

## 1B18

### 内部で増幅した DNA を含むベシクルの分裂におけるカスケードダイナミクス

(東大院・総合) ○栗原顕輔、鈴木健太郎、豊田太郎、菅原正

#### 【序】

ホスト/ゲストの化学に起因する超分子化学は、細胞を模倣したダイナミクスを発現する最小細胞を人工的に構築させるほどに発展してきた。両親媒性分子が水中で形成する中空状の分子集合体ベシクルにより構築される最小細胞は、細胞モデルや細胞の起源を解明する上で重要な役割を果たすであろうと、ソフトマター物理や化学の観点から期待されている。我々は化学的なアプローチに基づき非生物的な分子を用いることで、細胞とほぼ同じサイズを持つ自己生産するジャイアントベシクル(GV)を構築してきた

[1,2] (図1)。ベシクルを構成する膜分子(V)としては、親水部にカチオン性の4級アンモニウム塩、疎水部末端にアルデヒド基、疎水部にアルキル基を持つ二本鎖型両親媒性分子を用意する。ベシクルに含まれる触媒分子(C)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と肥大し、電解質(E)により表面が不安定化しほぼ、等割に近い分裂を起こすことを実験的に確認している[3, 4]。

本研究では、自己生産する GV に封入した DNA に対してポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行うことで、ベシクル内部で DNA が増幅することに成功した。さらに、このベシクル系に対して、ベシクルを構成する膜分子の前駆体分子を外部的に添加すると、増幅した DNA を含むベシクルが急速的にかつ連続的に自己生産することを示した。

#### 【結果・考察】

##### 1) PCR 可能な耐熱・耐高イオン強度ベシクル系の構築

本研究で用いる自己生産するベシクル系は、PCR に必要な高温、高イオン強度条件に耐えるように、リン脂質である POPC と POPG を、POPC : POPG : V : C = 6 : 2 : 2 : 1 の割合で調合した混合脂質を用いて調製した。アニオン性リン脂質 POPG は、POPC と同様にベシクル膜を強固にすると共に、カチオン性膜分子を電氣的に中和し、DNA と脂質の複合体を形成するのを防ぐ目的で混合した。実際、POPG が含まれるベシクル系は、PCR と同程度の水温 (95°C)、高イオン強度 (150 mM 食塩水相当) 条件でも安定に存在することを確認した。

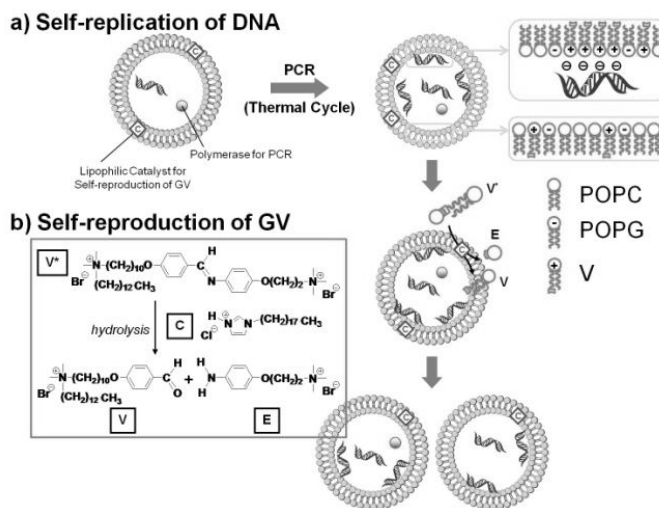


図1. 内部で DNA が増幅し、自己生産するベシクル系の模式図

## 2) PCR によるベシクル内 DNA の増幅

図 2 に示す蛍光顕微鏡観察像より、PCR 処理前のベシクルでは、2 本鎖 DNA を検出する SYBR Green I (SG) に基づく蛍光は観測されないが、鋳型 DNA を内包したベシクルに対して PCR を行うと、増幅した二本鎖 DNA と SG の複合体が発する蛍光を検出することができた。またフローサイトメトリー計測により、系全体の約 20% で PCR が進行したことが分かった。

## 3) 増幅した DNA を持つジャイアントベシクルの自己生産ダイナミクス

PCR を 20 サイクル行って DNA を増幅させた GV に、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 3 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 の分裂があったが、一方で DNA を含んでいないものの PCR による増幅処理を行っていないベシクルでは、分裂が遅いことがわかり、分裂の機構が異なることを示唆させた。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と考えられる。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 が分配されていることが明らかになった。

## 4) 自己生産速度の PCR サイクル依存性

PCR のサイクル数を変えることで、内部 DNA の量が異なる GV (膜は疎水性の蛍光プローブで染色してある) を用意し、それぞれに膜分子前駆体を添加し、FCM 計測により分裂の速度を比較すると、10 サイクルまでは分裂速度が遅かったが、15 サイクルを超えると速くなる傾向が見えた。これは、特に光学顕微鏡で見えるサイズ (>1  $\mu\text{m}$ ) のベシクルの消滅速度に明らかな PCR 回数依存性があることを意味しており、急速な自己生産ダイナミクスを起こす DNA 量に閾値があることを示唆する。PCR の熱サイクル数を変えると 15 サイクル程度から分裂速度が速くなってきたことから、PCR によりベシクル内部 (特に、外膜の内側) に蓄積した 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、カスケード的に分裂挙動を加速させていると解釈できる。

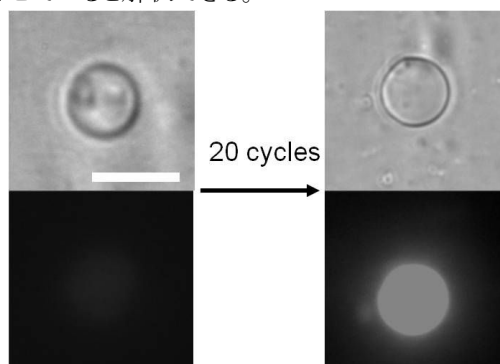


図 2. PCR 前後のベシクルの微分干渉顕微鏡像  
上:明視野像 下:蛍光野像 (bar=10  $\mu\text{m}$ )

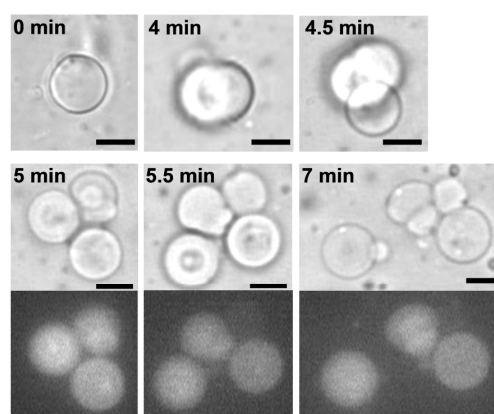


図 3. DNA を内包するベシクルの自己生産ダイナミクスの微分干渉顕微鏡像 (bar=10  $\mu\text{m}$ )

## 【引用文献】

1. Takakura, K. & Sugawara, T. *Langmuir* **20**, 3832-3834 (2004).
2. Suzuki, K., Toyota, T., Takakura, K. & Sugawara, T. *Chem. Lett.* **38**, 1010-1015 (2009).
3. Toyota, T. *et al. Langmuir* **24**, 3037-344 (2008).
4. Kurihara, K. *et al. Soft Matter* **6**, 1888-1891 (2010).