

機関番号： 24506

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2008～2010

課題番号：2020056

研究課題名（和文） 人工ウイルス合成に向けたヒト完全再構成型翻訳システムの開発

研究課題名（英文） Development of the complete translation system reconstituted with human factors toward the synthesis of artificial viruses

研究代表者 今高 寛晃 (IMATAKA HIROAKI)

兵庫県立大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：50201942

研究成果の概要（和文）：試験管内での脳心筋炎ウイルス合成はヒト細胞抽出液由来セルフリータンパク質合成系を用いて精製できるレベルまで行えるようになった。再構成型翻訳システムに関しては、C型肝炎ウイルスのRNAを利用して、翻訳伸長因子、翻訳停止因子、リボソーム、アミノアシル tRNA を含んだ系で、タンパク質を合成できるシステムを開発した。このシステムを利用して脳心筋炎ウイルスの殻のタンパク質合成を試みた。

研究成果の概要（英文）：We succeeded in synthesizing encephalomyocarditis virus in the human cell ext-derived in vitro protein synthesis system and purifying the virus. We developed the translation system reconstituted with human translation factors using the hepatitis C virus RNA, translation elongation factors, releasing factors, ribosomes and aminoacylated tRNAs. By using this system, we attempted to synthesize the capsid proteins of encephalomyocarditis virus.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2009年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2010年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
年度			
年度			
総計	23,400,000	7,020,000	30,420,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・バイオ生産プロセス

キーワード：再構成、ウイルス、タンパク質合成、翻訳、セルフリーシステム

1. 研究開始当初の背景

細胞内でのRNAウイルスの合成は複雑な過程を経て行われる。この過程を分子レベルで解析するために試験管内ウイルス合成系が細胞抽出液を利用して開発されていた。しかしながら従来のシステムは合成効率が悪くシステムとしては不完全であった。また、抽出液中には無数の因子が存在しているため、本質的には生きた細胞でのウイルス合成と変わり無く、本当の意味での試験管内でのウイルス合成とは言い難いシステムであった。

2. 研究の目的

RNAウイルスの合成メカニズムを分子レベルで解析するために、試験管内でのウイルス粒子合成、究極的には完全再構成系でのウイルス粒子合成に向かって技術開発を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

まず、ヒト細胞由来セルフリータンパク質合成系でのRNAウイルス合成系の効率化に取り組み、特に翻訳活性化因子GADD34の変異体

を準備し、それを合成系に加えることによって、ウイルスの合成がどれだけ上がるか測定した。また、再構成翻訳系の樹立に関しては、すべての翻訳因子を精製し、試験管内で再構成を行った。最後に、この再構成翻訳系で脳心筋炎ウイルス(EMCV)のカプシド(殻)の合成を試みた。

4. 研究成果

(1) セルフリー系におけるウイルス合成の効率化：翻訳活性化因子GADD34 (675 アミノ酸) はリコンビナント体として合成するのが難しく、今までは実験系に高濃度で投入できない状態であった。今回、N-端 240 アミノ酸を欠失させたGADD34 は活性を失わず、大量に合成できることがわかった。この欠失型GADD34 を投入したヒト細胞由来セルフリータンパク質合成系にて脳心筋炎ウイルス(EMCV) を非常に再現よく 10^7 pfu/・1 のレベルまで合成できるようになった。そして、合成されたEMCV粒子を電子顕微鏡で確認するため、その精製を行った。ショ糖密度勾配遠心を行うだけではリボソームと分離することができないことがわかった。そこで反応後、界面活性剤、RNase処理、ピューロマイシン処理、高塩濃度処理の後ショ糖密度勾配遠心を行うと、ほぼ完全にウイルス粒子を精製できることは判明した。

(2) 再構成型タンパク質合成系の樹立：RNAウイルスの中でC型肝炎ウイルスの翻訳は高濃度のマグネシウムの存在下では翻訳開始因子無しで進めることができることを利用し、再構成系を単純化した。つまり、翻訳伸長因子 eEF1 (eEF1A, eEF1B \cdot , \cdot eEF1B \cdot)、 \cdot eEF2、翻訳停止因子 eRF1、eRF3、アミノアシル tRNA、リボソームサブユニット (40S と 60S) を混合し、再構成翻訳系を構築した。このシステムに HCV-IRES-ルシフェラーゼ RNA を加え、加温した。特にマグネシウムの濃度に留意し、1 mM から 10 mM まで細かく検討した。1-3 時間後、ルシフェラーゼ活性を測定し、タンパク質が合成されているかどうか観察した。各々のコンポーネントがすべて揃っている条件でのみルシフェラーゼが合成された。最適条件を見出すために各々の因子の濃度を変化させると、比較的少量で済む因子は \cdot eEF2 と eRF1、eRF3 であり、最も高濃度を要求するのは eEF1 とアミノアシル tRNA であった。また、マグネシウムの濃度は 3.5-5 mM のみ翻訳が進行した。温度は 37 度が最適であった。

(3) 再構成系において EMCV ウイルスのカプシド領域 1A-1B-1C-1D の合成を試みた。ウエスタンブロットを行ったが合成は確認できなかった。また、(2) の再構成系が最適化されていないと考えられ、特に eEF1 とアミノアシル tRNA の濃度をさらに高くし、系を透析法にて長時間反応型に変える必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

① Tominari Kobayashi, Kodai Machida, Satoshi Mikami, Mamiko Masutani and Hiroaki Imataka (2011)

Cell-free RNA replication systems based on a human cell extracts-derived *in vitro* translation system with the encephalomyocarditisvirus RNA

J. Biochemistry doi: 10.1093/jb/mvr072
査読あり

② Satoshi Mikami, Tominari Kobayashi, Kodai Machida, Mamiko Masutani, Shigeyuki Yokoyama, and Hiroaki Imataka (2010)

N-terminally truncated GADD34 proteins are convenient translation enhancers in a human cell-derived *in vitro* protein synthesis system.

Biotechnology Letters 32: 897-902
査読あり

③ Satoshi Mikami, Tominari Kobayashi, Mamiko Masutani, Shigeyuki Yokoyama, and Hiroaki Imataka (2008)

A human cell-derived *in vitro* coupled transcription/translation system optimized for production of recombinant proteins

Protein Expr. Purif 62: 190-198
査読あり

[学会発表] (計 13 件)

① 三上暁, 横山茂之, 今高寛晃

ヒト細胞抽出液由来セルフリータンパク質合成システムを用いた糖タンパク質合成

第 10 回蛋白質科学年会 2010 年 6 月 18 日

札幌コンベンションセンター（札幌市）

② 小林富成, 中村祐輔, 町田幸大, 三上暁,
今高寛晃

ヒト細胞由来セルフリー系を用いたRNA
ウイルスの合成: From DNA to virus in one
tube

第5回 無細胞生命科学研究会 2010年9月
29日 岡山大学 (岡山市)

③ 宮崎祐輔, 小林富成, 町田幸大, 今高寛
晃

人工ウイルス粒子の手作り作製

第5回 無細胞生命科学研究会 2010年9月
29日 岡山大学 (岡山市)

④ 舛谷真美子, 三上暁, 町田幸大, 横山茂
之, 今高寛晃

ヒト細胞由来無細胞系によるタンパク質複
合体合成法

第5回 無細胞生命科学研究会 2010年9月
29日 岡山大学 (岡山市)

⑤ 町田幸大, 小林富成, 三上暁, 舛谷真美
子, 今高寛晃

HeLa 細胞由来無細胞タンパク質合成システ
ムを利用したシャペロニンCCT再構成

第5回 無細胞生命科学研究会 2010年9月
30日 岡山大学 (岡山市)

⑥ 町田幸大, 小林富成, 三上暁, 舛谷真美
子, 今高寛晃

リコンビナントサブユニットからの16量体
CCT再構成

第33回日本分子生物学会 2010年12月7日
神戸ポートアイランド (神戸市)

⑦ 舛谷真美子, 三上暁, 町田幸大, 横山茂

之, 今高寛晃

タンパク質複合体 eIF3 のセルフリー再構成
第33回日本分子生物学会 2010年12月8日
神戸ポートアイランド (神戸市)

⑧ 小林富成, 中村祐輔, 町田幸大, 宮崎祐
輔, 三上暁, 今高寛晃

ヒト細胞由来セルフリー系を用いたRNA ウイ
ルスの合成: From DNA to virus in one tube
第33回日本分子生物学会 2010年12月8日
神戸ポートアイランド (神戸市)

⑨ 三上暁, 舛谷真美子, 町田幸大, 小林富
成, 横山茂之, 今高寛晃

真核細胞特異的 / 翻訳依存的タンパク質プ
ロセッシング

第33回日本分子生物学会 2010年12月9日
神戸ポートアイランド (神戸市)

⑩ 今高 寛晃

試験管内ウイルス粒子合成技術の開発

第14回 けいはんなシーズフォーラム

2010年1月26日 (中ノ島センタービル
(大阪市))

⑪ K. Vattem, S. Mikami, K. Maas, E.
Homemema, A. Morgan, M. Schofield, B. Webb,
A. Deshpande, and H. Imataka

A novel human in vitro translation system
for glycoprotein expression

第8回 国際プロテオミクス会議

2009年9月28日 (ウエステインハーバ
ーキャスル (トロント))

⑫ S Mikami, K Machida S Yokoyama, and H
Imataka

Human Cell-Derived *in vitro* Coupled
Transcription/Translation Systems

第8回 国際プロテオミクス会議

2009年9月28日 (ウエステインハーバー
キャスル (トロント))

[図書] (計5件)

① 今高寛晃、舛谷真美子、小林富成

ヒト型無細胞翻訳システムを創る

実験医学(2011) 29 (7) 1091-1096

② Satoshi Mikami, Tominari Kobayashi and
Hiroaki Imataka (2010)

Cell-free protein synthesis systems with
extracts from cultured human cells. In:
Endo, Y., Takai, K. and Ueda, T.
(Eds.), Methods in Molecular Biology 607,
Cell-free protein production: Methods and
Protocols. Human Press, pp43-52.

③ 今高寛晃、三上暁 (2009) 翻訳開始の制
御

蛋白質 核酸 酵素 54: 2213-2218

④ 今高寛晃、三上暁 (2009)

ヒト細胞由来無細胞タンパク質合成システ
ムの魅力

生化学 81 巻 4号 303-307

⑤ 横山茂之, 今高寛晃 (2008)

pp135-138 大腸菌抽出液を用いた無細胞タ
ンパク質合成系

p139 動物細胞を用いた無細胞タンパク質
合成系

タンパク質科学実験法1 タンパク質をつ
くるー抽出・精製と合成

(化学同人) 長谷俊治、高尾敏文、高木淳一、
編集

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今高 寛晃 (IMATAKA HIROAKI)

兵庫県立大学・大学院・工学研究科・教授

研究者番号: 50201942

(2) 研究分担者
()

研究者番号:

(3) 連携研究者
()

研究者番号: