

博士論文

論文題目 1分子力学測定によるSecM翻訳アレスト解除機構の
解析

氏 名 楊 倬皓

目次

略語集	4
第 1 章 序論	5
1.1 研究の背景	5
1.1.1 リボソームによる翻訳過程のダイナミクス	5
1.1.2 新生ポリペプチド鎖がリボソームの翻訳に影響を与える	5
1.1.3 翻訳アレスト配列は翻訳を物理的に停止させる	5
1.1.4 SecM の翻訳アレスト機構と生理的役割	6
1.1.5 SecM 翻訳アレストの安定性を決める要因は何か	6
1.1.6 SecM 翻訳アレストは物理的な負荷によって解除されるか	7
1.2 研究の目的および方法	7
1.3 本論文の構成	7
1.4 第 1 章の図	8
第 2 章 SecM 翻訳アレストの安定性に関する検討	12
2.1 実験方法	12
2.1.1 使用した大腸菌の菌株・試薬・機器	12
2.1.2 各種アレスト配列発現コンストラクトの作製	14
2.1.3 <i>in vitro</i> 合成用鋳型の調製	23
2.1.4 翻訳アレスト複合体の調製	23
2.1.5 NuPAGE による翻訳アレスト複合体の解析	24
2.2 結果および考察	25
2.2.1 実験系の概要	25
2.2.2 リボソームトンネル外の新生ポリペプチド鎖が翻訳アレストを解除することがある	26
2.2.3 リボソームトンネル外の新生ポリペプチド鎖によって翻訳アレストの安定性が変わる	27
2.2.4 翻訳アレストの安定性の定量的評価	28
2.2.5 翻訳アレストの安定性に関する考察	28
2.3 小括	29
2.4 第 2 章の図	30
第 3 章 物理的な負荷による SecM 翻訳アレストの解除	39
3.1 実験方法	39
3.1.1 使用した大腸菌の菌株・試薬・機器	39
3.1.2 各種アレスト配列発現コンストラクトの作製	42
3.1.3 mRNA の合成	46
3.1.4 DNA ハンドルの合成	47

3.1.5	リボソームの精製	48
3.1.6	アレスト寿命の温度依存性の検討	49
3.1.7	ガラス基板の処理	49
3.1.8	光ピンセットのセットアップ	49
	光ピンセットの制御および観察	49
3.1.9	光ピンセットを用いた翻訳の 1 分子観察	50
3.1.10	磁気ピンセットを用いた 1 分子力学測定系の開発	53
3.1.11	磁気ピンセットによる翻訳アレスト解除の 1 分子力学測定	54
3.2	結果および考察	56
3.2.1	実験の戦略	56
3.2.2	無負荷時のアレスト寿命とその温度依存性	57
3.2.3	光ピンセットによる実験系の概略	58
3.2.4	光ピンセットによるリボソームの翻訳の観察	58
3.2.5	磁気ピンセットを用いた 1 分子力学測定系の構築	60
3.2.6	磁気ピンセットによる SecM 翻訳アレストの解除	60
3.2.7	物理的な負荷による翻訳アレスト解除に関する考察	62
3.3	小括	63
3.4	第 3 章の図	64
第 4 章	総括および今後の展望	83
4.1	本研究の総括	83
4.2	今後の展望	84
	参考文献	85
	謝辞	89

1.1	リボソームトンネルの狭窄部位	8
1.2	翻訳アレスト配列と翻訳停止機構	9
1.3	SecM による翻訳アレスト	10
1.4	SecM の翻訳アレストによる下流遺伝子の発現制御機構	11
2.1	各種アレスト配列発現コンストラクト	30
2.2	オーバーラップエクステンション PCR 法	31
2.3	翻訳アレスト複合体の解析	32
2.4	リボソームトンネル外の新生ポリペプチド鎖が翻訳アレストに与える影響	33
2.5	リボソームトンネル外の新生ポリペプチド鎖による翻訳アレスト複合体の割合の変化	34
2.6	アレスト配列特異的に翻訳が止まることの確認	35
2.7	翻訳アレスト寿命の測定	36
2.8	天然の SecM の翻訳アレスト寿命の測定	37
2.9	SecM の翻訳アレスト寿命とリボソームトンネル外の新生ポリペプチド鎖	38
3.1	1 分子力学測定用のコンストラクト	64
3.2	翻訳の 1 分子観察の戦略	65
3.3	アレスト寿命の温度依存性	66
3.4	光ピンセットの光学系	67
3.5	光ピンセットによる翻訳の 1 分子測定	68
3.6	ビーズの表面修飾の確認	69
3.7	Anti-digoxigenin ビーズへの mRNA の固定	70
3.8	ガラス基板上での翻訳活性の検討	71
3.9	2 つのビーズ間への翻訳アレスト複合体の固定	72
3.10	リボソームの動きの観察	73
3.11	磁気ピンセットの光学系	74
3.12	磁気ピンセットを用いた実験系の概要	75
3.13	ビーズの z 軸方向の変位の測定	76
3.14	磁性ビーズに印加される負荷の測定	77
3.15	翻訳アレスト複合体の基板固定	78
3.16	mRNA-DNA の長さとの関係	79
3.17	磁気ピンセットによる翻訳アレストの解除	80
3.18	磁気ピンセットによる翻訳の検出	81
3.19	翻訳アレスト解除の負荷依存性	82

略語集

BSA	bovine serum albumin
CV	column volume
DDS	dichlorodimethylsilane
Dig	digoxigenin
DNA	deoxyribonucleic acid
dsDNA	double-stranded DNA
DTT	dithiothreitol
EDC	N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EM-CCD	electron multiplying charge coupled device
GS リンカー	glycine-serine リンカー
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
mRNA	messenger RNA
NEM	N-ethylmaleimide
PAGE	polyacrylamidegel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
PEG	polyethylene glycol
PVDF	Polyvinylidene difluoride
RI	radioisotope
RNA	ribonucleic acid
rRNA	ribosomal RNA
SD	standard deviation
SDS	sodium dodecyl sulfate
SD 配列	Shine - Dalgarno 配列
ssDNA	single-stranded DNA
TIRF	total internal reflection fluorescence
Tris	2-amino-2-hydroxymethyl-1.3-propanediol
tRNA	transfer RNA

第 1 章

序論

1.1 研究の背景

1.1.1 リボソームによる翻訳過程のダイナミクス

リボソームによる翻訳速度は、原核生物で毎秒 10 ～ 20 アミノ酸、真核生物で毎秒 2 ～ 4 アミノ酸であるとされている。これは、タンパク質合成時の平均速度であり、実際の細胞内では、様々な要因によって、リボソームの翻訳速度は変化し、時には mRNA 上に停滞する現象も見られる。このようなリボソームの翻訳速度の変化は、遺伝子発現量の調節やタンパク質のフォールディングの介助などに利用されることがあり、生体内で重要な役割を担っている。例えば、タンパク質によっては、ドメイン間に使用頻度の低いコドンを設置し、翻訳速度を低下させることで、1つのドメインが正しくフォールディングされてから、次のドメインの翻訳に移るという仕掛けを施しているものがある¹。

そのため、個々のタンパク質の翻訳過程について正しく理解するためには、リボソームのタンパク質合成酵素としての側面だけでなく、その運動のダイナミクスを理解することが必要不可欠である。このような観点から、近年、1分子計測の技術を利用して、リボソームの運動特性や力学特性を調べる研究が行われ、翻訳過程におけるリボソームの新しいメカニズムが次々に発見されている^{2,3}。

1.1.2 新生ポリペプチド鎖がリボソームの翻訳に影響を与える

リボソームの翻訳速度は mRNA の構造や配列によって変化することが、様々な研究から明らかとなっている。大腸菌内において対応する tRNA の濃度が相対的に低いレアコドンと並べた配列では、翻訳速度が低下する^{4,5}。また、ステムループやシュードノットといった mRNA 上の 2 次構造が、翻訳速度を低下させる原因となる場合もある⁶。さらに、リボソームプロファイリングを用いた mRNA 上を翻訳するリボソームの網羅解析から、mRNA 上に SD 配列に似た配列があると、リボソームの 16S RNA との相互作用が強くなり、翻訳の一時的な停止が起こりやすくなることが示された^{7,8}。

近年、mRNA に加えて、翻訳産物である新生ポリペプチド鎖が翻訳速度に影響を与えていることが、徐々に明らかになってきた。例えば、プロリン残基や正電荷を持つ残基が連続すると、翻訳の効率が低下することが分かっている⁹。また、特定のアミノ酸配列はリボソームと相互作用して、翻訳の停止を引き起こす。これを翻訳アレストと呼ぶ。

1.1.3 翻訳アレスト配列は翻訳を物理的に停止させる

翻訳アレストは、新生ポリペプチド鎖とリボソームトンネルとの相互作用によって引き起こされる¹⁰。リボソームトンネルは、新生ポリペプチド鎖がリボソーム外に出る時の通り道であり、長さ約 10 nm、平均の幅 1.5 nm 程度の大きさで、中におよそ 30 ～ 40 残基分のポリペプチド鎖を収容する¹¹。周りを主に rRNA が取り囲ん

でいるため、基本的にはポリペプチド鎖とは相互作用しにくい構造となっている。しかし、リボソームトンネルには狭窄部位が存在し、その付近に位置するタンパク質や rRNA 中のいくつかの塩基が、特定のアミノ酸配列と相互作用をすることがある (図 1.1)。その結果、リボソームトンネル内における新生ポリペプチド鎖の立体配置が制限され、翻訳の停止を引き起こす。この翻訳停止は、mRNA にコードされたアミノ酸配列のみによって引き起こされるため、他の因子を必要としない、非常にユニークな翻訳停止機構である。

リボソームと相互作用して翻訳を停止させるアミノ酸配列は、アレスト配列と呼ばれ、真核・原核生物を問わず、これまで多数報告されている¹² (図 1.2)。これらのアレスト配列間に相同性は見られないため、リボソームトンネルは多くのアミノ酸配列と相互作用して翻訳アレストを起こすことが予想される。

翻訳アレストによってリボソームが mRNA 上に停滞することで、遺伝子の発現が制御される。例えば、mRNA の二次構造変化を誘起して下流遺伝子の翻訳を誘導する (本研究の対象である SecM はこのタイプ)、転写終結因子の結合を阻害して下流遺伝子の転写を助ける、mRNA のスキャンを止めることで遺伝子発現を抑制する、などの例が挙げられる¹³。これらは、周囲の環境に応じて、翻訳停止と翻訳再開が即座に切り替わるため、環境変化に応じた素早い応答が可能であり、非常に効率的な遺伝子発現制御機構といえる。

1.1.4 SecM の翻訳アレスト機構と生理的役割

翻訳アレストの中で最も研究が進んでいるのが、大腸菌の分泌タンパク質 SecM による翻訳アレストである。SecM のアレスト配列は、その 150 番目のアミノ酸残基であるフェニルアラニンから、166 番目の残基であるプロリンまでの領域である。翻訳アレストに必要な十分なアミノ酸残基をならべた **FXXXXWIXXXXGIRAGP** の配列が一般に SecM のアレスト配列と呼ばれる (図 1.3 A)。165 番目のアミノ酸残基であるグリシンをリボソームが翻訳すると、アレスト配列がリボソームトンネルと相互作用を起こす。これにより、ペプチジル転移酵素中心において P サイトのグリシンから A サイトのプロリンへのペプチド転移が阻害され、翻訳が停止する^{10,14}。

SecM のアレスト配列中で最も重要なのが、R163 と P166 の 2 つのアミノ酸残基である。R163 はペプチジル転移酵素中心付近で rRNA の塩基と相互作用し、G165 の空間配置を変化させる。これにより G165 が P166 から空間的に遠ざかり、P166 のイミノ基とのペプチド形成反応が完全に阻害される (図 1.3 B)。そのため、この 2 つのアミノ酸残基のうち、どちらか一方を置換すると、SecM のアレスト能は完全に失われる¹⁰。

SecM の翻訳アレストは、同一オペロンの下流遺伝子 *secA* (Sec 膜透過装置を駆動するモータータンパク質) の発現制御を担っている¹⁵ (図 1.4)。翻訳アレストによりリボソームが mRNA 上に停滞することで、mRNA の構造変化を伴って *secA* の SD 配列が露出し、その発現が誘導される。アレスト状態において、合成途上の SecM の N 末端側は、Sec 膜透過装置に認識され、膜透過される。このときに SecM が物理的に引っ張られることで翻訳アレストが解除されると考えられている。そのため、SecA の発現量が増加し、膜透過の活性が上昇すると、速やかに翻訳アレストが解除され、SecA の発現が抑制される。この一連の過程は、フィードバック機構を備えた SecA の巧妙な遺伝子発現制御機構である¹⁶。

1.1.5 SecM 翻訳アレストの安定性を決める要因は何か

これまで、SecM のアレスト配列単独で安定に翻訳が停止すると考えられてきた。そのため、SecM のアレスト配列は翻訳を止める実験によく用いられている。例えば、SecM のアレスト配列を様々な遺伝子の下流に組み込むことで、mRNA 上の特定の位置で翻訳を停止させ、リボソーム表面にタンパク質を提示する研究に利用されている¹⁷⁻²⁰。しかし、これらの研究について詳細に見ていくと、それぞれの翻訳アレスト産物の割合が異なっていることに気づく。中には、アレスト配列の直後にプロリンをもう一つ付加することで、翻訳効率をさらに低下させ、翻訳を止めているものもある¹⁷。これらは、リボソーム表面に提示されるタンパク質によって、翻訳アレストの安定性が変化することを示唆している。

一方、大腸菌の中では、SecM の翻訳アレストは熱力学的に安定であることが望ましい。膜透過以外の要因で

翻訳アレストが容易に解除されてしまつては、下流遺伝子の発現制御機構が成立しなくなる。もし、リボソーム外に出ている新生ポリペプチド鎖が翻訳アレストの安定性を変化させるなら、天然の SecM の N 末端側配列は翻訳アレストの安定化に関与していることが予想される。

しかし、これまで SecM の翻訳アレストの安定性に着目した研究は少ない。翻訳アレストの安定性について調べ、その安定性を変える要因を同定することは、翻訳アレストによる遺伝子発現制御機構を考える上で、大きな意義があると考えられる。

1.1.6 SecM 翻訳アレストは物理的な負荷によって解除されるか

SecM による遺伝子発現制御機構において、翻訳停止と同様に重要なのが翻訳の再開である。SecM の翻訳アレストは、膜透過時の物理的な張力によって解除されると考えられている。実際に、膜透過時に翻訳アレストが解除されることが実験によって確かめられている²¹。しかし、この翻訳アレストの解除が物理的な張力のみによるものかどうかは、完全に証明されていない。新生ポリペプチド鎖を引っ張ることで翻訳アレストを解除し、再開した翻訳を直接観察することは未だできていない。Bustamante らのグループは、翻訳アレスト解除後の、抗生物質 puromycin の取り込みによる新生ポリペプチド鎖の放出を 1 分子で観察することで、負荷依存的に SecM の翻訳アレストが解除されることを示した²²が、これも翻訳の再開を直接観察しているわけではない。

翻訳アレスト解除の最大の意義は、下流の翻訳の再開にある。人工的に翻訳アレストを解除できれば、任意の下流遺伝子の翻訳のタイミングを制御することが可能となる。それによって、翻訳アレストは翻訳の終結点となるだけでなく、翻訳の開始点としても利用できるようになる。

1.2 研究の目的および方法

これらの背景を踏まえ、本研究では、まず、SecM による翻訳アレストの安定性を定量的に評価し、その安定性を変化させる要因について調べることを目的とした。翻訳途上鎖のリボソームトンネル外領域が SecM の翻訳アレストに影響を与えるという仮説に基づいて、様々な翻訳アレスト複合体を作製し、それぞれの翻訳アレスト寿命を測定することで、安定性の検討を行った。

次に、物理的な張力で SecM の翻訳アレストを解除し、翻訳の再開を直接観察することを目指した。そのために、新生ポリペプチド鎖への負荷の印加とリボソームの動きの観察が同時にできる 1 分子力学測定系を、光ピンセットおよび磁気ピンセットを用いて開発し、測定を行った。

1.3 本論文の構成

第 1 章では、SecM の翻訳アレストに関する既往知見と未解決の課題および本研究の目的について述べた。

第 2 章では、翻訳途上鎖のリボソーム外領域が SecM の翻訳アレストに与える影響を検討した結果について述べる。様々なコンストラクトを作製して、翻訳アレスト複合体の寿命を測定することで、リボソームトンネル外の新生ポリペプチド鎖が翻訳アレストの安定性を大きく変えることを見出した。また、天然の SecM のリボソームトンネル外領域が翻訳アレストの安定化に寄与していることも明らかとなった。

第 3 章では、物理的な負荷による SecM の翻訳アレスト解除を行った結果について述べる。新生ポリペプチド鎖への負荷の印加およびリボソームの翻訳の可視化を行うために、光ピンセットと磁気ピンセットを用いた 1 分子力学測定系を構築した。これにより、SecM の翻訳アレストを人工的に解除し、下流の遺伝子の翻訳を観察することに成功した。

第 4 章では、本研究のまとめと今後の展望について記述する。

1.4 第1章の図

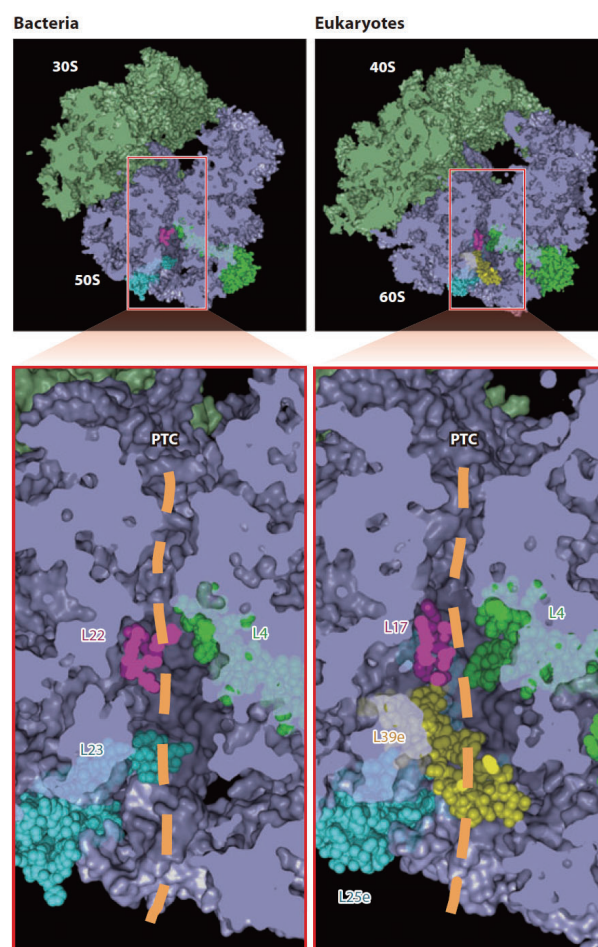


図 1.1 リボソームトンネルの狭窄部位

(左) 細菌のリボソームおよびリボソームトンネルの構造. 狭窄部位をリボソームタンパク質である uL4, uL22 が取り囲む.
(右) 真核生物のリボソームおよびリボソームトンネルの構造. 狭窄部位をリボソームタンパク質である uL4, uL17 が取り囲む. それぞれ, ペプチジル転移酵素中心 (PTC) から点線で示す部分を通して, 新生ポリペプチド鎖がリボソーム外へと排出される様子を示している. 図は参考文献¹³から引用転載

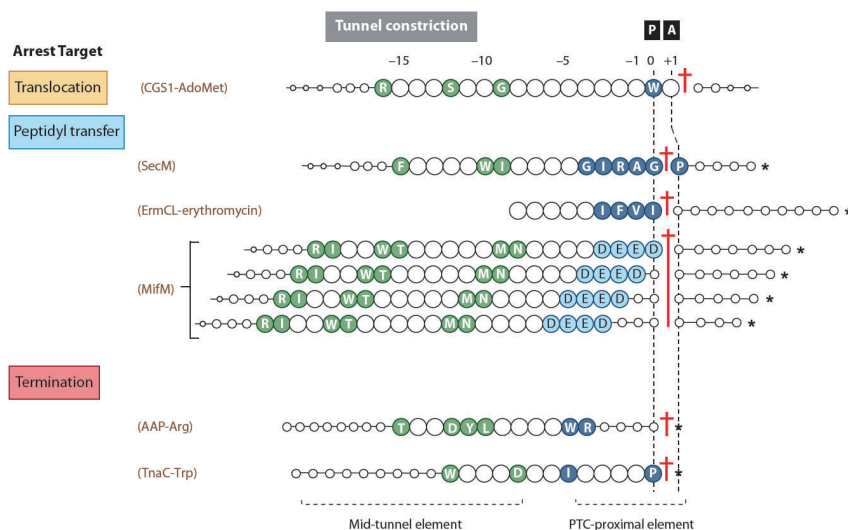


図 1.2 翻訳アレスト配列と翻訳停止機構

翻訳を停止したリボソームの P サイトの位置を 0 で表し、N 末端側のアミノ酸残基の位置を P サイトからの残基数に負の符号をつけて表す。それぞれ、翻訳アレストに必要な十分とされるアミノ酸残基を文字で示す。図中に緑で示されたアミノ酸残基がリボソームトンネルの狭窄部位付近に位置するアミノ酸残基であり、青で示されたアミノ酸残基がペプチジル転移酵素中心付近に位置するアミノ酸残基である。それぞれがリボソームと相互作用をすることで、翻訳アレストを誘起する。アレスト配列による翻訳阻害は大きく 3 種類に分類される。リボソームの転位の阻害、ペプチジル転移反応の阻害、翻訳終結反応の阻害である。以下にそれぞれのアレスト配列について記す。(CGS1-AdoMet) シロイヌナズナにおいて発見されたアレスト配列。リボソームの転位を阻害することで翻訳を停止させる。メチオニンの生合成の調節に関与する。(SecM) 大腸菌において発見されたアレスト配列。リボソームトンネルと相互作用して、ペプチジル転移反応を阻害することで翻訳を停止させる。A サイトのプロリンまでをアレスト配列に含む。(ErmCL-erythromycin) 黄色ブドウ球菌において発見されたアレスト配列。ペプチジル転移反応を阻害することで翻訳を停止させ、Erythromycin 存在下で、抗生物質耐性遺伝子の発現を誘導する働きを持つ。(MifM) 枯草菌において発見されたアレスト配列。複数の連続したコドンにおいて計 4 回分、ペプチジル転移反応を阻害する。これにより、長時間に渡って安定に翻訳を停止させる。タンパク質の膜挿入活性の調節に関与する。(AAP-Arg) アカパンカビにおいて発見されたアレスト配列。終結反応を阻害することで翻訳が停止する。アルギニンの生合成の調節に関与する。(TnaC-Trp) 大腸菌において発見されたアレスト配列。終結反応を阻害することで翻訳を停止させ、*tna* の転写を誘導する働きを持つ。図は参考文献¹³から引用転載

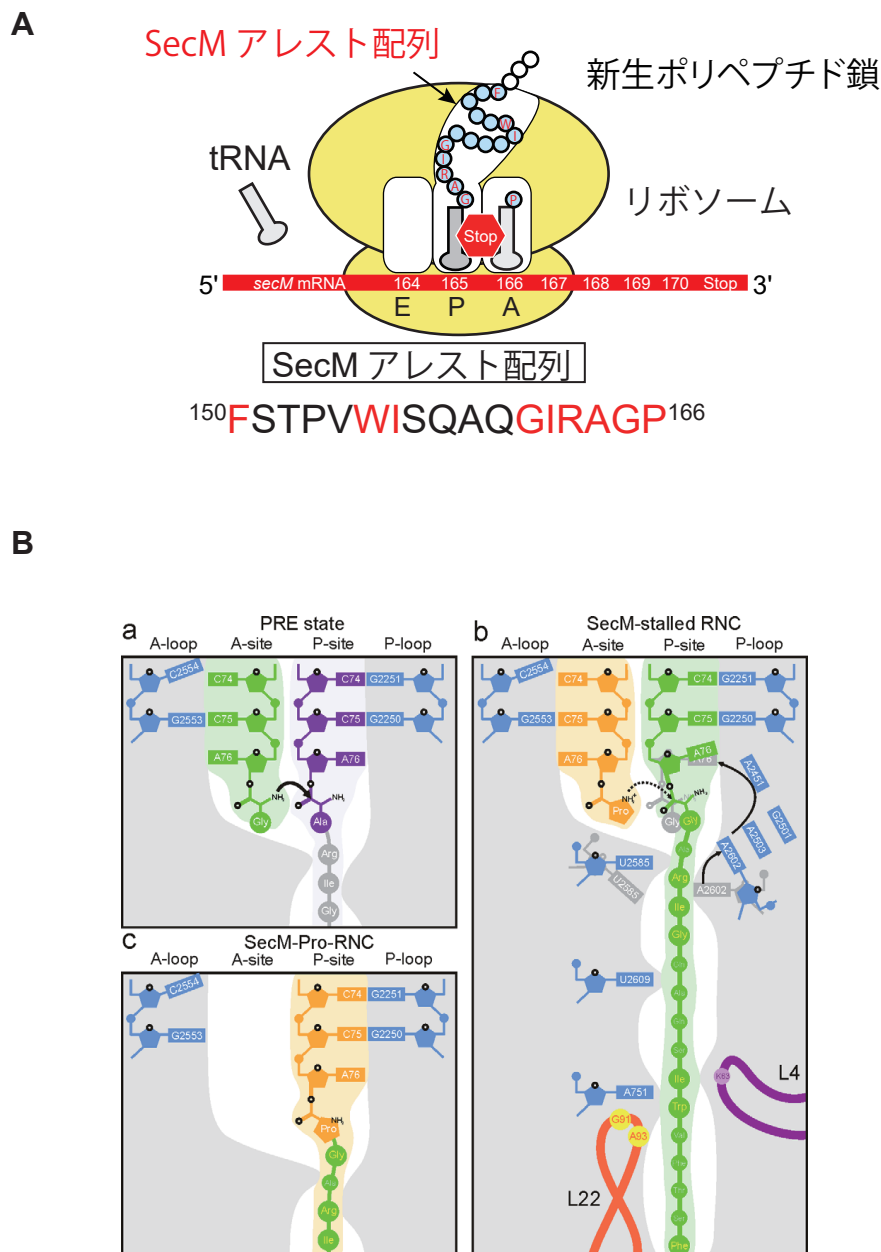


図 1.3 SecM による翻訳アレスト

(A) SecM の翻訳アレスト配列を翻訳後、P サイトのグリシンから A サイトのプロリンへのペプチジル転移反応が阻害され、翻訳が停止する。リボソームの P サイトにはペプチジル-tRNA、A サイトにはプロリル-tRNA が取まった状態となっている。

(B) SecM のアレスト配列とリボソームトンネルとの相互作用を示す。(a) アレストの前段階。A164 から G165 へのペプチジル転移反応時の配置。ポリペプチド鎖はリボソームトンネルと相互作用していない。(b) SecM による翻訳アレスト状態。本来の空間配置を灰色で示す。新生ポリペプチド鎖がリボソームトンネルと相互作用することで、rRNA の塩基 A2602 の位置が少しずれる。これによって tRNA の塩基 A76 の空間配置が変わることで、ペプチジル転移酵素中心における G165 の空間配置が変化し、P166 から遠ざかる。その結果、G165 から P166 へのペプチジル転移反応が阻害される。この反応の阻害には、プロリンの立体構造も重要であるため、166 番目の残基を他のアミノ酸に置換すると翻訳アレストは起こらなくなる。(c) 翻訳アレスト解除後。G165 から P166 へのペプチジル転移反応後の配置を示す。図 (B) は参考文献¹⁴から引用転載

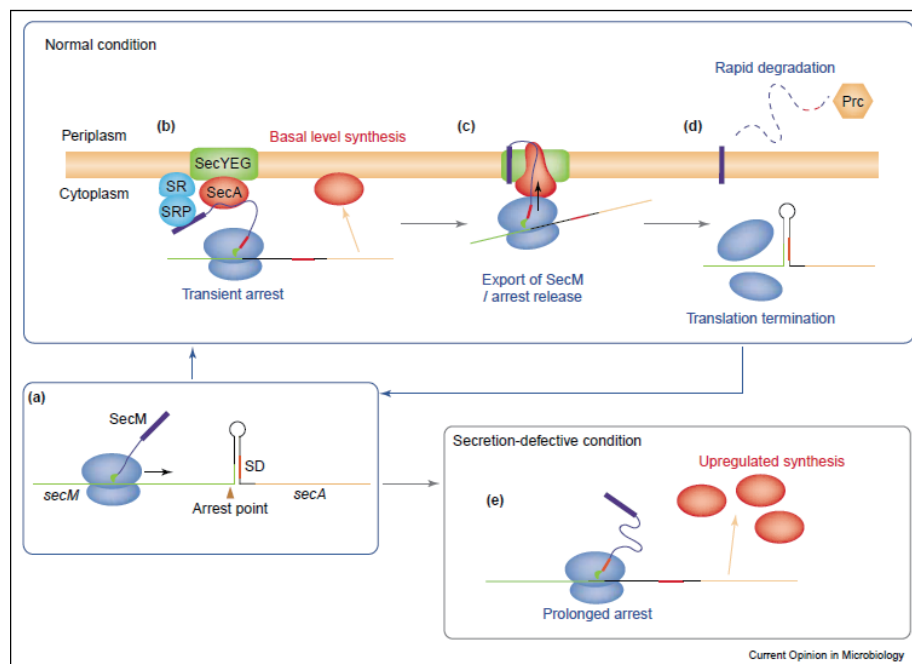


図 1.4 SecM の翻訳アレストによる下流遺伝子の発現制御機構

(a) *secM* と *secA* は同一 mRNA 上にコードされている。この mRNA が二次構造をとることで、*secA* の SD 配列が隠れ、SecA は発現しない。(b) SecM の翻訳アレストにより、リボソームが mRNA 上に停滞することで、mRNA の二次構造が壊され、SD 配列が露出し、SecA の翻訳が誘導される。(c) SecA と SecYEG により、分泌タンパク質である SecM がペリプラズム側へと膜透過される。この時の張力により、翻訳アレストが解除される。(d) SecM の翻訳が終結し、リボソームが mRNA から解離する。mRNA はもとの二次構造をとり、*secA* の発現が再び抑制される。ペリプラズム側へ膜透過された SecM は速やかに分解される。(e) 膜透過装置の活性が低いときには、SecM は膜透過されず、翻訳アレスト状態が続く。それにより、SecA の発現量が増えて、膜透過活性が上昇する。図は参考文献¹⁶から引用転載

第 2 章

SecM 翻訳アレストの安定性に関する検討

SecM 翻訳アレスト複合体の熱力学的安定性は、その遺伝子制御機構において最も重要な部分である。SecM の翻訳アレスト機構において、外部からの負荷がない条件で翻訳アレストが自発的に解除されにくいことが、下流の遺伝子発現制御のフィードバック機構の根幹をなす。しかし、SecM の翻訳アレストがどの程度安定であるかについては、これまで全く議論されてこなかった。そのため、SecM の翻訳アレスト配列があれば翻訳は停止する、という定性的な理解にとどまってきた。

SecM のアレスト配列とリボソームトンネルとの相互作用については、これまで生化学的・構造学的に詳細に調べられている。アレスト配列のアラニンスキャン解析から翻訳アレストに必要な不可欠なアミノ酸残基が同定され¹⁰、電子顕微鏡による翻訳アレスト複合体の立体構造解析からリボソームトンネルとの相互作用部位や、翻訳アレスト状態におけるアレスト配列の空間配置が明らかになった^{23,24}。しかし、アレスト配列以外の領域が翻訳アレストに与える影響については、これまでほとんど着目されてこなかった。

本研究では、リボソームトンネル外に出た新生ポリペプチド鎖が、翻訳アレストの安定性に関与している可能性に着目した。SecM 翻訳アレスト複合体のリボソーム外領域を変化させたコンストラクトを作製し、それぞれのアレスト寿命を測定することで安定性を比較した。その結果、翻訳途上鎖のリボソーム外領域が翻訳アレスト寿命を変化させることが分かった。また、天然の SecM のリボソーム外領域が翻訳アレストの安定化に寄与していることを初めて明らかにした。

2.1 実験方法

2.1.1 使用した大腸菌の菌株・試薬・機器

大腸菌の菌株

本研究で使用した菌株は、DH5 α 、XL10-Gold の 2 株である。以下にその遺伝子型を示す。

DH5 α :

F⁻, ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(r_K⁻, m_K⁺), *phoA*, *supE44*, λ^- , *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*

XL10-Gold:

Tet^r, Δ (*mcrA*)183, Δ (*mcrCB*-*hsdSMR*-*mrr*)173, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, *lac*, *Hte*, [F', *proAB*, *lacI*^qZ Δ M15, Tn10 (Tetr), *Amy*, *Camr*]

試薬

Agarose S	ニッポン・ジーン
Anti-IgG(H+L), Mouse, Rabbit-Poly, HiLyte Fluor 555	AnaSpec
<i>Bam</i> H I	タカラバイオ
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Life Technologies
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution	東洋紡
DNA Ligation Kit (Mighty Mix)	タカラバイオ
<i>Dpn</i> I	東洋紡
EasyTag L-[³⁵ S]-Methionine, 500 µCi, Stabilized FastGene Plasmid Mini Kit	FastGene
GenElute Bacterial Genomic DNA Kit	Sigma-Aldrich
HaloTag TMR Ligand	Promega
<i>Hind</i> III	タカラバイオ
ImmunoBlock	DS ファーマバイオメディカル
KOD -Plus- Mutagenesis Kit	東洋紡
MagExtractor -PCR&Gel Clean up-	東洋紡
MagExtractor -Plasmid-	東洋紡
<i>Nde</i> I	New England BioLabs
Nuclease-free water	QIAGEN
NuPAGE 10% Bis-Tris Gels	Life Technologies
NuPAGE MOPS SDS Running Buffer (20x)	Life Technologies
pET23a	Merck Millipore
pET21c	Merck Millipore
pFN18A (HaloTag 7) T7 Flexi Vector	Promega
Precision Plus Protein All Blue Prestained Protein Standards	Bio-Rad
Primers	オペロンバイオテクノロジー
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	タカラバイオ
pTA2	東洋紡
PURExpress <i>in vitro</i> Protein Synthesis Kit	New England BioLabs
PURExpress ΔRibosome Kit	New England BioLabs
Puromycin	Sigma-Aldrich
RNAsecure Reagent	Life Technologies
SUPERase • In RNase Inhibitor	Life Technologies
SYBR Safe DNA Gel Stain	Life Technologies
Tris Buffered Saline with Tween 20 (TBS-T) Tablets, pH7.6	タカラバイオ
人工遺伝子	Integrated DNA Technologies
クリアブロット・P 膜	アトー

その他の試薬は、和光純薬工業から購入した。

機器

DNA シーケンサー (Applied Biosystems 3130xL Genetic Analyzer)	Life Technologies
遠心エバポレーター (CVE-2000)	東京理化器械
蛍光イメージャー (Molecular Imager Fx)	Bio-Rad
恒温振盪培養機 (BioShaker BR-43FL)	タイテック
サーマルサイクラー (Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler)	Life Technologies
サーマルサイクラー (PTC-200 Thermal Cycler)	MJ Research
サブマリン型電気泳動装置 (Mupid-2plus)	Mupid
紫外可視分光光度計 (V-570)	日本分光
タンパク質ゲル電気泳動槽システム (XCell SureLock Mini-Cell)	Thermo Fisher Scientific
超微量紫外可視分光光度計 (Nanodrop 2000)	Thermo Fisher Scientific
パワーサプライ (Power Station 1000XP)	アトー
プロットング装置 (AE-6678 ホライズプロット)	アトー
微量高速冷却遠心機 (MX-300)	トミー精工

2.1.2 各種アレスト配列発現コンストラクトの作製

SecM 遺伝子のクローニング

大腸菌 DH5 α よりゲノム DNA を抽出した (GenElute Bacterial Genomic DNA Kit). これを鋳型に用い, SecM 遺伝子を PCR により増幅した. プライマーの配列 (表 2.1) を以下に示す.

表 2.1 SecM 遺伝子クローニング用プライマー

	配列	制限酵素サイト
SecM.F	5'-CCCAAGCTTGGCAATAACGTGAGTGG-3'	<i>Hind</i> III
SecM.R	5'-CGGGATCCATAATAAAATCTCAAACG-3'	<i>Bam</i> HI

下線部は制限酵素配列を示す. 以下の組成で PCR 反応溶液を調製した.

Nuclease-free water	31.5 μ L
5 \times PrimeSTAR Buffer	10 μ L
dNTPs (2.5 mM each)	4 μ L
10 μ M Primer 1	1.5 μ L
10 μ M Primer 2	1.5 μ L
84 ng/ μ L DH5 α genomic DNA	1 μ L
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	0.5 μ L
Total	50 μ L

反応は, 変性 (98 $^{\circ}$ C, 10 sec), アニーリング (50 $^{\circ}$ C, 5 sec), 伸長 (72 $^{\circ}$ C, 1 min) を 1 サイクルとし, 30 サイクル行った. 増幅産物を MagExtractor -PCR&Gel Clean up-により精製し, 制限酵素 (*Bam*HI および *Hind* III) 処理を行った. 制限酵素処理断片をアガロースゲルより切り出し精製し (MagExtractor -PCR&Gel Clean up-), *Bam*HI および *Hind* III で処理した pTA2 ベクターに挿入した. 遺伝子断片の挿入には, DNA Ligation Kit (Mighty Mix) を用いた. 産生プラスミドで形質転換した大腸菌 XL10-Gold よりプラスミドを抽出し (MagExtractor -Plasmid-), 挿入断片の塩基配列の確認を行った (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing

Kit, Applied Biosystems 3130xL Genetic Analyzer). 以下, このプラスミドを pTA-SecM と呼ぶ.

Halo-L8-SecM₁₃₃₋₁₇₀ 発現コンストラクトの作製

Halo-L8-SecM₁₃₃₋₁₇₀ は, HaloTag タンパク質の下流に 8 残基の GS リンカーを介して SecM の C 末端配列 (133-170 残基目) を連結したコンストラクトである (図 2.1 A). 発現コンストラクトは, 図 2.2 に示す方法 (オーバーラップエクステンション PCR 法) により作製した. まず, pFN18A (HaloTag 7) T7 Flexi Vector を鋳型に HaloTag 遺伝子を, pTA-SecM を鋳型に SecM の C 末端配列を PCR により増幅した. プライマーの配列 (表 2.2, 表 2.3) を以下に示す.

表 2.2 HaloTag 遺伝子増幅用プライマー

	配列	制限酵素サイト
HaloTag_F	5'-GGGAATTCCATATGGCAGAAATCGGTACTGG-3'	<i>Nde</i> I
HaloTag_R	5'-GCCAGAGCCACCGCCGATCCGCCGAAATCTCGAGCGTCG-3'	<i>Bam</i> HI

表 2.3 SecM の C 末端配列 (133-170 残基目) 増幅用プライマー

	配列	制限酵素サイト
SecM_F2	5'-GGATCCGGCGGTGGCTCTGGCTCTGAAAAGGGTTATCGCATTG-3'	<i>Bam</i> HI
SecM_R2	5'-CCCAAGCTTAGGTGAGGCGTTGAGGG-3'	<i>Hind</i> III

下線部は制限酵素配列を示す. 以下の組成で PCR 反応溶液を調製した.

Nuclease-free water	31.5 μ L
5 \times PrimeSTAR Buffer	10 μ L
dNTPs (2.5 mM each)	4 μ L
10 μ M Primer 1	1.5 μ L
10 μ M Primer 2	1.5 μ L
2 ng/ μ L Template	1 μ L
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	0.5 μ L
Total	50 μ L

反応は, 変性 (98°C, 10 sec), アニーリング (50°C, 15 sec), 伸長 (72°C, 1 min (HaloTag) or 30 sec (SecM₁₃₃₋₁₇₀)) を 1 サイクルとし, 30 サイクル行った. その後, 増幅産物を鋳型に, 以下のような反応を行った.

Nuclease-free water	31.5 μ L
5 \times PrimeSTAR Buffer	10 μ L
dNTPs (2.5 mM each)	4 μ L
PCR product (HaloTag)	0.5 μ L
PCR product (SecM)	0.5 μ L
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	0.5 μ L
Total	47 μ L

反応は, 変性 (98°C, 10 sec), アニーリング (50°C, 15 sec), 伸長 (72°C, 1.5 min) を 1 サイクルとし, 5 サイクル行った. その後, 10 μ M HaloTag_F および 10 μ M SecM_R2 を 1.5 μ L ずつ添加し, 変性 (98°C, 10

sec), アニーリング (50°C, 15 sec), 伸長 (72°C, 1.5 min) を 1 サイクルとした反応を 30 サイクル行った. 増幅産物を MagExtractor -PCR&Gel Clean up-により精製し, 制限酵素 (*Nde* I および *Hind* III) 処理を行った. 制限酵素処理断片をアガロースゲルより切り出し精製し (MagExtractor -PCR&Gel Clean up-), *Nde* I および *Hind* III で処理した pET21c ベクターに挿入した. 遺伝子断片の挿入には, DNA Ligation Kit (Mighty Mix) を用いた. 産生プラスミドで形質転換した大腸菌 XL10-Gold よりプラスミドを抽出し (FastGene Plasmid Mini Kit), 塩基配列の確認を行った (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems 3130xL Genetic Analyzer). 以下, このプラスミドを pHalo-L8-SecM₁₃₃₋₁₇₀ と呼ぶ.

Halo-L17-SecM₁₃₃₋₁₇₀ 発現コンストラクトの作製

Halo-L17-SecM₁₃₃₋₁₇₀ は, HaloTag タンパク質の下流に 17 残基の GS リンカーを介して SecM の C 末端配列 (133-170 残基目) を連結したコンストラクトである (図 2.1 A). HaloTag の C 末端配列の下流に 17 残基の GS リンカーを介して SecM の C 末端配列 (133-170 残基目) が連結された人工遺伝子を鋳型にし, PCR により増幅した. プライマーの配列 (表 2.4) を以下に示す.

表 2.4 Halo-L17-SecM₁₃₃₋₁₇₀ 人工遺伝子増幅用プライマー

配列		制限酵素サイト
Linker_F	5'-CGCTGGCTGTCGACGCTCG-3'	
SecM_R2	5'-CCCAAGCTTAGGTGAGGCGTTGAGGG-3'	<i>Hind</i> III

下線部は制限酵素配列を示す. 以下の組成で PCR 反応溶液を調製した.

Nuclease-free water	31.5 μ L
5 \times PrimeSTAR Buffer	10 μ L
dNTPs (2.5 mM each)	4 μ L
10 μ M Primer 1	1.5 μ L
10 μ M Primer 2	1.5 μ L
2 ng/ μ L Template	1 μ L
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	0.5 μ L
Total	50 μ L

反応は, 変性 (98°C, 10 sec), アニーリング (50°C, 15 sec), 伸長 (72°C, 20 sec) を 1 サイクルとし, 30 サイクル行った. その後, 以下のような反応を行った. 増幅産物を MagExtractor -PCR&Gel Clean up-により精製し, 制限酵素 (*Bam*HI および *Hind* III) 処理を行った. 制限酵素処理断片をアガロースゲルより切り出し精製し (MagExtractor -PCR&Gel Clean up-), *Bam*HI および *Hind* III で処理した pHalo-L8-SecM₁₃₃₋₁₇₀ とライゲーションした. ライゲーションには, DNA Ligation Kit (Mighty Mix) を用いた. 産生プラスミドで形質転換した大腸菌 XL10-Gold よりプラスミドを抽出し (FastGene Plasmid Mini Kit), 塩基配列の確認を行った (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems 3130xL Genetic Analyzer). 以下, このプラスミドを pHalo-L17-SecM₁₃₃₋₁₇₀ と呼ぶ.

Halo-L26-SecM₁₃₃₋₁₇₀ 発現コンストラクトの作製

Halo-L26-SecM₁₃₃₋₁₇₀ は, HaloTag タンパク質の下流に 26 残基の GS リンカーを介して SecM の C 末端配列 (133-170 残基目) を連結したコンストラクトである (図 2.1 A). HaloTag の C 末端配列の下流に 26 残基の GS リンカーを介して SecM の C 末端配列 (133-170 残基目) が連結された人工遺伝子を鋳型にし, PCR により増幅した. プライマーの配列 (表 2.5) を以下に示す.

表 2.5 Halo-L26-SecM₁₃₃₋₁₇₀ 人工遺伝子増幅用プライマー

	配列	制限酵素サイト
Linker_F	5'-CGCTGGCTGTCGACGCTCG-3'	
SecM_R2	5'-CCCAAGCTTAGGTGAGGCGTTGAGGG-3'	<i>Hind</i> III

下線部は制限酵素配列を示す。以下の組成で PCR 反応溶液を調製した。

Nuclease-free water	31.5 μ L
5 \times PrimeSTAR Buffer	10 μ L
dNTPs (2.5 mM each)	4 μ L
10 μ M Primer 1	1.5 μ L
10 μ M Primer 2	1.5 μ L
2 ng/ μ L Template	1 μ L
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	0.5 μ L
Total	50 μ L

反応は、変性 (98°C, 10 sec), アニーリング (50°C, 15 sec), 伸長 (72°C, 20 sec) を 1 サイクルとし, 30 サイクル行った。その後, 以下のような反応を行った。増幅産物を MagExtractor -PCR&Gel Clean up-により精製し, 制限酵素 (*Bam*H I および *Hind* III) 処理を行った。制限酵素処理断片をアガロースゲルより切り出し精製し (MagExtractor -PCR&Gel Clean up-), *Bam*H I および *Hind* III で処理した pHalo-L8-SecM₁₃₃₋₁₇₀ とライゲーションした。ライゲーションには, DNA Ligation Kit (Mighty Mix) を用いた。産生プラスミドで形質転換した大腸菌 XL10-Gold よりプラスミドを抽出し (FastGene Plasmid Mini Kit), 塩基配列の確認を行った (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems 3130xL Genetic Analyzer)。以下, このプラスミドを pHalo-L26-SecM₁₃₃₋₁₇₀ と呼ぶ。

Halo-pD-L8-SecM₁₃₃₋₁₇₀ 発現コンストラクトの作製

Halo-pD-L8-SecM₁₃₃₋₁₇₀ は, HaloTag タンパク質の下流に GS リンカー (12 残基), λ ファージ由来 Protein D (T21-V110; 90 残基)²⁵, GS リンカー (8 残基) を介して SecM の C 末端配列 (133-170 残基目) を連結したコンストラクトである (図 2.1 A)。まず, pFN18A (HaloTag 7) T7 Flexi Vector を鋳型に HaloTag 遺伝子を増幅した。プライマーの配列 (表 2.6) を以下に示す。

表 2.6 HaloTag 遺伝子増幅用プライマー

	配列	制限酵素サイト
HaloTag_F	5'-GGGAATTCCATATGGCAGAAATCGGTACTGG-3'	<i>Nde</i> I
HaloTag_R	5'-GCCAGAGCCACCGCCGATCCGCCGAAATCTCGAGCGTCG-3'	<i>Bam</i> H I

下線部は制限酵素配列を示す。以下の組成で PCR 反応溶液を調製した。

Nuclease-free water	31.5 μ L
5 \times PrimeSTAR Buffer	10 μ L
dNTPs (2.5 mM each)	4 μ L
10 μ M Primer 1	1.5 μ L
10 μ M Primer 2	1.5 μ L
2 ng/ μ L Template	1 μ L
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	0.5 μ L
Total	50 μ L

反応は、変性 (98°C, 10 sec), アニーリング (50°C, 15 sec), 伸長 (72°C, 1 min) を1サイクルとし, 30 サイクル行った。その後, 増幅産物を鋳型に, 以下のような反応を行った。増幅産物を MagExtractor -PCR&Gel Clean up-により精製し, 制限酵素 (*Nde* I および *Bam*HI) 処理を行った。制限酵素処理断片をアガロースゲルより切り出し精製し (MagExtractor -PCR&Gel Clean up-), *Nde* I および *Bam*HI で処理した pGFPuv3-pD-SecM₁₄₈₋₁₆₆¹⁷ に挿入した。遺伝子断片の挿入には, DNA Ligation Kit (Mighty Mix) を用いた。産生プラスミドで形質転換した大腸菌 XL10-Gold よりプラスミドを抽出し (MagExtractor -Plasmid-), 塩基配列の確認を行った (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems 3130xL Genetic Analyzer)。以下, このプラスミドを pHalo-pD-SecM₁₄₈₋₁₆₆ と呼ぶ。

次に, pHalo-pD-SecM₁₄₈₋₁₆₆ を鋳型に HaloTag と Protein D が連結したコンストラクトを, pTA-SecM を鋳型に SecM₁₃₃₋₁₇₀ をそれぞれ PCR により増幅した。プライマーの配列 (表 2.7, 表 2.8) を以下に示す。

表 2.7 HaloTag-Protein D 増幅用プライマー

	配列	制限酵素サイト
HaloTag_F	5'-GGGAATTCATATGGCAGAAATCGGTACTGG-3'	<i>Nde</i> I
pD_R	5'-GCCAGAGCCACCGCCGGATCCAACGATGCTGATTGCCGTTCC-3'	<i>Bam</i> HI

表 2.8 SecM の C 末端配列 (133-170 残基目) 増幅用プライマー

	配列	制限酵素サイト
SecM_F2	5'-GGATCCGGCGGTGGCTCTGGCTCTGAAAAGGGTTATCGCATTG-3'	<i>Bam</i> HI
SecM_R2	5'-CCCAAGCTTAGGTGAGGCGTTGAGGG-3'	<i>Hind</i> III

下線部は制限酵素配列を示す。以下の組成で PCR 反応溶液を調製した。

Nuclease-free water	31.5 μ L
5 \times PrimeSTAR Buffer	10 μ L
dNTPs (2.5 mM each)	4 μ L
10 μ M Primer 1	1.5 μ L
10 μ M Primer 2	1.5 μ L
2 ng/ μ L Template	1 μ L
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	0.5 μ L
Total	50 μ L

反応は、変性 (98°C, 10 sec), アニーリング (50°C, 15 sec), 伸長 (72°C, 1 min (HaloTag-pD) or 30 sec

(SecM₁₃₃₋₁₇₀) を 1 サイクルとし, 30 サイクル行った. その後, 増幅産物を鋳型に, 以下のような反応を行った.

Nuclease-free water	31.5 μ L
5 \times PrimeSTAR Buffer	10 μ L
dNTPs (2.5 mM each)	4 μ L
PCR product (Halo-pD)	0.5 μ L
PCR product (SecM)	0.5 μ L
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	0.5 μ L
Total	47 μ L

反応は, 変性 (98°C, 10 sec), アニーリング (50°C, 15 sec), 伸長 (72°C, 1.5 min) を 1 サイクルとし, 5 サイクル行った. その後, 10 μ M HaloTag_F および 10 μ M SecM_R2 を 1.5 μ L ずつ添加し, 変性 (98°C, 10 sec), アニーリング (50°C, 15 sec), 伸長 (72°C, 1.5 min) を 1 サイクルとした反応を 30 サイクル行った. 増幅産物を MagExtractor -PCR&Gel Clean up-により精製し, 制限酵素 (*Nde* I および *Hind* III) 処理を行った. 制限酵素処理断片をアガロースゲルより切り出し精製し (MagExtractor -PCR&Gel Clean up-), *Nde* I および *Hind* III で処理した pET23a ベクターに挿入した. 遺伝子断片の挿入には, DNA Ligation Kit (Mighty Mix) を用いた. 産生プラスミドで形質転換した大腸菌 XL10-Gold よりプラスミドを抽出し (FastGene Plasmid Mini Kit), 塩基配列の確認を行った (BigDye Terminator v3.1 Cyc1e Sequencing Kit, Applied Biosystems 3130xL Genetic Analyzer). 以下, このプラスミドを pHalo-pD-L8-SecM₁₃₃₋₁₇₀ と呼ぶ.

Halo-SecM₁₋₁₇₀ 発現コンストラクトの作製

Halo-SecM₁₋₁₇₀ は, HaloTag タンパク質の下流に 8 残基の GS リンカーを介して全長の SecM を連結したコンストラクトである (図 2.1 A). まず pTA-SecM を鋳型に, 全長の SecM 遺伝子を PCR により増幅した. プライマーの配列 (表 2.9) を以下に示す.

表 2.9 全長 SecM 遺伝子増幅用プライマー

	配列	制限酵素サイト
SecM_F3	5'-CGGGATCCGGCGGTGGCTCTGGCTCTGTGAGTGGAATACTGACGCG-3'	<i>Bam</i> H I
SecM_R2	5'-CCCAAGCTTAGGTGAGGCGTTGAGGG-3'	<i>Hind</i> III

下線部は制限酵素配列を示す. 以下の組成で PCR 反応溶液を調製した.

Nuclease-free water	31.5 μ L
5 \times PrimeSTAR Buffer	10 μ L
dNTPs (2.5 mM each)	4 μ L
10 μ M Primer 1	1.5 μ L
10 μ M Primer 2	1.5 μ L
2 ng/ μ L Template	1 μ L
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	0.5 μ L
Total	50 μ L

反応は, 変性 (98°C, 10 sec), アニーリング (50°C, 5 sec), 伸長 (72°C, 1 min) を 1 サイクルとし, 30 サイクル行った. 増幅産物を MagExtractor -PCR&Gel Clean up-により精製し, 制限酵素 (*Bam*H I および *Hind* III) 処理を行った. 制限酵素処理断片をアガロースゲルより切り出し精製し (MagExtractor -PCR&Gel Clean up-), *Bam*H I および *Hind* III で処理した pHalo-L8-SecM₁₃₃₋₁₇₀ とライゲーションした. ライゲーションには, DNA

Ligation Kit (Mighty Mix) を用いた。産生プラスミドで形質転換した大腸菌 XL10-Gold よりプラスミドを抽出し (FastGene Plasmid Mini Kit), 塩基配列の確認を行った (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems 3130xL Genetic Analyzer)。以下, このプラスミドを pHalo-SecM₁₋₁₇₀ と呼ぶ。

各種 SecM 変異体発現コンストラクトの作製

QuikChange 法により, 各種 SecM 変異体発現コンストラクトを作製した。プライマーの配列 (表 2.10) を以下に示す。

表 2.10 HaloTag-SecM 変異体作製用プライマー

	配列
F150A #1	5'-CCCACAAGCAAAA[GCT]AGCACGCCCCGTCTG-3'
F150A #2	5'-CAGACGGGCGTG[CTA]GCTTTTGCTTGTGGG-3'
W155A #1	5'-CAGCACGCCCCGTC[GCA]ATAAGCCAGGCGC-3'
W155A #2	5'-GCGCCTGGCTTAT[TGC]GACGGGCGTGCTG-3'
G161A #1	5'-AAGCCAGGCGCAA[GCA]ATCCGTGCTGGCCC-3'
G161A #2	5'-GGGCCAGCACGGAT[TGC]TTGCGCCTGGCTT-3'
I162A #1	5'-CCAGGCGCAAGGC[GCA]CGTGCTGGCCCTC-3'
I162A #2	5'-GAGGGCCAGCACG[TGC]GCCTTGCGCCTGG-3'
R163A #1	5'-AGGCGCAAGGCATC[GCT]GCTGGCCCTCAAC-3'
R163A #2	5'-TTGAGGGCCAGC[AGC]GATGCCTTGCGCCTG-3'
A164S #1	5'-CGCAAGGCATCCGT[TCT]GGCCCTCAACGC-3'
A164S #2	5'-GCGTTGAGGGCC[AGA]ACGGATGCCTTGCG-3'
P166A #1	5'-GCATCCGTGCTGGC[GCT]CAACGCCTCACC-3'
P166A #2	5'-GGTGAGGCGTTG[AGG]GCCAGCACGGATGC-3'

囲み枠は置換したトリプレットを示す。以下の組成で PCR 反応溶液を調製した。

Nuclease-free water	31.7 μ L
5 \times PrimeSTAR Buffer	10 μ L
dNTPs (2.5 mM each)	4 μ L
10 μ M Primer 1	1.4 μ L
10 μ M Primer 2	1.4 μ L
20 ng/ μ L Plasmid	1 μ L
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	0.5 μ L
Total	50 μ L

反応は変性 (98°C, 30 sec) 後, 変性 (98°C, 10 sec), アニーリング (50°C, 15 sec), 伸長 (68°C, 7 min) を 1 サイクルとし, 18 サイクル行った。その後 *Dpn* I 処理を行い, 大腸菌 XL10-Gold を形質転換した。形質転換体よりプラスミドを抽出し (FastGene Plasmid Mini Kit), 塩基配列の確認を行った (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems 3130xL Genetic Analyzer)。

myc タグを付与した各種発現コンストラクトの作製

myc-Halo-L8-SecM₁₃₃₋₁₇₀, myc-Halo-L17-SecM₁₃₃₋₁₇₀, myc-Halo-L26-SecM₁₃₃₋₁₇₀, myc-Halo-pD-L8-SecM₁₃₃₋₁₇₀, myc-Halo-SecM₁₋₁₇₀ は, それぞれ HaloTag の N 末端に myc タグを付与したコンストラクトである (図 2.1 B)。それぞれの発現プラスミド (pHalo-L8-SecM₁₃₃₋₁₇₀, pHalo-L17-SecM₁₃₃₋₁₇₀, pHalo-L26-SecM₁₃₃₋₁₇₀, pHalo-pD-L8-SecM₁₃₃₋₁₇₀, pHalo-SecM₁₋₁₇₀) を鋳型に, myc タグが付与されたコンストラクト

を PCR により増幅した．プライマーの配列（表 2.11）を以下に示す．

表 2.11 myc-SecM 発現コンストラクト作製用プライマー

	配列	制限酵素サイト
HaloTag_F2	5'-GGAATTCCATATGGAGCAGAAACTCATCTCT GAAGAGGATCTGGCAGAAATCGGTACTGGCTTTC-3'	<i>Nde</i> I
SecM_R2	5'-CCCAAGCTTAGGTGAGGCGTTGAGGG-3'	<i>Hind</i> III

太字は myc タグの配列，下線は制限酵素配列をそれぞれ示す．以下の組成で PCR 反応溶液を調製した．

Nuclease-free water	31.5 μ L
5 \times PrimeSTAR Buffer	10 μ L
dNTPs (2.5 mM each)	4 μ L
10 μ M Primer 1	1.5 μ L
10 μ M Primer 2	1.5 μ L
2 ng/ μ L Template	1 μ L
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	0.5 μ L
Total	50 μ L

反応は，変性（98 $^{\circ}$ C，10 sec），アニーリング（50 $^{\circ}$ C，5 sec），伸長（72 $^{\circ}$ C，1 min）を 1 サイクルとし，30 サイクル行った．増幅産物を MagExtractor -PCR&Gel Clean up-により精製し，制限酵素（*Nde* I および *Hind* III）処理を行った．制限酵素処理断片をアガロースゲルより切り出し精製し（MagExtractor -PCR&Gel Clean up-），*Nde* I および *Hind* III で処理した pET21c または pET23a ベクターに挿入した．遺伝子断片の挿入には，DNA Ligation Kit 〈Mighty Mix〉を用いた．産生プラスミドで形質転換した大腸菌 XL10-Gold よりプラスミドを抽出し（FastGene Plasmid Mini Kit），塩基配列の確認を行った（BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems 3130xL Genetic Analyzer）．以下，これらのプラスミドをそれぞれ，pMyc-Halo-L8-SecM₁₃₃₋₁₇₀，pMyc-Halo-L17-SecM₁₃₃₋₁₇₀，pMyc-Halo-L26-SecM₁₃₃₋₁₇₀，pMyc-Halo-pD-L8-SecM₁₃₃₋₁₇₀，pMyc-Halo-SecM₁₋₁₇₀ と呼ぶ．

myc-SecM₁₋₁₇₀ 発現コンストラクトの作製

myc-SecM₁₋₁₇₀ は，SecM の N 末端に myc タグを付与したコンストラクトである（図 2.1 B）．pTA-SecM を鋳型に，SecM 遺伝子を PCR により増幅した．プライマーの配列（表 2.12）を以下に示す．

表 2.12 myc-SecM 発現コンストラクト作製用プライマー

	配列	制限酵素サイト
SecM_F2	5'-GGAATTCCATATGGAGCAGAAACTCATCTCTGA AGAGGATCTGGTGAGTGGGAATACTGACGCG-3'	<i>Nde</i> I
SecM_R2	5'-CGGGATCCTTAGGTGAGGCGTTGAGGG-3'	<i>Bam</i> HI

太字は myc タグの配列，下線は制限酵素配列をそれぞれ示す．以下の組成で PCR 反応溶液を調製した．

Nuclease-free water	31.5 μ L
5 \times PrimeSTAR Buffer	10 μ L
dNTPs (2.5 mM each)	4 μ L
10 μ M Primer 1	1.5 μ L
10 μ M Primer 2	1.5 μ L
2 ng/ μ L pTA-SecM	1 μ L
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	0.5 μ L
Total	50 μ L

反応は、変性 (98°C, 10 sec), アニーリング (50°C, 5 sec), 伸長 (72°C, 1 min) を 1 サイクルとし, 30 サイクル行った. 増幅産物を MagExtractor -PCR&Gel Clean up-により精製し, 制限酵素 (*Nde* I および *Bam*H I) 処理を行った. 制限酵素処理断片をアガロースゲルより切り出し精製し (MagExtractor -PCR&Gel Clean up-), *Nde* I および *Bam*H I で処理した pET23a ベクターに挿入した. 遺伝子断片の挿入には, DNA Ligation Kit (Mighty Mix) を用いた. 産生プラスミドで形質転換した大腸菌 XL10-Gold よりプラスミドを抽出し (FastGene Plasmid Mini Kit), 塩基配列の確認を行った (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems 3130xL Genetic Analyzer). 以下, このプラスミドを pMyc-SecM₁₋₁₇₀ と呼ぶ.

SecM₁₃₃₋₁₇₀ 発現コンストラクトの作製

SecM₁₃₃₋₁₇₀ は, タグが付与されていない SecM の C 末端配列 (133-170 残基目) のみのコンストラクトである (図 2.1 C). pMyc-SecM₁₋₁₇₀ を鋳型に, Inverse PCR 法により作製した. プライマーの配列 (表 2.13) を以下に示す.

表 2.13 myc-SecM 発現コンストラクト作製用プライマー

配列	
Δ myc_#1	5'-CATATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAAT-3'
133-170_#2	5'-ATGATGTCTGAAAAGGGTTATCGCATTGATTATGC-3'

以下の組成で PCR 反応溶液を調製した.

Nuclease-free water	35 μ L
10 \times Buffer for iPCR	5 μ L
dNTPs (2 mM each)	5 μ L
10 μ M Primer 1	1.5 μ L
10 μ M Primer 2	1.5 μ L
50 ng/ μ L pMyc-SecM ₁₋₁₇₀	1 μ L
KOD -Plus- DNA Polymerase	1 μ L
Total	50 μ L

反応は, 変性 (94°C, 2 min) 後, 変性 (98°C, 10 sec), アニーリングおよび伸長 (68°C, 6 min) を 1 サイクルとし, 10 サイクル行った. その後 *Dpn* I 処理を行い, 増幅産物を DNA Ligation Kit (Mighty Mix) でセルフライゲーションした. これを用いて大腸菌 XL10-Gold を形質転換した. 形質転換体よりプラスミドを抽出し (MagExtractor -Plasmid-), 塩基配列の確認を行った (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems 3130xL Genetic Analyzer). 以下, このプラスミドを pSecM₁₃₃₋₁₇₀ と呼ぶ.

2.1.3 *in vitro* 合成用鋳型の調製

各種アレスト配列発現コンストラクトを PCR により増幅し、それを *in vitro* 合成用鋳型とした。プライマーの配列 (表 2.14) を以下に示す。

表 2.14 アレスト配列発現コンストラクトの増幅用プライマー

	配列
pET-F	5'-GAAATTAATACGACTCACTATAGGGG-3'
pET-R	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'

pET-F は、T7 プロモータに結合するように設計されている。増幅されたアレスト配列発現コンストラクトには、*in vitro* 合成に必要な T7 プロモータおよび SD 配列が付与される (図 2.1)。以下の組成で PCR 反応溶液を調製した。

Nuclease-free water	31.5 μ L
5 \times PrimeSTAR Buffer	10 μ L
dNTPs (2.5 mM each)	4 μ L
10 μ M Primer 1	1.5 μ L
10 μ M Primer 2	1.5 μ L
1-2 ng/ μ L Plasmid	1 μ L
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	0.5 μ L
Total	50 μ L

反応は、変性 (98°C, 10 sec), アニーリング (50°C, 15 sec), 伸長 (72°C, 1-2 min) を 1 サイクルとし、30 サイクル行った。反応後、アガロース電気泳動により、特異的増幅の確認を行った。PCR 産物は精製することなく、*in vitro* 翻訳の鋳型として使用した。

2.1.4 翻訳アレスト複合体の調製

無細胞タンパク質合成系による *in vitro* 合成

作製した各種鋳型 DNA を用いて、無細胞タンパク質合成系 (PURExpress Δ Ribosome kit) により、まず mRNA を転写し、その後、リボソームを添加することで翻訳アレスト複合体を調製した。反応溶液の組成を以下に示す。

反応溶液の組成 (myc タグを付与したコンストラクト)

Solution A	4 μ L
Factor Mix	1.2 μ L
Template DNA	2 μ L
RNase inhibitor	0.5 μ L
Nuclease-free water	0.5 μ L
Total	8.2 μ L

反応溶液の組成 (HaloTag を付与したコンストラクト)

Solution A	4 μ L
Factor Mix	1.2 μ L
Template DNA	2 μ L
10 μ M HaloTag TMR Ligand	0.5 μ L
RNase inhibitor	0.5 μ L
Total	8.2 μ L

反応溶液の組成 (RI 標識)

Solution A	8 μ L
Factor Mix	2.4 μ L
Template DNA	4 μ L
RNase inhibitor	1 μ L
[³⁵ S] - methionine	0.5 μ L
Nuclease-free water	3.1 μ L
Total	19 μ L

鋳型 DNA から mRNA を転写させた (37°C, 10 min) 後, キットに付属の 13.3 μ M リボソームを 0.4 μ L (HaloTag, myc タグ標識) または 1.0 μ L (RI 標識) 加えて翻訳アレスト複合体を調製した (37°C, 20 min). HaloTag が付与されたコンストラクトは, HaloTag のフォールディングが完了直後に TMR ligand が結合することになる.

溶液中に, 終濃度 2 mM となるように Puromycin を加え, 一定時間おきにサンプルを分取した.

2.1.5 NuPAGE による翻訳アレスト複合体の解析

翻訳アレスト複合体の電気泳動

採取したサンプルを Bromophenol blue を含まない 2× Sample buffer (125 mM Tris-HCl pH6.8, 10% β -mercaptoethanol, 4% (w/v) SDS, 20% (v/v) glycerol) と混合し, 加熱処理を行わずに NuPAGE ゲル (10% Bis-Tris Gels) にアプライした. なお 2× Sample buffer は, 混入した RNase を不活化させるため, RNase Reagent と混合し, 60 °C で 10 分インキュベートしたものを用いた. 泳動は, 1× NuPAGE MOPS SDS Running Buffer を用い, 24 mA, 4°C の条件下で行った.

HaloTag 蛍光リガンドの検出

HaloTag が付与されたコンストラクトについては, 泳動後のゲルを取り出し, Molecular Imager Fx を用いて, ゲル中の HaloTag 蛍光リガンドに由来するバンドの蛍光を検出した.

ウエスタンブロット法による myc タグの検出

myc タグが付与されたコンストラクトについては, ウエスタンブロット法により, 検出を行った. PVDF メンブレンを 100% メタノールに浸した (2 ~ 3 sec) 後, ろ紙とともに Transfer buffer (10 mM CAPS pH11.0, 5% (v/v) methanol) に浸漬させた (10 ~ 20 min). NuPAGE で電気泳動したゲルを Transfer buffer に浸した (1 min 程度). PVDF メンブレンおよびゲルをろ紙ではさみ, ブロッティングを行った (90 mA, 60 min). タンパク質が転写された PVDF メンブレンを, ブロッキング剤 (ImmunoBlock) に浸して 1 hr 振盪した. TBS-T で 2 回すすいだ後, さらに浸して振盪し, 洗浄を行った (10 min, 3 回). 終濃度 0.5 μ g/mL になるように 1 次抗体 (Anti c-Myc, Monoclonal Antibody) を Can Get Signal (Solution 1) で希釈し, その溶液にメンブレンを浸して 1 hr 振盪した. TBS-T で 2 回すすいだ後, さらに浸して振盪し, 洗浄を行った (10 min, 3 回). 終濃

度 0.5 $\mu\text{g/mL}$ になるように 2 次抗体 (Anti-IgG(H+L), Mouse, Rabbit-Poly, HiLyte Fluor 555) を Can Get Signal (Solution 2) で希釈し, その溶液にメンブレンを浸して 1 hr 振盪した. TBS-T で 2 回すすいだ後, さらに浸して振盪し, 洗浄を行った (10 min, 3 回). 最後に Molecular Imager Fx を用いて myc-SecM に由来するバンドを蛍光検出した.

オートラジオグラフィーによる SecM₁₃₃₋₁₇₀ の検出

タグタンパク質が付与されていない SecM₁₃₃₋₁₇₀ のコンストラクトについては, オートラジオグラフィーで [³⁵S] メチオニンの検出を行った. 電気泳動後, ゲルドライヤーを用いてゲルを乾燥させた後 (80°C, 100 min), カセットにセットし, イメージングプレートを上から重ねて露光した (24 ~ 36 hr). その後, スキャナー型画像解析装置 (Typhoon FLA) を用いて検出を行った.

翻訳アレスト複合体の寿命解析

画像解析ソフト Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>) を用いて, 検出されたバンドの蛍光強度を測定した. 翻訳アレスト複合体に由来するペプチジル-tRNA のバンドの蛍光強度を I_{Arrested} , 翻訳アレストが解除されてリボソームから放出されたタンパク質由来のバンドの蛍光強度を I_{Free} とし, 次式より溶液中の翻訳アレスト複合体の割合 P を求めた.

$$P = \frac{I_{\text{Arrested}}}{I_{\text{Arrested}} + I_{\text{Free}}} \quad (2.1)$$

Puromycin 添加時を 0 min と定義する. Puromycin を添加して, 3 min, 37 °C 処理後に, 最初に採取した溶液中の翻訳アレスト複合体の割合を $P(3)$, t [min] 経過後に採取した溶液中の翻訳アレスト複合体の割合を $P(t)$ とする. t [min] 経過後の反応溶液中における翻訳アレスト複合体の残存率 (ポリペプチジル tRNA の残存率) $R(t)$ を次式より求めた.

$$R(t) = \frac{P(t)}{P(3)} \quad (2.2)$$

時間 t に対して, 翻訳アレスト複合体の残存率 $R(t)$ をプロットし, KaleidaGraph (Synergy Software) を用いて式 (2.3) でフィッティングした.

$$R(t) = \exp\left(-\frac{t-3}{\tau}\right) \quad (2.3)$$

ここで得られた時定数 τ が, 翻訳アレストの寿命となる.

2.2 結果および考察

2.2.1 実験系の概要

HaloTag の下流に, 異なる配列を介して, SecM の C 末端領域 (133-170 番目アミノ酸配列; SecM₁₃₃₋₁₇₀) が連結された各種コンストラクトを作製した (図 2.3 A). これらのコンストラクトを *in vitro* で翻訳すると, SecM のアレスト配列によって, リボソームが mRNA 上に停止し, HaloTag がリボソーム表面に提示された翻訳アレスト複合体が形成される. HaloTag は, Promega 社が開発した *Rhodococcus rhodochrous* 由来 Haloalkane dehalogenase の変異体で, フォールディング能が非常に高く, 蛍光色素が付与された HaloTag lingad と迅速に反応し ($k = 2.7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$), 共有結合を形成する.²⁶ これにより翻訳アレスト複合体を標識することが可

能となる。HaloTag と SecM₁₃₃₋₁₇₀ の間の配列を変えることで、リボソーム表面に出ている新生ポリペプチド鎖を変えたコンストラクトを作製した。

翻訳アレスト複合体の量を、NuPAGE を用いて評価した (図 2.3 B)。NuPAGE は、中性条件下で行う SDS-PAGE である。通常のアルカリ性の条件下で行う SDS-PAGE ではポリペプチジル tRNA のエステル結合が加水分解されてしまうのに対し、中性条件下ではポリペプチジル tRNA が保持される。このため、翻訳アレストされた翻訳途上のポリペプチド鎖は tRNA が付加された状態で泳動され、見かけ上、実際の分子量よりも 18 kDa 程度大きくなったところにバンドが検出される²⁷。一方、翻訳アレストが解除され、翻訳が終結したポリペプチド鎖は、その分子量に従い泳動される。この2つのバンドの強度比から、翻訳アレスト複合体の割合を算出した。

さらに、翻訳アレスト複合体に由来するポリペプチジル tRNA のバンド強度の経時変化から、翻訳アレスト寿命を算出した。なお、各種コンストラクトの *in vitro* 翻訳は、転写を一定時間行った後、リボソームを添加した。これにより、リボソームに対する mRNA の量比を増やし、ポリソームが生成しにくい条件を作り出した。

また、経時変化の測定前に、溶液中に Puromycin を添加した。Puromycin の役割は以下の2点である。

1. ポリペプチジル tRNA のバンドが翻訳アレスト複合体由来であることを担保する
2. 新規のタンパク質合成を阻害し、既存の翻訳アレスト複合体の寿命を測定する

Puromycin は、アミノアシル tRNA 様の構造を有し、リボソームの A サイトに入り込むことで、P サイトに結合したポリペプチジル tRNA と反応して、翻訳途上のポリペプチド鎖をリボソームから速やかに解離させる抗生物質である²⁸。これによりタンパク質の合成を阻害する。しかし、SecM による翻訳アレスト複合体は、P サイトがプロリン tRNA によって占有されているため、Puromycin に対して耐性を持つ²⁷。そのため、Puromycin を添加することで、溶液中の翻訳アレスト複合体だけがポリペプチジル tRNA を保持し、他の要因でリボソームが mRNA 上に止まっているもの (例えば、翻訳アレスト複合体に追突して止まったポリソーム由来のもの) からは速やかに新生鎖が放出される。また、Puromycin 添加後は、新規のタンパク質合成が完全に阻害されるため、既存の翻訳アレスト複合体のみの経時変化を調べることが可能となる。

2.2.2 リボソームトンネル外の新生ポリペプチド鎖が翻訳アレストを解除することがある

リボソームトンネルは約 30 ~ 40 アミノ酸を収容する。そのため、翻訳アレスト状態で HaloTag がリボソーム表面に提示されるように、リボソームトンネル内を天然の SecM 由来の配列 (SecM₁₃₃₋₁₇₀) で満たし、8 残基の GS リンカーを介して、N 末端側に HaloTag を連結した Halo-L8-SecM₁₃₃₋₁₇₀ のコンストラクトを作製した。これを *in vitro* 翻訳し、翻訳アレスト複合体を NuPAGE で分離して、HaloTag 蛍光リガンドによる検出を行った (図 2.4 A)。

Puromycin 添加前のサンプル中に翻訳アレスト複合体由来のバンドがわずかながら検出された。アレスト能が完全に失われる変異体 (R163A, P166A) において、このバンドが検出されなかったことから、アレスト配列依存的な翻訳の停止が起こっていることが分かる。しかし、Puromycin を添加して 3 min 処理した後のサンプルを NuPAGE により分離したところ、翻訳アレスト複合体由来のバンドは完全に消失した。この結果から、HaloTag-L8-SecM₁₃₃₋₁₇₀ の翻訳アレストは 3 min に満たないほどの短い時間しか止まらず、非常に不安定であることが示された。

この翻訳アレストの不安定化が HaloTag に起因することを確かめるために、SecM の 133-170 番目のアミノ酸残基のみを翻訳し、NuPAGE で解析を行った。このコンストラクトは、新生ポリペプチド鎖がリボソームトンネル内に完全に収まっていて、リボソームトンネル外に出ない状態となっている。新生ポリペプチド鎖のメチオニンを [³⁵S] で放射性標識し、オートラジオグラフィーで検出を行った (図 2.4 B)。こちらは、Puromycin 添加後も、翻訳アレスト複合体由来のバンドが大半を占めていた。また、リボソームが mRNA 上に停止するために、翻訳のターンオーバーがなくなり、アレスト能が完全に失われる変異体に比べて、全体の合成量が大きく低下していることが確認された。この結果から、SecM の新生ポリペプチド鎖がリボソームトンネル内に完全に収容され

ているときは、翻訳アレストが非常に安定であることが分かった。

2つの結果の比較から、リボソーム外に提示された HaloTag が翻訳アレストを解除するように働くことが分かった。

2.2.3 リボソームトンネル外の新生ポリペプチド鎖によって翻訳アレストの安定性が変わる

リボソーム外領域の新生ポリペプチド鎖の影響についてさらに調べるために、リボソームトンネル内は天然の SecM 由来の配列 (SecM₁₃₃₋₁₇₀) のまま、その上流を変えたコンストラクトを作製した (図 2.5 A)。Halo-L17-SecM₁₃₃₋₁₇₀ および Halo-L26-SecM₁₃₃₋₁₇₀ は、HaloTag と SecM₁₃₃₋₁₇₀ 間の GS リンカーをそれぞれ 17 アミノ酸、26 アミノ酸に増やしたものである。また、Halo-pD-L8-SecM₁₃₃₋₁₇₀ はファージのカプシドを構成するタンパク質である Protein D を HaloTag と SecM₁₃₃₋₁₇₀ の間に挿入した配列であり、HaloTag をリボソーム表面からさらに離すことができる。Halo-SecM₁₋₁₇₀ は、HaloTag の下流に全長の SecM 配列を導入したコンストラクトである。これは、リボソームトンネル内のみならず、リボソーム表面にも天然の SecM 由来の新生ポリペプチド鎖が出た状態となっている。

これらのコンストラクトを *in vitro* で合成し、Puromycin 添加前と添加後の反応溶液を NuPAGE で分離し、HaloTag の蛍光リガンドによる検出を行った (図 2.5 B)。翻訳アレスト複合体由来のバンドと翻訳アレスト解除後にリボソームから放出されたポリペプチド鎖由来のバンドの蛍光強度比から、溶液中の翻訳アレスト複合体の割合を求めた (図 2.5 D; 黒棒)。合成速度が一定で、合成時間が同じであるなら、アレスト寿命が長いものほど翻訳アレスト複合体の割合が多くなる。そのため、翻訳アレスト複合体の割合は、翻訳アレストの安定性を比較する指標となる。

Halo-L8-SecM₁₃₃₋₁₇₀ では、Puromycin 処理後には翻訳アレスト複合体由来のバンドが全く検出されなかったが、GS リンカーを伸ばすことで Puromycin 処理後にも翻訳アレスト複合体由来のバンドが検出されるようになり、長くなるに従ってその割合が増加した (図 2.5 B, D; 2, 3)。また、Protein D を挿入したコンストラクト (Halo-pD-L8-SecM₁₃₃₋₁₇₀) でも翻訳アレスト複合体由来のバンドが確認された (図 2.5 B, D; 4)。全長の SecM を用いたコンストラクト (HaloTag-SecM₁₋₁₇₀) においては、翻訳アレスト複合体の割合が有意に増加した (図 2.5 B, D; 5)。

この実験では、HaloTag の蛍光リガンドを用いることで、翻訳アレスト複合体を検出している。しかし、この手法では、フォールディングが完了していない HaloTag を検出できない可能性がある。特に、翻訳アレスト状態においては、HaloTag がリボソーム表面付近に位置するため、フォールディング効率が低下する可能性がある。コンストラクトによって、リボソーム表面に出ている HaloTag と蛍光リガンドとの反応性が変化してしまうと、結果を正確に比較できなくなるため、HaloTag の上流に myc タグを付与したコンストラクトを作製し、その抗体を用いてウエスタンブロット法によって再度検出を試みた (図 2.5 C)。結果は、HaloTag の蛍光リガンドと同様の傾向を示した (図 2.5 D; 白棒) ため、HaloTag の蛍光リガンドによる検出で、翻訳アレストの割合を十分正確に評価できることが確かめられた。

Puromycin 添加後も翻訳アレスト複合体由来のバンドが確認された 4 種類のコンストラクトについて、これが SecM のアレスト配列依存的な翻訳停止であることを確かめるために、翻訳アレスト能を失った変異体 (R163A, P166A) との比較を行った (図 2.6)。全長の SecM を用いたコンストラクトについては、翻訳アレスト能が低下する変異体 (F150A, W155A, G161A, I162A, A164S) との比較も行った。4 種類のコンストラクトについて、翻訳アレスト能を失った変異体 (R163A, P166A) では、いずれも翻訳アレスト複合体由来のバンドが見られなかった。また、SecM の全長配列については、翻訳アレスト能が低下する変異体 (F150A, W155A, G161A, I162A, A164S) で、翻訳アレスト複合体由来のバンドの割合が大きく低下した。これらの結果から、いずれのコンストラクトでも、アレスト配列依存的に翻訳停止していることが確かめられた。

以上の結果から、SecM のアレスト配列で翻訳が停止したとき、リボソーム外に出ている新生ポリペプチド鎖が翻訳アレストの安定性を変えることが分かった。また、天然の SecM の全長配列は安定な翻訳アレストを引き

起こすことが示唆された。

2.2.4 翻訳アレストの安定性の定量的評価

溶液中の翻訳アレスト複合体の割合は、翻訳アレストの安定性だけでなく、翻訳速度や翻訳時間にも依存する量である。翻訳アレストの安定性をより定量的に評価するために、Puromycin 添加後の溶液中の翻訳アレスト複合体の残存率の時間変化を解析することで、アレスト寿命を算出した (図 2.7)。Puromycin で 3 min 処理した後の翻訳アレスト複合体の割合を 1 とし、そこからの割合の時間変化を計算した。

いずれのコンストラクトも指数関数的に翻訳アレスト複合体が減少していく様子が観察された。時間 t [min] に対する溶液中の翻訳アレスト複合体の残存率 R を 1 次の指数関数によりフィッティングした (図 2.7 B)。フィッティングによって得られた時定数 τ [min] がアレスト寿命となる。Halo-L8-SecM₁₃₃₋₁₇₀ はほとんどアレストされなかったが、GS リンカーの長さを長くした Halo-L17-SecM₁₃₃₋₁₇₀ のアレスト寿命は約 6 min、Halo-L26-SecM₁₃₃₋₁₇₀ は約 11 min となり、リンカーを長くすることでアレスト寿命が伸びることが確かめられた。Protein D を導入して、HaloTag をリボソーム表面からさらに遠ざけた Halo-pD-L8-SecM₁₃₃₋₁₇₀ はアレスト寿命が約 9 min となった。これらのコンストラクトが 6 min ~ 11 min 程度のアレスト寿命であったのに対し、SecM の全長配列を用いたコンストラクト (Halo-SecM₁₋₁₇₀) は、アレスト寿命が約 51 min と、劇的に伸びることが分かった。これにより、全長の SecM による翻訳アレストは非常に安定であることが示された。

HaloTag を付加しない天然の SecM の全長配列のアレスト寿命を調べるために、より小さいタグである myc タグを SecM に付加し、ウェスタンブロット法により myc-SecM₁₃₃₋₁₇₀ を検出し、アレスト寿命を測定した (図 2.8)。その結果、天然の SecM のアレスト寿命は約 48 min と見積もられ、Halo-SecM₁₋₁₇₀ と同程度であることが確かめられた。この結果から、天然の SecM の翻訳アレスト複合体は非常に安定であり、その上流にタンパク質を付加しても、安定性はほとんど変わらないことが分かった。

2.2.5 翻訳アレストの安定性に関する考察

本研究の結果から、SecM の翻訳アレストの安定性について、以下のことが明らかとなった。

1. 新生ポリペプチド鎖がリボソームトンネル内に収容されている時は、アレスト配列のみで翻訳が安定に止まる。
2. リボソームトンネル外に出ている新生ポリペプチド鎖が、翻訳アレストの安定性を大きく変化させる。
3. SecM の全長配列は安定に翻訳をアレストする。

これまで、SecM のアレスト配列は翻訳を完全に停止させると考えられてきた。しかし、本研究により、翻訳アレストの安定性はリボソームトンネル外に出ている新生ポリペプチド鎖によって変化することが明らかとなった。そのため、安定な翻訳アレストには、アレスト配列に加えて、リボソームトンネル外の新生ポリペプチド鎖の配列が重要であることが分かった。

リボソームトンネル外の新生ポリペプチド鎖が翻訳アレストの安定性を変える理由として、リボソーム表面でのポリペプチド鎖のフォールディングや、熱ゆらぎによる動きがリボソームトンネル内部に伝わり、アレスト配列付近に負荷が加わり、翻訳アレストが解除されやすくなるためだと推測される。

今回用いたコンストラクトのアレスト寿命を図 2.9 にまとめた。HaloTag はフォールディング能が高く、33 kDa とそれなりに大きさもあるため、リボソームトンネルに近いと、内部のアレスト配列に負荷がかかりやすくなると考えられる。そのため、HaloTag をリボソーム表面から離すことで、アレスト寿命を伸ばすことができる。その際に、GS リンカーのような柔らかいリンカーを用いた方が、Protein D のような強固な構造をとるものより、タンパク質からの力が伝わりにくくなると考えられる。

全長の SecM は、他のコンストラクトと比べても、著しく翻訳アレストが安定化された。この理由として、

SecM とリボソーム表面との間に相互作用があるためだと推測される。HaloTag がリボソームトンネルのすぐ外側にあるときは、翻訳アレストが解除されたのに対し、SecM の N 末端側領域はリボソームトンネル外にあっても、翻訳アレストの解除に働かない。これは、SecM のリボソーム外領域がリボソーム表面と何らかの相互作用をすることで、リボソーム表面での動きが制限されているためであると考えられる。

2.3 小括

様々なコンストラクトのアレスト寿命を測定することで、翻訳アレストの安定性がリボソームトンネル外の新生ポリペプチド鎖によって変化すること、また、全長の SecM のリボソームトンネル外領域が翻訳アレストの安定化に寄与していることが分かった。SecM の N 末端側配列は膜透過装置による認識に必須であるが、それに加えて、安定な翻訳アレストを実現するのに重要な配列であることが明らかとなった。

2.4 第2章の図

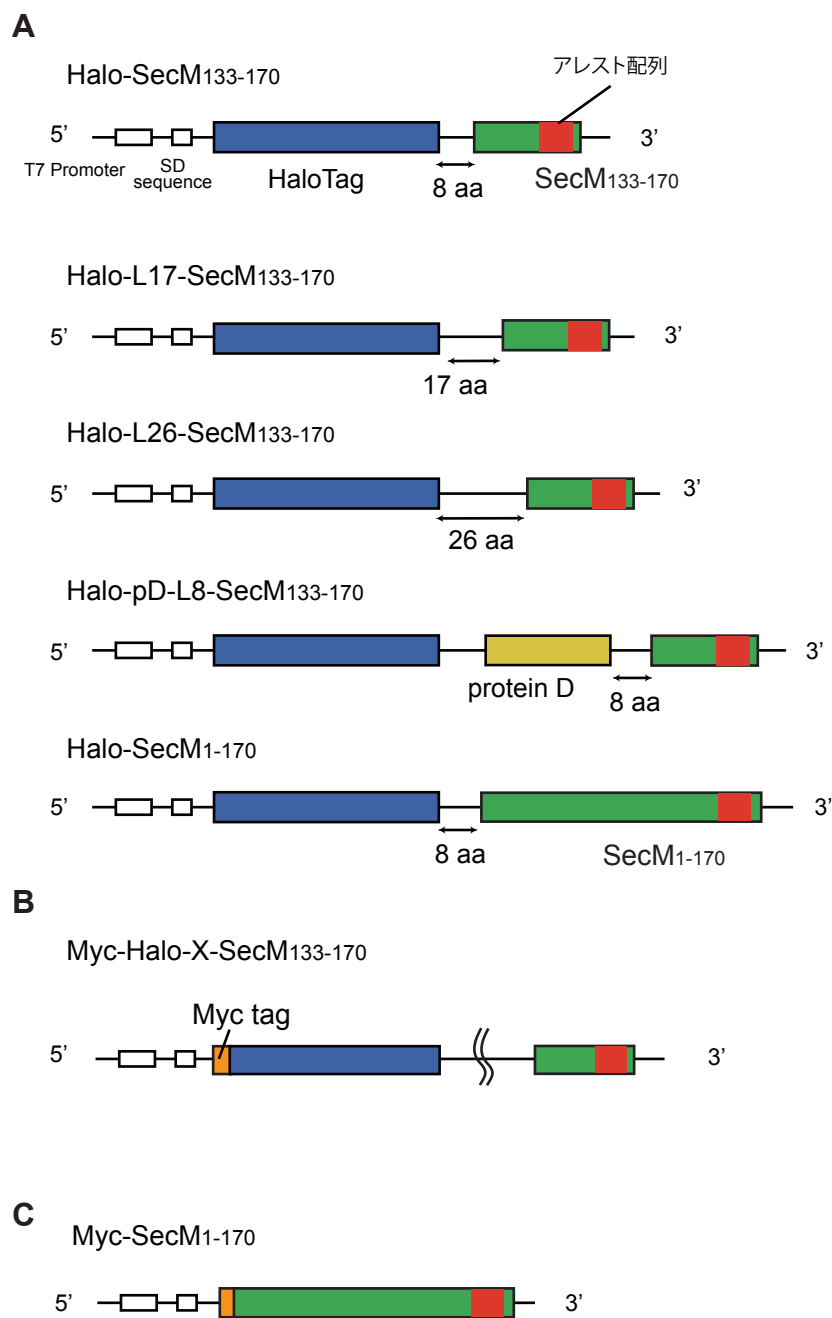


図 2.1 各種アレスト配列発現コンストラクト

実験に用いた各種アレスト配列発現コンストラクトの一覧. (A) HaloTag を付与したコンストラクト. (B) Myc タグを付与したコンストラクト. HaloTag が付与されているものについては, HaloTag より下流は (A) と同じ配列になっている. (C) SecM の 133-170 番目の残基を発現するコンストラクト

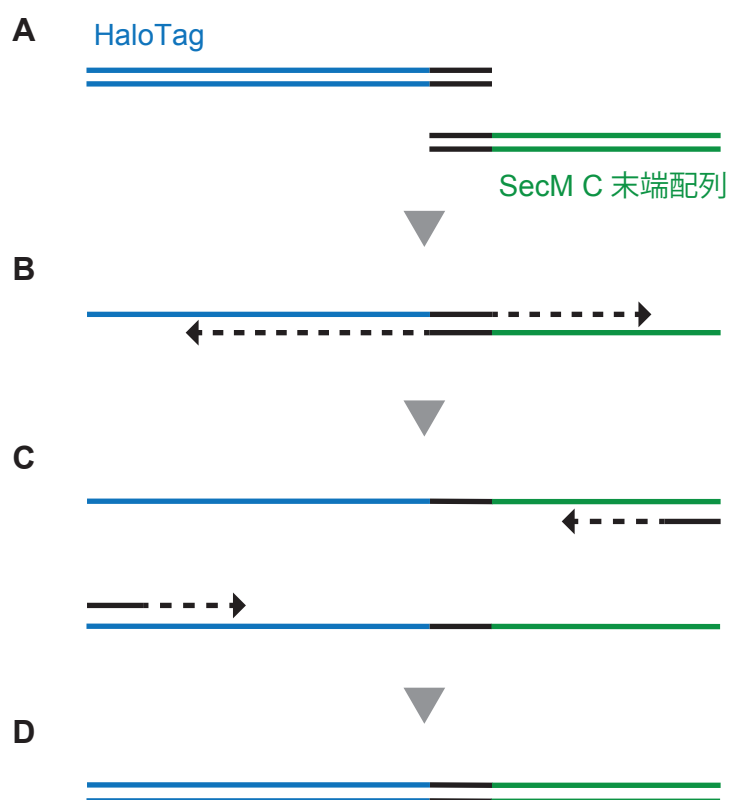


図 2.2 オーバーラップエクステンション PCR 法

最初の PCR で、HaloTag 遺伝子、SecM C 末端領域をそれぞれ増幅する。この際、HaloTag 遺伝子の 3' 末端と SecM C 末端領域の 5' 末端がオーバーラップするように増幅する (A)。2 回目の PCR で、両遺伝子がオーバーラップ部分 (黒) を介して連結し (B)、プライマー添加後、完全長の遺伝子が増幅される (C, D)。

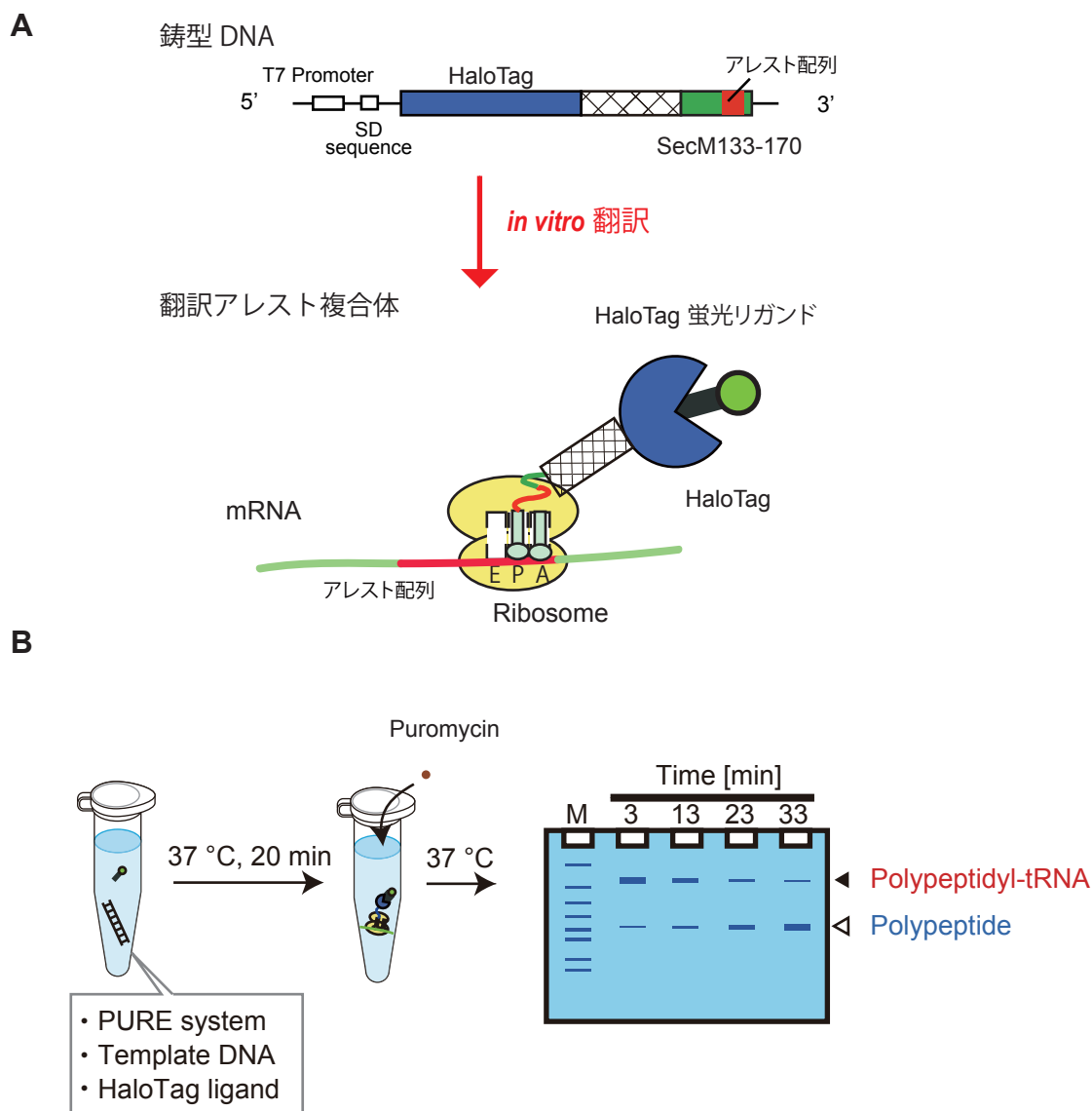


図 2.3 翻訳アレスト複合体の解析

(A) T7 プロモータおよび SD 配列が付与された各種アレスト配列発現コンストラクトの DNA を用いて, *in vitro* 翻訳により, リボソームがアレスト配列で停止した, HaloTag-リボソーム-mRNA の翻訳アレスト複合体を調製した. 合成された HaloTag には蛍光リガンドが結合する. (B) DNA を鋳型に, 37°C, 20 min *in vitro* 翻訳を行った後, 反応溶液に Puromycin を添加して, 37°C で 3 min 処理した. その後, 一定時間おきにサンプルを分取し, NuPAGE (中性の SDS-PAGE) で解析を行った. 翻訳アレスト複合体由来の新生ポリペプチド鎖は tRNA が付加された状態で泳動されるため, 翻訳アレストが解除されて翻訳が終結したポリペプチド鎖に比べて, 18 kDa 程度大きくなったところにバンドが検出される. バンドの強度比を計算することで翻訳アレスト複合体の割合を定量した. また, 翻訳アレスト複合体の残存率の時間変化を調べることで, アレスト寿命を計算した.

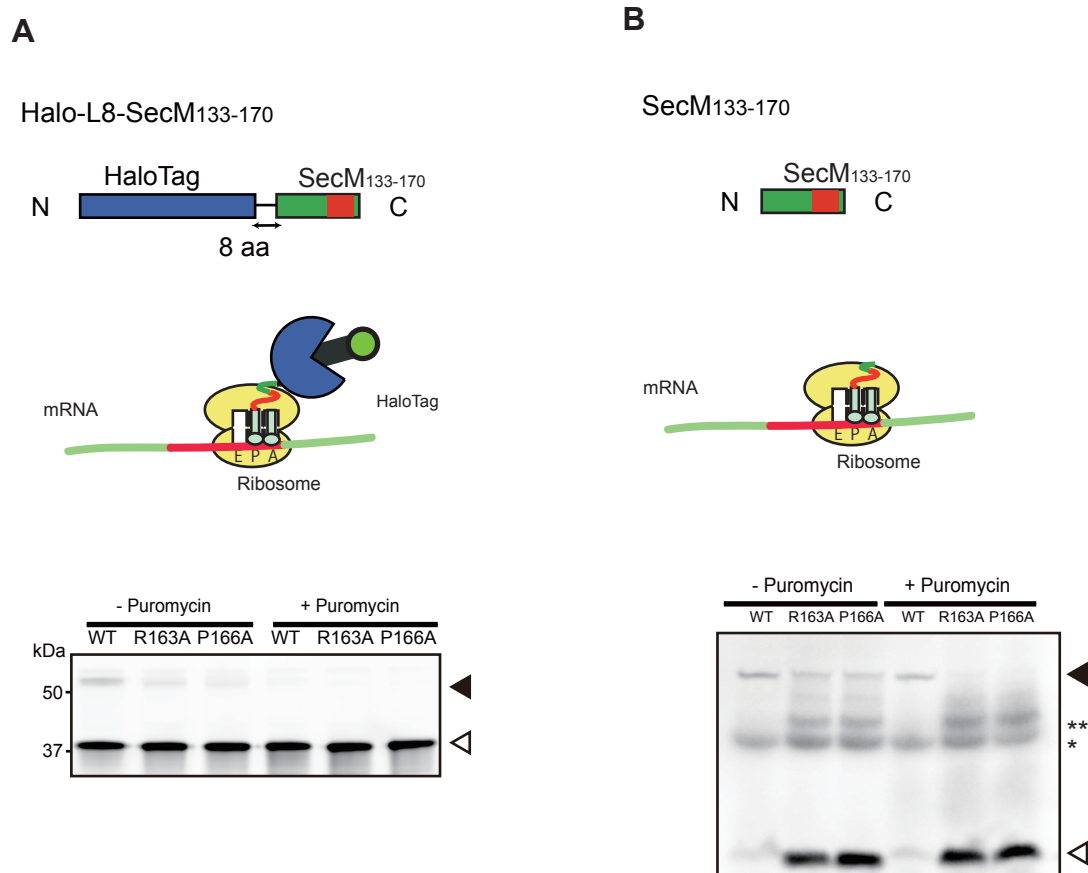


図 2.4 リボソームトンネル外の新生ポリペプチド鎖が翻訳アレストに与える影響

(A) HaloTag-L8-SecM₁₃₃₋₁₇₀ の翻訳アレストの解析. 翻訳アレスト状態では, リボソームトンネルの中に天然の SecM 由来の配列が収容され, リボソームトンネル外に HaloTag が提示されている. 37°C, 20 min 合成後, Puromycin を添加し, 37°C, 3 min 処理した. Puromycin 添加前と添加後の反応溶液を NuPAGE によって分離し, HaloTag の蛍光リガンドによる検出を行った. 黒三角は翻訳アレスト複合体由来のバンド, 白三角は翻訳アレストが解除されてリボソームから放出されたポリペプチド鎖由来のバンドを示す. WT は野生型のアレスト配列, P163A, P166A はアレスト能が失われる変異体をそれぞれ示す. (B) SecM₁₃₃₋₁₇₀ の翻訳アレストの解析. 翻訳アレスト状態では, 天然の SecM 由来の配列がリボソームトンネルの中に収容され, リボソームトンネル外には新生ポリペプチド鎖が出ていない. 反応溶液中に [³⁵S] メチオニンを添加し, 37°C, 20 min 合成後, Puromycin を添加して, 37°C, 3 min 処理した. Puromycin 添加前と添加後の反応溶液を NuPAGE によって分離し, オートラジオグラフィーで検出を行った. 黒三角は翻訳アレスト複合体由来のバンド, 白三角は翻訳アレストが解除されてリボソームから放出されたポリペプチド鎖由来のバンド, アスタリスク (*, **) は Met-tRNA^{Met} または fMet-tRNA^{fMet} のバンドを示す. WT は野生型のアレスト配列, P163A, P166A はアレスト能が失われる変異体をそれぞれ示す.

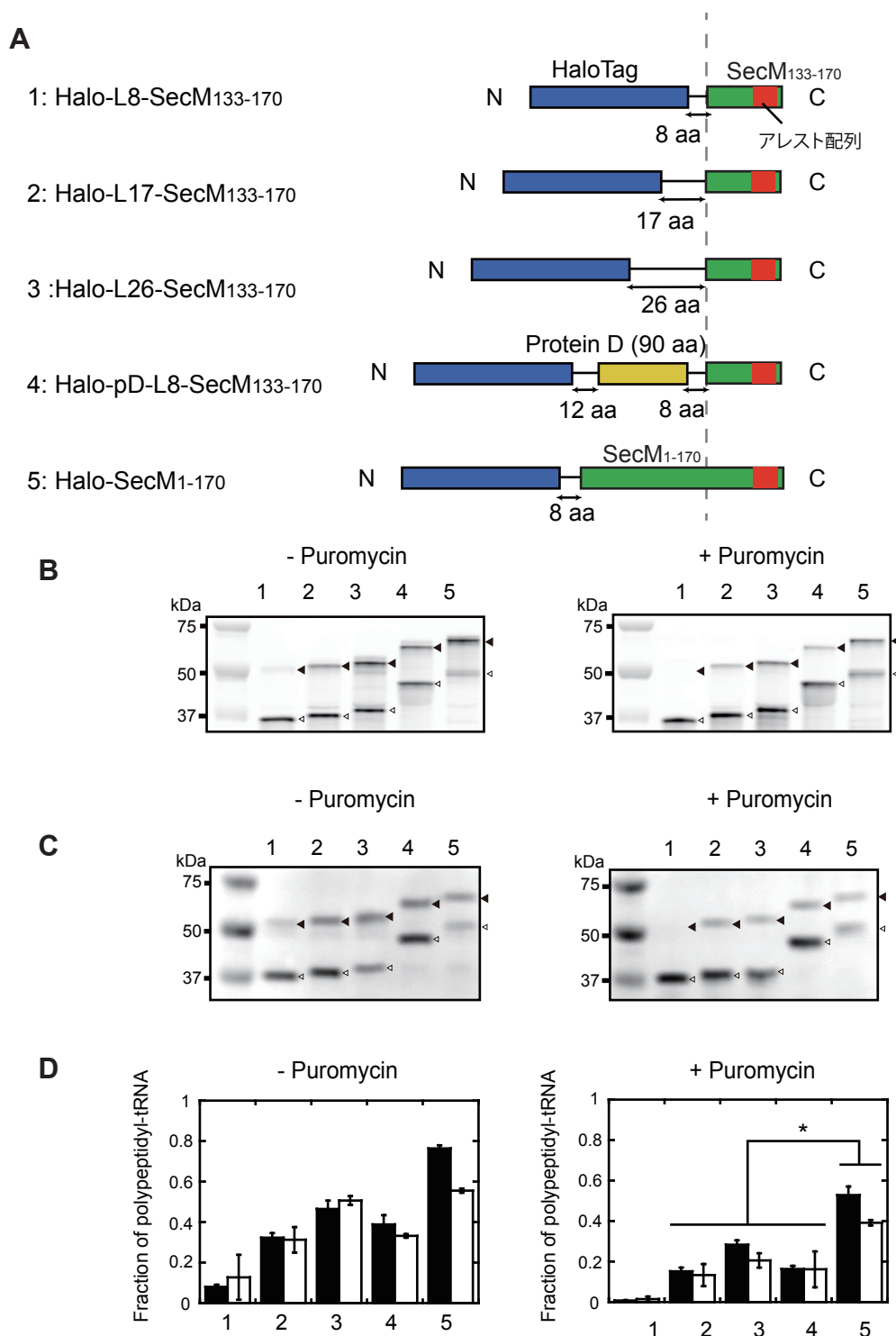


図 2.5 リボソームトンネル外の新生ポリペプチド鎖による翻訳アレスト複合体の割合の変化

(A) 実験で用いた 5 種類のコンストラクト。灰色の点線はリボソームトンネルの出口付近を表す。点線の左側がリボソームトンネル外領域に対応する。GS リンカーの長さを変えたもの (1-3), Protein D を挿入したもの (4), 天然の SecM 由来の配列を用いたもの (5) の 5 種類を作製した。(B) それぞれのコンストラクトを 37°C, 20 min 合成後, Puromycin を添加し, 37°C, 3 min 処理した。Puromycin 添加前と添加後の反応溶液を NuPAGE によって分離し, HaloTag の蛍光リガンドによる検出を行った。黒三角は翻訳アレスト複合体由来のバンド, 白三角は翻訳アレストが解除されてリボソームから放出されたポリペプチド鎖由来のバンドを表す。(C) HaloTag の上流に myc タグを付加したコンストラクトを用いて, 37°C, 20 min 合成後, Puromycin を添加し, 37°C, 3 min 処理した。Puromycin 添加前と添加後の反応溶液を NuPAGE によって分離し, myc タグの抗体を用いて, ウェスタンブロット法により検出を行った。黒三角は翻訳アレスト複合体由来のバンド, 白三角は翻訳アレストが解除されてリボソームから放出されたポリペプチド鎖由来のバンドを表す。(D) 翻訳アレスト複合体由来のバンドと翻訳アレストが解除されてリボソームから放出されたポリペプチド鎖由来のバンドとの強度比から, 溶液中の翻訳アレスト複合体の割合を算出し, グラフに示した。黒棒は HaloTag 蛍光リガンドによる検出, 白棒は myc タグの抗体による検出の結果を示す。Halo-SecM₁₋₁₇₀ とそれ以外のコンストラクトの翻訳アレスト複合体の割合を t 検定により検証した結果, いずれも有意差が認められた (*: $p < 0.05$)。

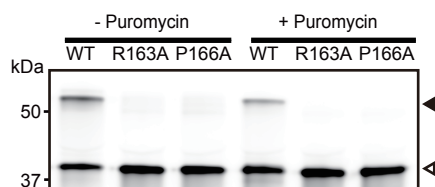
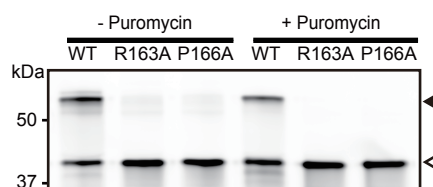
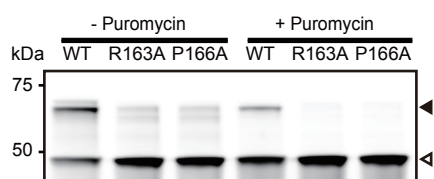
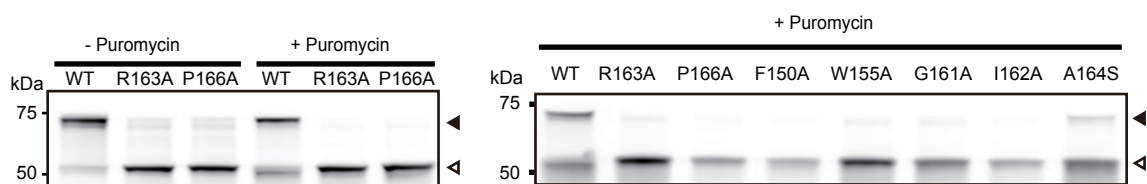
Halo-L17-SecM₁₃₃₋₁₇₀Halo-L26-SecM₁₃₃₋₁₇₀Halo-pD-L8-SecM₁₃₃₋₁₇₀Halo-SecM₁₋₁₇₀

図 2.6 アレスト配列特異的に翻訳が止まることの確認

Puromycin 添加後も、翻訳アレスト複合体由来のバンドが確認された 4 種類のコンストラクトに対して、翻訳アレスト能を失った変異体 (R163A, P166A) を作製した。Halo-SecM₁₋₁₇₀ については、翻訳アレスト能が低下する変異体 (F150A, W155A, G161A, I162A, A164S) も作製した。これらの変異体と野生型のコンストラクトを用いて、37°C, 20 min 合成後、Puromycin を添加し、37°C, 3 min 処理した。Puromycin 添加前と添加後の反応溶液を NuPAGE によって分離し、HaloTag の蛍光リガンドによる検出を行った。黒三角は翻訳アレスト複合体由来のバンド、白三角は翻訳アレストが解除されてリボソームから放出されたポリペプチド鎖由来のバンドを表す。

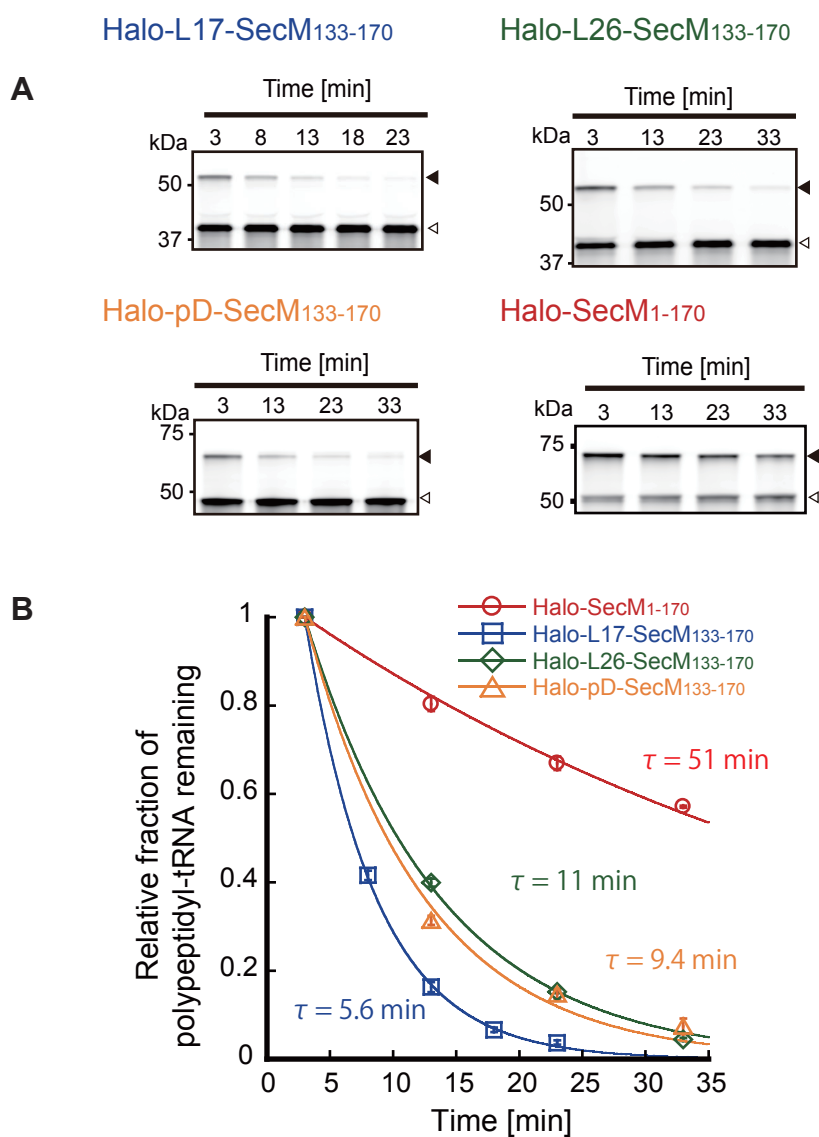


図 2.7 翻訳アレスト寿命の測定

(A) HaloTag を付与したそれぞれのコンストラクトを 37°C, 20 min 合成後, Puromycin を添加し, 37 °C, 3 min 処理した. その後, 37°C でインキュベートしながら, 一定時間おきにサンプルを分取した. それぞれのサンプルを NuPAGE で分離し, HaloTag の蛍光リガンドによる検出を行った. (B) 翻訳アレスト複合体の割合の変化を計算した. Puromycin を添加して, 3 min 処理したときの溶液中の翻訳アレスト複合体の割合を 1 とした. そこからの翻訳アレスト複合体の割合の時間変化をグラフにプロットした. それぞれのプロットは 3 回の測定の平均値と SD を表す. 得られたプロットを 1 次の指数関数でフィッティングし, 時定数 (翻訳アレスト寿命) を求めた.

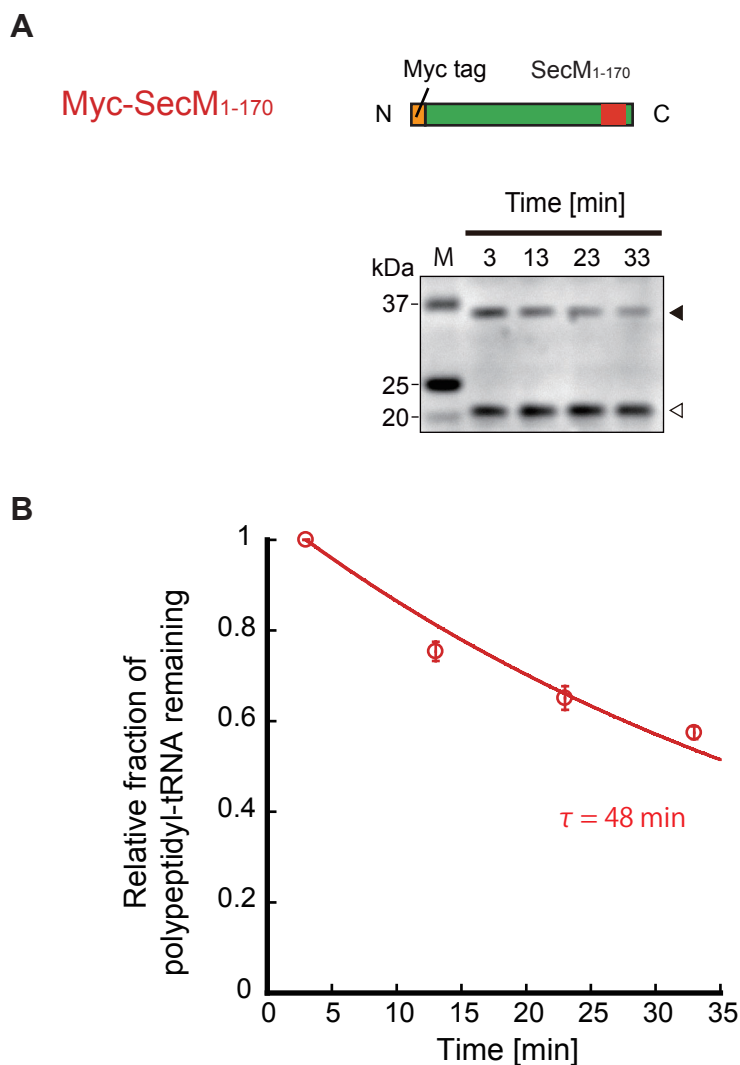


図 2.8 天然の SecM の翻訳アレスト寿命の測定

(A) myc タグを付与した SecM の全長配列のコンストラクトを 37°C, 20 min 合成後, Puromycin を添加し, 37 °C, 3 min 処理した. その後, 37°C でインキュベートしながら, 一定時間おきにサンプルを分取した. それぞれのサンプルを NuPAGE で分離し, ウェスタンブロット法により myc タグの検出を行った. (B) 翻訳アレスト複合体の割合の変化を計算した. Puromycin を添加して, 3 min 処理したときの溶液中の翻訳アレスト複合体の割合を 1 とした. そこからの翻訳アレスト複合体の割合の時間変化をグラフにプロットした. それぞれのプロットは 3 回の測定の平均値と SD を表す. 得られたプロットを 1 次の指数関数でフィッティングし, 時定数 (翻訳アレスト寿命) を求めた.

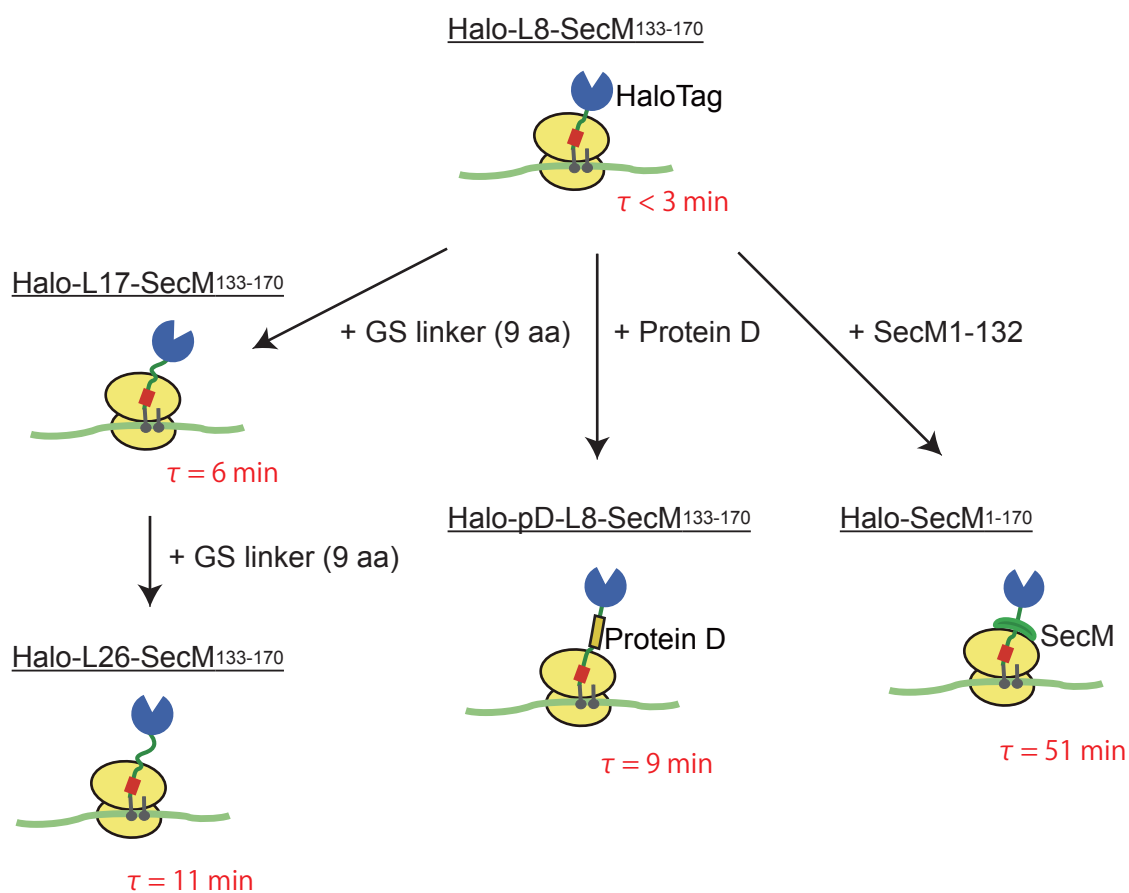


図 2.9 SecM の翻訳アレスト寿命とリボソームトンネル外の新生ポリペプチド鎖

今回作製したコンストラクトと翻訳アレスト寿命の関係をまとめた。いずれのコンストラクトも、リボソームトンネル内は天然の SecM 由来の配列になっている。8 残基の GS リンカーを介して HaloTag がリボソーム外に出ているコンストラクト (Halo-L8-SecM₁₃₃₋₁₇₀) では、アレスト寿命は 3 min 以下であった。GS リンカーを 17 残基、26 残基と伸ばしていくと (Halo-L17-SecM₁₃₃₋₁₇₀, Halo-L26-SecM₁₃₃₋₁₇₀) アレスト寿命も 6 min, 11 min と伸びていった。Protein D を挿入したコンストラクト (Halo-pD-L8-SecM₁₃₃₋₁₇₀) では、アレスト寿命は 9 min となった。リボソームトンネル外も天然の SecM 由来の配列を用いたコンストラクト (Halo-SecM₁₋₁₇₀) では、翻訳アレスト寿命は 51 min となった。

第 3 章

物理的な負荷による SecM 翻訳アレストの解除

本章では、SecM の最大の特徴である物理的な負荷による翻訳アレストの解除機構について検証する。前章の結果から、SecM の全長配列によって翻訳が安定に止まることが見出された。その安定な翻訳アレストが適切なタイミングで解除されて、翻訳が再開することが、SecM による遺伝子発現制御に必須である。SecM は止まるだけでなく、必要に応じてまた動き出すことで、遺伝子発現を調節するスイッチの役割を果たしている。

従来の研究では、SecM の翻訳停止の役割ばかりが注目され、翻訳の再開についてはほとんど調べられてこなかった。翻訳停止の検出は比較的容易だが、負荷を加えて翻訳アレストを解除し、それを検出することは、技術的に大変困難である。これにアプローチする鍵となるのが、近年、生物物理学の分野において目覚ましい発展を遂げている 1 分子計測技術である。これを用いて、DNA ポリメラーゼや RNA ポリメラーゼ、キネシン、ミオシンなどの動く分子の力学的特性がこれまで詳細に調べられてきた²⁹⁻³⁴。しかし、リボソームはタンパク質と RNA から構成される巨大な複合体であり、その動きもより複雑である。そのため、リボソームの 1 分子観察にはまだ困難が多い。

本研究では、新生ポリペプチド鎖に負荷を加えて、リボソームの翻訳を直接観察することで、物理的な負荷による翻訳アレスト解除の実証を目指した。そのために、新生ポリペプチド鎖と mRNA をそれぞれ逆向きに引っ張りながら観察を行う実験系を構築した。

まず、新生ポリペプチド鎖に負荷を加えながら、リボソームの動きが検出できることを、光ピンセットを用いて実証した。次に、測定効率を向上させるために、磁気ピンセットを用いた実験系を構築し、負荷を変えながら、SecM の翻訳アレスト解除および下流遺伝子の翻訳観察を行った。これによって、SecM の全長配列による安定な翻訳アレストが負荷によって解除されることを実証し、翻訳アレストの解除を人工的に制御することを可能とした。

3.1 実験方法

3.1.1 使用した大腸菌の菌株・試薬・機器

大腸菌の菌株

本研究で使用した菌株は、XL10-Gold, BL21(DE3) の 2 株である。以下にその遺伝子型を示す。

XL10-Gold:

Tet^r, $\Delta(mcrA)183$, $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, *lac*, *Hte*, [F', *proAB*, *lacI^q*Z Δ M15, *Tn10* (Tetr), *Amy*, *Camr*]

BL21(DE3):

E. coli B, F⁻, *dcm*, *ompT*, *hsdS_B*(r_B⁻ m_B⁻), *gal*, λ (DE3)

試薬・器具

Acetylated BSA	Sigma-Aldrich
BSA	Sigma-Aldrich
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Thermo Fisher Scientific
cOmplete, Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics
Dichlorodimethylsilane	Sigma-Aldrich
DNA Ligation Kit (Mighty Mix)	タカラバイオ
DNA oligonucleotide labeled with Cy3 and biotin	Integrated DNA Technologies
DNA oligonucleotide labeled with Cy5 and digoxigenin	Integrated DNA Technologies
<i>Dpn</i> I	東洋紡
Dynabeads MyOne Carboxylic Acid	Thermo Fisher Scientific
EDC (<i>N</i> -(3-dimethylaminopropyl)- <i>N</i> '-ethylcarbodiimide hydrochloride)	Sigma-Aldrich
Ex Taq Hot Start Version	タカラバイオ
GenElute Bacterial Genomic DNA Kit	Sigma-Aldrich
HaloTag Alexa Fluor 660 Ligand	Promega
HaloTag PEG-biotin Ligand	Promega
<i>Hind</i> III	タカラバイオ
KOD -Plus-	東洋紡
MagExtractor -Plasmid-	東洋紡
Maleimide PEG2-biotin	Thermo Fisher Scientific
Nuclease-free water	QIAGEN
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	MACHEREY-NAGEL
NucleoSpin Plasmid EasyPure	MACHEREY-NAGEL
NucleoSpin RNA	MACHEREY-NAGEL
NuPAGE 10% Bis-Tris Gels	Thermo Fisher Scientific
NuPAGE MOPS SDS Running Buffer (20 \times)	Thermo Fisher Scientific
pET21c	Merck Millipore
PD-10 Desalting Columns	GE ヘルスケア
Polybead Carboxylate Microspheres 1.00 μ m	Polysciences
Polybead Carboxylate Microspheres 0.75 μ m	Polysciences
Polyclonal Antibody to Digoxigenin	Acris Antibodies GmbH
Primers	Sigma-Aldrich
Primers (LacZ.Stop.R.Dig)	ジーンデザイン
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	タカラバイオ
PrimeSTAR Max DNA Polymerase	タカラバイオ
PURE <i>frex</i> 1.0	ジーンフロンティア
RiboMAX Large Scale RNA Production Systems - T7	Promega

RNAsecure Reagent	Thermo Fisher Scientific
STAR Agarose Powder	理科研
Streptavidin	Life Technologies
SYBR Green II	Life Technologies
TaKaRa Ex Taq	タカラバイオ
<i>Xba</i> I	タカラバイオ
<i>Xho</i> I	タカラバイオ
カバーガラス (18×18 mm, 厚さ 0.12-0.17 mm)	松浪硝子工業
カバーガラス (22×22 mm, 厚さ 0.12-0.17 mm)	松浪硝子工業
スライドガラス (76×26 mm, 厚さ 0.8-1.0 mm)	松浪硝子工業
ネオジム磁石	NeoMag

その他の試薬は、和光純薬工業から購入した。

機器

DNA シークエンサー (Applied Biosystems 3130xL Genetic Analyzer)	Thermo Fisher Scientific
アングルローター (70Ti)	Beckman Coulter
遠心エバポレーター (CVE-2000)	東京理化器械
グラジェント作成装置・フラクショネーター (Gradient Station)	Biocomp
蛍光イメージャー (Molecular Imager Fx)	Bio-Rad
恒温振盪培養機 (BioShaker BR-43FL)	タイテック
高速冷却遠心機 (himac CR 21G)	日立工機
小型微量遠心機 (HF-120)	トミー精工
サーマルサイクラー (Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler)	Applied Biosystems
サーマルサイクラー (PTC-200 Thermal Cycler)	MJ Research
サブマリン型電気泳動装置 (Mupid-2plus)	Mupid
タンパク質ゲル電気泳動槽システム (Mini Gel Tank)	Thermo Fisher Scientific
超微量紫外可視分光光度計 (Nanodrop 2000)	Thermo Fisher Scientific
スイングローター (SW32Ti)	Beckman Coulter
超遠心機 (Optima L-90K)	Beckman Coulter
超音波ホモジナイザー (Ultrasonic Processor GE 130)	Sonics & Materials
パワーサプライ (Power Station 1000XP)	アトー
微量高速冷却遠心機 (MX-300)	トミー精工
微量高速冷却遠心機 (himac CF15RX II)	日立工機
フラクションコレクター	IWAKI
プラズマリアクター (FEMTO plasma system)	Diener electronic GmbH

顕微鏡システム

1064 nm 赤外レーザー (J20I-106C)	Spectra-Physics
1/2 波長板 (WPQ-10640-2M)	シグマ光機
45° 入射用誘多膜平面ミラー (TFM-30C05-1064)	シグマ光機
Electron multiplying-CCD (EM-CCD) カメラ (iXonEM DU897D)	Andor technology
イメージジョンオイル (TYPE NF2)	Nikon
エンコーダ付オプトマイク (SOM-C13E)	シグマ光機
オプトマイク用コントローラ (OMEC-2BG)	シグマ光機
キネマティックミラーマウント (KC1-P)	Thorlabs
ジンバル式上操作ミラーホルダー (LMHA-30)	シグマ光機
コンピュータ (Precision Tower 5810)	Dell
赤外レーザーコントローラ (J20I-8S40-18K-TRI)	SPECTRA-PHYSICS
対物レンズ (Apo TIRF 60× Oil, N.A. 1.49)	Nikon
電動ステージ (BIOS-425T)	シグマ光機
倒立型顕微鏡 (Eclipse Ti-E)	Nikon
ピエゾコントローラ (MDT693B)	Thorlabs
プリズムホルダー (PLH-40)	シグマ光機
偏光ビームスプリッター (PBS-20-10640)	シグマ光機
ワンタッチ式ミラーホルダー (MHF-30)	シグマ光機

ソフトウェア

観察用ソフトウェア (Micro-Manager)	https://micro-manager.org/
画像解析ソフトウェア (Image J)	https://rsbweb.nih.gov/ij/
数値解析ソフトウェア (MATLAB)	MathWorks

3.1.2 各種アレスト配列発現コンストラクトの作製

LacZ 遺伝子の増幅

大腸菌 BL21(DE3) よりゲノム DNA を抽出した (GenElute Bacterial Genomic DNA Kit). これを鋳型として, LacZ 遺伝子を PCR により増幅した. プライマーの配列 (表 3.2) を以下に示す.

表 3.2 LacZ 遺伝子増幅用プライマー

	配列	制限酵素サイト
LacZ_F	5'-CCCAAGCTTATGACCATGATTACGGATTCACTGG-3'	<i>Hind</i> III
LacZ_R	5'-CCGCTCGAGTTATTTTGGACACCAGACCAACTGG-3'	<i>Xho</i> I

下線部は制限酵素配列を示す. 以下の組成で PCR 反応溶液を調製した.

Nuclease-free water	21 μ L
2× PrimeSTAR Max Premix	25 μ L
10 μ M Primer 1	1.5 μ L
10 μ M Primer 2	1.5 μ L
50 ng/ μ L BL21(DE3) genomic DNA	1 μ L
Total	50 μ L

反応は変性 (98°C, 10 s), アニーリング (55°C, 15s), 伸長 (72°C, 20 s) を 1 サイクルとして 30 サイクル行った。反応後, 増幅産物を MagExtractor -PCR&Gel Clean up-により精製し, LacZ 遺伝子の PCR 産物を得た。

Halo-L26-SecM₁₃₃₋₁₇₀-LacZ 発現コンストラクトの作製

Halo-L26-SecM₁₃₃₋₁₇₀-LacZ は, HaloTag タンパク質の下流に GS リンカー (26 残基) を介して SecM の C 末端配列 (133-170 残基目) および LacZ を連結したコンストラクトである (図 3.1)。2.1.2 で作製した pHalo-L26-SecM₁₃₃₋₁₇₀ のプラスミドに上記の LacZ 遺伝子を挿入して作製した。その前準備として, HaloTag 遺伝子および SecM 遺伝子に変異を導入した。以下にその手順を示す。

まず, pHalo-L26-SecM₁₃₃₋₁₇₀ を鋳型として QuikChange 法により, HaloTag 遺伝子配列内の *Xho* I サイトに対して, コードするアミノ酸を変えないように変異を導入した。プライマーの配列 (表 3.3) および反応溶液の組成を以下に示す。

表 3.3 HaloTag 遺伝子変異導入用プライマー

配列	
Halo_ΔXho #1	5'-CTGTCGACGCTCGAAATTTCGCGCGGATC-3'
Halo_ΔXho #2	5'-GATCCGCCGGAATTTTCGAGCGTCGACAG-3'

Nuclease-free water	31.7 μL
5× PrimeSTAR Buffer	10 μL
dNTPs (2.5 mM each)	4 μL
10 μM Primer 1	1.4 μL
10 μM Primer 2	1.4 μL
20 ng/μL pHalo-L26-SecM ₁₃₃₋₁₇₀	1 μL
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	0.5 μL
Total	50 μL

反応は変性 (98°C, 30 sec) 後, 変性 (98°C, 10 sec), アニーリング (55°C, 15 sec), 伸長 (68°C, 7 min) を 1 サイクルとし, 18 サイクル行った。その後, *Dpn* I 処理を行い, 大腸菌 XL10-Gold を形質転換した。形質転換体よりプラスミドを抽出し (NucleoSpin Plasmid EasyPure), *Xho* I 処理を行ったサンプルをアガロースゲル電気泳動に供し, 変異が導入されたことを確認した。

続けて, QuikChange 法により SecM 遺伝子配列に含まれる終止コドンに欠損させた。プライマーの配列 (表 3.4) および反応溶液の組成を以下に示す。

表 3.4 SecM 終止コドン欠損用プライマー

配列	
SecM_ΔStop #1	5'-CCTCAACGCCTCACCAAGCTTGCGGCCGC-3'
SecM_ΔStop #2	5'-GCGGCCGCAAGCTTGGTGAGGCGTTGAGG-3'

Nuclease-free water	31.7 μ L
5 \times PrimeSTAR Buffer	10 μ L
dNTPs (2.5 mM each)	4 μ L
10 μ M Primer 1	1.4 μ L
10 μ M Primer 2	1.4 μ L
20 ng/ μ L Plasmid	1 μ L
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	0.5 μ L
<hr/>	
Total	50 μ L

反応は変性 (98°C, 30 sec) 後, 変性 (98°C, 10 sec), アニーリング (55°C, 5 sec), 伸長 (68°C, 5 min) を 1 サイクルとし, 18 サイクル行った. その後, *Dpn* I 処理を行い, 大腸菌 XL10-Gold を形質転換した. 形質転換体よりプラスミドを抽出し (NucleoSpin Plasmid EasyPure), 塩基配列の確認を行った (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems 3130xL Genetic Analyzer). 以下, このプラスミドを pHalo Δ XhoI-L26-SecM₁₃₃₋₁₇₀ と呼ぶ.

最後に, LacZ 遺伝子を挿入した. pHalo Δ XhoI-L26-SecM₁₃₃₋₁₇₀ を制限酵素 (*Xho* I, *Hind* III) 処理後, 断片をアガロースゲルより切り出し精製し (MagExtractor -PCR&Gel Clean up-), これをベクターとした. LacZ 遺伝子の PCR 産物を *Xho* I および *Hind* III で処理し, このベクターに挿入した. 遺伝子断片の挿入には, DNA Ligation Kit (Mighty Mix) を用いた. 産生プラスミドで形質転換した大腸菌 XL10-Gold よりプラスミドを抽出し (NucleoSpin Plasmid EasyPure), 制限酵素 (*Xho* I, *Hind* III) 処理により LacZ 遺伝子の挿入を確認した. 以下, このプラスミドを pHalo-L26-SecM₁₃₃₋₁₇₀-LacZ と呼ぶ.

Halo-SecM₁₋₁₇₀-LacZ 発現コンストラクトの作製

Halo-SecM₁₋₁₇₀-LacZ は, HaloTag タンパク質の下流に GS リンカー (8 残基) を介して全長の SecM および LacZ 遺伝子を連結したコンストラクトである (図 3.1). 2.1.2 で作製した pHalo-SecM₁₋₁₇₀ のプラスミドに上記の LacZ 遺伝子を挿入して作製した. その前準備として, HaloTag 遺伝子および SecM 遺伝子に変異を導入した. 以下にその手順を示す.

まず, pHalo-SecM₁₋₁₇₀ を鋳型として QuikChange 法により, HaloTag 遺伝子配列内の *Xho* I サイトに対し, コードするアミノ酸を変えないように変異を導入した. プライマーは表 3.3 に示すものを用いた. 反応溶液の組成を以下に示す.

Nuclease-free water	31.7 μ L
5 \times PrimeSTAR Buffer	10 μ L
dNTPs (2.5 mM each)	4 μ L
10 μ M Primer 1	1.4 μ L
10 μ M Primer 2	1.4 μ L
20 ng/ μ L pHalo-SecM ₁₋₁₇₀	1 μ L
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	0.5 μ L
<hr/>	
Total	50 μ L

反応は変性 (98°C, 30 sec) 後, 変性 (98°C, 10 sec), アニーリング (55°C, 15 sec), 伸長 (68°C, 7 min) を 1 サイクルとし, 18 サイクル行った. その後, *Dpn* I 処理を行い, 大腸菌 XL10-Gold を形質転換した. 形質転換体よりプラスミドを抽出し (NucleoSpin Plasmid EasyPure), *Xho* I 処理を行ったサンプルをアガロースゲル電気泳動に供し, 変異が導入されたことを確認した.

続けて, QuikChange 法により SecM 遺伝子配列に含まれる終止コドンに欠損させた. プライマーは表 3.4 に示すものを用いた. 反応溶液の組成を以下に示す.

Nuclease-free water	31.7 μ L
5 \times PrimeSTAR Buffer	10 μ L
dNTPs (2.5 mM each)	4 μ L
10 μ M Primer 1	1.4 μ L
10 μ M Primer 2	1.4 μ L
20 ng/ μ L Plasmid	1 μ L
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	0.5 μ L
Total	50 μ L

反応は変性 (98°C, 30 sec) 後, 変性 (98°C, 10 sec), アニーリング (55°C, 5 sec), 伸長 (68°C, 5 min) を 1 サイクルとし, 18 サイクル行った. その後, *Dpn* I 処理を行い, 大腸菌 XL10-Gold を形質転換した. 形質転換体よりプラスミドを抽出し (NucleoSpin Plasmid EasyPure), 塩基配列の確認を行った (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems 3130xL Genetic Analyzer). 以下, このプラスミドを pHalo Δ XhoI-SecM₁₋₁₇₀ と呼ぶ.

最後に, LacZ 遺伝子を挿入した. pHalo Δ XhoI-SecM₁₋₁₇₀ を制限酵素 (*Xho* I, *Hind* III) 処理後, 断片をアガロースゲルより切り出し精製し (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up), これをベクターとした. LacZ 遺伝子の PCR 産物を *Xho* I および *Hind* III で処理し, このベクターに挿入した. 遺伝子断片の挿入には, DNA Ligation Kit (Mighty Mix) を用いた. 産生プラスミドで形質転換した大腸菌 XL10-Gold よりプラスミドを抽出し (NucleoSpin Plasmid EasyPure), 制限酵素 (*Xho* I, *Hind* III) 処理により LacZ 遺伝子の挿入を確認した. 以下, このプラスミドを pHalo-SecM₁₋₁₇₀-LacZ と呼ぶ.

Halo-SecM₁₋₁₇₀-LacZ_{250Stop} 発現コンストラクトの作製

Halo-SecM₁₋₁₇₀-LacZ_{250Stop} は, Halo-SecM₁₋₁₇₀-LacZ の LacZ 遺伝子の途中 (250 番目のアミノ酸残基) に終止コドンを導入したものである (図 3.1). pHalo-SecM₁₋₁₇₀-LacZ を鋳型として QuikChange 法により, LacZ 遺伝子配列内に変異を導入した. プライマーの配列 (表 3.5) を以下に示す.

表 3.5 LacZ 遺伝子変異導入用プライマー

配列	
LacZ.G748T.S	5'-TCAGATGTGCGGC[TAG]TTGCGTGACTACC-3'
LacZ.G748T.A	5'-GGTAGTCACGCAA[CTA]GCCGCACATCTGA-3'

囲み枠は置換したトリプレットを示す. 以下の組成で PCR 反応溶液を調製した.

Nuclease-free water	33.1 μ L
5 \times PrimeSTAR Buffer	10 μ L
dNTPs (2.5 mM each)	4 μ L
20 μ M Primer 1	0.7 μ L
20 μ M Primer 2	0.7 μ L
20 ng/ μ L pHalo-SecM ₁₋₁₇₀ -LacZ	1 μ L
PrimeSTAR HS DNA Polymerase	0.5 μ L
Total	50 μ L

反応は変性 (98°C, 30 sec) 後, 変性 (98°C, 10 s), アニーリング (50°C, 15s), 伸長 (68°C, 10 min) を 1 サイクルとして 18 サイクル行った. その後, *Dpn* I 処理を行い, 大腸菌 XL10-Gold を形質転換した. 形質転換

体よりプラスミドを抽出し (NucleoSpin Plasmid EasyPure), 塩基配列の確認を行い (Eurofins Genomics), 変異が導入されたことを確認した。以下, このプラスミドを pHalo-SecM₁₋₁₇₀-LacZ_{250Stop} と呼ぶ。

Halo-SecM₁₋₁₇₀-SecM₁₋₁₇₀-LacZ_{250Stop} 発現コンストラクトの作製

Halo-SecM₁₋₁₇₀-SecM₁₋₁₇₀-LacZ は, HaloTag タンパク質の下流に SecM の全長配列 (1-170 残基目) を 2 つ連結し, そのさらに下流に LacZ 遺伝子 (250 番目のコドンを終止コドンに置換) を連結したコンストラクトである (図 3.1)。以下に作製の手順を示す。

まず, pHalo-SecM₁₋₁₇₀-LacZ を鋳型に, SecM 遺伝子を PCR により増幅した。プライマーの配列 (表 3.6) および PCR 反応溶液の組成を以下に示す。

表 3.6 SecM 遺伝子増幅用プライマー

配列		制限酵素サイト
SecM.HindIII_F	5'-ACCA <u>AAGCTT</u> GGCGGTGGCTCTGGCTCTGTG-3'	Hind III
SecM.HindIII_R	5'-CATA <u>AAGCTT</u> GGTGAGGCGTTGAGGGCCA-3'	Hind III

下線部は制限酵素配列を示す。以下の組成で PCR 反応溶液を調製した。

Nuclease-free water	34.5 μ L
10 \times Buffer for KOD -Plus-	5 μ L
dNTPs (2 mM each)	5 μ L
MgSO ₄ (25 mM)	2 μ L
20 μ M Primer 1	0.75 μ L
20 μ M Primer 2	0.75 μ L
1 ng/ μ L DHFR DNA	1 μ L
KOD -Plus-	1 μ L
Total	50 μ L

反応は変性 (94°C, 2 min) 後, 変性 (94°C, 15 sec), アニーリング (64°C, 30 sec), 伸長 (68°C, 35 sec) を 1 サイクルとして 30 サイクル行った。反応後, 増幅産物を NucleoSpin Gel and PCR Clean-up により精製し, 制限酵素処理 (Hind III) を行った。制限酵素処理断片をアガロースゲルより切り出し精製し (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up), Hind III で処理した pHalo-SecM₁₋₁₇₀-LacZ_{250Stop} とライゲーションした。ライゲーションには, DNA Ligation Kit (Mighty Mix) を用いた。産生プラスミドで形質転換した大腸菌 XL10-Gold よりプラスミドを抽出し (NucleoSpin Plasmid EasyPure), 塩基配列の確認を行った (Eurofins Genomics)。以下, このプラスミドを pHalo-SecM₁₋₁₇₀-SecM₁₋₁₇₀-LacZ_{250Stop} と呼ぶ。

3.1.3 mRNA の合成

各種コンストラクトを PCR により増幅し, それを *in vitro* 転写用の鋳型とした。プライマーの配列 (表 3.7) および PCR 反応溶液の組成を以下に示す。

PURE-F は, T7 プロモータの上流に結合するように設計されている。増幅された DNA には, *in vitro* 転写に必要な T7 プロモータおよび翻訳に必要な SD 配列が付与される (図 3.1)。

表 3.7 mRNA 合成のための DNA 鋳型増幅用プライマー

配列	
PURE_F	5'-AGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACG-3'
LacZ_Stop_R	5'-TCGAGTTATTTTGGACACCAGACCAACTGG-3'

Nuclease-free water	34.5 μ L
10 \times Buffer for KOD -Plus-	5 μ L
dNTPs (2 mM each)	5 μ L
MgSO ₄ (25 mM)	2 μ L
20 μ M Primer 1	0.75 μ L
20 μ M Primer 2	0.75 μ L
1 ng/ μ L Template Plasmid	1 μ L
KOD -Plus-	1 μ L
Total	50 μ L

反応は変性 (94°C, 2 min) 後, 変性 (94°C, 15 sec), アニーリング (64°C, 30 sec), 伸長 (68°C, 5 min) を 1 サイクルとして 30 サイクル行った. 反応後, アガロース電気泳動により, 特異的増幅の確認を行った. PCR 産物は精製することなく, *in vitro* 転写用の鋳型として使用した. 以下に, *in vitro* 転写系 (RiboMAX Large Scale RNA Production Systems - T7) の反応溶液組成を示す.

Template DNA	8 μ L
rNTPs (25 mM each)	6 μ L
T7 transcription 5 \times buffer	4 μ L
Enzyme Mix	2 μ L
Total	20 μ L

反応は, 37°C で 4 hr 行った. 反応後, RQ1 RNase-Free DNase (1U/ μ L) を 1 μ L 加えて, 鋳型の DNA を消化した (37°C, 15 min). 反応溶液を NucleoSpin RNA により精製し, 変性アガロースゲルで mRNA の合成を確認した.

3.1.4 DNA ハンドルの合成

DNA ハンドルは, 合成した mRNA のアレスト配列の下流と完全相補的な配列となるように設計する. Anti-digoxigenin ビーズと結合させるために, アンチセンス鎖の 5' 末端に, Digoxigenin を 2 個付与した. 各種コンストラクトのプラスミドを鋳型に, PCR により増幅した. プライマーの配列 (表 3.8) を以下に示す.

表 3.8 DNA ハンドル (LacZ) 合成用プライマー

配列	
SecM.167_F	5'-CAACGCCTCACCAAGCTTATGACC-3'
LacZ_Stop_R.Dig	5'-Dig/DigT/TTCGAGTTATTTTGGACACCAGACCAACTGG-3'

Dig は 5' 末端に付与された Digoxigenin, DigT は塩基部に C6 リンカー, アミノ基を介して Digoxigenin が付与されたチミンを示す. 以下の組成で PCR 反応溶液を調製した.

Nuclease-free water	153 μ L
10 \times <i>Ex Taq</i> Buffer	20 μ L
dNTPmix (2.5 mM each)	16 μ L
20 μ M Primer 1	3 μ L
20 μ M Primer 2	3 μ L
1 ng/ μ L Plasmid	4 μ L
<i>TaKaRa Ex Taq HS</i>	1 μ L
Total	200 μ L

反応は、変性 (98°C, 10 sec), アニーリング (55°C, 30 sec), 伸長 (72°C, 3 min) を 1 サイクルとして 30 サイクル行った。反応後、アガロース電気泳動により、特異的増幅の確認を行った。PCR 産物は NucleoSpin Gel and PCR Clean-up により精製し、得られた 2 本鎖 DNA を以降の実験で DNA ハンドルとして用いた。

3.1.5 リボソームの精製

大腸菌 BL21 (DE3) 株由来のリボソームを以下のプロトコルで精製した。

大腸菌の大量培養

大腸菌 BL21 (DE3) 株を、100 μ g/mL カルベニシリンおよび 20% (w/v) グルコースを含む LB 培地 (1 L, 2 本) に植菌し、37°C で OD600 = 0.5 になるまで振盪培養した。培養液を遠心し (6,000 rpm, 10 min, 4°C), 集菌した。集菌した菌体を、Buffer A (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NH₄Cl, 10 mM MgCl₂, 0.5 mM EDTA, 6 mM β -mercaptoethanol) に懸濁して洗浄し、再び遠心 (6,000 rpm, 10 min, 4°C) を行った。菌体は、-80°C にて凍結保存した。

リボソームの精製

-80°C で凍結保存していた菌体を氷上で解凍し、cComplete, Mini Protease Inhibitor Cocktail および SUPERase[®] In RNase Inhibitor (3,000 unit) を添加した Buffer A (40 mL) に懸濁した。懸濁液の温度が上昇しないように氷冷しながら超音波処理を行い、大腸菌を破碎した。得られた粗抽出液を超遠心 (16,000 rpm, 15 min, 4°C) し、可溶性画分を回収した。ローターは、アングルローター (70Ti) を用いた。遠心管 (3 本) に Buffer B (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NH₄Cl, 10 mM MgCl₂, 0.5 mM EDTA, 6 mM β -mercaptoethanol, 37% sucrose) を 16 mL ずつ分注しておき、得られた上清を 10 mL ずつ、Buffer B の上に静かに重層し、超遠心を行った (33,000 rpm, 22 hr, 4°C)。ローターは、アングルローター (70Ti) を用いた。

上清をきれいに除去し、3 本の遠心管に Buffer C (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 60 mM NH₄Cl, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM EDTA, 6 mM β -mercaptoethanol) を 800 μ L ずつ加え、氷上で沈殿をピペッティングにより丁寧に溶かした。Buffer C 10-40% のスクロースグラジエントを作製し (2 本), リボソームを含む溶液を半量ずつスクロースグラジエント上に静かに重層し、超遠心した (22,000 rpm, 20 hr, 4°C)。ローターは、スイングローター (SW32Ti) を用いた。

フラクショネーター (Gradient Station) を用いて、遠心後の溶液を 500 μ L ずつ分画した。それぞれのフラクションの 260 nm における吸光度を測定した。吸光度にピークが現れた周辺のフラクションを、TAE アガロースゲル電気泳動 (40 mM Tris, 20 mM Acetic Acid, 1 mM EDTA, 1% (w/v) Agarose) により分析した³⁵。サンプル 1 μ L に 10 \times Loading dye (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 0.25% Bromphenol blue, 60% glycerol) を 0.6 μ L, Formamide を 4 μ L 添加し、65°C, 5 min 熱処理して変性させ、アガロースゲル電気泳動を行った。ゲルは Syber Green II を用いて染色し、蛍光イメージャー (Molecular Imager Fx) によりバンドを蛍光検出した。70S リボソームが含まれるフラクションを集めて分注した後、液体窒素で急速凍結させ、実験時まで -80°C にて保存

した。

3.1.6 アレスト寿命の温度依存性の検討

無細胞タンパク質合成系 (PURE *frex* 1.0) により、まず mRNA を転写し、その後、精製した大腸菌 BL21 (DE3) 株由来のリボソームを添加することで翻訳アレスト複合体を調製した。反応溶液の組成を以下に示す。

Solution I	10 μ L
Solution II	1 μ L
Template DNA	2 μ L
10 μ M HaloTag Alexa Fluor 660 Ligand	0.5 μ L
NF water	2.5 μ L
<hr/>	
Total	16 μ L

鋳型 DNA から mRNA を転写させた (30°C, 10 min) 後、精製した大腸菌 BL21 (DE3) 株由来のリボソーム (1 μ M) を 4.0 μ L 加えて翻訳アレスト複合体を調製した (30°C, 20 min)。

溶液中に、終濃度 2 mM となるように Puromycin を加えた後、30°C または 37°C でインキュベートしながら、3 min 後から一定時間おきにサンプルを分取した。

2.1.5 項に示した方法により電気泳動およびアレスト寿命の解析を行った。

3.1.7 ガラス基板の処理

ヘキサン 120 mL に DDS を 65 μ L 加え、5 min ソニケーションを行い、溶解させた。酸素プラズマ照射処理 (FEMTO plasma system) を 15 min 行ったカバーガラスをホルダーに並べ、DDS-ヘキサン溶液の入ったビーカーの中に浸し、パラフィルムで封をして、90 min 室温で振盪した。ビーカー内の DDS-ヘキサン溶液を捨て、新たにヘキサンを加えて、超音波洗浄を行った (1 min \times 3 回)。カバーガラスを風乾し、ケースに入れて、真空を引いた後、使用時まで -20°C にて保存した。作製から 1 ヶ月以内のもののみを実験に使用し、1 ヶ月以上経過したものは廃棄した。

3.1.8 光ピンセットのセットアップ

光ピンセットの光学系

光ピンセットの光学系を図 3.4 に示す。顕微鏡は倒立型顕微鏡 (Eclipse Ti-E)、対物レンズは油浸レンズ (Apo TIRF 60 \times Oil, N.A. 1.49)、ステージは電動ステージ (BIOS-425T) を用いた。ビーズの光捕捉用に 1064 nm 赤外レーザー (PDMJ-M530-26)、ビーズの明視野観察用にハロゲンランプ照明をそれぞれ用いた。1064 nm の赤外レーザーの光路中に 1/2 波長板 (WPQ-10640-2M) および偏光ビームスプリッター (PBS-20-10640) を入れることでレーザーを 2 光路に分け、Dual trap の光ピンセットを構築した。片方の光路には電動ミラー (SOM-C13E, LMHA-30)、もう片方にはピエゾ制御ミラー (KC1-P) を入れることで、赤外レーザーの顕微鏡への入射角を制御して、2 つのレーザーの捕捉中心を xy 方向に制御できるようにした。画像の取り込みには冷却 EM-CCD カメラ (iXonEM DU897D) を用いた。

光ピンセットの制御および観察

オープンソースの顕微鏡ソフトウェア Micro-Manager (<https://micro-manager.org/>) を用いて、レーザーの制御およびビーズの観察を行った。顕微鏡、冷却 EM-CCD カメラ、電動ミラーのコントローラー (OMEC-2BG)、ピエゾミラーのコントローラー (MDT693B)、赤外レーザーのコントローラー (J20I-8S40-18K-TRI) をそれぞれコンピュータに接続し、Micro-Manager で制御するためのプラグインを作成した。撮影された 2 つのビーズの輝

度重心をリアルタイムで解析し、中心間距離を表示するプラグインを作成した。これらを用いて、ビーズの中心間距離をモニターしながら、レーザー強度やレーザーの位置を制御して、実験を行った。

光ピンセットの捕捉力較正

光ピンセットの捕捉力 F_{trap} [pN] は、捕捉中心から半径 200 nm 程度の範囲内においては、捕捉中心からの距離 x [nm] に比例する復元力となり、式 (3.1) より表せる。

$$F_{\text{trap}} = kx \quad (3.1)$$

k [pN · nm⁻¹] は光ピンセットの弾性率であり、レーザー強度 P [mW] に比例する値である。

$$k = aP \quad (3.2)$$

光ピンセットの捕捉力を計算するために、弾性率とレーザー強度の比例定数 a を実験的に求めた。以下に手順を示す。

スライドガラスとカバーガラス (18 × 18 mm) を両面テープで張り合わせ、容積 15 μL 程度のフローセルを作製した。Milli Q に懸濁した 1 μm および 750 nm のビーズ溶液 (Polybead Carboxylate Microspheres) をフローセルに流し込み、マニキュアで封をした。ブラウン運動をしている 1 μm および 750 nm のビーズを光ピンセットの2つのレーザーでそれぞれ捕捉した。2,000 frame ごとにレーザー強度を変化させて、計 10,000 frame 撮影を行った。同じ測定を7セットのビーズについて行った。

画像解析ソフト Image J (<https://rsbweb.nih.gov/ij/>) を用いて、取得した画像データからビーズの輝度重心を解析した。解析には、自作の輝度重心解析用のプラグインを用いた。各レーザー強度ごとに、ビーズの輝度重心の x 座標 [nm] 方向の標準偏差 σ_x を算出した。

光捕捉された微粒子においては、光ピンセットによる弾性エネルギーとブラウン運動に現れる熱運動のエネルギーが釣り合っている。1 方向のゆらぎに着目すると、エネルギー等分配の法則により、次式が成り立つ。

$$\frac{1}{2}k_B T = \frac{1}{2}k\langle x^2 \rangle \quad (3.3)$$

k_B はボルツマン定数、 T は絶対温度である。また、 $\langle x^2 \rangle$ は捕捉中心からのビーズの x 座標の平均二乗変位、すなわちビーズの x 座標の分散 σ_x^2 [nm²] を表す。従って式 (3.3) は、

$$k = \frac{k_B T}{\sigma_x^2} \quad (3.4)$$

と変形できる。実験的に求めた σ_x を用いて、式 (3.4) より光ピンセットの弾性率 k [pN · nm⁻¹] を求めた。各レーザー強度に対する弾性率 k をプロットし、回帰直線を作成して式 (3.2) のレーザー強度と光ピンセットの弾性率の比例定数 a を計算した。

以後の測定では、式 (3.2) よりレーザー強度から弾性率 k [pN · nm⁻¹] を計算し、ビーズの捕捉中心からの距離 x [nm] を用いて式 (3.1) より光ピンセットの捕捉力 F_{trap} [pN] を算出した。

3.1.9 光ピンセットを用いた翻訳の1分子観察

ガラス基板上での翻訳活性の検討

DDS 処理したカバーガラスを2枚 (18 × 18 mm および 22 × 22 mm) 両面テープで張り合わせ、容積 15 μL 程度のフローセルを作製した。Polymix buffer (50 mM Tris-OAc pH 7.5, 5 mM Mg(OAc)₂, 1 mM

EDTA, 100 mM KCl, 5 mM NH_4OAc , 0.5 mM $\text{Ca}(\text{OAc})_2$, 5 mM putrescine, 1 mM spermidine, 5 mM β -mercaptethanol) の中に Tween 20 を最終濃度 0.2% (v/v) となるように添加し, これをフローセルに 20 μL 流し入れ, 10 min 静置して, ガラス基板をブロッキングした. 次に, Polymix buffer を 35 μL 流し入れ, ガラス基板表面に未結合の Tween 20 を洗い流した. 参考文献³⁶で使用された蛍光タンパク質 (GFPmut3) の DNA を鋳型に, 以下の溶液組成で, 無細胞タンパク質合成系 (PURE *frex*) の反応溶液を調製した.

Solution I	10 μL
Solution II	1 μL
Solution III	1 μL
Template DNA	2 μL
Nuclease-free water	6 μL
<hr/>	
Total	20 μL

これを全量フローセルに流し入れ, 溶液の蒸発を防ぐため, カバーガラスの周囲にマニキュアを塗って封をした. 顕微鏡の対物レンズを 30°C に設定し, 488 nm のレーザーを用いて, フローセル内の蛍光強度の時間変化を観察した (倍率: 360 倍, 露光時間: 100 ms, EM Gain: 200). 画像解析ソフト Image J で, 蛍光強度の時間変化を解析した.

Anti-digoxigenin ビーズおよび Streptavidin ビーズの作製

ビーズ溶液 (Polybead Carboxylate Microspheres 1.00 μm または 0.75 μm) 100 μL に Bead buffer [pH 6.5] (25 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4) 500 μL を加えてよく懸濁し, 遠心 (15,000 rpm, 2 min, 4°C. 以下の遠心はすべてこの条件で行った) した. 上清を捨て, Bead buffer [pH 6.5] を 500 μL 加えて懸濁し, 再び遠心した. この洗浄操作を計 3 回行い, 最終的に 200 μL の Bead buffer [pH 6.5] にビーズを懸濁した. 100 mg/mL EDC を 200 μL 加えて 2 min ボルテックスし, 室温で 1 hr インキュベートした. 遠心して上清を捨てた後, Bead buffer [pH 8.0] (25 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4) 500 μL を加えてよく懸濁し, 遠心した. この操作を計 3 回行い, 最終的に 50 μL の Bead buffer [pH 8.0] にビーズを懸濁した. 1 mg/mL Polyclonal Antibody to Digoxigenin (1 μm Anti-digoxigenin ビーズ) または 1 mg/mL Streptavidin (750 nm Streptavidin ビーズ) を 50 μL 加えて 10 min ボルテックスし, 室温で 1 hr インキュベートした. 10 μL の 1 M Tris-HCl [pH 7.5] を加えてさらに室温で 10 min インキュベートし, 反応を停止させた. 遠心して上清を捨て, 500 μL の NEM buffer (10 mM imidazole, 500 mM, KCl, 2 mM MgCl_2) に懸濁し, 5min 静置した後, 遠心した. この操作を計 3 回行った. 最後に, Polymix buffer で同様の洗浄操作を 2 回行い, 終濃度 1 mg/mL になるように BSA を添加した Polymix buffer 200 μL でペレットを溶かし, 4°C で保存した.

ビーズの修飾について確かめるために, 5' 末端側に Biotin または Digoxigenin, 3' 末端側に Cy3 または Cy5 がそれぞれ付与されたオリゴ DNA (表 3.9) を結合させて, 蛍光顕微鏡を用いてビーズ表面の蛍光を観察した. 以下に手順を示す.

表 3.9 ビーズの修飾確認用オリゴ DNA

配列	
Biotin-Cy3 オリゴ DNA	5'-Biotin/AAAGGGAGATCAGGATATAAAG/Cy3-3'
Digoxigenin-Cy5 オリゴ DNA	5'-Dig/AAAGGGAGATCAGGATATAAAG/Cy5-3'

カバーガラス (18 × 18 mm) とスライドガラスを両面テープで貼り合わせ, 容積 15 μL 程度のフローセルを作製した. Polymix buffer に懸濁した 1 μm Anti-digoxigenin ビーズ溶液および 750 nm Streptavidin ビーズ溶

液をフローセルに流し込み、2 min 静置して、基板に吸着させた。Polymix buffer を 35 μ L 流し入れて、未結合のビーズを洗い流した。次に、2 つのオリゴ DNA 溶液を、それぞれ最終濃度 500 μ M になるよう混ぜて希釈した。これを 20 μ L フローセルに流し入れ、2 min 静置し、ビーズに結合させた。Polymix buffer を 35 μ L 流し入れて、未結合のオリゴ DNA を洗い流した。マニキュアで封をして、蛍光顕微鏡で観察を行った（光源：532 nm レーザーおよび 635 nm レーザー、露光時間：30 ms, EM gain：10）。

Anti-digoxigenin ビーズ表面への mRNA-DNA の固定

合成した mRNA と DNA ハンドルをハイブリダイゼーションさせて、DNA ハンドルの 5' 末端側に付与した Digoxigenin を介して、1 μ m Anti-digoxigenin ビーズの表面に mRNA-DNA を固定した。以下に手順を示す。

まず、2 本鎖 DNA を熱変性させて 1 本鎖にした。10 \times Phosphate buffer pH6.4 (25 mM Na₂HPO₄, 75 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl) を調製し、DNA 溶液に添加した。以下に溶液組成を示す。

200 ng/ μ L DNA	2 μ L
10 \times Phosphate buffer pH6.4	0.8 μ L
Nuclease-free water	3.2 μ L
Total	6 μ L

95°C で 5 min 熱処理を行って DNA を変性させた。続いて、1000 ng/ μ L の mRNA 2 μ L を反応溶液中に添加し、95°C から 25°C まで毎秒 0.1°C ずつ温度を下げながら、mRNA と DNA をハイブリダイゼーションさせた。Anti-digoxigenin ビーズ溶液を 4 μ L 添加し、37°C で 5 min インキュベートした。小型微量遠心機 (HF-120) で 5 min 遠心し、ビーズに未結合の mRNA および DNA を含む上清を取り除いた。これにより得られた mRNA-DNA 結合ビーズを以降の実験に用いた。

Anti-digoxigenin ビーズ表面での翻訳アレスト複合体の合成

mRNA-DNA 結合ビーズに無細胞タンパク質合成系 (PURE *frex* 1.0) を加えた。反応溶液の組成を以下に示す。

Nuclease-free water	6.5 μ L
Solution I	10 μ L
Solution II	1 μ L
1.3 μ M BL21 (DE3) Ribosome	2 μ L
4 μ M HaloTag PEG-biotin Ligand	0.5 μ L
Total	20 μ L

ビーズに反応容器を添加後、37°C で 20 min インキュベートし、ビーズ表面に固定した mRNA を翻訳して、翻訳アレスト複合体を調製した。その後、750 nm Streptavidin ビーズを 2 μ L 添加した。この溶液を用いて、光ピンセットで測定を行った。

基板上での Streptavidin ビーズへの翻訳アレスト複合体の結合

DDS 処理したカバーガラスを 2 枚 (18 \times 18 mm および 22 \times 22 mm) 両面テープで張り合わせ、容積 15 μ L 程度のフローセルを作製した。Polymix buffer の中に Tween 20 を最終濃度 0.2% (v/v) となるように添加し、これをフローセルに 20 μ L 流し入れ、10 min 静置して、ガラス基板をブロッキングした。次に、Polymix buffer を 35 μ L 流し入れ、ガラス基板表面に未結合の Tween 20 を洗い流した。その後、前項で合成した翻訳アレスト複合体を含む溶液を 20 μ L 流し入れた。溶液の蒸発を防ぐため、カバーガラスの周囲にマニキュアを塗って封をした。

作製したフローセルを顕微鏡で観察しながら撮影を行った（照明：ハロゲンランプ、倍率：360 倍、露光時間：

30 ms) . ブラウン運動をしている 1 μm Anti-digoxigenin ビーズおよび 750 nm Streptavidin ビーズをそれぞれレーザーで光捕捉した. 750 nm Streptavidin ビーズは固定したまま, 1 μL Anti-digoxigenin ビーズを動かして, ビーズの中心間距離が 1100 nm 程度になるまで近づけた. そのまま 20 sec ほど待機し, ビーズの中心間距離が 1900 nm 程度になるまで 1 μL Anti-digoxigenin ビーズを遠ざけた. 2 つのビーズが翻訳アレスト複合体を介して連結されるまで, これを繰り返した.

リボソームの動きの観察

2 つのビーズ間に翻訳アレスト複合体を連結した後, 負荷が 1 ~ 2 pN 程度になるようにレーザー強度を調節し, ビーズ間距離の時間変化を調べることで, 翻訳の 1 分子観察を行った. 翻訳が停止している間は, ビーズの中心間距離は一定のままであるが, 翻訳アレストが解除されて, 翻訳が再開すると, ビーズの中心間距離が時間とともに小さくなる. ビーズの中心間距離の時間変化をモニターしながら, 撮影を行った (照明: ハロゲンランプ, 倍率: 360 倍, 露光時間: 30 ms).

撮影した画像の解析には, 画像解析ソフト Image J を用いた, ビーズの輝度重心解析用のプラグインを作成し, 2 つのビーズの中心間距離の時間変化を求めた.

3.1.10 磁気ピンセットを用いた 1 分子力学測定系の開発

磁気ピンセットのセットアップ

以下の手順で磁気ピンセットのセットアップを行った. 5 \times 5 \times 5 mm のネオジム磁石 2 つを逆向きに並べ, 1 mm のガラススペーサーを間に挟み, スライドガラスに貼り付け, 対物レンズの真上に設置した. 磁石を取り付けたスライドガラスを支柱を介して, ホルダーに取り付け, ステッピングモーターで磁石と対物レンズ間の距離を制御した.

照明にはハロゲンランプを用いた. ビーズの観察には油浸の対物レンズ, ステージは電動ステージ, 画像の取り込みには冷却 EM-CCD カメラをそれぞれ使用した.

ビーズの z 軸方向の変位の解析

先行研究³⁷の方法を参考に, z 軸方向の変位の解析を行った. 磁性ビーズの作る回折リングを式 3.5 で示す 2 次元のガウス関数の重ね合わせでフィッティングした.

$$I(x, y) = A_0 \cdot \exp \left(-\frac{(x - x_0)^2 + (y - y_0)^2}{2\sigma_0^2} \right) + \sum_{i=1}^N A_i \cdot \exp \left(-\frac{\left(\sqrt{(x - x_0)^2 + (y - y_0)^2} - R_i \right)^2}{2\sigma_i^2} \right) + B_0 \quad (3.5)$$

A_0 は中心の明るさの最大値, x_0, y_0 は中心の x 座標および y 座標, σ_0 は中心の円の広がり, A_i は i 番目のリングの明るさの最大値, R_i は i 番目のリングの半径, σ_i は i 番目のリングの幅, B_0 は背景の明るさをそれぞれ表す.

計算量を減らすために, 1 つ目の明環までをフィッティングした. 1 つ目の明環の半径 R_1 と z 軸方向の変位との関係をグラフにプロットし, 回帰直線を作成して, 比例定数を求めた. 求めた比例定数を用いて, ビーズの作る回折リングの半径から, z 軸方向の変位を計算した.

磁気ピンセットによる負荷の計算

磁気ピンセットは磁石と磁性ビーズとの間の距離を調製することにより, 力を制御する. 磁石が作る外部磁場 \vec{B} の中に置かれた磁性ビーズにかかる負荷 \vec{F} は以下の式で表される.

$$\vec{F} = -\nabla U = \frac{1}{2} \nabla (\vec{m} \cdot \vec{B}) \quad (3.6)$$

U は磁性ビーズのエネルギー、 \vec{m} は外部磁場 \vec{B} が印加されたときの磁性ビーズの磁気モーメントである。外部磁場が小さいときは、磁気モーメントは磁束密度に比例するため、力は磁場の 2 乗の勾配に比例する。

$$\vec{F} = \frac{V_b \chi}{2\mu_0} \nabla |\vec{B}|^2 \quad (3.7)$$

ここで、 V_b, χ, μ_0 はそれぞれ、磁性ビーズの体積、磁化率および真空の透磁率を表す。

外部磁場が一定以上の大きさになると、磁気モーメントは飽和に達する。今回使用した MyOne の磁性ビーズは、磁束密度が 13 mT 以上になると磁気モーメントが一定の値となる。磁束密度および磁気モーメントの出ている方向を x 座標にとると、磁気モーメントが飽和に達した後は、式 (3.6) は以下のように変形される。

$$F_z = \frac{1}{2} m_{\text{sat}} \frac{\partial B_x}{\partial z} \quad (3.8)$$

ここで、 m_{sat} は飽和に達した磁気モーメントを表す。従って、13 mT 以上の外部磁場の中で、磁性ビーズが受ける力は、磁束密度の z 方向の微分値に比例する。

磁性ビーズが受ける力 F_z を求めるために、3 kbp の DNA を介して、基板に係留したビーズの位置の熱変動を計測した。このビーズは、逆向きに固定した振り子と考えることができる。振り子の長さ (DNA 鎖の長さ + bead の半径) を l 、磁気ピンセットによる負荷を F_z とすると、振り子の水平方向の弾性率 α_y は、以下の式で表される。

$$\alpha_y = \frac{F_z}{l} \quad (3.9)$$

弾性エネルギーとブラウン運動に現れる熱運動のエネルギーが釣り合う。1 方向のゆらぎに着目すると、エネルギー等分配の法則により、次式が成り立つ。

$$\frac{1}{2} \alpha_y \langle y^2 \rangle = \frac{1}{2} k_B T \quad (3.10)$$

k_B はボルツマン定数、 T は絶対温度、 $\langle y^2 \rangle$ は力に垂直な方向に沿ったゆらぎの分散を表す。従って、磁性ビーズが受ける力は以下の式で計算できる。

$$F_z = \frac{k_B T l}{\sigma_y^2} \quad (3.11)$$

DNA を介して基板に係留した磁性ビーズを磁気ピンセットで鉛直上向き方向に引っ張りながら、ビーズのブラウン運動による動きを測定し、その位置の分散を計算することで σ_y^2 を求めた。 l は、ビーズの z 軸方向の変位を測定することで計算した。

この測定を、磁石の位置を変えながら繰り返した。求められた負荷の値と磁石の位置との関係をグラフにプロットし、2 項の指数関数によりフィッティングした。

3.1.11 磁気ピンセットによる翻訳アレスト解除の 1 分子力学測定

Anti-digoxigenin 磁性ビーズの作製

磁性ビーズ溶液 (Dynabeads MyOne Carboxylic Acid) 100 μL に Bead buffer [pH 6.5] 100 μL を加えてよく懸濁し、磁石を用いてビーズを沈殿させた。上清を吸い取り、Bead buffer [pH 6.5] を 200 μL 加えて懸濁し、

再び磁石でビーズを沈殿させた。この洗浄操作を計3回行い、最終的に 200 μ L の Bead buffer [pH 6.5] にビーズを懸濁した。100 mg/mL EDC を 200 μ L 加えて 2 min ボルテックスし、室温で 1 hr インキュベートした。磁石でビーズを沈殿させて上清を捨てた後、Bead buffer [pH 8.0] 200 μ L を加えてよく懸濁し、磁石でビーズを沈殿させた。この操作を計3回行い、最終的に 50 μ L の Bead buffer [pH 8.0] にビーズを懸濁した。1 mg/mL Polyclonal Antibody to Digoxigenin を 50 μ L 加えて 10 min ボルテックスし、室温で 1 hr インキュベートした。10 μ L の 1 M Tris-HCl [pH 7.5] を加えてさらに室温で 10 min インキュベートし、反応を停止させた。磁石でビーズを沈殿させて上清を捨て、500 μ L の NEM buffer に懸濁し、5 min 静置した後、磁石でビーズを沈殿させた。この操作を計3回行った。最後に、Polymix buffer で同様の洗浄操作を3回行い、終濃度 1 mg/mL になるように BSA を添加した Polymix buffer 200 μ L でペレットを溶かし、4°C で保存した。

ビーズの修飾について確かめるために、5' 末端側に Digoxigenin, 3' 末端側に Cy5 が付与されたオリゴ DNA (表 3.9) を結合させて、蛍光顕微鏡を用いてビーズ表面の蛍光を観察した。

カバーガラス (18×18 mm) とスライドガラスを両面テープで貼り合わせ、容積 15 μ L 程度のフローセルを作製した。Polymix buffer に懸濁した 1 μ m の Anti-digoxigenin ビーズ溶液をフローセルに流し込み、2 min 静置して、基板に吸着させた。Polymix buffer を 35 μ L 流し入れて、未結合のビーズを洗い流した。次に、Digoxigenin-Cy5 オリゴ DNA 溶液を、最終濃度 500 μ M になるように希釈した。これを 20 μ L フローセルに流し入れ、2 min 静置し、ビーズに結合させた。Polymix buffer を 35 μ L 流し入れて、未結合のオリゴ DNA を洗い流した。マニキュアで封をして、蛍光顕微鏡で観察を行った (光源: 635 nm レーザー, 露光時間: 30 ms, EM gain: 10)。

Biotin 化 BSA の調製

翻訳アレスト複合体の基板固定のための Biotin 化 BSA を、以下の方法で調製した。まず Acetylated BSA に、HKM buffer (25 mM HEPES-KOH pH 7.4, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂) を加え、最終濃度が 6.25 mg/mL となるように溶解した。そこに、ジメチルスルホキシドに溶解した Maleimide PEG2-Biotin を添加し (BSA:Biotin = 1:20), 90 min 室温で反応させた。Biotin 化された BSA は、HKM buffer で平衡化した PD-10 column を用いて精製し、最終濃度が 3 mg/mL になるように HKM buffer で希釈した。Biotin 化 BSA の溶液は分注後、液体窒素で急速凍結し、-30°C にて保存した。

翻訳アレスト複合体のガラス基板への結合

dsDNA ハンドルと mRNA を 1:20 程度の濃度比になるように混ぜて、光ピンセットの実験と同様の手法で mRNA-DNA のハイブリダイゼーションを行った。無細胞タンパク質合成系 (PURE *frex*) を用いて、これを翻訳した。以下に溶液の組成を示す。

mRNA-DNA	4 μ L
Solution I	5 μ L
Solution II	0.5 μ L
1.3 μ M BL21 (DE3) Ribosome	0.25 μ L
4 μ M HaloTag PEG-Biotin ligand	0.3 μ L
<hr/>	
Total	10.1 μ L

30°C, 10 min インキュベートし、翻訳アレスト複合体を調製した。この反応溶液の中に、1 μ m Anti-digoxigenin 磁性ビーズを 1 μ L 添加した。翻訳アレスト複合体を、Biotin 化 BSA, Streptavidin, HaloTag PEG-Biotin ligand を介してガラス基板上に固定し、1 μ m Anti-digoxigenin 磁性ビーズを結合させた。以下にその手順を示す。

DDS 処理を行ったカバーガラス (18 × 18 mm) とスライドガラスを両面テープで張り合わせ、容積 5 μ L 程度のフローセルを作製した。3 mg/mL Biotin 化 BSA を 10 μ L フローセルに流し入れ、2 min 静置し、ガラス

表面に吸着させた。次に、Polymix buffer を 15 μL 流し入れ、未結合の Biotin 化 BSA を洗い流した。続いて、Polymix buffer の中に Tween 20 を最終濃度 0.2% (v/v) となるように添加し、これをフローセルに 15 μL 流し入れ、10 min 静置して、ガラス基板をブロッキングした。その後、0.33 mg/mL Streptavidin を 10 μL 流し入れ、2 min 静置し、Biotin 化 BSA と結合させた。Polymix buffer 15 μL を流し入れることで未結合の Streptavidin を除去した。最後に、調製した翻訳アレスト複合体を含む反応溶液を 10 μL 流し入れ、カバーガラスの周囲にマニキュアを塗って封をした。

カバーガラスが下になるように、フローセルをひっくり返し、6 min 静置して、溶液中の磁性ビーズをすべて下に落とし、翻訳アレスト複合体を介してガラス基板に連結した。もう一度フローセルをひっくり返して、3 min 静置し、未結合の磁性ビーズを落とした。観察時は、再びカバーガラスが下になるようにフローセルを顕微鏡に設置した。

磁気ピンセットを用いた翻訳アレスト複合体への負荷の印加

顕微鏡の対物レンズ、照明、ステージ、カメラは光ピンセットと同様のものを用いた。画面を動かして、磁性ビーズの結合数が多く、1 分子で連結されている割合が多い（ビーズの回折リングの半径から高さを計算し、当たりをつけた）場所を探した。目的の負荷になるように、ステッピングモーターを動かして磁石の高さを変え、60 min 撮影を行った（倍率：120 倍，露光時間：30 ms，フレーム間隔：0.5 sec）。

取得した画像データを MATLAB により解析し、ビーズの z 軸方向の変位を計算することで、リボソームの動きを測定した。

3.2 結果および考察

3.2.1 実験の戦略

SecM の翻訳アレストが負荷によって解除されることを示すために、新生ポリペプチド鎖に人工的に負荷を加えて、再開した翻訳を直接観察できる実験系の構築を目指した。この実験系は、(1) 新生ポリペプチド鎖を物理的に引っ張る (2) リボソームの翻訳を可視化する、の 2 点を同時に行う必要がある。

新生ポリペプチド鎖を引っ張るためには、Bustamante らのグループ^{3,22} や Hegner らのグループ³⁸ のように、新生ポリペプチド鎖とリボソームの 50S サブユニットを両側から固定して、光ピンセットにより引っ張る方法がある (図 3.2 A)。Bustamante らのグループは、反応溶液中に Puromycin を添加して、翻訳アレスト複合体を引っ張り、アレスト解除後の Puromycin の取り込みによる新生ポリペプチド鎖の放出を観察することで、1 コドンの転位を観察した²²。Hegner らのグループは、ヒスチジンを抜いた *in vitro* 翻訳系を用いて、His tag のところで翻訳を止めることで、新生ポリペプチド鎖-リボソーム-mRNA 複合体を調製した。新生鎖とリボソームを両側から引っ張りながら、観察時にヒスチジンを添加した *in vitro* 翻訳系の反応溶液を流し入れ、翻訳を再開させることで、新生鎖の伸びから翻訳を可視化した³⁸。しかし、アミノ酸 1 残基の長さは 0.12 nm と短く³⁹、また、新生鎖のフォールディングによるバックステップも起こるため、光ピンセットを用いても、その翻訳をコードンレベルで見えることは難しい。よって、上記の手法では、新生鎖を引っ張ることはできても、翻訳の正確な観察は難しいと思われる。

アミノ酸 1 残基に比べて、mRNA の 1 コドンは 4 倍以上の長さを持つ³⁹。そのため、翻訳の観察には、mRNA 上のリボソームの動きを検出の方が望ましい。これまでに、mRNA を引っ張ることで、翻訳の 1 分子観察を行った研究はいくつかある^{2,40,41}。mRNA 上を翻訳するリボソームの動きの検出が難しい理由として、mRNA が 2 次構造をとって、直線状に伸びていないことが挙げられる。これが翻訳を可視化するときの障害となるため、先行研究では配列に工夫を施すことでこの問題を回避している。一つは、人工的に設計した 2 次構造（ステムループ）を強制的に取らせることで、2 次構造がほどかれて mRNA の伸びる様子を観察する手法である^{2,40,42} (図 3.2 B)。もう一つは、翻訳領域の塩基の種類を制限することで、mRNA が 2 次構造をとらないようにする方

法である⁴¹ (図 3.2 C). これらはいずれも翻訳させる配列を人工的に設計する必要があり、任意の遺伝子配列を翻訳させることはできない。

本研究の狙いは、人工的な負荷により翻訳アレストを解除し、再開した翻訳を直接観察することである。アレスト配列の下流遺伝子の翻訳が律速にならないよう、任意の遺伝子配列の翻訳を可視化できる実験系が求められる。

そこで、本研究では、mRNA のアレスト配列より下流の翻訳領域を DNA と完全にハイブリダイゼーションさせた。これにより、mRNA の2次構造に起因する問題を克服した。さらに、新生ポリペプチド鎖と mRNA を両側から引っ張ることで、負荷を加えながら翻訳の観察ができる実験系を考案した。これは、先行研究のいずれとも異なる新しい手法である。

リボソームの進行方向と逆向きに引っ張ることは、リボソームの翻訳を阻害することになる。リボソームの進行方向と逆向きの力が大きくなればなるほど、リボソームの翻訳効率が低下することが先行研究から示されている⁴¹。さらに、mRNA と新生ポリペプチド鎖を引っ張ることで、リボソームが mRNA から解離しやすくなることが予想される⁴³。そのため、この実験系では印加できる負荷に上限がある。また、DNA とダブルヘリックスを構成する mRNA をリボソームが効率よく翻訳できる保証はない。リボソームはそれ自身ヘリカーゼ活性を有している^{2,44} が、生体内において完全なダブルヘリックスを翻訳することはないと考えられる。

そのため、翻訳アレストの解除を行う前に、この実験系でリボソームの翻訳を観察できることを確かめる必要がある。これには空間分解能の高い光ピンセットを用いて確認を行った。

リボソームの翻訳の検出が確認できた後、より多くのサンプルを同時に測定するために磁気ピンセットを用いた実験系を構築した。負荷を変えながら翻訳アレストの解除を行うことで、翻訳アレスト解除の負荷依存性を確かめた。

3.2.2 無負荷時のアレスト寿命とその温度依存性

アレスト寿命は温度にも依存する。負荷を加えて翻訳アレストの解除を確かめる実験は、自発的な翻訳アレストの解除が起こらない条件で行うことが望ましい。そのため、温度を下げたときのアレスト寿命の変化について検討した。

第2章では、無細胞タンパク質合成系として PURExpress を用いていたが、1 分子力学測定の実験では、PURE *frex* を用いた。これは RNase をはじめとする夾雑タンパク質の混入が低減されているため、翻訳アレスト複合体がより安定に存在できると考えられるためである。しかし、先行研究により、PURE *frex* 中に含まれるリボソームは、30S と 50S をブリッジするリボソームタンパク質である bL31 が欠失している可能性が高く、サブユニットの解離が起こりやすいことが報告されている⁴⁵。1 分子力学測定の実験では、mRNA と新生ポリペプチド鎖をそれぞれ逆向きに引っ張るため、リボソームのサブユニットを解離させるように力が働く。そのため、なるべくサブユニットの会合が安定なリボソームを用いる必要がある。そこで、リボソームに関しては、大腸菌 BL21 株由来のものを精製して用いることにした。BL21 株はプロテアーゼ OmpT が欠損しているため、精製時に bL31 が切断されにくく、サブユニットの解離が起こりにくいと期待できる。

精製した BL21 株由来のリボソームを用いて、PURE *frex* 中で SecM 翻訳アレスト複合体を合成し、そのアレスト寿命を調べ、無負荷時のアレスト寿命の目安とした。後の 1 分子実験で用いるために、第2章で最も翻訳アレストが安定であった全長の SecM のコンストラクト (Halo-SecM₁₋₁₇₀) および次に翻訳アレストが安定であった Halo-L26-SecM₁₃₃₋₁₇₀ の2つのコンストラクトについて測定を行った。

30°C で翻訳アレスト複合体を合成し、濃度が 2 mM 程度になるように puromycin を添加後、30°C または 37°C でインキュベートしながら、一定時間おきにサンプルを分取した。翻訳アレスト解除後の puromycin の取り込みによる新生ポリペプチド鎖の放出を調べることで、それぞれのアレスト寿命を算出した (図 3.3 A)。

BL21 株由来のリボソームと PURE *frex* により合成された SecM 翻訳アレスト複合体は、第2章で用いた無細胞タンパク質合成系 (PURExpress) に比べて、より安定な翻訳アレストを示した (図 3.3 B)。また、温度が低くなるほど、アレスト寿命が長くなることが確かめられた。なお、本実験で用いた 2 mM puromycin の反応の時

定数は秒のオーダーであり²²、温度が 30°C に低下しても反応速度はそれほど変化しないため⁴⁶、翻訳アレスト解除において puromycin の反応が律速になることはない。

全長の SecM のコンストラクトは、30°C の条件下で翻訳アレストが大きく安定化し、そのアレスト寿命は 342 min と非常に長いものであった。この条件では、負荷を加えなければ翻訳アレストはほとんど解除されないと考えることができる。そのため、負荷による翻訳アレスト解除の実験では、全長の SecM のコンストラクトを用いて 30°C の条件で行うことが望ましい。

3.2.3 光ピンセットによる実験系の概略

新生ポリペプチド鎖と mRNA を両側から引っ張ることで翻訳を観察する実験系は本研究が初めてである。そのため、この実験系でリボソームが mRNA を翻訳できることをまず確かめる必要がある。アレスト寿命の短い Halo-L26-SecM₁₃₃₋₁₇₀ の下流に LacZ を連結したコンストラクト (Halo-L26-SecM₁₃₃₋₁₇₀-LacZ) を用いて、30°C で 1 pN 程度の弱い負荷をかけながら、翻訳アレスト解除後のリボソームの動きの検出を試みた。30°C における Halo-L26-SecM₁₃₃₋₁₇₀ のアレスト寿命は 29 min なので、仮に負荷によって翻訳アレストが解除できなくても、30 min の観察中に翻訳アレスト解除が自発的に起きることが期待できるため、まず翻訳の検出の可否を確かめることができる。

実験系は光ピンセットを用いて構築した。光ピンセットは、高開口数の対物レンズにより、レーザー光を回折限界まで集光し、微小物体を捕捉する技術である⁴⁷。pN オーダーの微小な負荷を厳密に制御でき、非接触的に生体分子を捕捉できるため、生物物理学の分野に広く応用されている。今回は、2本の赤外レーザーを用いた Dual trap の光ピンセットの実験系を構築した。Dual Trap は溶液中にサンプルを浮かせて測定を行うことができるため、基板のドリフトによるノイズを軽減して、空間分解能を上げることができる。光ピンセットの光学系のセットアップを図 3.4 に示す。

まず、mRNA のアレスト配列より下流の配列と完全相補的な DNA ハンドルを合成し、mRNA とハイブリダイゼーションさせた。これにより、翻訳アレスト解除後にリボソームが翻訳する領域は、mRNA-DNA の完全なダブルヘリックスとなる。DNA ハンドルの 5' 側に Digoxigenin を付与することで、この mRNA-DNA を 1 μ m Anti-digoxigenin ビーズと結合させた。ビーズ表面で翻訳を行い、翻訳アレスト複合体を調製した、750 nm Streptavidin ビーズと一緒にガラス基板上に流し入れ、光ピンセットで2つのビーズを捕捉して、1 μ m Anti-digoxigenin ビーズ表面の翻訳アレスト複合体を 750 nm Streptavidin ビーズに結合させた。このようにして、翻訳アレスト複合体を2つのビーズ間に固定し、光ピンセットにより、新生ポリペプチド鎖と mRNA を引っ張りながら、リボソームの翻訳を観察した (図 3.5)。

リボソームが mRNA 上に停滞したまま翻訳しないなら、2つのビーズ間距離は一定のまま保たれる。しかし、リボソームが翻訳を再開し、mRNA 上を進むことができるなら、2つのビーズは互いに近づくように動くはずである。

3.2.4 光ピンセットによるリボソームの翻訳の観察

ビーズへの翻訳アレスト複合体の固定

まず、実験に用いるビーズを作製した。Carboxylate modified ビーズを用いて、アミノカップリング法により Anti-digoxigenin および Streptavidin をビーズの表面に修飾した。修飾の確認を行うために、Digoxigenin と Cy5、および Biotin と Cy3 でそれぞれ標識されたオリゴ DNA をビーズに結合させ、顕微鏡で蛍光を観察した (図 3.6)。いずれのビーズも表面が均一に蛍光を発していたため、Anti-digoxigenin および Streptavidin によるビーズ表面の修飾が確認できた。

次に、作製した 1 μ m Anti-digoxigenin ビーズの表面に mRNA を結合させた (図 3.7)。まず、mRNA のアレスト配列の下流と完全相補的な配列を持つ二本鎖 DNA を PCR により合成し、これを 95°C でインキュベ-

トして変性させた。過剰量の mRNA を添加して、毎秒 0.1°C ずつ 25°C になるまでゆっくり温度を下げながら、mRNA と DNA のハイブリダイゼーションを行った。アガロースゲル電気泳動で確認したところ、もとの 2 本鎖 DNA のバンドが大きく減少し、mRNA-DNA 由来のバンドが新たに検出された (図 3.7 B; レーン 3)。続いて、DNA の 5' 末端に標識された Digoxigenin を介して、この mRNA-DNA を 1 μ m Anti-digoxigenin ビーズの表面に固定した。Anti-digoxigenin ビーズ添加後の溶液を遠心してビーズを沈殿させ、上清をアガロースゲル電気泳動で調べたところ、mRNA-DNA のバンドが完全に消失した (図 3.7 B; レーン 4)。このことから、溶液中の mRNA-DNA はほぼ全てビーズ表面に結合したことが分かった。DNA とハイブリダイゼーションしなかった mRNA を含む上清を捨て、沈殿させたビーズを用いて、*in vitro* 翻訳を行った。これにより、ビーズ表面でのみ翻訳が起り、多数の翻訳アレスト複合体がビーズ表面に提示される。

このサンプルをガラス基板上に流し入れ、光ピンセットによる 1 分子力学測定を行った。

ガラス基板上における翻訳活性

光ピンセットを用いた測定を行う前に、まずガラス基板上で *in vitro* 翻訳が進むことを確認し、その翻訳活性が持続する時間について調べた。Maturation が速い、GFP の変異体である GFPmut3 の DNA³⁶ を用いて、ガラス基板上で *in vitro* 翻訳を行った。顕微鏡上での観察は、すべて 30°C に加熱した条件で行った。GFPmut3 の PCR 産物を無細胞タンパク質合成系に添加し、基板上に流し入れて GFPmut3 の蛍光観察を行った。時間とともに、観察視野内の蛍光強度が上昇することが確認された (図 3.8 A)。蛍光強度を定量して、時間に対してプロットすると、2 時間までは線形で上昇し続けることが分かった (図 3.8 B)。この結果から、ガラス基板上において少なくとも 2 時間までは、翻訳活性は低下しないことが確かめられた。

顕微鏡上での翻訳の 1 分子観察

翻訳アレスト複合体が多数結合した 1 μ L Anti-digoxigenin ビーズと、750 nm Streptavidin ビーズをともにフローセル中に流し入れて、顕微鏡上で光ピンセットを用いて 2 つのビーズを連結した。2 つのビーズをそれぞれのレーザーで捕捉し、750 nm Streptavidin ビーズは固定したまま、1 μ m Anti-digoxigenin ビーズを動かして、翻訳アレスト複合体の新生ポリペプチド鎖を HaloTag PEG-biotin ligand を介して、750 nm Streptavidin ビーズの表面に固定した。2 つのビーズ間に翻訳アレスト複合体が連結されると、ビーズ間距離はアレスト配列の下流の mRNA-DNA の長さとなり、2 つのレーザー間距離よりも短くなる (図 3.9 (c))。この状態で、翻訳アレスト複合体には両側から負荷が印加される。1 pN 程度の負荷を加えているとき、アレスト配列下流の LacZ の mRNA-DNA の長さは 800 nm 程度となった (これに 2 つのビーズの半径を加えた値がビーズの中心間距離となる)。

ビーズを連結後、負荷を一定に保ったまま、10 ~ 20 min 程度観察を続けたところ、いくつかのサンプルで、2 つのビーズが互いに近づく様子が観察された (図 3.10 A)。このときのリボソームの翻訳速度は 1 codon/sec 程度であり、これはリボソームを引っ張りながら翻訳を観察した先行研究の値⁴¹と同程度だった。リボソームが mRNA 上を進むにつれて、レーザーの捕捉中心とビーズとの距離が離れていき、光ピンセットがビーズに及ぼす負荷はそれに比例して大きくなっていった (図 3.10 B)。最終的に 3 pN 弱の負荷が印加されても、リボソームの翻訳速度が低下する様子は見られなかった。

これらの結果から、以下の 2 点が確かめられた。

1. リボソームの進行方向と逆向きに新生ポリペプチド鎖を 3 pN 程度の力で引っ張ってもリボソームは翻訳が可能である
2. リボソームはヘリカーゼ活性により、mRNA-DNA のダブルヘリックスをほどこしながら mRNA を翻訳することができる

この実験系で翻訳の検出が可能であることが確かめられたので、次に自発的な翻訳アレスト解除が起りにくい SecM の全長配列を用いて、人工的な負荷による翻訳アレストの解除を試みることにした。

3.2.5 磁気ピンセットを用いた 1 分子力学測定系の構築

SecM の全長配列は安定に翻訳をアレストする。特に、30°C の条件では自発的な翻訳アレスト解除は非常に起こりにくい。この安定な翻訳アレストが、物理的な負荷によって解除されるかどうかを調べることを目的とした。光ピンセットは 1 度に 1 つのアレスト複合体しか測定できず、データ取得効率が低い。そのため、磁気ピンセットを用いたハイスループットの負荷印加および翻訳観察システムを構築した。

磁気ピンセットは、磁石を用いて磁性ビーズに制御された負荷を加え、ビーズに連結した生体分子を操作する手法である⁴⁸⁻⁵⁰。磁性ビーズの周りに強い磁場の勾配を作り出すことで、ビーズに力を加えることができる。磁場の向きを変えることで、ビーズの回転を制御する事もできるため、生物物理学の研究に広く応用されている。

本研究では、5 × 5 × 5 mm の 1 対のネオジム磁石を用いて磁気ピンセットを構築した。2 つの磁石を 1 mm 離して逆向きに並べ、対物レンズの真上にセットし、ステップモーターを用いて対物レンズとの間の距離を制御した (図 3.11)。磁気ピンセットの実験では、翻訳アレスト複合体の新生ポリペプチド鎖を基板に固定し、磁気ピンセットによって mRNA を真上に引っ張ることで負荷を印加し、翻訳アレストの解除を行った (図 3.12)。そのため、翻訳の検出には磁性ビーズの z 軸方向の動きを調べる必要がある。そこで、まず、磁気ピンセットによるビーズの z 軸方向の動きの高精度検出に取り組んだ。次に、構築した磁気ピンセットの負荷を求め、翻訳アレスト複合体に制御された負荷を加えて、翻訳アレストの解除および下流遺伝子の翻訳観察を行った。

ビーズの z 軸方向の変位の解析

磁性ビーズの z 軸方向の動きを検出するためには、ビーズの形の変化を z 軸方向の座標情報に変換する必要がある。本研究では、細胞内で量子ドットの 3 次元トラッキングを行った研究³⁷を参考に、ビーズの回折リングの形を 2 次元のガウス関数の重ね合わせによってフィッティングし、得られた値を指標に z 軸方向の位置決定を行った (図 3.13 A,B)。

フィッティングにより得られた回折リングの 1 つ目の明環の半径 R_1 と、z 軸方向の変位 Δz は、1000 nm の範囲内において、線形の関係となることが確かめられた (図 3.13 C)。そのため、ビーズの回折リングのフィッティングにより、z 軸方向の変位を求められることが分かった。

磁気ピンセットによる負荷の制御

ガラス基板上に 3 kbp の DNA を介して係留された磁性ビーズに磁気ピンセットで負荷を加えると、ビーズは上向きの力を受けて、振り子のような運動をする。このビーズのゆらぎの大きさを解析することで、磁気ピンセットによる負荷を計算することができる^{51,52} (図 3.14 A)。段階的に負荷を変えながら、磁性ビーズの位置を 3 次元でトラッキングした (図 3.14 B)。負荷が大きくなるに従って、ビーズのゆらぎは小さくなり、DNA 鎖が伸びて、ビーズの高さが上がっていく様子が観察された。磁石とサンプル面との高さを変化させながら、磁気ピンセットの負荷を求め、その関係をグラフにプロットした (図 3.14 C)。2 項の指数関数でフィッティングを行い、磁気ピンセットの負荷を計算した。この磁気ピンセットは、磁性ビーズに対して、0.1 ~ 4.0 pN 程度の負荷を加えられることが確かめられた。この負荷の範囲内で翻訳アレストの解除を試みた。

3.2.6 磁気ピンセットによる SecM 翻訳アレストの解除

ガラス基板への翻訳アレスト複合体および磁性ビーズの固定

翻訳アレストが安定な Halo-SecM₁₋₁₇₀ の下流に LacZ を連結したコンストラクト (Halo-SecM₁₋₁₇₀-LacZ) を作製した。このコンストラクトの mRNA を合成し、アレスト配列の下流と完全相補的な DNA ハンドルとハイブリダイゼーションさせた。このとき、DNA ハンドルに対して mRNA を過剰量加えた (dsDNA:mRNA = 1:20)。無細胞タンパク質合成系および BL21 株由来のリボソームを添加し、30°C で 10 min インキュベートすることで翻訳アレスト複合体を調製した。この中に 1 μ m Anti-digoxigenin 磁性ビーズを添加し、DNA ハンドル

を介してビーズ表面に翻訳アレスト複合体を固定した。DNA ハンドルに対して mRNA が過剰量入っているため、大部分の翻訳アレスト複合体には DNA ハンドルが結合していない。そのため、ビーズ表面には翻訳アレスト複合体がまばらに固定された状態になる。これをガラス基板に流し入れ、HaloTag PEG-biotin ligand を介して、翻訳アレスト複合体-磁性ビーズを基板上の Streptavidin に結合させた (図 3.15)。ビーズ表面に固定されたアレスト複合体の量が少なければ少ないほど、ビーズとガラス基板が 1 つの翻訳アレスト複合体だけで連結される確率が高くなる。これにより、1 分子の測定を行うことが可能となる。

人工的な負荷による翻訳アレストの解除

まず、基板に固定した翻訳アレスト複合体に、異なる負荷 F を加えて、mRNA-DNA の伸び l を調べた (図 3.16)。これを Worm-like chain モデルによりフィッティングした。

$$\frac{FP}{k_B T} = \frac{1}{4} \left(1 - \frac{l}{L_0} \right)^{-2} - \frac{1}{4} + \frac{l}{L_0} \quad (3.12)$$

P は Persistence length, L_0 は Contour length, k_B はボルツマン定数, T は絶対温度をそれぞれ表す。この結果を用いることで、リボソームの動いた距離から、実際に翻訳されたコドン数を見積もることが可能となる。

次に、基板に固定した Halo-SecM₁₋₁₇₀-LacZ の翻訳アレスト複合体に対して一定の大きさの負荷を印加し、翻訳アレストの解除を試みた。ガラス基板上は 30°C に設定されているため、SecM 全長配列によるアレスト寿命は、3.2.2 項の結果から約 342 min と見積もられる。測定は 30 min 行っているが、負荷がなければ観察中に翻訳アレストの解除は起こらない条件となる。

実際に負荷を印加したところ、磁性ビーズが 3 次元に動く様子が観察された (図 3.17 A)。z 軸方向の変位がリボソームの進んだ距離に対応する。Halo-SecM₁₋₁₇₀-LacZ のコンストラクトは、翻訳アレスト解除後に、700 nm 以上の長い距離をリボソームが翻訳する様子が観察された (図 3.17 A)。アレスト配列の下流にある全長の LacZ を最後まで翻訳すると、800 nm 以上の動きが観測されるはずだが、実際には終止コドンに達する前で止まってしまった。これは、リボソームが翻訳を進めていくと、磁性ビーズが基板に近接していき、基板に固定された他の翻訳アレスト複合体が障害となって、翻訳が停止してしまうと考えられる。

続いて、コントロール実験として、翻訳アレスト複合体を基板に固定した後、フローセル内の溶液を置換して、翻訳因子を除いたものについて測定を行った (図 3.17 B)。こちらのサンプルでは、予想通り、負荷を加えてもリボソームの動きは観測されなかった。また、溶液中に抗生物質 Puromycin を添加した実験も行った。こちらは、一定時間経過後に、ビーズが基板から離れる様子が観察された (図 3.17 C)。これは、翻訳アレスト解除後に速やかに Puromycin が取り込まれ、新生ポリペプチド鎖が放出されたためと考えられる。

次に、アレスト配列の下流を変えたコンストラクトを 2 種類作製した。Halo-SecM₁₋₁₇₀-LacZ_{250Stop} は、LacZ の 250 番目のコドンを終止コドンに置換したコンストラクトである。翻訳アレストが解除されると、LacZ の 249 残基目まで翻訳した後、翻訳終結が起こり、磁性ビーズが基板から離れると予想される。実際に測定してみると、200 nm 程度翻訳し、ビーズが基板から離れる様子が観察された (図 3.18 A)。これは想定される翻訳領域の長さとはよく一致している。リボソームが翻訳再開後、終止コドンまで翻訳し、翻訳終結反応により新生ポリペプチド鎖が放出されたことが分かる。

もう一つのコンストラクトとして、Halo-SecM₁₋₁₇₀-SecM₁₋₁₇₀-LacZ_{250Stop} を作製した。これは、LacZ (250 番目のコドンを終止コドンに置換) の上流に SecM が 2 つ連なったコンストラクトである。1 つ目の SecM のアレスト配列でリボソームが停止した翻訳アレスト複合体に対して負荷を加えると、2 つ目の SecM が翻訳され、もう一度翻訳停止が起こる。これも負荷によって解除されると、続いて LacZ が翻訳され、250 番目に導入した終止コドンに達して、翻訳終結が起こることが予想される。ビーズの動きを解析すると、想定された動きになっていることが確認できる (図 3.18 B)。

測定された翻訳速度は 1 ~ 2 codon/sec であり、光ピンセットの実験と同程度の値となった。また、負荷が 1 *sim* 3 pN の範囲内では、翻訳速度に大きな違いは見られなかった。

以上の結果から、測定中に翻訳アレストが解除され、下流遺伝子の翻訳を観察することに成功した。また、この実験系を用いて、終止コドンでの翻訳終結反応や抗生物質 Puromycin の反応、アレスト配列における翻訳の一時停止を観察することができた。

翻訳アレスト解除の負荷依存性

次に、負荷を変えて、全長 SecM の翻訳アレスト解除を試みた。磁気ピンセットを用いて、基板上に固定した Halo-SecM₁₋₁₇₀-LacZ_{250Stop} の翻訳アレスト複合体に 1, 2, 3 pN の 3 種類の負荷を印加し、翻訳アレストが解除されるまでの時間を測定し、負荷印加時のアレスト寿命を求めた。

測定は 30 min 行った。それぞれの負荷について、基板上に固定された全ビーズ (1 つの負荷につき 100 個程度) を解析し、30 min 以内に翻訳が再開したもの (図 3.19 A; 青色)、翻訳が再開せずにビーズが基板から離れたもの (図 3.19 A; オレンジ色)、翻訳が再開しなかったもの (図 3.19 A; 灰色)、それぞれの割合を算出した。

翻訳が再開せずにビーズが基板から離れたものは、リボソームの破断 (30S, 50S サブユニットの解離) が起こっていると考えられる。最大 3 pN 程度の比較的弱い負荷でも、30 min に渡って印加し続けることで、一定の割合でリボソームが破断することが分かる。

3 pN の負荷を加えたときには、半数近くの翻訳アレスト複合体でリボソームの動きが観察された。これは、全長の SecM の 30°C におけるアレスト寿命 (約 342 min) から考えると、劇的な割合の増加と言える。30 min 以内に動きが観察されなかったものの中には、リボソームが基板上で活性を失っているものも含まれている可能性があり、破断して解析できなかったものも含めて、実際にはより多くの翻訳アレスト解除が起こっていると考えられる。この結果から、物理的な負荷が翻訳アレストを解除することが示された。

30 min の測定中に翻訳アレストが解除されたものに着目し、翻訳アレスト解除までの時間を求め、ヒストグラムを作成した。これを 1 次の指数関数でフィッティングすることで、それぞれの負荷におけるアレスト寿命を算出した (図 3.19 B)。1, 2, 3 pN と負荷を大きくするに従って、アレスト寿命は少しずつ減少していった (8.9 min, 7.2 min, 6.7 min)。いずれも無負荷時のアレスト寿命に比べて大幅に短縮していることが分かる (図 3.19 C)。

この結果から、無負荷時には SecM の全長配列は翻訳アレストを安定化するが、一方向に連続的に印加される負荷に対しては敏感に応答し、効率よく翻訳アレストが解除されることが確かめられた。これは、負荷による翻訳発現制御のスイッチ機構を実現するうえで、大変合理的な性質であるといえる。

3.2.7 物理的な負荷による翻訳アレスト解除に関する考察

本研究の結果から、全長の SecM による安定な翻訳アレストは、数 pN の負荷を数分間加えることで十分に解除できることが分かった。数 pN という比較的弱い負荷を加えたときに、翻訳アレストが解除される割合が劇的に増えたこと、アレスト寿命が大きく減少したことから、物理的な負荷が翻訳アレスト解除の必要十分条件であることが証明された。

大腸菌の中では、膜透過装置によって新生ポリペプチド鎖が引っ張られる。その引っ張り方や、負荷のベクトルは *in vitro* の実験系とは異なっているため、単純に力の絶対値を議論することはできないが、数 pN という力は生体分子が十分に出しうる範囲の力^{30,34}であり、翻訳アレスト解除に合理的な値であるといえる。

また、負荷によって SecM 翻訳アレストの解除を試みた Bustamante らの先行研究²²と比べて、本実験では翻訳アレスト解除後の下流遺伝子の翻訳を観察したという点において、負荷による翻訳アレスト解除をより直接的に示したといえる。また、SecM の全長配列による翻訳アレストを弱い負荷で解除できたという点で、本研究はより生理学的な意義があるといえる。

3.3 小括

光ピンセットおよび磁気ピンセットを用いて、新生ポリペプチド鎖と mRNA を両側から引っ張ることで、新生ポリペプチド鎖に負荷を加えながら、リボソームの翻訳を可視化できる実験系を構築した。リボソームは進行方向と逆向きの力に抗って、mRNA-DNA のダブルヘリックスをほどこしながら翻訳できることが分かった。

この実験系を用いて、SecM 全長配列の翻訳アレスト複合体に、数 pN の負荷を数分間加えることで翻訳アレストを効率よく解除することができた。SecM 全長配列の翻訳アレストは、無負荷時には非常に安定で、負荷を加えると速やかに解除されることが示された。これは、負荷を検出して下流遺伝子の発現制御を行うスイッチ機構を実現する上で、大変合理的な性質であるといえる。

3.4 第3章の図

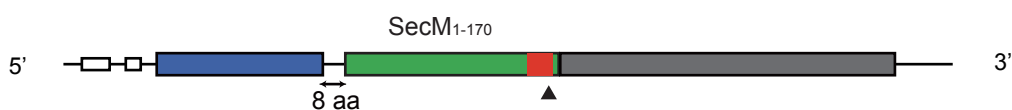
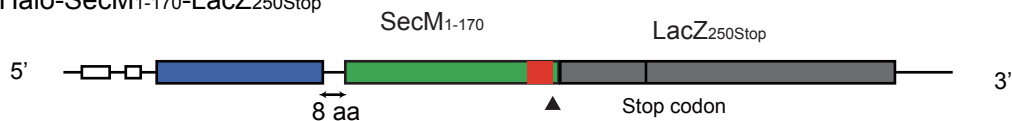
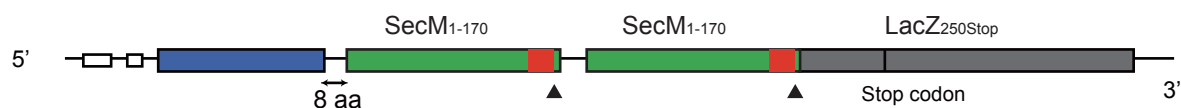
Halo-L26-SecM₁₃₃₋₁₇₀-LacZHalo-SecM₁₋₁₇₀-LacZHalo-SecM₁₋₁₇₀-LacZ_{250Stop}Halo-SecM₁₋₁₇₀-SecM₁₋₁₇₀-LacZ_{250Stop}

図 3.1 1 分子力学測定用のコンストラクト

1 分子力学測定用に作製したコンストラクトの一覧。黒三角はリボソームの停止位置を表す。

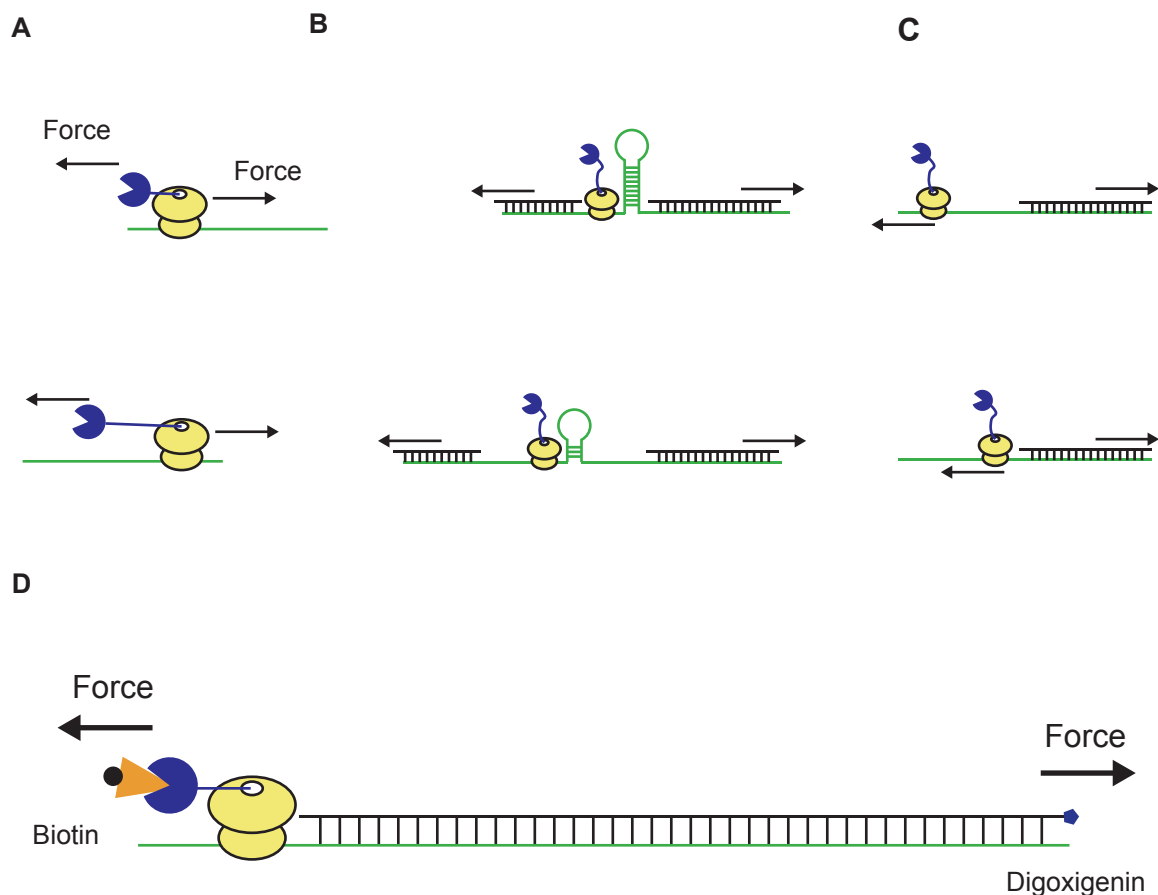
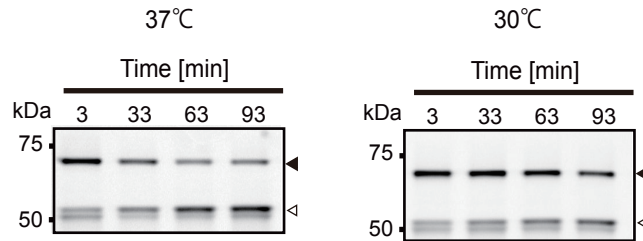
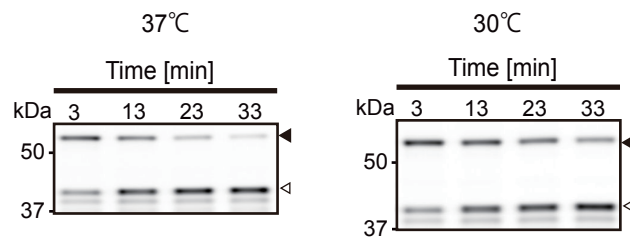


図 3.2 翻訳の 1 分子観察の戦略

リボソームの翻訳を 1 分子で観察する方法として、先行研究の手法と本研究で新たに開発した手法を示す。(A) 新生ポリペプチド鎖とリボソームの 50S サブユニットをそれぞれ引っ張ることで、新生ポリペプチド鎖の伸びから、翻訳の検出を行う。(B) DNA ハンドルを用いて mRNA の両端を引っ張る。人工的に作製したステムループの根本を翻訳させることで、ステムループの破壊による mRNA の伸びを検出し、翻訳を可視化する。(C) リボソームの 30S サブユニットと mRNA に結合した DNA ハンドルを引っ張る。リボソームが mRNA 上を翻訳するのを直接検出する。mRNA が二次構造をとらないように、使用する塩基の種類を制限する。(D) 本研究で開発した手法。新生ポリペプチド鎖と mRNA に結合した DNA ハンドルを引っ張る。リボソームが mRNA と DNA のダブルヘリックスをほどきながら進むのを直接観察する。

A

Halo-SecM₁₋₁₇₀Halo-L26-SecM₁₃₃₋₁₇₀

B

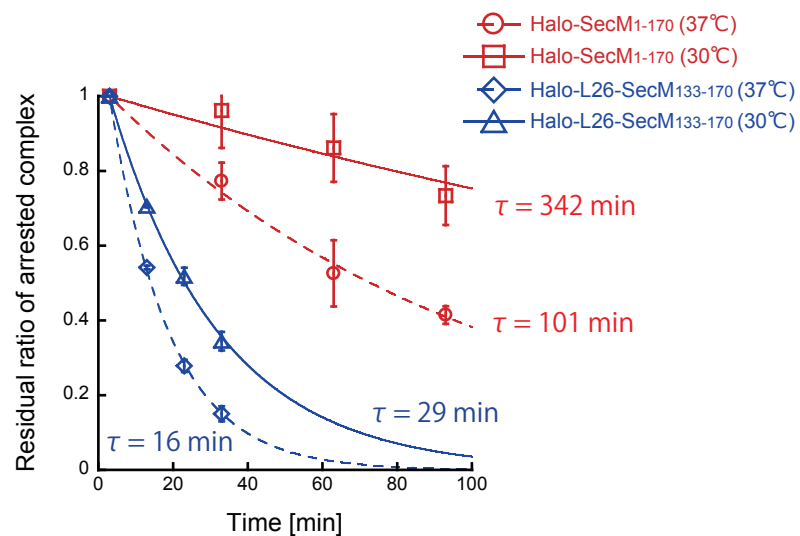


図 3.3 アレスト寿命の温度依存性

(A) HaloTag-SecM₁₋₁₇₀ および HaloTag-L26-SecM₁₃₃₋₁₇₀ のコンストラクトをそれぞれ、30°C, 20 min 合成後, Puromycin を添加し, 30°C または 37°C で 3 min 処理した. その後, 30°C または 37°C でインキュベートしながら, 一定時間おきにサンプルを分取した. それぞれのサンプルを NuPAGE で分離し, HaloTag の蛍光リガンドによる検出を行った. 黒三角は翻訳アレスト複合体由来のバンド, 白三角は翻訳アレストが解除されてリボソームから放出されたポリペプチド鎖由来のバンドを表す. (B) Puromycin 処理後の溶液中の翻訳アレスト複合体の割合を 1 として, そこからの割合の時間変化をグラフにプロットした. それぞれのプロットは 3 回の測定の実測値と SD を表す. 得られたプロットを 1 次の指数関数でフィッティングして, 時定数 (30°C または 37°C における無負荷時のアレスト寿命) を求めた.

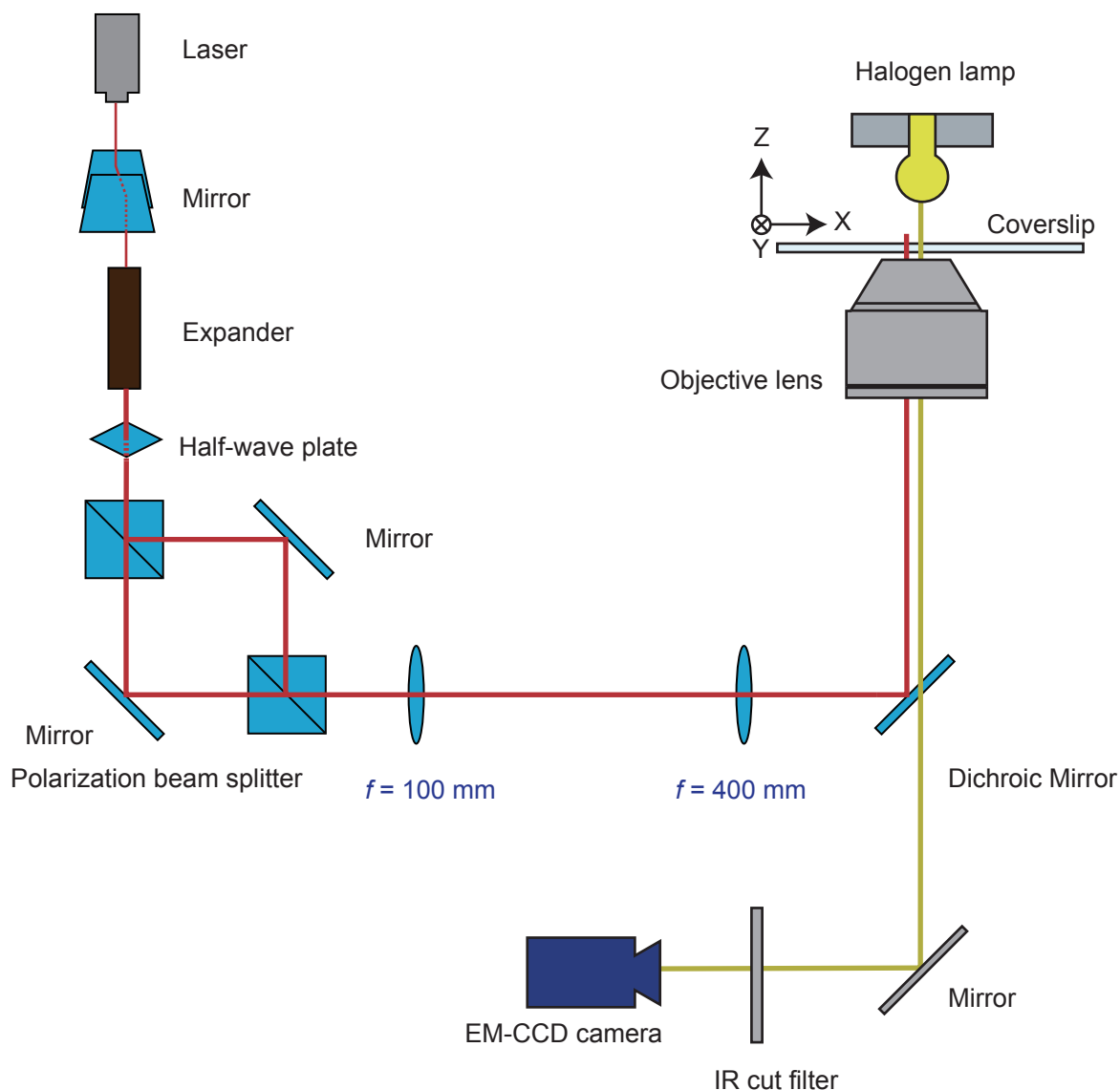


図 3.4 光ピンセットの光学系

顕微鏡は倒立型顕微鏡 (Eclipse Ti-E), 対物レンズは油浸レンズ (Apo TIRF 60 × Oil, N.A. 1.49) を用いた。ビーズの光捕捉用に 1064 nm 赤外レーザー (PDMJ-M530-26), ビーズの明視野観察用にハロゲンランプ照明をそれぞれ用いた。赤外レーザーは、偏光ビームスプリッターによって 2 光路に分けて顕微鏡に導入した。偏光ビームスプリッターの前に $\lambda/2$ 板を設置することで、2 つの光路に配分するレーザーパワーを調節できるようにした。それぞれの光路中に電動ミラーまたはピエゾ制御ミラーを入れることで、対物レンズ上に出るレーザーの位置を制御した。画像の取り込みには冷却 EM-CCD カメラ (iXonEM DU897D) を用いた。

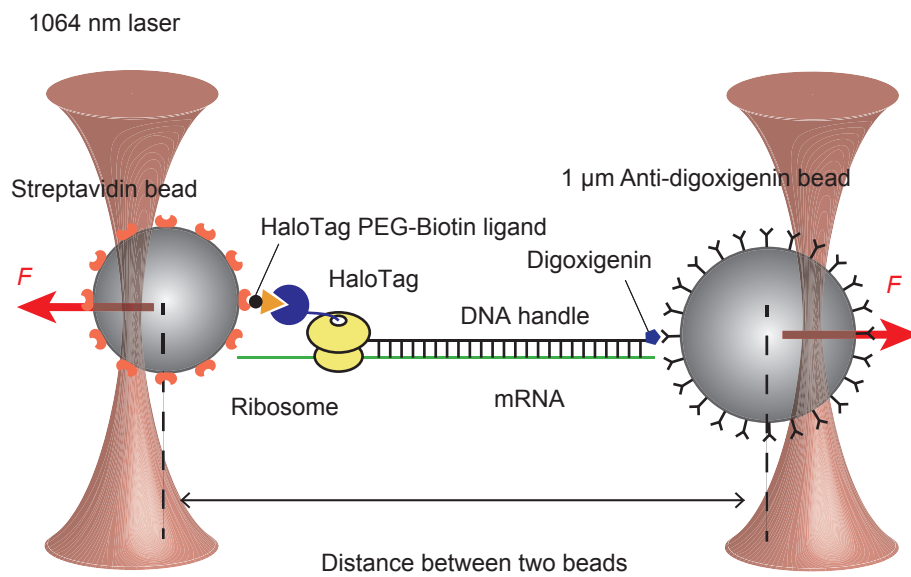


図 3.5 光ピンセットによる翻訳の 1 分子測定

2つの赤外レーザーを用いた Dual trap の光ピンセットを構築した。片方のレーザーで 1 μm Anti-digoxigenin bead を捕捉し、もう片方のレーザーで 750 nm Streptavidin bead を捕捉した。mRNA とハイブリダイゼーションした DNA ハンドルの 5' 末端側に Digoxigenin を付与することで、Anti-digoxigenin bead を結合させた。新生ポリペプチド鎖は、HaloTag biotin ligand を介して、Streptavidin ビーズに固定した。この状態で、2つのビーズを逆向きに引っ張ることで、新生ポリペプチド鎖に負荷を印加した。2つのビーズの中心間距離の変化から、リボソームの動きを測定した。

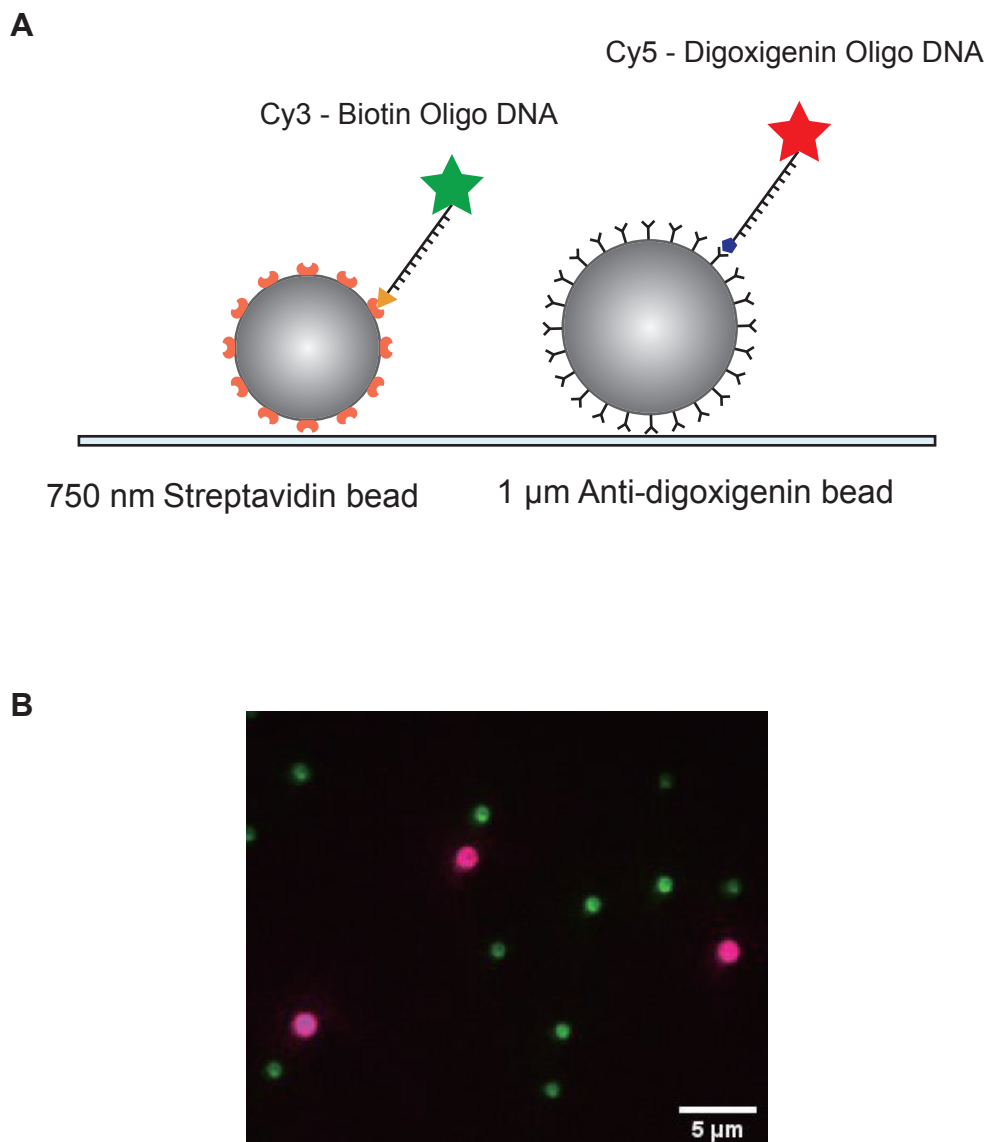


図 3.6 ビーズの表面修飾の確認

(A) 蛍光色素標識されたオリゴ DNA を用いて、ビーズの表面修飾の確認を行った。750 nm Streptavidin ビーズには、Cy3 と Biotin がそれぞれ標識されたオリゴ DNA を結合させ、1 μ m Anti-digoxigenin ビーズには、Cy5 と Digoxigenin がそれぞれ標識されたオリゴ DNA を結合させた。(B) ビーズをガラス基板上に固定し、オリゴ DNA 溶液を添加後、蛍光顕微鏡を用いて、ビーズ表面の蛍光を観察した。1 μ m Anti-digoxigenin ビーズは Cy5 由来の蛍光（赤色）、750 nm Streptavidin ビーズは Cy3 由来の蛍光（緑色）が観察された。

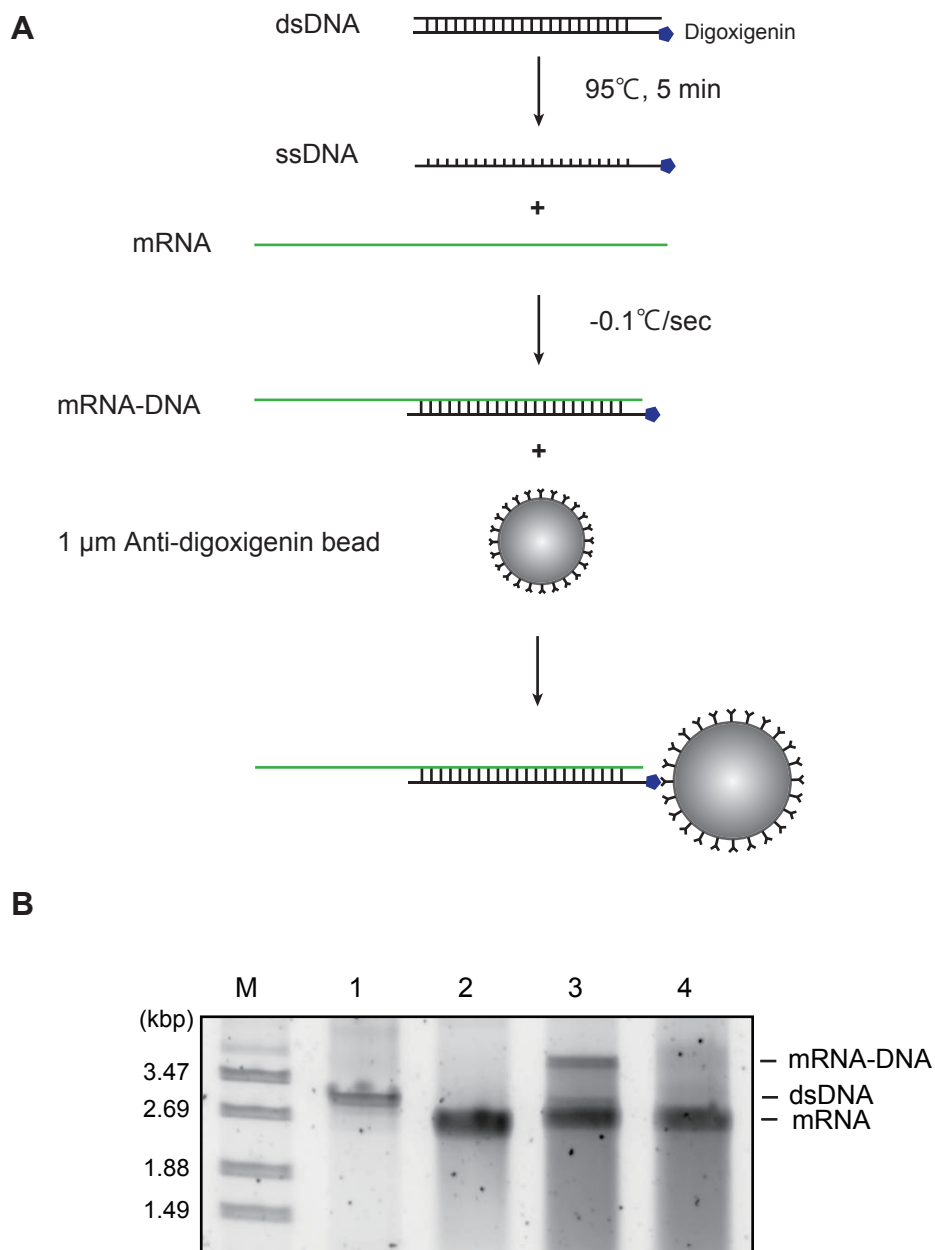


図 3.7 Anti-digoxigenin ビーズへの mRNA の固定

(A) まず, dsDNA を 95°C で 5 min インキュベートして変性させた. 過剰量の mRNA を添加して, 毎秒 0.1°C ずつ 25°C になるまで温度を下げて, mRNA と DNA をハイブリダイゼーションさせた. Anti-digoxigenin ビーズを添加し, DNA の 5' 末端に標識された Digoxigenin を介して, mRNA-DNA をビーズ表面に固定した. (B) 反応溶液中の mRNA-DNA ハイブリダイゼーション産物について, アガロースゲル電気泳動で検出を行った. レーン 1 は dsDNA, レーン 2 は mRNA, レーン 3 は, 95°C で変性した DNA 溶液に mRNA を添加後, 25°C まで温度を下げて DNA とハイブリダイゼーションさせた反応溶液, レーン 4 は反応溶液中にビーズを添加し, ビーズを沈殿させた後の上清を, それぞれアガロースゲル電気泳動で解析した結果を示す.

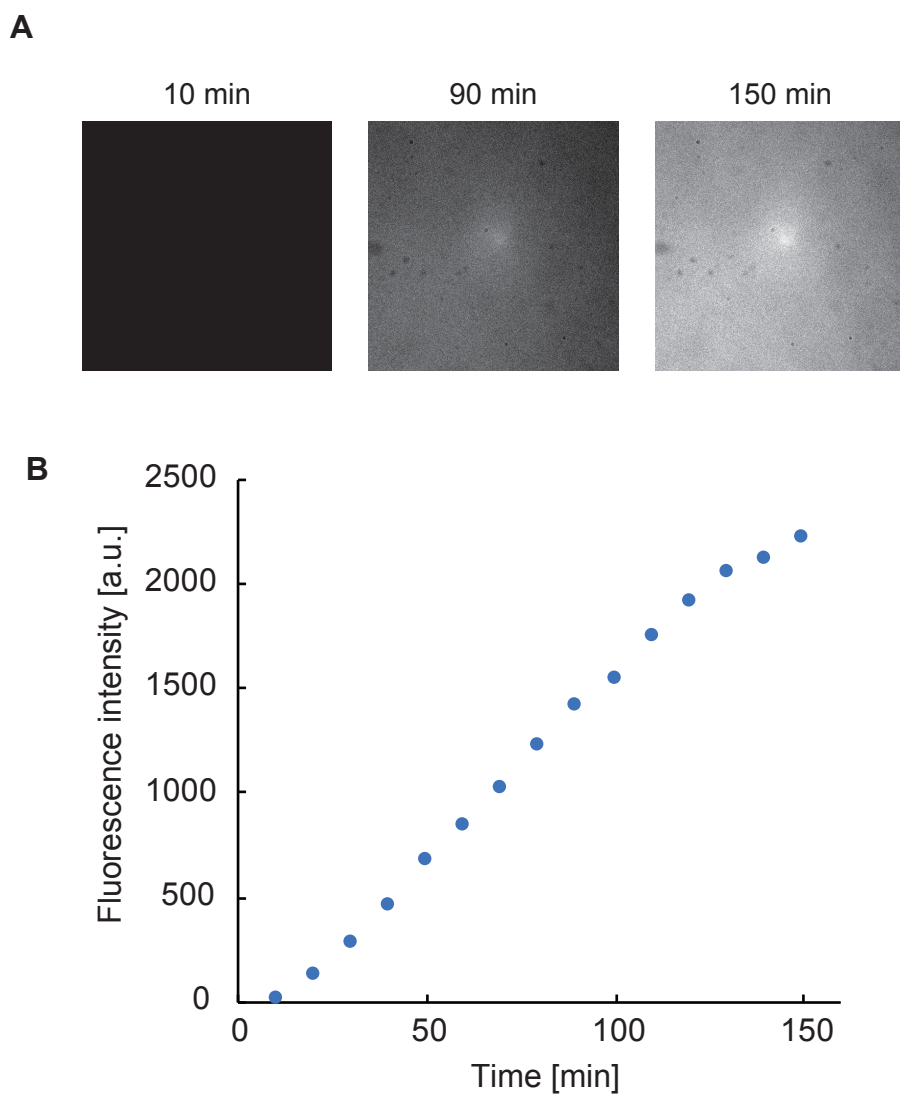


図 3.8 ガラス基板上での翻訳活性の検討

(A) フローセル内に GFPmut3 の DNA と無細胞タンパク質合成系を封入し、蛍光顕微鏡を用いて、フローセル内の GFP の蛍光を観察した。顕微鏡の対物レンズの温度は 30°C に設定した。(B) フローセル内の蛍光強度の時間変化を測定し、その時間変化をグラフにプロットした。

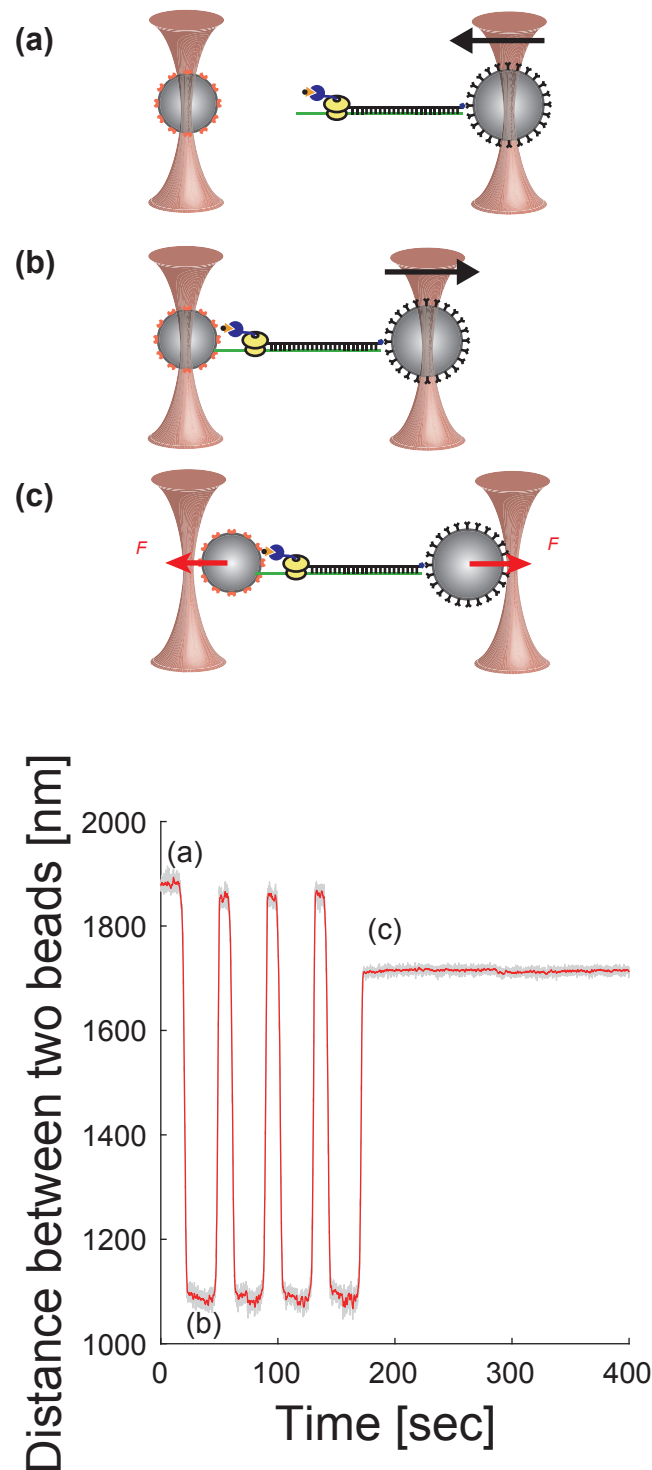


図 3.9 2つのビーズ間への翻訳アレスト複合体の固定

チューブ内で、 $1\ \mu\text{m}$ Anti-digoxigenin ビーズに固定した mRNA を翻訳させ、ビーズの表面に翻訳アレスト複合体を提示した。Streptavidin ビーズと一緒にフローセル中に入れて、光ピンセットで2つのビーズを捕捉した (a)。翻訳アレスト複合体が結合した Anti-digoxigenin ビーズを、もう片方の Streptavidin ビーズに近づけて、20 sec ほど待機した (b)。その後、Anti-digoxigenin ビーズを再び遠ざけた (a)。2つのビーズが翻訳アレスト複合体を介して連結されるまで、これを繰り返した。2つのビーズ間に翻訳アレスト複合体が連結されると、ビーズ間距離は mRNA-DNA の長さとなり、2つのレーザー間距離よりも短くなった (c)。この時、翻訳アレスト複合体には両側から負荷が印加された状態となっている。グラフの灰色の線は各 frame における2つのビーズの中心間距離、赤色の線は前後 30 frame の移動平均をそれぞれ表す。

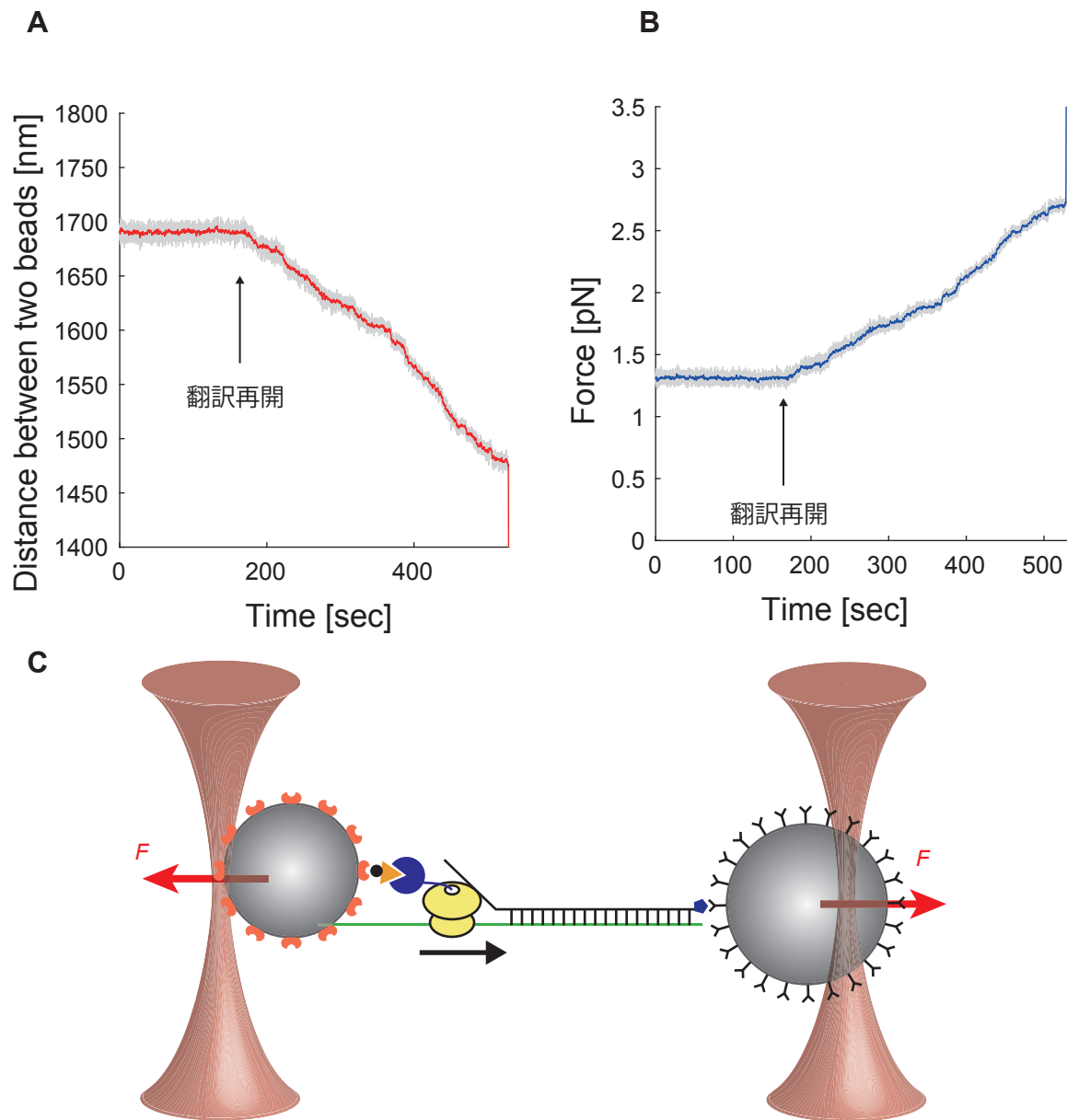


図 3.10 リボソームの動きの観察

(A) 2つのビーズの中心間距離の時間変化を示す。ビーズが200 nm以上動いた後、光ピンセットのレーザーを切って、ビーズをリリースした。グラフの灰色の線は各 frame における2つのビーズの中心間距離、赤色の線は前後30 frameの移動平均をそれぞれ表す。(B) 光ピンセットがビーズに及ぼす負荷を示す。2つのビーズが互いに近づくにつれて、レーザー中心からどんどん離れていくため、ビーズに印加される負荷は大きくなっていく。グラフの灰色の線は各 frame におけるビーズに印加された負荷、青色の線は前後30 frameの移動平均をそれぞれ表す。(C) 上記の結果から、リボソームが逆向きの力に逆らって、mRNAとDNAのダブルヘリックスをほどこきながら、mRNA上を翻訳できることが確かめられた。

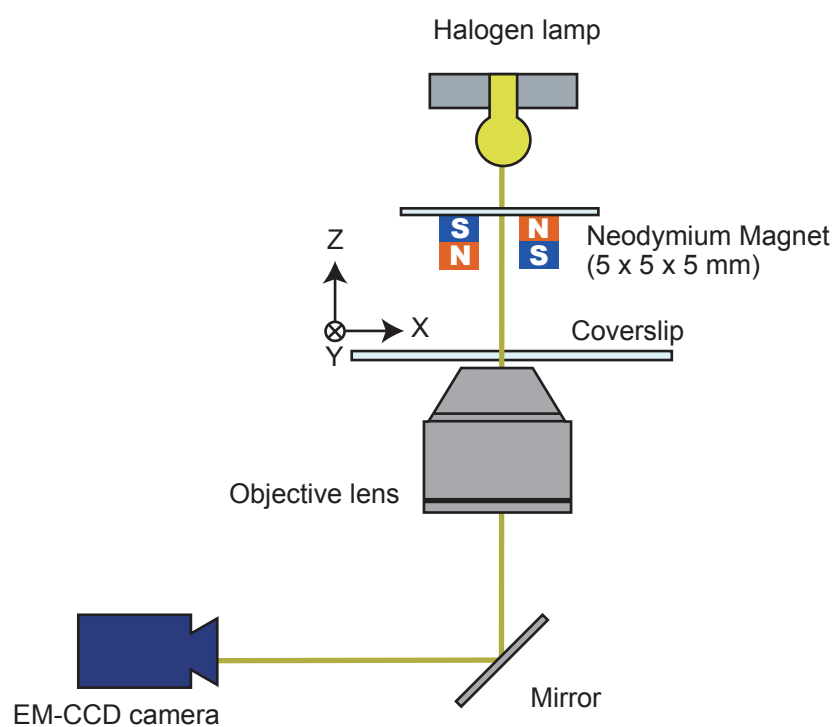


図 3.11 磁気ピンセットの光学系

磁気ピンセットの概略を示す。1 対のネオジム磁石 ($5 \times 5 \times 5 \text{ mm}$) を 1 mm 離して逆向きに並べ、対物レンズの真上にセットし、ステッピングモーターで高さを制御できるようにした。ガラス基板上のビーズの観察には、ハロゲンランプ照明を用いた。画像の取り込みには冷却 EM-CCD カメラ (iXonEM DU897D) を使用した。

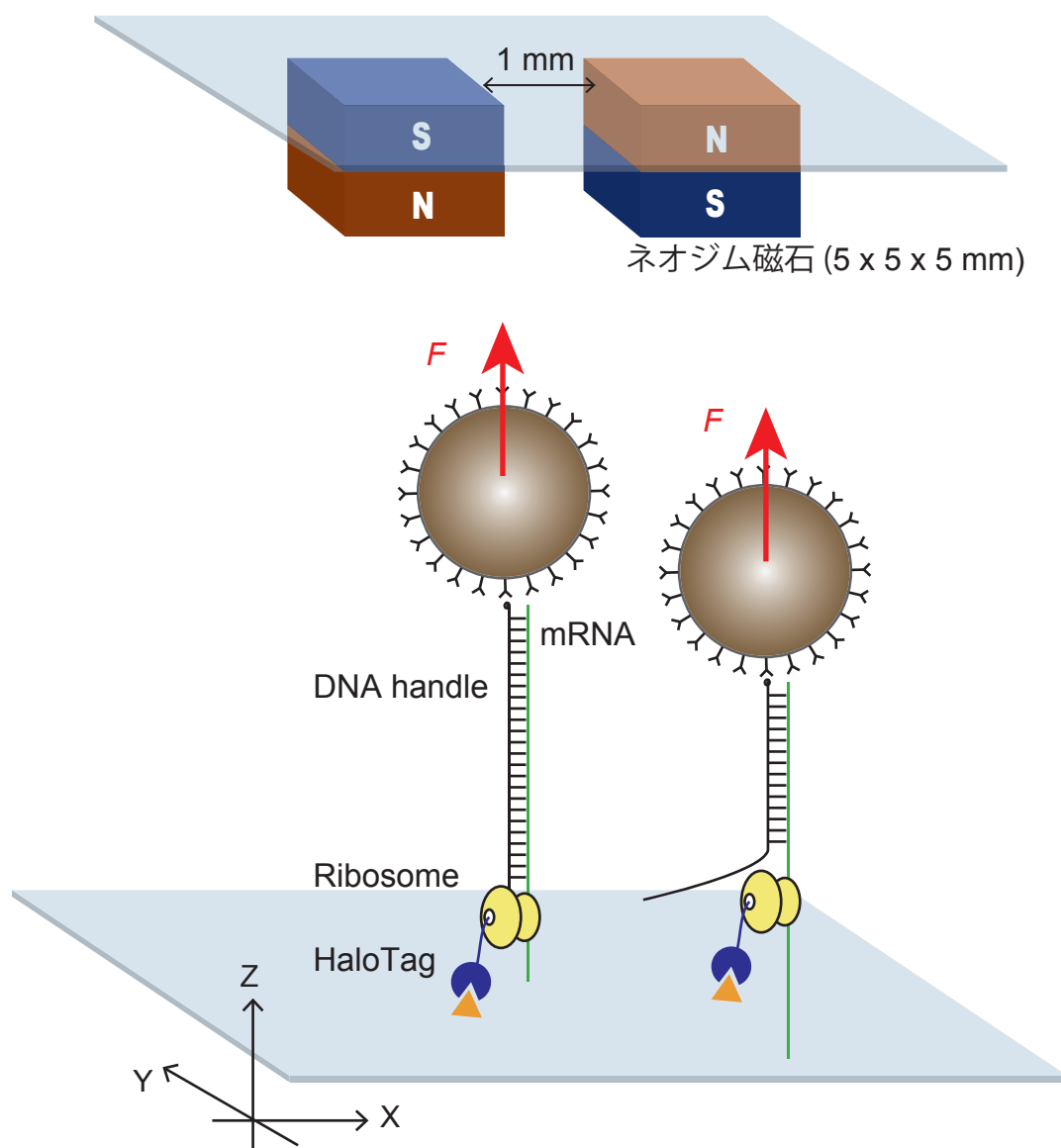


図 3.12 磁気ピンセットを用いた実験系の概要

磁気ピンセットを用いて、ガラス基板上に固定された翻訳アレスト産物に負荷を印加し、翻訳アレストの解除を試みる。翻訳が解除されると、リボソームが mRNA 上を進むため、磁性ビーズの z 軸方向の高さが変化する。これを検出することで翻訳を直接観察する。

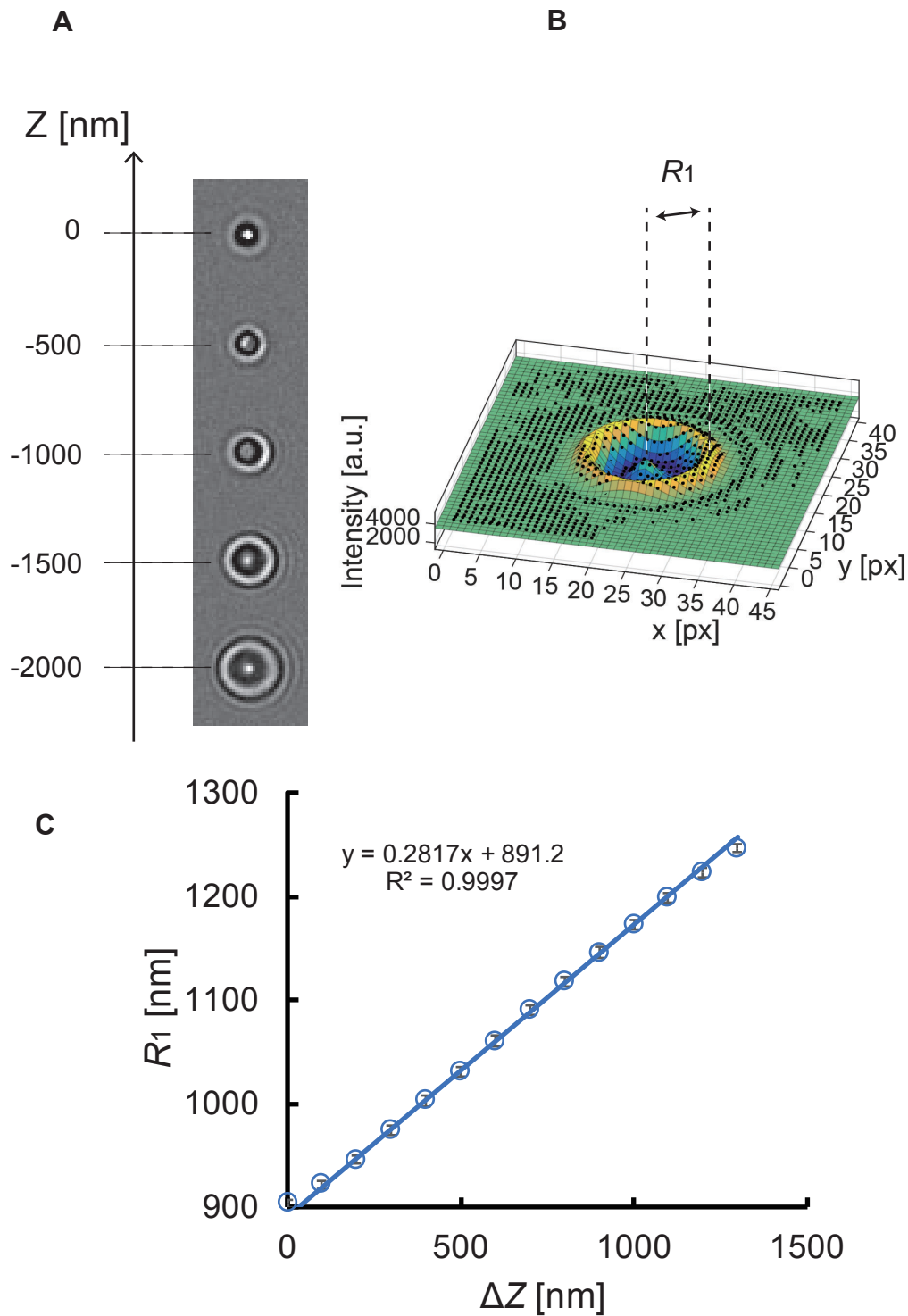


図 3.13 ビーズの z 軸方向の変位の測定

磁性ビーズの z 軸方向の動きを検出するために、焦点面から離れたときに観察されるビーズの回折リングを利用した。(A) ビーズが焦点面から離れると、複数の回折リングが見えるようになる。(B) 参考文献³⁷の手法にしたがって、回折リングを 2 次元のガウス関数の重ね合わせでフィッティングし、1 つ目の明環の半径 R_1 を指標にした。(C) 焦点の高さを変えながらビーズを観察し、明環の半径 R_1 と z 軸方向の変位との関係を調べ、グラフにプロットした。おおよそ 1000 nm の領域内では、線形性が成り立つことが確かめられた。

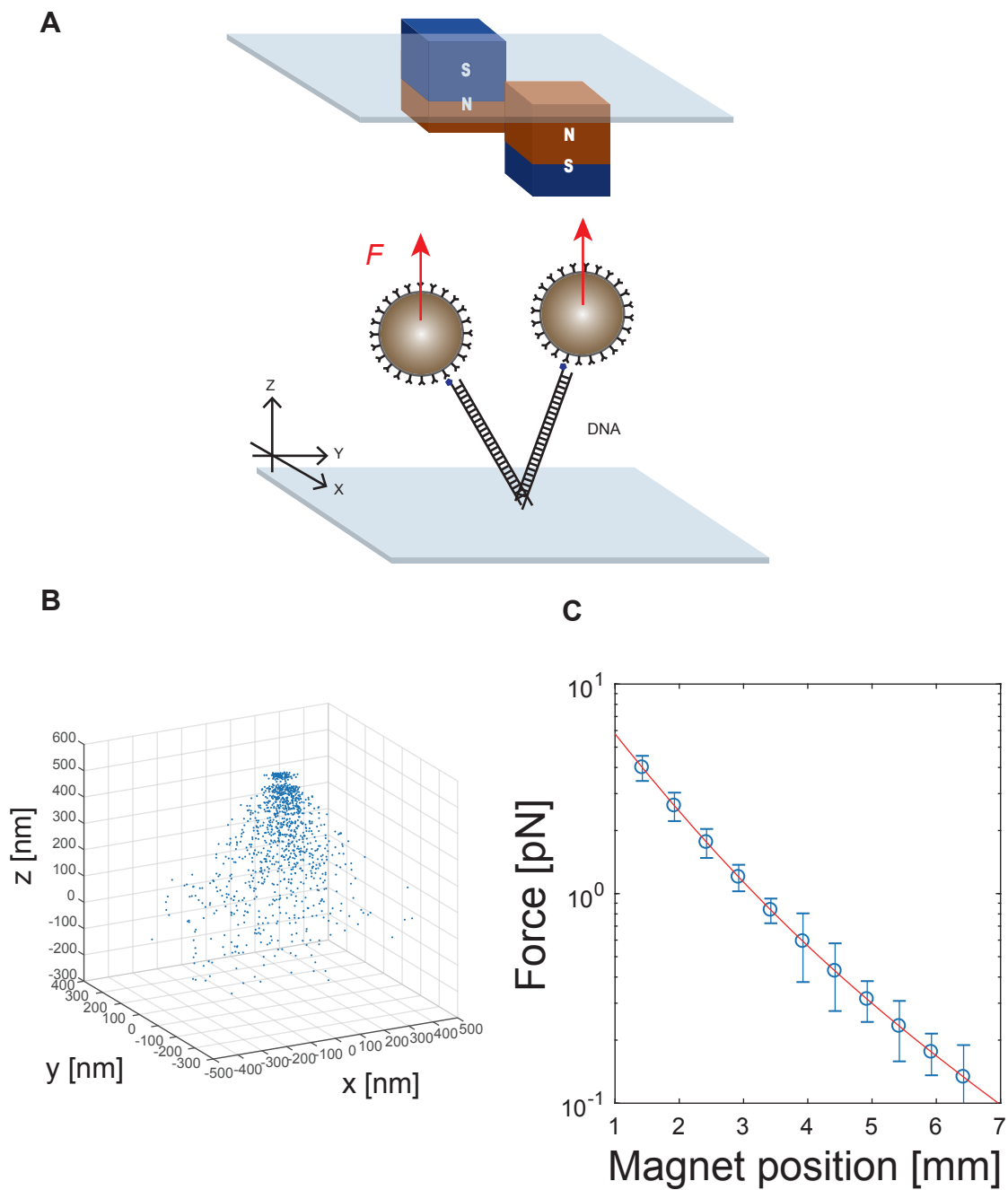


図 3.14 磁性ビーズに印加される負荷測定

(A) DNA 鎖を介して基板に係留されたビーズは、磁気ピンセットによる上向きの力を受けて、振り子のような運動をする。このビーズの動きを解析することで、磁気ピンセットによる負荷を計算することができる。(B) 0.1 pN から 4 pN まで段階的に負荷を変えながら、ビーズのゆらぎの大きさおよび 3 次元上でのビーズの位置を調べた。(C) ビーズのゆらぎから計算された磁気ピンセットの負荷と、磁石の高さとの関係をグラフにプロットした。2 項の指数関数でフィッティングを行った。

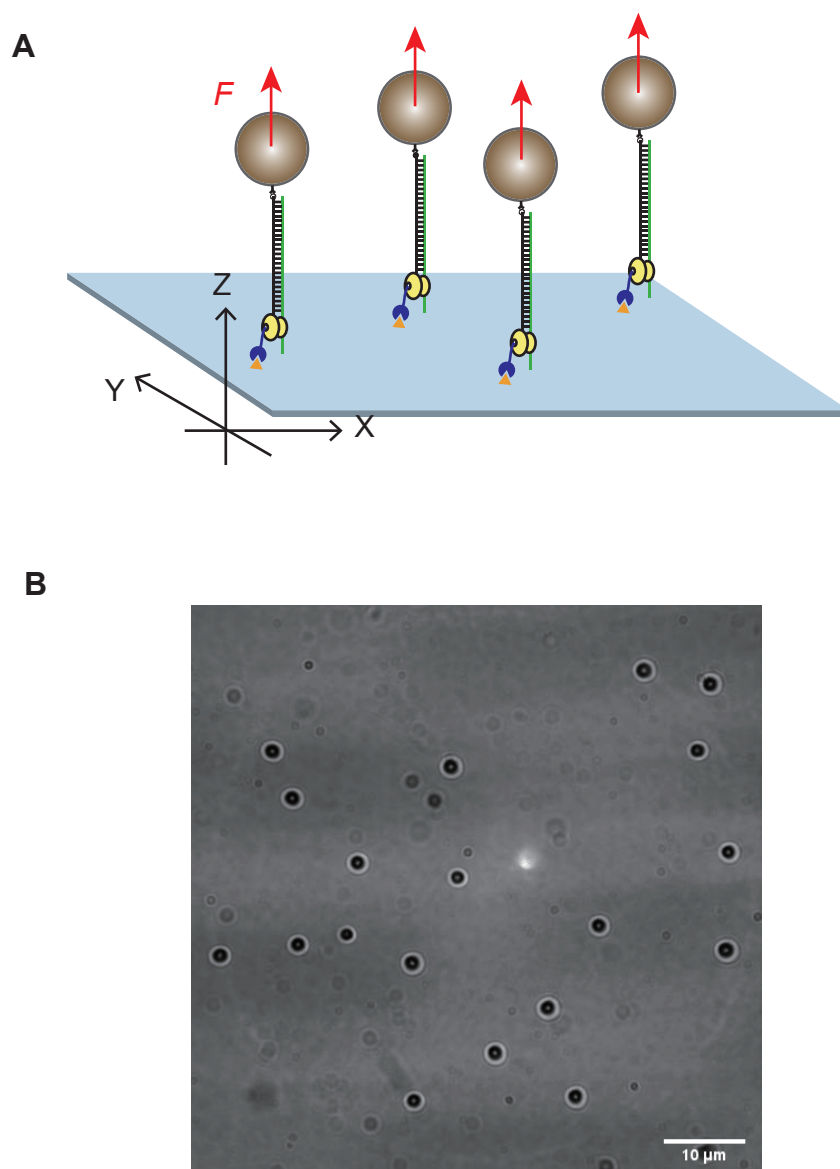


図 3.15 翻訳アレスト複合体の基板固定

(A) HaloTag PEG-biotin ligand を介して、新生ポリペプチド鎖を基板上の Streptavidin に結合させた。1 μm Anti-digoxigenin 磁性ビーズを Digoxigenin 標識された DNA ハンドルに結合させ、翻訳アレスト複合体に連結した。(B) 磁気ピンセットを用いて磁性ビーズを引っ張り、翻訳アレスト複合体を介して基板に連結されていることを確認した。

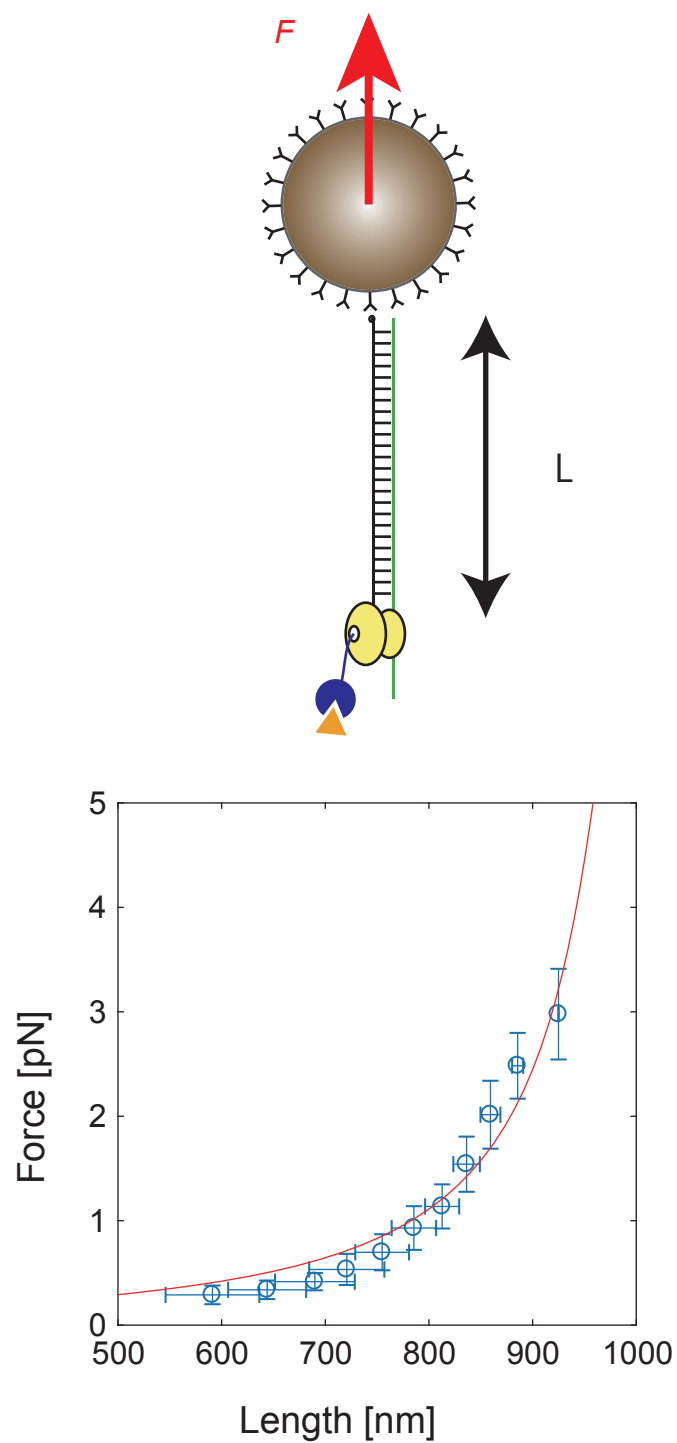
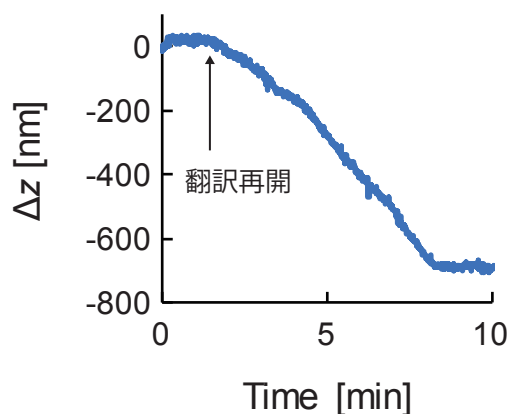
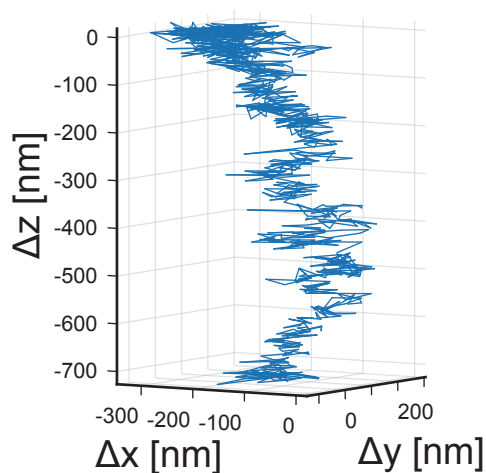


図 3.16 mRNA-DNA の長さ と 負 荷 の 関 係

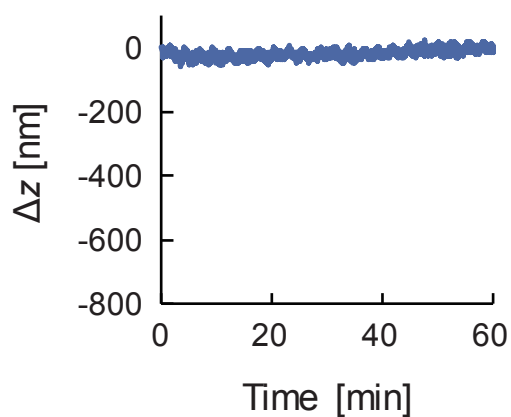
磁気ピンセットを用いて、負荷を変えながら翻訳アレスト複合体を引っ張り、mRNA-DNA の長さ と 負 荷 の 関 係 を 求 め、グ ラ フ に プ ロ ッ ト し た。Wormlike chain モデルによりフィッティングを行った。

A

Halo-SecM₁₋₁₇₀-LacZ

B

翻訳因子なし



C

Puromycin 添加

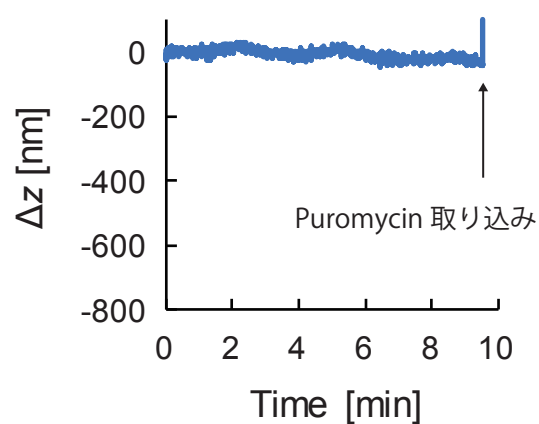
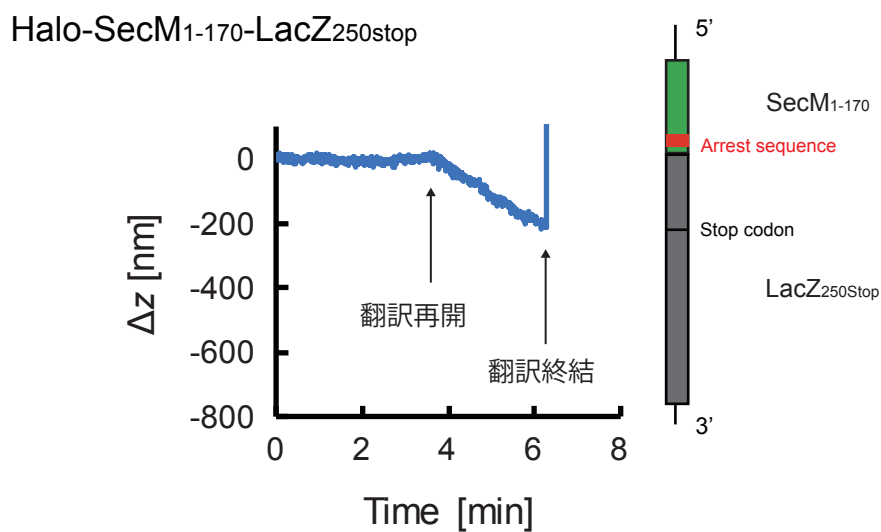


図 3.17 磁気ピンセットによる翻訳アレストの解除

(A) Halo-SecM₁₋₁₇₀-LacZ の翻訳アレスト複合体をガラス基板上に固定し、磁性ビーズを結合させ、1.75 pN の負荷を印加した。磁性ビーズの変位を 3 次元で解析し (左)、z 軸方向の変位の時間変化をプロットした (右)。(B) Halo-SecM₁₋₁₇₀-LacZ の翻訳アレスト複合体をガラス基板上に固定した後、溶液交換を行うことで、翻訳因子を取り除いた。その後、磁性ビーズを添加して翻訳アレスト複合体に 1.75 pN の負荷を加え、z 軸方向の変位の時間変化を調べた。(C) Halo-SecM₁₋₁₇₀-LacZ の翻訳アレスト複合体をガラス基板上に固定した後、溶液中に Puromycin を添加した。その後、磁性ビーズを添加して翻訳アレスト複合体に 1.75 pN の負荷を加え、z 軸方向の変位の時間変化を調べた。

A



B

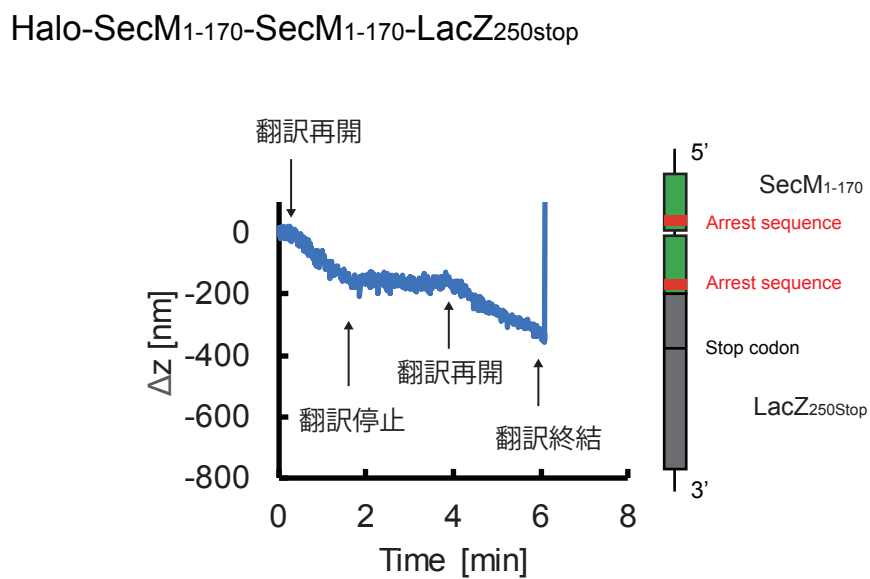


図 3.18 磁気ピンセットによる翻訳の検出

(A) Halo-SecM₁₋₁₇₀-LacZ_{250stop} は、LacZ の 250 番目のコドンを終止コドンに置換したコンストラクトである。この翻訳アレスト複合体をガラス基板上に固定し、磁性ビーズを結合させ、1.75 pN の負荷を加えながら磁性ビーズの z 軸方向の変位の時間変化を調べた。(B) Halo-SecM₁₋₁₇₀-SecM₁₋₁₇₀-LacZ_{250stop} は SecM が 2 つ連なったコンストラクトである。その下流の LacZ は、250 番目のコドンが終止コドンに置換されている。この翻訳アレスト複合体をガラス基板上に固定し、磁性ビーズを結合させ、1 pN の負荷を加えながら、磁性ビーズの z 軸方向の変位の時間変化を調べた。

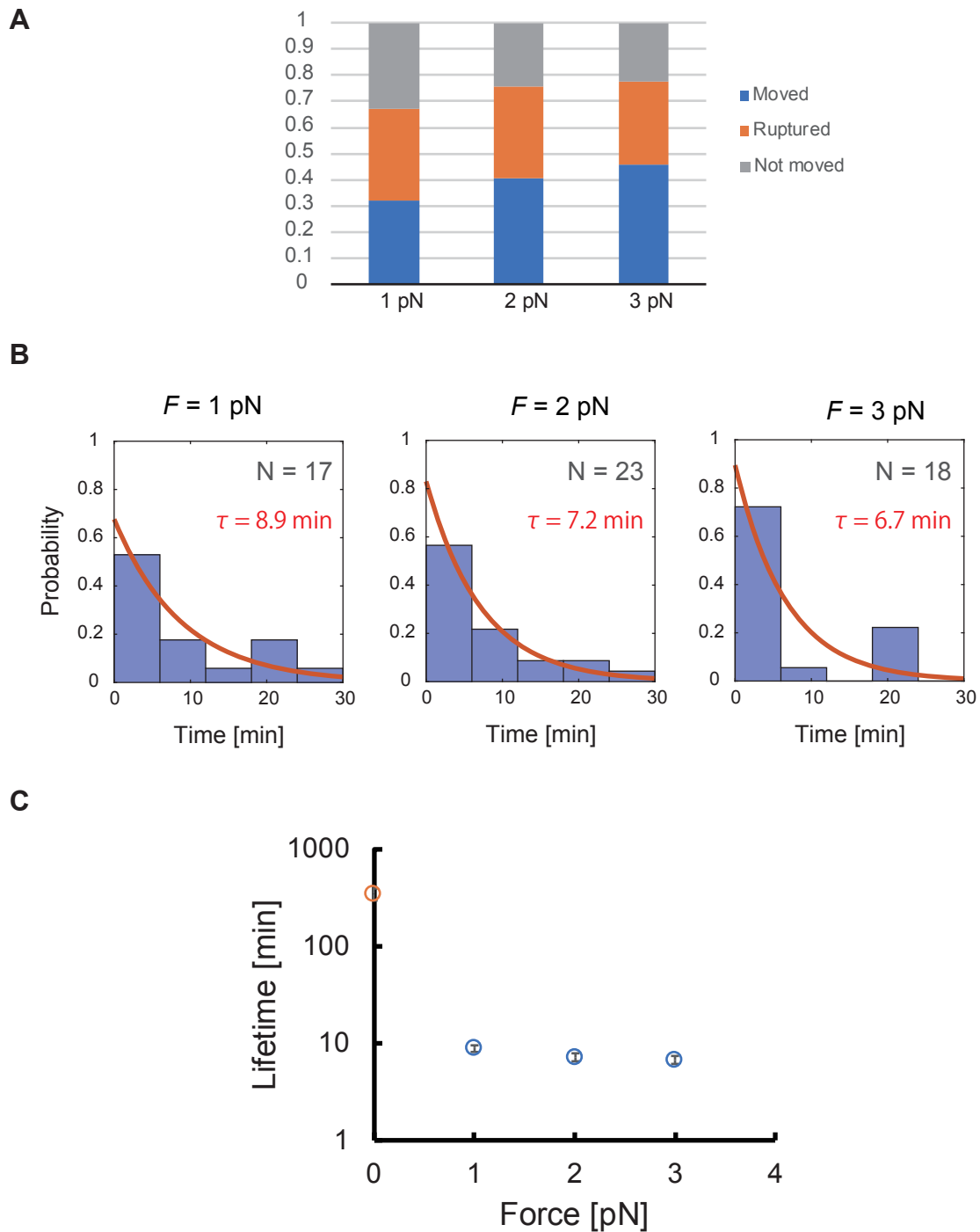


図 3.19 翻訳アレスト解除の負荷依存性

(A) Halo-SecM₁₋₁₇₀-LacZ_{250Stop} の翻訳アレスト複合体をガラス基板の上に固定し、磁気ピンセットにより 1, 2, 3 pN の負荷をそれぞれ加えることで翻訳アレストの解除を試みた。基板の上に固定された磁性ビーズの z 軸方向の変位を解析し、30 min 以内に翻訳が再開したもの（青色）、翻訳が再開せずにビーズが基板から離れたもの（オレンジ色）、翻訳が再開しなかったもの（灰色）、それぞれの割合を算出した。（B）翻訳が再開したものについて、負荷を印加してから翻訳再開までの時間（アレスト寿命）をビーズごとに求め、ヒストグラムを作成した。これを 1 次の指数関数でフィッティングし、1, 2, 3 pN の負荷印加時のアレスト寿命をそれぞれ算出した。（C）無負荷時のアレスト寿命（オレンジ色）および、1, 2, 3 pN の負荷を印加した時のアレスト寿命（青色）を、それぞれグラフにプロットした。エラーバーはフィッティングの 95% 信頼区間を示す。

第 4 章

総括および今後の展望

4.1 本研究の総括

本研究では、SecM の翻訳アレストについて、「リボソーム外領域の新生ポリペプチド鎖が安定性に与える影響」と「物理的な負荷による翻訳アレスト解除」の 2 点に着目して実験を行った。

まず、新生ポリペプチド鎖のリボソーム外領域を変えた様々なコンストラクトを作製し、翻訳アレスト複合体の寿命を測定した。これにより、リボソームトンネル外の新生ポリペプチド鎖が翻訳アレストの安定性を大きく変えることを見出した。また、SecM の全長配列を用いたコンストラクトが、他に比べて有意に長いアレスト寿命を示したことから、SecM のリボソームトンネル外領域が翻訳アレストの安定化に寄与していることが明らかとなった。これまでは SecM のアレスト配列のみで安定に翻訳が停止すると考えられてきたが、本研究の結果から、SecM の安定な翻訳アレストは、アレスト配列とリボソーム外領域の 2 つの作用によって実現していることが分かった。すなわち、アレスト配列は翻訳アレストを誘起するが、その後の安定性はリボソーム外領域が調節する、という翻訳アレストの新しい概念を提唱するものである⁵³。

次に、SecM の全長配列による安定な翻訳アレスト複合体に、人工的に負荷を加えて、翻訳アレストの解除を試みた。そのために、新生ポリペプチド鎖への負荷の印加とリボソームによる翻訳の観察を同時に可能とする 1 分子力学測定系を、光ピンセットおよび磁気ピンセットを用いて構築した。この実験系を用いて、SecM の翻訳アレストを人工的な負荷によって解除し、下流遺伝子の翻訳を観察することに成功した。これにより、SecM の翻訳アレストが物理的な負荷によって解除されることが実証された。SecM の全長配列による翻訳アレストは、無負荷時には非常に安定であったが、数 pN 程度の負荷を加えると、数分程度で効率よく解除された。

以上の結果を踏まえて、SecM の全長配列による翻訳アレスト機構について以下に考察する。SecM のアレスト配列とリボソームトンネルとの相互作用はそれほど強いものではなく、リボソーム表面での新生ポリペプチド鎖のフォールディングや熱ゆらぎによる負荷で容易に解除される。このような自発的な翻訳アレストの解除を防ぐために、SecM は翻訳アレスト時に、リボソーム外領域がリボソーム表面と弱く相互作用することで、新生ポリペプチド鎖の動きを抑制している。これにより、新生ポリペプチド鎖のフォールディングや熱ゆらぎに起因する力がリボソームトンネル内部に伝わりにくくなることで、翻訳アレストが安定化されていると考えられる。そのため、能動的に一方向に力を加えない限り、SecM の翻訳アレストはほとんど解除されない。しかし、数 pN 程度の負荷を一方向に加え続けると、リボソームトンネル外の新生ポリペプチド鎖とリボソーム表面との弱い相互作用が外れ、負荷がリボソームトンネル内に効率よく伝わるようになる。これによって、翻訳アレストが速やかに解除される。この仕組みを用いて、SecM は大腸菌内で膜透過時の負荷を検出して、必要に応じて効率よく翻訳を再開させていると考えられる。

4.2 今後の展望

本研究により、リボソームトンネル外の新生ポリペプチド鎖の配列を設計することで SecM の翻訳アレストの安定性が調節できること、また、人工的に負荷を加えることで翻訳アレストを効率よく解除できることが示された。これらは、SecM による遺伝子発現制御の応用の可能性を大きく広げるものである。

SecM による遺伝子発現制御機構では、SecM が停止している時間だけ下流遺伝子が発現する。そのため、この停止時間を制御できれば、下流遺伝子の発現量を調節できると推測される。

本研究の結果から、リボソーム表面での新生ポリペプチド鎖のフォールディングや熱ゆらぎによる動きが翻訳アレストの解除に働くことが示唆された。また、SecM の全長配列のリボソーム外領域がリボソーム表面と相互作用して、翻訳アレストを安定化していると推測された。そのため、SecM の翻訳アレストを不安定化するためには、フォールディング能の高いタンパク質がリボソームトンネル出口付近に位置するように設計することが望ましいと考えられる。逆に、翻訳アレストを安定化するためには、新生ポリペプチド鎖がフォールディングせずに、リボソーム表面と相互作用して、動きが制限されることが重要であると考えられる。リボソーム表面は rRNA によりその大部分が負に帯電しているため、PI が高いタンパク質はこの条件を満たしやすい⁵⁴。

SecM のリボソーム外領域がどのような機構で翻訳アレストを安定化するかについては、さらなる検証が求められる。SecM がリボソーム表面と相互作用しているのであれば、その相互作用部位を同定することが次の課題となるだろう。相互作用部位や機序を明らかにすることで、SecM による翻訳アレストの安定化機構が完全に理解され、その制御にもつながる。

また、本研究により、人工的に負荷を加えて翻訳アレストを解除することが可能となった。大腸菌の中で起きている SecM による翻訳停止と翻訳再開を *in vitro* の実験系で、膜透過装置を用いずに完全に再現することができた。これは、SecM の翻訳アレストが翻訳の停止ポイントとしてだけでなく、翻訳の開始ポイントとしても利用できるようになったことを意味する。遺伝子上の任意の場所で翻訳を停止させ、再開させることのできる実験系は、翻訳の研究において強力なツールとなりうる。

本研究で構築した翻訳の 1 分子測定系は、新生ポリペプチド鎖と mRNA を両側から引っ張ることで、リボソームが mRNA-DNA のダブルヘリックスをほどこしながら動く様子を直接観察するものである。この手法でリボソームの翻訳を観察したのは本研究が初めてである。リボソームの進行方向と逆向きに新生ポリペプチド鎖を引っ張っても、翻訳が阻害されることなく、リボソームはダブルヘリックスをほどこしながら進むことが確かめられた。この実験系のメリットは、リボソームの動きに加えて、新生ポリペプチド鎖の状態をモニターできる点である。そのため、翻訳終結反応や Puromycin の反応など、新生ポリペプチド鎖がリボソームから放出されるイベントを検出することができた。空間分解能をさらに向上させることで、翻訳と共役したタンパク質のフォールディングを検出することも原理的には可能である。

局所的に起こる配列特異的な翻訳速度の低下は、遺伝子発現制御やタンパク質のフォールディングを考える上で大変重要である。これまで任意の遺伝子の翻訳を 1 分子レベルで簡便に測定する方法がなかったが、本研究によって構築された 1 分子測定系は、SecM を用いて任意の場所で安定に翻訳を止め、観察時に負荷を加えることで翻訳を再開させ、その下流遺伝子の翻訳の可視化を可能とする。そのため、局所的な翻訳速度の変化を検出するのに非常に適した系である。さらに、新生ポリペプチド鎖の状態を同時に観察することで、翻訳とフォールディングのより詳細なダイナミクスに迫ることができると考えられる。

リボソームの翻訳機構に関する謎はまだ多く残されている。翻訳の停止と再開を制御する SecM の研究が、その解決への糸口を与えるきっかけとなることが期待される。

参考文献

- [1] Ian J. Purvis, Andrew J.E. Bettany, T.Chinnappan Santiago, John R. Coggins, Kenneth Duncan, Robert Eason, and Alistair J.P. Brown. The efficiency of folding of some proteins is increased by controlled rates of translation in vivo A hypothesis. *Journal of Molecular Biology*, 193:413–417, 1987.
- [2] Xiaohui Qu, Jin-Der Wen, Laura Lancaster, Harry F. Noller, Carlos Bustamante, and Ignacio Tinoco. The ribosome uses two active mechanisms to unwind messenger RNA during translation. *Nature*, 475:118, 2011.
- [3] Christian M. Kaiser, Daniel H. Goldman, John D. Chodera, Ignacio Tinoco, and Carlos Bustamante. The Ribosome Modulates Nascent Protein Folding. *Science*, 334:1723–1727, 2011.
- [4] Toshimichi Ikemura. Correlation between the abundance of Escherichia coli transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes. *Journal of Molecular Biology*, 146:1–21, 1981.
- [5] Alexandra Dana and Tamir Tuller. The effect of tRNA levels on decoding times of mRNA codons. *Nucleic Acids Research*, 42:9171–9181, 2014.
- [6] Jesper Tholstrup, Lene B. Oddershede, and Michael A. Sørensen. mRNA pseudoknot structures can act as ribosomal roadblocks. *Nucleic Acids Research*, 40:303–313, 2012.
- [7] Gene-Wei Li, Eugene Oh, and Jonathan S. Weissman. The anti-Shine-Dalgarno sequence drives translational pausing and codon choice in bacteria. *Nature*, 484:538, 2012.
- [8] Douglas R. Tanner, Daniel A. Cariello, Christopher J. Woolstenhulme, Mark A. Broadbent, and Allen R. Buskirk. Genetic Identification of Nascent Peptides That Induce Ribosome Stalling. *Journal of Biological Chemistry*, 284:34809–34818, 2009.
- [9] Lili K. Doerfel, Ingo Wohlgemuth, Christina Kothe, Frank Peske, Henning Urlaub, and Marina V. Rodnina. EF-P Is Essential for Rapid Synthesis of Proteins Containing Consecutive Proline Residues. *Science*, 339:85–88, 2013.
- [10] Hitoshi Nakatogawa and Koreaki Ito. The Ribosomal Exit Tunnel Functions as a Discriminating Gate. *Cell*, 108:629–636, 2002.
- [11] Daria V. Fedyukina and Silvia Cavagnero. Protein Folding at the Exit Tunnel. *Annual Review of Biophysics*, 40:337–359, 2011.
- [12] Feng Gong, Koichi Ito, Yoshikazu Nakamura, and Charles Yanofsky. The mechanism of tryptophan induction of tryptophanase operon expression: Tryptophan inhibits release factor-mediated cleavage of TnaC-peptidyl-tRNA^{Pro}. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98:8997–9001, 2001.
- [13] Koreaki Ito and Shinobu Chiba. Arrest Peptides: Cis-Acting Modulators of Translation. *Annual Review of Biochemistry*, 82:171–202, 2013.
- [14] Shashi Bhushan, Thomas Hoffmann, Birgit Seidelt, Jens Frauenfeld, Thorsten Mielke, Otto Berninghausen, Daniel N. Wilson, and Roland Beckmann. SecM-Stalled Ribosomes Adopt an Altered Geometry at the Peptidyl Transferase Center. *PLoS Biology*, 9:e1000581, 2011.
- [15] Akiko Murakami, Hitoshi Nakatogawa, and Koreaki Ito. Translation arrest of SecM is essential for the basal and regulated expression of SecA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108:10000–10005, 2011.

- States of America*, 101:12330–12335, 2004.
- [16] Hitoshi Nakatogawa, Akiko Murakami, and Koreaki Ito. Control of SecA and SecM translation by protein secretion. *Current Opinion in Microbiology*, 7:145–150, 2004.
- [17] Sotaro Uemura, Ryo Iizuka, Taro Ueno, Yoshihiro Shimizu, Hideki Taguchi, Takuya Ueda, Joseph D. Puglisi, and Takashi Funatsu. Single-molecule imaging of full protein synthesis by immobilized ribosomes. *Nucleic Acids Research*, 36:e70–e70, 2008.
- [18] Eriko Osada, Yoshihiro Shimizu, Bintang K Akbar, Takashi Kanamori, and Takuya Ueda. Epitope Mapping Using Ribosome Display in a Reconstituted Cell-Free Protein Synthesis System. *The Journal of Biochemistry*, 145:693–700, 2009.
- [19] Lydia M. Contreras-Martínez and Matthew P. DeLisa. Intracellular Ribosome Display Via SecM Translation Arrest as a Selection for Antibodies with Enhanced Cytosolic Stability. *Journal of Molecular Biology*, 372:513–524, 2007.
- [20] Elena Bencurova, Lucia Pulzova, Zuzana Flachbartova, and Mangesh Bhide. A rapid and simple pipeline for synthesis of mRNA-ribosome-VHH complexes used in single-domain antibody ribosome display. *Molecular BioSystems*, 11:1515–1524, 2015.
- [21] Nurzian Ismail, Rickard Hedman, Nina Schiller, and Gunnar von Heijne. A biphasic pulling force acts on transmembrane helices during translocon-mediated membrane integration. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19:1018–1022, 2012.
- [22] Daniel H. Goldman, Christian M. Kaiser, Anthony Milin, Maurizio Righini, Ignacio Tinoco, and Carlos Bustamante. Mechanical force releases nascent chain-mediated ribosome arrest in vitro and in vivo. *Science*, 348:457–460, 2015.
- [23] Jun Zhang, Xijiang Pan, Kaige Yan, Shan Sun, Ning Gao, and Sen-Fang Sui. Mechanisms of ribosome stalling by SecM at multiple elongation steps. *eLife*, 4:e09684, 2015.
- [24] Kakoli Mitra, Christiane Schaffitzel, Felcy Fabiola, Michael S Chapman, Nenad Ban, and Joachim Frank. Elongation Arrest by SecM via a Cascade of Ribosomal RNA Rearrangements. *Molecular Cell*, 22:533–543, 2006.
- [25] Patrik Forrer and Rolf Jaussi. High-level expression of soluble heterologous proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli* by fusion to the bacteriophage Lambda head protein D. *Gene*, 224:45–52, 1998.
- [26] Georgyi V. Los, Lance P. Encell, Mark G. McDougall, Danette D. Hartzell, Natasha Karassina, Chad Zimprich, Monika G. Wood, Randy Learish, Rachel Friedman Ohana, Marjeta Urh, Dan Simpson, Jacqui Mendez, Kris Zimmerman, Paul Otto, Gediminas Vidugiris, Ji Zhu, Aldis Darzins, Dieter H. Klaubert, Robert F. Bulleit, and Keith V. Wood. HaloTag: A Novel Protein Labeling Technology for Cell Imaging and Protein Analysis. *ACS Chemical Biology*, 3:373–82, 2008.
- [27] Hiroki Muto, Hitoshi Nakatogawa, and Koreaki Ito. Genetically Encoded but Nonpolypeptide Prolyl-tRNA Functions in the A Site for SecM-Mediated Ribosomal Stall. *Molecular Cell*, 22:545–552, 2006.
- [28] Marjorie A. Darken. Puromycin inhibition of protein synthesis. *Pharmacological reviews*, 16:223–43, 1964.
- [29] Karel Svoboda, Christoph F. Schmidt, Bruce J. Schnapp, and Steven M. Block. Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry. *Nature*, 365:365721a0, 1993.
- [30] Scot C. Kuo and Michael P. Sheetz. Force of single kinesin molecules measured with optical tweezers. *Science*, 260:232–234, 1993.
- [31] Hong Yin, Michelle D. Wang, Karel Svoboda, Robert Landick, Steven M. Block, and Jeff Gelles. Transcription Against an Applied Force. *Science*, 270:1653–1657, 1995.
- [32] José A. Morin, Francisco J. Cao, José M. Lázaro, J. Ricardo Arias-Gonzalez, José M. Valpuesta, José L.

- Carrascosa, Margarita Salas, and Borja Ibarra. Active DNA unwinding dynamics during processive DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109:8115–8120, 2012.
- [33] Jeffrey T. Finer, Robert M. Simmons, and James A. Spudich. Single myosin molecule mechanics: piconewton forces and nanometre steps. *Nature*, 368:113–119, 1994.
- [34] Amit D. Mehta, Matthias Rief, James A. Spudich, David A. Smith, and Robert M. Simmons. Single-Molecule Biomechanics with Optical Methods. *Science*, 283:1689–1695, 1999.
- [35] Tomas Masek, Vaclav Vopalensky, Petra Suchomelova, and Martin Pospisek. Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels. *Analytical Biochemistry*, 336:46–50, 2005.
- [36] Ryo Iizuka, Mai Yamagishi-Shirasaki, and Takashi Funatsu. Kinetic study of de novo chromophore maturation of fluorescent proteins. *Analytical Biochemistry*, 414:173–178, 2011.
- [37] Lucia Gardini, Marco Capitanio, and Francesco S. Pavone. 3D tracking of single nanoparticles and quantum dots in living cells by out-of-focus imaging with diffraction pattern recognition. *Scientific Reports*, 5:16088, 2015.
- [38] Florian Wruck, Alexandros Katranidis, Knud H. Nierhaus, Georg Büldt, and Martin Hegner. Translation and folding of single proteins in real time. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114:E4399–E4407, 2017.
- [39] Thomas T. Perkins. Ångström-Precision Optical Traps and Applications. *Annual review of biophysics*, 43:279–302, 2014.
- [40] Jin-Der Wen, Laura Lancaster, Courtney Hodges, Ana-Carolina Zeri, Shige H. Yoshimura, Harry F. Noller, Carlos Bustamante, and Ignacio Tinoco. Following translation by single ribosomes one codon at a time. *Nature*, 452:598, 2008.
- [41] Tingting Liu, Ariel Kaplan, Lisa Alexander, Shannon Yan, Jin-Der Wen, Laura Lancaster, Charles E Wickersham, Kurt Fredrick, Kurt Fredrik, Harry Noller, Ignacio Tinoco, and Carlos J Bustamante. Direct measurement of the mechanical work during translocation by the ribosome. *eLife*, 3:e03406, 2014.
- [42] Shannon Yan, Jin-Der Wen, Carlos Bustamante, and Ignacio Tinoco. Ribosome Excursions during mRNA Translocation Mediate Broad Branching of Frameshift Pathways. *Cell*, 160:870–881, 2015.
- [43] Tomoaki Masuda, Alexey N. Petrov, Ryo Iizuka, Takashi Funatsu, Joseph D. Puglisi, and Sotaro Uemura. Initiation factor 2, tRNA, and 50S subunits cooperatively stabilize mRNAs on the ribosome during initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109:4881–4885, 2012.
- [44] Seyedtaghi Takyar, Robyn P. Hickerson, and Harry F. Noller. mRNA Helicase Activity of the Ribosome. *Cell*, 120:49–58, 2005.
- [45] Yuhei Chadani, Tatsuya Niwa, Takashi Izumi, Nobuyuki Sugata, Asuteka Nagao, Tsutomu Suzuki, Shinobu Chiba, Koreaki Ito, and Hideki Taguchi. Intrinsic Ribosome Destabilization Underlies Translation and Provides an Organism with a Strategy of Environmental Sensing. *Molecular Cell*, 68:528–539.e5, 2017.
- [46] George Dinos, Dimitrios L. Kalpaxis, Daniel N. Wilson, and Knud H. Nierhaus. Deacylated tRNA is released from the E site upon A site occupation but before GTP is hydrolyzed by EF-Tu. *Nucleic Acids Research*, 33:5291–5296, 2005.
- [47] Arthur Ashkin. Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure. *Physical Review Letters*, 24:156–159, 1970.
- [48] Charlie Gosse and Vincent Croquette. Magnetic Tweezers: Micromanipulation and Force Measurement at the Molecular Level. *Biophysical Journal*, 82:3314–3329, 2002.
- [49] Samar Hodeib, Saurabh Raj, M. Manosas, Weiting Zhang, Debjani Bagchi, Bertrand Ducos, Jean-

- François Allemand, David Bensimon, and Vincent Croquette. Single molecule studies of helicases with magnetic tweezers. *Methods*, 105:3–15, 2016.
- [50] Rupa Sarkar and Valentin V. Rybenkov. A Guide to Magnetic Tweezers and Their Applications. *Frontiers in Physics*, 4:48, 2016.
- [51] T. R. Strick, J.-F. Allemand, D. Bensimon, A. Bensimon, and V. Croquette. The Elasticity of a Single Supercoiled DNA Molecule. *Science*, 271:1835–1837, 1996.
- [52] Jan Lipfert, Xiaomin Hao, and Nynke H. Dekker. Quantitative Modeling and Optimization of Magnetic Tweezers. *Biophysical journal*, 96:5040–9, 2009.
- [53] Zhuohao Yang, Ryo Iizuka, and Takashi Funatsu. Nascent SecM Chain Outside the Ribosome Reinforces Translation Arrest. *PLOS ONE*, 10:e0122017, 2015.
- [54] Anders M Knight, Peter H Culviner, Neşe Kurt-Yilmaz, Taisong Zou, S Banu Ozkan, and Silvia Cavagnero. Electrostatic Effect of the Ribosomal Surface on Nascent Polypeptide Dynamics. *ACS Chemical Biology*, 8:1195–1204, 2013.

謝辞

本研究の遂行にあたり、甚大なご指導、ご鞭撻を賜った東京大学大学院薬学系研究科生体分析化学教室 船津高志教授に深く感謝いたします。

日ごろ、本研究の実施に際し、熱心なご指導、ご尽力をいただいた東京大学大学院薬学系研究科生体分析化学教室の飯塚怜助教に心よりお礼申し上げます。

磁気ピンセットの構築において、ご助言をくださった東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻 野地博行教授に深く感謝いたします。

重心輝度解析用のプラグインを作成するにあたり、ご指導・ご助言をくださった菅原皓博士に感謝いたします。

実験や解析の多くの部分を共に進め、苦勞を分かち合った山城竣介氏に感謝いたします。

本研究に関して終始ご支援、ご協力をいただいた東京大学大学院薬学系研究科生体分析化学教室の皆様への感謝の意を表します。

最後に、本研究を支えて下さった家族、友人に感謝いたします。

2019 年 1 月
東京大学大学院薬学系研究科
生体分析化学教室
楊 倬皓