

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2012

課題番号：24656511

研究課題名（和文） 新規翻訳現象の解析と利用

研究課題名（英文） Analysis and application of new translation system

研究代表者

阿部 洋 (ABE HIROSHI)

独立行政法人理化学研究所・伊藤ナノ医工学研究室・専任研究員

研究者番号：80415067

研究成果の概要（和文）：

原核生物である大腸菌の翻訳系において、「環状 RNA を用いた終わりのない回転式翻訳システム」を構築し、その分子メカニズムを解析した。終止コドンを除いた環状のメッセンジャーRNA (mRNA) を合成し、それらが大腸菌の無細胞翻訳系に加えることでエンドレスにタンパク質合成させることに成功した。その反応は通常の直鎖状 RNA を鋳型とするタンパク質合成反応に比べ、単位時間当たり 200 倍ほど高効率であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Small circular RNA molecules containing an infinite open reading frame were synthesized and tested in an *E. coli* cell-free translation system. A circular RNA 126 nucleotides in length was found to produce more product than its linear counterpart by two orders of magnitude, because a ribosome can work more effectively towards the elongation on circular RNA than it can on linear RNA in this continuous peptide synthesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：mRNA、翻訳、タンパク質合成、環状 RNA、原核生物、リボソーム、終わりのない回転式翻訳

1. 研究開始当初の背景

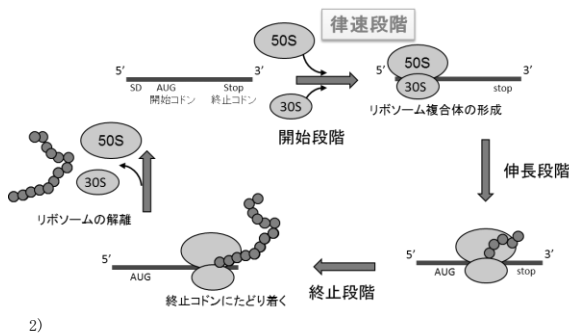
生物の体を構成しているタンパク質は、細胞核内にある DNA の一部の遺伝情報をもとに合成されている。その合成過程は、DNA がメッセンジャーRNA (mRNA) に変換され、続いて mRNA の一部の配列がアミノ酸に変換されて複数のアミノ酸が連なって1つのタンパク質が生産される。mRNA からタンパク質を合成する際には、リボソームが働き、mRNA の連続した3つの塩基を1つのアミノ酸に置き換える。

分子生物学的研究において、DNA は PCR 技

術で細胞外でも簡単に合成できる。しかし、タンパク質を人工的に合成することは技術的に制限があるため、どんなタンパク質でも簡便にかつ多量に合成できる手法の開発が望まれている。

近年、細胞核を持たない原始的な原核生物でのタンパク質合成過程の研究が進み、合成に関わるさまざまな因子の役割が解明された。その結果、試験管内で合成に関わる酵素を入れて効率的にタンパク質合成する「無細胞系」と呼ばれる手法が確立している。¹⁾

原核生物の1つである大腸菌がもつタンパク質合成過程では、直鎖状の mRNA を鋳型として合成が行われる。大まかに (1) 開始、(2) 伸長、(3) 終止の過程がある (図 1)。まず、リボソームが直鎖状の mRNA の先頭に存在するシャイン・ダルガノ配列 (SD 配列) に結合し、開始コドンからタンパク質合成を開始し、その後、アミノ酸が連なってできるタンパク質の伸長反応が起こり、リボソームが終止コドンに到達し、mRNA から解離する。タンパク質合成では、この一連の過程が繰り返される。タンパク質を多量に生産するためには、リボソームが mRNA 上で端から端まで結合と解離を繰り返す必要があるが、反応過程においてこの解離から次の結合までが最も遅い過程 (律速段階) になる。もし、この過程をスキップできればタンパク質合成の効率が飛躍的に増大することが予想され、これまでに大腸菌において緑色蛍光タンパク質 (GFP) をコードする 795 塩基の環状 RNA の翻訳実験が行われている。しかし、生産されたタンパク質は活性を持たなかったことが報告された。



2)

図 1 直鎖状の mRNA における始まりと終わりがある通常のタンパク質合成反応

- 1) Shimizu Y, Inoue A, Tomari Y, Suzuki T, Yokogawa T, Nishikawa K, Ueda T. *Nature Biotech.* 2001, 751
- 2) Perriman R, Sres M. *Methods Mol. Biol.* 2002, 69

2. 研究の目的

環状 RNA を利用した終わりのない回転式翻訳は、リボソームが結合・解離する時間のかかるサイクルを省略することで高効率なタンパク質合成を原理的に可能にするシステムである。

本研究では、原核生物の翻訳系において、「環状 RNA を用いた終わりのない回転式翻訳システム」を構築し、高効率に目的のタンパク質を合成する手法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

まず、大腸菌の直鎖状 mRNA 鋳型上から終止コドンを除き、開始コドンを残した環状 RNA を考案し、合成を行った (図 2)。

実験に用いる環状 mRNA として、先頭に開始コドンを含み、8 つのアミノ酸から構成されるタンパク質タグとして用いられている FLAG タンパク質を繰り返しコードし、終止コドンが存在しない mRNA 配列を設計した (図 3)。また、RNA の環サイズがリボソームの結合能や回転速度に影響を与えると考えられることから、環状化した RNA を種々設計・合成した。

作製したのは、FLAG タンパク質の繰り返し数を変えることで塩基配列の長さが 84 塩基、126 塩基、168 塩基、252 塩基の、それぞれ直鎖状と環状の mRNA である (図 4)。各 FLAG タンパク質の繰り返し回数は 2 - 6 回である。

それらに対して、大腸菌の中からタンパク質合成過程を取り出した無細胞系タンパク質合成システムを用いて、タンパク質合成反応を行い、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって、環状 mRNA や直鎖状 mRNA のタンパク質合成の効率を評価した。

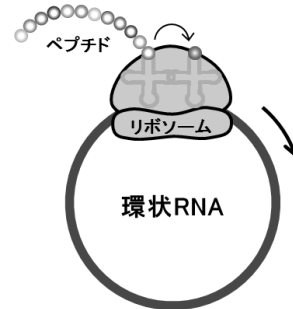


図 2 終わりのない回転式タンパク質合成反応

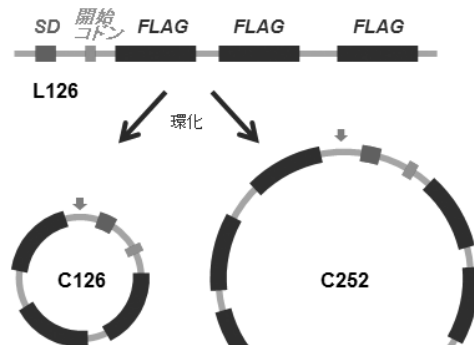


図 3 直鎖状 mRNA の配列と環状 mRNA

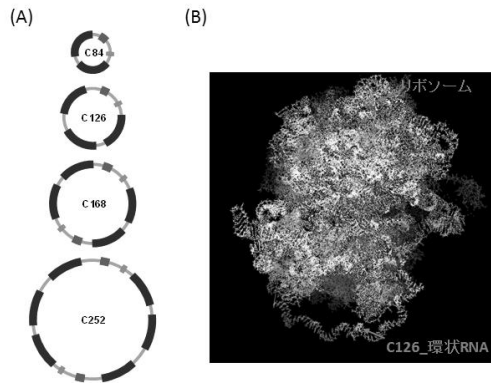


図4 合成した環状 mRNA (A) とリボソームと 126 塩基の mRNA 複合体のモデル (B)

4. 研究成果

直鎖状 mRNA では、それぞれの長さに応じて少量のペプチド断片が観察された。それに対し、環状 mRNA を用いた場合、84 塩基では環のサイズが小さすぎて長鎖のペプチドは観測されなかった (図 5)。一方、126 塩基、168 塩基では長鎖でかつ大量のペプチドが観測され、FLAG タンパク質が連続的に合成され、そのタンパク質は連なっていることが推測できた。翻訳産物は 1000kDa 以上の長鎖リピートタンパク質も含んでおり、一回転が 10kDa であることを考えると約 100 回程度回転したことになる。126 塩基サイズがより高効率であり、252 塩基では若干ペプチドの量が減少した。これは mRNA の高次構造による影響であると示唆される。

続いて、終止コドンありと終止コドンなしの 126 塩基の環状 mRNA を用いてタンパク質合成反応を解析した。その結果、終止コドンありの環状 mRNA は短いペプチド断片を産出するのに対して、終止コドンがない環状 mRNA は長鎖のタンパク質を大量に産出した。直鎖状 mRNA と比較して、環状 mRNA を用いたタンパク質合成反応は単位時間当たり 200 倍ほど高効率で進行することを確認した。

以上より、mRNA 配列から終止コドンを除き、3 の倍数の塩基数を有する環状 mRNA を作ると、直鎖 mRNA に比べ高効率で長鎖のタンパク質を合成できることが明らかになった。本手法を用いて特定のタンパク質を大量調製することが期待できる。例えば、長鎖のタンパク質であるコラーゲンや、シルク、クモの糸などの人工合成に応用できる可能性がある。また、リピートタンパク質を作って切断することで単量体タンパク質を効率よく作ることができるようになる。今後、さまざまなタンパク質材料合成への応用が期待できる。

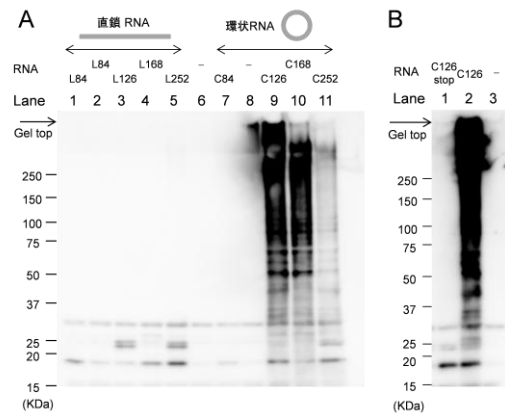


図 5 ポリアクリルアミドゲル電気泳動の解析結果

(A) 直鎖状 mRNA と環状 mRNA を用いた大腸菌の無細胞系タンパク質合成過程を用いたタンパク質合成。反応液をポリアクリルアミドゲル電気泳動で分子量解析した。126 塩基、168 塩基の環状 mRNA では大量のペプチドが確認できる。

(B) 126 塩基の環状 RNA における終止コドン有り (Lane1)、無し (Lane2) のタンパク質合成反応における影響。終止コドン無しの環状 mRNA では大量のペプチドが確認できる。

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 1 件)

Naoko Abe, Michio Hiroshima, Hideto Maruyama, Yuko Nakashima, Yukiko Nakano, Akira Matsuda, Yasushi Sako, Yoshihiro Ito,* and Hiroshi Abe* "Rolling circle amplification in a prokaryotic translation system using small circular RNA". *Angewandte Chemie International Edition*, 2013, doi:

10.1002/anie.201302044 査読有り

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[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 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

阿部 洋 (ABE HIROSHI)
独立行政法人理化学研究所・伊藤ナノ医工学
研究室・専任研究員
研究者番号：80415067

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者