

審査の結果の要旨

氏名 森泉 芳樹

注目する生命現象を試験管内再構成し、その特性を解明する“*in vitro*”な研究手法は、今日の生命科学において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、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」が実現している。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。細胞内は生体分子の質量濃度が 300 mg/ml にも達する、非常に混み合った環境にある。この状態は分子クラウディング状態と呼ばれ、希薄溶液とは異なる物性を細胞質にもたらし、複雑な反応系を実現する要因となっている。一方、人工細胞は、細胞質よりも希薄な溶液でできているため、分子クラウディング状態が再現されていない。この状態を再現した人工細胞を構築することで、生細胞と同等に高い生理活性を持つ人工細胞が構築できると期待されている。本論文では、異なる二つの方法で、分子クラウディング状態を維持した人工細胞を作製し、その遺伝子発現活性を評価することで、人工細胞における分子クラウディングの影響について研究した。本論文の内容は以下の4章から構成されている。

第1章では、序論として、研究の背景や目的について説明した。これまでに報告されてきた *in vitro*再構成や人工細胞系に関して、その利点や課題を議論した。さらに、先行研究によって判明した、分子クラウディング状態が引き起こす物性の変化についても説明した。

第2章では、大腸菌と微細加工デバイスの融合による Hybrid 型人工細胞の開発について報告した。細胞質が希釈されない人工細胞を構築するために、脂質二重膜が再構成された微小チャンバーを持つデバイス、Arrayed Lipid Bilayer Chamber system (ALBiC) に、生きた大腸菌の細胞質を直接融合させることで、人工細胞“Hybrid cell”を開発した。本章では、融合現象やその生理活性が検証された。蛍光タンパク質や蛍光色素を用いて大腸菌やチャンバーを可視化し、共焦点顕微鏡を用いることで、融合現象を詳細に解析した。また、Hybrid cell に外部から遺伝子を導入したところ、タンパク質の発現が検出され、

遺伝子発現活性の存在が確かめられた。Hybrid cell の特長を評価するために、遺伝子発現活性と細胞質の希釈割合の同時評価を行ったところ、両者に明確な相関は観察されず、常に一定の遺伝子発現活性が得られた。したがって、Hybrid cell の遺伝子発現活性は細胞質の分子クラウディング状態に大きくは依存しないことを明らかにした。

第3章では、オスモライト化合物と無細胞タンパク質合成系を用いて、遺伝子発現活性に与える分子クラウディング状態の影響について検証した。本章では、遺伝子発現に必要な要素を全て再構成した反応系である PURE システム (Protein synthesis Using Recombinant systems) を用いて遺伝子発現反応を評価した。クラウディング環境構築のために、細胞の浸透圧調整の役割を担う低分子化合物群オスモライトを PURE システムに添加した。このオスモライトはタンパク質を安定化させる作用があるが、これまでにオスモライト存在下での遺伝子発現活性の影響について検証した例は報告されていない。オスモライトである trimethylamine N-oxide (TMAO) やベタインを PURE システムに加えることで、蛍光タンパク質 Venus や酵素 β -galactosidase などの発現量が増加することが判明した。DNA と mRNA の異なるテンプレート遺伝子と、蛍光測定と SDS-PAGE の二種類の定量方法を用いたことで、オスモライト由来の分子クラウディング状態が、遺伝子発現反応の中の翻訳過程を大きく活性化することを明らかにした。また、微小人工細胞リアクタ内における PURE システムの遺伝子発現反応でも、オスモライト添加によって発現活性の上昇が確認できたことから、人工細胞内における一分子 DNA からの遺伝子発現でもオスモライト添加による効果があることが示された。

第4章では、本論文の総括を行っている。さらに、2つの異なる実験から得られた知見を基に、将来の技術発展について議論している。特に、人工合成ゲノムを用いた新規人工細胞の可能性について述べられている。

以上の内容から、本論文は、前例のない手法で構築された人工細胞 Hybrid cell の開発と、オスモライト化合物存在下での遺伝子発現活性の検証を通じて、分子クラウディング状態が遺伝子発現活性におよぼす影響を検証した。ここで得られた知見は、生命科学研究や産業分野で広く用いられる *in vitro* 技術と人工細胞系の性能上昇に貢献すると期待できる。

よって本論文は博士 (工学) の学位請求論文として合格と認められる。