

疾患関連蛋白質の生産技術の開発

●上田 卓也 ◆田口 英樹 ◆富田 野乃

東京大学大学院新領域創成科学研究科 メディカルゲノム専攻

〈研究の目的と進め方〉

蛋白質の研究の進展がゲノム解析のように進展しない理由は、蛋白質分子の固有の特性が多様であるために、DNAのように画一的な方法論では、アプローチできない点にある。特に、蛋白質を生産と精製の手段においては、遺伝子組み換え技術により発現系が開発されているが、成功しない例も多く試行錯誤に依存しており、DNAのクローニングや塩基配列決定のようなルーティンワークには、なり得てはいない。特に、大量発現系における凝集の問題、構造の不均一さの問題、また多種類の蛋白質を同時に生産する場合の労力の問題など、さまざまなハードルがあり、ゲノムプロジェクトのようなオートメーション化されたビッグプロジェクトには適さない状態である。本研究では、私たちが開発した無細胞蛋白質合成系PURESYSTEMを用いて、迅速かつ高品質な蛋白質の生産技術の開発を行う。

〈研究開始時の研究計画〉

PUREシステムの高効率化

現在PUREシステムの蛋白質生産能は一時間当たり0.2mg/mlの合成能を有している。この合成能は、通常の細胞抽出液の合成能とほぼ同一である。しかし、PUREシステムは反応の最適化はまだ十分ではない。そのため、mg/ml以上の合成能を実現するための条件検討を詳細に行い、生細胞による発現系に匹敵するシステムへと改良する。

分子シャペロン支援型PUREシステムの構築

蛋白質を合成する場合に遭遇する困難は、そのフォールディングの問題である。PUREシステムに、さまざまな分子シャペロンのサブシステムを共存させ、フォールディングの制御を行う。時に、凝集の抑制することはきわめて重要である。すでに、蛋白質の新生ペプチドに結合することが知られているDnaK関連のシャペロンの共存システム構築に成功している。また、真核生物由来のさまざまな分子シャペロンをすでに精製しており、これらのシャペロンの組み合わせにより、真核生物型のフォールディングが可能な蛋白質の生産システムを確立する。また、翻訳修飾の可能なシステムの開発も進める。

膜蛋白質の合成システムの構築

ゲノム上の蛋白質の3割は、膜蛋白質もしくは分泌蛋白質であるとされている。また、情報伝達において膜上のリセプターからその情報伝達が始まる。従って、膜蛋白質や分泌蛋白質などの細胞質以外で機能する蛋白質の解析は疾患の病理解明において重要であり、また薬剤の開発にはこうした蛋白質の機能と構造の研究が不可欠である。PUREシステムに反転膜小胞を連列したシステムを構築し、膜蛋白質を高効率で合成可能な系を開発する。

〈研究期間の成果〉

蛋白質を合成する場合に遭遇する困難は、そのフォールディングの問題である。PUREシステムに、さまざま

の分子シャペロンのサブシステムを共存させ、フォールディングの制御を行う。時に、凝集の抑制することはきわめて重要である。すでに、蛋白質の新生ペプチドに結合することが知られているDnaK関連のシャペロンの共存システム構築に成功した。また、GroELは翻訳とカップルして蛋白質のフォールディングに関与に関与することを見いだした。また、大腸菌ゲノムにコードされる蛋白質遺伝子について、GroELとDnaKの基質の網羅的検索を行い、stringent substrateの同定に成功した。

ゲノム上の蛋白質の3割は、膜蛋白質もしくは分泌蛋白質であるとされている。また、情報伝達において膜上のリセプターからその情報伝達が始まる。従って、膜蛋白質や分泌蛋白質などの細胞質以外で機能する蛋白質の解析は疾患の病理解明において重要であり、また薬剤の開発にはこうした蛋白質の機能と構造の研究が不可欠である。PUREシステムに反転膜小胞を連列したシステムの構築を行い、膜蛋白質を高効率で合成可能な系を開発することに成功した。

〈国内外での成果の位置づけ〉

PURESYSTEMは、次世代の蛋白質生産手段として、バイオテクノロジーの基盤技術となると内外のアカデミアのみならずバイオ産業からも注目されている。また、無細胞での膜蛋白質を膜上に合成する技術は、きわめて新規性が高く、創薬ターゲットの生産技術として有望であると期待されている。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

翻訳修飾のシステムの構築と、PURESYSTEMのハイスループット化に関するけんきゅうについては、時間および予算の点で十分な成果を得るには至らなかった。

〈今後の課題〉

膜蛋白質の合成については、多くの蛋白質の合成を試み、本システムの汎用性を検討する必要がある。また、フォールディングのシステムについて、シャペロンの作用機構を明らかにしなくてはならない。また、蛋白質の合成効率を、1ml当たりmg単位になるようにシステムの改善をはかることがもっとも大きな課題である。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文

1.0602041935

Kuruma, Y., Nishiyama, K., Shimizu, Y., Muller, M. and Ueda, T. Development of a Minimal Cell-Free Translation System for the Synthesis of Presecretory and Integral Membrane Proteins, Biotechnol. Prog. 21, 1243-1251 (2005)