

超域研究機構第2期プロジェクト
研究成果(中間)報告書 - 概要 -

1. 研究プロジェクト名

「プロテオーム発現系の機能工学的研究」

2. 研究プロジェクト構成員職・氏名

内海 利男 自然科学系 教授 (プロジェクトリーダー)
小谷 昌司 自然科学系 教授
前野 貢 自然科学系 准教授
杉本 健吉 自然科学系 准教授
牧 泰史 自然科学系・科学技術振興研究員 (平成18年度まで)
野村 隆臣 信州大学繊維学部 助教 (学外研究者)

3. 研究成果の概要

(1) プロジェクトにおいて目標としたもの

ポストゲノム時代をむかえた今日、タンパク質の網羅的機能解析は我が国の威信をかけたプロジェクトの一つとも言える。この研究の進展を妨げている要因の一つは、遺伝子から機能を保持した良質のタンパク質を合成する低コストで有効な系が不足していることである。特に、多様な動物細胞タンパク質を、機能を保持した状態で得るためには、様々な問題点を含む既存の合成系に頼らない、新規合成系を開発することが急務である。本プロジェクトは、リボソームを中心としたタンパク質発現機構とその制御の仕組みを分子レベルの解析により理解した上で、リボソームや mRNA の分子改変により、機能面を変化させ、各種動物タンパク質の発現に効果的なタンパク質合成系を開発し、プロテオーム機能研究に寄与することを目標としている。

(2) 目標に到達するために選択した方法・手段

タンパク質を合成する速度は得られる産物の質を決める大きな要素の一つとなる。そこで本研究では、タンパク質合成速度を決める機能中心となる、リボソームのGTPaseセンターを研究対象の一つの柱とする。もう一つの柱は、翻訳開始因子の非存在下でタンパク質合成開始反応を進行させる一部の昆虫ウイルスIRESで、mRNAの改変と利用に関する研究を実施する。具体的には次のような手法により研究をすすめている。

- ① リボソーム GTPase センターの機能構造解析：ハイブリッド型リボソームの解析と利用
生化学と結晶構造解析の手法により、この機能部位の構造と機能の関係を明らかにする。
- ② リボソーム GTPase センターの改変と利用
大腸菌リボソーム GTPase センターを改変し、合成速度を変化させた *in vitro* および *in vivo* の変位型タンパク質合成系を作成し、利用する。
- ③ mRNA の改変と利用 (昆虫ウイルス IRES 導入型 mRNA の利用)

PSIV ウイルス mRNA の IRES を一般の mRNA 上流に連結させ、タンパク質合成系への利用を試みる。

④ 新規無細胞タンパク質合成系の作製

甲殻類 *Artemia salina* の乾燥卵や、イネ胚芽から安価で有効な無細胞タンパク質合成系の開発を目指す。

(3) これまでの研究で得られた成果

ここまでの研究により、基礎研究面で予想以上の成果があった（下記、研究業績参照）。応用面でも2件の特許出願を行うなど、今後の研究の基盤固めとなった。以下に成果の詳細を説明する。

① リボソームGTPaseセンターの機能構造解析

リボソームGTPaseセンターにはstalkと呼ばれる機能面で重要なタンパク質二量体が存在し、この分子的性状と機能を解析する分析系として、大腸菌リボソームのstalkタンパク質を特異的に遊離させ、これに各種変異型タンパク質の再結合、または異なる生物種の相同タンパク質を結合させた後に機能を解析する“ハイブリッドリボソーム系”を開発し、これを使用して様々な構造と機能に関する新たな知見が得られた。

- ・ 真核リボソームstalkタンパク質の分子集合： 蚕リボソームstalkタンパク質P1とP2間ヘテロダイマー形成に両タンパク質のN末端の10個のアミノ酸配列部位が関与すること、さらに2個のP1-P2ダイマーがそれぞれN末端を介して、P0のC末端部位に隣接して結合し、5量体を形成することを明らかにした。そして、P0のN末端部位はrRNA結合に寄与することを解明した。また、真核生物のP0(P1-P2)₂5量体がリボソームの真核翻訳因子受容性と低速のGTPase回転速度に関与することを初めて実証した。P0(P1-P2)₂5量体から1個分のP1-P2ダイマーを遊離させた変異型複合体では、タンパク質合成活性が約50%に低下し、stalkダイマーの数とタンパク質合成効率との関係が示された。

上記研究の過程で、動物のP0(P1-P2)₂複合体が強力な自己免疫原になることを、マウスを用いた免疫実験により確認し、この複合体が有効な抗体作成系になることを提案し、特許として出願した。

- ・ 古細菌リボソームstalkタンパク質の分子集合： 古細菌*Pyrococcus horikoshii* (Ph-) のstalk二量体はPh-L12のホモダイマーであるがそのアミノ酸配列は真核のP1/P2に類似していた。そして3個のホモダイマーがPh-P0のC末端側に隣接して結合し、Ph-P0[(Ph-L12)₂]₃の7量体を形成することを初めて証明した。意外なことに古細菌のこの7量体構造は真核の伸長因子を受容し、複合体の機能構造は基本的に真核型に類似することが示された。全ての真核リボソームには2個のstalkダイマーが含まれ、古細菌では3個含まれることが判明したが、その機能面の意味については目下解析中である。一方、*P. horikoshii*のPh-P0とPh-L12間複合体を結晶化することに成功し、構造解析の結果Ph-L12のN末端がP0のC末端側に3個隣接して結合することが確認された。この結果は、上述した生化学的解析知見と一致した (Naganuma *et al.* 論文作成中)。

- ・ 真正細菌リボソームstalkタンパク質の分子集合： 真正細菌の場合、stalk二量体はL12ホモダイマーの2個がL10のC末端に隣接して結合し、 $L10[(L12)_2]_2$ の5量体を形成するが、*Thermus thermophilus*を含む一部の好熱性真正細菌では $L10[(L12)_2]_3$ の7量体を形成することを生化学的解析で確認し、さらにL10型タンパク質のアミノ酸配列比較から、真正細菌のstalk複合体は5量体型と7量体型がそれぞれ半数ずつに分類されることが示された。両種の複合体とも、stalkダイマーの数とリボソーム機能との関係は真核の場合と同様であった。

② リボソームGTPaseセンターの改変と利用

上述の①の研究からstalk二量体の数とリボソーム機能との関係が明確にされたので、減速型のタンパク質発現系を作成する目的で、大腸菌細胞ゲノムの改変により、L12ダイマー1個を欠失させた大腸菌変異株を作成した。この変異株より得られたリボソームではL12ダイマーのリボソーム結合性は不安定であり、この細胞の生育速度は低下した。さらに本研究では、stalk以外のGTPaseセンター構成タンパク質L11の欠損株 (AM68) にも注目した。この大腸菌は野性型の1/4の生育速度を示し、極めて低速型のタンパク質合成速度を示す株であることが示された。この大腸菌に、通常の大腸菌では可溶性タンパク質を得るのが困難な植物由来アミラーゼの遺伝子を導入し、その結果、可溶性画分に活性を保持するアミラーゼを得ることに成功した。この可溶性タンパク質を得る方法に関して、特許出願中である。

③ mRNAの改変と利用 (昆虫ウイルスIRES導入型mRNAの利用)

チャバネアオカメムシ腸管ウイルス (PSIV) のゲノムRNAに含まれるIRESには、リボソーム小亜粒子と強く結合し翻訳開始因子非依存的にタンパク質合成を開始させる性質がある。本研究ではこのユニークな合成開始の仕組みを解析した結果、a) IRESの結合によりリボソームの構造変化をひき起こすこと、b) 開始因子に代わって伸長因子eEF2の作用で、最初のアミノアシルtRNAを効率よくリボソームのPサイトにもたらし、を明らかにした。このIRESの下流に蛍光のルシフェラーゼ遺伝子を連結させることで、ルシフェラーゼが効率よく合成されることより、このIRESを一般の遺伝子発現に利用可能であることが示された。また最近、IRESを含むウイルスmRNAの3' UTR領域がタンパク質合成を促進することが判明した。3' UTRによるタンパク質合成促進機構の詳細については今後の重要な課題の一つとして残された。

④ 新規無細胞タンパク質合成系の作製

イネ胚芽の細胞抽出液を用いて、上述の③で使用した IRES に依存したルシフェラーゼ合成を解析したところ、タンパク質合成活性が検出された。今後さらに合成反応条件の検討を行う予定である。

(4) 更新する期間で目標とする事項及びその研究計画

今後、上述したこれまでの①～④の研究で残された以下の課題に取り組む予定である。

- ・ stalkタンパク質のC末端部位のはたらきと分子改造： stalkタンパク質はリボソーム中で柔軟に運動しており、この部分のはたらきがタンパク質合成の速度決定と密接に関わっていると考えられる。そこで、今後、C末端部位の構造、動態、機能面の解析を行い、その結果を利用して、大腸菌ゲノムの改変を行い、各種タンパク質合成速度を保有した大腸

菌株を得る。これまでに得られた一部の大腸菌株については特許を申請しているが、さらに有効なタンパク質発現用大腸菌株が得られた場合も特許を申請し、広く社会に提供する予定である。

- ・ ウイルスのmRNAを利用した有効な発現系の作成: PSIVのIRESの3' UTRのタンパク質合成促進機構を解明する。その結果を利用し、上流にIRES、下流にその3' UTRを保有する各種組み換え遺伝子を構築し、効率的なタンパク質合成系を作成する。
- ・ 生物種特異的に見られるタンパク質合成制御機構の解明: 甲殻類 *A. salina* やイネ胚芽には特徴的なタンパク質発現制御機構が存在している。今後、これらの材料を使用することで、新規のタンパク質合成制御の仕組みを探り、得られる結果をタンパク質合成系改良のヒントとして有効に活用する。

(5) 研究発表実績 (プロジェクト構成員に下線)

査読付き学術雑誌

1. Miyoshi, T., and Uchiumi, T. (2008) Functional interaction between bases C1049 in domain II and G2751 in domain VI of 23S rRNA in *Escherichia coli* ribosomes. *Nucleic Acids Res.* 36, 1783-1791.
2. Yamamoto, H., Nakashima, N., Ikeda, Y., and Uchiumi, T. (2007) Binding mode of the first aminoacyl-tRNA in translation initiation mediated by *Plautia stali intestine virus* IRES. *J. Biol. Chem.* 282, 7770-7776.
3. Nishiyama, T., Yamamoto, H., Uchiumi, T., and Nakashima, N. (2007) A eukaryotic ribosomal protein interacts with the conserved loop region in a dicistroviral intergenic internal ribosome entry site. *Nucleic Acids Res.* 35, 1514-1521.
4. Naganuma, T., Shiogama, K., and Uchiumi, T. (2007) The N-terminal regions of eukaryotic acidic phosphoproteins P1 and P2 are crucial for heterodimerization and assembly into the ribosomal GTPase-associated center. *Genes to Cells* 12, 501-510.
5. Maki, Y., Hashimoto, T., Zhou, M., Naganuma, T., Ohta, J., Nomura, T., Robinson, C. V., and Uchiumi, T. (2007) Three binding sites for stalk protein dimers are generally present in ribosomes from archaeal organism. *J. Biol. Chem.* 282, 32827-32833.
6. Ito N., Mita M., Takahashi, Y., Matsushima, A., Watanabe, Y.G., Hirano, S., and Odani, S. (2007) Novel cysteine-rich secretory protein in the buccal gland secretion of the parasitic lamprey, *Lethenteron japonicum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358, 35-40.
7. Ito, H. Koyama, Y., Takano, M., Ishii, K., Maeno, M., Furukawa, K. and Horigome, T. (2007) Nuclear envelope precursor vesicle targeting to chromatin is stimulated by protein phosphatase 1 in *Xenopus* egg extract. *Exp. Cell Res.* 313: 1897-1910.

8. Nomura, T., Nakano, K., Maki, Y., Naganuma, T., Nakashima, T., Tanaka, I., Kimura, M., Akira Hachimori, A., and Uchiumi, T. (2006) *In vitro* reconstitution of the GTPase-associated center of the archaeobacterial ribosome: the functional features observed in a hybrid form with *Escherichia coli* 50S subunits. **Biochemical J.** 396, 565-571.
9. Tashiro, S., Sedohara, A., Asashima, M., Izutsu, Y. and Maéno, M. (2006) Characterization of myeloid cells derived from the anterior ventral mesoderm in the *Xenopus laevis* embryo. **Dev. Growth Differ.**, 48, 499-512.
10. Koyama, Y., Suzuki, T., Odani S., Nakamura, S., Kominami, J., Hirabayashi, J., and Isemura, M. (2006) Carbohydrate specificity of lectins from *Boletopsis leucomelas* and *Aralia cordate*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 70, 542-545.
11. Nakayama, A., Matsui, H., Fukushima, T., Ichikawa, H., Yamada, K., Amao, T., Hosono, M., and Sugimoto, K. (2006) Murine serum obtained from bone marrow-transplanted mice promotes the proliferation of hematopoietic stem cells by co-culture with MS-5 murine stromal cells. **Growth Factors**, 24, 55-65.
12. Jiang, H. J, Sun, H. S., Wang, X. D., Wang, C. L., Liu, Z. L., Gonda, H., and Sugimoto, K. (2006) HB-1, an acute myeloid leukemic cell line with the capability of infiltrating into the brain in CBA/N mice. **Sheng Li Xue Bao.** 58, 377-383.
13. Hagiya, A., Naganuma, T., Maki, Y., Ohta, J., Tohkairin, Y., Shimizu, T., Nomura, T., Hachimori, A., and Uchiumi, T. (2005) A mode of assembly of P0, P1 and P2 proteins at the GTPase-associated center in animal ribosome: In vitro analyses with P0 truncation mutants. **J. Biol. Chem.** 280, 39193-39199.
14. Takahashi, Y., Hirayama, S., and Odani, S. (2005) Ribosomal proteins cross-linked to the initiator AUG codon of a mRNA in the translation initiation complex by UV-irradiation. **J. Biochem.** 138, 41-46.
15. Takeda, M., Kurauchi, T., Yamazaki, T., Izutsu, Y. and Maéno, M. (2005) Neptune is involved in posterior axis and tail formation in *Xenopus* embryogenesis. **Dev. Dyn.** 234: 63-73.

特許

1. 内海利男、浅妻悟、水口伊玖磨、山本紘、三ツ井敏明「大腸菌を用いたタンパク質の合成方法」, 特願2006-132818号, 新潟大学, 2006.5.11.
2. 内海利男、佐藤弘恵、田中勲「モノクローナル抗体の作成方法」, 特願2006-295202号, 新潟大学, 2006.10.31.