

人工再構築系を用いた機能的タンパク質の創出



研究ノート

應 蓓 文*
(イン ベイウエン)Functional protein biosynthesis using a reconstituted
gene expression systemKey Words : Cell-free translation, Gene expression,
PURE system, Protein folding, maturation

1. はじめに

タンパク質の構造と機能の網羅的な解析が医科学や産業への応用の主課題となってきたため、十分な生理活性を有するタンパク質をハイスループットで発現させるシステムの構築が必須である。そして、タンパク質の構造解析の研究では、タンパク質の発現・精製のステップが最大のネックとなっており、機能発現に必要な立体構造をもつ高品質のタンパク質を得るための技術の確立が求められている。従来の細胞を用いた大量発現系によるタンパク質生産の手法では、ハイスループット化が要求されるプロテオーム時代に対応できないことが明らかである。ここで、生細胞を用いた発現系に代わる技術として、無細胞タンパク質合成系が注目されている。無細胞タンパク質合成系では、培養などの面倒なプロセス(図1)が不要なために、プロテオーム時代のハイスループット化に適した技術になる可能性が高い。さらに、細胞内でのタンパク質の合成と翻訳後のプロセスはまだ不明な点が多く、タンパク質のクオリティーコントロールが難しい細胞による発現系と比べ、無細胞タンパク質合成系では、目的にあわせてさまざまなシステムを共存させることで、その生産と品質の向上が容易であるという優れた利点がある。

現在、主に使用されている無細胞タンパク質合成

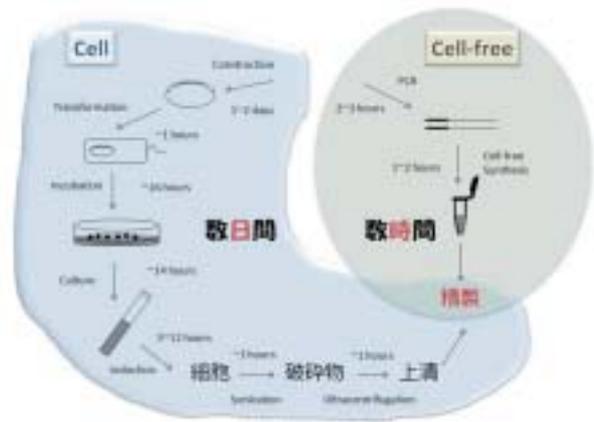


図1 無細胞タンパク質合成系と細胞を利用した発現系の比較

系として、大腸菌 S30 画分抽出液、小麦胚芽抽出液、ウサギ網状赤血球抽出液などがある。近年これらの細胞抽出液の調製法の改良が進み、アミノ酸やエネルギー源を供給するシステムが開発され(1, 2)、無細胞タンパク質合成系の合成効率の向上が進んでいる。しかし、これらの無細胞タンパク質合成系は細胞抽出液をベースとしたシステムであり、不明な因子が含まれているため、システムとしての安定性と効率化には限界があると考えられる。その中注目されているのは、人工的に再構築した無細胞タンパク質合成系 PURE システムである(3)。

2. PURE SYSTEM を用いた遺伝子の発現

大腸菌のタンパク質合成系に必須な最小限の構成要素から再構築された遺伝子発現系は、大腸菌においてタンパク質合成に関与する因子 開始因子(IF1, IF2, IF3)、伸長因子(EF-G, EF-Tu, EF-Ts)、終止因子(RF1, RF2, RF3, RRF)、20種類のアミノアシル tRNA 合成酵素、メチオニル tRNA ホルミル移転酵素、及びリボソームを再構成し(図2) 遺伝子の発現を可能にした人工システムである。上記構成



*Bei-Wen YING

1973年12月生
東京大学大学院・新領域創成科学研究科
(2005年)
現在、大阪大学大学院情報科学研究科
バイオ情報工学専攻 助教 博士 生命科学
TEL : 06-6879-4151
FAX : 06-6879-7433
E-mail : ying@ist.osaka-u.ac.jp

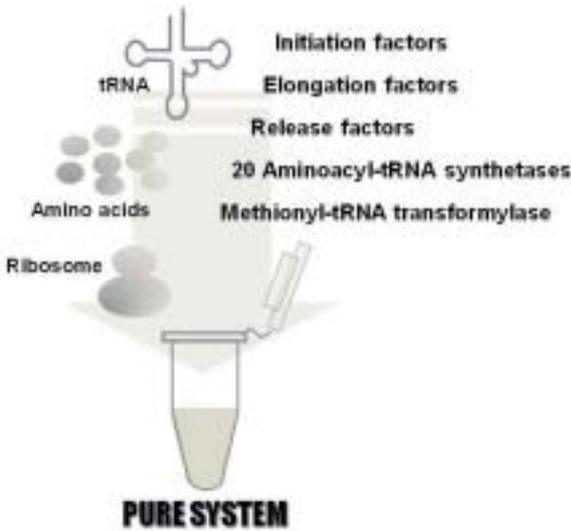


図2 PURE システムの模式図

因子は全て精製標品であり、リボソームもシヨ糖密度勾配遠心法と高塩濃度で処理することにより、付着した夾雑物を除去したものである。タンパク質合成に必須な因子のみを精製し再構成したシステムであることから、PURE (Protein synthesizing system Using Recombinant Elements) システムと名付けた。このシステムを用いて、様々なタンパク質の合成に成功している (図3)。

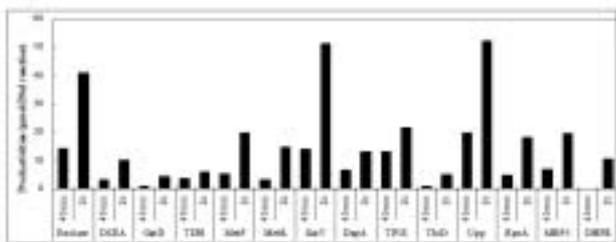


図3 タンパク質の合成例

PURE システムを構成する因子はすべてヒスタグが付加されているため、タンパク質発現後の溶液を Ni カラムに通すことによりこれらの因子を簡単に除去し、タグの付加されていない天然型のタンパク質のみを簡便に得ることができる。モデル例として、1ml 反応液あたり約 160 µg のジヒドロ葉酸還元酵素の合成と精製に成功した (3)。PURE システムで合成されたタンパク質は、一時間以内に精製が可能であるため、プロテオーム時代において重要であるハイスループット化に適したタンパク質合成システムとして、高い可能性を秘めている。最近の成果で

は、このシステムを用いて大腸菌全遺伝子 (ASKA library) を発現させたところ、4300 遺伝子のうち 3200 個ほどの遺伝子の発現に成功している (4)。これは、プロテインバンクの創出に大いに貢献できると思われる。

3. 機能性タンパク質の創出

機能を持つ多様な成熟型タンパク質は、リボソーム上で合成された新生ペプチドから複雑なプロセスを経て到達するものである。PURE システムは、このような細胞特有のタンパク質成熟プロセスを取り除いたシステムであるといえる。ここから、タンパク質成熟過程に関与する因子群を PURE システムに共存させた複合型無細胞システムを開発すれば、ピュアアプローチ (5) でタンパク質の成熟過程のメカニズムの解明が可能となり、成熟型のタンパク質の生産が実現できる (6)。

遺伝子発現系で遭遇する最大の問題点は、タンパク質のフォールディングである。細胞内による大量発現系においては、発現タンパク質は封入体を形成することが多いが、シャペロンの共発現によって、その可溶化率が向上することが知られている。同様に、無細胞タンパク質合成系においてもシャペロンを共存させることにより、新生ペプチドの生理活性向上が可能である (7)。大腸菌にとって最も重要なシャペロン：リボソームから出現したポリペプチドにとって最初の「ゆりかご」として働くトリガーファクター (TF)、全生物にわたって非常によく保存された熱ショックタンパク質 DnaK、また変性タンパク質を閉じ込めてフォールディングを助ける GroEL を PURE システムと共に用いて、翻訳とフォールディングネットワークの共役系の構築を試みた。

まず、工学応用に広く利用されている抗体を合成対象として検討を行った。単鎖抗体 scFv は人工的にデザインされた抗体タンパク質であるため、試験管内で発現すると、多くが不溶性になってしまう。ここで、翻訳中もしくは翻訳を停止したあとに TF、DnaK、GroEL を PURE システムに投入してそれらの効果を調べた。その結果、DnaK と TF はそれぞれ新生タンパク質の可溶化率とその抗原結合活性の

向上に著しく効果的であることを明らかにした (8)。つまり、これらの因子は合成された scFv の正確な折り畳みに有効である。このことから、TF と DnaK を添加することによって生理活性の高い抗体の合成が可能となった (9)。

次に、約 20 種類の遺伝子を含むミニライブラリーを PURE システムでそれぞれ合成させ、それらの合成効率と溶解度を調べた。その中には、GroEL の添加により、劇的に可溶性およびフォールディング活性が上昇するものがあることがわかった (表 1) (10)。TF と DnaK が co-translational および post-translational 的に新生タンパク質の凝集を抑えることが検出され、GroEL に特異的に依存してフォールディングする基質タンパク質を明らかにした (10)。このことから、目的タンパク質の性質に応じて、補助因子を投入することによって、生理活性の高いタンパク質の創出が可能となる (6)。

そのほか、secB や SRP などといった分泌関連因子の補助によって、膜タンパク質の生産にも成功している (11)。さらに、PURE システムの各成分濃度を最適化することにより、高い合成量を誇る“スーパー PURE システム”の開発に成功している (12)。これらの研究は、機能的タンパク質の合成に大いに貢献できる。

4. 多様な人工的工学システムへの応用

PURE システムを利用して、さまざまな人工系に幅広い応用が展開されている。無細胞タンパク質合成系と言っても細胞抽出液をベースにしたシステムがほとんどである。これらの系では、「引き算」で特定の因子を除くことができても、他の因子の影響を排除できないため、最適化を必要とする工学的応用に限界があろう。PURE システムには、他に余分な因子はないのであるから、「足し算」的に目的の成分を目的の濃度で加えて効果を調べたり、反応速度を調整したりすることが可能である。この特徴を生かした最も挑戦的な応用は、人工細胞の創出を目標とした様々な人工反応系の構築である。RNA の複製反応を触媒するタンパク質をコードする遺伝子 (RNA) を構成濃度の調整された PURE システムに

Substrates	Solubility	Chaperone dependency		
		DnaK system	GroEL/ES	Both systems
DGEA	+	+	+	+
GaII	++	+	+	+
THE	++	+	-	+
MetF	+	+	++	+++
MetK	++	++	+++	+++
GaII	+	++	+	++
DugA	+	+	+++	+++
TPS	+++	+	+	+
THE	++	+	+	+
MRPS	+++	+	+	+
GFP(free)	n.d.	+	+	+
Rhodanese	+++	-	+	+
ORF	+++	-	-	-

表 1 シャペロンの添加による可溶化率の変化

投入することにより、RNA タンパク質の自己触媒反応を進行させる自己複製システムの創出が実現している (13)。そして、天然の分泌マシナリーと融合した PURE システムを使って、膜透過の可能な人工的生産輸送システムが開発されている (14)。

PURE システムの最初の人工的応用は、非天然タンパク質の合成であった。サプレッサー tRNA に結合させた非天然アミノ酸を ORF 中に導入したアンバーコドンに対応させて、非天然アミノ酸を導入するのが一般的な方法である。従来の抽出液をベースにした合成系では、終結因子が存在するため、アンバーコドンで終結した不完全な蛋白質が副産物として合成される。PURE システムにおいては、終結因子を加えないことで、アンバーコドンに対応させた非天然アミノ酸の導入を高効率で行うことが可能である。バリンを付加したサプレッサー tRNA を用いて、アンバーコドンへのバリンの導入を 100% の効率で行えることが報告されている (3)。さらに、PURE システムを応用することによって、非天然タンパク質を創出するための新規 tRNA 修飾法が開発されている (15)。これらの手法により、20 種類以外のアミノ酸を組み込んだ新たな機能を持つポリペプチドを生産することが可能となっている。

そして、新規機能をもつタンパク質のスクリーニング方法にも PURE システムはすぐれたツールになると考え開発を進めている。リボソームディスプレイ法 (16) を始めとする多様な生体外選択法が開発されつつある。PURE システムは、終結因子を存在させないことで、より簡便かつ安定性の高い mRNA リボソーム タンパク質の複合体を形成

させることができる (17)。機能性ポリペプチドを高収率でスクリーニングできるシステムの構築が可能である (18)。

5. おわりに

細胞内合成されたポリペプチドは、フォールディング、サブユニット形成、糖鎖付加をはじめとした翻訳後修飾などのステップを経て、機能を発現する成熟型タンパク質となる。こうした生産プロセスに関与する各々のシステムを再構築し、PURE システムと連結させることによって、遺伝情報を忠実にポリペプチドへ変換するのみにとどまらず、タンパク質の成熟過程を試験管内で解析することが可能な系を創出可能である。こうして、人工再構築した PURE システムを利用すれば、基礎的なタンパク質の研究だけでなく、より生理活性の高いタンパク質の生産にも結びつくであろう。

参考文献

1. Kudlicki, W., Kramer, G., and Hardesty, B. (1992) *Anal Biochem* 206, 389-393
2. Ryabova, L. A., Morozov, I., and Spirin, A. S. (1998) *Methods Mol Biol* 77, 179-193
3. Shimizu, Y., Inoue, A., Tomari, Y., Suzuki, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K., and Ueda, T. (2001) *Nat Biotechnol* 19, 751-755
4. Niwa, T., Ying, B. W., Saito, K., Jin, W., Takada, S., Ueda, T., and Taguchi, H. (2009) *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 4201-4206
5. Swartz, J. R. (2001) *Curr Opin Biotechnol* 12, 195-201
6. Ying, B. W., Ueda T. (2008) Protein generation using a reconstituted System. in *Protein Engineering Handbook* (Stefan, L., Uwe, B. eds.) Wiley-VCH, Weinheim
7. Jermutus, L., Ryabova, L. A., and Pluckthun, A. (1998) *Curr Opin Biotechnol* 9, 534-548
8. Ying, B. W., Taguchi, H., Ueda, H., and Ueda, T. (2004) *Biochem Biophys Res Commun* 320, 1359-1364
9. Ying, B. W., Shimizu, Y., Ueda T. (2007) The PURE system: A Minimal Cell-Free Translation System. in *Cell-Free Expression* (Kudlicki, W. ed.) Landes Bioscience, Austin
10. Ying, B. W., Taguchi, H., Kondo, M., and Ueda, T. (2005) *J Biol Chem* 280, 12035-12040
11. Kuruma, Y., Nishiyama, K., Shimizu, Y., Muller, M., and Ueda, T. (2005) *Biotechnol Prog* 21, 1243-1251
12. Kazuta, Y., Adachi, J., Matsuura, T., Ono, N., Mori, H., and Yomo, T. (2008) *Mol Cell Proteomics* 7, 1530-1540
13. Kita, H., Matsuura, T., Sunami, T., Hosoda, K., Ichihashi, N., Tsukada, K., Urabe, I., and Yomo, T. (2008) *ChemBiochem* 9, 2403-2410
14. Kuruma, Y., Stano, P., Ueda, T., and Luisi, P. L. (2009) *Biochim Biophys Acta* 1788, 567-574
15. Murakami, H., Ohta, A., Ashigai, H., and Suga, H. (2006) *Nat Methods* 3, 357-359
16. Hanes, J., and Pluckthun, A. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4937-4942
17. Matsuura, T., Yanagida, H., Ushioda, J., Urabe, I., and Yomo, T. (2007) *Biochem Biophys Res Commun* 352, 372-377
18. Ohashi, H., Shimizu, Y., Ying, B. W., and Ueda, T. (2007) *Biochem Biophys Res Commun* 352, 270-276