

# 博士論文の要旨

題名 **The PURE Approach to Protein Generation, Selection and Maturation**  
**-Studies on Protein Function Using a Reconstituted Cell-free System**  
(試験管内遺伝子発現系による蛋白質の機能発現に関する研究)

氏名 應 蓓文 (イン ベイウエン)

---

## 序論

膨大なゲノム遺伝情報の解明を目的とするポストゲノム時代において、網羅的な蛋白質機能の解析が主眼となっている。その実現のためには、機能のある蛋白質の調製が重要となる。そのために、遺伝情報から蛋白質の機能解析が可能な蛋白質の探索・創製システムの確立と、蛋白質の誕生から成熟までのプロセスの無細胞再構築系の開発を本研究の目的とした。リボソーム上で合成された新生ペプチドは、複雑なプロセスをへて、機能を持つ多様な形態の成熟型蛋白質となる。翻訳過程に必須な因子のみから再構成された試験管内遺伝子発現系-PURE (**P**rotein **s**ynthesis **U**sing **R**ecombinant **E**lements) システムを用いて、蛋白質成熟プロセスに関与する因子群を翻訳系に共存させ、複合型無細胞システムを構築し、高い機能を有する蛋白質の生産効率を向上すると同時に、蛋白質の誕生、成熟過程のメカニズムの解明を目標とした。また、機能既知の蛋白質の合成以外にも、未知のランダムなライブラリーより期待された機能を持つ蛋白質を創製することが今後の蛋白質研究に新たな展開をもたらすものと期待できる。翻訳制御機構を利用し、遺伝子探索と創製において有用なスクリーニングシステムの確立も目的とした。

## 研究内容概要

### 1. RNA-蛋白質相互作用によるスクリーニングシステムの確立

新規蛋白質を創製するための基盤技術の開発を行った。試験管内遺伝子発現系である PURE システムを用いた生体外選択系を確立することを目標として、まず、自らの mRNA に結合能を持つ蛋白質を選択するモデル系を構築した。大腸菌リボソーム蛋白質 S15 を用いた実験の結果、自らの mRNA (野生型の S15 mRNA) に結合する蛋白質の遺伝子のみが濃縮され、自らの核酸をターゲットとする蛋白質のスクリーニングシステムのモデル系を確立した (Figure 1)。このことにより、特異的な mRNA-蛋白質相互作用をスクリーニングするシステムの構築が可能であることが示された。次に、リボソーム上に合成されたペプチドを提示させたまま、そのペプチドの機能によって、

mRNA を単離するスクリーニング法-リボソームディスプレイ法を検討し、単鎖抗体の選択への土台作りを行った。

QuickTimey C<sup>2</sup>  
TIFFAILZWAJ eLEVEÉeOÉaEÁ  
ç™ç4çÁEeENE EÉç%â@çÉççç%çç...ÇóKónççç AB

Fig. 1 スクリーニングシステムの模式図

### 2. 蛋白質誕生から成熟までのピュアアプローチ

無細胞の蛋白質成熟システムとして翻訳とフォールディングが共役したシステムを再構築し、シャペロンによる抗体蛋白質のフォールディングの促進の有無を検討した。まず、新生ポリペプチドのフォールディングにおけるシャペロンの役割を解析するために、シャペロンを共存させた PURE システムを構築した (Figure 2)。そして、単鎖抗体 (scFv) を用いて、大腸菌の主要なシャペロンシステムによる抗体蛋白質のフォールディング (可溶化率及び抗原結合活性) を検討した。その結果、DnaK システム (DnaK-J/GrpE) とトリガーファクター (TF) はそれぞれ新生蛋白質の正確な折り畳みに著しく効果的であることがわかった (Figure 3)。それに対して、GroEL/ES は抗体蛋白質の正しい折り畳みに効果が見られなかった。さらに、シャペロンが翻訳途中又は翻訳後に蛋白質凝集体の形成に影響を及ぼすかどうかを調べたところ、TF が蛋白質合成と共役しなくても新生ポリペプチドの凝集抑制活性を持つことが示唆された。これは、これまで報告されていなかった TF の機能である。その他、ジスルフィド形成に関与するシャペロン-

プロテジスルフィドイソメラーゼ (PDI) や、真核細胞のシャペロン (HSP110) の評価をした。ここで、ピュアアプローチにより、蛋白質翻訳と共役したフォールディングプロセス及び様々なシャペロンの効果を詳細に検討することが可能になった。

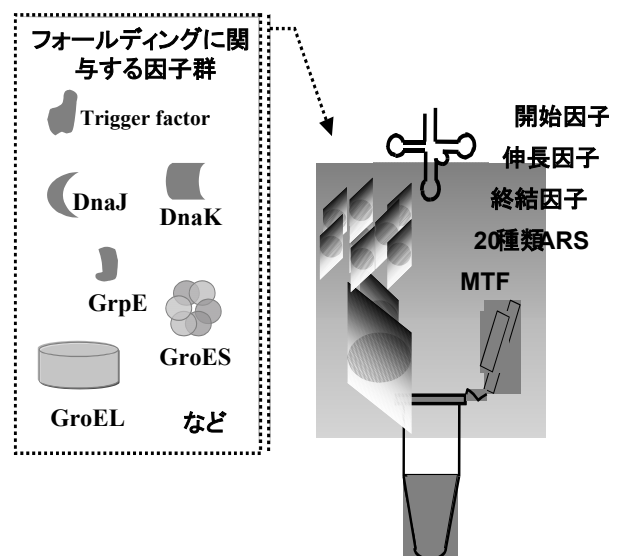


Fig. 2 PURE システムを用いた複雑合成系の再構築

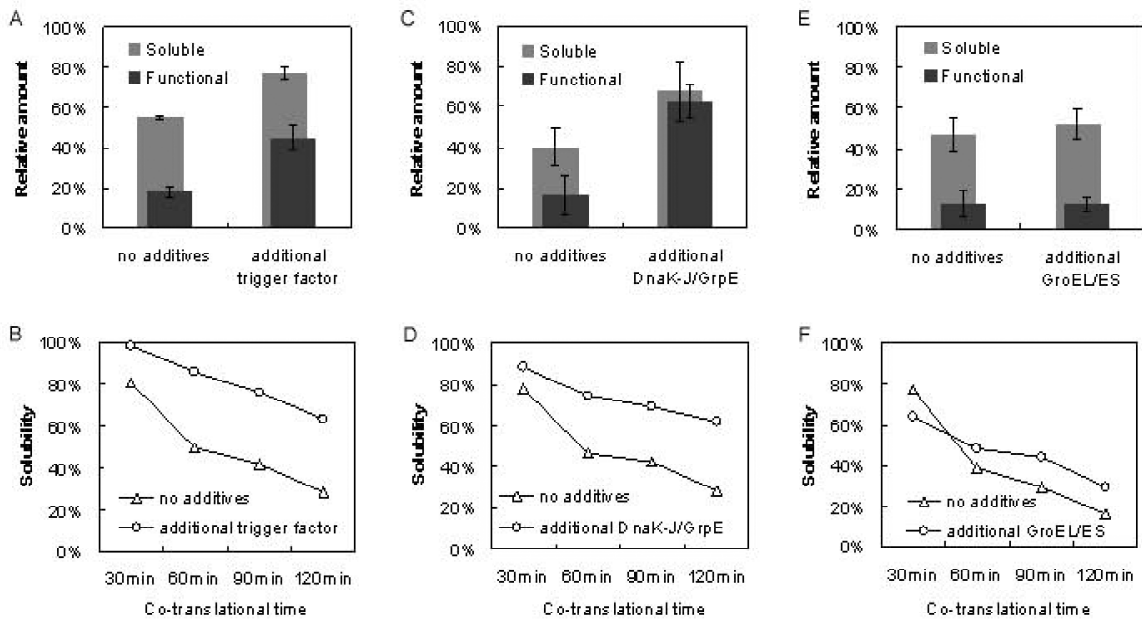


Fig. 3 シャペロンによる scFv 抗体のフォールディング

### 3. シャペロンによる蛋白質フォールディングメカニズムの解明

生体内の蛋白質の約 30%のフォールディングには、様々なシャペロンが必要と言われている。しかし、シャペロンがどの段階でそれらの役割を果たすのか実験的にまだ明確ではない。前述のように、再構築された複雑系としての PURE システムを利用し、まず、シャペロンに依存する基質蛋白質を検索した。大腸菌由来の蛋白質の遺伝子十数種類をゲノムからクローニングし、翻訳-フォールディング共役系を用いて、合成された蛋白質の可溶化率を検討したところ、大腸菌シャペロン (GroEL/ES) に特異的に依存してフォールディングする基質蛋白質 (stringent substrate) を見出した。それらの中から、酵素活性も測定可能な基質蛋白質-S-アデノシルメチオニンデカルボキシラーゼ (MetK) を選んで、GroEL/ES によるフォールディングプロセスの検証を試みた。これまでの定説では、GroEL は翻訳後に新生蛋白質と相互作用すると言われていた (Figure 4)。この相互作用は PURE システムを用いた実験だけでなく *in vivo* レベルでの実験でも同様な結果であった。以上の結果から、GroEL は、post-translational プロセスでフォールディングをとる従来定説とは異なり、co-translational にフォールディングを促進するという新たな仮説 (Figure 5) を提案した。この仮説を十分検証するために、現在、GroEL が蛋白質翻訳反応に及ぼす影響の検討と、GroEL の基質についてのゲノムワイドなスクリーニング実験を進めており、新たなシャペロンネットワークの解明を試みている。

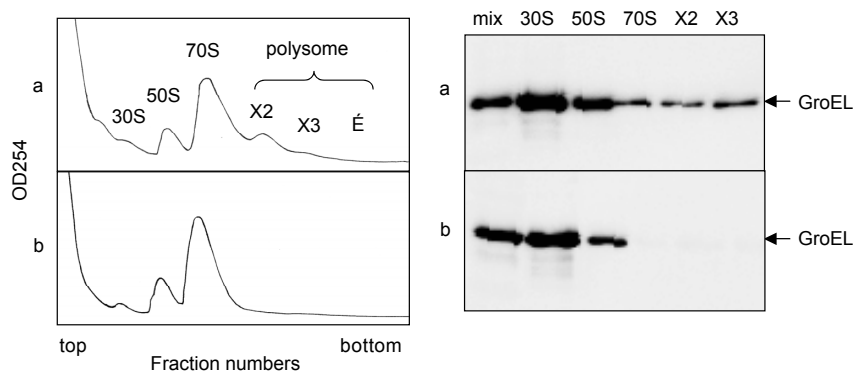


Fig. 4 Western Blot による翻訳複合体に GroEL の検出 (a, mRNA あり ; b, mRNA なし)

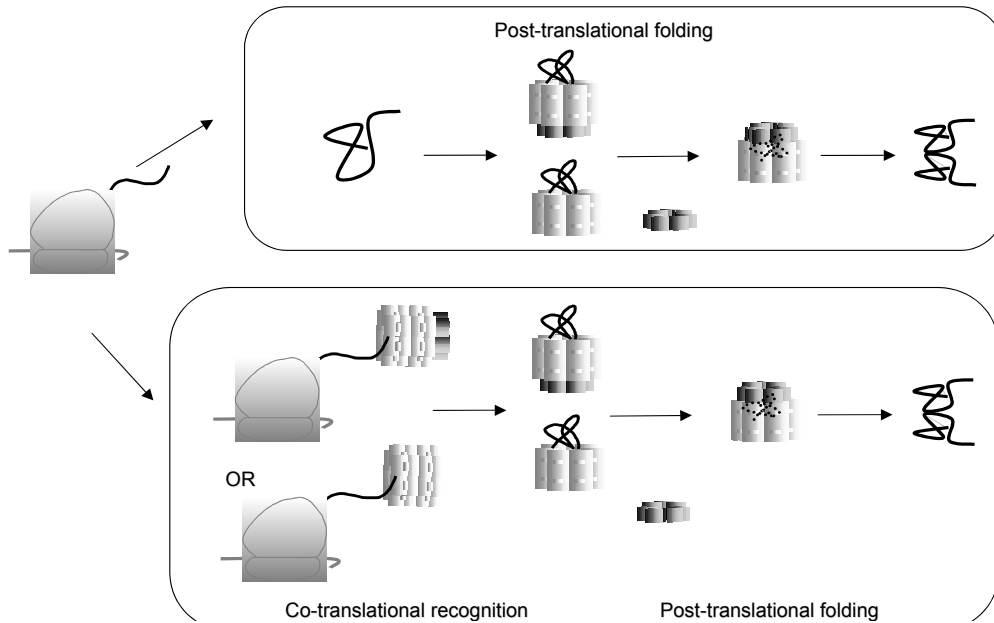


Fig. 5 GroEL/ES による基質蛋白質のフォールディングプロセスの仮説模式図

## 結論

以上、試験管内遺伝子発現系を活用し、機能をもった蛋白質の生合成、成熟、さらにはスクリーニング法などについて、生化学的な基礎及び応用の研究を行った。ポストゲノム時代においては、目的物質に特異的に相互作用する蛋白質を既存のゲノムライブラリーから探索することが重要である。私は、まず、PURE システムを用いた生体外スクリーニングシステムを確立し、抗原に対する高い結合能力を持つ配列を選択するための基礎を確立した。更に、ランダムなライブラリーより、生体外免疫システムの創製が可能となると期待できる。また、分子から再構築した翻訳系-PURE システムを用い、いままでの粗抽出液に基づく翻訳系の研究とはちがった、蛋白質の誕生と成熟の分子メカニズムのより厳密な解析が行えるようになった。細胞内では誕生したポリペプチドはさまざまな加工プロセス、輸送プロセスをへて、適切な場所であるべき姿で役割を果たす。この全容を再現すべく、PURE システムを基盤とした *in vitro* のアプローチで研究を進めたい。

## 発表論文

### 原著論文

B.W. Ying, H. Taguchi, M. Kondo & T. Ueda (Submitted) Co-translational involvement of the chaperonin GroEL in the folding of newly synthesized polypeptides.

B.W. Ying, H. Taguchi, H. Ueda & T. Ueda (2004) Chaperone-assisted folding of a single-chain antibody in a reconstituted translation system. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **320**, 1359-1364.

B.W. Ying, T. Suzuki, Y. Shimizu & T. Ueda (2003) A novel screening system for self-mRNA targeting proteins. *J. Biochem.* **133**, 485-491.

### 総説

B.W. Ying & T. Ueda (2004) 蛋白質合成系の完全再構成-蛋白質誕生から成熟までのピュアアプローチ 蛋白質 核酸 酵素 **49** (7) 834-837.