

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23247013

研究課題名(和文)合成生物学的手法による超分子複合体形成の研究

研究課題名(英文)Studies on the assembly of super-molecular complex by synthetic approach

研究代表者

上田 卓也 (Ueda, Takuya)

東京大学・新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：80184927

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 37,200,000円、(間接経費) 11,160,000円

研究成果の概要(和文)：多くの蛋白質は複合体を形成することで制御された機能発現が可能となるが、細胞内の複合体の形成プロセスはほとんど未解明である。本プロジェクトでは、再構築型無細胞蛋白質合成系PURE systemを用いて、ポリペプチドの合成反応と複合体形成を試験管内で再構築を行った。その結果、細胞膜上の22のポリペプチドから形成されるATP合成酵素、および3つのポリペプチドからなるトランスロコンの合成に成功した。また16SrRNAと20種類の蛋白質からなる超分子複合体であるリボソームの小サブユニット(30S)の効率の高い再構築を、さまざまな生合成因子の共存により成功した。

研究成果の概要(英文)：Most of proteins are able to express function by forming a complex of subunit. However, the formation process of a complex in the cell is only poorly understood. In this project, using a cell-free translation system constituted with purified translation factors, PURE system, complex formation processes were reconstructed in the test-tube. As a result, we succeeded in the synthesis of the ATP synthase, which is formed from 22 polypeptides and translocon composed of three polypeptides onto the cell membrane. The reconstruction of small subunit of the ribosome (30S) with high efficiency was also successfully achieved from a 16SrRNA and of 20 ribosomal proteins in the presence of the factors involved in biosynthesis of 30S ribosome subunit.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：リボソーム 無細胞蛋白質合成系 リボソーム シャペロン ATP合成酵素 トランスロコン

1. 研究開始当初の背景

リボソームによる上での蛋白質合成系は、単にアミノ酸の重合反応にすぎない。研究代表者は、蛋白質合成に必須な因子のみから構成された無細胞蛋白質合成系 PURE system を開発し、大腸菌の全蛋白質(4274 個)の合成を行った (Niwa et al. PNAS, 2009)。合成された蛋白質の凝集特性を解析したところ、正常な構造形成をしている可能性のある蛋白質は、1000 にも満たないことを明らかにした。つまり、蛋白質の大半のものが、Anfinsen のドグマには従わず、構造形成に何らかの成熟プロセスを必要とすることが示された。この解析は、従来の蛋白質の変性状態からの構造回復過程の解析ではなく、蛋白質の誕生過程での Anfinsen のドグマの妥当性を検証した最初の実験である。数千種類の分子が共存しブラックボックス化されている細胞や夾雑物を含む細胞抽出液などでは明確な結論を導き出せない問題点を、PURE system では解決できることが示された。また、PURE system にシャペロンを添加することで、蛋白質のシャペロンの要求性を明確に結論できる。実際、700 以上の大腸菌の細胞質蛋白質について、必要なシャペロンを明らかにすることに成功した。以上のようにポリペプチドのフォールディング解析に PURE system という合成生物学的手法が有効であることが受け入れられはじめられている。

2. 研究の目的

リボソーム上で合成されたポリペプチドは、個々の蛋白質に固有の加工プロセス(フォールディング、複合体形成、翻訳後修飾、輸送など)を経て生理活性を有する蛋白質分子となる。本研究では、この翻訳後のプロセスの中で未だ不明な点の多い複合体形成の過程について、研究代表者らが開発した翻訳必須因子のみから再構築された無細胞蛋白質合成系 PURE system を用いて、合成生物学的なアプローチによって解明する。ヘテロなサブユニット構造を持つ RNA ポリメラーゼ、膜蛋白質複合体である ATP 合成酵素、超分子複合体であるリボソームを対象として、成熟プロセスを融合させた PURE system を基盤とした生合成システムを試験管内で再構築する。この再構築系により、これらの複合体の形成メカニズムを明らかにする。素過程の解析には迫ることが困難な遺伝学的手法の問題点を、超分子複合体生合成マシナリーを組み立てる合成生物学的な手法を用いることで克服する。

3. 研究の方法

(1) 膜蛋白質複合体の生合成システムの構築と素過程解析
大腸菌では三割の蛋白質が膜蛋白質もしくは

は分泌蛋白質であると考えられている。膜蛋白質の膜への輸送・挿入系を試験管内で再構築する。すでに、PURE system で一本のポリペプチドの膜蛋白質の膜挿入に成功している。このシステムを基盤として、より複雑な膜蛋白質複合体であるトランスロコン (SecYEG) と Fo-F1 ATP 合成酵素の合成を行い、膜蛋白質複合体の複合体形成のメカニズムを明らかにする。トランスロコンは膜蛋白質の膜への挿入に関与する蛋白質複合体である。ATP 合成酵素は、細胞質の F1 部分 ($\alpha_3\beta\gamma\delta\epsilon$) と膜 (ab_2c_{10}) から構成される。まず、F1 部分の各サブユニットを PURE system により共発現させる。F1 のサブユニットのフォールディングと自己集合プロセスへのシャペロンの関与を明らかにする。また、Fo については、SRP 存在下で、トランスロコンを組み込んだプロテオリボソームへのターゲティング、トランスローケーション、膜内での自己集合について、詳細に解析をする。

(2) リボソーム生合成システムの構築

1960 年代から 70 年にかけて野村のグループや Wittmann のグループなどによってリボソームの再構成実験がなされ、リボソーム蛋白質のアセンブリーマップが作成された。しかし、これらの実験では高い塩濃度や低い pH での条件であり、生理的とは言えず、細胞内のリボソームの生合成過程を反映しているとは言えない。その後、リボソームの生合成経路には多数の蛋白質が関わる複雑な過程であることが示された。30S サブユニットに関して、リボソーム蛋白質の他に、リボソーム蛋白質修飾酵素、rRNA 修飾酵素、生合成関連因子、シャペロン蛋白質、rRNA 転写制御因子、プロセシング酵素などの、20 種以上の因子が関わる。30S サブユニットのリボソーム蛋白質を個別に発現させ調製後、これらの生合成因子などの補助因子の存在で再構成することを試みる。

4. 研究成果

多くの蛋白質は複合体を形成することで制御された機能発現が可能となるが、細胞内の複合体の形成プロセスはほとんど未解明である。本プロジェクトでは、再構築型無細胞蛋白質合成系 PURE system を用いて、ポリペプチドの合成反応と複合体形成を試験管内で再構築を行った。その結果、細胞膜上の 22 のポリペプチドから形成される ATP 合成酵素の PURE system による DNA からの合成に成功した。リボソーム共存下の PURE system により合成した ATP 合成酵素は、プロトンのプロトンポンピング活性と ATP 合成活性の両者ともに、天然の ATP 合成酵素とほとんど同等の比活性を有していることが示された。またミュータントも作製に、その機能解析にも成功した。また同様に、3 つのポリペプチドからなるトランスロコン (SecYEG) の合成に成功した。合成したトランス

ロコンは ompA の膜透過や膜蛋白質の膜挿入をする活性を有していた。これらの膜蛋白質はリポソームへ自発的に挿入されたものであり、ある意味リポソームはこうした膜蛋白質へのシャペロンということもできる。16SrRNA と 21 種類の蛋白質からなる超分子複合体であるリポソームの小サブユニット (30S) の効率の高い再構築を、試み成功した。このプロセスは高塩濃度で熱での処理をしたものである。また、30S の生合成に関与する、さまざまな生合成因子を精製し、これらの因子の存在下で 30S サブユニットの効率のよい再構築が可能であった。この再構成条件は低塩濃度、中性 pH の生理的のものであり、細胞内での生合成を反映したアセンブリーと考えられる。現在は、調製したリポソーム蛋白質を用いているが、これらのリポソーム蛋白質を生合成因子の共存した PURE system で発現させながら、30S サブユニットのアセンブリーするシステムの構築へとつながるものと期待できる。

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 21 件)

1.Kanamori T*, Fujino Y, Ueda T (2014). PURE ribosome display and its application in antibody technology. *Biochim Biophys Acta*. pii: S1570-9639(14)00093-4. doi: 10.1016/j.bbapap.2014.04.007. (査読有り)

2.Zhou Y, Ueda T, Müller M* (2014). Signal Recognition Particle and SecA Cooperate during Export of Secretory Proteins with Highly Hydrophobic Signal Sequences. *PLoS One* 9(4) :e92994DOI:10.1371/journal.pone.0092994. (査読有り)

3.van Nies P, Nourian Z, Kok M, van Wijk R, Moeskops J, Westerlaken I, Poolman JM, Eelkema R, van Esch JH, Kuruma Y, Ueda T, Danelon C* (2013). Unbiased Tracking of the Progression of mRNA and Protein Synthesis in Bulk and in Liposome-Confined Reactions. *Chembiochem*. 14(15):1963-6. (査読有り)

4.Takahashi S, Isobe H, Ueda T, Okahata Y* (2013). Direct monitoring of initiation factor dynamics through formation of 30S and 70S translation-initiation complexes on a quartz crystal microbalance. *Chemistry* 19(21):6807-16. (査読有り)

5.Takahashi S*, Furusawa H, Ueda T, Okahata Y (2013). Translation Enhancer Improves the Ribosome Liberation from

Translation Initiation. *J Am Chem Soc.* ; 135(35):13096-106. (査読有り)

6.Hayashi R*, Takeuchi N, Ueda T (2013). Nuclear Respiratory Factor 2 (NRF-2) Recruits NRF-2 to the Nucleus by Binding to Importin- : via an Unusual Monopartite-Type Nuclear Localization Signal. *J Mol Biol*; 425(18):3536-48. (査読有り)

7.Matsumoto A, Shimizu Y, Takemoto C, Ueda T, Uchiumi T, Ito K* (2013). Crystallization and preliminary X-ray analysis of peptidyl-tRNA hydrolase from *Thermus thermophilus* HB8. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* ;69(Pt 3):332-5. (査読有り)

8.Kotani T, Akabane S, Takeyasu K, Ueda T and Takeuchi N* (2013). Human G-proteins, ObgH1 and Mtg1, associate with the large mitochondrial ribosome subunit and are involved in translation and assembly of respiratory complexes. *Nucleic Acids Research* 41(6):3713-22. (査読有り)

9.Ito K*, Murakami R, Mochizuki M, Qi H, Shimizu, Y, Miura K, Ueda T, Uchiumi T, (2012). Structural basis for the substrate recognition and catalysis of peptidyl-tRNA hydrolase. *Nucleic Acids Research* 40(20): 10521-10531. (査読有り)

10.Kihira K, Shimizu Y, Shomura Y, Shibata N, Kitamura A, Ueda T, Ochi K, Higuchi Y* (2012). Crystal structure analysis of the translation factor RF3 (release factor 3). *Febs Letters* 586(20): 3705-3709. (査読有り)

11.Fujino Y*, Fujita R, Wada K, Fujishige K, Kanamori T, Hunt L, Shimizu Y, Ueda T* (2012) Robust in vitro affinity maturation strategy based on interface-focused high-throughput mutational scanning. *Biochem Biophys Res Commun* 428(3):395-400. (査読有り)

12.Bruder J*, Siewert K, Obermeier B, Malotka J, Scheinert P, Kellermann J, Ueda T, Hohlfield R (2012) Target Specificity of an Autoreactive Pathogenic Human gamma delta-T Cell Receptor in Myositis. *Journal of Biological Chemistry* 287(25): 20986-20995. (査読有り)

13.Kuruma Y, Suzuki T, Ono S, Yoshida M, Ueda T* (2012) Functional analysis of

membranous F₀-a subunit of F₁F₀-ATP synthase by in vitro protein synthesis. *Biochemical Journal*. 442: 631-638. (査読有り)

14. Nagano T, Kojima K, Hisabori T, Hayashi H, Morita E. H, Kanamori T, Miyagi T, Ueda T, Nishiyama Y* (2012) Elongation Factor G Is a Critical Target during Oxidative Damage to the Translation System of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. 287: 28697-28704. (査読有り)

15. Niwa T, Kanamori T, Ueda T*, Taguchi H* (2012) Global analysis of chaperone effects using a reconstituted cell-free translation system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(23): 8937-8942. (査読有り)

16. Takahashi S, Tsuji K, Ueda T, Okahata Y* (2012) Traveling Time of a Translating Ribosome along Messenger RNA Monitored Directly on a Quartz Crystal Microbalance. *Journal of the American Chemical Society* 134(15): 6793-6800. (査読有り)

17. Ohashi H, Kanamori T, Osada E, Akbar BK, Ueda T* (2012) Peptide screening using PURE ribosome display, *Methods in molecular biology* 805: 251-259. (査読有り)

18. Ueda T* (2011) Creation of biosystems in a test tube. *Genes & Genetic Systems* 86(6): 395-395. (査読有り)

19. Chiba S, Kanamori T, Ueda T, Akiyama Y, Pogliano K, Ito K* (2011) Recruitment of a species-specific translational arrest module to monitor different cellular processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(15): 6073-6078. (査読有り)

20. Ito K, Qi H, Shimizu Y, Murakami R, Miura KI, Ueda T, Uchiumi T* (2011) Crystallization and preliminary X-ray analysis of peptidyl-tRNA hydrolase from *Escherichia coli* in complex with the acceptor-T_ΨC domain of tRNA. *Acta crystallographica Section F, Structural biology and crystallization communications* 67 (Pt 12): 1566-1569. (査読有り)

21. Zhou ZP, Shimizu Y, Tadakuma H*, Taguchi H, Ito K, Ueda T (2011) Single

molecule imaging of the trans-translation entry process via anchoring of the tagged ribosome. *Journal of biochemistry* 149(5): 609-618. (査読有り)

[学会発表](計 29 件)

1. Takeaki Kawai, Jose Manuel Martinez Caaveiro, Hisashi Tadakuma, Kouhei Tsumoto, Takuya Ueda, "High-Resolution Thermodynamic Analysis of ABC-Transportation MSBA Reconstituted in Nanodiscs" *Biophysical Society 58th annual meeting Moscone Center, San Francisco, USA, 2014/3/15*

2. 上田卓也「PURE system の過去・現在・未来」第 36 回日本分子生物学会年会 神戸ポートピアホテル 2013/12/4

3. Takuya Ueda "The Pure System for Artificial Cells" *International Astrobiology Workshop 2013, ISAS Main Building 2F Conference Room, Sagami-hara 2013/11/28*

4. 松林英明、車兪澈、上田卓也「膜タンパク質合成システム Sec トランスコロン を創る」細胞を創る研究会 6.0 山形大学鶴岡タウンキャンパス 2013/11/14

5. Takeya Masubuchi, Hisashi Tadakuma, Masayuki Endo, Yoshie Harada, Hiroshi Sugiyama, Takuya Ueda, "Rational design of orthogonal gene nano-device on DNA origami" 第 51 回生物物理学会年会 国立京都国際会館 2013/10/28

6. 松林英明、車兪澈、上田卓也「無細胞タンパク質合成系を用いた Sec トランスコロンの構築」第 8 回無細胞生命科学研究会 新潟大学中央図書館 2013/10/21

7. 田丸大知、清水義宏、上田卓也「再構成型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 8 回無細胞生命科学研究会 新潟大学中央図書館 2013/10/21

8. 松林英明、車兪澈、上田卓也 "in vitro Synthesis of Membrane Protein Machinery toward the Construction of Artificial Cell" 12th European Conference on Artificial Life Taormina, Italy 2013/9/2

9. 車兪澈、上田卓也 "Autonomous Construction of Synthetic Cell Membrane" 12th European Conference on Artificial

Life Taormina, Italy 2013/9/2

10. 田丸大知、清水義宏、上田卓也「無細胞翻訳系における30Sリボソームサブユニットの再構成」第15回日本RNA学会年会 愛媛県県民文化会館 ひめぎんホール 2013/7/24

11. Zhan-Ping Zhou, Yoshihiro Shimizu, Hisashi Tadakuma, Hideki Taguchi, Koichi Ito, Takuya Ueda, "Single molecule imaging of the trans-translation entry process via anchoring of the tagged ribosome" 日本生化学会第85回大会マリンメッセ福岡 2012/12/15

12. 車兪澈、松林英明、鈴木俊治、吉田賢右、上田卓也、"Construction of Membrane Protein Complexes by Cell-free System" 日本分子生物学会第35回年会 2012/12/13

13. 車兪澈、松林英明、鈴木俊治、吉田賢右、上田卓也、"Construction of Membrane Protein Complexes by Cell-free System" 日本分子生物学会第35回年会 福岡国際会議場 2012/12/13

14. 増淵岳也、多田隈尚史、遠藤政幸、杉山弘、原田慶恵、上田卓也、「DNAナノ構造体を用いたDNA-RNAポリメラーゼナノ複合体の構築と活性評価」「細胞を作る」研究会5.0 東京工業大学 すすかけ台キャンパス 2012/11/21

15. 車兪澈、松林英明、鈴木俊治、上田卓也、「無細胞系で創る膜タンパク室複合体」「細胞を作る」研究会5.0 東京工業大学 すすかけ台キャンパス 2012/11/21

16. 車兪澈、松林英明、鈴木俊治、吉田賢右、上田卓也、「無細胞タンパク質合成系による膜タンパク質複合体の構築」第7回無細胞生命科学研究会 愛媛大学 南加記念ホール 2012/11/18

17. 上田卓也 "The PURE system" 第10回無細胞科学松山国際シンポジウム 松山全日空ホテル 2012/9/25

18. Takeaki Kawai, Jose Caaveiro, Toyomasu Katagiri, Hisashi Tadakuma, Takuya Ueda, Kouhei Tsumoto, "Catalytic activity of MsbA reconstituted in nanodisc particles is modulated by remote interactions with the bilayer." 第50回日本生物物理学会年会 名古屋大学東山キャンパス 2012/9/24

19. 増淵岳也、多田隈尚史、遠藤政幸、杉山弘、原田慶恵、上田卓也、「DNAナノ構造体を用いたDNA-RNAポリメラーゼナノ複合体の構築と活性評価」第50回日本生物物理学会年会 名古屋大学東山キャンパス 2012/9/24

20. 上田卓也、「PURE systemでバイオシステムを作る」日本農芸化学会2012年度大会 京都女子大学 2012/3/25

21. 車兪澈、松林英明、鈴木俊治、吉田賢右、上田卓也、「無細胞翻訳系を用いた機能性生体膜の構築」第6回無細胞生命科学研究会 兵庫県立大学 姫路書写キャンパス 2011/11/16

22. Yutetsu Kuruma, Hideaki Matsubayashi, Takuya Ueda. "Construction of Synthetic Biomembrane by Cell-Free Translation" 「細胞を創る」研究会4.0 大阪 千里ライフサイエンスセンター 2011/10/28

23. Takuya Ueda, "The PURE system for Synthetic Biology" Synthesizing, Life and Biological Systems 大阪 千里ライフサイエンスセンター 2011/10/26

24. Hideaki Matsubayashi, Yutetsu Kuruma, Shin-ichiro M. Nomura, Ken-ichi Nishiyama, Takuya Ueda, "Construction of SecYEG translocon by cell-free protein synthesis system" Synthesizing Life and Biological Systems 「細胞を創る」研究会4.0 2011/10/25

25. Hideaki Matsubayashi, Yutetsu Kuruma, Shin-ichiro M. Nomura, Ken-ichi Nishiyama, Takuya Ueda, "Construction of SecYEG translocon by cell-free protein synthesis system" 第84回日本生化学会大会 国立京都国際会館 2011/9/24

26. 上田卓也 「試験管内でバイオシステムを作る」日本遺伝学会第83回大会 京都大学 2011/9/20

27. Yuya Miyazono, Hisashi Tadakuma, Takuya Ueda, Yoshie Harada, "Constructing DNA-kinesin hybrid-nanomachine using the DNA-tile scaffold DNA-kinesin" ハイブリッド・ナノマシンの構築 日本生物物理学会 兵庫県立大学 2011/9/16

28. Yutetsu Kuruma, Toshiharu Suzuki, Masasuke Yoshida, Takuya Ueda, "Artificial Organelle for Energy

Production in Artificial Cell” European Conference on Artificial Life 2011 Internationale Universitaire de Paris, Paris France, 2011/8/8

29. Hideaki Matsubayashi, Yutetsu Kuruma, Shin-ichiro M. Nomura, Ken-ichi Nishiyama, Takuya Ueda, “Construction of SecYEG translocon by cell-free protein synthesis system” the Fifth International Meeting on Synthetic Biology Stanford University, Stanford, California, USA 2011/6/15

〔図書〕(計 3件)

1. 富田野乃、上田卓也 (2013) 「翻訳伸長制御のメカニズムとその意義」実験医学 31(7): 144 - 152

2. 多田隈尚史、上田卓也 (2013) 「合成生物学による翻訳系の新展開 リボゾームや遺伝コードの改変を通して」化学 68(6): 70-71

3. 車 兪澈, 上田卓也 (2011) Construction of the Synthetic Cell Based on the Reconstructed Cell-Free Translation System, PURE system. 化学とマイクロ・ナノシステム 10(2):5-11

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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 なし
()

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし
()

研究者番号：