

# 研究終了報告書

## 「ミニマルゲノムから成る人工細胞の構築」

研究期間：2018年10月～2022年3月

研究者：車 愈激

### 1. 研究のねらい

本研究では、分子と遺伝子を組み合わせ、生きた細胞を人工的に構築することを目的としている。最終的には、最小限の遺伝子のみを持つミニマルゲノムを人工細胞に導入することで、細胞におけるゲノムの動作原理を理解することを目指している。

2000年以降急速に発展してきた合成生物学は、細胞のもつ機能を工学的に利用し、有用物質生産のためのツールとして応用することに注力してきた。その究極として、細胞を部品から再構築し、100%制御可能な細胞を構築する、人工細胞研究が近年特に注目されている。人工細胞研究ではすでに、遺伝子発現機構やゲノム複製機構など、主要な細胞機構が再構築されている。しかし最も生物らしい特徴である自己複製はいまだに再現されておらず、このことこそが人工細胞の学術的・工学的発展を妨げていると言える。自己複製は内部の遺伝情報の複製と、細胞外殻である膜の成長・分裂に大別できる。前者についてはすでにいくつかの構築例が報告されているが、後者は技術的困難さが理由で研究が著しく遅れている。つまり膜の成長と分裂を再現する難しさが、人工細胞構築の一番のボトルネックであると言える。

この問題に対して、本研究では人工的に調製した脂質膜小胞の内部で脂質を合成することで膜の自己複製を図り、自己複製可能な人工細胞の基盤技術を構築することを目的としている。地球上の生物は例外無くリン脂質をベースとした細胞膜を形成している。リン脂質は疎水的な部分を司る脂肪酸部分と、それらを2つのアシル鎖をつなぐ親水基とに分けられる。これら脂肪酸と続くリン脂質を内部合成することで、細胞膜の自律的成長を促し最終的には自己分裂することを目指している。

増殖する人工細胞が構築できた場合、ナチュラル細胞との分別はなくなり新たな細胞基盤を我々は手に入れることができる。このことは生命科学をこれまで以上に発展させるための基盤となるだけでなく、生命と非生命のボーダーや生命誕生のプロセスについても考察可能な研究になることが期待できる。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

直径数十ミクロンの人工細胞の内部でリン脂質を合成するため、アセチル CoA 合成系、脂肪酸合成系、遺伝子発現系、リン脂質合成系を組み合わせた人工細胞を構築した。構築した人工細胞は外部からの NADPH の添加をきっかけとして内部でリン脂質を合成した。合成されたリン脂質の膜への挿入は蛍光プローブによって確認された。In vitro 反応による定量結果から、人工細胞内で合成されたリン脂質は母人工細胞膜の約 10% を合成していることがわかった。さらに、アセチル CoA 合成系を除いてアセチル CoA とマロニル CoA を出発物質とした in vitro 反応系では、400  $\mu$ M のリン脂質の合成を確認できた。これは目標合成量 1mM の約 40% にあたる値である。一方でアセチル CoA 合成系を含んだ反応系では合成量が

100 $\mu$ Mに留まった。これは脂肪酸合成の律速段階であるマロニル CoA 合成反応が、負の制御を受けていることが原因であることが示唆された。このような人工細胞実験を簡便に迅速に行うため、巨大膜小胞調製のステップを最適化し 20 分ほどで調整できるプロトコルを完成させた。

## (2) 詳細

### 【さきがけ研究期間における研究成果】

#### ● 脂肪酸合成系の構築

脂肪酸合成可能な無細胞系(図.1A)を構築するために、大腸菌由来の 9-10 種類の Fab 酵素タンパク質を精製した(図.1B)。これら混合物に基質(アセチル CoA とマロニル CoA)と電子供与体(NAD(P)H)を加えることで脂肪酸の合成が確認できた(図.1C)。さらに系内の構成酵素のバランスを調整することで、合成産物の 70%以上を不飽和脂肪酸として合成することにも成功した(図.1D)。しかし、脂肪酸合成反応に依存して反応液に沈殿物が発生し(図.1E)、特に FabZ が凝集していることが検出された(図.1F)。脂肪酸(オレイン酸)を反応開始時から加えた場合脂肪酸合成量が低下した(図.1G)、また合成産物の脂肪酸の局在場所としてリポソームを加えると脂肪酸合成量が増加した(図.1H)から、系内で合成された脂肪酸が脂肪酸合成酵素の活性を阻害していることが示唆された。

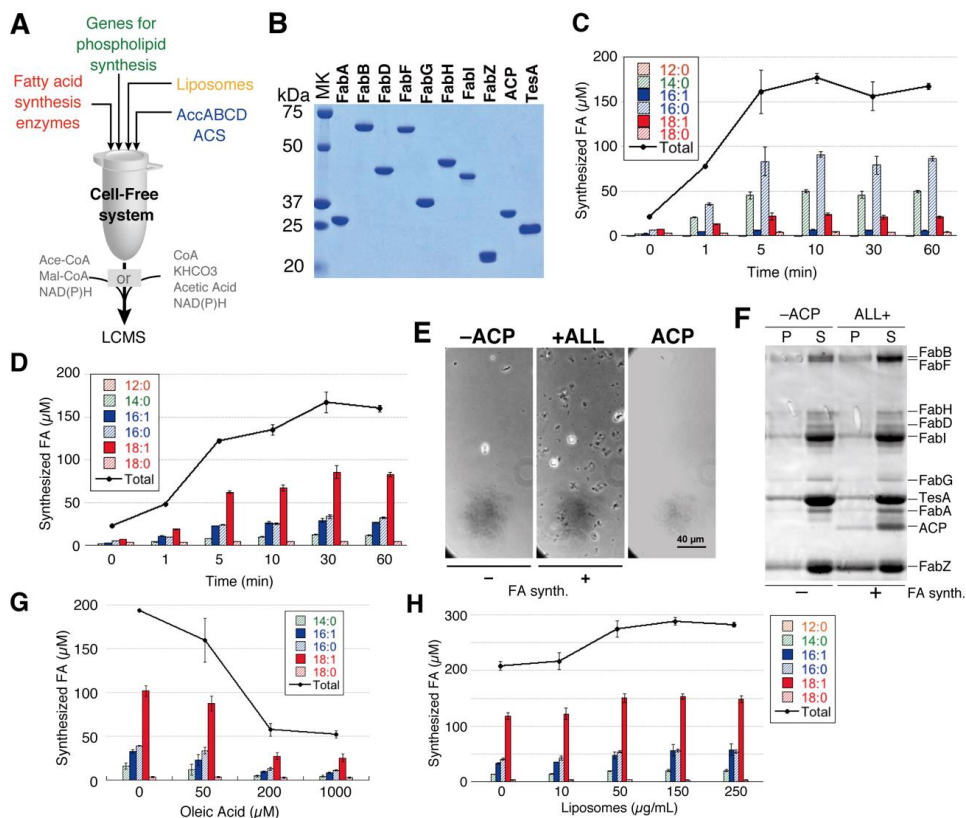


図 1. 無細胞脂肪酸合成系. (A) 構築した無細胞系の概要図. (B) 精製 Fab 酵素. (C) 飽和脂肪酸を多く合成した反応結果. (D) 不飽和脂肪酸を多く合成した反応結果. (E) 脂肪酸(FA)合成による沈殿物の発生. (F) 沈殿物の SDS-PAGE 解析. 遠心後の上清(S)と沈殿(P)画分, (G). 脂肪酸の初期添加による脂肪酸合成の阻害. (H) リポソーム添加による合成量の上昇.

## ● リン脂質合成系の構築

無細胞系で合成された脂肪酸からリン脂質を合成するため、アシル転移酵素である PlsXYC と組み合わせた系を設計した(図.2A)。PlsXYC3酵素は全て脂質膜局在酵素であるため、無細胞タンパク質合成系 PURE システムで合成することにした。PlsXY の遺伝子を PURE システムで今日発現した場合良好な量タンパク質の合成が確認できた(図.2B)。また GFP 融合タンパク質として人工細胞内部で合成した場合、PlsX(図.2C)と PlsY(図.2D)共に良好な膜局在かも観察された。リポソームを加えて PlsXY を発現した PURE システムと脂肪酸合成系を統合し、脂肪酸合成とリゾリン脂質合成を連続して行なった結果、リゾホスファチジン酸の合成が確認できた(図.2E)。しかしながら合成量が低かったため、さらに PlsC の遺伝子を加えた PURE システム(図.2F)と統合したところ、ホスファチジン酸(PA)の合成が観察できた(図.2G)。合成量がプラトーに達した後も基質を2、3回と追加することで最大 400 $\mu$ M まで PA の合成が確認できた(図.2H)。一方、反応開始時から基質濃度を増加した場合には合成量の増加は見られなかった(図.2I)。このことから、高効率なリン脂質合成には適正な基質濃度のフラックスが重要であることがわかった。

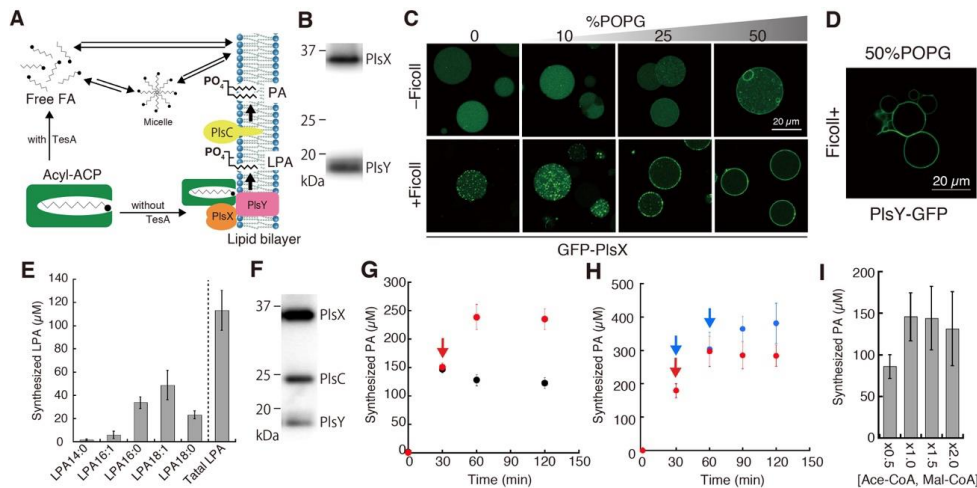


図 2. 無細胞リン脂質合成系。(A) 脂肪酸合成系と無細胞合成したリン脂質合成系の概要図。(B) 無細胞合成された PlsX と PlsY。(C) GFP-PlsX 融合タンパク質の人工細胞内合成とその局在。(D) PlsY-GFP 融合タンパク質の人工細胞内合成とその局在。(E) 無細胞系によるリゾリン酸合成。(F) 無細胞合成された PlsX と PlsY と PlsC。(G) 無細胞系によるリン酸合成。30 min 時点で基質を追加。(H) (G)の実験に 60min 時点で基質を再追加。(I) 反応開始時から基質の量を増やしたリン脂質合成反応。

## ● CoA リサイクルによる酢酸からのリン脂質合成

アセチル CoA とマロニル CoA を基質とした無細胞リン脂質合成系は、その副産物として多量の CoA を産出してしまいう問題があった。この問題を解決するために、副産物である CoA からアセチル CoA とマロニル CoA を合成する酵素(ACS と AccABCD)を精製し系内に加えた(図.3A)。その結果、80-100 $\mu$ M の PA 合成が検出された(図.3B)。この反応は、PURE システム内に含まれる酢酸を炭素源としてリン脂質が合成されたことを意味する。

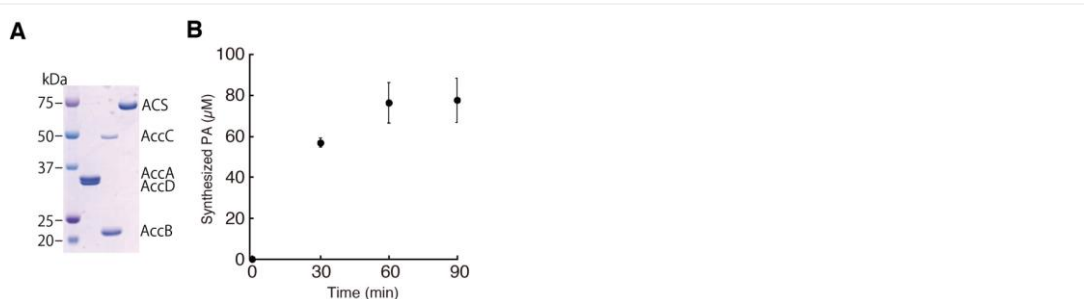


図 3. CoA リサイクリング酵素とこれらを投入したリン脂質合成. (A) 精製した ACS (acetyl-CoA synthetase)と AccABCD (acetyl-CoA carboxylase ABCD). (B) 精製酵素を加えて CoA を出発物質として無細胞合成したリン脂質.

● 人工細胞内部でのリン脂質合成

構築した無細胞系を人工細胞に内包し膜内部でリン脂質合成を行った。PlsXYC 合成後、膜外に添加した NADPH が膜内に浸透し脂肪酸合成反応をスタートさせることでリン脂質合成のトリガーとした(図.4A)。合成反応終了後、ホスファチジン酸に特異的に結合する Spo タンパク質に GFP を融合した GFP-Spo をプローブとして用いることで、合成されたホスファチジン酸の人工細胞膜上の存在を確認した。コントロールとして行った-CoA、-DNAs、-NADPH ではホスファチジン酸の存在は確認できなかった(図.4B)。これらの結果から、人工細胞内部でリン脂質が合成され膜に挿入されたことが証明できた。

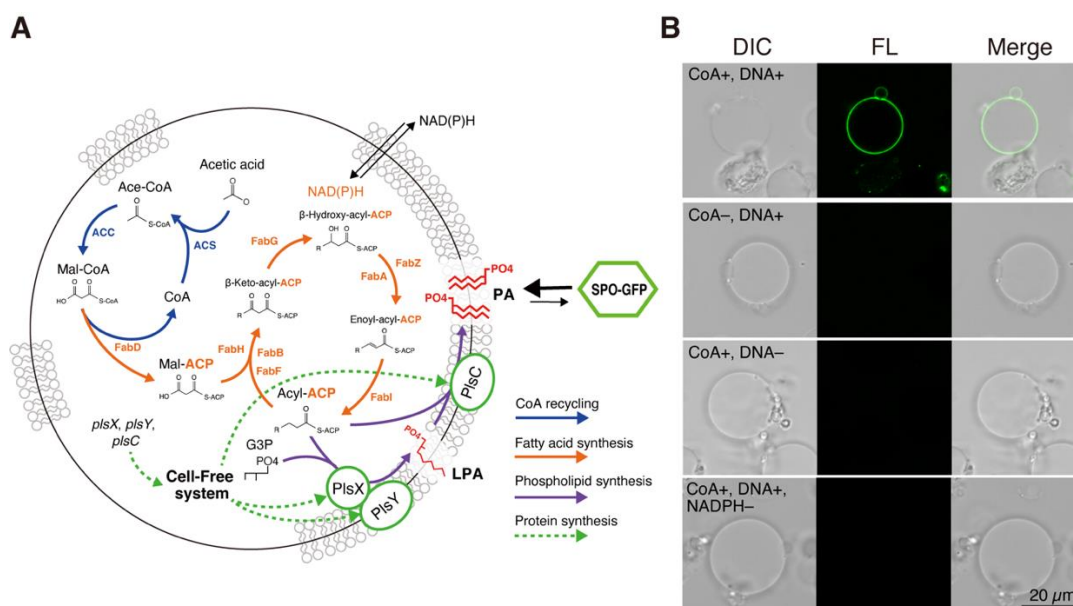


図 4. 人工細胞内でのリン脂質合成. (A) 4 つの反応系を再構築した人工細胞の概要図. (B) ホスファチジン酸を合成した人工細胞の顕微鏡写真. FL (蛍光)は GFP-Spo の膜上にあるホスファチジン酸への結合を示す.

● 人工細胞キットの作製

簡単に人工細胞実験が行えるよう、巨大膜小胞 (GUV)の調製方法を最適化した。その結



果従来法では3時間から1日かかっていた実験がわずか10-30分ほどで完了するほどに実験時間が短縮できた。最適化した方法で調製した人工細胞は高品質な膜形状を維持しており、従来法と比較しても同等の蛍光タンパク質合成の結果を示した(図.5A)。また、無細胞系反応液を凍結乾燥させ、lipid film やオイルと組み合わせることで、人工細胞キットを作製することにも成功した(図. 5B)。

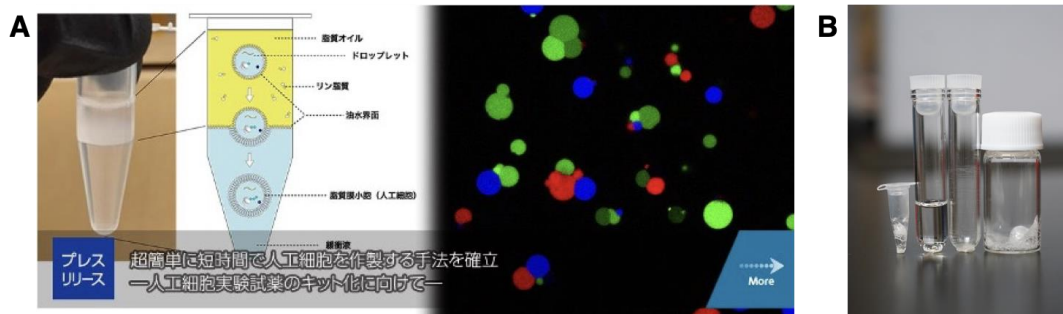


図 5. 人工細胞調製法の最適化. (A) 最適化した方法により作製した人工細胞. (B) 凍結乾燥した無細胞系と lipid film を組み合わせた人工細胞キット.

**【研究目的の達成状況】**

脂肪酸の合成からリン脂質を合成する人工細胞の構築というこれまでに誰もなし得なかったものを構築することができたので、当初の研究目的は大部分において達成できたと言える。膜の形状変化に必要な合成量は達成できなかったため、この点については今後の課題とする。また人工細胞実験を最適化したことで多くの人か取り組めるようフォーマット化した。

3. 今後の展開

人工細胞の機能をさらに拡張させ自己成長する人工系へと進化させる。最終的には増殖可能な人工細胞を構築し、物質生産や環境改善、各種研究基盤として応用し社会実装を目指している。今後数十年以上かかることが予想されるがその一方で、人工細胞構築のために生み出されたサブ技術を学術的・工学的に利用することを視野に入れている。具体的には、ワクチン生産や DDS ツールとして、リン脂質合成経路を阻害する抗菌剤や抗体の探索技術として、即時的な応用を目指す。

4. 自己評価

**【10段階評価でのスコア】**

研究目的の達成状況

【9/10】

研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

【9/10】

研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果

【9/10】

その他領域独自の評価項目

【7/10】

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 6件

1. Sumie Eto, Rumie Matsumura, Mai Fujimi, Yasuhiro Shimane, Samuel Berhanu, Takeshi Kasama, Yutetsu Kuruma. Phospholipid synthesis inside phospholipid membrane vesicles. <i>Communications Biology</i> , 2022, 5:1016, DOI: <a href="https://doi.org/10.1038/s42003-022-03999-1">https://doi.org/10.1038/s42003-022-03999-1</a>
人工細胞研究においての一番の課題は自己複製の再現化、特に膜の成長と分裂の再構築である。今問題を解決するための、膜小胞内部でリン脂質を合成する無細胞系の構築を行なった。本系では脂肪酸合成と、リン脂質合成、を統合することで、400 $\mu$ M以上のリン脂質を合成することに成功した。さらに CoA リサイクルの系も組み込み膜内部で稼働させたところ、人工細胞内部でのホスファチジン酸の合成と脂質膜への移行が確認できた。
2. Yasuhiro Shimane, Yutetsu Kuruma. Rapid and Facile Preparation of Giant Vesicles by the Droplet Transfer Method for Artificial Cell Construction. <i>Front. Bioeng. Biotechnol.</i> 2022, 10:873854. DOI: 10.3389/fbioe.2022.873854
ドロプレット沈降法は人工細胞作成のための主要な手法の一つであるが、品の高い膜を再現よく作製することが困難であった。この方法を簡略化し未経験者でも容易に迅速に人工細胞が形成できるよう、実験ステップの再考と最適化をおこなった。その結果、従来法では3時間ほどかかっていたものが、最短 20 分で形成することができた。さらに、膜内部のタンパク質合成反応液と膜小胞外液を凍結乾燥することで、常温での保存と研究室外での実験が容易になった。人工細胞キットや各種診断キットとしての応用が見えた。
3. Berhanu S, Ueda T, Kuruma Y. Artificial photosynthetic cell producing energy for protein synthesis. <i>Nature communications</i> , 2019, 10, 1325, DOI: 10.1038/s41467-019-09147-4
光依存的に ATP を合成する人工オルガネラを2種類の膜タンパク質とリボソームから構築した。これを人工細胞に実装することで、光依存的にタンパク質を合成する人工細胞の構築に成功した。この人工オルガネラと人工細胞システムを組み合わせ、光依存的に人工オルガネラの構成膜タンパク質を合成することに成功した。このような人工オルガネラは、人工細胞構築のためのエネルギー生産系として有効であることが示された。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 2 件(特許公開前のものも含む)

1	発 明 者	車 愈 澈
	発 明 の 名 称	無細胞リン脂質合成方法
	出 願 人	国立研究開発法人海洋研究開発機構
	出 願 日	令和 3 年 4 月 20 日
	出 願 番 号	特願 2021-070902
	概 要	脂肪酸合成反応とリン脂質合成反応を組み合わせ、試験管内でリ

	ン脂質を合成する技術の開発
--	---------------

1	発 明 者	車 愈 澈、嶋根康弘
	発 明 の 名 称	脂質膜小胞の製造方法
	出 願 人	国立研究開発法人海洋研究開発機構
	出 願 日	令和 4 年 3 月 4 日
	出 願 番 号	特願 2022-033672
	概 要	人工細胞作製の基礎技術であるドロップレット沈降法を最適化し短時間で作製可能な方法を編み出した

(3) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【プレスリリース】

超簡単に短時間で人工細胞を作製する手法を確立—人工細胞実験試薬のキット化に向けて—, 2022 年 4 月 7 日, JAMSTEC と HFSP の共同プレスリリース

【招待公演】

- International Workshop “Future Trends and Emerging Technologies in Synthetic Biology – Connecting Australia and Japan through science and technology”, March 16, 2022, Online
- International Workshop “From Soft Matter to Protocell 2020”, “Construction of artificial photosynthetic cell toward an autonomous system”, Oct. 29–30, 2020, Online
- 第43回日本分子生物学会年会, 「光を化学エネルギーに変換する人工細胞の創出」, Dec. 4, 2020, Online
- Cold Spring Harbor Asia–Synthetic Biology, “Artificial photosynthetic cell producing energy for protein synthesis”, 2019/10/21, 中国 蘇州
- Asian Synthetic Biology Association (ASBA) Meeting, “Artificial photosynthetic cell producing energy for protein synthesis”, 2019/10/27, 中国 成都
- 3rd UK–Japan Frontiers of Science Symposium (Fos UK–Jap), “Session Topic: Synthetic Biology Challenges Toward Creating Man–Made Cells”, 2019/11/09, 千葉