

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：58001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580083

研究課題名(和文) 昆虫無細胞タンパク質合成系における利用基盤の構築

研究課題名(英文) Construction of a base for utilization of insect cell-free protein synthesis system

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) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、昆虫無細胞タンパク質合成系の利用基盤を構築することを目的として、カイコ無細胞タンパク質合成系の翻訳促進配列である *Spodoptera frugiperda* 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、3'末端から18塩基の翻訳促進に重要な配列を見出し、もとの配列と比べて1.3倍の合成量向上に成功した。

先の科研費研究を進展させ、有機溶媒耐性チロシナーゼをモデルタンパク質として用い共発現解析システムを構築した。さらに、耐熱性ラッカーゼをモデルタンパク質として用い、ウエスタンブロット解析も含めた膜結合性タンパク質の発現解析システムを構築した。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we analyzed an enhancer sequence composed of *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus polyhedrin 5' -UTR for improvement of *Bombyx mori* cell-free protein synthesis system. As a result, we found important sequence of 18 base length composed 3'-terminal region. A protein synthesis activity using the sequence as enhancer was 1.3-fold greater than that of using usual enhancer.

We constructed cell-free translation and analysis system with co-expression of activation protein using organic solvent resistant tyrosinase as a model protein. Furthermore, we also constructed membrane-binding protein expression and analysis system using thermostable laccase as a model protein.

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 昆虫 カイコ 翻訳促進配列 チロシナーゼ ラッカーゼ

1. 研究開始当初の背景

本研究は、新しい昆虫産業を創出し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無細胞タンパク質合成系(以後、昆虫無細胞系とする)の利用基盤の構築に関する。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の一つである。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から調製した抽出液を用いて動物由来としては最も高い生産能(50 µg/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。そのような中、平成 21-23 年度の科研費基盤研究(C)による研究では、昆虫培養細胞無細胞タンパク質合成系(以後、昆虫培養細胞無細胞系とする)における 46 塩基からなる翻訳促進配列の機能解析を行い、コアとなる 16 塩基の配列を見出し、その 2 回繰り返し配列を翻訳促進配列として用いることで従来比 1.4 倍のタンパク質合成に成功した(特開 2013-158342)。また、金属タンパク質である放線菌 *Streptomyces* sp. REN-21 由来耐熱性チロシナーゼ遺伝子を用いて、その酵素の効率的な発現・解析に成功し、金属タンパク質無細胞合成系を構築した。さらに、膜結合性タンパク質である放線菌 *Streptomyces lavendulae* REN-7 由来耐熱性ラッカーゼ遺伝子を用い、その酵素の無細胞合成系を構築した。

2. 研究の目的

このような状況のもと、本研究では、カイコ幼虫後部絹糸腺無細胞タンパク質合成系(以後、カイコ無細胞系とする)および昆虫培養細胞無細胞系をさらに有力なタンパク質生産・解析手段の一つとし、広くライフサイエンス分野で用いられる技術とするために、その利用基盤技術を構築することを研究の目的とする。具体的には、カイコ無細胞系に適する翻訳促進配列のスクリーニング解析を行い、昆虫培養細胞無細胞系で得られた翻訳促進配列の機能解析結果と比べることにより、その機能について考察するとともに、昆虫無細胞系の大幅なタンパク質合成量向上を実現するスーパー翻訳促進配列の創出を目指す。活性化にシャペロンを有する有機溶媒耐性チロシナーゼをモデルタンパク質として用い、共発現解析に最適な合成条件を決定するとともに、その発現と活性化機構について、ウエスタンブロットなどを用いた解析を行い、それらを系統化することにより簡便に解析が可能な昆虫無細胞タンパク

質共発現解析システムを構築する。水溶液中で不溶化し解析が困難であった膜結合性タンパク質である耐熱性ラッカーゼをモデルタンパク質として用い、その発現系を評価解析していくことで、ウエスタンブロット解析を含めた膜結合性タンパク質の無細胞発現・解析システムを構築する。

以上を達成することで、昆虫無細胞合成系をさらに使いやすい系に仕上げ、その利用基盤の構築に結びつける。

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、-galactosidase 遺伝子が挿入された pTD1-gal を用いた。カイコ無細胞合成系翻訳促進配列のスクリーニングには、pTD1-gal プラスミドをもとに、*Malacosoma neustria* のほか、*Autographa carifornica*、*Ectropis oblique*、*Choristoneura rosaceana*、*Spodoptera frugiperuda* の核多角体病ウイルス(それぞれ MnNPV、AcNPV、EoNPV、CrNPV、SfNPV と略す)由来ポリヘドリン遺伝子、および、ウサギ網状赤血球由来 -グロビン遺伝子の 5' 非翻訳領域の配列がそれぞれ翻訳促進配列として挿入された合計 6 種類の発現プラスミドを作製し、それを鋳型とし、カイコ無細胞合成系を用いて -ガラクトシダーゼの合成を行い、その合成液中の活性測定を行うことでそれぞれの 5' -非翻訳領域配列の翻訳促進効果を評価した。次に、最も翻訳促進効果を示した SfNPV 由来ポリヘドリン遺伝子の 5' 非翻訳領域において、その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、もとの配列に加え、翻訳促進配列を 2 塩基ずつ 5'-末端から 3'-末端へ短縮したもの 19 種類 3'-末端から 5'-末端へ短縮したもの 19 種類 3'-末端より上流 5 番目の塩基から 5'-末端へ短縮したもの 17 種類からなる全 56 種類の発現プラスミドを作製し、それを鋳型とし、無細胞合成を行い、その合成液中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短縮の影響を評価した。

(2) 共発現解析システムの構築

共発現解析システムの構築にあたり、モデルタンパク質として、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。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され

ている。また、先の研究では、pTD1 ベクターに、OSRT、ORF393 の各遺伝子それぞれを挿入した発現プラスミドを用いて OSRT の無細胞合成系を構築した。今回は、OSRT、ORF393 それぞれの C 末端に Strep-tagII 配列が挿入されるように改変したプラスミドを構築し、mRNA 添加量や比率を詳細に変え、その影響を調べることで活性化機構を解析するとともに、Strep-tagII 配列を利用して、ウエスタンブロット解析を行うことで、共発現におけるそれぞれのタンパク質の挙動を調べた。

(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、放線菌 *Streptomyces lavendulae* REN-7 が生産する耐熱性ラッカーゼを用いた。先の研究で構築された昆虫無細胞合成系用ラッカーゼ遺伝子発現プラスミドをもとに、C 末端に Strep-tagII 配列が挿入されるように改変したプラスミドを構築し、それを用いて、ウエスタンブロット解析を行うことで、ラッカーゼ発現の状況を調べた。また、DTT 添加の有無の影響を調べることで、ジスルフィド結合を切断する還元剤の影響を調べた。

4. 研究成果

(1) 翻訳促進配列の解析

本研究では、今回作製した 6 種類の翻訳促進配列を含む *-galactosidase* 発現プラスミドを用いて、カイコ無細胞合成系において最も合成能を向上させる最適な翻訳促進配列についてスクリーニングを行った。その結果、SfNPV 由来ポリヘドリン遺伝子の 5'-非翻訳領域を翻訳促進配列として用いた場合が最も *-galactosidase* 合成量が高く、*-globin* 遺伝子の 5'-非翻訳領域を用いた場合が最も低かった。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いる。SfNPV 由来ポリヘドリン遺伝子の 5'-非翻訳領域の配列は、リボソームがコザック配列に結合する上で他の翻訳促進配列と比べ、有利な二次構造を形成したため最も高い翻訳促進能を有したのだと考えられる。しかし、依然として遺伝子の 5'-非翻訳領域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、その機構解明は今後の課題である。また、*-globin* 遺伝子の 5'-非翻訳領域は、それ以外の 5 種類の翻訳促進配列と異なって哺乳動物が有する 5'-非翻訳領域である。そのため節足動物であるカイコには不適合な翻訳促進配列であるため、*-galactosidase* 合成量が低かったと考えられる。

次に、SfNPV 由来ポリヘドリン遺伝子の 5'-非翻訳領域の配列に加え、その配列を 2 塩基ずつ 5'-末端から 3'-末端へ短縮したもの 19 種類、3'-末端から 5'-末端へ短縮したもの 19 種類、3'-末端より上流 5 番目の塩基から 5'-末端へ短縮したもの 17 種類

からなる全 56 種類の *-galactosidase* 発現プラスミドを鋳型として *-galactosidase* の合成を行い、その活性測定とウエスタンブロット法により、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、3'-末端から 18 塩基の配列 [5'-ACATTGTGAAAAAATAAA-3'] では、短縮していない SfNPV 由来のものとの翻訳促進配列と比べて約 1.3 倍と高いタンパク質合成能を有することがわかった。したがって、この配列がカイコ無細胞系における翻訳促進効果の高いコア配列と考えられる。また、今回カイコ無細胞系において見出されたコア配列と先の研究で見出されている昆虫培養細胞無細胞系のコア配列を比較したところ、両者には共通点が挙げられ、コア配列はどちらも 5'-末端から 3'-末端に向けて短縮した配列から見出された。類似した塩基数で、ほとんどの配列がアデニンとチミンで構成された配列であることが明らかになった。短縮していない SfNPV 由来の翻訳促進配列との比較において、3'-末端から 5'-末端に向けて短縮したサンプルは、5'-末端から 3'-末端に向けて短縮したサンプルと比べて、同じ配列長であっても低い値を示した。これは、3'-末端付近のコザック配列が欠損したことによる影響であると考えられる。

以上のことより、今回の研究を進めることで、カイコ無細胞合成系において、SfNPV 由来ポリヘドリン遺伝子の 5'-非翻訳領域を翻訳促進配列として用いた場合が最も合成量が高くなることがわかった。また、その 40 塩基からなる配列の中より、翻訳促進効果の高いコア配列を見出し、それを翻訳促進配列として用いることで合成量を向上することに成功した。

(2) 共発現解析システムの構築

まず、Strep tagII 配列を導入した OSRT の無細胞合成条件を決定した。次に、Strep tagII 配列を用いたウエスタンブロット法による合成産物の検出を行った。その結果、OSRT 前駆体の分子量約 32kDa と一致するバンドと、活性化タンパク質の分子量約 13kDa と一致するバンドが検出でき、OSRT 前駆体と活性化タンパク質がそれぞれ合成されていることを確認した。

以上のことから、先に開発した活性による評価系に加え、Strep tagII 配列を用いたウエスタンブロット法による解析系の構築に成功し、昆虫無細胞合成系を用いた共発現させるタンパク質の効率的な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

まず、Strep tagII 配列を導入した耐熱性ラッカーゼの無細胞合成条件を決定した。次に、Strep tagII 配列を用いたウエスタンブロット法による合成産物の検出を行った。その結

果、耐熱性ラッカーゼの分子量約 72kDa と一致するバンドが検出でき、耐熱性ラッカーゼが合成されていることを確認した。次に、構築した合成系を用いて還元剤である DTT 添加の影響を調べた。その結果、DTT 添加、非添加、どちらの場合も同様な活性が確認され、還元剤である DTT は、耐熱性ラッカーゼの無細胞合成において影響しないことが明らかになった。この結果は、先の研究結果とは異なっており、今後、さらに条件また、合成産物の不溶化は認められず、昆虫無細胞合成系を用いることで、膜結合性タンパク質の効率的な発現・解析手法を構築することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Toru Ezure, Kei Nanatani, Satomi Suzuki, Yoko Sato, Keishi Aizawa, Satoshi Souma, Masaaki Ito, Takahiro Hohsaka, Gunnar von Heijine, Toshihiko Utsumi, Keietsu Abe, Eiji Ando, Nobuyuki Uozumi, A cell-free translocation system using extracts of cultured insect cells to yield functional membrane proteins, PLoS ONE 9(12): e112874. doi:10.1371/journal.pone.0112874 (2014) 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

佐事武、尾山廣、伊東昌章、カイコ幼虫後部絹糸腺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 2014 年度大会、2014 年 3 月 29 日、明治大学生田キャンパス(神奈川県川崎市)

塩川史弥、尾山廣、伊東昌章、耐熱性セリン カルボキシシルプロテアーゼであるクマモリシンの活性化機構の解析、第 23 回九州沖縄地区高専フォーラム、2013 年 12 月 15 日、かごしま県民交流センター(鹿児島県鹿児島市)

塩川史弥、尾山廣、伊東昌章、耐熱性セリン カルボキシシルプロテアーゼ、クマモリシンの活性化機構の解析、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 27 日、東北大学川内北キャンパス(宮城県仙台市)

〔図書〕(計 1 件)

伊東昌章、シーエムシー出版、産業用酵素の応用技術と最新動向(普及版)、2015 年、第 3 1 章 ラッカーゼ - その特性と環境関連分野への利用、pp321-328

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称: カイコ幼虫中部絹糸腺を用いた無

細胞タンパク質合成方法

発明者: 伊東昌章、岡田英二、飯塚哲也

権利者: 独立行政法人国立高等専門学校機構、国立研究開発法人農業生物資源研究所

種類: 特許

番号: 特願 2013-230629

出願年月日: 2013 年 10 月 18 日

国内外の別: 国内

名称: 桑茶の製造方法

発明者: 普天間樹、伊東昌章、藏屋英介

権利者: 浦添市、公益社団法人浦添市シルバ一人材センター、独立行政法人国立高等専門学校機構

種類: 特許

番号: 特願 2013-057529

出願年月日: 2013 年 3 月 21 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 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