

コムギ無細胞タンパク質合成法

遠藤 弥重太, 澤 崎 達 也

遺伝情報からタンパク質をハイスループット合成する技術を確立することは、ポストゲノム研究に向けた必須課題である。生細胞を基盤とする従来の遺伝子発現方法には、生産できるタンパク質の分子種、量、品質等に限界があった。無細胞タンパク質合成法とは、生体の遺伝情報発現系を人工容器内に取り揃え、遺伝子 DNA からタンパク質を鋳型合成する試験管内合成法である。コムギ胚芽を翻訳酵素源とするコムギ無細胞系はその中でも、真核生物のマルチドメインタンパク質の合成に優れた性能を発揮する他にも多くの特性を備えている。ここでは、筆者らが最近開発に成功した、実用レベルのコムギ胚芽無細胞タンパク質合成法を紹介するとともに、これを基盤とした生命科学研究への応用について解説する。

1. はじめに

無細胞タンパク質合成法は、生細胞中のそれと同等のペプチド合成速度と正確性を保持しており、さらに、生きた生命体を利用しないので生理学的制約を受けることがなく、合成可能な分子種を飛躍的に拡大できることが期待できる^{1,2)}。しかしながら、試験管内へ取り出した翻訳酵素群のペプチド結合重合活性は低く、且つ不安定なことから得られる収量が極めて低く、タンパク質の調製法としては利用できなかった。A. Spirin らは、翻訳反応の進行に伴って消費される基質（アミノ酸、ATP、GTP）を反応槽へ連続的に供給すると同時に、合成されたタンパク質や翻訳阻害副産物（ピロリン酸等）を限外ろ過膜を通して反応系外へ排除する連続式無細胞タンパク質合成反応法（連続式翻訳反応方式）を考案した³⁾。実際、この反応法を用いて大腸菌抽出液を利用する無細胞タンパク質合成反応を行うと、従来のバッチ反応方式のタンパク質合成量を遙かに上回る収量を得ることができる⁴⁾。しかし、大腸菌には原核生物

に生来備わっている翻訳反応様式の特徴から、*in vivo* 系であれ *in vitro* 系であれ、真核生物に多いマルチドメインタンパク質を活性型フォームで合成することにもともと大きな限界があった^{5,6)}。すなわち、真核生物では *cotranslational domain folding* 方式、原核生物では *post translational folding* 方式であり、この機構の違いは、進化の過程で両生物種に至適化された結果であると考えられている。従って、遺伝情報翻訳特性を真核生物様式に改変することは、容易でない。実際、真核生物リボソームにおけるペプチド合成速度は、原核生物のそれに比べて1/5から1/10と遅く、これがリボソーム粒子上のフォールディングに重要な意味を持つらしいが、詳細は不明である。一方、ウサギ網状赤血球溶血液を酵素源とする無細胞系は、高等生物の遺伝子産物の同定手法として利用されてきた。しかし、tRNA種がグロビン mRNA のコドン使用に特化されていることや、溶血操作過程で網状赤血球膜から混入するリボスクレアーゼ M によって mRNA が消化されるためにタンパク質合成効率が低く、タンパク質の調製法としては利用できなかった⁷⁾。その他、酵母、植物種子、培養がん細胞、昆虫卵等を材料とする多くの真核生物無細胞系が開発されていたが、いずれも翻訳酵素群の不安定性に起因する低い合成収量の問題点があった。コムギ胚芽など高等生物である植物の種子胚芽は、発芽に備えて活性の高い大量の翻訳因子（胚芽重量の50%）を貯蔵しているため、無細胞系

愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター（〒790-8577
松山市文京町3番）

Wheat germ cell-free protein synthesis

Yaeta Endo and Tatsuya Sawasaki (Cell-Free Science and
Technology Research Center, Ehime University, 3 Bunkyo-
cho, Matsuyama 790-8577, Japan)

表1 代表的な無細胞系の性能比較

	大腸菌	ウサギ網状赤血球	コムギ胚芽
合成量 ^a	6mg	数μg	9.7mg
フォールディング	翻訳終了後	翻訳共役	翻訳共役
翻訳産物の品質 ^b	低い	高い	高い
翻訳コドンの選択性	狭い	狭い	広い
修飾反応 ^c	困難	可能	可能
膜タンパク質 ^d	可能	可能	可能
S-S結合の導入	可能	困難	可能
価格	低	高	低

a ; chloramphenicol acetyltransferase (大腸菌), 又は green fluorescent protein の反応液 1ml 当たりの合成量。

b ; 高等動物由来のマルチドメインタンパク質産物の酵素活性やリフォールディング未処理での抗原活性。

c ; 小胞体 (イヌ臍臓) 共存下におけるコア糖鎖の付加。

d ; タンパク質の生産は可能であるが不溶性で, 基本的には要リフォールディング処理。

調製の優れた材料であると考えられた。しかしながら, 従来のコムギ胚芽無細胞タンパク質合成系は, 他の無細胞系と同様に取り出した翻訳酵素系が不安定なために, タンパク質の調製法としては利用できなかった⁸⁾。表1に, 代表的な今日バージョンアップされた3種類の無細胞タンパク質合成法の性能をまとめた。

2. コムギ胚芽からの高効率・安定な翻訳酵素源の調製

無細胞タンパク質合成法は長い間トレーサー実験系として翻訳メカニズムの研究に利用されてきた。そして, 数百種の因子の関与する不安定な超分子複合体として翻訳反応が機能していることが明らかになるにつれ, タンパク質合成反応酵素系というものは本質的に脆弱であり, 試験管内で安定に機能するシステムを再構成することは不可能であると信じ込まれるようになった。筆者らは, 一群のリボソーム標的の不活性化タンパク質毒素 (ribotoxins) の作用機作を解明することから始め, それらを探査針としてリボソームの構造と機能を研究してきた⁹⁾。それらの研究で得た知見から, すべての無細胞系に一般的に見られる翻訳反応の不安定化現象は, 細胞破壊により起動する「翻訳系を標的とする生命体に備わった細胞自殺を伴う自己防御機構」の作動 (誤) に起因するものであると考えられるようになった。この考え方をもとにコムギ胚芽無細胞タンパク質合成システムの不安定化因子を追究したところ, リボソーム不活性化タンパク質を始めとして, 核酸分解酵素やタンパク質分解酵素などのタンパク質合成阻害因子群が, 胚芽の単離操作の過程でそれらの局在部位である種子の胚乳 (小麦粉を含む組織) から胚芽抽出液中に混入し, これらが翻訳反応の不安定化を引き起こしていることを見いだした。そこで, それらの翻訳阻害因子 (自殺因子) を排除する方策による無細胞系の効率化・安定化を試みた。その結果, 単

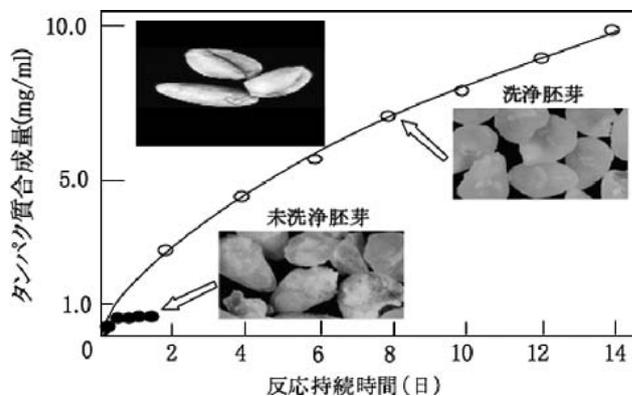


図1 洗浄胚芽から調製した抽出液を用いる無細胞法のタンパク質合成活性

図には, 未洗浄と洗浄胚芽と, それらから調製した抽出液を利用した連続方式による無細胞 GFP 合成の結果を示した。

位時間当たりの速度が従来の系に比べて著しく上昇するとともに, 従来は1時間程度で停止した合成反応が300時間(2週間)にも渡って持続するようになり, 大量のタンパク質を生産することができた¹⁰⁾ (図1)。自殺因子を排除したコムギ胚芽翻訳酵素 (抽出液) はきわめて安定で, -80°C の保存で5年を経ても活性低下は認められず, 凍結乾燥状態で長期保存も可能である。

以上の知見は, 従来の考え方とは逆に, “遺伝情報翻訳系というものはもとと極めて頑丈に作られている”ことを実証している。この考え方に立つと, どのような生物材料からでも“翻訳系を標的とする自殺因子群”を排除すれば, 高効率の無細胞系を構築することが可能であると思われる。我々が幸運であったのはコムギ種子を選んだ点にあって, 単離に便利な6倍体でサイズの大きい胚芽であることに加えて, 自殺因子群の局在する胚乳成分を胚芽から容易に排除することができたことであった。

3. 実用的な試験管内タンパク質合成法の開発

上記の安定・高効率なコムギ胚芽抽出液を重合酵素源として用いる高効率タンパク質合成法⁸⁾を基盤として, (1)高翻訳促進能を有する mRNA の5'末端及び3'末端非翻訳配列の設計, (2)専用高発現ベクターの構築, (3)新規改良PCR法を用いる転写鑄型構築法, (4)高効率翻訳反応方法, などのキー技術を開発することができた¹¹⁾ (図2)。一群のタンパク質合成阻害因子の排除によって, 真の翻訳律速反応のパラメーターがアミノ酸取り込み実験によって得られるようになり, 初めて要素技術の至適化が可能となった。これらの新規要素技術の要点は以下の通りである。

(1) 高い鑄型活性を付与する mRNA の5', 3'非翻訳配列の設計 (図3)

真核細胞 mRNA の5', 3'末端には, それぞれ CAP 構造とポリ A 配列が付加されており, 細胞質における翻訳制

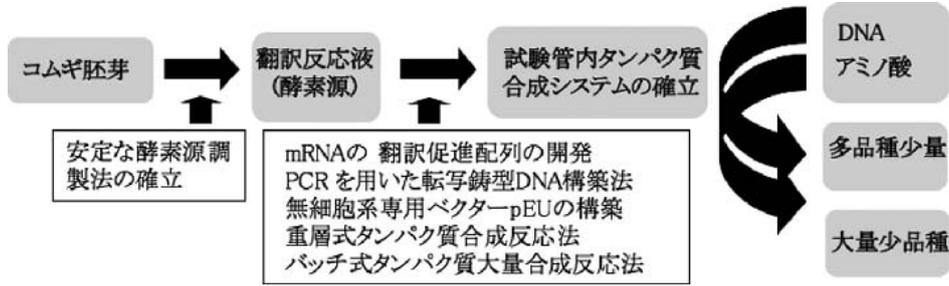


図2 開発した要素技術

(A) mRNAの5' 翻訳促進配列



(B) 人工的に選択した5' 翻訳促進配列

E01 (73塩基)

⁵GAACUCACCUAUCUCUCCCAACACCUAAUAACAUAUCAUAUCACUCUUUCCACUAACCACCUAUCUACAUCACCAA³

E02 (59塩基)

⁵GAACUCACCUAUCUCAUACAACUUUCAACUCCUAUUUCUACACAAAACAUUUCCCUAC³

(C) mRNAの鋳型活性

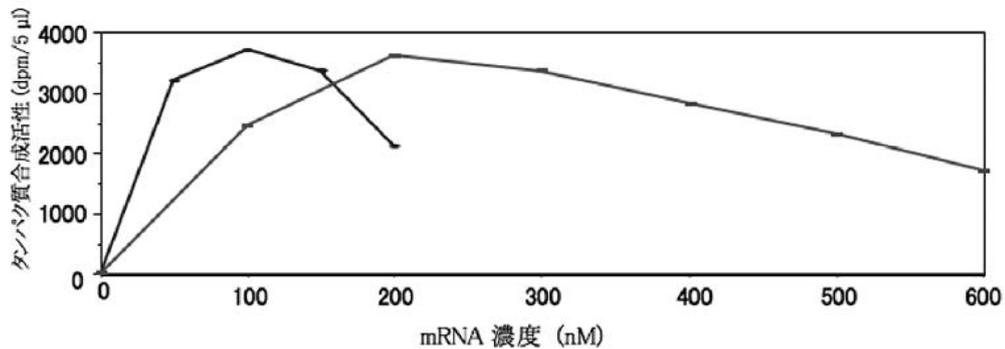


図3 mRNAの翻訳促進5'及び3'末端構造の開発

御等に深く関わっている。しかし、CAPアナログは高価であり、さらに翻訳至適濃度範囲を狭める欠点を持つことから、CAPやポリ A 配列に代わる、高い翻訳促進機能を備えた mRNA 末端構造をデザインすることが必要とされた。種々の RNA ウイルス+鎖の非翻訳部位 (UTR) に存在する翻訳促進配列を参考に検討した結果、我々は、5'翻訳促進配列としてタバコモザイクウイルスのオメガ (omega, Ω) 配列 (図 3-A) が、きわめて有効であることを確認した。一方、ポリ A 配列を与えるポリ dT は DNA 細工の際に扱いにくいので、mRNA の 3'UTR についても検討した。その結果、ポリ A 配列なしでも長鎖の RNA

(特別な塩基配列不要) の 3'末端への付加が鋳型分子の安定化に有効であることを見いだした。著者らは先に、タンパク質合成中のリボソームが、真核生物に特有の大きな環状ポリソーム構造をとっていることを明らかにしていた¹²⁾が、このコムギ胚芽無細胞系の特性を利用した polysome display 法で、新規 5'翻訳促進配列 (E02) (図 3-B) をランダムプールから人工的に選択することにも成功した¹³⁾。技術的な観点から重要な点は、これらの新規 5', 3'UTR の付加によって、mRNA の安定化と至適濃度が著しく広範囲になった (図 3-C) ことであり、個々の mRNA 濃度の至適化なしに、効率よくタンパク質合成ができるようになった

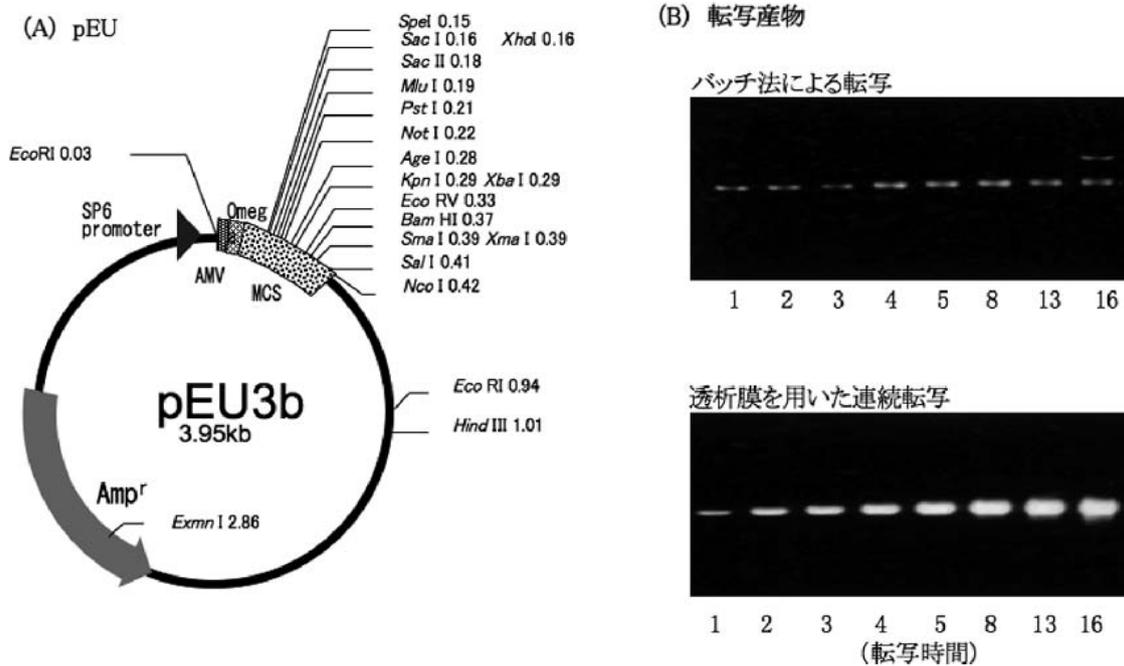


図4 コムギ無細胞系専用の発現ベクターの開発と、連続式転写反応法

たことである。

(2) 専用高発現ベクターの構築 (図4)

SP6やT7 RNAポリメラーゼのプロモーター配列、5'翻訳促進配列付加用配列、精製用やレポータータグ遺伝子配列を導入したコムギ胚芽無細胞系専用の発現ベクターpEUシリーズ(愛媛大学プラスミド)を構築した。実は図1では、pEUにクローン化したGFP遺伝子の転写産物を翻訳鑄型(ここでは、5'UTRとしてΩ配列を使用)として、透析膜を利用した連続翻訳方式(下述)によるGFP(クラゲ緑色蛍光タンパク質)の合成例を示した。このような方法によってタンパク質合成反応が2週間に渡って持続し、活性を保持した大量のGFP(9.7mg/ml反応液)を得ることができた¹¹⁾。タンパク質大量合成には大量のmRNAを必要とし、そのための転写反応はかなり高価になる。そこで、我々は、透析膜を利用する新規な連続式転写法を導入し、従来のバッチ転写反応法に比べて単位DNA量・RNAポリメラーゼ量あたり、7~8倍のmRNA収量を得ることに成功している。また、転写や翻訳反応で必要とされる酵素類については、コムギ無細胞系で生産したものを利用することができるようになった。

(3) Split-Primer PCR法の開発とハイスループット転写鑄型の構築法(図5)

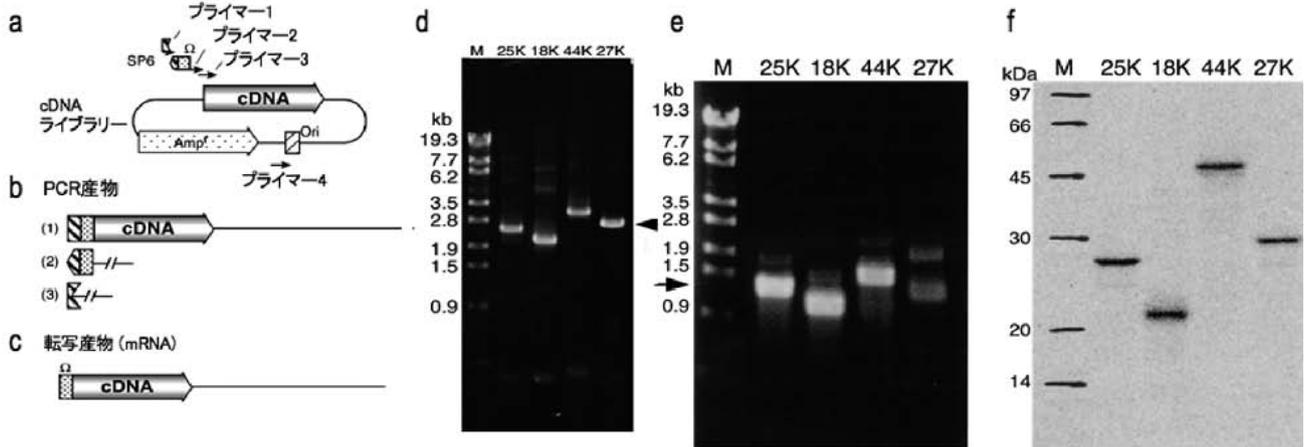
遺伝子産物の発現・機能スクリーニングには必ずしも大量の翻訳産物は必要としない場合が多い。一方、多数のcDNAからタンパク質を合成するに当たって、それら一つ一つpEUに再クローン化することは多大な労力を伴う。そこで、我々は、cDNAからPCR法によって上記の5'E02

配列、および3'長鎖RNA構造をコードする直鎖DNA転写鑄型を構築する方法を考案した。通常、このような目的のPCRには各遺伝子のORF(翻訳部位)に固有な塩基配列を含む1本のプライマーと3本の共通プライマーを準備するが、我々のデザインしたプライマーの特徴は、RNAポリメラーゼのプロモーター配列を2本の5'側共通のプライマーに分断させた点である(split-primer PCR法¹¹⁾)。本PCRではプライマーダイマーと呼ばれる人工副産物¹⁴⁾の生成を最小限に抑えることができることから、PCR条件の検討なしに設計どおりのDNA鎖を構築・増幅でき、フルサイズのmRNAを得ることができる。split-primer PCR法は、また、精製用タグやレポータータグとの融合体タンパク質合成用の鑄型DNA構築に極めて有効である。

(4) 新規翻訳反応方法の開発(図6)

A. Spirinらの開発した連続翻訳反応方式(図6-2)の欠点は、ポイントとなる透析膜が反応中に破れやすく、また、膜の品質管理が困難な点である。そこで、我々は2種類の反応方式、すなわち、重層式連続翻訳反応方式(図6-3)と、繰り返しバッチ翻訳反応方式(図6-4)を開発した。前者は、通常のバッチ反応の翻訳液の上にアミノ酸・エネルギー源を含む基質溶液を重層することによって保温中に生ずる両相間の拡散混和の原理を利用したもので、半透膜を用いることなく基質の連続供給と翻訳阻害副産物の連続的な希釈が可能になる¹⁵⁾。この方式の合成反応持続時間は、約6~12時間で、下層の翻訳液中の抽出液濃度に依存する。タンパク質合成収量は反応容量1ml当たり、数十μgから数百μgと少量ではあるが、多品種遺伝子産物

(A) “Split-Primer” PCR 法



(B) 従来のPCR法

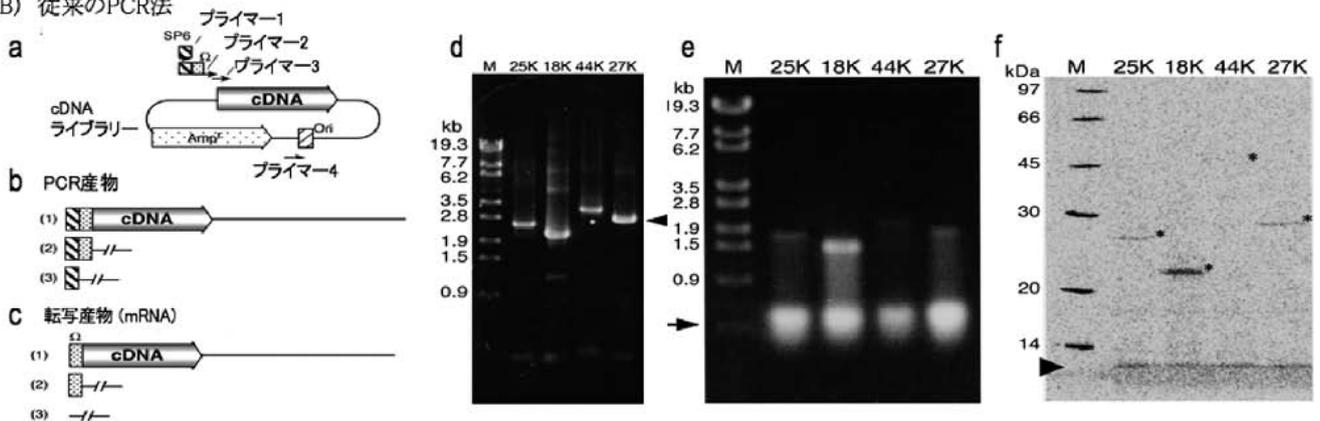


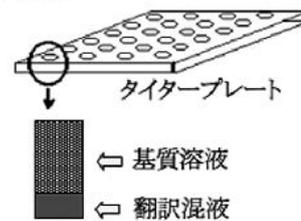
図5 Split-Primer PCR 法

4種類の遺伝子を鋳型にしたPCR産物(d), 転写産物(e), 翻訳産物(f)を示す。

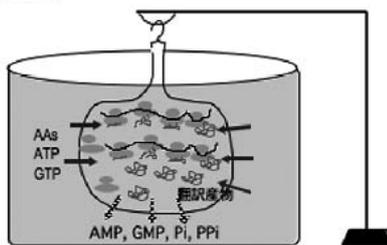
1) 従来からのパッチ法



3) 重層法



2) 連続反応法



4) 繰り返しパッチ法

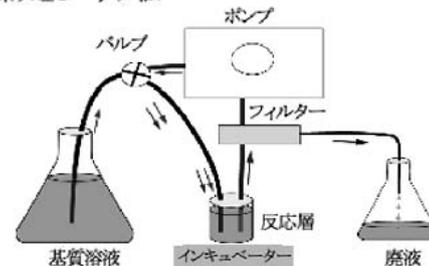


図6 新規開発した翻訳反応法

のスクリーニングには充分な量である。後者の繰り返しバッチ翻訳反応方式は、短時間のバッチ反応の後に限外ろ過膜を利用して新鮮な基質の入れ替えと、副産物の排除操作を不連続的に繰り返すことを原理とするタンパク質の大量合成に向けた反応方式である。いずれの方式も自動合成装置の要素技術となった。

(5) ハイスルーブットコムギ胚芽無細胞タンパク質合成プロトコルの完成

これらの要素技術を組み合わせることによって、遺伝子産物のスクリーニングを目的としてPCR法と組合せた、多品種・少量合成法と、タンパク質大量合成用にpEUベクターを組合せた、大量合成・少品種法のタンパク質無細胞合成法の二方法を完成させた。手順は、1) 目的遺伝子のインシリコ選択と精製用・検出用タグのデザイン→ 2) PCR法による転写鋳型の構築とmRNA合成→ 3) スクリーニングのためのタンパク質の多品種少量合成(反応は重層方式)となる。ここで、2)と3)の転写・翻訳反応は一つの反応容器内で行う(いわゆる転写・翻訳共役反応)。そして、構造解析用などのタンパク質の大量合成(反応方式は、繰り返しバッチ又は透析法)に向けては、遺伝子のpEUへのクローニングから始まり、翻訳反応は繰り返しバッチ又は透析法で行う。

4. 全自動タンパク質合成装置の開発¹⁶⁾ (図7)

上述のタンパク質合成プロトコルの転写・翻訳の操作を自動化することに成功した。図7Aに示した多品目スクリーニング用ロボットは、分注機アーム、遠心機、と重層方式反応を行う恒温槽を備えており、PCR法で構築した384種(96穴タイタープレート4枚)のDNAから、mRNA合成、精製とタンパク質の合成過程までを一夜のうちに完

了する性能(1穴当たりの合成量は数 μg である)を持っている。タンパク質大量調製用として、精製タグ融合用のpEUシリーズにクローン化した転写鋳型を添加すると、mRNA合成から翻訳反応(繰り返しバッチ反応方式)までを行う8個の反応槽を装備した合成機も完成させている(図は略す)。図7Bには、転写反応から翻訳と合成産物の精製(図7C、アフィニティー精製)までを自動で行う、卓上型全自動タンパク質合成ロボットを示した。いずれのタンパク質合成装置も現在国内外で市販され、大学や企業の研究室で稼働している。

5. コムギ胚芽無細胞タンパク質合成法の応用例

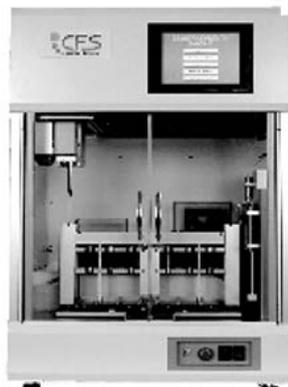
(1) 遺伝子産物の機能解析

動物(ヒト)と植物(*Arabidopsis thaliana*)のcDNAライブラリーから27個の遺伝子を選び、大腸菌菌体からのコロニーPCR(split-primer法)によって転写鋳型を構築するハイスルーブット-ゲノムワイドタンパク質合成の一例を示した¹¹⁾(表2)。精製用のGST融合タグ有りと無し(計54個)について試みたところ、50個の翻訳産物をSDS-ゲル電気泳動・クマシーブルー(CBB)染色で明確なタンパク質バンドとして確認できた。別のシリーズの実験から、産物の可溶性(30,000g, 15分遠心上清に回収)と合成量ともに生物種の違いによる差異は見られない。更に、好熱菌(高G/C)や熱帯熱マラリア原虫(高A/T)のような遺伝子の塩基組成の偏りによる翻訳効率の低下も見られなかった。我々は既に5,000種余りの遺伝子産物を合成しているが、発現成功率は95%程度である。しかし、タンパク質合成法に問われる最も重要な性能は、生産したタンパク質が正しくフォールディングし、活性を保持していることであろう。コムギ胚芽の翻訳酵素系を用いる本シス

(A)多品目合成ロボット



(B)机上型ロボット



(C)SDS-PAGE図

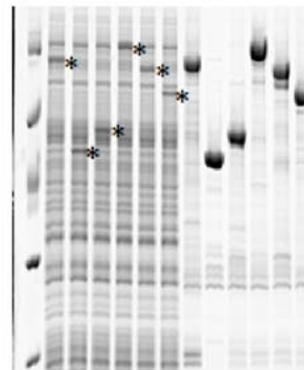


図7 全自動タンパク質合成装置

表2 コムギ胚芽無細胞法で合成した高等生物遺伝子産物の例

タンパク質種	遺伝子番号	分子量	オーセンティック型 ^a		GST融合型 ^b	
			合成量 (mg)	可溶画分 (%)	合成量 (mg)	可溶画分 (%)
Human (From GenBank)						
Neuron-specific gamma-2 enolase ^c	M22349	47,266	1.0	100	0.5	100
z-crystallin/quinone reductase	L13278	35,205	2.3	80	1.3	100
X11-like protein	AB014719	82,480	0.5	100	0.2	80
Importin alpha 1	NM_002266	57,859	— ^f	— ^f	0.2	30
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	M17851	36,051	0.4	70	0.9	100
Enolase 3 ^c	NM_001976	46,956	1.7	80	0.9	100
APBA3 ^{g,h}	NM_004886	61,451	0.9	100	0.2	100
JAK binding protein ^c (From a commercial cDNA library ^e)	NM_003745	23,550	0.4	30	0.2	100
Phosphoglycerate kinase 1	XM_010102	43,965	1.0	100	0.7	100
beta-Actin	X00351	41,735	1.3	100	0.3	100
Hypothetical protein FLJ10652	XM_006938	41,539	— ^f	— ^f	0.2	10
Arabidopsis (From GenBank and MIPS)						
Chlorophyll a/b-binding protein	X56062	25,995	0.2	30	0.5	90
Agamous-like gene 9 (AGL 9)	AF015552	29,065	0.7	30	0.8	90
Flowering locus T (FT)	AF152096	19,808	0.3	100	0.8	100
HY5	AB005456	18,462	0.4	90	1.5	90
Flowering locus F (FLF)	AF116527	21,864	0.2	100	0.4	100
Hypothetical protein (From a commercial cDNA library ^d)	At1g69630 ^e	11,311	0.1	40	0.1	100
Putative heat shock protein 40	AL021749	38,189	1.8	30	1.0	80
Heat shock protein 70-3	Y17053	71,144	0.9	100	— ^f	— ^f
Putative s-adenosylmethionine synthetase	AY037214	42,793	1.5	100	0.6	100
NADPH thioredoxin reductase	Z23108	40,635	0.1	10	0.5	20
Putative ACC oxidase	AF370155	36,677	1.0	10	1.2	100
Putative fructokinase	AF387001	35,276	1.0	10	0.6	100
Rubisco activase	X14212	51,981	0.4	20	0.6	80
Glutaredoxin	At4g15660 ^e	11,311	— ^f	— ^f	0.4	80
Chlorophyllase 2	AF134302	34,902	0.2	10	0.4	70

^aと^bはそれぞれ、遺伝子そのまま、又はGST融合体からのタンパク質産物で、合成量は反応液1ml当たりをmgで示した。MIPSはアラビドプシスデータベースMAAtDB、^dLambda ZAPIIライブラリーは、Stratagene社の製品。†検出レベル以下。*遺伝子は、BioChainInstitute社のcDNAライブラリー(心臓、脳、腎臓、肝臓、胎盤)からクローン化した。^hAmyloid beta h4) precursor protein-binding, family A, member 3.

テムは、真核細胞の遺伝子産物の調製法として特に優れた特性を示すものと期待できる。この点を確認した実験結果の一例を図8に示した¹⁰⁾。ヒトDNAデータベースの検索からプロテインキナーゼドメインを有する機能未知の遺伝子11種類を選び出し、対応するcDNAから精製用GST融合タンパク質として合成・アフィニティー精製した酵素はDNAのORFから予測できるそれぞれの電気泳動度を示す(図8A)。試料を脱リン酸処理し、モデル基質としてよく利用されているヒストンとミエリン塩基性タンパク質(MBP)共存下に、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を用いたリン酸化実験を行うと、各遺伝子産物に依存すると思われるオートリン酸化活性や、ヒストン、MBPのリン酸化活性が確認できる(図8B)。このような実験から、酵素としては未知であった遺伝子産物が、本手法によって活性を保持したプロテインキナーゼとして調製できた。私どもは、タンパク質リン酸化ネットワーク地図作成に向けて、種々生物のcDNAライブラリーを基にそれぞれタンパク質リン酸化酵素、それら

の天然基質、及びタンパク質脱リン酸化酵素の生化学的解析を進めている。表3には、大腸菌生細胞系で発現できなかった遺伝子をコムギ無細胞系発現できた例をまとめた。これまでの我々の経験では、単独分子として機能している可溶性酵素については、合成産物のほぼ100%が活性体として得られる。しかし、リン酸化酵素や転写因子では合成産物のおよそ50%が溶けて活性を保持しており、残りは凝集した不溶化物となる。翻訳反応液中のpH、界面活性剤やコファクターの添加等を検討することによってこのような凝集を防ぐことができ、品質の大きな改善が見られることも多い。とは言っても、本無細胞タンパク質合成法は未だオールマイティーではない。例えばGPCRのような膜貫通ドメインの多い膜タンパク質ではすべての産物が沈殿物となるため、細胞膜やリボソームを共存させるなどの合成技術改良が残された課題である。膜タンパク質については、リフォールディング処理が必要とされる。

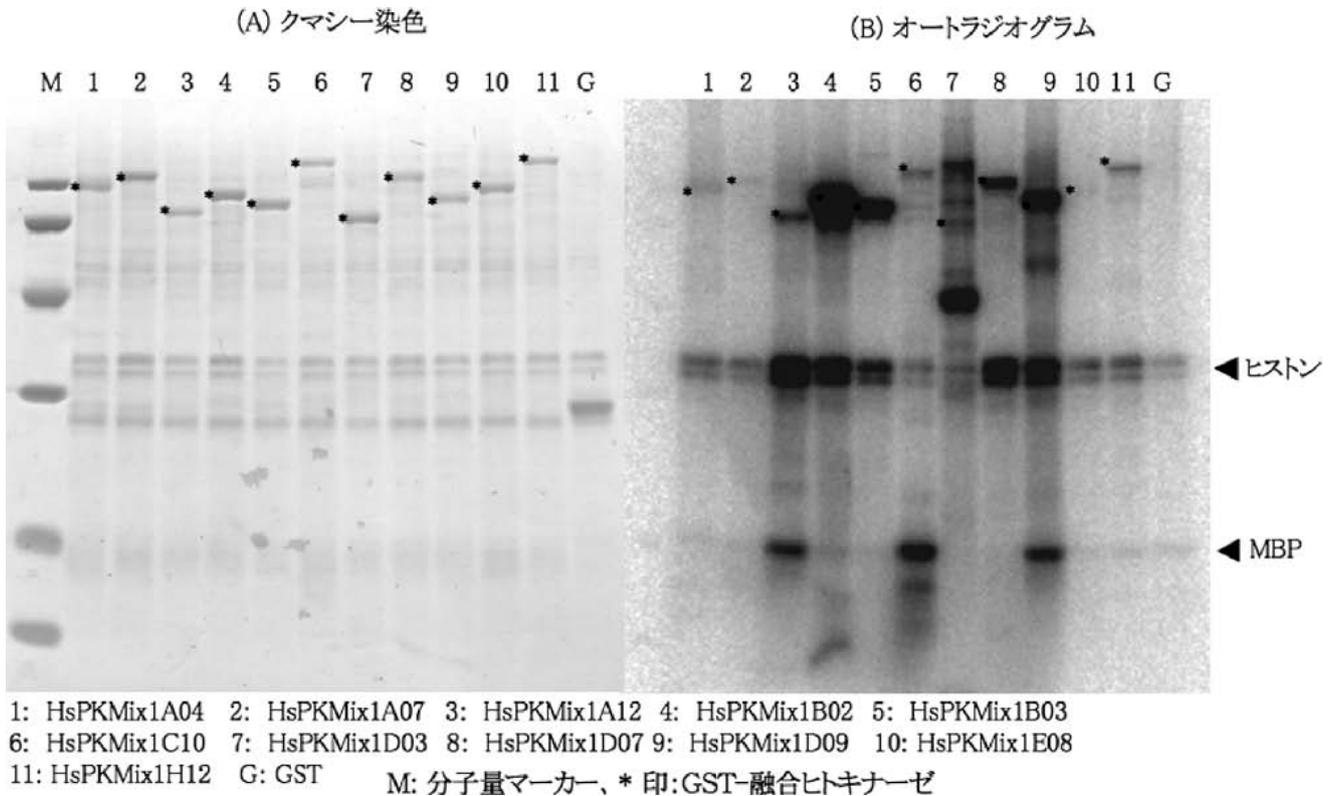


図8 プロテインキナーゼの合成・精製とリン酸化活性の測定

表3 “難しいタンパク質”のコムギ胚芽無細胞法による合成例

生物種	酵素活性	文献
Cypovirus	Crystalline particle formation	26)
Bacillus	Endonuclease (Bam HI)	15)
Thermococcus	DNA synthesis	15)
Aquifex	Methyltransferase	27)
Arthrobacter	Sarcosine oxidation	15)
シロイヌナズナ	Protein phosphorylation by light	28)
イネ	Anthranilate synthase	29)
イネ	Shikimate kinase	30)
イネ	EPSP synthase	30)
マウス	Immunoglobulin induction	31)
ヒト	DNA binding	32)

EPSP Synthetase, 5-enolpyruvylshikimic acid 3-phosphate synthetase.

(2) 構造解析

核磁気共鳴法はタンパク質の立体構造決定の他にも分子の品質測定方法としてよく利用されているが、分子を安定同位体標識することが必要である。無細胞系の特性として、合成産物以外に標識されることがないので試料の精製が不要となる利点を持つ。特に本無細胞法は休眠中の胚芽組織を利用しているために、アミノ酸代謝酵素系の活性が極めて低く、安定同位体標識アミノ酸が別のアミノ酸に代謝されず、シグナル解析に力を発揮する。米国ウイスコンシン大学マジソン校の構造生物学グループでは本無細胞法

を用いてタンパク質の立体構造解析を精力的に進めており、その成果がウェブサイトに公開されている (<http://uwstructuralgenomics.org>)。最近、甲斐庄らはこれまで困難であった高分子量タンパク質のNMR構造解析法として、2重標識アミノ酸を利用する画期的な“stereo-array isotope labelling (SAIL法)”を発表した¹⁷⁾。SAIL法に必要とされる2重標識アミノ酸は高価なことから、翻訳反応でタンパク質に取り込まれなかったアミノ酸を回収利用することが可能であるコムギ胚芽無細胞系は、その意味においても有用であろう。コムギ胚芽無細胞法は、タンパク質のX線結晶解析に向けた試料調製にも適している。特に、硫黄がセレン原子に置き換わったセレノメチオニン含有タンパク質産物は、MAD法(多波長異常分散法)位相決定に利用できることから、強力な手段となるだろう。

6. おわりに

人類が長年付き合ってきた地表の微生物で培養法が確立しているのは1%にも満たず、残りの大半についてはその存在を確認することも容易ではない。さらに、地表の生物圏を上回るとも言われている極限環境生物の仲間には、100年に1回しか細胞分裂しない種類もあるらしい。このような生物は培養ができないが故に従来の生物学や産業の対象にはなり得なかった。無細胞タンパク質合成法の最大の特徴は、遺伝子情報さえあればタンパク質を試験管内で

自由自在に合成することができる点である。この特性をフルに活用すれば、原理的にあるいは危険性や倫理的に飼育・培養できない生物の遺伝子からタンパク質を合成し、機能解析によって有用な遺伝子を発掘することができる。さらに、生命体を直接扱うことなしにインシリコでバーチャルに生きている新規生物学分野 (digital biology) の創成も夢では無いかも知れない。

最後に、試験管内タンパク質合成技術を基盤とする生命科学と新バイオ産業の可能性を展望してみたい。ゲノム情報が蓄積してきている今日、タンパク質マイクロアレイは、科学や産業の発展に大きなポテンシャルを秘めている。例えば、テーラーメイド医療の実現に向けての精密診断法の確立が必要であろう。そのためには、疾病診断用の新規バイオマーカーの特定と、ハイスループット検出方法としてのタンパク質チップ技術を確認することが必須課題である。バイオマーカーの探索に本無細胞タンパク質合成法が利用できる可能性については上述したが、後者の技術開発課題について述べてみたい。今日、DNAチップが基礎研究から医薬品開発・診断にまで広く利用されている。これは、数千～数十万種類の特定のDNA断片をガラスや半導体の基板の上に貼り付けたもので、患者の遺伝子群がどのように発現しているかを一度に調べることができる。DNAチップ化技術が確立した背景には、DNAの化学的安定性と、有機合成法の発展の二点があった。タンパク質チップ化技術で問題となるのもこの点で、1) 多数の高品質タンパク質をどのように生産するか、2) 微量場に固定した多様で固有の物性を持つ個々のタンパク質分子を如何に安定的に保存するか、ということである。コムギ胚芽無細胞合成法を利用して、産業技術総合研究所が22,000種のヒトタンパク質を1枚のスライドガラス基盤上に貼り付けたタンパク質チップの試作に成功していることから、前者に関しては、実用化に向けての第一歩をクリアーしたと言えるだろう。後者の問題解決に当たっては新しいチップコンセプトが必要とされ、タンパク質チップの用時調製利用法以外に実用的な手法は難しいだろう。すなわち、1) 目的とする遺伝子群の各DNAと転写溶液やコムギ胚芽翻訳液を凍結乾燥状態でマイクロタイタープレートに保存する(数年間安定)、2) 必要時に水の添加と保温によってタンパク質を合成し、3) 支持体に固定し、新鮮なタンパク質マイクロアレイとして使用する、等が考えられる。

コムギ無細胞タンパク質合成法によって、医薬、エネルギー生産、環境浄化・保全、宇宙開発などの産業分野においても役立つ新規機能タンパク質が見いだされることを期待したい。

文 献

- 1) Kurland, C.G. (1982) *Cell*, 28, 201-202.
- 2) Pavlov, M.Y. & Ehrenberg, M. (1996) *Arch. Biochem. Biophys.*, 328, 9-16.
- 3) Spirin, A.S., Baranov, V.I., Ryabova, L.A., Ovodov, S.Y., & Alakhov, Y.B. (1998) *Science*, 242, 1162-1164.
- 4) Kim, D.M. & Choi, C.Y. (1996) *Biotechnol. Prog.*, 12, 645-649.
- 5) Netzer, W.J. & Hartl, F.U. (1997) *Nature*, 388, 343-349.
- 6) Hartl, F.U. & Hayer-Hartl, M. (2002) *Science*, 295, 1852-1858.
- 7) Roberts, B.E. & Paterson, B.M. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70, 2330-2234.
- 8) Madin, K., Sawasaki, T., Ogasawara, T., & Endo, Y. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 559-564.
- 9) Wool, I.G., Glück, A., & Endo, Y. (1992) *Trends Biochem. Sci.*, 17, 266-269.
- 10) Endo, Y. & Sawasaki, T. (2006) *Curr. Opin. Biotechnol.*, 17, 373-380.
- 11) Sawasaki, T., Ogasawara, T., Morishita, R., & Endo, Y. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 14652-14657.
- 12) Madin, K., Sawasaki, T., Kamura, N., Takai, K., Ogasawara, T., Yazaki, K., Takei, T., Miura, K., & Endo, Y. (2004) *FEBS Lett.*, 562, 155-159.
- 13) Kamura, N., Sawasaki, T., Kasahara, Y., Takai, K., & Endo, Y. (2005) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15, 5402-5406.
- 14) Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- 15) Sawasaki, T., Hasegawa, Y., Tsuchimochi, M., Kamura, N., Ogasawara, T., Kuroita, T., & Endo, Y. (2002) *FEBS Lett.*, 514, 102-105.
- 16) Endo, Y. & Sawasaki, T. (2003) *Biotechnol. Adv.*, 21, 695-713.
- 17) Kainosho, M., Torizawa, T., Iwashita, Y., Terauchi, T., Mei Ono, A., & Guntert, P. (2006) *Nature*, 440, 52-57.
- 18) Kigawa, T., Yabuki, T., Yoshida, Y., Tsutsui, M., Ito, Y., Shibata, T., & Yokoyama, S. (1999) *FEBS Lett.*, 442, 15-19.
- 19) Aguiar, J.C., LaBaer, J., Blair, P.L., Shamailova, V.Y., Koundinya, M., Russell, J.A., Huang, F., Mar, W., Anthony, R.M., Witney, A. *et al.* (2004) *Genome Res.*, 14, 2076-2082.
- 20) Zou, L., Miles, A.P., Wang, J., & Stowers, A.W. (2003) *Vaccine*, 21, 1650-1657.
- 21) 坪井敬文 (2005) 生化学, 77, 646-649.
- 22) Klammt, C., Lohr, F., Schafer, B., Haase, W., Dotsch, V., Ruterjans, H., Glaubitz, C., & Bernhard, F. (2004) *Eur. J. Biochem.*, 271, 568-580.
- 23) Zhang, J.T., Chen, M., Foote, C.I., & Nicholson, B.J. (1996) *Mol. Biol. Cell.*, 7, 471-482.
- 24) Yin, G. & Swartz, J.R. (2004) *Biotechnol. Bioeng.*, 86, 188-195.
- 25) Kawasaki, T., Gouda, M.D., Sawasaki, T., Takai, K., & Endo, Y. (2003) *Eur. J. Biochem.*, 270, 4780-4786.
- 26) Ikeda, K., Nakazawa, H., Shimooka, A., Ishio, K., Miyata, S., Hosokawa, Y., Matsumura, S., Masuhara, H., Bellonick, S., Alain, R. *et al.* (2006) *Proteomics*, 6, 54-66.
- 27) Hori, H., Kubota, S., Watanabe, K., Kim, J.M., Ogasawara, T., Sawasaki, T., & Endo, Y. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 25081-25090.

- 28) Sawasaki, T., Hasegawa, Y., Morishita, R., Seki, M., Shinozuka, K., & Endo, Y. (2004) *Phytochemistry*, **65**, 1549–1555.
- 29) Kanno, T., Kasai, K., Ikejiri-Kanno, Y., Wakasa, K., & Tozawa, Y. (2004) *Plant Mol. Biol.*, **54**, 11–22.
- 30) Kasai, K., Kanno, T., Akita, M., Ikejiri-Kanno, Y., Wakasa, K., & Tozawa, Y. (2005) *Planta*, **222**, 438–447.
- 31) Miyazaki, T., Ono, M., Qu, W.M., Zhang, M.C., Mori, S., Nakatsuru, S., Nakamura, Y., Sawasaki, T., Endo, Y., & Nose, M. (2005) *Eur. J. Immunol.*, **35**, 1510–1520.
- 32) Miyamoto-Sato, E., Takashima, H., Fuse, S., Sue, K., Ishizaka, M., Tateyama, S., Horisawa, K., Sawasaki, T., Endo, Y., & Yanagawa, H. (2003) *Nucleic Acids Res.*, **31**, e78.
-