

次世代 1 分子可視化技術で明らかになるタンパク質翻訳の仕組み

Protein Translation Mechanism Revealed by Next-Generation Single Molecule Technology

上 村 想 太 郎

Sotaro Uemura

スタンフォード大学医学部構造生物学科

現所属:理化学研究所オミックス基盤研究領域

要 旨 近年開発された Zero-Mode Waveguides 法と呼ばれる次世代 1 分子蛍光イメージング技術は従来の全反射型 1 分子蛍光イメージング法の問題点を克服した。我々はその技術を応用し、tRNA (転移 RNA) を蛍光標識することによってタンパク質翻訳系を 1 分子レベルで再現させ、その結果タンパク質翻訳過程を世界で初めて可視化することに成功した。さらにそのデータを解析することによって従来まで明らかにされてこなかった tRNA のリボソームへの結合・解離のタイミングを解明することができた。また、tRNA の蛍光標識の代わりに翻訳開始因子などを蛍光標識すると翻訳開始過程における翻訳因子の会合の様子を可視化することもできた。これらの結果が示しているように次世代 1 分子蛍光イメージング手法はあらゆる複雑な分子メカニズムを解明するのに最も適している。

キーワード: タンパク質翻訳, 1 分子計測, ゼロモード導波路, 翻訳初期, リボソーム

1. 研究背景

生命現象を正しく理解するためには顕微鏡技術は欠かすことができない技術である。特に蛍光顕微鏡の発展とカメラの高感度化が生命現象の直接観察に著しく貢献してきた。1 分子の蛍光の検出が可能になったことで 1995 年に溶液中で蛍光 ATP1 分子がミオシン 1 分子に結合・解離する様子が生きのまま観測¹⁾されるようになり、1 分子蛍光イメージング法は世界中に広まるようになった。この技術を確認する上で大きな問題点は観察したい分子に結合せずにブラウン運動している蛍光分子からくる背景光をどのように減らし、観察したい分子 1 個の蛍光のみを捉えるかであった。その問題に対する解決法は励起領域をガラス面に結合している分子の近傍のみに絞込むために励起光を全反射させ、それによって生み出される限定された励起領域を用いることだった¹⁾ (図 1)。

この技術によって分子メカニズムに迫る多くの結果を得ることができた。しかし、従来の 1 分子イメージング法では溶液中に存在する蛍光分子の濃度の限界はおおよそ数十 nM であり、それ以上濃度を濃くすると強い背景光の影響で観測したい分子の蛍光がはっきりと計測できなくなってしまふ。通常、細胞内では各因子の濃度は局所的に μM から mM の濃度範囲で存在しているため、nM 領域での 1 分子イメージングは生体環境からかけ離れていると言わざるを得なかった。さらなる問題点は“蛍光退色”と呼ばれる消光現象が計測を困難に

していたことである。蛍光退色は励起された励起エネルギー状態が不安定な別のエネルギー状態へと推移してしまい、基底状態に戻っても蛍光を発しない現象のことである。この状態推移は活性酸素が影響していることがわかっているため、通常蛍光退色をさけるために活性酸素を除去する反応系を溶液内に導入する。しかし、これらは蛍光寿命を数倍伸ばすにすぎず、根本的に退色問題を解決することはできなかった。

この 2 つの問題を解決したのが、近年開発された Zero Mode Waveguides (ZMW) と呼ばれる手法である²⁾。この手法はガラス表面に蒸着したアルミニウムに直径 100 nm 程の穴をあけ、この穴底に観測したい生体分子を特異的に直接固定する。励起光は穴底から垂直に導入させるが穴の大きさは励起光の波長よりも小さいため透過できず、極小励起領域を生み出す。その励起領域は従来の全反射型に比べて 1000 分の 1 以下になり、高濃度蛍光分子存在下での 1 分子イメージングが可能となった²⁾ (図 1)。高濃度蛍光分子存在下での計測が可能となった利点として生体内に近い条件での計測ができるようになるだけでなく、高濃度による分子への結合頻度が著しく上がるため、反応時間が圧倒的に短くなることが挙げられる。その結果、蛍光寿命に比べ十分短い反応時間を達成することによって、従来蛍光退色過程に埋もれていた生体分子の解離現象が明確に検出できるようになった。

この ZMW 手法は米国 Pacific Biosciences 社で開発された 1 分子 DNA シーケンサーによって大きく発展した。この原理を用いた 1 分子シーケンサーは PacBioRS としてすでに世界中で販売されており、他のシーケンサーでは実現不可能な長い塩基を非常に短い時間で読むことができる³⁾。

このようにすでに ZMW 法を利用した技術は応用され、世

〒 230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-22
TEL: 045-503-9259; FAX: 045-503-9216
E-mail: s-uemura@gsc.riken.jp
2012 年 9 月 5 日受付

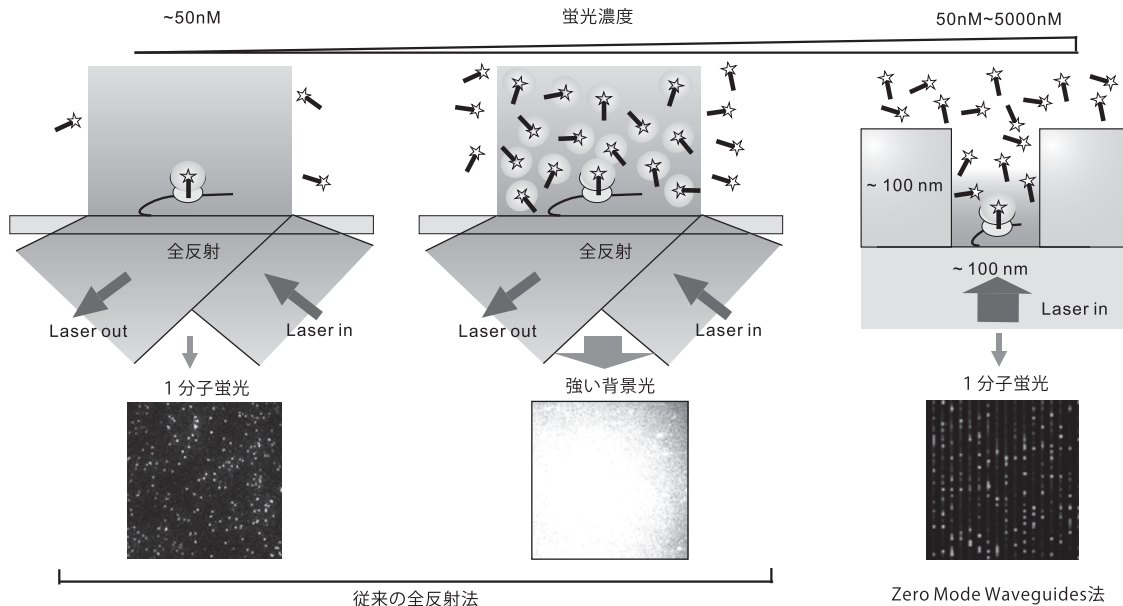


図1 従来の1分子全反射法(左, 中央図)とZero-Mode Waveguides法(右図). 蛍光濃度が薄い条件下では全反射照明法により1分子蛍光が観察可能であるが濃度が高くなると背景光が強くなるため1分子蛍光を識別するのが困難になる. 一方ZMW法では穴底に超極小の励起領域を発生させることができるため蛍光濃度が濃い条件下であっても1分子蛍光を観測することが可能となる. 穴のサイズは100 nmほどと可視光領域の波長より小さいため光は穴を透過できず励起領域を形成する.

界市場で使用されている. 我々はこの手法をDNA複製以外の生命現象であるタンパク質翻訳の可視化に世界で初めて応用した. リボソーム1分子を固定し, トランスファーRNA(tRNA)を蛍光染色することによってタンパク質翻訳を1分子で可視化し, その結果従来の1分子イメージング法では捉えることが困難であった翻訳メカニズムを解明することに成功した⁴⁾.

2. コドンレベルの1分子翻訳可視化

ZMW法で用いられるチップにはおよそ100 nm程度の穴がアレイ状に無数に広がっており, 数千個単位の分子の測定を一度に行うことができる. さらに穴底にはビオチン・アビジンによる特異結合で対象の分子を機能を損なわずに固定することができるため, 基本的にどのような生命現象でも高濃度条件下で反応を可視化することが可能である. 今回我々はタンパク質翻訳の可視化を試みた. まずはじめに我々はfMet-tRNA^{Met}をCy3で蛍光標識し, それをリボソーム初期複合体に結合させた後, mRNA末端のビオチンを介してZMWの底面に特異的に固定されるかどうかを確認した(図2a). 複合体の濃度を上昇させるとCy3の蛍光分子の密度も上昇した. また, 複合体をZMW基板へ導入する前にビオチン分子で表面の反応部位をブロックすると複合体を導入しても蛍光は観察されなかった(図2b). このことからリボソーム翻訳初期複合体はZMW基板の穴底に特異的に固定されることが証明された.

次に, 実際の翻訳過程を観察するために, Met開始コドンの後にUCAAACの配列を6回繰り返すようなビオチン化

mRNAを用意した(フェニルアラニン・リジンが6回繰り返すペプチドに翻訳される). このmRNAに結合するfMet-(Cy3)-tRNA^{Met}の蛍光を確認した後, 蛍光観察しながら200 nM Phe-(Cy5)-tRNA^{Phe}及び200 nM 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. 200 nMの濃度では通常全反射法では測定不可能な濃度領域である. 検出される蛍光シグナルはCy2(青), Cy3(緑)そしてCy5(赤)の各蛍光シグナルに分光して3色のシグナルそれぞれを同時に観察した(図3a).

翻訳因子を添加すると驚くべきことに我々はmRNA配列の各コ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1b). リボソームが固定されていない穴では蛍光tRNA分子の安定したシグナルがほとんど観測されなかったことから, この結果は世界で初めてリボソーム依存的なタンパク質の翻訳反応をコドンレベルで1分子可視化したことを示している. 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り, 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⁴⁾.

さらに興味深いことにストップコドン位置で種々のtRNAがランダムに結合, 解離(ストップコドンと適合しないため)を高速に繰り返す高速サンプリング現象が観測された⁴⁾. この現象は予期しないものであったが, リボソーム分子に対してtRNAの結合が最初に確率的に起こることを示しており, その後mRNAのコドンとtRNAのアンチコドンとの結合がマッチングしているかどうかによってリボソームA部位へとtRNAを受け入れるか, あるいは排出するかを判断していることがわかった. 面白いことにこの機能をうまく利用して

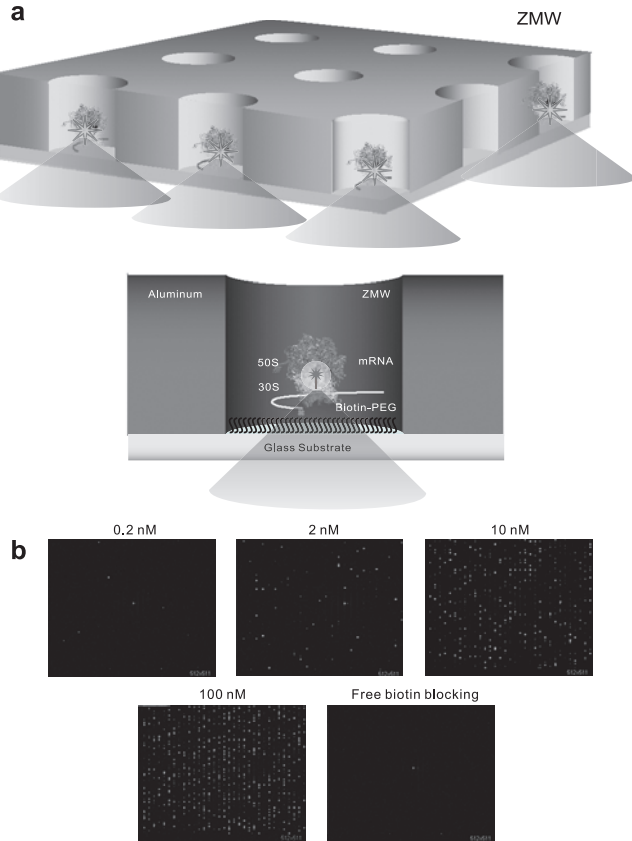


図2 リボソーム複合体のZMW基板への特異的結合の確認。a) mRNA・70S・Cy3標識したfMet-tRNA^{Met}の複合体をZMW基板へと導入後、Cy3の蛍光信号を観察する。各穴底から1分子ごとにCy3蛍光がそれぞれ観測される。b) 各複合体の濃度を上昇させると蛍光信号の密度が比例して高くなる。また、ビオチンで穴底のアビジンの結合部位を塞ぐと蛍光信号は観測できなくなる。このことから特異的な結合であることが示唆される。

いる抗生物質が存在する。アミドグリコシド抗生物質の中にはこのコドン・アンチコドンのマッチングによるtRNAの受け入れ判別を不確実なものにする機能を持つものもある。

次に、これらの翻訳反応中に実際にタンパク質を合成しているかどうかを調べるために、エリスロマイシン抗生物質(50Sサブユニットに結合しタンパク質合成を阻害する薬剤)を用いて翻訳反応がどの程度進むのかを調べた。その結果、エリスロマイシン抗生物質存在下では翻訳過程が途中で停止することが観察され実際に新生ペプチドの生成を阻害することがわかった。よって、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⁴⁾。

3. tRNA分子数の時間変化とtRNA解離モデル

リボソームにはA, P, Eと呼ばれる3つのtRNA結合部位が存在する。この結合部位に対してtRNAはA→P→Eの順番でリボソーム内を移動し、解離することが知られているが、どのタイミングでどの順番で何分子が結合するのかは現在までよくわかっていなかった。

特にE部位に結合しているtRNAはA部位へのtRNAの結合を待って解離するのか、あるいはP部位からE部位へとトランスロケーションを起こすとただちに解離するのか、別の言い方をするとtRNAは同時に3分子結合することがあるのかそれとも2分子以上は結合しないのかについては議論がなされていたが明確な証明は現在までなされなかった。tRNAがリボソームに結合するのはアミノ酸を受け渡し、新生ペプチドを合成するためであり、そのために最も効率の良い受け渡しのメカニズムがそこには存在するはずである。

そこで我々は得られた翻訳中のtRNA蛍光トレースからtRNAの結合数を調べることによってこの謎に迫った。tRNA蛍光トレースをよく観察すると(図3b)、各蛍光パルスが他のパルスと重なっている瞬間がある。この瞬間は実は2分子のtRNAが同時にリボソームに結合している瞬間を示しており、結合数は2となる。一方、重なっていない時間は結合数は1で蛍光パルスが存在していない時間は結合数は0である。このように各蛍光トレースのデータからそれぞれ結合数の時間変化をプロットすることが可能となった。これらのデータを元に各コドン位置のtRNAの結合をt=0とし、それぞれ結合数変化の統計処理をしたデータを図4aに示した。このデータが示しているのはtRNAが結合すると2分子からスタートし、その後1分子へと変化する傾向が見られた。この2→1の変化はtRNAの結合以前にリボソーム内で待っていたtRNAが解離をしたことを示している(退色時間に比べて十分に短い時間変化であるため退色の影響はほとんどない)。

また、トランスロケーションを引き起こすEF-G濃度を上昇させると、この2分子結合状態での待ち時間が短くなることもわかった。この結果はP部位にいたtRNAがE部位に移動するとすぐに解離することを示唆する。さらにそのモデルをよりはっきりと証明するために、EF-Gのリボソームからの解離を抑制してtRNAのA部位への結合を阻害するフシジン酸の効果を調べた。フシジン酸存在下においても2分子待ち時間は変化しなかったことからE部位tRNAは次のtRNAの結合を待たずに直ちに解離するモデルが正しいことが証明された(図4b)。従って我々の得た結論は、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ものである⁴⁾。このように新しいZMW法を用いて単なる可視化だけでなく、分子間の結合解離のタイミングを解析することは分子メカニズムをさらに深く掘り下げることに大きく貢献する。

4. 翻訳初期因子の結合解離経路

タンパク質翻訳の伸長過程は可視化することができたが、翻訳反応で特に重要な過程は翻訳開始過程である。なぜなら正しいmRNA位置において正確に翻訳反応をスタートさせなければならないからである。仮に一塩基分ずれて反応が始まってしまうと(フレームシフトと呼ぶ)全く異なるタンパク質を生成してしまい、それらは結果的に細胞毒性を引き起

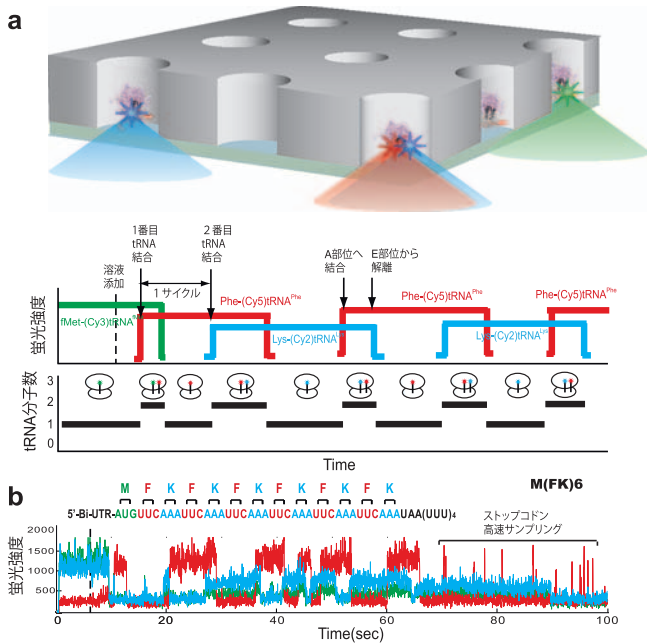


図3 a, Zero-Mode waveguides 法による1分子翻訳可視化の実験系(上). 各穴に1分子のリボソームを固定し, 染色し分けた tRNA を高濃度条件下で流し込む. それぞれ Cy2, Cy3, Cy5 を励起する 488 nm, 532 nm, 642 nm の3種類のレーザーで同時励起している. 予想される蛍光トレース(下). 蛍光シグナルの重複は tRNA が2分子同時にリボソームに結合していることを示している. b, 人工的に合成した Phe と Lys の繰り返し配列を持つ mRNA に対してそれぞれ Cy5 標識アミノアシル tRNA^{Phe} と Cy2 標識アミノアシル tRNA^{Lys} が交互に結合している様子が観測された. ストップコドン高速サンプリングとは数 10 ミリ秒の間に蛍光シグナルが観測される現象である.

こすことになる. 従っていかに正確に翻訳初期複合体を形成するかはとても重要であり, いくつかの翻訳初期因子がその反応に関与している. 翻訳初期因子は Initiation Factor と呼ばれ, IF1, IF2, IF3 が関与していることがわかっている. この中でも特に GTP 加水分解酵素である IF2 は必須である. 今回我々は翻訳初期複合体を形成する要素である mRNA, 開始 tRNA (fMet-tRNA^{fMet}), Phe-tRNA^{Phe}, 30S, 50S, IF2 に着目し, これらの要素がどのような順番でどのようなタイミングで複合体を形成するのかその過程の可視化を試みた. まず mRNA・初期 (Cy3)tRNA・30S の複合体を作成した. 次にこれらの複合体に対して Cy5-IF2(GTP), Cy3.5-50S, そして Phe-tRNA^{Phe} を混ぜた溶液を導入した. すると導入してまもなく Cy5 の蛍光シグナルが観測された後, 50S の結合が起きた. IF2 が解離した (Cy5 の蛍光シグナルが消える) 直後に Phe-tRNA^{Phe} の結合が観測され, その後は 50S と Phe-tRNA^{Phe} の安定した結合が観測された (図 4c).

これらの結果は IF2 が 50S の結合を促進させ, 安定した 70S 複合体が形成されると IF2 が解離し, Phe-tRNA^{Phe} の結合が続いて起こることを示している. すなわち何段階もの複合体の形成ステップを踏むことが間違いを起こさずに正確な初期複合体の形成に大きく貢献していることがわかった⁵⁾.

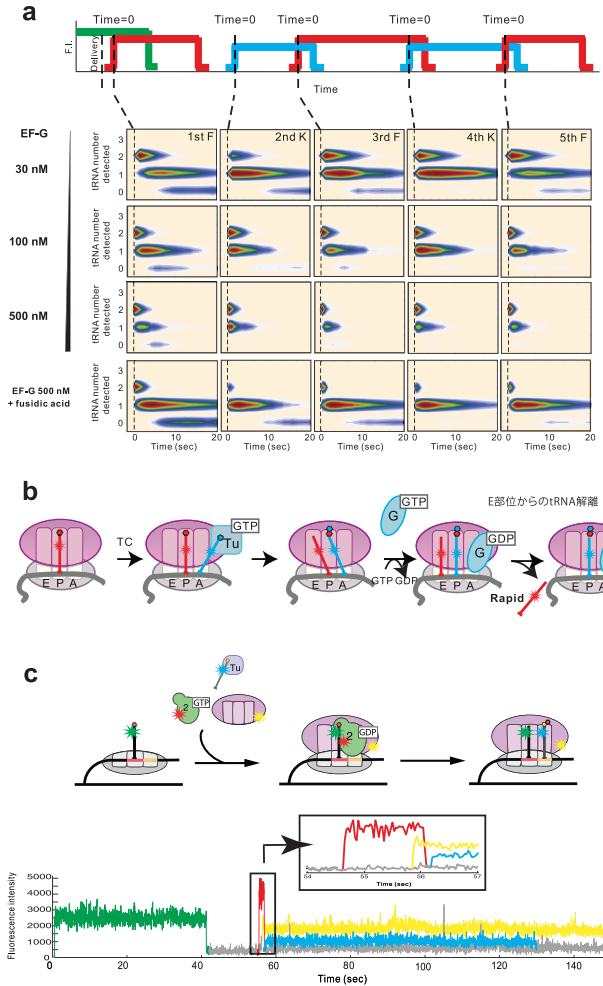


図4 結合数の時間変化の統計データ (a), 明らかになった翻訳モデル (b), 翻訳初期複合体形成過程の4色同時直接可視化 (c). a) 各蛍光トレースデータのパルスごとの重なりの有無を調べることによって結合数の変化をプロットすることができる. 各コドン位置に対して tRNA が結合した瞬間を t=0 とし, 各結合数プロットをトレースごとに統計処理する. すると結合数はほとんどが 2 → 1 へと変化を起こす. これらの結合数変化の時間は EF-G 濃度に強く依存し, 2 分子結合時間はフジジン酸の有無で変化がなかった. b) これらの結果は前の tRNA が P 部位から E 部位へとトランスロケーションを起こすと次の tRNA の結合に依存せず, 直ちに解離することを示している. c) mRNA・初期 (Cy3)tRNA・30S の複合体を作成し, Cy5-IF2(GTP), Cy3.5-50S, そして Phe-tRNA^{Phe} を混ぜた溶液を導入した (上図). すると導入してまもなく Cy5 の蛍光シグナル (赤) が観測された後, 50S の結合 (黄) が起きた. Cy5 の蛍光シグナルが消える直後に Phe-tRNA^{Phe} の結合 (青) が観測され, その後は 50S と Phe-tRNA^{Phe} の安定した結合が観測された (下図).

5. まとめ

今回我々は世界で初めて1分子のタンパク質翻訳過程を高濃度 tRNA 存在下で可視化することに成功した. また, 可視化だけでなく tRNA の結合解離のメカニズムや翻訳初期過程の一部を解明することができた. これらは1分子計測を発展させた ZMW 法によって明らかにされたものである. 今後は

メカニズムがほとんど理解されていない複雑な真核翻訳システムへの応用が期待される。

さらには抗生物質の翻訳阻害メカニズムをより広範囲に明らかにすることが求められる。

この研究は基本的に DNA シーケンサーで開発された技術をタンパク質翻訳系に適用したものである。DNA ポリメラーゼによる複製反応の可視化がうまくいくのであれば同様にリボソームによる翻訳反応の可視化もうまくいくはずであるという強い自信があった。そしてその結果、この手法が DNA シーケンサー反応だけでなくタンパク質翻訳をはじめとするあらゆる生体反応系に応用可能であることを示すことができた。この手法の強みは生体機能を細胞内条件に近い蛍光標識因子の濃度でリアルタイムに可視化することであり、従来までの手法では得られなかったダイナミクス現象を可視化できることにある。今後、研究対象をウイルス増殖、RNA 干渉、免疫システム、薬剤反応の可視化などあらゆる生体反応に幅広く応用していきたい。

謝 辞

本実験は全て米国 Pacific Biosciences 社で行った。Joseph Puglisi 教授、Colin Aitken 氏 (Stanford)、Jonas Korlack 氏、Benjamin Flusberg 氏、Stephen Turner 氏 (Pacific Biosciences 社) に感謝する。

文 献

- 1) Funatsu, T., Harada, Y., Tokunaga, M., Saito, K. and Yanagida, T.: *Nature*, **374**, 555–559 (1995)
- 2) Levene, M., Korlach, J., Turner, S.W., Foquet, M., Craighead, H.G. and Webb, W.W.: *Science*, **299**, 682–686 (2003)
- 3) Eid, J. *et al.*: *Science*, **323**, 133–138 (2009)
- 4) Uemura, S., Aitken, C.E., Korlach, J., Flusberg, B.A., Turner, S.W. and Puglisi, J.D.: *Nature*, **464**, 1012–1017 (2010)
- 5) Tsai, A., Petrov, A., Marshall, R.A., Korlach, J., Uemura, S. and Puglisi, J.D.: *Nature*, **487**, 390–393 (2012)