

無細胞タンパク質合成系 ～試験管内でタンパク質を作ろう！～

金井 保

タンパク質は細胞内でゲノム情報が具現化された実体であり、タンパク質が関与しない生命現象はないと言っても過言ではない。したがって、ライフサイエンス分野では日々、多種多様なタンパク質を用いた研究が続けられている。研究に必要なタンパク質を、その産生細胞より得ることが困難な場合には、大腸菌や酵母など培養が容易な細胞に当該遺伝子（最近では化学合成で作製する場合もある）を導入し、組換えタンパク質として生産する方法が用いられる。このような生細胞を用いた組換えタンパク質生産は、今やライフサイエンス分野に必要不可欠な技術であるが、本系にもその原理に由来する欠点が存在する。第一に、生細胞を用いたタンパク質生産は細胞増殖に依存することから、発現タンパク質が細胞毒性を示す場合にはその生産は困難である。さらに遺伝子組換え生物の培養は、バイオハザード防止の観点から、適切な実験設備・手順を用いて慎重に進める必要がある。近年、このような弱点を回避する手法として、無細胞タンパク質合成系が注目されている。本系は、翻訳成分（リボソーム、tRNA、アミノアシル化tRNA合成酵素、翻訳開始因子、翻訳伸長因子、翻訳終結因子など）を含む無細胞抽出液に対し、アミノ酸、エネルギー分子（ATPとGTP）、エネルギー再生系、塩類（ Mg^{2+} ほか）、テンプレート（DNAあるいはmRNA）を添加して、タンパク質を試験管内（*in vitro*）で合成する手法である（図1）。

本法の最大の特徴は、タンパク質合成反応が細胞の生死から切り離されている点であり、そのために系の自由度がきわめて高く、たとえば毒性タンパク質や非天然アミノ酸を含む人工タンパク質なども合成可能である。また本系は、外部溶液の混合という簡単な操作でタンパク質合成が進行し、さらに精製時にも煩雑な細胞破碎操作を必要としない。このような特徴は、タンパク質合成の自動化や高速多検体（ハイスループット）合成などに適している。さらに本系によるタンパク質生産は*in vitro*での反応であり、遺伝子組換え細胞を使用しないことから、バイオハザード防止の観点からも優れている。本稿では、優れた特徴をもつ無細胞タンパク質合成系の原理や利用可能なシステムについて概説し、その応用分野について紹介する。

無細胞タンパク質合成系の歴史

無細胞タンパク質合成系は、元来は翻訳機構解析のための実験系として開発されたものである。1950年代にラット肝臓を用いた無細胞タンパク質合成系が確立し、これによりtRNAの存在が明らかにされた¹⁾。また1961年には大腸菌由来の無細胞抽出液を用いた系が開発され、これを用いて遺伝コードの解明がなされた²⁾。本系のタンパク質生産手法として可能性が示されたのは、1988年にロシアのSpirinらにより報告された、Continuous-Flow Cell-Free (CFCF) translation systemの開発による³⁾。このシステムは、翻訳反応の進行に伴って消費される基質（アミノ酸、ATP、GTPなど）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反応を阻害する副産物（ピロリン酸など）を限外ろ過膜を通して反応系の外に排除する方法である（図2B）。本法により、以前までのバッチ法（図2A）では一時間程度であった反応持続時間が、数時間～数十時間にまで延長可能となった。1996年には、本法よりもさらに実用的な手法であるContinuous Exchange Cell-Free (CECF) translation systemが開発された（図2C）。CECF法は反応溶液に対して半透膜を介してアミノ酸やエネルギー源を供給し、同時に反応副産物を拡散（透析）により除去

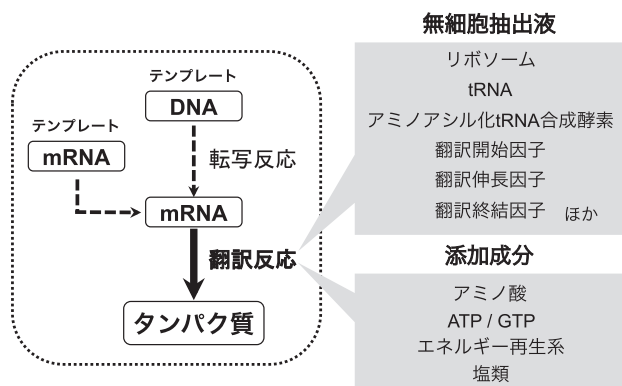


図1. 無細胞タンパク質合成の流れ

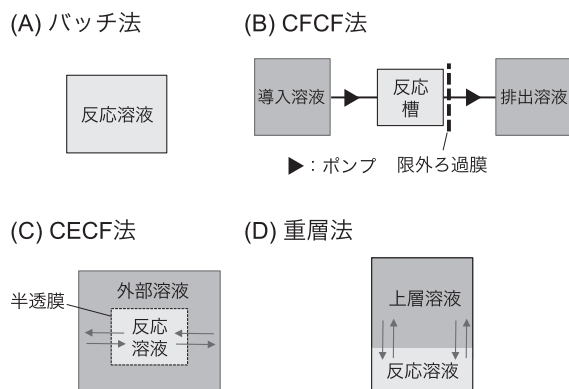


図2. さまざまな反応様式

するシステムである⁴⁾。このような方法の開発により、無細胞タンパク質合成系の合成タンパク質量は大幅に向上し、10 mg/mLを超えるタンパク質合成量も報告されるようになった⁵⁾。さらに2002年には、CECF法と同様のコンセプトによる重層法（図2D）が開発された⁶⁾。本法では、反応溶液と外部溶液の比重を変えることで、外部溶液を反応溶液上部に半透膜を用いることなく重層させ、反応中に生ずる両相間の拡散混和を利用して反応を行う方法である。本法は半透膜を使わない単純な系であるので、検体数が多い場合でも対応が可能であり、多種類のタンパク質の同時・大量合成を可能とする技術である。

利用可能な生物システム

ここでは、代表的な無細胞タンパク質合成系である、ウサギ網状赤血球（rabbit reticulocytes）、コムギ胚芽（wheat germ）、大腸菌（*Escherichia coli*）の抽出液を用いた無細胞タンパク質合成系などについて紹介する。また、翻訳因子を用いた完全再構成系であるPURE systemについても紹介する。

ウサギ網状赤血球 ウサギ網状赤血球を用いた無細胞タンパク質合成系は、1964年に最初に報告された歴史のある系である⁷⁾。本系は哺乳細胞由来の系であるため、真核生物由来タンパク質の翻訳後修飾に関する研究などに用いられている。一方で、本系によるタンパク質合成量は低いことから、タンパク質調製手段として用いられることはほとんどない。

大腸菌 大腸菌は増殖速度が速いために、分子生物学研究において大変良く用いられている生物種である。先にも述べたが、大腸菌を用いた無細胞タンパク質合成系は1961年に開発され、現在も幅広く開発が続けられている。大腸菌では遺伝子組換えが容易に行えることから、

さまざまな分解酵素（ヌクレアーゼ、プロテアーゼなど）を欠失させた際の影響が詳細に調べられている。本系は他生物の系と比べると、タンパク質合成量が多く、また合成反応速度も速いという特徴があるが、一方でバクテリア由来の系であるため、タンパク質合成がMetではなくN-formylmethionine (fMet) より開始されることや、真核生物型の翻訳後修飾を施すことが難しい、などの弱点もある。代表的な大腸菌由来の無細胞系タンパク質合成キットとして、RTS (5 PRIME) や無細胞くん（大陽日酸）などがある。

コムギ胚芽 種子胚芽は、発芽に備えて活性の高い翻訳因子を貯蔵しており、また内在性のmRNAレベルが非常に低いことから、無細胞タンパク質合成系の優れた材料になると考えられた。しかしながら、コムギ胚芽を用いて作製された無細胞タンパク質合成系は、予想に反しきわめて効率の悪い系であり、ほとんど使われていなかった。しかし2000年に愛媛大学の遠藤弥重太らは、従来の系には、胚芽に隣接する胚乳より多量のリボソーム不活性化タンパク質（ribosome-inactivating protein; RIP）が混入していることを見いだした。そこで、胚芽を慎重に水洗いしRIPを徹底的に除去した無細胞タンパク質合成系を用いた結果、タンパク質合成反応がきわめて長時間（数十時間）持続することを発見した⁸⁾。本系は真核生物由来の系であり、また上記のウサギ網状赤血球の系よりもタンパク質合成量が高く、また安価であることから、真核生物由来タンパク質の合成において、ファーストチョイスとして位置づけられる。コムギ胚芽系は、国内ではセルフリースサイエンス社を中心に商品展開が行われている。

それ以外の生物 上記の系以外で、現在市販されている無細胞タンパク質合成系としては、昆虫培養細胞由来の系であるTransdirect insect cell（島津製作所）や、ヒト培養細胞由来の系であるHuman Cell-Free Protein Expression System（タカラバイオ）などがある。また市販はされていないが、高度好熱性細菌*Thermus thermophilus*や超好熱性アーキア*Thermococcus kodakarensis*に由来する無細胞タンパク質合成系も作製されている^{9,10)}。

再構成無細胞タンパク質合成系（PURE system）

上記の無細胞タンパク質合成系は、いずれも細胞抽出液画分を用いて作製されている。これらの系に共通する問題点として、抽出液中に混在するATP分解酵素やヌクレアーゼ・プロテアーゼなどによる、系のエネルギー消費効率の低下や、タンパク質合成効率の悪化がある。これらの問題点は、程度の差はあれ、粗抽出液を用いる限

りは避けられない。2001年に東京大学の上田卓也と清水義宏らは、これまでの系とは一線を画する系であるPURE (Protein synthesis Using Recombinant Elements) systemを開発した¹¹⁾。彼らは、大腸菌の翻訳に関わる31種類の可溶性タンパク質因子を組換えタンパク質として調製し、さらに大腸菌の菌体から精製したリボソーム画分とtRNA画分を組み合わせることで、タンパク質合成系を試験管内で再構成することに成功した。このような再構成系は、細胞抽出液に存在するヌクレアーゼなどの阻害的要因を含まないことから、リボソームディスプレイ法^{12,13)}などの進化分子工学実験に最適である。またPURE systemでは、個々の構成因子の濃度を自由に変えることが可能であるため、ターゲットタンパク質に対応した柔軟なシステム設計が可能である。このPURE systemは大腸菌由来のシステムであるが、最近になって、*T. thermophilus*においても、PURE systemと同様の再構成タンパク質合成系が構築されている¹⁴⁾。

無細胞タンパク質合成系の応用

膜タンパク質の合成 細胞膜上に存在する受容体や輸送体などの膜タンパク質は創薬のターゲットとなることも多く、その構造や機能の解明は生命科学における最重要課題の一つである。しかしながら、活性型の膜タンパク質を組換えタンパク質として発現させることは一般には困難である。このような膜タンパク質を、無細胞タンパク質合成系により合成する試みが進んでいる。無細胞タンパク質合成系は、添加物を自由な濃度で系に導入可能であることから、界面活性剤・脂質・リボソームなどの膜タンパク質と親和性が高い物質を系に添加することで、活性型の膜タンパク質が合成された例が報告されている^{15,16)}。また反応系の外部にリボソームを添加するのではなく、リボソーム内部に無細胞タンパク質合成系を閉じ込めた系による膜タンパク質合成も報告されている^{17,18)}。このように脂質二重膜にタンパク質発現系が内包されている状態は、細胞と類似していることから、本系を擬似的な細胞（人工細胞モデル）として捉えた研究も行われている¹⁹⁾。

安定同位体によるタンパク質のラベル化 タンパク質の構造解析法の一つとして、核磁気共鳴 (NMR) を利用した手法がある。通常は¹³Cや¹⁵Nなどの安定同位体からのシグナルが用いられるが、天然タンパク質では、これらの安定同位体の存在比が低く、十分な解析には多量のタンパク質を必要とする。培地に安定同位体で標識された化合物を添加して培養をすることで、タンパク質へのラベル化効率は大きく向上する。しかし、この場合

はすべてのタンパク質がラベル化されることから、目的タンパク質の高純度精製が求められる。それに対し、無細胞タンパク質合成系を用いた安定同位体標識では、テンプレートから合成されたタンパク質のみがラベル化されることから、高度な精製は必要ではない。また高分子量タンパク質のNMR分析では、シグナルが多数となるために帰属が困難となるケースが見られるが、本系で作製したタンパク質の場合は、特定の種類のアミノ酸に対応する残基のみが標識化されることから、シグナル解析が格段に容易となる。NMR分析以外にも、本系により得られる純度の高い安定同位体標識タンパク質は、質量分析装置によりバイオマーカータンパク質を定量する際の内部標準タンパク質としても利用可能である。

非天然アミノ酸含有タンパク質の生産 タンパク質は基本的には20種類のアミノ酸より構成されているが、自然界に存在しない非天然アミノ酸をタンパク質に導入することが可能となれば、新規な機能性タンパク質の設計にもつながる。無細胞タンパク質合成系を用いて非天然アミノ酸含有タンパク質の生産する方法として、岡山大学の芳坂貴弘（現北陸先端科学技術大学院大学）らにより開発された4塩基コドン法がある（図3）²⁰⁾。本法は、通常は3塩基から成るコドンを4塩基に拡張するという、生物界の常識を覆す発想より生まれた手法である。4塩基コドン法では、まずは遺伝子上で非天然アミノ酸を導入したい部位のコドンを4塩基コドンに置換する。同時に、アンチコドン部位にそれに相補的な4塩基アンチコドンをもつtRNAを合成し、その3'末端に導入したい非天然アミノ酸を結合させておく。これら無細胞タンパク質合成系に加えてタンパク質合成を行うと、リボソームの中で4塩基コドンが4塩基のアンチコドンをもつtRNAによって認識され、その結果、非天然アミノ酸が伸長中のポリペプチド鎖に組み込まれる。この際、同時に4塩基コドンが3塩基コドンとして読まれる現象も生じるが、このような場合には、直後に終止コドンが現れるように遺伝子配列を設計しておくことで、ラベルが導入されなかったタンパク質の合成は途中で停止する。このようにして、非天然アミノ酸が導入された場合にのみ完全長タンパク質が得られる。

無細胞タンパク質合成系を用いて非天然アミノ酸含有タンパク質を生産する他の方法として、PURE systemを利用する方法も存在する¹¹⁾。大腸菌において、終止コドンを認識する解離因子 (releasing factor: RF) には、UAA/UAGを認識するRF1と、UAA/UGAを認識するRF2の2種類が存在する。そこで解離因子としてRF2のみを含むPURE systemを調製する。続いて、目的タン

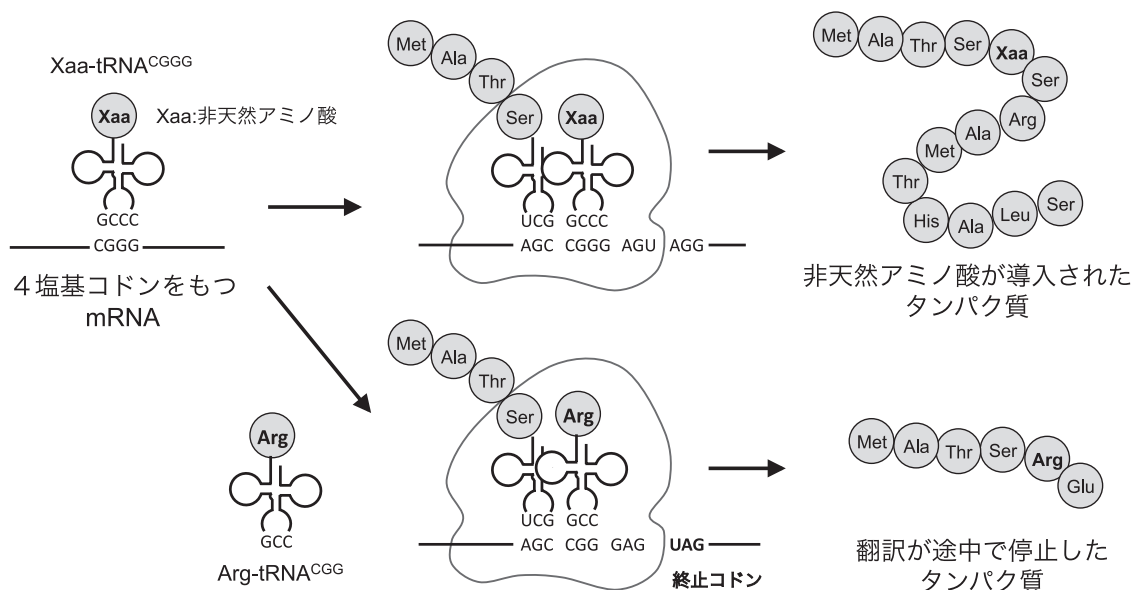


図3. 4塩基コドン法による非天然アミノ酸含有タンパク質の合成

パク質の終止コドンにRF2が認識するUAA/UGAとし、さらに非天然アミノ酸を導入したい部位にUAGコドンをもつテンプレートを準備する。UAGコドンはRF1を含まないPURE systemでは終止コドンとして認識されず、さらにこの系に、UAGに対応するアンチコドンをもつtRNAに非天然アミノ酸を結合させた分子を添加することで、UAGコドンが新規なアミノ酸導入のためのコドンとして機能し、非天然アミノ酸が導入されたタンパク質が合成される。

上記の二つの方法で共に鍵となるのは、非天然アミノ酸が結合したtRNA分子（4塩基アンチコドンもしくはUAGアンチコドンをもつ）であり、これらの合成には高い技術が必要となる。しかし現在では、これらのtRNA分子の受託合成を引き受ける会社（プロテイン・エクスプレス社など）もあることから、本サービスの利用により比較的容易に実験が可能となる。

進化分子工学手法への応用 進化分子工学とは、目的の機能をもつタンパク質分子を創り出すために、自然界に存在するタンパク質や人工的に作製した分子に対しランダムに変異を導入したライブラリーを構築し、特定の機能を指標としたスクリーニングを行うことで、タンパク質分子を人工的に進化させる手法である。本手法において、DNA分子とそれがコードするタンパク質分子とを、何らかの手法により物理的に関連づける必要がある。生細胞を用いてこれらを関連づける技術として、ファージや細胞の表面にタンパク質分子を提示する技術（ファージディスプレイ・細胞表面ディスプレイ）があり、

これまでさまざまな機能分子の創製技術として利用されている。一方で、多数の物理的な区画を準備し、その内部で無細胞タンパク質合成系による反応を実施することにより、生細胞を用いることなく関連づけを行う方法が開発されている。物理的な区画としては、たとえばマイクロタイタープレートなどを使うことが可能であるが、この場合は多数の候補をスクリーニングする際には、多数のプレート进行处理する必要があることから、機械による作業の自動化がほぼ必須となる。しかしながら、TawfikとGriffithsらが開発したwater in oil (w/o) エマルジョンを用いた*in vitro* compartmentalization法 (IVC法)²¹⁾では、特別な設備を必要とすることなく、多数の区画(>10⁶)を作製することが可能である。本法では、油相に水層を加えて攪拌し、平均数マイクロメートルの液滴（微小分画）が形成される条件でw/oエマルジョンを作製し、この各分画の中に、1分画あたりDNAが1分子以下となるように希釈した鋳型溶液を無細胞タンパク質合成系とともに封入する。このような状態で、タンパク質合成反応を行うことにより、区画の中で遺伝子型と表現形を関連付けることが可能となる。IVC法やこの改変法であるstreptavidin-biotin linkage in emulsions法 (STABLE法)²²⁾やマイクロビーズディスプレイ法^{23,24)}では、生細胞を用いた場合 (>10⁴ in several days) よりもはるかに多くのサンプルのスクリーニングが可能 (>10⁶ in several days) である。またIVC法の改良法として、water in oil in water (w/o/w) エマルジョンを用いた手法が開発されている²⁵⁾。このw/o/wエマルジョンの最外

相は水溶液であることから、エマルジョンを破壊することなく、直接セルソーターによる区画の選別が可能である。したがって、従来のIVC法では困難であった、酵素活性を指標としたスクリーニングも可能である²⁶⁾ことから、今後の応用展開が期待されている技術である。

おわりに

次世代シーケンサーの急速な進歩によりゲノム情報が加速度的に集積する中、ゲノム情報のアウトプットを担うタンパク質研究においても、研究の加速化が強く求められている。無細胞タンパク質合成系はタンパク質合成のハイスループット化に適した技術であることから、今後もプロテオミクス分野の研究において、その応用展開がますます進むことが期待される。

文 献

- 1) Zamecnik, P. C. and Keller, E. B.: *J. Biol. Chem.*, **209**, 337 (1954).
- 2) Nirenberg, M. and Matthaei, J. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **47**, 1588 (1961).
- 3) Spirin, A. S. *et al.*: *Science*, **242**, 1162 (1988).
- 4) Kim, D. M. and Choi, C. Y.: *Biotechnol. Prog.*, **12**, 645 (1996).
- 5) Kim, H. C. *et al.*: *J. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 885 (2008).
- 6) Sawasaki, T. *et al.*: *FEBS Lett.*, **514**, 102 (2002).
- 7) Arnstein, H. R. *et al.*: *Biochem. J.*, **92**, 648 (1964).
- 8) Madin, K. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 559 (2000).
- 9) Uzawa, T. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**, 639 (2003).
- 10) Endoh, T. *et al.*: *J. Biotechnol.*, **126**, 186 (2006).
- 11) Shimizu, Y. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **19**, 751 (2001).
- 12) Mattheakis, L. C. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 9022 (1994).
- 13) Hanes, J. and Pluckthun, A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 4937 (1997).
- 14) Zhou, Y. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **40**, 7932 (2012).
- 15) Nozawa, A. *et al.*: *Plant Cell Physiol.*, **48**, 1815 (2007).
- 16) Shimono, K. *et al.*: *Protein Sci.*, **18**, 2160 (2009).
- 17) Noireaux, V. and Libchaber, A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 17669 (2004).
- 18) Ohtsuka, T. *et al.*: *Anal. Biochem.*, **418**, 97 (2011).
- 19) Luisi, P. L. *et al.*: *Naturwissenschaften*, **93**, 1 (2006).
- 20) Hohsaka, T. *et al.*: *Biochemistry*, **40**, 11060 (2001).
- 21) Tawfik, D. S. and Griffiths, A. D.: *Nat. Biotechnol.*, **16**, 652 (1998).
- 22) Doi, N. and Yanagawa, H.: *FEBS Lett.*, **457**, 227 (1999).
- 23) Sepp, A. *et al.*: *FEBS Lett.*, **532**, 455 (2002).
- 24) Kojima, T. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **33**, e150 (2005).
- 25) Bernath, K. *et al.*: *Anal. Biochem.*, **325**, 151 (2004).
- 26) Mastrobattista, E. *et al.*: *Chem. Biol.*, **12**, 1291 (2005).