



無細胞タンパク質合成 —小麦胚芽で作るタンパク質—

金田 加奈子

ヒトを含めた多数の生物のゲノム解析が進み、タンパク質の立体構造や活性の研究が幅広く行われている中、活性を持つタンパク質を手軽に合成できる技術へのニーズは高い。無細胞タンパク質合成系は、鋳型DNAとRNAポリメラーゼ、アミノ酸、ATPなどの翻訳酵素、基質を試験管内にそろえ、生化学的にタンパク質合成を行う、いわば生体内反応と化学的手法の利点を組み合わせたタンパク質合成法であり、培養細胞や大腸菌を用いる組換え系と比較して、培養の技術や手間が不要で、精製などの操作も比較的容易であることから注目されている。無細胞系の最大の利点は、組換え系では合成が困難な毒性タンパク質、また非天然型のタンパク質の合成すら可能な点が挙げられる。たとえば、立体構造決定に有用なX線結晶解析の多波長異常分散法(MAD)に必要なセレンメチオニン(SeMet)導入タンパク質合成の場合、生細胞合成系では、SeMetの強い細胞毒性によって合成量が非常に低くなる場合が多いが、無細胞系では、標識アミノ酸を添加するだけで容易に合成することが可能である¹⁾。また、組換え系と異なり、バイオハザードのリスクや倫理的問題がほぼクリアになった。

現在、無細胞系には大腸菌由来、ウサギ網状赤血球由来、小麦由来などの翻訳酵素を使用する系が知られ、各々合成キットが市販されているが、その中でもコストや産生物の質の高さから小麦胚芽抽出液系が注目されている。小麦胚芽は休眠状態にあり、大腸菌などの活動期の細胞由来抽出液と比較してプロテアーゼやヌクレアーゼなどの狭雑物が少ないのが特徴である。小麦胚芽合成系は古くから知られていたが、反応持続時間が短く(2~3時間)収量が低いという欠点があった。しかし近年、リボソームRNAを特異的に脱アデニル化し、不活性化する働きを持つトリチンなどの複数の翻訳阻害因子が小麦胚芽の胚乳部分に多く含まれることが明らかとされ、この胚乳部分を徹底的に除去することにより、16時間(基質などを添加し続ければ1週間)以上の翻訳持続が可能となり、発現量は飛躍的に高まった^{2,3)}。本系による1mlあたりのタンパク質合成量は、反応時間1週間で平均数mgである²⁾。

また小麦は真核生物であるため、特に真核生物のタン

パク質を正しい立体構造で得られる可能性が高い。なぜなら、タンパク質の立体構造を決定するフォールディング機構は原核生物と真核生物でまったく異なっており、原核生物では翻訳終結後にフォールディングが行われるのに対し、真核生物では翻訳と共役してフォールディングは進んでいる。加えて、真核生物はリボソーム上でのペプチド合成速度がゆるやかであり、タンパク質が正常に折りたたまれやすくなっていると考えられている。詳しい機構は明らかではないが、真核生物のタンパク質を原核生物の大腸菌系で発現すると、翻訳スピードにフォールディングが追いつかず、凝集し、いわゆる封入体を形成してしまう場合があるが、小麦胚芽系では、このようなタンパク質でも可溶性タンパク質として得られた例が多くあり⁴⁾、この他にも活性を持つタンパク質が本系において多数合成されている。

もちろん小麦胚芽抽出系にも欠点がある。S-S(ジスルフィド)結合が形成されないこと、膜貫通タンパク質では大部分が不溶化してリフォールディング処理が必要であること、小胞体で糖鎖修飾などの翻訳後修飾を受けるタンパク質の活性型での合成が困難であることなどが挙げられる。しかし、これらの点については、反応系に共役的なプロセッシングを行うミクロソーム画分を添加することにより、ジスルフィド結合の形成やコア糖鎖の付加が可能になるなどの改善が図られると言われている^{5,6)}。

本技術は、現在はまだ限られた研究者が使用する技術であるが、今後は、前述のような非天然型の標識タンパク質合成、cDNAライブラリを網羅的に翻訳するタンパク質のハイスループットスクリーニングなどの多品種少量生産、また発現困難な病原体のタンパク質の免疫原性を保持したままの合成などの用途で、多くの研究者が使用する技術となるよう期待したい。

- 1) Kigawa, T. *et al.*: *J. Struct. Funct. Genomics*, **2**, 29 (2002).
- 2) Endo, Y.: *Bio Industry*, **17**, No.5, 20 (2000).
- 3) Madin, K. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 559 (2000).
- 4) 黒板: 蛋白質・核酸・酵素, **51**, 891 (2006).
- 5) Walter, P. and Blobel, G.: *Methods Enzymol.*, **96**, 84 (1983).
- 6) Fresco, S. and Ploia, R.: *J. Biol. Chem.*, **263**, 13463 (1988).