

論文の内容の要旨

論文題目

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

氏名 青山 遼

1. 研究背景・目的

リボソームは、33 種類のリボソームタンパク質(RP)と RNA2 本からなる大サブユニットと、21 種類の RP と RNA1 本からなる小サブユニットによって構成される、超分子複合体である。生命における最も重要なイベントの 1 つであるタンパク質の合成はリボソームによって行われており、1955 年におけるリボソームの発見以降、その機能や構造の分子レベルでの理解を目的とした研究が精力的に続けられてきた。また近年では、リボソームの機能改変や試験管内での生命システムの再構築といった、リボソームの工学的・合成生物学的利用を志向した研究が展開している。しかし、非常に多数の因子が介在するリボソームの組み立て、特に生合成過程が複雑な大サブユニットの組み立てについては未だわかっていない部分が多く、さらなるリボソームの理解や利用におけるボトルネックの 1 つとなっている。

リボソームの組み立てに関する研究は、大腸菌内在性 70S リボソームをタンパク質群 (TP) とリボソーム RNA (rRNA) に解離して、熱処理によって再び試験管内で組み立てるという、試験管内再構成法によって主に行われてきた。ここで各サブユニットからカラム精製によって RP を単離する手法を用いて、試験管内再構成における両サブユニットの組み立て順序が明らかにされ、アセンブリマップとして図示された (Mizushima *et al.*, *Nature* (1970), Herold *et al.*, *J. Biol. Chem* (1987))。30S サブユニットについてはこの知見を基に、内在性の構成要素の代わりに個別発現した RP や試験管内転写された rRNA を用いた試験管内再構成に成功している (Culver *et al.*, *RNA* (1999), Tamaru *et al.*, *RNA* (2019))。また、生体内でリボソームの組み立てを促進する非リボソームタンパク質である、生合成因子を大腸菌抽出液や組み換えタンパク質の形で加えることで、生理的な温度・塩濃度条件での再構成が達成されている (Jewett *et al.*, *Mol Syst Biol.* (2013), Tamaru *et al.*, *RNA* (2019))。

一方 50S サブユニットについては 30S サブユニットと比べて、リボソームの工学的・合成生物学的利用に向けたプラットフォーム技術が未発達である。構成要素が明らかな大腸菌 50S サブユニットの再構成系において、大腸菌内在性リボソーム由来でない構成要素を用いた報告は皆無に等しい。中でも奇妙なことに、大腸菌での個別発現や無細胞的な合成による 50S サブユニットの RP 精製は既に報告されているにもかかわらず (Semrad *et al.*, *RNA* (2004), Li *et al.*, *ACS Synth Biol.* (2017))、それらを用いて翻訳活性のある 50S サブユニットを再構成した報告はない。この事実は、50S サブユニットを構成する RP の中に、高純度で、且つ正しいフォールディングでの精製が困難なものが含まれていることを示唆するものである。

本研究では、理学的解析や工学的応用のしやすい 50S サブユニットの再構成系構築を目指し、組み換えタンパク質を用いた 50S サブユニットの試験管内再構成を試みた。具体的には、まず

個別発現した 33 種類の RP を高純度で精製する手法を確立した。続いて大腸菌内在性の rRNA とともに、熱処理による 50S サブユニットの試験管内再構成に成功した。再構成した 50S サブユニットは、再構成型無細胞タンパク質合成系 (PURE system) によるタンパク質合成実験によって、翻訳活性を有することを確認した。最後に、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系と統合して、全 54 種類の RP 全てが組み換えタンパク質によって置換された大腸菌 70S リボソームの作製を行った。

2. 結果

2-1. 33 種類の RP 精製法の確立

本研究では、RP の N 末端側に、N 末端の 6×His tag が付与された Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) が連結した融合タンパク質として発現し、精製途中で SUMO の C 末端をプロテアーゼ Ulp1 によって切断した。6×His tag-SUMO タグを用いることで、His-tag によるアフィニティ精製の工程を追加しつつも、目的タンパク質に余分なアミノ酸配列を残すことなく精製が可能である。また RP は核酸結合タンパク質で凝集しやすい傾向があるため、多くの RP については TP50 (Total protein from 50S subunit) の調製と同様に、2-6 M 程度の尿素存在下で精製を行うことで終始可溶な状態を維持した。

His-tag によるアフィニティ精製、Reverse His-tag 精製による 6×His tag-SUMO の除去、イオン交換カラムによる残存夾雑物の除去を経て、高純度な 33 種類の RP を回収した (図 1)。また、これらの RP は Intact-MS によって分子量を同定した。その結果、SUMO 切断効率のために N 末端残基をプロリンからアラニンに置換した L35、及び生体内では翻訳後修飾を受ける L3、L11、L12、L16、L33 を除き、大腸菌内在性 RP と同一の分子量を有することを確認した。

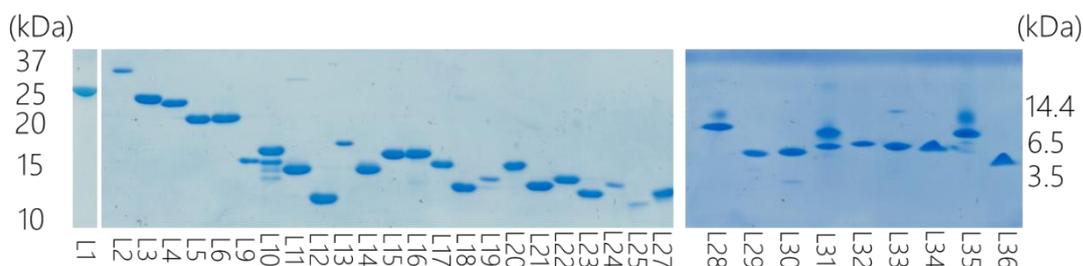


図 1 精製されたリボソームタンパク質(RP)の SDS-PAGE 写真

2-2. 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

個別精製された 33 種類の RP (33P) が 50S サブユニットの構成要素になり得るかどうかを調べた。具体的には、33P と大腸菌内在性 23S/5S rRNA を混合し、熱処理法(44°C, 4 mM Mg²⁺, 20 min、50°C, 20 mM Mg²⁺, 90 min)によって得られた再構成産物(r50S(33P))を、ショ糖密度勾配遠心(SDG)した。そして遠心後のショ糖密度勾配を上から連続的に吸い上げ、254 nm の吸光を経時的に測定することによって、再構成産物のサイズを評価した (図 2)。大腸菌内在性 50S サブユニット(n50S)や、TP50 を用いた再構成産物(r50S(TP))の吸光ピーク位置と比較し

た結果、r50S(33P)のピークがおよそ 50S の位置であることが示された。また、再構成の操作を全て氷上で行うことで既知の前駆体である 33S, 42S 前駆体を生じたもの(r50S(33P) Heat-)との比較から、r50S(33P)の殆どは組み立てが途中で止まることなく、高い効率で再構成されたことが示された。更に、図 2 における各種再構成産物にはトリクロロ酢酸による濃縮及びプロテアーゼ処理を行ったのち、LC-MS によって各 RP の存在率を半定量した。その結果、r50S(33P)が 33 種類全ての RP を含んでいることが確認された。

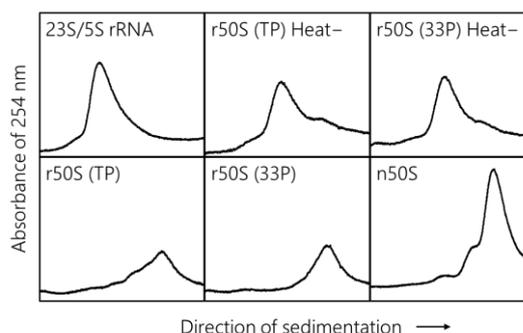


図 2 SDG による再構成産物のサイズの評価

2-3. 再構成 50S サブユニットの翻訳活性評価

上記再構成産物が、翻訳活性を有する 50S サブユニットを含んでいるかどうかを調べるため、PURE system (PUREfrefx 2.0)中でのタンパク質合成実験を行った。スプリットルシフェラーゼ小サブユニット(HiBiT)を含むペプチドと、緑色蛍光タンパク質(sfGFP)のそれぞれを 37°C で 12 時間合成し、再構成産物の翻訳活性を評価した。その結果、r50S(33P)から大腸菌内在性 50S サブユニットの 1-3 割程度の翻訳活性が検出された (図 3)。図 2 と合わせて、TP50 を個別調製した 33 種類の組み換え RP に置換しても翻訳活性を有する 50S サブユニットを組み立てられることが示された。

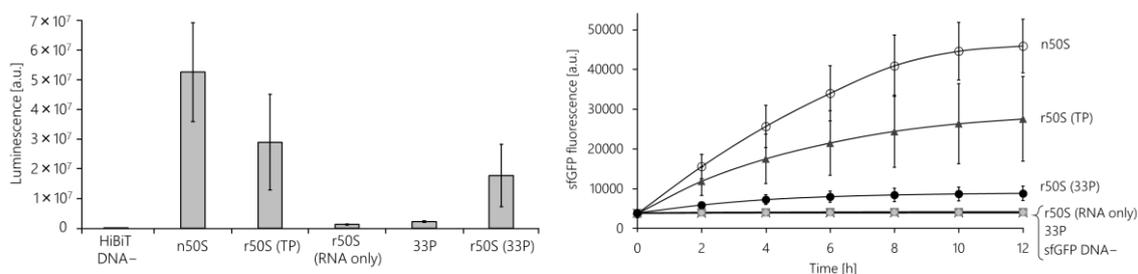


図 3 再構成産物による HiBiT (左) と sfGFP (右) の翻訳活性評価

2-4. 54 種類の組み換え RP による大腸菌 70S リボソームの作製

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(Tamaru *et al.*, *RNA* (2019), Shimojo *et al.*, *Comm Biol.* (2020))と、本研究で確立した 50S サブユニットの試験管内再構成系を統合し、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。具体的には図 4 に示すように、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、16S rDNA 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た (図 5)。

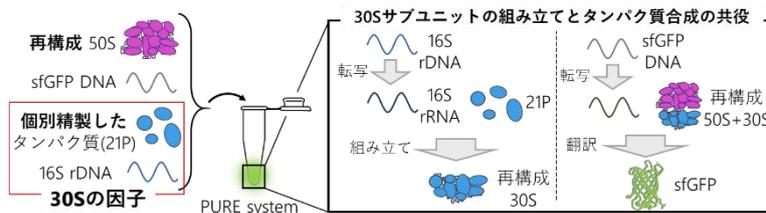


図 4 本研究における 70S リボソームの試験管内再構成系

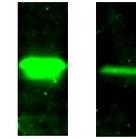


図 5 大腸菌内在性リボソーム (左) と再構成リボソーム (右) によって合成された sfGFP

3. 考察・展望

本研究では、50S サブユニットを構成する全 33 種類の RP(33P)の精製法を確立した。更に、個別調製した組み換え RP を用いて翻訳活性を有する 50S サブユニット、及び 70S リボソームの試験管内再構成に初めて成功した。先行研究において、50S サブユニットの RP 精製は精製タグを用いず 1-2 回のイオン交換カラム精製のみであった(Semrad *et al.*, **RNA** (2004))が、本研究では 3 回以上のカラム精製を行うなど、可能な限り夾雑物の除去を試みた。その結果、50S サブユニットの組み立てを阻害し得る RNase などの夾雑タンパク質や核酸がより少ない RP を調製できたのではないかと考えられる。

一方で、33P を用いて再構成した 50S サブユニットの翻訳活性は、TP50 を用いたものよりも有意に低かった。33P と TP50 の違いの一つに、個別発現した RP には翻訳後修飾が殆ど導入されていないことが挙げられる。今後、RP の翻訳後修飾を触媒する酵素のうち未同定のものが全て同定されれば、当該 RP と修飾酵素を共発現した発現系を用いることで、TP50 によって再構成した場合と同等の翻訳活性を有する 50S サブユニットが作製可能になると期待される。

また本研究では、単独で発現した L3、L11 の代わりに修飾酵素と共発現することで翻訳後修飾が導入された L3、L11 を用いた再構成を試みた。結果として再構成 50S サブユニットの翻訳活性向上にはつながらなかったが、本研究における 50S サブユニットの再構成系が RP を自由に改変可能な系であることを強く示唆した。この点において、現在までに唯一、試験管内転写した 23S/5S rRNA から翻訳活性を有する 50S サブユニットを再構成可能な系である、大腸菌 S150 抽出液を用いた再構成系(Jewett *et al.*, **Mol Syst Biol.** (2013))と補完しあう関係にあるといえる。塩基修飾の無い 23S rRNA を用いて翻訳活性を有する 50S サブユニットを再構成するのは困難とされているが、上記再構成系と本研究成果を統合することで、或いは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)によって、完全組み換えリボソームを試験管内再構成することも理論上可能だろう。

本研究において構築された系は、50S サブユニットの組み立て過程を理解するためのツールとしても、より自由な 50S サブユニットの機能改変を実現するための系としても有用である。そして試験管内でのリボソーム再生産、ひいては生命システムの再構成といった合成生物学の一つのゴールに向けた足掛かりとして、幅広く応用されることが期待される。