固定化 mRNA による生体外タンパク質生産

小島英理

東工大・生命理工・生物工学 碓山義人

相澤益男

1. はじめに

1970年代前半、Berg¹⁾、Cohen²⁾、Boyer²⁾らにより開発された遺伝子操作の技術は生体の持つ優れたタンパク質合成システムを利用することにより、人工的にタンパク質を合成することを可能にした。遺伝子操作は、目的とするタンパク質のアミノ酸配列をコードした遺伝子を抽出したり、あるいは化学合成して自己複製ができる細胞系に導入し、これらを細胞内で発現させることによって目的タンパク質を産出する技術である(図1)。

図1. 遺伝子工学によるタンパク質合成

現在、遺伝子操作は基礎研究のみならず、有用タンパク質の大量生産の両面にわたり威力を発揮してきており、従来天然には微量しか存在しないタンパク質や、化学合成により生産していたペプチドなどを比較的容易に生産できるようになってきた。しかし、遺伝子工学的合成法においてもいくつかの解決しなければなら

ない問題点が残されている。たとえば、1)細胞は生命を維持するために様々なタンパク質を合成しているので、目的とするタンパク質だけを生産するのが困難であること、2)目的とするタンパク質は宿主にとって不必要な場合が多いので発現しにくかったり、発現しても宿主細胞のプロテアーゼにより分解されてしまうこと、3)大腸菌や、枯草菌などの原核生物を宿主として用いた場合、糖鎖修飾などの翻訳後修飾が不十分であるために生成したタンパク質が期待通りの活性を有していないことなどである。最近では、酵母細胞などの真核生物あるいは動物細胞も宿主として利用されているが、4)動物細胞を利用する場合培養が難しく、5)大量のタンパク質の工業的生産には向かないことなどもあげられる。

しかしながら、もし細胞を使わずに生体外でタンパク質を生産することができればこれらの問題点は解決できるものと思われる。さらに、細胞を用いた系では導入が非常に困難な非天然のアミノ酸をタンパク質に導入した超タンパク質を合成できる可能性がある。

2. 生体外タンパク質合成

無細胞系を用いた mRNA の翻訳によるタンパク質合成は、1961年に Nirenberg らにより大腸菌の系で確立されている³⁾。彼らは大腸菌より抽出した無細胞タンパク質合成系を用いて合成 mRNA の翻訳を行い、遺伝情報(コドン)とアミノ酸が対応することを解明している。無細胞系による mRNA の翻訳は真核生物でも行われており、ウサギ網状赤血球⁴⁾、小麦胚芽⁵⁾など様々な系が開発されている。しかし、これらの系は mRNA の同定や、翻訳機構の解明を目的としたものであり、翻訳されるタンパク質もラジオアイソトープ標識したアミノ酸を用いてようやく検出できる程度の微量のものであった。

ところが最近、ソ連科学アカデミーの Spirin らは、大腸菌や小麦胚芽より抽出した cell-free タンパク質合成系と mRNA を反応槽に詰め、原料アミノ酸、エネルギー源(ATP, GTP)を連続的に供給し、生成タンパク質を選択的に系外に集めることにより、タンパク質の連続生産が可能であることを示している^{6),7)}。このフローシステムでは反応継続時間が飛躍的に向上し、効率のよい生体外タンパク質生産が行われている。

3. 生体物質の固定化

酵素や抗体など生体物質、あるいは微生物、動物細胞など生物そのものを担体に固定化して利用する固定化の技術も進展している。固定化の方法としては、共有結合による担体への結合、アフィニティーを利用し

Cell-Free Protein Production by Immobilized mRNA System

Eiry KOBATAKE, Yoshihito IKARIYAMA, Masuo AIZAWA

Department of Bioengineering, Faculty of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology

た固定化、高分子化合物を利用した包括固定化など、様々な方法が考案されている。固定化により本来不安定な物質が安定化され、その結果長期使用や連続使用が可能になる。固定化の技術は、すでにバイオリクターやバイオセンサーなどへ応用され、その有用性が実証されている。この技術を生体外タンパク質合成へ展開すると、mRNA の固定化によって不安定な mRNA を安定化し、しかも連続的に使用できる可能性があるなどの利点が予測される。

固定化 mRNA を用いてタンパク質の翻訳プロセスを無細胞で行い、タンパク質を生産しようという試みは、既に1979年に碓山らにより報告されている⁸⁾。この系では、カイコより抽出したフィブリン・ポリソームを3'末端のポリアデニル酸を利用してハイブリダイズ法により固定化し、カイコ絹糸腺の cell-free 系を用いてフィブリンの合成を行っている。

最近われわれはこの系を発展させ、固定化 mRNA と酵母細胞より抽出した cell-free 系を組み合わせることによって mRNA の情報が翻訳され、タンパク質の合成が進行することを明らかにした⁹⁾(図2)。

図2. 生体外タンパク質合成

4. 無細胞系の調製

タンパク質合成の無細胞系は、Gasior らの方法¹⁰⁾に従い酵母細胞 (*Saccharomyces cerevisiae*) より調製する。酵母を YEPD 培地で培養して対数増殖期に集菌する。菌体をガラスビーズ ($\phi=0.5\text{mm}$) で破碎し、 $30,000\times g(10\text{min})$ 、 $100,000\times g(30\text{min})$ の超遠心上清をセファデックス G-25 カラムに通して低分子物質を除去して無細胞系として用いる。この無細胞系にはリボソーム、tRNA、各種酵素、各種タンパク質合成因子、そのほかのタンパク質合成に必要な成分が含まれている。

5. タンパク質合成

酵母の無細胞タンパク質合成系に、原料アミノ酸 ($[^3\text{H}]$ フェニルアラニン)、エネルギー源として ATP、GTP、エネルギー再生系としてクレアチンリン酸、クレアチンホスホキナーゼ、適当な塩を混合した反応液に、mRNA を添加して反応を開始する。反応は 20°C で行い、タンパク質合成の確認は、反応液中の酸不溶性画分の放射活性を測定することにより行う。

まず、調製した無細胞系のタンパク質合成能を調べるため、モデル mRNA として poly(U) の翻訳を行った。無細胞タンパク質合成系に添加する poly(U) の濃度を変化させ、 20°C で1時間反応させた後反応液の酸不溶性画分に取り込まれる $[^3\text{H}]$ Phe の放射活性を測定する。その結果、添加した poly(U) の濃度に比例してポリフェニルアラニン生成量が増加することが示される(図3)。この結果より、抽出した酵母の無細胞系が十分な翻訳活性を有していることが示される。

図3. 酵母無細胞系による poly(U) の翻訳

6. 固定化 mRNA の翻訳

固定化の方法は、核酸の塩基間の相補性を利用した水素結合(ハイブリダイゼーション)により行う。すなわち、poly(U) は oligo(dA) セルロースに固定化できる。

poly(U) 固定化セルロースを酵母無細胞系とともにインキュベートし、 $[^3\text{H}]$ Phe 取り込みを測定すると、添加する poly(U) 固定化セルロースの濃度に依存した取り込みが認められる。また取り込みの経時変化(図4)は、3時間程度まで反応時間の経過とともにポリフェニルアラニンの合成が認められる。以上の結果は、鋳型 mRNA が担体に固定化された状態で

図4. poly(U) 固定系での翻訳

図5. アミノ酸供給による poly(U) の翻訳

も翻訳され、タンパク質が生成することを示している。

この系で、2 時間毎に反応溶液に $[^3\text{H}]$ Phe を添加し、酸不溶性画分の放射活性を測定してみると図5 に示す結果が得られる。 $[^3\text{H}]$ Phe 無添加の系では、酸不溶性画分の放射活性は、6 時間反応後も 2 時間反応時と同一のレベルであり、合成反応がほとんど進行していないことを表している。これに対し、 $[^3\text{H}]$ Phe を経時的に添加した系においては、放射活性の顕著な上昇が認められ、アミノ酸の添加によりポリフェニルアラニンの合成反応が持続することを示している。この結果は、タンパク質合成の原料となるアミノ酸を連続的に反応槽に供給することにより、タンパク質の連続生産が可能であることを示唆している。

また、酵母細胞やマウスミエローマ細胞より抽出した mRNA を 3' 末端の poly(A) 部位を利用して、oligo(dT) セファロースに固定化し、酵母の無細胞系を用いて翻訳反応を行ってみても、固定化 mRNA を添加した系においては $[^3\text{H}]$ Phe の取り込みが認められる。したがって、この系が異種細胞の mRNA の翻訳においても有効で汎用性の広いタンパク質生産システムになり得ることが予測される。

10. おわりに

本研究を通して、mRNA を固定化した状態で翻訳が可能であることが示され、タンパク質連続生産の可能性が示唆された。今後、フロー系を適用するなどし

てタンパク質の合成量を増加させることが課題である。実用化には解決すべき問題が残されているが、ここで示した無細胞タンパク質合成系は、従来の細胞を用いた手法に代わる新しいタンパク質生産の方法となり得る可能性を秘めているものと期待している。

文 献

- 1) Jackson, D., Symons, R., and Berg, P., (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **69**, 2904
- 2) Cohen, S., Chang, A., Boyer, H., and Helling, R., (1973) *ibid.*, **70**, 3240
- 3) Nirenberg, M. W. and Matthaei, J. H., (1961) *ibid.*, **47**, 1588
- 4) Schweer, R. S., Lamform, H., and Allen, E., (1958) *ibid.*, **44**, 1029
- 5) Roberts, B. E. and Paterson, B. M., (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **70**, 2330
- 6) Spirin, A. S., Baranov, V. I., Ryabova, L. A., Ovodov, S. Y., and Alakhov, Y. R., (1988) *Science*, **242**, 1162
- 7) Baranov, V. I., Morozov, I. Y., Ortlepp, S. A., and Spirin, A. S., (1989) *Gene*, **84**, 463
- 8) Ikariyama, Y., Aizawa, M., and Suzuki, S., (1979) *J. Solid Phase Biochem.*, **4**, 279
- 9) Kobatake, E., Ikariyama, Y., and Aizawa, M., (1991) *Biotech. Bioeng.*, **37**, 723
- 10) Gasior, E., Herera, F., Sacnik, I., McLaughlin, C. S., and Molodave, K., (1979) *J. Biol. Chem.*, **254**, 3965