

無細胞蛋白質合成系の高度化と蛋白質工学への応用

名古屋大学大学院生命農学研究科 中野秀雄

無細胞タンパク質合成系は、細胞抽出液中に存在するリボソームや翻訳因子、tRNA などの諸因子の働きにより、DNA あるいは mRNA からその遺伝子産物を生合成させるシステムであり、1) 反応系の制御が容易である、2) PCR 産物を鋳型としてタンパク質を合成できる、3) 細胞毒性を示すようなタンパク質の合成が可能である、4) 非天然アミノ酸の導入が容易であるなど、生細胞による合成系とは異なる様々な利点が存在する。

我々はこれまで上記1)の利点を生かし、生細胞での発現が容易でない微生物リパーゼ¹⁾、放線菌ホスホリパーゼ D²⁾、白色腐朽菌マンガンペルオキシダーゼ³⁾、抗体 Fab 断片⁴⁾などを、シャペロンとの共発現、酸化還元状態の制御、ヘムの添加などにより、活性体として合成することに成功している。

さらに我々は、無細胞蛋白質合成系と一分子 PCR と組み合わせ、タンパク質ライブラリーを試験管内だけの反応で構築する新規な技術(Single-Molecule-PCR-Linked in vitro Expression: SIMPLEX)を開発した。右図にその概要を示す。まず変異遺伝子集団を PCR プレート上に平均1分子/ウェルになるように分配する。次にPCRによりその一分子を増幅して、マイクロプレート上でDNAライ

ブラリーを作るといものである。このDNA断片にあらかじめプロモーター配列を付けておき、次に無細胞蛋白質合成系を加え反応させることで、タンパク質分子ライブラリーが作製できる。SIMPLEX 法は PCR に4時間、無細胞

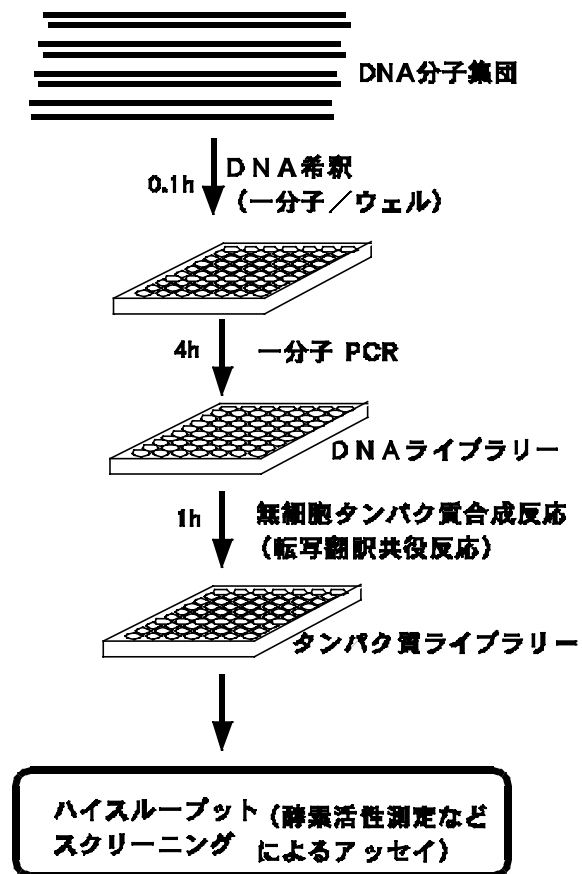


図 SIMPLEX法の概要

蛋白質合成に1時間しか必要とせず、アッセイを含めても6時間以内に1サイクルが終了する。

以上のように **SIMPLEX** によるライブラリー構築法は、1) 無細胞タンパク質合成系を用いるため、タンパク質合成の自由度が高い、2) 操作法が単純で機械化、マイクロ化が容易である、3) サンプル間のばらつきが少なく、均一性が高いライブラリーが得られる等の特徴を有している⁵⁾。

この新規ライブラリー構築法の応用例として、*Burkholderia cepacia* KWI-56由来リパーゼの基質特異性の改変を目的とした研究を行った。用いた基質は *p*-ニトロフェニル 3-フェニルブチレートで、野生型リパーゼはこの基質に対して、**(S)**体選択性を示す。基質とリパーゼの反応中間体のモデルを構築し、基質と接していると推定されるアミノ酸残基を推定してコンビナトリアル変異を導入し、**(R)**体基質に対するスクリーニングを試みた。その結果、野生体と同等な比活性を有し光学選択性が反転している変異体を多数得ることができた。さらに得られた変異体は熱安定性も野生体と同様に高かったことから、同様の分子活性および性状を有しながら、基質に対する光学選択性だけが反転しているいわば「ミラー酵素」の創出に成功したといえる^{6,7)}。

さらに我々はこの新規な手法を用いて、白色腐朽菌由来マンガンペルオキシダーゼ過酸化水素耐性の向上³⁾、単鎖 Fv の親和性の上昇⁸⁾などにも成功しており、無細胞蛋白質合成系を利用した新機能蛋白質創製技術として確立しつつある。

- 1) Yang, J. et al. J. Bacteriol., **182**, 295(2000).
- 2) Iwasaki, Y. et al. J. Biosci. Bioeng., **89**, 506 (2000).
- 3) Miyazaki-Imamura C. et al. Protein Eng., **16**, 423 (2003).
- 4) Jiang X. et al. FEBS Lett. **514**, 290 (2002).
- 5) Rungpragayphan S. et al. J. Mol. Biol., **318**, 395(2002).
- 6) Koga Y. et al. J. Mol. Biol., **331**, 585 (2003).
- 7) 山根恒夫, 中野秀雄. 日本農芸化学会誌, **78**, 751(2004).
- 8) Rungpragayphan S., et al. J. Mol Cat. B, Enzymatic, **28**, 223 (2004).