

無細胞タンパク質合成システム

清水 義宏¹・木賀 大介²

はじめに

合成生物学が目指すゴールの一つに、「細胞を創る」ことがあげられる。生命に限らず、何かしらのモノの内部構造を本質的に理解するためには、現実に対応した数式などを組み合わせたモデルを用いて、我々が理解可能な形で本質を表現することが可能になるか、または実際にその本質を再現する（創る）こと、さらに、その理解に基づいて我々が狙った形で再現したものを制御することができるようになることが必要不可欠である。「細胞を創る」という表現自体は、2010年に Venter らが行った、完全に人工合成したDNAを既存の細胞のもつDNAと置き換える技術や¹⁾、CRISPR、TALENなどの、近年になって飛躍的な発展を遂げたゲノム編集技術を利用して、狙った表現型をもつ細胞・個体を創り出すこと、またES細胞やiPS細胞などを利用した組織の再構成など、さまざまな目的・手段を内包するが、究極的には分子の自己集合体としての生命を、個々の分子から創り出すことが生命の本質的な理解へとつながると考えられる。

生命システムは、代謝、分裂、空間移動、外環境との物質交換、細胞間コミュニケーションなど、さまざまな挙動を示すが、そうした生命活動を支えているのは、細胞内外でさまざまな役割を果たすタンパク質やRNAである。地表付近のほとんどの細胞は、地球に降り注ぐ太陽エネルギーと二酸化炭素を出発点として生み出されたさまざまな外環境物質を取り込み、それらを基にDNAから遺伝情報を発現させ、RNA・タンパク質を合成し、生命活動を下支えることによっていわゆる散逸構造を形成する。合成産物であるRNA・タンパク質自体がそれらを合成するためのシステムの主体として働き、生命活動の維持・運営に貢献している。したがって、これらRNA・タンパク質を合成するシステムは生命システムを根本から支える基盤システムであるといえ、それらシステムの研究は「細胞を創る」研究においても必要不可欠であると考えられる。本稿では、タンパク質を合成するシステムに焦点をあて、それを試験管内において再構成する技術である、無細胞タンパク質合成システムと「細胞を創る」研究との関わりについて論じる。

無細胞タンパク質合成システムとは

遺伝情報を維持・機能させる一連のプロセスの要点である遺伝暗号表の解明に、無細胞タンパク質合成系は深

く貢献してきた。WatsonとCrickが1953年にDNAの二重らせん構造を発見し、生命が新しい生命を生み出すための基本的な原理が明らかにされたのち、研究の主眼はDNAの持つ配列情報がどのようにして具体的な機能へと変換されるのか、すなわち、DNAの持つ配列情報を基にしたタンパク質合成の仕組みがいかんして成り立っているのかに移っていった。1961年にNirenbergとMatthaeiは大腸菌を破碎して得た細胞抽出液に人工的に合成したポリウリジル酸を加えることにより、ポリフェニルアラニンが合成されることを発見した²⁾。この実験により、遺伝暗号の存在が明らかにされ、Uが連続した配列（DNA配列上ではT）がフェニルアラニンを規定していることが明らかにされた。また同時に、これは特定のアミノ酸配列を持つポリペプチドを鋳型配列依存的に合成した最初の例でもあり、無細胞タンパク質合成システムの基礎となる実験でもあった。この実験を皮切りに無細胞タンパク質合成システムを用いてさまざまな遺伝暗号が解読されたとともに、リボソームの構造や機能、タンパク質合成システム自体の機構などの解析に役立てられてきた。

一方、無細胞タンパク質合成システムは鋳型依存的に特定のタンパク質を試験管内において合成する技術としても注目され、さまざまな技術開発が行われてきた。鋳型mRNAの転写とタンパク質の合成を同時に行うZubayらの開発したシステム³⁾をベースに、反応液組成の最適化や、また、限外ろ過膜などを利用して基質を連続的に供給するシステムの構築^{4,5)}などが行われ、反応液あたりのタンパク質合成量は飛躍的に向上した。また、抽出液を取得する由来となる細胞についても、大腸菌のほか、コムギ胚芽⁶⁾やヒト細胞⁷⁾など、さまざまな細胞が用いられるようになった。特にコムギ胚芽は、RNA分解酵素が少なく、非常に安定なタンパク質合成システムを構築できることが報告されており、限外ろ過膜を用いた反応システムの構築により数日から数週間連続的にタンパク質を合成することが可能である⁸⁾。基本的な反応液組成については、細胞抽出液に依存せず、細胞を破碎して30,000 × gの遠心にて不要物を除去した細胞抽出液（S30）に、RNA合成酵素を加え、エネルギー源としてATPやGTPの他に、クレアチンリン酸やホスホエノールピルビン酸などのリン酸基供給源とそれらを基質として用いるエネルギー再生因子などを加えた反応液に基質となるアミノ酸や鋳型DNAを加えて試験管内で

著者紹介 ¹理化学研究所 生命システム研究センター 無細胞タンパク質合成研究ユニット E-mail: yshimizu@riken.jp

²東京工業大学大学院総合理工学研究科知能システム科学専攻・地球生命研究所（准教授） E-mail: kiga.d.aa@m.titech.ac.jp

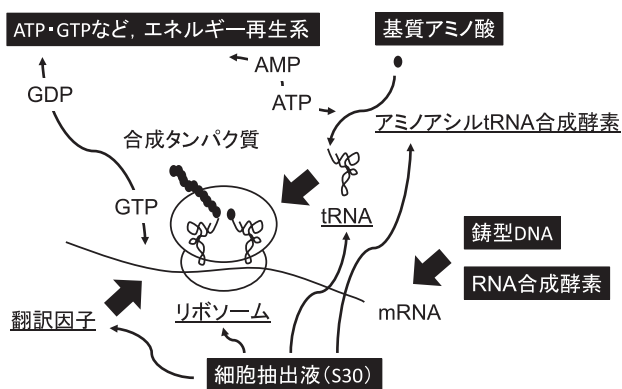


図1. 細胞抽出液 S30 を基にした無細胞タンパク質合成システムの構成要素. タンパク質合成に必要なリボソームや翻訳因子, tRNA, アミノアシルtRNA 合成酵素などは S30 から供給する. また鋳型 mRNA は鋳型 DNA および RNA 合成酵素を系に投入することにより系内にて供給する. その他, 基質アミノ酸や ATP・GTP, エネルギー再生系などを投入することによりタンパク質合成を効率的に行う.

タンパク質合成を行う (図1).

再構成型無細胞タンパク質合成システム, PURE system の構築

図1に示されるように, 細胞抽出液 S30 を用いた無細胞タンパク質合成システムはリボソームや tRNA のほか, 翻訳因子やアミノアシル tRNA 合成酵素など, タンパク質の合成を行うための必要な要素がすべて含まれている. 一方, システム内にはタンパク質合成とは無関係なタンパク質因子や酵素, RNA など含まれている. 細胞抽出液を用いたままでもタンパク質合成システム自体の解析や, それと他の細胞内システムとのネットワーク構造などの研究への応用, また後述するような無細胞タンパク質合成システムを利用した応用技術などに展開することも可能であるが, どういった成分がどの程度抽出液に含まれており, どのような反応が反応液中で起こっているかを正確に把握できないため, 本質的な制御が難しいといった欠点がある. こうした欠点を打破するため, タンパク質合成システムを個々の分子から完全に再構成したシステムである PURE system が 2001 年に報告された⁹⁾. PURE system は細胞抽出液を用いたシステムと異なり, 系の要素をすべて把握でき, かつ個々の要素を個別にシステムに投入できるため, タンパク質合成にとって不必要な RNA 分解酵素や DNA 分解酵素, タンパク質分解酵素などが原理的に含まれておらず, また, システムの構成要素を自在に操ることができるため, システムを改変することが容易であるなどの特徴を持っている. 構成要素としては, 前述したリボソーム, tRNA, RNA 合成酵素のほかに, 10 種類の翻訳因子, 20 種類のアミノ酸に対応したアミノアシル tRNA 合成

酵素, エネルギー再生システムとして, 3 種類の酵素などが含まれており, これらのタンパク質因子・酵素をヒスチジントグ融合タンパク質として個々に精製を行い, 利用している.

PURE system の構築により, 従来の細胞抽出液を用いたシステムでは困難であったさまざまな研究が展開されている. たとえば, タンパク質合成システムを形成する分子ネットワークの相互作用解析や¹⁰⁾, タンパク質合成の数理モデルの実験による検証など¹¹⁾, 実際の反応システムを用いたタンパク質合成システム自体が内包する分子動態の詳細な解析や, タンパク質合成システムに作用するタンパク質因子の機能を新しく解き明かすなど^{12,13)}, 再構成した反応システムを用いてしかできない独特な研究が数多く展開されている. また, 種々の分解系を原理的に含まない点から, 無細胞タンパク質合成システムを利用したタンパク質進化技術にも多大な利点をもたらしている. 無細胞タンパク質合成システムにおいては, 合成されたタンパク質および mRNA をリボソーム上において物理的に 1:1 対応で関連付けることが可能であり, 合成されたタンパク質の機能によって選択を行うことによって, その機能をもつタンパク質の配列情報を逆転写 PCR によって取得することが可能である. 多数の遺伝子ライブラリーを無細胞タンパク質合成システムに投入し, この操作を行うことにより, 目的の機能をもつ遺伝子を選択する手法は, リボソームディスプレイなどと呼ばれ進化分子工学の分野において利用されている. こうした手法においては, mRNA の分解活性が極端に低い PURE system が適しており¹⁴⁾, 抗体分子やその抗原分子の選択や機能向上などに役立てることが可能である^{15,16)}.

無細胞タンパク質合成システムにおける 遺伝暗号改変技術の利用: 非天然生物学 (Xenobiology)

無細胞タンパク質合成技術は, その内容物が操作可能であることを活かして, 塩基配列情報とアミノ酸配列情報を対応付ける規則としての遺伝暗号を改変する研究にも活用されてきた. たとえば, アミノ酸の間を連結するペプチド結合の生成と, アミノ酸と tRNA の結合を異なる試験管で行うことで, 普遍遺伝暗号に含まれていないアミノ酸を任意のコドンに割り当てることが可能である. 古くは化学合成によるアミノ酸と tRNA の結合¹⁷⁾, 最近では菅のグループによるリボザイムによる結合が行われ, 後者は多種の非標準アミノ酸を用いた環状ペプチドのセレクションまでをも可能にした¹⁸⁾. さらに, 細胞内の翻訳系と同様に, tRNA とアミノ酸との結合をペプチド結合の生成と同一の反応場で行い, tRNA のリサイクルを可能にした形でのタンパク質合成効率の高い遺伝暗号の拡張も, 無細胞系の利点を生かして行われてきた

(図2). 木賀らは、この形式による真核生物の翻訳系における遺伝暗号の拡張に世界で初めて成功し、また、前述のPURE systemは、解離因子を含まない再構成を行うことで、非標準アミノ酸へのコドンの完全な割り当てに成功している⁹⁾。これらの研究は、生きた細胞では難しい条件の探索を可能にする無細胞系の利点を生かしたものであり、さらに、続いて生きた細胞でも適用可能な条件を設定することも可能になる。実際、両技術とも、その後生きた細胞での適用が可能になった^{19,20)}。また、遺伝暗号表に含まれるアミノ酸の種類を増加させるこれらの研究とは逆に、アミノ酸の種類を減らす、つまり、UGU/Cコドンがシステインでなくセリンに翻訳されるなどの「単純化遺伝暗号表」の構築も木賀によって進んでいる(図2)^{21,22)}。この研究は、生命の起源に近い時代でのタンパク質の性質を調べる理学的研究のみならず、タンパク質の部位特異的修飾や、タンパク質への抗酸化性の付与などの、タンパク質工学面での活用も期待される。生体高分子のビルディングブロックの種類を変更する研究は、これらアミノ酸の数の変更にとどまらず、ヌクレオチドの数を変更したアプタマーの創出²³⁾、さらには、非標準アミノ酸を導入するために非天然塩基を用いることまでもが行われており²⁴⁾、非天然生物学(Xenobiology)という新たな領域が形成されつつある。

無細胞タンパク質合成技術の「細胞を創る」研究への応用

近年、合成生物学の概念・技術が発展するにしたがって、無細胞タンパク質合成システムを用いた細胞の再構成を目指した研究、いわゆる「細胞を創る」ことを志向した研究が盛んに行われるようになってきている。それらの研究の一つに人工細胞を創るといった研究があげられるが、これは脂質で形成された膜小胞の中に無細胞タンパク質合成システムを導入し、タンパク質合成やRNA合成などの機能を保持した状態で人工細胞を構築することで、生命システムを個々の分子から再構成させ、細胞との相違点や類似点などを観察し、生命自体に対する考察を深めることを目指している。Noireauxらは膜小胞中に細胞抽出液で構成された無細胞タンパク質合成システムを組み込み、膜上に5量体を形成し、小分子が通ることのできる孔を開ける性質を持つ黄色ブドウ球菌由来のタンパク質である α -hemolysinを合成させることにより、膜小胞と外部環境との間で物質交換を行うことのできる人工細胞を創り出した。これは無細胞タンパク質合成システムにおいて用いられた限外ろ過膜を用いた反応システムと性質を同じにしており、外部環境にタンパク質合成に必要な基質などを保持することによって、数日間のタンパク質合成を人工細胞中にて行わせることに成功している²⁵⁾。また、市橋らは、膜小胞とRNA分解活性の少ないPURE systemをうまく利用することにより、生物のような分子進化を再構成させることに成功している(詳細は市橋らの稿参照)。

膜小胞を用いた人工細胞作製とは少し異なる観点で「細胞を創る」ことを志向する研究として、マイクロ流路を利用したアプローチがあり、ここにおいても無細胞タンパク質合成システムが利用されている。2014年にKarzbrunらが報告した、マイクロ流路と無細胞タンパク質合成システムを利用して作製された人工細胞²⁶⁾は画期的で、非常に細胞に近い挙動を示している(図3A)。彼らはマイクロ流路上に、DNAを内包したタンパク質のような巨大な分子を含むさまざまな分子が入り出る流路を備えた反応区画を用意し、そこに無細胞タンパク質合成システムを流し込むことによって、内包したDNAを鋳型としてタンパク質合成を行わせることに成功した。転写およびタンパク質合成システムの諸要素を、反応区画に設けられた流路から流入させると同時に反応区画内にある成分を流出させることによって、合成産物であるタンパク質や外環境から流入する基質など、反応区画内における分子の質を一定に保ち、細胞がもつような散逸構造を形成させることに成功している。こうした構造に、さまざまな遺伝子ネットワークを組み込むことにより、タンパク質発現のフィードバック制御や振動現象、

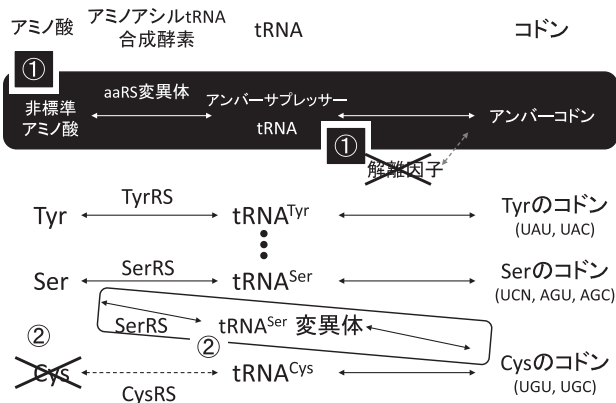


図2. 遺伝暗号の変更. 遺伝暗号におけるコドンとアミノ酸の対応付けを行っている鍵分子は、tRNAと、これにアミノ酸を結合させるアミノアシルtRNA合成酵素である。細胞内の20種類のアミノ酸それぞれは、基本的に、対応する酵素一つ、および、1もしくは複数のtRNAとともに、他のアミノ酸とは排他的なグループを形成している。この排他性が、遺伝暗号の正確さに重要である。①遺伝暗号の拡張. 非標準アミノ酸と、専用酵素・サプレッサー-tRNAとからなる排他的な組を、天然のタンパク質合成系に添加する。場合によっては、解離因子の一つを欠損させることで、非標準アミノ酸の取り込み効率を上げることもできる。②遺伝暗号の単純化. 特定のアミノ酸を系から除去し、そのアミノ酸のコドンに対応するセリンもしくはアラニンのtRNA変異体を添加することで、どのようなmRNAからもそのアミノ酸を持たないタンパク質が合成されるようになる。

合成産物を通じた反応区画同志のコミュニケーションなどを再現させることに成功している。マイクロ流路を反応場とした無細胞タンパク質合成反応はその他にもさまざまな用途に用いられている。岡野らは微小空間における1コピーDNAからのタンパク質合成の挙動を観察するため、ガラス上に非常に体積の少ない反応場を用意し、PURE systemを用いてタンパク質発現の挙動の観察に成功している²⁷⁾。また、田中らはDNAを内包したガラスマイクロ流路を構築し、流路内におけるタンパク質発現を簡便に行う仕組みを構築している(図3B)²⁸⁾。

さらに、人工細胞の中には、天然の生体高分子を天然とは異なる様式で組み合わせるかたちで人工的な分子ネットワークを構築することも可能である。たとえば、陶山の指導により木賀らが実装を開始した人工的な転写制御システムRTRACSは²⁹⁾、小分子の検知やタンパク質合成との接続、人工膜小胞内での反応が可能になっている³⁰⁾。他にも種々の人工システムが構築されている³¹⁾。この分野の研究が統合され、近い将来には、人工細胞内での外部環境に対応した情報処理、その結果としてセントラルドグマによる遺伝子発現、そしてその産物を用いた外環境との物質交換による恒常性維持といった細胞機能の下支えが可能になるだろう。さらに、自律的な細胞

分裂を介することで、複製時に生じるエラーは進化メカニズムの発揮を可能にすることになる。さらには、細胞の空間内での移動や細胞間コミュニケーションを活用することで、人工細胞は、集団としてふるまうことで、生命システムの能力を飛躍的に向上させることも間違いのない。これら、無細胞タンパク質合成系を中核に備えた「細胞を創る」分野の将来の研究は、生命の本質の理解と、生体高分子からなるシステムの活用との両面で、生物工学および生命科学に貢献が期待される。

文 献

- 1) Gibson, D. G. *et al.*: *Science*, **329**, 52 (2010).
- 2) Nirenberg, M. W. and Matthaei, J. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **47**, 1588 (1961).
- 3) Lederman, M. and Zubay, G.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **32**, 710 (1968).
- 4) Kim, D. M. and Choi, C. Y.: *Biotechnol. Prog.*, **12**, 645 (1996).
- 5) Kigawa, T. *et al.*: *FEBS Lett*, **442**, 15 (1999).
- 6) Madin, K. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 559 (2000).
- 7) Mikami, S. *et al.*: *Methods Mol. Biol.*, **607**, 43 (2010).
- 8) Endo, Y. and Sawasaki, T.: *Biotechnol. Adv.*, **21**, 695 (2003).
- 9) Shimizu, Y. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **19**, 751 (2001).
- 10) Matsuura, T. *et al.*: *Mol. Syst. Biol.*, **5**, 297 (2009).
- 11) Stogbauer, T. *et al.*: *Integr. Biol. (Camb)*, **4**, 494 (2012).
- 12) Niwa, T. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 8937 (2012).
- 13) Shimizu, Y.: *J. Mol. Biol.*, **423**, 624 (2012).
- 14) Ohashi, H. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **352**, 270 (2007).
- 15) Osada, E. *et al.*: *J. Biochem.*, **145**, 693 (2009).
- 16) Fujino, Y. *et al.*: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **428**, 395 (2012).
- 17) Noren, C. J. *et al.*: *Science*, **244**, 182 (1989).
- 18) Kawakami, T. *et al.*: *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 888 (2009).
- 19) Mukai, T. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **38**, 8188 (2010).
- 20) Sakamoto, K. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **30**, 4692 (2002).
- 21) Kawahara-Kobayashi, A. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **40**, 10576 (2012).
- 22) Amikura, K. *et al.*: *Acs Synth. Biol.*, **3**, 140 (2014).
- 23) Kimoto, M. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **31**, 453 (2013).
- 24) Hirao, I. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **20**, 177 (2002).
- 25) Noireaux, V. *et al.*: *Phys. Biol.*, **2**, P1 (2005).
- 26) Karzbrun, E. *et al.*: *Science*, **345**, 829 (2014).
- 27) Okano, T. *et al.*: *Lab Chip*, **12**, 2704 (2012).
- 28) Tanaka, Y. and Shimizu, Y.: *Anal. Sci.*, **31**, 67 (2015).
- 29) Takinoue, M. *et al.*: *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.*, **78**, 041921 (2008).
- 30) Ayukawa, S. *et al.*: *Acc. Chem. Res.*, **44**, 1369 (2011).
- 31) Genot, A. J. *et al.*: *Phys. Rev. Lett.*, **109**, 208102 (2012).

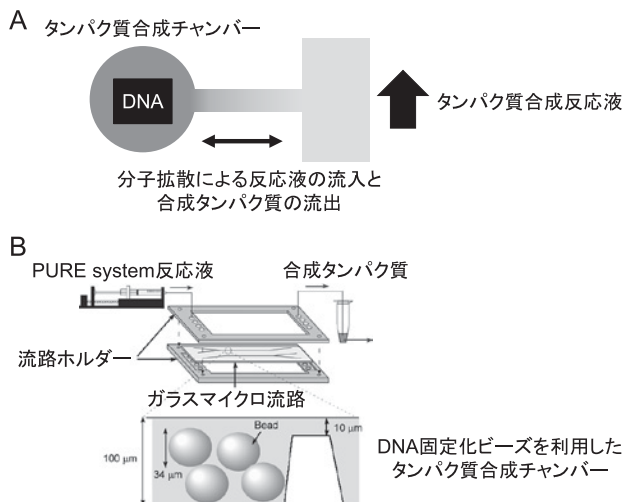


図3. マイクロ流路を利用した「細胞を創る」研究。(A) Karzbrunらが構築した人工細胞チップ²⁶⁾。太い流路から分岐した細い流路の先にDNAを固定化したチャンパーを設け、太い流路にタンパク質合成反応液を流すと、分子拡散により、細い流路に反応液が流れ込み、チャンパー内でタンパク質合成が行われる。また、合成されたタンパク質を含む反応液も分子拡散により太い流路へ流出することによって、チャンパー内の反応液の質が一定に保たれる。(B) 田中らが構築したタンパク質合成チップ²⁸⁾。ガラス製のマイクロ流路上にダム構造を設け、DNAを固定化したビーズを流路上に固定し、PURE systemの反応液を流すことにより、タンパク質合成を行う。図は文献28より引用し、改変を行った。