

「ヒト翻訳関連因子と人工細胞を利用したタンパク質凝集スクリーニング系の開発」

兵庫県立大学大学院 工学研究科

町田 幸大

1 研究の背景と目的

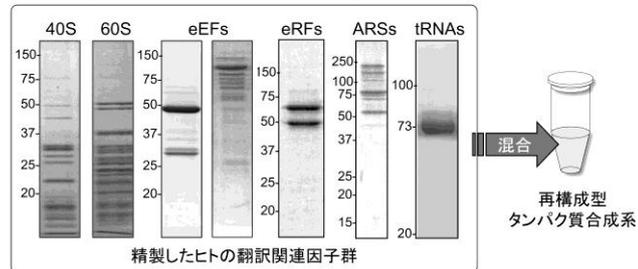
細胞内には数万種類のタンパク質が混在し、それらが正しく代謝（合成→立体構造形成→輸送→分解）されることで細胞の恒常性が維持されている。しかしながら、正しい代謝の経路から外れ病気の原因となる凝集体を形成するタンパク質も存在する。近年ではこれら疾患原因タンパク質の凝集機構の解析と凝集抑制因子の探索が精力的に進められている。一方申請者は、精製したヒトのタンパク質合成関連因子群を試験管内で混合したヒト因子由来「再構成型タンパク質合成系」を開発し、真核細胞由来の無細胞タンパク質合成系も併用して、真核細胞特異的なウイルスタンパク質の「合成」に関する解析を進めてきた。そこで本研究では、神経変性疾患の一種であるハンチントン病の原因タンパク質ポリ Q をモデル基質として、細胞内で生じるポリ Q の凝集体形成がヒトのタンパク質合成に必要な因子のみを試験管内で混合した「再構成型タンパク質合成系」と「再構成型タンパク質合成系を内包したリポソーム（人工細胞）」で再現されるかを検証し、上記二つの系がタンパク質凝集機構の解明および凝集抑制因子のスクリーニング系として利用可能かどうかを明らかにする。

2 研究方法・研究内容

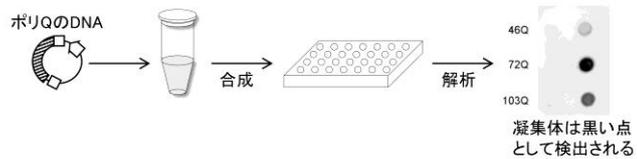
本研究は、図.1 に示した順序で実験の遂行を計画しており、計画通りに、まず、図.1-①の翻訳関連因子群（ネイティブ 40S リボソーム，ネイティブ 60S リボソーム，ネイティブ tRNAs，ネイティブ eEF2，

リコンビナント eEF1s，リコンビナント eRFs，リコンビナント ARSs) の精製と再構成型タンパク質合成系の調製を行った。次に、連続グルタミン（ポリ Q）長の異なる遺伝子の下流に、検出を容易にするための GFP-HA 遺伝子を融合させた DNA を合成するための発現ベクター（GFP-HA，25Q-GFP-HA，46Q-GFP-HA，72Q-GFP-HA，96Q-GFP-HA）を構築した。これらポリ Q の DNA をコードした発現ベクターを利用して、図.1-②の再構成型タンパク質合成系を利用したポリ Q の合成と凝集体トラップアッセイによる解析を行った。その結果、ポリ Q が合成されていることは SDS-PAGE 後、HA 抗体によるウェスタンブロット法によって検出することができたが、

①翻訳関連因子群の精製と再構成型タンパク質合成系の調製



②ポリQの合成と凝集体トラップアッセイによる解析



③凝集抑制因子(分子シャペロン群)の精製とスクリーニング

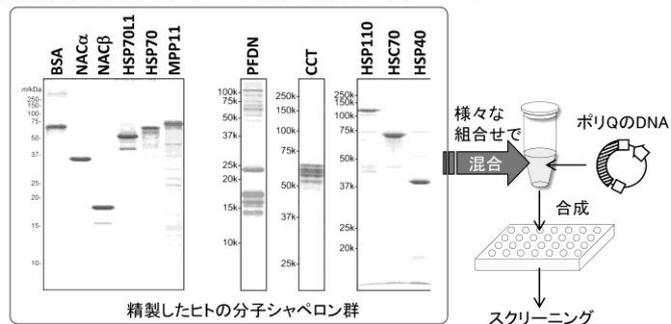


図.1 研究計画

凝集体トラップアッセイにおいてポリ Q の凝集体 (黒い点) を検出することはできなかった (図.2)。

これは、再構成型タンパク質合成系内で合成されたポリ Q-GFP-HA (96Q-GFP-HA) の合成量が、凝集できる濃度にまで到達していないこと、つまり反応系の合成力不足が原因であると示唆された。これは申請時に予期していた結果であるため、再構成型タンパク質合成系のリポソーム化 (人工細胞化) を試みた。これは、大腸菌由来の再構成型タンパク質合成系をリポソーム化すると、翻訳関連因子群がリポソームの脂質二重膜で囲まれた微小の反応場 (実際の細胞と同じような環境) に濃縮され効率よく合成反応が進むことが知られているため、申請者が開発したヒトの再構成型タンパク質合成系でもこの効果が得られる可能性は高いと考えられたためである。リポソーム化を行うと、凝集体トラップアッセイでの解析ができなくなるため、別の解析法として共焦点顕微鏡による直接蛍光観察をおこなった。仮に、ポリ Q-GFP-HA の凝集体が形成されていれば、リポソーム内に粒状の (輝度の高い) GFP 蛍光が検出されるはずである。しかしながら、図.3 に示した様にリポソーム化を行っても、ポリ Q-GFP-HA の凝集体を検出することはできなかった (図.3)。

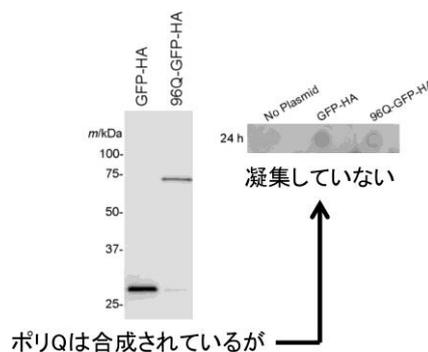


図.2 ポリ Q の合成と凝集解析

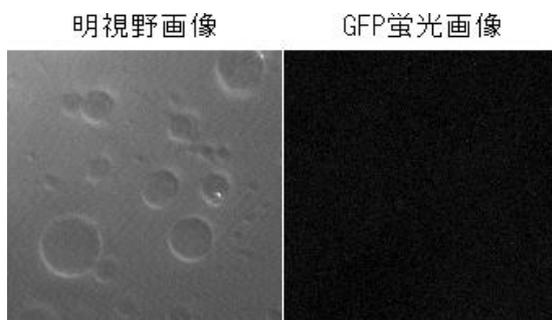


図.3 人工細胞化によるポリ Q 凝集解析

そこで、反応系の合成力不足を解決するために、再構成型タンパク質合成系よりも合成活性が約 100 倍高い HeLa 細胞抽出液由来の無細胞タンパク質合成系を代替システムとして利用して、図.1-②、図.1-③の実験を行った。さらに、これと併せて生きた細胞を利用した *in vivo* 解析も行ったので、以下にその詳細を記載する。

a まず、スクリーニング系のベースとなる HeLa 細胞抽出液由来の無細胞タンパク質合成系の調製を行った (図.4)。

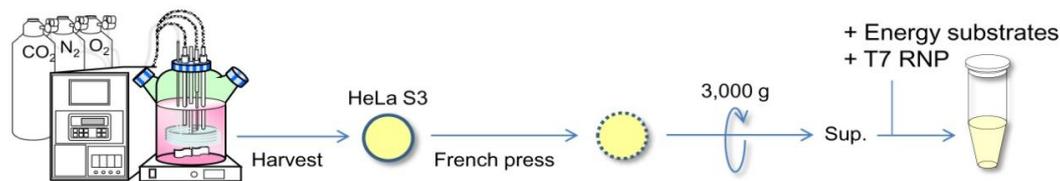


図.4 HeLa 細胞抽出液由来無細胞タンパク質合成系の調製法

次に、長さの異なるポリ Q-GFP-HA をコードしたプラスミド DNA を、無細胞タンパク質合成系にそれぞれ添加して各種ポリ Q タンパク質を合成した。合成開始後、数時間おきにサンプリングを行い、ポリ Q の合成量を SDS-PAGE と HA 抗体による WB 法で、また、合成されたポリ Q が凝集体を形成したかどうかを 96 穴プレートとセルロースアセテートメンブレンを用いた凝集体トラップアッセイで解析 (HA 抗体による WB 法) した (図.5)。

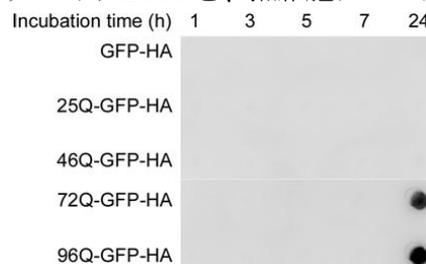


図.5 無細胞タンパク質合成系で合成したポリ Q の凝集体トラップアッセイ

さらに、ポリ Q-GFP-HA の凝集体形成が、生きた細胞内 (*in vivo*) でも再現されるかどうかを確認するために、HeLa 細胞にポリ Q-GFP-HA をコードしたプラスミド DNA を導入し、蛍光顕微鏡観察、SDS-PAGE、凝集体トラップアッセイなどを利用して解析した (図.6 上)。

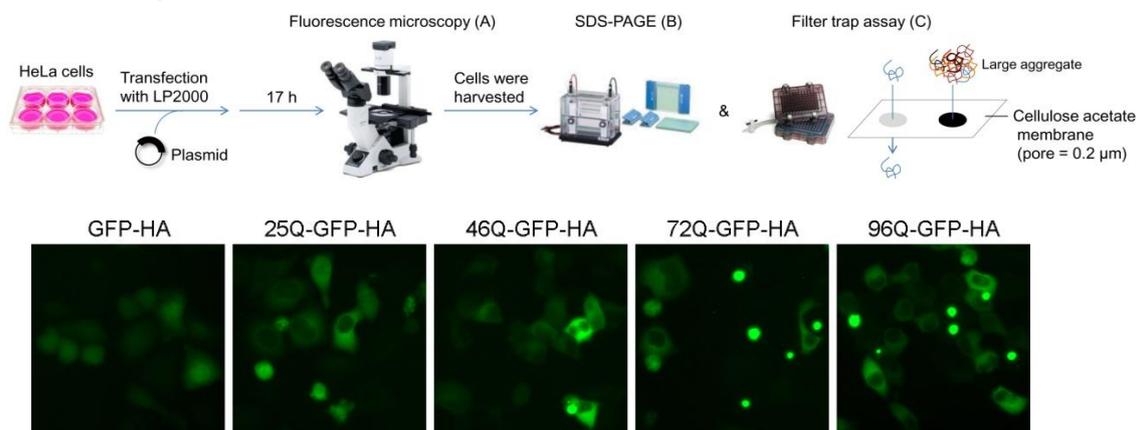


図.6 HeLa 細胞を利用したポリ Q 凝集の解析手順 (上) と蛍光顕微鏡観察結果 (下)

その結果、図.6 下に示した様に、HeLa 細胞内においてもポリ Q 凝集は、グルタミン長の増加に依存して生じていることが明らかになった。これにより、無細胞タンパク質合成系を利用した *in vitro* の実験が、細胞内で起こる反応を再現していることが証明された。

最終的には、図.1-③に示した様に、精製したヒトの分子シャペロン群 (NAC: NAC  $\alpha/\beta$ , RAC: Hsp70L1/MPP11/Hsp70A1A, Hsc70s: Hsp40/Hsc70/Hsp110, Hsp90s: p23/Hsp90, PFD, CCT) を様々な組合せで添加した無細胞タンパク質合成系で 96Q-GFP-HA を合成し、凝集体トラップアッセイを行うことで、どの分子シャペロンが、どの様な条件下で、96Q-GFP-HA の凝集体形成を抑制するかを調査した。

### 3 研究成果

以前の研究では、*in vivo* でも *in vitro* でも、ポリ Q タンパク質はグルタミン数が 35 以上になると凝集しやすくなることが明らかにされていたが、申請者が開発した HeLa 細胞抽出液由来の無細胞タンパク質合成系でポリ Q タンパク質を合成した場合でも、グルタミン数の増加に応じて凝集体が増加した。さらに、96Q-GFP-HA の合成に対して、リコンビナント体として調製 (発現・精製) したヒトの主要シャペロン群 (NAC: NAC  $\alpha/\beta$ , RAC: Hsp70L1/MPP11/Hsp70A1A, Hsc70s: Hsp40/Hsc70/Hsp110, Hsp90s: p23/Hsp90, PFD, CCT) を、それぞれコトランスレーショナルあるいはポストトランスレーショナルに添加すると、Hsc70s あるいは CCT をコトランスレーショナルに添加した場合にのみ、96Q-GFP-HA 由来のポリ Q 凝集が顕著に抑制された (図.7)。すなわち、Hsc70s と CCT は、新生途中の 96Q-GFP-HA ポリペプチド鎖に結合し、96Q-GFP-HA 同士の凝集や、96Q-GFP-HA が他のタンパク質を巻き込んでしまう様な凝集を抑制していることが示唆された。また、Hsc70s および CCT の凝集抑制実行濃度を調査した結果、約 0.5  $\mu\text{M}$  であることが明らかになった。この時、無細胞タンパク質合成系内では 96Q-GFP-HA が約 0.4  $\mu\text{M}$  合成されているので、96Q-GFP-HA 一分子に対し、Hsc70s あるいは CCT が一分子結合することで、凝集を抑制していると考えられる。

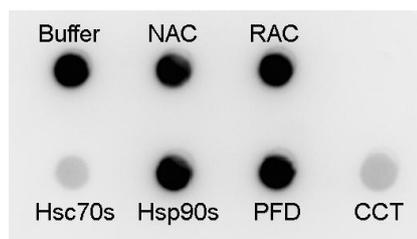


図.7 分子シャペロンによる凝集抑制

以上より、我々が開発した HeLa 細胞由来セルフリータンパク質合成系は、疾患の原因となるポリ Q タンパク質の凝集を再現できるシステムであると共に、タンパク質凝集抑制因子 (Hsc70s や CCT) のスクリーニング系としても有用であることが明らかになった。

上記の研究成果については、その一部を以下の学会で発表した。

1. 新学術領域研究「新生鎖の生物学」国際シンポジウム nascent chain biology (ポスター：P-4)
2. 第 89 回 日本生化学会大会 (招待講演：3S12-4)
3. 第 68 回 日本生物工学会大会 (招待講演：3S-Ep01)
4. 第 39 回 日本分子生物学会年会 (ポスターセッション：3P-0869)

尚、4. 第 39 回 日本分子生物学会年会 (ポスターセッション：3P-0869) においては、優秀ポスター賞を受賞した。

また、本研究の成果の一部については、解析データをまとめ

J Biotechnol. 2016 vol. 239:pp1-8.

Cell-free analysis of polyQ-dependent protein aggregation and its inhibition by chaperone proteins.

Machida K\*, Shigeta T, Kobayashi A, Masumoto A, Hidaka Y, Imataka H\*.

として論文発表した。

#### 4 生活や産業への貢献および波及効果

本研究においては、無細胞タンパク質合成系を利用して、細胞を使った実験では解析が困難であったヒトの「タンパク質合成と凝集の関連性」を解析し、凝集抑制因子を迅速に選別するシステム (スクリーニング系) の技術基盤を確立できたと言える。

従って、例えば、化合物ライブラリーを保持している製薬企業においては、本研究をベースとした (アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病などの原因となる) タンパク質凝集阻害化合物の一次スクリーニングがハイスループットに実施可能であるため、新規創薬探索の技術基盤になると期待される。