

B/O バイオテクノロジー ジャーナル

2007年3-4月号 掲載記事

本コンテンツの著作権につきまして YODOSHA CO., LTD. 2007

・本コンテンツに掲載された著作物の複写権・複製権・転載権・翻訳権・データベースへの取り込みおよび送信（送信可能化権を含む）・上映権・譲渡権は、(株)羊土社が保有します。

・JCLIS <(株)日本著作出版管理システム委託出版物>

本コンテンツの無断複写は著作権法上での例外を除き禁じられています。複写される場合は、そのつど事前に(株)日本著作出版管理システム (TEL 03-3817-5670, FAX 03-3815-8199) の許諾を得てください。

タンパク質発現システムの最新ツールと受託サービス

タンパク質の構造や機能を研究する上で、その生産システムは欠くことのできない技術です。近年、大腸菌等の一般的な手法の他に、無細胞システムも利用されるようになってきました。本製品特集では、さまざまなタンパク質生産システムの特長・活用法を概論として解説し、企業協賛記事では関連する製品・アプリケーション事例をご紹介します。

◆概論◆タンパク質発現システムの歴史と利用法

遠藤弥重太 230

◆協賛企業記事◆

迅速・高収量の哺乳細胞発現システム“FreeStyle™ 293, CHO”

インビトロジェン株式会社 234

「スーパーワーム」 カイコーバキュロ系タンパク質生産システムの最前線

片倉工業株式会社 236

小麦胚芽無細胞タンパク質合成技術 (ENDEXT®テクノロジー) が拓く新たな世界

株式会社セルフリーサイエンス 238

コールドショック発現系とMazFを利用したSingle Protein Production System (SPP System®) ならびにタンパク質発現受託のご紹介

タカラバイオ株式会社 240

◆協賛企業◆

インビトロジェン株式会社
片倉工業株式会社
株式会社セルフリーサイエンス

タカラバイオ株式会社
プレジジョン・システム・サイエンス株式会社

本記事のアンケートにご協力ください。抽選で
羊土社オリジナルグッズをプレゼントいたします

本コンテンツの著作権につきまして YODOSHA CO., LTD. 2007
・本コンテンツに掲載された著作物の複写権・複製権・転載権・翻訳権・データベースへの取り込みおよび送信（送
信可能化権を含む）・上映権・譲渡権は、(株)羊土社が保有します。
・UCIS <(株)日本著作出版管理システム委託出版物>
本コンテンツの無断複写は著作権法上での例外を除き禁じられています。複写される場合は、そのつど事前に
(株)日本著作出版管理システム (TEL 03-3817-5670, FAX 03-3815-8199) の許諾を得てください。

■FAX ⇒ このページ
■WEB ⇒ こちらをクリック

☆☆☆☆☆☆☆☆☆☆ アンケートにご協力ください ☆☆☆☆☆☆☆☆

抽選で毎月5名様に『羊土社ロゴ入り オリジナルタイマー』をプレゼント!!

プレゼント対象期間：2007年5月末日まで（当選者の発表は商品の発送をもってかえさせていただきます）



私どもバイオテクノロジージャーナル編集部では、皆様方の声をお聞きして、今後の雑誌や書籍発行の参考にさせていただきますと存じております。ぜひ、アンケートへのご協力をいただけますようお願い申し上げます。

1) バイオテクノロジージャーナル3-4月号 製品特集「タンパク質発現システムの最新ツールと受託サービス」を読んだ感想を教えてください

☐ 役に立った ☐ 役に立たなかった ☐ どちらともいえない

◎理由

2) 本特集の中で、最も興味深かった、面白かった協賛企業記事はどれですか？

- ☐ 「迅速・高収量の哺乳細胞発現システム“FreeStyle<TM> 293, CHO”」 インビトロジェン株式会社
☐ 「“スーパーフォーム” カイコ・バキュロ系タンパク質生産システムの最前線」 片倉工業株式会社
☐ 「小麦胚芽無細胞タンパク質合成技術 (ENDEXT<R> テクノロジー) が拓く新たな世界」 株式会社セルフリーサイエンス
☐ 「コールドショック発現系とMazFを利用したSingle Protein Production System (SPP System<R>)」
 ならびにタンパク質発現受託のご紹介 タカラバイオ株式会社

◎選んだ理由

3) 本特集に掲載されている協賛企業の詳しい資料をご希望される方は、☐ にレ印をご記入ください

※資料請求いただいた方については、羊土社がとりまとめ、該当広告主にお渡しします。それ以降は各社それぞれの責任において管理され、資料のご案内をさせていただきます

- ☐ 全ての資料を請求する ☐ インビトロジェン株式会社 ☐ 片倉工業株式会社 ☐ 株式会社セルフリーサイエンス
☐ タカラバイオ株式会社 ☐ プレジジョン・システム・サイエンス株式会社

4) 今後、製品特集として取り上げて欲しいテーマを教えてください

FAX 03-3292-1224 羊土社 バイオテクノロジージャーナル編集部 行

送
付
先
・
連
絡
先

ご住所 〒

ご所属

お名前

TEL

E-mail

※羊土社メール配信ならびに小社出版物のご案内に使用させていただきます。また、ご本人の許可なく第三者へ提供することはございません。内容のご確認、修正、削除のご希望がございましたら、弊社までお申し出下さい。万が一小社出版物のご案内がご不要の場合には下記チェック欄にレ印をお付けください。尚、羊土社の個人情報の取扱いに関しては次のURLをご覧ください。お願い申し上げます。
<http://www.yodosha.co.jp/ppi/index.html> ☐ 羊土社発行書籍の案内は不要です

〒101-0052
東京都千代田区神田小川町2-5-1 神田三和ビル
TEL 03(5282)1215 (編集部)
E-mail: btjournal@yodosha.co.jp
URL: http://www.yodosha.co.jp/

FAX番号: 03(3292)1224

発行 **羊土社**

「バイオテクノロジー ジャーナル」定期購読申し込み

本誌は定期でのご購読がお得です。定期購読をご希望でしたら、下記にご記入ください。

年 ・ 月号から 1 年間 6冊 14,175円 (10% OFF 税込) 定期購読する

<概論> タンパク質発現システムの歴史と利用法

遠藤弥重太

遺伝子情報をもとに、タンパク質を自由自在にハイスループット合成する技術確立することは、ポストゲノム研究に向けた必須課題である。従来の生細胞を基盤とする組換え法には、生産できるタンパク質の分子種などに限界があったし、無細胞タンパク質合成法には、合成量・コスト高など、実用的ではなかった。本特集では、近年とみに技術開発のめざましい両タンパク質生産法の最先端システムを紹介するとともに、生細胞系と無細胞系それぞれの優れた特性と限界などについて紹介する。

ポストゲノム研究に向けたタンパク質調製

ヒトをはじめ、高等生物や微生物のゲノム解析が進展し、多くの遺伝情報が日々蓄積してきている。遺伝子構造解析から得られる情報は、タンパク質を構成するアミノ酸の結合順序であるが、言わば生命体素子の単語のスペルが解読されただけで、その意味については不明である。DNA巻物に記載されている生き物の生涯をひもとくため、あるいは優れた生物機能を産業に利用するためには、まず1つ1つの遺伝子暗号をもとに活性を保持したタンパク質へと物質変換し、その機能や構造を解明することが必要となる。ゲノム情報を最大限に利用する21世紀のタンパク質生物学と生命科学産業の方向性と、実現に向けて必要とされる技術開発を図に展望した。

かつて、Thyrotropin Releasing Hormone 研究に、65万頭のブタと羊の頭を実験に用いた話は有名である。ところが今日においても、タンパク質をハイスループット調製することは容易なことではない。ポストゲノム時代に対応できるタンパク質生産法の要件としては、①種々生物遺伝子ソースから活性を保持し

たタンパク質をゲノムワイドに調製できること、②操作が安全で簡単、③低コスト、かつ、④生命倫理にやさしい、ことであろう。

この5年ほどの間に、生細胞をベースとした組換え技術や無細胞タンパク質合成技術が進展し、それぞれの手法を使い分けることによって、タンパク質のリフォールディング操作なしでも、ゲノム情報を利用するためのほぼ初期の要件を満たすまでになってきた(図、橙色-黄色部分)(表1)。本特集では、遺伝子産物の機能・構造解析に焦点を絞りポストゲノム研究に向けたハイスループットタンパク質生産法について、生細胞系¹⁾²⁾、および無細胞系³⁾のそれぞれの優れた特性と限界などについて紹介する。特にわが国におけるタンパク質生産技術は世界をリードするレベルにあることから、タンパク質の発現技術、アプリケーション例や受託合成サービスについても、企業から紹介していただく。

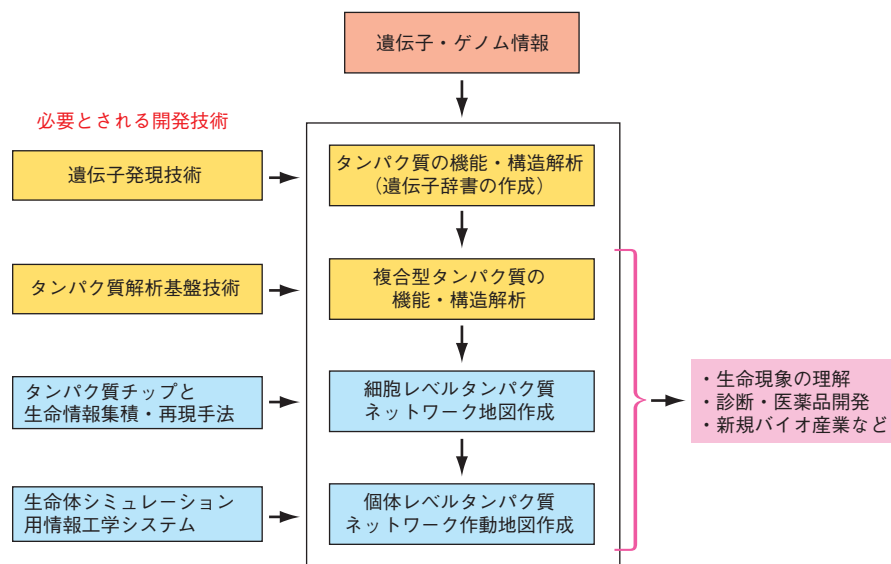
組換え法によるタンパク質生産法

i) 技術開発の歴史

今日のタンパク質生産法の主流となっ

ている組換え法は、1970年代初期の黄色ブドウ球菌の耐性遺伝子(β -Lactamase)が大腸菌で発現するという発見から誕生した。続く一連の研究、すなわち、酵母などの下等真核生物の遺伝子が大腸菌では発現するものの高等真核生物の遺伝子発現は起きないという現象の追求から、組換え技術が大きく発展してきた。そして、組換えタンパク質生産法はインターフェロンのような動物に微量しか存在しないタンパク質の大量生産を可能にした。

生きた細胞内で活性を保持したタンパク質が合成されるには、遺伝子の正確な転写、高い翻訳鑄型活性をもつmRNA構造(5'末端の翻訳促進配列と宿主細胞に合った翻訳コドン使用)に加えて、新生ペプチド鎖の修飾や切断プロセッシングが必要である。このために、種々のDNA配列を組み込んだ発現ベクターが開発されてきた。すなわち、遺伝子の転写活性を上げるプロモーター、翻訳促進配列(大腸菌mRNAの例ではShine-Dalgarno配列や昆虫ウイルスのもつIRES配列の利用)、新生ペプチドの小胞体膜への移行とその切断に必要なシグナルペプチド合成用の塩基配列や、精製・リポータータグ融合用のDNA配列である。タンパク質



図●ゲノム情報の利用に必要な技術開発と、ポストゲノム時代の科学と産業

の生産にあたっては目的に合致した発現ベクターの構築が必要となるが、今日では、種々の目的に合ったベクターが市販されている。

もう1つのキーは、宿主細胞の選択であるが、種々の特性をもった宿主の研究開発も同時に進展しており、多様な「宿主生物－ベクター系」が確立されている。すなわち、一般的な大腸菌や酵母を利用する系の他にも、枯草菌、糸状菌系、植物個体（培養細胞）、昆虫個体（培養細胞）、や動物個体（培養細胞）などから目的に応じた組換え系を選ぶことができる。

ii) 製品の特徴

組換え法によるタンパク質生産法のなかでも最もよく利用されているのが培養の簡単な大腸菌などの原核生物発現系で、生産タンパク質の精製操作を簡便にすることを目的として枯草菌等を宿主とする菌体外分泌系、高熱菌タンパク質の生産や耐熱タンパク質の創成手段として高熱菌を宿主とする組換え系も開発され

ている。しかしながら、原核生物を宿主とする発現系の最大の限界は、真核生物に多いマルチドメインタンパク質を高品質で生産することが困難な点にある。これは、原核生物と真核生物が進化の過程で至適化された翻訳産物のフォールディング機構の差異に起因すると考えられている。すなわち、前者は翻訳後フォールディング様式 (Post-translational Folding) で、後者のそれは翻訳と共役したフォールディング (Co-translational Folding) である。その分子機構についてはほとんど不明であるが、真核生物遺伝子を原核生物翻訳系で発現させた場合、リボソーム上でのペプチド合成速度が真核生物の10倍程度高速であるために〔新生ペプチド鎖はリボソーム粒子のトンネル（疎水環境）から水溶液中に放出される〕、より速度の遅いフォールディング反応が追いつけないものと、定性的には説明されている³⁾。

しかし、大腸菌系を用いるマルチドメインタンパク質生産技術が最近開発され

た。タカラバイオ株式会社（240頁参照）は、低温プロモーターをうまく利用し、転写速度とリボソームのペプチド合成速度を低下させることによって、マルチドメインタンパク質のミスフォールディング問題を解決しようとする大腸菌・コールドショックベクター技術と、目的タンパク質特異的な標識を可能とするSingle Protein Production Systemを開発している。

実用的な高等動物細胞を宿主とするタンパク質生産法として、昆虫、昆虫細胞や哺乳動物由来培養細胞系をあげることができる。片倉工業株式会社（236頁参照）は、カイコとバキュロウイルスを組み合わせた「スーパーワーム」システムを確立している。この技術は、翻訳後修飾生産されるタンパク質の生産を可能とし、天然型に近い構造を有する産物の生産に適している。

哺乳動物由来のタンパク質生産には、本来の環境に近いシステムで発現させることが重要であるとの観点から、インビ

表1 ●組換え系と無細胞系の性能比較

操作・性能など	組換え系	無細胞系
合成・精製の操作	細胞培養の熟練・労力 遺伝子設計による制御 制限あり（宿主生理攪乱） 可能（未修飾産物は困難） 通常は困難 ～数mg/1ml培養液	生化学反応なので容易 反応制御，全自動化が可能 非天然型タンパク質も可能 両分子型の調製が可能 容易（標識アミノ酸の添加） ～数mg/1ml反応液
合成可能な分子種		
分子の修飾		
特異的な同位体標識		
合成収量	1	1/3
産物の品質検定費用	あり	遺伝子組換えの規制なし
生物汚染のリスク	あり	なし
生命倫理問題		

トロジェン株式会社（234頁参照）は、哺乳動物細胞であるHEK293由来細胞やCHO細胞を宿主細胞として用いるFreeStyle™ MAX Expression Systemを開発している。

無細胞法による タンパク質生産法

組換え生産法の欠点としては、培養やタンパク質発現誘導条件の設定などに熟練を要することから、“誰にでも・何時でも・思いのまま”にゲノムワイドなタンパク質生産ができないことである。さらに、一般的にはタンパク質の修飾をコントロールすることや複合体タンパク質の合成が難点である。なかでも、生細胞の生理を攪乱するタンパク質の生産は原理的に困難を伴うことが多い。また、SARSウイルス研究者が実験中に感染し、死に至るといった不幸な例も記憶に新しい。このような問題点を解決する手段として、生命科学と化学的手法を融合し、生物体の優れた特性を最大限に利用しようとする、無細胞タンパク質合成法をあげることができる。

i) 技術開発の歴史

無細胞タンパク質合成法とは、生体の遺伝情報発現系を人工容器内に取り揃え、遺伝子DNAからタンパク質を鋳型合成する試験管内合成法である。無細胞タンパク質合成法は、生細胞中のそれと同

等のペプチド合成速度と正確性を保持しており、さらに、生きた生命体を利用しないので生理学的制約を受けることがなく、合成可能な分子種を飛躍的に拡大できることが期待できる。しかしながら、試験管内へ取り出した翻訳酵素群のアミノ酸重合活性は不安定で得られる収量がきわめて低く、タンパク質の調製法としては利用できなかった。A. Spirinらは、翻訳反応の進行に伴って消費される基質（アミノ酸、ATP、GTP）を反応槽へ連続的に供給すると同時に、合成されたタンパク質や翻訳阻害副産物（ピロリン酸など）を限外濾過膜を通して反応系外へ排除する連続式無細胞タンパク質合成反応法を考案した。実際、この反応法を用いて大腸菌抽出液を利用する無細胞タンパク質合成反応を行うと、従来のバッチ反応方式のタンパク質合成量をはるかに上回る収量を得ることができる。しかし、前述のように大腸菌には原核生物に生来備わっている翻訳反応様式の特長から、*in vivo*であれ*in vitro*系であれ、真核生物に多いマルチドメインタンパク質を活性型フォームで合成することにもとものと大きな限界があった。

一方、ウサギ網状赤血球溶血液を酵素源とする無細胞系も、高等生物の遺伝子産物の同定手法として利用されてきた。しかし、tRNA種がグロビンmRNAのコドン使用に特化されていることや、溶血操作過程で網状赤血球膜から混入するリボ

ヌクレアーゼMによってmRNAが消化されるためにタンパク質合成効率が低く、タンパク質の調製法としては利用できなかった。

その他、酵母、培養癌細胞等を材料とする多くの真核生物無細胞系が開発されているが、いずれも翻訳酵素群の不安定性に起因する低い合成収量の問題点があった。コムギ胚芽など高等植物の胚芽には、発芽（冬期）に備えて活性の高い翻訳装置を大量に貯蔵しているので、無細胞系調製の優れた材料であると考えられた。しかしながら、他の無細胞系と同様に、試験管内に取り出した翻訳酵素系が不安定なために、タンパク質の調製法としては利用できなかった。

ii) コムギ胚芽無細胞システム

筆者らは、すべての無細胞系に一般的にみられる翻訳反応の不安定化現象解明の研究から得た知見をもとに、真核生物コムギ胚芽無細胞タンパク質合成システムの効率化・安定化に成功し、その他の新規要素技術を統合することによって、実用的な無細胞タンパク質合成プロトコルを完成させた。表2に、バージョンアップされた3種類の実用的な無細胞タンパク質合成法の特長をまとめた。表2からわかるように、コムギ胚芽無細胞タンパク質合成法は、前述の組換えタンパク質生産法の欠点をほぼカバーできる。実際、ウィスコンシン大学のJ. Markleyらは、本法を真核生物タンパク質の

表2●代表的な無細胞タンパク質合成系の性能比較

産物の特性	大腸菌	ウサギ網状赤血球	コムギ胚芽
フォールディング	翻訳終結後	翻訳共役	翻訳共役
翻訳産物の品質 ^A	低い	高い	高い
翻訳コドン選択性	狭い	狭い	広い
修飾反応 ^B	困難	可能	可能
膜タンパク質 ^C	可能	可能	可能
S-S結合	可能	困難	可能
価格	低	高	低

A：高等動物のマルチドメインタンパク質産物の酵素活性やリフォールディング未処理試料の抗原活性。

B：小胞体膜（犬臍臓）共存下におけるコア糖鎖の付加。

C：タンパク質の生産は可能であるが不溶性なので、リフォールディング処理が必要。

NMR解析用試料調製に利用し、その有用性を従来の大腸菌組換え法と比較している⁴¹⁾。

しかし、本コムギ無細胞法は未だオールマイティーではない。例えば、膜貫通ドメインの多い膜タンパク質では、合成産物の大部分が不溶化しているため、リフォールディング処理を必要とする。界面活性剤の選択やリボソームを共存させるなどの合成技術改良が残された課題である。実用的な真核生物型無細胞タンパク質合成法については、**株式会社セルフリーサイエンス（238頁参照）**が紹介する。

iii) 今後の展望

以上のようにしてタンパク質成分野は研究開発に注目を浴びているが、新規バイオ産業の創出に向けては、タンパク質複合体、膜タンパク質複合体や種々の

修飾タンパク質の生産、さらに、生物情報関連など（図、青→ピンク色）の新規基盤技術の開発が必要である。

参考文献

- 1) 組換えタンパク質生産法, 「生物化学実験法

45」(塚越規弘/編): 学会出版センター, 2001

2) Studier, F. W.: Protein Expression Purif., 41: 207-234, 2005

3) Endo, Y. et al.: Current Opinion in Biotechnology, 17: 1-8, 2006

4) Vinarov, D. A. et al.: Nature Methods, 1: 149-153, 2004



遠藤弥重太 (Yaeta Endo)

愛媛大学教授。

1946年に徳島県で生まれる。徳島大学医学部栄養学科卒業、保健学博士。徳島大学助手、講師、シカゴ大学生命科学研究所でポストクの後、山梨医科大学助教授を経て、1991年から愛媛大学教授。現、無細胞生命科学工学研究センター長・愛媛大学理事。赤痢菌毒素など、リボキシンの分子機作の解明に続く、リボソームの構造・機能解析にプローブとして利用した研究からSarcin-Ricin Loopを発見し、リボソームRNAの機能的な重要性を示した。これらの知見をもとに、コムギ無細胞タンパク質合成法の実用化に成功(1999年)した。本技術をベースとして、遺伝子辞書の完成とタンパク質ネットワーク解析用基盤技術の開発を進めている。

迅速・高収量の哺乳細胞発現システム “FreeStyle™ 293, CHO”

インビトロジェン株式会社 粥川堅太郎

哺乳動物由来のタンパク質を活性のある状態で生産するためには、本来機能している環境に近いシステムで発現させることが重要となります。インビトロジェン株式会社では従来手間と技術を要した哺乳動物細胞タンパク質生産システムを改良し、HEK293由来細胞からmg単位で組換えタンパク質を効率よく生産する“FreeStyle™ MAX Expression System”を販売・受託生産しております。本稿では最近上市したCHO細胞由来の新製品も含めてこれらのシステムについて紹介します。

FreeStyle™ 293 Expression System の紹介

従来、哺乳動物から大量に組換えタンパク質を生産するためには、COS7やCHO細胞から安定株を作製し、そのなかから高発現する株を選別して大量培養する必要がありました。しかし、安定株の作製には手間と技術を要し、数多くの組換えタンパク質を得るためには多大な労力が必要となります。弊社ではこれらの問題を解決し、迅速に高収量の組換えタンパク質を得るために“FreeStyle™ 293 Expression System”を販売しております。

このシステムでは293細胞から浮遊培

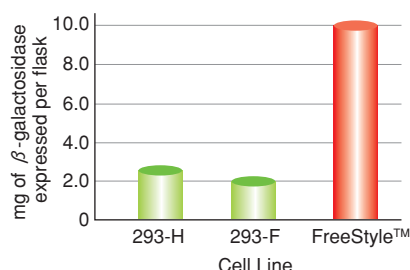


図1 ●通常の293細胞（293-H, 293-F）とFreeStyleシステムの発現量の比較

通常の細胞に比べてFreeStyle 293-F細胞では3～5倍の発現量の増加が見られました

養に適し、かつ組換えタンパク質の生産量が高い細胞株“FreeStyle™ 293-F”を樹立し、専用のトランスフェクション試薬“293fectin”を用いることで、通常の293細胞に比べて発現量を3～5倍増加させました（図1）。また一般的に哺乳細胞から高収量の組換えタンパク質を得るためには安定株の樹立や無血清浮遊培養への馴化などの操作のため期間が2～6

カ月必要となりますが、このシステムではプラスミドからの一過性発現であるため、わずか2～7日で高収量の組換えタンパク質を得ることができます（図2）。しかも、動物由来成分を含まない無血清培地を使用するため結果が安定しやすいこと、浮遊培養であるためスケールアップが容易であることなどが利点としてあげられます。発現量も1 l培養で最大

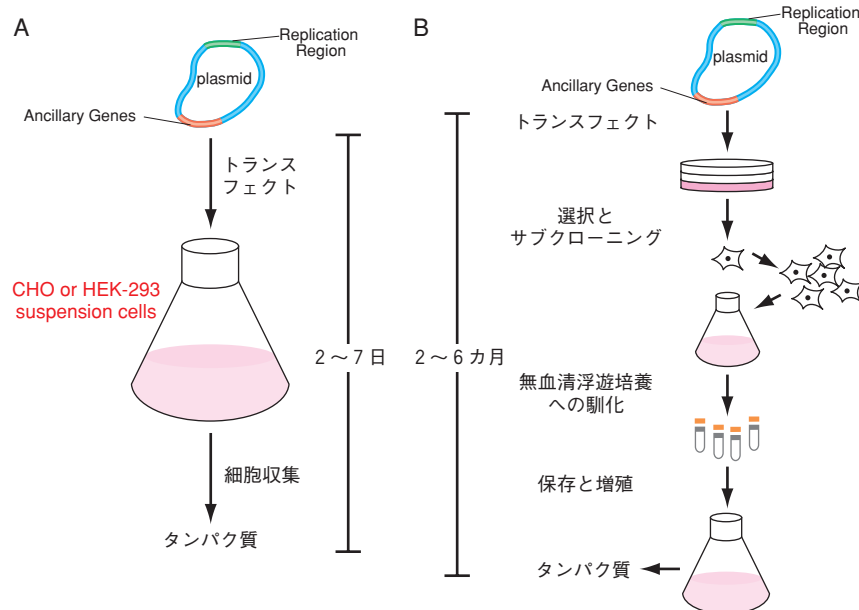


図2 ●一過性発現と安定株発現での作業期間の比較

A) Free Style™ 293. 通常、数月かかる発現がわずか1週間で終わります。B) 従来の安定株発現法

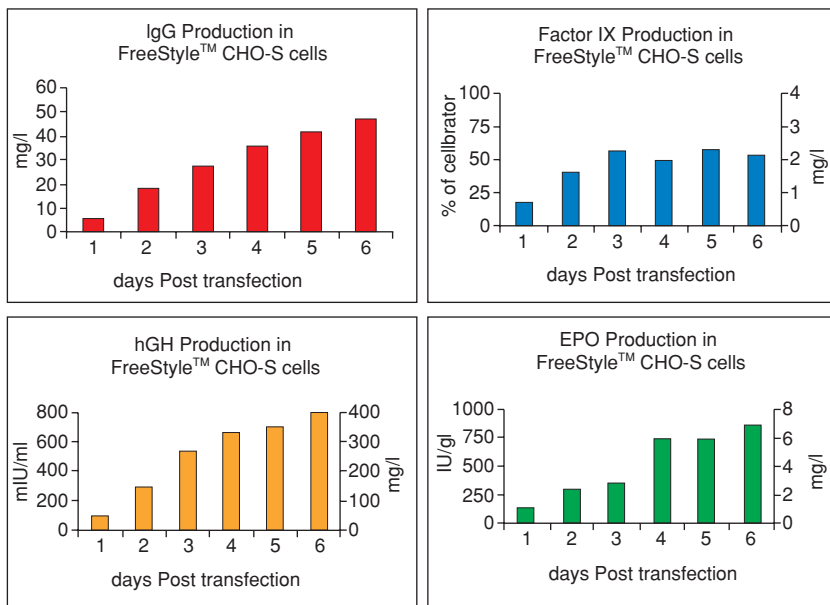


図3●FreeStyle CHO-Sを用いた場合のタンパク質生産量
1lあたり数mgから400mgものタンパク質発現が見られました

400mgの組換えタンパク質が得られたというデータもあり、他の発現系に比べても発現量に遜色はありません。

CHO細胞も扱えるようになった新製品 FreeStyle™ MAX Expression System

新製品の“FreeStyle™ MAX reagent”というトランスフェクション試薬は、FreeStyle™ 293細胞での発現を高めるだけでなく、新たに樹立した“FreeStyle™ CHO”細胞へのトランスフェクションにも利用できます。タンパク質の生産量もFreeStyle™ 293と同様に高発現が期待できます(図3)。293細胞がヒト由来であるのに対して、CHO細胞はハムスター由来ですので、目的タンパク質をより本来の環境に近づけたい場合や逆に同種から

のタンパク質の混入を避ける際に使い分けをする場合などご利用の幅が格段に広がりました。

FreeStyle™ Expression System を用いて

このシステムを用いることでさまざまな利用法が考えられます。例えば一過性発現という特性を生かして、数種類のプラスミドを混ぜて共発現することにより、複合体として機能する抗体や酵素を作製することが考えられます。また成分が明確な無血清培地を用いるため、目的タンパク質を夾雑物の少ない培地中に分泌させれば精製も比較的容易に行うことが可能です。一番の利点はプラスミドさえあれば1週間程度で結果がわかるためさまざまな組み合わせや方法を短期間の



図4●受託サービスのウェブサイト

FreeStyle発現サービス以外にも、クローニング、大腸菌・バキュロウイルス発現、RNAi、定量PCRなどさまざまなサービスをご提供しておりますので、ご興味をお持ちの方はMail (jpcustom@invitrogen.com) またはTEL (03-5753-3006) にてご連絡下さい

うちに試せることです。

また、設備が無く大量培養ができない方やシステムの導入前にお手持ちの遺伝子で効果を試したいという方には受託サービスも承っております。詳しい説明は当社のウェブサイト (<http://www.invitrogen.co.jp/services/transient.shtml>) をご覧下さい。目的遺伝子のクローニングからトランスフェクショングレードのプラスミド抽出、発現条件検討、大量培養・精製まで経験豊富なスタッフがプラスミドのデザインからご提案させていただきます(図4)。



粥川堅太郎

(Kentarō Kayukawa)

インビトロジェン株式会社
羽田事業所サービスラボ室長
〒143-0004
東京都大田区昭和島2丁目4番3号
TEL : 03-5753-3006
FAX : 03-5753-3007

「スーパーワーム」 カイコーバキュロ系タンパク質生産システムの最前線

片倉工業株式会社 山本 岳志

タンパク質解析研究におけるタンパク質生産システムの最有力ツールとして、カイコーバキュロウイルスによる生産システムが注目されている。バキュロウイルス系による生産では、翻訳後修飾が天然型に類似しており、大腸菌などに比べ高い確率で活性を有するタンパク質生産が可能となっている。また、複合型タンパク質も本来の機能と構造を保った形で生産が可能である。さらに、「スーパーワーム」では、生産宿主としてのカイコの特長を十分に活用することによって、迅速生産、高生産性、生産安定性の向上を実現した。

バキュロウイルス発現システムの基本メカニズムと特長

昆虫を宿主とするバキュロウイルスは、増殖過程において感染細胞の核内に多角体を大量に生成する。この多核体タンパク質はウイルスの増殖とは無関係であるため、プロモーター（ポリヘドリンプロモーター）を利用できる。多角体遺伝子の代わりに目的遺伝子を挿入したバキュロウイ

ルスを昆虫細胞やカイコなどの宿主に感染させることによって、目的のタンパク質を大量に発現させることができる。

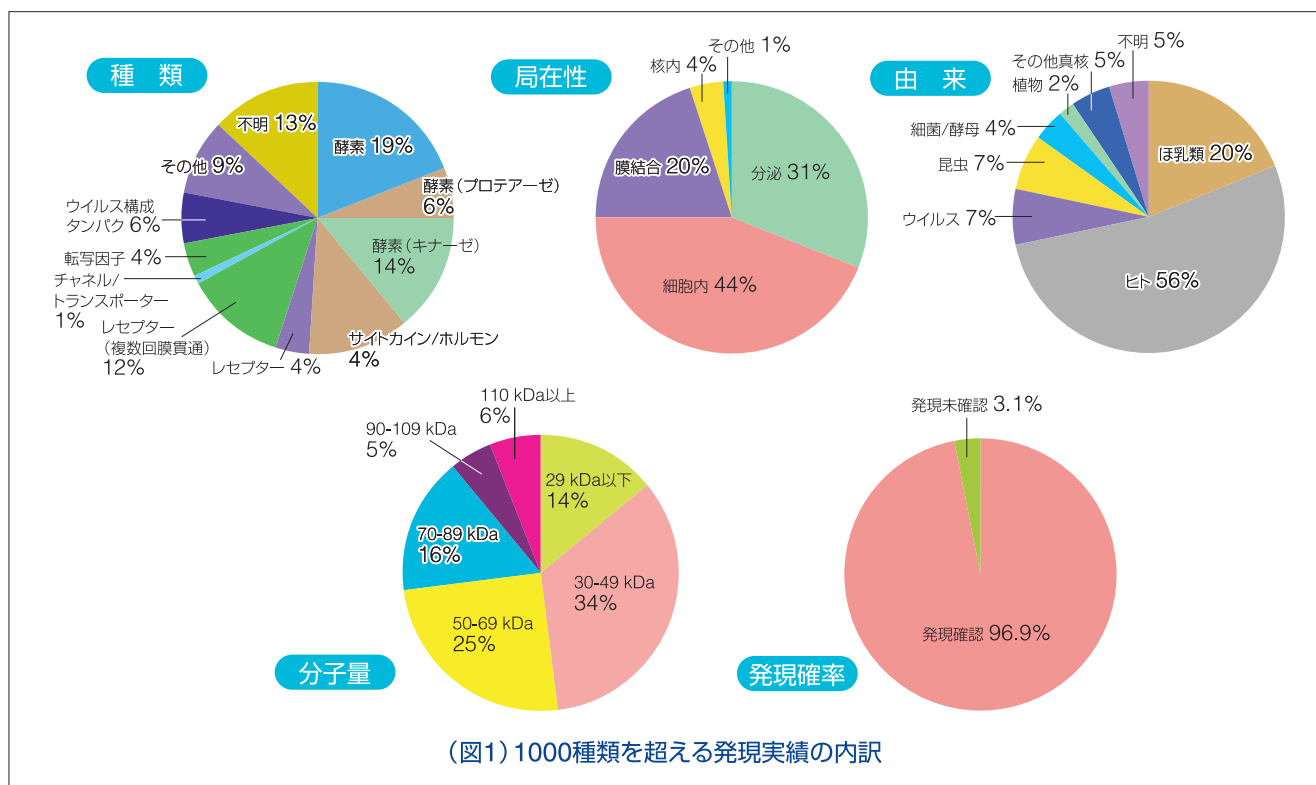
このバキュロウイルスを用いたタンパク質発現システムの特長として、生産性の高さ、天然型に近い翻訳後修飾などがある。そのため、天然型と同様の構造や機能を持ったタンパク質を大量に生産することが知られている。

「カイコーバキュロウイルス発現システム」

片倉工業では、生産宿主にカイコを用いて、タンパク質の受託生産サービス「スーパーワーム」を行っている。このサービスは以下のような利点を持つ。

① 高品質

天然型と同様の構造、機能を持った活性のあるタンパク質の生産を見込むことが



でき、現在までに発現の成功率は96.9%である。膜タンパク質や分子量が200kDaを超えるタンパク質、さらに、本来の構造・機能を保有した複合型タンパク質生産も可能である(図1)。

② 高生産性

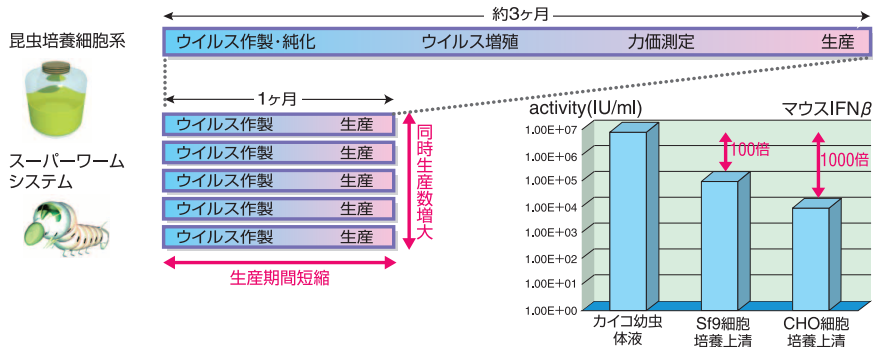
カイコ1頭から得られる精製タンパク質の生産量は、数十 μg ~数mgとバラつきはあるものの、平均すると約100 μg となっている(表1)。従って、わずかにカイコ10頭の使用で、抗体作製用の抗原として、またはX線構造解析などに必要なmgオーダーの生産量が期待できる。カイコは細胞の増殖、更新が自動で行われる全自動細胞培養タンクであり、タンパク質の合成能力に長けている。さらに、バキュロウイルスを改良することによって、生産タンパク質の分解を抑制することが可能となり、生産性が飛躍的に向上した※1)。この結果、カイコ体液1mlで、昆虫細胞の培養ボトル約100ml分に相当するタンパク質が得られた(図2)。

③ 迅速生産

昆虫細胞系を用いた場合では約3ヶ月かかっていた生産期間を、「スーパーワーム」では、組換えウイルスの高効率作製法とウイルスの増殖や力価測定を省くことにより、約1ヶ月に短縮した。また、カイコを利用することによって、省スペース、省エネルギーが実現され、一度に数百種類のタンパク質を同時に生産することが可能である(図2)。

④ スケールアップの高再現性

カイコでの発現では、ウイルス感染条件による生産量のバラつきがなく、安定的にかつ再現性高くタンパク質が生産できる。また、



(図2) カイコを用いたハイスループットシステムと昆虫培養細胞生産システムの生産性の比較

タンパク質名	局在性	分子量	タグ有無	発現形態	精製ステップ	精製品取得量	おおよその精製純度
ホタルシフェラーゼ	細胞内	65K	—	幼虫磨砕液	前処理+カラム1step	2.5mg/頭	>90%
ヒトキマーゼ	分泌	27K	—	カイコ体液	前処理+カラム2step	0.03mg/ml	>90%
マウスIFN β	分泌	—	—	カイコ体液	前処理+カラム2step	0.02mg/ml	>90%
ウマインフルエンザHA	膜結合	72K	—	幼虫磨砕液	可溶化+アフィニティー1	0.24mg/頭	>95%
ウシIFN γ	分泌	—	—	カイコ体液	カラム2step	0.15mg/ml	>90%
2'-5'OA合成酵素	細胞内	—	—	蛹磨砕液	前処理+カラム1step	0.5mg/頭	>90%
タンパク質A	細胞内	61K	—	蛹磨砕液	前処理+カラム1step	3.0mg/頭	>90%
タンパク質B	細胞内	40K	—	蛹磨砕液	前処理+アフィニティー1	2.2mg/頭	>95%※
タンパク質C	細胞内	43K	—	蛹磨砕液	前処理+カラム2step	0.3mg/頭	>95%※
タンパク質D	細胞内	45K	—	蛹磨砕液	前処理+カラム2step	0.07mg/頭	>95%※
タンパク質E	細胞内	51K	—	幼虫磨砕液	カラム3step	0.1mg/頭	>95%
タンパク質F	核内	50K	His-tag	蛹磨砕液	前処理+アフィニティー1	0.5mg/頭	>80%
タンパク質G	膜結合	160K	His-tag	蛹磨砕液	可溶化+アフィニティー1	0.2mg/頭	>80%
タンパク質H	細胞内	20K	His-tag	蛹磨砕液	アフィニティー1step	15mg/頭	>90%
タンパク質I	分泌	40K	His-tag	カイコ体液	アフィニティー1step	0.06mg/ml	>70%

※発現タンパク質の結晶化に成功しています。

(表1) カイコによる主な発現・精製実績

片倉工業では、カイコ飼育体系の確立によって年間を通じての安定したカイコ供給を実現しており、ウイルスを接種するカイコの頭数を単純に増やすだけで再現性の高いタンパク質のスケールアップが可能である。

⑤ 高い問題解決能力

1,000種類を超えるタンパク質の生産経験と豊富な精製実績と経験から、不溶化などの問題解決やクオリティの高いタンパク

質獲得のためのトータルソリューションを提案できる。

このような特長を有する「スーパーワーム」システムは、様々なタンパク質解析研究を行うためのタンパク質生産系として、現在最も優れたシステムであると考えられる。

参考文献

- 1) Suzuki et al. : J. Gen. Virol. 78 : 3073-3080, 1997

研究者の皆様へ

タンパク質を準備するという事は、多くの研究者にとってスタート地点に立つことにすぎません。そのために頭を悩ませ、時間を取られる事は研究の進展の大きなブレーキとなり得ます。タンパク質の準備に費やす時間とコストを大幅に節約し、研究のスピードを最大限加速させるために片倉工業が強力にサポートします。



山本 岳志 (Takeshi Yamamoto)

片倉工業株式会社

生物科学研究所
〒350-1332 埼玉県狭山市下奥富1548
TEL: 04-2954-2171
FAX: 04-2954-2172
E-mail: sw_info@katakura.co.jp
URL: <http://www.katakura.co.jp/superworm>

小麦胚芽無細胞タンパク質合成技術 (ENDEXT®テクノロジー) が拓く新たな世界

株式会社セルフリーサイエンス 嘉村奈美, 渡部素生

(株)セルフリーサイエンスは、愛媛大学遠藤教授により開発された小麦胚芽無細胞タンパク質合成系(ENDEXT®テクノロジー)を、ポストゲノム時代のトータルなタンパク質研究ツールとして提供しています。本稿では、タンパク質科学研究に新たな世界を拓くENDEXT®テクノロジーの優れたパフォーマンスとアプリケーションについて紹介します。

はじめに

ENDEXT®テクノロジーは、高品質の小麦胚芽抽出液をベースとし、1)タンパク質合成、2)自動合成・精製、3)網羅的なタンパク質解析、の技術要素を統合したトータルなタンパク質研究システムです(図1)。この技術は、ポストゲノムタンパク質研究の機能・構造解析分野で威力を発揮しつつあります。

高品質タンパク質への期待

最近ではゲノム創薬への期待から、研究の対象がヒトを中心とする高等生物のタンパク質に集まっており、研究の現場からは、合成されるタンパク質の品質、すなわちタンパク質の活性や正しいフォールディングへの要求が非常に高まっています。

タンパク質の合成手段として主流であった大腸菌発現系では、原核生物特有のPost-translationalなタンパク質foldingが行われます。これに対し真核生物では、翻訳と共役したco-translational foldingであるといわれています。このため、大腸菌では原核生物由来のタンパク質の合成はできても、高等

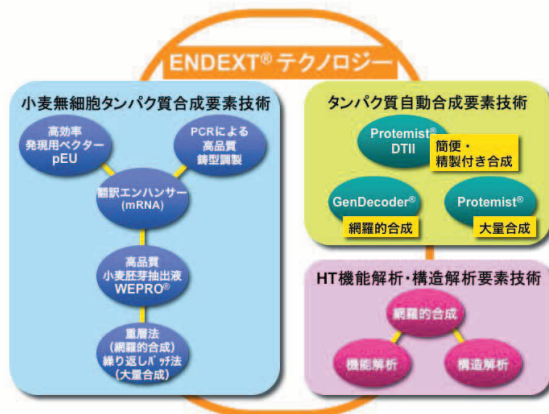


図1: ENDEXT®テクノロジーの概要

生物由来のタンパク質を正しく合成することは困難です。しかし、真核生物のタンパク質合成システムを利用しているENDEXT®テクノロジーは、高等生物のタンパク質の生産手段として優れていると言えます(表1)。

迅速・簡便なタンパク質合成の実現

無細胞タンパク質合成系は、PCR産物のような直鎖状DNAを鋳型に使用出来ること、反応容量をコンパクトにできることから、遺伝子ライブラリーからのタンパ

ク質合成などのハイスループット合成に優れることが知られています。

(株)セルフリーサイエンスでは研究目的に応じ、小麦胚芽抽出液(WEPRO®シリーズ)(表2)、キット等豊富に取りそろえています。特にENDEXT®

Wheat Germ Expression Premium Kitは、タンパク

質合成に必要な試薬をすべてパッケージングしているため、便利にお使い頂けます。

更に自動合成機をシリーズ化しました(表3)。研究者は鋳型DNAを準備するだけで、翌日にはタン

表1: ENDEXT®テクノロジーのタンパク質合成例
(約5,000種のタンパク質発現を確認。現在も更新中)

シロイヌナズナ	
プロテインキナーゼ	-----500
プロテインフォスファターゼ	-----86
転写因子	-----750
プロテアーゼ	-----50
ヒト	
プロテインキナーゼ	-----300
プロテインフォスファターゼ	-----80
転写因子	-----900
核内レセプター	-----38
マウス	
プロテインキナーゼ	-----300
転写因子	-----900
プロテアーゼ	-----180
膜タンパク質	-----180
自己抗原	-----240
熱帯熱マラリア原虫 (Plasmodium falciparum)	-----400

愛媛大学 無細胞生命科学工学研究センター
澤崎達也助教授 遠藤素生教授 (2006年6月)

表2: タンパク質合成用試薬 ラインアップ

商品名	Cat. No.	製品内容、用途
WEPRO® シリーズ	WEPRO1240	標準プロトコルでのタンパク質合成抽出液
	WEPRO2200	NMR構造解析を目的とした標識タンパク質合成抽出液(抽出液中のアミノ酸を除去しています。)
	WEPRO1240G	精製を目的としたGST融合タンパク質合成抽出液
	WEPRO1240H	精製を目的としたHis融合タンパク質合成抽出液
p EU Vector		コムギ胚芽無細胞タンパク質系専用ベクター

コールドショック発現系とMazFを利用したSingle Protein Production System (SPP System[®]) ならびにタンパク質発現受託のご紹介

タカラバイオ株式会社 小代俊浩, 田中啓二, 栗津尚之, 高蔵 晃

大腸菌コールドショック発現系は、従来の大腸菌発現ベクターと比較して、目的タンパク質を発現できる確率や発現量、発現産物の可溶性度を向上させることができ、高純度発現も可能です。MazFとの組み合わせで目的タンパク質のみを発現できる画期的なSPP System[®]と併せて、タンパク質研究の重要なツールとして皆様にご利用いただいています。本稿では、コールドショック発現系を基盤とするタンパク質発現受託や組換えバキュロウィルス/昆虫細胞発現系など真核生物を宿主としたタンパク質発現受託についてもご紹介します。

目的タンパク質のみの発現が可能なSPP System[®]

SPP System[®]の概要

コールドショック発現ベクターは、低温で特異的に機能するプロモーターを利用しています¹⁾。このコールドショック発現ベクターとMazFを利用して大腸菌由来のタンパク質発現を抑制し、目的タンパク質のみの発現を効率的に行う発現系が、SPP (Single Protein Production) システムです。

MazFは大腸菌のタンパク質で、米国New Jersey医科歯科大学の井上正順博士らのグループによって、一本鎖RNAの特定配列 (ACA) を認識して切断するRNA

干渉酵素であることが示されました²⁾。MazFと目的タンパク質を共発現させると、ほとんどの宿主由来のmRNAはACA配列を有するためMazFにより分解され、新規タンパク質の発現が抑制されます。一方で、目的遺伝子中のACA配列をサイレント置換すれば、目的遺伝子のmRNAは切断を受けず、目的タンパク質のみを効率よく発現させることができます³⁾。

タカラバイオでは、このユニークなシステムを利用したタンパク質発現キット (SPP System[®]) を販売しています。コールドショック発現系と併せることで、SPPの威力を最も発揮するように設計してあります。発現率が高い・可溶性になりやすいなどコールドショック発現系の

利点を保ちつつ、新生タンパク質の90%以上は目的タンパク質となります。したがって、構造解析などにおいて目的タンパク質を特異的に同位体標識する場合に最適です。例えば、NMRにおけるタンパク質調製の際、効率良く¹⁵N、¹³C標識されるためシグナルノイズ比が向上します。実際SPPシステムを用いると、精製操作なし (cell lysate) でも簡便にHSQC測定が可能です。また、細胞毒性のあるセレノメチオニン (SeMet) などの導入においても有用であることが示されています⁴⁾。

また、菌体を高密度で培養してもSPPシステムは機能するため、高価な標識用培地などの使用量を節約することができます。菌体当たりの目的タンパク質量も多く、*in vitro*発現系、*in vivo*系の両方の特長も併せ持った系と言えます。

実施例

実施例1：envZBの発現およびバルスラベル実験

図1に示したように、envZBの発現量は、MazF+とMazF-でほぼ同等です (1培養液当たり22 mg) が、バルスラベルでは、MazFの発現によって、宿主由来のタンパク質の新規発現が抑制されていることがわかります。

実施例2：バルスラベルによる発現の経時変化 (図2)

SPP System[®]による目的タンパク質の発現プロトコール

ACA配列を他の配列にサイレント置換した目的タンパク質の遺伝子を、SPPコールドショック発現ベクターに挿入して発現用プラスミドを作製^{※1}。

↓
発現用プラスミドとMazF発現プラスミドで宿主大腸菌 (BL21など) を形質転換。アンピシリンとクロラムフェニコールで選択した形質転換体を同薬剤を含む液体培地に植菌し、37℃で培養^{※2}。
(同位体標識等を行う場合はM9グルコース培地などの最少培地を使用)

↓
OD600=0.5付近で培養液を15℃に冷却し45~60分間放置した後、培養液にIPTGを加え、15℃でさらに24時間以上振とう培養^{※3}。(バルスラベルを行う場合は、サンプリング時に放射性同位体標識アミノ酸を加え、さらに15℃で15分間静置)

↓
集菌、菌体破碎し、SDS-PAGEなどにより目的タンパク質を解析。

- * 1: ヒト遺伝子などでACA配列を含まない遺伝子を作製する場合は、レオコドンなどを考慮した遺伝子全合成を行うことをお勧めします。発現量が劇的に良くなる場合があります。特に、1つのタンパク質について詳細に解析したい構造解析の場合などは、是非、弊社の遺伝子合成技術をご利用下さい。
- * 2: より長時間SPPを持続させたい場合は、アンピシリンの代わりにカルベニシリンを使用した方が、プラスミドの欠落防止に有効です。
- * 3: 高価な培地で標識する場合など、IPTGを添加後、いったん集菌し、元の培養液の1/20から1/40程度の培地量にすることも可能⁴⁾。例えば、1Lで菌体を増殖させた場合、標識の入った培地はわずかに25 mLで良いことを意味します。

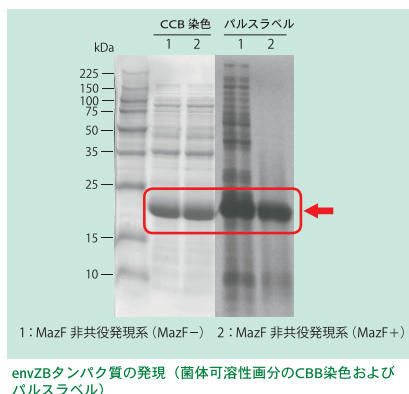


図1 ●envZBタンパク質の発現（菌体可溶性画分のCBB染色およびパルスラベル）

Positive Control pCold I (SP-4) envZBを用い、MazF共役発現系（MazF+）と非共役発現系（MazF-）で発現を試みた。宿主に大腸菌BL21を使用し、プロトコールに従って、M9 グルコース培地で培養、発現。一定量の培養液をサンプルとして使用。CBB染色により発現量を、パルスラベル実験により新生タンパク質の発現を解析

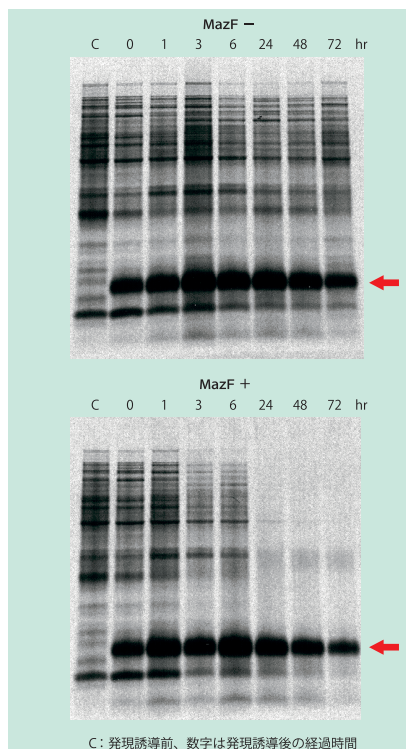
MazF+では、エオタキシン以外の大腸菌由来のタンパク質の発現が大きく減少しているのがわかります。菌体当たりのエオタキシン発現量は保ったまま、発現誘導後72時間まで目的タンパク質のみの発現が持続しました。

タンパク質発現受託サービスメニューのご紹介

タカラバイオでは遺伝子クローンの取得からさまざまな宿主を用いたタンパク質発現まで各種サービスを提供し、皆様の研究をサポートいたします。

大腸菌コールドショック発現系

大腸菌コールドショック発現系をはじめとする発現系構築や宿主／ベクター系のスクリーニングおよびタンパク質の発現・精製などを承ります。発現ベクター構築、発現テスト、大量発現の他、オプションとして*in vivo*フォールディング、*in vitro*リフォールディング、遺伝子合成（GeneArt社の設計アルゴリズムによる最適な塩基配列設計も可能）や、立体構造解析を目的とした同位体標識やSeMet標



エオタキシンの発現（パルスラベル）

図2 ●エオタキシンの発現（パルスラベル）

MazF共役発現系（MazF+）と非共役発現系（MazF-）でエオタキシンの発現の経時変化をパルスラベル実験で追った例。SPP用コールドショック発現ベクターはpCold I (SP-4) を、宿主は大腸菌BL21を使用。プロトコールに従って、培養、発現を行い、発現誘導後の各時間でサンプリングした菌体をそれぞれパルスラベルした。一定量の培養液をサンプルとして、SDS-PAGEに供した

識も行っております。

組換えバキュロウイルス／昆虫細胞発現系

バキュロウイルスベクターは昆虫細胞内で効率良く目的遺伝子を発現するため、活性を有するタンパク質の大量発現実験には欠かせないシステムとして利用されています。

発現系の特長は、①高発現量（1～100 mg/l）、②高分子タンパク質発現（>100kDa）、③動物細胞と同様の翻訳後修飾を受けるためタンパク質の構造、生物活性、免疫学的反応性が天然物に類似、④複数タンパク質を同一細胞内で発現させ複合体を構成できるなどがあげられます。

また、発現系として20年以上の歴史があり、種々の改良により扱いやすいシステムに進化しています。Clontech社のBacPAK Baculovirus Expression Systemなどは定評のある発現システムです。ただ、大腸菌発現系に比べると細胞の取扱いに経験と技術が必要になります。弊社では経験豊富な熟練スタッフが、発現遺伝子の情報をもとにベクター構築、組換えバキュロウイルス作製から、タンパク質発現、精製、さらに抗体作製までの作業を承ります。

哺乳動物細胞発現系

動物由来の遺伝子を天然型タンパク質として発現させるには、哺乳類細胞株を用います。293細胞や293T細胞で一過性発現を行うと1培養あたり数mgのタンパク質発現が期待できます。また目的タンパク質を大量に産生する場合、CHO細胞株での安定発現細胞株の作製が一般的です。CHO細胞株では無血清浮遊培養系が確立されており、安全で純度の高いタンパク質産生（特に分泌タンパク質）が可能です。

各種サービスの詳細につきましては、弊社ドラゴンジェノミクスセンターへお問い合わせください。弊社ホームページ（<http://www.takara-bio.co.jp/>）でも製品および受託サービスについての詳細をご覧ください。

参考文献

- 1) Qing, G. et al. : Nature Biotechnology, 22 : 877-882, 2004
- 2) Zhang, Y. et al. : Molecular Cell, 12 : 913-923, 2003
- 3) Suzuki, M. et al. : Molecular Cell, 18 : 253-261, 2005
- 4) Suzuki, M. et al. : J. Biol. Chem., 281 : 37559-37565, 2006

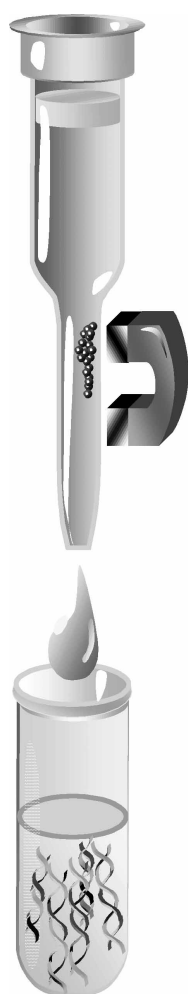
タカラバイオ株式会社

タカラバイオ株式会社
ドラゴンジェノミクスセンター
〒520-2193
滋賀県大津市瀬田三丁目4-1
TEL : 077-543-7331
FAX : 077-543-7225

Total System Integration & Solutions

ゲノミクス・プロテオミクス研究の 自動化を提供します

PSSは独自開発した磁性体粒子分離・加圧ろ過制御・微量分注技術等によりゲノミクス・プロテオミクス研究&開発における自動化を提供します。



- **核酸抽出・精製**
Nucleic acid extraction
- **タンパク質精製**
Protein purification
- **タンパク質除去**
Protein removal
- **質量分析前処理**
Sample preparation for MS
- **マイクロアレイ用サンプル調製**
Microarray target preparation
- **PCR前処理・Clean-up**
PCR clean-up & preparation
- **検体仕分・分注管理システム**
Sample dispensing & management
- **OEMシステム開発・製造**
OEM system manufacturing

標準自動化システムから特注システム・受託開発まで、
分注・自動化システムのことなら何でもPSSにお問い合わせください。
PSSが柔軟に、ニーズに合った高性能・高信頼システムを提案致します。



自動化技術によるTotal System Innovationを提供する…

プレジジョン・システム・サイエンス株式会社

〒271-0064 千葉県松戸市上本郷88

Tel.047-303-4801 Fax.047-303-4811

URL : <http://www.pss.co.jp> E-mail : service@pss.co.jp