無細胞蛋白質合成システムの開発

A Robust, Highly Efficient Cell-free Protein Synthesis System

（研究プロジェクト番号：JSPS-RFTF 96100305）

プロジェクトリーダー
遠藤彌重太　愛媛大学工学部・教授
コアメンバー
三浦謹一郎　学習院大学生命分子科学研究所・教授
武藤あきら　弘前大学理学部・教授
内藤　利男　信州大学繊維学部・助教授
上田　卓也　東京大学大学院新領域創成科学研究科・教授
遠藤斗志也　名古屋大学大学院理学系研究科・教授
大島　泰郎　東京薬科大学生命科学部・教授

1．研究目的

本研究プロジェクトでは、既存のタンパク質調製法の限界を打破する新規タンパク質合成法の創成を目的として、生きた細胞を全く使わず、すべての反応を人工容器内で進行させる無細胞タンパク質合成法の開発を推進した。

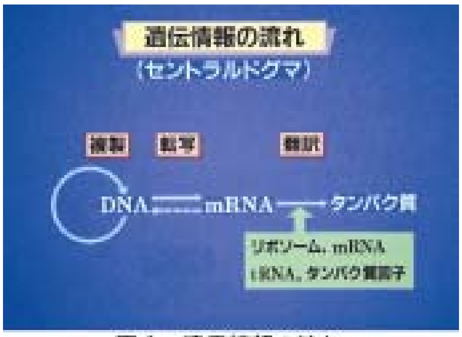

図１　遺伝情報の流れ

2．研究成果概要

DNA 上に暗号化された遺伝情報は、mRNA を介してタンパク質へと変換、翻訳される（図１）。人工容器内で、この翻訳過程を再現し、タンパク質を自由自在に合成するためには、リボソーム、tRNA、各種タンパク質因子など翻訳因子群を安定化し、かつ、効率的な転写・翻訳鋳型を構築して、目的に応じて mRNA を生産するシステムの開発が必須であった（図２）。

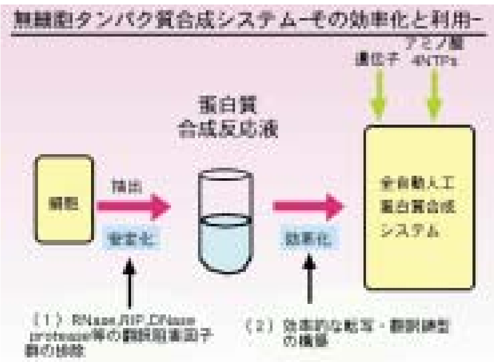

図２　タンパク質合成システム

まず、翻訳因子群を調製する素材として、小麦胚芽を選択した。小麦胚芽には、種子が発芽して爆発的にタンパク質合成を行なうための翻訳因子群が休眠状態で保存されている。実際に生命活動を行なっている細胞では、タンパク質や RNA の分解酵素も活性化されており、翻訳因子群の調製には不適当であった。また、胚乳部分を除去することにより、リボソーム不活性化タンパク質（RIP）を完全に取り除くことにも成功した。これにより、クラゲ蛍光タンパク質（GFP）をモデルタンパク質とした場合、２週間以上もタンパク質合成が継続する画期的なシステムが確立された（図３）。

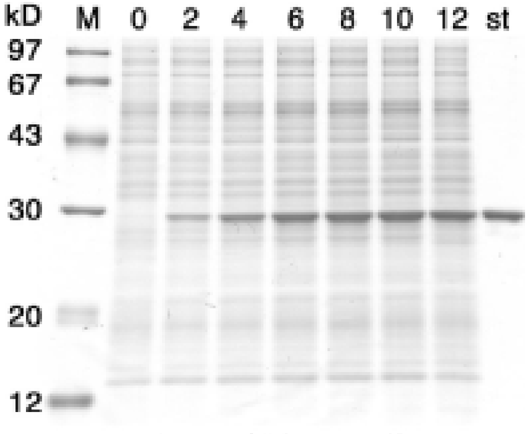

図３　クラゲ蛍光タンパク質

次に、タンパク質合成効率を制御している mRNA の 5’非翻訳領域に、植物ウイルス由来のΩ（オメガ）配列を導入することにより、従来法に比べて、より安価で至適濃度領域の広い mRNA 調製法を確立した。また、この配列を軸にした汎用プラスミドベクター、pEU（plasmid of Ehime University）を開発した（図４）。さらに、本ベクターシリーズは、目的用途にあわせて、RNA ポリメラーゼ・プロモーターやマルチクローニング・リンカーが改良され、グルタチオン-S-トランスフェラーゼやヒスチジン・タグを備えたものも開発された。これにより、タンパク質の大量合成から多検体処理に至るまで、幅広い用途に対応が可能となり、タンパク質精製法も簡便化すること

ができた。図５は、本ベクターを用いて、三種類のモデルタンパク質を合成した例を示している。いずれも、60 時間以上合成が継続し、生産量は 1ml あたり、数 mg に達することが確認できる。

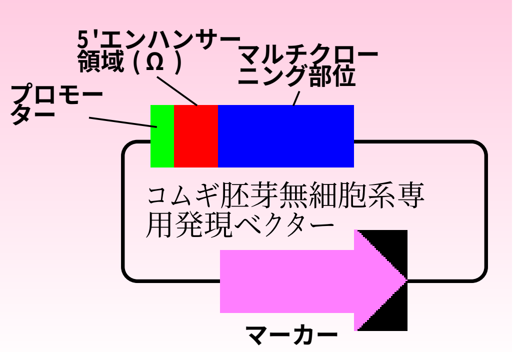

図４　無細胞系専用発現ベクター

そこで、ポストゲノム時代のプロテオーム解析を視野にいれ、多検体機械化処理技術の開発に着手することにした。タイタープレートで供給される cDNA ライブラリーから、短工程でタンパク質ライブラリーを構築するためには、より効率よく転写鋳型を作成し、タイタープレート上で転写から翻訳まで行なうシステムの開発が必要である（図６）。まず、

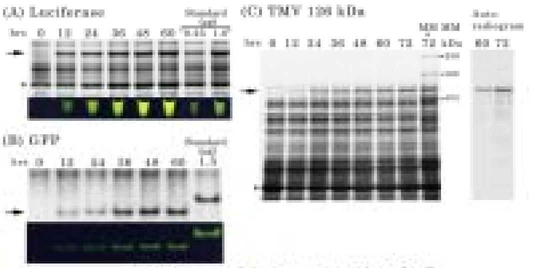

図５　モデルタンパク質の合成

汎用のプライマーセットを工夫し、二段階 PCR 法により、低分子副産物の生じない鋳型作成法を開発した。次に、タイタープレート上で転写から翻訳までをいかにして行なうかを検討した。この過程で、転写・翻訳一体型希釈方式や重層方式を比較検討したところ、重層方式がすぐれていることが確認された。これにより、DNA からタンパク質まで、すべての工程を一つのタイタープレート上で完了する多検体同時処理システムが実現した。図７は、シロイヌナズナライブラリーから無作為抽出した６４種類の cDNA をもとに合成さ

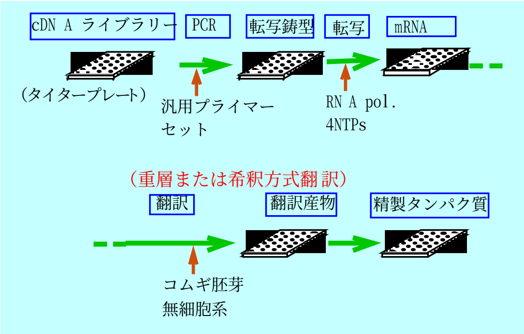

図６　無細胞系を用いる cDNA ライブラリーからのタンパク質ライブラリーの作成

れたタンパク質の電気泳動分析の結果である。多くのレーンで、無細胞翻訳系で合成された目的タンパク質が確認できる。

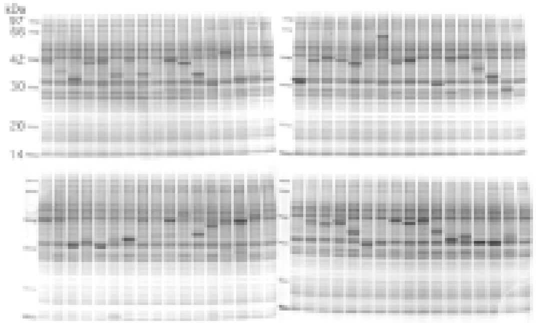

図７　多検体同時合成システムによるタンパク質合成

３．結論

全く新たなタンパク質調製法として、無細胞タンパク質合成システムを実用化レベルで開発することに成功した。本法は、生きた細胞に遺伝子を挿入することによる様々な制約を受けることがないため、今までは調製が困難であった様々なタンパク質の合成が可能である。また、生体内では存在しえない、全く新しい機能をもったタンパク質すら、合成しうる。さらに機械化処理技術を発展させていけば、生産規模を工業レベルまで拡大することも可能である。新たな産業シーズを発掘する上で、工程数が少なく、多検体の同時処理が可能な無細胞工学技術はオートメーション化に適しており、強力なツールとなるだろう。

主な発表論文

1) T. Sawasaki, Y. Hasegawa, M.Tsuchimochi, N. Kamura, T. Ogasawara, T. roita, and Y. Endo “A bilayer cell-free protein synthesis system for high-throughput screening of gene products.”, ***FEBS Letters 514,*** 102-105 (2002)

2) Y. Shimizu, A. Inoue, Y. Tomari, T. Suzuki, T. Yokogawa, K. Nishikawa, and T. Ueda "Cell-free translation reconsititured with purified components" ***Nature Biotech.*** **19,** 751-755 (2001)

3) K. Madin, T. Sawasaki, T. Ogasawra, and Y. Endo, "A highly efficient and robust cell-free protein synthesis system prepared from wheat embryos: plants apparently contain a suicide system directed at ribosomes.", ***Proc. Natl. Acad. Sci.*** **USA 97**, 559-564 (2000).

4) T. Ogasawara, T. Sawasaki, R. Morishita, A. Ozawa, K. Madain, and Y Endo, "A new class of enzyme acting on damaged ribosomes: ribosomal RNA apurinic site specific lyase found in wheat germ.", ***EMBO J.*** **18**, 6522-6531 (1999).

5) R. Morishita, A. Kawagoshi, T. Sawasaki, K. Madin, T. Ogasawara, Oka, and Y. Endo, "Ribonuclease activity of rat liver perchloric acid-soluble protein, a potent inhibitor of protein synthesis.", ***J. Biol. Chem.*** **274**, 20688-20692 (1999).

6) Y. Endo, R. Morishita, K. Madin, and S. Yoshinari, “Mechanisms of Action of Ribotoxins.”, ***J. Toxicol.*** **17**, 427-439 (1998).