



低温無細胞タンパク質合成技術による難発現タンパク質の合成法

Low Temperature Cell-Free Protein Synthesis to Improve Solubility of Aggregation-Prone Proteins

矢吹孝**, 樋口佳恵**, 伊東優拓**, 木川隆則**
YABUKI Takashi HIGUCHI Kae ITO Masahiro KIGAWA Takanori

大腸菌由来の無細胞タンパク質合成系は、簡便な操作で高速にタンパク質を発現できる手法として、生命科学研究分野、創薬研究開発分野等において注目されている。これらの分野において標的とされるヒト等真核生物由来タンパク質は、標準的な合成条件においては凝集や変性を起こしやすく、正しい構造を形成できずに不溶化する「難発現タンパク質」であることがしばしばある。このような「難発現タンパク質」を可溶化状態で合成するためには低い温度でのタンパク質合成が有効であるが、従来の無細胞タンパク質合成系には、低温における合成量が低いという問題があった。

今回、コールドショックタンパク質群に着目し、低温における mRNA の構造安定化に関わるコールドショックタンパク質 CspA を用いて低温無細胞タンパク質合成系の構築を試みた。その結果、低温域 (4–23°C) におけるタンパク質合成性能を顕著に向上し、「難発現タンパク質」を可溶化して効率よく合成できることを見出した。

Escherichia coli cell extract-based cell-free protein synthesis (CF) can quickly express proteins with least procedures. This feature is advantageous for life science and pharmaceutical researches. Human proteins, which are often targeted in pharmaceutical researches, can be aggregation-prone and difficult-to-express in standard CF conditions. Protein expression at a low temperature is regarded as an effective technic to improve solubility of such proteins. However, conventional CF does not operate well at lower temperature, thus results in lower protein yield. In order to fix the problem, we focused on function of a cold shock protein, CspA, to flex undesirable mRNA structures. We found that a CF fortified with CspA dramatically improved protein yield and its soluble yield at low temperature range (4–23°C). This novel CF technology will accelerate basic life science and pharmaceutical researches that target difficult-to-express proteins.

1. はじめに

組換えタンパク質生産は、生命科学研究分野、創薬研究開発分野、産業用タンパク質生産分野において必要不可欠な技術である。タンパク質生産手法のうち、細胞抽出液を用いて、試験管内にてタンパク質合成を行う「無細胞タンパク質合成系」には以下の特徴がある。

(1) 簡便な操作で迅速 (1–16 時間) に多検体のタンパク質を合成可能である、(2) 対象タンパク質にあわせた合成系の最適化が容易である、(3) 遺伝子組換え生物を用いないため、カルタヘナ法関連の規制を受けず

に組換えタンパク質合成が可能である。特にスピードが求められる創薬研究開発分野において、強力なタンパク質合成ツールとして有用性が認められている。大陽日酸では、理化学研究所が開発した大腸菌由来の無細胞タンパク質合成系¹⁾を、「無細胞くん」キットとして商品化した (Fig. 1)。このタンパク質合成反応系は、目的タンパク質の遺伝子の転写と翻訳反応に必要な酵素類と低分子基質類 (酵素反応に必要なエネルギー源、mRNA の基質となるヌクレオチド (NTPs)、タンパク質の基質となるアミノ酸) を含む内液 (Internal solution) と、低分子基質類のリザーバーとしての外液 (External

* メディカル事業本部 S I 事業部 S I イノベーションセンター

** 理化学研究所 生命機能科学研究センター 細胞構造生物学研究チーム

solution) が、透析膜を介して接して構築される。目的タンパク質の鋳型 DNA を内液に加えると転写、翻訳反応が進み、目的タンパク質が合成される。このとき、タンパク質合成反応で消費される基質類が外液側から内液側に供給され、また、内液中で生じた老廃物が外液側に除去されるため、反応を長時間 (16 時間程度) 継続させることが可能となり、高いタンパク質合成収量 (1 mL 内液あたり最大 8 mg 程度のタンパク質) が得られる。

従来の「無細胞くん」キット等、大腸菌由来の無細胞タンパク質合成系の標準的な合成反応温度は 30–37°C であるが、この合成反応温度では、タンパク質を構成するポリペプチド鎖が正しく折りたたまれず凝集体となる「難発現タンパク質」が存在する。特に、創薬研究開発等で標的とされることの多い、ヒト等真核生物由来のタンパク質はしばしば難発現タンパク質であり、このような難発現タンパク質を正しく折りたたまれた構造の活性型として合成できる無細胞タンパク質合成系が待ち望まれていた。

難発現タンパク質は、大腸菌等の微生物を用いた組換えタンパク質生産においても、標準的な菌体培養温度 (30–37°C) ではタンパク質が正しく折りたたまれずに凝集体を生じる。この問題を解決するために菌体を低温 (4–25°C) で培養しつつタンパク質を生産し、タンパク質の折りたたみ速度を低下させることで凝集体の形成を減らし、可溶体を増やす戦略が有効であることが知られている²⁾。無細胞タンパク質合成も低温 (4–25°C) で合成反応を実施できれば同様の効果が期待されるが、既存の無細胞タンパク質合成系には低温ではほとんどタンパク質を合成できない問題があった。

この問題を解決するため、我々は大腸菌を培養中に培養温度を急激に低下させて低温ショックを与えると誘導される一群のコールドショックタンパク質 (CSP) に着目した。CSP は messenger RNA (mRNA) に結合してその構造変化を引き起こし、その結果タンパク質の翻訳反応が促進されると考えられている。そこで、CSP を従来の無細胞タンパク質合成系に組み込むことで、低温においても合成反応が効率よく進むタンパク質合成系の構築を試みた。その結果、4–30°C の広範な温度領域において合成効率のよいタンパク質合成系の構築に成功した。さらに、低温 (16–23°C) での合成反応により、凝集傾向であったヒト由来の難発現タンパク質を活性のある可溶体として合成できることを確認したので報告する³⁾。

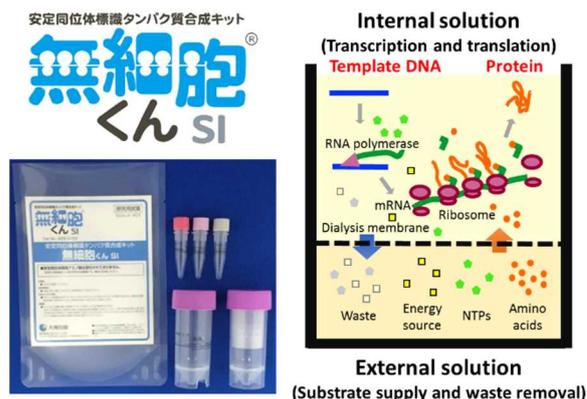


Fig. 1 Outline of cell-free protein synthesis kit, Musaibo kun

2. 材料

2.1 CspA タンパク質の調製

大腸菌由来 CSP の 1 種, CspA タンパク質 (Uniprot: P0A9X9) をコードする遺伝子を遺伝子合成により調製し、サブクローニングにより pCR2.1-N11-CspA プラスミドを得た。これを鋳型として、無細胞タンパク質合成系を用いて N11-CspA タンパク質を合成した。N11-CspA タンパク質よりアフィニティ精製、タグ切断、イオン交換カラム精製、バッファー交換を経て精製 CspA タンパク質を得た³⁾。

2.2 評価用タンパク質の選定

一般的なモデルタンパク質として緑色蛍光タンパク質 (GFP, green fluorescent protein)、難発現タンパク質としてヒト adenylate kinase isoenzyme 1 (hAK1, UniProt: P00568) とヒト phosphoglycerate kinase 1 (hPGK1, UniProt: P00558) を選定し、タンパク質合成用の鋳型として pGFPS1, pCR2.1-N11-hAK1 および pCR2.1-N11-hPGK1 をそれぞれ用いた³⁾。

2.3 タンパク質合成

無細胞タンパク質合成は 30 μ L, 1 mL もしくは 9 mL スケールの透析法で実施した³⁾。

3. 実施例

3.1 CspA 添加した無細胞タンパク質合成系の特性

まず、CspA を添加した無細胞タンパク質合成系の基本的な特性を知るため、各種合成温度 (4–30°C)、各種 CspA 添加量 (0–1.5 μ g/ μ L) において、18 時間の透析法による合成反応を行った場合のモデルタンパク質 GFP の合成量を調査した (Fig. 2)。GFP はその活性体の合成量を蛍光で容易に定量可能であるた

め、基礎的な合成能力の調査に適している。

標準的な合成温度 30°Cにおいては、CspA の添加による合成量への影響はほとんど見られなかったが、それ以下の温度では CspA の濃度依存的に合成量が増大した。特に 20, 23°Cにおいては、増大が顕著であり、1 µg/µL CspA 以上添加した場合に 30°Cと同等の合成量が得られた。8, 12, 16°Cにおいても、絶対的な GFP の合成量は 30°Cのそれに及ばないものの、CspA 濃度に依存した増大が観測された。

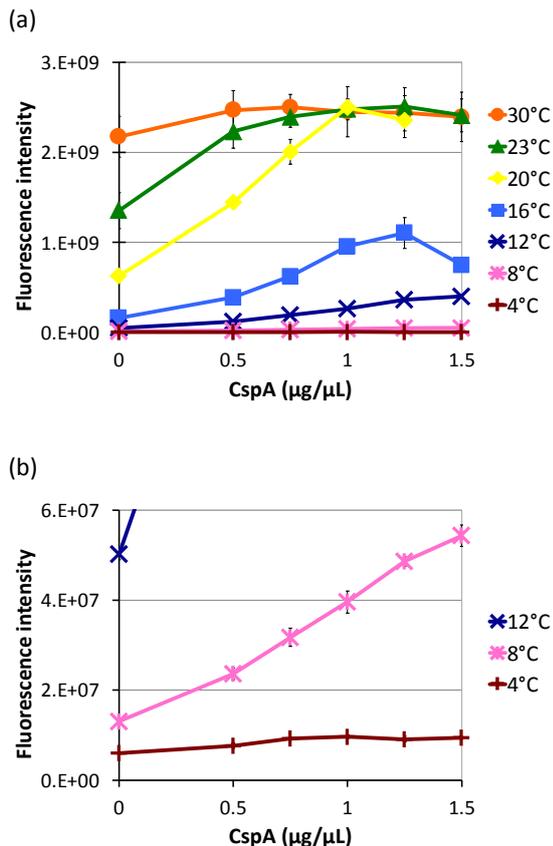


Fig. 2 Effect of CspA addition on GFP synthesis yield at various temperatures. (a) GFP yield is represented as fluorescence intensity. (b) Magnified view of low fluorescence region (0–6E+07 FI) of (a).

各温度における CspA 未添加時の合成量に対する相対合成量としては、4–23°Cの広範な温度領域にわたり増大が見られ、各温度における相対合成量の最大は 150–800%であった。特に、8–20°Cにおいて増大は顕著であり、400–800%であった (Fig. 3)。広い低温領域 (4–23°C) にわたり、CspA 添加が合成量増大に有効であることが明らかとなった。

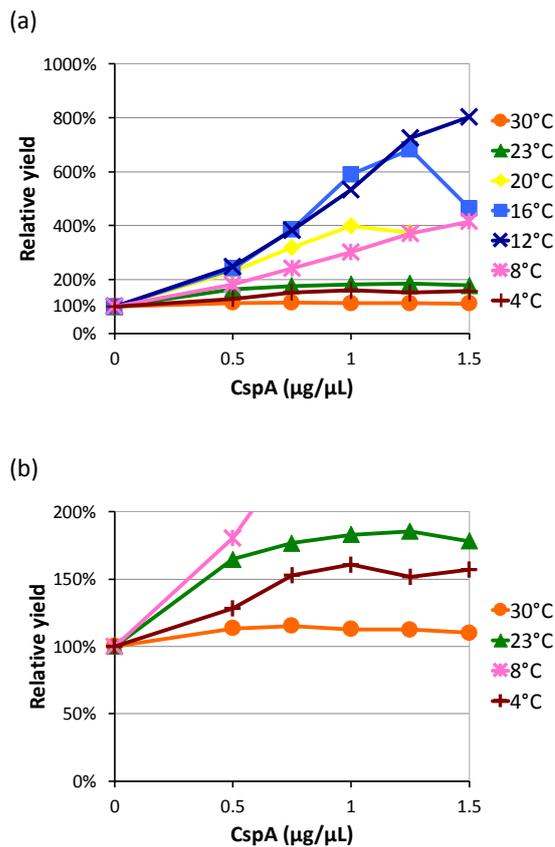


Fig. 3 Effect of CspA addition on relative GFP synthesis yield at various temperatures. (a) GFP yield relative to that without CspA, calculated from Fig. 2a. (b) Magnified view of low yield region (0–200%).

16, 23, 30°Cにおける GFP の合成を蛍光以外の方法で確認するため、タンパク質合成の反応液のポリアクリルアミドゲル電気泳動 (以下、SDS-PAGE) 分析を実施した。この分析法では、タンパク質の活性の有無、可溶性にかかわらず、合成された GFP の総量をバンド強度から見積もることができる。その結果、蛍光による定量結果 (Fig. 2) に相応する GFP のバンド強度が得られた (Fig. 4)。したがって、どの温度においても GFP は同程度に正しく折りたたまれた活性体として合成されていると考えられた。

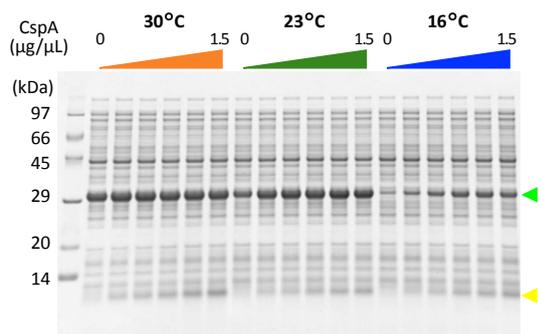


Fig. 4 SDS-PAGE of CF reactions at various temperatures and various CspA concentrations. Green and yellow arrowheads represent the band of GFP and CspA, respectively.

3.2 GFP 合成タイムコース

次いで、低温タンパク合成において反応がどの程度の期間継続するかを調査するため、16、23、30°Cにおける GFP の合成タイムコースを取得した (Fig. 5)。30°Cにおいては CspA 添加の有無に関わらず、およそ 16 時間程度で合成反応は終了した。16、23°Cにおいては、時間経過とともに合成速度は低下するものの、少なくとも 40 時間まで合成反応が継続した。特に、23°C、40 時間反応においては 30°C 反応時より 3 割ほど多くのタンパク質が合成できた点は注目し値する。低温において合成時間が延長された原因としては、タンパク質合成に関わらない無駄なエネルギー代謝、アミノ酸、 mRNA の代謝が抑えられた等が考えられる。

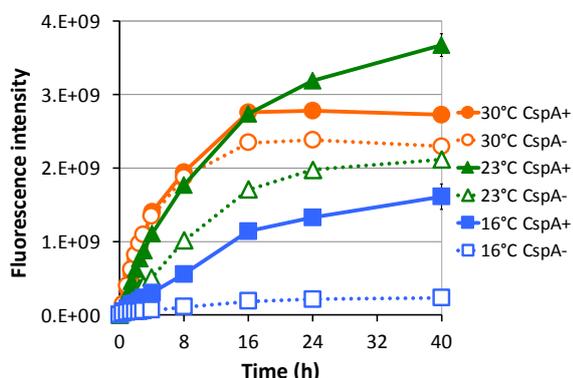


Fig. 5 Time-course of GFP production with or without CspA at various temperatures.

3.3 難発現タンパク質の合成

CspA のヒト由来の難発現タンパク質の合成への効果を調査した。ヒト Adenylate kinase isoform 1 (hAK1) とヒト Phosphoglycerate kinase 1 (hPGK1) を透析法にて 18 時間合成し、合成量と可溶性を SDS-PAGE により分析した (Fig. 6)。

hAK1 は 30°C 反応において高い合成量が得られるものの、可溶性が低かった。30°C 反応、CspA 添加時にも可溶性には変化が見られなかった。一方、20°C 反応では合成された hAK1 のほぼ全量が可溶性となった。20°C 反応、CspA 未添加時には合成量が低かったが、CspA 添加時には 30°C 反応と同程度まで合成量が向上し、かつほぼ全量が可溶性となった。また、hPGK1 は CspA 添加時に 20°C 反応における合成量が向上した。

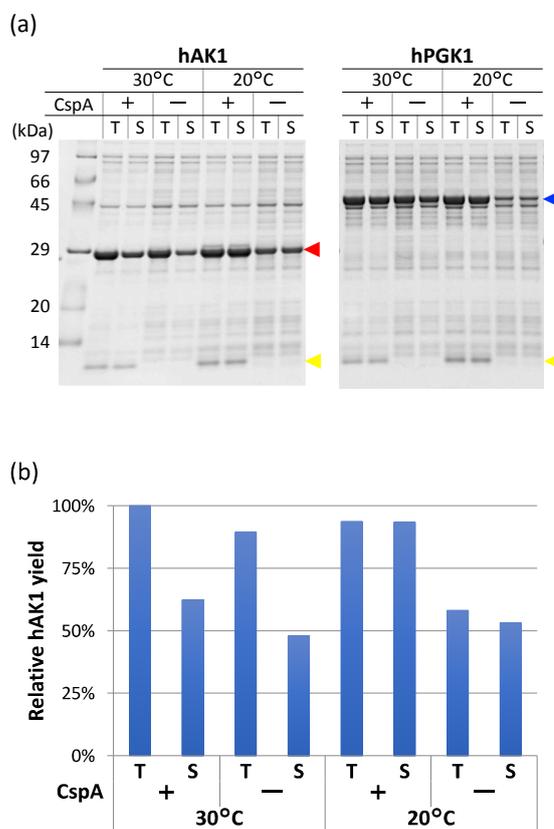
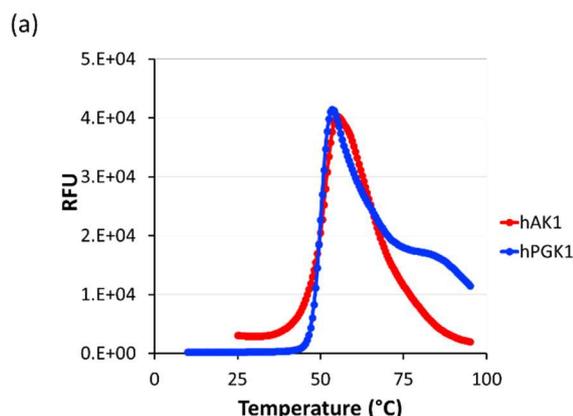


Fig. 6 Effect of CspA addition on hAK1 and hPGK1 synthesis. (a) SDS-PAGE of CF reactions at various temperatures with and without CspA. Lane T, total fractions; lane S, soluble fractions. Red, blue and yellow arrowheads represent the band of hAK1, hPGK1 and CspA, respectively. (b) hAK1 yield relative to that of total fraction without CspA at 30°C quantified by densitometry of the bands on (a).

3.4 低温合成した難発現タンパク質の安定性と活性試験

低温合成された hAK1 と hPGK1 の熱安定性と酵素活性を調べるため、16°C, CspA 添加, 透析法にて合成反応を実施し, タンパク質を精製した。熱安定性試験は, CFX96 Touch リアルタイム PCR (Bio-Rad 製) にて, メーカー推奨の Protein Thermal Shift Assay プロトコルを用いて実施した。熱安定性試験では, hAK1 と hPGK1 とともに既存の報告^{4), 5)}と近い変性温度が観測された (Fig. 7)。

活性定量試験は, 既報^{4), 6)}の方法で実施した。活性定量試験においては, 基質との結合強度, ミカエリス定数 K_m は既報と同程度, 酵素の代謝回転数 k_{cat} は既報^{4), 6)}より高い値が観測された。既報のタンパク質と同程度以上の比活性を持つタンパク質が得られたことが確認された。



Protein	Melting temperature (°C)	
	This study	Previous report
hAK1	52	55 (T_{50}) ⁴⁾
hPGK1	50.3	52.8 (T_m) ⁵⁾

(b)

Protein	This study		Previous report		Substrate
	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	
hAK1	0.30	4200	0.38 ⁴⁾	842 ⁴⁾	AMP
hPGK1	0.93	1100	3.3±0.5 ⁶⁾	490±30 ⁶⁾	3-phosphoglycerate

Fig. 7 Stability and activity of hAK1 and hPGK1 synthesized by CF. (a) Protein thermal shift assay. (b) Kinetic parameters.

4. まとめ

無細胞タンパク質合成系に CspA タンパク質を終濃度で 0.5–1.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 添加することより, 標準的な合成温度 (30–37°C) より低い温度 (4–23°C) でも合成反応の進む無細胞タンパク質合成系を構築できた。特に, 20–23°Cにおける合成量は 30°Cにおける合成量と同程度まで向上した。また, 低温合成は難発現タンパク質の合成

にも効果的であった。本技術により, 無細胞タンパク質合成の簡便, 迅速に発現できる特徴を, 創薬研究開発分野において対象となるヒト等の真核生物由来の難発現タンパク質にも存分に生かすことが可能となる。

本低温無細胞タンパク質合成系は室温域においても効率よいタンパク質合成反応が可能であることから, これまで反応に必須であった保温インキュベーター設備なしでも合成可能となる。作業手順はより簡単になり, 実験用分注ロボットを用いた作業自動化にも親和性が高い。また, 屋外等実験室以外におけるタンパク質合成等, まったく新たな領域への応用も期待できる。

本技術は無細胞タンパク質合成をより使いやすく, より活性体タンパク質の合成成功率を高めるものである。本技術を組み込んだタンパク質合成キットの商品化を進め, 無細胞タンパク質合成の新たなスタンダードとしてゆきたい。

参考文献

- (a) Kigawa, T., Inoue, M., Aoki, M., Matsuda, T., Yabuki, T., Seki, E., Harada, T., Watanabe, S., Yokoyama, S. (2007). The use of the Escherichia coli cell - free protein synthesis for structural biology and structural proteomics. In A. S. Spirin & J. R. Swartz (Eds.), *Cell - free protein synthesis methods and protocols*. (pp. 99–109). Weinheim: Wiley - VCH.; (b) Kigawa, T., Yabuki, T., Matsuda, N., Matsuda, T., Nakajima, R., Tanaka, A., & Yokoyama, S. (2004). Preparation of Escherichia coli cell extract for highly productive cell - free protein expression. *Journal of Structural and Functional Genomics*, 5(1–2), 63–68.; (c) Matsuda, T., Koshiba, S., Tochio, N., Seki, E., Iwasaki, N., Yabuki, T., Inoue, M., Yokoyama, S., Kigawa, T. (2007). Improving cell - free protein synthesis for stableisotope labeling. *Journal of Biomolecular NMR*, 37(3), 225–229.
- Shirano, Y., & Shibata, D. (1990). Low - temperature cultivation of Escherichia coli carrying a rice lipoxigenase L - 2 Cdna produces a soluble and active enzyme at a high - level. *FEBS Letters*, 271(1–2), 128–130.
- (a) Higuchi, K., Yabuki, T., Ito, M., Kigawa, T. (2020) Cold shock proteins improve E. coli cell - free synthesis in terms of soluble yields of aggregation - prone proteins. *Biotechnology and Bioengineering*, 117(6), 1628–1639; (b) 特願 2019-134081
- Abrusci, P., Chiarelli, L. R., Galizzi, A., Fermo, E., Bianchi, P., Zanella, A., & Valentini, G. (2007) Erythrocyte adenylate

kinase deficiency: Characterization of recombinant mutant forms and relationship with nonspherocytic hemolytic anemia. *Experimental Hematology*, 35(8), 1182–1189.

- 5) Pey, A. L., Mesa - Torres, N., Chiarelli, L. R., & Valentini, G. (2013) Structural and energetic basis of protein kinetic destabilization in human phosphoglycerate kinase 1 deficiency. *Biochemistry*, 52(7), 1160–1170.
- 6) Vopel, T., & Makhatadze, G. I. (2012) Enzyme activity in the crowded milieu. *PLOS One*, 7(6):e39418.