

令和元年6月18日現在

機関番号：12401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14665

研究課題名(和文)植物種子細胞に見られるATP依存型翻訳活性の分子機構解明

研究課題名(英文)Elucidation of molecular mechanism in ATP-dependent translation activity in plant seed cells

研究代表者

戸澤 譲 (Tozawa, Yuzuru)

埼玉大学・理工学研究科・教授

研究者番号：90363267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、イネカルス抽出液を利用する無細胞タンパク質合成系を確立した。この系の特性の解析により、GTP無添加条件でのタンパク質合成が可能で、抽出液内在性のヌクレアーゼによるmRNA分解で生じるGMPよりGTPが生成することを確認した。そこで、GTPが翻訳に必須か否かを検証するため、Gを含まないpoly(U)を鋳型とする翻訳伸長活性測定を進め、GTP非依存的なペプチド伸長活性を確認するに至った。並行して、酵母の無細胞翻訳系のGTP依存性をイネカルス抽出液のものと比較を行った結果、酵母においてはGTP添加がペプチド伸長活性をより亢進させ、イネの系と明瞭に異なることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新たに確立したイネカルス無細胞翻訳系は、1 mlあたり数百マイクログラム相当のタンパク質合成が可能で、精製用ヒスチジンタグの利用による合成タンパク質の精製も可能であり、生化学的機能解析用のタンパク質合成系に実用化できる生産性を有すると考える。また、薬害試験の対象となるヒト心筋カリウムチャンネルタンパク質hERGの合成について検証したところ、脂質二分子膜ベシクル添加条件で、hERGとその再構成促進因子との共合成により、活性型hERGの効率的再構成系の構築が可能であることを確認した。このように、確立したシステムが、創薬関連タンパク質の機能型再構成系の構築にも資することを確認できた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have established a new plant cell-free translation system based on rice callus extracts. We revealed that the rice cell-free system allows efficient protein expression in the absence of GTP. We confirmed generation of low level GTP from GMP, which is degradation product of mRNA by endogenous nuclease. On the other hand, By using polyuridylic acid (polyU), which contains only uridine but not guanine nucleotide, as a template, we demonstrated that translation elongation activity of the system is not affected by the lack of GTP in the reaction. This GTP-independence in the translation elongation activity is different from yeast cell-free system, and seems to be unique to plant seed cell system.

研究分野：タンパク質生化学

キーワード：無細胞タンパク質合成 イネ GTP カルス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

コムギ胚芽抽出液を利用する試験管内翻訳系は、幅広い分野で基盤的な生化学技術として利用されている。申請者は、これまでに企業研究所(旧三菱化学生命科学研究所)および愛媛大学無細胞生命科学工学研究センターにおいてこのシステムの開発に取り組んできた。またこれ以前にはイネを中心とする植物の分子生物学的な研究に組み、植物の一般的な代謝、転写、翻訳に関連する幅広い基礎および応用研究に従事してきた。植物機能としての試験管内翻訳系の応用研究として、これまでに合理的な酵素機能改変技術<sup>1)</sup>、膜輸送体の試験管内再構成系の構築<sup>2,3)</sup>などの技術開発を進めてきたとともに、応用研究を下支えする目的で、この翻訳系の翻訳開始コドンの選択性に関する調査研究<sup>4)</sup>、翻訳とカップルした開始メチオニン残基のプロセッシング機構<sup>5)</sup>など、基礎的研究も平行して進めてきた。その中で、にわかには信じ難い現象を見出した。それは、このコムギ胚芽抽出液の翻訳機能全体がGTP非依存的にATPのみで動くという性質である。これは最初に企業研究所の同僚が見出した知見<sup>6)</sup>に基づき、より掘り下げて解析を進めた結果、導き出した結論である。これまで、その真偽について確定的な知見を得るために先行実験を積み重ねて来た。既報においては、GTPが抽出液中で、微量合成されることによりGTP供給が可能となると最終的に結論付けているが<sup>6)</sup>、後述の「研究計画・方法」のFig.1に示すように、我々はペプチド伸長反応を古典的な方法により再試験したところ、ATPのみで反応が進み、GTPの添加による顕著な活性亢進効果は確認できなかった。

1. Kanno & Tozawa (2010) Protein engineering accelerated by cell-free technology. *Methods Mol. Biol.*, 607, 85-99.
2. Nozawa & Tozawa (2014) Modifications of wheat germ cell-free system for functional proteomics of plant membrane proteins. *Methods Mol. Biol.*, 1072, 259-272.
3. Bernhard & Tozawa (2013) Cell-Free Expression - Making a Mark. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 23, 374-380.
4. Ohta *et al.* (2010) Control of translational initiation in the wheat-embryo cell-free protein expression system for producing homogenous products. *Protein Express. Purif.*, 73, 15-22.
5. Kanno *et al.* (2007) Sequence specificity and efficiency of protein N-terminal methionine elimination in wheat-embryo cell-free system. *Protein Express. Purif.*, 52, 59-65.
6. Koga H *et al.* (2009) A Wheat Embryo Cell-Free Protein Synthesis System not Requiring an Exogenous Supply of GTP. *Biotechnol. Prog.*, 25, 1322-1327.

### 2. 研究の目的

コムギ胚芽細胞がATP依存型の翻訳装置を有することを生化学的なデータを収集することにより、論理的に証明しきることを明確な研究期間内の目標とした。具体的には、ATP依存型の翻訳活性を支える翻訳因子蛋白質群の同定およびそれらのATPase活性ドメインの特定などを進めるといふものである。先行実験で活性を持つ抽出液の調製に成功しているイネの種子胚盤由来カルス細胞を材料とする無細胞翻訳系においても、同様のATP依存型翻訳活性を示すか否かについて検証を行った。本応募研究期間においては、これら検証実験で得た研究成果の発表を完了し、期間終了後に、本研究を重要な分子生物学研究課題としてより大きく展開することを目指す。

### 3. 研究の方法

見出した翻訳活性がGTP非依存的な反応機構であることを明確に証明するために、RI標識アミノ酸を利用して、翻訳開始反応と伸長反応を個別の系で解析した。開始反応については、オワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質GFPの全長合成を指標として、伸長反応については、モデルペプチドを利用して<sup>14</sup>C-Leuの取込み活性を指標として反応を解析を進めた。平行してコムギ胚芽の翻訳開始因子および伸長因子の単離を進め、ATP依存性の機能を検証している。また、コムギ翻訳因子のアミノ酸配列を他生物のホモログと比較し、その配列的特徴を探り、組換え蛋白質作製によりこれら因子のATP相互作用の解析を目指した。

### 4. 研究成果

(1) イネ胚盤由来カルスの無細胞タンパク質合成系を確立した(Fig. 1)。材料は全ゲノム解析が完了しているイネ品種である日本晴を用い、カルス誘導培地により種子胚盤由来の脱分化細胞塊であるカルスを得た(Fig. 1A)。このカルスを生育の良好な状態で凍結保存し、まとめて細胞破碎から抽出液の調製を進めた(Fig. 1B)。タンパク質合成活性は、市販のコムギ胚芽抽出液を対照として<sup>14</sup>C-標識ロイシンの取り込み率を指標とする方法により解析した

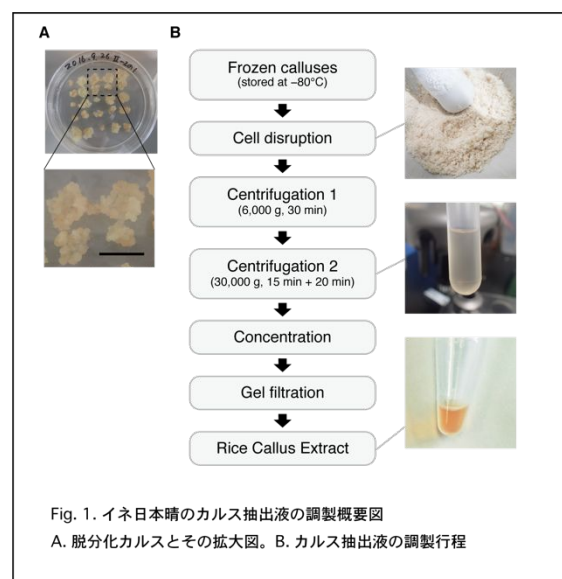


Fig. 1. イネ日本晴のカルス抽出液の調製概要図  
A. 脱分化カルスとその拡大図。B. カルス抽出液の調製行程

(Fig. 2A)。GFP の全長が合成可能であることを確認し(Fig. 2B)、添加 mRNA の至適濃度範囲についても明らかにした(Fig. 2C)。さらに、このタンパク質合成活性が細胞質 80S リボソームシステムに依存する点についても阻害剤を用いて確認した(Fig. 2D)。

(2) GTP 依存性に関し試験を進めた結果、これまでに ATP 添加条件において GTP の有無に無関係で試験タンパク質 GFP の合成が可能であることを確認した(Fig. 3A, 3B)。一方、GFP の mRNA を鋳型とする場合、内在性のヌクレアーゼが mRNA 分解を進めるため一定量の GMP が生成する。この GMP が抽出液内の GMP kinase および dinucleotide linase の作用により、GMP から GTP へ変換することも確認した(Fig. 3C)。しかしながら、GTP 蓄積がまだ十分に進まない反応初期の初速度を解析した結果、GTP 非添加条件においても反応速度は初期から直線性を示し(Fig. 3D, 3E)、GTP の正の寄与は疑わしい結果も得られた。そこで、次に、GTP が mRNA より生成しない人工鋳型を用いた解析を進めた。

(3) polyU を鋳型とする翻訳伸長活性測定では、この活性がシクロヘキシミドにより阻害されることより、観察している活性が確かに細胞質由来の 80S リボソーム翻訳系のものであることを確認した(Fig. 4A)。また、この反応においては GTP が生成しないことも確認した(Fig. 4B)。さらに、予想外に、GTP 添加が伸長反応活性を阻害することを確認した(Fig. 4C)。この結果は、大腸菌で広く知られる GTP 依存性と大きく異なることから、GTP 非依存性は、これら植物種子由来細胞に特徴的な性質であることを示唆している。

(4) この新たに確立したイネカルス無細胞翻訳系は、1 ml あたり数百マイクログラム相当のタンパク質合成が可能であり、脂質二分子膜ベシクル添加条件でのヒト心筋に存在する重要な大分子量 (126 kDa) のカリウムチャンネルタンパク質 hERG の合成も可能であることを確認した(Fig. 5)。hERG は同年度内にコムギ無細胞翻訳系で調製し、カリウムイオンチャンネルとして機能することを示し報告済みである (Tadaki et al. Sci Rep. 7: 17736, 2018)。

以上のように、イネカルス抽出液はコムギ胚芽抽出液に準ずる生化学的なタンパク質調製ツールとしての利便性も併せ持つことより、他の特性も考慮の上、共同研究契約を結ぶ企業と特許申請する予定で準備を進めている。

本研究では、研究室スケールで比較的容易に調製可能なイネの培養細胞 (カルス) を材料とする無細胞タンパク質合成系の構築に成功し、バクテリア無細胞系では不可能な 100kDa を越える分子量の膜タンパク質全長も合成可能であることを示した。本研究で材料としているイネ品種「日本晴」は全ゲノム解析が完了しており、遺伝子組換えのみならず CRISPR-Cas9 系によ

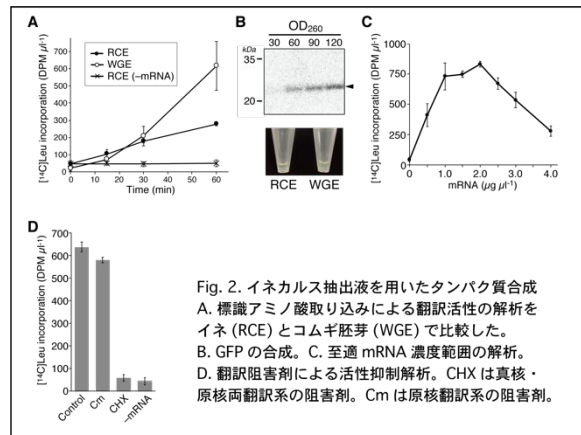


Fig. 2. イネカルス抽出液を用いたタンパク質合成  
A. 標識アミノ酸取り込みによる翻訳活性の解析をイネ (RCE) とコムギ胚芽 (WGE) で比較した。  
B. GFP の合成。C. 至適 mRNA 濃度範囲の解析。  
D. 翻訳阻害剤による活性抑制解析。CHX は真核・原核両翻訳系の阻害剤。Cm は原核翻訳系の阻害剤。

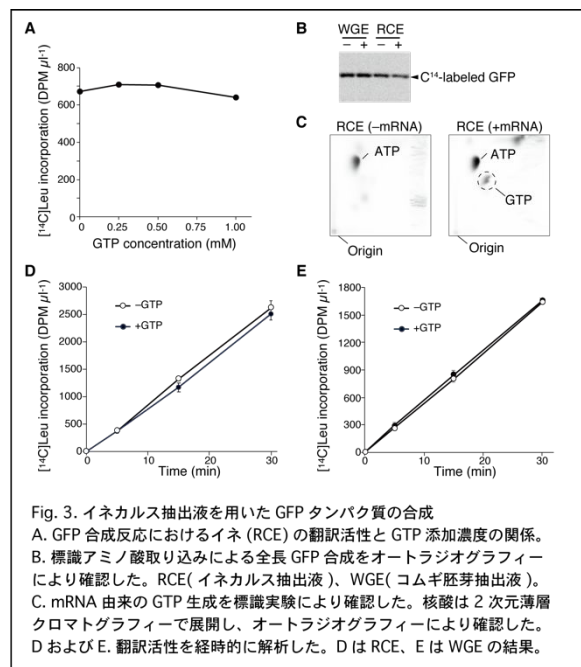


Fig. 3. イネカルス抽出液を用いた GFP タンパク質の合成  
A. GFP 合成反応におけるイネ (RCE) の翻訳活性と GTP 添加濃度の関係。  
B. 標識アミノ酸取り込みによる全長 GFP 合成をオートラジオグラフィーにより確認した。RCE (イネカルス抽出液)、WGE (コムギ胚芽抽出液)。  
C. mRNA 由来の GTP 生成を標識実験により確認した。核酸は 2 次元薄層クロマトグラフィーで展開し、オートラジオグラフィーにより確認した。  
D および E. 翻訳活性を経時的に解析した。D は RCE、E は WGE の結果。

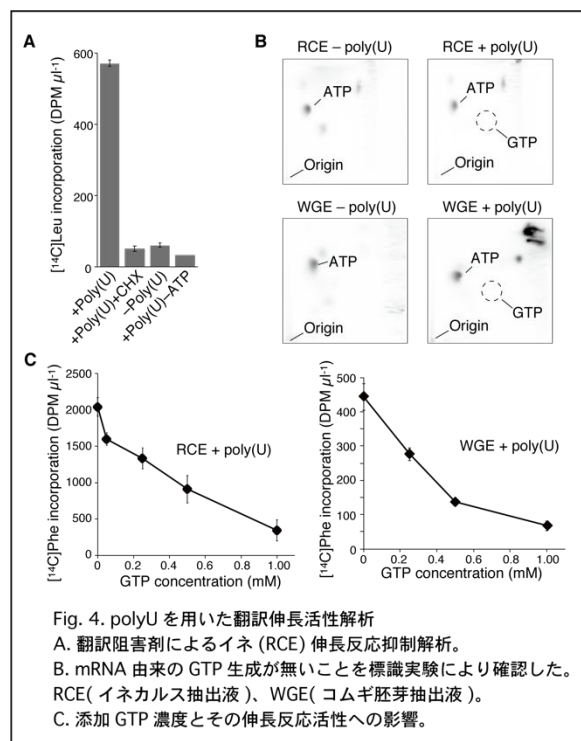
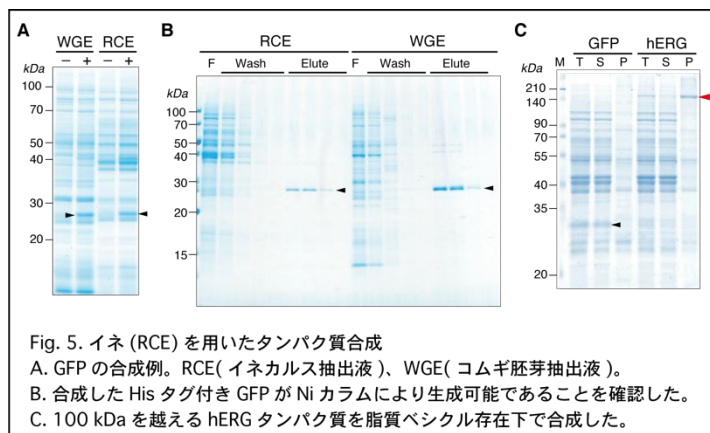


Fig. 4. polyU を用いた翻訳伸長活性解析  
A. 翻訳阻害剤によるイネ (RCE) 伸長反応抑制解析。  
B. mRNA 由来の GTP 生成が無いことを標識実験により確認した。RCE (イネカルス抽出液)、WGE (コムギ胚芽抽出液)。  
C. 添加 GTP 濃度とその伸長反応活性への影響。



る細胞改変も可能であることから、抽出液そのものを自在に改変可能な次世代型の無細胞系の構築にもつながることが期待できる。そのため、特許申請を最優先として取りまとめを進めている。



## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Daisuke Tadaki, Daichi Yamaura, Shun Araki, Miyu Yoshida, Kohei Arata, Takeshi Ohori, Ken-ichi Ishibashi, Miki Kato, Teng Ma, Ryusuke Miyata, Yuzuru Tozawa, Hideaki Yamamoto, Michio Niwano, and Ayumi Hirano-Iwata. Mechanically stable solvent-free lipid bilayers in nano- and micro-tapered apertures for reconstitution of cell-free synthesized hERG channels. *Sci Rep* 7: 17736 (2017) 査読有り

Sousuke Imamura, Yuhta Nomura, Tokiaki Takemura, Imran Pancha, Keiko Taki, Kazuki Toguchi, Yuzuru Tozawa, Kan Tanaka. The checkpoint kinase TOR (target of rapamycin) regulates expression of a nuclear-encoded chloroplast RelA-SpoT homolog (RSH) and modulates chloroplast ribosomal RNA synthesis in a unicellular red alga. *Plant J* 94(2):327-339. doi: 10.1111/tpj.13859. (2018) 査読有り

Shunya Saito, Shin Hamamoto, Koko Moriya, Aiko Matsuura, Yoko Sato, Jun Muto, Hiroto Noguchi, Seiji Yamauchi, Yuzuru Tozawa, Minoru Ueda, Kenji Hashimoto, Philipp Köster, Qiuyan Dong, Katrin Held, Jörg Kudla, Toshihiko Utsumi, Nobuyuki Uozumi. N-myristoylation and S-acylation are common modifications of Ca<sup>2+</sup> regulated Arabidopsis kinases and are required for activation of the SLAC1 anion channel. *New Phytol.* 218(4):1504-1521. doi: 10.1111/nph.15053. (2018) 査読有り

Herbert Santos, Kenichiro Imai, Takashi Makiuchi, Kentaro Tomii, Paul Horton, Akira Nozawa, Kenta Okada, Yuzuru Tozawa, Tomoyoshi Nozaki. Novel lineage-specific transmembrane  $\beta$ -barrel proteins in the endoplasmic reticulum of *Entamoeba histolytica*. *FEBS J* (2019) in press doi: 10.1111/febs.14870. 査読有り

〔学会発表〕(計 4 件)

近藤久海香、鈴木翔、戸澤譲 イネ培養細胞抽出液の試験管内翻訳系の構築 第 3 5 回日本植物細胞分子生物学会大会 (2017 年)

鈴木翔、近藤久海香、松岡聡、戸澤譲 イネ種子胚盤由来のカルスを材料とする無細胞翻訳系の構築 日本農芸化学会 2018 年度大会 (2018 年)

Yuzuru Tozawa Cell-free translation system: a tool for producing proteinous nanomachines 10th International Workshop on Nanostructures & Nanoelectronics (国際学会)(2019 年)

戸澤譲 ポリイソプレン鎖合成系の完全インビトロ再構成を目指して 第二回天然ゴム研究会「天然ゴムから考えるバイオマテリアルエンジニアリングのこれから」(2019 年)

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：鈴木 翔

ローマ字氏名：Suzuki Kakeru

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。