

# 野村 隆臣・八森 章

目的別テーマ：バイオファイバー生合成機構の解明

研究テーマ

15-2-17：蚕タンパク質合成系の生化学的解析とその応用

## ABSTRACT

*Silkworm (Bombyx mori) has an efficient protein synthesis (translation) system because it can synthesize so many amounts of silk proteins (fibroin and sericin) in a short period. It is thought that this feature is derived from the characteristics of its ribosomes, which play a central role of protein biosynthesis in a cell. We are analyzing the silkworm ribosomes with a focus on the "GTPase center", which is functional domain related to translational factor-dependent GTP hydrolysis reaction closely linked translational speed and accuracy. GTPase center is consisted of RNA domain and protein components, called as "GTPase domain" and P proteins (P0, P1, P2), respectively. Previously, we found that two bases, completely conserved in all organisms so far examined, in the GTPase domain were substituted in silkworm (U1094C and A1098G). Therefore, it was inferred that this base exchanges were related to an efficient protein synthesis ability of silkworm. In this work, we tried to clarify the assembly mechanism of the GTPase domain binding proteins, P proteins, and to resolve the functional roles of U1094C/A1098G in the GTPase domain. It was revealed that two P1-P2 hetero-dimers bound to two different regions of P0, one binding site existed in 55-65 and another site in 81-107 amino acids region from C-terminus of P0. E. coli ribosome induced U1094C/A1098G mutation showed lower translational activities than wild type, and this result was assumed us to exist new factors specifically binding to silkworm GTPase domain. Indeed, we found the cohesive 50 kDa protein in the S200 fraction of the posterior silk gland. We also tried to construct the recombinant translation elongation factors, eEF-1 $\alpha$  and eEF-2, and succeeded to express the both factors as soluble protein in insect cell by using baculovirus expression system.*

## 研究目的

蚕は短期間に大量の絹タンパク質（フィブロインやセリシン）を合成することから、極めて効率的な生体内タンパク質合成（翻訳）系を保有すると考えられる。この特徴は、翻訳反応の中核を担う「リボソーム」の性質に依存すると推測され、特に翻訳速度に直結する GTP 加水分解反応に深く関与するリボソーム上の「GTPase センター」が注目すべき領域であると考えている。この領域は RNA 成分（28S rRNA 中の GTPase ドメイン：1070 領域；大腸菌の塩基番号に従う）とタンパク質成分（P0, P1, P2）より構成されており、ここに GTP 結合性翻訳因子が相互作用することで GTP 加水分解反応が生じ、翻訳反応が促進される。本研究の目的は、蚕の効率的タンパク質合成能に由来する要因を抽出し、得られた知見より工学的応用化を検討することである。本研究では、特に GTPase センターに焦点を絞って解析を進める。

## 5年間の研究内容と成果

【蚕リボソームの解析：タンパク質成分の解析】

真核生物の P0, P1, P2 は P0 の C 末端領域に二組の P1-P2 ヘテロダイマーが結合した複合体を形成することが知られている。我々は、蚕 P タンパク質の分子集合状態を解析するため、P0 上の P1-P2 結合領域の特定を試みた。P0 の C 末端からアミノ酸を段階的に削除した変異 P0 ( $\Delta 18$ ,  $\Delta 55$ ,  $\Delta 65$ ,  $\Delta 81$ ,  $\Delta 107$ ：数字は削除したアミノ酸の数を示す) を作製し、これら変異 P0 と P1-P2 の複合体形成能を Native ゲル電気泳動により分析した。その結果、 $\Delta 18$  と  $\Delta 55$  は野生型と同様に二組の P1-P2 と複合体を形成したのに対し、 $\Delta 65$  と  $\Delta 81$  は一組であり、また  $\Delta 107$  は結合性を示さなかった。これは P0 上の P1-P2 結合領域は異なる二ヶ所存在することを示して

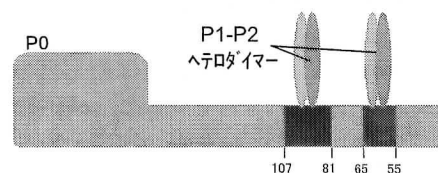


図1 P タンパク質の分子集合モデル

また  $\Delta 107$  は結合性を示さなかった。これは P0 上の P1-P2 結合領域は異なる二ヶ所存在することを示して

おり、一つはC末端から55-65アミノ酸領域に、もう一つは81-107アミノ酸領域に存在することが判明した(図1)。これらタンパク質を大腸菌リボソームの相同タンパク質と置き換えたハイブリッド体の機能解析を行ったところ、P1-P2を二組合むものは一組のものとは比べ翻訳効率が4割程度に低下しており、リボソーム中のP1-P2会合数とタンパク質合成能は密接に関連することが明らかとなった。

#### 【蚕リボソームの解析：RNA成分の解析】

これまでに我々は、全生物において完全に保存されるGTPaseドメイン中の塩基である1094番目のU(ウラシル)と1098番目のA(アデニン)が蚕においてそれぞれ、C(シトシン)とG(グアニン)に変化していることを明らかにしている(塩基番号は大腸菌に従う、図2)。リボソームの基本的翻訳反応機構は全生物にて共通であると考えられることから、我々はこの塩基置換が蚕の特徴的なタンパク質合成能を導く要因の一つであると考え、U1094CとA1098G変異を導入した大腸菌リボソームを作製し、変異が及ぼすリボソーム機能への影響を解析した。変異導入リボソームの作製は、ストレプトアビジンに特異的に結合するRNA配列(ストレプトアビジン結合アプタマー)を進化的に保存性の低い23S rRNA中のHelix 25に挿入した大腸菌rRNA発現プラスミドを利用した(Moscow State UniversityのPetr V. Sergievより提供)。このプラスミドを用いることにより、大腸菌ゲノム中のrRNAオペロンに由来するリボソームと発現プラスミド由来のリボソームをストレプトアビジン固定化アフィニティークラム精製より分離することが可能である。U1094C/A1098G変異を含むプラスミドを大腸菌(DH-5株)に導入し、そこからリボソーム成分を抽出、続くアフィニティークラム精製することにより蚕型変異を有する大腸菌リボソームを単離することに成功した。蚕型変異リボソームの機能は野生型と比較して、30-40%の翻訳伸長因子依存活性、15%のnatural mRNA翻訳活性を示し、蚕型変異は大腸菌リボソーム中では正常な機能を有しないことが示された。このことは、蚕型配列そのものだけでなく、蚕GTPaseドメインを特異的に認識する因子が蚕絹糸腺細胞中に存在し、これと蚕リボソームが相互作用することにより蚕の特徴的なタンパク質合成能が発現される可能性が示唆された。

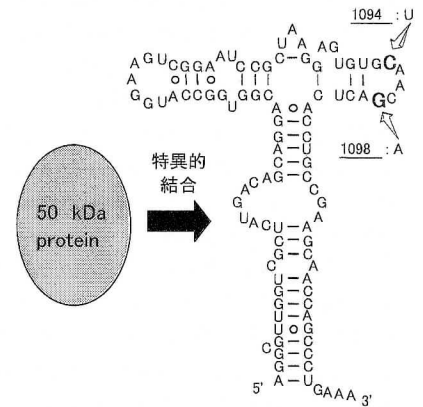


図2 蚕GTPaseドメインの二次構造と特異的結合因子:50 kDa protein

#### 【蚕GTPaseドメイン結合性因子の探索】

蚕型配列の機能的意味を探るため、蚕GTPaseドメインに特異的に結合する因子の探索を行った。探索対象材料として5齢5日目の家蚕から摘出した後部絹糸腺の細胞抽出液を調製し、蚕GTPaseドメインを含む<sup>32</sup>P標識RNA断片をプローブとしたゲルシフトアッセイを行うことにより結合性因子の探索を試みた。蚕特異的であることをスクリーニングの条件とするため、ラットのGTPaseドメインRNA断片を比較対象とした。その結果、細胞抽出液の200,000 × g上清(S200画分)に蚕GTPaseドメイン特異的に結合する成分が確認された。S200画分をDEAEカラムクロマトグラフィーおよびDEAE-5PWを用いたHPLCにより細分画を行ったところ、単離するには至っていないが分子量約50 kDaのタンパク質が結合性タンパク質であると推測された(図2)。結合様式は不明であるが、蚕の特異的塩基配列もしくはそれに起因するRNA高次構造を認識していると考えられる。また、このタンパク質はリン酸化修飾が施されていることも明らかとなった。解析途中であることから詳細は不明であるが、この50 kDa因子はGTPaseドメインへの結合を介した蚕リボソームとの相互作用により翻訳反応に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

#### 【GTP結合性翻訳伸長因子の解析】

GTP結合性翻訳伸長因子はリボソームのGTPaseセンターと相互作用することでGTP加水分解反応を触媒する重要なタンパク質因子である。この因子の解析は大腸菌を中心とした原核生物で精力的に行われているが真核生物では遅れている。この理由は真核生物の翻訳伸長因子を大腸菌内発現すると不溶化してしまい機能を保持した状態で調製することが不可能であるためである。我々は蚕の翻訳伸長因子である「eEF-1α」と「eEF-2」を遺伝子組換え体として調製する系を確立し、蚕のタンパク質合成系を翻訳伸長因子の方面から解析することを試みた。用いた手法はバキュロウィルスを用いた発現系(Bac-to-Bacシステム)である。PCR法を用いて増幅した蚕eEF-1αとeEF-2の構造遺伝子をそれぞれpFastBacベクターに挿入し、これを大腸菌DH10Bacに導入することで両因子をそれぞれ含むBacmidを作製した。Bacmidを昆虫細胞sf9にトランスフェクションすることでバキュロウィルスを調製した後、これをsf9細胞にインフェクションすることにより蚕eEF-1αとeEF-2を発現させた。細胞内における発現状態を免疫組織化学発光法により分析したところ、可溶性タンパク質として発現していることが確認され、機能を保持した状態であることが期待された。