

## コドンが決め手！？組換えタンパク質の高発現法

今中 洋行

組換えタンパク質の発現は、遺伝子工学の確立以降、生物工学分野において中心的な技術である。これまでに、大腸菌、動物細胞、昆虫細胞、酵母、枯草菌などが組換えタンパク質発現用宿主として広く普及している。特に大腸菌を宿主とした組換えタンパク質発現系は、低コストで、増殖が速く、発現のコントロールが容易、高密度培養ができ、多様なベクター-宿主の組合せが可能であるなどの理由から、もっとも汎用されている。さらに、ここ10年来、シーケンシング技術の革新を通じ、遺伝子配列情報の収集は飛躍的に向上してきた。これまでに未培養生物のものを含め、数多のゲノム全配列が決定され、遺伝子配列のデータは年々、指数関数的に増え、実に多様な特徴を有する配列が見いだされてきた。一方で、最近では人工遺伝子の合成コストも比較的手の届く範囲に収まるようになり、クローニング技術の革新も相まって、発現系を包括的に自分の手でデザイン化することが可能となってきた。つまり、組換えタンパク質の発現戦略法の確立は、サイエンスに軸足を置いた芸術ともいえるようになってきた。

組換えタンパク質の発現収率を向上させる方法については、これまでさまざまな検討がなされてきた。たとえば、レアコドンを補強する方法、シャペロンの共発現やジスルフィド結合の形成促進が可能な宿主を用いる方法、発現ベクターのプロモーター強度を高めて、mRNA発現レベルを向上させる方法、リボソーム結合サイト(RBS)をコンセンサス配列にして翻訳開始を促進させる方法、あるいは、終止コドンをUAAに変更して転写終結の精度を向上させる方法があげられる。さらに、複製起点を変更して発現ベクターのコピー数を変えてタンパク質発現量を制御する方法や、培地をリッチにして菌体濃度を高め組換えタンパク質収量を上げる方法もある。こうした包括的な対応はもちろん重要であるが、やはり、組換えタンパク質発現システムを構築する際には、発現対象となる個々のタンパク質をコードしている遺伝子配列中のコドンがそれぞれ異なることを十分に考慮せねばならない。そこで、組換えタンパク質の収量増加を目的とし、セントラルドグマにおける転写、翻訳の制御に着目し、それらとコドン使用頻度やmRNA二次構造との相関を調べた研究が広く進められている<sup>1,2)</sup>。

Kudlaらは、緑色蛍光タンパク質(GFP)について、

同義コドンを用いた変異導入により計154種類の配列ライブラリーを作製し、大腸菌を宿主とした網羅的発現実験を行った<sup>3)</sup>。その結果、最大250倍の発現量差がみられ、遺伝子発現はコドンバイアスとの相関がみられず、RBS近辺におけるmRNAの構造安定性と、それに関連した翻訳開始速度がタンパク質発現レベルを規定する大きな要因であるとした。しかし、Welchらは、標的とした組換えタンパク質の発現量がCodon Adaptation Index(CAI)やmRNAの構造安定性ではなく、コドンバイアスに依存するという結果を得た<sup>4)</sup>。さらに、高発現に影響を及ぼす配列として、細胞内で高発現しているタンパク質でもっとも多く出現するコドンではなく、アミノ酸枯渇条件下で多く利用されるコドンがより好ましいとした。また、Supekらは、Kudlaらのデータを用いた回帰分析を行い、5'末端領域のmRNAの二次構造安定性が顕著に高い場合を除き、組換えGFPの発現量はコドン使用頻度と相関すると結論付けた<sup>5)</sup>。

コドン最適化の手法については、CAI最大化やコドンハーモナイゼーション、コドンサンプリングなどいくつかが提案されており、それぞれに整合する発現系がある。これまでに報告されたさまざまな組換えタンパク質発現実験の情報を踏まえると、現在のところ、配列を検討する上で最低限考慮すべき事項として、(1) 5'末端領域におけるmRNAの安定な二次構造形成を回避すること、(2) N末端から約50アミノ酸残基までのコーディング領域におけるレアコドンを減らすこと、があげられる。しかし、これら以外にも発現の鍵を握る重要な因子がまだまだ存在するはずである。

個々のタンパク質の機能解析により、生命現象に潜む謎を紐解いていく基礎研究から、たとえばタンパク質系薬剤の大量調製といった産業利用まで、組換えタンパク質の発現は今後も重要な技術であり、需要が続くであろう。引き続き知見およびノウハウの蓄積が必要で、汎用性の高い技術開発が求められている。

- 1) Plotkin, J. B. and Kudla, G.: *Nat. Rev. Genet.*, **12**, 32 (2011).
- 2) Angov, E.: *Biotechnol. J.*, **6**, 650 (2011).
- 3) Kudla, G. *et al.*: *Science*, **324**, 255 (2009).
- 4) Welch, M. *et al.*: *PLoS One*, **4**, e7002 (2009).
- 5) Supek, F. *et al.*: *Genetics*, **185**, 1129 (2010).