

## ERATO 四方動的微小反応場プロジェクト事後評価（最終評価）報告書

【研究総括】 四方 哲也（元大阪大学 大学院情報科学研究科／教授）

【評価委員】（敬称略、五十音順）

今村 千絵（(株)豊田中央研究所／主任研究員）

上田 卓也（委員長；東京大学 大学院新領域創成科学研究科／教授）

佐野 雅己（東京大学 大学院理学系研究科／教授）

谷口 雄一（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）

山崎 昌一（静岡大学 電子工学研究所／教授）

## 評価の概要

ERATO四方動的微小反応場プロジェクトは、既知の分子からボトムアップ的に、細胞のもつ自己複製や自己増殖、進化といった特性を付与した人工の動的微小反応場を実験的に創造することを目指した。自己複製や進化する能力は生物の持つ大きな特徴のひとつであるが、天然の細胞には、様々な分子や機構があり、その多くは完全には解明されていないため、「進化可能な動的微小反応場」として性質を定量的に理解するのは、天然の細胞だけでは困難である。本研究プロジェクトでは、人工RNAゲノムの複製システムを油中水滴で区画化することにより、動的な「進化する」反応場を実現するとともに、天然の細胞の特性と比較し、「無生物界と生物界の間に橋を架ける」という独自性の高い研究に取り組んだ。

本プロジェクトの研究体制は区画内反応グループ、ダイナミック反応区画グループ、進化的プログラミンググループ、膜小胞反応組織化グループ、微小反応場特性解析グループの5つで構成されており、四方哲也総括のリーダーシップのもと、細胞生物学、生化学、物理化学、理論生物学、マイクロ・ナノ工学など、様々な分野をバックグラウンドに持つメンバーが招集され、分野融合的で効果的なプロジェクト運営がなされた。合同のセミナーでの情報交換や議論の中で、各グループが有機的に連携を図り、お互いの解析結果を共有、還元する形で効率的に研究が推進されており、新しい領域を切り開く人材を育成する場となっていた。

プロジェクトでは①微小区画での反応の高効率性、確率性、頑強性、②成長分裂する微小区画による再帰性、③変異と選択による進化能という三項目を柱に研究が進められた。それぞれ①無細胞翻訳系の構成成分や濃度の最適化によりタンパク質の合成効率を従来の約50倍に向上、②ポリマーの添加により自発的に分裂する人工細胞の作製に成功、③-1「進化の機能」を持った人工細胞の作成に成功、③-2人工細胞を使って膜タンパクを「進化」させる技術を開発、と注目すべき成果を着実にあげてきた。これらの研究成果は、生命進化やネットワーク、生命の起源など生命科学の多くの分野に大きく貢献するだけでなく、高い活性を有する酵素の創成等、産業分野においても高い波及効果が期待できる。

以上のとおり、四方動的微小反応場プロジェクトは、新物質探索方法・生成方法についてあらたな概念を創出ただけでなく、複雑な細胞を再構成し定量的検討を可能にする基盤技術を確立しつつあり、戦略目標「異種材料・異種物質状態間の高機能接合界面を実現する革新的ナノ界面技術の創出とその応用」に資する十分な成果が得られたと評価する。

## 1. 研究プロジェクトの設定および運営

### 1-1. プロジェクトの全体構想

よく引用されている生命の定義は「進化可能な自律的化学反应システム」である。しかし、すべての人にこの定義が受け入れられているわけでもなく、また、細胞の持つ動的微小反応場としての性質がこの定義の中に十分反映されているわけではない。本プロジェクトの研究構想では、

- 1) 微小区画での反応の高効率性、確率性、頑強性
- 2) 成長分裂する微小区画による再帰性
- 3) 変異と選択による進化能

以上の三点に着目して、動的微小反応場としての特性を既知物質のみから創りあげる。そして、単細胞生物である大腸菌などの動的微小反応場としての性質を調べ、人工の動的微小反応場と比較する。この創出と比較のサイクルを繰り返すことによって、生命の最小単位である細胞という概念の確立を目指し、人工細胞創出の設計指針を得ることを目的としていた。

プロジェクトの全体構想は、既知分子からボトムアップ的に、自己複製・進化する反応系と、自己増殖する反応容器を併せ持つ動的微小反応場を実験的に創造することにより、最終的には「人工細胞」の構築を目指した挑戦的なものである。生命の持つ進化能を主なターゲットとし、長時間にわたって反応・選択を行うことのできる微小区画を構築して動的な「進化する」反応場を実現することにより、独自性の高い研究を可能としている。研究遂行のためには、細胞生物学、生化学、物理化学、理論生物学、マイクロ・ナノ工学など多くの異なる専門分野の融合が必要であり、ERATO の理念に合致している。

### 1-2. プロジェクトの目標・計画

プロジェクトの目標・計画は、ERATO の期間・規模を鑑みれば妥当なものであった。合成生物学では、計画が萌芽的な発見や知見に基づいて絶えず見直されることが重要であるが、自由度・融通性を担保しながら設定がなされており、適切であったと考えられる。基礎から応用までのバランスも取れていた。

### 1-3. プロジェクトの運営

四方研究総括は、これまでに生命と同様な仕組みで遺伝情報を複製する反応系を構築するなど本研究領域の基盤となる人工細胞の研究を行ってきた。本プロジェクトは、細胞生物学、生化学、物理化学、理論生物学、マイクロ・ナノ工学など多くの異なる専門分野の若手研究者を結集し、分野融合のための会合等の機会を設けるほか、研究者の育成・プロモーションの配慮もなされており、総括の強いリーダーシップのもとで推進されていた。

本プロジェクトは、区画内反応グループ、ダイナミック反応区画グループ、進化的プログラミンググループ、膜小胞反応組織化グループ、微小反応場特性解析グループの5グループの体制で実施していた。5グループに分けることで各グループの目標とやるべきことが明確化されていた。各研究グループは互いに良い形で連携しており、多くの研究成果が各グループの協力関係の下で挙げられている。本プロジェクトは新しい領域を切り開く人材育成の場ともなっていた。

研究費は、設備費、研究費、人件費のバランスが程よくとれていたように思われる。購入された大型設備、たとえば蛍光セルソーター、シリコンディープエッチング装置、光ピンセット装置、次世代シーケンサーなどは、プロジェクトに有効に使用され、それらを用いた研究成果が生み出されていた。

7名の国内の研究者、2名の国外の研究者との共同研究を行っており、効果的な連携がなされていたと考えられる。

## 2. 研究の達成状況および得られた研究成果

### 2-1. 区画内反応グループ

本グループでは、微小区画での反応の高効率性、確率性、頑強性を理解することを目指して無細胞翻訳システムの最適化、並びに微小反応場が生化学反応に与える影響の検討を行った。全体的には十分な成果が達成され、今後の研究展開も期待される。

転写翻訳反応に必要な因子をすべて精製して再構成された無細胞翻訳系である **PURE system** の構成成分や濃度を変化させて最適化を行った結果、タンパク質の合成効率を従来の約 50 倍と大腸菌抽出液と同程度に向上することができたことは画期的であり、**PURE system** を生命科学の基幹テクノロジーに据えるための大きなブレイクスルーをもたらすものと高く評価できる。

**PURE system** の 228 成分、866 の反応を微分方程式によりモデル化し、タンパク質の合成反応をシミュレーションできるプログラムを開発した。このモデル(**ePURE**)では、すべての反応の時間変化を観測できる。ペプチドの翻訳反応をシミュレーションした結果、実験結果とよく一致するモデルが得られ、翻訳速度が反応後 1 分以内に定常状態に達することや定常状態に至る遷移過程など新規な知見を得ることができた。また、シミュレーションの結果の解析は不十分であるが、今後、シミュレーションの結果と実験結果との比較、定常状態になる時間についての生理学的な意味の考察、特にハブとなる分子の結合定数などとの関連を明らかにすれば、本質的な内容が得られる可能性もある。

膜タンパク質の分子進化を実現するリポソームディスプレイ法を開発し、実際に **pore** 形成活性が向上した改変ヘモリシンの生成を行った。薬剤のターゲットとなる膜タンパク質の機能進化の実験が試験管内で可能となったことで、医療分野など産業面への大きな貢献が期待できる。

### 2-2. ダイナミック反応区画グループ

本グループでは、成長分裂する微小区画による再帰性を理解することを目指して、成長分裂する微小区画の構築法の開発、特性評価を行っており、他のグループの研究においても基礎となる研究を数多く行った。

高分子を内封した電気融合リポソームが自発的に分裂変形するという発見はすぐれた成果であり高く評価できる。ポリエチレングルコールやデキストラン以外の細胞分裂に関与しているタンパク質等の高分子、脂質組成との関係も追求し、一般化を図ることを期待する。特に分裂の効率を高める人工的なタンパク質が開発できれば、生命の進化を考察する上で大きなヒントになる可能性がある。また、より理論的な考察も進めることが望ましい。

膜表面が正に帯電したリポソームと負に帯電したリポソームで生じる膜融合をフローサトメトリーで測定する方法を開発した。これは多くのリポソームからなる集団での膜融合を調べる方法として有効である。

脂質膜のリポソームを用いた反応においては基質が枯渇することにより反応が停止する問題があったが、新しい基質などを入れたエマルジョンやリポソームを融合させることにより、基質を微小反応系に供給する技術を開発したことは評価できる。

### 2-3. 進化的プログラミンググループ

本グループでは、変異と選択による進化能を持つ反応系を構築し、生物の進化する能力の原理を理解することを目指して、再帰的な **RNA** 自己複製システムの開発、並びにこれを用いた進化実験を行っており、人工細胞につながる先駆的な研究と評価できる。

生物と同じように自己複製・翻訳の両方の機能、進化能を持つ人工微小反応場を構築するという重要な成果を挙げている。さらに次世代シーケンサーを用いて、人為的な進化の速度を、遺伝系の存在頻度を求めることにより測定できるようになった。生命進化のメカニズムの理解だけでなく、タンパク質の人工進化にも応用できるものであり、開発の意義は大きい。今後、**RNA** 相補

鎖とのハイブリッドの問題を解消できるような補助因子を組み込んだ系、DNA での複製系も視野に研究を進めれば、さらに発展が期待される。また、有用タンパク質遺伝子を組み込むことなどで、応用面での展開も期待される。

パラサイト RNA とゲノム RNA の共進化実験や進化プロセスの解析は専門分野のサイエンスの研究の発展に寄与するだけでなく、専門分野以外の研究者からも興味を持たれる内容である。

#### 2-4. 膜小胞反応組織化グループ

本グループでは、人工細胞モデルとしてのリポソームの利用を目標として、リポソーム内における生化学反応の評価、リポソームへの物質供給法の開発、並びにリポソームを用いた進化分子実験系の開発を行っており、基礎的な成果を着実に得た。

疎水性のアミノ酸に脂質膜透過性がみられたことは、非常に興味深い結果である。さらに、脂質の組成との関係などを詳細に解析し、そのメカニズムを明らかにすることを期待する。

脂質膜どうしの融合を利用したリポソームへの物質供給法の開発により、自己増殖する人工細胞を構築する基礎技術ができたことになる。現時点では融合効率が低いので、今後、膜融合の効率の高い方法を開発することを期待する。

サイズの異なるリポソームを用いた進化分子工学的手法を開発し、反応場サイズが多量体タンパクの進化の方向性に影響を及ぼすことを明らかにした。これは、新しい進化分子工学手法の開発として評価できる。なお、リポソーム構築のためにエマルジョン界面通過法を主に用いているが、脂質膜中にオイルが含まれるという欠点がある。脂質膜に炭化水素が少し含まれると脂質膜の物性が大きく変化し、脂質膜の構造、相転移や相の安定性、外来物質との相互作用、膜タンパク質の機能に影響を与えることが知られている。この方法で作成されたリポソームを膜タンパク質の機能や抗菌ペプチドなどの外来物質との相互作用を調べる目的で利用する場合には、この点に留意する必要がある。

#### 2-5. 微小反応場特性解析グループ

本グループでは、人工反応場と実際の細胞の比較を行うことによって生物と無生物の間に存在する概念的断層を埋めることを目指しており、化学反応と生命現象をつなげる横串を入れる役割を担った。

微小反応場での遺伝子発現には揺らぎがあり、サイズ以外の因子も重要であるという結果を得た。また、大腸菌でも遺伝子発現の揺らぎが環境適応に重要な役割を果たしているという結果を得た。どちらも興味深い結果であり、さらなる実験と理論の解析が望まれる。

大腸菌とそれに感染する溶菌性 RNA バクテリオファージの共培養を行ったところ、大腸菌は部分抵抗性を示し、ファージは元の大腸菌に対して弱毒化した。両者はその数を振動しながら長期間共存できた。さらに人工動的微小反応場での寄生体とホストゲノムとの共進化（進化的プログラミンググループが実施）と比較したところ、どちらも個体群振動を起こしながら進化するという共通性があることを見出した。この共通性が意味するところは未だ明らかではないものの、今後、これら共進化過程を詳しく比較することにより、共進化という現象に共通した原理が抽出できると期待される。大腸菌による高温適応進化実験においては、DNA 修復系の変異によって変異率が上昇することや、シャペロニンへの変異導入による補償効果により高速進化が可能となった。得られた進化型シャペロニンについては、今後再構築無細胞タンパク質合成系への応用も期待される。

現時点でのレベルで人工細胞と実際の細菌などの細胞を比較することはどうしてもスペキュレーションに陥りやすいと考えられるが、作業仮説として研究を進めることは興味深い。今後、様々なターゲットに対して比較実験を行い、人工反応場と細胞の違いを検出することにより、両者の概念的断層をさらに埋めるような解析が行われ、進化系をデザインできるようになるまでに研究

が進展することを期待したい。

以上に基づき研究成果を俯瞰すると、「動的微小反応場」という微小反応場の構築と解析を行うことにより、生体分子システムや分子進化のメカニズムの解明を行うというプロジェクトで、①微小区画での反応の高効率性、確率性、頑強性、②成長分裂する微小区画による再帰性、③変異と選択による進化能という三項目を具体的な研究目的として研究が進められた。それぞれ①無細胞翻訳系の構成成分や濃度の最適化によりタンパク質の合成効率を従来の約 50 倍に向上、②ポリマーの添加により自発的に分裂する人工細胞の作製に成功、③-1「進化の機能」を持った人工細胞の作成に成功、③-2 人工細胞を使って膜タンパクを「進化」させる技術を開発、と注目すべき成果を着実にあげた。これらの研究成果は、生命進化やネットワーク、生命の起源など生命科学の多くの分野に大きく貢献するだけでなく、高い活性を有する酵素の創成等、産業分野においても高い波及効果が期待できる。

今後、微小区画内での再構築無細胞翻訳システムの更なる最適化や、定量的な理論構築、RNA 複製酵素だけではなく他の転写・翻訳にかかわる因子も自己複製しつつ、増殖し進化できる微小区画の実現をめざすことで、より人工細胞に近づくことができると期待する。

### 3. 研究成果の科学技術、社会・経済への貢献

#### 3-1. 科学技術への貢献

本プロジェクトは合成生物学、システムバイオロジーの領域で進化の観点を中心に据えている点で世界的に見ても独自性が高く、先導的であり、新領域を開拓する取り組みであると評価できる。自発的に進化する能力を持つ人工細胞を初めて作成できたことは、微小区画においてもダーウィンの提唱した進化メカニズムを再現できたものであり、科学技術上のインパクトは高い。今後、生物物理学および数理生物学とのより密接な連携が図られればさらに大きな広がりをもたらすことが期待できる。

#### 3-2. 社会・経済への貢献

本プロジェクトの研究成果は将来的に先進的かつ基盤的な産業になると予想される分野のイノベーションにつながる基礎的なものである。

具体的には、組成が明らかである再構築型無細胞タンパク質合成系を最適化することにより大腸菌並の合成量を達成しており、企業との共同研究も実施されたことから、今後市場規模の拡大が期待される。また、リボソームディスプレイ法は可溶性タンパク質や膜タンパク質の評価や分子進化のツールとして画期的な技術であり、創薬に結びつく可能性もあると思われるので、製薬企業などとの共同研究へも発展させることを期待したい。また、無細胞系での合成による細胞の細胞質増殖モデル構築、人工集積最少ゲノムを持つ大腸菌、油中水滴内での繰り返し反応装置の開発、RNA 自己複製酵素以外の酵素（翻訳反応関連酵素）での自己進化システム等の検討も科学技術イノベーションに大きく寄与する可能性を秘めている。

### 4. その他特記すべき事項

#### 4-1. 若手研究者支援

研究員、特にグループライダーの育成に注力しており、各グループライダーは、研究のみならず、指導・事務処理・室運営に活躍できている。期間内に複数のメンバーが大学教職員や研究室主宰者の形で独立しており、良好なキャリア形成が行われた。

#### 4-2. アウトリーチ活動

国際シンポジウムの開催、細胞を創る研究会の開催、サイエンスカフェやニコニコ動画での発信など十分にアウトリーチ活動がなされていると評価できる。また、人工細胞の開発に伴う倫理面に関する社会調査を行い、一般国民の意識の理解を図る取り組みを行っていた。

#### 5. 総合評価

生命に必要と考えられる基本的な機能を微小区画内の動的反応と捉え、重要と思われる性質を確実に実現しようとする目標設定は明確かつ適切である。また、各機能を分けて研究グループごとに追求する方策により着実に実現に近づいていることは高く評価できる。本プロジェクトが掲げた目標は、極めて独創的なものであり、新たな概念の創出につながりうる成果をいくつか生み出した。

具体的には、動的な微小反応場を安定して構築・制御するための方法論を確立する事に成功し、さらに成長分裂・変異発生・遺伝子発現の機構を反応場に持たせることによって、最終的に自己進化する微小反応場の構築に成功している。今後、本プロジェクトの実験室内進化系を一般の研究室に普及させ、合成生物学の基盤形成や社会への還元を図るため、システムの簡便化と高効率化を目指すことが望ましい。

本プロジェクトの成果は、生命進化やネットワーク、生命の起源など生命科学の多くの分野に大きく貢献するだけでなく、高い活性を有する酵素の創成等、産業分野においても高い波及効果が期待できる。

四方動的微小反応場プロジェクトは、分野融合により生命科学の新たな学問分野を切り拓き、戦略目標「異種材料・異種物質状態間の高機能接合界面を実現する革新的ナノ界面技術の創出とその応用」に資する十分な成果が得られたと評価する。

#### 特記事項

上記の科学技術的な評価とは別に、本プロジェクトにおいて、研究総括による業者へのいわゆる預け金などによる研究費の不正使用が行われていたことは、誠に遺憾である。科学技術振興機構では、不正に使用された研究費の返還を求めたとともに、一定期間、競争的資金の応募資格を停止したが、今後、このようなことが絶対に生じないよう、姿勢を正されたい。

以上