

リボソーム自己複製プロセスの再構成

大阪大学大学院工学研究科 青木 航

【背景】

リボソームは、アミノ酸からタンパク質を合成する分子機械である。もしリボソームを改変できれば、多様なモノマーを効率よく重合可能な人工リボソームの創出に繋がり、人類が利用可能な化学ポリマーの種類を拡張できる。しかし、リボソームは生命の必須因子であるためその改変は難しい。そこで本研究では、リボソーム自己複製プロセス(リボソームをリボソーム遺伝子から合成するプロセス)を試験管内で再構成することを目標とした。リボソーム自己複製プロセスを試験管内で再構成できれば、細胞毒性を回避して自由自在にリボソームをエンジニアリングできるようになると期待される。

【方法と結果】

リボソーム自己複製の試験管内再構成に向け、リボソーム小サブユニット自己複製プロセスの再構成をまず試みた。リボソームは、遺伝暗号のデコーディングを担う小サブユニットと、ペプチジル転移反応を担う大サブユニットから構成される。大サブユニットに比べて小サブユニットの構造はシンプルなため、再構成の最初のターゲットとして有望であると考えられた。

小サブユニットの再構成に向けて、2つの連続した反応から成る実験スキームを設計した。第一の反応では、生体内を模倣した大腸菌無細胞転写翻訳系において、or1-ASDを含むリボソーム RNA (rRNA) 遺伝子の転写と、21種の小サブユニットリボソームタンパク質(r-protein)遺伝子の転写と翻訳を同時に活性化させる。もし rRNA と r-protein がうまくアセンブリすれば、機能的な小サブユニットが形成されると期待される。この際、新しく合成された小サブユニットの活性のみを検出可能とするために、rRNA 遺伝子に抗生物質スペクチノマイシン耐性を与える変異を導入した。第二の反応では、抗生物質存在下で、酵素反応を1分子レベルで検出可能なフェムトリットル液滴アッセイを用いて、新生小サブユニットに LacZ 遺伝子を翻訳させることでその活性を検出する。当初の反応条件では新生小サブユニットに由来するシグナルはまったく観察されなかった。実験計画法の一種である単純格子計画法を用いて、天然リボソーム・rRNA 遺伝子・r-protein 遺伝子の濃度を網羅的に検討したところ、当初の反応条件よりも rRNA 遺伝子と r-protein 遺伝子の濃度を大きく下げた反応条件において、新生小サブユニットの活性を検出することができた (図 1)。

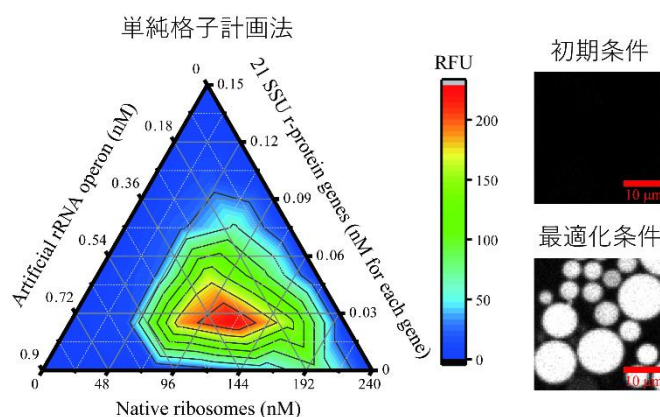


図1 リボソーム小サブユニットの試験管内再構成

再構成反応において、天然リボソーム・rRNA 遺伝子・r-protein 遺伝子の濃度を最適化したところ、フェムトリットル液滴アッセイにおいて強い翻訳活性が検出された。

次に、リボソーム大サブユニットの再構成に挑戦した。実験スキームは、小サブユニットの場合とほぼ同様である。第一の反応では、先述の大腸菌無細胞転写翻訳系において、抗生物質クリンダマイシン耐性を持つ rRNA 遺伝子の転写と、大サブユニット r-protein 遺伝子の転写と翻訳を同時に活性化させる。第二の反応では、抗生物質存在下で、新生大サブユニットに LacZ 遺伝子を翻訳させることでその活性を検出する。驚くべきことに、小サブユニットの再構成条件を出発点として、rRNA 遺伝子と r-protein 遺伝子の濃度を 16 条件検討しただけで、新生大サブユニットの活性を検出することができた。

【将来展望】

本研究において、リボソーム自己複製の試験管内再構成を世界で初めて成功した。この成果を応用することで、20 種天然アミノ酸以外のモノマーを効率よく重合可能な人工リボソームの創出に繋がり、そこから生み出される新たな機能性ポリマーは、創薬・化学・食品などさまざまな産業に貢献すると期待される。

【成果発表】

1. Kosaka Y, *et al.* Reconstitution of ribosome self-replication outside a living cell. *bioRxiv*, 2022.08.29.505692.
2. Kosaka Y, *et al.* *In vitro* reconstitution of ribosome biogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 2999, 3, S531, 2023.

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、多大なるご支援を頂いた杉山産業化学研究所様に心より感謝申し上げます。