

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05692

研究課題名(和文) 常温で生育するメタン生成アーキアを活用した難合成タンパク質産生系の開発

研究課題名(英文) Development of protein production system by using translation system from mesophilic methanogen

研究代表者

横川 隆志 (Yokogawa, Takashi)

岐阜大学・工学部・教授

研究者番号：90242304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：常温で生育するメタン生成アーキア *Methanosarcina acetivorans* をリットルスケールで培養し、無細胞タンパク質合成系に使用する細胞抽出液を嫌氣的に調製することで、chloramphenicol acetyltransferase をマイクログラムスケールで合成することに成功した。細胞抽出液の不活化要素として、tRNA の不活化と某かの翻訳因子の酸化が原因であることを明らかにした。また *M. acetivorans* にベクターDNA を導入することに成功し、puromycin N-acetyltransferase 遺伝子の発現を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトには多くの機能未知タンパク質が存在する。機能未知タンパク質の機能を調べるのが現代の課題だが、そのためには天然の状態に近いタンパク質が必要となる。ヒトの全塩基配列がわかっているため、大腸菌に遺伝子を導入してタンパク質を生産させることが多いが、大腸菌細胞内で沈殿してしまうことも多い。アーキアは見た目が大腸菌に似ていても細胞の成分は真核生物に近いと考えられるので、天然に近い状態のタンパク質が得られる可能性がある。この技術は、タンパク質を生産するための選択肢の一つとなりうる。

研究成果の概要(英文)：Microgram-scale chloramphenicol acetyltransferase synthesis was successfully achieved by using cell-free translation system with the cell extract anaerobically prepared from 1.5 liters culture of mesophilic methanogen, *Methanosarcina acetivorans*. However, the extract was unstable. The reasons of its instability appeared to be inactivation of tRNAs and oxidative disulfide bond formations of translation factors. The author also successfully introduced a vector DNA into *M. acetivorans* cells and confirmed the expression of puromycin N-acetyltransferase gene in the cells.

研究分野：遺伝子工学

キーワード：無細胞タンパク質合成系 遺伝子工学 メタン生成アーキア 翻訳 tRNA

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は代謝を触媒したり、細胞の情報伝達など細胞の応答に関わったり、免疫に働いたり、生物機能の中心的な役割を果たす重要な物質である。研究対象となるタンパク質の機能に迫るためには、その活性を調べたり、その構造を解析したりする必要があるが、そのためには、精製された品質の高いタンパク質が必要である。標的タンパク質を試料から直接精製することは、非常に手間のかかる作業であるが、現代は、あらゆる生物のゲノム情報が蓄積されている時代であり、たいいていの標的タンパク質遺伝子の塩基配列は容易に入手できる。そこで、標的タンパク質遺伝子から標的タンパク質を産生させる手法が広く行われている。

その手法については、宿主細胞に過剰産生させる手法 (*in vivo* の系) と、無細胞タンパク質合成系を用いる手法 (*in vitro* の系) に大別できる。生物種によって分類すると、*In vivo* の系では、大腸菌、酵母、カイコなどが、*in vitro* の系では、大腸菌、コムギ胚芽がよく用いられている。また、*in vivo* の系は、多量の標的タンパク質を得るために、*in vitro* の系は、多種類の標的タンパク質を得るために用いられることが多い (図1)。目的に合致する高品質のタンパク質を得るためには、*in vivo*、*in vitro* いずれの系を用いるのか、どの生物種を用いるのかを正しく選択する必要がある。

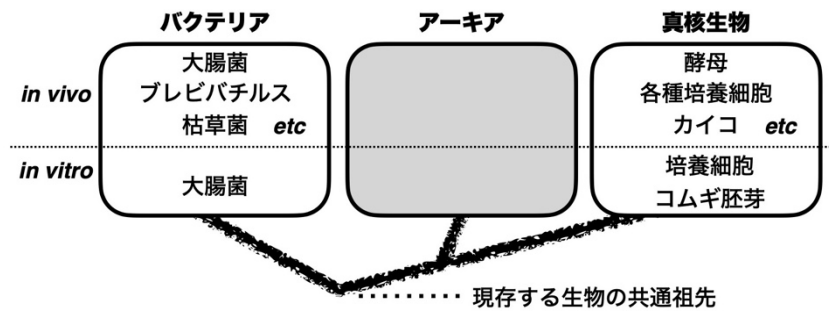


図1 現在、利用できるタンパク質産生系

ファーストチョイスとしては、大腸菌の *in vivo* の系が用いられる場合が多いと思われるが、細菌界以外の生物種のタンパク質を産生しようとする場合が多い。タンパク質が不溶化した場合、リフォールディングすることで、標的タンパク質を得ることもできるが、本来のタンパク質と同等の活性があるのか、同じ構造をしているのか、調べるのが難しい上に、リフォールディング条件が、タンパク質ごとに異なることも多く、個別に条件を探る必要がある。真核生物のタンパク質産生系を用いる手法もあるが、一般に、大腸菌に比べてコストが高いという問題点がある。筆者の経験上、品質の標的タンパク質を得るためには、同じ生物ドメインのタンパク質産生系を用いること、ではないかと感じていた。

筆者が研究対象としているメタン生成アーキアは、地球規模の炭素循環に関与していると考えられており、地球温暖化の進行をいかに食い止めるかという問題提起に対して注目されてしるべき生物群である。しかし、高い品質のアーキアタンパク質を得ようにも、アーキアのタンパク質産生系は存在していない (図1)。アーキアでは、細菌界と同様、1つの mRNA から複数のタンパク質が合成されるが、タンパク質合成に関与する翻訳因子には、真核生物と相同な因子が使われている。つまりアーキアは、真核生物の翻訳因子を用いて細菌界のようなタンパク質合成を行っている、ということになるが、アーキアは培養困難な種が多く、生化学的にはまだよくわからないことが多い。これまで *in vivo* の系で他生物種のタンパク質が産生されたという報告はなく、*in vitro* の系でタンパク質を産生させたという例は、2008年、超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* の抽出液を用いて熱安定な GFP の合成に成功した、という報告以来、途絶えている。また、*T. kodakarensis* の抽出液を反応に用いるためには、高温で保温する必要があり、他生物種のタンパク質を産生させるためには適切ではないと考えられた。

そこで筆者は、メタン生成アーキア *Methanosarcina acetivorans* が常温で生育すること、アーキアのタンパク質合成が細菌界と真核生物の両方の特徴を兼ね備えていることから、*M. acetivorans* のタンパク質産生系を構築することができれば、すべての生物種のタンパク質を産生できる系となるのではないかと期待して研究を行うことにした。

2. 研究の目的

アーキアのタンパク質合成系は、細菌界と真核生物の特徴を兼ね備えていることから、興味深い研究対象ではあるが、アーキアを大量培養するのが難しいために、翻訳にかかわる因子の生化学的な特徴については詳しく知られていない。酸素がわずかでも存在すると生育しない難しさはあるが、常温、中性の環境で生育する数少ないアーキアである *M. acetivorans* の細胞抽出液を用いて、無細胞タンパク質合成系を構築し、他生物種のタンパク質が産生できる実験系を

構築することが目的である。少量であってもタンパク質が産生できれば、合成量を増加させるための条件を探る。また、*M. acetivorans* は、遺伝子工学が報告されている数少ないアーキアなので、発現ベクターを開発して、他生物種のタンパク質を *in vivo* の系で合成させることにも取り組む。

3. 研究の方法

一般的にメタン生成アーキアは、わずかでも酸素が混入すると育成しないため、培養することが難しい。*M. acetivorans* はメタノールからメタンを発生させて生育できるので、密閉容器内の酸素を除去し、菌体は注射器で接種することで、酸素雰囲気下でも培養することができる。ただ細胞抽出液を得てタンパク質合成を行うにはリットル培養が不可欠であるが、発生するメタンが密閉容器内の圧力を高めてしまうために、大量培養は危険であった。そこで、筆者は、容量可変嫌気培養装置を自作することで、安全にリットル培養を行うことを可能にした(図2)。

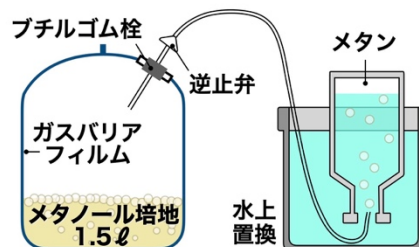


図2 容量可変嫌気培養装置

まずは、*in vitro* のタンパク質産生系の構築について記載する。

細胞抽出液を酸素に曝すと失活することも考えられたため、菌体の破砕や、細胞抽出液を得るために遠心分離を行う際には、できるだけ酸素に触れないよう工夫した。破砕は、窒素ガスを圧力容器に充填した後、圧力を解放して細胞を破砕できる Parr Cell Disruption Bomb を用いて嫌気チャンバー内で行い、超遠心用のチューブに充填して遠心を行うことで遠心時の酸素の混入をできるだけ減らした。細胞抽出液を分注するプラスチックチューブは、あらかじめ嫌気チャンバーに保管し、チューブ内に溶けている酸素を可能な限り除去した。チューブの保管にはガスバリア性の高い保存袋にチューブを封入して、液体窒素で凍結し、 -80°C で保存した。

標的には、活性測定が容易な chloramphenicol acetyltransferase (CAT) 遺伝子を選択した。アーキアでは、mRNA の leader 配列が必要ないという報告があるので、T7 プロモーターの転写開始部位直後に開始コドン配置するベクター (leaderless) を作製した。コントロールには、大腸菌のリボソーム結合部位を含む大腸菌用の CAT 発現ベクター (+SD) を用いた。CAT が産生されたか、どうかは、CAT の活性を測定することで行った。活性は、アセチル CoA からアセチル基が転移した後に生じるチオール基を定量することで行った。

次に、*in vivo* のタンパク質産生系の構築について記載する。

M. acetivorans の形質転換については、米国の Metcalf のグループからの報告に限られており、国内で成功事例が存在していなかった。まず大腸菌と *M. acetivorans* のシャトルベクターを作製するために、pUC19 のマルチクローニングサイトに、*M. acetivorans* で発現量が多いことがわかっている methyl-coenzyme M reductase のオペロンをプロモーターとターミネーターを含む形で導入し、遺伝子部分に puromycin N-acetyltransferase (PAC) 遺伝子を導入した。作製したベクターと *M. acetivorans* のプラスミドである pC2A を融合した DNA を、シャトルベクターとした。このシャトルベクターとトランスフェクション試薬 (LipoTrust™ EXGene) を混合したものを *M. acetivorans* の菌体に加えて、puromycin 耐性を示す菌の出現を三週間待ち、耐性菌が現れれば、形質転換されたと判断した。

4. 研究成果

(1) *In vitro* のタンパク質産生系の構築

まず mRNA の鋳型 DNA について検討した。鋳型 DNA はすべて T7 プロモーター下に遺伝子を持つベクター-DNA を用い、タンパク質合成の反応に T7 RNA ポリメラーゼを添加することによる転写と翻訳の共役系を採用した。5'末端直後に開始コドンがある leaderless mRNA が転写されるベクターを用いた時は、ベクターを加えないときと差がなかったが、意外なことに大腸菌用の CAT 発現ベクターを用いた時に、CAT の合成が認められた(図3)。このことは、大腸菌の leader 配列が *M. acetivorans* の系で機能することを示している。残念ながら、この時は、細胞抽出液が酸素に曝されると活性を失う可能性を考慮していなかったため、CAT の産生量は極めて少なく、放射性アミノ酸を用いなければ検出できないレベルであった。

その後、細胞抽出液が酸素に曝される機会を減らすことによって、CAT の合成量を SDS-PAGE でタンパク質のバンドが確認できるまでに増加させることができた(図4)。この結果は、*M. acetivorans* の細胞抽出液に含まれる某かの因子が酸素に曝されると失活することを示すものである。CAT の合成量は 1 mL の反応液あたり、およそ 20 μg と大腸菌やコムギの無細胞タンパク質合成系の 100 分の 1 程度で、さらに改善する必要がある。添加する試薬すべてを脱酸素することは困難なので、反応中に翻訳にかかわる因子が失活している可能性が考えられる。

本研究で明らかになった問題点は、細胞抽出液のタンパク質合成活性が安定しないことである。活性を失いやすい因子があると考えて、調査したところ、対数増殖期の後期に tRNA がこれまでに知られていない機構で不活化される現象が見出された。現在、不活化にかかわる因子を同定している。

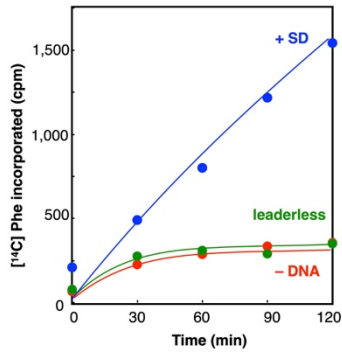


図3 leader配列の効果

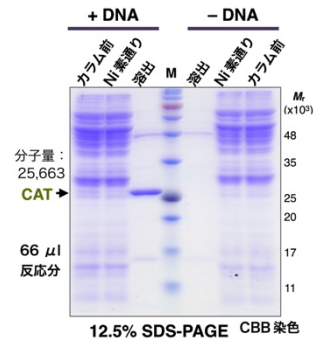


図4 嫌気調製の効果

その他の要因としては、細胞抽出液の調製手順のどこかで酸素が混入している可能性が示唆された。できるだけ酸素に触れないように保存していても、細胞抽出液の保存期間が長くなると細胞抽出液の活性が低下する。そのために、一度使用した細胞抽出液は、二度は使えない状況にあった。そこで、細胞抽出液に添加する還元剤を検討した。敢えて一度酸素に曝して活性を失わせた細胞抽出液に、終濃度 2.5 mM になるように Tris(2- carboxyethyl)phosphine (TCEP)を加えたところ、細胞抽出液のタンパク質合成活性が復活し、CAT 活性が認められるようになった。TCEP はジスルフィド結合を還元するので、この結果から、某かの翻訳因子が酸化されて失活する場合は、ジスルフィド結合が形成されたためであると考えられた。

本研究期間に CAT 以外のタンパク質を合成する実験を行うことはできなかったが、細胞抽出液を不活化する要因を特定することができたので、今後、さらに合成量を増やすよう条件を検討し、多様なタンパク質の合成に取り組みたい。M. acetivorans の in vitro の系では、添加する mRNA の鋳型 DNA に大腸菌用の T7 系発現ベクターをそのまま使えるので、大腸菌では不溶化してしまうタンパク質が M. acetivorans の in vitro の系では可溶性になる可能性について容易に調査できる。

(2) In vivo のタンパク質産生系の構築

シャトルベクターを作製して、形質転換することを試行錯誤するうちに、試薬や用いるチューブから徹底的に酸素を除去すれば、puromycin 耐性菌が現れる確率が増したと感じている。筆者が知る限り、M. acetivorans の形質転換に成功したのは、国内では初めてのことである。Puromycin 耐性菌のタンパク質を SDS-PAGE で分析したところ、PAC 相当のバンドが確認された (図 5)。この結果より M. acetivorans で他生物種のタンパク質を産生することには成功したものの、PAC は選択マーカーであり、それ以外のタンパク質を産生するためには、さらに工夫が必要である。作製したシャトルベクターは 10,000 塩基対に近くベクターとしては大きなサイズなので、まずはシャトルベクターの縮小をはかりたい。予想される問題点としては、アーキアの転写については詳しくわかっていないことも多く、また大腸菌のような転写誘導の仕組みなどもよくわかっていない。試行錯誤を重ねて、他生物種のタンパク質を産生できるよう研究を継続したいと考えている。

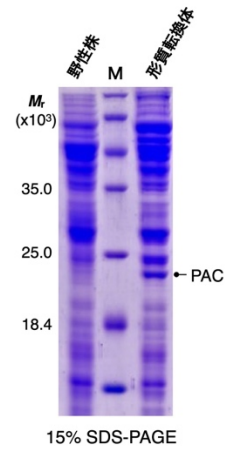


図5 PACの産生

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 2件）

1. 著者名 Arakawa Shizuka, Kamizaki Kohsuke, Kuwana Yusuke, Kataoka Naruki, Naoe Chieko, Takemoto Chie, Yokogawa Takashi, Hori Hiroyuki	4. 巻 168
2. 論文標題 Application of solid-phase DNA probe method with cleavage by deoxyribozyme for analysis of long non-coding RNAs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 273 ~ 283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvaa048	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 Hibi Keita, Amikura Kazuaki, Sugiura Naoki, Masuda Keiko, Ohno Satoshi, Yokogawa Takashi, Ueda Takuya, Shimizu Yoshihiro	4. 巻 3
2. 論文標題 Reconstituted cell-free protein synthesis using in vitro transcribed tRNAs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-1074-2	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 Yokogawa Takashi, Nomura Yuichiro, Yasuda Akihiro, Ogino Hiromi, Hiura Keita, Nakada Saori, Oka Natsuhisa, Ando Kaori, Kawamura Takuya, Hirata Akira, Hori Hiroyuki, Ohno Satoshi	4. 巻 15
2. 論文標題 Identification of a radical SAM enzyme involved in the synthesis of archaeosine	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 1148 ~ 1155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41589-019-0390-7	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 Tahara Nariyasu, Tachibana Itaru, Takeo Kazuyo, Yamashita Shinji, Shimada Atsuhiko, Hashimoto Misuzu, Ohno Satoshi, Yokogawa Takashi, Nakagawa Tsutomu, Suzuki Fumiaki, Ebihara Akio	4. 巻 28
2. 論文標題 Boosting Auto-Induction of Recombinant Proteins in Escherichia coli with Glucose and Lactose Additives	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Protein and Peptide Letters	6. 最初と最後の頁 1180 ~ 1190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/0929866528666210805120715	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 横川 隆志、平沼 芳哉、大平 翼、林 蒔歩、尾木野 弘実、大野 敏
2. 発表標題 メタン生成アーキアMethanosarcina acetivoransの無細胞タンパク質合成系の構築
3. 学会等名 第15回無細胞生命科学研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横川 隆志、能村 友一郎、安田 旭宏、尾木野 弘実、日浦 恵太、仲田 沙織、岡 夏央、安藤 香織、河村 卓哉、平田 章、堀 弘幸、大野 敏
2. 発表標題 アーキア特異的修飾ヌクレオシド、アーケオシンの合成に関わる新奇ラジカルSAM酵素
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横川 隆志、小川 純平、石田 祥輝、尾木野 弘実、大野 敏
2. 発表標題 アーキア由来 RNA free RNase P の基質特異性
3. 学会等名 第16回無細胞生命科学研究会
4. 発表年 2022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
---------	---------