

論文題目 必須因子のみからなる生体外タンパク質合成系の構築と 10Sa RNA の作用  
機序の解析

氏名 清水義宏

### 1. 必須因子のみからなる生体外タンパク質合成系

生体外蛋白質合成系の開発は、1960年代前半の遺伝暗号解読の研究にまでさかのぼるが、現在に至るまでの40年にわたって、大腸菌、小麦胚芽、ウサギ網状赤血球などの細胞を破碎し、不要物を超遠心などで荒く除いた細胞抽出液が使用されてきた。当然のことながら、こうした抽出液には蛋白質を合成する上で必要な因子はすべて揃っているものの、蛋白質合成系にのみ特化したものではなく、翻訳とは無関係な因子も多分に含まれている。なかにはプロテアーゼやヌクレアーゼなど翻訳に無関係だけでなく、蛋白質合成を阻害するものさえも含まれている。その結果、これを用いたシステムの蛋白質合成の効率は低く、特定の蛋白質を研究のために調製することは想像にも及ばないほどであった。しかし、1988年に Spirin, A. S.らが反応液に連続的にアミノ酸やエネルギー源を供給することにより数十時間以上蛋白質を合成し続けることに成功し、収率も1mlの反応液あたり100マイクログラム近くまで高めることが可能となり、生体外蛋白質合成系を蛋白質生産の一手段として利用する可能性が、垣間見えてきた。その後、細胞抽出液の調製法の改善、系の改良と反応条件の検討などにより、合成効率の改善が報告されている。しかしながら、これらの系は先ほど述べた阻害因子を完全に除去されたわけではなく、システムが細胞抽出液から構成されている限り、本質的な解決とはなっていない。

こうした観点から本研究では生体外蛋白質合成系を一から組み立てるというアプローチを採用した。すなわち精製した、翻訳に必須な因子のみで再構成し、従来とは異なるコンセプトの蛋白質合成システム、PURE システムを構築しようとする試みである(図1)。このPURE システムを構成する諸因子には、これまでもっとも詳細な研究がなされ、蛋白質合成のメカニズムがほぼ解明されている大腸菌のものを用いることとした。

### 2. 各因子の精製と蛋白質合成

大腸菌の蛋白質合成系はリボソーム、mRNA、tRNA の他に、様々な翻訳因子及び様々な酵素から構成されている。翻訳に関与する蛋白質としては、開始因子(IF1,IF2,IF3)、伸長因子(EF-G,EF-Tu,EF-Ts)、終結因子(RF1,RF2,RF3,RRF)が必要であり、酵素としてはアミノ酸をtRNAに結合させる20種類のアミノアシル tRNA 合成酵素やメチオニル tRNA のメチオニンのアミノ基をホルミル化するメチオニル tRNA ホルミル転移酵素が必要である。これら31種類の蛋白質因子をすべてヒスチジンタグとの融合蛋白質として発現ベクターで発現させ、それぞれの因子の大量発現系を構築した。各因子の精製にはニッケルカラムによるアフィニティクロマトグラフィーを用い、それぞれ電気泳動で単一バンドにまで精製することに成功した(図2A)。また、各因子についてそれぞれ活性測定を行い、蛋白質合成における機能を果たすのに、十分な活性を保持していることを確認した。

これらの可溶性蛋白質因子群と、ショ糖密度勾配遠心を用いて高純度に調製したリボソーム画分、tRNA 画分、T7 フェージ由来のRNAポリメラーゼを用い、DNA依存的にDHFR(ジヒドロ葉酸還元酵素)の蛋白質合成を行った。その結果、目的の分子量をもった蛋白質が、合成されていることを電気泳動で確認した。さらに、その合成産物の活性測定を行ったところ、比活性は大腸菌において発現、精製を行ったそれと同程度のものであることを確認した。すなわち、PURE システムは生理活性のある蛋白質を

合成する能力を有することを示したもので、今回精製した因子による構築が、蛋白質を合成する上で必要かつ十分であることが、初めて明確となった。また、DHFR 以外の鑄型についても 4 種類の鑄型について合成を行い、それぞれ目的の分子量をもつ蛋白質の合成を確認、さらに 2 種類についてはその酵素活性の測定から、酵素活性を持つ構造にフォールディングされていることを確認し、PURE システムによって様々な蛋白質の合成が可能であると結論した(図 2B,C)。反応 1 時間後の DHFR 合成量についても反応液 1ml あたり約 160 マイクログラムの蛋白質合成が観察され、単位時間における合成効率についても従来の細胞抽出液のものと比較して、遜色のない性能のシステムを構築することができたと考えている。

### 3. PURE システムを用いた 10Sa RNA の作用機序の解析

真性細菌においては、trans-translation というメカニズムが知られている。trans-translation は、何らかの要因によって終止コドンを失った mRNA を翻訳しているリボソームの A 部位にアラニルを受容した tmRNA と呼ばれる RNA がエンターし、不完全な mRNA から tmRNA 自身が持つ mRNA 領域を置き換え翻訳させることにより正常な翻訳の終結へ導くシステムである。tmRNA が持つ mRNA 領域にコードされているアミノ酸配列はタグペプチドと呼ばれ、これが付加されたタンパク質は細胞内のプロテアーゼにより認識され分解されることが知られている。生体内においてはこの一連の反応によって翻訳に参加できないリボソームの解放と細胞内の蛋白質の質の維持が行われていると考えられている。また、この反応において機能する RNA 分子、tmRNA は、10Sa RNA とも呼ばれ、原核生物に幅広く存在する 10S の大きさを持つ RNA 分子である。この分子は tmRNA のその名が示すように数アミノ酸の遺伝情報を持つという mRNA としての機能を保ちながら一方では tRNA として機能するといった非常にユニークな特徴を備えている。この分子についてはそのユニークな特徴から上記のようにさまざまな研究が行われており、現在ではその機能や生理的意義の概要はすでに明らかにされてきている。

しかしながら、それら一連の反応について各ステップを詳細に追うような実験が行われた例はなく、詳細な反応機構についての証拠はほとんどないのが現状である。実際、近年になって遺伝子欠損による *in vivo* の実験から SmpB と呼ばれる因子が trans-translation 反応に関与しているという報告がなされており、またその因子がどういったメカニズムで反応に関与しているかはいまだ明らかにされていない。

そこで、通常の素抽出液を用いた蛋白質合成系とは異なり系の構成成分を自由に操作可能であるという PURE システムの大きな利点を用いて、trans-translation 反応の素過程のメカニズムの解明を目指した。本研究では、SmpB と協同して、tmRNA がどういった形でリボソームに結合し、その機能発現を行っているかという点について検討を行った。

### 4. SmpB の機能解析

まず、PURE システムで利用した因子群を用いて trans-translation 反応の再構築を試みた。終止コドンのない鑄型のモデルとしては、poly(U)及び、DHFR をコードする DNA を EcoRI で切断し、終止コドンを排除したものを用い、tmRNA 及び精製した SmpB の存在下、非存在下でそれぞれ PURE システムを用いて蛋白質合成を行った。その結果、いずれの鑄型についても tmRNA、SmpB 共に存在しないとタグ配列の付加が行われないという結果を得た(図 3 A)。この結果から trans-translation 反応によるタグペプチドの付加には tmRNA の他には SmpB が必須因子であるが、それ以外の因子は不要であることが明らかにされた。

次に SmpB が trans-translation 反応のどの段階で実際に作用しているのかを検討した。その結果、

tmRNA のアラニル tRNA 合成酵素 (AlaRS) によるアラニン受容能が、SmpB の存在によって促進されるという結果が得られた(図 3 B)。また、SmpB の tmRNA のアラニン受容活性に対する効果を排除するため、tmRNA 及び tRNA<sup>Ala</sup> を予めアミノアシル化しておき、系から AlaRS を除いた状態で poly(U) 依存的 trans-translation 反応を行った。その結果、SmpB 非存在下ではペプチドに対してアラニンの取り込みが観察されず、SmpB がアミノアシル化反応だけでなくタグペプチドの付加反応に対しても何らかの役割を保持していることが明らかにされた(図 3 C 左)。さらに、tmRNA のみを前もってアミノアシル化しておき、同様の反応を行った結果、やはり SmpB 存在下のみアラニンの取り込みが観察された。この結果から、SmpB がアラニル tmRNA のリボソームの A サイトへの結合に必須であることが明らかにされた(図 3 C 右)。一般的には、アミノアシル tRNA のリボソームへの結合は EF-Tu 及び GTP によってなされており、これら通常のアミノアシル tRNA のリボソームへの結合と SmpB が必要なアラニル tmRNA のリボソームへの結合との違いについては興味深い点である。現在、EF-Tu と SmpB のアラニル tmRNA に対する役割などに関して、trans-translation 反応についてさらに詳細な解析を進めているところである。

# 翻訳に必要な酵素・因子

開始因子 (IF1, IF2, IF3)

伸長因子 (EF-G, EF-Tu, EF-Ts)

終結因子 (RF1, RF2, RF3, RRF)

20種類のアミノアシルtRNA合成酵素 (ARS)

メチオニルtRNAホルミル転移酵素 (MTF)





