

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 14 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22750147

研究課題名（和文） 翻訳中に変化するタンパク質粘弾性のリアルタイム測定

研究課題名（英文） Real-time monitoring of variable viscoelasticity of proteins during translation reaction

研究代表者

高橋 俊太郎（TAKAHASHI SHUNTARO）

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・特任助教

研究者番号：40456257

研究成果の概要（和文）：

ナノグラムレベルの質量変化を測定できる水晶発振子を用いてタンパク質合成の速度を求める手法を確立した。これはストレプトアビジン結合性ペプチドの上流に興味あるタンパク質を融合し、翻訳反応を観察する事で可能にした。これより、翻訳速度はコード領域において mRNA 配列だけでなく翻訳されるタンパク質にも影響することが示唆された。翻訳途中のタンパク質の粘弾性と翻訳速度を同時測定することで、タンパク質の物性が翻訳反応に与える影響の理解が期待される。

研究成果の概要（英文）：

We used a quartz crystal microbalance technique to monitor the rate of mRNA translation in real time. This method permitted us to evaluate the translation of proteins of interest fused upstream of a streptavidin-binding peptide fusion protein. The results indicated that the rate of translation can be regulated by not only the sequence of mRNA, but also the protein translated. We will be able to understand how the property of the protein translated affects the reaction of translation by evaluating the viscoelasticity of the protein during translation together with monitoring the rate of translation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,300,000 円	690,000 円	2,990,000 円
2011 年度	900,000 円	270,000 円	1,170,000 円
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000 円	960,000 円	4,160,000 円

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：翻訳・リボソーム・フォールディング・水晶発振子・リアルタイムモニタリング・粘弾性

載された遺伝暗号を翻訳し、アミノ酸を重合することで合成される。合成されるタンパク質の合成速度とフォールディングは重要であると近年多数報告があるが、技術的にタンパク質合成と物性を同時に評価することは困難であった。

以前より申請者はタンパク質生合成の解析にナノグラムレベルの微量天秤である水晶発振子マイクロバランス(QCM)法を用いており、最近、RI等のラベルを使うことなくリアルタイムにタンパク質生合成のシングルターンオーバーを観察できる手法を初めて開発した。その一方でQCMは基板上の分子を直接振動させることのできるデバイスであり、物質の固さ・柔らかさ(粘弾性)という力学的物性情報も得ることが可能である。このことから、タンパク質の構造変化測定に用いられている。タンパク質の粘弾性はフォールディングの定量評価として記述することのできるパラメータである。そこで、リアルタイムでタンパク質合成を観察しながら、新生タンパク質の粘弾性を測定できれば、合成速度と構造多型の関係を明らかにすることができるのではと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、翻訳途中のタンパク質の物性変化をリアルタイムに観察することを目的としている。生体内で翻訳速度を決定する要因の一つは遺伝暗号であるコドンの偏りである。生体内であまり使われていないレアコドンがあると、対応するアミノ酸を供給するtRNAが少ないため、翻訳が遅くなる。クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ3(CAT3)は分子内にレアコドンを複数含む領域を持ち、この領域が翻訳を遅くすることで、CAT3のフォールディングを助けているという報告がある。本研究ではCAT3をQCMセル内で合成し、その過程における新生ペプチドの粘弾性評価をリアルタイムに追跡する手法の開発を行う。CAT3の合成が進むと質量が増加するためにセンサーの振動数が減少し、またフォールディングが進むと、三次構造を取り“固く”なるためエネルギー散逸が小さくなると期待できる。レアコドンの数やtRNAの濃度を増減させたり、あるいは翻訳を途中で停止させたりすることで翻訳速度を人為的に変え、その際の合成中

のCAT3の物性変化を比較し、翻訳速度とフォールディングの相関性を調べる。

3. 研究の方法

(1) 各種 tRNA の調製

翻訳速度を人為的に調節するために、大腸菌を用いた tRNA 過剰発現株を確立し、各種 tRNA の合成および精製を行った。

(2) 翻訳速度の評価

翻訳する mRNA として、ストレプトアビジン結合性タグ(SBP)のコード配列を興味あるタンパク質コード配列のC末端側に融合したものを設計した。水晶発振子の基板にストレプトアビジンを固定し、再構成型部細胞タンパク質合成系でセル内を満たした後に mRNA を添加して翻訳を開始させた。翻訳中のリボソームが合成されたタグを介してストレプトアビジンに結合することによる振動数減少を経時観察し、その変化開始時間から翻訳速度を導出した。

(3) 合成中のタンパク質の粘弾性評価

水晶発振子にネットワークアナライザーを接続し、翻訳反応によって生じる各種合成タンパク質と基板間でのエネルギー散逸を評価した。

4. 研究成果

実験のモデルとして T7-tag 配列を用い、SBP の前にコードする T7tag の個数を変化させることにより、翻訳される mRNA 長が変わり、SBP がリボソームから合成されるタイミングが変わるため、振動数変化が始まる時間は各 mRNA によって異なった。そのタイムラグを合成されるポリペプチド鎖長に対してプロットすると、良い直線性を示し、翻訳速度を求めることができた。また調製した各 tRNA を添加して翻訳を行うことで、レアコドンや内部 Shine-Dalgarno 配列による翻訳速度に与える影響を評価することができた。様々なタンパク質をコードする配列についても同様に、各翻訳速度を評価したところ、

いずれも T7-tag とは異なる速度を示した。tRNA 添加実験によりコドンの効果をキャンセルしても一致しなかったことから、各遺伝子はコドンの他にも mRNA の二次構造、リボソームと相互作用するある特定の配列の効果によって翻訳速度が決定されていることが示唆された。翻訳されたタンパク質の効果も一つの要因と考えられるため、翻訳されたタンパク質の物性と相関付ける必要がある。そのために、現在、特別な立体構造をとらないタンパク質や ヘリックス含量が異なるタンパク質をコードする mRNA の翻訳に関して粘弾性と翻訳速度に対する関連性について評価を行っている。

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 3 件)

(1) S. Takahashi, K. Tsuji, T. Ueda, and Y. Okahata
Traveling time of a translating ribosome along mRNA monitored directly on a quartz crystal microbalance
J. Am. Chem. Soc., *in press*.
査読有り

(2) S. Takahashi, K. Hisanaga, A. Yoshida, and Y. Okahata
Real-time monitoring of a step-wise transcription reaction on a quartz-crystal microbalance
Anal. Biochem., **421**, 732-741 (2012).
査読有り

(3) 岡畑恵雄、古澤宏幸、高橋俊太郎
生体反応追跡ツールとしての QCM ふ・んせき、日本分析化学会、第一号、13-20 (2011).

査読有り

[学会発表](計 9 件)

(1) 高橋俊太郎、日下部峻斗、岡畑恵雄、翻訳反応観察(1) 終結過程の動力学解析、第 92 回日本化学会春季年会、2012.3.27、慶応大学

(2) 高橋俊太郎、翻訳制御機構の理解を目指した無細胞タンパク質合成のリアルタイム測定、若手研究会「新規材料創成を目指した合成生物学」、2012.1.27、理化学研究所

(3) 高橋俊太郎、日下部峻斗、辻健太郎、岡畑恵雄、mRNA 配列情報で制御されたタンパク質合成のシングルターンオーバー解析、第 5 回バイオ関連シンポジウム、2011.9.13、筑波大学

(4) 高橋俊太郎、セントラルドグマの解明を目指した水晶発振子による研究展開、関東高分子若手研究会サマーキャンプ、2011.8.5、千葉県館山市

(5) 高橋俊太郎、岡畑恵雄、QCM を用いた mRNA 配列依存的なタンパク質合成レベルの解析法、第 21 回バイオ・高分子シンポジウム、2011.7.25、関西大学

(6) Shuntaro Takahashi, Takato Kusakabe, Takuya Ueda, Yoshio Okahata, Real-time monitoring of cell-free translation process using a quartz-crystal microbalance、RNA 2011、2011.6.18、京都国際会議場

(7) 高橋俊太郎、タンパク質合成を重さで量る、FIBER Forum 2010、2010.12.25、甲南大学

(8) Shuntaro Takahashi、Real-time monitoring of a protein biosynthesis using

a quartz-crystal microbalance、William
Mong Nano Seminar Series、2010.8.9、香港
科学技術大学

(9) 高橋俊太郎、岡畑恵雄、水晶発振子を用
いた翻訳反応のシングルターンオーバー解
析、第20回バイオ・高分子シンポジウム、
2010.7.29、東京大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 俊太郎 (TAKAHASHI SHUNTARO)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・
特任助教
研究者番号：40456257

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：