T2R2 東京工業大学リサーチリポジトリ
Tokyo Tech Research Repository

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	特定タンパク質の生産を目的とした遺伝子人工発現系に関する研究
Title(English)	
著者(和文)	小畠英理
Author(English)	EIRY KOBATAKE
出典(和文)	学位:工学博士, 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第2145号, 授与年月日:1990年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:
Citation(English)	Degree:Doctor of Engineering, Conferring organization: , Report number:甲第2145号, Conferred date:1990/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

Powered by T2R2 (Tokyo Institute Research Repository)

特定タンパク質の生産を目的とした遺伝子人工発現系に関する研究

東京工業大学
理工学研究科　化学工学専攻
博士課程7049 小畠英理

目　　次

第１章　序論　1

１－１　緒言　2

１－２　タンパク質の生合成　１０

１－２－１　アミノ酸の活性化とｔＲＮＡへの転移　１０

１－２－２　合成の開始　１１

１－２－３　ペプチド鎖の伸長　１３

１－２－４　合成の終結　１５

１－３　タンパク質の合成

－化学合成法から遺伝子工学的方法まで－　１７

１－３－１　複製段階における発現効率　１７

１－３－２　転写段階における発現効率　１８

１－３－３　翻訳段階における発現効率　１８

１－３－４　大腸菌以外の宿主－ベクター系における発現効率　１９

１－３－５　遺伝子工学による人工タンパク質の合成　１９

１－３－６　遺伝子工学におけるタンパク質合成の問題点　２０

１－４　無細胞系によるタンパク質の合成　２１

１－４－１　無細胞系におけるタンパク質合成の問題点　２１

１－４－２　無細胞系によるｐｏｌｙ（Ｕ）の翻訳　２２

１－４－３　ｍＲＮＡの固定化　２２

１－４－４　酵母抽出液を用いた固定化ｍＲＮＡの発現　２３

１－５　特定遺伝子の増幅法　２５

１－５－１　制限酵素－リガーゼ法による遺伝子の増幅　２５

１－５－２　ＰＣＲ法による特定遺伝子の増幅　２５

１－５－３　鋳型固定化によるＰＣＲ　２８
１－６　本研究の目的と意義　２９
参考文献　３１

第２章　大腸菌によるメタピロカテカーゼ・プロテインＡ
融合遺伝子の発現　３４
２－１　緒言　３５
２－２　実験方法　３７
２－２－１　菌体とプラスミド　３７
２－２－２　試薬　３７
２－２－３　融合タンパク質の生産　３７
２－２－４　電気泳動　３７
２－２－５　ウエスタン・ブロッティング　３８
２－２－６　メタピロカテカーゼの活性測定　３８
２－３　実験結果および考察　４０
２－３－１　メタピロカテカーゼープロテインＡ
融合遺伝子発現ベクターの構築　４３
２－３－２　融合タンパク質の特性解析　５１
２－４　結言　５７
参考文献　５８

第３章　メタピロカテカーゼ・プロテインＡ融合タンパク質の
酵素免疫測定への応用　６０
３－１　緒言　６１
３－２　実験方法　６３

３－２－１　試薬　６３
３－２－２　融合タンパク質の調製　６３
３－２－３　抗ＢＳＡ抗体に対する酵素免疫測定　６３
３－２－４　ＢＳＡに対する酵素免疫測定　６５
３－３　実験結果および考察　６７
３－３－１　融合タンパク質の性質　６７
３－３－２　固相への非特異吸着の検討　６９
３－３－３　メタピロカテカーゼ・プロテインＡ融合タンパク質による抗ＢＳＡ抗体の定量　７１
３－３－４　メタピロカテカーゼ・プロテインＡ融合タンパク質によるＢＳＡの定量　７３
３－４　結言　７９
参考文献　８０

第４章　固定化ｍＲＮＡを用いる特定タンパク質の産生システム　８１
４－１　緒言　８２
４－２　実験方法　８６
４－２－１　試薬および測定機器　８６
４－２－２　酵母無細胞系の調製　８６
４－２－３　ｍＲＮＡの調製　８７
４－２－４　無細胞系によるｐｏｌｙ（Ｕ）の翻訳　８９
４－２－５　[^{3}Ｈ]Ｐｈｅの取り込み測定　８９
４－２－６　ｐｏｌｙ（Ｕ）およびｍＲＮＡの固定化　９１
４－２－７　ｐｏｌｙ（Ｕ）およびｍＲＮＡ固定化での翻訳　９１
４－３　実験結果および考察　９２

４－３－１　遊離状態のｐｏｌｙ（Ｕ）系での翻訳　９２
４－３－２　ｐｏｌｙ（Ｕ）固定化系での酵母無細胞系を用いるペプチドの生成　９５
４－３－３　固定化ｍＲＮＡと酵母無細胞系を用いるタンパク質の合成　１０２
４－４　結言　１０６
参考文献　１０９

第５章　鋳型固定化法による特定遺伝子の増幅　１１０
５－１　緒言　１１１
５－２　実験方法　１１４
５－２－１　試薬　１１４
５－２－２　ｐｏｌｙ（Ｕ）のハイブリダイゼーション　１１４
５－２－３　逆転写酵素反応　１１４
５－２－４　ＴｄＴ反応　１１５
５－２－５　ＰＣＲ反応　１１５
５－３　実験結果および考察　１１８
５－３－１　ＰＣＲ法によるｐｏｌｙ（ｄＡ）の増幅　１１８
５－３－２　ＰＣＲ法によるｐＢＲ３２２の増幅　１２１
５－４　結言　１２８
参考文献　１３０

第６章　結論　１３１

謝辞　１３５

第 1 章

序論

第1章 序論

1－1 緒言

あらゆる生物において、タンパク質は共通の経路により合成されている。すなわち、遺伝情報はＤＮＡ上の４種の塩基、アデニン、グアニン、シトシン、チミンの配列によって規定され、その情報は複製により存続維持されている。この情報がｍＲＮＡに転写され、リボソーム上でｔＲＮＡを介してアミノ酸に翻訳されてタンパク質を形成する。1956年Ｆ．Ｃｒｉｃｋは、遺伝情報の流れに関するこの経路をセントラルドグマと名づけた[1]（Ｆｉｇ．１－１）。生体は、このＤＮＡからタンパク質への情報伝達、変換という極めて複雑な反応を非常に効率よく行っている（Ｆｉｇ．１－２）。

1970年代前半、Ｂｅｒｇ[2]，Ｃｏｈｅｎ[3]，Ｂｏｙｅｒ[3]らにより開発された遺伝子操作の技術は、生体の持つ優れたタンパク質合成システムを利用することにより、人工的にタンパク質を生産することを可能にした。遺伝子操作は、目的とするタンパク質をコードする遺伝子を抽出したり、あるいは合成して自己複製ができる系に導入し、これらを発現させて目的とするタンパク質を産生する技術である。換言すれば、ＤＮＡからタンパク質への遺伝情報発現の過程を細胞に行わせる一種の遺伝子人工発現系といえる（Ｆｉｇ．１－３）。この手法をもとにして、プロテインエンジニアリング（タンパク質工学）という新分野[4]が開拓され、単に天然のタンパク質を生産するだけでなく、人為的に遺伝子に改造を施して人工的に有用なタンパク質を生産しようとする研究も盛んに行われている[5)6)]。

ところで、生細胞が行っている遺伝子発現過程は、きわめて複雑かつ高度に体

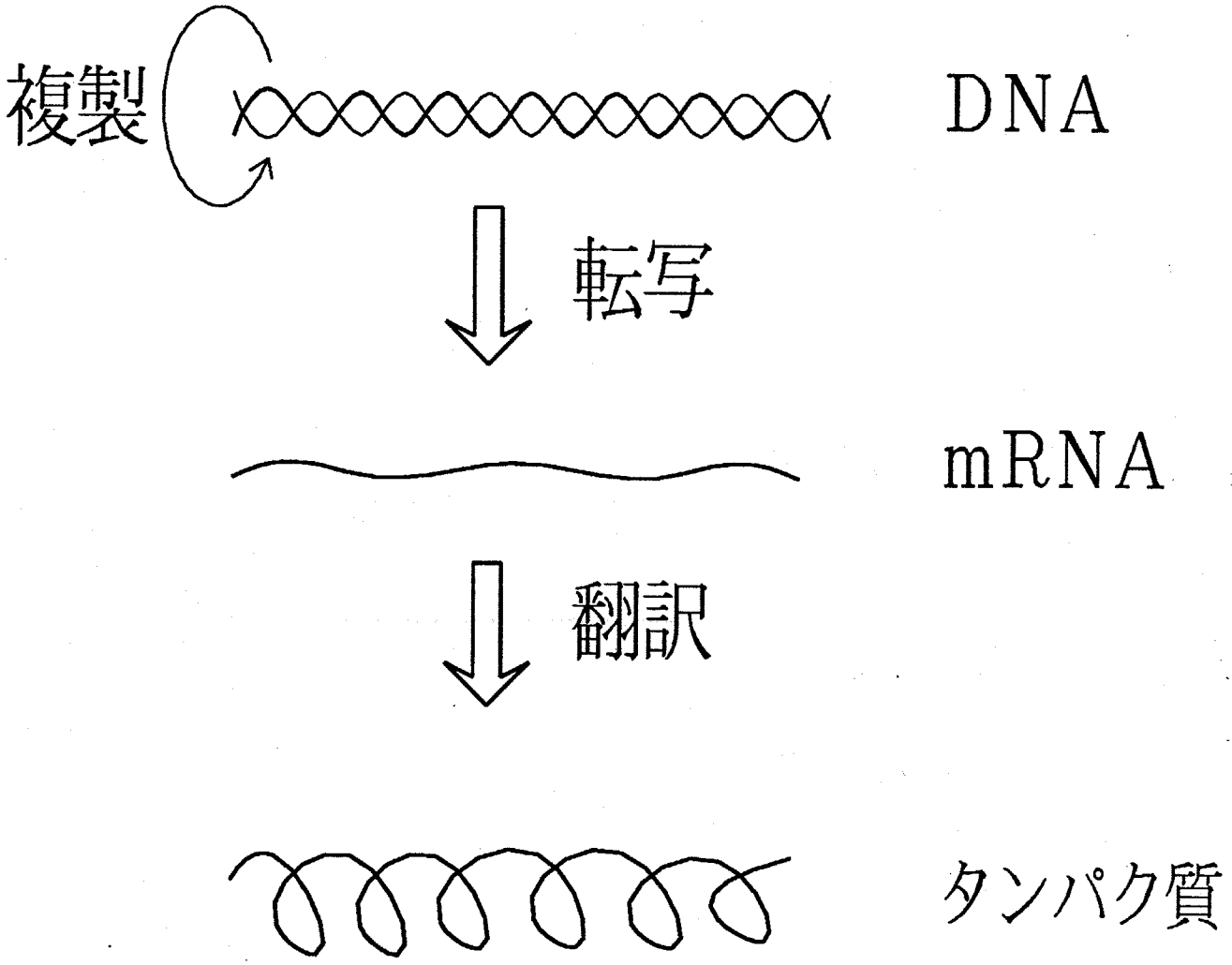
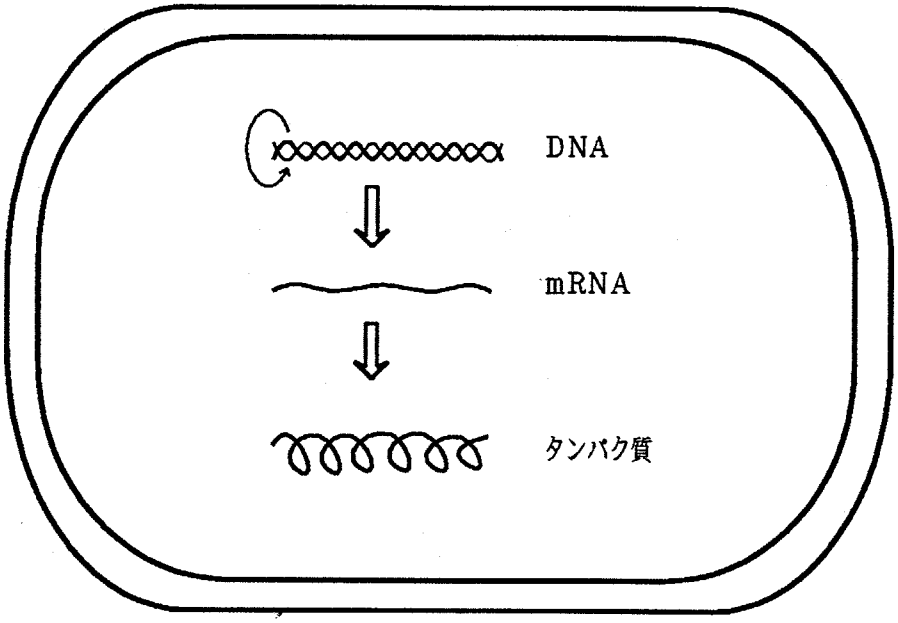
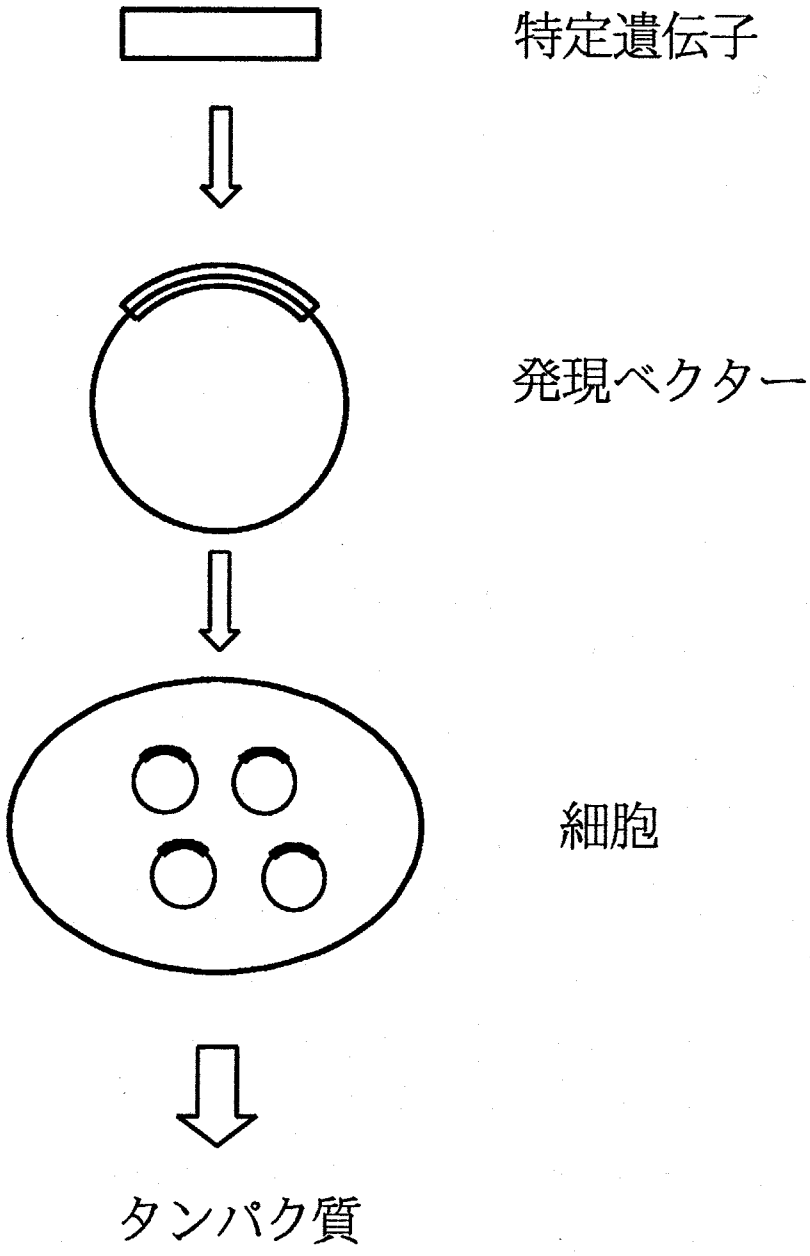


Fig. 1－1　セントラルドグマ



Ｆｉｇ．１－２　細胞のタンパク質合成



Ｆｉｇ．１－３　遺伝子工学によるタンパク質合成

系化された反応の複合プロセスであると考えることができる。遺伝子の発現機構がかなり解明されてきた現在において、タンパク質合成の複合プロセスをより簡略化されたプロセス、すなわちＤＮＡ複製プロセス、転写プロセス、翻訳プロセスに分割することができるであろう。著者はこのような考えに基づき、細胞を使わずにin vitroでタンパク質合成系を構築すること、換言すればタンパク質合成プロセスのユニット化が可能であると考えた（Ｆｉｇ．１－４）。遺伝子工学によるタンパク質の生産は必ずしも万能ではなく、様々な解決すべき問題が残されている。例をあげれば、組み替えた遺伝子が必ずしも効率よく発現しないため目的とするタンパク質の収量が少ないこと、生細胞は生命を維持するために様々なタンパク質を合成しているので目的とするタンパク質のみを産生する事が困難であること、さらに、動物細胞を利用する場合培養が難しく、工業的規模の大量のタンパク質生産には向かないことなどである。そこで本研究では、遺伝子工学的手法に代わり得る新しいタンパク質生産法の開発が近い将来において必要であると考えた。その一つのアプローチとして、タンパク質合成プロセスの最終段階である翻訳プロセスに着目して、in vitroでの遺伝情報発現によりタンパク質を生成させる系の構築を目指すことにした。すなわち、特定のタンパク質をコードし、しかも遺伝情報の最小の担い手であるｍＲＮＡを固定化したシステムに、リボソーム、ｔＲＮＡ、タンパク質合成に関与する諸酵素とエネルギーを含む反応系を加えるだけで純粋に特定のタンパク質が得られるものと期待した。このアプローチは現在の遺伝子工学によるタンパク質生産を最も単純化したものと考えることができる。換言すれば、アミノ酸とエネルギー源を加えると、ｍＲＮＡの情報が特定のタンパク質へ読み換えられる遺伝情報翻訳システムが構築できることになる（Ｆｉｇ．１－５）。

以上のような背景をもとに、本研究では遺伝子工学の手法、すなわち生細胞による遺伝子発現を行ない実用的な人工タンパク質の創製を行なう。ついで、遺伝

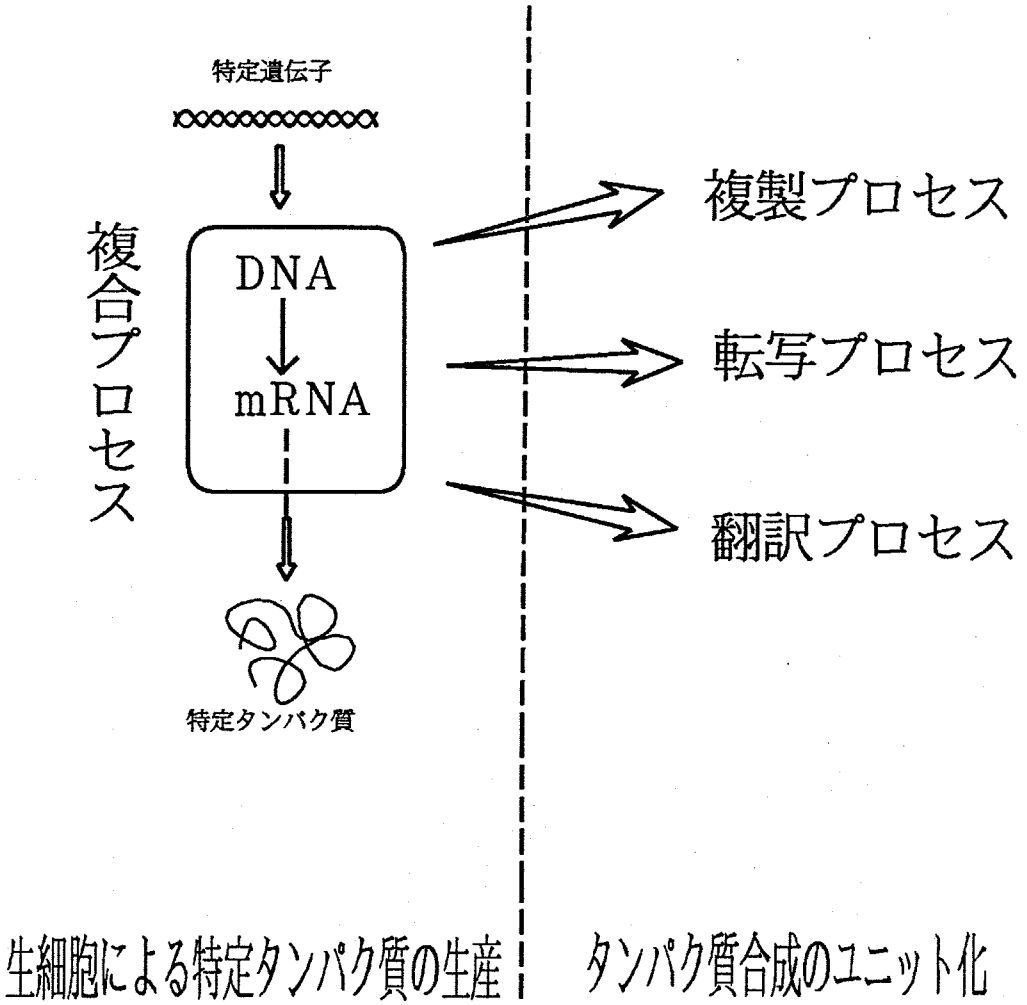


Fig. 1—4　タンパク質合成のプロセスユニット化

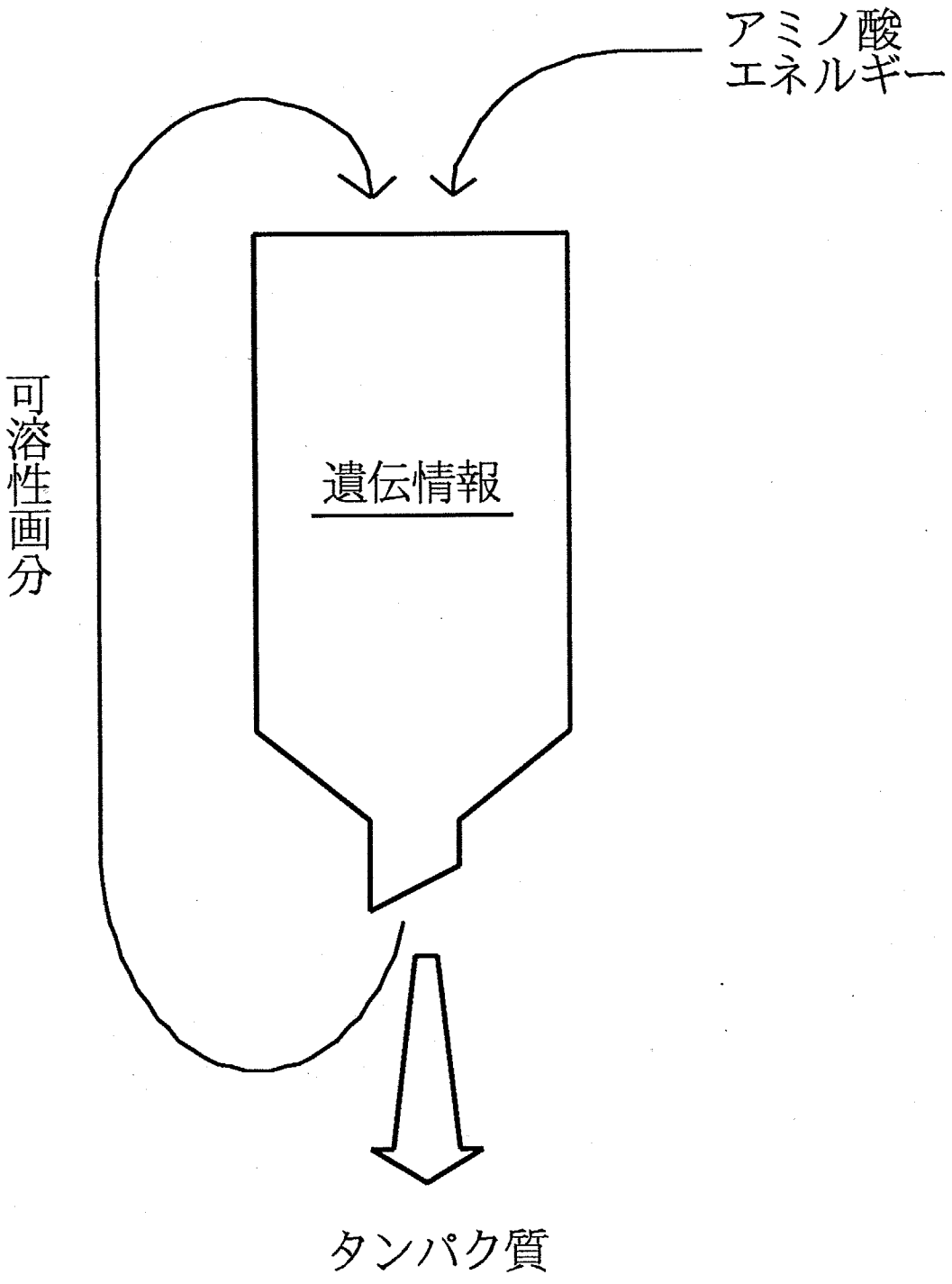


Fig. 1−5　無細胞系によるタンパク質合成

子工学に代わり得る可能性を有するタンパク質生産の新しい方法の確立を目指し、生体外遺伝子発現系の構築を行なうことにした。

本章においては、タンパク質の生合成過程、遺伝子工学によるタンパク質合成、無細胞系によるタンパク質合成、そして遺伝子の増幅法についてまとめ、最後に本研究の目的と意義を述べる。

１－２　タンパク質の生合成[7)8)]

ＤＮＡに蓄えられた情報は、ｍＲＮＡに転写されたのち、翻訳されてタンパク質に変換される。この過程では、ｍＲＮＡ、ｔＲＮＡ、リボソーム、そのほか様々な諸酵素やタンパク質が効率よく作用してタンパク質の合成反応が進行する。タンパク質合成は、大きく４段階に分けることができる。１）アミノ酸の活性化とｔＲＮＡへの転移、２）合成の開始、３）ポリペプチド鎖の伸長、４）合成の終結である。本節では、タンパク質の生合成における翻訳過程を原核生物の場合を中心に、真核生物についてもふれながら簡単にまとめてみる。

１－２－１　アミノ酸の活性化とｔＲＮＡへの転移

タンパク質を構成する２０種類のアミノ酸はまずそれぞれに特異的なアミノアシル－ｔＲＮＡ合成酵素（ＡＲＳ）により活性化され、アミノアシル－ｔＲＮＡとなる。最初の反応は，アミノ酸（ＡＡ）のカルボキシル基の活性化である。

$$AA + ATP \underset{}{\overset{ARS}{\rightleftharpoons}} AA-AMP + PPi$$

生成したＡＡ－ＡＭＰは酵素と結合して複合体を形成しており，特定のｔＲＮＡが付加されてアミノアシルｔＲＮＡ（ＡＡ－ｔＲＮＡ）が形成される。

$$AA-AMP + tRNA \underset{}{\overset{ARS}{\rightleftharpoons}} AA-tRNA + AMP$$

この反応でアミノ酸のカルボキシル基はｔＲＮＡのＣＣＡ末端のアデニンの３’－ＯＨと脱水縮合し，ＡＡ－ｔＲＮＡが生成される．そしてこの形でリボソームにおいてタンパク質合成に加わる。

ｔＲＮＡには次の３つの機能がある。

１）特異的なアミノアシルーｔＲＮＡシンテターゼを認識し、特定の活性化アミノ酸を受け取る。

２）アンチコドン部分により、ｍＲＮＡ上の特定アミノ酸に対するコドンを認識する。

３）延長中のペプチド鎖をリボソームに結合させる。

１－２－２　合成の開始（Ｆｉｇ．１－６）

まず、ＩＦ３の共存下、ｍＲＮＡがリボソーム３０Ｓサブユニットに結合しｍＲＮＡ－３０Ｓ－ＩＦ３複合体を生成する。この複合体形成は，３０Ｓリボソームサブユニットに含まれる１６Ｓ　ｒＲＮＡの３’末端の塩基配列とｍＲＮＡのＳＤ配列との相補的な水素結合により行われる．ここでＩＦ１とＩＦ２が作用してｆＭｅｔ－ｔＲＮＡとＧＴＰが３０Ｓ－ｍＲＮＡ－ｔＲＮＡ複合体に結合して開始複合体３０Ｓ－ｍＲＮＡ－ＩＦ３－ｆＭｅｔ－ｔＲＮＡ－ＧＴＰを形成する。ｆＭｅｔ－ｔＲＮＡはｍＲＮＡの開始コドンＡＵＧに結合している。ここでリボソーム５０Ｓが開始複合体に結合し、ＧＴＰがＧＤＰとリン酸に加水分解し、ＩＦ１，ＩＦ２，ＩＦ３が放出される。こうしてｆＭｅｔ－ｔＲＮＡ－ｍＲＮＡを含む７０Ｓリボソーム複合体ができる。ｆＭｅｔ－ｔＲＮＡは７０Ｓ複合体のＰ部位（ペプチジル部位）を占めるとＡ部位（アミノアシル部位）には開始コドンのとなりのコドンによって指定されるアミノアシルーｔＲＮＡが結合できるようになる。

真核生物においてはこのしくみは若干異なっている。まず，メチオニンｔＲＮＡが３種類の開始因子とＧＴＰの存在下で４０Ｓサブユニットと結合し，Ｍｅｔ－ｔＲＮＡ－４０Ｓリボソームサブユニット複合体が形成される。キャップ結合タンパク質がｍＲＮＡの５’末端のキャップ構造を認識して３種類の開始因子と

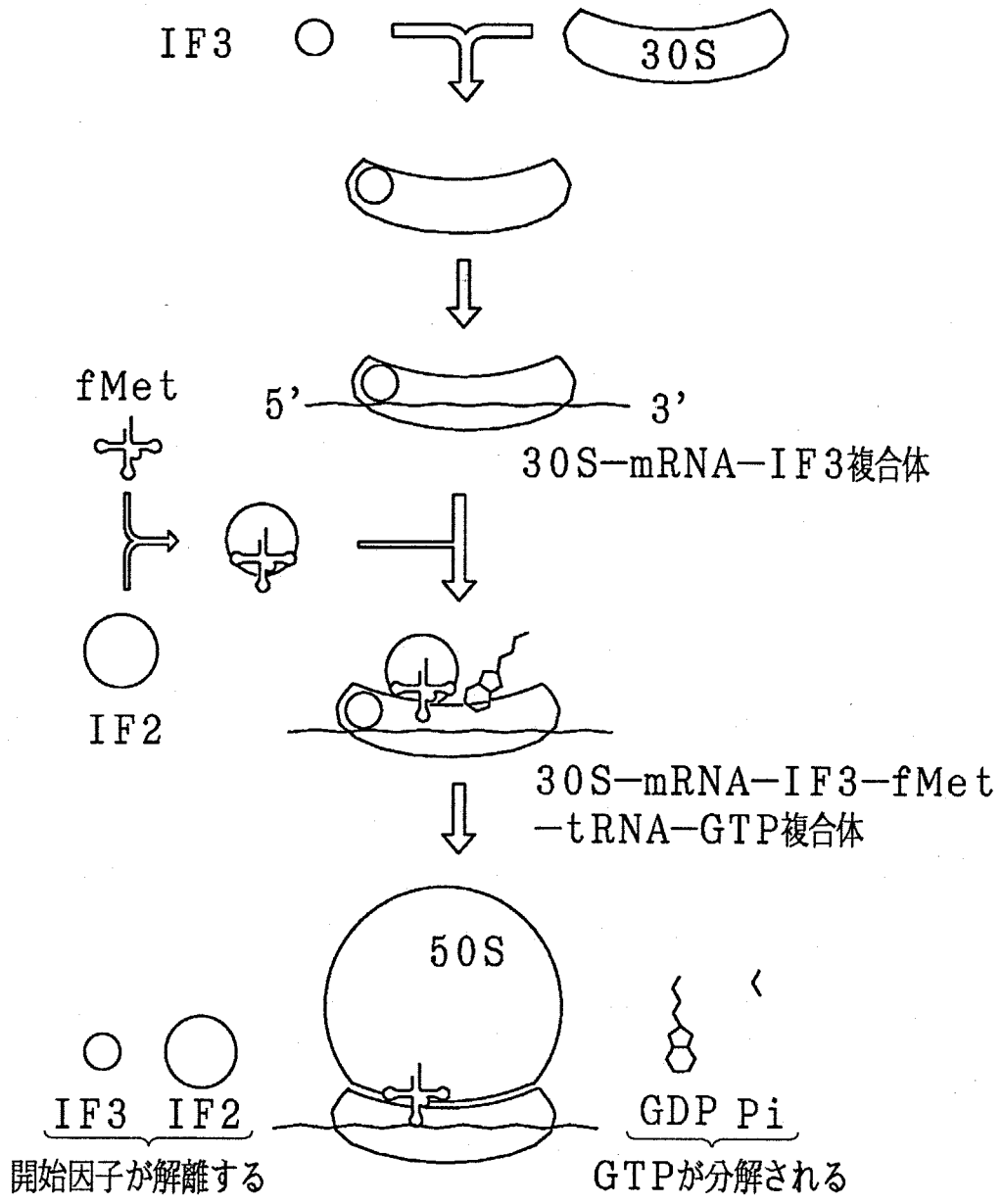


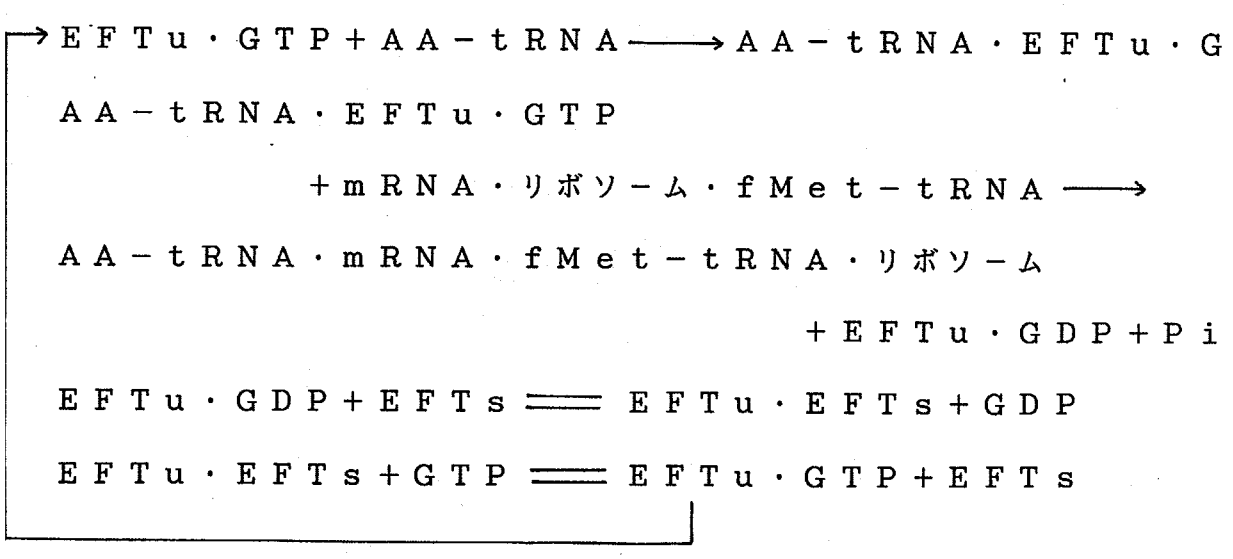
Fig. 1−6　タンパク質合成の開始

ＡＴＰの存在下で先の複合体とｍＲＮＡが結合する。次いで，６０Ｓリボソームサブユニットが結合して８０Ｓリボソーム開始複合体が形成され，次のペプチド伸長反応へ移行する。

１－２－３　ペプチド鎖の伸長（Ｆｉｇ．１－７）

伸長反応はさらに３段階に分けることができる。１）７０Ｓリボソームのａ部位に、コドンの指定に従って、アミノアシルーｔＲＮＡ（ＡＡ－ｔＲＮＡ）が結合する。２）Ｐ部位上のペプチジルーｔＲＮＡからＡ部位のアミノアシルーｔＲＮＡにペプチドが転移してペプチドが一個延長する。３）７０ＳリボソームがｍＲＮＡ上を５’から３’方向に移動すると、ペプチジルーｔＲＮＡはｍＲＮＡの特定コドンに結合したままでＡ部位からＰ部位に移る。

第一段階（ＡＡ－ｔＲＮＡの結合）　新しい特定のアミノアシルーｔＲＮＡがコドンの指示に従い７０Ｓリボソームのａ部位に結合する。ＧＴＰと２種の伸長因子ＥＦＴｕとＥＦＴｓが関与する。ＥＦＴｕ－ＧＴＰ複合体中のＥＦＴｕがアミノアシルーｔＲＮＡと作用して複合体を形成し以下の反応が進む。



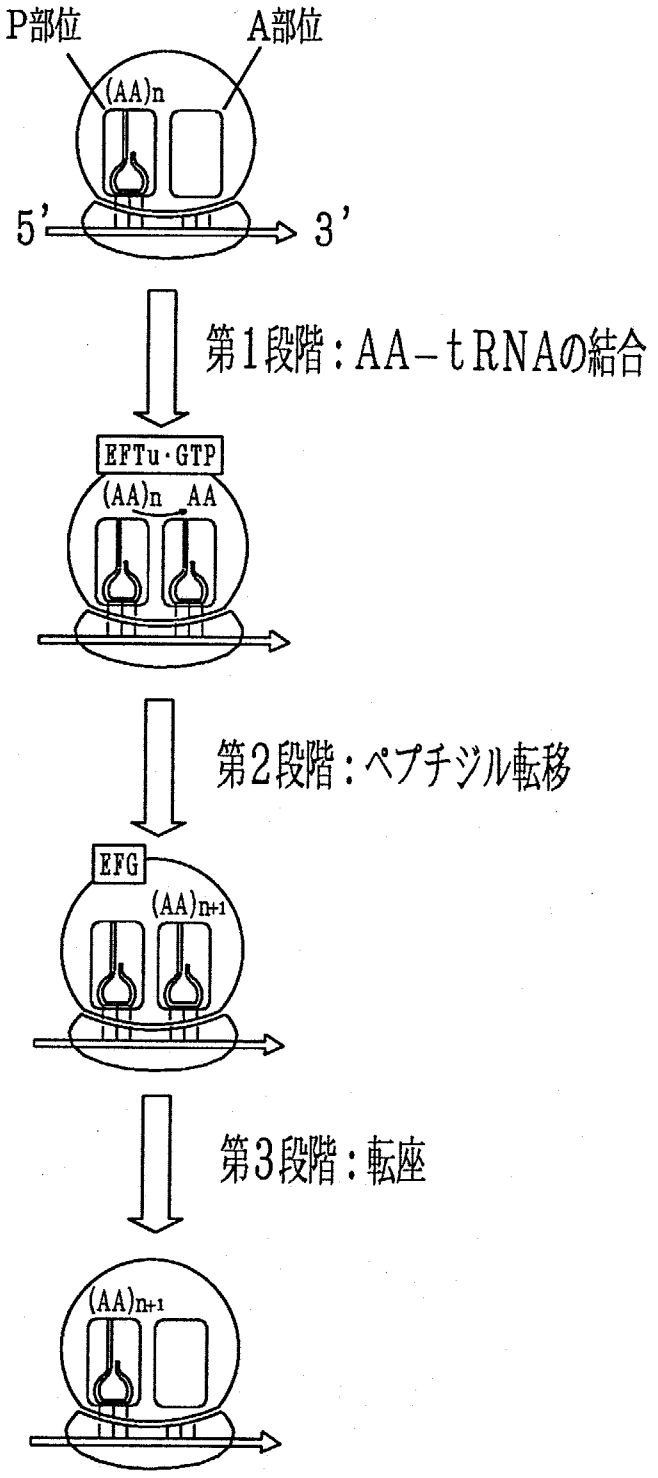


Fig. 1－7 ペプチド延長反応

第二段階（ペプチジル転移）　新しいペプチド結合は５０Ｓリボソームサブユニットの Ａ部位に結合する特殊タンパク質触媒の作用で生成する。ペプチジルトランスフェラーゼによりＰ部位上のペプチジルｔＲＮＡのペプチジル基がＡ部位上のアミノアシルｔＲＮＡのアミノ基と反応してペプチド結合をつくり、Ｐ部位には何もついていないｔＲＮＡが残る。

第三段階（転座）　Ｐ部位にあった空のｔＲＮＡはリボソームから放出され新しいペプチジルｔＲＮＡがＡ部位からＰ部位に移動する過程。このときペプチジルｔＲＮＡはｍＲＮＡ上のコドンに結合したままで、リボソームがｍＲＮＡ上を５’から３’方向に移動する。そこでＡ部位がｍＲＮＡ上のつぎのコドンに移動する。この移動にはＥＦＧとＧＴＰが必要で、ＧＴＰがＧＤＰとリン酸に加水分解される。

真核生物のペプチド伸長反応においても，原核生物によく似た因子（ＥＦ１α，ＥＦ１β，ＥＦ１γ，ＥＦ２）が関与している．

１－２－４　合成の終結

タンパク質合成はｍＲＮＡの終止コドンを認識し、完成したペプチドとｔＲＮＡのエステル結合を加水分解して終止する。終止コドンはＵＡＡ，ＵＡＧ，ＵＧＡである。また終止にはＲ１，Ｒ２，Ｒ３、３種のタンパク因子が関与する。Ｒ１はＵＡＡ，ＵＡＧ、Ｒ２はＵＡＡ，ＵＧＡのコドンを認識するのに必要である。Ｒ３因子はこの認識を補助するものと思われる。ここでもう一つの因子ＲＲがはたらいてＰ部位に結合しているｔＲＮＡを解離する。すると７０ＳのリボソームはｍＲＮＡから解離し３０Ｓと５０Ｓのサブユニットになる。ＩＦ３は３０Ｓサブユニットと結合して３０Ｓと５０Ｓの再結合を妨げ、３０Ｓはタンパク質合成サイクルにはいっていく。真核生物では，終止因子は１種類であり上記と同様の方法で終結反応を進行させている．

以上述べたように、タンパク質の生合成の過程は分子生物学の急速な進展にともない概要はほぼ解明されてきた。しかし、真核生物の場合には、不明な点もかなり残されており、その全貌が解明されるには今後の研究の進展を待たなくてはならない。本研究の目的の一つでもある、生体外タンパク質合成に関する研究は、タンパク質生合成機構の解明への寄与も大きいものと期待される。

１－３　タンパク質の合成－化学合成法から遺伝子工学的方法まで－

微量のタンパク質を生体から抽出するのではなく，人工的な方法によって得ようとする場合，現在２つの方法が考えられる．そのひとつは化学的な合成法で，アミノ酸を末端より１個ずつつないでいく方法である．タンパク質の化学合成法は，今世紀の初頭，Ｅ．Ｆｉｓｃｈｅｒ[9]が原型を考案して以来幾多の改良が加えられてきた。1962年，Ｍｅｒｒｉｆｉｅｌｄ[10]により固相合成法が導入され，合成の効率は飛躍的に進歩した。現在では自動化も進められ、数十個のアミノ酸をつなぐ事が可能となった。Ｆａｉｒｗｅｌｌらは８４アミノ酸残基からなるヒトＰＴＨを固相法で合成し、天然物と同等の活性を持ったものを得たと報告している[11]。一方、Ｓａｋａｋｉｂａｒａらは液相法による同ペプチドの合成を行い、この程度の大きさのペプチドの化学合成の実用性を示している[12]。しかし，合成量，分子量，純度などの点で問題が残されておりタンパク質の工業生産という見地からは実用的な方法ではない。

現在、タンパク質の大量生産は、遺伝子工学的手法によってのみ可能である。生細胞の合成システムを利用して、目的とする遺伝子を発現させる遺伝子操作は、一種の遺伝子人工発現系である。ここでは、導入遺伝子の発現効率を上昇させることが効率の良いタンパク質の生産につながる。そこで本節では、遺伝子組み替え法によるタンパク質の生産において、タンパク質合成の各ステップでの発現効率を決定する要因、そして遺伝子工学におけるタンパク質合成の問題点を浮き彫りにしてみる。

１－３－１　複製段階における発現効率

ＤＮＡ複製の段階においては、導入されたＤＮＡ分子、すなわちプラスミドが宿主細胞内で安定に存在でき、かつそのコピー数が多いほど発現に有利である。

そのため、遺伝子組み替えに使われるプラスミドにはいろいろな工夫がなされている。たとえば、プラスミドの複製に染色体の酵素タンパク質を必要としないような場合、培地にクロラムフェニコールを加えることによって染色体の複製を抑制できる。その結果、プラスミドのコピー数のみを数千個にまで増幅させることができる。また、ある温度にすると複製の抑制が外れるようなプラスミドを作成し、温度によってコピー数を上げる試みもなされている[13]。

１－３－２　転写段階における発現効率

遺伝子の発現効率を最も左右するのは、ＤＮＡからｍＲＮＡへの転写段階にある。ＲＮＡポリメラーゼによる転写は、プロモーターと呼ばれる配列へのポリメラーゼの結合から開始される。最もよく研究された大腸菌について例をとると、転写の開始点から上流１０塩基位の位置にpribnow box、－３５塩基あたりに－３５領域配列がある。この領域が転写効率を決定し、遺伝子の発現効率を左右する最も重要な因子であり[14]、外来遺伝子の前に強力なプロモーターを配置することがその遺伝子を効率よく発現させるための鍵となる[15]。そして、転写終結は、ターミネーターで行われる。すなわち、この配列のところでＲＮＡポリメラーゼがＤＮＡから離脱する。外来遺伝子の下流にこのターミネーターを挿入することにより、不必要なｍＲＮＡの合成を防止でき、その結果プラスミドが安定化するといわれている[16]。

１－３－３　翻訳段階における発現効率

ｍＲＮＡに転写された遺伝情報がタンパク質に翻訳される過程は、ｍＲＮＡがリボソームに結合することから始まる。このときリボソームへの結合効率を決定するのがShine-Dalgarno配列（ＳＤ配列）[17]と呼ばれるプリン塩基の多い領域であり、翻訳レベルにおける発現効率を左右している[18]。ＳＤ配列と開始コドンＡ

ＵＧとの距離も翻訳効率に影響することが知られている。また、アミノ酸を規定するコドンには重複があるが、生物種間で重複コドンの使用頻度に著しい片寄りがあり、それは各々のコードに対応する細胞内ｔＲＮＡの量に対応している[19]。したがって、外来遺伝子を用いたタンパク質の生産においてはコドンの使用頻度が発現効率に影響を与えることが考えられる。合成ＤＮＡを用いる場合、宿主の好むコドンを選択することも重要である。

１－３－４　大腸菌以外の宿主－ベクター系における情報発現

遺伝子組み替えがスタートした当初は、大腸菌における研究がほとんどであったが、現在では枯草菌、酵母、動物細胞などを用いた遺伝子操作も盛んに行われている。合成された外来タンパク質を効率よく回収するためには細胞外へ分泌させるのが効果的であり、この目的には枯草菌が適している。枯草菌の最大の特色は菌体外酵素の活発な生産であり、この特質を利用した分泌型ベクターが開発されている[20]。また、真核生物の遺伝子産物であるタンパク質は多くの場合ゴルジ体などを通過して翻訳後修飾を受けている。この過程でタンパク質は適当な２次，３次構造を形成し，糖鎖などで修飾される。このような修飾系は大腸菌などの原核生物では存在しないため、真核生物由来の遺伝子発現においては活性のあるタンパク質が得られない場合が多い。このような理由から、酵母[21]やさらには動物細胞[22]の系の開発が行われている。

１－３－５　遺伝子工学による人工タンパク質の合成

遺伝子操作法と遺伝子の化学合成が技術的に確立された結果、単に天然のタンパク質を大量に生産するだけでなく、遺伝子に改造を施し、非天然のより有用なタンパク質を創製することが可能となった。いわゆる、プロテインエンジニアリング（タンパク質工学）と称される分野が誕生した[4]。現在のところ、プロテイ

ンエンジニアリングの主流は天然のタンパク質の部分的改変である。例えば、酵素のアミノ酸を置換することにより耐熱性を向上させたり[23]、基質特異性を変化させたり[24]することができる。また、異種タンパク質を融合し、複数の機能を有するタンパク質の生産も行われている[25]。そして将来は、２０種類のアミノ酸の無限に近い組み合わせにより全く新しい機能を持つタンパク質を人為的に創り出すことも可能といわれている。

１－３－６　遺伝子工学におけるタンパク質合成の問題点

以上のように、遺伝子工学の急速な進展により自由にタンパク質を合成できるようになってきた。現在の問題点として、１）組み替えた遺伝子が効率よく発現せず、目的とするタンパク質の収量が少ないこと、２）生細胞は生命を維持するために様々なタンパク質を合成しているので、目的とするタンパク質だけを純粋に取り出すのが困難であること、３）目的とするタンパク質は宿主にとって不必要な場合が多いので、発現しても宿主細胞内のプロテアーゼにより分解されてしまうこと、また４）動物細胞を利用する場合培養がむずかしく、５）大量のタンパク質の工業的生産には向かないことなどがあげられる。これらの問題点を解決するために、生体外のタンパク質合成のシステム化、いわゆるバイオリアクター化ということを考えていく必要がある。そこで次節では、無細胞系によるタンパク質の合成について述べる。

１－４　無細胞系によるタンパク質の合成

細胞のタンパク質合成システムを利用してｍＲＮＡの翻訳をおこなうin vitroの系は、1961年、Ｎｉｒｅｎｂｅｒｇ、Ｍａｔｔｈａｅｉによる遺伝暗号解読の実験において大腸菌の系を用いて確立された[26]。添加ｍＲＮＡの翻訳は、細胞より抽出したタンパク質合成系に原料となるアミノ酸、エネルギー源としてＡＴＰ，ＧＴＰ，エネルギー再生系としてクレアチンリン酸、クレアチンホスフォキナーゼ、そして適当量のイオンを加えて行う。無細胞系による翻訳は、真核細胞の系でも行われており、ウサギ網状赤血球[27]、ラット肝臓[28]、小麦胚芽[29]など様々な系が開発され現在に至っている。しかし、これらの研究は、タンパク質の生合成機構の解明、あるいはｍＲＮＡの同定を目的とするものであり、タンパク質の生産を目的とするものではない。その合成量もラジオアイソトープラベルしたアミノ酸の取り込みにより検出できる程度の微量なものである。

これに対し、本研究はタンパク質生産を目的とした無細胞タンパク質合成系の構築をめざすものである。そこで、本節では無細胞系の問題点について考察し、タンパク質連続生産への一つのアプローチを述べる。

１－４－１　無細胞系におけるタンパク質合成の問題点

無細胞系によりタンパク質を合成する場合の問題点は、第一に情報をになうｍＲＮＡの安定性であろう。ｍＲＮＡは元来、非常に不安定な物質であり、生体内での寿命は原核生物で数分、真核生物でも数時間から数日である。これはおもに細胞内に存在するヌクレアーゼによる分解が原因と考えられる。一方、細胞外に取り出してもヌクレアーゼはいたるところに存在し、完全に分解をのがれることは難しい。また、タンパク質合成の場となるリボソームは多数のタンパク質とＲＮＡからなる非常に複雑かつ精巧な分子複合体であり、その機能は生体内で様々

な因子により微妙にコントロールされている。このような物質を生体外において、生体内同様に効率よく機能させるのは困難なことが予想される。その他、タンパク質合成に関与する酵素などタンパク質についても同様のことがいえる。

１－４－２　無細胞系によるｐｏｌｙ（Ｕ）の翻訳

細胞が行なっているタンパク質の生合成というきわめて複雑かつ高度に組織化された反応を生体外で行う場合、より簡略化された系を考えていく必要がある。このような観点から、まず遺伝情報変換を各段階に分けて考えることにした。そのひとつが、ｍＲＮＡからタンパク質への翻訳過程に注目したものである。翻訳段階もさらに細かく分けると、既に述べたように開始反応、伸張反応、そして終結反応に分けられる。本研究では、情報源となるｍＲＮＡとして、ｐｏｌｙ（Ｕ）を選択することにより、翻訳過程のなかでもペプチドの伸張反応にのみ着目することにした。ｐｏｌｙ（Ｕ）は通常のｍＲＮＡが持つ開始コドン及び終止コドンが排除されているため、アミノ酸の重合、すなわち伸張反応のみが行われるわけである。

１－４－３　ｍＲＮＡの固定化

タンパク質の連続生産システムを考える場合、一つのアプローチとして固定化という方法が考えられる。現在、酵素[30]や微生物[31]など生物活性物質が様々な担体に固定化され、利用されている。これと同様にリボソームをはじめとするタンパク質合成系、あるいはｍＲＮＡを固定化することができれば安定化にもつながり、生体外でも効率よくタンパク質を生産することができるものと期待される。ところが、リボソームは上述のように、非常に複雑な分子複合体であり、その活性発現にはダイナミックな動きを必要とする。このような物質を、生体外で活性を保持したまま固定化するのはかなり困難であろう。そこで、まずｍＲＮＡを固

定化することを考えた。このようなアプローチは、Ｉｋａｒｉｙａｍａら[32]やＢｒｅｓｓｅｒら[33]が既に試みているが、いずれの系とも生成タンパク質の定量性の点で問題があり、また汎用性のある特定タンパク質産生システムの構築は困難であると考えられる。これに対し、本研究はより汎用性のあるタンパク質生産システムの構築を目的とするものである。ところで、真核生物のｍＲＮＡは３’末端がポリアデニル化されており、５’末端はメチル化されたキャップ構造を持つ。原核生物に比べて真核生物のｍＲＮＡの寿命が長いのは、これらの修飾によりエキソヌクレアーゼによる攻撃から保護されているためと考えられている。従って、ポリアデニル化された３’末端を担体に固定化することによりｍＲＮＡは安定に保持され、タンパク質の連続生産が可能になるものと考えられる。

１－４－４　酵母抽出液を用いた固定化ｍＲＮＡの発現

本研究では、無細胞タンパク質合成系として酵母細胞より抽出したものを用いた。真核細胞の無細胞タンパク質合成系としては、ウサギ網状赤血球[27]、ラット肝臓[28]、マウス腹水がん細胞[34]、小麦胚芽[29]など、様々な系が開発され、使用されているが、最近では酵母細胞の系でも行なわれている。酵母は真核細胞の単純な例として研究が盛んであるが、翻訳制御や、遺伝子発現などの遺伝学的研究において、無細胞系での研究は一つの強力な手段であることがその理由としてあげられる。本研究においてはタンパク質生産という目的から、大量培養が可能である、抽出が比較的容易である、などの理由から無細胞系として酵母細胞より抽出したものを用いることにした。

一方、ｍＲＮＡとして、まず翻訳条件の最適化のため、最も単純化された遺伝情報の例としてｐｏｌｙ（Ｕ）を用いた。そして生細胞のｍＲＮＡ翻訳の例として、無細胞系と同一の酵母細胞より抽出したｍＲＮＡ、さらに異種生物の組み合わせの例としてマウスミエローマ細胞より抽出したｍＲＮＡを用いた。これらの

ｍＲＮＡを情報源として担体に固定化した状態で、酵母細胞の無細胞タンパク質合成系によるタンパク質の合成を試みる。

１－５ 特定遺伝子の増幅法

タンパク質のアミノ酸配列はｍＲＮＡの情報により規定されており、一方ｍＲＮＡの情報はＤＮＡから伝達されている。したがって、無細胞系において大量のタンパク質を得るためには、情報体としてｍＲＮＡ，ＤＮＡも大量に生産する必要がある。そこで本節では、ＤＮＡの増幅法について現在までの方法を述べるとともに、本研究で試みる特定遺伝子連続生産に向けての新しい方法を提示する。

１－５－１ 制限酵素－リガーゼ法による遺伝子の増幅（Ｆｉｇ．１－８）

特定遺伝子の増幅は、1972年Ｂｅｒｇら[2]により開発されたクローン化法により可能となった。この方法はかなり複雑な方法であったが、翌年Ｃｏｈｅｎ[3]らにより制限酵素－リガーゼ法が開発され、特定遺伝子のみを単離し増幅する方法として確立された。この方法は、まず目的とするＤＮＡを制限酵素とリガーゼを用いてプラスミドに挿入する。この組み替えプラスミドを大腸菌に移入すると、プラスミドは自己複製能を持っているので大腸菌とともに増殖し、プラスミド内の目的ＤＮＡも増幅される。大腸菌を培養後、プラスミドを抽出、精製し、制限酵素で切断すれば、目的とする遺伝子断片のみを回収することができる。この方法により目的遺伝子を大量に調製する場合、少なくとも２、３週間を費やさなければならなかった。ところが、1988年に発表されたＰＣＲ法[35]を用いれば、ごく短時間で特定遺伝子のみを増幅させることができる。以下において、この画期的な遺伝子増幅法（ＰＣＲ法）について概説する。

１－５－２ ＰＣＲ法による特定遺伝子の増幅（Ｆｉｇ．１－９）

1985年、クローン化法に代わる新しい特定遺伝子の増幅法が開発された[36]。大腸菌から抽出したＤＮＡポリメラーゼを用いてin vitroで特定の遺伝子だけを増

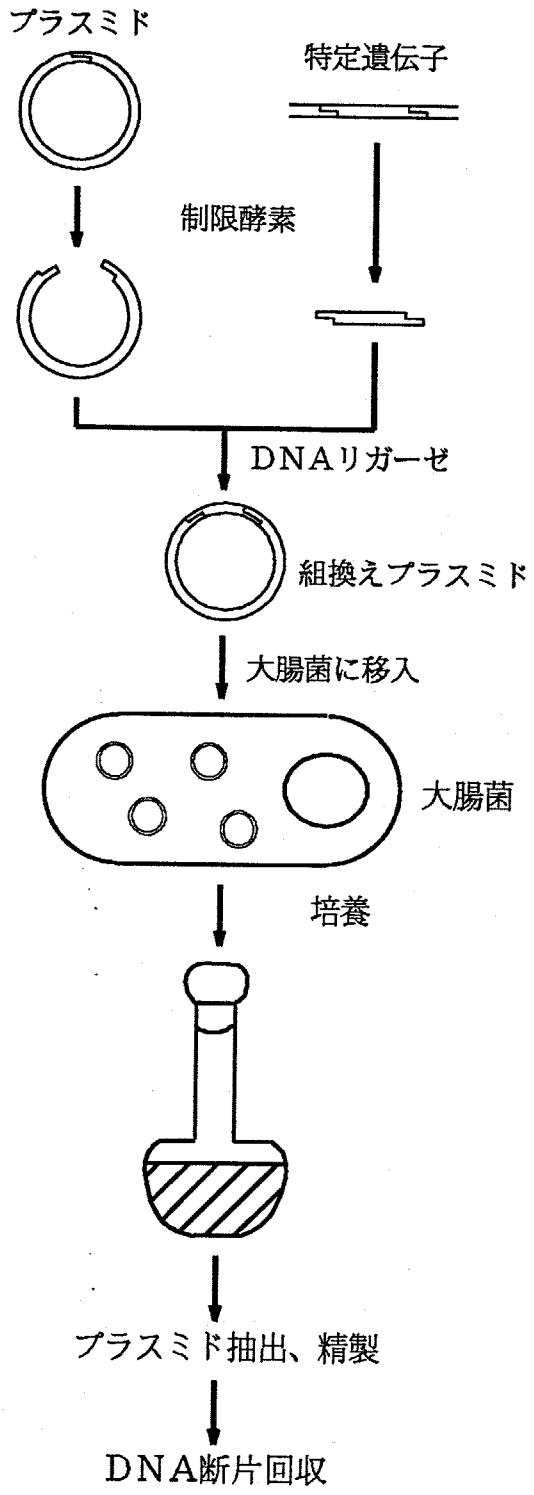
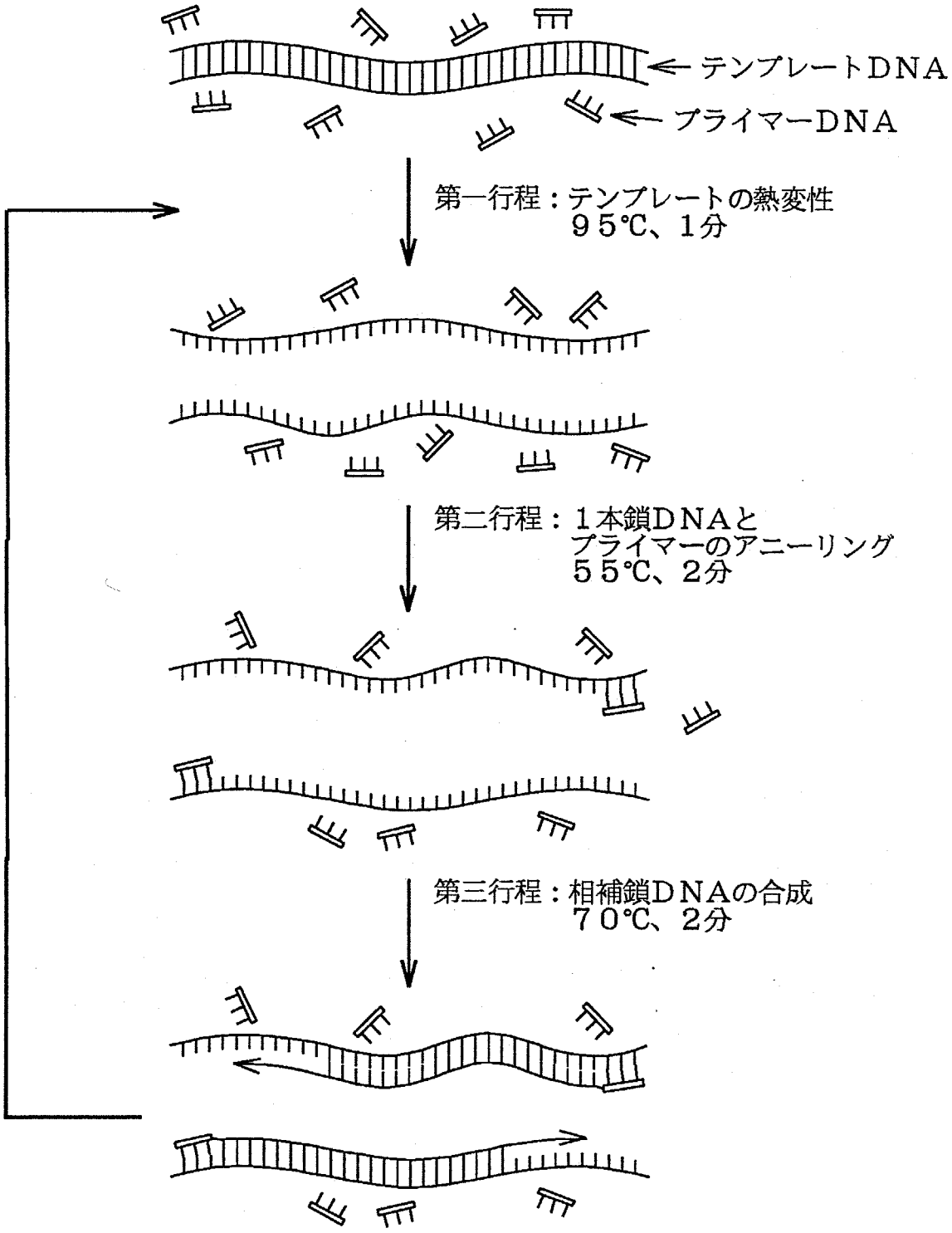


Fig. 1−8 制限酵素−リガーゼ法


テンプレートDNA
プライマーDNA
第一行程：テンプレートの熱変性
９５℃、１分
第二行程：１本鎖ＤＮＡと
プライマーのアニーリング
５５℃、２分
第三行程：相補鎖ＤＮＡの合成
７０℃、２分

Ｆｉｇ．１－９　ＰＣＲ法

幅させるこの方法は、ＰＣＲ（Polymerase Chain Reaction）法と名付けられ、急速に普及してきている。ＰＣＲ法では増幅したいＤＮＡ領域をはさむ二つのプライマーＤＮＡを用いて、鋳型ＤＮＡを変性させて一本鎖とした後にＤＮＡポリメラーゼ反応を行わせる。その結果、一回目の反応では、ＤＮＡは２倍に増幅する。反応液中の過剰のプライマーを用いて２回目のポリメラーゼ反応を行うとＤＮＡは４倍に増加する。このサイクルをｎ回繰り返せば理論的にはＤＮＡは2^n倍に増幅することになる。当初は大腸菌のポリメラーゼが用いられていたが、熱変性の行程で酵素が失活してしまうなどの欠点もあり実用化には至らなかった。しかし、1988年耐熱性細菌Thermus aquaticusのポリメラーゼ（Ｔａｑポリメラーゼ）を用いることにより熱処理がきわめて容易となった。これにより、幾つかあった欠点がすべて解消されただけでなく、反応の連続化、自動化が可能となりＰＣＲ法は一気に実用化され始めた。

１－５－３　鋳型固定化によるＰＣＲ

ＰＣＲ法の開発により、いままで細胞増殖に頼っていたＤＮＡの複製を生体外で行うことが可能となった。タンパク質合成の一つの段階として、ここではＤＮＡの複製に着目した。特定ＤＮＡの一本鎖を鋳型として担体上に固定化し、ＰＣＲ法を適用することにより、生体外でのＤＮＡの連続生産が可能であると考えられる。

１－６　本研究の目的と意義

本研究は、分子生物学のセントラルドグマである、ＤＮＡからｍＲＮＡ、ｍＲＮＡからタンパク質への遺伝情報の流れを体系づけて、遺伝子の人工的な発現系を構築し、遺伝情報の発現により特定のタンパク質を生産することを目的とするものである。医学、薬学、生物学のみならず、農業、工業、環境など広い分野においてタンパク質が利用されている現在、より有用な人工タンパク質を創製しようとするプロテインエンジニアリングおよび、遺伝子工学に代わる新しいタンパク質生産システム開発へのアプローチは新しい方法論をバイオテクノロジーに導入するものである。

生細胞を利用してＤＮＡからタンパク質への情報変換を行う遺伝子操作によるタンパク質生産はすでに確立された技術であり、タンパク質の大量生産が可能となった。著者は、これを一種の遺伝子人工発現系とみなし、遺伝子操作による特定のタンパク質の生産を試みた。本研究では遺伝子工学の手法、すなわち、生細胞による遺伝子発現により実用的な人工タンパク質の創製をおこなった。ここでは、反応性の優れた酵素であるメタピロカテカーゼの遺伝子と、抗体に特異的に結合するタンパク質であるプロテインＡの遺伝子を遺伝子融合により結合し、大腸菌内で発現させることを行なう（第２章）。また、ここで得られる融合タンパク質の有用性を示すために酵素免疫測定への応用を試みて、従来の化学的に結合されたタンパク質に比べて優れた特徴を持つことを見いだすとともに、実用化が可能であることを明示する（第３章）。

生細胞の合成系を利用する遺伝子工学の手法を使うことにより、ＤＮＡの発現を行ない、タンパク質を効率よく生産することができる。しかし、遺伝子工学も万能な技術ではなく、さきに述べたようないくつかの解決すべき問題点が残されている。そこで、これらの問題を解決するための一つのアプローチとして、新し

いタンパク質生産系の開発を試みることにした。すなわち、生体外タンパク質合成系の開発である。そこで第４章において、酵母から抽出したリボソーム、ｔＲＮＡ，諸酵素系を含む可溶性画分に、エネルギー源物質、原料アミノ酸及び情報源としてｐｏｌｙ（Ｕ）を添加するだけで、ＵＵＵコドンに対応するフェニルアラニンの重合が起こることを明らかにする。また、連続生産に向けての一つのアプローチとして、ｐｏｌｙ（Ｕ）を固定化した系でもアミノ酸の重合が起こることを示す。さらに、この結果をもとに酵母ｍＲＮＡおよびマウスミエローマｍＲＮＡを固定化すると、それぞれに対応するタンパク質が連続産生されることを示す。第５章ではＤＮＡの複製段階に着目して、鋳型としてのＤＮＡの一端を固相に固定化することにより、これに相補的なＤＮＡを連続的に合成できることを示す。

このように、いくつかの段階からなる遺伝子発現の複合プロセスを、ユニット化して組み立てることによって特定タンパク質が産生できることを示すとともに、新しいタンパク質生産システムを提唱することを目的とする。したがって、本研究はバイオテクノロジー分野にとどまらず、タンパク質合成機構の解明などの研究領域へも大きなインパクトを与えるものと考えられる。

参考文献

1) Crick,F.H.C., "On Protein Synthesis.", Symp. Soc. Exp. Biol., 12, 548 (1958)

2) Jackson,D., Symons,R., and Berg,P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2904 (1972)

3) Cohen,S., Chang,A., Boyer,H., and Helling,R., ibid., 70, 3240 (1973)

4) Ulmer,K.M., Science, 219, 666 (1983)

5) Imanaka,T., Shibazaki,M., and Takagi,M., Nature, 324, 695 (1986)

6) Peterhans,A., Mecklenburg,M., Meussdoerffer,F., and Mosbach,K., Anal. Biochem., 163, 470 (1987)

7) Lewin,B., "Genes", John Wiley & Sons (1985)

8) Conn,E.E., Stumpe,P.K., Bruening,G., and Doi,R.H., "Outlines of Biochemistry", John Wiely & sons (1987)

9) Fischer, E., Chem. Ber., 39, 530 (1906)

10) Merifield, R.B., J. Amer. Chem. Soc., 85, 2149, (1963)

11) Fairwell,T., Hospattankar,A.V., Ronan,R., Brewer,H.B., Chang,J.K., Shimizu,M., Zitzner,L. and Arnaud,C.D., Biochemistry, 22, 2691 (1983)

12) Kimura,T., Morikawa,T., Takai,M., and Sakakibara,S., J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1982, 340 (1982)

13) Uhlin,B.E., Molin,S., Gustafsson,P., and Nordstorm,K., Gene, 6, 91 (1979)

14) Rosenberg,M. and Court,D., Ann. Rev. Genetics, 13, 19 (1979)

15) DeBoer,H.A., Comstock,L.J., Vasser,M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 21 (1983)

16) Gentz,R., Langner,A., Chang,A.C.Y., Cohen,S., and Bujard,H., ibid., 78, 4963 (1981)

17) Mandecki,W., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 7177 (1986)

18) Gold,L., Pribnow,D., Schneider,T., Shinedling,S., Singer,B.S., and Stormo,G., Ann. Rev. Microbiol., 35, 365 (1981)

19) Ikemura,T., J. Mol. Biol., 151, 389 (1981)

20) Palva,I., Saruas,M., Lehtovuara,P., Sibakov,M., and Kaariainen,L., Proc. Natl., Acad. Sci. USA, 79, 5582 (1982)

21) Hitzeman,R.A., Hagie,F.E., Levine,H.L., Goeddel,D.V., Ammerer,G., and Hall,B.D., Nature, 293, 717 (1981)

22) Lee,F., Mulligan,R., Berg,P. and Ringhold,G., Nature, 294, 228 (1981)

23) Perry,L.J., and Weezel,R., Science, 226, 555 (1984)

24) Wilkinson,A.J., Fersher,A.R., Blow,D.M., Carter,P., and Winter,G., Nature, 307, 187 (1984)

25) Nirenberg,M.W., Matthaei,J.H., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 47, 1588 (1961)

26) Schweet,R.S., Lamform,H., Allen,E., ibid., 44, 1029 (1958)

27) Zamencnik,P.C., Keller,E.B., J. Biol. Chem., 209, 337 (1954)

28) Roberts,B.E., and Paterson,B.M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 2330 (1973)

29) Zaborsky,O.R., "Immobilized Enzymes", CRC Press (1973)

30) Weetall,H.H., Suzuki,S. (Eds.), "Immobilized Enzyme Technology", Plenum Press (1975)

31) Suzuki,S., and Karube,I., Immobilized Microbial Cells Symposium Series, 106, 59, The American Chemical Society (1979)

32) Ikariyama,Y., Aizawa,M., and Suzuki,S., J. Solid-Phase Biochem., 4, 279 (1979)

33) Bresser,J., Hubbel,H.R., and Gillespie,D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 6523 (1983)

34) Mathews,M.B., and Korder,A., Eur. J. Biochem., 17, 328 (1970)

35) Saiki,R., Glfand,D.H., Stoffel,S., Schart,S.J., Higuchi,R., Horn,G.T., Mullis,K.B., and Erlich,H.A., Science, 239, 487 (1988)

36) Saiki,R.K., Scharf,S., Faloona,F., Mullis,K.B., Horn,G.T., and Erlich,H.A., and Arnheim,N., ibid., 230, 1350 (1985)

第２章

大腸菌による
メタピロカテカーゼ・プロテインＡ
融合遺伝子の発現

第2章　大腸菌によるメタピロカテカーゼ・プロテインA融合遺伝子の発現

2－1　緒言

1953年、ＷａｔｓｏｎとＣｒｉｃｋ[1]によってＤＮＡの二重らせん構造のモデルが提出されて以来、ＤＮＡの発現プロセスが急速な勢いで解明されてきた。すなわち、ＤＮＡからタンパク質への情報変換プロセス、すなわちセントラルドグマの解明である。この過程において、いくつかの画期的な手法が生まれてきた。なかでも遺伝子操作の技術は今世紀を代表する発明の一つである。1972年、Ｂｅ-ｒｇら[2]の実験に端を発して以来遺伝子工学の技術は急速な進展をみせ，外来遺伝子を生細胞内で発現させることができるようになり、タンパク質の大量生産が可能となった。この技術を利用することにより，単に天然のタンパク質を大量に生産できるだけでなく，非天然の新しいタンパク質を創製する事も可能となった。たとえば、部位特異変異により酵素のアミノ酸を置換することにより耐熱性を向上させたり[3][4]、基質特異性や[5][6]、ｐＨ依存性[7]を変化させるなど、タンパク質の機能や性質を変換することが可能である。また、インターフェロン・β－ガラクトシダーゼ[8]やプロテインＡ・β－ガラクトシダーゼ[9]などの異種タンパク質の融合により多機能タンパク質を作製する試みもなされている。特に、酵素－結合タンパク質の融合タンパク質は、生物分析化学やバイオリアクターシステムなどへの応用を考えた場合、非常に有用である。

本研究では，生細胞による遺伝子発現の一例として、大腸菌によるメタピロカテカーゼ・プロテインＡ融合タンパク質の生産を試みる。

メタピロカテカーゼ（catechol:oxygen 2,3-oxidoreductase,EC1.13.1.2)は，

Pseudomonas putida由来の酵素で，カテコールを酸化してα－ヒドロキシムコニックε－セミアルデヒドを生成する反応を触媒する[10]。この酵素は分子量35,000の同一のサブユニットからなる４量体酵素で[11]，構造遺伝子の塩基配列も既に決定されている[12]。一方のプロテインＡはStaphylococcus aureus由来の分子量42,000のタンパク質で、ヒト、マウス、ウサギなどのイムノグロブリンＧ（ＩｇＧ）のＦｃ部位に特異的に結合するタンパク質である[13]。本章では、これらのタンパク質の遺伝子を融合し、大腸菌内で発現できるプラスミドを構築し、このプラスミドにより形質転換をした大腸菌で融合タンパク質を大量に生産できることを示す。

２－２　実験方法

２－２－１　菌体とプラスミド

大腸菌ＪＭ１０９株は宝酒造より購入した。プラスミドｐＵＣ１９，ｐＫＫ２２３－３，ｐＲＩＴ５はファルマシア社製を用いた。メタピロカテカーゼの構造遺伝子をコードするプラスミドｐＳＬＭＫ１[14]は相模中央化学研究所から供給された。

２－２－２　試薬

制限酵素，ＳｍａＩリンカー，リガーゼ，クレノーフラグメント（Klenow fragment）は宝酒造より，ＸｍａＩはNew England Biolabs.より購入した。オリゴヌクレオチドはＤＮＡシンセサイザー（日本ゼオン）により合成した。アルカリホスファターゼ標識抗マウスＩｇＧ抗体はZYMED Lab.より購入した。その他の試薬はすべてシグマ社および関東化学社の製品を用いた。

２－２－３　融合タンパク質の生産

プラスミドｐＭＰＲＡ３により形質転換した大腸菌はアンピシリン存在下（50μｇ／ｍｌ），１ｌのＬＢ培地（1% Bacto tryptone,0.5% Yeast extract,0.5% NaCl)中３７℃で６時間培養（対数増殖期）したのち，４℃で１０分間遠心（5,000 x ｇ）して集菌した。湿菌体（４ｇ）はＰＢＳ緩衝液で洗浄後，１０％アセトンを含むトリス酢酸緩衝液（５０ｍＭ，ｐＨ７．５）に懸濁し、リゾチーム（100μｇ／ｍｌ）、超音波処理（１ｍｉｎ）により破砕した。得られたリゼートは5,000 x ｇにて３０分遠心し、可溶性画分を分離して－８０℃で保存した。

２－２－４　電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）

大腸菌より得られたタンパク質は、ＳＤＳ－ポリアクリルアミド電気泳動[15]により分析した。

菌体破砕後の可溶性画分は、β－メルカプトエタノールを含む緩衝液を加え、１００℃の水浴中で２分間加熱処理してタンパク質を変性させた。また、不溶性画分は８Ｍ尿素により可溶化したのち、上述の処理を行った。泳動ゲルは１２.５％のポリアクリルアミドを用い、電圧５０Ｖで２０時間泳動した。電気泳動後ゲルを５％クマシー・ブリリアント・ブルー溶液で１時間染色した後、脱色液中（７％メタノール、５％酢酸）で非特異吸着による着色が脱色されるまで浸漬し、乾燥させた。

２－２－５　ウエスタン・ブロッティング[16]

電気泳動後のゲル中のタンパク質を、緩衝液（25 mM Tris-HCl,pH8.3,192 mM Glycine,20% MeOH）中で４０Ｖで４時間電圧を加えてニトロセルロース膜上に移し換えた。このニトロセルロース膜は３％のゼラチンを含むＴＢＳ緩衝液（20 mM Tris-HCl,pH 7.5,500 mM NaCl）中に１時間浸漬したのち、ＴＢＳ緩衝液で洗浄した。次いで、ＴＢＳ緩衝液で１／１,０００に希釈したアルカリホスファターゼ標識抗マウスＩｇＧ抗体（rabbit）の溶液中で１時間緩やかに振とうした。これをＴＢＳ緩衝液でよく洗浄した後、アルカリホスファターゼの発色性基質であるnaphtol AS-MX phosphate, Fast Red TRを添加して染色した。

２－２－６　メタピロカテカーゼの活性測定

メタピロカテカーゼの酵素活性測定はＮｏｚａｋｉの方法[17]に従った。すなわち、形質転換菌から得たタンパク質溶液を、３３０μＭのカテコールを含むリン酸カリウム緩衝液（５０ ｍＭ）に加え、生成物の増加にともなう３７５ｎｍの吸光度変化を測定した。３０℃で１分間に１μｍｏｌのカテコールを酸化する酵素

量が1ユニットと定義されている。

２－３　実験結果および考察

２－３－１ メタピロカテカーゼープロテインＡ融合遺伝子発現ベクターの構築

２－３－１－１ メタピロカテカーゼ遺伝子の発現ベクター

メタピロカテカーゼ遺伝子発現ベクターｐＭＫ１２は、Ｆｉｇ．２－１に示すように次の５つの部分よりなる。

１）ｒｒｎT_1T_2ターミネーター、β－ラクタマーゼ遺伝子の上流部分を有する、ｐＫＫ２２３－３のＨｉｎｄⅢ－ＳｃａＩフラグメント

２）β－ラクタマーゼ遺伝子の下流部分、複製起点を有する、ｐＵＣ１９のＳｃａＩ－ＰｖｕⅡフラグメント

３）ｔａｃプロモーターを有するｐＫＫ２２３－３のＳｐｈＩ－ＥｃｏＲＩフラグメント

４）メタピロカテカーゼのＳＤ配列と構造遺伝子を有するｐＳＬＭＫＩのＥｃｏＲＩ－ＨｉｎｆＩフラグメント

５）メタピロカテカーゼのＣ末端リンカーペプチド、ポリクローニング部位、ストップコドンをコードするＨｉｎｆＩ－ＨｉｎｄⅢ合成オリゴヌクレオチドフラグメント

すなわち、ｐＭＫ１２はメタピロカテカーゼのＣ末端に１５アミノ酸に相当するＤＮＡが付加されたものである。Ｆｉｇ．２－２は、合成オリゴヌクレオチド部分のアミノ酸配列を示す。ｐＭＫ１２で形質転換された大腸菌ＪＭ１０９株は、アンピシリンを含む寒天プレートで培養し、メタピロカテカーゼ活性を示すコロニーを単離した。ｐＭＫ１２はβ－ラクタマーゼ遺伝子、すなわちアンピシリン耐性遺伝子をコードするので、このプラスミドにより形質転換された大腸菌はア

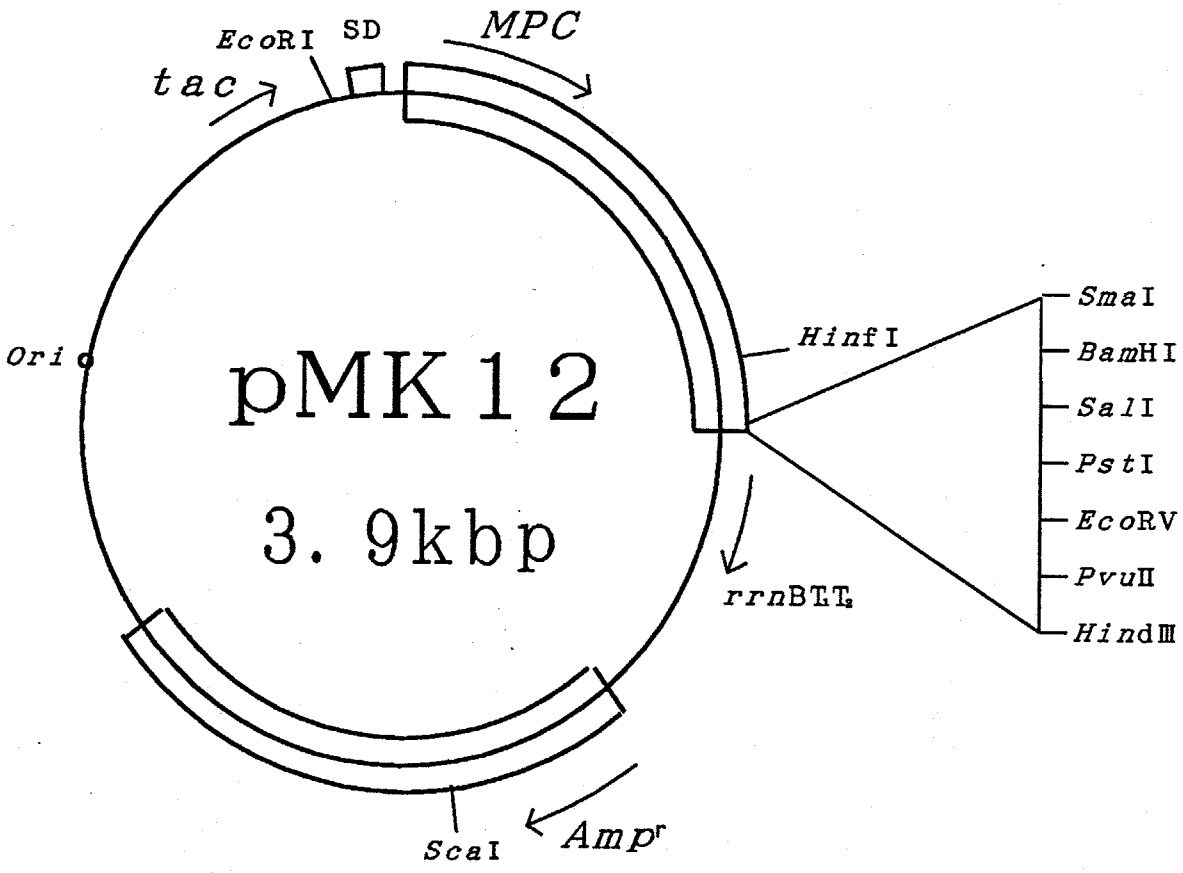


Fig. 2-1 Metapyrocatechase expression plasmid, pMK12.

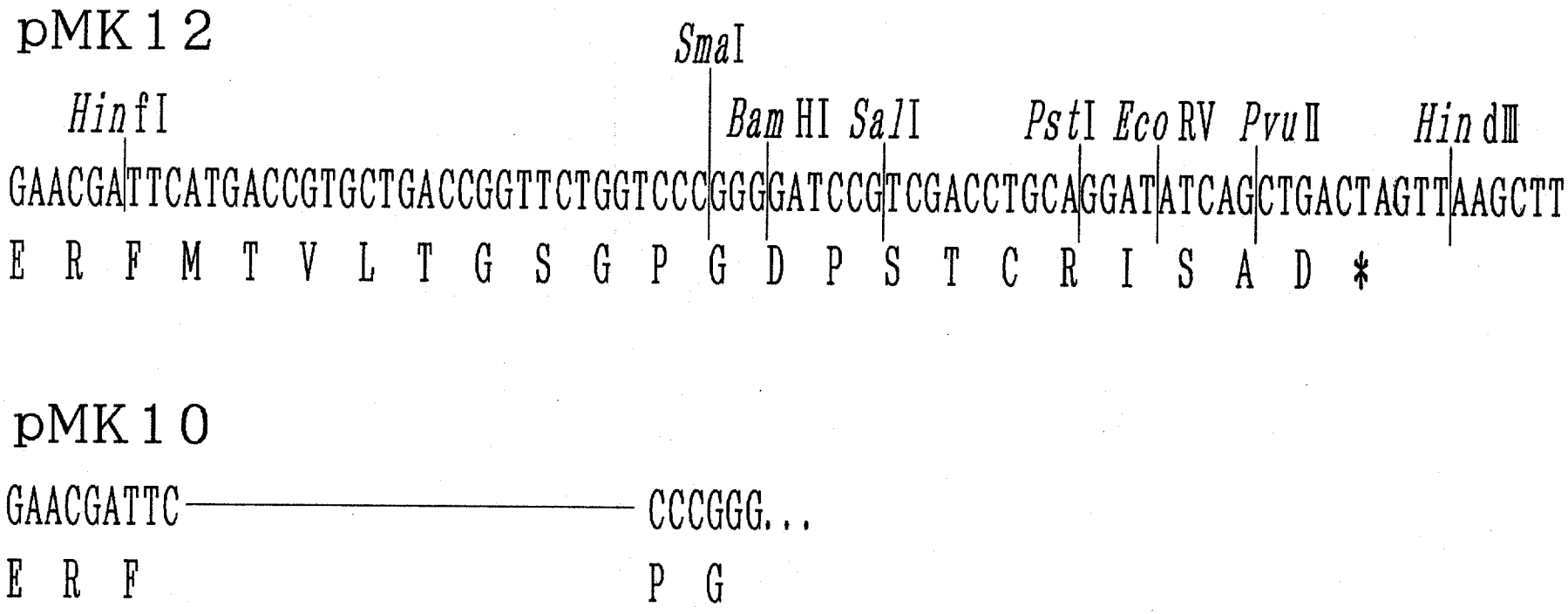


Fig. 2–2 Amino acid sequence of terminal region of metapyrochatechase.

ンピシリン存在下でも増殖できるので宿主菌との選別が容易にできる。またメタピロカテカーゼ活性を持つコロニーは、カテコール溶液を噴霧したとき黄色く着色するので選別が容易である。このｐＭＫ１２にコードされたメタピロカテカーゼ遺伝子は大腸菌内で発現され、抽出タンパク質は安定なメタピロカテカーゼ活性を持つことが明らかとなった。

ｐＭＫ１２構築の過程で中間体として得たｐＭＫ１０は、Ｃ末端の５アミノ酸とリンカーペプチド部分に相当する遺伝子が欠如している（Ｆｉｇ．２－２）。ｐＭＫ１０により形質転換されたコロニーにカテコール溶液を噴霧したとき黄色く着色し、メタピロカテカーゼ活性を提示することが確かめられた。しかしながら、菌体から抽出したタンパク質はメタピロカテカーゼ活性を示さなかった。従って、メタピロカテカーゼ酵素活性が安定に発現されるためにはＣ末端が重要な役割を果たしているものと推測される。

２－３－１－２　メタピロカテカーゼープロテインＡ融合遺伝子発現プラスミドの構築

Stapylococcas aureus由来プロテインＡの免疫グロブリンＦｃ結合部位の遺伝子をコードするプラスミドｐＲＩＴ５は制限酵素部位、ＢｃｌＩ部位、ＳｍａＩ部位を有している。次のようにしてＢｃｌＩ部位をＳｍａＩ部位に変換し、新たなＳｍａＩ部位を導入した。まず、ｐＲＩＴ５をＢｃｌＩで切断した後、クレノーフラグメントで処理して平滑末端とした。この切断部位にＳｍａＩリンカー（ＣＣＣＧＧＧ）を導入した。このプラスミドをｐＲＩＴ５Ｓと命名した。プロテインＡ遺伝子はｐＲＩＴ５ＳのＳｍａＩ部位をＸｍａＩで切断し、１.５％アガロースゲル電気泳動により７６０ｂｐのフラグメントを分離して得た。このＸｍａＩフラグメントを、ｐＭＫ１２のメタピロカテカーゼ構造遺伝子の下流にあるＳｍａＩ部位に挿入して、遺伝子融合プラスミドｐＭＰＲＡ３を作製した。ｐＭ

ＰＲＡ３は、ｔａｃプロモーター、ＳＤ配列、メタピロカテカーゼの構造遺伝子、リンカーペプチド（Ｇｌｙ－Ｓｅｒ－Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－Ｇｌｙ）、プロテインＡの構造遺伝子、ｒｒｎT_1T_2ターミネーター、複製起点、そしてβ－ラクタマーゼの構造遺伝子を有している。ｐＭＰＲＡ３の構築はＦｉｇ．２－３に、ｐＭＰＲＡ３はＦｉｇ．２－４に模式的に示した。

遺伝子操作により異種の遺伝子を融合して融合タンパク質を生産する場合、いかにしてそれぞれのタンパク質の活性を保持するかが最も困難な問題である。タンパク質はアミノ酸が連結したものであるが、高次構造まで正しく形成されたとき初めてその活性を発現するものだからである。特に本研究で用いたメタピロカテカーゼはテトラマー酵素であり、４次構造まで正しく規定される必要がある。本研究においてもｐＭＰＲＡ３構築に至るまでにいくつかのプラスミドを構築した（Ｆｉｇ．２－５）。ｐＭＡＭ１，ｐＭＡＭ２はプロテインＡ遺伝子の下流にメタピロカテカーゼ遺伝子を連結したものである。ｐＭＡＭ１の発現タンパク質は、メタピロカテカーゼのＮ末端から１５アミノ酸が欠如しており、形質転換菌のコロニー状態においても酵素活性は認められなかった。次に作成したｐＭＡＭ２は、メタピロカテカーゼの全遺伝子を含むものであるが、ここでも活性のある酵素は得られなかった。メタピロカテカーゼのＮ末端およびＣ末端付近のアミノ酸配列を調べてみると、Ｎ末端付近では疎水性の高いアミノ酸が多く観測され、この部分がタンパク質の４次構造形成に寄与しているものと推測される（Ｆｉｇ．２－６）。ところがｐＭＡＭ１，ｐＭＡＭ２は、プロテインＡのＣ末端とメタピロカテカーゼのＮ末端が連結されているために、メタピロカテカーゼが適当な高次構造を形成できなかったものと推察した。

そこで次に両遺伝子の連結順序を変更し、メタピロカテカーゼのＣ末端とプロテインＡのＮ末端が連結するような融合遺伝子を作成した。ｐＭＰＲＡ２はメタピロカテカーゼのＣ末端から５アミノ酸が欠如したものである。この場合、形質

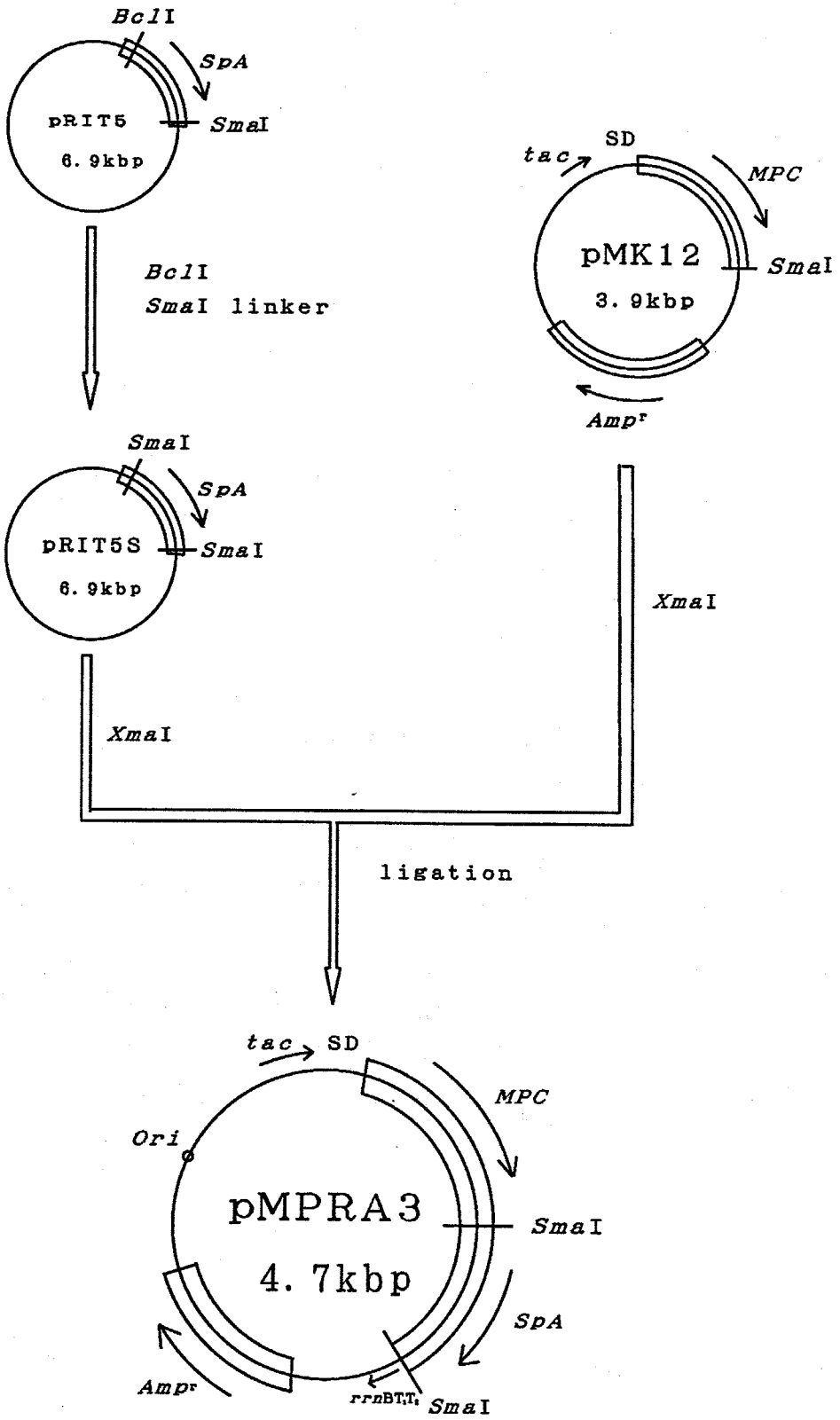


Fig. 2—3 Construction of pMPRA3

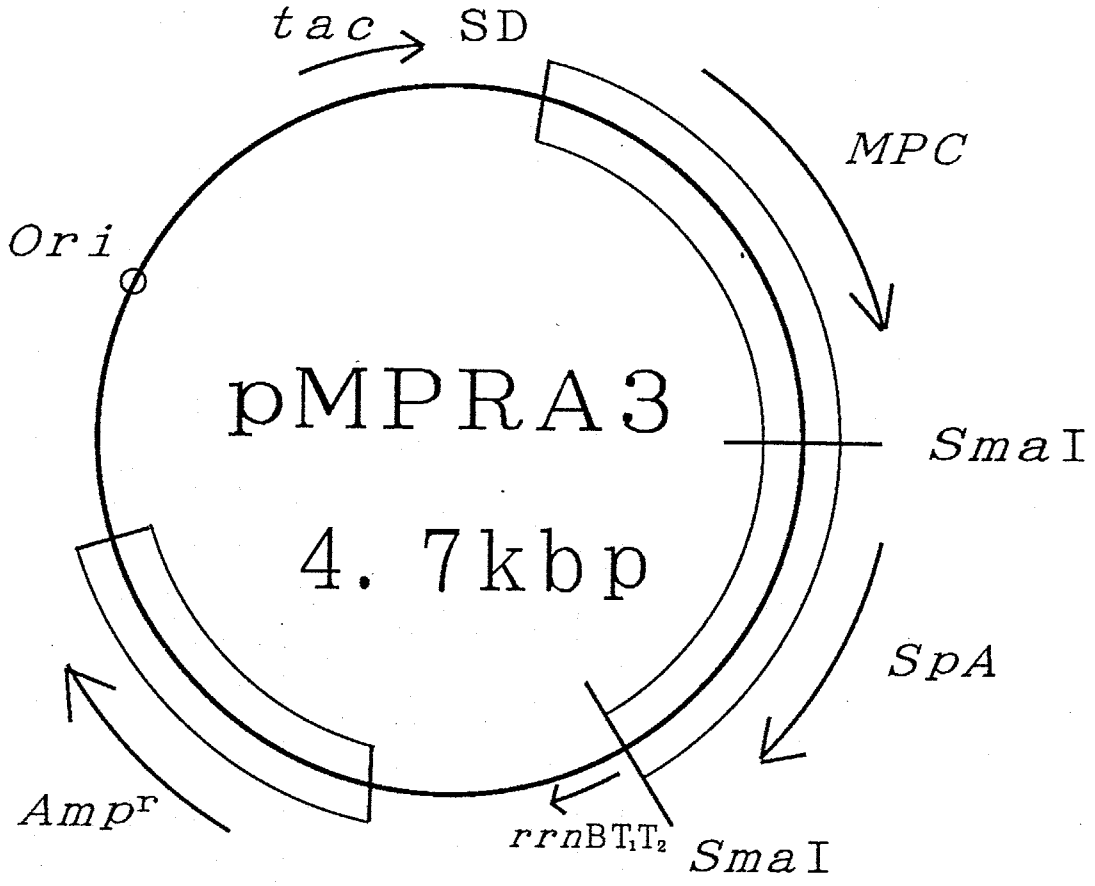


Fig. 2-4 *MPC-SpA* expression plasmid, pMPRA3

plasmid	MPC—SpA fusion protein	MPC activity	
		colony	extract
pMAM1	SpA | MPC N—terminal:15AA deletion	—	—
pMAM2	SpA | MPC full sequence	—	—
pMPRA2	MPC | SpA C—terminal:5AA deletion	+	—
pMPRA3	MPC | SpA full sequence	+	+

Fig. 2—5 MPC activities of various hybrid proteins

N—terminal

1
MNKGVMRPGHVQLRVLDMSK
ALEHYVELLGLIEMDRDDQG
RVYLKAWTEVDKFSLVLREA
DEPGMDFMGFKVVDEDALRQ
LERDLMAYGCAVEQLPAGEL
NSCGRRVRFQAPSGHHFELY
ADKEYTGKWGLNDVNPEAWP
RDLKGMAAVRFDHALMYGDE
LPATYDLFTKZVLGFYLAEQ
VLDENGTRVAQFLSLSTKAH
DVAFIHHPEKGRLHHVSFHL
ETWEDLLRAADLISMTDTSI
DIGPTRHGLTHGKTIYFFDP
SGNRNEVFCGGDYNYPDHKP
VTWTTDQLGKAIFYHDRILN
308
ERFMTVLT

C—terminal

Fig. 2-6 Aminoacid sequence of MPC

転換菌のコロニー状態においては酵素活性を示したものの、抽出したタンパク質にはほとんど活性が認められなかった。ここでは、適当な高次構造は形成するものの安定性に問題があり、精製過程で容易に失活するものと推察される。この酵素は酸素に対して不安定な酵素であるので、C末端のアミノ酸がその安定性に大きく寄与しているものと思われる。そこで、メタピロカテカーゼの全遺伝子を含むpMPRA3を作成した。メタピロカテカーゼの構造遺伝子の直後にリンカーペプチドとして、Gly－Ser－Gly－Pro－Glyを挿入した。その狙いはリンカー部位に柔軟性をもたせ、それぞれのタンパク質が高次構造を形成しやすくするためである。このようにして得られたプラスミドpMPRA3による形質転換菌から抽出したタンパク質は、安定な酵素活性を保持していることが示された。

2－3－1－3　融合遺伝子の発現

pMPRA3により形質転換した大腸菌JM109株は、アンピシリン存在下LB培地中37℃で培養した。遠心により集菌したあと、リゾチーム処理により破砕した。1lの培養液から約400mgの融合タンパク質が得られた。融合タンパク質発現の確認はSDS－PAGEにより行った。電気泳動は12.5％のゲルを用い、50V，20時間行った後、クマシーブリリアントブルーで染色した。その結果をFig．2－7に示す。泳動した試料は、pMPRA3によるJM109の形質転換菌、および宿主JM109それぞれの細胞破砕可溶画分と不溶画分そして分子量マーカーである。

pMPRA3により発現する融合遺伝子はリンカーペプチドを含め574アミノ酸残基をコードし、塩基配列から予測されるタンパク質の分子量は65,015である。電気泳動の結果より、pMPRA3／JM109の可溶画分には分子量約65,000に相当する位置に宿主のJM109には存在しないバンドが観測さ

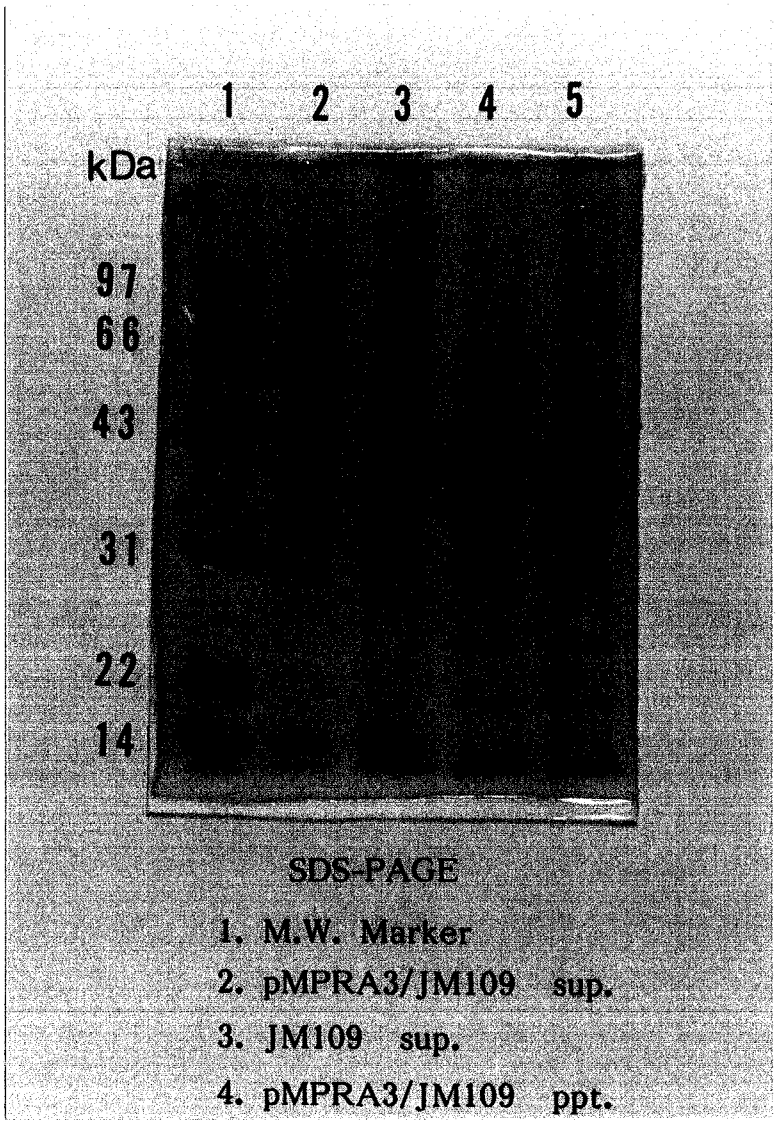


Fig. 2-7 SDS-PAGE analysis of cell extracts

れ、目的とする融合タンパク質が発現していることが確認できた。デンシトメーターによる分析の結果、融合タンパク質は抽出したタンパク質の７０％以上に相当することが示された。また、融合タンパク質は形質転換菌の不溶性画分にはほとんど観測されなかった。このことは、目的とするタンパク質を活性を保持したまま抽出し、精製することがが容易であることを示唆している。

２－３－２　融合タンパク質の特性解析

２－３－２－１　プロテインＡの性質

プロテインＡはStaphylococcas aureusの細胞膜に存在する分子量４２，０００のタンパク質で，シグナル領域，Ｆｃ結合領域，そして細胞壁結合領域からなる。Ｆｃ結合領域は相同性の高い５つのドメイン（Ｅ，Ｄ，Ａ，Ｂ，Ｃ）からなる。融合タンパク質中のプロテインＡ（ＢｃｌＩ－ＳｍａＩフラグメント）は，このうちＤ，Ａ，Ｂドメインの全てと，Ｅ，Ｃドメインの一部を有しており，ＩｇＧのＦｃ部位への結合能力は十分保持しているものと推察される。

融合タンパク質がプロテインＡの性質，すなわちＩｇＧとの結合能力を有することはウエスタンブロッティングにより確認した。抽出タンパク質は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（１２.５％ゲル）後、ゲルからニトロセルロース膜上に移し換えた（４０Ｖ，４ｈ）あとアルカリフォスファターゼ標識ＩｇＧ（ｒａｂｂｉｔ）と反応させた。ついで、酵素の発色性基質であるnaphtol AS-MX phosphate, Fast Red Trを添加し染色した。この方法により，ｒａｂｂｉｔ　ＩｇＧに結合するニトロセルロース上のタンパク質のみが発色する。この結果をＦｉｇ．２－８に示した。ｐＭＰＲＡ３／ＪＭ１０９タンパク質の分子量約６５、０００に相当する位置に強い発色がみられた。一方、宿主のＪＭ１０９には発色部位が認められなかった。

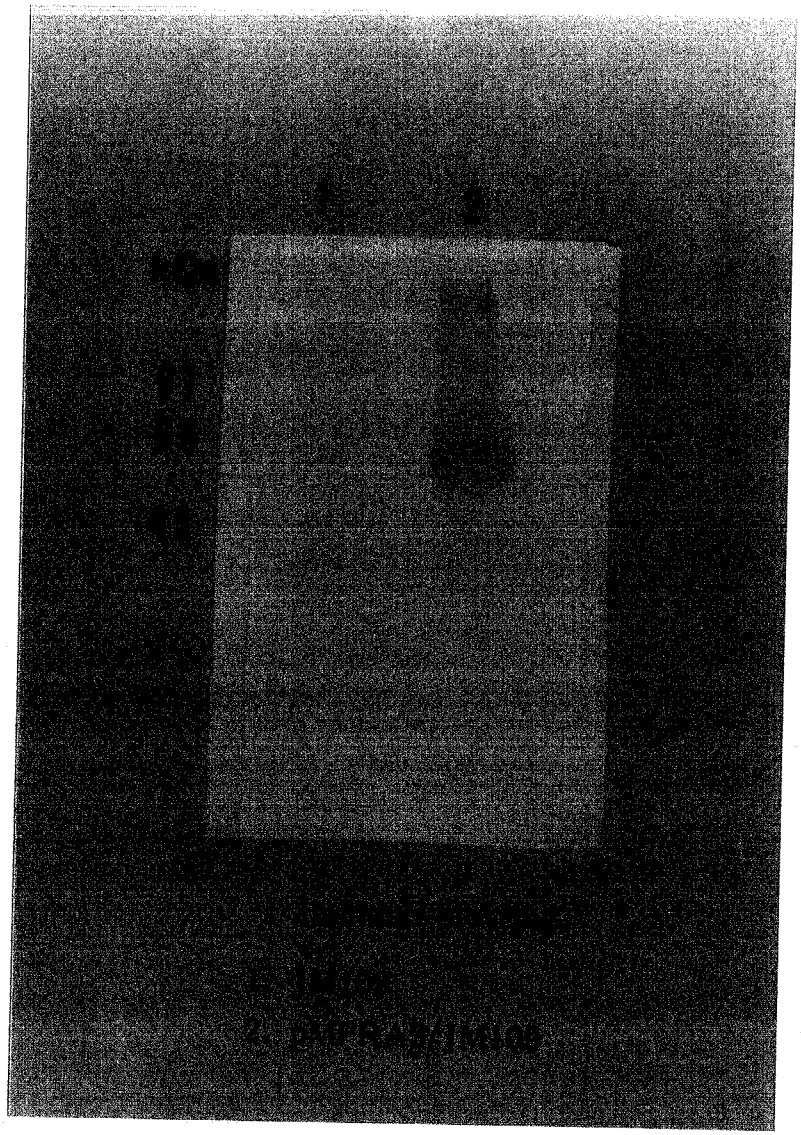


Fig. 2-8 Western blotting analysis of cell extracts

この結果より、融合タンパク質はＩｇＧとの結合能力を有していることが明らかとなった。また、融合タンパク質より低分子量のプロテインＡは観測されず、遺伝子組み替えにおけるタンパク質生産においてしばしば問題となるタンパク質の分解[18]は酵素部分、あるいは２つのタンパク質の結合部位では起こっていないことが示された。

２－３－２－２　メタピロカテカーゼの性質

メタピロカテカーゼはカテコールを酸化して、α－ヒドロキシムコニックε－セミアルデヒドとする反応を触媒する（Ｆｉｇ．２－９）。生成物のＵＶ吸収スペクトルは、３７５ｎｍに吸収極大を示す。したがって、メタピロカテカーゼの活性測定は生成物の増加にともなうＡｂｓ375の増加速度を測定することにより求めることができる。光路長１ｃｍのキュベットに、５０ ｍＭリン酸カリウム緩衝液（ｐＨ７.５）２.９ｍｌに１０ ｍＭカテコール水溶液０.１ｍｌを入れ混合し、これに酵素溶液を加え混合した後Ａ375の経時変化を測定する。この測定条件における生成物のモル吸光係数は，４.４ｘ１０$^{-5}$であることから１分間に酸化されるカテコールの量が求められる。３０℃で１分間に１μｍｏｌのカテコールを酸化する酵素量が１ユニットと定義されている。

ｐＭＰＲＡ３による形質転換菌より得た融合タンパク質のメタピロカテカーゼ活性を、ｐＭＫ１２による形質転換菌より得たメタピロカテカーゼ活性と比較した。それぞれの酵素活性のｐＨ依存生をＦｉｇ．２－１０に示す。メタピロカテカーゼ融合タンパク質、およびメタピロカテカーゼの至適ｐＨはそれぞれ、６.５，６.０であった。また、この最適条件下（ｐＨ６.５）での融合タンパク質中のメタピロカテカーゼ活性は、抽出タンパク質１ｍｌあたり１３８ユニットであった。抽出タンパク質はプロテインアッセイ（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）の結果、およそ２ｍｇ／ｍｌのタンパク質が含まれていることがわかった。そのうち７０％が融合タン

Metapyrocatechase (MPC): Catalyzing the oxidation of catechol.

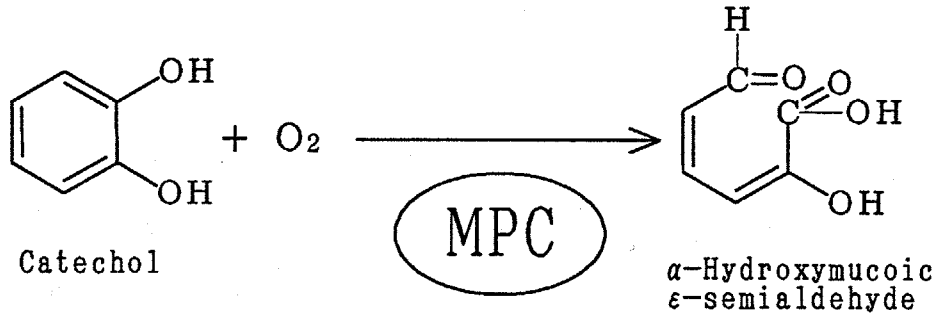


Fig. 2—9 Oxidation of catechol by MPC.

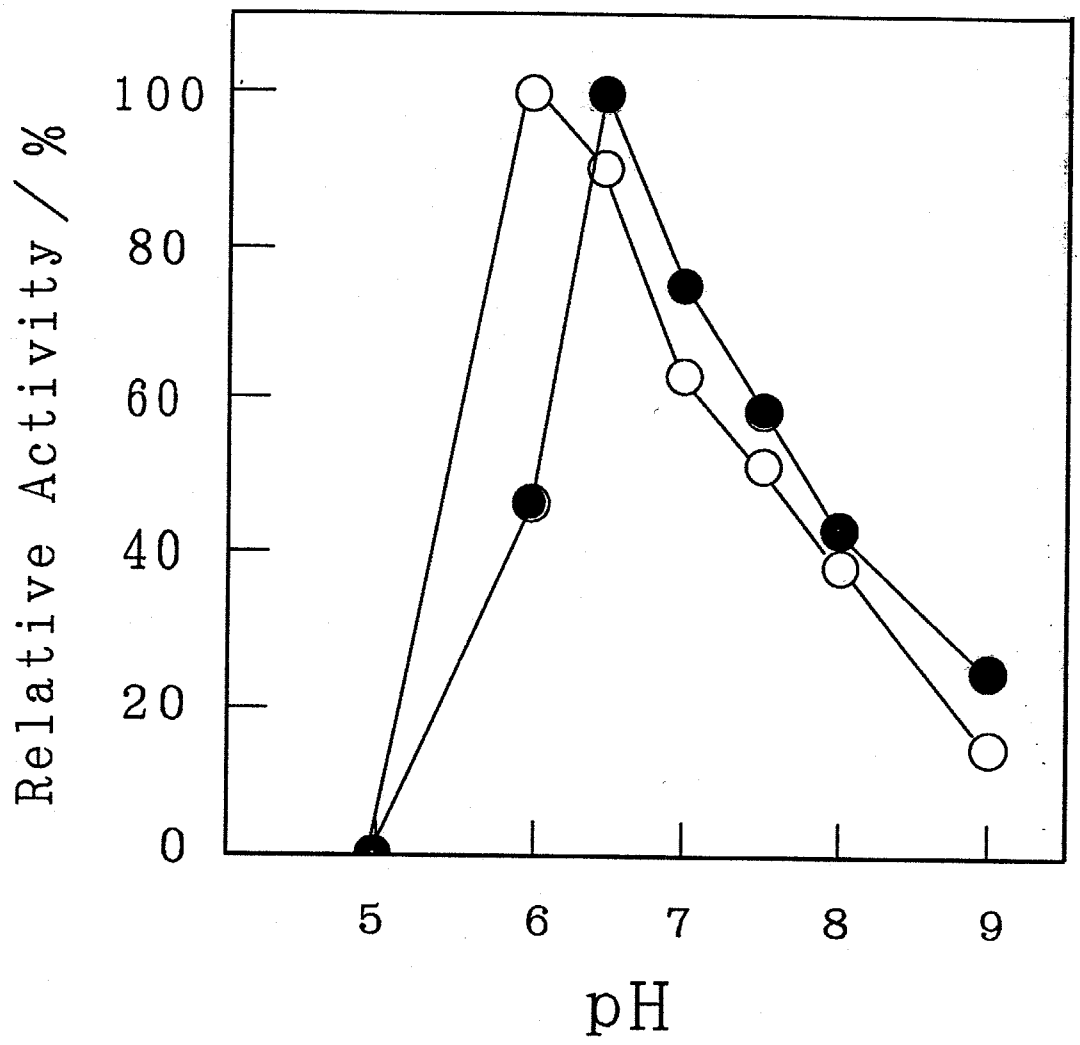


Fig. 2-10 pH dependency of metapyrocatechase reaction

● : pMPPA3 / JM109 (the fusion protein)

○ : pMK12 / JM109 (the native enzyme)

パク質であるとすると、酵素の比活性は約１００ｕｎｉｔ／ｍｇと推測される。

Ｌｉｎｅｗｅａｖｅｒ－Ｂｕｒｋの方法により、それぞれの酵素のカテコールに対するＫｍを求めた。その結果、融合酵素、ｎａｔｉｖｅ酵素のＫｍはそれぞれ、１.３ｘ１０$^{-5}$、３.４ｘ１０$^{-5}$であった。Ｎｏｚａｋｉによれば、Pseudomonas putida より抽出、精製したメタピロカテカーゼのＫｍは、３ｘ１０$^{-6}$である。この違いは本研究で用いた酵素が未精製のため、共存物質の影響を受けて若干大きな値となったものと考えられる。

メタピロカテカーゼのカテコールに対するＫｍは、酵素免疫測定に通常用いられている酵素であるアルカリフォスファターゼやβ－ガラクトシダーゼ等に比べて非常に小さく、本研究で得られた融合タンパク質の酵素分析、とりわけ免疫測定への応用展開の可能性が示唆された。

２－４　結言

本章においては、遺伝子工学の手法により非天然の人工タンパク質を創製することを目的とした。ここでは二つの異なるタンパク質の遺伝子を融合して細胞内に導入し、細胞内の遺伝子発現系を利用してこれらの融合タンパク質を生産することを試みた。

大腸菌内でメタピロカテカーゼ遺伝子を大量に発現させることができるプラスミド、ｐＭＫ１２のメタピロカテカーゼ構造遺伝子の下流に、リンカーペプチドを介してプロテインＡの遺伝子を挿入し、メタピロカテカーゼ・プロテインＡ遺伝子融合プラスミド、ｐＭＰＲＡ３を構築した。ｐＭＰＲＡ３で形質転換した大腸菌ＪＭ１０９株により、融合タンパク質を大量に発現させることができた。生産されたタンパク質は菌体を破砕した可溶性画分から容易に回収することができ、その量は可溶性タンパク質の７０％以上にも達した。得られた融合タンパク質は、もとの２つのタンパク質双方の性質、すなわちメタピロカテカーゼの酵素活性とプロテインＡのＩｇＧ結合能を有していることが明らかとなった。

生細胞の遺伝子発現系を利用して目的とする特定の遺伝子を発現させる、いわゆる遺伝子操作技術は、現在のところタンパク質生産における唯一の方法である。本章では、この技術により実際に非天然の人工タンパク質を創製できることが明示された。

参考文献

1) Watson,J.D. and Crick,F.H.C., Nature, 171, 737 (1953)

2) Jackson,D., Symons,R., and Berg,P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2904 (1972)

3) Perry,L.J. and Wetzel,R., Science, 226, 555 (1984)

4) Imanaka,T., Shibazaki,M. and Takagi,M., Nature, 324, 695 (1986)

5) Winter,G., Fersht A.W., Wilkinson,A.J., Zoller,M., and Smith,M., Nature, 229, 756 (1982)

6) Wilkinson,A.J., Fersht,A.R., Blow D.M., Carter,P., and Winter,G., Nature, 307, 187 (1984)

7) Yumoto,N., Tokushige,M., and Hayashi,R., Biochim. Biophys. Acta., 616, 319 (1980)

8) Peterhans,A., Mecklenburg,M., Meussdoerffer,F., and Mosbach,K., Anal. Biochem., 163, 470 (1987)

9) Uhlen,M., Nilsson,B., Guss,M., Gatenbeck,S., and Philipson,L., Gene, 23, 369 (1983)

10) Nozaki,M., Ono,K., Nakazawa,T., Kotani,S., and Hayaishi,O., J. Biol. Chem., 243, 2682 (1968)

11) Nakai,C., Hori,K., Kagamiyama,H., Nakazawa,T., and Nozaki,M., J. Biol. Chem., 258, 2916 (1983)

12) Nakai,C., Kagamiyama,H., Nozaki,M., Nakazawa,T., Inouye,S., Ebina,Y., and Nakazawa,A., J. Biol. Chem., 258, 2923 (1983)

13) Sjodahl,J., Eur. J. Biochem., 78, 471 (1977)

14) Ohomori,M., Narushima,H., Miki,T., Numao,N., and Kondo,K.,

Agric. Biol. Chem., 52, 2823 (1988)

15) Laemmli,U.K., Nature, 227, 680 (1970)

16) Towbin,H., Stahelin,T., and Gordon,J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 76, 4350 (1979)

17) Nozaki,M., Methods Enzymol., 17A, 552 (1970)

18) Chung,C.H. and Goldberg,A.L.,Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 4931 (1981)

第３章

メタピロカテカーゼ・プロテインＡ融合タンパク質の酵素免疫測定への応用

第3章　メタピロカテカーゼ・プロテインA融合タンパク質の酵素免疫測定への応用

3－1　緒言

第2章において、遺伝子操作の手法により作成したメタピロカテカーゼ・プロテインA融合遺伝子を大腸菌内で大量に発現させる事ができ、得られた融合タンパク質は構成する2つのタンパク質の機能を有している事が明らかになった。本章では、この融合タンパク質が酵素免疫測定へ応用できることを示す。

医療分野や生化学分野での微量物質の検出において、酵素免疫測定法は欠くことのできない技術である[1)2)]。この方法には、酵素標識抗原あるいは酵素標識抗体が必要である。酵素標識は従来、酵素と抗原、あるいは酵素と抗体との化学的な結合により行なわれてきた[3)4)]。しかし、本法を用いるかぎり両者の結合比は普通1：1にはならず、一般に複雑な複合体を形成しやすい[5)]。このことは、抗原抗体反応の円滑な進行や酵素活性の発現を阻害することになり、その結果反応の特異性や測定の感度を下げることにつながる[6)7)]。また、タンパク質の分子量が巨大化するにともない固相表面に吸着しやすくなるために、測定の高感度化には不利である。ところが、遺伝子組み替えにより融合タンパク質を作製することにより、結合比を厳密に1：1に制御でき、さらに結合部位を制御できることが期待されるためにタンパク質の失活が起こらないように設計することが可能と考えられる。遺伝子工学によるハイブリッドタンパク質の産生アプローチによって、上述のような化学結合における問題点は解決できると考えられる。また特定遺伝子の選択的な発現により特定タンパク質を大量に生産できる利点も指摘できよう。

プロテインAは抗体と特異的に結合するタンパク質である。この特異性を利用して細胞化学[8]及び免疫化学研究[9]、あるいは細胞表面構造の研究[10]などが精力的に行われている。特に、プロテインAと酵素を結合したものは酵素免疫測定において非常に有用な試薬である[11][12][13]。すなわち、ほとんどの免疫グロブリンに結合するプロテインAと化学増幅反応を触媒する酵素の両者の機能を有しているためである。本研究では酸素添加酵素メタピロカテカーゼを標識酵素とする。このメタピロカテカーゼは非常に小さいKm値を有する酵素で、カテコールを基質としてα－ヒドロキシムコニックε－セミアルデヒドを生成する。この生成物は黄色く着色しているので酵素免疫測定におけるマーカー酵素となり得る。従って、これらのタンパク質を遺伝子工学的に結合した融合タンパク質は数多くの酵素免疫測定に適用できるものと期待される。さらにメタピロカテカーゼの優れた増幅機能を利用するために高感度化も達成できよう。そこで本章では、メタピロカテカーゼ・プロテインA融合タンパク質を用いてウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）および抗ＢＳＡ抗体の免疫測定、高感度に微量タンパク質を定量できることを示す。

３－２　実験方法

３－２－１　試薬

ＢＳＡに対する抗体はOrgano Tecknika Corpより、ＢＳＡはSigma社より、ＩｇＧ結合セファロースはファルマシア社より購入した。その他の試薬は全てSigma社、関東化学社より購入した。また、固相免疫測定に用いたプレートはBecton,Dickinson & companyの製品を使用した。

３－２－２　融合タンパク質の調製

メタピロカテカーゼ・プロテインＡ融合タンパク質の調製は、２－２－３に述べた方法に従った。すなわち、メタピロカテカーゼ・プロテインＡ遺伝子融合プラスミドｐＭＰＲＡ３により形質転換した大腸菌をＬＢ培地で培養後リゾチーム、超音波処理により破砕し、遠心により得られた上清を融合タンパク質溶液として使用した。

３－２－３　抗ＢＳＡ抗体に対する酵素免疫測定　（Ｆｉｇ．３－１）

ＢＳＡを終濃度１ｍｇ／ｍｌになるようにＫＰｉ緩衝液（５０ｍＭ，ｐＨ７．５）に溶解し、ＢＳＡ溶液（０．５ｍｌ）を２４穴マイクロタイタープレートに注いだのち、４℃で一晩放置し吸着させた。溶液を除去したのち、ＫＰｉ緩衝液で５回洗浄した後種々の濃度の抗ＢＳＡ抗体溶液（５００μｌ）をウェルに注ぎ３０℃で２時間免疫反応後、３回洗浄した。そして融合タンパク質を含む細胞抽出液を注ぎ、３０℃で２時間反応を行なったのち、ＫＰｉ緩衝液でよく洗浄した。続いて３００μＭのカテコール溶液を注ぎ、ＩｇＧ－プロテインＡを介し固相に吸着したメタピロカテカーゼの活性を測定した。３０℃で５分間の酵素反応後、メタピロカテカーゼの阻害剤である１，１０－フェナントロリン（１Ｍ）を添加して酵

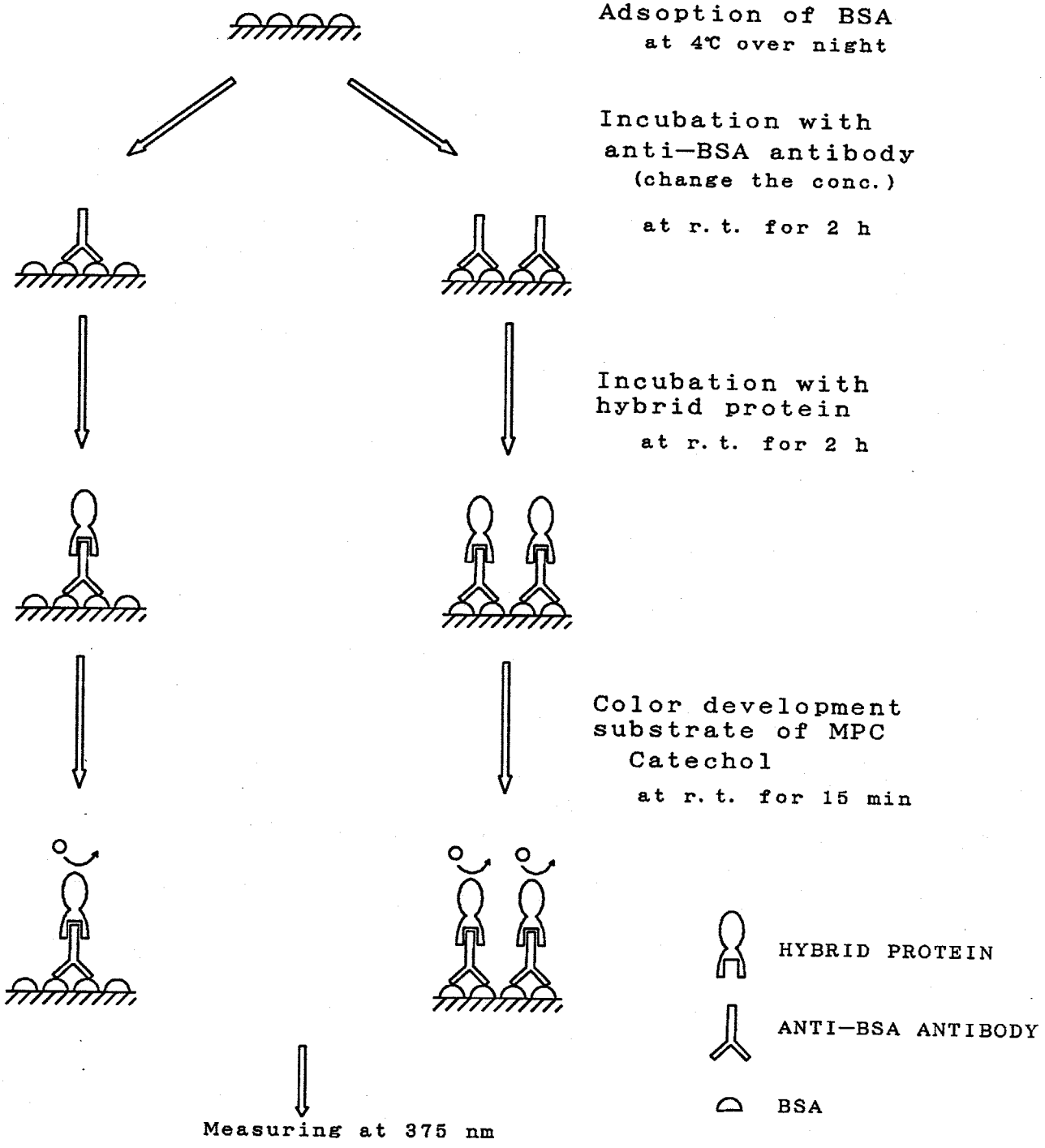


Fig. 3—1 Principle of enzyme immunoassay for anti—BSA antibody.

素反応を停止し、３７５ｎｍの吸光度変化を測定した。

３－２－４　ＢＳＡに対する酵素免疫測定　（Ｆｉｇ．３－２）

ＢＳＡの定量は以下の手順で行った。最初に第一抗体として終濃度１ｍｇ／ｍｌの抗ＢＳＡ抗体をＴＢＳ緩衝液（２０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．０、５０ｍＭ ＮａＣｌ）に溶解し、２４穴プレートに５００μｌづつ注ぎ４℃で一晩放置し吸着させた。溶液を除いた後、プレートはＴＢＳ緩衝液で３回洗浄し、非特異吸着点をブロックするために、スキムミルク溶液（１％）を注ぎ３０℃で１時間インキュベートした。ＴＢＳ緩衝液で洗浄した後、種々の濃度のＢＳＡ溶液を３０℃、２時間反応後、第二抗体として抗ＢＳＡ抗体を３０℃において２時間反応させた。ウェルはＴＢＳ緩衝液で３回洗浄後、２０倍に希釈した融合タンパク質を含む溶液５００μｌを注いだ。３０℃で２時間反応し洗浄後、カテコール溶液（３００μＭ）を注ぎウェルに吸着したメタピロカテカーゼの活性を測定した。酵素反応は５０μｌの停止溶液（１Ｍ，１，１０－フェナントロリン）を添加し、３７５ｎｍの吸光度をＵＶ吸光度測定装置（日本分光、ＵＶＩＤＥＣ－６１０Ｃ）で測定した。

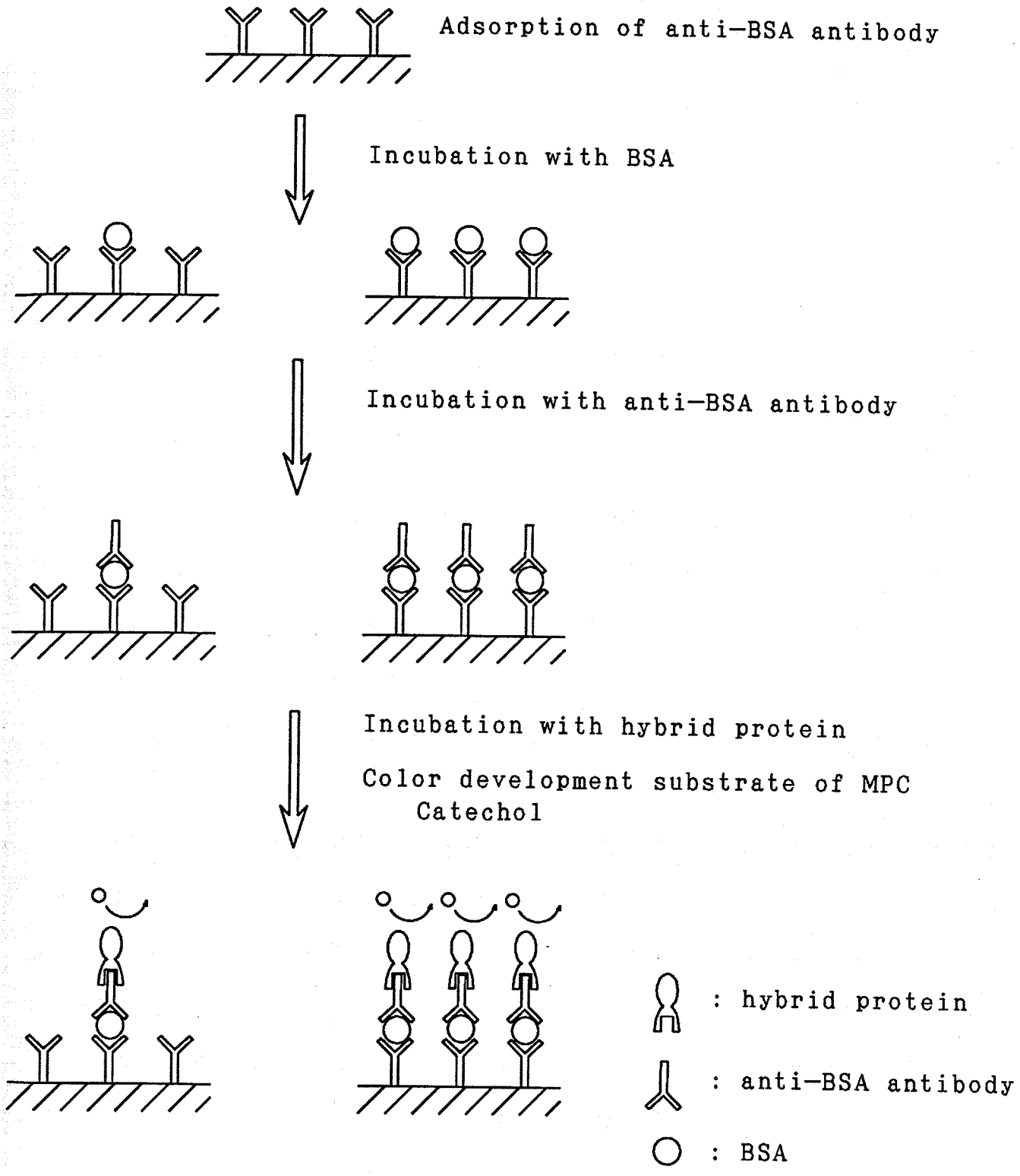


Fig. 3-2 Principle of enzyme immunoassay for BSA

３－３　実験結果及び考察

３－３－１　融合タンパク質の性質

メタピロカテカーゼ・プロテインＡ融合タンパク質は、メタピロカテカーゼのＣ末端とプロテインＡのＮ末端がリンカーペプチドを介して結合するように遺伝子上で設計されている。このため、結合部位がランダムな化学結合と異なり活性部位がふさがれる可能性がきわめて小さい。このように設計して得られた融合タンパク質は、第２章において示したように酵素活性と結合タンパク質の性質を有する多機能ハイブリッドタンパク質である。メタピロカテカーゼの分子量は35,000、プロテインＡの分子量は30,000である。ＳＤＳ－ＰＡＧＥによる分析の結果（第２章）、融合タンパク質の分子量は約65,000であり、メタピロカテカーゼとプロテインＡが１：１の比で結合していることが示された。

メタピロカテカーゼ・プロテインＡ融合タンパク質が酵素免疫測定へ応用できる可能性を確かめるために、プロテインＡが固相上のＩｇＧ分子に結合した状態でメタピロカテカーゼ酵素活性を保持することを以下の実験で確認した（Ｆｉｇ．３－３）。ヒトＩｇＧが共有結合で結合されたセファロースゲルに、融合タンパク質の溶液を添加し１時間インキュベートした後ＴＢＳ緩衝液で洗浄し、非特異的に吸着した融合タンパク質を除去した。これにカテコール溶液（０．３ｍＭ）を添加するとゲルは黄色く着色した。このことから融合タンパク質は固相上、すなわち不均一な系においてもプロテインＡのＩｇＧ結合能力、メタピロカテカーゼ酵素活性の性質を保持していることが明らかとなった。

以上のようにして、このタンパク質が酵素免疫測定の試薬として使用できる可能性が示唆された。

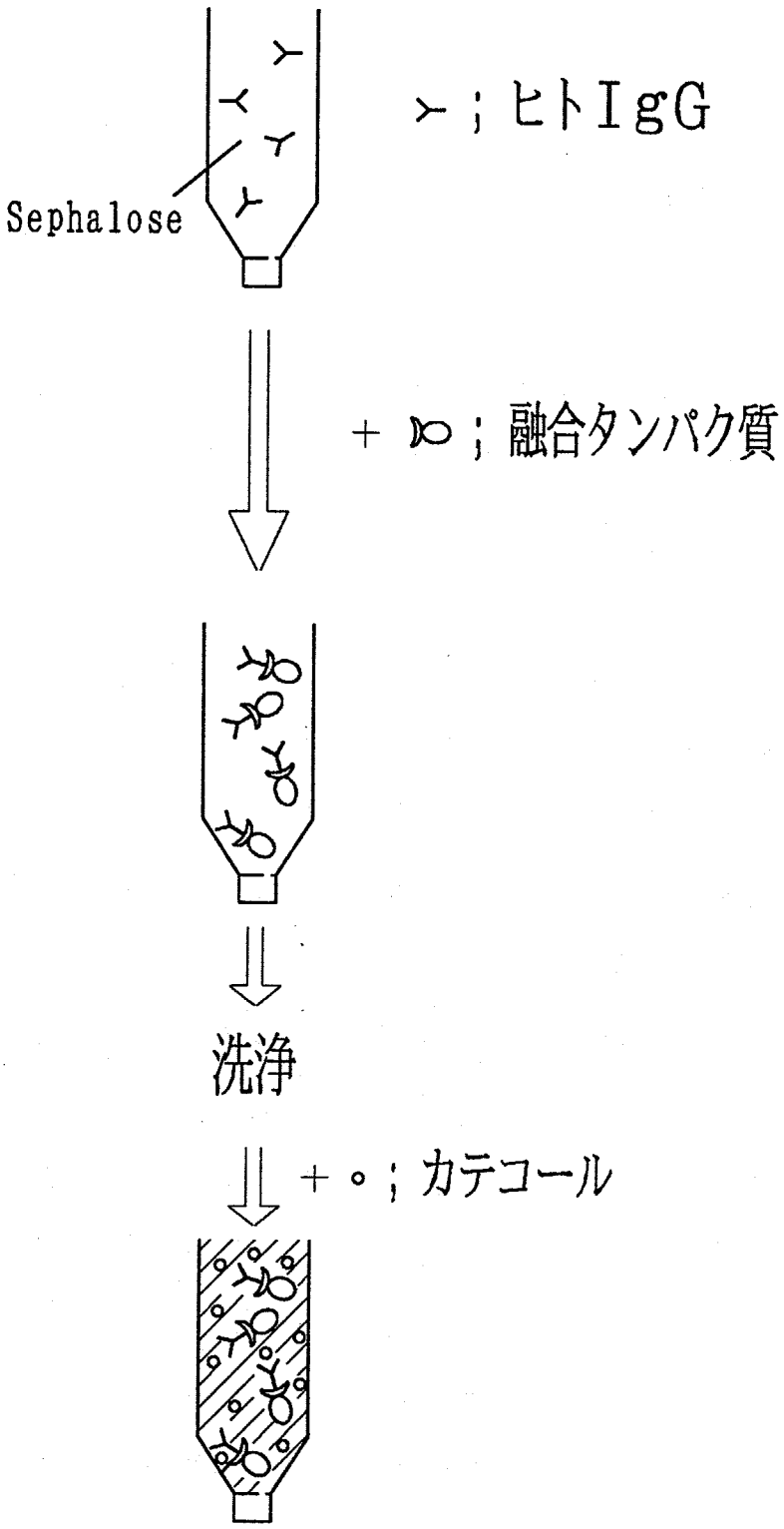


Fig. 3-3　融合タンパク質によるIgGセファロースの発色

３－３－２　固相への非特異吸着の検討

酵素免疫測定において感度を上げるためには、酵素標識抗体の固相表面への吸着をできるだけ小さく抑えることが重要である。一般に、タンパク質の分子量が大きいほど吸着は起こりやすい。酵素と抗体を化学的に結合したものは、巨大な分子量の複合体を形成しやすく、非特異吸着の原因となる[14]。しかし、遺伝子工学の手法によりタンパク質を結合すると、結合比を厳密に１：１に制御することが可能であり、分子量は比較的小さく制御できるため、非特異吸着の抑制が期待できる。

本研究で用いた固相の材質はポリスチレンであり、タンパク質との相互作用が比較的強い物質である。そこで、融合タンパク質の固相表面への非特異吸着を評価するために、タンパク質を直接固相表面に添加した。固相表面は、１％スキムミルク、１％ＢＳＡ、３％ゼラチンでコートしたもの、何もコートしていないものを比較検討した。融合タンパク質のインキュベーションは３０℃で２時間行い、よく洗浄後５００μｌのカテコール溶液（０.３ｍＭ）を注ぎ、メタピロカテカーゼ活性を測定した（Ｔａｂｌｅ　３－１）。固相表面をいずれかのタンパク質でコートした場合、メタピロカテカーゼ活性はほとんど観測されなかったが、なかでもスキムミルクによるコートが最も効果的に非特異吸着を抑制できることが示された。

融合タンパク質の第一抗体への結合を評価するために、第一抗体を吸着させたプレートに融合タンパク質を直接反応させた。固相表面は、１％スキムミルク、３％ゼラチンでコートしたもの、なにもコートしていないものを比較検討した。ウェルがタンパク質でコートされていない場合、融合タンパク質の吸着が若干認められたが、ミルク、ゼラチンでコートした場合、吸着はほとんど起こらなかった。この結果は、固相表面をスキムミルクあるいはゼラチンでコートすると、融合タンパク質のプロテインＡ部分は固相上の第一抗体に結合しないということを

Table 3—1

Effect of Protein Coating on Nonspecific Adsorption of The Fusion Protein

Protein coating	Relative absorbance at 375 nm (%)
none	100
milk (1%)	60
BSA (1%)	70
gelatin (3%)	80

表している。イムノグロブリンのＦｃ領域は疎水性であり、この部分でプラスチック表面に吸着していると予測されるので、融合タンパク質が結合しにくいものと思われる。しかし、ウェル表面がミルクやゼラチンでコートされていない時は、Ｆｃ領域とプロテインＡの非特異的相互作用により結合したものと考えられる。このことからプロテインＡにより認識されるＩｇＧのＦｃ部位はタンパク質（ミルク、ゼラチン）のコートにより効果的にブロックされていることが明らかとなった。近年、従来用いられてきたＢＳＡやゼラチンに代わるブロッキング剤としてスキムミルクが注目されているが[15]、本研究においてもミルクコートが非常に効果的に非特異吸着を抑制できるとともに、プロテインＡと第一抗体の相互作用も抑制できることが示された。

３－３－３　メタピロカテカーゼ・プロテインＡ融合タンパク質による抗ＢＳＡ抗体の定量

酵素免疫測定への応用の一つの例として、抗ＢＳＡ抗体の定量を試みた。方法は、３－２－３に従った。すなわち、固相にＢＳＡを吸着させ、ここに種々の濃度の抗ＢＳＡ抗体を反応させた。さらに、メタピロカテカーゼ・プロテインＡ融合タンパク質を反応させて，ＩｇＧ－プロテインＡの結合を介して固相に吸着したメタピロカテカーゼの酵素活性を測定した。固相を緩衝液でよく洗浄後、３００ μＭのカテコール溶液を加えて５分間の酵素反応したのち、阻害剤（１，１０－フェナントロリン）を添加して反応を停止した。紫外可視スペクトロメーターで各ウェルの３７５ｎｍの吸光度を測定した。この結果をＦｉｇ．３－４に示した。Ｆｉｇ．３－４では横軸に抗ＢＳＡ抗体の濃度、縦軸に３７５ｎｍにおける吸光度を示した。この方法により、５ｘ１０$^{-5}$から２ｘ１０$^{-4}$ｇ／ｍｌの範囲で抗ＢＳＡ抗体を測定できることが示された。

以上の結果は、メタピロカテカーゼ・プロテインＡ融合タンパク質が酵素免疫

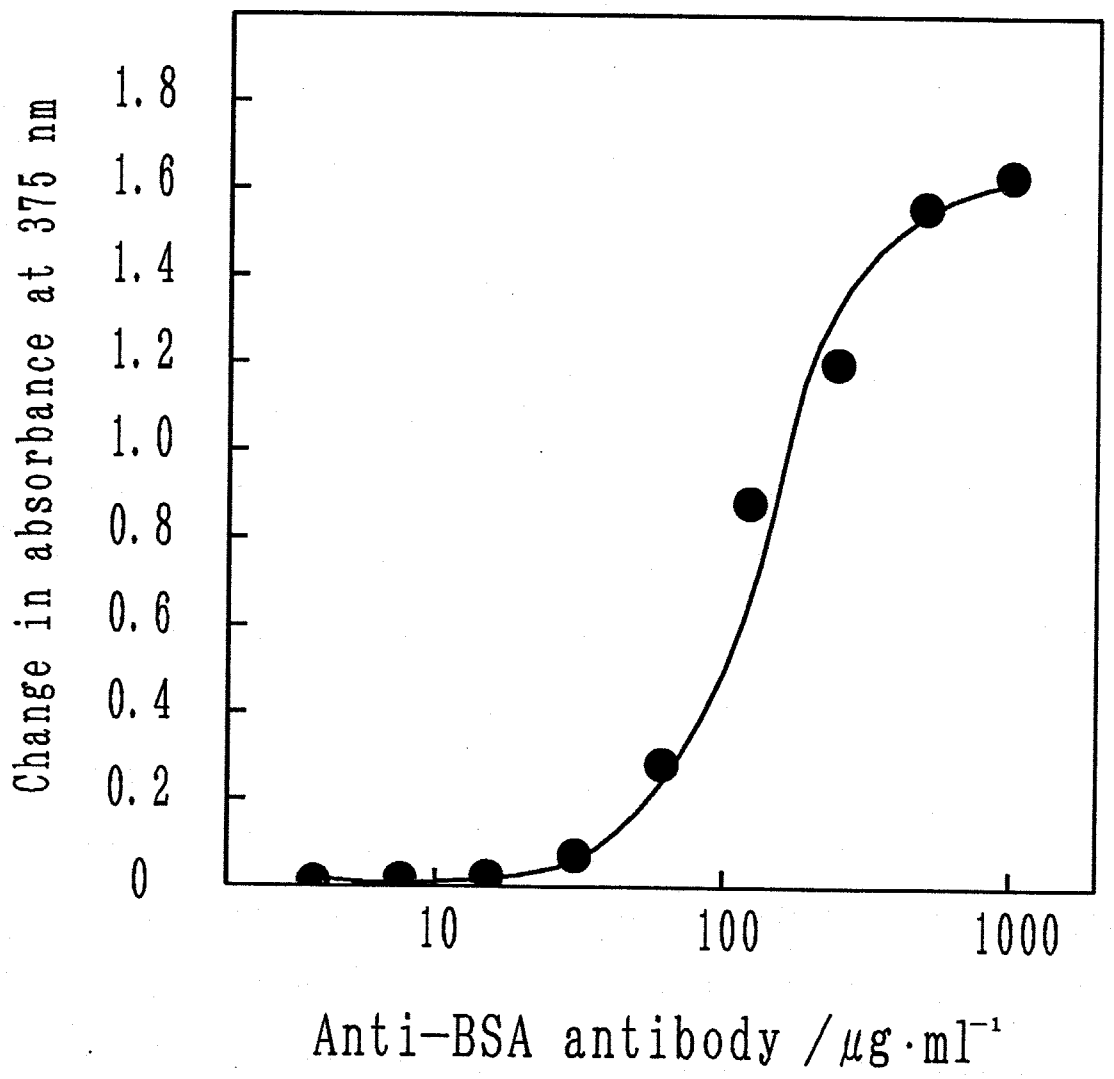


Fig. 3-4 Standard curve for anti-BSA antibody

測定に応用可能なことを示している。そこで次節においてサンドイッチ法によるＢＳＡの高感度測定を試みることにする。

３－３－４　メタピロカテカーゼ・プロテインＡ融合タンパク質によるＢＳＡの定量

３－３－４－１　第一抗体濃度の検討

固相免疫測定における最適条件を決定するために、第一抗体の濃度を変化させて実験を行った。ＢＳＡの濃度は１０μｇ／ｍｌとし、その他の手順は３－２－３の方法に従った。横軸に第一抗体の濃度、縦軸に吸光度（相対値）をとり、Ｆｉｇ．３－５に示した。第一抗体の濃度が１ｍｇ／ｍｌの時、酵素活性は顕著に増大した。そこで、以下の実験において第一抗体の濃度はすべて１ｍｇ／ｍｌで固相表面に吸着させた。

３－３－４－２　融合タンパク質の結合時間の検討

第二抗体と融合タンパク質の結合時間を検討した。一定時間反応後、融合タンパク質を含む溶液をウェルから除き、０.３ ｍＭのカテコール溶液を添加した。酵素反応は１０分後に停止し、３７５ｎｍにおける吸光度の変化を測定した。吸光度の変化を反応時間に対してプロットしたところ、Ｆｉｇ．３－６に示す結果を得た。この結果から融合タンパク質の結合は２時間の結合反応時間で顕著に増大することが分かった。

プロテインＡとＩｇＧの結合効率は、それぞれのタンパク質の濃度に依存すると考えられる。一般に免疫測定において測定対象物の濃度が低い場合、抗原抗体の反応（この場合プロテインＡと抗体の反応）にある程度の時間を要する。また一般に酵素増幅反応にも時間を要するが、この融合タンパク質を用いた場合、酵素による発色反応には１０分程度で十分であった。融合タンパク質中のメタピロ

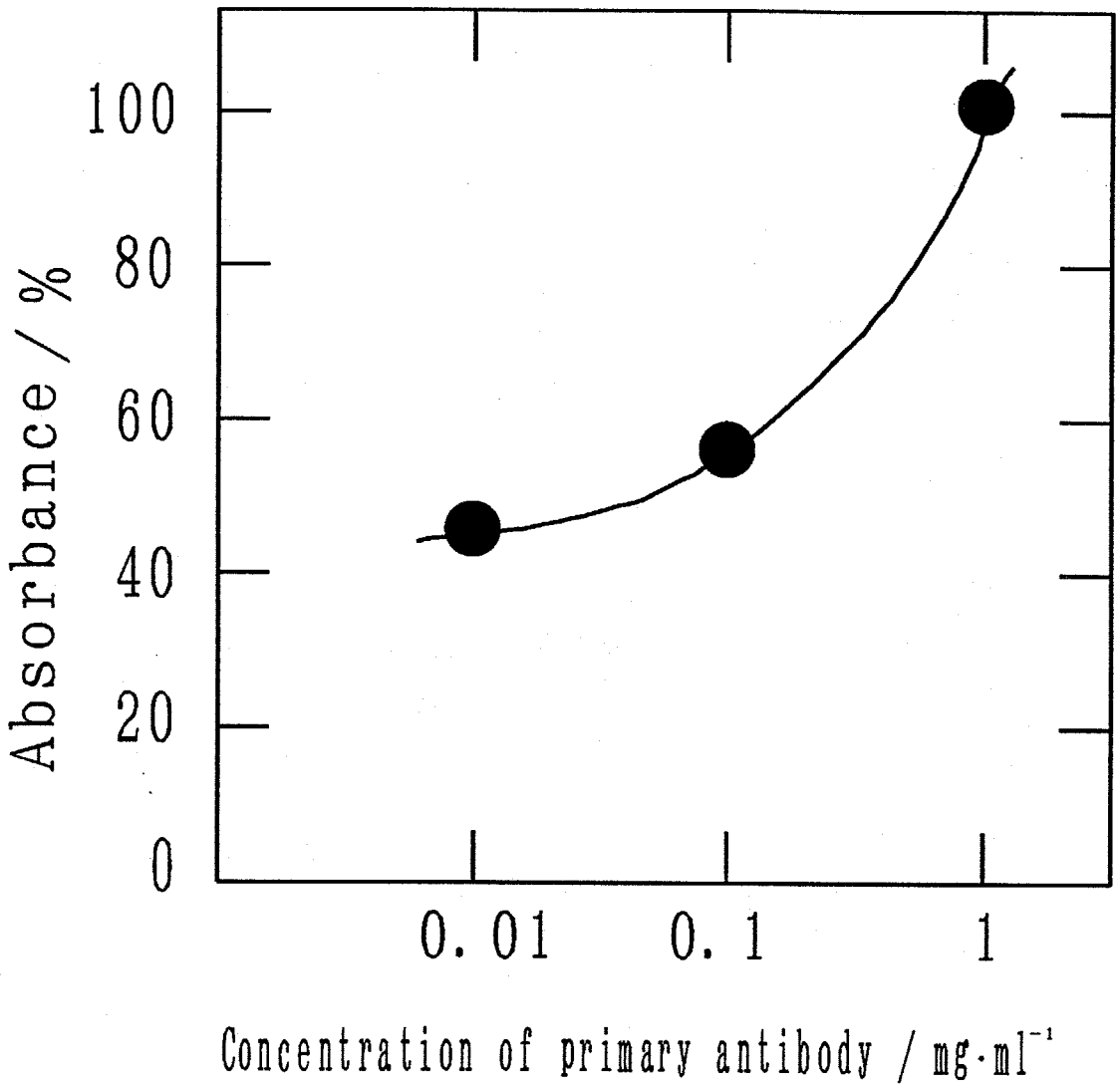


Fig. 3-5 Effect of the concentration of the primary anti-BSA antibody onlid-phase immunoassay

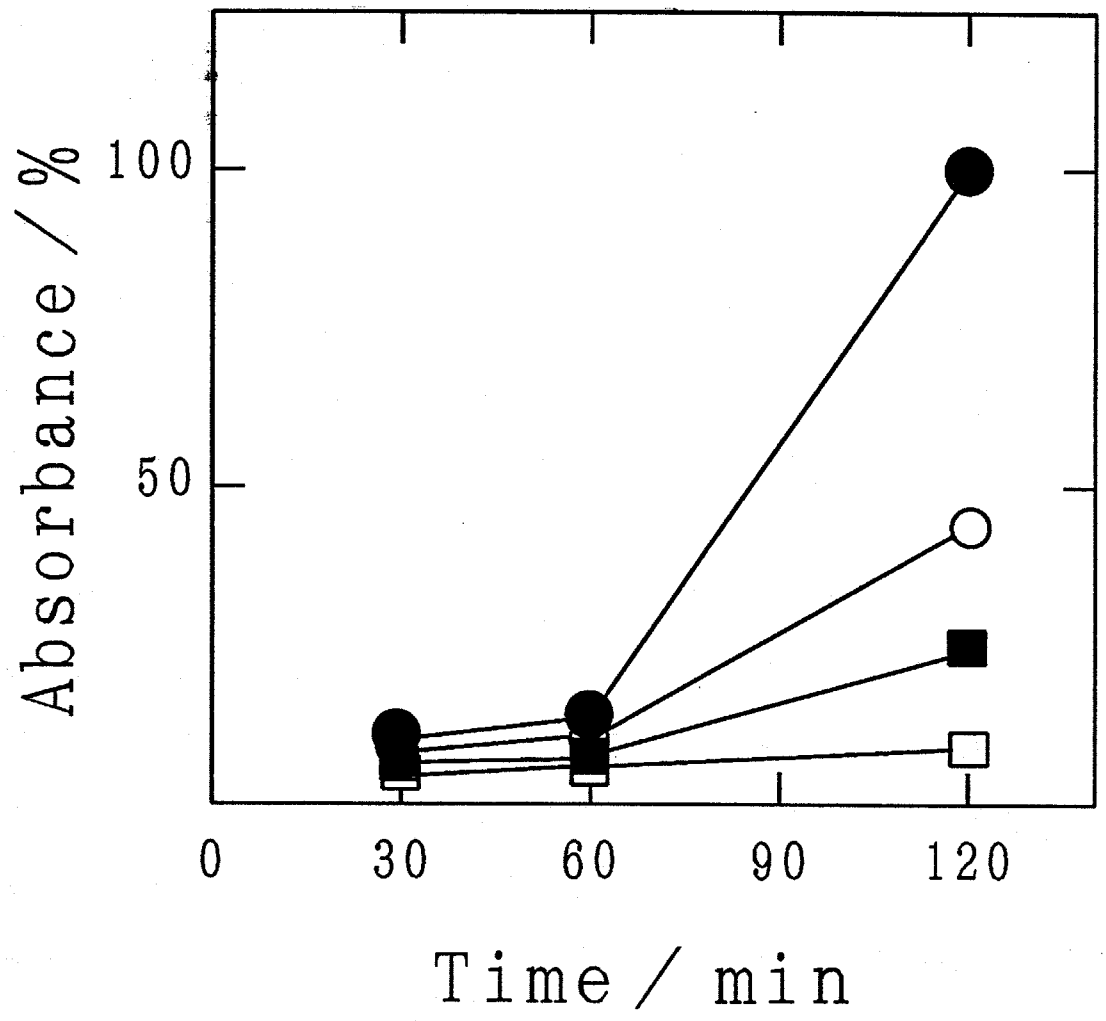


Fig. 3-6 Time dependence of the binding reaction between the secondary antibody and the fusion protein. BSA concentrations were: 0 (□), 10^{-4} (■), 10^{-2} (○), and 1 (●) mg/ml.

カテカーゼは、酵素免疫測定に用いられる代表的な酵素であるβ－ガラクトシダーゼやアルカリホスファターゼよりも小さいＫｍ（１.３ｘ１０$^{-5}$）を有しており効率よく短時間で反応を触媒するものと考えられる。

３－３－４－３　サンドイッチ固相免疫測定法によるＢＳＡの定量

上述の最適化した条件下（第一抗体濃度：１ｍｇ／ｍｌ，融合タンパク質との結合反応時間：２ｈ）で、モデル抗原としてＢＳＡの定量を行った。第一抗体として抗ＢＳＡ抗体を吸着させた固相上に、種々の濃度のＢＳＡを反応させた後、第二抗体として抗ＢＳＡ抗体を反応させた。これに、融合タンパク質を反応させ、第二抗体－プロテインＡの結合を介して固相に結合したメタピロカテカーゼの活性を測定した。このときの結合様式をＦｉｇ．３－７に模式的に示す。３７５ｎｍにおける吸光度をＢＳＡ濃度に対してプロットすると、Ｆｉｇ．３－８に示す結果が得られた。その結果、１０$^{-3}$から１０$^{-7}$ｇ／ｍｌの範囲でＢＳＡを測定することができた。

本実験においてはモデル抗原としてＢＳＡを選択したが、プロテインＡの特性を利用すれば抗原抗体系を適宜選択することにより、数多くの抗原の定量分析が行えることが期待できる。

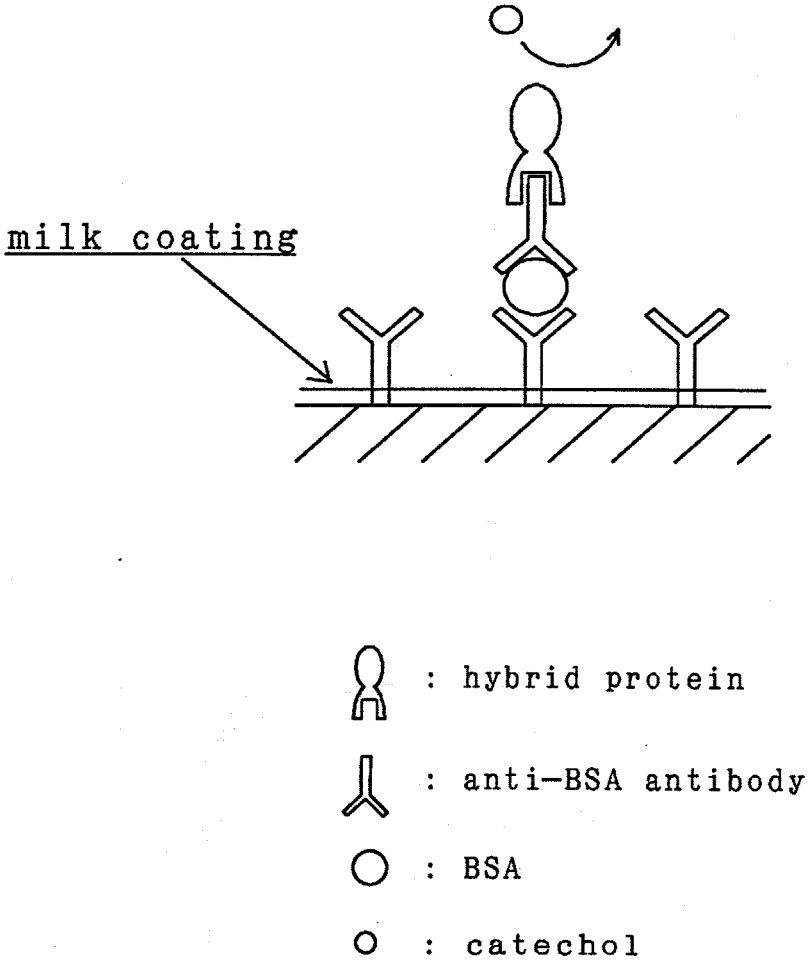


Fig. 3-7 Principle of solid-phase immunoassay

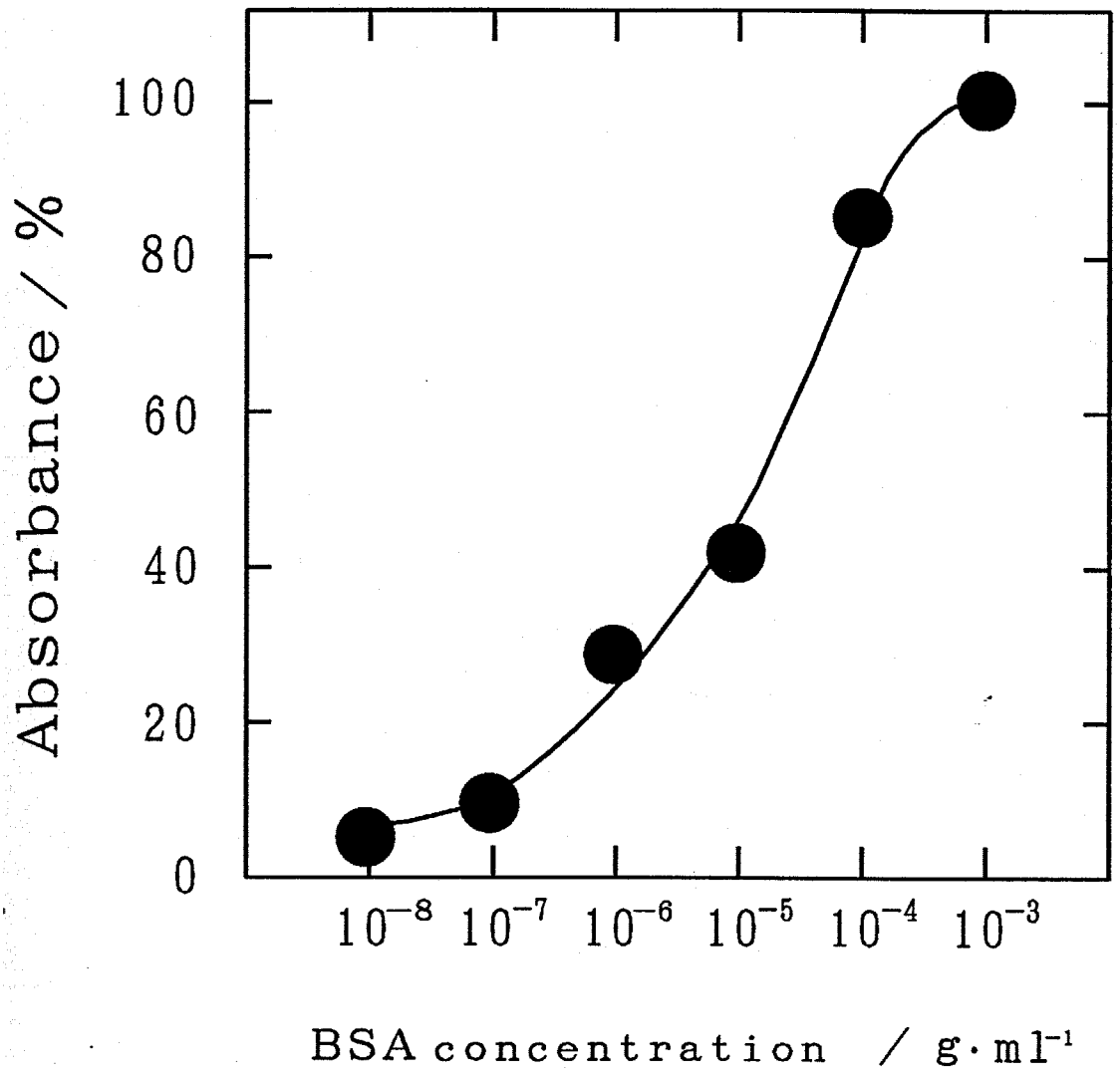


Fig. 3-8 Standard curve for BSA

３－４　結言

本章では、遺伝子工学の手法により作製したメタピロカテカーゼ・プロテインＡ融合タンパク質を酵素免疫測定に応用した。測定対象としては、抗ＢＳＡ抗体およびＢＳＡを選択し、それぞれの測定を行った。その結果、迅速かつ簡便に微量タンパク質を定量分析できることが明らかとなった。また、この融合タンパク質は固相表面への非特異吸着がほとんど認められず、測定の高感度化に有利であることが示された。以上の結果によって、遺伝子融合によるマーカー酵素と結合タンパク質の融合は、従来の化学的な結合に代わり得るものであることを明らかにすることができた。

遺伝子を操作することにより、より有用なタンパク質を創製しようという研究分野、いわゆるプロテインエンジニアリングはスタートしたばかりであり、実用化に向けての準備段階にあるともいえる。本研究で得られた成果は、遺伝子工学による非天然タンパク質生産の実用化の一例を示すものである。

参考文献

1) Engvall,E., Methods Enzymol., 70, 419 (1980)

2) Van Weemen, B.K. and Schuurs,A.H.W.M., FEBA Lett., 15, 232 (1971)

3) Feldman,G., Druet,P., Bignon,J., and Avrameas,S. (Eds.)
"Immunoenzymatic Techniques", North-Holland, Amsterdam (1976)

4) Ishikawa,E., J. Biochem., 73, 1319 (1973)

5) Ikariyama,Y., Furuki,M., and Aizawa,M., Anal. Chem., 57, 496 (1985)

6) Ishikawa,E., Kawai,T., and Miyai,K. (Eds.)
"Enzyme Immunoassay", Igaku-shoin, Tokyo (1987)

7) Kuplan,L.A. and Pesce,A.J. (Eds.),"Nonisotopic Alternatives to Radio
-immunoassay", Marcel Dekker, New York

8) Targan,S. and Jondal,M., J. Immunol. Methods., 22, 123 (1978)

9) Yolken,R.H. and Leister,F.J., ibid., 43, 209 (1981)

10) Dorval,G., Wigzell,H., and Leibold,W.,
J. Immunol. Methods, 9, 251 (1976)

11) Goding,J.W., ibid., 20, 241 (1978)

12) Kessler,S.W., J. Immunol., 117, 1482 (1976)

13) O'Keefe,E. and Bennett,V., J. Biol. Chem., 255, 561 (1980)

14) Hamaguchi,Y., Yoshitake,S., Ishikawa,E., Endo,Y., and Ohtaki,S.,
J. Biochem., 85, 1289 (1979)

15) Johonson,D.A., Gautsch,J.W., Sportsman,J.R., and Elder,J.H.,
Gene Anal. Tech., 1, 3 (1984)

第４章

固定化ｍＲＮＡを用いる
特定タンパク質の生産システム

第4章　固定化mRNAを用いる特定タンパク質の生産システム

4－1　緒言

遺伝子工学によるタンパク質の生産はすでに実用化の段階にあり、すでに工業化も相当進んでいる場合もある[1]。しかしながら、依然として未解決の問題点もかなり残されている。たとえば、生細胞は生命維持のため様々なタンパク質を生産しているので、組み替えたタンパク質だけを純粋に得ることが困難である。特に、医薬やワクチンなど人体内で使用するタンパク質を遺伝子工学で生産する場合、極微量の宿主由来の不純物が問題となるようにきわめて高純度のタンパク質が要求される。特定のタンパク質のみを生産するためには、遺伝情報最小の担い手である特定のmRNAのみを発現させる必要があろう。また、細胞内で発現した外来タンパク質はプロテアーゼにより分解されることもある。糖鎖修飾などの翻訳後プロセッシングの問題が不十分なために、期待したほどの生理活性を有しないことも最近では問題になっている。以上の問題を克服するために動物細胞による遺伝子組み替えも研究されている[2][3][4]が、細胞の大量培養が困難であり目的とする物質の生産には必ずしも向かない。そこで、これらの問題を克服するためには、生体外でタンパク質を合成するのに必要な成分のみを用いた新しいタンパク質産生システムを構築する必要がある。

ところで、近年生体物質の固定化の技術が急速に進展し、酵素[5][6]、微生物[7]などの生物活性物質をその活性を保持したまま担体に固定化し、その結果安定にしかも連続的に使用することが可能となってきた。これらの技術は、生体物質を固定化した計測や物質生産という見地からも非常に有効な方法であり、既にバイ

オセンサー[8]やバイオリアクター[9]の要素技術として活用されている。この方法をタンパク質合成に展開すると、タンパク質合成系あるいはｍＲＮＡを担体上に固定化することにより、目的とするタンパク質を連続的に合成することが可能であると考えられる。すなわち、タンパク質合成系、あるいはｍＲＮＡを含む系に原料となるアミノ酸とエネルギー源としてＡＴＰ，ＧＴＰを連続的に供給すれば、遺伝情報にしたがった特定タンパク質の連続生産ができる可能性がある。このようなアプローチは既にＩｋａｒｉｙａｍａら[10]やＢｒｅｓｓｅｒら[11]が試みた。前者ではカイコ絹糸腺から取り出したフィブロインｍＲＮＡを固定化し、カイコ絹糸腺の可溶性画分、アミノ酸、そしてエネルギー源を加えてフィブロインが生成されるとしている。一方、後者ではニトロセルロースに固定化したグロビンｍＲＮＡを赤血球の可溶性画分で発現させ、グロビンが生成することを述べている。しかしながら、両者の系とも定量性に問題があるのみならず核酸および可溶性画分を同一組織から得ているために汎用性のある特定タンパク質の産生システムの構築は困難であると考えられる。

そこで本研究では、より汎用性のある特定タンパク質生産システムの構築を目的とした。即ち、情報源であるｍＲＮＡを安定かつ連続的に使用できるように、担体に固定化した系でのタンパク質生産を試みる。タンパク質合成系としては、真核細胞であり大量供給が可能な酵母細胞を選択し、ｍＲＮＡ固定系への連続投与によりタンパク質の連続生産が可能であることを示す。このアプローチをＦｉｇ．４－１に示す。まずｍＲＮＡのモデルとして、ｐｏｌｙ（Ｕ）をハイブリダイゼーションによりセルロース担体に固定化した。これと酵母細胞より抽出したタンパク質合成系とを組み合わせることにより、ｐｏｌｙ（Ｕ）の遺伝情報が翻訳されてポリフェニルアラニンが生成されることを示す。ついで、同様の系で生細胞のｍＲＮＡにおいても翻訳反応が起こることを示すために、酵母ｍＲＮＡを３’側のポリアデニル酸を利用することによりセルロース担体に水素結合により

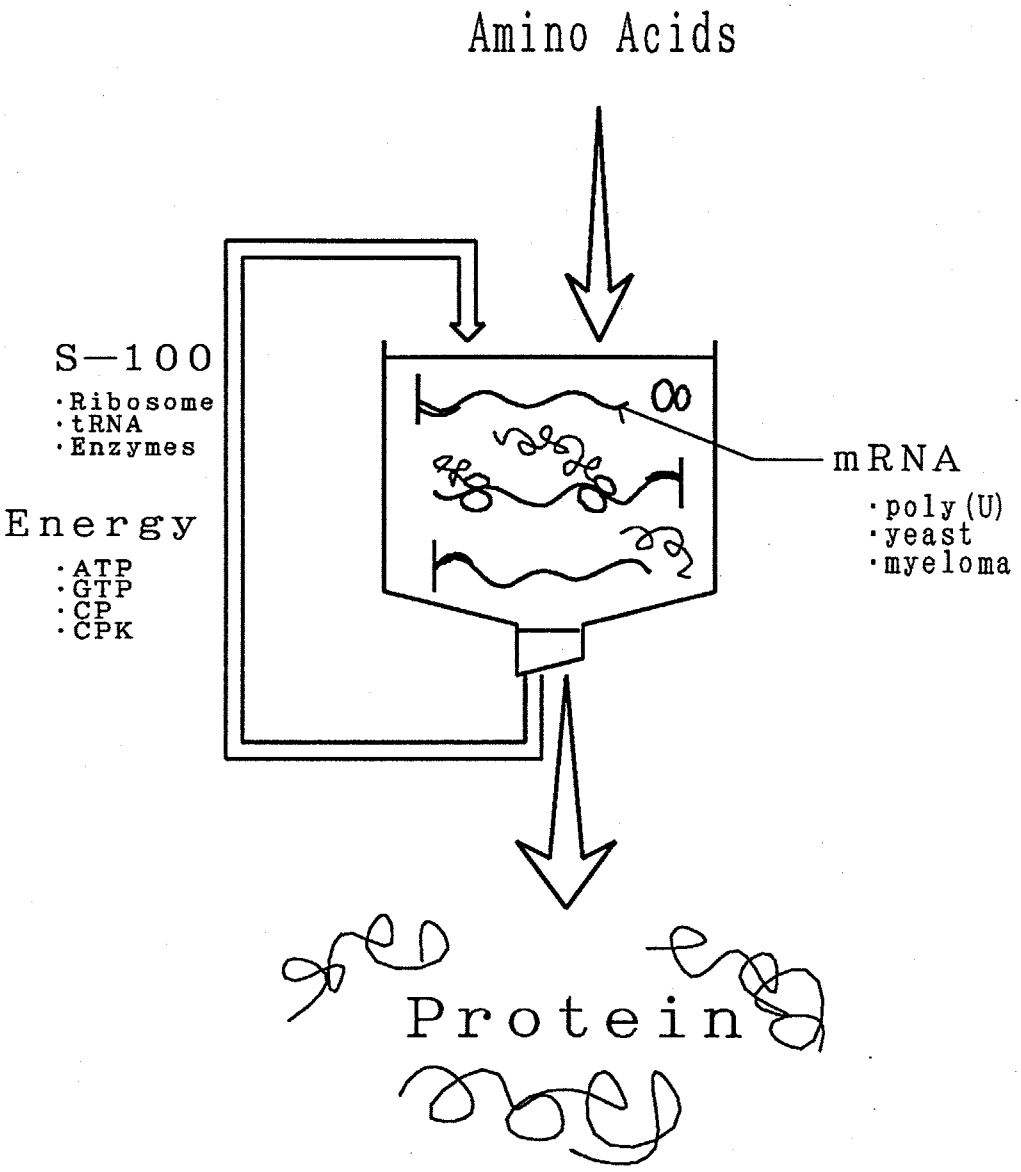


Fig. 4—1　mRNA固定化系によるタンパク質合成

固定化し、酵母より抽出した無細胞系を用いてｍＲＮＡの翻訳反応が起こることを示す。さらに、マウスミエローマ細胞より抽出したｍＲＮＡを酵母ｍＲＮＡの場合と同様の方法で固定化し、異種生物由来の成分の組み合わせでの翻訳反応を試みる。これらの試みにより汎用性の広い翻訳系であることが示されれば、特定のｍＲＮＡを固定化してそれに対応するタンパク質を連続的に生産できる可能性を示すことができる。

４－２　実験方法

４－２－１　試薬及び測定機器

ｐｏｌｙ（Ｕ）は生化学工業社より、ｏｌｉｇｏ（ｄＴ）およびｏｌｉｇｏ（ｄＡ）セルロースはファルマシアより購入した。酵母ｍＲＮＡおよびマウスミエローマｍＲＮＡはそれぞれSaccharomyces cerevisiaeおよびマウスミエローマ細胞より抽出した。^{3}Ｈ標識フェニルアラニンはＮＥＮ社より購入した。ニトロセルロース膜はアドバンテック東洋社より，ウルトラフリーＣ３－ＧＶは日本ミリポア社より購入した。その他の試薬はＳｉｇｍａ社および関東化学社より購入した。超遠心機は日立工機社製ＳＣＰ－７０Ｈ、ローターはＳＲＰ－７０ＡＴを使用した。液体シンチレーションカウンターはＡｌｏｋａ社ＬＳＣ－７０００を使用した。

４－２－２　酵母無細胞系の調製[12)13)]

酵母（Saccharomyces cerevisiae）を１.０ ｌのＹＥＰＤ培地で１０時間培養（対数増殖期）後、遠心（３,０００ ｘ ｇ，５ｍｉｎ）により集菌して４ｇの湿菌体を得た。滅菌水で洗浄後、１ Ｍソルビトール溶液３０ｍｌに懸濁し、緩やかに振蕩しながら２０℃で１時間インキュベーションした後、遠心（２,０００ ｘ ｇ，５ｍｉｎ）により集菌した。ついで硫酸マグネシウム（０.４Ｍ）を含むＹＭ５溶液に再懸濁し、緩やかに振蕩しながら２０℃で１.５時間インキュベーション後、遠心（２,０００ ｘ ｇ，５ｍｉｎ）し緩衝液Ａに懸濁した。これに滅菌済みのガラスビーズ１５ｇを加え、氷上で冷やしながら３０秒間、６回ボルテックスミキサーにより激しく振蕩して細胞を破砕した。３０,０００ ｘ ｇ、１０分間超遠心後、上清をさらに１００,０００ ｘ ｇ、３０分間の超遠心分離を行なった。得られた上清を緩衝液Ｂで平衡化したＳｅｐｈａｄｅｘ Ｇ－２５カラムで低分子

物質を除去した後、－８０℃で保存した。

なお，ここで用いた溶液の組成はＴａｂｌｅ４－１にまとめて示した。

４－２－３　ｍＲＮＡの調製[14]

酵母およびマウスミエローマ細胞のｍＲＮＡはそれぞれ次のようにして抽出した。

４－２－３－１　酵母ＲＮＡの抽出

酵母を８００ｍｌのＹＥＰＤ培地で１０時間培養し，１.７ｇの湿菌体を得た。滅菌水で２回洗浄後，７ｍｌの緩衝液（１０ ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７.４，１０ ｍＭ ＮａＣｌ，１００ ｍＭ ＬｉＣｌ，１ ｍＭ ＥＤＴＡ，０.５％ＳＤＳ）に懸濁した。ここに滅菌済みガラスビーズ（直径０.４ － ０.５ｍｍ）２０ｇとＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ９）で飽和したフェノール４ｍｌ，クロロホルム・イソアミルアルコール（２４：１）４ｍｌを添加し，激しく攪拌した。遠心後得られた水相をエタノール沈澱したのちＴＥ緩衝液（１０ ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７.５，１ ｍＭ ＥＤＴＡ）に溶解した。

４－２－３－２　マウスミエローマ細胞ＲＮＡの抽出

マウスミエローマ細胞ＭＯＰＣ－３１Ｃは大日本製薬社より購入した。９００ｍｌのＬ－１５培地で培養して９００ｍｇの湿細胞を得た。これを０.２５ Ｍのショ糖を含む３ｍｌのＡ緩衝液（２０ ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７.６，０.１ Ｍ ＫＣｌ，５ ｍＭ $MgCl_2$、６ ｍＭ ２－メルカプトエタノール）に懸濁し、テフロン－ガラスホモジナイザーで細胞を破砕したのち遠心（10,000 x g,10min）により細胞断片を分離した。上清にTriton X-100を添加して１ Ｍのショ糖を含むＡ緩衝液４ｍｌに上層し、さらにＡ緩衝液を上層して遠心（260,000 x g）によりポリソームの沈澱を得た。これを１.５ｍｌのＡ緩衝液に懸濁しＢ緩衝液（２０ ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７.４，４０ ｍＭ ＥＤＴＡ，１％ＳＤＳ）

Table 4—1
Component of buffer/media
used to prepare yeast lysate

Buffer/ media	components
YEPD	2% glucose 2% bactopeptone 1% yeast extract
YM5	2 % glucose 0.2% bactopeptone 0.1% yeast extract 1 % succinic acid 0.6% NaOH 0.67% yeast nitrogen base with amino acid
BufferA	20mM Hepes-KOH (pH7. 4) 100mM KOAc 2mM $Mg(OAc)_2$ 2mM dithothreitol 0.5 mM PMSF
BufferB	as for A except made 20%v/v glycerol

を添加して、１００℃で２分間加熱後３０℃に急冷し、終濃度０.５ｍｇ／ｍｌのプロテイナーゼＫを添加した。これをフェノール抽出、エタノール沈澱してＲＮＡを得た。

４－２－４　無細胞系によるｐｏｌｙ（Ｕ）の翻訳

無細胞系によるｐｏｌｙ（Ｕ）およびｍＲＮＡの翻訳はＴａｂｌｅ ４－２に示す組成で行なった。酵母より抽出した無細胞系に、エネルギー源としてＡＴＰ、ＧＴＰ、そしてエネルギー再生系としてクレアチンリン酸、クレアチンホスホキナーゼ、適当な塩を混合した。[^{3}Ｈ]Ｐｈｅを加え、総量５０μｌとし２０℃で反応を行なった。

４－２－５　[^{3}Ｈ]Ｐｈｅの取り込み測定

ポリフェニルアラニンおよびタンパク質の合成は以下のように２つの方法を用いて測定した。

１）リボソーム結合測定：反応液をサンプリングしニトロセルロース膜上に滴下して、緩衝液（２９ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，５ｍＭ Ｍｇ（$CH_3COO)_2$，１００ｍＭ NH_4Cl）で4回洗浄し乾燥させた後、液体シンチレーターによりニトロセルロースに結合した放射活性を測定した。リボソームはニトロセルロースに結合する性質があるため、この方法で合成量を測定できる。

２）酸不溶性物質の放射活性測定[15]：反応液をサンプリングしロ紙（Toyo No.5B）上に滴下して０.２Ｎ ＨＣｌに浸漬（１５分，３回）した後、エタノール・エーテル（１：１）混合溶液に１５分間浸漬した。よく乾燥させたのち液体シンチレーターを用いて酸不溶性画分の放射能活性を測定した。

Table 4-2

Final component of incubation medium

Component	Concentration
S-100	
Hepes-KOH (pH7.4)	25 mM
KOAc	150 mM
$Mg(OAc)_2$	3.0 mM
ATP	0.5 mM
GTP	0.1 mM
Creatine Phoshate	25 mM
Creatine Phospho Kinase	80$\mu g ml^{-1}$
Glycerol	6%
Dithiothreitol	2.1mM
$[^3H]$Phe	1.23×10^6 Bq·ml^{-1}
Amino Acids	50μM

４－２－６　ｐｏｌｙ（Ｕ）およびｍＲＮＡの固定化

ｏｌｉｇｏ（ｄＴ）セルロース，ｏｌｉｇｏ（ｄＡ）セルロースをＴＥ緩衝液（１０ｍＭ Ｔｒｉｓ・ＨＣｌ；ｐＨ７.５、１ｍＭ ＥＤＴＡ）で平衡化した後、０.５Ｍ ＮａＣｌを含むＴＥに溶解したｐｏｌｙ（Ｕ）およびｍＲＮＡを添加して室温で１時間静置してハイブリダイゼーションによって吸着させた。０.５Ｍ ＮａＣｌを含むＴＥ緩衝液で洗浄後、これらをｐｏｌｙ（Ｕ）およびｍＲＮＡ固定化担体として用いた。

４－２－７　ｐｏｌｙ（Ｕ）およびｍＲＮＡ固定化系での翻訳

ＴＥに懸濁したｐｏｌｙ（Ｕ）およびｍＲＮＡ固定化セルロースをウルトラフリーに充填し遠心により水分を除去した後、上述の組成のタンパク質合成溶液を添加した。タンパク質合成反応は、ミキサーで振蕩して反応を促進した。

反応後、遠心により溶液と担体を分離して、担体はＴＥ緩衝液ついで８０％アセトンで洗浄後乾燥させた。溶液、担体それぞれの放射活性を液体シンチレーションカウンターにより測定した。

ここで用いたウルトラフリーＣ３－ＧＶは、遠心タイプの除粒子フィルター（ポアサイズ０.２２μｍ）で、遠心により担体と溶液を分離することができる。

４－３　実験結果および考察

４－３－１　遊離状態のｐｏｌｙ（Ｕ）系での翻訳

酵母より抽出した無細胞系を用いて、モデルｍＲＮＡとしてｐｏｌｙ（Ｕ）の翻訳を行い、翻訳の最適条件を求めた。。

４－３－１－１　ｐｏｌｙ（Ｕ）翻訳におけるＭｇ$^{2+}$濃度の影響

翻訳効率の最適化をはかるためにタンパク質合成系に添加するＭｇ$^{2+}$濃度を変化させ、Ｍｇ$^{2+}$濃度がｐｏｌｙ（Ｕ）の翻訳に及ぼす影響を調べた。その結果を、Ｆｉｇ．４－２に示す。通常のｍＲＮＡ翻訳過程においては３ ｍＭ程度のＭｇ$^{2+}$濃度が最適とされているが、この濃度でｐｏｌｙ（Ｕ）の翻訳はほとんど起こらなかった。図に示すように、Ｍｇ$^{2+}$濃度の増加とともに［^{3}Ｈ］Ｐｈｅの取り込みの増大が観測された。この理由として、Ｍｇイオンが高濃度に存在すると翻訳が開始コドンに依存しないで開始され、従って開始コドンを持たないｐｏｌｙ（Ｕ）も効率よく翻訳されるためと考えられる。そこで、以下のｐｏｌｙ（Ｕ）翻訳の実験はすべて１２ｍＭのＭｇ$^{2+}$濃度で行った。

４－３－１－２　酵母無細胞系でのｐｏｌｙ（Ｕ）濃度依存性

無細胞タンパク質合成系に添加するｐｏｌｙ（Ｕ）の濃度を変化させ、２０℃で１時間反応させた後反応液をニトロセルロース膜上に滴下した。膜は緩衝液で洗浄した後乾燥し、吸着成分の放射活性を測定した。リボソームを介してニトロセルロース上に保持された［^{3}Ｈ］Ｐｈｅ量をｐｏｌｙ（Ｕ）濃度に対してプロットし、その結果をＦｉｇ．４－３に示す。この図から、添加したｐｏｌｙ（Ｕ）濃度に比例してポリフェニルアラニン生成量が増加していくことが分かる。しかし、１５０μｇ／ｍｌの濃度で生成量は飽和し、それ以上のｐｏｌｙ（Ｕ）濃度においては顕著な変化は認められなかった。

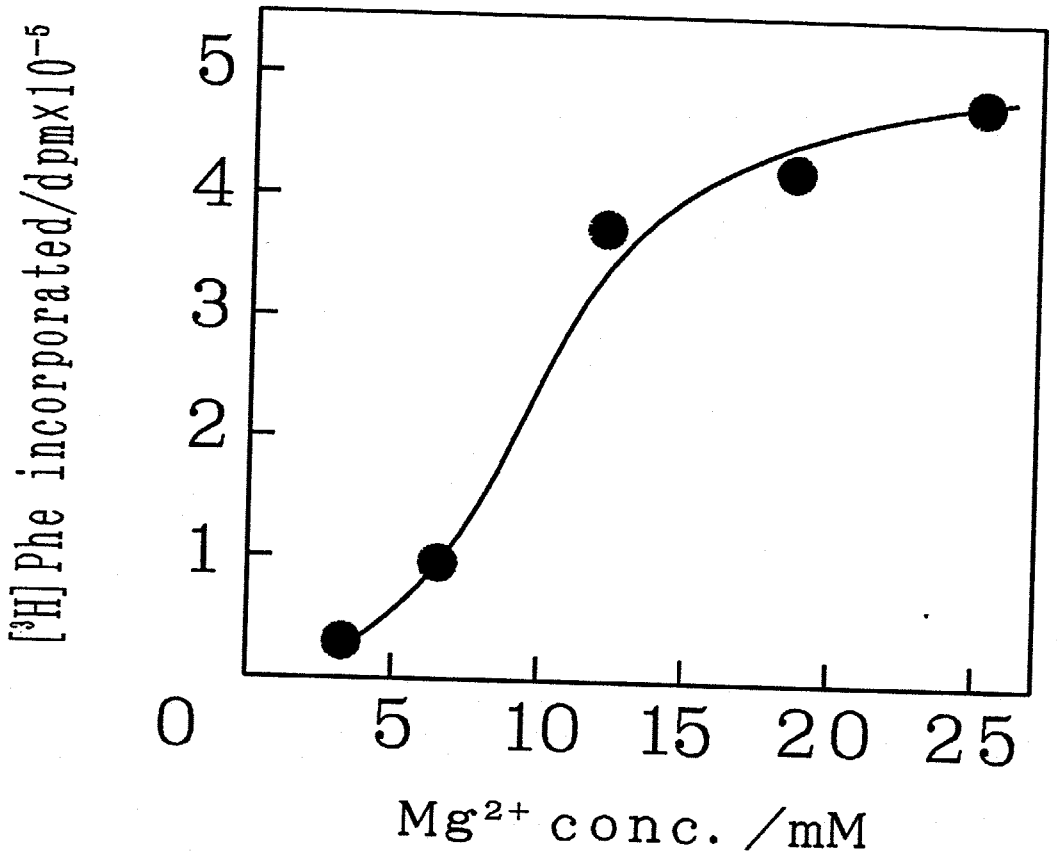


Fig. 4-2 Effect of Mg^{2+} concentration on translation of poly(U)

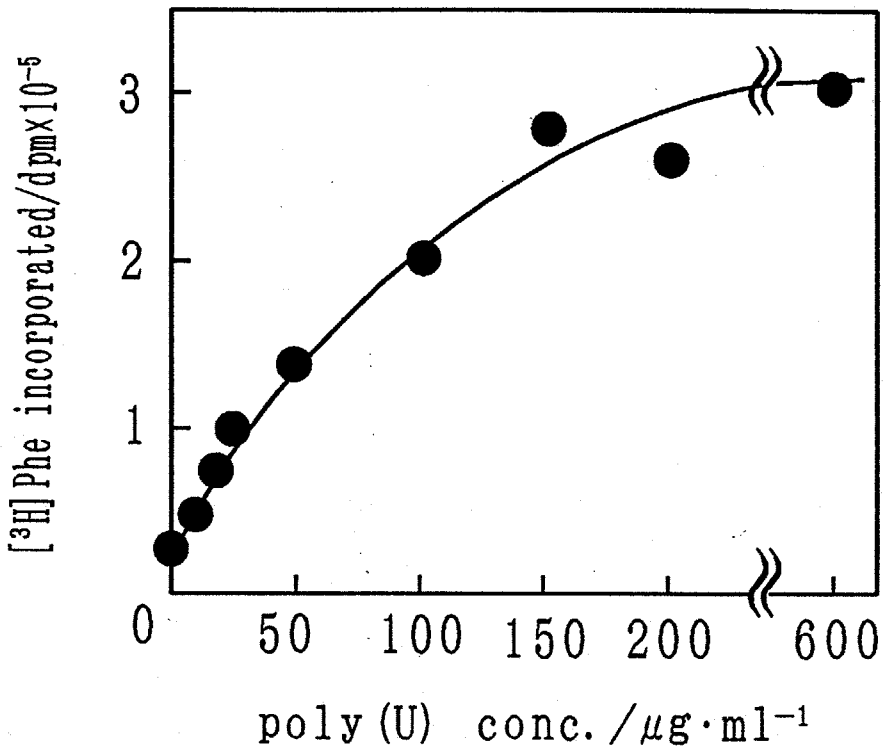


Fig. 4–3 Dependency of poly(U) concentration on incorporation of [³H]Phe.

4－3－1－3　ポリフェニルアラニン生成の時間依存性

[^{3}H]Ｐｈｅ取り込みの経時変化を測定した。無細胞タンパク質合成系にｐｏｌｙ（Ｕ）を終濃度２００μｇ／ｍｌの濃度で添加して、適当な反応時間後にサンプリングした反応液をニトロセルロース膜上に滴下し、保持される放射活性を測定した。その結果をｐｏｌｙ（Ｕ）無添加の系と比較してＦｉｇ．４－４に示す。合成反応開始後、ほぼ反応時間に比例して取り込みの増加がみられ、３、４時間経過するとそれ以上の取り込みは認められなかった。一方、ｐｏｌｙ（Ｕ）無添加の系においても取り込みは若干増加したが、これは酵母無細胞系に内在するｍＲＮＡに起因するものと考えられる。

4－3－2　ｐｏｌｙ（Ｕ）固定化系での酵母無細胞系を用いるペプチドの生成

4－3－2－1　放射性アミノ酸の取り込みと生成物の状態

ｐｏｌｙ（Ｕ）を固定化したｏｌｉｇｏ（ｄＡ）セルロースを酵母無細胞翻訳系と共にインキュベートし、３時間反応させたのち遠心により担体と溶液を分離した。それぞれの画分の放射活性を液体シンチレーターで測定した。この結果を、ｐｏｌｙ（Ｕ）無添加系と比較してＴａｂｌｅ４－３に示す。ｐｏｌｙ（Ｕ）を固定化した担体には、していないものに比べて３０倍以上の放射活性が認められた。一方、溶液中においてもｐｏｌｙ（Ｕ）を固定化した系としていない系では明らかな差異が認められた。このことからｍＲＮＡが固定化された状態においても無細胞系による翻訳反応が進行することが示された。この系で合成されたポリフェニルアラニンは、情報源であるｐｏｌｙ（Ｕ）が終止コドンを持たないためにｍＲＮＡとリボソーム、そして合成されたタンパク質とを解離させる解離因子

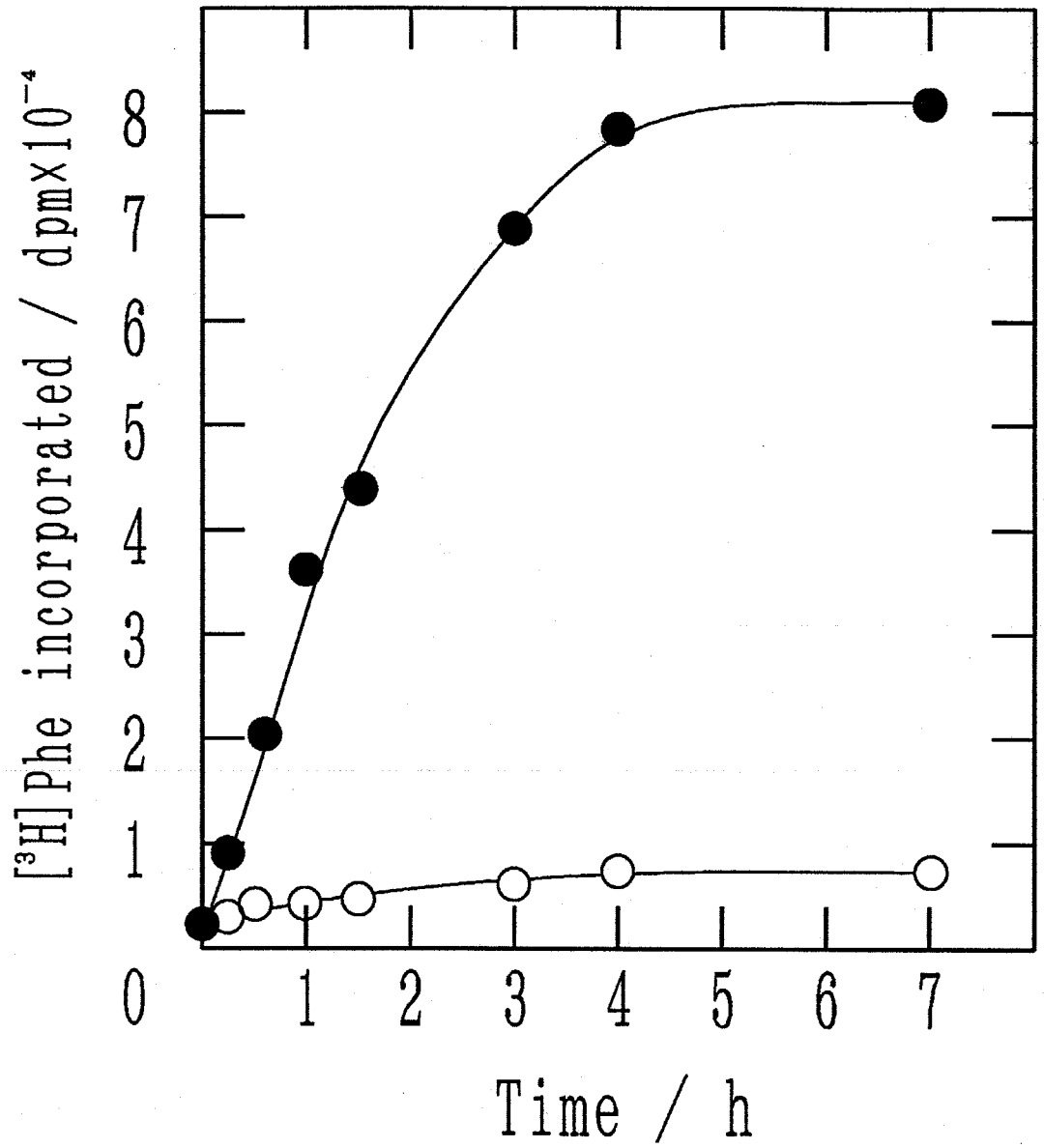


Fig. 4-4 Time course of translation with poly(U) (-●-) and without poly(U) (-○-)

Table 4—3
Translation of immobilized poly(U)

	[^{3}H]Phe incorporated/dpm×10^{-3}	
	poly(U)−	poly(U)+
matrix	1.3	40.4
solution	45.2	182.0

が効率よく作用しないものと考えられる。したがって合成されたポリフェニルアラニンの一部が、ｏｌｉｇｏ（ｄＡ）に固定化されたｐｏｌｙ（Ｕ）－リボソームを介して担体上に保持されたものと推測される。

４－３－２－２　酵母無細胞系における固定化ｐｏｌｙ（Ｕ）の濃度とタンパク質合成量との関係

無細胞合成反応液の量は一定（６０μｌ）とし、ｐｏｌｙ（Ｕ）固定化担体の量を変化させて翻訳効率のｐｏｌｙ（Ｕ）濃度に対する依存性を調べた。担体に保持される放射活性を担体量に対してプロットし、Ｆｉｇ．４－５に示す。１００μｌまでは担体の量に依存して、[^{3}Ｈ]Ｐｈｅの取り込み量は増加するが、２００μｌにおいて若干の減少が観測された。これは、固体量が多くなりすぎると反応の効率が低下するためと推測される。

４－３－２－３　ポリフェニルアラニンの固定化ｐｏｌｙ（Ｕ）依存性合成の経時変化

適当な時間反応したのち、遠心により担体と分離した溶液中の酸不溶性画分に認められる放射活性を測定した。Ｆｉｇ．４－６に示すようにｐｏｌｙ（Ｕ）が固定化された系においては、３時間まで反応時間の経過にともないポリフェニルアラニンの合成が認められた。しかし，ｐｏｌｙ（Ｕ）が固定化されていない系では３０分程度で定常値に達し，それ以降フェニルアラニンの取り込みは観測されなかった。

４－３－２－４　固定化ｐｏｌｙ（Ｕ）を用いたポリフェニルアラニンの連続合成

上述の系で２時間反応するごとに遠心分離し，溶液に[^{3}Ｈ]Ｐｈｅを添加し、酸不溶画分の放射活性を測定した。その結果をＦｉｇ．４－７に示す。[^{3}Ｈ]Ｐｈｅを無添加の系は酸不溶性画分の放射活性は、６時間反応後も２時間反応時と同一のレベルを保持しており、合成反応がこれ以上進行していないことを表して

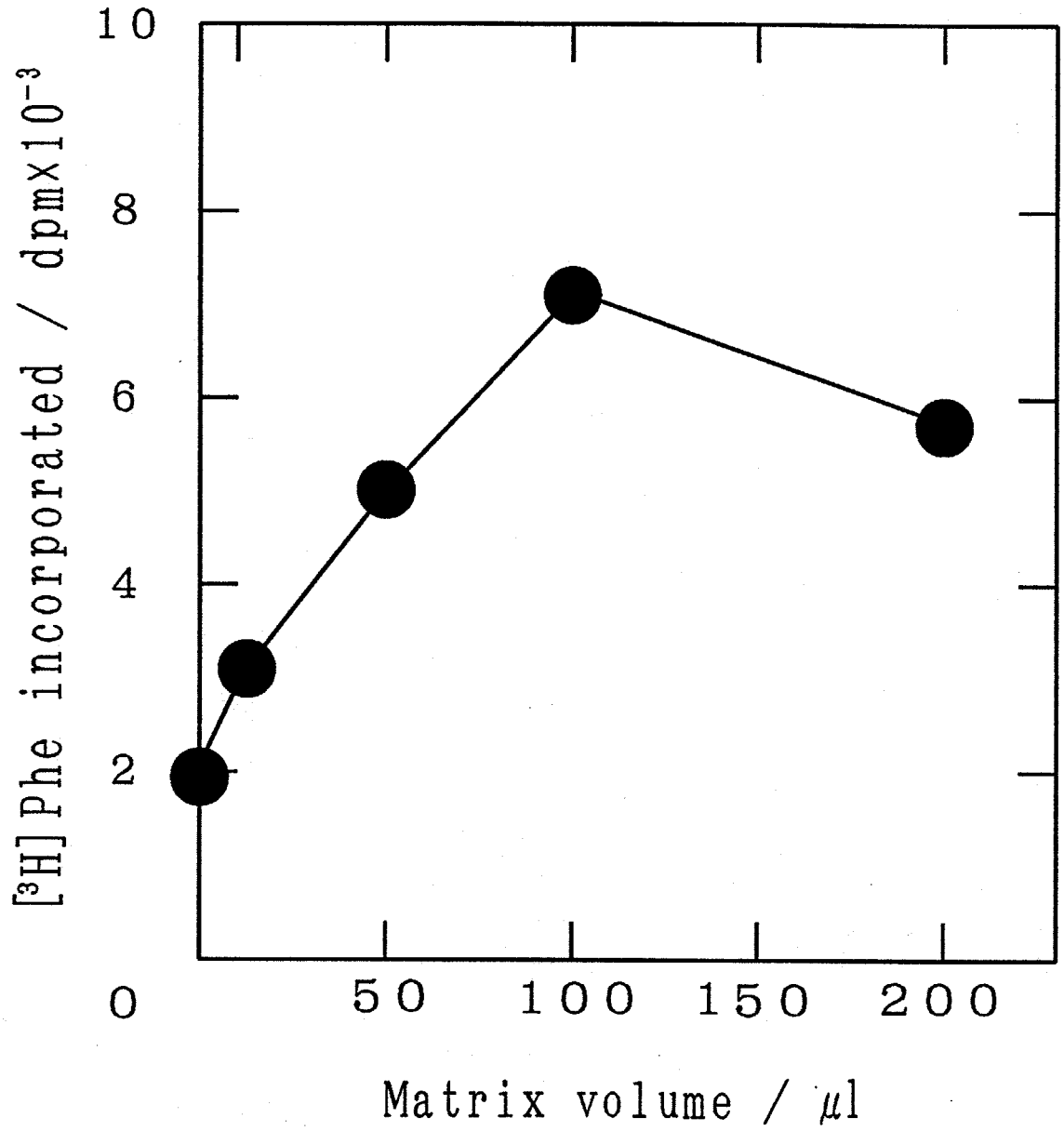
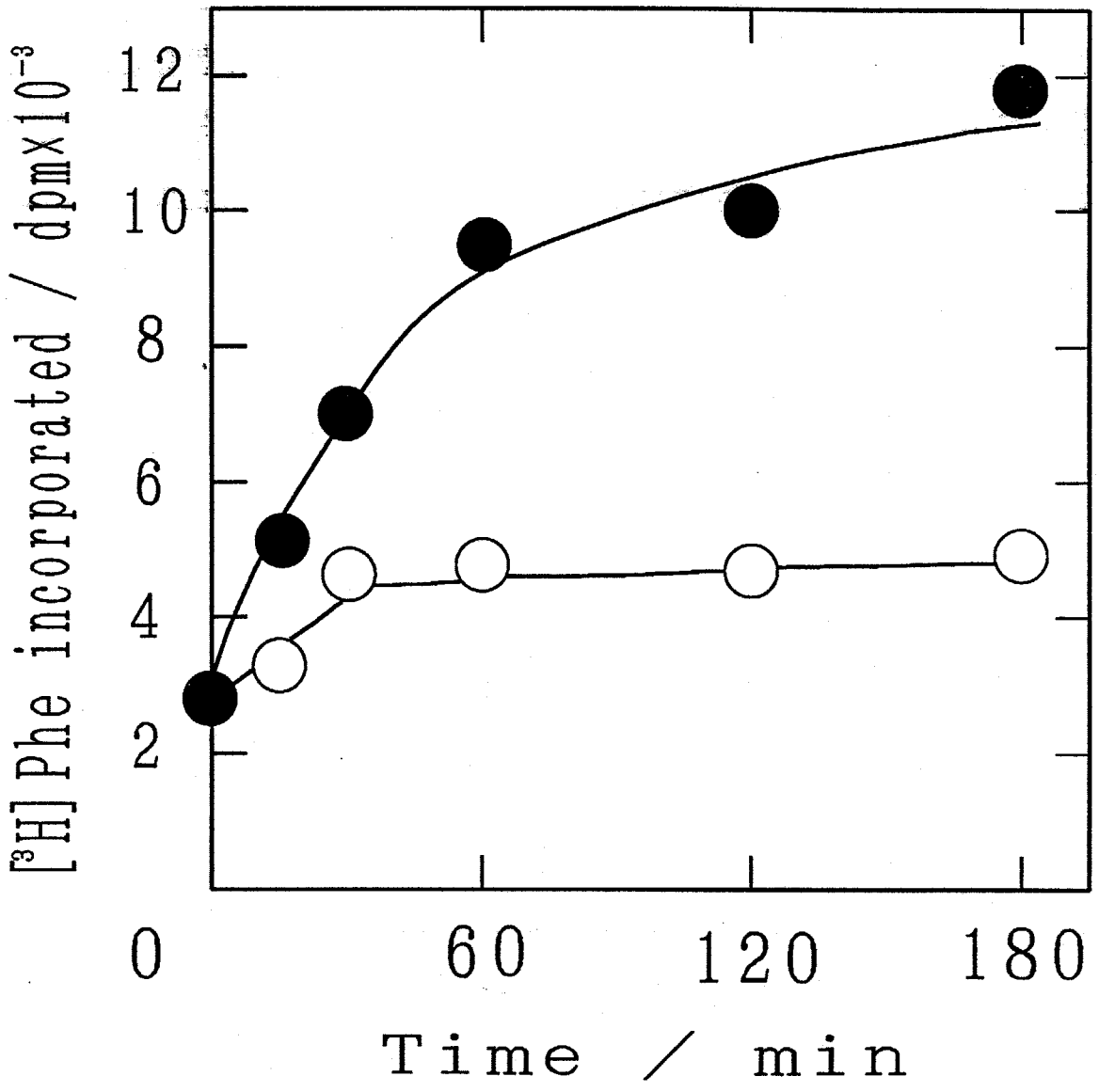


Fig. 4-5 Effect of poly(U) immobilized matrix volume on poly(U) translation.



ig. 4-6 Time course of poly(U) translation
n the poly(U) immobilized system with
oly(U) (-●-) and without poly(U) (-○-)

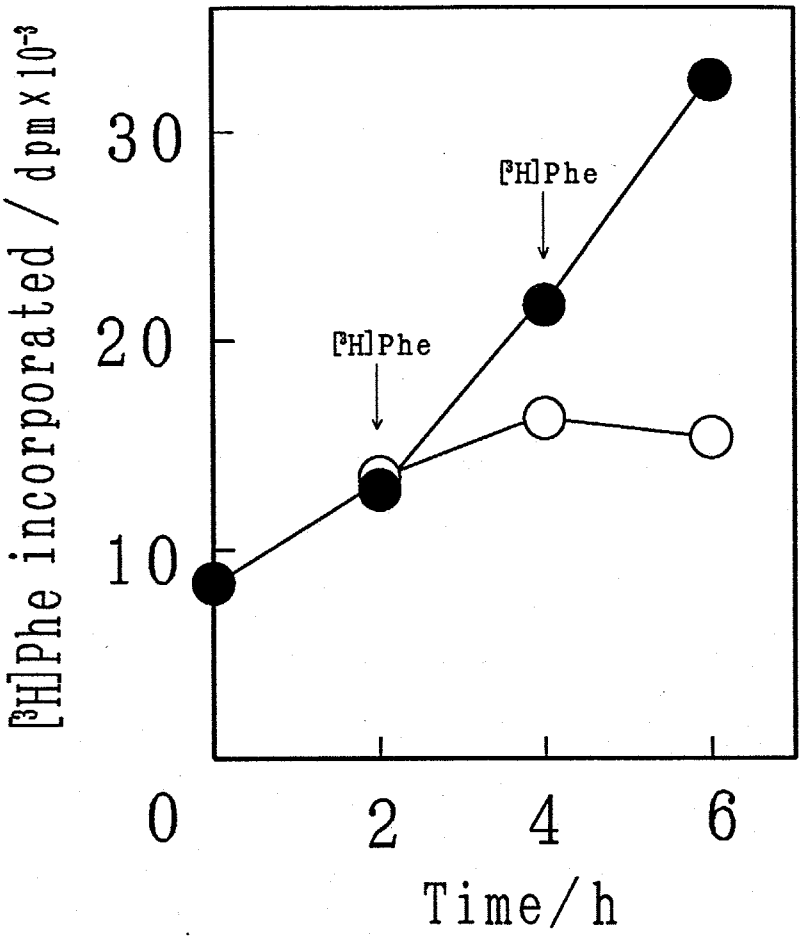


Fig. 4-7 Effect of [³H] Phe addition on translation of poly(U) in the poly(U) immobilized system.

—●— : [³H] Phe+

—○— : [³H] Phe−

いる。これに対し、[^{3}H]Pheを経時的に添加した系においては、放射活性の顕著な上昇が認められ、アミノ酸の添加によりポリフェニルアラニンの合成反応が持続することを示している。この結果から、タンパク質合成の原料となるアミノ酸を連続的に供給することにより、タンパク質が連続的に生産できる可能性が示唆された。

4－3－3　固定化mRNAと酵母無細胞系を用いるタンパク質の合成

4－3－3－1　酵母mRNAの翻訳

酵母の無細胞系によりmRNAが翻訳されてタンパク質が合成されることを確かめるため以下の実験を行った。酵母の無細胞系に酵母より抽出したmRNAを添加して、20℃で3時間インキュベートしたあと反応液を口紙上に適下し、酸不溶画分に認められる放射活性を測定した。添加するmRNAの濃度に対して、取り込まれた[^{3}H]Pheの放射活性をプロットしたところ，Fig．4－8に示す結果が得られた。この結果から、酵母無細胞系によりmRNAの翻訳が行われることが示されるとともに、添加mRNAの濃度に依存してタンパク質の合成が行われることが明らかとなった。

4－3－3－2　固定化酵母mRNAを用いた酵母タンパク質の合成

酵母より抽出したmRNAを、3’末端のpoly（A）を利用することによりoligo（dT）セルロースにハイブリダイゼーション法によって固定化して、poly（U）の場合と同様に酵母の無細胞系を用いてその翻訳反応を行なった。室温で3時間反応後、担体に保持された放射活性を測定したところ，Table 4－4に示す結果が得られた。すなわち，酵母mRNAを固定化した系では、oligo（dT）単独の場合と比べて担体に保持される放射活性が顕著に

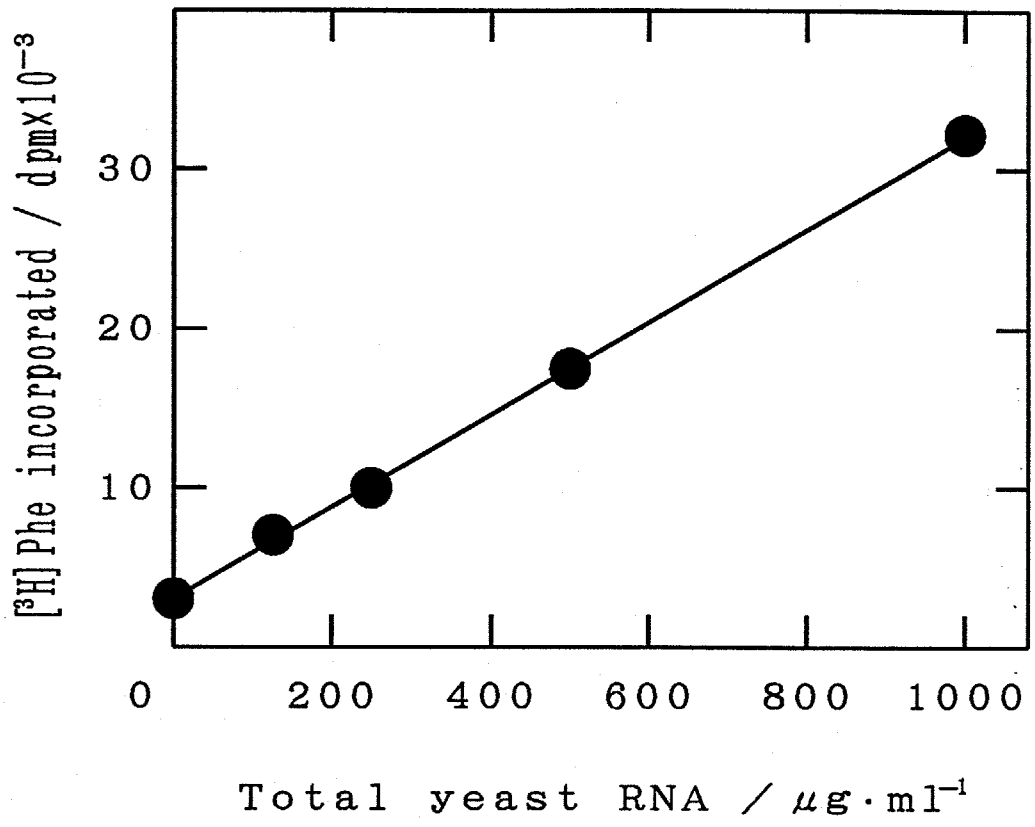


Fig. 4-8 Dependency of yeast RNA concentration on incorporation of [^{3}H] Phe.

増加していることが分かる。この結果より、細胞より抽出したｍＲＮＡにおいてもこれを固定化状態で使用した系でタンパク質の合成が進行することが明らかとなった。

４－３－３－３　固定化マウスミエローマｍＲＮＡを用いたタンパク質の合成

マウスミエローマ細胞より抽出したｍＲＮＡを，４－３－３－１と同様にｏｌｉｇｏ（ｄＡ）セルロースに固定化し、酵母の無細胞系を用いて翻訳反応を行った。Ｔａｂｌｅ ４－４に示す結果より、酵母ｍＲＮＡの場合と同様に、タンパク質合成反応が進行していることが示された。この結果より、動物細胞のｍＲＮＡと酵母細胞のタンパク質合成系という異種間の組み合わせでもｍＲＮＡの翻訳が行なわれることが示された。

Table 4-4 Translation of immobilized mRNA

Immobilized mRNA	[^{3}H] Phe incorporated/dpm$\times 10^{-3}$		
	Matrix volume/μl 10	50	100
None	2.3	5.8	9.5
Yeast	3.6	13.5	35.0
MOPC	2.7	9.0	28.1

4－4　結言

本章においては，無細胞系で固定化ｍＲＮＡの情報がタンパク質へ翻訳されることを確かめ，次いで特定タンパク質の産生プロセスを構築するための基礎データを得た。そのために，まず人工ｍＲＮＡとしてｐｏｌｙ（Ｕ）を選び、酵母無細胞系でポリフェニルアラニンが合成されることを確かめた。タンパク質合成はMg^{2+}濃度に依存する。そこで酵母無細胞系におけるｐｏｌｙ（Ｕ）翻訳の至適Mg^{2+}濃度を求めたところ，高濃度Mg^{2+}の存在下でポリフェニルアラニンの合成が促進されることが見いだされた。ｐｏｌｙ（Ｕ）は通常のｍＲＮＡと異なって，開始コドン、終止コドンを持たないためにタンパク質合成の３段階、すなわち開始反応、延長反応、終結反応のなかでペプチド延長反応のみが起きている。この延長反応がMg^{2+}濃度が極めて高いところで進行することは，高濃度のMg^{2+}存在下では開始コドンに依存しない延長反応のみが進行することができる。

つぎに遊離状態のｐｏｌｙ（Ｕ）を用いるタンパク質合成系におけるｐｏｌｙ（Ｕ）濃度依存性を調べたところ，ｐｏｌｙ（Ｕ）濃度が１５０μｇ／ｍｌ程度で飽和することが分かった。ｐｏｌｙ（Ｕ）をｏｌｉｇｏ（ｄＡ）を固定化したセルロース担体にハイブリダイゼーション法によって固定化したところ、ｐｏｌｙ（Ｕ）を固定した系でもアミノ酸取り込み反応におけるｐｏｌｙ（Ｕ）濃度依存性が確かめられた。ここではｏｌｉｇｏ（ｄＴ）１００μｌに約５０μｇのｐｏｌｙ（Ｕ）が結合している。用いた固定化ｐｏｌｙ（Ｕ）の懸濁液６０μｌ中のｐｏｌｙ（Ｕ）の濃度は約８００μｇ／ｍｌである。このとき、担体成分と溶液成分の双方に放射活性が見いだされた．固相担体に結合している放射性生成物および溶液中の放射性生成物（ポリフェニルアラニン）の総量は3×10^{4}ｄｐｍであった。一方，遊離のｐｏｌｙ（Ｕ）系では同濃度のｐｏｌｙ（Ｕ）によって生成されるポリフェニルアラニンの放射活性は6×10^{5}ｄｐｍであったことから，

固定化系における翻訳効率は遊離系に比べて約１／２０程度に低下していることが明らかになった。

ｐｏｌｙ（Ｕ）固定化系での［^{3}Ｈ］Ｐｈｅの取り込みは２時間程度でほぼ定常状態となりそれ以降顕著な増加は認められなかった。ところが、２時間後にアミノ酸を添加することにより、［^{3}Ｈ］Ｐｈｅの取り込みが持続することが示された。このことは、アミノ酸の連続的供給によりタンパク質の連続生産が可能であることを示唆するものである。

ｐｏｌｙ（Ｕ）系で得られた知見をもとに，固定化された状態のｍＲＮＡを用いて対応するタンパク質を翻訳することを試みた。用いたｍＲＮＡは酵母およびマウスミエローマのｍＲＮＡである。このときｍＲＮＡの３’末端のポリアデニル酸に着目し、固定化ｏｌｉｇｏ（ｄＴ）とのハイブリダイゼーションによってｍＲＮＡを固定化した。酵母ｍＲＮＡの場合は，多数のｍＲＮＡの混合物である。もちいた無細胞系は酵母より抽出した。前者では固定化酵母ｍＲＮＡの酵母無細胞系での発現，後者では固定化マウスｍＲＮＡの酵母無細胞系での翻訳を行ったことになる。

上述の通り、固定化ｐｏｌｙ（Ｕ）系での翻訳においては，翻訳産物は担体、溶液中のいずれにも見い出されたが、酵母およびマウスミエローマｍＲＮＡの翻訳では合成されたタンパク質の大部分が固定化担体上に保持された。この理由としてｍＲＮＡ－リボソーム－合成タンパク質複合体を解離する因子（ＲＦ）は効率よく作用していないものと推察した。

以上示したｍＲＮＡが固定化された系においては，固定化ｍＲＮＡの遺伝情報に従って酵母の無細胞抽出液で翻訳反応が進行することが示された。すなわち、３’末端部を固定化に用いることによって５’末端部からの情報の写し換えが有効に進行したものと考えられる。しかしいずれの場合も，生成タンパク質の同定までは行なうことが出来なかった。

酵母無細胞系による翻訳システムは、酵母ｍＲＮＡの翻訳という同一生物由来の成分の組み合わせのみならず、マウスミエローマのｍＲＮＡ（動物ｍＲＮＡ）の翻訳も行なえることが示された。すなわち，酵母無細胞系を用いると，汎用性の広いタンパク質合成システムを構築できることが明示された。したがって、本章で得られた結果は特定ｍＲＮＡを担体に固定化することにより，対応するタンパク質を生産できることを示している。特に本章の後半で示したマウスミエローマ細胞（ＭＯＰＣ）はイムノグロブリンを大量に生産する細胞であることを考えると，特定タンパク質を生産するアプローチのよい例といえる。

以上の成果は、生体外でタンパク質を連続的に生産できるシステムが可能であることを示唆するとともに、現在の遺伝子工学の欠点を克服するための方法になり得るものと考えられる。

参考文献

1) Johnson,I.S., Science, 219, 632 (1983)

2) Malligan,R.C., Howard,B.H., and Berg,P., Nature, 277, 108 (1979)

3) Mitrani-Rosenbaum,S. et al., Moll. Cell. Biol., 3, 233 (1983)

4) Shih,M.F. etal., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 586 (1984)

5) Zaborsky,O.R., "Immobilized Enzymes",CRC Press (1973)

6) Weetall,H.H. and Suzuki,S. (Eds.), "Immobilized Enzyme Technology", Plenum Press (1975)

7) Suzuki,S. and Karube,I., Immobilized Microbial Cells Symposium Series, 106, 59, The American Chemical Society (1979)

8) Suzuki,S. (Eds.), "Biosensors", Kodan-sya (1984)

9) Lagerlof,E. et al., "Methods Enzymol", 44, 759 (1976)

10) Ikariyama,Y., Aizawa,M., and Suzuki,S., J. Solid-Phase Biochem., 4, 279 (1979)

11) Bresser,J., Hubbel,H.R., and Gillespie,D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 6523 (1983)

12) Tuite,M.F. and Plesset,J., Yeast, 2, 35 (1986)

13) Gassior,E., Herrera,F., Sadnik,I., McLaughlin, and Moldave,K., J. Biolog. Chem., 254, 3965 (1979)

14) Altmann,M., Edery,I., Sonenberg,N., and Trachsel,H., Biochemistry, 24, 6085 (1985)

15) Hoskinson,R.M., and Khorana,H.G., J.Biol.Chem., 240, 2129 (1985)

第５章

鋳型固定化法による特定遺伝子の増幅

第5章　鋳型固定化法による特定遺伝子の増幅

5－1　緒言

第４章において、特定ｍＲＮＡを固定化することによってタンパク質生産プロセスを構築できることを示した。特定ｍＲＮＡを選択的に調製するためには、マウスミエローマやカイコ絹糸腺などの特殊な細胞や器官からそれぞれイムノグロブリンＧｍＲＮＡやフィブロインｍＲＮＡを抽出精製することも考えられるものの、任意のタンパク質を産生するためにはｍＲＮＡの汎用性のある調製法が必要となる。

ところで、遺伝情報の源であるＤＮＡは複製により増幅されて存続維持されている。細胞内では、ＤＮＡポリメラーゼの作用により親ＤＮＡを鋳型にプライマーを起点として５’末端から３’末端方向にＡＴＰ，ＧＴＰ，ＣＴＰ，ＴＴＰを相補的に連結して娘ＤＮＡを合成していく。

１９７２年にＢｅｒｇらによりクローン化法[1)]、１９７３年にＣｏｈｅｎらにより制限酵素－リガーゼ法[2)]が開発された。これらの方法を駆使すると特定遺伝子をプラスミドに挿入し、これを細胞内に導入することにより特定遺伝子の増幅を人工的に行なうことが可能となった。このことによって、特定遺伝子の大量取得、そして遺伝子やタンパク質の一次構造の決定が可能になった。本法を用いると、特定遺伝子の大量取得が可能である。しかしこの方法はいくつかの過程を正しく踏襲する必要があるのみならず、時間がかかるのが欠点である。ところが、１９８８年Polymerase Chain Reaction（ＰＣＲ）法[3)]という新しい遺伝子増幅法が開発された。この方法によると生体外で簡単な操作により、しかも短時間で特

定遺伝子の増幅を行うことが可能である。この方法は単に目的とする遺伝子を増幅できるだけに留まらず、幅広い分野への応用がなされている。たとえば、がんの早期発見[4]、遺伝病の胎児診断[5]、エイズウィルスキャリアーの判定[6][7]などの諸診断において、特に大きな効果をもたらしている。その他ＤＮＡ塩基配列決定[8]やクローニング[9]においても非常に有用であることが明らかにされ、急速に普及してきている。

ところで、本研究は特定遺伝子の人工発現系の構築を目的とするものである。この目的のため第４章ではタンパク質を生体外で合成することを行なった。本法を幅広く展開するためには、タンパク質のアミノ酸配列を規定している情報源である核酸、すなわちｍＲＮＡ，ＤＮＡを任意に調製することが必要である。そしてＰＣＲ法を用いてＤＮＡを増幅し、ついでこの情報をｍＲＮＡに転写することができれば、第４章で提案したアプローチはより具体性を帯びてくるものになろう。

そこで本章では、鋳型を固定化した状態で特定遺伝子を連続的に増幅産生することを試みる。もし、固定化状態でＤＮＡポリメラーゼによる合成反応が可能ならば、鋳型を安定化した状態で、しかも連続的に使用することが可能となりＰＣＲ法によるＤＮＡの連続生産には有利であると考えられる。そのために、まず鋳型を固定化した状態でＤＮＡの合成増幅反応が行なえることを明らかにする。即ち、ＤＮＡをロ紙上に固定化し、その３’末端にプライマー結合部位を酵素的に付加する。ついで、これを鋳型ＤＮＡとしてＰＣＲ法により相補的なＤＮＡを合成することを試みる（Ｆｉｇ．５－１）。このようなアプローチは、新しい生体外遺伝子増幅システムの構築を目標とするものであり、ＤＮＡ複製プロセスのユニット化、すなわちタンパク質生産システム構築のための１ステップとなり得るものと期待される。

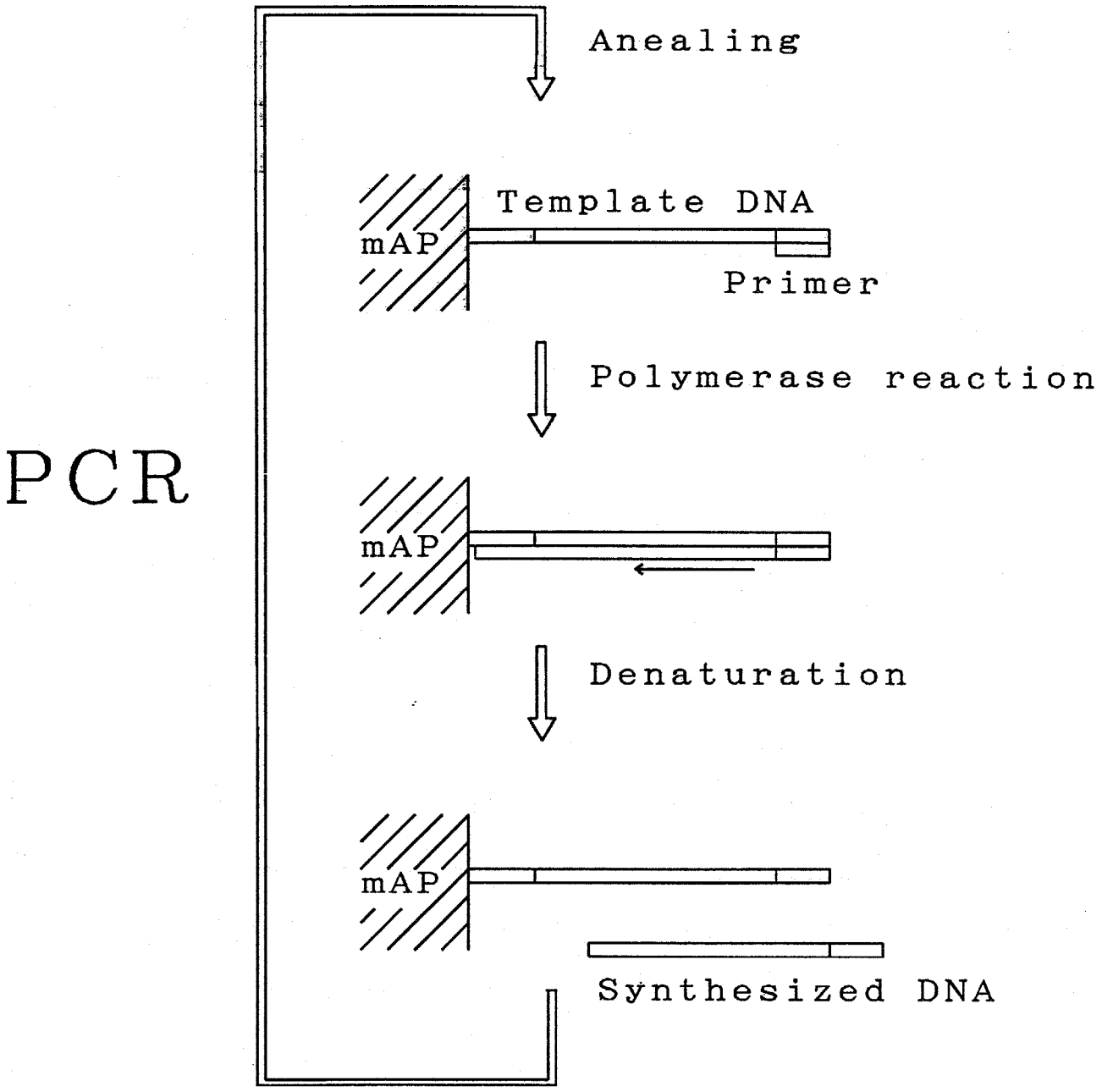


Fig. 5-1 Schematic drawing of the immobilized system on PCR

５－２　実験方法

５－２－１　試薬

ｐｏｌｙ（Ａ）は生化学工業（株）より、ｄＡＴＰ，ｄＧＴＰ，ｄＣＴＰ，ｄＴＴＰおよびｐ（ｄＧ）$_{12-18}$（oligo(dG)）はファルマシア社より、Messenger Activated Paper（ｍＡＰ）、ｐＢＲ３２２，λ－ＤＮＡは宝酒造（株）より購入した。制限酵素ＨｉｎｃⅡ、ＨｉｎｄⅢおよびTerminal Deoxynucleotidyl Transferase（ＴｄＴ）、Ｔａｑ ＤＮＡ polymeraseは宝酒造（株）より、AMV Riverse Transcriptase（ＲＴ）はファルマシア社より購入した。

増幅前後の遺伝子量は液体クロマトグラフ（日本分光）を用いて定量した。分離カラムとしてはAsahipack ＧＳ－６２０（旭化成）を用いた。

５－２－２　ｐｏｌｙ（Ｕ）のハイブリダイゼーション

ｐｏｌｙ（Ｕ）を５００ ｍＭのＮａＣｌを含むＴＥ緩衝液（１０ ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７.５，１ ｍＭ ＥＤＴＡ）に溶解しｍＡＰ（１ｘ０．５ ｃｍ^2）を３０分間浸漬してハイブリダイゼーション法によりｐｏｌｙ（Ａ）を結合した。５００ｍＭのＮａＣｌを含むＴＥ緩衝液で２回洗浄後、７０％ ＥｔＯＨで洗浄したのち乾燥させた。

５－２－３　逆転写酵素反応

１０倍濃度の反応用緩衝液１０μｌ、ｄＴＴＰ溶液（１０ｍｇ／ｍｌ）１０μｌ、ＲＴ１μｌ（２０Ｕ）に滅菌水７９μｌを加えて総量を１００μｌとした。この反応溶液にｐｏｌｙ（Ａ）を結合したｍＡＰを浸漬して３７℃で１時間インキュベートして逆転写反応をおこなったのち、７０℃で５分間インキュベートして酵素を失活させた。

５－２－４　ＴｄＴ反応

１０倍濃度の反応用緩衝液１０μｌ，ｄＣＴＰ溶液（２ｍｇ／ｍｌ）５μｌ、ＴｄＴ１μｌ（１０Ｕ）に滅菌水８４μｌを加え総量１００μｌとし、ＲＴ反応を終えたｍＡＰを浸漬して３７℃にて酵素反応を行った。

５－２－５　ＰＣＲ反応

１０倍濃度の反応用緩衝液１０μｌ、プライマーとしてｏｌｉｇｏ（ｄＧ）５μｌ、ｄＡＴＰ１０μｌ，ｄＧＴＰ２μｌ、Ｔａｑ ＤＮＡ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ４μｌ（４Ｕ）に滅菌水６９μｌを加え総量を１００μｌとした。これにＴｄＴ反応を終えたｍＡＰを浸漬し、ＰＣＲ反応に用いた。

ＰＣＲ反応は、４０℃にて１.５ｍｉｎの間アニーリングを行ったのち、７０℃にて２ｍｉｎ polymerase反応を行った。そのあと９５℃にて１.５ｍｉｎの間ＤＮＡ変性を行った。以上のサイクルを繰り返すことによって増幅反応を行った。

即ち、ＰＣＲ反応は以下の手順で行った。

１）プライマーのアニーリング　／　４０℃ ｘ １.５ｍｉｎ　：　プライマーであるｏｌｉｇｏ（ｄＧ）は、固定化されたＤＮＡの３’末端に存在するｐｏｌｙ（ｄＣ）鎖に水素結合により相補的に結合した。

２）相補鎖の合成　／　７０℃ ｘ ２ｍｉｎ　：　Ｔａｑ ＤＮＡ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅの反応により固定化されたｐｏｌｙ（ｄＴ）を鋳型、ｏｌｉｇｏ（ｄＧ）をプライマーとしてｐｏｌｙ（ｄＴ）に相補的なｐｏｌｙ（ｄＡ）を合成した。

３）ＤＮＡの変性　／　９５℃ ｘ １.５ｍｉｎ　：　合成されたｐｏｌｙ（ｄＡ）と鋳型ＤＮＡの水素結合を加熱処理によって切断し、新たなプライマーが結合できるようになる。

尚、各酵素反応で用いた反応用緩衝液の組成はＴａｂｌｅ　５－１にまとめて示した。

Table 5-1 Component of reaction buffer

Reverse Transcriptase	50mM Tris-HCl (pH 8.3) 6mM $MgCl_2$ 40mM KCl 3mM DTT
Terminal Deoxynucleotidyl Transferase	100mM Sodium Cacodylate Trihydrate 8mM $MnCl_2$ 0.1mM DTT
Taq DNA Polymerase	10mM Tris-HCl (pH 8.9) 1.5mM $MgCl_2$ 80mM KCl 500μg/ml BSA 0.1% Sodium Cholate 0.1% Triton X-100

５－３　実験結果および考察

５－３－１　ＰＣＲ法によるｐｏｌｙ（ｄＡ）の増幅

５－３－１－１　ｐｏｌｙ（ｄＴ）の固定化（Ｆｉｇ．５－２）

ｍＡＰはｐｏｌｙ（Ｕ）を共有結合により固定化させたロ紙で、真核細胞生物のｍＲＮＡ，即ちｐｏｌｙ（Ａ）ＲＮＡとのみ、可逆的に結合できるロ紙である。このロ紙は１ｃｍ^{2}あたり１０μｇのｐｏｌｙ（Ａ）を結合できる。そこでハイブリダイゼーション法によりｍＡＰにｐｏｌｙ（Ａ）を結合させた。ついで逆転写酵素を用いてｐｏｌｙ（Ｕ）をプライマーとして、ｐｏｌｙ（Ａ）に相補的なｐｏｌｙ（ｄＴ）を合成した。これはｍＡＰに固定化されている。ついで、ｄＣＴＰの存在下でＴｄＴを反応させることにより、固定化したｐｏｌｙ（ｄＴ）鎖の３’末端にＰＣＲ反応のプライマー結合部位となるｐｏｌｙ（ｄＣ）鎖を付加した。

以上のようにしてｏｌｉｇｏ（ｄＧ）プライマー結合部位を有するｐｏｌｙ（ｄＴ）固定化ｍＡＰを作製した。

５－３－１－２　ＰＣＲ反応（Ｆｉｇ．５－３）

ＰＣＲ反応は、５－２－５に示した手順に従って行った。即ち、１.５ｍｌのマイクロチューブ中、１００μｌのＰＣＲ反応溶液に、ｐｏｌｙ（ｄＴ）を固定化したｍＡＰを浸漬し、１）アニーリング、２）合成反応、３）熱変性のサイクルを繰り返して反応を行なった。

５－３－１－３　ＰＣＲ反応生成物の同定

ＰＣＲ反応により得られた生成物は電気泳動により分析した。

ＰＣＲの反応サイクルは４０回行ない、増幅前、１，１０，２０、４０サイクル反応時に、それぞれ５μｌずつサンプリングしたものを電気泳動により分析し

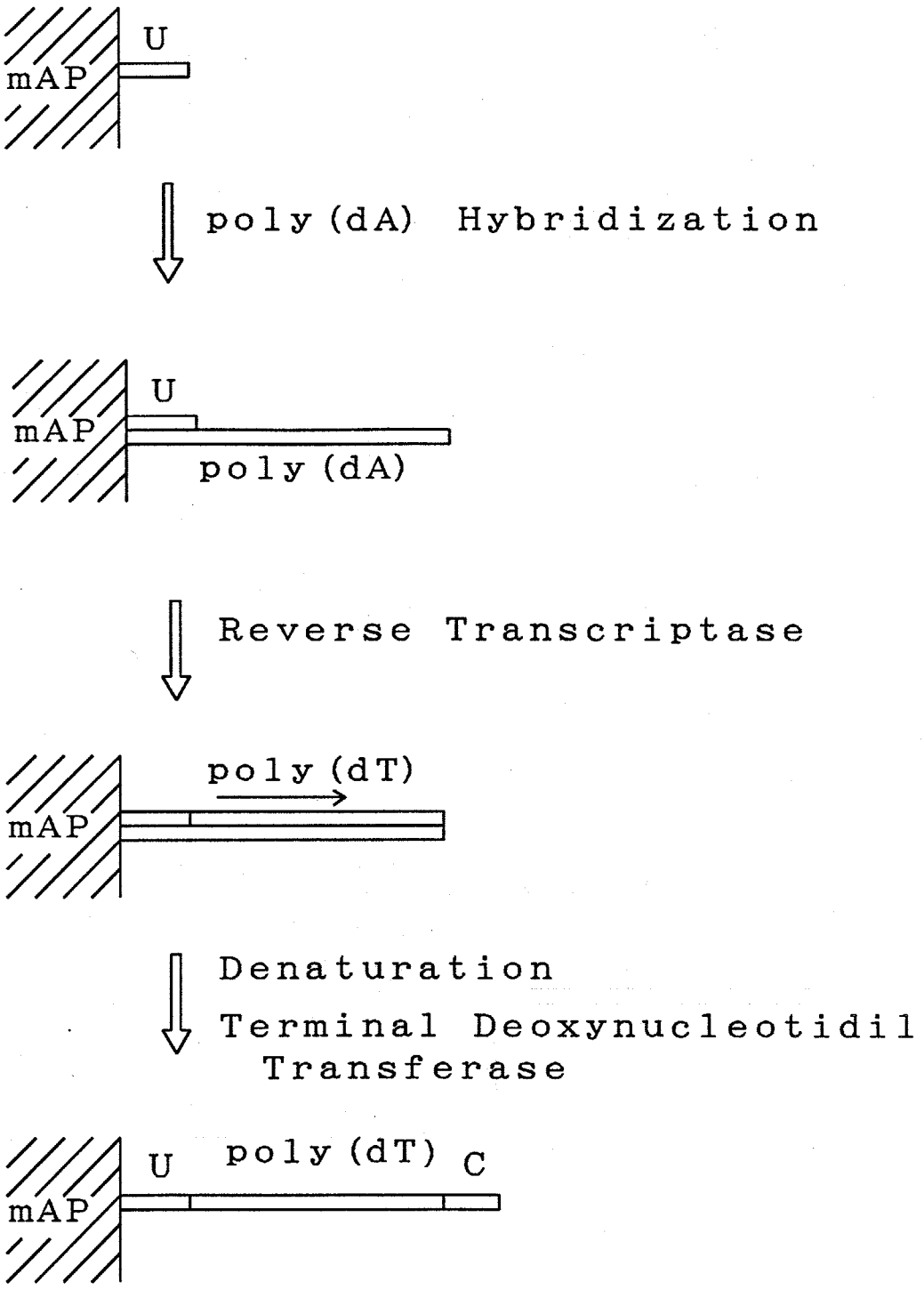


Fig. 5-2 Immobilization of poly(dT)

PCR

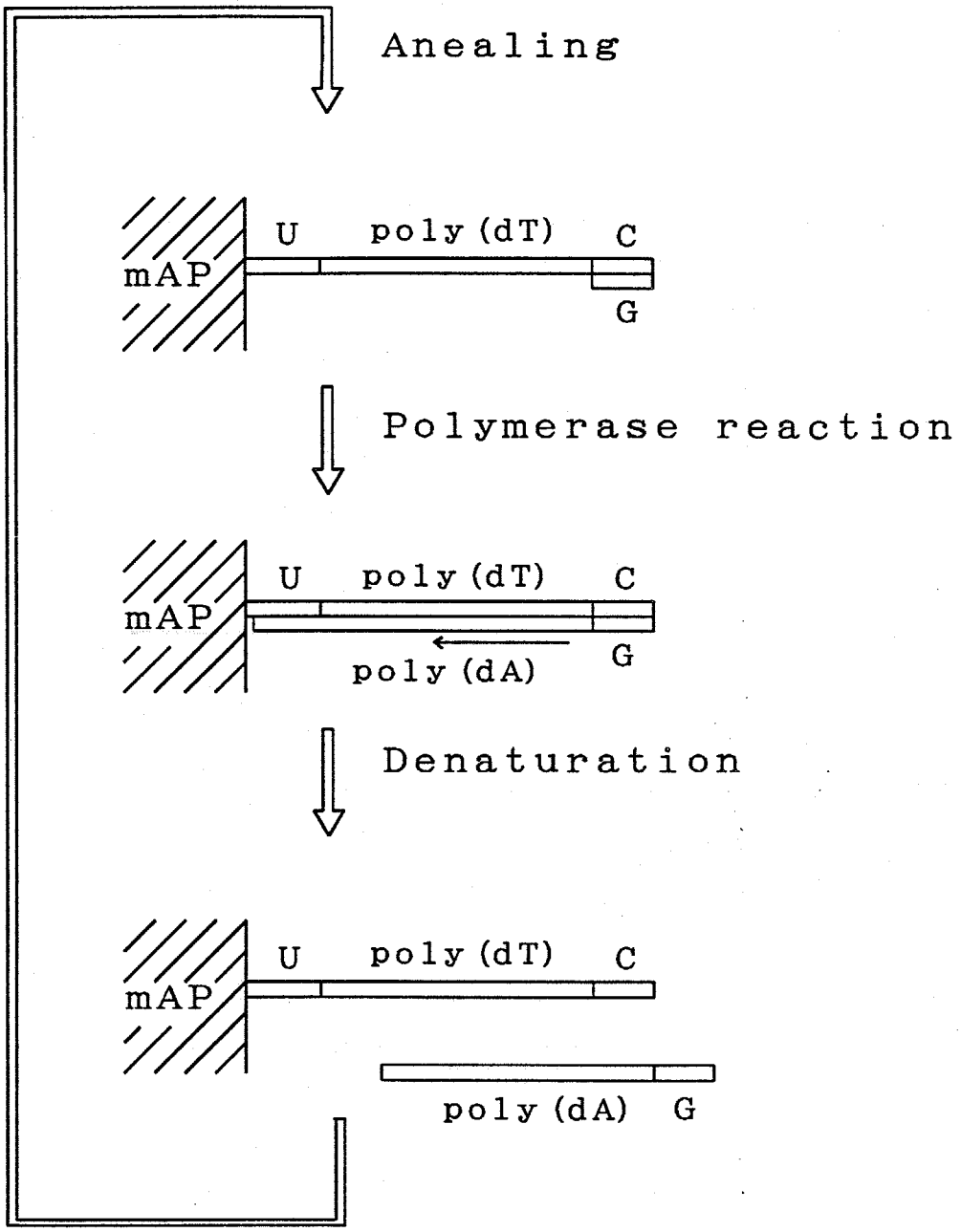


Fig. 5-3 Amplification of poly(dA) by PCR

た。サンプルはｐｏｌｙ（Ｕ）とハイブリダイズしたのち１.５％のアガロースゲル中を５０Ｖで１時間泳動した。ゲルはエチジウムブロミド溶液により染色したのち、ＵＶランプを照射して写真を撮影した。その結果をＦｉｇ．５－４に示す。この図から、増幅回数が増えるにしたがい蛍光強度が増大し、ｐｏｌｙ（ｄＡ）が増幅されていることが確かめられた。ｍＡＰに固定化されたｐｏｌｙ（Ｕ）とのハイブリダイズに用いたｐｏｌｙ（Ａ）は、分子量２５万－３５万、塩基数にして７００－１０００の分布となっている。従って、固定化されるｐｏｌｙ（ｄＴ）の分子量も不均一なものであり、これを鋳型として合成されるｐｏｌｙ（ｄＡ）の分子量も不均一であることが予想される。電気泳動のバンド幅がブロードであるのはこのためと思われる。ＰＣＲの回数を増やすことにより分子量が若干低分子側にシフトし、分子量分布が狭くなる傾向が認められた。この原因は現在のところ明確ではないが、固相に結合しているために立体障害を受け、その結果ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ反応が末端部まで進行しないことを主な理由に考えている。

５－３－２　ＰＣＲ法によるｐＢＲ３２２の増幅

５－３－２－１　ＰＣＲ法による遊離ｐＢＲ３２２の増幅

まず、ｐＢＲ３２２遊離状態でのＰＣＲ反応を行った。

ｐＢＲ３２２は４３６１ｂｐのプラスミドでＨｉｎｃIIにより２つの断片、すなわち１１０７ｂｐ，３２５４ｂｐの断片に切断される。ｐＢＲ３２２をＨｉｎｃIIで切断したものにＴｄＴにより３’末端部にｐｏｌｙ（ｄＣ）鎖を付加した。ｏｌｉｇｏ（ｄＧ）をプライマーとしてＰＣＲ反応を行いｐＢＲ３２２ ＨｉｎｃII断片の増幅を行った。この方法ではＤＮＡ２本鎖のそれぞれが同一のプライマーを使い相補鎖を合成するので理論的にはｎサイクルの反応を行うと2^nの増幅が

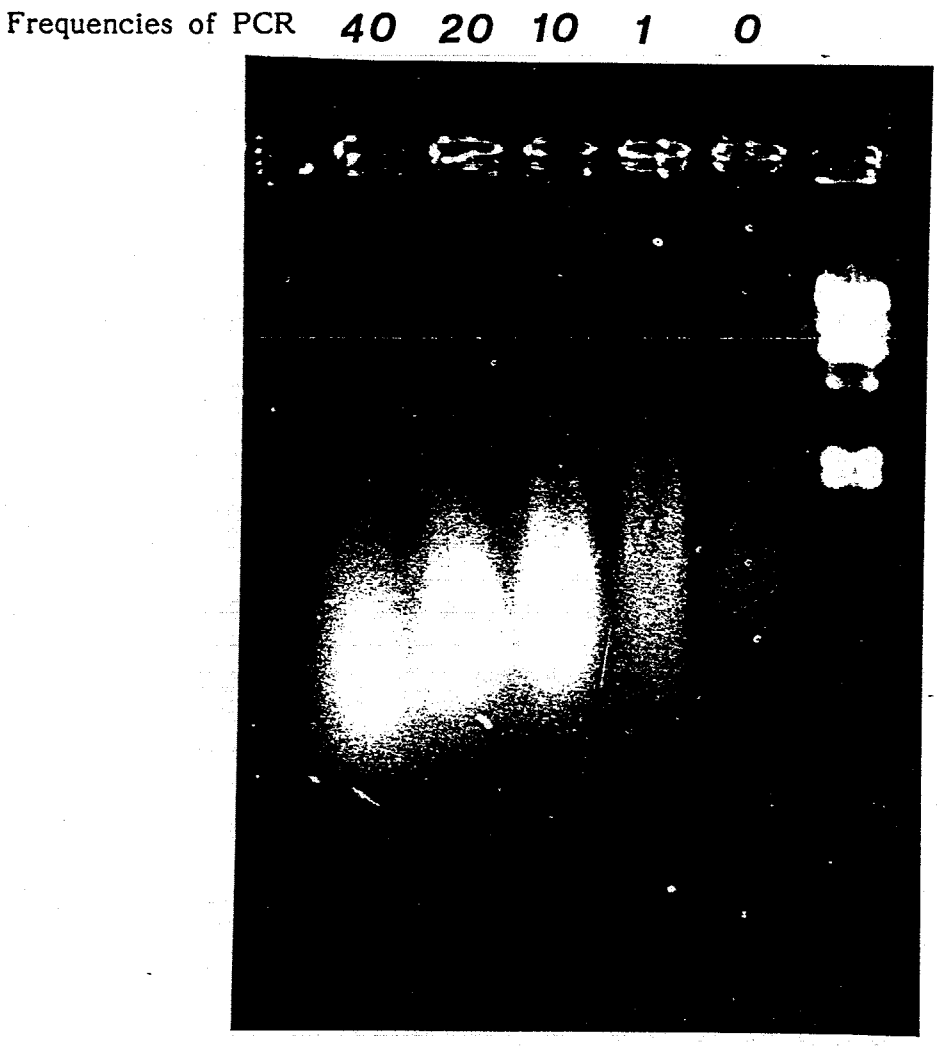


Fig. 5-4 Electrophoresis of amplified poly (dA).

起こるはずである。そこで、所定の条件のもとでＰＣＲによって増幅を行い、反応生成物をＨＰＬＣにより分析した。用いたカラムはＡｓａｈｉｐａｃｋ ＧＳ－６２０である。このカラムの排除分子量限界は３００万である。５μｌのサンプルを注入して２６０ｎｍの吸光度を検出した。あらかじめ純粋なサンプルを分析し、ｐＢＲ３２２／ＨｉｎｃII，ｏｌｉｇｏ（ｄＧ），ＮＴＰはそれぞれ７分、１１分、１３分の保持時間（ＲＴ）で溶出する事を確認した。この反応では２種類のｐＢＲ３２２断片が生成されるが、この条件下でのＨＰＬＣでは１本のピークとして検出された。Ｆｉｇ．５－５に反応前および２０サイクル反応後のサンプルのＨＰＬＣ分析パターンを示す。反応前にはわずかにしか存在しなかったｐＢＲ３２２フラグメントに相当するピーク（ＲＴ：７分）が、２０回反応後に増大しているのが認められた。一方、プライマーに由来するピーク（ＲＴ：１１ｍｉｎ）は、ＰＣＲ反応後減少が観測された。この結果から、ＰＣＲ反応によりプライマーが消費され、ｐＢＲ３２２断片が新たに合成されて増幅していることが確認できた。合成されたＤＮＡとプライマーＤＮＡのピーク面積をサイクル数に対しプロットしたところＦｉｇ．５－６に示す結果が得られた。一般にＰＣＲではｎサイクルの反応を行うと、理想的には2^nの増幅度が期待できる。しかし、本研究では指数的な増幅というよりも対数的な増幅結果が得られた。この理由については、サイクル条件の最適化、プライマー濃度の最適化などを検討する必要があると考えている。

５－３－４－２　ｐＢＲ３２２固定化系での遺伝子増幅

前節の結果をもとに、ｐＢＲ３２２を固定化した系でＰＣＲ反応を行った。

ｐＢＲ３２２／ＨｉｎｃII断片にＴｄＴにより３’末端にｐｏｌｙ（ｄＡ）鎖を付加した。これを９５℃に加熱して水素結合を切断し１本鎖にした。ついでｍＡＰにｐＢＲ３２２の断片を固定化した。これにTaq DNA polymeraseを用いて相補的なＤＮＡを合成した。さらに、ｄＣＴＰ存在下ＴｄＴの反応により３’末端

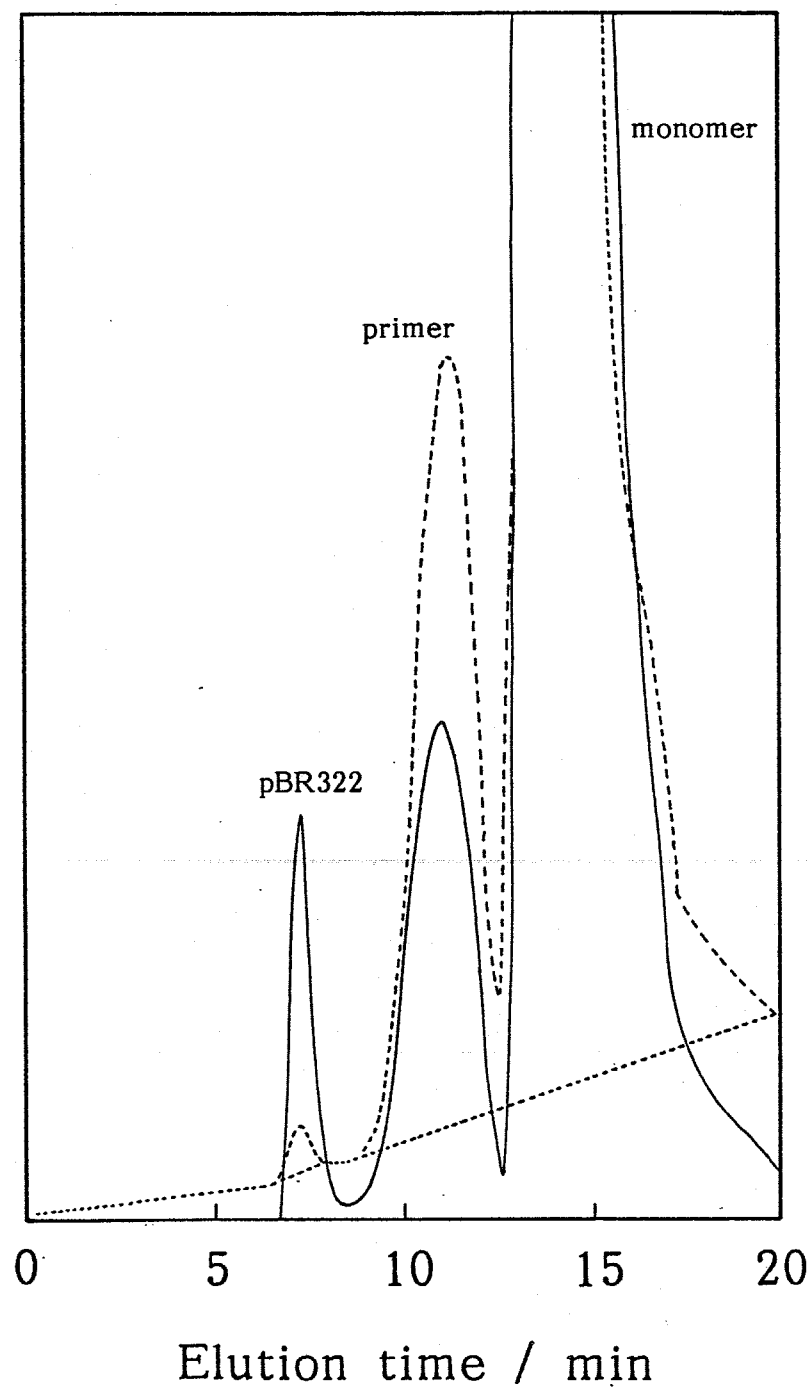


Fig. 5-5 HPLC patterns of PCR.

---------- : Before PCR

———————— : After PCR

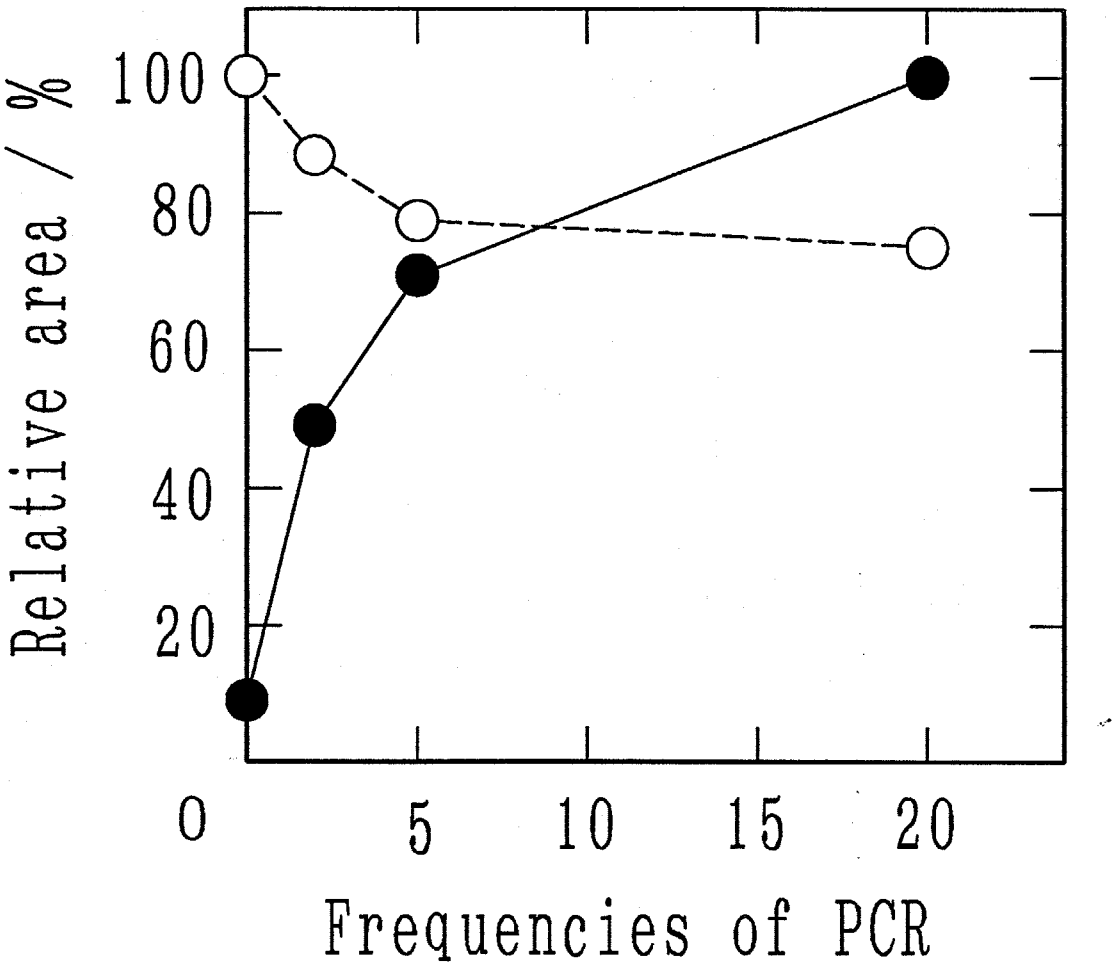


Fig. 5-6 Change in peak area of HPLC patterns.

—●— : pBR322 / *Hinc*Ⅱ

—○— : primer

にｐｏｌｙ（ｄＣ）鎖を付加した。このようにしてｐＢＲ３２２の１本鎖がｐｏｌｙ（Ｕ）を介しｍＡＰ上に固定化されたものが得られた。ここでは、ｐＢＲ３２２の２本のＨｉｎｃII断片にそれぞれ＋鎖および－鎖があるので４種類のＤＮＡが固定化されていることになる。この反応ではＰＣＲ反応により新たに合成されるＤＮＡ同士が溶液中で結合することにより、溶液中でも反応が進行することに注意する必要がある。

ｏｌｉｇｏ（ｄＧ）をプライマーとしてＰＣＲ反応を行い、生成物をＨＰＬＣにより分析したところ、Ｆｉｇ．５－７に示す結果が得られた。ＨＰＬＣで検出できるほどの増幅は認められたが、溶液中における増幅反応ほど顕著な増幅は起きていない。この理由としては、不均一系（固定化系）では拡散律速のために、反応効率が低下していることが考えられる。

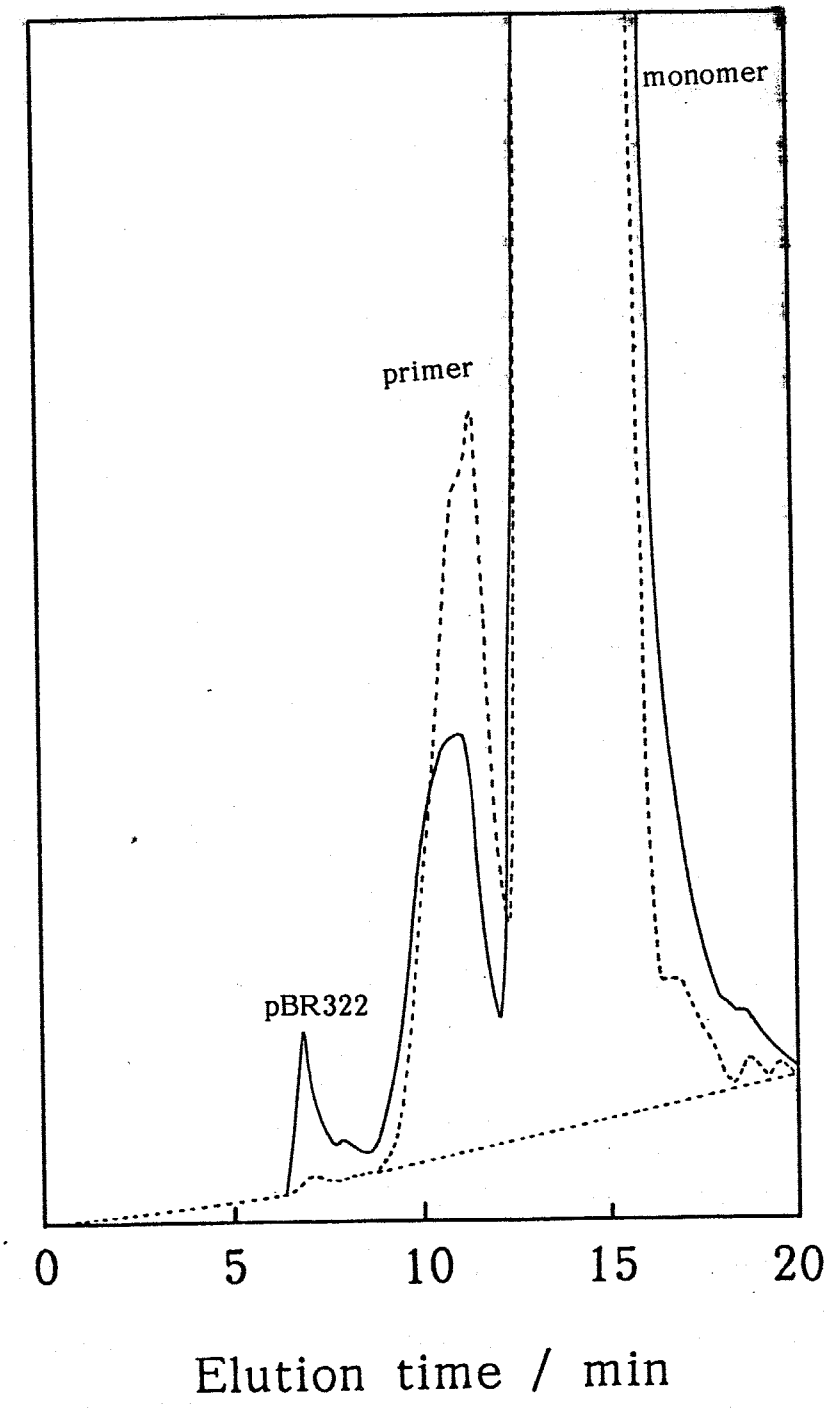


Fig. 5-7 HPLC patterns of PCR in the immobilized system.

---------- : Before PCR

———— : After PCR

5－4　結言

本章では生体外タンパク質合成プロセス構築のための一つのステップであるＤＮＡ複製プロセスのユニット化を目的として、生体外でＤＮＡが連続的に増幅産生できることを示した。

第４章において、生体外でｍＲＮＡの情報がタンパク質へ翻訳されることを示したが、このとき情報源としてのｍＲＮＡは細胞から抽出したものを使用した。しかし、特定タンパク質の生産のためには特定ｍＲＮＡを調製する必要がある。そのためには遺伝情報源をｍＲＮＡからさらにさかのぼり、ｍＲＮＡへ遺伝情報を伝達しているＤＮＡに着目し、ＤＮＡを産生できるシステムを構築することにした。特定のＤＮＡを大量に調製することができれば、これを転写してｍＲＮＡを大量に調製することが可能である。

そこでまず、モデルＤＮＡとしてｐｏｌｙ（ｄＡ）を選択しこれを増幅生産することを試みた。連続生産へのアプローチとして、鋳型となるｐｏｌｙ（ｄＴ）を担体上に固定化して、ＤＮＡポリメラーゼの反応によりこれと相補的なｐｏｌｙ（ｄＡ）を増幅させることができた。また、特定遺伝子のモデルとしてｐＢＲ３２２の断片を担体に固定化し、ｐｏｌｙ（ｄＡ）の場合と同様の手法によりｐＢＲ３２２を生産することができた。ＤＮＡ合成の確認は電気泳動およびＨＰＬＣ分析により行った。その結果ＤＮＡの増幅は確認されたが、ＰＣＲ法を用いて報告されているような指数的な増幅は起こらなかった。また、遊離状態のＤＮＡについても同様の方法で増幅を試みたが、この場合鋳型を固定化した系に比べると増幅反応の効率は若干良いようである。しかしながら、鋳型を固定化することにより反応効率は低下すものの、ＤＮＡポリメラーゼによる複製、増幅は起こり得ることが示された。

固定化酵素や固定化微生物などの生物活性物質を担体に固定化することにより、

生体外で不安定な物質を安定に、しかも連続的に使用することが可能となったように、遺伝情報を担う核酸においてもこのようなことが可能であると考えられる。このような視点から鋳型ＤＮＡを固定化し特定遺伝子を連続的に生産しようとする本研究の試みは、特定遺伝子の新しい生産プロセスの開発へのアプローチとなり得るものと考えている。今後、固定化での反応効率を向上させることによって、特定遺伝子を大量に生産できるようになれば、第４章で示した生体外タンパク質合成系と生体外転写システムによるＤＮＡからｍＲＮＡへの情報変換システムと組み合わせることにて、特定タンパク質のみを連続的に合成するプロセスを構築することが可能となるであろう。

参考文献

1) Jackson,D., Symons,R., and Berg,P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2904 (1972)

2) Cohen,S., Chang,A., Boyer,H., and Helling,R., ibid., 70, 3240 (1973)

3) Saiki,R.K., Glfand,D.H., Stoffel,S., Schart,H.A., Higuchi,R., Horn,G.T., Mullis,K.B., and Erlich,H.A., Science, 239, 487 (1988)

4) Lee,M.S., Chang,K.S., Cabanillas,F., Freireich,E.J., Trujillo,J.M., and Stass,S.A., Science, 237, 175 (1987)

5) Sasaki,H., Sakaki,Y., Matsuo,H., Sahashi,K., Goto,I., Kuroiwa,G., Shinoba,T., Isobe,T., and Takagi,Y., Biochem. Biophys. Res. Commun., 152, 636 (1984)

6) Jackson,J.B., Coombs,R.W., Sannerud,K., Rhame,F.S., and Balfour,H.H. Jr., J. Clin. Microbiol, 26, 1416 (1988)

7) Ou,C.Y., Kwok,S., Mitchell,S.W., Mack,D.H., Sninsky,J.J., Krebs,J.W., Feorino,P., Warfield,D., and Schochetman,G., Science, 239, 295 (1988)

8) Saiki,R.K., Gyllenten,U.B., and Erlich,H.A., "Genome Analysis", 141, I.R.L.Press, Oxford (1988)

9) Gil,G., Smith,J.R., Goldstein,J.L., Slaughter,C.A., Orth,K., Brown,M. S., and Osbone,T.F., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8963 (1988)

第 6 章

結 論

第6章　結論

本研究は、分子生物学のセントラルドグマである、ＤＮＡからｍＲＮＡ，ｍＲＮＡからタンパク質への遺伝情報の流れを参考にして遺伝子の人工的な発現系を構築し、さらに特定のタンパク質を生産することを目的とした。

この目的のため、まず第２章では、生細胞のタンパク質合成系を利用する遺伝子工学の手法により特定タンパク質の生産を行った。現在のタンパク質生産は遺伝子組み替えが唯一の方法といえるが、特定遺伝子の情報を効率よく細胞に行わせるシステムは一種の遺伝子人工発現系といえる。宿主細胞として大腸菌を用いて大腸菌内で外来遺伝子を大量に発現できるように設計された発現ベクタープラスミドにメタピロカテカーゼ・プロテインＡの遺伝子を挿入し、これらの融合タンパク質を大量に生産することができた。ここで得られたメタピロカテカーゼ・プロテインＡ融合タンパク質は双方のタンパク質の性質を合わせ持つ新しい人工タンパク質であることが明示された。

そして第３章では、第２章において生産されたタンパク質の有用性を示した。すなわち、メタピロカテカーゼの有する酵素活性とプロテインＡのイムノグロブリン結合能力を利用することにより、この融合タンパク質を酵素免疫測定に応用した。従来、酵素免疫測定の試薬として、マーカー酵素を結合タンパク質に化学的に結合した標識タンパク質が用いられてきた。しかし、化学的な結合法においては、結合比や結合部位の制御が困難であり、特定の標識タンパク質を再現性よく合成することが困難であった。ところが第２章で得られた融合タンパク質は、遺伝子レベルで結合比や結合部位を制御しているために、従来の化学結合法における問題点を克服でき、その結果高感度な酵素免疫測定を実現できることが明ら

かとなった。

以上の結果から、生細胞を利用した遺伝子発現系により目的とする遺伝子を発現させ機能を有するタンパク質を生産できることが示された。

第４章では、遺伝子工学に代わり得る新しいタンパク質生産システムの構築を目的とし、生体外タンパク質合成を行った。酵母の無細胞系により合成ＲＮＡｐｏｌｙ（Ｕ）が翻訳されてポリフェニルアラニンが生成されることが示された。またこの系により細胞より抽出したｍＲＮＡが翻訳されてタンパク質が生成されることも確認された。さらにタンパク質合成系構築へのアプローチとして情報源であるｍＲＮＡが固定化された系でも翻訳反応が進行しタンパク質が合成されることが示された。ここではまず、合成ＲＮＡとしてｐｏｌｙ（Ｕ）がハイブリダイゼーションによりセルロース担体に固定化された状態においても、酵母無細胞系により翻訳されポリフェニルアラニンが生成されることが明らかとなった。また、原料のアミノ酸を供給することによりタンパク質合成が継続できることが示された。このことはアミノ酸の連続供給によりタンパク質の連続生産が可能であることを示唆するものである。

さらにこのようなアプローチは、細胞由来のｍＲＮＡ、すなわち酵母細胞及びマウスミエローマ細胞より抽出されたｍＲＮＡがハイブリダイゼーションによりセルロース担体に固定化された系においても有効であり、タンパク質合成反応が進行することが示された。現在のところ合成されたタンパク質の同定までは至っていないが、動物細胞のｍＲＮＡが固定化された状態で、タンパク質の合成が起こり得ることは汎用性の広いタンパク質合成システムであることを示唆している。以上の結果から特定のｍＲＮＡを固定化することで、特定のタンパク質を連続的に生産することが可能と考えられる。

最後に第５章では、第４章で示されたタンパク質合成系の展開として情報源であるｍＲＮＡの大量生産を目的とし、ｍＲＮＡの情報を担うＤＮＡの増幅生産を

行った。鋳型ＤＮＡを担体に固定化した系で目的ＤＮＡが連続的に合成できることが示された。ここでは合成効率の向上など今後解決しなければならない問題が残されているが、特定遺伝子の増幅生産が生体外においてきわめて簡略化された系で行える原理が提示できた。本研究では、生成ＤＮＡを転写するプロセスを研究するまで至らなかったが、第４章で示された生体外タンパク質合成系と組み合わせると任意に特定のタンパク質を生産し得るシステムが生体外で再現できるものと考えている。

以上、本研究で得られた諸成果は遺伝子工学に変わり得るタンパク質生産システム開発への新しい方法論をバイオテクノロジーに導入するものと考えられる。

謝辞

本研究を行なうにあたり、終始適切なる御指導、御教鞭をを賜りました本学教授相澤益男先生、ならびに本学助教授碇山義人先生に深く感謝の意を表します。

遺伝子操作技術を御教授いただきましたのみならず、本研究を進めるにあたり有益なる御指導を賜りました相模中央化学研究所の加藤誠志博士、ならびに同研究所の皆様にに厚く御礼申し上げます。

本研究の実験の一部に御助力をいただきました西森裕二氏に感謝いたします。

本研究をまとめるにあたり、適切な御助言をいただきました本学助手篠原寛明先生に御礼申し上げます。

本論文の作製にあたり、御助力をいただきました研究室の皆様に心より感謝いたします。

本学での三年間の研究生活において共に研究を行ない、討論し、また日常生活においても大変お世話になりました研究室の皆様に深く御礼申し上げます。

京都大学大学院修士課程在学中、そして本学への進学にあたり御指導頂きました京都大学工学部高分子化学科教授今西幸男先生、ならびに同助手木村俊作先生に厚く御礼申し上げます。

そして父、故小畠陽之助氏に深く感謝の意を表します。