

研究成果報告書

【申請者氏名】

長岡 純治

【所属機関】

京都工芸繊維大学 応用生物学系

【研究題目】

家蚕絹糸腺抽出液を利用した転写・翻訳共役型無細胞タンパク質合成系の開発

【研究目的】

大規模高速 DNA 解析技術や長鎖 DNA の化学合成技術の発展とサービスの低価格化に伴い、生物種に関係なくタンパク質をコードする遺伝子の入手は容易なものとなった。そのため、急速に、タンパク質に関する解析・応用研究の中心は、元々の配列や、それを改変した遺伝子配列から人工的に発現・合成したタンパク質を用いる形態へと移行していつている。それ故に、さまざまな外来遺伝子発現によるタンパク質合成法も盛んに開発・提案されている。本研究では、生細胞から抽出したタンパク質合成（翻訳反応）に必要な諸因子（リボソーム、伸長因子など）に、反応基質類（エネルギー源、アミノ酸など）を加えた反応液に任意の「RNA」を添加することでタンパク質合成を可能とする無細胞タンパク質合成系を取り上げる。この系は、多種類のタンパク質を同時に、短時間で翻訳合成できる点が大いに期待される技術である。高いタンパク質合成と翻訳後修飾能力をもつカイコガ絹糸腺から調整した抽出液を利用することで、市販されている反応系よりも安価でかつタンパク質種類を選ばない（特に、他のタンパク質合成系で合成が難しいものを解決でき）、高収量な合成系の提供を目指し、かつ、近年、タンパク質をコードする核酸配列が DNA の形で容易に提供されることを踏まえ、転写・翻訳共役型による簡便化（「DNA」添加によるタンパク質合成）系の構築を目指す。

【研究内容及び成果】

I. モデルタンパク質を用いた合成量増加のための反応系の改善

合成モデルタンパク質として、ホタルルシフェラーゼおよび大腸菌 β -ガラクトシダーゼを用いて、合成量増加のための反応系改善方法の探索を行った。

1. 反応系の検討

1-1. 組織抽出液調製方法の検討

組織破砕法は、前年の結果を踏まえ、ダウンズホモジナイザー（Loose）を採用し、抽出液（第1表）を基礎に検討した。

20 mM HEPES-KOH (pH 7.0)
150 mM Potassium acetate (KOAc)
2 mM Magnesium acetate (MgOAc)
2 mM Leupeptin
20% (w/v) Glycerol

抽出緩衝液に含まれる 20 % (v/v) glycerol を絹糸タンパク質の安定的な可溶化を意識して 150 mM hydroxypropyl- β -cyclodextrin で置換した緩衝液を用いて調製した Lysate ならびに、MgOAc と KOAc を Magnesium diglutamate と Potassium glutamate に置換した反応系、計 4 種類の組み合わせについて反応時間に伴うタンパク質合成量を調査した。抽出緩衝液に関係なく glutamate を添加すると合成量は著しく減少した。また、hydroxypropyl- β -cyclodextrin を含む抽出緩衝液により調製した Lysate を用いると、glycerol を含む抽出緩衝液により調製した Lysate を用いたときよりも合成量は減少した。すなわち、**抽出液には、glycerol を添加することが望ましく、反応系のマグネシウム、カリウムについては、酢酸塩を用いる方が良いと判断した。**

1-2. Nucleotide の添加条件検討

タンパク質合成において、ペプチド結合の形成に、エネルギー源となる ATP が主に利用され、ADP、AMP と変化する。また、ATP は RNA 合成にも利用される。そのため、ATP vs ADP、AMP の量比を一定に保つための Creatine phosphate (CP)、Creatine kinase (CK) が必要であり、さらに、そのバランスが UTP、GTP、CTP の添加量に影響する可能性が予想される。そこで、ATP、UTP、GTP、CTP の濃度を 0.2-0.8 mM の範囲で変化させ、タンパク質合成量を検討した。タンパク質合成の反応持続時間は、濃度に関係なく反応開始後 4-6 時間であり、それぞれ 0.4 mM まで添加量に伴って合成量を急激に増加させたが、それ以上を添加すると合成量は低下した。現段階では、**CP は 10 mM、CK は 20 μ g/ml、に変化はなく ATP、UTP、GTP、CTP の濃度を 0.4 mM 添加により合成が安定的に進むことが判明した。**

1-3. T7 RNA polymerase

T7 RNA polymerase について、Promega、NEB、富士フイルム和光純薬社を 0.76-3.8 U/ μ l の範囲で変化させ、タンパク質合成量を検討した。タンパク質合成の反応持続時間は、T7 RNApolymerase 量に関係なく反応開始後 3-6 時間であり、いずれのベンダーであっても 2.28 U/ μ l の添加で最大合成量をとった。また、RNAase inhibitor の添加はまったく合成量の増加に寄与しなかった。現在、T7 RNA polymerase の大腸菌発現系の譲渡を受け、自前での合成を試みていると同時に、低濃度 Mg²⁺ (翻訳) 条件下でも機能する T7 RNA polymerase の創成を準備している。

1-4. 反応液に含まれる DTT 濃度

T7 RNA polymerase の活性発現には、DTT が必要であるが、タンパク質の立体構造形成には DTT の存在は悪影響をもつものと推定される。無添加に比較して、0.2 mM 添加で少し合成量は増加したが、あまり大きな影響は見られなかった。よって、**合成タンパク質の種類に応じて、反応系に DTT を添加するか、しないかを検討する必要がある**ものと考えた。

1-5. Tris-acetic acid buffer の添加とその pH

反応系 pH 安定と、T7 RNA polymerase の反応条件の改良を目指し、終濃度 3.3 mM になるように Tris-acetic acid を添加し、反応系 pH を 7.4-8.0 の範囲で変化させ、タンパク質合成量を検討した。pH 8.0 にすることで、僅かではあるが合成量の増加が観察されたもの、基本的には、反応系 pH の変更は必要ないものと判断した。

1-6. 反応温度

反応温度を 25, 28, 30° C に設定し、タンパク質合成量を検討したが、**28° C** のときに最も合成量が高かった。

※ここまでに得られた反応系の組成は、第 2 表に掲載する。

第2表 転写・翻訳共役型無細胞反応系の組成

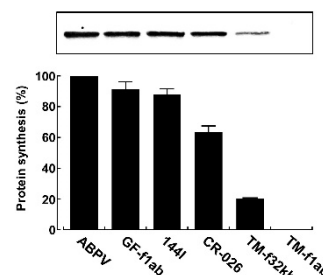
112 mM	Potassium acetate (KOAc)
1.6 mM	Magnesium acetate (MgOAc)
0.4 mM	γ ATP
0.4 mM	γ UTP
0.4 mM	γ GTP
0.4 mM	γ CTP
0.2 mM	Spermidine
0.05 mM	DTT
10 mM	Creatine phosphate
0.02 mg/ml	Creatine kinase
1.52 U/ml	T7 RNA polymerase
12.5% (v/v)	Lysate
0.5 mg	Plasmid

2. 添加 DNA 構造 (ABPV-IRES) の最適化に向けた検討

現時点の試作系 (第 2 表) は、転写部分を T7 RNA polymerase によりまかなっているので、合成される RNA の 5' には Cap 構造が存在していない。このことは、リボソームの RNA への参入効率を低くし、結果、十分なタンパク質合成が確保できない原因となる。この問題を解決するには、Cap 構造を人工的に附加するか、Cap 類似の機能を持つ配列を附加するかのいずれかを採用する必要がある。Cap 構造付加反応には、5' -m7GpppG を用いるが、これが残留すると翻訳に対して阻害的に働くので、タンパク質合成量はむしろ悪くなるとされている。一方で、一部の RNA ゲノムをもつピコルナウイルスには、宿主細胞内翻訳活性を有する IRES (internal ribosome entry site; 配列内部のリボソーム参入部位) が知られている (Holcik et al., 2000)。実際、ウサギ網状赤血球由来の市販翻訳単独型無細胞タンパク質合成系では、Picornavirales 目 Picornaviridae 属に属する脳心筋炎ウイルス (encephalomyocarditis virus, EMCV) の 5' 非コード配列 IRES が利用されている。この点を踏まえ、本反応系において有効な Cap 非依存的な翻訳を可能とする internal ribosome entry site (IRES) 配列を探索したところ、Dicistroviridae 属 Aparavirus から Acute bee paralysis virus (ABPV; Genbank accession No. AF150629) の intergenic region (IGR)-IRES およびその近傍配列が極めて有効であることが、昨年度までの研究により見出された。

2-1. 変異種配列に含まれる有効配列の探索

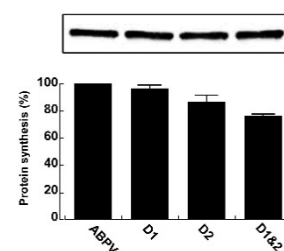
Acute bee paralysis virus (ABPV; Genbank accession No. AF150629) の IGR-IRES 配列をもとにデータベースに登録されている配列を探索すると、Acute bee paralysis virus isolate ABPV/144I (No. MN565031), Acute bee paralysis virus isolate GF-f1ab (No. HM228893), Acute bee paralysis virus isolate TM-f1ab (HM228890), Kashmir bee virus isolate TM-f32kb



(No. HM228885), Acute bee paralysis virus strain ABPV CR-026 (No. MN510868) と類似する配列が見出されたので、これらについて検討した。**144I (No. MN565031) および GF-f1ab (No. HM228893) については、従来用いてきた配列 (No. AF150629) と比べて、合成量には有意な差が認められなかった。**今後、より効率の良い配列の探索に資するものと考えられる。

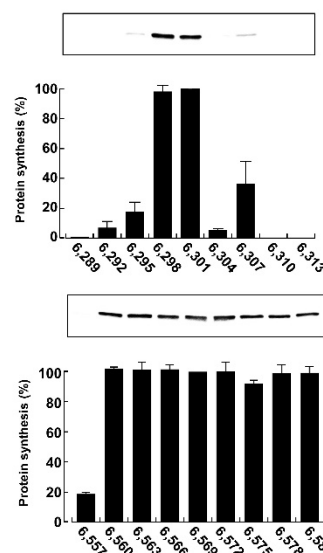
2-2. 開始コドンの制御

用いてきた ABPV IGR-IRES および近傍配列は、キャプシドタンパク質遺伝子の 5' 端を含んでいるから、その開始コドン (AUG; D1) およびその近傍に (インフレームではない) AUG 配列 (D2) が存在しており、これらが合成量に影響している可能性が予想された。そこで、それぞれの U を A に改変したものの (D1, D2)、さらには、両変異を同時にもつものを作成し (D1&2)、これについてタンパク質合成能を評価した。結果、反応持続時間、合成量には概ね影響を与えなかった。



2-3. 有効配列の決定

当初より用いてきた ABPV の IGR-IRES 配列およびその近傍配列 (6, 301-6, 569) を中心に、5' 側あるいは 3' 側を 3 base ずつ欠損もしくは追加していき、タンパク質合成量に与える影響を検討した。**この結果、6, 301-6, 560 の範囲が適当であるが明らかとなった。但し、IGR-IRES 配列およびその近傍配列と合成タンパク質をコードする遺伝子の開始コドンの距離は、合成量に影響する場面があることも見出された。**この知見は、次項における「難合成タンパク質の合成」に役立った。



3. 総括

昨年に比して、本年度の研究検討から導き出された反応系の組成・反応条件は大きな変化はなく、合成量も飛躍的に上昇することはなかった。しかしながら、**ルシフェラーゼタンパク質を合成させた場合、最大合成量が得られる時間は4時間、反応系1 ml あたり 20-30 μ g 程度が再現性良く合成されるようになった。**市販の転写・翻訳共役型無細胞タンパク質合成系のカタログ値よりも優れたものである。

II. 難合成タンパク質の合成

他のタンパク質合成系との差別化と優位性を提示する目的から、以下のタンパク質の合成を試み、同時に、合成方法の更なる検討を行った。

1. バキュロウイルス-昆虫細胞発現系で発現が難しい哺乳動物タンパク質の合成

バキュロウイルス-カイコガ個体を用いた各種タンパク質の合成を行っている九

州大大学院農学研究院の日下部宜宏 教授の研究において、合成がうまくいっていない *Homo sapiens* R-spondin 1 (RSP01; NCBI No. XM_006710583.4), *Homo sapiens* Wnt family member 3A (WNT3A; NCBI No. NM_033131.3), *Pan troglodytes* bone morphogenetic protein 4 (BMP4; NCBI No. XM_003314330.4) の3種について、上記で得られた条件で合成を試みた (昨年度に合成には成功したものの、反応条件が今年度の研究により改善したため)。合成に当たり、合成タンパク質のN末端またはC末端に His-tag または Strep-tag を附加させ、それぞれの tag に対する抗体による western blotting でその合成を確認した。**位置に関係なく、Strep-tag をつけたものは、His-tag よりも合成量は多くなる傾向にあり、全体として昨年と比して、western blotting のシグナルから判断すると、合成量は増加していた。また、DTT を含まない反応系でも合成量には変化が認められなかった。**合成タンパク質が生理活性を十分に持っているかについての検討は、現在再度準備を行っている。

2. 大腸菌発現系で発現が難しい昆虫由来タンパク質の合成

大腸菌を用いた各種タンパク質発現・合成を行っている九州大大学院農学研究院の山本幸治 助教の研究において、発現・合成が出来ない *Bombyx mori* strain Dazao RR1-type cuticular protein (LCP17; Genbank accession No. KF672849), *Nilaparvata lugens* extracellular Cu/Zn superoxide dismutase (n1SOD; Genbank accession No. MH169600) について、N末端またはC末端に His-tag または Strep-tag を附加して合成を試みた。合成タンパク質の状況は、それぞれの tag に対する抗体を用い western blotting で確認した。N末端、C末端に His-tag を附加した場合、両タンパク質の合成は確認されたが、Strep-tag については、n1SOD についてN末端、C末端での発現が確認され、LCP17 ではまったく合成が確認されなかった。しかし、合成量が確認されたものでも、その量は、極めて少なかった。そこで、前項の結果を参考に、ABPV IGR-IRES 配列に対して発現タンパク質開始コドンの位置を、6 base 下げることで再検討を行った。その結果、LCP17 については、C末端に His-tag、n1SOD については、C末端に Strep-tag をつけた状態で合成量は飛躍的に増加した。今後、合成スケールを拡張し、精製したものを生化学的な検討に資する予定である。

3. 総括

合成タンパク質の簡易精製を目的に公知の tag 配列を用いる場合、複数種について検討する必要があることが認識された。また、例数が少ないので断定は出来ないものの、今回採り上げたタンパク質においては、概ねC末端側に tag 配列を附加した方が合成量の確保の観点からは望ましかった。ただし、合成量とともに合成タンパク質の機能性との関連性については不明で有り、さらに検討を要するものと考える。

【今後の課題】

1. **合成量の増加に資する ABPV-IRES の最適領域条件の検討**はかなり進んだので、合成遺伝子をもったプラスミドが容易に構築出来るようにベクターを構築する。

2. **本研究で取り上げた難合成タンパク質については合成が可能**となったので、反応系の規模を拡大し、精製した後、生物化学的な方法でタンパク質の評価を進める。
3. **高分子、膜、多量体形成, 翻訳後修飾(リン酸化、ユビキチン化、プレニル化や糖鎖附加)といったタンパク質の合成**に関する検討の準備をしてきたので今後行う。
4. コロナ禍の影響で、企業との共同研究締結まで至らなかったため、再度、系の優位性を確認する観点からも、対応を進めていく。

【発表論文等】

(特許)

1. 特開 2017-131171 (国立大学法人京都工芸繊維大学) 特許出願審査請求中