

A03 GUV内環境での脂肪鎖合成による動態変化観察とその物理

東京工業大学地球生命研究所 車 兪 激

本研究グループは、モデル細胞膜であるベシクルの内環境で脂肪鎖合成反応を再構築する。これにより生ずると思われるベシクルの形態変化を顕微鏡下で観察し、脂質膜上でどのようなダイナミクスが起こるのかを解析することを目的としている。本年度の進捗状況は以下の通りである。

(1) 脂肪鎖合成経路

大腸菌における脂肪鎖の生合成経路は Acetyl-CoA または Malonyl-CoA を基質として、8種の Fab (Fatty acid biosynthesis) 酵素、TesA、および ACP (Acyl Carrier Protein) から構成される (図 1)。2011年に Yu らが試験管内での再構築に成功しているものの、250 μ M (パルミジン酸として) の脂肪鎖の合成にとどまっている。その原因の一つに、合成された脂肪鎖による酵素活性阻害が示唆されている。この先行研究をもとに、直径数十マイクロメートルの Giant Unilamellar Vesicle (GUV) 内で脂肪鎖合成反応を行う。リン脂質から構成されるベシクルはその物性的側面から多く研究されているが、多種の酵素などを用いた生物学的な反応と組み合わせた系においてもその有用性が認知されている[1,2]。また、ベシクルをベースに最小限のコンポーネントから細胞を構築することで、進化初期段階の生命を理解しようとする研究もある[3-5]。本研究はそのような背景のもと、生体分子を再構築することで細胞の自己複製を再現しようとするものである。

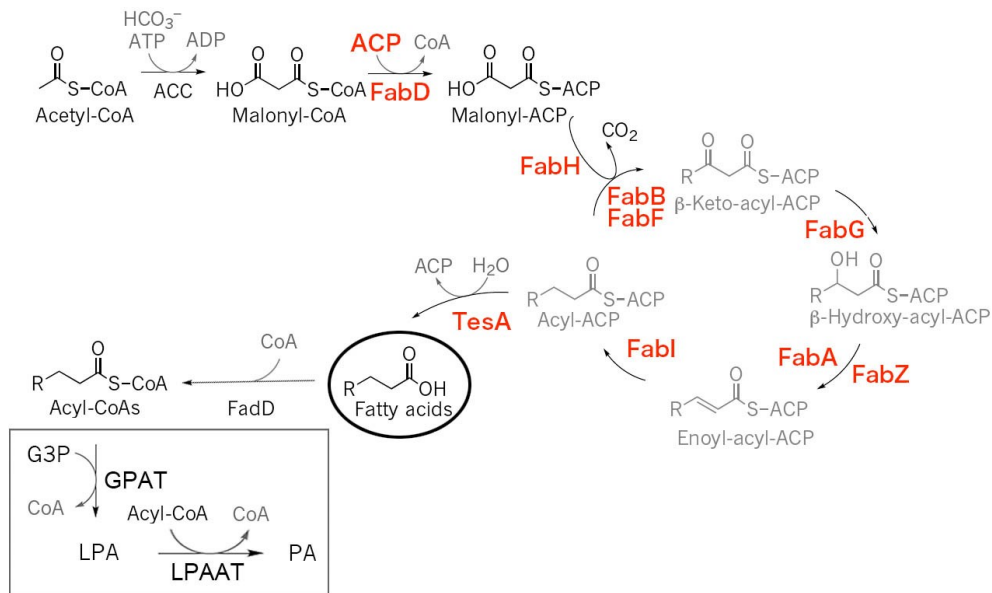


図 1. Fab 酵素群による脂肪鎖合成経路.

(2) 酵素精製

スタンフォード大 Khosla 教授から脂肪鎖合成酵素の DNA を譲渡していただいた。これを大腸菌発現株 BL21 (DE3) に形質転換し、IPTG インダクションによる大量発現を行った。菌体回収後破碎し、大腸菌抽出液から目的の酵素タンパク質を、HisTrap カラム、HiTrapQ カラムを用いて精製した。その結果、8 種 Fab 酵素と TesA についてはすでに精製が完了し、SDS-PAGE 上で single band として確認できるまでの精製度 (90%以上) で得ることができた。FabZ については精製量が少なかったため再精製した。一方、ACP は Apo-ACP を Holo-ACP に転位するための補助酵素 sfp との共発現を必要とするため、現在両遺伝子を導入した大腸菌株を作成中である。今年度中に全精製を完了する予定である。

(3) GUVs の調製と観察

GUVs 調製方法はローマ第 3 大学の Pasquale により最適化された。また科研費の一部をもちいて、蛍光顕微鏡 (オリンパス社製) を導入し、GUVs の観察環境を整えた。ただし蛍光観察下でのタイムラプス取得のための設備は付属されていないため、次年度に導入を予定している。

(4) 今後の予定

- GUV 内に全酵素と基質エネルギーを封入し、反応を行う。
- 形態観察から得られたパターンを今井先生、好村先生とともに物理化学的側面から考察する。

参考文献:

- (1) Y. Kuruma, and T. Ueda, *Nat. Protocols* (2015), *in press*.
- (2) H. Matsubayashi, Y. Kuruma, T. Ueda, *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 7535 (2014).
- (3) H. Matsubayashi, Y. Kuruma, T. Ueda, *Orig. Life Evol. Biosph.* (2015).
- (4) P. L. Luisi, and Y. Kuruma, *Orig. Life Evol. Biosph.* (2015).
- (5) Y. Kuruma, *Artificial Life* 14, The MIT Press p. 963-964 (2014).