

転写・翻訳反応のQCM法による時空間的解析

Quantitative Analyses of Transcription and Translation Processes on a QCM

岡畑 恵雄 (OKAHATA YOSHIO)

山形大学・大学院理工学研究科・教授



研究の概要

水晶発振子マイクロバランス (QCM) 法を用いて転写と翻訳過程を質量変化として追跡し、そのメカニズムと速度を解析する。

研究分野：生体関連化学

科研費の分科・細目：化学・複合化学・生体関連化学

キーワード：転写・翻訳過程、水晶発振子マイクロバランス法、定量的解析

1. 研究開始当初の背景

生体内では転写・翻訳過程に代表されるように、多くの分子が順序よくそのタイミングに従って認識し反応している。しかし、分子間で連携して進行する複雑な反応を追跡する計測手法はまだ確立されていない。

分子の認識、解離、反応には必ず質量変化が伴うので、我々がこれまでに用いてきた水晶発振子マイクロバランス (QCM) 法が有効である。27-MHz の基本振動数をもつ QCM 法を用いれば、基板上に 0.6 ng/cm² の物質が結合すると、1 Hz の振動数が減少するので、非常に高感度で分子の結合量が経時的に定量化できる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、転写・翻訳過程を水晶発振子マイクロバランス (QCM) 法を用いて、定量的に解析し、生体内反応の時空間制御を解明することにある。

3. 研究の方法

1) 転写過程の動力学解析

これまで転写過程は生成物である RNA をゲル電気泳動で確認する事が多く、各々の因子がどのような順序で、どのようなタイミングで結合して RNA が伸長するのかは明らかになっていない。QCM 基板上に DNA 二本鎖を固定化し、①転写因子と②RNA ポリメラーゼを添

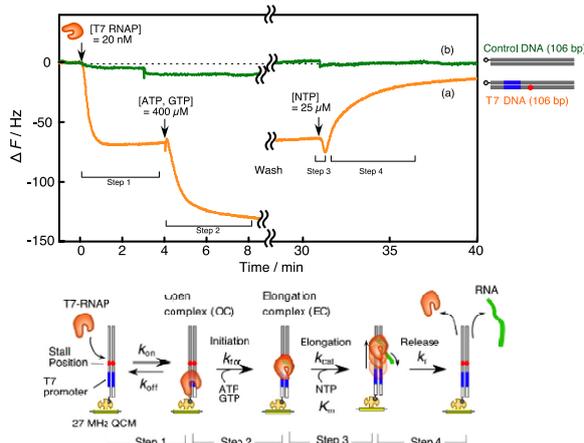
加すると塩基配列特異的に結合 (質量増加) し、続いて RNA モノマーを加えると③転写 (RNA の伸長) (質量増加) が起こり、DNA の終止コドンや鎖末端まで来ると④酵素と RNA の脱離 (質量減少) が続いておこり、質量は元の DNA 鎖の状態に戻ることが予想される。転写因子の種類、酵素への変異の導入、DNA 鎖長の長さ、などを変えることにより転写過程を定量的に評価できるようになる。

2) 翻訳過程の動力学解析

ストレプトアビジンを固定化した QCM セル内に開始因子 (IF)、成長因子 (EF)、tRNA やアミノ酸や tRNA アミノアシル化酵素を入れ、これに mRNA を加えるとセル内で翻訳が始まる。このとき mRNA の開始コドンのすぐ下流に目的タンパク質をコードする配列、ストレプトアビジン結合ペプチド (SBP) をコードする配列を入れておけば、翻訳が進むにつれてタンパク質、続いて SBP がリボソームから顔を出し、SBP が QCM 基板上のアビジンに特異的に結合し、質量が増加する。翻訳が止まった後で解離因子 (RF1) を加えるとリボソームがペプチドから離れて質量が減少して、基板上にはタンパク質とペプチドの質量分だけ残ることが期待される。

4. これまでの成果

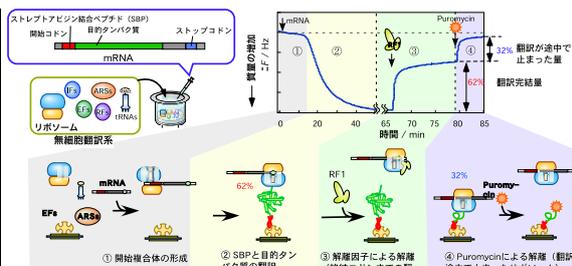
1) 転写過程の動力学解析



得られた結果を図に示した。DNA 固定化水晶発振子に対して NTP (モノマー) 非存在下で T7 RNA ポリメラーゼを添加すると振動数減少 (質量増加) が観察された (Step 1)。続いて ATP と GTP を系内に添加すると大きな振動数変化が観察された (step 2)。その後、振動数が安定するのを待ってから 4 種類の NTP を添加すると、急激な振動数減少 (質量増加, step 3) の後に振動数上昇 (質量減少, step 4) が観察された。これは転写反応の再開により RNA が伸長したことによる質量増加と、その後 T7 RNA ポリメラーゼが DNA の 3' 末端まで到達し、RNA と T7 RNA ポリメラーゼが Run-off して DNA 上から抜けたことによる質量減少に伴う変化である。以上から、T7 RNA ポリメラーゼの転写反応の一連のステップ、結合、開始、伸長、解離過程を質量変化として観察することができ、振動数変化のカーブフィッティングから各過程の速度定数が算出できた。

2) 翻訳過程の動力学解析

DNA から転写された mRNA の塩基配列に従ってタンパク質が合成される過程を QCM の振動数変化から追跡した。具体的には下図に示すように、ストレプトアビジン結合ペプチド (SBP、赤色) と目的タンパク質 (緑色) とストップコドンをコードする mRNA を作製した。ストレプトアビジン固定化 QCM セルに翻訳に必要な因子 (3 種の開始因子、3 種の伸長因子、リボソーム、20 種のアミノ酸、tRNA、20 種のアミノアシル tRNA 合成酵素など) を入れ、これに mRNA を添加すると最初にリボソームに tRNA が結合した開始複合体が出来るがこの時点では振動数は変化しない (step ①)。開始複合体から翻訳が始まり SBP に続いて目的タンパク質が翻訳されるとストレプトアビジン固定化 QCM 上に結合し、振動数が減少 (リボソームの結合による質量増加) する (step②)。翻訳が最後まで進むと mRNA のストップコドン手前で翻訳が停止する。ここで終結因子 (RF1) を加えるとストップコドンに結合して tRNA とタンパク質間のエステル結合を切断するので、リボソームの脱離



により振動数は上昇 (質量減少) がおこる (step③)。

翻訳のシングルターンオーバーを質量変化として追跡できれば翻訳の素過程を解析できる。例えば、目的タンパク質のアミノ酸配列 (mRNA のコドン配列) を変えた時に翻訳速度が遅くなると step ②のカーブの傾きは小さくなることがわかった。また mRNA 上にレアコドンを導入しても翻訳速度が遅くなり step ②の傾きが小さくなった。翻訳速度が早すぎると生成したタンパク質のフォールディングが追いつかなくなり、翻訳が途中で止まることがわかった。

5. 今後の計画

転写過程の解析は終了したので、今後は翻訳過程の解析に集中する。具体的には、翻訳するタンパク質の種類と長さを変えたり、mRNA 上にレアコドンを入れたときの伸長速度の変化を定量化する予定である。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

- 1) S. Takahashi, H. Isobe, T. Ueda, and Y. Okahata, Direct Monitoring of Initiation Factor Dynamics through Formations of 30S and 70S Translation Initiation Complexes on a Quartz-crystal Microbalance, *Chem. Eur. J.*, in press (2013).
- 2) S. Takahashi, M. Iida, H. Furusawa, Y. Shimizu, T. Ueda, and Y. Okahata, Real-time Monitoring of Cell-free Translation on a Quartz-crystal Microbalance, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 9326-9332 (2009).
- 3) S. Takahashi, K. Tsuji, T. Ueda, and Y. Okahata, Traveling time of a translating ribosome along mRNA monitored directly on a quartz crystal microbalance, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 6793-6800 (2012).

を含めて原著論文は 19 報。

ホームページ等

<http://okahta-furusawa-lab.yz.yamagata-u.ac.jp>