

翻訳促進技術の開発とタンパク質生産・機能評価への応用

名古屋大学大学院 生命農学研究科 加藤 晃代

【略歴】

2008 年：名古屋大学大学院 生命農学研究科 修士課程修了
2008 年～2012 年：日本食品化工株式会社 研究所
2012 年～2016 年：公益財団法人科学技術交流財団・知の拠点あいち重点研究プロジェクト 研究員
2013 年：名古屋大学 生命農学研究科にて博士（農学）取得
2013 年～2017 年：名古屋大学大学院 生命農学研究科 客員研究員
2016 年～2017 年：名城大学総合研究所 研究員（兼任）
2017 年～2018 年：日本学術振興会 特別研究員 PD
2018 年～2020 年：iBody 株式会社 代表取締役、研究開発部長
2020 年～2022 年：日本マイクロバイオファーマ
2018 年～2022 年：名古屋大学大学院 生命農学研究科 客員研究員（兼任）
2022 年～：名古屋大学大学院 生命農学研究科 助教（現在に至る）

はじめに

微生物や動・植物細胞等を用いた異種タンパク質生産技術は、ライフサイエンス研究のみならず、持続可能なバイオ産業の発展に必須な技術の一つであり、「いかに効率的にタンパク質を生産するか」は、機能するタンパク質（酵素、抗体、分化因子、輸送体等）の探索や評価、そして実用化工程において常につきまとう最も重要な課題のひとつである。近年、合成遺伝子の作製技術やゲノム編集技術など、核酸を扱う技術水準が飛躍的に進歩し、さらに mRNA の構造エネルギー等を考慮した塩基配列の最適化技術、コドン最適化技術などもウェブツールとして利用可能となり、もはや、どのような遺伝子でも任意の宿主で自由に発現できるようなプラットフォームが整ってきている。しかしながら、実際にはタンパク質を自由自在に組換え生産できるわけではなく、原因不明で生産性が低い・あるいは全く出来ない「難発現タンパク質」と呼ばれるものが存在し、世界中のバイオ研究者・技術者らを悩ませているのが事実である。難発現な原因としては、mRNA の構造やコドンの問題、分解されやすい、そもそも真核生物由来タンパク質は原核系ではできにくい、などの話が存在するが、明確な原因が分かっていない場合が多い。従って、生産したいタンパク質が難発現である場合、培養条件・コドン・他のタンパク質との融合・宿主ベクター系の見直しなど、手間と時間（＝コスト）のかかる試行錯誤が必要である。そこで、本研究では、難発現タンパク質の生産量を増大するための簡便な手法の開発と、より合理的なタンパク質生産量改善・制御法の開発を目指した。

タンパク質の生産量を増大させるペプチドの開発と有用タンパク質（モノクローナル抗体）探索系への応用

モノクローナル抗体 (mAb) は、動物の免疫反応により作られるタンパク質であり、狙った分子に強く結合するという特性を活かし、治療薬や診断薬、センサーとしての利用が拡大している。我々は、ウサギやヒトなどの動物の抗体産生細胞である B 細胞を材料とし、シングル B 細胞から mAb 遺伝子を増幅し、大腸菌無細胞系タンパク質合成系により 90 分程度の反応で mAb フラグメントを合成し評価可能な迅速かつ低コストな mAb 探索・評価技術の開発を目指した。当初は「抗体遺伝子によって、生産できるものもあれば、全くできないものがあり、その理由が分からない」という課題があったが、N 末端に SKIK (Ser-Lys-Ile-Lys) というペプチドを付加することにより、殆ど生産できなかった抗体の生産量を数十倍以上にも増大でき、機能する改変型抗体として評価できるようになることを見出した 1, 2。本 SKIK ペプチドタグは、当該配列をコードする 12 塩基を仕込んだ DNA プライマーで PCR を行うのみで

導入可能であり、簡単でコストもかからず、遺伝子内部配列が不明である場合でも試せるという利点があった。

翻訳促進ペプチドの酵素への応用

上述の SKIK ペプチドタグは、大腸菌無細胞タンパク質合成系だけではなく、大腸菌生細胞系および酵母発現系においてもタンパク質生産量増大効果があり、さらに、抗体遺伝子だけでなく、大腸菌でなぜか生産困難な様々な難発現タンパク質遺伝子に対し生産量増大効果があることがわかった 3, 4。また、その後、上述の SKIK ペプチドによるタンパク質生産量増大メカニズムを解明できれば、簡単にタンパク質を大量に作るための技術開発に繋がると考え研究を進めた。当初は、コドンや mRNA の構造が重要である可能性を考慮していたが、これまでに、1) SKIK をコードするコドンの影響はないこと、2) 転写ではなく翻訳効率を向上させていること、3) 翻訳工程で生じる SKIK という新生ペプチドがリボソームを加速するような働きがあること、4) N 末端ではなくても翻訳促進効果を発揮できること、などの驚くべき結果が得られてきている 5。さらに、リボソームの内部成分と相互作用し翻訳を停滞させてしまうことで知られるアレストペプチド (AP) とを組み合わせた実験により、SKIK ペプチドが、下流の AP による翻訳停滞作用を打ち消し、結果的に全長タンパク質の生産量を増大可能であることや、SKIK ペプチドと AP との距離がアレスト打ち消しのために重要な因子であることを見出した 6。現在は、SKIK のような翻訳促進ペプチド配列の探索・同定を進めると同時に、大腸菌においてなぜか異種生産困難な酵素遺伝子をターゲットとし翻訳促進ペプチド配列を利用したタンパク質生産量増大を試みている。

今後の展望

自然界やデータベースには未利用なタンパク質が豊富に存在しており、AI を活用した新機能タンパク質のデザインは今後ますます盛んになると考えられる。SKIK のような翻訳促進配列の拡充とそれらを利用した難発現タンパク質の配列改変技術は、そのような新機能の優れた性質のタンパク質の探索・評価や、これまで生産困難が故に未利用であったり機能評価ができなかったりしたタンパク質の利用拡大に資するものと期待される。今後も、微生物やタンパク質の産業利用を加速すべく、自由自在にタンパク質を生産できる未来を目指した研究に取り組みたいと考えている。

謝辞

本研究は、主に知の拠点あいち重点研究プロジェクト I 期、名古屋大学、および名城大学にて行われました。研究遂行にあたり、田村廣人教授（名城大学）および中野秀雄教授（名古屋大学）をはじめ名古屋大学生命農学研究科分子生物工学研究室のスタッフの皆様、学生の皆様に多大なるご協力をいただきました。関与していただいた皆様に心より感謝申し上げます。

引用文献

1. Ojima-Kato, T. et al., Sci. rep., 7, 13979 (2017)
2. Ojima-Kato, T. et al., Antibodies, 7, 38 (2018)
3. Ojima-Kato, T. et al., J. Biosci. Bioeng., 123, 540 (2017)
4. Ritthisan, P. et al., J. Biosci. Bioeng., 126, 705 (2018)
5. Ojima-Kato, T. et al., J. Biol. Chem. 299, 104676 (2023)
6. Nishikawa, Y. et al., bioRxiv, <https://doi.org/10.1101/2024.02.28.582505> (2024)