

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	リポソーム型人工細胞の接合ナノポアタンパク質の構築及び遺伝子発現制御に関する研究
Title(English)	Study on construction of junctional protein nanopores and switchable control of gene expression in liposomal artificial cells
著者(和文)	石井裕太
Author(English)	Yuta Ishii
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12818号, 授与年月日:2024年6月30日, 学位の種別:課程博士, 審査員:松浦 友亮,瀧ノ上 正浩,上野 隆史,加納 ふみ,藤島 皓介
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12818号, Conferred date:2024/6/30, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

博士学位論文

リポソーム型人工細胞の接合ナノポアタンパク質の
構築及び遺伝子発現制御に関する研究

Study on construction of junctional protein nanopores and
switchable control of gene expression
in liposomal artificial cells

東京工業大学
生命理工学院
生命理工学系

石井裕太

目次

抄録

略称

第1章 緒言	5
1.1 ボトムアップ合成生物学	5
1.2 人工多細胞系	8
1.3 遺伝子発現制御	9
1.4 本論文の目的及び構成	12
第2章 相互接続するタンパク質ナノポアの構築	13
2.1 緒言	13
2.2 実験材料及び方法	20
2.3 実験結果	29
2.4 考察	37
2.5 要約	39
2.6 参考	40
第3章 リボスイッチを用いた人工細胞内発現制御	47
3.1 緒言	47
3.2 実験材料及び方法	52
3.3 実験結果	57
3.4 考察	68
3.5 要約	69
第4章 結言	70
参考文献	73
本研究に関する論文	83
謝辞	84

抄録

多細胞生物はマクロスケールの構造化によって単なる細胞の働きの総和を超える洗練された能力を発揮している。工学的に設計された細胞系においても多細胞構造化により、化学人工知能、生体ロボット、人体内で共生する *in situ* 医薬合成・デリバリーシステムなど、高度で社会的恩恵の大きい技術の開発が可能になると期待されているが、細胞を人工的に多細胞化させる技術は未成熟である。天然の多細胞生物の発生は、細胞間の接着、分子コミュニケーション、シグナル分子に対する細胞応答に基づいており、人工多細胞システムをボトムアップに構築するためには、それらを可能にする生物学的機能モジュールが必要となる。

本研究では、隣接する細胞間の分子コミュニケーションのための、自発的に集合し2つの膜にまたがるナノポアを形成するタンパク質と、人工的なシグナル応答のための、直交する2つのリボスイッチからなる最小限のシグナル応答機構を設計し、人工多細胞システムのための新たな分子ツールの開発を目指した。

人工多細胞組織の実現へ向けて、様々な研究が報告されている。エマルションベース人工多細胞系では、ナノポアタンパク質で細胞同士を相互に界面で接続して物質が移動できるようにすることで、シグナル伝達やモルフォゲンによる位置情報の取得が達成されている。しかし、リボソームベースのシステムでは、人工細胞同士を直接接続する手法が欠けており、人工細胞間の分子コミュニケーションは溶媒への拡散を媒介したものに限られていた。そこで本研究では、*S. Aureus* 由来のタンパク質膜孔形成毒素 α -ヘモリシンをエンジニアリングすることにより、隣接するリボソームベース人工細胞同士を直接つなぐことのできるナノポアタンパク質の開発を目指した。 α -ヘモリシン (AH) は、可溶性タンパク質として発現し、リン脂質膜上で7量体となって約1100 Da以下の低分子が通過できるナノポアを形成する。AHにタンパク質同士を結合するドメインである SpyTag/SpyCatcher をそれぞれ融合させ、混合することで自発的に7量体同士が結合して2つの脂質二重層間にまたがる14量体ナノポアを形成できる AH-SpyTag/SpyCatcher を設計した。大腸菌で発現・精製した AH-SpyTag/SpyCatcher を蛍光分子を封入した細胞サイズリボソーム(GUV)に加えると、蛍光分子が漏出したことから、SpyTag/SpyCatcher の融合は、AHのナノポア形成を阻害しないことがわかった。クライオ電子顕微鏡トモグラフィにより、AH-SpyTag-AH-SpyCatcher 複合体が設計通りに head-to-head 14量体構造を取ることを明らかにした。

次に、リボソーム人工細胞に内包された無細胞翻訳系において、2つの物質に応答するスイッチング可能な翻訳制御システムを設計した。多細胞生物の発生では、モルフォゲンと呼ばれる濃度によって個々の細胞に位置情報を与える分子に細胞が応答して遺伝子発現を変化させることが重要である。天然の細胞は遺伝子発現を緻密に制御し、エネルギーや物質利用の効率化、タンパク質の機能的な組み立て・外部刺激への

対応・細胞分化など高度な生物学的機能を実現している。転写制御は、細胞及び人工細胞において遺伝子発現を調節する最も一般的な段階であるが、RNA 分解系を欠く再構成型無細胞タンパク質合成 (Cell Free Protein Synthesis; CFPS)系を封入した人工細胞においては、転写制御による遺伝子発現の停止を含むスイッチング可能な制御は複雑になる。したがって、CFPS を封入した人工細胞においては、翻訳制御による遺伝子発現制御が有力だと考えられる。しかしながら、CFPS を封入した人工細胞において、リボスイッチを用いて遺伝子発現を制御した例は少なく、2つの遺伝子発現を直交的かつスイッチング可能に制御した例は存在していなかった。本研究では、膜透過性リガンドである ASP2905 とテオフィリンにそれぞれ応答する互いに直交するリボスイッチ AC17-5c と Theo-3c が、人工細胞内で GFP と mScarlet-I3 の発現を制御する系を構築した。CFPS システムをリボソームで区画化したことで、人工細胞の遠心洗浄によるリガンドの添加と除去が可能になり、リボスイッチ制御下の GFP と mScarlet-I3 の発現を、それぞれ独立して開始・終了させ、発現順序を制御できることを示した。この技術は、人工的な形態形成だけでなく、Sec-Translocon を必要とする膜タンパク質の無細胞発現にも応用可能である。

本研究は、人工多細胞系をボトムアップに構築するための生体分子モジュールを新たに提示し、より高度な人工多細胞系構築技術のためのステップとなる。

略称

PURE system	The protein synthesis using recombinant elements system
mRNA	messenger RNA
AH	α -hemolysin
GUV	Giant Unilamellar Vesicle
AF647	Alexa Fluor 647
OA647	Ovalbumin Alexa Fluor 647
BSA	Bovine Serum Albumin
FCM	Flowcytometry
GFP	Green Fluorescent Protein
Egg-PC	Egg-yolk phosphatidylcholine
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate–PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
chol	Cholesterol
UTR	Untranslated region
AmpR	アンピシリン耐性遺伝子
KanR	カナマイシン耐性遺伝子
IPTG	isopropyl β -D-thiogalactopyranoside
PVDF	Poly Vinylidene Fluoride
HRP	Horseradish peroxidase
TBS-T	Tris Buffered Saline with Tween20
RBS	Ribosome Binding Site
DTT	dithiothreitol

第1章 緒言

1.1 ボトムアップ合成生物学

既存の生物システムについての理解が進んだことで、近年ではその知見を応用し新たに人工的な生物システムを設計する合成生物学が台頭している。比較的容易に製造できる機械的システムとは対照的に、生物学的システムは人類がボトムアップに構築することが困難であるため、従来の生物学では生物に関わる巨視的現象からその原因となる微視的メカニズムを探り出す解析的アプローチが取られてきた。解析的生物学によって生物についての理解が遺伝子・細胞機能・生体分子レベルにまで及んだことで、近年では生物学においても機械工学と同様に、試行錯誤を繰り返して工学理論体系・技術体系を構築していく構成的アプローチを取ることが可能になった[1]。このような合成生物学分野では、人工的な生物システムを設計、製造・評価していくことで、人類社会に資する工学的に設計された細胞の創出を目指している。

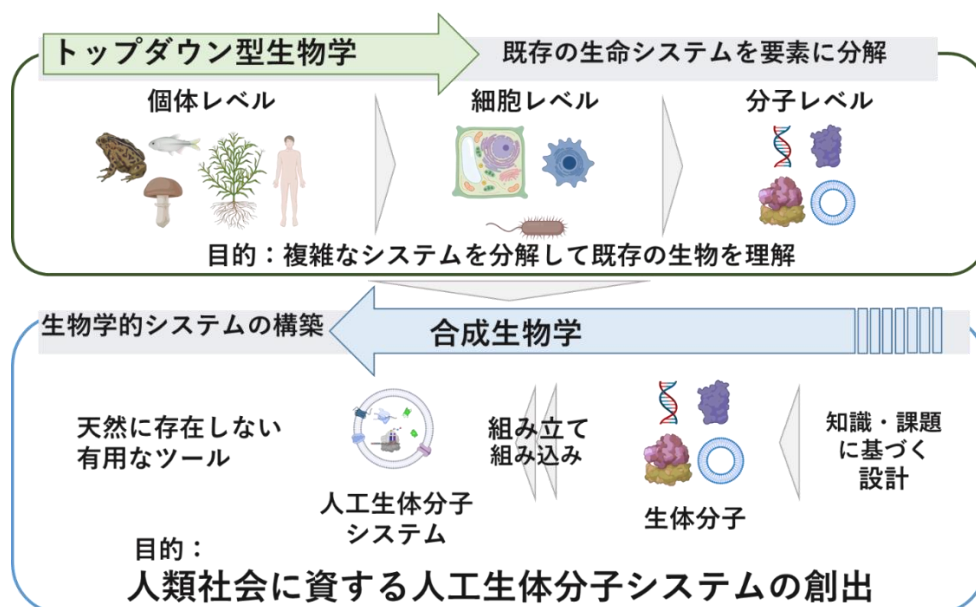


図 1-1. 合成生物学

図中の画像は biorender による

合成生物学的手法で工学的に設計された細胞は、既存の細胞をベースにしたものと細胞を含まない生体分子から組み立てられたボトムアップ人工細胞に大別できる。既存の細胞をベースにしたものとしては、農薬や害虫への抵抗性や収量・栄養価などを高めた遺伝子組み換え作物[2][3]、細胞医薬などがあり[4]、これらは医療・食品産業分野で既に実用化されている。自然淘汰をくぐり抜けてきた天然細胞は高い頑健性を持ち、天然の状態に近い形質へ向けては比較的容易にエンジニアリングできる利点を持つものの、細胞というブラックボックスを含むためそのカスタマイズ性は制限されている[5]。一方で、ボトムアップな人工細胞の構築技術は発展途上にあり、自然界の細胞のように自律的に作動する実用的な人工細胞は実現されていない。

人工細胞は、生物学的機能の一部を再現した、区画化された人工の細胞様構造体である。天然細胞はリン脂質からなる細胞膜によって区画化され、遺伝情報を持ち、自己複製するという性質を合わせ持つのに対し、人工細胞は最低限、区画化されているという性質を持つ。人工細胞の区画としては、リポソーム[6][7][8][9]だけでなく、油中水滴エマルション[10][11]、プロテिनソーム[12][13]、ポリマーソーム[14][15]などが使われている。これまでに、タンパク質合成[16][17]、アメーバ型移動[18]、リン脂質の生合成[19]、転写制御[20]、光合成[21]など多くの生物学的機能が人工細胞に実装されている。

ボトムアップ合成生物学では、天然細胞が持つ細胞機能または新規に人工的に設計された生物学的機能をボトムアップに実装していくことで、着目する生物学的機能を実現するための最小のコンポーネントと動作原理、設計理論を明らかにすることを目指す[5]。完全に制御可能かつ実用的な生物学的システムの創出のためには、現在までに人工的に実現されていない様々な生物学的機能を1つ1つボトムアップ人工細胞に実装し[22]、人工的な生物学的システムを自在に設計する技術体系を構築していく必要がある。

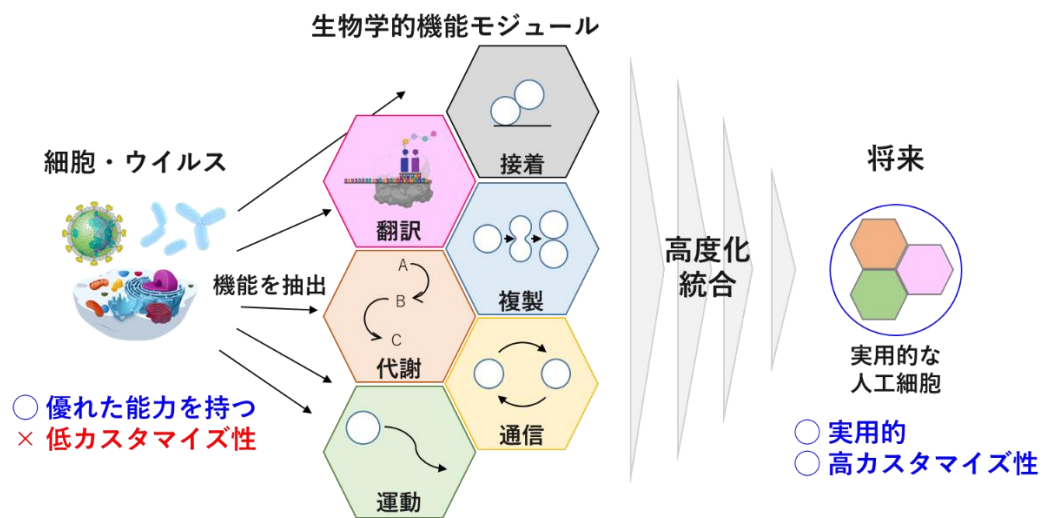
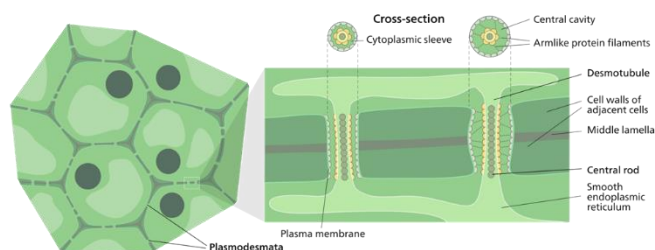


図 1-2. モジュラーアプローチによる人工細胞の開発

現状の工学的に設計された細胞の能力は、細胞を人工的に多細胞構造化する技術の不足によって制限されている。天然の多細胞生物の発生は、細胞間の接着・分子コミュニケーション、シグナル分子に対する細胞応答に基づいており、人工多細胞システムをボトムアップに構築するためには、それらを可能にする生物学的機能モジュールが必要となる。本研究では、未だ人工的に実現されていない細胞機能として多細胞性に着目し、人工的に細胞間の接着・分子コミュニケーションを行う機構とシグナル分子に応答して遺伝子発現を制御する機構を設計した。

1.2 人工多細胞系

植物の原形質連絡



心臓の刺激伝導系

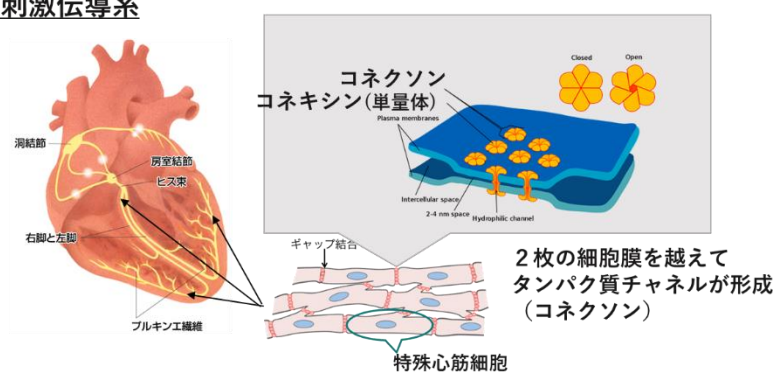


図 1-3. 多細胞組織の例（植物、心臓）

植物細胞は互いに原形質連絡と呼ばれる 50-60 nm のチャンネルで連結されており、

それによって細胞間のコミュニケーションを可能にしている[23]。

動物では細胞間にギャップジャンクションと呼ばれる多数のチャンネルでつながった構造があり、それによって小分子の輸送を行っている。ギャップジャンクションは心臓の鼓動に必要な電氣的シグナルを発生・伝達するために特に重要である[24][25]。

生物史上の多細胞化は、他の細胞が貪食できる粒子の大きさの上限に由来する選択圧によって生じたと考えられている[26]が、多細胞化の利点は、単に細胞同士が接着していることだけでなく、異なる働きを持つ細胞を空間的に異なる位置に秩序立って配置できることに由来している。天然の多細胞生物は、多細胞化することでシステムに階層性を持たせ、1つ1つの細胞の働きの単純な総和ではないマクロスケールの構造化された現象を引き起こ

すことを可能にしている[27]。植物では、根で水分や養分を吸収する細胞、葉で光合成をする細胞、茎で水分や養分を運ぶ細胞などが協調して動作し、全体として個体の生命を維持している。動物では、目の細胞が外界の環境を神経信号に変換し、神経細胞が集まった脳で情報を処理し、運動神経への出力を制御して骨格筋を駆動することで、食物を探して食べる・長距離を移動する・自分の住処を作る・社会を形成するなどの、決して単細胞生物では成し得ない高度なタスクを実行している。合成生物学的手法で設計される(人工)細胞系においても多細胞化を実現することで、化学人工知能[28]、生体ロボット[29]、人体内で共生する *in situ* 医薬合成・デリバリーシステムなど、高度で社会的恩恵の大きい技術の開発が可能になると期待される。

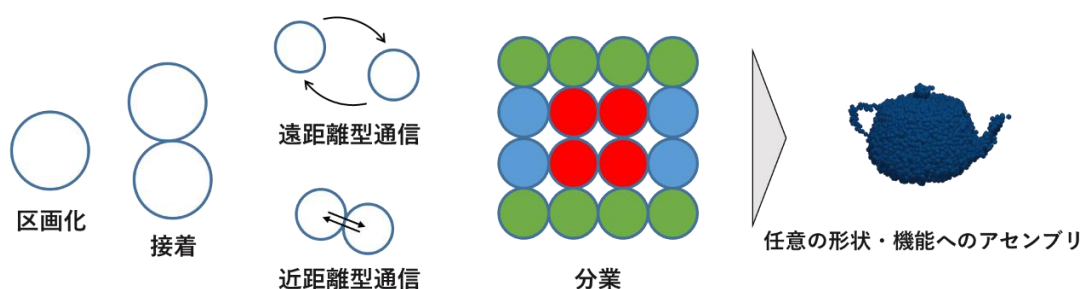


図 1-4. 人工多細胞システムの開発

接着・分子通信・分業・遺伝子発現制御などの機能モジュールを人工細胞で利用可能にするこ
とで、任意の形状・機能を持った人工多細胞システムの構築が可能になると期待される。

1.3 遺伝子発現制御

天然の細胞はタンパク質発現を緻密に制御し、エネルギーや物質利用の効率化、タンパク質の機能的な組み立て・外部刺激への対応・細胞分化など高度な生物学的機能を実現している。遺伝子発現制御はすべての生物学的存在にとって必須であり、多細胞生物の発生においてはとりわけ重要である。多細胞生物の形態形成は、他の細胞が発する拡散性シグナル（異位置情報を与える分子；モルフォゲン）、隣接する細胞が提示しているシグナル分子、自己

の内部の状態履歴を元に、1つ1つの細胞が遺伝子発現制御ネットワークによる情報処理を行い、出力(タンパク質発現)を行った結果として起こる[30]。

遺伝子発現は化学的・物理的刺激に基づいて制御され、原核生物では、遺伝子発現は *lacI-lac* オペレーター系[31]に代表される転写制御機構により、翻訳後のタンパク質分解によるものを除くとほとんど転写レベルでのみ制御される。一部の遺伝子は、素早く環境変化に応答するため転写後に低分子化合物に応答するリボスイッチを用いて制御される場合もある[32]。真核生物の遺伝子発現は、転写・RNA プロセッシング・RNA 輸送・翻訳開始・翻訳後のそのすべての段階で制御されうる。真核生物においても、マクロスケール・長い時間スパンにおける定常状態では細胞内の転写産物濃度とタンパク質濃度には強い相関があり[33]、これは転写制御が遺伝子発現制御の最も主要な段階であることを示している。細胞は、新しい状態に変化または適応するために、発現を開始するだけでなく、特定の細胞機能を停止するような遺伝子発現制御を行う必要がある[33]。天然の細胞は高度に制御された mRNA 分解系およびタンパク質分解系を持ち、転写・翻訳反応が行われながら同時に転写産物・翻訳産物が制御された形で分解される定常状態を維持することで、転写制御によってほとんどの遺伝子発現を制御することを可能にしている。

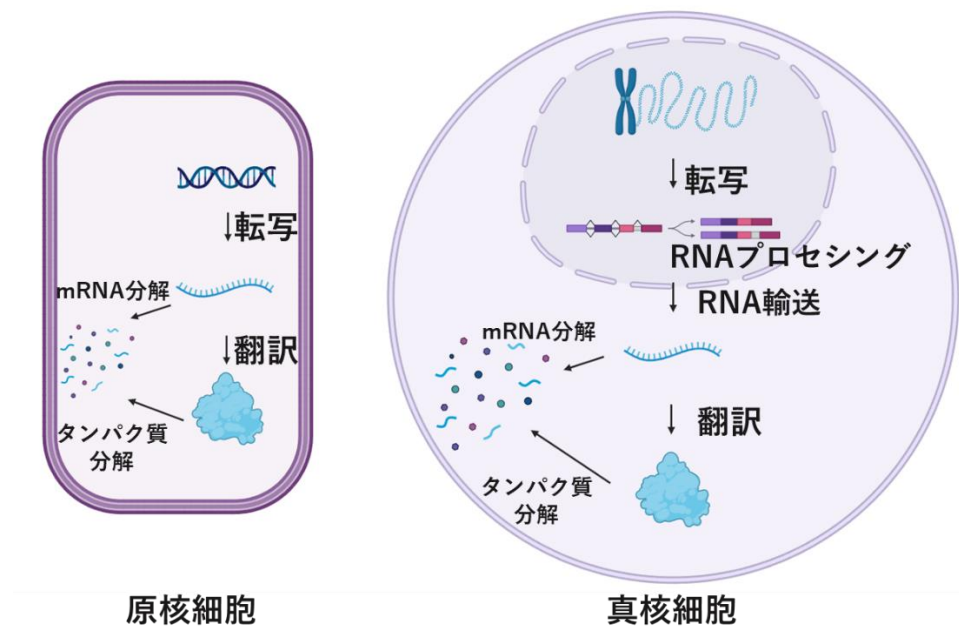


図 1-5. 原核生物・真核生物における遺伝子発現制御

原核生物では化学的・物理的シグナルに応答する転写因子によって主に遺伝子発現が制御されている。真核生物においても転写因子・エンハンサー・クロマチンリモデリング・エピジェネティック調節などにより主に転写段階で遺伝子発現が制御されているが、RNA プロセッシング、核外への RNA 輸送、翻訳も遺伝子発現の制御段階である。

1.4 本論文の目的及び構成

本研究では、人工多細胞系に利用できる細胞機能を拡張するために、リボソーム型人工細胞を相互に接続するタンパク質ナノポアの構築と、リボスイッチを用いた人工細胞内遺伝子発現制御の実証を目的とした。

1 章では、研究背景、人工多細胞系、人工細胞における遺伝子発現制御、本論文の目的及び構成について述べた。

2 章では、ミニマル人工多細胞組織のための相互接続するタンパク質ナノポア α -ヘモリシン-SpyTag/SpyCatcher の構築とその特性評価の結果について述べた。

3 章では、直交する 2 種のリボスイッチを用いて人工細胞内で 2 種のタンパク質発現を独立に制御する技術を実証した。

4 章では、本研究で得られた知見をまとめ、今後の展望について述べた。

第2章 相互接続するタンパク質ナノポアの構築

2.1 緒言

人工多細胞システムを実現することで、化学人工知能[28]、生体ロボット[29]、人体内で共生する *in situ* 医薬合成・デリバリーシステムなど、高度で社会的恩恵の大きい技術の開発が可能になると期待される。

人工多細胞の実現へ向けて、生細胞ベース及び人工細胞ベースの人工多細胞系について様々な研究が報告されている。細胞から組織・器官を機械的に組み立てるバイオ 3D プリントリング[34]によって作製された組織や、各種臓器のオルガノイド[35][36]は、生細胞が持つ発生プロシーダを流用した半人工多細胞系である。これらの生細胞を組み立てた人工多細胞系では、多細胞性を構成する細胞機能——(i)細胞同士の接着、(ii)細胞間の分業、(iii)細胞間コミュニケーションが実現されている。しかし、これらの系は細胞というブラックボックスを含み、(i)～(iii)の機能を真に人工的に再構築して自在に制御することは目的としていない。生細胞に人工的な接着分子を提示させる[37][38][39]ことで、その自発的な多細胞形態形成を完全に人工的にコントロールする試みも行われている。S.Toda et al., 2018[40]では、3種類の細胞を相互に認識する *synNotch* レセプターとそれによって制御されるプロモーター、カドヘリンの組み合わせにより、人工的に形態形成を行わせることで、2層または3層の色分けされたスフェロイドを形成させることに成功している。また、S.Toda et al., 2020[41]では、細胞に濃度勾配によって位置情報を与えるモルフォゲンとして蛍光タンパク質 GFP/mCherry、それらを認識するレセプターとして *synNotch* レセプターを用いることで平面上で細胞をある程度自発的にパターンニングさせることに成功している。細胞ベースの人工多細胞系では、細胞が元来持つ接着分子、シグナル伝達機能を利用できるため、組織レベルのミニマル構造を構築することは比較的容易であり、器官レベル以上の構造形成を可能にする形態形成の自在な制御が課題となっている。一方で、人工細胞からなるボトムアップ

な系では、(i)細胞同士の接着、(ii)細胞間の分業、(iii)細胞間コミュニケーション 多細胞性を成立させるためのすべての細胞機能を人工的に設計する必要があり、組織レベル構造の形成も挑戦的である。人工細胞からなる多細胞系として最も成功している形式は、油中水滴エマルションからなる合成組織[42][43]である。油中水滴エマルションは粘性の高い流動パラフィン中に形成されるため形状を維持しやすく、エマルション間は DIB(Droplet interface bilayer)と呼ばれる 1 枚の脂質二重層となるため膜タンパク質ナノポアによる接続が容易である。よって、マイクロピペットによって機械的にリン脂質が溶解した油中に細胞内液を注入して液滴を形成していくだけで多細胞様の構造を構築することができる。同様の技術を用いて、複数の細胞間で 1 方向のシグナル伝達[44]や、人工モルフォゲンを用いた位置情報の取得[45]などが達成されている。しかしながら、エマルションベース人工多細胞体では外部が疎水性溶媒となるため、水中で機能を発揮するタンパク質などの生体分子の特異的相互作用を細胞表面で利用できない。したがって、外部水性環境から物質を取り込んだり、細胞同士を自発的に接着させたりすることは困難である。よって、より生細胞に近く、細胞内から外部環境と容易にアクセスできるリポソーム、ポリマーソーム、プロテिनソームベースの人工多細胞体構築技術が応用上より重要だと考えられる。これまでに、ポリマーソーム・プロテिनソームベースの人工細胞系において自発的接着を行わせた例[46]、DNA 分子を用いたシグナル伝達を行った例[47][13][15]や、リポソームを接着分子を用いて自発的に集合させた例[48][49][50]、複数種のリポソーム間で溶液を介したシグナル伝達を行った例[51][52]などが報告されている。これらのうちポリマーソーム・プロテिनソームを区画として用いた系は、その多孔性のために DNA などの巨大な分子の通過が容易であるため、DNA コンピューティング技術[53]の適用が可能で、複雑なシグナル伝達カスケードを構築しやすい利点を持つ。一方、外殻が多孔性であることは区画化が不十分ということでもあり、低分子の内容物を漏出してしまうため、利用できる反応は制限される。リポソーム型人工多細胞系については、自発的な接着、ナノポアを介して外部溶液に一度シグナル分子を放出す

る遠距離型の分子通信は達成されているものの、区画の間に2枚の脂質二重層が存在するため、植物における原形質連絡(plasmodesma)[23]あるいは動物におけるギャップジャンクション[24]のような最低限の多細胞組織を構築する一般的に確立した技術は存在していない。多細胞化という生物学的機能を人工細胞に実装する技術体系の構築のためには、リポソーム型人工細胞を自発的に多細胞組織化する分子ツールの開発が重要である。

本研究では、リポソームベースのミニマル人工多細胞組織の構築を目指して、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) 由来膜孔形成毒素 α -ヘモリシン(AH)[54]にタンパク質同士の結合ドメイン SpyTag/SpyCatcher[55]を融合したタンパク質 AH-SpyTag/SpyCatcher を構築し、その性質評価を行った。

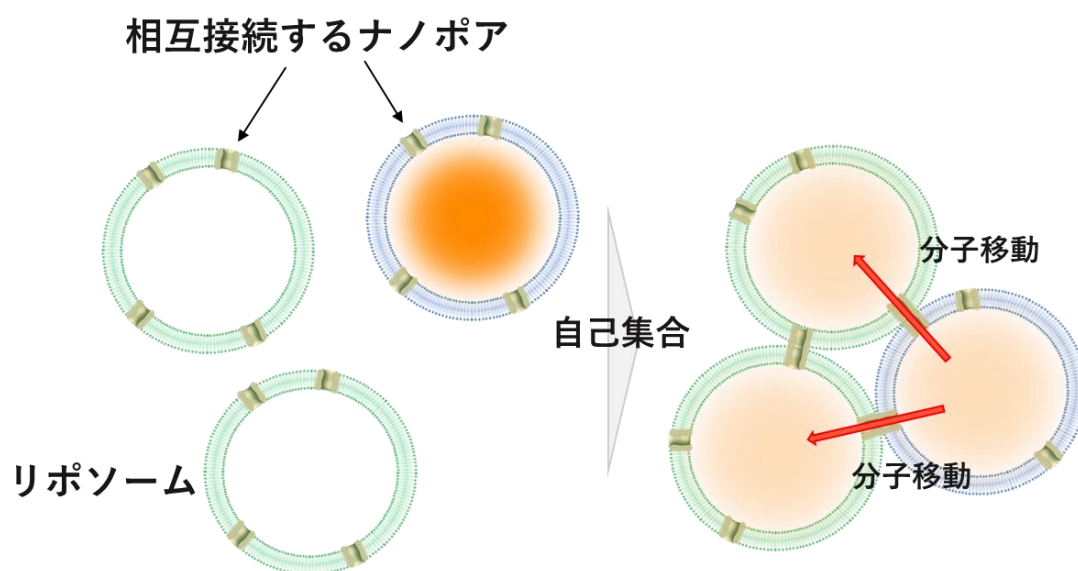


図 2-1. 本研究で目指したミニマル人工多細胞の概念図

α -ヘモリシン

Staphylococcus α -ヘモリシンは、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) 由来膜孔形成毒素タンパク質であり、天然では黄色ブドウ球菌が細胞外に分泌し、捕食者となるマクロファージなどの細胞を傷害することで黄色ブドウ球菌の生存に役立っていると考えられている[56]。 α -ヘモリシンは可溶性タンパク質として発現し、脂質膜に会合して 7 量体プレポアを形成した後に β バレルからなるナノポアを脂質膜に形成する[57]。

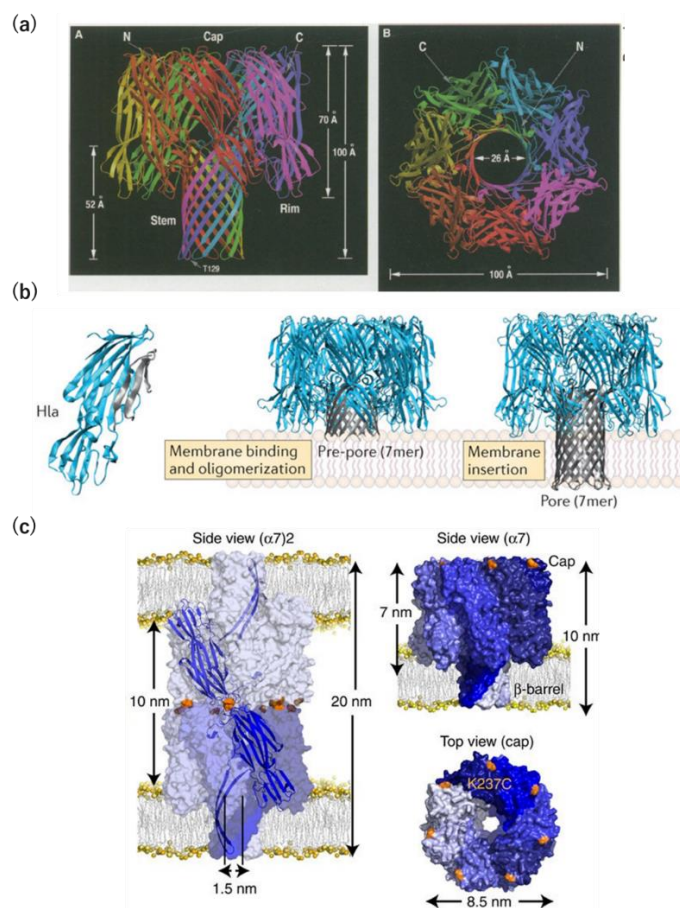


図 2-2. α -ヘモリシンおよび AH-K237C

(a) α -ヘモリシン 7 量体の X 線結晶構造[54] (b) ポア形成メカニズム[57]

(c) 先行研究[58]で得られたジスルフィド結合で AH を頭合せに結合できる K237C 変異の位置
ジスルフィド結合形成により原子レベルで 2 つの AH が密に近接することが期待された。

膜タンパク質でありながら可溶性タンパク質として扱えるため、比較的取り扱いが容易でナノポアシーケンサー[59]や油中水滴エマルション型の人工多細胞の研究[44][45]などに用いられている。本研究では、当研究グループの先行研究の指向性進化実験で得られた高活性型 α -ヘモリシン(G122S/K147R)変異体を用いた。また、先行研究(S.Mantri, et al., 2013, [58])で、237 番目のリシン残基をシステインに置換することでジスルフィド結合が形成されて α -ヘモリシン同士が頭合せにアセンブリした 14 量体構造を取ることがわかっており、このジスルフィド結合形成を後述の SpyTag/SpyCatcher と合わせて補助的に用いた。この研究[58]では形成効率が低いジスルフィド結合のみを利用していたため、14 量体を高収率で得ることができず、あらかじめポリアクリルアミドゲル電気泳動で精製した 14 量体をリポソームに加え、電子顕微鏡で撮影することでギャップジャンクション様構造を観察していた。本研究では、タンパク質のアフィニティを用いてより積極的に α -ヘモリシン同士を結合させるために、SpyTag/SpyCatcher システムを利用した。

SpyTag / SpyCatcher

SpyCatcher および SpyTag は、化膿レンサ球菌(*Streptococcus pyogenes*)のフィブロネクチン結合タンパク質 FbaB の分子内イソペプチド結合形成ドメイン CnaB2 を分割して得られたタンパク質同士の結合ドメインである[55]。SpyCatcher は SpyTag を特異的に認識し、自身のリシン残基と SpyTag のアスパラギン酸残基をペプチド結合で不可逆的に結合する。

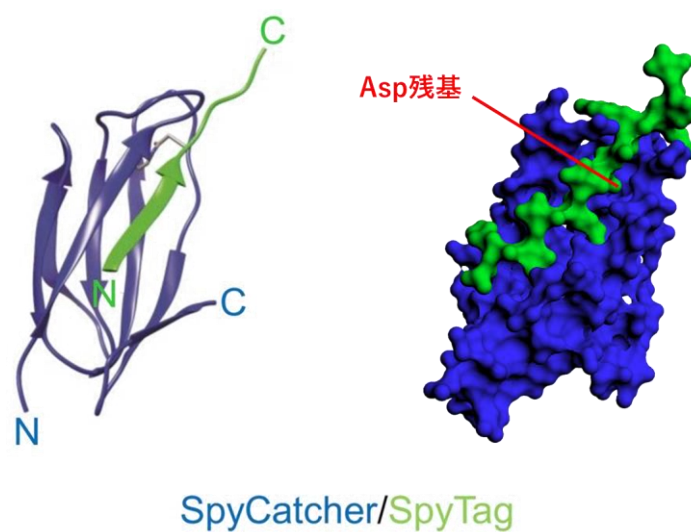


図 2-3. SpyTag/SpyCatcher 複合体の X 線結晶構造[60]

PDB-ID:4MLI

SpyTag/SpyCatcher の反応は様々な条件下で起こり、pH や温度の変化に比較的敏感ではない [55]。本研究では、ヘモリシン同士を水溶液中で積極的に結合させるために SpyTag/SpyCatcher を改良して得られた SpyCatcher003, SpyTag003 のセット[61]を α -ヘモリシンに融合して用いた。

本研究で構築したタンパク質の設計上の構造を以下の図 2-4 に示す。

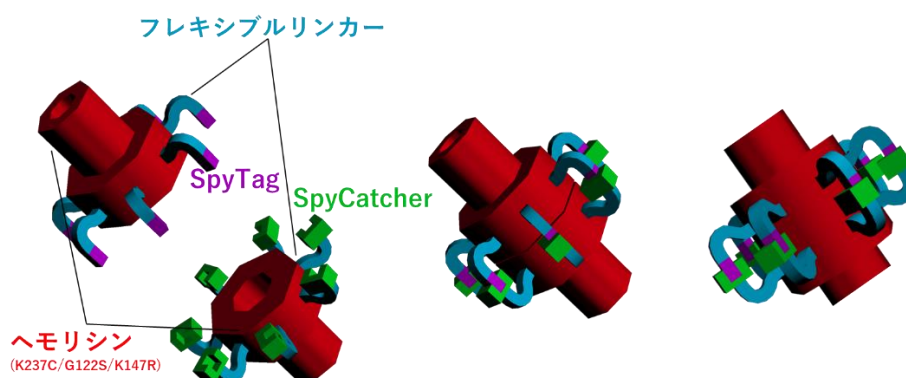


図 2-4. タンパク質設計

本研究では、7 量体ポアを形成した α -ヘモリシンがその単量体それぞれが持つ

SpyTag/SpyCatcher のアフィニティーにより結合し、図 2-4 に示すようなナノポアが導通した 14 量体構造を形成することを期待した。さらに、K237C 変異部分で形成されるジスルフィド結合によりヘモリシンポア同士がさらに密着し、原子レベルで隙間がなく低分子やイオンが横から漏出しない構造になることを期待した。

2.2 実験材料及び方法

プラスミド構築

本研究で使したプライマーおよびプラスミドを次の表 2-1, 2-2 に示す。

表 2-1. AH コンストラクト用プライマー

Primer	Sequence(5' → '3)
T7F	TAATACGACTCACTATAGGG
T7R	ATGCTAGTTATTGCTCAGCGG
K237C-FP	ATTACTATGGATAGATGCGCATCCAAACAACAAAC
K237C-RP	GTTTGTGTTGTTGGATGCGCATCTATCCATAGTAAT
AH-NF	GCAGATTCTGATATTAATATTAACCGG
AH-NR	CATGGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAAC
AH-CF	GGGGGTTCTCATCATCATC
AH-CR	ATTTGTCATTTCTTCTTTTCCCAATC
AHST-NF	TATCGTGATGGTGGATGCATACAAACGCTATAAAGGATCCAGTGGTAGCG CAGATTCTGATATTAATATTAACCGG
AHST-NR	CATCCACCATCACGATATGCGGAACACCACGCATGGTATATCTCCTTCTTA AAGTTAAAC
AHST-CF	GTTCCGCATATCGTGATGGTGGATGCATACAAACGCTATAAAGGGGGTTC TCATCATCATC
AHST-CR	CCATCACGATATGCGGAACACCACGGCTACCACTGGATCCATTTGTCATTT CTTCTTTTCC
SC3-GS-F	AGAAGGAGATATACCATGTCGTACTACCATCACCATCACC
SC3-GS-R	ATATTAATATCAGAATCTGCGCTACCACTGGATCCAGTATGAGCGTCACCT TCAGTTG

GS-SC3-F	GAAGAAATGACAAATGGATCCAGTGGTAGCTCGTACTACCATCACCATCA CC
GS-SC3-R	GAGCGGATCCACAATTTAAGTATGAGCGTCACCTTCAGTTG
pET28b-F	TGAGATCCGGCTGCTAACAAAG
pET28b-R	GGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTA
2fix-to- pET28b-F	TAAGAAGGAGATATACCATGGCAGATTCTGATATTAATATT
2fix-to- pET28b-R	GTTAGCAGCCGGATCTCATTAAATGATGATGATGATGAG

表 2-2. 本研究で用いたプラスミド

Plasmid	Description	Selection marker	Reference
pIVEX2.3d-AH-6CHis- 2fix	α -Hemolysin(G122S/K147R)- 6CHis	AmpR	[7] S.Fujii, et al., 2013
pIVEX2.3d-AH-6CHis- 2fix-K237C	AH-G122S/K147R/K237C		This study
pIVEX2.3d-AH-6CHis- 2fix-N-ST	AH-G122S/K147R-N-terminal SpyTag003		This study
pIVEX2.3d-AH-6CHis- 2fix-N-SC	AH-G122S/K147R-N-terminal SpyCatcher003		This study
pIVEX2.3d-AH-6CHis- 2fix-C-ST	AH-G122S/K147R-C-terminal SpyTag003		This study
pIVEX2.3d-AH-6CHis-	AH-G122S/K147R-C-terminal		This study

2fix-C-SC	SpyCatcher003		
pIVEX2.3d-AH-6CHis-2fix-K237C-N-ST	AH-G122S/K147R/K237C-N-terminal SpyTag003		This study
pIVEX2.3d-AH-6CHis-2fix-K237C-N-SC	AH-G122S/K147R/K237C-N-terminal SpyCatcher003		This study
pIVEX2.3d-AH-6CHis-2fix-K237C-C-ST	AH-G122S/K147R/K237C-C-terminal SpyTag003		This study
pIVEX2.3d-AH-6CHis-2fix-K237C-C-SC	AH-G122S/K147R/K237C-C-terminal SpyCatcher003		This study
pET28b-AH-6CHis-2fix-C-ST	AH-G122S/K147R-C-terminal SpyTag003	KanR	This study
pET28b-AH-6CHis-2fix-C-SC	AH-G122S/K147R-C-terminal SpyCatcher003		This study
pET28b-AH-6CHis-2fix-K237C-C-ST	AH-G122S/K147R/K237C-C-terminal SpyTag003		This study
pET28b-AH-6CHis-2fix-K237C-C-SC	AH-G122S/K147R/K237C-C-terminal SpyCatcher003		This study
pET28b	Cloning vector		Novagen

まず、[7] S.Fujii, et al., 2013 で得られていた pIVEX2.3d-AH-6CHis-2fix をテンプレートとし、互いに相補的なプライマーK237C-FP 及び K237C-RP を用いて、KOD -Plus- Neo(東洋紡) でインバース PCR—セルフライゲーションによる Site-directed Mutagenesis を行った。増幅産物を SpeedCut Dpn I (LABTAS+, LT-10-SC-609)で処理して残存テンプレートを消化した後、XL10-Gold に導入して 100 µg / mL アンピシリン LB 寒天プレートにプレーティングした。一晩培養後、得られたコロニーを LB 培地で 37℃一晩培養し、プラスミド精製キットを用いて pIVEX2.3d-AH-6CHis-2fix-K237C を得た。さらにこれと元の pIVEX2.3d-AH-6CHis-2fix

をテンプレートとし、AHST-NF/AHST-NR, AHST-CF/AHST-CR による Primer Extension で SpyTag003 がそれぞれ N 末端、C 末端に挿入されたコンストラクトをコードするプラスミド 4 種を得た。AH-NF/AH-NR, AH-CF/AH-CR を用いて N 末端、C 末端に SpyCatcher003 を挿入するバックボーン及び AH をコードする DNA フラグメントを得た。Eurofin 人工遺伝子合成で委託合成した SpyCatcher003 をコードする DNA フラグメント (5'-TCGTACTACCATCACCATCACCATCACGATTACGACATCCCAACGACCGAAAACCTGTATTTCAGGGCGCCATGGTAACCACCTTATCAGGTTTATCAGGTGAGCAAGGTCCGTCCGGTGATATGACAACCTGAAGAAGATAGTGCTACCCATATTAAATTCTCAAAACGTGATGAGGACGGCCGTGAGTTAGCTGGTGCAACTATGGAGTTGCGTGATTCATCTGGTAAACTATTAGTACATGGATTTTCAGATGGACATGTGAAGGATTTCTACCTGTATCCAGGAAAATATACATTTGTCGAAACCGCAGCACCAGACGGTTATGAGGTAGCAACTCCAATTGAATTTACAGTTAATGAGGACGGTCAGGTTACTGTAGATGGTGAAGCAACTGAAGGTGACGCTCATACT-3') を (SC3-GS-F/ SC3-GS-R; N 末端に挿入する SpyCatcher003 のため)及び(GS-SC3-F/ GS-SC3-R; C 末端に挿入する SpyCatcher003 のため)で PCR 増幅して得た DNA フラグメントと合わせて Gibson Assembly Master Mix(NEB, E2611L)を用いたギブソンアセンブリにより、AH・AH-K237C の N 末端・C 末端に SpyCatcher003 が挿入されたタンパク質をコードするプラスミド 4 種を得た。pIVEX2.3d は無細胞翻訳系用 DNA 断片のテンプレートとして最適化されており、Lac operator を持たず IPTG による発現誘導が適用できないため、大腸菌発現用に、得られた DNA コンストラクトを pET28b に移し替えた。移し替えは、AH-SpyTag/SpyCatcher をコードする部分を増幅する 2fix-to-pET28b-F/R プライマーと pET28b を増幅する pET28b-F/R プライマーを用いて DNA フラグメントを作製し、それをギブソンアセンブリによりプラスミド化した。それを同様に DpnI 処理・XL10-Gold に導入・プラスミド精製を行い、AH-SpyTag/SpyCatcher の大腸菌発現用プラスミドを得た。各プラスミド精製は T7E, T7R プライマーと SapphireAmp® Fast PCR Master Mix(タカラバイオ)を用いたコロニーダイレクト PCR・アガロース電気泳動により長さ確認を行い、正しい長さを示したコロニーについて

NucleoSpin® Plasmid EasyPure(タカラバイオ)を用いて行った。精製後のプラスミドは作製の都度 T7F, T7R プライマーを用いて Euroifn DNA シーケンスサービスによる配列確認を行った。

無細胞タンパク質合成

Western blot および Calcein 漏出アッセイのために、PUREfrex1.0 による無細胞タンパク質合成を行った。反応に必要なテンプレート DNA は、表 2-2 の pIVEX-AH/AH(K237C)-(N/C)-SpyTag/Catcher(8 種類)をテンプレートとし、T7F/T7R をプライマーとした PCR 増幅(KOD-plus-neo)によって得た。増幅産物は NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (MACHEREY-NAGEL)で濃縮・精製し、NanoDrop 2000(Thermo Fisher Scientific)で 260 nm 吸光度測定を行うことで濃度を測定し、超純水で希釈して濃度を 100 nM に調整した。無細胞合成反応は以下の組成で PCR チューブ内で 37℃、4 時間行った。

表 2-3. 無細胞合成反応液の調製

成分	Volume (μL)
PURE 1.0 sol. I	10
PURE 1.0 sol. II	1
Ribosome (sol. III)	1
Rnase Inhibitor	0.2
100 nM linearDNA	1
超純水	6.8
Volume / sample	20

Western blot

SpyTag/SpyCatcher を機能的に AH に挿入できる位置が N 末端か C 末端か決定するため、それぞれ無細胞合成した各 4 種類の AH-SpyTag, AH-SpyCatcher 合成液 6 μ L ずつを混合して 37°C 3 時間インキュベート後、抗 His $\times$ 6 抗体を用いた Western blotting を行った。ゲルにアプライするサンプルは PURE 合成液 2 μ L, 超純水 3 μ L, 2 $\times$ SDS-PAGE-Sample buffer 5 μ L を混合して 95°C, 10 分ボイルして調製した。サンプルを 6 μ L ずつポリアクリルアミドゲルにアプライし、200 V, 40 分泳動した。ポリアクリルアミドゲルから、メタノール処理した PVDF 膜に転写装置を用いて 110 mA, 60 分通電してタンパク質を転写した。PVDF 膜を Blocking One(ナカライテスク)でブロッキング処理し、TBS-T で洗浄、40000 倍希釈した Anti-6His-HRP 抗体処理した。検出液(Amercham ECL Western blot detecting reagent)で発光反応を開始し、イメージング装置で画像化した。

タンパク質発現・精製

精製タンパク質を得るために、大腸菌を形質転換してタンパク質発現・Co イオン-ヒスチジンタグアフィニティー精製を行った。まず、4 種のプラスミド pET28b-AH-SpyTag/SpyCatcher を BL21(DE3)-pLysS に導入し、20 mM グルコースを添加した LB 寒天培地で培養してコロニーを得た。50 μ g/mL カナマイシンを含む LB 培地でプレートのコロニーをすべて懸濁して、37°C 1 時間前培養した。それを 800 mL の TB 培地に植菌して 37°C で増殖が飽和するまで振盪培養し、終濃度 0.5 mM の IPTG を添加して発現を誘導した。さらに 37°C 3 時間培養後、6000G, 4°C, 15 分遠心して培地を除去した。さらに菌体ペレットを Buffer A(HEPES-KOH[pH7.6] 50 mM, NH₄Cl 1000 mM, MgCl₂ 10 mM, 2-メルカプトエタノール 7 mM) で懸濁して 50 mL コニカルチューブ内で遠心・上清を除去して菌体ペレットを得た。菌体を-80°Cで保存後、平衡化バッファ(Tris-HCl[pH8.0] 50 mM, NaCl 300 mM, Tween20 0.05 vol%, グリセロール 10 vol%, メルカプトエタノール 7 mM, 尿素 7 M)を加え、7 M 尿

素の浸透圧により菌体を溶解した。平衡化バッファーで平衡化した TALON® Metal Affinity Resins ビーズを 2 mL 程度加え、遠心・上清除去して菌体の夾雑物を除去した後、ビーズをエンプティカラムにアプライした。平衡化バッファーを 40 mL, 洗浄バッファー(Tris-HCl[pH8.0] 50 mM, NaCl 300 mM, Tween20 0.05 vol%, グリセロール 10 vol%, メルカプトエタノール 7 mM, 尿素 7 M, イミダゾール 20 mM) 20mL, 高濃度 NaCl 洗浄バッファー(Tris-HCl[pH8.0] 50 mM, NaCl 1M, Tween20 0.05 vol%, グリセロール 10 vol%, メルカプトエタノール 7 mM, 尿素 7 M, イミダゾール 20 mM)15mL, 洗浄バッファー20mL を通し、10 mL の溶出バッファー(Tris-HCl[pH8.0] 50 mM, NaCl 300 mM, Tween20 0.05 vol%, グリセロール 10 vol%, 尿素 7 M, イミダゾール 300 mM)で溶出し、コニカルチューブに回収した。得られたタンパク質溶液から尿素を除去するため、分画分子量 3500 Da の透析チューブに溶液を入れ、400 mL の Urea(+)透析バッファー(HEPES-KOH[pH7.6] 20 mM, NaCl 300 mM, メルカプトエタノール 5 mM, 尿素 3.5 M)を外液として 4℃で 3 時間透析後、透析外液を透析バッファー(HEPES-KOH[pH7.6] 20 mM, NaCl 300 mM, メルカプトエタノール 5 mM) 2 L に交換し、4℃で 1 2 時間以上透析を行った。透析外液は 4 時間毎に交換した。透析後、限外ろ過チューブで 1 mL 以下になるまで濃縮し、終濃度 10 mM の DTT を加えて-80℃で保存した。

LUV の作製

精製したレコンビナント AH が脂質膜に結合する様子を電子顕微鏡で撮影するために、LUV を作製した。100 mg / mL POPC 60 μ L と 100mg / mL コレステロール 40 μ L(クロロホルム溶液)を混合し、エバポレーターにセットした 5 mL ナスフラスコ内で回転させながらクロロホルムを揮発させて脂質フィルムを形成した。HEPES-K-Glu バッファー(HEPES-KOH[pH7.6] 20 mM, グルタミン酸カリウム 50 mM) 200 μ L で脂質膜を水和し、超音波処理(28 Hz-1 min, 45 Hz-1 min, 100 Hz-3 sec, total 10 min)して 1.5 mL チューブに移した。液体窒素と 65℃に設定したウォーターバスで 5 回凍結解凍した後、Avanti Mini-Extruder を用いて 100

nm VCTP フィルター(Merck Millipore)を 10 回程度往復させて LUV を得た。21000 G, 30 分遠心して上清の LUV を回収した。この LUV 溶液の濃度を 50 mg/mL とみなし、0.3 mg/mL の LUV, AH-SpyTag 溶液 8 μ M, HEPES-KOH[pH7.6] 20 mM, NaCl 150 mM の溶液を調製してネガティブ染色による透過型電子顕微鏡撮影用のサンプルとした。電子顕微鏡撮影は東北大学大学院 生命科学研究科 田中良和研究室で行って頂いた。

GUV の作製

GUV は界面通過法[62]の変法である[63]で報告された方法に若干の改変を加えた方法で作製した。まず、ガラスチューブ(マルエム, ミクロチューブ 透明 1.5mL No.2)内に脂質クロロホルム溶液を入れ、vortex しながらエアダスタースプレーを吹き付けてクロロホルムを揮発させた。脂質組成は、カルセイン漏出アッセイでは POPC : Chol = 60 : 40 wt%, GUV 接着アッセイでは Egg-PC : Chol = 60 : 40 wt%を使用し、脂質量が 1 チューブあたり 7.6 mg となるようにした。ガラスチューブ内に 500 μ L の流動パラフィンを加え、vortex してから 70°C に昇温したアルミビーズバスで 1 分以上加熱した。一度取り出して 30 秒間 vortex し、再度 1 分以上加熱した。vortex して常温になるまで待ち、内液を流動パラフィン内にマイクロピペットで注入して 1 つの大きいエマルションを形成した。内液の組成は内液バッファー(HEPES-KOH[pH7.6] 20 mM, グルタミン酸カリウム 250 mM, 酢酸マグネシウム 18 mM, グルコース 120 mM, スクロース 280 mM)に、カルセイン漏出アッセイでは OA647 2 μ M, カルセイン 20 μ M を加えたものを、GUV 接着アッセイでは OA647 4 μ M または mCherry 8 μ M を加えたものを使用した。内液のエマルションを 1.5 mL チューブ用ラックを用いた機械的攪拌[64]で分割し、さらに 30 秒間 vortex を行うことで細胞サイズエマルションを得た。それを 1.5 mL チューブに入れた 300 μ L 外液バッファー(HEPES-KOH[pH7.6] 20 mM, グルタミン酸カリウム 250 mM, 酢酸マグネシウム 18 mM, グルコース 400 mM)の上に静かに乗せて 15°C, 10000 G で 5 分遠心した。得られた GUV を 21G(0.80 $\times$ 13mm)の注射針でチュー

ブの底に穴を開けてふたを閉めることで回収した。

カルセイン漏出アッセイ

精製した AH-SpyTag/SpyCatcher のナノポア形成活性を確認するために、フローサイトメトリーによるカルセイン漏出アッセイを行った。精製タンパク質 4 種の濃度を nanodrop の 280 nm 吸光度測定により定量し、浸透圧ショックを避けるために GUV の外液バッファーで希釈して 3 μM になるように調整した。そのタンパク質溶液それぞれ 25 μL と GUV 懸濁液 25 μL をピペッティングにより混合し、サンプルとした。PCR チューブ内で 37°C インキュベートしながら 10 μL サンプリングし、100 μL の外液バッファーで希釈して FACS Aria III (BD) で FCM 測定を行った。解析は Flowjo を用いて、体積マーカである AF647 蛍光の値でカルセイン蛍光値を除算し、1000 倍した値の幾何平均(Geometric Mean)を取った。

GUV 接着アッセイ

AH-SpyTag/SpyCatcher が実際に GUV 同士を接着させる活性を測定するために、フローサイトメトリーによる GUV 接着アッセイを行った。作製した OA647 または mCherry で着色した GUV 2 種にそれぞれ AH-SpyTag または AH-SpyCatcher 溶液を終濃度 0.8 μM となるように混合した。37°C で 1 時間インキュベート後、2 種の GUV を混合し、SpyTag と SpyCatcher の結合反応のために 30°C で 2 時間インキュベートした。カルセイン漏出アッセイと同様に外液バッファーで希釈して FCM 測定を行った。

AH14 量体構造決定

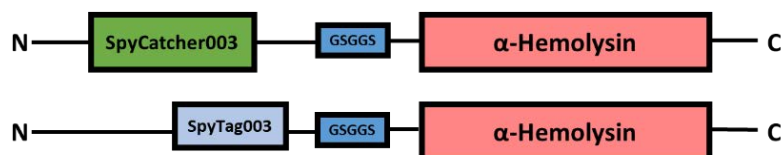
AH/AH-(K237C)-SpyTag と AH/AH-(K237C)-SpyCatcher を等物質で混合し、クライオ電子顕微鏡トモグラフィーのサンプルとした。クライオ電子顕微鏡による撮影、電子密度分布の算出は東北大学大学院 生命科学研究科 田中良和研究室で行って頂いた。構造精密化は結果の電子密度分布データと WT- α -ヘモリシンの構造データを元に、WinCoot 及び Phenix を用いて行った。

2.3 結果

SpyTag/SpyCatcher 挿入位置の検討

α -ヘモリシンの構造から、SpyTag/SpyCatcher の挿入位置は C 末端または N 末端に挿入すると機能的に挿入できると予想されたため、以下の図 2-4 に示すような 1 次構造の融合タンパク質を設計した。

■ N末端にSpyTag/Catcher挿入



■ C末端にSpyTag/Catcher挿入

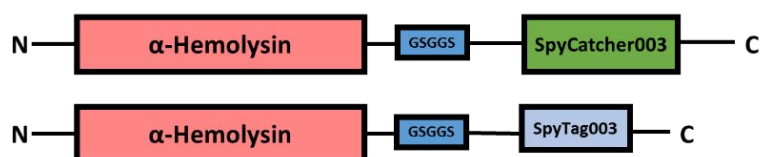


図 2-5. 構築したプラスミドがコードするタンパク質の 1 次構造

構築した DNA を用いて無細胞タンパク質合成を行い、SpyTag/SpyCatcher の反応活性を確認した Western Blot の結果を以下の図 2-6 に示す。

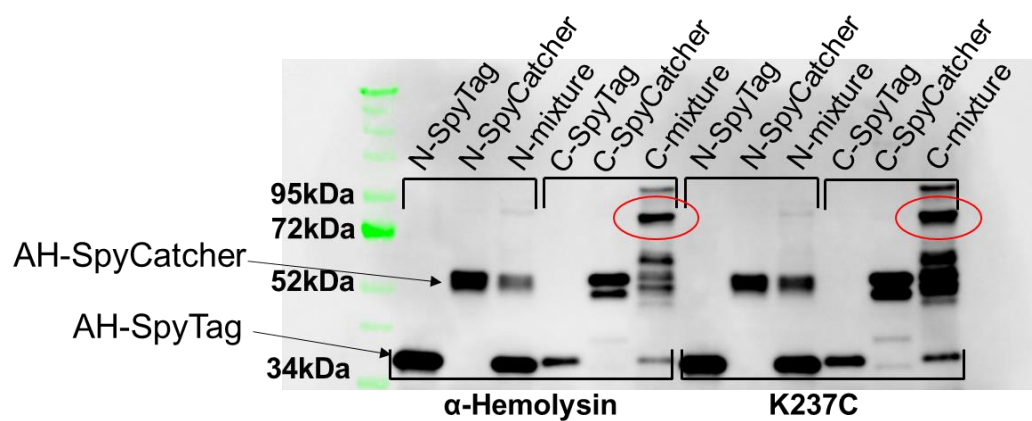


図 2-6. SpyTag/SpyCatcher の位置検討

N-, C-はそれぞれ N 末端, C 末端に SpyTag または SpyCatcher を挿入したタンパク質を表す。

N 末端に SpyTag/SpyCatcher を挿入した場合は SpyTag/SpyCatcher が反応できず、C 末端に挿入した場合のみ反応した。

以上の結果より、AH の C 末端に SpyTag/SpyCatcher を機能的に挿入できることが示されたため、AH-C- SpyTag/SpyCatcher 及びそれらの K237C 変異体の大腸菌発現・精製を行った。精製タンパク質の SDS-PAGE の結果を以下の図 2-7 に示す。

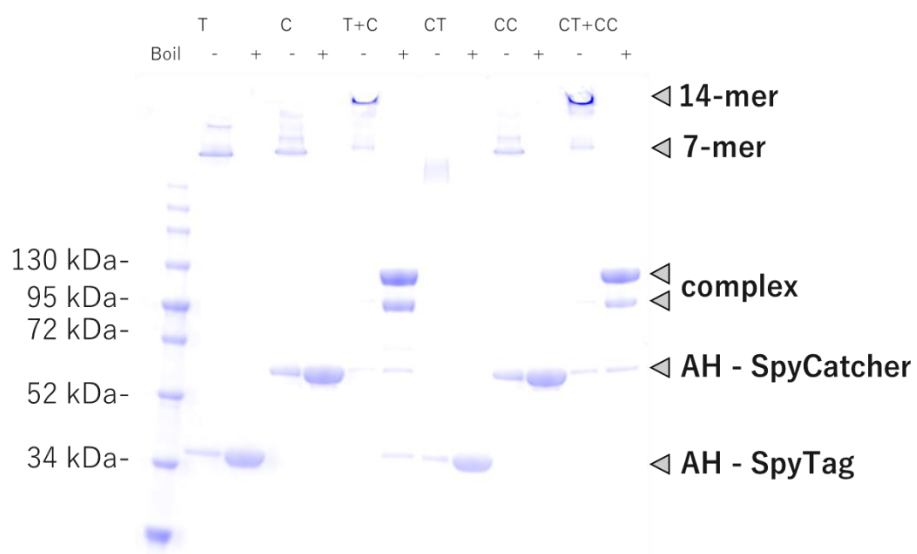


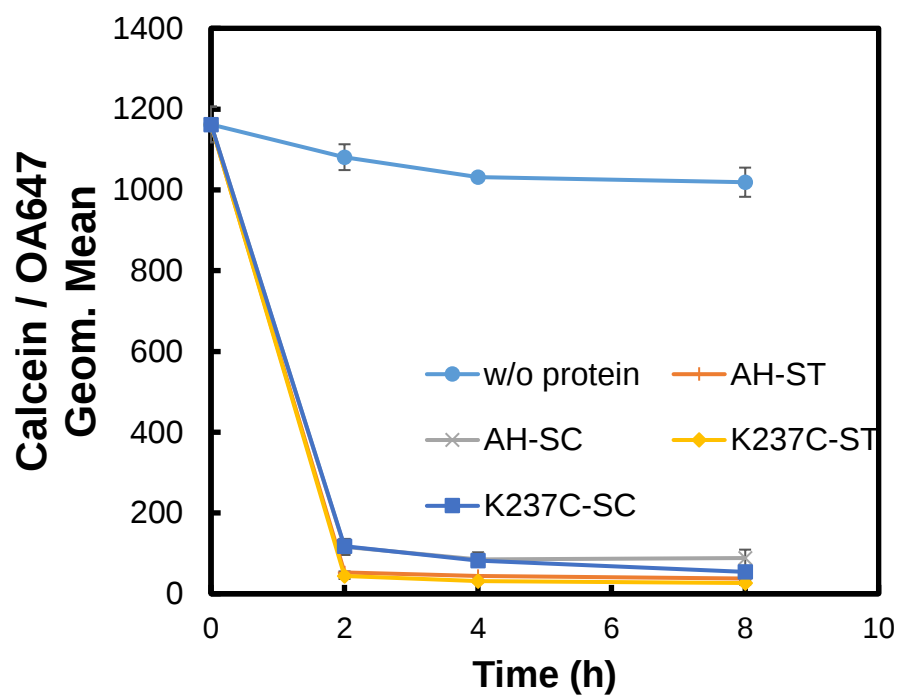
図 2-7. 精製タンパク質 SDS-PAGE

それぞれ SDS サンプルバッファー中で 95℃, 15 分ボイルしたものとしていないものをアプライした。ボイルしていないサンプルではポリアクリルアミドゲルのウェル内に 14 量体と考えられるタンパク質が泳動されずに残っている。ボイルしたサンプルでは 7 量体と考えられるバンドが消失している。

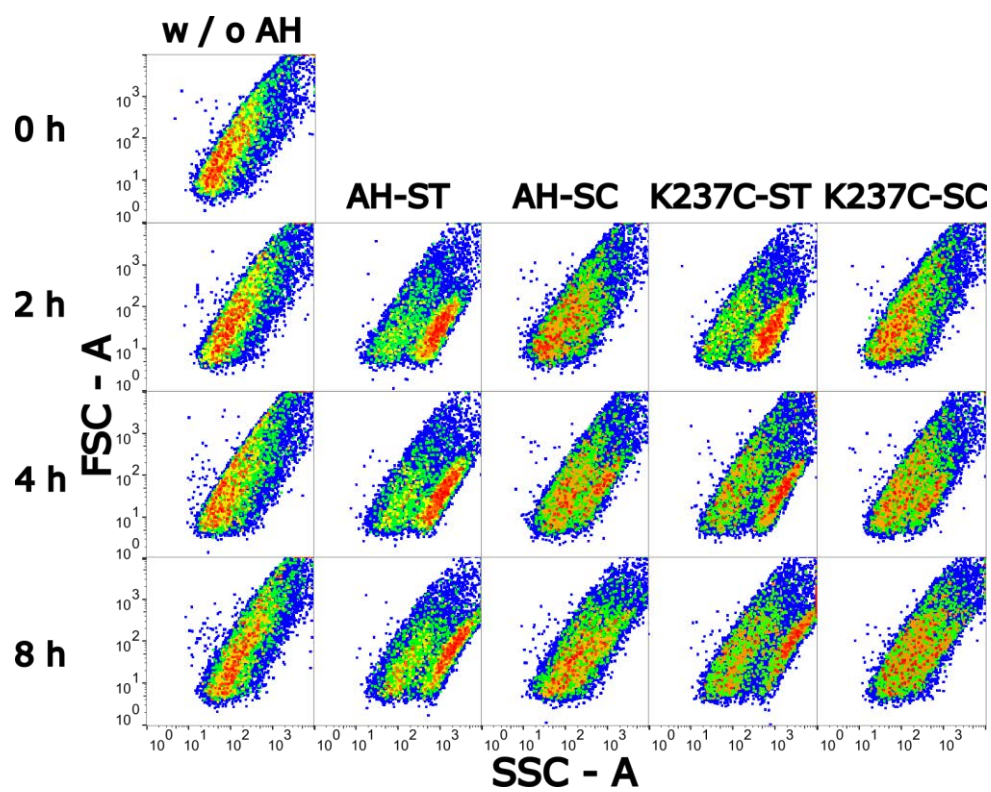
図 2-7 に示すように、AH-C- SpyTag/SpyCatcher は混合するだけで 7 量体よりも大きな複合体とすることが示唆された。

精製 AH のポア形成活性を確認するためのフローサイトメトリーの結果を以下の図 2-9 に示す。

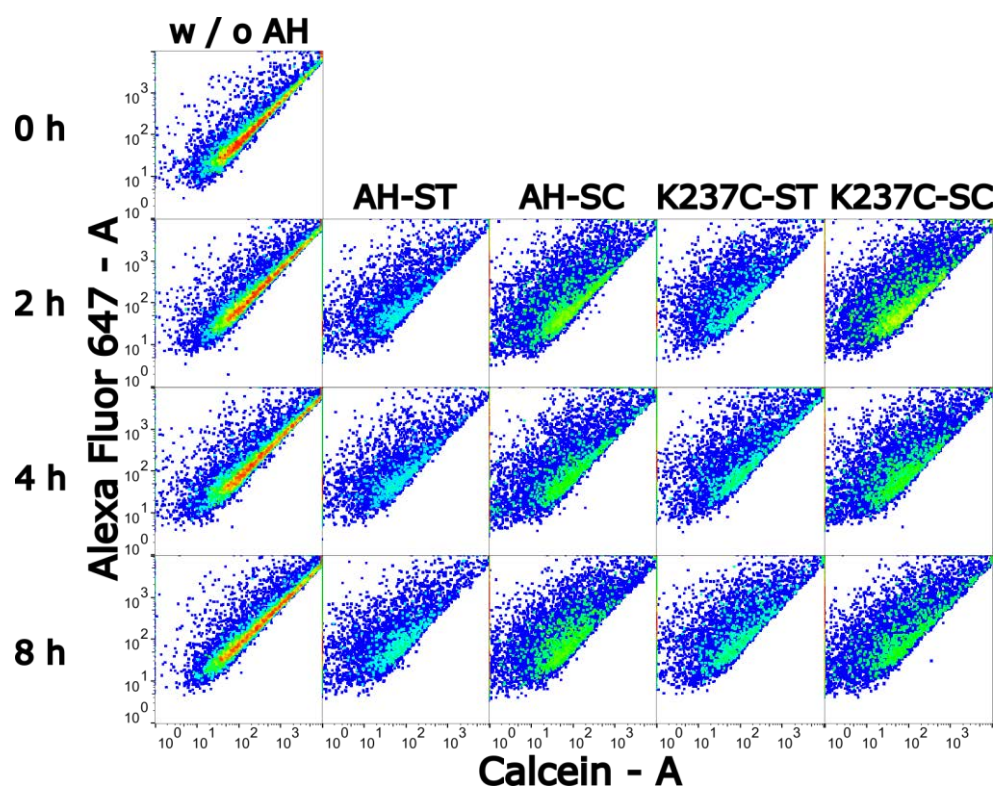
(a)



(b)



(c)



(d)

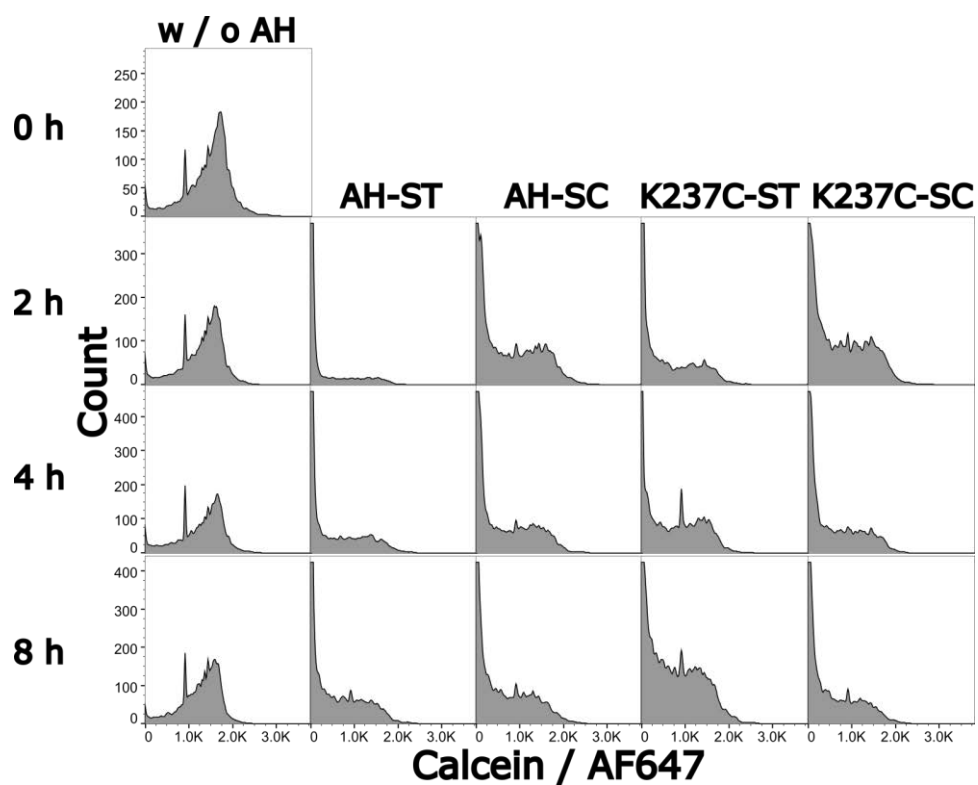


図 2-9. カルセイン漏出アッセイ

(a) OA647 で規格化したカルセイン蛍光の幾何平均 4 種すべてのタンパク質でカルセインが漏出した。(b) FS(前方散乱光)-SS (側方散乱光)プロット FS は粒子サイズと関連し、SS は粒子内部の屈折率分布の複雑さと関連する。AH を挿入した GUV では SS が増大した集団が見られた。(c)AF647-Calcein 蛍光プロット AH 添加により OA647 が漏出せずカルセイン蛍光のみが減少している。(d)OA647 規格化カルセイン蛍光の粒子数ヒストグラム

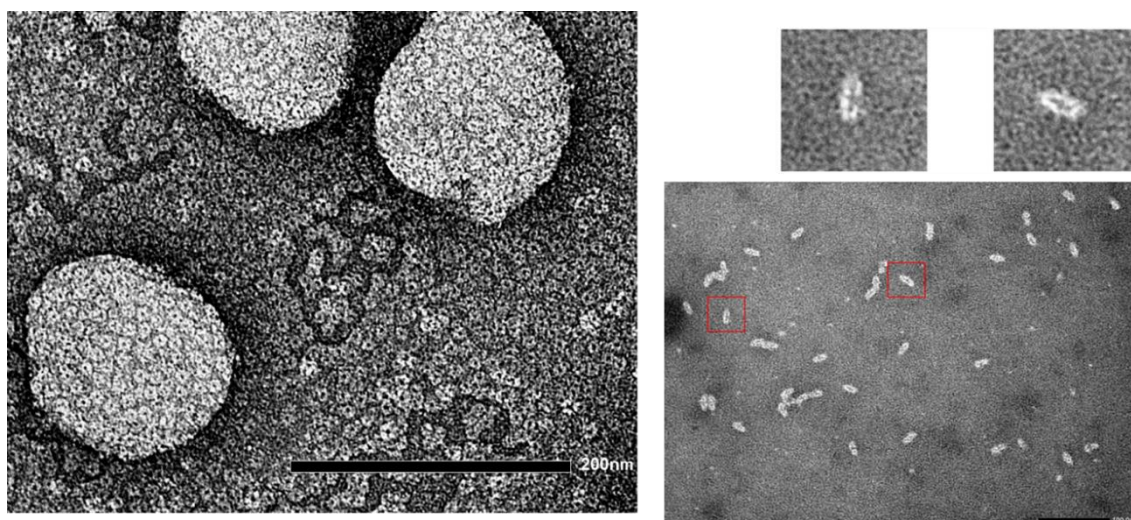


図 2-10. AH-SpyTag と LUV(左)及び

AH-SpyTag と AH-SpyCatcher の混合物(右)の TEM 像

LUV に α ヘモリシンポアが密集している様子がみられる(左)

AH-SpyTag と AH-SpyCatcher の混合物は、14 量体のように見える粒子が主成分であった

以上の結果より、AH の C 末端に SpyTag/SpyCatcher を挿入したタンパク質は、SpyTag/SpyCatcher の結合活性および脂質膜ナノポア形成活性を維持していることが示された。また、SDS-PAGE の結果より、精製 AH-SpyTag/SpyCatcher 溶液は 7 量体と単量体の混合物であり、その等量混合物は 14 量体とみられる高分子量の複合体となることが示唆された。そのため、AH-SpyTag/SpyCatcher の混合物、AH(K237C)-SpyTag/SpyCatcher の混合物をサンプルとして、クライオ電子顕微鏡トモグラフィーによる 14 量体の構造決定を行った。構造決定の結果を以下の図 2-11 に示す。

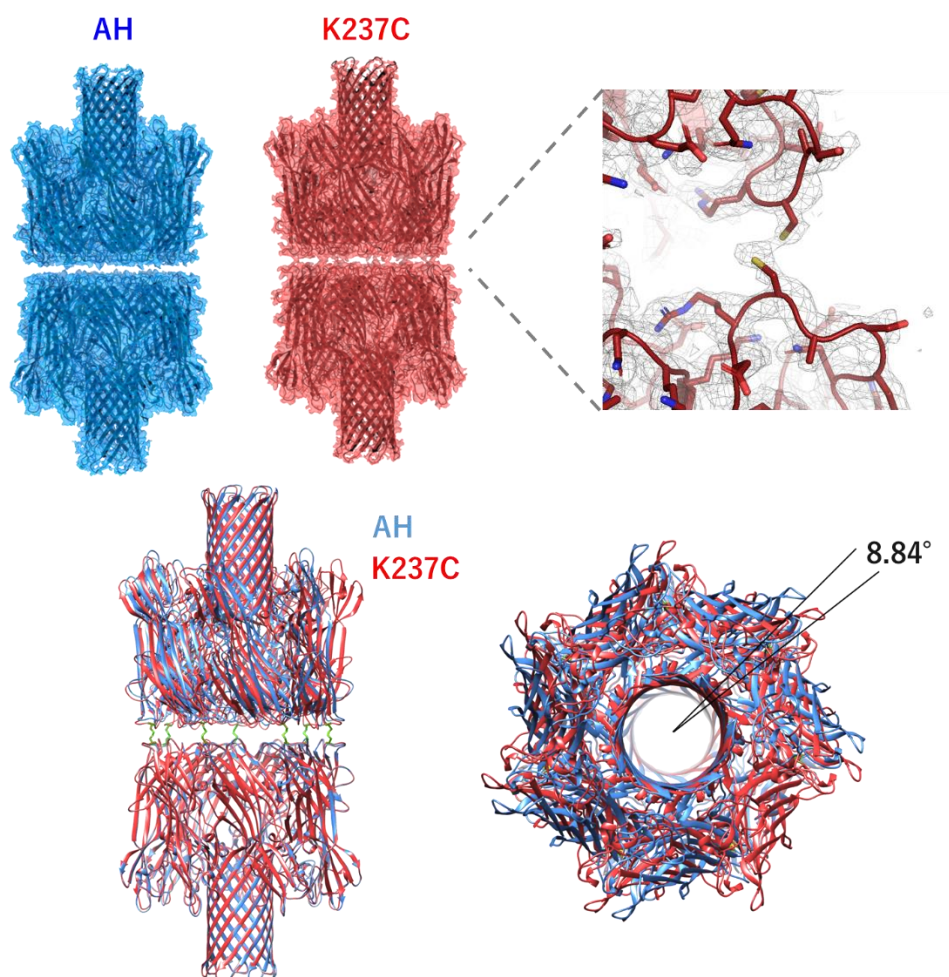


図 2-11. AH-14 量体のクライオ電子顕微鏡構造

上段：AH-14mer の電子密度分布 K237C 間のジスルフィド結合が観察された

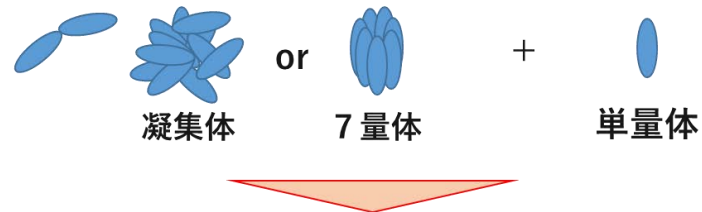
下段：構造精密化後の構造重ね合わせ システイン変異によってヘモリシンポアが約 8.84° 回転し約 0.94 Å 接近していた。角度及び変位の計算は Chimera を用いて行った。構造解析の結果、SpyTag/SpyCatcher 部分以外の AH-14 量体の 2.2 Å 分解能での構造決定に成功し、設計通りに 14 量体ナノポア複合体が形成されていることが示された。設計段階では、K237C 変異によってヘモリシンポアが接近することを期待したが、ジスルフィド結合形成がなくとも原子レベルでほぼ隙間のないポアが導通した構造を取ることがわかった。

2.4 考察

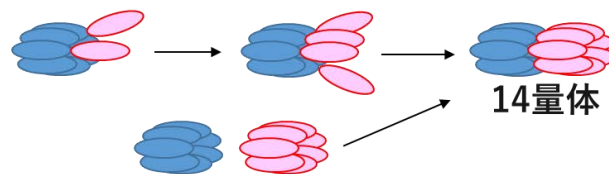
図 2-9 のカルセイン漏出アッセイの結果では、カルセインが漏出したベシクルと漏出していないベシクルが 2 次元プロット上で見られた。一方で、図 2-10 の LUV と AH-SpyTag の混合物の電子顕微鏡像では、リポソーム粒子全体に AH ナノポアが密集している様子が観察された。これは、脂質とタンパク質の濃度比の違いによるものだと考えられる。リン脂質分子 1 つ（表裏 2 つ）が占有する面積が 0.65 nm^2 [65]、AH7 量体ナノポアが占有する面積が 56.7 nm^2 であるとして計算すると、図 2-10 の実験条件(脂質 0.3 mg/mL , AH $8 \mu\text{M}$)では、AH がすべて脂質二重層に挿入された場合の脂質膜の AH 被覆率(AH ナノポア総面積 / 脂質膜総面積)は約 18%となる。一方、図 2-9 の GUV からのカルセイン漏出実験の条件(AH $1.5 \mu\text{M}$)では、GUV の内液に対する収率が 0.2、粒子径分布が $10 \mu\text{m}$ を最頻値とする対数正規分布(図 S2-3)に従うと仮定した数値計算(使用した Python コードは 2.6 参考に示した)によると、脂質膜の AH 被覆率は 0.08% ($20 \mu\text{m}$ の GUV に対して平均で約 18000 個の AH ナノポア)となる。実際には完全に均一に GUV 粒子に AH が挿入されるわけではないため、GUV からのカルセイン漏出実験では一部の AH が多く挿入された GUV 粒子からカルセインが漏出したと考えられる。

本研究では、人工多細胞システムの形成に必要な細胞同士の接着及び接触型細胞間コミュニケーションを行う設計された分子ツールとして、コネキシン様融合タンパク質 AH-SpyTag/SpyCatcher を設計した。このタンパク質は、精製したものを SpyTag/SpyCatcher のペプで混合するだけで設計通りに 14 量体を形成した。SpyTag/SpyCatcher の反応は不可逆的であるため、溶液中のタンパク質が AH 単量体のみからなる場合、乱雑な凝集体を形成してしまいう可能性も考えられた。しかし、実際には精製した当タンパク質は明示的には脂質膜が存在しないにもかかわらず単量体と 7 量体の混合物であったため、以下の図 2-14 に示すような機構によって 7 量体 AH が相方の AH の 7 量体化を促進して自発的に 14 量体を形成したと考えられる。

- 予想される精製タンパク質溶液の状態



- 7量体の割合が高い場合



AH-SpyTag(Catcher)- 7量体が
AH-SpyCatcher(Tag)をリクルートし、
7量体化を促進

図 2-14. 推定される 14 量体形成の過程

2.5 要約

本研究では、リボソーム型人工細胞がナノポアを介して接合した多細胞構造をボトムアップに形成するために、リボソーム間の2枚の脂質膜を超えて内部同士を導通させる構造を持った融合タンパク質 AH-SpyTag/SpyCatcher を構築した。このタンパク質は α -ヘモリシンの脂質膜ナノポア形成活性と SpyCatcher – SpyTag の結合活性を維持しており、変性条件で精製することができた。クライオ電子顕微鏡トモグラフィーにより、このタンパク質は混合するだけで α -ヘモリシンが頭合せに結合した14量体構造を取ることを示された。

2.6 参考

AH-SpyTag/SpyCatcher が設計通りの構造を取ることが確認されたため、実際にこのタンパク質が細胞に見立てた 2 種の GUV をナノポアを介して結合させることができるか検証を行った。フローサイトメトリーによる GUV 接着アッセイの結果を以下の図 S2-1 に示す。

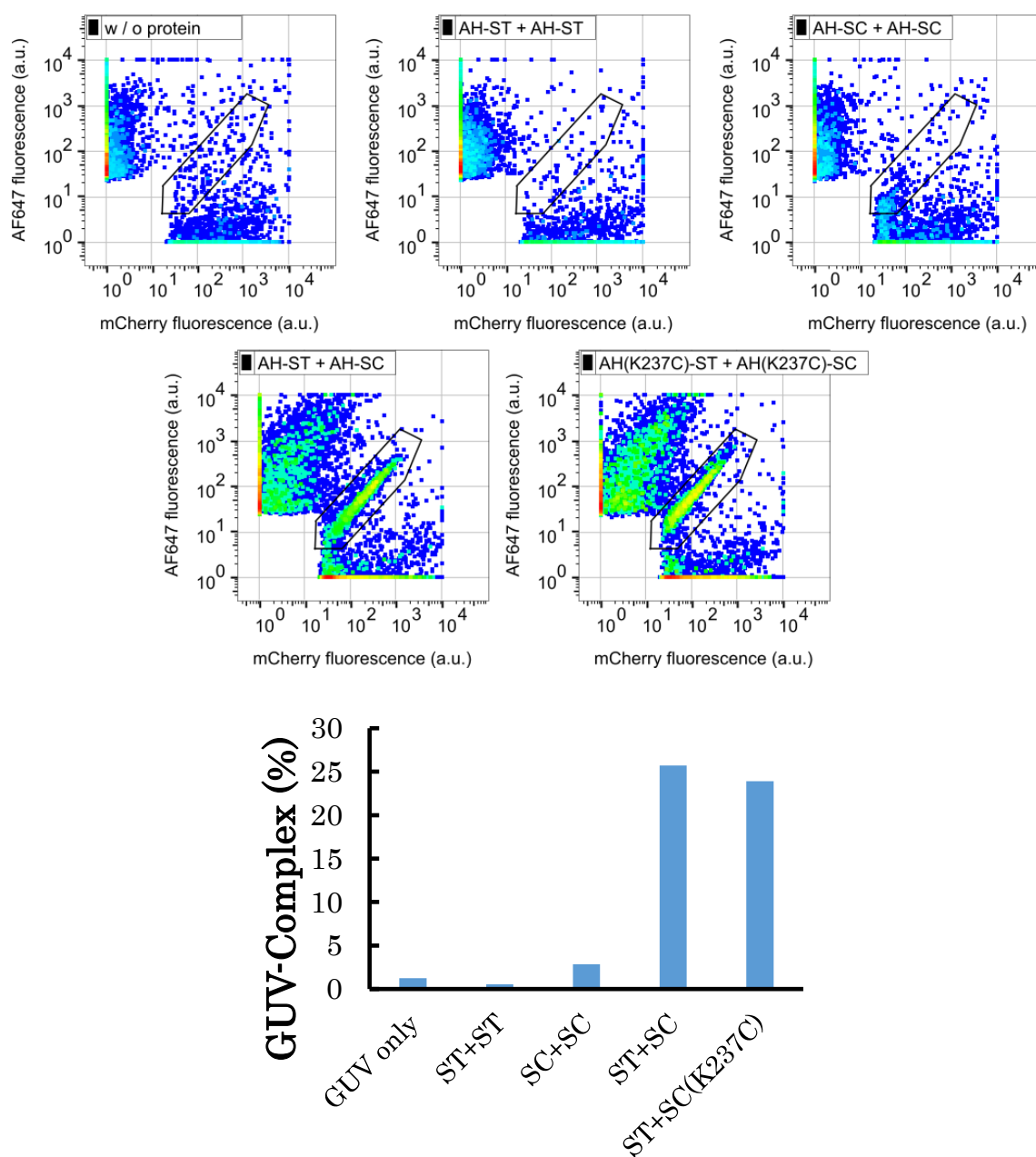


図 S2-1. GUV 接着アッセイ

ST; SpyTag, SC; SpyCatcher と表記。ST, SC のペアが成立した場合にのみ OA647-GUV と mCherry-GUV 両方の蛍光を持つ複合体の集団が出現した。

図 S2-1 に示すように、実際に本タンパク質は SpyTag/SpyCatcher の活性により GUV を特異的に結合させることが可能であることが示唆された。しかし、図 S2-2 に示すように、

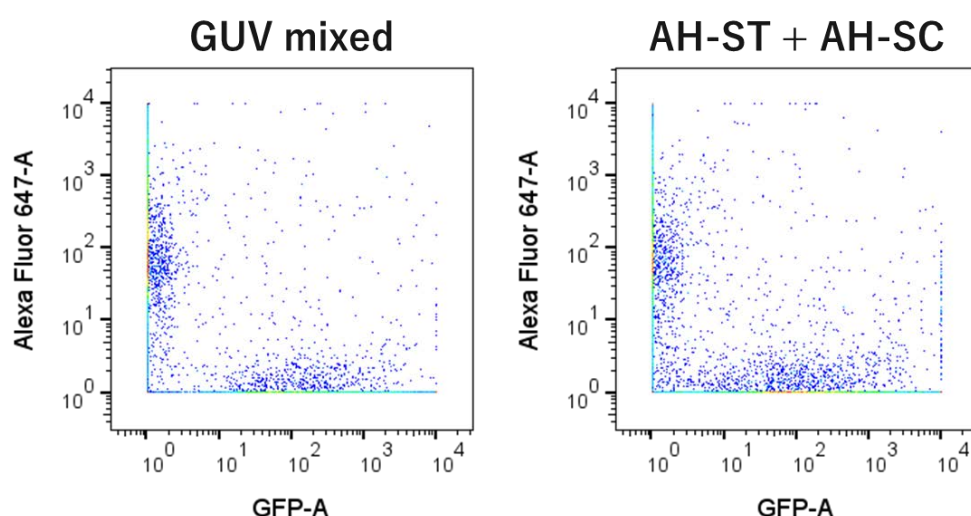


図 S2-2. GUV 接着アッセイ (失敗例)

SpyTag, Spycatcher のペアを成立させても GUV 結合が見られない場合が本研究では多くなり、AH-SpyTag/SpyCatcher による GUV 接着は再現性に問題があった。

AH-SpyTag/SpyCatcher は設計通りに 14 量体化することが示されたものの、GUV 同士を再現性良く結合させるには不十分であった。これは、この精製タンパク質溶液には AH 7 量体が含まれ、既に形成された 7 量体は新たなボア形成活性がない上、疎水性部分が溶液に露出しているため凝集しやすいことが原因の 1 つとして考えられる。今後、リポソーム人工細胞系においてミニマムな人工多細胞組織を形成するためには、凝集の可能性が低い人工細胞

内部での無細胞合成・自発的膜挿入を利用できる、新たな接合ナノポアタンパク質の設計 [66]などが有望だと考えられる。

・GUV 脂質膜に対する AH ナノポア占有面積の比を計算する Python コード

```
-----  
import matplotlib.pyplot as plt  
  
import numpy as np  
  
import math  
  
pi = math.pi  
micro = 0.000001  
  
def log_normal_distribution(sigma, mu, x):  
    y = (1.0 / (x*np.sqrt(2.0*pi*sigma*sigma)))*np.exp(-((np.log(x) - mu)**2) / (2.0*(sigma**2)))  
    return y  
  
x = np.linspace( 0, 40*micro, 70)    # linspace(min, max, N) で範囲 min から max を N 分割  
  
mu = -11.36  
  
sigma = np.sqrt(11.512925465 + mu) # 最頻値が r=10μm と仮定  
  
y = log_normal_distribution(sigma, mu, x)  
  
plt.plot(x, y) #対数正規分布のプロット  
  
plt.show()
```

#数値積分(台形公式)で半径 $r=2\mu\text{m}\sim 40\mu\text{m}$ までの GUV の体積の累計を求める

#内液の体積 $20\mu\text{L}$

Inner_sol_vol = $2.0 \times 10^{(-8)}$

#AH7 量体 1 つが専有する面積

#直径 8.5nm

AH_s = $5.674501730546563849 \times 10^{(-17)}\text{m}^2$

#AH 単量体の濃度

concAH = $1.5\mu\text{M}$

#アボガドロ数

avoN = $6.02214076 \times 10^{23}$

#反応溶液の体積($50\mu\text{L}$)

solV = $0.5 \times 10^{(-7)}$

#AH が占める面積

AH_surface = $\text{AH_s} \times \text{concAH} \times \text{micro} \times \text{avoN} \times \text{solV} / 7$

#分割数

dN = 10000

#最大 GUV

r_max = $40 \times \text{micro}$

r_min = $2 \times \text{micro}$

短冊の幅 Δx

dx = $(r_{\text{max}} - r_{\text{min}}) / dN$

#GUV の濃度倍率

GUV_mult = $0.1538 \times 4 \times 4 \times \text{tube}$

```

#GUV の収率

Yield = 0.2

# 積分する関数(vol)の定義

def fv(x):

    return (4/3)*pi*(x**3)*log_normal_distribution(sigma, mu, x)

# 数値積分(体積)

s = 0

for i in range(1,dN-1):

    x1 = r_min + dx*i

    x2 = r_min + dx*(i+1)

    f1 = fv(x1)    # 上底

    f2 = fv(x2)    # 下底

    s += dx * (f1+f2)/2

# 結果の表示

print(s)

#GUV の総数

print("GUV_num")

n=Inner_sol_vol*Yield*GUV_mult/s

print(n)

# 積分する関数(表面積)の定義

def fs(x):

```

```

    return 4*pi*(x**2)*log_normal_distribution(sigma, mu, x)

# 数値積分

s = 0

for i in range(1,dN-1):

    x1 = r_min + dx*i

    x2 = r_min + dx*(i+1)

    f1 = fs(x1)    # 上底

    f2 = fs(x2)    # 下底

    s += dx * (f1+f2)/2

GUV_Surface = s*n

# 結果の表示

print("AllGUV_Surface(m^2):")

print(GUV_Surface)

print("AllAH_surface(m^2):")

print(AH_surface)

print("surface percentage(%)")

surface_percentage = AH_surface/GUV_Surface

print(surface_percentage*100)

_20umGUV_surface = 4*pi*(10**(-5))**2

N_perGUV = _20umGUV_surface * surface_percentage / AH_s

print("N_per20umGUV")

print(N_perGUV)

```

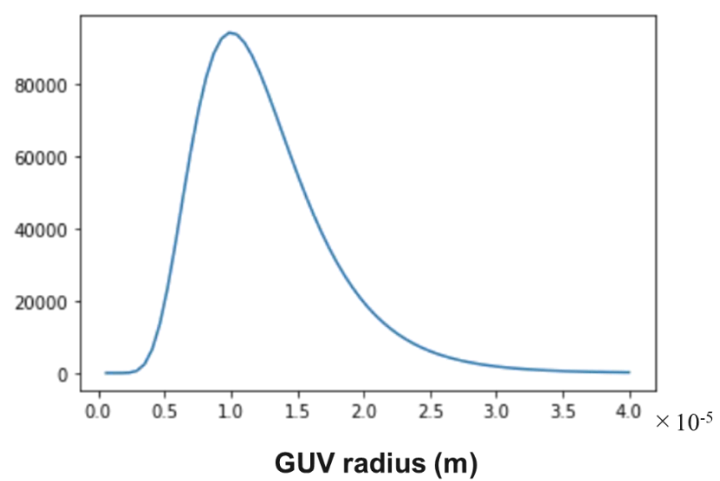


図 S2-3. GUV の AH 被覆率計算に用いた GUV 粒子径分布（対数正規分布）

第3章 リボスイッチを用いた人工細胞内発現制御

3.1 緒言

再構成型無細胞転写翻訳系[67]をリボソームなどの区画に封入した人工細胞[16][17][68]は、バイオリアクターの開発[69]、バイオセンシング[70]、膜タンパク質の指向性進化[71]、生命の起源に関する研究[72]、治療用分子ロボットのシャーシ[73][74]などの様々な用途に用いられるプラットフォームである。無細胞翻訳系を封入した人工細胞においても転写制御は最も一般的な遺伝子発現制御の段階である[75][76]が、無細胞転写翻訳系は mRNA 分解系を欠く[77]ため、転写制御による遺伝子発現のスイッチ制御は困難である。遺伝子発現のスイッチング制御のために、光応答性分子を用いた転写翻訳反応制御[78][79]や、RNA 分解系の導入[80][81][82]などが行われてきた。それらに加えて、人工リボスイッチ[83][84][85]を用いた翻訳制御が、遺伝子発現の開始・停止制御を可能にする簡便な解決策となると考えられる。これまでに、人工細胞内で人工リボスイッチを用いた翻訳制御を検討した例[86]、転写制御と組み合わせて複数の細胞間で複雑な遺伝子制御カスケードを構築した例[75][87]や、ヒスタミンに応答して自己分解を誘導した例[88]はあるが、直交性のある2種のリボスイッチを用いて、2種類のタンパク質発現を独立に制御し、タンパク質発現の順序を制御した例はない。

本研究では、膜透過性物質である ASP2905 及びテオフィリンに応答するリボスイッチ AC17, Theo-3c を用いて 2 種類のタンパク質発現を独立に制御し、無細胞翻訳系を封入した人工細胞内におけるタンパク質発現順序のスイッチング可能な制御を実証した。

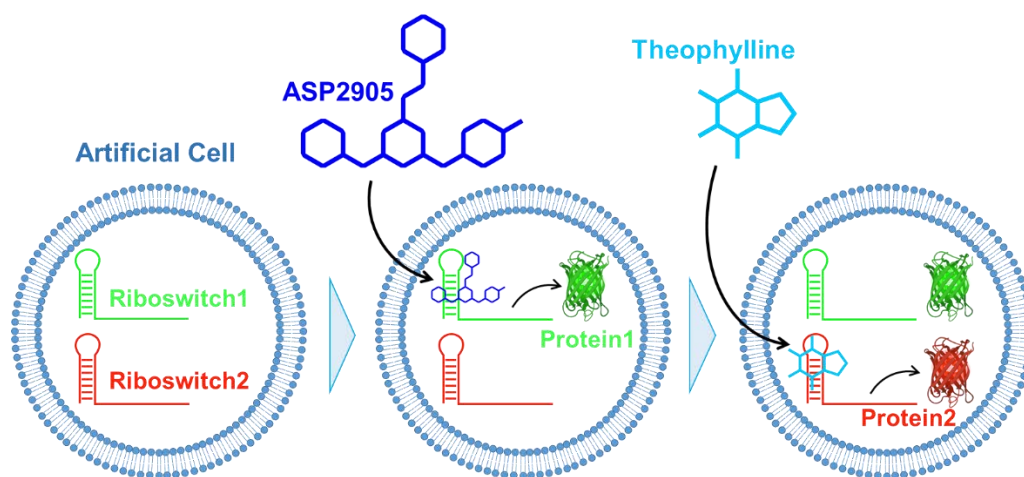


図 3-1. 本研究の概略

リボスイッチ AC17-5c / Theo-3c

リボスイッチは、特定の分子の結合によって翻訳を抑制または可能にする、mRNA の 5'-UTR に付加された翻訳制御配列である[89]。リボスイッチは細菌や植物において天然でも見られる[32]が、SELEX 法[90]および自由エネルギー計算などによって合理的に de novo 設計することも可能である[91]。典型的なリボスイッチの原理を以下の図 3-2 に示す。

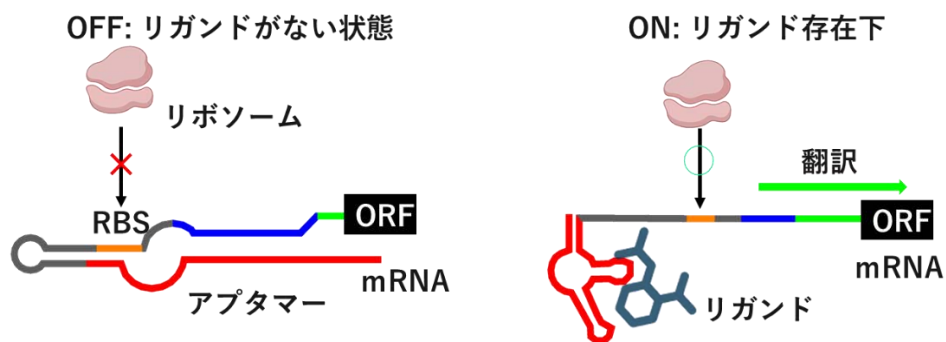
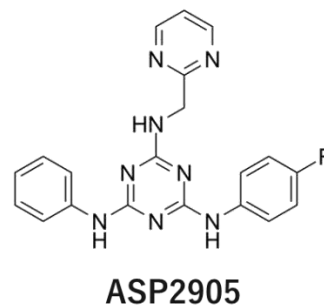
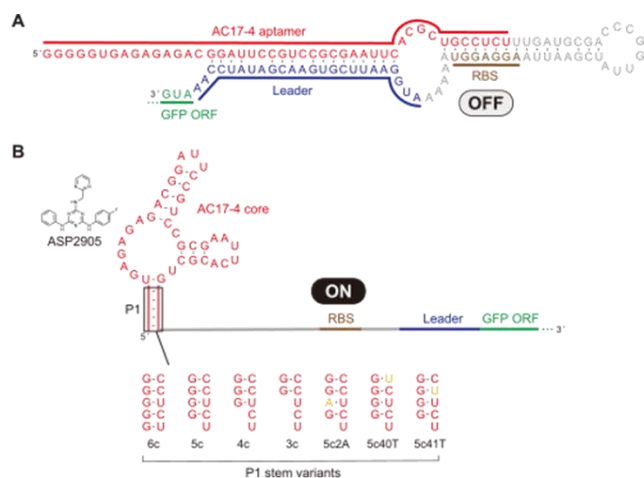


図 3-2. ON 型リボスイッチの原理

リガンドがない状態では、そのアプタマー配列はアプタマーのコンフォメーションを取らず、リボソーム結合部位（RBS, 原核生物型の場合シャイン・ダルガノ配列）と相補性により結合している状態がエネルギー的に安定となっている。そのため、リボソーム結合部位にリボソームが結合できなくなっている。リガンドが加えられると、リガンドと結合したアプタマーコンフォメーションがより安定となり、リボソーム結合部位が露出してリボソームが結合できるようになり、翻訳が開始される。

本研究では、松浦研究室 福永圭佑 特任助教が新規に開発した人工リボスイッチ ASP2905 応答性 AC17-5c とテオフィリン応答性 Theo-3c を用いた。以下の図 3-3 に AC17-5c, Theo-3c の構造、ASP2905 及びテオフィリンの構造を示す。

AC17-5c(ASP2905応答性)



Theo-3c (テオフィリン応答性)

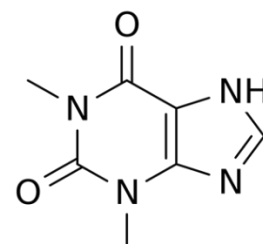
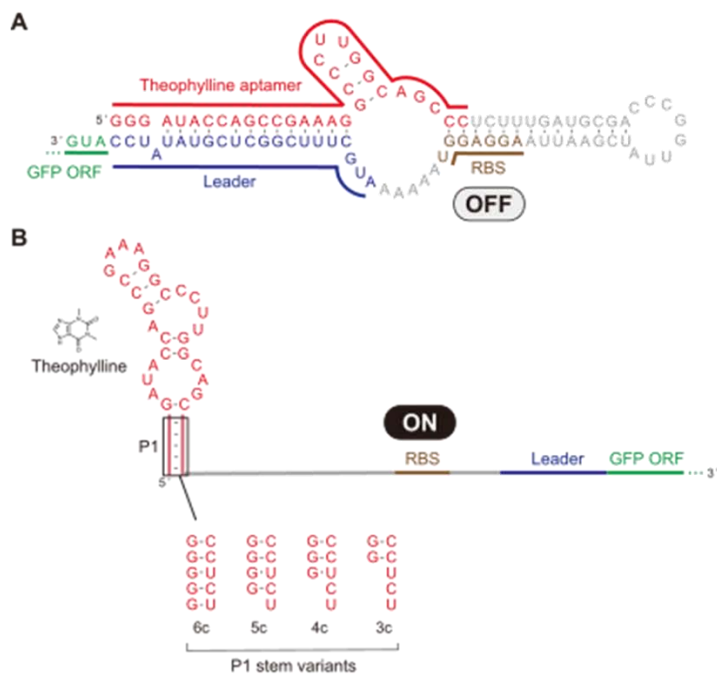


図 3-3. 本研究で用いたリボスイッチおよびそれらのリガンド

AC17-5c, Theo-3c は、各アプタマーステム部分の長さを変化させたバリエーションからスクリーニングによって得られた。

ASP2905[92][93][94]はカリウム電位依存性チャネル・サブファミリーH メンバー3 (KCNH3) の阻害剤としてアステラス製薬が開発した低毒性で細胞に取り込まれやすい（膜透過性の）低分子化合物である[95]。先行研究[95]で、そのアプタマーAC17-4 が得られており、AC17-

5c はそのアプタマーを利用して無細胞翻訳系溶液中で翻訳制御できるよう設計されたリボスイッチである。テオフィリンは茶葉やカフェインの代謝産物として天然にも存在する気管支拡張薬であり、古くから RNA アプタマーが同定されている[96]化合物である。本研究では、研究室で新たに開発された従来のものよりもより高い ON/OFF 比を示す Theo-3c リボスイッチを使用した。

2 種のリボスイッチを用いて 2 つの遺伝子発現を独立に制御する技術を実証するために本研究で取得を目指すデータの疑似データを以下の図 3-4 に示す。

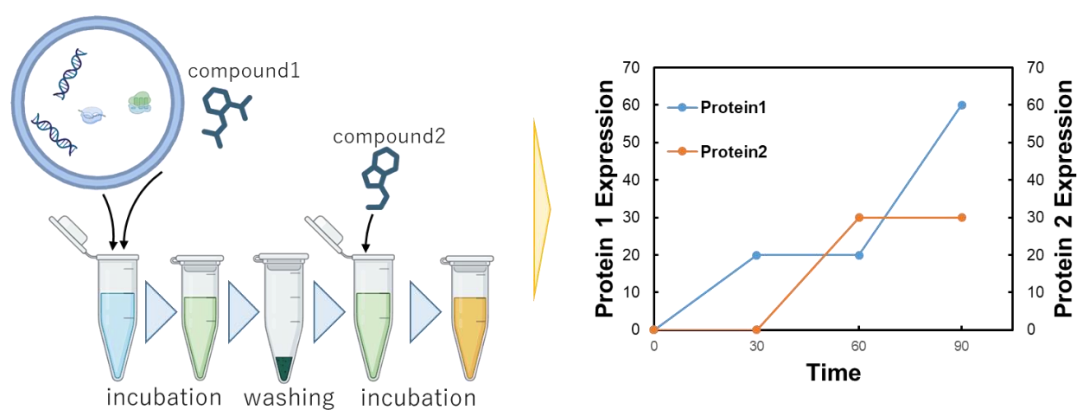


図 3-4. 本研究における実験の概略図及びその疑似データ

本研究の目的となる技術実証のために、化合物 1 (ASP2905) と化合物 2 (テオフィリン) をバッファー交換により入れ替えることで、図右のようなタンパク質発現タイムコースのデータを取得することを実験上の目的とした。

3.2 実験材料及び方法

無細胞タンパク質合成(CFPS)用 LinearDNA 作製

本研究で用いたプラスミド pIVEX2.3-AC17-5c-frGFP(folding reporter GFP)は福永圭佑さんより恵与頂いた。Theo-3c-mScarlet-I3 プラスミドは Eurofin 人工遺伝子合成で委託合成・購入した。2種のプラスミドそれぞれ 3 ng をテンプレート、T7F/T7R をプライマーとして KOD-Plus-Neo(東洋紡)で 50 μ L $\times$ 4 スケールで PCR 増幅を行い、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (MACHEREY-NAGEL)で濃縮・精製した。NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific)で 260 nm 吸光度測定を行うことで濃度を測定し、超純水で希釈して濃度を 100 nM に調整した。

プレートリーダーによる蛍光測定

CFPS 反応 (10 μ L スケール) は、超純水 (1.5 μ L)、PUREfrex1.0 solution I (5 μ L)、Solution II (0.5 μ L)、SolutionIII (0.5 μ L)、1 μ M Alexa Fluor 647 hydrazide (0.5 μ L)、10 $\times$ リガンド (1 μ L)、50ng/ μ L テンプレート DNA (1 μ L) / チューブで行った。10 $\times$ リガンド溶液 (1%DMSO 中 100 μ M ASP2905 ; 10%DMSO 中 10 mM テオフィリン) は毎回新しく調製したものを使用した。チューブをサーマルサイクラー (T100、Bio-Rad) で 37°C、3 時間インキュベートした後、0.1% Tween20 を加えたダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (D-PBS) を等量 (10 μ L) 加えた。18 μ L の混合液を 384 ウェルブラックプレートに移し、マイクロプレートリーダー (Synergy H1、BioTek) で蛍光 (GFP は励起 490nm、発光 520nm、Alexa Fluor 647 は励起 650nm、発光 680nm) を測定した。バックグラウンド蛍光を GFP と AF647 蛍光値から差し引いた。GFP 蛍光はウェル間のばらつきを考慮し、AF647 蛍光で正規化した。相対蛍光値は、標準としてリボスイッチなしの GFP 発現量から計算した。ON/OFF 比は、リガンドありの GFP/Alexa Fluor 647 の値をリガンドなしの値で割って算出した。棒グラフとデータプロットは、GraphPad Prism software 10 (GraphPad Software) を用いて作成し、非線形曲線フ

フィッティングは以下の式を用いて行った。

$$Y = Y_{min} + \frac{Y_{max} - Y_{min}}{1 + (\frac{EC_{50}}{X})^h}$$

Y_{min} : 最小の蛍光値

Y_{max} : 最大の蛍光値

EC_{50} : 50%効果濃度

X : リガンドのモル濃度

h : ヒル係数

CFPS のリアルタイム測定

CFPS による蛍光タンパク質合成のリアルタイムモニタリングは、適切なフィルターセット (frGFP は励起: 492 nm, 蛍光: 516 nm, mScarlet-I3 は励起: 545 nm, 蛍光: 568 nm) を設定したリアルタイム PCR 装置 (Stratagene, Mx3005P) を用いて行った。CFPS 反応は ASP2905(in 1% DMSO)またはテオフィリン(in 1% DMSO)溶液を終濃度 10 μ M(ASP2905), 1 mM(テオフィリン)となるように加えて PCR チューブ内, 20 μ L スケール、37°Cで行った。

GUV 作製

PUREfrex 1.0 を封入したリポソームは、[63]で報告された方法に若干の変更を加えた油中水滴エマルジョン界面通過法を用いて調製した。まず、16 μ L の Egg-PC : Cholesterol = 8 : 2(1 種のリボスイッチの実験)または 6:4(顕微鏡用サンプルと共用である 2 種のリボスイッチを用いた直交制御の実験; 凝集抑制とガラス面への固定化のために、DSPE-PEG(2000)

Biotin(Avanti, 880129)を脂質量に対して 1.2 wt%となるように加えた)の混合物 (100 mg/mL クロロホルム溶液) をガラスチューブ(マルエム, ミクロチューブ 透明 1.5mL No.2)に入れ、窒素ガスを吹き付けてクロロホルムを蒸発させて脂質膜を形成した。200 μ L の流動パラフィン (CAS 番号 8042-47-5、富士フイルム和光純薬) を加えた後、チューブをボルテックスし、70°Cで数分間インキュベートした。さらに 30 秒間ボルテックスした後、70°Cで数分間インキュベートした。室温まで冷却した後、CFPS 用成分を含む内溶液 20 μ L を流動パラフィン溶液に注入した。内液 (20 μ L / ガラスチューブ) は、氷上で PCR チューブに、1 $\times$ PUREfrex1.0 solution I、PUREfrex1.0 solution II、PUREfrex1.0 solution III、5 nM テンプレート DNA、1.2 μ M OA647、20 mM HEPES-KOH[pH7.6]、250 mM グルタミン酸カリウム、120 mM スクロース、280 mM グルコース、および 0.8 U/ μ L RNase inhibitor (東洋紡, 元濃度 40U / μ L) を混合して調製した。再現性のために、内液調製の際、スクロース、グルコース、グルタミン酸カリウム、HEPES についてはそれらを事前に混合した 2 $\times$ ストック溶液を用いた。液体パラフィン中の内液エマルジョンを 1.5 mL チューブラックに沿って機械的に攪拌し、30 秒間ボルテックスしてエマルジョンを得た。このエマルジョン溶液を 200 μ L の外液 (0.5mM 各 20 アミノ酸、1.5mM ATP および GTP、0.5mM CTP および UTP、1 mM スペルミジン、1mM クレアチンリン酸、1mM ジチオスレイトール、20mM HEPES-KOH[pH7.6]、250 mM グルタミン酸カリウム、18 mM 酢酸マグネシウム、400 mM グルコース) を加え、スイングローターをセットした微量遠心機 (タカラトミー、MX-307) を用いて、15000G、20°Cで 5 分間遠心した。微量遠心チューブの底に皮下注射針 (21 G; 0.8 $\times$ 13 mm) で穴を開け、沈殿したリポソームを含む水層を穴から回収し、別の 1.5 mL チューブに移した。回収した GUV はピペッティングで再懸濁した。リボスイッチで制御されたレポーター遺伝子のタンパク質発現をトリガーするため、外側の溶液を 20 μ M ASP2905 または 2 mM テオフィリンを添加した溶液に交換した。CFPS 反応は 37°Cで行い、サンプリング (各 10 μ L) は各時点で行った。リポソーム中での時間的遺伝子発現制御のために、リポソーム内のリボス

イッチリガンドをバッファー交換で除去した。バッファー交換はリポソームを 15000G、5 分間、4°Cで遠心分離して沈殿させ、リガンドを含まない外液(1% DMSO)を加える操作を 3 回繰り返して行った。インキュベート後、全サンプルについて次の測定/洗浄操作までは 30 分、15°Cでインキュベートしてから行うことで、mScarlet-I3 の成熟時間による遅れをわずかに補正した。

フローサイトメトリー

フローサイトメトリー (FCM) 分析は、FACSAria III (BD) を用いて行った。リポソーム懸濁液を緩衝液 (20 mM HEPES-KOH[pH 7.6], 250 mM グルタミン酸カリウム、18 mM 酢酸マグネシウム、400 mM グルコース) で約 10 倍に希釈し、FCM 分析に供した。サンプル 1 回の測定あたり合計 10,000 個のリポソーム粒子を測定した。データは FlowJo ソフトウェア (BD) で解析した。

共焦点顕微鏡観察

リポソーム中のリボスイッチ制御遺伝子発現の蛍光イメージングを、40 倍のオイルレンズと 90 μm のピンホールを備えた共焦点レーザー走査型顕微鏡 (LSM 900 with Airyscan 2, ZEISS) を用いて行った。frGFP と mScarlet-I3 の発現を、それぞれ 480 nm と 561 nm のレーザー励起を用いてモニターし、Zeiss Zen ソフトウェアを用いてレーザーを 2%に設定し、511 nm と 594 nm に発光ピークを集めた。サンプルは、BSA コーティングしたイメージンググラスディッシュ上でイメージングした。BSA コートグラスディッシュは、150 μL の 1% BSA を緩衝液 (20 mM HEPES-KOH、[pH 7.6]、250 mM グルタミン酸カリウム、18 mM 酢酸マグネシウム、400 mM グルコース) 中で 1 時間インキュベートした後、超純水ですすぎ、窒素ガスで乾燥させることによって作製した。穴あけパンチで約 1 mm の穴を開けたシリコーンゴムシートを BSA コーティンググラスディッシュのガラス面に圧着し、サンプルをそ

の約 1 mm のウェルの中に入れて撮影した。サンプルはステージトップインキュベーター (TOKAI HIT) を用いて 37°Cでインキュベートし、30 分時点でバッファー交換を行った。ASP2905 をできるだけ除去するため、100 nm VCTP フィルター(Merck Millipore)をウェルの穴の上に置き、その上部に外液バッファーを置いて 4 回バッファーを交換し、 mScarlet-I3 の発現を開始させるために、2 mM テオフィリン含有バッファー10 μ L を加えた。画像は ImageJ ソフトウェア (米国国立衛生研究所) を用いて解析・編集した。

3.3 実験結果

リボスイッチ 2 種で制御されたタンパク質発現系の特性評価

まず、リボソームを含まない無細胞翻訳系バルク溶液における AC17-5c-frGFP, Theo-3c-mScarlet-I3 発現系の特性評価を行った。その結果を以下の図 3-5, 3-6 に示す。

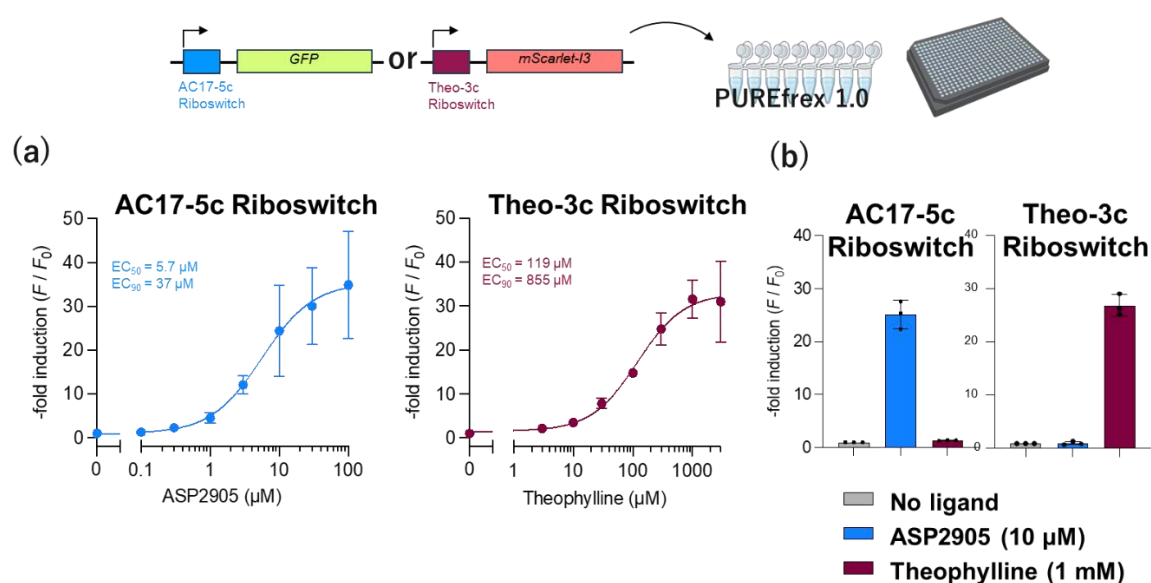


図 3-5. AC17-5c, Theo-3c リボスイッチのリガンド濃度依存性と直交性

(a) リボスイッチ 2 種で制御されたタンパク質発現のリガンド濃度依存性 カーブフィッティングにより、AC17-5c の 50%効果濃度は 5.7 μM , 90%効果濃度は 37 μM , Theo-3c の 50%効果濃度は 119 μM , 90%効果濃度は 855 μM であると見積もられた。

(b) リボスイッチ 2 種の直交性 これらのリボスイッチはアプタマーと一致するリガンドを加えたときのみ翻訳を開始し、一致しないリガンドには応答しない直交性のあるリボスイッチである。

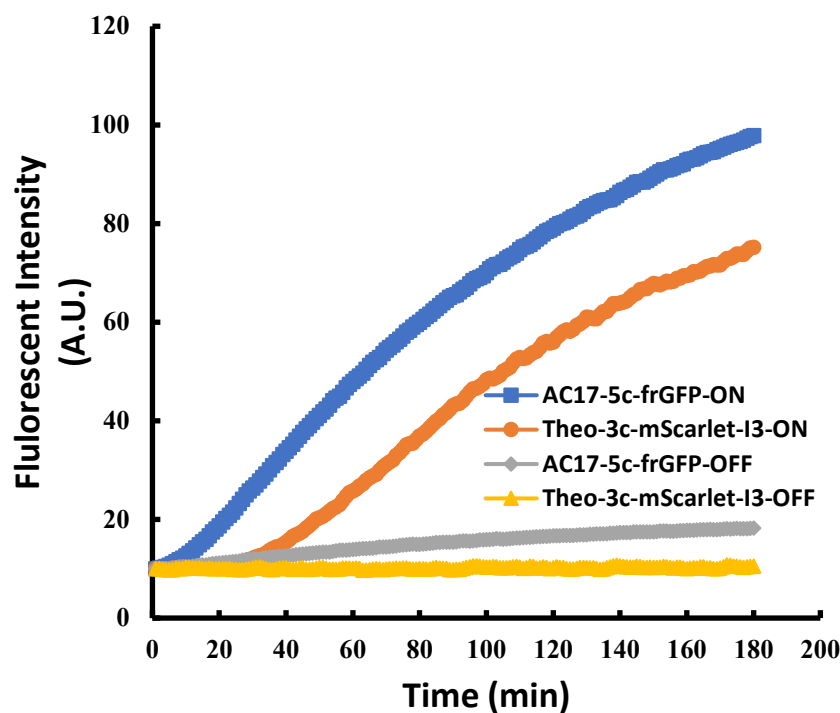


図 3-6. CFPS のリアルタイム測定の結果

蛍光値は体積マーカーAF647 で規格化した frGFP または mScarlet-I3 蛍光の値。

AC17-5c-frGFP 系では、60 分未満の領域ではほとんど線形に蛍光値が増大しており、frGFP のフォールディング時間は数分～15 分程度と見積もられる。mScarlet-I3 は、文献[97]では 2 分で発色団が成熟するとされているが、本実験系では CFPS 反応開始から 30 分程度遅れて蛍光増大が起きた。

以上の結果より、AC17-5c, Theo-3c リボスイッチは互いに直交性があり、ASP2905 については 10 μ M, テオフィリンについては 1 mM で十分に翻訳が ON 状態になることが示されたため、実際にそれぞれのリボスイッチ-レポータータンパク質系をコードする linearDNA を無細胞翻訳系とともに GUV 内に封入した人工細胞を作製し、まず 1 種ずつのリボスイッチについてリガンド添加-除去-添加を行うことで人工細胞内のタンパク質発現を制御できるか検証した。その結果を以下の図 3-7 に示す。

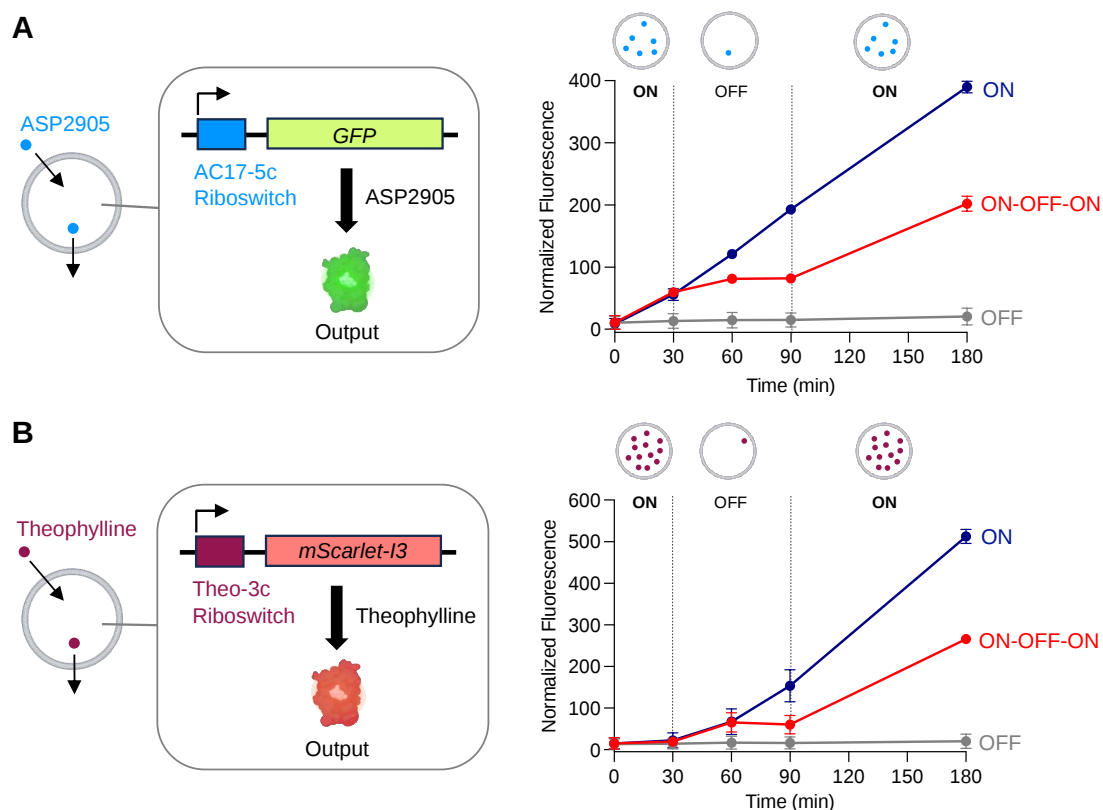


図 3-7. A) AC17-5c リボスイッチで制御された frGFP と (B) Theo-3c リボスイッチで

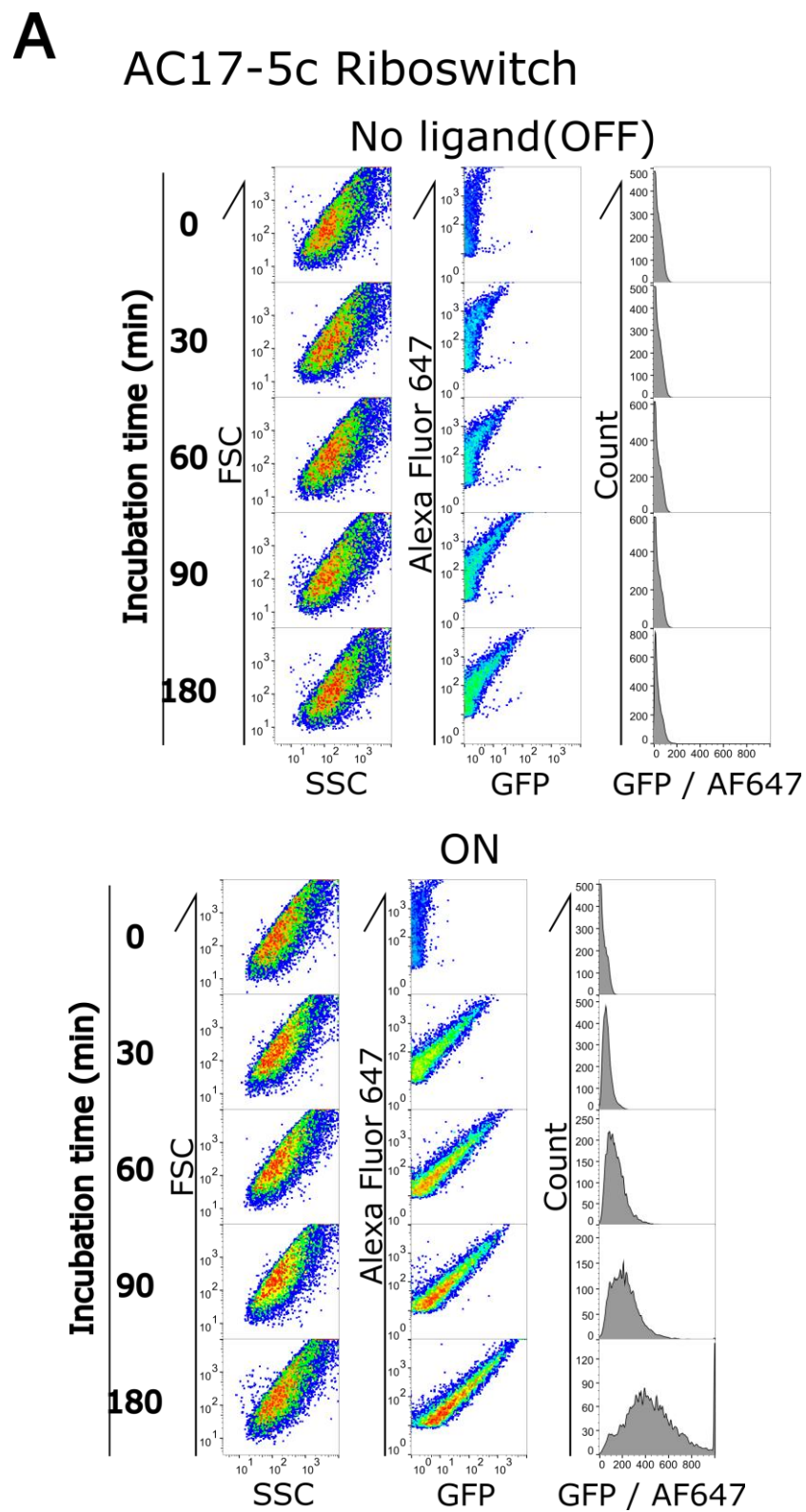
制御された mScarlet-I3 のリボソーム内での遺伝子発現の時間的制御

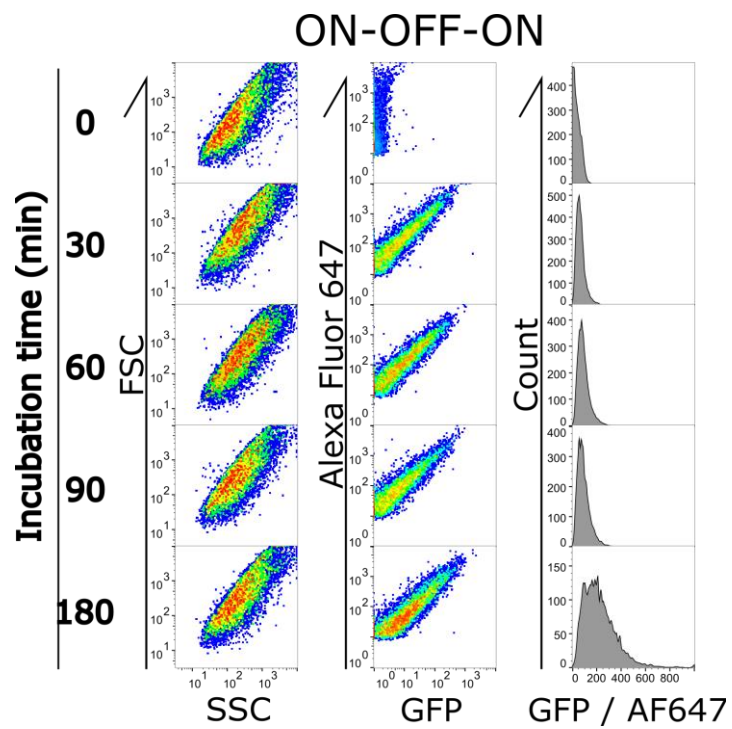
グラフのプロットは独立した 2 回の実験 ($n = 4$) での蛍光値の幾何平均 4 つの算術平均で、エラーバーは標準偏差を表す。各実験で 10,000 個の粒子をフローサイトメトリーで 2 回分析した。frGFP または mScarlet-I3 からの蛍光は、共に封入した Alexa Fluor 647 標識オボアルブミンで正規化した。

図 3-7 に示す通り、リガンドが存在している 0-30 分、90-180 分では frGFP の蛍光が増大し、遠心洗浄によってリガンドが除去された 30-90 分の間では frGFP 蛍光は増大しなかった。mScarlet-I3 蛍光は、リガンドが存在する 0-30 分間に蛍光増大は見られなかったが、遅れてリガンドが存在しない 30-60 分間に蛍光が増大し、60-90 分の間には増加しなかった。90 分にテオフィリン(+)バッファーに置換すると、AC17-5c-frGFP 系と同様に再度蛍光が増大した。これは mScarlet-I3 の蛍光値の応答は遅れていたものの、発現自体は AC17-5c-frGFP

系と同様に 30-60 分の間に停止していることを示している。

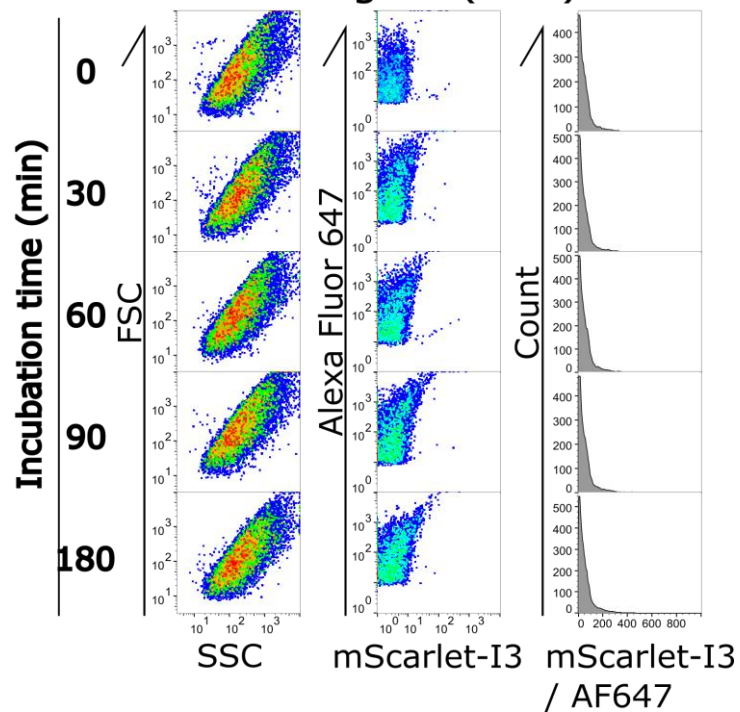
図 3-7 の実験における FCM データの 2D プロット、ヒストグラムを以下の図 3-8 に示す。





B Theo-3c Riboswitch

No ligand(OFF)



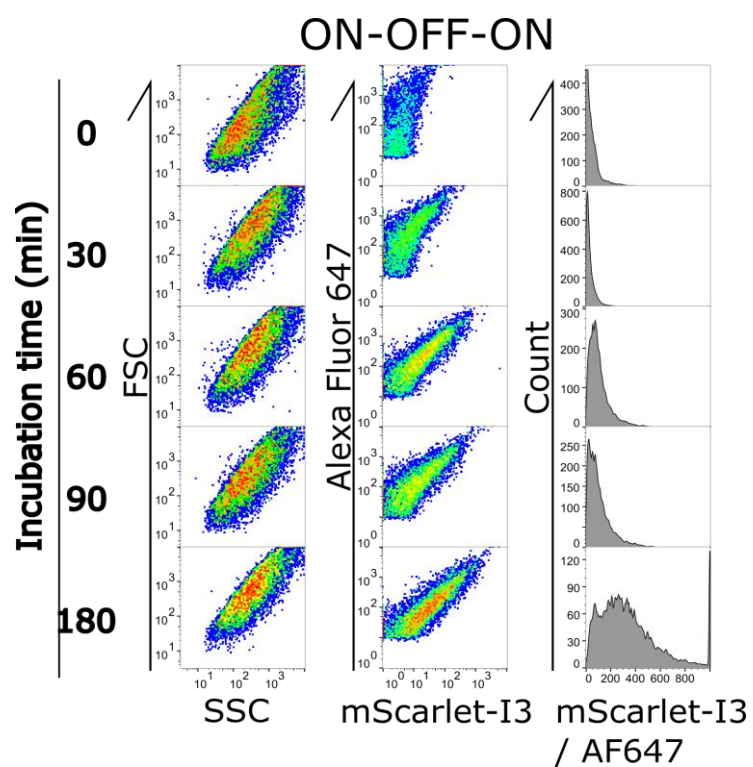
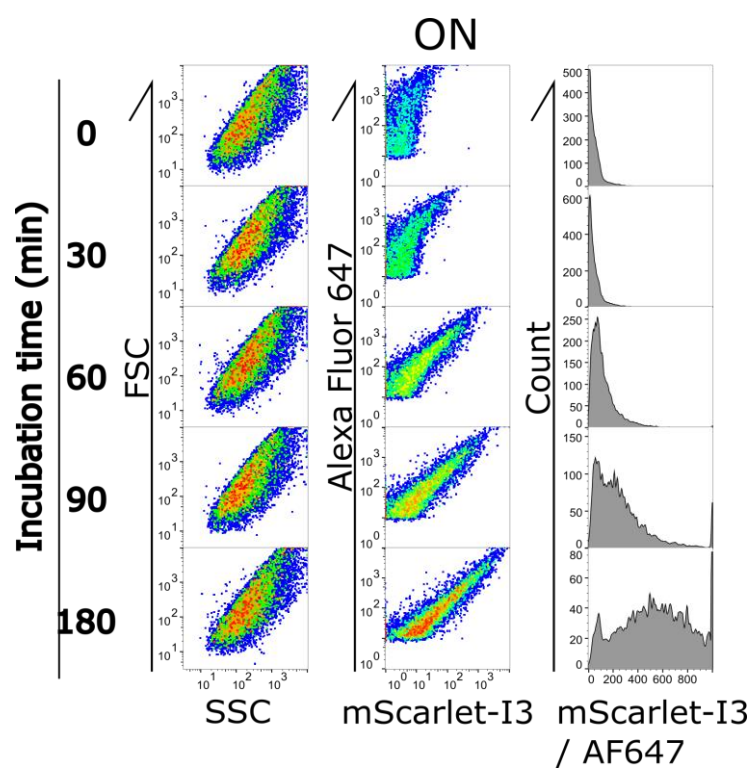


図 3-8. A) AC17-5c-frGFP B) Theo-3c-mScarlet-I3

を封入した GUV 粒子の 2D プロット

2 種のリボスイッチ-レポータータンパク質系をそれぞれ 1 つずつ封入した人工細胞で、遠心洗浄によって外部のリガンドを除去したり添加したりすることで、人工細胞内部のタンパク質発現を開始・停止する制御を行うことが可能であることが示された。そして、図 3-5 で示したように、AC17-5c リボスイッチと Theo-3c リボスイッチは互いに交差反応しないので、AC17-5c リボスイッチと Theo-3c リボスイッチを 1 種類の人工細胞に共封入することで、2 種の遺伝子発現のスイッチング可能な直交的制御の実証ができると考えた。本実験では、AC17-5c リボスイッチが制御する frGFP の発現を ASP2905 で 30 分間誘導した。この時点で、両方のリガンドが含まれるポジティブコントロールではわずかながら mScarlet-I3 の蛍光増大も観察されたが、図 3-9;Regulated のサンプルでは mScarlet-I3 の発現は全く観察されなかった。次に、リボソームの外部バッファーを、テオフィリンを含むが ASP2905 を含まないバッファーに交換し、リボソームを 60 分間インキュベートして、Theo-3c リボスイッチ制御型 mScarlet-I3 の発現を誘導し、frGFP の発現を終了させた。最後に、バッファーを再び ASP2905 を含むテオフィリンを含まないバッファーに交換し、120 分間インキュベートすると、frGFP の発現は再開されたが、mScarlet-I3 の発現は停止した。予想通り、FCM 解析の結果、第一ステップでは frGFP が合成されたが、mScarlet-I3 の発現は観察されなかった（図 3-9 ; 0-30 分）。第 2 ステップでは、mScarlet-I3 の発現が確認され、frGFP の追加発現はほとんど見られなかった（図 3-9 ; 30-90 分）。第 3 ステップでは、frGFP の発現が回復した（図 3-9; 90-210 分）。発色団の成熟時間に由来する応答の遅れのため、mScarlet-I3 の蛍光は第 3 ステップの最初の 60 分間は増加したが、後半は蛍光の追加的な増加は観察されなかった。

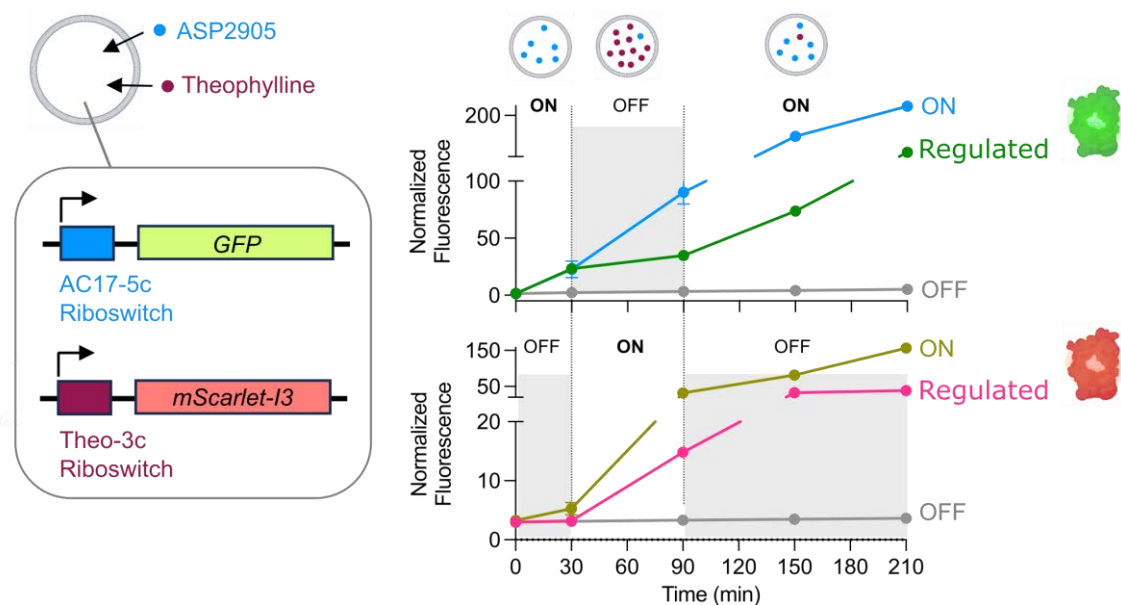
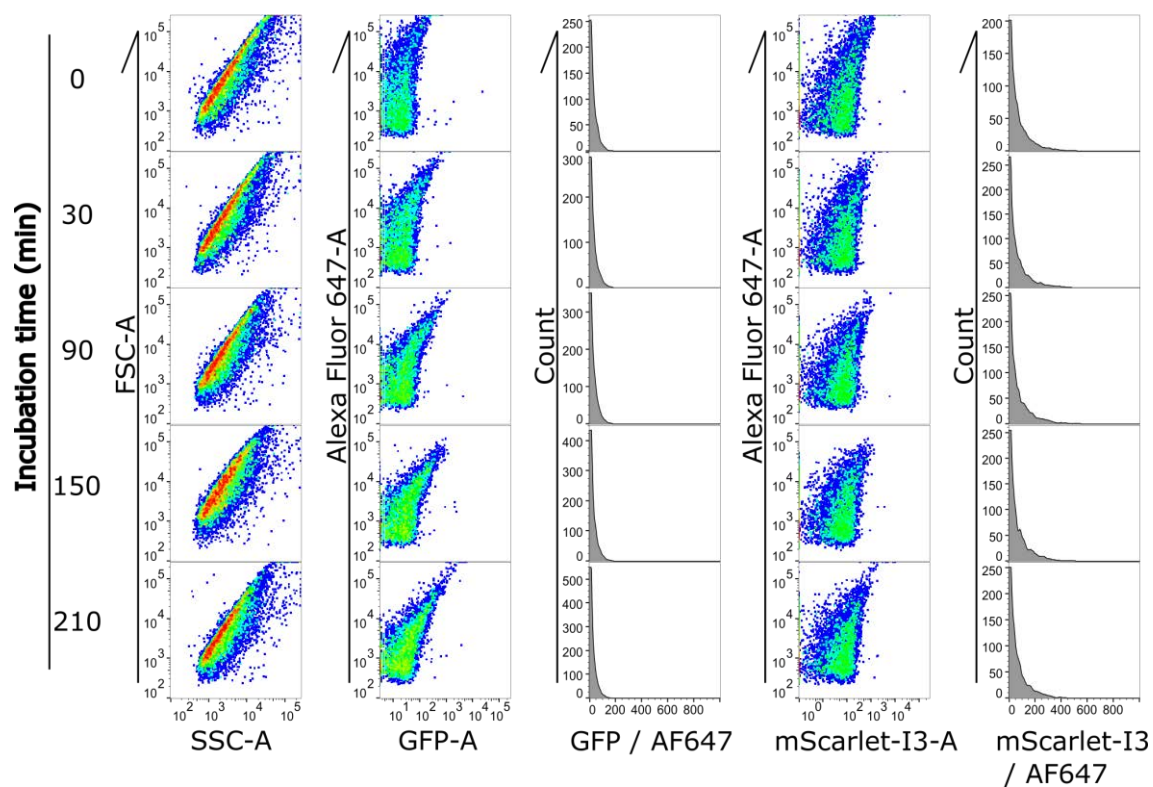


図 3-9. 2 種の遺伝子発現の時間的・直交的制御

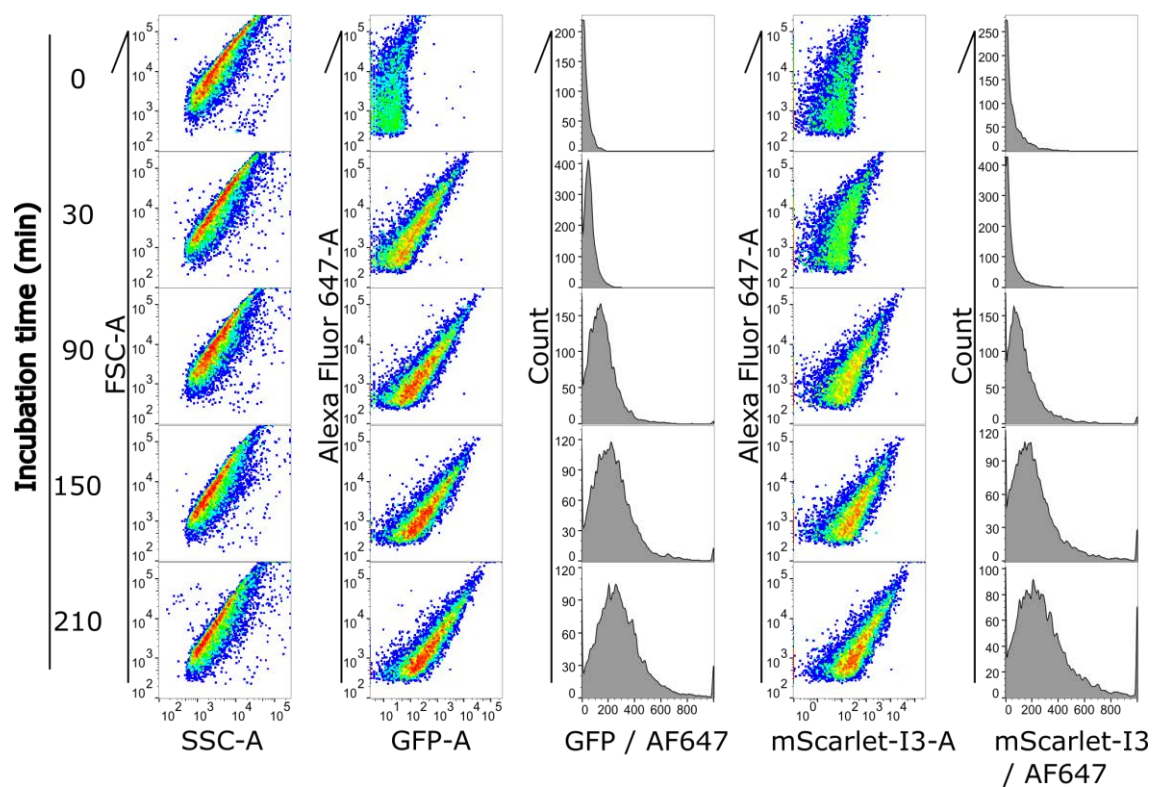
右上段：正規化 frGFP 蛍光。右下パネル：正規化 mScarlet-I3 蛍光。ON: 常に ASP2905, テオフィリン存在下でインキュベートしたサンプル。 OFF: 常にリガンドが存在しないバッファーでインキュベートしたサンプル。 Regulated: 30 分、90 分時点でリガンドを交換したサンプル。プロットは 2 回の独立した実験 (n=4) の幾何平均値の算術平均で、エラーバーは幾何標準偏差を表す。各実験で 10,000 個の粒子をフローサイトメトリーで分析した。frGFP または mScarlet-I3 からの蛍光は、ともに封入した OA647 で正規化した。

図 3-9 の実験における 2D プロットを以下の図 3-9 に示す。

No ligand(OFF)



Both ON



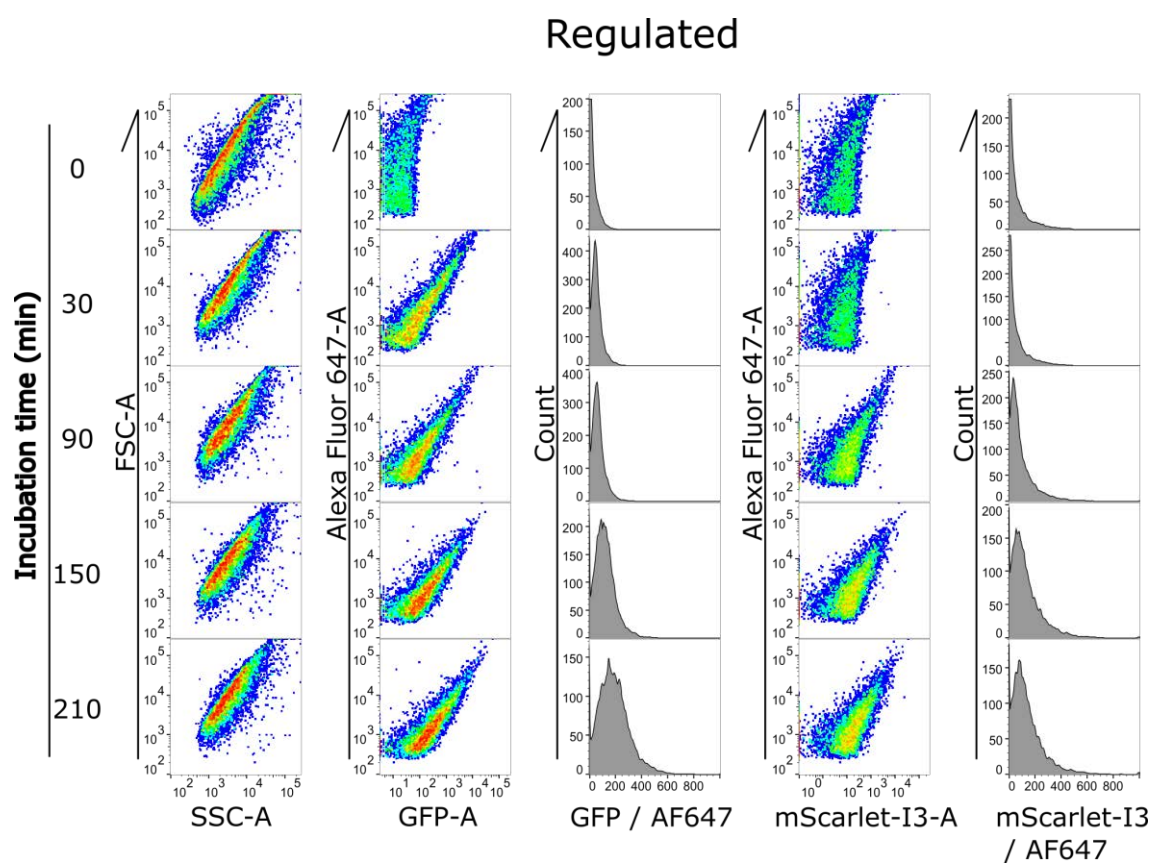


図 3-10. 図 3-9 (A)の実験における代表的な 2D プロット

最後に、2 種リボスイッチを用いた独立な 2 種翻訳制御を行った人工細胞の共焦点顕微鏡によるイメージングを行った結果を以下の図 3-11 に示す。

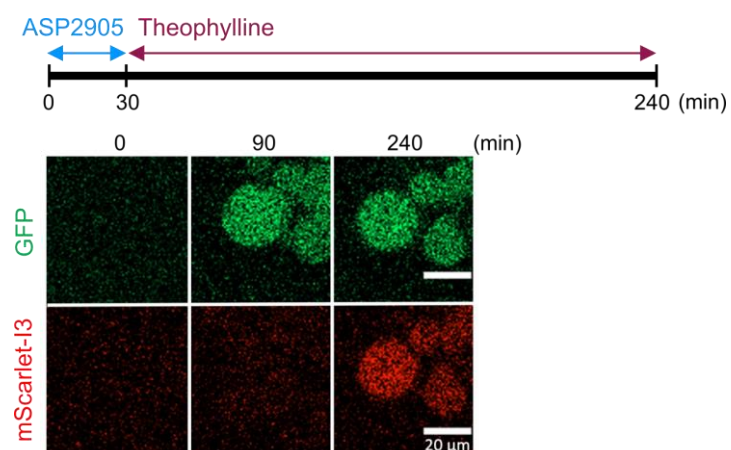


図 3-11. リボソーム中のレポータータンパク質発現の蛍光顕微鏡観察

緑と赤のパネルはそれぞれ、AC17-5c リボスイッチ制御 frGFP と

Theo-3c リボスイッチ制御 mScarlet-I3 の発現を示す。

今回の顕微鏡観察では 30 分時点で ASP2905 を除去し、テオフィリンを添加したが、frGFP 蛍光は 90 分あたりまで増加した。また、テオフィリンの添加後 1 時間程度遅れてから mScarlet-I3 蛍光が増加する様子が撮影された。

3.4 考察

mScarlet-I3 は、文献[91]では 2 分で発色団が成熟するとされているが、本実験系では CFPS 反応開始から 30 分程度遅れて蛍光増大が起きた。この相違は、文献[97]では哺乳動物細胞における成熟時間を測定しており、本実験系では大腸菌由来の無細胞翻訳系を使用したことによるものだと考えられる。mScarlet-I3 の成熟に 30 分程度かかることを考慮すると、本実験結果は、1%DMSO を含む外液バッファで洗浄することで人工細胞内のリガンドを除去でき、リボスイッチの働きで翻訳を停止できたことを明確に示している。

共焦点顕微鏡観察では、外液中のリガンドを ASP2905 からテオフィリンに 30 分時点で交換したものの、実際に frGFP 蛍光がはっきりと観察されたのは 90 分で、mScarlet-I3 蛍光増加が観察されたのは 90-240 分の間であった。これは、本実験に用いた装置では CFPS 反応が起こっているガラスディッシュ部分の温度を厳密に 37°C にすることが困難であり、実際には設定より低い温度であったために反応がゆっくりと進行していたことが原因として考えられる。

通常バルク溶液系では、遠心洗浄によってリガンドのみを除去することは不可能であり、遠心洗浄が可能であるのは区画化された系である人工細胞の利点である。

無細胞翻訳系におけるタンパク質発現順序の制御技術は、単体では人工細胞内で正しく再構成できないタンパク質を、膜タンパク質を細胞膜外にトランスロケーションする Sec トランスロコン[98][99]や、シャペロンなどを用いて機能的に発現することを可能にし、人工細胞に統合できる細胞機能群を拡張すると期待される。

3.5 要約

無細胞転写翻訳系では、一度転写されると mRNA から翻訳反応が起こり続けるため、タンパク質発現を停止するためにはリボスイッチによる翻訳制御が有効であるが、リボスイッチによる翻訳制御を人工細胞系に適用した研究は数例に限られている。直交性のある2種のリボスイッチを用いて、2種類のタンパク質発現を独立に制御し、タンパク質発現の順序を制御した例はなかった。本研究では、2種類のリボスイッチを用いた翻訳制御により、2種のタンパク質を独立に発現開始・停止できる系の構築を目的とした。ASP2905 応答性リボスイッチ AC17-5c, テオフィリン応答性リボスイッチ Theo-3c は互いに直交的でありこれらのリガンドが膜透過性であることと、人工細胞の区画化されているという性質を利用し、簡便な操作で2種のタンパク質を独立かつスイッチング可能な形で制御できる技術を実証した。この技術は、従来発現が困難であった、機能的なフォールディングのために事前に発現した sec トランスロコンやシャペロンを要求するタンパク質を人工細胞内で発現させることを可能にする技術に発展すると考えられる。

第4章 結言

本研究では、生物学的機能をモジュールとして捉えてボトムアップ型人工細胞に統合するモジュラーアプローチでボトムアップ合成生物学の発展に寄与することを目指し、ミニマル人工多細胞組織の構築と人工細胞内遺伝子発現制御技術の開発を目的とした。

2章では、ミニマル人工多細胞組織の構築のために、自発的にリポソーム間の2枚の脂質膜を超えて内部同士を導通させる構造を取る融合タンパク質 AH-SpyTag/SpyCatcher を構築した研究について記した。このタンパク質は α -ヘモリシンの脂質膜ナノポア形成活性と SpyCatcher-SpyTag の結合活性を維持しており、変性条件で精製することができた。クライオ電子顕微鏡トモグラフィーにより、このタンパク質は混合するだけで設計通りに α -ヘモリシンが頭合せに結合した14量体構造を取ることを示された。

AH-SpyTag/SpyCatcher を GUV 外部から挿入しただけでは、GUV 同士を架橋していない開口ポアが溶液中に露出する。これを回避するためには、AH のブロッカー分子を利用するか、ナノポアタンパク質を変更することが必要である。AH のブロッカー分子としては、 β シクロデキストリンが同定されている。 β シクロデキストリンは、AH のトランス側からのみナノポアをブロックする[100]ことが知られており、シス側が外部溶液中に向く AH-SpyTag/SpyCatcher には適用できない。 β バレルポア部分に結合ドメインを持ち、トランス側で相互に接続可能なレコンビナント AH[66]が報告されている。このレコンビナント AH を GUV 内部で無細胞翻訳系によって発現させ、 β シクロデキストリンを外部の溶液に添加することで露出したポアをブロックすることができると考えられる。AH-SpyTag/SpyCatcher についても、SpyTag-SpyCatcher 系と直交する DogTag-DogCatcher 系[101]を用いて AH-SpyTag/SpyCatcher の N 末端付近に適当な立体障害となるタンパク質を結合することで、露出したポアをブロックすることが可能だと考えられるが、DogTag を挿入しても AH 活性が失われない1次配列上の位置探索が必要となる。また、他の解決策としては、コネキシン、

パネキシンのような天然で同様の作用を持つタンパク質の利用や、Rosetta による De novo タンパク質デザイン[102]によってそれら同士が接合したときのみ開口するナノポアタンパク質を創出することが考えられる。

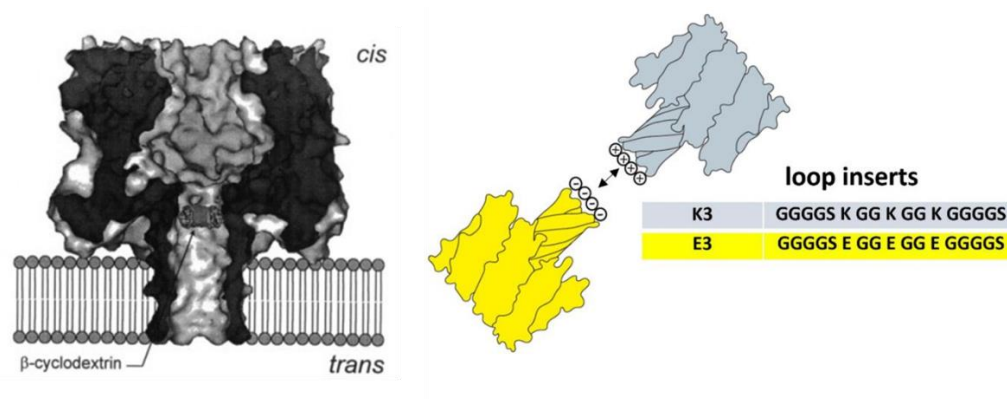


図 4-1. β シクロデキストリンの作用部位(左)[100] AH-D128-K131 間に会合ペプチドを挿入したレコンビナント AH(右)[66]

3 章では、2 種の直交性リボスイッチを用いて、無細胞転写翻訳系が封入された人工細胞内で 2 種のタンパク質発現を独立にスイッチング制御する技術の開発について記した。本研究では、2 種類のリボスイッチを用いた翻訳制御により、2 種のタンパク質を独立に発現開始・停止できる系の構築を目的とした。ASP2905 応答性リボスイッチ AC17-5c, テオフィリン応答性リボスイッチ Theo-3c は互いに直交的であり、これらのリガンドが膜透過性であることと、人工細胞の区画化されているという性質を利用することで、簡便な操作で 2 種のタンパク質を独立に制御し、その発現順序を制御する技術を実証した。この技術は、従来発現が困難であった、機能的なフォールディングのために事前に発現した sec トランスロコンやシャペロンを要求するタンパク質を人工細胞内で発現させることを可能にする技術に発展すると考えられる。

本研究で、ナノポア形成タンパク質のプロトマーに相互に結合するドメインを融合することでナノポア同士が導通した 2 つの脂質膜にまたがる 2 枚膜導通ポア構造を形成可能で

あることが示された。同様の戦略で、GUV の外側に結合ドメインを提示するように内側から無細胞翻訳系で発現できる接合ナノポアタンパク質を構築することが可能なことが報告されている[66]。今後の展開としては、本研究で実証された 2 つの直交リボスイッチを用いたタンパク質発現順序制御技術と組み合わせて、物質に応答して半自発的に集合してさらに人工モルフォゲンによってグラデーションパターンを形成する以下の図 4-2 に示すような人工多細胞系の構築が考えられる。

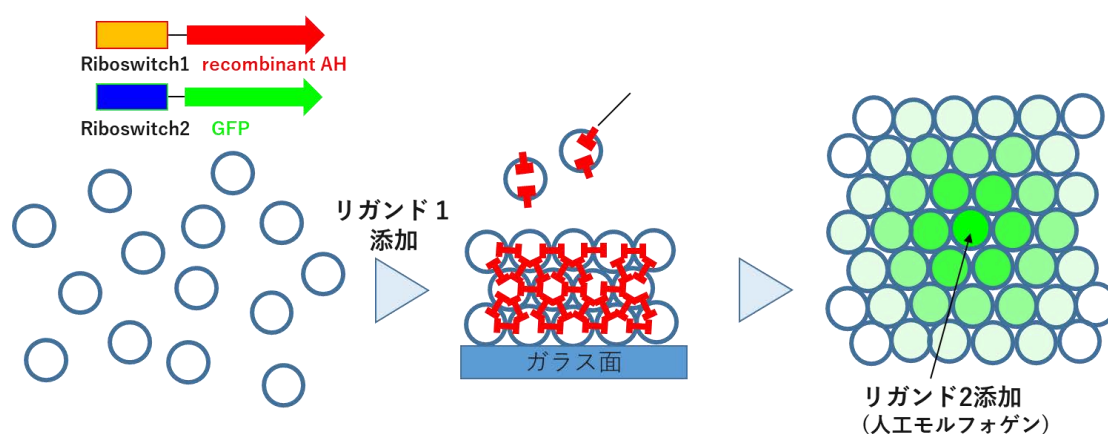


図 4-2. 128-131 改変 AH と直交リボスイッチを用いた人工多細胞システムの例

ある膜透過性リガンド 1 応答性リボスイッチで相互に結合する性質を持つレコンビナント AH 2 種を制御する。リガンド 1 添加によって 2 種類の GUV がレコンビナント AH を発現し、相互に接続した GUV からなる人工組織を形成する。膜非透過性リガンド 2 を顕微鏡下で人工組織の 1 点に滴下することでグラデーションパターンを形成する。

本研究では、人工多細胞組織のボトムアップ構築のための 2 つ新たな生体分子システムを提案した。本研究が人類社会に資する人工細胞システム開発のための工学理論構築に貢献することが期待される。

参考文献

- [1] A. S. Khalil, J. J. Collins, Synthetic biology: applications come of age, *Nat. Rev. Genet.*, 2010, 11, 367–379
- [2] X. Ye, S. Al-Babili, A. Klöti, J. Zhang, P. Lucca, P. Beyer, I. Potrykus, Engineering the Provitamin A (β -Carotene) Biosynthetic Pathway into (Carotenoid-Free) Rice Endosperm, *Science*, 2000, 287(5451)
- [3] P. Christou, T. Capell, A. Kohli, J. A. Gatehouse, A. M. R. Gatehouse, Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops, *Trends Plant Sci.*, 2006, (6), 302-308
- [4] Y. Shi, H. Inoue, J. C. Wu, S. Yamanaka, Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2017, 16, 115-130
- [5] Y. Ding, F. Wu, C. Tan, Synthetic Biology: A Bridge between Artificial and Natural Cells, *Life* 2014, 4(4), 1092-1116
- [6] H. Kita , T. Matsuura , T. Sunami , K. Hosoda , N. Ichihashi , K. Tsukada , I. Urabe, T. Yomo, Replication of Genetic Information with Self-Encoded Replicase in Liposomes, *ChemBioChem*, 2008, 9 , 2403-2410
- [7] S. Fujii, T. Matsuura, T. Sunami, T. Yomo, In vitro evolution of α -hemolysin using a liposome display, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2013, 110(42), 16796-16801
- [8] K. Kurihara, M. Tamura , K.-I. Shohda, T. Toyota, K. Suzuki, T. Sugawara, Self-reproduction of supramolecular giant vesicles combined with the amplification of encapsulated DNA, *Nat. Chem.*, 2011, 3 , 775-781
- [9] G. Delaittre, I. C. Reynhout, J. J. L. M. Cornelissen, R. J. M. Nolte, Cascade Reactions in an All-Enzyme Nanoreactor, *Chem. Eur. J.*, 2009, 15, 12600-12603
- [10] N. Ichihashi, K. Usui, Y. Kazuta, T. Sunami, T. Matsuura, T. Yomo, Darwinian evolution in a translation-coupled RNA replication system within a cell-like compartment, *Nat. Commun.*, 2013, 4(2494)

- [11] Y. Bansho, N. Ichihashi, Y. Kazuta, T. Matsuura, H. Suzuki, T. Yomo, Importance of Parasite RNA Species Repression for Prolonged Translation-Coupled RNA Self-Replication, *Chem. Biol.*, 2012, 19(4), 478-487
- [12] J. Su, H. Chen, Z. Xu, S. Wang, X. Liu, L. Wang, X. Huang, Near-Infrared-Induced Contractile Proteinosome Microreactor with a Fast Control on Enzymatic Reactions, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* , 2020, 12 (37), 41079-41087
- [13] A. Joesaar, S. Yang, B. Bögels, A. van der Linden, P. Pieters, B. V. V. S. Pavan Kumar, N. Dalchau, A. Phillips, S. Mann, T. F. A. de Greef, DNA-based communication in populations of synthetic protocells, *Nat. Nanotechnol.*, 2019, 14, 369–378
- [14] K. Renggli, P. Baumann, K. Langowska, O. Onaca, N. Bruns, W. Meier, *Adv. Funct. Mater.* 2011, 21(1241)
- [15] H. Niederholtmeyer, C. Chaggan, N. K. Devaraj, Communication and quorum sensing in non-living mimics of eukaryotic cells, *Nat. Commun.*, 2018, 9(5027)
- [16] V. Noireaux, A. Libchaber, A vesicle bioreactor as a step toward an artificial cell assembly, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2004, 101(51), 17669-17674
- [17] E. Cho, Y. Lu, Compartmentalizing Cell-Free Systems: Toward Creating Life-Like Artificial Cells and Beyond, *ACS Synt. Biol.*, 2020, 9(11), 2881-2901
- [18] S. M. Bartelt, J. Steinkühler, R. Dimova, S. V. Wegner, Light-Guided Motility of a Minimal Synthetic Cell, *Nano Lett.* 2018, 18, 11, 7268–7274
- [19] A. Scott, M. J. Noga, P. de Graaf, I. Westerlaken, E. Yildirim, C. Danelon, Cell-Free Phospholipid Biosynthesis by Gene-Encoded Enzymes Reconstituted in Liposomes, *PLoS ONE*, 2016, 11(10) : e0163058
- [20] L. Y. T. Chou, W. M. Shih, In Vitro Transcriptional Regulation via Nucleic-Acid-Based Transcription Factors, *ACS Synth. Biol.* 2019, 8, (11), 2558–2565
- [21] S. Berhanu, T. Ueda, Y. Kuruma, Artificial photosynthetic cell producing energy for protein synthesis, *Nat. Commun.*, 2019, 10:1325
- [22] C. Guindani, L. C. Silva, S. Cao, T. Ivanov, K. Landfester, Synthetic Cells: From Simple Bio-

- Inspired Modules to Sophisticated Integrated Systems, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2021, 134, (16), e202110855
- [23] A. J. Maule, Plasmodesmata: structure, function and biogenesis, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2008, 11(6)
- [24] C. W. Lo, Role of Gap Junctions in Cardiac Conduction and Development, *Circ. Res.*, 2000, 87, 346–348
- [25] <https://www.miyake-naika.or.jp>
- [26] N. King, The Unicellular Ancestry of Animal Development, *Dev. Cell*, 2004, 7(3), 313-325
- [27] H. Bayley, I. Cazimoglu, C. E. G. Hoskin, Synthetic tissues, *Emerg. Top. Life Sci.*, 2019 3(5): 615–622
- [28] S. Murata, T. Toyota, S. M. Nomura, T. Nakakuki, A. Kuzuya, Molecular Cybernetics: Challenges toward Cellular Chemical Artificial Intelligence, *Adv. Funct. Mater.*, 2022, 32(37)
- [29] S. Kriegman, D. Blackiston, M. Levin, J. Bongard, A scalable pipeline for designing reconfigurable organisms, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2020, 117 (4) 1853-1859
- [30] A. Sagner, J. Briscoe, Morphogen interpretation: concentration, time, competence, and signaling dynamics, *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 2017, 6(4): e271
- [31] A. D. Riggs, S. Bourgeois, M. Cohn, The lac repressor-operator interaction: III. Kinetic studies, *J. Mol. Biol.*, 1970, 53(3), 401-417
- [32] J. C. Cochrane, S. A. Strobel, Riboswitch effectors as protein enzyme cofactors, *RNA*, 2008, 14(6), 993-1002
- [33] Y. Liu, A. Beyer, R. Aebersold, On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance, *Cell*, 2016, 165(3), 535-550
- [34] H. Cui, M. Nowicki, J. P. Fisher, L. G. Zhang, 3D Bioprinting for Organ Regeneration, *Adv. Healthc. Mater.*, 2017, 6(1)
- [35] M. A. Lancaster, M. Renner, C. A. Martin, D. Wenzel, L. S. Bicknell, M. E. Hurles, T. Homfray, J. M. Penninger, A. P. Jackson, J. A. Knoblich, Cerebral organoids model human brain development and microcephaly, *Nature*, 2013, (501), 373-379

- [36] G. Gao, J. H. Lee, J. Jang, D. H. Lee, J. S. Kong, B. S. Kim, Y. J. Choi, W. B. Jang, Y. J. Hong, S. M. Kwon, D. Cho, Tissue Engineered Bio-Blood-Vessels Constructed Using a Tissue-Specific Bioink and 3D Coaxial Cell Printing Technique: A Novel Therapy for Ischemic Disease, *Adv. Funct. Mater.*, 2017, 27(33)
- [37] M. E. Todhunter, N. Y. Jee, A. J. Hughes, M. C. Coyle, A. Cerchiari, J. Farlow, J. C. Garbe, M. A. LaBarge, T. A. Desai, Z. J. Gartner, Programmed synthesis of three-dimensional tissues, *Nat. Methods*, 2015, 12,975-981
- [38] O. I. Sentürk, E. Chervyachkova, Y. Ji, S. V. Wegner, Independent Blue and Red Light Triggered Narcissistic Self-Sorting Self-Assembly of Colloidal Particles, *Small*, 2019, 15(25)
- [39] A. J. Stevens, A. R. Harris, J. Gerdt, K. H. Kim, C. Trentesaux, J. T. Ramirez, W. L. McKeithan, F. Fattahi, O. D. Klein, D. A. Fletcher, W. A. Lim, Programming multicellular assembly with synthetic cell adhesion molecules, *Nature*, 2023, 614, 144-152
- [40] S. Toda, L. R. Blauch, S. K. Y. Tang, L. Morsut, W. A. Lim, Programming self-organizing multicellular structures with synthetic cell-cell signaling, *Science*, 2018, 361(6398):156-162
- [41] S. Toda, W. L. McKeithan, T. J. Hakkinen, P. Lopez, O. D. Klein, W. A. Lim, Engineering synthetic morphogen systems that can program multicellular patterning, *Science*, 2020, 370(6514), 327-331
- [42] G. Villar, A. D. Graham, H. Baylay, A Tissue-Like Printed Material, *Science*, 2013, 340(6128), 48-52
- [43] A. D. Graham, S. N. Olof, M. J. Burke, J. P. K. Armstrong, E. A. Mikhailova, J. G. Nicholson, S. J. Box, F. G. Szele, A. W. Perriman, H. Bayley, High-Resolution Patterned Cellular Constructs by Droplet-Based 3D Printing, *Sci. Rep.*, 2017, 7(7004)
- [44] A. Dupin, F. C. Simmel, Signalling and differentiation in emulsion-based multi-compartmentalized in vitro gene circuits, *Nat. Chem.*, 2019, 11, 32–39
- [45] A. Dupin, L. Aufinger, I. Styazhkin, F. Rothfischer, B. K. Kaufmann, S. Schwarz, N. Galensowske, H. C. Schaumann, F. C. Simmel, Synthetic cell-based materials extract positional information from morphogen gradients, *Sci. Adv.*, 2022, 8(14)

- [46] P. Gobbo, A. J. Patil, M. Li, R. Harniman, W. H. Briscoe, S. Mann, Programmed assembly of synthetic protocells into thermoresponsive prototissues, *Nat. Mat.*, 2018, 17, 1145–1153
- [47] S. Yang, P. A. Pieters, A. Joesaar, B. W. A. Bögels, R. Brouwers, I. Myrgorodska, S. Mann, T. F. A. de Greef, Light-Activated Signaling in DNA-Encoded Sender–Receiver Architectures, *ACS Nano* 2020, 14(11), 15992–16002
- [48] Q. Li, S. Li, X. Zhang, W. Xu, X. Han, Programmed magnetic manipulation of vesicles into spatially coded prototissue architectures arrays, *Nat. Commun.*, 2020, 11(232)
- [49] S. Villringer, J. Madl, T. Sych, C. Manner, A. Imberty, W. Römer, Lectin-mediated protocell crosslinking to mimic cell-cell junctions and adhesion, *Sci. Rep.*, 2018, 8(1932)
- [50] S. Liu, C. Zhang, L. Li, X. Deng, C. Hu, F. Yang, Q. Liu, W. Tan, Organization of an Artificial Multicellular System with a Tunable DNA Patch on a Membrane Surface, *Nano Lett.*, 2024, 24(1), 433–440
- [51] B. C. Buddingh', J. Elzinga, J. C. M. van Hest, Intercellular communication between artificial cells by allosteric amplification of a molecular signal, *Nat. Commun.*, 2020, 11(1652)
- [52] T. Chakraborty, S. V. Wegner, Cell to Cell Signaling through Light in Artificial Cell Communities: Glowing Predator Lures Prey, *ACS Nano* 2021, 15(6), 9434–9444
- [53] J. Elbaz, O. Lioubashevski, F. Wang, F. Remacle, R. D. Levine, I. Willner, DNA computing circuits using libraries of DNAzyme subunits, *Nat. Nanotechnol.*, 2010, 5, 417–422
- [54] L. Song, M. R. Hobaugh, C. Shustak, S. Cheley, H. Bayley, J. E. Gouaux, Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore, *Science*, 1996, 274(5294), 1859-1866
- [55] B. Zakeri, J. O. Fierer, E. Celik, E. C. Chittock, U. Schwarz-Linek, V. T. Moy, M. Howarth, Peptide tag forming a rapid covalent bond to a protein, through engineering a bacterial adhesin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2012, 109(12), E690-E697
- [56] S. J. Cavalieri, I. S. Snyder, Effect of Escherichia coli alpha-hemolysin on human peripheral leukocyte function in vitro, *Infect. Immun.*, 1982, 37(3), 966-974
- [57] M. D. Peraro, F. G. van der Goot, Pore-forming toxins: ancient, but never really out of fashion,

Nat. Rev. Microbiol., 2016, 14, 77–92

- [58] S. Mantri, K. T. Sapra, S. Cheley, T. H. Sharp, H. Bayley, An engineered dimeric protein pore that spans adjacent lipid bilayers, *Nat. Commun.*, 2013, 4, 1725
- [59] S. Wang, Z. Zhao, F. Haque, P. Guo, Engineering of Protein Nanopores for Sequencing, Chemical or Protein Sensing and Disease Diagnosis, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2018, 51, 80-89
- [60] L. Li, J. O. Fierer, T. A. Rapoport, M. Howarth, Structural Analysis and Optimization of the Covalent Association between SpyCatcher and a Peptide Tag, *J. Mol. Biol.*, 2014, 426(2), 309-317
- [61] A. H. Keeble, P. Turkki, S. Stokes, M. Howarth, Approaching infinite affinity through engineering of peptide–protein interaction, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2019, 116 (52) 26523-26533
- [62] S. Pautot, B. J. Frisken, D. A. Weitz, Production of Unilamellar Vesicles Using an Inverted Emulsion, *Langmuir*, 2003, 19(7), 2870-2879
- [63] Y. Shimane, Y. Kuruma, Rapid and Facile Preparation of Giant Vesicles by the Droplet Transfer Method for Artificial Cell Construction, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2022, 10
- [64] A. Moga, N. Yandrapalli, R. Dimova, T. Robinson, Optimization of the Inverted Emulsion Method for High-Yield Production of Biomimetic Giant Unilamellar Vesicles, *ChemBioChem*, 2019, 20(20), 2674-2682
- [65] J. F. Nagle and S. Tristram-Nagle, Structure of lipid bilayers, *Biochim Biophys Acta*. 2000, 1469(3): 159–195
- [66] A. Harjung, A. Fracassi, N. Devaraj, Encoding extracellular modification of artificial cell membranes using engineered self-translocating proteins, *bioRxiv*, doi: <https://doi.org/10.1101/2023.10.06.561148>
- [67] Y. Shimizu, A. Inoue, Y. Tomari, T. Suzuki, T. Yokogawa, K. Nishikawa, T. Ueda, Cell-free translation reconstituted with purified components, *Nat. Biotechnol.*, 2001, 19, 751-755
- [68] K. Yue, Y. Zhu, L. Kai, Cell-Free Protein Synthesis: Chassis toward the Minimal Cell, *Cells*, 2019, 8(4), 315

- [69] Y. Elani, R. V. Law, O. Ces, Protein synthesis in artificial cells: using compartmentalisation for spatial organisation in vesicle bioreactors, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2015, 17, 15534-15537
- [70] M. A. Boyd, N. P. Kamat, Designing Artificial Cells towards a New Generation of Biosensors, *Trends Biotechnol.*, 2021, 39, 927-939
- [71] T. Nishikawa, T. Sunami, T. Matsuura, T. Yomo, Directed Evolution of Proteins through In Vitro Protein Synthesis in Liposomes, *J. Nucleic Acids*, 2012, 2012, 923214
- [72] K. Powell, How biologists are creating life-like cells from scratch, *Nature*, 2018, 563(7730), 172-175
- [73] F. Lussier, O. Staufer, I. Platzman, J. P. Spatz, Can Bottom-Up Synthetic Biology Generate Advanced Drug-Delivery Systems?, *Trends Biotechnol.*, 2021, 39, 445-459
- [74] Z. Peng, S. Iwabuchi, K. Izumi, S. Takiguchi, M. Yamaji, S. Fujita, H. Suzuki, F. Kambara, G. Fukasawa, A. Cooney, L. Di Michele, Y. Elani, T. Matsuura, R. Kawano, Lipid vesicle-based molecular robots, *Lab Chip*, 2024, 5
- [75] K. P. Adamala, D. A. Martin-Alarcon, K. R. Guthrie-Honea, E. S. Boyden, Engineering genetic circuit interactions within and between synthetic minimal cells, *Nat. Chem.*, 2017, 9(5), 431-439
- [76] S. Kobori, N. Ichihashi, Y. Kazuta, T. Yomo, *Mol. BioSyst.*, 2013, 6, 1282-1285
- [77] H. Matsubayashi, T. Ueda, Purified cell-free systems as standard parts for synthetic biology, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2014, 22, 158-162
- [78] A. Estévez-Torres, C. Crozatier, A. Diguët, T. Hara, H. Saito, K. Yoshikawa, D. Baigl, Sequence-independent and reversible photocontrol of transcription/expression systems using a photosensitive nucleic acid binder, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2009, 106 (30) 12219-12223
- [79] Y. Kamiya, T. Takagi, H. Ooi, H. Ito, X. Liang, and H. Asanuma, Synthetic Gene Involving Azobenzene-Tethered T7 Promoter for the Photocontrol of Gene Expression by Visible Light, *ACS Synth. Biol.* 2015, 4(4), 365–370
- [80] D. Hartmann & M. J. Booth, Accessible light-controlled knockdown of cell-free protein synthesis using phosphorothioate-caged antisense oligonucleotides, *Commun. Chem.* 2023, 6(59)
- [81] Y. Kamiya, Y. Arimura, H. Ooi, K. Kato, X. Liang, H. Asanuma, Development of Visible-Light-

- Responsive RNA Scissors Based on a 10–23 DNAzyme, *ChemBioChem*, 2018, 19(12), 1305-1311
- [82] W. Sato, M. Rasmussen, N. Gaut, M. Devarajan, K. Stokes, C. Deich, A. E. Engelhart, K. P. Adamala, A gene expression control technology for cell-free systems and synthetic cells via targeted gene silencing and transfection, *Biotechnol. Bioeng.* 2023, 120(7), 1986-1997
- [83] A. L. Chang, J. J. Wolf and C. D. Smolke, Synthetic RNA switches as a tool for temporal and spatial control over gene expression, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2012, 23, 679-688
- [84] F. Groher, B. Suess, Synthetic riboswitches - A tool comes of age, *Biochim. Biophys. Acta*, 2014, 1839, 964-973
- [85] T. Tabuchi, Y. Yokobayashi, Cell-free riboswitches, *RSC Chem. Biol.*, 2021, 2, 1430-1440
- [86] L. Martinia, S. S. Mansy, Cell-like systems with riboswitch controlled gene expression, *Chem. Comm.* 2011, 38
- [87] R. Lentini, S. P. Santero, F. Chizzolini, D. Cecchi, J. Fontana, M. Marchiorretto, C. Del Bianco, J. L. Terrell, A. C. Spencer, L. Martini, M. Forlin, M. Assfalg, M. Dalla Serra, W. E. Bentley and S. S. Mansy, Integrating artificial with natural cells to translate chemical messages that direct E. coli behaviour, *Nat. Commun.*, 2014, 5, 4012
- [88] M. Dwidar, Y. Seike, S. Kobori, C. Whitaker, T. Matsuura and Y. Yokobayashi, Programmable Artificial Cells Using Histamine-Responsive Synthetic Riboswitch, *J. Am. Chem. Soc.*, 2019, 141, 11103-11114
- [89] A. A. Mateos, A. Nuthanakanti, and A. Serganov, Riboswitch mechanisms: new tricks for an old dog, *Biochem. (Mosc)*. 2021, 86(8): 962–975
- [90] C. Tuerk, L. Gold, Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase, *Science*, 1990, 249(4968), 505-510
- [91] A. Boussebayle, D. Torka, S. Ollivaud, J. Braun, C. Bofill-Bosch, M. Dombrowski, F. Groher, K. Hamacher, B. Suess, Next-level riboswitch development-implementation of Capture-SELEX facilitates identification of a new synthetic riboswitch, *Nucleic Acids Res.*, 2019, 47(9), 4883-4895

- [92] S. Takahashi, M. Ohmiya, S. Honda, K. Ni, The KCNH3 inhibitor ASP2905 shows potential in the treatment of attention deficit/hyperactivity disorder. *PLoS One*, 2018, 13, e0207750
- [93] S. Takahashi, K. Inamura, J. Yarimizu, M. Yamazaki, N. Murai, K. Ni, Neurochemical and neuropharmacological characterization of ASP2905, a novel potent selective inhibitor of the potassium channel KCNH3. *Eur. J. Pharmacol.* 2017, 810, 26–35
- [94] S. Takahashi, A. Okamura, M. Yamazaki, K. Ni, ASP2905, a specific inhibitor of the potassium channel Kv12.2 encoded by the *Kcnh3* gene, is psychoactive in mice. *Behav. Brain Res.* 2020, 378, 112315
- [95] K. Fukunaga, V. Dhamodharan, N. Miyahira, Y. Nomura, K. Mustafina, Y. Oosumi, K. Takayama, A. Kanai, Y. Yokobayashi, Small-Molecule Aptamer for Regulating RNA Functions in Mammalian Cells and Animals, *J. Am. Chem. Soc.* 2023, 145, 14, 7820–7828
- [96] R. D. Jenison, S. C. Gill, A. Pardi, B. Polisky, High-Resolution Molecular Discrimination by RNA, *Science*, 1994, 263, 1425-1429
- [97] T. W. J. Gadella Jr., L. van Weeren, J. Stouthamer, M. A. Hink, A. H. G. Wolters, B. N. G. Giepmans, S. Aumonier, J. Dupuy & A. Royant, mScarlet3: a brilliant and fast-maturing red fluorescent protein, *Nat. Methods*, 2023, 20, 541-545
- [98] K. Denks, A. Vogt, I. Sachelaru, N. A. Petriman, R. Kudva, H. G. Koch, The Sec translocon mediated protein transport in prokaryotes and eukaryotes, *Mol. Membr. Biol.*, 2014, 31(2-3), 58-84
- [99] N. Ohta, Y. Kato, H. Watanabe, H. Mori & T. Matsuura, In vitro membrane protein synthesis inside Sec translocon-reconstituted cell-sized liposomes, *Sci. Rep.* 2016, 6(36466)
- [100] L. Gu, H. Baylay, Interaction of the Noncovalent Molecular Adapter, β -Cyclodextrin, with the Staphylococcal α -Hemolysin Pore, *Biophys. J.*, 2000, 79(4), 1967-1975
- [101] A. H. Keeble, V. K. Yadav, M. P. Ferla, C. C. Bauer, E. Chuntharpursat-Bon, J. Huang, R. S. Bon, M. Howarth, DogCatcher allows loop-friendly protein-protein ligation, *Cell Chem. Biol.*, 2022, 29(2), 339-350
- [102] C. Xu, P. Lu, T. M. G. El-Din, X. Y. Pei, M. C. Johnson, A. Uyeda, M. J. Bick, Q. Xu, D.

Jiang, H. Bai, G. Reggiano, Y. Hsia, T. J. Brunette, J. Dou, D. Ma, E. M. Lynch, S. E. Boyken, P. Huang, L. Stewart, F. DiMaio, J. M. Kollman, B. F. Luisi, T. Matsuura, W. A. Catterall & D. Baker, Computational design of transmembrane pores, *Nature*, 2000, 585, 129-134

本研究に関する論文

- Y. Ishii, K. Fukunaga, A. Cooney, Y. Yokobayashi, T. Matsuura, Switchable and orthogonal gene expression control inside artificial cells by synthetic riboswitches, *Chem. Commun.*, 2024, doi: 10.1039/D4CC00965G

謝辞

本研究を行うにあたり、ご懇厚なるご指導・ご鞭撻を賜りました東京工業大学地球生命研究所の松浦友亮先生、福永圭佑先生に謹んで感謝の意を表します。

2章の研究についてご助言を頂き、ヘモリシンのクライオ電子顕微鏡構造解析を行って下さった東北大学 生命科学研究科 田中良和先生、横山武司先生に心より御礼申し上げます。

研究テーマ設定においてご助言を頂きました東北大学 大学院工学研究科 野村慎一郎先生に謹んで御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、使用する試薬を提供してくださいました渡邊貴嘉さん、共焦点顕微鏡撮影をしてくださいました Aileen Cooney さん、タンパク質発現精製など実験の補助をしてくださいましたテクニカルスタッフの香川亜子さん、Anuradha Thakur さん、成田麻子さんに厚く御礼申し上げます。

最後に、有意義な学生生活を送るにあたり、多大な御支援賜りました家族並びに松浦研究室の皆様心より感謝致します。