

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26640134

研究課題名(和文) リボソームプロファイリングを用いた無細胞タンパク質合成システムの解析

研究課題名(英文) State analyses of a cell-free protein synthesis system using ribosome profiling

研究代表者

清水 義宏 (Shimizu, Yoshihiro)

国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・ユニットリーダー

研究者番号：90401231

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：再構成型無細胞タンパク質合成システムであるPURE systemにおいて、mRNA配列の変化に対してPURE systemの内部状態がどのように変化するかを、ディープシーケンシングを利用して解析する技術の確立を目指した。開始コドン下流12塩基をランダム化させたmRNAを調製し、これをPURE system中において翻訳させ開始複合体または伸長複合体を取得することにより、リボソームと相互作用したmRNA配列のみを特異的に抽出し、配列解析を行うことによって、mRNA配列の影響を定量的に評価することが可能となった。

研究成果の概要(英文)：We aimed to establish a technique to analyze how the internal state of the PURE system, a reconstituted cell-free protein synthesis system, changes according to the changes in mRNA sequence by using deep sequencing. By preparing an mRNA where 12 bases downstream of the start codon are randomized and translating it in the PURE system to obtain an initiation complex or elongation complex, only the mRNA sequence interacting with the ribosome is specifically extracted. It became possible to quantitatively evaluate the influence of mRNA sequence by performing deep sequence analysis.

研究分野：生化学

キーワード：無細胞タンパク質合成 リボソーム mRNA 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

次世代型シーケンサーの開発など、近年のシーケンシング技術の発展にともない、これを利用した細胞状態の定量的な評価を通じた生命動態解析を行う様々なアプリケーションが提示されている。外部環境の変化に応じた細胞内における mRNA の発現状態変化の定量的な観測や、またそれを 1 細胞レベルで行うことによる個々の細胞内の相違の理解などに基づいた生命システムの理解への道筋が整備されつつある。中でも、UCSF の Weissman らによって精力的に進められているリボソームプロファイリングという手法 (Ingolia, N. T. *et al.*, *Science*, **324**, 218-223, 2009) は、特定の状態における細胞がその瞬間に翻訳している mRNA の配列をディープシーケンシングによって解析する手法であり、細胞内の翻訳状態をコドンレベルで解析することが可能である。そこで、本研究では、このリボソームプロファイリング法に基づく手法を研究代表者が構築した、タンパク質合成に関わる個々の因子のみからなる再構成型無細胞タンパク質合成システムである PURE system (Shimizu, Y. *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, **19**, 751-755, 2001) の解析に応用した。PURE system において使用する mRNA 配列の変化に対して、リボソームに結合する mRNA の配列情報をディープシーケンシングにより解析することによって、初期条件に対する PURE system の内部状態の解析技術の確立を目指した。

これまでにディープシーケンシングを試験管内の再構成システムに応用した例はなく、本研究による解析技術が確立されれば、再構成された細胞内サブシステムの内部構造の観察を通じた生命システムの定量的理解に向けた有効なアプローチを確立することが可能であると考えられた。さらに、システムの内部構造の理解を通じた生命システムの包括的な理解に向けた研究戦略のモデルケースとするべく、研究開発を行った。

2. 研究の目的

大腸菌タンパク質合成システムにおいては、開始コドン上流の SD (Shine-Dalgarno) 配列がリボソーム anti-SD 配列と相補鎖を形成することにより、開始複合体の形成が促進されることが知られている。一方、mRNA は開始コドンの下流 15 塩基程度および開始コドンの上流 25 塩基程度がリボソームと相互作用することが知られている。上流配列については、SD 配列上流にファージ由来のイプシロン配列が存在するとタンパク質合成が促進されることが (Olins, P. O. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **264**, 16973-16976, 1989) 下流配列については、ゲノム解析からアデノシンが豊富な配列になるようなバイアスがかかっていることが知られている (Sato, T. *et al.*, *J.*

Biochem., **129**, 851-860, 2001)。また、大橋らは開始コドン下流 12 塩基について様々な配列を導入した GFP 遺伝子をコードするプラスミドを 137 種類用意し、細胞内での GFP 蛍光を測定することにより、開始コドン下流配列の GFP 発現量への影響に関するモデル化を行っている (Ohashi *et al.*, *Gene*, **347**, 11-19, 2005)。

本研究では、翻訳開始複合体形成過程における mRNA 配列の影響を、より多様な配列から定量的に評価するために、開始コドン下流 12 塩基をランダム化させた mRNA を調製し、これを PURE system 中における開始複合体形成反応において利用した。リボソームと相互作用した mRNA 配列のみを特異的に抽出し、ディープシーケンスを行い、それぞれの配列の濃縮度または希釈度から mRNA 配列の影響の解析を行った。

3. 研究の方法

図 1 に示す、開始コドン下流 12 塩基をランダム化した鑄型 DNA またはそれらから転写させた mRNA を調製し、以下に示す (1) ~ (3) の条件においてリボソームと相互作用した mRNA を逆転写 PCR によって回収し、これを次世代シーケンサー MiSeq または HiSeq (イルミナ社) によって配列解析を行った。

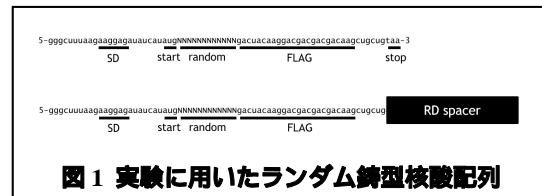


図 1 実験に用いたランダム鑄型核酸配列

(1) 三種類の開始因子 (IF1、IF2、IF3)、フォルミルメチオニル化した開始 tRNA、リボソームおよびランダム mRNA (図 1 上部) の存在下において開始複合体を形成させ、超遠心によってリボソームを沈殿させ、沈殿物からリボソームに結合した mRNA を回収した。

(2) 三種類の開始因子に加え、三種類の伸長因子 (EF-G、EF-Tu、EF-Ts) およびアミノシル tRNA 合成酵素や tRNA 混合物、20 種類のアミノ酸などを加え、終結因子が存在せず、翻訳終結が起こらない条件において、ランダム mRNA (図 1 下部) を反応液に加えた。FLAG エピトープ配列が翻訳される形で mRNA およびペプチジル tRNA がリボソームに結合した状態で翻訳伸長複合体を形成させ、FLAG エピトープおよびそれに結合する FLAG 抗体との相互作用によるアフィニティ精製を行い、mRNA を回収した。図 1 の RD spacer は無細胞タンパク質合成システムを用いた進化分子工学において利用されるリボソームディスプレイ法において翻訳伸長複合体を効率よく形成することのできる配列であり、本研究に応用している。

(3) (2)と同様の条件であるが、鋳型核酸には DNA を利用し、反応液中で転写と翻訳が共役する系を用いて同様に mRNA の回収を行った。

4. 研究成果

研究の方法 (1) により取得した配列を用い、開始複合体の形成過程に着目した解析を行った。超遠心時に投入する塩濃度を高くすることによって mRNA のリボソームへの非特異吸着を抑え、開始複合体形成依存的にリボソームに結合した mRNA を効率よく取得可能であることがわかった。開始複合体形成させていない元々の配列および開始複合体形成された配列に対して、それぞれ約 100 万リードずつ複数回解析を行い、データを取得した。

RNAfold (<https://www.tbi.univie.ac.at/RNA/>) を用い、得られた個々の配列が二次構造を形成した際の自由エネルギー変化を計算したところ、元の配列よりも開始複合体から得られた配列の方が、自由エネルギー変化が低いという結果が得られ、自身で二次構造を取りにくい mRNA が優先的に開始複合体を形成することがわかった。また、ランダム化した領域の配列と上流の配列または下流の配列に分断した上で RNAfold を用い、再計算したところ、上流の配列とランダム化した領域の配列を含む配列の自由エネルギー変化に複合体形成前後における差が観察された。このことは開始コドン下流の配列と上流の SD 配列との相互作用の有無が開始複合体形成に大きく影響を与えることを示唆するものであった。二次構造の影響が観察された一方で、ランダム領域内の各コドンやコドンの並びにも複合体形成前後の差が観察されたが、複数回の解析における再現性が低く、定性的な議論が困難であったため、研究の方法 (2) によって取得した配列を用いた解析を行うことにした。

研究の方法 (2) では、開始複合体形成だけでなく、形成後の翻訳伸長が正確に行われた mRNA の配列情報のみを取得することができる。FLAG エピトープと抗体のアフィニティを利用した精製を行い、さらに再度、精製した mRNA からの翻訳および精製を行うことによって、複数回の選択を行った。これにより、mRNA の濃縮または希釈の再現性を、異なる mRNA の配列集団から観察することが可能である。ランダム領域内の各コドンについて、ラウンド間における濃縮率（または希釈率）を計算したところ、高い相関性を持って（相関係数 0.95 ~ 0.97）各コドンが濃縮（または希釈）されていることがわかった。また、終止コドンを持つ配列が高い割合で希釈されていることから、翻訳伸長された mRNA のみが効果的に濃縮されていることが示唆された。さらに、ランダム領域内のど

の位置にどのようなコドンが存在すれば mRNA が翻訳されやすい（またはされにくい）かの単純な指標を得た上で、一次マルコフ連鎖を導入したモデル化を行い、配列を元にした mRNA の翻訳のされやすさを予測するモデルの構築に成功した。さらに、研究の方法 (3) により同様に複数回の選択における配列情報を得ることによって、mRNA の転写が翻訳と共役する場合と共役しない場合の翻訳のされやすさの違いを、モデルから定量的に評価することも可能となった。

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 9 件)

Matsuura, T., Tanimura, N., Hosada, K., Yomo, T., Shimizu, Y.
Reaction dynamics analysis of a reconstituted Escherichia coli protein translation system by computational modeling.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **114**, E1336-E1344, 2017
査読あり
DOI: 10.1073/pnas.1615351114

安達仁朗, 清水義宏
人工細胞と無細胞タンパク質合成システム。
人工細胞の創製とその応用（シーエムシー出版 植田充美 監修）, 8-14, 2017
査読なし

Narumi, R., Shimizu, Y., Ukai-Tadenuma, M., Ode, K. L., Kanda, G. N., Shinohara, Y., Sato, A., Matsumoto, K., Ueda, H. R.
Mass spectrometry-based absolute quantification reveals rhythmic variation of mouse circadian clock proteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **113**, E3461-E3467, 2016
査読あり
DOI: 10.1073/pnas.1603799113

Sunagawa, G. A., Sumiyama, K., Ukai-Tadenuma, M., Perrin, D., Fujishima, H., Ukai, H., Nishimura, O., Shi, S., Ohno, R., Narumi, R., Shimizu, Y., Tone, D., Ode, K. L., Kuraku, S., Ueda, H. R.
Mammalian reverse genetics without crossing reveals Nr3a as a short-sleeper gene.
Cell Rep., **14**, 662-77, 2016
査読あり
DOI: 10.1016/j.celrep.2015.12.052

清水義宏, 木賀大介
無細胞タンパク質合成システム
生物校学会誌, **93**, 603-606, 2015
査読なし

Tanaka, Y., Shimizu, Y.
Integration of a reconstituted cell-free protein-synthesis system on a glass microchip.
Anal. Sci., **31**, 67-71, 2015
査読あり
DOI: 10.2116/analsci.31.67

Susaki, E. A., Tainaka, K., Perrin, D., Kishino, F., Tawara, T., Watanabe, T. M., Yokoyama, C., Onoe, H., Eguchi, M., Yamaguchi, S., Abe, T., Kiyonari, H., Shimizu, Y., Miyawaki, A., Yokota, H., Ueda, H. R.
Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis.
Cell, **157**, 726-39, 2014
査読あり
DOI: 10.1016/j.cell.2014.03.042

Shimizu, Y.
Biochemical aspects of bacterial strategies for handling the incomplete translation processes.
Front. Microbiol., **5**, 170, 2014
査読あり
DOI: 10.3389/fmicb.2014.00170

清水義宏
生命の部分再構成としての PURE system
生体の科学, **65**, 498-499, 2014
査読なし

〔学会発表〕(計 12件)

清水義宏
新規タンパク質定量法「MS-QBiC」による体内時刻の測定
メディカルジャパン 2017 大阪
2017年2月16日
インテックス大阪(大阪府・大阪市)

清水義宏
新規タンパク質定量法「MS-QBiC」による体内時刻の測定
神戸ポートアイランド創薬フォーラム
2017年1月18日
理化学研究所融合連携イノベーション推進棟(兵庫県・神戸市)

清水義宏
次世代シーケンサーを用いた mRNA 配列とリボソームの相互作用解析
「細胞を創る」研究会 9.0
2016年11月21日-22日
早稲田大学(東京都・新宿区)

清水義宏
次世代シーケンサーを用いた mRNA 配列とリボソームの相互作用解析
第11回無細胞生命科学研究会

2016年10月6日-7日
ゆこたんの森(岩手県・雫石町)

清水義宏, 鳴海良平, 上田泰己
再構成型無細胞タンパク質合成システムを利用した新規タンパク質定量法「MS-QBiC」による体内時刻の測定
第68回日本生物工学会大会
2016年9月30日
富山国際会議場(富山県・富山市)

Shimizu, Y., Narumi, R., Ueda, H. R.
Body time detection by a novel protein quantification method using mass spectrometry and cell-free protein synthesis system.
QBIC Symposium 2016
2016年9月5日-7日
千里ライフサイエンスセンター(大阪府・吹田市)

清水義宏
タンパク質の再構成
日本進化学会第18回大会ワークショップ
2016年8月25日
東京工業大学 大岡山キャンパス(東京都・目黒区)

清水義宏
次世代シーケンサーを用いた mRNA 配列とリボソームの相互作用解析
第10回無細胞生命科学研究会
2015年10月13-14日
理化学研究所 横浜キャンパス(神奈川県・横浜市)

松浦友亮, 清水義宏, 細田一史, 谷村直樹, 四方哲也
全成分タンパク質合成反応モデルの構築とこれを用いた反応ダイナミクス解析
第53回生物物理学会年会
2015年9月14日
金沢大学(石川県・金沢市)

Shimizu, Y.
Systems biological approaches for the E. coli translation system.
Workshop in 13th European Conference on Artificial Life
2015年7月21日
York (U. K.)

鳴海良平, 清水義宏, 上田泰己
PURE system によるペプチド合成を利用したマウス時計タンパク質の絶対定量
第9回無細胞生命科学研究会
2014年10月9日
大阪大学 吹田キャンパス(大阪府・吹田市)

Shimizu, Y.
Reconstitution of a translation system from

molecular parts.

Development an future of artificial cells:

Computation, fluctuation, and evolution

2014年6月10日

京都大学（京都府・京都市）

〔図書〕（計 0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0件）

○取得状況（計 0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.qbic.riken.jp/japanese/research/outline/lab-16.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

清水 義宏 （Shimizu, Yoshihiro）

国立研究開発法人理化学研究所・生命システム研究センター・ユニットリーダー

研究者番号：90401231

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし