

生体外タンパク質合成システムを活用した ウイルスタンパク質の機能解析

理工学研究科 物質工学専攻 物質変換工学講座
土持 政照

タンパク質は、水に次いで主要な生物の構成成分であり、様々な生命現象を演出する主役分子である。タンパク質の様々な機能やその種類は多数知られているが、自然界で未だに機能の不明なタンパク質も膨大に存在することが知られている。我々の研究室では、試験管内において自由自在にタンパク質合成を行う生体外タンパク質合成系の開発を推し進めてきた。目的とするタンパク質を実際に手に入れることは、医薬レベルや農業レベル、工業レベルにおいて貢献できるだけでなく、機能未知なタンパク質を直接解析する場合においても非常に重要である。本セミナーでは、前半、我々の研究室で開発された生体外タンパク質合成系について、後半は、ゲノム配列が明らかにされながら、未だ機能が明確でないウイルスのタンパク質について、我々の系にて合成し、その機能解析を行った結果について講演させていただいた。

生体外タンパク質合成系の開発

タンパク質を合成する方法として現在広く利用されているのは、生きた細胞内にDNAを導入し、目的タンパク質を生物に合成させるものであるが、この方法では生物が持つ生命維持装置の制限を受けないタンパク質しか合成できない。また、生き物を扱うため、時間、手間、経費、バイオハザード等の問題もある。一方、タンパク質合成に必要な分子セットを含む細胞抽出液を試験管内に調製し、そこに目的タンパク質の鋳型(mRNA、DNA)やアミノ酸などの基質を添加することで、手軽に目的タンパク質の合成を行おうとする生体外タンパク質合成法は、理論上生細胞系では合成できないタンパク質でも合成可能で、バイオハザードの問題もない。しかし、調製される翻訳反応液の不安定さからこれまでに市販されている生体外合成キットを用いてもその合成効率が低く、利用用途も少なかった。

我々は生体外タンパク質合成系の翻訳効率を高めるべく、まず細胞抽出液の調製法に注目した。その結果、我々が利用したコムギ胚芽の場合、その調製段階で混入してしまう胚乳に含まれる翻訳阻害因子が原因となって、翻訳効率の低下を招いていることが分かり、胚乳をきれいに取り除いた胚芽の抽出液を利用することで、飛躍的にタンパク質合成効率を高めることに成功した¹⁾。我々は更に、反応条件の最適化や翻訳活性を最大限に引き出すような mRNA の構築などにより、例えばクラゲ蛍光タンパク質(GFP)の場合、翻訳反応が安定に14日間以上も持続し、9mg/mLもの合成が可能なシステムが確立できた²⁾。

ウイルスタンパク質の機能解析

近年多くの生物種でゲノム解析が完了もしくは進行し、機能未知なタンパク質が膨大に存在することが明らかと

なった。しかし、比較的ゲノムサイズの小さなウイルスなどにおいても、以前からその全塩基配列は報告されていながら、自由にタンパク質合成が出来ないため、その遺伝子産物の機能解析は遅れているのが現状である。そこで私は、我々の生体外タンパク質合成系が機能解析にも有用であることを検討する意味も含めて、これを活用したウイルス遺伝子産物の合成とその機能解析を目指すことにした。

ウイルスは、DNAまたはRNAからなるゲノムと、それを包むタンパク質(外被タンパク質)とからなる単純な構造をしている。従ってウイルス自身にはタンパク質合成システムが備わっておらず、そのため他の生物の細胞に侵入してその翻訳装置を乗っ取った後、子孫を増殖させるという戦略をとっている。例えば植物ウイルスの多くは、宿主細胞に侵入後 mRNA として機能する RNA(プラス鎖 RNA)をゲノムとして持っており、感染後まずそこにコードされた複製酵素が合成され、これがウイルスゲノムのコピーを合成していくものと考えられている(図1)。ウイルスの生活環において最も重要なプロセスと言えるこの複製反応の詳細は、ほとんどのウイルスで未だ不明であるが、これが解明されれば医学やバイオテクノロジーの分野でも有益な利用につながるものと期待される。

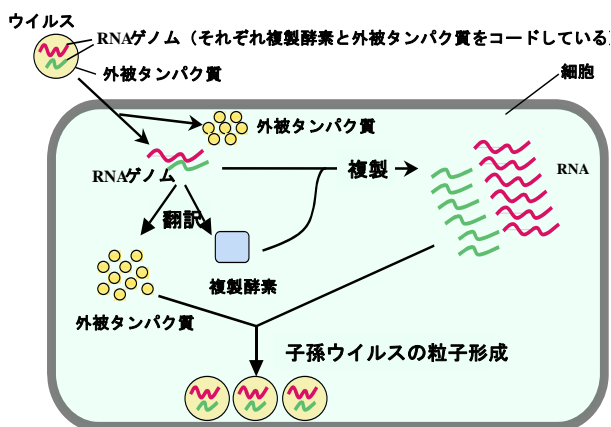


図1 仮想ウイルスの生活環の模式図

代表的な植物ウイルスのひとつで、コムギに感染性を示す BMV は、粒子中にプラス鎖 RNA ゲノムを4種類持っており、その遺伝子産物の内1a 及び2a の各タンパク質が複製酵素といわれている(図2)。また BMV は、他の植物ウイルスや動物ウイルスと比較して、その複製酵素の類似性から、宿主域やゲノムの数、粒子の形などに関係なくひとつの大きなウイルスファミリーに分類され、同ファミリー内のウイルス間ではおそらくその複製反応機構も似ているのではないかとされている。従って BMV の研究で得られた知見は同じファミリー内に属する他のウイルスについても共有できる可能性が高い。

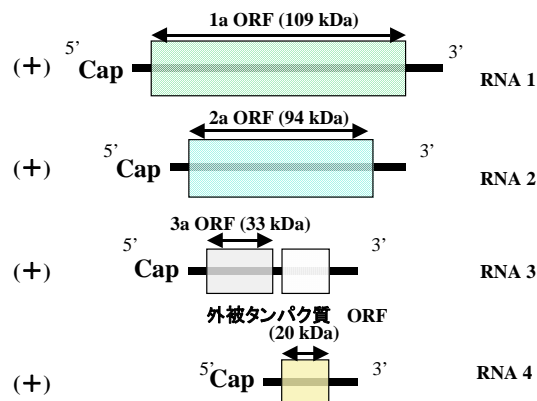


図2 ゲノム RNA とコードされている遺伝子

BMV 複製酵素のひとつである1a タンパク質は、GTP をメチル化し、これを脱リン酸化した m^7GMP と共有結合体(中間体)を形成後、自身のゲノム RNA 5' 末端に m^7GMP を転移して m^7GpppG 構造(Cap 構造)を形成する反応(Capping 反応)を触媒するのではないかと予想されているが、1a タンパク質の精製標品が得られていないためその詳細は明らかにはされていない³⁾。Cap 構造は、翻訳を促進しその効率を高める役割を持つと考えられており、真核生物の mRNA に特徴的に見られるものであるが、詳細に解析されている真核生物の Capping 反応の場合は共有結合中間体が GMP と形成されるため、BMV で予想されている反応機構とは異なる

っている。そこで私は、その詳細を解明すべく、BMV1a タンパク質と、その N 末端にグルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)のタグを融合させた GST-1a タンパク質を我々のタンパク質合成系にて合成し、まずその各翻訳反応液を [α - 32 P]GTP 存在下で保温した。その結果いずれの場合も Capping 反応中間体が、メチル基供与体依存的に検出でき、グルタチオンカラムにてアフィニティー精製した GST-1a タンパク質でも同様の中間体生成活性が検出された。更にこの中間体を高温下で酸処理して遊離するヌクレオチドを調べたところ、中間体の結合相手が m^7 GMP であることが確認できた。このことは生体外タンパク質合成した1a タンパク質に中間体生成活性のあることを示すとともに、これまでの反応機構の予想を強く支持している。今後は、中間体における m^7 GMP の結合部位やその結合相手であるアミノ酸について解析していく。

文献

- 1) K. Madin, T. Sawasaki, T. Ogasawara and Y. Endo, "A highly efficient and robust cell-free protein synthesis system prepared from wheat embryos: Plants apparently contain a suicide system directed at ribosomes.", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 559-564 (2000)
- 2) T. Sawasaki, T. Ogasawara, R. Morishita and Y. Endo, "A cell-free protein synthesis system for high-throughput proteomics.", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 14652-14657 (2002)
- 3) T. Ahola and P. Ahlquist, "Putative RNA capping activities encoded by brome mosaic virus: Methylation and covalent binding of guanylate by replicase protein 1a.", J. Virol. 73, 10061-10069 (1999)