

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2006～2008

課題番号：18201040

研究課題名（和文） 翻訳と共役した無細胞蛋白質成熟システムの構築

研究課題名（英文） Reconstitution of cell-free protein maturation system coupled with translation system.

研究代表者 上田 卓也 (UEDA TAKUYA)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：80184927

研究成果の概要：蛋白質の成熟過程のメカニズム解明することを目標として、再構築した蛋白質合成系 PURE system によって大腸菌ゲノム上の全蛋白質(4132 個)の合成を行い、各蛋白質の凝集特性を遠心分離により可溶性を評価した。PURE system により合成可能また電気泳動可能であった 7 割についての評価したところ、凝集しやすさは二峰性を示すことが示された。分子量が小さい蛋白質、等電点が低い蛋白質は可溶性が高いことが示された。また、細胞質の凝集傾向のある蛋白質 792 個について、シャペロン存在下の PURE system で合成を行い、その可溶性の向上から、シャペロン依存性を評価した。以上の解析結果を e-Sol データベースとして公開した (<http://tp-esol.genes.nig.ac.jp/>)。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 18 年度	18,200,000	5,460,000	23,660,000
平成 19 年度	10,800,000	3,240,000	14,040,000
平成 20 年度	10,800,000	3,240,000	14,040,000
年度			
年度			
総計	39,800,000	11,940,000	51,740,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：2401

キーワード：無細胞蛋白質合成系、リボソーム、シャペロン、フォールディング、分泌蛋白質、膜蛋白質

1. 研究開始当初の背景

ポストゲノム時代において、蛋白質の研究の発展が最重要課題であることは言うまでもない。蛋白質の研究の進展がゲノム解析のように急速に進展しない理由は、蛋白質分子が機能や構造において多様であり、DNA のように画一的な方法論ではアプローチできない点にある。蛋白質の生産と精製的手段に

おいては、遺伝子組み換え技術により、飛躍的に向上がみられたものの、試行錯誤に依存しており、DNA のクローニングや塩基配列決定のようなルーティンワークにはなり得てはいない。特に、大量発現系における凝集の問題、構造の不均一さの問題といった発現系自体の持つ問題点については、理論的な解決のアプローチが乏しい。またポリペプチド

のリボソームでの合成後のフォールディングや翻訳後の修飾といった蛋白質の成熟プロセスについての知見が集積されていない。つまり、ポリペプチドの合成すなわち蛋白質であるという安易な考えは、蛋白質研究の進展を妨げている大きな要因と言える。この課題を解決する有効な実験的手段の1つが、試験管内で再構築した蛋白質の合成・成熟システムである。

2. 研究の目的

研究代表者は、大腸菌の蛋白質合成の関与する可溶性因子(開始因子、伸長因子、終止因子、アミノアシル tRNA 合成酵素)などを、大量に発現させ、数百 mg のオーダーで精製することに成功している。さらにリボソームなどについても高純度な標品を精製している。これらの因子から抽出液と遜色のない蛋白質合成活性を有する蛋白質合成系を再構築することに成功した。この新規の生体外蛋白質合成システムを、組み換え DNA 技術により大量発現された因子から再構成されたシステムであることから、PURE(Protein synthesizing system Using Recombinant Elements) system と名付けた。PURE system はポリペプチドを合成するのみであり、翻訳後の蛋白質の成熟過程に関与するシステムは全く含まれない。しかし、PURE system をベースとして、生産する蛋白質に対応した成熟プロセスを融合させることにより、目的蛋白質の機能発現を最強にするような生産システムを、テラーメイドで構築が可能である。このことは、高い生理活性を有する蛋白質を得られるということのみならず、蛋白質の成熟プロセスについての知見を得るためにも、有効なシステムとなることが期待される。

3. 研究の方法

蛋白質を合成する場合に遭遇する困難は、そのフォールディングの問題である。PURE system に、さまざまな分子シャペロンのサブシステムを共存させ、フォールディングの制御を行う。時に、凝集の抑制することはきわめて重要である。すでに、蛋白質の新生ペプチドに結合することが知られている DnaK 関連のシャペロンの共存システム構築に成功している。また、他の分子シャペロンをすでに精製しており、これらのシャペロンの組み合わせにより、より立体構造の均一な蛋白質の生産システムを確立する。大腸菌の全蛋白質遺伝子(ASKA library)を、PURE system で合成し、その蛋白質のシャペロン存在下での可溶性や活性発現の解析を進める。この解析を進め、各々のシャペロンの基質を同定し、大腸菌での蛋白質の生合成過程におけるシャペロンネットワークの全貌を

明らかにする。

有用な蛋白質の多くのものは、分泌蛋白質である。これらの蛋白質は分泌装置により膜を通過し、細胞内とは異なった酸化条件で折り畳まれる。従って、PURE systemこれらに膜関連要素を付加し、分泌蛋白質の蛋白質合成プロセスを再現することが理想的である。通常の細胞抽出液では、これらの分泌システムが損傷された状態で混入しているため、こうしたアプローチはきわめて困難である。すでに、分泌装置(Secマシーナリー)をもつ膜小胞を大腸菌より単離することに成功しており、PURE systemと組み合わせたシステムに構築し、いくつかの分泌蛋白質の膜透過と膜蛋白質の膜挿入に成功している。また、膜画分を尿素処理し、より精製された膜画分を用いても、同様の効率で膜へのターゲティングがおきることを見いだしている。分泌装置支援型PURE systemを発展させて、リボソームにSecYEGを組み込んだプロテオリボソームを作製し、このプロテオリボソームに、膜蛋白質を挿入可能なシステムを構築する。すでに、ATPaseのF₀部分の一部のサブユニットを、PURE systemでプロテオリボソーム上に活性を有する形で、挿入することに成功している。このSecYEGと蛋白質合成系の因子以外の蛋白質を含まない膜蛋白質合成系は、合成蛋白質の機能解析にきわめて有効であろう。大腸菌ゲノム上の約1000個の膜蛋白質を、リボソーム上での合成を行い、その膜への局在とその生理活性を評価する。

4. 研究成果

私たちは、翻訳過程に必須な因子のみ構成された試験管内遺伝子発現系 PURE system を再構築し、蛋白質の誕生プロセスを無細胞化した。このシステムの発展型として蛋白質成熟プロセスに関与する因子群を PURE system に共存させた複合型無細胞システムを開発し、蛋白質の成熟過程のメカニズムを本研究所の目標としている。

まず、PURE system によって大腸菌ゲノム上の全蛋白質(4132 個)の合成を行い、各蛋白質の凝集特性を遠心分離により可溶性を評価した(図1)。PURE system により合成可能また電気泳動可能であった7割についての評価したところ、凝集しやすさは二峰性を示すことが示された。分子量が小さい蛋白質、等電点が低い蛋白質は可溶性が高いことが示された。立体構造と凝集特性の相関を解析したところ、SCOP データベースの fold の階層で、相関が認められた。例えば、c94 という fold では8割以上が凝集するが、c47の fold では7割以上が可溶性であった(図2)。また、細胞質の凝集傾向のある蛋白質792個について、シャペロン存在下の PURE system

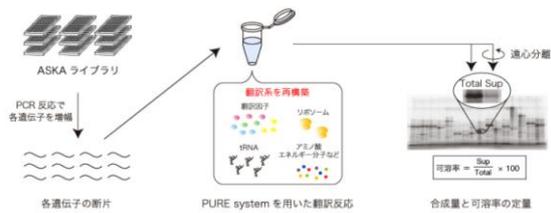


図1 大腸菌の全蛋白質の凝集特性の解析手順

で合成を行い、その可溶性の向上から、シャペロン依存性を評価した。Trigger factor は単独での凝集抑制効果は低いこと、GroEL/ES は分子量 20-50kDa に対して効果があること、DnaK/DnaJ/GrpE では高分子のものに効果があることが示された。また塩基性蛋白質には、DnaK/DnaJ/GrpE が効果のあることが示された。この結果は、ポリペプチド固有の特性を初めてゲノムワイドに明らかにしたものである。また以上の解析結果を e-Sol データベース (<http://tp-esol.genes.nig.ac.jp/>) として公開した。

PURE system にリボソームを付加因子として加えることによって、活性を持った膜タンパク質をリボソーム膜上に合成することに成功した。具体的には 5 回膜貫通型蛋白質であるグリセロールアシルトランスフェラーゼ(GPAT)と、内膜にアンカリングしているペリプラズム蛋白質(LPAAT)、さらに FoF1 の Fo 部分を構成する c サブユニットと a サブユニットについて成功している。特に c サブユニットについては、プライベートシャペロンとして UncI がその構造形成に必要であることが示された。

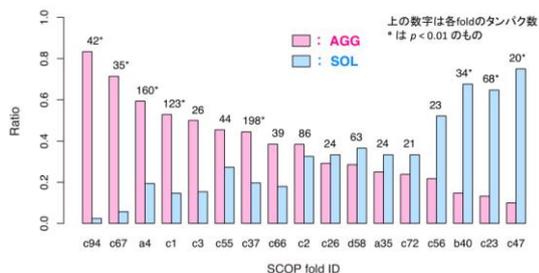


図2 凝集特性とSCOPの構造データベースとの相関。(AGGは凝集性の高いグループ、SOLは可溶性の高いグループ)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

- ①. Tsuboi, M., Morita, H., Nozaki, Y., Akama, K., Ueda, T., Ito, K., Nierhaus, K.H., and Takeuchi, N. (2009). EF-G2mt is an exclusive recycling factor in mammalian mitochondrial protein synthesis. *Mol Cell* **35**, 502-510.
- ②. Takahashi, S., Iida, M., Furusawa, H., Shimizu, Y., Ueda, T., and Okahata, Y. (2009). Real-time monitoring of cell-free translation on a quartz-crystal microbalance. *Journal of the American Chemical Society* **131**, 9326-9332.
- ③. Niwa, T., Ying, B.W., Saito, K., Jin, W., Takada, S., Ueda, T., and Taguchi, H. (2009). Bimodal protein solubility distribution revealed by an aggregation analysis of the entire ensemble of Escherichia coli proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 4201-4206.
- ④. Holzapfel, E., Moser, M., Schiltz, E., Ueda, T., Betton, J.M., and Muller, M. (2009). Twin-arginine-dependent translocation of SufI in the absence of cytosolic helper proteins. *Biochemistry* **48**, 5096-5105.
- ⑤. Kuruma, Y., Stano, P., Ueda, T., and Luisi, P.L. (2009). A synthetic biology approach to the construction of membrane proteins in semi-synthetic minimal cells. *Biochim Biophys Acta* **1788**, 567-574.
- ⑥. Osada, E., Shimizu, Y., Akbar, B.K., Kanamori, T., and Ueda, T. (2009). Epitope mapping using ribosome display in a reconstituted cell-free protein synthesis system. *J Biochem* **145**, 693-700.
- ⑦. Takemoto, C., Spremulli, L.L., Benkowski, L.A., Ueda, T., Yokogawa, T., and Watanabe, K. (2009). Unconventional decoding of the AUA codon as methionine by mitochondrial tRNAMet with the anticodon f⁵CAU as revealed with a mitochondrial in vitro translation system. *Nucleic Acids Res* **37**, 1616-1627.
- ⑧. Yamashita, R., Suzuki, Y., Takeuchi, N., Wakaguri, H., Ueda, T., Sugano, S. and Nakai, K. (2008) Comprehensive detection of human terminal oligo-pyrimidine (TOP) genes and analysis of their characteristics.

Nucleic Acids Res.

- ⑨. Uemura, S., Iizuka, R., Ueno, T., Shimizu, Y., Taguchi, H., Ueda, T., Puglisi, J.D. and Funatsu, T. (2008) Single-molecule imaging of full protein synthesis by immobilized ribosomes. *Nucleic Acids Res.*
- ⑩. Takahashi, S., Akita, R., Matsuno, H., Furusawa, H., Shimizu, Y., Ueda, T. and Okahata, Y. (2008) 70 S ribosomes bind to Shine-Dalgarno sequences without required dissociations. *ChemBiochem*, **9**, 870-873.
- ⑪. Ozaki, Y., Suzuki, T., Kuruma, Y., Ueda, T. and Yoshida, M. (2008) Unc1 protein can mediate ring-assembly of c-subunits of FoF1-ATP synthase in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, **367**, 663-666.
- ⑫. Nozaki, Y., Matsunaga, N., Ishizawa, T., Ueda, T. and Takeuchi, N. (2008) HMRF1L is a human mitochondrial translation release factor involved in the decoding of the termination codons UAA and UAG. *Genes Cells*, **13**, 429-438.
- ⑬. Nagaike, T., Suzuki, T. and Ueda, T. (2008) Polyadenylation in mammalian mitochondria: Insights from recent studies. *Biochim Biophys Acta*, **1779**, 266-269.
- ⑭. Ishizawa, T., Nozaki, Y., Ueda, T. and Takeuchi, N. (2008) The human mitochondrial translation release factor HMRF1L is methylated in the GGQ motif by the methyltransferase HMPmC. *Biochem Biophys Res Commun*.
- ⑮. Ying, B.-W., Shimizu, Y. and Ueda, T. (2007) The PURE System: A Minimal Cell-Free Translation System. In Kudlick, W., Katzen, F. and Bennett, R. (eds.), *Cell-Free Protein Expression*. Landes Bioscience, pp. 76-83.

[学会発表] (計 17 件)

- ①. Yutetsu Kuruma, Pasquale Stano, Takuya Ueda, Pier Luigi Luisi 「Cell-free を使った膜タンパク質のリボソーム内合成」第 3 回無細胞生命科学研究会、弘前大学創立 50 周年記念会館、2009/03/16
- ②. 田丸大知、清水義宏、上田卓也 「無細胞蛋白質合成系における 30S リボソームサブユニットの再構成」第 3 回無細胞生命科学研究会弘前大学 創立 50 周年

記念会館みちのくホール 2009/03/16

- ③. Yutetsu Kuruma, Pasquale Stano, Takuya Ueda, Pier Luigi Luisi "Cell-free Expression of Phospholipid-Synthesizing Membrane Proteins in the Interior of Liposomes —リン脂質の生合成過程に関わる膜蛋白質のリボソーム内合成” 日本生物物理学会第 46 回年会福岡国際会議、2008/12/03
- ④. 車兪徹、Pasquale Stano、上田卓也、Pier Luigi Luisi 「自己複製可能な人工細胞の構築 - Construction of Self-Reproducible Synthetic Cell」 「細胞を創る」研究会 1.0 大阪大学吹田キャンパス 2008/10/16
- ⑤. 田丸大知、清水義宏、上田卓也 「無細胞蛋白質合成系における 30S リボソームサブユニットの再構成」 「細胞を創る」研究会 1.0 大阪大学吹田キャンパス 銀杏会館 2008/10/16
- ⑥. Yutetsu Kuruma, Pasquale Stano, Takuya Ueda, Pier Luigi Luisi " Construction of Self-Reproducible Synthetic Cell" SYNTHETIC BIOLOGY 4.0, Hong Kong University of Science & Technology, 2008/10/10
- ⑦. Daichi Tamaru, Yoshihiro Shimizu, Takuya Ueda " Reconstruction of functional E.coli 30S ribosomal subunits in a cell-free system. " The Fourth International Meeting on Synthetic Biology, Hong Kong University of Science and Technology, 2008/10/10
- ⑧. 田丸大知、清水義宏、上田卓也 「無細胞蛋白質合成系における 30S リボソームサブユニットの再構成」第 5 回 21 世紀大腸菌研究会、静岡国民年金健康センター 「藤枝エミナース」 2008/07/28
- ⑨. 田丸大知、清水義宏、上田卓也 「無細胞蛋白質合成系における 30S リボソームサブユニットの再構成無細胞蛋白質合成系における 30S リボソームサブユニットの再構成」第 10 回日本 RNA 学会年会、札幌市・札幌コンベンションセンター、2008/07/23
- ⑩. 丹羽達也、斎藤克代、イン・ベイウエン、金文珍、高田彰二、上田卓也、田口英樹 「PURE system を用いた大腸菌全蛋白質」第 8 回日本蛋白質科学会年会、タワーホール船堀 (東京) 2008/06/11
- ⑪. Yutetsu Kuruma, Pasquale Stano, Takuya Ueda, Pier Luigi Luisi 「自己複製可能な人工細胞の構築 - Construction of Self-reproducible

- Minimal Cell」第8回蛋白質科学会年会、
タワーホール船堀（東京）2008/06/10
- ⑫. 阿部真人, 金森崇, 車兪徹, 西山賢一,
清水義宏, 上田卓也 「PURE system に
よる膜タンパク質の合成」日本分子生物
学会、横浜、2007/12/14
 - ⑬. 福島伸也, 清水義宏, 大野敏, 横川隆
志, 西川一八, 上田卓也 「PURE system
における tRNA 成分の再構成」日本分子
生物学会、横浜、2007/12/14
 - ⑭. 阿部真人, 金森崇, 車兪徹, 西山賢一,
清水義宏, 上田卓也 「PURE system に
よる膜タンパク質の合成」日本分子生物
学会、横浜、2007/12/13
 - ⑮. 福島伸也, 清水義宏, 大野敏, 横川隆
志, 西川一八, 上田卓也 「PURE system
における tRNA 成分の再構成」日本分子
生物学会、横浜、2007/12/13
 - ⑯. 上田卓也 「生命への constructive
approach」日本分子生物学会、横浜、
2007/12/12
 - ⑰. 上田卓也 「蛋白質研究のために何をなす
べきか」タンパク質生産・精製技術最
前線セミナー～高品質タンパク質生産
と精製システムの開発を目指して～横
浜ランドマークタワー、2007/12/10

[その他]

データベース

<http://tp-esol.genes.nig.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 卓也 (UEDA TAKUYA)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教
授

研究者番号：80184927

(2) 研究分担者

清水 義宏 (SHIMIZU YOSHIHIRO)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・助
教

研究者番号：90401231

(3) 連携研究者

なし