タンパク質合成系を利用した アミノ酸の鋳型重合

新田 至 Itaru NITTA | 上田卓也 Takuya UEDA | 渡辺公綱 Kimitsuna WATANABE 東京大学大学院工学系研究科

配列が制御されたポリペプチドの生産法として、タンパク質合成系の有用性がクローズアップされている。また、芳香族三級アミンを利用したタンパク質合成系の開発を契機に、遺伝情報発現の起源を探ることも夢ではなくなりつつある。本報では、これら応用および基礎の両側面より、タンパク質合成系に関する研究の現状を紹介する。

はじめに

生体内では、生命を維持し自己を複製するために、種々の生化学反応が営まれており、これらの反応には、人類に有益なものが多い。タンパク質合成反応も、鋳型分子(mRNA)が指定するシーケンスに従って高速(毎秒18個のアミノ酸を重合)かつ高精度(数万回に1回以下の誤訳)に常温(37℃)常圧(1気圧)下でアミノ酸を重合するという縮合系高分子合成反応と解釈すれば、極めて興味深かつ利用価値の高い生化学反応といえる。E. Fischer がグリシンとロイシンからなるオクタデカペプチドを化学合成して以来88年を経た今日、ペプチド合成法の進歩には目を見張るものがあるが、生命の妙技にははるかに及びもつかないのが現状である。生体を用いたタンパク質の生産法には、遺伝子組み換え技術によって生細胞に目的タンパク質を大量発現させる *in vivo* 法と、タンパク質合成系だけを生体から取り出して試験管内で稼働させる *in vitro* 法がある。*in vivo* 法は、比較的安価にタンパク質の大量合成が可能で、現在最も利用価値が高い。しかし生細胞を用いるため、細胞の増殖や生存に有害なタンパク質の生産は困難であり、また特別な場合を除いて、非天然型のアミノ酸を利

用することもできない。一方、*in vitro* 法には生細胞を使用することに由来する制約が存在せず、高分子量のタンパク質を汎用的に高効率で生成できる可能性があるが、これまでの検討では、得られるタンパク質の収量が極めて低く、通常アイソトープレベルの合成量しか得られていなかった。しかし、1988年、A. S. Spirin ら(ロシア、蛋白研)は連続生体外タンパク質合成系を開発、収量の飛躍的増大に成功し¹⁾、一挙に実用化の期待が高まっている。

図1には、タンパク質の生合成に関与する分子種を模式的に示した。リボソームは数十種類のリボソームタンパク質と数種類のリボソームRNA(rRNA)から構成される大、小2個のサブユニットの会合体で、その基本的な構成はすべての生物種に共通である。そして、タンパク質合成の活性中心はリボソームタンパク質に存在し、rRNAはリボソームの骨組みを維持しているにすぎないとい歴史的には考えられてきた。しかし、ある種のRNAに触媒活性のあること(リボサイム)が発見され²⁾、さらにタンパク質合成の各過程でmRNAを初めとして転移RNA(tRNA)やrRNAが反応に直接関与していることを示す実験事実が多量に集積されるに及んで、実はタンパク質合成の活性中心は、rRNAに存在するのではないかとの考えが徐々に広まってきた³⁾。このことは、卵と鶏の関係にある核酸とタンパク質のどちら

Template-dependent Polymerization of Amino Acids by Utilizing Protein Synthesis Systems

新田 至 東京大学大学院工学系研究科化学系生命工学専攻(113 東京都文京区本郷7-3-1)助手(写真左)
1984年京大大学院工学研究科修士課程修了。住友化学工業(株)を経て、1995年より現職。〈趣味〉ドライブ
上田卓也 同上・講師、農博(写真中央)
1979年東大農学部農芸化学科卒、1984年大学院農学系研究科博士課程修了。マックスプランク実験医学研究所、横浜市立大木原生物研究所、東工大生命理工学部、東大工学部助手を経て、1994年より現職。〈趣味〉スポーツ
渡辺公綱 同上・教授、理博(写真右)
1967年東大教養学部基礎科学科卒、1972年大学院理学系博士課程修了。三菱化成生命科学研究所、マックスプランク実験医学研究所、東大農学部・工学部助教授、東工大生命理工学部教授を経て、1991年より現職。

図1 タンパク質の生成に関与するタンパク質とRNA

が先に原始生命体として出現したかと言う、分子生物学最大のパラドックスに対し、「生命は自己複製能を有するRNAに端を発した」とすることでこの矛盾を解決しようとするRNAワールド仮説⁴⁾に大きな根拠を与えることになった。

このように、タンパク質合成系の研究は、物質生産という応用的側面に役立つばかりでなく、分子生物学の根本問題に迫るという基礎的側面への展開の可能性をも兼ね備えている。ここではこれらの両側面における生体外蛋白質合成の研究の最近の進展状況を、著者らの研究成果も織り混ぜながら概観したい。

1. *in vivo* タンパク質合成法

Tirrell ら (米・マサチューセッツ大) は、逆平行βシートとβターンが規則的に配列されたラメラ構造や、細胞接着性などの機能を有するタンパク質のアミノ酸シーケンスを人工的にデザインし、これらの遺伝子工学的発現を検討した結果、絹類似のシーケンスにβターン部位が組み込まれた $-\text{[Ala-Gly]}_n\text{-Gly-Pro-Glu-}$, $-\text{[Ala-Gly]}_n\text{-Glu-Gly-}$ ($n=3-6$) というシーケンスをもつタンパク質の大量合成に成功している⁵⁾。その際用いられた手法は、目的とするアミノ酸シーケンスをコードしているオリゴヌクレオチドを、制限酵素とDNA連結酵素を用いてベクター・プラスミドに導入し、これで形質転換した大腸菌を増殖後、目的タンパク質を誘導するというオーソドックスなものである。この方法は遺伝子工学的手法が高分子材料の合成方法としても有用であることを示したものとして注目されている。

図2 連続式生体外タンパク質合成系の概念図

彼らは、得られたタンパク質の一次構造を確認したのち、これらタンパク質の高次構造を解析し、計算機による分子設計の結果と比較している。

2. 生体外タンパク質合成法

2-1. 連続流動式合成システム

Spirin ら (ロシア・蛋白研) は大腸菌と小麦胚芽の生体外タンパク質合成系を用いて連続流動式合成システムを開発し、タンパク質の大量生産への道を拓いた⁶⁾。すなわち、図2に示すように、メンブレンを装着した限外濾過装置で生成したタンパク質を分離しながら、アミノ酸とエネルギー源を連続的に供給することにより、通常1時間以内で頭打ちになる合成反応を数十時間まで延ばすことに成功した。mRNAを鋳型としてこの反応系により、カルシトニン、MS2 ファージコートタンパク、ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) などの比較的分子量のタンパク質を0.1 mg/mLのオーダーで合成できることが報告されている。近年、彼らは1 Lスケールの大量生産を目的として、反応系を直径0.1 mmのポリサッカリド小球に封入し、この小球をカラムに充填した反応カラムを開発している⁶⁾。

遠藤ら (愛媛大) は、大腸菌 DHFR の mRNA を鋳型として15時間以上の連続流動合成を行い、57 mg の DHFR や 18 mg のヘモグロビンを得ている⁷⁾。横山ら (東大) は、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) の長時間連続合成に成功し、0.1 mg の CAT タンパク質を得ている⁷⁾。

2-2. 生体外タンパク質合成系の高活性化

生体外タンパク質合成系が低効率である理由の一つに、mRNAの不安定性があげられる。この問題を回避すべく mRNA の合成 (転写) とタンパク質合成を同時に行う系が Zubay ら⁸⁾や Spirin ら⁶⁾によって開発されている。さらに Spirin らは、Qβ-レプリカーゼによる

mRNA の複製と翻訳を同時に行う系も開発している⁹⁾。また Hecht ら (米, バージニア大) は, DHFR 遺伝子を Polymerase Chain Reaction (PCR) 法で大量増幅後, T7 RNA ポリメラーゼによる *in vitro* 転写系により mRNA を調製し, 大量発現に成功している¹⁰⁾。大島ら (東葉大) は, ネオマイシン存在下で DNA を直接鋳型とする生体外翻訳を, 高度好熱菌由来の系で開発している¹¹⁾。

さらに, mRNA 自身の安定化の試みもなされている。我々は, mRNA のホスホジエステル結合部位に硫黄を導入したホスホチオエート mRNA (チオ mRNA) を, T7 ファージ DNA を鋳型としてヌクレオシド 5'-O-(1-チオ三リン酸) から *in vitro* 転写によって合成し, このチオ mRNA が大腸菌や高度好熱菌の生体外タンパク質合成系で, 天然型 mRNA を上回る鋳型活性を示すことを見いだしている⁷⁾。この活性の上昇はチオ mRNA の RNA 分解酵素に対する抵抗性に起因することを証明し, 生体外タンパク質合成系におけるチオ mRNA の有効性を示した。

平尾 (東葉大) と三浦ら (学習院大) は, mRNA の 3' 末端に相補的な短鎖 DNA フラグメントをハイブリダイズさせることにより, 生体外タンパク質合成系内での mRNA の安定性を向上できることを見いだした⁷⁾。

さらに, リボソーム不活性化機構の解明¹²⁾, マグネシウム濃度の最適化¹³⁾, ポリアミン添加¹⁴⁾, 反応系の濃縮¹⁵⁾などの条件検討により, 生体外タンパク質合成系をパッチで構築した場合でも, 1 mg/mL オーダーでのタンパク質生産が可能との報告がある。

3. 有機溶媒を用いたタンパク質合成

最近, われわれは, ピリジンと水溶液から構成される。有機溶媒-水の混合系において, 可溶性タンパク質因子やアデノシン 3 リン酸 (ATP), グアノシン 3 リン酸 (GTP) を一切必要とすることなく, 生体外タンパク質合成が進行することを発見した¹⁶⁾。この系は, アミノアシル tRNA, mRNA, リボソーム, K^+ と Mg^{2+} そしてピリジンのみから構成されており, クロラムフェニコールなどの原核生物のタンパク質合成を阻害する各種の抗生物質で阻害される。このことは, 従来の水溶液系に比べ, このピリジン系は極めて単純化されているものの, 基本的な合成メカニズムは従来と同様であることを意味している。さらに, ポリウリジル酸「ポリ (U)」を鋳型としてフェニルアラニル tRNA よりオリゴフェニルアラニン「オリゴ (Phe)」を合成する場合を例に取り, ピリジン濃度が収率に与える影響を図 3 に示した。○はポリ (U) が存在している場合, ●は存在していない場合で, 反応温度は 37°C, 反応時間は 1 時間である。ポリ (U) の有無に

図 3 ポリ (U) 依存オリゴ (Phe) 合成効率のピリジン濃度依存性

関係なく, ピリジン濃度 50% の場合が最も高収率 (69.5%) であるが, ピリジン濃度が 60% 近傍の場合, ポリ (U) の存在による収率の上昇が最も顕著であり, このことは重合反応に鋳型依存性が出現したことを意味する。

有機溶媒中で酵素を用いることによって高分子を合成する試みは, 小林ら (東北大) によっても精力的に検討されている¹⁷⁾。彼らは, 数種の有機溶媒と緩衝溶液の混合系中でセルラーゼにより, フッ化 β -D-セロピオシルから選択的に β (1 $\rightarrow$ 4) グリコシド結合を形成することにより, *in vitro* セルロース合成に成功している。さらに, リパーゼによるポリエステル合成やペルオキシターゼなどによる酸化重合が有機溶媒中で進行するとの報告もある。

4. リボソームの活性中心と RNA ワールド仮説

ところで, ピリジンは最も簡単な芳香族三級アミンであり, 芳香族三級アミン類は広く求核置換反応を触媒することが知られている。そしてタンパク質合成の重要な素過程であるペプチド結合形成反応は, リボソーム上で進行する典型的な求核置換反応であり, ピリジンはこの反応を促進していると考えられる。我々はこの考え方をさらに進め, プリン, ピリミジン, さらにアデニンやシトシンなどの核酸塩基にも同様の効果があることを見出した¹⁸⁾。図 4 には, 核酸塩基類としてアデニン, グアニン, シトシン, チミン, ウラシルを用い, これらの濃度に依存してタンパク質合成が促進されるか否かを示したものである。なお, アデニンおよびグアニンの飽和溶解度は, それぞれ 5 および 0.5 mM である。この図より, アデニンとシトシンは活性化効果を有していることがわかるが, これらの塩基にはピリジンと同様, 分子内に芳香族性の窒素 (図の構造式中○で囲んだ部分) が存

図4 核酸塩基類の添加によるタンパク質合成の促進

にしている。この結果は、原始タンパク質合成系でも RNA に存在する核酸塩基類の芳香族性窒素が直接関与していたのではないかと考えるを抱かせる。

タンパク質合成の基本反応に RNA が直接関与する可能性は、Nierhaus ら¹⁹⁾ (独, マックスプランク研) や Noller ら²⁰⁾ (米, カリフォルニア大) によって報告されている。特に Noller らは、高度好熱菌のリボソーム大サブユニットに対し、界面活性剤存在下にタンパク質分解酵素で処理後、さらにフェノールで入念に除タンパク質処理を行っても、ペプチド結合形成反応は失われないことを報告した²⁰⁾。われわれは、最近、上述のピリジン存在下のタンパク質合成系であれば、同様に殆ど除タンパク質処理されたリボソームが鋳型依存的にタンパク質合成を行うことを確認している²¹⁾。

おわりに

非天然型のアミノ酸が導入されたタンパク質の合成は生体外タンパク質合成系の有用な応用例である。横山らは、非天然型アミノ酸のアミノアシル tRNA 合成酵素による誤認を利用し、また Schultz ら (米・カリフォルニア大) は、非天然型アミノ酸が人工的にチャージされたアンバーサプレッサー tRNA でアンバーコドンを抑止させることにより、それぞれ非天然型アミノ酸の導入に成功している²²⁾。また、穴戸ら (岡山大) は、アルギニンのマイナーコドンである AGG を非天然型アミノ酸に割り当て、2-ナフチルアラニンや 2-アンスリルアラニン、さらにトランスアゾベンジルアラニンが導入されたタンパク質を合成し、これらをモノクローナル抗体により精製する方法を確立している²³⁾。前二者については蛍光プローブや光増感基としての機能が、後者についてはアゾベンゼン基の光異性化による光スイッチとしての機能が検討されている。

タンパク質合成系の研究は物質生産の観点からだけではなく、翻訳系のメカニズム解明にも役だっており、その成果を通じて、翻訳系の起源を探ることも夢ではなくなりつつある。今後のこの分野の進展が期待される。

文 献

- 1) A. S. Spirin, V. I. Baranov, L. A. Ryabova, S. Yu. Ovodov, Yu. B. Alakhov: *Science*, **242**, 1162 (1988)
- 2) T. R. Cech, A. J. Zaug, P. J. Grabowski: *Cell*, **27**, 487 (1981)
- 3) H. F. Noller: *Annu. Rev. Biochem.*, **60**, 191 (1991)
- 4) 大澤省三, 志村令郎: RNA の世界, 講談社サイエンティフィク (1990) p. 24
- 5) M. T. Krejci, E. D. T. Atkins, A. J. Waddon, M. J. Fournier, T. L. Mason, D. A. Tirrell: *Science*, **265**, 1427 (1994)
- 6) A. S. Spirin: *Frontiers in Bioprocessing II*, ACS (1992) p. 31
- 7) 達藤弥重太, 横山茂之, 渡辺公綱, 三浦謹一郎: 蛋白質・核酸・酵素, **37**, 430 (1992)
- 8) J. K. DeVries, G. Zubay: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **57**, 1010 (1967)
- 9) V. I. Ugarov, I. Yu. Morozov, G. Y. Jung, A. B. Chetverin, A. S. Spirin: *FEBS Lett.*, **341**, 131 (1994)
- 10) E. Resto, A. Iida, M. D. V. Cleve, S. M. Hecht: *Nucleic Acids Res.*, **20**, 5979 (1992)
- 11) 鶴沢武俊, 野地博行, 山岸明彦, 大島泰郎: 生化学, **66**, 738 (1994)
- 12) 吉成茂夫, 吉田真二, 達藤弥重太: 同上
- 13) A. Bartetzko, K. H. Nierhaus: *Methods Enzymol.*, **164**, 650 (1988)
- 14) T. Uzawa, A. Yamagishi, T. Ueda, N. Chikazumi, K. Watanabe, T. Oshima: *J. Biochem.*, **114**, 732 (1993)
- 15) H. Nakano, T. Tanaka, Y. Kawarasaki, T. Yamane: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 631 (1994)
- 16) I. Nitta, T. Ueda, K. Watanabe: *J. Biochem.*, **115**, 803 (1994)
- 17) 小林四郎, 正田晋一郎, 宇山 活: 有機合成化学, **52**, 754 (1994)
- 18) T. Ueda, I. Nitta, T. Nojima, K. Watanabe: *Translational Control*, Cold Spring Harbor (1994) p. 228
- 19) H. Schulze, K. H. Nierhaus: *EMBO J.*, **1**, 609 (1982)
- 20) H. F. Noller, V. Hoffarth, L. Zimniak: *Science*, **236**, 1416 (1992)
- 21) 新田 至, 上田卓也, 野島高彦, 渡辺公綱: 投稿予定
- 22) 近角信利, 渡辺公綱: *BIO INDUSTRY*, **8**, 749 (1991)
- 23) 穴戸昌彦: 高分子, **43**, 632 (1994)