

■原 著■ 2022 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

進化するベシクル型人工細胞の基盤となる カチオン性自己生産ベシクルの集団計測

阿部真也¹ 松尾宗征^{2,3} 菅原 正⁴ 鈴木健太郎^{1,4,5,6}

Population Analysis of Self-reproducing Giant Vesicle Consisting of
Cationic Amphiphiles towards Model-protocell Providing Evolvability

Sinya Abe¹, Muneyuki Matsuo^{2,3}, Tadashi Sugawara⁴ and Kentaro Suzuki^{1,4,5,6}

¹ Graduate School of Science, Kanagawa University, Yokohama City, Kanagawa 221-8686, Japan.

² Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo, Meguro-ku, Tokyo 153-8902, Japan.

³ Department of Chemistry, Faculty of Science, Hiroshima University, Higashihiroshima City, Hiroshima 739-8526, Japan.

⁴ Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Yokohama City, Kanagawa 221-8686, Japan.

⁵ Department of Science, Faculty of Science, Kanagawa University, Yokohama City, Kanagawa 221-8686, Japan.

⁶ To whom correspondence should be addressed. E-mail: suzuken@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: Using Z-stack observations of laser scanning confocal fluorescence microscopy, population analysis of self-reproducing cationic giant vesicles (GVs) dispersing into buffered saline for an enzymatic reaction, which is the major component of GV-based model-protocell, was performed. After addition of the precursor of the membrane molecule, the number of GV shows a 4-times increase, and the diameters of GV increased from 1-2 to 3-4 μm before addition of the precursor. This behavior can be explained by a cell-like auxesis and self-division of the self-reproducing GV caused by the chemical reaction to produce the membrane molecule constructing GV themselves from the membrane precursor assisted by the lipophilic catalyst placed into the vesicular membrane. This interpretation is consistent with a previous report employing a combination of optical microscopy observation and flow-cytometry (FCM). This new analysis, which can be performed using only optical microscopy and not FCM, which requires special experimental conditions optimizing GV, facilitates rapid measurement for optimization of the conditions for construction of the GV-based model protocell, which can evolve spontaneously.

Keywords: giant vesicle, self-reproduction, model-protocell, amphiphile, laser scanning confocal fluorescence microscope

序論

脂肪酸やリン脂質のような両親媒性分子は、水中での自己集合化により、細胞膜によく似た脂質二分子膜構造を構築する。これが袋状に閉じたものはベシクルと呼ばれ^{1,2)}、なかでも、細胞と同程度の数十マイクロメートルの大きさを持つものは、ジャイアントベシクル (GV) とよばれる。GV 内部には、膜によって隔てられた内水相があり、さまざまな物質を封入できる。内部に有用な化学反応を内封し、自ら増殖する人工の GV を構築できれば、細胞として

の最低限の機能を備えたモデル人工細胞の構築につながる³⁾。高倉は、膜内に酸触媒を担持したカチオン性 GV に、酸触媒の作用によってカチオン性膜分子へと変換される膜分子前駆体とを利用して、自ら肥大・分裂して数を増やす「自己生産 GV」の構築に成功した^{4,5)}。さらに、ここで用いたカチオン性膜分子を含む GV 内部で情報分子としての DNA を自己複製することで「ベシクル型人工細胞」⁶⁾が開発された。内封 DNA の持つ情報を活用し、現実の細

胞のように競争による進化可能なモデル人工細胞⁷⁾を実現するためには、基盤となる自己生産 GV の持つ特性の、より詳細な理解が不可欠である。

分子と比較して遙かに巨大な GV を対象とする研究においては、個別の GV を対象とした光学顕微鏡による実時間計測が必要である。しかしながら、一回の測定で数時間が必要な自己生産 GV では、統計的な評価に必要な計測数を稼ぐことが難しい。多数の生体細胞の集団的な基礎情報を引き出すために開発されたフローサイトメーター (FCM) を利用することで、短時間のうちに数万もの多数 GV に関する情報を引き出すことも可能ではある⁸⁻¹¹⁾。しかしここから得られる情報は、散乱光や蛍光強度に帰属されるものに限られるので、その解釈には、顕微鏡計測をはじめとする別種の計測が不可欠である。

最近我々は、レーザー走査型共焦点顕微鏡 (LSCM) の持つ、焦点面内だけでなく、奥行き方向に対しても補償される高い空間分解能に着目し、個別計測と集団計測の双方の特徴を併せもった測定法を開発しつつある⁷⁾。本共同研究では、この測定法を応用し、ベシクル型人工細胞を構築するうえで基礎となるベシクル型人工細胞に、外部から膜分子前駆体を添加した際のダイナミクスについて測定および解析を行い、これに DNA のような情報分子を組み合わせた進化するベシクル型人工細胞に繋がる情報を引き出すことを目指した。

材料と方法

試料

膜分子前駆体 V*、膜分子 V および膜親和性触媒 C (図 1) は、すでに報告した方法により合成し⁴⁾、その純度は、観測前に ¹H NMR 測定により確認した。LSCM に必要とされる蛍光色素として、市販の蛍光性リン脂質 BODIPY-HPC (B) (D3792, Invitrogen) をそのまま利用した。ベシクル分散媒として用いた緩衝液は、KOD-plus[®] 用緩衝液 (東洋紡) を用いた。

ベシクル分散液の調製

ガラス容器表面に、V、C、B をそれぞれ 9:1:0.1 のモル比で含む乾燥薄膜を調製し、これに、膜全体の濃度が 1 mM となるような体積の KOD-plus[®] 用緩衝液を加えた。軽く振盪後、室温に設定した恒温器中で一時間以上静置し、顕微鏡観察用の GV 分散液を得た。なお、得られた試料の一部を位相差顕微鏡観察することで、観察に適したベシクルが形成されていることを確認した。

また、GV 分散液に加える V* 溶液として、V* を KOD-plus[®] 用緩衝液にとかした溶液 (4 mM) も別途

調製した。

プレパラートの調製

エッペンドルフチューブ中に、前項で調製した GV 分散液と V* 溶液を 1:1 の体積比であわせ、良く攪拌した。この混合液を、9 mm × 9 mm の矩形孔を持った、容積 25 uL のスぺーサー (フレーム密閉スライドチャンバー #SLF0201, BIO-LAD) を貼付したカバーガラスに満量加え、もう一枚のカバーガラスで封じて、観察用プレパラートとした。また、V* 溶液を含まない緩衝液を 1:1 で混合した対照試料もあわせて調製した。

観察と解析

恒温器内で 15 時間静置したプレパラートを、レーザー走査型共焦点顕微鏡 (LSM700, Carl Zeiss) のステージ上に置き、プレパラート内のベシクルについて観察を行った。スぺーサー中央付近およびスぺーサーの四隅近傍の 160 μm × 160 μm を観察領域とし、それぞれに対して、プレパラート底面から、最上部までの約 300 μm を、5 μm の間隔で Z-stack 測定した (図 2A)。画像解析ソフト Image J Fiji¹²⁾ を利用した画像解析については、本文中に示した。また、顕微鏡観察におけるサイズに関する情報は、LSM700 の制御ソフト ZEN (Carl Zeiss) から得られる情報を利用した。

結果

試料調製条件の選定

自己生産 GV を構築する分子群を図 1 に示す³⁾。

はじめに自己生産 GV を開発した高倉は、分散媒として純水 (イオン交換水) を用いている³⁾。一方で、これを発展させたベシクル型人工細胞⁶⁾ では、GV 内部で酵素反応 (PCR) による DNA 複製を行う都合から、重合酵素の至適条件に合わせた緩衝液 (KOD-plus[®] 用緩衝液 : pH8-9 程度の Tris[®] 塩酸緩生理食塩水) が用いられる。そこで、ベシクル型人工細胞系

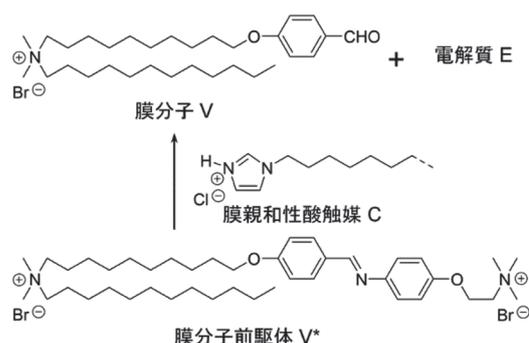


図 1. 自己生産ベシクルを構成する主要な分子. 図中で省略されている触媒 C のアルキル鎖の炭素数は 18.

への展開を視野に入れた本研究で用いる分散媒として、同緩衝液中を選択した。緩衝液中に含まれる、生理食塩水に近い濃度の電解質の効果により、純水中で調製したGVと性状が大きく異なる可能性がある。そこで、同緩衝液中でカチオン性膜分子VからなるGVを調製し、光学顕微鏡で観察した結果、純水中で調製した場合と類似した、ミエリン状GV（タマネギ状に多層の膜が積層したGV）の形成を確認した。

レーザー走査型共焦点顕微鏡観察

緩衝液中で調製された、Cを含むカチオン性Vからなるミエリン状GV分散液に、膜前駆体であるV*溶液を添加後15時間経過した試料について、LSCMにより観察した(図2A)。なお、今後時点でのGV構成分子と、添加したV*の濃度は、それぞれ、0.5 mMと2 mMである。

これまでの研究から、本条件に近い実験条件では、反応は半日以内に平衡状態に至っていることから、観測時点で試料中におけるGVダイナミクスは終了しており、一時間程度を要する観測中に計測に影響を与えるような大きな状態変化は起こらないものと考えられる。

画像解析によるGVの計数

材料と方法に示した方法で、同一プレパラート内の、5箇所(底面(160 μm \times 160 μm)および高さ(300 μm)の四角柱状の観測領域に対し5 μm の高さ間隔で、Z-stack測定を行った。これにより得られた、LSCM画像(各試料あたり、300枚程度)それぞれに対し、Image J Fiji¹⁾により、以下のような解析を

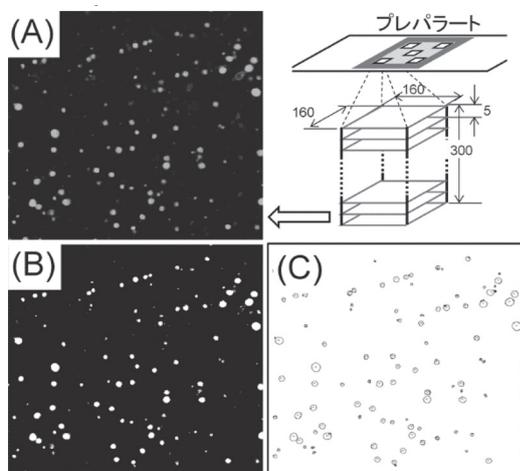


図2. (A) LSCMによる自己生産GVの集団計測の概念図(右、図中の単位は μm)と、観測された顕微鏡像の例(左、画像の一边は160 μm)。 (B) 二値処理後の顕微鏡像。 (C) 計数を行う画像。

行った。

得られた蛍光画像を二値処理し(図2B)、得られた粒状の構造体に対し、その数およびサイズに関する情報を獲得した(図2C)。ここで、粒径1 μm を下回るGVは、その直径から期待される内部体積は小さく、人工細胞を視野に入れた研究では、酵素反応に必要な十分な場を確保できない¹¹⁾。本系で対象とするGVは明確な内水相は持つものではないが、従来の研究に倣い、1 μm を下回るGVについては計数対象にしないこととした。また、画像の外周をまたぐ位置に存在するGVについては、正しいサイズを求めることが出来ないため、これらを除外するオプションを利用した。

討論

膜分子前駆体添加によるGVサイズ分布の変化

V*添加によるGVの個数変化について図3に示す。V*を添加した試料では、一視野あたり平均99個のGVが観測された。これに対し、V*を含まない緩衝液を加えた試料での平均個数は25個であった。次項で議論するように、分散液中に含まれるGVの主要なサイズは、Z-stackの測定間隔より小さいため、四角柱状の観測領域に含まれるすべてのGVを計数するものではないが、長時間の静置により、両試料とも類似した沈降平衡に至っていると見なせるので、この個数は、試料に含まれるGV全数を反映した量であると見なせる。

自己生産ダイナミクスによるGVサイズ変化

変化前後のGVサイズに着目すると、V*を添加しなかった試料で観測されたGV直径の最頻値は1-2

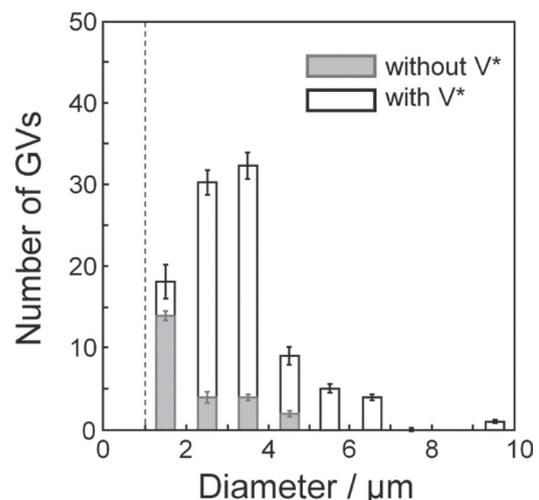


図3. 自己生産GV分散液に、V*溶液あるいはV*を含まない緩衝液を添加し、15時間経過した試料の顕微鏡視野内に含まれるGVのサイズ分布。図中のエラーバーは標準誤差を表す。

μm であった。一方、 V^* を添加した試料では3-4 μm に増大し、さらに、 V^* を添加しなかった場合にはほとんど観測されることがなかった5 μm を超えるGVも、十分な頻度で観測されるようになった。

分散液中のGVは、その中心で焦点面を跨ぐとは限らないので、観察された直径は、そのままGV粒径と見なすことは出来ない。しかし、GV粒径が増せば、それに比例して観測されるGV半径も増加するので、ここで得られた変化は、 V^* によるGV粒径増大に関連した量として取り扱うことが出来る。

集団計測結果から読み取るGVダイナミクス

もし、肥大することなくGVが分裂した場合、新たに出現したGVの粒径はもとより小さくなる。それに対し、個数増加と同時にサイズ増大も観察される(図3)ことから、本GVは肥大と分裂が共に起こったと解釈される。GVに V^* を添加すると、膜内の酸触媒Cの効果により V^* のイミン結合部位が加水分解が効率的に進み、膜構成分子であるVとなる(図1)。これがGVに取り込まれGVを構成する膜分子Vの総数が増やし、GVのサイズ増大(肥大)の原因となる⁴⁾。GVが肥大した後で分裂したのか、あるいは、分裂後に肥大したのかについては本研究の結果からは判断できないが、どちらの可能性も起こりうることは、すでに報告している¹⁰⁾。

自己生産過程において、初期試料にみられる稠密なミエリン状GVのまま、ほぼ倍の大きさとなり、それと同時にその数が約4倍にまで増加すると、全GV内部体積の総和は初期の30倍以上と見積もられる。しかしながら、本実験で加えた膜分子前駆体 V^* の総量は、GVを構成する膜分子Vの4倍にすぎない。薄膜法により人工的に形成されたGVと、化学反応を介して自己集散的に形成されるGVとの間には性質に違いがあり¹⁰⁾、 V^* 添加後に生じるGVには、初期にはあまり含まれない、明確な内水相を持った多層膜GVが含まれることが知られている⁹⁾。従って、今回得られたGVの個数増大とサイズ変化は、まさに自己生産GVの特徴を捉えたものであると解釈できる。

おわりに

今回の研究では、DNA複製とベシクル自己生産が連動して引き起こされるベシクル型人工細胞において重要な構成要素である、カチオン性自己生産ベシクルの集団挙動を、空間分解能に優れたLSCMを利用して、簡便に解析することを目指した研究を行った。組成や形状に小さくない揺らぎを内在するGVを対象とする観察では、ある瞬間の画像から、撮影より

前のGVの経歴を知ることは難しい。そのため、実験開始直後から終了までの連続観察や、FCMによる集団計測が不可欠であった。それに対し、LSCMの優れた空間分解能を利用することで、変化前と変化後の二点の観測測定のみからでも、従来の観測結果に矛盾しないGVの変化の様子を引き出せることが、今回の研究から示された。

今後、多様な条件検討が必要とされる、ベシクル型人工細胞の研究を進める上で、研究の遂行速度の向上に繋がる重要な実験結果と言えるだろう。

謝辞

本研究は、研究課題「進化能の実装を目指した混合DNA内封ベシクル型人工細胞」に対する2022年度総合理学研究所の共同研究助成(RIIS202203)によって行われた。

文献

- 1) Dimova R and Marques CM (2019) *The Giant Vesicle Handbook*. CRC Press, Boca Raton.
- 2) Walde P, Cosentino K, Engle H and Stano P (2010) Giant Vesicles: Preparation and Applications. *Chem-BioChem* 11: 848-865.
- 3) Szostak JW, Bartel DP and Luisi PL (2001) Synthesizing Life. *Nature* 409: 387-390.
- 4) Takakura K and Sugawara T (2004) Membrane Dynamics of Myelin-like Giant Multilamellar Vesicle Applicable to a Self-Reproducing System. *Langmuir* 20: 3832-3834.
- 5) Suzuki K, Toyota T, Takakura T and Sugawara T (2008) Sparkling Morphological Change and Spontaneous Movements of Self-assemblies in Water Induced by Chemical Reaction. *Chem. Lett.* 38: 1010-1015.
- 6) Kurihara K, Tamura M, Shohda K, Toyota T, Suzuki K and Sugawara T (2011) Self-reproduction of Supramolecular Giant Vesicles Combined with the Amplification of Encapsulated DNA. *Nat. Chem.* 3: 775-781.
- 7) Matsuo M, Hirata Y, Kurihara K, Toyota T, Miura T, Suzuki K and Sugawara T (2020) Environment-Sensitive Intelligent Self-Reproducing Artificial Cell with a Modification-Active Lipo-Deoxyribozyme. *Micromachines* 11: 606-623.
- 8) Sato K, Obinata K, Sugawara T, Urabe I and Yomo T (2006) Quantification of Structural Properties of Cell-sized Indivisual Liposomes by Flow Cytometry. *J. Biosci. Bioeng.* 102: 171-178.
- 9) Toyota T, Takakura T, Kageyama Y, Kurihara K, Maru N, Ohnuma K, Kaneko K and Sugawara T (2008) Population Study of Size and Components of Self-Reproducing Giant Multilamellar Vesicles. *Langmuir* 24: 3037-3044.
- 10) Kurihara K, Takakura K, Suzuki K, Toyota T and Sugawara T (2010) Cell-sorting of Robust Self-reproducing Giant Vesicles Tolerant to a Highly Ionic Medium. *Soft Matter* 6: 1888-1891.

- 11) Shohda K, Tamura M, Kageyama Y, Suzuki K, Suyama A and Sugawara T (2011) Compartment Size Dependence of Performance of Polymerase Chain Reaction inside Giant Vesicles. *Soft Matter* **7**: 3750-3753.
- 12) Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez J, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P and Cardona A, (2012) Fiji: An Open-source Platform for Biological-image Analysis. *Nat. Methods* **9**: 676-682.