

## 遺伝情報・脂質膜・エネルギー供給を備えたオンチップバイオリアクターを開発 ～人工細胞を創り、理解し、役立てる～

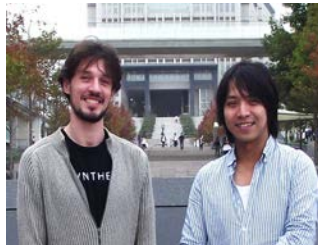
生命の基本単位は、細胞です。この細胞は脂質膜で囲まれたミクロンサイズの小さなカプセルであり、DNAに設計図となる遺伝情報が保持されています。現実の細胞を模倣しながら可能な限り単純なバイオリアクターを創ることは、細胞の設計原理を理解するのみならず有用な生体材料を創出する重要な課題です。

九州大学大学院理学研究院物理学部門のZiane Izri 研究員と前多裕介准教授の研究グループはミネソタ大学物理学科のVincent Noireaux 教授と共同で、脂質膜の境界を持ち、エネルギーのやり取りをしながら自律的に遺伝子発現するバイオリアクター「オンチップ膜融合型人工細胞<sup>\*1</sup>、On-chip membrane-bound artificial cells」を開発しました。直径25 $\mu\text{m}$ サイズのマイクロウェルを平面脂質膜でシールし、5000個の人工細胞が集積したデバイスにおいて24時間以上に渡って安定して遺伝子発現が行われることを確認しました。従来技術を越える大規模計測から、1mg/mLを越える世界最高レベルのタンパク質合成量を示すことを明らかにし、この遺伝子発現能力を発揮するためにはエネルギー供給のバランスを担う脂質膜の界面が不可欠であることがわかりました。

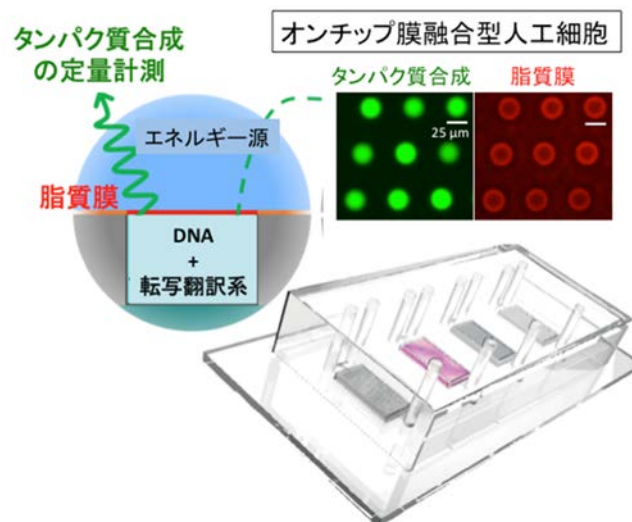
今回構築したオンチップ膜融合型人工細胞は、最小限の要素で人工的な細胞を構築する合成生物学<sup>\*2</sup>の研究を加速させると期待されます。また、マイクロ流体デバイス<sup>\*3</sup>と無細胞系<sup>\*4</sup>の遺伝子発現<sup>\*5</sup>を活用し、転写翻訳系、膜機能、細胞骨格形成などの生体機能に関わる薬剤や抗生物質のスクリーニングといった応用につながると期待できます。本研究成果は、2019年7月4日(木)(日本時間)に米国科学雑誌「ACS Synthetic Biology」のオンライン速報版に掲載されました。

### 研究者からひとこと：

オンチップ膜融合型人工細胞は、いかにしてミクロな生命の世界が形作られるかを物理学で問うツールです。現代の物理学には、原子や宇宙だけでなく、生命の本質も捉えるフロンティアが広がっています (Izri)。



左：Ziane Izri 研究員  
右：前多裕介准教授



### 図. オンチップ膜融合型人工細胞の概要.

無細胞転写翻訳の遺伝子発現を行うマイクロ流体デバイスを構築。5000個の独立した人工細胞が集積している。

【問い合わせ先】 九州大学理学研究院 准教授 前多裕介

TEL : 092-802-4071

Mail : ymaeda@phys.kyushu-u.ac.jp

## ■背景

生命の基本単位は、細胞です（図1）。この細胞はDNAに遺伝情報を保持し、遺伝子発現によってタンパク質を合成して様々な酵素反応を行い、細胞の分裂やDNA複製などを制御しています。細胞は自分自身のコピーを生み出しながら増殖する「自己複製」を行う精密な機械であり、その仕組みは自然界で最も洗練され、そして複雑なシステムから実現されています（図1）。いかにして細胞は自己複製するのでしょうか？分子から細胞を構築することは可能なのでしょうか？

分子生物学の発展により細胞内の生命現象を司る遺伝子やタンパク質が数多く同定され、分子レベルでの理解は飛躍的に進みました。そして近年、遺伝子工学技術や合成化学を駆使し、細胞を構成する分子を集め、あたかも機械のように生命システムを再構成する「合成生物学」が注目を集めています。“There’s plenty of room at the bottom（原子分子スケールには情報を蓄える広大な地がある）”とR. ファインマンが述べたように、目に見えない物質のスケールには新たな科学的発見の種があります。そして、細胞のように複雑なシステムを分子から構築し、自己複製という生命のあり方を分子レベルから理解する人工細胞の合成生物学が世界中で進められています。

ここでいう人工細胞とは、現実の細胞を模倣しながらも、可能な限り単純な反応系で動作するバイオリアクター（生体模倣反応系）を意味します。人工細胞は直径10 $\mu$ m~100 $\mu$ m程度の区画をもつリポソーム（微小なカプセル）であり、生きた細胞と同様に、脂質膜で外界と区切られた表面構造をもちます。この区画内には、水、DNA、そして遺伝子発現に必要なタンパク質分子のリポソーム、RNAポリメラーゼ、tRNA、ATP、イオン等が閉じ込められ、DNA塩基配列に基づき遺伝子発現が自律的に行われる無細胞系の遺伝子発現を行う機能を持ちます。これまでに本研究グループは、遺伝情報の読み取りと自律的な遺伝子発現でタンパク質を合成し、細胞骨格を自己組織化する人工細胞の構築などを報告してきました（PNAS 2011, ACS Synth. Biol. 2012）。

しかし、人工的なバイオリアクターを構築し細胞の設計原理を理解するためには、従来の手法には以下の点で問題がありました（図2）。

- ① リポソームはサイズや形状を厳密に制御することができず、同じ条件での解析が難しい
- ② 一度の測定で10個程度の計測数に留まり、大規模な解析や測定が困難

これらの制約を解消するため、本研究グループは過去にも無細胞系の抽出液を脂質と油で囲んだドロップレット（Sci. Rep. 2018）も用いましたが、

- ③ 脂質膜を介した物質輸送が起こらないため、エネルギー供給が断たれてしまうという問題も生じてしまい、各々の系がもつ利点を保ちながら問題点を解決する手法の開発が求められていました。

## ■内容

本研究では、上記の問題を解決するため、脂質膜を持ちながらもサイズや形状を制御でき、一度の実験で1000個以上のバイオリアクターを計測できる「オンチップ膜融合型人工細胞, On-chip membrane-bound artificial cells」の開発を行いました。

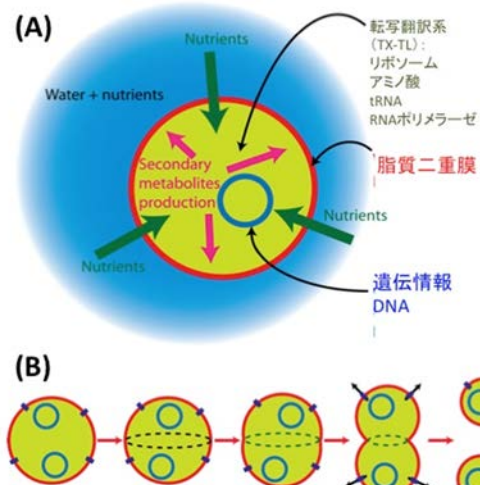


図1. 人工細胞(A)と自己複製(B)の概念図

② 一度の測定で10個程度の計測数に留まり、大規模な解析や測定が困難

- ③ 脂質膜を介した物質輸送が起こらないため、エネルギー供給が断たれてしまうという問題も生じてしまい、各々の系がもつ利点を保ちながら問題点を解決する手法の開発が求められていました。

	ドロップレット	リポソーム	デバイスチップ
遺伝子発現	○	○	○
脂質膜	△	○	○
集積化	△	×	○
サイズ制御	×	×	○

図2. 本研究で構築したオンチップ膜融合型人工細胞デバイスと既存技術(ドロップレット、リポソーム)の比較

直径  $25\ \mu\text{m}$  サイズのマイクロウェルを平面脂質膜でシールし、無細胞転写翻訳の遺伝子発現を行うマイクロ流体デバイスを構築しました (図 3)。ここに plasmid DNA もしくはゲノム DNA を含む抽出液を第 1 の水相として封入し、脂質を含む液層を流した後にエネルギー源となる化合物を含む第 2 の水相を流すことで、脂質膜に囲まれる人工細胞を多数デバイス上に構築しました。脂質膜でシールされた区画内での無細胞遺伝子発現を計測するため、レポーター遺伝子として緑色蛍光タンパク質 deGFP を用いました。deGFP の蛍光量から合成されたタンパク質量の時間経過を計測したところ、24 時間以上に渡って安定して遺伝子発現を行い、その平均濃度は  $1\ \text{mg/mL}$  と高いタンパク質合成能力を示しました (図 4)。最大で  $4\ \text{mg/mL}$  に達するタンパク質合成量を示すリアクターも存在し、高濃度のタンパク質合成を行うために最も重要な要因として、第 2 の水相である外液に ATP やアミノ酸などエネルギー源や基質となる化合物を与えることを突き止めました。これは、脂質膜を介した受動的な分子の漏れがあり、外液とバイオリアクター間で物質輸送のバランスによって恒常的な遺伝子発現が維持できることを示唆しています。

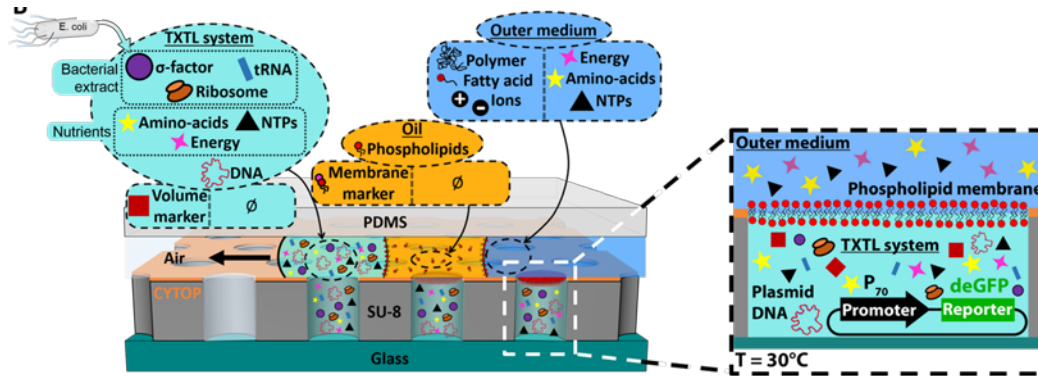


図 3. オンチップ膜融合型人工細胞.

直径  $25\ \mu\text{m}$  サイズのマイクロウェルを平面脂質膜でシールし、無細胞転写翻訳の遺伝子発現を行うマイクロ流体デバイスを構築。1つのデバイスに 5000 個の独立した人工細胞が集積したバイオリアクターとなっている。

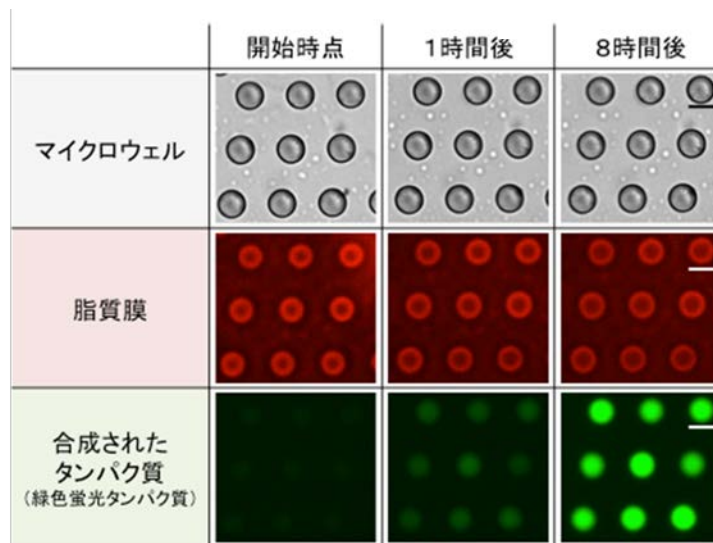


図 4. オンチップ膜融合型人工細胞における脂質膜 (赤色) と遺伝子発現 (緑色) .

人工細胞がもつ脂質膜を蛍光色素つき脂質分子で可視化。無細胞系の遺伝子発現で合成される deGFP を蛍光顕微鏡で計測。

さらに、一つのデバイスで数千個もの人工細胞の反応を計測することができるため、個々の人工細胞が合成したタンパク質量を全て計測し、遺伝子発現量の統計分布を計測しました。その結果、無細胞抽出液の量は全ての人工細胞でほぼ一定であるにもかかわらず、合成されたタンパク質量には大きなばらつきがあることがわかりました。これは遺伝子発現が転写や翻訳など多段階からなる酵素反応であるため、化学反応のゆらぎが次の反応に影響し、遺伝子発現量が高くなる頻度が上昇することを示唆しています。このような大きなばらつきは実際の細胞集団でもみられますが、転写翻訳のみで起こるかは明らかではありませんでした。本研究により、均一な転写翻訳の反応系でも、遺伝子発現量には大きなゆらぎを伴うことが明らかになりました。

本手法で構築した人工細胞デバイスは、従来の手法と比較すると

- ① 反応区画のサイズを均一に設計し、サイズや形状のばらつきを抑制できる
  - ② 反応区画の数は1つのデバイスで最大5000個に達し、計測規模を100倍向上
  - ③ 反応区画は脂質膜をもち、外部溶液との物質の交換やエネルギー補給を受ける
  - ④ これにより試験管内での無細胞遺伝子発現と同等の高収率なタンパク質合成を実現
- という利点をもちます。従来のリポソームや液滴、固体デバイスの利点を確保しながらも問題点を解消し、細胞の設計原理の解明に向けた合成生物学に新しいツールをもたらしました。

## ■今後の展開

バクテリアなどはロッド状の形状をもち、分裂しながら増殖を行います。この自己複製は洗練された酵素反応と、細胞の形や成長といった幾何学や力学が関わる複雑なプロセスです。本研究で構築した人工細胞デバイスは、区画のサイズや形状を制御できるため、細胞内の構造やダイナミックな変形に与える様々な幾何学および力学的な影響を調べるツールとなります。とくに脂質膜は人工細胞が必要とするエネルギーの産生にも関与するため、細胞内の代謝をエネルギー変換として捉える熱力学も重要な課題です。こうした生物学・物理学・工学を中心とした学際的研究をさらに進めることで、自己複製する細胞の設計原理の理解がもたらされると期待されます(図5)。さらに、オンチップ膜融合型人工細胞を用いて転写翻訳系や膜機能を阻害する抗生物質を探索するといった応用にもつながると期待されます。

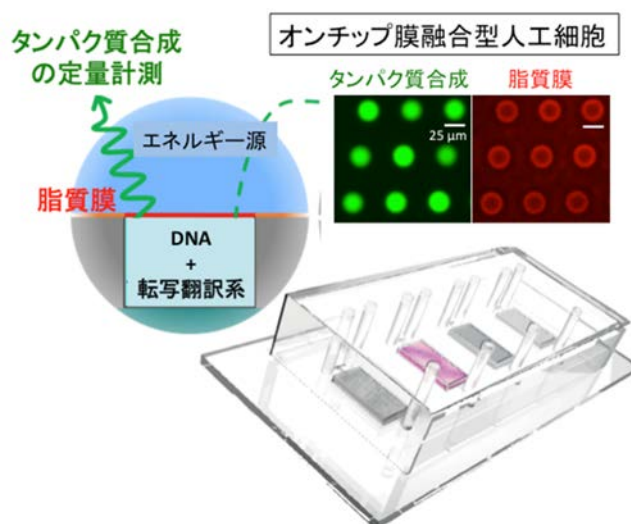


図5. オンチップ膜融合型人工細胞の特徴のまとめ.

遺伝子発現に必要な分子群をもつ人工細胞をもち、その個数は1つのチップで数千個を越える。構築方法はシンプルであり、機能的なタンパク質の発現で複雑な生命現象の理解や、薬剤スクリーニングなどの応用につながると期待される。

## ■論文情報

論文名 : Gene Expression in on-Chip Membrane-Bound Artificial Cells

著者名 : Ziane Izri, David Garenne, Vincent Noireaux, and Yusuke T. Maeda

ジャーナル名 : ACS Synthetic Biology,

DOI : 10.1021/acssynbio.9b00247

2019年7月4日(木) (日本時間) オンライン版掲載

本研究は、Human Frontier Science Program 研究グラント「Towards self-reproduction of protocells and minimal cells: evolution versus engineering」(RGP0037/2015 研究代表者: 前多裕介, joint grant with Prof. Vincent Noireaux) で支援を受けて行われ、科学研究費補助金 (JP16H00805, JP17H05234, JP18H05427 研究代表者: 前多裕介) の一環で行われました。

## ■用語解説

### ※1 人工細胞

脂質二重膜でできた袋状の形をしており、その直径は10 $\mu$ m程度と細胞に近い大きさの小胞。その内部にはタンパク質やDNA、RNAなどが含まれ、自律的に遺伝子を転写・翻訳してタンパク質を合成する機能をもつ。複雑な細胞を使うのではなく単純化した人工細胞で実験を行うことや、分子を設計して自然界に無い新しい性質を構築する等の研究に用いられる。

### ※2 合成生物学

生物に内在する遺伝子を同定・解析する分子生物学と異なり、人工的に遺伝子ネットワークを構成する、あるいは細胞が持つ機能や構造をタンパク質の組み合わせから再構築して生命現象の理解を目指す新たな生命科学のアプローチ。研究グループは自律的な遺伝子発現を行う人工細胞の構築を合成生物学的な手法で行っている。

### ※3 マイクロ流体デバイス

微細加工技術を利用して100万分の1メートル（マイクロメートル）～1万分の1メートル（100マイクロメートル）程の幅や厚みをもつ微小な流路や容器からなる小さなデバイス。透明で顕微鏡観察に適している。

### ※4 無細胞系

遺伝子発現のように複数の酵素タンパク質が関与する複雑な反応を、細胞内ではなく試験管内で行うための反応溶液。本研究で用いた無細胞系は、大腸菌を破碎して転写・翻訳に必要な酵素群を保有しつつ、大腸菌由来のゲノムDNAやメッセンジャーRNAを取り除いた細胞抽出液である。

### ※5 遺伝子発現

DNAからRNAへの転写、RNAからタンパク質への翻訳からなるタンパク質合成のプロセス。DNAの塩基配列はメッセンジャーRNAに転写され、その塩基配列はトランスファーRNAという別種のRNAが担う遺伝暗号に基づいてアミノ酸配列に翻訳され、合成されたペプチド鎖が折り畳み構造をとり機能的なタンパク質が合成される。