



Title	RNA自己複製反応を高感度に検出可能なレポーターシステムの開発に関する研究
Author(s)	西山, 浩太郎
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52019
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

RNA 自己複製反応を高感度に検出可能なレポ
ーターシステムの開発に関する研究

提出先 大阪大学大学院情報科学研究科

提出年月 2015 年 1 月

西山 浩太郎

【論文題目】

RNAi 自己複製反応を高感度に検出可能なレポーターシステムの開発に関する研究

【論文内容の要旨】

レポータータンパク質は、基質分解反応を起こすことで検出感度を大きく向上させるため、遺伝子・抗体・タンパク質などと結合させ、タンパク質相互作用や細胞内分布の検出、スクリーニングに用いられている。中でも、 β ガラクトシダーゼ (bGal) は安定性と反応性の高さから広く利用され、多種の基質が開発されている。さらに、bGal では N 末端側を欠損し不活性化した α タンパク質を入れておけば、欠損部分を補う α タンパク質だけでレポーターとして働くこと (α -コンプリメンテーション) が知られている。 α タンパク質の特徴として、上記の反応により高い基質分解活性を示すために検出感度が高く、しかも非常に小さい (45 から 200 アミノ酸) ために反応を阻害しにくいことが挙げられる。

本研究では、まずこの α タンパクを用いたレポーターシステムを我々の研究室で構築した RNA 自己複製反応系に応用し、リアルタイムで反応を検出することを試みた。RNA 複製反応は生命システムの中で非常に重要な反応であり、リアルタイムに反応を追跡できれば、RNA 複製反応の理解へ貢献することが期待できる。以前の研究では、bGal を蛍光レポーターとして用いたが、反応効率が 1400 分の 1 と非常に低いことが分かった。そこで蛍光レポーターとして bGal の α コンプリメンテーションを用いた。bGal の代わりに α タンパク質をコードしたことで、鋳型 RNA の長さが短く (約 5400 塩基から約 2500 塩基) なり、蛍光で検出可能という特性を保持したまま反応効率が向上した反応系を構築することができた。

上記の自己複製反応に用いた α タンパク質は、 α コンプリメンテーション活性が低く微小区画内での観察には検出感が低いという問題点があった。そこで、次に α タンパク質の改良により、検出感を向上することを目指した。先行研究より、大腸菌内・動物細胞内など環境の違いにより最適な α タンパク質の大きさが違うことが報告されている。そこで、まず無細胞翻訳系において、 α タンパク質として用いる bGal 領域の最適な大きさを探索した。その結果、領域の大きさを 180 塩基にすることにより、活性を 5 倍に上げることができた。さらに、微小区画内実験室進化による改良を行った。その結果、77 番目のアミノ酸が変わったことで、リポソーム内で 180 塩基長の α タンパク質よりも 4 倍活性が高い、リポソーム内反応に特化した α タンパク質が得られた。また、 α タンパク質の最小サイズを探索したところ、15 アミノ酸という非常に小さいタンパク質で α コンプリメンテーション活性を持つことが分かった。本研究で開発した改良型 α タンパク質は、 α タンパクがレポーターとして使われている様々な研究における検出感度の向上に貢献するだろう。

博士論文に関わる業績

学術論文誌および掲載論文

1. **Kotaro Nishiyama**, Norikazu Ichihashi, Tomoaki Matsuura, Yasuaki Kazuta, Tetsuya Yomo., α -Complementation in an artificial genome replication system in liposomes., *Chembiochem*, 2012(13),2701-2706 (第2章)

国際会議発表

(査読有り)

1. **Kotaro Nishiyama**, Norikazu Ichihashi, Tomoaki Matsuura, Tetsuya Yomo, “ α -Complementation in an artificial genome replication system in liposomes “, International Symposium on Synthesizing life and biological system, Life Science center, Osaka, Japan, 2011/10/24-26 (第2章)
2. **Kotaro Nishiyama**, Norikazu Ichihashi, Yasuaki Kazuta, Tetsuya Yomo; “Constructing highly detectable fluorescence reporter protein for *in vitro* single molecular screening”, The 28th Annual Symposium of The Protein Society, July 27-30, 2014, Manchester Grand Hyatt , San Diego, CA, USA (第3章)

目次

博士論文に関わる業績.....	3
第1章 緒論.....	1
1-1 研究背景.....	1
1-2 本論文の目的.....	3
1-3 本論文の構成.....	3
第2章 α -complementation を用いた RNA 自己複製反応レポーターシステムの構築.....	4
2-1 緒言.....	4
2-2 実験方法.....	6
2-2-1 実験試薬.....	6
2-2-2 無細胞翻訳系の組成.....	6
2-2-3 様々な長さの α 断片の配列をコードした DNA 断片の作成.....	7
2-2-4 RNA 合成.....	10
2-2-5 タンパク質サイズ決定のための蛍光値測定.....	10
2-2-6 タンパク質翻訳量の定量.....	10
2-2-7 プラスミド構築.....	11
2-2-8 mdv(+) β (+) α (-)の作成.....	11
2-2-9 pBR322_ mdv(+) β (+) α (-)プラスミドの構築.....	11
2-2-10 Rep(+) α (-)RNA 合成.....	12
2-2-11 Rep(+) $\text{Gal}(-)$ RNA 合成.....	12
2-2-12 試験管内におけるレポーターシステムの蛍光値測定.....	12
2-2-13 ラジオアイソトープ法を用いた RNA 複製量の定量.....	13
2-2-14 リポソームの作成方法.....	13
2-2-15 リポソーム内におけるレポーターシステムの蛍光値測定.....	13
2-3-1 結果および考察.....	14
2-3-1 α タンパク質サイズ決定のための蛍光値測定.....	14
2-3-2 タンパク質翻訳量の比較.....	15
2-3-3 添加する ω タンパク質量の検討.....	15
2-3-4 最適化した条件での β ガラクトシダーゼと α -complementation の活性の比較.....	16
2-3-5 試験管内での β ガラクトシダーゼと α を用いた自己複製反応レポーターシステムの蛍光値測定.....	17
2-3-6 試験管内での β ガラクトシダーゼと α を用いたレポーターシステムの RNA 複製量の比較.....	18
2-3-7 リポソーム内での β ガラクトシダーゼと α を用いた自己複製反応レポーター	

システムの蛍光値測定	19
2-4 結語	22
第3章 検出感度向上のためのレポータータンパク質の改良	23
3-1 緒言	23
3-2 実験方法	24
3-2-1 実験試薬	24
3-2-2 α タンパク質をコードした DNA の作成	26
3-2-3 無細胞翻訳系の組成	30
3-2-4 α タンパク質の蛍光活性測定	30
3-2-5 DNA 変異導入	30
3-2-6 リポソーム内実験室進化	31
3-2-7 クローニング	32
3-2-8 変異体の配列解析	32
3-2-9 変異体プラスミドから DNA 断片の PCR	32
3-2-9 変異体の試験管内蛍光活性測定	33
3-2-10 変異体のリポソーム内蛍光活性測定	33
3-3 結果と考察	34
3-3-1 無細胞翻訳系中で活性の高い α タンパク質の探索	34
3-3-2 リポソーム内実験室進化実験	35
3-3-3 変異体の配列解析	36
3-3-4 試験管内反応での変異体の蛍光活性比較	38
3-3-5 リポソーム内反応での蛍光活性比較	39
3-3-6 試験管内反応での DNA 濃度の反応性への影響	40
3-3-6 リポソーム内反応における DNA 濃度の反応性への影響	41
3-3-8 試験管内反応とリポソーム内反応の結果の違いの考察	43
3-3-9 original と進化型の比較	43
3-4 結語	44
第4章 タンパク質サイズの小さい蛍光レポーターの探索	46
4-1 緒言	46
4-2 実験方法	47
4-2-1 実験材料	47
4-2-2 無細胞翻訳系の組成	48
4-2-3 短い α タンパク質をコードした DNA 断片の作成	48
4-2-4 試験管内での蛍光値測定	50
4-2-5 プラスミド pET-nat-lacZdlt2AA の作成	50
4-2-6 リポソーム作成方法	50

4-2-7	リポソーム内での蛍光値測定.....	51
4-2-8	タンパク質の化学合成.....	51
4-2-9	化学合成した α タンパク質の蛍光値測定.....	51
4-2-10	短い α タンパク質を挿入した鋳型プラスミドの構築.....	51
4-2-11	短い α タンパク質を挿入した鋳型 RNA 作成.....	52
4-2-12	Rep(+) α (-)と short の試験管内反応での蛍光値測定.....	52
4-3	結果および考察.....	54
4-3-1	試験管内における短い α タンパク質の蛍光値測定.....	54
4-3-2	N 末端 2 つのアミノ酸を欠損させた α タンパク質の蛍光値測定.....	54
4-3-3	リポソーム内反応の蛍光値測定.....	55
4-3-4	化学合成した α タンパク質の蛍光値測定.....	56
4-3-5	α -complementation に関する考察.....	57
4-3-6	短い α タンパク質をレポータータンパク質として用いた RNA 自己複製反応レポーターシステム.....	58
4-4	結語.....	60
第 5 章	総括.....	62
5-1	α -complementation を用いた RNA 自己複製反応レポーターシステムの開発.....	62
5-2	再構築反応系のレポーターとしての α -complementation.....	63
参考資料	66
謝辞	71

第 1 章 緒論

1-1 研究背景

細胞は、内部でタンパク質を含む数多くの遺伝子産物が相互作用している複雑系である。そのため、細胞内の反応を追跡することは困難である。その問題を解消するために蛍光イメージングという技術が用いられている。蛍光イメージングはバイオイメージング法の一つで、蛍光色素などを用いて特定の分子がいつ、どこで機能しているかを検出する技術である。この蛍光イメージング法は、蛍光を発するタンパク質である GFP の発見により大きく発展した[1][2]。GFP を含むレポータータンパク質の登場により、生きたままの細胞を用いて特定の遺伝子がいつ、どこで発現しているなどを観察することが可能になった[3]。レポータータンパク質とは、GFP のように励起光によって発光するタンパク質や、基質と反応することで発光・発色する酵素を指す。中でも酵素は、基質分解反応を起こすことで検出感度が高くなる、すなわちバックグラウンドノイズとのシグナルの差が大きくなるため、遺伝子・抗体・タンパク質などと結合させ、タンパク質相互作用や細胞内分布の検出、スクリーニングに用いられている[4][5][6]。特に、 β ガラクトシダーゼは安定性と反応性[7][8]の高さから広く利用[9][10][11]され、多種の基質が開発されている。さらに、N 末端側を欠損し不活性化した ω タンパク質を入れておけば、欠損部分を補う α タンパク質だけでレポーターとして働くこと (α -complementation) [12]が知られており、ブルーホワイトスクリーニングなどに利用されている(図 1)[13]。 α -complementation の特徴として、酵素反応により 1 分子の酵素が多数の基質を分解するために検出感度が高いことと、 α タンパク質という非常に小さいタンパク質 (45~200 アミノ酸) によって反応が開始することが挙げられる[4][14][15]。

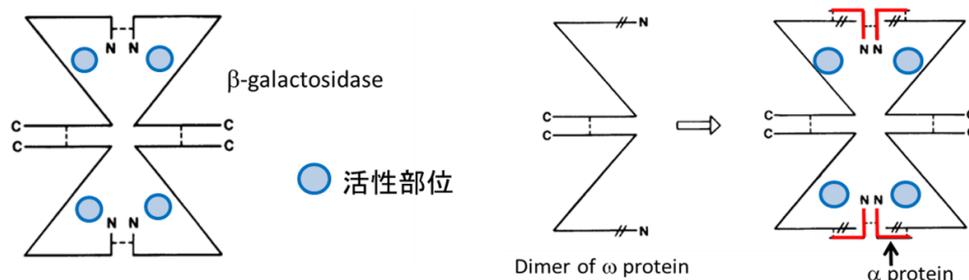


図 1. α -complementation の概要図(Matthews *et al.*, 2005 を一部改訂)

近年、細胞の持つ機能を試験管内で再構成する研究が盛んに行われている[16][17]。再構成することで、様々な外的影響を排除した簡略化した反応系を構築できるため、細胞を観察することでは解明できなかったタンパク質などの遺伝子産物の機能解明が期待されている。タンパク質翻訳反応の再構築系として再構成無細胞翻訳系(PURE system)が使われている。PURE system とは、翻訳に必要最小限の因子から構成されており、すべて高純度に

精製した翻訳因子を人工的に再構成したものである[18][19][20]。PURE systemの開発により、再構築反応系で翻訳反応が制御可能になった。レポータータンパク質を発現することが可能になったことで、リポソームなどの微小区画内での反応の進行を顕微鏡やフローサイトメーターで観察・検出することが可能になった。このように、再構築反応系でも、レポータータンパク質は反応系が機能していることの確認や、反応系の定量・定性、スクリーニングなどに用いられている[16][17][21]。再構築反応系においては、生きた細胞の場合と比べて選択できるレポータータンパク質の種類が多いという特徴がある。生きた細胞に用いるレポータータンパク質には以下の4つの特性が必要である。①細胞毒性がないこと、②単一分子が検出可能なほど感度が高いこと、③目的分子のみが検出可能であること、④レポータータンパク質が翻訳されてからシグナルを発するまでが迅速であること。再構築反応系では①の特性を必要としない、すなわち観察したい反応を阻害しなければ使用することが可能であるため検出方法の自由度が高くなる。再構築反応系の多くは、遺伝情報分子であるDNAかRNAを起点とする。反応を検出するために、DNAかRNAにレポータータンパク質の配列情報を挿入する必要がある。そのため、再構築反応系をレポータータンパク質で観察するには問題点が2つ考えられる。まず、再構築反応系は細胞と違い栄養を取り込むことが難しいため、反応に用いることができる資源が限られた環境下で反応を行う。そのため、レポータータンパク質を発現するために資源を大量に使用しては、資源枯渇により本来観察したい反応が十分に進まないことが考えられる。次に、レポータータンパク質を反応系に組み込むことで、反応系の反応効率に影響が出ることである。レポータータンパク質の遺伝子配列を挿入することによりDNAやRNAが長くなり、転写効率や翻訳効率に影響が出る事が考えられる。これらの問題点に対応するためには、サイズの小さい、すなわち遺伝子配列の短いレポータータンパク質が必要である。したがって、レポーターサイズの小さい β ガラクトシダーゼの α -complementationが有効だと考えられるが、これまでに再構築反応系において α -complementationが利用されている前例がない。これまで再構築反応系は、翻訳反応のみという単純な反応系[16][21]が多く、複雑な反応系は構築されていない。そのため、前述のようなレポーターを発現することによる反応系の反応効率への影響というのは考慮されていなかった。しかし、北らが構築したRNA自己複製反応系[17]のような2種類以上の反応を組み合わせた複雑な再構築反応系では、レポーター遺伝子の長さによる反応速度への影響や翻訳することのコストの影響等を考慮する必要がある。再構築反応系の反応を蛍光で検出できるようにすることは、バックグラウンドノイズの少ない環境で反応を観察することを可能にする。また微小区画内に1分子のRNAを封入し、反応を検出することが可能になれば、反応性のゆらぎを検出することが可能になる。他にも、体積の違う微小区画内に1分子のRNAを封入することで、反応場体積の影響を検出することが可能になり、現在の細胞サイズがどのように決まったのかに対して一つの可能性を示すことが可能になる。そのためには、1分子のRNAによる反応を検出できるほど高感度な検出感度が必要である。

1-2 本論文の目的

α -complementation を実際に複雑な再構築反応系に組み込み、再構築反応系でのレポーターとしての有用性を示すこと、および再構築反応系のレポーターに特化した改良をすることを目的とした。具体的には、 α タンパク質の利点であるタンパク質サイズの縮小や、実験室進化による活性の向上を行うことを目的とした。

1-3 本論文の構成

第2章では、複雑な再構築反応系で α -complementation を用いる例として、RNA 自己複製反応系のレポーターとして組み込んだ反応系の構築を行った。RNA 自己複製反応系は、無細胞翻訳系中に約 150 個の因子のみで RNA の複製反応を再現した反応系である。この反応系のレポーターとして、 β ガラクトシダーゼが使用されていた。しかし、反応系の鋳型 RNA に β ガラクトシダーゼの遺伝子を挿入したことで、RNA 複製効率が低くなっていた。反応系としては、 β ガラクトシダーゼの代わりに α タンパク質の遺伝子を挿入し、反応系には ω タンパク質という 1 つの因子を加えた。レポーターとして α -complementation を用いることで、反応効率・検出感度を向上した反応系が構築できた。

第3章では、大腸菌由来の無細胞翻訳系中での α -complementation の活性向上を目指した。第2章で、 α -complementation の基質分解活性が、 β ガラクトシダーゼのそれと比べて弱いことが分かった。また、RNA 自己複製反応系のレポーターとして、試験管内反応では十分な活性を示したが、微小区画の一例として脂質二重膜小胞(リポソーム)内では十分な検出感度ではなかった。そこで、微小区画内での検出感度の向上を目指した。 α タンパク質の配列は、自由度が高く、 α -complementation を行う環境によって最適な配列が異なる。このことから、無細胞翻訳系中での最適な α タンパク質の配列の探索を行った。さらに、実験室進化を行うことで、活性の向上した α タンパク質の獲得を目指した。

第4章では、最小 α タンパク質の探索を行った。再構築反応系で α -complementation を用いる利点は、 α タンパク質のサイズが小さい、遺伝子配列が短いことである。 α -complementation は ω タンパク質の欠損部分を α タンパク質が補填することで基質分解活性を獲得する。しかし、無細胞翻訳系中の実験で、 ω タンパク質の欠損部分全てを補填しなくても良いという新たな知見が得られた。そこで、無細胞翻訳系中で検出可能な最小サイズの α タンパク質の探索を行った。また RNA 自己複製反応系レポーターシステムに短い α タンパク質を挿入することで、検出感度の変化を確認した。

第5章では、本研究の総括および本研究の展望・応用を記述した。

第 2 章 α -complementation を用いた RNA 自己複製反応レポーターシステムの構築

2-1 緒言

細胞内で起こっている反応は様々な種類のタンパク質を含む遺伝子産物によって構成される複雑な反応系である。そのため複雑な細胞を用いてはタンパク質などの遺伝産物の生化学反応への影響を見ることは非常に困難である。そのため、近年簡略化した、すなわち必要最小限の因子から構成される人工細胞の構築が試みられている[22][23]。最少因子から構築された人工細胞を構築できれば、簡単な化学反応系からの細胞内反応システムを持つために必要な条件の一例を示すことが可能であり、生物の基本単位である細胞の構築原理の理解に新しい知見をもたらす可能性がある。人工細胞構築に向けて脂質二重膜小胞（リポソーム）が容器として注目されている[24]。そしてその中でペプチド合成[25]、タンパク質合成[16][26]などが行われてきた。我々の研究室では、脂質二重膜小胞内に最少の既知物質のみを用いて RNA 自己複製反応系を構築してきた[17] (図 2-1 左)。

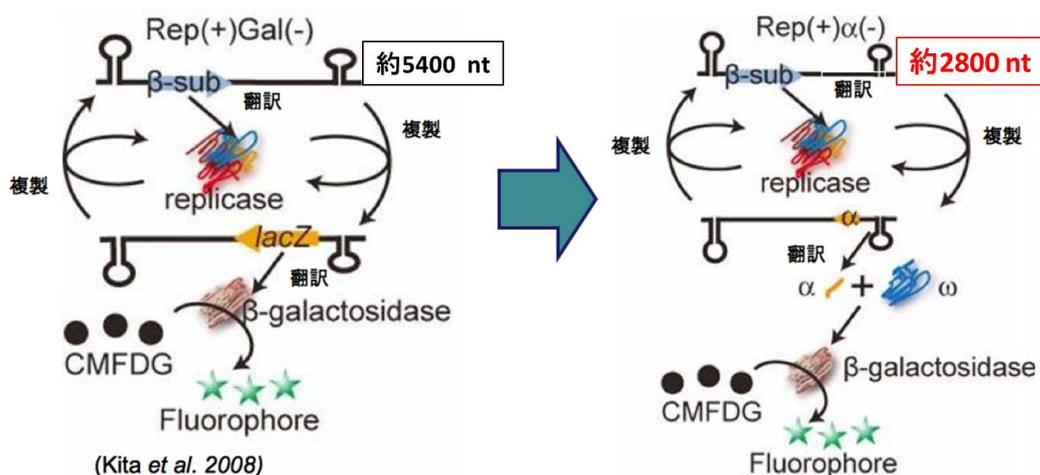


図 2-1. (左) β ガラクトシダーゼを用いた自己複製反応系
(右) α コンプリメンテーションを用いた自己複製反応系

この自己複製反応系は、情報分子である RNA に Q β レプリカーゼの β サブユニットがコードされており、その情報にもとづき β サブユニットが翻訳され、Q β レプリカーゼが合成される。この Q β レプリカーゼによって RNA が複製されるという反応系である。自己複製反応の進行を定量的に検出するためのレポーター遺伝子として β ガラクトシダーゼを用いている。RNA が複製され一鎖 RNA ができると β ガラクトシダーゼが翻訳され、基質分解反応が起こり蛍光で検出可能になる。遺伝情報分子の複製反応というのは、細胞内の最も重要な反応の一つである。この反応系の進行を蛍光で追跡できれば、それぞれのタンパク質や遺伝子配列の持つ機能や、新たに加える因子の影響をリアルタイムに検出することが可

能になり、複製反応の理解に貢献することが期待できる。しかし、 β ガラクトシダーゼを用いたレポーターシステムは、低頻度でしか自己複製反応が進行せず検出感が低い、すなわちバックグラウンドノイズとの差が小さくなっている。 β ガラクトシダーゼを用いた自己複製反応系の反応効率が低くなる原因として、RNA の長さが考えられた。この自己複製反応系に用いている RNA 複製酵素は、RNA 複製反応の反応効率が RNA の長さに依存していることが分かっている[27]。 α -complementation を用いると、鋳型 RNA に挿入するレポータータンパク質の遺伝子の長さが短くなるため、鋳型 RNA の長さを約半分(5400 塩基から 2800 塩基)にすることが可能になる。そこで本章では、 α -complementation を用いて自己複製反応系を高感度に検出できるレポーターシステムの構築を目的とした。

2-2 実験方法

2-2-1 実験試薬

QIAprep Spin、QIAquick Spin、RNeasy Mini kit は QIAGEN より購入した。制限酵素 Not I は New England Biolab より購入した。制限酵素 Hind III、制限酵素 Sma I、PrimeStar(premix)、Pyrobest DNA polymerase、T7 RNA polymerase は Takara より購入した。In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit および ProLabel Detection Kit II は Clontec より購入し、ProLabel Detection Kit II の EA reagent をタンパク質溶液として使用した。Acrylamide、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン(TEMED)、ペルオキソ二硫酸アンモニウム(APS)は和光純薬工業より購入した。トリスヒドロキシメチルアミノメタン塩酸塩(Tris-HCl)は同仁化学研究所より購入した。Rnase Inhibitor は Promega より購入した。Alexa647 および transferrin Alexa647 は life technologies より購入した。

9-(4'-methoxy-2'-methylphenyl)-6-(β-D-glucopyranosyloxy)-xanthen-3-one (TG-FDG)は積水メディカルより購入した。[³⁵S]-methionine および[³²P]-UTP は Parkin Elmer より購入した。1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(POPC)は Avanti、コレステロール(chol)はナカライテスクより購入した。DpnI は New England BioLabs より購入した。5-chloromethylfluorescein di-β-D-galactopyranoside (CMFDG)は life technologies より購入した。

2-2-2 無細胞翻訳系の組成

無細胞翻訳系とは大腸菌由来の翻訳に必要最小限の因子から構成されており、すべて高純度に精製した翻訳因子を人工的に再構成したものである[19][18]。本章で用いた無細胞翻訳系の組成を表 2-1 に示す。以下にそれぞれの略称について記載する。

18AA: チロシン(Tyr)、システイン(Cys)を除く 18 種のアミノ酸溶液。濃度はそれぞれのアミノ酸の濃度を指す。

Glu-K: グルタミン酸カリウム

Mg(OAc)₂: 酢酸マグネシウム

CP: クレアチンフォスフェート

FD: 10-formyl-5.6.7.8.-tetrahydrofolic acid

MTF: メチオニン tRNA フォルミラーゼ

MK: ミオキナーゼ

CK: クレアチンキナーゼ

NDK: nucleoside diphosphate kinase

表 2-2. PCR 条件

94°C	2 min	
98°C	10 sec	
60°C	5 sec	
72°C	1 min	x 30 cycle
4°C	infinite	

作成した DNA は T7 プロモーターの下流に遺伝子をコードさせている。プライマーの配列および作成した DNA 断片の配列を以下に記す。

プライマー

101216_T7pro_Gal_3':

TAATACGACTCACTATAGGCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAAC

1210_Ter_gal_1:

AGGCGTAAATTATTACATCTGCCAGTTTGAGGGGAC

1210_Ter_gal_2:

AGGCGTAAATTATTAAACGCCATCAAAAATAATTTCGC

1210_Ter_gal_3

AGGCGTAAATTATTAGTGAGCGAGTAACAACCCGTC

1210_Ter_gal_4

AGGCGTAAATTATTACGTAAAAATGCGCTCAGGTC

1210_Ter_gal_5

AGGCGTAAATTATTAGCGCCATTCGCCATTCAG

それぞれの α タンパク質の配列

alpha-1

ATGCCTTCTGAACAATGGAAAGGCATTATTGCCGTAAGCCGTGGCGGTCTGGTACC
GGTGGGTGAAGACCAGAAACAGCACCTCGAACTGAGCCGCGATATTGCCAGCGT
TTCAACGCGCTGTATGGCGAGATCGATCCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGA
AAACCCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTCGCCAGCT
GGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCT
GAATGGCGAATGGCGCTTTGCCTGGTTTCCGGCACCAAGCGGTGCCGAAAGC

TGGCTGGAGTGCATCTTCCTGAGGCCGATACTGTCGTCGTCCCCTCAAACCTGGCA
GATGCACGGTTACGATGCG (408 bp)

alpha-2

ATGCCTTCTGAACAATGGAAAGGCATTATTGCCGTAAGCCGTGGCGGTCTGGTACC
GGTGGGTGAAGACCAGAAACAGCACCTCGAACTGAGCCGCGATATTGCCAGCGT
TTCAACGCGCTGTATGGCGAGATCGATCCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGA
AAACCCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCT
GGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCT
GAATGGCGAATGGCGCTTTGCCTGGTTTCCGGCACCAGAAGCGGTGCCGAAAGC
TGGCTGGAGTGCATCTTCCTGAGGCCGATACTGTCGTCGTCCCCTCAAACCTGGCA
GATGCACGGTTACGATGCGCCCATCTACACCAACGTGACCTATCCATTACGGTCA
ATCCGCCGTTTGTTCACCGGAGAATCCGACGGGTTGTTACTCGCTCACATTTAAT
GTTGATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCCAGACGCGAATTATTTTTGATGGCGTTAA
CTCGGCGTTTCAT (570 bp)

alpha-3

ATGCCTTCTGAACAATGGAAAGGCATTATTGCCGTAAGCCGTGGCGGTCTGGTACC
GGTGGGTGAAGACCAGAAACAGCACCTCGAACTGAGCCGCGATATTGCCAGCGT
TTCAACGCGCTGTATGGCGAGATCGATCCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGA
AAACCCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCT
GGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCT
GAATGGCGAATGGCGCTTTGCCTGGTTTCCGGCACCAGAAGCGGTGCCGAAAGC
TGGCTGGAGTGCATCTTCCTGAGGCCGATACTGTCGTCGTCCCCTCAAACCTGGCA
GATGCACGGTTACGATGCGCCCATCTACACCAACGTGACCTATCCATTACGGTCA
ATCCGCCGTTTGTTCACCGGAGAATCCGACGGGTTGTTACTCGCTCACATTTAAT
GTTGATGA (509 bp)

alpha-4

ATGCCTTCTGAACAATGGAAAGGCATTATTGCCGTAAGCCGTGGCGGTCTGGTACC
GGTGGGTGAAGACCAGAAACAGCACCTCGAACTGAGCCGCGATATTGCCAGCGT
TTCAACGCGCTGTATGGCGAGATCGATCCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGA
AAACCCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCT
GGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCT
GAATGGCGAATGGCGCTTTGCCTGGTTTCCGGCACCAGAAGCGGTGCCGAAAGC
TGGCTGGAGTGCATCTTCCTGAGGCCGATACTGTCGTCGTCCCCTCAAACCTGGCA

GATGCACGGTTACGATGCGCCCATCTACACCAACGTGACCTATCCCATTACGGTCA
ATCCGCCGTTTGTCCACGGAGAATCCGACGGGTTGTTACTCGCTCACATTTAAT
GTTGATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCCAGACGCGAATTATTTTTGATGGCGTTAA
CTCGGCGTTTCATCTGTGGTGCAACGGGCGCTGGGTTCGGTTACGGCCAGGACAGT
CGTTTGCCGTCTGAATTTGACCTGAGCGCATTTTTACGCGCCGGAGAAAACCG (665
bp)

alpha-5

ATGCCTTCTGAACAATGGAAAGGCATTATTGCCGTAAGCCGTGGCGGTCTGGTACC
GGTGGGTGAAGACCAGAAACAGCACCTCGAACTGAGCCGCGATATTGCCCAGCGT
TTCAACGCGCTGTATGGCGAGATCGATCCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGA
AAACCCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCT
GGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCT
GAATGGCGAATGGCGCTTTGCCTGGTTTCCG (309 bp)

2-2-4 RNA 合成

作成した DNA(alpha-1, alpha-2, alpha-3, alpha-4, alpha-5)を QIAGEN の QIAquick のプロトコルに従って精製を行った。10x reaction buffer 5 µl、DTT が終濃度 5 mM、各 NTP を終濃度 2 mM、Rnase Inhibitor 10 unit、T7 RNA polymerase 50 unit、精製済みテンプレート DNA 2000 ng を混合し、全量を 50 µl に milliQ 水でメスアップし、37°C で 3 時間反応させた。そして DNase (RNase free) を 3 µl 加え 37°C で 20 分反応させ、Rneasy Mini kit で精製を行った。

2-2-5 タンパク質サイズ決定のための蛍光値測定

Sol. A 8.78 µl、Sol. B 2.32 µl、Rnase Inhibitor 10 unit、TG-FDG 終濃度 50 µM、ωタンパク質 2.00 µl、RNA 終濃度 70 nM になるように加え milliQ 水で 20 µl にメスアップした。リアルタイム PCR 機 Mx3005P(Agilent technologies)を用いて 37°C で 2 時間蛍光値(励起波長 492 nm、蛍光波長 516nm)を測定した。

2-2-6 タンパク質翻訳量の定量

無細胞翻訳系に ³⁵S を持つメチオニンを加えることで、翻訳されたタンパク質を標識し、検出した。SolA 4.39 µl、SolB 1.16 µl、[³⁵S] Methionie 0.5 µl、RNasin 5 unit、RNA 終濃度 10 nM になるように加え、milliQ 水で合計 10 µl にした。37°C で反応させ、反応開始 0 分、15 分、30 分、45 分、60 分でサンプリングを行い、sodium dodecyl sulfate-polyacrylamidegel(SDS-PAGE)電気泳動を行った。SDS-PAGE のゲルは、分離ゲルは 30% acrylamide 2.2 ml、1.5 M Tris-HCl(ph8.8) 1.6 ml、20% SDS 65 µl、40 mg/ml

APS 170 μ l、TEMED 6.5 μ l、milliQ 水 2.2ml を混合した。濃縮ゲルは 30% acrylamide 0.5 ml、1 M Tris-HCL(pH6.8) 0.625 ml、20% SDS 50 μ l、40 mg/ml APS 60 μ l、TEMED 12.5 μ l、milliQ 水 3.7 ml を混合した。サンプリングしたサンプル 1 μ l に sample buffer 6.5 μ l 加え、98°C で 4 分熱変性させた。サンプルをゲルにアプライし、100 V で 1 時間 50 分泳動した。その後固定および乾燥を行い Typhoon FLA 700(GE)を用いて測定を行った。

2-2-7 プラスミド構築

ベクターとインサートを In-Fusion 反応を用いて形質転換し、プラスミド抽出を行った。プラスミド mdv(+) β (-)を Hind III と Not I で制限酵素処理し、ベクターとして用いた。インサートには alpha-2 を用いた。In-Fusion 反応は 5x in-Fusion reaction buffer 2 μ l、In-Fusion enzyme 1 μ l、ベクター150 ng、インサート 45 ng に milliQ 水を加え全量を 5 μ l とし 37°C で 15 分、50°C で 15 分反応させ、反応液を TE buffer で全量を 50 μ l にした。この反応液を用いて competent cell (JM109)に形質転換(ヒートショック法)を行った。菌体は LB アンピシリンプレート培地で 37°C でオーバーナイト培養を行い、その後 LB アンピシリン液体培地でオーバーナイト培養後にプラスミド抽出を行った。プラスミド抽出は QIAprep の推奨プロトコルに従って行った。このプラスミドはこれ以降プラスミド mdv(+) β (+) α (-)と記載する。

2-2-8 mdv(+) β (+) α (-)の作成

10x pyrobest buffer 5 μ l、dNTP 終濃 200 μ M、100 μ M、mdv-F2001 0.25 μ l、100 μ M mdv-R1001 0.25 μ l、pyrobest 1 μ l、10 ng/ μ l、alpha2 1 μ l、10 ng/ μ l mdv(+) β (+) 1 μ l に milliQ 水を加え全量 50 μ l で PCR を行った。精製は QIAquick の推奨プロトコルに従った。PCR 条件を表 2-3 に示した。

表 2-3. PCR 条件

98°C	1 min	
98°C	15 sec	
60°C	30 sec	
72°C	3 min	x 30 cycle
4°C	infinite	

2-2-9 pBR322_ mdv(+) β (+) α (-)プラスミドの構築

大腸菌から再現的に抽出可能な鋳型 DNA を含むプラスミドの構築を行った。pBR322 を Hind III で制限酵素処理し、ベクターとして用いた。インサートには mdv(+) β (+) α (-)を用いた。In-Fusion 反応は 5x in-Fusion reaction buffer 2 μ l、In-Fusion enzyme 1 μ l、ベクター150 ng、インサート 45 ng に milliQ 水を加え全量を 5 μ l とし 37°C で 15 分、50°C で 15 分反応させ、反応液を TE buffer で全量を 50 μ l にした。この反応液を用いて competent cell

(JM109)に形質転換(ヒートショック法)を行った。菌体はLB アンピシリンプレート培地で37°Cでオーバーナイト培養を行い、その後LB アンピシリン液体培地でオーバーナイト培養後にプラスミド抽出を行った。プラスミド抽出は QIAprep の推奨プロトコルに従って行った。このプラスミドはこれ以降 pBR322Rep(+) α (-)と記載する。

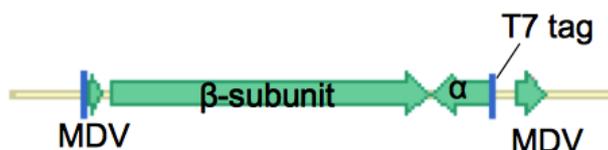
2-2-10 Rep(+) α (-)RNA 合成

プラスミド pBR322 Rep(+) α (-)を制限酵素 SmaI で 30°Cで4時間反応させ、QIAGEN の QIAquick のプロトコルに従って精製を行った。T7 RNA polymerase 1 μ l、10x reaction buffer 5 μ l、DTT 終濃度 5 mM、各 NTP を終濃度 2 mM、Rnase Inhibitor 10 unit、精製済みテンプレート DNA 2000 ng を混合し、全量が 50 μ l になるように milliQ 水を加え 37°C で3時間反応させた。そして DNase (Rnase free)を 3 μ l 加え 37°Cで20分反応させ、Rneasy Mini kit で精製した。以降ではこの RNA を Rep(+) α (-)と呼ぶ。

2-2-11 Rep(+) α (-)Gal(-)RNA 合成

プラスミド Rep(+) α (-)Gal(-)を制限酵素 SmaI で 30°Cで4時間反応させ、QIAGEN の QIAquick のプロトコルに従って精製を行った。T7 RNA polymerase 1 μ l、10x reaction buffer 5 μ l、DTT 終濃度 5 mM、各 NTP を終濃度 2 mM、Rnase Inhibitor 10 unit、精製済みテンプレート DNA 2000 ng を混合し、全量が 50 μ l になるように milliQ 水を加え 37°C で3時間反応させた。そして DNase (Rnase free)を 3 μ l 加え 37°Cで20分反応させ、Rneasy Mini kit で精製した。以降ではこの RNA を Rep(+) α (-)Gal(-)と呼ぶ。

Rep(+) α (-)



Rep(+) α (-)Gal(-)



図 2-2. Rep(+) α (-)と Rep(+) α (-)Gal(-)の構造模式図

2-2-12 試験管内におけるレポーターシステムの蛍光値測定

Sol.A 8.78 μ l、Sol.B 2.61 μ l、Rnase Inhibitor 10 unit、TG-FDG 終濃度 50 μ M、 ω タンパク質 2.00 μ l、RNA 終濃度 10 nM になるように加え milliQ で 20 μ l にメスアップする。

リアルタイム PCR 機 Mx3005P を用いて 37°C で 2 時間蛍光値(励起波長 492 nm、蛍光波長 516nm)を測定した。

2-2-13 ラジオアイソトープ法を用いた RNA 複製量の定量

[³²P]-UTP で複製された RNA を標識し、定量した。Sol.A 4.39 μ l、Sol.B 1.3 μ l、RNase inhibitor 5 unit、[³²P]-UTP 0.2 μ l、Q β replicase 750 nM、RNA 終濃度 10 nM になるように加え全量を milliQ 水で 10 μ l にした。操作は全て氷上で作成した。そして 37°C で反応させ 5 分、10 分、20 分、40 分でタイムサンプリングを行った。サンプリングしたサンプルは氷上保存した。サンプルは 1%アガロース TBE ゲルで電気泳動を行った。ゲルを固定液に 20 分浸し、乾燥させ写真を撮影しバンドの濃さから RNA の複製量の定量を行った。

2-2-14 リポソームの作成方法

先行研究の方法[28]を一部変更してリポソームを作成した。POPC と chol をリン脂質(POPC:chol=9:1 weight ratio)として用いた。リン脂質混合物を有機相に溶かすために、あらかじめ 100 μ l のクロロホルムに溶解させた後、2 ml の流動パラフィンを加え、80°C エアークューバー内で 20 分静置し、完全に溶解させた。この溶液をガラス試験管に 400 μ l とり、20 μ l の内封液(Sol. A 8.78 μ l、Sol. B 2.61 μ l、Rnase Inhibitor 10 unit、CM-FDG 50 μ M、 ω タンパク質溶液 2.00 μ l、RNA 終濃度 15 nM になるように加え milliQ 水を加え合計で 20 μ l にした)を加え、30 秒間ボルテックスによって分散し、10 分間氷上に静置した。この操作により、リポソームの鋳型となる water in oil(W/O)エマルジョンが形成される。新しいエッペンチューブに 200 μ l の等張液(Sol.A 76.6 μ l、酢酸マグネシウムを終濃度 14 mM、グルコースを終濃度 400 mM なるように加え、milliQ 水で 200 μ l にメスアップ)を入れ、350 μ l の W/O エマルジョン溶液を静かに重層し、小型冷却遠心分離機を用いて 4°C、14000 rpm で 30 分遠心を行った。遠心分離後、注射針(ϕ =0.8 mm)を用いてエッペンチューブの底に針で穴を空け、沈殿物および液を数滴新しいエッペンチューブに取り出した。

2-2-15 リポソーム内におけるレポーターシステムの蛍光値測定

反応液を封入したリポソームを 37°C で反応させ、反応開始 1200 分後に fluorescence activated cell sorter(FACS)でリポソームの蛍光値を測定した。測定方法は、前方散乱光および側方散乱光、緑色蛍光、赤色蛍光を測定した。緑色蛍光は励起光 488 nm、蛍光 520 nm で行い、赤色蛍光は励起光 633 nm、蛍光 660 nm で測定した。赤色蛍光値の測定値に 0.003724 をかけ体積を算出した。単層膜と言われる領域[29]に含まれるリポソームを 100000 点測定した。

2-3-1 結果および考察

2-3-1 α タンパク質サイズ決定のための蛍光値測定

α タンパク質は、 ω タンパク質と結合する領域さえあれば活性があると考えられており、厳密なサイズは決まっていない[30]。レポーターシステムに用いる α タンパク質を決定するために、Rep(+) β Gal(-)の β ガラクトシダーゼから様々なサイズの α タンパク質を作成し、蛍光活性を調べた。

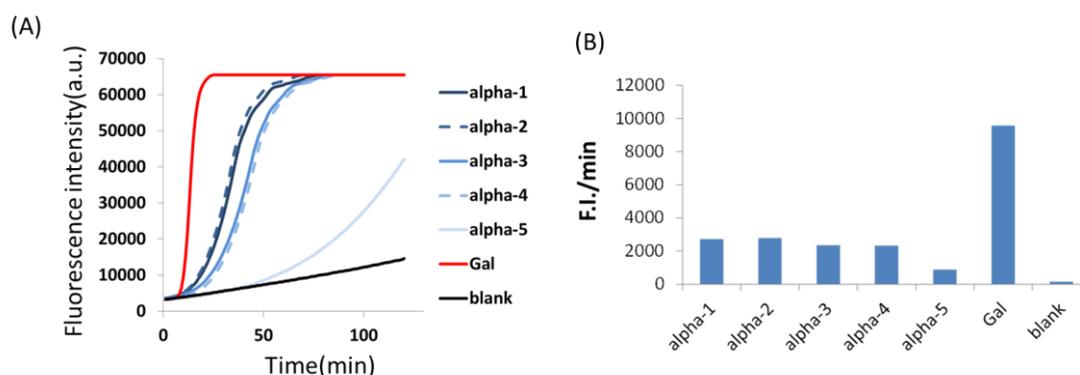


図 2-3.(A) RNA 終濃度 70 nM からそれぞれの α タンパク質を発現させた時の蛍光値経時変化、(B) それぞれの α タンパク質による α -complementation と β ガラクトシダーゼ(Gal)の最大の蛍光値上昇速度(F.I./min)比較。

無細胞翻訳系中に、alpha-1 から alpha-5 のそれぞれの遺伝子をコードした RNA を終濃度 70 nM 加え、反応液中で α タンパク質を翻訳させ、 α -complementation による蛍光値測定を行った結果を図 2-3 に示した。それぞれの α タンパク質はサイズを変えている。タンパク質のサイズは次のようになっている。alpha-1: 136 アミノ酸、alpha-2: 190 アミノ酸、alpha-3: 169 アミノ酸、alpha-4: 222 アミノ酸、alpha-5: 103 アミノ酸。blank は無細胞翻訳系に ω タンパク質のみを加えた場合の蛍光値変化を示している。この結果から、alpha-1 から alpha-5 全てで α -complementation 活性を示していることが分かった。その中で、alpha-2 が最も強い活性を持つことが分かった。しかし、 β ガラクトシダーゼと比べると最大の蛍光値上昇速度(F.I./min)では約 1/4 しか活性が見られなかった。この原因としては、1) 翻訳された α タンパク質の量が少ない、2) ω タンパク質の量が不十分である、3) α -complementation 活性の活性が β ガラクトシダーゼに比べて弱いのが考えられる。また α -complementation 活性については、alpha-5 以外は同程度の蛍光値・蛍光値上昇速度を示した。このことより alpha-1 から alpha-4 には α タンパク質と ω タンパク質の親和性を高める領域、あるいは α -complementation 複合体の基質分解に重要な役割を果たす領域などの、活性に重要な領域があると考えられる。本章の以降では、alpha-2 を alpha と記載する。

2-3-2 タンパク質翻訳量の比較

2-3-1 でβガラクトシダーゼに比べてα-complemnetation の活性が低かったのは、αタンパク質翻訳量が少ないためではないか確認する必要がある。そこで、αタンパク質とβガラクトシダーゼの翻訳活性を比較するために、 $[^{35}\text{S}]$ -methionine を用いてαタンパク質とβガラクトシダーゼを標識し、翻訳活性を確認した。

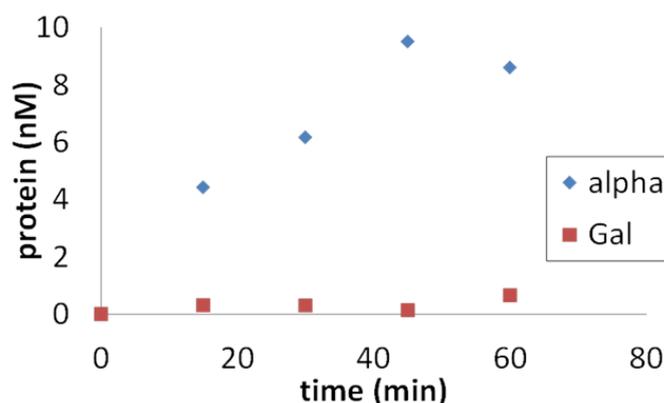


図 2-4. alpha とβガラクトシダーゼ(Gal)の翻訳量の定量結果

図 2-4 に、無細胞翻訳系中でそれぞれ RNA 終濃度 10 nM から翻訳されたβガラクトシダーゼと alpha を $[^{35}\text{S}]$ -methionine で標識し定量した結果を示した。alphaの方が、翻訳速度が速いことが分った。翻訳反応は反応液中のリボソームによって起こるが、alphaの配列の方が短いため1分子翻訳するのに要する時間が短いためであると考えられる。alphaの翻訳量は、反応開始40分以降定常に達していた。反応開始40分後で翻訳量の差は約15倍になっていた。この結果より、2-3-1のβガラクトシダーゼに比べてα-complemnetationの活性が低かったことの原因が翻訳量の差でないことが分かった。

2-3-3 添加するωタンパク質量の検討

2-3-1のβガラクトシダーゼに比べてα-complemnetationの活性が低かった原因は、αタンパク質の発現量に対して、ωタンパク質の量が不足している可能性が考えられる。そこで、ωタンパク質の量の検討を行った。

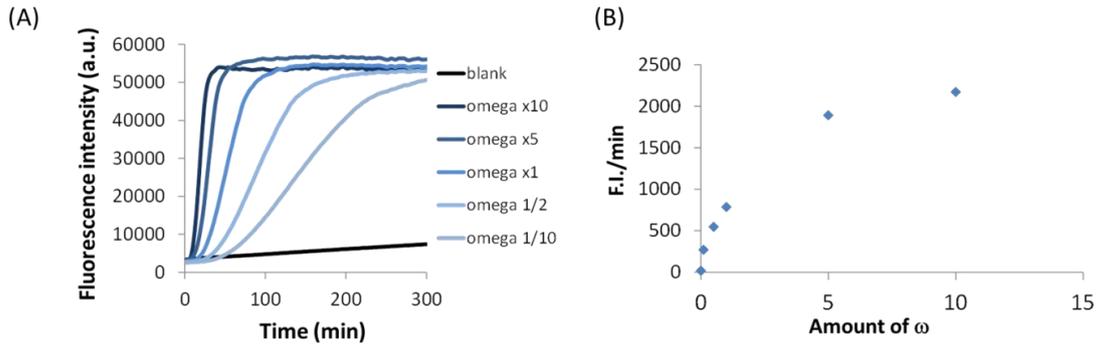


図 2-5. (A) ω タンパク質の量を変えた条件での α -complementationによる蛍光値経時変化、(B) ω タンパク質の量と α -complementationによる最大蛍光値上昇速度(F.I./min)の関係。

無細胞翻訳系に alphaRNA 終濃度 70 nM を加え、 ω タンパク質の量を変え蛍光値測定を行った結果を図 2-5 に示した。本研究では、Clontec の Prolabel Detection kit II の EA reagent を ω タンパク質溶液として用いているため、2-3-1 で用いた量を x1 とした。この結果より、 ω タンパク質の量を増やすことで、最大 F.I./min が向上していることが分かった。また図 2-5(B)より x5 以上では ω タンパク質が飽和していることが分かった。この結果より、70 nM の RNA から発現される α タンパク質に対して加える ω タンパク質は 5 倍量で充分であることが分かった。

2-3-4 最適化した条件での β ガラクトシダーゼと α -complementationの活性の比較

2-3-3 で ω タンパク質が不足していたことが判明したので、 ω タンパク質を 5 倍量加えた条件で β ガラクトシダーゼと α -complementationの活性の比較を行った。RNA 濃度が 70 nM では、立ち上がり早すぎるために差が見えにくかったため、RNA 濃度を 10 nM で測定を行った。

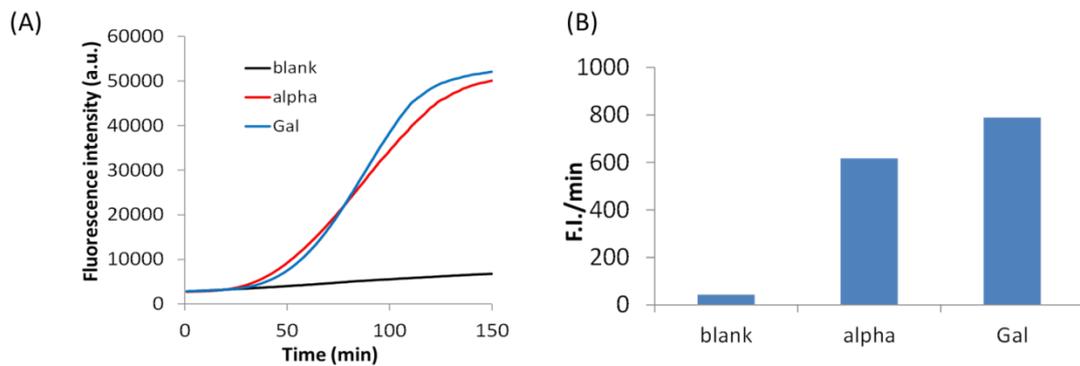


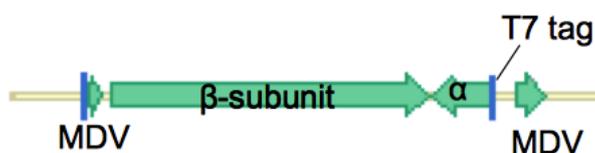
図 2-6. (A) ω タンパク質を 5 倍量加えた条件下での β ガラクトシダーゼ(Gal)と α -complementationの蛍光値経時変化、(B) ω タンパク質を 5 倍量加えた条件下での最大蛍光値上昇速度(F.I./min)の比較。

図 2-6 にβガラクトシダーゼと alpha によるα-complementaiton の蛍光値変化および最大蛍光値上昇速度(F.I./min)の測定結果を示した。図 2-4(A)より、蛍光値の立ち上がりはα-complemenationの方が早いことが分かる。これは、βガラクトシダーゼと alpha のそれぞれの翻訳速度の違いのために見られたと考えられる。蛍光値の立ち上がりはα-complementationの方が早い、蛍光強度は time = 80 min で逆転している。翻訳量は alpha の方が多いことと図 2-6(B)より、酵素の活性はβガラクトシダーゼの方が高いことが分かる。

2-3-5 試験管内でのβガラクトシダーゼと alpha を用いた自己複製反応レポーターシステムの蛍光値測定

alpha を自己複製反応系の鋳型 RNA に挿入し、βガラクトシダーゼを用いた場合と蛍光強度を比較した。それぞれの鋳型の模式図と、βガラクトシダーゼと alpha を用いた場合のレポーターシステムの蛍光値測定の結果を図 2-7 に示した。図 2-7(A)より、alpha を用いたレポーターシステムの方が蛍光値の立ち上がりが早くなっていることが分かった。2-3-4の結果とは違い、最大蛍光値上昇速度(F.I./min)も alpha を用いた場合の方が大きくなっていった。これは alpha を用いたことで、鋳型 RNA の長さが約半分(約 5400 塩基から約 2800 塩基)になったために、RNA の複製速度が速くなったためであると考えられる。alpha を用いたことで、蛍光感度は向上したと言える。

Rep(+) α (-)



Rep(+) β (-)

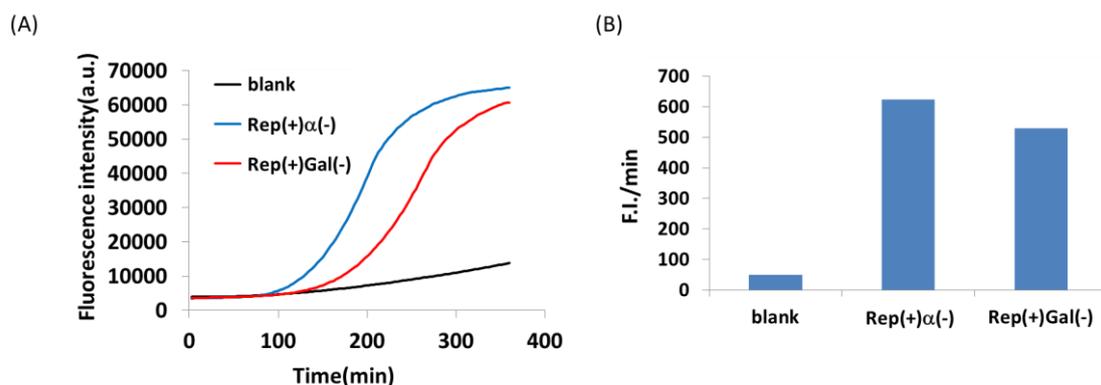


図 2-7.それぞれの鋳型 RNA の模式図と (A) β ガラクトシダーゼ(Gal)と α を用いたレポーターシステムの蛍光値経時変化、(B) β ガラクトシダーゼ(Gal)と α を用いたレポーターシステムの最大蛍光値上昇速度 (F.I./min)。

2-3-6 試験管内での β ガラクトシダーゼと α を用いたレポーターシステムの RNA 複製量の比較

2-3-5 で β ガラクトシダーゼの代わりに α を用いたことで、蛍光値の立ち上がりが早くなり、検出感度が向上していることが分かった。次に、無細胞翻訳系に $[^{32}\text{P}]\text{-UTP}$ と鋳型 RNA 終濃度 10 nM を加えて 37°C で反応させることで、複製された RNA を $[^{32}\text{P}]\text{-UTP}$ で標識し、自己複製反応の反応効率を比較した。

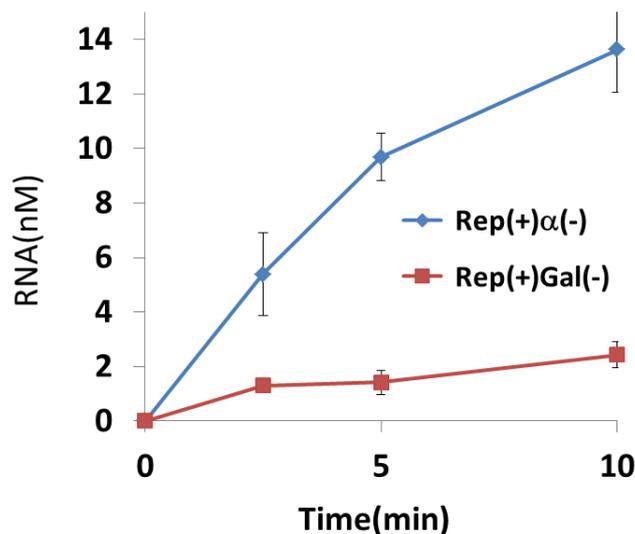


図 2-8. それぞれのレポーターシステムの RNA 複製量

図 2-8 にそれぞれのレポーターシステムの RNA 複製量の定量結果を示した。ここでは、検出量を増やすために外部から Q β replicase を加えた。反応開始 5 分後には、alpha を用いたレポーターシステムの方が RNA 複製量が約 8 倍多くなっていた。この違いが生まれた原因は、この自己複製反応で用いている RNA 複製酵素は RNA が短いほど RNA 複製効率が高い[27]ためであると考えられる。Rep(+)\alpha(-)の結果を見ると、5 分後から 10 分後の間で複製量の変化が緩やかになっていた。

2-3-7 リポソーム内での β ガラクトシダーゼと alpha を用いた自己複製反応レポーターシステムの蛍光値測定

試験管内という RNA が非常に多い環境では、2 本鎖 RNA が形成されても反応できる RNA の数が十分にあるために、反応を検出することができた。RNA 自己複製反応系は、人工細胞モデルとして構築された反応系であるため、細胞サイズの微小区画内での反応でも検出できる必要がある。そこで、微小区画という RNA の数が少なくなる環境下で検出できるか測定した。微小区画として脂質二重膜小胞リポソームを用い、リポソーム内反応での蛍光値をセルソーター(FACS)を用いて測定した。

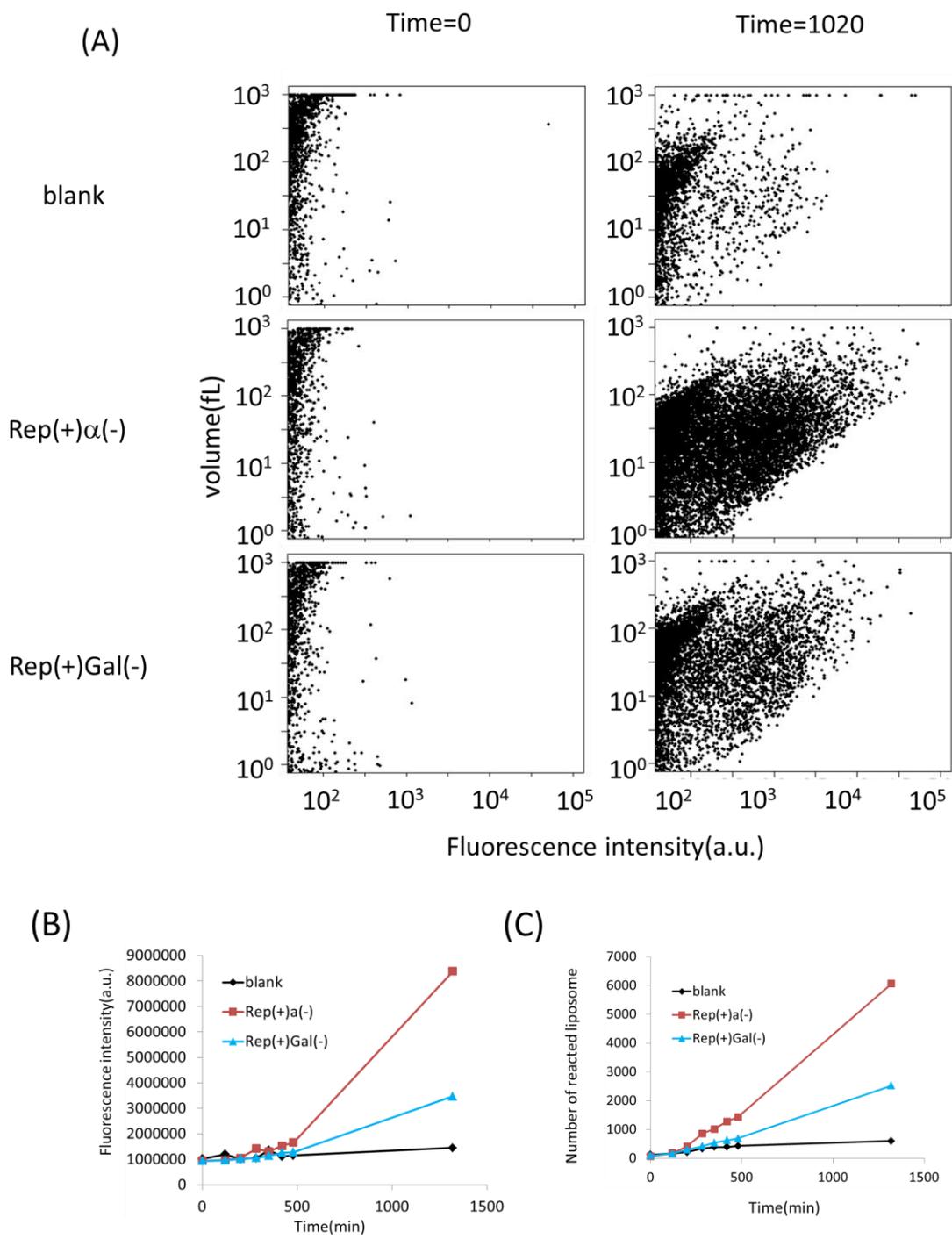


図 2-9. リポソーム内に無細胞翻訳系と RNA 終濃度 15 nM を封入し、37°C で反応。
 (A)1020 分反応後のリポソームの分布図、(B)それぞれの条件での蛍光値経時変化、
 (C)反応したリポソーム(蛍光値が 10^2 以上)の数

リポソーム内に、無細胞翻訳系と RNA 終濃度 15 nM を封入し、37°C で 1020 分反応後
 させ、FACS を用いて 100000 個のリポソームの蛍光値を測定した。その測定結果のリポソ

ーム分布図を図 2-9(A)に、それぞれの条件でのリポソームの蛍光値経時変化および反応したリポソーム数の変化を図 2-9(B)(C)に示した。Time= 0 の分布図から判断し、fluorescence intensity が 10^2 より大きいものを反応が進行したリポソームであるとした。図 2-9(B)(C) より、反応開始 1020 分後では Rep(+) α (-)の方が Rep(+) α (-)に比べて蛍光値は 3.4 倍大きく、反応しているリポソームの数は 2.8 倍に増えていた。試験管内同様、リポソーム内反応でも α -complementation を用いたことで検出感度を向上させることができている。しかし、図 2-9(A)の blank と Rep(+) α (-)を比べると、blank の蛍光値が高く、リポソームの分布が重なってしまっている箇所が見られる。特に、体積が小さい場合(1-10 fL)では、分布のほとんどが重なっている。反応したリポソームの数の違いはあるが、1つのリポソームを観察する場合には、そのリポソームの蛍光が Rep(+) α (-)由来なのかバックグラウンドノイズなのかを識別することが難しくなっている。一方、体積の大きい場合(100fL 以上)では、分布が重なっていない領域(FI が 10^4 以上)がある。この違いは、それぞれの体積に封入されている RNA 数に起因すると考えられる。 α タンパク質が翻訳されるには、RNA 複製反応が起こらなくてはならない。しかしリポソームの体積が小さいと、封入される RNA 数が少ないため、翻訳される α タンパク質が減少することが考えられる。これにより、 α -complementation 複合体の数が少なくなり、基質分解による蛍光値の上昇が blank よりも十分に大きくならなかったと考えられる。一方、体積が大きい場合は、 α -complementation 複合体の数が多いため、基質分解による蛍光値上昇が blank に比べて大きくなったと考えられる。レポーターシステムとしては、体積によらず blank と識別できる必要がある。このレポーターシステムを微小区画でも利用するには、改良が必要であると考えられる。向上可能であると思われる箇所は、レポータータンパク質である。レポータータンパク質は、 α -complementation の活性を向上させれば、RNA の複製効率が低くても blank との蛍光値の差が明白になることが期待できる。

2-4 結語

β ガラクトシダーゼの α -complementation には大きな特徴がある。それは、 α タンパク質という非常に小さいタンパク質によって、加水分解反応が開始されることである。この特徴は、外部から栄養の供給が難しい完全再構築系などの資源の限られた環境下では大きなメリットとなることが考えられる。そのメリットというのは次の2つである。一つは、 α タンパク質は非常に小さいために翻訳するために必要な資源が少ないこと。もう一つは、遺伝子配列が短いので、反応系に組み込んでも複製反応などへの影響が少ないということである。しかし、完全再構築系に α -complementation を用いた前例はない。そこで、完全再構築反応系のレポーターとして α -complementation を用いる例として、RNA 自己複製反応系に組み込み、その有用性を示すことを目的とした。

まず、無細胞翻訳系内で α -complementation を行った前例がないため、無細胞翻訳系内で β ガラクトシダーゼとの酵素活性の比較を行った。2-3-3 より、翻訳量については、配列が短いために α の方が β ガラクトシダーゼよりも翻訳速度が速いという結果が得られた。一方、2-3-4 より、酵素活性としては α -complementation は β ガラクトシダーゼよりも弱いということが分かった。次に、RNA 自己複製反応系の鋳型 RNA に α タンパク質の遺伝子を挿入し、 β ガラクトシダーゼを用いた場合との比較を行った。2-3-5 より、 α -complementation を用いた場合の方が、蛍光値の立ち上がりが高く、最大蛍光値上昇速度も大きいことが分かった。また、RNA の複製反応では、 α -complementation を用いた場合の方が、約8倍複製していることが分かった。このレポーターシステムを、リポソームに封入し蛍光値測定を行った。その結果、反応しているリポソームの数は、Rep(+)/Gal(-)に比べて2.8倍になっていた。これらの結果より、 β ガラクトシダーゼの代わりに α -complementation を用いたことで、試験管内・リポソーム内のどちらでも検出感度を向上させることができた。

この章の結果から、再構築反応系において α -complementation はレポーターとして有用であることが示された。 α タンパク質のサイズが小さいことで、図2-4で示したように多くのタンパク質を翻訳している。また、自己複製反応系において、複製効率も向上しており、再構築反応系の反応を阻害しにくいということが示唆された。しかし、図2-6のように、翻訳反応のみといったシンプルな反応系では、 α -complementation の利点が小さい。このことより、複雑な反応系を再構築することが容易でない現状では、 α -complementation は α タンパク質と ω タンパク質の2つが揃って反応する特性を利用する方が良いと思われる。例えば、リポソームなどの微小区画の融合[31]の検出などへの利用が考えられる。

第3章 検出感度向上のためのレポータータンパク質の改良

3-1 緒言

近年、生化学反応をより細胞に近い環境で行うために、微小区画内で反応を行う研究が盛んに行われている[28][32]。第二章で構築した RNA 自己複製反応レポーターシステムは、試験管サイズの反応体積では十分な検出感度であるが、リポソームという微小区画内では十分とは言えない検出感度であった。図 2-9 に示したように、体積の小さい(1-10 fL)リポソームでは、レポーターの発現により蛍光値が上昇したりリポソームの分布と、レポーターシステムとは関係なく蛍光値が上昇したりリポソームの分布 (バックグラウンドノイズ) が重なっている。これは、1つのリポソームを観察した際に、そのリポソームの蛍光が封入した反応系依存であるか判断できないことを意味する。バックグラウンドノイズと分布が重なる原因は、レポーターシステムに用いている α -complementation の基質分解活性が低いことが考えられる。検出感度を向上させることで、RNA 自己複製反応の反応効率を向上させることも可能になる。すなわち、反応液中の因子の濃度や、RNA の配列の変更による反応効率の変化を明確に検出することができるため、複製効率が向上する条件探索が可能になると考えた。図 2-9 の結果より、活性が 10 倍以上になればバックグラウンドとレポーターシステムによる蛍光を区別することが可能であると見積もられる。そこでこの章では、 α -complementation の活性に着目し、レポーターの蛍光活性を 10 倍以上向上させることを目的として、 α タンパク質の配列の改良を行った。

3-2 実験方法

3-2-1 実験試薬

QIAquick Spin および QIAelute Spin は QIAGEN より購入した。KOD FX DNA Polymerase は東洋紡より購入した。PrimeSTAR HS DNA Polymerase はタカラバイオより購入した。1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(POPC)は Avanti、コレステロールはナカライテスクより購入した。100 bp DNA ladder および制限酵素 Dpn I は New England BioLabs より購入した。DNA 変異導入のための GeneMorph II Random Mutagenesis Kit は Agilent technologies より購入した。ProLabel Detection Kit II を Clontech より購入し、その EA reagent をタンパク質溶液として使用した。Alexa647 および transferrin Alexa 647 は life technologies より購入した。Rnase Inhibitor は Promega より購入した。5-chloromethylfluorescein di- β -D-galactopyranoside (CMFDG)は life technologies より購入した。

9-(4'-methoxy-2'-methylphenyl)-6-(β -D-glucopylanosyloxy)-xanthen-3-one (TG-FDG) は積水メディカルより購入した。使用した primer 配列を以下に記す。

140408_alpha_687

AGGCGTAAATTATTAGGCAACATGGAAATCGCTG

140408_alpha_504

AGGCGTAAATTATTACAAACGACTGTCCTGGCCG

140408_alpha_420

AGGCGTAAATTATTACGTCTGGCCTTCCTGTAGCCAG

140408_alpha_360

AGGCGTAAATTATTACGGATTCTCCGTGGGAACAAAC

140408_alpha_312

AGGCGTAAATTATTACACGTTGGTGTAGATGGGCG

140408_alpha_255

AGGCGTAAATTATTAGACAGTATCGGCCTCAGGAAGATC

140411_alpha_165

AGGCGTAAATTATTACAGGCTGCGCAACTGTTGG

140411_alpha_153

AGGCGTAAATTATTACTGTTGGGAAGGGCGATCG

140411_alpha_135

AGGCGTAAATTATTAGGTGCGGGCCTCTTCGC

140411_alpha_120

AGGCGTAAATTATTAGCTATTACGCCAGCTGGCG

140411_alpha_111

AGGCGTAAATTATTACCAGCTGGCGAAAGGGG

140411_alpha_81

AGGCGTAAATTATTAGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAG

101216_T7pro_Gal-3'

TAATACGACTCACTATAGGCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAAC

101216_Ter_gal_5

AGGCGTAAATTATTAGCGCCATTCGCCATTCAG

140905_alpha_vector_F1

TAATAATTTACGCCTCGCTCACTGCCCGCTTTC

140905_alpha_vector_R1

TAGTGAGTCGTATTAAGCCAGCCC

140905_alpha_vector_F2

TAATAATTTACGCCTAGTCACGGGCTAGCGCTTTC

140905_alpha_vector_R2

TAGTGAGTCGTATTATCGAACTCCCGTACGAGGTGCC

130904_pUCprimer+4

GACGGTCACAGCTTGTCTGTAAG

3-2-2 α タンパク質をコードした DNA の作成

プラスミド pET-lacZ の β ガラクトシダーゼ配列で使用する部分を PCR で増幅することで作成した。KOD X2 buffer を 25 μ l、KOD FX DNA polymerase 1 unit、dNTP mix を終濃度 400 nM、プラスミド pET-lacZ 1 ng、プライマーは forward primer は 101216_T7pro_Gal-3'を、reverse primer はそれぞれに対応したものをそれぞれ終濃度 250 nM になるように加え、milliQ 水で 50 μ l にメスアップした。PCR 条件を表 3-1 に示した。

表 3-1. PCR 条件

Hot start	
94°C	2:00
98°C	0:10
60°C	0:30
72°C	0:06 x25 cycles
4°C	infinite

作成した α タンパク質の配列の長さは 687 bp、507 bp、420 bp、360 bp、312 bp、255 bp、180 bp、165 bp、153 bp、135 bp、111 bp、81 bp である。それぞれの DNA の模式図と配列を以下に示す。

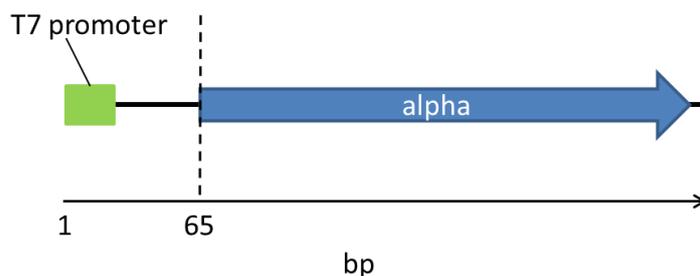


図 3-1. DNA 断片の模式図

alpha-687

```

TAATACGACTCACTATAGGCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGA
TATACATATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTG
GGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCA
GCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAG
CCTGAATGGCGAATGGCGCTTTGCCTGGTTTCCGGCACCAGAAGCGGTGCCGGAA
AGCTGGCTGGAGTGCGATCTTCCTGAGGCCGATACTGTTCGTTCGTCCCCTCAAACCTG
GCAGATGCACGGTTACGATGCGCCCATCTACACCAACGTGACCTATCCCATTACGG
TCAATCCGCCGTTTGTTCACGGAGAATCCGACGGGTGTTACTCGCTCACATTT
AATGTTGATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCCAGACGCGAATTATTTTTGATGGCGT
TAACTCGGCGTTTCATCTGTGGTGCAACGGGCGCTGGGTTCGGTTACGGCCAGGAC
AGTCGTTTGCCTGCTGAATTTGACCTGAGCGCATTTTTACGCGCCGGAGAAAACCG
    
```

CCTCGCGGTGATGGTGCTGCGCTGGAGTGACGGCAGTTATCTGGAAGATCAGGAT
ATGTGGCGGATGAGCGGCATTTTCCGTGACGTCTCGTTGCTGCATAAACCGACTAC
ACAAATCAGCGATTTCCATGTTGCCTAATAATTTACGCCT (766 bp)

alpha-504

TAATACGACTCACTATAGGCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGA
TATACATATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTG
GGAAAACCCTGGCGTTACCCA ACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCA
GCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAG
CCTGAATGGCGAATGGCGCTTTGCCTGGTTTCCGGCACCAGAAGCGGTGCCGGAA
AGCTGGCTGGAGTGCGATCTTCCTGAGGCCGATACTGTTCGTTCGTCCCCTCAA ACTG
GCAGATGCACGGTTACGATGCGCCCATCTACACCAACGTGACCTATCCCATTACGG
TCAATCCGCCGTTTGTTCACGAGGAGAATCCGACGGGTTGTTACTCGCTCACATTT
AATGTTGATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCCAGACGCGAATTATTTTTGATGGCGT
TAACTCGGCCTTTCATCTGTGGTGCAACGGGCGCTGGGTTCGGTTACGGCCAGGAC
AGTCGTTTGTAAATAATTTACGCCT (583 bp)

alpha-420

TAATACGACTCACTATAGGCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGA
TATACATATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTG
GGAAAACCCTGGCGTTACCCA ACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCA
GCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAG
CCTGAATGGCGAATGGCGCTTTGCCTGGTTTCCGGCACCAGAAGCGGTGCCGGAA
AGCTGGCTGGAGTGCGATCTTCCTGAGGCCGATACTGTTCGTTCGTCCCCTCAA ACTG
GCAGATGCACGGTTACGATGCGCCCATCTACACCAACGTGACCTATCCCATTACGG
TCAATCCGCCGTTTGTTCACGAGGAGAATCCGACGGGTTGTTACTCGCTCACATTT
AATGTTGATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCCAGACGTAATAATTTACGCCT (499 bp)

alpha-360

TAATACGACTCACTATAGGCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGA
TATACATATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTG
GGAAAACCCTGGCGTTACCCA ACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCA
GCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAG
CCTGAATGGCGAATGGCGCTTTGCCTGGTTTCCGGCACCAGAAGCGGTGCCGGAA
AGCTGGCTGGAGTGCGATCTTCCTGAGGCCGATACTGTTCGTTCGTCCCCTCAA ACTG
GCAGATGCACGGTTACGATGCGCCCATCTACACCAACGTGACCTATCCCATTACGG

TCAATCCGCCGTTTGTTCACGAGGAGAATCCGTAATAATTTACGCCT (439 bp)

alpha-312

TAATACGACTCACTATAGGCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGA
TATACATATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTG
GGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCA
GCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAG
CCTGAATGGCGAATGGCGCTTTGCCTGGTTTCCGGCACCAGAAGCGGTGCCGGAA
AGCTGGCTGGAGTGCGATCTTCCCTGAGGCCGATACTGTCTGTCGTCCCCTCAAACCTG
GCAGATGCACGGTTACGATGCGCCCATCTACACCAACGTGTAATAATTTACGCCT
(391 bp)

alpha-255

TAATACGACTCACTATAGGCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGA
TATACATATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTG
GGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCA
GCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAG
CCTGAATGGCGAATGGCGCTTTGCCTGGTTTCCGGCACCAGAAGCGGTGCCGGAA
AGCTGGCTGGAGTGCGATCTTCCCTGAGGCCGATACTGTCTAATAATTTACGCCT
(334 bp)

alpha-180

TAATACGACTCACTATAGGCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGA
TATACATATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTG
GGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCA
GCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAG
CCTGAATGGCGAATGGCGCTAATAATTTACGCCT (259 bp)

alpha-165

TAATACGACTCACTATAGGCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGA
TATACATATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTG
GGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCA
GCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAG
CCTGTAATAATTTACGCCT (244 bp)

alpha-153

TAATACGACTCACTATAGGCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGA
TATACATATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTG
GGAAAACCCTGGCGTTACCCA ACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCA
GCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTAATAATTT
ACGCCT (232 bp)

alpha-135

TAATACGACTCACTATAGGCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGA
TATACATATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTG
GGAAAACCCTGGCGTTACCCA ACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCA
GCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCTAATAATTTACGCCT (214 bp)

alpha-111

TAATACGACTCACTATAGGCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGA
TATACATATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTG
GGAAAACCCTGGCGTTACCCA ACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCA
GCTGGTAATAATTTACGCCT (190 bp)

alpha-81

TAATACGACTCACTATAGGCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGA
TATACATATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTG
GGAAAACCCTGGCGTTACCCA ACTTAATCGCTAATAATTTACGCCT (160 bp)

3-2-3 無細胞翻訳系の組成

本章で用いた無細胞翻訳系は先行研究[20]を基に構築している。組成を表 3-2 に示す。略称は第 2 章と同じである。

表 3-2 無細胞翻訳系の組成

試薬名	終濃度		試薬名	終濃度	
Sol.A			Sol. B		
18 AA	2	mM	AsnRS	1679	nM
Tyr	2	mM	AspRS	486	nM
Cys	2	mM	CysRS	96	nM
Hepes(pH 7.6)	100	mM	GlnRS	240	nM
Glu-K	70	mM	GluRS	929	nM
Spermidine	350	mM	GlyRS	345	nM
Mg(OAc) ₂	19	mM	HisRS	341	nM
CP	50	mM	IleRS	1459	nM
DTT	5	mM	LeuRS	165	nM
FD	60	ng/ μ l	LysRS	460	nM
ATP	3.8	mM	MetRS	436	nM
GTP	2.5	mM	PheRS	538	nM
CTP	1.3	mM	ProRS	666	nM
UTP	1.3	mM	SerRS	157	nM
tRNA mix	0.432	mM	ThrRS	335	nM
Sol.B			TrpRS	112	nM
IF1	98765	nM	TyrRS	30	nM
IF2	4111	nM	ValRS	68	nM
IF3	4854	nM	MTF	2353	nM
EF-G	4299	nM	MK	5556	nM
EF-Tu	80162	nM	CK	991	nM
EF-Ts	13201	nM	NDK	65	nM
RF1	198	nM	Ppiase2	161	nM
RF2	194	nM	Ribosome	3000	nM
RF3	637	nM	Tig	1000	nM
RRF	15534	nM	HrpA	200	nM
AlaRS	2917	nM	Pth	1000	nM
ArgRS	124	nM	T7 polymerase	506	nM

3-2-4 α タンパク質の蛍光活性測定

Sol. A 10.21 μ l、Sol. B 2.00 μ l、RNasin 10 unit、TG-FDG 50 μ M、 ω タンパク質溶液 2.00 μ l、DNA 終濃度 0.1 nM になるように加え milliQ 水を加え合計で 20 μ l にした。リアルタイム PCR 機 Mx3005P を用いて 37°C で 4 時間蛍光値(励起波長 492 nm、蛍光波長 516nm)を測定した。

3-2-5 DNA 変異導入

変異導入は GeneMorph II Random Mutagenesis Kit の推奨プロトコルに従って行った。

変異導入率は low と medium を行った。テンプレートは 3-2-2 で作成した alpha-180 を用い、プライマーは 101216_T7pro_Gal-3' と 101216_Ter_gal_5 を用いた。

3-2-6 リポソーム内実験室進化

alpha-180 と変異を導入した DNA 断片(以下 mutant と記す)それぞれを無細胞翻訳系 Sol. A 10.21 μl 、Sol. B 2.00 μl 、 ω タンパク質溶液 2.00 μl に RNasin 10 unit、CM-FDG 終濃度 25 μM 、sucrose 終濃度 400mM、DNA 終濃度 10 pM になるように加え milliQ 水で 20 μl にメスアップした。DNA 終濃度 10 pM ではポアソン分布に従い、体積が 7-13 fL のリポソームにおいて確率的に 0.06 個の DNA がリポソームに封入される。ポアソン分布とは、所与の時間間隔で発生する離散的な事象を数える特定の確率変数 X を持つ離散確率分布であり、

$$P(X = k) = \frac{\lambda^k e^{-\lambda}}{k!}$$

と表される。 λ は所与の区間内で発生する事象の期待発生回数、 $P(X=k)$ は単位時間中に平均で λ 回発生する事象がちょうど k 回発生する確率を表す。これより、 k 個の DNA が体積 $V(L)$ のリポソームに封入される確率 $P(k)$ は

$$P(X = k) = \frac{(\lambda * V)^k e^{-(\lambda * V)}}{k!}$$

と表される。 λ は 1L 当たりの封入期待値を表す。この溶液を 2-2-14 の方法でリポソームに封入した。37°Cで反応させ、反応開始 60 分後にセルソーター(FACS)でリポソームの蛍光値を測定した。測定方法は、前方散乱光および側方散乱光、緑色蛍光、赤色蛍光を測定した。緑色蛍光は励起光 488 nm、蛍光 520 nm で行い、赤色蛍光は励起光 633 nm、蛍光 660 nm で測定した。赤色蛍光値の測定値に 0.003724 をかけ体積を算出した。単層膜と言われる領域[29]に含まれるリポソームの内、リポソーム体積が 7-13 fL の部分を 50000 点測定した。alpha-180 と mutant の測定結果を比較し、alpha-180 よりも蛍光値が大きい mutant のリポソームを 1000 個分取した。分取したリポソームに封入されている DNA を QIAelute Spin で精製し、10 μl 溶出した。溶出液 10 μl に KOD X2 buffer を 25 μl 、KOD FX DNA polymerase 1 unit、dNTP mix を終濃度 400 nM、プライマーは 101216_T7pro_Gal-3' と 101216_Ter_gal_5 をそれぞれ終濃度 250 nM になるように加え、milliQ 水で 50 μl にメスアップした。PCR 条件を表 3-2 に示す。PCR 反応後、QIAquick Spin で精製し、濃度を測定した。得られた DNA 断片溶液を上述の方法で再度封入し、以下同様の手順を繰り返した。(図 3-2.)

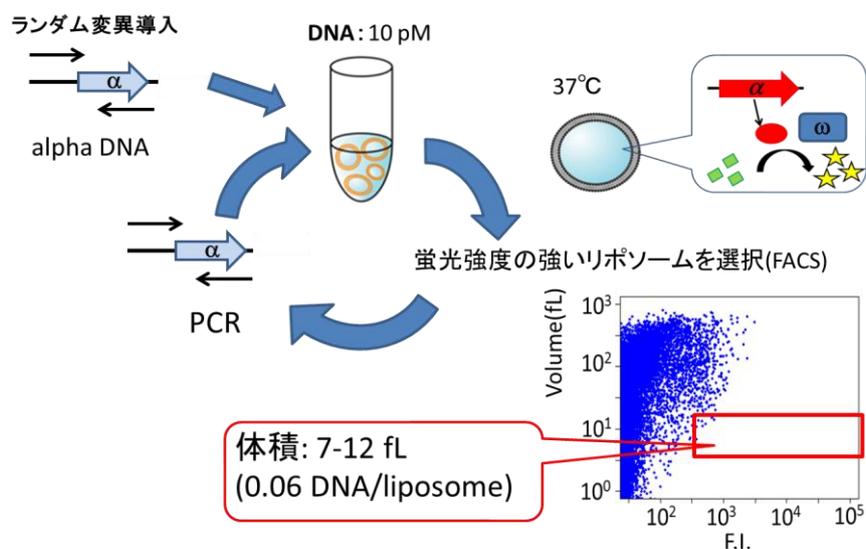


図 3-2. リボソーム内実験室内進化の概要図

3-2-7 クローニング

ベクターとインサートを In-Fusion 反応を用いて形質転換した。プラスミド pUC19 の α タンパク質の配列を取り除いた pUC19 α をベクターとして用いた。In-Fusion 反応は 5x in-Fusion reaction buffer 2 μ l、In-Fusion enzyme 1 μ l、ベクター 150 ng、インサート 45 ng に milliQ 水を加え全量を 5 μ l とし 37°C で 15 分、50°C で 15 分反応させ、反応液を TE buffer で全量を 50 μ l にした。この反応液を用いて competent cell (JM109) に形質転換 (ヒートショック法) を行った。菌体は LB アンピシリンプレート培地で 37°C でオーバーナイト培養を行い、その後 LB アンピシリン液体培地でオーバーナイト培養後にプラスミド抽出を行った。プラスミド抽出は QIAprep の推奨プロトコルに従って行った。

3-2-8 変異体の配列解析

プライマー 130906_pUCprimer+4 を用いて配列解析を行った。

3-2-9 変異体プラスミドから DNA 断片の PCR

KOD X2 buffer を 25 μ l、KOD FX DNA polymerase 1 unit、dNTP mix を終濃度 400 nM、プラスミド pET-nat-lacZ 1 ng、プライマーは forward primer は 101216_T7pro_Gal-3' を、reverse primer は 101216_Ter_gal_5 をそれぞれ終濃度 250 nM になるように加え、milliQ 水で 50 μ l にメスアップした。PCR 条件を表 3-3 に示した。

表 3-3. PCR 条件

Hot start	
94°C	2:00
98°C	0:10
60°C	0:30
72°C	0:06 x25 cycles
4°C	infinite

3-2-9 変異体の試験管内蛍光活性測定

Sol. A 10.21 μ l、Sol. B 2.00 μ l、RNasin 10 unit、CM-FDG 50 μ M、 ω タンパク質溶液 2.00 μ l、DNA 終濃度 0.1 nM になるように加え milliQ 水を加え合計で 20 μ l にした。リアルタイム PCR 機 Mx3005P を用いて 37°C で 4 時間蛍光値(励起波長 492 nm、蛍光波長 516nm)を測定した。

3-2-10 変異体のリポソーム内蛍光活性測定

Sol. A 10.21 μ l、Sol. B 2.00 μ l、 ω タンパク質溶液 2.00 μ l に RNasin 10 unit、CM-FDG 終濃度 25 μ M、sucrose 終濃度 400mM、DNA 終濃度 1 nM になるように加え milliQ 水で 20 μ l にメスアップした。この溶液を 2-2-14 の方法でリポソームに封入した。37°C で反応させ、反応開始 30、60、90、120 分後に FACS でリポソームの蛍光値を測定した。測定方法は、前方散乱光および側方散乱光、緑色蛍光、赤色蛍光を測定した。緑色蛍光は励起光 488 nm、蛍光 520 nm で行い、赤色蛍光は励起光 633 nm、蛍光 660 nm で測定した。赤色蛍光値の測定値に 0.003724 をかけ体積を算出した。単層膜と言われる領域[29]に含まれるリポソームを 100000 点測定した。

3-3 結果と考察

3-3-1 無細胞翻訳系中で活性の高い α タンパク質の探索

第2章では先行研究のレポーターシステム[17]の β ガラクトシダーゼのC末端を欠損させて作成したのだが、この β ガラクトシダーゼには天然の β ガラクトシダーゼとはN末端側の配列が違っていた。天然の β ガラクトシダーゼ由来で同程度のサイズの α タンパク質を作成したところ、天然の β ガラクトシダーゼ由来の方が α -complementation 活性が高いことが分かった。天然の β ガラクトシダーゼ由来で、無細胞翻訳系中で最も蛍光活性を示す α タンパク質の探索を行った。 α タンパク質は ω タンパク質と結合する部分以外の配列の長さは決まっていない[30]。そこで様々なサイズの α タンパク質を作成し、無細胞翻訳系中での α -complementation 反応に適したサイズを探索した。 α タンパク質のサイズを第2章よりも広い範囲で、刻み幅を細かくして探索を行った。

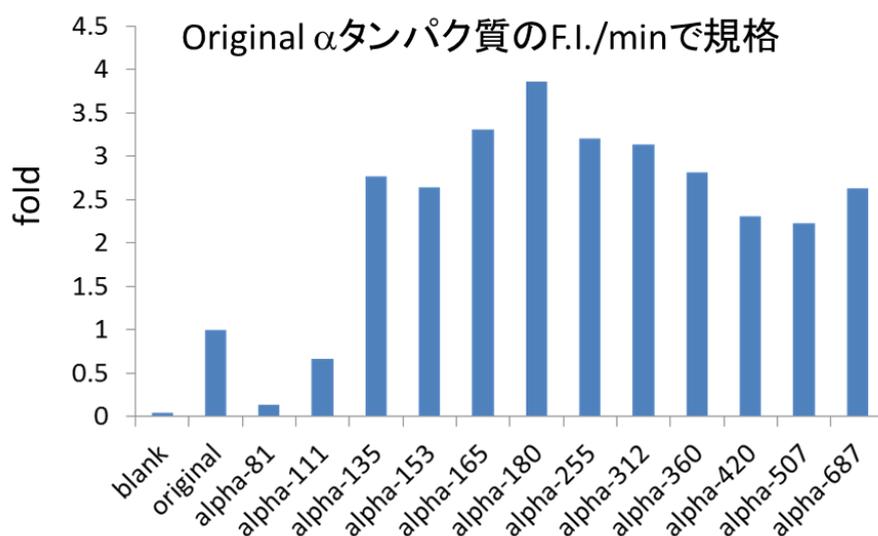


図 3-3. 試験管内での様々な α タンパクによる最大蛍光値上昇速度(F.I./min)の比較

α タンパク質の遺伝子配列を alpha-687 から alpha-81 まで作成し、それぞれを試験管内で発現させ、蛍光活性を比較した(図 3-3.)。original は第2章で用いた α タンパク質のことを指す。alpha-180 が original の4倍と最も高く、それよりも長くても短くても蛍光活性が低下することが分かった。alpha-81 と alpha-111 以外は original よりも高い活性を示した。original は α タンパク質のサイズは190アミノ酸であり、alpha-507 と alpha-687 の間のサイズである。しかし、その二つと比較すると半分以下の活性しか示さなかった。考えられる原因としては、original はN末端側の配列が違うという点が挙げられる。その配列はN末端側にあるため、発現した α タンパク質のN末端部分の折り畳みなどの立体構造が α タンパク質と ω タンパク質の結合、または α -complementation による ω タンパク質の2量体同士の結合阻害していることが予想される。

3-3-2 リポソーム内実験室進化実験

配列の改良により蛍光活性を4倍向上させることができた。しかし目標は10倍以上なので、更なる活性の向上を目指し、リポソーム内実験室進化[33]を行った。進化実験を行う配列を選ぶには、次の2通りの選択方法がある。 α -complementation 活性が高い配列から始める方法と、 α -complementation の特徴である配列の長さが短いものを選び高活性化を目指す方法である。本章では、 α -complementation 活性の最も高い配列から始めることにした。後者の配列の短いものを選ぶ方法では、短いことでまだ発見されていない反応機構に関わるタンパク質部分を失っている可能性があることと、配列が短ければ短いほど、アミノ酸配列などの影響で変異の選択肢は少なく、失活し進化しない可能性が高くなることが考えられた。今回行うリポソーム内実験室進化では、DNA断片にランダムに変異を導入しリポソーム内にDNAを1分子ずつ封入する。リポソーム内で α タンパク質を発現させ、その活性を蛍光で検出する。より蛍光の強いリポソームをセルソーター(FACS)で分取することで、祖先型よりも α -complementation 活性が高い配列を得ることが可能である。本実験では、alpha-180をコードしたDNAにランダム変異導入を行い、DNA群の変異ライブラリ溶液を作成した。それをリポソーム内にDNAを1分子封入した。DNAが封入される確率はポアソン分布に従い、今回の実験では1リポソームに確率的に0.06個のDNAが封入されるようにした。これにより、蛍光値が上昇したリポソームには活性を持つ α タンパク質の配列がコードされているDNAが1分子入っていることになる。FACSを用いて祖先型であるalpha-180よりも蛍光値が高いリポソームを1000個分取した。そのDNAをPCRで増幅し、再度リポソームにDNAを1分子封入することを繰り返した。

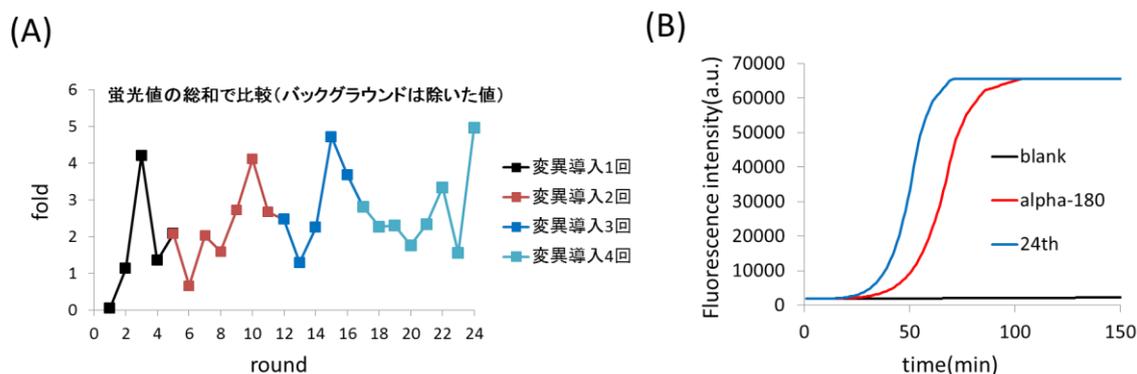


図 3-4. (A)リポソーム内進化実験の各ラウンドにおける祖先型との蛍光値総和の比較
(B)試験管内での alpha-180 と 24 ラウンド目のサンプルの蛍光値経時変化

図 3-4.に進化実験での各ラウンドの体積 7–13 fL の蛍光値総和を alpha-180 と比較した結果を示した。それぞれの色の違いは変異導入回数の違いを表している。この実験では4回変異導入を行い、24ラウンド進化実験を行った。3回目の変異導入と4回目の変異導入後で比活性が約4.8倍になったことから、これ以上の向上は起こらないと判断し進化実験を

終了した。試験管内で alpha-180 と 24 ラウンド目のサンプルを、無細胞翻訳系に DNA 終濃度 1 nM での蛍光値経時変化比較した結果を図 3-4(B)に示した。24 ラウンド目のサンプルは複数の配列の集合体である。この結果から、24 ラウンド目のサンプルは alpha-180 よりも活性の高いことが確認できた。

3-3-3 変異体の配列解析

進化実験後に得られた DNA 断片は、複数種類の配列の集合体であるのでクローニングを行い、それぞれの配列を単離した。図 3-5 に変異の一覧を示した。全 16 種類の内、非同義置換を持つものが 9 種類あった。αタンパク質の配列より上流のシャイン・ダルガノ配列(以降 SD 配列と記述)部分に変異・欠損が入っているものが 5 種類あった。変異体 No.2 はαタンパク質の配列の C 末端側が欠損しており、より短いαタンパク質が選択されていた。また変異体 No.9 は翻訳開始箇所が変わっていた。alpha-180 のαタンパク質は 3 番目のコドンが ATG であることから、この部分から翻訳が開始されたと考えられる。今回 24 ラウンドも進化実験を行ったにもかかわらず、固定されている変異、すなわち各変異体に共通の変異が見られなかった。様々な箇所に変異が見られたことから、変異が入ることによってそれぞれの変異は活性をある程度向上するが、今回用いた alpha-180 には変異が入ることで著しく活性が向上する箇所が無いということが考えられる。No.2 や No.9 のようにアミノ酸が欠損しているものが得られていることや図 3-3 より、タンパク質サイズの方が活性への影響が大きいことが考えられる。

変異体No.	配列No	変異内容	備考
1	32	A→G	αタンパク質のコドンへの影響なし
2	237-243	欠損	α配列の末端部分
3	124	T→C	同義置換
	135-136	AA→TC	Gln→Leu
	183	G→A	Ser→Asn
4	22	C→T	αタンパク質のコドンへの影響なし
5	156	A→T	His→Leu
6	119	A→G	Asn→Asp
7	23	欠損	αタンパク質のコドンへの影響なし
8	28	A→C	αタンパク質のコドンへの影響なし
	158	C→T	Pro→Ser
9	63	A→G	1stATG消滅
	130	T→C	同義置換
	227	C→A	Leu→Met
10	82	T→C	同義置換
11	134	C→A	Gln→Lys
12	230	A→G	Asn→Asp
13	22	欠損	αタンパク質のコドンへの影響なし
	33-36	欠損	αタンパク質のコドンへの影響なし
	104	C→G	Arg→Gly
14	145	C→A	同義置換
15	19	G→A	αタンパク質のコドンへの影響なし
16	120	欠損	これ以降のコドンが全部変わる

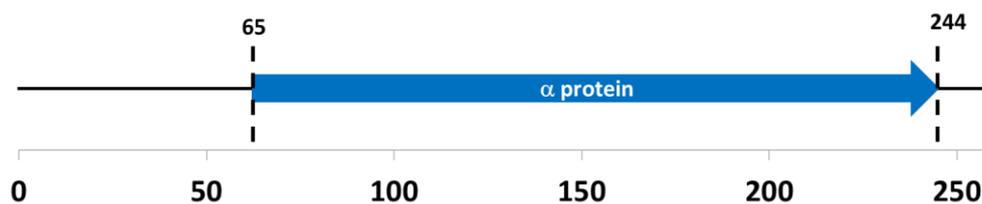


図 3-5. 変異一覧および、alpha-180 模式図

3-3-4 試験管内反応での変異体の蛍光活性比較

得られた変異体について、試験管内およびリポソーム内で蛍光活性を比較し、最も活性の高い変異体を決定することを目的とした。

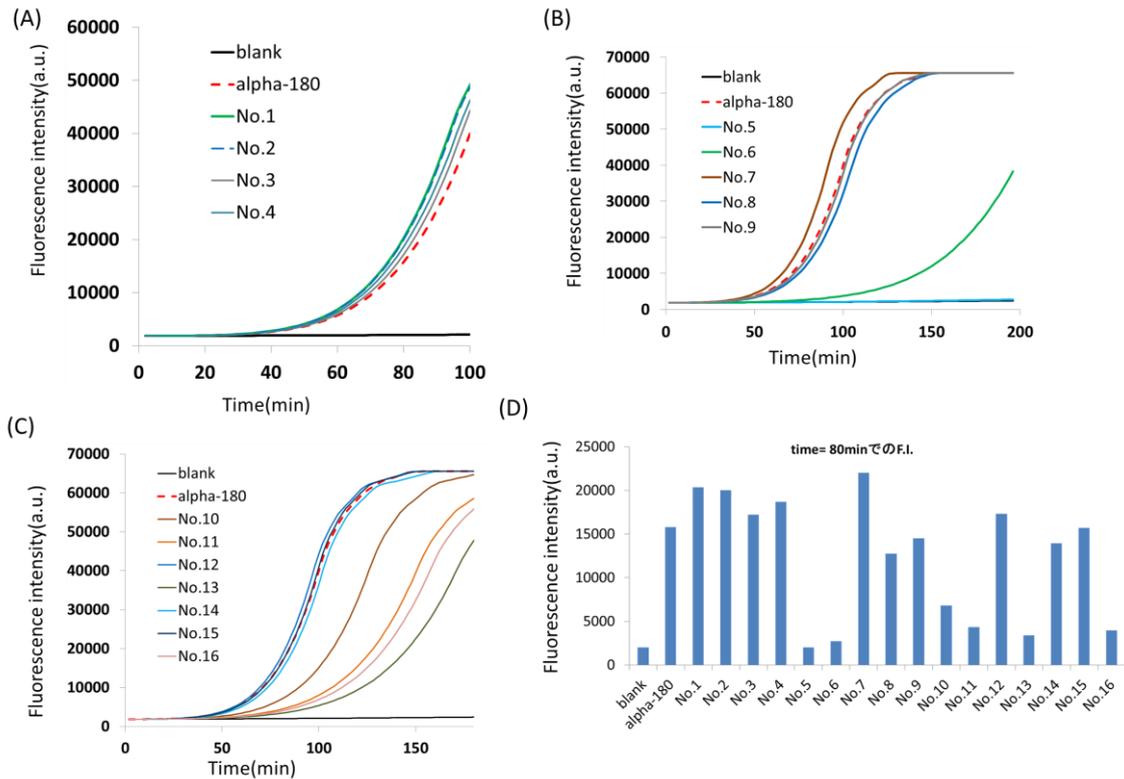


図 3-6. (A)(B)(C) 試験管内での各変異体の蛍光値経時変化
(D) time = 80 min での各変異体の蛍光値

DNA 濃度 1 nM の条件で試験管内でタンパク質を発現させ、 α -complementation による蛍光値変化を測定した。その時の蛍光値経時変化を図 3-6(A)(B)(C)に、反応時間 80 分後のそれぞれの蛍光値を図 3-6(D)に示した。赤点線が alpha-180 の変化を表している。図 3-6(D)より No.1、No.2、No.3、No.4、No.7、No.12 が alpha-180 より高い蛍光値を示していた。進化実験により、活性の高い α タンパク質を得ることができた。No.1、No.4、No.7 は α タンパク質の遺伝子よりも上流の SD 配列に変異または欠損が起こっている。このことから、 α タンパク質の翻訳量が向上していることが考えられる。No.2 は α タンパク質の遺伝子の C 末端側が欠損しており、alpha-180 より短い α タンパク質が選択されている。No.3 と No.12 には、非同義置換が含まれており、タンパク質が変化している。進化実験サイクル後に得られた変異体、すなわち alpha-180 よりも高い蛍光活性を持つという選択圧により選ばれたにも関わらず、活性が低いまたは失っている変異体が見られた。考えられる原因としては、クローニングを行う際に大腸菌に形質転換したことにより、進化実験とは関係のない変異・欠損が起こったことが考えられる。事実、この alpha-180 を形質転換した際には、

抽出したプラスミドは大きく欠損していたり、変異が入っていることが多かった。このことから、alpha-180 の配列またはタンパク質サイズが大腸菌にとって毒性を持つなどの理由により欠損や変異しやすくなっている可能性が考えられる。

3-3-5 リポソーム内反応での蛍光活性比較

3-3-4 で α -complementation 活性を示した変異体 No.1、No.2、No.3、No.4、No.7、No.8、No.9、No.12、No.13、No.15 の 10 種類をリポソームに封入し、蛍光活性を比較した。

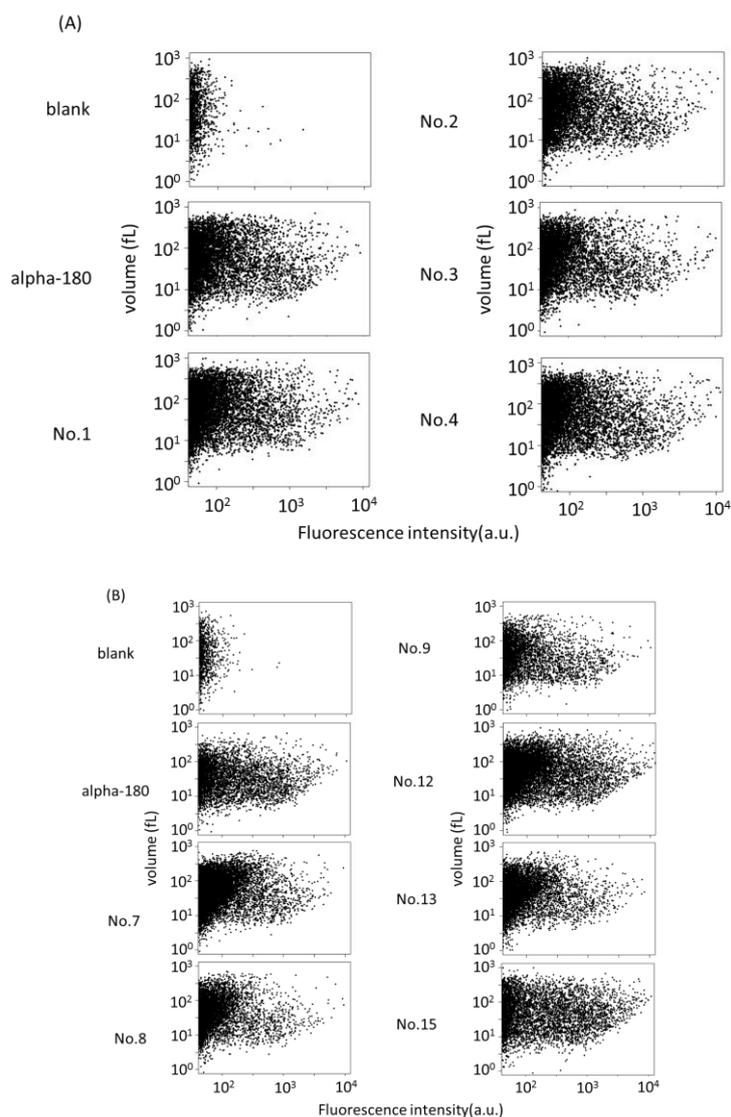


図 3-7. 変異体のリポソーム内反応の蛍光値(F.I.)測定。(A)、(B)は別々に測定したため、比較可能にするためにそれぞれに対して blank(DNA 無し)および alpha-180 を測定している。

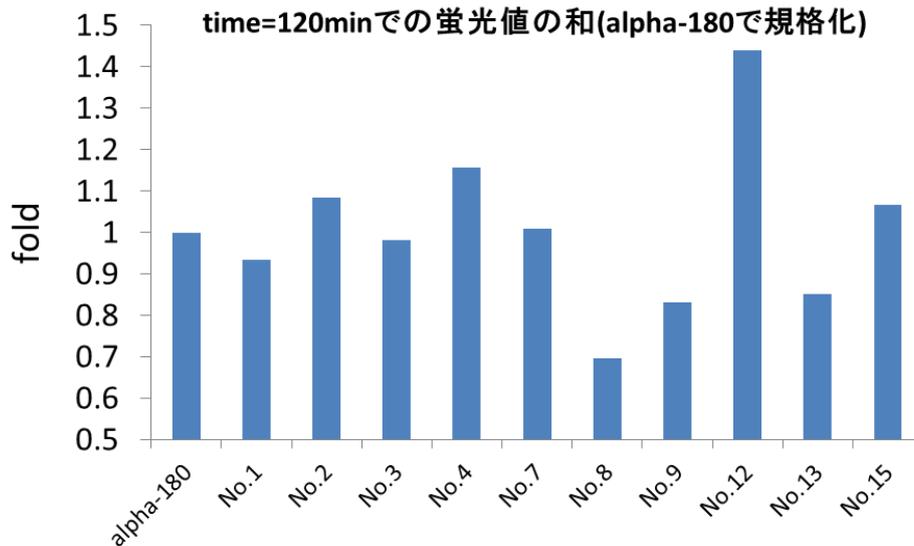


図 3-8. alpha-180 と変異体のそれぞれのリポソーム内反応での蛍光値の比較

図 3-7 に進化実験と同じ条件、DNA 濃度 10 pM でのリポソーム内反応時のリポソームの分布図、図 3-8 にそれぞれの変異体のリポソームの蛍光値の和を比較した図を示した。図 3-8 では、全てのサンプルを同時に測定してないため、alpha-180 の蛍光値で規格化して比較した。リポソーム内測定では、変異体 No.12 が最も高い活性を示した。試験管内反応では、alpha-180 に対して特に高い活性を示していたわけではない。逆に、試験管内で高い活性を示していた No.1、No.7 がリポソーム内測定では高い活性を示さなかった。リポソーム内でも高感度に検出できるレポータータンパク質の構築が本章の目的であるため、変異体 No.12 について DNA 濃度と反応環境（試験管内・リポソーム内）の影響を調べる必要がある。

3-3-6 試験管内反応での DNA 濃度の反応性への影響

試験管内測定とリポソーム内測定で活性に違いが見られた。試験管内・リポソーム内という環境の違いの他に、DNA 濃度の違いがあった。そこで DNA 濃度の試験管内反応への影響を調べた。

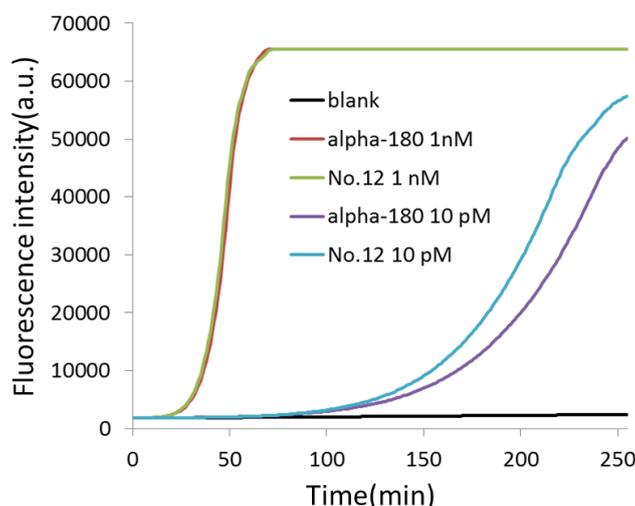


図 3-9. 試験管内反応における DNA 濃度の影響

図 3-9 に試験管内反応で DNA 濃度を変えた場合の蛍光値の経時変化を示した。DNA 濃度を 1 nM の場合と、10 pM の場合を比較した。1 nM ではほぼ同等の結果になっているが、それは蛍光値の上昇が速過ぎたために差が見られていないということも考えられる。一方、10 pM の条件では alpha-180 と No.12 の蛍光値の差は最大で 1.4 倍であった。3-3-4 の条件、DNA 100 pM の条件では蛍光値の差は最大で 1.1 倍であった。1 nM では差がほとんど見られないことを考えると、試験管内反応においては DNA 濃度が増加すると alpha-180 と変異体の差が小さくなっていった。

3-3-6 リポソーム内反応における DNA 濃度の反応性への影響

リポソーム内反応では DNA 濃度による活性の違いが見られるか確認した。全てのリポソームに DNA が封入されるように、DNA 濃度を 1 nM に調整し、測定を行った。図 3-10(A)(B) に 30、60、90、120 分におけるリポソームの分布図を示した。図 3-10(A)を見ると、反応開始 120 分後には alpha-180 に対して、No.12 の方がより蛍光値の強い方(図 3-10(A)赤線部分)に密度のピークが来ている。図 3-10(C)(D)にそれぞれのリポソームの蛍光値の総和を示した。この結果から、最初の内は No.12 の方が蛍光値が大きく、その後 alpha-180 が追いついてくるのが分かった。これは、リポソームに封入されている基質量が同じなので、No.12 が先に基質枯渇(図 3-10(A)赤線部分)まで反応が進み、その後に alpha-180 が基質枯渇になっているためであると考えられる。反応開始 60 分後が蛍光値の差が一番大きく、約 4 倍の差が見られた。リポソーム内においては、DNA 濃度が高くなることで、alpha-180 と変異体 No.12 の差がより顕著に観察されるようになった。

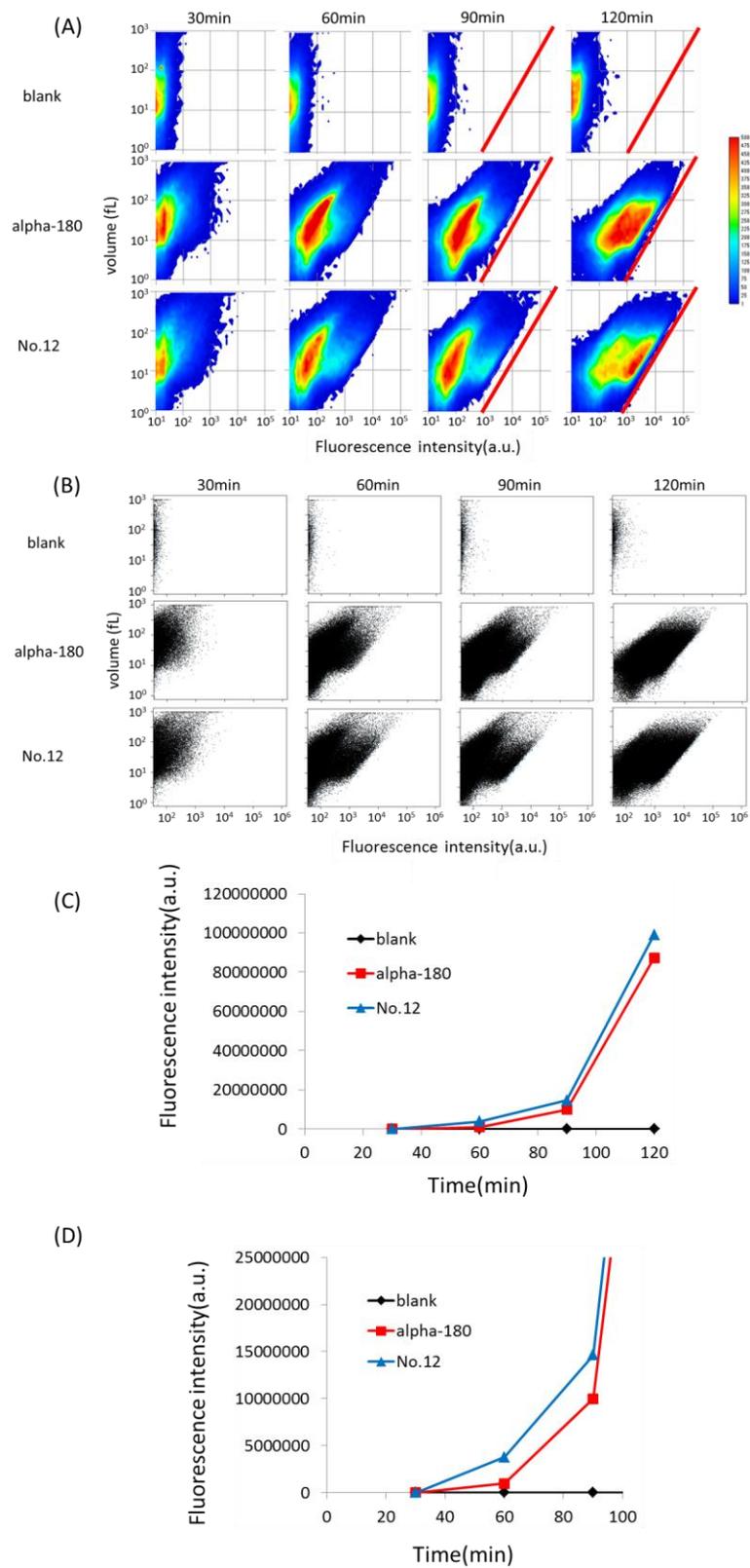


図 3-10. (A)リボソーム密度図、(B)リボソーム分布図、(C)リボソームの蛍光値総和の時間変化、(D)(C)の拡大図

3-3-8 試験管内反応とリポソーム内反応の結果の違いの考察

今回得られた変異体 No.12 は、リポソーム内反応では DNA 濃度と比例して蛍光活性が向上していたが、試験管内反応では DNA 濃度が増えると蛍光活性が alpha-180 と同程度になっていた。変異体 No.12 の変異は、 α タンパク質と ω タンパク質の結合(図3-5概略図での配列 No.98-188) とは関係ない配列部分(配列 No.230)であった。結合部分以外は α -complementation 活性に影響がないと言われている[30]。まだ解明されていない知見を示唆している可能性、すなわち ω タンパク質との親和性の向上か、 α -complementation 複合体の活性向上による影響であると考えられるが、今回の実験結果からはその配列の α -complementation 反応への影響は判明できていない。変異体 No.12 が獲得した変異の影響により、反応を行っている環境、すなわち試験管内・リポソーム内という区画の違いが反応性に影響するようになったことが考えられる。リポソームは脂質膜のため、脂質とタンパク質間の相互作用が起こり得る。例えば、 ω タンパク質が膜と結合して固定・局在化されているなどである。タンパク質の固定や局在化が起こっていると、タンパク質同士の衝突頻度やすくなるのが考えられる。今回の反応系では、 α タンパク質と ω タンパク質の衝突頻度が上がり、 α -complementation 複合体が形成しやすくなるのが考えられる。今回の研究では、リポソームは POPC : cholesterol = 9 : 1 で調整しているので、別の脂質や極性の持つ脂質を用いることで膜の影響を見ることができる。

3-3-9 original と進化型の比較

第2章でレポーターシステムに用いていた α タンパク質(original)と、今回の進化実験で得られた α タンパク質(No.12)の活性を比較した。微小区画内での検出感度向上が目的なので、リポソーム内反応で比較した。その結果を図 3-12 に示す。蛍光値の総和を比較したところ、今回の進化実験で得られた変異体は、original に対して反応開始 60 分後で 128 倍であることが分かった。目的は 10 倍以上の活性を示す α タンパク質を得ることなので、目的を達成している。

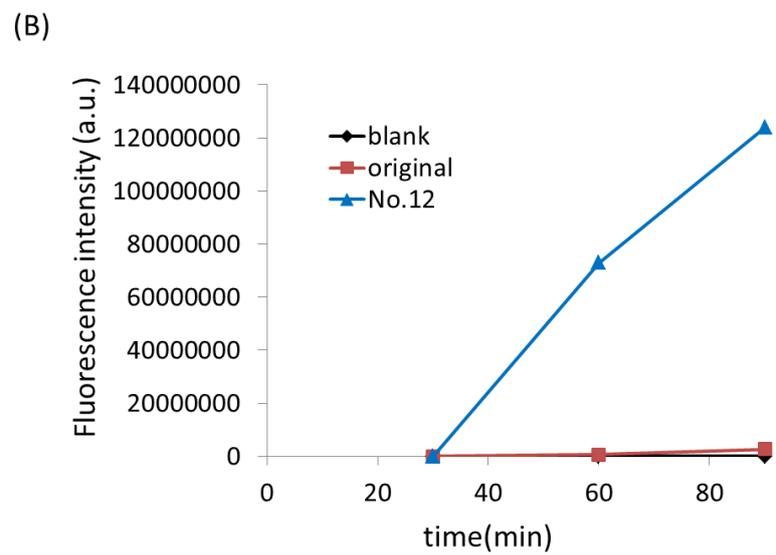
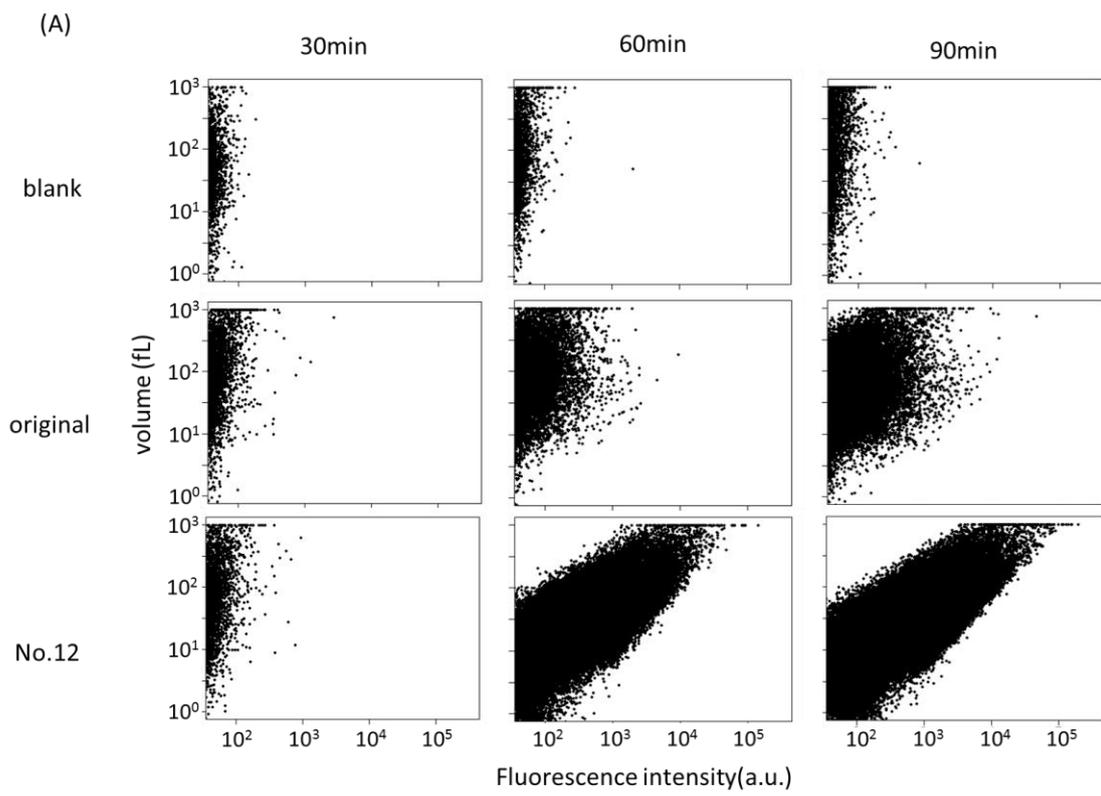


図 3-12. (A)リボソーム内反応のリボソーム分布図、(B)それぞれの蛍光値の総和

3-4 結語

第2章で構築した RNA 自己複製反応レポーターシステムには問題点があった。それは試験管内では検出感度、すなわちバックグラウンドノイズとの差が十分であるが、微小区画であるリポソーム内では検出感度不十分であるという点だった。この原因は2つ考えられた。1つ目はレポータータンパク質として用いているβガラクトシダーゼのαタンパク質によるα-complementation の基質分解活性が低いこと。もう一つは、レポーターシステムの反応効率が低いこと。本章では、この問題点のうち1つ目のα-complementation の基質分解活性に焦点をあて、10倍以上の活性向上を目的とした。

最初に、無細胞翻訳系中で最も高い活性を示すαタンパク質サイズを探索した。その結果、αタンパク質の遺伝子配列がβガラクトシダーゼの N 末端から 180 bp のものが最も活性が高いことが分かった。これまで、レポーターシステムに用いていたαタンパク質 alpha-570 と比べると約 4 倍の活性を持っていた。目的に対して不十分であったため、リポソーム内実験室進化を用いて更なる向上を行った。その結果、alpha-180 と比較する試験管内では 1.4 倍、リポソーム内で 4 倍以上の活性を持つ変異体を獲得した。この変異体を alpha-570 と比較したところ、リポソーム内で 128 倍の活性を示し、目的に合致したαタンパク質が得られた。

本章で得られた変異体は、試験管内反応に比べてリポソーム内反応の方が活性の大きな向上が確認できた。DNA 濃度などは同じであるため、この現象の原因は反応環境にあると考えられる。考えられる要因は、リポソームは脂質二重膜である点である。脂質とタンパク質が相互作用し、タンパク質の固定や局在化が起こると、タンパク質同士の衝突頻度が上がる。それにより、α-complementation 複合体を形成しやすくなることが考えられる。脂質の影響に関しては、リポソームの膜組成の変更や別の微小区画で反応を行うことで確認することができるだろう。

本章で得られている変異体は、リポソーム内反応で alpha-180 との差が大きいことから、微小区画内反応に特化したレポータータンパク質であると言える。近年では、微小区画内反応は盛んに行われている。GFP タンパク質のように大量に発現しなくても、基質分解により検出可能になる酵素の重要度は大きい。既存の微小区画内反応のレポータータンパク質を、置き換えることで検出感度の向上が可能になると考えられる。また、αタンパク質の配列は短いことから、別の反応系に挿入しても反応系への影響を低減でき、微小区画内進化実験に応用が期待できる。

第4章 タンパク質サイズの小さい蛍光レポーターの探索

4-1 緒言

再構築反応系は、細胞のように外部から栄養を取り込むことが難しい。そのため、使用可能な資源が限られた環境下で反応を行わなくてはならない。レポータータンパク質を発現するために資源を大量に必要としては、目的の反応の進行を阻害することになる。レポータータンパク質のサイズが小さければ小さいほど、発現させるために必要な資源の数は減り、より長く、より多くの反応を同じ反応液中で動かすことが可能になる。また、本研究で再構築反応系の一例として用いている RNA 自己複製反応系は、第2章の結果より RNA の長さが短いほど反応効率が高くなることが示された。この反応系では、反応効率が向上するということは、RNA の複製が進み、レポータータンパク質を発現可能な RNA の数が増えることを意味する。これは結果として、検出感度の向上に繋がる。そこで、本章では検出感度の向上を目指す方法として反応系の反応効率に着目し、タンパク質サイズの小さいレポータータンパク質の探索を行った。

第3章で、無細胞翻訳系中でのβガラクトシダーゼのα-complementation に最適なαタンパク質を探索した際に、alpha-81(27 アミノ酸)という非常に小さなタンパク質でも活性を持っていることが示された。α-complementation は、N 末端の一部を欠損したωタンパク質の欠損部分を補うαタンパク質会合することで起こる[34]。しかし、欠損部分の一部しか補っていない alpha-111(37 アミノ酸)、alpha-81(27 アミノ酸)でもバックグラウンドノイズよりも有意に高い蛍光値を示した。再構築反応系でαタンパク質を用いる利点は、αタンパク質のサイズが小さいことおよび遺伝子配列が短いことである。この結果から、もっと小さなαタンパク質でもα-complementation 可能ではないかと考えた。そこで、無細胞翻訳系中で検出可能な最小のαタンパク質の探索を行った。

4-2 実験方法

4-2-1 実験材料

QIAprep spin および QIAquick Spin は QIAGEN より購入した。KOD FX DNA Polymerase は東洋紡より購入した。制限酵素 Sma I、PrimeSTAR(premix)、T7 RNA polymerase、DNase Iは Takara より購入した。DpnI は New England BioLabs より購入した。In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit および ProLabel Detection Kit II は Clontech より購入し、ProLabel Detection Kit II の EA reagent をタンパク質溶液として使用した。Transferrin Alexa647 は life technologies より購入した。9-(4'-methoxy-2'-methylphenyl)-6-(β -D-glucopyranosyloxy)-xanthen-3-one (TG-FDG)は 積水メディカルより購入した。Rnase Inhibitor は Promega より購入した。1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(POPC)は Avanti、コレステロール(chol)はナカライテスクより購入した。5-chloromethylfluorescein di- β -D-galactopyranoside (CMFDG)は life technologies より購入した。

PCR で使用した primer 配列を以下に記す。

140905_alpha_69

AGGCGTAAATTATTAGGGTAACGCCAGGGTTTTCCC

140905_alpha_63

AGGCGTAAATTATTAGGCCAGGGTTTTCCCAGTCAC

140905_alpha_51

AGGCGTAAATTATTAGCCAGTCACGACGTTGTAAAACG

140912_alpha_48

AGGCGTAAATTATTAGTCACGACGTTGTAAAACGACGG

140912_alpha_30

AGGCGTAAATTATTAGACGGCCAGTGAATCCGTAATC

140905_nat_lacZ_dlt_3aa_F

GAAGGAGATATACATATGATTACGGATTCACTGGCCG

140905_nat_lacZ_dlt_3aa_R

ATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTCTAGAGGGG

140917_pET_nat_lacZ_228_F
GGAATTGTGAGCGGATAACAATTCC

140917_pET_nat_lacZ_528_R
CGCACTCCAGCCAGCTTTCC

101216_T7pro_Gal-3'
TAATACGACTCACTATAGGCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAAC

140517_vec_B_F1
GTCCCCCCTTCCGGGGGGGTCCCCGGGGATCCTCTAGAGTC

140517_vec_B_R2
ACGGGAGTTCGACCGTGATG

090602_mdv-3
CCGGAAGGGGGGACGAGG

140517_ins_B_R3
CGGTGCGAACTCCCGTCTATGCGGCATCGCTGC

141014_N96_alpha_del_F4
CATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATAAAAAAAAAAC

141014_N96_alpha_del_R1
TAGACGGGAGTTCGACCGTG

4-2-2 無細胞翻訳系の組成

本章で用いた無細胞翻訳系の組成は実験 4-2-12 では第 2 章の表 2-1、それ以外では第 3 章の表 3-2 と同じである。

4-2-3 短い α タンパク質をコードした DNA 断片の作成

KOD X2 buffer を 25 μ l、KOD FX DNA polymerase 1 unit、dNTP mix を終濃度 400 nM、プラスミド pET-nat-lacZ 1 ng、プライマーは forward primer は 101216_T7pro_Gal-3'を、reverse primer はそれぞれの α タンパク質に対応したものをそれぞれ終濃度 250 nM になるように加え、milliQ 水で 50 μ l にメスアップし PCR で増幅した。以下に PCR 条件(表 4-1)、

それぞれの α タンパク質をコードした DNA の模式図と配列を記す。

表 4-1. PCR 条件

Hot start	
94°C	2:00
98°C	0:10
60°C	0:30
72°C	0:06 x25 cycles
4°C	infinite

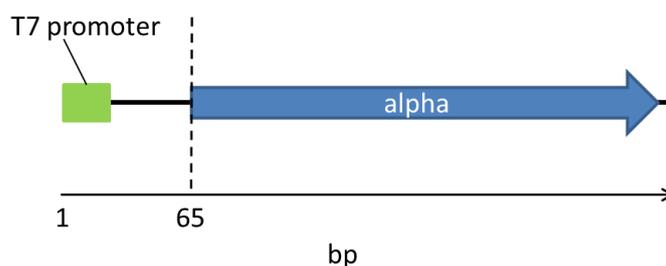


図 4-1. DNA 断片の模式図

alpha-69

TAATACGACTCACTATAGGCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGA
TATACATATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTG
GGAAAACCCTGGCGTTACCTAATAATTTACGCCT(148 bp)

alpha-63

TAATACGACTCACTATAGGCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGA
TATACATATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTG
GGAAAACCCTGGCTAATAATTTACGCCT(142 bp)

alpha-51

TAATACGACTCACTATAGGCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGA
TATACATATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTG
GTAATAATTTACGCCT(130 bp)

alpha-48

TAATACGACTCACTATAGGCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGA
TATACATATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGATAAT
AATTTACGCCT(126 bp)

alpha-30

TAATACGACTCACTATAGGCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGA
TATACATATGACCATGATTACGGATTCACTGGCCGTTAATAATTTACGCCT(108 bp)

4-2-4 試験管内での蛍光値測定

Sol. A 10.22 μ l、Sol. B 2.00 μ l、Rnase Inhibitor 10 unit、TG-FDG 50 μ M、 ω タンパク質溶液 2.00 μ l、DNA 終濃度 0.1 nM になるように加え milliQ 水を加え合計で 20 μ l にした。リアルタイム PCR 機 Mx3005P を用いて 37°C で 4 時間蛍光値(励起波長 492 nm、蛍光波長 516nm)を測定した。

4-2-5 プラスミド pET-nat-lacZdlt2AA の作成

β ガラクトシダーゼの N 末端側 2 つのアミノ酸を欠損させたプラスミド pET-nat-lacZdlt2AA を作成した。KOD X2 buffer を 25 μ l、KOD FX DNA polymerase 1 unit、dNTP mix を終濃度 400 nM、プラスミド pET-nat-lacZ 1 ng、プライマーは forward primer は 140905_nat_lacZ_dlt_3aa_F を、reverse primer は 140905_nat_lacZ_dlt_3aa_R をそれぞれ終濃度 250 nM になるように加え、milliQ 水で 50 μ l にメスアップし PCR で増幅した。In-Fusion 反応を行い、その後大腸菌に形質転換し、プラスミド抽出を行った。In-Fusion 反応は 5x in-Fusion reaction buffer 2 μ l、In-Fusion enzyme 1 μ l、DNA 断片 150 ng に milliQ 水を加え全量を 5 μ l とし 37°C で 15 分、50 度で 15 分反応させ、反応液を TE buffer で全量を 50 μ l にした。この反応液を用いて competent cell (JM109)に形質転換(ヒートショック法)を行った。菌体は LB アンピシリンプレート培地で 37°C でオーバーナイト培養を行い、その後 LB アンピシリン液体培地でオーバーナイト培養後にプラスミド抽出を行った。プラスミド抽出は QIAprep の推奨プロトコルに従って行った。表 4-2 に PCR 条件を記す。

表 4-2. PCR 条件

Hot start	
94°C	2:00
98°C	0:10
60°C	0:30
72°C	8:30 x25 cycles
4°C	infinite

4-2-6 リポソーム作成方法

先行研究の方法[28]を一部変更して作成した。POPC と chol をリン脂質(POPC:chol=9:1 weight ratio)として用いた。リン脂質混合物を有機相に溶かすために、あらかじめ 100 μ l のクロロホルムに溶解させた後、2 ml の流動パラフィンを加え、80°C エアークューベ

ター内で 20 分間静置し、完全に溶解させた。この溶液をガラス試験管に 400 μ l とり、20 μ l の内封液(Sol. A 10.22 μ l, Sol. B 2.00 μ l, Rnase Inhibitor 10 unit, CM-FDG 終濃度 50 μ M、TA647 終濃度 2.8 μ M、 ω タンパク質溶液 2.00 μ l、DNA 終濃度 1 nM または 10 pM になるように加え milliQ 水を加え合計で 20 μ l にした)を加え、30 秒間ボルテックスによって分散し、10 分間氷上に静置した。この操作により、リポソームの鋳型となる W/O エマルションが形成される。新しいエッペンチューブに 200 μ l の等張液(Sol.A 76.6 μ l、酢酸マグネシウムを終濃度 14 mM、グルコースを終濃度 400 mM なるように加え、milliQ 水で 200 μ l にメスアップ)を入れ、350 μ l の W/O エマルション溶液を静かに重層し、小型冷却遠心分離機を用いて 4 $^{\circ}$ C、14000 rpm で 30 分間遠心を行った。遠心分離後、注射針(ϕ =0.8 mm)を用いてエッペンチューブの底に針で穴を空け、沈殿物および液を数滴新しいエッペンチューブに取り出した。

4-2-7 リポソーム内での蛍光値測定

反応液を封入したリポソームを 37 $^{\circ}$ C で反応させ、反応開始 30、60、90、120 分後にセルソーター(FACS)でリポソームの蛍光値を測定した。測定方法は、前方散乱光および側方散乱光、緑色蛍光、赤色蛍光を測定した。緑色蛍光は励起光 488 nm、蛍光 520 nm で行い、赤色蛍光は励起光 633 nm、蛍光 660 nm で測定した。赤色蛍光値の測定値に 0.003724 をかけリポソームの体積を算出した。単層膜と言われる領域[29]に含まれるリポソームを 100000 点測定した。

4-2-8 タンパク質の化学合成

ジーンデザイン株式会社に依頼した。

4-2-9 化学合成した α タンパク質の蛍光値測定

Sol. A 10.22 μ l、Sol. B 2.00 μ l、Rnase Inhibitor 10 unit、TG-FDG 50 μ M、 ω タンパク質溶液 2.00 μ l に 25AA、15AA、8AA を加えて測定した。加えたタンパク質終濃度は、25AA は 300 μ M、30 μ M、3 μ M、15AA は 500 μ M、50 μ M、5 μ M、8AA は 1100 μ M、110 μ M、11 μ M になるように調整した。この反応液をリアルタイム PCR 機 Mx3005P を用いて 37 $^{\circ}$ C で 4 時間蛍光値(励起波長 492 nm、蛍光波長 516nm)を測定した。

4-2-10 短い α タンパク質を挿入した鋳型プラスミドの構築

先行研究[35]のプラスミド pUC-N96 を PCR してベクターとした。PrimeSTAR HS(Premix)を 25 μ l、プラスミドを 50 pg、プライマーは 140517_vec_B_F1 と 140517_vec_B_R2 をそれぞれ終濃度 250 nM になるように加え、milliQ 水で 50 μ l にメスアップし PCR を行った。表 4-3 に PCR 条件を記す。

表 4-3. PCR 条件

Hot start	
94°C	2:00
98°C	0:10
60°C	0:05
72°C	4:50 x30 cycles
4°C	Infinite

プラスミド pUC19 の α タンパク質配列の一部を α タンパク質としてインサートに用いた。KOD X2 buffer を 25 μ l、KOD FX DNA polymerase 1 unit、dNTP mix を終濃度 400 nM、プラスミド pET-nat-lacZ 1 ng、プライマーは 090602_mdv-3 と 140517_ins_B_R3 をそれぞれ終濃度 250 nM になるように加え、milliQ 水で 50 μ l にメスアップし PCR で増幅した。表 4-4 に PCR 条件を記す。

表 4-4. PCR 条件

Hot start	
94°C	2:00
98°C	0:10
60°C	0:05
72°C	1:00 x30 cycles
4°C	Infinite

これらを In-fusion 反応した。5X In-Fusion HD Enzyme premix 1 μ l、ベクター 20 ng、インサート 35 ng 加え、milliQ 水で 5 μ l にメスアップし、50°C で 15 分反応させ、TE buffer を 20 μ l 加え、コンピテントセル(JM109)に形質転換した。その後、QIAprep spin の推奨プロトコルに従ってプラスミド抽出を行った。

4-2-11 短い α タンパク質を挿入した鋳型 RNA 作成

プラスミドを制限酵素 Sma I で 30°C で 4 時間反応させ、QIAGEN の QIAquick のプロトコルに従って精製を行った。T7 RNA polymerase 1 μ l、10x reaction buffer 5 μ l、DTT 終濃度 5 mM、各 NTP を終濃度 2 mM、Rnase Inhibitor 10 unit、精製済みテンプレート DNA 1000 ng を混合し、全量が 50 μ l になるように milliQ 水を加え 37°C で 3 時間反応させた。そして DNase (Rnase free) を 3 μ l 加え 37°C で 20 分反応させ、Rneasy Mini kit で精製した。以降ではこの RNA を short と呼ぶ。

4-2-12 Rep(+) α (-) と short の試験管内反応での蛍光値測定

Sol.A 8.78 μ l、Sol.B 2.61 μ l、Rnase Inhibitor 10 unit、TG-FDG 終濃度 50 μ M、 ω タンパク質 2.00 μ l、RNA 終濃度 10 nM になるように加え milliQ で 20 μ l にメスアップする。リ

アルタイム PCR 機 Mx3005P を用いて 37°C で 8 時間蛍光値(励起波長 492 nm、蛍光波長 516nm)を測定した。

4-3 結果および考察

4-3-1 試験管内における短い α タンパク質の蛍光値測定

alpha-81(27 AA)よりも短い α タンパク質でも蛍光値の上昇が検出できるか確認するために、試験管内で α タンパク質を発現させ確認した。

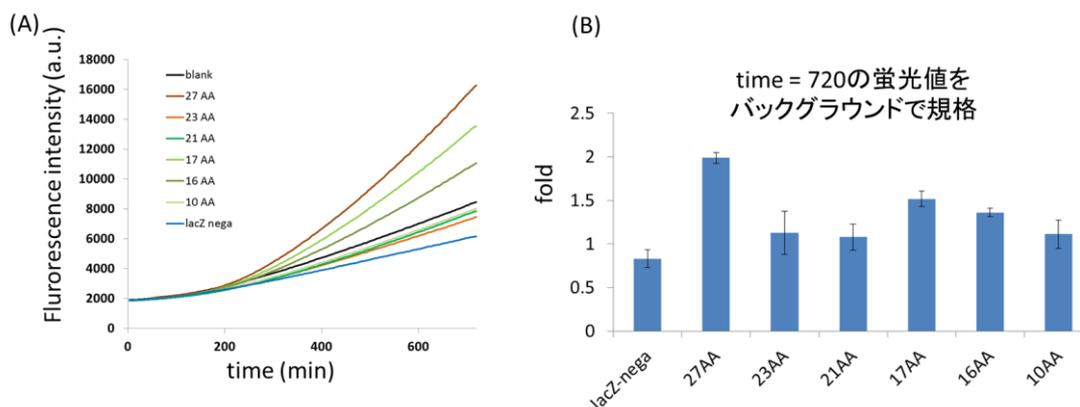


図 4-2. (A)短い α タンパク質の蛍光値経時変化、
(B)反応時間 720 分後の蛍光値の比較

図 4-2 に、27 AA から 10 AA までのサイズの α タンパク質を試験管内で発現させた時の(A) 蛍光値経時変化と、(B)反応時間 720 分の時の蛍光値をバックグラウンド(blank)の蛍光値で規格化し比較した結果を示した。エラーバーは標準誤差である。blank は無細胞翻訳系中に ω タンパク質のみを加えていることを示す。lacZ-nega は、それぞれの DNA 断片作成時に用いた β ガラクトシダーゼがコードされているプラスミドの持ち込みによる蛍光値変化を示している。図 4-2(A)の結果より、lacZ-nega では蛍光値の上昇がほとんど確認できなかった。このことから、それぞれの DNA 断片の蛍光値は α -complementation によるものである。27 AA、17 AA、16 AA で蛍光値の上昇が確認できた。23 AA と 21 AA は、蛍光活性を示した 27 AA や 17 AA、16 AA と補填している部位が重複している部分があるにも関わらず、蛍光活性が見られなかった。このことから、23 AA と 21 AA は折り畳みなどの立体構造により、 ω タンパク質と結合できていない、または結合しているが活性部位を形成することができていないことが考えられる。

4-3-2 N 末端 2 つのアミノ酸を欠損させた α タンパク質の蛍光値測定

大腸菌内では、 β ガラクトシダーゼの 3-92 番目のアミノ酸の α タンパク質で α -complementation が起こる[36]。この α タンパク質の配列の特徴は、N 末端の 2 つのアミノ酸を欠損させていることである。使用している無細胞翻訳系は大腸菌由来であることから、2 つのアミノ酸を欠損させることで反応性がどのように変化するか確かめた。

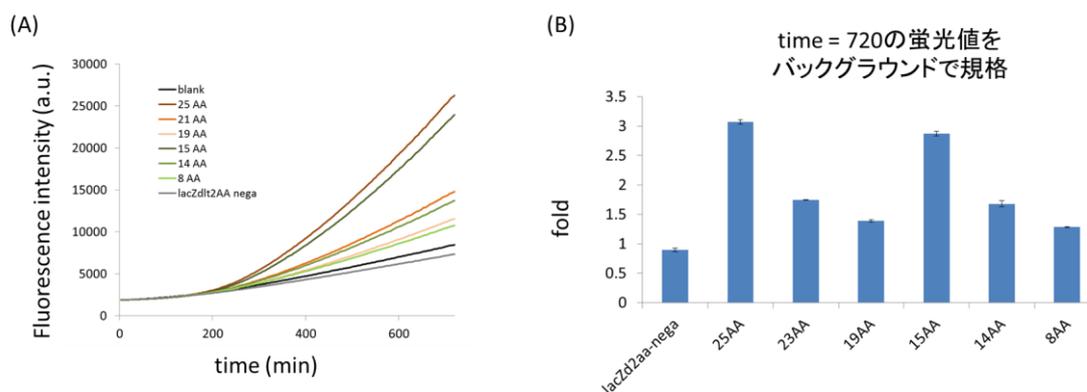


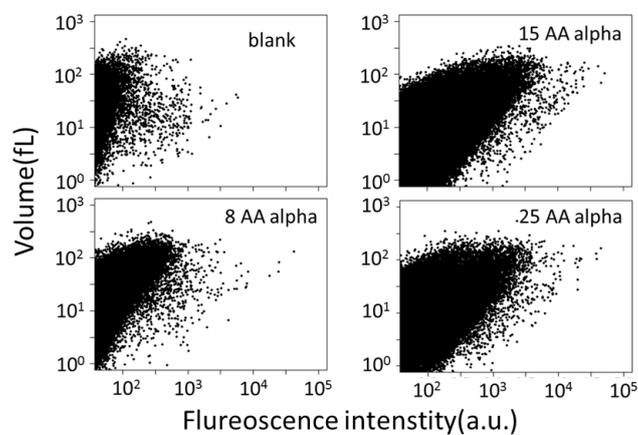
図 4-3. N 末端 2 つのアミノ酸を欠損させた場合の(A)蛍光値経時変化、
(B)720 分後の蛍光値の比較

図 4-3 に、4-3-1 で測定した α タンパク質の N 末端 2 つのアミノ酸を欠損させた場合の(A) 蛍光値経時変化と、(B)反応時間 720 分の時の蛍光値をバックグラウンド(blank)の蛍光値で規格化し比較した結果を示した。エラーバーは標準誤差である。blank は無細胞翻訳系中に ω タンパク質のみを加えていることを示す。lacZdlt2AA-nega は、それぞれの DNA 断片作成時に用いた β ガラクトシダーゼがコードされているプラスミドの持ち込みによる蛍光値変化を示している。図 4-2(A)の結果より、lacZdlt2AA-nega では蛍光値の上昇がほとんど確認できなかった。このことから、それぞれの DNA 断片の蛍光値は α -complementation によるものである。N 末端 2 つのアミノ酸を欠損させることで、全てのタンパク質で蛍光活性が向上した。欠損させる前は活性が無かった 21 AA や、19 AA、8AA でも蛍光活性が確認できた。

4-3-3 リポソーム内反応の蛍光値測定

短い α タンパク質の中で活性が高かった N 末端側 2 つのアミノ酸を欠損させた 25 AA と 15 AA、本章の中で活性を示した最小の α タンパク質である 8 AA の蛍光活性をリポソーム内反応でも検出できるか測定を行った。図 4-4(A)に、リポソーム内に無細胞翻訳系と DNA 終濃度 1 nM を封入し 1200 分反応後のリポソームの分布図を示した。図 4-4(B)に、分布図の赤線より右に出ているリポソームを反応しているリポソームとして蛍光値の総和を示した。25 AA、15 AA、8 AA の全てにおいて blank よりも高い蛍光値を示していることが確認できた。15 AA が最も蛍光値が大きく、blank と比較して 95 倍の蛍光値を示していた。8 AA も blank に対して 9 倍の蛍光値を示していた。この結果から、リポソームという微小反応場内でも蛍光を検出することが可能であることが分かった。

(A)



(B)

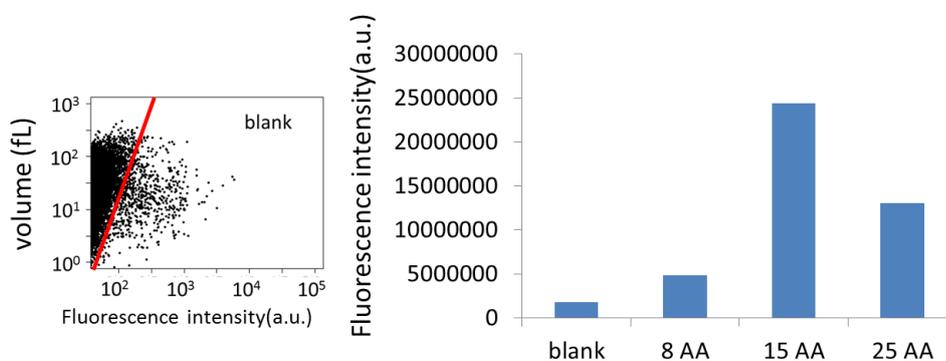


図 4-4. (A)1200 分後のリポソームの分布図
(B)それぞれのリポソームの蛍光値総和の比較

4-3-4 化学合成した α タンパク質の蛍光値測定

α タンパク質をコードした DNA 断片は、 β ガラクトシダーゼをコードしたプラスミドから目的部分を PCR で増幅することで作成していた。しかし、PCR のエラーにより目的 DNA 断片よりも長い DNA が微量にでき、その DNA 断片による活性を検出している可能性が考えられる。化学合成により 25AA、15AA、8AA の α タンパク質を合成し、基質分解反応が起きるかどうか検討した。

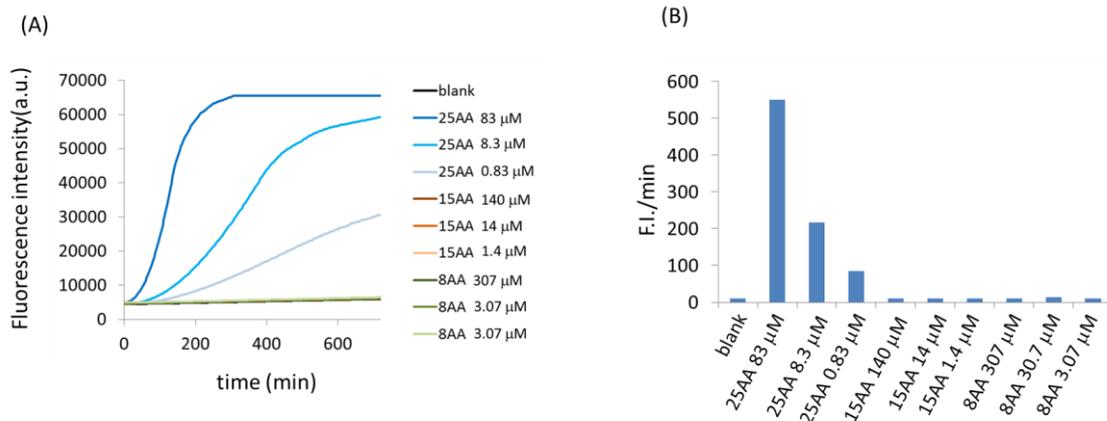


図 4-5. それぞれのタンパク質の濃度を変えて試験管内で蛍光値測定を行った。
(A) 蛍光値経時変化、(B) それぞれの最大蛍光値上昇速度(F.I./min)

無細胞翻訳系中に 25AA、15AA、8AA の濃度を変えて加え、それぞれの α タンパク質の α -complementation による蛍光値変化を測定し、図 4-5 にその結果を示した。blank は無細胞翻訳系中に ω タンパク質のみを加えた条件を示している。図 4-5(A)はそれぞれの蛍光値経時変化を示している。図 4-5(B)にはそれぞれの F.I./min を示した。この2つの結果より、25AA の濃度と比例して最大蛍光値上昇速度(F.I./min)が大きくなっていることが分かった。このことから、 α -complementation 活性を示したと言える。15AA、8AA は活性を確認できなかった。15 AA はその他の 25AA や 8AA と違い、milliQ 水に溶けず、N,N-ジメチルホルムアミドを加えて可溶化させていた。その結果、無細胞翻訳系に加えると白濁していたために α タンパク質の変性が起こり、反応しなかった可能性が考えられる。この実験の結果から、25 アミノ酸という非常に小さな α タンパク質でも α -complementation が起こることが確認できた。これにより、 α -complementation は α タンパク質が ω タンパク質の欠損部分を全て補填しなくても起こることが実験的に示せた。

4-3-5 α -complementation に関する考察

本実験で用いている ω タンパク質は、LacZ Δ M15 と呼ばれるもので、 β ガラクトシダーゼの N 末端から 11~41 番目のアミノ酸が欠損している。 α -complementation はこの欠損部位を α タンパク質が補填することで起こる。具体的には、 ω タンパク質の欠損部位によってできた”トンネル”に α タンパク質が入ることで、複合体の安定性を向上させていると考えられている[37]。本章の結果は、欠損部位の全てを補填しなくても良いこと実験的に示している。先行研究より、 β ガラクトシダーゼの N 末端側 13 番目から 20 番目のアミノ酸は、 α -complementation では隣接したサブユニット同士を結合させるために重要で、中でも Asp16、Asn19、Val22 は Mg²⁺結合し、 ω タンパク質との結合に関与していると言われている[37]。図 4-2 では、27 AA、23AA はこれら全てを含む。しかし、23AA は活性を示さな

かった。一方、Val22 を持たない 17AA や 16AA で活性が確認された。この結果から、 α タンパク質が取る立体構造が影響していることが考えられる。つまり、結合に必要なアミノ酸を持っていても、 α タンパク質と ω タンパク質の結合箇所が接近するような立体構造を取れなければ活性を獲得できない。このことから、 α タンパク質の構造が α -complementation では重要であると考えられる。 α タンパク質の N 末端側を削ることで活性が向上したことも、立体構造の影響であると考えられる。 α タンパク質の N 末端側の 1 番目から 12 番目のアミノ酸は、他のタンパク質と結合していないため自由な状態にあると考えられる[38]。その場合、N 末端側 12 個のアミノ酸の立体構造というのが、 α タンパク質と ω タンパク質の複合体同士の結合を阻害することが考えられる。N 末端 2 つのアミノ酸を欠損させたら活性が向上したのは、欠損させたことで自由な状態のアミノ酸が減り、その構造による α -complementation 複合体の形成阻害を軽減したことが考えられる。

4-3-6 短い α タンパク質をレポータータンパク質として用いた RNA 自己複製反応レポーターシステム

RNA 自己複製反応の鋳型 RNA に、短くした α タンパク質を挿入し、自己複製反応への影響を調べた。Rep(+) α (-)と今回作成した改良鋳型(short と記載)の試験管内での蛍光値変化を比較した。

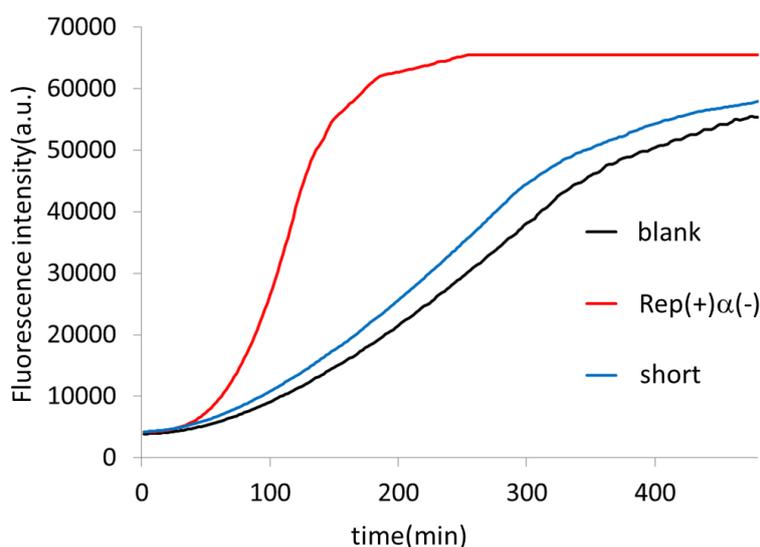


図 4-6. レポーターシステムによる蛍光値経時変化

図 4-6 に試験管内での Rep(+) α (-)と short のそれぞれ終濃度 10 nM の RNA による蛍光値経時変化を示した。blank は無細胞翻訳系中に ω タンパク質のみを加えた条件を示す。この結果から、short の検出感度が Rep(+) α (-)より低いことが分かる。Rep(+) α (-)の α タンパク質の遺伝子配列の長さは 570 bp で、short は 174 bp である。short の鋳型が進化実験で複製効率が低い[35]ものを使用したことと、第 2 章で得られた「RNA の長さが短い方が複製

効率が高い」という知見と合わせると、**short**の方が検出感度が高くなることが予想された。**short**の検出感度が低くなった原因として、自己複製反応の2本鎖形成率が考えられる。2本鎖形成は、鋳型RNAとその複製RNAの配列が相同であるために起こる。RNAは複雑な二次構造を取っており、**short**に使用したベースとなるRNAは、それ自身のみでは、2本鎖率が低いことが分かっている[35]。しかし、 α タンパク質を挿入したことで、二次構造が変わり2本鎖形成率が大きく上がったことが考えられる。2本鎖形成率がRep(+) α (-)よりも高いために、翻訳反応・複製反応が早期に止まってしまい、検出感度が低くなったと考えられる。この結果から、RNA自己複製反応の2本鎖形成率は、RNAの長さではなく、RNA全体の配列の影響が大きいことがわかる。検出感度の向上には、2本鎖率形成のメカニズムの解明が重要であると言える。また、今回の結果からレポータータンパク質と鋳型を別々に改良するのではなく、レポーターの活性と鋳型の複製効率を同時に向上する必要があると考えられる。

4-4 結語

再構築反応系は、細胞のように外部から栄養を取り込むことが難しい。そのため、使用可能な資源が限られた環境下で反応を行わなくてはならない。レポータータンパク質のサイズが小さければ小さいほど、発現させるために必要な資源の数は減り、より長く、より多くの反応を同じ反応液中で動かすことが可能になる。RNA 自己複製反応系においては、第 2 章の結果より RNA の長さが短いほど反応効率が高くなることが示された。この反応系は、反応効率が向上するという事は、RNA の複製が進み、レポータータンパク質を発現可能な RNA の数が増えることを意味する。これは結果として、検出感度の向上に繋がる。そこで、本章では検出感度の向上を目指す方法として反応系の反応効率に着目し、タンパク質サイズの小さいレポータータンパク質の探索を行った。

短い α タンパク質を作成し、無細胞翻訳系中で α -complementation による蛍光値変化がみられるか確認した。4-3-1 では、27AA、23 AA、21 AA、17 AA、16 AA、10 AA の 6 種類の α タンパク質の蛍光値変化を測定した。結果、27 AA、17 AA、16 AA の α タンパク質で蛍光値変化が確認できた。しかし、23 AA、21 AA では確認できなかった。この 2 つの α タンパク質は、17 AA や 16 AA より数アミノ酸長いだけだが、活性が確認できなかった。この結果から、 α タンパク質は小さいタンパク質であるが、アミノ酸配列だけでなく、その三次構造も α -complementation の反応性に影響を与えていることが考えられる。次に、大腸菌内で α -complementation を行うための α タンパク質は N 末端の 2 つのアミノ酸を欠損させていることから、N 末端の 2 つのアミノ酸を欠損させた。4-3-1 で測定した α タンパク質の N 末端のアミノ酸を欠損させ、25AA、21 AA、19 AA、15 AA、14 AA、8 AA の 6 種類の α タンパク質を作成し蛍光値変化を測定した。その結果、全ての α タンパク質で蛍光値変化が見られた。欠損させる前は活性が無かった 21 AA、19 AA、8AA が活性を獲得していた。この結果から、欠損させた 2 つのアミノ酸を含む N 末端側の配列が α -complementation 複合体形成に影響を与えていることが考えられる。

作成した α タンパク質のうち、最も活性が高かった、25AA、15AA と、最もサイズの小さい 8AA をリポソーム内で発現させ活性を測定した。その結果、上記の 3 種類で活性を確認できた。この活性が目的 α タンパク質によるものであることを確認するために、それぞれの α タンパク質を化学合成し、試験管内で蛍光値測定を行った。その結果、25AA のみで蛍光活性が確認できた。この結果から、無細胞翻訳系中では 25 アミノ酸という非常に小さな α タンパク質で α -complementation が可能であることが分かり、 α タンパク質が ω タンパク質の欠損部分全てを補填しなくても起こることが実験的に示せた。今回、25 アミノ酸の α タンパク質のアミノ酸配列の検討は行っていない。アミノ酸配列の検討を行うことで、25 アミノ酸の α タンパク質での α -complementation 活性が向上する可能性がある。

短い α タンパク質を RNA 自己複製反応に導入し、第 2 章で構築したレポーターシステムと比較した。第 2 章の結果から、鋳型 RNA を短くすると RNA 自己複製反応の複製効率が向上することが予想された。しかし、第 2 章で用いた α タンパク質よりも遺伝子配列の短い

α タンパク質を挿入したにも関わらず、非常に低い蛍光活性を示した。原因としては、短い α タンパク質の配列を挿入したことで、RNA2 本鎖形成率が上昇し、複製反応・翻訳反応が停止してしまっていることが考えられる。この結果から、RNA 自己複製反応では RNA の二次構造が反応性に与える影響が大きく、レポーターシステムの検出感度向上には、レポーターの検出感度の向上と 2 本鎖 RNA 形成の抑制を同時に行う必要があると考えられる。

α -complementation は、 ω タンパク質の欠損部分を α タンパク質が補うことで基質分解活性を獲得する反応である。今回作成した α タンパク質は、 ω タンパク質の欠損部分の全てを補っていないが α -complementation 活性を持つことを実験的に示した。このことから、 α -complementation は ω タンパク質の欠損部分を補うことではなく、 ω タンパク質との結合によって起こる各タンパク質の三次構造変化が活性部位の形成には重要であることが考えられる。今回作成した α タンパク質で蛍光活性があったもの、なかったものを詳細に調べることで、 α -complementation が起こるために必要なアミノ酸配列を決定することが可能になると予想される。また、無細胞翻訳系というノイズの少ない環境で反応を行うことで、1 アミノ酸置換による活性の変化を検出することが可能であると考えられるため、 α -complementation の反応機構の理解への貢献が期待できる。また、今回作成した RNA 自己複製反応の鋳型 RNA は、レポーターシステムの検出感度向上のために貢献することが考えられる。具体的には、今回蛍光活性が低くなっていた原因を調べることで、どのような配列が 2 本鎖を形成しやすいなどの知見が得られると考えられる。

第5章 総括

5-1 α -complementation を用いた RNA 自己複製反応レポーターシステムの開発

再構築反応系は、細胞のように外部から栄養を取り込むことが難しいため、使用可能な資源が限られた環境下で反応を行わなくてはならない。そのため、レポータータンパク質を発現するために資源を大量に必要としては、目的の反応の進行を阻害することになる。本研究で用いる、 β ガラクトシダーゼの α -complementation は、 α タンパク質という小さいタンパク質(50~200 アミノ酸)によって基質分解反応が開始するため、再構築反応系のレポーターとして適していると考えた。 α -complementation の特徴は点である。しかし、再構築反応系で α -complementation が使用された前例がなかった。そこで、再構築反応系に α -complementation を組み込むことで有用性を示すこと、再構築反応系のレポーターに特化する改良をすることを目的とした。

再構築反応系での α -complementation 利用の一例として、RNA 自己複製反応系のレポーターシステムに応用した。このレポーターシステムでは、鋳型 RNA から複製された相補鎖 RNA からレポータータンパク質が発現し、蛍光で検出可能になる。それまでは、 β ガラクトシダーゼが用いられていたが、代わりに β ガラクトシダーゼの α タンパク質を発現させ、反応液中で α -complementation が起こるようにした。その結果、試験管内・リポソーム内の両方で、 β ガラクトシダーゼを用いた場合よりも検出感度を向上させることができた。これは、 α タンパク質の遺伝子配列が短いために、鋳型 RNA の長さが約半分になり、RNA 複製効率が向上したためであると考えられる。 α タンパク質のサイズが小さいという特徴が活かされた好例と言える。このように、 α -complementation は再構築反応系でもレポーターとして機能し、反応効率への影響が小さくなることを示せた。

しかし、 α -complementation を用いた RNA 自己複製反応のレポーターシステムは、体積の小さいリポソーム(1-10 fL)ではバックグラウンドノイズと識別できないほどシグナルが弱いことが分かった。その原因として、 α -complementation の活性が低いことが考えられた。 α タンパク質の配列は、 ω タンパク質との結合部分以外は厳密に決まっていないため、配列の改良を行うことで α -complementation の活性の 10 倍以上の向上を目指した。 β ガラクトシダーゼの C 末端側の配列を削ることで、様々な α タンパク質を試した結果、180bp(60 アミノ酸)の α タンパク質が PURE system 中では最も高い活性を示し、それまで用いていた 570 bp(190 アミノ酸)の α タンパク質に比べて約 4 倍の活性を示すことが分かった。更なる向上を目指し、180bp の α タンパク質のリポソーム内実験室進化を行った。その結果、非同義置換が 1 か所入った変異体が得られた。この変異体は、180bp の α タンパク質よりも試験管内で 1.4 倍、リポソーム内では 4 倍の活性を示した。このことから、本研究で得られた変異体は、微小区画内反応に特化したレポータータンパク質であると言える。また、この結果から、 α タンパク質は ω タンパク質との結合部分以外の配列を変えることで、反応環境・反応条件に対応した配列を取ることが期待できる。

PURE system 中での最適な配列を探索した際に、27 アミノ酸という非常に小さな α タン

パク質でも α -complementation 活性を持っていることが確認できた。 α -complementation は、 ω タンパク質の欠損部分を α タンパク質が補填することで基質分解活性を獲得する反応である。しかし、この 27 アミノ酸の α タンパク質は、 ω タンパク質の欠損部分の全てを補填していないにも関わらず、 α -complementation 活性を示した。そこで、PURE system 中で検出可能な最小の α タンパク質の探索を行った。本研究では、最小で 25 アミノ酸の α タンパク質で α -complementation 活性が確認できた。このことから、 α -complementation では α タンパク質が ω タンパク質の欠損部分を全て補填しなくても良いという新しい知見を得ることができた。

遺伝子配列の短い α タンパク質の配列を、RNA 自己複製反応の鋳型 RNA に挿入し、検出感度への影響を検討した。RNA の長さが短くなることにより RNA 複製効率が向上することが期待された。さらに用いる鋳型が進化実験によって複製効率が向上しているもの[35]を使用したため、検出感度も向上することが予想された。しかし、予想に反して以前構築したレポーターシステムよりも検出感度は低かった。原因としては、2 本鎖 RNA 形成率が高く、複製反応・翻訳反応が止まってしまったことが考えられる。このことから、RNA 自己複製反応の複製効率は、RNA の長さだけではなく、RNA の配列全体の影響を強く受けると示唆される。したがって、RNA 自己複製反応系のレポーターシステムの検出感度向上には、鋳型 RNA とレポーターを別々に改良し組み合わせる手法ではなく、複製反応・翻訳反応の両方が起こる反応系で改良や進化実験などを行う必要があるだろう。

本研究の目的は 1 分子の RNA による反応を検出可能なほど高感度な RNA 自己複製反応レポーターシステムの構築である。その目的のために、 α -complementation をレポーターとして用いた。その結果、既存の β ガラクトシダーゼを用いたレポーターシステムよりも、検出感度、RNA 複製効率共に高いレポーターシステムを構築することができた。しかし、リポソーム内で反応を行った際には、体積の小さい(1-10 fL)リポソーム内では、バックグラウンドノイズと判別することが難しかった。これは 1 つのリポソームを観察した際に、そのリポソームの蛍光値が内部反応依存であるかどうかを判断できないことを意味する。そこでレポーターの改良を行った。今回の研究で、多種の α タンパク質とその蛍光活性を示すことができた。これらをレポーターとして導入することで、RNA 自己複製反応のレポーターシステムとして適している α タンパク質、すなわち 2 本鎖 RNA を形成しにくい配列を持つ α タンパク質が推定可能であると思われる。また、RNA 自己複製反応レポーターシステムの改良としては、レポーターと鋳型 RNA を別々に改良するのではなく、それらを組み合わせた状態で行う、すなわち複製反応も翻訳反応も行う条件で行う方が良いことを示唆された。今回の研究で、多種のレポーター候補の提案と、新たな改良方法の提案ができたと考えている。

5-2 再構築反応系のレポーターとしての α -complementation

本研究では、 α -complementation の持つ特徴に注目し、再構築反応系のレポーターとし

て有用であると考え、それを示すことおよび再構築反応系のレポーターとして特化させることを目的とした。注目した α -complementation の特徴は、 α タンパク質という小さいタンパク質によって基質分解反応が開始することである。図 5-1 に β ガラクトシダーゼと各 α タンパク質の試験管内(Y 軸)、およびリポソーム内(X 軸)での比活性を示した。各 α タンパク質の比活性は β ガラクトシダーゼで規格している。図 5-1 より、original での α -complementation は試験管内・リポソーム内共に β ガラクトシダーゼよりも活性が低い。無細胞翻訳系中で最も活性の高かった alpha-180 は、試験管内では β ガラクトシダーゼと同程度であり、リポソーム内では 8 倍の活性を示した。進化型である mutant No.12 は、試験管内・リポソーム内で共に β ガラクトシダーゼよりも活性が高く、特にリポソーム内では非常に高い活性を示した。25 アミノ酸の α タンパク質は、試験管内では活性が弱いがりポソーム内反応ではバックグラウンドノイズと比べると十分な蛍光値を示すことが確認できた。 α -complementation は、タンパク質サイズを変えるだけで幅広い反応系への応用が期待できるレポータータンパク質であると考えられる。alpha-180 と mutant No.12 は、リポソーム内反応に特化していると言える。25 AA alpha は活性は低いが、タンパク質サイズが小さいレポーターを必要とする反応系では有用である。

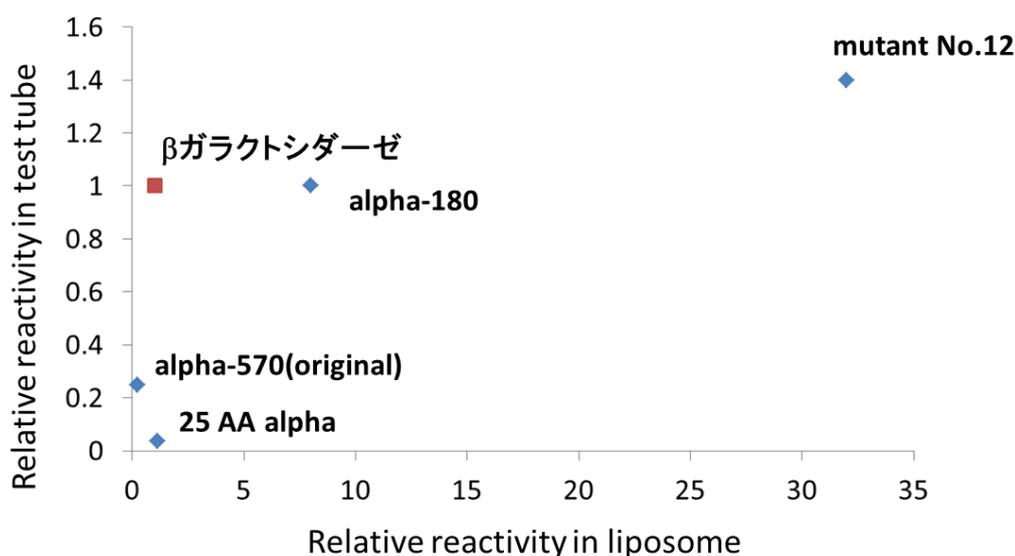


図 5-1. β ガラクトシダーゼと各 α タンパク質の活性比較

今回の研究で、最小で 25 アミノ酸の α タンパク質で α -complementation が起こることが確認できた。この α タンパク質での活性が検出できたのは、再構築反応系という外的影響を排除したノイズの少ない環境のためであると考えられる。生体内での検出感度は測定していないので分からないが、少なくとも再構築反応系には十分に利用可能なレポータータンパク質を得ることができた。資源の限られた環境下で、25 アミノ酸のタンパク質を発現

するだけで蛍光で検出可能になるこの α タンパク質は、再構築反応系の研究ではメリットの大きいツールになると考えられる。再構築する大きな理由は、生命現象を理解することである。近年では、生命の起源を探るために、前生物的な細胞を構築する試みが行われている[39][40]。生命は適応・進化し続けて現在の状態になっている。前生物の生化学反応はエラー率が現在の細胞よりも高いことが考えられる。それを模擬した反応系を構築しても、エラー率の高さから再現的にレポータータンパク質を発現し、観察することは困難であると考えられる。しかし、25アミノ酸の α タンパク質であれば、エラー率が高くでも再現的に発現させることが可能であると予想される。また、リボザイムと呼ばれる酵素のように振る舞うRNAが存在する。リボザイムがRNAを複製する反応が最も初期のRNAの複製反応であるとして研究が行われている[41][42]が、現在リボザイムが伸長できるRNAの長さは約200塩基までである[43]。この25アミノ酸の α タンパク質は、配列は75塩基なのでリボザイムの伸長可能範囲内である。そのため、この α タンパク質であればリボザイムの反応を検出することにも利用可能であると思われる。このように、今まではレポーターをコードできなかったような反応系にも使用することが可能である。また、 α -complementationのもう一つの特徴である、 α タンパク質と ω タンパク質の2つがないと基質分解反応が開始しない点を利用する方法も考えられる。例えば、リボソームなどの微小区画の融合させる際に、片方には α タンパク質、もう片方に ω タンパク質を封入しておけば、区画の融合が起これば基質分解反応が起こり蛍光で検出することが可能になると考えられる。

今回作成した様々なサイズの α タンパク質の活性の知見は、 α -complementationの更なる改良に繋がると予想される。 α -complementationはまだ反応機構が完全に解明されていない。再構築反応系は、目的の反応以外を除去したバックグラウンドノイズの少ない反応であるため、1アミノ酸の増減の活性への影響が検出することができた。つまり、アミノ酸置換による高活性型の探索が可能である。また今回行ったように、様々なサイズの α タンパク質を作成し、活性を比較することで反応機構の解明に繋がることが期待できる。反応機構の解明は、既存の α -complementationを利用している検出系の改良に応用することができると思われる。

参考資料

- [1] O. Shimomura, F. Johnson, and Y. Saiga, "Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan," *Aequorea. J. Cell Comp. Physiol.*, vol. 59, no. 3, pp. 223–239, 1962.
- [2] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. Ward, and D. Prasher, "Green fluorescent protein as a marker for gene expression," *Science (80-.)*, vol. 263, p. 802, 1994.
- [3] G. Feng, R. H. Mellor, M. Bernstein, C. Keller-peck, Q. T. Nguyen, M. Wallace, J. M. Nerbonne, J. W. Lichtman, and J. R. Sanes, "Imaging Neuronal Subsets in Transgenic Mice Expressing Multiple Spectral Variants of GFP," *Neuron*, vol. 28, pp. 41–51, 2000.
- [4] T. S. Wehrman, C. L. Casipit, N. M. Gewertz, and H. M. Blau, "Enzymatic detection of protein translocation," *Nat. Methods*, vol. 2, no. 7, 2005.
- [5] J. Hashimoto, T. Watanabe, T. Seki, S. Karasawa, M. Izumikawa, T. Seki, S.-I. Iemura, T. Natsume, N. Nomura, N. Goshima, A. Miyawaki, M. Takagi, and K. Shin-Ya, "Novel in vitro protein fragment complementation assay applicable to high-throughput screening in a 1536-well format.," *J. Biomol. Screen.*, vol. 14, no. 8, pp. 970–9, Sep. 2009.
- [6] F. Verkaar, W. M. Blankesteyn, J. F. M. Smits, and G. J. R. Zaman, "beta-Galactosidase enzyme fragment complementation for the measurement of Wnt/beta-catenin signaling.," *FASEB J.*, vol. 24, no. 4, pp. 1205–17, Apr. 2010.
- [7] D. Givol, G. R. Craven, E. Steers, and C. B. Anfinsen, "Effect of limited digestion by proteolytic enzymes on Escherichia coli β -galactosidase," *Biochim. Biophys. Acta - Enzymol. Biol. Oxid.*, vol. 113, no. 1, pp. 120–125, Jan. 1966.
- [8] D. Perrin and J. Monod, "On the reversibility by treatment with urea of the thermal inactivation of E. coli β -galactosidase," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 12, no. 5, 1963.
- [9] J. T. Lis, J. A. Simon, and C. A. Sutton, "New Heat Shock Puffs and ,& Galactosidase Activity Resulting from Transformation of Drosophila with an hsp704acZ Hybrid Gene," *Cell*, vol. 35, no. December, pp. 403–410, 1983.

- [10] I. Bronstein and L. J. Kricka, "Clinical Applications of Luminescent Assays for Enzymes and Enzyme Labels," *J. Clin. Lab. Anal.*, vol. 322, pp. 316–322, 1989.
- [11] C. Tung, Q. Zeng, K. Shah, D. Kim, D. Schellingerhout, and R. Weissleder, "In Vivo Imaging of β -Galactosidase Activity Using Far Red Fluorescent Switch Advances in Brief In Vivo Imaging of β -Galactosidase Activity Using Far Red Fluorescent Switch," *Cancer Res.*, pp. 1579–1583, 2004.
- [12] A. Ullmann, D. Perrin, F. Jacob, and J. Monod, "Identification par complémentation in vitro et purification d'un segment peptidique de la β -galactosidase d'Escherichia coli," *J. Mol. Biol.*, vol. 12, no. 3, pp. 918–923, Jul. 1965.
- [13] B. W. Matthews, "The structure of E. coli beta-galactosidase.," *C. R. Biol.*, vol. 328, no. 6, pp. 549–56, Jun. 2005.
- [14] P. Moosmann and S. Rusconi, "Alpha complementation of LacZ in mammalian cells," vol. 24, no. 6, pp. 1171–1172, 1996.
- [15] C. Burkard, L.-M. Bloyet, O. Wicht, F. J. van Kuppeveld, P. J. M. Rottier, C. a M. de Haan, and B. J. Bosch, "Dissecting virus entry: replication-independent analysis of virus binding, internalization, and penetration using minimal complementation of β -galactosidase.," *PLoS One*, vol. 9, no. 7, e101762, Jan. 2014.
- [16] S. M. Nomura, K. Tsumoto, T. Hamada, K. Akiyoshi, Y. Nakatani, and K. Yoshikawa, "Gene Expression within Cell-Sized Lipid Vesicles," *ChemBiochem*, vol. 4, no. 11, pp. 1172–1175, 2003.
- [17] H. Kita, T. Matsuura, T. Sunami, K. Hosoda, N. Ichihashi, K. Tsukada, I. Urabe, and T. Yomo, "Replication of genetic information with self-encoded replicase in liposomes.," *ChemBiochem*, vol. 9, no. 15, pp. 2403–10, Oct. 2008.
- [18] Y. Shimizu, A. Inoue, Y. Tomari, T. Suzuki, T. Yokogawa, K. Nishikawa, and T. Ueda, "Cell-free translation reconstituted with purified components," *Nat. Biotechnol.*, vol. 19, no. August, pp. 751–755, 2001.
- [19] Y. Kazuta, J. Adachi, T. Matsuura, N. Ono, H. Mori, and T. Yomo, "Comprehensive Analysis of the Effects of Escherichia coli ORFs on Protein Translation Reaction * □," *Molecular Cell. Proteomics*, vol. 7, pp. 1530–1540, 2008.

- [20] Y. Kazuta, T. Matsuura, N. Ichihashi, and T. Yomo, "Synthesis of milligram quantities of proteins using a reconstituted in vitro protein synthesis system.," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. In Press, pp. 5–8, May 2014.
- [21] K. Yamaji, T. Kanai, S. M. Nomura, K. Akiyoshi, M. Negishi, Y. Chen, H. Atomi, K. Yoshikawa, and T. Imanaka, "Protein Synthesis in Giant Liposomes Using the In Vitro Translation System of *Thermococcus kodakaraensis*," *IEEE Trans. Nanobioscience*, vol. 8, no. 4, pp. 325–331, 2009.
- [22] J. W. Szostak, D. P. Bartel, and P. L. Luisi, "Synthesizing life," *Nature*, vol. 409, pp. 387–390, 2001.
- [23] P. Luigi, L. Francesca, and F. Pasquale, "Approaches to semi-synthetic minimal cells : a review," *Naturwissenschaften*, vol. 93, pp. 1–13, 2006.
- [24] Pier Luigi Luisi, P. Walde, and T. Oberholzer, "Lipid vesicles as possible intermediates in the origin of life," *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 4, vol. 4, pp. 33–39, 1999.
- [25] T. Oberholzer, K. H. Nierhaus, and P. L. Luisi, "Protein Expression in Liposomes," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 261, pp. 238–241, 1999.
- [26] V. Noireaux and A. Libchaber, "A vesicle bioreactor as a step toward an artificial cell assembly," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 51, pp. 17669–74, 2004.
- [27] K. Hosoda, T. Matsuura, H. Kita, N. Ichihashi, K. Tsukada, and T. Yomo, "Amplification Process by Q β Replicase Kinetic Analysis of the Entire RNA Amplification Process by," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 21, pp. 15516–27, 2007.
- [28] K. Nishimura, T. Matsuura, K. Nishimura, T. Sunami, H. Suzuki, and T. Yomo, "Cell-Free Protein Synthesis inside Giant Unilamellar Vesicles Analyzed by Flow Cytometry," *Langmuir*, vol. 28, no. 22, pp. 8426–32, 2012.
- [29] K. Nishimura, H. Suzuki, T. Toyota, and T. Yomo, "Size control of giant unilamellar vesicles prepared from inverted emulsion droplets.," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 376, no. 1, pp. 119–25, Jun. 2012.

- [30] C. N. Gallagher and R. E. Huber, "Studies of the M15 B-Galactosidase Complementation Process," vol. 17, no. 2, 1998.
- [31] H. Terasawa, K. Nishimura, H. Suzuki, T. Matsuura, and T. Yomo, "Coupling of the fusion and budding of giant phospholipid vesicles containing macromolecules," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 16, pp. 5942–7, 2012.
- [32] S. F. Fenz, R. Sachse, T. Schmidt, and S. Kubick, "Cell-free synthesis of membrane proteins : Tailored cell models out of microsomes.," *BBA - Biomembr.*, vol. 1838, no. 5, pp. 1382–1388, 2013.
- [33] T. Nishikawa, T. Sunami, T. Matsuura, and T. Yomo, "Directed Evolution of Proteins through In Vitro Protein Synthesis in Liposomes.," *J. Nucleic Acids*, pp. 1–11, Jan. 2012.
- [34] A. Ullmann, "Complementation in beta-Galactosidase: From Protein Structure to Genetic Engineering," *Bioessays*, vol. 14, no. 3, pp. 201–205, 1992.
- [35] N. Ichihashi, K. Usui, Y. Kazuta, T. Sunami, T. Matsuura, and T. Yomo, "Darwinian evolution in a translation-coupled RNA replication system within a cell-like compartment," *Nat. Commun.*, vol. 4, no. 2494, 2013.
- [36] K E langley, A V fowler, and I Zabin, "Amino Acid Sequence of beta-Galactosidase. IV Sequence of an alpha-complemting cyanogen bromide peptide, residues 3 to 92," *J. Biol. Chem.*, vol. 250, pp. 2587–2592, 1975.
- [37] D. H. Juers, R. H. Jacobson, D. Wigley, X. Zhang, R. E. Huber, D. E. Tronrud, and B. W. Matthews, "High resolution refinement of b-galactosidase in a new crystal form reveals multiple metal-binding sites and provides a structural basis for a-complementation," pp. 1685–1699, 2000.
- [38] D. H. Juers, B. W. Matthews, and R. E. Huber, "LacZ β -galactosidase: structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance.," *Protein Sci.*, vol. 21, no. 12, pp. 1792–807, Dec. 2012.
- [39] S. A. Shelke and J. A. Piccirilli, "Origins of life: RNA made in its own mirror image," *Nature*, vol. Oct 29, no. doi 10.1038, p. nature13935, 2014.

- [40] J. T. Szcepanski and G. F. Joyce, “A cross-chiral RNA polymerase ribozyme,” *Nature*, vol. doi.10.103, no. nature13900, 2014.
- [41] M. Levy and A. D. Ellington, “RNA world : Catalysis abets binding , but not vice versa,” *Curr. Biol.*, vol. 11, no. 16, pp. 665–667, 2001.
- [42] M. P. Robertson and G. F. Joyce, “Highly efficient self-replicating RNA enzymes.,” *Chem. Biol.*, vol. 21, no. 2, pp. 238–45, Feb. 2014.
- [43] J. Attwater, A. Wochner, V. B. Pinheiro, A. Coulson, and P. Holliger, “Ice as a protocellular medium for RNA replication.,” *Nat. Commun.*, vol. 1, no. 6, p. 76, Jan. 2010.

謝辞

本研究の遂行にあたって、多大なるご指導と研究環境を与えてくださった四方哲也教授(大阪大学大学院情報科学研究科、共生ネットワークデザイン学講座)に心から感謝いたします。

本論文をまとめるにあたり、副査として貴重なお時間を割いていただき、様々な視点から助言・指導を賜りました松田秀雄教授(大阪大学大学院情報科学研究科、ゲノム情報工学講座)、清水浩教授(大阪大学大学院情報科学研究科、代謝情報工学講座)、若宮直紀教授(バイオシステム解析学講座)、前田太郎教授(人間情報工学講座)に深く感謝いたします。

研究計画と考察について直接のご指導をいただいた市橋伯一准教授(大阪大学大学院情報科学研究科、共生ネットワークデザイン学講座)、鈴木宏明准教授(中央大学理工学部精密機械工学科)、角南武志博士に深くお礼を申し上げます。

無細胞翻訳系関連の実験材料の提供と多くの助言をしてくださった数田恭章博士(ERATO技術参事、JST)、松浦友亮准教授(大阪大学大学院工学研究科、生命先端工学専攻)に深くお礼申し上げます。

無細胞翻訳系関連の実験材料の提供をしてくださった駒井仁美さん、三木直子さん、大槻涼子さん、坂本友見さん、古島理恵さんに深くお礼申し上げます。

多くの助言を頂いた一居哲夫特任助教授(大阪大学大学院情報科学研究科、共生ネットワークデザイン学講座)、西川雄大博士、藤井聡志博士および細かい実験指導をしていただいた臼井公人博士、小堀峻吾博士、番所洋輔博士、西村晃司博士に深くお礼申し上げます。

研究生生活をサポートしてくださった事務の方々に深くお礼申し上げます。

公私ともにお世話になりました四方研究室のみなさん、情報科学研究科のみなさん、ありがとうございました。

経済面でお世話になった日本学生支援機構の奨学金プログラムに深く感謝いたします。

最後に、経済面、生活面で支えてくださった家族に心からお礼申し上げます。