

人工 Ribosome の構築による多様なポリマー素材の創出に向けた 油水ダブルエマルジョンの活用に関する研究

京都大学大学院農学研究科 青木 航

【背景】

Ribosome は、遺伝コードに従って 20 種類の天然アミノ酸を重合し、多様なタンパク質を生み出す。Ribosome の改変により、重合可能な非天然モノマーの種類が増えれば、人類が利用可能なポリマー空間が大幅に拡張されるため、そのインパクトは極めて大きい。

しかし、デザイナー Ribosome の創出は極めて難しい。Ribosome は生命の必須因子であり、*in vivo* での変異導入は細胞死に繋がりがやすい。また、Ribosome は極めて複雑なタンパク質複合体であり、*in vitro* で人工 Ribosome を構築するにも多大な時間とコストが必要とされる。

これまでに、Ribosome の一部に変異を導入可能な方法論が発表されてきた (Mol Syst Biol 9, 678, 2013; Nature 524, 119–124, 2015; Commun Bio 3, 142, 2020)。しかし、「変異を導入可能な箇所が限定的」「多大な時間とコストが必要とされ多くの変異体を構築できない」などの課題があり、Ribosome の全構成要素に簡便に変異を導入できる方法論はいまだ存在しない。

【目的】

本研究では、大腸菌破碎液を無細胞発現系として活用し、大腸菌 Ribosome の生合成環境を模倣—rRNAs と r-proteins をコードする全遺伝子のワンポット転写・翻訳・アセンブリ—することで、人工 Ribosome を簡便に構築可能とする (図 1)。具体的には、大腸菌破碎液中で 3 種のリボソーム RNA (rRNAs) と 54 種のリボソームタンパク質 (r-proteins) を一斉に発現させる。本研究では、「新生 r-proteins を高感度に定量可能な質量分析法」および「超高感度な新生人工 Ribosome 活性測定法の開発」を開発し、「ワンポット Ribosome アセンブリシステム」の実現に向けた基盤を確立する。



図 1 Ribosome 全構成要素のワンポット転写・翻訳・アセンブリ

【方法・結果・考察】

1. 新生 r-proteins を高感度に定量可能な質量分析法

三連四重極型質量分析計を用いた Selected reaction monitoring (SRM) では、目的のタンパク質を高い特異性で定量することができる。しかしながら Ribosome タンパク質を網羅的に定量するための SRM 法は未だ開発されていなかった。そこで本研究においては、精製 Ribosome・大腸菌ライセート・過剰発現株ライセート由来の Ribosome タンパク質を三連四重極型質量分析計で分析し、54 種存在する大腸菌 Ribosome 構成タンパク質それぞれを特異的に検出可能な SRM 法を構築した。また本研究で開発された SRM 法を用いて、大腸菌無細胞翻訳系で合成した Ribosome タンパク質の分析を行ったところ、54 種の Ribosome タンパク質のうち 41 種が検出できた (図 2)。この技術は、Ribosome 生合成プロセスを理解する上で強力な分析手法になると期待される。

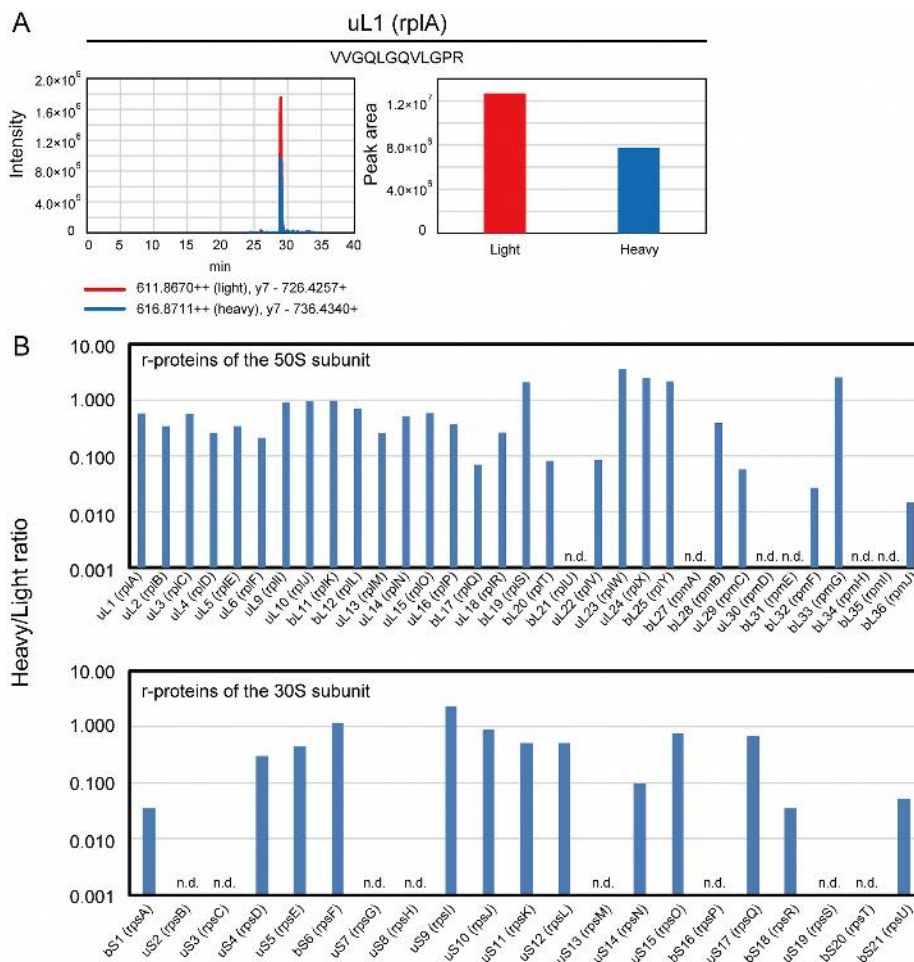


図2 特異的 SRM 法による新生 Ribosome タンパク質の検出。A) Ribosome uL1 タンパク質の検出。内在性 uL1 タンパク質は C12 (light) で、新生 uL1 タンパク質は C13 (heavy) で区別可能であり、heavy/light 比率が、内在性 uL1 に対する新生 uL1 の存在量となる。B) 全 Ribosome タンパク質の一斉定量。

2. 超高感度な新生人工 Ribosome 活性測定法の開発

従来用いられてきたマイクロプレートリーダー法の感度は低く、非常に少量しか存在しない人工 Ribosome は検出できない。そこで我々は、反応液をコンパートメントすることでひとつの人工 Ribosome の活性を検出可能な方法論を開発した。現在、特許化および論文化を進めており、近い将来に本成果を広く発表したいと考えている。

【成果発表】

1. Kosaka Y, **Aoki W**, Mori M, Aburaya S, Ohtani Y, Minakuchi H, Ueda M. Selected reaction monitoring for the quantification of *Escherichia coli* ribosomal proteins. PLOS ONE. 2020 Dec 14;15(12):e0236850. doi: 10.1371/journal.pone.0236850. eCollection 2020.
2. 小坂唯心, 森めぐみ, **青木航**, 植田充美. Ribosome タンパク質の包括的な解析のための selected reaction monitoring. 第 43 回日本分子生物学会年会, 2020.

【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。