

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	無細胞タンパク質合成法の効率化へ向けた研究
Title(English)	Improvement of cell-free protein synthesis system for efficient protein production
著者(和文)	関英子
Author(English)	EIKO SEKI
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第7529号, 授与年月日:2009年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:木川 隆則,山村 雅幸
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第7529号, Conferred date:2009/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner;
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

学位論文

無細胞タンパク質合成法の 効率化へ向けた研究

Improvement of cell-free protein synthesis system
for efficient protein production

平成二十一年三月博士（理学）申請

指導教員 木川 隆則 教授

山村 雅幸 教授

氏名 関 英子

目次

第1章 序論

1.1 背景と目的	3
1.2 論文の構成	6

第2章 直鎖状 DNA 鋳型に適した調製方法

2.1 導入	8
2.2 材料と方法	10
2.2.1 大腸菌株	10
2.2.2 細胞抽出液調製方法	11
2.2.3 鋳型 DNA と mRNA	11
2.2.4 無細胞タンパク質合成	12
2.2.5 直鎖状 DNA 分解活性測定	13
2.2.6 無細胞タンパク質合成反応液中の DNA の検出	13
2.2.7 mRNA 分解活性測定	14
2.2.8 無細胞タンパク質合成反応中の mRNA の挙動確認	14
2.2.9 細胞抽出液中にふくまれるタンパク質の定量	14
2.3 結果と考察	14
2.3.1 無細胞タンパク質合成反応中の DNA と mRNA の挙動	14
2.3.2 大腸菌培養温度と無細胞タンパク質合成量	16
2.3.3 培養温度が mRNA 鋳型タンパク質合成に与える影響	17
2.3.4 培養温度が直鎖状 DNA 分解活性に与える影響	18
2.3.5 直鎖状 DNA 分解への RecD の関与	19
2.3.6 直鎖状 DNA 鋳型を用いた効率化	20
図	22

第3章 細胞抽出液内の複数因子を同時に減量する調製方法

3.1 導入	32
3.2 材料と方法	33
3.2.1 挿入タグとアフィニティーレジン	33

3.2.2 大腸菌株	33
3.2.3 細胞抽出液調製方法	34
3.2.4 細胞抽出液からの標的因子減量	34
3.2.5 鋳型 DNA と mRNA	34
3.2.6 無細胞タンパク質合成	35
3.2.7 特異的吸着および非特異的吸着確認	35
3.2.8 細胞抽出液中のタグ付きタンパク質の確認	35
3.3 結果と考察	36
3.3.1 挿入タグとアフィニティーレジンの組み合わせの検討	36
3.3.2 モデルタンパク質因子の選択	37
3.3.3 改変大腸菌の確認	38
3.3.4 PNPase 減量の効果	38
3.3.5 RecD 減量の効果	40
3.3.6 RecD と PNPase 同時減量の効果	40
3.3.7 効率化の確認	41
3.3.8 従来方法との比較	42
3.3.9 細胞抽出液調製方法の汎用性	43
図	45
 第4章 総合討論	 56
 公表論文	 63
 参考文献	 64
 謝辞	 74

第 1 章

序論

1.1 背景と目的

近年の生命科学研究は、遺伝子解析技術の進展により劇的な変化を遂げつつある。2003 年のヒトゲノム解析完了後、2007 年には第 2 世代シーケンサーが実用化され、従来の 100 倍以上の解析速度、1/100 のコストで、一度に 10 億 (1 ギガ) 塩基の解読が可能になった。現在までに 850 種を超えるゲノム解析が完了し、さらに 1600 種を超えるゲノム解析が進行中であり、ヒトの健康と病気に関わる生物や産業上有用な生物などの膨大な遺伝子情報の蓄積が進んでいる[1, 2]。ゲノム解析の次の段階であるポストゲノム研究として、これら遺伝子をもとにして作られる生体内の機能分子としてのタンパク質の解析は重要な研究課題の一つである。その研究手法も従来の小規模研究にとどまらず、体系的、網羅的な大規模研究へと広がっており、試料となるタンパク質の効率的な調製が求められている。

従来のタンパク質試料の調製には、生体からの精製や、生きた細胞を利用した合成系などが用いられてきた。生体から目的のタンパク質を精製してくる方法は、タンパク質が生体内で機能している状態、本来の形や修飾が保たれているという大きな利点がある。しかしながら、存在量が微量なために膨大な数の検体を要し、特にヒト由来のタンパク質などを扱う場合に検体の収集に倫理的問題が生じることがある。また解析を行うために有効な標識などの導入も困難である。そこで、生きた細胞に目的タンパク質の鋳型 DNA を導入してタンパク質を強制的に合成させる方法が開発された。生きた細胞による合成法では、目的のタンパク質は、それが本来発現し、機能している生体組織の細胞とは異なる細胞内で強制的に合成させるため、生体から精製した天然のタンパク質とは修飾などが異なる状態になっている可能性があるものの、様々な標識や修飾を導入したタンパク質の大量調製が可能となった。今日では、安価で大規模調製や大量調製に適した大腸菌などの原核細胞を用いた系や、翻訳後修飾などを考慮した真核細胞を用いた系などが用いられており、タンパク質を用いた研究の進展に大いに寄与している。しかしながら生きた細胞を用いた系は試料調製工

程数が多く、調製にかかる時間も長く、また鋳型に環状 DNA を必要としているため、多検体のタンパク質調製は困難である。さらに、細胞を生育させ続けることが必須のため、細胞に悪影響を及ぼすタンパク質の合成が困難である。一方、無細胞タンパク質合成法は、生きた細胞を使わず、試験管内でタンパク質を合成する方法である。無細胞タンパク質合成法では、生きた細胞からタンパク質合成に関わる因子を抽出した細胞抽出液に、鋳型となる DNA 又は RNA、転写反応の酵素、アミノ酸、エネルギー源などを加えることで、細胞抽出液中に含まれるタンパク質合成に寄与する因子を用いて目的のタンパク質を合成する方法である。様々な細胞抽出液を用いた系が開発されており、大量合成に優れた大腸菌などの原核生物の細胞抽出液を用いた系[3]、真核生物のタンパク質調製に適した小麦胚芽 [4]、昆虫培養細胞[5]、動物細胞[6]などの真核生物の細胞抽出液を用いた系などが開発されている。さらには、細胞抽出液の代わりに試験管内にタンパク質合成に関わる因子を再構築した系も開発されている[7]。生きた細胞を用いた合成と同様に、天然のタンパク質の状態とは異なっている可能性があり、また、大腸菌などによる生きた細胞を用いた合成と比べて広く普及していないが、次のような利点がある。まず試験管内で試薬を混合して合成する開いた系であるため、ロボットによる自動化が容易である。また、PCR で調製した直鎖状 DNA 鋳型を直接使用できるため、クローニング、形質転換、培養、破碎といった手間のかかる環状 DNA 鋳型調製の工程が省略できる。生きた細胞を用いないので、細胞の生育に害のある条件下でのタンパク質合成が可能であり、合成反応条件の変更等の改良が行いやすく、様々な解析のための標識や修飾も容易である。よって、無細胞タンパク質合成法はタンパク質の多検体調製に適した方法と言える。

初期の無細胞タンパク質合成法では合成できるタンパク質の収量が少なかった。無細胞タンパク質合成法の高収量化に向けた戦略として、合成反応方法、合成反応条件、合成反応槽の改良、タンパク質合成反応液の組成の改良などが行われてきた。無細胞タンパク質合成反応を長時間持続させるために、アミノ酸や ATP などの基質やエネルギー源を連続的に供給する方法として 1988 年に Spirin によるフロー法[8]が開発されたのに続き、透析法[9-11]や重層法[12]などの合成反応方法の開発が進み、様々な合成反応条件の改良も進んだ。透析法では、より使いやすくするために、初期の透析膜チューブを用いた方法から透析合成反応装置やデバイスとして Roche 社の RTS システム[13]や透析カップ[10]

14]などの開発が進み、タンパク質合成量は飛躍的に向上した。また、無細胞タンパク質合成反応液組成は、タンパク質合成反応に必要なエネルギー源として、ATP の再生方法の改良や[11, 15, 16]や解糖系の中間体物質を用いる方法[16, 17]などが試みられている。さらに、無細胞タンパク質合成法の試験管内での開いた系という特徴を生かした添加物を利用した合成反応液の改良も進んでおり、合成反応液に含まれる因子の阻害物質を用いる方法では、鋳型 DNA 分解酵素[16]、アミノ酸代謝酵素[18]、ATP 分解酵素[19]などの阻害が試みられている。また、様々な特徴を持つタンパク質を合成するために、金属結合タンパク質の合成には鉄[20]や亜鉛[21]の添加、自発的フォールディングが難しいタンパク質の改善にはシャペロンの添加[22]、膜タンパク質の合成にはミクロソーム[23, 24]や、界面活性剤とリポソーム[25, 26]、大腸菌内膜[27, 28]などを添加した改良が行われている。

その中で、無細胞タンパク質合成反応液の主成分である細胞抽出液もさまざまな改良が行われている。大腸菌の細胞抽出液を用いた系では、従来の大腸菌 K 株からタンパク質合成の宿主として主に用いられている B 株への変更や[29, 30]、様々な分解酵素や代謝酵素をコードする遺伝子を改変した大腸菌株を用いた方法として、DNA 分解酵素[31-33]、RNA 分解酵素[34-36]、タンパク質分解酵素[37]、アミノ酸代謝酵素[38]、終結因子 (RF1) [39, 40]などの改変株を用いた方法が報告されている。大腸菌培養方法の変更では、大腸菌の増殖速度を上げて 1 細胞内のリボソーム含有量を上げることで合成量を増加する方法として、大腸菌培養培地組成の変更[41]、培養温度の変更[42]、フェドバッチ法などの培養方法の変更[43]などが報告されている。また、細胞抽出液調製方法の改良として、大腸菌破碎方法の改良[30, 44]や調製工程の省略化の検討[45]も行われている。これらの改良により、最新の報告では環状 DNA 鋳型での微量透析法無細胞タンパク質合成反応で反応液 1 ml あたり 10 mg の chloramphenicol acetyltransferase (CAT)タンパク質の合成に成功している[17]。

このような進展により、現在では様々な特徴を持ったタンパク質の調製に大腸菌の細胞抽出液を用いた無細胞タンパク質合成法は用いられており[46]、タンパク質の立体構造解析に用いる NMR 構造解析試料用の安定同位体標識[47]や重水素標識、X 線構造解析試料のセレノメチオニン導入[48]の効率が改善され、ポストゲノム研究に貢献している。

遺伝子改変大腸菌株を用いた合成量改善の研究で明らかなように、大腸菌の

細胞抽出液にはタンパク質合成に寄与する多くの因子が含まれているが、同時に、タンパク質合成に悪影響を及ぼす因子も含まれており、タンパク質合成量を低下させる一因になっている。無細胞タンパク質合成反応液において、細胞抽出液以外の組成は明らかだが、細胞を破碎しただけの状態である細胞抽出液は組成に不明な部分が多い。上記の様に、様々な方法で細胞抽出液の改良が行われてきたが、細胞抽出液内の各因子を制御するまでは達していない。よって、細胞抽出液の改良の余地は大きく、さらなる無細胞タンパク質合成法の改良に繋がることを期待できる。

さて、タンパク質試料調製の効率化とはどのようなものであろうか。より短時間で、安価にタンパク質を調製することにより、全工程にかかる時間と費用の削減を達成することが効率化と考えられる。タンパク質試料調製の効率化の指標としては、高収量化、工程の短縮化、工程の自動化、そして多検体同時処理などに着目することができる。高収量化により、量の小さいスケールでのタンパク質合成が可能になり、安価な合成が可能になる。工程の短縮化は、タンパク質調製に要する時間を短縮すると共に、労力の削減と、工程数の減少による費用の削減を可能にする。工程の自動化は、ロボットなどの導入により manpower を削減するとともに、夜間などの従来作業が困難であった時間帯の有効活用ができ、最終的な所要時間の短縮を可能にする。多検体同時処理は、並行作業による所要時間の短縮を可能にする。このように、高収量化、工程の短縮化、工程の自動化、そして多検体同時処理を進めることは、タンパク質試料調製の効率化を促進する。

本研究では、無細胞タンパク質合成法を用いたタンパク質試料調製の効率化を、大腸菌の細胞抽出液の改良によって行った。まず、直鎖状 DNA をタンパク質調製の鋳型に用いることができればタンパク質調製工程の短縮と自動化および多検体処理が促進され、効率化を進められることから、直鎖状 DNA 鋳型に適した細胞抽出液調製方法の構築を目標とした。次に、細胞抽出液にはタンパク質合成に悪影響を及ぼす様々な因子が含まれることから、細胞抽出液中から任意の複数のタンパク質性因子を減量する方法を構築し、高収量なタンパク質合成を行うことを目標とした。本研究によりタンパク質調製の効率化が進むことにより、ポストゲノム研究を含むタンパク質を用いた研究がより一層進展することが期待される。

1.2 論文の構成

本論文は「無細胞タンパク質合成法の効率化へ向けた研究」と題し、4章から構成される。

第1章の「序論」では、研究の背景と目的、および論文の構成を説明する。

第2章の「直鎖状 DNA 鋳型に適した調製方法」では、無細胞タンパク質合成反応液中の DNA と mRNA の挙動を明らかにし、直鎖状 DNA 鋳型に適した細胞抽出液の簡便な調製方法を大腸菌 BL21 株の培養温度を下げることにより実現した。直鎖状 DNA 鋳型での合成タンパク質の高収量化により、多検体タンパク質試料調製を効率化した。また、従来の高温培養抽出液を用いた直鎖状 DNA 鋳型での合成量低下に関与する因子を同定した。

第3章の「細胞抽出液内の複数因子を同時に減量する調製方法」では、大腸菌ゲノム DNA 上の標的遺伝子にアフィニティータグ配列を挿入した改変大腸菌を作製し、アフィニティーレジンを用いて細胞抽出液中から標的タンパク質因子を複数同時に減量する方法を構築した。本方法の効果を検証するために、DNA 分解酵素である RecD と RNA 分解酵素である PNPase を減量させた細胞抽出液を調製し、複数因子を減量した効果を確認した。また、タンパク質合成の高収量化によるタンパク質試料調製の効率化を確認した。

第4章の「総合討論」は研究成果をまとめ、本論文で構築した細胞抽出液の改良方法を、従来の大腸菌無細胞タンパク質合成法の改良方法、他の無細胞タンパク質合成法、生細胞を用いた合成方法、及び生体試料からの精製法と比較したうえで、今後の課題や展望などについても考察している。

第 2 章

直鎖状 DNA 鋳型に適した調製方法

2.1 導入

無細胞タンパク質試料調製の鋳型に用いられる DNA の形には環状と直鎖状の 2 種類がある。環状 DNA の調製には大腸菌などの生きた細胞が用いられており、その調製工程は、(i) 目的タンパク質の遺伝子を含む鋳型 DNA の環状化、(ii) 環状 DNA の細胞への導入、(iii) 細胞培養による環状 DNA の増幅、(iv) 細胞破碎による環状 DNA の回収、という多段階からなり、数日間を要する工程である。また、無細胞タンパク質合成反応には精製度の高い鋳型を要することも多いため[49]、多検体の環状 DNA の調製は煩雑な作業となっている。さらに、鋳型 DNA の中には細胞の生育に有害な配列を含むものがあり、そのような配列の環状 DNA を細胞内で増幅して調製するのも困難を伴うことが多い。

一方、直鎖状 DNA の調製は PCR 法を用いた試験管内での増幅が可能であり、調製工程は数時間のために環状 DNA に比べて圧倒的に短い。Yabuki らの改良による two-step PCR 法[50]を用いると、従来は目的タンパク質ごとの最適条件の探索が必要だった直鎖状 DNA の増幅が同一条件で可能となり、多検体の直鎖状 DNA の同時調製や、ロボットを用いた作業の自動化が容易になった。生きた細胞を使用しない試験管内調製のため、上記の生きた細胞内での増幅が難しい鋳型 DNA の調製も可能である。従って、多検体のタンパク質試料調製の鋳型 DNA としては、直鎖状 DNA は作業工程の短縮と自動化などで効率化を進めることが可能であり、環状 DNA よりも適している。

DNA の安定性の観点からは、直鎖状 DNA は DNA 分解酵素、特に DNA を末端から削るように分解するエキソヌクレアーゼに対する耐性が低く、環状 DNA に比べて不安定である。生きた細胞を用いたタンパク質合成系は、細胞が増殖する過程の細胞内の転写翻訳機構を利用して鋳型 DNA からタンパク質を合成する方法であり、自己複製能力以外にも細胞内に存在する様々な DNA 分解酵素に対する耐性から、分解されにくい環状 DNA が鋳型として用いられており、直鎖状 DNA を用いることは難しい。一方、無細胞タンパク質合成法は試験管内で鋳型 DNA を転写・翻訳させてタンパク質を合成するため、環状 DNA だけで

なく直鎖状 DNA をタンパク質合成の鋳型に用いることが可能である。しかしながら、従来の無細胞タンパク質合成法では、直鎖状 DNA 鋳型におけるタンパク質の合成量が環状 DNA を用いた時に比べて低く、特に反応が長時間にわたる透析法などの合成においてその差は顕著であった。タンパク質合成量の増加は、タンパク質合成反応スケールの縮小化を可能にし、序論で述べた様に、タンパク質合成の効率化に繋げることができる。さらに、効率的な鋳型 DNA の調製には直鎖状 DNA が適していることをふまえると、直鎖状 DNA 鋳型を用いたタンパク質合成量の高収量化は、効率化の側面から重要な改良と言える。

そこで、直鎖状 DNA 鋳型に適した無細胞タンパク質合成法のいくつかの改良が行われてきた。DNA または RNA 分解酵素が変異した遺伝子改変大腸菌株から調製した細胞抽出液を用いる方法[31-36]、DNA 分解酵素の阻害物質を用いて活性を抑制する方法[16]、直鎖状 DNA 鋳型標的因子による分解耐性を配列の改変や修飾によって上げる方法[35, 51-53]などの報告がある。大腸菌の変異株を用いる方法では、大腸菌 K 株の DNA 分解酵素 RecBCD の様々な変異株を用いた改良が試みられている[31-33]。初期の変異株は DNA 分解活性低下に伴い上昇する細胞抽出液中の内在性 DNA によって目的タンパク質の合成量が低下してしまうという問題点があった[32]。改良が進み、細胞抽出液の直鎖状 DNA 分解活性を低下させて鋳型 DNA の寿命を 1 時間まで伸ばし、タンパク質合成反応時間が伸びることによるタンパク質合成量の増加に成功した[33]。ただし、透析法などの長時間反応のためには更なる改良の余地がある。RNA 分解酵素遺伝子の変異株を用いる方法では、市販されている大腸菌 B 株の RNA 分解酵素 RNase E 変異株 BL21 Star (DE3) (Invitrogen)を用いて、mRNA の分解活性の低下によるタンパク質合成量増加を実現しており、鋳型配列の改良と併用することにより、より高い合成量を実現している[34-36]。BL21 Star (DE3)株は特許によりその使用に制限がある点を除けば、入手が容易であることも含めて利点は大きい。DNA 分解酵素の阻害物質を添加する方法では、RecBCD の阻害効果がある λ Gam タンパク質を添加する方法が報告されており、直鎖状 DNA 鋳型での CAT タンパク質の合成量を 2-3 倍に改善している[16]。この方法は λ Gam を無細胞タンパク質合成反応液に添加するだけであり、簡便で有効な方法と言える。ただし、阻害物質が見つからない DNA 分解酵素については、変異株などその他の方法を試みる必要性が述べられている[16]。直鎖状鋳型 DNA の配列を改変する方法は、鋳型調製時の PCR に用いるプライマーの変更だけで導入可能な方

法であり、容易でかつ安価に対応可能な手法である。ただし、一つの改良では分解抑制が不十分な場合や、反応液への大量添加を要するなど[52]、改良の余地が残っている。

この様に直鎖状 DNA 鋳型での無細胞タンパク質合成量を上げるための様々な改良が進められてきたが、より簡便な方法で、透析法などにおいて長時間タンパク質合成が持続できるように無細胞タンパク質合成法を改良することは、効率的にタンパク質試料の収量を上げるために有効である。また、そのアプローチとして、序論に述べたように細胞抽出液の改良を行うことは有効な方法であると思われる。

以上より、本章では、効率的な多検体のタンパク質試料調製を行うために、効率的な鋳型調製を行うことができる直鎖状 DNA を鋳型に用いた無細胞タンパク質合成法におけるタンパク質合成量の増加を、細胞抽出液調製方法の簡便な改良によって実現した。その過程において、無細胞タンパク質合成反応液中の直鎖状 DNA および mRNA の挙動を簡便に測定する手法も構築し、直鎖状 DNA 鋳型における合成量低下に関与する因子を同定した。また、得られた細胞抽出液を用いた直鎖状 DNA 鋳型でのタンパク質合成における効率化についての考察を行った。

2.2 材料と方法

2.2.1 大腸菌株

無細胞タンパク質合成に用いる細胞抽出液調製用大腸菌として BL21 株 (Novagen), RNase E 活性の低い変異株 (*rne 131*) として BL21 Star (DE3) 株 (Invitrogen) を用いた。改変大腸菌 RecD-SBP 株は、BL21 株の *recD* 遺伝子 3' 末端に Streptavidin binding protein (SBP) タグ [54] (GGSGGSGGSGMDEKTTGWRGGHVVEGLAGELEQLRARLEHHPQGQREP DHH) をコードした遺伝子を、Red/ET Recombination の手法[55]を用いて挿入し作成した。Red/ET Recombination は相同組換えを用いた組換え方法であり、組換え用のカセットには以下の DNA 配列を用いた：

```
5'-ctcgtagtgagcggcgagtggtctggcggtgtgttagttcacgggaaggcggtagcggcggttcagg  
cggttctggtATGGATGAAAAACGACTGGTTGGCGTGGTGGTCATGTTGTT  
GAAGGTCTGGCCGGTGAAGTGGAGCAACTGCGTGCCCGTTTAGAACACC  
ATCCGCAGGGTCAGCGTGAACCGGACCATCACTaataattgatacgttaattgtcgg
```

gatgcgacgcacgagtgttacgcatgtcgcatccgcg-3' (小文字：homology arms [55], 下線：リンカー配列, 大文字：SBP タグ配列, 太文字：連続停止コドン). 組換え用カセット遺伝子を挿入した BL21 株の選択には 7~15% (w/v) のスクロースを含む LB 培地を用いた.

2.2.2 細胞抽出液調製方法

無細胞タンパク質合成に用いる大腸菌細胞抽出液の調製は Kigawa らの方法 [30]で行った. ただし, 大腸菌の培養温度は実験内容により 20, 23, 26, 30, 32, 34, および 37°Cに変更した. またレジンは処理済み細胞抽出液として, 細胞抽出液に Streptavidin Sepharose High Performance (SA-SHP) レジン (GE Healthcare Biosciences) を用いて以下のとおりの追加処理を施した. 細胞抽出液 1 ml に S30 バッファー (14 mM Mg(OAc)₂, 60 mM KOAc, 10 mM Tris-acetate, pH 8.2) で平衡化した SA-SHP レジン 200 µl を混合し, 4°Cで 1 時間回転震盪後, 10,000 x g で 5 分間遠心し, 上清を採取してレジンは処理済み細胞抽出液とした.

2.2.3 鋳型 DNA と mRNA

合成されたタンパク質収量の確認を簡便に行うために, 蛍光強度が強く, 発色団の形成が速い特性を持たせた蛍光タンパク質 GFP の改変体 GFPS1 (F46L, S65T, F99S, M153T, V163A, Y200C) を作成した (図 2.1). GFPS1 はオワンクラゲの GFP 遺伝子のコドンが大腸菌のコドンに最適化され, また UV 光で励起したときに最大の蛍光を発するように変異体 GFPuv (F99S, M153T, V163A) (Clontech) を元に, QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) を用いて作製した. GFPS1 には蛍光強度を上げ, 発色団の形成が速め, また蛍光を長波長側に変える変異 (F46L, S65T), および開始コドンの次に挿入することで合成量を上げる遺伝子配列(AAA)が挿入されている. なお, この挿入により, GFPS1 のアミノ酸配列は GFP および GFPuv と 1 アミノ酸分ずれるが, 便宜上, 上記の GFPS1 の変異を示すアミノ酸の番号は, GFP および GFPuv のアミノ酸配列の番号に合わせて表記してある. GFPS1 をコードする遺伝子の 5'末端側に T7 プロモーター部位とリボソーム結合部位, 3'末端側に T7 ターミネーターを PCR により接続し, pCR2.1-TOPO ベクター (Invitrogen) にクローニングして, 環状 DNA 鋳型 pGFPS1 とした.

CAT タンパク質合成の環状 DNA 鋳型には pk7-CAT[44]を用いた.

全ての環状 DNA は Wizard Plus Midipreps DNA Purification System Kit (Promega) を用いて pre-wash buffer (40% 1-propanol/4.2M guanidine-HCl) の追加洗浄を通常の洗浄作業の前に追加して調製した.

直鎖状 DNA 鋳型は pGFPS1 および pk7-CAT から PCR により増幅し, 精製を行わずに直接使用した. mRNA の調製には MEGAscript T7 kit (Ambion) を用いた.

2.2.4 無細胞タンパク質合成

無細胞タンパク質合成方法は Kigawa および Matsuda らの方法[21, 30]に従った. タンパク質合成反応液の組成は, 55 mM Hepes-KOH (pH 7.5), 1.7 mM DTT, 1.2 mM ATP, 各 0.8 mM CTP, GTP および UTP, 80 mM creatine phosphate (Roche), 250 µg/ml creatine kinase, 4 % PEG 8000 (Sigma), 0.64 mM 3', 5'-cyclic AMP, 68 µM L(-)-5-formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolic acid, 175 µg/ml *E. coli* total tRNA (Roche), 210 mM potassium L-glutamate (Sigma), 27.5 mM ammonium acetate, 10.7 mM magnesium acetate, 各 1.5 mM の 20 種類のアミノ酸, 0.05 % NaN_3 , 66 µg/ml T7 RNA polymerase, 0.3 容積の細胞抽出液である. DNA 鋳型の合成には環状又は直鎖状 DNA を 2 µg/ml 用いた. mRNA 鋳型の合成には mRNA を 100 µg/ml 用い, T7 RNA polymerase のかわりに Milli-Q 水を加えた.

直鎖状および環状 DNA 鋳型による合成は, Matsuda らにより改良された, 透析内液 30 µl, 透析外液 300 µl の 30-300 µl スケールの微量透析法[14]にて 30°C で 8 又は 16 時間行った. mRNA 鋳型による合成はバッチ法にて 30°C で 2 時間行った.

CAT タンパク質の合成量は, Shaw らの方法[56]に従い換算した. まず acetyl-coenzyme A と chloramphenicol を基質として CAT によるアセチル化反応を行い, 生じた還元型 coenzyme A を 5, 5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) を用いて発色定量した. 30°C, 405 nm における吸光度の単位時間での増加量から, モル吸光係数 (11288/units/cm/min), 比活性 (150 units/µg) の値を用いて CAT タンパク質量に換算した.

GFPS1 タンパク質の合成量は GFPS1 の蛍光値で示した. 合成液を PBS バッファー (8.1 mM Na_2HPO_4 , 1.47 mM KH_2PO_4 , 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl)

で希釈後，蛍光プレートリーダーARVO（PerkinElmer）または EnVision（PerkinElmer）を用いて励起 485 nm，蛍光 507 nm で測定した。

2.2.5 直鎖状 DNA 分解活性測定

細胞抽出液の直鎖状 DNA 分解活性の測定には，蛍光標識した DNA (FL-DNA) を用いた。FL-DNA は Fluorescein Labeling Mix Kit（Roche）を用いて Fluorescein-dUTP を PCR により取り込ませて調製した。終量 20 μ l の反応バッファー（10mM ATP, 9.28 mM Mg(OAc)₂, 58 mM Hepes-KOH, pH 7.5）に細胞抽出液 6 μ l, FL-DNA 600 ng を混合し，30°C で 30 分間反応後，分解された FL-DNA を GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Biosciences) を用いて精製し，50 bp 以上の残留 FL-DNA を回収した。残留 FL-DNA は TE 緩衝液で希釈後，蛍光プレートリーダーARVO または EnVision を用いて励起 485 nm，蛍光 507 nm で測定し，初期量に対する割合（%）で残存量を提示した。

2.2.6 無細胞タンパク質合成反応液中の DNA の検出

無細胞タンパク質合成反応液中に存在する鋳型 DNA 量の確認は，直鎖状 FL-DNA 又は環状 DNA を鋳型として用いた微量透析法の無細胞タンパク質合成反応液中に残っている DNA を，GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit で精製回収し，以下の方法で残留量を検出して行った。FL-DNA は TE 緩衝液で希釈後，蛍光プレートリーダーARVO および EnVision を用いて励起 485 nm，蛍光 507 nm で測定し，初期量に対する割合（%）で残存量を提示した。環状 DNA はサザンハイブリダイゼーション法を用いて確認した。使用したプローブは pGFPS1 を鋳型に GFPS1 配列の 3'側領域を PCR DIG Labeling Mix（Roche）を用いて PCR で調製した。プライマーには次の配列を使用した：5'-CTTATGGTGTTC AATGCTTTTCCCG-3'，5'-AAGCTTGCTAGCGGCGCTCAGTTGGA-3'。アガロースゲル電気泳動にて分離後，ナイロンメンブレン Hybond-N+（GE Healthcare Biosciences）にブロッティングし，Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments (Roche) と CDP-*Star* Detection Reagent (GE Healthcare Biosciences) で発光し，LAS-3000 ルミノ・イメージアナライザー（FUJIFILM）で検出した。

2.2.7 mRNA 分解活性測定

細胞抽出液の mRNA 分解活性の測定には、蛍光標識した mRNA (FL-mRNA) を用いた。mRNA の蛍光標識は MEGAscript T7 kit を用いて ChromaTide Alexa Fluor 546-14-UTP (Molecular Probes) を取り込ませることで行った。FL-mRNA を鋳型としてバッチ法の無細胞タンパク質合成を 30°C で 30 分間行い、無細胞合成反応液中に残っている FL-mRNA を RNeasy MinElute Cleanup Kit (QIAGEN) で精製して回収した。アガロース電気泳動にて分離後、LAS-3000 を用いて泳動像を撮影し、残った全長の FL-mRNA 量を画像解析ソフト Image Gauge (FUJIFILM) にて定量した。

2.2.8 無細胞タンパク質合成反応中の mRNA の挙動確認

無細胞タンパク質合成反応中の mRNA の挙動は、無細胞タンパク質反応液に蛍光標識 UTP を混合してタンパク質合成反応を行い、転写合成された蛍光標識 mRNA 量で確認した。非標識 UTP 量の 1% 分の ChromaTide Alexa Fluor 546-14-UTP を無細胞タンパク質合成反応液に混合し、DNA 鋳型の微量透析法の無細胞タンパク質合成を 30°C で行った。タンパク質合成反応を RNeasy MinElute Cleanup Kit のグアニジン溶液を用いて一定時間ごとに停止させ、精製した。合成された蛍光標識 mRNA 量の経時変化は蛍光プレートリーダー EnVision を用いて励起 544 nm、蛍光 590 nm で測定した。

2.2.9 細胞抽出液中に含まれるタンパク質の定量

細胞抽出液中に含まれるタンパク質の定量は Bio-Rad Protein Assay kit (Bio-Rad) を用いて Bradford 法により行った。標準タンパク質としては牛血清アルブミン (BSA) を用いた。

2.3 結果と考察

2.3.1 無細胞タンパク質合成反応中の DNA と mRNA の挙動

従来の 37°C で培養した大腸菌から調製した細胞抽出液を用いた無細胞タンパク質合成反応では、直鎖状 DNA 鋳型で合成されたタンパク質量が、環状 DNA 鋳型を用いた合成量にくらべて低かった。鋳型 DNA の形状の違いによりタンパク質の合成量が異なる原因を探るため、無細胞タンパク質合成反応液中の環状 DNA と直鎖状 DNA の挙動、および DNA からの転写産物である mRNA の挙動

を把握することは重要と思われる。そこで、最初に無細胞タンパク質合成反応液中の直鎖状 DNA および mRNA 量の簡便な測定方法を構築した。

従来は、無細胞タンパク質合成反応液中の鋳型 DNA および mRNA 量の確認にはサザンハイブリダイゼーション法およびノーザンハイブリダイゼーション法が用いられてきた。これらの手法は、(i) 反応液中に含まれる DNA または mRNA の精製、(ii) 電気泳動による分離、(iii) メンブレンへの転写、(iv) プローブとのハイブリダイゼーション、(v) 検出、という多段階からなるため、確認までの作業時間が長く、また多検体の処理が難しい方法である。そこで簡便に測定するために、蛍光標識された dUTP および UTP を用いた検出方法を構築した。使用する蛍光色素は、標識した鋳型を用いたタンパク質の合成量や標識鋳型の分解パターンが、非標識鋳型に近い挙動を示すものを選択した。また、DNA と mRNA の同時に解析するために、dUTP と UTP では異なる波長のものので標識することにした。Fluorescein は励起波長 495 nm、蛍光波長 525 nm であり、蛍光標識された直鎖状 DNA (FL-DNA) を鋳型にした無細胞タンパク質合成では、非標識直鎖状 DNA 鋳型と同等のタンパク質合成量を得られた。また、無細胞タンパク質合成反応液中の FL-DNA の分解パターンは、サザンハイブリダイゼーション法で確認した非標識直鎖状 DNA 鋳型と同等だった(データ非表示)。ChromaTide Alexa Fluor 546 は励起波長 555 nm、蛍光波長 570 nm であり、Fluorescein と異なる波長である。mRNA の標識率は、MEGAscript T7 kit による mRNA 合成反応液に加えた Alexa Fluor 546-14-UTP と非標識 UTP の混合率とほぼ一致した。標識率の上昇に伴い無細胞タンパク質合成量は低下したが、4%以下の標識率ではタンパク質合成量の低下は少なく、非標識 mRNA に近い合成量を得られた。また、4%標識における無細胞タンパク質合成反応液中の分解パターンは、ノーザンハイブリダイゼーション法で確認した非標識 mRNA の消失パターンと同等だった(データ非表示)。

無細胞タンパク質合成反応液中の環状 DNA の挙動は、微量透析法の無細胞タンパク質合成反応液中に残っている鋳型 pGFPS1 量の変化をサザンハイブリダイゼーション法にて検出して確認した(図 2.2)。合成開始から 16 時間の pGFPS1 量に変化は少なく、環状 DNA 鋳型は分解していないことが確認できた。直鎖状 DNA 鋳型の挙動は、微量透析法における GFPS1 の直鎖状 FL-DNA 量の変化を蛍光測定で確認した(図 2.3)。合成開始後約 4 時間で FL-DNA 量は 20 %まで減少しており、無細胞タンパク質合成反応液には直鎖状 DNA 分解活性があるこ

とが確認できた。それぞれの鋳型を用いたときの無細胞タンパク質合成反応液中の mRNA の挙動は、1%の ChromaTide Alexa Fluor 546-14-UTP を加えた微量透析法の無細胞タンパク質合成において転写された FL-mRNA 量の変化を蛍光測定で確認した (図 2.4)。どちらの鋳型でも合成反応開始後すぐに FL-mRNA が合成され、時間経過に伴い減少することが確認できた。直鎖状 DNA 鋳型を用いたときの FL-mRNA は、直鎖状 DNA 鋳型が消失する合成開始後約 4 時間で同様に消失している。一方、分解の少ない環状 DNA 鋳型を用いたときの FL-mRNA は長時間 FL-mRNA が存在していることが確認できた。よって、無細胞タンパク質合成反応液には mRNA 分解活性があり、mRNA 残留量には鋳型 DNA 残留量が影響していることが明らかになった。

以上より、細胞抽出液中には直鎖状 DNA および mRNA を分解する因子が存在するが、環状 DNA を分解する因子はほとんど存在していない。異なる形状の鋳型 DNA を用いた時の無細胞タンパク質合成量の違いは、DNA 鋳型の残留量の違いと、それから転写される mRNA の存在量の違いに起因することが示唆された。

2.3.2 大腸菌培養温度と無細胞タンパク質合成量

大腸菌は細胞培養条件により細胞内の状態が変化し、得られる細胞抽出液の性質が異なってくる。培養条件を制御することで、無細胞タンパク質合成により適した細胞抽出液が得られる可能性があり、培地、培養時間、培養温度、培養方法などの条件を変えた方法が検討されている。Yamane [42]や Swartz[43]らの報告によると、培養温度を上げるなどの方法により細胞増殖速度を上げると、大腸菌 1 細胞あたりのリボソーム量が増加し、調製した細胞抽出液中のリボソーム量の増加により、無細胞タンパク質合成量を上げることが可能である。そこで、培養温度を 20, 23, 26, 30, 32, 34, および 37°C に変えて調製した細胞抽出液を用いて、環状 DNA 鋳型と直鎖状 DNA 鋳型におけるタンパク質合成量の変化を、微量透析法による 30°C, 16 時間反応の CAT タンパク質合成で確認した (図 2.5)。

環状 DNA 鋳型を用いた微量透析法による CAT タンパク質の無細胞合成では (図 2.5, ●), 細胞抽出液調製時の大腸菌培養温度の上昇に伴い CAT の合成量が増加し、37°C 培養の細胞抽出液では無細胞タンパク質合成反応液 1ml あたり約 6 mg の CAT が得られることが確認できた。細胞培養の温度上昇に伴い BL21

株の細胞増殖速度も上昇することから（データ非表示），この結果は上記の細胞増殖速度の上昇に伴う細胞抽出液中のリボソーム量の増加による効果が含まれると推測できる．一方，直鎖状 DNA 鋳型では（図 2.5, □），大腸菌培養温度 20°C から 30°C の間は温度の上昇に伴い CAT 合成量が増加し，30°C では 1 ml あたり約 4 mg の CAT が合成された．しかし培養温度が 30°C 以上では CAT 合成量が急激に低下し，従来の細胞培養温度である 37°C においては約 1 mg しか合成できないことが確認できた．よって，培養温度 30°C 以上の細胞抽出液中には，環状 DNA 鋳型のタンパク質合成には関与しないが，直鎖状 DNA 鋳型のタンパク質合成において合成量を低下させる何らかの因子が関与していることが示唆された．

以上より，細胞抽出液調製時の大腸菌培養温度を，従来の 37°C から 30°C 以下の低温に移行させることにより，直鎖状 DNA 鋳型での微量透析法無細胞タンパク質合成において，従来の細胞抽出液の約 4 倍，環状 DNA 鋳型と比べて約 75% のタンパク質合成が可能になることが明らかになり，直鎖状 DNA 鋳型における無細胞タンパク質合成量の増加を実現した．ここで，本現象を理解するために，30°C 以上で培養した細胞抽出液内に含まれる直鎖状 DNA 鋳型におけるタンパク質合成量の低下に関与している因子を確認することにした．

2.3.3 培養温度が mRNA 鋳型タンパク質合成に与える影響

タンパク質合成の反応は大きく分けると，（１）鋳型 DNA から mRNA の転写，（２）mRNA からタンパク質の翻訳，の 2 段階からなる．タンパク質合成量の低下には，（１）では鋳型 DNA を分解する因子と転写反応を阻害する因子，（２）では mRNA を分解する因子，翻訳反応を阻害する因子，合成されたタンパク質を分解する因子などが関わっている．多数の因子が関与しているため，大腸菌高温培養の細胞抽出液において直鎖状 DNA 鋳型を用いた無細胞タンパク質合成量を低下させている因子の特定を，段階的に行った．まず，タンパク質合成反応の下流である（２）の mRNA からタンパク質の翻訳に関与する因子の確認を行った．

mRNA 鋳型の無細胞タンパク質合成液中の（A）mRNA 残留量と（B）タンパク質合成量を比べると，mRNA を分解する因子が関与する場合は（A）に差が現れ，翻訳反応を阻害する因子および生成されたタンパク質を分解する因子が関与する場合は（A）の変化が少ない状態でも（B）に差が現れると推測され

る。そこで、BL21 株および RNase E の変異 (*rne 131*) で mRNA 分解が遅い BL21 Star (DE3) 株を 30°C および 37°C で培養した細胞抽出液を用いて、蛍光標識した GFPS1 の FL-mRNA を鋳型にした反応温度 30°C のバッチ法の無細胞タンパク質合成反応を行い (図 2.6), (A) 反応開始 30 分後の FL-mRNA 残留量と, (B) 反応開始 2 時間後の GFPS1 合成量を比較した。BL21 株の (A) FL-mRNA 残留量, (B) GFPS1 合成量はともに培養温度が異なる細胞抽出液において大きな差は見られなかった。一方 mRNA 分解活性の低い BL21 Star (DE3) 株から調製した細胞抽出液は、培養温度の違いによる FL-mRNA 残留量と GFPS1 合成量の差は同様に少ないが、BL21 株と比べて (A) の残留 mRNA 量, (B) の合成された GFPS1 量が共に多かった。よって、BL21 株の細胞抽出液は、BL21 Star (DE3) 株の細胞抽出液と比べると mRNA の分解活性が高いが、培養温度の違いによる mRNA 分解、翻訳反応阻害、および合成されたタンパク質の分解の差が小さいことが明らかになった。以上より、今回の高温培養で調製した細胞抽出液を用いた時の直鎖状 DNA 鋳型を用いた無細胞タンパク質合成量の低下には、タンパク質合成反応の下流である (2) の mRNA からタンパク質の翻訳反応においてタンパク質合成量を低下させる因子はあまり関与しないことが明らかになった。

2.3.4 菌培養温度が直鎖状 DNA 分解活性に与える影響

タンパク質合成反応の上流である (1) の鋳型 DNA から mRNA の転写に関与する因子の確認には、異なる培養温度で調製した細胞抽出液の直鎖状 DNA 分解活性を比較した (図 2.7)。大腸菌 BL21 株を培養温度 20, 23, 26, 30, 32, 34, および 37°C で増殖して調製した細胞抽出液では、大腸菌の培養温度上昇に伴い直鎖状 DNA 分解活性が上昇する事が明らかになった。37°C 培養の細胞抽出液では、30°C 培養の 2 倍近い直鎖状 DNA が分解された。さらに、FL-DNA 鋳型を用いた微量透析法の GFPS1 無細胞タンパク質合成反応液中の、FL-DNA 残留量と GFPS1 合成量の経時変化を確認した (図 2.8)。37°C 培養細胞抽出液は直鎖状 DNA 分解活性が高く FL-DNA は約 4 時間で消失し (A)、GFPS1 の合成は反応開始 2 時間後に停止した (B)。一方、30°C 培養細胞抽出液では直鎖状 DNA 分解活性が低く FL-DNA は 37°C 培養細胞抽出液よりも長時間残留し、GFPS1 の合成も反応開始から 8 時間近くまで持続した。よって、細胞抽出液の直鎖状 DNA 鋳型の分解活性はタンパク質合成量に大いに関与していることが

明らかになった。

以上および前項から、図 2.5 における直鎖状 DNA 鋳型を用いたタンパク質合成量の低下には、主に高温培養の細胞抽出液に含まれる、直鎖状 DNA を分解する因子が関与していることが示唆された。

なお、図 2.5 では培養温度が 30°C 以上の細胞抽出液において環状 DNA 鋳型での CAT 合成量は増加している。よって、培養温度が 30°C 以上の直鎖状 DNA 鋳型のタンパク質合成反応の律速要因は、鋳型 DNA の分解・減少に伴う mRNA の転写量低下と思われる。一方、培養温度が 30°C 以下の細胞抽出液では培養温度の低下に伴い環状 DNA 鋳型での合成量が低下していることから、低温培養での大腸菌の細胞増殖速度低下に伴うリボソーム量減少による翻訳活性低下がタンパク質合成反応の律速要因になっていると思われる。

2.3.5 直鎖状 DNA 分解への RecD の関与

高温培養細胞抽出液に含まれる因子の中で直鎖状 DNA 鋳型でのタンパク質合成量低下に関与しているのは、前項より、主に直鎖状 DNA を分解する因子であることが明らかになった。大腸菌の無細胞タンパク質合成反応における直鎖状 DNA 鋳型の分解には、主に Exonuclease V が関与していることが報告されている[31-33]。Exonuclease V は 3 つのサブユニット、RecB, RecC, RecD から構成されており、RecB と RecD のヘリケース活性を用いて DNA の 2 本鎖を 1 本鎖に解きながら末端から DNA を分解する。RecD は RecB よりも速く 2 本鎖を解くことから、RecD への変異導入または RecD をコードする遺伝子を欠失した大腸菌変異株は RecB 変異変異株よりも Exonuclease V による DNA 分解速度が低下することが報告されている[57]。そこで、直鎖状 DNA 分解への RecD の関与を確認することにした。

RecD の関与は、通常の細胞抽出液と RecD を除去した細胞抽出液との比較で確認した。細胞抽出液の RecD 以外の状態を同等に保つために、BL21 株の細胞抽出液から RecD だけを細胞抽出液が劣化しない条件で取り除くことにした。RecD の除去方法には、穏やかかつ迅速に除去できる、アフィニティータグとアフィニティーレジンで分離する手法を用いることにした。この手法には、除去する RecD にアフィニティータグが付加されていることが必要なため、BL21 株の RecD をコードする遺伝子の 3'側に SBP タグ配列の遺伝子を挿入し、RecD の C 末が SBP に融合している改変大腸菌を作成して用いた。この改変大腸菌

RecD-SBP 株の 30℃および 37℃における細胞培養増殖速度は BL21 株と同等であった (図 2.9)。また、RecD-SBP 株を 30℃および 37℃で培養して調製した細胞抽出液は、直鎖状 DNA 分解活性 (図 2.10 A, 黒棒: レジン精製前) および直鎖状 DNA 鋳型を用いた 30℃反応の微量透析法の無細胞タンパク質合成量 (図 2.10 B, 黒棒: レジン精製前) とともに BL21 株の細胞抽出液と同等である。よって、RecD-SBP 株は BL21 株と同様の性質を保持していると思われる。

RecD-SBP 株の細胞抽出液から 20%の SA-SHP レジン処理にて RecD-SBP を除去した細胞抽出液を用いると、直鎖状 DNA 分解活性 (図 2.10 A, 白棒: レジン精製後) および直鎖状 DNA 鋳型を用いた 30℃反応の微量透析法の無細胞タンパク質合成量 (図 2.10 B, 白棒: レジン精製後) が大幅に改善された。特に 37℃培養の細胞抽出液ではレジン処理前と比べて処理後の改善が顕著であった。RecD が除去されない BL21 株の細胞抽出液ではレジン処理による改善は見られなかったことから、高温培養で調製された細胞抽出液における直鎖状 DNA 分解には RecD が関与していることが明らかになった。低温培養で調製された細胞抽出液において直鎖状 DNA 鋳型での無細胞タンパク質合成量が増加するのは、低温培養時の大腸菌内の RecD 発現量が低く、得られた細胞抽出液中の RecD 量が少ないことに起因していると思われる。また、今回用いた細胞抽出液中から RecD を除去する方法は、細胞抽出液の改良に有効な手段であることも明らかになった。

2.3.6 直鎖状 DNA 鋳型を用いた効率化

多検体のタンパク質試料調製の鋳型として直鎖状 DNA を用いると、鋳型調製工程において効率化が促進される。環状 DNA の調製作業が複数日にわたる多段階からなるのに比べ、直鎖状 DNA は two-step PCR 法[50]により 2 段階の調製作業を数時間行えるため、大幅な工程の短縮化が可能である。さらに、生きた細胞を用いない試験管内での調製のため、ロボットを用いた自動化による多検体処理も容易であり、工程の自動化も容易である。

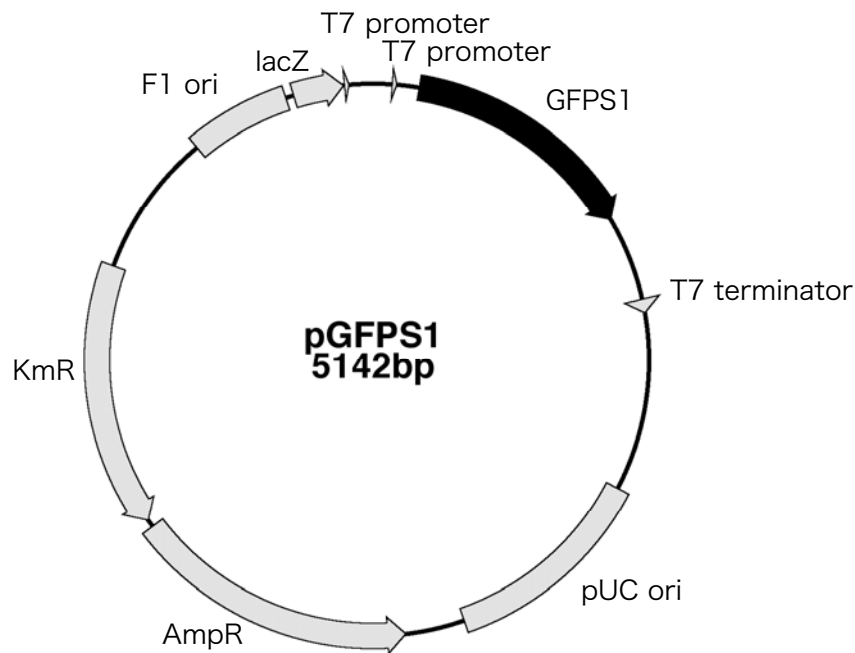
本方法を用いた直鎖状 DNA 鋳型での無細胞タンパク質合成が、実用に足りうる合成量に達したことにより、直鎖状 DNA 鋳型を用いた効率的なタンパク質試料調製の実用化が進められている。理化学研究所の青木らは、two-step PCR 法による直鎖状 DNA 鋳型の調製からバッチ法による無細胞タンパク質合成と確認までの工程を 1 台のロボットで行う完全自動化を実現しており、768 種類の

タンパク質試料の同時調製を可能にしている。夜間の稼働を含めた効率的な試料調製を可能であり、理化学研究所生命分子システム基盤研究領域の NMR パイプライン高度化研究チームによって構築された無細胞タンパク質合成法を用いた立体構造解析パイプラインでの多数のタンパク質試料の調製に用いられている。

本章では、細胞抽出液調製工程における大腸菌の培養温度を従来の 37°C から 30°C 以下に低温化することにより、直鎖状 DNA の分解を抑え、直鎖状 DNA 鋳型に適した細胞抽出液を調製する方法を実現化した。さらに、直鎖状 DNA 分解の要因を解析し、低温培養で調製した細胞抽出液内の RecD 量の低下が、その要因であることを同定した。本方法は、従来の直鎖状 DNA 鋳型を用いた細胞抽出液の改良方法[31-36]と比べると、培養温度を下げるだけという単純で簡単な方法であり、改良のための追加技術、設備、試薬消耗品等を必要とせず、導入が容易な方法である。しかしながら、30°C で培養した細胞抽出液を用いた直鎖状 DNA 鋳型のタンパク質合成では鋳型分解活性が低く、合成反応も約 8 時間持続し、従来の 37°C で培養した細胞抽出液を用いた時の 2~3 倍量のタンパク質合成量増加を実現し、CAT タンパク質の合成量は約 4.1 mg/ml に達している。これは現時点で報告されている直鎖状 DNA 鋳型での無細胞タンパク質法では最大の合成量である。

以上より、本研究においてタンパク質試料の多検体調製の効率化を推進できた。また、本方法は直鎖状 DNA 鋳型を用いた無細胞タンパク質合成の高収量化を簡便で容易に実現できる方法であり、広く用いられうる細胞抽出液調製方法と言えるだろう。

A



B

5'-ATGAAAAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTTGAATTA
 GATGGTGATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTCAAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCA
 ACATACGGAAAACCTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACCTGTTCCATG
 GCCAACACTTGTCACTACTTTGACTTATGGTGTTCAATGCTTTTCCCGTTATCCGGATC
 ACATGAAACGGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAGGAAC
 GCACTATATCTTTCAAAGATGACGGGAAC TACAAGACGCGTGCTGAAGTCAAGTTTGA
 AGGTGATACCCTTGTTAATCGTATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGAA
 ACATTCTCGGACACAAACTCGAGTACAAC TATAACTCACACAATGTATACATCACGGC
 AGACAAACAAAAGAATGGAATCAAAGCTAACTTCAA AATTCGCCACAACATTGAAGAT
 GGTTCCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAACAAA AACTCCAATTGGCGATGGCCCTG
 TCCTTTTACCAGACAACCATTGCCTGTGACACAATCTGCCCTTTCGAAAGATCCCAA
 CGAAAAGCGTGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTTGTA ACTGCTGCTGGGATTACACAT
 GGCATGGATGAGCTCTACAAA-3'

図 2.1 pGFPS1 の構造と配列

A : pGFPS1 の構造, B : GFPS1 の塩基配列

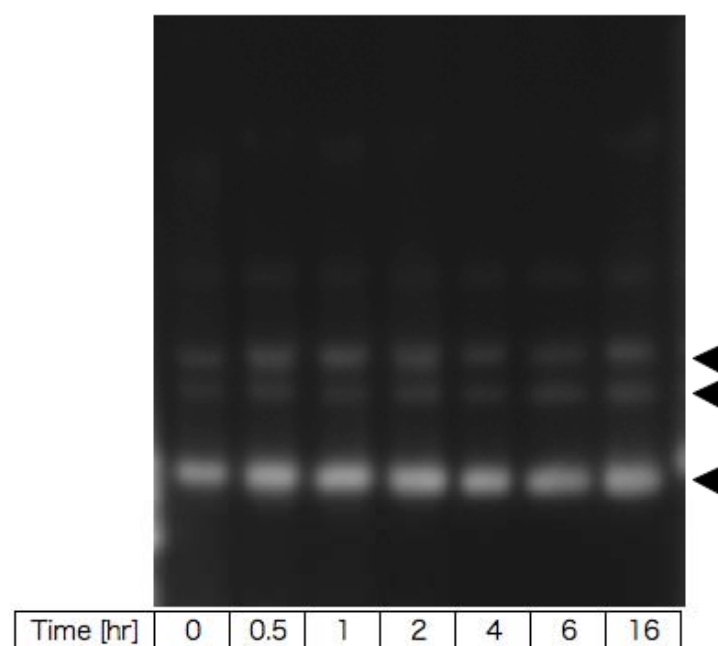


図 2.2 無細胞タンパク質合成反応液中の環状 DNA 鋳型の挙動

微量透析法における反応開始から 16 時間までの反応液中の環状 DNA 鋳型 pGFPS1 (◄) 量. サザンハイブリダイゼーション法により検出.

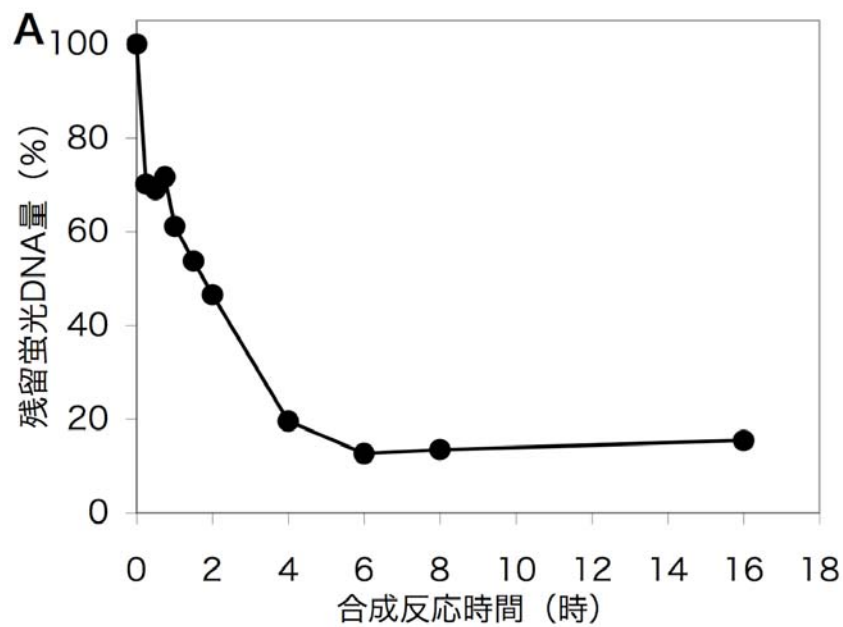


図 2.3 無細胞タンパク質合成反応液中の直鎖状 DNA 鋳型の挙動
 微量透析法における反応開始から 16 時間までの反応液中の直鎖状蛍光標識 DNA 鋳型量。蛍光値から換算した初期量に対する残留量を割合 (%) で示す。

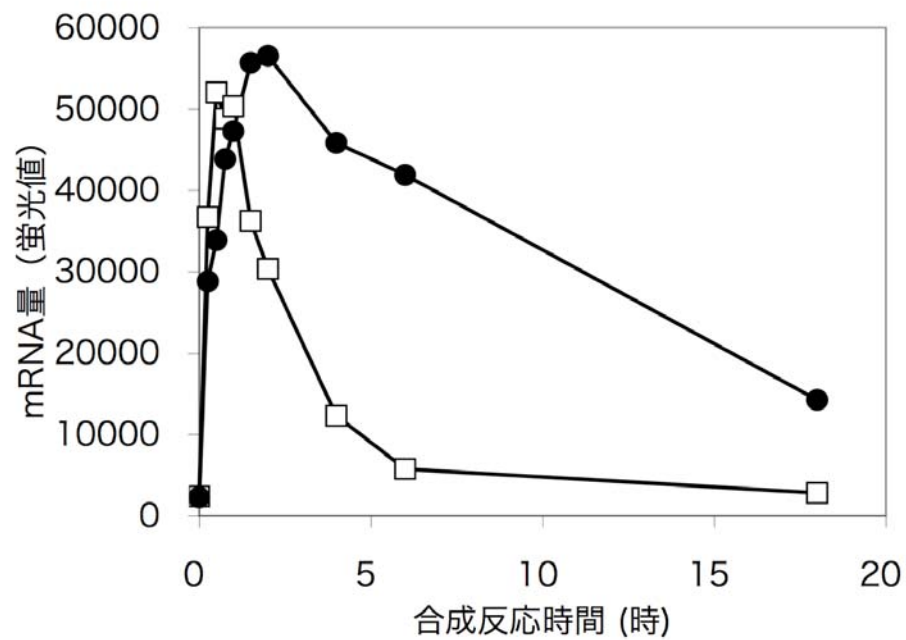


図 2.4 無細胞タンパク質合成反応液中の mRNA の挙動

微量透析法における反応開始から 18 時間まで反応液中の蛍光標識 mRNA 量を蛍光値で表示. (●) 環状 DNA 鋳型, (□) 直鎖状 DNA 鋳型での合成反応.

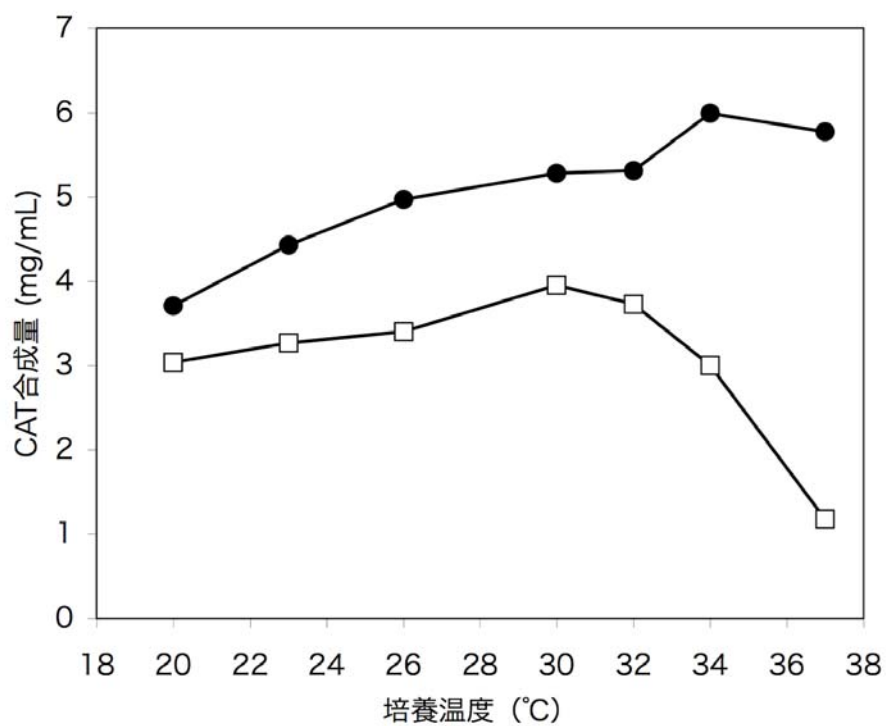


図 2.5 培養温度の異なる細胞抽出液でのタンパク質合成

大腸菌培養温度 20°Cから 37°Cで調製した細胞抽出液を用いた微量透析法による CAT 合成, 30°Cで 16 時間反応, 環状 DNA 鋳型(●), 直鎖状 DNA 鋳型(□). CAT 合成量は透析内液 1ml あたりに換算して示した.

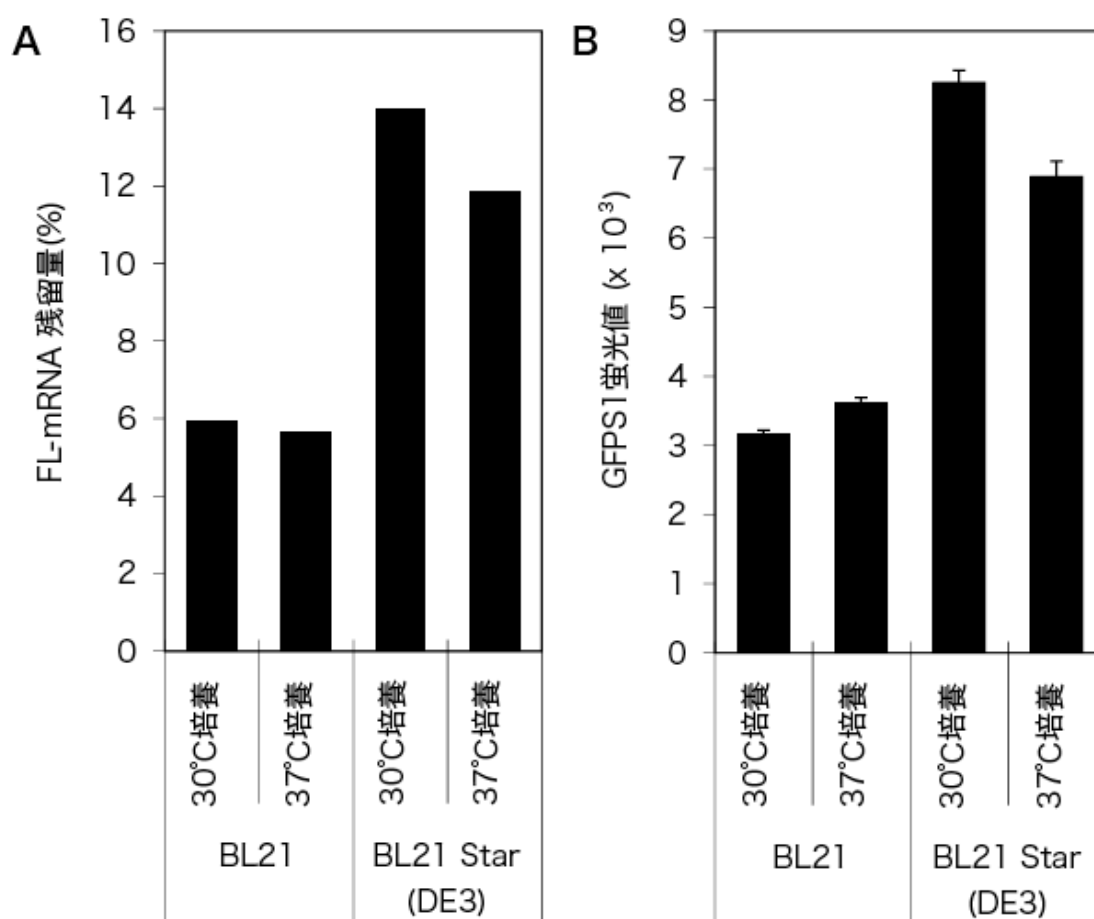


図 2.6 培養温度の異なる細胞抽出液における mRNA 分解活性と mRNA 鋳型の無細胞タンパク質合成量

大腸菌培養温度 30°C および 37°C で調製した細胞抽出液を用いた FL-mRNA 鋳型のバッチ法無細胞タンパク質合成。30°C で 2 時間反応。(A) 反応開始 30 分後の FL-mRNA 残留量, (B) 反応開始 2 時間後の GFP-S1 合成量。GFP-S1 合成量は蛍光値で示した。

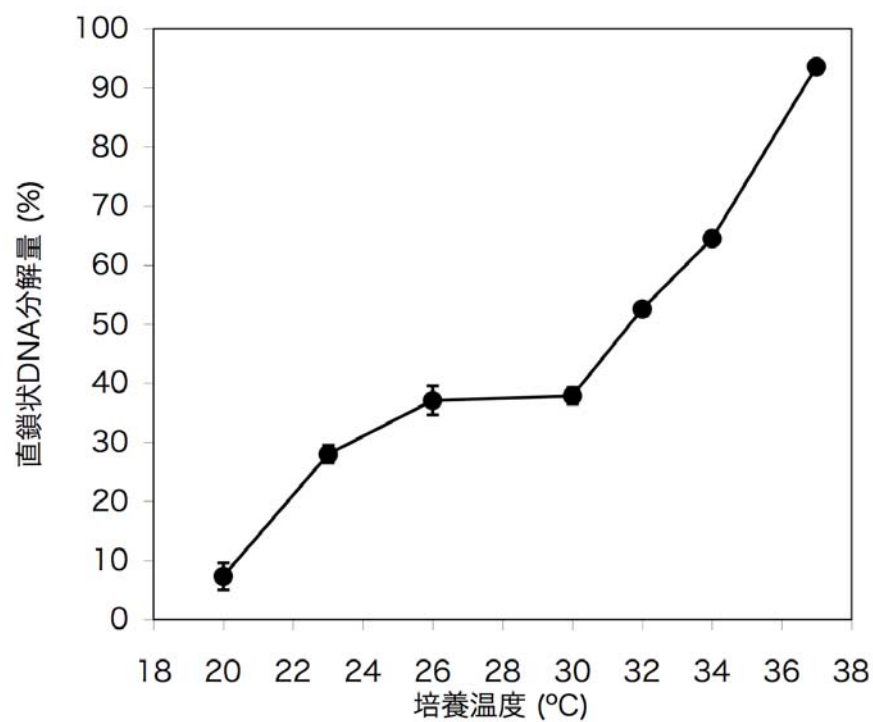


図 2.7 培養温度の異なる細胞抽出液における直鎖状 DNA 分解量
大腸菌培養温度 20°C から 37°C で調製した細胞抽出液の GFPS1 の蛍光標識直鎖状 DNA (FL-DNA) の分解活性. 細胞抽出液と FL-DNA を 30°C で 30 分間反応. 初期量に対する DNA 分解量を残留 FL-DNA の蛍光値から換算し, 割合 (%) で示す.

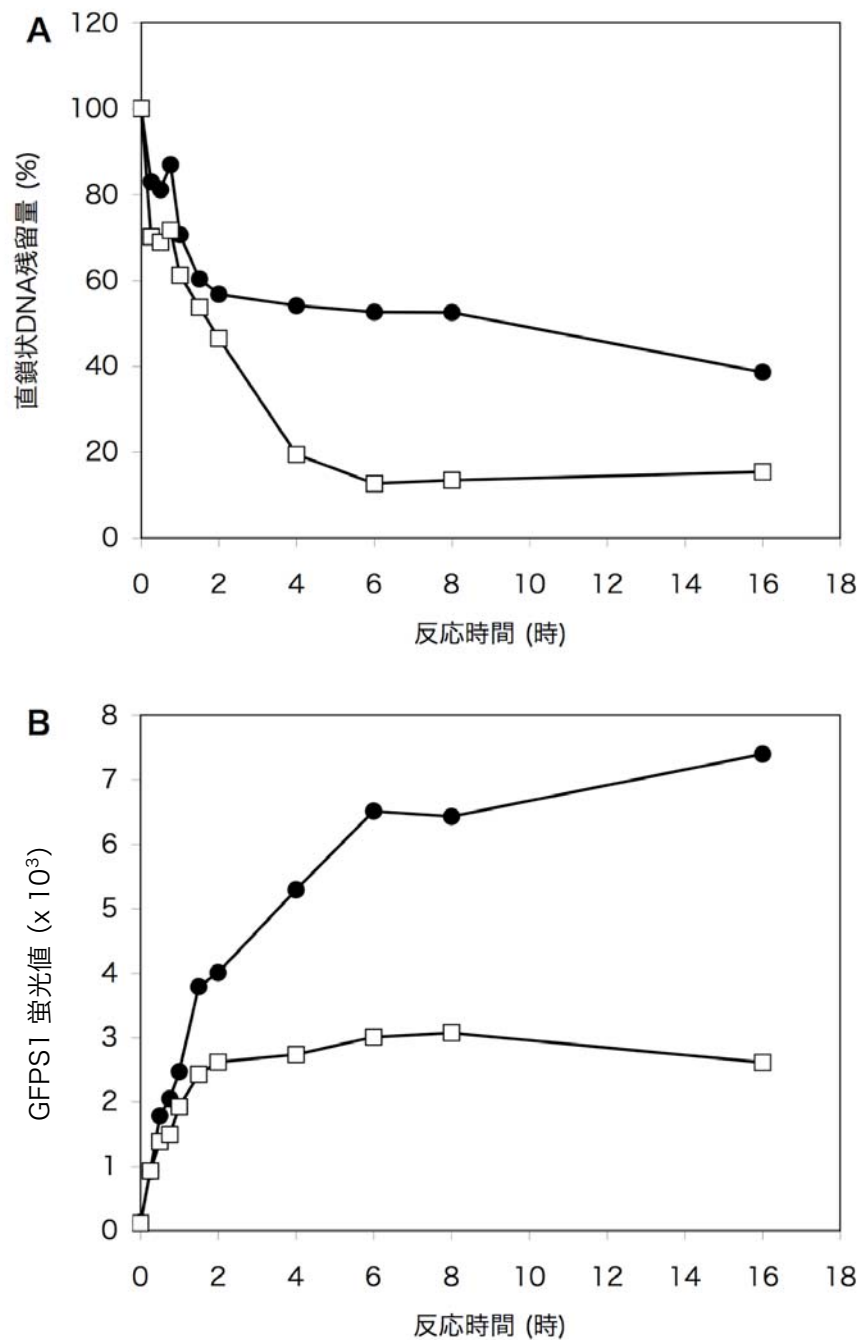


図 2.8 直鎖状 DNA 鋳型を用いた無細胞タンパク質合成の経時変化
BL21 株の 30°C (●), 37°C (□) 培養細胞抽出液を用いた, GFP-S1 の蛍光標識直鎖状 DNA (FL-DNA) を鋳型にした 30°C での微量透析法無細胞タンパク質合成における (A) FL-DNA の残留量, (B) GFP-S1 合成量.

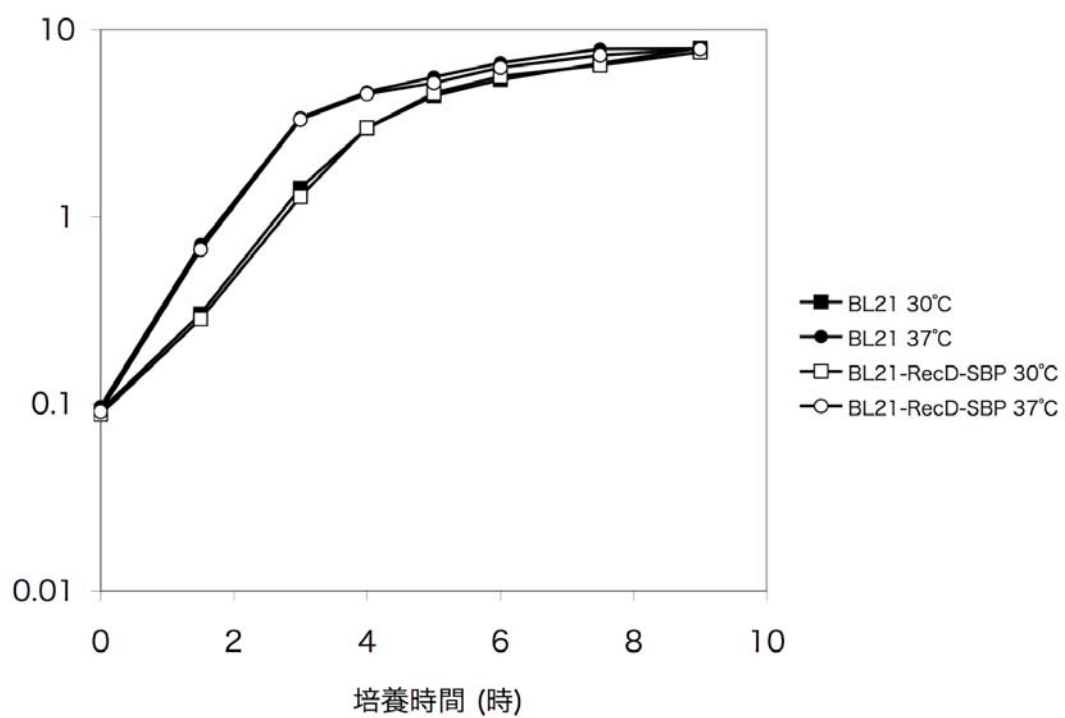


図 2.9 大腸菌培養増殖速度の SBP タグ挿入による影響の確認
BL21 株（黒）と RecD-SBP 株（白）の 30°C（四角）および 37°C（丸）における培養増殖曲線.

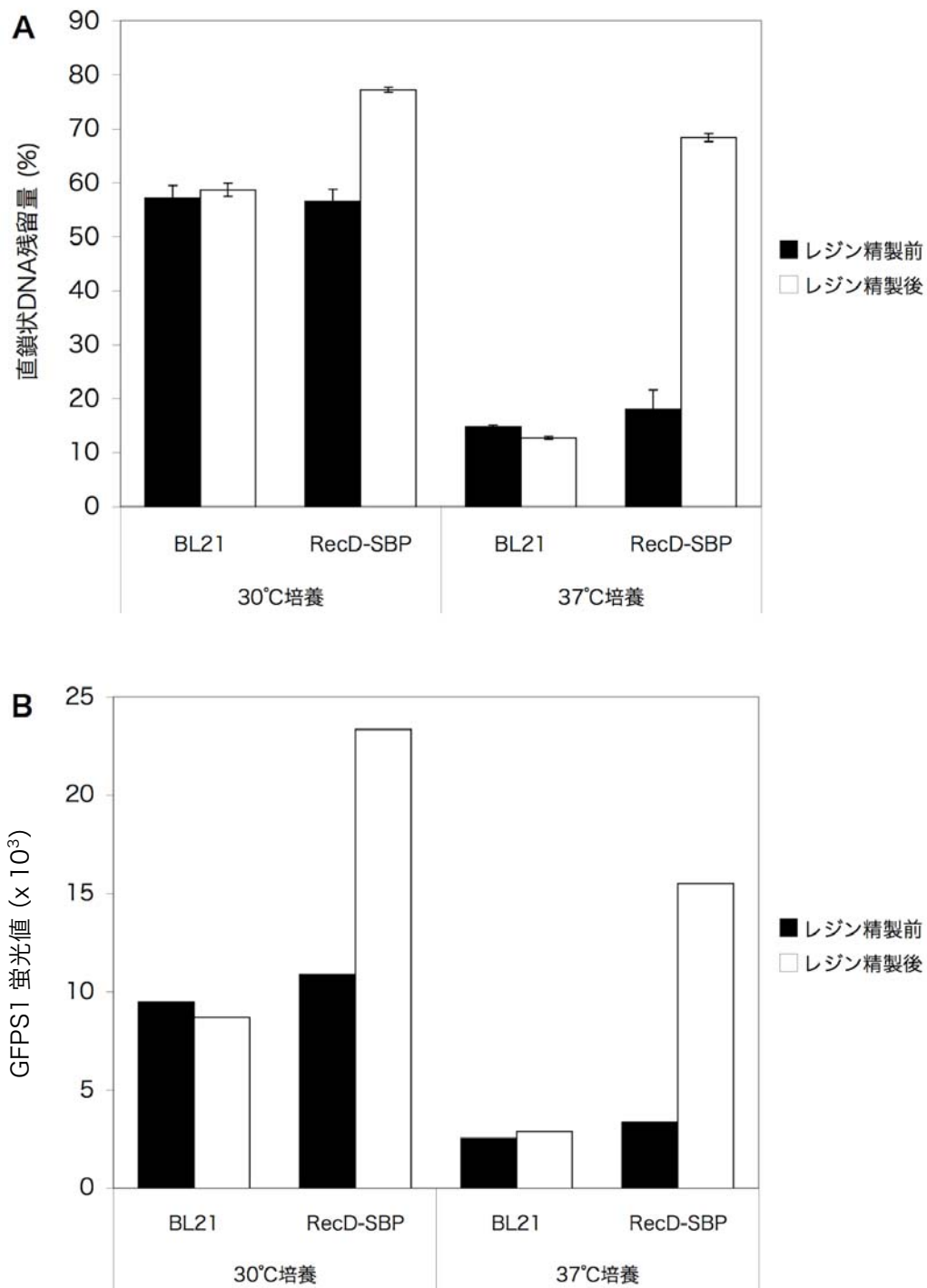


図 2.10 RecD を除去した細胞抽出液の無細胞タンパク質合成

BL21 株と RecD-SBP 株を 30°C と 37°C の培養温度で調製した細胞抽出液の (A) 直鎖状 DNA 分解活性測定 (30°C, 30 分), (B) 微量透析法 GFPS1 合成 (30°C, 16 時間). SA-SHP レジン 20% 精製無し (黒棒) と精製後 (白棒) の比較.

第 3 章

細胞抽出液内の複数因子を同時に減量する調製方法

3.1 導入

無細胞タンパク質合成法で用いる大腸菌の細胞抽出液中にはタンパク質合成反応を促進する因子以外にも様々な因子が含まれており、細胞の増殖時や細胞抽出液調製時には必須だが無細胞タンパク質合成反応時には悪影響を及ぼすものなどが含まれている。DNA、RNA、タンパク質などを分解する因子や転写翻訳反応を抑制したり阻害したりする因子はタンパク質合成量の低下に大きく関与している。また安定同位体標識タンパク質の調製では、アミノ酸の代謝に関与する因子がアミノ酸の標識率を低下させることが小麦胚芽由来の無細胞タンパク質合成系において報告されている[18]。

これら悪影響を及ぼす因子を抑えるために、様々な方法が試みられてきた。一つ目の方法は、標的因子をコードする遺伝子の全長又は一部を、欠失又は変異させた細胞株の使用であり、DNA 分解酵素[31-33]、RNA 分解酵素[34-36]、タンパク質分解酵素[37]、アミノ酸代謝酵素[38]などの遺伝子の変異株を用いた細胞抽出液が試みられてきた。二つ目の方法は阻害物質を用いて標的因子の活性を抑制する方法であり、DNA 分解酵素[16]やアミノ酸代謝酵素[38]の阻害物質が試みられている。三つ目の方法は標的因子が作用する対象を改変する方法であり、鋳型配列の分解耐性を上げる遺伝子配列の導入[35, 51-53]、分解耐性を上げるように末端の修飾[53]、PCR 産物を自己環状化させる配列の導入[52]などが報告されている。しかしながら、従来の方法には様々な問題点もある。一つ目の方法では、大腸菌の必須遺伝子など、欠失や変異を導入することが困難な因子を対象にすることは難しく、また必須遺伝子でない場合でも、しばし翻訳活性の低下 [35]や細胞増殖速度の低下[58]をもたらすことが報告されている。また、細胞抽出液調製に悪影響を及ぼす場合もあり、RecB をコードする遺伝子を欠失させると、内在性の DNA 量の増加によるバックグランドが高くなり、目的の鋳型 DNA から合成されるタンパク質の量が低くなる例が報告されている[32]。このような遺伝子を複数同時に欠失、又は変異させると細胞への負荷は増大し、細胞増殖に重大な異常をもたらすことも報告されている[33]。二つ目の

方法は有効に阻害物質が存在しない因子には対応出来ず、他の方法を用いる必要がある[16]。三つ目の方法は標的因子の対象が鋳型 DNA や RNA の場合、鋳型調製時の PCR に用いるプライマーの変更で導入可能な方法のため導入が容易でかつ安価に対応可能な方法であるが、分解抑制が不十分のために mRNA 分解活性の低い変異株の細胞抽出液を用いないと単独では合成量が不十分であったり[34, 35]、合成反応液へ大量に添加する必要があったり[52]、また、鋳型配列に制約があることなどが報告されている。

そこで本章では、効率的なタンパク質試料調製の為の細胞抽出液調製方法の改良として、前章で実施した細胞抽出液中から RecD を除去した方法を活用し、複数のタンパク質因子を同時に減量できる、汎用性の高い細胞抽出液調製方法を構築した (図 3.1)。本方法の特徴は、標的因子の細胞内での存在量は変化させずに活性を保つことで、細胞増殖時や細胞抽出液調製時にそれぞれの因子の活性を利用できるため、必須遺伝子など欠失又は変異の導入が難しい因子を対象にすることが可能であり、これらの複数因子を同時に減量することが可能となることにある。そこで、まず細胞のゲノム DNA に挿入するアフィニティータグとアフィニティーレジンの組み合わせを検討し、実際に鋳型分解に関与する 2 種類の因子、RecD と PNPase [59, 60]を減量した細胞抽出液を調製し、細胞抽出液中からの同時減量によるタンパク質合成量増加の効果を確認し、期待した特徴を持つ細胞抽出液調製方法が構築出来たことを確認した。また改良された細胞タンパク質抽出液を用いたタンパク質調製の高収量化を確認し、無細胞タンパク質合成反応における効率化を検証した。

3.2 材料と方法

3.2.1 挿入タグとアフィニティーレジン

使用した H6 タグおよび SBP タグ[54]とアフィニティーレジンの組み合わせは表 3.1 に示した。

3.2.2 大腸菌株

無細胞タンパク質合成に用いる細胞抽出液調製用大腸菌の改変元株には 2.2.1 と同じ BL21 株を用いた。RecD を減量した細胞抽出液調製用の株は 2.2.1 の RecD-SBP 株を用いた。BL21 株と RecD-SBP 株の PNPase をコードする遺伝子 *pnp* の 3'末端に SBP タグ遺伝子を Red/ET Recombination の手法[55]を

用いて挿入して作成した改変大腸菌は、それぞれ PNPase-SBP 株と RecD-PNPase-SBP 株とした。組換え用のカセット遺伝子には、それぞれ以下の配列を用いた：

5'-agtctcaacctgctgcagcaccggaagctccggctgctgaacagggcgagggcggttagcggcggttc
aggcggttctggtATGGATGAAAAAACGACTGGTTGGCGTGGTGGTCATGTTG
TTGAAGGTCTGGCCGGTGAACCTGGAGCAACTGCGTGCCCGTTTAGAACA
CCATCCGCAGGGTCAGCGTGAACCGGACCATCAC**taataattgat**ggttgccattt
gccctccgctgcggcggggggcctttaaccgggcaggac-3',

5'-agtctcaacctgctgcagcaccggaagctccggctgctgaacagggcgagggcggttagcggcggttc
aggcggttctggtATGGATGAAAAAACGACTGGTTGGCGTGGTGGTCATGTTG
TTGAAGGTCTGGCCGGTGAACCTGGAGCAACTGCGTGCCCGTTTAGAACA
CCATCCGCAGGGTCAGCGTGAACCGGACCATCAC**taataattgat**ggttgccattt
gccctccgctgcggcggggggcctttaaccgggcaggac-3' (小文字：homology arms [55],
下線：リンカー配列, 大文字：SBP タグ配列, 太文字：連続停止コドン). 組
換え用カセット遺伝子を BL21 株に挿入し、7~15%(w/v)のスクロースを含む
LB 培地で選択を行った。

3.2.3 細胞抽出液調製方法

大腸菌の細胞抽出液調製は、30℃または 37℃で培養した大腸菌を Kigawa
らの方法[30]で行った。

3.2.4 細胞抽出液からの標的因子減量

細胞抽出液からの標的因子減量には、S30 バッファー (14 mM Mg(OAc)₂,
60 mM KOAc, 10 mM Tris-acetate, pH 8.2) で平衡化した表 3.1 のアフィニ
ティーレジンを細胞抽出液に対して 0 から 20% (v/v)の割合で混合し、4℃で 1
時間回転震盪後に 10,000 x g で 5 分間の遠心にて分離した。得られた上精を回
収し、レジン処理済み細胞抽出液とした。

3.2.5 鋳型 DNA と mRNA

無細胞タンパク質合成の鋳型 DNA, mRNA, 蛍光標識直鎖状 DNA (FL-DNA)
および蛍光標識 mRNA (FL-mRNA) は 2.2.3, 2.2.5 および 2.2.6 と同様に調
製した。タグとアフィニティーレジンの特異的吸着確認試験には、GFPS1 の C

末に H6 または SBP タグを付加した GFPS1-H6 と GFPS1-SBP を用い、その鋳型は pGFPS1 上の GFPS1 遺伝子の停止コドンの前に遺伝子配列 5'-ggcggtagcggcggttcaggcggttctggtCACCACCACCACCACCAC-3' と 5'-ggcggtagcggcggttcaggcggttctggtATGGATGAAAAACGACTGGTTGGCGTGGTGGTCATGTTGTTGAAGGTCTGGCCGGTGAAGTGGAGCAACTGCGTGCCCGTTTAGAACACCATCCGCAGGGTCAGAGGGAACCC-3' (小文字：リンカー GGS GGS GGS GSG 配列, 大文字：H6 または SBP タグ配列) を PCR により挿入して作成した。それぞれは pGFPS1-H6 および pGFPS1-SBP とした。

3.2.6 無細胞タンパク質合成

無細胞タンパク質合成方法および合成された CAT タンパク質と GFPS1 タンパク質の合成量の確認は 2.2.4 に従った。

3.2.7 特異的吸着および非特異的吸着の確認

タグとアフィニティーレジンの特異的吸着は、微量透析法無細胞合成で調製した GFPS1-H6 および GFPS1-SBP を用いて確認した。GFPS1-H6 および GFPS1-SBP を S30 バッファーで 10 % (v/v) に希釈し、同じく S30 バッファーで平衡化した表 3.1 のアフィニティーレジン を 0 から 20% (v/v) の割合で混合し、4°C で 1 時間回転震盪後、10,000 x g で 5 分間遠心分離した。回収した上清は蛍光プレートリーダー ARVO を用いて励起 485 nm, 蛍光 507 nm で測定し、未吸着の GFPS1-H6 又は GFPS1-SBP 量からレジンへの特異的吸着量を換算した。

アフィニティーレジンの非特異的吸着は、BL21 株の細胞抽出液を 3.2.4 と同様に処理し、細胞抽出液中の内在性のタンパク質量の減少によって確認した。タンパク質量の定量は、Bio-Rad Protein Assay kit (Bio-Rad) を用いて Bradford 法により行った。また、レジン処理した BL21 株の細胞抽出液を用いて環状 DNA pGFPS1 を鋳型にした微量透析法無細胞タンパク質合成を行い、非特異的吸着による細胞抽出液の劣化に伴うタンパク質合成量の変化を確認した。

3.2.8 細胞抽出液中のタグ付きタンパク質の確認

細胞抽出液に含まれるタグ付きタンパク質の検出には Western Blotting 法を用いた。細胞抽出液に 2 倍量 (v/v) の Milli-Q 水と 6 倍量 (v/v) のアセトン

を加えて氷上で 5 分間冷却後 4,500 x g で 30 分間遠心し、得られた沈殿物に等量の 1 × SDS-PAGE サンプルバッファーを加えて攪拌し、100°C で 5 分間処理し電気泳動用の試料とした。グラジエントポリアクリルアミドゲル (7.5-15%) を用いた SDS-PAGE 後にセミドライ方式にて PVDF メンブレンの Hybond-P (GE Healthcare Biosciences) に転写し、Streptavidin-Alkaline Phosphatase Conjugate 抗体 (Roche) と CDP-*Star* Detection Reagent (GE Healthcare Biosciences) で発光し、LAS-3000 で検出した。

3.3 結果と考察

3.3.1 挿入タグとアフィニティーレジンの組み合わせの検討

細胞抽出液の改良方法として任意の複数タンパク質因子を同時に減量するために、ゲノム DNA 上の標的因子をコードする遺伝子にタグ配列を挿入し、細胞抽出液調製後にアフィニティーレジンを用いて標的因子のみを特異的に減量する細胞抽出液調製方法を考案した(図 3.1)。本方法の特徴は、従来のゲノム DNA 上の標的因子をコードする遺伝子の全長又は一部を欠失又は変異させる方法とは異なり、標的因子の活性を保ったままタグを挿入する事にある。これにより、アフィニティーレジンで減量するまでは標的因子の活性は保持されたままであり、細胞増殖時や細胞抽出液調製時にその活性を利用することができる。標的因子の活性が保たれることで細胞への負荷も抑えられ、必須遺伝子など、欠失又は変異が困難な因子を対象にすることができ、これら複数のタンパク質因子を細胞抽出液中から同時に減量することが可能となる。従って、本方法の成否には、細胞への負荷を抑えた状態でゲノム DNA 上に挿入するアフィニティータグの選択と、精製に用いるアフィニティーレジンの組み合わせが重要となる。

使用するアフィニティータグは、標的タンパク質の活性・立体構造への影響を抑えるために、小さい形状のものが望ましい。使用するアフィニティーレジンには、高い特異的吸着力によりタグを結合した標的因子を確実に減量し、低い非特異的吸着により標的因子以外の因子を細胞抽出液中から除去しないものが望ましい。よって、市販されている特異的吸着力が高いアフィニティーレジンとの組み合わせから、長さが 6 アミノ酸からなる H6 タグと 41 アミノ酸からなる SBP タグ[54]、およびそれぞれに用いるアフィニティーレジン 6 種を候補とした (表 3.1)。

微量透析法無細胞タンパク質合成で調製した GFPS1-H6 および GFPS1-SBP

タンパク質を用いた確認では、特異的吸着力の高いアフィニティーレジンの順番は、Ni-SHP > TALON, Ni-NTA, SA-SHP > COS-HA >> SA-PMP になった (図 3.2). GFPS1 タンパク質を用いた予備試験においてアフィニティーレジンの非特異的吸着は Ni-SHP > Ni-NTA, COS-HA > TALON > SA-SHP >> SA-PMP の順番で高かった。そこで詳細な非特異的吸着確認試験を Ni-SHP, TALON および SA-SHP について行った。BL21 株の細胞抽出液を用いた確認では (図 3.3), (A) 細胞抽出液中のタンパク質量の変化と (B) 環状 DNA pGFPS1 を鋳型にした 30°C, 16 時間反応の微量透析法無細胞タンパク質合成量の変化の両方において、非特異的吸着量は少ない方から SA-SHP < TALON < Ni-SHP の順番となった。

以上より、小さい形状のタグであり、特異的吸着力が高く、非特異的吸着が少ないアフィニティーレジンの組み合わせとして、SBP タグと SA-SHP レジンが本方法には適している判断し、実際に SBP タグの配列を BL21 株のゲノム DNA 上に挿入し、本方法の有効性評価に用いることにした。

3.3.2 モデルタンパク質因子の選択

本細胞抽出液調製方法の有効性を評価するために、実際に複数のタンパク質因子の減量を試みる。使用するモデル因子は、(1) 細胞抽出液中からのモデル因子そのものの減量、(2) 細胞抽出液中のモデル因子の活性低下、(3) 無細胞タンパク質合成法によるタンパク質調製に与える効果、の3点が評価・検討できるものを用いることにした。DNA または mRNA の分解酵素は、基質である DNA および mRNA 量の測定によりその活性を簡便に確認できるので (2) の評価に適している。また、DNA や mRNA 量の減少はタンパク質合成量に反映され容易に確認できるので (3) の評価に適している。そこで複数因子の1つとして、第2章で用いた大腸菌の直鎖状 DNA を分解する酵素 Exonuclease V のサブユニットである RecD を使用することにした。ただし RecD は1細胞あたりの発現量が 10 コピー以下[61]のため (1) の細胞抽出液中からの減量を Western Blotting 法で確認するのは困難である。よって2つ目の因子は (1) の確認が容易である mRNA の分解酵素を用いる事にした。PNPase は大腸菌の mRNA 分解酵素であり、mRNA を 3'から 5'に分解する複数のエキソリボヌクレアーゼの中でも mRNA 分解の主要な役割を担っている[59, 60]。PNPase は大腸菌内での発現量も多いため (1) の確認が容易であり、mRNA を分解する

ため（２）と（３）の確認も容易である。また、PNPase 遺伝子の欠失株は細胞増殖速度が低下することも報告されており[62], 本方法と従来の欠失株を用いる方法と比較するのにも適している。よって 2 番目の因子には PNPase を用いる事にした。

3.3.3 改変大腸菌の確認

ゲノム DNA 上に遺伝子配列を挿入する方法は各種あるが、複数部位にタグ配列を挿入するには選択マーカー等の余分な配列を挿入部位に残さない方法が望ましい。そこで、相同組換えを用いた Red/ET Recombination 法[55]を用いて改変体 PNPase-SBP および RecD-PNPase-SBP 株を作成した。この手法は汎用性・迅速性という観点でも優れており、大腸菌のミニマムゲノムの研究における複数箇所の遺伝子欠失体作成においても、類似の手法が採用されている[63]。

SBP タグの挿入が 1 カ所である RecD-SBP 株と PNPase-SBP 株、および挿入が 2 カ所である RecD-PNPase-SBP の 3 種類の改変大腸菌の細胞培養増殖速度は、30℃および 37℃培養にてタグを挿入していない野生型である BL21 株と同等であった（図 3.4）。よって Red/ET Recombination 法で複数部位に SBP タグを挿入しても BL21 株と同等の性質を保持している事が確認できた。PNPase をコードする遺伝子 *pnp* の欠失は細胞増殖速度の低下を起こすことが報告されていることから[62], 本方法により、細胞への負荷を抑えた状態で PNPase の活性を保ったままタグが挿入できたと思われる。

得られた改変大腸菌を用いて調製した細胞抽出液を SA-SHP レジンで処理すると、細胞抽出液中の PNPase-SBP 量が使用レジン濃度の上昇に伴い減少していることが確認できた（図 3.5）。一方、RecD-SBP は細胞抽出液中の量が少なく、細胞抽出液の泳動図からは確認できないが、処理後の SA-SHP レジンに吸着していることを確認した（データ非表示）。よって、SBP タグと SA-SHP レジンの組み合わせで、細胞抽出液から SBP タグ付きタンパク質の減量が SA-SHP レジン濃度依存的であることが確認できた。

3.3.4 PNPase 減量の効果

細胞抽出液からの PNPase 減量の効果は、SA-SHP レジン 0~20%で処理した細胞抽出液を用いて GFPS1 の FL-mRNA を鋳型にした反応温度 30℃のバッチ法無細胞タンパク質合成反応で確認した（図 3.6）。BL21 株および RecD-SBP

株の細胞抽出液を用いたタンパク質合成液中の FL-mRNA 量は、使用するレジニン量に関わらず少ないままであり、mRNA 分解活性は高い状態が維持されている。一方、PNPase-SBP 株および RecD-PNPase-SBP 株細胞抽出液では使用するレジニン濃度の上昇に伴いタンパク質合成反応液中の FL-mRNA 量が増加し、細胞抽出液の mRNA 分解活性が低下していることが確認できた (図 3.6 A)。SA-SHP レジニン量 20 % (v/v) で処理した PNPase-SBP 株および RecD-PNPase-SBP 株細胞抽出液を用いたタンパク質合成液中の FL-mRNA 量は、SA-SHP レジニン未処理の細胞抽出液や BL21 株および RecD-SBP 株の細胞抽出液の約 3 倍であった。GFPS1 の合成量は、SA-SHP レジニン量 20 % (v/v) で処理した PNPase-SBP 株および RecD-PNPase-SBP 株細胞抽出液では、SA-SHP レジニン未処理の細胞抽出液や BL21 株および RecD-SBP 株細胞抽出液を使用したときの約 2 倍であった (図 3.6 B)。以上より、細胞抽出液中からの PNPase の減量によって無細胞タンパク質合成反応液中の mRNA の分解が抑制され、mRNA の寿命が伸びて、タンパク質合成量が増加することが確認できた。

細胞抽出液中からの PNPase 減量は、直鎖状 DNA 鋳型を用いた微量透析法無細胞タンパク質合成反応 (30°C, 16 時間) においても合成量増加に効果があることが、PNPase-SBP 株および RecD-PNPase-SBP 株の細胞抽出液を用いた合成で確認できた (図 3.7)。SA-SHP レジニン 20% で処理した PNPase-SBP 株細胞抽出液の DNA 分解活性は、SA-SHP レジニン未処理の細胞抽出液や BL21 株と同等に高いままであり、無細胞タンパク質合成反応液中の直鎖状 DNA 鋳型の寿命は短いままであった (図 3.7 A)。しかし、タンパク質合成量は SA-SHP レジニン未処理の細胞抽出液や BL21 株の約 2 倍であり、SA-SHP レジニン 20% で処理した RecD-SBP 株の細胞抽出液の時と同等になっていた (図 3.7 B)。同様に、SA-SHP レジニン 20% で処理した RecD-PNPase-SBP 株細胞抽出液の直鎖状 DNA 分解活性はレジニン処理した RecD-SBP 株と同等であるが、タンパク質合成量では大幅に上回っていた。以上より、細胞抽出液中からの PNPase 減量は、無細胞タンパク質合成反応において鋳型 DNA から転写された mRNA の寿命も伸ばし、タンパク質合成量の増加に寄与することが確認できた。

なお、PNPase には RNA 分解の逆反応として NDP を用いて mRNA の 3' 末端にオリゴヌクレオチドを付加するオリゴヌクレオチドポリメラーゼ活性がある。しかしながら、FL-mRNA の電気泳動図では FL-mRNA の延長は確認できなかった。PNPase による mRNA 3' 末端へのポリヌクレオチド付加により、末端の

ステムループ構造が壊され、3'末端からの mRNA の分解が促進され则认为られている[64]. よって、PNPase を除くことによって細胞抽出液中のオリゴヌクレオチドポリメラーゼ活性が低下することも、mRNA の安定に寄与している可能性もある.

3.3.5 RecD 減量の効果

細胞抽出液からの RecD 減量による効果は、同様に、SA-SHP レジンで処理した細胞抽出液を用いた直鎖状 DNA 鋳型の寿命と、GFPS1 の直鎖状 DNA 鋳型での微量透析法無細胞タンパク質合成反応 (30°C, 16 時間) の合成量増加で確認出来た (図 3.7). SA-SHP レジン濃度の上昇に伴い RecD-SBP 株および RecD-PNPase-SBP 株の細胞抽出液中の直鎖状 DNA 分解活性は減少するが、BL21 株および PNPase-SBP 株では変化していない (図 3.7 A). SA-SHP レジン 20%で処理した RecD-SBP 株および RecD-PNPase-SBP 株の直鎖状 DNA の残留量は、SA-SHP レジン未処理の細胞抽出液や BL21 株および PNPase-SBP 株の約 2 倍であった. GFPS1 の合成量は、SA-SHP レジン量 20%で処理した RecD-SBP 株および RecD-PNPase-SBP 株の細胞抽出液では、SA-SHP レジン未処理の細胞抽出液や BL21 株の細胞抽出液よりも大幅に上回っていた (図 3.7 B). 以上より、RecD の減量により無細胞タンパク質合成反応液中の直鎖状 DNA の分解が抑制され、直鎖状 DNA 鋳型の寿命が伸びることでタンパク質合成量が増加することが確認できた. 一方、RecD を減量しても、mRNA の分解活性 (図 3.6 A) および mRNA 鋳型のバッチ法無細胞タンパク質合成量 (図 3.6 B) には影響が無いことから、RecD は無細胞タンパク質合成反応中の直鎖状 DNA 鋳型から mRNA の転写反応に影響を与えるが、mRNA 以降の反応には影響を及ぼさないことが明らかになった.

3.3.6 RecD と PNPase 同時減量の効果

細胞抽出液から RecD と PNPase を同時に減量した効果も、同様に確認した. SA-SHP レジン 20% (v/v) 処理 RecD-PNPase-SBP 株細胞抽出液を用いた直鎖状 DNA 鋳型での微量透析法無細胞タンパク質合成量は、RecD または PNPase を単独で減量した RecD-SBP 株又は PNPase-SBP 株の細胞抽出液よりも上回っており (図 3.7 B), 複数因子の同時減量が有効であることを示した. さらに詳しく複数因子の同時減量の効果を確認するために、反応温度 30°Cでの無細胞タ

ンパク質合成反応液中の直鎖状 FL-DNA 鋳型量(図 3.8 A)と合成された GFPS1 量 (図 3.8 B) の時間変化を測定した。BL21 株では鋳型の FL-DNA は反応開始 6 時間後にほぼ消失しており, タンパク質合成反応も約 3 時間で停止していた。PNPase-SBP 株では FL-DNA の分解傾向は BL21 株と同等だが, 転写された mRNA の寿命が長いために GFPS1 合成量は BL21 株に対して約 2 倍であった。RecD-SBP 株では FL-DNA 分解が遅くて鋳型 DNA の寿命が長いため, mRNA の寿命が短くても GFPS1 合成量は BL21 株よりも多くなっており, PNPase-SBP 株と同等量であった。RecD-PNPase-SBP 株では, 直鎖状 DNA と mRNA の両方の寿命が長いため, GFPS1 の合成反応は合成開始 8~10 時間後まで持続し, GFPS1 の合成量も最も多かった。以上より, 無細胞タンパク質合成反応液中の鋳型の直鎖状 DNA および mRNA 量とタンパク質合成反応時間の持続には相関関係があり, RecD と PNPase 同時減量による直鎖状 DNA および mRNA の分解抑制を組み合わせた効果が, タンパク質合成量の増加に寄与することが確認できた。

なお, 細胞抽出液を SA-SHP レジン 20%で処理することにより生じる非特異的吸着で, GFPS1 の環状 DNA 鋳型での無細胞タンパク質合成量は約 85 %に減少する (図 3.3 B)。しかしながら, RecD と PNPase を同時に減量した細胞抽出液を用いた直鎖状 DNA 鋳型の無細胞タンパク質合成量は約 4 倍に増加しており (図 3.7 B, 3.8 B), レジン処理の非特異的吸着による合成量の低下分をふまえても, 本方法による RecD と PNPase を同時減量は十分に有効と言えるだろう。

3.3.7 効率化の確認

本章の SA-SHP レジン 20% (v/v) で処理した RecD-PNPase-SBP 株の細胞抽出液と, 前章の低温培養で調製した細胞抽出液と比べると, GFPS1 の直鎖状 DNA 鋳型での微量透析法無細胞タンパク質合成反応 (30°C, 8 時間) では, 本章のタグで減量した細胞抽出液はおよそ 2 倍の合成量になった (図 3.9)。よって, 直鎖状 DNA 鋳型を用いたタンパク質試料調製の高収量化には, 本章の方法は有効であることが確認出来た。

また, 本章の方法での細胞抽出液調製にかかる費用は, SA-SHP レジンの使用分だけ, 前章の低温培養による細胞抽出液調製方法よりも上昇する。現在 30-300 μ l スケールの微量透析法無細胞タンパク質合成 1 反応にかかる試薬分の経費は

レジ処理前の細胞抽出液使用で約 68 円, SA-SHP レジン 20% (v/v) 処理後の細胞抽出液使用で約 85 円である. SA-SHP レジン処理をしていない 37°C 培養の細胞抽出液を基準に, 等量の GFPS1 を合成するのにかかる消耗品費を算出すると (図 3.10), 前章の 30°C 培養による BL21 株の細胞抽出液を用いると 40%, 本章の SA-SHP レジン 20% (v/v) で RecD と PNPase を同時に減量処理した RecD-PNPase-SBP 株の細胞抽出液では 28% の経費で GFPS1 の合成が可能であった. よって, レジン処理作業追加によるコスト上昇よりも, タンパク質合成量増加によるコスト削減効果が上回っていることが確認出来た.

以上より, 本章の細胞抽出液調製方法により, タンパク質試料調製の高収量化が実現し, 必要経費の削減による効率化が進んだと言えるだろう.

3.3.8 従来方法との比較

従来の標的因子をコードする遺伝子の全長又は一部を欠失又は変異させた細胞株を用いる方法で複数の因子を対象にした場合, 翻訳活性の低下 [35] や細胞増殖異常 [33, 58], 細胞抽出液調製時に必要な因子の活性低下 [32] などの問題点が含まれていた. これらを抑える方法も試みられており, Jackson らによる RecB の温度感受性株 (N138 *recB^{ts}*) を用いる方法では, *recB* 遺伝子欠失による細胞抽出液調製の不備を改善し, 直鎖状 DNA 鋳型が 2 時間保持されてタンパク質合成が 100 分持続する改善を得た [32]. しかしながら温度感受性株を使用しているため, タンパク質合成反応温度が 37°C に限定されるなど, 合成反応条件が制限されている. Swartz らのグループは DNA の二本鎖を切断する酵素 endonuclease A をコードする遺伝子 (*endA*) の欠失と, *recBCD* 遺伝子をより弱いエキソヌクレアーゼを含む λ フェージの Red recombination system 遺伝子 (*exo*, *bet*) に置換したものを組み合わせた大腸菌 K 株由来の株 (NMR5) を用いて, *recBCD* 遺伝子欠失による細胞増殖速度の低下を抑え, バッチ法の CAT 合成で約 600 $\mu\text{g/ml}$ まで合成量を増加させた [33]. しかしながら, 置換された *exo* 遺伝子から合成されたエキソヌクレアーゼによる分解のためか, NMR5 細胞抽出液を用いた時の無細胞タンパク質合成反応液内で直鎖状 DNA 鋳型は約 60 分で消失しており, タンパク質合成を長時間持続させるためには改善の余地が残っている. Kim らのグループは RNase E の変異 (*rne131*) を持つ BL21 Star (DE3) 株の細胞抽出液に, T7 terminator 配列を付加した直鎖状 DNA 鋳型を用いて, 反応温度を 25°C に下げることで, 透析法の無細胞タンパク質合成を

15 時間持続させて約 1.1 mg/ml の CAT を合成している[34]. ただしこの方法では、反応温度を 25°C に下げることにより、無細胞タンパク質合成反応液中のヌクレアーゼ活性を下げて鋳型 DNA の分解を抑制しているが、同時にタンパク質合成速度も遅くなっている. これらの改善方法に対して、本章の RecD と PNPase を除いた細胞抽出液を用いた無細胞タンパク質合成は、直鎖状 DNA および mRNA の寿命が長く、反応温度 30°C での無細胞タンパク質合成反応を 8 時間以上持続することができる. 直鎖状 DNA 鋳型を用いた無細胞タンパク質合成量が現時点での報告の中では最大であることから、本方法は、有効な細胞抽出液調製方法と思われる.

3.3.9 細胞抽出液調製方法の汎用性

本方法の細胞抽出液調製方法を用いた無細胞タンパク質合成法の改良は、タグ配列を挿入できるタンパク質因子に対して広く適応可能であり、標的因子の活性を保つことにより細胞への負荷を抑えることが出来るので、必須遺伝子を含む複数の因子を同時に減量することが可能である. よって、様々な因子の減量による効果を組み合わせた様々な改良が可能であり、従来には無い無細胞タンパク質合成が行える可能性がある.

今回はモデル因子として RecD および PNPase を用いたので、無細胞タンパク質合成反応液中の鋳型分解を抑制することで、タンパク質合成の高収量化を進めることが出来た. その他のタンパク質合成量の高収量化を目指した他の因子としては、タンパク質分解に関与する因子を除くことで、天然変性タンパク質などの不安定なタンパク質の高収量化を考えられる. また、高収量化以外にも本方法を用いることでさまざまな改良が期待できる. アミノ酸代謝に関わる因子を減量すると、標識されたアミノ酸の希釈を防ぎ、高度に標識されたタンパク質が調製できるようになると思われる. よって、タンパク質立体構造解析のためのタンパク質試料の安定同位体標識率、重水素化効率、セレノメチオン導入率などが向上され、従来よりも精度の高い構造解析を可能にして研究解析の速度を早めることが期待出来る.

また、本方法は従来の改良方法との併用が可能である. BL21 Star (DE3) 株から調製した細胞抽出液を用いて微量透析法で CAT 合成を行ったところ、培養温度 30°C の細胞抽出液において直鎖状 DNA 鋳型、環状 DNA 鋳型ともに BL21 株の細胞抽出液よりも CAT 合成量が高いことが確認できた (データ非表示).

BL21 Star (DE3)株は *in vivo* のタンパク質合成の為に改良された株であり、変異導入による細胞培養時、細胞抽出液調製時、無細胞タンパク質合成反応時における問題等は確認されていない。よって、BL21 Star (DE3)株の RNase E の *rne131* 変異は無細胞タンパク質合成に用いる大腸菌において有効な変異であると考えられる。よって BL21 Star (DE3)株を元に、本方法を用いて RecD および PNPase を減量した細胞抽出液を調製すると、今回の BL21 株よりも合成量を上げることが可能と思われる。ただし、BL21 Star (DE3)はバクテリオファージ λ DE3 溶原菌であり、T7 polymerase 遺伝子がゲノム上にあるため、T7 polymerase を用いる無細胞タンパク質合成系においてこれらが有利に働いている可能性も考慮すべきである。また、阻害物質などの添加物を用いた方法は、タンパク質合成反応液に添加するだけの簡便な改良方法であり、本方法で調製した細胞抽出液に適用することに障害は無く、むしろ積極的な併用による効果が期待出来る。

さて、本方法はタグ配列を挿入できる配列を持つタンパク質に対して広く適応可能であるが、適用できない場合もあり、それらは課題として残る。大腸菌の一部の ORF や制御配列の遺伝子は、ゲノム上のセンス鎖またはアンチセンス鎖上で他の遺伝子と重なり合っており独立していない。よって、このような配列部位にタグ配列を挿入すると、重なり合っている配列を妨げてしまい、細胞に悪影響を及ぼす可能性がある。また、遺伝子が独立している場合でも、標的タンパク質の立体構造により、N 末と C 末のどちらにタグを挿入しても、その活性に影響を及ぼす立体障害が起きる場合がある。これらの因子が、細胞の生育に必須な遺伝子または遺伝子領域に関わる場合、タグ挿入による細胞への影響は大きくなり、複数因子を同時に減量する妨げとなる。現在タンパク質の立体構造情報の蓄積は進んでおり、生育に影響を与える遺伝子や領域についても大腸菌の網羅的な単一遺伝子変異株 (Keio collection) [65]や Minimum Genome の研究[63, 66, 67]などによって蓄積されている。これら情報を積極的にタグ挿入部位の設計に活用することで、これら課題に対応することが重要と考えている。

以上より、本方法は従来法よりも様々な因子に適応可能であり、汎用性も高いことから、広く用いられうる細胞抽出液調製方法と言えるだろう。

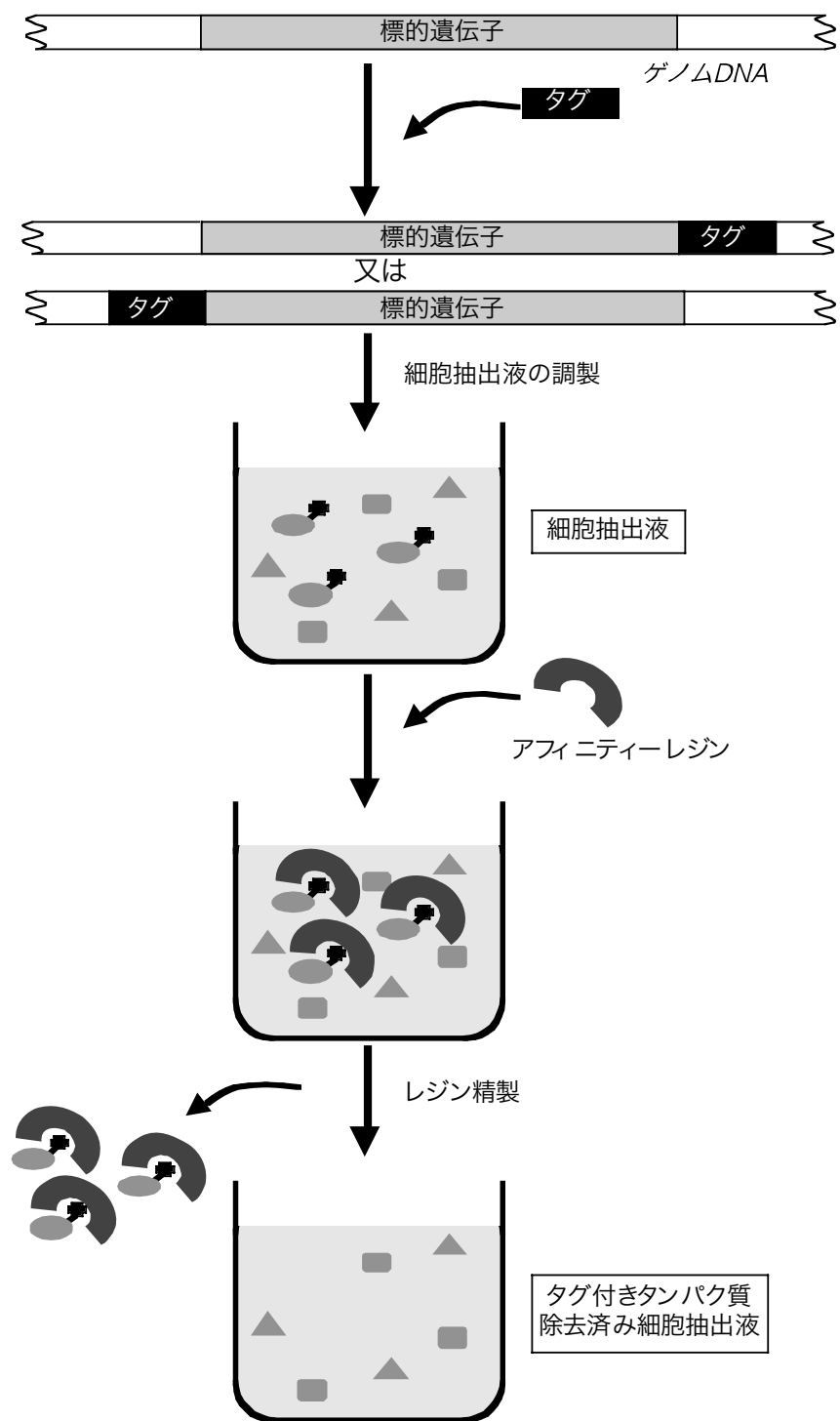


図 3.1 改良した細胞抽出液調製方法

表 3.1 タグとアフィニティーレジンの組み合わせ

番号	タグ	アフィニティーレジン	略称	メーカー	価格 (¥ /ml)
1	H6	Ni Sepharose High Performance	Ni-SHP	GE Healthcare	1,330
2		TALON Superflow Resin	TALON-SF	Clontech	2,080
3		COSMOGEL His-Accept	COS-HA	Nacalai tesque	1,200
4		Ni-NTA Superflow	Ni-NTA	QIAGEN	1,518
5	SBP	Streptavidin Sepharose High Performance	SA-SHP	GE Healthcare	9,200
6		Streptavidin MagnetSphere Paramagnetic Particles	SA-PMP	Promega	2,160

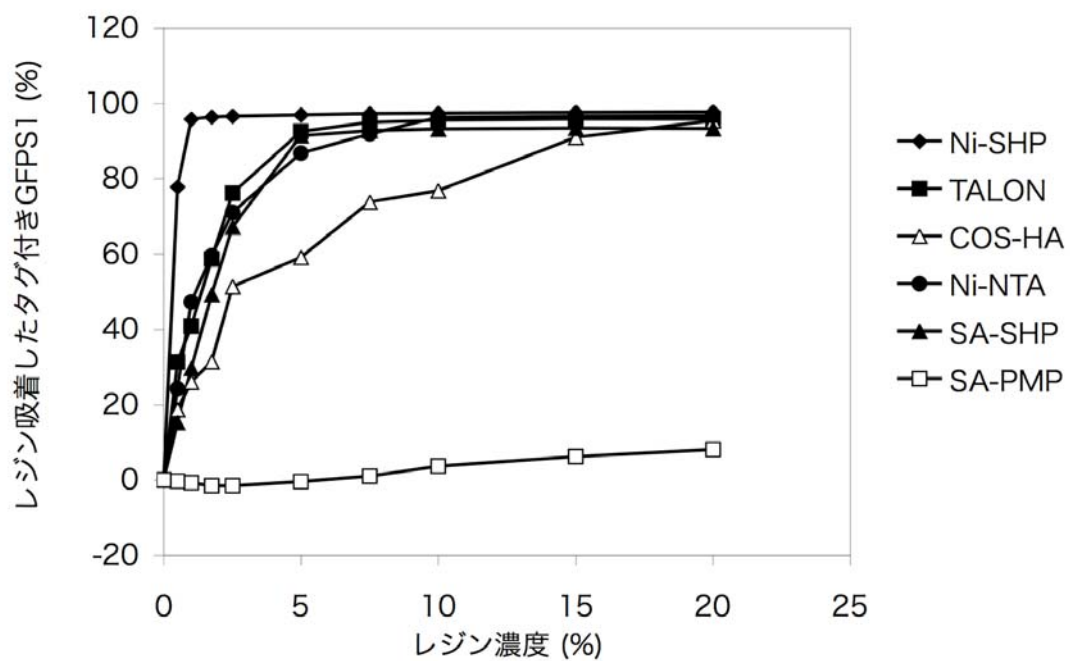


図 3.2 タグとレジンの特異的吸着の確認

C 末に H6 または SBP を結合した GFPS1 の各種レジン濃度に対する吸着量. レジン吸着処理後の上精の蛍光値を測定し, 未吸着量から吸着量を換算し割合 (%) で示す.

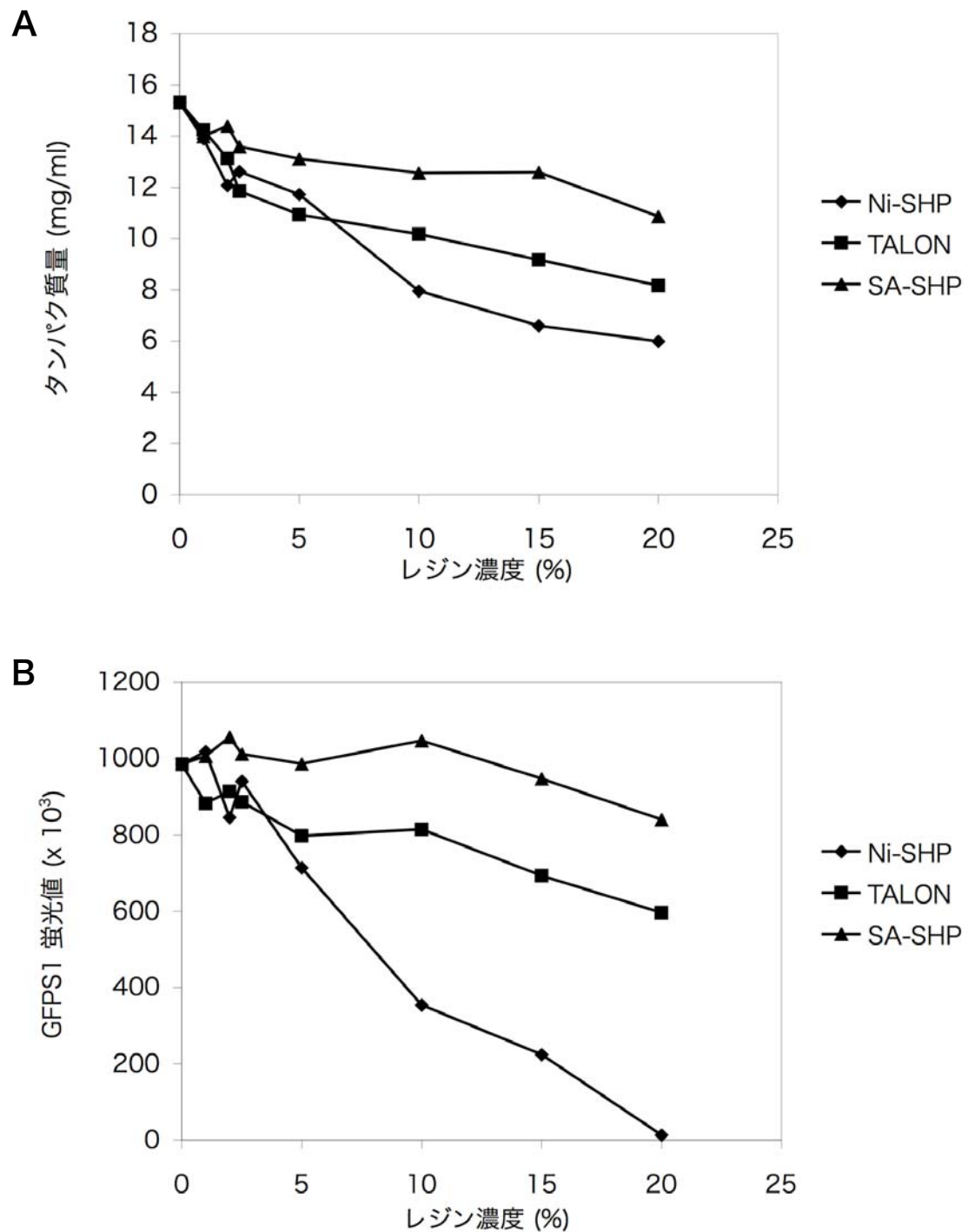


図 3.3 レジンの非特異的吸着の確認

BL21 株細胞抽出液を各種レジン濃度で処理した時の (A) 細胞抽出液中のタンパク質量の変化, (B) 環状 DNA 鋳型 pGFP-S1 を用いた微量透析法無細胞タンパク質合成量の変化.

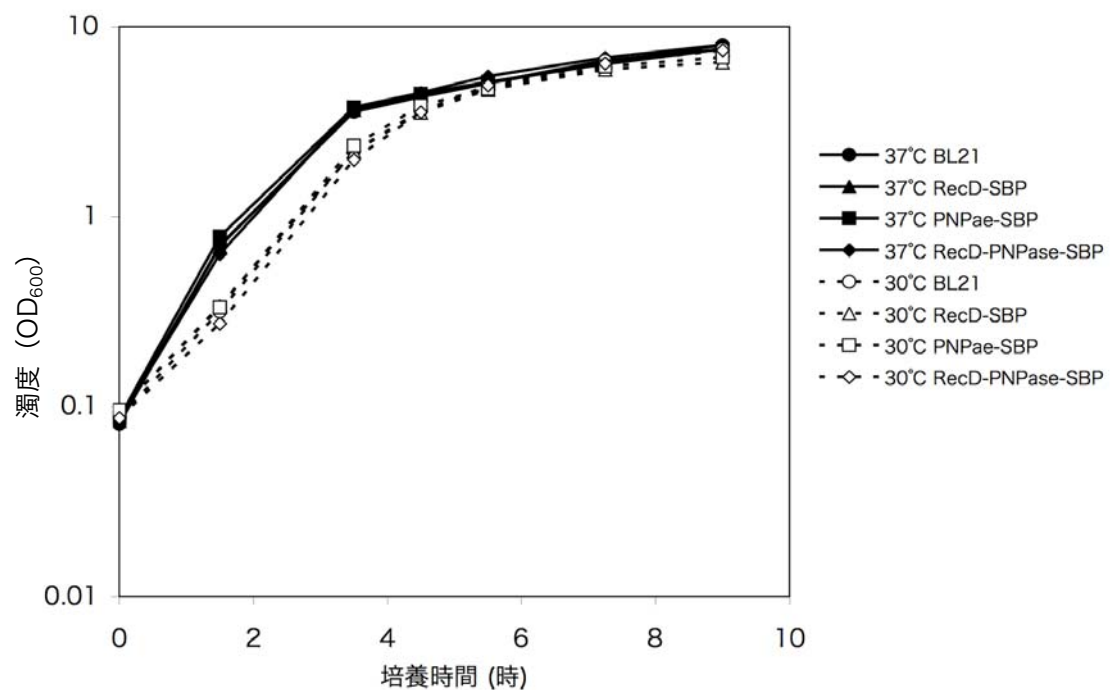


図 3.4 大腸菌培養増殖速度の SBP タグ挿入による影響の確認

BL21 株（丸）と各種 SBP タグ挿入大腸菌（RecD-SBP：三角，PNPase-SBP：四角，RecD-PNPase-SBP：ダイヤ）の 30°C（白，点線）および 37°C（黒，実線）における培養増殖曲線。

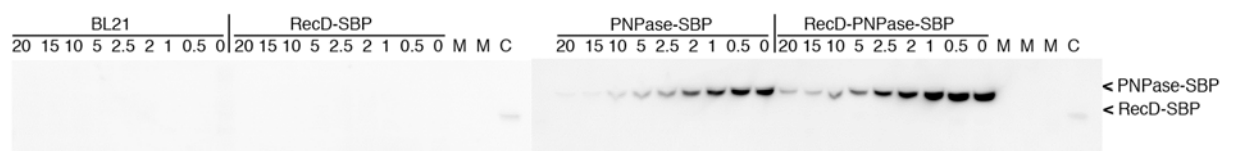


図 3.5 レジン処理による細胞抽出液からのタグ付きタンパク質の減少

BL21, RecD-SBP, PNPase-SBP, RecD-PNPase-SBP 株から調製した細胞抽出液の SA-SHP レジン処理後の RecD-SBP および PNPase-SBP 量を Western Blotting 法で確認. 上段の数字は使用 SA-SHP レジン量の%表示. M: マーカー, C: コントロールとしての無細胞タンパク質合成で調製した RecD-SBP および PNPase-SBP.

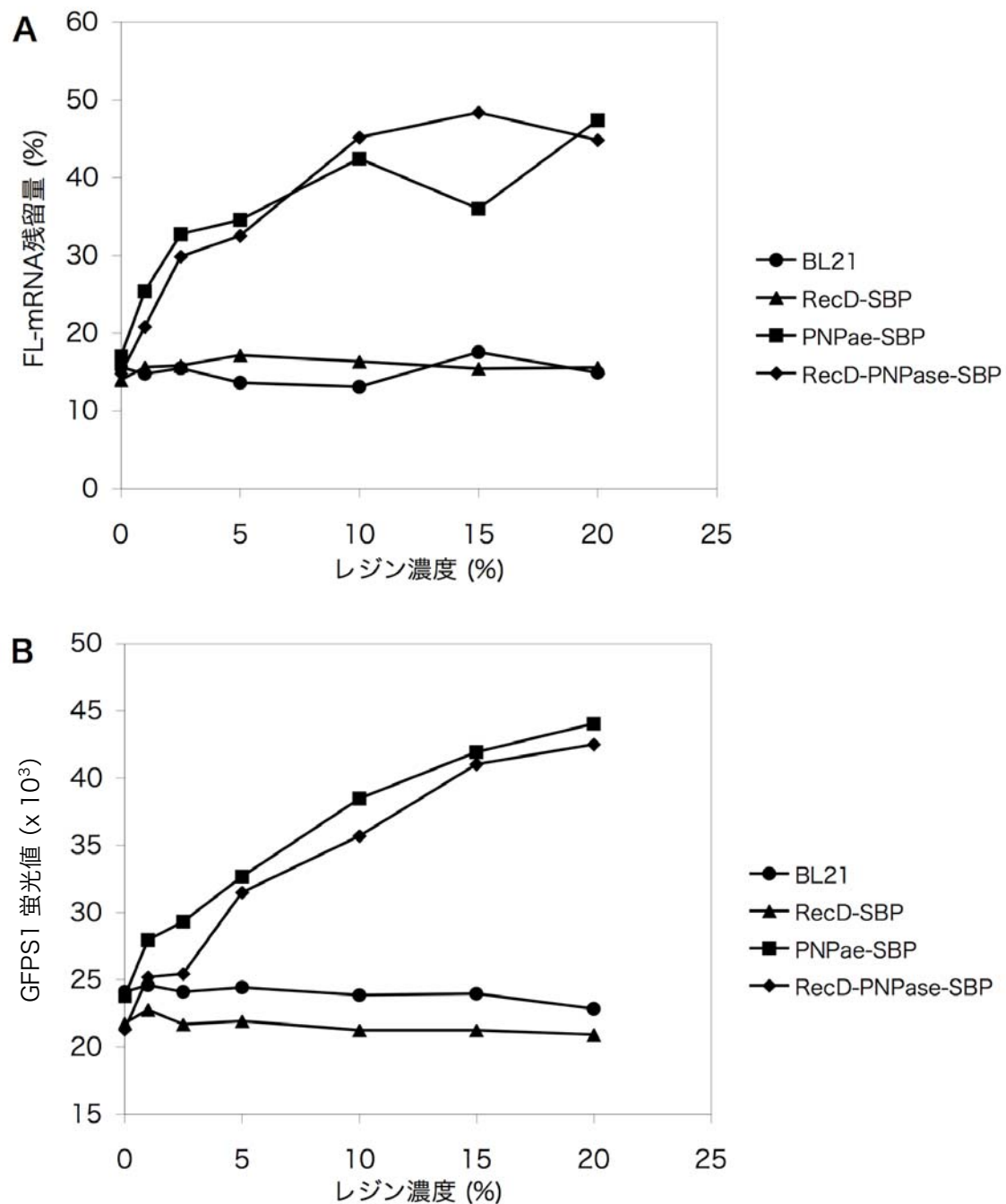


図 3.6 レジン処理細胞抽出液の mRNA 分解活性と
mRNA 鋳型の無細胞タンパク質合成量

SA-SHP レジン処理済み RecD-SBP, PNPase-SBP, RecD-PNPase-SBP, BL21 株細胞抽出液を用いて, FL-mRNA 鋳型のバッチ法無細胞タンパク質合成を行い, (A) 反応開始 30 分後の FL-mRNA 残留量, (B) 反応 2 時間後の GFPS1 合成量を確認. GFPS1 合成量は蛍光値で示した.

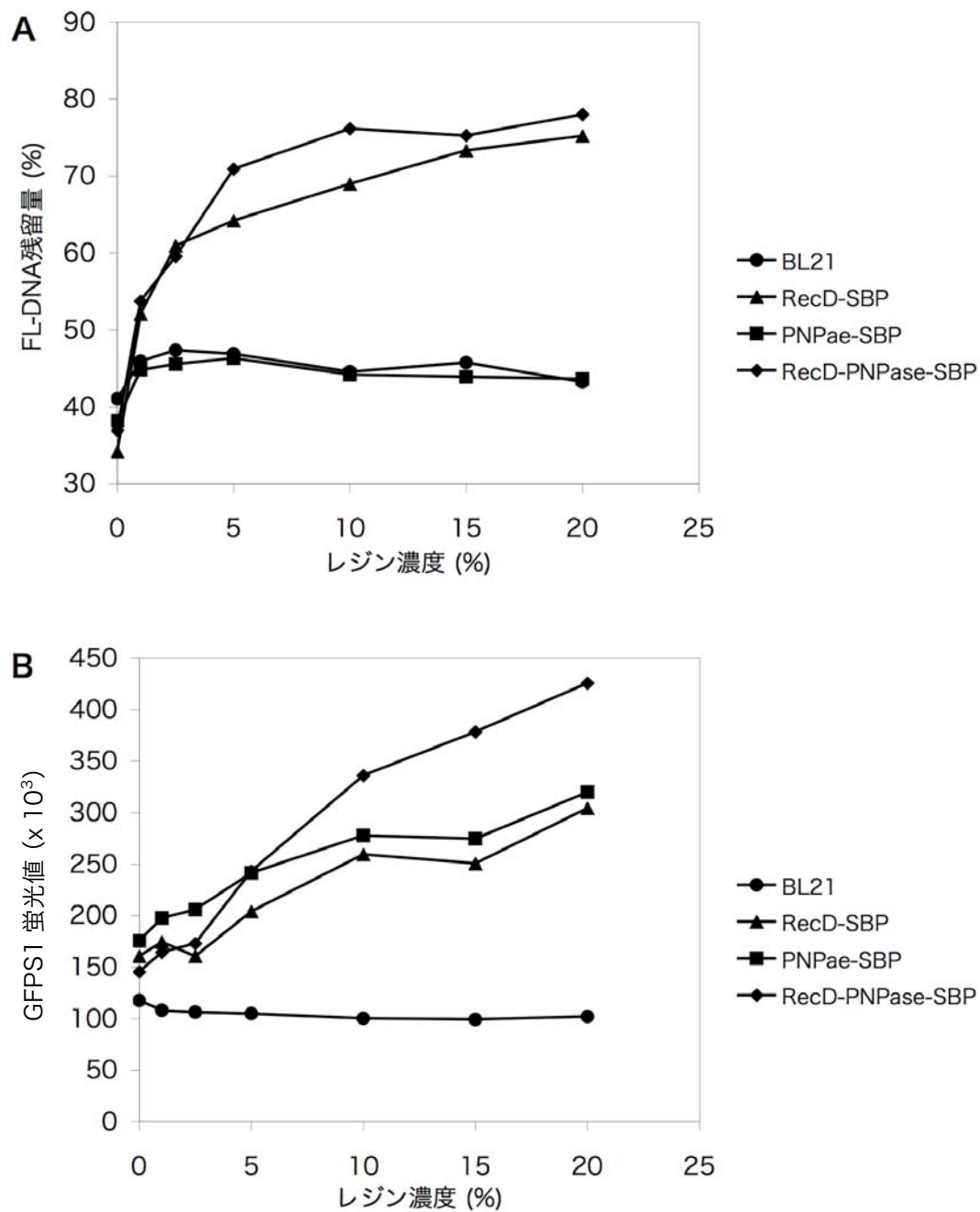


図 3.7 レジン処理細胞抽出液の DNA 分解活性と
直鎖状 DNA 鋳型の無細胞タンパク質合成量

SA-SHP レジン処理済み RecD-SBP, PNPase-SBP, RecD-PNPase-SBP, BL21 株細胞抽出液を用いて, (A)FL-DNA を用いた直鎖状 DNA 分解活性確認 (30°C, 30 分), (B) GFPS1 の直鎖状 DNA 鋳型を用いた微量透析法 (30°C, 16 時間) の無細胞タンパク質合成量確認. 合成量は蛍光値で示した.

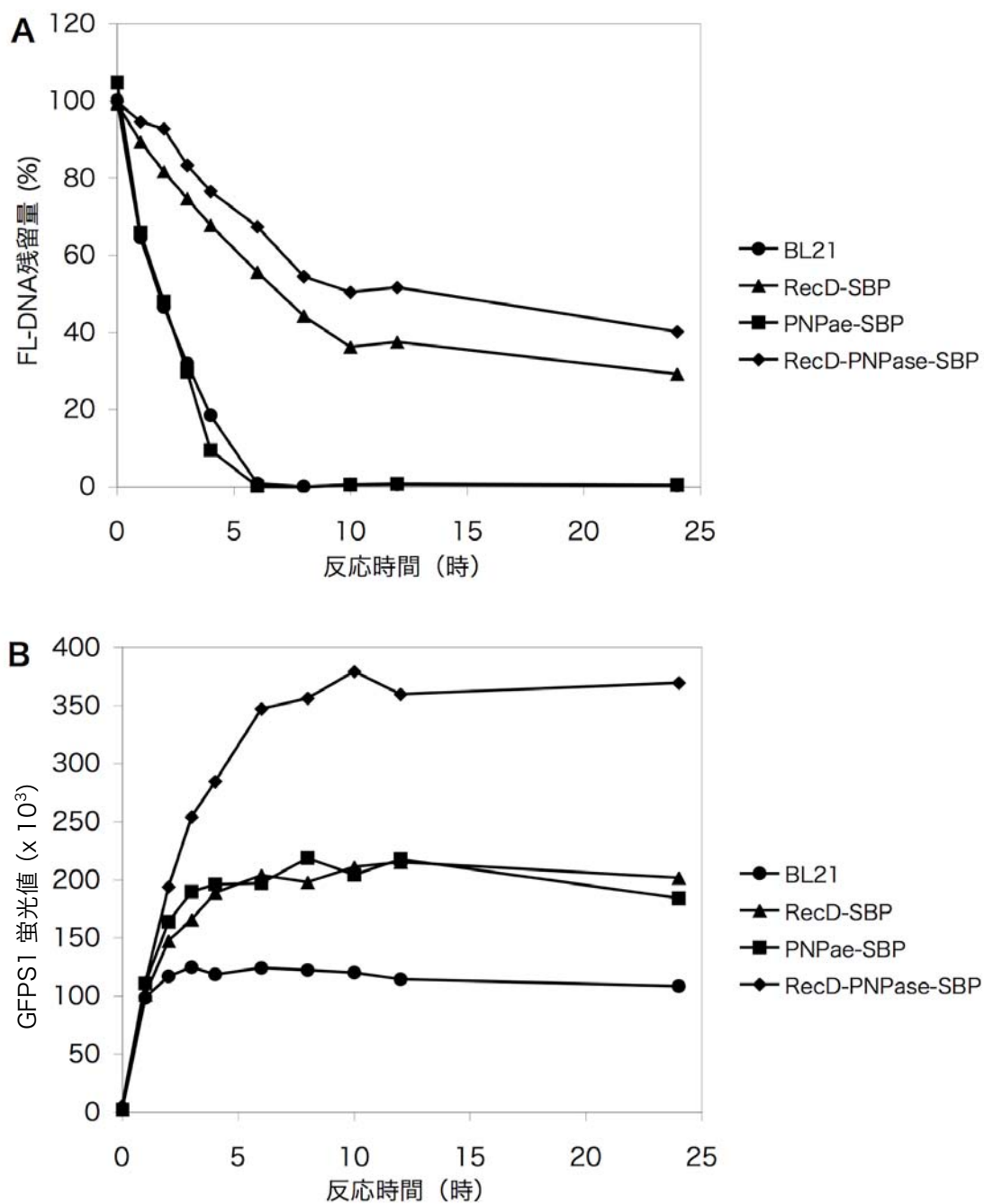


図 3.8 RecD, PNPase を減量した細胞抽出液の DNA 分解活性と
直鎖状 DNA 鋳型の無細胞タンパク質合成の時間変化

SA-SHP レジン 20%処理済み RecD-SBP, PNPase-SBP, RecD-PNPase-SBP, BL21 株細胞抽出液を用いた直鎖状 DNA (FL-DNA) 鋳型での微量透析法無細胞タンパク質合成反応液中の (A) GFP-S1 合成量と (B) FL-DNA の残留量の時間変化. 合成量は蛍光値で示した. 反応温度は 30°C.

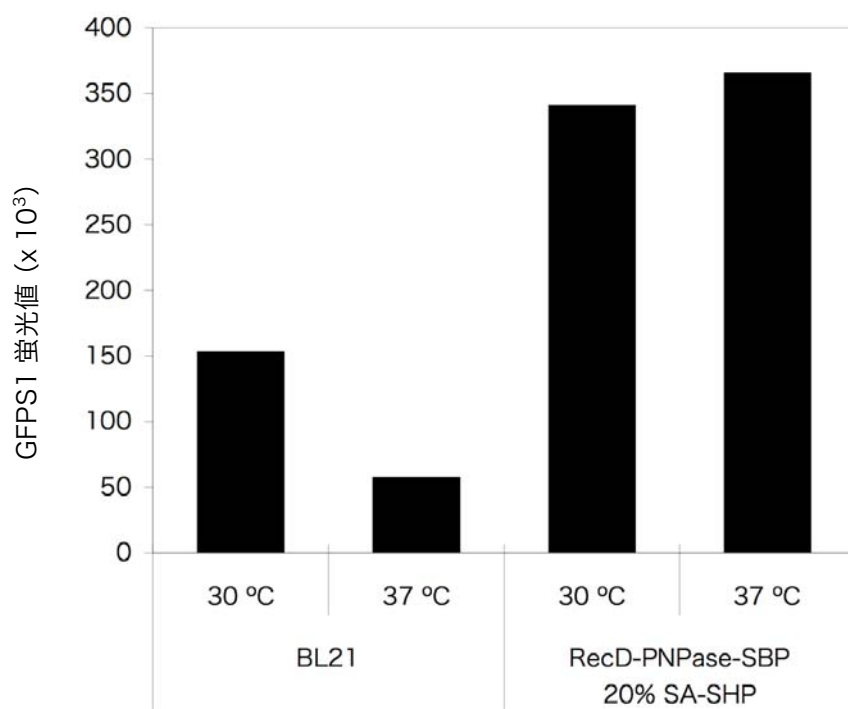


図 3.9 低温培養と RecD, PNPase を同時減量した細胞抽出液による
タンパク質合成量の比較

30°Cおよび 37°C培養で調製した BL21 および SA-SHP レジン 20%処理済み RecD-PNPase-SBP 細胞抽出液を用いた GFP-S1 の直鎖状 DNA 鋳型での微量透析法無細胞タンパク質合成反応 (30°C, 8 時間). 合成量は蛍光値で示した.

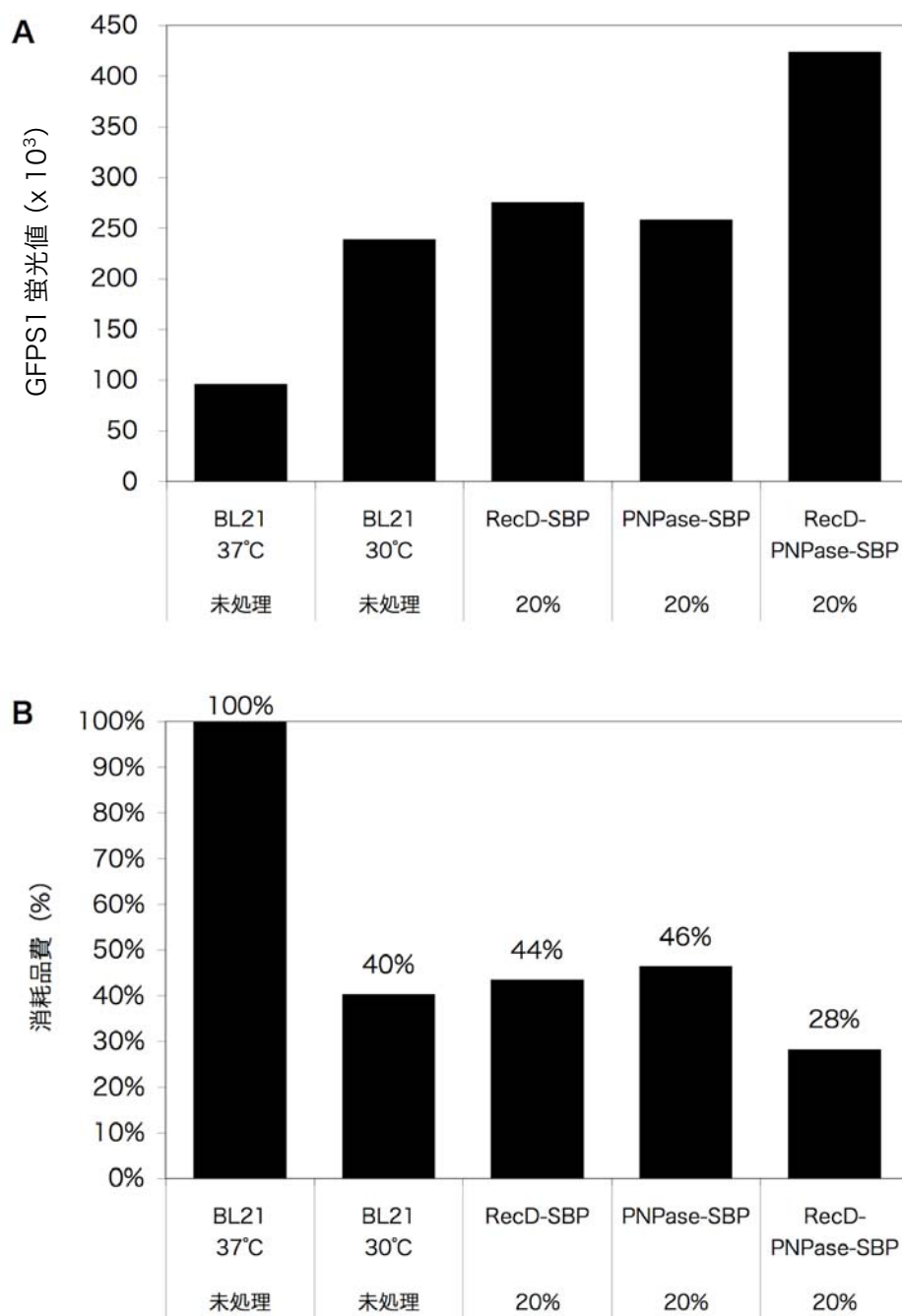


図 3.10 タンパク質合成量あたりの消耗品費の効率化

等量の GFPS1 を 30-300 μ l スケールの微量透析法無細胞タンパク質合成反応 (30°C, 16 時間) で調製するのにかかる消耗品費の比較. BL21 はレジン未処理, RecD-SBP, PNPase-SBP, RecD-PNPase-SBP は SA-SHP レジン 20%処理. (A) GFPS1 合成量, (B) 37°C培養 BL21 株使用時の消耗品費を 100%とした時の消耗品費.

第4章

総合討論

本研究は、無細胞タンパク質合成法の改良によってタンパク質試料の調製の効率化を実現することを目的として行った。

第2章では細胞抽出液調製方法の改良により、直鎖状 DNA 鋳型を用いた無細胞タンパク質合成量の増加を実現し、さらに、細胞抽出液内の RecD の存在量が直鎖状 DNA 鋳型の分解の要因であることを同定した。細胞抽出液調製における大腸菌の培養温度を 30℃以下の低温にすることで、直鎖状 DNA 鋳型での CAT タンパク質合成において従来の 3~4 倍、環状 DNA 鋳型の約 75%にあたる、1 ml あたり約 4 mg の高収量なタンパク質合成を可能になり、直鎖状 DNA を鋳型として実用に足りうる量のタンパク質が合成できたことで、タンパク質試料の多検体調製の大幅な効率化を進めることが可能になった。

まず、鋳型 DNA 調製を PCR 法によって試験管内で行うことにより、従来の環状 DNA 調製で要した多段階の実験作業および生きた細胞の使用より生じる制約が除かれ、鋳型 DNA の多検体調製が可能になった。タンパク質合成反応においても、無細胞タンパク質合成法で行うことにより、生きた細胞を用いた調製方法と比べて作業工程が短縮され、タンパク質の多検体調製が容易になった。これら鋳型調製工程とタンパク質合成工程が共に試験管内だけで完結する反応となるため、両工程のロボットを用いた自動化が容易になり、ポストゲノム研究を含むタンパク質を用いた研究への適用が可能になったと言えるだろう。本改良により、理化学研究所では青木らにより直鎖状 DNA 鋳型の調製からバッチ法を用いた無細胞タンパク質合成と合成量確認までの全工程を行うロボットが開発され、効率的なタンパク質試料の多検体調製を実現している。

タンパク質試料調製の効率化とは、調製にかかる時間と費用がバランスよく削減することだと考えられる。安価な調製であっても時間がかかりすぎでは競争にならず、速く調製出来ても、費用がかかりすぎでは資源の問題で限界に達する。特に多検体のタンパク質試料調製においては、高収量化により使用する材料の減量によるコスト削減、作業の少量化に伴う同時処理数の増大による作業時間の短縮に繋がる。工程の短縮は、使用品目の減少によるコスト削減と処

理時間の短縮に繋がる。また、工程の自動化はマンパワーの節約によるコスト削減と、24 時間無停止作業による時間の節約に繋がる。ただし自動化に伴い、ロボット導入による設備費等の初期投資や、自動化に適した作業工程への変更に伴う資材変更など、経費が増大する可能性も発生する。なお工程の自動化には、人的エラーによる実験誤差や実験者の技能の差による実験結果のバラツキの低減により、再現性の良い均質な結果を得られるという側面ある。本研究の直鎖状 DNA 鋳型を用いた無細胞タンパク質合成量の増加は、直鎖状 DNA 鋳型の導入による作業工程の短縮および自動化を実現し、多検体のタンパク質試料調製にかかる時間と費用を削減による効率化を進めたと言えるであろう。

また、従来の菌体を扱うタンパク質試料調製の実験は、実験技術の習得、法令に準じた適切な実験施設の準備などが必要であった。無細胞タンパク質合成法を用いる場合でも、環状 DNA 鋳型は精製度の高い調製が必要であり[49]、古典的で一般化された方法ではあるが、実験の難易度を上げていた。しかし直鎖状 DNA 鋳型を用いた無細胞タンパク質合成は、鋳型調製からタンパク質合成まで全ての反応が溶液を混ぜるだけの試験管内での化学反応である。また、生きた細胞を扱わないので、化学実験室での作業も可能である。よって、タンパク質調製実験に着手しやすくなり、タンパク質を用いた研究がより広く行われることを容易にすると考えられる。

本細胞抽出液調製方法は培養温度を下げるだけという簡便な改良方法であるため、導入が容易であり、無細胞タンパク質合成に用いる細胞抽出液調製方法として、広く普及することが期待される。

第 3 章では無細胞タンパク質合成方法の改良として、細胞抽出液から任意の複数因子を減量する方法を構築した。ゲノム上にタグ配列遺伝子を挿入し、アフィニティーレジンを用いて細胞抽出液から標的因子を減量する方法によって、新規な細胞抽出液調製方法を構築し、無細胞タンパク質合成法を改良した。本方法は先行研究の標的因子をコードする遺伝子の全長又は一部を欠失又は変異させた細胞株を用いる細胞抽出液調製方法と異なり、標的因子の活性を保った状態で細胞の生育と細胞抽出液調製を行う。よって、従来生じていた翻訳活性の低下や細胞増殖異常、細胞抽出液調製時に必要な因子の活性低下などの問題点を回避でき、複数の因子を対象に減量することが可能である。本章では用いるタグとアフィニティーレジンの組み合わせを検討し、モデル因子として鋳型分解に関与する RecD と PNPase を細胞抽出液から同時に減量できることを確

認した。本方法により改良された細胞抽出液を用いると、無細胞タンパク質合成反応液中の DNA および mRNA の寿命が伸び、直鎖状 DNA 鋳型での無細胞タンパク質合成量が増加し、タンパク質合成にかかるコスト面からの効率化を実現している。さらに、本改良方法では、様々な因子を組み合わせで減量することが可能であり、新しい性質を有した細胞抽出液が調製できるため、従来では難しかった様々なタンパク質試料調製が無細胞タンパク質合成によって可能になると考えられる。

以上本研究により、細胞抽出液改良のアプローチから無細胞タンパク質合成法を用いたタンパク質試料調製の効率化を進めることができた。また、目的に応じた細胞抽出液の改良を行うことが可能になった。本研究を通し、無細胞タンパク質合成法が広く一般的に用いられてタンパク質を用いた研究に寄与することを期待している。

さて、従来無細胞タンパク質合成法の高収量化に向けた戦略として、タンパク質合成反応液の組成、合成反応の方法、合成反応装置・デバイスの改良などが行われてきた。序論で述べた様に、様々な改良が行われており、最新の報告では環状 DNA 鋳型での微量透析法無細胞タンパク質合成反応で反応液 1 ml あたり 10 mg の CAT タンパク質合成が達成し [17]、様々な特徴を持ったタンパク質を合成するための改良も進み、ポストゲノム研究に貢献している。

直鎖状 DNA 鋳型を用いた無細胞タンパク質合成法の改良に着目すると、3.3.8 項で述べた細胞抽出液の改良以外の方法として、阻害物質を用いた直鎖状 DNA を分解する因子の活性抑制や、鋳型配列の改変や修飾による分解耐性を上げる方法が効果を上げている。直鎖状 DNA 分解反応の阻害には、Exonuclease V の阻害物質である λ Gam の添加による改善が報告されており [16]、バッチ法の CAT 合成において反応開始 2 時間後に約 30% の直鎖状 DNA が残っており、2~3 倍の CAT の合成量増加を達成している。鋳型配列の改変は、3'末端への T7T 配列の追加による mRNA のステムループ構造形成による mRNA 安定化 [35]、3'末端への poly (G)配列の追加による mRNA の安定化 [51]が試みられている。分解耐性を上げる末端の修飾としては、5'-ホスホチオエート保護ヌクレオシド三リン酸又はデオキシヌクレオシド三リン酸を含むプライマーを用いた PCR により修飾する方法 [53]や、PCR により自己環状化させる配列を導入する方法 [52]も報告されている。ただし、現時点で報告されている直鎖状 DNA 鋳型の無細胞タンパク質合成量の中では、本研究第 2 章で合成した 30°C 培養の細胞

抽出液で合成した CAT タンパク質約 4.1 mg/ml が最大量である。

これら大腸菌の培養方法、鋳型配列、鋳型 DNA の修飾、無細胞タンパク質反応条件、無細胞タンパク質反応組成、添加物の追加などによる改良方法は、本研究第 3 章で構築した細胞抽出液中からの複数因子を減量する方法による改良と相反するものではなく、むしろ併用することにより更なる改良を導くことができる。添加物による改良の際に、無細胞タンパク質合成反応液中に存在する添加物質を分解・代謝する因子を細胞抽出液から減量することで、より効果が増すと思われる。例えば、安定同位体標識や重水素標識したタンパク質の合成では、合成反応中のアミノ酸の代謝反応により安定同位体標識率や重水素化率が低下するが、これら代謝に関わる因子を減量した細胞抽出液と因子を抑制する阻害物質の併用で、より高度な標識タンパク質を得られることが期待できる。

さて、無細胞タンパク質合成方法の一つとして、細胞抽出液を用いない PURE system がある[68]。PURE system は大腸菌のリボソームや tRNA など翻訳合成に必要な因子をそれぞれ精製して混ぜ合わせ、タンパク質合成反応を試験管内に再構築した系である。タンパク質合成に必要な既知の成分だけで構成されており、細胞抽出液中に含まれるタンパク質合成に悪影響を与える因子などが含まれていないので、バックグラウンドの低いタンパク質合成に有効な系である。しかしながら、現時点では細胞抽出液に含まれるタンパク質合成に有効な因子が十分でなく、タンパク質合成量、タンパク質のフォールディング、および低温での合成活性低下などの点で細胞抽出液を用いた無細胞タンパク質合成法に及ばないことが報告されている[69]。今回構築した方法は細胞抽出液から不要な因子を除く戦略であり、PURE system の必要な因子を足していく戦略とは逆向きのアプローチである。現在は両方法の特性に差があり、それぞれの利点、特徴をふまえて、目的に応じて合成方法を選ぶのが望ましい。将来的に差が縮まったとき、細胞抽出液調製費用が安価な本方法の利点は大きいと考えている。

大腸菌の細胞抽出液を用いた系と真核生物の細胞抽出液を用いた無細胞タンパク質合成方法を比べると、大腸菌の系は細胞抽出液の調製方法の簡便性やタンパク質の収量などにおいて優れている。一方、真核生物由来のタンパク質の合成では、翻訳後修飾の点で真核細胞の抽出液の系の方が適している場合があり、複雑な高分子量の融合タンパク質を合成した場合には真核細胞の抽出液の系のタンパク質の活性の方が高いとする報告がある[69]。また、糖鎖を付加する修飾では真核細胞の抽出液の系でのみ実現している[24, 70]。これらのタンパク

質を大腸菌の細胞抽出液を用いた系で合成するにはさらなる改良が必要であり、今後の課題の一つである。改良には大腸菌の細胞抽出液には存在しない、真核細胞の抽出液に含まれる因子を添加する方法が考えられる。これらの添加因子を有効に働かせるためには、本研究で構築した細胞抽出液改良方法は、細胞抽出液内に含まれる添加物に悪影響を及ぼす因子を除くことが出来ることから、有効であると考えている。

タンパク質試料の調製方法としての無細胞タンパク質合成法は、上記の様に、生きた細胞を用いた合成方法と比べると様々な利点があり、多検体のタンパク質調製に適している以外にも、生きた細胞を用いないことによる毒性のあるタンパク質の調製や非天然タンパク質調製など、従来調製が困難であったタンパク質の調製を可能にする。一方、無細胞タンパク質合成反応液には細胞内に存在しない化合物が使用されており、細胞内環境と試験管内の環境の違うことにより合成されるタンパク質に影響が現れる可能性もある。細胞内に存在しない無細胞タンパク質合成反応液に含まれる化合物が、合成されるタンパク質に与える影響も不明である。そこで、より細胞内環境に近い無細胞タンパク質合成反応液を構築するために、大腸菌の無細胞タンパク質合成反応液の組成を細胞質の組成に置換する方法も試みられている[71]。また、大腸菌内の細胞質は高分子の濃度が 0.3~0.4 g/ml にもなる高密度な環境である[72]。一方、無細胞タンパク質合成反応液内は、細胞抽出液由来のタンパク質と核酸などの濃度が約 10 mg/ml であり、合成されたタンパク質を合わせても、多く見積もっても高分子濃度は大腸菌内の十数分の一と低いため、タンパク質のフォールディングやタンパク質の相互作用などに影響を及ぼしていることが考えられる。ただし、PEG などの反応液を高密度化する化合物の添加をすることで、タンパク質のフォールディングが改善することが報告されていることから[73]、無細胞タンパク質合成反応液に含まれる 4%の PEG8000 が、細胞内での合成に近い状態にして、タンパク質のフォールディングなどを助けている可能性がある。

生体試料から精製したタンパク質調製と比べると、無細胞タンパク質合成系には様々な課題が残っている。タンパク質翻訳後に複雑な修飾が行われる場合、タンパク質合成の環境が異なるため、完全に同一のものが調製できている保証はない。これは無細胞タンパク質合成法に限ったことではなく、生きた細胞を用いた合成方法、特に原核生物の細胞で真核生物のタンパク質を合成する場合にも共通する課題であり、タンパク質の翻訳速度や合成するタンパク質と相互

作用する因子量などが異なるために、正しく折り畳まった 3 次元構造を持つタンパク質が調製できる確証はない。特に大腸菌の無細胞タンパク質合成法で真核生物のタンパク質を調製する場合、細胞抽出液の組成が異なることや、真核細胞内にある小胞体などの細胞内小器官などが存在していないことなど、様々な点で異なる環境下でのタンパク質合成反応となっている。活性を確認できるタンパク質は活性測定により調製されたタンパク質の同等性を確認できるが、そうでない場合は目的に応じてどのような検証を行うべきか考慮する必要がある。これら課題については、上記糖鎖修飾の例のように様々な改良が検討されている段階であり、大腸菌の細胞抽出液を用いた系でも今後の改良により改善が進むと思われる。無細胞タンパク質合成法の開いた系という特徴は自由度が高いため、生きた細胞で合成する方法よりも、大胆な改良を行うことも可能であり、今後の進展が期待できる。

さて、本研究で構築した複数因子を同時に減量できる細胞抽出液の調製方法による改良を用いることで、どのような無細胞タンパク質合成法の進展を期待できるだろうか。一つの方向性として、無細胞タンパク質合成用の「スーパー」細胞株の構築が考えられる。今回はモデルとして鋳型の安定性に関わる RecD と PNPase を減量したが、この他にもタンパク質を分解する因子、タンパク質の合成や修飾に関与しない不必要な因子、ATP 分解に関わる因子、リン酸生成に関わる因子などにタグを挿入した細胞株を作成することで、高収量で、バックグラウンドが低く、エネルギー効率が良い、合成時間が長時間持続する無細胞タンパク質合成系が作成できると考えられる。また伸長因子 EF (Elongation factor) の減量によってペプチド伸張反応の速度を調節し、タンパク質の折りたたみ（フォールディング）を改善することも可能になると思われる。そもそも大腸菌の細胞内には未だに機能が解き明かされていない遺伝子が多く含まれており、ブラックボックスの状態である。機能未知遺伝子には、タンパク質合成に有効に働く因子も含まれるが、一方悪影響を与える因子や、タンパク質合成反応に関与しない不要な因子が含まれており、バックグラウンドが高くなる原因となっている。これは細胞抽出液を用いた無細胞タンパク質合成法の利点であり欠点でもある。BL21 Star (DE3) 株の細胞抽出液を用いると、直鎖状 DNA 鋳型だけでなく、環状 DNA 鋳型の無細胞タンパク質合成量も高くなることから、翻訳能力が高くて大腸菌のタンパク質合成の潜在能力を引き出した株の構築の余地は十分あると考えられる。大腸菌のミニマムゲノムの研究[63, 66]では染色

体を 1 メガ塩基分縮小しても高いタンパク質合成能力を維持した MGF-01 株 [67]などが作成されており、染色体が小さいことによる細胞抽出液中に含まれる因子が少なく、バックグラウンドの低い細胞抽出液が調製できると期待できる。このような株について、本研究で構築した方法を用いて細胞の生育に影響を与える因子にタグを挿入し、減量することにより、より高効率な無細胞タンパク質合成に適した細胞抽出液が調製できるようになると考えられる。

タンパク質には多様性があり、同一の条件では最適の調製を行うことは困難である。また、様々な用途に応じた修飾等の改変タンパク質の調製も求められている。このような様々な反応条件でタンパク質を調製するには、改良の容易な試験管内の反応であることは無細胞タンパク質合成方法の特徴は大きな利点である。本研究で構築した方法などを用いて合成反応液の要である細胞抽出液の改良を進め、より柔軟に様々なタンパク質の調製が進展することを期待している。

公表論文

学術論文

1. 第2章の初出

Seki E, Matsuda N, Yokoyama S, Kigawa T., Cell-free protein synthesis system from *Escherichia coli* cells cultured at decreased temperatures improves productivity by decreasing DNA template degradation. Anal. Biochem. 2008 Jun 15;377(2):156-61.

2. 第3章の初出

Seki E, Matsuda N, Kigawa T., Multiple inhibitory factor removal from an *Escherichia coli* cell extract improves cell-free protein synthesis. J. Biosci. Bioeng. 2009 doi:10.1016/j.jbiosc2009.02.011.

学会発表

国際学会ポスター発表

1. Eiko Seki, Takanori Kigawa, Natsuko Matsuda, Yoshihide Hayashizaki, Shigeyuki Yokoyama, Protein domain screening system for structural genomics, Canada-UK-Japan Symposium, February 25-27, 2002, Yokohama, Japan

国内学会ポスター発表

1. 関英子, 松田夏子, 木川隆則, 横山茂之
高効率な無細胞タンパク質合成系のための大腸菌抽出液
BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会, 第80回日本生化学会大会 合同大会) 2007年12月14日

参考文献

- [1] Blow, N., (2008) Metagenomics: exploring unseen communities., *Nature* 453, 687-690.
- [2] Morozova, O., and Marra, M. (2008) Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics., *Genomics* 92, 255-264.
- [3] Zubay, G., (1973) *In vitro* synthesis of protein in microbial systems., *Annu. Rev. Genet.* 267-287.
- [4] Roberts, B., and Paterson, B., (1973) Efficient translation of tobacco mosaic virus RNA and rabbit globin 9S RNA in a cell-free system from commercial wheat germ., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 70, 2330-2334.
- [5] Fox, A., Kan, J., Kang, S., and Wallis, B. (1965) Protein synthesis in cell-free preparations from *Drosophila melanogaster*., *J. Biol. Chem.* 240, 2059-2065.
- [6] Pelham, H., and Jackson, R. (1976) An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates., *Eur. J. Biochem.* 67, 247-256.
- [7] Kung, H., Redfield, B., Treadwell, B., Eskin, B., Spears, C., and Weissbach, H. (1977) DNA-directed *in vitro* synthesis of beta-galactosidase. Studies with purified factors., *J. Biol. Chem.* 252, 6889-6894.

- [8] Spirin, A., Baranov, V., Ryabova, L., Ovodov, S., and Alakhov, Y. (1988) A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield., *Science* 242, 1162-1164.
- [9] Alakhov, J., Baranov, V., Ovodov, S., Ryabova, L., Spirin, A., and Morozov, I., Method of preparing polypeptides in cell-free translation system, US Patent 5,478,730 (December 26, 1995).
- [10] Kim, D., and Choi, C. (1996) A semicontinuous prokaryotic coupled transcription/translation system using a dialysis membrane, *Biotechnol. Prog.* 12, 645-649.
- [11] Kigawa, T., Yabuki, T., Yoshida, Y., Tsutsui, M., Ito, Y., Shibata, T., and Yokoyama, S. (1999) Cell-free production and stable-isotope labeling of milligram quantities of proteins., *FEBS Lett.* 442, 15-19.
- [12] Sawasaki, T., Hasegawa, Y., Tsuchimochi, M., Kamura, N., Ogasawara, T., Kuroita, T., and Endo, Y. (2002) A bilayer cell-free protein synthesis system for high-throughput screening of gene products., *FEBS Lett.* 514, 102-105.
- [13] Martin, G., Kawaguchi, R., Lam, Y., DeGiovanni, A., Fukushima, M., and Mutter, W. (2001) High-yield, in vitro protein expression using a continuous-exchange, coupled transcription/ translation system., *Biotechniques* 31 948-953.
- [14] Matsuda, T., Koshiba, S., Tochio, N., Seki, E., Iwasaki, N., Yabuki, T., Inoue, M., Yokoyama, S., and Kigawa, T. (2007) Improving cell-free protein synthesis for stable-isotope labeling., *J. Biomol. NMR* 37, 225-229.
- [15] Anderson, C., Straus, J., and Dudock, B. (1983) Preparation of a

cell-free protein-synthesizing system from wheat germ, *Methods Enzymol.* 101, 635-644.

- [16] Sitaraman, K., Esposito, D., Klarmann, G., Le Grice, S., Hartley, J., and Chatterjee, D. (2004) A novel cell-free protein synthesis system., *J. Biotechnol.* 110, 257-263.
- [17] Kim, H., Kim, T., Park, C., Oh, I., Park, K., and Kim, D. (2008) Continuous cell-free protein synthesis using glycolytic intermediates as energy sources., *J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 885-888.
- [18] Morita, E., Shimizu, M., Ogasawara, T., Endo, Y., Tanaka, R., and Kohno, T. (2004) A novel way of amino acid-specific assignment in ^1H - ^{15}N HSQC spectra with a wheat germ cell-free protein synthesis system., *J. Biomol. NMR* 30, 37-45.
- [19] Kim, D., and Swartz, J. (2000) Oxalate improves protein synthesis by enhancing ATP supply in a cell-free system derived from *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* 22, 1537-1542.
- [20] Boyer, M., Wang, C., and Swartz, J. (2006) Simultaneous expression and maturation of the iron-sulfur protein ferredoxin in a cell-free system, *Biotechnol. Bioeng.* 94, 128-138.
- [21] Matsuda, T., Kigawa, T., Koshiha, S., Inoue, M., Aoki, M., Yamasaki, K., Seki, M., Shinozaki, K., and Yokoyama, S. (2006) Cell-free synthesis of zinc-binding proteins., *J. Struct. Funct. Genomics* 7, 93-100.
- [22] Tsalkova, T., Zardeneta, G., Kudlicki, W., Kramer, G., Horowitz, P., and Hardesty, B. (1993) GroEL and GroES increase the specific enzymatic activity of newly-synthesized rhodanese if present during *in vitro* transcription/translation., *Biochemistry* 32, 3377-3380.

- [23] Blobel, G., and Dobberstein, B. (1975) Transfer of proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components., J. Cell Biol. 67, 852-862.
- [24] Katz, F., Rothman, J., Lingappa, V., Blobel, G., and Lodish, H. (1977) Membrane assembly *in vitro*: synthesis, glycosylation, and asymmetric insertion of a transmembrane protein., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 74, 3278-3282.
- [25] Berrier, C., Park, K., Abes, S., Bibonne, A., Betton, J., and Ghazi, A. (2004) Cell-free synthesis of a functional ion channel in the absence of a membrane and in the presence of detergent., Biochemistry 43, 12585-12591.
- [26] Elbaz, Y., Steiner-Mordoch, S., Danieli, T., and Schuldiner, S. (2004) *In vitro* synthesis of fully functional EmrE, a multidrug transporter, and study of its oligomeric state., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 101, 1519-1524.
- [27] Watanabe, M., Hunt, J., and Blobel, G. *In vitro* synthesized bacterial outer membrane protein is integrated into bacterial inner membranes but translocated across microsomal membranes., Nature 323, 71-73.
- [28] Wu, J., and Swartz, J. (2008) High yield cell-free production of integral membrane proteins without refolding or detergents., Biochim. Biophys. Acta. 1778, 1237-1250.
- [29] Nishimura, N., Kitaoka, Y., and Niwano, M. (1995) Improvement of *Escherichia coli* cell-free system by utilization of cell extract having additional property. Problems and countermeasures., Appl. Biochem. Biotechnol. 53, 29-35.

- [30] Kigawa, T., Yabuki, T., Matsuda, N., Matsuda, T., Nakajima, R., Tanaka, A., and Yokoyama, S. (2004) Preparation of *Escherichia coli* cell extract for highly productive cell-free protein expression., J. Struct. Funct. Genomics 5, 63-68.
- [31] Yang, H., Ivashkiv, L., Chen, H., Zubay, G., and Cashel, M. (1980) Cell-free coupled transcription-translation system for investigation of linear DNA segments., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 7029-7033.
- [32] Jackson, M., Pratt, J., and Holland, I. (1983) Enhanced polypeptide synthesis programmed by linear DNA fragments in cell-free extracts lacking exonuclease V., FEBS Lett. 163, 221-224.
- [33] Michel-Reydellet, N., Woodrow, K., and Swartz, J. (2005) Increasing PCR fragment stability and protein yields in a cell-free system with genetically modified *Escherichia coli* extracts., J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 9, 26-34.
- [34] Hahn, G., and Kim, D. (2006) Production of milligram quantities of recombinant proteins from PCR-amplified DNAs in a continuous-exchange cell-free protein synthesis system., Anal. Biochem. 355, 151-153.
- [35] Ahn, J., Chu, H., Kim, T., Oh, I., Choi, C., Hahn, G., Park, C., and Kim, D. (2005) Cell-free synthesis of recombinant proteins from PCR-amplified genes at a comparable productivity to that of plasmid-based reactions., Biochem. Biophys. Res. Commun. 338, 1346-1352.
- [36] Jun, S., Kang, S., and Lee, K. (2008) Continuous-exchange cell-free protein synthesis using PCR-generated DNA and an RNase E-deficient

extract., *Biotechniques* 44, 387-391.

- [37] Ali, M., Suzuki, H., Fukuba, T., Jiang, X., Nakano, H., and Yamane, T. (2005) Improvements in the cell-free production of functional antibodies using cell extract from protease-deficient *Escherichia coli* mutant., *J. Biosci. Bioeng.* 99, 181-186.
- [38] Michel-Reydellet, N., Calhoun, K., and Swartz, J. (2004) Amino acid stabilization for cell-free protein synthesis by modification of the *Escherichia coli* genome., *Metab. Eng.* 6, 197-203.
- [39] Steward, L., Collins, C., Gilmore, M., Carlson, J., Ross, J., and Chamberlin, A. (1997) *In vitro* site-specific incorporation of fluorescent probes into β -galactosidase, *J. Am. Chem. Soc.* 119, 6-11.
- [40] Short, G. r., Golovine, S., and Hecht, S. (1999) Effects of release factor 1 on in vitro protein translation and the elaboration of proteins containing unnatural amino acids., *Biochemistry* 38, 8808-8819.
- [41] Kim, R., and Choi, C. (2001) Expression-independent consumption of substrates in cell-free expression system from *Escherichia coli*., *J. Biotechnol.* 84, 27-32.
- [42] Yamane, T., Ikeda, Y., Nagasaka, T., and Nakano, H. (2005) Enhanced cell-free protein synthesis using a S30 extract from *Escherichia coli* grown rapidly at 42 degrees C in an amino acid enriched medium., *Biotechnol. Prog.* 21, 608-613.
- [43] Zawada, J., and Swartz, J. (2006) Effects of growth rate on cell extract performance in cell-free protein synthesis., *Biotechnol. Bioeng.* 94, 618-624.

- [44] Kim, D., Kigawa, T., Choi, C., and Yokoyama, S. (1996) A highly efficient cell-free protein synthesis system from *Escherichia coli*., Eur. J. Biochem. 239, 881-886.
- [45] Liu, D., Zawada, J., and Swartz, J. (2005) Streamlining *Escherichia coli* S30 extract preparation for economical cell-free protein synthesis., Biotechnol. Prog. 21, 460-465.
- [46] Yokoyama, S. (2003) Protein expression systems for structural genomics and proteomics., Curr. Opin. Chem. Biol. 7, 39-43.
- [47] Kigawa, T., Muto, Y., and Yokoyama, S. (1995) Cell-free synthesis and amino acid-selective stable isotope labeling of proteins for NMR analysis., J. Biomol. NMR 6, 129-134.
- [48] Kigawa, T., Yamaguchi-Nunokawa, E., Kodama, K., Matsuda, T., Yabuki, T., Matsuda, N., Ishitani, R., Nureki, O., and Yokoyama, S. (2002) Selenomethionine incorporation into a protein by cell-free synthesis., J. Struct. Funct. Genomics 2, 29-35.
- [49] Kigawa, T., Matsuda, T., Yabuki, T., and Yokoyama, S. (2008) Bacterial cell-free system for highly efficient protein synthesis, in Cell-free Protein Synthesis Methods and Protocols (Spirin, A. S., and Swartz, J. R., Eds.), pp 83-97, Wiley-VCH, Weinheim.
- [50] Yabuki, T., Motoda, Y., Hanada, K., Nunokawa, E., Saito, M., Seki, E., Inoue, M., Kigawa, T., and Yokoyama, S. (2007) A robust two-step PCR method of template DNA production for high-throughput cell-free protein synthesis., J. Struct. Funct. Genomics 8, 173-191.
- [51] Lee, K., and Cohen, S. (2001) Effects of 3' terminus modifications on mRNA functional decay during *in vitro* protein synthesis., J. Biol. Chem.

276, 23268-23274.

- [52] Wu, P., Ozawa, K., Lim, S., Vasudevan, S., Dixon, N., and Otting, G. (2007) Cell-free transcription/translation from PCR-amplified DNA for high-throughput NMR studies., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 46, 3356-3358.
- [53] Watzele, M., Hoffmann, T., Nemetz, C., Heindl, D., Metzler, T., and Mutter, W., Method for improving the stability of linear DNA in cell-free *in vitro* transcription/translation systems, US Patent 7,011,958 (March 14, 2006).
- [54] Keefe, A., Wilson, D., Seelig, B., and Szostak, J. (2001) One-step purification of recombinant proteins using a nanomolar-affinity streptavidin-binding peptide, the SBP-Tag., *Protein Expr. Purif.* 23, 440-446.
- [55] Muyrers, J., Zhang, Y., Benes, V., Testa, G., Ansorge, W., and Stewart, A. (2000) Point mutation of bacterial artificial chromosomes by ET recombination., *EMBO Rep.* 1, 239-243.
- [56] Shaw, W. (1975) Chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol-resistant bacteria., *Methods Enzymol.* 43, 737-755.
- [57] Taylor, A., and Smith, G. (2003) RecBCD enzyme is a DNA helicase with fast and slow motors of opposite polarity., *Nature* 423, 889-893.
- [58] Chaudhury, A., and Smith, G. (1984) *Escherichia coli* recBC deletion mutants., *J. Bacteriol.* 160, 788-791.
- [59] Zhou, Z., and Deutscher, M. (1997) An essential function for the phosphate-dependent exoribonucleases RNase PH and polynucleotide

phosphorylase., J. Bacteriol. 179, 4391-4395.

- [60] Kushner, S. (2002) mRNA decay in *Escherichia coli* comes of age., J. Bacteriol. 184, 4658-4665; discussion 4657.
- [61] Arnold, D. A., and Kowalczykowski, S. (1999) RecBCD Helicase/Nuclease, in Encyclopedia of Life Sciences, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester.
- [62] Mohanty, BK., and Kushner, SR. (2002) Genomic analysis in *Escherichia coli* demonstrates differential roles for polynucleotide phosphorylase and RNase II in mRNA abundance and decay., Mol. Microbiol. 50, 645-658.
- [63] 森英郎, 穴澤秀治, 大腸菌のミニマムゲノムファクトリー, p. 15-32. 微生物機能を活用した革新的生産技術の最前線-ミニマムゲノムファクトリーとシステムバイオロジー. シーエムシー出版 (2007).
- [64] Yehudai-Resheff, S., Hirsh, M., and Schuster, G. (2001) Polynucleotide phosphorylase functions as both an exonuclease and a poly(A) polymerase in spinach chloroplasts., Mol. Cell. Biol. 21, 5408-5416.
- [65] Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K., Tomita, M., Wanner, B., and Mori, H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection., Mol. Syst. Biol. 2, 2006.0008.
- [66] Kato, J., and Hashimoto, M. (2007) Construction of consecutive deletions of the *Escherichia coli* chromosome., Mol. Syst. Biol. 3, 132.
- [67] Mizoguchi, H., Sawano, Y., Kato, J., and Mori, H. (2008) Superpositioning of deletions promotes growth of *Escherichia coli* with a

reduced genome., DNA Res. 15, 277-284.

- [68] Shimizu, Y., Inoue, A., Tomari, Y., Suzuki, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K., and Ueda, T. (2001) Cell-free translation reconstituted with purified components., Nat. Biotechnol. 19, 751-755.
- [69] Hillebrecht, J., and Chong, S. (2008) A comparative study of protein synthesis in *in vitro* systems: from the prokaryotic reconstituted to the eukaryotic extract-based., BMC Biotechnol. 8, 58.
- [70] Mikami, S., Kobayashi, T., Yokoyama, S., and Imataka, H. (2006) A hybridoma-based in vitro translation system that efficiently synthesizes glycoproteins., J. Biotechnol. 127, 65-78.
- [71] Jewett, M., and Swartz, J. (2004) Mimicking the *Escherichia coli* cytoplasmic environment activates long-lived and efficient cell-free protein synthesis., Biotechnol. Bioeng. 86, 19-26.
- [72] Zimmerman, S., and Trach, S. (1991) Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of *Escherichia coli*., J. Mol. Biol. 222, 599-620.
- [73] Tokuriki, N., Kinjo, M., Negi, S., Hoshino, M., Goto, Y., Urabe, I., and Yomo, T. (2004) Protein folding by the effects of macromolecular crowding., Protein Sci. 13, 125-133.

謝辞

本研究は、木川隆則教授の忍耐強いご指導のもとに行われました。先生には多大なるご苦勞をおかけしました。心から感謝いたします。

山村雅幸教授には研究を進めるにあたり貴重なご指導とご助言を頂きました。大きな視点からの先生のお話にはとても助けて頂きました。感謝いたします。

本論文をまとめるにあたり、ご指導とご助言を頂きました木賀大介准教授、三宅美博准教授、柳田保子准教授に感謝いたします。

理化学研究所生命分子システム基盤研究領域の横山茂之領域長には研究の機会と環境を与えて頂き、また論文のご指導も頂きました。感謝いたします。

同研究領域 NMR パイプライン高度化研究チームの皆様には大変お世話になりました。特に、松田夏子さんには実験のパートナーとして、時には厳しい日程の中頑張って頂き、本当にお世話になりました。心から感謝いたします。碓正臣さん、廣安文子さんには共に仕事を行う中で、たくさんの心遣いを頂きました。青木雅昭博士には論文執筆においてたくさんのご助言を頂きました。矢吹孝博士には無細胞タンパク質合成法に関する貴重なご助言を頂きました。渡部暁博士、小柴生造博士、栃尾直哉博士、葛西卓磨博士には様々な貴重なご助言を頂きました。大西哲博士、李華博士、原田拓志博士、藤倉由起子さん、元田容子さん、鞆康子さん、花田和晴さん、柳楽武志さん、佐藤真奈美さんにもお世話になりました。安田聡子さん、菊池昭子さんには様々なサポートを頂きました。上記の皆様を含む、現在および過去に研究室で一緒させていただきました皆様には、公私に渡り、本当にお世話になりました。ありがとうございます。

東京工業大学木川研究室の松田貴意博士、横山順さん、赤間悟さん、中塚公哉さんには沢山の励ましとサポートを頂きました。ありがとうございます。

最後に、常に温かく見守り、励まし、支えてくれた両親と姉妹に感謝します。