

ディビジョン番号	8
ディビジョン名	生体機能関連化学・バイオテクノロジー

大項目	1. 生体機能関連化学
中項目	1-10. 酵素機能分子
小項目	1-10-3. 蛋白質スプライシング

概要（200字以内）

プロテインスプライシングは、タンパク質精製法、環状ペプチド合成法、レポータータンパク質再構成法の開発に利用されてきた。また expressed-protein ligation 法による、タンパク質への非天然アミノ酸の導入や蛍光標識、アイソトープ標識、平面基盤へのタンパク質固定などが報告されている。今後はプロテインスプライシングの化学的・物理的制御、スプライシング反応の高速化が重要な課題である。

＜基本原理＞

タンパク質前駆体: ペプチドX インテイン ペプチドY

機能的タンパク質: ペプチドX ペプチドY

インテイン

プロテインスプライシング

＜テクノロジー＞

- タンパク質精製法
- 環状ペプチド（タンパク質）合成法
- レポータータンパク質再構成法
- タンパク質への非天然アミノ酸導入法
- タンパク質の蛍光・アイソトープ標識法
- 平面基盤へのタンパク質固定法

＜今後期待される技術＞

スプライシング反応の物理的・化学的制御
反応時間の高速化等

現状と最前線

プロテインスプライシングが酵母の液胞膜上 V-ATPase の形成に関与していることが 1990 年に発見されて以来、スプライシングを触媒するタンパク質（インテイン）のクローニング、インテインの 3 次元立体構造解析、スプライシング反応のメカニズムに関する研究が盛んに展開されてきた。また、現在までにゲノム配列の比較から、プロテインスプライシングの機能を有するタンパク質は 100 種類以上の存在が予想されている。このような研究背景のもと、インテインをバイオテクノロジーの新たなツールとして、プロテインスプライシング反応を利用した様々な技術開発が進められてきた。一つは、大腸菌発現系を利用したタンパク質精製法がある。インテインに連結した目的タンパク質を大腸菌内で過剰発現し、カラムにインテインを吸着させた後に、チオールの添加あるいは温度上昇により目的タンパク質を切り出すことが可能である。また、2つのペプチドを試験管内で連結する技術 expressed-protein ligation (EPL) 法が開発されている。目的とするタンパク質の毒性が強いと、大腸菌発現系を利用しても大腸菌が生育しないため、目的タンパク質の大量合成ができない。この場合、2分した無毒なタンパク質フラグメントを大腸菌で大量合成した後、試験管内でスプライシングによりフラグメントを連結し、目的のタンパク質を大量に得る方法が実用化されている。また EPL 法は、タンパク質への非天然アミノ酸の導入や蛍光標識、また NMR 測定試料のためのアイソトープ標識、平面基盤へのタンパク質固定など、様々な応用が報告されている。

環状ペプチドはこれまでペプチド合成機を利用して合成されているが、インテインを利用すれば、試験管内や細胞内で容易に作成することが可能である。またタンパク質のN末端とC末端を連結する環状化も可能であり、タンパク質の folding 研究に利用されている。

一方、蛍光タンパク質 (GFP やその誘導体) や発光タンパク質 (luciferase) の切断と、スプライシングによる再構成を利用した、新たなレポータータンパク質が開発されている。再構成に基づくレポーターはこれまでに、細胞内や動物個体内のタンパク質間相互作用やタンパク質のオルガネラ移行を可視化する技術、またオルガネラ局在タンパク質の網羅的解析法などに応用されてきた。いずれもレポータータンパク質の2つのフラグメントの「自己触媒的再構成反応」により、蛍光・発光に情報変換できる特異な性質を有する。また、スプライシング反応を化学物質で制御することを目的として、相互作用するタンパク質に FKBP-FRB を用い、ラパマイシン添加によりスプライシング活性を制御する方法が開発された。同様に、エストロゲンリセプターの mutant を利用して、化学物質添加によるスプライシング活性制御の報告もある。いずれも基礎概念の提案に留まっているが、これから生物個体内での選択的なタンパク質活性制御への応用が期待できる。

今後の重要な展開のひとつは、薬物や毒物のスクリーニングを目的としたレポーターの開発である。また、生命科学の基礎研究として、プロテインスプライシングの化学的・物理的制御は新たなテクノロジーとして展開していくことが期待できる。現在は、スプライシング反応速度が1時間以上かかることが大きな問題である。スプライシング反応時間の高速化は、上記技術すべてにおいて多大な効果が期待できる。

将来予測と方向性

- ・ 5年後までに解決・実現が望まれる課題
- プロテインスプライシング反応の化学的・物理的制御
- 新たなインテインの発見
- 生命現象解明のための新たなテクノロジーの概念の創出
- ・ 10年後までに解決・実現が望まれる課題
- スプライシング反応速度の高速化

キーワード

インテイン, レポータータンパク質, expressed-protein ligation, 蛍光標識, アイソトープ標識

(執筆者: 小澤 岳昌)