3 ガラスに 0.05% エポキシシランをコーティングする。エポキシシランはエタノールで希釈する。スピンのコーターに接続されている真空ポンプの電源をオンにし、ガラスをセット、エポキシシラン 70 μL をガラス上に静かに乗せる。回転速度 3000 rpm、時間 15 秒でスタートする。
- 4 コーティングしたガラスをヒーターで 100 °C 10 分間加熱する。
- 5 CTL-816AP (Asahi-Glass, Tokyo, Japan) を CYTOP 希釈液で 9/16 に希釈する。粘度が高い液体を扱うため、専用のマイクロピペッターを用いる。
- 6 エアダスターでガラス表面のゴミを落としてから、希釈した CYTOP 80 μL をガラスに乗せ、500 rpm 10 秒 \rightarrow 1000 rpm 30 秒の速度で回転させる。気泡が入らないように注意する。
- 7 180 °C で 1 時間加熱。スピンのコーターと真空ポンプの電源は切っておく。
- 8 ヒーターを切り、ガラスの表面の温度がおおよそ室温まで下がったら、次の行程に移る。
- 9 ガラスにフォトレジストを塗る。
冷蔵庫内で保存されているレジスト AZP4903 を取り出す。スピンのコーターが加熱してしまうのを防ぐため、回転台座の周りに保冷剤を置く。
ガラスに乗せる量は、溶液を垂らしたときに直径約 8 mm の円ができる程度にする。

- 500 rpm 10 秒 → 7500 rpm 30 秒で回転させる。
- ガラスの淵に残ったレジストを、エタノールで湿らせたベムコットで拭き取る。
- 10 全てのガラスにレジストを塗り終わったら、再びヒーターで 55 °C 3 分間、110 °C 5 分間加熱する。
 - 11 露光作業に移る。
穴の直径が 3 μm、穴間の距離 (interval) が 6 μm のフォトマスクを用いる。マスクにレジストの汚れが付着していると、正しく露光できないので、使用前に予めアセトン溶液に浸けた状態で 10 分間バスソニケーションしておく。フォトマスクをマスクアライナーに装着し、レジストが塗られたガラスサンプルをマスクアライナーに設置し、7 秒間露光する。
 - 12 全てのガラスへ露光が完了したら、ガラス立てに並べて、AZ developer 溶液に浸して 5 分間静置することで、現像する。取り出したガラスをイオン交換水でゆすぎ、一枚一枚乾燥させる。水分が残らないように気をつける。
 - 13 RIE によるプラズマ処理を行う。
RIE につながる窒素ガス G3 と酸素ガスのボンベ元栓を開く (開き過ぎに注意)。
RIE 本体の ON スイッチを押し、液晶画面内の「システム起動」を選択、自動プロセスメニューから「サンプルセット」を選択する。これで反応室内の大気解放が行われる。しばらく待つと大気解放が完了し、OPEN ボタン (二カ所) を押せば扉が開く。
 - 14 乾燥させたガラスを一枚一枚反応室内に置いていく。全て置き終わったら CLOSE ボタン (二カ所、長押し) で扉を閉める。
 - 15 プロセス>レシピ 1 を選択し実行する。条件は O₂ 50 sccm、Pressure 10 Pa、Power 50 W、Time 30 min。反応が完了するまで、30 分間程待機する。
 - 16 終わったらパージボタンを押して大気解放を行い、その後扉を開けてガラスを取り出す。吸盤を使うと回収し易い。
 - 17 RIE のシャットダウン方法は、サンプル取り出し後扉を閉め、プロセス>メニュー>システム終了を選択する。シャットダウン処理が行われるので、しばらく待った後、OFF ボタンを押してシャットダウンする。最後にガスボンベを二つ閉じてシャットダウン完了となる。
 - 18 回収したサンプルをガラス立てに並べ、アセトン溶液に浸してバスソニックを 5 分間行う。同様にイソプロピルアルコール溶液に浸して 5 分間バスソニックする。一連の操作でレジストが除かれる。
 - 19 イオン交換水で数回ゆすぎ、乾燥させれば完成。その後、形状を確認するために、顕微鏡でチャンバーの直径、深さなどを測定する。

S-1.3 大腸菌と ALBiC チャンバーの融合による Hybrid cell の構築

第二章における、Hybrid cell に関する実験手法について説明する。

S-1.3.1 使用した大腸菌の菌株と蛍光タンパク質発現用プラスミド DNA の調製

本実験では、大腸菌株 Top10 と C43 (DE3) を使用した。各大腸菌に蛍光タンパク質を発現させるために、各種クローニング・形質転換を行った。

各種クローニングには、In-Fusion HD kit (Takara Bio, Inc., Shiga, Japan) が用いられた。tdTomato、mseCFP、そして GFPuv の遺伝子は、それぞれ、ptdTomato vector (Takara Bio, Inc.)、永井研究室の mseCFP ベクター¹⁸⁸、そして大腸菌 DH1 $\Delta leuB::(gfpuv5-Km)$ ¹⁸⁹ からクローニングした。カナマイシン耐性遺伝子は、pET-9a ベクター (Novagen, Madison, WI, USA) からクローニングした。各実験で用いられた大腸菌株、蛍光タンパク質の種類、それぞれのタンパク質発現時に利用したプロモーターは以下の表にまとめた。

実験	目的	大腸菌株	蛍光タンパク質の種類	タンパク質発現用のプロモーター
2.2.1項、図 2-7、 図 2-8	融合用プロトプラスト	Top10	tdTomato (赤)	<i>lac</i>
2.2.3項、図 2-11	融合用プロトプラスト	C43 (DE3)	tdTomato (赤)	<i>T7</i>
2.3項、図 2-15、 図 2-17	融合用プロトプラスト	Top10	mseCFP (シアン)	<i>lac</i>
2.4項、図 2-18、 図 2-19	融合用プロトプラスト	Top10	GFPuv (緑)	<i>lac</i>
2.6項、図 2-21	融合用プロトプラスト	Top10	GFPuv (緑)	<i>lac</i>
	チャンバー内への封入	Top10	tdTomato (赤)	<i>lac</i>

大腸菌株の遺伝子型

Top10	F ⁻ <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\phi 80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ <i>recA1</i> <i>araD139</i> $\Delta(ara-leu)7697$ <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i>
C43 (DE3)	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdSB</i> (<i>rB-</i> <i>mB-</i>) <i>gal</i> <i>dcm</i> (DE3)

表 1-1 第 2 章において用いられた大腸菌株とその遺伝子型

S-1.3.2 大腸菌のプロトプラスト化

ALBiC チャンバーに融合させる、プロトプラスト型大腸菌の作り方について説明する。この方法は主に Kuroda らの先行研究を参考にしている¹⁹⁰。

1 プロトプラスト化に必要な以下の溶液を調製する。

(A) GP 培地

	最終濃度	
Trypticase Soy Broth without Dextrose	2.75 %	6.875 g
MgSO ₄	10 mM	0.6162 g
Sucrose	300 mM	25.67 g
KCl	50 mM	0.932 g
MilliQ		250 mL

以上を調製後、オートクレーブ加熱によって滅菌する。Sucrose が完全に溶けてからオートクレーブにかけないと焦げてしまうので注意する。

(B) SP buffer

	最終濃度	
Tris-HCl (pH7.4)	25 mM	
Sucrose	400 mM	13.69 g
MilliQ		100 mL

同様に、調製後にオートクレーブで滅菌処理を行う。

- (注意) 抗生物質 Ampicillin を用いた処理を行うため、Ampicillin 耐性を持つ大腸菌をプロトプラスト化することはできない。本実験では、全てカナマイシン耐性のある大腸菌を用いた。
- 目的の大腸菌を適量の抗生物質を含む LB 培地で前日から前培養しておく。
- 十分に菌が増えたら、そこから 100 μ L を新たな LB 培地 10 mL + 抗生物質に植え継ぎ、37 °C で本培養する。
- 本培養中に、次の操作の準備をしておく。
 - 試験管に SP buffer 3 mL を入れる
 - 三角フラスコ 50 mL (滅菌済み) に GP buffer 15 mL、Kanamycin (50 mg/mL) 15 μ L、Ampicillin (100 mg/mL) 120 μ L、DNase 5.2 μ L を加える。大腸菌内で目的タンパク質を発現させたい場合はさらに IPTG (1M) を 15 μ L 加える。DNase のみ使う直前に入れる。この溶液を「GP 培地 A」とする。
 - 試験管に GP 培地 5 mL、Kanamycin 5 μ L、DNase 1.5 μ L 加える。必要があれば IPTG (1M) を 5 μ L 加える。この溶液を「GP 培地 B」とする。

- ・ 以上の各溶液と、後に使うコーニングチューブ（15 mL × 2 本と 50 mL 2 本）を 30 °C 恒温槽にて温めておく。
 - ・ リゾチーム 300 mg/mL を調製する。粉末を滅菌水で溶かし、その後 0.22 μm フィルターで滅菌する。リゾチームは 4°C で保存するが、一週間ほどで劣化してしまうため、その都度新しく作り直す。
- 6 本培養中の培養液の OD がおよそ 0.6 になったところで集菌作業に入る。OD が 0.6 より少なかったり多かかったりすると、正しくプロトプラスト化されない。試験管内の培養液を、温めておいたコーニングチューブ 15 mL に入れ、遠心機にて 6000 rpm・10 min で遠心する。
 - 7 チューブの底に菌体がペレットとして残るので、上清の培地を捨てる。少しでも培地が残っているとプロトプラスト化が上手く進まないため、しっかり取り除く。
 - 8 温めておいた SP buffer 少量でペレットを懸濁し、再び試験管内に戻す。この 3 mL の溶液にリゾチーム 300 μL（最終濃度 30 mg/mL）を静かに加える。これによって菌体の細胞壁が分解されるため、この後は激しく扱うと菌体が壊れてしまうので注意する。
 - 9 30 °C の恒温槽で 10 min 静置させる。
 - 10 溶液を静かにコーニングチューブ 15 mL に移し、再び遠心機にて 6000 rpm・10 min で遠心する。
 - 11 静かに上清を除き、GP 培地 A から 500 μL とって残ったペレットを懸濁する。ピペティングはせずにチューブをゆらしながら懸濁させる。懸濁後は再び三角フラスコ内の GP 培地 A に戻す。
 - 12 三角フラスコを恒温シェイカーに入れて、30 °C 30 rpm で静かに震盪させる。この過程で徐々に、大腸菌の形は円柱型から球状に変わり、浸透圧によって体積も増えていく。3~4 時間程で形状は完全に球状になる。融合実験時はこのくらいの時間培養させる。さらに長い時間培養させればさらに体積は増える。
 - 13 再び集菌する。コーニングチューブ 50 mL に静かに移し、同条件で遠心する。上清を捨てた後、GP 培地 80 ~ 100 μL で懸濁させる。この量であればかなり濃い濃度のプロトプラスト化大腸菌が得られる。
 - 14 融合実験をする場合はこの溶液をデバイスに注入する。

S-1.3.3 Hybrid cell の作製

S-1.3.3.1 ALBiC チャンバーへの脂質二重膜の再構成方法

- 1 ALBiC デバイスにスペーサーとして両面テープ（オレンジ色）を貼付け、その上からガラス製の蓋を貼付ける。ガラス製の蓋には 2 つずつインレットとアウトレットがついているので、一枚のデバイスから二本の流路を作製できる（図 S 1-4）。

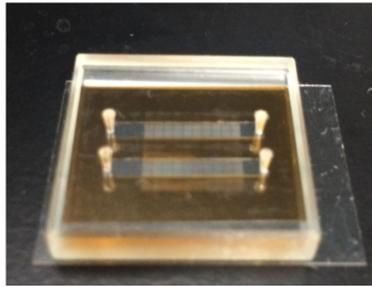


図 S 1-4 ALBiC デバイスにスペーサーとガラス製の蓋を貼り付けた

- 2 水溶液を 10 μL 程をデバイス内に注入する。インレットにマイクロピペッターのチップを差し込み、注入する。気泡が入らないように気をつける。デバイスを 1 分間程冷却すると、チャンバー内に水溶液が入っていき、白いパターンが消える。
- 3 冷えたままでは脂質を流せないなので、室温になるまで放置しておく。
- 4 1 mg/mL の 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) (Avanti Polar Lipids, AL, USA) と、0.2 mg/mL の 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) (Avanti Polar Lipids) をヘキサデカンに溶かして脂質溶媒とし、デバイスのインレットから注入し、既に入っている水溶液を押し出す。出てきた水溶液はろ紙などで吸い取る
- 5 最後に 60 μL の水溶液を静かに注入する。Hybrid cell を作製位する場合は、GP 培地を流す。これによって、チャンバー開口部に脂質二重膜が再構成される。

S-1.3.3.2 大腸菌とマイクロデバイスの融合

- 1 以上の方法で用意されたプロトプラスト型大腸菌と ALBiC デバイスを用いる。
- 2 4.3.2 項で調製したプロトプラスト大腸菌の懸濁液を膜が張ってある状態のデバイスに流す。溶液中の菌体が下に落ちてきて膜と融合するようになるまで約 1 時間 30°C で静置しておく。
- 3 1 時間後にデバイスに GP 培地 B を 100 μL 流すことで、デバイス中を浮いている大量の菌体を洗い流す。この作業によって、融合しなかった余剰の大腸菌をデバイスから洗い流す。
- 4 共焦点顕微鏡を用いて、融合が起きている箇所を探し、目的に応じて、長時間タイムラプス撮影や、立体的な断面図取得のための z-stack 撮影などを行う。

S-1.3.4 共焦点顕微鏡による顕微鏡観察

第2章では、Nikon 共焦点レーザー顕微鏡 A1 を使用して観察・測定を行った。この実験系では、撮影したいチャンバーの上にも余剰な大腸菌が存在する場合があるため、共焦点顕微鏡を用いた撮影が適している。画像の取得は 60 倍対物レンズとフォトマルチプライヤーを用いて行われた。蛍光観察時は、以下の光学系セットアップを用いた。

撮影対象	レーザー	蛍光検出
mseCFP	400 nm	425 – 475 nm
Alexa405	400 nm	425 – 475 nm
Alexa488	488 nm	500 – 550 nm
TopFluor-PS	488 nm	500 – 550 nm
GFPuv	488 nm	500 – 550 nm
SPiDER-β Gal (図 2-14 ~ 図 2-17)	488 nm	500 – 550 nm
SPiDER-β Gal (図 2-18・図 2-19)	488 nm	570 – 620 nm
tdTomato	561 nm	570 – 620 nm

画像の取得や解析は、専用ソフトウェア NIS Elements (Nikon) や画像解析ソフトウェア ImageJ/Fiji (National Institutes of Health, MD, USA) を用いて行った。

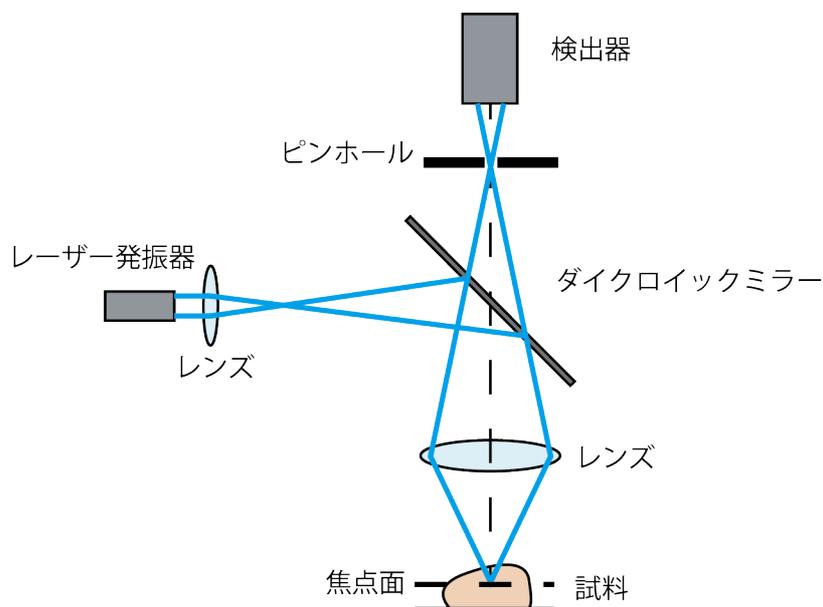


図 S 1-5 共焦点レーザー顕微鏡の仕組み

S-1.3.5 大腸菌の細胞膜の染色と、ALBiC チャンバーへの融合

プロトプラスト型大腸菌の膜を蛍光染色し、それを ALBiC の膜と融合させることで、プロトプラストの膜成分が、Hybrid cell の膜に移植されているかどうか確かめる。

- 1 プロトプラスト型大腸菌の膜を緑色蛍光で染色するため、赤色蛍光タンパク質である tdTomato を発現する大腸菌を用いた。発現量が大きすぎると、緑色蛍光へのクロストークが起きてしまうため、T7 プロモーター下に tdTomato コード領域を設けたプラスミドを作製し、C43 (DE3) 株に形質転換した。この株は *lac* リプレッサーによって発現が制限されており、敢えて IPTG を添加せずに培養することで、蛍光タンパク質の発現を抑えることができる（発現が全く無いわけではない）。
- 2 プロトプラストを作製し、Ampicillin 存在下、30 °C で約 2 時間インキュベートする。
- 3 培地を取り除くために、2300 g で 15 min (30 °C) で遠心する。培地成分が残っていると、膜が染まらないため、しっかり取り除く（チューブを新品に交換するなどして）。生じたペレットを静かに SP2 buffer (SP buffer に 50 mM KCl と 50 mM MgCl₂ を加えた溶液) で懸濁する。ピペティングすると、プロトプラストが壊れてしまうので、静かにチューブを揺らしながら懸濁させる。
- 4 懸濁液を異なるチューブに移し（培地の残留成分を除くため）、再び同様に遠心し、ペレットを SP2 buffer で懸濁する。
- 5 4 番をもう一度繰り返し、完全に培地を除く。最後は 200 μL の SP2 buffer に溶かす。
- 6 蛍光ラベル化脂質分子である、1-palmitoyl-2-(dipyrrometheneboron difluoride)undecanoyl-*sn*-glycero-3-phospho-L-serine (TopFluor-PS、Avanti Polar Lipids) を、クロロホルム溶液に溶かし、ストック溶液とする。必要な量のストック溶液をバイアル瓶に移し、デシケーターで蒸発乾燥させる。フィルム状に乾いた TopFluor-PS が得られるので、DMSO に溶かす。この際、TopFluor-PS の最終濃度が 1 mg/mL になるように量を調整する。
- 7 5 番で作ったプロトプラスト溶液に、DMSO に溶けた TopFluor-PS を最終濃度 0.002 mg/mL となるように加え (1/500 希釈)、30 °C で 1 時間インキュベートする。
- 8 染色後のプロトプラスト溶液を GP 培地で 50 倍に希釈し、脂質二重膜を再構成した ALBiC デバイスに注入する。チャンバー内には 10 μM Alexa405 を含む SP buffer を封入しておく。
- 9 プロトプラスト溶液を希釈したことによって、プロトプラストの個数は少なくなり、融合現象が起こりにくくなっている。したがって、プロトプラスト注入直後から、複数視野をタイムラプス撮影しておくこと、融合の瞬間を撮影できる可能性が高くなる。

S-1.3.6 Hybrid cell の遺伝子発現反応

S-1.3.6.1 mRNA の合成と精製

mRNA の合成は *In vitro* Transcription T7 Kit (Takara Bio, Inc.) を用いた転写反応によって行われた。このキットでは、T7 プロモーターの下流に位置する DNA 配列を mRNA に転写できる。

- 1 キットに付属している試薬を解凍し、以下の順序で混合する。混ぜ合わせる際は、RNase free チップを用いる。

1 : 10x Transcription buffer	2 μ L
4 : ATP solution	2 μ L
5 : GTP solution	2 μ L
6 : CTP solution	2 μ L
7 : UTP solution	2 μ L
3 : RNase Inhibitor	0.5 μ L
2 : T7 RNA Polymerase	2 μ L
RNase-free H ₂ O	2 μ L
DNA 溶液	(8 - x) μ L
Total 20.5 μ L	

※テンプレート DNA 溶液は、20 ng ~ 1 μ g 必要。

※溶液は必ず表の上から順番に加える。アグリゲーションを防ぐため。

- 2 42 °C で 2 時間インキュベートすることで反応させる。

反応後の溶液から mRNA を精製する際は NucleoSpin RNA Clean-up XS (Takara Bio, Inc.) を使用する。

- 1 反応溶液に付属の H₂O を 100 μ L 加え、さらに RCU 溶液を 100 μ L 加える。静かに転倒攪拌する。
- 2 付属のカラムに静かに注ぎ、4 °C、11000 g、30 sec 遠心する。
- 3 底のチューブに溶液が出てくるので、チューブごと捨て、新しいチューブを挿す。RA3 溶液 400 μ L 加えて、4 °C、11000 g、30 sec 遠心する。
- 4 出てきた下の液を捨て、RA3 溶液 200 μ L 加えて、4 °C、11000 g、2 min 遠心する。
- 5 カラムを付属のエッペンチューブに挿し、20 μ L H₂O を静かにカラムに注ぎ、1 min 待つ。4 °C、11000 g、30 sec 遠心して、mRNA 溶液が得られる。
- 6 mRNA 溶液の濃度を NanoDrop 2000 Spectrophotometer で定量する。

S-1.3.6.2 Hybrid cell への遺伝子封入と、SPiDER- β Gal を用いた定量

- 1 *lacZ* をコードしたプラスミド、あるいは mRNA は SP buffer で希釈され、ALBiC チャンバー内に封入される。30 ng/ μ L のプラスミド溶液、あるいは 95 ng/ μ L の mRNA 溶液を封入することで、各チャンバーに約 2.73×10^2 分子のプラスミド、あるいは 1.44×10^3 分子の mRNA を封入することになる。
- 2 青色蛍光タンパク質 mseCFP を発現する大腸菌 Top10 を用意する。Top10 株は、*lacZ* 遺伝子がノックアウトされているので、本実験にふさわしい。
- 3 このプロトプラスト型大腸菌を ALBiC に注入し、1 時間待つ。余剰のプロトプラストを洗い流した後、Hybrid cell を探す。
- 4 Hybrid cell が複数見つかったら、 β -gal が十分合成されるまで待つために、プロトプラストを洗い流した時点から 3 時間 30 °C で静置する。
- 5 100 μ M の SPiDER- β Gal を含む GP buffer 150 μ L をデバイスに流し、 β -gal の酵素反応を開始させると共に、マルチポイントタイムラプス撮影によって、複数の Hybrid cell の蛍光の時間変化を同時に測定する。

S-1.3.6.3 精製 β -gal を用いた、Hybrid cell 内 β -gal 分子数の定量

Hybrid cell 内で発現した β -gal 分子の数を見積もるために、市販の精製 β -gal (Wako) を ALBiC チャンバー内に封入し、そこにプロトプラストを融合させ、SPiDER- β Gal と反応させる。精製 β -gal は SP buffer で 0.44 nM、0.88 nM、1.76 nM に希釈した。それぞれ、チャンバー内に 5、10、20 分子の β -gal が封入されることになる。S-1.3.6.2 項と同様に実験を進め、Hybrid cell の蛍光強度の時間変化を測定する。複数の Hybrid cell における蛍光強度の単位時間あたりの変化量 (AU/h) を求め、封入した β -gal の数に対する検量線を作成する。

S-1.3.7 Hybrid cell 内大腸菌の作製

Hybrid cell 内に野生型の桿状大腸菌を封入するために、tdTomato 発現 Top10 大腸菌を LB 培地で培養する。OD = 0.6 前後まで増殖したら、菌体 0.3 mL を 6000 rpm、5 min で遠心し集菌する。上清の培地を捨て、0.9 mL の SP buffer で懸濁する。この懸濁液を ALBiC に流し、大腸菌がデバイス表面に沈むまで 15 min 程待った後、通常通り脂質二重膜を張ることで、チャンバー内に大腸菌を封入することができる。その後、GFPuv 発現 Top10 大腸菌のプロトプラストを ALBiC 内に流し、融合させる。

S-1.4 無細胞タンパク質合成系とオスマライトを用いた遺伝子発現反応

第3章における実験手法について説明する。

S-1.4.1 使用したオスマライト試薬

Trimethylamine *N*-oxide (TMAO) とベタインは、それぞれ Tokyo Chemical Industry Co., LTD. (Tokyo, Japan) と Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。75 mM Tris-HCl (pH 7.5) に溶かして、3 M TMAO のストック溶液と、4 M ベタインのストック溶液を調製した。

S-1.4.2 遺伝子発現反应用テンプレート遺伝子の調製

S-1.4.2.1 DNA テンプレート用プラスミドの調製と、DNA 断片の増幅

無細胞タンパク質合成で用いたテンプレート DNA は全てプラスミド DNA から PCR 増幅した DNA 断片を用いた。

- 1 Venus、tdTomato、そして β -gal をコードしたプラスミド DNA はそれぞれ、Venus コード遺伝子¹⁹¹、ptdTomato vector (Takara Bio, Inc., Shiga, Japan)、大腸菌 BL21 (DE3) 株の *lacZ* 遺伝子から、pRSET-B ベクターの T7 プロモーターの下流マルチクローニングサイトにクローニングした。クローニングは In-Fusion HD kit (Takara Bio, Inc.) を用いた。DHFR をコードしたプラスミドは PURExpress (New England Biolabs, Inc., MA, USA) のコントロールプラスミドを使用した。
- 2 テンプレート DNA 鎖は PrimeSTAR Max DNA polymerase (Takara Bio, Inc.) で、T7 プロモーター領域を含む Fw プライマーと、T7 ターミネーターを含む Re プライマーを用いて増幅し、電気泳動で増幅を確認後、FastGene Gel/PCR Extraction Kit (NIPPON Genetics Co., Ltd., Tokyo, Japan) によって精製した。
- 3 NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific, MA, USA) によって DNA を定量する。

S-1.4.2.2 mRNA テンプレートの増幅

- 1 Venus をコードした mRNA テンプレートは、Venus をコードしたプラスミド DNA をテンプレートとして用いて、*In vitro* Transcription T7 Kit (Takara Bio, Inc.) を用いて転写した。操作方法は S-1.3.6.1 項参照。
- 2 DNA を除くために、1.5 U / μ L の DNase I recombinant RNase-free (Roche, Basel, Switzerland) を添加し、37 °C で1時間インキュベートした。
- 3 合成された mRNA 転写反応溶液は、NucleoSpin RNA Clean-up XS (Takara Bio, Inc.)を用いて精製する。操作方法は S-1.3.6.1 項参照。
- 4 精製された mRNA 溶液は NanoDrop 2000 Spectrophotometer で定量した。

S-1.4.3 無細胞タンパク質合成系 PURE システムを用いた遺伝子発現反応

本研究における PURE システム反応は、全て PURExpress (New England Biolabs, Inc., MA, USA) を用いて行われた。反応溶液の組成は、PURExpress のプロトコールを基に、以下の組成で調製した。

	1 サンプル分	n サンプル分
PURExpress A 液	6 μ L	6 n μ L
PURExpress B 液	4.5 μ L	4.5 n μ L
RNase inhibitor	0.5 μ L	0.5 n μ L
40 nM DNA 溶液	1 μ L (final 2 nM)	n μ L
オスモライト溶液 or 75 mM Tris-HCl	8 μ L	8 n μ L
	Total 20 μ L	Total 20 n μ L

※RNase inhibitor : Recombinant RNase Inhibitor (Takara Bio., Inc.)

- 20 μ L 分の溶液は、プレートリーダーを用いた蛍光測定時における 1 サンプル分の溶液となる。したがって、1 回の実験で複数サンプルを同時に測定する際は、予め多めに溶液を調製しておき、その後分注する。その際、B 液は粘性が水よりも高い溶液であるため、多めに用意しておく、分注時に容量が足りなくなることを防げる（例えば、3 サンプル分用意する場合は、5 サンプル分の容量で計算する）。
- 特に記述がない場合は、DNA テンプレートの最終濃度は 2 nM とした。それ以外の濃度の場合は、最終濃度から逆算して希釈した溶液を用いる。
- β -gal 合成時には、蛍光性基質である fluorescein di- β -D-galactopyranoside (FDG) (Sigma-Aldrich) を上記反応溶液に追加した。DMSO に溶けたストック溶液を milliQ で 100 μ M に希釈し、その溶液を 1 μ L 添加することで、最終濃度 5 μ M としている。

S-1.4.4 プレートリーダーを用いた蛍光の時間変化の測定

遺伝子発現反応時の蛍光測定では、FlexStation 3 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices Co., CA, USA)を用いた。それぞれ蛍光測定と光学系の設定は以下の通り。

測定対象	励起	蛍光
Venus	485 nm	538 nm
tdTomato	485 nm	538 nm
FDG	544 nm	590 nm

Read Mode	Fluorescence, Bottom read
Readings	3
PMT	Medium (FDG の場合は Low)
Assay Plate Type	384 Well Greiner blk/clr
Automix	Before: 10 sec, Between: Off
AutoCalibrate	On

使用したプレートは、384穴プレート (MICROPLATE, 384 WELL, PS, μ CLEAR, BLACK, NON-BINDING, greiner bio-one) で、1 サンプルあたり 20 μ L の溶液をウェルに入れて測定した。乾燥を防ぐために、透明シールを上から貼り付ける。泡が入らないように静かに注入する。

S-1.4.5 SDS-PAGE を用いた遺伝子発現反応の定量

S-1.4.5.1 15% SDS-アクリルアミドゲルの作製

SDS-polyacrylamide electrophoresis (SDS-PAGE) に用いられるゲルは、以下の方法で調製された。なお、本研究では、市販のプレキャストゲルは用いずに、全て自作ゲルを用いた。

- 1 ゲル用ガラス板 2 枚、スペーサーゴム、ウェル用コーム、固定用クリップ 4 つを準備し、70%エタノールで洗浄する。
- 2 スペーサーゴムをはさんだ状態でガラス板を組合せ、クリップで固定する。コームを差し込み、コームの下 1.5 cm ほどの箇所に印をつけておく。コームは外す。
- 3 以下のゲル溶液を 15 mL コーニングチューブに調製する。TEMED を加えるとすぐにゲル化が始まるので、まだ加えない。

SDS 分離ゲル (lower)		SDS 濃縮ゲル (upper)	
30% アクリルアミド	3.5 mL	30% アクリルアミド	0.5 mL
Lower 用 buffer	1.8 mL	Upper 用 buffer	0.8 mL
APS	スパチュラ半分	APS	スパチュラ 1/4
TEMED (最後に加える)	7 μ L	TEMED (最後に加える)	3 μ L
MilliQ	7mL にメスアップ	MilliQ	3mL にメスアップ

- 4 分離ゲル溶液に TEMED を加え、速やかに数回攪拌させ、ガラス板の間に流し込む。あらかじめつけておいた印まで注ぐ。すぐに固まり始めるので、上からエタノールをゆっくり注ぎ、乾燥を防ぐ。20 min 静置。
- 5 注いだエタノールを捨て、エアダスターやろ紙でエタノールを完全に除去したら (ゲルを傷つけないように注意)、濃縮ゲルに TEMED を加え、すぐに分離ゲルの上に注ぐ。固まり始める前に丁寧にコームを差し込み、気泡ができないように注意する。30 min 静置。固まったら完成。

S-1.4.5.2 PURE システムによる反応、泳動、ゲル染色

- 1 SDS 泳動用のサンプルはタイムラプスサンプリング法で調製する (3.3.2 項参照)。0 M、0.2 M、0.4 M の TMAO を含む PURE system の反応溶液に、DNA テンプレートを添加後、37 $^{\circ}$ C でインキュベートを開始する (β -gal 合成時は、0 M、0.4 M、0.8 M)。
- 2 各反応溶液から、指定されたタイミング (15 min 後、30 min 後、60 min 後、120 min 後、20 h 後) で一部 (5 μ L) 取り出す。取り出した溶液は、全条件で TMAO 濃

度を 0.4 M に揃えるために、適宜 75 mM Tris-HCl buffer と TMAO 溶液で希釈する。その後、 -20°C で保存することで反応を停止させる。

- 3 全サンプリングが完了したら、各サンプルに 4X SDS sample buffer を加え、 95°C で 5 min インキュベートする。
- 4 ゲル泳動槽を準備する。ゲル板を固定した泳動槽の内側と外側に、1×SDS 泳動用 buffer を注ぐ。

10× SDS 泳動用 buffer

0.25 M Tris	30.2 g
1.92 M Glycine	144 g
1% SDS	10 g
MilliQ	1L にメスアップ

- 5 コーム付近に残るゲルの切れ端を注射針で掃除した後、ゆっくりコームを引き抜く。
- 6 SDS ゲルのウェルに各サンプルをアプライする。コード・電源を接続し、定電流 30 mA で泳動開始する。およそ 90 min で泳動が完了する。
- 7 泳動終了後はヘラを使ってゲルを静かにガラスからはがす。
- 8 ゲル染色は、蛍光染色剤 Flamingo Fluorescent Gel Stain (Bio-Rad, CA, USA) を用いて行う。ゲルを染色用容器に移した後、40% メタノール+10% エタノールを含む固定液を加えて、3 時間～一晩振盪させる。
- 9 固定液を捨て、原液 Flamingo Fluorescent Gel Stain を 10 倍希釈し、ゲル容器に加え、2 ~ 3 時間振盪させる。
- 10 染色後、FAS-nano (NIPPON Genetics Co., Ltd.) を用いてゲルを撮影する。

S-1.4.5.3 SDS ゲルの定量方法

SDS-PAGE による泳動結果から、タンパク質合成量を定量する。ゲルを撮影した画像は、画像解析ソフトウェア Fiji/ImageJ (National Institutes of Health, MD, USA) で解析した。

- 1 撮影した画像 (.jpg) をプレビューソフトで.tif ファイルに変換する。
- 2 .tif ファイルを Fiji で開き、8-bit gray scale に変換。Image > Transform > rotate (interpolation: none) を選択して、バンドの傾きが水平になるように調整する。その後、解析に必要な部分のみ crop する。
- 3 Fiji メニューバーの、Analyze > Gels の Gel analyzer plug-in を用いて、ゲルのバンドの強度を定量する。Rectangle ツールを用いて、定量したいレーンの複数のバンドを「縦長」の四角形で囲む。その状態で、Analyze > Gels > Select First Lane (あるいは“⌘ + 1”)を選択。続いて、隣のレーンに四角形を移動し、Analyze > Gels > Select Next Lane (あるいは“⌘ + 2”)を選択する。さらに他のレーンを定量したい場合は、四角形を移動し、同じく Analyze > Gels > Select Next Lane (あるいは“⌘ + 2”)を選択する。この要領で定量したいレーンを選択していく (図 S 1-6)。
- 4 Analyze > Gels > Plot Lanes (あるいは“⌘ + 3”)を選択すると、各レーンの強度を

ヒストグラム化した profile 画像が作成される (図 S 1-7)。定量したいバンドに対応するピークの底面を区切るように、“Straight” 直線描画ツールで線を引く。全ピークを選択したら、各ピークを“Wand tool” (杖のようなアイコン) で選択する。すると、選択されたピークの面積が測定され、Result 画面に記録される。最後に Analyze > Gels > Label Peaks を選択して、ヒストグラムに各ピーク的面積比が記される。Profile 画像と、Result を保存する。

- 5 以上の手順で、各レーンにおける目的タンパク質のバンドと、その近傍の PURE システム由来のバンド (3つ) を Reference バンドとして定量する。Reference バンドの強度の和で目的バンドの強度を割ることで、目的バンドの強度を規格化した。各サンプルで PURE システムの反応 ~ ゲル泳動実験は 3 回行われ、目的強度値の平均値を求め、その時間変化をプロットした。

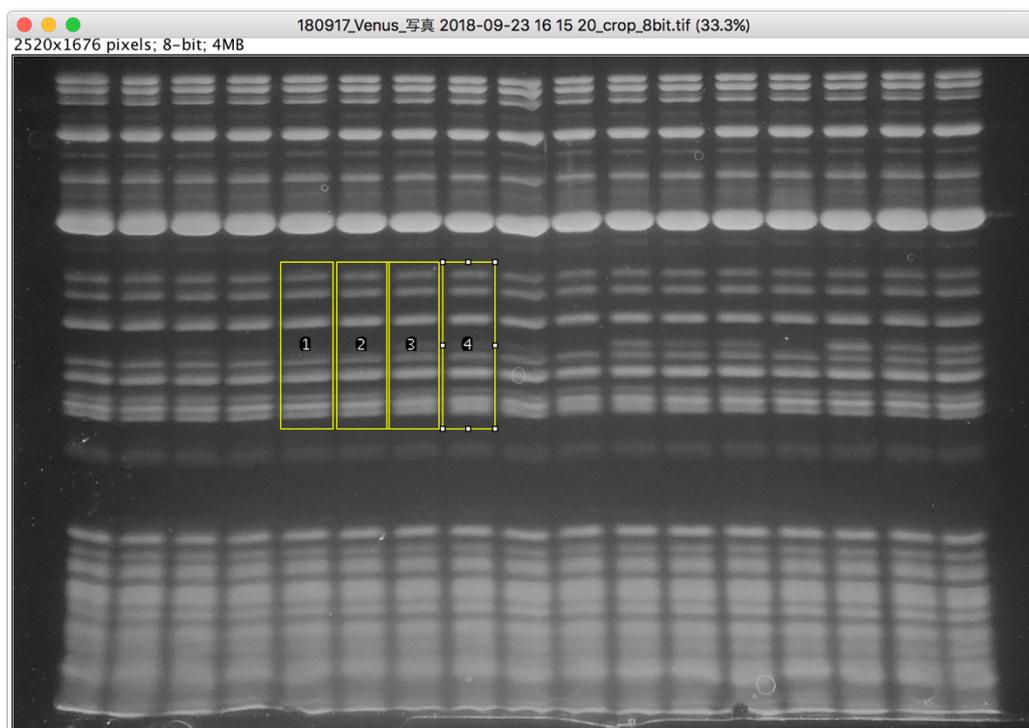


図 S 1-6 Fiji プラグイン Gel Analyzer を用いた SDS ゲルの定量

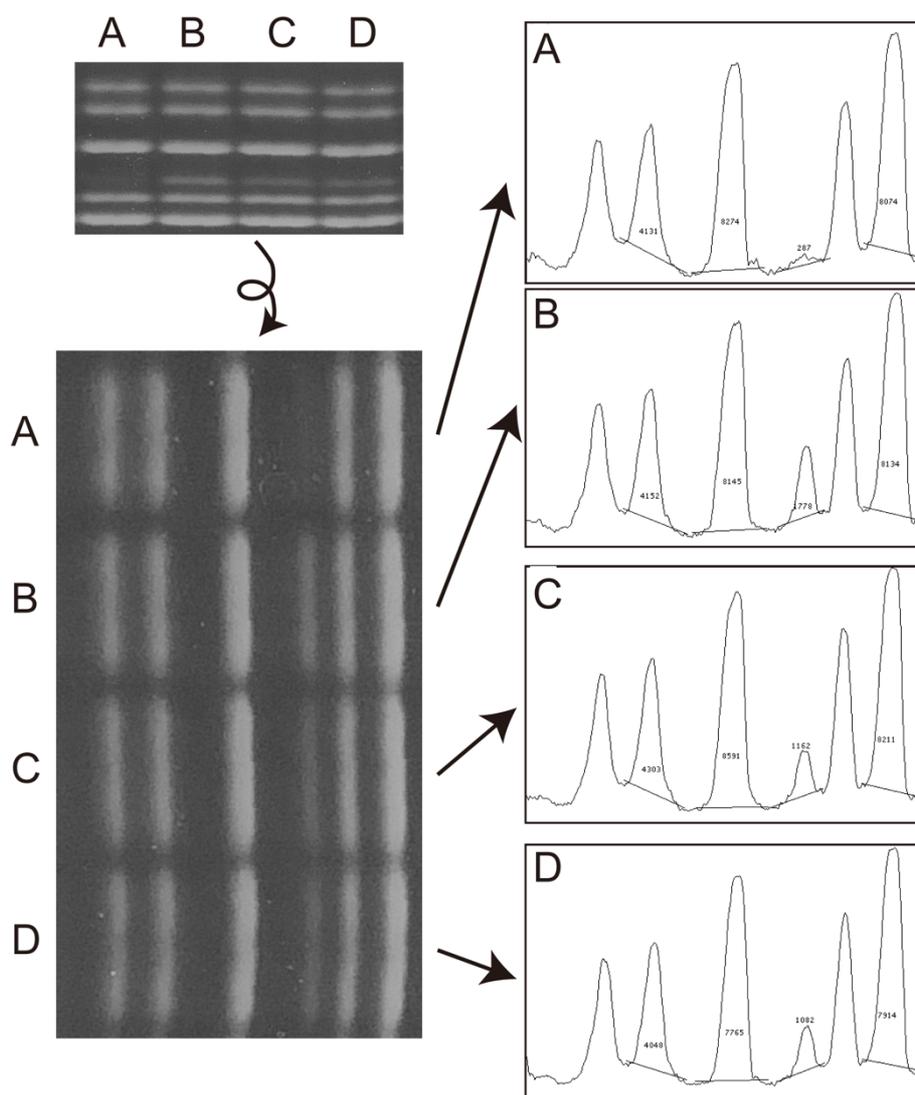


図 S 1-7 Gel Analyzer を用いた SDS ゲルの定量 (Plot Lanes)

S-1.4.6 人工細胞デバイスの遺伝子発現活性の測定

S-1.4.6.1 微細加工デバイスへの PURE システムの封入

ALBiC デバイスと同様の微細加工チャンバー内に PURE システム反応溶液を封入し、Venus の遺伝子発現活性を調べた。

- 1 本実験では、厚さ 3 μm 、直径 4.5 μm のデバイスを用いた。ALBiC デバイスを構築した際と同様に、両面テープとガラス製の上面蓋をデバイスに貼り付ける。本実験では、一枚のデバイスで 4 条件を同時に測定するために、インレットとアウトレットの穴が合計 8 つ空いたガラス蓋を利用し、4 本の流路を同時に作製した。

2 以下の反応溶液を調製する。

PURExpress A 液	6 μ L
TMAO 溶液 or 75 mM Tris buffer	2 μ L
20 μ M Alexa647	1 μ L
RNase inhibitor	0.5 μ L
29.5 nM DNA 溶液 (Venus)	1 μ L
PURExpress B 液	4 μ L
Total 20.5 μ L	

※上から順番に混合させる。

※赤色蛍光色素 Alexa647 は、アルゴリズムを用いた蛍光強度解析時に、チャンバーを自動認識させるために、封入している。

※29.5 nM の DNA 溶液を 1/20 希釈して封入することで、各チャンバー内に DNA 分子が 0.5 分子存在することになる。

- 3 アウトレットにマイクロピペッター用の黄色チップをそれぞれ差し込んでおき、上記反応溶液をマイクロピペッターで吸い取り、インレットから流し込む。溶液が全て流れないように注意し、流路内が溶液で満ちたら、静かにマイクロピペッターからチップを外し、インレットに挿したままにしておく。
- 4 その状態のままデバイスを氷上冷却する。
- 5 氷上に置いたまま、インレットに挿した黄色チップに、冷やしておいた有機オイル AE3000 を静かに流す。この AE3000 には予め界面活性剤 S-386 が最終体積濃度 0.05%となるように加えられている。
- 6 流しただけでは、オイルは流路内に入っていないので、静かにマイクロピペッターで黄色チップを押し込むことで圧力をかけ、少しずつ流路内にオイルを進ませる。オイルがアウトレットまで到達したら、チップを取り外す。氷上から取り外し、室温になるまで静置する。
- 7 新しいチップをアウトレットに取り付けたら、フォンブリンオイルを 50 ~ 100 μ L 流路に流す。ここでは、強く流し込んで良い。
- 8 アウトレットとインレットにシールで封をし、顕微鏡観察を行う。

S-1.4.6.2 落射型蛍光顕微鏡による蛍光観察

人工細胞デバイス内で発現した Venus の蛍光強度と、Alexa647 の蛍光強度は、蛍光顕微鏡 Ti-Eclipse (Nikon)、カメラ、光源 SpectraX (Lumencor) を用いて計測された。詳細な条件は以下の通り。

対物レンズ	60 ×
カメラ	ORCA-Flash 4.0
ND フィルター	なし
Venus 観察	
励起	513 nm (power 30)
蛍光	542 nm (レンジ 27 nm)
露光時間	200 ms
Alexa647 観察	
励起	632 nm (power 5)
蛍光	590 – 650 nm
露光時間	100 ms

タイムラプス撮影の結果は、Fiji/ImageJ を用いて解析された。詳細な解析方法と解析に用いたアルゴリズムは S-2.4 項参照。

付録 2 補足データ

S-2.1 ALBiC チャンバーの膜上に乗るプロトプラストの個数の評価

プロトプラストと大腸菌の融合効率を求めるために、ALBiC の膜の上に乗ったプロトプラストの個数を評価した。本実験系では、大量のプロトプラストを ALBiC 中に流し、インキュベートするため、その個数を顕微鏡で直接観察することはできない。そこで、注入したプロトプラスト溶液の密度と、ALBiC 内の流路のサイズを基としたモデルから、以下のように膜上のプロトプラストの個数を求めた。

Hybrid cell 作製時に用いるプロトプラストの懸濁液に含まれるプロトプラストの個数を、血球検査板を用いて数えると、 3.25×10^9 個/mlであった。

ALBiC 内の流路は図 S 2-1 のような構造となっている。このデバイス表面にプロトプラストが充填すると仮定すると、プロトプラストの直径を $2 \mu\text{m}$ とした場合、表面近傍の

$$2 \text{ mm} \times 17 \text{ mm} \times 2 \mu\text{m} = 6.8 \times 10^{-5} \text{ cm}^3$$

の体積を持つ空間にプロトプラストが並ぶことになる。したがって、懸濁液の密度からデバイス表面近傍の空間に存在するプロトプラストの個数は、

$$(6.8 \times 10^{-5} \text{ ml}) \times (3.25 \times 10^9 \text{ 個/ml}) = 2.2 \times 10^5 \text{ 個}$$

と求められる。この個数をデバイス表面の面積で割ると、以下のように、単位面積あたりに存在するプロトプラストの個数が求まる。

$$2.2 \times 10^5 \div (2 \text{ mm} \times 17 \text{ mm}) = 6.5 \times 10^{-3} \text{ 個}/\mu\text{m}^2$$

今、デバイス表面に 160,000 個のチャンバーが存在し、その総面積は、

$$16000 \times (2 \times 2 \times 3.14) = 2.0 \times 10^6 \mu\text{m}^2$$

と求められるため、

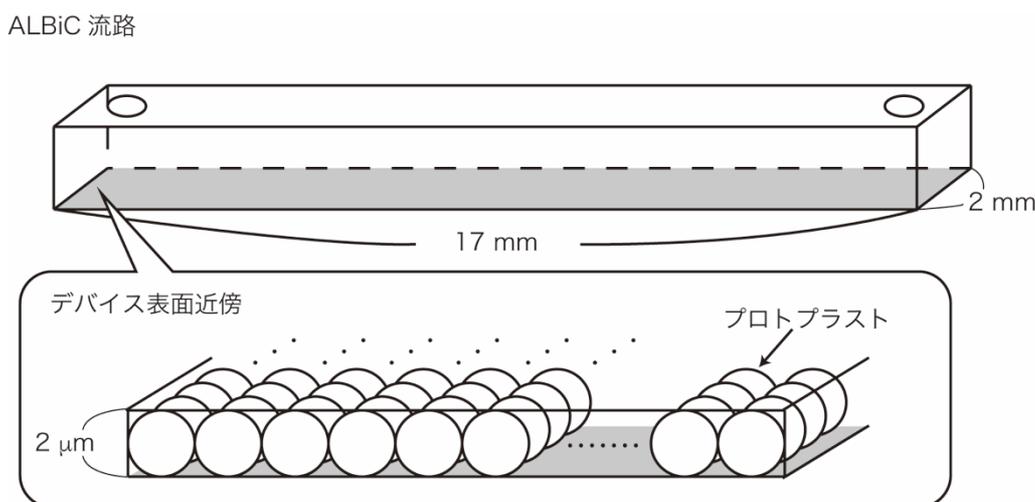


図 S 2-1 融合確率評価のための、膜チャンバーに乗ったプロトプラストの個数の導出モデル

$$6.5 \times 10^{-3} \times 2.0 \times 10^6 = 13000$$

より、13000 個のプロトプラストがチャンバーの上に乗っている計算になる。観察によると、全体の約 9 割のチャンバーで脂質二重膜が張れているため、実際に膜に触れているプロトプラストは約 12000 個と見積もられた。

S-2.2 クロロホルムを溶媒とする脂質溶液を用いて作製された Hybrid cell

ALBiC に関する先行研究によると、クロロホルムを溶媒とする脂質溶液を用いて再構成された脂質二重膜の方が、膜タンパク質の再構成と、その活性測定には適している²²。粘性の高いヘキサデカンを用いる場合、脂質二重膜の間に溶媒が残留してしまう可能性があり、薄い脂質二重膜にならないことがある。一方で、揮発性が高く、粘性が低いクロロホルムを用いた脂質溶液を用いると、薄い脂質二重膜を再構成しやすい。膜タンパク質が正常に働くためには、薄い脂質二重膜の再構成に適したクロロホルムを用いる方法が望ましい。

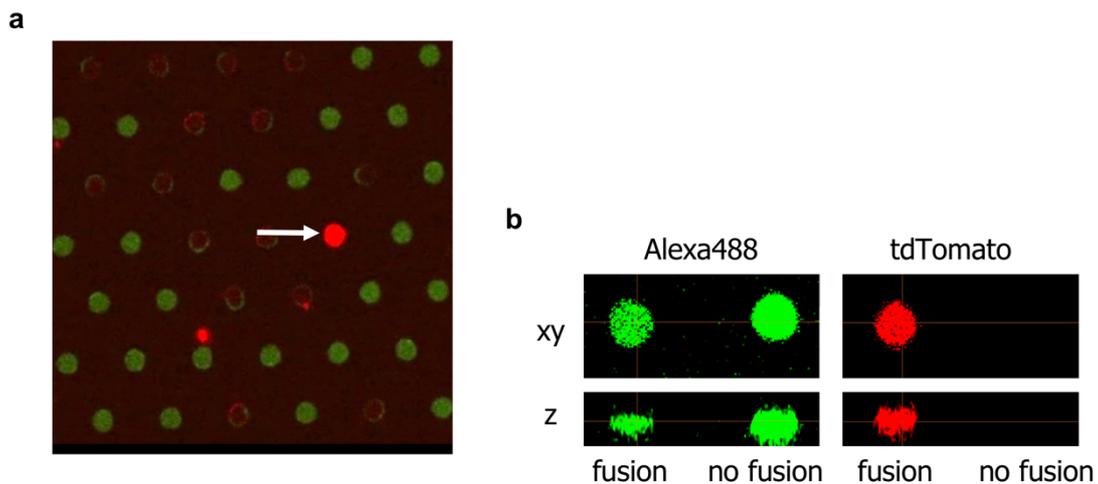


図 S 2-2 クロロホルムを溶媒とする脂質二重膜を用いた Hybrid cell の作製

(a) クロロホルム脂質溶液を用いて脂質二重膜を張った ALBiC に大腸菌を融合させた。矢印で示されたチャンバーに大腸菌が融合している。プロトプラストは赤色蛍光タンパク質 tdTomato を発現しており、チャンバー内には緑色蛍光色素 Alexa488 が封入されている。大きく希釈されたプロトプラスト溶液を ALBiC に注入するため、融合確率は大きく低下した。一枚のデバイスで 1~2 個しか Hybrid cell は見つからなかった。(b) 共焦点顕微鏡で撮影した (a) の Hybrid cell の断面図向かって左のチャンバーで融合が起きており、右側には起きていない。上段 (xy) は上から見た画像、下段が z-stack 撮影で得られた断面図。正しく膜融合が起きていることがわかる。

脂質溶液の溶媒をクロロホルムに変えて、脂質二重膜を再構成し、そこにプロトプラスト型大腸菌を注入したところ、全チャンバーの膜がすぐに破れてしまった。薄い脂質二重膜は非常に sensitive で割れやすいため、プロトプラスト溶液中に含まれる無数のプロトプラストや、そこから漏れ出したタンパク質、培地成分が脂質二重膜に悪影響を及ぼしていると考えた。そこで、このプロトプラスト溶液を遠心することで培地成分を除去し、かつ希釈によってプロトプラスト密度も大きく減らし、ALBiC に注入したところ融合が発見された (図 S 2-2)。プロトプラスト個数が大きく減少しているため、融合確率は大きく減り、1 デバイスにつき 0 ~ 2 個しか融合を発見できなかった。このように低い再現性のため、遺伝子発現活性を評価することはできなかった。今後、各種条件検討によって、クロロホルム利用時の融合現象の再現性を高めることが、膜タンパク質機能の評価につながる。

S-2.3 大腸菌破裂型人工細胞の遺伝子発現活性の評価

2.7 項において開発した、大腸菌破裂型人工細胞に、 β -gal をコードした *lacZ* プラスミド DNA と基質 FDG を添加することで、プロトプラスト内から出てきた細胞質成分によって、*lacZ* 遺伝子が β -gal に発現されるかどうかを確かめた。

tdTomato を発現するプロトプラスト大腸菌をチャンバー内に封入し、大腸菌が割れたチャンバーにおける FDG の蛍光変化を測定したところ、FDG の蛍光が上昇した (図 S 2-3)。これはプロトプラストの細胞質によって、 β -gal が発現したことを示唆している。しかし、その蛍光上昇速度は遅く、 β -gal の発現数は非常に小さいことがわかった。今後は、条件検討により、合成活性を改良したい。

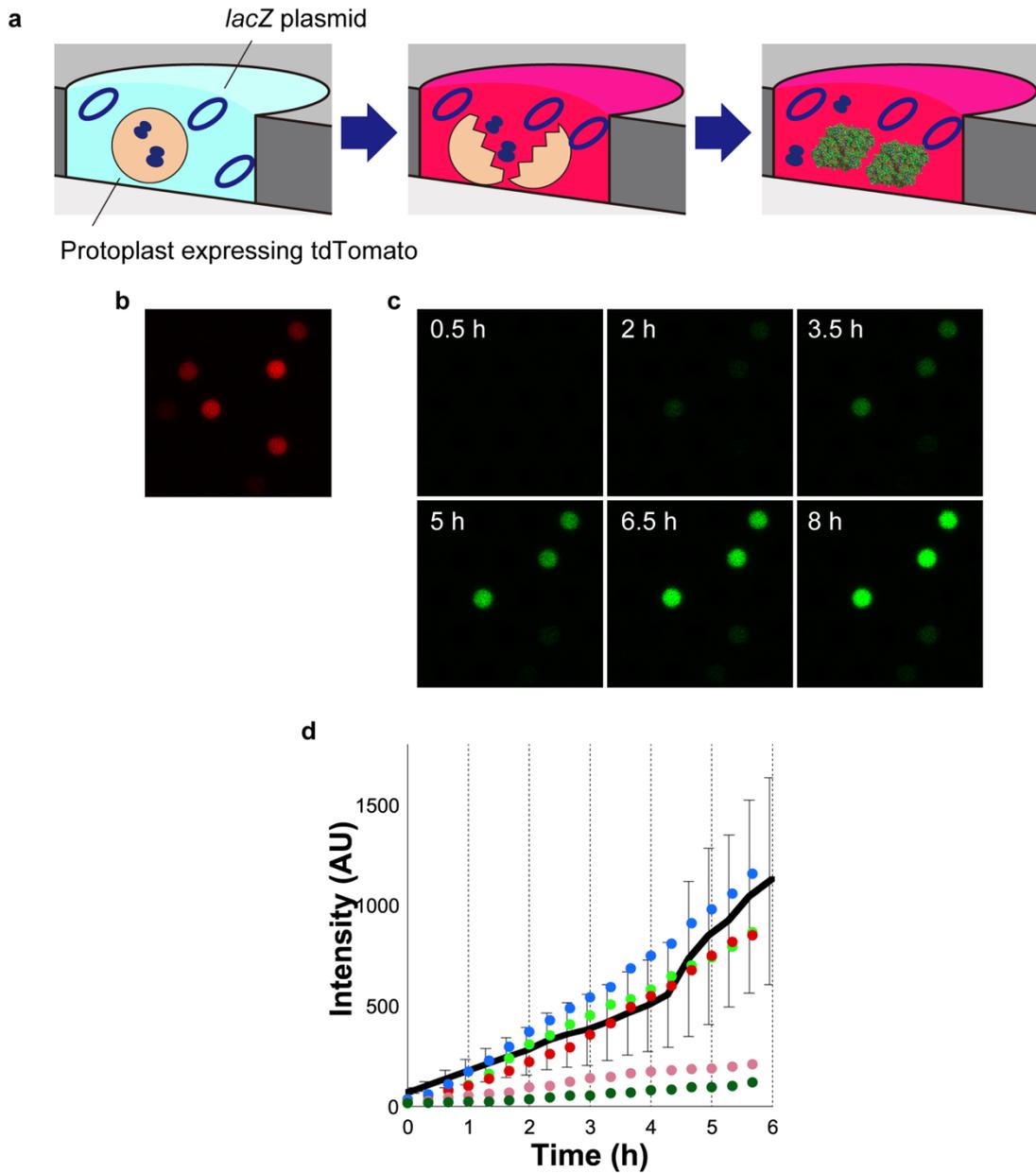


図 S 2-3 大腸菌破裂型人工細胞の遺伝子発現活性の測定

(a) 実験の概要。本文参照。(b) 封入した赤色蛍光タンパク質 tdTomato 発現プロトプラストが割れたチャンパー。(c) (b) と同じチャンパーにおける FDG の蛍光強度変化。破裂が起きたチャンパーの内、3 箇所まで FDG の蛍光強度が強く変化した。これは β -gal の発現を示唆している。(d) (c) の FDG の蛍光強度のプロット。黒、灰、赤、緑、青色のプロットは、それぞれ別のチャンパーの FDG 蛍光強度変化を示している。実線は、予備実験で見積もられた、精製 β -gal 一分子の蛍光強度の時間変化を示している。複数チャンパーの蛍光強度の平均がプロットされており、エラーバーは標準偏差を示す。

S-2.4 プロトプラストの大きさの分布

細胞質の希釈の度合いを見積もるために、融合に使用されたプロトプラストの大きさを計測した。Hybrid cell 作製時と同様の条件でプロトプラストを作製し、ガラス上にプロトプラスト溶液を滴下し、顕微鏡を用いて、その直径を調べた。その結果、平均は約 1.96 μm (SD: 0.48) であったものの、1.01~ 3.01 μm まで直径の値はばらついた (図 S 2-4)。そこから計算される体積のばらつきは、およそ 0.5 ~ 14 fL と見積もられた。

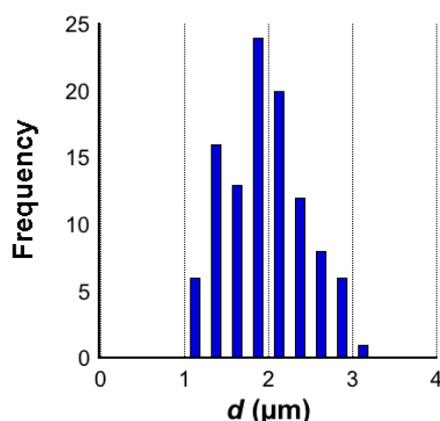


図 S 2-4 プロトプラストの直径の分布

tdTomato 発現大腸菌をプロトプラスト化させ、その直径の分布を調べた。

S-2.5 オスモライト存在下での人工細胞内 Venus 発現反応の解析について

S-2.5.1 蛍光強度の定量に利用した Fiji アルゴリズム

顕微鏡で撮影された画像の各チャンバーの蛍光強度は、Fiji のアルゴリズムを用いて自動計測された。視野毎に分割された nd2 ファイルを Fiji で開き、チャンバーの位置を自動で認識して計測用の ROI を配置し、その蛍光強度を計測し、その結果を csv ファイル上に保存するアルゴリズムになっている。

なお、本アルゴリズムは、野地研究室所属の西村知也君によって作成され、筆者によって一部改変された。

```
//各視野の nd2 ファイルを開き、チャンネル分割したのち、Alexa チャンネルのはじめの画像で ROI を取って、  
//蛍光チャンネルの輝度をまとめて csv ファイルで保存するマクロ  
//要求事項：各視野の画像を開く時は"concatenate series when compatible"で開く  
//注意：binning しているときは ROI size に注意 (小さくなる：2x2 で size150-160 前後)
```

```
filehead="18xxxx_"
```

```
showMessage("Select Open Folder");  
openDir = getDirectory("Choose a Directory");  
showMessage("Select Save Folder (Result_csv file)");  
saveDir = getDirectory("Choose a Directory");
```

```
imin = getNumber("i_min=?、何視野から?", 1);  
imax = getNumber("i_max=?、何視野まで?", 1);
```

```

tmax = getNumber("t_max=?、時間時点数はいくつ?", 1);

for(i=imin;i<=imax; i++){
//      if (i<10) {
//          filename=filehead+"0"+i+".nd2";
//      } else {
//          filename=filehead+i+".nd2";
//      }
    analyse_field();
}
showMessage("終了しました");

function analyse_field() {
    //開いた視野ごとの nd2 ファイルからチャンネル分割
    open(openDir+filename);
    run("Split Channels");
    C1name = "C1-"+filename; //Alexa
    C2name = "C2-"+filename; //FL

    //Alexa チャンネル(C=1)のスタックを解除
    selectWindow(C1name);
    run("Stack to Images");
    selectWindow("c:1/2 t:"+tmax+"/"+tmax+" - " + filename+" (series 1)");

    //Alexa チャンネルの最初以外の画像を閉じる
    for (j=tmax;j>=2; j--){
        name = "c:1/2 t:"+j+"/"+tmax+" - " + filename+" (series 1)";
        rename(name);
        selectWindow(name);
        //showMessage(name);
        close(name);
    }

    //Alexa 画像で ROI を決定
    selectWindow("c:1/2 t:"+1+"/"+tmax+" - " + filename+" (series 1)");
    run("Set Scale...", "distance=0 known=1 pixel=1 unit=micron global"); //pixel 単位に設定
    setAutoThreshold("Default dark");
    //setThreshold(1384,4095); //任意の値で Threshold
    run("Median...", "radius=2");
    run("Analyze Particles...", "size=1200-2200 circularity=0.05-1.00 exclude clear add");

    //設定した ROI で蛍光画像の輝度を測定、csv ファイルで保存
    selectWindow(C2name);
    roiManager("Show None");
    roiManager("Show All");
    for (k=1;k<=tmax; k++){
        roiManager("Measure");
        run("Next Slice [>]");
    }
    newname = ""+i+"-Results TL.csv";
    rename(newname);
    saveAs("Results", saveDir+newname);

    //ウインドウを閉じる
    selectWindow("Results");
    run("Close");
    selectWindow("ROI Manager");
    run("Close");
}

```

```
}    run("Close");  
    run("Close");
```

参考文献

- (1) Watson, J. D., and Crick, F. H. C. (1953) Molecular structure of nucleic acids. *Nature* *171*, 737–738.
- (2) Lehman, I. R., Bessman, M. J., Simms, E. S., and Kornberg, A. (1958) Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid I. Preparation of Substrates and Partial Purification of an Enzyme from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *233*, 163–70.
- (3) Kornberg, A. (1960) Biologic synthesis of deoxyribonucleic acid. *Science (80-)*. *131*, 1503–1508.
- (4) Liu, A. P., and Fletcher, D. A. (2009) Biology under construction: In vitro reconstitution of cellular function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 644–650.
- (5) Brekke, O. H., and Sandlie, I. (2003) Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century. *Nat. Rev. Drug Discov.* *2*, 52–62.
- (6) Foley, P. L., and Shuler, M. L. (2010) Considerations for the design and construction of a synthetic platform cell for biotechnological applications. *Biotechnol. Bioeng.* *105*, 26–36.
- (7) Gibson, D. G., Benders, G. A., Andrews-Pfannkoch, C., Denisova, E. A., Baden-Tillson, H., Zaveri, J., Stockwell, T. B., Brownley, A., Thomas, D. W., Algire, M. A., Merryman, C., Young, L., Noskov, V. N., Glass, J. I., Venter, J. C., Hutchison 3rd, C. A., and Smith, H. O. (2008) Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. *Science (80-)*. *319*, 1215–1220.
- (8) Gibson, D. G., Glass, J. I., Lartigue, C., Noskov, V. N., Chuang, R.-Y., Algire, M. A., Benders, G. A., Montague, M. G., Ma, L., Moodie, M. M., Merryman, C., Vashee, S., Krishnakumar, R., Assad-Garcia, N., Andrews-Pfannkoch, C., Denisova, E. A., Young, L., Qi, Z.-Q., Segall-Shapiro, T. H., Calvey, C. H., Parmar, P. P., Hutchison 3rd, C. A., Smith, H. O., and Venter, J. C. (2010) Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science (80-)*. *329*, 52–56.
- (9) Hutchison 3rd, C. A., Chuang, R.-Y., Noskov, V. N., Assad-Garcia, N., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., Gill, J., Kannan, K., Karas, B. J., Ma, L., Pelletier, J. F., Qi, Z.-Q., Richter, R. A., Strychalski, E. A., Sun, L., Suzuki, Y., Tsvetanova, B., Wise, K. S., Smith, H. O., Glass, J. I., Merryman, C., Gibson, D. G., and Venter, J. C. (2016) Design and synthesis of a minimal bacterial genome. *Science (80-)*. *351*, aad6253–aad6253.
- (10) Itaya, M., Tsume, K., Koizumi, M., and Fujita, K. (2005) Combining two genomes in one cell: stable cloning of the *Synechocystis* PCC6803 genome in the *Bacillus subtilis* 168 genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 15971–15976.
- (11) Richardson, S. M., Mitchell, L. A., Stracquadanio, G., Yang, K., Dymond, J. S., DiCarlo, J. E., Lee, D., Huang, C. L. V., Chandrasegaran, S., Cai, Y., Boeke, J. D., and Bader, J. S. (2017) Design of a synthetic yeast genome. *Science (80-)*. *355*, 1040–1044.
- (12) Su'etsugu, M., Takada, H., Katayama, T., and Tsujimoto, H. (2017) Exponential propagation of large circular DNA by reconstitution of a chromosome-replication cycle. *Nucleic Acids Res.* *45*, 11525–11534.
- (13) Loisel, T. P., Boujemaa, R., Pantaloni, D., and Carlier, M.-F. (1999) Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature* *401*, 613–616.
- (14) Heald, R., Tournebise, R., Blank, T., Sandaltzopoulos, R., Becker, P., Hyman, A., and Karsenti, E. (1996) Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in *Xenopus* egg extracts. *Nature* *382*, 420–425.
- (15) Yu, X. C., and Margolin, W. (1997) Ca²⁺-mediated GTP-dependent dynamic assembly of bacterial cell division protein FtsZ into asters and polymer networks in vitro. *EMBO J.* *16*, 5455–5463.
- (16) Erickson, H. P., Taylor, D. W., Taylor, K. A., and Bramhill, D. (2008) Bacterial cell division protein FtsZ assembles into protofilament sheets and minirings, structural homologs of tubulin polymers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 519–523.
- (17) Osawa, M., Anderson, D. E., and Erickson, H. P. (2008) Reconstitution of Contractile FtsZ Rings

in Liposomes. *Science (80-)*. 320, 792–794.

(18) Loose, M., Fischer-Friedrich, E., Ries, J., Kruse, K., and Schwille, P. (2008) Spatial Regulators for Bacterial Cell Division Self-Organize into Surface Waves in Vitro. *Science (80-)*. 320, 789–792.

(19) Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., and Kinosita, K. (1997) Direct observation of the rotation of F1-ATPase. *Nature* 386, 299–302.

(20) Yasuda, R., Noji, H., Yoshida, M., Kinosita, K., and Itoh, H. (2001) Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F1-ATPase. *Nature* 410, 898–904.

(21) Watanabe, R., Tabata, K. V, Iino, R., Ueno, H., Iwamoto, M., Oiki, S., and Noji, H. (2013) Biased Brownian stepping rotation of FoF1-ATP synthase driven by proton motive force. *Nat. Commun.* 4, 1631.

(22) Watanabe, R., Soga, N., Fujita, D., Tabata, K. V, Yamauchi, L., Kim, S. H., Asanuma, D., Kamiya, M., Urano, Y., Suga, H., and Noji, H. (2014) Arrayed lipid bilayer chambers allow single-molecule analysis of membrane transporter activity. *Nat. Commun.* 5, 4519.

(23) Caschera, F., and Noireaux, V. (2014) Integration of biological parts toward the synthesis of a minimal cell. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 22, 85–91.

(24) Powell, K. (2018) How biologists are creating life-like cells from scratch. *Nature* 563, 172–175.

(25) Erickson, A. H., and Blobel, G. (1983) Cell-free translation of messenger RNA in a wheat germ system. *Methods Enzymol.* 96, 38–50.

(26) Anderson, C. W., Straus, J. W., and Dudock, B. S. (1989) Preparation of a Cell-Free Protein-Synthesizing System from Wheat Germ. *Recomb. DNA Methodol.* 677–685.

(27) Takai, K., Sawasaki, T., and Endo, Y. (2010) The Wheat-Germ Cell-Free Expression System. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 11, 272–278.

(28) Shin, J., and Noireaux, V. (2010) Efficient cell-free expression with the endogenous E. Coli RNA polymerase and sigma factor 70. *J. Biol. Eng.* 4, 8.

(29) Spirin, A. S., Baranov, V. I., Ryabova, L. A., Ovodov, S., and Alakhov, Y. (1988) A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield. *Science (80-)*. 242, 1162–1164.

(30) Shimizu, Y., Inoue, A., Tomari, Y., Suzuki, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K., and Ueda, T. (2001) Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nat. Biotechnol.* 19, 751–755.

(31) Shimizu, Y., Kuruma, Y., Ying, B. W., Umekage, S., and Ueda, T. (2006) Cell-free translation systems for protein engineering. *FEBS J.* 273, 4133–4140.

(32) Matsuura, T., Kazuta, Y., Aita, T., Adachi, J., and Yomo, T. (2009) Quantifying epistatic interactions among the components constituting the protein translation system. *Mol. Syst. Biol.* 5, 1–10.

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

(34) Garenne, D., and Noireaux, V. (2019) Cell-free transcription–translation: engineering biology from the nanometer to the millimeter scale. *Curr. Opin. Biotechnol.* 58, 19–27.

(35) Perez, J. G., Stark, J. C., and Jewett, M. C. (2016) Cell-free synthetic biology: Engineering beyond the cell. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 8.

(36) Carlson, E. D., Gan, R., Hodgman, C. E., and Jewett, M. C. (2012) Cell-free protein synthesis: Applications come of age. *Biotechnol. Adv.* 30, 1185–1194.

(37) Ying, B. W., Taguchi, H., Kondo, M., and Ueda, T. (2005) Co-translational involvement of the chaperonin GroEL in the folding of newly translated polypeptides. *J. Biol. Chem.* 280, 12035–12040.

(38) Ying, B. W., Taguchi, H., and Ueda, T. (2006) Co-translational binding of GroEL to nascent polypeptides is followed by post-translational encapsulation by GroES to mediate protein folding. *J. Biol. Chem.* 281, 21813–21819.

(39) Niwa, T., Kanamori, T., Ueda, T., and Taguchi, H. (2012) Global analysis of chaperone effects

- using a reconstituted cell-free translation system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 8937–8942.
- (40) Chadani, Y., Niwa, T., Chiba, S., Taguchi, H., and Ito, K. (2016) Integrated in vivo and in vitro nascent chain profiling reveals widespread translational pausing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *113*, E829–E838.
- (41) Chadani, Y., Niwa, T., Izumi, T., Sugata, N., Nagao, A., Suzuki, T., Chiba, S., Ito, K., and Taguchi, H. (2017) Intrinsic Ribosome Destabilization Underlies Translation and Provides an Organism with a Strategy of Environmental Sensing. *Mol. Cell* *68*, 528–539.
- (42) Smith, G. P. (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science (80-.)*. *228*, 1315–7.
- (43) Winter, G., Griffiths, A. D., Hawkins, R. E., and Hoogenboom, H. R. (1994) Making Antibodies by Phage Display Technology. *Annu. Rev. Immunol.* *12*, 433–455.
- (44) Mattheakis, L. C., Bhatt, R. R., and Dower, W. J. (1994) An in vitro polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 9022–6.
- (45) Zahnd, C., Amstutz, P., and Plückthun, A. (2007) Ribosome display: Selecting and evolving proteins in vitro that specifically bind to a target. *Nat. Methods* *4*, 269–279.
- (46) Roberts, R. W., and Szostak, J. W. (1997) RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins RICHARD. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 12297–12302.
- (47) Ichihashi, N., Usui, K., Kazuta, Y., Sunami, T., Matsuura, T., and Yomo, T. (2013) Darwinian evolution in a translation-coupled RNA replication system within a cell-like compartment. *Nat. Commun.* *4*, 2494.
- (48) Tawfik, D. S., and Griffiths, A. D. (1998) Man-made cell-like compartments for molecular evolution. *Nat. Biotechnol.* *16*, 652–656.
- (49) Stapleton, J. A., and Swartz, J. R. (2010) Development of an in vitro compartmentalization screen for high-throughput directed evolution of [FeFe] hydrogenases. *PLoS One* *5*, 1–8.
- (50) Fujii, S., Matsuura, T., Sunami, T., Kazuta, Y., and Yomo, T. (2013) In vitro evolution of α -hemolysin using a liposome display. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 16796–801.
- (51) Josephson, K., Hartman, M. C. T., and Szostak, J. W. (2005) Ribosomal synthesis of unnatural peptides. *J. Am. Chem. Soc.* *127*, 11727–35.
- (52) Bundy, B. C., and Swartz, J. R. (2010) Site-Specific Incorporation of p-Propargyloxyphenylalanine in a Cell-Free Environment for Direct Protein - Protein Click Conjugation. *Bioconjug. Chem.* *21*, 255–263.
- (53) Chemla, Y., Ozer, E., Schlesinger, O., Noireaux, V., and Alfonta, L. (2015) Genetically expanded cell-free protein synthesis using endogenous pyrrolysyl orthogonal translation system. *Biotechnol. Bioeng.* *112*, 1663–1672.
- (54) Ohta, A., Murakami, H., Higashimura, E., and Suga, H. (2007) Synthesis of polyester by means of genetic code reprogramming. *Chem. Biol.* *14*, 1315–22.
- (55) Iwane, Y., Hitomi, A., Murakami, H., Katoh, T., Goto, Y., and Suga, H. (2016) Expanding the amino acid repertoire of ribosomal polypeptide synthesis via the artificial division of codon boxes. *Nat. Chem.* *8*, 317–325.
- (56) Terasaka, N., Hayashi, G., Katoh, T., and Suga, H. (2014) An orthogonal ribosome-tRNA pair via engineering of the peptidyl transferase center. *Nat. Chem. Biol.* *10*, 555–557.
- (57) Khnouf, R., Olivero, D., Jin, S., Coleman, M. A., and Fan, Z. H. (2010) Cell-free expression of soluble and membrane proteins in an array device for drug screening. *Anal. Chem.* *82*, 7021–7026.
- (58) Klammt, C., Schwarz, D., Löhr, F., Schneider, B., Dötsch, V., and Bernhard, F. (2006) Cell-free expression as an emerging technique for the large scale production of integral membrane protein. *FEBS J.* *273*, 4141–4153.
- (59) Klammt, C., Schwarz, D., Fendler, K., Haase, W., Dötsch, V., and Bernhard, F. (2005) Evaluation of detergents for the soluble expression of α -helical and β -barrel-type integral membrane proteins by a preparative scale individual cell-free expression system. *FEBS J.* *272*, 6024–6038.

- (60) Wuu, J. J., and Swartz, J. R. (2008) High yield cell-free production of integral membrane proteins without refolding or detergents. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1778, 1237–1250.
- (61) Cappuccio, J. A., Blanchette, C. D., Sulchek, T. A., Arroyo, E. S., Kralj, J. M., Hinz, A. K., Kuhn, E. A., Chromy, B. A., Segelke, B. W., Rothschild, K. J., Fletcher, J. E., Katzen, F., Peterson, T. C., Kudlicki, W. A., Bench, G., Hoepflich, P. D., and Coleman, M. A. (2008) Cell-free Co-expression of Functional Membrane Proteins and Apolipoprotein, Forming Soluble Nanolipoprotein Particles. *Mol. Cell. Proteomics* 7, 2246–2253.
- (62) Goren, M. A., Nozawa, A., Makino, S., Wrobel, R. L., and Fox, B. G. (2009) Chapter 37 Cell-Free Translation of Integral Membrane Proteins into Unilamellar Liposomes. *Methods Enzymol.* 463, 647–673.
- (63) Blain, J. C., and Szostak, J. W. (2014) Progress toward synthetic cells. *Annu. Rev. Biochem.* 83, 615–640.
- (64) Jesorka, A., and Orwar, O. (2008) Liposomes: Technologies and Analytical Applications. *Annu. Rev. Anal. Chem.* 1, 801–832.
- (65) Walde, P., Cosentino, K., Engel, H., and Stano, P. (2010) Giant Vesicles: Preparations and Applications. *ChemBioChem* 11, 848–865.
- (66) Cistola, D. P., Hamilton, J. A., Jackson, D., and Small, D. M. (1988) Ionization and Phase Behavior of Fatty Acids in Water: Application of the Gibbs Phase Rule. *Biochemistry* 27, 1881–1888.
- (67) Haines, T. H. (1983) Anionic lipid headgroups as a proton-conducting pathway along the surface of membranes: a hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80, 160–164.
- (68) Chen, I. A., Roberts, R. W., and Szostak, J. W. (2004) The emergence of competition between model protocells. *Science (80-)*. 305, 1474–6.
- (69) Budin, I., and Szostak, J. W. (2011) Physical effects underlying the transition from primitive to modern cell membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 5249–5254.
- (70) Chen, I. A., and Szostak, J. W. (2004) A kinetic study of the growth of fatty acid vesicles. *Biophys. J.* 87, 988–998.
- (71) Walde, P., Goto, A., Monnard, P. A., Wessicken, M., and Luisi, P. L. (1994) Oparin's Reactions Revisited: Enzymatic Synthesis of Poly (adenylic acid) in Micelles and Self-Reproducing Vesicles. *J. Am. Chem. Soc.* 116, 7541–7547.
- (72) Szostak, J. W., Bartel, D. P., and Luisi, P. L. (2001) Synthesizing life. *Nature* 409, 387–390.
- (73) Budin, I., Debnath, A., and Szostak, J. W. (2012) Concentration-driven growth of model protocell membranes. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 20812–20819.
- (74) Urabe, H., Ichihashi, N., Matsuura, T., Hosoda, K., Kazuta, Y., Kita, H., and Yomo, T. (2010) Compartmentalization in a water-in-oil emulsion repressed the spontaneous amplification of RNA by Q β replicase. *Biochemistry* 49, 1809–1813.
- (75) Pietrini, A. V., and Luisi, P. L. (2004) Cell-free protein synthesis through solubilisate exchange in water/oil emulsion compartments. *ChemBioChem* 5, 1055–1062.
- (76) Karzbrun, E., Tayar, A. M., Noireaux, V., and Bar-Ziv, R. H. (2014) Programmable on-chip DNA compartments as artificial cells. *Science (80-)*. 345, 829–832.
- (77) Blackburn, M. C., Petrova, E., Correia, B. E., and Maerkl, S. J. (2016) Integrating gene synthesis and microfluidic protein analysis for rapid protein engineering. *Nucleic Acids Res.* 44, e68.
- (78) Okano, T., Matsuura, T., Kazuta, Y., Suzuki, H., and Yomo, T. (2012) Cell-free protein synthesis from a single copy of DNA in a glass microchamber. *Lab Chip* 12, 2704.
- (79) Yu, W., Sato, K., Wakabayashi, M., Nakaishi, T., Ko-Mitamura, E. P., Shima, Y., Urabe, I., and Yomo, T. (2001) Synthesis of functional protein in liposome. *J. Biosci. Bioeng.* 92, 590–593.
- (80) Nomura, S. M., Tsumoto, K., Hamada, T., Akiyoshi, K., Nakatani, Y., and Yoshikawa, K. (2003) Gene Expression within Cell-Sized Lipid Vesicles. *ChemBioChem* 4, 1172–1175.
- (81) Murtas, G., Kuruma, Y., Bianchini, P., Diaspro, A., and Luisi, P. L. (2007) Protein synthesis in liposomes with a minimal set of enzymes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 363, 12–17.

- (82) Ishikawa, K., Sato, K., Shima, Y., Urabe, I., and Yomo, T. (2004) Expression of a cascading genetic network within liposomes. *FEBS Lett.* *576*, 387–90.
- (83) Noireaux, V., and Libchaber, A. (2004) A vesicle bioreactor as a step toward an artificial cell assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 17669–17674.
- (84) Treyer, M., Walde, P., and Oberholzer, T. (2002) Permeability enhancement of lipid vesicles to nucleotides by use of sodium cholate: Basic studies and application to an enzyme-catalyzed reaction occurring inside the vesicles. *Langmuir* *18*, 1043–1050.
- (85) Yoshimoto, M., Wang, S., Fukunaga, K., Fournier, D., Walde, P., Kuboi, R., and Nakao, K. (2005) Novel immobilized liposomal glucose oxidase system using the channel protein OmpF and catalase. *Biotechnol. Bioeng.* *90*, 231–238.
- (86) Ryabova, L. A., Ortlepp, S. A., and Baranov, V. I. (1989) Preparative synthesis of globin in a continuous cell-free translation system from rabbit reticulocytes. *Nucleic Acids Res.* *17*, 4412.
- (87) Takinoue, M., Onoe, H., and Takeuchi, S. (2010) Fusion and fission control of picoliter-sized microdroplets for changing the solution concentration of microreactors. *Small* *6*, 2374–7.
- (88) Yamashita, H., Morita, M., Sugiura, H., Fujiwara, K., Onoe, H., and Takinoue, M. (2014) Generation of monodisperse cell-sized microdroplets using a centrifuge-based axisymmetric co-flowing microfluidic device. *J. Biosci. Bioeng.*
- (89) Niederholtmeyer, H., Stepanova, V., and Maerkl, S. J. (2013) Implementation of cell-free biological networks at steady state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 15985–15990.
- (90) Hasatani, K., Leocmach, M., Genot, A. J., Estévez-Torres, A., Fujii, T., and Rondelez, Y. (2013) High-throughput and long-term observation of compartmentalized biochemical oscillators. *Chem. Commun.* *49*, 8090.
- (91) Genot, A. J., Baccouche, A., Sieskind, R., Aubert-Kato, N., Bredeche, N., Bartolo, J. F., Taly, V., Fujii, T., and Rondelez, Y. (2016) High-resolution mapping of bifurcations in nonlinear biochemical circuits. *Nat. Chem.* *8*, 760–767.
- (92) Oberholzer, T., Albrizio, M., and Luisi, P. L. (1995) Polymerase chain reaction in liposomes. *Chem. Biol.* *2*, 677–682.
- (93) Chakrabarti, A. C., Breaker, R. R., Joyce, G. F., and Deamer, D. W. (1994) Production of RNA by a polymerase protein encapsulated within phospholipid vesicles. *J. Mol. Evol.* *39*, 555–559.
- (94) Oberholzer, T., Wick, R., Luisi, P. L., and Biebricher, C. K. (1995) Enzymatic RNA Replication in Self-Reproducing Vesicles: An Approach to a Minimal Cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*
- (95) Kita, H., Matsuura, T., Sunami, T., Hosoda, K., Ichihashi, N., Tsukada, K., Urabe, I., and Yomo, T. (2008) Replication of genetic information with self-encoded replicase in liposomes. *ChemBioChem* *9*, 2403–2410.
- (96) Hentrich, C., and Szostak, J. W. (2014) Controlled growth of filamentous fatty acid vesicles under flow. *Langmuir* *30*, 14916–14925.
- (97) Zhu, T. F., and Szostak, J. W. (2009) Coupled growth and division of model protocell membranes. *J. Am. Chem. Soc.* *131*, 5705–13.
- (98) Zhu, T. F., Adamala, K., Zhang, N., and Szostak, J. W. (2012) Photochemically driven redox chemistry induces protocell membrane pearling and division. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 9828–9832.
- (99) Terasawa, H., Nishimura, K., Suzuki, H., Matsuura, T., and Yomo, T. (2012) Coupling of the fusion and budding of giant phospholipid vesicles containing macromolecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 5942–7.
- (100) Kuruma, Y., Stano, P., Ueda, T., and Luisi, P. L. (2009) A synthetic biology approach to the construction of membrane proteins in semi-synthetic minimal cells. *Biochim. Biophys. Acta* *1788*, 567–574.
- (101) Staneva, G., Angelova, M. I., and Koumanov, K. (2004) Phospholipase A2 promotes raft budding and fission from giant liposomes. *Chem. Phys. Lipids* *129*, 53–62.
- (102) Kurihara, K., Tamura, M., Shohda, K.-I., Toyota, T., Suzuki, K., and Sugawara, T. (2011) Self-

reproduction of supramolecular giant vesicles combined with the amplification of encapsulated DNA. *Nat. Chem.* *3*, 775–781.

(103) Kurihara, K., Okura, Y., Matsuo, M., Toyota, T., Suzuki, K., and Sugawara, T. (2015) A recursive vesicle-based model protocell with a primitive model cell cycle. *Nat. Commun.* *6*, 8352.

(104) Forster, A. C., and Church, G. M. (2006) Towards synthesis of a minimal cell. *Mol. Syst. Biol.* *2*, 45.

(105) Luisi, P. L., Ferri, F., and Stanó, P. (2006) Approaches to semi-synthetic minimal cells: A review. *Naturwissenschaften* *93*, 1–13.

(106) Zimmerman, S. B., and Trach, S. O. (1991) Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* *222*, 599–620.

(107) Fujiwara, K., and Nomura, S. M. (2013) Condensation of an additive-free cell extract to mimic the conditions of live cells. *PLoS One* *8*, e54155.

(108) Minton, A. P. (2006) How can biochemical reactions within cells differ from those in test tubes? *J. Cell Sci.* *119*, 2863–9.

(109) Ellis, R. J. (2001) Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. *Trends Biochem. Sci.* *26*, 597–604.

(110) Ellis, R. J. (2001) Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *11*, 114–119.

(111) van den Berg, J., Boersma, A. J., and Poolman, B. (2017) Microorganisms maintain crowding homeostasis. *Nat. Rev. Microbiol.* *15*, 309–318.

(112) Zhou, H.-X., Rivas, G., and Minton, A. P. (2008) Macromolecular Crowding and Confinement: Biochemical, Biophysical, and Potential Physiological Consequences. *Annu. Rev. Biophys.* *37*, 375–397.

(113) Fujiwara, K., Yanagisawa, M., and Nomura, S. M. (2014) Reconstitution of intracellular environments in vitro and in artificial cells. *Biophysics (Oxf)*. *10*.

(114) Parry, B. R., Surovtsev, I. V., Cabeen, M. T., O'Hern, C. S., Dufresne, E. R., and Jacobs-Wagner, C. (2014) The Bacterial Cytoplasm Has Glass-like Properties and Is Fluidized by Metabolic Activity. *Cell* *156*, 183–194.

(115) Zimmerman, S. B., and Trach, S. O. (1988) Effects of macromolecular crowding on the association of *E. coli* ribosomal particles. *Nucleic Acids Res.* *16*, 6309–6326.

(116) Murphy, L. D., and Zimmerman, S. B. (1994) Macromolecular crowding effects on the interaction of DNA with *Escherichia coli* DNA-binding proteins: a model for bacterial nucleoid stabilization. *Biochim. Biophys. Acta* *1219*, 277–284.

(117) Sasaki, Y., Miyoshi, D., and Sugimoto, N. (2006) Effect of molecular crowding on DNA polymerase activity. *Biotechnol. J.* *1*, 440–446.

(118) Nakano, H., Tanaka, T., Kawarasaki, Y., and Yamane, T. (1994) An increased rate of cell-free protein synthesis by condensing wheat-germ extract with ultrafiltration membranes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *58*, 631–4.

(119) Ge, X., Luo, D., and Xu, J. (2011) Cell-free protein expression under macromolecular crowding conditions. *PLoS One* *6*.

(120) Li, J., Gu, L., Aach, J., and Church, G. M. (2014) Improved cell-free RNA and protein synthesis system. *PLoS One* *9*.

(121) Simmel, F. C. (2013) Crowded genes perform differently. *Nat. Nanotechnol.* *8*, 545–546.

(122) Tan, C., Saurabh, S., Bruchez, M. P., Schwartz, R., and LeDuc, P. (2013) Molecular crowding shapes gene expression in synthetic cellular nanosystems. *Nat. Nanotechnol.* *8*, 602–608.

(123) Spruijt, E., Sokolova, E., and Huck, W. T. S. (2014) Complexity of molecular crowding in cell-free enzymatic reaction networks. *Nat. Nanotechnol.* *9*, 406–407.

(124) Hansen, M. M. K., Meijer, L. H. H., Spruijt, E., Maas, R. J. M., Rosquelles, M. V., Groen, J., Heus, H. A., and Huck, W. T. S. (2016) Macromolecular crowding creates heterogeneous environments of

gene expression in picolitre droplets. *Nat. Nanotechnol.* *11*, 191–197.

(125) Homchaudhuri, L., Sarma, N., and Swaminathan, R. (2006) Effect of crowding by dextrans and Ficolls on the rate of alkaline phosphatase-catalyzed hydrolysis: A size-dependent investigation. *Biopolymers* *83*, 477–486.

(126) Nakano, S., Karimata, H., Ohmichi, T., Kawakami, J., and Sugimoto, N. (2004) The effect of molecular crowding with nucleotide length and cosolute structure on DNA duplex stability. *J. Am. Chem. Soc.* *126*, 14330–14331.

(127) Nakano, S., Miyoshi, D., and Sugimoto, N. (2014) Effects of molecular crowding on the structures, interactions, and functions of nucleic acids. *Chem. Rev.* *114*, 2733–2758.

(128) Sleator, R. D., and Hill, C. (2002) Bacterial osmoadaptation: The role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiol. Rev.* *26*, 49–71.

(129) Czonka, L. N. (1989) Physiological and Genetic Responses of Bacteria to Osmotic Stress. *Microbiol. Rev.* *53*, 121–147.

(130) Kempf, B., and Bremer, E. (1998) Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch. Microbiol.* *170*, 319–330.

(131) Burg, M. B., and Ferraris, J. D. (2008) Intracellular organic osmolytes: Function and regulation. *J. Biol. Chem.* *283*, 7309–7313.

(132) Perroud, B., and Le Rudulier, D. (1985) Glycine betaine transport in *Escherichia coli*: Osmotic modulation. *J. Bacteriol.* *161*, 393–401.

(133) Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D., and Somero, G. N. (1982) Living with Water Stress: Evolution of Osmolyte Systems. *Science (80-)*. *217*, 1214–1222.

(134) Ueda, Y. M., Zouzumi, Y. K., Maruyama, A., Nakano, S. I., Sugimoto, N., and Miyoshi, D. (2016) Effects of trimethylamine N-oxide and urea on DNA duplex and G-quadruplex. *Sci. Technol. Adv. Mater.* *17*, 753–759.

(135) Wang, A., and Bolen, D. W. (1997) A naturally occurring protective system in urea-rich cells: Mechanism of osmolyte protection of proteins against urea denaturation. *Biochemistry* *36*, 9101–9108.

(136) Yancey, P. H., and Somero, G. N. (1980) Methylamine osmoregulatory solutes of elasmobranch fishes counteract urea inhibition of enzymes. *J. Exp. Zool.* *212*, 205–213.

(137) Tseng, H. C., and Graves, D. J. (1998) Natural methylamine osmolytes, trimethylamine N-oxide and betaine, increase tau-induced polymerization of microtubules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *250*, 726–730.

(138) Yancey, P. H., and Somero, G. N. (1979) Counteraction of urea destabilization of protein structure by methylamine osmoregulatory compounds of elasmobranch fishes. *Biochem. J.* *183*, 317–323.

(139) Gopal, S., and Ahluwalia, J. C. (1993) Effect of osmoregulatory solutes on the stability of proteins. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* *89*, 2769–2774.

(140) Cho, S. S., Reddy, G., Straub, J. E., and Thirumalai, D. (2011) Entropic stabilization of proteins by TMAO. *J. Phys. Chem. B* *115*, 13401–13407.

(141) Liao, Y.-T., Manson, A. C., DeLyser, M. R., Noid, W. G., and Cremer, P. S. (2017) Trimethylamine N-oxide stabilizes proteins via a distinct mechanism compared with betaine and glycine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *114*, 2479–2484.

(142) Schneck, E., Horinek, D., and Netz, R. R. (2013) Insight into the molecular mechanisms of protein stabilizing osmolytes from global force-field variations. *J. Phys. Chem. B* *117*, 8310–8321.

(143) Arakawa, T., and Timasheff, S. N. (1985) The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophys. J.* *47*, 411–414.

(144) Brigotti, M., Petronini, P. G., Carnicelli, D., Alfieri, R. R., Bonelli, M. A., Borghetti, A. F., and Wheeler, K. P. (2003) Effects of osmolarity, ions and compatible osmolytes on cell-free protein synthesis. *Biochem. J.* *369*, 369–374.

- (145) Rondelez, Y., Tresset, G., Nakashima, T., Kato-Yamada, Y., Fujita, H., Takeuchi, S., and Noji, H. (2005) Highly coupled ATP synthesis by F1-ATPase single molecules. *Nature* *433*, 773–777.
- (146) Rondelez, Y., Tresset, G., Tabata, K. V, Arata, H., Fujita, H., Takeuchi, S., and Noji, H. (2005) Microfabricated arrays of femtoliter chambers allow single molecule enzymology. *Nat. Biotechnol.* *23*, 361–365.
- (147) Sakakihara, S., Araki, S., Iino, R., and Noji, H. (2010) A single-molecule enzymatic assay in a directly accessible femtoliter droplet array. *Lab Chip* *10*, 3355–3362.
- (148) Ono, T., Ichiki, T., and Noji, H. (2018) Digital enzyme assay using attoliter droplet array. *Analyst* *143*, 4923–4929.
- (149) Iino, R., Hayama, K., Amezawa, H., Sakakihara, S., Kim, S. H., Matsumono, Y., Nishino, K., Yamaguchi, A., and Noji, H. (2012) A single-cell drug efflux assay in bacteria by using a directly accessible femtoliter droplet array. *Lab Chip* *12*, 3923.
- (150) Kim, S. H., Iwai, S., Araki, S., Sakakihara, S., Iino, R., and Noji, H. (2012) Large-scale femtoliter droplet array for digital counting of single biomolecules. *Lab Chip* *12*, 4986–4991.
- (151) Obayashi, Y., Iino, R., and Noji, H. (2015) A single-molecule digital enzyme assay using alkaline phosphatase with a coumarin-based fluorogenic substrate. *Analyst* *140*, 5065–5073.
- (152) Soga, N., Watanabe, R., and Noji, H. (2015) Attolitre-sized lipid bilayer chamber array for rapid detection of single transporters. *Sci. Rep.* *5*, 11025.
- (153) Watanabe, R., Soga, N., and Noji, H. (2016) Novel Nano-Device to Measure Voltage-Driven Membrane Transporter Activity. *IEEE Trans. Nanotechnol.* *15*, 70–73.
- (154) Watanabe, R., Soga, N., Yamanaka, T., and Noji, H. (2014) High-throughput formation of lipid bilayer membrane arrays with an asymmetric lipid composition. *Sci. Rep.* *4*, 7076.
- (155) Watanabe, R., Sakuragi, T., Noji, H., and Nagata, S. (2018) Single-molecule analysis of phospholipid scrambling by TMEM16F. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2017117956.
- (156) Onitsuka, M. O., Rikihisa, Y., and Maruyama, H. B. (1979) Biochemical and topographical studies on *Escherichia coli* cell surface. IV. Giant spheroplast formation from a filamentous cell. *J. Bacteriol.* *138*, 567–574.
- (157) Hanson, P. K., Grant, A. M., and Nichols, J. W. (2002) NBD-labeled phosphatidylcholine enters the yeast vacuole via the pre-vacuolar compartment. *J. Cell Sci.* *115*, 2725–33.
- (158) Kay, J. G., Koivusalo, M., Ma, X., Wohland, T., and Grinstein, S. (2012) Phosphatidylserine dynamics in cellular membranes. *Mol. Biol. Cell* *23*, 2198–2212.
- (159) Doura, T., Kamiya, M., Obata, F., Yamaguchi, Y., Hiyama, T. Y., Matsuda, T., Fukamizu, A., Noda, M., Miura, M., and Urano, Y. (2016) Detection of LacZ -Positive Cells in Living Tissue with Single-Cell Resolution. *Angew. Chemie Int. Ed.* *55*, 9620–9624.
- (160) Leaver, M., Domínguez-Cuevas, P., Coxhead, J. M., Daniel, R. A., and Errington, J. (2009) Life without a wall or division machine in *Bacillus subtilis*. *Nature* *457*, 849–853.
- (161) Joseleau-Petit, D., Liébart, J.-C., Ayala, J. A., and D’Ari, R. (2007) Unstable *Escherichia coli* L forms revisited: Growth requires peptidoglycan synthesis. *J. Bacteriol.* *189*, 6512–6520.
- (162) Allan, E. J., Hoischen, C., and Gumpert, J. (2009) Bacterial L-forms. *Adv. Appl. Microbiol.* *68*, 1–39.
- (163) Mercier, R., Kawai, Y., and Errington, J. (2013) Excess membrane synthesis drives a primitive mode of cell proliferation. *Cell* *152*, 997–1007.
- (164) Kozlovsky, Y., and Kozlov, M. M. (2002) Stalk Model of Membrane Fusion: Solution of Energy Crisis. *Biophys. J.* *82*, 882–895.
- (165) Zimmermann, U. (1982) Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena. *Biochim. Biophys. Acta* *694*, 227–277.
- (166) Tareste, D., Shen, J., Melia, T. J., and Rothman, J. E. (2008) SNAREpin/Munc18 promotes adhesion and fusion of large vesicles to giant membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 2380–2385.
- (167) Trier, S., Henriksen, J. R., and Andresen, T. L. (2011) Membrane fusion of pH-sensitive

- liposomes - A quantitative study using giant unilamellar vesicles. *Soft Matter* 7, 9027–9034.
- (168) Lei, G., and MacDonald, R. C. (2008) Effects on interactions of oppositely charged phospholipid vesicles of covalent attachment of polyethylene glycol oligomers to their surfaces: Adhesion, hemifusion, full fusion and “endocytosis.” *J. Membr. Biol.* 221, 97–106.
- (169) Kahya, N., Pécheur, E. I., De Boeij, W. P., Wiersma, D. A., and Hoekstra, D. (2001) Reconstitution of membrane proteins into giant unilamellar vesicles via peptide-induced fusion. *Biophys. J.* 81, 1464–1474.
- (170) Wang, Z., Ma, Y., Khalil, H., Wang, R., Lu, T., Zhao, W., Zhang, Y., Chen, J., and Chen, T. (2016) Fusion between fluid liposomes and intact bacteria: study of driving parameters and in vitro bactericidal efficacy. *Int. J. Nanomedicine* 11, 4025–36.
- (171) Gasson, M. J. (1980) Production, regeneration and fusion of protoplasts in lactic streptococci. *FEMS Microbiol. Lett.* 9, 99–102.
- (172) Weber, T., Zemelman, B. V., McNew, J. A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Sollner, T. H., and Rothman, J. E. (1998) SNAREpins: Minimal machinery for membrane fusion. *Cell* 92, 759–772.
- (173) Taniguchi, Y., Choi, P. J., Li, G., Chen, H., Babu, M., Hearn, J., Emili, A., and Xie, X. S. (2010) Quantifying E. coli Proteome and Transcriptome with Single-Molecule Sensitivity in Single Cells. *Science (80-)*. 329, 533–539.
- (174) Yaginuma, H., Kawai, S., Tabata, K. V., Tomiyama, K., Kakizuka, A., Komatsuzaki, T., Noji, H., and Imamura, H. (2014) Diversity in ATP concentrations in a single bacterial cell population revealed by quantitative single-cell imaging. *Sci. Rep.* 4, 6522.
- (175) Mercier, R., Kawai, Y., and Errington, J. (2016) Wall proficient E. coli capable of sustained growth in the absence of the Z-ring division machine. *Nat. Microbiol.* 1, 1–5.
- (176) Elani, Y., Trantidou, T., Wylie, D., Dekker, L., Polizzi, K., Law, R. V., and Ces, O. (2018) Constructing vesicle-based artificial cells with embedded living cells as organelle-like modules. *Sci. Rep.* 8, 1–8.
- (177) Denning, E. J., Thirumalai, D., and Mackerell, A. D. (2013) Protonation of trimethylamine N-oxide (TMAO) is required for stabilization of RNA tertiary structure. *Biophys. Chem.* 184, 8–16.
- (178) Zou, Q., Bennion, B. J., Daggett, V., and Murphy, K. P. (2002) The molecular mechanism of stabilization of proteins by TMAO and its ability to counteract the effects of urea. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 1192–1202.
- (179) Street, T. O., Bolen, D. W., and Rose, G. D. (2006) A molecular mechanism for osmolyte-induced protein stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 13997–14002.
- (180) Ma, J., Pazos, I. M., and Gai, F. (2014) Microscopic insights into the protein-stabilizing effect of trimethylamine N-oxide (TMAO). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 8476–8481.
- (181) Sharp, K. A., Madan, B., Manas, E., and Vanderkooi, J. M. (2001) Water structure changes induced by hydrophobic and polar solutes revealed by simulations and infrared spectroscopy. *J. Chem. Phys.* 114, 1791–1796.
- (182) Semrad, K., and Green, R. (2002) Osmolytes stimulate the reconstitution of functional 50S ribosomes from in vitro transcripts of Escherichia coli 23S rRNA. *RNA* 8, 401–411.
- (183) Doerr, A., de Reus, E., van Nies, P., van der Haar, M., Wei, K., Kattan, J., Wahl, A., and Danelon, C. (2019) Modelling cell-free RNA and protein synthesis with minimal systems. *Phys. Biol.* 16, 025001.
- (184) Gavrilova, L. P., and Spirin, A. S. (1974) [43] “Nonenzymatic” translation. *Methods Enzymol.* 30, 452–462.
- (185) Gavrilova, L. P., Kostiashekina, O. E., Koteliansky, V. E., Rutkevitch, N. M., and Spirin, A. S. (1976) Factor-free (“Non-enzymic”) and factor-dependent systems of translation of polyuridylic acid by Escherichia coli ribosomes. *J. Mol. Biol.* 101, 537–552.
- (186) Wagner, E. G. H., Jelenc, P. C., Ehrenberg, M., and Kurland, C. G. (1982) Rate of Elongation of Polyphenylalanine in vitro. *Eur. J. Biochem.* 122, 193–197.

- (187) Anand, G., Jamadagni, S. N., Garde, S., and Belfort, G. (2010) Self-assembly of TMAO at hydrophobic interfaces and its effect on protein adsorption: Insights from experiments and simulations. *Langmuir* 26, 9695–9702.
- (188) Matsuda, T., Miyawaki, A., and Nagai, T. (2008) Direct measurement of protein dynamics inside cells using a rationally designed photoconvertible protein. *Nat. Methods* 5, 339–345.
- (189) Hosoda, K., Suzuki, S., Yamauchi, Y., Shiroguchi, Y., Kashiwagi, A., Ono, N., Mori, K., and Yomo, T. (2011) Cooperative adaptation to establishment of a synthetic bacterial mutualism. *PLoS One* 6.
- (190) Kuroda, T., Okuda, N., Saitoh, N., Hiyama, T., Terasaki, Y., Anazawa, H., Hirata, A., Mogi, T., Kusaka, I., Tsuchiya, T., and Yabe, I. (1998) Patch clamp studies on ion pumps of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. Formation, preparation, and utilization of giant vacuole-like structures consisting of everted cytoplasmic membrane. *J. Biol. Chem.* 273, 16897–16904.
- (191) Nagai, T., Ibata, K., Park, E. S., Kubota, M., Mikoshiba, K., and Miyawaki, A. (2002) A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat. Biotechnol.* 20, 87–90.

謝辞

本研究は、数多くの方々のお力をお借りすることによって完成いたしました。この場を借りて皆様に深く御礼を述べさせていただきます。

野地博行教授には、将来について何一つ具体的な目標のなかった私に、研究の楽しさや難しさを教えていただきました。その教えがあったからこそ、博士課程に進学し、研究者として生きていくことを決意することができました。次から次へと新しいアイデアが出てくるところ、研究に対しての厳しさや鋭さ、研究者仲間から信頼されるリーダーシップ、その全てが私にとっての目標です。本研究を進める上では、論文執筆の添削やディスカッションに膨大な時間をかけてくださり、大変感謝しております。

田端和仁講師は、指導教官として、本研究のあらゆる面でサポートしていただきました。その知識の幅は非常に広く、日々の実験でのささいなトラブルなどに対して数々のアドバイスをいただきました。また、本研究の出発点は、田端さんの斬新なアイデアがベースにありました。その豊かな発想力をとても尊敬しております。

渡邊力也講師（現・理化学研究所主任研究員）からは、四年生時に研究や発表の基礎をしっかりと教えていただきました。ALBiCの実験を始めた後は、技術的なアドバイスはもちろん、研究者としての心構えも教わりました。時に厳しい指導をいただくこともありましたが、それも全て自分にとっての貴重な財産です。今後もその言葉を思い出しながら、研究に励みます。

また、本研究において技術的に支援して下さった野地研究室の方々にも感謝いたします。技術補佐員の原舞雪さんには、遺伝子操作や、その他数々の実験操作を手伝っていただきました。普段の研究室生活面でも仲良くさせていただき、日々の生活でも欠かせない存在でした。同じく技術補佐員の千代田悦子さんには、微細加工デバイスを作製していただきました。非常に性能の良いデバイスを提供していただき、大変感謝しております。後輩である修士課程の西村知也君には、デバイスを用いた遺伝子発現実験や解析アルゴリズムについて教わりました。一から丁寧に教えてくれたおかげで、実験を上手く進めることができ、研究の終盤において大きな助けになりました。現在は野地研究室を退職された山中智子さんにも、遺伝子操作やデバイス作製などの点でサポートしていただきました。

その他の野地研究室所属の方々にも、たくさん助けていただきました。上野博史助教、曾我直樹助教を始め、博士の先輩方や技術補佐員の方々には、技術的な相談やディスカッションを通して、日々支えていただきました。また、進路についての相談に乗っていただくことも多く、特に池田朋宏博士（現・アボットジャパン株式会社研究員）や張翼博士（現・JAMSTEC 研究員）には、就職に関するお力添えや重要なアドバイスをいただき大変感謝しております。秘書の太田希久代さんには、事務関連の手続きや研究室での日々の生活において大変お世話になりました。特に、この一年間は私が対応できない手続きを代行してくださり、本当に感謝しております。そして、野地研究室で関わってきた、たくさんの学生全員にも深く感謝しています。先輩のみなさんにはたくさん可愛がっていただき、同期のみんなとはたくさん遊んだり飲んだりしながらも、研究に関する熱い議論をすることもあり、とても有意義な時間を過ごせました。この四年間は、ほとんどの時間を後輩のみなさんと過ごしました。みなさんの研究や就職の相談に乗ることは、私

自身にとってもかけがえのない貴重な経験でした。本当にどうもありがとうございました。

また、野地研究室以外の方々にも大変お世話になりました。東京大学医学系研究科・薬学系研究科浦野研究室の浦野泰照教授、神谷真子講師、堂浦智裕博士（現・東京薬科大学助教）には、基質 SPiDER- β Gal を提供していただきました。当時は、全く研究が上手くいっておりませんでした。この基質のおかげで突破口を開くことができました。それ以降も、学会でお会いした時などには、研究を応援してくださり大変励みになりました。どうもありがとうございました。

甲南大学の三好大輔教授、並びに、杉本直己教授、建石寿枝講師には、後半の研究テーマで重要な分子クラウディング効果に関する情報を数多くいただきました。特に、教えていただいたオスモライトを用いることで、目的であった活性化効果を見つけることができました。どうもありがとうございました。

また、社会人として働く傍らで、博士論文の執筆を許可して下さった、アボットジャパン株式会社の吉村徹所長と千葉陵太郎研究員にも深く感謝いたします。これからもアボットジャパンの研究開発に貢献していけるよう精一杯努力して参ります。今後も何卒よろしく願います。

野地研究室で研究を始めてから7年間が経ちました。前半の3年間は、研究もある程度上手く進み、深く悩むことはありませんでした。しかし、後半の博士課程では上手くいかないことだらけで、体力的にも精神的にも辛い日々でした。夜中まで実験しても何も成果が出ない日が続いた時期には、自分の情けなさや無能さに嫌気がさし、博士号を取得するのにふさわしくないと落ち込んでばかりいました。しかし、今振り返るとそれは、人生をかけて自らの研究に没頭していたことの証でもありました。今まで目標も持たずなんとなく生きてきた私にとって、本気で取り組めることを見つけられたこの7年間は、決して無駄ではありませんでした。研究成果としては、納得のできるものは残せませんでしたが、この悔しさと、ここで学んだ数えきれない程多くの教訓を胸に、社会の役に立てる人間になれるよう、懸命に励んでまいります。

最後になりますが、大学院への進学を快く後押ししてくれ、今も単身赴任という形で家族を支えてくれる父、夕飯・お昼のお弁当作りやその他あらゆる家事を担い、生活面でいつもサポートしてくれた母、夢を追って留学中の妹、遠くからいつも応援してくれる仙台と長野の祖父母・叔母、18年間ずっと一緒のマロン、天国のノア、みなさんの支えによって、長い学生生活を無事に納めることができました。本当にありがとうございました。これからは私がみなさんを助けられるよう、一生懸命努力していきます。今後もどうぞよろしく願います。

平成30年11月30日 提出

平成31年 2月15日 改訂

森泉 芳樹