

論文の内容の要旨

論文題目 内封 DNA の自己複製と連動するベシクル自己生産系

氏名 栗原顕輔

【1.背景】

生命の起源や生命システムの仕組みを探求する手法として、ベシクルを用いた人工細胞の構築が注目を集めている。一般に人工細胞を分子レベルから構築する構成的アプローチと、ベシクルに細胞の機能を持たせた物質を封入して機能を発現させる準構成的アプローチ(semi-synthetic approach)に分けられる。前者では Luisi や Szostak らのグループが RNA 細胞を目指しており、後者では四方や吉川らのグループが生体由来物質を封入して、それらの機能を持つベシクルを構築している。どちらのアプローチにとっても人工細胞に必須の要素は、次世代へと受け継がれる情報物質の複製、自他を区別できる境界膜の自己生産、反応を触媒する物質だと考えられる(図 1)。

本研究室では、前者のアプローチとして、高倉による外部から膜分子前駆体を添加することで自己生産できるジャイアントベシクル(GV)系を構築している^[1]。また情報物質の複製として GV 内での DNA の複製が課題となるが、最近庄田と田村によりベシクル内ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)の条件が見つかったことにより、この課題は解決しつつある。そこで筆者は、内部で DNA の複製が進行しているベシクルに自己生産を誘発することで、人工細胞へ向けた大きなステップを踏み出すことを

目標とした。

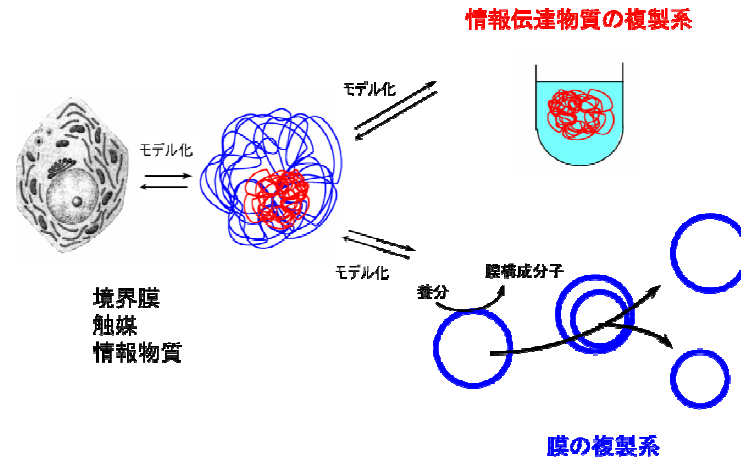


図 1. 人工細胞モデル構築に必要な要素

【2.高電解質溶液中でのベシクル系の構築】

第二章では、DNAの複製手法であるPCR用の緩衝溶液と、同程度の高電解質液中でも調製でき、かつ長時間安定に存続できるベシクルの作成を目指した。DNA複製が進行する高電解質溶液に耐えうる新規膜分子と触媒(図2)は、次のような指針の下に行った。膜分子(V)としては、親水部にカチオン性である4級アンモニウム塩を持ち、疎水部末端にアルデヒド基を持ち、疎水部としてはやや長めのアルキル基を用いる二本鎖型両親媒性分子を用意する。それにより高電解質条件下でも安定に二分子膜を形成し、前駆体の加水分解に必要な触媒の取り込み能力を高める。蛍光性触媒分子(C_F)としては二本の長鎖アルキル基を、非蛍光性触媒分子(C_N)としては、一本の長鎖アルキル基をもつイミダゾール塩酸塩を用いる。膜分子前駆体(V^*)は、水溶性の必要があるため双頭極性型とし、極性を持つ電解質分子をイミン結合で連結させる。この膜分子前駆体を、GV分散液に添加すると、ベシクルに含まれる酸触媒の作用によりイミン結合が加水分解を受け、生じた膜分子(V)がベシクルに取り込まれる。

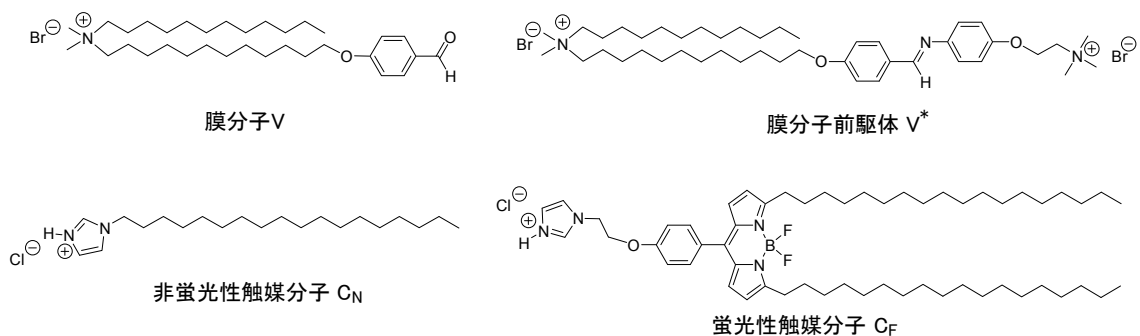


図 2. 合成した分子の構造式

膜分子Vと非蛍光性触媒分子 C_N と蛍光性触媒分子 C_F を、90:10:1の割合で混合したGVを調

製したところ、顕微鏡観察の結果、ベシクルはフローサイトメリー(FCM)計測に用いる高電解質の緩衝溶液中でも、安定に存在することがわかった。さらに膜分子前駆体を添加すると、脱イオン水中と同様に自己生産挙動を示した。本研究よりも前に、アルキル鎖の炭素が二つほど少ない膜分子で構築したベシクルの自己生産を集団計測した例があるが、初期分布からいきなり2,3回分裂が進んで安定した分布に移行しており、中間過程である肥大・分裂・成長についての情報が得られていなかった^[2]。本系は自己生産の進行が遅いので、中間過程の観測も可能となり、DNA の複製とベシクルの分裂との関係性を調べることも繋がった。また、セルソーターを用いて自己生産するベシクルのソーティングもできるため、ソーティングしたベシクルも自己生産することを確認した。自己生産ダイナミクスのサイズ依存性についても考察を行った。

【3.内部で DNA を増幅した自己生産するジャイアントベシクルの構築】

第三章では、DNA を複製した自己生産する GV 系を構築したことについて述べている。情報分子(DNA)を内部で自己複製させつつ、袋(GV)自体が自己生産するには、PCR による DNA の複製条件下でベシクルを自己生産させる必要がある。このときの満たすべき条件としては、以下の三つがある。第一は、強い電解質溶液中で DNA が内包できるような中空のベシクル系を構築すること。第二は、ベシクルに封入した DNA が PCR で増幅すること。第三は、DNA が増幅したベシクルに膜分子前駆体を添加した際、自己生産ダイナミクスが起こること。以上の要件が達成できれば、少なくとも人工細胞と呼べる系が構築できたことになる(図 3)。

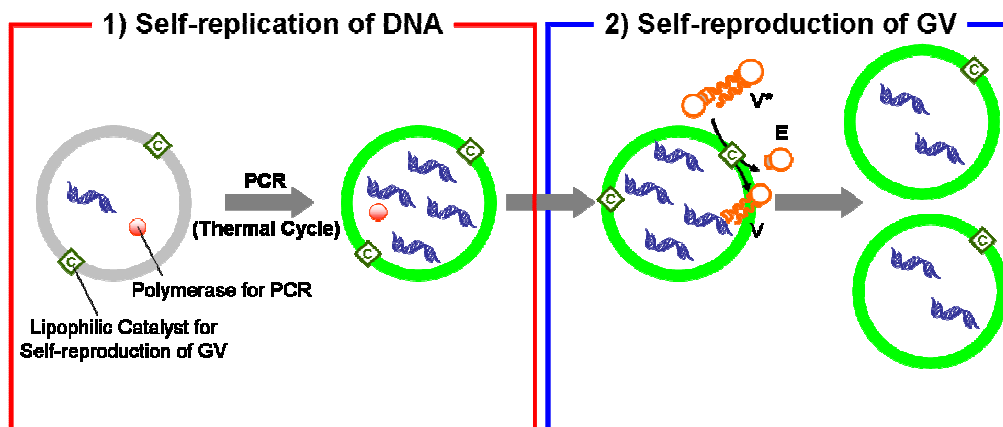


図 3. 人工細胞モデルの模式図

そのためには、PCR の高熱条件にも耐えうる系を構築する必要がある。第二章で述べたベシクル系に高熱条件下でも相転移を起こしにくいリン脂質を配合することとし、膜の脂質として POPC、POPG、人工膜分子 V、非蛍光触媒分子 C_N を 6:2:2:1 の割合で調合した。POPG は POPC と同様にベシクル膜を強固にし、カチオン性膜分子を電氣的に中和する狙いがある。DNA はポリアニオン性なので、仮に膜がカチオン性ならば、膜分子と相互作用して DNA と脂質の複合体を形成する恐れがあるからである。ベシクルに封入する内容物は、緑色蛍光タンパクを発現できる 1229 塩基

対の鋳型 DNA、プライマー対、デオキシヌクレオチド、DNA 合成酵素、 Mg^{2+} 、二本鎖 DNA(dsDNA)を検出する SYBR® Green I (SG)である。上記の膜成分を用いて作製したマルチラメラの粗ベシクルを押し出し法で再調製することで、内部 DNA を含むことのできる中空状の GV の構築に成功した。このベシクルは PCR の熱条件でも安定で、中空状の構造を保った。図 4 に示す蛍光顕微鏡観察像より、PCR 処理前のベシクルでは蛍光は観測されないが、鋳型 DNA を内包したベシクルを PCR にかけて、増幅した dsDNA と SG の複合体が発する蛍光を検出することができた。この GV 系を集団計測すると、系全体の約 15%のベシクルの蛍光強度が増加したことも分かった。増幅した dsDNA が鋳型 DNA と同鎖長であることは、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により確認した。

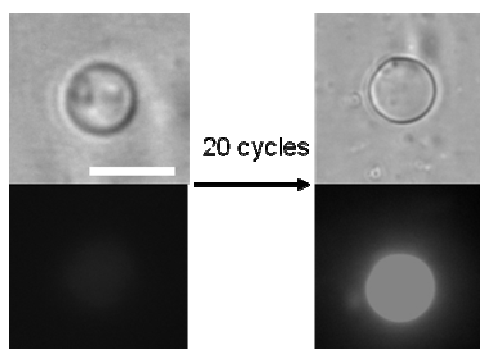


図 4. PCR 前のベシクルと PCR 後のベシクルの微分干渉顕微鏡像
上:明視野像 下:蛍光野像 (bar=10 μ m)

PCR で DNA を増幅させた GV に、カチオン性膜分子の前駆体 V^* を添加することで、ベシクルの自己生産ダイナミクスを引き起こすことに成功した。これを微分干渉顕微鏡で観察した連続写真を図 5 に示す。増幅した DNA を含むベシクルは、膜分子前駆体を添加してから数分間で数回の GV の分裂があった。さらに蛍光顕微鏡観察では、分裂後のベシクルも蛍光が観測されたので、分裂したベシクルにも増幅した DNA が含まれていることが明らかになった。

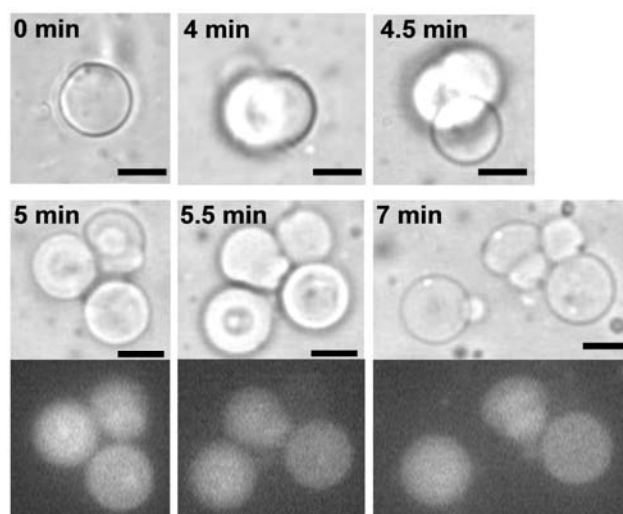


図 5. DNA を内包するベシクルの自己生産ダイナミクスの微分干渉顕微鏡像 (bar=10 μ m)

一方、DNA 内包ベシクルの自己生産は、DNA を内包していないベシクルのそれと比較して速く進行する傾向がある。すなわち鋳型 DNA が無い GV に温度サイクルをかけた場合、約 2 時間で平均して数回しか分裂しない。これらの結果は、増幅した DNA が外水相に添加したカチオン性の膜分子前駆体と連携することで、GV の分裂を加速させることを示している。本系では全体としてベシクル膜の電荷は中和されているが、部分的にポリアニオン性の DNA と相互作用する膜分子のクラスターが生じ、DNA がベシクル二分子膜のうち内側の膜に取り込まれる際に、相対的に外側の膜分子が多くなるので外膜の曲率が大きくなり変形を起こす。すなわちエキソサイトーシス様の変形がベシクルの分裂を誘発すると考えられる。このメカニズムは、増幅した DNA を持つ GV では連続した分裂が起き、増幅した DNA を持たない GV ではそれが起こらないことを説明している。

【4.結論と展望】

ここで関連研究との比較をしてみたい。Luisi らの人工細胞の研究では、ラージベシクル内部で PCR を行ったが分裂させることができず、PCR 効率も約 0.1%と低かった。Szostak らはラージベシクル内部に複製する核酸の前駆体を取り込み、内部で核酸の重合をしているが、物理的な力でベシクルを分裂させており、不自然さが残る。また両者とも単一ベシクルについて顕微鏡観察を行っており、その現象が頻度よく起こる事象であるか判断できない。

本研究で構築した系は、PCR の高電解質条件や加熱冷却条件にも耐えうるベシクル系である。本系は添加された膜分子前駆体を加水分解することで膜分子としてベシクル中に取り込み、肥大・分裂を起こさせる点で化学的なアプローチから GV を自己生産することにも成功した人工細胞モデルといえる。外部からの条件設定により、任意に膜分子前駆体を添加して自己生産することができ、適宜 DNA を増幅できる系といえる。本研究はまた集団解析より、この現象が決して希有な現象でないことも示した。集団解析の結果、内部情報分子の複製と自己生産ダイナミクスの連動性が見えてきた最初の例であり、DNA を多く含むベシクルほど分裂が速く進んだことは、二つのダイナミクスの連携を強く示唆している。現在のところ、DNA の情報はポリアニオン性であることのみで、膜分子と相互作用しているように見える。さらに情報としての意味を取り出すには、ベシクルの分裂と内部 DNA の増幅量の閾値との関連を調べる必要があるだろう。自己生産を多数回繰り返させるには、分裂の度ごとに減少する V 以外の膜分子や、内部の DNA 複製に必要な物質をベシクルに補給する手法の確立が前提となるが、このベシクル系と FCM 計測の技術を用いれば、複製した人工細胞がどのように進化するのかの実験を行うことも可能となろう。

【5.引用文献】

- [1] K. Takakura, T. Sugawara, *Langmuir* **2004**, *20*, 3832-3834.
- [2] T. Toyota, K. Takakura, Y. Kageyama, K. Kurihara, N. Maru, K. Ohnuma, K. Kaneko and T. Sugawara, *Langmuir* **2008**, *24*, 3037-3044.