

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K16083

研究課題名(和文) 初期生命が用いたタンパク質のみから構成される人工ゲノムの合成

研究課題名(英文) Synthesis of artificial genome consisting of only proteins used by early life

研究代表者

網蔵 和晃 (Amikura, Kazuaki)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・助教

研究者番号：60735918

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、人工ゲノム構築に不可欠である関連遺伝子の追究から、それらの基盤技術の発展に貢献する研究である。本研究では、無細胞翻訳系中で複数種類のタンパク質が協働することで所望の機能が発揮される系の開発を行なった。特に、リボソーム関連遺伝子に着目したが、それ以外の遺伝子を用いた系の開発も行った。リコンビナントタンパク質を用いたリボソームの試験管内再構成系は、生合成因子を用いることで、よりリボソームの再構成効率が低い系を構築できた。また、リボソームの生合成過程における各因子の機能について新たな知見が示された。

研究成果の概要(英文)：This study is a research contributing to the development of basic technologies for artificial genome construction. In this study, we developed a system which exhibits desired function by cooperation of multiple kinds of proteins in cell-free translation system. In particular, we were focused on ribosome-related genes and other genes. The in vitro reconstitution system of ribosome using recombinant protein was able to construct a system with higher reconstitution efficiency of ribosome by using biosynthesis factor. In addition, new findings on the function of each factor in the ribosome biosynthesis process were presented.

研究分野：合成生物学

キーワード：合成生物学 無細胞翻訳系 リボソーム tRNA リボソーム 構成的アプローチ

### 1. 研究開始当初の背景

従来の生体の解析を中心とした要素還元主義的な生物学、生物をシステムとしてとらえ構成要素の相互作用やダイナミクスを解析するシステム生物学とは異なり、ある環境の中で目標設定した動作を行える人工生命システムを合成しようとするのが合成生物学である。近年では、自己複製を行うゲノムの全合成にクレイグベンター研究所が成功した(Daniel GG et al., (2010), Science)。これらの合成生物学の最終的な目標の一つは人工ゲノムの実現である。生命が持つ翻訳システムをボトムアップ的に再構成した無細胞タンパク質合成系は、増殖する人工ゲノムの実現のための要素技術として、関連技術のさらなる発展が期待されている。

### 2. 研究の目的

本研究では、複数の遺伝子の組み合わせから構成される超分子複合体・バイオシステムを無細胞翻訳系内で再構成する。これらの過程で得られる知見は、複数のバイオシステムを集積することで実現される人工ゲノム構築のための基盤となるだろう。現存する生命のバイオシステムを単純化し構成される人工ゲノムから、初期生命が用いていたであろうゲノムを構築することも可能となるだろう。

### 3. 研究の方法

本研究では無細胞翻訳系内にて生体内のバイオシステムの再構築を行った。再構築には、精製されたりコンビナントタンパク質もしくは試験管内転写された RNA が用いられた。無細胞翻訳系には、再構成型無細胞翻訳系である PURE system もしくは PUREflex® を用いた。

リボソームの構成因子であるリボソーマルタンパク質は、His-SUMO 融合タンパク質として精製した後に、プロテアーゼで His-SUMO 領域を除去することで、天然とほぼ同一のアミノ酸配列のコンビナントタンパク質として精製した(図 1)。それ以外の、生合成因子などのタンパク質性因子は、His-tag 融合タンパク質として精製した。

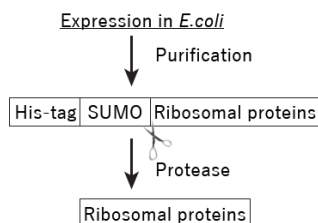


図 1 : タンパク質精製方法

### 4. 研究成果

無細胞翻訳系内で、精製したコンビナント r-Protein および生合成因子を混合することで、生理的条件下( $Mg^{2+}$  5 mM,  $K^+$  150 mM)でリボソームの 30S サブユニットを再構成可能

であることを示した(図 2)。また、それらのリコンビナント r-Protein を添加した無細胞翻訳系内で 16S rRNA を転写させることで、転写共役的にリボソームの 30S サブユニットを再構成可能であることを示した。さらに、無細胞翻訳系をリボソームに封入し細胞骨格因子を発現させることでリボソームを变形可能であることを示した(Furusato T. et al., (2018), ACS Synth Biol)。

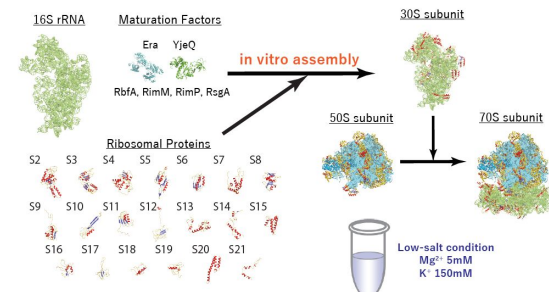


図 2 : 研究結果の概要

#### ➤ 生合成因子を用いたリボソームの試験管内再構成

30S サブユニットを含まない無細胞翻訳系内で、リコンビナント r-Protein、16S rRNA および生合成因子を混合させ、リボソーム 30S サブユニットの試験管内再構成効率をポリペプチドもしくはタンパク質合成活性で評価する PURE Direct Assay を開発した。PURE Direct Assay は状況に応じて 1-step 型と 2-step 型を用いた。(図 3)

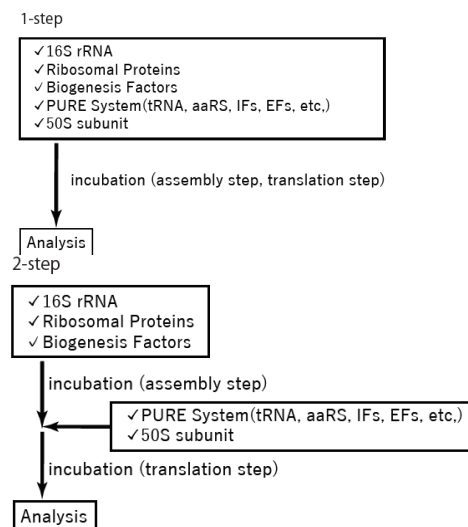


図 3 : PURE direct assay

PURE Direct Assay およびスクロース密度勾配遠心による解析から生合成因子の添加が生理的条件下でリボソームの 30S サブユニットの再構成を進行させるのに重要であることが示された(図 4)。また、熱処理がさらに 30S サブユニットの再構成を促進させることも示された。図 4 では今回の研究で用いた生合成因子 7 種類を全て添加している。今回、中でも Era と YjeQ が特に 30S サブユニットの再構成を促進することを確認した。(国際学術誌に投稿中)

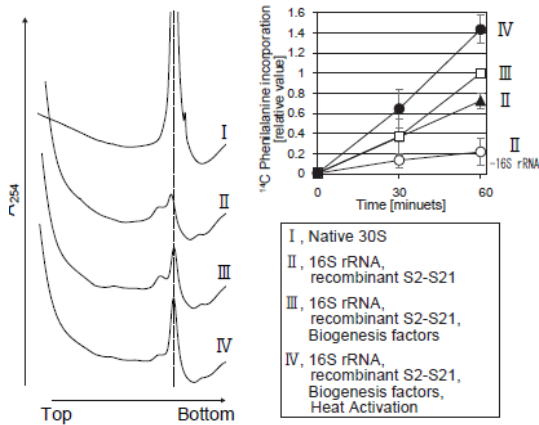


図 4: 生合成因子による 30S 再構成の促進  
シヨ糖密度勾配遠心包により 30S サブユニットの再構成を確認した(左)。2-step PURE direct assay による 30S サブユニットの再構成効率を poly-(Phe)合成量で確認した(右)。

➤ 転写共役的な 30S サブユニットの試験管内再構成

リコンビナント r-Protein を添加した無細胞翻訳系内で 16S rRNA を転写させることで、転写共役的にリボソームの 30S サブユニットを再構成可能であることを示した。また、特定の 1 種類のリコンビナント r-Protein が含まれない 19 種類の r-Protein を添加した場合は、著しく再構成が行われないことも確認した。本系への、生合成因子や rRNA/rProtein 修飾酵素の添加は、更なる効率的なリボソーム試験管内再構成を構築することを可能とし、そこで得られる知見は未だに不明瞭なりボソーム生合成過程の解明に役立つだろう。

➤ リボソーム内での複数遺伝子の発現とその機能再構成

人工膜小胞に分裂機構を付与することを目的として、細胞骨格因子である(FtsZ, ZipA, FtsA)を、無細胞翻訳系を封入した人工膜小胞内で合成させた。結果、発現させるタンパク質の組み合わせや合成比率、膜小胞内環境を変動させることで、細胞骨格因子のバンドル化、膜への局在、膜の変形を確認することができた(図 5)。これらの系を発展させ、各因子の時空間的発現制御や他の細胞骨格関連因子の同時発現を行うことで自発的に分裂する人工膜小胞の構築も将来的には可能となるだろう。

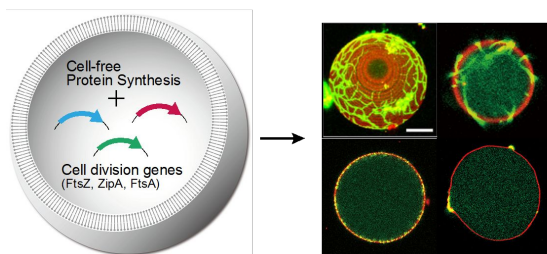


図 5: 人工膜小胞内での細胞骨格因子の発現

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

1. *De novo* synthesis of basal bacterial cell division proteins FtsZ, FtsA, and ZipA inside giant vesicles. Takumi Furusato, Fumihito Horie, Hideaki Matsubayashi, Kazuaki Amikura, Yutetsu Kuruma, Takuya Ueda, *ACS Synthetic Biology*, 7(4), 953-961, (2018). (査読有)
2. Cell-free translation system: Development in biochemistry and advance in synthetic biology. Takashi Kanamori, Takashi Nagaike, Yutetsu Kuruma, Kazuaki Amikura, Takuya Ueda, *Journal of Japanese Biochemical Society*, 89(2), 211-220, (2017), (査読有)

[学会発表](計 15 件)

1. 試験管内転写された tRNA によるタンパク質合成系の構築, 日比 敬太, 杉浦 直樹, 網藏 和晃, 清水 義宏, 横川 隆志, 上田 卓也, 第 12 回無細胞生命科学研究会, B5, 2017
2. (招待講演)生命の共通点とその再構成, 網藏和晃, 生命の起原および進化学会 & 日本アストロバイオロジーネットワーク夏の学校, 2017
3. (招待講演)リボソームの試験管内再構成系から考える生命進化, 網藏和晃, 日本進化学会第 19 回大会, S5, 2017
4. リボソーム内での大腸菌細胞骨格因子群の de novo 合成, 古里 匠, 堀江 史博, 松林 英明, 網藏 和晃, 車 ゆうてつ, 上田 卓也, 第 14 回 21 世紀大腸菌研究会, V-5, 2017
5. 大腸菌 50S リボソームサブユニット初期前駆体の試験管内再構成, 青山 遼, 網藏和晃, 上田 卓也, 第 14 回 21 世紀大腸菌研究会, 2017
6. 試験管内転写 tRNA による遺伝暗号改変タンパク質合成系の構築, 日比 敬太, 網藏和晃, 清水 義宏, 横川 隆志, 上田 卓也 第 14 回 21 世紀大腸菌研究会, 2017
7. 全ての生命が普遍的に有する翻訳系の起源, 網藏和晃 第 5 回宇宙における生命ワークショップ, 2017
8. Kazuaki Amikura, Aoyama Ryo, Tamaru Daichi, Shimizu Yoshihiro, Ueda Takuya, "In vitro reconstitution of 30S

ribosomal subunit in the presence of ribosome biogenesis factors",EMBO conference ribosome structure and function 2016, Strasbourg, (2016)

9. Aoyama Ryo, Kazuaki Amikura, Ueda Takuya,"Reconstitution of the early step assembly of E.coli 50S ribosomal subunit in vitro",EMBO conference ribosome structure and function 2016, Strasbourg, (2016)
10. Ueda, T., Aoyama, R., Amikura, K., Bercy, M., Bizebard, T., Bockelmann, U.,Biebricher, A., Wuite, G.J.L., Peterman, E.J.G., Nikolay, R., Hilal, T., Bo, Q., and Nierhaus, K.H., "Single-molecule studies of ribosome assembly: Coupling transcription and assembly",the 16th HFSP Awardees Meeting, Biopolis, Singapore, 73, (2016)
11. 試験管内再構成実験によるバクテリアリボソームの生合成過程の解明,網藏和晃、青山遼、田丸大知、清水義宏、上田卓也,第4回 Ribosome Meeting, S2-2, 2016
12. (招待講演) バクテリアリボソームの試験管内再構成, 網藏和晃,日本進化学会第18回大会, W3, 2016
13. リボソームの 30S サブユニットの in vitro 再構成手法, 網藏和晃、青山遼、田丸大知、清水義宏、上田卓也, 第13回 21世紀大腸菌研究会, 2016
14. 全ての生命が有する翻訳系の起源,網藏和晃,第4回宇宙における生命ワークショップ, 2016
15. (招待講演) 単純化遺伝暗号: 限られたアミノ酸セットで構成されるタンパク質配列空間を探索するための進化分子工学的ツール,網藏和晃, 木賀大介,日本進化学会第17回大会, W17-2, 2015

〔図書〕(計2件)

1. 無細胞タンパク質合成系による生命システムの再構成,網藏和晃, 上田卓也, 人工細胞の創製とその応用, シーエムシー出版, P1-7, (2017)
2. 生命の文字に着目した進化分子工学,網藏和晃, 木賀大介,理大 科学フォーラム, 377号, 11月号, P14-17, (2015)

〔その他〕

学会運営活動

1. 第12回 無細胞生命科学研究会、世話人
2. 第14回 21世紀大腸菌研究会、セッション座長
3. 第39回 日本分子生物学会年会、ポスター座長

6. 研究組織

(1)研究代表者

網藏和晃 (Kazuaki AMIKURA)

東京大学・大学院新領域創生科学研究科・助教

研究者番号 : 60735918

(2)研究協力者

木賀大介 (Kiga Daisuke)

早稲田大学・先進理工学部・電気・情報生命工学科・教授

研究者番号 : 30376587