

ベシクル型人工細胞の自己生産ダイナミクスにおける異なるDNA鎖長が及ぼす効果

¹神奈川大院理, ²東大院総合

○平田結子¹, 松尾宗征², 鈴木健太郎¹, 菅原正¹

Influence of Different Length of DNA on Self-reproduction of Vesicle-based Artificial Cells

○Yuiko Hirata¹, Muneyuki Matsuo², Kentaro Suzuki¹, Tadashi Sugawara¹

¹Department of Chemistry, Kanagawa University, Japan

²Department of Basic Science, Graduate School of Arts and Science, University of Tokyo, Japan

【Abstract】

We have developed a giant vesicle (GV)-based artificial cell in which a self-reproduction of the GV (compartment) takes place linked with amplification of template DNA in GV. We expect that the chain length of the encapsulated DNA influences the frequency and pattern of the GV division because the amplified DNA intrudes into the membrane and complexes with amphiphilic catalysts (C) to construct an active site for the membrane lipid (V) production. Hence GV-based artificial cell containing different length of DNA (374 bp, 1164 bp, 3200 bp) may exhibit difference in the proliferation efficiency through the competitive feeding of nutrients (precursor of the membrane lipid V*). A buffer solution of V* was added to the vesicular dispersion after 0.5 h, 24 h and 72 h of incubation times. Their morphological changes were observed by a confocal laser scanning microscope 0.5 h and 2 h after the addition of V*. It was found that GVs containing 1164 bp DNA became a dominant group in these competitions.

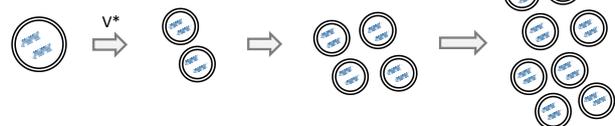
【序】

近年我々は、情報物質としての DNA 複製と、ベシクル自己生産とが連動したベシクル型人工細胞の構築に成功した。この自己生産過程で増幅した DNA は、カチオン性膜分子との静電相互作用により表面が疎水化し、膜内部に取り込まれて、触媒分子 C と複合体 (C@DNA) を形成する[1]。従って、ベシクル型人工細胞内に含まれる DNA の性状の違いによって C@DNA のもつ触媒としての性質が変調すると期待される。このことから、

我々は内封する DNA の長さを変えればベシクルの分裂しやすさに違いが生じ、異なる長さの DNA を内封したベシクルを共存させ、一定量の膜分子前駆体を与えれば、自己増殖の競争が起こるのではないかと考えた。そこで、3 種の異なる長さの DNA (374 bp, 1164 bp, 3200 bp) を用意し、それぞれ内封されたベシクルを同一条件下で競争的に自己生産させる実

Phenotype (DNA-A)

Rate of membrane-lipid production : (fast)



Phenotype (DNA-B)

Rate of membrane-lipid production : (slow)

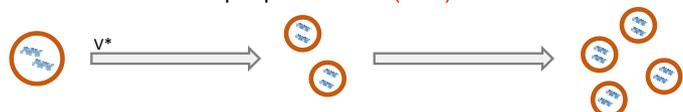
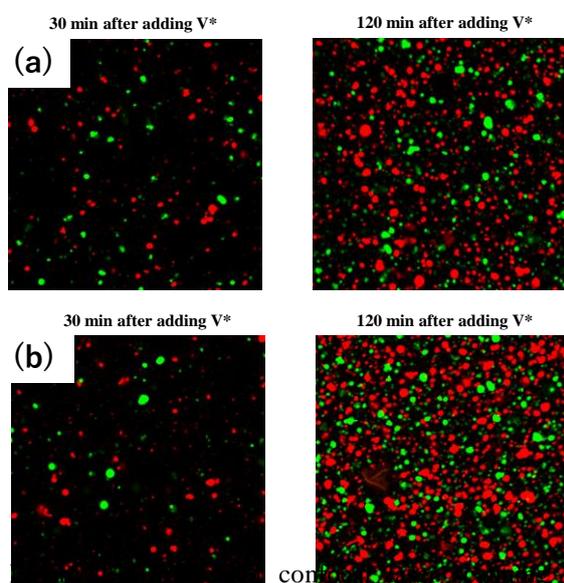


Figure 1 : difference of division speed of GVs by included DNA's lengths

験を行った。作成したベシクルの膜組成比は、両性イオン型リン脂質 POPC : カチオン性膜分子 V : 触媒分子 C : PEG 部位を有するリン脂質(DSPE-PEG₁₀₀₀) : コレステロール = 78 : 4.2 : 8.4 : 0.84 : 8.4 (mol%)である。PCR で内封 DNA を増幅させた後、この溶液に膜分子前駆体である V* 入り buffer 溶液を添加し、共焦点レーザー走査型顕微鏡にて V* 添加前後でのベシクル数の変化を観測・解析した。なお、1164 bp 入り GV は Texas Red(赤)で、374 bp と 3200 bp 入り GV は BODIPY(緑)で染色し、374 bp と 1164 bp、1164 bp と 3200 bp の組み合わせで観測した。PCR 後 30 分、24 時間、72 時間静置したベシクル分散溶液に V* を添加し、30 分後及び 120 分後の共焦点顕微鏡像を取得した後、プレパラート内(340 μm 四方)について 5 か所(中央、四隅)に含まれる直径 5 μm 以上のベシクル(約 1000 個)を計測することで GV の増殖率を求めた。

【結果・考察】

膜分子前駆体添加後に、膜の蛍光色より内封した DNA の鎖長の違いがわかる GVn の総数を数えあげることで、両競争系における優勢 GV を判定したところ、2つの組み合わせにおいて、共に 1164 bp-GV が優勢であることがわかった(Figure 2, Table 1, 2)。その理由として、以下のことが考えられる。まず、374 bp の DNA は、鎖長が短いために触媒 C を集める数に限りがあり、小さめのベシクルが多くできる。次に、3200 bp の DNA は、鎖長が長く膜を修飾している PEG 鎖により、膜への陥入が阻害されており、DNA が膜へ陥入しにくく活性点の形勢に時間がかかることが挙げられる。現在、ベシクル自己生産に対する DNA 鎖長の影響を顕著にすることを想定して、ベシクル膜に担持された PEG 量を増大した試料についての測定も行っている。この結果については、当日発表する予定である。



microscopy of (a) a mixture of GV's (green) with short DNA(374 bp) and GV's (red) with middle DNA(1164 bp) at 30 min and 120 min after addition of V*, (b) a mixture of GV's with long DNA(3200 bp) (Green) and GV's (red) with middle DNA(1164 bp). Diameters of counted GV's were larger than 5 μm.

Table 1. Ratio of number of 1164 bp-GV to number of 374 bp-GV (a) or 3200 bp-GV (b) after addition of V*.

(a)

| PCR後の 静置時間 /h | V*添加後 0.5 h | V*添加後 2 h |
|------------------|----------------|--------------|
| 0.5 | 1.3 | 1.5 |
| 24 | 1.3 | 1.3 |
| 72 | 1.4 | 1.5 |

(b)

| PCR後の 静置時間 /h | V*添加後 0.5 h | V*添加後 2 h |
|------------------|----------------|--------------|
| 0.5 | 1.6 | 1.9 |
| 24 | 1.8 | 1.7 |
| 72 | 2.0 | 1.4 |

【参考文献】 [1] K. Kurihara, K. Suzuki, T. Sugawara *et al.*, *Nature Chem.* **4**, 1-6 (2011).