

DNA 含有ベシクル型人工細胞の変形様式と膜中 DNA-触媒分子複合体の局在モードとの相関

(¹東大院・総合、²岡崎統合バイオ、³分子研、⁴東大・複雑系生命システム研究センター、⁵神大・理)
○松尾 宗征¹、栗原 顕輔^{2,3}、豊田 太郎^{1,4}、菅原 正^{4,5}

Correlation between GV-deformation pattern and localization mode of DNA-catalyst complexes in the membrane of GV-based protocell

(¹The University of Tokyo, ²Okazaki Institute for Integrative Bioscience, ³Institute for Molecular Science, ⁴Research Center for Complex System Biology, ⁵Kanagawa University.)

Muneyuki MATSUO¹, Kensuke KURIHARA^{2,3}, Taro TOYOTA^{1,4}, Tadashi SUGAWARA^{4,5}.

背景・目的

近年、「生命とは何か」という命題に対し、両親媒性分子からなる閉じた二分子膜のジャイアントベシクル(GV)で細胞の生体膜を模倣し、人工細胞を構築する研究が行われている。我々のグループは、膜分子前駆体 V^* を取り込み、構成分子 V へと変換し、肥大・分裂する GV 自己生産系を報告した[1]。さらに、 V からなる GV の膜組成に、2 種類のリン脂質(1-パルミトイル-2-オレオイル-3-*sn*-ホスファチジルコリン; POPC と 1-パルミトイル-2-オレオイル-3-*sn*-ホスファチジルグリセロール; POPG) を加えたハイブリッド GV を用い、その内部で DNA を増幅させることで、GV の自己生産系と DNA の複製系とが化学的に連動した GV 型人工細胞系を実現した[2]。

この研究では、膜分子前駆体を添加すると、DNA を増幅したベシクルの方が、増幅していないベシクルよりも、より迅速に分裂することが見出された。これは、ポリアニオンである DNA とイミダゾール塩酸塩骨格をもつカチオン性両親媒性分子(触媒分子 C) との間に静電的な引力がはたらき、ベシクル膜内で局所的に複合体が形成され、この DNA-触媒分子 C 複合体が膜分子前駆体を分解するより強力な触媒として機能することが要因と考えられる。

そこで、本研究では DNA-触媒分子 C 複合体が人工細胞の形態変化に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。まず、形態変化時の DNA- C 複合体の状態が変化することを期待し、DNA 増幅後から膜分子前駆体添加までの時間を変化させ、膜分子添加後のダイナミクスが著しく変化する新奇人工細胞の構築を目指した。次に、蛍光分子間で生じる励起エネルギー移動を利用し、形態変化前の人工細胞における DNA- C 複合体形成の進行度合いを蛍光顕微鏡で観測した。

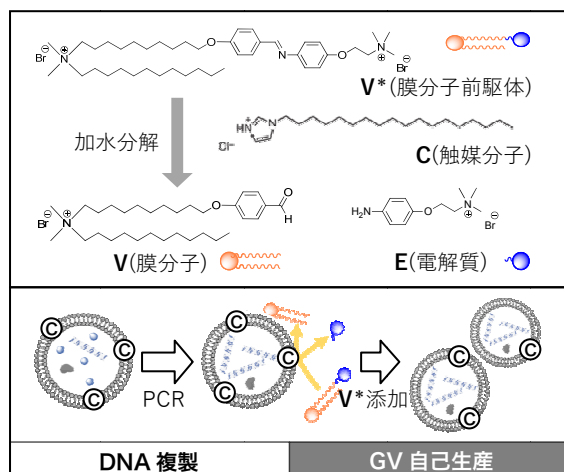


図1 GV型人工細胞の構成分子と概略図

[1] K. Takakura, et al., *Langmuir*, **20**(10), 3832–3834 (2004)

[2] K. Kurihara, et al., *Nat. Chem.*, **3**, 775–781(2011)

実験・結果

POPC:POPG:V:C:コレステロール=35:39:12:9:5を膜組成として、1164bpのDNAとDNAポリメラーゼおよびPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)試薬を内包する人工細胞を凍結融解法で作製した。この人工細胞は、PCRでDNAを増幅した直後にV*を添加すると、先行研究と同様の Budding 変形を高い頻度で起こした(図 2a)が、DNA 増幅後の静置時間の増加に伴い、Budding 変形の割合は減少し、人工細胞が球形から全方向に複数のチューブ状ベシクルを伸長させた形状に変形(Multi-tubulation 変形、図 2b)する割合が増加した。

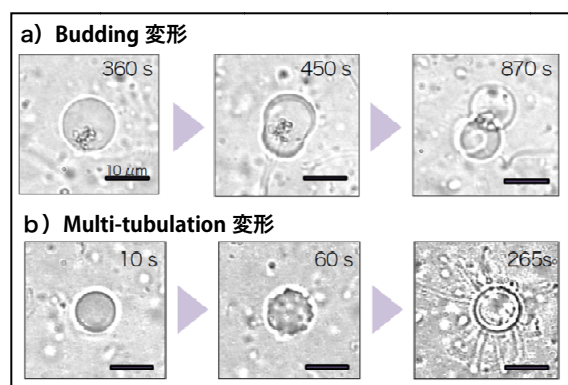


図 2 人工細胞の2つの変形パターン

一方、試験管内でPCRにより増幅したDNAに上記の組成で脂質を混合し、形成した脂質凝集体にV*を添加すると、一つの脂質凝集体からチューブ状ベシクルが多数生成することが観察された。この結果は、DNA-触媒分子C複合体形成の進行がMulti-tubulation変形を誘発していることを示唆している。

次に、触媒分子CにドナーとなるBODIPYを、DNAのプライマーにアクセプターとなるTexas Redをそれぞれ担持させ、上記の膜組成で人工細胞を調製した。これらの蛍光プローブ分子が約5nm以内の近接状態にあるときに生じるBODIPYの励起エネルギー移動に基づくTexas Redの蛍光を共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡で観測した。PCRによりDNAを増幅し

た後の人工細胞について、①BODIPYのみを励起・検出、②Texas Redのみを励起・検出、および③BODIPYを励起しTexas Redを検出するそれぞれの観測条件で蛍光観察したところ、①②のみならず③の条件でもこの人工細胞はTexas Redの強い蛍光を発した。DNA増幅後の静置時間を変えて、③の条件で撮影した顕微鏡像から励起エネルギー移動に基づくTexas Redの蛍光輝度を測定したところ、静置時間の経過に伴い輝度が増大することがわかった。以上より、蛍光プローブを担持させたDNAと触媒分子Cが近接していることが明らかになったが、DNA-C複合体形成の有無に関わらず、DNAが膜表面に吸着するだけでも励起エネルギー移動は起こる可能性がある。そこで、人工細胞の内水相と外水相に、Texas Redの水溶性消光剤であるTEMPOLを溶解させ、蛍光観察を先と同様に行った。その結果、③の条件で観察されたTexas Redの蛍光輝度はあまり消光剤の影響を受けなかった。これにより、GV膜内部にDNAが侵入していることが示された。

総括

以上の実験結果から、DNA-触媒分子C複合体形成の進行に伴い、膜分子前駆体添加後のGV型人工細胞の変形パターンが変わることが強く示唆された。本研究において、PCR後静置時間が短い場合、複合体形成があまり進行せず、膜分子生産が穏やかに行われ、人工細胞が熱力学的に安定な曲率を維持しながら変形すると考えられる。一方で、PCR後静置時間が長い場合は、急速に膜分子が生産されるため、自発曲率を維持できず、速度論的変形としてMulti-tubulationが誘発されると考えられる。

これらの結果は、DNAが膜分子と相互作用することで酵素のように振る舞うことを示しており、生命起源研究の観点からも興味深い。