

次世代のタンパク質工学を目指して



研究室紹介

青木 航*

Toward the Next Generation of Protein Engineering

Key Words : Artificial ribosome, artificial protein

はじめに

リボソームは、遺伝コードに従って 20 種類のアミノ酸を重合する。このタンパク質合成プロセスを改変し、多様な非天然モノマーを取り込ませられれば、人類が利用可能なポリマー種の大幅な拡張に繋がり、優れた中分子医薬や産業用酵素の創出を可能とすると期待される。

しかし、リボソームに非天然モノマーを効率的に重合させることはいまだ難しい。先行研究では、リボソーム以外の翻訳関連因子 (tRNA や EF-Tu) を改変し、リボソームに非天然モノマーを重合させることが試みられてきた。その結果、例えば D-アミノ酸においては最大 10 連続程度の重合が可能になっている¹⁾。

非天然モノマーの重合効率をさらに改善するためには、リボソーム自体を改変することが必須と考えられる。その理由は、近年の結晶構造解析などにより、リボソームの活性中心は L- α -アミノ酸に最適化されており、それ以外の非天然モノマーは効率的に重合できないことが示されたからである²⁾。しかし、リボソームは生命の必須因子であり、その改変は難しかった。

私達は、リボソームの触媒活性を自由自在に改変可能とするために、DNA を出発物質として試験管内でリボソームを合成する試みに 10 年に渡り挑戦を続けてきた。本稿では、リボソームの試験管内合

成に向けた我々のこれまでの成果を概説する。

リボソームの生合成プロセスとは

リボソームの生合成プロセスは、大腸菌においてすら極めて複雑である。大腸菌のリボソームは、57 種の構造因子から成り、その内訳は、3 種のリボソーム RNA (rRNA) と 54 種のリボソームタンパク質 (r-protein) である。これらの構成要素は、rRNA のプロセシングや転写後修飾、r-protein の翻訳後修飾、リボソームのフォールディングをサポートする 100 種近くのアクセサリタンパク質のサポートのもとアセンブリし、新たなリボソームを形成する。つまりリボソーム生合成とは、約 200 種類もの因子が協調的に働くことで成立する、最も複雑な生命現象のひとつなのである。

このように極めて複雑な反応を試験管内で再構成するためには、ただ闇雲にトライアル&エラーを試みるわけにはいかず、何らかの大きな指針を立てることが必要である。そこで我々は、「生体内環境を徹底的に模倣すれば、リボソーム生合成を試験管内で再現できるのではないか?」という仮説を立てた。リボソーム生合成は少なくとも生体内では問題なく動作しているので、生体内環境を可能な限り模倣すれば、いつかはその試験管内再構成に到達できると考えたためである。この仮説を検証するために、私達は、生体内を模倣した反応場の構築にまず取り組んだ。具体的には、リボソーム生合成に必要な 100 種のアクセサリタンパク質を含む反応場として、大腸菌の S150 破砕液を準備した。S150 破砕液とは、大腸菌の破砕液を 150,000 g で遠心した後の上清画分であり、ほぼすべての可溶性タンパク質が含まれると期待される。そこに、細胞内の化学的環境を模倣するための各種低分子化合物 (グルタミン酸カリウム・グルタミン酸マグネシウム・グルタミン酸アンモニウム・スペルミジン・プトレシンなど) を、



* Wataru AOKI

1985年5月生まれ
京都大学 大学院農学研究科 応用生命科学専攻 博士後期課程 修了 (2013年)
現在、大阪大学大学院 工学研究科 生物工学専攻 教授 農学博士
専門/生物工学
TEL : 06-6879-7437
E-mail : aoki.wataru@bio.eng.osaka-u.ac.jp

細胞内に近い濃度になるよう透析で満たした。次に、rRNA や r-protein の転写・翻訳に必要とされる 50 種ほどの因子 (NTP・アミノ酸・tRNA・CoA・NAD など) をそれぞれ適切な濃度で添加した。さらに、転写翻訳をスタートさせるために、天然リボソーム・RNA ポリメラーゼ・3 種の rRNA 遺伝子・54 種の r-protein 遺伝子を添加する計画を立てた。(図 1)

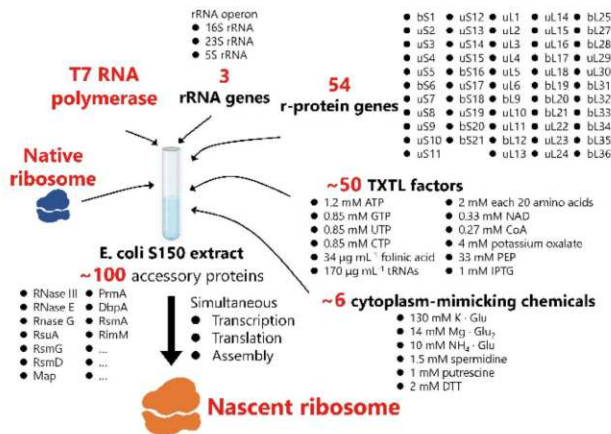


図 1 リボソーム生成の再構成戦略

特異的かつ超高感度な新生リボソーム検出系の構築

しかしながら、すぐに上記仮説を検証するわけにはいかなかった。リボソーム生成とは、既に存在するリボソームが新しくリボソームを合成する反応である。そのため、新生リボソームの翻訳活性のみを検出するための方法論がなければ、リボソーム生成を再構成できたかどうか評価できない。

そこで私たちは、mRNA の翻訳開始メカニズムに。リボソームは、mRNA 上に存在する Shine-Dalgarno (SD) 配列が、16S rRNA の anti-Shine-Dalgarno (ASD) 配列によって認識されることで、翻訳を開始する。つまり、天然には存在しない SD 配列と ASD 配列を用いれば、新生リボソームの翻訳活性のみを計測できると期待される (図 2)。先行研究において、大腸菌内で直交性を示すいくつかの SD/ASD 配列が報告されたが、試験

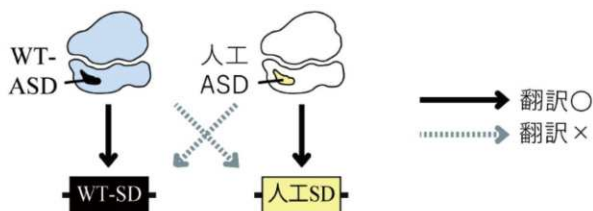


図 2 リボソーム特異的検出系

管内でも同様に機能するかは不明であった³⁻⁴⁾。そこで、先行研究で報告されていた直交 SD/ASD ペア (a・b・c・d・or1・or4・j と命名) を網羅的に検討したところ、or1-SD/ASD ペアが、新生リボソームのみを特異的に検出可能なレポーターアッセイとして利用できることがわかった。

次に、上記レポーターアッセイの高感度化を試みた。なぜなら、リボソーム生成は極めて複雑なプロセスであり、最適化されていない状況では、新生リボソームの合成量は極めて少ないと想定されたからである。そこで私達は、フェムトリットル液滴を用いた酵素検出系に着目した。この方法、酵素を含む反応液をフェムトリット液滴に閉じ込めて酵素活性を検出する方法論である (図 3)。反応液をフェムトリットサイズの微小液滴に封入すると、微量しか存在しない物質でも濃度が高くなる。また、親水性の反応生成物であれば液滴から拡散しないため、高感度な酵素活性検出が可能になる。私達は、U-Net ディープラーニングモデルを用いて、高い精度でフェムトリット液滴の同定・体積決定・蛍光強度決定が可能なアッセイ系を確立したところ、反応液中にごく微量でもターゲットとなるリボソームが存在すれば、その翻訳活性を検出できることがわかった。

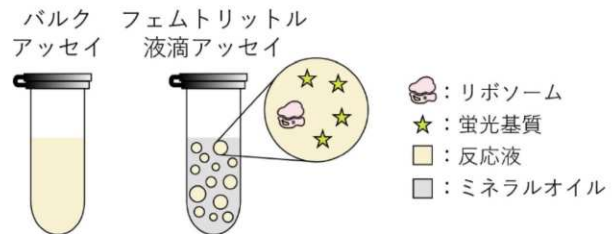


図 3 リボソームの超高感度検出系

リボソーム生成の試験管内再構成

私達は最初のターゲットとして、リボソーム小サブユニット生成を選択した。リボソームは、小サブユニット (small subunit; SSU) と大サブユニット (large subunit; LSU) から構成される。LSU に比べて SSU の構造はずっとシンプルなため、再構成の最初のターゲットとして有望であった。

SSU 再構成に向け、2 つの連続した反応系を考案した。第一の反応では、先述の生体内模倣反応場において、or1-ASD を含む人工 rRNA 遺伝子と 21 種の SSU r-protein 遺伝子を同時に一斉発現させる。第二の反応では、or1-SD 蛍光レポーターとフェム

トリットル液滴アッセイを用いて、新生 SSU の翻訳活性を検出する。単純格子計画法を用いて反応条件を網羅的に最適化したところ、rRNA 遺伝子と SSU r-protein 遺伝子の濃度を大幅に下げた反応条件において、微弱なレポーターシグナルを検出できた。これらの濃度をさらに最適化したところ、フェムトリットル液滴アッセイにおいて飽和したシグナルが得られる反応条件を決定することに成功した (図 4)。

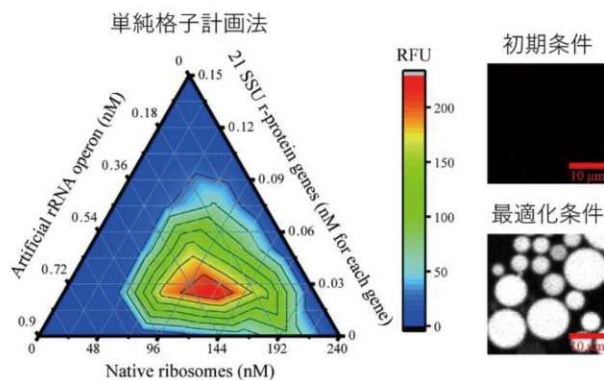


図 4 リボソーム小サブユニットの試験管内合成

次に、リボソーム大サブユニット (LSU) の試験管内合成に挑戦した。スキームは SSU の場合と類似している。第一の反応では、先述の生体内模倣反応場において、クリンダマイシン耐性を持つ rRNA 遺伝子と 33 種の LSU r-protein 遺伝子を同時に一斉発現させる。第二の反応では、WT-SD 蛍光レポーターとクリンダマイシンを用いて、新生 LSU の翻訳活性を検出する。LSU の構造は非常に複雑であるため、その試験管内合成は難しいと想定していた。しかし驚くべきことに、SSU 生合成のために最適化された反応条件をベースに、シンプルな探索的実験を行ったところ、新生 LSU に由来する蛍光シグナルを検出することができた。

私達の手法で合成されたリボソームは、大腸菌から精製したリボソームと非常に似ていることがわかってきている。例えば、heavy isotope でラベルされた L-アルギニンと L-リジンを用いて、試験管内で合成された r-protein を標識したところ、新生 r-protein にも生体内と同様の翻訳後修飾が入ることがわかった。また、新生 rRNA を生成して質量分析で測定したところ、生体内と同様の転写後修飾を持つことがわかった。これらの結果から私達は、試験管内でリボソームをゼロから合成することに成

功したと結論付けた⁵⁾。

将来展望

本研究において我々は、「リボソーム生合成の試験管内再構成」に世界で初めて成功した。この成果を応用し、次のステップでは、さまざまな非天然モノマーを自由自在に重合できるリボソームを創出したい。本研究は、以下のようなさまざまなインパクトを与えると期待される。第一に、リボソームの触媒メカニズムの理解を深化させると期待される。リボソームはなぜ 20 種類の天然アミノ酸を効率的に重合できるのか？なぜ非天然モノマーの重合効率は低いのか？という問いは解明されていない。本研究は、これまで実現が難しかった多様なリボソーム変異体の構築・評価を可能とすることで、リボソームの触媒メカニズムの理解に大きく貢献する。第二に、人類が利用可能なポリマーの種類に大きく貢献すると期待される。天然アミノ酸とは性質が異なる非天然モノマーを効率的に重合可能とすることで、経口投与性や細胞膜透過性に優れた次世代中分子医薬の創出に貢献すると期待される。また、D-アミノ酸を効率的に重合可能とすることで鏡像タンパク質工学を実現できる。D-タンパク質は、L-タンパク質が触媒する反応のキラリティを反転できる。また、プロテアーゼ耐性が高く分解されにくい。そのため、産業用酵素や消化管へ投与可能なタンパク質医薬として活躍すると期待される (図 5)。

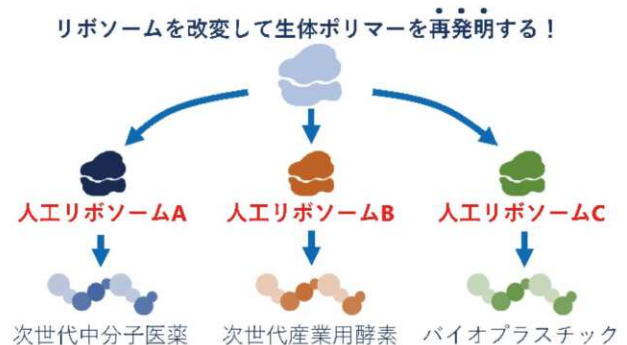


図 5 生体ポリマーの再発明に向けて

参考文献

- 1) Nucleic Acids Res., 45(22), 12601-10, 2017
- 2) Nucleic Acids Res., 47(4), 2089-100, 2018
- 3) Nat. Chem. Biol., 1, 3, 2005
- 4) Commun. Biol., 3, 142, 2020
- 5) bioRxiv, 505692, 2022