

大腸菌蛋白質が蛋白質翻訳反応に与える影響の網羅解析と蛋白質生産技術への応用

松浦 友亮

(大阪大学大学院 情報科学研究科)

研究の目的

蛋白質合成システムは細胞にとって非常に重要な反応である。最近の研究から、翻訳反応を行うのに最低限必要な蛋白質因子は36種類の蛋白質とリボソームだけであることが実験的に示されている¹。具体的には、Initiation, elongation, termination factors、さらにはARS、エネルギー再生に関わる蛋白質、並びにribosomal proteinsなどである。これら基本因子は大腸菌ではわずかに全遺伝子4300種類²のうちのわずか2.5%だけである。一方で、大腸菌ゲノムにコードされている要素は互いに相互作用して、大きなネットワークを構成している³。では、2.5%の基本因子で稼働する反応ネットワーク（蛋白質合成反応システム）とは、どれだけの蛋白質因子が相互作用するのであろうか？これらの疑問に答えることで、蛋白質合成システムの全容を明らかに出来るだけでなく、蛋白質合成システムの工学的最適化に関する知見を得ることができると考えられる。

方法

基本因子のみから構成される無細胞翻訳系、PURE systemは大腸菌由来の翻訳反応に関与する蛋白質分子を全て精製しこれを再構成することにより、試験管内で蛋白質合成反応が行えるものである¹。我々は、大腸菌由来のORF蛋白質4194種類を無細胞翻訳系により合成し、それぞれがPURE systemを用いたgreen fluorescent protein (GFP)合成反応に与える影響を調べた

(図1)⁴。

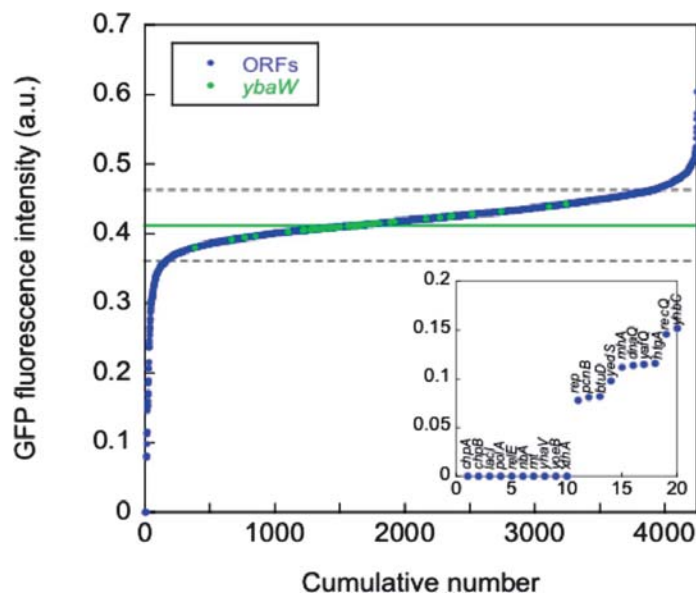


図1:大腸菌蛋白質がGFP合成反応に与える影響

縦軸はそれぞれの蛋白質を加え合成反応を行ったときの3時間後のGFP蛍光値、横軸には4194測定値の低いものから順に左から並んでいる。

結果

測定の結果、4194種類のうち8.2%がGFP合成反応を促進し、3.8%が阻害させる効果があることを明らかにした。よって、あわせて少なくとも12%のORFが基本因子から構成される蛋白質合成システムと相互作用することが明らかになった。大腸菌ゲノム上にコードされているORFのうち、約半数が（実験的に）機能未知である²。よ

って、上記のデータは、多数の機能未知蛋白質の機能を推定する上でも非常に有用である。

翻訳反応に影響を与えた個々の蛋白質について調べた。図1で反応を阻害すると特定された蛋白質には、**toxin**として報告されている分子（ChpA, ChpB, RelE, YoeB, YafQ）が全て含まれていた。一方で、どのような機構で蛋白質合成反応を阻害しているのか見当がつかない分子も多数同定された（YhaV, PolA, RibA）。また、これらが蛋白質合成を阻害していることは**SDS-PAGE**により確認した。翻訳反応を促進すると特定された蛋白質は、それぞれを精製しその効果を調べた。その結果、調べた6つの蛋白質のいずれも、**PURE system**を用いたGFP合成反応を促進させる効果が確認できた。また、6つの精製蛋白質を同時に加えることでGFP蛍光値が2.44倍上昇した。これらの結果は、図1の網羅解析の信憑性を示すものである。これら6つの蛋白質の効果は加法的であった。つまり、6つの蛋白質はGFP合成反応に独立に作用していた。このことは、さらなる蛋白質合成システムの最適化には重要であり、より多種の因子の添加により、さらなる合成量の増加が期待されることを意味している。

さらに、翻訳ネットワークを構成する蛋白質の蛋白質間相互作用ネットワーク上でのトポロジーを明らかにした。具体的には、翻訳反応のコア成分である**PURE system**構成要素と実験的に特定された機能的な作用因子の蛋白質間相互作用ネットワーク上での、互いの相対的な位置関係を調べた。さらには、コア成分、作用因子の生物種間保存性を調べた。これらの結果から、翻訳ネットワークの拡張過程に関する知見を得ることが出来た。すなわち、翻訳ネットワークは、コアとなるネットワークを壊さないように拡張されてきたというシナリオを提案するに至った⁴。このように、蛋白質合成システムのネットワーク構造を解明し、このネットワークが構成されてきた過程に関する知見を種々のデータベースの情報をもとに得ることができた。

結論

我々は作用因子が全大腸菌遺伝子の少なくとも12%であると結論づけた。ただし、12%は**underestimate**されており、それ以上に影響を与える因子が存在することが予想される。なぜならば、加えた大腸菌蛋白質が機能を発現しうる状態で加えられているとは限らないからである。例として、多数存在するヘテロオリゴマーとして機能する蛋白質や膜蛋白質の存在を考えれば容易に想像できる。こうした理由から12%は最小値であって、それ以上の作用因子が存在すると考えるのが適当である。このことは、生物の特性の多くが蛋白質によりコントロールされている事実から考えると、この結果は非常に妥当なものである。

文献

1. Shimizu, Y. et al. Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nat. Biotechnol.* **19**, 751-755 (2001).

2. Riley, M. et al. *Escherichia coli* K-12: a cooperatively developed annotation snapshot—2005. *Nucleic Acids Res.* **34**, 1-9 (2006).
3. Butland, G. et al. Interaction network containing conserved and essential protein complexes in *Escherichia coli*. *Nature* **433**, 531-537 (2005).
4. Kazuta, Y. et al. Comprehensive analysis of the effects of *Escherichia coli* ORFs on protein translation reaction. *Mol Cell Proteomics* **7**, 1530-1540 (2008).