



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

Abstract

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 synthesise, 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

第一章：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
第二章：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
	参考文献	48
	第三章：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
参考文献	83
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	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
第五章: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た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、真核生物のゲノム配列を用いて、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 Q β -virus 由来の RNA 複製酵素である Q β -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攪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、攪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攪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」人工細胞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、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(Q β -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、特にリポ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 Q β -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

1. 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.
2. Luisi, P.L., F. Ferri, and P. Stano, *Approaches to semi-synthetic minimal cells: a review*. Naturwissenschaften, 2006. **93**(1): p. 1-13.
3. 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).
5. Johnston, W.K., et al., *RNA-catalyzed RNA polymerization: accurate and general RNA-templated primer extension*. Science, 2001. **292**(5520): p. 1319-25.
6. 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.
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.
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. Edidin, M., *The state of lipid rafts: from model membranes to cells*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2003. **32**: p. 257-83.
12. 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.
13. Pluckthun, A., et al., *In vitro selection and evolution of proteins*. Adv Protein Chem, 2000. **55**: p. 367-403.
14. 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.
16. Kita, H., et al., *Replication of genetic information with self-encoded replicase in liposomes*. Chembiochem, 2008. **9**(15): p. 2403-10.
17. 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.
19. Chiarabelli, C., P. Stano, and P.L. Luisi, *Chemical approaches to synthetic biology*. Curr Opin Biotechnol, 2009. **20**(4): p. 492-7.
 20. 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.
 25. Zimmermann, U. and J. Vienken, *Electric field-induced cell-to-cell fusion*. J Membr Biol, 1982. **67**(3): p. 165-82.
 26. Stoicheva, N.G. and S.W. Hui, *Electrofusion of cell-size liposomes*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1195**(1): p. 31-8.
 27. 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.
 28. Caschera, F., et al., *Programmed vesicle fusion triggers gene expression*. Langmuir, 2011. **27**(21): p. 13082-90.
 29. 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]。

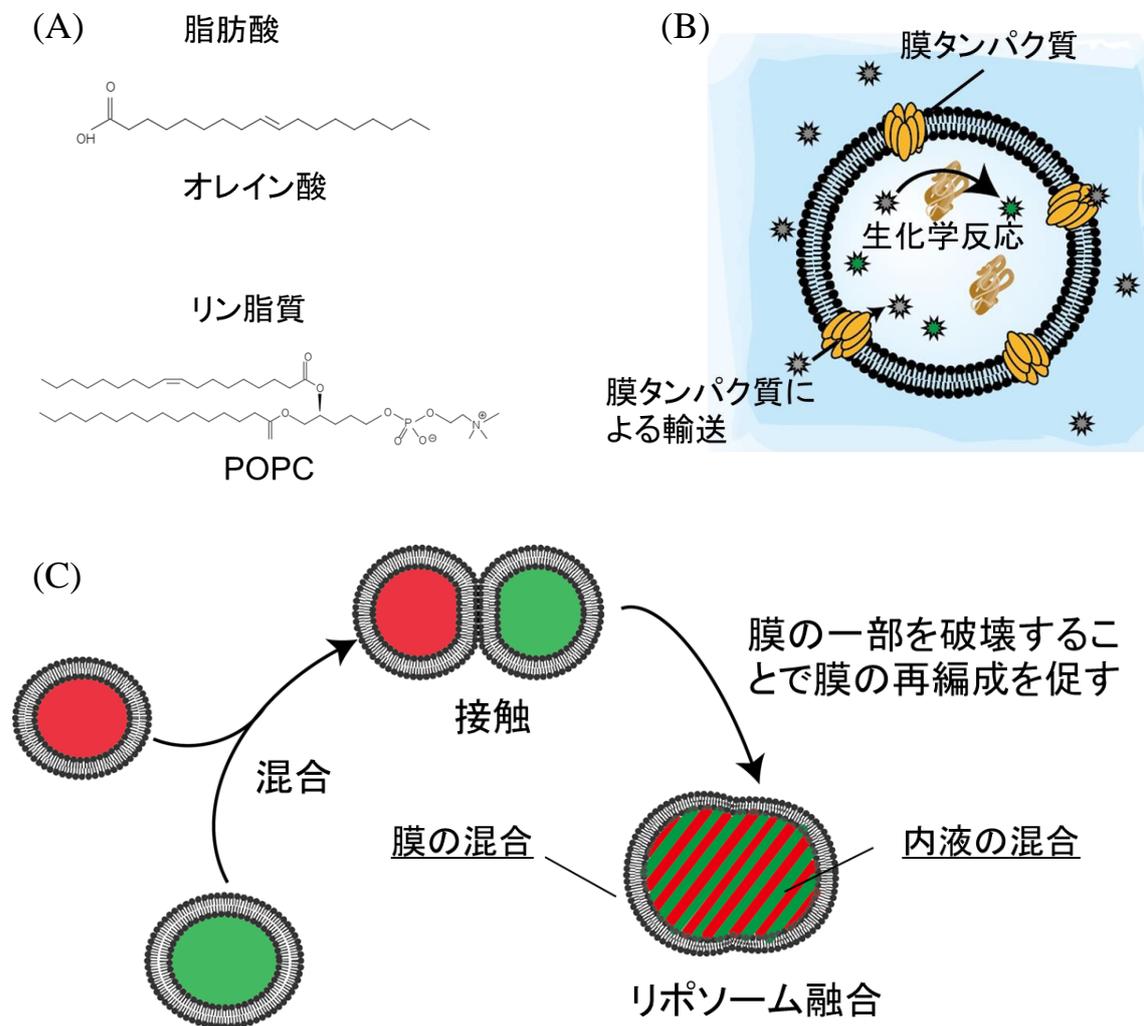


Fig. 2-1 リポソームの成長と分裂

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過し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過し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变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。

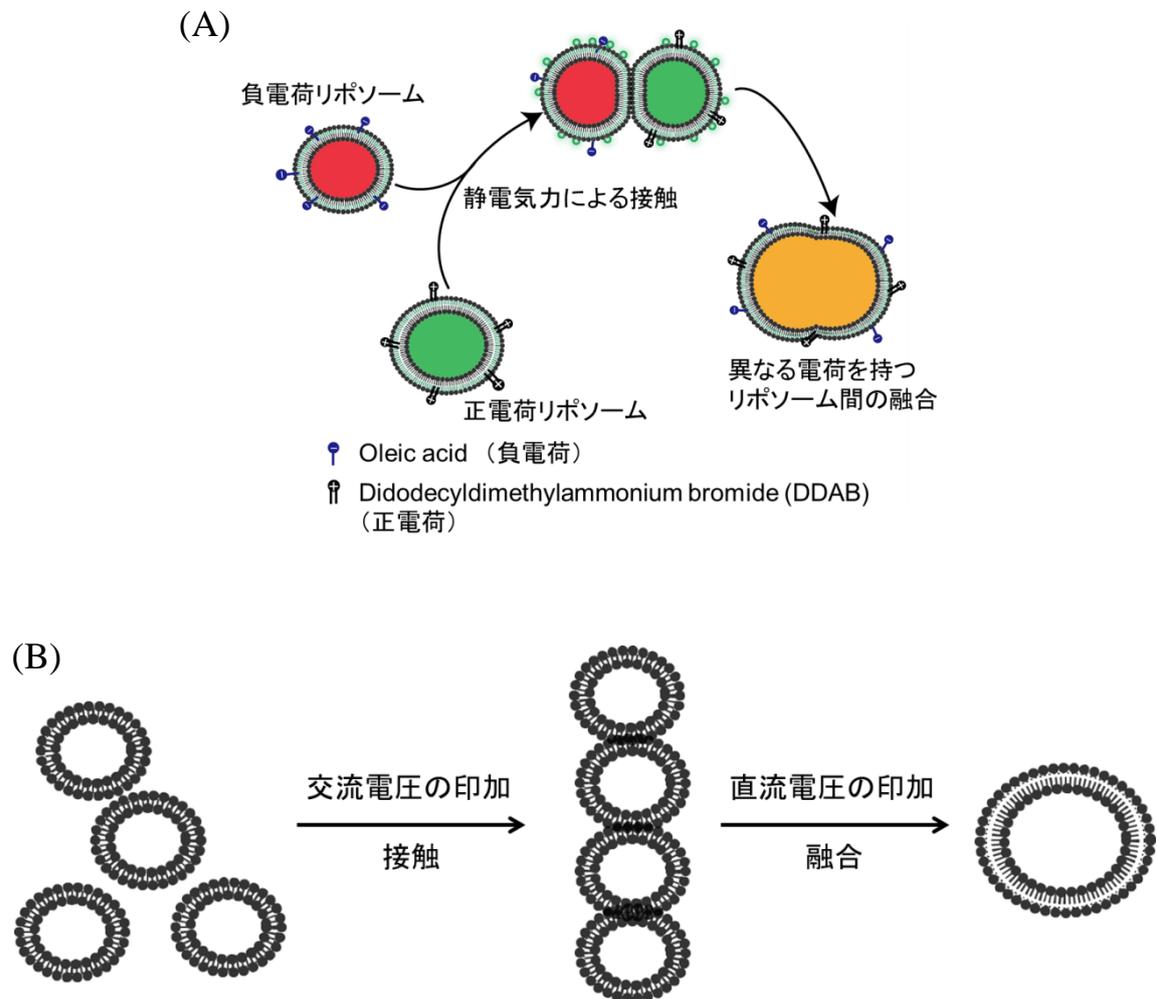


Fig. 2-2 リポソームの融合手法例

(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 (パールチェーンの形成)、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、膜の再編成が起こればと考えられ、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ればと予想される。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 μ L 加えて攪拌した後、80°C で 5 分保温し、氷上で流動パラフィンをやした。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 μ M 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、攪拌した後、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 μ M 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 μ L の脂質含有流動パラフィンに対して 20 μ L 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 μ L の 50 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 1 M glucose, 350 mM potassium glutamate 溶液の上に 400 μ L 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 μ L の 50 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 1 M glucose 溶液に交換した。

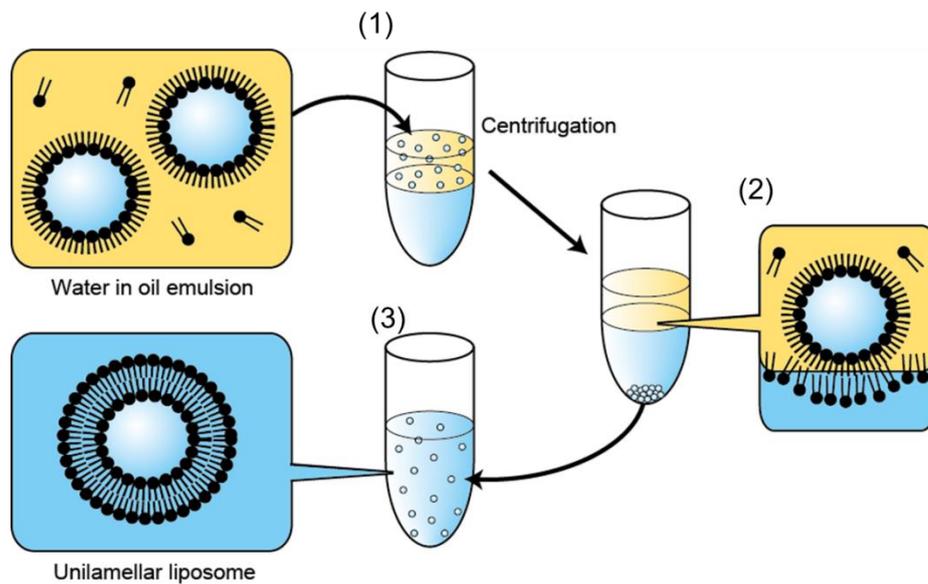


Fig. 2-3 界面通過法によるリポソームの形成

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°C で遠心してペレット状にした。次に、-20°C(冷凍庫内), -80°C(冷凍庫内), または -196°C(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°C 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。

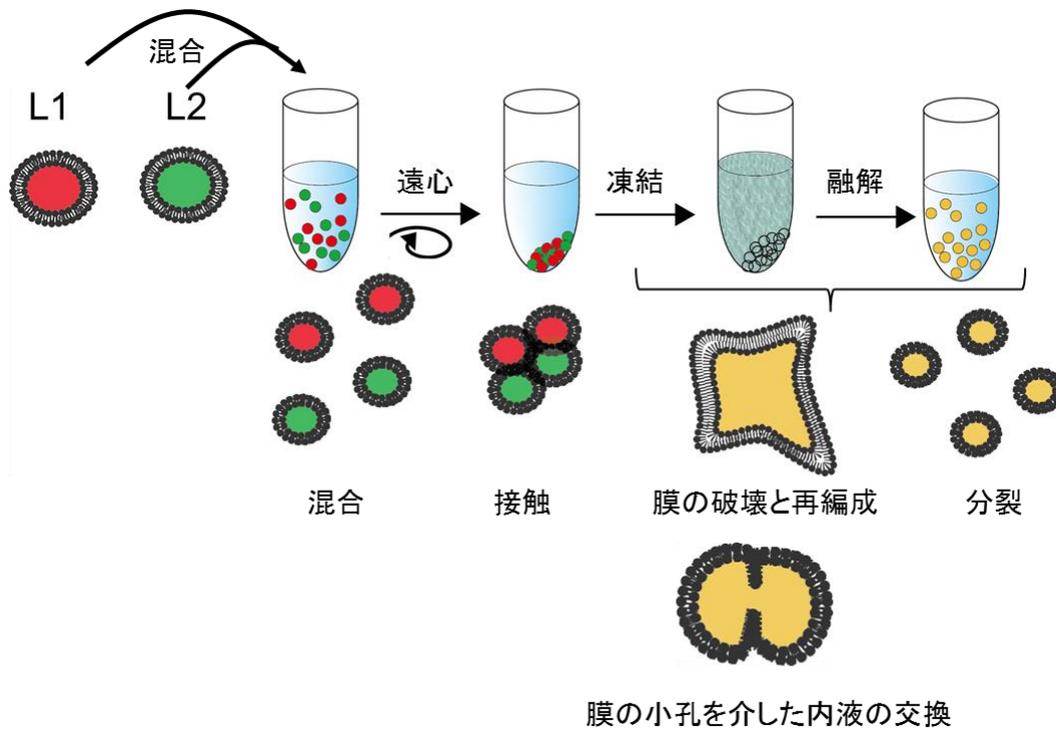


Fig. 2-4 凍結融解によるリポソーム融合

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 で用意したり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)、もう一方のリポソー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°C 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 $(111 * (\text{緑色蛍光強度}) - 1100)$ 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°C (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°C))。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°C 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°C (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。

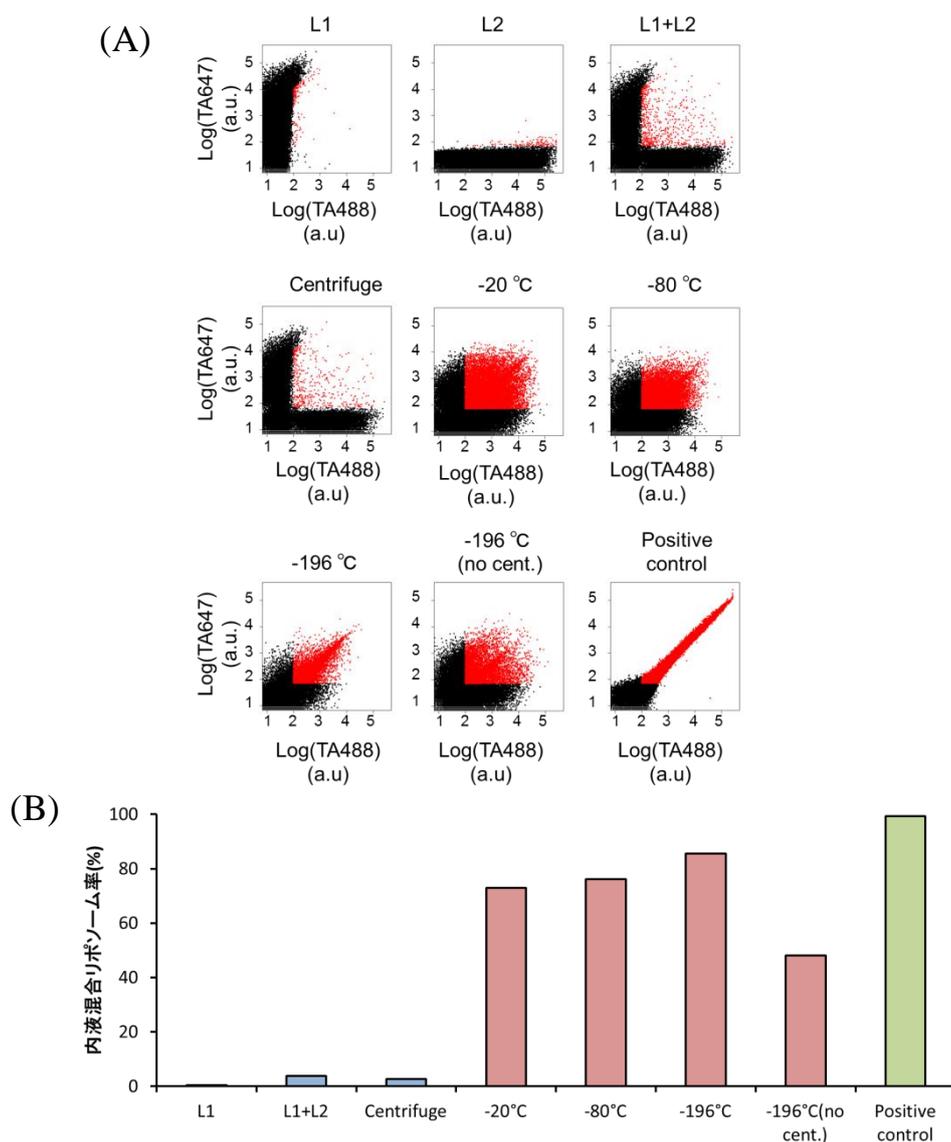


Fig. 2-5 凍結融解前後のリポソーム内液の混合

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
 らかじめ内封したり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、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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。 $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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、 $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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、 $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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。

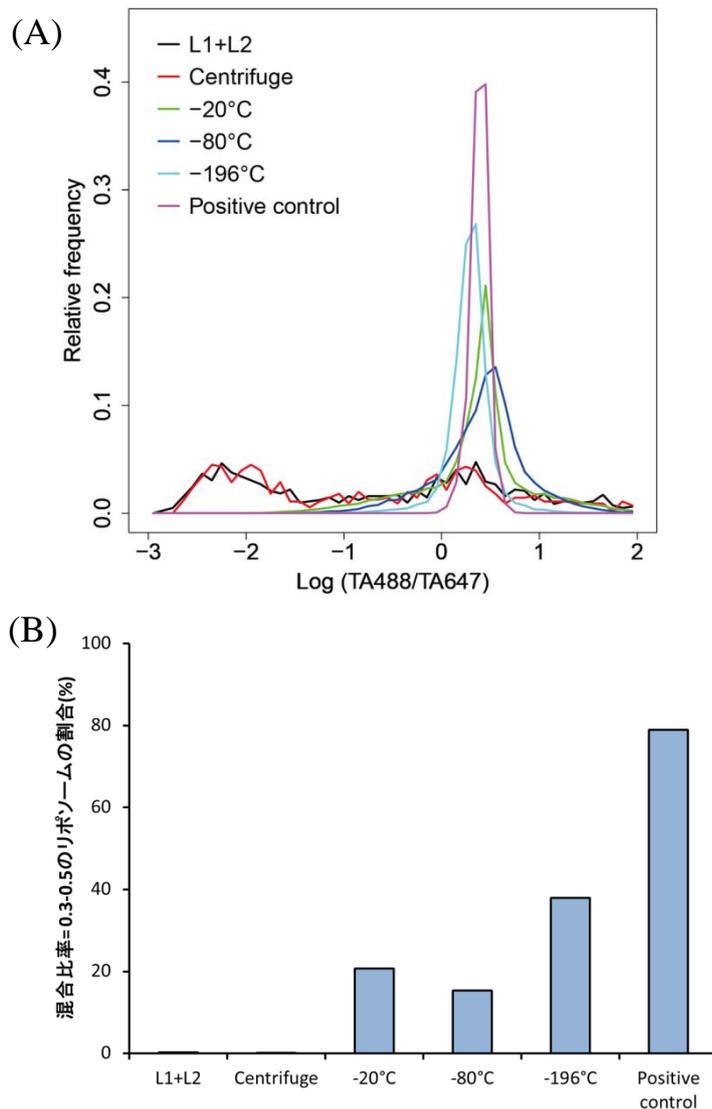


Fig. 2-6 凍結融解前後のリポソーム内液における内封液の混合比率

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(一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一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°C 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°C 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。

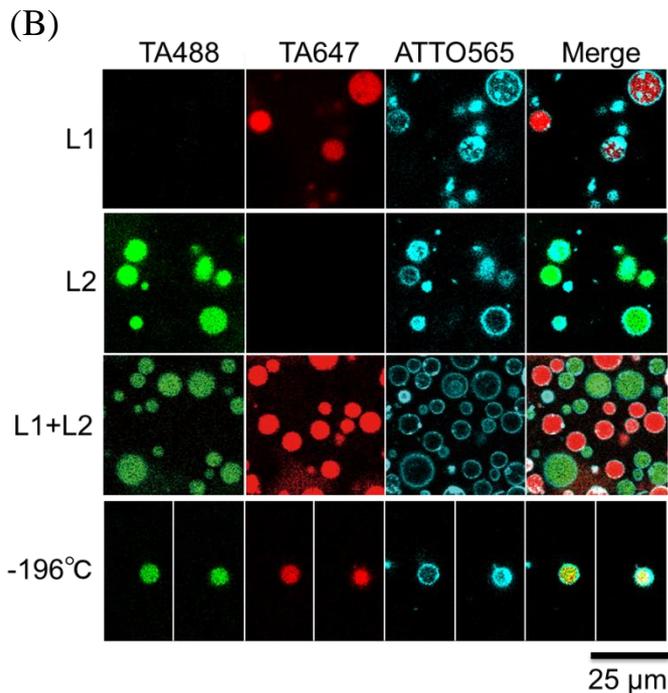
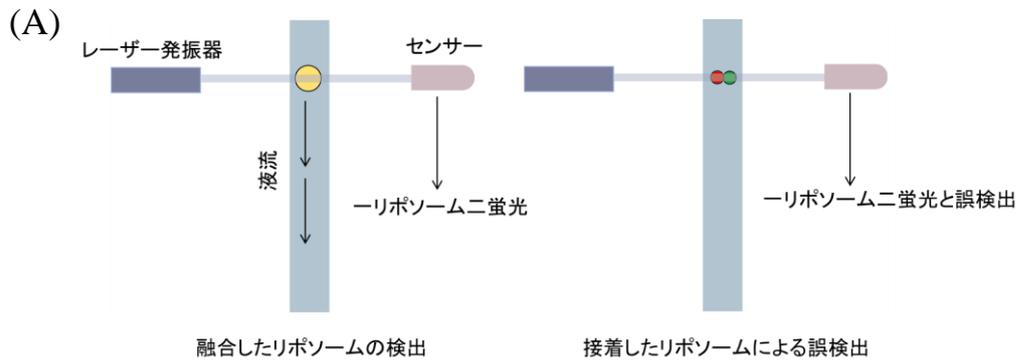
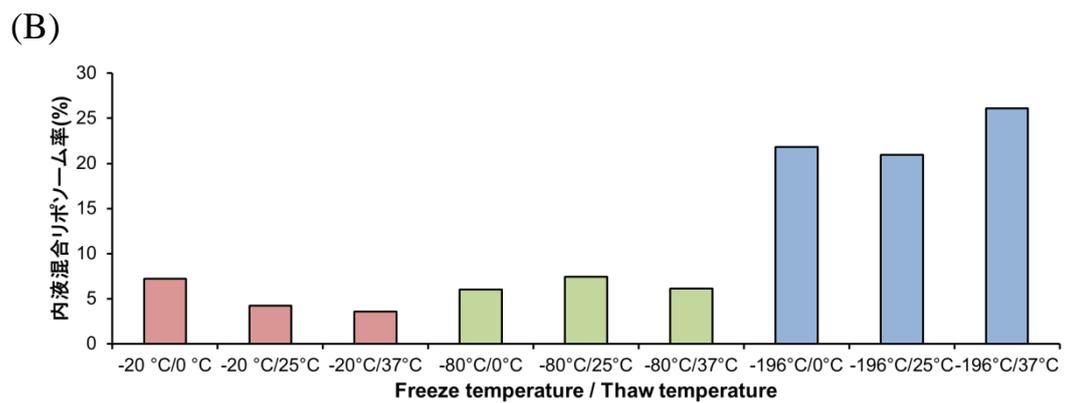
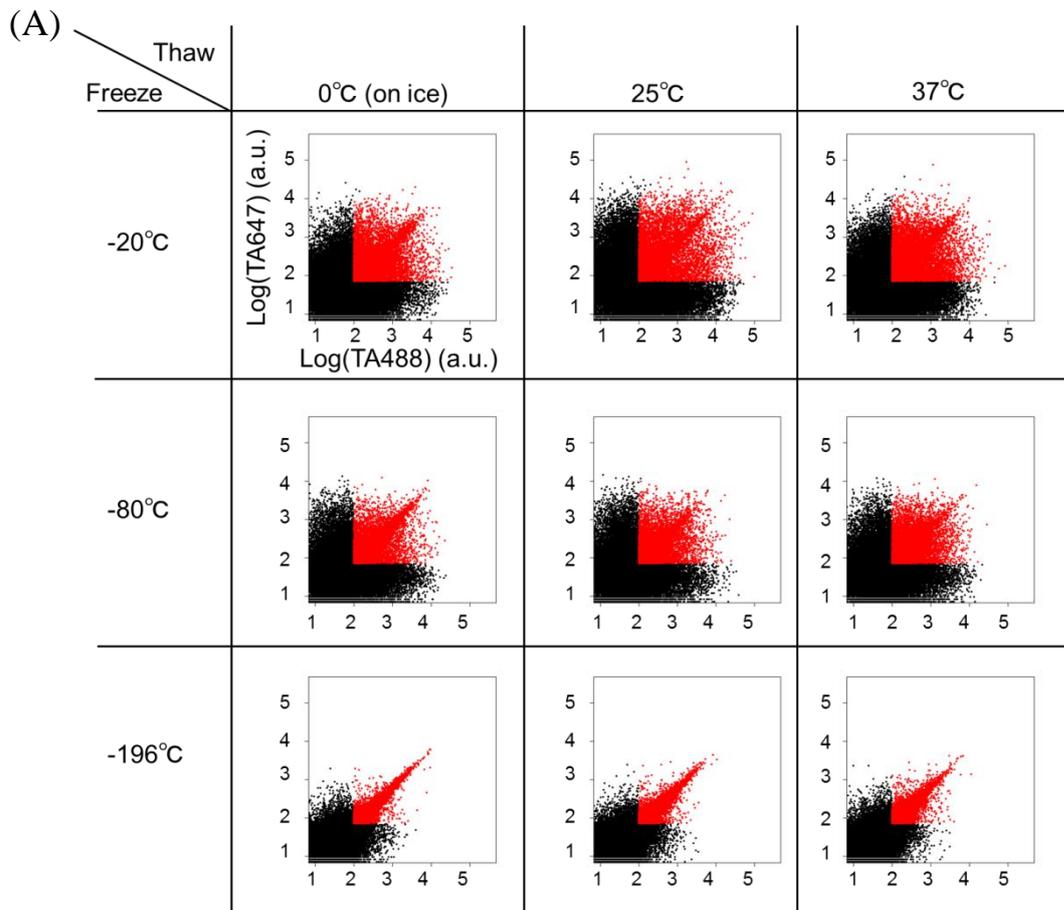


Fig. 2-7 共焦点レーザー顕微鏡によるリボソームの解析

凍結融解前後のリボソームの共焦点顕微鏡観察(A)一つのリボ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ボ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ボソームの共焦点顕微鏡観察。L1, L2はそれぞれ、TA647を内封したリボソームとTA488(緑色蛍光物質)を内封したリボソームを観察した。L1+L2はL1とL2を混ぜ、凍結融解する前のリボソームを観察した。-196°CはL1とL2のリボソームを凍結融解によってリボソーム融合させた後のリボ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°C 、 -80°C 、 -196°C (液体窒素)の三条件に対して、融解温度として 0°C (氷上)、 25°C (室温)、 37°C 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°C 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°C 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。



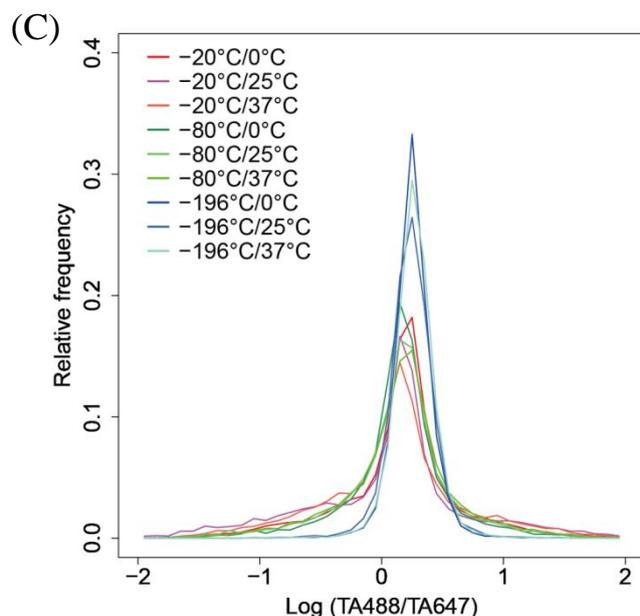


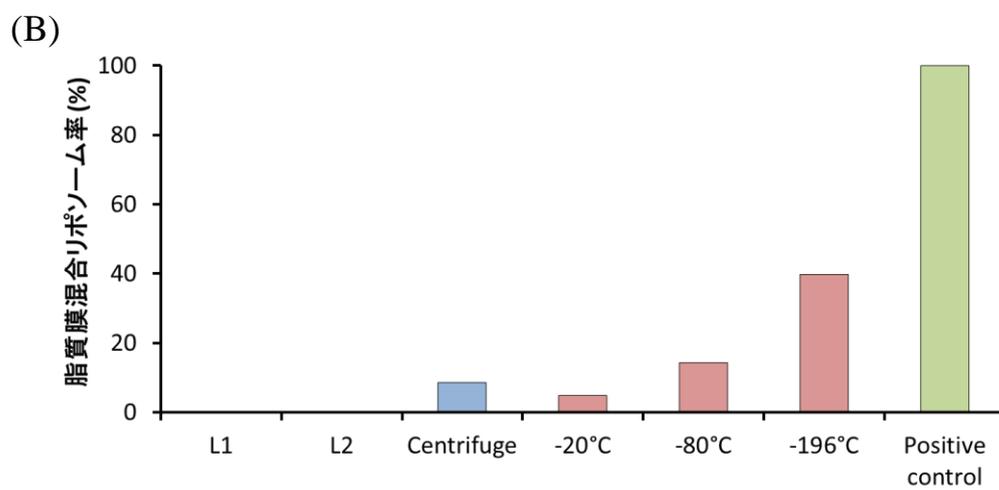
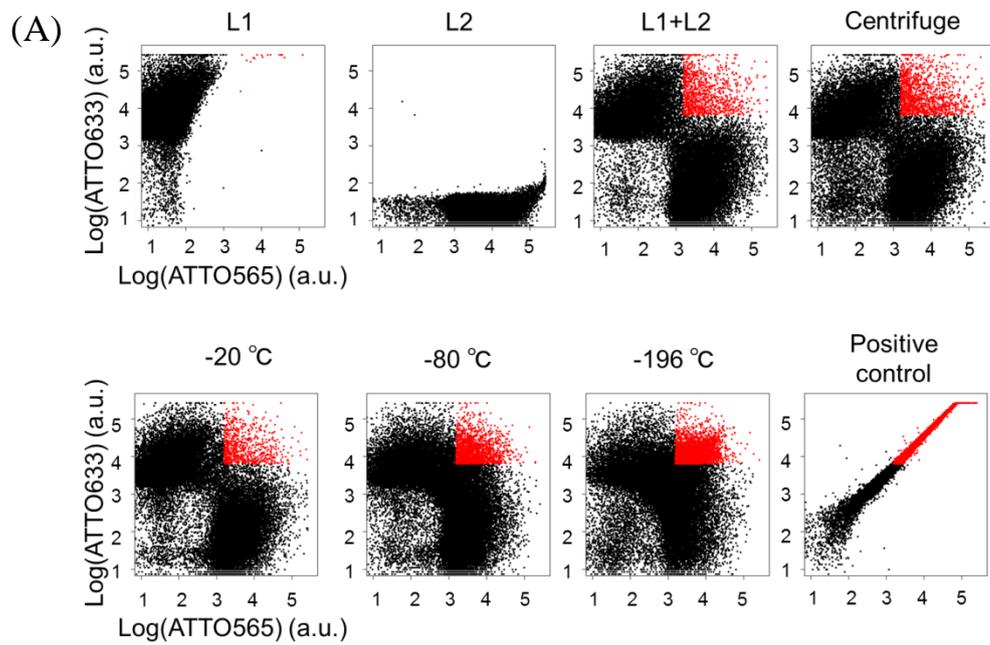
Fig. 2-8 凍結および融解温度がリポソーム融合に与える影響

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°C で凍結したもの、緑色は -80°C で凍結したもの、青色は -196°C 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°C で凍結したリポソームは赤系統、 -80°C で凍結させたリポソームは緑系統、 -196°C 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り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°C 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°C 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 °C では 14.3%、-196 °C 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°C 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°C 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。



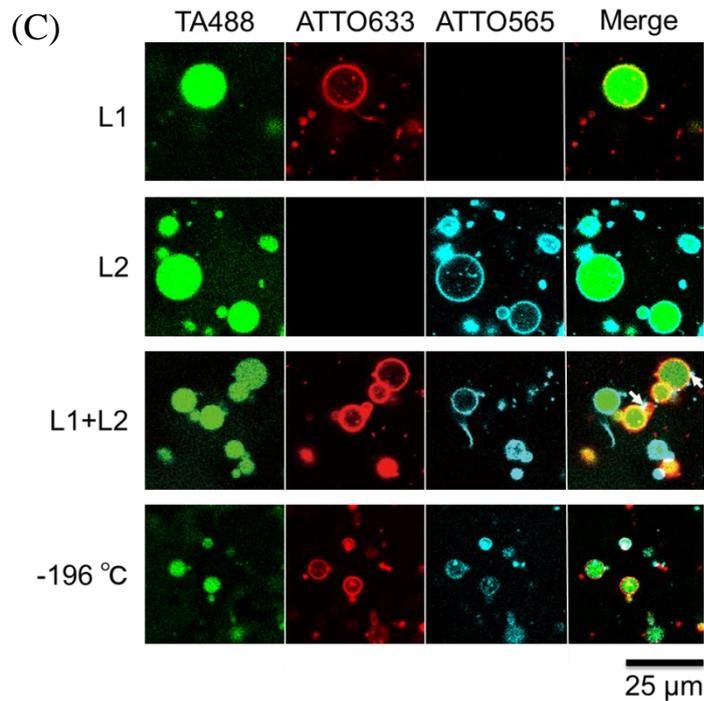


Fig. 2-9 凍結融解前後におけるリポソーム膜融合

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りポソームとした。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りポソームの割合とした。(C)蛍光脂質を混ぜたり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°C で凍結後融解させたり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、脂質膜の混合から見た融合率の値が異なると考えられる。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 10^4 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、凍結融解によってリポソームは融合後分裂したことで、リポソームの大きさが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。

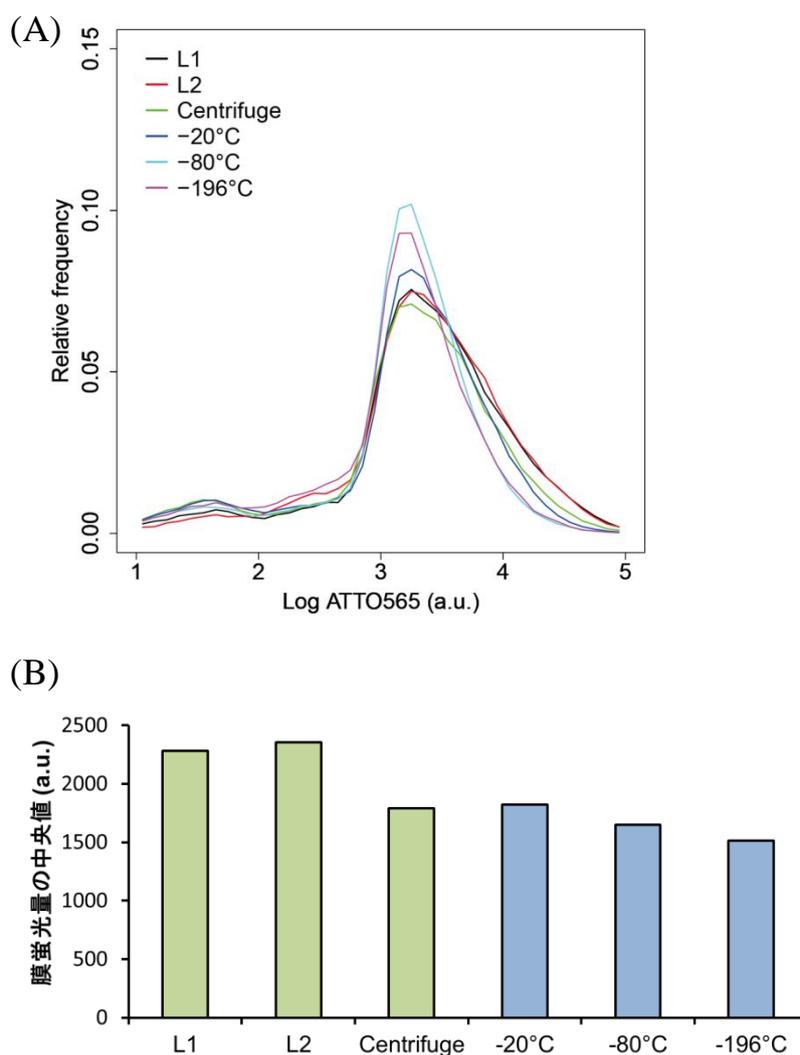


Fig. 2-10 凍結融解操作前後の各リポソームの膜量比較

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 10^0 以上のリポソームを用いた。L1, L2, Centrifuge は凍結融解操作前、-20°C、-80°C、-196°C 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°C 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り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°C や -80°C 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°C 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。

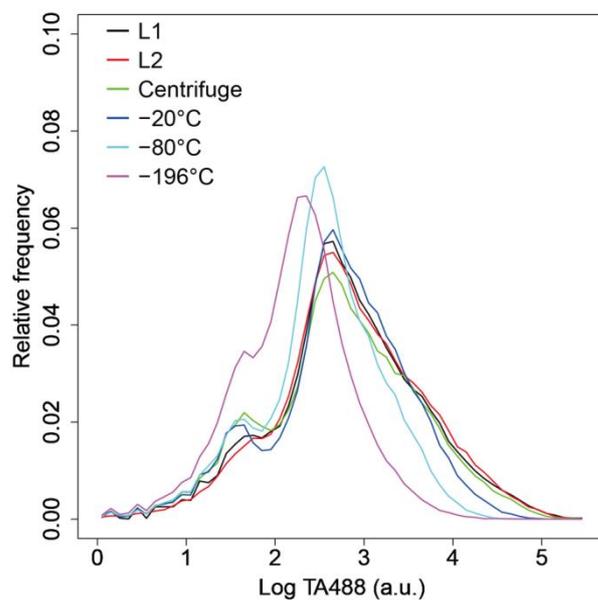


Fig. 2-11 凍結融解前後のリポソーム内液量の比較

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と、またその際に異なるリポソームが接触していると、破壊されたり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 Q β -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ポソームは 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与し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°C 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

こ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°Cで融合させると、内液の混合から見た融合率が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この可能性が考えられる。それに対して、-80°Cや-196°C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°C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によって膜余りが起こり、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.
2. 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.
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.
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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
18. 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.
 20. 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.
 23. 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.
 24. 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か、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 に含まれるリン酸基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 Q β -replicase

を用いた[5]。Q β -replicase は、大腸菌ファージである Q β 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 Q β ファージ由来のサブユニット(β サブユニット)と、Q β 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]。Q β -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をする[8]。また、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(Q β -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。

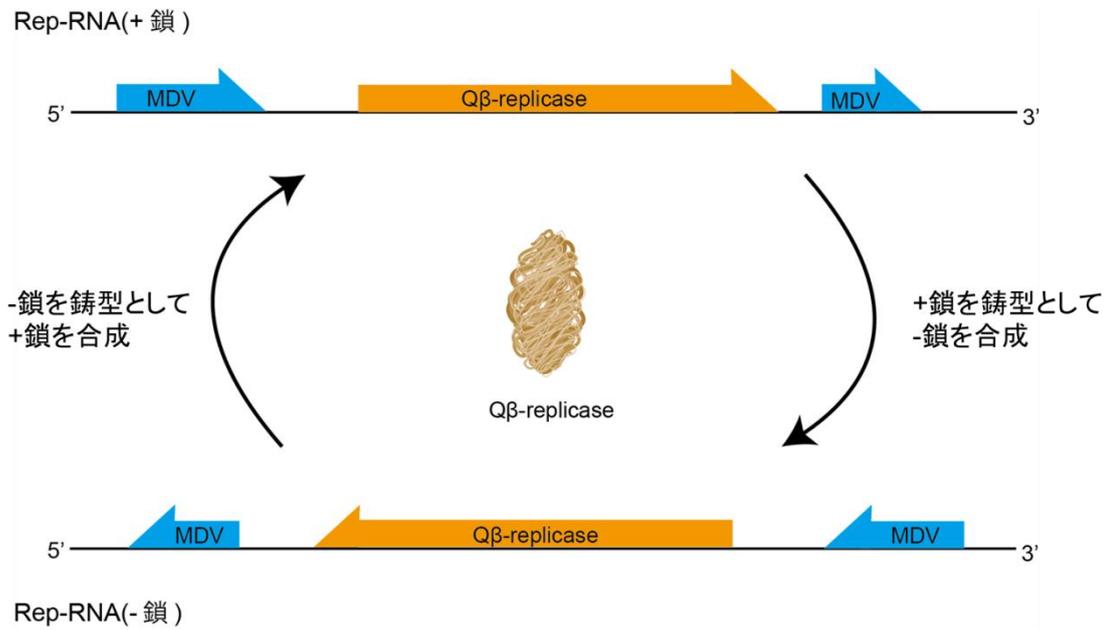


Fig. 3-1 Rep-RNA の複製の概略図 Rep-RNA(+鎖)を鋳型としたRNA複製反応の概略図。リポソームには Rep-RNA の+鎖と Q β -replicase を封入した。Q β -replicase は MDV 配列を認識し、Rep-RNA の+鎖を鋳型として相補鎖である Rep-RNA の-鎖を合成する。Q β -replicase は Rep-RNA の+鎖だけでなく、-鎖も認識し、それを鋳型として+鎖の合成も触媒する。

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、膜の不可逆的变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(Q β -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。

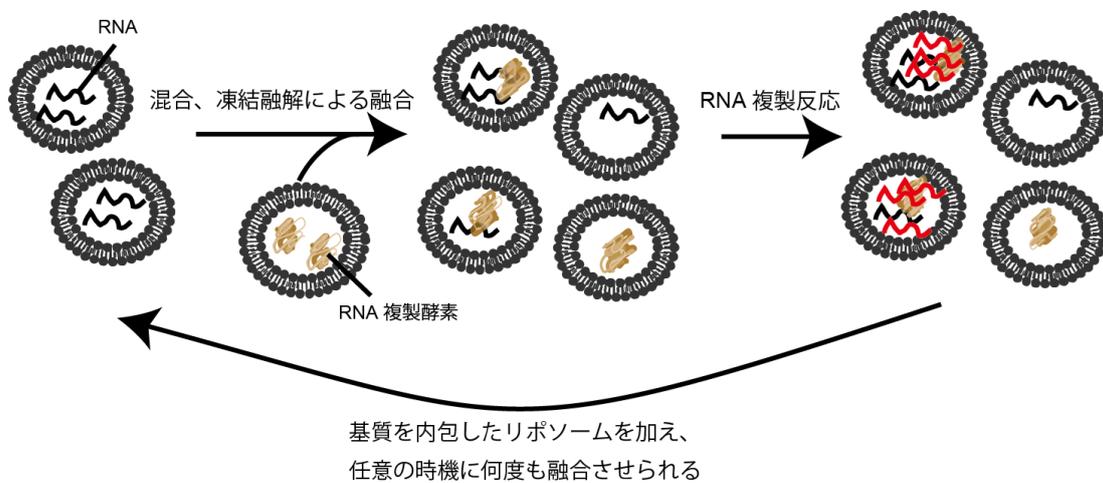


Fig. 3-2 リボソーム融合による RNA 複製反応の継続化

リボソーム融合によりリボソーム内反応を継続する手法の概略図。リボソーム内反応に必要な酵素や基質を封入したリボソームを供給し、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ボソームを加え、融合させることで、リボ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: CCACGGTCAGGACTGACTCGTAGCGCTGAGAGATCAACCGTTGC
TAAG

Primer 2: CCACGGTCAGGACTGACTCGTAG

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 Q β -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 μ L に対して Nutrient リポソームを 15 μ L 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 μ L 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 μ L 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 リポソームは当日に調整したものを用いた。この反応後のリポソームに等量の体積の Nutrient リポソーム溶液を加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 \pm 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 \pm 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 $RNA (nM) = 1.33 \times SYBR F.I.$ 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。

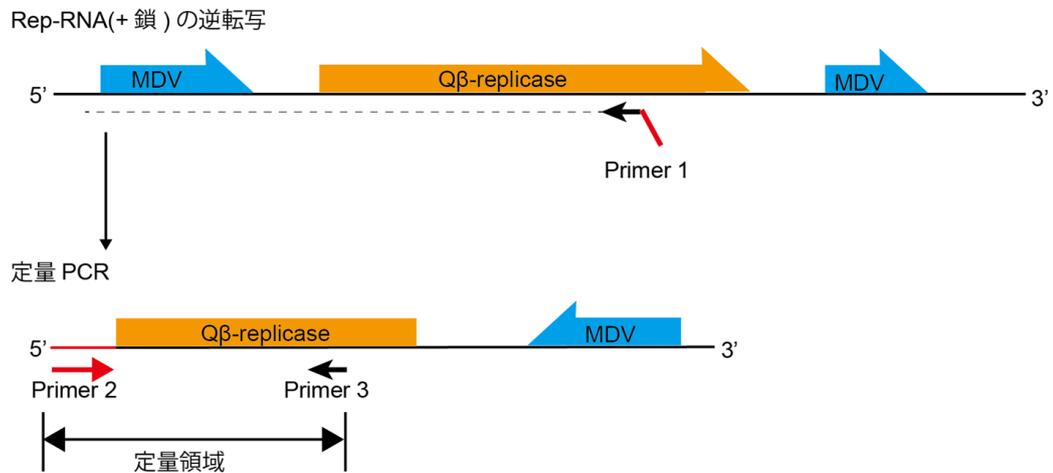


Fig. 3-3 Rep-RNA (+鎖)に対する逆転写定量 PCR の原理

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 Q β -replicase をリポソーム融合を介して供給できることが実証された。また、凍結融解という刺激では Q β -replicase が失活しないことが分かった。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。

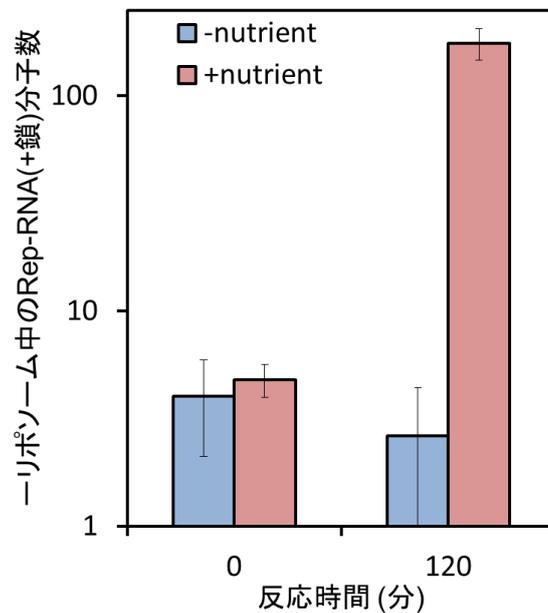


Fig. 3-4 凍結融解によるリポソーム融合後の RNA 複製反応

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 万個分取り、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、などといった一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

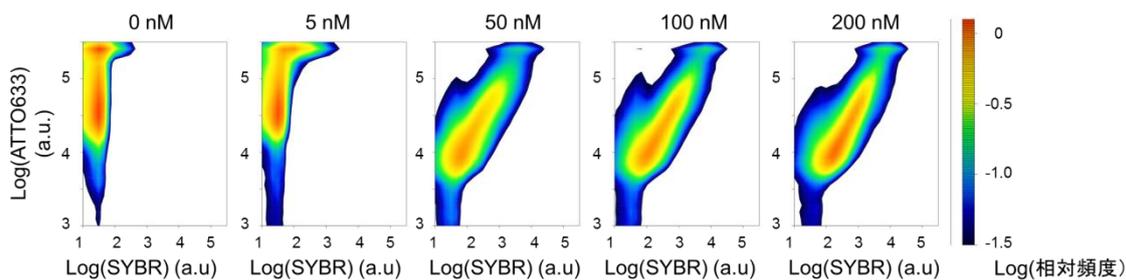
のほとんどが RNA を内包していたと考えられる。それに対して、凍結融解の際に内封液が漏洩して脂質塊となったリポソームが生まれ、そのようなリポソームの内部では RNA 複製反応が進まなかったため、リポソーム融合後に SYBR 蛍光を示さなかったリポソームが見られたと考えられる。

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。

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「非反応リポソーム」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%のうち一部は 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ームや、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。

(A)



(B)

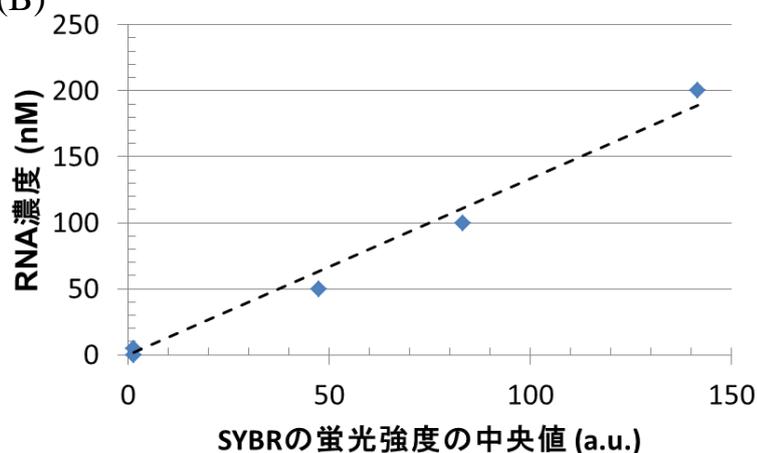
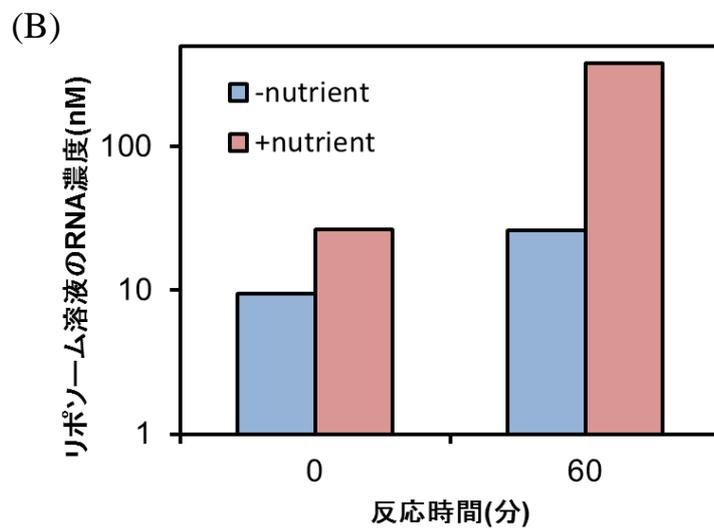
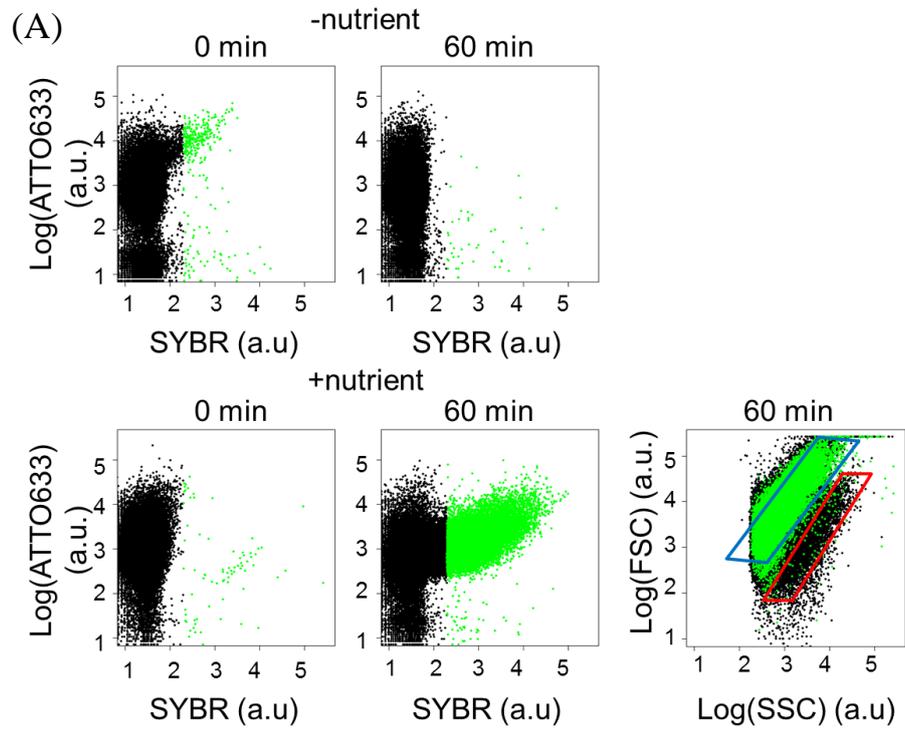


Fig. 3-5 SYBR を用いたリポソーム内 RNA の定量手法の確立

(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、 $\text{RNA (nM)} = 1.33 \times \text{SYBR F.I.}$ となった。



(C)

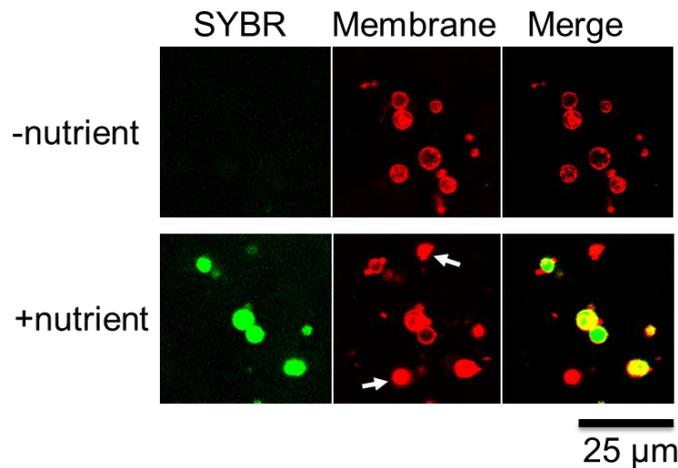


Fig. 3-6 リポソーム融合後のリポソーム内 RNA 複製および SYBR を用いた RNA の定量

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 Q β -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 Q β -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 個のリボ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 リボソームを加え凍結融解によってリボソーム融合を促すと、RNA を持つリボ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、リボソーム融合によって基質を供給するだけではなく、RNA の分配やリボ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。

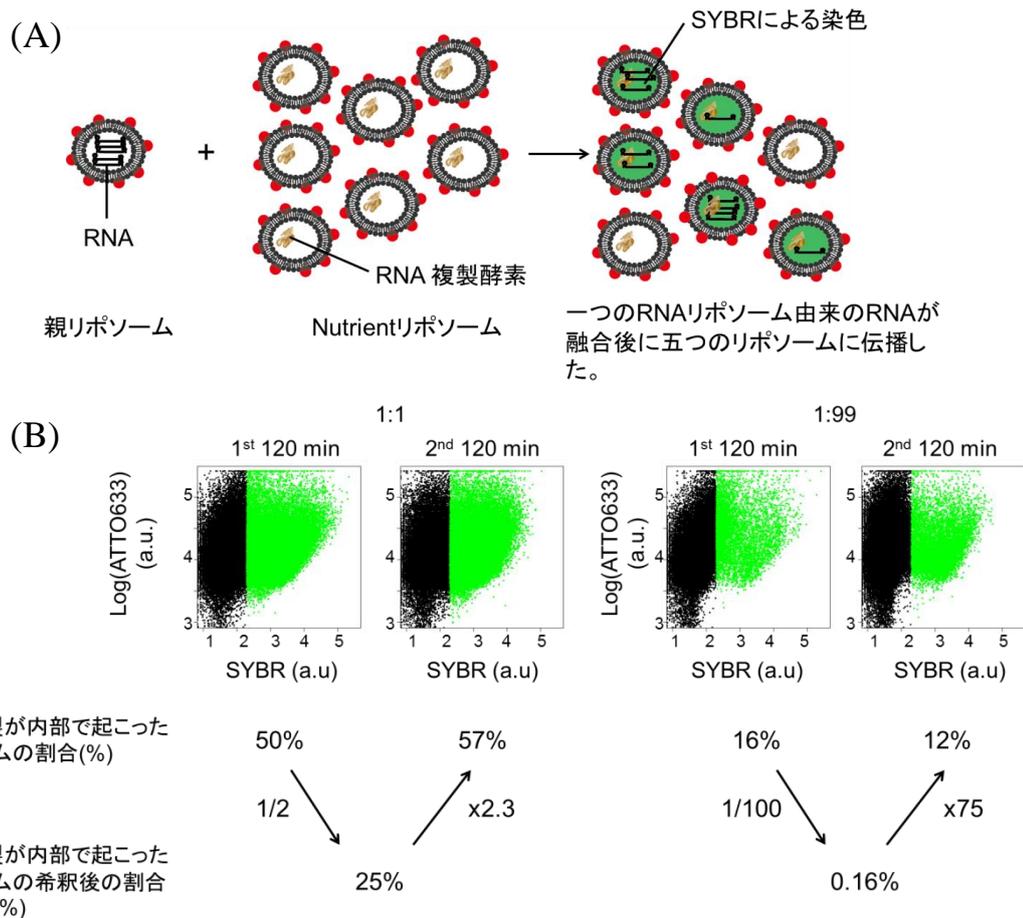


Fig. 3-7 RNA 複製反応が起こったリボソーム区画の増加

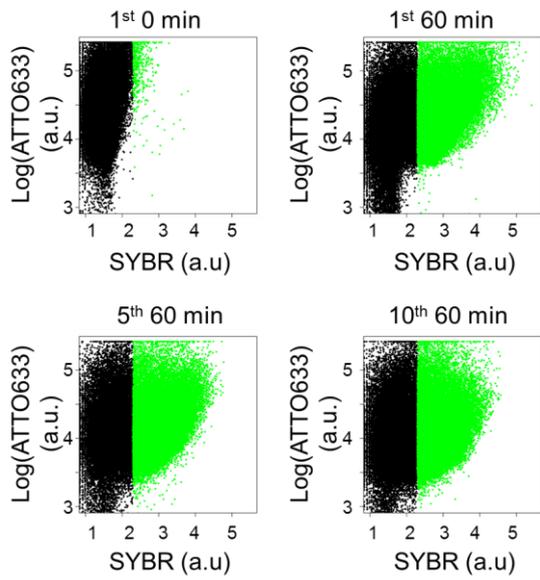
リボソーム融合によってRNAはいくつの子供リボソームに対して伝播するかについて検討した。(A)RNA 複製後の親リボソームに対して RNA を持たない Nutrient リボソームを過剰量加えて凍結融解によって融合させ、RNA 複製反応させた時の概略図。一つの RNA リボソーム由来の RNA が五つのリボソームに伝播し、それぞれの中で RNA 複製反応が起こったとした。(B)RNA リボソームと Nutrient リボソームを 1:1 もしくは 1:99 の比で混合し凍結融解で融合させた後、37°C120 分反応させたリボソームをフローサイトメーターで解析した。1 回目の融合後に反応させたリボソームに対して、もう一度同じ比率で Nutrient リボソームを加えて融合させたときに、RNA を持つリボ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 が検出されたリボ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ボ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 が含まれているリボソームとし、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

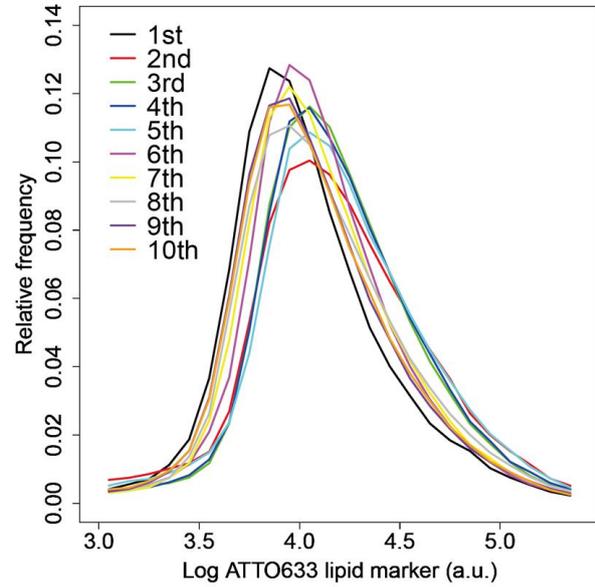
凍結融解を繰り返すことによってリポソーム融合を繰り返し導入し、何度も反応に必要な物質を供給することで、人工細胞に「栄養の獲得」と「増殖能」を同時に付与できる可能性が考えられる。3-4-4 で凍結融解によるリポソーム融合を繰り返した際に、反応リポソームの数が保たれることが示された。そこで、本項では 10 世代にわたってリポソーム内で RNA 複製反応を継続させたまま植え継げるかどうか検討した。リポソームはこれまで一度調製した後長期間にわたって保存する方法がなく要時調製するしかなかった。そこで細胞を保存するようにリポソームを凍結状態で保存できると、一度反応を止めることが可能になるため、日を越えてリポソーム内から 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。

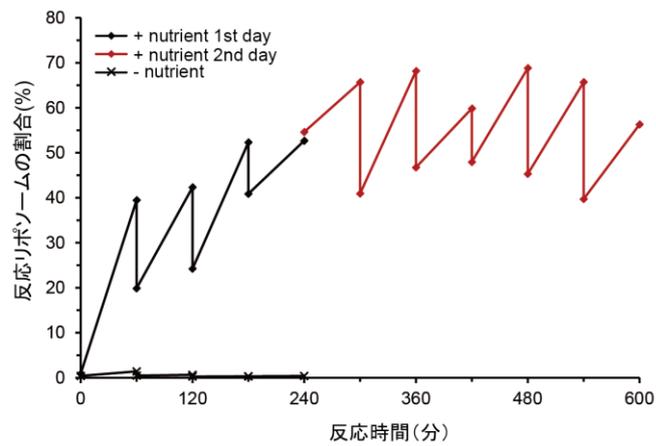
(A)



(B)



(C)



(D)

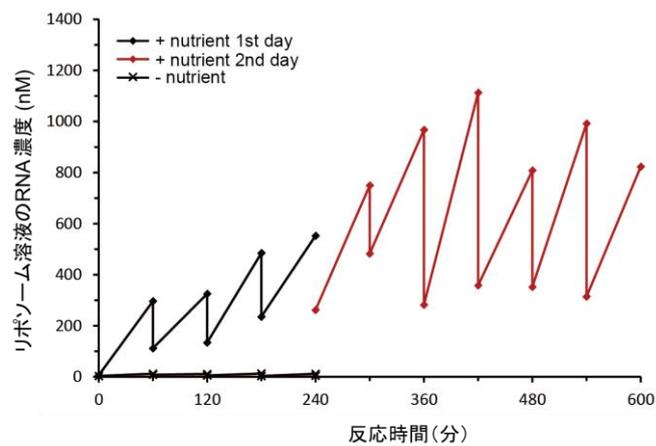


Fig. 3-8 RNA 複製反応を内包したリポソームの十世代植え継ぎ

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た (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°C 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°C 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°C 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°C 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°C 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的最頻値)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°C 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。

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。

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).
2. 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.
3. Szostak, J.W., D.P. Bartel, and P.L. Luisi, *Synthesizing life*. Nature, 2001. **409**(6818): p. 387-90.
4. Deamer, D.W., *The first living systems: a bioenergetic perspective*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1997. **61**(2): p. 239-261.
5. 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.
6. Haruna, I. and S. Spiegelman, *Specific template requirements of RNA replicases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1965. **54**(2): p. 579-87.
7. 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.
9. 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.
 13. 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.
 15. Nishimura, K., et al., *Population analysis of structural properties of giant liposomes by flow cytometry*. Langmuir, 2009. **25**(18): p. 10439-43.
 16. 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.
 18. Jahn, R. and H. Grubmuller, *Membrane fusion*. Curr Opin Cell Biol, 2002. **14**(4): p. 488-95.
 19. 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.
 20. 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、リポ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ポ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 やリポ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 をリ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)。

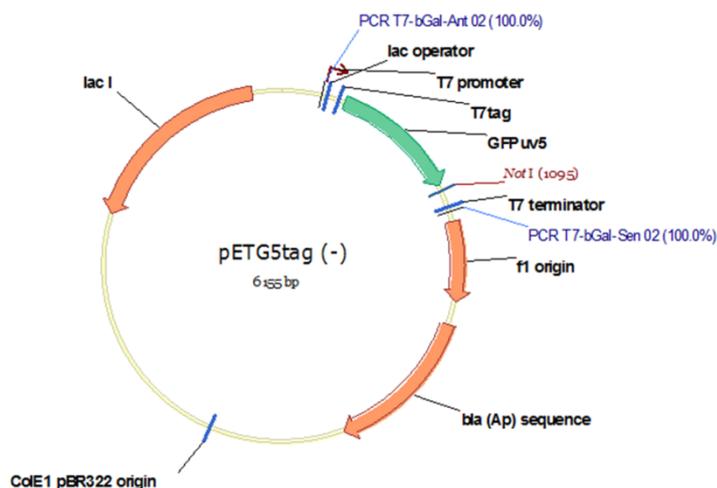


Fig 4-1 pETG5tag プラスミド

GFP の遺伝子情報を持ったプラスミドの概要。

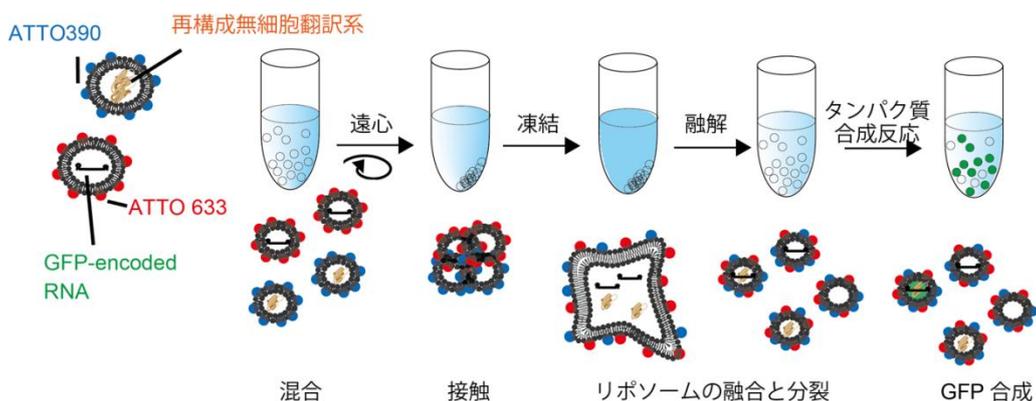


Fig 4-2 リボソーム融合による再構成無細胞翻訳系の供給

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 の遺伝子情報をコードした RNA を封入したリボソームと再構成無細胞翻訳系を封入したリボソームを用意し、それらを混合後、遠心によってリボソーム同士を接触させた。その後、 -196°C で凍結融解をし、 37°C で 180 分反応させた後、GFP 蛍光を測定した。異なるリボ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じ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 DH5 α (Takara, Tokyo, Japan)

Primer

PCR T7-bGal-Sen02: CTCCTTTCAGCAAAAAACCCCTCAAGACCC

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 DH5 α (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、リボ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 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 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 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 10-formyl-tetrahydrofolate

4-3-4 界面通過法によるリボソーム調製

リボ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 $\text{mg}/\mu\text{L}$ 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、攪拌した後、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、以下の組成のリボソーム内液とリボソーム外液を用いて界面通過法によってリボソームを作製した。

リボソーム内液

RNA リボソーム: Sol.A, 200 mM sucrose, 2000 nM gfp-RNA

Empty リボソーム: Sol.A, 200 mM sucrose

Sol.B リボソーム: Sol.A, Sol.B, 200 mM sucrose

リボソーム外液

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

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。

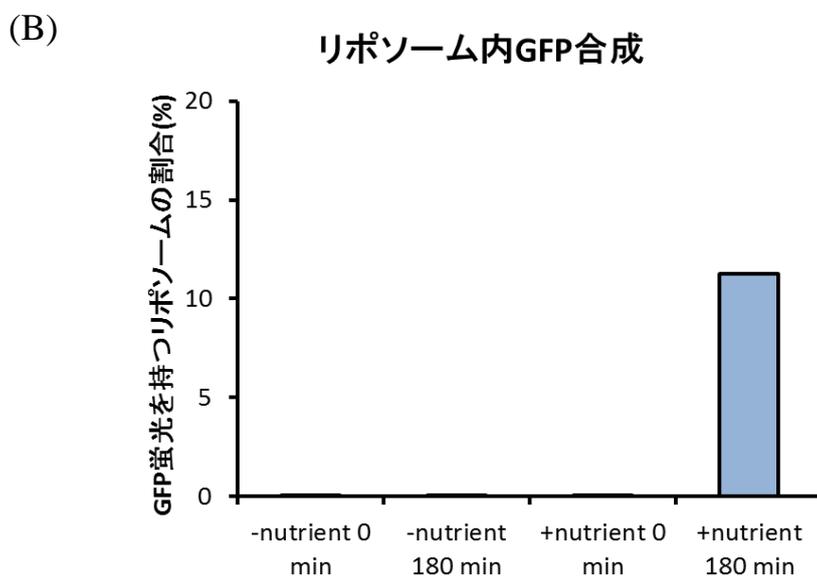
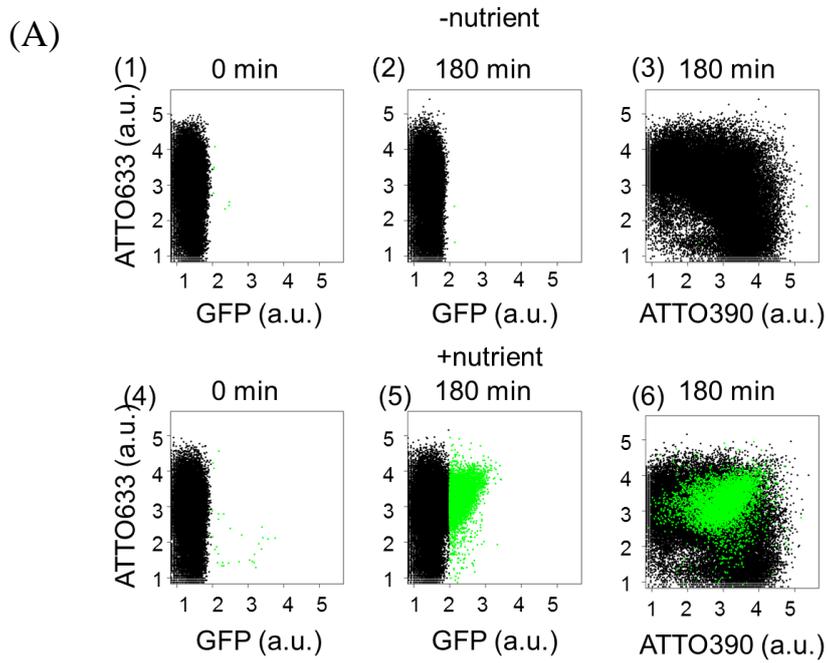
4-4 結果

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°C 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つたため、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た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。



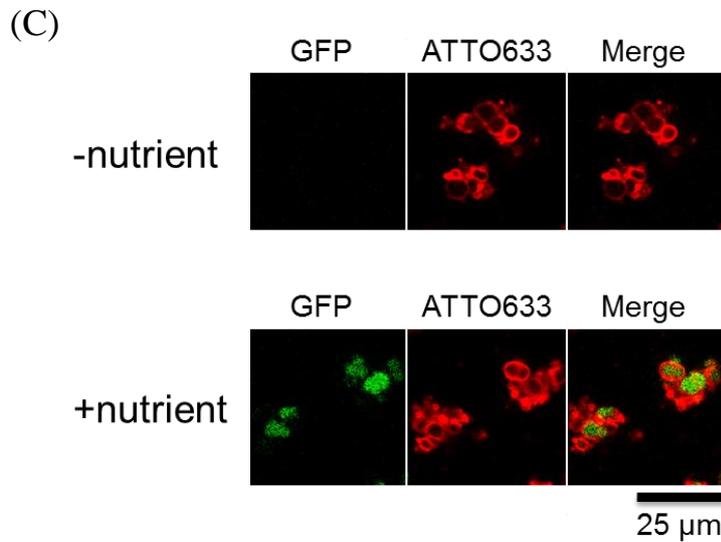


Fig 4-3 凍結融解後のリポソーム内 GFP 合成

(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°C 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 $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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ポ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り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。

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

1. 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.
7. 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.
9. Pautot, S.F., B.J.; Weitz, D.A., *Production of unilamellar vesicles using an inverted emulsion*. Langmuir, 2003. **19**(7): p. 10.
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、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、Q β -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攪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 Q β -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ポソームや 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 $\mu\text{G}/\mu\text{L}$ 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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]。

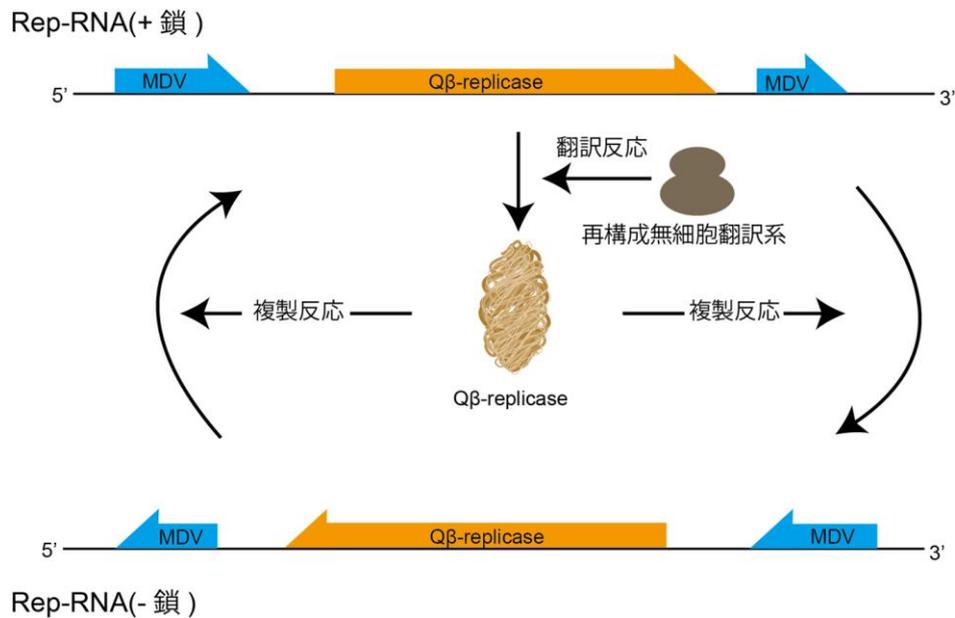


Fig. 5-1 RNA 自己複製反応の概略図

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、攪拌した後、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° C 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 Q β -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 μ L 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/ μ L RNasin, 20 units/ μ L 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 μ M 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。

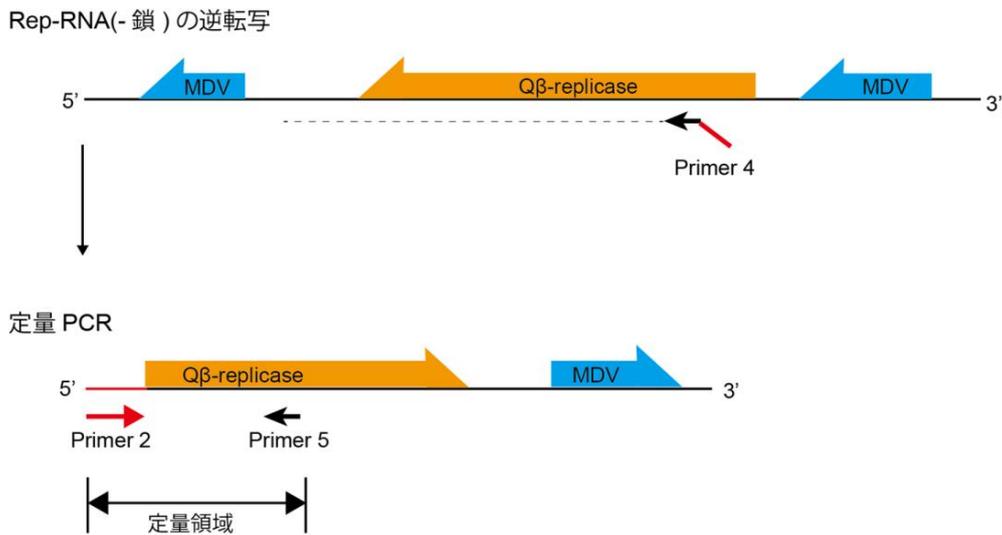


Fig. 5-2 再構成無細胞翻訳系の供給による RNA 自己複製反応の検出

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 Q β -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、Q β -replicase が翻訳され、その後、翻訳された Q β -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。

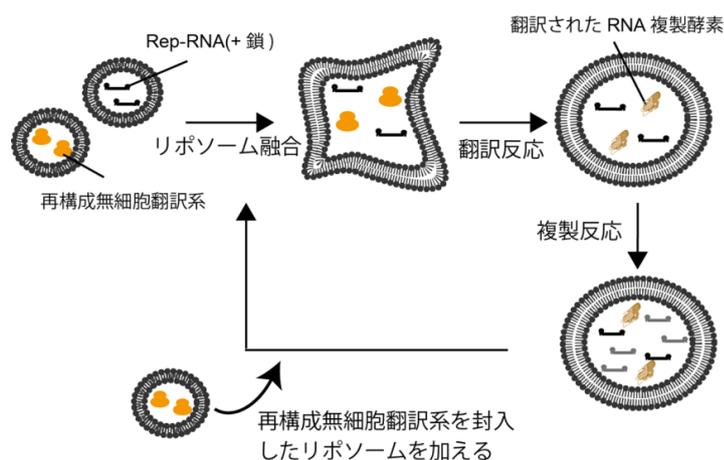


Fig. 5-3 再構成無細胞翻訳系の供給によるリボソーム内 RNA 自己複製反応の概略

凍結融解によるリボ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 リボソームと再構成無細胞翻訳系を封入した Nutrient リボソームを融合させ、37°C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 複製反応後のリボソームに Nutrient リボ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。

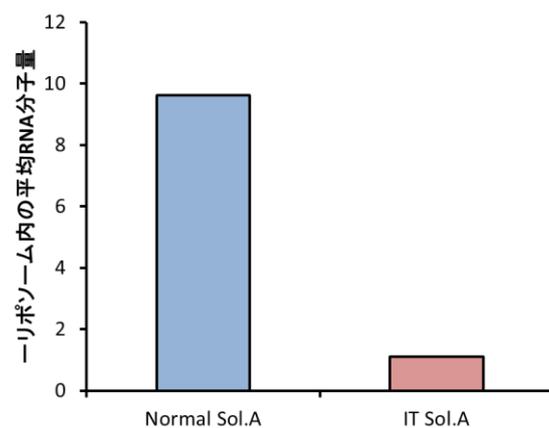


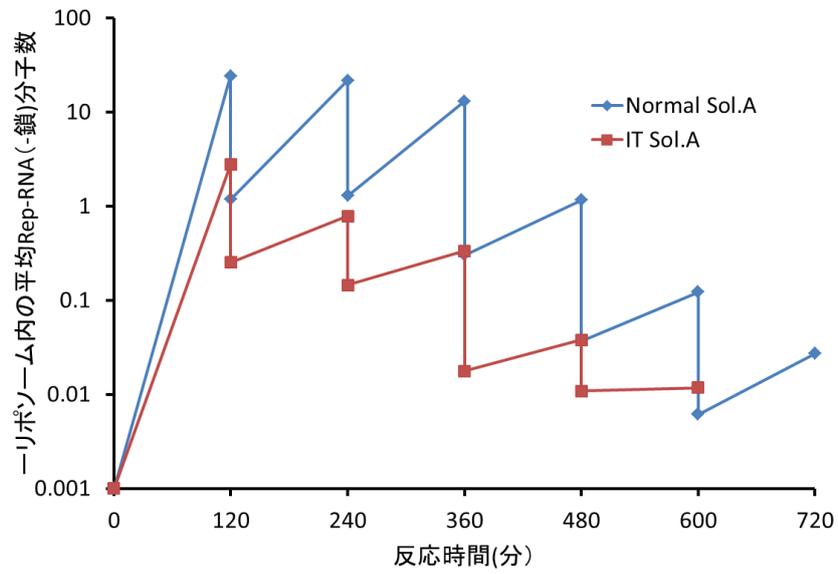
Fig. 5-4 凍結融解後のリボソーム内での RNA 自己複製反応

凍結融解によるリボソーム融合で Rep-RNA を内包したリボ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°C で 120 分反応させ、反応後のリボソームから RNA を精製した後、逆転写 PCR で Rep-RNA(-鎖)を定量した。縦軸は、定量に用いたリボソーム数で割った 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 Q β -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。

(A)



(B)

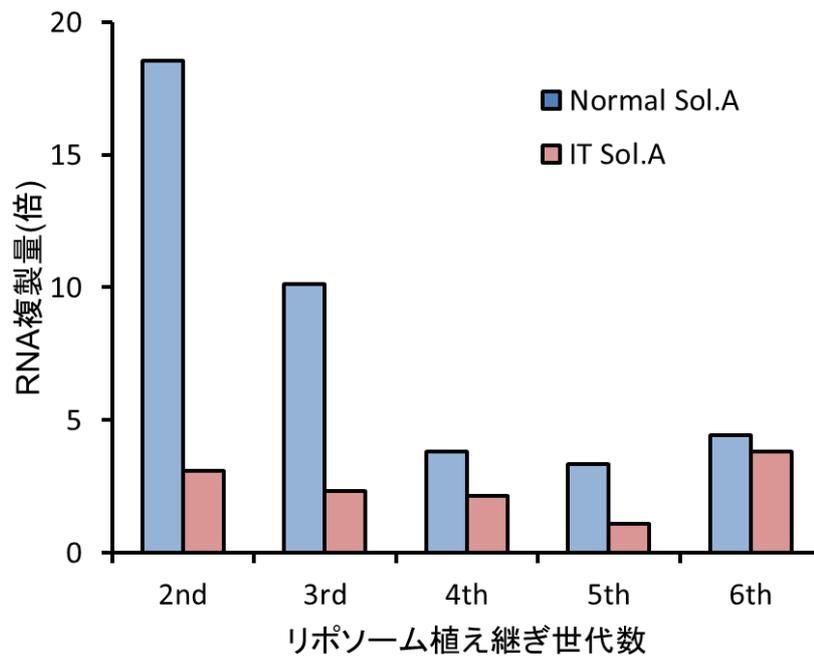


Fig. 5-5 RNA 自己複製反応を内包したリポソームの六世代植え継ぎ

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°C 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つたため、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つたため、両 Sol. A 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 自己複製反応を内包したリポソームへ繰り返し栄養を供給できる手法を改善し長期間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 NY 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.
3. 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.
6. Pautot, S.F., B.J.; Weitz, D.A., *Production of unilamellar vesicles using an inverted emulsion*. Langmuir, 2003. **19**(7): p. 10.
7. 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.
9. 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.
10. 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°C や -80°C 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 Q β -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 Q β -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。

業績

印刷済主論文

Tsuji G, 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)

Tsuji G, 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。リーディングプ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。