

目的別テーマ：バイオファイバー生合成機構の解明

16年度研究テーマ

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 translation system because silkworm can synthesize numerous silk proteins (fibroin) in a short period of time. By analyses of its "Ribosome" that plays a central role of protein biosynthesis in the cell, two unique base exchanges (U1094C and A1098G) were detected in the GTPase domain (1070 region; E. coli numbering), which is universal conserved ribosomal RNA (rRNA) domain related with translational factors dependent GTP hydrolysis linked translational speed. We constructed E. coli ribosome introduced their base exchanges to GTPase domain, and analysed its ribosomal function. Resultly, E. coli ribosome harvested C1094/G1098 showed, compared with wild type, 30-40 % of activities in dependent on elongation factors and 15 % in translation of natural mRNA. By these result, it was suggested that C1097/G1098 base exchange was relative to a regulation rather than an efficiency of the protein biosynthesis.*

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）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系を保有すると考えられる。この特徴は、生体内タンパク質合成反応（翻訳）の中核を担う“リボソーム”の性質に強く依存すると推測され、その中でも翻訳の速度に直結するGTP加水分解反応に深く関与する部位（GTPaseドメイン）が注目すべき領域であると考えられる。GTPaseドメインは全生物を通じて高度に保存されているが、蚕において二つの特異的な変異（U1094CとA1098G；大腸菌の塩基番号に従う）が検出されている。この塩基置換が蚕の効率的なタンパク質合成能を導く要因の一つであると考え、その生物学のおよび機能的意味を探ることを目的とする。本研究の最終目標は、蚕リボソームの生化学的緒性質を明確にすることにより、得られた知見を考慮して効率性の高い新規無細胞タンパク質合成系を確立することである。

一年間の研究内容と成果

蚕において検出されたU1094C/A1098G変異の機能的意味を探るため、変異を導入した大腸菌リボソームの機能解析を行うことにした。変異リボソームの調製は、PCR法を用いてU1094C/A1098G変異を導入した大腸菌rRNA発現プラスミドを構築することにより可能であるが、大腸菌は染色体中に7つのrRNAオペロンを保有するため、内因性とプラスミド由来リボソームを区別することは難しい。そこで、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23S rRNA中で進化的に保存性の低いHelix 25に挿入した。このプラスミドを形質転換した大腸菌（DH-5株）よりリボソームを調製した後、ストレプトアビジンを固定化したアフィニティー精製を行いプラスミド由来リボソームのみ単離することに成功した。蚕型変異を有する大腸菌リボソームは野生型と比較して、30-40%の翻訳伸長因子依存の活性を保持していた。また、Pure Systemと呼ばれる大腸菌の無細胞タンパク質合成系を用いたnatural mRNA翻訳活性は、野生型の15%であった。従って、蚕型変異は翻訳の効率を高めるといよりはむしろ翻訳の制御に関与していると考えられ、特に翻訳の開始あるいは終結過程に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

展望

蚕型配列と翻訳制御の関係は基礎・応用の両面において極めて興味深い。翻訳の速度を自由に調節可能であれば、翻訳後修飾を兼ね備えたより実用的なタンパク質合成系を構築する基盤となりうる。蚕型配列の持つ翻訳制御機構を分子レベルで解き明かすことが最も近道であり、このためには、翻訳開始・終結過程に及ぼす影響をより詳細に探る必要があり、今後の課題である。また、蚕リボソーム（GTPaseドメイン）に特異的に結合する新規因子の探索を行う予定である。