

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26710014

研究課題名(和文)無細胞タンパク質合成システムの自己複製

研究課題名(英文)Development of the self-replicable cell-free protein synthesis system

研究代表者

清水 義宏(Shimizu, Yoshihiro)

国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・ユニットリーダー

研究者番号：90401231

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,000,000円

研究成果の概要(和文)：生体分子の組み合わせによる生命の再構成を達成するためには、タンパク質を生産する手段そのものを自己複製可能な状態で再構成することが不可欠であると考えられる。本研究では、再構成型無細胞タンパク質合成システムであるPURE systemを生命の再構成のための基幹システムとして捉え、翻訳システムを用いた翻訳システム自体の自己複製を達成するために、リボソームの再構成、tRNAの再構成、マイクロ流路におけるタンパク質合成系の構築を行い、それぞれの技術基盤の構築を行った。

研究成果の概要(英文)：To achieve the reconstruction of life by a combination of biomolecules, it is considered essential to reconstitute the means for producing proteins themselves in a self-replicable state. In this research, to achieve self-replication of the translation system by itself, we regarded the PURE system, a reconstituted cell-free protein synthesis system, as a fundamental system for the reconstruction of life and developed each technological basis for ribosome reconstitution, tRNA reconstitution, and protein synthesis in a microchannel.

研究分野：生化学

キーワード：無細胞タンパク質合成 リボソーム tRNA マイクロ流路

## 1. 研究開始当初の背景

人工的に合成した細胞の全遺伝子配列を細胞に組み込むことによる人工細胞の創成 (Gibson, D.G. *et al.*, *Science*, **329**, 52-56, 2010) や、DNA 合成と自己生産する膜小胞を同時に行うことによる原始的細胞モデルの構築 (Kurihara, K. *et al.*, *Nat. Chem.*, **3**, 775-781, 2011)、RNA 複製とタンパク質合成を膜小胞内で行わせることによる分子進化の再構成 (Ichihashi, N. *et al.*, *Nat. Commun.*, **4**, 2494, 2013) など、近年様々な切り口から細胞機能を再構成する研究が活発に行われているが、細胞を構成する生体分子を一から組み立てることによる生命の再構成ははまだ実現されていない。単独で培養可能な生物の中で最小のゲノムを持つ *Mycoplasma genitalium* が持つ 482 の遺伝子のうち、382 の遺伝子が生育に必須であることが明らかにされている (Glass, J.L., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**, 425-430, 2006) が、これらのうち 95 種類はタンパク質の生合成に関与する遺伝子であり、生体分子の組み合わせによる生命の再構成を達成するためには、タンパク質を生産する手段そのものを自己複製可能な状態で再構成することが不可欠であると考えられた。

## 2. 研究の目的

前述した研究開始当初の背景を踏まえ、研究代表者によって構築された、タンパク質合成に関わる個々の因子から構成される再構成型無細胞翻訳システムである PURE system (Shimizu, Y. *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, **19**, 751-755, 2001) を生命の再構成のための基幹システムとして捉え、翻訳システムを用いた翻訳システム自体の自己複製を達成するための技術開発を行い、個々の生体分子から生命を再構成させるための基盤を構築することを目的とした。

PURE system そのものを自己複製可能な状態に昇華するためには、現在、混合物の状態から調製している tRNA およびリボソームの再構成研究と、それを内包する「うつわ」の研究が必須であると考えられた。大腸菌のタンパク質合成システムにおいてはコードンの読み取りに 41 種類の tRNA を用いており、またリボソームは大小 2 つのサブユニットから構成され、30S サブユニットは 16S rRNA と 21 のリボソームタンパク質 (S1 ~ S21) から、50S サブユニットは 23S rRNA および 5S rRNA と 33 のリボソームタンパク質 (L1 ~ L6, L7/L12, L9 ~ L25, L27 ~ L36) から構成されている複雑な複合体を形成している。tRNA、リボソームいずれの分子においても RNA のプロセッシングや、RNA・タンパク質に分子修飾が施されるなど、細胞内において効率的にタンパク質合成を行うために、複雑な過程を経て成熟化されており、それ故、

PURE system においても、細胞内で合成された完成品の状態を細胞から調製し、利用するに留まっている。したがって、これらの分子の修飾過程や、複合体形成過程のメカニズムを理解した上で再構成研究を行う必要があり、これら tRNA やリボソームを、個々の分子から活性を保持した状態で合成することができるようにすることで、PURE system の自己複製にむけた基盤構築につながると考えられた。そこで、本研究では、試験管内におけるリボソームの再構成研究、転写合成した tRNA の利用による tRNA の再構成研究、また、これらの研究成果を内包するための「うつわ」として、ガラス基板を利用したマイクロ流路上におけるタンパク質合成研究を行い、PURE system の自己複製にむけた基盤構築を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) リボソームの再構成研究

細胞内においてはリボソームの再構成を補助するとされている因子が多数存在しており、これらの機能についてはよくわかっていないことが多い。そこで、リボソーム小サブユニットに着目し、リボソームを構成するリボソーム RNA、リボソームタンパク質およびこれらの補助因子の調製を個々に行い、それらを用いた小サブユニットの再構成を行うことにより、試験管内リボソーム再構成系を構築する。また、再構成されたりリボソームにおける個々のリボソームタンパク質の量比などを明らかにするために、質量分析機を利用したタンパク質の絶対定量法を開発し、リボソームの再構成研究に役立てる基盤を構築する。

### (2) tRNA の再構成研究

天然型 tRNA は様々な修飾塩基が施されており、特に、コードンの解読を直接担うアンチコードン部位においては細胞にとって必須な修飾塩基が施されていることが分かっている。これらの修飾塩基の役割などを完全に解明し、PURE system においてタンパク質合成を行う上で必要な tRNA のセットを同定するため、修飾塩基を全く含まない tRNA 混合物の転写合成系を確立し、これを用いたタンパク質合成研究を行うことによって tRNA をどのように再構成させることがよいのかの検討を行う。

### (3) マイクロ流路上におけるタンパク質合成研究

PURE system を自己複製可能な状態で構築した際の評価系に「うつわ」としての人工細胞の構築が必要である。人工細胞の構築にはこれまで脂質二重膜などを用いた小胞形成

が主に用いられてきたが、近年ではマイクロ流路を利用した「うつわ」の形成による人工細胞構築が行われるようになってきた。そこで、本研究では、ガラス基板を利用したマイクロ流路を構築し、マイクロ流路内に DNA を固定化し、固定化した DNA から PURE system によるタンパク質合成を行うことが可能な、遺伝情報を内包した人工細胞の構築を行う。

#### 4. 研究成果

##### (1) リボソームの再構成研究

リボソーム小サブユニットを構成する 21 種類のリボソームタンパク質の大量発現系の構築およびそれらの調製、これらに天然型のリボソーム RNA を加えたリボソーム小サブユニットの再構成を過去の知見 (Maki, J.A., et al., *Mol. Cell*, **10**, 129-138, 2002) を参考にすること、また、小サブユニットの生合成を補助する因子を個々に精製し、再構成系に投入することによって生理条件下に近い形で小サブユニットの再構成を行うことに成功した。また、リボソームの再構成状態を定量的に評価するための評価系として、PURE system によって合成された安定同位体標識ペプチドおよび質量分析機を利用したタンパク質の絶対定量法、MS-QBiC (MS-Quantification By isotope-labeled Cell-free products) 法の確立を行った。さらに、小サブユニットに RNA 分解酵素処理およびトリプシン処理を行うことによってリボソームタンパク質から生ずるペプチド断片の質量分析を行い、リボソーム小サブユニットの再構成を定量的に評価するためのリボソームタンパク質のペプチド断片を選出し、これを元に MS-QBiC 法によるリボソームの再構成状態の評価を行うための基盤整備を行った。

##### (2) tRNA の再構成研究

これまで、大腸菌が保持する 41 種類の tRNA のうち、21 種類の tRNA について、転写調製を行い、それぞれのアミノ酸受容能・コドン解読能の測定を行い、それらを用いた PURE system におけるタンパク質合成に成功していた。転写合成による tRNA 調製において、RNA/タンパク質複合体である大腸菌由来の RNaseP を用いた 5' 端のプロセシングを行っていたが、これを *Trypanosoma brucei* 由来のタンパク質のみで形成されるプロセシング酵素 (PRORP1 および PRORP2) に置き換えることによって tRNA 調製が可能であることがわかった。これによって分解に弱い RNA 成分を持たない tRNA の 5' 端プロセシング系を構築することができ、tRNA の調製が簡便になるだけでなく、PURE system の自己複製系においても積極的に利用する基盤が

整った。

##### (3) マイクロ流路上におけるタンパク質合成研究

ストレプトアビジンが固定化された直径 34  $\mu\text{m}$  のマイクロビーズに対し、ビオチンを結合した GFP 遺伝子 DNA を吸着させ、これをタンパク質などの吸着の少ないガラスマイクロチップに導入した。流路内には流路幅が 10  $\mu\text{m}$  になるようなダム構造を設け、マイクロビーズが流路内に留まるように設計を行った (図 1)。

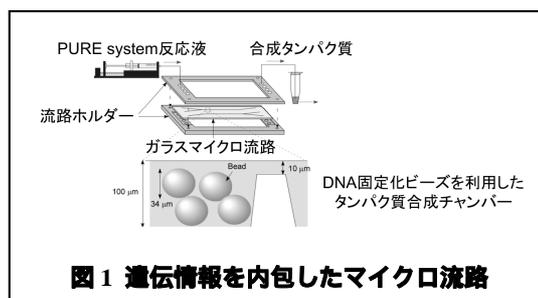


図 1 遺伝情報を内包したマイクロ流路

作製したマイクロ流路に対し、PURE system の反応液を導入することにより GFP の合成が蛍光測定により確認され、さらに、反応液を導入する流速を遅くすることによって合成量が増大することが確認された。また、マイクロ流路を水で洗い流してやることにより、再度 GFP の合成が可能であることも確認され、遺伝情報が内包されたタンパク質合成の「うつわ」として機能することが確認された。

#### 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)

Matsuura, T., Tanimura, N., Hosada, K., Yomo, T., Shimizu, Y.  
Reaction dynamics analysis of a reconstituted Escherichia coli protein translation system by computational modeling.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **114**, E1336-E1344, 2017  
査読あり  
DOI: 10.1073/pnas.1615351114

安達仁朗, 清水義宏  
人工細胞と無細胞タンパク質合成システム.  
人工細胞の創製とその応用 (シーエムシー出版 植田充美 監修), 8-14, 2017  
査読なし

Narumi, R., Shimizu, Y., Ukai-Tadenuma, M., Ode, K. L., Kanda, G. N., Shinohara, Y., Sato, A., Matsumoto, K., Ueda, H. R.

Mass spectrometry-based absolute quantification reveals rhythmic variation of mouse circadian clock proteins.

*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **113**, E3461-E3467, 2016

査読あり

DOI: 10.1073/pnas.1603799113

Sunagawa, G. A., Sumiyama, K., Ukai-Tadenuma, M., Perrin, D., Fujishima, H., Ukai, H., Nishimura, O., Shi, S., Ohno, R., Narumi, R., Shimizu, Y., Tone, D., Ode, K. L., Kuraku, S., Ueda, H. R.

Mammalian reverse genetics without crossing reveals Nr3a as a short-sleeper gene.

*Cell Rep.*, **14**, 662-77, 2016

査読あり

DOI: 10.1016/j.celrep.2015.12.052

清水義宏, 木賀大介  
無細胞タンパク質合成システム  
生物校学会誌, **93**, 603-606, 2015  
査読なし

Tanaka, Y., Shimizu, Y.  
Integration of a reconstituted cell-free protein-synthesis system on a glass microchip.

*Anal. Sci.*, **31**, 67-71, 2015

査読あり

DOI: 10.2116/analsci.31.67

Susaki, E. A., Tainaka, K., Perrin, D., Kishino, F., Tawara, T., Watanabe, T. M., Yokoyama, C., Onoe, H., Eguchi, M., Yamaguchi, S., Abe, T., Kiyonari, H., Shimizu, Y., Miyawaki, A., Yokota, H., Ueda, H. R.

Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis.

*Cell*, **157**, 726-39, 2014

査読あり

DOI: 10.1016/j.cell.2014.03.042

Shimizu, Y.  
Biochemical aspects of bacterial strategies for handling the incomplete translation processes.

*Front. Microbiol.*, **5**, 170, 2014

査読あり

DOI: 10.3389/fmicb.2014.00170

清水義宏  
生命の部分再構成としての PURE system  
生体の科学, **65**, 498-499, 2014  
査読なし

〔学会発表〕(計 12件)

清水義宏  
新規タンパク質定量法「MS-QBiC」による体内時刻の測定

メディカルジャパン 2017 大阪

2017年2月16日

インテックス大阪(大阪府・大阪市)

清水義宏

新規タンパク質定量法「MS-QBiC」による体内時刻の測定

神戸ポートアイランド創薬フォーラム

2017年1月18日

理化学研究所融合連携イノベーション推進棟(兵庫県・神戸市)

清水義宏

次世代シーケンサーを用いた mRNA 配列とリボソームの相互作用解析

「細胞を創る」研究会 9.0

2016年11月21日-22日

早稲田大学(東京都・新宿区)

清水義宏

次世代シーケンサーを用いた mRNA 配列とリボソームの相互作用解析

第11回無細胞生命科学研究会

2016年10月6日-7日

ゆこたんの森(岩手県・雫石町)

清水義宏, 鳴海良平, 上田泰己

再構成型無細胞タンパク質合成システムを利用した新規タンパク質定量法「MS-QBiC」による体内時刻の測定

第68回日本生物工学会大会

2016年9月30日

富山国際会議場(富山県・富山市)

Shimizu, Y., Narumi, R., Ueda, H. R.

Body time detection by a novel protein quantification method using mass spectrometry and cell-free protein synthesis system.

QBIC Symposium 2016

2016年9月5日-7日

千里ライフサイエンスセンター(大阪府・吹田市)

清水義宏

タンパク質の再構成

日本進化学会第18回大会ワークショップ

2016年8月25日

東京工業大学 大岡山キャンパス(東京都・目黒区)

清水義宏

次世代シーケンサーを用いた mRNA 配列とリボソームの相互作用解析

第10回無細胞生命科学研究会

2015年10月13-14日

理化学研究所 横浜キャンパス(神奈川県・横浜市)

松浦友亮, 清水義宏, 細田一史, 谷村直樹, 四方哲也

全成分タンパク質合成反応モデルの構築と  
これを用いた反応ダイナミクス解析  
第 53 回生物物理学学会年会  
2015 年 9 月 14 日  
金沢大学 (石川県・金沢市)

Shimizu, Y.

Systems biological approaches for the E. coli  
translation system.  
Workshop in 13<sup>th</sup> European Conference on  
Artificial Life  
2015 年 7 月 21 日  
York (U. K.)

鳴海良平, 清水義宏, 上田泰己  
PURE system によるペプチド合成を利用した  
マウス時計タンパク質の絶対定量  
第 9 回無細胞生命科学研究会  
2014 年 10 月 9 日  
大阪大学 吹田キャンパス (大阪府・吹田市)

Shimizu, Y.

Reconstitution of a translation system from  
molecular parts.  
Development an future of artificial cells:  
Computation, fluctuation, and evolution  
2014 年 6 月 10 日  
京都大学 (京都府・京都市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.qbic.riken.jp/japanese/research/outline/lab-16.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

清水 義宏 (Shimizu, Yoshihiro)  
国立研究開発法人理化学研究所・生命システム  
研究センター・ユニットリーダー

研究者番号 : 90401231

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし

### (4)研究協力者

なし