



Miyachi R^[a] and Ichihashi N^[a,b, c]

Toward *in vitro* reconstitution of self-replicating molecular systems

増殖する人工分子システムの構築にむけて

^[a]東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻

^[b]東京大学先進科学研究機構

^[c]東京大学生物普遍性研究機構

宮地亮多^[a]、市橋伯一^[a,b,c]

^[a] Department of Life Science, Graduate School of Arts and Science, The University of Tokyo, 3-8-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153-8902, Japan

^[b] Komaba Institute for Science, The University of Tokyo, 3-8-1 Komaba, Meguro, Tokyo 153-8902, Japan

^[c] Research Center for Complex Systems Biology, Universal Biology Institute, The University of Tokyo, 3-8-1 Komaba, Meguro, Tokyo 153-8902, Japan

Corresponding author: Norikazu Ichihashi

Department of Life Science, Graduate School of Arts and Science, The University of Tokyo, 3-8-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153-8902, Japan

Tel: 81-3-5465-7307; Fax: 81-3-5465-7307; Email: ichihashi@bio.c.tokyo-u.ac.jp

Received: Jan. 11, 2023/ Revised: Jan. 26, 2023/ Accepted: Feb. 27, 2023

Abstract Recently, *in vitro* synthetic biology has been actively engaged in the reconstitution of artificial systems implemented with life-like characteristics to understand the principle and origins of life. One of the most important characteristics of life is self-reproducibility, which is originated from the self-regeneration ability of the gene replication and expression system (i.e., central dogma). In this review, we summarize recent progress in *in vitro* reconstitution of biological functions that constitute central dogma, DNA replication, transcription, and translation.

Key words: Synthetic biology, DNA replication, Translation, central dogma, self-reproduction.

はじめに

極限微生物学の重要な使命は、人間から見ると異常とも思える環境で生息する微生物を調べることで、生物の可能性と限界を明らかにすることだと考える。こうした研究は、「生命とは何なのか」という、根本的でありながらどうやったら理解できるか分からない問いに答える一つの方法論となるだろう。一方で、この問いに対しては、別のアプローチもありうる。それが本稿で紹介する合成生物学的な方法論である。この方法論では、生命の特徴を部分的に有した人工システムをボトムアップ的に再構築し、その振る舞いを検証することで生命の特徴を実現する条件が明らかになる。これまでに生物の持つ多くの機能が試験管内で再構成されてきているが¹⁻⁸⁾、生命にとって特に重要な性質である「自己を複製・増殖することができ、さらに進化をする能力」は未だに再構成されていない⁹⁻¹¹⁾。この能力を試験管内で単純

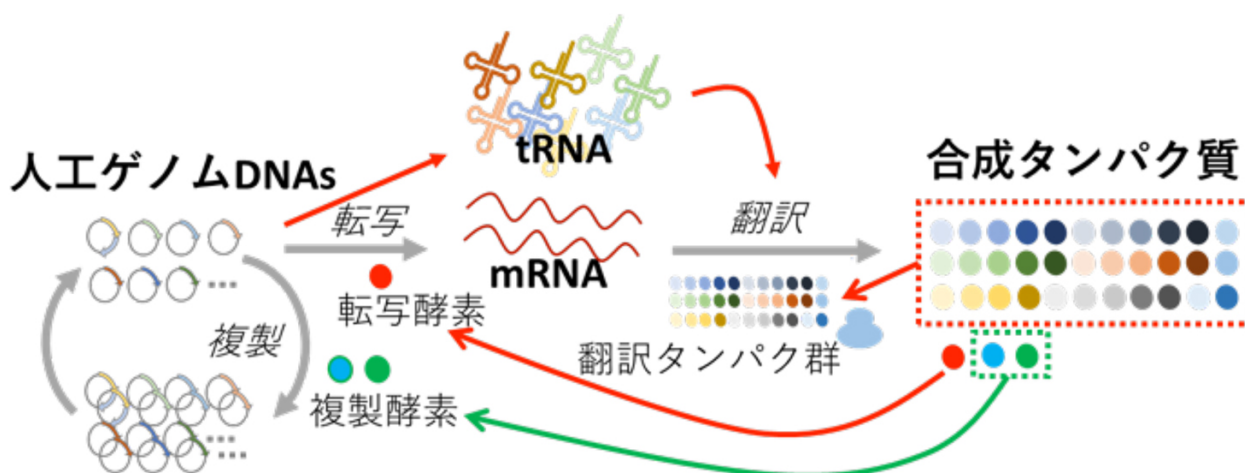


図1 試験管内で増殖する DNA 複製・転写・翻訳システム

増殖能力を持つ DNA 複製・転写・翻訳システムのスキーム。ゲノム DNA には DNA 複製・転写・翻訳過程の各反応を担うタンパク質や RNA がコードされており、これらが発現することで DNA 複製・転写・翻訳システム自体が再生産される。

な分子システムとして実現することができれば、システムが増殖して進化するための条件、すなわち生命誕生の条件が明らかになるだろう。こうした知見は、ただ現存の複雑な生物を解析するのみでは得られない、作ってみることで初めて得られる知見である。

生物が持つ「自己を複製、増殖して進化をする能力」の中心となるのは、DNA 複製・転写・翻訳システムである。このシステム（いわゆるセントラルドグマ）では、遺伝情報である DNA が複製し、RNA へと転写され、RNA からタンパク質へと翻訳され、そのタンパク質や一部の RNA が DNA の複製や転写、翻訳に再び使われる。つまり DNA 複製・転写・翻訳システムを構成する分子群は、アミノ酸やヌクレオチドなどの低分子化合物を供給すれば自らを再生産しながら増殖することができるはずである。筆者らは、この増殖能力を持つ DNA 複製・転写・翻訳システム（図 1）を試験管内で構築することを目指している。

本稿ではこのような DNA 複製・転写・翻訳システムの自律的増殖システムを *in vitro* で再構成する試みについて、筆者らの最近の研究や課題も含め概説する。また細胞の増殖には、中身となる DNA 複製・転写・翻訳システムの増殖以外にも、細胞膜構造を複製することも必要になる。このような研究も近年盛んではあるが¹²⁾、本稿では深く言及しない。

遺伝情報を自律的に複製するシステム

現存の生物の遺伝情報の複製、すなわち DNA の複製は、多数のタンパク質がかかわる複雑なメカニズムで達成されている。これまでに大腸菌¹³⁾や枯草菌¹⁵⁾、ミトコンドリア¹⁶⁾、酵母¹⁷⁾など様々な DNA

複製系を試験管内で再構成する取り組みが進められてきた(図 2A)。近年の例として Su'etsugu らは、大腸菌の DNA 複製起点 *oriC* を持った環状 DNA と 25 種類の精製因子を用いて複製サイクル全体を再構成し連続的に複製反応を繰り返す(Replication-cycle reaction, RCR)ことが可能であることを示し¹⁸⁾、メガベースレベルのゲノム DNA を複製することが可能となってきた¹⁹⁾。

以上の研究例は、あらかじめ精製されたタンパク質を使って試験管内で DNA 複製を起こしたものである。一方で遺伝情報が自律的に複製されるシステムを達成するには、複製に必要なタンパク質を複製される DNA 自身から発現(転写と翻訳)させ、それらのタンパク質による DNA の複製を 1 つの反応場で共役させることが求められる(図 2B)。これにより、DNA は自身にコードした複製酵素の発現に依存して再帰的に複製できるようになる。DNA から複製に関わる酵素を発現させるためには、転写と翻訳に必要なタンパク質をすべて含んでいる無細胞転写翻訳系を用いる必要がある^{12),20)}。特に、大腸菌の翻訳タンパク質やリボソームなどの因子が個別に精製された再構成型無細胞翻訳系(PURE system)²¹⁾は、各因子の濃度を自由に調整でき制御性が高いため、本分野で広く使われている(図 2C)。実際に、Fujiwara らは大腸菌の DNA 複製の模倣として、DnaA、DnaB、DnaC、DnaG、DNA ポリメラーゼ III ホロ酵素(9 種類)の計 13 種類の複製に関わるタンパク質を PURE system 内で発現させ、転写-翻訳と DNA の複製を共役させることに成功し、更に新規に合成した DNA からタンパク質を合成できることを示した²²⁾。また最近、RCR と PURE system を組み合わせるための反

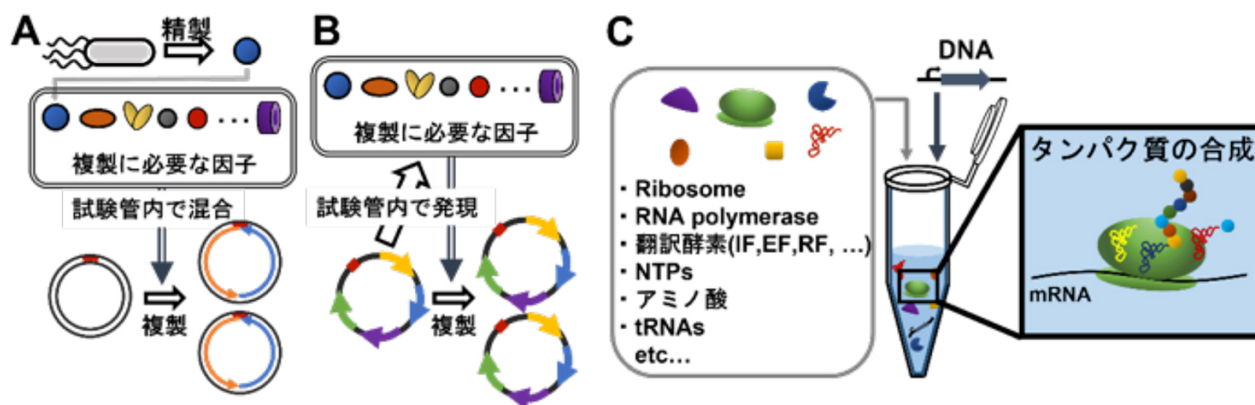


図 2 DNA 複製を精製因子で再構成および転写-翻訳と複製を共役させる研究

(A)DNA の複製に必要な因子が全て組み換えタンパク質などとして精製され、試験管内で再構成させる研究。(B) DNA の複製に必要な因子が DNA そのものにコードされており、その遺伝子発現を通して DNA を再帰的に試験管内で自律複製させる研究。(C)PURE system の模式図。タンパク質の合成(転写-翻訳)に必要な因子が全て試験管内で再構成されている。

応条件についても検証が進められている²³⁾。

上記のような既存の生命が採用している複雑な複製様式の問題点は、発現に必要なタンパク質の種類が多い点である。そのため、その全ての因子を発現させながら連続的に複製を起こすことが容易ではない。そこで、なるべく少ない種類のタンパク質で DNA の複製が達成できるシステムの開発も進められている。単純な DNA 増幅法として PCR 法が有名だが、PCR 法の様に高温のステップを挟む場合は大腸菌由来の遺伝子発現系が失活してしまうため、用いることができない。同様に LAMP(Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法や SDA(Strand Displacement Amplification)法の様には 60°C 程度の温度を要するものも遺伝子発現系と相性が悪い。更にこれらは増幅可能な DNA の長さに制限がある²⁴⁻²⁵⁾ため、その場合コードさせる遺伝子数を自由に増やすことが出来ないという別の問題もある。試験管内で増殖するシステムに用いる DNA 複製には、少なくとも自律複製に必要な全ての遺伝子をコードできる長さの DNA (例えば、最小細胞に向けて Forster と Church により 151 遺伝子、113 kbp 程度のミニマルゲノムが提案されている¹⁾) が増幅できることが望まれる。

少ない種類のタンパク質で高温ステップを挟むことなく長い DNA を複製させるためには、ウイルスのゲノム複製システムが有用である。例えば、T4²⁶⁾ や T7^{14),27)} などいくつかのファージは、数種類のタンパク質のみでファージゲノム DNA の複製を *in vitro*

で再構成できることがわかっている。そしてその中でも、枯草菌バクテリオファージ phi29 の DNA 複製システムや、その DNA 複製酵素が、近年、自律複製システムの構築に用いられている。

Phi29 は 19 kb の直鎖状二本鎖 DNA をゲノムに持ち、その 5'末端に結合した末端タンパク質(terminal protein, TP)がプライマーとして DNA 合成の起点となって DNA 複製が起こる^{28),29)}。TP の他に Phi29 DNA の複製機構に必要なタンパク質は、末端領域に結合し DNA らせんを歪めて複製開始を促進する二本鎖結合タンパク質(double-stranded DNA binding protein, DSB)、二本鎖を剥がす鎖置換活性も持つ DNA ポリメラーゼ(以下 phi29 DNA 複製酵素)、一本鎖結合タンパク質 (single stranded DNA binding protein, SSB)の 4 種類であることが知られており³⁰⁾、*in vitro* でこの DNA 複製系が組み換えタンパク質を用いて再構成されている^{29),31)}。van Nies らはこのうち、phi29 DNA 複製酵素と TP をコードした DNA と SSB、DSB(これらは組み換えタンパク質として)および PURE system を組み合わせ、2 つのタンパク質の発現とそれら自身をコードする直鎖状 DNA ゲノムの複製を共役することに成功した³²⁾(図 3A)。また、この一連の転写-翻訳-複製が共役(Transcription Translation coupled DNA Replication, TTcDR)できる反応系を人工的な脂質二重膜であるリボソームに内包させて反応させることで、細胞を模したシステムを提案している。

一方で phi29 DNA 複製酵素は、ランダムプライマー（通常、6 塩基のランダムな配列を持つオリゴプライマー）からも DNA 複製を開始することができる。そして強い鎖置換能力を持つため、環状の DNA をテンプレートとして、ローリングサークル型の複製が可能である³³⁾。我々はこの性質を利用して、phi29 DNA 複製酵素のみをコードする環状 DNA を用いた転写-翻訳-複製共役型反応でローリングサークル型のゲノム複製を示した³⁴⁾ (図 3B)。さらにランダムプライマー非存在下であっても、複製に利用できるプライマーの合成を T7 RNA ポリメラーが担うことができることを見出している。しかしながら、複製反応で合成された産物は直鎖のコンカテマー（複数の配列の繰り返し構造からなる DNA）であり、再帰的な複製反応を達成するには再び DNA を環状化させる必要があった。この問題の解決案として、Forster と Church は Cre 組み換え酵素を用いた

再環状化を提案しており¹⁾、我々はこの方法に従い、ローリングサークル型の複製と組み換えを利用した再帰的複製スキームを実験的に構築した³⁵⁾。この複製スキームでは、環状 DNA から phi29 DNA 複製酵素を用いたローリングサークル型複製と、Cre 組み換え酵素を用いた相同組み換えによる複製された直鎖 DNA の再環状化の 2 つの段階からなり、これら 2 種類のタンパク質のみで DNA 複製サイクルが達成されるはずである。しかし、実際にやってみると Cre 組み換え酵素が phi29 DNA 複製酵素による DNA 複製を大きく阻害してしまうため、DNA 複製がほとんど起こらなかった。そこで我々は、phi29 DNA 複製酵素と組み換え配列(loxP)をコードした環状 DNA にランダム変異を入れたライブラリーを作成し、外部から供給した Cre 組み換え酵素存在下で DNA 複製反応と DNA の回収を油中水滴中で繰り返すことで、Cre 組み換え酵素存在下でも効率的に複製できる環

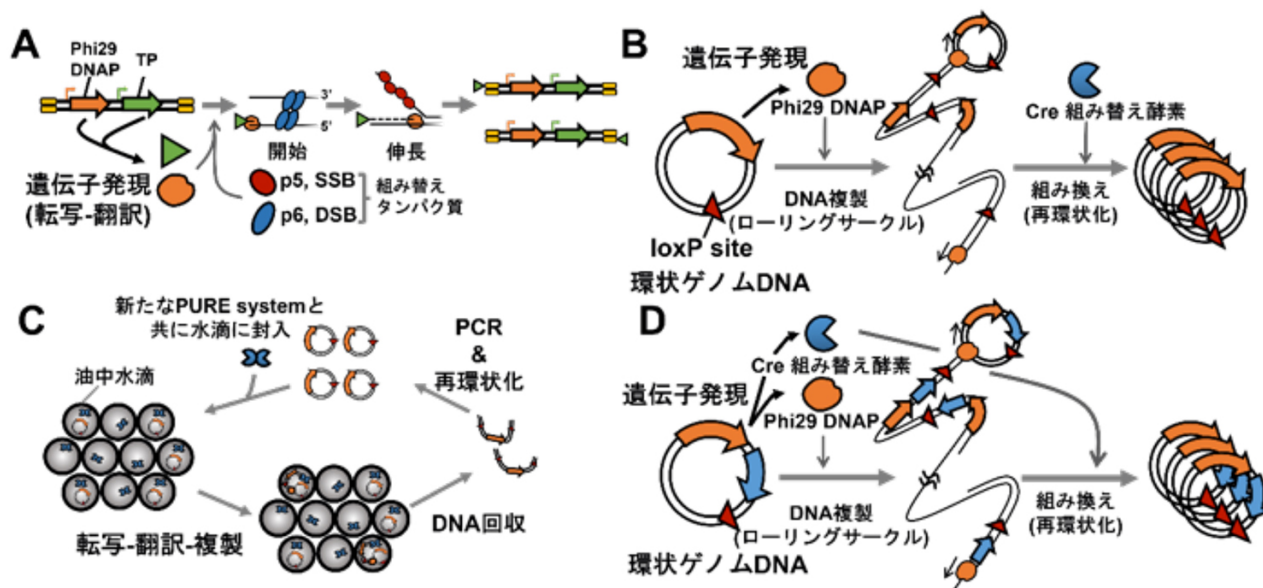


図 3 phi29 DNA 複製酵素を用いた DNA 複製と転写-翻訳の共役

(A)バクテリオファージ phi29 の DNA 複製システムを無細胞発現と共役させた DNA 複製スキーム Phi29DNA 複製酵素と TP をコードした直鎖状 DNA は、これらのタンパク質の発現に依存して自己複製が達成される。一本鎖結合タンパク質(p5)と複製起点の巻き戻しを促進する二本鎖結合タンパク質(p6)は組み換え精製タンパク質として導入された。(B) ローリングサークル型の複製と組み換えを利用した再帰的複製スキーム。DNA から発現した phi29 DNA 複製酵素は環状 DNA を用いたローリングサークル型複製を行い、その後 Cre 組み換え酵素が LoxP 配列を利用した相同組み換えを行うことによって環状 DNA が再び得られる。(C)油中水滴を用いた環状 DNA の人為進化。油中水滴内での転写-翻訳-複製によって DNA が複製される。継代毎に DNA 産物を回収し PCR で増幅(主にここで変異が導入される)したのち、新たな PURE system および Cre 組み換え酵素とともに油中水滴に再び導入する。この一連の実験を繰り返すことで、次第に複製能力の高い DNA が濃縮される。(D)ローリングサークル型の複製と組み換えをコードした DNA による自律複製スキーム phi29 DNA 複製酵素と Cre 組み換え酵素の 2 つをコードした DNA は、環状 DNA の複製に必要な遺伝子全てをコードしており、これらのタンパク質の発現によって自律的に複製が達成される。

状 DNA を人為進化させた(図 3C)。さらに我々は、この人為進化させた環状 DNA に Cre 組み換え酵素の遺伝子もコードして、複製に必要な酵素を全て自律的に合成しながら DNA を複製させることに成功した³⁶⁾(図 3D)。この遺伝子発現と共役した DNA 複製を継代すると、過去に報告している RNA の自己複製系³⁷⁾と同様に継代を通して濃度振動の繰り返しが見られた。さらに継代を通してより複製能力の高い DNA が進化することを見出している。

転写-翻訳系の自己再生産

上記で達成された phi29 DNA 複製酵素を用いた DNA 複製系には、遺伝子をゲノム DNA に組み込むことでさらに複雑なシステムを作ることができる。次の重要な課題は、PURE system 中の遺伝子発現に関わる因子もこの DNA ゲノムに導入することで、セントラルドグマに必要な因子を再生産し、図 1 に示すような自律的な自己複製システムを構築することである。ここでは特に、転写-翻訳タンパク質、tRNA、リボソームを自己再生産系に組み込む試みについて、現状達成されていること未達成の課題について紹介する。

転写-翻訳タンパク質

PURE system 内に含まれるタンパク質、すなわち遺伝子発現に必要なタンパク質)はリボソームタンパク質を除いて 36 種類存在する。この中には、転写反応のための T7 RNA ポリメラーゼ(T7 RNAP)、翻訳開始因子(IF1, 2, 3)、翻訳伸長因子(EF-Tu, Ts, G)、翻訳終結因子(RF1, 2, 3, RRF)、ホルミルメチオニン合成因子、20 種類のアミノアシル tRNA 合成酵素(aaRS)、エネルギー再生系(creatine kinase, myokinase, nucleotide diphosphate kinase(NDK), ppiase)が含まれる。従って、これらをコードするような DNA はそれだけ長鎖のゲノム(コード領域のみで約 60 kbp³⁸⁾)となる。これまでに Libicher らは、これらが複数の DNA に分割してコードされているゲノム DNA(rRNA など含む、合計 116 kbp)が、phi29 DNA 複製酵素の発現と共役して複製可能であることを示した³⁹⁾。さらに彼らは、32 種類の PURE system 成分を PURE system 中で共発現させた場合、約半分程度の因子のみではあるが、元々の PURE system 内に含まれる量と同程度以上の合成量が得られることを示している。また、NDK、T7 RNAP およびアデニル酸キナーゼ(エネルギー再生系)について PURE system

で合成させ、これらのタンパク質が取り除かれた PURE system を用いた連続希釈反応が 3 世代ほど持続可能であることを明らかにした⁴⁰⁾。彼らは、12 種類の aaRS および RF1 をコードした DNA についても連続希釈反応を行い、3 世代の間これらの同時合成が維持させられることを示したが、翻訳活性は 3 世代目で急激に低下していた。他にも Lavickova らは、マイクロ流体デバイスを利用して反応液を供給させることを用い、aaRS を 7 種類まで自己再生産させ、翻訳系が持続することを報告している⁴¹⁾。このように翻訳タンパク質を自己再生産するシステムは進展している一方で、同時に再生産できる遺伝子数は限られており⁴²⁾、より多種類の遺伝子の持続的な合成を可能にするためには反応系を改良する余地がある。また以上の研究例では DNA は継代のたびに外部から添加しているが、自律的な自己再生産をするには DNA も複製するシステムが求められる。

tRNA

tRNA はアミノ酸とコドンを対応づける分子であり、遺伝情報の翻訳に中心的な役割を果たす分子の一つである。現存の細胞内では、tRNA は純粋な RNA ではなく、多くの塩基に転写後修飾がなされている。この転写後修飾は翻訳の正確性などを担保しているとされている。通常の PURE system では大腸菌から精製された tRNA を用いているため、tRNA には転写後修飾がされているが、近年、*In vitro* 転写などで人工的に合成した転写後修飾のない tRNA のままでも、PURE system 内で翻訳に十分利用可能であるような tRNA セットも提案されている⁴⁵⁻⁴⁶⁾。この tRNA セットでは、翻訳に最低限必要な 20 種類のアミノ酸にそれぞれ 1 種の tRNA と開始 tRNA の合計 21 種類の tRNA を用いて翻訳を担保している。このような人工的に合成した tRNA を用いれば、特定のコドン-アミノ酸対を空けた状態にすることも可能である。従って、これを利用して非天然アミノ酸を部位特異的に複数導入すること⁴⁵⁾や、コドン-アミノ酸対同士をスワップさせた特殊な遺伝暗号系を人工的に構築することが可能である⁴⁶⁾。一方、これらの研究ではすべて予め調製した tRNA を翻訳系と混ぜて再構成するものとなっており、tRNA は反応中で再生産されているわけではない。本レビューで扱う自己再生産システムの構築を目指すという目的には、これらの tRNA を合成するシステムと tRNA をコードした DNA の自己複製システムを統合する必要がある。

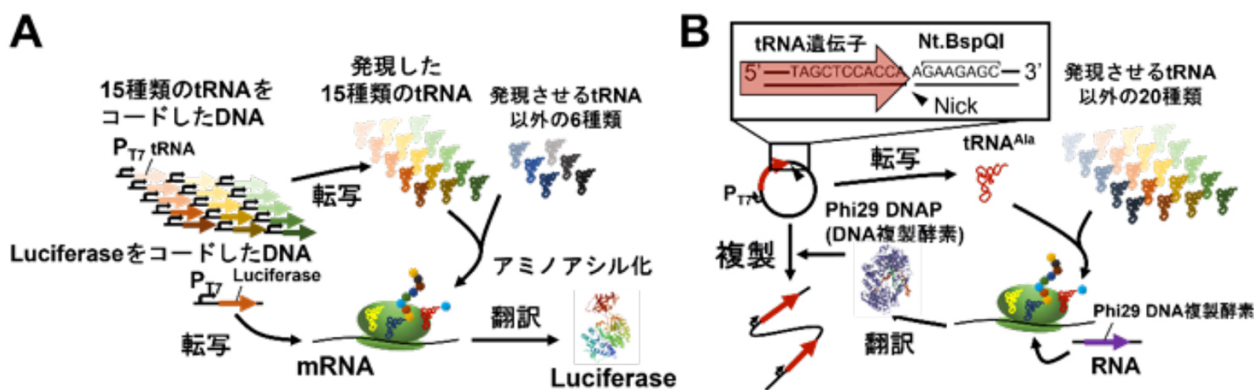


図 4 tRNA の合成と翻訳-複製を共役させたシステム

(A)tRNA の発現と翻訳を共役させるスキーム 15 種類の tRNA をコードした直鎖状の DNA から、PURE system 内で 15 種類の tRNA が同時に合成される。PURE system 内には発現させる tRNA 以外の 6 種類の tRNA のみを入れておく。これによって、15 種類の tRNA が全て発現した時にのみ翻訳反応が進むようになる。Luciferase は PDBID:1LICI。 (B)tRNA の発現と翻訳および複製を共役させるスキーム tRNA^{Ala} を除く 20 種類の tRNA を含んだ PURE system 内で環状 DNA から tRNA^{Ala} が合成され、この発現に依存して phi29 DNA 複製酵素が合成される。Phi29 DNA 複製酵素は、環状 DNA をテンプレートとしたローリングサークル型複製によって、tRNA をコードした DNA が複製される。環状 DNA から tRNA への転写反応を正確に終結させるために、tRNA 遺伝子の直下にニックを導入している。Phi29 DNAP は PDBID:2PZS。

そこで我々は、まず tRNA をコードした DNA から PURE system 内で tRNA を発現させ翻訳と共役させることを試みた⁴⁷⁾。ここでは、21 種類の tRNA の中で T7 RNAP によって直接合成可能な 15 種類 tRNA を用いた。各 tRNA をコードした DNA から、PURE system 中で 15 種類すべての tRNA を同時に発現させ、その tRNA を使ってレポーター遺伝子の翻訳を起こすことに成功した(図 4A)。またそのうち 1 種類のアラニン結合する tRNA について、発現した tRNA に依存して phi29 DNA 複製酵素を合成し、元の tRNA をコードする DNA を複製するような部分的な自律的複製に成功した(図 4B)。今後は、すべての tRNA 種に対してその発現と共役した翻訳を実現させ、tRNA が自律的な複製継代を通して維持させ続けられるようなシステムを構築することが望まれる。

リボソーム

リボソームは翻訳が行われる場を提供する分子複合体である。大腸菌では 50S と 30S の 2 つのサブユニットから構成される。50S サブユニットは 5S および 23S の 2 種のリボソーム RNA (rRNA) と 33 種類のリボソームタンパク質(rProtein)からなり、アミノ酸間のペプチド結合形成を触媒する活性(ペプチジルトランスフェラーゼ活性)をもつ。30S サブユニットは、16S rRNA と 21 種類のリボソームタンパク質からなり、mRNA と tRNA の結合(解読)に関わる。大腸菌リボソームのサブユニット形成過程を理

解するために、これまでに単離した rRNA と rProtein を使って試験管内でリボソームサブユニットを段階的に再構成する研究がおこなわれてきた⁵⁰⁻⁵²⁾。試験管内での 30S サブユニットの再構成過程には中間体が存在し⁵¹⁾、40°C の処理による熱活性化や、タンパク質シャペロン存在化で成熟した 30S リボソームサブユニットが形成されることがわかっている⁵²⁾。50S サブユニットの場合も一定の生理的条件下では効率的な再構成が起こらず、4 mM Mg²⁺、44°C と 20 mM Mg²⁺、50°C の 2-step の反応を利用する非生理的な過程を経ることで、成熟した 50S リボソームサブユニットが形成されることが分かっている⁵⁰⁾。

これまでに、これらのリボソーム再構成反応を無細胞翻訳系と統合させ、無細胞翻訳系内でリボソーム構成因子を合成し、その場でリボソームを再生産する試みがなされている。Jewett らは rRNA への転写とリボソームの組み立ておよびタンパク質の発現を、S150 細胞抽出液を用いた一つの反応系で行う方法 (iSAT (integrated Synthesis, Assembly, and Translation)法)を開発した⁵³⁾(図 5A)。この方法では、30S と 50S サブユニットの全タンパク質(それぞれ TP30、TP50 と呼称)を用いて、合成された 3 種の rRNA に対して TP30、TP50 が結合することによってそれぞれのサブユニットが形成される。ただし、これらの研究では細胞の粗抽出液を用いている。細胞粗抽出液の組成は基本的にはブラックボックスであり、生理的環境でのリボソームの構築に必要な因子

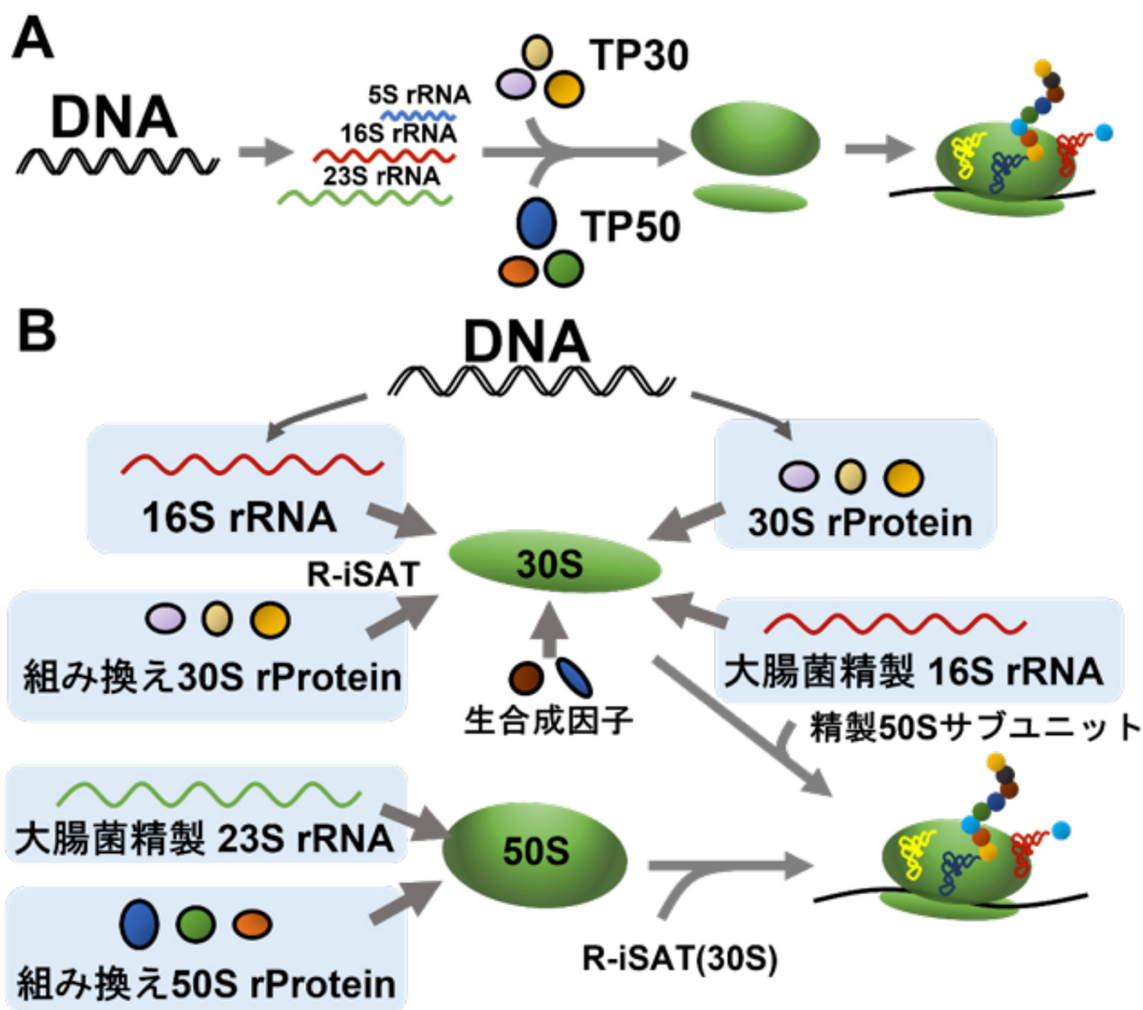


図5 リボソーム再構成反応と無細胞翻訳系の統合

(A) iSAT システムのスキーム DNA から3つの rRNA が合成され、それぞれのサブユニットの全タンパク質(TP30 および TP50)とともにリボソームが *in vitro* で組み立てられる。細胞粗抽出液内での反応であることに注意。(B) 精製された既知の因子のみでリボソームの再構成を目指す研究 最終的にはリボソームの合成に必要な遺伝子を全てコードした DNA を用いて、各リボソーム成分の発現およびリボソームへの組み立てを *in vitro* で行うことが目標であるが、その部分的な達成が報告されている。

の全貌は未だ明らかになっていない。これが、リボソームを試験管内で再生産する際の大きな課題となっている。

この課題を克服するために、近年では精製された既知因子のみからリボソームの部分的な再構成に成功した例がいくつか報告されている(図5B)。Tamaruらは、精製した組み換えリボソームタンパク質と大腸菌から精製した16S rRNAを用いて30Sサブユニットを再構成し、PURE systemでの翻訳に直接適用できるような条件を検討した。その結果、EraやYjeQなどのGTPaseリボソーム生合成因子を加えることで、熱による活性化プロセスを経ることなく低塩条件での再構成効率が向上することを明らかにした⁵⁴⁾。またLiらは、大腸菌から精製した16S rRNA

とPURE systemを用いて合成した個々のrProteinを用いて、無細胞で翻訳能力をもった30Sサブユニットを再構成することに成功した⁵⁵⁾。ShimojoらはiSAT systemをPURE system用に導入することで、転写によって合成された16S rRNAがTP30や組み換えリボソームタンパク質と共に組み立てられて30Sサブユニットを再構成するR-iSATを開発した。さらに、SD/アンチSDの直交ペアを利用してTP30を構成するrProteinの合成とR-iSATを共役できることを示した⁵⁶⁾。そしてLevyらは、rProteinとrRNAをコードしたDNAをチップ上にDNAブラシとして固定化させ、rProteinと16S rRNAの合成を共役しこれらアセンブリ因子が30Sサブユニットを階層的に再構成できることを示している⁵⁷⁾。さらに最近Aoyamaら

は、大腸菌から抽出した 23S rRNA と 50S サブユニットの組み換え rProtein を用いて 50S サブユニットを再構成し、16S rRNA の発現と共役させる R-iSAT と組み合わせることで 54 種類の組み換え rProtein すべてを含む 70S リボソームの形成に成功した⁵⁸⁾。

このように近年急速にリボソーム再構成研究が進展しているものの、現在まで PURE system 中で合成された rRNA からのリボソームの完全な生合成は達成されていない。その問題の一つは、PURE system で合成された rRNA には転写後修飾がされていないことである。16S rRNA は修飾がなくても比較的機能するが 23S rRNA については未修飾状態では殆ど活性を持たない⁵⁹⁾ため、PURE system に rRNA の修飾酵素を追加することが必要になるだろう。別の方法として、実験進化によって転写後修飾が不要になった rRNA を得ることもありうるかもしれない。例えば Murase らは、PURE system における iSAT とリボソームソーティング技術を利用して、修飾を持たない状態でも高塩濃度条件下で高活性な 30S サブユニットを形成するような 16S rRNA の進化実験系を開発した⁶⁰⁾。今後 23S rRNA についても未修飾または修飾が少ない状態でも活性を持つような変異体が進化実験を通して取得できる可能性がある。さらに *Bacillus stearothermophilus* 由来の 50S サブユニットについて、*in vitro* 転写によって調製された未修飾の 23S rRNA を利用したアセンブリに成功している例もあり⁶¹⁾、他生物由来とのリボソームを組み合わせたアプローチでも利用可能となり得るかもしれない⁶²⁾。

おわりに

本稿では、生命システムとしての成立条件の理解を目的とした、自律的複製システムを *in vitro* で再構成する研究の進展について概説した。遺伝情報の複製および翻訳タンパク質や tRNA、リボソームなどの自己複製や再構成は部分的に構築されつつあり、今後はさらにこれらを統合してより自律的な複製システムを構築することが大きな課題である。

以上のような *in vitro* で生物の機能を再構成する研究を行っている、いつも生物の持つ複雑な仕組みに悩まされる。なぜ、今回作ったようなもっと簡単な DNA 複製を採用している生物がないのか、必要な分量のバランスはどの様にして決まったのか、なぜ 20 種類もアミノ酸が必要なのか、tRNA や rRNA はなぜ何種類もの化学修飾を必要とするのか？ こうした疑問が、もっと単純でありながら増殖して進化する能力を持つ分子システムを構築する

ことで、少しでもわかるのではないかと期待している。極限微生物学では現存している生命の生存条件の範囲を探っていく見方が多いが、今回紹介したようなボトムアップ的に生命システムを再構築するアプローチも組み合わせることで、生命に対する私たちの理解をさらに進めることができると考える。

Reference

- 1) Forster, A. C., Church, G. M. 2006. Towards Synthesis of a Minimal Cell. *Mol. Syst. Biol.* 2: 45.
- 2) Damiano, L., Stano, P. 2020. On the “Life-Likeness” of Synthetic Cells. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8: 953.
- 3) Ivanov, I., Castellanos, S. L., Balasbas, S., Otrin, L., Maruscaronicaron, N., Vidakovicacute-Koch, T., Sundmacher, K. 2021. Bottom-Up Synthesis of Artificial Cells: Recent Highlights and Future Challenges. *Annu Rev Chem Biomol Eng.* 12: 287~308.
- 4) Forlin, M., Lentini, R., Mansy, S. S. 2012. Cellular Imitations. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 16: 586~592.
- 5) Buddingh', B. C., Van Hest, J. C. M. 2017. Artificial Cells: Synthetic Compartments with Life-like Functionality and Adaptivity. *Acc. Chem. Res.* 50: 769~777.
- 6) Amy Yewdall, N., Mason, A. F., Van Hest, J. C. M. 2018. The Hallmarks of Living Systems: Towards Creating Artificial Cells. *Interface Focus.* 8: 20180023.
- 7) Ichihashi, N. 2019. What Can We Learn from the Construction of *in Vitro* Replication Systems? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1447: 144~156.
- 8) Biner, O., Fedor, J. G., Yin, Z., Hirst, J. 2020. Bottom-Up Construction of a Minimal System for Cellular Respiration and Energy Regeneration. *ACS Synth. Biol.* 9: 1450~1459.
- 9) Ruiz-Mirazo, K., Peretó, J., Moreno, A. 2004. A Universal Definition of Life: Autonomy and Open-Ended Evolution. *Orig. life Evol. Biosph.* 34: 323~346.
- 10) Duim, H., Otto, S. 2017. Towards Open-Ended

- Evolution in Self-Replicating Molecular Systems. *Beilstein J. Org. Chem.* 13: 1189~1203.
- 11) Szostak, J. W., Bartel, D. P., Luisi, P. L. 2001. Synthesizing Life. *Nature.* 409: 387~390.
 - 12) Gaut, N. J., Adamala, K. P. 2021. Reconstituting Natural Cell Elements in Synthetic Cells. *Adv Biol (Weinh)* . 5: e2000188.
 - 13) Kaguni, J. M., Kornberg, A. 1984. Replication Initiated at the Origin (OriC) of the E. Coli Chromosome Reconstituted with Purified Enzymes. *Cell.* 38 : 183~190.
 - 14) Hürtgen, D., Mascarenhas, J., Heymann, M., Murray, S. M., Schwille, P., Sourjik, V. 2019. Reconstitution and Coupling of DNA Replication and Segregation in a Biomimetic System. *Chembiochem.* 20: 2633~2642.
 - 15) Sanders, G. M., Dallmann, H. G., McHenry, C. S. 2010. Reconstitution of the B. Subtilis Replisome with 13 Proteins Including Two Distinct Replicases. *Mol. Cell.* 37: 273~281.
 - 16) Korhonen, J. A., Pham, X. H., Pellegrini, M., Falkenberg, M. 2004. Reconstitution of a Minimal MtDNA Replisome in Vitro. *EMBO J.* 23: 2423~2429.
 - 17) Georgescu, R. E., Schauer, G. D., Yao, N. Y., Langston, L. D., Yurieva, O., Zhang, D., Finkelstein, J., O'Donnell, M. E. 2015. Reconstitution of a Eukaryotic Replisome Reveals Suppression Mechanisms That Define Leading/Lagging Strand Operation. *Elife.* 4: e04988.
 - 18) Su'etsugu, M., Takada, H., Katayama, T., Tsujimoto, H. 2017. Exponential Propagation of Large Circular DNA by Reconstitution of a Chromosome-Replication Cycle. *Nucleic Acids Res.* 45: 11525~11534.
 - 19) Fujita, H., Osaku, A., Sakane, Y., Yoshida, K., Yamada, K., Nara, S., Mukai, T., Su'etsugu, M. 2022. Enzymatic Supercoiling of Bacterial Chromosomes Facilitates Genome Manipulation. *ACS Synth. Biol.* 11: 3088~3099.
 - 20) Laohakunakorn, N., Grasmann, L., Lavickova, B., Michielin, G., Shahein, A., Swank, Z., Maerkl, S. J. 2020. Bottom-Up Construction of Complex Biomolecular Systems With Cell-Free Synthetic Biology. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8: 213.
 - 21) Shimizu, Y., Inoue, A., Tomari, Y., Suzuki, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K., Ueda, T. 2001. Cell-Free Translation Reconstituted with Purified Components. *Nat. Biotechnol.* 19:751~755.
 - 22) Fujiwara, K., Katayama, T., Nomura, S. I. M. 2013. Cooperative Working of Bacterial Chromosome Replication Proteins Generated by a Reconstituted Protein Expression System. *Nucleic Acids Res.* 41: 7176~7183.
 - 23) Han, F., Xu, B., Lu, N., Caliar, A., Lu, H., Xia, Y., Su'etsugu, M., Xu, J., Yomo, T. 2022. Optimization and Compartmentalization of a Cell-Free Mixture of DNA Amplification and Protein Translation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 106: 8139~8149.
 - 24) Tomita, N., Mori, Y., Kanda, H., Notomi, T. 2008. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) of Gene Sequences and Simple Visual Detection of Products. *Nat. Protoc.* 3: 877~882.
 - 25) Walker, G. T., Fraiser, M. S., Schram, J. L., Little, M. C., Nadeau, J. G., Malinowski, D. P. 1992. Strand Displacement Amplification—an Isothermal, in Vitro DNA Amplification Technique. *Nucleic Acids Res.* 20: 1691~1696.
 - 26) Schaerli, Y., Stein, V., Spiering, M. M., Benkovic, S. J., Abell, C., Hollfelder, F. 2010. Isothermal DNA Amplification Using the T4 Replisome: Circular Nicking Endonuclease-Dependent Amplification and Primase-Based Whole-Genome Amplification. *Nucleic Acids Res.* 38: e201.
 - 27) Fischer, H., Hinkle, D. C. 1980. Bacteriophage T7 DNA Replication in Vitro. Stimulation of DNA Synthesis by T7 RNA Polymerase. *J. Biol. Chem.* 255: 7956~7964.
 - 28) Salas, M. 1991. Protein-Priming of DNA Replication. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 39~71.

- 29) Blanco, L., Lázaro, J. M., de Vega, M., Bonnin, A., Salas, M. 1994. Terminal Protein-Primed DNA Amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91: 12198~12202.
- 30) Salas, M., Holguera, I., Redrejo-Rodríguez, M., de Vega, M. 2016. DNA-Binding Proteins Essential for Protein-Primed Bacteriophage Φ 29 DNA Replication. *Front. Mol. Biosci.* 3: 37.
- 31) Mencía, M., Gella, P., Camacho, A., de Vega, M., Salas, M. 2011. Terminal Protein-Primed Amplification of Heterologous DNA with a Minimal Replication System Based on Phage Phi29. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108: 18655~18660.
- 32) van Nies, P., Westerlaken, I., Blanken, D., Salas, M., Mencía, M., Danelon, C. 2018. Self-Replication of DNA by Its Encoded Proteins in Liposome-Based Synthetic Cells. *Nat. Commun.* 9: 1583.
- 33) Dean, F. B., Nelson, J. R., Giesler, T. L., Lasken, R. S. 2001. Rapid Amplification of Plasmid and Phage DNA Using Phi 29 DNA Polymerase and Multiply-Primed Rolling Circle Amplification. *Genome Res.* 11: 1095~1099.
- 34) Sakatani, Y., Ichihashi, N., Kazuta, Y., Yomo, T. 2015. A Transcription and Translation-Coupled DNA Replication System Using Rolling-Circle Replication. *Sci. Rep.* 5: 10404.
- 35) Sakatani, Y., Yomo, T., Ichihashi, N. 2018. Self-Replication of Circular DNA by a Self-Encoded DNA Polymerase through Rolling-Circle Replication and Recombination. *Sci. Rep.* 8 (1): 13089.
- 36) Okauchi, H., Ichihashi, N. 2021. Continuous Cell-Free Replication and Evolution of Artificial Genomic DNA in a Compartmentalized Gene Expression System. *ACS Synth. Biol.* 10 (12): 3507~3517.
- 37) Bansho, Y., Furubayashi, T., Ichihashi, N., Yomo, T. 2016. Host-Parasite Oscillation Dynamics and Evolution in a Compartmentalized RNA Replication System. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113: 4045~4050.
- 38) Shepherd, T. R., Du, L., Liljeruhm, J., Samudiyata, Wang, J., Sjödin, M. O. D., Wetterhall, M., Yomo, T., Forster, A. C. 2017. De Novo Design and Synthesis of a 30-Cistron Translation-Factor Module. *Nucleic Acids Res.* 45: 10895~10905.
- 39) Libicher, K., Hornberger, R., Heymann, M., Mutschler, H. 2020. In Vitro Self-Replication and Multicistronic Expression of Large Synthetic Genomes. *Nat. Commun.* 11: 904.
- 40) Libicher, K., Mutschler, H. 2020. Probing Self-Regeneration of Essential Protein Factors Required for: In Vitro Translation Activity by Serial Transfer. *Chem. Commun.* 56: 15426~15429.
- 41) Lavickova, B., Laohakunakorn, N., Maerkl, S. J. 2020. A Partially Self-Regenerating Synthetic Cell. *Nat. Commun.* 11: 6340.
- 42) Doerr, A., Foscchepoth, D., Forster, A. C., Danelon, C. 2021. In Vitro Synthesis of 32 Translation-Factor Proteins from a Single Template Reveals Impaired Ribosomal Processivity. *Sci. Rep.* 11: 1898.
- 43) Calles, J., Justice, I., Brinkley, D., Garcia, A., Endy, D. 2019. Fail-Safe Genetic Codes Designed to Intrinsically Contain Engineered Organisms. *Nucleic Acids Res.* 47: 10439~10451.
- 44) Hibi, K., Amikura, K., Sugiura, N., Masuda, K., Ohno, S., Yokogawa, T., Ueda, T., Shimizu, Y. 2020. Reconstituted Cell-Free Protein Synthesis Using in Vitro Transcribed TRNAs. *Commun. Biol.* 3: 350.
- 45) Iwane, Y., Hitomi, A., Murakami, H., Katoh, T., Goto, Y., Suga, H. 2016. Expanding the Amino Acid Repertoire of Ribosomal Polypeptide Synthesis via the Artificial Division of Codon Boxes. *Nat. Chem.* 8: 317~325.
- 46) Fujino, T., Tozaki, M., Murakami, H. 2020. An Amino Acid-Swapped Genetic Code. *ACS Synth. Biol.* 9: 2703~2713.
- 47) Miyachi, R., Shimizu, Y., Ichihashi, N. 2022.

- Transfer RNA Synthesis-Coupled Translation and DNA Replication in a Reconstituted Transcription/Translation System. *ACS Synth. Biol.* 11: 2791~2799.
- 48) Traub, P., Nomura, M. 1968. Structure and Function of *E. Coli* Ribosomes. V. Reconstitution of Functionally Active 30S Ribosomal Particles from RNA and Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 59: 777~784.
- 49) Culver, G. M. 2003. Assembly of the 30S Ribosomal Subunit. *Biopolymers* 68: 234~249.
- 50) Nierhaus, K. H., Dohme, F. 1974. Total Reconstitution of Functionally Active 50S Ribosomal Subunits from *Escherichia Coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71: 4713~4717.
- 51) Held, W. A., Mizushima, S., Nomura, M. 1973. Reconstitution of *Escherichia Coli* 30 S Ribosomal Subunits from Purified Molecular Components. *J. Biol. Chem.* 248: 5720~5730.
- 52) Maki, J. A., Schnobrich, D. J., Culver, G. M. 2002. The DnaK Chaperone System Facilitates 30S Ribosomal Subunit Assembly. *Mol. Cell* 10: 129~138.
- 53) Jewett, M. C., Fritz, B. R., Timmerman, L. E., Church, G. M. 2013. In Vitro Integration of Ribosomal RNA Synthesis, Ribosome Assembly, and Translation. *Mol. Syst. Biol.* 9: 678.
- 54) Tamaru, D., Amikura, K., Shimizu, Y., Nierhaus, K. H., Ueda, T. 2018. Reconstitution of 30S Ribosomal Subunits in Vitro Using Ribosome Biogenesis Factors. *RNA* 24: 1512~1519.
- 55) Li, J., Haas, W., Jackson, K., Kuru, E., Jewett, M. C., Fan, Z. H., Gygi, S., Church, G. M. 2017. Cogenerating Synthetic Parts toward a Self-Replicating System. *ACS Synth. Biol.* 6: 1327~1336.
- 56) Shimojo, M., Amikura, K., Masuda, K., Kanamori, T., Ueda, T., Shimizu, Y. 2020. In Vitro Reconstitution of Functional Small Ribosomal Subunit Assembly for Comprehensive Analysis of Ribosomal Elements in *E. Coli*. *Commun. Biol.* 3: 142.
- 57) Levy, M., Falkovich, R., Daube, S. S., Bar-Ziv, R. H. 2020. Autonomous Synthesis and Assembly of a Ribosomal Subunit on a Chip. *Sci. Adv.* 6: eaaz6020.
- 58) Aoyama, R., Masuda, K., Shimojo, M., Kanamori, T., Ueda, T., Shimizu, Y. 2022. In Vitro Reconstitution of the *Escherichia Coli* 70S Ribosome with a Full Set of Recombinant Ribosomal Proteins. *J. Biochem.* 171: 227~237.
- 59) Green, R., Noller, H. F. 1996. In Vitro Complementation Analysis Localizes 23S rRNA Posttranscriptional Modifications That Are Required for *Escherichia Coli* 50S Ribosomal Subunit Assembly and Function. *RNA* 2: 1011~1021.
- 60) Murase, Y., Nakanishi, H., Tsuji, G., Sunami, T., Ichihashi, N. 2018. In Vitro Evolution of Unmodified 16S rRNA for Simple Ribosome Reconstitution. *ACS Synth. Biol.* 7: 576~583.
- 61) Green, R., Noller, H. F. 1999. Reconstitution of Functional 50S Ribosomes from in Vitro Transcripts of *Bacillus Stearothermophilus* 23S rRNA. *Biochemistry* 38: 1772~1779.
- 62) Tsuji, S., Ichihashi, N. 2017. Translation Activity of Chimeric Ribosomes Composed of *Escherichia Coli* and *Bacillus Subtilis* or *Geobacillus Stearothermophilus* Subunits. *Biochem. Biophys. reports.* 10: 325~328.