

mRNA 核外輸送機構を利用した効率的組換え型蛋白質発現システムの開発

増田 誠司

(京都大学大学院生命科学研究所 統合生命科学専攻)

研究の目的

糖鎖などの修飾をその活性に必要とする医薬品等の蛋白質は、動物細胞などを用いて生産する必要があるが、その発現量は大腸菌に比べて非常に効率が悪い。この問題を解決する方法の1つは、ウイルスのmRNAの核外輸送を利用する方法である。ウイルスのCTEを含むmRNAは、スプライシングを受けなくても効率的に核外に輸送されることが知られている。最近、この原因は、CTE mRNAには、核外輸送に必要なTAP/p15 が直接結合するからであることが判明した⁽¹⁾。そこで目的遺伝子を、このCTEを持つ融合mRNAとして発現させる発現ベクターを構築する。このベクターを用いればCTEの作用により、自動的にmRNAを蛋白質合成の場である細胞質に輸送することによって、蛋白質発現効率が飛躍的に上昇すると考えられる。本研究で採用する方法は、これまでのように強いプロモータを使用した発現系と異なる発現システムであるので生産効率の向上が期待される。本研究は、そのためのスーパー細胞の作製を試みる。

方法

CTEを含むルシフェラーゼ発現プラスミドは、木村博士に供与していただいた⁽²⁾。コントロールの発現プラスミドは、CTEを制限酵素により除去した。TAP発現プラスミドは、Ferber, BK. 博士に供与していただいた⁽³⁾。P15 は、Hela細胞のcDNAライブラリーより構築した。また、遺伝子導入は、リポフェクトアミン 2000 を使用し、ルシフェラーゼ活性の測定は、ルミノメータを用いた。293T細胞の培養は、定法に従った。HATapの検出は、HA抗体を使用してwesternで行った。

結果

ルシフェラーゼの酵素活性で新たな発現系の検討を行った。CTE を含むルシフェラーゼ遺伝子の発現は、含まないものに比べて30%の活性上昇が見られた。しかし効果は期待したほどではなかった。この原因として、一過性の発現により、核内 Tap/p15 の貯蔵量が足りなくなるために活性の上昇が見られにくいと考えられた。そこで、Tap/p15 を安定に発現する細胞株を取得することを試みた。ここでその効果をはっきりと確認するために Tap 遺伝子の発現を制御できる系の構築を行った。Ha でタグをつけた Tap を pCMV/FRT/ベクターに導入した。このベクターを 293T/REX flp 細胞に pOG44 と共に導入することにより、1 遺伝子のみ HATap が導入された細胞を取得できる。実際に、約15種類のクローンを取得してその誘導発現を確認した所、ほぼ均一の発現が確認できた。そこで1種類の細胞を選択し、この細胞 (No1) にさらに flag でタグをつけた p15 遺伝子を発現しているクローンを取得している。

結論

Tap/p15 を十分に発現しない環境下での一過性の発現での結果からでは、その有効性を十分に検討することは困難であることが判明した。そこで、Tap/p15 を安定に発現するクローンを取得している。クローンが取れ次第、CTEを含む遺伝子の発現効率について検討する。また、CTEの挿入場所についても様々な場所での効果を観察する。ここでは述べていないが、これとは別に細胞自身のmRNAの輸送経路を利用する方法論がある。この経路にはTREX複合体が関与するが^(4,5)、細胞の生理的な輸送経路であるのでうまく発現を調節することが出来れば非常に期待できる。しかし、TREXは、8種類のタンパク質からなる複合体であり、その性状解析に3年を要した⁽⁵⁾。そのためこれらのタンパク質の発現を制御し、効率的な生産系を構築するのはかなり困難を伴うと考えられる。そのため、CTEを利用した発現系の構築とその生産性に焦点を当ててさらに研究を展開することが良いと考えられた。

文献

1. Gruter, P., *et al.* TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus. *Mol. Cell*, **1** 649-659, 1998
2. Kimura, T., *et al.* CRM1-dependent, but not ARE-mediated, nuclear export of IFN- α 1 mRNA. *J. Cell. Sci.*, **117**, 2259-2270.
3. Bear, J., *et al.* Identification of novel import and export signals of human Tap, the protein that bind to constitutive transport element of the type D retrovirus mRNAs. *Mol. Biol. Chem.*, **19**, 6306-6317, 1999
4. Stresser, K., *et al.* TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature*, **417**, 304-308, 2002
5. Masuda, S., *et al.* Recruitment of the human TREX complex to mRNA during splicing. *Genes Dev.*, **19**, 1512-1517, 2005