

2.4.7 合成生物学 (人工生体高分子・人工細胞合成)

(1) 研究開発領域の定義

合成生物学は、生体高分子を組みあわせることを研究手段とする研究開発領域である。合成生物学のアプローチは大きく分けて、top-downとbottom-upに大別される。前者は主として、ゲノム編集技術などにより細胞をリデザインするもの、後者は、主として細胞を構成する生体分子やそれに改変を加えた分子を用いて、現在の生命の規格を超えた人工生体高分子、ないしは細胞の機能・性質の一部を持つ人工の分子システム(人工細胞)を構築する研究領域をいう。合成生物学は、「ありえた生命」をつくることで生命を理解するという理学的な側面と、作る手段の進展を活かして人類にとって有用な分子や生命システムを構築するという工学・医学的な側面が共存している。Top-downアプローチは、発酵・代謝工学の発展形としての有用分子生産が注目され産業化のフェーズに入りつつある一方で、bottom-upアプローチはまだ理学的な側面が大きい領域である。

後者が本稿で概説する合成生物学 (人工生体高分子・人工細胞合成) に対応する。

(2) キーワード

ボトムアップ生物学、In vitro 合成生物学、蛋白質工学、核酸工学、進化分子工学、人工生体高分子、Xenobiology、人工細胞、遺伝暗号、生命システム、自己複製、遺伝子合成・長鎖 DNA 合成・ゲノム合成、無細胞翻訳系、マイクロタス (mTAS)、ELSI、バイオセキュリティ

(3) 研究開発領域の概要

[本領域の意義]

ゲノム解読プロジェクト以降の遺伝子情報の蓄積と長鎖 DNA 合成技術の発展により、種々の生物から必要な生体高分子の遺伝子を集積することで、任意の機能を有する細胞を構築できると期待されていたが、実際には困難であることが明らかになった。DNA 配列を大規模に決定するのみでは任意の機能をもつ細胞を組み立てることができず、どのように組み立てるのかを解明する研究が進められている。

生体分子を組み合わせることを研究手段とする合成生物学分野についても、情動的基盤、物質供給基盤が揃い、情報と分子を大規模に蓄積・合成できるようになった今だからこそ、実際に分子を組み合わせ、理学・工学的に有用な人工システムを実装するための学理を構築する研究領域が重要になっている。本研究領域は、構築を目指す階層の違いにより、生体内で機能する素子としての人工生体高分子と、細胞の機能・性質を有するシステムとしての人工細胞の2つに分かれる。

人工生体高分子は、普遍遺伝暗号に含まれる4種類の塩基と20種類のアミノ酸以外のビルディングブロックを活用して、人工的に選別した遺伝情報によって合成される生体高分子のことをいう。天然のビルディングブロックを用いても天然の生体高分子とは異なる遺伝子の起原を持つ(完全ランダムライブラリから得られた)生体高分子も対象に含む。世界的には、非天然アミノ酸・塩基を用いた研究は、Xenobiologyとも呼ばれる。非天然アミノ酸や塩基、コドンを用いた合成を行なうためには、それを利用するtRNAやポリメラーゼといった転写・翻訳に関わる生体分子も非天然のものを導入する必要があるため、人工生体高分子生成のための基盤として、セントラルドグマの改変が重要な研究対象となっている。理学的な研究の意義としては、つくることと理解をすすめる構成的アプローチと、1回きりの進化の産物である現在の地球生命の共通規格に縛られない「ありえた生命」の具現化である。工学面での意義は、複雑なシステムを構築するための技術確立とし

ての基礎工学と、直近の産業・医学応用を目指した人工物の作成にあると言える。

人工細胞は、主として細胞を構成する（天然の）生体分子を用い、細胞の機能・性質の一部を持つ分子システムの構築を目指す研究である。理学的な研究の意義としては、構成的アプローチによる細胞システムの理解である。単純なモデル生物である大腸菌でさえ、数千万以上の分子から構成されてにもかかわらず僅か20分で自らのコピーを正確に作り出すことができる。また、内部状態を変化させることで様々な環境条件に適応し生育する。このような驚異的な自己複製能力、環境適応能力がどのようなメカニズムから構成されているのか、また、どのように誕生したのか。自己複製能力、環境適応能力をもつ人工細胞をボトムアップに作ることであれば、これらの性質を持つ分子システムを構築する十分条件が明らかになる。加えて、本研究領域では、非生物から生物を構築するため、非生物と生物の境界が明らかにできることが期待される。工学的観点では、天然の細胞に対してシステムの設計自由度やモジュラリティが高いという点が期待されている。人工細胞は、既知の物質のみから構成されているため、構成成分を自由に調整することが出来る。この利点を生かせば、原理的には人工細胞に望みの機能を付与することが可能となる。同様に不要な性質を持たないようにデザインすることも可能である。これは「生きている」ことを絶対条件とする細胞にはない性質である。従って、医療応用、バイオセンサー、物質生産などに資する人工細胞をデザインできることが期待される。

分子を大規模に組み合わせる開発を効率よく進めるためには、組み合わせ爆発への対応が重要となる。人工生体高分子と人工細胞のそれぞれの領域で組み合わせ爆発への対応が少しずつ進んでおり、今まさにさらなる対応策を開発する機運が世界各所で交流しており、本邦からも先導的な研究が発信されている。分子を組み合わせる際には、研究そのものだけではなく、組み合わせるための視野を持った標準化や人材供給も重要となっており、これらに対応する動きも世界的に進んでいるが、本邦では若干の遅れがみられる状況である。

【研究開発の動向】

ゲノム編集技術などにより細胞をリデザインするtop-downの研究は、大きな進展を見せており、マイコプラズマ、大腸菌、酵母などのゲノムの全合成などが報告されている¹⁾。これは、大規模に決定されたゲノム配列を活かして任意の機能をもつ細胞を組み立てるためには、DNAの配列を計算機中で適切にデザインするのみならず、そのデザインされた長鎖DNAを実際に物質として調製できる、という点から非常に重要な研究である。具体的には、Sc2.0やGP-writeなどのプロジェクトがこれに相当する。加えて、ゲノム編集技術を用いた宿主の改変による医薬品、バイオ燃料生産・産業化に成功しており、基礎から応用までが出そろった研究分野として確立されたと考えて良い²⁻⁵⁾。一方、bottom-up的なアプローチによる研究については理学的な研究が中心で、特に人工細胞についてはまだ産学連携・社会実装のフェーズに到達していないと考えるのが妥当であろう。

人工生体高分子の合成と人工細胞の創出、それぞれの動向を記した後、共通する領域の動向を説明する。

【人工生体高分子】

人工生体高分子研究の源流は、人工進化（Directed evolution）を核酸に適用したin vitro selectionによりRNAアプタマーを創出した研究事例にあると言える^{6), 7)}。進化の初期集団として、天然の生体高分子ではなく完全にランダムな配列の核酸断片ライブラリを用いることで、「進化を1からやりなおせる」ことを示した。また、種々のリボザイムの合成は、RNAワールドが存在したという状況証拠を提供し、現在の地球生命には見られないフォールドの具現化といったタンパク質の人工進化研究についても、生体高分子の可能性を広く示すこととなった。

2.4

セントラルドグマの改変については、人工塩基対を形成するヌクレオチドや非標準アミノ酸を酵素によって生体高分子に取り込む系を創出した研究事例に源流を見ることができる^{8), 9)}。機能性高分子の構成要素である原子団（タンパク質ではアミノ酸）とその遺伝情報を記したデジタル配列（塩基配列）のバリエーションを増やせば、高分子の機能の幅も広がる、という発想に基づいた研究である。ヌクレオチドの種類の拡張については新たな核酸塩基をデザインする有機化学が、アミノ酸の種類の拡張についてはtRNAとこれにアミノ酸を付加するアミノアシルtRNA合成酵素の改変が、それぞれ研究の鍵であった。最近では、非天然アミノ酸を指定するコドンに標準アミノ酸が混入しないように、大腸菌内のゲノム中のコドン为非天然塩基によって記す研究や¹⁰⁾、ゲノムをまるごと書き換えたいうで特定のtRNAを欠損させる研究も発表された¹¹⁾。また、非天然アミノ酸を細胞に導入する研究は技術として一般化しており、多くの研究成果が報告されている。さらに、本邦における過去の研究の蓄積から、遺伝暗号を改変できる人材の層は広く、アミノ酸を持たせない人工進化や、意図的に翻訳の正確性を低下させることによる人工進化の効率化など、新技術の萌芽がみられる。

人工生体高分子は、原性が低い、生体内で安定する、といった天然の生体高分子にはない性質を持たせることができるため、理学的研究の成果を応用研究に適用することにより、アプタマー創薬や、さらにセントラルドグマの改変も適用したペプチドセレクションでの創薬リードの創出（菅CRESTなど）に繋がっている。アプタマーの応用については、修飾核酸や（Somalogic社）、光学異性体を用いた安定化^{12), 13)}（NOXXON社）により、応用が進んでいる。天然タンパク質を人工進化で改変する研究も巨大な広がりを見せており、人工進化の2018年ノーベル化学賞の授与に繋がった。最近では、計算の能力の向上を活かして、既知の立体構造データを活かしつつも、配列は天然物とは全く異なるタンパク質をデザインする研究も進展している。

人工生体高分子の進化について、本邦の現状では領域としてのまとまりが弱く、また、海外ほどは産業応用に結びついていない。

【人工細胞】

細胞を創る研究の重要性は古くから議論され¹⁴⁾、Szostak¹⁵⁾、Deamer¹⁶⁾、Luisi¹⁷⁾らがその初期に中心的な役割を果たしてきた。この分野の最終的な目標の一つは、自律的に複製する人工細胞を創ることにある。このためには、細胞の内容物を閉じ込める役割を果たす区画（細胞膜）の複製、遺伝情報の複製という二つの事象が同期して起こるシステムを構築する必要がある¹⁸⁾。区画と遺伝情報の複製を再構成する研究は、近年も盛んに行われている。

区画の複製に関しては、脂肪酸を加えるとリン脂質からなる区画（リポソーム）が成長分裂するというLuisiらの初期の研究から¹⁹⁾、最近ではリン脂質よりも単純な脂肪酸だけからなる区画の複製が報告されている^{20), 21)}。遺伝子の複製に関しては、RNAワールド仮説を実証すべく自己複製するRNAを創り出す試みが長年行われている。RNAをつなぎ合わせるリガーゼの発見に始まり²²⁾、それらが最適化され100塩基ほどのRNA分子を伸長できるまでになっている^{24), 25)}。しかし自己複製するRNAを創り出すにはまた及ばず、さらに100塩基を繋ぐRNAを創り出すだけに20年以上の歳月が掛かっていることから、原始地球ではRNAだけでは無く他の分子も自己複製に関与していた可能性を示唆している¹⁸⁾。実際、ペプチドの存在がリボザイムの活性を著しく向上させることが示された²⁶⁾。加えて、区画と遺伝情報の複製を同期させるには至っておらず、現時点では脂質や脂肪酸の区画内でRNA複製反応を行えることを示すに留まっている^{26), 27)}。これらの研究は、非酵素的に化合物でのみ自己複製する人工細胞を創る試みであり、原始地球で起こりえた生命の誕生プロセスを解明する重要な研究である。

一方で、近年、天然に存在する酵素など原始地球には存在し得なかった材料を用いて人工細胞を創り出す

試みが盛んに行われ、この方向性の研究が主流になっている^{28), 29)}。材料にこだわらず人工細胞を作る研究には2つの意義がある。一つは、原材料は異なるが原始地球にあり得た生命体の一部の特徴・性質を持つ細胞を調製し、その特性を明らかにできる点、もう一つは、現存の細胞の一部の性質を取りだし、これを実験室で再構成した人工細胞を詳しく調べることができる点にある^{1), 30)}。何れも、ボトムアップに創った人工細胞であるため構成要素を自在に調整でき、そのため構成要素と細胞全体の性質の関係性を容易に結びつけることができる。

人工細胞を用いることで生命の起源や細胞の性質に関する新たな知見が得られており、研究事例としては、RNA自己複製系を区画することで区画化が寄生体を取り除くのに有効であることを示した例³¹⁻³³⁾、区画内での遺伝子発現が分子混雑条件や区画サイズに依存することを示した例³⁴⁾。脂質膜の内膜と外膜の脂質組成が膜タンパク質の機能に与える影響を明らかにした例³⁵⁾などが挙げられる。また、人工細胞を用いて、自律的に複製する細胞機能の再現を目指す研究成果も多く報告されている。光によりエネルギー物質を生産する人工細胞^{36), 37)}、成長する区画を持つ人工細胞^{38), 39)}、巨大遺伝子の複製を行える人工細胞^{40), 41)}の構築などが報告されており、少しずつではあるが、自律的に自己複製する人工細胞の構築に近づいていると考えることができる。

合成生物学の中心的課題は、多種の生体高分子を天然には存在しない組み合わせで集積する人工生命システムの構築である。効率の良いシステム構築のために、生体高分子を用いた実験を重視することと同様に、生体高分子システムの挙動を数理モデル化して事前の設計、実験結果を受けた改良の方向を知る、というプロセス (Design-Build-Test-Learn: DBTL サイクル) が重視されている。学際的で分野融合が求められる領域であり、そのため専門性の異なる研究者を集結させる必要がある。米国ではNSFの大型予算に基づいて2006年に設置されたSynBERC⁴²⁾が、非営利の官民連携体であるEBRC (Engineering Biology Research Consortium) へと改組され積極的な活動を行っている。英国では、マンチェスターのSYNBIOCEMを始めとした6つの研究所から成るNational Synthetic Biology Research Centresを組織化した。アジア地域においては、工学寄りの性質が強いAsian Synthetic Biology Association (ASBA) が組織されている。また人工細胞研究においては、Build-a-Cell (アメリカ)、BaSyC (Building a Synthetic Cell) (オランダ)、MaxSynBio (ドイツ)、fabriCELL (イギリス) などの人工細胞構築を目指すコンソーシアムや関連する教育プログラムが海外において次々と設立されている⁴³⁻⁴⁶⁾。国内においても、JSTにおいて細胞機能の再構成など、合成生物学を一つの軸としたプロジェクトが運営されたが、各種プロジェクトにおける合成生物学研究は少なく、多くは既存生物学の枠組みが強くなりがちであった。研究者団体としては、2005年に活動を開始した「細胞を創る」研究会を挙げることができる。

生体高分子を組み合わせる際に今後重要視されることは、標準化である。例えば、ネジにおけるピッチと溝の深さの規格 (産業革命以前の家内制手工業の時代は工房によって規格が異なった)、コンピューターにおけるUSBポートの規格の例にも見られるように、標準化に基づく組み合わせ可能性が、工学の発展の基盤となっていることは間違いない。対して生物学実験については、ラボ固有のプロトコルの存在が標準化に対する阻害となってきた。しかし、組み合わせを重視する合成生物学においては、工学一般と同様に、今後標準化がますます求められるようになることは間違いない。実際、EUのBioroboostなど、すでにいくつかのプロジェクトが進展しつつある。

合成生物に関する人材育成では、2005年から米英で、2006年からアジアを含めた国際展開を行なった結果、近年では毎年4000人近くが集結する大会となっている合成生物学の国際コンテストiGEMが大きく寄与している。

(4) 注目動向

[新展開・技術トピックス]

人工生体高分子の進化について、天然とは異なる側鎖や塩基を使用した研究が行われてきたことに対し⁴⁷⁾、今後は、重合装置の改変を含めたアミノ酸や核酸のバックボーンも変更した研究がより活発に行われていくと考えられる。すでに、核酸のバックボーン変更については、ポリメラーゼの改変事例が報告されている⁴⁸⁾。アミノ酸についても、 β アミノ酸の取り込みなどが、リボソームの改変も含めた研究として報告されつつある⁴⁹⁻⁵⁰⁾。

ゲノム合成による遺伝暗号の改変 (Genome recoding) が、ハーバード大を中心したチームなど各所で進められてきたが、2019年に英国MRCのChinのグループが競争に勝利して、特定のコドンを使わない大腸菌ゲノムを設計し、全合成に成功した¹¹⁾。これまでにストップコドンの一つUAGを持たない菌が合成されたことはあったが⁵¹⁾、今回はセンスコドンも改変したという点に大きな意義がある。これら特定のコドンが20種類の標準アミノ酸にも停止コドンにも対応しない場合、そのコドンへの非天然アミノ酸の導入効率は極めて高くなる。また、大澤らによるコドン捕獲説⁵²⁾の手順に則った水平伝搬 (例えばアラニンとセリンのコドンの入れ替わりなど) を起こしにくいという意味で、新たな「生物学的封じ込め」という遺伝子組み換え実験の安全装置になりうる。基盤技術として、約4億塩基もののゲノムを高精度に全合成できたという点も注目される。

人工細胞が持つ共通の性質の一つに内容物を閉じ込めている区画を有している点にある。細胞と同じようにその容積が小さい区画を調製するのに、2000年頃からマイクロデバイスが使われてきた⁵³⁾。本領域が、ここ数年でさらに成熟してきた。これまでは困難であった、均一サイズの人工脂質二重膜小胞 (リボソーム) を創ることが可能になってきた⁵⁴⁻⁵⁶⁾。加えて、その内膜と外膜の脂質組成を調製し、非対称の脂質組成を持つリボソームの調製も可能となってきた^{23), 51)}。人工細胞の多細胞化技術なども開発されている^{58), 59)}。マイクロデバイスを用いることで、より生細胞に類似した区画を多く調製することが可能となってきた。技術としてかなり成熟した領域に達したように思われる。

人工細胞に様々な機能を付与する研究が盛んに行われ、高機能化が近年著しく進んできた²⁸⁾。これは人工細胞構築技術の実用化に向けた流れと解釈できる。その中でも着目すべきは、人工細胞内の遺伝子回路を外部環境により操作する技術の開発がある⁶⁰⁻⁶⁴⁾。これにより人工細胞を用いて生細胞を操作することができるようになりつつある⁶⁵⁻⁶⁷⁾。これらの技術は最終的には生細胞の選別など、医療応用分野への展開が考えられる。その他にも、光からエネルギー化合物を生成する人工細胞の構築も報告されており^{37), 68)}、将来的には太陽光による物質生産が実現する可能性がある。また近年、安定性の高い頑強な材料を用いた微小区画の調製が報告されている^{58), 69)}。自己複製しない人工細胞であれば、遺伝子改変技術と比較して倫理的な問題は小さく、通常環境中での使用に対する抵抗が低いと考えられる。一方で、これらの研究はモデル実験を示しているに過ぎず、実用化にはまだ遠いと考えられる。

人工細胞を構築する研究の目的の一つは、ボトムアップに自己複製するシステムを構築することある。そのために細胞を模した分子システムを創る研究が行われてきた。これらとは一線を画す研究として、細胞を模擬することに捕らわれずボトムアップに社会実装可能な分子システムを構築する研究の潮流がある。特筆すべきは、Collinsのグループの研究である。彼らは、paper-based sensorという新しい技術を開発した⁷⁰⁻⁷²⁾。これはろ紙に様々な分子から構成される遺伝子反応ネットワークを染み込ませ乾燥させたセンサーである。紙でできているので、輸送コストも安く、さらには長期の常温保存も可能である。サンプルをろ紙に染み込ませるだけで、ウイルス、化合物、微生物種などが検出できる。オックスフォードナノポア社が開発した1分子の長鎖DNAの配列を決定できるシーケンサーもボトムアップに構築された分子システムである⁷³⁾。今後、これら

に続く実用化技術が現れることが期待される⁷⁴⁾。

人工細胞の構築の一つの材料として試験管内でタンパク質を合成する無細胞タンパク質合成系が用いられている。近年、無細胞タンパク質合成系を用いた応用研究の発展が顕在化してきた⁷⁵⁾。100 Lスケールでの蛋白質合成⁷⁶⁾、医薬品生産⁷⁷⁾、非天然アミノ酸を有するウイルス様粒子の調製⁷⁸⁾、糖鎖修飾タンパク質の生産⁷⁹⁾などが挙げられる。また、平行して産業界では、Genomatica、Greenlight Biosciences、Sutro Biopharma、Tierra Biosciencesなどの企業がセルフリーでのタンパク質や物質生産に取り組んでいる。

合成生物学の標準化の流れが、欧米で進んできている⁸⁰⁾。EUではHrizon2020の一つとして、Bioroboostが運営されている。このプロジェクトでは、遺伝子、宿主といった実験材料の標準化だけではなく、デザインツールや知的財産権を含めた政策面までを扱っている。また、実験の安全性評価のためにも標準化が必用である、という観点を、(2017年の細胞を創る研究会のシンポジウムと同様に) 打ち出している。標準化を広める一つの方法が、ある程度の参加人数を持つ集団への強制から、より広い集団へのデファクトスタンダードを目指す方法である。合成生物学の国際学生コンテストiGEMにおける標準化測定は、コンテストのメダル要件とすることで、244チームによる同一サンプルの測定を行うことができた。この測定では、プロモーター強度が異なるGFP発現プラスミドのセットのみならず、かつてのメートル原器のように同一の蛍光物質およびコロイド粒子を各チームに送付することで、機械ごとの感度の違いを補正した⁸¹⁾。また、数年間の同様の標準化測定での各チームの失敗を反映したプロトコルとすることで、学部生が大半であるこれらチームによってでも、誤差が極めて小さい(95.5% of teams having residuals less than 1.2-fold) 測定が行えることを示した。顕微鏡の測定においても、標準化の策定と、その基準を満たすことを論文投稿の要件とするような運動が始まっている⁸²⁾。

ソフトウェアハウスの多くが、学生に無料または安価にソフトを提供していることは、最初に習得したソフトを社会人としても継続的に使用する、ということを期待しての経営戦略である。合成生物学の学生コンテストiGEMにも、計算ソフトMATLABや、DNA配列操作ソフトsnapgene、実験データ管理ソフトBenchlingの提供が行われている⁸³⁾。また、合成生物学における分子ネットワーク記述言語SBOLとiGEMとの連携が進みつつあり、将来的に、使用人口の多さからデファクト化が進む可能性がある。

[注目すべき国内外のプロジェクト]

国内外において、下記のような合成生物学に関するファンディングプロジェクトが進められている。

・ Center for Genomically Encoded Materials (C-GEM)⁸⁴⁾

米国NSFのプロジェクトで、研究チームはUC Berkeleyを中心とした6研究機関からなり、天然の翻訳系を改変してペプチドではないポリマーの合成を目指す。5年間で2,000万ドルの資金を拠出することを2020年に決定した。

・ CREST「ゲノムスケールのDNA設計・合成による細胞制御技術の創出」

本研究領域では、ゲノムの構造と機能に関する基本原理の解明および細胞利用に向けた基盤技術の構築に向け、「ゲノムの構造と機能の解明」、「ゲノム設計のための基盤技術」、「ゲノムスケールのDNA合成技術」、「人工細胞の構築」の4つの課題を推進する。「人工細胞の構築」では、設計したゲノムの機能を用いて人工細胞を駆動させることを目指している。

・学術変革領域A「分子サイバネティクス：化学の力によるミニマル人工脳の構築」

外部のシグナルを受け取り自律的に運動するのに必要な最低限の人工脳を実装した化学システムを構築することを目指している。2020年に終了する新学術領域「分子ロボティクス」と同様、試験管内反応系の構築を志向するプロジェクトである。

学際的な研究分野である人工細胞構築を目的として、欧米では以下のようなコンソーシアムや関連する教育プログラムが次々と設立されている。

・ Build-a-Cell (米国)⁸⁵⁾

2017年にスタートした人工細胞構築コンソーシアム。NSFによる支援を受けている。セミナーなどを主催する、人材交流などが主目的。

・ BaSyC (Building a Synthetic Cell) (オランダ)⁸⁶⁾

分子を用いてボトムアップに自律的で自己複製可能な合成細胞を作ることとを目的とした研究プログラム。2017年に開始。物理学、化学、生物学のバックグラウンドを持つ17人（6研究機関）のチームリーダーが参画。オランダ科学研究機構を含めた複数機関から資金提供を受けている。

・ MaxSynBio (ドイツ)⁸⁷⁾

2014年にスタートした研究プロジェクト。ドイツ国内の9つのマックスプランク研究所が参画。完全なる人工細胞を再構成することを目的としていないことを明言している。代わりに、特定の機能を持つ人工細胞の構築を目指しており、応用のための技術開発を狙っている。

・ fabriCELL (英国)⁸⁸⁾

Imperial College London と Kings College London が中心になって運営する人工細胞構築コンソーシアム。2017年に発足。教育プログラムを構築している点で特徴的。

日本では「細胞を創る」研究会が15年前に発足し、その時点では世界的に見ても先駆的であったが、現時点では世界的な情勢から遅れを取っているのが実情である。

(5) 科学技術的課題

人工進化工学において、中長期的に、機械学習とオリゴプール合成の組み合わせが今後ますます盛んになっていくと考えられる。機械学習は、active learningなどと呼ばれる方式でライブラリをデザインすることで、これまでに探索していなかった範囲をランダムライブラリを用いる研究と比較して効率よく探索することができる。このようなライブラリのデザインは、ランダムな変異導入によっては困難であるが、遺伝子合成技術の進展により、数万種類のオリゴDNAを10万円程度で供給できるようになっている。その結果、あるラウンドの結果について機械学習を行なうことで、次世代のライブラリを調製する、といった進化工学が行われるだろう。核酸アプタマーについては一本のオリゴDNAによって全長をカバーすることも可能であり、容易に達成される。タンパク質についても、DNAシャッフリングと同様にオリゴDNA集団からのコード配列全長がデザインされるようになるだろう。

人工細胞構築については、基礎研究レベルにおいて生細胞が持つ一部の機能を持つ人工細胞を構築した例がいくつも報告されている。一方で、人工細胞を構築することによりどのような理解が進んだのか、今までわからなかった何をどのように明らかにしたのか、こうした問いが明確ではない研究が散見される。生命の起源に関しての知見を与えるのか、もしくは、細胞生物学的に新たな知見を与えるのか、研究の意義を明確し、細胞の機能を模倣したシステムを創ること自体を目的化してはいけない。分野融合研究である人工細胞構築においてその意義や出口が明確でないと、何を目指す融合研究であるかが不明瞭となり、結果的に分野横断的なコミュニティや人材育成システムの構築が難しく可能性がある。また、実用研究・開発においては、人工細胞の構築という大きな目標と分けて、社会実装可能なスケールの分子システムをボトムアップに構築することを目指す必要がある。

(6) その他の課題

Top-down・Bottom-upに関わらず、合成生物学における一番の課題は人材育成である。合成生物学の本質は、理論と生物実験を両輪として進める研究サイクルにあり、どちらかを得意とする者は、もう一方の基礎知識を習得していることが望ましい。人工細胞の構築においては、数学、計算科学を専門とする研究者がシステムを設計・デザインし、化学を専門とする研究者が必要な分子を合成し、物理を専門とする研究者が必要なデバイスを開発し、生物を専門とする研究者が生体分子を組み合わせる、といった多分野に跨がる知識と技術が必要である。大学院で実質的な座学もなされるアメリカ型の教育システムでは、システム生物学・合成生物学の専攻の教育が行われている。対して本邦では、大学院教育の実質化が求められる一方、外部資金による限定的な教育プログラムを除けば、そのようなWet-Dry双方を学ぶ教育プログラムや研究組織はほぼない。また、この教育を負荷と感じられることが多いせいか、外部資金のサポート終了後には教育プログラムへの参画者は減少しがちである。また、学部教育についても、ごく一部の学際学科を除くと、有力大学においては古典的な生物学関連の枠組みによる教育が主であることが現状となっている。中長期的な人材育成の方策は学部教育の枠組みの変更であるが、短期的には、学生コンテストのフォーマットの活用も視野に入れるべきであろう。世界的には、年間300チーム4,000人が参加する学生コンテストiGEMが、人材供給エコシステムの基盤になっている。このコンテストには各年100名以上の審判が動員されるが、彼らの何割かが、過去にこのコンテストに学生として参加し、ベンチャー企業やアカデミアでのポスドクや若手PIとなっている人材である。実際、iGEMの企画から、すでに150社以上が起業された、とアナウンスされている⁸⁹⁾。

「細胞を創る」研究は、人類にとって大きな挑戦である一方、現時点でビジネスとして成立する要素はない。従って、アカデミアが主導している分野であり、今のところ産業界が参入する気配はない。一方で、人工細胞を創る研究から産み出させる分子や分子システムが人に利便性を与えるものとなる可能性が見えてくれば、その時点で直ちに産学連携が始まることが期待される。現時点で、世界のどこにもこのようなシーズは見えていないが、分野横断型のコンソーシアム等により人工細胞構築研究を進めることでいち早くシーズを産みだし、世界をリードするビジネスへと発展させることが期待される。

合成生物学の工学的な活用について期待される一方で、生体や環境、生態系に与える影響が常にリスクとしてある。特に非標準・非天然のビルディングブロックを用いた人工生体高分子を薬剤として用いる際には、生体がこれまで遭遇していなかった化合物を用いることによる副作用が潜在的な懸念として残るだろう。こうした合成生物学に対して生じる不安からの、新規法規制の出現についても留意する必要がある。原理的には、合成生物学については、組換え、および、化合物に対する既存の法規制の体系で理解されることができる。しかし、生物多様性の国際会議では、合成生物学に別途の枠組みが求められる、また、組換え体から得られ

たタンパク質等の産物についても、新たにこの規制の枠組みに包含する、といった議論がみられている。逆に、組換えバクテリアを実験室外で使用する、という動きもみられ、こちらについては既存の制度でカバーされつつも、遺伝子組換え植物の栽培のように大きな議論を巻き起こす可能性がある。合成生物学分野の立場としては、社会一般への丁寧な説明とともに、水平伝搬を起こさない遺伝暗号やキルスイッチなど、リスクを低減する技術開発が必要となる。

(7) 国際比較

国・地域	フェーズ	現状	トレンド	各国の状況、評価の際に参考にした根拠など
日本	基礎研究	◎	↘	一定の成果が見られるものの研究者が単独で進めている個別研究が多く、特に新規な人工生体高分子の創出系については、一時期よりその傾向が強い。非天然アミノ酸の使用については広がりが見られる。人工細胞構築はCREST「ゲノム合成」の課題の1つに挙がるものの、強力に進める機運は見られない。
	応用研究・開発	○	→	人工生体高分子について、核酸アプタマー、ペプチドアプタマーに関するベンチャー企業が一定の収益を得ている。非天然アミノ酸を含有したタンパク質の応用については、革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業による一定の成果が得られていた ⁹⁰⁾ 。人工細胞の応用研究は、研究者が単独で進めている研究が散見され、一定の成果が見られている。
米国	基礎研究	◎	→	人工生体高分子についてはCenter for Genomically Encoded Materials (C-GEM) のNSF ファundingの効果が大きい。Szostak, Deamer, Joyceらを中心に、酵素を用いることなく人工細胞を構築する研究が数多く行われてきた ^{15), 16)} 。材料を規定しない人工細胞の構築に関する研究も、世界に先駆けて行ってきた ⁹¹⁾ 。2017年にコンソーシアムを創り、研究が進められている。
	応用研究・開発	◎	→	非天然塩基と非天然アミノ酸を組み合わせた研究を行ってきたRomesbergの設立したSynthorx社がフランスSanofiに23.5億ドルで買収され、今後のタンパク質製剤化が期待される。人工細胞の構築よりも、ボトムアップに実用化に資する分子システムを構築する応用研究が進められている ^{75), 92)} 。
欧州	基礎研究	◎	↗	MRCのゲノム合成を伴う遺伝暗号の改変は、今後の研究の大規模化のための重要な1ステップであり、さらに、今後の応用研究も期待される。人工細胞構築を目指すコンソーシアムがドイツ、オランダ、英国でそれぞれ出来上がっており、精力的に研究を進めている ⁴⁴⁾ 。
	応用研究・開発	○	↗	Xenobiologyとして人工生体高分子の合成を行う研究者が集っており、ChemBioChem誌に特集号を発行した ⁹³⁾ 。コンソーシアムにおいて、人工細胞の応用展開を見いだすべく研究を精力的に推進している。
中国	基礎研究	△	→	小数の研究グループで、無細胞蛋白質合成系を用いた人工細胞構築に関する基礎研究が精力的に行われている ^{28), 94)} 。まだ国として目立った動きはない。
	応用研究・開発	○	↗	人工生体高分子については、北京大などの伝統校のみならず深圳地区の積極的な活動がみられる。人工細胞については特に目立った動きはない。

韓国	基礎研究	△	↗	光合成する人工細胞を世界で初めて調製することに成功した ³⁷⁾ 。まだ国として目立った動きはないが、米国の合成生物学研究室からの留学帰りの若手が独立した研究室を運営し始めており、今後の成長が期待される。
	応用研究・開発	△	→	Asian Synthetic Biology Association (ASBA) の初回が韓国開催であるなど、KAIST の代謝工学を核とした研究が進んでいる。人工細胞については特に目立った動きはない。
シンガポール	基礎研究	△	→	国全体として応用志向が強い
	応用研究・開発	○	↗	人工生体高分子について、Xnobiology の人材が A*STAR に集まっている。また、シンガポール国立大を中心とした Foundry の活動がみられる。

(註1) フェーズ

基礎研究：大学・国研などでの基礎研究の範囲

応用研究・開発：技術開発（プロトタイプの開発含む）の範囲

(註2) 現状 ※日本の現状を基準にした評価ではなく、CRDS の調査・見解による評価

◎：特に顕著な活動・成果が見えている

○：顕著な活動・成果が見えている

△：顕著な活動・成果が見えていない

×：特筆すべき活動・成果が見えていない

(註3) テレンド ※ここ1～2年の研究開発水準の変化

↗：上昇傾向、→：現状維持、↘：下降傾向

参考・引用文献

- 1) R. A. Hughes and A. D. Ellington, "Synthetic DNA Synthesis and Assembly : Putting the Synthetic in Synthetic Biology", *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 9, no. 1 (2017) : a023812. doi : 10.1101/cshperspect.a023812
- 2) S. Auslander, D. Auslander and M. Fussenegger, "Synthetic Biology-The Synthesis of Biology", *Angew. Chem. Int. Ed.* 56, no. 23 (2017) : 6396-6419. doi : 10.1002/anie.201609229
- 3) S. Jagadevan et al., "Recent developments in synthetic biology and metabolic engineering in microalgae towards biofuel production", *Biotechnol. Biofuels* 11 (2018) : 185. doi : 10.1186/s13068-018-1181-1
- 4) F. Lienert et al., "Synthetic biology in mammalian cells : next generation research tools and therapeutics", *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, no. 2 (2014) : 95-107. doi : 10.1038/nrm3738
- 5) C. A. Voigt, "Synthetic biology 2020–2030 : six commercially-available products that are changing our world", *Nature Communications* 11 (2020) : 6379. doi : 10.1038/s41467-020-20122-2
- 6) A. D. Ellington and J. W. Szostak, "In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands", *Nature* 346, no. 6287 (1990) : 818-822. doi : 10.1038/346818a0
- 7) C. Tuerk and L. Gold, "Systematic evolution of ligands by exponential enrichment : RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase", *Science* 249, no. 4968 (1990) : 505-510. doi : 10.1126/science.2200121
- 8) D. Kiga et al., "An engineered Escherichia coli tyrosyl-tRNA synthetase for site-specific

2.4

俯瞰
分子・細胞
基礎
基盤
盤
科学
技術
研究
開発
領域

- incorporation of an unnatural amino acid into proteins in eukaryotic translation and its application in a wheat germ cell-free system”, *Proc Natl Acad Sci USA* 99, no. 15 (2002) : 9715-9720. doi : 10.1073/pnas.142220099
- 9) L. Wang et al., “Expanding the Genetic Code of *Escherichia coli*”, *Science* 292, no. 5516 (2001) : 498-500. doi : 10.1126/science.1060077
- 10) Y. Zhang et al., “A semi-synthetic organism that stores and retrieves increased genetic information”, *Nature* 551, no. 7682 (2017) : 644-647. doi : 10.1038/nature24659
- 11) J. Fredens et al., “Total synthesis of *Escherichia coli* with a recoded genome”, *Nature* 569, no. 7757 (2019) : 514-518. doi : 10.1038/s41586-019-1192-5
- 12) W. G. Purschke et al., “An l-RNA-based aquarectic agent that inhibits vasopressin *in vivo*”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, no. 13 (2006) : 5173-5178. doi : 10.1073/pnas.0509663103
- 13) O. Khorkova and C. Wahlestedt, “Oligonucleotide therapies for disorders of the nervous system”, *Nat. Biotechnol.* 35, no. 3 (2017) : 249-263. doi : 10.1038/nbt.3784
- 14) J. W. Szostak, D. P. Bartel and P. L. Luisi, “Synthesizing life”, *Nature* 409, no. 6818 (2001) : 387-390. doi : 10.1038/35053176
- 15) G. F. Joyce and J. W. Szostak, “Protocells and RNA Self-Replication”, *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 10, no. 9 (2018) : a034801. doi : 10.1101/cshperspect.a034801
- 16) D. Deamer and A. L. Weber, “Bioenergetics and life's origins”, *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2, no. 2 (2010) : a004929. doi : 10.1101/cshperspect.a004929
- 17) P. L. Luisi, “Toward the engineering of minimal living cells”, *Anat. Rec.* 268, no. 3 (2002) : 208-214. doi : 10.1002/ar.10155
- 18) O. D. Toparlak and S. S. Mansy, “Progress in synthesizing protocells”, *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 244, no. 4 (2019) : 304-313. doi : 10.1177/1535370218816657
- 19) N. Berclaz et al., “Growth and transformation of vesicles studied by ferritin labeling and cryotransmission electron microscopy”, *J Phys Chem B* 105, no. 5 (2001) : 1056-1064. doi : 10.1021/jp001298i
- 20) T. F. Zhu and J. W. Szostak, “Coupled growth and division of model protocell membranes”, *J. Am. Chem. Soc.* 131, no. 15 (2009) : 5705-5713. doi : 10.1021/ja900919c
- 21) T. F. Zhu et al., “Photochemically driven redox chemistry induces protocell membrane pearling and division”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, no. 25 (2012) : 9828-9832. doi : 10.1073/pnas.1203212109
- 22) D. P. Bartel and J. W. Szostak, “Isolation of new ribozymes from a large pool of random sequences [see comment]”, *Science* 261, no. 5127 (1993) : 1411-1418. doi : 10.1126/science.7690155
- 23) E. H. Eklund and D. P. Bartel, “RNA-catalysed RNA polymerization using nucleoside triphosphates”, *Nature* 382, no. 6589 (1996) : 373-376. doi : 10.1038/382373a0
- 24) D. P. Horning and G. F. Joyce, “Amplification of RNA by an RNA polymerase ribozyme”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113, no. 35 (2016) : 9786-9791. doi : 10.1073/pnas.1610103113
- 25) A. Wochner et al., “Ribozyme-catalyzed transcription of an active ribozyme”, *Science* 332, no.

- 6026 (2011) : 209-212. doi : 10.1126/science.1200752
- 26) S. Tagami, S. J. Attwater and P. Holliger, “Simple peptides derived from the ribosomal core potentiate RNA polymerase ribozyme function”, *Nat. Chem.* 9, no. 4 (2017) : 325-332. doi : 10.1038/nchem.2739
- 27) D. K. O’Flaherty et al., “Copying of Mixed-Sequence RNA Templates inside Model Protocells”, *J. Am. Chem. Soc.* 140, no. 15 (2018) : 5171-5178. doi : 10.1021/jacs.8b00639
- 28) E. Cho and Y. Lu, “Compartmentalizing Cell-Free Systems : Toward Creating Life-Like Artificial Cells and Beyond”, *ACS Synth. Biol.* 9, no. 11 (2020) : 2881-2901. doi : 10.1021/acssynbio.0c00433
- 29) N. Laohakunakorn et al., “Bottom-Up Construction of Complex Biomolecular Systems With Cell-Free Synthetic Biology”, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8 (2020) : 213. doi : 10.3389/fbioe.2020.00213
- 30) N. Ichihashi, “What can we learn from the construction of in vitro replication systems?”, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1447, no. 1 (2019) : 144-156. doi : 10.1111/nyas.14042
- 31) Y. Bansho et al., “Host-parasite oscillation dynamics and evolution in a compartmentalized RNA replication system”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113, no. 15 (2016) : 4045-4050. doi : 10.1073/pnas.1524404113
- 32) T. Furubayashi et al., “Emergence and diversification of a host-parasite RNA ecosystem through Darwinian evolution”, *eLife* 9 (2020) : e56038. doi : 10.7554/eLife.56038
- 33) S. Matsumura et al., “Transient compartmentalization of RNA replicators prevents extinction due to parasites”, *Science* 354, no. 6317 (2016) : 1293-1296. doi : 10.1126/science.aag1582
- 34) C. Tan et al., “Molecular crowding shapes gene expression in synthetic cellular nanosystems”, *Nat. Nanotechnol.* 8, no. 8 (2013) : 602-608. doi : 10.1038/nnano.2013.132
- 35) K. Kamiya et al., “Cell-sized asymmetric lipid vesicles facilitate the investigation of asymmetric membranes”, *Nat. Chem.* 8, no. 9 (2016) : 881-889. doi : 10.1038/nchem.2537
- 36) S. Berhanu, T. Ueda and Y. Kuruma, “Artificial photosynthetic cell producing energy for protein synthesis”, *Nat. Commun.* 10, no. 1 (2019) : 1325. doi : 10.1038/s41467-019-09147-4
- 37) K. Y. Lee et al., “Photosynthetic artificial organelles sustain and control ATP-dependent reactions in a protocellular system”, *Nat. Biotechnol.* 36, no. 6 (2018) : 530-535. doi : 10.1038/nbt.4140
- 38) M. Exterkate et al., “Growing Membranes In Vitro by Continuous Phospholipid Biosynthesis from Free Fatty Acids”, *ACS Synth. Biol.* 7, no. 1 (2018) : 153-165. doi : 10.1021/acssynbio.7b00265
- 39) A. Bhattacharya et al., “A minimal biochemical route towards de novo formation of synthetic phospholipid membranes”, *Nat. Commun.* 10, no. 1 (2019) : 300. doi : 10.1038/s41467-018-08174-x
- 40) K. Libicher et al., “In vitro self-replication and multicistronic expression of large synthetic genomes”, *Nat. Commun.* 11, no. 1 (2020) : 904. doi : 10.1038/s41467-020-14694-2
- 41) P. van Nies et al., “Self-replication of DNA by its encoded proteins in liposome-based

- synthetic cells”, *Nat. Commun.* 9, no. 1 (2018) : 1583. doi : 10.1038/s41467-018-03926-1
- 42) <https://www.jst.go.jp/crds/pdf/2014/RR/CRDS-FY2014-RR-02.pdf> (2021年2月1日アクセス)
- 43) I. Cazimoglu et al., “Developing a graduate training program in Synthetic Biology : SynBioCDT”, *Synth. Biol.* 4, no. 1 (2019) : ysz006. doi : 10.1093/synbio/ysz006
- 44) O. Ces and Y. Elani, “Community building in synthetic biology”, *Exp. Biol. Med.* 244, no. 4 (2019) : 281-282. doi : 10.1177/1535370219832279
- 45) P. Schwille et al., “MaxSynBio : Avenues Towards Creating Cells from the Bottom Up”, *Angew. Chem. Int. Ed.* 57, no. 41 (2018) : 13382-13392. doi : 10.1002/anie.201802288
- 46) K. R. Sedgley, P. R. Race and D. N. Woolfson, “BrisSynBio : a BBSRC/EP SRC-funded Synthetic Biology Research Centre”, *Biochem. Soc. Trans.* 44, no. 3 (2016) : 689-691. doi : 10.1042/bst20160004
- 47) V. B. Pinheiro et al., “Synthetic Genetic Polymers Capable of Heredity and Evolution”, *Science* 336, no. 6079 : 341-344, doi : 10.1126/science.1217622
- 48) H. Yu, S. Zhang and J. C. Chaput, “Darwinian evolution of an alternative genetic system provides support for TNA as an RNA progenitor”, *Nat Chem* 4 (2013) : 183-187. doi : 10.1038/nchem.1241
- 49) T. Katoh and H. Suga, “Ribosomal Incorporation of Consecutive β -Amino Acids”, *J. Am. Chem. Soc.* 140, no. 38 (2018) : 12159-12167, doi : 10.1021/jacs.8b07247
- 50) J. Lee et al., “Ribosome-mediated polymerization of long chain carbon and cyclic amino acids into peptides in vitro”, *Nat Commun* 11 (2020) : 4304. doi : 10.1038/s41467-020-18001-x
- 51) M. J. Lajoie et al., “Genomically Recoded Organisms Expand Biological Functions”, *Science* 342, no. 6156 (2013) : 357-360. doi : 10.1126/science.1241459
- 52) S. Osawa and T. H. Jukes, “Codon reassignment (codon capture) in evolution”, *J. Mol. Evol.* 28, no. 4 (1989) : 271-278. doi : 10.1007/BF02103422.
- 53) K. Kamiya, “Development of Artificial Cell Models Using Microfluidic Technology and Synthetic Biology”, *Micromachines* 11, no. 6 (2020) : 559. doi : 10.3390/mi11060559
- 54) M. Morita et al., “Droplet-Shooting and Size-Filtration (DSSF) Method for Synthesis of Cell-Sized Liposomes with Controlled Lipid Compositions”, *Chembiochem.* 16, no. 14 (2015) : 2029-2035. doi : 10.1002/cbic.201500354
- 55) K. Karamdad et al., “Preparation and mechanical characterisation of giant unilamellar vesicles by a microfluidic method”, *Lab. Chip* 15, no. 2 (2015) : 557-562. doi : 10.1039/C4LC01277A
- 56) P. C. Hu, S. Li and N. Malmstadt, “Microfluidic fabrication of asymmetric giant lipid vesicles”, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 3, no. 5 (2011) : 1434-1440. doi : 10.1021/am101191d
- 57) L. R. Arriaga et al., “Single-step assembly of asymmetric vesicles”, *Lab. Chip* 19, no. 5 (2019) : 749-756. doi : 10.1039/C8LC00882E
- 58) N. N. Deng et al., “Microfluidic Assembly of Monodisperse Vesosomes as Artificial Cell Models”, *J. Am. Chem. Soc.* 139, no. 2 (2017) : 587-590. doi : 10.1021/jacs.6b10977

- 59) M. J. Booth et al., “Light-activated communication in synthetic tissues”, *Sci. Adv.* 2, no. 4 (2016) : e1600056. doi : 10.1126/sciadv.1600056
- 60) K. P. Adamala et al., “Engineering genetic circuit interactions within and between synthetic minimal cells”, *Nat. Chem.* 9, no. 5 (2017) : 431-439. doi : 10.1038/nchem.2644
- 61) Y. Qiao et al., “Predatory behaviour in synthetic protocell communities”, *Nat. Chem.* 9, no. 2 (2017) : 110-119. doi : 10.1038/nchem.2617
- 62) H. Shum and A. C. Balazs, “Synthetic quorum sensing in model microcapsule colonies”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 114, no. 32 (2017) : 8475-8480. doi : 10.1073/pnas.1702288114
- 63) T. D. Tang et al., “Gene-Mediated Chemical Communication in Synthetic Protocell Communities”, *ACS Synth. Biol.* 7, no. 2 (2018) : 339-346. doi : 10.1021/acssynbio.7b00306
- 64) M. Dwidar et al., “Programmable Artificial Cells Using Histamine-Responsive Synthetic Riboswitch”, *J. Am. Chem. Soc.* 141, no. 28 (2019) : 11103-11114. doi : 10.1021/jacs.9b03300
- 65) R. Lentini et al., “Two-Way Chemical Communication between Artificial and Natural Cells”, *ACS Cent. Sci.* 3, no. 2 (2017) : 117-123. doi : 10.1021/acscentsci.6b00330
- 66) H. Niederholtmeyer, C. Chagga and N. K. Devaraj, “Communication and quorum sensing in non-living mimics of eukaryotic cells”, *Nat. Commun.* 9, no. 1 (2018) : 5027. doi : 10.1038/s41467-018-07473-7
- 67) G. Rampioni et al., “Synthetic cells produce a quorum sensing chemical signal perceived by *Pseudomonas aeruginosa*”, *Chem. Commun.* 54, no. 17 (2018) : 2090-2093. doi : 10.1039/C7CC09678J
- 68) Z. Chen et al., “Light-Gated Synthetic Protocells for Plasmon-Enhanced Chemiosmotic Gradient Generation and ATP Synthesis”, *Angew. Chem.* 131, no. 15 (2019) : 4950-4954. doi : 10.1002/ange.201813963
- 69) M. Weiss et al., “Sequential bottom-up assembly of mechanically stabilized synthetic cells by microfluidics”, *Nat. Mater.* 17, no. 1 (2018) : 89-96. doi : 10.1038/nmat5005
- 70) M. K. Takahashi et al., “A low-cost paper-based synthetic biology platform for analyzing gut microbiota and host biomarkers”, *Nat. Commun.* 9, no. 1 (2018) : 3347. doi : 10.1038/s41467-018-05864-4
- 71) K. Pardee et al., “Rapid, Low-Cost Detection of Zika Virus Using Programmable Biomolecular Components”, *Cell* 165, no. 5 (2016) : 1255-1266. doi : 10.1016/j.cell.2016.04.059
- 72) K. Pardee et al., “Paper-based synthetic gene networks”, *Cell* 159, no. 4 (2014) : 940-954. doi : 10.1016/j.cell.2014.10.004
- 73) M. Ayub and H. Bayley, “Engineered transmembrane pores”, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 34 (2016) : 117-126. doi : 10.1016/j.cbpa.2016.08.005
- 74) E. Spruijt, S. E. Tusk and H. Bayley, “DNA scaffolds support stable and uniform peptide nanopores”, *Nat. Nanotechnol.* 13, no. 8 (2018) : 739-745. doi : 10.1038/s41565-018-0139-6
- 75) A. D. Silverman, A. S. Karim and M. C. Jewett, “Cell-free gene expression : an expanded

- repertoire of applications”, *Nat. Rev. Genet.* 21, no. 3 (2020) : 151-170. doi : 10.1038/s41576-019-0186-3
- 76) J. F. Zawada et al., “Microscale to manufacturing scale-up of cell-free cytokine production - a new approach for shortening protein production development timelines”, *Biotechnol. Bioeng.* 108, no. 7 (2011) : 1570-1578. doi : 10.1002/bit.23103
- 77) K. Pardee et al., “Portable, On-Demand Biomolecular Manufacturing”, *Cell* 167, no. 1 (2016) : 248-259.e12. doi : 10.1016/j.cell.2016.09.013
- 78) R. W. Martin et al., “Cell-free protein synthesis from genomically recoded bacteria enables multisite incorporation of noncanonical amino acids”, *Nat. Commun.* 9, no. 1 (2018) : 1203. doi : 10.1038/s41467-018-03469-5
- 79) T. Jaroentomeechai et al., “Single-pot glycoprotein biosynthesis using a cell-free transcription-translation system enriched with glycosylation machinery”, *Nat. Commun.* 9, no. 1 (2018) : 2686. doi : 10.1038/s41467-018-05110-x
- 80) J. Beal et al., “The long journey towards standards for engineering biosystems”, *EMBO Rep.* 21 (2020) : e50521. doi : 10.15252/embr.202050521
- 81) J. Beal et al., “Robust estimation of bacterial cell count from optical density”, *Communications Biology* 3 (2020) : 512. doi : 10.1038/s42003-020-01127-5
- 82) <https://arxiv.org/ftp/arxiv/papers/2010/2010.10107.pdf> (2021年2月1日アクセス)
- 83) <https://igem.org/Sponsors> (2021年2月1日アクセス)
- 84) <https://gem-net.net/research/> (2021年2月1日アクセス)
- 85) <https://www.buildacell.org/> (2021年2月1日アクセス)
- 86) <https://www.basyc.nl/> (2021年2月1日アクセス)
- 87) <https://www.maxsynbio.mpg.de/home> (2021年2月1日アクセス)
- 88) <http://fabricell.org/> (2021年2月1日アクセス)
- 89) <https://igem.org/Startups> (2021年2月1日アクセス)
- 90) https://www.amed.go.jp/content/files/jp/houkoku_h28/0101002/h27_008.pdf (2021年2月1日アクセス)
- 91) V. Noireaux and A. Libchaber, “A vesicle bioreactor as a step toward an artificial cell assembly”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, no. 51 (2004) : 17669-17674. doi : 10.1073/pnas.0408236101
- 92) R. J. R. Kelwick, A. J. Webb and P. S. Freemont, “Biological Materials : The Next Frontier for Cell-Free Synthetic Biology”, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8 (2020) : 399. doi : 10.3389/fbioe.2020.00399
- 93) <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/toc/10.1002/> (ISSN) 1439-7633. *Xenobiology* (2021年2月1日アクセス)
- 94) K. Yue, Y. Zhu and L. Kai, “Cell-Free Protein Synthesis : Chassis toward the Minimal Cell”, *Cells* 8, no. 4 (2019) : 315. doi : 10.3390/cells8040315