

研 究 報 告 書

「1分子同時計測技術によるタンパク質翻訳操作」

研究期間：平成19年10月～平成23年3月

研究者：上村 想太郎

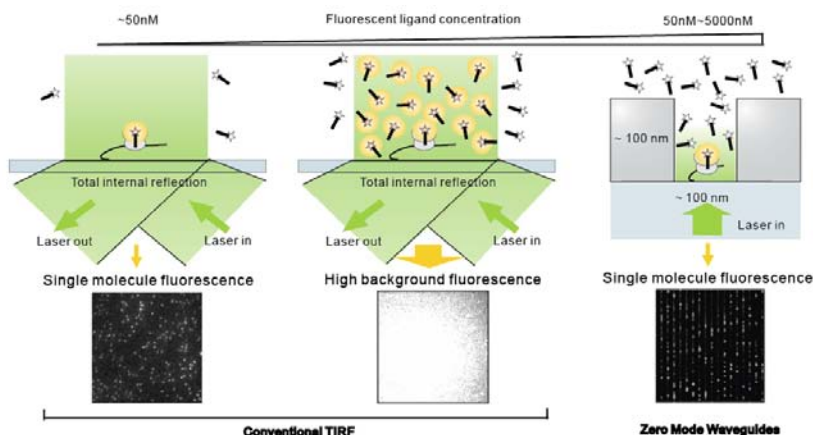
1. 研究のねらい

1分子蛍光イメージング法は、蛍光色素をタンパク質や核酸などの特定の部位に付けることで分子1つ1つの動きを直接リアルタイムに計測することができる手法である。しかし、従来の1分子蛍光イメージング法(全反射型)は、細胞内の本来の環境に比べると極めて低い濃度で測定することしかできないことから、研究の対象となるタンパク質や核酸が細胞内でどのように働いているか分からないことが問題だった。その原因は、溶液内に浮遊している蛍光因子も蛍光励起されてしまうため、背景光と基板固定された目的分子に結合する蛍光シグナルとの識別が困難であることである(図1)。さらに低い蛍光濃度での測定による極めて大きな問題がある。それは低い濃度での反応は反応時間がとても遅いために通常数十秒内で起こる「蛍光退色」と呼ばれる蛍光消光現象によって観測したい生命現象が正確に観測することができないことである。なぜなら分子の解離現象か、退色による消光かを識別することができないからである。通常この退色時間を酸素除去酵素系を用いて引き伸ばす方法が用いられるが数倍程度であり、限界がある。

この2つの問題を見事に解決したのが新しい1分子イメージング法である「Zero-mode waveguides法(ZMW法)」である。ZMW法は米国・Pacific Biosciences社によって次世代DNAシーケンサーに応用されている。ZMW法は、基板にアルミニウム膜を蒸着させて100nmほどの穴を開けたところに局所励起光を当てるため、蛍光色素が高濃度に存在していても背景光を激減させることができる(図1)。そのため、上述の濃度問題を解決し、より細胞内に近い条件で生命現象を1分子レベルで可視化できる。さらに高濃度による反応速度の上昇によって退色時間に比べて十分速い生命現象を捉えることができた結果、上述の退色問題も解決することができる。すなわち1分子蛍光イメージング法の長年の大きな問題を解決することのできる、生命現象を新しい角度でより生命の本質に迫ることのできる大きな技術革新である。

この新しいZMW法を用いて私はタンパク質翻訳の計測を試みた。2009年、リボソームの分子構造を突き止めた研究者3人がノーベル化学賞を受賞した。リボソームの構造が明らかになったことはタンパク質翻訳機構の理解に大きな貢献をしたが、構造を解明するには分子を結晶化しなければならないため、時々刻々と変化する分子の動的な変化をとらえることはできない。この問題を解決するために通常用いられる手法は多数の分子を用いる生化学的手法である。これはす

べての分子が同様に振舞うことが前提であり、個々の分子の特性をとらえることはできない。さらにタンパク質翻訳は複雑であるが、生命現象の本質であり、抗生物質などの薬剤反応だけでなく真核細胞においてはウイルス感染、免疫反応、遺伝制御などに深く関与している。



(図1)従来型全反射法と新ZMW法

以上の理由からリボソームによる翻訳過程はZMW法による新しい1分子計測に最も適した研究対象であると考え、Pacific Biosciences社と共同研究でより詳細なタンパク質翻訳のダイナミクスを可視化することを目標に研究を行った。

2. 研究成果

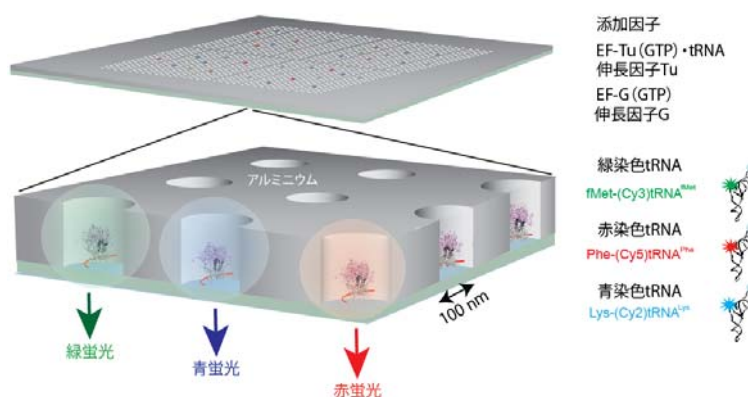
A) ZMW法による新しい1分子翻訳反応実験系の構築と評価

ZMW法の特徴は縦横に3000個ほど配列された各穴の計測を同時並列で行うことができるだけでなく、各色素の蛍光パターンから4種類の蛍光色を識別することも可能である(図2)。したがって高濃度条件下において多色同時並列高速反応を1分子レベルで測定することができる。さらに励起光は穴配列と同じパターンを持つピンホールを用いることによって共焦点励起が用いられている。それによって高いS/N比を得ることができるだけでなくアルミニウムへの励起光照射による温度上昇も防ぐ働きがある。これらの理由により現状ではPacific Bioscience社のZMW計測装置は世界最高能を誇っている。

我々はまずタンパク質翻訳系の構築のためにリボソーム複合体のZMW面への特異的固定を行った。特異的固定はビオチン化mRNA・70S・Cy3標識fMet-tRNA^{fMet}(fMetはNフォルミル化メチオニン)の安定初期複合体を用いた。検出されたCy3の蛍光密度は複合体濃度に比例し、底面に固定されたアビジンにビオチンを結合させ複合体のアビジンへの結合を遮断すると蛍光は消失した。

この結果はリボソーム複合体がZMW表面に特異的に固定されたことを示している。

次にCy5で標識したPhe-tRNA^{Phe}(Pheはフェニルアラニン)及びCy2で標識したLys-tRNA^{Lys}(Lysはリジン)の調製を行い、短いPheとLysを用いた人工mRNAで翻訳反応が可視化できるかを低濃度tRNA添加によって蛍光を確認した。蛍光はmRNAのコードンに従って検出された。

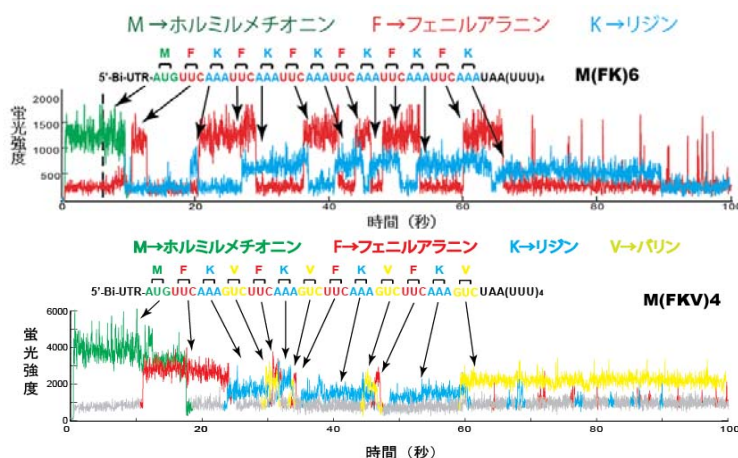


(図2) ZMWアレイによる1分子翻訳可視化

B) 高濃度蛍光tRNAによる翻訳反応1分子可視化の成功

次にCy3の1分子蛍光を確認した後、蛍光観察しながら200nM Phe(Cy5)tRNA^{Phe}及び200nM Lys(Cy2)tRNA^{Lys}さらに2種類の伸長因子(EF-Tu及びEF-G)をそれぞれ含む溶液を添加した。実験に使用したmRNAは、UTRを先頭にメチオニンMet(AUG)が続き、更にその後にフェニルアラニンPhe(UUC)とリジンLys(AAA)の6回繰り返しのストップコードンを含む配列を使用した。

我々はmRNA配列の各コードンパターンに対応したtRNAの蛍光色のパターンを得ることができた(図3上)。この結果は世界で初めてタンパク質の翻訳反応をコードンレベルで



(図3) 1分子翻訳過程可視化蛍光トレース

1分子可視化したことを示している。さらにCy3.5で蛍光標識したVal-tRNA^{Val}を加えた4色の翻訳可視化も成功した(図3下)。各蛍光パルスのパルス時間はEF-Gの濃度が高いほど短くなることを示し、トランスロケーションに依存した反応であることも示された。興味深いことにストップコドンの位置において非常に短い時間(数十ミリ秒)のtRNAパルスが連続的に観測された。これはストップコドン位置におけるtRNAの高速サンプリング現象を示している。

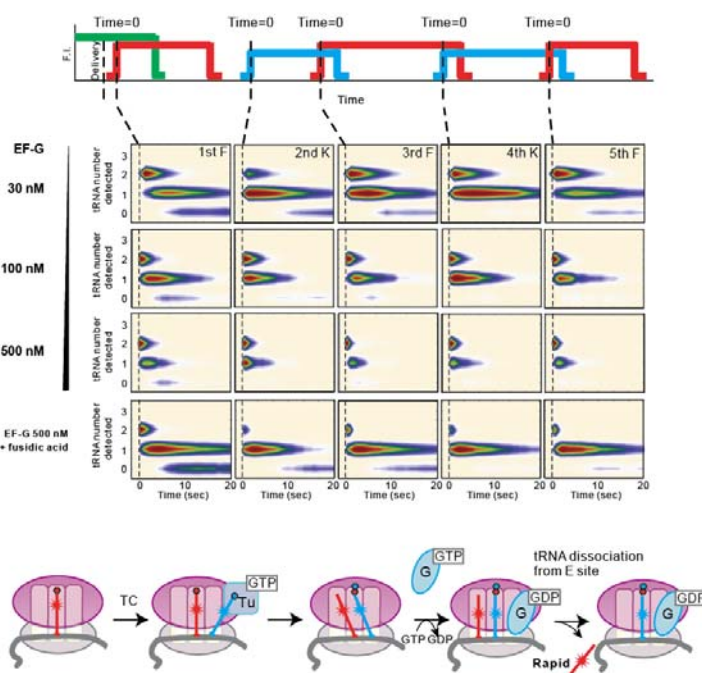
また、エリスロマイシン抗生物質を用いて翻訳反応中に実際にタンパク質を合成していることも証明することができた。エリスロマイシンは50Sサブユニット内のペプチドトンネル内に結合し、合成された新生ペプチドを物理的にブロックし、タンパク質合成を阻害する薬剤である。他の翻訳阻害を引き起こす抗生物質であるアミノグリコシド系においても翻訳阻害のダイナミクスを確認することができた。

C). 翻訳中のtRNA分子数可視化による新しい翻訳モデルの特定

リボソームには3つのtRNA結合部位が存在することがわかっている。この結合部位に対してtRNAがどのようにどのタイミングでどの順番で結合するのかは長年の謎であった。我々は得られた翻訳中のtRNA蛍光トレースからtRNAの結合数と結合・解離のタイミングを直接解析することによって新しいtRNA解離モデルを明らかにすることができた。結合数の時間変化はEF-Gのトランスロケーションに強く依存し、次のtRNAのA部位への結合には依存しないことが分かった。

従って、EF-Gによるトランスロケーションに伴ってtRNAがP部位からE部位へと移動し、そのtRNAは次のtRNAのA部位への結合に関わらずただちに解離するというモデルが特定された。

ZMW法によって蛍光標識されたtRNAを高濃度存在下で翻訳反応を直接可視化することによって従来までの1分子計測で大きな問題であった「高濃度計測不可能」「退色問題」の2点を解決し、翻訳時のリアルタイムな配列情報だけでなく結合数の変化やタイミングなど唯一1分子計測でのみ計測可能な結果を解析することによって新しいメカニズムを明らかにすることができた。



(図4) 結合数変化と新しい翻訳モデル

3. 今後の展開

これらの成果はNature誌のArticleに掲載されただけでなくNature誌を含む他のジャーナルにも大きく取り上げられた。今回の結果で大きな成果はZMW法による高濃度1分子計測はあらゆる生命現象に応用可能であるということを具体的に証明したことにある。すでに我々は今回の結果を他の生命現象の可視化に応用している。翻訳反応ではtRNAの蛍光標識だけでなく翻訳開始因子への蛍光標識によって翻訳初期における各因子の役割を調べている。翻訳初期における各因子の役割はおおよそ50年間謎とされていたが、ようやくこの手法を用いて明らかにされようとしている。さらに、翻訳阻害を引き起こす抗生物質が翻訳中にどのように阻害を引き起こすのかを初めて1分子で捉えることに成功した。この結果は薬剤開発に

応用される重要な結果であり、他の薬剤反応にも応用されるべきである。そして真核細胞の翻訳過程の可視化にも着手した。真核の翻訳過程はより複雑で細かい制御メカニズムが存在するため、この手法がその詳しいメカニズム解明に大きく貢献することは明らかである。

さらに、最近ではHIVウイルスに存在する2本鎖RNAがヒト免疫細胞内のProtein Kinase R (PKR)を活性化する過程を可視化することに世界で初めて成功した。PKRの活性化は免疫細胞内の翻訳初期因子eIF2のリン酸化を引き起こすことによって結果的に翻訳阻害を引き起こす。

このようにあらゆる生命現象に応用可能なこの手法は分野横断的に応用されるべきであり、新しい学問領域を創成する可能性を秘めている。従って我々は多くの他分野の研究者と新しい生命現象についての理解を深め、具体的にどの生命現象に応用すればいいのかを常に開拓していかなければならない。

4. 自己評価

個人的にはさきかけ研究期間で得られた我々の成果は当初の予想を遥かに超え、大変満足のいく成果が達成できたと自負している。それは次の点についてである。1)次世代シーケンサーとしてのみ用いられていた新しい1分子 ZMW 法をタンパク質翻訳過程に応用し、従来の常識では得られることのできない翻訳ダイナミクスを直接可視化することができた。2)詳細な解析から従来まで謎とされてきた tRNA 解離モデルを特定することに成功した。3)薬剤がどのように翻訳過程に作用するのかをより詳細に明らかにした。4)これらの手法はあらゆる生命現象に応用可能であることを具体的に証明した。

5. 研究総括の見解

申請研究課題を途中で変更しているがむしろ本領域研究により適した研究を遂行した。東大の助教の職を辞してまでアメリカで本研究に集中し、短期間でありながら生命現象の本質の一つであるリボソームでのタンパク質合成のダイナミックな分子機構を新しい1分子計測技術 ZMW 法を用いて解明した。構造生物学を超え生命現象における1分子計測の新しい利用の途を切り開いた実に素晴らしい成果を挙げている。ZMW 法自体は Pacific Biosciences 社が新しいDNAシーケンサーとして開発したものであるが生命現象の本質に迫る課題解決に応用し得ることを実証したことを特に高く評価したい。今後様々な生命現象の解明に応用展開されるものと期待する。

このような見事な成果を挙げ得たのも、本研究者が以前留学先のスタンフォード大医学部でリボソームの研究を行っていた研究室との共同研究でもあることが大いに寄与していよう。課題に対する問題点をとことんまで煮詰めていたからこそ達し得たものと思われる。この研究には本研究者の強靱な意思、実行力、そして1分子生物学分野を創造しようとする夢があるように思われる。本総括もサイトヴィジツし研究現場を見、共同研究者と意見交換してみてこのことを強く感じた。

6. 主要な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

	<ul style="list-style-type: none"> • S. Uemura, C. E. Aitken, J. Korlach, B. Flusberg, S. Turner, and J. D. Puglisi. 'Real time tRNA transit on single translating ribosomes at codon resolution' <i>Nature</i> 464, 1012-1017. (2010)
	<ul style="list-style-type: none"> • S. Uemura, R. Iizuka, T. Ueno, Y. Shimizu, H. Taguchi, T. Ueda, J. D. Puglisi and T. Funatsu. 'Single molecule imaging of full protein synthesis by immobilized ribosomes'. <i>Nucleic Acids Research</i> 36, e70 (2008)

	<ul style="list-style-type: none"> • S. Uemura, M. Dorywalska, T. H. Lee, H. D. Kim, J. D. Puglisi, and S. Chu. 'Peptide bond formation destabilizes Shine-Dalgarno interaction on the ribosome'. <i>Nature</i> 446, 454-457 (2007)

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)受賞

・上村想太郎、光科学技術振興財団 研究表彰 (2009 年 3 月)

(4)著書

・上村想太郎. 'ついに可視化されたコドンレベルのタンパク質合成'
生物物理 **50**,294-295. (2010)

・上村想太郎. 'レーザートラップや蛍光を用いた1分子計測のタンパク質翻訳機構への応用' *BIOINDUSTRY* シーエムシー出版 2月号 (2009)

・上村想太郎. 'タンパク質誕生の1分子可視化法'

生物物理 **48**, 340-341. (2008)

・上村想太郎、船津高志. 'タンパク質の翻訳と折りたたみ過程の1分子蛍光イメージング'

ぶんせき **11**, 582-586. (2008)

・上村想太郎. 'リニア分子モーターの奥深さ～細胞骨格モーターから核酸モーターへ～'

化学同人. 化学同人編集部編 「最新分子マシン」 113-117. (2008)

(5)招待講演

招待講演(国際)

・ **S. Uemura** 'Real time tRNA shuttle on the ribosome during translation'
Structural Biology, Retreat conference, Stanford, U.S.A (2009)

・ **S. Uemura** 'Single molecule measurement for protein synthesis'
SSF-JST joint symposium, Sigtuna, Sweden (2008)

・ **S. Uemura** 'Single molecule force measurement for protein synthesis'
The 21st century COE international symposium, Waseda, Japan (2007)