

バクテリアのタンパク質合成系に関与する未知遺伝子群の探索

●横川 隆志

岐阜大学工学部生命工学科

＜研究の目的と進め方＞

研究代表者は、これまでにタンパク質合成系を純粋に化学的反応場としてとらえ、タンパク質合成系そのものや、系を改変して非天然アミノ酸を含むタンパク質を合成し、それを利用しようとする目的で、*in vitro* タンパク質合成系に興味を持って研究に取り組んできた。

その一環として、教科書的にタンパク質合成に必須と考えられる大腸菌のタンパク質性因子をすべて過剰発現させて精製し、試験管内で再構築することによってタンパク質合成を行わせることに成功している（PURE システム）。しかし合成されるタンパク質量は、単に大腸菌を破碎しただけの抽出液を用いた合成量に比べて低いレベルに留まっている。このことから、タンパク質合成系を効率化させる未知の因子が存在するとの作業仮説を構築した。

本研究の目的は効率的なタンパク質合成に関与する未知タンパク質遺伝子群をバクテリアのゲノムから探索することであった。効率的にタンパク質合成を行うことはバクテリアにとって最重要なイベントと考えられるので、目的の候補遺伝子はすべてのバクテリアに保存されていると考えて、遺伝子の絞り込みを行うことにした。また同時に大腸菌抽出液から PURE システムを効率化する因子の単離を試みることにした。

＜研究開始時の研究計画＞

- 1) すべてのバクテリアに保存されている遺伝子を効率よく絞り込むために、ゲノムサイズの小さな *Buchnera* のすべての遺伝子のうち *Mycoplasma genitalium* に共通して存在する遺伝子を FASTA によって調査し、両者に共通する遺伝子をすべてピックアップする。
- 2) 1) でピックアップされた遺伝子に関する文献を調査し、機能がよくわかっていない遺伝子を絞り込む。
- 3) 2) で絞り込まれた機能未知遺伝子の *E. coli* ホモログを過剰発現させる。個々の機能未知タンパク質間で相互作用解析し、複合体を形成するものがないか調査する。
- 4) 3) で過剰発現させたタンパク質を PURE システムに添加し、タンパク質の合成効率が増加するもの、または合成を阻害するものがないかを検索する。
- 5) *E. coli* の抽出液の中から PURE システムに添加してタンパク質の合成効率を増加させる因子が存在するか検討し、実際に単離精製を試みる。
- 6) タンパク質間の相互作用、タンパク質・リボソーム相互作用を *in vitro* で詳細に解析する。そのためにタンパク質の部位特異的標識法を開発し、相互作用部位を同定する手法を確立する。

＜研究期間の成果＞

1) *Buchnera* と *Mycoplasma genitalium* に共通して存在する遺伝子は、わずか 180 遺伝子に過ぎなかった。このうち 80 遺伝子が教科書的なタンパク質合成関連遺伝子であり、タンパク質合成に関与する遺伝子の保存性が極めて高いことが改めて示された。また、近年発見された、タ

ンパク質合成の周辺で機能する修飾酵素、解離因子メチル化酵素やリジン合成酵素の遺伝子も含まれており、この絞り込み方法が効果的であることをうかがわせた。

2) *Buchnera* と *Mycoplasma genitalium* に共通している遺伝子のうち、機能がよくわからない遺伝子はわずか 30 遺伝子程度であった（図 1）。注目すべきは、ATP 結合モチーフを持つタンパク質や、GTP 結合タンパク質が多く存在したことである。教科書的なタンパク質合成関連タンパク質の中で GTP 結合タンパク質が重要な役割を担っていることから、特に GTP 結合タンパク質に注目した。また文献上、タンパク質合成に関与しそうな遺伝子にも注目し、*E. coli* ホモログを過剰発現させた。

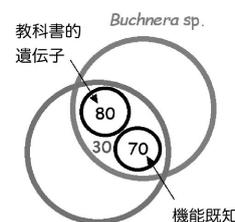


図 1 *M. genitalium* 遺伝子

3) 2) の条件に当てはまる GTP 結合タンパク質 *mnmE*、*era*、*lepA*、*yihA*、*ychF*、*yhbZ*、*engA*、タンパク質合成に関与しそうな *efp*、*gidA* を過剰発現させた。いずれも可溶性画分に大量に発現した。また過剰発現させることで *E. coli* の生育に大きな影響を与えたタンパク質は見られなかった。このうち *MnmE* と *GidA* については native アガロースゲル電気泳動により、複合体を形成することが示された。この相互作用の詳細な解析は 6) に譲る。

4) 3) で過剰発現させたタンパク質を個々に PURE システムに添加したが、いずれもタンパク質の合成効率に影響を与えたタンパク質は見られなかった（図 2）。またタンパク質をすべて混合して添加しても、顕著な効果は観察されなかった。現時点では、調べた機能未知タンパク質はタンパク質合成に直接関与しないものと考えられる。

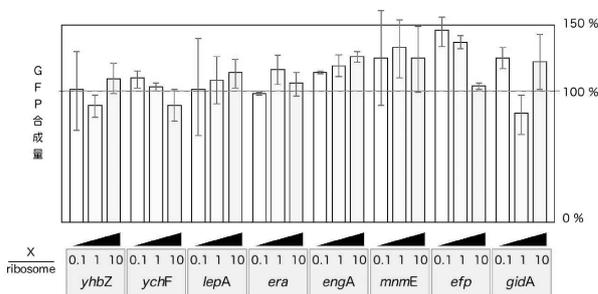
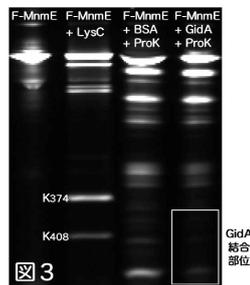


図 2 各遺伝子産物の PURE system への添加効果

5) 当初、リボソームに付着している何らかのタンパク質性因子が、PURE システムにおけるタンパク質合成に必須だという結果が得られ、その因子を特定したが、結局システム内の EF-Tu の活性低下が原因であることが判明した。PURE システムにおいては、いかにして EF-Tu の活性低下を防ぐかが今後の課題と言える。

6) C 末端を蛍光標識した MnmE を調製し、GidA が MnmE のどの部位と相互作用しているかを proteinase K を用いた footprinting 法を利用して解析した。その結果、GidA は MnmE の C 末端ヘリカルドメインに結合していることが明らかとなった (図3)。これまでは MnmE の C 末端ヘリカルドメインは RNA と相互作用するのではないかと考えられており、これは予想を覆す結果である。また新規にタンパク質の N 末端や内部の任意の部位に、1 残基だけ蛍光標識する手法やその相互作用解析法を開発したので、〈成果公表リスト 3-1) ~ 3-5)〉 今後 *in vitro* でさらに詳細な相互作用部位の解析が可能となった。



〈国内外での成果の位置づけ〉

本研究で絞り込んだ、機能が未だ不明な遺伝子は、バクテリアに取って非常に重要な機能を持っていると推定されるが、多くが必須遺伝子であり、遺伝学的な手法で機能解析することが困難な遺伝子でもある。その中に多くの GTP 結合タンパク質が含まれていたこと、しかも、その多くがリボソームと何らかの相互作用することが示唆されていたことから、本研究の結果、すなわち PURE システムに添加したときに、機能不明なタンパク質にタンパク質合成を制御する効果があるかないか、に興味を持たれた研究者もきつといたのではないかと思います。しかし、残念ながら、PURE システムのタンパク質合成効率に直接影響を与えるタンパク質が、1 つも見いだせなかった。これは自分でも期待はずれとしか言いようがない。

ただし機能未知のタンパク質の相互作用解析を *in vitro* で簡便に行うために開発していた、蛍光標識タンパク質を調製する手法は、確立されつつあり、タンパク質の footprinting を行うことも可能となってきている。また、この手法はオリンパス社の 1 分子蛍光分析システムに適していると認められ、同社との共同研究が進行している。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

本研究課題の当初の目的は、タンパク質合成系に関する未知遺伝子を探索することにあつたので、PURE システムのタンパク質合成効率に直接影響を与えるタンパク質が、1 つも見いだせなかったという点で何一つ達成できなかったと言える。

個々のタンパク質の合成効率は、非必須遺伝子が複雑に相互作用し合って、制御されているのだと思うほかない。

また PURE システムは、確かに最小のタンパク質合成系ではあるが、それでも 30 以上のタンパク質因子が含まれている。このうち一つの活性が低下しただけで全体に影響を与えるため、PURE システムの合成効率を向上させるといふ実験に再現性が見られないことがたびたびあった。特に、EF-Tu の活性が低下しただけの現象に、精力を投じた戦略上の失敗が悔やまれる。

〈今後の課題〉

本研究で、未知遺伝子を扱う難しさを十分に味わった。遺伝子産物の立体構造、基質、相互作用ネットワークが不明である場合、タンパク質合成系に直接関与しないとなった時点で、どのように研究を進めていけばよいか途

方にくれてしまった。今更ながらタンパク質の構造解析や結合する低分子化合物のインシリコシミュレーションとの強力な連携が必須であると感じている。

ただし、今回見いだされた GTP 結合タンパク質がバクテリアにとって重要なイベントに参加していることは間違いなく、いかにして機能不明なタンパク質間相互作用ネットワークを解明するかが、今後の研究の鍵になると感じた。

この点、研究代表者は部位特異的にタンパク質を蛍光標識する手法を確立しつつある。特に、末端を蛍光標識したタンパク質を利用して、footprinting 法により、相互作用部位を同定する手法を確立できそうである。実際、本研究では GidA が MnmE のどの部位と相互作用しているかを明らかにすることができた。GidA、MnmE の両タンパク質は、tRNA の塩基修飾に関与していることが示唆されている。しかし MnmE はスイッチ分子として知られる GTP 結合タンパク質であり、単なる修飾酵素だとは思えない。

今後は、特に MnmE がどのような相互作用ネットワークを有しているかに焦点を当て、研究を進めたいと考えている。また他の GTP 結合タンパク質においてもリボソームとの相互作用が示唆されているので、確立しつつある部位特異的蛍光修飾法をうまく生かしてその相互作用解析を続けたいと考えている。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 1) 論文/プロシーディング (査読付きのものに限る)
- 2) データベース/ソフトウェア
- 4) その他顕著なもの
については残念ながらありません。

3) 特許など

3-1) PCT/JP2005/021938

名称：ミトコンドリア蛋白質を用いる、非天然アミノ酸を蛋白質に部位特異的に導入する方法および tRNA の効率的調製方法

発明者：西川一八、横川隆志、大野敏

出願人：国立大学法人岐阜大学

3-2) 特願2005-174097

名称：部位特異的にタンパク質にチロシンアナログを導入する方法

発明者：西川一八、横川隆志、大野敏

出願人：国立大学法人岐阜大学

3-3) 特願2005-332676

名称：N末端アミノ酸が標識されたタンパク質の効率的な合成方法

発明者：金森崇、西川一八、横川隆志、大野敏

出願人：ポストゲノム研究所、国立大学法人岐阜大学

3-4) 特願2005-336164

名称：生体分子の相互作用の測定方法

発明者：小林佐代子、西川一八、横川隆志、大野敏、岡本直明

出願人：オリンパス株式会社、国立大学法人岐阜大学

3-5) 特願2005-337537

名称：タンパク質のN末を酵素的に修飾する方法

発明者：西川一八、横川隆志、大野敏

出願人：国立大学法人岐阜大学