

令和 4 年 6 月 26 日現在

機関番号：58001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05176

研究課題名(和文) 昆虫抽出液を用いた高効率完全無細胞タンパク質合成系の構築

研究課題名(英文) Construction of highly efficient completely cell-free protein synthesis system using insect extract

研究代表者

伊東 昌章 (Ito, Masaaki)

沖縄工業高等専門学校・生物資源工学科・教授

研究者番号：00395659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、まず、翻訳促進配列を検討し、カイコ無細胞タンパク質合成系における実験操作の効率化に成功し、完全無細胞タンパク質合成系を構築することができた。次に、合成量向上に向けて、カイコ幼虫後部絹糸腺由来抽出液調製条件の検討を行った。その結果、 β -ガラクトシダーゼの合成を指標とした場合で、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の合成能を有する抽出液の調製方法を確立した。また、その抽出液を用いたRNA精製の手間を省くLink法の最適キレート剤濃度を検討した。その結果、EDTA 0.5 mMにおいて最も合成量が高いことが明らかとなった。これらにより、カイコ無細胞タンパク質合成系における合成量の向上に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、試薬キットとして実用化されたが未だマイナーなタンパク質生産技術である昆虫無細胞系の合成効率および利便性の向上を図ることで「創薬研究・ポストゲノム研究に使われる技術」にすることを目的とした。これまで申請者が開発してきた昆虫無細胞系は、カイコ幼虫や昆虫培養細胞が高いタンパク質合成能を有することに着目して研究をすすめ、昆虫を利用した科学技術革新を目指しており学術的に意義がある。また、この系は、動物由来の無細胞系の中で高い合成能を有しており、各種翻訳後修飾も哺乳動物と同様であることから極めて有用であり、利便性を高め、さらに合成量を高めたことの意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：In this study, we first investigated the enhancer sequence, succeeded in improving the efficiency of experimental operations in the silkworm cell-free protein synthesis system, and were able to construct a completely cell-free protein synthesis system. Next, in order to improve the amount of synthesis, the conditions for preparing the extract derived from the silkworm posterior silk gland were examined. As a result, we established a method for preparing an extract having a synthetic ability of 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ or more when the synthesis of β -galactosidase was used as a control. In addition, the optimum chelating agent concentration of the link method, which saves the trouble of RNA purification using the extract, was examined. As a result, it was clarified that the amount of synthesis was the highest in EDTA 0.5 mM. As a result, we succeeded in improving the amount of synthesis in the silkworm cell-free protein synthesis system.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：無細胞タンパク質合成系 カイコ 昆虫培養細胞 翻訳促進配列

1. 研究開始当初の背景

無細胞タンパク質合成系（無細胞系）は、生細胞を用いず、試験管内でタンパク質を合成する創薬研究やポストゲノム研究におけるキーテクノロジーの一つである。これまで、大腸菌、コムギ胚芽、ウサギ網状赤血球由来の抽出液を利用した無細胞系が利用されてきた。しかしながら、大腸菌、コムギ胚芽の系では高い合成量が得られるものの活性型のジスルフィド結合を有するタンパク質が得られ難い、ウサギ網状赤血球の系では合成量が極めて低い等、それぞれメリット、デメリットを有していた。

そのような中、申請者は、タンパク質生産方法のスタンダードとなり得る高等生物由来でジスルフィド結合を含む翻訳後修飾等が適切に起こりかつ高い合成能を有する無細胞系が必要と考え、昆虫に着目し、カイコ幼虫絹糸腺抽出液を用いた無細胞系（カイコ無細胞系）を開発した。また、昆虫培養細胞抽出液を用いた無細胞系（昆虫培養細胞無細胞系）を開発し、世界ではじめて試薬キット化した。開発した昆虫無細胞系の特徴・メリットを前ページの図に示した。この技術を利用した無細胞タンパク質合成試薬キットは、現在、複数の試薬メーカーより全世界で販売されており、ライフサイエンス分野の研究者に簡便なタンパク質の生産手段として使われている。

その後、平成 21-23 および 24-26 年度の基盤研究 (C) 採択研究課題では、昆虫培養細胞およびカイコの無細胞系における翻訳促進配列の機能解析を行い、新たな翻訳促進配列を創出することで合成量向上に成功した。また、有機溶媒耐性チロシナーゼのその活性化タンパク質との共発現・解析システムを構築した。さらに、ウエスタンブロット解析を用いた耐熱性ラッカーゼなどの膜タンパク質無細胞発現システムを構築した。平成 23、24 年度 JST A-STEP (FS) の研究課題では、セリシン生産に特化したカイコ品種である「セリシンホープ」に着目し、その交雑種の中部絹糸腺を用いて新規カイコ無細胞系を構築した。さらに、この特許出願技術をもとに、沖縄県が実施する知的・産業クラスター形成推進事業の研究課題に採択され、平成 26-28 年度の 3 年間で、カイコ無細胞系の高度化を進め、約 70 μg/ml までの合成量向上などに成功している。そして、昆虫無細胞系を利用した応用研究として逆転写酵素や膜タンパク質の発現・解析を行った。現在は、沖縄科学技術イノベーションシステム構築事業採択研究課題で、カイコ無細胞系を用いて疾患関連タンパク質とその変異体ライブラリーを構築している。このように、さまざまな応用展開が可能な系であるが、現状では、大腸菌等の生細胞を用いたさまざまなタンパク質生産方法がある中で、昆虫無細胞系はマイナーなタンパク質生産手段にしか過ぎない。今後、昆虫無細胞系を有力なタンパク質合成方法にするためには、「創薬研究・ポストゲノム研究に使われる技術」に仕上げ、研究用の試薬キットとしてのみならず、タンパク質性医薬品、産業用酵素の製造等多くの産業分野において、昆虫無細胞系技術の利用を促していくことが必要である。

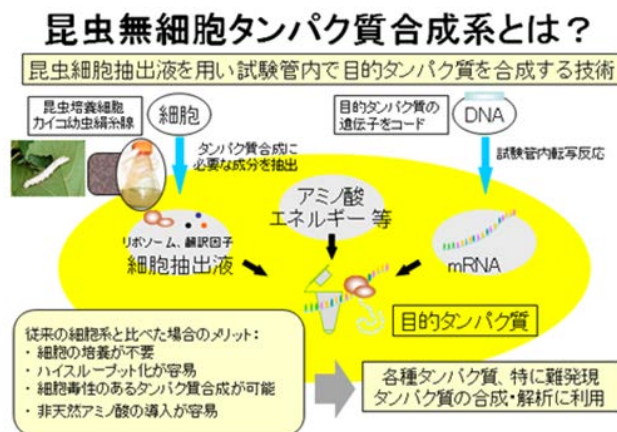


図1 昆虫無細胞タンパク質合成の概要

2. 研究の目的

本研究は、試薬キットとして実用化されたが未だマイナーなタンパク質生産技術である昆虫無細胞系の合成効率および利便性の向上を図ることで「創薬研究・ポストゲノム研究に使われる技術」にすることを目的とした。

これまで申請者が開発してきた昆虫無細胞系は、カイコ幼虫や昆虫培養細胞が高いタンパク質合成能を有することに注目して研究をすすめ、昆虫を利用した科学技術革新を目指しており学術的に意義がある。また、この系は、動物由来の無細胞系の中で高い合成能を有しており、各種翻訳後修飾も哺乳動物と同様であることから極めて有用であり、さらに合成量を高め「創薬研究・ポストゲノム研究に使われる技術」とすることの意義は大きい。昆虫無細胞系において、

mRNA の二次構造と翻訳効率との関連性に着目して昆虫無細胞系の合成量向上に取り組むのはこれまで行われておらず独創性を有している。また、すべての実験工程を遺伝子組換え実験に該当しない昆虫抽出液を用いた完全無細胞系とすることは、遺伝子組換え実験申請を省略でき、研究の利便性を高めることにつながり、学術的利用においてその意義は大きい。

3. 研究の方法

3.1 Link 法の最適化

pTD1 に MnNPV 翻訳促進配列と β -galactosidase 遺伝子が挿入された pTD1- β gal を用いて mRNA を合成した。未精製 mRNA 溶液 2 μ l に、キレート剤として EDTA を最終濃度 0 mM, 0.25 mM, 0.5 mM, 0.75 mM, 1 mM, 2 mM, 3 mM となるように添加しタンパク質合成を行うことで、Link 法におけるキレート剤の最適濃度の検討を行った。 β -galactosidase 合成量は、あらかじめ作成した検量線と比活性から算出した。

以下にキレート剤濃度ごとに合成されたタンパク質量の結果を示す (図 3)。キレート濃度が 0-2 mM のいずれにおいても β -galactosidase が合成されていることから、Link 法においてもカイコ無細胞系によるタンパク質合成が行われていることが確認された。

合成された β -galactosidase は EDTA 0.75 mM において 45.6 μ g/ml と最も合成量が多い結果となった。キレートが行われない 0 mM における β -galactosidase 合成量は 23.4 μ g/ml であり、キレート剤を添加しない場合と最適キレート濃度を添加した場合でタンパク質合成量に 2 倍の差があることが明らかとなった。

0 mM から 0.75 mM にかけて β -galactosidase の合成量の上昇が見られるが、1 mM 以上の濃度では β -galactosidase の合成量が減少しており、EDTA 3 mM を添加した際には β -galactosidase が殆ど合成されなかった。

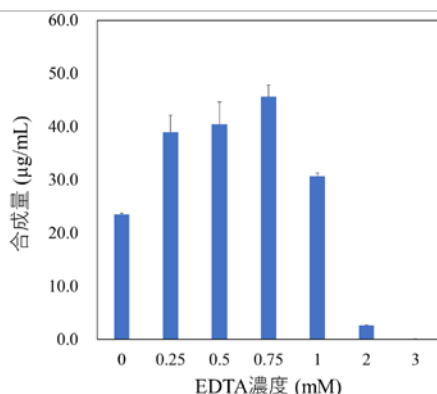


図3 EDTA 濃度による β -galactosidase 相対合成量
エラーバーは各データの標準偏差を表している。

3.2 翻訳促進配列の比較

MnNPV 翻訳促進配列と β -galactosidase 遺伝子が挿入された pTD1- β gal , 及び IGR-IRES 翻訳促進配列と β -galactosidase 遺伝子が挿入された pT7-IRES を鋳型とした mRNA を用いてタンパク質合成を行い、合成された β -galactosidase 量を活性測定により定量することで、翻訳促進配列によるタンパク質合成能を比較した。また、それぞれの配列において Link 法と精製法による合成量の差異も確認した (図 4)。

MnNPV 翻訳促進配列が挿入された mRNA を鋳型としたタンパク質合成では、Link 法で合成した場合、8.6 μ g/ml の β -galactosidase が合成された。一方で、mRNA 精製を行った場合 16 μ g/ml の β -galactosidase が合成され、Link 法による合成量は精製法による合成量の 50%の合成量を達成した。また、IGR-IRES 翻訳促進配列挿入 mRNA によるタンパク質合成では β -galactosidase が殆ど合成されなかった。

3.3 完全無細胞タンパク質合成系の構築

MnNPV 翻訳促進コア配列 5' -UTR および SfNPV 翻訳促進コア配列 5' -UTR, T7 プロモーター, 3' -UTR, ポリ A 配列を付与した β -galactosidase 遺伝子を、大腸菌を用いず PCR のみで作製する手法の検討を行った。フォワード及びリバースプライマーを各 1 本ずつ用いて PCR を行う primer A 群と、各 2 本ずつを用いて PCR を行う primer B 群を設計し、アニーリング温度は 40 $^{\circ}$ C, 45 $^{\circ}$ C, 50 $^{\circ}$ C の 3 点で反応させ、アガロースゲル電気泳動を行うことで、PCR 産物の確認と適正アニーリング温度を検討した。配列が適確に付与された場合の DNA サイズは、MnNPV 翻訳促進コア配列を挿入した DNA が 3160 bp, SfNPV 翻訳促進コア配列を挿入した DNA が 3162 bp である。

MnNPV 翻訳促進コア配列および SfNPV 翻訳促進コア配列を付与する primer による PCR において、どちらも primerA 群ではアニーリング温度 45 $^{\circ}$ C および 40 $^{\circ}$ C, primerB 群ではアニーリング温度 55 $^{\circ}$ C で 3 kbp 付近にバンドが確認された (図 5)。

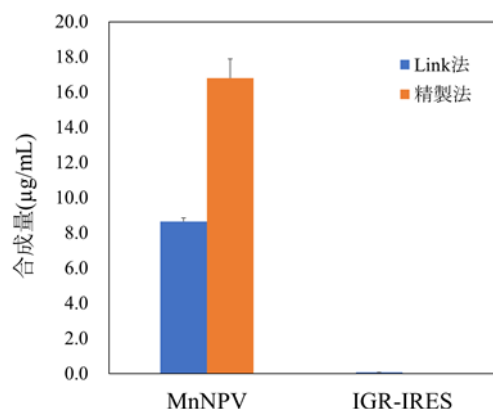


図4 2種類の翻訳促進配列におけるβ-galactosidase合成量
エラーバーは各データの標準偏差を表している。

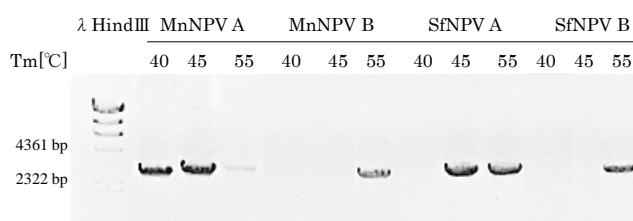


図5 翻訳促進配列を付与した
PCR産物のアガロースゲル電気泳動結果

A群（フォワードおよびリバースプライマー各1本で合成されたPCR産物）B群（フォワードおよびリバースプライマー各2本で合成されたPCR産物）

次に、アガロースゲル電気泳動でバンドが確認されたPCR産物を鋳型とし、mRNA合成およびLink法によるβ-galactosidase合成を行い、活性測定によって合成を確認した（図6）。controlは、大腸菌形質転換によって増幅したpTD1-βgalを鋳型として同様にLinkでタンパク質合成を行った際のβ-galactosidase合成量を用いた。

primerA群によるPCR産物では、MnNPV翻訳促進コア配列を付与したDNAで6.4 µg/ml、SfNPV翻訳促進コア配列を付与したDNAで3.6 µg/mlのβ-galactosidase合成が確認された。primerB群によるPCR産物ではそれぞれ0.37 µg/mlのβ-galactosidase合成が確認された。

controlと比較すると、PCR法による合成量の減少は、MnNPV翻訳促進配列を付与したprimerA群によるタンパク質合成量で27%に留まった。

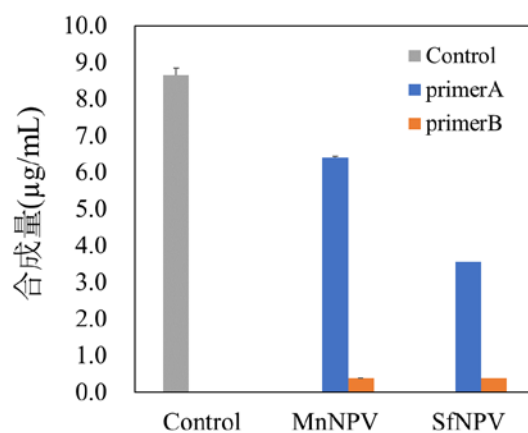


図6 PCR産物によるβ-galactosidase合成量
エラーバーは各データの標準偏差を表している。

4 研究成果

4.1 Link 法による効率化の検討

本研究では、迅速かつ簡便に目的タンパク質を合成するカイコ系の構築を目的に、*in vitro* で合成した mRNA をそのまま用いる Link 法の最適化を検討した。今回、目的タンパク質を β -galactosidase とし、活性測定によりタンパク質合成量を定量することで、Link 法におけるキレート剤最適濃度を調べた。図 2 に示された通り、 β -galactosidase 合成量は EDTA 0.75 mM において 45.6 μ g/ml と最も合成量が多く、最適であると考えられる。1 mM 以上の EDTA を添加した場合、 β -galactosidase 合成量は濃度に依存して低下した。この原因として、高濃度のキレート剤の添加によりタンパク質無細胞合成の化学反応時に必要なイオンもキレートしてしまったことが考えられる。

図 4 に示された通り、Link 法と精製法による目的タンパク質合成量を比較した際、精製法が Link 法の 2 倍量のタンパク質を合成している。精製法が濃度既知 (3.2 μ g/10 μ l) の精製 mRNA を使用するのに対して、Link 法では mRNA 溶液の濃度に関わらず 2 μ l の mRNA 溶液を使用する。このことから、合成量の差は混合した溶液中に存在した mRNA の量の差に影響されていると考えられる。このように、Link 法の導入によって精製法と比較して合成量の差が生じてしまう一方で、mRNA 精製の手間を省くことでより簡便かつ迅速にタンパク質合成を行うことができるといった利点を付加することができ、本研究の目的である無細胞合成系における操作の効率化が見込めると考えられる。

4.2 最適翻訳促進配列の決定

本研究では、カイコ無細胞系において翻訳促進能を向上させる最適な翻訳促進配列を考察するため、2 種類の翻訳促進配列によるタンパク質合成量を比較した。その結果、IGR-IRES 翻訳促進配列による β -galactosidase 合成は殆ど確認されず、MnNPV 翻訳促進では高い合成量が確認された。IGR-IRES 翻訳促進配列は、コード領域上流にあるリボソーム侵入部位を介して翻訳を行うため、高次構造が崩れると翻訳が妨げられるという特徴を持つ[10]。その特異な構造による翻訳開始機構がカイコ無細胞系に不適合であったために β -galactosidase 合成量が低くなったと考えられる。キャップ構造に依存しない翻訳促進配列は mRNA 二次構造の形成が重要であると知られており[11]、MnNPV 翻訳促進配列の二次構造はカイコ無細胞系に適合していると考えられるが、依然として遺伝子の 5' -UTR が翻訳促進能を向上させる詳細な機構の多くは明らかになっておらず、解明は今後の課題である。

4.3 完全無細胞タンパク質合成系の構築

図 5 に示された通り、PCR 産物のアガロースゲル電気泳動を行った結果、T7 プロモーター、各種 5' -UTR、3' -UTR、ポリ A 配列が付与された β -galactosidase の DNA 分子量に相当する 3 kbp 付近にバンドが確認された。また、図 6 に示されたように、PCR 産物を鋳型 DNA としたカイコ無細胞系による β -galactosidase 合成が、活性測定によって確認された。このことから、設計したプライマーを用いて PCR による鋳型 DNA の作製が正常に行われたと考えられる。mRNA 合成に用いる鋳型 DNA の作製には大腸菌を形質転換させる手法があるが、通常数日かかるものであり、迅速な回収が難しい。PCR を用いた鋳型 DNA の作製によって、大腸菌遺伝子組換え法に係る形質転換および培養の手間を大幅に省き、実験をより簡便かつ迅速に進めることが可能となった。

4.4 合成量の向上

次に、合成量向上に向けて、カイコ幼虫後部絹糸腺由来抽出液調製条件の検討を行った。その結果、一般品種の 5 齢 5 日のカイコの後部絹糸腺を摘出し、ダウンスホモジナイザーを用いて破碎・抽出方法の検討を行い、また、抽出用緩衝液量を最適化することで、 β -ガラクトシダーゼの合成を指標とした場合で、100 μ g/ml 以上の合成能を有する抽出液の調製方法を確立した。また、その抽出液を用いた RNA 精製の手間を省く Link 法の最適キレート剤濃度を検討した。その結果、EDTA 0.5 mM において最も合成量が高いことが明らかとなった。これらにより、カイコ無細胞タンパク質合成系における合成量の向上に成功した。

以上のことから、本研究を遂行することにより、完全無細胞タンパク質合成系を構築することができ、合成量向上もできたことから当初の目標を達成することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 久米大祐, 髙瀬, 中山珠里, 保川清, 島尻佳典, 伊東昌章	4. 巻 74
2. 論文標題 シマグワ葉パウダーを配合したパンの血糖値上昇抑制効果	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本栄養・食糧学会誌	6. 最初と最後の頁 15-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Masaaki Ito	4. 巻 21
2. 論文標題 Development and implementation of silkworm cell-free protein synthesis systems	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Biol. Macromol.	6. 最初と最後の頁 3-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 伊東昌章	4. 巻 89
2. 論文標題 カイコ無細胞タンパク質合成系の開発と実用化	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 蚕糸・昆虫バイオテック	6. 最初と最後の頁 51-57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Qiao Ying, Nakayama Juri, Ikeuchi Takeaki, Ito Masaaki, Kimura Toshiyuki, Kojima Kenji, Takita Teisuke, Yasukawa Kiyoshi	4. 巻 84
2. 論文標題 Kinetic analysis of inhibition of α -glucosidase by leaf powder from <i>Morus australis</i> and its component iminosugars	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2149 ~ 2156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2020.1783991	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 伊東昌章	4. 巻 74
2. 論文標題 沖縄での新たな養蚕業への挑戦 - カイコを活用するベンチャーの起業 -	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本シルク学会誌	6. 最初と最後の頁 7-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 伊東昌章	4. 巻 56
2. 論文標題 カイコ無細胞タンパク質合成系の開発と利用	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 昆虫と自然	6. 最初と最後の頁 38-41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 保川清, 喬穎, 伊東昌章, 久米大祐	4. 巻 e_2021
2. 論文標題 クワ葉成分による糖質分解酵素の阻害と食後高血糖の抑制	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 食品・臨床栄養	6. 最初と最後の頁 11-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ying Qiao, Masaaki Ito, Toshiyuki Kimura, Takeaki Ikeuchi, Teisuke Takita, Kiyoshi Yasukawa	4. 巻 132
2. 論文標題 Inhibitory effect of Morus australis leaf extract and its component iminosugars on intestinal carbohydrate-digesting enzymes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 226-233
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbiosc.2021.05.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 喬 穎、中山珠里、伊東昌章、木村俊之、兒島憲二、滝田禎亮、保川清
2. 発表標題 シマグワ茶に含まれる -グルコシダーゼ阻害成分の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会関西支部第512回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊東昌章
2. 発表標題 カイコ無細胞タンパク質合成系の開発とその応用
3. 学会等名 第46回日本毒性学会学術年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山珠里、伊東昌章、兒島憲二、滝田禎亮、保川清
2. 発表標題 シマグワ茶成分による -グルコシダーゼ阻害機構の解析
3. 学会等名 日本生物高分子学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 喬 穎、中山珠里、伊東昌章、木村俊之、兒島憲二、滝田禎亮、保川清
2. 発表標題 シマグワ茶に含まれる -グルコシダーゼ阻害成分の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会関西支部例会第512回講演会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------