

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650013

研究課題名(和文)大腸菌リボソーム駆動部構成蛋白質のカセット交換による真核型合成速度の実現

研究課題名(英文)Realization of eukaryotic synthesis speed in Escherichia coli by cassette exchange of ribosome stalk complex

研究代表者

姚 閔(YAO, Min)

北海道大学・先端生命科学研究科(研究院)・教授

研究者番号：40311518

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、大腸菌のストークタンパク質の一部を真核型に変換したキメラストーク複合体を用いて、真核型タンパク質のフォールド速度に対応した減速型(真核型)発現系に変更させることによって、真核生物タンパク質の可溶化発現の改善を目指す。この目的を達成するために、大腸菌由来のストーク複合体の背骨タンパク質L10のキメラ体をin vitro作製を試み、L10の変異体L10 CHと2種類のL10P0キメラL10 CH-POH2CTD/H3CTDの可溶化発現に成功した。また、そのL10P0キメラを精製し、P1との結合実験を行い、大腸菌のキメラリボソームストーク複合体を創製する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The protein synthesis speed of ribosome is one of the important factors for over-expressing soluble protein using Escherichia coli, especially over-expressing eukaryotic proteins. In addition, it has been known that the bacterial protein synthesis speed (GTPases-turnover) is about 10 times of eukaryote. In order to construct an over-expression system with low speed of protein synthesis (translation) of E. coli, we tried to modify ribosomal stalk L10 from E. coli to a chimera L10 (L10P0) which binds to both ribosomal protein L12 and P1 (eukaryotic type), and has a chimera characters of bacteria and eukaryote of GTPases-turnover. We have successfully expressed mutants of L10 CH, L10 CH-POH2CTD, and L10 CH-POH3CTD. The binding assay of purified L10 CH-POH2CTD with P1 showed the possibility for constructing a chimera stalk complex which will reduce the protein synthesis speed on ribosome.

研究分野：構造生物学、タンパク質結晶学

キーワード：翻訳速度 発現系 ストーク複合体 タンパク質工学 リボソーム X線結晶解析

1. 研究開始当初の背景

タンパク質合成装置であるリボソームには、本体から突き出たストックと呼ばれる部位がある。この部位は、タンパク質合成に必要とされる各種翻訳因子 (GTPase) をリクルートし、タンパク質合成速度を制御する重要な機能部位である⁽¹⁾。ストック部位はリボソーム本体に固く結合した背骨タンパク質 (バクテリアでは L10, 古細菌と真核生物では P0 と呼ばれる) に、複数の翻訳因子結合タンパク質 (バクテリアでは 2 個の L12 二量体, 古細菌では 3 個の P1 二量体) が結合した複合体から成る (図 1)。ストック部位は高度に動的な性質を持っているため、リボソームの構造解析では可視化できていない。研究代表者らは、古細菌ストック複合体 P0[P1]₂[P1]₂[P1]₂ の構造を決定し、その構造をもとに、P0 を改変することで様々な P1 欠損ストックを作製できること、各々の P1 二量体は独立して各

種翻訳因子をリクルートすることを明らかにし (図 2)⁽²⁾、さらには、バクテリアと真核型のストック構成成分が交換可能であることを示した^(3,4)。

大腸菌と比べて真核生物のタンパク質合成速度 (ターンオーバータイム) は、約 10 分の 1 であることが知られており、その差は、ストック複合体と翻訳因子の両種間差によるものであることが解明されている。これらことから、我々は、大腸菌リボソームの性質を持ちながら、真核生物のタンパク質に最適の合成速度を持つ、キメラ合成システムを構築するという着想に至った。

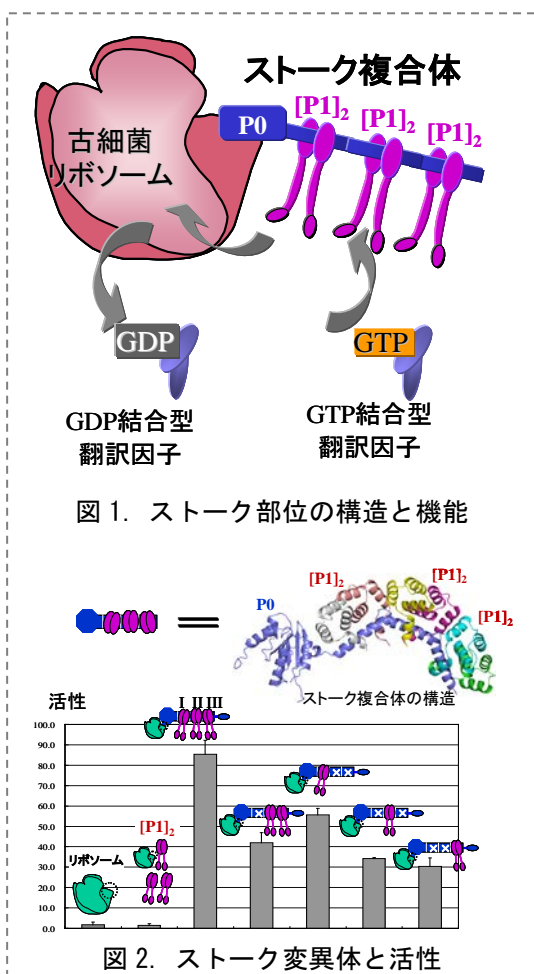
[参考文献]

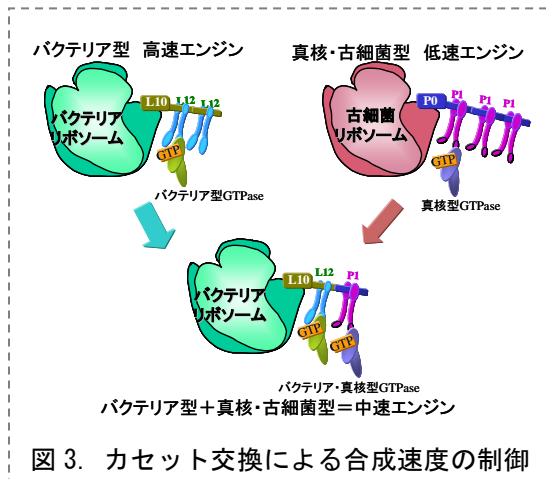
- (1) Uchiumi et al., *J. Biol. Chem.* 277, 3857-62, 2002
- (2) Naganuma et al., *J. Biol. Chem.* 285, 4747-56, 2010
- (3) Nomura et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109, 3748-53, 2012
- (4) Baba et al., *Nucl. Acid Res.*, 41, 3635-43, 2013

2. 研究の目的

リボソームの高分解能での構造解析が完成しつつある現在、その詳細な分子構造情報をもとに、次世代型タンパク質生産系の開発に向けた展開が期待されるが、タンパク質合成装置そのものを改変して異なる性質を付与しようとする試みは、未だほとんど行われていない。前述のように、研究代表者らはリボソーム駆動部となる機能部位 (GTPase センター) の主要成分であるストック複合体の構造解析に成功し、それを構成するタンパク質が、バクテリア型と真核型の間で、カセットのように交換できることを示した。

本研究では、構造解析情報に基づいて、大腸菌の背骨タンパク質 L10 に真核型 P1 が結





合するように結合部位の改変を行い、大腸菌を使いながらも、真核型タンパク質のフォールド速度に適した速度で合成されるタンパク質合成系を構築する。本システムは、背骨タンパク質 L10 に結合する L12 または P1 二量体の個数を調節することで、合成速度を制御することができる (図 3)。

大腸菌を用いたタンパク質の生産では、不溶化発現を抑制するため、低温培養や貧栄養培養など、合成速度を下げるための工夫がなされている。本研究は、菌の生育条件を変えるのではなく、合成マシン本体であるリボソームストーク複合体を改変することによって、タンパク質合成速度を制御する合成系を創出しようとするものである。タンパク質合成装置リボソームの駆動部の構成成分を入れ替えることによる機能改変は、この部位の構造解析の成功によって初めて可能になった手法であり、バクテリアと真核生物の両方の翻訳因子を認識できるタンパク質合成システムの構築は全く新しい試みである。

タンパク質合成過程において、ストーク複合体がリクルートする翻訳因子のうち、最も頻りに運搬されるのは、バクテリアの場合、伸長因子 EF-Tu と EF-G である。高等生物でこれらに対応する伸長因子は、EF1A と EF2 である。本研究では、このうち、単独分子としてリクルートされる EF2 を大腸菌のリボソームに取り込むことでタンパク質合成を低速化する。大腸菌のリボソームの一部を真

核型にしてタンパク質合成の速度を下げるというアイディアは、これまでに例のない、斬新でチャレンジ性の高い企てである。

3. 研究の方法

本研究では、大腸菌を使って減速型 (真核生物型) のタンパク質合成系を構築する。そのために、まず、①構造情報をもとに、大腸菌のストーク背骨タンパク質 L10 を改変して (L10^{ACH}: C 末端の L12 ダイマー結合ヘリックスの欠損体)、真核生物由来 P0 を結合する L10 変異体 (L10-P0^{CTD}: C 末端に EF2 を認識する P0 の C 末ドメイン P0^{CTD} を付加した変異体, L10^{ACH}-P0^{CTD}: L10^{ACH} の C 末端に EF2 を認識する P0 の C 末ドメイン P0^{CTD} を付加した変異体, L10^{ACH}-P0^{H3CTD}: L10^{ACH} の C 末端側に P1 ダイマー結合ヘリックスと P0^{CTD} を加える変異体) を作製する。②L10 変異体を用いてタンパク質合成の速度の異なる 3 種類のキメラストーク複合体を作製し、活性測定を行う。③作製したキメラストーク複合体を大腸菌に形質転換し、バクテリアと真核生物の両方の性質を持つ、新規キメラタンパク質合成システムを構築する。④大腸菌に真核生物由来 EF2 を加えて、バクテリアおよびヒト由来タンパク質の発現を試み、構築した新規キメラタンパク質合成システムを評価し、最適化を行う。

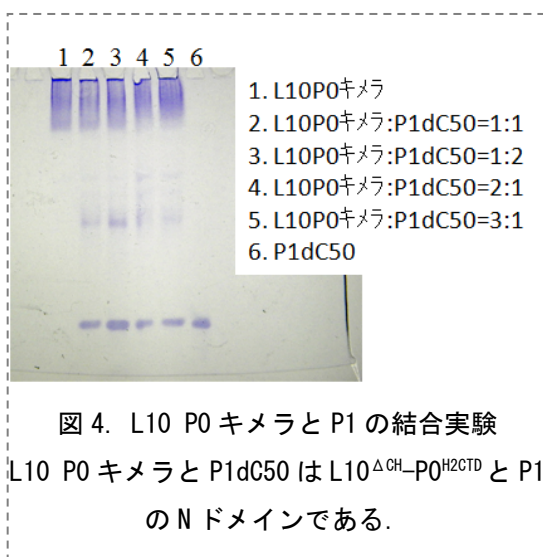
4. 研究成果

本研究では、構造解析情報に基づいて、大腸菌のストークタンパク質の一部を真核型に変換したストーク複合体を用いて、真核型伸長因子 EF2 を運搬・利用するタンパク質合成システムを作製する。これにより、大腸菌の安定したリボソームを使いながらも、真核型タンパク質のフォールド速度に対応した減速型 (真核型) 発現系を実現し、ヒトなどの真核

生物タンパク質の可溶化発現に供する。

この目的を達成するために、研究計画に基づき、平成26年度は、まず、大腸菌由来のストーク複合体の背骨タンパク質L10と、既に構造が得られた*Thermotoga maritime*由来のストーク複合体の背骨タンパク質L10変異体の4種類を設計した。その後、それらの変異体の大量調製を試みたが、大腸菌由来のL10変異体が多量に不溶化となり、時間がかかった。様々な発現条件を検討した結果、L10-L12の共発現によって、L10変異体のin vitroでの大量調製の可能性が示唆された。

平成27年度は、L10-L12の共発現によって、L10の変異体 L10^{ΔCH}、L10^{ΔCH}-P0^{H2CTD}、L10^{ΔCH}-P0^{H3CTD} などの様々なコンストラクトを作製し、そのうち、L10^{ΔCH}と2種類のL10^{ΔCH}-P0^{H2CTD}の可溶化発現ができた。また、クロマトグラフィーシステムを用いてL10^{ΔCH}-P0^{H2CTD}に成功し、Native-pageを用いたP1NTD (P0結合ドメイン)との結合実験を行った結果(図4)、大腸菌のキメラリボソームストーク複合体を創製する可能性が示唆された。



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0件)

[学会発表] (計5件)

- ① Takehito Tanzawa, Yuki Kumakura, Yoshikazu Tanaka, Toshio Uchiumi, Isao Tanaka, Min Yao, The study on GTPase recognition mechanism of ribosomal P stalk on GTPase-associated center, The 10th International Conference on Ribosome Synthesis, 2015年8月19-23日, ブリュッセル (ベルギー)
- ② 丹澤豪人, 熊倉侑紀, 田中良和, 内海利男, 田中勲, 姚閔, リボソームストークと翻訳因子GTPaseの相互作用, 第17回日本RNA学会年会, 2015年7月15-17日, ホテルライフオーツ札幌 (北海道札幌市)
- ③ 丹澤豪人, 熊倉侑紀, 田中良和, 内海利男, 田中勲, 姚閔, リボソームストークによるGTPase認識機構の解明, 平成26年度日本結晶学会年会及び総会, 2014年11月1-3日, 東京大学農学部本郷キャンパス (東京都文京区)
- ④ Takehito Tanzawa, Yuki Kumakura, Yoshikazu Tanaka, Toshio Uchiumi, Isao Tanaka, Min Yao, リボソームストークによる翻訳伸長因子の認識の仕組み (The study on aEF-2 recognition mechanism of ribosomal stalk), 第52回日本生物物理学会年会, 2014年9月25-27日, 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)
- ⑤ 丹澤豪人, 熊倉侑紀, 内海利男, 田中勲, 姚閔, リボソームストークによる翻訳伸長因子の認識機構の解明, 第16回日本RNA学会年会, 2014年7月23-25日, ウィンクあいち (愛知県名古屋市)

[その他]

北海道大学 X線構造生物学研究室
ホームページ

<http://altair.sci.hokudai.ac.jp/g6/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

姚 閔 (YAO, Min)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・
教授

研究者番号：40311518

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

内海 利男 (UCHIUMI, Toshio)

新潟大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：50143764

加藤 公児 (KATO, Koji)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・
助教

研究者番号：30452428