

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

本課題の目的

生命の最も特徴的な現象である自己複製を、ベシクル系を用いて再現する。これにより、膜の成長と分裂がどのような物理プロセスを経て成り立っているのかを理解する。具体的には、ベシクルの内部で脂質を合成し膜へ供給することで誘起される形態変化を観察する(図1)。

(1) 脂肪酸合成酵素 Fab の精製

Fatty acid binding protein (Fab) と呼ばれる8種類の酵素(FabABDFGHIZ)と Acyl carrier protein (ACP)、TesA を大腸菌から精製した。

(2) 試験管内脂肪酸合成

Fab 酵素と基質を混合し試験管内で脂肪酸合成を行なったところ、C16:0 をメインとする飽和脂肪酸の合成が LCMS により確認できた。しかしながら、脂肪酸合成反応は開始後約 10 分で停止した。また同じタイミングで反応溶液中に数十マイクロンサイズの凝集体が発生していることが顕微鏡により観察された。遊離脂肪酸は種々の酵素に結合し機能を阻害することが知られているため、合成産物である飽和脂肪酸がその高い melting point (MP: 液状化に必要な最低温度) から酵素に付着し活性阻害を起こしていると考えられる。そのため、より MP が低い不飽和脂肪酸を合成するため系の調整をおこなった。酵素の濃度比を調整した結果、C16:1 プロダクトの大きな増加と、初期状態では観察されなかった C18:1 プロダクトが確認できた(図2)。さらに嫌気的条件下で反応を行なったところ、C18:1 のみが約 50% 増加していることが観察された(図2)。これは酸素がないことで不飽和鎖の酸化が抑制されたためではないかと考えられる。定量的結果、約 60 μ M の脂肪酸が試験管内で合成された。脂肪酸合成効率を高め、ベシクル内部で十分量合成できるよう現在高度化を行なっている。

(3) 膜存在下における脂肪酸合成

細胞内では十分な鎖長に達した脂肪酸を直ちに細胞膜に組み込む機構を持っており、これにより細胞質への遊離を抑えていることが考えられる。これを再現するため、脂肪酸の局在場所となる人工膜リポソーム(直径 200nm)を調製し反応液に加えた。その結果、リポソームが無いものに比べて 1.5 倍合成量が増加した。また、反応後の凝集体形成も見られなかつ

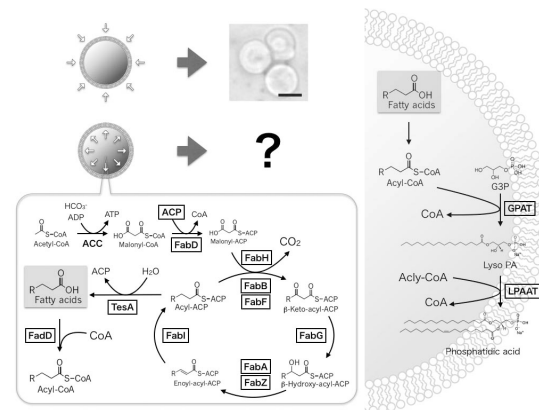


図1. 脂質を内部合成するベシクル

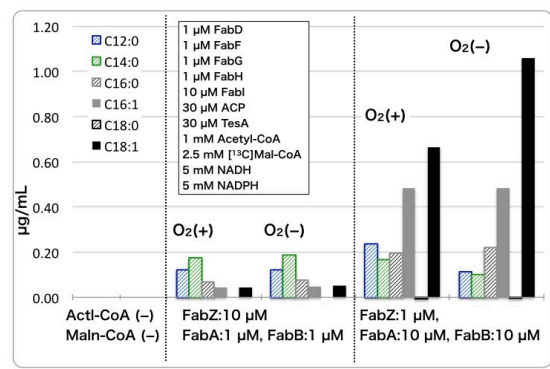


図2. 試験管内脂肪酸合成

た。このことから脂肪酸がリポソーム膜にトラップされ酵素阻害が軽減され、その結果合成量が上がったと考えられる。しかし反応時間は依然として10分程度であった。現在この原因について解析中である。

(4) Fab 酵素の細胞内局在

2017年4月10日から6月30日までイギリスニューカッスル大学の Jeff Errington 研究室に滞在し、細胞内における脂肪酸合成酵素の細胞内局在について研究を行なった。その結果上記(1)の Fab 酵素は細胞質内部に一樣に蛍光が分布していた。また、脂肪酸の細胞膜への取り込みを促す酵素 PlsX・PlsY については細胞質膜と隔壁に強い蛍光が確認された。このことから、脂肪質のいたるところで合成された脂肪酸を膜表面上で PlsX・PlsY に受け渡し、効率よく膜挿入していることが示唆された。

(5) 外環境からの脂肪酸供給による膜の形態変化

2017年8月1日から10月6日までバーバード大学の Jack Szostak 研究室に滞在し、ベシクル外側から脂肪酸(オレイン酸)を供給することで起こる形態変化観察を行った。その結果、ベシクル内側に外液を取り込んだ娘ベシクルを形成するもの、または外側に形成するものが観察された(図3)。さらにベシクル内部に100 μ Mの脂肪酸を内封し直ちに観察したところ、脂肪酸の自発的な膜局在が観察された。この局在は温度を50度にあげたところさらに顕著になった(図3)。このことから内部で合成された脂肪酸は、遊離状態から自発的にベシクル膜へ移行すること、温度変化による膜の脂質流動性の上昇により移行が促進されることが示唆された。

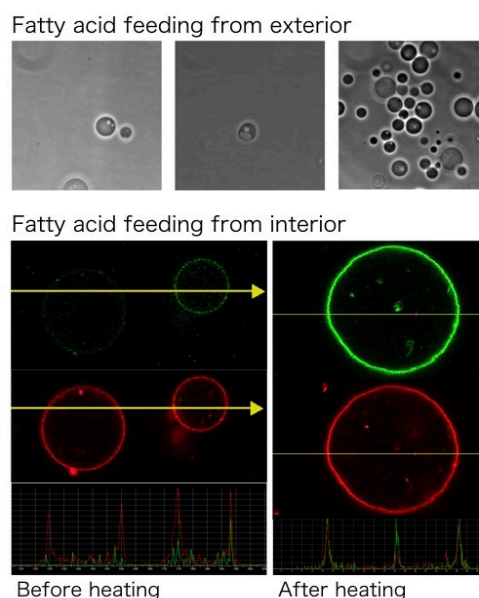


図3. ベシクル内外からの脂肪酸供給

(6) ベシクル内部での脂肪酸合成

ベシクル内部でタンパク質酵素を合成し、それにより機能を持たせたベシクルを作り出す手法を確立している(参考文献1-4)。この方法を用いて、合成後の脂肪酸を効率よくベシクル膜に組み込む機構(PlsX、PlsY)を構築する。すでに、DAN コンストラクトの調製を終わらせている。脂肪酸合成系の高度化と合わせ、ベシクル内部で脂肪酸を合成し膜挿入する人工細胞の構築を志す。

(1) T. Furusato, F. Horie, HT Matsubayashi, K Amikura, Y Kuruma, and T Ueda, *ACS Synth Biol.* (2018) in press.

(2) G. Rampioni, F. D'Angelo, M Messina, A. Zennaro, Y. Kuruma, D. Tofani, L. Leoni, P. Stano. *Chem Commun.* 54:2090-3 (2018).

(3) Y. Kuruma and T. Ueda, *Nat Protoc.* 10:1328-44 (2015).

(4) H. Matsubayashi, Y. Kuruma, T. Ueda, *Angew Chem Int Ed Engl.* 53:7535-8 (2014).