

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26640129

研究課題名(和文) 真核型シャペロニンと大腸菌翻訳系を組み合わせてみる

研究課題名(英文) Combining eukaryotic chaperonins with the translation system from Escherichia coli

研究代表者

高井 和幸 (Takai, Kazuyuki)

愛媛大学・理工学研究科(工学系)・教授

研究者番号：40260848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質は鎖状の分子であるが、それが立体的に正しく折り畳まれてはじめて機能を持つ。高等動植物のタンパク質が折り畳まれるには、真核細胞特有のシャペロニンが必要であるが、大腸菌にはこれが無い。ヒトや植物のタンパク質を大腸菌に自在に合成させる技術の確立を目指して、関連技術と理論について研究した。まず、大腸菌に真核型シャペロニンを含む多数の遺伝子を同時導入するために便利なDNA構築法を開発した。次に、遺伝子そのものを大腸菌で効率よく発現するよう最適化する際に研究者が自分で合理的に塩基配列を微調整できる方法を開発した。さらに、大腸菌で複数の遺伝子が発現するときの相対発現量に関する理論を構築した。

研究成果の概要(英文)：Proteins function only when the polypeptide chain folds into its correct shape. Proteins from animals and plants need eukaryote-specific chaperonins for the correct folding, which lack in Escherichia coli. For future establishment of technologies for synthesizing eukaryotic proteins in E. coli, related technologies and some theory were studied. The first achievement was a plasmid construction method that could be useful for introduction of a dozen genes simultaneously in E. coli. The second was a method for optimization of gene sequences, with which researchers could change the sequences manually if necessary. The third achievement was a theory on relative expression levels of proteins in growing bacteria.

研究分野：生物化学

キーワード：chaperonin expression Escherichia coli wheat

### 1. 研究開始当初の背景

生命の理解のためには、個々のタンパク質を単離して機能を詳細に検討し、さらにそれらが集まってどのように機能するのかを調べることが極めて重要である。また、タンパク質の構造を解析することによって、そのタンパク質と相互作用する医薬品の合理的な開発が可能になるし、酵素の機能改変は、バイオ燃料や工業原料などの物質生産の効率化や環境負荷低減などにもつながる可能性を持つ。

真核細胞は、非常に多様なタンパク質の進化の舞台となっている。これらのタンパク質の機能や構造を調べることは、医薬品開発や物質生産技術開発のために極めて重要である。タンパク質を安価に大量合成する最も有力な方法は、それをコードする遺伝子を大腸菌に導入して、大腸菌に合成させる方法である。過去半世紀の分子生物学発展の経緯から、大腸菌は、タンパク質合成の仕組みが最もよく理解されており、しかも、遺伝子の導入が最も容易な生物である。

細胞内でタンパク質が合成される際には、遺伝コードに従ってアミノ酸が一つ一つ連結される。地球上のほとんどの生物の遺伝コードは、大腸菌の遺伝コードと同じである。そのため、大腸菌以外の生物の遺伝子をそのまま大腸菌に導入すれば、基本的にはアミノ酸が連結される。この原理を利用してタンパク質を合成する技術を通じて、分子生物学が大いに発展し、現在の高度な生命科学が成り立っている。

しかし、一般にはアミノ酸がつながってできるのは鎖状のポリペプチドであり、これが機能できる立体構造に折りたたまれることによって初めて、生体内で機能するタンパク質になる。この過程を折りたたみ、あるいはフォールディングという。折りたたみ補助機構には、真核細胞と大腸菌との間で共通の部分もあるが、明らかに異なる部分がある。大きな違いの一つがシャペロニンの違いである。真核細胞のシャペロニンは CCT と呼ばれる 8 種類のポリペプチドが会合した複合体タンパク質である。同じタンパク質は大腸菌に存在しない。真核細胞は CCT が存在する前提で進化してきたので、真核細胞由来のタンパク質のかなりの割合が、立体構造に折り畳まれるために CCT の存在を必要とする。

このような事情から、真核細胞由来のタンパク質を、真正細菌である大腸菌を使った組換え発現法により合成しても、得られたポリペプチド鎖は正しくフォールディングせず本来の機能を有しない場合が多い。そのような場合、研究者は、基本的に個々の目的タンパク質に対して個々の対応をしてきており、それでも研究できるタンパク質だけが研究されている。

真核細胞由来のタンパク質を最も確実に折り畳ませるシステムとして、今世紀初頭にコムギ胚芽由来無細胞タンパク質合成法が

発表され、ポストゲノム解析のためのハイスループットタンパク質合成法として、広汎に用いられてきた。これにより、少なくともコムギ胚芽抽出液には、真核細胞由来の多様な細胞内タンパク質を正しくフォールディングさせるための機能が備わっていることが確認できた。

### 2. 研究の目的

大腸菌のタンパク質合成系とコムギ由来シャペロニン CCT の共存下で働かせる実験系を確立することを、本研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

第一の方法は、ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) が集めている cDNA を用いて、CCT を発現する大腸菌を作成する方法であった。CCT は 8 種のサブユニットから構成される複合体タンパク質であり、CCT を機能する形で発現させるためには 8 種の遺伝子を同時に発現させる必要がある。最終的に 8 種のサブユニットをどのような順に並べてどのような発現系で発現させればよいかを検討する必要があるため、まず、各々を単独で発現させる実験を行い、きちんと発現することを確認してからそれらをそのまま使って同時発現系を構築するための、遺伝子実験法を確立することにした。これについては、CCT サブユニットの遺伝子を用いると遺伝子サイズが皆同じくらいであるため不都合があったので、eEF1B 遺伝子を用いた。そのうえで、8 種のサブユニットをコードする cDNA の単独発現を試みた。

第一の方法では、マイナー tRNA を補充していない大腸菌 BL21(DE3) ではほとんど発現しないこと、および、目的遺伝子 DNA 分子自体が扱いにくいこと (おそらく繰り返し配列が多いため) などの問題があることがわかったので、コドン最適化した遺伝子を合成し、それらを BL21(DE3) で合成できるか確認した。コドン最適化の方法については、信頼できる既存のプログラムがなかったので、表計算ソフトウェアで簡単に最適化できるユーティリティを自作した。

第三の方法として、コムギ胚芽から CCT を精製し、それを大腸菌由来無細胞タンパク質合成系に加える実験を考案し、そのための準備として、製粉所から分譲されたコムギ胚芽をクロマトグラフィーや沈殿分画法を用いて分画した。

### 4. 研究成果

個々の遺伝子の大腸菌での発現を確認した後、それらをつなぎ合わせて共発現させるためのベクター DNA のセットと、それを使うためのプライマーやリンカーなどの DNA 部品のセットを整えて、SfiNX システムと名付けて利用可能にした (Takai & Hisamatsu, 2016)。これを用いると、大腸菌で発現用プラスミドを作成する際の各ステップで 9 割に

上の確率でポジティブクローンが得られることを、eIF1B サブユニット遺伝子を用いて確認した。論文としては未発表であるが、eIF2 サブユニット遺伝子やペプチド鎖解離因子遺伝子についても、SfiNX システムを用いるとタグの付替えや共発現用プラスミドの作製が容易にできることを確認することができた。

必要性から自作したコドン最適化ユーティリティについては、CodHonEditor と名付け、一般公開した (Takai, 2016)。CodHonEditor はどのような計算が内部で行われているか、すべて見えるようになっており、分子生物学教育のためにも役立つものと期待している。また、作成の過程で、コドン最適化という分野にきちんとした理論がないことに気づいたので、これまでの理論を整理し、大腸菌における遺伝子配列と発現量との関係に関する新しいモデルを構築した (Takai, 2017)。

NBRP 由来の cDNA については、3 種類について単独発現を試みたが、マイナー tRNA を補充していない BL21(DE3) 株では発現せず、補充した Rosetta 2(DE3) 株ではよく発現した。また、および サブユニットの cDNA については、それを増やすための PCR が非常にやりにくいことがわかった。ちょうど、遺伝子合成受託サービスの価格が大きく下がった時期と重なったので、から までの 8 種のサブユニットをコードする、コドン最適化された合成遺伝子を作成した。これらのうち、少なくとも 1 つのサブユニットに関しては、本来会合すべき他のサブユニットが共存しないにも関わらず可溶性の状態で作成されることが判明した。これらの発現結果についてはまだ途中であり、一般公開には至っていない。

一方、第三の方法に関しては、CCT を含み、凝集抑制活性のある画分を得ることができた (研究会にて一部発表済み)。

## 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 3 件)

Takai, K. (2017). Translational resistivity/conductivity of coding sequences during exponential growth of *Escherichia coli*. *J. Theor. Biol.*, 査読有, 413, 66–71.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jtbi.2016.11.015>.

Takai, K. (2016). CodHonEditor: Spreadsheets for Codon Optimization and Editing of Protein Coding Sequences. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 査読有, 35, 223–232.

Takai, K. and Hisamatsu, K. (2016). SfiNX: a method for assembly of

protein coding sequences with high success rates. *Biotechnol. Lett.*, 査読有, 38, 773–778.

[学会発表](計 6 件)

高井和幸 CodHonEditor: 中身が見えるコドン最適化ツール, 「細胞を創る」研究会 9.0, 2016 年 11 月 21–22 日, 早稲田大学国際会議場井深記念ホール (東京都新宿区). ポスター発表, P-36.  
阿賀健, 久松啓伍, 富川千恵, 高井和幸 コムギ由来ペプチド鎖解離因子複合体の調製, 「細胞を創る」研究会 9.0, 2016 年 11 月 21–22 日, 早稲田大学国際会議場井深記念ホール (東京都新宿区). ポスター発表, P-37.

加藤凌平, 富川千恵, 高井和幸 コムギ胚芽からのシャペロニンを含む画分の調製, 「細胞を創る」研究会 9.0, 2016 年 11 月 21–22 日, 早稲田大学国際会議場井深記念ホール (東京都新宿区). ポスター発表, P-68.

高井和幸 タンパク質をコードする DNA の効率的な連結, 「細胞を創る」研究会 8.0, 2015 年 11 月 12–13 日, 大阪大学吹田キャンパス (大阪府吹田市).

高井和幸, SfiI 認識部位を導入した大腸菌共発現ベクターの試み (A set of *E. coli* vectors with an SfiI site for co-expression of multiple proteins), 「細胞を創る」研究会 7.0, ポスター発表 P-6, 東京大学 (東京都文京区), 2014 年 11 月 13–14 日.

上野秀道, 高井和幸, 富川千恵. 大腸菌を用いたコムギ由来翻訳開始因子 eIF2B の調製の試み (Expression of wheat eIF2B subunits in *Escherichia coli*), 「細胞を創る」研究会 7.0, ポスター発表 P-17, 東京大学 (東京都文京区), 2014 年 11 月 13–14 日.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/takai-labopen/home>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高井 和幸 (TAKAI, Kazuyuki)

愛媛大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号：40260848