

プログラム名：豊かで安全な社会と新しいバイオものづくりを
実現する人工細胞リアクタ

PM名： 野地 博行

プロジェクト名：「ふえる」人工細胞デバイス

委 託 研 究 開 発

実 施 状 況 報 告 書 (成 果)

平 成 2 8 年 度

研究開発課題名：

ゲノム導入と起動のためのリボソーム融合技術の開発

研究開発機関名：

大阪大学

研究開発責任者

市橋 伯一

I 当該年度における計画と成果

1. 当該年度の担当研究開発課題の目標と計画

本研究では細胞壁を除去した細菌と DNA を封入したジャイアントリポソーム (GUV) を融合させることでゲノムなどの巨大 DNA を細菌細胞に導入する。そのために、課題 1. 細胞とジャイアントリポソーム (GUV) のバルク融合法の開発、課題 2. 細胞質と混合しても細胞の生存を可能にする人工細胞質の開発、課題 3. 外来 DNA からの主要な遺伝子発現を可能にする人工細胞質の開発という 3 つの課題を達成する。

H28 年度は、上記課題のうち、課題 1 および 2 を実施する。H28 年度中の達成目標としては、課題 1 について融合効率は考慮せず GUV と細胞の融合を 1 つ以上検出することを目的とする。課題 2 については効率は考慮せず、融合後に生存した細胞を 1 つ以上検出することを目指す。

2. 当該年度の担当研究開発課題の進捗状況と成果

2-1 進捗状況 (図 1 を参照)

課題 1 について

本年度では融合効率は考慮せず GUV と細胞の融合を 1 つ以上検出すること、そしてステージゲートまでに 1 % 以上の効率で融合を検出することを目標とした。本年度は細胞の調製法、および GUV の調製法、融合方法を改良することにより約 10% の効率で細胞と GUV を融合させる条件を見出した (図 2)。したがって、課題 1 については H29 年度に予定されているステージゲートまでの目標を達成することができた。

課題 2 について

本年度は効率は考慮せず、GUV と融合後に生存した細胞を 1 つ以上検出することを目指した。GUV の内部にプラスミドを入れておくことで、融合した細胞のみが生存しコロニーを形成できる実験系を用い、約 1000 個程度のコロニーを形成させる条件を見つけることができた。ただし、本当に融合したものがコロニーを形成したかどうかについては、まだ検討の余地がある。例えば融合を経ずに導入された可能性は完全には否定できない。今後、融合した細胞を直接観察し、コロニーを形成することを確かめる必要

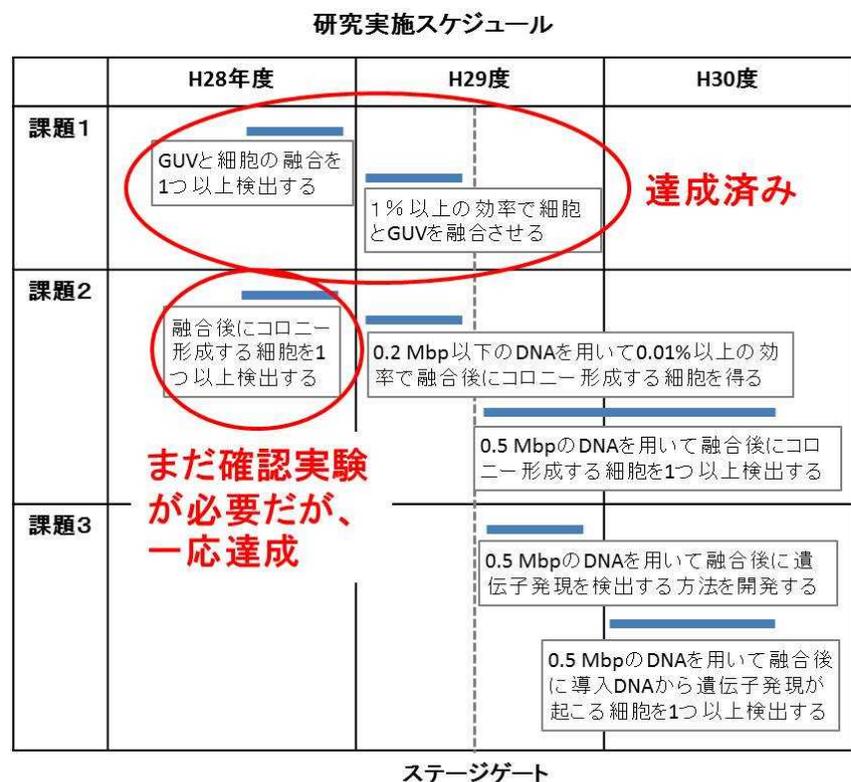


図 1 H28年度の進捗

がある。

2-2 成果

課題1については、約10%の高い効率で細胞（大腸菌スフェロプラスト）とGUVを融合させる条件を見出すことができた（図2）。これにより本研究計画の目標は既に達成済みである。具体的に融合のために重要な条件とは、スフェロプラスト化の時間、凍結融解時の溶液中の塩濃度、GUV作成時の塩濃度であった。

課題2については、まだ確認実験が必要ではあるが、融合したと予想される細胞がコロニー形成する条件を見つけることができた。この場合に重要な条件もまた、凍結融解時の溶液中の塩濃度であった。ある程度塩濃度が高くないと凍結融解時に細胞は壊れてしまうが、高すぎると浸透圧により細胞が死んでしまうという問題があった。この問題も上記のグリセロールを使うことにより解決することができた。

2-3 新たな課題など

残る課題は未だ融合した細胞が増殖している様子を直接観察していないことである。これによって本当に融合した細胞がコロニー形成できているかについては未だ確証が得られていない。今後、顕微鏡下での培養によりこの課題を解決する予定である。

3. アウトリーチ活動報告

なし。

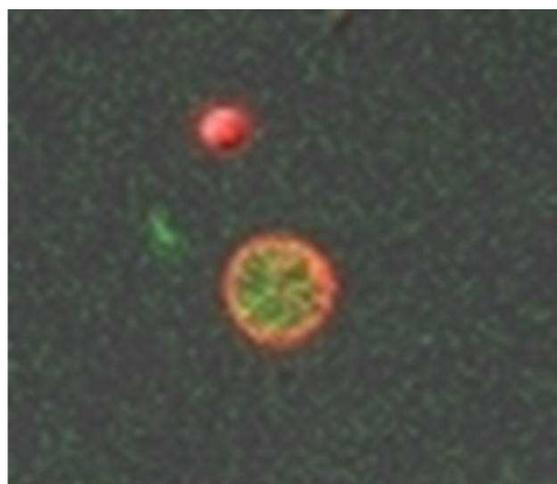


図2 GUVと融合した大腸菌細胞

大腸菌スフェロプラストはGFPを発現しているため緑色蛍光を発する。GUVは膜に蛍光脂質を入れているため赤色蛍光を発する。融合した細胞は中が緑、膜が赤色となる。