

Title	凍結融解によるリポソーム融合を介した、人工細胞へ の栄養供給法に関する研究
Author(s)	辻, 岳志
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61874
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

凍結融解によるリポソーム融合を介した、 人工細胞への栄養供給法に関する研究

大阪大学大学院生命機能研究科

平成 29 年 3 月

辻 岳志

<u>Abstract</u>

Reconstitution of life-like structure is one of the most challengeable themes for society to elucidate the border between life and non-life. Although many biochemical reactions have been reconstituted inside the artificial lipid-bilayer compartments called liposomes, reactions inside the liposomes were not sustainable and a continuous cell cultivation system had not been reconstructed. Cells can acquire nutrients such as amino acids, nucleotides, and lipids via membrane proteins and they reproduce themselves. However liposome membrane do not have such kinds of pore proteins, and they couldn't take in the biological substrates. In this study, I tried to add liposomes the function to "acquire the nutrients" and "grow-fission of compartments" for constructing artificial cell which can self-reproduce.

For constructing artificial cell which can acquire nutrients and grow-fission, I was focus on liposome fusion. Some of materials for biochemical reactions couldn't pass through the liposome membrane because they are huge like proteins. I expected that liposome fusion can supply such kinds of huge bio materials for inner biochemical reaction via inner contents mixture. I expected that liposome fusion can supply not only nutrients but also lipids for membrane growth which may realize growth-fission of liposomes. In this research, I established the freeze-thaw method for inducing liposome fusion. Concretely, liposome was centrifuged to contact with other liposomes, and freeze-thawed inducing inner contents mixture and membrane lipid mixture among the liposomes. I also supplied nutrients to the three kinds of basic biochemical reactions such as RNA replication, protein synthesize, and RNA self-replication in liposomes via liposome fusion. Also I succeeded to supply nutrients "repetitively" for RNA replication and RNA self-replication compatible with liposome proliferation. To summarize, I established artificial cells which can acquire nutrients via liposome fusion and can self-reproduce.

本論文の要旨

既知の物質を材料として作られた人工細胞を用いて、生命が有する特性が どのようにして生じるのかという、生命と非生命の境界を探る研究がこれまで 行われてきた。脂質二重膜小胞(リポソーム)は、人工細胞のモデルとしてよく用 いられており、細胞と同様に内包された水溶液を外部の環境から切り離す区画 として機能する。このようなリポソーム内ではタンパク質合成やRNA複製など の、生命にとって重要な生化学反応が進行することも報告されており、リポソ ームは実際の細胞のように微小な反応場として機能する。しかし、細胞が膜タ ンパク質などを通して、外部の環境から反応に必要な様々な小分子(基質)を 取り込み、成長・分裂を繰り返しながら自己増殖することができるのに対して、 リポソームはそのような機構を持っていない。そこで、人工細胞を生命に近づ けるためには、「栄養の獲得」と「区画の成長・分裂」という機能を付与する 必要があると私は考えた。

人工細胞の栄養獲得および成長・分裂の手段として、私はリポソーム融合に 着目した。リポソーム同士を融合させることによって二種類の内液の混合が起 こり、一方のリポソームに内包したタンパク質などの膜透過しづらい物質を他 方のリポソームに供給できると期待される。また、リポソーム融合によってリ ポソームの膜を構成する脂質を供給できるため、リポソームの成長と分裂も誘 導できると期待される。本研究ではまず、凍結・融解を介してリポソームを融 合させることを可能にした。具体的には、リポソームを遠心により凝集させた 後に凍結および融解させることで二種類のリポソームの内部溶液および脂質膜 の混合が見られることを発見した。本研究ではさらに、この凍結融解によるリ ポソーム融合を利用して、RNAの複製反応、タンパク質の翻訳反応、そしてRNA の自己複製反応の三種類の生化学反応に対して、栄養を供給できることを実証 した。さらに、RNA複製に対して10回、RNA自己複製反応に対して6回、繰り返 し栄養を供給するとともにリポソームを分裂させることに成功した。以上の結 果から、本研究では、「外部から栄養を獲得し」「自己複製する」人工細胞を 確立した。 目次

<u>第</u> -	-章:緒論	1
1	-1 本研究の背景	1
	1-1-1 構成的アプローチによる生命起源の探求	1
	1-1-2 RNA world 仮説	1
	1-1-3 原始生命の細胞膜モデルとしてのリポソーム	2
	1-1-4 生化学反応を内包したリポソームの構築	3
	1-1-5 自己複製 RNA の進化	4
1	-2 本研究の目的	4
	1-2-1 凍結融解によるリポソーム融合と基質獲得手法の確立	4
	1-2-2 リポソームへ繰り返し栄養を供給することでのリポソーム	ム内反応の
	継続化	6
1	-3 本論文の構成	5
	1-3-1 緒論	5
	1-3-2 リポソームの凍結融解による融合手法の確立	7
	1-3-3 リポソーム融合による生化学反応基質の供給	7
	1-3-4 リポソーム融合による再構成無細胞翻訳系の供給	8
	1-3-5 リポソーム内 RNA 自己複製反応への栄養供給	9
	1-3-6 統括	9
1	-4 参考文献	9
<u>第</u> 二	二章:リポソームの凍結融解による融合手法の確立	13
2-1	概要および本論文での位置づけ	13
2-2	背景	13
	2-2-1 凍結融解によるリポソーム融合の意義	13
	2-2-2 本章の概要	19
2-3	実験材料及び方法	19
	2-3-1 試薬	19

	2-3-2	界面通過法によるリポソーム調製	20
	2-3-3	凍結融解によるリポソーム融合法	23
	2-3-4	フローサイトメーターを用いたリポソーム解析	25
	2-3-5	共焦点レーザー顕微鏡を用いたリポソーム解析	25
2-4	結果	:	26
	2-4-1	凍結融解によるリポソーム内液の混合	26
	2-4-2	凍結融解によるリポソーム膜の融合	36
	2-4-3	凍結融解によるリポソームの大きさの変化と内液の漏出	40
2-5	考察		45
	2-5-1	第二章の結論	45
	2-5-2	凍結融解によるリポソーム内への物質の供給	45
	2-5-3	凍結融解によるリポソーム膜への脂質の供給	46
	2-5-4	まとめと展望	47
参考	蒲 文献		48

第3	三章:リポソーム融合による生化学反応基質の供給	51
3-1	概要および本論文での位置づけ	51
3-2	背景	51
	3-2-1 リポソーム内 RNA 複製反応に対する栄養供給の重要性	51
	3-2-2 RNA 複製反応について	52
	3-2-3 研究における本章の位置づけ	55
3-3	実験材料及び方法	58
	3-3-1 試薬	58
	3-3-2 Primers	58
	3-3-3 界面通過法によるリポソーム調製	58
	3-3-4 凍結融解によるリポソーム融合と RNA 複製反応	59
	3-3-5 凍結融解によるリポソーム融合の十回繰り返し	60
	3-3-6 フローサイトメーターを用いたリポソーム解析	60
	3-3-7 共焦点レーザー顕微鏡観察	61
	3-3-8 逆転写定量 PCR	61

3-4	結果		64
	3-4-1	凍結融解法による NTP と RNA 複製酵素の供給	64
	3-4-2	フローサイトメーターによる凍結融解後の RNA 複製量の解析	66
	3-4-3	共焦点レーザー顕微鏡による RNA 複製の観察	72
	3-4-4	リポソーム内 RNA の分配	72
	3-4-5	リポソーム内 RNA 複製反応の 10 回植え継ぎ	76
3-5	考察		80
	3-5-1	リポソーム融合による内部反応への基質供給と区画の増殖	80
	3-5-2	凍結融解を繰り返した際のリポソームの大きさの変化	81
	3-5-3	原始細胞における凍結融解による融合・基質獲得の可能性	82
	3-5-4	まとめと展望	83
参考	参考文献		83

<u>第</u> [四章:リポソーム融合による再構成無細胞翻訳系の供給	85
4-1	概要および本論文での位置づけ	85
4-2	背景	85
	4-2-1 再構成無細胞翻訳系による GFP 合成	85
	4-2-2 研究における本章の位置づけ	88
4-3	実験材料及び方法	88
	4-3-1 試薬	88
	4-3-2 Primers	89
	4-3-3 プラスミド構築と RNA 合成	89
	4-3-4 再構成無細胞翻訳系によるタンパク質合成	90
	4-3-5 界面通過法によるリポソーム調製	90
	4-3-6 凍結融解によるリポソーム融合法	91
	4-3-7 フローサイトメーターを用いたリポソーム解析	91
	3-3-8 共焦点レーザー顕微鏡を用いたリポソーム解析	91
4-4	結果	92
	4-4-1 凍結融解法による再構成無細胞翻訳系の供給	92
4-5	考察	96

4-5-1	再構成無細胞翻訳系の供給効率	96
4-5-2	凍結融解によるリポソーム融合の人工細胞構築における重要性	97
4-5-3	まとめと展望	98
参考文献		98

<u>第</u> 3	五章:リポソーム内 RNA 自己複製反応への栄養供給	99
5-1	概要および本論文での位置づけ	99
5-2	背景	99
	5-2-1 再構成無細胞翻訳系を用いた RNA 自己複製反応	99
	5-2-2 研究における本章の位置づけ	101
5-3	実験材料及び方法	101
	5-3-1 試薬	101
	5-3-2 Primers	102
	5-3-3 再構成無細胞翻訳系を用いた RNA 自己複製系	102
	5-3-4 界面通過法によるリポソーム調製	105
	5-3-5 凍結融解によるリポソーム融合	106
	5-3-6 逆転写定量 PCR	106
5-4	結果	108
	5-4-1 リポソーム内 RNA 自己複製反応への栄養供給	108
	5-4-2 RNA 自己複製反応を内包したリポソームの六世代植え継ぎ	102
5-5	考察	114
	5-5-1 リポソーム融合による RNA 自己複製反応に対する栄養供給	114
	5-5-2 RNA 自己複製反応を内包したリポソームの植え継ぎ	114
	5-5-3 自己複製する人工細胞を用いた初期生命の進化能の検証	115
	5-5-4 まとめと展望	116
参考	う 文献	117

第六章:統括	119
6-1 本論文のまとめ	119
6-2 最後に	120

第一章:緒論

1-1 本研究の背景

1-1-1 構成的アプローチによる生命起源の探求

原始地球における生命の起源とはどのようなものであったのか。それは、今 ではもう確認することのできない、人類にとって最も興味深い疑問の一つであ る。今の地球上には過去から現在にかけて複雑化し、高機能化した様々な生物 種が存在している。それらは共通の原始的祖先をもっていると言われているが そのような原始生命は現存しておらず、どのようなものであったのかは推測の 域を出ない。近年、原始生命の誕生過程を理解するために様々な試みがされて いる。その一つの方法として、現存する生命の遺伝子配列を解析し、それらの 相同性、共通性から系統樹を描き、その根幹にある共通祖先を導き出す方法が 挙げられる。その一例として、真核生物のだノム配列を用いて、共通のタンパ ク質の配列を比較することで真核生物の起源を探る試みが報告されている[1]。 一方で、このように現在の生物から過去を推測するのではなく、生命の特徴を 持つ構造体を既知の化学物質から組み立てていく構成的アプローチにより、人 工的に生命の特性を持つ構造体を作り、それによって生命と非生命の境界につ いて知見を得ようとする試みがなされている[2,3]。

1-1-2 RNA world 仮説

原始的な生命を再構築する際に、原始生命はどのような形質であったのかを 知る必要がある。現在、生命の起源の一つとして RNA world 仮説が提唱されて いる[4]。RNA は現在の生物では DNA から転写されタンパク質の翻訳を仲介し たり(Messenger RNA)、タンパク質の合成時にアミノ酸と結合し、必要なアミノ 酸を Messenger RNA のコドンに対応する順番で運搬したり(Transfer RNA)する機 能を持っている。これは DNA が非常に安定的な構造を持っているのに対して RNA は分解されやすい性質を持っており、必要な時に合成され、そして分解さ れるという代謝反応に適しているためであると考えられている。しかし、原始 生命では、現存の生物のように DNA や RNA がタンパク質の遺伝情報を保持し、 生化学反応をタンパク質が触媒していたのではなく、RNA が遺伝子として働く と同時にタンパク質の機能を持っていたのではないかと考えられている。この ような生化学反応を触媒する RNA はリボザイムと呼ばれ、これまで様々な機能 を持つリボザイムが報告されており、リボザイムによって遺伝情報が維持・複 製されていたのではないかと考えられている[5]。その一つの例として、RNA 自 身を複製するリボザイムの存在が挙げられる[6]。このような自己複製 RNA は、 生物に必要な機能とされている「遺伝情報の保持」と「生化学反応を触媒する 機能」を兼ね備えており、生命の起源を研究する際に注目されている。

生命としての特性として遺伝情報を保持し、自己複製によって子孫に受け継 いでいく性質が挙げられる。しかし、リボザイムが生命の起源であると考えた 時に、RNA は不安定な分子であり分解されやすいため、遺伝情報の保持には適 していないという問題が挙げられた。そこで、初めは比較的安定的に存在する ことのできる氷点下の環境で、リボザイムとして機能していたのではないかと 考えられている[7]。外環境が凍結すると、液体状態の溶媒が減少するため、溶 媒に溶けた溶質が濃縮されると考えられる。これにより溶媒に溶けた RNA 同士 が濃縮され区画化されるのと同様の状態となり、複製機能を持ったリボザイム が出現することで RNA の自己複製が始まったのではないかと考えられている。 そして、生化学反応を触媒する機能がより多様な構造をとり様々な活性を持ち うるタンパク質へと置き換わっていき、遺伝情報の保持はより安定的な核酸で ある DNA に変化していったのではないかと考えられている[8]。

1-1-3 原始生命の細胞膜モデルとしてのリポソーム

生物はリボザイムやタンパク質、遺伝子など生化学反応に必要な物質を脂質 膜によって外環境から隔てることで濃縮し、生化学反応を効率的に進めている。 このような区画として生物はリン脂質や膜タンパク質などから構成される細胞 膜を共通の構造物として備えている。そして生物は細胞膜を境界として、細胞 外とは異なる環境を細胞内で維持している。人工的に生命を再構築することで 生命の起源を理解しようという目的で、リン脂質から成る人工的な脂質二重膜 小胞(リポソーム)が細胞膜のモデルとして用いられている。リポソームは Bangham らによって発見され[9]、その後、脂質を用いて人工的に調製する方法 が開発された。リポソームは細胞膜と同様にリン脂質によって構成することが でき、生物の細胞膜を貫通するようなチャネルやポンプといった膜タンパク質 をリポソーム膜上で再構築することが可能である[10]ため、リポソームを細胞膜 モデルとして用いた研究が多くされている[11]。

1-1-4 生化学反応を内包したリポソームの構築

人工的に生命の特性を持った構造体を再構築し、それによって生命と非生命 の違いを明らかにすることを目指して、リポソームを細胞膜モデルとして用い、 その内側において様々な生化学反応を再構築した報告がされている。その中で も全ての生物に共通してみられる遺伝子の複製反応とタンパク質の合成反応は 特に重要な生化学反応である。遺伝子の複製反応に関しては、これまでに RNA 複製酵素(Polynucleotide phosphorylase)を用いて、リポソーム内での RNA の複製 反応の再構築に成功した報告がされている[12]。タンパク質の合成反応について も、大腸菌からタンパク質の翻訳反応に必要なタンパク質を精製した無細胞翻 訳系が構築されており[13]、それを用いて細胞外で RNA や DNA の遺伝情報か らタンパク質合成する反応を人工的に再構築することに成功している。人工的 に生命を再構築することで生命の起源を理解するためには、生化学反応に用い る全ての要素が既知であることが望ましい。このような目的に対しても、個々 の精製タンパク質を既知濃度で混合した再構成無細胞翻訳系が開発されている [14]。当研究室ではその再構成無細胞翻訳系を改良し、タンパク質の翻訳能の向 上に成功している[15]。そして、このような再構成無細胞翻訳系を用いることで、 リポソーム内でのタンパク質の翻訳反応の再構築に成功しており[16]、タンパク 質の翻訳能を有する人工細胞がこれまでに構築された。また Qβ-virus 由来の RNA 複製酵素である Qβ-replicase の遺伝情報を持った RNA と再構成無細胞翻訳 系を混合することで、RNA から RNA 複製酵素を翻訳させ、翻訳された酵素に よって RNA が複製する RNA の自己複製反応がリポソーム内で再構築されてい る[16]。このように、これまでに遺伝子の複製反応とタンパク質の合成反応、そ してそれらを組み合わせた遺伝子の自己複製反応について、それらに必要な分 子をリポソームに内封することによる反応の再構築が達成された。

1-1-5 自己複製 RNA の進化

遺伝子は自己複製する際に変異が入り、その変異が蓄積することで遺伝情報 が変化していき、様々な機能を持つリボザイムやタンパク質が作られてきたと 考えられている。現在の生命は、外部から栄養を獲得し遺伝子を複製するとき に変異が蓄積していき、それによって環境に合わせて進化することが可能とな っている。このような進化能は原始生命も持っていたと考えられ、進化能を人 工的に再構築し人工細胞に付与することは、生命の起源を明らかにするために 重要である。進化能を人工細胞に付与するためには、人工細胞が「外部から栄 養を獲得することで成長・分裂する」性質と、「遺伝子に変異が入り、翻訳され るタンパク質の機能が遺伝子の生存に関わっている」性質を同時に持たなけれ ばならない。このような進化能を再現する試みとして油中水滴を用いた研究が 挙げられる。油中水滴区画は脂質一重膜によって包まれた微小な生化学反応場 であり、その区画を用いて様々な生化学反応が再構築されている[17-20]。また 油中水滴の区画は撹拌によって他の油中水滴区画と衝突したときに融合し内液 が混合し、そして分裂する特性を持っている。その特性を利用して、外部から 生化学反応に必要な栄養を内包した水滴を供給し、撹拌することで栄養を供給 する手法が確立されている[21]。これにより 1-1-4 で説明した RNA 自己複製反 応に対して栄養を供給し、複製活性の高い RNA 複製酵素の遺伝情報を持つ RNA の取得という、自然選択による進化を実験室内で再現することに成功した[21]。 この成果は、「栄養を供給し」「器が増殖する」特性を付与することで、器を油 中水滴からリポソームに変えても進化能を付与できる可能性を示唆している。 現在の生命は油中ではなく水中で生きているため、リポソームのような細胞と 同様の膜構造を有している器を用いた人工細胞が進化能を持つことは生命の起 源について考察するために重要であると考えられる。

1-2 本研究の目的

1-2-1 凍結融解によるリポソーム融合と基質獲得手法の確立

本研究はリポソームを人工細胞モデルとして用いて、生命が持つ特性のうち「外部から栄養を獲得し」「成長・分裂する」能力を人工細胞に付与すること

で、「自己複製する」人工細胞モデルの構築を目指した。成長・分裂に関しては、 外部から脂質膜の材料である脂肪酸を取り込み膜が伸長し分裂するリポソーム が報告されている[22]。また外部からの栄養獲得手法としては、膜に電荷を持た せてリポソームを融合させる手法[23, 24]や、電気刺激を利用した融合手法 [25-27]などが報告されている。これらの報告では、リポソーム融合後に内液が 混合し、更にタンパク質の翻訳反応に必要な基質や酵素の供給に成功した報告 がされている[24, 28]。また、リポソーム融合だけではなくリポソームが分裂す ることによって脂質膜区画の増殖が達成できることが示されてきた。例えば、 リン脂質でできたリポソームを電気刺激で融合させた後、内封した高分子化合 物によって分裂を誘導した報告がされている[27]。このように内部反応に必要な 基質の供給と、膜の増大に必要な脂質の供給が別々に達成された。しかし、「外 部からの栄養獲得」と「リポソームの成長・分裂」を同時に達成し、かつそれ を繰り返すことで、リポソーム内の反応を長期間継続させるとともにリポソー ムを増殖させることは達成できていなかった。1-1-5 で記述した通り、油中水滴 を用いた系では、油中水滴を含む溶液を撹拌することで油中水滴同士が融合・ 分裂をする性質を活用して、栄養の獲得と区画の増殖を同時に達成し、長期間 RNA 自己複製反応を内包した油中水滴に栄養を供給することで、自然選択によ る進化を人工的に再構築することに成功した[21]。翻って、リポソームにおいて 同様のことを行おうとしたときに、リポソーム内に対して外から物質を供給す ることができず、また容易にリポソームを成長・分裂させることはできない。 これは、リポソームの脂質二重膜が油中水滴の膜に比べてより安定的であり、 リポソーム同士の融合が起こりづらいという性質によるものである。そのため、 リポソームを融合させるには膜を一時的に不安定化させる必要がある。本研究 では遠心によってリポソームを接触させ、凍結融解によって脂質膜の一部を破 壊することで隣接するリポソーム間で融合を促進させられることに着目した。 凍結融解によるリポソーム融合は、任意の時点で融合誘導可能なことに加えて、 電気融合のような特別な装置を必要としない簡便な融合手法であることが利点 である。そこで、凍結融解によってリポソームを融合させる手法を確立し、RNA のような遺伝物質やタンパク質などの巨大な分子量を持つ生化学物質を失活さ せずに供給すると同時に、脂質膜の材料を供給することでリポソームが成長・

分裂すると実証することを本研究の目的の一つとした。

1-2-2 リポソームへ繰り返し栄養を供給することでのリポソーム内反応の継続 化

本研究の二つ目の目的として、1-2-1 で示した凍結融解によるリポソーム融合 を繰り返すことで、外部から栄養を「繰り返し」供給し、生化学物質を内包し たリポソーム数を「分裂によって」増殖させ、リポソームでの生化学内反応を 長期にわたって継続するような「自己複製する」人工細胞モデルを構築するこ とを目指した。近年、リポソーム膜に電荷を持たせて静電気力でリポソームを 接触させ、低 pH 下融合させることで内部の PCR 反応に必要な物質を供給する と同時に、リポソーム膜の材料を供給することで分裂を誘導した報告がされた [29]。これによって、栄養の供給と区画の分裂が同時に達成された。しかし、こ の報告ではこのような栄養の供給と区画の分裂のサイクルを繰り返すことがで きておらず、未だ、リポソームの融合を繰り返すことで内部反応を継続させつ つ器が増殖する人工細胞の構築には至っていない。本研究では、凍結融解によ るリポソーム融合を繰り返すことで、リポソームに対して栄養供給を繰り返し、 内部反応を継続させると同時に生化学反応を内包したリポソームが増殖するこ とを実証することを目的の一つとした。この時、凍結融解によるリポソーム融 合が、同じ刺激によって何度でも融合を誘導できる性質を利用した。これによ って、「繰り返し外部から栄養を獲得する」人工細胞が構築できる。その人工細 胞が遺伝子を持ち、その遺伝子が人工細胞内で複製され、そして成長・分裂す る際に子供人工細胞にその遺伝子が伝播していくことで「進化能を持つ」人工 細部を構築できることが期待される。そこで、1-1-5 で言及した自己複製 RNA を用いた RNA 自己複製反応をモデル反応とし、リポソーム型人工細胞内での遺 伝子進化を実証するための人工細胞の確立を目指した。

1-3 本論文の構成

1-3-1 緒論

第一章では、本研究における背景と目的を述べる。

1-3-2 リポソームの凍結融解による融合手法の確立

第二章では、基質および脂質といった栄養を外部から獲得する能力をリポソ ームに付与することに取り組んだ。基質はリポソーム内で生化学反応を継続す るために必要な成分であり、脂質は生化学反応の反応場であるリポソームを構 成する材料として必要である。まず、凍結融解によってリポソームが融合し、 基質および脂質を供給できるということを示すために、蛍光物質を用いてリポ ソームの内液の混合とリポソームの脂質膜の混合を評価する手法を検討した。 具体的には、内液混合の観測には二種類の蛍光タンパク質を指標として用い、 <u> 膜融合の観測には二種類の蛍光脂質を指標として用いた。そしてこれらの蛍光</u> 物質の検出にフローサイトメーターを用いることで、リポソームごとの内液の 混合比率や脂質膜の混合比率、リポソームの大きさを解析し、凍結融解前後で のリポソームの変化を調べた。生化学反応に必要な栄養を供給し、反応を駆動 させるためには、目的の要素を想定通りの量で供給しなくてはならないため、 凍結融解前後のリポソームの融合率だけではなく、内液の漏洩やリポソームの サイズ変化にも着目して解析を行った。その結果、凍結融解によって内液の50% が外液に漏れるものの、蛍光タンパク質の混合および脂質膜の混合が起こるこ とが分かり、リポソームが凍結融解によって融合することを実証した。

1-3-3 リポソーム融合による生化学反応基質の供給

第三章では、凍結融解によるリポソーム融合を利用し、RNA の複製反応に必要な基質の供給と、繰り返し基質を供給できるかについて検討した。本章では、 生化学反応をモデルとしてリポソーム融合によってタンパク質を失活させずに 供給することと、そしてリポソーム融合による供給を繰り返すことを目的とし た。具体的には、RNA の材料である核酸(NTP)と RNA 複製反応を触媒する酵素 (Qβ-replicase)をリポソームに封入し、それらをリポソーム融合によって供給した。 RNA の複製については SYBR-Green II を利用し、SYBR の蛍光強度を指標にフ ローサイトメーターで検出することで、リポソームごとの複製量の解析やリポ ソーム融合後に RNA 複製反応を内包したリポソームの割合などの解析を行った。 更に、RNA の複製反応がリポソームの中で起こっているのかについては共焦点 蛍光顕微鏡で観察をした。その結果、リポソーム融合後に RNA がリポソーム内

で複製されたことが分かった。次に、凍結融解によるリポソーム融合によって 基質を繰り返し供給することができるかどうかについて検討を行った。リポソ ーム融合を繰り返した際に、内部反応が継続するだけでなく、RNA 複製反応を 内包したリポソームの割合を維持し、反応区画であるリポソームの大きさが変 わらないことが長期的に栄養供給するためには望ましい。そこで、リポソーム 内 RNA 複製後に、リポソーム融合をするという操作を繰り返した時に、リポソ ーム内の RNA 複製反応が継続するか、リポソームの大きさが融合を繰り返すこ とでどのように変化するか、RNA 複製が行われるリポソームの数はどのように 変化していくかの三点に着目して解析を行った。RNA の複製については前述と 同様、SYBR の蛍光強度を指標にフローサイトメーターで検出し解析をした。そ の結果、リポソーム融合を繰り返すことでリポソーム内 RNA 複製反応を継続さ せることを達成し、その際にリポソームが分裂し RNA が子供リポソームに伝播 することを示した。以上の結果から、この章では生物にとって重要な生化学反 応の一つである遺伝子の複製反応をモデルとして、凍結融解によるリポソーム 融合によって酵素のような巨大分子を、失活させずに供給することを達成した。 またリポソーム融合を繰り返し、基質を繰り返し供給することで生化学反応を 長期間継続することが可能となった。

1-3-4 リポソーム融合による再構成無細胞翻訳系の供給

第四章では、凍結融解によるリポソーム融合によって再構成無細胞翻訳系が 供給できるかどうかについて検討を行った。タンパク質の翻訳反応は RNA の複 製反応と同様、全ての生物に共通してみられる重要な生化学反応の一つである。 本章ではタンパク質の翻訳反応に必要な再構成無細胞翻訳系を構成する諸要素 の内、特にリボソームなどの巨大分子 40 種類について失活させずに供給できる かどうかを検討した。この時、翻訳するタンパク質として、蛍光を検出するこ とで翻訳の有無の測定が容易な緑色蛍光タンパク質 GFP を用いた。GFP の蛍光 強度を指標として、リポソーム融合後に翻訳が起こったかをフローサイトメー ターおよび共焦点蛍光顕微鏡を用いて解析と観察を行った。その結果、凍結融 解後に再構成無細胞翻訳系が供給され、リポソーム内で GFP の翻訳反応が起こ ったことを示した。本章では、これまで失活させずに繰り返し供給することが 困難であった再構成無細胞翻訳系を、凍結融解によるリポソーム融合という繰 り返し栄養を供給できる手法で供給し、リポソーム内でタンパク質の翻訳が起 こることを示した。

1-3-5 リポソーム内 RNA 自己複製反応への栄養供給

第五章では、RNA 自己複製反応を内包したリポソームに対して、凍結融解に よって再構成無細胞翻訳系を繰り返し供給できるか検討を行った。第三章にお いて遺伝情報の複製能と栄養獲得能を持つ人工細胞モデルを構築し、第四章に おいてタンパク質の翻訳能と栄養獲得能を持つ人工細胞モデル構築した。本章 では、それらを組み合わせることで「進化能を持つ」人工細胞を構築すること を目的に、遺伝情報の複製・タンパク質の翻訳、そしてそれらの反応に必要な 基質をリポソーム融合で獲得する人工細胞モデルの構築を目指した。再構成無 細胞翻訳系の供給に関しては第四章で条件検討をした結果を用い、翻訳するタ ンパク質として RNA 複製酵素である Qβ-replicase の β サブユニットを対象とし て、このタンパク質の遺伝情報をコードした RNA を用いた。リポソーム融合に よって RNA を内包したリポソームに再構成無細胞翻訳系が供給されると、RNA 複製酵素が翻訳され、翻訳された酵素によって RNA が複製される。そこで、リ ポソーム融合によって再構成無細胞翻訳系が供給され RNA 複製反応が起こった ことを、複製された RNA を逆転写定量 PCR によって定量することで確認した。 次に、凍結融解によるリポソーム融合により無細胞翻訳系を複数回供給し、リ ポソーム内 RNA 自己複製反応を継続できるかについて調べた。その結果、凍結 融解後に RNA 自己複製反応が起こったことを示し、またその反応を五回以上繰 り返すことができた。以上の結果から、凍結融解によるリポソーム融合によっ て再構成無細胞翻訳系を繰り返し供給し、リポソーム内 RNA 自己複製反応を継 続できることを実証した。

1-3-6 総括

第六章では本研究のまとめと今後の展望について述べる。

1-4 参考文献

- Pisani, D., J.A. Cotton, and J.O. McInerney, Supertrees disentangle the chimerical origin of eukaryotic genomes. Mol Biol Evol, 2007. 24(8): p. 1752-60.
- Luisi, P.L., F. Ferri, and P. Stano, Approaches to semi-synthetic minimal cells: a review. Naturwissenschaften, 2006. 93(1): p. 1-13.
- Szostak, J.W., D.P. Bartel, and P.L. Luisi, *Synthesizing life*. Nature, 2001. 409(6818):
 p. 387-90.
- 4. Gilbert, W., Origin of life: The RNA world. Nature, 1986. 319(6055).
- Johnston, W.K., et al., RNA-catalyzed RNA polymerization: accurate and general RNA-templated primer extension. Science, 2001. 292(5520): p. 1319-25.
- Unrau, P.J. and D.P. Bartel, *RNA-catalysed nucleotide synthesis*. Nature, 1998.
 395(6699): p. 260-3.
- 7. Vlassov, A.V., et al., *Ligation activity of fragmented ribozymes in frozen solution: implications for the RNA world.* Nucleic Acids Res, 2004. **32**(9): p. 2966-74.
- 8. Piccirilli, J.A., Origin of life. RNA seeks its maker. Nature, 1995. **376**(6541): p. 548-9.
- Bangham, A.D. and R.W. Horne, NEGATIVE STAINING OF PHOSPHOLIPIDS AND THEIR STRUCTURAL MODIFICATION BY SURFACE-ACTIVE AGENTS AS OBSERVED IN THE ELECTRON MICROSCOPE. J Mol Biol, 1964. 8: p. 660-8.
- Fujii, S., et al., *In vitro evolution of alpha-hemolysin using a liposome display.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(42): p. 16796-801.
- Edidin, M., The state of lipid rafts: from model membranes to cells. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2003. 32: p. 257-83.
- Chakrabarti, A.C., et al., Production of RNA by a polymerase protein encapsulated within phospholipid vesicles. Journal of Molecular Evolution, 1994. 39(6): p. 555-559.
- Pluckthun, A., et al., *In vitro selection and evolution of proteins*. Adv Protein Chem, 2000. 55: p. 367-403.
- Shimizu, Y., et al., *Cell-free translation reconstituted with purified components.* Nat Biotechnol, 2001. 19(8): p. 751-5.
- 15. Kazuta, Y., et al., *Synthesis of milligram quantities of proteins using a reconstituted in vitro protein synthesis system.* J Biosci Bioeng, 2014. **118**(5): p. 554-7.
- Kita, H., et al., Replication of genetic information with self-encoded replicase in liposomes. Chembiochem, 2008. 9(15): p. 2403-10.
- Noireaux, V., et al., Toward an artificial cell based on gene expression in vesicles. Phys Biol, 2005. 2(3): p. P1-8.
- 18. Zepik, H.H. and P. Walde, Achievements and challenges in generating protocell

models. Chembiochem, 2008. **9**(17): p. 2771-2.

- Chiarabelli, C., P. Stano, and P.L. Luisi, *Chemical approaches to synthetic biology*. Curr Opin Biotechnol, 2009. 20(4): p. 492-7.
- Jewett, M.C. and A.C. Forster, Update on designing and building minimal cells. Curr Opin Biotechnol, 2010. 21(5): p. 697-703.
- 21. Ichihashi, N., et al., *Darwinian evolution in a translation-coupled RNA replication system within a cell-like compartment.* Nat Commun, 2013. **4**: p. 2494.
- 22. Zhu, T.F. and J.W. Szostak, *Coupled growth and division of model protocell membranes.* J Am Chem Soc, 2009. **131**(15): p. 5705-13.
- 23. Lei, G. and R.C. MacDonald, 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, 2008. 221(2): p. 97-106.
- 24. Sunami, T., et al., *Detection of association and fusion of giant vesicles using a fluorescence-activated cell sorter.* Langmuir, 2010. **26**(19): p. 15098-103.
- Zimmermann, U. and J. Vienken, *Electric field-induced cell-to-cell fusion*. J Membr Biol, 1982. 67(3): p. 165-82.
- Stoicheva, N.G. and S.W. Hui, *Electrofusion of cell-size liposomes*. Biochim Biophys Acta, 1994. 1195(1): p. 31-8.
- Terasawa, H., et al., Coupling of the fusion and budding of giant phospholipid vesicles containing macromolecules. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. 109(16): p. 5942-7.
- Caschera, F., et al., Programmed vesicle fusion triggers gene expression. Langmuir, 2011. 27(21): p. 13082-90.
- Kurihara, K., et al., A recursive vesicle-based model protocell with a primitive model cell cycle. Nat Commun, 2015. 6: p. 8352.

第二章:リポソームの凍結融解による融合手法の確立

2-1 概要および本論文での位置づけ

本章では、人工細胞モデルとしてよく用いられる脂質二重膜小胞(リポソーム)内に反応基質や生化学反応に関わる酵素や膜の材料となる脂質などの「栄養」を送る手法を開発するために、凍結融解によるリポソーム融合手法を確立した。これまで様々なリポソーム融合法が考案されてきたが、それらの手法に関してリポソーム膜の不可逆的変質や操作の複雑性、融合を繰り返すことができないなどの問題点が挙げられてきた。私はそれらの問題を解決するために、リポソームを融合させる新しい手法として、凍結融解法を開発した。この章では、リポソームに封入した内液が凍結融解後に他のリポソーム内液と混合すること、その際にリポソーム膜の混合も同時に起こることを見出した。これらの結果は凍結融解によってリポソーム同士の融合が起こることを示唆している。この章で得られた知見を用いて、三、四、五章ではリポソーム内でのRNA 複製反応やタンパク質の合成反応などの生化学反応に対して基質を供給することを目指した。

2-2 背景

2-2-1 凍結融解によるリポソーム融合の意義

生命と非生命の境界を探るために、人工的に細胞様の区画を構築し、生化学 反応をその区画内で再構築することで、ただの生化学反応と生命の特性を比較 しようとする試みがされている。そのためには、生物が共通して持つ遺伝子の 複製やタンパク質の合成、細胞の成長と分裂といった特性を持つ人工細胞を創 る必要がある。このような人工細胞を構築するために、私たちは、生命にとっ て最も重要な特性の一つである「増殖する」という特性に着目した。人工細胞 の増殖には、(1)外部から内部反応の基質の供給、(2)区画を作るための膜材料の 供給とそれによる区画数の増加、そして(3)それらを繰り返すことができること の三点が重要である。脂肪酸(Fig. 2-1 (A))でできた脂質二重膜の小胞は、外液中

の脂肪酸を取り込んで成長することができ、また外部からのせんだん力で分裂 することができる[1,2]。特に Szostak らは小胞外に脂質膜の材料である脂肪酸を 加えると、脂肪酸小胞が脂肪酸を取り込み成長、分裂する様子を報告した[2,3]。 また、脂肪酸小胞外に RNA 複製に必要な NTP を添加すると、脂肪酸小胞はそ の基質を獲得し、内部で RNA 複製反応が進行することが報告されている[4,5]。 このように、脂肪酸小胞では、内部反応への基質の供給と、反応区画である小 胞の成長と分裂が達成されており、更に外液に基質を加えているために、この ような物質の供給が継続的に可能である。しかし、生物の細胞膜はリン脂質(Fig. 2-1 (A))でできているため、脂肪酸でできた人工細胞モデルだけでなく、増殖・ 栄養獲得するリン脂質でできた人工細胞を確立することは生命現象を理解する ために重要であると提言されている[6]。リン脂質を用いて人工的に再構築した リポソームは、人工細胞の区画モデルとしてよく用いられており、小胞内に水 溶液を封入して生化学反応を起こさせることができる[7]。これまで RNA の複製 反応やタンパク質の合成反応など、生物にとって重要な生化学反応がリポソー ム内で再構築されており、人工的な細胞モデルとして多くの研究・報告がされ てきた[8-12]。しかし、そのようなリポソーム内での反応は、内部に封入された 基質を使い尽くすと反応が止まってしまうという問題がある。この基質枯渇は、 リポソームの脂質膜が一部のアミノ酸や核酸などの生化学反応に必要な基質を 透過することができないために起こる。また、脂肪酸と異なり、リン脂質で構 成されたリポソームは、遊離したリン脂質を取り込んで成長することが困難で ある。そのため、リポソームの自発的な成長とそれに伴う分裂を誘導すること は難しいとされている[13]。

14





リポソームに対する栄養供給手法 (A)脂肪酸とリン脂質の構造の違い。脂肪酸 (例:オレイン酸)は、一本の長鎖炭化水素のカルボン酸であり、両親媒性物質と しての性質を持つ。一方でリン脂質(例:POPC)は、グリセリンやスフィンゴシ ンを中心骨格として、二つの脂肪酸とリン酸が結合している。(B)膜タンパク質を 用いたリポソーム内への物質輸送。膜タンパク質をリポソーム膜に挿入すること で、外部に添加した基質が小孔を通ってリポソーム内に取り込まれる。(C)リポソ ーム融合による内液の供給。リポソームを混合し、リポソームを接触させた後、膜 の一部を破壊することで、近接するリポソーム間で膜の再編成が起こり、異なるリ ポソームが融合する。リポソームの融合は内液の混合と膜の混合が起こる。

これまでに、生物が持つ「栄養獲得性」を人工細胞に付与するために大きく 二つの手法が用いられてきた。一つはリポソーム膜に穴を形成する膜タンパク 質を挿入する手法であり、もう一つは基質を封入したリポソームを融合させる ことで、リポソームに内封した基質を供給する手法である(Fig. 2-1)。前者の研究 の成果として、膜タンパク質の一つである α ヘモリシンをリポソーム膜に挿入 し、7量体である小孔を膜上で再構成し、外部から 0.6 kDa のタンパク質をリポ ソーム内へ供給した報告がされている[14]。しかし、この手法の問題点としては、 リポソーム内の物質が小孔を通って外に出てしまう点や、リポソーム膜上での 小孔の形成が非常に困難であるといった点、そして、酵素などの巨大分子を、 小孔を介して供給することはまだ困難である点が挙げられている[14]。後者の研 究の成果として、リポソーム膜に電荷を付与することでリポソーム同士の接着 と融合を促進する手法[15, 16] (Fig. 2-2(A))や交流電圧によるリポソームの整列 と直流電圧による膜の破壊によって融合させる手法などが考案されてきた [17-19](Fig. 2-2(B))。これらのリポソームの融合により基質を供給する手法には、 膜タンパク質の小孔を通過できないタンパク質のような巨大分子も供給するこ とができるという長所がある。また、リポソーム同士の融合によってリポソー ム膜を同時に供給するため、リポソームの成長と分裂を誘導しうる。実際に、 電気融合によってリポソームを融合させた際、リポソームの体積に対してリポ ソーム膜の面積が過剰になると、リポソームが分裂する現象が報告されている [19]。ただし、これらのリポソーム融合手法の短所として、リポソームを融合さ せる際にリポソーム膜が一部破壊され、リポソームの破裂や内液の漏洩が起こ ることが挙げられる[17]。また、例えばリポソーム膜に電荷を持つ脂質を混ぜ、 リポソーム膜の静電気力を利用してリポソームの融合を誘導する手法では、リ ポソーム融合前はどちらか一方の電荷しかもっていなかったのに対し、融合後 には両電荷を持っているといった、融合前後で膜の不可逆的変化が起こるため 融合を何度も繰り返せないという問題[15, 16]がある。また、電気刺激により融 合を誘導する手法では、電圧を印加するため、供給するタンパク質などの生化 学物質が失活してしまう可能性が挙げられる[17,18]。

私は、外部から栄養を獲得させ、人工細胞の成長・分裂を誘導させる、人工 細胞の「培養手法」の確立を目指した。そのために本研究では、1. 複雑な手順 を用いず、2.供給する際に基質の失活を防ぎつつ 3. 繰り返すことのできる融合 手法としてリポソームの凍結融解による融合に着目した。凍結融解によるリポ ソームの融合はこれまで報告されていなかったが、リポソームを凍結融解した 際に、リポソーム数の減少(破裂)やリポソーム膜の一枚膜化(膜の再編集)が起こ ることが報告されている[20, 21]。そこで、リポソーム同士が近接している際に 凍結融解によって膜を破壊することで、隣接する膜同士の再編集が起こり、近 接した膜同士の癒着、混合、そして融合が起こることが期待された。凍結融解 が他の手法と異なる点として、手法として単純である点、熱が発生する刺激を 利用しないため生化学物質の失活が抑えられる点、そしてリポソーム膜の組成 は不変であるために容易に融合操作を繰り返せる点が挙げられる。このような 繰り返すことのできるリポソーム融合手法は、区画の成長・分裂と内部反応の 継続化を同時に満たした人工細胞の「培養」手法として期待される。





Fig. 2-2 リポソームの融合手法例

(A)負電荷を持つオレイン酸と正電荷を持つ DDAB を異なるリポソームに添加 し、膜に電荷を持たせることで、異なる電荷を持つリポソーム同士の接触を促 し融合を誘導する。(B)交流電圧によってリポソームを整列させ(パールチェイ ンの形成)、直流電圧によって膜に穴をあけることで、隣接したリポソーム間で の膜の再編成を誘導しリポソームを融合させる。

2-2-2 本章の概要

本章では、凍結融解によるリポソーム融合を人工細胞に対する栄養供給手法 として用いることができるかどうか、内液および脂質膜の混合を指標として検 討した。まず、リポソームの内液混合の指標として、二種類のリポソームに異 なる二種類の蛍光物質を封入して、凍結融解後にそれらの蛍光物質がどの程度 混合しているか解析した。次に、リポソームの脂質膜混合の指標として、二種 類のリポソームの脂質膜に異なる二種類の蛍光脂質を加え、凍結融解後にそれ らの蛍光脂質がどの程度混合しているか解析した。その結果、凍結融解により、 リポソームの内液および脂質膜が混合することが実験的に示された。

凍結融解によるリポソーム融合を繰り返して栄養を供給する際に、リポソームの破裂および内液漏洩を抑えることは非常に重要である。そこで、凍結融解によってリポソームを融合させる際、リポソームが破裂する割合と、リポソーム内液の漏洩の割合、そしてリポソームの大きさの変化について解析した。凍結融解によりリポソームが融合する際には、膜の再編成が起こると考えられ、リポソームの内液が漏洩すると予想される。リポソーム内液の漏洩が起こることが予想される。そこで、リポソームに内封した蛍光物質の全量を凍結融解前後で比較したところ、-196°C で凍結させた後融解させるとリポソーム内液が50%漏洩したことが分かった。またそれに伴い、リポソームが破裂した結果生まれたと考えられる内液をほとんど持たないリポソームの増加が見られた。さらに、凍結融解の前後でリポソームの大きさを比較した結果、リポソームの大きさが凍結融解後も保たれていることが分かった。以上の結果は、凍結融解によるリポソーム融合を繰り返すためには、内液の漏洩を考慮してリポソーム内に封入する基質量を調整する必要があるが、リポソーム数を維持しつつリポソーム内反応への基質供給が可能であることを示している。

2-3 実験材料及び方法

2-3-1 試薬

1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) (Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL)).

流動パラフィン (0.86-0.89 g/mL at 20°C) (Wako, Osaka, Japan).

Transferrin Alexa Fluor 488 (TA488) (Invitrogen, Carlsbad, CA) (緑色蛍光物質が 結合したタンパク質)

Transferrin Alexa Fluor 647 (TA647) (Invitrogen, Carlsbad, CA). (赤色蛍光物質が 結合したタンパク質)

1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) labeled with ATTO 633 (ATTO 633-DOPE) (ATTO-TEC, Siegen, Germany) (赤色蛍光を示す蛍光脂質)

1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) labeled with ATTO 565 (ATTO 565-DOPE) (ATTO-TEC, Siegen, Germany) (黄色蛍光を示す蛍光脂質) 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) labeled with ATTO 390 (ATTO 390-DOPE) (ATTO-TEC, Siegen, Germany) (紫外蛍光を示す蛍光脂質)

2-3-2 界面通過法によるリポソーム調製

リポソームの調製は過去に報告された界面通過法[22]を私の研究室で目的に 応じて改変した手法[23]を用いて行った(Fig. 2-3)。この手法は、まず脂質を溶か した流動パラフィン(油)の中にリポソームに内封するための水溶液 (水)を加え、 油中水滴を作る。この油中水滴は、脂質一層からなる一重膜を形成している。 その後、流動パラフィンをリポソーム外液(水)に乗せる(Fig. 2-3 (1))。油と水はそ の性質から二層に分離しており、その境界では両親媒性物質である脂質分子が 整列していると考えられている(Fig. 2-3 (2))。この状態で試料を遠心すると、油 中水滴が二層の境界を通り抜ける際に、油中水滴の外側に外膜が形成されるこ とで、脂質二重膜小胞(リポソーム)ができる。

私たちはリン脂質である POPC の粉末をバイアルに分取し、クロロホルムに 終濃度 0.1 mg/μL になるように溶解させた。その後、流動パラフィンに終濃度 5 mg/mL になるように溶解した後、80°C で 30 分保温することでクロロホルムを 蒸発させ、流動パラフィンに脂質を完全に溶かした。POPC を溶解した流動パラ フィンをガラスチューブに 400 μL ずつ分注したのち、それぞれの目的に応じて 以下の操作を行った。

1) リポソーム内封液の混合実験

内封液の混合を観察するための実験では、蛍光脂質である ATTO565-DOPE (ク ロロホルムに 1 mg/ml で溶解させた)を 4 μL 加えて撹拌した後、80°C で 5 分保 温し、氷上で流動パラフィンを冷やした。リポソームの内封液として 50 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 500 mM sucrose, 350 mM potassium glutamate の組成液に終 濃度 1.5 μM となるように TA 488(緑色蛍光物質が結合したタンパク質)または TA 647(赤色蛍光物質が結合したタンパク質)を加えた水溶液を用いた。

2) リポソーム 膜融合実験

蛍光脂質を用いてリポソームの膜が融合しているかどうか確かめた実験の場合、脂質を含有した流動パラフィンをガラスチューブに分注した後、ATTO565(黄色蛍光物質)もしくは ATTO633(赤色蛍光物質)が結合した DOPE を入れ、撹拌した後、80°C で 5 分保温し、氷上で流動パラフィンを冷やした。その後、リポソーム内液としては 50 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 500 mM sucrose, 350 mM potassium glutamate, 1.5 μM TA488 を用いた。内液に加えた TA488 は、リポソームの内部体積の指標として用いた。

それぞれ内封液を 400 μL の脂質含有流動パラフィンに対して 20 μL 加え、40 秒間ボルテックス処理をして油中水滴を作製した。次に、別のエッペンドルフ チューブにあらかじめ用意した 200 μL の 50 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 1 M glucose, 350 mM potassium glutamate 溶液の上に 400 μL の油中水滴溶液を静かに 置き(Fig. 2-3 (1))、18,000 g (14,000 rpm) 30 分 4°C で遠心をした。これにより、油 中水滴は油水境界を通過し脂質外膜を獲得してリポソームが形成される(Fig. 2-3 (3))。次にリポソーム溶液を 18,000 g (14,000 rpm) 5 分 4°C で遠心してリポソ ームを沈殿させ、上澄みを全てマイクロピペットで吸い取った後、30 μL の 50 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 1 M glucose 溶液に交換した。

21



Fig. 2-3 界面通過法によるリポソームの形成

油中水滴を外液(水溶液)の上に乗せ(1)、遠心することで油層と水層の境界で 油中水滴の外に外膜が形成され(2)、脂質二重膜につつまれた小胞(リポソー ム)が作られる(3)。またこの時に作られるリポソームの多くは膜が一枚となっ た一枚膜リポソームである。

2-3-3 凍結融解によるリポソーム融合法

凍結融解によるリポソーム融合法の全体像に関して、概略図をFig. 2-4に示す。 2-3-2 で用意した二種類のリポソームをリポソームの粒子数が 1:1 になるように エッペンドルフチューブ内で混合した後、18,000 g (14,000 rpm) 5 分 4℃ で遠心 してペレット状にした。次に、-20℃(冷凍庫内), -80℃(冷凍庫内), または -196℃(液体窒素中)で 30 分間凍結させた。それらを室温で融解させた後、凍結 融解時に漏洩した内液の成分を取り除くために、リポソーム溶液を 18,000 g (14,000 rpm) 5 分 4℃ で遠心し、その上澄みを 50 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 1 M glucose 溶液と交換した。



膜の小孔を介した内液の交換

Fig. 2-4 凍結融解によるリポソーム融合

凍結融解によるリポソーム融合の概略図。異なるリポソームを混合し、遠心に よってリポソーム同士を接触させた後、リポソームを凍結させ、その後融解さ せた。凍結融解時にリポソーム内から漏れた物質を除くために外液交換をした。

2-3-4 フローサイトメーターを用いたリポソーム解析

フローサイトメーター(FACS Aria II, BD Biosciences, Palo Alto, CA)を用いて、 リポソームの大きさや内液の混合などを解析した。2-3-2 や 2-3-3 で用意したリ ポソーム溶液を希釈液(50 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 1 M glucose)を用いて 1/100 に希釈し、フローサイトメーターで測定を行った。本章では TA488, TA647, ATTO390, ATTO565, ATTO633 のそれぞれの蛍光物質の蛍光量及び、前方散乱光、 側方散乱光を測定することで、リポソームの大きさや数、内封液の混合や脂質 膜の混合など、凍結融解前後のリポソームを多面的に解析した。

TA488 は 488 nm 波長の半導体レーザーで励起させ、蛍光波長を 530±15 nm バ ンドパスフィルター(FITC-A)で検出した。ATTO565 は 488 nm 波長の半導体レー ザーで励起させ、蛍光波長を 585±21 nm バンドパスフィルター(PE-A)で検出し た。TA647 と ATTO633 は 633 nm 波長の HeNe レーザーで励起させ、蛍光波長 を 660±10 nm バンドパスフィルター(APC-A)で検出した。ATTO390 は 375 nm 波長の近紫外レーザーで励起させ、蛍光波長を 450±20 nm バンドパスフィルタ ーで検出した。TA488 と ATTO565 はそれぞれの蛍光波長に蛍光が漏れこんで検 出されることが分かった。そこで、蛍光の漏れこみを補正するための換算式を それぞれ以下のように定義した。

TA488 = [FITC-A] - (0.0043)*[PE-A]

ATTO565 = [PE-A] - (0.205*[FITC-A])

ただし、[FITC-A]と[PE-A]はフローサイトメーターにおけるそれぞれのバンド パスフィルターが検出した蛍光量とした。

2-3-5 共焦点レーザー顕微鏡を用いたリポソーム解析

共焦点レーザー顕微鏡(Leica TCS SP8; Leica Microsystems)を用いた顕微鏡観察 では、TA488, TA647, ATTO565, ATTO633の蛍光について観察を行った。TA488 の蛍光はアルゴンレーザー(488 nm励起光)で励起させ490-550 nmの蛍光を検出 した。ATTO565の蛍光は DPSS レーザー(561 nm 励起光)で励起させ、590-620 nm の蛍光を検出した。TA647 と ATTO633 は HeNe レーザー(633 nm 励起光)で励起 させ、650-710 nm の蛍光を検出した。

2-4 結果

2-4-1 凍結融解によるリポソーム内液の混合

本研究ではリポソーム融合によって、リポソーム内反応に必要な基質の供給 を目指した。その手段として凍結融解によるリポソーム融合に着目した。この 手法では、遠心によってリポソーム同士を接触させた後、リポソーム溶液を凍 結融解させリポソーム膜を部分的に破壊することで、隣接するリポソーム間で 膜が再構成されてつながりリポソームが融合すると予想された(Fig. 2-4)が、これ までそのような報告はなかった。そこで、まず凍結融解によって二種類のリポ ソームの内液が混ざりあうかを調べた。内液混合をフローサイトメーターおよ び共焦点レーザー顕微鏡下で解析をするために二種類のリポソームを用意した。 一方のリポソームには赤色蛍光を示す TA647 を封入し(L1)、もう一方のリポソ ムには緑色蛍光を示す TA488 を封入した(L2)。これら二種類のリポソームを リポソームの粒子数の比が 1:1 になるように混合し、遠心後、凍結融解によって 融合させた。融合後に外液を交換し、フローサイトメーターで解析した。以降 の解析では、TA647 由来の赤色蛍光強度が 70 a.u. 以上を示したリポソームを母 数として解析した。そのため、TA488 のみを加えた L2 リポソームは解析の対象 外とした。

まず、凍結融解によって二種類のリポソームの内液が混合するかどうかについて調べた。凍結融解前に用意した二種類のリポソームについて、内封した蛍光をフローサイトメーターで計測すると、互いの蛍光は別々に検出され漏れこみは見られなかった(Fig. 2-5(A) L1, L2)。L1 と L2 を混ぜたところ、混合前に見られた領域にそれぞれの集団が見られた(Fig. 2-5(A) L1+L2)。次に、18,000 g (14,000 rpm) 5 分 4℃ での遠心操作を加えたところ、Fig. 2-5(A) Centrifuge で見られるように、リポソームを混合しただけの条件(Fig. 2-5(A) L1+L2)と同様の結果となった。これらの結果より、混合および遠心しただけでは二種類のリポソーム間での内液混合は起こらないことが示唆された。次に内液が混合したリポソームの割合を解析した。Fig. 2-5(A)のドット図内で赤いドットとして表している領域(赤色蛍光強度が 70 以上、緑色蛍光強度が 100 以上、赤色蛍光強度が (111*(緑色蛍光強度)-1100) 以下の領域)に存在するリポソームの割合を内液混

合リポソーム率とし (Fig. 2-5(B))、凍結融解後の内液混合リポソーム率を調べた。 凍結による膜の一枚膜化を報告した論文では凍結温度として-196℃(液体窒素) を用いていた[20]ため、リポソーム溶液を遠心した後、液体窒素を用いて凍結さ せた。そして室温で融解させた後にフローサイトメーターでリポソームを測定 すると、Fig. 2-5(A)(B)で見られるように、内液混合リポソーム率は 85.6%であっ た(Fig. 2-5(B) (-196 ℃))。このことより、遠心操作によってリポソームを接触さ せ凍結融解すると異なるリポソーム同士で内液混合が起こることが分かった。

凍結融解後に見られたリポソームの融合現象において、遠心によるリポソームの接触が必要であるかについて調べた。すると、リポソームを遠心せずに -196 ℃ で凍結融解させたリポソームの融合率は 48.1%であった(Fig. 2-5(B) -196 ℃ (no cent.))。遠心の有無で内液混合リポソーム率に大きな差が生じたのは、 リポソーム同士が接触していないと、凍結融解によって膜の一部が破れたとし ても、他のリポソームと膜の再編成が起こらず、脂質膜が修復されるかリポソ ームの破裂のみが起こるからだと考えられる。この結果から、リポソーム間で の融合を促進するためにはリポソームを遠心し接触させることが重要であるこ とが分かった。

リポソーム溶液は-196°C よりも高い温度で凍結することが分かっているため、 凍結時の温度によってリポソームの融合率が変わるかどうかを確かめるために、 -20°C、-80°C の各温度で凍結させた後、室温で融解したリポソームをフローサ イトメーターで計測した。すると、Fig. 2-5(B)で見られるように、各温度で凍結 させたリポソームはそれぞれ、-196°C で見られた 85.6%に近い内液混合リポソ ーム率であった。この結果から、凍結温度に関わらずリポソーム同士を接着さ せ凍結融解させることで、リポソームが融合し、内液の混合が起こることが分 かった。しかしそれぞれの凍結温度条件を比較すると、内液混合リポソーム率 は同程度であったが、二種類の蛍光物質の混合具合が異なっていた。

27





フローサイトメーターを使った凍結融解前後のリポソーム内蛍光物質の解析。 (A)各条件(それぞれの詳細な条件は 2-4-1 で記述した)におけるリポソーム内 蛍光量を 100,000 リポソーム計測した結果。縦軸は L1 リポソームに封入した TA647 の赤色蛍光量、横軸は L2 リポソームに封入した TA488 の緑色蛍光量を 表している。また異なるリポソーム由来の蛍光タンパク質が混合しているリポ ソームを赤色のドットで示した。(B)内液混合が起こったリポソームの割合。縦 軸は、(A)の図で赤色のドットとして示した二種類の蛍光タンパク質がリポソー ム内で混合しているリポソームの割合とした。この時、二種類の蛍光物質をあ らかじめ内封したリポソームは内液混合リポソーム率 99.4%であった。
そこで、次に、リポソームに内封した緑色蛍光物質 TA488 の蛍光強度を TA647 の蛍光強度で割った値を指標として、それぞれの凍結温度条件における二種類 の蛍光物質の混合具合を比較した (Fig. 2-6(A))。以後、TA488/TA647 の値を混合 比率と呼ぶ。二種類の蛍光物質をあらかじめ 1:1 で内封した Positive Control では、 混合比率は 10^{0.3-0.5} がピークとなっていた。この値を二種類の蛍光物質が 1:1 で 混合した時の指標とした。次に、TA647 を封入した L1 と TA488 を封入した L2 を混合した L1+L2 や、混合後に遠心した Centrifuge では、混合比率の対数値 0 未満に単一のピークが見られた。これは TA647 を内包したリポソームを解析対 象としたからだと考えられる。そして、-20 ℃, -80 ℃, -196 ℃ で凍結後、室温で 融解させたリポソームの内液の蛍光物質を計測すると、混合比率の対数値 0.4 か ら 0.5 を中心に、-2 から 2 までの間に広く分布が見られた。これは融合後に異な るリポソーム由来の物質が必ずしもモル比 1:1 で混合しないことを示している。 この理由としては異なる大きさのリポソーム同士が融合した場合に供給される 内液の量比が一定にならない可能性が挙げられる。

人工細胞に対して反応に必要な栄養を供給するためには、リポソーム融合に よって供給する内液量を制御できることが非常に重要である。そこで、混合比 率が 10^{0.3-0.5} を示すリポソーム数の割合を解析することで、異なるリポソーム由 来の物質が 1:1 で混合する確率の高い条件を探索した。その結果、特に-196 ℃ で凍結した場合は、他の条件と比較して、融合後のリポソーム内に存在する蛍 光物質のモル比が 1:1 に近いことが分かった。-196 ℃ で凍結させた場合に、隣 接するリポソームの膜が融合している報告がされている[21]が、それよりも高い 温度で凍結させた場合にリポソーム膜がどの程度破壊され、隣接するリポソー ムと融合するかはわかっていない。しかし、今回の結果より、-196 ℃ で凍結し たときよりも膜の損傷が少なかったため、隣接するリポソーム間での内液交換 頻度が下がった可能性がある。以上の解析結果より、-196 ℃ で凍結したときに 内液の混合比率が 1:1 となるリポソームの割合が高く、融合によって目的の物質 を適切に供給することに適していると考えられる。

29





フローサイトメーターを用いた凍結融解前後のリポソームの内液混合の解析(A)各 条件の混合比率(ーリポソームあたりのTA488 由来の緑色蛍光強度をTA647 由来の 赤色蛍光強度で割った値)比較。横軸を混合比率、縦軸を相対頻度としてヒストグ ラムを作った。この時、リポソームの母集団としてTA647 の蛍光強度が 70 以上の リポソームを対象とした。またここで解析対象とした各条件は Fig 2-5 で解析した リポソームと同様のリポソームである。(B)凍結融解前後のリポソームのうち混合 比率(緑色蛍光強度値を赤色蛍光強度値で割った値)の対数値が 0.3-0.5 であった リポソームの、母集団に対する割合。この時、リポソームの母集団として TA647 の蛍光強度が 70 以上のリポソームを対象とした。またここで解析対象とした各条 件は Fig. 2-5 で解析したリポソームと同様のリポソームである。

これまで行ってきたフローサイトメーターを用いた計測の問題点として、一 つの粒子から二種類の蛍光が検出された場合、リポソームが融合して内液が混 合した場合と、それぞれ異なる蛍光を持った二種類のリポソームが接着してフ ローサイトメーター上で一つのリポソームと誤検出された場合とを区別するこ とが困難であることが挙げられる(Fig. 2-7 (A))。そこで、凍結融解操作前後のリ ポソーム内に封入した蛍光物質について共焦点レーザー顕微鏡を用いてーリポ ソーム単位で観察することで、リポソームの接着かリポソーム融合のどちらが 起こったのかについて調べた。本実験で用いたリポソームは、脂質膜の一部に ATTO565-DOPE という黄色蛍光の脂質を標識として用いており、内液に TA488 および TA647 を加えている。そのため、凍結融解前のL1 とL2 はそれぞれ Fig. 2-7 (B) L1, L2 のようにどちらか一種類の内液の蛍光物質(TA488 または TA647)が蛍 光標識された脂質膜に包まれた形で検出された。これらを混合して 18,000 g (14.000 rpm) 5 分 4℃ の遠心操作を加え、凍結融解をしたリポソームを観察する と Fig. 2-7(B) -196℃ のように、一つのリポソーム内に異なるリポソーム由来の 蛍光物質が同時に存在していることが分かった。この結果から、フローサイト メーターでの測定で見られた異なる蛍光物質が混合したリポソーム(Fig. 2-5 (A))は、異なる二種類のリポソームの接着ではなくリポソーム融合によって内液 が混合したことが確かめられた。以上の結果より、凍結融解によってリポソー ム内液の混合が起こったことが分かった。



Fig. 2-7 共焦点レーザー顕微鏡によるリポソームの解析

凍結融解前後のリポソームの共焦点顕微鏡観察(A)一つのリポソームに緑および 赤色蛍光物質が両方内包されている場合、二種類の蛍光を有した粒子として検 出される。一方、緑および赤色蛍光物質をそれぞれ内包した二種類のリポソー ムが互いに接着していた場合も、二種類の蛍光を有した粒子として検出される。 (B) 異なる蛍光物質を内封したリポソームの共焦点顕微鏡観察。L1, L2 はそれ ぞれ、TA647 を内封したリポソームと TA488(緑色蛍光物質)を内封したリポソ ームを観察した。L1+L2 は L1 と L2 を混ぜ、凍結融解する前のリポソームを観 察した。-196℃は L1 と L2 のリポソームを凍結融解によってリポソーム融合さ せた後のリポソームの顕微鏡写真である。

次に、融解の温度を変えることでリポソームの内液混合に差が出るかどうか について調べた。凍結温度として-20℃, -80℃, -196℃(液体窒素)の三条件に対し て、融解温度として 0℃(氷上), 25℃(室温), 37℃ の三条件を検討した。これらの 9条件を比較すると、凍結温度に依存してリポソームの内液混合の分布は変わっ たが、融解温度を変えてもその分布はほとんど変わらなかった(Fig. 2-8(A))。ま た、凍結温度の比較時と同様に、融解温度を変えると内液が1:1 で混合した際に 算出される混合比率の対数値が 0.3-0.5 を示すリポソームの割合がどう変わるか について調べたところ、融解温度ではほとんど変わらず、凍結温度に依存して 変化することが分かった(Fig. 2-8 (B))。またこの時、-196℃ で凍結すると混合比 率の対数値が 0.3-0.5 を示すリポソームの割合が最も高くなることが分かった。 以上の結果より、融合率については凍結温度と融解温度を変えても大きな違い が見られなかったのに対して、混合比率については凍結温度によって異なるが、 融解温度には依存しないことが分かった。これらの結果は、リポソームの脂質 膜に与える損傷が凍結の温度に依存する可能性を示唆している。凍結温度が高 い時は脂質膜に小さな穴が開くときがあり、隣接するリポソームと物質の混合 が起こる(Fig. 2-4 膜の小孔を介した内液の混合)のに対して、凍結温度が低い時 には脂質膜が大きく破れ、他のリポソームと物質の混合と共に膜の再構成が起 こりやすくなる(Fig.2-4 膜の破壊と再編成)のではないかと考えられる。

これまでの結果から、凍結融解によって内液混合が起こり、-196 ℃で凍結させることにより、異なる二種類の内液が 1:1 で混合する割合が増加することが示唆された。この性質を利用することにより、内液の混合比を制御しつつリポソーム融合によってリポソーム内に基質を供給できるため、人工細胞モデルに対して反応に適した量の基質供給が可能になることが期待される。

33







Fig. 2-8 凍結および融解温度がリポソーム融合に与える影響

様々な凍結・融解温度で融合させたリポソームをフローサイトメーターで測定 した。(A)様々な凍結・融解温度で融合させたリポソームのリポソーム内蛍光物 質をフローサイトメーターで測定した。リポソーム内に封入した蛍光タンパク 質の内、赤色蛍光の強度を縦軸、緑色蛍光の強度を横軸として、一リポソーム あたりに含まれている蛍光タンパク質の蛍光強度を測定した。異なるリポソー ム由来の内液の混合が見られたリポソームは赤色のドットで示した。(B)各条件 における内液混合リポソーム率。様々な凍結・融解温度で融合させたリポソー ムのうち、内液の混合が見られたリポソームの割合を比較した。赤色の棒グラ フは-20℃で凍結したもの、緑色は-80℃で凍結したもの、青色は-196℃で凍結し たものとしている。縦軸は赤色蛍光と緑色蛍光をともに持っているリポソーム の割合(内液混合リポソーム率)とした。(C)各条件で凍結融解した際の異なる リポソーム由来の蛍光タンパク質の緑色蛍光強度を赤色蛍光強度で割った値 (混合比率)をヒストグラムとして表した。それぞれの条件を凍結温度/融解温 度とし、-20℃で凍結したリポソームは赤系統、-80℃で凍結させたリポソームは 緑系統、-196℃で凍結させたリポソームは青系統で表した。縦軸は相対頻度、横 軸は混合比率の対数値とした。

2-4-2 凍結融解によるリポソーム膜の融合

この項では、前項で述べた内液の混合による内封物の供給が、リポソーム融 合によるものか、凍結融解の際に形成された膜上の穴から漏れた内封物が外液 を介して間接的に他のリポソームに移動したことによるものかについて検討し た。リポソーム同士が融合した際、リポソームの膜も混合すると考えられる。 そこで、膜の混合を検出するために二種類のリポソームを用意した。一方のリ ポソーム膜に ATTO 565-DOPE を混合し黄色蛍光に染色した(L1)。もう一方のリ ポソーム膜には ATTO 633-DOPE を混合し赤色蛍光に染色した(L2)。また両方の リポソームには内液の指標として蛍光物質 TA488 を内封した。これら二種類の リポソームを粒子数の比率が 1:1 になるように混合し、凍結融解によって融合さ せた。融合後に外液を交換し、フローサイトメーターで解析した。この時、赤 色蛍光強度(ATTO 633-DOPE 由来)が 10^{3.8} 以上かつ緑色蛍光強度(ATTO 565-DOPE 由来)が 10^{3.2} 以上の領域(以後、膜混合領域と呼ぶ)に属するリポソー ムを膜混合が起こったリポソームとして定義し、その領域に属するリポソーム の割合を脂質膜混合リポソーム率とした。次に、これらを混合すると、Fig. 2-9A L1+L2 で見られるように、脂質膜混合リポソーム率が 3.7% であった。これは、 後程詳しく述べるが、Fig. 2-9(C)においてこのリポソームを共焦点レーザー顕微 鏡で観察した際に、脂質膜が混合したリポソームが見られなかった。そのため、 膜が混合したリポソームではなく、リポソームの脂質膜に微小なリポソームや 脂質の塊が付着したことによって、フローサイトメーター上で膜混合として誤 検出された可能性が考えられる。次に 18,000 g (14,000 rpm) 5 分 4℃ の遠心操作 を加えたところ、Fig. 2-9(A) Centrifuge のように脂質膜混合リポソーム率が 8.6% のリポソームが属していた。次に凍結融解後のリポソームを計測したところ、 Fig. 2-9(A) -20°C -80°C, -196°C で見られるように、各温度において以下のような 差が見られた。-20℃ では脂質膜混合リポソーム率は 4.7%であり、凍結融解を していない Centrifuge の 8.6% と大きな違いが見られなかった(Fig. 2-9(B))。それ に対して-80 ℃では14.3%、-196 ℃では39.8%と、凍結温度を下げていくに従 い凍結融解する前のリポソームに比べて脂質膜混合リポソーム率が有意に増加 した(Fig. 2-9(B))。以上の結果から、凍結温度が低い時には、膜がより大きく壊 れ、隣接するリポソームの脂質膜との膜の再構築が起こる可能性が示唆された。

フローサイトメーターを用いた解析では、リポソーム同士の接着と、二種類 のリポソームの脂質膜混合との区別をつけることが難しい (Fig. 2-7 (A)のフロ ーサイトメーターにおける誤検出は膜蛍光にも同様に適用される)。そこで共焦 点レーザー顕微鏡を用いて凍結融解操作前後のリポソームについて観察した。 この時、フローサイトメーター上で膜混合領域に最も多くリポソームが属して いた-196 °C 条件についてのみ顕微鏡観察を行った。 凍結融解前の L1 と L2 はそ れぞれ Fig. 2-9(C) L1, L2 のようにどちらか一種類の蛍光膜脂質のみが検出され た。L1 と L2 を混ぜた L1+L2 の条件では、異なるリポソーム由来の蛍光脂質が 膜に接着している様子が観察された(Fig. 2-9(C) L1+L2 白矢印)。 フローサイトメ ーターでの測定において、凍結融解前のL1+L2のリポソームの内3.7%のリポソ ームが膜混合領域に属していたのは、このような遊離蛍光脂質が異なるリポソ ームに接着していたことが原因だと考えられる。次に、凍結融解をしたリポソ ームを観察すると Fig. 2-9(C) -196 ℃ のように、一つのリポソーム膜に異なるリ ポソーム由来の蛍光物質が混ざっていることが分かった。以上の結果より、凍 結融解によってリポソームの内液が混合するだけではなく、脂質膜も混合する ことが分かった。また脂質膜が混合したリポソームの割合は凍結温度を下げる ことで増加することが Fig. 2-9(B)より示唆された。また、凍結温度を下げること で脂質膜の混合がより頻繁に起こることは、前述したとおり、より低い温度で はリポソーム膜がより大きく破壊され、隣接するリポソームとの膜の再編成が 起こりやすくなり融合がより起こるという可能性を支持している。実際に、 -196℃ で凍結した際に、隣接するリポソームと膜の一部が融合している様子が クライオ電子顕微鏡画像として報告されており[21]、私の確立した手法において も凍結融解によって膜の融合が起こることが分かった。

37







Fig. 2-9 凍結融解前後におけるリポソーム膜融合

凍結融解前後における膜蛍光脂質の混合についての解析(A)異なる蛍光脂質を混 ぜた二種類のリポソームを様々な条件下でフローサイトメーターを用いて測定 した。測定対象のリポソームとして、赤色の蛍光脂質(ATTO633-DOPE)を混ぜた L1 と黄色の蛍光脂質 (ATTO565-DOPE)を混ぜた L2 を用いた。Positive control は これら二種類の蛍光脂質を混ぜたリポソームとした。縦軸は ATTO633 由来の赤 色蛍光強度、横軸は ATTO565 由来の黄色蛍光強度とした。異なるリポソーム由 来の蛍光脂質が混ざっているリポソーム(赤色蛍光強度 10^{3.8}以上、黄色蛍光強度 10^{3.2}以上)を赤色のドットで示した。(B)脂質膜混合リポソーム率。異なるリポソ ーム由来の蛍光脂質が混ざっているリポソームの割合を比較した。この時リポ ソームの母数としては、ATTO633の蛍光強度が10^{3.8}以上のリポソームとした。 青色の棒グラフは凍結融解前、赤色の棒グラフは凍結融解後、緑色の棒グラフ はあらかじめ二種類の蛍光脂質を混ぜて作成したリポソームの割合とした。(C) 蛍光脂質を混ぜたリポソームの顕微鏡観察像。リポソーム膜に加えた蛍光脂質 と、リポソームの内液に加えた蛍光タンパク質を共焦点レーザー顕微鏡を用い て観察した。上段から凍結融解前(L1, L2)のリポソーム画像、凍結融解前の二種 類のリポソームを混合したときのリポソーム画像(L1+L2)、最下段は-196℃で凍 結後融解させたリポソームの画像である。

脂質膜混合とリポソーム内液の混合を比較すると、脂質膜と水溶液とが異な る物性を持っていることから、内液の混合から見た融合率と、脂質膜の混合か らみた融合率の値が異なったと考えられる。2-4-1 でも述べたとおり、これら三 種の凍結条件は、異なる内液由来の物質の混合比に違いが見られるものの、内 液が混合したリポソームの割合に大きな差は見られなかった。一方で、これら 三種の凍結条件において脂質膜混合から見た膜混合リポソームの割合に違いが 見られた。脂質膜混合と内液混合との間に見られたこのような違いは、内液と して用いた水溶液と脂質膜が異なる物性を示すことから生まれたと考えられる。 すなわち、内液は拡散速度が速く、凍結融解によって生じたリポソーム膜の穴 を介して混合されるのに対して、リポソームの脂質膜はより強固な構造体を構 築しており、穴が開いた時に、それが小さい場合は隣接するリポソームとの再 構成をするよりも、脂質が流動しその穴をふさぐ方が生じやすい可能性が挙げ られる。実際に、-196°C でリポソームを凍結した様子をクライオ電子顕微鏡で 観察した報告では、リポソームの構造が残ったまま、膜の一部が隣接するリポ ソームと融合している様子が見られた[21]。より高い温度で凍結させたとき (-20°C、-80°C)、-196°Cで凍結させたときに比べて隣接するリポソーム間での脂 質膜混合リポソーム率が低かったことから、リポソーム膜に生じる穴はより小 さいと考えられる。そのため、内液混合と脂質膜混合で異なる性質が観察され たと考えられる。

2-4-3 凍結融解によるリポソームの大きさの変化と内液の漏出

この項では、凍結融解によって内液の漏洩がどの程度起こったのか、そして リポソームの大きさや数がどのように変化したかについて着目して解析した。 この解析により、今後リポソーム融合によって内封物を供給する際に、供給効 率を予測できると同時に、リポソームの破裂や分裂に関する知見が得られると 期待できる。まず、リポソームの大きさが凍結融解前後でどのように変化した のかについて解析した。凍結融解後、リポソームの形態変化として(1)融合する、 (2)融合後分裂する、(3)破裂する、という三通りの可能性が考えられた。もし、 リポソーム融合が起こった場合、膜量が増え、リポソームは大きくなると予想 される。一方で、過去の研究より、内液量に対してリポソーム膜が過剰になり、 膜あまりが生じた場合、リポソームが変形し自発的に出芽・分裂が起こったことが報告されている[19]。また、リポソーム融合が起こるためには膜が一部破壊されることが必要だが、この膜の破壊によりリポソーム自体が壊れてしまい区画としての機能を果たさなくなる可能性も考えられる。そこで、解析対象として、2-4-1で用いた L1, L2 を用いて凍結融解前後の膜蛍光強度のヒストグラムを作製しリポソームの大きさについて解析をした(Fig. 2-10 (A))。すると凍結前のリポソームと凍結後のリポソームについて脂質膜量の最頻値は変わらなかった(Fig. 2-10 (A))。しかし、リポソームの膜蛍光量の中央値を比較すると、凍結融解前と比べて、凍結融解後は膜蛍光量の中央値が3割減少した(Fig. 2-10 (B))。このような変化は、Fig. 2-10 (A)で見られる膜蛍光強度が10⁴以上を示すリポソーム数の減少が原因であると考えられる。以上の結果より、凍結融解前後で大きなものが減少し、均一になったことが分かった。



Fig. 2-10 凍結融解操作前後の各リポソームの膜量比較

凍結融解前後のリポソームの大きさの変化。(A)凍結融解前後のリポソームについて各リポソームの脂質膜の蛍光強度をヒストグラムとして表した。測定対象のリポソームとして膜に黄色蛍光脂質 ATTO565-DOPE を混ぜ、リポソーム内にTA647(L1)または TA488(L2)を内封したリポソームを用いた。また膜蛍光強度の解析には膜の黄色蛍光強度が 10⁰以上のリポソームを用いた。L1, L2, Centrifugeは凍結融解操作前、-20℃、-80℃、-196℃は凍結融解操作後のリポソームである。(B)凍結融解前後のリポソームの膜蛍光強度の中央値の比較。縦軸は、それぞれのリポソームの膜蛍光強度の中央値(a.u.)とした。緑色の棒は凍結融解前、青色の棒は凍結融解後のリポソームとした。

リポソーム融合によって基質を供給する際、リポソームに封入した物質がど れほど外部に漏れるかは、生化学反応に対して想定通りの濃度で基質を供給す る際に非常に重要である。そこで凍結融解によってリポソームの内液がどれだ け外部に漏れたのかについて解析した。この解析には 2-4-2 項で用いたリポソー ム膜を異なる蛍光脂質で標識し内液として TA488 を封入した二種類のリポソー ムを凍結融解によって融合させたデータを用いた。このデータを用いて、個々 のリポソーム内に封入された TA488 の蛍光量について、頻度を縦軸にしたヒス トグラムを作製した(Fig. 2-11)。凍結融解前では、リポソームが示す TA488 由来 の緑色蛍光強度の最頻値は 10^{2.55}-10^{2.65}の間であった(Fig. 2-11 (1))。この内液量は -20 °C で融合させた場合に変わらず、内液の漏洩がほとんど見られなかったと考 えられる。それに対して、温度を下げていくと内液の漏洩が見られ、-196℃で はリポソームが示す TA488 由来の緑色蛍光強度の最頻値は 10^{2.25} に減少した(Fig. 2-11 (2))。このような凍結融解後における緑色蛍光強度の減少は、凍結融解によ って内液がおよそ半減したことを示唆している。このような内液の減少したリ ポソーム数の増加が見られると同時に、TA488 の蛍光をほとんど持たない集団 の増加が見られた(Fig2-11 (3))。このような集団は、おそらくリポソームが破裂 して遊離した脂質が凝集して脂質の塊となったような構造をとっており、リポ ソーム内の生化学反応に必要な要素をほとんど保持できないと考えられる。こ のような区画は第三章以降で生化学反応をリポソーム内に封入した際に「非活 性リポソーム」が出現する原因ではないかと考えられる。

リポソーム融合によって基質を供給し、生化学反応を継続するためには、酵素などのタンパク質や基質をリポソーム間で偏りなく供給することが重要である。これまでの結果から、-20 ℃ や-80 ℃ で凍結し融解すると内液の漏れを抑えながら融合を促すことができる。しかし、これらの温度での融合は、内液混合を制御することができず、リポソーム内液が不均一に供給されてしまう。一方で-196 ℃ で凍結し融解するとリポソーム内液が 50%漏出するが、融合後にリポソーム内液を供給できることが分かった。そのため、リポソーム内液の漏出量を計算に入れつつリポソームに基質を封入し供給することで、想定した量の基質をリポソーム内に均一に供給し、生化学反応を継続させることが可能になると期待される。



Fig. 2-11 凍結融解前後のリポソーム内液量の比較

凍結融解による内液の漏洩の解析。凍結融解前後のリポソーム内蛍光物質量を フローサイトメーターで測定した。凍結融解前後のリポソームについて封入し た蛍光タンパク質(TA488)のリポソームごとの蛍光強度を横軸、相対頻度を縦 軸としてヒストグラムとして表した。この時、Fig. 2-5 で用いたリポソームと 同様のリポソームについて解析をした。

2-5 考察

2-5-1 第二章の結論

私は、凍結融解という刺激がリポソーム膜の一部を破壊することができるの ではないか、またその際に異なるリポソームが接触していると、破壊されたリ ポソーム膜が再編成されリポソーム融合が起こるのではないかという仮定の元、 実験を行った。その結果、凍結融解によって内液の混合及び脂質膜の混合が観 察され、それらを総合するとリポソームが融合したことが示唆された。また凍 結時の温度によって、内液混合リポソーム率が変わらないのに対し、膜混合リ ポソーム率は凍結時の温度が低い時の方が高いことを示した。このことより、 過去の報告で示唆された通り[21]、融合時におけるリポソーム膜の破壊は凍結と いう刺激によって起こされたと考えられる。

本研究で確立したこの凍結融解によるリポソーム融合によって、生化学反応 に必要な酵素やRNAといったような巨大分子をリポソーム融合によって供給す ることができる可能性がある。またこの融合法は、リポソームの膜を作ってい る脂質も同時に供給しているため、リポソームの数を保ったままリポソーム融 合を繰り返し引き起こすことができる可能性がある。すなわち、人工細胞に対 して「区画の成長・分裂」と「基質の供給による内部反応の継続化」が同時に 達成できるのではないかと考えた。次章以降は、それを実証するために、リポ ソーム内に生化学反応を封入し、生化学反応に必要な基質を凍結融解によるリ ポソーム融合で供給することを目指した。

2-5-2 凍結融解によるリポソーム内への物質の供給

人工細胞に対してタンパク質を供給すると同時に脂質膜を供給することは、 人工細胞に対して「成長と分裂」という機能を加え、より生命に近付けること ができるのではないかと期待できる。しかし、生化学反応で必要となるタンパ ク質は一般的に巨大タンパク質であり、膜を透過することができない。特に第3 章で用いる Qβ-replicase のβサブユニットは分子量 64 kDa、全体で 218 kDA と なる巨大分子である[24]。また、同様に第4章および第5章で用いる大腸菌のタ ンパク質の例として、タンパク質の翻訳に必須であるリボソームは 2,700 kDa の 巨大な RNA-タンパク質複合体であることが知られている。これらの生化学物質 を供給できると、リポソーム内での遺伝子の複製やタンパク質の翻訳反応を継 続させることができるようになり、生化学反応を長期にわたり継続する「増殖 する反応場」としての人工細胞の構築につながると期待できる。そこで本章で は、凍結融解によるリポソーム融合という形で脂質膜を供給すると同時に、内 封したタンパク質(Transferrin) Alexa を供給できることを示した。Transferrin は約 80 kDa の分子量を持つタンパク質であり、膜を透過することができない生化学 物質である。このような膜を透過できない物質を、凍結融解によってリポソー ムを融合させることで供給できたことの意義は非常に大きいと考えられる。し かし上記の RNA 複製酵素やリボソームと比べて Transferrin は酵素ではなく生化 学反応に関わらない分子であるため、今後は、生化学反応に必要な巨大タンパ ク質を失活させずに供給できるかどうかについて検討する必要がある。

2-5-3 凍結融解によるリポソーム膜への脂質の供給

本章では、凍結温度を変化させ、より低温にすることで内液の混合率や脂質 膜の混合率が上がることを見出した。またその時に融解温度の変化はリポソー ムの破裂や融合に影響しないことがフローサイトメーターの結果より示唆され た(Fig. 2-8 (B))。しかし、Costa らがクライオ電子顕微鏡観察で示したような[21]、 凍結時のリポソームがどのような形態変化を起こしたのかについて、直接的な データを得ることはできなかった。そのため、ここからはフローサイトメータ ーで得られた様々な蛍光のデータや凍結融解後のリポソームの共焦点顕微鏡写 真から、実際に何が起こったのかを間接的に推測していく。まず Fig. 2-11 のデ ータより、リポソームに内封していた蛍光物質が凍結融解によって漏洩したこ とから、凍結融解の間に膜の部分的な破壊が起こったと考えられる。膜破壊の 原因は、脂質膜と内液の構成が違うことだと考えられる。内封液は水を主成分 としており、水の体積は液体と比べて凍結時に 1/11(約 9%)の増加が見られる。 それに対して、脂質膜は凍結融解前後で面積の増減はない。この差によって内 封液が脂質膜に対して過剰になり、膜の一部が破れたのではないかと考えられ る。実際に、-196℃で凍結した場合には、このような膜の破れと隣接するリポ ソームの脂質膜との膜の再構成の様子が報告されている[21]。このような膜の破

れは凍結時の温度によって異なっていたと推測される。その理由として、凍結 時の温度に依存して、内液から見た融合率と混合比率及び膜脂質の混合率が変 化することがFig. 2-5 (A), Fig. 2-6 (B), Fig. 2-9 (B)から示唆されたことが挙げられ る。-20℃で融合させると、内液の混合からみた融合率が 76.1%であるのに対し て、脂質膜が混合したリポソームの割合は4.7%であった。このことから、Fig. 2-4 で示した模式図のように、リポソーム膜の一部に穴が開き、内液の交換が起こ った後にその穴が閉じたのではないかという可能性が考えられる。それに対し て、-80℃や-196℃での凍結といったより低い温度で凍結させると、内液混合リ ポソーム率は-20 ℃と同程度だが、脂質膜混合リポソーム率は低温で凍結させた ときに有意に上昇した。このことから、凍結温度が下がると、より大きな穴が リポソーム膜に空き、その穴は自然に閉じることができなくなったためリポソ ームが破裂するか、隣接するリポソーム膜と融合して一つのリポソームになっ た可能性が考えられる。リポソーム内からの内液の漏出量はこの可能性を支持 している。またその時、上記で述べたように、内液の漏洩と脂質膜の融合が同 時に起こることで膜余りが起こり、リポソームの分裂が起こったのではないか と考えられる。

2-5-4 まとめと展望

「成長・増殖」する人工細胞の開発には、(1)外部から内部反応の基質の供 給、(2)区画を作るための膜材料の供給とそれによる区画数の増加、そして(3)そ れらを繰り返すことができることの三点が重要となってくる。本章では凍結融 解によるリポソーム融合を用いることで(1)凍結融解によってリポソーム内液 の混合が起こり、また凍結温度を下げることにより融合による内液混合が1:1 に 近づくため、目的の物質を目的の量供給できる点、(2)リポソーム融合によって 脂質膜の供給を行うことができる点を示した。この手法は、リポソームの脂質 膜成分が変化していないために、凍結融解を繰り返すことによって原理的には リポソーム融合を繰り返せると期待される。そこで次章では、(3)同操作を繰り 返すことでリポソーム融合の誘導を繰り返せる点について実証することを目指 した。

参考文献

- 1. Zhu, T.F. and J.W. Szostak, *Coupled growth and division of model protocell membranes*. J Am Chem Soc, 2009. **131**(15): p. 5705-13.
- Budin, I., A. Debnath, and J.W. Szostak, *Concentration-driven growth of model protocell membranes*. J Am Chem Soc, 2012. 134(51): p. 20812-9.
- 3. Hanczyc, M.M., S.M. Fujikawa, and J.W. Szostak, *Experimental models of primitive cellular compartments: encapsulation, growth, and division.* Science, 2003. **302**(5645): p. 618-22.
- 4. Mansy, S.S., et al., *Template-directed synthesis of a genetic polymer in a model protocell*. Nature, 2008. **454**(7200): p. 122-5.
- Blain, J.C. and J.W. Szostak, *Progress toward synthetic cells*. Annu Rev Biochem, 2014. 83: p. 615-40.
- 6. Budin, I. and J.W. Szostak, *Physical effects underlying the transition from primitive to modern cell membranes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(13): p. 5249-54.
- 7. Walde, P. and S. Ichikawa, *Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications*. Biomol Eng, 2001. **18**(4): p. 143-77.
- 8. Luisi, P.L., F. Ferri, and P. Stano, *Approaches to semi-synthetic minimal cells: a review*. Naturwissenschaften, 2006. **93**(1): p. 1-13.
- 9. Kita, H., et al., *Replication of genetic information with self-encoded replicase in liposomes*. Chembiochem, 2008. **9**(15): p. 2403-10.
- Nomura, S.M., et al., *Gene expression within cell-sized lipid vesicles*. Chembiochem, 2003.
 4(11): p. 1172-5.
- 11. Oberholzer, T. and P.L. Luisi, *The use of liposomes for constructing cell models*. J Biol Phys, 2002. **28**(4): p. 733-44.
- 12. Yu, W., et al., Synthesis of functional protein in liposome. J Biosci Bioeng, 2001. 92(6): p. 590-3.
- Noireaux, V., Y.T. Maeda, and A. Libchaber, *Development of an artificial cell, from self-organization to computation and self-reproduction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. 108(9): p. 3473-80.
- Fujii, S., et al., *In vitro evolution of alpha-hemolysin using a liposome display*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(42): p. 16796-801.
- Lei, G. and R.C. MacDonald, 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, 2008. 221(2): p. 97-106.
- 16. Sunami, T., et al., *Detection of association and fusion of giant vesicles using a fluorescence-activated cell sorter.* Langmuir, 2010. **26**(19): p. 15098-103.
- 17. Zimmermann, U. and J. Vienken, *Electric field-induced cell-to-cell fusion*. J Membr Biol, 1982.

67(3): p. 165-82.

- Stoicheva, N.G. and S.W. Hui, *Electrofusion of cell-size liposomes*. Biochim Biophys Acta, 1994. 1195(1): p. 31-8.
- 19. Terasawa, H., et al., *Coupling of the fusion and budding of giant phospholipid vesicles containing macromolecules.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(16): p. 5942-7.
- Anzai, K., M. Yoshida, and Y. Kirino, Change in intravesicular volume of liposomes by freeze-thaw treatment as studied by the ESR stopped-flow technique. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1990. 1021(1): p. 21-26.
- 21. Costa, A.P., X. Xu, and D.J. Burgess, *Freeze-anneal-thaw cycling of unilamellar liposomes: effect on encapsulation efficiency*. Pharm Res, 2014. **31**(1): p. 97-103.
- 22. Pautot, S.F., B.J.; Weitz, D.A., *Production of unilamellar vesicles using an inverted emulsion*. Langmuir, 2003. **19**(7): p. 10.
- Tsuji, G., et al., Sustainable proliferation of liposomes compatible with inner RNA replication.
 Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. 113(3): p. 590-5.
- Kondo, M., Structure and function of RNA replicase of bacteriophage Qbeta. Arch Int Physiol Biochim, 1975. 83(5): p. 909-48.

第三章:リポソーム融合による生化学反応基質の供給

3-1 概要および本論文での位置づけ

人工細胞が「基質を獲得し」「増殖する」ためには、酵素やタンパク質のよう な「巨大分子が供給でき、同時に区画が成長・分裂すること」と「供給を繰り 返せること」が非常に重要である。本章では、RNA 複製反応をモデル反応とし て、リポソーム内 RNA 複製反応に必要な基質と酵素を凍結融解によるリポソー ム融合によって繰り返し供給することを目指した。その結果、前章では凍結融 解によるリポソーム融合によって内液と膜脂質を一度供給できることを示した が、本章では一度限りの融合ではなく、反応と融合とを繰り返していくことで、 リポソーム型人工細胞の数を増やしながら、長期間生化学反応を継続させるこ とができた。すなわち、人工細胞の「培養」ができることを示した。従来のリ ポソーム融合法では、これまで述べてきたように、膜組成の不可逆的変化、リ ポソームの破裂率、供給する酵素などの失活などによって、生化学反応に必要 な分子をその活性や量を十分に維持したまま繰り返し供給することは困難であ った。本章では、凍結融解によるリポソーム融合を用いることで、リポソーム 内 RNA 複製反応を 10 世代にわたり「植え継ぎ」、RNA 複製反応が長時間継続 できることを示した。また、その際に、反応場となるリポソームが凍結融解に よる融合後、分裂することで繰り返し増えることが分かった。

3-2 背景

3-2-1 リポソーム内 RNA 複製反応に対する栄養供給の重要性

原始的な細胞を構築する際に、脂質膜でできた区画は細胞の特徴として重要 であり、そういった反応区画間および区画内外の物質の移動は区画内反応を継 続させていくために不可欠である。原始生命がどのようなものであったかを示 唆する仮説の一つとして RNA world 仮説が提唱されている[1]。RNA world 仮説 は RNA が遺伝情報の保持機能と生化学反応の触媒としての機能を同時に持ち合 わせており、それが生命の起源であるとしている[1]。そのため、RNA が合成さ れる反応は原始生命にとって必要不可欠であったと考えられる。RNA world 仮説 の問題点の一つとして RNA の不安定性が挙げられている。RNA は DNA と異な り、2'位に水酸基を持っており、この RNA に含まれるリン酸気が塩基性条件下 で水酸基から求核攻撃を受けることで分解するといったように、DNA に比べて 化学的に不安定である。このような不安定性は、遺伝子発現の一過性の担保な ど生体内では有利であるが、遺伝情報を保持するという点では不利となる。し かし、この不安定性は、温度を下げることで解決でき、それをもとに氷点下の 環境で機能する RNA を用いた原始環境下での氷海の RNA world が提案されてい る[2]。そういった機能分子としての RNA が注目されており、その RNA を内包 し、外環境から区切られた閉鎖空間として機能する脂質膜小胞が原始生命の器 として注目されている。そこで、本章では RNA 複製反応を内包したリポソーム に対して、凍結融解によるリポソーム融合を用いて栄養を供給することで、凍 結融解条件下において脂質区画としてのリポソームが融合することで区画間の 分子の移動を再現し、原始生命における栄養獲得と内部反応の継続について知 見を得ることを目的とした。

3-2-2 RNA 複製反応について

本章では凍結融解によるリポソーム融合によって、生化学反応で重要な機能 を果たしているタンパク質のような巨大分子を、生化学反応の触媒としての活 性を失活させずに供給できるかについて調べた。この時、生化学反応のモデル として遺伝子の複製反応を用いた。遺伝子の複製反応は生物にとって非常に重 要な生化学反応の一つである。通常生物は細胞膜を通して外部からグルコース を獲得し、解糖系を介してヌクレオチドやアミノ酸など生体分子を合成し、そ れらを用いて遺伝子複製酵素によって遺伝子を複製することが一般的に知られ ている。しかし、原始的な生命は解糖系のような複雑な生化学反応や生合成系 を備えていないと考えられている[3]。遺伝子の材料となる NTP などの電荷をも つ物質は膜を透過しづらいことが知られており[4]、原始生命において外部から 遺伝子複製に必要な分子の取り込むことは非常に重要な課題となっている。そ こで私は、生化学反応(酵素-基質反応)のモデルとして RNA の複製反応を用 いた(Fig. 3-1)。この時、RNA 複製酵素として当研究室で精製された Qβ-replicase を用いた[5]。Qβ-replicase は、大腸菌ファージである Qβ ファージから単離され た一本鎖 RNA を複製する RNA 依存性 RNA 複製酵素である[6]。この酵素は 1 つの Qβ ファージ由来のサブユニット(β サブユニット)と、Qβ ファージの宿主で ある大腸菌由来の 3 つのサブユニットから構成されている[7]。Qβ-replicase は RNA テンプレートを複製する際にオリゴヌクレオチドプライマーを加える必要 はなく、RNA のプラス鎖を鋳型としてそのプラス鎖と相補的な配列となるマイ ナス鎖を合成し、合成されたマイナス鎖を鋳型としてプラス鎖の合成が起こり、RNA のプ ラス鎖を起点としてプラス鎖とマイナス鎖が合成されていく。この RNA 複製反 応はリポソーム内で再構築が可能であることが報告されており[9]、単純な基質 (NTP)-酵素(Qβ-replicase)反応であるため、凍結融解によるリポソーム融合によっ てタンパク質のような生化学物質を供給した場合、生化学反応が正常に働くか どうか、そして生化学物質を繰り返し供給したときに、生化学反応が継続する かどうかについて調べるのに適していると考えた。



Fig. 3-1 Rep-RNAの複製の概略図 Rep-RNA(+鎖)を鋳型とした RNA 複製反応の 概略図。リポソームには Rep-RNA の+鎖と Qβ-replicase を封入した。 Qβ-replicase は MDV 配列を認識し、Rep-RNA の+鎖を鋳型として相補鎖である Rep-RNA の-鎖を合成する。 Qβ-replicase は Rep-RNA の+鎖だけでなく、-鎖も認識し、それ を鋳型として+鎖の合成も触媒する。

3-2-3 研究における本章の位置づけ

本章では、生物にとって重要な「遺伝子の複製反応」をモデル反応とし、リ ポソーム内での生化学反応に対してリポソーム融合によりタンパク質および小 分子からなる栄養を供給でき、反応を継続化させられることを示した。第二章 では凍結融解によってリポソームが融合し、異なるリポソーム由来の内液が混 合するとともに、リポソーム膜の混合が見られることを示した。しかし、より 生物に近い人工細胞を再構築するためには、RNA の複製反応などの生物にとっ て重要な生化学反応に対して基質の供給をする必要がある。生化学反応にはタ ンパク質のような巨大分子や NTP のように電荷をもつ物質が必須だが、このよ うな物質は脂質膜を透過することが困難である。そのため、リポソーム外液に 反応基質を加えるだけではリポソーム内の反応を継続化させることは難しい。 タンパク質やNTPを供給するために、リポソーム膜に膜タンパク質を挿入する ことで穴をあける試み[10]や、リポソーム融合によって供給する試み[11]などが 報告されてきた。これらの手法により、リポソームに対してタンパク質などの 膜を透過しない物質を供給することが可能になってきた。しかし、これらの手 法では、膜の不可逆的変化を伴うために融合を繰り返せないといった問題点が 挙げられてきた。これらを解決するために、本章では、「タンパク質などの生体 高分子をその活性を失うことなく繰り返し供給できるリポソーム融合法」の確 立を目指した(Fig. 3-2)。

凍結融解によるリポソーム融合は、融合時に膜組成の変化を伴わないために、 リポソームを加えて凍結する、という操作を繰り返すことで、リポソーム融合 を繰り返し導入できることが期待された。本章では RNA の複製反応に必要な小 分子(NTP)と巨大分子である RNA 複製酵素(Qβ-replicase)を凍結融解によって繰 り返し供給することで、リポソーム内 RNA 複製反応に必要な分子を失活させず に供給できるかについて検討を行った。そして、RNA 複製に必要な分子を供給 できることを示したのちに、それら分子を繰り返し供給することでリポソーム 融合と分裂により子孫リポソームが生み出され、それらのリポソーム内でも親 リポソームと同様に RNA 複製が起こるかどうか、すなわち細胞のようにリポソ ーム型人工細胞を「培養」できるかどうかについて検討を行った(Fig. 3-2)。その 結果、十世代にわたってリポソーム内での RNA 複製を継続させることに成功し た(Fig. 3-8 (D))。これにより、リポソーム融合による生化学反応に必要な物質の 継続的な供給と共に、リポソーム区画の数が安定的に保たれることが分かった。 本章の結果より、一種類のタンパク質が触媒する生化学反応に対して基質を失 活させずに供給することが可能だと示したので、次章以降では、RNA からタン パク質を翻訳し、翻訳されたタンパク質によって RNA 自身が複製されるといっ た複数のタンパク質や小分子が必要となる生化学反応について基質の供給が可 能であるかを検証していく。



任意の時機に何度も融合させられる

Fig. 3-2 リポソーム融合による RNA 複製反応の継続化

リポソーム融合によりリポソーム内反応を継続する手法の概略図。リポソー ム内反応に必要な酵素や基質を封入したリポソームを供給し、凍結融解によ って融合させた後、内部反応を進行させる。任意の時点で、再び内部反応に 必要な物質を封入したリポソームを加え、融合させることで、リポソーム内 反応を継続できる。

3-3 実験材料及び方法

3-3-1 試薬

1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) (Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL)).

流動パラフィン (0.86-0.89 g/mL at 20°C) (Wako, Osaka, Japan).

SYBR Green II RNA Gel Stain (SYBR Green II) (Lonza, Basel, Swiss).

SYBR premix Ex Taq II for quantitative PCR and PrimeScript reverse transcriptase (Takara, Tokyo, Japan).

RNA purification micro kit (QIAGEN, Venlo, Holland).

RNase inhibitor (RNasin) (Promega, Madison, WI).

1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) labeled with ATTO 633 (ATTO633-DOPE) (ATTO-TEC, Siegen, Germany) (赤色蛍光を示す蛍光脂質)

5x Primer Script Reverse Transcriptase (Takara, Tokyo, Japan)

3-3-2 Primers

Primer 1: CCACGGTCAGGACTGACACTCGTAGCGCTGAGAGATCAACCGTTGC TAAG

Primer 2: CCACGGTCAGGACTGACACTCGTAG

Primer 3: GGTATCGGTGGCATTCTACGCGA

3-3-3 界面通過法によるリポソーム調製

2-3-2 で述べた方法と同様の手順で界面通過法によってリポソームを作成した [12] [13]。この章では RNA の複製反応を生化学反応のモデルとして用いた。 RNA 複製反応のテンプレートとして、過去に報告された RNA(Rep-RNA)を用いた[14]。 この Rep-RNA は両末端に Q β -replicase の認識領域を持ち、その中央に Q β -replicase を構成するサブユニットの内、 β -subunit がコードされており、RNA の全長は 2041 塩基である。二種類のリポソームの内、一方には基本内液(125 mM Tris-HCl (pH 8.0), 25 mM MgCl₂, 0.01% BSA, 500 mM sucrose, 350 mM potassium glutamate, 50 mM HEPES-KOH (pH 7.6))に Rep-RNA を終濃度 5 nM になるように 加えたものを内封した(以後 RNA リポソームとする)。もう一方のリポソーム には基本内液に Rep-RNA の代わりに終濃度が 6.25 mM の NTP と 100 nM 精製 Qβ-replicase を加えた(以後 Nutrient リポソームとする)。これまで記述してきた リポソーム内の各種成分は、リポソーム融合の際にリポソーム内液が外液に漏 洩することが前章で示されたため、過去の論文でリポソーム内 RNA 複製を再構 築した条件[5]と比較して基質および酵素濃度を五倍濃くした。また、全てのリ ポソームについて、膜脂質として蛍光物質である ATTO 633 が結合した脂質 (DOPE)を質量比 1%混合した。遠心操作によって油中水滴溶液を油水界面に通過 させる時(Fig. 2-3)には、外液としては 1 M Glucose, 350 mM potassium glutamate, 50 mM HEPES-KOH(pH 7.6) 溶液を用いた(以後外液 1 とする)。18,000 g (14,000 rpm) 30 分 4° C で遠心をして界面を通過させた後、18,000 g (14,000 rpm) 5 分 4° C で遠心をしてリポソームを沈殿させ外液交換を行った。この時、外液として、 1 M Glucose, 50 mM HEPES-KOH(pH 7.6)溶液を用いた(それまでの外液から potassium glutamate を抜いた。以後、外液 2 とする。)。この溶液を以後リポソー ム溶液として凍結融解実験に用いた。

3-3-4 凍結融解によるリポソーム融合と RNA 複製反応

3-3-3 で用意した RNA リポソームと Nutrient リポソームをリポソーム数が 1:1 になるよう混合した後、18,000 g (14,000 rpm) 5 分 4°C で遠心してペレット状にした。次に、液体窒素内に入れ、1 分間凍結させ、室温で融解させた。この時、凍結融解によってリポソームが破裂し、内液が外液に漏れた可能性が考えられたため、リポソーム溶液を18,000 g (14,000 rpm) 5 分 4°C で遠心し、外液を除き、外液 2 と交換した。その後、37°C で RNA 複製反応を進ませた。反応時間は実験ごとに異なるために本文に記載した。

RNA リポソームに対して、Nutrient リポソームの供給と融合を十回繰り返し た際には、一世代目はリポソームの数が 1:1 になるように混合した後、凍結融解 操作を行った。二世代目以降は、リポソーム溶液換算で、凍結融解後に 60 分間 RNA 複製反応を行ったリポソーム溶液 15 µL に対して Nutrient リポソームを 15 µL 加えて(反応リポソーム溶液と同体積の Nutrient リポソームを加えて)凍結融 解操作を行った。

3-3-5 凍結融解によるリポソーム融合の十回繰り返し

3-3-3 で用意した RNA リポソームと Nutrient リポソームをリポソーム数が 1:1 になるよう混合した後、18,000 g (14,000 rpm) 5 分 4°C で遠心してペレット状に した。次に、液体窒素内に入れ、1 分間凍結させ、室温で融解させた。その後 37°C で 60 分間 RNA 複製反応を進行させた。反応後、リポソーム溶液から 15 μL 回収し、そのリポソーム溶液と等量の体積の Nutrient リポソーム溶液を加えて再 び凍結融解によってリポソーム融合を導入した。その後 37°C で 60 分間 RNA 複製反応を進行させた。この操作を 4 回行った後、4 回目の反応後のリポソーム に対して Nutrient リポソームを加えて、遠心後に凍結させたリポソーム試料を、 -80°C で 10 日間保存した。10 日後に、凍結していたリポソーム試料を融解し、 37°C で 60 分間 RNA 複製反応をさせた後に、リポソーム溶液を 15 μL 回収し、 そのリポソーム溶液と等量の体積の Nutrient リポソームを加えて凍結融解によ って融合させた。この時に用いた Nutrient リポソームな揃えて凍結融解によ って融合させた。この操作を 1 回目の融合操作から数えて 10 回に なるまで繰り返した。

3-3-6 フローサイトメーターを用いたリポソーム解析

凍結融解後のリポソーム溶液を分取し、それらに対して終濃度 1/10000 になる ように SYBR Green II を外液に加えた。SYBR Green II は膜透過によりリポソー ム内部に取り込まれ、リポソーム内に存在する RNA 分子数に比例して強い蛍光 を放つ。SYBR Green II で染色したリポソーム溶液を希釈液(50 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 1 M glucose)を用いて 1/100 希釈して FACS Aria II (BD Biosciences, Palo Alto, CA)で測定を行った。SYBR Green II を 488 nm の半導体レーザーで励起さ せ、蛍光波長を 530±15 nm バンドパスフィルター(FITC-A)で検出した。また、 リポソーム膜に添加した蛍光物質である ATTO633-DOPEを 633 nm 波長の HeNe レーザーで励起させ、蛍光波長を 660±10 nm バンドパスフィルター(APC-A)で 検出した。 SYBR の蛍光強度からリポソーム内の RNA 量を算出できるか検討するため、 あらかじめリポソーム内に既知濃度(0 nM, 5 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM)の RNA を基本内液に溶解して封入し、SYBR Green II で染色後にフローサイトメーター で検出した。この際、膜量を ATTO633 蛍光で検出し、最頻値である ATTO633 F.I. = 8000-12000 の範囲の膜蛍光を持つリポソームに対して、SYBR Green II の蛍光 量と濃度に対する比例換算式を定義した(Fig. 3-5(B))。このとき、RNA 濃度と SYBR Green II の蛍光量とは、換算式 RNA (nM) = 1.33 X SYBR F.I.として表すこ とができた。ATTO 633 F.I.および SYBR F.I.はフローサイトメーターから FCS3.0 形式で出力した際のそれぞれの蛍光強度である。

3-3-7 共焦点レーザー顕微鏡観察

凍結融解後にRNA 複製を 37°C で 60 分反応させたリポソーム溶液を分取し、
それらに対して終濃度 1/10000 になるように SYBR Green II を外液に加えて共焦
点レーザー顕微鏡(Leica TCS SP8; Leica Microsystems)を用いて顕微鏡観察をした。
SYBR Green II の蛍光はアルゴンレーザー(488 nm 励起光) で励起させ 490-550
nm の蛍光を検出した。脂質膜蛍光の ATTO633 は HeNe レーザー(633 nm 励起光)
で励起させ、650-710 nm の蛍光を検出した。

3-3-8 逆転写定量 PCR

凍結融解後のリポソーム溶液について、フローサイトメーターを用いて、リ ポソーム膜に含まれる蛍光脂質の赤色蛍光強度が 20,000-50,000 の範囲かつ前方 散乱光強度が 20,000-50,000 の範囲に含まれるリポソームを 10 万点分取した。そ の後、分取したリポソームから RNA purification micro kit を用いて RNA を精製 した。RNA 精製後、精製 RNA のうち Rep-RNA のプラス鎖をテンプレートとし て Primer 1 を終濃度 100 nM 加え、Primer Script Reverse Transcriptase 溶液(0.5 mM dNTP, PrimeScript buffer, 1 unit/μL RNasin, 20 units/μL PrimeScript Reverse Transcriptase)を用いて逆転写を行った。逆転写後、cDNA 溶液を 5 倍に希釈し、 終濃度 0.4µM となるように Primer 2 と Primer 3 を加え、SYBR premix Ex Taq II for quantitative PCR (Takara)を加えて定量 PCR を行った(Fig. 3-3)。SYBR の蛍光量の 検出にはリアルタイム PCR 機器(Mx3005P, Agilent Technologies)を用い、95°C で 30 秒加熱した後、「95°C、5 秒で加熱し、63°C、30 秒で反応させて SYBR 蛍 光量のデータ取得」という過程を 50 回繰り返した。



Fig. 3-3 Rep-RNA (+鎖)に対する逆転写定量 PCR の原理

RNA 量を逆転写定量 PCR で定量するときの概略図。本章で用いた Rep-RNA は Qβ-replicase の認識配列である MDV 配列に挟まれて Qβ-replicase の遺伝情報がコ ードされている。Rep-RNA (+鎖)の逆転写には、Primer 1 (Primer の配列は 3-3-2 を 参照)を用いた。この時 Primer 1 には RNA 上に存在しない配列(図中赤線)を 25 塩基付け加えており、その領域と相補な Primer 2 を定量 PCR で用いることで、 Rep-RNA(+鎖)の検出精度を上げた。定量 PCR では Primer 2 と Primer 3 で挟まれ た約 100 塩基の領域を増幅対象とした。

3-4 結果

3-4-1 凍結融解法による NTP と RNA 複製酵素の供給

私はまず、電荷をもつ NTP や巨大分子である RNA 複製酵素を、凍結融解を 介したリポソーム融合によって失活させずに供給できるか検討した。本章では 反応に必要な物質が全て同定されており、リポソーム内での反応が再構築され ている RNA 複製反応[5]をモデルとした。そこで 3-3-3 で記述した通りに調製し た RNA リポソームと Nutrient リポソームを凍結融解によって融合させ、37°C で 120 分間 RNA 複製反応を進行させた。反応前後のリポソーム溶液から、3-3-8 で記述した条件でリポソームを 10 万個分取し、分取したリポソームから RNA を精製した。その後、逆転写定量 PCR を行うと、反応基質を内封していないリ ポソームを用いた場合(-nutrient)は、120 分後に RNA が増加しなかったのに対し て、反応基質を内封したリポソームを用いた場合(+nutrient)には Rep-RNA(+鎖) が約 37 倍に増加した(Fig. 3-4)。この結果から、RNA の材料となる NTP とそれ を触媒する酵素である Qβ-replicase をリポソーム融合を介して供給できることが分 かった。以上の結果より、リポソーム内 RNA 複製反応に必要な生化学物質を、 凍結融解によって供給できることが分かった。


Fig. 3-4 凍結融解によるリポソーム融合後の RNA 複製反応

凍結融解後のリポソーム内 RNA 複製前後の RNA の定量。全リポソームの内、 リポソーム膜に含まれる蛍光脂質の赤色蛍光強度が 20,000-50,000 の範囲かつ 前方散乱光強度が 20,000-50,000 の範囲に含まれるリポソームを 10 万個分取 し、その中に含まれる Rep-RNA(+鎖)を逆転写定量 PCR により定量した。 -nutrient および+nutrient 条件は本文 3-4-1 参照。縦軸を同実験を三回行ったと きのーリポソーム辺りの RNA 分子数の平均値とし、標準偏差をエラーバーと して表した。横軸は反応時間とした。

3-4-2 フローサイトメーターによる凍結融解後の RNA 複製量の解析

リポソーム内反応において、個々のリポソーム内でどれだけの反応が起こっ ているのか、大きさに依存しているのか、反応していないリポソームの割合は どれくらいか、などといったーリポソームごとの反応量の情報は、リポソーム 融合で内部反応を継続させる際にどれだけの産物ができるかを予測するために 重要である。逆転写定量 PCR では、リポソームごとにどれだけの RNA 複製が 起こったかはわからず、リポソーム集団での平均的な複製量しか分からなかっ た。そこで SYBR Green II をリポソームの外液に加えて、リポソーム内の RNA を蛍光染色することで、フローサイトメーターを用いて一リポソームごとの SYBR 蛍光量を測定することでリポソームごとの RNA 量について解析できるか 検討をした。まず、RNA リポソームと Nutrient リポソームを凍結融解によって 融合させ(+nutrient)、その後 37°C で 60 分間 RNA 複製反応を進行させた。その 後、SYBR Green II をリポソーム外に添加しフローサイトメーターで解析を行っ た。反応基質を内液として含まないリポソームを加えて凍結融解して融合させ た際(-nutrient)には、反応前後で SYBR Green II の蛍光はほとんど検出されなかっ た(Fig. 3-6(A) -nutrient)。一方で、+nutrient 条件でリポソームを融合させた場合、 RNA 複製反応前には SYBR Green II の蛍光を持つリポソームがほとんど見られ なかったのに対し、反応後には SYBR Green II の蛍光を示すリポソーム数が増加 した (Fig. 3-6(A) +nutrient)。次に、RNA 複製反応が起こったリポソームについ て、大きさや脂質膜の枚数といった性質に共通点があるか調べた。フローサイ トメーターでリポソームを測定した際に、前方散乱光と側方散乱光はリポソー ムの大きさや内液相、リポソームの膜が一枚膜なのか多重膜なのかを表してい ることが報告されている[15]。そこで、RNA 複製反応が起こったリポソームが 一枚膜かどうかを調べたところ、一枚膜リポソームの領域に含まれるリポソー ムにおいて RNA 複製が良く見られた(Fig. 3-6(A) + nutrient FSC-SSC 図青枠内)。 一方で、RNA 複製反応が起こらなかったリポソームの一部は、多重膜や内部に 脂質が詰まっていて内液相を持たないような脂質塊であることが推定された (Fig. 3-6(A) + nutrient FSC-SSC 図赤枠内)。加えて、Fig. 3-5(A)において、既知濃 度の RNA をリポソームに封入した際に、SYBR 蛍光を示さないリポソームはほ とんど見られなかった。このことから、界面通過法で準備したリポソームはそ

のほとんどが RNA を内包していたと考えられる。それに対して、凍結融解の際 に内封液が漏洩して脂質塊となったリポソームが生まれ、そのようなリポソー ムの内部では RNA 複製反応が進まなかったため、リポソーム融合後に SYBR 蛍 光を示さなかったリポソームが見られたと考えられる。

次に、フローサイトメーターで検出された蛍光強度から RNA を定量できるか について調べた。あらかじめリポソーム内に既知濃度(0 nM, 5 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM)の Rep-RNA を封入し、SYBR Green II の蛍光量と RNA 濃度との比例換 算式を定義した(Fig. 3-5(A)(B))(Method3-3-5 に記述)。Rep-RNA を 5 nM 封入した RNA リポソームと Nutrient リポソームを凍結融解によって融合させ(+nutrient)、 SYBR 蛍光量から RNA 量を計算すると RNA 複製反応前は 26.4 nM であった(Fig. 3-6(B))。それに対して、RNA 複製反応に必要な基質を入れていないリポソーム を融合させ(-nutrient)、RNA 量を算出すると RNA 複製反応前は 9.4 nM であり、 反応後は 26.3 nM であった。(Fig. 3-6(B))。-nutrient 条件ではリポソーム内で RNA 複製反応が起こらなかったと考えられるため、SYBR 蛍光からの RNA 量計算は 濃度が低い時には数十 nM ほどの誤差が見られることが示唆された。 次に、RNA 複製後のRNA 量を推定すると378 nM であり、RNA は14.3 倍まで複製された(Fig. 3-6(B))。以上の結果から、3-4-1 で逆転写定量 PCR により RNA を定量したとき と同様に RNA 複製反応に依存した RNA 量の増加が SYBR 蛍光からも推定でき た。しかし、これらの手法は RNA の検出原理が異なる。逆転写定量 PCR では、 設計したプライマーの対象となる RNA のリポソーム内の平均分子数が分かるが 個々のリポソーム内の RNA 量や、プライマーの対象以外の RNA を検出できな い。一方で、SYBR 蛍光から RNA 量を推定する方法では、個々のリポソームに 含まれる RNA の濃度を推定することが可能であるが、溶液に含まれる全ての RNA を染色するため、Rep-RNA の+鎖と-鎖の区別がつけられず、また Rep-RNA ではない RNA も染色してしまう。そのため、逆転写定量 PCR で推定された RNA 量と SYBR 蛍光量から換算した RNA 量を定性的に比較することはできるが、定 量的な比較はできないと考えられる。

リポソームに既知濃度の RNA を封入した実験から、全てのリポソームに RNA が封入されるわけではないことが分かり(Fig. 3-6(A))、リポソーム内での RNA 複 製反応は全てのリポソーム内で進行しているわけではないことが予想された。

67

すなわち、凍結融解後に、RNA や複製酵素の欠如により反応が起こらない区画 が存在することが予想された。そこで、SYBR Green II の蛍光強度が、200 以上 のリポソームを「反応リポソーム」とし (Fig. 3-6(A) Green dots)、それ以外のリ ポソームを「東反応リポソーム」とした(Fig. 3-6(A) Black dots)。凍結融解後、37° C で 60 分反応させたリポソームをフローサイトメーターで計測すると、-nutrient 条件では反応リポソームはリポソーム全体の内 1%未満だったのに対して、 +nutrient 条件では 27%であった。また反応前では、両条件下ともに反応リポソ ームはリポソーム全体の内 1%未満であった。以上の結果より、凍結融解によっ て RNA 複製反応に必要な物質を供給すると、全てのリポソームの内、およそ 30% のリポソーム内で RNA 複製反応が起こることが分かった。残りのリポソーム 70%のうちー部は RNA 複製反応に必要な物質を一部供給されなかったリポソ ムや、Fig. 3-6(A) +nutrient FSC-SSC 図赤枠内に見られるような、リポソームが破 裂した後、脂質が凝集した脂質塊が生じ、それがフローサイトメーターで粒子 として計測された(Fig. 3-6(A) +nutrient FSC-SSC 図赤枠内)と考えられる。



Fig. 3-5 SYBR を用いたリポソーム内 RNA の定量手法の確立

(A)Rep-RNA(+鎖)を 0 nM, 5 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM 封入したリポソームに 対して外液に SYBR Green II を添加し RNA を染色した。縦軸をリポソームの脂 質膜を標識した蛍光脂質の赤色蛍光強度(ATTO633)、横軸を SYBR の緑色蛍光 強度とした。(B)リポソームの蛍光脂質膜の蛍光強度が ATTO633 F.I. = 8,000-12,000 のリポソーム((Fig. 2-10(A))におけるリポソームサイズの最頻値) に対して、SYBR の蛍光強度の中央値をプロットした。縦軸を RNA の濃度、 横軸を SYBR の蛍光強度とした。RNA 濃度と SYBR の緑色蛍光強度の近似式 は、RNA (nM) = 1.33×SYBR F.I.となった。







Fig. 3-6 リポソーム融合後のリポソーム内 RNA 複製および SYBR を用いた RNA の定量

フローサイトメーターと共焦点顕微鏡を用いて、SYBR で染色したリポソーム 内 RNA の測定をした。(A)リポソーム融合後のリポソーム内 RNA 複製。凍結 融解後に RNA 複製反応を 0 min させたものと 60 min させたリポソームの外液 に SYBR Green II を加え、フローサイトメーターで SYBR 蛍光の測定をした。 -nutrient と+nutrient のそれぞれの条件は本文 3-4-2 を参照。縦軸はリポソームの 蛍光脂質の赤色蛍光強度、横軸は SYBR の蛍光強度とした。SYBR の蛍光強度 が 200 (a.u.)以上を示したリポソームを緑色のドットとして示した。(B)リポソ ーム内 SYBR 蛍光強度から求めたリポソーム内 RNA 濃度。リポソーム内の RNA 濃度を(A)で得られたそれぞれの条件における SYBR の蛍光強度から求め た(Fig. 3-5 (B))。この時、SYBR の蛍光強度は膜の蛍光脂質の蛍光強度が ATTO633 F.I. = 8,000-12,000 のリポソーム((Fig. 2-10(A))におけるリポソームサ イズの最頻値)のリポソームについて調べた。それぞれのリポソーム条件につい てSYBRの中央値からRNA濃度を算出した。縦軸はリポソーム内のRep-RNA(+ 鎖および-鎖)の濃度、横軸は反応時間とした。(C)それぞれの条件での反応後の リポソームの共焦点顕微鏡画像。共焦点顕微鏡を用いて、リポソーム内の RNA を SYBR 蛍光で観察した。緑色蛍光は SYBR の蛍光、赤色蛍光はリポソームの 膜に含まれた蛍光脂質である。白い矢印は RNA が検出されなかった脂質の塊 を示した。

3-4-3 共焦点レーザー顕微鏡による RNA 複製の観察

フローサイトメーターの解析ではRNAの複製がリポソームの内側で起こった 可能性が高いと考えられる。しかし、凍結融解後に外液交換をすることで外液 に漏れた RNA 量や複製酵素などの RNA 複製反応に必要な物質の濃度を減らし たため、外液での RNA 複製反応は起こりづらいと考えられるものの、外液で RNA が複製し、複製された RNA がリポソームの脂質に吸着し、SYBR 蛍光を持 つリポソームとしてフローサイトメーターで検出された可能性を排除しきれな い。そこで、蛍光顕微鏡を用いてリポソーム内で RNA 複製が起こったかどうか を確認した。まず RNA リポソームと Nutrient リポソームを用意し、凍結融解に よって融合を促進し、その後 37°C で 120 分間 RNA 複製反応を進行させた。そ の後、SYBR Green II を外液に添加し、共焦点レーザー顕微鏡(Leica TCS SP8; Leica Microsystems)を用いて観察を行った。NTP 及び Qβ-replicase を含むリポソ ーム(+nutrient)と融合させたリポソームは RNA 複製後、蛍光脂質膜で囲まれた 区画内で SYBR Green II 蛍光が見られた (Fig. 3-6(C) (+nutrient))。このような蛍 光脂質膜内での SYBR Green II 蛍光は NTP 及び Qβ-replicase を含まないリポソー ム(-nutrient)と融合させたリポソームでは見られなかった(Fig. 3-6(C) (-nutrient))。 また、このような SYBR Green II 蛍光は膜蛍光リポソーム外には見られなかった ことから、RNA はリポソーム内で複製されたと考えられる。加えて、リポソー ムの他に、内部が脂質で詰まった脂質塊も観察された。このような脂質塊は SYBR Green II 蛍光がほとんど観察されなかったことから、内部の空間が脂質で 詰まっており RNA 複製反応に必要な基質や RNA が封入されていなかったと考 えられる(Fig. 3-6(C)矢印)。このような脂質塊は 3-4-2 で言及したフローサイトメ ーター上で内液相を持たないと予想された集団ではないかと考えられる(Fig. 3-6(A) + nutrient FSC-SSC 図赤枠内)。以上の結果から、凍結融解によって反応が 起こらないリポソームが一部生じるものの、RNA 複製反応に必要な基質および 酵素を失活せずにリポソーム内に供給できることが分かった。

3-4-4 リポソーム内 RNA の分配

凍結融解によるポソーム融合を介して基質が供給されるときに、リポソーム 融合後のリポソーム分裂によって生じる子供リポソームへとリポソーム内の RNA が伝播することで、「RNA を持つリポソームの増殖」が達成できると考え られる。リポソーム融合によってリポソーム内部反応に必要な基質を供給する とき、供給するリポソーム内には RNA が含まれていない(Fig. 3-7(A))。そのため、 凍結融解によるリポソーム融合後、リポソームが分裂し子供リポソームが生じ る際に、一つのリポソームからいくつのリポソームに伝播し、RNA 複製反応が 起こるリポソームがどれだけ生じるかは反応区画の増加にとって非常に重要な 要因となる。そこで、Nutrient リポソームの添加によって RNA を持つリポソー ム数の全リポソーム数に対する割合が減少した後、凍結融解後に RNA が伝播す ることでRNA複製反応が起こるリポソーム数の割合が増加するのかについて検 討した。まず、RNA リポソームと Nutrient リポソームをリポソーム数が 1:1 に なるように混合し、凍結融解によってリポソームを融合させて 120 分 37°C で 反応させた。その後、反応後のリポソームに対して再びリポソーム数が 1:1 にな るように Nutrient リポソームを加え凍結融解によってリポソームを融合させた 後再び 120 分 37°C で反応させた。一回目の反応では、反応リポソームは全体 のリポソームに対して 50%であり、50%のリポソームが少なくとも RNA を保持 していた(Fig. 3-7(B) 1:1, 1st 120 min)。それに対して、リポソーム数に対して 1:1 でNutrientリポソームを加えたため、計算上ではRNAを持つリポソーム数は25% になるはずであった。しかし、二回目のリポソーム内 RNA 複製反応後にフロー サイトメーターで測定を行うと反応リポソームは全体のリポソームに対して 57%であり、予想の 2.2 倍のリポソームが RNA を持っていた(Fig. 3-7(B) 1:1, 2nd 120 min)。すなわち、凍結融解によるリポソーム融合では、少なくとも1つのリ ポソームから自身を含み 2.2 個のリポソームに対して RNA が伝播したと考えら れる。同様の実験をリポソーム数について Nutrient リポソームが RNA リポソー ムの 99 倍になるように混合して行った。一回目の RNA 複製反応では、反応リ ポソームが全体のリポソームに対して 16%であった。その後、再びリポソーム 数が 1:99 になるように混合し、凍結融解によってリポソームを融合させたとき、 RNA を持つリポソームは計算上 0.16%になると考えられた。しかし、二回目の 反応後にリポソームをフローサイトメーターで測定すると、反応リポソームは 全体のリポソームに対して 12%であった。すなわち、この条件下ではリポソー ムは凍結融解によってリポソーム融合し、その際に一つのリポソーム由来の

RNA が少なくとも自信を含み 75 個のリポソームに対して分配されたと考えら れる。以上の結果から、Nutrient リポソームを加え凍結融解によってリポソーム 融合を促すと、RNA を持つリポソームの増殖が確認された。これは、RNA 複製 反応に限らず、遺伝物質を用いる反応に対して、リポソーム融合によって基質 を供給するだけではなく、RNA の分配やリポソームの分裂によって反応区画の 数自体を維持ないし増殖させていくことが可能であることを示唆している。



Fig. 3-7 RNA 複製反応が起こったリポソーム区画の増加

リポソーム融合によってRNA はいくつの子供リポソームに対して伝播するかに ついて検討した。(A)RNA 複製後の親リポソームに対して RNA を持たない Nutrient リポソームを過剰量加えて凍結融解によって融合させ、RNA 複製反応 させた時の概略図。一つの RNA リポソーム由来の RNA が五つのリポソームに 伝播し、それぞれの中で RNA 複製反応が起こったとした。(B)RNA リポソーム と Nutrient リポソームを 1:1 もしくは 1:99 の比で混合し凍結融解で融合させた 後、37℃120 分反応させたリポソームをフローサイトメーターで解析した。1 回 目の融合後に反応させたリポソームに対して、もう一度同じ比率で Nutrient リポ ソームを加えて融合させたときに、RNA を持つリポソームの数が希釈された時 の計算値と、実際に RNA 複製後に十分量の内包 RNA が検出されたリポソーム 数をそれぞれ記述した。二次元ドット図は縦軸をリポソーム膜の蛍光脂質の蛍 光強度、横軸を SYBR の蛍光強度とした。また、SYBR の蛍光強度が 200(a.u.) 以上のものを RNA が含まれているリポソームとし、緑色のドットで示した。

3-4-5 リポソーム内 RNA 複製反応の 10 回植え継ぎ

凍結融解を繰り返すことによってリポソーム融合を繰り返し導入し、何度も 反応に必要な物質を供給することで、人工細胞に「栄養の獲得」と「増殖能」 を同時に付与できる可能性が考えられる。3-4-4 で凍結融解によるリポソーム融 合を繰り返した際に、反応リポソームの数が保たれることが示された。そこで、 本項では 10 世代にわたってリポソーム内で RNA 複製反応を継続させたまま植 え継げるかどうか検討した。リポソームはこれまで一度調製した後長期間にわ たって保存する方法がなく要時調製するしかなかった。そこで細胞を保存する ようにリポソームを凍結状態で保存できると、一度反応を止めることが可能に なるため、日を越えてリポソーム内から RNA を精製することなく反応を継続化 することが容易になることが期待される。そこで、内包物が失活しないよう人 工細胞を凍結保存可能かどうかについて調べた。具体的には、リポソームに対 して 10 回栄養を供給する際に、4 回目の RNA 複製反応後のリポソームに対して Nutrient リポソームを加え凍結した状態で-80°Cで保存し、保存したリポソーム を融解させると RNA 複製反応が再び起こるかどうかについて調べた。3-3-5 で 記述した通り、凍結融解による融合操作を 4 回行い、それぞれの世代における 凍結融解直後のリポソームと、反応後のリポソームのそれぞれに SYBR Green II を外液に添加し、フローサイトメーターを用いて SYBR 蛍光量を測定して、RNA 量を算出した(Fig. 3-8(D) (+nutrient 1st day) black line)。10 日後に、五回目の凍結 融解操作を行ったリポソームを RNA 複製反応させた後に Nutrient リポソームを 加えて凍結融解によって融合させる操作を1回目の融合操作から数えて10回に なるまで繰り返した。得られた試料に SYBR を加えてフローサイトメーターを 用いて蛍光量を測定した後、RNA 量を算出した(Fig. 3-8(D) (+nutrient 2nd day) red line)。Nutrient リポソームを加えて凍結融解操作を繰り返した場合、RNA 複製反 応による RNA 量の増加と、Nutrient リポソームを加えて、凍結融解操作をした ことによる RNA 量の減少が各世代において見られた。この時、基質などを含ま ないリポソームを加えて、凍結融解操作を四回繰り返したが、RNA 複製反応は 見られなかった(Fig. 3-8(D) (-nutrient) black line)。以上の結果から、リポソーム内 の RNA 複製反応に必要な分子を、凍結融解によるリポソーム融合によって 10 世代にわたって繰り返し供給できることが分かった。

RNA を持たないリポソームに対して RNA が拡散する(Fig. 3-7 (A))ことは、 3-4-4 で言及した通り、遺伝子の複製が起こる区画数が増加するために必要な過 程である。そこで凍結融解操作を 10 回繰り返した時に、反応リポソームのリポ ソーム全体に対する割合を調べた。すると、RNA 複製反応が起こったリポソー ム数が保たれることが分かった(Fig. 3-8(A) Green dot, (C))。しかし、RNA 複製反 応が起こったリポソームの割合は、フローサイトメーターでの解析では 60%以 上にはならず、常に RNA 複製反応が起こらなかったリポソームが存在した。顕 微鏡観察の結果から、RNA 複製反応が起こらなかったリポソームの一部は脂質 の塊であると推察される(Fig. 3-6(C))。このような RNA 複製反応が起こらない脂 質塊のような集団は、3-4-2におけるフローサイトメーターでの測定で検出され た脂質膜を多く持ち内液相がほとんどないリポソーム集団と同一の物と推測さ れる(Fig. 3-6(A) + nutrient FSC-SSC 図赤枠内)。このような脂質塊には RNA 複製 反応に必要な分子が含まれていないか、反応に必要な空間がないと考えられる。 以上の結果から、凍結融解を繰り返した際、RNA 複製が検出できないリポソー ムが常に存在したものの、RNA 複製反応が検出できたリポソームの割合が十世 代の間 40-60%の間で保たれたことが分かった。



Fig. 3-8 RNA 複製反応を内包したリポソームの十世代植え継ぎ

凍結融解によるリポソーム融合とリポソーム内 RNA 複製反応を十回繰り返し (Fig. 3-1)、それぞれの世代での RNA の複製をフローサイトメーターで解析し た。(A)一回目のリポソーム融合直後(1st 0 min)、一回目の融合後に 37℃で 60 分 間反応させたリポソーム(1st 60 min)、五回目の融合後に 37℃で 60 分間反応させ たリポソーム(5th 60 min)、十回目の融合後に 37℃で 60 分間反応させたリポソー ム(10th 60min)をフローサイトメーターで測定した。縦軸をリポソーム膜の蛍光 脂質の蛍光強度、横軸を SYBR の蛍光強度とした。(B)凍結融解を 10 回繰り返 した時の各世代のリポソームの脂質膜の蛍光強度をフローサイトメーターで解 析した。それぞれの世代で 37℃で 60 分間反応させたリポソームについて、脂 質膜の蛍光強度をヒストグラムとして表した。縦軸は相対頻度、横軸を脂質膜 の蛍光強度とした。(C)各世代の反応前後のリポソームについて、RNA 複製反 応が起こったリポソームの割合を解析した。各世代の反応前後のリポソームに ついて、SYBR の蛍光強度が 200 (a.u.)以上のリポソームを反応リポソームとし、 その割合を解析した。縦軸は反応リポソームの割合、横軸は一回目の凍結融解 直後を0分として、37℃で反応させた時間の合計とした。凍結融解1回目から 4回目を一日目(黒線)、5回目以降を二日目に行った(赤線)。(D)凍結融解を10 回繰り返した時の各世代のリポソーム内の RNA 量をフローサイトメーターで 解析した。各世代の反応前後のリポソームについて、脂質膜の蛍光強度が ATTO633 F.I. = 8,000-12,000 のリポソーム((Fig. 3-7(B))におけるリポソームサイ ズの最頻値)のリポソームを対象に、SYBR の平均蛍光強度からリポソーム内 RNA 濃度を算出した。縦軸をリポソーム内の Rep-RNA(+鎖および-鎖)濃度、横 軸を一回目の凍結融解直後を0分として、37℃で反応させた時間の合計とした。 また(C)と同様に1日目の世代を黒線で、二日目の世代を赤線とした。

79

3-5 考察

3-5-1 リポソーム融合による内部反応への基質供給と区画の増殖

細胞は遺伝情報を遺伝物質に保存し、分裂する際にはその遺伝物質が正確に 分配されて増殖していくが、人工細胞としてよく用いられるリポソームには、 このような遺伝物質を正確に分配する機能が備わっていない。しかし、遺伝物 質を正確に分配することはできなくとも、リポソームが融合後に分裂する際、 遺伝物質がリポソーム間を伝播することは、自己複製する人工細胞を構築する ために重要である。Nutrient リポソームを二回融合させた二世代目以降の親リポ ソームは、RNA 複製反応に必要な分子を持っている(Fig. 3-7(A))。それに対して 供給する Nutrient リポソームは反応に必要な分子を内封しているが、RNA は内 封していない。もし、リポソームが融合・分裂したときに RNA がリポソーム間 で伝播せず、基質のみが内液交換で供給された場合、RNA を持つリポソーム数 は加えた Nutrient リポソーム数に従って減少していくと考えられる。このような RNA を持つリポソーム数の減少が続くと、RNA 複製反応が起こるリポソームの 割合が減少していき、最終的には絶滅すると考えられる。しかし、その仮定と は異なり、RNA 複製反応が起こったリポソームの全体に対する割合は約 60%で 維持された(Fig. 3-8(C))。このことから、凍結融解によってリポソームが融合し、 内液および脂質膜が供給されたのち、続けて分裂が起こり子供リポソームに RNA が伝播したと考えられる。これにより、不等分配ではあるが、RNA および RNA 複製反応に必要な分子が分裂した子供リポソームに分配され、RNA 複製反 応が起こったと考えられる。

今回の研究で、凍結融解によるリポソーム融合を繰り返すことで RNA 複製反応が 10 世代継続できたが、ここで見られた RNA 量の増加と減少は 10 世代以降も継続できるかどうかについて考察した。これまでの解析から、凍結融解によってリポソームに封入した内液のうち 50%がリポソームの外へ漏れることが分かっており(Fig. 2-11)、今回の実験条件では融合の際に、二種類のリポソームが1:1 の量比で内液混合した場合、RNA の濃度は凍結融解直後に 1/4 になったと考えられる。実際に凍結融解後の RNA 濃度は、各世代でばらつきがあるものの、平均 0.5 倍、中央値 0.62 倍に減少したことが分かった。これは、予想よりも RNA

がリポソームの外部へ漏れにくい性質を持っていることを示唆している。また、 リポソーム内での RNA 複製量も各世代でばらつきはあるが、平均 2.4 倍、中央 値 2.3 倍に RNA が複製された。すなわち、凍結融解によるリポソーム融合での RNA に対する希釈の効果を打ち消すだけの RNA の複製が起こった(Fig. 3-8 (D))。 以上の結果から、凍結融解によるリポソーム融合は遺伝子の複製反応に対して 基質を繰り返し供給でき、そして遺伝子は長期にわたってリポソーム内に保持 され複製反応が繰り返されることが分かった。これを発展させ、遺伝子の複製 反応だけではなく、より複雑な生化学反応であるタンパク質の翻訳反応といっ た生物にとって重要な生化学反応に応用していくことで、様々な機能を持った 人工細胞を植え継いでいけるようになると期待される。

3-5-2 凍結融解を繰り返した際のリポソームサイズの変化

生化学反応を内包する区画の大きさは、内部に保持できる反応基質の量と相 関し、区画内反応の効率に影響すると考えられる。そのため、凍結融解を繰り 返していく間、リポソームの大きさが保たれることは反応に対して繰り返し基 質を供給するために重要である。そこで、リポソームの区画自体が凍結融解に よるリポソーム融合を繰り返した際にどのように変化していくかについてリポ ソームの大きさと反応が起こったリポソームの割合の二点に着目して調べた。 まず凍結融解を十回繰り返した時に、各世代におけるリポソームの大きさ(膜 脂質量)がどのように変化したのか、蛍光脂質由来の赤色蛍光強度を指標とし て調べた(Fig. 3-8(B))。その結果、凍結融解操作を繰り返してもリポソームの大 きさの最頻値はあまり変わらなかったことから、リポソームの大きさは10回の 凍結融解操作の間保たれていたことが分かった。これは凍結融解による融合・ 分裂に対してリポソームの大きさには一定の安定値が存在することを示唆して いる。次に、反応が起こったリポソームの全体に対する割合をみると全ての世 代において 40%以上のリポソーム内で反応が起こった。以上の結果から、凍結 融解によるリポソーム融合を繰り返すことで、RNA 複製反応を内包するリポソ ームに対して区画の成長・分裂と内部反応の継続化を同時に達成できたといえ る。

81

3-5-3 原始細胞における凍結融解による融合・基質獲得の可能性

原始生命が栄養を獲得する際に、本章で確立した「凍結融解によって栄養を 獲得する人工細胞系」のように、凍結融解によって外部から栄養を得た可能性 は考えられるだろうか。3-2-2 で論じたように、RNA は低温環境下では、ある程 度の安定性を獲得できることが報告されている[2]。その報告では、凍結によっ て液体状態の溶媒が減って、溶質が濃縮されることで、生化学反応が起こった 可能性を基に RNA world 仮説を支持している[2]。私はそのような外液中におけ る濃縮効果に加えて微小区画としての脂質膜小胞が原始生命の生化学反応に重 要な役割を果たしていたと考えている。具体的には、脂質膜により外液と内液 を分けることで、分子が存在する空間を微小にし、内封された分子が小胞内で 濃縮されることが生命にとって有利であったため、現在の細胞のような微小区 画が保存されてきたのだと考えている。しかし、膜区画は同時に内外の物質の 通過を制限するため、現在の細胞のような膜タンパク質が発達していなかった と考えられる原始生命は、現在の細胞と異なる様式で基質を獲得する必要があ ったと考えられる[16]。基質獲得の手段としては様々な方法が考えられるが、今 回の凍結融解を介したリポソームの融合と分裂による基質獲得は、原始生命に おける栄養獲得法の一つとしてあり得たと期待される。実際に、生物でも様々 なタンパク質によって制御された形で膜融合を起こし、それによって物質の交 換を行っている[17-19]。このような膜融合による物質の交換が、原始生命では 物理刺激のような原始的な形で起こっていた可能性がある。本章における凍結 は液体窒素を用いた急速凍結であるが、前章でも議論した通り-20°C、-80°C でも基質獲得効率は下がるものの、リポソームの融合が見られた。このような 温度は原始地球でも十分にあり得たと考えられている[20]。そのため、原始生命 は膜内に遺伝物質を保持し、低温環境で凍結した際に隣接する生命と融合した り、膜に開いた穴を介して外部から栄養を獲得したりして遺伝子の複製をして いた可能性が考えられる。これらの可能性を実証するためには、より原始生命 に近い組成で膜区画を構築し、凍結融解によって隣接する膜区画や外液からど の程度物質を獲得できるのか、またそれにより内部反応を進行させることが可 能か調べていく必要がある。

3-5-4 まとめと今後の課題

本章では、現在の生物にとって非常に重要な生化学反応の一つである RNA 複 製反応を、リポソーム内で再構築し、凍結融解という単純な物理刺激で基質を 封入したリポソームと融合させ、反応要素を供給できることを示した。またそ の際に、内部反応が長期間継続したと同時に、反応が起こっている区画数が維 持されたことを示した。今回モデル反応として用いた RNA 複製は一つの酵素に よる単純な生化学反応である。そこで、次章では、生物にとって重要な生化学 反応の一つであるタンパク質合成反応をモデルとして、より多くのタンパク質 が共同して働く複雑な生化学反応に対して凍結融解によるリポソーム融合で基 質を供給できるかについて検討を行った。

参考文献

- 1. Gilbert, W., Origin of life: The RNA world. Nature, 1986. 319(6055).
- Vlassov, A.V., et al., Ligation activity of fragmented ribozymes in frozen solution: implications for the RNA world. Nucleic Acids Res, 2004. 32(9): p. 2966-74.
- Szostak, J.W., D.P. Bartel, and P.L. Luisi, *Synthesizing life*. Nature, 2001. 409(6818):
 p. 387-90.
- Deamer, D.W., *The first living systems: a bioenergetic perspective.* Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1997. 61(2): p. 239-261.
- Kita, H., et al., Functional Qbeta replicase genetically fusing essential subunits EF-Ts and EF-Tu with beta-subunit. J Biosci Bioeng, 2006. 101(5): p. 421-6.
- Haruna, I. and S. Spiegelman, Specific template requirments of RNA replicases. Proc Natl Acad Sci U S A, 1965. 54(2): p. 579-87.
- Brown, D. and L. Gold, *RNA replication by Q beta replicase: a working model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(21): p. 11558-62.
- 8. Biebricher, C.K., M. Eigen, and R. Luce, *Kinetic analysis of template-instructed and de novo RNA synthesis by Q beta replicase.* J Mol Biol, 1981. **148**(4): p. 391-410.
- Chakrabarti, A.C., et al., Production of RNA by a polymerase protein encapsulated within phospholipid vesicles. Journal of Molecular Evolution, 1994. 39(6): p. 555-559.
- 10. Fujii, S., et al., In vitro evolution of alpha-hemolysin using a liposome display. Proc

Natl Acad Sci U S A, 2013. 110(42): p. 16796-801.

- 11. Sunami, T., et al., *Detection of association and fusion of giant vesicles using a fluorescence-activated cell sorter.* Langmuir, 2010. **26**(19): p. 15098-103.
- 12. Pautot, S.F., B.J.; Weitz, D.A., *Production of unilamellar vesicles using an inverted emulsion*. Langmuir, 2003. **19(7)**: p. 10.
- Tsuji, G., et al., Sustainable proliferation of liposomes compatible with inner RNA replication. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. 113(3): p. 590-5.
- 14. Ichihashi, N., et al., *Darwinian evolution in a translation-coupled RNA replication system within a cell-like compartment.* Nat Commun, 2013. **4**: p. 2494.
- Nishimura, K., et al., Population analysis of structural properties of giant liposomes by flow cytometry. Langmuir, 2009. 25(18): p. 10439-43.
- Blain, J.C. and J.W. Szostak, *Progress toward synthetic cells.* Annu Rev Biochem, 2014. 83: p. 615-40.
- 17. Tamm, L.K., J. Crane, and V. Kiessling, *Membrane fusion: a structural perspective* on the interplay of lipids and proteins. Curr Opin Struct Biol, 2003. **13**(4): p. 453-66.
- Jahn, R. and H. Grubmuller, *Membrane fusion*. Curr Opin Cell Biol, 2002. 14(4): p. 488-95.
- Lentz, B.R., Polymer-induced membrane fusion: potential mechanism and relation to cell fusion events. Chem Phys Lipids, 1994. 73(1-2): p. 91-106.
- Zahnle, K., L. Schaefer, and B. Fegley, *Earth's earliest atmospheres*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. 2(10): p. a004895.

第四章:リポソーム融合による再構成無細胞翻訳系の供給

4-1 概要および本論文での位置づけ

本章では、前章までで確立した凍結融解によるリポソーム融合手法を用いて、 リボソームなどの巨大タンパク質を含む再構成無細胞翻訳系を供給できるかど うかについて検討を行った。タンパク質の合成反応は、遺伝子の複製反応と同 様、現存する全ての生物に共通している生化学反応の一つであり、非常に多く の種類のタンパク質や核酸などを必要とする複雑な反応である。この章では、 緑色蛍光タンパク質(GFP, Green fluorescent protein)をモデルタンパク質として用 いて、再構成無細胞翻訳系をリポソーム融合によって供給し、リポソーム内で タンパク質の翻訳をさせることができるかについて検討を行った。この時、複 製反応とは異なる糖濃度や組成の溶液をリポソームに封入し、またリポソーム 外液についてもタンパク質の翻訳反応の最適化のために前章までとは組成を変 えた。それによってリポソーム融合が起こらない可能性が懸念されたが、リポ ソーム内での GFP 合成が確認された。しかし、RNA の複製反応と比較して、タ ンパク質の翻訳反応が起こったリポソームの割合は少なかった。本章の結果よ り、凍結融解によるリポソーム融合は遺伝子の複製反応だけではなくタンパク 質の合成反応に必要なリボソームのような巨大タンパク質を含む、再構成無細 胞翻訳系という多くの生化学物質の混合液を失活させずに供給できる手法であ ることが分かった。次の章ではこれらの二つの反応を共益させたより複雑な反 応に対してリポソーム融合を繰り返すことで、リポソーム内の基質枯渇を回避 し、生化学反応を長期にわたって維持することを目指した。

4-2 背景

4-2-1 再構成無細胞翻訳系による GFP 合成

タンパク質の翻訳反応は全ての生物にとって必須となる反応の一つである。 翻訳反応は、tRNAやリボソームといった多くの生化学物質が関わっている複雑 な反応だが、無細胞翻訳系と呼ばれる実際の細胞の抽出液を利用して細胞外で 遺伝物質から任意のタンパク質合成を行うことができる。この際に用いられる 無細胞翻訳系として大腸菌由来の酵素類が一般的である[1]。しかし、このよう な生物由来の無細胞翻訳系は、含有成分やその濃度が既知ではないため細胞外 での反応において最適化することが難しく、細胞外でのタンパク質の合成量な どの予測や制御が困難である。また、人工的に細胞を再構築し、生命と非生命 の境界を解明する際に、全ての要素が既知であることが望ましい。過去に、タ ンパク質の翻訳反応に必要な生化学物質を別々に精製し、それぞれの濃度を調 整して既知濃度の混合液として作られた再構成無細胞翻訳系が報告されている。 例えば、Shimizu らは再構成無細胞翻訳系を開発し、ジヒドロ葉酸還元酵素、GFP、 λリゾチームなどを細胞外で合成することに成功した[2]。私の研究室では、この 再構成無細胞翻訳系を独自に改良し、タンパク質の合成量をより高くした再構 成無細胞翻訳系を用いてきた[3,4]。

本章では GFP の翻訳反応を、リポソーム内での生化学反応のモデルとして用 いた。これまでに、再構成無細胞翻訳系によりリポソーム内でのタンパク質合 成反応が可能であることが報告されている[5, 6]。GFP 合成反応は、合成された GFP の蛍光を検出することでフローサイトメーターや共焦点レーザー顕微鏡な どを用いることでタンパク質の合成を容易に観察することができる。この性質 を利用して、凍結融解によるリポソーム融合によって再構成無細胞翻訳系を供 給し、タンパク質合成反応が可能であるかについて検討を行った。この時に、 遺伝情報として、GFP 発現用のプラスミド(pETG5tag)(Fig4-1)[4]を角南博士より 頂き、プラスミドから GFP の遺伝情報部分の RNA を作製した。その RNA をり ポソーム内に封入し、凍結融解によるリポソーム融合により再構成無細胞翻訳 系を供給することで GFP が翻訳されることを示した(Fig 4-2)。



Fig 4-1 pETG5tag プラスミド

GFP の遺伝子情報を持ったプラスミドの概要。



Fig 4-2 リポソーム融合による再構成無細胞翻訳系の供給

凍結融解による再構成無細胞翻訳系の供給についての概略図。GFP の遺 伝情報をコードした RNA を封入したリポソームと再構成無細胞翻訳系 を封入したリポソームを用意し、それらを混合後、遠心によってリポソ ーム同士を接触させた。その後、-196℃で凍結融解をし、37℃で 180 分 反応させた後、GFP 蛍光を測定した。異なるリポソーム間での内液の交 換が起こった場合にのみ GFP が合成された。

4-2-2研究における本章の位置づけ

タンパク質は生体内において、遺伝子の複製反応や脂質の合成、細胞分裂の 制御など様々な生化学反応に関わっている。そのため、タンパク質の合成反応 は非常に重要な生化学反応の一つとして注目されており、この反応に必要な物 質を繰り返し供給することは、「内部反応が継続しつつ増殖する人工細胞」の構 築にとって重要である。本章では、多数の分子が共同して働くタンパク質の合 成反応に必要な分子を凍結融解によるリポソーム融合によって供給できるかど うかについて検証した。これまで報告されてきたリポソームを人工細胞モデル として用いた実験室内進化では、リポソーム内で一過性の反応を行い、優れた 形質を持つ遺伝子を分取し、リポソーム内から回収して、再びリポソームに封 入する過程で濃縮していくことで、実験室内において遺伝子の変異を通した進 化を再構築する試みがされてきた[7]。しかし、生命は自身の遺伝情報を保持し、 複製し、そしてそれを膜区画に包まれたまま次世代に分配していく過程で、遺 伝子の変異が蓄積していくとされている。そのため、生物における進化を実験 室内で再現するためには、外部から栄養を供給し区画内の反応を継続させると 同時に、反応場である膜区画の増殖を達成しなくてはならない。実際に、油中 水滴(エマルジョン)を区画として用いて、その中で RNA からの RNA 複製酵 素の翻訳と翻訳された RNA によって RNA 自身が複製される RNA の自己複製反 応に対して、栄養を供給し反応を継続させると、封入した RNA の変異が蓄積し、 複製されやすい RNA が得られた報告がされている[8]。 そこで、 凍結融解による リポソーム融合手法を用いることで、膜区画内でのタンパク質の合成と、膜区 画の成長・分裂を同時に達成すること細胞様区画内での遺伝子進化の解析が可 能になると期待される。そこで次章以降で行う遺伝子の自己複製反応に対する 反応基質の供給の前段階として、本章では再構成無細胞翻訳系の供給手法の確 立を目指した。

4-3 実験材料及び方法

4-3-1 試薬

再構成無細胞翻訳系[5,6]

1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) (Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL)).

流動パラフィン (0.86-0.89 g/mL at 20°C) (Wako, Osaka, Japan).

SYBR premix Ex Taq II for quantitative PCR and PrimeScript reverse transcriptase (Takara, Tokyo, Japan).

RNA purification micro kit (QIAGEN, Venlo, Holland). RNase inhibitor (RNasin) (Promega, Madison, WI).

1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) labeled with ATTO 633 (ATTO 633-DOPE) (ATTO-TEC, Siegen, Germany) (赤色蛍光を示す蛍光脂質) 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) labeled with ATTO 390 (ATTO390 390-DOPE) (ATTO-TEC, Siegen, Germany) (紫外蛍光を示す蛍光脂質)

大腸菌 DH5α(Takara, Tokyo, Japan)

Primer

PCR T7-bGal-Sen02: CTCCTTTCAGCAAAAAACCCCCTCAAGACCC PCR T7-bGal-Ant02: CCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGG

4-3-2 プラスミド構築と RNA 合成

GFP 発現用のプラスミドとして、角南博士から pETG5tag プラスミド[4]を頂い た。pETG5tag は T7 プロモーターの下流に *GFPuv5* 遺伝子が存在し(Fig4-1)、 T7RNA 合成酵素を用いて mRNA を転写し、無細胞翻訳系と混ぜることで GFP 合成が可能となる。作成した pETG5tag を大腸菌 DH5α(Takara, Tokyo, Japan)に形 質転換して培養した後、Plasmid purification kit (Invitrogen)を用いて大量に精製し た。次に、図中の PCR T7-bGal-Ant02 から PCR T7-bGal-Sen02 の間の領域を PCR によって増幅した(Fig 4-1)。このとき、KOD FX (TaKaRa)を用いた。PCR 後に Invitrogen の PCR purification kit を用いて PCR 断片を精製した。その後、その PCR 断片をテンプレートとして、T7 RNA polymerase を用いて RNA 合成をし、RNA purification kit (Invitrogen)を用いて精製をした後、nano drop で RNA 濃度を計測 した。この RNA を以降 gfp-RNA とする。

4-3-3 再構成無細胞翻訳系によるタンパク質合成

再構成無細胞翻訳系は我々の研究室で作成したものを用いた(以降、リボソー ムやInitiation Factor, Elongation Factor, Release Factor,アミノRS などの巨大分子を 混合した溶液を Sol.B と呼ぶ)[3]。またこの時、小分子溶液として、以下の組成 の溶液を作製した(以下この溶液を Sol.A と呼ぶ。また各濃度は、リポソームに 内封した際の終濃度とする)。

Sol.A: 0.3 mM 20 amino acids, 0.8 μ G/ μ L tRNA mix, 3.75 mM ATP, 2.5 mM GTP, 1.25 mM CTP, 1.25 mM UTP, 100 mM HEPES-KOH (pH7.6), 280 mM potassium glutamate, 1.5 mM spermidine, 19 mM magnesium acetate, 2.5 mM phosphocreatine, 1.5 mM dithiothreitol, 0.01 μ g/ μ l 10-formyl-tetrahydrofolate

4-3-4界面通過法によるリポソーム調製

リポソームの調製方法は 2-3-2 と同様の手法を用いた[9, 10]。リン脂質である POPC の粉末をバイアルに分取し、クロロホルムに終濃度 0.1 mg/μL になるよう に溶解させた。その後、流動パラフィンに終濃度 5 mg/mL になるように溶解し た後、80°C で 30 分保温することでクロロホルムを蒸発させ、流動パラフィンに 脂質を完全に溶かした。POPC を溶解した流動パラフィンをガラスチューブに 400 μL ずつ分注したのち、クロロホルムに 1 mg/mL になるように溶解した ATTO633(赤色蛍光物質)が結合した DOPE あるいは ATTO390(紫外蛍光物質)が結 合した DOPE を 4 μL 加え、撹拌した後、80°C で 5 分保温し、氷上で流動パラフ ィンを冷やした。その後、以下の組成のリポソーム内液とリポソーム外液を用 いて界面通過法によってリポソームを作製した。

リポソーム内液

RNA リポソーム: Sol.A, 200 mM sucrose, 2000 nM gfp-RNA

Empty リポソーム: Sol.A, 200 mM sucrose

Sol.B リポソーム:Sol.A, Sol.B, 200 mM sucrose

リポソーム外液

Fusion: Sol.A, 300 mM glucose, 1.12 mM magnesium acetate

Incubate: 300 mM glucose, 1.12 mM magnesium acetate

界面通過によるリポソームの調製時およびその後の凍結融解までは外液とし Fusion を用い、4-3-5 において凍結融解後に凍結融解によってリポソームから漏 れた物質を除くために外液交換をしたときに外液を Incubate に変えた。

4-3-5 凍結融解によるリポソーム融合法

4-3-4 で用意した二種類のリポソームをリポソームの粒子数が 1:1 になるよう にエッペンドルフチューブ内で混合した後、18,000 g (14,000 rpm) 5 分 4°C で遠 心してペレット状にした。次に、-196°C(液体窒素)で 5 分間凍結させた。それを 室温で融解させた後、凍結融解時に漏洩した内液の成分を取り除くために、リ ポソーム溶液を 18,000 g (14,000 rpm) 5 分 4°C で遠心し、Incubate 溶液(4-3-4)と 交換した。その後リポソーム内でのタンパク質合成を誘導するため 37 °C で 180 分反応させた。

4-3-6 フローサイトメーターを用いたリポソーム解析

フローサイトメーター(FACS Aria II, BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA)を 用いて、蛍光脂質を指標にしたリポソームの脂質膜量や粒子ごとの内封された 蛍光物質量などを計測し、リポソームの大きさや内液の混合などの解析を行っ た。4-3-3 および 4-3-4 で調製したリポソーム試料を、希釈液(300 mM Glucose, 20 mM magnesium acetate, 50 mM HEPES-KOH (pH7.6))を用いて 1/100 に希釈した。 本章では、GFP と ATTO633 および ATTO390 の蛍光を測定した。

GFP は 488 nm 波長の半導体レーザーで励起させ、蛍光波長を 530±15 nm バ ンドパスフィルター(FITC-A)で検出した。ATTO633 は 633 nm 波長の HeNe レー ザーで励起させ、蛍光波長を 660±10 nm バンドパスフィルター(APC-A)で検出 した。ATTO390 は 375 nm 波長の近紫外レーザーで励起させ、蛍光波長を 450±20 nm バンドパスフィルターで検出した。

4-3-7 共焦点レーザー顕微鏡を用いたリポソーム解析

共焦点レーザー顕微鏡(Leica TCS SP8; Leica Microsystems)を用いた顕微鏡観察では、GFP と ATTO633 の蛍光について観察を行った。GFP の蛍光はアルゴンレ

ーザー(488 nm 励起光) で励起させ 490-550 nm の蛍光を検出した。ATTO633 は HeNe レーザー(633 nm 励起光)で励起させ、650-710 nm の蛍光を検出した。

4-4 結果

4-4-1 凍結融解による再構成無細胞翻訳系の供給

凍結融解によるリポソーム融合によって、再構成無細胞翻訳系を供給できる かどうかについて、GFP 合成反応をモデル反応として検討した。2-4-3 において 凍結融解の際に内液の 50%が外液に漏れることが分かったため、再構成無細胞 翻訳系の Sol.B の濃度を反応が起こるとされている濃度[3]の2倍にして用いた。 融合させるリポソームとして、一方のリポソームには赤色蛍光を示す ATTO 633-DOPE を用いて脂質膜を赤色蛍光標識して gfp-RNA を封入し(RNA リポソー ム)、もう一方のリポソームには ATTO 390-DOPE を用いて脂質膜を紫外蛍光標 識して再構成無細胞翻訳系を封入した(Sol.B リポソーム)。これら二種類のリポ ソームをリポソームの粒子数の比が 1:1 になるように混合し、遠心後、-196 °C で凍結させた後に融解することでリポソームを融合させた(+nutrient)。融合後に 外液を交換し、得られたリポソーム溶液の一部を回収した(0 分 sample)後 37℃ で 180 分間タンパク質翻訳反応を進行させた(180 分 sample)。そして回収した 試料を用いてフローサイトメーターでの解析を行った。またこの時、Sol.B リポ ソームだけでなく、Sol.B を含まず、脂質膜を ATTO 390-DOPE を用いて標識し たリポソーム(Empty リポソーム)を対照実験として用いた(-nutrient)。まず 0 分 では GFP 蛍光が検出できるリポソームは、-nutrient 条件、+nutrient 条件ともに 見られなかった(Fig. 4-3(A)(1)および(4))。それに対して、180 分反応させたリポ ソームでは、-nutrient 条件では GFP 蛍光が検出できるリポソームはほとんどな かったのに対して(Fig. 4-3(A)(2))、Sol.B 条件では 11%のリポソームが GFP 蛍光 を示していた(Fig 4-3 (A)(5) Green dot および Fig. 4-3(B))。この GFP 蛍光が検出 できたリポソームがどのような膜組成をしているかについて調べた。すると、 もともとは RNA リポソームと Sol.B リポソームは別々の膜蛍光を持っていたの に対して、GFP 蛍光を示していたリポソームはこれら両方のリポソーム由来の |膜蛍光物質を有していた(Fig 4-3 (A)(6) Green dot)。以上の結果から、凍結融解に

よってリポソームを融合させることで、再構成無細胞翻訳系に含まれる巨大分 子を不足することなく供給し、タンパク質の合成反応に成功したことが示唆さ れた。

次に、フローサイトメーターで見られた GFP の合成が、リポソームの中で合 成されたものか、リポソームの外で合成されたものかを区別するために、共焦 点レーザー顕微鏡でリポソームを観察した。フローサイトメーターによる測定 では GFP が合成されたことは分かったが、GFP がリポソーム外で合成された可 能性を完全には配乗できないので、リポソーム内で GFP 合成がされたことを確 認するために共焦点レーザー顕微鏡を用いてリポソームを観察した。共焦点レ ーザー顕微鏡では ATTO390 の紫外蛍光を検出することができなかったため、 ATTO633 の蛍光と GFP 蛍光の観察をした。すると、Fig 4-3(C) で見られるよう に、-nutrient 条件では GFP の緑色蛍光が見られないのに対し、+nutrient 条件で は膜蛍光で包まれた区画の内側に GFP 蛍光が見られた。また、この GFP 蛍光は 膜に蓄積している様子が見られず、リポソーム内部で GFP 合成がされていない 場合には、膜の蛍光だけが見られた。このことから、フローサイトメーターで 見られた GFP の蛍光は、リポソーム内で合成された GFP が検出されたものだと 考えられる。以上の結果より凍結融解によって再構成無細胞翻訳系を供給しタ ンパク質の合成反応をリポソーム内で再構築することに成功した。



(B)

リポソーム内GFP合成





Fig 4-3 凍結融解後のリポソーム内 GFP 合成

(A)凍結融解後のリポソームについて反応前後でのフローサイトメーターを用いた GFP 蛍光の計測。-nutrient は再構成無細胞翻訳系を含まないリポソームを加えて融合させ、+nutrient は再構成無細胞翻訳系を含むリポソームを加えて融合させた(Fig 4-2)。各条件についてそれぞれ 100,000 個のリポソームを測定した。縦軸は蛍光脂質(ATTO633)の蛍光強度である。(1),(2),(4),(5)は横軸 GFP の緑色蛍光強度を示し、GFP 蛍光を持つリポソーム(蛍光強度>200)は緑色のドットで示した。(3),(6)は縦軸を ATTO633 の赤色蛍光強度、横軸を ATTO390 の紫外蛍光強度として図を作成した。(1)(4)はリポソーム融合直後のリポソーム、(2),(3),(5),(6)はリポソーム融合後、180 分間 37℃でインキュベートした後のリポソームをそれぞれ計測した。(B)GFP 蛍光を示すリポソーム(Fig 4-3 (A) Green dots)の全リポソームに対する割合を棒グラフとして示した。(C)それぞれの条件においてリポソームを融合させた後(Fig 4-2)、180 分反応させたリポソームを共焦点蛍光顕微鏡で観察した。

4-5 考察

4-5-1 再構成無細胞翻訳系の供給効率

本章では、リポソームを-196 ℃で凍結させた後融解することでリポソームが 融合し、それによって再構成無細胞翻訳系が供給されリポソーム内でタンパク 質の翻訳反応が起こることを示した。また、タンパク質の翻訳反応が見られた リポソームの膜組成を解析すると、もともと別のリポソーム(RNA と再構成無細 胞翻訳系を封入した別個のリポソーム)由来の蛍光脂質を両方持っていることが 分かった(Fig 4-3 (A)(6))。このことから、凍結融解によって再構成無細胞翻訳系 という数十種類の巨大分子の混合溶液を供給するためには、隣接するリポソー ム間での膜の再編成が起こるほどリポソームの脂質膜に大きな穴が開く必要が あったと考えられる。

リポソーム融合によって再構成無細胞翻訳系が供給され GFP の合成が見られ たリポソームの割合はおよそ 11%であり、前章で見られた RNA 複製反応を起こ していたリポソームの割合である 50-60%に比べて低い値となった(Fig. 3-8 (C))。 この理由としては二つの可能性が考えられる。一つ目は再構成無細胞翻訳系が RNA 複製反応に必要な基質数よりも多くの成分を含んでいることである。RNA 複製反応では、RNA 複製酵素と NTP(ATP. UTP. CTP. GTP)の5種類の基質を供給 したのに対し、再構成無細胞翻訳系ではリボソームのような巨大分子を含む数 十の要素[5,6]を供給した。タンパク質の翻訳反応には、これら因子を全て欠け ることなく供給しなくてはならないが、必要要素の増加によって供給に失敗す る要素の出現確率が高くなる。例えば、二つの因子を供給する際、それぞれが 50%の確率で供給に失敗すると仮定すると、両方供給できる確率は25%であるが、 因子が3つに増えると12.5%になる。そのため要素の欠失が起こらず、数十の 要素全てを供給できる確率は要素数が多い再構成無細胞系の供給時に下がった 可能性が考えられる。二つ目の可能性としては GFP 蛍光の検出感度の問題が挙 げられる。RNAの複製反応では、SYBRによるRNAを染色することで低濃度の RNA であってもリポソームあたり数百分子の RNA の検出ができていた(Fig. 3-4 (A))。一方、リポソーム内で合成された GFP の蛍光をフローサイトメーターで 検出するためには GFP 分子が千分子以上必要であることが報告されている[6]。

そのため、GFP を数十から数百分子合成したリポソームが存在していたとして も、それらを検出できなかったという可能性が考えられる。今回の実験結果だ けではこれらの可能性についてどちらが原因であるか特定はできなかった。し かし、凍結融解によるリポソーム融合により再構成無細胞翻訳系を供給し、タ ンパク質の翻訳反応をリポソーム内で再構築することに成功した。この手法は RNA 上の遺伝子を変えるだけで脂質の合成や RNA の複製反応など様々な生化 学反応に応用できると期待される。そこで、次章では RNA 複製酵素をコードし た RNA を用いて、タンパク質の翻訳と RNA の複製という二種類の生化学反応 が内包されたより複雑な人工細胞への基質供給を目指した。

4-5-2 凍結融解によるリポソーム融合の人工細胞構築における重要性

凍結融解によるリポソーム融合を応用することで複数の生化学反応に必要な 物質を同時に供給できることを本章で実証した。これまでの結果から、凍結融 解によるリポソーム融合は遺伝子の複製反応及びタンパク質の合成反応といっ た様々な生化学反応に応用できることが分かり、またタンパク質の合成反応と いった多くの生化学物質が働く複雑な反応に対しても基質を供給できることが 分かった。しかし、現時点での課題としてこのような基質の供給を複数回行う ことが可能であることは実証されていない。第三章では遺伝子の複製反応とい う単一の酵素-基質反応への栄養の供給を繰り返すことを示した。GFP の合成反 応は遺伝子の複製反応と異なり、定量的な増減の議論が困難であり、二回目以 降の基質供給後のタンパク質合成を測定することが難しいと予想された。そこ で、次章ではタンパク質の合成と遺伝子の複製を組み合わせた遺伝子の自己複 製反応といった複数の生化学反応が同時に働いている反応をモデルとして、そ のような反応に対して基質を繰り返し供給できるかどうかについて検証してい く。これまでに、このような複雑な反応に対して、基質を複数回供給できた例 は報告されていない。もし、このような複数の生化学反応に対して基質を繰り 返し供給することが可能となれば、細胞のように数十の反応を内包した人工細 胞に対して基質を供給すると同時に区画を増殖させることが可能になると期待 される。

97

4-5-3 まとめと展望

本章では、凍結融解によるリポソーム融合を介して再構成無細胞翻訳系をタ ンパク質の翻訳能を持ったまま供給し、RNAからGFPの合成反応が起こること を示した。この結果は、リポソーム型人工細胞に対してNTPのような小分子や RNA複製酵素のような単一のタンパク質による生化学反応のみではなく、多く の酵素やタンパク質が共同して働く生化学反応に対して、機能を失活させるこ となく必要な生化学物質を供給できることを示している。そこで次の段階とし て、複数の生化学反応が同時に働いているような、より細胞に近づけた人工細 胞に対して同様に基質を供給することができるかについて検討を行った

参考文献

- Pluckthun, A., et al., *In vitro selection and evolution of proteins*. Adv Protein Chem, 2000. 55: p. 367-403.
- 2. Shimizu, Y., et al., *Cell-free translation reconstituted with purified components*. Nat Biotechnol, 2001. **19**(8): p. 751-5.
- 3. Matsuura, T., et al., *Quantifying epistatic interactions among the components constituting the protein translation system.* Mol Syst Biol, 2009. **5**: p. 297.
- 4. Kazuta, Y., et al., *Synthesis of milligram quantities of proteins using a reconstituted in vitro protein synthesis system.* J Biosci Bioeng, 2014. **118**(5): p. 554-7.
- 5. Hosoda, K., et al., *Quantitative study of the structure of multilamellar giant liposomes as a container of protein synthesis reaction.* Langmuir, 2008. **24**(23): p. 13540-8.
- 6. Nishimura, K., et al., *Cell-free protein synthesis inside giant unilamellar vesicles analyzed by flow cytometry*. Langmuir, 2012. **28**(22): p. 8426-32.
- Fujii, S., et al., *In vitro evolution of alpha-hemolysin using a liposome display*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. 110(42): p. 16796-801.
- 8. Ichihashi, N., et al., *Darwinian evolution in a translation-coupled RNA replication system within a cell-like compartment*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 2494.
- Pautot, S.F., B.J.; Weitz, D.A., Production of unilamellar vesicles using an inverted emulsion. Langmuir, 2003. 19(7): p. 10.
- Tsuji, G., et al., Sustainable proliferation of liposomes compatible with inner RNA replication. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. 113(3): p. 590-5.

第五章:リポソーム内 RNA 自己複製反応への栄養供給

5-1 概要および本論文での位置づけ

人工細胞に、「自身の遺伝子から翻訳されたタンパク質を用いて内部の生化学 反応が進み」「その反応が外部からの栄養供給によって継続する」という性質を 持たせることで、進化能をもった人工細胞を構築できると期待される。本章で は、第三章で確立した遺伝子の複製反応を内包したリポソームへの栄養供給と、 第四章で確立したタンパク質の翻訳反応を内包したリポソームへの栄養供給を 組み合わせて、RNA 自己複製反応を内包したリポソームへの栄養供給を目指し た。第四章では再構成無細胞翻訳系を一回供給し、タンパク質翻訳反応が起こ ることを示したが、本章では再構成無細胞翻訳系を繰り返しリポソーム内に供 給しながら、RNA 自己複製反応を長期間継続させられることを示した。第三章 で示した RNA 複製反応に対してリポソーム融合を繰り返し、栄養を供給した場 合と異なり、RNA 自己複製反応に対して再構成無細胞翻訳系の供給を繰り返す と、RNA 自己複製反応における RNA 複製量が減少することが分かった。その ため、現時点では RNA 複製量の低下が見られるものの、再構成無細胞翻訳系を 供給しRNA 自己複製反応を内包するリポソームを6回植え継ぐことに成功した。 この手法を改善することにより、ダーウィン進化を細胞と似た構造を持つリポ ソームにおいて再構築できることが期待される。

5-2 背景

5-2-1 再構成無細胞翻訳系を用いた RNA 自己複製反応

生物の細胞内では、遺伝子から様々なタンパク質が翻訳され、それらの働き によって生化学反応が進行する。この時、遺伝子を構成している塩基の配列に 変異が加わることで、翻訳されるタンパク質の性質が変わり、そのタンパク質 が触媒する生化学反応の効率が上下する。この時、生化学反応の効率が上がる などによって、集団の中でその形質が生存に有利になった場合、そのような形 質を持った個体は子孫を増やしやすいため、集団内でそのような子孫が多数派 を占めるようになり、変異した遺伝子配列が固定される。このような生存に有 利な遺伝子が選択されることを自然選択と呼び、この自然選択によって生物は 進化してきたという説がダーウィンに提唱され、多くの科学者によって検証が されている[1]。

実験室内でこのような自然選択による遺伝子の進化を再構築することは、人 工細胞に生物と同様に進化しうる形質を持たせ、原始生命の発生における進化 能の役割を解明するために重要である。このような進化能を持たせるために、 油中水滴を細胞様の反応場として用いた実験系において、RNA の自己複製反応 が再構成された[2]。RNA の自己複製反応は、Qβ-replicase の遺伝子をコードした RNA から、再構成無細胞翻訳系を用いて RNA 複製酵素を翻訳し、翻訳された RNA 複製酵素が RNA を複製する反応である。この反応を油中水滴という微小 空間内で再構築し、RNA を一分子だけ封入することで、RNA から翻訳される RNA 複製酵素の活性は封入された RNA の遺伝子によって決まる。この時、よ り複製能が高い RNA 複製酵素の遺伝子を持った RNA は、自身から翻訳された 酵素によって他の RNA よりも多く複製される。その結果、集団内でそのような RNA が多数派を示すようになり、進化能を再構築できると考えられる。過去の 報告では、RNA 自己複製反応を油中水滴内に封入し、その油中水滴に栄養を内 包した油中水滴を撹拌によって融合させることで、長期間 RNA 複製反応を植え 継いだところ、ダーウィン進化が起こったことが示された[2]。このように、油 中水滴において遺伝子の進化が報告されているが、リポソーム型人工細胞では このような進化能を持たせたという報告はされていない。その理由としては、 第二章でも述べたとおり、リポソーム内に外部から栄養供給を繰り返す方法が これまで確立されていなかったからである。そこで、私は、リポソームを人工 細胞モデルとして用い、凍結融解によってリポソームを融合させることで栄養 供給をすることで RNA 自己複製反応を長期間継続させるとともに、リポソーム が分裂することを利用して RNA を子供リポソームに伝播させる系を確立するこ とを目指した。このような系を確立することで、リポソームに進化能を付与で きると考えられ、このような人工細胞を用いることで、生命の起源において原 始細胞が区画内に遺伝子を保持し、そして栄養を獲得することで区画内の反応 が継続した結果、進化が起こり得たことを示すことができると期待できる。
5-2-2 研究における本章の位置づけ

生物は、遺伝子の変異によって生存に有利なタンパク質を獲得した個体が子 孫を増やしていくというダーウィン進化をしてきたと考えられている。のよう な進化能を人工細胞に付与するためには、遺伝子がタンパク質に翻訳され、翻 訳されたタンパク質が人工細胞の増殖に有利な形質を持つというような反応系 を構築する必要がある。本章では、第二章で確立した凍結融解によるリポソー ム融合を用いて、第三章、第四章でそれぞれ示した RNA 複製反応とタンパク質 の翻訳反応を組み合わせた RNA 自己複製反応に対して栄養を供給し、リポソー ム内 RNA 自己複製反応(Fig. 5-1)を継続させられるか検証した。油中水滴を用い た研究によって、RNA 自己複製反応を微小空間内で植え継げることは既に実証 されている[2]。しかし、油中水滴では器となる区画の大きさが人工的に制御さ れていたのに対し、本研究で用いているリポソームの大きさは制御していない。 そのため、このような大きさの異なる集団であるリポソームを用いて、油中水 滴と同様に RNA 自己複製反応が植え継げるかどうかは分からない。 そこで本章 では、リポソーム内 RNA 自己複製を長期継続させ、遺伝子の変化を解析するた めの進化能を持つ人工細胞の構築を目的とした。具体的には凍結融解によるリ ポソーム融合によって再構成無細胞翻訳系を供給し、RNA 自己複製系を継続さ せることを目指した(Fig. 5-3)。本章で確立した進化能を持ちうる人工細胞の系を 用いることで、生命の起源において、栄養を獲得し反応が継続することで進化 が起こりうるかを解明できることが期待される。

5-3 実験材料及び方法

5-3-1 試薬

再構成無細胞翻訳系[3,4]

1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) (Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL))

流動パラフィン (0.86-0.89 g/mL at 20°C) (Wako, Osaka, Japan)

SYBR premix Ex Taq II for quantitative PCR (Takara, Tokyo, Japan)

PrimeScript reverse transcriptase (Takara, Tokyo, Japan) RNA purification micro kit (Invitrogen, CA, USA) RNase inhibitor (RNasin) (Promega, Madison, WI) 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE) labeled with ATTO 633 (ATTO 633-DOPE) Primer Script Reverse Transcriptase (Takara, Tokyo, Japan) RNA purification micro kit (Invitrogen, CA, USA)

5-3-2 Primers

Rep-RNA(-鎖)に対する定量 PCR

Primer 2: CCACGGTCAGGACTGACACTCGTAG

Primer 4: CCACGGTCAGGACTGACACTCGTAGGGTATCGGTGGCATTCTACGC GA

Primer 5: GGTATCGGTGGCATTCTACGCGA

5-3-3 再構成無細胞翻訳系を用いた RNA 自己複製反応

本章では、リポソーム内の生化学反応として RNA 自己複製反応をモデル反応 とした。RNA 自己複製反応とは、第三章でも用いた Qβ-replicase の β サブユニ ットがコードされた Rep-RNA のプラス鎖を用いて、再構成無細胞翻訳系によっ て RNA 複製酵素が翻訳され、さらにその RNA 複製酵素によって Rep-RNA 自身 が複製されるという反応である(Fig. 5-1)。

再構成無細胞翻訳系のうちリボソームや Initiation Factor, Elongation Factor, Release Factor, aminoacyl-tRNA synthetase (aaRS)などの巨大分子を混合した Sol.B は 4-3-3 と同じ組成のものを用いた[5]。その他の小分子溶液 Sol.A については二種類の組成を用いた。

Normal Sol.A: 0.3 mM 20 amino acids, 0.8 μ G/ μ L tRNA mix, 3.75 mM ATP, 2.5 mM GTP, 1.25 mM CTP, 1.25 mM UTP, 100 mM HEPES-KOH (pH7.6), 280 mM potassium glutamate, 1.5 mM spermidine, 19 mM magnesium acetate, 25 mM creatine phosphate, 1.5 mM dithiothreitol, 0.01 μ g/ml 10-formyl-tetrahydrofolate

IT Sol.A : 0.3 mM 20 amino acids, 0.39 μ G/ μ L tRNA mix, 3.75 mM ATP, 2.5 mM GTP, 1.25 mM CTP, 1.25 mM UTP, 100 mM HEPES-KOH (pH7.6), 70 mM potassium glutamate, 0.375 mM spermidine, 16 mM magnesium acetate, 25 mM creatine phosphate, 6 mM dithiothreitol, 10 μ g/ml 10-formyl-tetrahydrofolate

*IT Sol.A は Normal Sol.A から、tRNA mix, potassium glutamate, spermidine, magnesium acetate, dithiothreitol, 10-formyl-tetrahydrofolate の濃度を変えた。

Normal Sol.A は第四章でも用いた組成で、タンパク質の翻訳に用いられている 組成である[3,4]。一方、IT Sol.A は過去の報告で RNA 自己複製反応を内包した 油中水滴の植え継ぎに用いられている組成である[2]。



Fig. 5-1 RNA 自己複製反応の概略図

RNA 複製反応とタンパク質翻訳反応を組み合わせた RNA 自己複製反応の概略 図。再構成無細胞翻訳系は Rep-RNA(+鎖)から RNA 複製酵素である Q β -replicase を翻訳し、翻訳された Q β -replicase は Rep-RNA(+鎖)からその相補鎖である Rep-RNA(-鎖)を合成する。また、 Q β -replicase は Rep-RNA(-鎖)を鋳型にし、 Rep-RNA(+鎖)の合成もする。

5-3-4 界面通過法によるリポソーム調製

リポソームの調製方法は 2-3-2 と同様の手法を用いた[6, 7]。リン脂質である POPC の粉末をバイアルに分取し、クロロホルムに終濃度 0.1 mg/μL になるよう に溶解させた。その後、流動パラフィンに終濃度 5 mg/mL になるように溶解し た後、80°C で 30 分保温することでクロロホルムを蒸発させ、流動パラフィン に脂質を完全に溶かした。POPC を溶解した流動パラフィンをガラスチューブに 400 μL ずつ分注したのち、クロロホルムに 1 mg/mL になるように溶解した ATTO 633(赤色蛍光物質)が結合した DOPE(ATTO 633-DOPE)を 4 μL 加え、撹拌 した後、80°C で 5 分保温し、氷上で流動パラフィンを冷やした。その後、以下 の組成のリポソーム内液とリポソーム外液を用いて界面通過法によってリポソ ームを作製した。

リポソーム内液

RNA リポソーム: Sol.A, 200 mM sucrose, 5 nM Rep-RNA Empty リポソーム: Sol.A, 200 mM sucrose Sol.B リポソーム:Sol.A, Sol.B, 200 mM sucrose

リポソーム外液

Fusion: Sol.A, 300 mM glucose, 1.12 mM magnesium acetate Incubate: 300 mM glucose, 1.12 mM magnesium acetate

界面通過によるリポソームの調製時およびその後の凍結融解までは外液とし て Fusion を用い、5-3-5 において凍結融解後に凍結融解によってリポソームから 漏れた物質を除くために外液交換をしたときに外液を Incubate に変えた。5-3-3 で記述した通り、この時、Sol.A について、異なる組成の Sol.A を二種類用意し た。それぞれの Sol.A は内液および外液について同種のものを用い、リポソーム を作製する際や外液を交換する際に異なる二種類の Sol.A を混合することはな かった。

5-3-5 凍結融解によるリポソーム融合

凍結融解によってリポソームを融合させ、再構成無細胞翻訳系の供給を行った。5-3-4 で用意した二種類のリポソームをリポソームの粒子数が RNA リポソーム:Nutrient リポソーム=1:2 になるようにエッペンドルフチューブ内で混合した後、18,000 g (14,000 rpm) 5 分 4°C で遠心してペレット状にした。次に、-196°C(液体窒素)で 5 分間凍結させた。それを室温で融解させた後、凍結融解時に漏洩した内液の成分を取り除くために、リポソーム溶液を 18,000 g (14,000 rpm) 5 分 4°C で遠心し、Incubate 溶液(5-3-4)と外液を交換した。その後リポソーム内でのタンパク質合成を誘導するため 37 ℃ で 120 分反応させた。

5-3-6 逆転写定量 PCR による RNA の定量

リポソーム内で RNA 自己複製反応が起こったかどうかを調べるために、 Rep-RNA のマイナス鎖を標的とした逆転写定量 PCR を行った(Fig. 5-2)。第三章 と異なりマイナス鎖を定量した理由は、リポソームには Rep-RNA のプラス鎖の みを封入しており、Rep-RNAのマイナス鎖はリポソーム内で Qβ-replicase が翻訳 された時のみに合成されるため、RNA 自己複製反応の産物として RNA 自己複 製反応の検出に適しているからである。凍結融解後のリポソーム溶液を 37°C で 120 分反応させた前後のリポソーム溶液をそれぞれ 10 µL 分取し、RNA purification micro kit を用いて RNA をリポソームから精製した。RNA 精製後、 Rep-RNA のマイナス鎖に対して相同配列をもつ Primer 1 を終濃度 100 nM になる よう加え、Primer Script Reverse Transcriptase 溶液(0.5 mM dNTP, PrimeScript buffer, 1 unit/µL RNasin, 20 units/µL PrimeScript Reverse Transcriptase)を用いて逆転写を 行った。逆転写後、cDNA 溶液を5倍に希釈し、終濃度 0.4 μM となるように Primer 2 と Primer 3 を加え、SYBR premix Ex Taq II for quantitative PCR (Takara)を加えて 定量 PCR を行った(Fig. 3-2)。SYBR の蛍光量の検出にはリアルタイム PCR 機器 (Mx3005P, Agilent Technologies)を用い、95°Cで30秒加熱した後、「95°C、5秒 で加熱し、63°C、30秒で反応させて SYBR 蛍光量のデータ取得」という過程を 50回繰り返した。



Fig. 5-2 再構成無細胞翻訳系の供給による RNA 自己複製反応の検出

Rep-RNA(-鎖)の検出法の概略図。本章で用いた Rep-RNA(-鎖)は第三章で用いた Rep-RNA(+鎖)の相補鎖である(Fig. 3-2)。リポソームから Rep-RNA を精製後、 Rep-RNA のマイナス鎖に対して Primer 4 (Primer の配列は 5-3-2 を参照)を用いて逆転写をした。この時 Primer 4 には RNA 上に存在しない配列(図中赤線)を 25 塩基付け加えており、その領域と相補な Primer 2(第三章と共通)を定量 PCR で用いることで、Rep-RNA(-鎖)の検出精度を上げた。定量 PCR では、Primer 2 と Primer 3 で挟まれた約 100 塩基の領域を増幅対象とした。

5-4 結果

5-4-1 再構成無細胞翻訳系の供給によるリポソーム内 RNA 自己複製反応

原始生命がどのように進化したかを解明するためには、「外部から栄養を獲得 し」「遺伝情報が複製され、その複製時に変異が入り」「遺伝子が子供に伝播し ていくことで、生存に有利な遺伝子が生き残る」という性質を持った人工細胞 を構築し、その人工細胞を長期的に植え継いでいく必要があると考えられる。 そこで凍結融解によるリポソーム融合で RNA 自己複製反応に必要な栄養を供給 できるか検討をした。具体的には、一方のリポソームに再構成無細胞翻訳系を 封入し(Nutrient リポソーム)、他方のリポソームに Qβ-replicase のβサブユニット がコードされた Rep-RNA のプラス鎖を封入した(RNA リポソーム)(Fig. 5-3)。リ ポソームが融合し、再構成無細胞翻訳系が Rep-RNA(+鎖)を持つリポソームに対 して供給された時に、Qβ-replicase が翻訳され、その後、翻訳された Qβ-replicase が Rep-RNA のプラス鎖をテンプレートとして Rep-RNA のマイナス鎖を合成す る (Fig. 5-1)と考えられる。そこで、凍結融解によって RNA リポソームと Nutrient リポソームを融合させ、37°Cで120分反応させた。この時、長期植え継ぎにお いて適している小分子の濃度を検証するすために、Normal Sol. A 条件と IT Sol. A 条件の二種類の Sol. A についてそれぞれ RNA の自己複製反応が起こるかについ て検討をした。反応後のリポソームから RNA を精製し、逆転写定量 PCR で Rep-RNA(-鎖)を定量した(Fig. 5-4)。すると、どちらの Sol.A 条件でも、反応後に Rep-RNA(-鎖)が合成されたことが分かり、凍結融解によるリポソーム融合で再 構成無細胞翻訳系が供給され翻訳反応および複製反応が起こったことが分かっ た。以上の結果から、凍結融解によるリポソーム融合によって再構成無細胞翻 訳系を失活させずに供給し、RNA 自己複製反応が起こることを示した。





凍結融解によるリポソーム融合を介して再構成無細胞翻訳系を繰り返し供給 したときの概略図。Rep-RNA(+鎖)を封入した RNA リポソームと再構成無細 胞翻訳系を封入した Nutrient リポソームを融合させ、37℃で 120 分反応させ ることで、RNA 複製酵素が翻訳され RNA 複製反応が起こった。そして RNA 複製反応後のリポソームに Nutrient リポソームを融合させ再構成無細胞翻訳 系を供給し、RNA 自己複製反応を継続させた。



Fig. 5-4 凍結融解後のリポソーム内での RNA 自己複製反応

凍結融解によるリポソーム融合で Rep-RNA を内包したリポソームに再構成無細胞翻訳系を供給し、逆転写定量 PCR で Rep-RNA(-鎖)を定量した。Normal Sol.A および IT Sol.A は再構成無細胞翻訳系の成分の内小分子を混合したもので、詳しい組成は、5-3-3 を参照。凍結融解直後を 0 分とし、37℃で 120 分反応させ、反応後のリポソームから RNA を精製した後、逆転写 PCR で Rep-RNA(-鎖)を定量した。縦軸は、定量に用いたリポソーム数で割った RNA 分子数とし、横軸は反応時間とした。

5-4-2 RNA 自己複製反応を内包したリポソームの六世代植え継ぎ

生物が持っている進化能を人工細胞に付与するためには、人工細胞に対して 栄養を繰り返し供給し、長期間生化学反応を継続させると同時に、反応を内包 した人工細胞を分裂によって増やす必要がある。凍結融解によるリポソーム融 合は第二章、第三章から融合後に分裂し、RNA が子供リポソームに伝播するこ とを示した。そこで、リポソームを融合させ、再構成無細胞翻訳系を繰り返し 供給するとともに、リポソーム分裂によって RNA を伝播させた時に、リポソー ム内反応である RNA 自己複製系を継続させられるかについて検討した。 具体的 には、一方のリポソームに再構成無細胞翻訳系を封入し(Nutrient リポソーム)、 他方のリポソームに QB-replicase の β サブユニットがコードされた Rep-RNA の プラス鎖を封入した(RNA リポソーム)(Fig. 5-3)。それらを凍結融解によって融合 させた後、37°Cで120分反応させた。反応後のリポソームを回収し、新しく Nutrient リポソームを加えて再び凍結融解によって融合させた後、37°C で 120 分反応させた。この操作を六回繰り返した後、それぞれの世代における凍結融 解後に反応させる前と反応させた後のリポソームからそれぞれ RNA を精製し、 逆転写定量 PCR によって RNA を定量した。その結果、最初の三回は二種類の Sol.A 両条件下で RNA の自己複製反応が起こった(Fig. 5-5 (A))。Normal Sol.A 条 件でリポソーム融合を繰り返していくと、四回目以降で RNA の自己複製反応の 効率が下がっていくことが分かった(Fig. 5-5(B))。 また、IT Sol.A でリポソーム融 合を繰り返した時では、五回目は RNA 自己複製が起こらず、六回目では RNA の定量ができなかった(Fig. 5-5(A)。このような現象は、IT Sol.A 条件では見られ なかった。以上の結果から、凍結融解によるリポソーム融合を使って、RNA 自 己複製反応を内包したリポソームに対して繰り返し栄養を供給し、RNA 自己複 製反応を継続できるとともに、RNA を内包した子供リポソームを繰り返し生み 出したことを示した。しかし、Normal Sol.A では四世代以降の RNA 複製量の低 下を改善する必要があり、IT Sol.A では複製量を改善する必要があると考えられ る。



Fig. 5-5 RNA 自己複製反応を内包したリポソームの六世代植え継ぎ

リポソーム融合を繰り返し、RNA 自己複製反応を内包したリポソームを六回 植え継いだ。(A)RNA 自己複製反応を内包したリポソームへの栄養供給を六回 繰り返し、逆転写定量 PCR で Rep-RNA(-鎖)を定量した。RNA リポソームと Nutrient リポソームを混合し、凍結融解した時点を0分とし、120分反応させた リポソームに Nutrient リポソームを加えて融合させるという操作を五回繰り返 した。反応前後のリポソームから RNA を精製し、逆転写定量 PCR によって RNA を定量した。定量した RNA 分子数を、RNA 精製に用いたリポソーム数 で割った値を縦軸とし、一回目の凍結融解直後を0分として、37℃で反応させ た時間の合計を横軸とした。一回目の反応前の Rep-RNA(-鎖)を定量できなかっ たため、便宜上 0.001 分子とした。また IT Sol.A 条件での六世代目は定量 RNA の検出限界以下であったためグラフから除いた。(B)RNA 自己複製反応を内包 したリポソームを植え継いだときに、各世代で RNA が何倍に複製されたか。 各世代における RNA 自己複製後の RNA 量を複製前の RNA 量で割った値を RNA 複製量とした。縦軸を RNA 複製量、横軸を世代数とした。一回目は複製 反応の RNA は定量できなかったため、一世代目の複製量は除いた。また、IT Sol.A 条件での六世代目は定量 RNA の検出限界以下だったため除いた。

5-5 考察

5-5-1 リポソーム融合による RNA 自己複製反応に対する栄養供給

本章では、凍結融解によるリポソーム融合を介して、RNA 自己複製反応を内 包したリポソームに対して再構成無細胞翻訳系を供給できることを示した。こ の時、第四章で用いたタンパク質の翻訳反応に適した Normal Sol. A と 5-5-2 で 詳しく説明するが parasite RNA の出現を防ぎ、 区画に封入された RNA 自己複製 反応を長期間継続させるのに適している IT Sol. A の二条件で、リポソーム融合 後の RNA 自己複製効率に差が出るかを調べた。過去の報告では IT Sol. A を用い て油中水滴中で長期間 RNA 自己複製反応を継続させることによって RNA 複製 酵素の遺伝情報が変化し、酵素活性の高い RNA 複製酵素の遺伝情報を持った RNAの取得に成功した[2]。同じ組成がリポソーム型の人工細胞においても有効 であるかは断言できなかったため、タンパク質の翻訳反応の効率が高いと報告 されている Sol. A 組成(Normal Sol. A)条件下[5]での実験も同時に行った(Fig. 5-4)。 リポソームを融合させ、RNA 自己複製が起こったかを調べたところ、両条件下 で Rep-RNA(-鎖)が合成されることが分かった。また、IT Sol. A の方が Normal Sol. AよりもRNAの複製量が少なかった。過去の報告より、これは、IT Sol.Aを用 いた時に RNA 複製酵素の翻訳量が減ることが原因であると考えられる[2]が、 RNA 自己複製反応を内包したリポソームを長期植え継ぐ時には IT Sol.A の方が 適している可能性があったため、両 SolA 条件で RNA 自己複製反応を内包した リポソームを植え継ぐことにした。

5-5-2 RNA 自己複製反応を内包したリポソームの植え継ぎ

本章での Rep-RNA を用いた RNA 自己複製反応への栄養供給は、4 世代以降に RNA 自己複製反応の効率が低下する現象が見られた。このような現象の原因と して、二つの可能性が考えられる。第一に、油中水滴における RNA 自己複製反 応への栄養供給時に発生した parasite RNA が生じた可能性が考えられる[8, 9]。 Parasite RNA は複製酵素の遺伝情報を持たず、複製酵素の認識配列を持った短い RNA を指す。このような parasite RNA は Rep-RNA と同じ区画内にあるときに、 Rep-RNA から翻訳された RNA 複製酵素によって Rep-RNA が複製される速度の 20 倍以上の速度で複製されると考えられる[8]。現在、一リポソームあたりの Rep-RNA の分子数は一以下になっているため(Fig. 5-5)、過去の報告[8, 9]から、 この状態で栄養供給を繰り返すことによって、parasite RNA は Rep-RNA と異な る区画に隔離されると期待される。Rep-RNA から隔離された parasite RNA は再 構成無細胞翻訳があっても RNA 複製酵素が翻訳されないため、区画内でそれ以 上増えることができない。そのため parasite RNA は絶滅し、再び Rep-RNA のみ の環境になるため、自己複製効率が上がると期待できる。第二に、凍結融解後 にリポソーム内に失活した再構成無細胞翻訳系が蓄積した可能性が挙げられる。 凍結融解時に RNA 自己複製反応後のリポソームと Nutrient リポソームが 1:2 で 融合したと仮定したときに、凍結融解時に内封液が 50%外液に漏れることも合 わせると、凍結融解を二回以上繰り返した再構成無細胞翻訳系の成分は二世代 目以降常に 17%残っていると考えられる。このような成分が計算値以上に残留 しやすくなっており、リポソーム内の大部分を占めることで、RNA 自己複製反 応を阻害した可能性が考えられる。これを回避するためには Nutrient リポソーム をより多く加えることで、リポソーム融合、分裂後の子供リポソームに持ち越 される再構成無細胞翻訳系の成分の割合を減らすなどといった対策が考えられ る。

5-5-3 自己複製する人工細胞を用いた初期生命の進化能の検証

本章では、外部から栄養を獲得し、内部反応の RNA 自己複製反応を継続させ ると同時に、膜区画が増殖するような「自己複製する」人工細胞の構築を目指 した。初期生命は多様な中立変異を持つ集団から生存に有利な形質を持つ個体 が生き残る自然選択によって進化してきたと考えられている。それを実証する ためには、外部から栄養を供給し、人工細胞モデル内で遺伝子の複製反応を長 期間継続させた時に、遺伝子に変異が導入され、それが蓄積することで、タン パク質の機能が変化することを示す必要がある。本章では、RNA 自己複製反応 に対して、凍結融解によるリポソーム融合を介して、反応に必要な栄養を繰り 返し供給できることを示した。リポソーム内で複製酵素が RNA を複製する際に RNA に変異を導入するため、RNA 複製を内包したリポソームを長期的に植え継 ぐことで変異を蓄積させることができると考えられる。すなわち、個々のリポ ソームは変異が入ったことにより少しずつ異なる Rep-RNA を持っており、リポ ソームを集団としてみると様々な形質を持った区画が存在していると考えられ る。このような Rep-RNA のうち、失活した RNA 複製酵素の遺伝情報を持つ RNA はリポソーム内で RNA 複製酵素が翻訳されても RNA が複製されない。Rep-RNA のうち、RNA 複製酵素の活性が上がった場合には、RNA 複製酵素の活性が変わ らない中立的な変異が入った場合よりも、より多くの Rep-RNA が合成されると 考えられる。凍結融解時にリポソーム内から内封物が外液に漏れると考えられ るため (Fig. 2-11)、栄養供給を繰り返し、長期間 RNA 自己複製反応を継続させ つつ区画の成長・分裂と RNA の分配を繰り返すことで複製活性の高い RNA 複 製酵素の遺伝情報を持つ Rep-RNA を内包したリポソームが増えると考えられる。 本章で確立した、Rep-RNA を用いた RNA 自己複製反応を継続させることで、初期 生命が進化しうるかを実証できると期待される。

5-5-4 まとめと展望

本章では、凍結融解によるリポソーム融合を介して、RNA 自己複製反応に 必要な基質を繰り返し供給できることを示した。これにより、外部から栄養を 供給し、翻訳された RNA 複製酵素が RNA 複製をする際に変異が導入され、そ れが子孫リポソームに伝播していくことで、より有利な特性を持つ RNA が多数 派を占めるという進化能を獲得した人工細胞を構築できたと考えられる。凍結 融解という現象は原始地球環境下でも起こり得たと考えられており[10]、遺伝子 を内包した原始的な細胞は本章で示してきたように凍結融解時に外部から栄養 を獲得し、区画内で生化学反応が継続したことが原始生命における進化を誘導 した駆動力の一つである可能性が考えられる。本章で達成した、リポソームに 対する RNA 自己複製反応への栄養供給をより長期的に継続させることで、進化 能を持った人工細胞を用いて原始地球下において凍結融解によって栄養を獲得 し遺伝子が進化しうるかという仮説について検証が可能になると考えられる。

参考文献

- 1. Caporale, L.H. and J. Doyle, *In Darwinian evolution, feedback from natural selection leads to biased mutations.* Ann N Y Acad Sci, 2013. **1305**: p. 18-28.
- 2. Ichihashi, N., et al., *Darwinian evolution in a translation-coupled RNA replication system within a cell-like compartment.* Nat Commun, 2013. **4**: p. 2494.
- Hosoda, K., et al., Quantitative study of the structure of multilamellar giant liposomes as a container of protein synthesis reaction. Langmuir, 2008. 24(23): p. 13540-8.
- 4. Nishimura, K., et al., *Cell-free protein synthesis inside giant unilamellar vesicles analyzed by flow cytometry.* Langmuir, 2012. **28**(22): p. 8426-32.
- 5. Kazuta, Y., et al., *Synthesis of milligram quantities of proteins using a reconstituted in vitro protein synthesis system.* J Biosci Bioeng, 2014. **118**(5): p. 554-7.
- Pautot, S.F., B.J.; Weitz, D.A., Production of unilamellar vesicles using an inverted emulsion. Langmuir, 2003. 19(7): p. 10.
- Tsuji, G., et al., Sustainable proliferation of liposomes compatible with inner RNA replication. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. 113(3): p. 590-5.
- 8. Bansho, Y., et al., Importance of parasite RNA species repression for prolonged translation-coupled RNA self-replication. Chem Biol, 2012. **19**(4): p. 478-87.
- Bansho, Y., et al., Host-parasite oscillation dynamics and evolution in a compartmentalized RNA replication system. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. 113(15): p. 4045-50.
- Zahnle, K., L. Schaefer, and B. Fegley, *Earth's earliest atmospheres*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. 2(10): p. a004895.

第六章:本論文の総括

6-1 本論文のまとめ

本論文では、「栄養を獲得し」「成長・分裂する」人工細胞を確立し、生命の 起源における栄養獲得手法を探るとともに、人工細胞が進化能を獲得しうるか ということを示すことを目指した。そのために必要な知見として、「栄養を繰り 返し供給できるリポソーム融合法」の確立が挙げられた(緒論参照)。本論文で は、人工細胞の器としてリポソームを用い、リポソーム同士の融合を凍結融解 によって促進することで、リポソーム内に栄養を繰り返し供給できることを実 証した。その結果、各章において以下のような知見が得られた。

第二章では、凍結融解によってリポソームを融合させたときに、凍結時の温 度や融解時の温度によって内液の混合および脂質膜の混合がどのように変化す るかを測定し解析した。その結果、凍結融解後に、蛍光タンパク質が混合し手 いることが分かった。また、凍結時の温度を低くすると、内液の混合について 異なるリポソーム由来の蛍光タンパク質が1:1 で混合する割合が高くなり、膜融 合したリポソームの数も増加した。また、-20℃や-80℃といった原始地球であり えたような温度で凍結したときでもリポソーム内液の混合が起こったことから、 原始生命がこのような凍結融解によって栄養を獲得していた可能性は十分にあ り得ると考えられる。以上の結果から、凍結融解によるリポソーム融合によっ て内液の混合と脂質膜の混合が見られ、生化学反応への栄養供給へ応用できる 可能性を示した。

第三章では、RNA 複製反応をモデルとして、RNA 複製酵素である Qβ-replicase と RNA 複製反応に必要な NTP などの小分子を凍結融解によるリ ポソーム融合で供給できるかについて解析を行った。特に、生化学反応におい て触媒として働く Qβ-replicase は凍結融解によって失活する可能性があった。 そこで、凍結融解によってリポソームを融合させ、RNA 複製酵素を失活させず に供給し、リポソーム内で RNA 複製反応が起こることをまず示した。その後、 RNA 複製反応と凍結融解によるリポソーム融合を介した栄養供給を繰り返すこ とで、十回にわたって栄養を繰り返し供給し、内部反応である RNA 複製反応を 継続させられることを示した。またこの時にリポソームが融合した後に分裂し、 RNA が子供リポソームに伝播することで、RNA 複製反応を内包したリポソー ムが増殖したことを示した。以上の結果から、一つの酵素によって駆動する単 純な生化学反応を内包した人工細胞に対して「栄養を繰り返し獲得し」「融合・ 分裂する」性質を付与できたことを実証した。

第四章では、タンパク質の翻訳反応という、複数のタンパク質が働く生化学 反応に必要な栄養を失活させずに供給できることを示した。本章ではGFP 合成 反応をモデルとして、GFP の遺伝情報をコードした RNA に対して再構成無細 胞翻訳系をリポソーム融合で供給した後、GFP がリポソーム内で合成されたこ とを確認した。この時、GFP が合成されたリポソームの膜は二種類のリポソー ム由来の蛍光脂質が混合しており、リポソームが融合したことによって再構成 無細胞翻訳系が供給されたことを示した。以上の結果から、凍結融解によるリ ポソーム融合で単一の酵素によって駆動する生化学反応だけでなく、複数の酵 素が必要となる生化学反応についても、栄養を供給できることを実証した。

第五章では、RNAの自己複製反応をモデルとして、再構成無細胞翻訳系を繰り返し供給できることを示した。しかし、現在の手法では、Normal Sol.A 条件下では融合を四回繰り返した以降はリポソーム融合後の RNA 自己複製反応の効率が下がることが分かった。IT Sol.A ではリポソーム融合後の RNA 自己複製 効率が低く、六世代目では RNA が検出できないほど希釈された。これらの課題 を解決し、RNA 自己複製反応を内包したリポソームの長期間培養を可能にする ことで、「進化能を持つ」人工細胞を確立できることが期待される。

6-2 最後に

本論文では、「栄養を獲得し」「成長・分裂する」人工細胞の確立を目指し、 6-1のような結果を得た。特筆する成果としては、これまで困難だと考えられて きた、生化学反応に必要なタンパク質などの生化学物質を失活させずに「繰り 返し」リポソーム融合によって供給できる手法を確立したことである。この手 法では RNA 複製反応といった単一のタンパク質によって駆動する生化学反応 だけでなく、再構成無細胞翻訳系という 40 種類のタンパク質を含む巨大分子の 混合液を失活させずに供給できた。以上の結果は、原始地球において自己複製 RNA を内包した原始生命が沈降によって隣接し、凍結融解によって融合するこ とで内液を交換し、区画内での反応が駆動され、また外部から栄養を繰り返し 獲得することで反応が持続化できることを示唆している。そのため、原始生命 が脂質二重膜で外環境と隔絶されていたとしても、融合を介して外界から基質 および脂質の獲得が可能であったと考えられる。すなわち、初期原始生命は、 膜タンパク質を利用するような現在の生物のような融合機構が不要であった可 能性が考えられ、生命の起源を研究する分野において重要な成果であると考え られる。それだけでなく、凍結融解という刺激によって任意の時点で脂質膜小 胞の融合を促進できるため、微小空間での反応に対して基質を供給できるとい う汎用性を生かし、本研究の成果が後続の研究に役に立てたら幸いである。

<u>業績</u>

印刷済主論文

<u>Tsuji G</u>, Fujii S, Sunami T, and Yomo T Sustainable proliferation of liposomes compatible with inner RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016. 113(3): p. 590-5.

国際学会口頭発表

(査読あり)

Tsuji G, Fujii S, Sunami T, Yomo T

Protein synthesis with liposome fusion and fission by using the freeze-thaw method

Alife XV

Cancun 2016/7

国内学会ポスター発表 (査読なし) <u>Tsuji G</u>, Sunami T, Yomo T 凍結融解によるリポソーム融合の導入とリポソーム内反応に必要な小分子の供 給法の確立 細胞を創る研究会 7.0 東京大学 2014/11

Tsuji G, Fujii S, Sunami T, Yomo T

Freeze thaw method for supply small nutrients to the liposome by inducing liposome fusion

第 53 回日本生物物理学会年会 金沢大学 2015/9

Tsuji G, Fujii S, Sunami T, Yomo T

Freeze thaw method for supply small nutrients to the liposome by inducing liposome fusion

細胞を創る研究会 8.0 大阪大学 2015/11

Tsuji G, Sunami T, Ichihashi N

Culturing artificial cells with RNA self-replication system for experimental evolution 細胞を創る研究会 9.0

早稲田大学 2016/11

謝辞

本研究を進めるにあたって適切なご助言・ご指導を賜り、私が研究者として の基礎を築く手助けをしてくださった角南 武志特任准教授、藤井 聡志特任 助教、市橋 伯一准教授に心より感謝の意を表します。本論文をまとめるにあ たり、博士論文審査会におきまして貴重な時間を割いていただき、適切なご助 言を頂きました上田 昌宏教授、近藤 滋教授、難波 啓一教授に深く感謝い たします。また、博士課程に進学の際に本研究室に受け入れてくださった当時 の教授に感謝いたします。修士時代に研究の厳しさと得られたデータに真摯に向き合う 姿勢を叩き込んでくださった篠原 彰教授、篠原 美紀准教授(蛋白質研究所)に深く感 謝いたします。本研究において必要不可欠であった再構成無細胞翻訳系を提供し てくださった数田 恭章博士に心より感謝いたします。博士課程を通じて、日々 の生活に潤いと笑いと癒しをくれた同期の明野 優也氏と高野 壮太郎氏に厚 く感謝の意を表します。博士論文を書くに当たりプログラムの悩み相談を快く 解決してくださった吉山 友明氏に深く感謝いたします。リーディングブログ ラム関係の書類などを快刀乱麻を断つごとく処理してくださった錫村 あき氏、 西村 登美子氏に深く感謝いたします。研究室での生活を明るいものにしてく れた共生ネットワークデザイン学講座の皆様には感謝してもしきれないほどで す。特に、黙々と仕事をしがちな私に積極的に話題を振ってくださった芝井 厚 氏と田中 基輝氏には感謝しています。冬の夜の栄養補給として鍋会を開催し ていた小森 隆弘氏の存在なくして冬の健康は保てなかったかもしれません。本当にあ りがとうございました。五年にわたる大学院生活において研究に専念できたの は、大阪大学リーディング大学院生体統御ネットワーク医学教育プログラムか らの援助のおかげです。心より感謝いたします。

最後に、博士課程の進学を応援し、背中を押してくださった父、母、弟、祖 父、祖母に深く感謝を申し上げます。五年間にわたった大学院生活は、家族を 含め多くの人々に支えられた日々であったと痛感しております。これまで受け た御恩を決して忘れることなく、今後の人生を通じて返していきます。本当に ありがとうございました。