セルフリーシステムにおける人工リボスイッチの構築

横林　洋平

はじめに

近年，無細胞翻訳系（cell-free translation system, CFTS）を基盤としたボトムアップ的合成生物学の研究が盛んになってきている．CFTS自体は1960年代から研究されており，大腸菌をはじめとした細胞抽出液に，基質アミノ酸，エネルギー源などを加え，任意の鋳型DNAもしくはmRNAにコードされるタンパク質を合成できる[1]．また，清水・上田らは，個別に精製された翻訳因子から再構成されたCFTSである「PURE system」を2001年に発表した[1,2]．

基礎的には，細胞のさまざまな機能を再構成することにより，その動作原理を明らかにすることはもちろん，最終的には「生きている」とみなせる人工細胞をボトムアップに構築することを目指した研究がある[3]．一方で，細胞という生物学的制約を排しつつ，遺伝子情報の転写や翻訳といった緻密な生体分子システムを活用した「セルフリーシステム」の応用を志向した研究も盛んになってきている[4]．

これらのセルフリーシステムは，CFTS中に遺伝子回路や代謝回路をコードしたDNAを保持し，必要に応じてシステム内部や外部からの化学的もしくは物理的シグナルに応答したり，別のセルフリーシステムと通信したりする（図1）．セルフリーシステムにおいては，CFTSに投入する鋳型DNAや精製タンパク質の量を自由に調整可能であり，複雑な遺伝子回路や代謝回路の最適化に適している．またPURE systemでは，各種翻訳因子の量の調節や，計算による，より厳密なシミュレーションも可能である[5]．その実装においても，試験管（マイクロチューブ）内の均一系バッチ反応はもちろん，リポソームなどの微小区画，マイクロ流路系を用いたフロー型リアクターなど，柔軟性が高い．

このようなセルフリーシステムは，より複雑，かつ高度な機能を実現するため，生細胞を用いた合成生物学と同様，さまざまな部品（パーツ）を必要とする．中でも特定の化合物（化学シグナル）を検出して，任意の遺伝子発現を制御する「遺伝子スイッチ」は，セルフリーシステムを外部または内部の化学環境とつなぐ重要なパーツである．

天然，人工を問わず，望みの化合物に応答する遺伝子スイッチは，生細胞系・セルフリーシステム共に有用である．しかし，これまでセルフリーシステムにおいて用いられてきた遺伝子スイッチの多くは，Lacリプレッサー/IPTGなど，大腸菌で一般的に使用されている転写因子を基盤とした誘導発現系を転用したものである（図2A）．

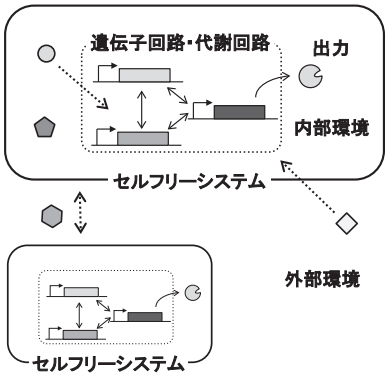

図1．セルフリーシステムの概念図

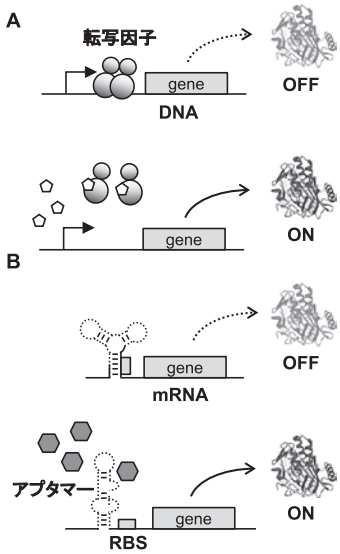

図2．遺伝子スイッチの動作原理．（A）転写因子（リプレッサー）を基盤とした遺伝子スイッチ．低分子化合物が転写因子と結合して，DNAオペレーター配列から乖離し，転写が活性化される．（B）リボスイッチによる遺伝子発現制御．低分子化合物がmRNAの非翻訳領域にあるアプタマーと結合することにより，リボソーム結合部位（RBS）を開放し，翻訳を活性化する．

著者紹介　沖縄科学技術大学院大学　核酸化学・工学ユニット（教授）　E-mail: yohei.yokobayashi@oist.jp

一般に，大腸菌などの生細胞で機能する遺伝子スイッチをセルフリーシステムで利用する際には，転写因子や鋳型DNAの量などを最適化する必要がある．転写因子を新規化合物に応答するように改変することも容易ではない．また，セルフリーシステムの利点の一つとして，細胞膜を透過しなかったり，毒性があったりするため，生細胞では検出できないような化学シグナルに対応できる可能性がある．その場合，当然ながら大腸菌を用いて人工遺伝子スイッチを作製することはできない．したがって，将来的にはセルフリーシステムに特化した人工遺伝子スイッチやその他のパーツを設計する必要がある．

セルフリーシステムにおけるリボスイッチの利点

大腸菌など，バクテリアで用いられる人工遺伝子スイッチとしては，転写因子を基盤とする物の他に，mRNAの5'UTR（非翻訳領域）に存在するリボスイッチがある．リボスイッチは，そのアプタマー領域が低分子化合物と結合し，それに伴うRNAの構造変化がmRNAの翻訳効率や転写伸長に影響を与えることにより，遺伝子発現を制御する（図2B）．

これまでランダムRNA配列から，目的化合物に結合する配列を，選択・増幅操作を繰り返すことにより取得するSELEX（Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment）法[6,7]によって，さまざまな化合物を認識するRNAアプタマーが得られてきた．このような人工アプタマーを用いることにより，より多くの化合物に応答する人工リボスイッチを作製できる可能性がある．実際，バクテリアや真核細胞中で機能する人工リボスイッチは数多く報告されてきたが，これらのリボスイッチが応答する化合物はきわめて限定されている．その理由は，1）アプタマーのリガンドとなる化合物が細胞内に効率良く到達しない，2）化合物に毒性がある，3）化合物が細胞内要素と非特異的に相互作用する，4）細胞内の環境がアプタマー結合に適していない，などが考えられる．

セルフリーシステムにおいても同様の問題が起こり得るが，生細胞よりも制約が少ない．たとえば，開放系であれば化合物の細胞膜透過性に依存せず，また，翻訳機構に影響を及ばさない毒性も許容される．さらに必要であれば金属イオンや転写・翻訳因子などの濃度も，リボスイッチに合わせて最適化できる．また，転写因子などのタンパク質が関与しないこと，制御機構と制御対象遺伝子が一つのmRNAにコードされること（シス制御）から，パーツとしてシンプルであり，より複雑な回路への予期しにくい影響が最小化できると期待できる．

このように人工リボスイッチは，セルフリーシステムをさまざまな化学シグナルに動的に応答させるために，非常に有用なインターフェースとなり得る．

セルフリー人工リボスイッチ

CFTSで機能する人工リボスイッチは比較的古くから報告されている．2007年にOgawaおよびMaedaはPURE systemで機能するテオフィリン応答性リボスイッチを報告している[8]．筆者らも大腸菌S30抽出液系でチアミン二リン酸応答リボスイッチを作製した[9]．Ogawaはその後，コムギ胚芽由来無細胞タンパク質合成系において動作するリボスイッチを精力的に研究しており，真核生物特有のさまざまな翻訳制御機構を巧みに利用した人工リボスイッチを多く報告している[10,11]．また最近になり，セルフリー系のバイオセンサーとしての応用を目指した研究が盛り上がりつつあり，その一環として，*Bacillus cereus*由来のフッ素イオン応答性リボスイッチを地下水のフッ素イオン含有量測定に用いた例がある[12]．

これまでのCFTSにおける人工リボスイッチの多くは，大腸菌などの生細胞で最適化されたものを転用するか，CFTS内で試行錯誤することにより作製されてきた．CFTSは均一溶液系であり，しかも高価であるため，大腸菌で成功している，高スループットスクリーニングや進化工学的手法が適用しにくい．

2016年にSalisらは，熱力学的パラメータを用いたリボスイッチの自動設計モデルを構築し，6種類の化合物に応答するリボスイッチを実際に作製した[13]．その中には大腸菌が有する制約を回避するため，CFTSを用いて評価されたリボスイッチもあったが，その性能には大きなばらつきがあった．モデルとしては非常に細部まで考えられているが，その前提として必要な熱力学的パラメータが必ずしも入手しやすいわけではないことなどから，広く利用されるには至っていない．

人工細胞とリボスイッチ

CFTSをリポソームなどの疑似細胞膜に内包した人工細胞は，近年基礎・応用の両面から国内外で研究が加速している[3]．人工細胞内での遺伝子発現をリボスイッチで制御することができれば，アプタマーにより認識可能な任意の化合物により，mRNAにコードされた任意のタンパク質の発現レベルを時間的に調節できる．このような化学応答性は，人工細胞と外界との通信，人工細胞内での代謝経路調節，ドラッグデリバリーなどさまざまな用途に役立つといえる．

しかしながら，人工細胞内でのリボスイッチの利用はきわめて限られてきた．MartiniとMansyが2011年に

脂質ベシクル内で構成されたPURE systemを用いて，大腸菌中で最適化されたテオフィリンリボスイッチによるGFP発現制御を蛍光顕微鏡で定性的に観測した[14]．その後，Lentiniら[15]とAdamalaら[16]が同じテオフィリンリボスイッチを，人工細胞間もしくは人工細胞とバクテリア間の通信に用いたが，人工細胞内でのリボスイッチ機能は直接測定されなかった．また，このテオフィリンリボスイッチのバルクCFTS溶液中での性能も低く，Lentiniらの測定ではテオフィリン添加時に発現量が1.5倍に増加したのみであった．

このように，人工細胞およびセルフリーシステム一般において，「望みの化合物に応答する遺伝子スイッチ」として期待される人工リボスイッチが，いわば看板倒れである現状を少しでも前進させるため，新規のアプタマーを作製し，CFTS，人工細胞内で効率的に機能する人工リボスイッチの構築を試みた．また，その過程で，セルフリーシステムで実用に耐えうるリボスイッチを作るための課題を洗い出すことも目的の一つであった．

今回筆者らはヒスタミンに応答する人工リボスイッチの開発を目指した[17]．ヒスタミン（図3A）はアレルギーなどに関連した炎症マーカー，神経伝達物質，食中毒原因物質などとして重要な代謝物であるが，生物では細胞膜上の受容体で検出され，CFTSに容易に転用できる転写因子は知られていない．したがって，まずSELEX法により，ヒスタミンに結合するRNAアプタマーを取得した（図3B）．特筆すべき点は，このアプタマーはCFTSに高濃度で存在するヒスチジン（図3A）に対して選択的でなければならないということである．幸い，ヒスチジンに対して60倍以上選択的なアプタマーを得ることができた．

次に，このアプタマーを用いてPURE system（PURE *frex*®として市販されている）で機能する人工リボスイッチを作製した．この過程も半合理的設計と試行錯誤であるが，ヒスタミンが存在しない状態では，翻訳開始領域が二次構造を作るような配列を設計し，ヒスタミンがアプタマーに結合した状態では，翻訳開始領域がオープンになるように調節した（図3C）．最終的に5 mMという高濃度ではあるが，ヒスタミン存在下でタンパク質発現が30倍に増加するリボスイッチが得られた．

さらに，大阪大学の松浦グループとの共同研究により，ヒスタミンリボスイッチの機能を人工細胞内で定量的に解析した．人工細胞内での蛍光タンパク質の発現を，リボスイッチ機能を用いて制御し，人工細胞内の蛍光をフローサイトメトリーにより検出することで，初めて直接，定量的に解析することができた．これにより，リボスイッチが個々の人工細胞内で機能していることが確認された．

さらに，ヒスタミンリボスイッチによりα-ヘモリシンおよびホスホリパーゼCの発現を人工細胞内で制御し，それぞれ人工細胞内による低分子の選択的放出，および人工細胞膜の破壊，という現象を，ヒスタミンの有無により制御することに成功した（図3D）．

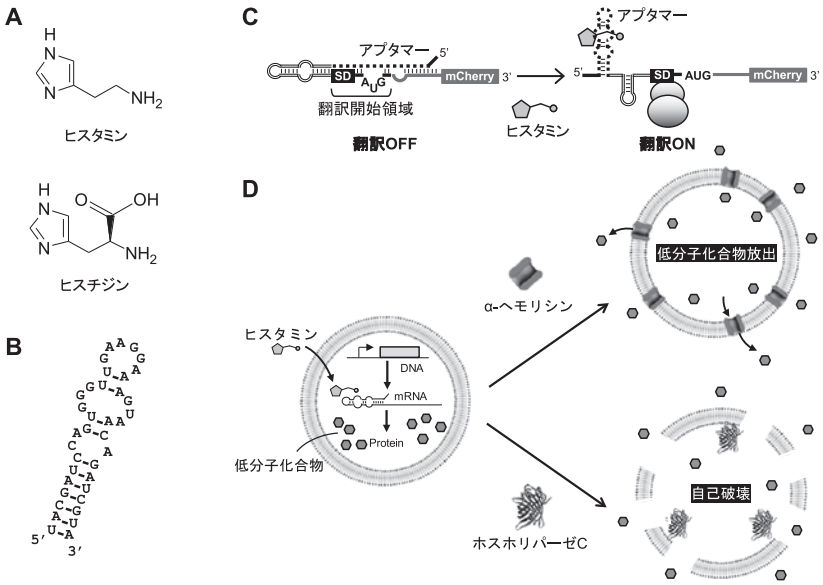

図3．ヒスタミン応答リボスイッチ．（A）ヒスタミンおよびヒスチジンの構造．（B）ヒスタミンアプタマー．（C）ヒスタミン応答リボスイッチの動作原理．（D）人工細胞におけるヒスタミンリボスイッチの応用．文献17をもとに改変．

セルフリーシステムにおけるリボスイッチの課題

これらの実験から，ヒスタミンで人工細胞内におけるさまざまな遺伝子の発現を制御することにより，人工細胞に異なる機能を付与できることが示された．一方，その過程でいくつかの課題も明らかになった．セルフリーシステムで機能するリボスイッチをアプタマーから作製するプロセスは未だに効率が悪く，主に二次構造予測などを参考にした半合理的設計と試行錯誤に依存している．セルフリーシステムに特化した，効率的な人工リボスイッチ設計手法の確立もこれからの研究課題であるといえる．

今回得られたヒスタミンリボスイッチは，これまでの人工リボスイッチと比較しても非常に性能が良いが，リガンド濃度に対する感度は低い．単なるスイッチとしてだけでなく，応答感度の最適化も含めた設計手法の改良が必要である．また，人工細胞内で機能するリボスイッチは，対象化合物が細胞内に到達する必要がある．ヒスタミンは，ある程度拡散により脂質二重膜を透過したが，化合物によっては脂質膜の改変や膜タンパク質による受動的もしくは能動的な輸送が必要となるであろう．

人工細胞を含むセルフリーシステムは，「使い古された」パーツを組み合わせたproof of principleから，徐々に学術的もしくは産業的に意義のあるシステムの構築へと移行していくと考えられる．そのためにはアプリケーションに応じた多種多様な化学シグナルとセルフリーシステムとを仲介するインターフェースがより重要となる．人工リボスイッチがその役割の一端を担うことを期待する．

文　献

1) 清水義宏，木賀大介：生物工学，**10**, 603 (2015).
2) Shimizu, Y. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **19**, 751 (2001).
3) Buddingh', B. C. and van Hest, J. C. M.: *Acc. Chem. Res.*, **50**, 769, (2017).
4) Tinafar, A. *et al.*: *BMC Biol.*, **17**, 64 (2018).
5) Matsuura, T. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, E1336 (2017).
6) Tuerk, C., and Gold, L.: *Science*, **249**, 505, (1990).
7) Ellington, A. D. and Szostak, J. W.: *Nature*, **346**, 818, (1990).
8) Ogawa, A. and Maeda, M.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**, 3156 (2007).
9) Muranaka, N. *et al.*: *Anal. Lett.*, **42**, 108 (2009).
10) Ogawa, A.: *Applied RNA Bioscience* (Masuda, S. and Izawa, S. Eds.), p. 79, Springer (2018).
11) Ogawa, A. *et al.*: *ACS Synth. Biol.*, **6**, 1656 (2017).
12) Thavarajah, W. *et al.*: *ACS Synth. Biol.*, **9**, 10 (2020).
13) Espah Borujeni, A. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **44**, 1 (2016).
14) Martini, L. and Mansy, S. S. *Chem. Commun.*, **47**, 10734 (2011).
15) Lentini, R. *et al.*: *Nat. Commun.*, **5**, 4012 (2014).
16) Adamala, K. P. *et al.*: *Nat. Chem.*, **9**, 431 (2017).
17) Dwidar, M. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **141**, 11103 (2019).