様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

# 科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　　元 年　　５ 月 ３１ 日現在

機関番号：１２６０１
研究種目：基盤研究(A)（一般）
研究期間：2016～2018
課題番号：１６Ｈ０２０８９

研究課題名（和文）人工細胞を指向したバイオシステムの無細胞合成系の開発

研究課題名（英文）Development of cell-free biosystems for artificial cells

研究代表者
上田　卓也（Ueda, Takuya）

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：８０１８４９２７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　32,200,000円

研究成果の概要（和文）：人工細胞を目標として、再構築型遺伝子発現系PURE systemによるバイオシステムの構築を進めた。細胞分裂システムを、リポソーム内で合成し、変形するリポソームを作製した。ATP合成酵素とバクテリオロドプシンを、リポソーム内で発現させ、光依存的なエネルギー生産システムを構築した。リボソームの小サブユニットについては、生合成因子の存在下、生理的条件下でのアセンブリー系を構築した。大サブユニットについては個別精製したリボソームタンパク質とrRNAから、タンパク質合成活性を有するサブユニットの再構成に成功した。また、転写されたtRNA分子よるPURE systemを開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
人工細胞は、今後の生命科学の中心的な流れである合成生物学の目標である。本研究では、DNAから分裂やエネルギー生産をする生命システムを作製した。また、遺伝子発現系を増殖させるために、リボソームのアセンブリー系とDNAから機能をもった tRNA分子の合成に成功した。これらの研究は、分子から細胞を創ろうとする試みの基盤技術を提供するものである。

研究成果の概要（英文）：Aiming at artificial cells, biosystems based on the reconstituted gene expression system, PURE system, have been developed. The proteins involved in the cell division system were synthesized in liposomes and liposomes appeared to deform. By expressing ATP synthetase and bacteriorhodopsin in liposome, a light-dependent energy production system was constructed. For the small subunit of ribosomes, an assembly system under the physiological conditions in the presence of biosynthetic factors was constructed. For the large subunit, we succeeded in reconstituting subunits with protein synthesis activity from individually purified ribosomal proteins and rRNA. We also developed a PURE system based on transcribed tRNA molecules.

研究分野：生化学

キーワード：リポソーム　PURE system　ATP合成酵素　バクテリオロドプシン　光合成　細胞分裂　リボソーム　tRNA

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９、ＣＫ－１９（共通）

**１．研究開始当初の背景**

細胞の *de novo* 合成は、21 世紀の生命科学の大きな目標であり、生命原理の理解に大きく貢献することが期待される。細胞の実験室内合成の実現には、ゲノムを細胞に導入し情報を合成するトップダウン的なアプローチと、機能を担う分子（主にはタンパク質）から細胞を合成するボトムアップ的なアプーチがある。前者については、マイコプラズマ、酵母などの全ゲノム合成と細胞移植の系が確立しつつある。それに対して後者については細胞レベルでの再構築は未だ困難であるものの、タンパク質翻訳系や DNA 複製系などのサブシステムの構築がなされている。研究代表者は、PURE system という再構築型タンパク質合成系の開発に成功し、このシステムを用いてさまざまなタンパク質を合成し、その機能や構造解析を進めている。PURE system を用いて大腸菌のゲノム上のすべてのタンパク質の合成に成功している。しかし、ゲノムワイドなタンパク質の合成から、人工的に細胞を作製する上での問題点はゲノム上にコードされたタンパク質を合成しシステムを構築する場合に、少数の不活性なタンパク質の存在により、システムが機能しない可能性が高いことにある。本研究では、この問題点を解決するために、個別のサブシステムを作製し、そのシステムの機能をチェックしたのち、融合するというアプローチで、人工細胞の作製への基盤技術を開発した。

**２．研究の目的**

人工細胞の創成は合成生物学の目標の一つであり、再構築型タンパク質合成系 PURE system はその基幹システムとなることが期待されている。しかし、PURE system を人工細胞へと発展させるためには、解決すべき問題点がある。まず、PURE system 自体を、増殖特性を有するシステムへと改良する必要がある。そのために、タンパク質合成系の中心的サブシステムであるリボソームを試験内で合成するシステムを構築する。同時に、遺伝解読の基盤である tRNA 群を試験管内転写系により、高機能な形で合成する。次の課題は機能性リポソームの作製である。分裂装置、酸化的リン酸化などに関与する膜タンパク質を脂質膜上に配向性を制御して合成するシステムを開発する。さらに、エネルギーシステムとして解糖系や、酸化的リン酸化を担う巨大膜タンパク質複合体である ATP 合成酵素を、試験管内で合成する技術の開発を行い、エネルギーを生産する人工細胞を開発する。これらのサブシステムを融合させ、細胞の特性を持つ人工細胞を創成する。

**3. 研究の方法**

研究代表者は、大腸菌の翻訳に必須な因子のみから再構成した無細胞タンパク質合成系 PURE system の開発に成功している。また、PURE system を用いて大腸菌の全タンパク質(4,132 個)を合成することに成功している。情報と機能を結びつける遺伝子発現システムは生命の根幹であり、PURE system を中心にシステムを構築していくことは、人工細胞へのもっとも有効なアプローチである。しかし、PURE system を用いて人工細胞を作製するには、PURE system の増殖系を構築することが必要不可欠である。本研究では、まずその問題点を解決する。PURE system の構成成分である翻訳因子やアミノアシル tRNA 合成酵素は、PURE system で DNA から合成可能であるが、リボソーム、tRNA 群を DNA から合成するシステムを構築する必要がある。そのために本研究では①リボソームの試験管内再構築系の開発、②転写合成 tRNA による PURE system の開発を行った。また、細胞は分裂することで増殖する。分裂装置を発現したリポソームを作製し、③分裂する人工細胞を開発する。生命システムにはエネルギー生産が必要であるが、④光依存でエネルギーを生産する人工光合成細胞を構築する。

**①リボソーム再構築系の開発**

リボソームの生合成系の知見をもとに、生合成因子存在下で、生理的条件で再構成系を構築する。30S サブユニットについては、21 種類のリボソームタンパク質の調製を完了しており、またすでに関与が明らかな生合成因子を調製している。16SrRNA とリボソームタンパク質から、これらの生合成因子の存在下で、生理的条件で 30S サブユニットを構築することに成功している。現在は 50S サブユニットのリボソームタンパク質の調製と、生合成因子の調製を進め、50S サブユニットの再構成系を構築する。細胞内では、rRNA と転写系とこれらの会合プロセスは共役していると考えられるため、転写もしくは翻訳と再構成の共役系を開発する。

**②転写 tRNA による PURE system の開発**

DNA から生理活性を有した tRNA 群の転写合成系を構築する。tRNA については大腸菌では約 40 種類あり、遺伝暗号にもとづいて mRNA を解読する。機能を有する tRNA を試験管内で合成できれば、人工的な遺伝暗号表の作成が可能となり、非天然アミノ酸の導入などのさまざまな応用が可能となる。しかし、tRNA を修飾塩基が多数存在しており、翻訳プロセスにおいてこれらの修飾塩基が、その効率に関与していることが示されている。大腸菌の 21 種類（20 種類のアミノ酸と開始メチオニンに対応）の tRNA の転写系を作製しており、これらの tRNA で翻訳が可能であることを示す。また、転写 tRNA では、翻訳効率や忠実度はまだ十分とは言えないため、修飾酵素による修飾塩基の導入によって転写 tRNA 群の翻訳活性を改良する。

**③分裂する人工細胞の開発**

機能を有したプロテオリポソームの作製は、膜タンパク質の重要性を考えると、遺伝子発現系ともに人工細胞の創成に必須である。すでに PURE system と脂質を共存させることで、自発的挿入による膜タンパク質（ATP 合成酵素、トランスロコン）のリポソーム上への合成には成功している。このシステムを用いて分裂装置（FtsZ 等）の膜複合体を発現させ、分裂するリポソームを作製する。

④人工光合成細胞の開発

人工細胞の合成において解決すべき大きな問題はエネルギーの供給システムである。増殖する人工細胞のためには、エネルギーの生産系の構築が重要である。PURE system では、クレアチンリン酸でのエネルギー供給系を用いているが、タンパク質合成の阻害効果の高いリン酸の除去が大きな問題点である。エネルギー生産系について、DNA から生産系の構築を進める。バクテリオロドプシンと ATP 合成酵素を PURE system でリポソーム上に共発現させて、光依存で形成されたプロトン勾配を用いた ATP 合成酵素による ATP 合成システムを構築する。

## ４．研究成果

①リボソーム再構築系の開発

大腸菌で個別に発現と精製を行った 30S サブユニットのリボソームタンパク質と 16SrRNA から 30S サブユニットの試験管内再構成系を構築することに成功した。また生合成因子も精製し、これらの因子存在下で、生理的条件下での再構築に成功した。この系は、構成要素の量比を調節できるといった利点があるものの、原核生物の細胞内でのように、rRNA の転写やリボソームタンパク質の翻訳と共役した再構成系ではない。そこで、まず 16S rRNA の転写と共役した再構成系の開発を試みた。16S rRNA をコードする DNA、sfGFP をコードする DNA、リボソームタンパク質、精製した天然の 50S サブユニットを、リボソームを除いた PURE system に添加し、アセンブルした 30S 量を評価した。その結果、30S サブユニットの形成を示す sfGFP の合成が確認された（図 1）。また、この系に 16S rRNA の修飾酵素とその基質を加えることで、タンパク質合成活性がさらに増加した。

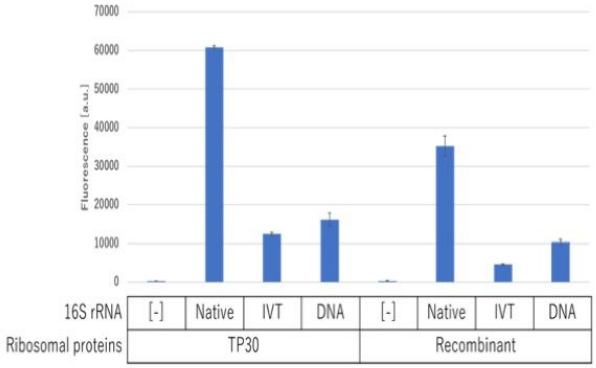


図1　30Sサブユニットの転写アセンブリー共役系
Native: 天然の16S rRNAを加えた再構成系、IVT: 試験管内で転写した16S rRNAを加えた再構成系、DNA: 16S rRNAをコードしたDNAを加えた転写と共訳した再構成系

リボソームタンパク質の翻訳と共役した 30S サブユニットの再構成系の構築には、新規のアセンブルした 30S サブユニット、内在性の 30S サブユニットを区別する必要がある。この問題を解決するために、野生型の SD 配列と異なる配列を認識する直交性リボソームを用いた。上記再構成系の 16S rRNA、sfGFP の DNA を直交性 SD pair を持つものにそれぞれ変更し、1 種類のリボソームタンパク質を除去したリボソームタンパク質の混合液と、除去した 1 種類のリボソームタンパク質 DNA を翻訳させた。その結果、一部のリボソームタンパク質において、直交性 30S サブユニットの形成を示す直交性 sfGFP の合成、つまり翻訳と再構成の共役が確認された。

50S サブユニットを構成するリボソームタンパク質 33 種類を、組み換えタンパク質として個別に発現し精製する手法を確立した。これらの組み換えリボソームタンパク質と大腸菌内在性リボソーム由来のリボソーム RNA を用いて、熱処理によって翻訳活性を有する 50S サブユニットの組み立てに初めて成功した。また熱処理後の再構成産物のサイズをショ糖密度勾配遠心で確認したところ、少量ではあるが完成したと思われる 50S サブユニットの存在が示唆された。（図 2）一方、再構成産物全体の翻訳活性は大腸菌内在性 50S サブユニットの 0.2%程度である。

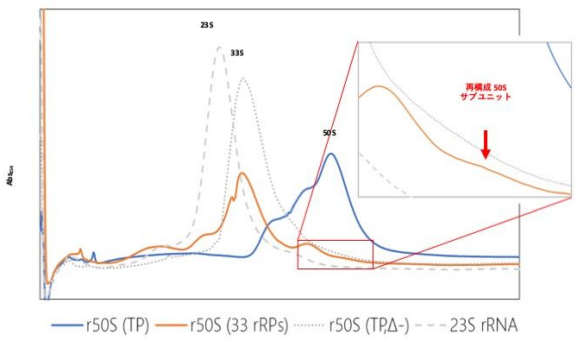


図2　再構築された50Sサブユニット

これと図 2 より、完成まで組み立てられた 50S サブユニットの比活性は十分に高いと考えられる。しかしリボソームの自己増殖を見据えると組み立て効率の改善が必要である。再構成産物中には組み立て途中の 50S サブユニット前駆体が多く蓄積しており、50S サブユニットの組み立て初期過程に組み立てのボトルネックがあると考えられる。そこで、現状のボトルネックが 50S サブユニットの組み立て初期段階に重要なリボソームタンパク質 L3、L20 のいずれかであると予

想し、当該リボソームタンパク質の新しい調製法を試みている。L3 は生体内で翻訳後にメチル化を受けるが、本研究において大量発現によって調製した L3 は大部分が未修飾であることが質量分析によって確認された。また先行研究より L3 のメチル化が 50S サブユニットの初期の組み立てに影響を与えることが示唆されている。そこで L3 とその修飾酵素 PrmB の共発現系を構築し、翻訳後修飾を受けた L3 の調製に成功した。L20 は最も凝集しやすく分解されやすいリボソームタンパク質の 1 つで、本研究においても精製過程での凝集や一部ドメインの切断が起きている。そこで、L20 をリボソーム RNA 存在下で PURE system 中で合成する手法を現在検討中である。

②転写 tRNA による PURE system の開発

修飾塩基がなくても機能すると tRNA を各アミノ酸と開始メチオニンについて一つずつ選択した合計 21 種類の試験管内転写 tRNA(iVTtRNA)からなる蛋白質合成系の構築に成功した。選択した各 tRNA のアミノアシル化特性を網羅的に観察した結果、修飾塩基を持たない iVTtRNA であっても、対応する tRNA、アミノアシル tRNA 合成酵素が揃った場合にのみアミノ酸が付加され、ミスアミノアシル化は起こらないことが示された。また、モデル蛋白質としてジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)、緑色蛍光蛋白質(GFP)を PURE system 中で合成させたところ、活性のある蛋白質が合成された。また、合成された DHFR の一分子あたりの活性は大腸菌由来 tRNA から合成された DHFR の 75%程度であった。このことから、iVTtRNA によってある程度の正確性をもって蛋白質が合成可能であることが示された。また、UCG コドンに対応する $tRNA^{Ala}_{CGA}$ を用いて自然界とは異なる遺伝暗号に基づく蛋白質合成系の構築を行った。その結果、UCG コドンが Ala に置き換わった 20 種類のアミノ酸を利用しながらも GCN コドンが非指定のコドンとなった蛋白質合成系の構築に成功した。

一方、今回構築した系の課題として蛋白質の収量が大腸菌から調製した天然の tRNA を用いた場合の 1/10 程度であることが挙げられる。これまでに、アミノアシル化効率の低い Ile、Pro、Glu、Asn に対応する tRNA を過剰に加えることで収量が 6 倍に向上することを見いだしている。このことから、アミノアシル化反応が律速となり収量を低下させていると考えている。アンチコドンループ上の修飾塩基の中にはアミノアシル化効率を向上させることが知られている。これら修飾塩基を iVTtRNA 上に導入することで、最低限の修飾塩基のみで大腸菌 tRNA と同等の合成効率が得られる系の構築が可能になると期待される。すでに $tRNA^{Ile}$ 上に $t^6A$ を導入し、アミノアシル化反応の $k_{cat}$ を 76 倍向上させること成功した。もっともアミノアシル化効率の低い $tRNA^{Glu}$ 上に $mnm^5s^2U$ を導入することを試みているが、現状では 15%程度の導入率にとどまる。今後は $mnm^5s^2U$ の導入効率の改善を進める予定である。

③分裂する人工細胞の開発

大腸菌の分裂装置の主要な構成要素は、FtsA、FtsZ 、ZipA である。これらのタンパク質をリポソーム内で PURE system を用いて発現させると、FtsZ のリングが膜上で形成されてリポソームの変形が引き起こされることを見いだした。この分裂装置が機能する上で、リポソームの電荷とタンパク質の濃度の最適化が重要であることが示された。

④人工光合成細胞の開発

エネルギーの生産系の構築については、バクテリオロドプシン（bR）が光照射によりプロトン濃度勾配を形成することに着目し、bR と ATP 合成酵素をリポソーム（SUV）上で組み合わせることで、光によって ATP を合成する人工細胞小器官を作製した。SUV を人工脂質で作製しリポソーム小胞（GUV）に封入した人工光合成細胞を作製し、ATP 合成酵素の逆反応である ATP 加水分解をアジドにより阻害することで、光照射より mM オーダーで ADP を ATP へと変換することに成功した。このシステムで合成した ATP を、PURE system の転写反応や翻訳反応に基質やエネルギーとして利用し、光依存的にタンパク質を合成する人工細胞を設計した。光合成した ATP による、mRNA を転写合成、アミノアシル化反応、翻訳のエネルギー源である GTP を合成することに成功した。さらに、光合成された ATP によって bR または ATP 合成酵素を自己増殖することで、人工細胞小器官の ATP 合成が加速化するシステムを構築した。bR を光合成した場合は、ATP 合成量が約 1.5 倍上昇、ATP 合成酵素の膜部分（Fo）を光合成した場合は、約 1.4 倍上昇した（図 3）。細胞と同様に正のフィードバック構造をもつ人工光合成細胞の構築に成功した。

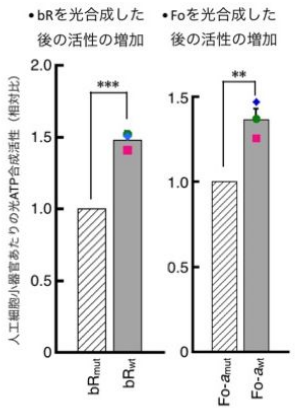


**図3.** bRまたはFoの光合成による人工細胞小器官の活性の増加。$bR_{mut}$ または $Fo\text{-}a_{mut}$ は活性を欠損した変異体。

## ５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 5 件）


① Berhanu S, Ueda T, Kuruma Y (2019) Artificial photosynthetic cell producing energy for protein synthesis. *Nature Communications* 10：1–10 （査読あり）

② Geffroy L, Bizebard T, Aoyama R, Ueda T, Bockelmann U (2019) Force measurements show that uL4 and uL24 mechanically stabilize a fragment of 23S rRNA essential for ribosome assembly. *Rna* 25: 472-480 （査読あり）

③ Masubuchi T, Endo M, Iizuka R, Iguchi A, Yoon DH, Sekiguchi T, Qi H, Iinuma R, Miyazono Y, Shoji S, Funatsu T, Sugiyama H, Harada Y, Ueda T, Tadakuma H (2018) Construction of integrated gene logic-chip. *Nature Nanotechnology* 13: 933-940 （査読あり）

④ Tamaru D, Amikura K, Shimizu Y, Nierhaus KH, Ueda T (2018) Reconstitution of 30S ribosomal subunits in vitro using ribosome biogenesis factors. *Rna* 24: 1512-1519（査読あり）

⑤ Furusato T, Horie F, Matsubayashi HT, Amikura K, Kuruma Y, Ueda T (2018) De Novo Synthesis of Basal Bacterial Cell Division Proteins FtsZ, FtsA, and ZipA Inside Giant Vesicles. *Acs Synthetic Biology* 7: 953-961（査読あり）

〔学会発表〕（計 23 件）

① 杉浦 直樹、日比 敬太、網藏 和晃、上田 卓也、無細胞タンパク質合成系を用いた $t^6A$ tRNA 修飾の生化学的機能の解明、第 41 回日本分子生物学会年会、2018 年

② 青山 遼、網藏 和晃、上田 卓也 組み換えタンパク質による大腸菌 50S リボソームサブユニットの試験管内再構成 第 41 日本回分子生物学会年会 2018 年

③ 下條 優、 網藏 和晃、 上田 卓也、PURE system における 30S サブユニット転写共役的再構成系の最適化、第 41 回 日本分子生物学会年会、2018 年

④ 日比 敬太、網藏 和晃、清水 義宏、横川 隆志、上田 卓也、試験管内転写 tRNA による遺伝暗号改変型タンパク質合成系の構築、第 41 回日本分子生物学会年会、2018 年

⑤ 下條 優、 網藏 和晃、 上田 卓也、リコンビナントタンパク質によるリボソーム 30S サブユニットの転写共役的試験管内再構成、細胞を創る研究会 11.0、2018 年

⑥ 下條 優、 網藏 和晃、 上田 卓也、PURE system における転写共役的なリボソーム 30S サブユニット構築、第 5 回 Ribosome Meeting、2018 年

⑦ 網藏 和晃、 青山 遼、 日比 敬太、 下條 優、 風穴 彰洋、 福嶋 瑞穂、 清水 義宏、 上田 卓也、 再生産可能な再構成型無細胞翻訳系、 第 43 回 生命の起源および進化学会 学術講演会、 2018 年

⑧ 山西 祐、日比 敬太、網藏 和晃、上田 卓也、tRNA 転写共役型無細胞タンパク質合成系の構築、第 13 回無細胞生命科学研究会、2018 年

⑨ 日比 敬太、網藏 和晃、清水 義宏、横川 隆志、上田 卓也、試験管内転写 tRNA による遺伝暗号改変型タンパク質合成系の構築、第 13 回無細胞生命科学研究会、2018 年

⑩ 杉浦 直樹、日比 敬太、網藏 和晃、上田 卓也、無細胞タンパク質合成系を用いた $t^6A$ tRNA 修飾の生化学的機能の解明、第 13 回無細胞生命科学研究会、2018 年

⑪ 日比 敬太、網藏 和晃、清水 義宏、横川 隆志、上田 卓也、試験管内転写 tRNA による遺伝暗号改変型タンパク質合成系の構築、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017 年

⑫ 杉浦 直樹、日比 敬太、網藏 和晃、上田 卓也、修飾導入された試験管内転写 tRNA の無細胞タンパク質合成系内における機能解析、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017 年

⑬ 下條 優、 網藏 和晃、 上田 卓也、 PURE system を用いたリボソームタンパク質の同時翻訳とその制御機構の構築、 「細胞を創る」研究会 10.0、 2017 年

⑭ 日比 敬太、網藏 和晃、清水 義宏、横川 隆志、上田 卓也、試験管内転写 tRNA による遺伝暗号改変型タンパク質合成系の構築、「細胞を創る」研究会 10.0、2017 年

⑮ Keita Hibi, Kazuaki Amikura, Yoshihiro Shimizu, Takashi Yokogawa, Takuya Ueda, Construction of Protein Synthesis System Based on Non-Canonical Genetic Code Using In Vitro Transcribed tRNA, Zhejiang University－The University of Tokyo Joint Symposium 2017, 2017

⑯ 青山 遼、網藏 和晃、上田 卓也 組み換えタンパク質を用いた大腸菌 50S リボソームサブユニット試験管内再構成系の構築 第 12 回無細胞生命科学研究会 2017 年

⑰ 下條 優、 網藏 和晃、 上田 卓也、 無細胞翻訳系におけるリボソームタンパク質の発現条件の最適化、 第 12 回 無細胞生命科学研究会、 2017 年

⑱ 杉浦 直樹、日比 敬太、網藏 和晃、上田 卓也、無細胞タンパク質合成系内における 37 位に修飾導入された試験管内転写 tRNA の機能解析、第 12 回無細胞生命科学研究会、2017 年

⑲ 福嶋 瑞穂、日比 敬太、網藏 和晃、上田 卓也、広範に存在する塩基修飾が導入された試験管内転写 tRNA による無細胞タンパク質合成系の機能向上の検討、第 12 回無細胞生命科学研究会、2017 年

⑳ 日比 敬太、杉浦 直樹、網藏 和晃、清水 義宏、横川 隆志、上田 卓也、試験管内転写された tRNA によるタンパク質合成系の構築、第 12 回 無細胞生命科学研究会、2017 年

㉑ 青山 遼、網藏 和晃、上田 卓也 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 第 14 回 21 世紀大腸菌研究会 2017 年

㉒ 下條 優、 網藏 和晃、 上田 卓也、 無細胞翻訳系中でのリボソームタンパク質の発現解析と制御、 第 14 回 21 世紀大腸菌研究会、 2017 年

㉓日比　敬太、網蔵　和晃、清水 義宏、横川 隆志、上田　卓也、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、第 14 回　21 世紀大腸菌研究会、2017 年

〔図書〕（計　0 件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計　1 件）

名称：光依存的にタンパク質生産可能な人工細胞系の構築
発明者：上田　卓也、サミュエル・ベルハヌ・レンマ、車　兪澈
権利者：国立大学法人東京大学、国立大学法人東京工業大学
種類：特許
番号：特願 2019-010844
出願年：2019 年
国内外の別： 国内

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。