

博士論文

組み換えタンパク質による
大腸菌 50S リボソームサブユニットの
試験管内再構成

青山 遼

博士論文

組み換えタンパク質による
大腸菌 50S リボソームサブユニットの
試験管内再構成

東京大学大学院新領域創成科学研究科

メディカル情報生命専攻

指導教員 富田 野乃

青山 遼

2021 年 11 月

Copyright©2021 by Aoyama Ryo
All rights reserved

目次

1. 序論.....	6
1.1 リボソームとは.....	6
1.2 リボソームの組み立て.....	8
1.3 リボソームの機能改変.....	12
1.4 本研究の目的.....	13
2. 実験手法.....	14
2.1 使用試薬.....	14
2.2 プラスミド.....	14
2.3 タンパク質の精製.....	17
2.3.1 タンパク質精製に用いたバッファー等.....	17
2.3.2 タンパク質の発現.....	20
2.3.3 プロテアーゼ Ulp1 活性部位の精製.....	21
2.3.4 リボソームタンパク質 L1 の精製.....	21
2.3.5 リボソームタンパク質 L2 の精製.....	22
2.3.6 リボソームタンパク質 L3 の精製.....	23
2.3.7 リボソームタンパク質 L4 の精製.....	25
2.3.8 リボソームタンパク質 L5 の精製.....	26
2.3.9 リボソームタンパク質 L6 の精製.....	27
2.3.10 リボソームタンパク質 L9 の精製.....	29
2.3.11 リボソームタンパク質 L10 の精製.....	30
2.3.12 リボソームタンパク質 L11 の精製.....	32
2.3.13 リボソームタンパク質 L12 の精製.....	33
2.3.14 リボソームタンパク質 L13 の精製.....	34
2.3.15 リボソームタンパク質 L14 の精製.....	36
2.3.16 リボソームタンパク質 L15 の精製.....	37
2.3.17 リボソームタンパク質 L16 の精製.....	39
2.3.18 リボソームタンパク質 L17 の精製.....	40
2.3.19 リボソームタンパク質 L18 の精製.....	41
2.3.20 リボソームタンパク質 L19 の精製.....	43
2.3.21 リボソームタンパク質 L20 の精製.....	44
2.3.22 リボソームタンパク質 L21 の精製.....	45
2.3.23 リボソームタンパク質 L22 の精製.....	46

2.3.24	リボソームタンパク質 L23 の精製.....	48
2.3.25	リボソームタンパク質 L24 の精製.....	49
2.3.26	リボソームタンパク質 L25 の精製.....	50
2.3.27	リボソームタンパク質 L27 の精製.....	51
2.3.28	リボソームタンパク質 L28 の精製.....	53
2.3.29	リボソームタンパク質 L29 の精製.....	54
2.3.30	リボソームタンパク質 L30 の精製.....	56
2.3.31	リボソームタンパク質 L31 の精製.....	57
2.3.32	リボソームタンパク質 L32 の精製.....	59
2.3.33	リボソームタンパク質 L33 の精製.....	61
2.3.34	リボソームタンパク質 L34 の精製.....	62
2.3.35	リボソームタンパク質 L35 の精製.....	63
2.3.36	リボソームタンパク質 L36 の精製.....	65
2.3.37	修飾酵素 PrmB と共発現したリボソームタンパク質 L3 の精製	66
2.3.38	修飾酵素 PrmA と共発現したリボソームタンパク質 L11 の精製	67
2.3.39	修飾酵素 RimL と共発現したリボソームタンパク質 L12 の精製.....	69
2.3.40	スプリットルシフェラーゼ大サブユニット LgBiT の精製	70
2.4	Intact Mass による精製タンパク質の分子量測定	71
2.5	大腸菌内在性リボソーム及びリボソーム構成要素の調製.....	72
2.5.1	大腸菌内在性 70S リボソームの調製.....	72
2.5.2	大腸菌内在性 30S/50S リボソームサブユニットの調製	72
2.5.3	TP50 の調製.....	73
2.5.4	大腸菌内在性 23S/5S rRNA の調製.....	73
2.6	組み換えタンパク質による 50S サブユニットの試験管内再構成	74
2.6.1	組み換えリボソームタンパク質 33 種類の混合溶液(33P)の調製.....	74
2.6.2	熱処理による 50S サブユニットの組み立て及び再構成産物の濃縮	74
2.7	再構成 50S サブユニットの性状評価	75
2.7.1	シヨ糖密度勾配遠心による再構成産物の沈降速度評価	75
2.7.2	質量分析用の試料調製.....	75
2.7.3	LC-MS/MS による再構成産物中の RP の検出及び定量.....	76
2.8	再構成 50S サブユニットの翻訳活性評価	76
2.8.1	PURE system を用いた HiBiT の合成及び合成量の評価.....	77
2.8.2	PURE system を用いた sfGFP の合成及び合成量の評価.....	77
2.9	70S リボソームの試験管内再構成及び翻訳活性評価.....	77
3.	実験結果.....	79

3.1 組み換えリボソームタンパク質 L1-L36 の発現と精製	79
3.2 組み換えタンパク質による 50S サブユニットの試験管内再構成	89
3.3 組み換え RP による再構成 50S サブユニットの翻訳活性評価.....	93
3.4 全 54 種類の組み換え RP による 70S リボソームの作製.....	99
4. 考察.....	101
4.1 本研究のまとめ	101
4.2 精製された組み換えタンパク質について.....	101
4.3 再構成された 50S サブユニットについて	105
5. 参考文献.....	108
6. 謝辞.....	113

1. 序論

1.1 リボソームとは

タンパク質は生命の主要な構成物質で、水に次いで多くの重量を占める。その機能や構造は、生体内で用いられる基本的なアミノ酸約 20 種類の順列組み合わせによって極めて多種多様であり、生体の構造維持、物質の運搬や化学反応の触媒など、あらゆる生命現象において欠かすことの出来ない存在である。これらのタンパク質は全て、「リボソーム」という粒径数十ナノメートルほどの粒子によって合成されている。つまりリボソームは生命システムにおける最も主要な要素の一つであり、Palade による発見 (Palade, *J Biophys Biochem Cytol.*, 1955) 以降、重要な研究対象とみなされてきた。

リボソームの大まかな機能や構造は全生物に共通している。リボソームは数本のリボソーム RNA (rRNA) と多数のリボソームタンパク質 (Ribosomal Protein, RP) が分子間相互作用によって会合した超分子複合体であり、大小 2 つのサブユニットから構成される (Tissieres *et al*, *Nature*, 1958)。大サブユニットの役割はアミノ酸の脱水重合 (Gilbert, *J. Mol. Biol.*, 1963, Monro, *J. Mol. Biol.*, 1967)、小サブユニットの役割は遺伝情報のコピーである伝令 RNA (mRNA) の解読である (Okamoto *et al.*, *Biochim Biophys Acta.*, 1963, Pestka *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 1966)。またリボソームや大小のサブユニットは遠心したときの沈降速度を表す沈降係数によって呼称される。例えば、これまでリボソームに関する知見の大半をもたらしてきた大腸菌などにおいては、それぞれ 70S リボソーム、50S サブユニット、30S サブユニットと呼ばれる。50S サブユニット (大サブユニット) は 2 本の rRNA (23S, 5S rRNA) と 33 種類の RP (L1-L36) から成り、30S サブユニット (小サブユニット) は 1 本の rRNA (16S rRNA) と 21 種類の RP (S1-S21) によって構成される (図 1-1)。

2006 年に X 線結晶構造解析によって大腸菌 70S リボソームの高解像度な構造が明らかとなり (Selmer *et al.*, *Science*, 2006)、リボソームの研究は一つの成熟期を迎えた。それ以来リボソームの構造解明を切り口とした研究によって、リボソームの機能や組み立てまでもがより一層鮮明になった。しかしながら、Richard Feynman の言葉である "What I cannot create, I do not understand." に表されているように、我々はリボソームを作ることが出来てはじめてリボソームを本当に理解したと言えるのではないだろうか。リボソームを「見る」ことが出来るようになった今、次世代のリボソーム研究はリボソームを「作る」こと、そして最終的にはリボソームの深い理解に基づきリボソームを「利用する」ことだと考えられる。

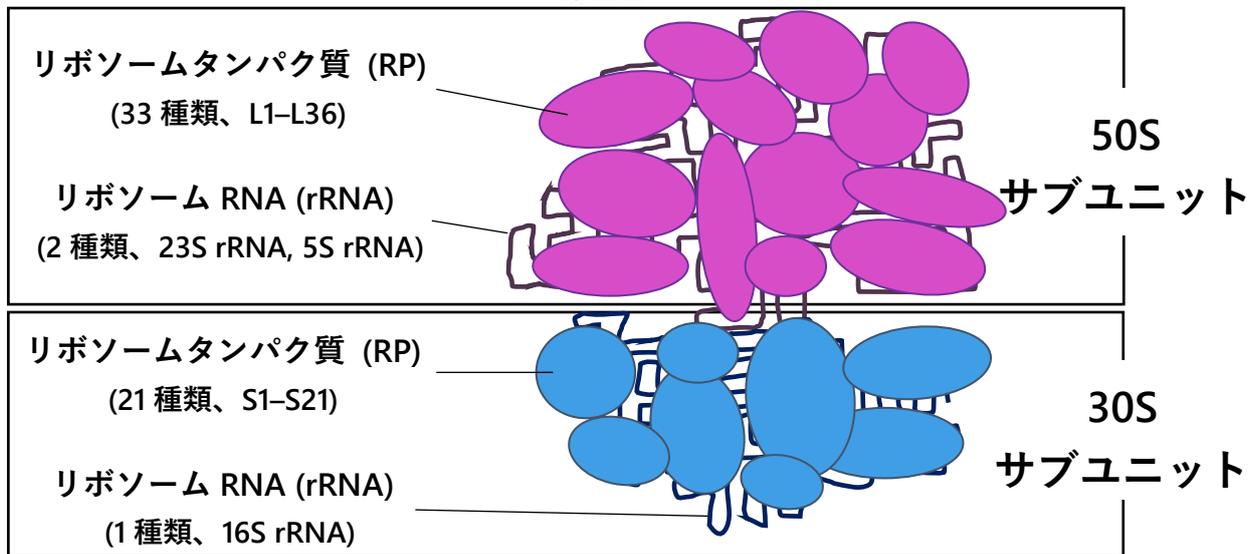
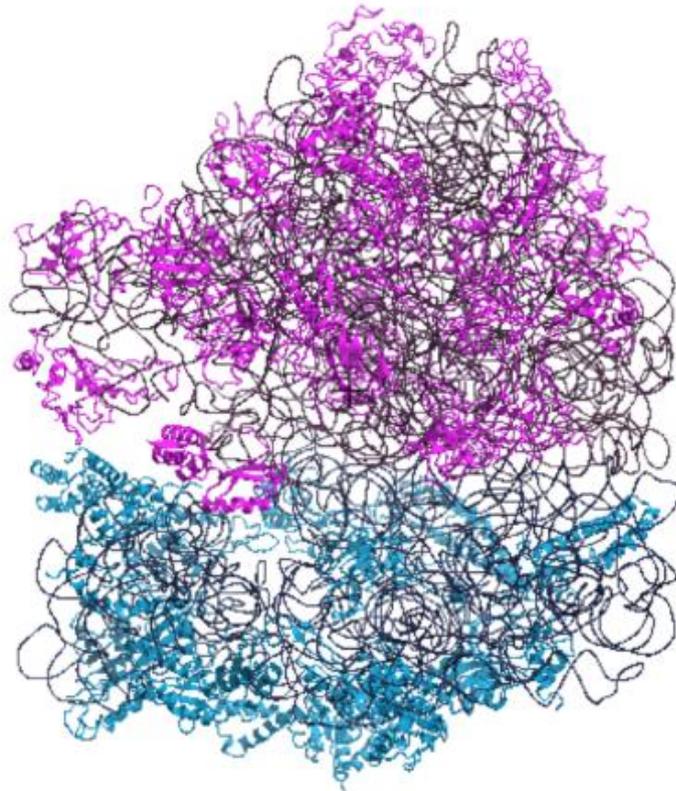


図 1-1 大腸菌リボソームの結晶構造 (PDB: 2avy, 2aw4) (上) と模式図 (下)
 50S サブユニットを構成するリボソームタンパク質は赤紫色、rRNA は黒紫色、30S サブユニットを構成するリボソームタンパク質は淡青色、rRNA は濃青色で示した。なお、50S サブユニットの RP のうち、L7 と L12 は翻訳後修飾のみが異なり同一のアミノ酸配列を持つためまとめて 1 種類と数えており、また L8 と L26 は欠番である。

1.2 リボソームの組み立て

リボソームの組み立ては、負電荷を持つ rRNA に正電荷を持つ RP が自発的に結合し、rRNA の正しい構造変化を促すことによって進行する。そして熱力学的には組み立て過程で構成要素以外的高分子を一切必要としない。このことは、大小のリボソームサブユニットから解離した RP 群 (Total protein from 50S/30S subunit, TP50/30) と rRNA を用いた、熱処理による試験管内再構成実験によって示された (Traub *et al.*, *PNAS*, 1968, Nomura *et al.*, *Nature*, 1970, Nierhaus *et al.*, *PNAS*, 1974)。また各サブユニットの組み立て順序は、大腸菌のリボソームからカラム精製などによって単離した RP を様々な組み合わせで用いた再構成実験によって明らかとなっており (Mizushima *et al.*, *Nature*, 1970, Herold *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 1987)、これを図式化したものは「アセンブリマップ」と呼ばれている (図 1-2)。近年では、構造の不安定な再構成途中のサブユニット前駆体を電子顕微鏡によって観察することに成功しており、より詳細なリボソームの組み立て過程が明らかとなりつつある (Nikolay *et al.*, *Mol. Cell.*, 2018)。

熱処理によるリボソームの試験管内再構成においては、非生理的な高温・高塩濃度条件で長時間且つ多段階の反応を必要とする。特に 50S サブユニットは 50°C という過酷な温度条件で組み立てを行う。これは前駆体が殆ど蓄積することなくわずか数分で完了するというリボソームの生合成条件 (Lindahl, *J. Mol. Biol.*, 1975) からは程遠い。しかしリボソームの生合成は生存に必須かつ迅速ゆえ、遺伝学的解析や構造解析のみによって詳細に解明するのは難しい。そのため試験管内再構成系はリボソームの組み立てに関して重要な研究ツールのひとつとなっている。幸いなことに、試験管内と生体内とで組み立て条件が大きく異なるにもかかわらず、組み立て過程の大枠は類似する点が多い。例えば、試験管内と生体内のいずれにおいてもリボソームは幾つかの前駆体 (30S サブユニットは 22S と 26S の 2 種類、50S サブユニットでは 33S、41S、48S の 3 種類) を経て段階的に組み立てられ、その構成要素も類似している (Nomura *et al.*, *J. Cell. Physiol.*, 1969, Dohme *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 1976, Lindahl, *J. Mol. Biol.*, 1975)。では、リボソームの再構成過程が生合成と類似しているにもかかわらず、組み立てに非生理的な条件を必要とするのは何故だろうか。それは、試験管内再構成においては rRNA の構造変化を熱エネルギーのみに依存しているのに対し、生合成においては「rRNA の転写と組み立ての共役」、「RP 以外のタンパク質によるリボソームの生合成の促進」という 2 つの仕組みを利用しているためである。

「rRNA の転写と組み立ての共役」というのは、生体内においては rRNA の転写の完了を待たずに、既に転写が完了した部分に RP が結合するということである。つまり完

全長の rRNA の至る所に RP が結合を始めるのではなく、rRNA の転写される方向である 5'側から 3'側に向かってリボソームの組み立てが徐々に進行する（アセンブリーグラジエント）（Spillmann *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 1977, de Narvaez *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 1979）。このシステムは、完全長の rRNA から組み立てを始めるよりも誤った部分構造の形成を避けやすく、すなわち rRNA の正しい構造変化を起しやすくしていると思われる。アセンブリーグラジエントを直接的に示す決定的な証拠は無く、未だ仮説の域を出ないものの、rRNA の 5'側が最初に組み立てられることの重要性を示唆する先行研究は複数有る。代表的なのが、50S サブユニットの試験管内再構成において、23S rRNA の 5'側に結合する 5 種類の RP (L4、L13、L20、L22、L24) が 33S 前駆体の形成に必須なことである（Spillmann *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 1977）。但し、23S rRNA の円循環変異体を用いた実験において、rRNA の局所的な構造が崩れないならば必ずしも 5'末端から転写される必要は無く（Kitahara *et al.*, *Mol. Cell.*, 2009）、リボソームの生合成経路はある程度柔軟性を持つことも示されている。

もう 1 つの仕組みは、「RP 以外のタンパク質によるリボソームの生合成の促進」である。通常、熱処理によるリボソームの試験管内再構成に用いられる遺伝子産物は RP と rRNA のみである。一方生合成においては、これら以外にもリボソームの組み立てを促進する機能を持った RNA ヘリカーゼ、GTPase やシャペロン類のようなタンパク質（生合成因子）が多数関わっている。生合成因子は、30S サブユニットの組み立てに重要な Era (Lu *et al.*, *J. Bacteriol.*, 1998) と 50S サブユニットの組み立てに関わる EngA、ObgE (Hwang *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2001, Kobayashi *et al.*, *Mol. Microbiol.*, 2001) のみが細胞の生存に必須である。それ以外は単独で欠損しても特定の温度条件においてサブユニットの前駆体を蓄積させる程度の表現型しか表れないものも多い。しかし、生体内と試験管内でリボソームの組み立て速度が大きく異なることを考えれば、生合成因子群全体がリボソームの組み立てに与える影響は決して小さくないと考えられる。

rRNA の修飾酵素の一部もリボソームの機能及び組み立てに重要である。大腸菌においては 23S rRNA のペプチド転移反応を司るドメイン V の修飾塩基が特に重要であり、試験管内再構成においてこれらの領域の塩基修飾を欠失すると再構成産物の翻訳活性が 1 万分の 1 以下になる (Green *et al.*, *RNA*, 1996)。しかし塩基修飾が無くとも、この再構成系に添加剤としてテリスロマイシンとトリメチルグリシンを加えると再構成産物の翻訳活性が最大 100 分の 1 程度にまで回復する (Semrad *et al.*, *RNA*, 2002)。また好熱菌の 50S サブユニットにおいては試験管内転写した塩基修飾の無い 23S rRNA でも比較的効率よく再構成できる (Green *et al.*, *Biochem.*, 1999, Khaitovich *et al.*,

Biochem., 1999)。これらの先行研究より、23S rRNA のドメイン V に位置する修飾塩基は 50S サブユニットの翻訳活性ではなく組み立てに重要と考えられる。なお RP の翻訳後修飾については、L3 の 150 位のグルタミンに対するメチル化において唯一リボソームの組み立てに関与するという報告がある (Lhoest *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, 1981)。

これまでのリボソームの試験管内再構成研究に関する課題として、RP として専ら TP30/50 が用いられていることが挙げられる。TP の原料であるリボソームは致死でないものしか取得できないため、細胞の生死に関係の無い試験管内の実験系にもかかわらず、RP に対して自由な変異導入ができない。それゆえ RP の網羅的な変異体解析は不可能であり、リボソームの組み立てや翻訳における個々の RP の機能解析にも制限があった。また RP をリボソームから個別調製する操作は非常に煩雑な上に RP 同士のクロスコンタミネーションが避けられないという技術的な問題もあった。そこでこれらの問題を克服するため、個別に発現・精製した組み換え RP を用いたリボソームの試験管内再構成が試みられている。この手法による 30S サブユニットの再構成は 1999 年に達成されており (Culver *et al.*, *RNA*, 1999)、この系に生合成因子を加えることで、生理的な温度・塩濃度条件で組み立てを進行させることも可能となっている (Maki *et al.*, *Methods*, 2005, Tamaru *et al.*, *RNA*, 2018)。

一方 50S サブユニットについては、組み換え RP 31 種類 (L1-L34) の個別精製に関する報告 (Semrad *et al.*, *RNA*, 2004) があるものの、組み換え RP による 50S サブユニットの再構成には至っていない。その原因として、私は Semrad らの精製した組み換え RP の純度に問題があったのではないかと推測する。Culver らの論文においては精製組み換え RP のゲル写真に多数の夾雑物が残っており、Culver と類似の手法で精製を行った Semrad らの論文においては組み換え RP のゲル写真が存在しない。尚且つ「RNase 活性が有意に残っている RP はバッファー条件を変えて 2 度目のカラム精製を行った」という記述があり、組み換え RP の純度が低かったことを示唆する。更に、Tamaru らの行った 30S サブユニットの試験管内再構成においては、組み換え RP の純度向上が 30S サブユニットの組み立ての成否に影響している (Data not shown)。以上より、50S サブユニットについても高純度の RP を個別調製する手法を確立できれば、組み換え RP による試験管内再構成、そして網羅的な変異体の作製と解析が可能なのではないかと考えられる。

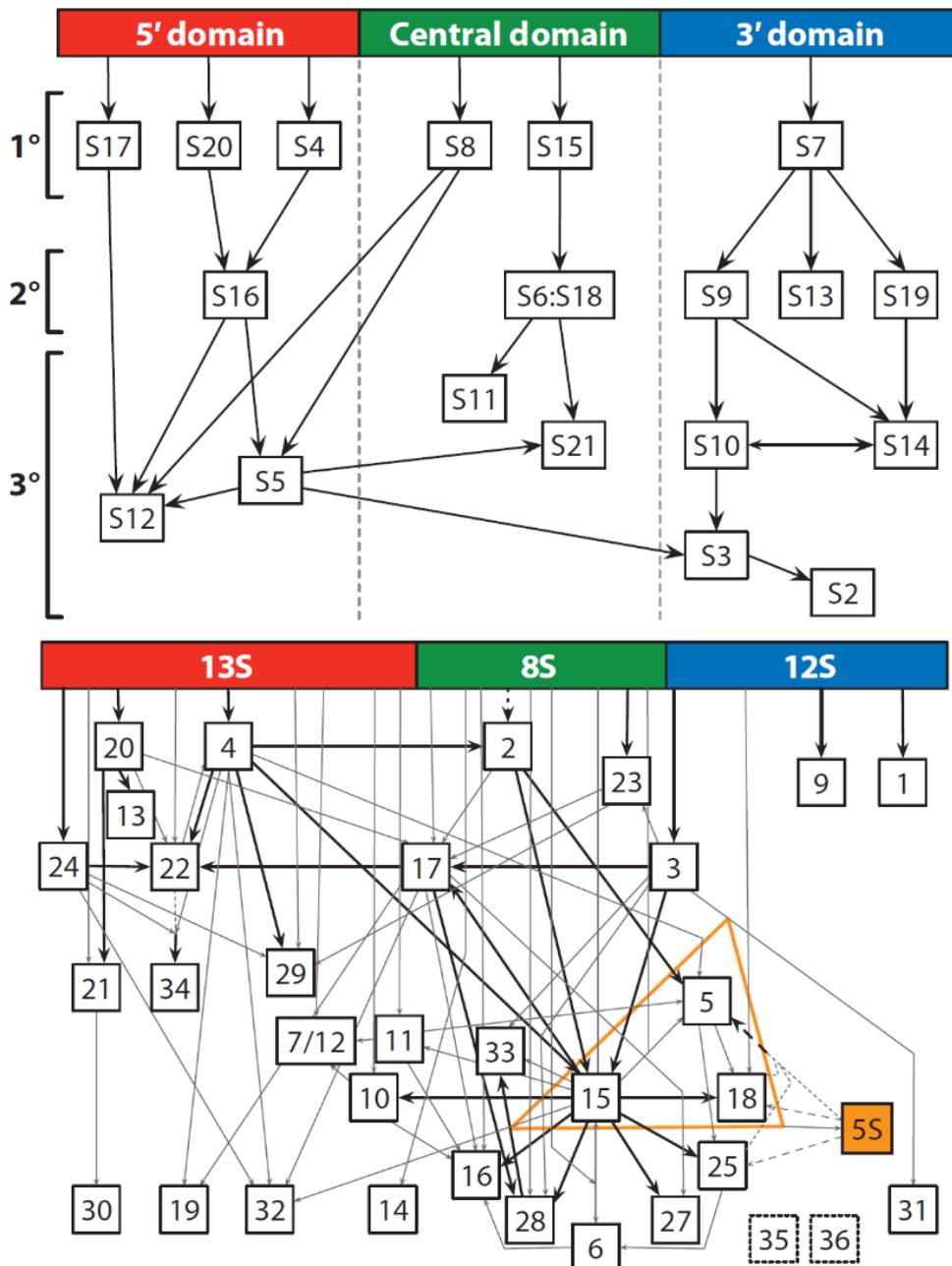


図 1-2 大腸菌 30S リボソームサブユニット (上) と 50S サブユニット (下) のアセンブリマップ (図は Shajani *et al.*, *Annu. Rev. Biochem.*, 2011 より引用)

矢印の先端のタンパク質の結合には根元のタンパク質 (又は 16S, 23S rRNA) を必要とすることを表す。細い矢印は、根元のタンパク質の存在によって先端のタンパク質が微量に (弱く) 結合することを示す。30S サブユニットのリボソームタンパク質は 16S rRNA への大まかな結合の順序によってグループ 1-3 (1°-3°) に類型化される。50S サブユニットのアセンブリマップにおいては、タンパク質名の "L" を省略している。また、橙色の枠内のタンパク質の結合は 5S rRNA に依存する。

1.3 リボソームの機能改変

前節では、リボソームの構造や生合成過程を理解することを主な目的とした先行研究について述べた。これらの研究が目指す再構成リボソームの性状は、生体内と同等のものである。一方、本節で述べるようにリボソームの工学的、合成生物学的な利用を主眼とした先行研究も存在する。これらの中にはリボソームの試験管内再構成に関わる研究も含まれるが、生体内におけるリボソームと同等のものを必ずしも最終的な目標としていない点で前節の先行研究とは異なる。

リボソームを用いたタンパク質合成において用いることの出来るアミノ酸は、通常は普遍遺伝暗号表に書かれた約 20 種類のアミノ酸 (天然アミノ酸) に限られる。これは、アミノ酸をリボソームに運ぶ役割を担う転移 RNA (tRNA) やリボソームのペプチド転移中心が、不適切な化学構造の化学種を通常は認識しないためである。しかしリボソームの基質特異性はあまり高くなく、非天然アミノ酸が低効率ながら重合される例が数多く存在する。ここで、重合されやすさはリボソーム内部へ入った時にリボソームと立体障害を起こしにくい化学構造を持つかどうか大きく依存し (Hohsaka *et al.*, *FEBS Lett.*, 1993)、必ずしも α -アミノ酸でなくてもよい。例えば、tRNA に結合したフェニルアラニンのアミノ基を亜硝酸によって脱アミノ化しヒドロキシ基に変えることにより、リボソームによる短鎖ポリエステルの合成が可能であり (Fahnestock *et al.*, *Science*, 1971)、他にも β -アミノ酸などを含むタンパク質合成も可能である (Ellman *et al.*, *Science*, 1992)。このような非天然アミノ酸を含むポリマーの合成効率率はリボソームの適切な変異導入によって向上することが示されており (Dedkova *et al.*, *Biochem.*, 2006, Maini *et al.*, *Biochem.*, 2015)、リボソームへの変異導入はより多様なタンパク質の合成において重要だと言える。

また、生体内での選抜によって変異体を取得するのではなく、合理的に設計された改変体も存在する。例えば、16S rRNA のアンチ SD 配列を通常のものと同様な配列にすることで翻訳直交性を持たせたり (Rackham *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, 2005)、16S rRNA と 23S rRNA を繋げることでサブユニットの完全な解離を起こらなくしたり (Orelle *et al.*, *Nature*, 2015) したものがこれに該当する。

以上に述べたリボソーム変異体及び改変体は全て生体内から取得したものである。それゆえ細胞の翻訳系に致命的な影響を及ぼさないリボソームの改変は出来ても、既存のタンパク質合成の枠組みを変えるようリボソームの改変は難しい。またリボソームの多重変異に関する知見も乏しく、合理的なりボソームの設計も容易ではないのが現状である。そこでリボソームの網羅的な改変が容易な系として、リボソームの試験管内再構

成系が用いられつつある。更に無細胞タンパク質合成系とリボソームの再構成を共役することで、非天然アミノ酸を含むタンパク質合成の知見を簡便に利用することも試みられている。

リボソーム工学を志向した再構成系では、構成因子が必ずしも明確である必要が無く、大腸菌 S150 抽出液を用いて改変リボソームを効率的に組み立てる系(iSAT system)が確立されている(Jewett *et al.*, *Mol. Syst. Biol.*, 2013)。この系では大腸菌抽出液中の生合成因子や修飾酵素によって rRNA の塩基修飾導入やフォールディング変化の促進が起こり、且つ rRNA の転写自体も同一の系で行うことが出来る。したがって、rRNA の転写と共役したリボソームの組み立てが可能であり、鋳型となる rDNA の変異導入によって rRNA の変異体も非常に簡便に作製できる。

一方構成因子が明確に定義された系として、大腸菌由来の翻訳因子、アミノ酸、エネルギー類などから成る再構成型のタンパク質合成系(PURE system)(Shimizu *et al.*, *Nat. Biotech.*, 2001)を使用したリボソームの再構成も試みられている(Li *et al.*, *ACS. Syn. Biol.*, 2017, Shimojo *et al.*, *Comm. Biol.*, 2020)。この系でリボソームを再構成出来れば、リボソームのみならず翻訳システム全体の包括的な改変、或いはリボソームの生合成過程の理解や自己複製システムの完全再構成も理論上可能である。しかし、これらの試験管内再構成系においても組み換えタンパク質による 50S サブユニットの組み立てはボトルネックの1つとなっている。iSAT system で 50S サブユニットの再構成に用いられている RP は TP50 であり、このことが因子数で大半を占める RP の網羅的な改変を困難にしている。また PURE system 内における 50S サブユニットの再構成は達成されていない。したがって、組み換えタンパク質による 50S サブユニットの試験管内再構成系の確立は、リボソーム工学的、合成生物学な視点からも意義のあることだと考えられる。

1.4 本研究の目的

このような背景から、本研究ではリボソームの生合成過程の理解と自由なリボソーム改変の両方を実現可能な系の構築を目的とし、組み換えリボソームタンパク質から成る 50S サブユニットの再構成を試みた。具体的には、まず先行研究で問題となっていた精製組み換え RP の純度を高める手法を考案した。そして高純度で個別精製した RP 33 種類と大腸菌内在性の rRNA から、Nierhaus の構築した 2 段階の熱処理による試験管内再構成法(Nierhaus, *Ribosomes and protein synthesis*, 1990) によって 50S サブユニットの再構成を行い、PURE system 内でのタンパク質合成実験によって再構成 50S サブユニットの翻訳活性を評価した。

2. 実験手法

2.1 使用試薬

再構成型無細胞タンパク質合成系(PURE system)は、ジーンフロンティア社の PUREflex[®]2.0 を使用した。タンパク質 ORF の増幅に用いた pSUMO-15b は所属研究室の田丸大知さんから、PURE system 内でのタンパク質合成実験に用いた sfGFP DNA 及び HiBiT DNA は所属研究室の日比敬太さんから、16S rDNA は所属研究室の下條優さんから頂いた。鋳型 DNA の作製に用いた KOD-plus NEO は東洋紡株式会社から購入した。鋳型 DNA の増幅に用いたプライマーは全てユーロフィンジェノミクス株式会社から購入した。ギブソニアセンブリ premix は所属研究室の長田江里子さんから頂いた。リボソームタンパク質 S1-S21 は田丸大知さん及び下條優さんから、LgBiT を発現した菌体及び Ulp1 活性部位を発現した菌体は日比敬太さんから頂いた。その他明記しない試薬は全て和光純薬工業株式会社又はナカライテスク株式会社から購入した。

2.2 プラスミド

大腸菌からのリボソームタンパク質及び LgBiT の発現精製には、pSUMO-15b (pET-15b の thrombin 配列の代わりに SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) が挿入されたプラスミド、図 2-1) の SUMO 配列の直下にリボソームタンパク質の ORF (生体内では翻訳後に開始メチオニンが切断される L1, L2, L5, L6, L7/L12, L10, L11, L20, L24, L26, L27, L28, L30, L32, L33, L35 は第二コドン以降、また L35 の N 末端に位置するプロリンはアラニンに置換) が挿入されたプラスミドを使用した。目的配列の増幅に用いたプライマーの配列は表 2-1, 3 の通りである。目的タンパク質 ORF の挿入には、In fusion HD Enzyme (Takara)を用いた相同組み換えを使用し、目的プラスミドの増幅には所属研究室内で継代、塩化カルシウム処理したコンピテントセル XL-10 Gold (Agilent Technologies)株を使用した。また目的プラスミドの抽出及び精製は、PureLink[®] Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen) を使用した。目的タンパク質 ORF の配列確認には、目的プラスミドを鋳型として BigDye[®] Terminator v3.1 Ready Reaction Mix (Applied Biosystems)による PCR 反応産物を用いた。エタノールで不溶化・洗浄された目的 DNA は、Hi Di Formamide (Applied Biosystems)によって再溶解され、3130xl genetic analyzer (Applied Biosystems)によって配列が確認された。配列確認用のプライマーは表 2-2 の通りである。

プロテアーゼ Ulp1 活性部位 ($\Delta 1-402$)の発現精製には、所属研究室の布施朋重さんから頂いたプラスミドを使用した。

L3-PrmB、L11-PrmA、L12-RimL の共発現及び精製には、pSUMO-15b に当該リボソームタンパク質が挿入されたプラスミドに ORF が挿入されたプラスミドを使用した。具体的には、リボソームタンパク質の終止コドンの下流 16-42 塩基目の配列の代わりに、SD 配列を含む配列(AATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACAT)と修飾酵素の ORF を挿入した。目的配列の増幅に用いたプライマーは表 2-1, 4 の通りである。目的タンパク質 ORF の挿入には、ギブソンアセンブリを用いた相同組み換えを使用し、以降の操作はリボソームタンパク質発現用のプラスミド作製と同様の手順で行った。

表 2-1 pSUMO-15b の配列増幅用プライマー (左端が 5'、以下同じ)

pET15b_SUMO_Fw	CATATGCCCGGGCTC
pET15b_SUMO_Rv	ACCACCAATCTGTTCTCTGTG
pET15b_co-expr_Fw2	CGGATCCGGCTGCTAAC
pET15b_co-expr_Rv1	GAGCCCGGGCATATG

表 2-2 挿入配列確認の DNA シーケンシング用プライマー

T7_promoter_primer_for_pET	GCGAAATTAATACGACTCACTATAGGG
T7_terminator_primer_for_pET	GGTTATGCTAGTTATTGCTCAGCGG
SUMO_seq_203_Fw	TATTAGAATCAAGCTGATCAGACCCC
SrmB_seq_977_Rv	GGCATATCGAAGTTAAAGACGTGG
DeaD_seq_850_Rv	CGCTTAATCCTATGACACCAGCG
DeaD_seq_400_Rv	CAGTTTGTGGCGACCATC
DbpA_seq_1011_Rv	ATTTCTGCACGAGCTGTACG
DbpA_seq_550_Rv	AAAACAGAAGCGTCTGTCGAGATG
RhIE_seq_1070_Rv	AGCAGTTTGTGTTTCATCAACACAC
RhIE_seq_630_Rv	CACTTCGATTTCCAGCGGG
SUMO_seq_152_Fw	CGTTCGCTAAAAGACAGGGTAAGG
L3_seq_290_Fw	GCGTTGAAGTGTGCTGACG
PrmB_seq_50_Fw	AAGACGGCGTTTCTATCCAG
PrmB_seq_507_Fw	GGCGTTGCTGAACAGAAC
L11_seq_291_Fw	GGGTAAAATTTCCCGCGCTC
PrmA_seq_97_Fw	CAGGATACCCACGATACGCCAG
PrmA_seq_507_Fw	CGGCATTCTGGCGATCG
L12_seq_200_Fw	CTGTTATCAAAGCAGTACGTGGCG
RimL_seq_23_Fw	GCGAATCACTTGAATTACATGCTG
RimL_seq_340_Fw	CTGCAGGCATTGATTCATCATTAC

表 2-3 pSUMO-15b への挿入配列増幅用プライマー

遺伝子	タンパク質	Fw プライマー配列	Rv プライマー配列
rplA	L1	GAACAGATTGGTGGTGCCTAACTGACCAAGCGC	GAGCCCGGGCATATGTTAGTTTACAGAAGCGCTCAGG
rplB	L2	GAACAGATTGGTGGTGCAGTTGTTAAATGTAACCG	GAGCCCGGGCATATGTTATTTGCTACGGCGAC
rplC	L3	GAACAGATTGGTGGTATGATTGGTTTAGTCGGTAAAAAG	GAGCCCGGGCATATGTTACGCCTTCACAGCTGG
rplD	L4	GAACAGATTGGTGGTATGAAATTAGTATTGAAAGACGC	GAGCCCGGGCATATGTCATGCCAGCATCTCC
rplE	L5	GAACAGATTGGTGGTGCAGAACTGCATGATTACTACAAAG	GAGCCCGGGCATATGTTACTTGCAGAACGGGAAG
rplF	L6	GAACAGATTGGTGGTTCTCGTGTGCTAAAGCAC	GAGCCCGGGCATATGTTACTTCTTCTTAGCCTCTTTGG
rplI	L9	GAACAGATTGGTGGTATGCAAGTTATTCTGCTTG	GAGCCCGGGCATATGTTATTCAGCTACTACGTTTACG
rplJ	L10	GAACAGATTGGTGGTGTCTTAAATCTTCAAGACAACAAGC	GAGCCCGGGCATATGTTAAGCAGCTTCTTTCGCATC
rplK	L11	GAACAGATTGGTGGTGCCTAAGAAAGTACAAGCCTATG	GAGCCCGGGCATATGTTAGTCTCCACTACCAGG
rplL	L12	GAACAGATTGGTGGTTCTATCACTAAAGATCAAATCATTG	GAGCCCGGGCATATGTTATTTAACTTCAACTTCAGCG
rplM	L13	GAACAGATTGGTGGTATGAAAACTTTTACAGCTAAACC	GAGCCCGGGCATATGTTAGATGTCAGAAGCTTGC
rplN	L14	GAACAGATTGGTGGTATGATCCAAGAAGACTATGC	GAGCCCGGGCATATGTTAGAGTACTTCTGGTGCCAG
rplO	L15	GAACAGATTGGTGGTATGCGTTTAAATACTCTGTCTCC	GAGCCCGGGCATATGTTATTCCTCGATTTTACC
rplP	L16	GAACAGATTGGTGGTATGTTACAACCAAAGCGTAC	GAGCCCGGGCATATGTTACATCACCGTCTTAGTTACA
rplQ	L17	GAACAGATTGGTGGTATGCGCCATCGTAAG	GAGCCCGGGCATATGTTACTCTGCAGCAGCTTC
rplR	L18	GAACAGATTGGTGGTATGATAAAGAAATCTGCTCG	GAGCCCGGGCATATGTTAGAAGTGAAGCCAGC
rplS	L19	GAACAGATTGGTGGTATGAGCAACATTATTAAGCAACTTG	GAGCCCGGGCATATGTTAGTTAAGACGCTCTTGTATACGAG
rplT	L20	GAACAGATTGGTGGTGCCTCGCTGAAAAAGCTG	GAGCCCGGGCATATGTTATGCCAGAGCTGCTTTC
rplU	L21	GAACAGATTGGTGGTATGTACGCGGTTTTCCAAAG	GAGCCCGGGCATATGTTAGCGCTGATGCCAG
rplV	L22	GAACAGATTGGTGGTATGAAACTATCGCTAAACATC	GAGCCCGGGCATATGTCAGCGATCGGACAC
rplW	L23	GAACAGATTGGTGGTATGATTCGTGAAGAACGTCTG	GAGCCCGGGCATATGTTACTCAGCGCCGCC
rplX	L24	GAACAGATTGGTGGTGCAGCGAAAAATCCG	GAGCCCGGGCATATGTTACTTGATAGTTTTCGCTGTTAG
rplY	L25	GAACAGATTGGTGGTATGTTTACTATCAACGCAGAAGTAC	GAGCCCGGGCATATGTTAAGCGCAACGAAG
rplZ	L26	GAACAGATTGGTGGTGCCTAATATCAAATCAGCTAAGAAGC	GAGCCCGGGCATATGTTAAGCCAGTTTGTGATCTG
rpmA	L27	GAACAGATTGGTGGTGCACATAAAAAGGCTGGC	GAGCCCGGGCATATGTTATTCAGCTTCGATGCTG
rpmB	L28	GAACAGATTGGTGGTTCCCGAGTCTGCCAAG	GAGCCCGGGCATATGTTAGTACTTTTCGCCACGG
rpmC	L29	GAACAGATTGGTGGTATGAAAGCAAAGAGCTGCG	GAGCCCGGGCATATGTTACGCACCCGCCTTC
rpmD	L30	GAACAGATTGGTGGTGCAAAAGACTATTAATAACTCAAAC	GAGCCCGGGCATATGTTACTCCTCAACTTTAACCATG
rpmE	L31	GAACAGATTGGTGGTATGAAAAAGATATTCACCCG	GAGCCCGGGCATATGTTATTTGCTGCCCGG
rpmF	L32	GAACAGATTGGTGGTGCCTACAACAGAATAAAC	GAGCCCGGGCATATGTTACTTAGCGATGACCTTG
rpmG	L33	GAACAGATTGGTGGTGCCTAAAGTATTCGTGAGAAAATC	GAGCCCGGGCATATGTTATTTGATTTTCGCTTCTTTG
rpmH	L34	GAACAGATTGGTGGTATGAAACGCACTTTTCAAC	GAGCCCGGGCATATGTTACTTAGAAAACGGTCAGACG
rpmI	L35	GAACAGATTGGTGGTCCAAAAATTAAGACCGTACG	GAGCCCGGGCATATGTTATGCGTACGGCAGG
rpmJ	L36	GAACAGATTGGTGGTATGAAAGTTCGTGCTTCCG	GAGCCCGGGCATATGTCAGCCTTGGCGCTG
srmB	SrmB	GAACAGATTGGTGGTATGACTGTAACGACTTTTCCG	GAGCCCGGGCATATGTTACTTCTGTGCTTTGCG
deaD	DeaD	GAACAGATTGGTGGTATGAACGTTTTTAAATCCCGC	GAGCCCGGGCATATGTTAATCCACCAATAAATCCAGC
dbpA	DbpA	GAACAGATTGGTGGTACCGCTTTTCTACCCCTG	GAGCCCGGGCATATGTTATTTTAAATCCGACCC
rhIE	RhIE	GAACAGATTGGTGGTCTTTCGATTCTTTGGGTTAAGC	GAGCCCGGGCATATGTTACTGCGCAGCGGC

表 2-4 pSUMO-15b-ribosomal protein への挿入配列増幅用プライマー

遺伝子	修飾対象	Fw プライマー配列	Rv プライマー配列
prmB	L3	CATATGCCCGGGCTCAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACAT GTGGATAAAATTTTCGTTGATG	TTAGCAGCCGGATCCGTTAATCTTTATAAATCGCGAAATG
prmA	L11	CATATGCCCGGGCTCAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACAT ATGCCTTGATCCAACCTG	TTAGCAGCCGGATCCGTTAATCTTACGACCGGTAATACG
rhlE	L12	CATATGCCCGGGCTCAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACAT ATGACTGAAACGATAAAAGTAAGCG	TTAGCAGCCGGATCCGTTATTGTGAATCGATAATACGCG

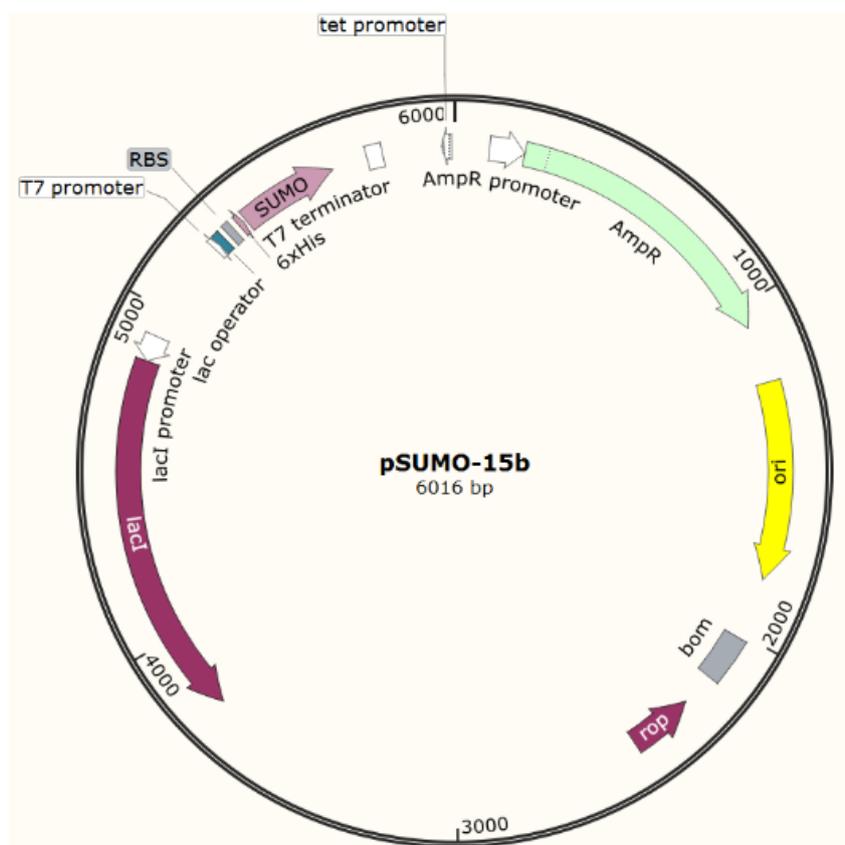


図 2-1 pSUMO-15b のベクターマップ

2.3 タンパク質の精製

2.3.1 タンパク質精製に用いたバッファー等

- ・プラスチック容器類

200 μ L チューブ (8-Strip of 0.2 mL Thin Wall PCR[®] Tubes (Quality Scientific

Plastics))

1.5 mL チューブ (Easy Fit 1.5 mL 丸底チューブ (Treff Lab))

1.5 mL 低吸着チューブ (Protein LoBind Tubes (Eppendorf))又は 1.5 mL SnapLock Microtube, Non-Sterile, MaxyClear, Maximum Recovery (Axigen))

15 mL チューブ (STAR 50 mL Centrifuge Tube (Rikaken))

35 mL チューブ (V 底遠沈管 35mL PPCO (TGK))

50 mL チューブ (STAR 50 mL Centrifuge Tube (Rikaken))

Type 45Ti Rotor 用チューブ (PC ボトル (Beckman Coulter))

1 L ボトル (PP 1 L ボトル (Beckman))

試験管 (Reagenzröhrchen PS 12 mL, 16×100 mm (nerbe plus))

96 穴プレート (96F Untreated/Not Sterile Straight W/O Lid (Thermo Scientific))

滅菌プラスチックシャーレ (SH 90-15 (IWAKI))

1, 2.5, 5, 10, 20, 50 mL シリンジ (Terumo)

エコノパックカラム (BIO-RAD)

- アンピシリン

100 mg/mL アンピシリンナトリウム塩 (ナカライテスク) を水に溶解した。

- クロラムフェニコール

25 mg/mL クロラムフェニコールを EtOH に溶解した。

- LB 培地

0.5% (w/v) Bacto Yeast Extract (BD)、1.0% (w/v) Bacto Tryptone (BD)、1.0% (w/v) NaCl を脱イオン水に溶解した。

- LB/Amp100 プレート、LB/Amp100Cm25 プレート

LB 培地に 7.5% (w/v) Agar (岩井化学又は松栄寒天) を加えオートクレーブし、適度に冷却したところで上記の抗生物質を 0.1% (v/v) 加え、滅菌プラスチックシャーレに 10 - 20 mL 程度流した。

- IPTG

100 mM イソプロピル- β -チオガラクトピラノシドを水に溶解した。

- 透析膜

Dialysis Tubing 3.5 kD MWCO (Spectora/Por)

Biotech CE Tubing 500 - 1000 D MWCO (Spectora/Por) (L20、L29-L36 の精製に使用)

Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Device 2000 MWCO (Thermo Scientific) (濃縮後、回収

量が少ない場合に使用)

Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette 2000 MWCO または 3500 MWCO (Thermo Scientific) (濃縮後に使用)

- HT Buffer

50 mM Tris-HCl (pH 7.6 at 4°C)、10 mM MgCl₂、100 mM KCl、7 mM β-ME (使用直前に添加)

- A Buffer

50 mM Tris-HCl (pH 7.6 at 4°C)、10 mM MgCl₂、1 M NH₄Cl、7 mM β-ME (使用直前に添加)

- B Buffer

50 mM Tris-HCl (pH 7.6 at 4°C)、10 mM MgCl₂、400 mM KCl、500 mM Imidazole-HCl (pH 7.6 at 4°C)、7 mM β-ME (使用直前に添加)

- C Buffer

50 mM Tris-HCl (pH 7.6 at 4°C)、20 mM MgCl₂、400 mM KCl、2 M Urea、7 mM β-ME (使用直前に添加)

- D Buffer

50 mM Tris-HCl (pH 7.6 at 4°C)、20 mM MgCl₂、400 mM KCl、2 M Urea、500 mM Imidazole - HCl (pH 7.6 at 4°C)、7 mM β-ME (使用直前に添加)

- E Buffer

50 mM Tris-HCl (pH 7.6 at 4°C)、10 mM MgCl₂、20 mM KCl、2 M Urea、7 mM β-ME (使用直前に添加)

- LSE Buffer

20 mM Tris-HCl (pH 7.6 at 4°C)、5 mM MgCl₂、20 mM KCl、2 M Urea、7 mM β-ME (使用直前に添加)

- Q Buffer

20 mM Hepes-KOH (pH 8.0 at 25°C)、5 mM MgCl₂、20 mM KCl、2 M Urea、7 mM β-ME (使用直前に添加)

- R Buffer

50 mM Tris-HCl (pH 7.6 at 4°C)、20 mM MgCl₂、400 mM KCl、7 mM β-ME (使用直前に添加)

- F Buffer

50 mM Tris-HCl (pH 7.6 at 4°C)、10 mM MgCl₂、1 M KCl、2 M Urea、7 mM β-

ME (使用直前に添加)

• P Buffer

20 mM Hepes-KOH (pH 7.6 at 25°C)、100 mM KCl、7 mM β -ME (使用直前に添加)、30% (v/v)グリセロール

• S Buffer

50 mM Tris-HCl (pH 7.6 at 4°C)、10 mM $MgCl_2$ 、1 M KCl、7 mM β -ME (使用直前に添加)、30% (v/v)グリセロール

• T Buffer

50 mM Tris-HCl (pH 7.6 at 4°C)、10 mM $MgCl_2$ 、400 mM KCl、3 M グアニジン塩酸塩、7 mM β -ME (使用直前に添加)、30% (v/v)グリセロール

本節におけるバッファー名は "a M X bYcG Buffer" のような形で表記することがある。これは Y Buffer (Y は任意のバッファーの名称) の組成の一部が異なる派生形のバッファーであり、化合物 X の濃度が a M、尿素濃度が b M、グリセロール濃度が c% (v/v)に変更されたバッファーを指す。また、カラム精製における平衡化バッファー Z と溶出バッファー W の(100-a):a 混合液は、Z の割合を省略した "a% W Buffer" の形で表記する。Ni-NTA agarose (Qiagen)又は cOmplete His-Tag Purification Resin (Roche) によるカラム精製に用いたバッファーは、 β -ME (2-メルカプトエタノール) の濃度を 3.5 mM とした。

タンパク質溶液に直接触れるバッファーは全てフィルター(MF Membrane Filters 0.45 μ m HA (Merck Millipore))を通し、高速液体クロマトグラフィーの移動相として用いる場合は更に脱気をしてから使用した。

透析において、外液の体積は内液の 20–500 倍程度であり、特に記述の無い限り外液の交換はしていない。

2.3.2 タンパク質の発現

所属研究室内で継代、塩化カルシウム処理したコンピテントセル Rosetta (DE3) pLysS 株に目的プラスミドを熱処理によって導入した。これを LB/Amp100Cm25 プレートに植菌し 37°C で一晩静置した。十分に大きくなった単一コロニーから菌体を爪楊枝で採取し、100 μ g/mL アンピシリンナトリウム塩、25 μ g/mL クロラムフェニコールを含む LB 培地 25 mL に加え、37°C で一晩振盪培養した。培養液 10 mL を 2 L 羽根付き三角フラスコに入った同一組成の培地 1 L に加え、更に 37°C で 2–3 h 程度振盪培養

した。OD₆₀₀ が 0.3–1.0 程度の時に IPTG を終濃度 0.1 mM (L33 発現時は 0.25 mM、L3、L5、L10、L16、L35 発現時は 0.5 mM) 加え、37°C で 3–4 h 程度 (L10、L35 発現時は 3 h 未満) 振盪培養を続けた。培養液は遠心処理をした後上清を捨て、菌体は 0 mM β-ME HT Buffer によって一回洗浄した。遠心した上清を捨て、菌体は液体窒素で急冷し、−70°C 以下で保存した。

2.3.3 プロテアーゼ Ulp1 活性部位の精製

Ulp1 活性部位(Δ1–402)の精製は、Malakhov らの手法(Malakhov *et al.*, *J. Struct. Funct. Genomics*, 2004)を用いた。

2.3.4 リボソームタンパク質 L1 の精製

菌体湿重量 1 g に対し 10–20 mL 程度の A Buffer で懸濁した菌体を、金属ビーカーに移した。氷上に置かれた懸濁液は、Digital Sonifier 450 (BRANSON)を用いて 2 sec の超音波出力と 8 sec の休止を繰り返しながら、約 100 W 以下の出力で十分な時間破碎した。得られた大腸菌抽出液を 35 mL 遠沈管に移して 20000 × g、4°C で 45 min 遠心し、上清をシリンジに入れて Millex®-HV Filter Unit Low Protein Binding Durapore® (PVDF) Membrane 0.45 μm (Merck Millipore)を通した。

このタンパク質溶液はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって粗精製した。タンパク質溶液に 2–5%(v/v)程度の溶出バッファーを加えた後、十分量の A Buffer で平衡化した Ni-NTA agarose 6–8 mL 程度を加えた。4°C で 5 min 転倒混和した後、カラム 1 本あたり単体の体積が 2 mL 以下になるように溶液ごとエコノパック®カラム(BIO-RAD)に充填した。目的タンパク質は 50 CV(column volume)の 2% B Buffer と 0.50 CV の 60% B Buffer で洗浄した後、1.25 CV の 60% B Buffer で 4 回溶出した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。回収画分にはプロテアーゼ Ulp1 活性部位を 1/2000–1/500 体積程度加えた後、A Buffer で一晩透析した。

切断された 6×His tag-SUMO はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって除去された。2 本のエコノパック®カラム(BIO-RAD)に 2 mL ずつの担体を充填し、1 本目は 10 CV の 5% B Buffer で、2 本目は A Buffer で平衡化した。次に Ulp1 処理したタンパク質溶液を 1 本目のカラムに加え素通り画分を回収し、更に 3 CV の 5% B Buffer、3 CV の B Buffer で溶出を行った。素通り画分と 5% B

Buffer 画分を混合し 2 本目のカラムに加え、素通り画分を回収した。次に 2 CV の 2 % B Buffer で 2 回、3 CV の 5% B Buffer で 1 回、3 CV の B Buffer で 1 回溶出した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。

回収画分は E5G Buffer で約 3 h 以上透析し、Hi Trap Q (GE)及び Hi Trap SP (GE) による精製を行った。Hi Trap Q 5 mL と Hi Trap SP 5 mL をこの順に直列につなぎ、十分量の E5G Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。更に E5G Buffer を約 0.7 CV 以上流した後、Hi Trap Q のみを外した。目的タンパク質は E5G Buffer から F5G Buffer のグラジエントによって溶出し、1 mL ずつ分画して回収した。そして 15% SDS-PAGE によって、高い精製度の目的タンパク質が存在する画分 (L1 のピークの後ろ 1/3 程度) を決定、回収した。

精製タンパク質は Amicon® Ultra centrifugal filter units MWCO 10 kDa (Merck Millipore)を用いた限外濾過によって濃縮した。そして 1F5G Buffer、0F10G Buffer、S Buffer の順にそれぞれ約 3 h 以上ずつ透析を行った。精製タンパク質に沈殿を視認できた場合は 20000×g、4°C で 10 min 遠心し、上清のみを回収した。精製タンパク質の濃度はブラッドフォード法によって測定し、適当に分注した後液体窒素で急冷し、-70°C 以下で保存した。

2.3.5 リボソームタンパク質 L2 の精製

菌体湿重量 1 g に対し 10–20 mL 程度の A Buffer で懸濁した菌体を、金属ビーカーに移した。氷上に置かれた懸濁液は、Digital Sonifier 450 (BRANSON)を用いて 2 sec の超音波出力と 8 sec の休止を繰り返しながら、約 100 W 以下の出力で十分な時間破碎した。得られた大腸菌抽出液を 35 mL 遠沈管に移して 20000×g、4°C で 45 min 遠心し、上清をシリンジに入れて Millex®-HV Filter Unit Low Protein Binding Durapore® (PVDF) Membrane 0.45 µm (Merck Millipore)を通した。

このタンパク質溶液はニッケルカラム His Trap HP (GE)を用いたアフィニティ精製によって粗精製した。His Trap HP 5 mL を十分量の A Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。9.75 CV (column volume)の 5% B Buffer (イミダゾール 25 mM) でカラムを洗浄し、5–60% B Buffer (イミダゾール 25–300 mM)、50 mL 程度のグラジエントで流速 1 mL/min で溶出し、1 mL ずつ分画して回収した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収

した。回収画分にはプロテアーゼ Ulp1 活性部位を 1/2000–1/500 体積程度加えた後、A Buffer で一晩透析した。

切断された 6×His tag-SUMO はニッケルカラム His Trap HP (GE)を用いたアフィニティ精製によって除去された。His Trap HP 5 mL を十分量の A Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラープ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。0–40% B Buffer (イミダゾール 25–200 mM)、40 mL 以上のグラジエントで溶出を行い、1 mL ずつ分画して回収した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分 (グラジエント溶出中に現れる 2 つの 280 nm のピークのうち、先に現れる方)を決定、回収した。

回収画分は 150 mM KCl R Buffer で約 3 h 以上透析し、MONOS S 4.6/100 PE (GE)による精製を行った。MONOS を十分量の 150 mM KCl R Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラープ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 0.5 mL/min でカラムに投入した。目的タンパク質は 150 mM KCl R Buffer から 60% 1 M KCl R Buffer の 15 CV 以上のグラジエントによって溶出し、1 mL ずつ分画して回収した。そして 15% SDS-PAGE によって、高い精製度の目的タンパク質が存在する画分 (75 kDa 付近のバンドは無視した)を決定、回収した。

精製タンパク質は Amicon® Ultra centrifugal filter units MWCO 10 kDa (Merck Millipore)を用いた限外濾過によって濃縮した。ここで、S Buffer 置換後の濃度がおおよそ 50 g/L を超えないように注意した。そして 0F Buffer、0F10G Buffer、S Buffer の順にそれぞれ約 3 h 以上ずつ透析を行った。精製タンパク質に沈殿を視認できた場合は 20000×g、4°C で 10 min 遠心し、上清のみを回収した。精製タンパク質の濃度はブラッドフォード法によって測定し、適当に分注した後液体窒素で急冷し、−70°C 以下で保存した。

2.3.6 リボソームタンパク質 L3 の精製

菌体湿重量 1 g に対し 10–20 mL 程度の C Buffer で懸濁した菌体を、金属ビーカーに移した。氷上に置かれた懸濁液は、Digital Sonifier 450 (BRANSON)を用いて 2 sec の超音波出力と 8 sec の休止を繰り返しながら、約 100 W 以下の出力で十分な時間破碎した。得られた大腸菌抽出液を 35 mL 遠沈管に移して 20000×g、4°C で 45 min 遠心し、上清をシリンジに入れて Millex®-HV Filter Unit Low Protein Binding Durapore® (PVDF) Membrane 0.45 µm (Merck Millipore)を通した。ここで、シリンジを押す手に異常な手応えを感じたため、尿素を粉で 2 M (タンパク質溶液 9.1 mL に対し尿素 1.2

g) 追加した。

このタンパク質溶液はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって粗精製した。タンパク質溶液に 2-5%(v/v)程度の 4D Buffer を加えた後、十分量の 4C Buffer で平衡化した Ni-NTA agarose 6-8 mL 程度を加えた。4°C で 5 min 転倒混和した後、カラム 1 本あたり単体の体積が 2 mL 以下になるように溶液ごとエコノパック®カラム(BIO-RAD)に充填した。目的タンパク質は 50 CV(column volume)の 2% 4D Buffer と 0.50 CV の 60% 4D Buffer で洗浄した後、1.25 CV の 60% 4D Buffer で 4 回溶出した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。回収画分にはプロテアーゼ Ulp1 活性部位を 1/2000-1/500 体積程度加えた後、C Buffer で一晩、続いて 4C Buffer で約 3 h 以上透析した。

切断された 6×His tag-SUMO はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって除去された。2 本のエコノパック®カラム(BIO-RAD)に 2 mL ずつの担体を充填し、1 本目は 10 CV の 5% 4D Buffer で、2 本目は 4C Buffer で平衡化した。次に Ulp1 処理したタンパク質溶液を 1 本目のカラムに加え素通り画分を回収し、更に 3 CV の 5% 4D Buffer、3 CV の 4D Buffer で溶出を行った。素通り画分と 5% 4D Buffer 画分を混合し 2 本目のカラムに加え、素通り画分を回収した。次に 2 CV の 2% 4D Buffer で 2 回、3 CV の 5% 4D Buffer で 1 回、3 CV の 4D Buffer で 1 回溶出した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。

回収画分は 4E5G Buffer で約 3 h 以上透析し、Hi Trap Q (GE)及び Hi Trap SP (GE)による精製を行った。Hi Trap Q 5 mL と Hi Trap SP 5 mL をこの順に直列につなぎ、十分量の 4E5G Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。更に 4E5G Buffer を約 0.7 CV 以上流した後、Hi Trap Q のみを外した。目的タンパク質は 4E5G Buffer から 4F5G Buffer のグラジエントによって溶出し(すぐに溶出する)、1 mL ずつ分画して回収した。そして 15% SDS-PAGE によって、高い精製度の目的タンパク質が存在する画分を決定、回収した。

精製タンパク質は Amicon® Ultra centrifugal filter units MWCO 3 kDa (Merck Millipore)を用いた限外濾過によって濃縮した。そして F5G Buffer、1F5G Buffer、0F10G Buffer、S Buffer の順にそれぞれ約 3 h 以上ずつ透析を行った。精製タンパク質に沈殿を視認できた場合は 20000×g、4°C で 10 min 遠心し、上清のみを回収した。精製タンパク質の濃度はブラッドフォード法によって測定し、適当に分注した後液体窒素で急冷

し、 -70°C 以下で保存した。

2.3.7 リボソームタンパク質 L4 の精製

菌体湿重量 1 g に対し 10–20 mL 程度の 4C Buffer で懸濁した菌体を、金属ビーカーに移した。氷上に置かれた懸濁液は、Digital Sonifier 450 (BRANSON)を用いて 2 sec の超音波出力と 8 sec の休止を繰り返しながら、約 100 W 以下の出力で十分な時間破碎した。得られた大腸菌抽出液を 35 mL 遠沈管に移して $20000\times g$ 、 4°C で 45 min 遠心し、上清をシリンジに入れて Millex[®]-HV Filter Unit Low Protein Binding Durapore[®] (PVDF) Membrane $0.45\ \mu\text{m}$ (Merck Millipore)を通した。

このタンパク質溶液はニッケルカラム His Trap HP (GE)を用いたアフィニティ精製によって粗精製した。His Trap HP 5 mL を十分量の 4C Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラープ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。9.75 CV (column volume)の 5% 4D Buffer (イミダゾール 25 mM) でカラムを洗浄し、5–60% 4D Buffer (イミダゾール 25–300 mM)、50 mL 程度のグラジエントで流速 1 mL/min で溶出し、1 mL ずつ分画して回収した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。回収画分にはプロテアーゼ Ulp1 活性部位を 1/2000–1/500 体積程度加えた後、C Buffer で一晩、続いて 4C Buffer で約 3 h 以上透析した。

切断された $6\times$ His tag-SUMO はニッケルカラム His Trap HP (GE)を用いたアフィニティ精製によって除去された。His Trap HP 5 mL を十分量の 4C Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラープ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。素通り画分に続いて流速 1 mL/min で十分量の 5% 4D Buffer (イミダゾール 25 mM) を流し、これらを 1 mL ずつ試験管に分画した。続いて 5–40% 4D Buffer (イミダゾール 25–200 mM)、30 mL 以上のグラジエントで溶出を行った。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。

回収画分は 100 mM KCl 4E Buffer で約 3 h 以上透析し、MONOS S 4.6/100 PE (GE)による精製を行った。MONOS を十分量の 100 mM KCl 4E Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラープ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 0.5 mL/min でカラムに投入した。目的タンパク質は 100 mM KCl 4E Buffer から 60% 4F Buffer の 15 CV 以上のグラジエントによって溶出し、1 mL ずつ分画して回収した。そして 15% SDS-PAGE によって、高い精製度の目的タンパク質が存

在する画分を決定、回収した。

精製タンパク質は Amicon® Ultra centrifugal filter units MWCO 3 kDa (Merck Millipore)を用いた限外濾過によって濃縮した。そして F Buffer、1F Buffer、0F10G Buffer、S Buffer の順にそれぞれ約 3 h 以上ずつ透析を行った。精製タンパク質に沈殿を視認できた場合は 20000×g、4°C で 10 min 遠心し、上清のみを回収した。精製タンパク質の濃度はブラッドフォード法によって測定し、適当に分注した後液体窒素で急冷し、-70°C 以下で保存した。

2.3.8 リボソームタンパク質 L5 の精製

菌体湿重量 1 g に対し 10–20 mL 程度の A Buffer で懸濁した菌体を、金属ビーカーに移した。氷上に置かれた懸濁液は、Digital Sonifier 450 (BRANSON)を用いて 2 sec の超音波出力と 8 sec の休止を繰り返しながら、約 100 W 以下の出力で十分な時間破碎した。得られた大腸菌抽出液を 35 mL 遠沈管に移して 20000×g、4°C で 45 min 遠心し、沈殿に 4%(v/v)Triton X-100 を含む A Buffer を 25 mL 加え、スパチュラやボルテクスなどによって沈殿を完全に懸濁した後、120 rpm、4°C で 30 min 振盪した。懸濁液を 7000×g、4°C で 30 min 遠心し、上清を捨てた。この沈殿を洗浄する操作を 5 回繰り返した。但し、3 回目は A Buffer、4 回目は C Buffer で懸濁した。5 回目は 8C Buffer で懸濁した後、振盪する代わりに 4°C で一晩穏やかに転倒混和し、遠心した上清は 6C Buffer で約 3 h 以上透析し、シリンジに入れて Millex®-HV Filter Unit Low Protein Binding Durapore® (PVDF) Membrane 0.45 µm (Merck Millipore)を通した。

このタンパク質溶液はニッケルカラム His Trap HP (GE)を用いたアフィニティ精製によって粗精製した。His Trap HP 5 mL を十分量の 4C Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラープ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。9.75 CV (column volume)の 5% 4D Buffer (イミダゾール 25 mM) でカラムを洗浄し、5–60% 4D Buffer (イミダゾール 25–300 mM)、50 mL 程度のグラジエントで流速 1 mL/min で溶出し、1 mL ずつ分画して回収した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。

回収画分は 4C Buffer で一晩透析し、再度ニッケルカラム His Trap HP (GE)による精製を同様の手順で行った。但し平衡化には 6C Buffer、溶出には 6D Buffer を用いた。回収画分を 4C Buffer で約 3 h 以上、続いて C Buffer で 30 min 透析した後に、プロテアーゼ Ulp1 活性部位を 1/1000–1/500 体積程度加え、SUMO が十分に切断され且つ目

的タンパク質の凝集が進行しない程度の時間（約 6 h 程度）透析を続けた。その後更に 6C Buffer で約 3 h 以上透析した。

切断された 6×His tag-SUMO はニッケルカラム His Trap HP (GE)を用いたアフィニティ精製によって除去された。His Trap HP 5 mL を十分量の 6C Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラープ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。素通り画分に続いて流速 1 mL/min で十分量の 5% 6D Buffer (イミダゾール 25 mM) を流し、これらを 1 mL ずつ試験管に分画した。続いて 5–40% 6D Buffer (イミダゾール 25–200 mM)、30 mL 以上のグラジエントで溶出を行った。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。

回収画分は 6LSE Buffer で約 3 h 以上透析し、更に外液を一度交換し内液の完全な置換を行い、又は透析後のタンパク質溶液を十分量の 6LSE Buffer で希釈し、MONOS S 4.6/100 PE (GE)による精製を行った。MONOS を十分量の 6LSE Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラープ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 0.5 mL/min でカラムに投入した。目的タンパク質は 6LSE Buffer から 20% 6F Buffer の 15 CV 以上のグラジエントによって溶出し（すぐに溶出する）、1 mL ずつ分画して回収した。そして 15% SDS-PAGE によって、高い精製度の目的タンパク質が存在する画分を決定、回収した。回収画分の選定にあたっては、S Buffer 置換後のタンパク質濃度が約 3 g/L を決して超えないよう注意し、必要に応じて 6F Buffer で希釈した。そして 8F Buffer、4F Buffer、F Buffer、1F Buffer、0F10G Buffer、S Buffer の順にそれぞれ約 3 h 以上ずつ透析を行った。精製タンパク質に沈殿を視認できた場合は 20000×g、4°C で 10 min 遠心し、上清のみを回収した。精製タンパク質の濃度はブラッドフォード法によって測定し、適当に分注した後液体窒素で急冷し、-70°C 以下で保存した。

2.3.9 リボソームタンパク質 L6 の精製

菌体湿重量 1 g に対し 10–20 mL 程度の A Buffer で懸濁した菌体を、金属ビーカーに移した。氷上に置かれた懸濁液は、Digital Sonifier 450 (BRANSON)を用いて 2 sec の超音波出力と 8 sec の休止を繰り返しながら、約 100 W 以下の出力で十分な時間破碎した。得られた大腸菌抽出液を 35 mL 遠沈管に移して 20000×g、4°C で 45 min 遠心し、上清をシリンジに入れて Millex®-HV Filter Unit Low Protein Binding Durapore® (PVDF) Membrane 0.45 µm (Merck Millipore)を通した。

このタンパク質溶液はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって粗精製した。タンパク質溶液に 2-5%(v/v)程度の B Buffer を加えた後、十分量の A Buffer で平衡化した Ni-NTA agarose 6-8 mL 程度を加えた。4°C で 5 min 転倒混和した後、カラム 1 本あたり単体の体積が 2 mL 以下になるように溶液ごとエコノパック®カラム(BIO-RAD)に充填した。目的タンパク質は 50 CV(column volume)の 2% B Buffer と 0.50 CV の 60% B Buffer で洗浄した後、1.25 CV の 60% B Buffer で 4 回溶出した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。回収画分にはプロテアーゼ Ulp1 活性部位を 1/2000-1/500 体積程度加えた後、A Buffer で一晚透析した。

切断された 6×His tag-SUMO はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって除去された。2 本のエコノパック®カラム(BIO-RAD)に 2 mL ずつの担体を充填し、1 本目は 10 CV の 5% B Buffer で、2 本目は A Buffer で平衡化した。次に Ulp1 処理したタンパク質溶液を 1 本目のカラムに加え素通り画分を回収し、更に 3 CV の 5% B Buffer、3 CV の B Buffer で溶出を行った。素通り画分と 5% B Buffer 画分を混合し 2 本目のカラムに加え、素通り画分を回収した。次に 2 CV の 2% B Buffer で 2 回、3 CV の 5% B Buffer で 1 回、3 CV の B Buffer で 1 回溶出した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。

回収画分は LSE Buffer で約 3 h 以上透析し、Hi Trap SP (GE)による精製を行った。Hi Trap SP 5 mL を十分量の LSE Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。目的タンパク質は LSE Buffer から F Buffer のグラジエントによって溶出し、1 mL ずつ分画して回収した。そして 15% SDS-PAGE によって、高い精製度の目的タンパク質が存在する画分を決定、回収した。

回収画分は 6LSE5G Buffer で約 3 h 以上透析し、Hi Trap Q (GE)及び Hi Trap SP (GE)による精製を行った。Hi Trap Q 5 mL と Hi Trap SP 5 mL をこの順に直列につなぎ、十分量の 6LSE5G Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。更に 6LSE5G Buffer を約 0.7 CV 以上流した後、Hi Trap Q のみを外した。目的タンパク質は 6LSE5G Buffer から 6F5G Buffer のグラジエントによって溶出し、1 mL ずつ分画して回収した。そして 15% SDS-PAGE によって、高い精製度の目的タンパク質が存在する画分を決定、回収した。そして 4F5G Buffer、F5G Buffer、1F5G Buffer、0F10G Buffer、S Buffer の順にそれぞれ約 3 h 以上ずつ透析を行った。精製タ

ソパク質に沈殿を視認できた場合は 20000×g、4°C で 10 min 遠心し、上清のみを回収した。精製タンパク質の濃度はブラッドフォード法によって測定し、適当に分注した後液体窒素で急冷し、-70°C 以下で保存した。

2.3.10 リボソームタンパク質 L9 の精製

菌体湿重量 1 g に対し 10–20 mL 程度の A Buffer で懸濁した菌体を、金属ビーカーに移した。氷上に置かれた懸濁液は、Digital Sonifier 450 (BRANSON)を用いて 2 sec の超音波出力と 8 sec の休止を繰り返しながら、約 100 W 以下の出力で十分な時間破碎した。得られた大腸菌抽出液を 35 mL 遠沈管に移して 20000×g、4°C で 45 min 遠心し、上清をシリンジに入れて Millex®-HV Filter Unit Low Protein Binding Durapore® (PVDF) Membrane 0.45 µm (Merck Millipore)を通した。

このタンパク質溶液はニッケルカラム His Trap HP (GE)を用いたアフィニティ精製によって粗精製した。His Trap HP 5 mL を十分量の A Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。9.75 CV (column volume)の 5% B Buffer (イミダゾール 25 mM) でカラムを洗浄し、5–60% B Buffer (イミダゾール 25–300 mM)、50 mL 程度のグラジエントで流速 1 mL/min で溶出し、1 mL ずつ分画して回収した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分(比較的濃度の高い画分のみ)を決定、回収した。回収画分にはプロテアーゼ Ulp1 活性部位を 1/2000–1/500 体積程度加えた後、C Buffer で一晩、続いて 4C Buffer で約 3 h 以上透析した。

切断された 6×His tag-SUMO はニッケルカラム His Trap HP (GE)を用いたアフィニティ精製によって除去された。His Trap HP 5 mL を十分量の 4C Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。素通り画分に続いて流速 1 mL/min で十分量の 5% 4D Buffer (イミダゾール 25 mM) を流し、これらを 1 mL ずつ試験管に分画した。続いて 5–40% 4D Buffer (イミダゾール 25–200 mM)、30 mL 以上のグラジエントで溶出を行った。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。

回収画分は 4E Buffer で約 3 h 以上透析し、MONOS S 4.6/100 PE (GE)による精製を行った。MONOS を十分量の 4E Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 0.5

mL/min でカラムに投入した。主に素通り画分に検出された目的タンパク質は、1 mL ずつ分画して回収した。そして 15% SDS-PAGE によって、高い精製度の目的タンパク質が存在する画分を決定、回収した。

回収画分は 4Q Buffer で約 3 h 以上透析し、MONOS Q 4.6/100 PE (GE) による精製を行った。MONOS Q を十分量の 4Q Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーチューブ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE) に接続し、流速 0.5 mL/min でカラムに投入した。主に素通り画分に検出された目的タンパク質は、1 mL ずつ分画して回収した。そして 15% SDS-PAGE によって、高い精製度の目的タンパク質が存在する画分を決定、回収した。

精製タンパク質は Amicon® Ultra centrifugal filter units MWCO 3 kDa (Merck Millipore) を用いた限外濾過によって濃縮した。そして 4F Buffer、F Buffer、1F Buffer、0F10G Buffer、S Buffer の順にそれぞれ約 3 h 以上ずつ透析を行った。精製タンパク質に沈殿を視認できた場合は 20000×g、4°C で 10 min 遠心し、上清のみを回収した。精製タンパク質の濃度はブラッドフォード法によって測定し、適当に分注した後液体窒素で急冷し、-70°C 以下で保存した。

2.3.11 リボソームタンパク質 L10 の精製

菌体湿重量 1 g に対し 10-20 mL 程度の 4C Buffer で懸濁した菌体を、金属ビーカーに移した。氷上に置かれた懸濁液は、Digital Sonifier 450 (BRANSON) を用いて 2 sec の超音波出力と 8 sec の休止を繰り返しながら、約 100 W 以下の出力で十分な時間破碎した。得られた大腸菌抽出液を 35 mL 遠沈管に移して 20000×g、4°C で 45 min 遠心し、上清をシリンジに入れて Millex®-HV Filter Unit Low Protein Binding Durapore® (PVDF) Membrane 0.45 µm (Merck Millipore) を通した。

このタンパク質溶液はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen) を用いたアフィニティ精製によって粗精製した。タンパク質溶液に 2-5%(v/v) 程度の 4D Buffer を加えた後、十分量の 4C Buffer で平衡化した Ni-NTA agarose 6-8 mL 程度を加えた。4°C で 5 min 転倒混和した後、カラム 1 本あたり単体の体積が 2 mL 以下になるように溶液ごとエコノパック® カラム (BIO-RAD) に充填した。目的タンパク質は 50 CV (column volume) の 2% 4D Buffer と 0.50 CV の 60% 4D Buffer で洗浄した後、1.25 CV の 60% 4D Buffer で 4 回溶出した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。

回収画分は 6C Buffer で一晩透析し、ニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen) を用

いたアフィニティ精製によって再び粗精製した。2本のエコノパック®カラム(BIO-RAD)に2 mLずつの担体を充填し、5% 6D Bufferで平衡化した。次にタンパク質溶液を1本目のカラムに加え素通り画分を回収し、更に10 CVの2% 6D Bufferで1回、1.25 CVの60% 6D Bufferで3回、3 CVの6D Bufferで1回溶出を行った。素通り画分を2本目のカラムに加え、1本目と同様の手順で溶出した。そして15% SDS-PAGEによって、高い精製度で目的タンパク質が存在する画分を決定、回収した。

回収画分を4C Bufferで約3 h以上、続いてC Bufferで30 min透析した後に、プロテアーゼUlp1活性部位を1/1000-1/500体積程度加え、SUMOが十分に切断され且つ目的タンパク質の凝集が進行しない程度の時間(一晚程度)透析を続けた。その後更に4C Bufferで約3 h以上透析した。

切断された6×His tag-SUMOはニッケルカラムNi-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって除去された。2本のエコノパック®カラム(BIO-RAD)に2 mLずつの担体を充填し、1本目は10 CVの5% 4D Bufferで、2本目は4C Bufferで平衡化した。次にUlp1処理したタンパク質溶液を1本目のカラムに加え素通り画分を回収し、更に3 CVの5% 4D Buffer、3 CVの4D Bufferで溶出を行った。素通り画分と5% 4D Buffer画分を混合し2本目のカラムに加え、素通り画分を回収した。次に2 CVの2% 4D Bufferで2回、3 CVの5% 4D Bufferで1回、3 CVの4D Bufferで1回溶出した。そして15% SDS-PAGEによって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。

回収画分は4Q Bufferで約3 h以上透析し、更に外液を一度交換し内液の完全な置換を行い、又は透析後のタンパク質溶液を十分量の4Q Bufferで希釈し、Hi Trap Q (GE)による精製を行った。Hi Trap Q 5 mLを十分量の4Q Bufferで平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れてÄKTA explorer又はÄKTA purifier (GE)に接続し、流速1 mL/minでカラムに投入した。主に素通り画分に検出された目的タンパク質を回収した。そして18% SDS-PAGEによって、比較的高い精製度の目的タンパク質が存在する画分を決定、回収した。

精製タンパク質は硫酸沈殿によって濃縮した。Type 45Ti Rotor (Beckman Coulter)用チューブに精製タンパク質溶液を注ぎ、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 粉末を80%飽和になるように加えた。80%飽和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 水溶液をチューブの肩口まで加え、Type 45 Ti Rotorに入れて32000 rpm (RCF at rmax: $119000 \times g$), 4°Cで30 min遠心した。上清をピペッティングによって完全に捨て、沈殿を適量の4Q Bufferで溶解した。そしてF Buffer、1F Buffer、0F10G Buffer、S Bufferの順にそれぞれ約3 h以上ずつ透析を行った。精製タンパク質

に沈殿を視認できた場合は 20000×g、4°C で 10 min 遠心し、上清のみを回収した。精製タンパク質の濃度はブラッドフォード法によって測定し、適当に分注した後液体窒素で急冷し、−70°C 以下で保存した。

2.3.12 リボソームタンパク質 L11 の精製

菌体湿重量 1 g に対し 10–20 mL 程度の A5G Buffer で懸濁した菌体を、金属ビーカーに移した。氷上に置かれた懸濁液は、Digital Sonifier 450 (BRANSON)を用いて 2 sec の超音波出力と 8 sec の休止を繰り返しながら、約 100 W 以下の出力で十分な時間破碎した。得られた大腸菌抽出液を 35 mL 遠沈管に移して 20000×g、4°C で 45 min 遠心し、上清をシリンジに入れて Millex®-HV Filter Unit Low Protein Binding Durapore® (PVDF) Membrane 0.45 µm (Merck Millipore)を通した。

このタンパク質溶液はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって粗精製した。タンパク質溶液に 2–5%(v/v)程度の B5G Buffer を加えた後、十分量の A5G Buffer で平衡化した Ni-NTA agarose 6–8 mL 程度を加えた。4°C で 5 min 転倒混和した後、カラム 1 本あたり単体の体積が 2 mL 以下になるように溶液ごとエコノパック®カラム(BIO-RAD)に充填した。目的タンパク質は 50 CV(column volume)の 2 % B5G Buffer と 0.50 CV の 60% B5G Buffer で洗浄した後、1.25 CV の 60% B5G Buffer で 4 回溶出した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。回収画分にはプロテアーゼ Ulp1 活性部位を 1/2000–1/500 体積程度加えた後、A5G Buffer で一晚透析した。

切断された 6×His tag-SUMO はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって除去された。2 本のエコノパック®カラム(BIO-RAD)に 2 mL ずつの担体を充填し、1 本目は 10 CV の 5% B5G Buffer で、2 本目は A5G Buffer で平衡化した。次に Ulp1 処理したタンパク質溶液を 1 本目のカラムに加え素通り画分を回収し、更に 3 CV の 5% B5G Buffer、3 CV の B5G Buffer で溶出を行った。素通り画分と 5% B5G Buffer 画分を混合し 2 本目のカラムに加え、素通り画分を回収した。次に 2 CV の 2 % B5G Buffer で 2 回、3 CV の 5% B5G Buffer で 1 回、3 CV の B5G Buffer で 1 回溶出した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。

回収画分は LSE5G Buffer で約 3 h 以上透析し、更に外液を一度交換し内液の完全な置換を行い、又は透析後のタンパク質溶液を十分量の LSE5G Buffer で希釈し、MONOS S 4.6/100 PE (GE)による精製を行った。MONOS を十分量の LSE5G Buffer で平衡化

し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速0.5 mL/min でカラムに投入した。目的タンパク質はLSE5G Buffer から 20% F5G Buffer の 15 CV 以上のグラジエントによって溶出し（比較的すぐに溶出する）、1 mL ずつ分画して回収した。そして 15% SDS-PAGE によって、高い精製度の目的タンパク質が存在する画分（ピークの真ん中よりやや後ろ）を決定、回収した。

精製タンパク質は Amicon® Ultra centrifugal filter units MWCO 3 kDa (Merck Millipore)を用いた限外濾過によって濃縮した。そして 1F10G Buffer、0F10G Buffer、S Buffer の順にそれぞれ約 3 h 以上ずつ透析を行った。精製タンパク質に沈殿を視認できた場合は 20000×g、4°C で 10 min 遠心し、上清のみを回収した。精製タンパク質の濃度はブラッドフォード法によって測定し、適当に分注した後液体窒素で急冷し、-70°C 以下で保存した。

2.3.13 リボソームタンパク質 L12 の精製

菌体湿重量 1 g に対し 10–20 mL 程度の 4C Buffer で懸濁した菌体を、金属ビーカーに移した。氷上に置かれた懸濁液は、Digital Sonifier 450 (BRANSON)を用いて 2 sec の超音波出力と 8 sec の休止を繰り返しながら、約 100 W 以下の出力で十分な時間破碎した。得られた大腸菌抽出液を 35 mL 遠沈管に移して 20000×g、4°C で 45 min 遠心し、上清をシリンジに入れて Millex®-HV Filter Unit Low Protein Binding Durapore® (PVDF) Membrane 0.45 µm (Merck Millipore)を通した。

このタンパク質溶液はニッケルカラム His Trap HP (GE)を用いたアフィニティ精製によって粗精製した。His Trap HP 5 mL を十分量の 4C Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。9.75 CV (column volume)の 5% 4D Buffer (イミダゾール 25 mM) でカラムを洗浄し、5–60% 4D Buffer (イミダゾール 25–300 mM)、50 mL 程度のグラジエントで流速 1 mL/min で溶出し、1 mL ずつ分画して回収した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分（先に出たピークのみ）を決定、回収した。回収画分にはプロテアーゼ Ulp1 活性部位を 1/2000–1/500 体積程度加えた後、C Buffer で一晩、続いて 4C Buffer で約 3 h 以上透析した。

切断された 6×His tag-SUMO はニッケルカラム His Trap HP (GE)を用いたアフィニティ精製によって除去された。His Trap HP 5 mL を十分量の 4C Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA

purifier (GE)に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。素通り画分が続いて流速 1 mL/min で十分量の 5% 4D Buffer (イミダゾール 25 mM) を流し、これらを 1 mL ずつ試験管に分画した。続いて 5–40% 4D Buffer (イミダゾール 25–200 mM)、30 mL 以上のグラジエントで溶出を行った。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。

回収画分は 4LSE Buffer で約 3 h 以上透析し、Hi Trap Q (GE)による精製を行った。Hi Trap Q 5 mL を十分量の 4LSE Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。目的タンパク質は 4LSE Buffer から 30% 4F Buffer のグラジエントによって溶出し、1 mL ずつ分画して回収した。そして 18% SDS-PAGE によって、比較的高い精製度の目的タンパク質が存在する画分を決定、回収した。

精製タンパク質は硫酸沈殿によって濃縮した。Type 45Ti Rotor (Beckman Coulter) 用チューブに精製タンパク質溶液を注ぎ、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 粉末を 80%飽和になるように加えた。80%飽和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 水溶液をチューブの肩口まで加え、Type 45 Ti Rotor に入れて 32000 rpm (RCF at rmax: 119000 \times g), 4°C で 30 min 遠心した。上清を捨て、沈殿を適量の 4LSE Buffer で溶解した。そして F5G Buffer、1F5G Buffer、0F10G Buffer、S Buffer の順にそれぞれ約 3 h 以上ずつ透析を行った。精製タンパク質に沈殿を視認できた場合は 20000 \times g, 4°C で 10 min 遠心し、上清のみを回収した。精製タンパク質の濃度はブラッドフォード法によって測定し、適当に分注した後液体窒素で急冷し、 -70°C 以下で保存した。

2.3.14 リボソームタンパク質 L13 の精製

菌体湿重量 1 g に対し 10–20 mL 程度の A Buffer で懸濁した菌体を、金属ビーカーに移した。氷上に置かれた懸濁液は、Digital Sonifier 450 (BRANSON)を用いて 2 sec の超音波出力と 8 sec の休止を繰り返しながら、約 100 W 以下の出力で十分な時間破碎した。得られた大腸菌抽出液を 35 mL 遠沈管に移して 20000 \times g, 4°C で 45 min 遠心し、上清をシリンジに入れて Millex®-HV Filter Unit Low Protein Binding Durapore® (PVDF) Membrane 0.45 μm (Merck Millipore)を通した。

このタンパク質溶液はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって粗精製した。タンパク質溶液に 2–5%(v/v)程度の B Buffer を加えた後、十分量の A Buffer で平衡化した Ni-NTA agarose 6–8 mL 程度を加えた。4°C で 5 min 転倒混和した後、カラム 1 本あたり単体の体積が 2 mL 以下になるように溶液ごとエコ

ノパック®カラム(BIO-RAD)に充填した。目的タンパク質は 50 CV(column volume)の 2% B Buffer と 0.50 CV の 60% B Buffer で洗浄した後、1.25 CV の 60% B Buffer で 4 回溶出した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。回収画分にはプロテアーゼ Ulp1 活性部位を 1/2000–1/500 体積程度加えた後、A Buffer で一晩透析した。

切断された 6×His tag-SUMO はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって除去出来なかった。2 本のエコノパック®カラム(BIO-RAD)に 2 mL ずつの担体を充填し、1 本目は 10 CV の 5% B Buffer で、2 本目は A Buffer で平衡化した。次に Ulp1 処理したタンパク質溶液を 1 本目のカラムに加え素通り画分を回収し、更に 3 CV の 5% B Buffer、3 CV の B Buffer で溶出を行った。素通り画分と 5% B Buffer 画分を混合し 2 本目のカラムに加え、素通り画分を回収した。次に 2 CV の 2% B Buffer で 2 回、3 CV の 5% B Buffer で 1 回、3 CV の B Buffer で 1 回溶出した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。

回収画分は 100 mM KCl E Buffer で約 3 h 以上透析し、MONOS S 4.6/100 PE (GE) による精製を行った。MONOS を十分量の 100 mM KCl E Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE) に接続し、流速 0.5 mL/min でカラムに投入した。目的タンパク質は 100 mM KCl E Buffer から 60% F Buffer の 15 CV 以上のグラジエントによって溶出し、1 mL ずつ分画して回収した。そして 15% SDS-PAGE によって、高い精製度の目的タンパク質が存在する画分を決定、回収した。

回収画分は A Buffer で約 3 h 以上透析し、ニッケルカラム His Trap HP (GE)を用いたアフィニティ精製によって精製した。His Trap HP 5 mL を十分量の A Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE) に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。流速 1 mL/min で 5–40% B Buffer (イミダゾール 25–200 mM)、30 mL 以上のグラジエントで溶出を行った。そして 15% SDS-PAGE によって、高い精製度の目的タンパク質の存在する画分 (2 つのピークのうち先に出てきた方が L13、後に出てくる方は SDS-PAGE の泳動度が殆ど同じだが 6×His tag-SUMO なので捨てる、また若干量の 35 kDa 付近のバンドは無視した) を決定、回収した。

精製タンパク質は Amicon® Ultra centrifugal filter units MWCO 3 kDa (Merck Millipore)を用いた限外濾過によって濃縮した。そして 0F10G Buffer、S Buffer の順に

それぞれ約 3 h 以上ずつ透析を行った。精製タンパク質に沈殿を視認できた場合は 20000×g、4°C で 10 min 遠心し、上清のみを回収した。精製タンパク質の濃度はブラッドフォード法によって測定し、適宜に分注した後液体窒素で急冷し、−70°C 以下で保存した。

2.3.15 リボソームタンパク質 L14 の精製

菌体湿重量 1 g に対し 10–20 mL 程度の 4C Buffer で懸濁した菌体を、金属ビーカーに移した。氷上に置かれた懸濁液は、Digital Sonifier 450 (BRANSON)を用いて 2 sec の超音波出力と 8 sec の休止を繰り返しながら、約 100 W 以下の出力で十分な時間破碎した。得られた大腸菌抽出液を 35 mL 遠沈管に移して 20000×g、4°C で 45 min 遠心し、上清をシリンジに入れて Millex®-HV Filter Unit Low Protein Binding Durapore® (PVDF) Membrane 0.45 µm (Merck Millipore)を通した。

このタンパク質溶液はニッケルカラム cOmplete His-Tag Purification Resin (Roche)を用いたアフィニティ精製によって粗精製した。タンパク質溶液に 2–5%(v/v)程度の溶出バッファーを加えた後、十分量の 4C Buffer で平衡化した cOmplete His-Tag Purification Resin 6–8 mL 程度を加えた。4°C で 5 min 転倒混和した後、カラム 1 本あたり単体の体積が 2 mL 以下になるように溶液ごとエコノパック®カラム(BIO-RAD)に充填した。目的タンパク質は 100 CV(column volume)の 98% 4A Buffer 2 % 4D Buffer と 0.50 CV の 40% 4C Buffer 60% 4D Buffer で洗浄した後、1.25 CV の 40% 4C Buffer 60% 4D Buffer で 4 回溶出した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。回収画分にはプロテアーゼ Ulp1 活性部位を 1/2000–1/500 体積程度加えた後、C Buffer で一晩、続いて 4C Buffer で約 3 h 以上透析した。

切断された 6×His tag-SUMO はニッケルカラム His Trap HP (GE)を用いたアフィニティ精製によって除去された。His Trap HP 5 mL を十分量の 4C Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。素通り画分に続いて流速 1 mL/min で十分量の 5% 4D Buffer (イミダゾール 25 mM) を流し、これらを 1 mL ずつ試験管に分画した。続いて 5–40% 4D Buffer (イミダゾール 25–200 mM)、30 mL 以上のグラジエントで溶出を行った。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。

回収画分は 4E5G Buffer で約 3 h 以上透析し、Hi Trap Q (GE)及び Hi Trap SP (GE)による精製を行った。Hi Trap Q 5 mL と Hi Trap SP 5 mL をこの順に直列につなぎ、

十分量の 4E5G Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。更に 4E5G Buffer を約 0.7 CV 以上流した後、Hi Trap Q のみを外した。目的タンパク質は 4E5G Buffer から 4F5G Buffer のグラジエントによって溶出し、1 mL ずつ分画して回収した。そして 15% SDS-PAGE によって、高い精製度の目的タンパク質が存在する画分を決定、回収した。

回収画分は 4F5G Buffer で約 3 h 以上透析し、ニッケルカラム His Trap HP (GE)を用いたアフィニティ精製によって精製した。His Trap HP 5 mL を十分量の 4F5G Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。素通り画分について流速 1 mL/min で十分量の 5% 4D Buffer (イミダゾール 25 mM) を流し、これらを 1 mL ずつ試験管に分画した。続いて 5–40% 4D Buffer (イミダゾール 25–200 mM)、30 mL 以上のグラジエントで溶出を行った。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。

精製タンパク質は Amicon® Ultra centrifugal filter units MWCO 3 kDa (Merck Millipore)を用いた限外濾過によって濃縮した。ここで、S Buffer 置換後のタンパク質濃度が約 4.5 g/L を超えないように注意した。そして 4F5G Buffer、F5G Buffer、1F5G Buffer、0F10G Buffer、S Buffer の順にそれぞれ約 3 h 以上ずつ透析を行った。精製タンパク質に沈殿を視認できた場合は 20000×g、4°C で 10 min 遠心し、上清のみを回収した。精製タンパク質の濃度はブラッドフォード法によって測定し、適当に分注した後液体窒素で急冷し、−70°C 以下で保存した。

2.3.16 リボソームタンパク質 L15 の精製

菌体湿重量 1 g に対し 10–20 mL 程度の 4C Buffer で懸濁した菌体を、金属ビーカーに移した。氷上に置かれた懸濁液は、Digital Sonifier 450 (BRANSON)を用いて 2 sec の超音波出力と 8 sec の休止を繰り返しながら、約 100 W 以下の出力で十分な時間破碎した。得られた大腸菌抽出液を 35 mL 遠沈管に移して 20000×g、4°C で 45 min 遠心し、上清をシリンジに入れて Millex®-HV Filter Unit Low Protein Binding Durapore® (PVDF) Membrane 0.45 µm (Merck Millipore)を通した。このタンパク質溶液はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって粗精製した。タンパク質溶液に 2–5%(v/v)程度の 4D Buffer を加えた後、十分量の 4C Buffer で平衡化した Ni-NTA agarose 6–8 mL 程度を加えた。4°C で 5 min 転倒混和した後、カラム 1

本あたり単体の体積が 2 mL 以下になるように溶液ごとエコノパック®カラム(BIO-RAD)に充填した。目的タンパク質は 50 CV(column volume)の 2 % 4D Buffer と 0.50 CV の 60% 4D Buffer で洗浄した後、1.25 CV の 60% 4D Buffer で 4 回溶出した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。

回収画分は 4C Buffer で一晩透析し、再度ニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen) による精製を行った。2 本のエコノパック®カラムに充填した担体 2 mL ずつを 10 CV の 4C Buffer で平衡化し、その後タンパク質溶液を 1 本目のカラムに加え、素通り画分を 2 本目のカラムに加えた。タンパク質の溶出以降は 1 回目のカラム精製と同様の手順で行った。

回収画分は 6C Buffer で一晩透析し、再度ニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen) による精製を同様の手順で行った。但し平衡化には 6C Buffer、溶出には 6D Buffer を用いた。回収画分を 4C Buffer で約 3 h 以上、続いて C Buffer で 30 min 透析した後に、プロテアーゼ Ulp1 活性部位を 1/1000-1/500 体積程度加え、SUMO が十分に切断され且つ目的タンパク質の凝集が進行しない程度の時間 (約 9 h 程度) 透析を続けた。その後更に 6C Buffer で約 3 h 以上透析した。

切断された 6×His tag-SUMO はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって除去された 3 本のエコノパック®カラム(BIO-RAD) に 2 mL ずつの担体を充填し、1 本目は 10 CV の 5% 6D Buffer で、2 本目以降は 6C Buffer で平衡化した。次に Ulp1 処理したタンパク質溶液を 1 本目のカラムに加え素通り画分を回収し、更に 3 CV の 5% 6D Buffer、3 CV の 6D Buffer で溶出を行った。素通り画分と 5% 6D Buffer 画分を混合し 2 本目のカラムに加え、素通り画分を回収した。次に 2 CV の 2 % 6D Buffer で 2 回、3 CV の 5% 6D Buffer で 1 回、3 CV の 6D Buffer で 1 回溶出した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。回収画分は 3 本目のカラムに加え、2 本目と同様の操作を行い、残存する 6 × his tag-SUMO を更に除去した。

回収画分は 100 mM KCl 6E5G Buffer で約 3 h 以上透析し、Hi Trap SP (GE)による精製を行った。Hi Trap SP 5 mL を十分量の 100 mM KCl 6E5G Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。目的タンパク質は 100 mM KCl 6E5G Buffer から 6F5G Buffer のグラジエントによって溶出し、1 mL ずつ分画して回収した。そして 15% SDS-PAGE によって、比較的高い精製度の目的タンパク質が存在する画分 (ピークの前方向約半分) を決定、回収した。

そして 4F5G Buffer、F5G Buffer、1F5G Buffer、0F10G Buffer、S Buffer の順にそれぞれ約 3 h 以上ずつ透析を行った。精製タンパク質に沈殿を視認できた場合は 20000 ×g、4°C で 10 min 遠心し、上清のみを回収した。精製タンパク質の濃度はブラッドフォード法によって測定し、適当に分注した後液体窒素で急冷し、−70°C 以下で保存した。

2.3.17 リボソームタンパク質 L16 の精製

菌体湿重量 1 g に対し 10–20 mL 程度の A Buffer で懸濁した菌体を、金属ビーカーに移した。氷上に置かれた懸濁液は、Digital Sonifier 450 (BRANSON)を用いて 2 sec の超音波出力と 8 sec の休止を繰り返しながら、約 100 W 以下の出力で十分な時間破碎した。得られた大腸菌抽出液を 35 mL 遠沈管に移して 20000 ×g、4°C で 45 min 遠心し、上清をシリンジに入れて Millex®-HV Filter Unit Low Protein Binding Durapore® (PVDF) Membrane 0.45 μm (Merck Millipore)を通した。

このタンパク質溶液はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって粗精製した。タンパク質溶液に 2–5%(v/v)程度の B Buffer を加えた後、十分量の A Buffer で平衡化した Ni-NTA agarose 6–8 mL 程度を加えた。4°C で 5 min 転倒混和した後、カラム 1 本あたり単体の体積が 2 mL 以下になるように溶液ごとエコノパック®カラム(BIO-RAD)に充填した。目的タンパク質は 50 CV(column volume)の 2% B Buffer と 0.50 CV の 60% B Buffer で洗浄した後、1.25 CV の 60% B Buffer で 4 回溶出した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。回収画分にはプロテアーゼ Ulp1 活性部位を 1/2000–1/500 体積程度加えた後、A Buffer で一晩透析した。

切断された 6×His tag-SUMO はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって除去された。2 本のエコノパック®カラム(BIO-RAD)に 2 mL ずつの担体を充填し、1 本目は 10 CV の 5% B Buffer で、2 本目は A Buffer で平衡化した。次に Ulp1 処理したタンパク質溶液を 1 本目のカラムに加え素通り画分を回収し、更に 3 CV の 5% B Buffer、3 CV の B Buffer で溶出を行った。素通り画分と 5% B Buffer 画分を混合し 2 本目のカラムに加え、素通り画分を回収した。次に 2 CV の 2% B Buffer で 2 回、3 CV の 5% B Buffer で 1 回、3 CV の B Buffer で 1 回溶出した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。

回収画分は 4E5G Buffer で約 3 h 以上透析し、Hi Trap Q (GE)及び Hi Trap SP (GE)による精製を行った。Hi Trap Q 5 mL と Hi Trap SP 5 mL をこの順に直列につなぎ、

十分量の 4E5G Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。更に 4E5G Buffer を約 0.7 CV 以上流した後、Hi Trap Q のみを外した。目的タンパク質は 4E5G Buffer から 4F5G Buffer のグラジエントによって溶出し、1 mL ずつ分画して回収した。そして 15% SDS-PAGE によって、低くない精製度の目的タンパク質が存在する画分を決定、回収した。

精製タンパク質は Amicon® Ultra centrifugal filter units MWCO 3 kDa (Merck Millipore)を用いた限外濾過によって濃縮した。そして 4F10G Buffer、F10G Buffer、1F10G Buffer、0F10G Buffer、S Buffer の順にそれぞれ約 3 h 以上ずつ透析を行った。精製タンパク質に沈殿を視認できた場合は 20000×g、4°C で 10 min 遠心し、上清のみを回収した。精製タンパク質の濃度はブラッドフォード法によって測定し、適当に分注した後液体窒素で急冷し、-70°C 以下で保存した。

2.3.18 リボソームタンパク質 L17 の精製

菌体湿重量 1 g に対し 10-20 mL 程度の A Buffer で懸濁した菌体を、金属ビーカーに移した。氷上に置かれた懸濁液は、Digital Sonifier 450 (BRANSON)を用いて 2 sec の超音波出力と 8 sec の休止を繰り返しながら、約 100 W 以下の出力で十分な時間破碎した。得られた大腸菌抽出液を 35 mL 遠沈管に移して 20000×g、4°C で 45 min 遠心し、上清をシリンジに入れて Millex®-HV Filter Unit Low Protein Binding Durapore® (PVDF) Membrane 0.45 µm (Merck Millipore)を通した。

このタンパク質溶液はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって粗精製した。タンパク質溶液に 2-5%(v/v)程度の B Buffer を加えた後、十分量の A Buffer で平衡化した Ni-NTA agarose 6-8 mL 程度を加えた。4°C で 5 min 転倒混和した後、カラム 1 本あたり単体の体積が 2 mL 以下になるように溶液ごとエコノパック®カラム(BIO-RAD)に充填した。目的タンパク質は 50 CV(column volume)の 2% B Buffer と 0.50 CV の 60% B Buffer で洗浄した後、1.25 CV の 60% B Buffer で 4 回溶出した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。

回収画分は A Buffer で一晩透析し、ニッケルカラム His Trap HP (GE)を用いたアフィニティ精製によって再び粗精製した。His Trap HP 5 mL を十分量の A Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。9.75 CV (column

volume)の 5% B Buffer (イミダゾール 25 mM) でカラムを洗浄し、5–60% B Buffer (イミダゾール 25–300 mM)、50 mL 程度のグラジエントで流速 1 mL/min で溶出し、1 mL ずつ分画して回収した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。回収画分にはプロテアーゼ Ulp1 活性部位を 1/2000–1/500 体積程度加えた後、C Buffer で一晩透析した。

切断された 6×His tag-SUMO はニッケルカラム His Trap HP (GE)を用いたアフィニティ精製によって除去された。His Trap HP 5 mL を十分量の C Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。流速 1 mL/min で 5–40% D Buffer (イミダゾール 25–200 mM)、30 mL 以上のグラジエントで溶出を行い、1 mL ずつ分画した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分 (2 つのピークのうち先に現れる方) を決定、回収した。

回収画分は 150 mM KCl E5G Buffer で約 3 h 以上透析し、Hi Trap Q (GE)及び Hi Trap SP (GE)による精製を行った。Hi Trap Q 5 mL と Hi Trap SP 5 mL をこの順に直列につなぎ、十分量の 150 mM KCl E5G Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。更に 150 mM KCl E5G Buffer を約 0.7 CV 以上流した後、Hi Trap Q のみを外した。目的タンパク質は 150 mM KCl E5G Buffer から F5G Buffer のグラジエントによって溶出し、1 mL ずつ分画して回収した。そして 15% SDS-PAGE によって、高い精製度の目的タンパク質が存在する画分 (ピークの左約 1/3 を避けた、また 30 kDa 付近のバンドは無視した) を決定、回収した。

精製タンパク質は Amicon® Ultra centrifugal filter units MWCO 3 kDa (Merck Millipore)を用いた限外濾過によって濃縮した。そして F5G Buffer、1F5G Buffer、0F10G Buffer、S Buffer の順にそれぞれ約 3 h 以上ずつ透析を行った。精製タンパク質に沈殿を視認できた場合は 20000×g、4°C で 10 min 遠心し、上清のみを回収した。精製タンパク質の濃度はブラッドフォード法によって測定し、適当に分注した後液体窒素で急冷し、−70°C 以下で保存した。

2.3.19 リボソームタンパク質 L18 の精製

菌体湿重量 1 g に対し 10–20 mL 程度の A5G Buffer で懸濁した菌体を、金属ビーカーに移した。氷上に置かれた懸濁液は、Digital Sonifier 450 (BRANSON)を用いて 2 sec の超音波出力と 8 sec の休止を繰り返しながら、約 100 W 以下の出力で十分な時間破碎

した。得られた大腸菌抽出液を 35 mL 遠沈管に移して 20000×g、4°C で 45 min 遠心し、上清をシリンジに入れて Millex®-HV Filter Unit Low Protein Binding Durapore® (PVDF) Membrane 0.45 µm (Merck Millipore)を通した。

このタンパク質溶液はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって粗精製した。タンパク質溶液に 2–5%(v/v)程度の B5G Buffer を加えた後、十分量の A5G Buffer で平衡化した Ni-NTA agarose 6–8 mL 程度を加えた。4°C で 5 min 転倒混和した後、カラム 1 本あたり単体の体積が 2 mL 以下になるように溶液ごとエコノパック®カラム(BIO-RAD)に充填した。目的タンパク質は 50 CV(column volume)の 2% B5G Buffer と 0.50 CV の 60% B5G Buffer で洗浄した後、1.25 CV の 60% B5G Buffer で 4 回溶出した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。回収画分にはプロテアーゼ Ulp1 活性部位を 1/2000–1/500 体積程度加えた後、C5G Buffer で一晚透析した。

切断された 6×His tag-SUMO はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって除去された。2 本のエコノパック®カラム(BIO-RAD)に 2 mL ずつの担体を充填し、1 本目は 10 CV の 5% D5G Buffer で、2 本目は C5G Buffer で平衡化した。次に Ulp1 処理したタンパク質溶液を 1 本目のカラムに加え素通り画分を回収し、更に 3 CV の 5% D5G Buffer、3 CV の D5G Buffer で溶出を行った。素通り画分と 5% D5G Buffer 画分を混合し 2 本目のカラムに加え、素通り画分を回収した。次に 2 CV の 2% D5G Buffer で 2 回、3 CV の 5% D5G Buffer で 1 回、3 CV の D5G Buffer で 1 回溶出した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。

回収画分は 100 mM KCl E5G Buffer で約 3 h 以上透析し、MONOS S 4.6/100 PE (GE)による精製を行った。MONOS を十分量の 100 mM KCl E5G Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラープ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 0.5 mL/min でカラムに投入した。目的タンパク質は 100 mM KCl E5G Buffer から 60% F5G Buffer の 15 CV 以上のグラジエントによって溶出し、1 mL ずつ分画して回収した。そして 15% SDS-PAGE によって、比較的高い精製度の目的タンパク質が存在する画分（ピークの後ろ約半分）を決定、回収した。

精製タンパク質は Amicon® Ultra centrifugal filter units MWCO 3 kDa (Merck Millipore)を用いた限外濾過によって濃縮した。そして 1F10G Buffer、0F10G Buffer、S Buffer の順にそれぞれ約 3 h 以上ずつ透析を行った。精製タンパク質に沈殿を視認できた場合は 20000×g、4°C で 10 min 遠心し、上清のみを回収した。精製タンパク質の

濃度はブラッドフォード法によって測定し、適当に分注した後液体窒素で急冷し、 -70°C 以下で保存した。

2.3.20 リボソームタンパク質 L19 の精製

菌体湿重量 1 g に対し 10–20 mL 程度の A Buffer で懸濁した菌体を、金属ビーカーに移した。氷上に置かれた懸濁液は、Digital Sonifier 450 (BRANSON)を用いて 2 sec の超音波出力と 8 sec の休止を繰り返しながら、約 100 W 以下の出力で十分な時間破碎した。得られた大腸菌抽出液を 35 mL 遠沈管に移して $20000\times g$ 、 4°C で 45 min 遠心し、上清をシリンジに入れて Millex[®]-HV Filter Unit Low Protein Binding Durapore[®] (PVDF) Membrane $0.45\ \mu\text{m}$ (Merck Millipore)を通した。

このタンパク質溶液はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって粗精製した。タンパク質溶液に 2–5%(v/v)程度の B Buffer を加えた後、十分量の A Buffer で平衡化した Ni-NTA agarose 6–8 mL 程度を加えた。 4°C で 5 min 転倒混和した後、カラム 1 本あたり単体の体積が 2 mL 以下になるように溶液ごとエコノパック[®]カラム(BIO-RAD)に充填した。目的タンパク質は 50 CV(column volume)の 2% B Buffer と 0.50 CV の 60% B Buffer で洗浄した後、1.25 CV の 60% B Buffer で 4 回溶出した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。回収画分にはプロテアーゼ Ulp1 活性部位を 1/2000–1/500 体積程度加えた後、A Buffer で一晩透析した。

切断された 6×His tag-SUMO はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって除去された。2 本のエコノパック[®]カラム(BIO-RAD)に 2 mL ずつの担体を充填し、1 本目は 10 CV の 5% B Buffer で、2 本目は A Buffer で平衡化した。次に Ulp1 処理したタンパク質溶液を 1 本目のカラムに加え素通り画分を回収し、更に 3 CV の 5% B Buffer、3 CV の B Buffer で溶出を行った。素通り画分と 5% B Buffer 画分を混合し 2 本目のカラムに加え、素通り画分を回収した。次に 2 CV の 2% B Buffer で 2 回、3 CV の 5% B Buffer で 1 回、3 CV の B Buffer で 1 回溶出した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。

回収画分は 4LSE5G Buffer で約 3 h 以上透析し、Hi Trap Q (GE)及び Hi Trap SP (GE)による精製を行った。Hi Trap Q 5 mL と Hi Trap SP 5 mL をこの順に直列につなぎ、十分量の 4LSE5G Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。更に 4LSE5G Buffer を約 0.7 CV 以上流した後、Hi Trap Q のみを外した。

目的タンパク質は 4LSE5G Buffer から 4F5G Buffer のグラジエントによって溶出し、1 mL ずつ分画して回収した。そして 15% SDS-PAGE によって、高い精製度の目的タンパク質が存在する画分（ピークの殆ど全体、30k Da 付近の夾雑物ほか数本は無視した）を決定、回収した。

精製タンパク質は Amicon® Ultra centrifugal filter units MWCO 3 kDa (Merck Millipore)を用いた限外濾過によって濃縮した。そして F5G Buffer、1F5G Buffer、0F10G Buffer、S Buffer の順にそれぞれ約 3 h 以上ずつ透析を行った。精製タンパク質に沈殿を視認できた場合は 20000×g、4°C で 10 min 遠心し、上清のみを回収した。精製タンパク質の濃度はブラッドフォード法によって測定し、適当に分注した後液体窒素で急冷し、-70°C 以下で保存した。

2.3.21 リボソームタンパク質 L20 の精製

菌体湿重量 1 g に対し 10–20 mL 程度の HT Buffer で懸濁した菌体を、金属ビーカーに移した。氷上に置かれた懸濁液は、Digital Sonifier 450 (BRANSON)を用いて 2 sec の超音波出力と 8 sec の休止を繰り返しながら、約 100 W 以下の出力で十分な時間破碎した。得られた大腸菌抽出液を 35 mL 遠沈管に移して 20000×g、4°C で 45 min 遠心し、沈殿に 4%(v/v)Triton X-100 を含む A Buffer を 25 mL 加え、スパチュラやボルテクスなどによって沈殿を完全に懸濁した後、120 rpm、4°C で 30 min 振盪した。懸濁液を 7000×g、4°C で 30 min 遠心し、上清を捨てた。この沈殿を洗浄する操作を 5 回繰り返した。但し、3 回目は A Buffer、4 回目は C Buffer で懸濁した。5 回目は 8C Buffer で懸濁した後、振盪する代わりに 4°C で一晩穏やかに転倒混和し、遠心した上清は 6C Buffer で約 3 h 以上透析し、シリンジに入れて Millex®-HV Filter Unit Low Protein Binding Durapore® (PVDF) Membrane 0.45 µm (Merck Millipore)を通した。

このタンパク質溶液はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって粗精製した。タンパク質溶液に 2–5%(v/v)程度の 6D Buffer を加えた後、十分量の 6C Buffer で平衡化した Ni-NTA agarose 6–8 mL 程度を加えた。4°C で 5 min 転倒混和した後、カラム 1 本あたり単体の体積が 2 mL 以下になるように溶液ごとエコノパック®カラム(BIO-RAD)に充填した。目的タンパク質は 50 CV(column volume)の 2% 6D Buffer と 0.50 CV の 60% 6D Buffer で洗浄した後、1.25 CV の 60% 6D Buffer で 4 回溶出した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。回収画分を 4C Buffer で約 3 h 以上、続いて C Buffer で 30 min 透析した後に、プロテアーゼ Ulp1 活性部位を 1/1000–1/500 体積程度加え、SUMO

が十分に切断され且つ目的タンパク質の凝集が進行しない程度の時間（約 8 h 程度）透析を続けた。その後更に 6C Buffer で約 3 h 以上透析した。

切断された 6×His tag-SUMO はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって除去された。2 本のエコノパック®カラム(BIO-RAD) に 2 mL ずつの担体を充填し、1 本目は 10 CV の 5% 6D Buffer で、2 本目は 6C Buffer で平衡化した。次に Ulp1 処理したタンパク質溶液を 1 本目のカラムに加え素通り画分を回収し、更に 3 CV の 5% 6D Buffer、3 CV の 6D Buffer で溶出を行った。素通り画分と 5% 6D Buffer 画分を混合し 2 本目のカラムに加え、素通り画分を回収した。次に 2 CV の 2 % 6D Buffer で 2 回、3 CV の 5% 6D Buffer で 1 回、3 CV の 6D Buffer で 1 回溶出した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。

回収画分は 20 mM Tris 100 mM KCl 6E Buffer で約 3 h 以上透析し、SP Sepharose Fast Flow (GE)による精製を行った。1 本のエコノパック®カラム(BIO-RAD) に担体 1 mL を充填し、10 CV の 20 mM Tris 100 mM KCl 6E Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をカラムに加え、1 mL の 20 mM Tris 6F Buffer で 10 回溶出した。そして 15% SDS-PAGE によって、高い精製度の目的タンパク質が十分な濃度で存在する画分を決定、回収した。

そして 4T10G Buffer、T Buffer の順にそれぞれ約 3 h 以上ずつ透析を行った。精製タンパク質に沈殿を視認できた場合は 20000×g、4°C で 10 min 遠心し、上清のみを回収した。精製タンパク質の濃度はブラッドフォード法によって測定し、適当に希釈・分注した後液体窒素で急冷し、-70°C 以下で保存した。

2.3.22 リボソームタンパク質 L21 の精製

菌体湿重量 1 g に対し 10-20 mL 程度の A Buffer で懸濁した菌体を、金属ビーカーに移した。氷上に置かれた懸濁液は、Digital Sonifier 450 (BRANSON)を用いて 2 sec の超音波出力と 8 sec の休止を繰り返しながら、約 100 W 以下の出力で十分な時間破碎した。得られた大腸菌抽出液を 35 mL 遠沈管に移して 20000×g、4°C で 45 min 遠心し、上清をシリンジに入れて Millex®-HV Filter Unit Low Protein Binding Durapore® (PVDF) Membrane 0.45 μm (Merck Millipore)を通した。

このタンパク質溶液はニッケルカラム His Trap HP (GE)を用いたアフィニティ精製によって粗精製した。His Trap HP 5 mL を十分量の A Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接

続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。9.75 CV (column volume)の 5% B Buffer (イミダゾール 25 mM) でカラムを洗浄し、5–60% B Buffer (イミダゾール 25–300 mM)、50 mL 程度のグラジエントで流速 1 mL/min で溶出し、1 mL ずつ分画して回収した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。回収画分にはプロテアーゼ Ulp1 活性部位を 1/2000–1/500 体積程度加えた後、C Buffer で一晩、続いて 6C Buffer で約 3 h 以上透析した。

切断された 6×His tag-SUMO はニッケルカラム His Trap HP (GE)を用いたアフィニティ精製によって除去された。His Trap HP 5 mL を十分量の 6C Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。素通り画分に続いて流速 1 mL/min で十分量の 5% 6D Buffer (イミダゾール 25 mM) を流し、これらを 1 mL ずつ試験管に分画した。続いて 5–40% 6D Buffer (イミダゾール 25–200 mM)、30 mL 以上のグラジエントで溶出を行った。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。

回収画分は 6E Buffer で約 3 h 以上透析し、MONOS S 4.6/100 PE (GE)による精製を行った。MONOS を十分量の 6E Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 0.5 mL/min でカラムに投入した。目的タンパク質は 6E Buffer から 60% 6F Buffer の 15 CV 以上のグラジエントによって溶出し、1 mL ずつ分画して回収した。そして 15% SDS-PAGE によって、比較的高い精製度の目的タンパク質が存在する画分 (20 kDa 付近の夾雑物などと 30 kDa 付近の夾雑物などに挟まれた画分) を決定、回収した。

精製タンパク質は Amicon® Ultra centrifugal filter units MWCO 3 kDa (Merck Millipore)を用いた限外濾過によって濃縮した。ここで、S Buffer 置換後のタンパク質濃度が約 4.5 g/L を超えないように注意した。そして 4F Buffer、F Buffer、1F Buffer、0F10G Buffer、S Buffer の順にそれぞれ約 3 h 以上ずつ透析を行った。精製タンパク質に沈殿を視認できた場合は 20000×g、4°C で 10 min 遠心し、上清のみを回収した。精製タンパク質の濃度はブラッドフォード法によって測定し、適当に分注した後液体窒素で急冷し、−70°C 以下で保存した。

2.3.23 リボソームタンパク質 L22 の精製

菌体湿重量 1 g に対し 10–20 mL 程度の A Buffer で懸濁した菌体を、金属ビーカーに移した。氷上に置かれた懸濁液は、Digital Sonifier 450 (BRANSON)を用いて 2 sec の

超音波出力と 8 sec の休止を繰り返しながら、約 100 W 以下の出力で十分な時間破碎した。得られた大腸菌抽出液を 35 mL 遠沈管に移して 20000×g、4°C で 45 min 遠心し、上清をシリンジに入れて Millex®-HV Filter Unit Low Protein Binding Durapore® (PVDF) Membrane 0.45 µm (Merck Millipore)を通した。ここで、シリンジを押す手に異常な手応えを感じたため、尿素を粉で 2 M (タンパク質溶液 9.1 mL に対し尿素 1.2 g) 追加した。

このタンパク質溶液はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって粗精製した。タンパク質溶液に 2–5%(v/v)程度の B Buffer を加えた後、十分量の A Buffer で平衡化した Ni-NTA agarose 6–8 mL 程度を加えた。4°C で 5 min 転倒混和した後、カラム 1 本あたり単体の体積が 2 mL 以下になるように溶液ごとエコノパック®カラム(BIO-RAD)に充填した。目的タンパク質は 50 CV(column volume)の 2% B Buffer と 0.50 CV の 60% B Buffer で洗浄した後、1.25 CV の 60% B Buffer で 4 回溶出した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。回収画分にはプロテアーゼ Ulp1 活性部位を 1/2000–1/500 体積程度加えた後、750 mM NH₄Cl A Buffer で一晩透析した。

切断された 6×His tag-SUMO はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって除去された。2 本のエコノパック®カラム(BIO-RAD)に 2 mL ずつの担体を充填し、1 本目は 10 CV の 5% B Buffer で、2 本目は A Buffer で平衡化した。次に Ulp1 処理したタンパク質溶液を 1 本目のカラムに加え素通り画分を回収し、更に 3 CV の 5% B Buffer、3 CV の B Buffer で溶出を行った。素通り画分と 5% B Buffer 画分を混合し 2 本目のカラムに加え、素通り画分を回収した。次に 2 CV の 2% B Buffer で 2 回、3 CV の 5% B Buffer で 1 回、3 CV の B Buffer で 1 回溶出した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。

回収画分は 100 mM KCl E Buffer で約 3 h 以上透析し、MONOS S 4.6/100 PE (GE)による精製を行った。MONOS を十分量の 100 mM KCl E Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 0.5 mL/min でカラムに投入した。目的タンパク質は 100 mM KCl E Buffer から 60% F Buffer の 15 CV 以上のグラジエントによって溶出し、1 mL ずつ分画して回収した。そして 15% SDS-PAGE によって、高い精製度の目的タンパク質が存在する画分を決定、回収した。

精製タンパク質は Amicon® Ultra centrifugal filter units MWCO 3 kDa (Merck Millipore)を用いた限外濾過によって濃縮した。そして 1F Buffer、0F10G Buffer、S

Buffer の順にそれぞれ約 3 h 以上ずつ透析を行った。精製タンパク質に沈殿を視認できた場合は 20000×g、4°C で 10 min 遠心し、上清のみを回収した。精製タンパク質の濃度はブラッドフォード法によって測定し、適当に分注した後液体窒素で急冷し、−70°C 以下で保存した。

2.3.24 リボソームタンパク質 L23 の精製

菌体湿重量 1 g に対し 10–20 mL 程度の A Buffer で懸濁した菌体を、金属ビーカーに移した。氷上に置かれた懸濁液は、Digital Sonifier 450 (BRANSON)を用いて 2 sec の超音波出力と 8 sec の休止を繰り返しながら、約 100 W 以下の出力で十分な時間破碎した。得られた大腸菌抽出液を 35 mL 遠沈管に移して 20000×g、4°C で 45 min 遠心し、上清をシリンジに入れて Millex®-HV Filter Unit Low Protein Binding Durapore® (PVDF) Membrane 0.45 µm (Merck Millipore)を通した。

このタンパク質溶液は同様の手順で調製された L10 及び L18 の抽出液と混合し、ニッケルカラム His Trap HP (GE)を用いたアフィニティ精製によって粗精製した。His Trap HP 5 mL を十分量の A Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラープ (GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。9.75 CV (column volume)の 5% B Buffer (イミダゾール 25 mM) でカラムを洗浄し、5–60% B Buffer (イミダゾール 25–300 mM)、50 mL 程度のグラジエントで流速 1 mL/min で溶出し、1 mL ずつ分画して回収した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。回収画分にはプロテアーゼ Ulp1 活性部位を 1/2000–1/500 体積程度加えた後、C Buffer で一晚透析した。

切断された 6×His tag-SUMO はニッケルカラム His Trap HP (GE)を用いたアフィニティ精製によって除去された。His Trap HP 5 mL を十分量の C Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラープ (GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。素通り画分に続いて流速 1 mL/min で十分量の 5% D Buffer (イミダゾール 25 mM) を流し、これらを 1 mL ずつ試験管に分画した。続いて 5–40% D Buffer (イミダゾール 25–200 mM)、30 mL 以上のグラジエントで溶出を行った。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分 (グラジエント開始直後に溶出した画分) を決定、回収した。

回収画分は 100 mM KCl E Buffer で約 3 h 以上透析し、MONOS S 4.6/100 PE (GE) による精製を行った。MONOS を十分量の 100 mM KCl E Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラープ (GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)

に接続し、流速 0.5 mL/min でカラムに投入した。目的タンパク質は 100 mM KCl E Buffer から 60% F Buffer の 15 CV 以上のグラジエントによって溶出し、1 mL ずつ分画して回収した。そして 15% SDS-PAGE によって、高い精製度の目的タンパク質が存在する画分を決定、回収した。

精製タンパク質は Amicon® Ultra centrifugal filter units MWCO 30 kDa (Merck Millipore)によって限外濾過を行った。F Buffer を間欠的に加えながら遠心を繰り返し、素通り画分を回収した。その後、Amicon® Ultra centrifugal filter units MWCO 3 kDa (Merck Millipore)を用いた限外濾過によって濃縮した。そして 1F Buffer、0F10G Buffer、S Buffer の順にそれぞれ約 3 h 以上ずつ透析を行った。精製タンパク質に沈殿を視認できた場合は 20000×g、4°C で 10 min 遠心し、上清のみを回収した。精製タンパク質の濃度はブラッドフォード法によって測定し、適当に分注した後液体窒素で急冷し、-70°C 以下で保存した。

2.3.25 リボソームタンパク質 L24 の精製

菌体湿重量 1 g に対し 10–20 mL 程度の A Buffer で懸濁した菌体を、金属ビーカーに移した。氷上に置かれた懸濁液は、Digital Sonifier 450 (BRANSON)を用いて 2 sec の超音波出力と 8 sec の休止を繰り返しながら、約 100 W 以下の出力で十分な時間破碎した。得られた大腸菌抽出液を 35 mL 遠沈管に移して 20000×g、4°C で 45 min 遠心し、上清をシリンジに入れて Millex®-HV Filter Unit Low Protein Binding Durapore® (PVDF) Membrane 0.45 µm (Merck Millipore)を通した。

このタンパク質溶液はニッケルカラム His Trap HP (GE)を用いたアフィニティ精製によって粗精製した。His Trap HP 5 mL を十分量の A Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。9.75 CV (column volume)の 5% B Buffer (イミダゾール 25 mM) でカラムを洗浄し、5–60% B Buffer (イミダゾール 25–300 mM)、50 mL 程度のグラジエントで流速 1 mL/min で溶出し、1 mL ずつ分画して回収した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。

回収画分にはプロテアーゼ Ulp1 活性部位を 1/2000–1/500 体積程度加えた後、A Buffer で一晚透析した。

切断された 6×His tag-SUMO はニッケルカラム His Trap HP (GE)を用いたアフィニティ精製によって除去された。His Trap HP 5 mL を十分量の A Buffer で平衡化し、

次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。素通り画分にかけて流速 1 mL/min で十分量の 5% B Buffer (イミダゾール 25 mM) を流し、これらを 1 mL ずつ試験管に分画した。続いて 5–40% B Buffer (イミダゾール 25–200 mM)、30 mL 以上のグラジエントで溶出を行った。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。

回収画分は 200 mM KCl 0E Buffer で約 3 h 以上透析し、MONOS S 4.6/100 PE (GE) による精製を行った。MONOS を十分量の 200 mM KCl 0E Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE) に接続し、流速 0.5 mL/min でカラムに投入した。目的タンパク質は 200 mM KCl 0E Buffer から 60% F5G Buffer の 15 CV 以上のグラジエントによって溶出し、1 mL ずつ分画して回収した。そして 15% SDS-PAGE によって、高い精製度の目的タンパク質が存在する画分 (25 kDa 付近のバンドは無視した) を決定、回収した。

精製タンパク質は Amicon® Ultra centrifugal filter units MWCO 3 kDa (Merck Millipore)を用いた限外濾過によって濃縮した。そして 20 mM MgCl₂ S0G Buffer、20 mM MgCl₂ S10G Buffer、20 mM MgCl₂ S Buffer の順にそれぞれ約 3 h 以上ずつ透析を行った。精製タンパク質に沈殿を視認できた場合は 20000×g、4°C で 10 min 遠心し、上清のみを回収した。精製タンパク質の濃度はブラッドフォード法によって測定し、適当に分注した後液体窒素で急冷し、−70°C 以下で保存した。

2.3.26 リボソームタンパク質 L25 の精製

菌体湿重量 1 g に対し 10–20 mL 程度の A Buffer で懸濁した菌体を、金属ビーカーに移した。氷上に置かれた懸濁液は、Digital Sonifier 450 (BRANSON)を用いて 2 sec の超音波出力と 8 sec の休止を繰り返しながら、約 100 W 以下の出力で十分な時間破碎した。得られた大腸菌抽出液を 35 mL 遠沈管に移して 20000×g、4°C で 45 min 遠心し、上清をシリンジに入れて Millex®-HV Filter Unit Low Protein Binding Durapore® (PVDF) Membrane 0.45 µm (Merck Millipore)を通した。

このタンパク質溶液はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって粗精製した。タンパク質溶液に 2–5%(v/v)程度の B Buffer を加えた後、十分量の A Buffer で平衡化した Ni-NTA agarose 6–8 mL 程度を加えた。4°C で 5 min 転倒混和した後、カラム 1 本あたり単体の体積が 2 mL 以下になるように溶液ごとエコノパック®カラム(BIO-RAD)に充填した。目的タンパク質は 50 CV(column volume)の

2 % B Buffer と 0.50 CV の 60% B Buffer で洗浄した後、1.25 CV の 60% B Buffer で 4 回溶出した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。回収画分にはプロテアーゼ Ulp1 活性部位を 1/2000-1/500 体積程度加えた後、C Buffer で一晩透析した。

切断された 6×His tag-SUMO はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって除去された。2 本のエコノパック®カラム(BIO-RAD) に 2 mL ずつの担体を充填し、1 本目は 10 CV の 5% D Buffer で、2 本目は C Buffer で平衡化した。次に Ulp1 処理したタンパク質溶液を 1 本目のカラムに加え素通り画分を回収し、更に 3 CV の 5% D Buffer、3 CV の D Buffer で溶出を行った。素通り画分と 5% D Buffer 画分を混合し 2 本目のカラムに加え、素通り画分を回収した。次に 2 CV の 2 % D Buffer で 2 回、3 CV の 5% D Buffer で 1 回、3 CV の D Buffer で 1 回溶出した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。

回収画分は 4LSE5G Buffer で約 3 h 以上透析し、Hi Trap Q (GE)及び Hi Trap SP (GE)による精製を行った。Hi Trap Q 5 mL と Hi Trap SP 5 mL をこの順に直列につなぎ、十分量の 4LSE5G Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。更に 4LSE5G Buffer を約 0.7 CV 以上流した後、Hi Trap Q のみを外した。目的タンパク質は 4LSE5G Buffer から 4F5G Buffer のグラジエントによって溶出し(すぐ溶出する)、1 mL ずつ分画して回収した。そして 18% SDS-PAGE によって、高い精製度の目的タンパク質が存在する画分(ピークの左約 1/3 を避けた)を決定、回収した。

精製タンパク質は Amicon® Ultra centrifugal filter units MWCO 3 kDa (Merck Millipore)を用いた限外濾過によって濃縮した。そして 4F10G Buffer、F10G Buffer、1F10G Buffer、0F10G Buffer、S Buffer の順にそれぞれ約 3 h 以上ずつ透析を行った。精製タンパク質に沈殿を視認できた場合は 20000×g、4°C で 10 min 遠心し、上清のみを回収した。精製タンパク質の濃度はブラッドフォード法によって測定し、適当に分注した後液体窒素で急冷し、-70°C 以下で保存した。

2.3.27 リボソームタンパク質 L27 の精製

菌体湿重量 1 g に対し 10-20 mL 程度の C Buffer で懸濁した菌体を、金属ビーカーに移した。氷上に置かれた懸濁液は、Digital Sonifier 450 (BRANSON)を用いて 2 sec の超音波出力と 8 sec の休止を繰り返しながら、約 100 W 以下の出力で十分な時間破碎し

た。得られた大腸菌抽出液を 35 mL 遠沈管に移して 20000×g、4°C で 45 min 遠心し、上清をシリンジに入れて Millex®-HV Filter Unit Low Protein Binding Durapore® (PVDF) Membrane 0.45 µm (Merck Millipore)を通した。

このタンパク質溶液はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって粗精製した。タンパク質溶液に 2–5%(v/v)程度の D Buffer を加えた後、十分量の C Buffer で平衡化した Ni-NTA agarose 6–8 mL 程度を加えた。4°C で 5 min 転倒混和した後、カラム 1 本あたり単体の体積が 2 mL 以下になるように溶液ごとエコノパック®カラム(BIO-RAD)に充填した。目的タンパク質は 50 CV(column volume)の 2 % D Buffer と 0.50 CV の 60% D Buffer で洗浄した後、1.25 CV の 60% D Buffer で 4 回溶出した。そして 20% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。回収画分にはプロテアーゼ Ulp1 活性部位を 1/2000–1/500 体積程度加えた後、C Buffer で一晚透析した。

切断された 6×His tag-SUMO はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって除去された。2 本のエコノパック®カラム(BIO-RAD)に 2 mL ずつの担体を充填し、1 本目は 10 CV の 5% D Buffer で、2 本目は C Buffer で平衡化した。次に Ulp1 処理したタンパク質溶液を 1 本目のカラムに加え素通り画分を回収し、更に 3 CV の 5% D Buffer、3 CV の D Buffer で溶出を行った。素通り画分と 5% D Buffer 画分を混合し 2 本目のカラムに加え、素通り画分を回収した。次に 2 CV の 2 % D Buffer で 2 回、3 CV の 5% D Buffer で 1 回、3 CV の D Buffer で 1 回溶出した。そして 20% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。

回収画分は 4E5G Buffer で約 3 h 以上透析し、Hi Trap Q (GE)及び Hi Trap SP (GE)による精製を行った。Hi Trap Q 5 mL と Hi Trap SP 5 mL をこの順に直列につなぎ、十分量の 4E5G Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。更に 4E5G Buffer を約 0.7 CV 以上流した後、Hi Trap Q のみを外した。目的タンパク質は 20% 4F5G Buffer から 4F5G Buffer のグラジエントによって溶出し、1 mL ずつ分画して回収した。280 nm のピークが観察される画分とその近傍の画分は十分量の 4E5G Buffer で希釈し、再び Hi Trap SP (GE)による精製を行った。平衡化には 4E5G Buffer を使い、目的タンパク質は流速 1 mL/min で 4E5G Buffer から 30% 4F5G Buffer のグラジエントによって溶出し、1 mL ずつ分画して回収した。そして 20% SDS-PAGE によって、高い精製度の目的タンパク質が存在する画分 (280 nm のピークの後ろに位

置する、220 nm の吸光のみが観察される画分) を決定、回収した。

回収画分は十分量の 4E5G Buffer で希釈し、精製タンパク質は MONOS S 4.6/100 PE (GE)によって濃縮した。MONOS を十分量の 4E5G Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 0.5 mL/min でカラムに投入した。目的タンパク質は 4F5G Buffer によって溶出し、適量ずつ画分して回収した。そして 20% SDS-PAGE によって、十分な濃度の目的タンパク質が存在する画分を決定、回収した。そして F5G Buffer、1F5G Buffer、0F10G Buffer、S Buffer の順にそれぞれ約 3 h 以上ずつ透析を行った。精製タンパク質に沈殿を視認できた場合は 20000×g、4°C で 10 min 遠心し、上清のみを回収した。精製タンパク質の濃度は BCA 法によって測定し、適当に分注した後液体窒素で急冷し、-70°C 以下で保存した。

2.3.28 リボソームタンパク質 L28 の精製

菌体湿重量 1 g に対し 10–20 mL 程度の 4C Buffer で懸濁した菌体を、金属ビーカーに移した。氷上に置かれた懸濁液は、Digital Sonifier 450 (BRANSON)を用いて 2 sec の超音波出力と 8 sec の休止を繰り返しながら、約 100 W 以下の出力で十分な時間破碎した。得られた大腸菌抽出液を 35 mL 遠沈管に移して 20000×g、4°C で 45 min 遠心し、上清をシリンジに入れて Millex®-HV Filter Unit Low Protein Binding Durapore® (PVDF) Membrane 0.45 µm (Merck Millipore)を通した。

このタンパク質溶液はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって粗精製した。タンパク質溶液に 2–5%(v/v)程度の 4D Buffer を加えた後、十分量の 4C Buffer で平衡化した Ni-NTA agarose 6–8 mL 程度を加えた。4°C で 5 min 転倒混和した後、カラム 1 本あたり単体の体積が 2 mL 以下になるように溶液ごとエコノパック®カラム(BIO-RAD)に充填した。目的タンパク質は 50 CV(column volume)の 2% 4D Buffer と 0.50 CV の 60% 4D Buffer で洗浄した後、1.25 CV の 60% 4D Buffer で 4 回溶出した。そして 20% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。回収画分にはプロテアーゼ Ulp1 活性部位を 1/2000–1/500 体積程度加えた後、C Buffer で一晩、続いて 4C Buffer で約 3 h 以上透析した。

切断された 6×His tag-SUMO はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって除去された。2 本のエコノパック®カラム(BIO-RAD)に 2 mL ずつの担体を充填し、1 本目は 10 CV の 5% 4D Buffer で、2 本目は 4C Buffer で平衡化した。次に Ulp1 処理したタンパク質溶液を 1 本目のカラムに加え素通り画分を

回収し、更に 3 CV の 5% 4D Buffer、3 CV の 4D Buffer で溶出を行った。素通り画分と 5% 4D Buffer 画分を混合し 2 本目のカラムに加え、素通り画分を回収した。次に 2 CV の 2% 4D Buffer で 2 回、3 CV の 5% 4D Buffer で 1 回、3 CV の 4D Buffer で 1 回溶出した。そして 20% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。

回収画分は 4E5G Buffer で約 3 h 以上透析し、Hi Trap Q (GE)及び Hi Trap SP (GE) による精製を行った。Hi Trap Q 5 mL と Hi Trap SP 5 mL をこの順に直列につなぎ、十分量の 4E5G Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。更に 4E5G Buffer を約 0.7 CV 以上流した後、Hi Trap Q のみを外した。目的タンパク質は 4E5G Buffer から 4F5G Buffer のグラジエントによって溶出し、1 mL ずつ分画して回収した。そして 20% SDS-PAGE によって、高い精製度の目的タンパク質が存在する画分（分離ゲル上端に詰まった夾雑物は無視した）を決定、回収した。

回収画分は十分量の 4E5G Buffer で希釈し、精製タンパク質は MONOS S 4.6/100 PE (GE)によって濃縮した。MONOS を十分量の 4E5G Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 0.5 mL/min でカラムに投入した。目的タンパク質は 4F5G Buffer によって溶出し、適量ずつ分画して回収した。そして 20% SDS-PAGE によって、十分な濃度の目的タンパク質が存在する画分を決定、回収した。そして 6F5G Buffer、4F5G Buffer、F5G Buffer、1F5G Buffer、0F10G Buffer、S Buffer の順にそれぞれ約 3 h 以上ずつ透析を行った。精製タンパク質に沈殿を視認できた場合は 20000×g、4°C で 10 min 遠心し、上清のみを回収した。精製タンパク質の濃度は BCA 法によって測定し、適宜に分注した後液体窒素で急冷し、-70°C 以下で保存した。

2.3.29 リボソームタンパク質 L29 の精製

菌体湿重量 1 g に対し 10–20 mL 程度の A Buffer で懸濁した菌体を、金属ビーカーに移した。氷上に置かれた懸濁液は、Digital Sonifier 450 (BRANSON)を用いて 2 sec の超音波出力と 8 sec の休止を繰り返しながら、約 100 W 以下の出力で十分な時間破碎した。得られた大腸菌抽出液を 35 mL 遠沈管に移して 20000×g、4°C で 45 min 遠心し、上清をシリンジに入れて Millex®-HV Filter Unit Low Protein Binding Durapore® (PVDF) Membrane 0.45 µm (Merck Millipore)を通した。

このタンパク質溶液はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニテ

ィ精製によって粗精製した。タンパク質溶液に 2-5%(v/v)程度の B Buffer を加えた後、十分量の A Buffer で平衡化した Ni-NTA agarose 6-8 mL 程度を加えた。4°C で 5 min 転倒混和した後、カラム 1 本あたり単体の体積が 2 mL 以下になるように溶液ごとエコノパック®カラム(BIO-RAD)に充填した。目的タンパク質は 50 CV(column volume)の 2% B Buffer と 0.50 CV の 60% B Buffer で洗浄した後、1.25 CV の 60% B Buffer で 4 回溶出した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。

回収画分は C Buffer で一晩透析し、再度ニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)による精製を行った。2 本のエコノパック®カラムに充填した担体 2 mL ずつを 10 CV の C Buffer で平衡化し、その後タンパク質溶液を 1 本目のカラムに加え、素通り画分を 2 本目のカラムに加えた。目的タンパク質は 10 CV の 2% D Buffer で洗浄し 1.25 CV の 60% D Buffer で 4 回溶出した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。

回収画分にはプロテアーゼ Ulp1 活性部位を 1/2000-1/500 体積程度加えた後、C Buffer で一晩透析した。

切断された 6×His tag-SUMO はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって除去された。3 本のエコノパック®カラム(BIO-RAD)に 2 mL ずつの担体を充填し、1 本目は 10 CV の 5% D Buffer で、2 本目以降は C Buffer で平衡化した。次に Ulp1 処理したタンパク質溶液を 1 本目のカラムに加え素通り画分を回収し、更に 3 CV の 5% D Buffer、3 CV の D Buffer で溶出を行った。素通り画分と 5% D Buffer 画分を混合し 2 本目のカラムに加え、素通り画分を回収した。次に 2 CV の 2% D Buffer で 2 回、3 CV の 5% D Buffer で 1 回、3 CV の D Buffer で 1 回溶出した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。回収画分は 3 本目のカラムに加え、2 本目と同様の操作を行い、残存する 6×his tag-SUMO を更に除去した。

回収画分は 4Q Buffer で約 3 h 以上透析し、更に外液を一度交換し内液の完全な置換を行い、又は透析後のタンパク質溶液を十分量の 4Q Buffer で希釈し、Hi Trap Q (GE)による精製を行った。Hi Trap Q 5 mL を十分量の 4Q Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。主に素通り画分に検出された目的タンパク質を回収した。そして 18% SDS-PAGE によって、比較的高い精製度の目的タンパク質が存在する画分を決定、回収した。

精製タンパク質は硫酸沈殿によって濃縮した。Type 45Ti Rotor (Beckman Coulter) 用チューブに精製タンパク質溶液を注ぎ、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 粉末を 80%飽和になるように加えた。80%飽和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 水溶液をチューブの肩口まで加え、Type 45 Ti Rotor に入れて 32000 rpm (RCF at rmax: 119000×g), 4°C で 30 min 遠心した。上清をピペッティングによって完全に捨て、沈殿を適量の 4Q Buffer で溶解した。そして F10G Buffer、1F10G Buffer、0F10G Buffer、S Buffer の順にそれぞれ約 3 h 以上ずつ透析を行った。精製タンパク質に沈殿を視認できた場合は 20000×g、4°C で 10 min 遠心し、上清のみを回収した。精製タンパク質の濃度は BCA 法によって測定し、適量に分注した後液体窒素で急冷し、-70°C 以下で保存した。

2.3.30 リボソームタンパク質 L30 の精製

菌体湿重量 1 g に対し 10–20 mL 程度の 4C Buffer で懸濁した菌体を、金属ビーカーに移した。氷上に置かれた懸濁液は、Digital Sonifier 450 (BRANSON)を用いて 2 sec の超音波出力と 8 sec の休止を繰り返しながら、約 100 W 以下の出力で十分な時間破碎した。得られた大腸菌抽出液を 35 mL 遠沈管に移して 20000×g、4°C で 45 min 遠心し、上清をシリンジに入れて Millex®-HV Filter Unit Low Protein Binding Durapore® (PVDF) Membrane 0.45 μm (Merck Millipore)を通した。

このタンパク質溶液はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって粗精製した。タンパク質溶液に 2–5%(v/v)程度の 4D Buffer を加えた後、十分量の 4C Buffer で平衡化した Ni-NTA agarose 6–8 mL 程度を加えた。4°C で 5 min 転倒混和した後、カラム 1 本あたり単体の体積が 2 mL 以下になるように溶液ごとエコノパック®カラム(BIO-RAD)に充填した。目的タンパク質は 50 CV(column volume)の 2% 4D Buffer と 0.50 CV の 60% 4D Buffer で洗浄した後、1.25 CV の 60% 4D Buffer で 4 回溶出した。そして 20% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。回収画分にはプロテアーゼ Ulp1 活性部位を 1/2000–1/500 体積程度加えた後、C Buffer で一晩透析した。

切断された 6×His tag-SUMO はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって除去された。2 本のエコノパック®カラム(BIO-RAD)に 2 mL ずつの担体を充填し、1 本目は 10 CV の 5% 4D Buffer で、2 本目は 4C Buffer で平衡化した。次に Ulp1 処理したタンパク質溶液を 1 本目のカラムに加え素通り画分を回収し、更に 3 CV の 5% 4D Buffer、3 CV の 4D Buffer で溶出を行った。素通り画分と 5% 4D Buffer 画分を混合し 2 本目のカラムに加え、素通り画分を回収した。次に 2

CV の 2 % 4D Buffer で 2 回、3 CV の 5% 4D Buffer で 1 回、3 CV の 4D Buffer で 1 回溶出した。そして 20% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。

回収画分は 4E5G Buffer で約 3 h 以上透析し、Hi Trap Q (GE)及び Hi Trap SP (GE) による精製を行った。Hi Trap Q 5 mL と Hi Trap SP 5 mL をこの順に直列につなぎ、十分量の 4E5G Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。更に 4E5G Buffer を約 0.7 CV 以上流した後、Hi Trap Q のみを外した。目的タンパク質は 4E5G Buffer から 4F5G Buffer のグラジエントによって溶出し、1 mL ずつ分画して回収した。そして 20% SDS-PAGE によって、高い精製度の目的タンパク質が存在する画分を決定、回収した。

回収画分は 100 mM KCl E5G Buffer で約 3 h 以上透析し、再度 Hi Trap Q (GE)及び Hi Trap SP (GE)による精製を同様の手順で行った。但し平衡化バッファーには 100 mM KCl E5G Buffer、溶出バッファーには F5G Buffer を用いた。また回収画分は、220 nm の吸光のピークの後ろ半分とした。

回収画分は十分量の E5G Buffer で希釈し、精製タンパク質は MONOS S 4.6/100 PE (GE)によって濃縮した。MONOS を十分量の 100 mM KCl E5G Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 0.5 mL/min でカラムに投入した。目的タンパク質は F5G Buffer によって溶出し、適量ずつ分画して回収した。そして 20% SDS-PAGE によって、十分な濃度の目的タンパク質が存在する画分を決定、回収した。そして 1F5G Buffer、0F10G Buffer、S Buffer の順にそれぞれ約 3 h 以上ずつ透析を行った。精製タンパク質に沈殿を視認できた場合は 20000×g、4°C で 10 min 遠心し、上清のみを回収した。精製タンパク質の濃度は BCA 法によって測定し、適当に分注した後液体窒素で急冷し、-70°C 以下で保存した。

2.3.31 リボソームタンパク質 L31 の精製

菌体湿重量 1 g に対し 10-20 mL 程度の 4A Buffer で懸濁した菌体を、金属ビーカーに移した。氷上に置かれた懸濁液は、Digital Sonifier 450 (BRANSON)を用いて 2 sec の超音波出力と 8 sec の休止を繰り返しながら、約 100 W 以下の出力で十分な時間破碎した。得られた大腸菌抽出液を 35 mL 遠沈管に移して 20000×g、4°C で 45 min 遠心し、上清をシリンジに入れて Millex®-HV Filter Unit Low Protein Binding Durapore®

(PVDF) Membrane 0.45 μm (Merck Millipore)を通した。

このタンパク質溶液はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって粗精製した。タンパク質溶液に 2-5%(v/v)程度の 4D Buffer を加えた後、十分量の 4A Buffer で平衡化した Ni-NTA agarose 6-8 mL 程度を加えた。4°C で 5 min 転倒混和した後、カラム 1 本あたり単体の体積が 2 mL 以下になるように溶液ごとエコノパック®カラム(BIO-RAD)に充填した。目的タンパク質は 50 CV(column volume)の 2% 4D Buffer と 0.50 CV の 60% 4D Buffer で洗浄した後、1.25 CV の 60% 4D Buffer で 4 回溶出した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。

回収画分は 4C Buffer で一晩透析し、再度ニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)による精製を行った。3 本のエコノパック®カラムに充填した担体 2 mL ずつを 10 CV の 4C Buffer で平衡化し、その後タンパク質溶液をそれぞれのカラムに 1/3 体積ずつ加えた。目的タンパク質の洗浄以降は 1 回目のカラム精製と同様の手順で行った。但し平衡化バッファーには 4C Buffer を用いた。回収画分にはプロテアーゼ Ulp1 活性部位を 1/2000-1/500 体積程度加えた後、C Buffer で一晩、続いて 4C Buffer で約 3 h 以上透析した。

切断された 6×His tag-SUMO はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって除去出来なかった。2 本のエコノパック®カラム(BIO-RAD)に 2 mL ずつの担体を充填し、1 本目は 10 CV の 5% 4D Buffer で、2 本目は 4C Buffer で平衡化した。次に Ulp1 処理したタンパク質溶液を 1 本目のカラムに加え素通り画分を回収し、更に 3 CV の 5% 4D Buffer、3 CV の 4D Buffer で溶出を行った。素通り画分と 5% 4D Buffer 画分を混合し 2 本目のカラムに加え、素通り画分を回収した。次に 2 CV の 2% 4D Buffer で 2 回、3 CV の 5% 4D Buffer で 1 回、3 CV の 4D Buffer で 1 回溶出した。そして 20% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。

回収画分は 4E5G Buffer で約 3 h 以上透析し、Hi Trap Q (GE)及び Hi Trap SP (GE)による精製を行った。Hi Trap Q 5 mL と Hi Trap SP 5 mL をこの順に直列につなぎ、十分量の 4E5G Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。更に 4E5G Buffer を約 0.7 CV 以上流した後、Hi Trap Q のみを外した。目的タンパク質は 4E5G Buffer から 4F5G Buffer のグラジエントによって溶出し(素通り画分から溶出が始まった)、1 mL ずつ分画して回収した。そして 20% SDS-PAGE によ

て、目的タンパク質が存在する画分を決定、回収した。回収画分に残存した SUMO 未切断の L31 は Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって除去出来なかった。回収画分をカラムに加え、素通り画分に続いて 2 CV の 4E5G Buffer を加えた。その後 3 CV の 4D Buffer で溶出し、溶出画分は 4E Buffer で約 3 h 以上透析した。

残存した SUMO 未切断の L31 はニッケルカラム His Trap HP (GE)を用いたアフィニティ精製によって除去された。His Trap HP 5 mL を十分量の 4E Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。流速 1 mL/min で 0-40% 4D Buffer (イミダゾール 25-200 mM)、30 mL 以上のグラジエントで溶出を行い、1 mL ずつ分画した。そして 20% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分 (15 kDa 付近のバンドは無視した) を決定、回収した。

回収画分は 4LSE5G Buffer で約 3 h 以上透析し、精製タンパク質は MONOS S 4.6/100 PE (GE)によって濃縮した。MONOS を十分量の 4LSE5G Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 0.5 mL/min でカラムに投入した。目的タンパク質は 4F5G Buffer によって溶出し、適量ずつ分画して回収した。そして 20% SDS-PAGE によって、十分な濃度の目的タンパク質が存在する画分を決定、回収した。そして F5G Buffer、1F5G Buffer、0F10G Buffer、S Buffer の順にそれぞれ約 3 h 以上ずつ透析を行った。精製タンパク質に沈殿を視認できた場合は 20000×g、4°C で 10 min 遠心し、上清のみを回収した。精製タンパク質の濃度は BCA 法によって測定し、適当に分注した後液体窒素で急冷し、-70°C 以下で保存した。

2.3.32 リボソームタンパク質 L32 の精製

菌体湿重量 1 g に対し 10-20 mL 程度の A Buffer で懸濁した菌体を、金属ビーカーに移した。氷上に置かれた懸濁液は、Digital Sonifier 450 (BRANSON)を用いて 2 sec の超音波出力と 8 sec の休止を繰り返しながら、約 100 W 以下の出力で十分な時間破碎した。得られた大腸菌抽出液を 35 mL 遠沈管に移して 20000×g、4°C で 45 min 遠心し、上清をシリンジに入れて Millex®-HV Filter Unit Low Protein Binding Durapore® (PVDF) Membrane 0.45 µm (Merck Millipore)を通した。

このタンパク質溶液はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって粗精製した。タンパク質溶液に 2-5%(v/v)程度の B Buffer を加えた後、十分量の A Buffer で平衡化した Ni-NTA agarose 6-8 mL 程度を加えた。4°C で 5 min

転倒混和した後、カラム 1 本あたり単体の体積が 2 mL 以下になるように溶液ごとエコノパック®カラム(BIO-RAD)に充填した。目的タンパク質は 50 CV(column volume)の 2% B Buffer と 0.50 CV の 60% B Buffer で洗浄した後、1.25 CV の 60% B Buffer で 4 回溶出した。そして 20% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。回収画分にはプロテアーゼ Ulp1 活性部位を 1/2000–1/500 体積程度加えた後、A Buffer で一晚透析した。

切断された 6×His tag-SUMO はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって除去された。2 本のエコノパック®カラム(BIO-RAD)に 2 mL ずつの担体を充填し、1 本目は 10 CV の 5% B Buffer で、2 本目は A Buffer で平衡化した。次に Ulp1 処理したタンパク質溶液を 1 本目のカラムに加え素通り画分を回収し、更に 3 CV の 5% B Buffer、3 CV の B Buffer で溶出を行った。素通り画分と 5% B Buffer 画分を混合し 2 本目のカラムに加え、素通り画分を回収した。次に 2 CV の 2% B Buffer で 2 回、3 CV の 5% B Buffer で 1 回、3 CV の B Buffer で 1 回溶出した。そして 20% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。

回収画分は E5G Buffer で約 3 h 以上透析し、Hi Trap Q (GE)及び Hi Trap SP (GE)による精製を行った。Hi Trap Q 5 mL と Hi Trap SP 5 mL をこの順に直列につなぎ、十分量の E5G Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。更に E5G Buffer を約 0.7 CV 以上流した後、Hi Trap Q のみを外した。目的タンパク質は E5G Buffer から F5G Buffer のグラジエントによって溶出し、1 mL ずつ分画して回収した。そして 20% SDS-PAGE によって、高い精製度の目的タンパク質が存在する画分を決定、回収した。

回収画分は十分量の E5G Buffer で希釈し、精製タンパク質は MONOS S 4.6/100 PE (GE)によって濃縮した。MONOS を十分量の E5G Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 0.5 mL/min でカラムに投入した。目的タンパク質は F5G Buffer によって溶出し、適量ずつ分画して回収した。そして 20% SDS-PAGE によって、十分な濃度の目的タンパク質が存在する画分を決定、回収した。そして F5G Buffer、1F5G Buffer、0F10G Buffer、S Buffer の順にそれぞれ約 3 h 以上ずつ透析を行った。精製タンパク質に沈殿を視認できた場合は 20000×g、4°C で 10 min 遠心し、上清のみを回収した。精製タンパク質の濃度は BCA 法によって測定し、適当に分注した後液体窒素で急冷し、−70°C 以下で保存した。

2.3.33 リボソームタンパク質 L33 の精製

菌体湿重量 1 g に対し 10–20 mL 程度の A Buffer で懸濁した菌体を、金属ビーカーに移した。氷上に置かれた懸濁液は、Digital Sonifier 450 (BRANSON)を用いて 2 sec の超音波出力と 8 sec の休止を繰り返しながら、約 100 W 以下の出力で十分な時間破碎した。得られた大腸菌抽出液を 35 mL 遠沈管に移して 20000×g、4°C で 45 min 遠心し、上清をシリンジに入れて Millex®-HV Filter Unit Low Protein Binding Durapore® (PVDF) Membrane 0.45 µm (Merck Millipore)を通した。

このタンパク質溶液はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって粗精製した。タンパク質溶液に 2–5%(v/v)程度の B Buffer を加えた後、十分量の A Buffer で平衡化した Ni-NTA agarose 6–8 mL 程度を加えた。4°C で 5 min 転倒混和した後、カラム 1 本あたり単体の体積が 2 mL 以下になるように溶液ごとエコノパック®カラム(BIO-RAD)に充填した。目的タンパク質は 50 CV(column volume)の 2% B Buffer と 0.50 CV の 60% B Buffer で洗浄した後、1.25 CV の 60% B Buffer で 4 回溶出した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。回収画分にはプロテアーゼ Ulp1 活性部位を 1/2000–1/500 体積程度加えた後、A Buffer で一晚透析した。

切断された 6×His tag-SUMO はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって除去された。2 本のエコノパック®カラム(BIO-RAD)に 2 mL ずつの担体を充填し、1 本目は 10 CV の 5% B Buffer で、2 本目は A Buffer で平衡化した。次に Ulp1 処理したタンパク質溶液を 1 本目のカラムに加え素通り画分を回収し、更に 3 CV の 5% B Buffer、3 CV の B Buffer で溶出を行った。素通り画分と 5% B Buffer 画分を混合し 2 本目のカラムに加え、素通り画分を回収した。次に 2 CV の 2% B Buffer で 2 回、3 CV の 5% B Buffer で 1 回、3 CV の B Buffer で 1 回溶出した。そして 19% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。

回収画分は 100 mM KCl E Buffer で約 3 h 以上透析し、更に外液を一度交換し内液の完全な置換を行い、又は透析後のタンパク質溶液を十分量の LSE Buffer で希釈し、MONOS S 4.6/100 PE (GE)による精製を行った。MONOS を十分量の 100 mM KCl E Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 0.5 mL/min でカラムに投入した。目的タンパク質は 100 mM KCl E Buffer から 60% F5G Buffer の 15 CV 以上のグラジエントによって溶出し、1 mL ずつ分画して回収した。そして 18% SDS-PAGE によって、高い精製度の目的タンパク質が存在する画分 (15 kDa 付近のバンドは無視した) を決定、回

収した。

精製タンパク質は硫酸沈殿によって濃縮した。Type 45Ti Rotor (Beckman Coulter) 用チューブに精製タンパク質溶液を注ぎ、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 粉末を 80%飽和になるように加えた。80%飽和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 水溶液をチューブの肩口まで加え、Type 45 Ti Rotor に入れて 32000 rpm (RCF at rmax: 119000×g), 4°C で 30 min 遠心した。上清をピペッティングによって完全に捨て、沈殿を適量の 100 mM KCl E Buffer で溶解した。そして 1F 10G Buffer、0F10G Buffer、S Buffer の順にそれぞれ約 3 h 以上ずつ透析を行った。精製タンパク質に沈殿を視認できた場合は 20000×g、4°C で 10 min 遠心し、上清のみを回収した。精製タンパク質の濃度は BCA 法によって測定し、適当に分注した後液体窒素で急冷し、-70°C 以下で保存した。

2.3.34 リボソームタンパク質 L34 の精製

菌体湿重量 1 g に対し 10–20 mL 程度の A Buffer で懸濁した菌体を、金属ビーカーに移した。氷上に置かれた懸濁液は、Digital Sonifier 450 (BRANSON)を用いて 2 sec の超音波出力と 8 sec の休止を繰り返しながら、約 100 W 以下の出力で十分な時間破碎した。得られた大腸菌抽出液を 35 mL 遠沈管に移して 20000×g、4°C で 45 min 遠心し、上清をシリンジに入れて Millex®-HV Filter Unit Low Protein Binding Durapore® (PVDF) Membrane 0.45 μm (Merck Millipore)を通した。

このタンパク質溶液はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって粗精製した。タンパク質溶液に 2–5%(v/v)程度の B Buffer を加えた後、十分量の A Buffer で平衡化した Ni-NTA agarose 6–8 mL 程度を加えた。4°C で 5 min 転倒混和した後、カラム 1 本あたり単体の体積が 2 mL 以下になるように溶液ごとエコノパック®カラム(BIO-RAD)に充填した。目的タンパク質は 50 CV(column volume)の 2 % B Buffer と 0.50 CV の 60% B Buffer で洗浄した後、1.25 CV の 60% B Buffer で 4 回溶出した。そして 18% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。回収画分にはプロテアーゼ Ulp1 活性部位を 1/2000–1/500 体積程度加えた後、A Buffer で一晚透析した。

切断された 6×His tag-SUMO はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって除去された。2 本のエコノパック®カラム(BIO-RAD) に 2 mL ずつの担体を充填し、1 本目は 10 CV の 5% B Buffer で、2 本目は A Buffer で平衡化した。次に Ulp1 処理したタンパク質溶液を 1 本目のカラムに加え素通り画分を回収し、更に 3 CV の 5% B Buffer、3 CV の B Buffer で溶出を行った。素通り画分と 5% B

Buffer 画分を混合し 2 本目のカラムに加え、素通り画分を回収した。次に 2 CV の 2 % B Buffer で 2 回、3 CV の 5% B Buffer で 1 回、3 CV の B Buffer で 1 回溶出した。そして 18% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。

回収画分は 100 mM KCl E5G Buffer で約 3 h 以上透析し、MONOS S 4.6/100 PE (GE)による精製を行った。MONOS を十分量の 100 mM KCl E5G Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 0.5 mL/min でカラムに投入した。目的タンパク質は 100 mM KCl E5G Buffer から 30% F5G Buffer の 15 CV 以上のグラジエントによって溶出し、続いて 30% F5G Buffer で洗浄した。220 nm の吸光度が上昇しはじめたところで F5G Buffer で溶出し、流速を 0.2 mL/min に下げ、適量ずつ分画して回収した。そして 18% SDS-PAGE によって、高い濃度の目的タンパク質が存在する画分を決定、回収した。

精製タンパク質は 1F10G Buffer、0F10G Buffer、S Buffer の順にそれぞれ約 3 h 以上ずつ透析を行った。精製タンパク質に沈殿を視認できた場合は 20000×g、4°C で 10 min 遠心し、上清のみを回収した。精製タンパク質の濃度は BCA 法によって測定し、適当に分注した後液体窒素で急冷し、-70°C 以下で保存した。

2.3.35 リボソームタンパク質 L35 の精製

菌体湿重量 1 g に対し 10-20 mL 程度の 4A Buffer で懸濁した菌体を、金属ビーカーに移した。氷上に置かれた懸濁液は、Digital Sonifier 450 (BRANSON)を用いて 2 sec の超音波出力と 8 sec の休止を繰り返しながら、約 100 W 以下の出力で十分な時間破碎した。得られた大腸菌抽出液を 35 mL 遠沈管に移して 20000×g、4°C で 45 min 遠心し、上清をシリンジに入れて Millex®-HV Filter Unit Low Protein Binding Durapore® (PVDF) Membrane 0.45 µm (Merck Millipore)を通した。

このタンパク質溶液はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって粗精製した。タンパク質溶液に 2-5%(v/v)程度の 4D Buffer を加えた後、十分量の 4A Buffer で平衡化した Ni-NTA agarose 6-8 mL 程度を加えた。4°C で 5 min 転倒混和した後、カラム 1 本あたり単体の体積が 2 mL 以下になるように溶液ごと エコノパック®カラム (BIO-RAD)に充填した。目的タンパク質は 50 CV(column volume)の 2% 4D Buffer と 0.50 CV の 60% 4D Buffer で洗浄した後、1.25 CV の 60% 4D Buffer で 4 回溶出した。そして 20% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。

回収画分にはプロテアーゼ Ulp1 活性部位を 1/2000–1/500 体積程度加えた後、C Buffer で一晚、続いて 4C Buffer で約 3 h 以上透析した。

切断された 6×His tag-SUMO はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって除去された。2 本のエコノパック®カラム(BIO-RAD) に 2 mL ずつの担体を充填し、1 本目は 10 CV の 5% 4D Buffer で、2 本目は 4C Buffer で平衡化した。次に Ulp1 処理したタンパク質溶液を 1 本目のカラムに加え素通り画分を回収し、更に 3 CV の 5% 4D Buffer、3 CV の 4D Buffer で溶出を行った。素通り画分と 5% 4D Buffer 画分を混合し 2 本目のカラムに加え、素通り画分を回収した。次に 2 CV の 2% 4D Buffer で 2 回、3 CV の 5% 4D Buffer で 1 回、3 CV の 4D Buffer で 1 回溶出した。そして 20% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。

回収画分は 4E5G Buffer で約 3 h 以上透析し、Hi Trap Q (GE)及び Hi Trap SP (GE) による精製を行った。Hi Trap Q 5 mL と Hi Trap SP 5 mL をこの順に直列につなぎ、十分量の 4E5G Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。更に 4E5G Buffer を約 0.7 CV 以上流した後、Hi Trap Q のみを外した。目的タンパク質は十分量の 40% 4F5G Buffer で洗浄した後、4E5G Buffer から 4F5G Buffer、40–60%のグラジエントによって溶出し (すぐに溶出する)、1 mL ずつ分画して回収した。そして 20% SDS-PAGE によって、高い精製度の目的タンパク質が存在する画分を決定、回収した。

回収画分は十分量の 4E5G Buffer で希釈し、精製タンパク質は MONOS S 4.6/100 PE (GE)によって濃縮した。MONOS を十分量の 4E5G Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 0.5 mL/min でカラムに投入した。目的タンパク質は 4F5G Buffer によって溶出し、適量ずつ分画して回収した。そして 20% SDS-PAGE によって、十分な濃度の目的タンパク質が存在する画分を決定、回収した。そして F5G Buffer、1F5G Buffer、0F10G Buffer、S Buffer の順にそれぞれ約 3 h 以上ずつ透析を行った。精製タンパク質に沈殿を視認できた場合は 20000×g、4°C で 10 min 遠心し、上清のみを回収した。精製タンパク質の濃度は BCA 法によって測定し、適当に分注した後液体窒素で急冷し、−70°C 以下で保存した。

2.3.36 リボソームタンパク質 L36 の精製

菌体湿重量 1 g に対し 10–20 mL 程度の A Buffer で懸濁した菌体を、金属ビーカーに移した。氷上に置かれた懸濁液は、Digital Sonifier 450 (BRANSON)を用いて 2 sec の超音波出力と 8 sec の休止を繰り返しながら、約 100 W 以下の出力で十分な時間破碎した。得られた大腸菌抽出液を 35 mL 遠沈管に移して 20000×g、4°C で 45 min 遠心し、上清をシリンジに入れて Millex®-HV Filter Unit Low Protein Binding Durapore® (PVDF) Membrane 0.45 µm (Merck Millipore)を通した。

このタンパク質溶液はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって粗精製した。タンパク質溶液に 2–5%(v/v)程度の B Buffer を加えた後、十分量の A Buffer で平衡化した Ni-NTA agarose 6–8 mL 程度を加えた。4°C で 5 min 転倒混和した後、カラム 1 本あたり単体の体積が 2 mL 以下になるように溶液ごとエコノパック®カラム(BIO-RAD)に充填した。目的タンパク質は 50 CV(column volume)の 2% B Buffer と 0.50 CV の 60% B Buffer で洗浄した後、1.25 CV の 60% B Buffer で 4 回溶出した。そして 20% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。

回収画分は 2A Buffer で一晩透析し、再度ニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)による精製を行った。3 本のエコノパック®カラムに充填した担体 2 mL ずつを 10 CV の 2A Buffer で平衡化し、その後タンパク質溶液をそれぞれのカラムに 1/3 体積ずつ加えた。目的タンパク質の洗浄以降は 1 回目のカラム精製と同様の手順で行った。但し平衡化バッファーには 2A Buffer、溶出バッファーは D Buffer を用いた。回収画分にはプロテアーゼ Ulp1 活性部位を 1/2000–1/500 体積程度加えた後、C Buffer で一晩透析した。

切断された 6×His tag-SUMO はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって除去された。2 本のエコノパック®カラム(BIO-RAD)に 2 mL ずつの担体を充填し、1 本目は 10 CV の 5% D Buffer で、2 本目は C Buffer で平衡化した。次に Ulp1 処理したタンパク質溶液を 1 本目のカラムに加え素通り画分を回収し、更に 3 CV の 5% D Buffer、3 CV の D Buffer で溶出を行った。素通り画分と 5% D Buffer 画分を混合し 2 本目のカラムに加え、素通り画分を回収した。次に 2 CV の 2% D Buffer で 2 回、3 CV の 5% D Buffer で 1 回、3 CV の D Buffer で 1 回溶出した。そして 20% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。

回収画分は E5G Buffer で約 3 h 以上透析し、Hi Trap Q (GE)及び Hi Trap SP (GE)

による精製を行った。Hi Trap Q 5 mL と Hi Trap SP 5 mL をこの順に直列につなぎ、十分量の E5G Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。更に E5G Buffer を約 0.7 CV 以上流した後、Hi Trap Q のみを外した。目的タンパク質は E5G Buffer から F5G Buffer のグラジエントによって溶出し、1 mL ずつ分画して回収した。そして 20% SDS-PAGE によって、目的タンパク質が多く存在する画分を決定、回収した。

回収画分は十分量の 4LSE5G Buffer で希釈し、再び Hi Trap Q (GE)及び Hi Trap SP (GE)による精製を行った。同様の操作で精製したが、平衡化バッファは 4LSE Buffer、溶出バッファは 4F Buffer を用いた。そして 20% SDS-PAGE によって、比較的高い濃度の目的タンパク質が多く存在する画分（目的タンパク質の両側に存在する 280 nm のピークを含む画分を取り過ぎないようにした）を決定、回収した。

精製タンパク質は F5G Buffer、1F5G Buffer、0F10G Buffer、S Buffer の順にそれぞれ約 3 h 以上ずつ透析を行った。精製タンパク質に沈殿を視認できた場合は 20000×g、4°C で 10 min 遠心し、上清のみを回収した。精製タンパク質の濃度は BCA 法によって測定し、適当に分注した後液体窒素で急冷し、-70°C 以下で保存した。

2.3.37 修飾酵素 PrmB と共発現したリボソームタンパク質 L3 の精製

菌体湿重量 1 g に対し 10–20 mL 程度の 4C Buffer で懸濁した菌体を、金属ビーカーに移した。氷上に置かれた懸濁液は、Digital Sonifier 450 (BRANSON)を用いて 2 sec の超音波出力と 8 sec の休止を繰り返しながら、約 100 W 以下の出力で十分な時間破碎した。得られた大腸菌抽出液を 35 mL 遠沈管に移して 20000×g、4°C で 45 min 遠心し、上清をシリンジに入れて Millex®-HV Filter Unit Low Protein Binding Durapore® (PVDF) Membrane 0.45 µm (Merck Millipore)を通した。

このタンパク質溶液はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって粗精製した。タンパク質溶液に 2–5%(v/v)程度の 4D Buffer を加えた後、十分量の 4C Buffer で平衡化した Ni-NTA agarose 6–8 mL 程度を加えた。4°C で 5 min 転倒混和した後、カラム 1 本あたり単体の体積が 2 mL 以下になるように溶液ごとエコノパック®カラム(BIO-RAD)に充填した。目的タンパク質は 50 CV(column volume)の 2% 4D Buffer と 0.50 CV の 60% 4D Buffer で洗浄した後、1.25 CV の 60% 4D Buffer で 4 回溶出した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。回収画分にはプロテアーゼ Ulp1 活性部位を 1/2000–1/500

体積程度加えた後、C Buffer で一晚透析した。

切断された 6×His tag-SUMO はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって除去された。2 本のエコノパック®カラム(BIO-RAD) に 2 mL ずつの担体を充填し、1 本目は 10 CV の 5% D Buffer で、2 本目は 4C Buffer で平衡化した。次に Ulp1 処理したタンパク質溶液を 1 本目のカラムに加え素通り画分を回収し、更に 3 CV の 5% D Buffer、3 CV の D Buffer で溶出を行った。素通り画分と 5% D Buffer 画分を混合し 2 本目のカラムに加え、素通り画分を回収した。次に 2 CV の 2 % D Buffer で 2 回、3 CV の 5% D Buffer で 1 回、3 CV の D Buffer で 1 回溶出した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。

回収画分は 4E5G Buffer で約 3 h 以上透析し、Hi Trap Q (GE)及び Hi Trap SP (GE)による精製を行った。Hi Trap Q 5 mL と Hi Trap SP 5 mL をこの順に直列につなぎ、十分量の 4E5G Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。更に 4E5G Buffer を約 0.7 CV 以上流した後、Hi Trap Q のみを外した。目的タンパク質は 4E5G Buffer から 4F5G Buffer のグラジエントによって溶出し (素通り画分から溶出し始める)、1 mL ずつ分画して回収した。そして 15% SDS-PAGE によって、高い精製度の目的タンパク質が存在する画分を決定、回収した。

精製タンパク質は Amicon® Ultra centrifugal filter units MWCO 3 kDa (Merck Millipore)を用いた限外濾過によって濃縮した。そして F10G Buffer、1F10G Buffer、0F10G Buffer、S Buffer の順にそれぞれ約 3 h 以上ずつ透析を行った。精製タンパク質に沈殿を視認できた場合は 20000×g、4°C で 10 min 遠心し、上清のみを回収した。精製タンパク質の濃度はブラッドフォード法によって測定し、適当に分注した後液体窒素で急冷し、-70°C 以下で保存した。

2.3.38 修飾酵素 PrmA と共発現したリボソームタンパク質 L11 の精製

菌体湿重量 1 g に対し 10–20 mL 程度の A Buffer で懸濁した菌体を、金属ビーカーに移した。氷上に置かれた懸濁液は、Digital Sonifier 450 (BRANSON)を用いて 2 sec の超音波出力と 8 sec の休止を繰り返しながら、約 100 W 以下の出力で十分な時間破碎した。得られた大腸菌抽出液を 35 mL 遠沈管に移して 20000×g、4°C で 45 min 遠心し、上清をシリンジに入れて Millex®-HV Filter Unit Low Protein Binding Durapore® (PVDF) Membrane 0.45 µm (Merck Millipore)を通した。

このタンパク質溶液はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって粗精製した。タンパク質溶液に 2-5%(v/v)程度の B Buffer を加えた後、十分量の A Buffer で平衡化した Ni-NTA agarose 6-8 mL 程度を加えた。4°C で 5 min 転倒混和した後、カラム 1 本あたり単体の体積が 2 mL 以下になるように溶液ごとエコノパック®カラム(BIO-RAD)に充填した。目的タンパク質は 50 CV(column volume)の 2% B Buffer と 0.50 CV の 60% B Buffer で洗浄した後、1.25 CV の 60% B Buffer で 4 回溶出した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。回収画分にはプロテアーゼ Ulp1 活性部位を 1/2000-1/500 体積程度加えた後、A Buffer で一晚透析した。

切断された 6×His tag-SUMO はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって除去された。2 本のエコノパック®カラム(BIO-RAD)に 2 mL ずつの担体を充填し、1 本目は 10 CV の 5% B Buffer で、2 本目は A Buffer で平衡化した。次に Ulp1 処理したタンパク質溶液を 1 本目のカラムに加え素通り画分を回収し、更に 3 CV の 5% B Buffer、3 CV の B Buffer で溶出を行った。素通り画分と 5% B Buffer 画分を混合し 2 本目のカラムに加え、素通り画分を回収した。次に 2 CV の 2% B Buffer で 2 回、3 CV の 5% B Buffer で 1 回、3 CV の B Buffer で 1 回溶出した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分（約 30 kDa に位置する大量の夾雑物は PrmA の可能性が高く次の精製過程で除けるので無視した）を決定、回収した。

回収画分は LSE5G Buffer で約 3 h 以上透析し、Hi Trap Q (GE)及び Hi Trap SP (GE)による精製を行った。Hi Trap Q 5 mL と Hi Trap SP 5 mL をこの順に直列につなぎ、十分量の LSE5G Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。更に LSE5G Buffer を約 0.7 CV 以上流した後、Hi Trap Q のみを外した。目的タンパク質は LSE5G Buffer から F5G Buffer のグラジエントによって溶出し、1 mL ずつ分画して回収した。そして 15% SDS-PAGE によって、比較的高い精製度の目的タンパク質が存在する画分（ピークの頂上付近）を決定、回収した。

精製タンパク質は 1F10G Buffer、0F10G Buffer、S Buffer の順にそれぞれ約 3 h 以上ずつ透析を行った。精製タンパク質に沈殿を視認できた場合は 20000×g、4°C で 10 min 遠心し、上清のみを回収した。精製タンパク質の濃度はブラッドフォード法によって測定し、適当に分注した後液体窒素で急冷し、-70°C 以下で保存した。

2.3.39 修飾酵素 RimL と共発現したリボソームタンパク質 L12 の精製

菌体湿重量 1 g に対し 10–20 mL 程度の 4C Buffer で懸濁した菌体を、金属ビーカーに移した。氷上に置かれた懸濁液は、Digital Sonifier 450 (BRANSON)を用いて 2 sec の超音波出力と 8 sec の休止を繰り返しながら、約 100 W 以下の出力で十分な時間破碎した。得られた大腸菌抽出液を 35 mL 遠沈管に移して 20000×g、4°C で 45 min 遠心し、上清をシリンジに入れて Millex®-HV Filter Unit Low Protein Binding Durapore® (PVDF) Membrane 0.45 µm (Merck Millipore)を通した。

このタンパク質溶液はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって粗精製した。タンパク質溶液に 2–5%(v/v)程度の 4D Buffer を加えた後、十分量の 4C Buffer で平衡化した Ni-NTA agarose 6–8 mL 程度を加えた。4°C で 5 min 転倒混和した後、カラム 1 本あたり単体の体積が 2 mL 以下になるように溶液ごとエコノパック®カラム (BIO-RAD)に充填した。目的タンパク質は 50 CV(column volume)の 2% 4D Buffer と 0.50 CV の 60% 4D Buffer で洗浄した後、1.25 CV の 60% 4D Buffer で 4 回溶出した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。回収画分にはプロテアーゼ Ulp1 活性部位を 1/2000–1/500 体積程度加えた後、C Buffer で一晚透析した。

切断された 6×His tag-SUMO はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって除去された。2 本のエコノパック®カラム (BIO-RAD) に 2 mL ずつの担体を充填し、1 本目は 10 CV の 5% D Buffer で、2 本目は 4C Buffer で平衡化した。次に Ulp1 処理したタンパク質溶液を 1 本目のカラムに加え素通り画分を回収し、更に 3 CV の 5% D Buffer、3 CV の D Buffer で溶出を行った。素通り画分と 5% D Buffer 画分を混合し 2 本目のカラムに加え、素通り画分を回収した。次に 2 CV の 2% D Buffer で 2 回、3 CV の 5% D Buffer で 1 回、3 CV の D Buffer で 1 回溶出した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。

回収画分は 4LSE5G Buffer で約 3 h 以上透析し、Hi Trap SP (GE)及び Hi Trap Q (GE)による精製を行った。Hi Trap SP 5 mL と Hi Trap Q 5 mL をこの順に直列につなぎ、十分量の 4LSE5G Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーラップ(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。更に 4LSE5G Buffer を約 0.7 CV 以上流した後、Hi Trap Q のみを外した。目的タンパク質は 4LSE5G Buffer から 4F5G Buffer のグラジエントによって溶出し、1 mL ずつ分画して回収した。そして 15% SDS-PAGE によって、高い精製度の目的タ

ンパク質が存在する画分を決定、回収した。回収画分はニッケルカラム His Trap HP (GE)を用いたアフィニティ精製によって精製した。His Trap HP 5 mL を十分量の 4F Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーloop(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。素通り画分に続いて流速 1 mL/min で十分量の 5% 4D Buffer (イミダゾール 25 mM) を流し、これらを 1 mL ずつ試験管に分画した。続いて 5–40% 4D Buffer (イミダゾール 25–200 mM)、30 mL 以上のグラジエントで溶出を行った。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。

精製タンパク質は硫酸沈殿によって濃縮した。Type 45Ti Rotor (Beckman Coulter) 用チューブに精製タンパク質溶液を注ぎ、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 粉末を 80%飽和になるように加えた。80%飽和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 水溶液をチューブの肩口まで加え、Type 45 Ti Rotor に入れて 32000 rpm (RCF at rmax: 119000 \times g), 4°C で 30 min 遠心した。上清をピペッティングによって完全に捨て、沈殿を適量の 4E5G Buffer で溶解した。そして F10G Buffer、1F10G Buffer、0F10G Buffer、S Buffer の順にそれぞれ約 3 h 以上ずつ透析を行った。精製タンパク質に沈殿を視認できた場合は 20000 \times g、4°C で 10 min 遠心し、上清のみを回収した。精製タンパク質の濃度はブラッドフォード法によって測定し、適宜に分注した後液体窒素で急冷し、 -70°C 以下で保存した。

2.3.40 スプリットルシフェラーゼ大サブユニット LgBiT の精製

菌体湿重量 1 g に対し 10–20 mL 程度の A Buffer で懸濁した菌体を、金属ビーカーに移した。氷上に置かれた懸濁液は、Digital Sonifier 450 (BRANSON)を用いて 2 sec の超音波出力と 8 sec の休止を繰り返しながら、約 100 W 以下の出力で十分な時間破碎した。得られた大腸菌抽出液を 35 mL 遠沈管に移して 20000 \times g、4°C で 45 min 遠心し、上清をシリンジに入れて Millex®-HV Filter Unit Low Protein Binding Durapore® (PVDF) Membrane 0.45 μm (Merck Millipore)を通した。

このタンパク質溶液はニッケルカラム Ni-NTA agarose (Qiagen)を用いたアフィニティ精製によって粗精製した。タンパク質溶液に 2–5%(v/v)程度の B Buffer を加えた後、十分量の 4C Buffer で平衡化した Ni-NTA agarose 6–8 mL 程度を加えた。4°C で 5 min 転倒混和した後、カラム 1 本あたり単体の体積が 2 mL 以下になるように溶液ごとエコノパック®カラム (BIO-RAD)に充填した。目的タンパク質は 50 CV(column volume)の 2% B Buffer と 0.50 CV の 60% B Buffer で洗浄した後、1.25 CV の 60% B Buffer で 4 回溶出した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する

画分を決定、回収した。

回収画分は A Buffer で一晚透析し、ニッケルカラム His Trap HP (GE)を用いたアフィニティ精製によって再び粗精製した。His Trap HP 5 mL を十分量の A Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーloop(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。9.75 CV (column volume) の 5% B Buffer (イミダゾール 25 mM) でカラムを洗浄し、5–60% B Buffer (イミダゾール 25–300 mM)、50 mL 程度のグラジエントで流速 1 mL/min で溶出し、1 mL ずつ分画して回収した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。回収画分にはプロテアーゼ Ulp1 活性部位を 1/2000–1/500 体積程度加えた後、500 mM KCl 0F Buffer で一晚透析した。

このタンパク質溶液はニッケルカラム His Trap HP (GE)によって精製した。His Trap HP 5 mL を十分量の A Buffer で平衡化し、次にタンパク質溶液をスーパーloop(GE)に入れて ÄKTA explorer 又は ÄKTA purifier (GE)に接続し、流速 1 mL/min でカラムに投入した。5–60% B Buffer (イミダゾール 25–300 mM)、45 mL 程度のグラジエントで流速 1 mL/min で溶出し、1 mL ずつ分画して回収した。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分を決定、回収した。回収画分にはプロテアーゼ Ulp1 活性部位を 1/2000–1/500 体積程度加えた後、100 mM KCl 0F5G Buffer で一晚透析した。

このタンパク質溶液はニッケルカラム His Trap HP (GE)を用いた同様の手順による精製を行った。そして 15% SDS-PAGE によって、目的タンパク質の存在する画分 (SUMO は殆ど切断できなかつたので未切断の LgBiT、わずかに切断された 6×His tag-SUMO、及びその他の夾雑物を含む画分) を決定、回収した。

精製タンパク質は Amicon® Ultra centrifugal filter units MWCO 10 kDa (Merck Millipore)を用いた限外濾過によって濃縮した。そして P Buffer によって透析を行った。精製タンパク質の濃度はブラッドフォード法によって測定し、適宜に分注した後液体窒素で急冷し、−70°C 以下で保存した。

2.4 Intact Mass による精製タンパク質の分子量測定

まずタンパク質の脱塩処理を行った。L1–L4 については純水による一晚の透析を行い、L5–L36 については自作のステージチップ(Rappsilber *et al.*, *Nat. Protoc.*, 2007)を用い、0.1%酢酸を含む 50%アセトニトリルで溶出した。

マスマスペクトルの解析は、ナノスプレーイオンソース(Nanospray Flex, Thermo

Scientific)を装備した Orbitrap 質量分析計(LTQ OrbitrapVelos Pro, Thermo Scientific)を用いて行った。脱塩処理したタンパク質は Cellomics tips (CT-10 μm , HUMANIX)に充填し、1.7 kV の電圧で質量分析器 (ポジティブモード、スキャン幅 400–2000 m/z、質量分解能 140000 (半値幅)) で電気噴霧した。測定結果は Xcalibur (Thermo Scientific, Waltham, MA)を用いてモデル化した理論的なスペクトルと比較した。

2.5 大腸菌内在性リボソーム及びリボソーム構成要素の調製

2.5.1 大腸菌内在性 70S リボソームの調製

大腸菌 A19 株を対数増殖期まで培養し、フレンチプレスによる破碎後、硫酸沈殿と疎水カラム精製によってリボソームを単離した。詳細な調製法については、ジーンフロンティア株式会社が 2017 年頃まで用いていた手順によった。

2.5.2 大腸菌内在性 30S/50S リボソームサブユニットの調製

SW28 Ti 用マーカブロック (Bio Comp)を用いて SW28 Ti Rotor 用 UC チューブ (Beckman Coulter)内に重層した 12.2/36.6% (w/v)スクロース Buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.6 at 4°C)、10 mM MgCl_2 、60 mM NH_4Cl 、400 mM NaCl、7 mM β -ME、12.2/36.6% (w/v)スクロース)をグラジエントマスター (Bio Comp)に載せ、「SW28、Short、10% – 30% (w/w)」のプログラムを用いて 12 本のショ糖密度勾配を作製した。2.5.1 に述べた方法で調製した 70S リボソームの NaCl 濃度を 400 mM に調整し約 6000 pmol (=250 Abs_{260}) ずつを密度勾配の上に重層し、SW28 Ti Rotor (Beckman Coulter)を用いて 27000 rpm(RCF at r_{max} : 130000 \times g)、3°C で 14 h 遠心した。但し、減圧と遠心は同時に行い、減速時のブレーキは OFF にした。

分離されたサブユニットはピストン・グラジエント・フラクショネーター (Bio Comp)によって回収し FC 203B Fraction Collector (Gilson)によって 1 mL ずつ分画した。各画分の 260 nm の吸光を測定し、もう一方のサブユニットの混入率が概ね 3%未満になるように各サブユニットを回収した。回収したサブユニットは 1 本ずつの Type 45Ti Rotor PC チューブ (Beckman Coulter)に加え、TMNSH Buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.6 at 4°C)、10 mM MgCl_2 、60 mM NH_4Cl 、7 mM β -ME)によって定容した後 Type 45 Ti Rotor (Beckman Coulter)を用いて 45000 rpm(RCF at r_{max} : 235000 \times g)、3°C で 24 h 遠心した。但し減圧と遠心は同時に行い、減速時のブレーキは OFF にした。

上清を完全に捨てた後、少量の Ribosome Resuspension Buffer (10 mM HEPES-KOH (pH 7.6 at 4°C)、10 mM Mg(OAc)₂、30 mM KOAc、1 mM ジチオトレイトール)によってサブユニットを再懸濁した。得られた粗精製サブユニットに対し再度のショ糖密度勾配遠心を行い、30S サブユニットにおける 50S サブユニットの混入率が概ね 0.02%未満、50S サブユニットにおける 30S サブユニットの混入率が概ね 1.5%未満になるようにした。得られたサブユニットは 260 nm の吸光によって濃度を決定し (50S: 36 pmol = 1 Abs₂₆₀、30S: 72 pmol = 1 Abs₂₆₀ によって近似した)、適当に分注した後液体窒素で急冷し、-70°C 以下で保存した。

2.5.3 TP50 の調製

大腸菌内在性 50S サブユニットからの TP50 の調製は Nierhaus らの方法(Nierhaus, *Ribosomes and protein synthesis*, 1990)に準拠した。簡潔には、66.6% (v/v) 酢酸と氷冷アセトンによって処理した後 6 M の尿素を含むバッファーで再懸濁し、透析によって尿素を除去した。

2.5.4 大腸菌内在性 23S/5S rRNA の調製

大腸菌内在性 rRNA の調製には、清水らの方法(Shimizu *et al.*, *Methods of Mol. Biol.*, 2010)によって精製された大腸菌 70S リボソームを用いた。

SW28 Ti 用マーカブロック (Bio Comp) を用いて SW28 Ti Rotor 用 UC チューブ (Beckman Coulter) 内に重層した 12.2/36.6% (w/v) スクロース Buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.6 at 4°C)、10 mM MgCl₂、60 mM NH₄Cl、400 mM NaCl、7 mM β-ME、12.2/36.6% (w/v) スクロース) をグラジエントマスター (Bio Comp) に載せ、「SW28、Short、10% - 30% (w/w)」のプログラムを用いて 6 本のショ糖密度勾配を作製した。本節第 1 項の方法で調製した 70S リボソームの NaCl 濃度を 400 mM に調整し約 1200 pmol ずつを密度勾配の上に重層し、SW32 Ti Rotor (Beckman Coulter) を用いて 27700 rpm (RCF at r_{max}: 131000 × g)、3°C で 17 h 遠心した。但し、減圧と遠心は同時に行い、減速時のブレーキは OFF にした。

分離されたサブユニットは CHD255AA (Advantec) によって回収し約 1 mL ずつ分画した。各画分の 260 nm の吸光を測定し、30S サブユニットの混入が少ないと考えられる画分 (重い方から数えて第 4-第 8 又は第 9 画分) を回収した。

回収画分に含まれる rRNA はフェノール・クロロホルム抽出によって精製した。まず

終濃度 270 mM の KOAc (pH 5.2 at 25°C)、次いで 1/2 体積の水飽和フェノールを加え、4°C で 8 min ボルテクスした。10000×g、30 min の遠心後水層を回収し、同様の操作によるフェノール処理を更に 2 回、その後同様の操作によるクロロホルム処理を 1 回行った。得られた水層に 1/2 体積の氷冷 2-プロパノールを加え、氷上で 30 min 静置した。その後 10000×g、30 min 遠心した上清を捨て、沈殿を十分な体積の 70% (v/v) エタノールで洗浄したのち、rRNA 濃度が 9 μM を下回るまで純水を加えた。再溶解した rRNA に 1/40 体積の 20 g/L Protease K Solution (Invitrogen) を加え、37°C で 30 min 静置した。その後 1/2 体積の水飽和フェノールを加え、4°C で 8 min ボルテクスした。15000×g、10 min の遠心後、水層に対し同様の操作によるクロロホルム処理を 1 回行った。得られた rRNA は 1/2 体積の氷冷 2-プロパノールによって不溶化し、氷上で 30 min 静置した後 15000×g、10 min 遠心した沈殿を十分な体積の 70% (v/v) エタノールで洗浄したのち少量の純水を加え再溶解した。得られた rRNA は 260 nm の吸光によって濃度を決定し(36 pmol = 1 Abs₂₆₀ によって近似した)、1 回で使い切れる程度の量に分注した後液体窒素で急冷し、-70°C 以下で保存した。

2.6 組み換えタンパク質による 50S サブユニットの試験管内再構成

2.6.1 組み換えリボソームタンパク質 33 種類の混合溶液(33P)の調製

33P の調製法は、TP50 のアセトン処理後の手順に準拠した。1 当量ずつの精製組み換えリボソームタンパク質(Ribosomal protein, RP) L1-L11、L13-L36 と 4 当量の L12 を混合し、Buffer 5 (20 mM Tris-HCl (pH 7.6 at 4°C)、4 mM Mg Cl₂、400 mM NH₄Cl、6 M Urea、7 mM β-ME)で一晩、次いで 100 倍体積以上の Buffer 4 (Buffer 5 から尿素を除いた組成で、Tris-HCl は 37°C で pH 7.4 に調整したものを使用した)で 45 min ごとに外液を交換しながら合計 135 min 透析した。33P の濃度は 230 nm の吸光度測定によって決定し (TP50 と同様に 360 pmol = 1 Abs₂₃₀ と近似した)、1 回で使い切れる程度の量に速やかに分注した後窒素で急冷し、-70°C 以下で保存した。

2.6.2 熱処理による 50S サブユニットの組み立て及び再構成産物の濃縮

組み換えタンパク質による 50S サブユニットの試験管内再構成は、Nierhaus らの方法(Nierhaus, *Ribosomes and protein synthesis*, 1990)に準拠した。6.25 Abs₂₆₀ (= 225 pmol)の 23S/5S rRNA に 1/10 体積の Buffer 9 (110 mM Tris-HCl (pH 7.6 at 4°C)、4

mM Mg(OAc)₂、4 M NH₄Cl、20 mM β-ME)と 0.75 Abs₂₃₀ (= 270 pmol)の 33P 又は TP50 を加え、Buffer 4 で 250 μL に定容した。試料は 44°C で 20 min 加熱した後、0.4 M Mg(OAc)₂を 0.04 体積加えることで Mg²⁺濃度を 20 mM に調整し、更に 50°C で 90 min 加熱した。その後 5000×g で 5 min 遠心し上清を回収した。

再構成産物は Amicon® Ultra 0.5 mL centrifugal filter units MWCO 30 kDa (Merck Millipore)を用いた限外濾過によって濃縮・バッファー交換した。再構成産物を 10000×g、5–10 min 程度の遠心によって 100 μL 程度に濃縮し、Ribosome Resuspension Buffer 300 μL によって希釈した。濃縮と希釈の操作を 4 回繰り返した後、50 μL 以下になるまで濃縮した。濃縮された再構成産物の濃度は 260 nm の吸光度測定によって決定し (36 pmol = 1 Abs₂₆₀ によって近似した)、少量ずつ分注した後窒素で急冷し、−70°C 以下で保存した。

2.7 再構成 50S サブユニットの性状評価

2.7.1 ショ糖密度勾配遠心による再構成産物の沈降速度評価

SW28 Ti 用マーカブロック (Bio Comp)を用いて SW28 Ti Rotor 用 UC チューブ (Beckman Coulter)内に重層した 5.0/20.0% (w/v)スクロース Buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.6 at 4°C)、4 mM MgCl₂、400 mM NH₄Cl、7 mM β-ME、5.0/20.0% (w/v)スクロース)をグラジエントマスター (Bio Comp)に載せ、「SW28、Short、5% – 20% (w/v)」のプログラムを用いてショ糖密度勾配を作製した。2.5.2 における濃縮前の再構成産物 100 μL を密度勾配の上に重層し、SW32 Ti Rotor (Beckman Coulter)を用いて 30600 rpm (RCF at r_{max}: 160000×g)、4°C で 5 h 遠心した。但し、十分に脱気してから遠心を開始し、減速時のブレーキは OFF にした。

2.7.2 質量分析用の試料調製

サイズごとに分離された再構成産物は CHD255AA (Advantec)によって回収し、254 nm の吸光度を連続的に測定しながら約 0.5 mL ずつ分画した。熱処理をしたサンプルについては最も大きなピークの重い方半分と軽い方半分、熱処理をしていないサンプルについては最も大きなピーク全体と 2 番目に大きなピーク全体に含まれる画分を回収し、50% (w/v)トリクロロ酢酸 (TCA)を 1/9 体積加えて 4°C で一晩静置した。

TCA 処理した再構成産物は 10000×g、4°C で 30 min 遠心し、上清と思われる部分

を捨てた。沈殿（アセトンを加えるまでは肉眼で見えない）を 200 μ L の氷冷アセトンによって洗浄し、10000 \times g、4 $^{\circ}$ C で 30 min 遠心した後上清を捨てた。

沈殿は、相間移動溶解剤(PTS)支援法(Masuda *et al.*, *J. Proteome Res.*, 2008)に準拠して酵素消化された。10 μ L の酵素消化用 Buffer (10 mM デオキシコール酸ナトリウム、10 mM N-ラウロイルサルコシナトリウム、50 mM 炭酸水素アンモニウム)で再溶解し、10 mM TCEP によって 37 $^{\circ}$ C で 30 min 還元処理し、20 mM 沃化アセトアミドによって 37 $^{\circ}$ C で 30 min アルキル化処理した後、20 mM L-システイン残基によって反応を停止した。アルキル化処理した再構成産物を 50 mM 炭酸水素アンモニウムで 5 倍に希釈し、100 ng のプロテアーゼ Lys-C によって 37 $^{\circ}$ C で一晩酵素消化を行った。その後 5 μ L の 10% トリフルオロ酢酸を加え界面活性剤を不溶化し、15000 \times g、4 $^{\circ}$ C で 5 min 遠心した。上清を回収し、自作のステージチップ(Rappsilber *et al.*, *Nat. Protoc.*, 2007)を用いて脱塩処理を行った後、SpeedVac (Thermo Scientific)で乾燥した。

2.7.3 LC-MS/MS による再構成産物中の RP の検出及び定量

マススペクトルの解析は、ナノスプレーイオンソース(Nanospray Flex, Thermo Scientific)及び nano-LC システム(UltiMate 3000, Thermo Scientific)を装備した Orbitrap 質量分析計(LTQ Orbitrap Velos Pro, Thermo Scientific)を用いて行った。乾燥したペプチド混合物は 5%アセトニトリル及び 0.1%トリフルオロ酢酸を含む溶液によって再溶解し、試料約 1 pmol を nano-LC システムに投入した。トラップカラム(0.075 \times 20 mm, 3 μ m, Acclaim PepMap 100 C18, Thermo Scientific)によって濃縮されたペプチドは、ナノキャピラリーカラム(0.1 \times 150 mm, 3 μ m, C18, Nikkyo Technos)によって単離された。具体的には 2 種類の移動相 (0.1%蟻酸 (移動相 A) とアセトニトリル及び 0.1%蟻酸 (移動相 B)) を用い、流速 500 nL/min において、5% B で 5 min、5–45% B で 40 min、45–90% B で 1 min、90% B で 4 min のグラジエントによって溶出した。溶出液は質量分析器 (ポジティブモード、スキャン幅 200–1500 m/z、質量分解能 60000 (半値幅)) に直接電気噴霧した。データ解析には Skyline (v4.2.0.18305) (MacCoss LabSoftware)(MacLean *et al.*, *Bioinformatics.*, 2010)を用い、MS1 フィルターのカウント数を 3 (M, M+1, M+2)に設定してピーク面積を計算した。

2.8 再構成 50S サブユニットの翻訳活性評価

2.6 に記述した方法で再構成した 50S サブユニットの翻訳活性は、PURE system を用

いたスプリットルシフェラーゼ小サブユニット HiBiT 及び緑色蛍光タンパク質 sfGFP の合成によって評価した。

2.8.1 PURE system を用いた HiBiT の合成及び合成量の評価

PUREfrex[®]2.0 (ジーンフロンティア) 2×Buffer premix と 10×Enzyme premix の混合液に、1 nM HiBiT DNA、50 nM 大腸菌内在性 30S サブユニット、50 nM 再構成 50S サブユニットを加え、リボソームサブユニットからの Mg²⁺の持ち込みと合わせて 4 mM になるように Mg(OAc)₂を添加した。反応液は純水で 5 μL に定容し、37°C で 12 h タンパク質合成を行った。

HiBiT の合成は Nano-Glo[®] Luciferase Assay System (Promega)によって検出した。PURE 産物 0.6 μL を約 50 pmol のスプリットルシフェラーゼ大サブユニット LgBiT と混合し、P Buffer で 25 μL に定容した後 37°C、5 min のサブユニット会合処理を行った。試料は氷上で Nano-Glo[®] Luciferase Assay Reagent 25 μL と混合し、40 μL を白色 96 穴プレート (Corning[®] EIA/RIA Plate, 96 well half area, No Lid Flat Bottom, Non-treated white polystyrene) 上の、他の試料と隣接しないウェルに移した後、直ちに GloMax[®] Explorer Multimode Microplate Reader (Promega)によって発光量の測定を行った。

2.8.2 PURE system を用いた sfGFP の合成及び合成量の評価

PUREfrex[®]2.0 (ジーンフロンティア) 2×Buffer premix と 10×Enzyme premix の混合液に、1 nM sfGFP DNA、200 nM 大腸菌内在性 30S サブユニット、200 nM 再構成 50S サブユニットを加え、リボソームサブユニットからの Mg²⁺の持ち込みと合わせて 4 mM になるように Mg(OAc)₂を添加した。反応液は純水で 10 μL に定容し、Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies)を用いて 37°C に保ちながら緑色の蛍光量を 3 分ごとに 240 回測定した。

2.9 70S リボソームの試験管内再構成及び翻訳活性評価

PUREfrex[®]2.0 (ジーンフロンティア) 2×Buffer premix と 10×Enzyme premix の混合液に、5 nM sfGFP DNA、20 nM 16S rDNA、200 nM 再構成 50S サブユニット、そして R-rps Buffer (50 mM HEPES-KOH (pH7.6)、300 mM グルタミン酸カリウム、2

mM ジチオトレイトール、30%グリセロール)に溶解した組み換えリボソームタンパク質 S1-S21 を 500 nM ずつ加え、更にリボソームサブユニットからの Mg^{2+} の持ち込みと合わせて 4 mM になるように $Mg(OAc)_2$ を添加した。反応液は純水で 10 μ L に定容し、Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies)を用いて 37°C に保ちながら緑色の蛍光量を 3 分ごとに 240 回測定した。

3. 実験結果

3.1 組み換えリボソームタンパク質 L1-L36 の発現と精製

まず、組み換えリボソームタンパク質(RP) 33 種類の精製法を確立した。本研究では全ての RP を、6×His tag、Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO)、RP を N 末端から順に連結させた融合タンパク質として大量発現した。SUMO は大腸菌発現系において発現タンパク質の可溶化を促進する(Malakhov *et al.*, *J. Struct. Funct. Genomics*, 2004) ため、単独では構造が不安定で凝集しやすい RP を概ね可溶な状態で発現させることができた。精製の手順としては、ニッケルカラムを用いたアフィニティ精製後、プロテアーゼ Ulp1 活性部位によって SUMO の C 末端を特異的に切断し、再度ニッケルカラムを通して素通り画分を回収した。更に残った夾雑物をイオン交換カラムによって除去し、33 種類の RP を高い精製度で精製できた (図 3-1)。具体的な精製の手順については第 2 章第 3 節に述べた。Ulp1 は SUMO の直下にプロリン残基を持つタンパク質に作用しない。生体内では開始メチオニンが除去され、且つ 2 位のアミノ酸がプロリンとなっている L35 は、2 位をアラニンに置換した。

多くの RP は IPTG 濃度 0.1 mM で容易に発現したが、L3、L5、L10、L16、L33、L35 については発現量が少なかったため IPTG の量を 2.5-5 倍に増やした (図 3-2)。IPTG 濃度を増やしても L10 と L35 については発現が改善しなかったため、発現時間を様々に変えてみた。その結果、発現すると直ちに大腸菌内で分解を受けていることがわかった(図 3-2)。そこでこの 2 種類の RP については OD₆₀₀ が 0.5 を超えてから IPTG を加え、発現時間を 2.5 時間未満にしたところ、約半分の RP が分解から免れ、タンパク質の全長を十分量発現させることができた。

RP には可溶性の低いものが多く、通常可溶性タンパク質で用いられるバッファー条件下では凝集することが多い (図 3-3)。そのため、比較的可溶性の高い RP は 1 M 塩化アンモニウムを含むバッファーで、比較的可溶性の低い RP は 2 M 以上の尿素を含むバッファーで精製を行った。

SUMO の切断においては、低塩濃度、低変性剤濃度条件下においては RP の凝集を引きおこし、高塩濃度、高変性剤濃度条件下ではプロテアーゼ Ulp1 の活性が阻害される。また、SUMO の切断によって RP の可溶性は低下する傾向がある(Data not shown)。Ulp1 の活性は尿素の濃度が 2 M を超えると著しく低下するため、可溶性の低い RP については 2 M の尿素を含むバッファー条件下で多量のプロテアーゼを短時間作用させ、その後尿素濃度を上げることで凝集を防いだ。

L5 と L20 は可溶性が著しく低く、可溶性画分から高精製度の RP を単離することが困難だったため、不溶性画分を尿素で再可溶化することで精製度を向上させた (図 3-4)。

多くの RP は塩基性アミノ酸残基を多く持ち、等電点が高いため陽イオン交換カラムによる精製が可能である。しかし L9、L10、L12 の 3 種類は陽イオン交換カラムに吸着しなかった。これらの等電点は、Kaltschmidt (Kaltschmidt, *Anal. Biochem.*, 1971) によるとそれぞれ 6.4、7.5、4.9 であり、pH 7.6 のバッファー条件において陽イオン交換カラムに吸着しなかったのは矛盾の無い結果と言える。

L15 についてはニッケルカラム精製と透析によるイミダゾールの除去を繰り返すことで高分子量側の夾雑物の多くを除去できた (図 3-5)。これは L15 に非特異的に吸着する夾雑物を除くために効果的な精製操作であったと考えられ、他の幾つかの RP に対しても有効な手法であった。なお、図 3-5 において低分子量の夾雑物は濃縮されたが、これらは SUMO 切断後のカラム精製により最終的に除去された (図 3-1)。

L10 は発現中に L10 の一部が分解されたものを分離するのが困難であるが、ニッケルカラムへの親和性の高さが若干異なることを利用した精製が可能である (図 3-6)。6 × His tag-SUMO を切断する前の段階で、カラムの結合容量に対して過剰量の目的タンパク質を投入すると、L10 の一部が分解された「6 × His tag-SUMO-L10 N 末端側残基」が優先的にカラムに吸着する。そのため、L10 の全長が残った「6 × His tag-SUMO-L10」は、6 × His tag を持っているにもかかわらず素通り画分に多く現れた。これを回収することで、比較的精製度の高い L10 を得た。しかし図 3-1 に示されているように、L10 の一部が分解されたものは完全には除去することが出来なかった。これは、L10 を単独で大量発現させると大腸菌内在性の分解機構によって直ちに分解されるために精製が不可能という先行研究 (Petersen, *J. Bacteriol.*, 1990, Griaznova *et al.*, *Biochemistry*, 2000) と矛盾しない結果であり、この問題は Griaznova の方法に従って L12 との共発現系を構築することで改善できる可能性がある。また図 3-2 に示した通り、L35 も同様に発現中に直ちに分解されるが、陽イオン交換カラムで L35 断片の殆どを除去できた。

L31 については目的タンパク質の分子量よりも小さい分子量の夾雑物が存在する (図 3-1) が、精製時は単一バンドであった (図 3-7)。このとき用いたゲルは通常の 20% SDS-PAGE であり、図 3-1 において用いた 16.5% Urea-Tris/Tricine-SDS-PAGE よりも分解能が低い。そのため精製過程で夾雑物を検出できなかった可能性がある。或いは複数回の凍結融解によって L31 の一部が切断されたものが図 3-1 に現れている可能性もある。

これら以外の組み換え RP にも SDS-PAGE で検出できる程度の夾雑物を含むものが何種類かあるが、いずれも量比としてはわずかであり、50S サブユニットの再構成に致命的な影響を与えることは無いと考えられる。

精製された組み換え RP は Intact-MS によって、L2 を除く 32 種類が正しい分子量であることが確認された (図 3-8)。L2 はイオン化が困難なタンパク質であり (Arnold *et al.*, *Anal. Biochem.*, 1999)、本研究においては L2 の分子量同定ができなかった。よって L2 は SDS-PAGE の泳動度に矛盾が無く (L2: 29.7 kDa、塩基性タンパク質により見かけの分子量が若干大きい)、及び後述する LC-MS/MS によって得られたペプチド断片より部分的に正しいアミノ酸配列となっていることから、目的のタンパク質が得られたと判断した。また、大腸菌内で翻訳後修飾を受ける L3、L11、L7/L12、L16、L33 は翻訳後修飾を受けている分子と受けていない分子の混在した状態であり、一部修飾は殆ど導入されていないことが示唆された (図 3-9)。但しいずれの翻訳後修飾も生存に必須ではなく、50S サブユニットの再構成に致命的な影響を与えることは無いと考えられる。

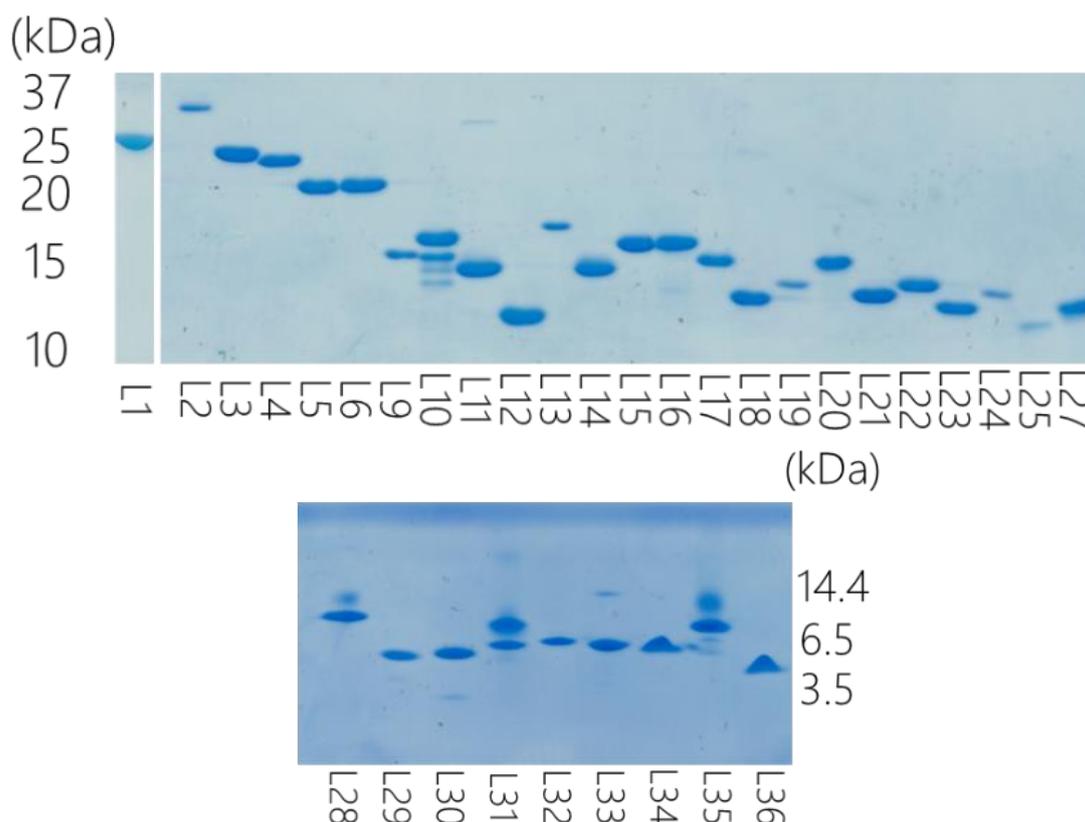


図 3-1 精製された 33 種類の組み換え RP

精製リボソームタンパク質 L1、L2-L27、L28-L36 はそれぞれ 15% SDS-PAGE、17% SDS-PAGE、16.5% Urea-Tris/Tricine-SDS-PAGE を用いて泳動した。特に記述の無い限り、この図を含む全てのポリアクリルアミドゲルは CBB-G250 で染色した。

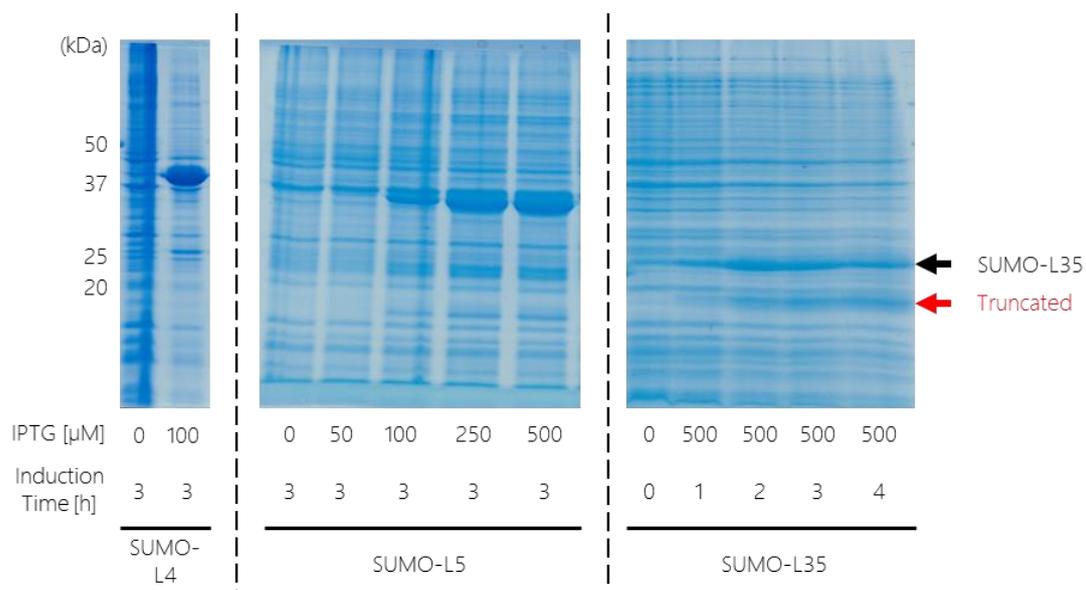


図 3-2 RP の大量発現

容易に発現する RP、高 IPTG 濃度によって発現する RP、発現中に細胞内で分解される RP の代表例として、それぞれ L4、L5、L35 を挙げる。いずれも pSUMO-15b 内に目的タンパク質の ORF 配列が挿入されたプラスミドを持った Rosetta (DE3) pLysS 株を 37°C で培養し、OD₆₀₀ が 0.3–0.7 のときに図に示した終濃度になるように IPTG を添加した。培養液 150/OD₆₀₀ μ L を遠心して沈殿した菌体に 10 μ L の 2 \times SDS Loading Dye を加え、95°C で 5 min 加熱した後全量を 15% SDS-PAGE で流した。IPTG 依存的に出現するバンドが目的タンパク質由来のバンドである。L35 のゲル写真において示した赤色の矢印に位置するバンドは、L35 の一部が切断され「6 \times His tag-SUMO-L35 N 末端領域」となった融合タンパク質由来のものである。

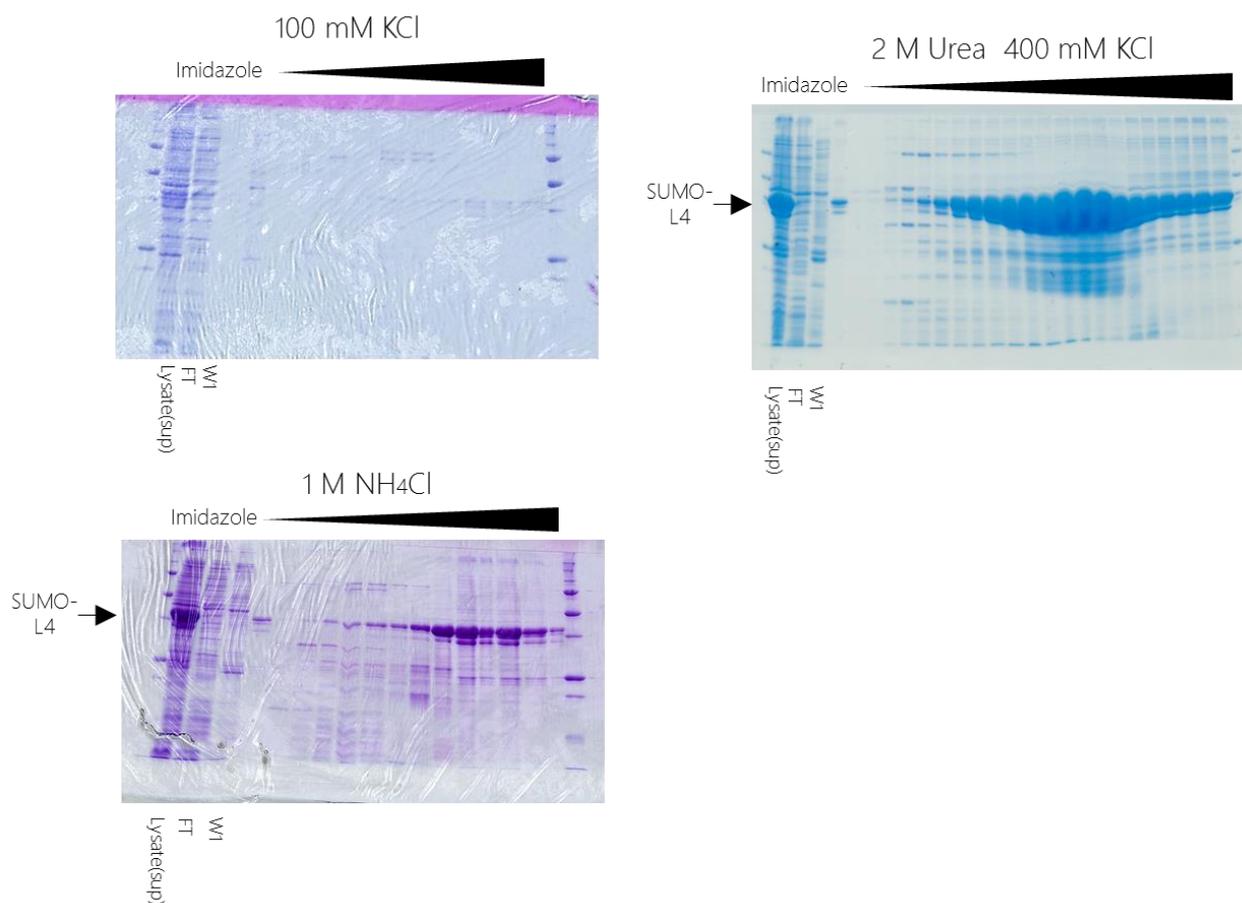


図 3-3 バッファーによる RP の可溶性の違い

L4 を HT Buffer (左上)、A Buffer (左下)、C Buffer (右上) で破碎し、His Trap HP (GE) による粗精製を行った。グラジエント精製後適当な画分を 10 μ L ずつ 15% SDS-PAGE で流した。図中の「Lysate(sup)」はカラム精製前、「FT」は素通り画分、「W1」は 25 mM イミダゾールを含むバッファーによる洗浄画分を表す。また両端のレーンはタンパク質マーカー(Unstained Precision Plus Protein Standards (Bio Rad))である。ゲルの染色は、HT Buffer と A Buffer で精製したものは CBB R-250、C Buffer で精製したものは CBB G-250 を用いた。HT Buffer で破碎したものは目的タンパク質の殆ど全てが不溶性画分に現れたため、どの溶出画分にも検出されなかった。

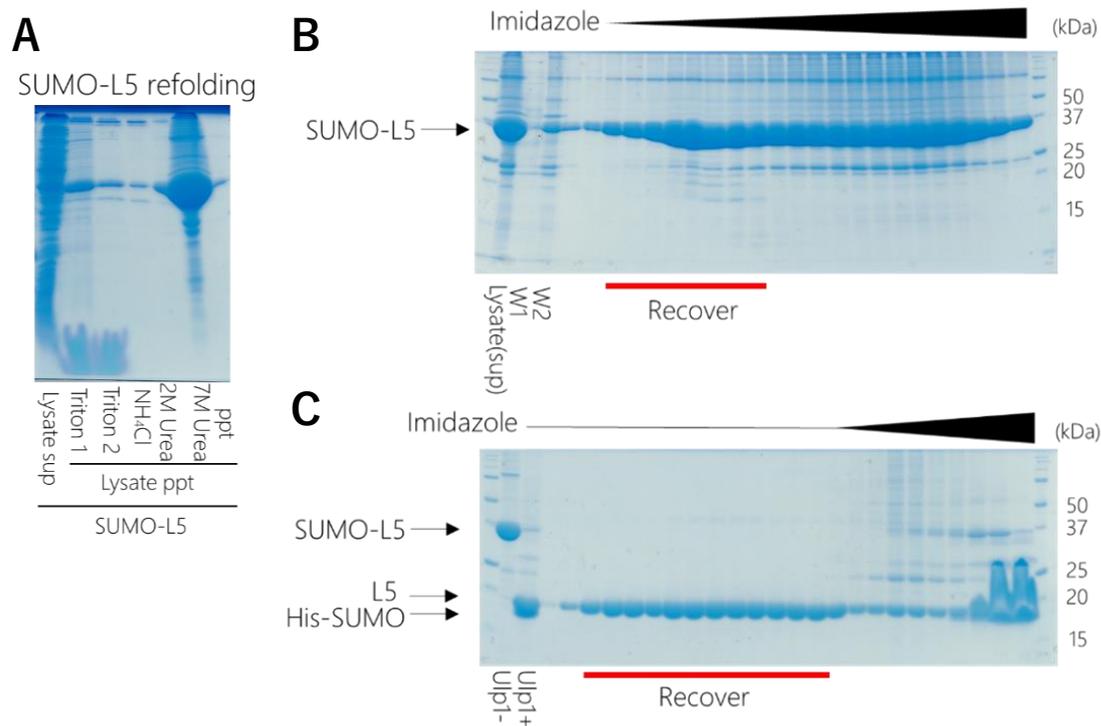


図 3-4 不溶性画分の再可溶化による L5 の精製

A L5 の不溶性画分を、Triton X-100 を含むバッファーで洗浄し、7 M の尿素で再可溶化した。「Lysate sup」は破碎液を遠心した上清、「Lysate ppt」は沈殿である。「Triton 1」「Triton 2」「NH₄Cl」「2 M Urea」は、それぞれ Triton を含むバッファー（2 回）、A Buffer、C Buffer による洗浄画分であり、「7 M Urea」は 7C Buffer で再可溶化した画分、「ppt」は 7C Buffer で再可溶化しなかった画分をそれぞれ 8 μL ずつ SDS-PAGE で流したものである。

B 再可溶化した L5 を His Trap HP (GE) で精製した。図の見方は図 3-3 に同じ。「W2」は 500 mM イミダゾールによる洗浄画分を表す。赤色の傍線部分の画分を回収した。

C SUMO 切断後の L5 を再度 His Trap HP (GE) で精製した。「Ulp1-」はプロテアーゼ投入前、「Ulp1+」はプロテアーゼ投入後カラム精製前のタンパク質溶液を一部分取したものである。赤色の傍線部分で表される回収画分からは殆どの夾雑タンパク質が除去されている。

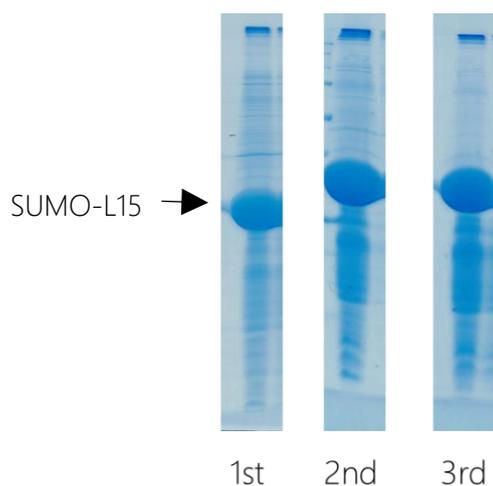


図 3-5 複数回の His tag 精製による L15 の粗精製

抽出液を Ni-NTA agarose (Qiagen) によって精製した(1st)後、透析によってイミダゾールを除去した。同様の操作によって更に 2 回精製を行った(2nd、3rd)。図に示した目的タンパク質のバンドよりも分子量の大きい夾雑物は、回を重ねるごとに減少している。

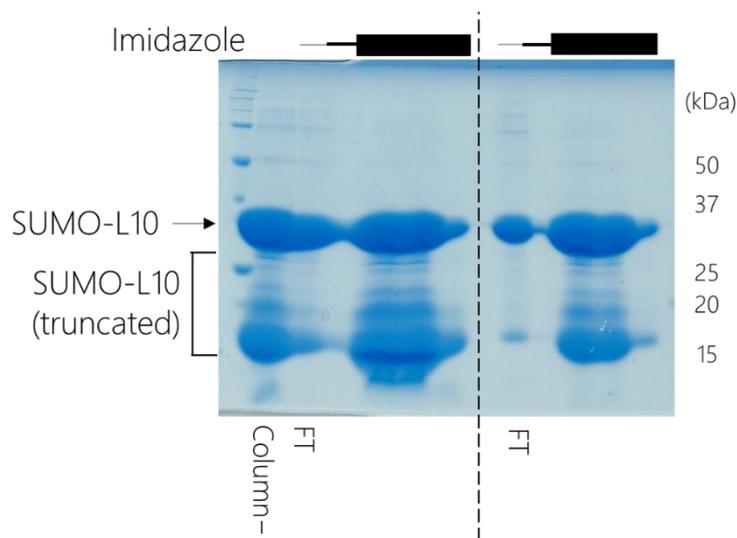


図 3-6 L10 の His tag 精製

抽出液を Ni-NTA agarose (Qiagen) によって精製した (溶出画分を回収した) 後、透析によってイミダゾールを除去した(Column-)。これを Ni-NTA agarose によって再度精製した (図の破線より左側)。素通り画分は別の Ni-NTA agarose 担体を用いて精製した (図の破線より右側)。「SUMO-L10 (truncated)」は、L10 の発現中に細胞内で消化されたものであり、L10 の C 末端側の残基を幾つか欠いている。この精製において回収した画分は、素通り画分を再度カラムに通した素通り画分だが、目的タンパク質に 6×His tag は残っている。



図 3-7 精製された L31

全てのカラム精製を完了し、濃縮を行う前の 20% SDS-PAGE 結果。図に示されるバンドは L31 である。2 つのバンドが重なっているようにも見えるが、低分子量のタンパク質は通常の SDS-PAGE においてバンドが縦に大きく広がり明瞭でなくなることが多く、このゲル写真の情報のみから夾雑物の存在を断定することは出来ない。

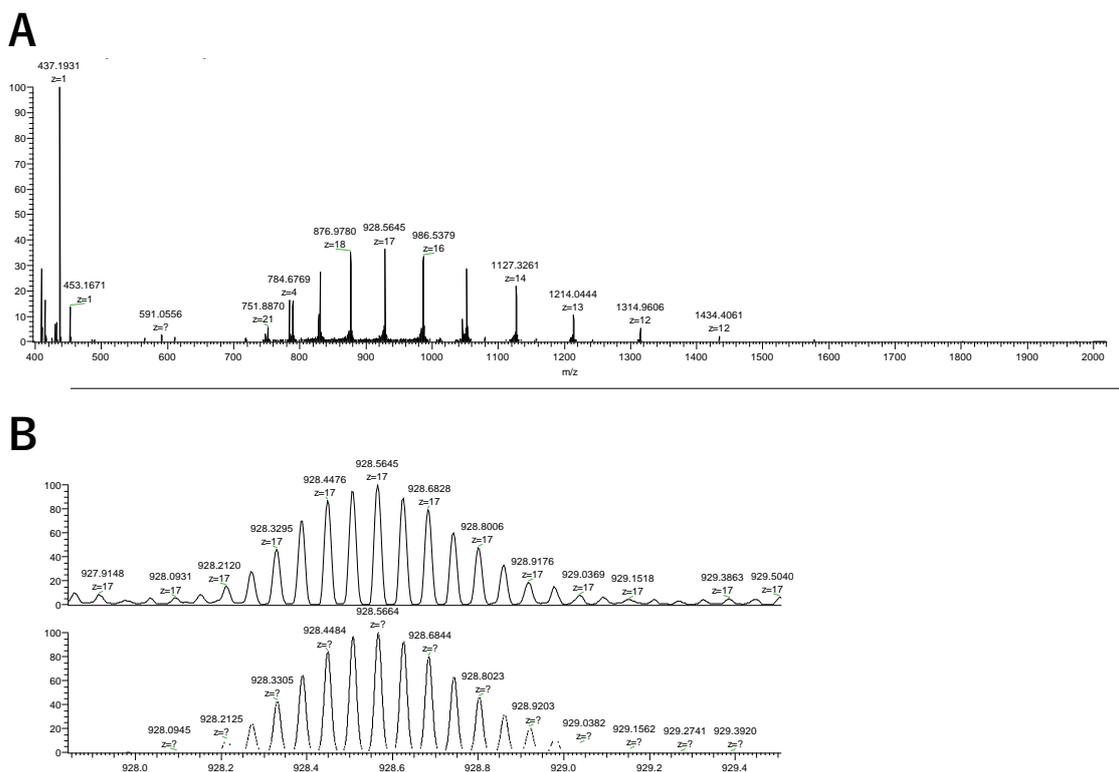


図 3-8 Intact MS による RP の分子量測定

典型的な結果として L9 の測定結果のみを挙げる。L2 を除く他のタンパク質についてもこの図と同様の結果が得られている。

A Intact MS によって様々な価数のタンパク質イオンが検出された。m は質量、z はイオン価数を表す。この図において、「 $m/z=928.5645$ $Z=17$ 」及び m がこれに等しいピークが L9 由来のピークである。

B A における「 $m/z=928.5645$ $Z=17$ 」のピークを拡大したもの（上）と、Xcalibur (Thermo Scientific, Waltham, MA) によって計算された理論的なピーク形状（下）の比較。複数のピークは主に分子中に含まれる ^{13}C の個数によって分裂する同位体ピークである。両者のピーク位置及び形状は概ね一致し、このピークが L9 由来のものであると同定された。

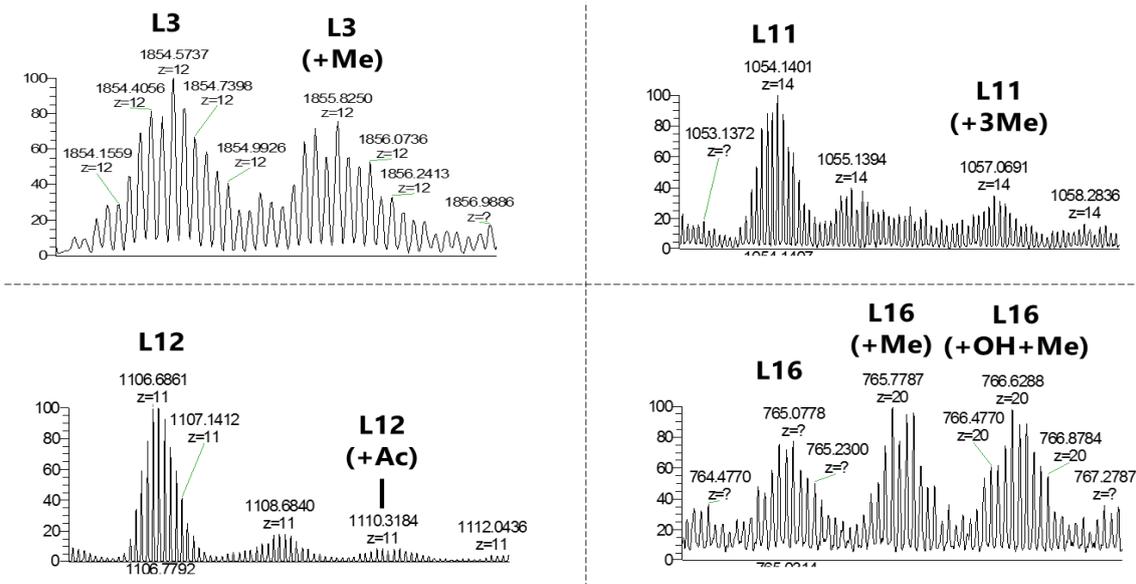


図 3-9 Intact MS による L3、L11、L12、L16 の分子量測定

L3、L11、L12、L16 の Intact MS において最も強度の高かったピークの拡大図（図 3-8B の上半分に相当する）。50S サブユニットを構成する RP は、L3 は Q150 のメチル化、L11 は A1、K33、K39 の 3 箇所それぞれトリメチル化、L7/L12 は K81 のメチル化、若しくは S1 のアセチル化、L16 は M1 のメチル化他 1-2 箇所の修飾、L33 は A1 のメチル化を受ける。本研究において、L7 のメチル化と L33 のメチル化は検出されなかった（Data not shown）。Xcalibur (Thermo Scientific, Waltham, MA)による計算より帰属が明らかなピークはその由来を併記した。

3.2 組み換えタンパク質による 50S サブユニットの試験管内再構成

50S サブユニットを構成する RP は、L7/L12 は 4 当量、それ以外は 1 当量ずつである (Thammana *et al.*, *Nature*, 1973, Subramanian, *J. Mol. Biol.*, 1975)。この知見に基づき、精製された 33 種類の RP を 1 当量ずつ (L12 については 4 当量) 混合したもの (33 recombinant large ribosomal protein mix, 33P) を TP50 の代わりとし、大腸菌内在性 50S サブユニット (*E. coli* native 50S subunit, n50S) から抽出した 23S/5S rRNA とともに 50S サブユニットの試験管内再構成を行った。Nierhaus らが構築した 2 段階の熱処理による再構成法 (Nierhaus, *Ribosomes and protein synthesis*, 1990) に従って処理されたサンプル (reconstituted 50S subunit, r50S) の再構成効率は、シヨ糖密度勾配遠心処理後の再構成産物における rRNA の吸光を測定することによって評価した (図 3-10)。その結果、260 nm の吸光の大半は n50S と殆ど同じ位置に現れ、50S サブユニットが再構成されていることが強く示唆された。

33P を用いて再構成した再構成産物 (r50S(33P)) のピーク形状は、TP50 を用いて再構成した再構成産物 (r50S(TP)) と類似していた。また熱処理をしなかったサンプルは 260 nm の吸光がより軽い位置に現れた。これは rRNA の構造変化を起こせずに 33S 前駆体が蓄積した結果と考えられ、本研究における対照実験の結果とも、TP50 を用いた再構成研究の結果 (Dohme *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 1976) と一致する。これらを踏まえると、33P は 50S サブユニットの組み立てにおいて TP50 と遜色ない活性を持つと考えられる。

シヨ糖密度勾配遠心後の再構成産物は、熱処理をしたサンプルについては最も大きなピークの重い方半分と軽い方半分、熱処理をしていないサンプルについては最も大きなピーク全体と 2 番目に大きなピーク全体の、それぞれ 2 種類ずつにまとめた。これらを TCA とプロテアーゼ Lys-C で処理し、それぞれに含まれる RP の種類と量比を LC-MS/MS によって調べた。r50S (33P) の 50S ピークの重い方半分には 33 種類全ての RP が含まれ、且つ各 RP の量比が r50S (TP) と類似の傾向となっていることが示された (図 3-11 H)。この結果は図 3-10 で示された、50S サブユニットの組み立てにおける 33P の高い活性を支持する結果である。r50S(33P) においては幾つかのタンパク質の存在比が高い。これは 50S サブユニットの調製における幾つかの RP が脱離や、TP50 の調製における幾つかの RP の低い回収率に起因すると考えられる。また L31 については、C 末端のペプチドのみ r50S(TP) の 46 倍検出され、N 末端側のペプチドは 1.0 倍検出された。これは本研究において調製した大腸菌リボソームの殆どが L31 の C 末端ドメインを欠いているためだと考えられ、再構成された 50S 粒子中に含まれる L31 の実質的な

量比は殆ど 1 当量だと考えられる。

熱処理をしなかった再構成産物は、重い画分のものであっても限られた種類の RP し
か結合しなかった。量比が 0 に近いものはいずれも、アセンブリマップの下側に位置す
る、つまり組み立て後期に結合するタンパク質であり、先行研究 (Herold *et al.*, *J. Biol.*
Chem., 1987) を支持する結果である。

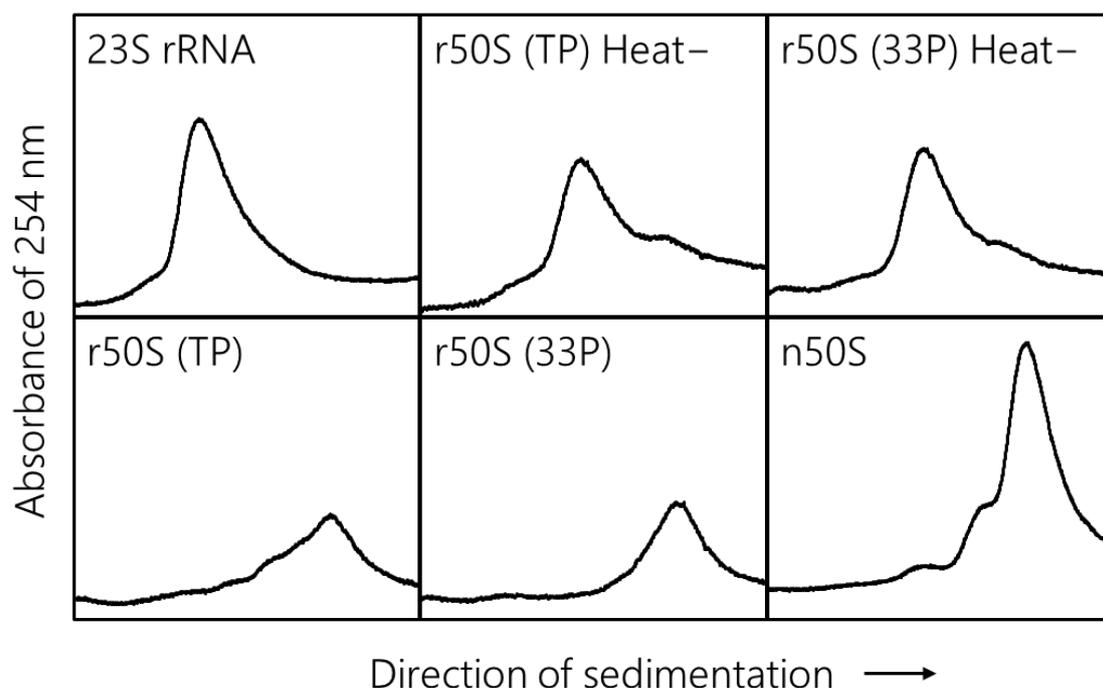
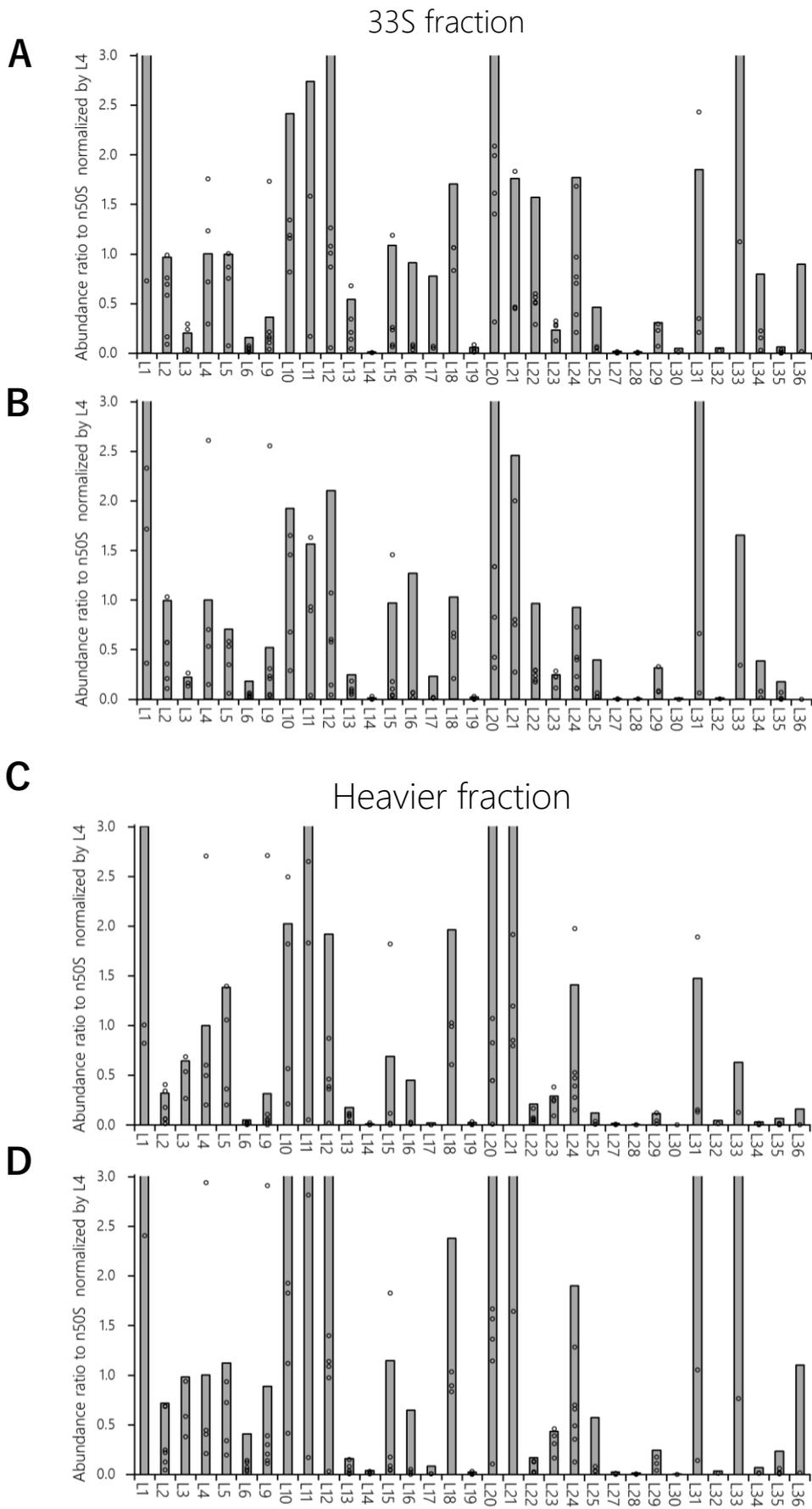


図 3-10 ショ糖密度勾配遠心処理した再構成産物の RNA 吸光度

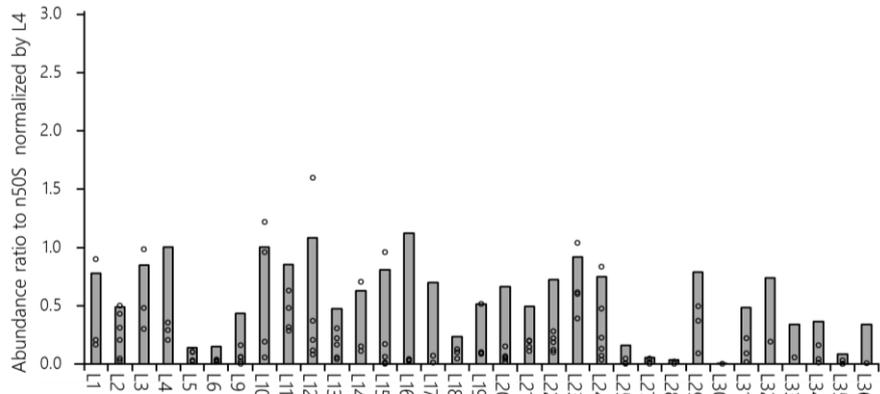
23S/5S rRNA 2.5 A_{260} と RP 0.3 A_{230} を Buffer 4 で 100 μL に定容し、44°C で 20 min、続いて酢酸マグネシウムによって Mg^{2+} を 20 mM に上げて更に 50°C で 90 min 加熱した。再構成産物は 5–20% (w/v) ショ糖密度勾配に重層し、SW32 rotor を用いて $1.6 \times 10^5 \times g$ 、5 h の遠心をした。その後密度勾配の上から連続的に吸い上げながら 254 nm の吸光を測定した。

「23S rRNA」は 50S サブユニットから抽出した rRNA 90 pmol のコントロール (5S rRNA はこの実験系では検出できない)、「r50S(TP) Heat-」と「r50S(33P) Heat-」はそれぞれ TP50 と 33P を用い氷上で再構成を行ったもの、「r50S(TP)」と「r50S(33P)」はそれぞれ TP50 と 33P を用い二段階の熱処理によって再構成を行ったものである。「n50S」は大腸菌内在性 50S サブユニット 90 pmol のコントロールである。凍結融解を繰り返したため 50S のピークの左肩に前駆体と思われる粒子が蓄積しており、その左には残存する 30S サブユニットのピークがわずかに見える。

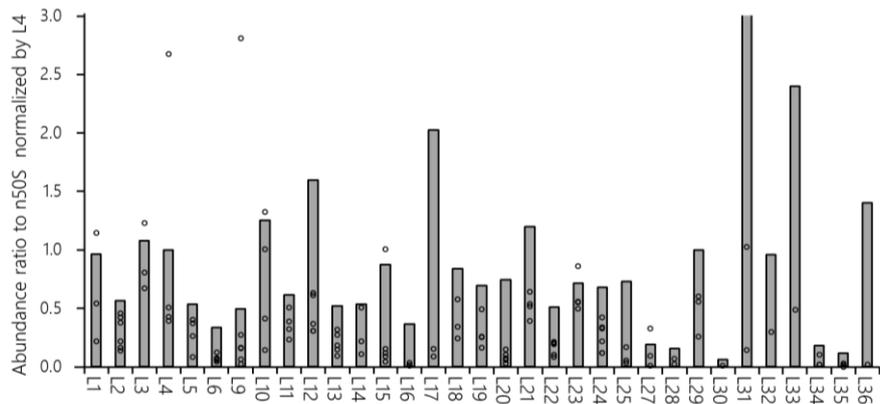


50S light fraction

E

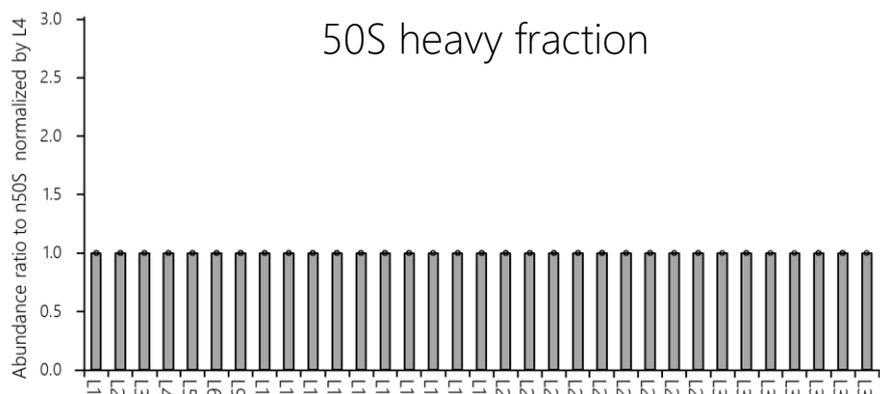


F



G

50S heavy fraction



H

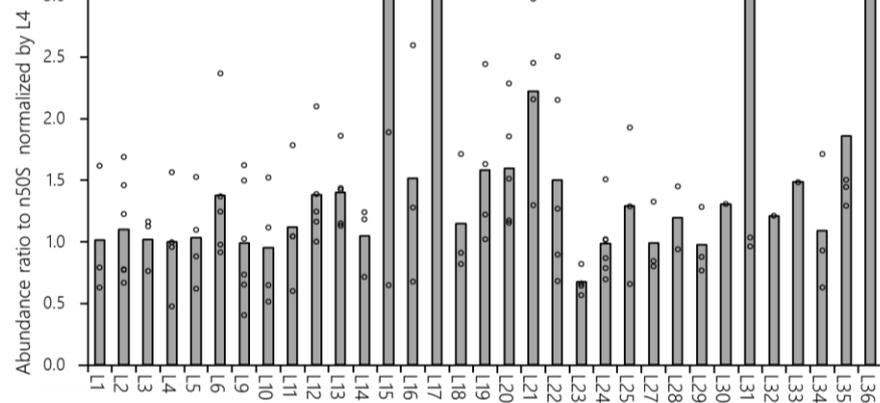


図 3-11 ショ糖密度勾配遠心処理した再構成産物の RP 存在比

ショ糖密度勾配遠心処理後の再構成産物（図 3-10）を 5% (w/v)TCA で濃縮したものをプロテアーゼ Lys-C で消化し、LC-MS/MS によって含まれる各 RP の量比を定量した。組み立ての初期に直接 23S rRNA に結合する L4 はいずれのサンプルにも 1 当量存在すると仮定し、**G** (r50S(TP)の 50S ピークの重い方半分) に対する RP ペプチドシグナル強度の比をドットで示し、更にその平均を灰色の棒で示した。

A r50S(TP, Δ-) の 33S ピーク、**B** r50S(33P, Δ-) の 33S ピーク、**C** r50S(TP, Δ-) の 33S より重いピーク、**D** r50S(33P, Δ-) の 33S より重いピーク、**E** r50S(TP) の 50S ピークの軽い方半分、**F** r50S(33P) の 50S ピークの軽い方半分、**G** r50S(TP) の 50S ピークの重い方半分、

3.3 組み換え RP による再構成 50S サブユニットの翻訳活性評価

再構成 50S サブユニットの翻訳活性は、PURE system (PUREfrex®2.0) 中でのタンパク質合成実験によって評価した。具体的には、大腸菌内在性 30S サブユニットとともにスプリットリソフェラーゼの小さいサブユニットである HiBiT と緑色蛍光タンパク質 sfGFP をそれぞれ合成した。HiBiT 合成後の PURE system には、精製されたもう一方のサブユニット LgBiT を過剰量添加しリソフェラーゼ活性を評価した。sfGFP の合成量は緑色の蛍光量の経時変化を観察した。その結果、r50S(33P)は、HiBiT では n50S を用いた場合に比べ 3 割程度、sfGFP では 1 割程度の合成が確認され、組み換えタンパク質によって再構成された 50S サブユニットが翻訳活性を有することが示された(図 3-12,13)。r50S(TP)においては 5-6 割程度の活性であり、ポリウリジル酸依存ポリフェニルアラニン合成実験によって 7-8 割程度の活性を検出した先行研究 (Dohme *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 1976) に比べやや低い活性だが、これはタンパク質合成実験系の違い、或いは限外濾過による再構成産物の濃縮による再構成産物へのダメージに起因するものと思われる。

再構成 50S サブユニットの性状解析において、r50S(TP)と r50S(33P)は類似の結果であったが、翻訳活性評価においては、r50S(33P)の活性は r50S(TP)の 1/5-1/3 程度しかなかった。これは TP50 と 33P に化学的な違いがあることを意味する。TP50 と 33P の最大の違いは翻訳後修飾である。大量発現した RP の多くは翻訳後修飾を受けておらず(図 3-9)、このことがリボソームの翻訳機能に影響しているのではないかと考えた。そこで、組み換え RP の翻訳後修飾を、その修飾酵素との共発現によってより多く導入することを試みた。2019 年現在、50S サブユニットを構成する RP のうち翻訳後修飾を受け、且つ修飾酵素が同定されているものは L3、L11、L12 の 3 種類である。ま

ずこれらの3種類のRPを修飾酵素であるPrmB、PrmA、RimLと共発現させ精製した(図3-14)。次にこれらの修飾導入率の変化をIntact MSによって確認したところ、L3とL11については修飾導入率が向上していることが示された(図3-15)。L11については3箇所入るべきトリメチル化が2箇所しか入っていない、或いは3箇所目がモノメチル化を受けているものが大半を占めるが、驚くべき結果ではない。1位のアラニンがSUMOと連結している状態ではアミノ基が露出していないため修飾が入らないはずだからである。逆に、僅かに3箇所ともトリメチル化を受けたL11が検出されているという結果は、精製過程におけるSUMO切断後に若干量の修飾を受けた可能性を示唆する。確かにL11とPrmAは精製過程で複合体を形成するようで、イオン交換カラムを通すまでこの2つを分離することが出来なかった。なおL12についてはLC-MSにより修飾導入率に明らかな変化が見られないことを確認した(Data not shown)。

修飾酵素と共発現したL3とL11を用いて50Sサブユニットを再構成し、sfGFP合成実験を行ったところ、これらの翻訳後修飾の有無によってsfGFPの合成量に有意な差は見られなかった(図3-16)。よってL3のQ150、L11のK33とK39位の翻訳後修飾は50Sサブユニットの翻訳活性と無関係であることが示された。

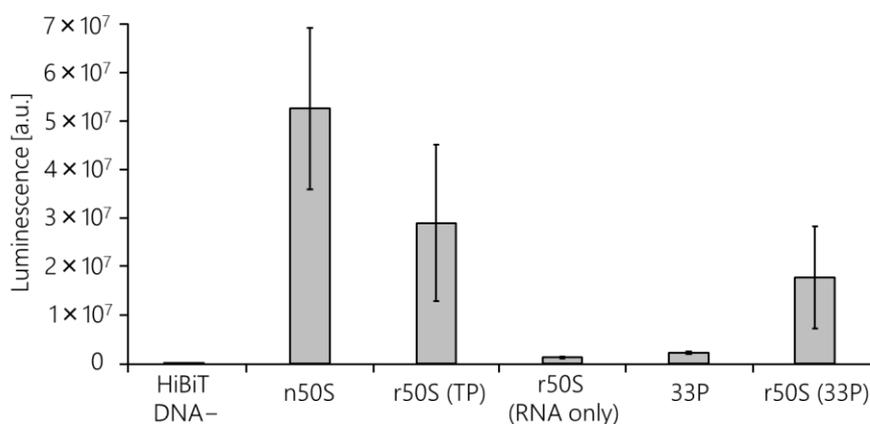


図3-12 再構成50Sサブユニットによって合成されたHiBiTの活性測定結果

PUREflex®2.0 (ジーンフロンティア)の2×Buffer premixと10×Enzyme premixに、大腸菌30Sサブユニットと再構成50Sサブユニットを50 nMずつ、HiBiT DNAを1 nM加え37°Cで12 hタンパク質合成を行った。反応液0.6 μLに、予め精製されたスプリットルシフェラーゼ大サブユニットLgBiT過剰量とルシフェリン基質を加え、発光量を測定した。「r50S (RNA only)」は、RPを加えずに再構成を行ったもの、「33P」は、50Sサブユニットの代わりに33Pを加えたものである。同一ロットのTP50、33P、23S/5S rRNAを用いて、再構成の操作以降が独立した実験を3度行い、標準偏差を併記した。

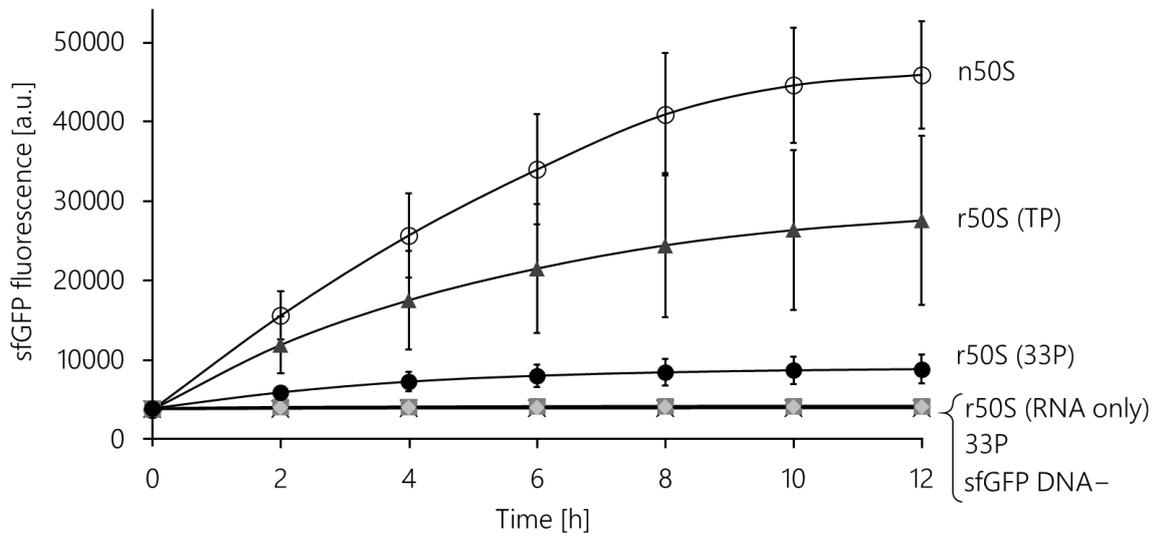


図 3-13 再構成 50S サブユニットによって合成された sfGFP の蛍光量測定結果

PURE *frex*[®]2.0 (ジーンフロンティア) の 2×Buffer premix と 10×Enzyme premix に、大腸菌 30S サブユニットと再構成 50S サブユニットを 200 nM ずつ、sfGFP DNA を 1 nM 加え 37°C で 12 h タンパク質合成を行った。反応液 10 μL は sfGFP の蛍光量を経時的に観察された。「r50S (RNA only)」は、RP を加えずに再構成を行ったもの、「33P」は、50S サブユニットの代わりに 33P を加えたものである。同一ロットの TP50、33P、23S/5S rRNA を用いて、再構成の操作以降が独立した実験を 3 度行い、標準偏差を併記した。

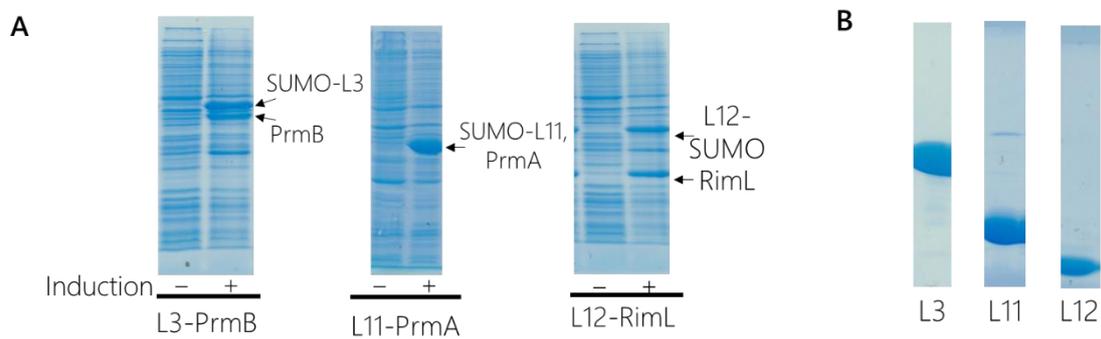


図 3-14 修飾酵素と共発現し精製された RP

A pSUMO-15b の SUMO 配列の直下に RP を挿入し、その下流に SD 配列及び修飾酵素の ORF を挿入したプラスミドを作製し、単独で発現した RP と同様の手法で発現した。培養液 150/OD₆₀₀ μL を遠心して菌体を回収し、2×SDS Loading Dye 10 μL で懸濁した後 95°C で 5 min 加熱処理したものを 15% SDS-PAGE で流した。IPTG 依存的に 2 種類のタンパク質が発現している。L11 については、6×His tag-SUMO-L11 と PrmA の泳動度が全く同じでありバンドが縮重している。

B 精製した L3、L11、L12 は、いずれも 15% SDS-PAGE で殆ど夾雑物が検出できない純度で精製された。L11 において、L11 の次に濃い夾雑物のバンドは PrmA である。

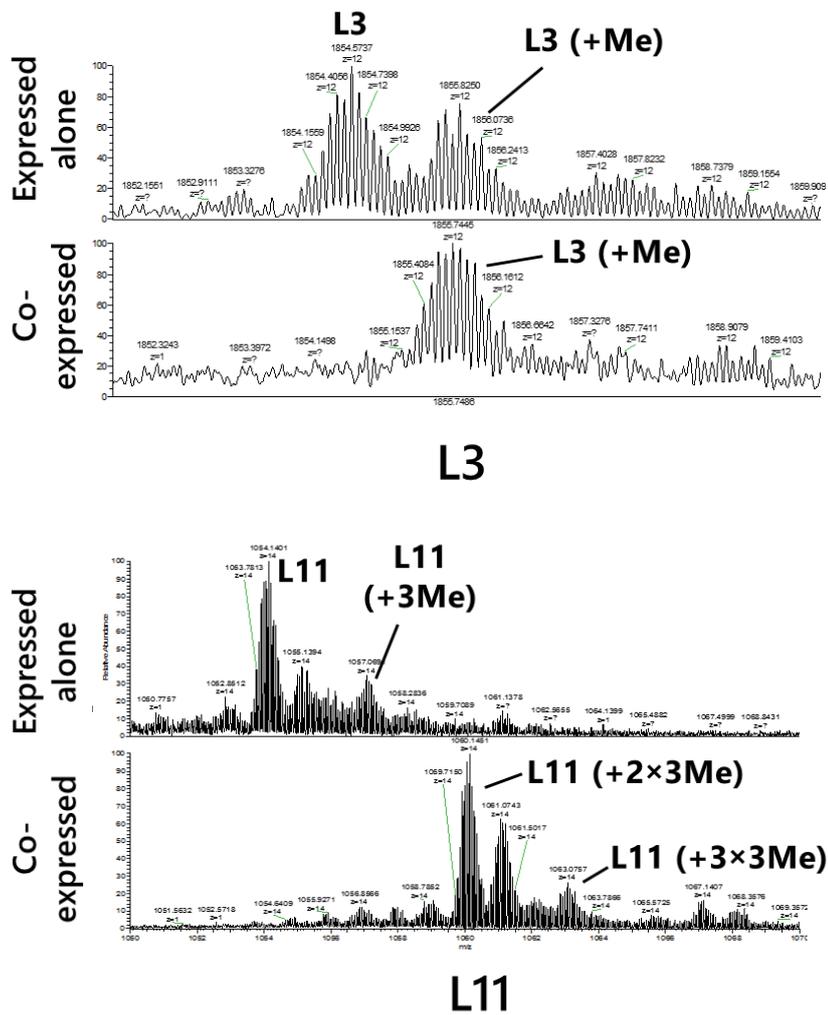


図 3-15 修飾酵素と共発現し精製された RP の翻訳後修飾導入率の変化
 図の見方は図 3-9 と同様。それぞれのタンパク質について、上の波形が単独で発現させたときのもの (図 3-9 と同一のデータ)、下の波形が修飾酵素と共発現させたときのもの。L13 は共発現により殆ど全ての分子がメチル化された。L11 において「 $2 \times 3\text{Me}$ 」と示したピークの右隣のピークは、合計で 7つのメチル基が導入されたものに由来する。

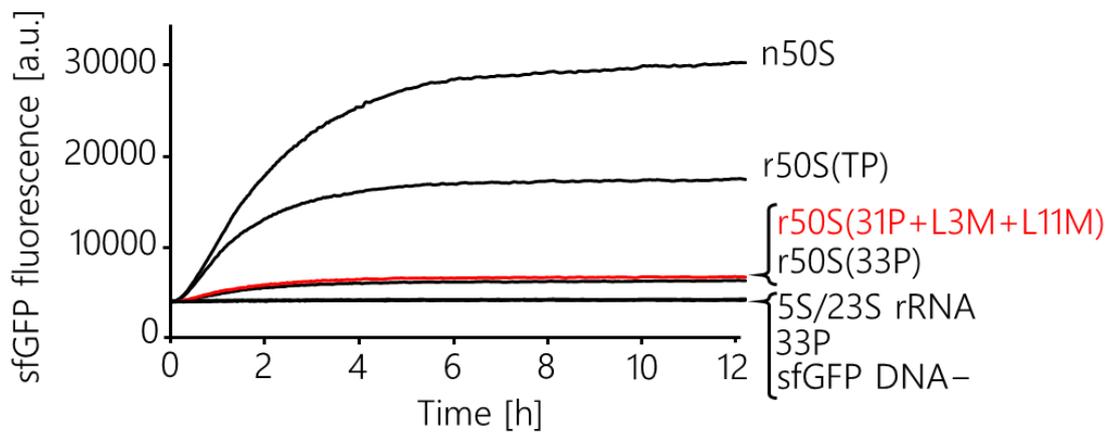


図 3-16 L3 及び L11 の翻訳後修飾の有無による再構成 50S サブユニットの sfGFP 合成能の変化

図 3-13 と同様の実験を行ったが、実験は 1 回だけ行われた。「r50S(31P+L3M+L11M)」は、L3、L11 を除く 31 種類の組み換え RP と、修飾酵素と共発現した L3、L11 による再構成産物を用いたものである。「5S/23S rRNA」は、PURE *frex*[®]2.0 に 50S サブユニットの代わりに 5S/23S rRNA を加えたものである。

3.4 全 54 種類の組み換え RP による 70S リボソームの作製

所属研究室で確立された、組み換えタンパク質による 30S サブユニットの試験管内再構成の技術(Shimojo *et al.*, *Comn. Biol.*, 2020)と本研究の成果を統合して、全 54 種類の RP が組み換えタンパク質に置換された大腸菌 70S リボソームの作製を試みた。具体的には、熱処理によって組み立てた 50S サブユニットと、30S サブユニットを構成する全 21 種類の RP を PURE system に添加した。この系では、PURE system 内で 16S rDNA から 16S rRNA の転写、転写された 16S rRNA と精製組み換え RP から成る 30S サブユニットの組み立て、組み立てられた 30S サブユニットと予め再構成された 50S サブユニットによる sfGFP の合成が全て同時に行われる (図 3-17)。結果として、微量ではあるものの sfGFP の合成が検出され、23S/5S rRNA 以外の構成要素が全て組み換え要素に置換された 70S リボソームの試験管内再構成に成功した (図 3-18)。また、SDS-PAGE によって sfGFP の全長が合成出来ていることも確認した (図 3-19)。

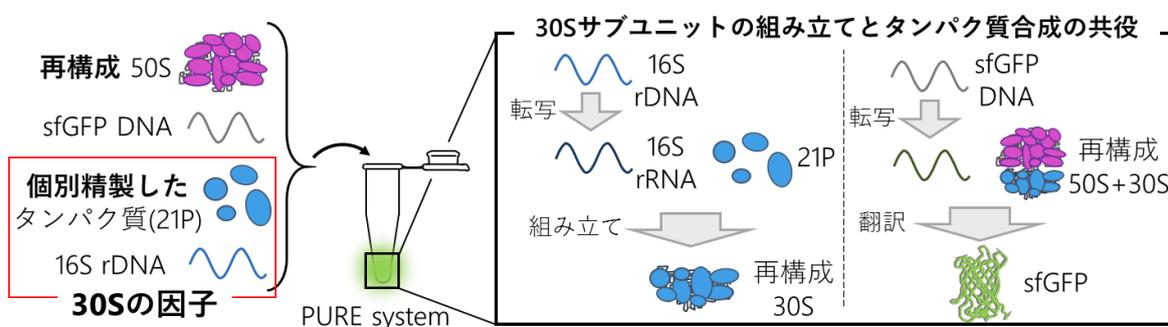


図 3-17 本研究における 70S リボソームの再構成実験系

この実験系は基本的に前節における無細胞タンパク質合成実験と同じだが、大腸菌内在性 30S サブユニットの代わりに個別精製した組み換え RP S1-S21 と、16S rDNA を用いている (図の左)。PURE system 内では、まず 16S rRNA が転写され、ここに S1-S21 が順次結合して 30S サブユニットがその場で再構成される (図の中央)。同時にレポーター遺伝子である sfGFP の mRNA が転写される。そして、予め熱処理によって再構成された 50S サブユニットと PURE system 内で再構成された 30S サブユニットは sfGFP の翻訳を行う (図の右)。

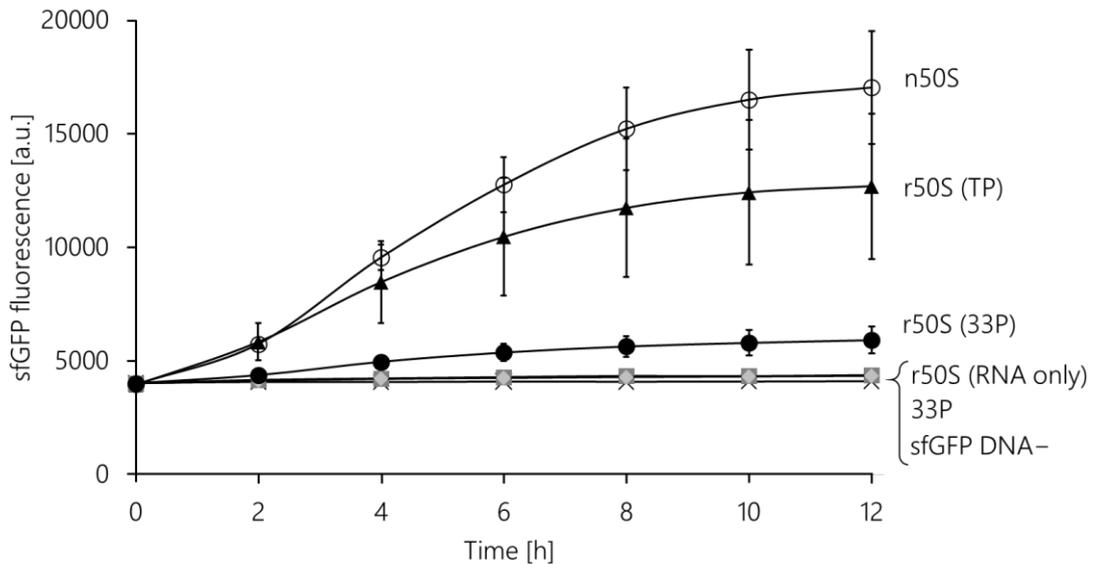


図 3-18 sfGFP 合成実験による再構成 70S リボソームの翻訳活性評価

PURE *frex*[®]2.0 (ジーンフロンティア) の 2×Buffer premix と 10×Enzyme premix に、16S rDNA を 20 nM、S1–S21 を 500 nM ずつ、再構成 50S サブユニットを 200 nM、sfGFP DNA を 5 nM 加え 37°C で 12 h タンパク質合成を行った。反応液 10 μL は sfGFP の蛍光量を経時的に観察された。図の見方は図 3-13 に同じ。同一ロットの TP50、33P、23S/5S rRNA を用いて、再構成の操作以降が独立した実験を 3 度行い、標準偏差を併記した。

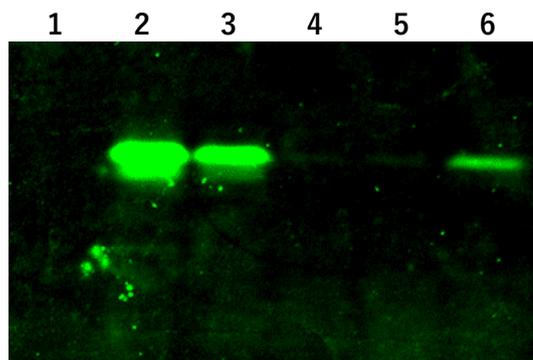


図 3-19 PURE system によって合成された sfGFP

第 2 章第 9 節に記述した実験におけるタンパク質合成反応後の溶液全量に 5×LiDS Loading Dye を加え、15% SDS-PAGE で流した。その後 Image Quant LAS 500 (GE) を使い、露光時間を 10 min に設定して緑色の蛍光を観察した。レーン 1 から順に、sfGFP DNA–、n50S、r50S(TP)、r50S(RNA only)、33P、r50S(33P) のサンプルである。

4. 考察

4.1 本研究のまとめ

本研究では、50S サブユニットを構成する全 33 種類の RP の精製法を確立した。更に、個別調製した組み換え RP によって翻訳活性のある大腸菌 50S リボソームサブユニットの再構成に初めて成功した。そして、PURE system を用いた転写共役的な 30S サブユニットの再構成系と統合して、23S/5S rRNA 以外の全ての因子が組み換え因子に置換された大腸菌 70S リボソームの作製にも成功した。本研究の成果によって、組み換え要素のみによるリボソームの再構成という、合成生物学的に重要な課題の一つの達成に向けて大きく前進したと言える。また本研究ではこれまで大腸菌内在性のタンパク質因子に依存してきた無細胞翻訳系のリボソームを自由に改変できるための系を提供する。すなわち、PURE system の機能拡張を志向したリボソーム作製への第一歩としても位置づけることが出来る。

一方、上記のような大きな研究課題の完全な達成には、本研究で構築した 50S サブユニットの再構成系を大幅に改善する必要がある。具体的には、有意に低い再構成 50S サブユニットの翻訳活性、依然として膨大な熱エネルギーを必要とした 50S サブユニットの再構成手法、塩基修飾が既に導入されている大腸菌内在性 23S rRNA への依存などである。これらをボトムアップな再構成系によって解決するのはいずれも簡単ではなく、30S サブユニットのような気軽さで 50S サブユニットを試験管内再構成出来るようになるには、まだまだ多大な時間と労力を要するだろう。

4.2 精製された組み換えタンパク質について

本研究の新規性・先進性の本質は、Semrad らが達成できなかった、33 種類の RP を高純度且つ高濃度で精製する手法の確立にある。本研究における RP の精製法と Semrad らの精製法の最大の違いは、コンストラクトである。本研究では目的タンパク質の全長をそのまま発現させるのではなく、6×His tag-SUMO との融合タンパク質として発現した。His tag のある状態でアフィニティ精製を行い、その後 His tag を取り除いて再度同一のカラムに通した素通り画分を得るという手法は、理論上全ての夾雑物を除くことの出来る強力な精製法である。現実には、目的タンパク質やカラム担体に非特異的に吸着する夾雑タンパク質の存在により、ニッケルカラム精製のみで目的タンパク質を単離出来ないとはいえ、RP の精製度の向上に大きく貢献しているのは疑いようがない。も

うひとつ、本研究においては精製過程で積極的に陰イオン交換カラムを用いたことが Semrad らの精製法との大きな違いである。本研究において、RP を陽イオン交換カラムに通した時に全く夾雑物が除けないことが何度かあった (Data not shown)。恐らく RP 若しくは担体に非特異的に結合した夾雑物がそのまま RP とともに溶出されるのだと考えられる。このような夾雑物を多く含む RP を用いて再構成を行うと、夾雑物が rRNA と競合して RP を奪い合い、50S サブユニットの組み立てを阻害したり、RNase が混入していれば rRNA を不活性化したりする可能性がある。夾雑物だけが吸着するカラムを通して素通り画分を得ることでこのような夾雑物を除去できることがあり、本研究においては陰イオン交換カラムを通す工程がこれに該当する。Semrad らはバッファ条件を変えて同じカラムを最大 2 回通しているが、これだけで RP が単離できるとは考えにくい。もし、Semrad らがサイズ排除カラムや陰イオン交換カラムなどによる多段階の RP 精製を行っていたら、本研究課題は 15 年前に完結していたかもしれない。

本研究においても、幾つかの RP は SDS-PAGE と CBB 染色によって夾雑物が検出された (図 3-1)。とりわけ L10 は、Petersen の報告通り (Petersen, *J. Bacteriol.*, 1990)、発現中に大腸菌内在性のプロテアーゼによって分解された発現タンパク質の断片が大量に生じ、顕著な精製度の低下をもたらした。また、L10 は C 末端の残基が欠けると L12 との結合に影響し、その結果翻訳活性の低下をもたらす (Griaznova *et al.*, *Biochemistry*, 2000)。したがって本研究における再構成 50S サブユニットの翻訳活性の低さは、L10 断片の混入に起因している可能性があるため、精製法の根本的な改良が必要と考えられる。Griaznova によれば、全長の L10 を発現させるには L12 との共発現系が有効である。SUMO と融合した L10 においてもこの共発現系を試してみる価値はあると考える。一方で本研究における L10 の精製法の確立は、あえて肯定的な見方をすれば、L10 を単独で大量発現させてもある程度の純度で精製する方法、つまり L12 の混入が全く無い精製法を発見したということも出来る。

L31 の精製度も低く、どちらが目的タンパク質かわからないほどのエクストラバンドが存在する (図 3-1, 7)。にもかかわらず、再構成 50S サブユニットからは十分な量の L31 が検出された (図 3-11)。Urea-Tria/Tricine-SDS-PAGE の泳動度から考えると、図 3-1 における上側のバンドが L31 の全長で、下側のバンドが L31 の C 末端約 10 アミノ酸が切断されたものに由来すると考えるのが妥当である。確かに大腸菌 A19 株においては、プロテアーゼ OmpT によって L31 の C 末端ドメインが切断される。しかし本研究で L31 の発現に用いた Rosetta (DE3) pLysS は OmpT 欠損株なのでこの推論は誤っていることになる。だとしたら大腸菌湿重量 1 g あたり mg オーダーで発現してい

る約 5 kDa のタンパク質が存在することになり、こちらも妥当性を欠く。目下のところは、精製段階で Tricine-PAGE を用い、2 つのタンパク質が分離された画分を回収することが最善だと考えられる。

本研究では全 33 種類の RP を全て精製するのに約 4 年を要した。またこの間の試行錯誤により、RP の精製法の大まかな方針は少しずつ変遷しており、煩雑且つ個別化しすぎた精製法となっている。中には L10 のように再現性の良くない精製手順を用いているものもある。そこで、今後は RP の精製法を全面的に見直し、最適化・類型化された精製手順を考える必要がある。以下に、これまで 33 種類の RP を精製した経験を基に考案した、汎用性のありそうな精製手順を記述する。この方法は多少煩雑だが安全マージンを取った方法であり、33 種類のうち 22 種類は汎用プロトコル通りの手順によってそれなりの収量、精製度で精製できると予想する。また L12, L13, L17, L28, L30, L34, L35 の 7 種類は汎用精製手順の一部を修正して用いることが出来ると考えられる。完全に個別化された精製法を用いなければならないのは L5, L10, L15, L20 の 4 種類だけになるだろう。

汎用プロトコル

Day 1. 破碎から粗精製の段階は 4A バッファー、4D バッファー、Ni-NTA agarose 1 mL×6-8 本を用いる。菌体湿重量 2-3 g 程度を超音波破碎し、遠心・フィルトレーション後の抽出液に Ni-NTA agarose 6-8 mL を加え、5 分間振盪。これを 6-8 本のオープンカラムに等分して乗せる。wash を 50 CV 以上行った後、4A:4D=40:60 (イミダゾール 300 mM) 3.5 CV で溶出する。Ulp1 は加えず、500 mL の 4C バッファーで一晩透析。透析膜は尿素に耐性のあるもので、分画分子量は目的タンパク質より少しだけ小さいもの (タンパク質の種類によるが 20-30 kDa 程度) を使う。

Day 2. 4C バッファー、4D バッファー、His Trap HP 5 mL×1 を用いる。Wash は不要。5-60%B、15 CV (75 mL) のグラジエントで溶出し、15% SDS-PAGE によって回収画分を決める。イミダゾール低濃度で溶出した夾雑物を含む画分はなるべく避ける。Ulp1 1/2000-1/500 量 (タンパク質の濃度による) を加え、500 mL の C バッファーで一晩透析。これ以降の透析膜の分画分子量は 3.5-10 kDa くらいのもを使う。

Day 3. 4C バッファー、4D バッファー、His Trap HP 5 mL×1 を用いる。まず粗精製タンパク質 9.1 mL に対して 1.2 g の尿素を粉で加え、濃度をおよそ 4 M にする。カラム精製の手順は Day 2. に準じる。L1-L27 は 15% 又は 18% SDS-PAGE、L28-L36 は 18% 7.5 M Urea/SDS-PAGE (※) の結果を基に回収画分を決める。回収画分を 500 mL の 4LSE+5G バッファーで 3 時間、更に外液を交換して一晩透析。

(※) 池内の系 (Ikeuchi *et al.*, *Plant Cell Physiol.*, 1988) で行う。Laemmli の系 (最も一般的な系) に尿素を加えたものでは泳動実績がない。通常の 20% SDS-PAGE は夾雑物のバンドが見えにくいので非推奨。Tris/Tricine-SDS-PAGE は泳動に時間がかかるので非推奨。

Day 4. 4LSE+5G バッファー、4F バッファー、Hi Trap QSP (Q と SP をこの順で直列につなぐ) 5 mL×(1+1)を用いる。タンパク質を Injection したら約 0.7 CV 4LSE+5G バッファーで洗浄した後 Hi Trap Q を外す。0-50%、15 CV のグラジエントで溶出し、220, 260, 280 nm の吸光、及び SDS-PAGE のバンドパターンより回収画分を決める。必要に応じて、精製タンパク質の濃縮を行う (可溶性の高いタンパク質はこの段階で概ね 300 μ M 以上の濃度にするのが望ましい)。透析によって 30%(v/v)グリセロールを含むストックバッファーに置換する (グリセロール導入により体積が約半分になる)。

Day 5. L1-L25 はブラッドフォード法、L27-L36 は BCA 法によって濃度を測って凍結保存。濃度が約 100 μ M を下回っている場合は濃縮し直すか精製をやり直す。

修正プロトコル

L12: イオン交換カラムは SP→Q の順序でつなぐ。濃縮には限外濾過ではなく硫酸沈殿を用いる。

L13: SUMO の切断には A Buffer を用い、その後のニッケルカラム精製は A→B Buffer を用いる。

L17: イオン交換カラム精製のバッファーを 0.15 M KCl E5G→F5G Buffer にする。

L28: 粗精製の段階から、分離ゲルの最上部に現れる夾雑物をなるべく避けて目的タンパク質を回収する。

L30: イオン交換カラム精製のバッファーを 0.1 M KCl E5G→F5G Buffer にする。

L34: イオン交換カラム精製には MONOS を用い、0.1 M KCl E5G→F5G Buffer を用いる。第 2 章第 3 節に述べたグラジエント操作によって目的タンパク質を溶出する。

L35: イオン交換カラム精製においては第 2 章第 3 節に述べたグラジエント操作によって目的タンパク質を溶出する。

ここまで His tag-SUMO の利点を述べてきたが、SUMO は万能ではない。本研究における SUMO の欠点を 2 つ指摘する。一つは、SUMO 切断効率が著しく低くなるために N 末端残基をプロリンに出来ないことである。そのため、本研究では L35 の N 末端残基をアラニンに置換せざるを得なかった。もう一つは、また、N 末端に近い残基の翻

訳後修飾が入らないことである。これは主には SUMO による立体障害のためと考えられる。加えて、1 位のアラニン残基がトリメチル化される L11 については、修飾部位のうち 1 箇所が SUMO の C 末端残基によって占有されているため、原理的に 2 箇所までしかメチル化されない。ひょっとすると、こうした大腸菌内在性 RP とのわずかな差異が、組み換え RP の機能に影響しているかもしれない。

上記の問題を解決するには、SUMO を用いないで組み換え RP を調製する方法を確立すればよい。では、His tag-SUMO を用いずに最初から完全長のまま発現した L11、L12、L16、L33、L35 を高純度で精製可能かということ、陽イオン交換カラムに比較的強く吸着する L33 と L35 については精製できる可能性が高いと思われる。この 2 つは、分子量が小さいことを利用した精製も可能なため、硫安分画とサイズ排除カラムを精製工程に加えることで、かなりの純度で回収できるのではないだろうか。一方、イオン交換カラムへの吸着が弱い L11 と L12、SUMO 付きでも高い純度での精製が容易でない L16 については、SUMO 無しでの精製は容易ではないと予想される。SUMO 切断後に翻訳後修飾を試験管内で導入する系を別途確立するアプローチの方が適切と考える。

本研究において精製困難だった RP の中には、L4 や L20 のように、自身の発現制御に関わっているものが多かった。これは、RP の核酸結合性と RP の凝集しやすさにある程度の正の相関があるということなのかもしれない。つまり凝集しやすい RP は、リボソームの構成要素以外にも機能を持っている可能性が高いと考えられる。本研究によって RP の精製法の確立によって、凝集しやすい RP を生化学的に調べるのが容易になったことから、本研究が RP の未知の機能を解明する一助にもなると考えられる。

4.3 再構成された 50S サブユニットについて

図 3-12, 13 においてタンパク質合成が検出されたことにより、TP50 を個別調製した組み換えタンパク質に置換するという本研究のコンセプトは達成されたと言える。また、単独では活性の確認が難しい精製 RP が、全体として組み立て及び翻訳に関する活性を有していたことも同時に示された。一方、本研究をリボソーム工学の研究ツールとして利用することを見据えると、系の改善が必要である。

まず、現状の再構成効率及び翻訳活性を向上させるには、再構成 50S サブユニットの機能と組み立ての両面を考える必要がある。機能については、前節に述べた L10 の精製法の改良、若しくは各種翻訳後修飾の積極的な導入によって改善される可能性がある。組み立てについては、図 3-10, 11 の結果を見ると、一見完成した 50S サブユニットが大量に出来上がっているように思われる。しかし、50S サブユニットの既知の前駆体の

中には、33 種類全ての RP が結合しているにもかかわらず翻訳活性を有しない 48S 前駆体が存在する (Dohme *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 1976) ことに注意が必要である。図 3-10 を注意深く見ると、r50S(33P)のピークが n50S に比べて若干軽い方に位置しているように見えることから、本研究における r50S(33P)には 48S 前駆体を多く含んでいる可能性がある。もし 48S 前駆体が多く蓄積しているとするれば、ペプチド転移中心付近の構造が不完全であるということである。実際に、再構成 50S サブユニットのクライオ電子顕微鏡観察より、2448 位のアデニンが立体的に正しい位置にいないことを示すようなデータが得られている (data not shown)。ひょっとするとペプチド転移中心に位置する RP である L2、L15、L16、L27、L33 など (Wower *et al.*, *The Translat. Appar.*, 1993) の活性が低いのかもかもしれない。確かにこれらの精製組み換え RP は全て、精製度が完璧でなかったり、精製途中で一度凝集しかけていたり、翻訳後修飾を欠いていたりする。今後はこれらの精製法の条件検討を行うとともに、50S サブユニットの組み立て後期に作用すると考えられる生合成因子を系に加えることを検討したい。具体的には、EngA と ObgE の 2 種類の GTPase が挙げられる。この 2 つは生体内において重要なタンパク質であり (Hwang *et al.*, *Mol. Microbiol.*, 2006, Kobayashi *et al.*, *Mol. Microbiol.*, 2001)、いずれも 23S rRNA の 2552 位のウリジンをメチル化する酵素 RrmJ を補償する (Tan *et al.*, *J. Bacteriol.*, 2002)。また完成間近の 50S サブユニット前駆体に結合している構造も得られている (Zhang *et al.*, *NAR.*, 2014, Feng *et al.*, *Plos Biol.*, 2014)。このような生合成因子群を用いれば、50S サブユニットの再構成効率を向上させるとともに、より低い温度での 50S サブユニットの組み立て、或いは試験管内転写した 23S rRNA を用いた 50S サブユニットの再構成も可能になるかもしれない。

本研究において、23S/5S rRNA については唯一組み換え要素に置換することが出来ていないが、iSAT system (Jewett *et al.*, *Mol. Syst. Biol.*, 2013) との統合や、本研究における再構成系へのテリスロマイシンとトリメチルグリシンの添加 (Semrad *et al.*, *RNA*, 2002) のような現行の技術の組み合わせのみで、全ての構成要素が組み換え要素に置換されたリボソームを再構成することが理論上可能である。しかし、本研究の目的は組み換え要素からなる 70S リボソームを再構成することそれ自体ではない。リボソームの利用を最終的な目標としたとき、リボソーム工学とリボソームの組み立ての両方に関する深い知見を同時に獲得し統合するために、そして既存のタンパク質合成の枠組みを超えたりリボソーム改変を行うために、構成要素が明確に定義され組成の調節が容易な PURE system での完全再構成リボソーム作製を目指したい。本研究における 70S リボソームの再構成系 (図 3-17) は、そのような応用の仕方を志向した実験であった。

PURE system 内で、通常のリボソームから改変リボソームの構成因子を合成し再構成する系が確立すれば、試験管内で完結した改変リボソームの利用における問題となり得る、改変リボソームの製造コストを克服できるだろう。将来的には、試験管内逆進化系と組み合わせた原始生命の探究や、試験管内での細胞分裂系や代謝系と組み合わせた人工細胞の創製など、本研究で構築した系が幅広く応用されることを期待したい。

5. 参考文献

- Palade GE. A small particulate component of the cytoplasm. *J Biophys Biochem Cytol.* 1955; 1(1): 59–68.
- Tissieres A. *et al.* Ribonucleoprotein particles from *Escherichia coli*. *Nature.* 1958; 182: 778–780.
- Gilbert W. Polypeptide synthesis in *Escherichia coli*. II. The polypeptide chain and S-RNA. *J. Mol. Biol.* 1963; 6: 389–403.
- Monro RE. Catalysis of peptide bond formation by 50 s ribosomal subunits from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 1967; 26: 147–151.
- Okamoto T. *et al.* Interaction of ribosomes and natural polyribonucleotides. *Biochim. Biophys. Acta.* 1963; 76: 266–274.
- Pestka S. *et al.* Regulatory mechanisms and protein synthesis X. Codon recognition on 30 s ribosomes. *J. Mol. Biol.* 1966; 21(1): 145–171.
- Selmer M. *et al.* Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science.* 2006; 313(5795): 1935–1942.
- Traub P. *et al.* Structure and function of *E. coli* ribosomes. V. Reconstitution of functionally active 30S ribosomal particles from RNA and proteins. *PNAS.* 1968; 59: 777–784
- Nomura M. *et al.* Reconstitution of 50S Ribosomal Subunits from Dissociated Molecular Components. *Nature.* 1970; 228: 744–748
- Nierhaus KH. *et al.* Total reconstitution of functionally active 50S ribosomal subunits from *Escherichia coli*. *PNAS.* 1974; 71(12): 4713–4717
- Mizushima S. *et al.* Assembly mapping of 30S ribosomal proteins from *E. coli*. *Nature.* 1970; 226: 1214.
- Herold M. *et al.* Incorporation of six additional proteins to complete the assembly map of the 50 S subunit from *Escherichia coli* ribosomes. *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 8826–8833
- Nikolay R. *et al.* Structural visualization of the formation and activation of the 50S ribosomal subunit during *in vitro* reconstitution. *Mol. Cell.* 2018; 70(5): 881–893.
- Lindahl L. Intermediates and time kinetics of the *in vivo* assembly of *Escherichia coli* ribosomes. *J. Mol. Biol.* 1975; 92: 15–37.
- Nomura M. *et al.* The assembly of ribosomes. *J. Cell. Physiol.* 1969; 74(2): 241–251.
- Dohme F. *et al.* Total reconstitution and assembly of 50 S subunits from *Escherichia*

coli ribosomes *in vitro*. *J. Mol. Biol.* 1976; 107(4): 585–599

Spillmann S. *et al.* Assembly *in vitro* of 50S subunit from *Escherichia coli* ribosomes: Proteins essential for the first heat-dependent conformational change. *J. Mol. Biol.* 1977; 115: 513–523.

de Narvaez CC. *et al.* *In vivo* transcriptionally coupled assembly of *Escherichia coli* ribosomal subunits. *J. Mol. Biol.* 1979; 134: 1–22.

Kitahara K. *et al.* The ordered transcription of RNA domains is not essential for ribosome biogenesis in *Escherichia coli*. *Mol. Cell.* 2009; 34(6): 760–766.

Lu Q. *et al.* The gene for 16S rRNA methyltransferase (*ksgA*) functions as a multicopy suppressor for a cold-sensitive mutant of *era*, an essential RAS-like GTP-binding protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 1998; 180: 5243–5246

Hwang J. *et al.* An essential GTPase, *der*, containing double GTP-binding domains from *Escherichia coli* and *Thermotoga maritima*. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(33): 31415–31421.

Kobayashi G. *et al.* Deficiency of essential GTP-binding protein *ObgE* in *Escherichia coli* inhibits chromosome partition. *Mol. Microbiol.* 2001; 41(5): 1037–1051

Green R. *et al.* *In vitro* complementation analysis localizes 23S rRNA posttranscriptional modifications that are required for *Escherichia coli* 50S ribosomal subunit assembly and function. *RNA.* 1996; 2(10): 1011–1021.

Semrad K. *et al.* Osmolytes stimulate the reconstitution of functional 50S ribosomes from *in vitro* transcripts of *Escherichia coli* 23S rRNA. *RNA.* 2002; 8(4): 401–411.

Green R. *et al.* Reconstitution of functional 50S ribosomes from *in vitro* transcripts of *Bacillus stearothermophilus* 23S rRNA. *Biochem.* 1999; 38: 1772–1779.

Khaitovich P. *et al.* Reconstitution of functionally active *Thermus aquaticus* large ribosomal subunits with *in vitro*-transcribed rRNA. *Biochem.* 1999; 38: 1780–1788.

Lhoest J. *et al.* Cold-sensitive ribosome assembly in an *Escherichia coli* mutant lacking a single methyl group in ribosomal protein L3. *Eur. J. Biochem.* 1981; 121: 33–37.

Culver GM. *et al.* Efficient reconstitution of functional *Escherichia coli* 30S ribosomal subunits from a complete set of recombinant small subunit ribosomal proteins. *RNA.* 1999; 5(6): 832–843.

Maki JA. *et al.* Recent developments in factor-facilitated ribosome assembly. *Methods.* 2005; 36(3): 313–320.

Tamaru D. *et al.* Reconstitution of 30S ribosomal subunits *in vitro* using ribosome biogenesis factors. *RNA*. 2018; 24(11): 1512–1519.

Semrad K. *et al.* RNA chaperone activity of large ribosomal subunit proteins from *Escherichia coli*. *RNA*. 2004; 10(12): 1855–1860.

Shajani Z. *et al.* Assembly of bacterial ribosomes. *Annu. Rev. Biochem.* 2011; 80: 501–526

Hohsaka T. *et al.* Adaptability of nonnatural aromatic amino acids to the active center of the *E. coli* ribosomal A site. *FEBS. Lett.* 1993; 335 (1): 47–50

Fahnestock S. *et al.* Ribosome-catalyzed polyester formation. *Science*. 1971; 173(3994): 340–343

Ellman JA. *et al.* Site-specific incorporation of novel backbone structures into proteins. *Science*. 1992; 255(5041): 197–200

Dedkova LM. *et al.* Construction of modified ribosomes for incorporation of D-amino acids into proteins. *Biochem.* 2006; 45(51): 15541–15551

Maini R. *et al.* Protein synthesis with ribosomes selected for the incorporation of β -amino acids.. *Biochem.* 2015; 54 (23): 3694–3706

Rackham O. *et al.* A network of orthogonal ribosome x mRNA pairs. *Nat. Chem. Biol.* 2005; 1 (3): 159–166

Orelle C. *et al.* Protein synthesis by ribosomes with tethered subunits. *Nature*. 2015; 524 (7563): 119–124

Jewett MC. *et al.* *In vitro* integration of ribosomal RNA synthesis, ribosome assembly, and translation. *Mol. Syst. Biol.* 2013; 9: 678

Li J. *et al.* Cogenerating Synthetic Parts toward a Self-Replicating System. *ACS. Syn. Biol.* 2017; 6 (7): 1327–1336

Shimojo M. *et al.* *In vitro* integration of ribosomal RNA synthesis, protein synthesis, assembly, and following translation for comprehensive analysis of ribosomal elements. *Comm. Biol.*, 2020; 3 (1): 142

Nierhaus KH. *Reconstitution of ribosomes, in Ribosomes and Protein Synthesis, A Practical Approach*. Oxford: Oxford University Press. 1990; 161–189

Malakhov M. *et al.* SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. *J. Struct. Funct. Genomics*. 2004; 5: 75–86

Rappsilber J. *et al.* Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and

storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat. Protoc.* 2007; 2(8): 1896–1906

Shimizu Y. *et al.* PURE technology. *Methods of Mol. Biol.* 2010; 607: 11–21

Masuda T. *et al.* Phase transfer surfactant-aided trypsin digestion formembrane proteome analysis. *J. Proteome Res.* 2008; 7(2): 731–740

MacLean B. *et al.* Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics.* 2010; 26(7): 966–968

Kaltschmidt E. Isoelectric points of ribosomal proteins of *E.coli* as determined by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 1971; 43: 25–31

Petersen C. *Escherichia coli* ribosomal protein L10 is rapidly degraded when synthesized in excess of ribosomal protein L7/L12. *J. Bacteriol.* 1990; 172(1): 431–436

Griaznova O. *et al.* Deletion of C-terminal residues of *Escherichia coli* ribosomal protein L10 causes the loss of binding of one L7/L12 dimer: ribosomes with one L7/L12 dimer are active. *Biochem.* 2000; 39: 4075–4081

Arnold RJ. *et al.* Observation of *Escherichia coli* ribosomal proteins and their posttranslational modifications by mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 1999; 269: 105–112

Thammana P. *et al.* Structural and functional evidence for a repeated 50S subunit ribosomal protein. *Nat. New Biol.* 1973; 242: 47–49

Subramanian AR. Copies of proteins L7 and L12 and heterogeneity of the large subunit of *Escherichia coli* ribosome. *J. Mol. Biol.* 1973; 95: 1–4

Ikeuchi M. *et al.* A new photosystem II reaction center component (4.8 kDa protein) encoded by chloroplast genome. *Plant Cell Physiol.* 1988; 241: 99–104

Wower J. *et al.* A model of the tRNA binding sites on the *E.coli* ribosome. *The Translational Apparatus.* New York: Plenum Press. 1993; 455–464

Hwang J. *et al.* The tandem GTPase, Der, is essential for the biogenesis of 50S ribosomal subunits in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 2006; 61: 1660–1672

Kobayashi G. *et al.* Deficiency of essential GTP-binding protein ObgE in *Escherichia coli* inhibits chromosome partition. *Mol. Microbiol.* 2001; 41(5): 1037–1051

Tan J. *et al.* Overexpression of two different GTPases rescues a null mutation in a heat-induced rRNA methyltransferase *J. Bacteriol.*, 2002; 184(10): 2692–2698

Zhang X. *et al.* Structural insights into the function of a unique tandem GTPase EngA in bacterial ribosome assembly. *NAR.* 2014; 41(21): 13430–13439

Feng B. *et al.* Structural and functional insights into the mode of action of a universally conserved Obg GTPase. *Plos Biol.* 2014; 12(5): e1001866

6. 謝辞

本研究の遂行にあたり、元指導教員である上田卓也先生には感謝してもしきれません。研究に殆ど全く口を出されない自由な研究環境で、尚且つ金銭的に実験に困るようなことは一度もありませんでした。自由ゆえの不自由さを感じることも多々ありましたが、そう思えるだけ本当に有り難いことです。上田先生は2019年3月に我々の元を去られてしまいましたが、今も我々のことを温かく見守ってくださっているように思います。本当にありがとうございました。

清水義宏先生は、2019年6月末から2020年3月まで、研究費を持たない私を受け入れてくださりました。私の学位取得のため、高価な実験機器も躊躇なく購入して下さりましたし、何よりディスカッションの頻度が桁違いに増えました。清水先生のおっしゃることは事の本質を突いたことばかりで、私が最大効率で研究を進められたことへの貢献は計り知れません。その後2021年4月頃から、学术论文の作成に携わっていただきました。非対面で完結したやり取りということもあり、最後の最後まで意思疎通に苦慮し続けましたが、何とか学位だけは頂戴できる運びとなりました。

研究室の同期として6年間友人であり続けてくれた日比敬太さんにも感謝せずにはいられません。全国模試生物5位の実力は伊達ではなく、上田先生の授業である「分子生物学II」の単位を落としてしまうほど無知な私に生物学に関する様々な知識をわかりやすい形で教えてくれました。地頭の良さも抜群であり、私の実験の方針について何度も相談に乗ってくれました。彼の提案したHiBiT合成の実験系がなければ再構成50Sサブユニットの活性を検出できずに絶望して泥沼にはまっていたことでしょう。更には、自分の進路のことだけでも手一杯なはずなのに、私の就職活動の面倒を手厚く見てくれました。でなければ今のような安定した定職に就くことは叶わなかったでしょうし、そもそも鬱をこじらせて本論文の執筆を放棄していたことでしょう。

質量分析の実験操作やデータ解析に関しては益田恵子博士に執り行っていただきました。サンプル調製やデータの解釈に関する助言も多数頂き、研究が捗りました。

研究室の先輩であった田丸大知さんにも大変お世話になりました。デイトレードで多忙な中、まだアガロースゲル電気泳動もパワーポイントの操作も全くできない私に対して、週に一度は基礎的な実験操作や進捗報告の資料作成などの指導に時間を割いてくださりました。非常に的確な指導ができる優秀な先輩が学位を取得できなかったという事実は、私が無理をせずに自分のペースで実験を進めるための教訓となっています。

富田野乃准教授には2019年度より公式の指導教員となっただいた他、タンパク質精製の基礎を教えて頂きました。そのおかげで33種類のリボソームタンパク質の精

製を完了できたと言っても過言ではありません。もし精製ができなければ、50S サブユニットの組み立て初期過程の観察について今も非生産的な実験を続けていたことでしょうから、かけがえのない助言であったと確信しています。

網藏和晃助教は、2016 年に国際学会へ向かう途中で電車に乗れず、薬中や乞食ばかりの街に一泊する羽目になった時に、急遽安全な宿を手配してくれました。おかげで誰にも襲われることなく無事にたどり着きました。また、共同研究先への組み換え RP の納期が迫っていたとき、私の提案した方法で L4 の精製を手伝っていただきました。

その他色々な方々にお世話になり、何とか本研究に一応の区切りをつけることができました。ありがとうございます。