

10S コンホメーション形成に重要な役割を果たす可能性が示唆された。78-81 残基領域には Lys 残基が二つ含まれており (ホタテ貝 ELC では Met と Cys になっている), これらが例えば S2 の負電荷領域と相互作用することによって頭部が尾部側に向き, 露出した頭部・尾部連結部に尾部が結合して 10S コンホメーションが形成されるのかもしれない。

4. 終わりに

長い間はっきりしていなかった ELC の機能が少しずつ明らかになり, ELC も平滑筋ミオシンのモーター活性のリン酸化依存調節やコンホメーション変換・フィラメント形成において重要な役割を果たしていることがわかってきた。詳細な相互作用部位の解明がまだ残されているが, 平滑筋ミオシンに見られた ELC が導く活性化機構と同様の機構が軟体動物であるホタテ貝のミオシンの調節機構にも存在する可能性もある。また, 脊椎動物の骨格筋ミオシンではどうなのだろうか。今後の進展が期待される。

- 1) 加藤剛志 (1999) 生化学, 71, 290-294.
- 2) Dominguez, R., Freyzon, Y., Trybus, K.M., & Cohen, C. (1998) *Cell*, 94, 559-571.
- 3) Konishi, K., Kojima, S., Katoh, T., Yazawa, M., Kato, K., Fujiwara, K., & Onishi, H. (2001) *J. Biochem.*, 129, 365-372.
- 4) Trybus, K.M., Freyzon, Y., Faust, L.Z., & Sweeney, H.L. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 48-52.
- 5) Li, X., Saito, J., Ikebe, R., Mabuchi, K., & Ikebe, M. (2000) *Biochemistry*, 39, 2254-2260.
- 6) Sweeney, H.L., Chen, L-Q., & Trybus, K.M. (2000) *J. Biol. Chem.*, 275, 41273-41277.
- 7) Wendt, T., Taylor, D., Trybus, K.M., & Taylor, K. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 4361-4366.
- 8) Shen, S., Alexander, Y. G., Somlyo, A.V., & Somlyo, A.P. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 39892-39896.
- 9) Hasegawa, Y., Ueno, H., Horie, K., & Morita, F. (1988) *J. Biochem.*, 103, 15-18.
- 10) Malmqvist, U. & Amer, A. (1991) *Pflügers Arch.*, 418, 523-530.
- 11) Hasegawa, Y. & Morita, F. (1992) *J. Biochem.*, 111, 804-809.
- 12) Katoh, T. & Morita, F. (1997) *J. Biochem.*, 121, 56-62.
- 13) Katoh, T. & Morita, F. (1996) *J. Biol. Chem.*, 271, 9992-9996.
- 14) Katoh, T., Konishi, K., & Yazawa, M. (2002) *J. Biochem.*, 131, 641-645.
- 15) Gillis, J.M., Cao, M.L., & Godfraind-De Becker, A. (1988) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 9, 18-28.
- 16) Xu, J-Q., Gillis, J.M., & Craig, R. (1997) *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 18, 381-393.
- 17) Katoh, T., Takeuchi, M., Ishida, A., & Taniguchi, T. (2006) *Seibutsu Butsuri*, 46, S202.

加藤 剛志

(旭川医科大学学生化学講座 (細胞制御科学分野))

Function of essential light chain and phosphorylation-dependent regulation in smooth muscle myosin

Tsuyoshi Katoh (Department of Biochemistry, Asahikawa Medical College, Midorigaoka Higashi 2-1-1-1, Asahikawa 078-8510, Japan)

ヒト細胞由来無細胞タンパク質合成システムの魅力

はじめに

無細胞 (セルフリー) タンパク質合成システムは組換えタンパク質を合成するための有用な手段であり, 大腸菌やコムギ胚芽の抽出液をベースにしたシステムはすでに商品化され多くの研究者に利用されている。一方, 哺乳類細胞, 特にヒト細胞由来のセルフリータンパク質合成システムも大腸菌やコムギ胚芽に無い特徴を生かしながら急速に発展してきている。本ミニレビューにおいてはヒト細胞抽出液由来のセルフリータンパク質合成システムの有用性について, そしてその魅力について解説したい。

1. なぜ動物細胞由来無細胞システム?

リコンビナントタンパク質を手に入れた場合, まず生きた大腸菌を考えるであろう。うまくいかない場合は, 酵母, 昆虫細胞そして動物細胞で発現させることを考える。それでもうまくいかない場合セルフリー系を使う, というのが一般的な順序であろう。生きた細胞での発現がうまくいかない理由は, [1]毒性があり細胞内で一定量を超えると細胞死に至る, または増殖が阻害される, [2]分解されやすい, などが考えられる。セルフリー系は細胞を一度殺し, 液体として都合よく生き返らせた系であり, 発現させるタンパク質が生きた細胞にとって毒性があってもセルフリー系で合成できる場合がある。また, 工夫次第では分解を避けながらタンパク質を合成できる。セルフリー系の価値はこれだけではない。[1]放射性同位元素や修飾アミノ酸の取り込みが容易であり, X線やNMRによるタンパク質の解析のための試料調製に威力を発揮する, [2]タンパク質のスクリーニング, 例えば cDNA ライブラリーからタンパク質を発現させて, cDNA 産物を網羅的にスクリー

ニングする場合に有用である。大腸菌¹⁾やコムギ胚芽²⁾のセルフリースシステムはこれらの価値を背景に確立されてきた。

では、なぜより経費のかかる動物細胞を使いセルフリースシステムを立ち上げるのか？ それはまずその細胞種の多さにある。神経系、免疫系、内分泌系細胞などそれぞれに分化した細胞が株としてセルバンク（例えば理化学研究所BRC）に保存されている。それをうまく利用すれば特徴あるセルフリース系を樹立することができる。例えば糖タンパク質をセルフリース系で合成したい場合、ハイブリドーマを選択する。ハイブリドーマはモノクローナル抗体（糖タンパク質）を大量に産生するため、この細胞から作製したセルフリースシステムは効率よく糖タンパク質を合成することができる³⁾。また、動物細胞は一般的に比較的大きなタンパク質を合成することができるため、工夫次第ではセルフリース系で生きた細胞を使うよりも遥かに簡単に大型タンパク質を合成できるようになる⁴⁾。動物細胞由来セルフリースシステムのもう一つの利点は医学、薬学への応用に直結させることができる、という点である。例えばRNAウイルスの試験管内合成である。RNAウイルスは核酸・タンパク質超高分子複合体であり、細胞内では複雑な工程により構築される。この過程をHeLa細胞由来セルフリースシステムで再現することができ、感染性のあるウイルスを合成することができる⁵⁾。このような系を利用すれば抗ウイルス薬のセルフリースクリーニングシステムを樹立できる。そして、ヒトに感染するウイルスを合成するためにはヒトまたは哺乳類由来のシステムを利用する必要がある。以下のセクションでこれらのヒト細胞由来セルフリースタンパク質合成システムの利点をより詳しく解説する。

2. 糖タンパク質のセルフリース合成

タンパク質の多くには糖鎖が付加されている。糖鎖の付加は小胞体（*N*-結合型）やゴルジ体（*O*-結合型）で行われ、細胞外に分泌されるタンパク質やリセプターなど細胞表面に局在するタンパク質の大部分が糖鎖付加の対象となる。糖鎖はホルモンとリセプターとの結合、細胞間の認識、タンパク質や細胞の保護に重要な働きをしている。また、小胞体における糖鎖付加は、その過程自体がタンパク質のフォールディングにおいて決定的な役割を演じている。ヒトのタンパク質の実に3分の1は糖タンパク質であることを考えると、益々糖タンパク質の研究が重要であることがわかる。

糖タンパク質をセルフリース系で合成するのは20年以上

も前から行われてきた。主に、ウサギ網状赤血球から作られたセルフリースタンパク質合成系にイヌの膵臓から得たミクロソームを添加する系である⁶⁾。しかし、これは異種の動物組織の抽出液を混ぜ合わせたちぐはぐな系であり、いくつかの問題点がある。まず、市販されている商品のロット間に活性のばらつきがあり、中にはほとんど活性を示さないものもある。研究者自身が自らの手で調製するのは簡単ではなく、動物保護の観点からしても2種類もの動物を殺傷するのは好ましくない。しかしながら、このような問題点は、培養細胞を原料にすれば解決する。ヒト（動物）培養細胞の中でセルフリースシステムの原料として最も一般

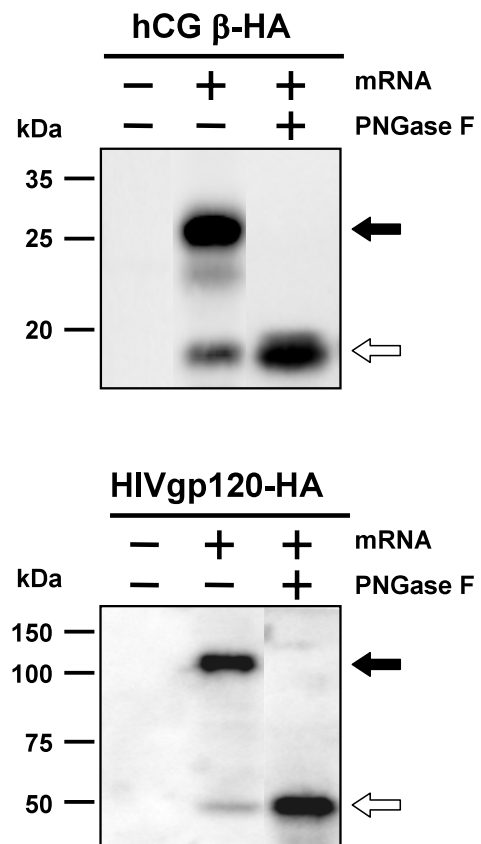


図1 ヒトホルモン（hCGβサブユニット）およびHIVエンベロープタンパク質（gp120）のセルフリース合成

ハイブリドーマ細胞由来の抽出液で構成したセルフリースシステムによって、各タンパク質（C末にヘマグルチニン（HA）タグを付加）をコードしたmRNAを翻訳した。各翻訳産物はHAに対する抗体を用いて検出した。

N-結合型糖鎖が付加した産物を黒塗りの矢印、糖鎖が付加されていない産物を白抜き矢印で示す。

翻訳反応後、ペプチド*N*-グリコサターゼ（PNGase F）で処理すると、分子量が減少することで糖鎖が付加されていたことがわかる。

的である細胞株は HeLa 細胞である。しかし分泌細胞でない HeLa 細胞はそれほど小胞体が発達しておらず、そこから確立されたセルフリー系では糖付加の効率は低い。その点を克服したのがハイブリドーマ由来のセルフリータンパク質合成系である (図 1)³⁾。ハイブリドーマは糖タンパク質である抗体を大量に合成するため小胞体がよく発達しており、セルフリー系においてもその能力を発揮する。このシステムでは O-結合型糖鎖付加は起こらず N-結合型糖鎖付加しか起こらないため、均一なサンプルを調製するのにちょうどよい³⁾。また、ヒトのハイブリドーマを使うとヒト型の糖鎖が付加されるためヒトのタンパク質の研究には好ましい。このシステムを利用して生物活性を持つホルモン複合体 hCG (human chorionadotropin) を合成できることも証明されている³⁾。

3. 大型タンパク質のセルフリー合成

生命活動で重要な働きをするタンパク質には大型なもの (150-200 kDa 以上) も多い。大概いくつかの機能ドメインを持ち、それぞれのドメイン機能が一つのタンパク質上で効率的に結びついている。しかし、各々のドメインの構造や機能はよく研究されてはいるが、タンパク質全体の研究となると、精製品調製の困難さ故に進んでいないものが多い。哺乳類細胞にはもともと大型タンパク質が多く、大型タンパク質を合成する能力自体は備わっている、と思われる。しかし、生きた細胞を用いた過剰発現系では、細胞毒性の問題や安定性の問題のため、なかなか量を得るのは難しい。そこでヒト (哺乳類) 細胞由来のセルフリータンパク質合成系が有用となる。タンパク質合成 (翻訳) においては、mRNA の翻訳開始が律速段階であるため、その障壁を破ることにより、細胞本来の能力を遺憾なく発揮させることができる。そこで、我々が確立したシステムでは以下のような工夫がされている (図 2)。

(A) mRNA の合成と翻訳開始を連動して行えるように転写・翻訳連動システムを採用している。系には T7 RNA ポリメラーゼが含まれているため、プラスミドの添加後 mRNA が合成され、速やかに目的タンパク質の翻訳開始に繋がるようになっている。

(B) 翻訳開始促進のため IRES (internal ribosomal entry site) を利用している。もともと動物細胞の場合、転写と翻訳は連動しておらず、また、mRNA の 5'末端にキャップ構造が存在している。抽出液中で mRNA を合成するには T7 RNA ポリメラーゼとそのプロモーターを有したプラスミドを添加するが、そのままではキャップ構造は付加

されない。キャップ構造を付加するためには高濃度のキャップアナログを系に添加する必要があるが、キャップアナログは極めて高価であり、mRNA に取り込まれなかったキャップアナログは逆に翻訳開始の阻害剤として働いてしまう。そこで我々はウイルス由来の IRES を利用することにした。IRES を有する mRNA には、リボソーム・翻訳開始因子複合体が 5'末端ではなく RNA の途中に結合することができ、翻訳開始にキャップ構造が必要ではない。様々な IRES を試した結果、脳心筋炎ウイルス (EMCV) と C 型肝炎ウイルス (HCV) の IRES が有効であることが判明した⁴⁾。

(C) 哺乳類抽出液由来のセルフリータンパク質合成系では翻訳開始因子 eIF2 (eukaryotic translation initiation factor 2) の α サブユニットが高度にリン酸化されてしまう。これは添加されている ATP あるいはその原料であるクレアチンリン酸が eIF2 α キナーゼを活性化してしまうからである³⁾。 α サブユニットがリン酸化されると eIF2 は機能低下を起こし、結果的にタンパク質合成量が低下する。ATP やクレアチンリン酸はタンパク質合成系の必須コンポーネントであるため高濃度を維持しなければならない。しかし、そのことが結果的に負の作用をしている。そこで、2種類のタンパク質、GADD34 と K3L の添加を行うことにより解決策を見出した。GADD34 はホスファターゼを eIF2 α にリクルートし、リン酸基の除去を促進する。一方、K3L はその構造が eIF2 α に似ており、eIF2 α キナーゼに対し擬似物質として働くためその活性を阻害する。この二つの因子を翻訳系に添加することにより懸念の問題点はほぼ解決された³⁾。更に合成量を上げたい場合はインキュベーションの方法を閉鎖系 (バッチ法) でなく透析法を選択すればよい⁷⁾。透析法ではアミノ酸や ATP の持続的供給、そして老廃物の速やかな除去が可能になり、セルフリーでのタンパク質合成量は更に上昇する。

以上の工夫により翻訳開始のバリアーが破られ、比較的大きなタンパク質でも持続的に合成できるようになった。実際この系で合成され、精製された大型タンパク質の機能解析が進んでいる⁴⁾。

4. RNA ウイルスのセルフリー合成

ウイルスは核酸とタンパク質の複合体であり、その複製過程を分子レベルで解析することは抗ウイルス剤の開発には不可欠である。そのため、細胞を使わずに試験管内でウイルス複製の過程を忠実に再現できる系を構築する必要がある。ウイルス粒子をゲノム RNA から試験管内で合

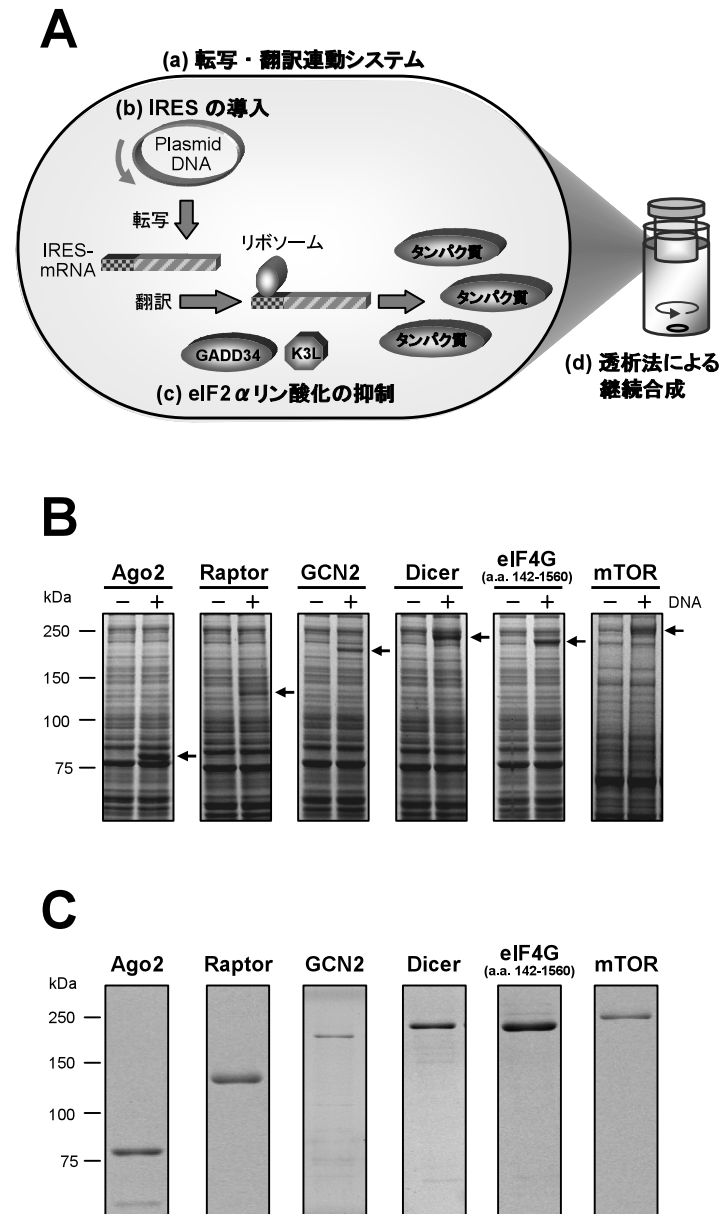


図 2 大型タンパク質のセルフフリー合成

本文中で述べたシステムを HeLa 細胞由来の抽出液で構成し (A), 各タンパク質を発現 (B), および精製 (C) した. いずれも CBB 染色で検出.

成することに最初に成功したのは Wimmer のグループである. 彼らはポリオウイルスのゲノム RNA を HeLa 細胞抽出液とインキュベーションし, ポリオウイルス粒子を合成した⁹⁾. その後 Svitkin らが脳心筋炎ウイルス (EMCV) のゲノム RNA から感染性 EMCV 粒子を試験管内で合成することに成功した⁹⁾. しかし, 総じてウイルスの合成量が低く, 効率のよい系の開発が待たれていた. そこで我々は

自分たちが開発してきたヒト細胞抽出液由来セルフフリーシステムを試したところ, EMCV の試験管内合成量が従来の 10 倍に跳ね上がった⁵⁾. EMCV RNA は一つの大きなポリプロテイン (2300 アミノ酸) をコードしており, 翻訳後, 自分自身がコードするプロテアーゼにより様々なウイルス由来タンパク質へと切断されていく. その中の一つが RNA 依存性 RNA 合成酵素 (RdRp) である. RdRp は他の

ウイルス性タンパク質と共役することによりウイルスゲノム RNA を複製する。複製された RNA はカプシドタンパク質と結合し、ウイルス粒子を形成する (図 3)。このプロセスを試験管内で再現するには、まず、大型タンパク質であるポリプロテインを効率よく合成しなければならない。大型タンパク質合成に焦点を合わせた我々のセルフリー系はこの目的に適合していたわけである。更に、透析法を用いることで持続的なウイルス合成も可能になった⁵⁾。また、転写・翻訳連動システムを導入することにより直接プラスミドから試験管内で EMCV を合成できるようにもなっている (小林ら, 未発表)。大腸菌やコムギ胚芽抽出液を用いた系ではヒトに感染するウイルス粒子の合成は不可能であり、ここにヒト細胞由来セルフリータンパク質合成系の価値が発揮されている。

おわりに

以上のようにヒト細胞由来セルフリータンパク質合成系は新たな価値を生み続けている。しかしながら、抽出液を使っている限り未知の物質が含まれており、それでは完全なセルフリー系とはいえない。特にプロテアーゼが常に存在している限り合成されたタンパク質が損傷を受けることは免れない。その点、大腸菌由来の PURE (protein synthesis using recombinant elements) システムはこれらの欠点を克服しており、理想的な系であるといえる¹⁰⁾。一日も早くヒトでの PURE システムが構築されることが望まれる。そうすれば、ウイルス複製などのプロセスが精製された因子だけで再現できるようになり、抗ウイルス剤の開発にも大きく役立つものと思われる。

謝辞 図の作製や実験を手伝っていただいた小林富成氏に感謝いたします。

- 1) Kigawa, T., Yabuki, T., Matsuda, N., Matsuda, T., Nakajima, R., Tanaka, A., & Yokoyama, S. (2004) *J. Struct. Funct. Genomics*, 5, 63–68.
- 2) Endo, Y. & Sawasaki, T. (2004) *J. Struct. Funct. Genomics*, 5, 45–57.
- 3) Mikami, S., Kobayashi, T., Yokoyama, S., & Imataka, H. (2006) *J. Biotechnol.*, 127, 65–78.
- 4) Mikami, S., Kobayashi, T., Masutani, M., Yokoyama, S., & Imataka, H. (2008) *Protein Expr. Purif.*, 62, 190–198.

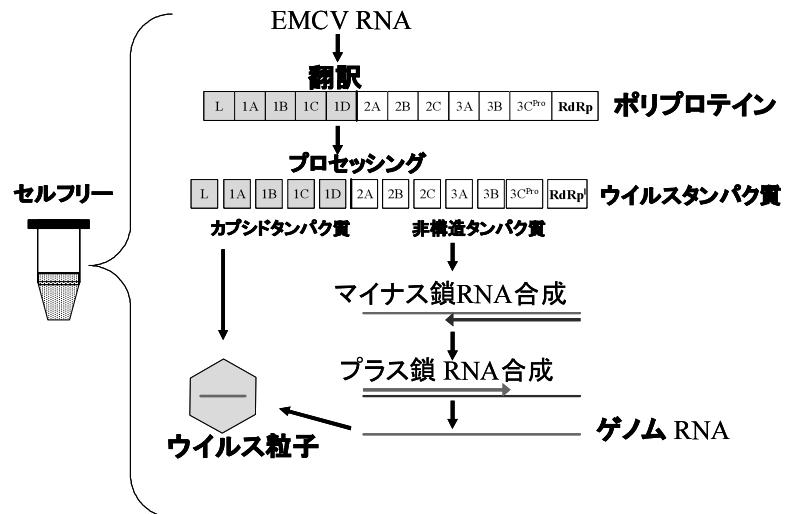


図 3 脳心筋炎ウイルスの翻訳から粒子形成

- 5) Kobayashi, T., Mikami, S., Yokoyama, S., & Imataka, H. (2007) *J. Virol. Methods*, 142, 182–188.
- 6) Walter, P. & Blobel, G. (1983) *Methods Enzymol.*, 96, 84–93.
- 7) Mikami, S., Masutani, M., Sonenberg, N., Yokoyama, S., & Imataka, H. (2006) *Protein Expr. Purif.*, 46, 348–357.
- 8) Molla, A., Paul, A.V., & Wimmer, E. (1991) *Science*, 254, 1647–1651.
- 9) Svitkin, Y.V. & Sonenberg, N. (2003) *J. Virol.*, 77, 6551–6555.
- 10) Shimizu, Y., Inoue, A., Tomari, Y., Suzuki, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K., & Ueda, T. (2001) *Nat. Biotechnol.*, 19, 751–755.

今高 寛晃^{1,2)}, 三上 暁²⁾

¹⁾ 兵庫県立大学大学院工学研究科物質系工学専攻,

²⁾ 独立行政法人理化学研究所
生命分子システム基盤研究領域)

Advantages of human cell-derived cell-free protein synthesis systems

Hiroaki Imataka^{1,2)} and Satoshi Mikami²⁾ (¹⁾Department of Materials Science and Chemistry, Graduate School of Engineering, University of Hyogo, Shosha 2167, Himeji, Hyogo 671–2201, Japan, ²⁾RIKEN Systems and Structural Biology Center, 1–7–22 Suehiro-cho, Tsurumi-ku, Yokohama 230–0045, Japan)