

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23310141

研究課題名(和文)コムギ翻訳系の構成的解析

研究課題名(英文)Constitutive approach to the translation system from wheat

研究代表者

高井 和幸 (Takai, Kazuyuki)

愛媛大学・理工学研究科・教授

研究者番号：40260848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,100,000円

研究成果の概要(和文)：真核型翻訳反応について、因子を組み立てて系を組み上げるアプローチで理解することに役立つ目的で、コムギ胚芽由来の翻訳因子をひとつひとつ単離精製することを試みた。その結果、リボソーム、翻訳伸長因子2種、翻訳開始因子14種のうち7種、翻訳終結因子2種のうち1種、アミノアシルtRNA合成酵素(ARS)20種のうち4種については、最低限の純度の標品を得ることができた。ARSについては予想外に難しいことがわかった。また、コムギの大規模cDNA解析プロジェクトNBRP-wheatの成果物にeRF3に対応するもののみが含まれないことを確認し、それをコムギ胚芽からクローニングした。

研究成果の概要(英文)：Factors involving in translation in wheat were purified one by one, in order to facilitate constructive approaches to the mechanisms in eukaryotic protein synthesis. Samples of acceptable quality were obtained concerning the ribosomes, the 2 eukaryotic elongation factors, 7 of the 14 eukaryotic initiation factors, eukaryotic release factor (eRF) 1, and 4 of the 20 aminoacyl-tRNA synthetases. As no cDNA clone for eRF3 was found in the library of wheat cDNA clones by the National Bio-Resource Project, which had been in progress in parallel with this project, we obtained a clone from wheat germ.

研究分野：生物化学

キーワード：コムギ タンパク質合成 再構成 組換え発現

### 1. 研究開始当初の背景

ゲノムや cDNA の配列情報は、細胞および生命を、その構成分子から理解するための重要な基盤である。次に必要なのは、配列情報が何を意味するかを解析することであり、そのためにゲノムにコードされたタンパク質や RNA などの構造や機能の解析が内外で精力的に行われている。しかし、個々の因子を解析するだけで、ゲノム情報の意味が解釈できるのではない。ゲノムにコードされた因子が集まることで何をしているのかを解析することではじめて意味がわかるのである。また、因子を集めることによって、人為的、工学的に何か新しい有用なものが創りだされることも期待されている。

細胞の中で、タンパク質合成系が最も重要な分子システムのひとつであることは論を待たない。特に真核細胞では、翻訳レベルでの遺伝子発現制御が原核細胞の場合よりも優勢であり、制御システムが翻訳系自体に組み込まれているので、それだけ重要性も高い。また、その分だけ翻訳系が複雑であることもあって、現時点で翻訳に関与する因子すべてが同定されているわけではない。翻訳系を単離することは、必要な因子を実証的に解明することであり、それだけでも大きな意義を持つ。さらに、単離された翻訳系は、翻訳系を含むより大きな制御系の構成的理解につながる。

真核細胞の翻訳系における分子機構は、主に、酵母の遺伝学と生化学を駆使した実験によって解明されてきた。哺乳動物細胞における翻訳系については、従来からウサギ網状赤血球細胞由来の翻訳系や、マウス及びヒトの翻訳因子などを用いて解明されてきた。現在までに、酵母と動物の翻訳開始反応が、試験管内で再構成されているが、これらは、活性のあるタンパク質を合成するような系ではない。現実的には、酵母では細胞壁を壊す処理が比較的難しく、動物組織は複数の細胞種から成っているために単一の試料を得るのが難しい、という課題を抱えている。動物については、HeLa 細胞などの培養細胞からの無細胞タンパク質合成系や翻訳因子が調製されており、今後これらの問題を克服することが期待される。

動物の系の重要性については言うまでもないが、植物の系も重要である。植物のタンパク質合成系は、酵母や動物の系と多くの点で共通性がある一方、多くの点で異なる。特に、タンパク質合成の制御に関わる部分については、少なくともそれに関わる因子の存在/不在から、大幅に異なると考えられる。しかし、具体的にどのように異なるのかは、適切な実験系が存在しないために明らかでない。植物の翻訳制御系は、環境に应答した細胞内制御等に密接にかかわる。それについての知見の蓄積は、植物や藻類を用いた物質生産などのグリーン産業技術の開発のためにも重要な基盤となりうる。

近年、胚芽を高度に精製することによってリボソームを損傷する胚乳由来成分を排除したコムギ胚芽抽出液に依存した無細胞タンパク質合成系が、真核型タンパク質の調製を必要とする様々な目的に利用され始めている。抽出液の高い合成活性、安定性、保存安定性は、再構成翻訳系を構築するための材料として理想的である。しかし、植物の翻訳因子が酵母や動物のものと同じように働いているのかについては不明な点が多く、再構成系構築のためにはひとつひとつ実証しながら解明する必要がある。

### 2. 研究の目的

開始当初、本研究では、次の2点を目標とした。第一は、翻訳開始、伸長、終結反応の起こる最小限の再構成翻訳系を構築することを通じて、反応に関与する因子とその役割をひとつひとつ実証することであった。第二は、それまでに得られているリボソームをきちんと特徴付けることであった。

なお、研究を進めているうちに、ナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) のコムギプロジェクトが公開する cDNA クローン情報が徐々に拡充された。その状況を踏まえて、cDNA ライブラリーの中から翻訳因子およびそのサブユニットをコードするものを選び出し、それらを大腸菌で発現させ、合成されるタンパク質を単離精製することも試みることにした。特に、アミノアシル tRNA 合成酵素については、バクテリアのものでは可溶性になりやすく組換え発現法に適しているものが多いことがわかっていたので、植物でも同様と考え、優先的に組換え発現法を試みることにした。

さらに、多数の cDNA を同じように扱えるようにするため、また、多くの翻訳因子が複数のサブユニットから成っているという特殊な事情があるため、この目的に沿った発現ベクターの開発も行うことにした。

### 3. 研究の方法

リボソームと、eIF2、eIF3 のように複数のポリペプチドから成る複合体タンパク質について、コムギ胚芽から精製することを試みた。このうち、eIF2 についてはバリエーションがあるらしく精製を進めると単一の分子として単離することができなかつたので、遺伝子組換え法による調製も併せて検討した。

また、伸長因子とリボソームについては胚芽から精製する従来法を改良することを試みた。

一方、当時、NBRP でコムギ cDNA 配列の解析が行われており、cDNA クローン配列が公開され始めていた。ひとつひとつの翻訳因子に関して、シロイヌナズナやトウモロコシの配列を元にして、公開されているコムギの配列に対して BLAST 検索を行い、ヒットするものがあるか調べた。ヒットしたものに

関して、米国国立生物工学情報センター (NCBI) の Conserved Domain Search (CDS: 種々のタンパク質の間でアミノ酸配列を比較した場合に、いろいろなタンパク質の中に存在して特定の機能を持つと考えられる部分配列を検出する検索エンジン) により解析し、その結果を判断基準として、各翻訳因子をコードする NBRP クローンを同定した。基本的には確実性の低いクローンも含めて入手した。

これらの cDNA については、最も一般的にタンパク質調製のために用いられる pET の発現プラスミドに載せて大腸菌内での組換え発現と、タグを利用したアフィニティー精製を試みた。また、実際に行ってみると、低温での発現誘導が有効であったので、低温誘導型の発現ベクター-pCold も用いた。さらに、これらの発現ベクターと、いくつかの生物材料レポジトリからのプラスミドを組み合わせて独自の発現ベクターを作成した。

なお、必要なすべての cDNA が NBRP に最初からあったわけではないので、組換え発現に関してはできるものから順に行った。ただし、eRF3 の cDNA に関しては、NBRP には無いことがわかっていたが配列は推定できたので、自前で cDNA クローニングを行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 翻訳伸長因子およびリボソームの精製

翻訳伸長因子 eEF1A および eEF2 については、研究開始当初からある程度の純度ものが得られていたが、eEF1A については保存安定性に問題があり、また、eEF2 については、純度に問題があった。そこで、胚芽からの調製法(分画法の種類と順序)を検討した。その結果、eEF1A については eEF1B との複合体として、比較的高純度で得られる方法を見出した。また、eEF2 についても純度が改善できた。

研究開始当初からリボソームについても活性のある画分を得ていたが、純度に問題があった。これについても種々検討し、サブユニットに乖離させた後超遠心分離し回収することで、比較的高純度と思われる画分を得た。現状では活性測定のために必要な他の因子の純度が十分でないため、これらの成果については公開に至っていない。

##### (2) 翻訳開始因子の調製

翻訳開始因子のうち、eIF5 については研究開始前に組換え発現法で調製できていた。本研究では、eIF5 については調製法の細かな改良を行った。eIF1, eIF1A, eIF4A, eIF4B, eIF(iso)4E については、大腸菌を用いた組換え法により合成し、タグアフィニティークロマトグラフィーで精製することができた。これらのうち、eIF4A と eIF(iso)4E については酵素活性および cap 結合活性が確認できた。

eIF2 に関しては、2つの新しい方法で調製することを試みた。第一に、eIF5 とのアフィニティーを利用して、コムギ胚芽抽出液中に

存在する eIF2 を精製することに挑戦した。HisTag を付加して大腸菌に合成させ Ni-Sepharose カラムに結合させて部分精製した eIF5 を調製した。これに、胚芽抽出液を分画した eIF2 を含む画分を混ぜ、再び Ni-Sepharose カラムに結合させ洗浄した。結合しているものをイミダゾールで溶出し分析したところ、eIF2 の3つのサブユニットのうち、サブユニットのみが結合していたと解釈できるデータが得られた。従来、eIF2 のサブユニットが細胞内で部分的にでも解離することは知られていないため、この結果は、何らかの未知の分子メカニズムの存在を示唆する。しかし、残念ながらこの性質は当研究の目的には不都合と判ったので、これ以上追究しなかった。これについては、2013年の「細胞を創る」研究会にて発表した。

第二の方法は、eIF2 の3つのサブユニットを大腸菌内で同時に発現させる方法である。組換え発現のアプローチは従来他の生物由来の eIF2 についてたくさんの研究者が種々の宿主を使って試みたがうまくいかなかった。従来法では、ポリペプチドとしては合成されても正しい立体構造を取らないことがわかっていて、我々は、これらサブユニットの他に EDA35 というタンパク質を共発現させることで正しい立体構造を取るようになることを考え、合計4つのポリペプチドを同時発現させるシステムを構築することを試みた。これまでに、3つまでは、大腸菌の全タンパク質後電気泳動するだけで確認できる程度に同時発現させることができている。研究開始当初には高額なため研究計画に組み入れることを想定していなかった遺伝子全合成技術が最終年度には現実的な価格になり、役に立った。この方法の有効性の検証については、研究期間終了後第一に取り組むべき課題となった。

eIF3 に関しては、文献に従って胚芽から精製を試みたところ、再現出来た。ただし、調べるうちに、eIF3 の各サブユニットのみかけのサイズと、cDNA 配列から推定されるサイズとが完全には一致しないことがわかった。胚芽から精製できる eIF3 と cDNA 配列から推定される eIF3 とが同じものなのかどうかについては今後検証が必要になる。

eIF2B に関しては当初計画にはなかったが、NBRP に cDNA クローンがすべてあることがわかったので、大腸菌での組換え発現を試みた。5つのサブユニット全てについてポリペプチドを得ることのできる条件をそれぞれ見出した。これについては2014年の「細胞を創る」研究会で発表した。今後、1つの発現条件で5つとも発現するような方法を見出す必要があり、これが課題として残された。

##### (3) 翻訳終結因子の調製

翻訳終結因子のうち、eRF1 については、大腸菌を用いた組換え発現法により大量調製できた。eRF3 については、NBRP に cDNA クローンがなかったため、cDNA クローニングを行

い、公的データベースである GenBank に登録されている機能未知タンパク質の配列とほぼ一致することがわかった。

#### (4) アミノアシル tRNA 合成酵素の調製

研究開始時点では、アミノアシル tRNA 合成酵素については、細胞内で高濃度に存在するはずであるため、少々大量発現させても大腸菌内で可溶性になりやすいものと考えていた。活性測定もしやすいので、cDNA を揃えて大腸菌で発現させれば良いと見込んでいた。ところが、実際に試みると、一般によく研究されている Tyr と Trp の酵素 (TyrRS, TyrRS のようにアミノ酸の記号に RS を付けて表す) に関しては予想通りだったものの、他の酵素のほとんどは簡単には可溶性の状態では発現しないことが判った。

研究期間内に、PheRS( ), LeuRS, IleRS, MetRS, ValRS, SerRS, AlaRS, TyrRS, HisRS, GlnRS, LysRS, GluRS, CysRS, TrpRS, ArgRS, GlyRS について着手 (未着手は 4 種) し、13 種については大腸菌内での発現を試みた。しかし、大量に可溶性の状態では発現し活性も見られたのは TyrRS と TrpRS だけであった。

また、PheRS, LeuRS, IleRS, CysRS については NBRP に完全長 cDNA の情報が無かった。IleRS については、配列解析が終わっていないクローンの中にそれらしいものが 2 種あったため、両者を取り寄せて自前で配列を解析した。その結果、片方の配列については CDS などの結果から全長を含んでいると判断できた。PheRS, LeuRS, CysRS については、欠失や挿入があることが推定されたので、他のクローンとの比較に基づいて配列を改変修正した。

cDNA 配列を精査したところ、多くのアミノアシル合成酵素 cDNA には、ミトコンドリアや葉緑体への移行のための配列がコードされており、細胞質の酵素の配列は、一部のものについては 2 番めの開始コドンから翻訳されたものであることが判るが、それ以外のものについて、cDNA 配列から確実に細胞質型酵素の N 末端アミノ酸が判定できるわけではないことがわかった。

#### (5) 独自発現ベクターセットの開発

研究を進めるうちに、大腸菌での cDNA 発現の際の温度がかなり重要な要素であることが判り、pET の他に低温発現誘導の pCold ベクターを併用するようになった。また、かなり多くの因子については複数のポリペプチドから成っており、大腸菌に合成させるためには共発現させる必要があった。また、アフィニティタグの位置の選択が重要であることは最初からわかっていた。ただでさえ発現させるべき cDNA の種類が多い上に、それぞれ最適な条件が異なる可能性が高く、種々の条件を実験で比較検討する必要があることになる。発現ベクターは基本的にそれぞれのメーカーが独立に作成したものであり、それらにクローニング可能な cDNA の末

端構造には統一性がない。末端構造を統一し、また、複数の cDNA を繋ぐことができるようにして、実験の手間をできる限り少なくすることは、研究を進める上で必須と考えた。そこで、自前の発現ベクターのセットを作成した。これを使うと、個々の cDNA のコード領域をいったん基本となるプラスミドに挿入すると、発現系、複製起点、薬剤耐性の変換と、他の cDNA との連結がそれぞれ 1 ステップで可能である。これについては、2014 年の「細胞を創る」研究会でその概要を発表した。

#### (6) 総括と展望

当初目標では、翻訳開始、伸長、終結反応を担う分子を集める予定であった。本研究開始以前からの分も含めると、翻訳開始因子のうち、eIF1, 1A, 3, 4A, (iso)4E, 5, 6 については、最低限の純度の因子が得られた。一方、eIF2, 2B, 4E, 4G, (iso)4G, 5B, PABP については着手し種々の検討を行ったが、活性の見込める試料が未だ得られていない。今後に課題を残した。伸長因子とリボソームに関しては、研究開始以前からある程度のクオリティの試料が得られていたが、本研究でそれらの調製方法を改良できた。伸長反応に必要なアミノアシル tRNA 合成酵素については 20 種中 13 種に着手し、2 種については問題なく調製できたが、当初予想に反して難しい問題があることが判った。終結因子については eRF1 が大量調製でき、eRF3 については未知だった cDNA をクローニングできた。すべてを揃えて翻訳反応を再構成するにはまだ時間がかかる。

一方で、リボソーム以外の主要な翻訳因子のすべての cDNA が手元に残った (eIF4G については完全長か不明)。これらの大腸菌での発現を同じやり方でテストするプラットフォームもできつつある。今後、この研究をさらに推進することが許されるならば、再構成タンパク質合成系の完成に近づけることができるものと期待される。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表](計 8 件)

K. Takai. Toward In Vitro Reconstitution of the Protein Synthesis System from Wheat. 8th International Symposium on Nanomedicine - Fusion of Nanomedicine and Molecular Science of Photosynthesis -, Ehime University, Matsuyama, December 4 - 6, 2014.

高井和幸, SfiI 認識部位を導入した大腸菌共発現ベクターの試み (A set of E. coli vectors with an SfiI site for co-expression of multiple proteins), 「細胞を創る」研究会 7.0, 東京大学, 東京, 2014 年 11 月 13-14 日。

上野秀道, 高井和幸, 富川千恵. 大腸菌を用いたコムギ由来翻訳開始因子 eIF2B の調

製の試み ( Expression of wheat eIF2B subunits in Escherichia coli ), 「細胞を創る」研究会 7.0, 東京大学, 東京, 2014 年 11 月 13-14 日 .

野中拓, 久松啓伍, 富川千恵, 高井和幸 コムギ由来翻訳開始因子 eIF2 の調製法の検討 「細胞を創る」研究会 6.0, 2013 年 11 月 14 ~ 15 日, 鶴岡(鶴岡メタポロームキャンパス).

野中拓, 久松啓伍, 富川千恵, 高井和幸 コムギ由来翻訳開始因子 eIF2 の調製法の検討 第 15 回日本 RNA 学会年会, 2013 年 7 月 24 ~ 26 日, 松山 (ひめぎんホール).

高井和幸, 久松啓伍 コムギ由来タンパク質合成関連因子の一次配列情報 「細胞を創る」研究会 5.0, ポスター発表 P-17, 2012 年 11 月 21 ~ 22 日, 横浜(東京工業大学すずかけ台キャンパス).

久松啓伍, 小笠原富夫, 遠藤弥重太, 高井和幸 タンパク質合成の再構成に向けた真核生物翻訳因子の調製 第 6 回無細胞生命科学研究会, 2011 年 11 月 16 ~ 17 日, 姫路(兵庫県立大学書写記念会館).

Keigo Hisamatsu, Tomio Ogasawara, Yaeta Endo, Kazuyuki Takai. Preparation of eukaryotic translation factors for reconstitution of protein synthesis. International Symposium on SYNTHESIZING LIFE AND BIOLOGICAL SYSTEMS & The Fourth Annual Meeting of the Japanese Society for Cell Synthesis Research ( 「細胞を創る」研究会 4.0 ), ポスター発表 P-40, 2011 年 10 月 24 ~ 28 日, 吹田 (千里ライフサイエンスセンター).

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

高井 和幸 (TAKAI, Kazuyuki)  
愛媛大学大学院理工学研究科・教授  
研究者番号: 40260848

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし

##### (4) 研究協力者

久松 啓伍 (HISAMATSU, Keigo)  
富川 千恵 (TOMIKAWA, Chie)  
岸本 達郎 (KISHIMOTO, Tatsuro)  
菅野 圭佑 (KANNO, Keisuke)  
上野 秀道 (UENO, Hidemichi)  
近藤 真輝 (KONDO, Masaki)

徳丸 達也 (TOKUMARU, Tatsuya)

野中 拓 (NONAKA, Taku)