

4P082

ベシクル型人工細胞における増殖 DNA が誘発する ベシクル肥大・分裂機構について

○ 菅悠美¹、栗原顕輔²、豊田太郎^{2,3}、今井正幸¹、菅原正^{2,3}

1. お茶大院・理 2. 東大院・総合 3. 東大・複雑系生命システム研究センター

【序】

近年、生命の起源を物理・化学的に解明する上で人工細胞を創る研究が注目されている。人工細胞を構築するに当たり、まず細胞を構成する要素を抽出し、モデル化を行うことが重要である。この要素とは自己と外界とを分ける境界、境界内部で反応を活性化するための触媒、そして世代間で受け継がれる情報である。このうち境界に関しては、ソフトマター物理の面から脂質二分子膜で構成されるベシクルについての研究が進められており、さらに化学反応を組み合わせることで、自己生産を繰り返してもベシクルのサイズが保たれる系が確立されている。

我々はこれまでに、情報伝達物質である DNA の複製系と膜の自己生産系とが連動したベシクル型人工細胞の構築を報告した。この系で、増幅した DNA がベシクル分裂の促進因子として働いたことから、そのメカニズムを解明するため、DNA のもつ電荷に注目し、ベシクル変形ダイナミクスに対する DNA の鎖長依存性を調べることを本研究の目的とした。鎖長の異なる DNA (374bp, 1164bp, 3200bp) を内包したベシクルを調製し、DNA 増幅後に膜分子前駆体を添加したところ、光学顕微鏡観察及び共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡により、どの鎖長を含むベシクルについても肥大・分裂のダイナミクスが確認できた。さらに DNA 鎖長および内部膜構造との相関について精査した結果を報告する。

【結果・考察】

1) PCR 可能なベシクル系の構築

本研究で用いる自己生産するベシクルの膜組成は、PCR における熱条件に対して安定な両イオン性のリン脂質である POPC を主成分とした。さらに、カチオン性の膜分子 **V** (図 1) と共に、高濃度の電解質存在下でベシクルの加熱をともなう PCR 条件下でのベシクルの安定性を確保する

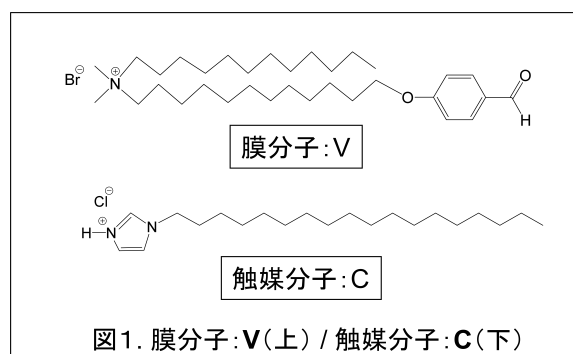


図1. 膜分子:V(上) / 触媒分子:C(下)

ために、ポリエチレングリコール(PEG)鎖のついたリン脂質 DSPE-PEG₅₀₀₀ を加え、混合比率 POPC : DSPE-PEG₅₀₀₀ : V : 触媒分子 C = 74 : 5 : 4 : 8 (mol%) の脂質からなるベシクルを調製した。

2) ベシクル内 PCR の可視化

PCR 用膨潤溶液に二本鎖 DNA の検出剤である SYBR Green I (SG) を加え、ベシクル内 PCR を行なった。ベシクル内部で DNA が増幅されると、二本鎖 DNA と SG の複合体が蛍光を発するので、蛍光顕

微鏡観察によりベシクル内で PCR が進行したことを確認した。

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

①微分干渉顕微鏡観察

ベシクル内部での DNA の複製は、内封した 3 種の DNA の鎖長の違いに関わらず進行した。さらに、DNA を増幅させたベシクルに、膜分子前駆体 **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。観察結果より、本系における変形挙動は、**V*** 添加後 (0 分) からベシクルの変形が始まるまでの初期状態、さらに変形を始め最終的な形状に落ち着くまでの中間状態を経て、最終的な

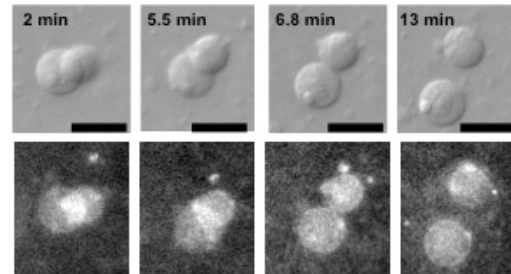


図 2. DNA (鎖長:3200bp) を内包するベシクル自己生産ダイナミクスの微分干渉顕微鏡像 (上: 明視野像 下: 蛍光像 bar = 20 μm)

形状である終状態へと進行することが明らかになった。また、このダイナミクスを蛍光顕微鏡で観察したところ、分裂後のベシクルにも二本鎖 DNA と蛍光プローブ (SG) との複合体に由来する蛍光が観察された (図 2)。このことは、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を意味している。

②共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡観察

膜分子前駆体 **V*** 添加後、ベシクルが初期状態から中間状態に移行する過程で起こる内部膜構造の変化を追跡することを目的として、ベシクルの膜を蛍光色素で標識し、共焦点蛍光顕微鏡を用いた三次元計測を行なった (図 3)。この計測により、**V*** 添加直後からベシクル内で、内部の膜を足場とする活発な膜生成を伴う形態変化が起こっていることが明らかになった。ベシクル内部の膜構造の変化は、i) DNA がベシクル内部の膜上へ接着することが引き金となり、その近傍で膜変形が誘発される、ii) これに伴い、膜に溶存する触媒の作用で、外水相に添加したカチオン性の膜分子前駆体の加水分解が起こりやすい環境が形成される、iii) その結果 DNA 接着箇所が活性点となり、ベシクル内部での膜生産が急速に起こり、新たなベシクルの肥大・分裂あるいはバーシングが起こるという機構により理解される。

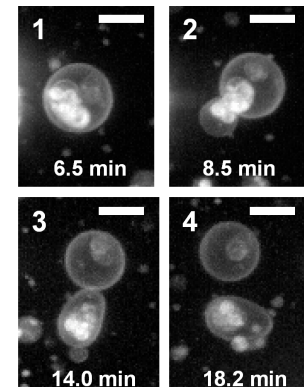


図 3. DNA (鎖長:1164bp) を内包するベシクル自己生産ダイナミクスの共焦点顕微鏡像 (bar = 5 μm)

【総括・展望】

全鎖長 DNA において、ベシクル内部での DNA の増幅、さらに膜分子前駆体添加後にベシクルの自己生産ダイナミクスを確認することができた。これらの結果より、変形挙動に関して分類を行なった。さらに、共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡観察より変形時の内部膜構造を三次元的に明らかにした。今後は、DNA 鎖長および内部膜構造との相関について明らかにして行く予定である。