

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月9日現在

機関番号： 58001

研究種目： 基盤研究（C）

研究期間： 2009 ～ 2011

課題番号： 21580069

研究課題名（和文） 昆虫由来無細胞タンパク質合成系の高度化

研究課題名（英文） An improvement of insect cell-free protein synthesis system

## 研究代表者

伊東 昌章（ITO MASAOKI）

沖縄工業高等専門学校・生物資源工学科・教授

研究者番号： 00395650

## 研究成果の概要（和文）：

本研究では、昆虫由来無細胞タンパク質合成系を高度化することを目的として、翻訳促進配列である *Malacosma neustria* 核多角体病ウイルス由来ポリヘドリン遺伝子の5' 非翻訳領域の解析を行った。その結果、16塩基からなる翻訳促進に重要な配列を見出し、それを2回反復することで、従来と比べて1.4倍の合成量向上に成功した。また、有機溶媒耐性チロシナーゼ（金属タンパク質）、耐熱性ラッカーゼ（膜結合性タンパク質）の発現系を構築し、その評価方法を確立した。

## 研究成果の概要（英文）：

In the present study, we analyzed an enhancer sequence composed of *Malacosma Neustria* nucleopolyhedrovirus polyhedrin 5'-UTR for improvement of insect cell-free protein synthesis system. As a result, we found important sequence of 16 base length. A protein synthesis activity using twice repeat of the sequence as enhancer was 1.4-fold greater than that of using usual enhancer. Furthermore, we constructed cell-free expression and analysis systems for organic solvent resistant tyrosinase (metal protein) and thermostable laccase (membrane-binding protein)

## 交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,600,000 | 480,000   | 2,080,000 |
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000   | 1,300,000 |
| 2011年度 | 1,200,000 | 360,000   | 1,560,000 |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,800,000 | 1,140,000 | 4,940,000 |

研究分野： 農学

科研費の分科・細目： 農学・応用昆虫学

キーワード： 昆虫利用・機能開発、無細胞タンパク質合成系

## 1. 研究開始当初の背景

本研究は、昆虫産業を創出・発展させるための基盤技術の確立を最終目的とした昆虫由来無細胞タンパク質合成系の高度化に関する。無細胞タンパク質合成系は、生細胞を用いず、試験管内でタンパク質を合成するポ

ストゲノム研究におけるキーテクノロジーである。これまでに我々は、カイコ幼虫や昆虫培養細胞の高いタンパク質合成能に着目し、カイコ幼虫後部絹糸腺および昆虫培養細胞の抽出液を用いて動物由来の系としては最も高い生産能（50  $\mu$ g/ml 以上）を有する無

細胞タンパク質合成系を開発した。また、昆虫培養細胞由来の抽出液を用いた系を用いて世界ではじめて試薬キット化した。この技術は、現在、世界中のバイオテクノロジーやライフサイエンス分野の研究者に簡便なタンパク質発現手段として広く使われている。さらに、昆虫を用いた技術以外にも、哺乳動物培養細胞などの動物細胞、酵母やキノコなどの微生物由来の抽出液を用いた無細胞タンパク質合成系を構築している。

## 2. 研究の目的

このような研究状況のもと、本研究では、動物由来で最も高い合成能を有し各種翻訳後修飾が哺乳動物と同様に生じることが明らかとなっており、今後さらなる利用の拡大が期待できる昆虫を用いた無細胞タンパク質合成系を構築し、その翻訳機構や生成タンパク質の状態を解析し、系を改良していくことで、これまで構築してきた技術をさらに高度化することを目的とする。

具体的には、①翻訳促進配列のスクリーニング、変異解析を行うことにより、mRNA中の翻訳促進配列とリボソームとの相互作用を解析し、得られた知見より合成量向上を可能とする新たな翻訳促進配列を創出する。②これまで発現実績がない金属タンパク質の発現の解析を行うことにより、金属タンパク質の成熟化過程を考察するとともに効率的な金属タンパク質発現系を構築する。③独自に調製した動物培養細胞由来のミクロソーム膜を系に添加することによる膜タンパク質発現、解析手法を構築する。

これらを行い、昆虫由来の無細胞タンパク質合成系における翻訳機構、生成タンパク質の成熟化機構、および膜タンパク質のミクロソーム膜への結合・挿入機構を理解していくことにより、可溶化タンパク質から膜タンパク質まで幅広い種類のタンパク質に対応でき得る動物由来で最も実用的な昆虫無細胞タンパク質合成系の構築を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 翻訳促進配列の解析

実験には、翻訳を促進する配列として46塩基からなる *Malacosma neustria* 核多角体病ウイルス由来ポリヘドリン遺伝子の5'非翻訳領域が用いられている昆虫無細胞系用の発現ベクターpTD1 (DDBJ/GenBank/EMBL Accession Number: AB194742) の翻訳促進配列の直下と BamHI サイトの間に、 $\beta$ -galactosidase 遺伝子が挿入された pTD1- $\beta$ gal を用いた。翻訳促進配列の短縮がタンパク質合成能に与える影響を評価するために、翻訳促進配列を2塩基ずつ①5'-末

端から3'-末端へ短縮したもの23種類 ②3'-末端から5'-末端へ短縮したもの23種類 ③3'-末端より上流5番目の塩基から5'-末端へ短縮したもの20種類からなる全66種類の変異発現プラスミドを作製し、それを鋳型とし昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成を行い、合成された $\beta$ -ガラクトシダーゼの活性測定およびウエスタンブロット解析を行うことで評価した。さらに、翻訳促進配列の5'-末端より30番目から3'-末端までの16塩基からなる配列[5'-AAAAATAAAATATAAAA-3']をコア配列とし、それぞれ1回(R1)、2回(R2)、3回(R3)反復させた配列を有するプラスミドを調製し、評価に用いた。

### (2) 金属タンパク質の発現解析

解析対象としては、銅イオンを活性中心に持つ金属酵素である放線菌 *Streptomyces* sp. REN-21 が生産する有機溶媒耐性チロシナーゼ(OSRT)を用いた。先のOSRTの遺伝子解析の結果より、OSRTのオペロンはOSRTとその活性化に関わるORF393をコードする2つの遺伝子から構成されていることを明らかにしている。本研究では、まず、pTD1ベクターを用いてOSRTの無細胞合成系を構築し、それを用いて、mRNA添加量や比率を変え影響を調べることで活性化機構を解析した。

### (3) 膜結合性タンパク質の発現解析

モデルタンパク質としては、銅イオンを活性中心に持つ金属酵素でもある放線菌 *Streptomyces lavendulae* REN-7 が生産する耐熱性ラッカーゼを用いた。本研究では、まず、pTD1ベクターを用いて耐熱性ラッカーゼの無細胞合成系を構築し、合成された膜結合性タンパク質の評価系を確立した。

## 4. 研究成果

### (1) 翻訳促進配列の解析

まず翻訳促進配列を2塩基ずつ①5'-末端から3'-末端へ短縮したもの23種類 ②3'-末端から5'-末端へ短縮したもの23種類 ③3'-末端より上流5番目の塩基から5'-末端へ短縮したもの20種類からなる全66種類の直鎖状DNAをサンプルに用いて $\beta$ -galactosidaseの合成を行い、その活性測定とウエスタンブロットングにより、翻訳促進配列の短縮が翻訳促進能に与える影響を評価した。その結果、配列長の短縮に伴い翻訳促進能も低下する傾向がみられた。しかし、5'-末端より30番目から3'-末端までの16塩基の配列[5'-AAAAATAAAATATAAAA-3']を翻訳促進配列として有するサンプルでは、配列長が約三分の一に短縮されているにも関わらず、改変前の配列を有するサンプルの

71.8%に相当する翻訳促進能を示した。筆者はこの16塩基の配列が翻訳促進能を担う重要な部位であると仮定しコア配列と名付けた。そしてこの配列を1-3回反復させた配列をそれぞれ有するプラスミドDNAをサンプルに用いて $\beta$ -galactosidase合成を行い、その活性測定により翻訳促進能を評価した。その結果、コア配列を2回反復させた配列は、変更前の配列と比較して約138%の翻訳促進能を示し、残り2つの配列では変更前の配列と比較して10%未満の減少にとどまった。

以上の結果より、本研究では、5'-末端より30番目から3'-末端までの16塩基の配列を2回反復させた32塩基よりなる新たな翻訳促進配列[5'-AAAAATAAAATATAAAA AAAAATAAAATATAAAA -3']を創出することにより、昆虫無細胞系のタンパク質合成能を向上することに成功した。

### (2) 金属タンパク質の発現解析

OSRTの無細胞合成条件を決定した。その結果、酢酸銅25 $\mu$ M含有、DTT非添加の昆虫培養細胞無細胞タンパク質合成系を用い、ORF393とOSRTのmRNA添加モル比は1:1とする条件にて行うことが最適であると決定した。さらに、その条件を用いてOSRTの活性化機構の解析、シグナルペプチドの影響を調べた。その結果、OSRTの活性化機構は、翻訳後に不活性型OSRTはモル比1:1にてORF393と相互作用して銅イオンを取込み、ORF393と離れ、活性型OSRTとなると推定された。また、ORF393のシグナルペプチドは、OSRT活性へ影響しない。また、基質ポケット占有残基Tyr104、銅イオン配位残基His88、Met90、His103はOSRT活性化のために重要な残基だと示唆された。

以上のことから、昆虫無細胞タンパク質合成系を用いた金属タンパク質の発現、解析手法を構築することができた。

### (3) 膜結合性タンパク質の発現解析

金属酵素でもある耐熱性ラッカーゼの無細胞合成条件を決定した。その結果、硫酸銅25 $\mu$ M含有、DTT非添加の昆虫培養細胞無細胞タンパク質合成系を用いることで高いカタコール酸化活性が得られた。各種添加物質がSTSLの活性に与える影響については、DTT存在下で活性が低下することから、耐熱性ラッカーゼ中のジスルフィド結合が活性に関与していることが示唆された。また、銅イオンの添加により約18倍活性が高くなっていることから、銅酵素である耐熱性ラッカーゼの活性発現には銅イオンが必須であることが示された。

以上のことから、膜結合性タンパク質である耐熱性ラッカーゼの活性型での発現に成功し、膜結合性タンパク質の発現解析手法を

構築することができた。今後は、マイクロソーム膜を添加し、その影響を調べることで、膜結合性タンパク質と膜との相互作用を解析していく。

### 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1件)

①Suzuki, T., Ezure, T., Shikata, M., Ito, M., Ando, E., Utsumi, T., Nishimura, O., and Tsunasawa, S., Development of an insect cell-free system, Current Pharmaceutical Biotechnology, 2010, 11, 279-284

[学会発表] (計10件)

①島村修司、湧川盛洋、伊東昌章、昆虫培養細胞由来無細胞タンパク質合成系における翻訳促進配列の解析、日本農芸化学会2012年度大会、2012年3月24日、京都女子大学

②尾山廣、伊東昌章、中山亨、耐熱性セリン-カルボキシルプロテアーゼ、kumamolisinの構造と機能、第84回日本生化学会大会(シンポジウム招待講演)、2011年9月24日、京都国際会館

③近藤智文、大塚京平、伊東昌章、カイコ抽出液を用いた無細胞タンパク質合成系の実用化研究、第20回九州沖縄地区高専フォーラム、2010年12月11日、沖縄工業高等専門学校

④島村修司、湧川盛洋、伊東昌章、昆虫無細胞タンパク質合成系における翻訳促進配列の機能解析、第20回九州沖縄地区高専フォーラム、2010年12月11日、沖縄工業高等専門学校

⑤伊東昌章、前兼久千尋、江連徹、井上國世、長岡純治、昆虫無細胞タンパク質合成系を用いた有機溶媒耐性チロシナーゼ活性化機構の解析、日本蚕糸学会支部合同大会、2010年11月15日、浦添市でだこホール

⑥伊東昌章、前兼久千尋、江連徹、井上國世、放線菌由来有機溶媒耐性チロシナーゼ活性化機構の解析、日本蛋白質科学会2010年度大会、2010年6月17日、札幌コンベンションセンター

⑦相澤圭師、佐藤陽子、吉村昌一郎、江連徹、安藤英治、伊東昌章、魚住信之、昆虫培養細胞由来無細胞系の効率化と膜タンパク質の膜組込み効率の評価、日本生化学会東北支部第76回例会・シンポジウム、2010年5月8日、コラッセふくしま

⑧鈴木崇、江連徹、伊東昌章、四方正光、安藤英治、西村紀、内海俊彦、綱澤進、昆虫無細胞タンパク質合成系に存在するカスパーゼ様活性の同定、日本農芸化学会2010年度

大会、2010年3月30日、東京大学駒場キャンパス

⑨前兼久千尋、江連徹、井上國世、伊東昌章、有機溶媒耐性チロシナーゼ無細胞合成系の構築とそれを用いた活性化機構の解析、日本農芸化学会2010年度大会、2010年3月29日、東京大学駒場キャンパス

⑩伊東昌章、カイコ無細胞タンパク質合成系の実用化研究－新たな養蚕業の創出を目指して－、沖縄産学官イノベーションフォーラム2009、2009年11月22日、沖縄県工業技術センター

〔図書〕（計4件）

①伊東昌章、シーエムシー出版、食品酵素化学の最新技術と応用Ⅱ－展開するフードプロテオミクス－ 第18章「有機溶媒耐性チロシナーゼ－その特性と利用の可能性－」、2011年、184-191

②Ezure, T., Suzuki, T., Shikata, M., Ito, M., and Ando, E., Humana Press, “A cell-free protein synthesis system from insect cells” in Cell-free Protein Production, Methods in Molecular Biology, vol.607, 2010, 31-42

③Suzuki, T., Ezure, T., Ito, M., Shikata, M., and Ando, T., Humana Press, “An insect cell-free system for recombinant protein expression using cDNA resources” in Reverse Chemical Genetics, Methods in Molecular Biology, vol.577, 2009, 97-108

④伊東昌章、シーエムシー出版、ラッカーゼ－その特性と環境分野への利用－「産業酵素の応用技術と最新動向」、2009年、321-328

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：翻訳促進配列およびそれを用いた無細胞タンパク質合成方法

発明者：伊東昌章

権利者：独立行政法人国立高等専門学校機構

種類：特許

番号：特願2012-38002

出願年月日：2012年2月7日

国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊東 昌章 (ITO MASA AKI)

沖縄工業高等専門学校・生物資源工学科・教授

研究者番号：00395650