無細胞タンパク質合成系へのピュアアプローチ

東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻 上田卓也

東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻 清水義宏

Development of high-throughput methods for protein production is one of the most urgent issues to be addressed in the post-genome era. Recently we have succeeded in constructing a novel translation system, reconstituted *in vitro* from purified protein components involved in translation, called the PURE system. The PURE system is capable of synthesizing submilligram amount of protein per hour. The protein products are easily purified within one hour by the removal of the tagged translation factors using affinity chromatography. The PURE system will provide the possibility of efficient production of labile products.

cell-free translation / protease / nuclease / unnatural amino acid / high-through put / ribosome-display

1. はじめに

私たちはすでに膨大なDNA情報を蓄積し、その情報量は今後急速に増大するであろう。ゲノム上の遺伝子の情報をタンパク質として実体化し、システムティックな構造と機能の解析により、プロテオームの視点から生命像を描くことができるなら、生命科学の新たな潮流を作り出せるであろう。しかし、タンパク質研究は、DNAの塩基配列決定のように単純作業を集積すれば可能になるという性質のものではない。特に、現在広く用いられているクローニングと発現系によりタンパク質を生産する手法は、発現させたタンパク質が不活性な場合も多く、その改善のために多くの労力と時間が必要である。また、微生物や細胞の培養というステップは手数がかり、場合によってはバイオハザードの問題にも留意しなければならない。このタンパク質の生産プロセスを、試行錯誤によらない確実性のあるものとし、迅速簡便なシステムへと進化させることは、ポストゲノム時代において要求されるハイスループットなタンパク質解析の研究に必要不可欠であろう。

これらの問題点を解決するタンパク質発現システムとして、細胞の抽出液を用いてタンパク質を生産する無細胞タンパク質合成系がある。細胞の抽出液を用いたタンパク質合成の歴史は古いが、実際にタンパク質の生産

手法としての可能性が示されたのは、ロシア科学アカデミーのSpirin A. S.らによる1988年の報告である。アミノ酸やエネルギー源を連続的に反応液に供給することで、タンパク質合成が数十時間以上続くことが示され、無細胞タンパク質合成系がタンパク質の生産手段の1つとなり得ることが認識されるようになった¹⁾。その後、理化学研究所の横山ら、愛媛大学の遠藤らによって、合成効率の改善が報告されてはいるものの^{2,3)}、必ずしも信頼性の高い技術にはなっていないのが現状である。

DNAの解析法が飛躍的に向上し、かつ一般化されたきっかけとして、DNAの塩基配列決定法と、PCR法があった。この2つの方法はともに、精製されたDNAポリメラーゼの使用によって初めて可能となった。また、純度の高いRNAポリメラーゼによる試験管内転写系は、SELEX法などの機能性RNAの開発のための試験管内進化系の開発へと結びついた。私たちは、DNA複製や転写のステップと同様に、タンパク質合成系を精製された因子から試験管内で再構築することによって、再現性の高いタンパク質の合成技術を実現できるのではないかと考えた。

2. PURE システムとは

これまでの無細胞タンパク質合成系は、大腸菌、小麦胚芽、ウサギ網状赤血球などを破碎し、膜成分を遠心分

PURE Approach for Cell-Free Translation System

Takuya UEDA* and Yoshihiro SHIMIZU**

* Department of Integrated Biosciences, Graduate School of Frontier Sciences, the University of Tokyo

** Department of Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, the University of Tokyo

Fig.1 The components of the PURE system.

離で除いた細胞抽出液を使用している。しかしながら、これらの無細胞のタンパク質合成系には大きな問題点が2つある。1つは、ATPを加水分解する酵素などの混在により、タンパク質合成以外に無駄に消費されるエネルギー量が多く、エネルギー効率が悪いという点⁴⁾、もう1つは細胞抽出液中に存在するプロテアーゼやヌクレアーゼなどの阻害因子により、タンパク質合成の効率が低下するという点である。これらの問題点はこうした粗抽出液を用いる限り避けられないものである。1つの改善策として、これら阻害因子の働きを抑えるといった対処法が考えられるが、対症療法にすぎず、改善にも限界がある。

もし、タンパク質合成に関与するすべての因子を精製し、それらを再構成することでタンパク質生産システムを完成することができれば、上で述べた細胞抽出液中に存在するような阻害的要因を含まず、また構成成分を自由に操作することができるため、システムの生産性の向上を図ることやターゲットのタンパク質に対応したシステム設計ができる点で優れているはずである。こうした観点から、次のような戦略で、細胞抽出液を用いない新規の無細胞タンパク質合成系の構築にチャレンジした。

私たちは、大腸菌ゲノムより、タンパク質合成に関与する31種類の可溶性タンパク質因子をヒスチジンタグを付加した形でクローニングし、大量発現および精製を行った。これらの因子を、ショ糖密度勾配遠心法により精製した大腸菌リボソーム、tRNA画分と組み合わせた(Fig.1)。このように再構成した無細胞タンパク質合成系は、今までの抽出液を用いたものとコンセプトが異なるため、新たにPURE(Protein synthesis Using Recombinant Elements)システムと名付けた⁵⁾。

3. PURE システムの構築

細胞内でのタンパク質合成のプロセスは、大きく分けて、開始、伸長、終結の3段階で進行する。バクテリアでは、これらの段階に必要な翻訳因子として、3種類の開始因子(IF1, IF2, IF3)、3種類の伸長因子(EF-Tu, EF-Ts, EF-G)、また終結に関与する4つの因子(RF1, RF2, RF3, RRF)がある。これらの10種類の因子以外にも、20種のアミノ酸に対応するtRNAに受容させる20種類のアミノアシルtRNA合成酵素、また開始tRNAに結合したメチオニンのアミノ基をホルミル化するメチオニルtRNAホルミル転移酵素が必要である。これら31種類の因子の遺伝子を大腸菌ゲノムからPCR法により増幅後、発現ベクターに組み込み、ヒスチジンタグとの融合タンパク質として大量発現させた。これらの融合タンパク質をニッケルカラムにより高度に精製し、電気泳動でも単一バンドであることを確認した(Fig.2)。活性を確認したところ、これらの因子はすべて十分な活性を有していた。また、リボソームについては、大腸菌を破碎した後、超遠心、ショ糖密度勾配遠心により、夾雑物を含まない純度の高いものを調製した。

これらの因子から再構成されたPUREシステムは果たして十分なタンパク質生産能力を有しているのだろうか？T7RNAポリメラーゼで転写とカップルさせたPUREシステムによって、DHFR(ジヒドロ葉酸還元酵素, dihydrofolate reductase)の遺伝子などを用い、タンパク質合成を行ったところ、1 mlの反応液当たり、約160 µgの生産が確認された。この合成量は、従来の細胞の粗抽出液での生産量と比較しても遜色のないものであった。このことは、PUREシステムの因子は、タンパク質の生産を行う上で、必要かつ十分なものであることを示している。

Fig.2 SDS-PAGE pattern of the purified components used in the PURE system⁵⁾. (a) Translational factors involved in initiation, elongation and termination steps (b) Aminoacyl-tRNA synthetases and methionyl-tRNA transformylase. Glycyl-tRNA synthetase (GlyRS) and phenylalanyl-tRNA synthetase (PheRS) exhibit two bands, because of their subunit structure.

さらに、因子を1つでも除くと、大半の場合、タンパク質の合成は停止した。このことは、前述のように各因子が十分な活性を有していることを示しているとともに、これらの因子の純度がきわめて高いことを示唆している。また、リボソームの精製が不十分な場合は、リボソームに可溶性タンパク質が付着しているが、ショ糖密度勾配遠心で精製したリボソームではそうした持ち込みがないことが示された。このことは、PUREシステムの構成要素を操作することにより、合成量のコントロールや、後述のように非天然のアミノ酸を導入するような人工的なシステムへの応用が可能であることを示している。

では、合成されたタンパク質の活性はどうであろうか？ DHFRをPUREシステムで合成させた場合、その比活性は、遺伝子組み換えにより大量発現させて調製したDHFRの比活性とほぼ同じであった。リゾチームやGFPなどのタンパク質においても同様の結果であった。このことからPUREシステムは、生理活性を有するタンパク質の生産に必要な因子をすべて含むことが示された。また、PUREシステムは、内在性の分子シャペロンを含まないシステムであるが、DHFRの場合は、こうした分子シャペロンなしに、活性のある状態へと折り畳まれるということが出来る。

4. 精製が容易なPURE システム

*In vivo*での遺伝子組み換えの場合はもちろん、無細胞タンパク質合成系の場合でも、目的のタンパク質の精

製は、最もデリケートで神経を使う行程である。この点を解決するために、遺伝子にタグを付加して、アフィニティーカラムで精製するのが主流となっている。しかし、タグの付加によって機能が失われることが、しばしば見受けられる。PUREシステムでは、可溶性因子のそれぞれにヒスチジンタグが付いていることを活用することで、天然とまったく同一の配列をもつ目的タンパク質を合成し、簡便に精製することが可能である。

まず、PUREシステムによりタンパク質合成反応を行った後、分画分子量为10万の限外ろ過膜で遠心ろ過を行い、リボソームを除去する。その後、ニッケルカラムを通すことで、タグの付いている可溶性因子をカラムに吸着させ、目的の産物は未吸着画分として溶出させる。この溶出画分には、目的のタンパク質のみが含まれているはずである (Fig.3a)。実際にDHFRを合成後この手順で精製したところ、電気泳動では単一バンドのDHFRが得られた (Fig.3b)。この精製操作はきわめて簡便であり、1時間以内で終了する。つまり、タンパク質合成反応も含めて2時間という短時間で、純度が高く、タグの付いていない天然型のタンパク質を精製できることが示された。

限外ろ過とカラムを通すだけの2段階の精製操作は、自動プラスミド調製機とほぼ同様のものであり、すぐにもオートメーション化が可能である。その点でPUREシステムによる合成および精製のプロセスは、ハイスループット化に適していると言える。もしヒトのゲノム上のタンパク質遺伝子が4万程度であると考え

Fig.3 Purification of the translation product synthesized by the PURE system⁵⁾. (a) After the translation reaction, ribosomes were firstly removed by ultrafiltration using a membrane with 100 kDa MW limit followed by the passage through a Ni-column. Because all the translation factors bound the Ni-column, only translation product eluted in flow-through. (b) SDS-PAGE of the translation reaction mixture (lane 2), and purified product (lane 3). Lane 1 indicates marker proteins.

れば、PUREシステムにより96穴のプレートを用いてオートメーションでタンパク質合成を行えば、1つの研究室で、純度の高いタンパク質をすべてそろえることも可能になるであろう。また、プロテアーゼによる分解や、タグによる構造や機能の変化といった問題に心を悩ませることもない。

5. PURE システムでタンパク質に新機能を付加する

無細胞タンパク質合成系の大きな利点は、システムを自由に操作できる点にある。遺伝子組み換えによるタンパク質発現系では、アミノ酸は20種類に限定されており、それ以外のアミノ酸やその誘導体を導入することはきわめて困難である。しかし、無細胞の系では、アミノ酸誘導体を結合させたtRNAを加えることで、効率よくこれらの非天然型のアミノ酸を導入することが可能である。特に、3種類ある終止コドンのうちの一部をこれらの新規のアミノ酸に対応させることができれば、新たな機能をタンパク質に導入することが可能になる。特にPUREシステムでは、構成因子を自由に操作できるという大きな利点がある。実際に、PUREシステムで、UAGコドン（翻訳終止コドンの1つで、アンバーと呼ばれる）を完全にセンスコドンへと変換することに成功した（Fig.4）。

この実験では、DHFRの37番目のコドンをアンバーコドンに置換した変異型DHFR遺伝子を用い、バリンを化学的に連結したアンバーサプレッサーtRNAをPUREシステムに添加した。幸運なことに、大腸菌の翻訳システムには複数の終止因子が存在し、RF1はUAA、

UAGに対応し、RF2はUGA、UAAに対応する（不思議なことに真核生物では1つのRFがすべての終止コドンに対応する）。したがって、RF1を含まずRF2を終止因子として含むPUREシステムでは、UAGコドンは、終止コドンではなく、どのアミノ酸にも対応しない非指定の状態となる。実際に変異型のDHFRを用いてRF1を含まない系でタンパク質合成を行うと、アンバーコドンに到達した状態でリボソームが停止するため、single-turn overの反応により、短鎖のペプチドがわずかに合成される（Fig.4）。バリンを結合させたサプレッサーtRNAを含む系では、全長のDHFRが大量に合成され、短鎖のペプチドはまったく合成されない⁵⁾。この場合、ペプチド合成の終結はRF2が担う。この結果は、37番目のアンバーコドンが完全にバリンへと変換されたことを示している。

細胞の抽出液による生体外タンパク質合成系で非天然のアミノ酸を導入する試みは、すでになされており、成功例も多い⁶⁾。しかし、こうした抽出液を用いた場合の大きな問題点は、導入する部位のコドンと競合する因子が、システム内に存在することにある。たとえば、アンバーコドンに対して導入する場合は、RF1との競合が生じるため、合成産物は短鎖のペプチドとの混合物となる。RFが温度感受性の大腸菌の抽出液を調製し、RFを不活性化することや、RFに対する抗体を用いることも試みられているが、成功しているとは言い難い。非天然のアミノ酸を結合させるtRNAのアンチコドンを4塩基以上にして非天然アミノ酸を導入するシステムが、穴戸らによって開発されている⁷⁾。この場合には、通常の3塩基コドンに対応するtRNAとの競合がある

Fig.4 Conversion of an amber codon to a valine codon using the PURE system⁵ (a) mutant DHFR gene with the amber codon at 37th codon. The amber codon is recognized by either RF1 or suppressor tRNA. (b) In the absence of RF1 and suppressor tRNA, ribosome stalled at the amber codon, resulting in a small amount of short protein product. Addition of suppressor tRNA attached with valine, caused only the full-length DHFR protein, indicating occurrence of suppression with high efficiency.

はずである。したがって、こうしたシステムでは、非天然アミノ酸の導入には成功してはいるが、コドン完全に非天然のアミノ酸へと変換したとは言えない。PUREシステムでは、一部のRFを加えないというきわめてシンプルな操作で、こうした競合を完全に回避し、遺伝暗号を変換するという難関を突破することができた。無細胞タンパク質合成系は、通常の生細胞を用いた発現系に比べ、操作性の点で大変優れているとされている。しかし、細胞の抽出液を用いた系は、まだ細胞の中の大半のものが含まれたシステムであり、自由に操作できるシステムとは言い難い。その点、PUREシステムは、構成要素を自由自在に除いたり、濃度を変化させたりすることが可能である。このような優れた操作性は、PUREシステムの最大の長所であると言える。

6. PURE システムの可能性

PUREシステムの確立は、タンパク質の生産という応用面はもちろん、基礎研究においても利用価値が高いものと期待できる。PUREシステムは、遺伝子上の読みとり枠 (ORF) から正確にポリペプチド鎖を合成する。しかし、生体では、生合成されたポリペプチドがそのままの状態では機能するとは限らない。

第1番目の問題として、タンパク質のフォールディングの問題がある。現在数多くの分子シャペロンの存在が報告されている。こうした分子シャペロンは、おそらくは変性したタンパク質の構造の回復に必要であろうが、新生ペプチドのフォールディングへの関与の可能性も指摘されている。また、ペプチドがアミノ末端から

カルボキシル末端へと合成されるというメカニズムが、フォールディング過程にどのように寄与しているかについては、現在のところ解析に適したシステムがないために、いまだ不明な点が多い。細胞の抽出液を用いたシステムでは、内在する分子シャペロンの影響のため、この問題についての精緻な議論はできない。その点、PUREシステムは、ペプチドの合成プロセスとフォールディングの関連を研究する上で、大変よい解析手法になるのではないかと考えている。PUREシステムを用いてさまざまな分子シャペロンの存在下、非存在下でタンパク質を合成することにより、分子シャペロンの寄与を試験管内で解析することができであろう。また、PUREシステムは大腸菌由来のタンパク質合成系であるが、真核生物由来の分子シャペロン群を共存させることで、真核生物型のフォールディングが可能なシステムになるであろうと期待される。

2番目の問題点として、翻訳後修飾がある。リボソーム上で合成された多数のタンパク質は、翻訳後修飾を受ける。現在、この翻訳後修飾の反応には、150以上の様式があるとされている。大腸菌で発現させたタンパク質が十分な機能をもたないケースの中には、こうした修飾が本来のものとは異なる場合があると思われる。PUREシステムで合成されたタンパク質は、当然こうした修飾を受けない。しかし、希望する修飾システムを共存させることができるなら、目的の翻訳後修飾がされたタンパク質を合成することが可能になると期待される。PUREシステムが、細胞抽出液の場合のように中途半端に修飾システムをもたないことが、むしろ長所と

なり得るのではないかと思われる。たとえば、合成されたタンパク質を特異的にリン酸化するキナーゼがわかっているならば、PUREシステムにこのキナーゼを加えることで、リン酸化されたタンパク質を合成することもできる。この手法によれば、修飾型と未修飾型の両者のタンパク質を容易に得ることができ、機能を比較できるという利点もある。また、修飾を行う酵素が未知である場合は、上述した非天然アミノ酸を組み込む手法によって、修飾アミノ酸を部位特異的に導入することも可能であろう。

このように、PUREシステムは、目的に合わせたさまざまなサブシステムを組み込むことで、ある意味ではオーダーメイドのタンパク質合成系となる可能性を秘めている。こうしたシステムにより、量が多だけではなく、質の高いタンパク質が生産できるようになれば、プラットフォーム技術としてタンパク質研究を推進する原動力になるのではないかと期待される。

7. 生物学とPURE テクノロジー

私たちは、タンパク質合成系を、試験管内で精製された分子集団から再構築することに成功した。タンパク質合成系は、細胞の破砕液を用いても構築が可能であり、こうした抽出液の調製方法の改良や反応条件の検討により、合成効率の点でも進歩がみられているのが現状である。しかし、さまざまな夾雑物が存在する無細胞システムを使用する限りは、自ずと限界があるだろう。DNA ポリメラーゼという、たった1つの酵素を精製することで、PCR 法やDNA の塩基配列の決定法が生まれ、現在のゲノム科学の基盤技術となっている。筆者らが考案した、因子の精製という一見回り道とも思えるPUREシステムのアプローチ (Stanford 大の Swartz 教授には pure approach とよんで頂いたが⁸⁾) は、タンパク質研究における強力な方法論になるであろうと信じている。現在、細胞の抽出液でDNA の塩基配列を決めよ

うとする研究者はいないであろう。また、PCR法は細胞内では起こり得ないような人工的なDNA複製システムを可能にし、その応用の可能性は留まるところを知らない。機能分子であるタンパク質の合成システムにおける pure approach は、DNA という単なる情報分子を対象とする場合に比べれば、そのポテンシャルは計りしれないだろう。PUREシステムの構築によって、DNA からタンパク質へというセントラルドグマの情報の流れを、精製された因子で行うことが可能となり、遺伝子発現系の真の意味での再構成に成功したと自負している。この試験管内遺伝子発現系が基盤となって生まれる研究分野としては、ざっと考えただけでも、高効率の ribosome display 法の開発、構造生物学への応用、プロテインバンク (データバンクではない) の設立、人工細胞の創製といったものが思い浮かぶ。多くの研究者にその利用を考えていただければ、この技術のさらなる発展が可能であろうと確信している。

文 献

- 1) Spirin, A. S., Baranov, V. I., Ryabova, L. A., Ovodov, S. Y. and Alakhov, Y. B. (1988) *Science* **242**, 1162-1164.
- 2) Kim, D. M., Kigawa, T., Choi, C. Y. and Yokoyama, S. (1996) *Eur. J. Biochem.* **239**, 881-886.
- 3) Madin, K., Sawasaki, T., Ogasawara, T. and Endo, Y. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 559-564.
- 4) Kim, D. M. and Swartz, J. R. (2000) *Biotechnol. Prog.* **16**, 385-390.
- 5) Shimizu, Y., Inoue, A., Tomari, Y., Suzuki, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K. and Ueda, T. (2001) *Nat. Biotechnol.* **19**, 751-755.
- 6) Liu, D. R. and Schultz, P. G. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 4780-4785.
- 7) Hoshaka, T., Kajihara, D., Ashizuka, Y., Murakami, H. and Sisido, M. (1999) *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 34-40.
- 8) Swartz, J. (2001) *Nat. Biotechnol.* **19**, 732-733.

上田卓也

上田卓也 (うへだ たくや)

東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻 教授

農学博士 (東京大学) 横浜市立大学木原生物学研究所, 東京工業大学生理工学部, 東京大学工学部を経て, 1999 年より現職。

タンパク質合成系のメカニズムの研究と応用に基いて, 生命の起源にアプローチしようと模索している。

連絡先: 〒277-8562 柏市柏の葉 5-1-5 東京大学新領域生命棟 401

E-mail: ueda@k.u-tokyo.ac.jp

<http://www.kw1.t.u-tokyo.ac.jp/~ueda/index-e.html>

清水義宏 (しみず よしひろ)

東京大学大学院工学系研究科博士後期課程3年 (化学生命工学専攻)

研究内容: 必須因子のみからなる無細胞タンパク質合成系の構築とその応用

連絡先: 〒277-8562 柏市柏の葉 5-1-5 東京大学新領域生命棟 401

E-mail: shimizu@molbio.t.u-tokyo.ac.jp