

A03 自己成長するプロトセルの形態変化観察と物理学的解析

東京工業大学地球生命研究所 車 愈激

本研究グループは、細胞機能を発現する人工細胞系（プロトセル）を、非平衡ゆらぎが起こる場として考え、生命現象がどのような物理的機構を経て成り立っているのかを理解することを目的とする。特に、膜の自己複製現象に着目し、ベシクルの内空間から脂質を供給し自己成長・分裂を促すことで、ベシクルの形態変化を観察しその物理を解析する。

1. 脂肪酸合成酵素の精製

脂肪酸合成に関わる 10 種の酵素については、前回の報告までにおおむねその精製が終了していた。しかし、FabZ と ACP (acyl carrier protein) の 2 種に関しては、高度に凝集体を形成しやすいという性質から、精製段階において界面活性剤を用いることが強いられていた。この界面活性剤は最終精製サンプルにおいても残存していたことから、精製サンプルを用いた膜形成が難しく、より良い条件で再精製する必要があった。今回、FabZ と ACP において、培養条件、細胞破碎条件、バッファー条件などを総合的に見直すことにより、界面活性剤フリーで精製することに成功した。精製純度はいずれも SDS-PAGE 上で約 95% 以上に達した。また精製サンプルを用いてベシクル膜の形成を試みたところ、問題なく膜が形成されたことを確認した。これにより、脂肪酸合成に必要な 10 種の酵素と、基質である Acetyl-CoA, Malonyl-CoA, 補因子 NADH, NADPH 全てが揃った。

2. 試験管内脂肪酸合成反応

精製した酵素と基質等を先行研究[1]の数値を参考にしつつ至適条件で混合し、脂肪酸合成反応を行なった。反応後の溶液を観察したところわずかに濁度が上昇していることが観察できた。これに対して、脂肪酸合成が起こらないコントロールサンプル (-ACP) においては、反応後においても濁度の上昇は見られなかった。さらに、各酵素を欠損させた反応液を調製しインキュベーションしたところ、脂肪酸合成反応が進む経路が保持された系においてのみ、僅かな濁度の上昇が観察された。濁度が観察されたサンプルを位相差顕微鏡で観察したところ数マイクロメートルほどの凝集体のような塊が観察された。さらに 30 分までのタイムラプスを取ったところ、0 時点でサイズの小さい凝集体が、経時的に大きくなっている様子がリアルタイムで観察された。これにより凝集体の形成は脂肪酸合成反応に基づくものであることが示唆された。

合成産物である脂肪酸を直接検出するため、全酵素と基質等を混ぜ合わせて反応させたサンプルを LC-MSMS にて解析した。その結果、コントロール実験と比較して、脂肪酸を示す優位なピークが得られた。具体的には、dodecanoic acid (C12:0) と tetradecanoic acid (C14:0) が最もピーク強度が高く、メジャープロダクトであることが確認できた。さらに生体膜の構成脂質鎖長である、palmitic acid (C16:0) のピークも確認できた。これらについては現在標準品を用いて定量中である。

脂肪酸の合成に従い形成される凝集体に、何の酵素が含まれるのかを解析するため、各酵素を欠損させた反応液と全酵素を混合した反応液を調製し、反応終了後に簡易遠心機で遠心処

理することで上清と沈殿に分離した。上清は凝集していない可溶性タンパク質を、沈殿は凝集したタンパク質を意味する。その結果、凝集体の中に含まれるタンパク質の内、FabZ が脂肪酸合成反応依存的に現れた。この結果から、FabZ を中心としたタンパク質の凝集化により、脂肪酸合成反応が阻害されている可能性があることが示唆された。

3. ベシクル内脂肪酸合成反応

Emulsion 沈降法により全酵素と基質等をベシクルに内包したあと、直ちにサンプルを顕微鏡下に設置し、ステージ上で反応を行いつつベシクルを観察した。その結果、ベシクルの形態変化は観察することは困難だった。その理由として、反応開始前のベシクルの状態がヘテロな状態にあり、反応後に起こったと考えられる形態変化の差分を評価することが困難だったためである。この問題に対して、Microfluidics により均一なベシクルを形成することで解決することが可能だと考えられる。また、今後得られる LC-MSMS による定量結果から、形態変化を誘発するために十分な量の脂肪酸が、ベシクル内部で合成されているかどうかを算出することも重要である。

4. 無細胞合成系による脂肪酸合成酵素の合成

自律的永続的な人工細胞の構築のためには、代謝反応を再構築するだけではなく、酵素自体を DNA から合成し、その合成産物により代謝を創発しなくてはならない。そのため、脂肪酸合成を触媒する酵素が、正しく無細胞系内で合成されるかどうかテストを行った。酵素の無細胞合成とその活性発現にはこれまでに複数のタンパク質で成功している[2-5]。合成した無細胞系反応液を SDS-PAGE で展開し、Western Blotting を行なった結果、8 種の Fab 酵素と TesA について良好なタンパク質合成が確認できた。ACP に関しては、2 種類のプロダクトを示す 2 つのバンドが検出された。これは、Apo 型と Holo 型を示すものであり、本来 ACPS (ACP synthase) により ACP が翻訳後修飾され、Apo 型から Holo 型に変化しなくてはならない。おそらく、無細胞系の構成因子に ACPS がコンタミしており、それにより合成された ACP が修飾され Holo 型が出現したと考えられる。無細胞合成された ACP の全てを Holo 型にするため、ACP と ACPS を基質存在下で同じ無細胞系内で同時に合成した。しかし、ACPS の顕著な効果は見られなかったため、両者の合成量を調整する必要があると考えられる。

(1) Yu *et al.*, *PNAS* **108**, 18643–18648 (2011).

(2) L. Damiano, Y. Kuruma, P. Stano, What can synthetic biology offer to artificial intelligence (and vice versa)?, **148**, 1-3 (2016).

車 兪澈, 上田卓也「膜タンパク質の無細胞合成法」生物物理 **56** (3), 162-164 (2016).

(3) 車 兪澈, 上田卓也「クローズアップ実験法: PURE システムを用いた膜タンパク質の無細胞合成」実験医学 **34** (3), 471-476 (2016).

(4) 車 兪澈 「無細胞タンパク質合成系とベシクルによる人工細胞の構築」, CMC 出版『人工細胞の創製とその応用』 (2017) (in Press) .

(5) 金森崇, 杉本 (永池) 崇, 車兪澈, 網藏和晃, 上田卓也「総説: 無細胞タンパク質合成系と利用」, 生化学 (2017) (in Press) .