

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660082

研究課題名(和文) 合成生物学的な手法による人工光合成システムの開発

研究課題名(英文) Development of artificial photosynthetic cells by synthetic approach.

研究代表者

上田 卓也 (Ueda, Takuya)

東京大学・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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：バクテリオロドプシンとFoF1-ATP合成酵素を組み込んだ(BR-FoF1)リポソームベースのバイオリアクターの構築が研究目的である。PURE systemによりFoF1-ATP合成酵素の全サブユニットをリポソーム上に発現させた。特に、各サブユニットの合成量が等しくなるように、DNA量の条件検討を行った。合成されたATP合成酵素が十分な活性を有していることを見いだした。バクテリオロドプシンについては、レチナルのスペクトルからナノディスク上には活性を有した形で挿入されていることが示された。さらに、変異型と天然型のバクテリオロドプシンをリポソームディスプレイ法による選抜が可能であった。

研究成果の概要(英文)：For production of membrane protein, liposome integrated PURE system was developed. Using this system, bacteriorhodopsin and FoF1-ATP synthase were successfully expressed onto lipid bilayer. While bacteriorhodopsin expressed onto liposome composed of soy bean extract exhibited proton-pumping activities, artificial liposome such as POPC cannot provided scaffold for the activity of bacteriorhodopsin. Concerning FoF1-ATP synthase, amount of template DNA for individual subunit was optimized for the synthesis of active ATPase. Both synthesized bacteriorhodopsin and ATPase were evaluated by measuring enzymatic activities. To synthesize photosynthetic cell, the Gigantic Unilamellar Vesicle (GUV) containing the Small Unilamellar Vesicles (SUV) onto which bacteriorhodopsin and FoF1-ATP synthase were translocated, were developed.

研究分野：合成生物学

キーワード：バクテリオロドプシン ATP合成酵素 光合成

1. 研究開始当初の背景

光合成は植物やある種のバクテリアが光エネルギーを利用して水と二酸化炭素から酸素と有機化合物(炭水化物)を作り出す生体システムである。農業は、光合成を活用する工学とも換言できる。しかし、光合成は生命を利用しなければならないという考えが、工学的な発展に大きな制約を与えている。たとえば、空気中のCO₂固定を目標としての植林でも、樹木が十分生長し期待される効果が得られるまでには、数十年間の時間を要する。また光合成細菌によるCO₂の取り込みに関しても、バクテリアが生存可能な環境をまず確保し適した条件へ整備する必要がある。この問題に対して本提案は、光合成のメカニズムを模倣した自立的かつ制御性に高い人工バイオシステムを構築し、太陽光エネルギー変換によるCO₂固定(同時にCO₂削減)を目標とする。

この構想は、現時点では試験管内もしくは実験室スケールで実現可能なシステムであるが、いくつかの問題点を克服し基盤技術を確立すれば、将来的には地球環境のCO₂固定という極めて大きなスケールへの応用が期待できる。本提案の構想は、人工光合成システムを組み込んだ、自己複製型の人工細胞の構築である。人工細胞の構築は生命科学、主に合成生物学の分野で研究が開始されているが、個々の生体システムは構築可能な段階まで進んでいるものの、それらを統合したメタレベルとしての大きなシステムの構築までには至っていない。特に細胞の持つ最もダイナミックな反応である自己複製については、基礎的なレベルを含めた研究がまだ不足している。しかし仮に、上述のような光エネルギーからCO₂を固定できるシステムが構築され、かつ自己触媒的にシステムが複製(増殖)する特性を有しているとすれば、農業における人工細胞利用という可能性が生まれる。そのためには、光合成という生体システムの再構築化が必須であり、さらシステムに自己複製性(もしくは増殖性)を付与する必要がある。なぜなら、化学工業とは異なり、生物の増殖という特性は、農業における最大の利点であるからである。バイオテクノロジーにおいて、こうした増殖する再構築型生命システムが求められるのは必至であ

り、来るべき低炭素化社会においても基盤的技術となるものと考え。本提案では、自己複製系の前段階として遺伝情報から自動的にバイオシステムが生産される自発的なシステムを作製する。PURE systemはまさに独自技術であるため、そのユニークは十分であると確信している。

生命システムを解析しメカニズムを解明するという研究が、生命科学におけるメインストリームであった。しかし、生命の複雑なシステムの理解が進み、そうした知見をもとに生命を作ることでもできるのでは、という思いが膨らみつつある。こうした新たな芽が、合成生物学である。本研究は、こうした合成生物学の一つの挑戦ということができる。バイオシステムを再構築することで、システムのより定量的なデータを得ることができる。こうしたデータをもとにより精緻な生命システムのシミュレーションが可能となり、生命のより深い理解へとつながる。

2. 研究の目的

光エネルギー変換系の酵素とCO₂固定系の酵素を融合したハイブリッド光合成システムの人工細胞化を目的とする。光エネルギー変換系には好熱菌由来のバクテリオロドプシンとATPaseを、CO₂固定系については植物由来の酵素を用いる。再構築型遺伝子発現システムPURE systemでこれらの酵素群の遺伝子を共発現させ光合成人工細胞を構築する。本研究の新規性は、次の二点である。生細胞では組み合わせることが困難なハイブリッドシステムを、異種の遺伝子をPURE systemで共発現させることで容易に達成できること、PURE systemで遺伝子から酵素群が無制限に生産できること、である。遺伝子情報からバイオシステムを構築する合成生物学的アプローチにより、酵素の機能を最大限に利用しながらも細胞を用いない光合成化学工場の構築を目標とする。

3. 研究の方法

異種の生物種の光合成関連プロセスを融合させた人工的光合成システムを構築する。具体的なシステム構築は、光合成細菌の持つバクテリオロドプシン、好熱菌の持つFoF1-ATP合成酵素、さらに植物の持つ

Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase (RubisCO) を融合し、これらの反応が連続して進行するバイナノリアクターの、遺伝子からの作製を目指す。基盤技術は、私達が開発した無細胞、タンパク質合成系 PURE system である (Shimizu *et al. Nat Biotechnol*, 2001)。この PURE system は任意の DNA を加えるだけで、数時間のうちに目的のタンパク質が得られる再構築型タンパク質合成系である。細胞内での発現・精製が難しいタンパク質、特に膜タンパク質の合成に有効なツールとして、現在注目を集めている。すでにリポソーム存在下において、活性を維持したいくつかの膜タンパク質の合成に成功している。特に、巨大膜タンパク質複合体 (分子量約 550 kDa) である FoF1-ATP 合成酵素 (FoF1) を PURE system で高い生理活性を有する形で合成すること示した (Kuruma *et al. Biochemical Journal*, 2012)。また、バクテリオロドプシン (BR) に関しても、すでに無細胞系で天然の構造を維持した活性状態で合成されることが確認されている。この二つ酵素を統合した人工膜小胞を構築する事によって、光によるリポソーム内への H₊ 勾配の形成と、それに依存した FoF1-ATP 合成酵素による ATP の合成を行なうリアクターが構築を目的とする。光エネルギー変換系の酵素と CO₂ 固定系の酵素を融合したハイブリッド光合成システムの人工細胞化を目的とする。光エネルギー変換系には好熱菌由来のバクテリオロドプシンと ATPase を、CO₂ 固定系については植物由来の酵素を用いる。再構築型遺伝子発現システム PURE system でこれらの酵素群の遺伝子を共発現させ光合成人工細胞を構築する。

4. 研究成果

バクテリオロドプシンと FoF1-ATP 合成酵素を組み込んだ (BR-FoF1) リポソームベースのバイナノリアクターの構築をまず行った。PURE system により FoF1-ATP 合成酵素の全サブユニットをリポソーム上に発現させた。特に、各サブユニットの合成量が等しくなるように、DNA 量の条件検討を行った。合成された ATP 合成酵素が十分な活性を有していることを見いだした。

バクテリオロドプシンについては、レチナールのスペクトルからナノディスク上には活性を有した形で挿入されていることが示されたが、リポソーム上では明確なスペクトルを測定することができなかった。しかし、リポソームの調製法や脂質の組成を検討することにより、光照射でプロトン勾配が形成できるバクテリオロドプシンの合成に成功した。リポソームについて POPC などの合成脂質を検討したが、良好な結果をえることができず、Soy Bean Extract のみが、活性を有していた。また変異体のバクテリオロドプシンをリポソームディスプレイ法で選抜することにも成功した。また、合成脂質で構成した GUV 中に、バクテリオロドプシンと ATP 合成酵素を組み込んだ SUV を内包することに成功し、人工オルガネラ様の構造を構築することに成功した。

またバクテリオロドプシンも ATP 合成酵素も脂質二重膜上に配向性を制御して合成する必要がある。そのためには、トランスロコン (SecYEG) をあらかじめ合成しておけば、制御が可能になると考えられる。大腸菌の SecYEG を PURE system で発現させ、合成された SecYEG がタンパク質の膜の挿入活性を有していた。

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 9件)

1. Yutthanasirikul R, Nagano T, Jimbo H, Hihara Y, Kanamori T, Ueda T, Haruyama T, Konno H, Yoshida K, Hisabori T, Nishiyama Y (2016) Oxidation of a Cysteine Residue in Elongation Factor EF-Tu Reversibly Inhibits Translation in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803. *J Biol Chem* **291**(11): 5860-5870 (査読有り)
2. Kuruma Y, Ueda T (2015) The PURE system for the cell-free synthesis of membrane proteins. *Nat Protoc* **10**(9): 1328-1344 (査読有り)
3. N Nagano T, Yutthanasirikul R, Hihara Y, Hisabori T, Kanamori T, Takeuchi N, Ueda T, Nishiyama Y (2015) Oxidation of translation factor EF-G transiently retards the translational elongation cycle in *Escherichia coli*. *J Biochem* **158**(2): 165-172 (査読有り)

4. Niwa T, Sasaki Y, Uemura E, Nakamura S, Akiyama M, Ando M, Sawada S, Mukai S-a, Ueda T, Taguchi H, Akiyoshi K (2015) Comprehensive study of liposome-assisted synthesis of membrane proteins using a reconstituted cell-free translation system. *Sci Rep* **5** (査読有り)
5. Niwa T, Sugimoto R, Watanabe L, Nakamura S, Ueda T, Taguchi H (2015) Large-scale analysis of macromolecular crowding effects on protein aggregation using a reconstituted cell-free translation system. *Front Microbiol* **6** (査読有り)
6. Matsubayashi H, Kuruma Y, Ueda T (2014) Cell-free synthesis of SecYEG translocon as the fundamental protein transport machinery. *Orig Life Evol Biosph* **44**(4): 331-334 (査読有り)
7. Matsubayashi H, Kuruma Y, Ueda T (2014) In vitro synthesis of the E. coli Sec translocon from DNA. *Angew Chem Int Ed Engl* **53**(29): 7535-7538 (査読有り)
8. Matsubayashi H, Ueda T (2014) Purified cell-free systems as standard parts for synthetic biology. *Curr Opin Chem Biol* **22C**: 158-162 (査読有り)
9. Shimizu Y, Kuruma Y, Kanamori T, Ueda T (2014) The PURE system for protein production. *Methods Mol Biol* **1118**: 275-284 (査読有り)

〔学会発表〕(計 18 件)

1. 上田卓也「人工細胞の構築に向けて：創発と依存」第 38 回日本分子生物学会、神戸ポートアイランド 2015/12/4
2. 上田卓也「どのようにして細胞を創るのか」細胞を創る研究会 8.0 大阪大学、2015/11/12
3. 古里匠、松林英明、車兪澈、上田卓也「無細胞タンパク質合成系を用いた細胞分裂系の再構成」細胞を創る研究会 8.0 大阪大学、2015/11/12
4. 上田卓也「生化学は無細胞ではじまり、無細胞で終わる」第 10 回無細胞生命科学研究会 理研横浜キャンパスホール、2015/10/13
5. Takuya Ueda "The Pure System for Artificial Cells" Satellite Meeting "Genetic code and translation: from single molecule to systems biology view" Dresden, Germany, 2015/7/17
6. Takuya Ueda "The PURE System as a platform technology for Synthetic Biology" Gordon Research Center on Synthetic Biology 2015, Sunday River, Newly, Maine, USA, 2015/7/2
7. Takuya Ueda "The PURE System for Synthetic Biology" 1st World Congress

- on Laboratory Medicine of Chinese Research Hospital Association Hangzhou, China, 2015/4/24
8. Belay Bezabeh, Takashi Kanamori, Hideaki Matsubayashi, Takuya Ueda "Cell free synthesis of the human chemokine G protein coupled receptor for future antibody screening" Antibody as Drugs: Immunological Scaffolds as Therapeutics, Banff, Canada, 2015/2/12
9. Hideaki Matsubayashi, Yutetsu Kuruma, Takuya Ueda "Cell free Synthesis of Sec Translocon Liposome Membrane" Biophysical Society 59th Annual Meeting, Baltimore Maryland, USA, 2015/1/29
10. 松林英明、車兪澈、西山賢一、上田卓也「PURE system による膜タンパク質合成システムの構築」第 9 回無細胞生命科学研究会 大阪大学医学部、2014/10/9
11. 遠藤佑太、松林英明、車兪澈、上田卓也、西山賢一「タンパク質膜挿入に關与する糖脂質酵素 MPLase の植物ホモログの探索」第 9 回無細胞生命科学研究会、大阪大学医学部、2014/10/8
12. 古里匠、松林英明、車兪澈、上田卓也「無細胞タンパク質合成系を用いた細胞分裂系の再構成」第 9 回無細胞生命科学研究会、大阪大学医学部、2014/10/8
13. 瀧澤剛、松林英明、車兪澈、上田卓也「ヒト由来膜タンパク質の無細胞発現と膜局在化傾向の網羅的解析」第 52 回生物物理学会年会 札幌コンベンションセンター、2014/9/27
14. 松林英明、車兪澈、上田卓也「In vitro Synthesis SecYEG Tranlocon」第 5 2 回日本生物物理学会年会、札幌コンベンションセンター、2014/9/25
15. 松林英明、車兪澈、上田卓也「In vitro Synthesis SecYEG Tranlocon」生命科学夏の学校 滋賀県高島市 白浜荘、2014/8/29
16. 松林英明 車兪澈 上田卓也「In vitro Synthesis of Sec Translocon from DNA」Open Questions on the Origin of Life 2014 国際高等研究所、2014/7/13
17. Takuya Ueda "The Pure System" International Symposium "Cell Free Protein Synthesis" and 3rd Status Seminar "Cell free Bioproduction" Fraunhofer Forum Berlin, 2014/6/27
18. 松林英明、車兪澈、上田卓也、「無細胞翻訳系による SecYEG トランスロコンの合成」第 11 回 21 世紀大腸菌研究会 ホテル大観、盛岡市、2014/6/6

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/molbio/index.html>

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者 なし

()

研究者番号：

(3)連携研究者 なし

()

研究者番号：