

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15809

研究課題名(和文) 外来塩基配列による翻訳促進効果を利用した大腸菌タンパク質発現系の革新と原理の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of translation enhancement in Escherichia coli by exogenous nucleotide sequences

研究代表者

近藤 興 (Kondo, Tomo)

東京大学・大学院総合文化研究科・助教

研究者番号：50728293

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、研究代表者らが先に見出した「外来の塩基配列によって翻訳が促進される現象(TED)」のメカニズムの解明に取り組んだ。まず、TEDの影響下にある遺伝子の転写産物の量に着目し、レポーター遺伝子のmRNA量を調べた。その結果、対照と比べて数倍程度多かった。さらに、試験管内においてTEDの再現を得る方法の検討を行った。その結果、大腸菌由来リボソームなどの精製した分子群を用いることでその再現に成功した。この時、反応に対照と同量のmRNAを用いた場合でもTEDが観察できた。細胞内でのTEDのメカニズムとして、分解抑制によるmRNAの量的変化、リボソームによる翻訳の開始促進があると考えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸菌を用いた異種タンパク質の生産は、基礎研究のみならず産業レベルでも基盤的な技術である。我々が見出したTEDと今回明らかにしたそのメカニズムは、これまで生産技術改良が頭打ちになっていたところに、増産に向けた開発の新しい端緒と視点を与えるものである。基礎研究でも簡単に導入可能である。

研究成果の概要(英文)：In this study, I sought to elucidate the mechanism of the phenomenon of translation enhancement by foreign nucleotide sequences in E. coli, which was discovered earlier by us. First, I focused on the amount of transcripts of genes under the influence of TED, and examined the amount of mRNA of reporter genes. I found that the amount of mRNA of the reporter gene was several times higher than that of the control. Furthermore, I investigated a method to reproduce TED in vitro and succeeded in reproducing TED by using purified molecules such as ribosomes from E. coli. Importantly, TED was observed even when the same amount of mRNA as the control was used in the reaction. Taken together, I hypothesized that the mechanisms of TED in cells include 1) quantitative change of mRNA by suppression of its degradation, and 2) acceleration of translation initiation by ribosomes.

研究分野：細胞生物学

キーワード：大腸菌 物質生産 翻訳促進

1. 研究開始当初の背景

本研究では、研究代表者らが本研究開始以前に見出した「大腸菌のタンパク質翻訳が外来の塩基配列によって促進される現象 (TED)」を基にしたタンパク質生産力の強化に関する技術開発に向けたメカニズムの解明に取り組むことにした。TED は、Shine-Dalgarno 配列の上流に特定の塩基配列 (特に細胞性粘菌に由来する遺伝子配列) を挿入することで、その下流にある遺伝子の翻訳量を増大させる方法である。しかし、なぜタンパク質発現が上昇するのか不明で、効率的な改良などが難しいのが現状であった。

2. 研究の目的

TED が起きる時、細胞 (大腸菌) の中でどういうことが起きて、結果的にタンパク質発現が増大するか知ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) mRNA 量の変化について

リアルタイム PCR を用いて TED を起こす細胞と起こさない細胞の間で、レポーター遺伝子の転写産物の量に差があるか検討した。

(2) in vitro タンパク質発現系を用いた TED の観察

TED に必要な要素を明確にするために、精製タンパク質を用いた in vitro タンパク質発現系によって TED が起きるか検討した。

(3) 既存配列の変更による TED 効果への影響

既に TED を起こすことが明らかな配列を PCR を用いた点変異導入によって、改良を試みた。

4. 研究成果

(1) mRNA 量の変化について

TED が起きる既知の配列として mlcR25 (Kondo & Yumura, Appl Microbiol Biotechnol., 2019) を用いた。mlcR25 と ribosome binding site (RBS), その下流にレポーター遺伝子として EGFP (緑色蛍光タンパク質) を挿入した pUC19 ベクターを作成し大腸菌 HST08 に形質転換した (TED(+))。ネガティブコントロールとして mlcR25 のみが挿入されていないベクターを用いた (TED(-))。通常の生育条件下 (37°C) で培養したのち、標準的な方法で mRNA を精製し逆転写を行い、cDNA を作成した。それらの cDNA を鋳型として、リアルタイム PCR を行った。この時の CysG 遺伝子 (Zhou et al., BMC Mol Biol., 2011) を用いて標準化し比較定量を行うこととした。その結果、TED が起きている方がレポーター遺伝子の mRNA 量が平均 3.8 倍程度増加していることが明らかになった (図 1)。転写は lac プロモーターによって基底レベルでどちらも同等程度に起こっていることから、両者の違いは翻訳の影響が関係していると考えられる。

(2) in vitro タンパク質発現系を用いた TED の観察

(1)の結果は、TED(+)条件では mRNA が増えていることで翻訳量が増大していることが考えられたが、翻訳レベルでの mlcR25 配列の影響は不明であった。そこで、大腸菌の in vitro 翻訳系を用いてその効果が調べた。T7 プロモーターの下流に(1)で用いた 2 種類の配列を挿入し、発現ベクターを作成した。このプラスミド DNA を高純度に精製し、まず in vitro タンパク質発現系に添加した。その結果、in vitro でも平均 3.8 倍に増加することがわかった (図 2)。この事実は、TED を起こすには、既知の基本的な転写及び翻訳因子で十分であることを示す発見である。その後、これらのベクターを鋳型に mRNA を合成し精製し、同様に等量の mRNA を使って、翻訳促進効果を検討した。その結果、約 3 倍の翻訳促進が見られた。このことから mlcR25 配列はリボソームが関わる翻訳に正の効果をもたらしていることが明らかになった。

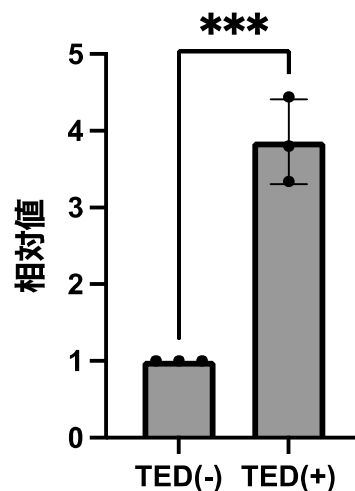


図 1. mRNA 量の比較

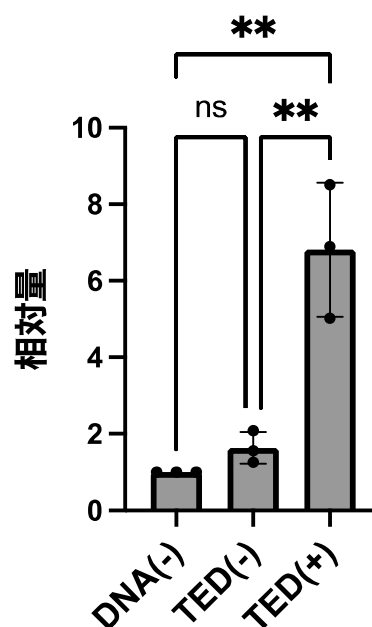


図 2. in vitro での翻訳量

(3) 既存配列の変更による TED 効果への影響

mIcR25 配列を基に, PCR を用いた点変異導入によって, 翻訳促進効果の改良を試みた。先行研究では, この領域の二次構造がその効果を考える上で重要であることが予想されていたため, 上記の点変異ごとに RNA 二次構造の自由エネルギーを先行研究に基づいて計算した(図3)。その結果, 変異なしでは-2.8 kcal だったものが, 1塩基ずつ変更したパターンでは, -10 から 5 kcal の間に分散した。しかし, これらのプラスミドを導入した大腸菌では翻訳促進は依然として高く明らかな変化は認められなかった。これは, 従来考えとは異なり, 単純な自由エネルギーでは説明できない状態が(1)と(2)の結果を生んでいることが考えられた。

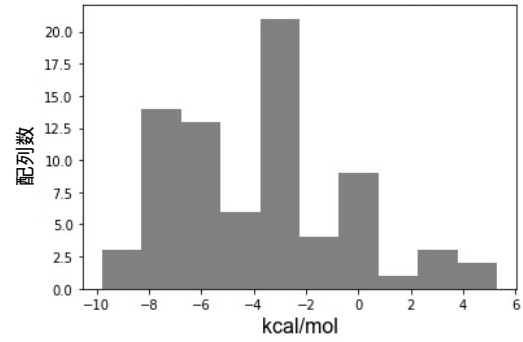


図3. 点変異導入後の自由エネルギー

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kondo Tomo, Yumura Shigehiko	4. 巻 104
2. 論文標題 Strategies for enhancing gene expression in Escherichia coli	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Microbiology and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 3825 ~ 3834
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00253-020-10430-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kondo Tomo, Yumura Shigehiko	4. 巻 68
2. 論文標題 An improved molecular tool for screening bacterial colonies using GFP expression enhanced by a Dictyostelium sequence	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BioTechniques	6. 最初と最後の頁 91 ~ 95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2144/btn-2019-0127	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 近藤興
2. 発表標題 外来塩基配列による翻訳促進効果を利用した大腸菌タンパク質発現系の改良
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------