

リボソームの *in vitro* 進化技術の開発

市橋 伯一

リボソームは複雑すぎる

リボソームはタンパク質の合成装置であり、tRNAや多数の翻訳タンパクとともにmRNA配列をアミノ酸配列に変換する役割を担っている。リボソームはタンパク質を作ると言う、細胞にとって重要な役割をもっているために細胞内に多数存在する。大腸菌の場合、もっとも早く増殖している時には細胞体積の1/3はリボソームで占められているという。リボソームは細胞内におけるもっとも巨大で複雑な複合体の一つでもある。大腸菌のリボソームはラージ(50S)サブユニットとスモール(30S)サブユニットの2つからなる。典型的な細菌のリボソームであれば、50Sサブユニットは2種類のRNA(23S, 5S rRNA)と32種類のリボソーマルタンパク質から、30Sサブユニットは1種類のRNA(16S rRNA)と22種類のリボソーマルタンパク質からできている。そのRNAも普通のRNAではなくて、メチル化やシュドウリジン化など、さまざまな化学修飾を受けている。これらの化学修飾には多数の酵素が関わっており、リボソームは細胞内で他に例のない複雑な分子の複合体である。さらに、リボソームの機能はただタンパク質の翻訳をしているだけではない。本特集の他の記事でおそらく述べられているように、新生鎖のフォールディングを制御したり、新規合成タンパク質の精度管理にかかわっていたりと、その多機能が注目を集めている。

この複雑さのために、リボソームの改良は容易ではない。何しろほとんどの変異は細胞にとって致死になる。致死にならなくても細胞の増殖速度に直結する。増殖速度が落ちてしまえば、すぐに復帰変異が入って変異は元に戻ってしまう。このためリボソームの変異体は、これまでに抗生物質耐性のものなど少数しか得られていない。リボソームは工学的な応用のために改変するには多機能すぎるのである。とはいえ、リボソームの改変ができれば、たとえば、高速で高品質なタンパク質合成や、非天然アミノ酸を持つタンパク質の合成、DNAからの直接のタンパク質合成など、革新的な技術開発につながる。リボソーム改変には未開のフロンティアが広がっていると書いてもいいだろう。

リボソームの進化工学

リボソームを人為的に改変する一つの方法は、完全に *in vitro* で進化工学を行うことである。通常の進化工学は細胞を使って (*in vivo*) で行われる。酵素の進化工学の場合であれば、酵素の変異体ライブラリーを微生物に発現させて、何らかのアッセイで発現した酵素活性を評価し、望みの活性を持つ変異体を選択する。リボソームについても、これまでに限られた例ではあるが大腸菌を使った進化工学が行われており、抗生物質耐性のリボソームが作られている¹⁾。ただし、前述のようにリボソームは細胞増殖に直結した多数の機能を持っている。変異導入によって抗生物質耐性になったとしても、それ以外の機能が低下したりすれば、その変異型リボソームを持つ大腸菌は増殖できないため、そのような変異体を選択されることはない。これまでにリボソームの進化工学が限られた例しかないのは、リボソームの変異がほとんど許されないという事情があったためだと予想される。これに対し、完全に *in vitro* でリボソームの再構成と活性評価ができれば、リボソームの細胞内での多機能さに邪魔されることなく、目的の活性だけを変化させることができる。細胞を用いないため変異体にどれだけ毒性があるかと関係ない。どんな偏った機能を持つ変異体であっても取得することができる。このような *in vitro* の進化工学であれば、純粋に翻訳活性に特化したリボソーム変異体も得ることができる。

そこで筆者らは、完全に *in vitro* のリボソームの人為進化技術を目指した。この技術では、rRNAへの変異導入、リボソームの再構成、活性の高いリボソームの選択をすべて細胞の外で行う。翻訳活性に基づいて選択を行うことにより、任意の環境で翻訳活性を維持したリボソームを得ることができる。この方法なら、たとえ翻訳以外の活性が失われていても、翻訳活性さえ検出できるレベルであれば選択できる。筆者らは、最初の段階として、16S rRNAの修飾を不要とするような変異体リボソームを得ることを試みた。rRNAの修飾部位は種間での共通性が低く、進化的には比較的最近獲得された可能性が高い。そうだとすると、修飾がなくてもリボソームの翻訳活性は維持できる可能性がある。特に16S rRNAは、

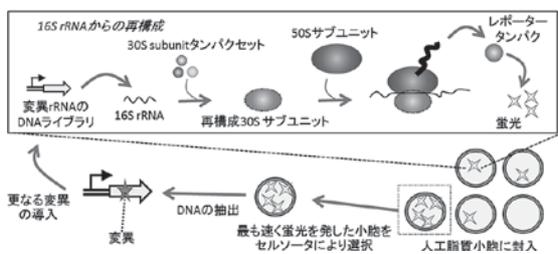


図1. リボソーム再構成とrRNAの人為選択方法

23S rRNAとは異なり、修飾がなくても翻訳活性が少しは残ることがわかっている。したがって、16S rRNA 変異体ライブラリーの中から、修飾がなくても翻訳活性が維持されるものを選択することができる。

筆者らが行った方法は、無細胞翻訳系での転写、翻訳と共役したリボソーム再構成と脂質小胞ソーティングによる選択技術を組み合わせたものである。図1に方法の模式図を示す。まず大腸菌由来の再構成された転写翻訳系（ただしリボソームは除いてある）とランダム変異を導入した16S rRNAの遺伝子ライブラリー、リボソームタンパク質セット、50Sサブユニット、レポーター遺伝子としてβガラクトシダーゼ遺伝子とその蛍光基質を封入した脂質小胞を37°Cで反応させる。そうすると16S rRNAが転写され、リボソームタンパク質と複合体を形成し30Sサブユニットが再構成される。この系では修飾酵素は入っていないため、このrRNAは修飾されていない。再構成された30Sサブユニットは、系中の50Sサブユニットと完全なリボソームを形成し、さらに別に転写されたレポーター遺伝子のmRNAを、レポータータンパク質に翻訳する。レポータータンパク質は蛍光基質を分解して蛍光物質を作る。これにより、修飾がなくても翻訳活性の高い16S rRNA遺伝子を持つ脂質小胞は、より高い蛍光を持つことになる。次に強い蛍光を持つ脂質小胞（たとえば上位5%）をセルソーターにより分取する。そして脂質小胞内から16S rRNA 遺伝子を回収する。回収した16S rRNA 遺伝子集団は、もとのライブラリーよりも修飾なしでも高い翻訳活性を示す変異体が濃縮されているはずである。あとは回収した16S rRNA 遺伝子を用いてさらに脂質小胞内再構成と選択をrRNA 変異体が十分に濃縮されるまで繰り返せばよい。

筆者らはこの再構成と選択過程を15回繰り返し、複数の変異体を得た。そのうちひとつの変異体（変異U1495Cを持つ）は、修飾がない*in vitro*の条件で修飾のない野生型よりも数十倍高いルシフェラーゼの翻訳活性を示すことを見いだした（図2）。ちなみにルシフェラーゼ以外のタンパク質（たとえばGFP）の翻訳活性も上昇している²⁾。

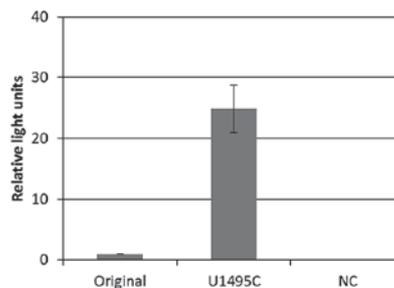


図2. 修飾されていない各16S rRNAを使ったリボソーム再構成-翻訳活性. 修飾されていない各16S rRNAを*in vitro*で転写し、リボソームを再構成したうえでルシフェラーゼを翻訳させ、その活性を比較した。Originalが野生型配列を示す。NCは16S rRNAを入れないときのルシフェラーゼ活性を示す。図は文献2より改変した。

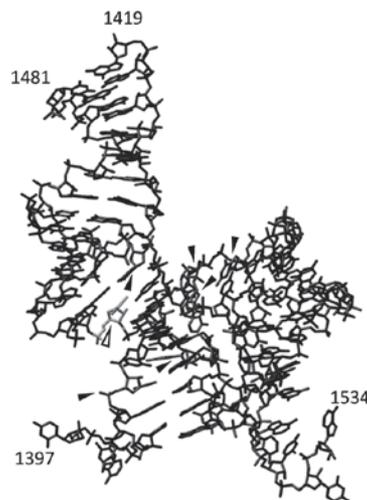


図3. 変異部位周辺の16S rRNAの立体構造. 変異(U1495C)の場所を白抜き矢尻、修飾部位を黒尻で示す。図は文献2より改変した。

この変異体の活性は、通常の修飾のあるリボソームと比べても60%程度の活性を維持しており、修飾がなくても野生型に匹敵する活性を持つリボソームが存在することを示す知見である。

立体構造を見てみると、変異部位はrRNAの修飾部位が集まっている箇所を中心部に位置していた（図3）。これらの修飾部位はrRNAの構造の安定化に重要だと示唆されていること、さらに変異によって従来のrRNAのステム構造が安定化することから、今回見つかった変異はおそらく修飾がなくなったことにより不安定化したrRNA構造を安定化していることが予想された。本研究結果は、まだ16S rRNAについてだけではあるが、リボソームの翻訳活性には必ずしも修飾が必要ではないことを示している。

以上ではうまくいったところばかりを書いてきたが、この研究は当初の予定よりもずっと難航し、約5年間、2名の修士課程学生と1年間の筆者の追加実験という労力が費やされている。もっとも大変だったのは、リボソームのコンタミネーションである。脂質小胞内でのレポーターアッセイはとても感度が高く、一分子のリボソームの活性でも検出してしまふ。この感度の高さは、修飾のなく活性の落ちたりリボソームの翻訳活性を検出するために必要ではあるものの、同時にコンタミネーションした野生型のリボソームの活性も検出してしまい、選択実験に深刻な影響を及ぼす。たとえば反応液10 μLに1000分子の野生型リボソームが混入しているだけで、変異体の選択実験はできなくなってしまう。あまり知られていないかもしれないが、このくらいの数のリボソームは精製タンパク質の中に普通に混入している。もちろんこのくらいの少量であれば普通のアッセイには問題にならないが、本進化実験には致命的である。このような混入りリボソームの影響を防ぐため、本研究では再精製や抗生物質耐性のリボソームを使うことなどいろいろな手法を試したが、もっとも効果的だったのは、オーソゴナル16S rRNAを使うことだった。オーソゴナル16S rRNAというのは、16S rRNAの末端にあるShine-Dalgarno (SD) 配列(mRNAの翻訳開始部位のすぐ上流にあり、リボソームが結合する配列)に相補的な部分が、人為的に異なる配列に変更されている16S rRNAである³⁾。もちろんオーソゴナル16S rRNAを含むリボソームでは、普通のmRNAを翻訳することはできない。しかし、オーソゴナルanti SDと相補的な配列(オーソゴナルSD)を持ったmRNAであれば翻訳することができる。したがって、オーソゴナル16S rRNAを使い、かつレポーター遺伝子をオーソゴナルSDにかえておけば、混入りリボソームの影響なく、再構成したリボソームの活性を選択的に検出することができる。これによってようやく、修飾がない条件での進化実験が可能になっている。

まとめと展望

本研究により、完全に*in vitro*で30Sサブユニットを再構成し、その翻訳活性に基づいて人為選択する実験系を構築することができた。そしてこの系を使ってRNAに修飾がなくても高い翻訳活性を示す30Sサブユニットを得ることができた。次の課題のひとつは、50Sサブユニットの再構成と選択系を作ることである。これはかなり困難な課題である。16S rRNAとは異なり23S rRNAの修飾はリボソーム再構成に必須である。今のところ、修飾のない23S rRNAからできたりボソームには翻訳活

性がまったく検出されていない。翻訳活性が検出できなければ選択もできないので、進化学もできない。このような状況で修飾を必要としない23S rRNAを選択するには、修飾を完全になくすのではなく、少し活性が残る程度に修飾を減らした条件で、少しずつ23S rRNAを適応させていく必要がある。しかし、23S rRNAの修飾は未だ*in vitro*で再現できておらず、どの修飾酵素がどの程度かかわっているのか不明である⁴⁾。23S rRNAの修飾の詳しい分子メカニズムの解明が望まれる。別の手段として、まずは大腸菌粗抽出液で23S rRNAの修飾を行って、徐々にその粗抽出液を減らしても活性のある23S rRNAを人為進化により獲得するという方法もある⁵⁾。これならば、修飾に関わる分子が不明であっても、修飾を不要とするrRNA変異体が取得できるかもしれない。

もうひとつの展望としては、*in vitro*のリボソームの人為進化により、リボソーマルタンパク質をなくしたりリボソームが得られるのではないかと期待している。この試みは、生物の進化を理解するために重要だと考えている。リボソームは、言うまでもなく、タンパク質の合成装置である。そのリボソームの構成成分にタンパク質が含まれているのはよくよく考えてみるとおかしなことである。生物の歴史で最初に現れたリボソームはいったいどうやってタンパク質を手に入れたのだろうか？これはタマゴが先かニワトリが先かの問題と同じである。現在、広く受け入れられている説明は、原始のリボソームはRNAのみからできていたとするものである。いわゆるRNAワールド仮説である。もし、この仮説が正しいとするとリボソームの翻訳活性は純粋にRNAだけで達成されなければならない。今回構築した*in vitro*進化学系を使えば、そのようなリボソームの人為進化が可能になる。このための実験は比較的容易である。ただ反応液中のリボソーマルタンパク質濃度を減らしながら、それでも翻訳活性のあるrRNAを選択すればいい(図4)。実際に現在、3代目の修士課程の学生がこの人為進化を進

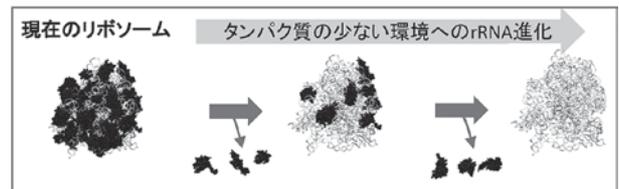


図4. 展望：タンパク質のないリボソームを得るための進化実験。再構成の際のリボソーマルタンパク質を段階的に減らしていき、それでも翻訳活性を維持したrRNAの変異体を取得すれば、タンパク質のない原始のリボソームが得られるかもしれない。

めてくれている。

このように *in vitro* の進化実験は現在の生物が持っていない、あるいは失ってしまったリボソームの形を探ることができる。そのようなリボソームは天然のリボソームのように細胞内のさまざまな機能を担う必要がないため、翻訳活性だけに限れば天然ものよりも高活性になってもおかしくない。それ以外にも非天然アミノ酸の取り込みなど応用範囲は広い。また、本特集のテーマである新生鎖のフォールディングや、品質管理に関わる活性のない変異体の獲得ができるかもしれない。このような変異体の獲得は、工学的な応用はもとより、リボソームの本来の機能の解析にも有用である。本研究で開発した *in*

vitro のリボソーム進化技術により、今までには得られなかったリボソーム変異体を得ることができると期待される。

文 献

- 1) Cochella, L. and Green, R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 3786 (2004).
- 2) Murase, Y. *et al.*: *ACS Synth. Biol.*, **7**, 576 (2018).
- 3) Rackham, O. and Chin, J. W.: *Nat. Chem. Biol.*, **1**, 159 (2005).
- 4) Decatur, W. A. and Fournier, M. J.: *Trends Biochem. Sci.*, **27**, 344 (2002).
- 5) Jewett, M. C. *et al.*: *Mol. Syst. Biol.*, **9**, 678 (2013).