

## 生体外タンパク質合成システムの能力を

### 最大限に引き出す mRNA の構築

理工学研究科 物質工学専攻 物質変換工学講座

嘉村 奈美

生物を構成する生体分子の中でも細胞乾燥重量の半分以上を占めるタンパク質は、細胞の形や構造を決定し、生体内の分子識別と触媒作用の大部分を担っており、それはゲノム上の遺伝子がコードしているアミノ酸の配列順序にしたがって合成される。世界的に進行しているゲノムプロジェクトの成果から、現在100種類を超える生物の全ゲノム塩基配列の解読が完了し、これに伴い遺伝子産物であるタンパク質の機能や構造の解析に研究の焦点は移行されるようになってきた。ところが、モデル植物としてよく研究され、高等植物の中でもっとも小さいゲノムサイズのシロイヌナズナにおいても、予想される遺伝子数は25498を数え、そのうち実験的に機能が解析されているものはわずか9%ほどである。そこで、これからタンパク質の解析を行い、生物学、医学、農学、工学などの各分野において活用していくためには、膨大な数ある遺伝子から一つ一つタンパク質を合成する効率的なタンパク質合成システムの開発が、基盤技術として必要不可欠である。

生体外（無細胞）タンパク質合成システム（以下、無細胞系と省略）は、生物の持つ精巧なタンパク質合成反応（翻訳）装置を試験管内に取りそろえ、構築した鋳型分子を外部から加えることによって、タンパク質を合成する原理であり（Fig. 1）、細胞に匹敵する合成速度と正確性を保持している。このシステムを用いると、非天然型のアミノ酸を持ったタンパク質も合成可能であり、また、従来より広く利用されていた生細胞を宿主とする発現系とは異なり、細胞に悪影響を与えるタンパク質も合成できる。しかしながら、これまで無細胞系は反応時間が数時間程度と短く不安定であったことからタンパク質の調整方法として利用する

ことは難しかった。最近、当研究室では、コムギ胚芽無細胞系の開発を進め、タンパク質合成阻害因子を取り除くことによって無細胞系の安定化に成功した。そこで、タンパク質のハイスループット合成や、大量合

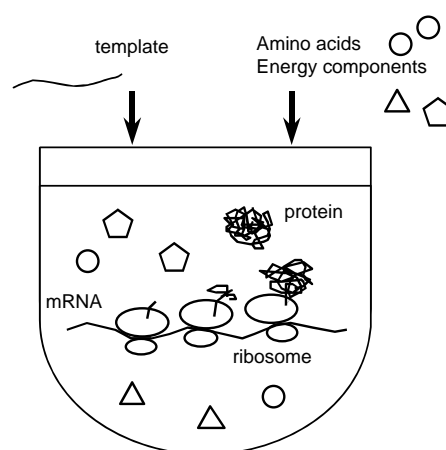


Fig.1 生体外タンパク質合成システムの原理

成などに利用できる実用的な無細胞タンパク質合成法を確立するためのステップアップを目指し、タンパク質合成反応の鋳型である mRNA の開発を行った。

## 1. 5'-、3'-UTR の最適化

真核細胞の mRNA は、5'側から cap 構造、5'非翻訳領域 (UTR)、翻訳領域 (ORF)、3'-UTR、poly (A) から構成されている。これらの構造は翻訳開始因子との相互作用を通して開始反応を促進し、さらにその結果はまた mRNA 分子の安定化にも関与することが知られている。当研究室では、これまでコムギ無細胞系の鋳型に、Cap 構造導入 mRNA を使用しており、これは *In vitro* RNA 合成時に用いる RNA ポリメラーゼによって、修飾ヌクレオチド 7-mG-5'-ppp-5'G を合成 RNA 鎖の末端に取り込ませることによって調整していた。ところが、このヌクレオチドの取り込み率は低く、また、残存する遊離のヌクレオチドは翻訳開始因子と強い結合性を持ち、翻訳阻害剤として作用するが、これを除くことは簡単ではなかった。加えて、Cap 構造導入 mRNA は、無細胞系において mRNA の指摘濃度範囲がきわめて狭いという特性を有していたため、まず mRNA ごとの至適濃度条件の検討を必要としていた。それ故に、cap 構造非依存的かつ効率的な mRNA のデザインは重要な課題であった。

そこで、タンパク質合成反応に影響を及ぼす UTR に着目し、まず 5'-UTR のスクリーニングを行った。その結果、種々の植物ウィルスゲノムの中でも、タバコモザイクウィルス (TMV) ゲノムの 5'-UTR オメガ配列 (Ω) が導入された mRNA が、cap 構造導入 mRNA の 60% の翻訳鋳型活性を有することが確認された。次に、5'には上記の UTR を備えた mRNA の 3'末端構造に着目して、3'-UTR の構造と鋳型活性との関係を検討した。その結果、塩基配列よりも鎖長が重要であり、鎖長 1.6knts 以上の長鎖 3'-UTR を結合させた mRNA は、poly (A) 非存在下で高い鋳型活性を示すことを見出した。この mRNA は、cap 構造導入 mRNA と同等の翻訳鋳型活性を有すると同時に、mRNA の至適濃度範囲が広いという特性を保持していた。加えて、ここでデザインした上記 UTR 構造は PCR 法を用いて容易に目的遺伝子に導入できることから、クローニング操作を行うことなくタンパク質合成の鋳型を合成することも可能となる (Fig. 2)。

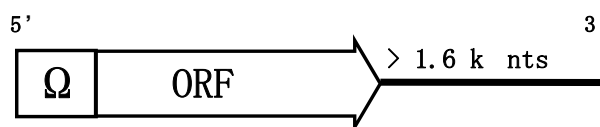


Fig.2 コムギ胚芽無細胞タンパク質合成システムに特化した mRNA

これらの知見を基に、コムギ胚芽無細胞系専用の高発現ベクター pEU を構築した (Fig. 3)。このベクターにクラゲ由来の蛍光タンパク質 green fluorescence protein (GFP) を導入し、この転写産物を鋳型にコムギ無細胞系を用いて GFP の合成を行うと、翻訳反応が 1 4 日以上に渡って持続し、得られる収量も 9.7 mg/ml と高いことが確認された。

以上のことから、デザインした mRNA をコムギ胚芽無細胞系の鋳型として使用することによって、cDNA カタログを準備すれば、転写鋳型構築→翻訳鋳型合成→タンパク質合成、に至る一連の反応を試験管内で完結できるシステムを完成できた。

## 2. 試験管内進化実験法を用いた 5'-UTR 配列の創製

これまでのことから、コムギ無細胞系において、TMV ゲノムの 7 2 塩基からなるオメガ配列が、cap 構造と同レベルの強いタンパク質合成開始促進活性を持っていることを報告した。mRNA の 5'-UTR が、タンパク質合成

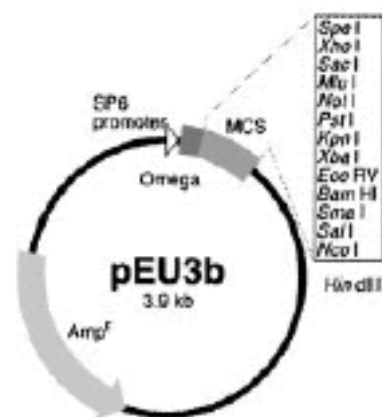


Fig.3 高発現ベクター pEU

開始反応効率に影響を与える事は知られており、中でもウイルス mRNA は、特異な UTR 構造を持ち、高い翻訳活性を示す。それは細胞内で自身の遺伝子を優先的に発現させる戦略の一つであり、ウイルスの進化上、有効であったのではないかと考えられる。そこで、天然に存在し、高翻訳促進活性を持つオメガ配列が選択されるまでの進化の過程とは対照的に、人工的な進化実験の試行によってオメガ配列より短く汎用性を兼ね備え、高い翻訳促進活性を持った新規 5'-UTR 配列の創製が可能であると期待できる。

試験管内にて、人為的に変異・選択のサイクルを繰り返す試験管内進化を試行することによって、核酸などの生体高分子をバイオテクノロジーにとって有用な機能を持った分子へと進化させ得ることが期待されている。無細胞系は、その原理からタンパク質合成に必要な因子、または合成されるタンパク質の試験管内進化を高速に行うことが可能である。そこで、本研究ではコムギ胚芽無細胞系を用いた mRNA のポリソームセレクション法の開発と、これを利用し、ランダムに A、U、G、C、4 種の塩基を組み合わせた配列から成る mRNA 5'-UTR ライブラリーから、まったく新しい配列であり、高翻訳促進活性を持つ 5'-UTR 配列の選抜を試みた。

最初に、ルシフェラーゼ遺伝子をモデルとして、PCR法を用いて、開始コドンの上流域 22 塩基から成るランダム配列を含む 37 塩基の 5'-UTR を有する mRNA 合成用の鋳型 DNA ライブラリーを作製した。このランダム配列合成過程で新たな開始コドンを与える ATG の生成を排除するために、それぞれ、A、T および G を含まないランダム DNA 塩基配列ライブラリーを、3 種類の塩基組成、B (T、C、G)、V (A、C、G)、および H (A、T、C) で自動合成したものを用いた。In vitro RNA 合成で得たそれぞれ 3 種類の mRNA ライブラリーのタンパク質合成における鋳型活性をコムギ胚芽無細胞系で調べたところ、H 塩基組成からなるランダム配列群が最も高い翻訳促進活性を示した。

次に、この G を含まない 22 塩基領域のランダム配列の中から、mRNA の高いタンパク質合成促進活性を与える配列を、ポリソームセレクション法を用いて選択した。すなわち、まず、H 群 DNA から合成した mRNA ライブラリーを鋳型に無細胞タンパク質合成反応をおこなった後に、ショ糖密度勾配遠心分離法によってサイズの大きいポリソーム画分を分取する。ここから高いタンパク質合成促進 5'-UTR を持つ mRNA 分子種を抽出し、RT-PCR により調製した転写鋳型から合成した mRNA を用いてタンパク質合成反応を行う。この一連のサイクルを繰り返して高機能 5'-UTR を持つ mRNA 分子種の濃縮を進めた。この結果、4 サイクル後には天然のオメガ配列と同等の翻訳促進活性を持つ塩基配列群を得る事ができた。さらに、この配列群の中から任意の 6 分子種の塩基配列を決定したところ、天然には知られていない新規な構造である事が確認された。

以上のことから、試験管内進化実験のツールとしてコムギ無細胞系を用い、ポリソームセレクション法を開発することによって、高いタンパク質合成促進活性を付与する 5'-UTR 配列の創製が可能である事が分かった。今後、得られた配列群の中からオメガ配列と同等、あるいはそれ以上の翻訳促進活性を持つ 5'-UTR 配列をスクリーニングするシステムの開発を行い、得られた配列をもとに改良を加えた無細胞系専用の鋳型を構築し、コムギ胚芽無細胞系の進化工学への応用が可能であることの一例を提示したいと考えている。