

## 1B04

ジャイアントベシクル型人工細胞の継代的増殖を目指した基質補給条件の最適化  
(東大院総合文化<sup>1</sup>, お茶大院人間<sup>2</sup>, 神奈川大学理学部<sup>3</sup>, 東大複雑系生命システム研究セ<sup>4</sup>)  
栗原顕輔<sup>1</sup>・菅悠美<sup>2</sup>・大倉優作<sup>1</sup>・鈴木健太郎<sup>3,4</sup>・豊田太郎<sup>1,4</sup>・菅原正<sup>3,4</sup>

Optimization of substrates-replenishment for recursive amplification of giant vesicle-based protocell  
(Univ. of Tokyo<sup>1</sup>, Ochanomizu Univ.<sup>2</sup>, Kanagawa Univ.<sup>3</sup>, Research Center for Complex System Biology<sup>4</sup>)  
Kensuke Kurihara<sup>1</sup>, Yumi Kan<sup>2</sup>, Yusaku Okura<sup>1</sup>, Kentaro Suzuki<sup>3,4</sup>, Taro Toyota<sup>1,4</sup>, Tadashi Sugawara<sup>3,4</sup>

### 【序】

生命の起源である原始細胞には、境界・触媒・情報の三要素が必須である[1]。脂質分子が水中で形成する中空状の分子集合体であるベシクル、水素結合認識能をもつ高分子、および基本的な有機分子を用い、それらの間に分子間力や基質選択的の化学反応性を導入することで、原始細胞モデルといえる超・分子システムを構築することは、分子科学としても挑戦的課題と思われる。我々は境界の複製系として、自己生産するジャイアントベシクル(GV, 直径 1  $\mu\text{m}$  以上)を構築した[2]。一方、情報分子の複製系としては、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による GV 内部での DNA 増幅系を実現している[3]。次いで 2011 年には「GV の自己生産」と「内部情報分子の複製系」という二つの要素を組みこんだ原始細胞モデルを報告した[4]。この報告では、自己生産する GV に鑄型となる DNA を封入し、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 を増幅させた後、ベシクルを構成する膜分子の前駆体分子 (図 1) を外部より添加すると、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。

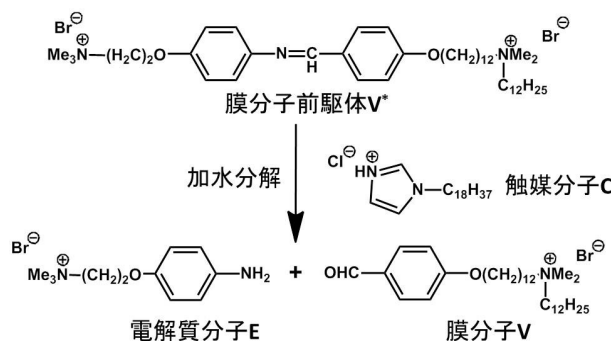


図 1. 前駆体分子 V\* の加水分解反応による膜分子 V の生成

完全なる原始細胞モデルとしては、さらに継代的に増殖する原始細胞モデルが進化することが求められる。我々が構築した原始細胞モデルは一世代の増殖系であり、GV を継代するには「内部情報物質の原料補給」と「自己生産によって変化した脂質膜組成の回復」が必須である。本研究の目的は、pH 調整によって融合した GV[5]の内部で PCR により情報分子を増幅できる基質補給系の構築にある。

### 【実験方法と結果】

#### 1) PCR 原料を含む GV 融合系の構築

分散液の pH に応じて極性基の電荷が異なる二種のリン脂質、ホスファチジルコリン(PC)とホス

ファチジルグリセロール(PG)、自己生産する GV の膜分子 **V**、および **V\*** を加水分解する触媒 **C** を含む GV を次のように 2 種類作製した。POPC を主成分とするコンベイヤー GV として、膜組成比が POPC : **V** : **C** : コレステロール = **65 : 20 : 10 : 5** (モル比) の混合脂質を用いて GV を調製した。自己生産後の GV を仮想した POPG を主成分とするターゲット GV には、組成比が POPC : POPG : **V** : **C** : コレステロール = **15 : 60 : 10 : 10 : 5** (モル比) の混合脂質を用いた。コンベイヤーGV には PCR に必要な基質であるデオキシリボヌクレオチド三リン酸(dNTP)を、ターゲット GV には鋳型 DNA や dNTP 以外の PCR 原料を凍結乾燥法にて封入した。両者を混合後、1 M の塩酸を加え分散液の pH を 3 に低下させて、24 時間 23°C で静置して GV を融合させた。GV 融合後に 1 M 水酸化ナトリウム水溶液を加えることで分散液の pH を 8 へ戻した。

## 2) PCR によるベシクル内 DNA の増幅

融合後のベシクルについて 94 °C(15 秒)–68°C(90 秒)のサイクルを 20 回繰り返す PCR を行った。2 本鎖 DNA を検出するために、GV 内部に予め SYBR Green I (SG)を内包しておくことで、GV 内での DNA 増幅が微分干渉/蛍光顕微鏡観測で明らかになった。図 2 は、PCR 処理前のベシクルでは、SYBR Green I (SG)に基づく蛍光は観測されなかったが、鋳型 DNA を内包したベシクルに対して PCR を行くと、GV 内で増幅した二本鎖 DNA と SG の複合体が発する蛍光を観測できたことを示している。

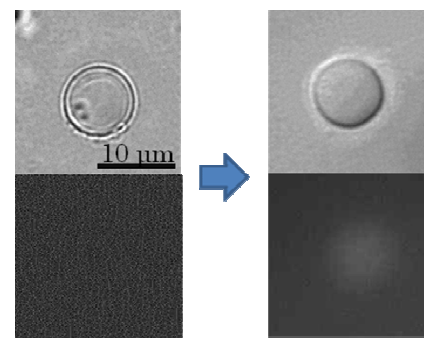


図 2 PCR 前後の写真

左 : PCR 前 右: PCR 後

## 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

上記の PCR を 20 サイクル行って DNA を増幅させた GV に、前駆体 **V\*** を添加して微分干渉顕微鏡で観察した連続写真を図 3 に示した。添加して 1.5 分後に肥大と分裂が起こり、最終的に 3 個へ分裂したことがわかる。さらに蛍光顕微鏡で観察したところ、分裂後の GV にも蛍光が観測されたことより、分裂した GV 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。融合後の GV 内で DNA を増殖し、自己生産ダイナミクスを引き起こすことに成功したといえる。

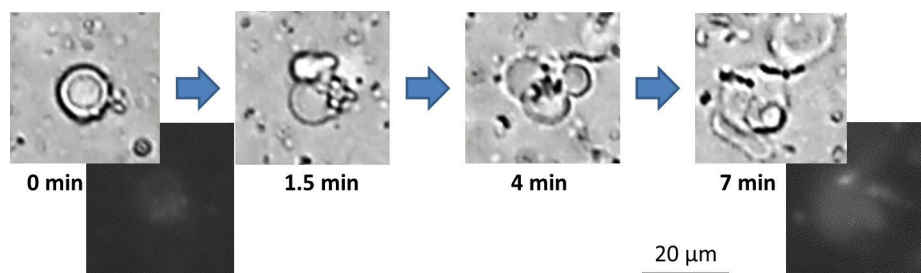


図 3. 自己生産ダイナミクス写真

### 【引用文献】

1. J. W. Szostak et al, *Nature* **409**, 387-390 (2001).
2. K. Takakura et al, *Langmuir* **20**, 3832-3834 (2004).
3. K. Shohda et al, *Soft Matter* **7**, 3750-3753 (2011).
4. K. Kurihara et al, *Nature Chem.* **3**, 775-581 (2011).
5. K. Suzuki et al, *Chem. Lett.* **41**, 789-791 (2012).