

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 森泉 芳樹

1 序論

生命科学において、注目する生命現象を関係する要素のみで試験管内再構成し、必要最小限の要素を決定するとともに、その特性を解明する“*in vitro*”な研究手法は、生細胞を解析する研究手法と相補的な関係にあり、不可欠な研究アプローチである。近年、*in vitro*再構成技術は急速に進化しており、細胞サイズの微小容器内で細胞内反応を再構成した「人工細胞」の研究が盛んになっている。しかし、無生物分子から「自律的に自己複製する人工細胞」を *in vitro*再構成することは、未だに達成されていない。生きた細胞と人工細胞の大きな違いの一つに、細胞質の分子濃度がある。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にも達しており、非常に混み合った環境にある¹。この状態を、分子クラウディング状態と呼ぶ。これによって個々の生体分子が存在できる体積は減少し、分子運動の制限や活量の低下が起きるため、細胞質は希薄溶液とは異なる環境にある。一方、人工細胞は、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。そのため、細胞内のクラウディング状態を再構成できれば、より生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、異なる二つの方法で、クラウディング状態を維持した人工細胞の作製を試み、その遺伝子発現活性の評価を行うことで、人工細胞におけるクラウディングの役割について議論した。

2 大腸菌と微細加工デバイスの融合による Hybrid 型人工細胞

2.1 背景

これまでの人工細胞研究では、細胞を構成する要素全てを細胞サイズの人工細胞リアクタ中に導入するために、生きた細胞の細胞抽出液を再構成する方法が用いられてきた。しかし、一般的な細胞抽出液の調製法では、細胞質は約10分の1に希釈される²。これに対して、生きた細胞の細胞質を反応容器内に直接封入できれば、希釈を最小限に抑え、クラウディング状態が維持された人工細胞を作ることができるはずである。これに基づき、我々は独自の微細加工デバイスを用いた人工細胞を作製した。

2.2 手法

我々は先行研究で、体積がフェムトリットルサイズの微小反応容器（チャンバー）を約百万個アレイ状に配置し、各チャンバーの開口部に脂質二重膜を張ることが可能な Arrayed Lipid Bilayer Chamber system (ALBiC) を開発した³ (図 1a、b)。これを人工細胞リアクタとして用いた。酵素反応で大腸菌の細胞壁を分解し、細胞膜のみのプロトプラスト状態を作る。これが ALBiC の脂質二重膜と膜融合を起こすと、チャンバー内に大腸菌の細胞質が入り、人工細胞が再構成される (図 1c)。膜融合を用いたことで、細胞質の希釈を最小限に抑えられる上、細胞の生命活動に必要な膜成分も再構成できる点で、これまでの報告例と大きく異なる。我々は、この人工細胞を “Hybrid cell” と呼び、融合現象やその遺伝子発現活性を調べた。

2.3 結果

■ Hybrid cell の遺伝子発現活性の評価

Hybrid cell の生理活性を評価するために、遺伝子発現活性を調べた。予め酵素 β -galactosidase (β -gal) をコードした DNA をチャンバー内に封入し、そこに β -gal を発現しない大腸菌を融合させた。 β -gal に分解されると蛍光を示す基質 SPiDER- β Gal をチャンバー内に入れることで、蛍光の有無から Hybrid cell の遺伝子発現活性を評価できる⁴。結果、全体の 20.9% の Hybrid cell が蛍光を示し (図 2)、つまり、約 20% の確率で Hybrid cell が遺伝子発現活性を持つことが明らかになった。

■ 細胞質の希釈割合と遺伝子発現活性の関係

Hybrid cell の特長を評価するために、遺伝子発現活性と希釈割合の同時評価を行い、その相関を調べた。予めチャンバー内に封入した蛍光色素 Alexa405 の蛍光が、融合後にどの程度下がったかによって、各 Hybrid cell 内の溶液が希釈された割合を見積もった。遺伝子発現活性は SPiDER- β Gal を用いて評価した。その結果、Hybrid cell の希釈の割合と発現活性の間に明確な相関は得られなかった。

2.4 考察

大腸菌の微小チャンバーへの膜融合によって、希釈の小さな人工細胞の作製に成功した。しかし、遺伝子発現活性を調べたところ、約 20% の Hybrid cell にしか活性がなかった。活性の有無と希釈割合の相関を調べたところ、明確な相関関係は見つからなかったため、遺伝子発現活性が維持された Hybrid cell が少ない原因は、希釈以外にあることが示唆された。

3 オスモライト化合物と無細胞タンパク質合成系を用いた細胞内クラウディング環境の評価

3.1 背景

遺伝子発現反応を直接評価するために、本章では、遺伝子発現に必要な要素を全て精製・再構成した反応系である PURE システム (Protein synthesis Using Recombinant systems)⁵ を用いた分子クラウディング環境の評価を行った。PURE システムは高い反応効率を持つ無細胞タンパク質合成系であるが、その高分子濃度も生細胞の細胞質の 10 分の 1 の低さであるため、ここにクラウディング環境を構築できれば、活性が向上する可能性がある。クラウディング環境構築のために、細胞内に高濃度 (~数百 mM) で存在し、浸透圧調整に寄与する、オスモライトと呼ばれる低分子化合物群を PURE システムに添加した。オスモライトの中にはベタインや trimethylamine *N*-

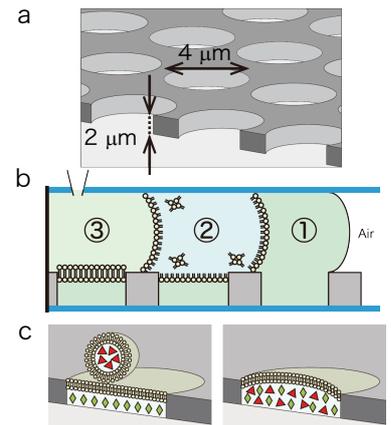


図 1 (a) 微細加工デバイス ALBiC (b) 脂質二重膜の再構成法。Inlet から①水溶液、②脂質を含んだ有機溶媒、③水溶液、を順に流すと、脂質二重膜を再構成できる。(c) 大腸菌融合の概要図。

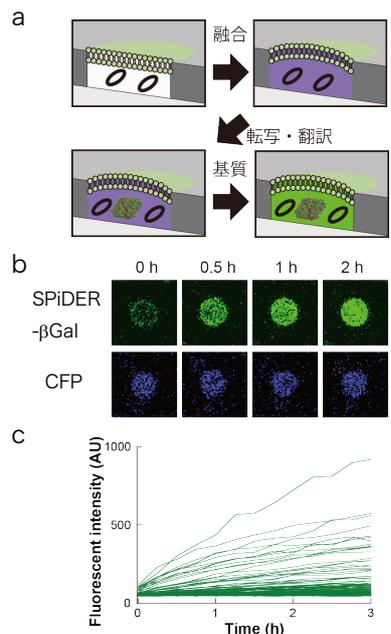


図 2 Hybrid cell の遺伝子発現実験。(a) 実験の概要図。本文参照。

(b) Hybrid cell における SPiDER- β Gal の蛍光強度の変化。CFP 発現大腸菌を融合させているため、CFP の蛍光も同時に観察される。(c) 全 Hybrid cell における SPiDER- β Gal の蛍光強度の時間変化。解析の結果、全体の 20.9% の Hybrid cell で蛍光シグナルが得られていることがわかった。

oxide (TMAO) のようにクラウディング効果でタンパク質を安定化させるものがある。また、オスマライトは核酸分子を安定化させる作用も持っているため、遺伝子発現活性を向上させる可能性があるが、試験管内再構成系の遺伝子発現活性に対するオスマライトのクラウディング効果について調べた研究はほとんどない。

3.2 手法

遺伝子発現量を調べるために、蛍光タンパク質の発現に伴う蛍光上昇の測定、酵素タンパク質発現に伴う蛍光性生成物の測定、そして SDS-page 電気泳動による発現量の定量を行った。オスマライトとして、TMAO とベタインを用い、また、微細加工デバイスの微小チャンバー内に PURE システムを封入させた、人工細胞リアクタにおけるオスマライトの影響も調べた。

3.3 結果

■ オスマライト添加による蛍光タンパク質と酵素の発現量の変化

PURE システムで蛍光タンパク質 Venus を発現させる際、様々な濃度の TMAO とベタインを添加し、その蛍光強度の変化を測定した (図 3)。結果、0.05-0.8 M の TMAO や 0.25-1 M のベタインを添加した際に、蛍光強度の上昇速度と最終強度が増加しており、オスマライト添加によって Venus 発現が活性化されていることがわかった。

さらに、他のタンパク質合成時の影響を調べるために、酵素 β -gal をコードした DNA、 β -gal の蛍光性基質 FDG、そして TMAO とベタインを添加し、蛍光強度の変化を測定した。その結果、0.1-0.4 M TMAO の添加で蛍光強度上昇の開始が早くなり、 β -gal の合成速度が速かったことが示された。しかし、最終的な収量は、0.2 M の TMAO を添加した場合でも、非添加時より小さかった。したがって、TMAO 添加によって β -gal 翻訳反応の初期段階でのみ合成量が上昇したことが示された。

■ SDS-page による、オスマライトが翻訳活性に与える影響の評価

オスマライトの効果がタンパク質の翻訳反応と folding 反応のどちらに影響しているかを調べるために、PURE システムの反応産物を SDS-page で定量した。この方法では、タンパク質は変性された状態で泳動されるので、folding や蛍光タンパク質の maturation の影響を除いて定量できる。PURE システムによる Venus、 β -gal、そしてジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) の発現を TMAO の有無で定量したところ、Venus (図 4) と DHFR では合成速度・最終合成量が共に上昇したのに対して、 β -gal は初期合成速度のみ上昇した。これは、蛍光測定時の評価と同様の結果となった。これにより、翻訳反応はオスマライトによって活性化されていることが示唆された。

■ 人工細胞リアクタの遺伝子発現におけるオスマライト添加の影響

微小チャンバーに PURE システムを封入させた人工細胞リアクタにオスマライトを添加することで、Venus 発現に与えるクラウディングの影響を、顕微鏡観察によって評価した。低濃度の DNA を加えることで、各チャンバーあたり DNA 1-2 分子からの発現が実現する。結果、オスマライトを添加した場合、Venus の発現量が増加した (図 5)。これによって、人工細胞でもオスマライト添加による効果があることが示された。

3.4 考察

0.2-0.4 M の濃度の TMAO 濃度を添加することで、Venus や DHFR のタンパク質合成活性が上昇したが、さらに濃度を増やすと合成量が下がった。この結果は、クラウディング効果が強すぎると、翻訳反応に関わるタンパク

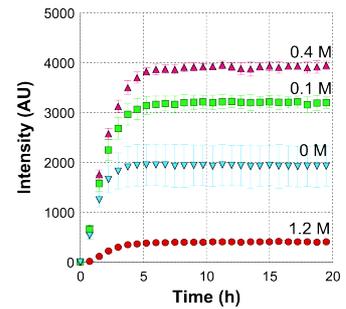


図 3 TMAO 添加による、PURE システムの Venus 発現量の変化。Venus 発現による蛍光の時間変化。数字は添加した TMAO 濃度を表す。エラーバーは標準偏差を表す。

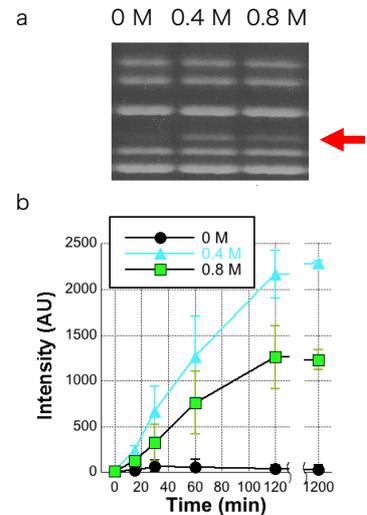


図 4 SDS-page を用いた、PURE システムへの TMAO 添加による各種タンパク質発現量の変化。(a) SDS-page ゲル。例として 30 min における Venus 発現サンプルを泳動したゲル画像を載せた。数字は TMAO 濃度を示し、Venus のバンドは矢印で示されている。その他のバンドは PURE システム構成タンパク質のバンド。

(b) SDS-page のバンド定量による Venus 発現量の時間変化。縦軸はゲルのバンドの強度を表す。

質や核酸の複合体が安定化し、動的解離が抑えられることで合成量が低下したことに原因があると考えられる。一方、 β -gal の合成では、反応初期における合成量のみ増加した。 β -gal は分子量が他よりも5倍以上大きい。分子量が大きい方が翻訳の伸長反応に時間がかかるため、分子クラウディングは伸長反応以外を活性化させている可能性がある。

また、TMAOの方がベタインよりも高い活性化効果を示した。他の先行研究によって、TMAOの方がタンパク質を安定化させる効果が高いという実験結果が得られており、本研究の結果と合致したが、その分子機構はわかっていない。今後、翻訳以外の各反応素過程における評価や計算化学などを併用して詳細を調べる必要がある。

4 総括

本研究では、まず、微細加工デバイスを用いて、細胞質の希釈が抑えられた人工細胞 Hybrid cell を作製した。Hybrid cell に DNA を導入することで遺伝子発現活性を評価し、希釈割合との同時評価法も構築した。Hybrid cell 内には大きな分子を導入できるため、人工ゲノムの物理シミュレータとして用いることが考えられるが、そのためには Hybrid cell の遺伝子発現活性を決定する要因を明らかにする必要がある。

次に、無細胞タンパク質合成系にオスモライトを添加することで分子クラウディング環境を再現し、合成活性に与える影響を調べた。特定のオスモライトを添加することで、タンパク質合成活性を上昇させることが明らかとなった。今後は、オスモライトを利用した、生細胞に近い人工細胞の創生を目指す。

References

[1] Zimmerman, S. B., *J. Mol. Biol.* **222**, 599–620 (1991). [2] Fujiwara, K., *PLoS One* **8**, e54155 (2013). [3] Watanabe, R., *Nat. Commun.* **5**, 4519 (2014). [4] Doura, T., *Angew. Chemie Int. Ed.* **55**, 9620–9624 (2016). [5] Shimizu, Y., *Nat. Biotechnol.* **19**, 751–755 (2001).

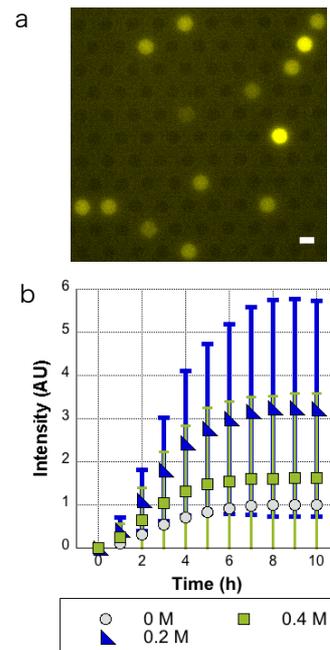


図 5 人工細胞リアクタ内の翻訳活性とオスモライト添加時の変化。(a) Venus を発現させた人工細胞リアクタを撮影した顕微鏡画像。スケールバーは 5 μ m。(b) オスモライト濃度を変えた場合の蛍光強度の時間変化。y 軸の値は、各条件における光るチャンパーの蛍光強度の合計 (0 M 条件での最終蛍光強度値を 1 として補正した)。凡例は TMAO の濃度、エラーバーは標準偏差を示す。