

「リボゾーム工学」の構築と生物の潜在能力開発

融合研究機関：(株)食品総合研究所

理化学研究所

(研究総括責任者：佐々木 堯)

I 研究の全体計画

1. 研究の趣旨

本研究は、食品総合研究所及び理化学研究所の両研究機関が発見した幾つかの新知見をもとに、全生物共有の細胞器であるリボゾームに隠された未知の機能の探索・解明を進め、リボゾーム改変による潜在機能の発現機構を解明する。それにより生物がもつ潜在能力の開発及び制御、並びに、リボゾームを合目的的に改造する新しい技術を開発する。さらに、得られた改造技術を駆使して、高性能な無細胞系タンパク質合成システムを構築し、細胞系と無細胞系両面にわたる新しい技術「リボゾーム工学」の構築を目的とする。

これにより、タンパク質、抗生物質、生理活性物質生産能など、生物の有する潜在能力を自在に発揮させ、かつ構築しつつある高性能無細胞系タンパク質合成システムを活用することにより、それら新規有用物質の大量生産が可能になる。したがって、医薬・農薬・環境・食料分野へ多大な貢献が期待される。

食品総合研究所が開発しつつあるリボゾーム改変による潜在能力の発現を、「リボゾーム工学」という普遍的な手法として確立していくためには、理化学研究所が得意とするリボゾームの構造解析並びに無細胞系タンパク質合成システムを活用したリボゾーム改変の生化学的解析が重要である。逆に、理化学研究所が目指している高性能無細胞系タンパク質合成システムを確立するためには、食品総合研究所が開発しつつある特異機能を付与した改造型リボゾームを使用することが重要である。

本課題は、3つのサブテーマから成る。サブテーマ1では、微生物のリボゾームに内在する未知の機能を探索・解明する。サブテーマ2では、最新鋭の機器を利用して、X線解析、NMR解析等による三次元構造解析を行い、リボゾームの構造と機能の関係を明らかにする。サブテーマ3では、リボゾームを合目的的に改造する技術を確立するとともに、タンパク質、抗生物質、生理活性物質の生産能など、生物のもつ広範な潜在能力を開発する。さらに、それら有用物質を無細胞系で効率よく生産できるシステムの構築を行う。

最終的な研究目標として、リボゾーム機能の解明と改変による生物の潜在機能の開発及び制御を実用レベルにまで

高めることである。

2. 開放的融合研究の概要

【1】研究の概要

1. 微生物のリボゾーム機能の解明

潜在能力発現に関わるリボゾームタンパク質の決定、変異を導入したリボゾームタンパク質とその機能変化、未知リボゾームタンパク質の探索と機能解明など、微生物のリボゾームに内在する未知の機能を探索・解明するとともに、翻訳及び翻訳制御機構の解明を行って合目的的に改変するための基礎的知見を得る。

(1) リボゾームタンパク質の機能解明

リボゾームタンパク質 S12 は翻訳精度調節機能に中心的な役割を果たすことが知られている。これまでに、S12 の特定の部位に生じた変異(ストレプトマイシン耐性を付与)が微生物の二次代謝能(抗生物質生産能)を活性化することを明らかにしてきた。しかし、S12 を始めとするリボゾーム構成因子が果たすリボゾーム機能における役割と変異で誘起される潜在機能発現との関係は全く未解明である。そこで、多様な二次代謝で知られる放線菌及びゲノム解読が完了し、遺伝子工学的手法の適用が容易な枯草菌を用いて解析する。

(2) リボゾーム関連機能の解明

微生物リボゾーム機能には、タンパク質合成能に加え、会合タンパク質 RelA による緊縮制御因子 ppGpp 合成があり、二次代謝誘発に必須であることが明らかにされている。二次代謝誘発に関与する ppGpp の作用機構及び合成制御機構を分子生物学的手法により解明し、有用二次代謝物質の生産性向上への寄与を目指すとともに、さらに未知のリボゾーム会合タンパク質の探索を行い、生物機能との関連性を解析する。

2. リボゾームの構造と機能の解明

リボゾームの機能に関する知見を構造生物学的解析により再編する。巨大な RNA・タンパク質複合体であるリボゾームの機能は、多段階で、しかも空間的に離れた場所で、連続的に発現するので、その全容を解明するためには、様々な複合体の構造解析を行う必要がある。そして、その構造解析の結果をもとに、これまでの機能解析のデータを再検討することによって、リボゾームの全体像を明らかにする。

(1) リボゾーム及びリボゾーム関連因子の構造解析

より質の高い(解像度の高い)リボゾームの結晶を調製すると同時に、機能解明のために有用な複合体や、リボゾームの構造をより安定化するような複合体を調製することを

目的に、Two-hybrid 法によるスクリーニングと実際のリボゾームに結合しているタンパク質の LC/MS による網羅的解析を行う。

(2) 構造解析に基づくリボゾーム機能の改変

リボゾームの機能に何らかの影響を与える、タンパク質や RNA のリボゾーム複合体を解析することによって、作用部位や作用機序を明らかにする。ここから得られた成果は、リボゾームの機能改変に応用する。

3. リボゾーム工学の構築と潜在能力の開発

リボゾームを合目的的に改変する技術（リボゾーム工学として提唱）を確立することによって、タンパク質、抗生物質、生理活性物質などの新たな物質生産系の構築や効率的な生物資源の活用法の開発を行う。

(1) 改造型リボゾーム活用システムの構築

リボゾームの有する未知機能を探索・究明して、それを応用（工学）のレベルにまで発展させるには、応用を直視した観点からの研究アプローチが必須である。すなわち基礎と応用の中間に位置付けられる研究が要求される。そこで、リボゾームを合目的的に改変し、微生物の持つ広範な潜在能力を開発するとともに、作物育種など植物へのリボゾーム工学の応用技術の開発を行う。とりわけ、リボゾームの構造と機能に基づいた無細胞系における高生産能システムの構築を行う。

(2) リボゾーム工学によるタンパク質生産システムの構築

試験管内でタンパク質合成反応を行う無細胞タンパク質合成系は、系の改変が容易で、目的タンパク質の発現に系を特化することが可能であることから、タンパク質生産系として高い潜在能力を備えていると考えられる。そのタンパク質生産能力は、反応条件の最適化や反応方法の改良などにより、近年飛躍的に向上し、生細胞を用いるタンパク質生産系に匹敵しつつある。しかしながら、リボゾームを始めとする系内の各因子の能力が、最大限に発揮された場合に想定される生産能力と比較すれば、現状の生産能力は依然として高くはないと思われる。言い換えれば、無細胞系の生産能力には、向上の余地が十分に残されているということである。そこで、本プロジェクトにより得られた、リボゾームやリボゾーム関連因子に関する様々な知見を活用する一方、成分の添加・除去が自由に行えるという無細胞系ならではの特性を生かして、反応系内のタンパク質合成に関与する諸因子を、質的、量的に変化させることにより、生産性の高い系を構築していくとともに、無細胞系をタンパク質生産系として活用していくための研究開発を行う。

【2】 融合への取り組みの概要

1. 研究総括責任者の指導性

研究総括責任者は、すでにこれまでに、推進委員会の意見や評価委員会の評価結果を参考に、研究方向、研究課題、予算、人員構成などの見直しを行うとともに、研究の重点化を図ってきた。また、融合研究グループ会議を開催し、

研究推進のために開放的で効果的な弾力的研究運営に努めてきた。さらに、研究成果等の外部に対する広報では、これまでにホームページの開設、ニュースレター、パンフレット等の発行や国際シンポジウムを開催するなど、国内外に最新の情報を発信するとともに、外部研究グループとの情報交換を通じて研究の活性化に努めてきた。

平成 14 年度は、前年度までに開催してきた推進委員会及び評価委員会を引き続き開催するとともに、融合研究グループ会議では、両研究グループの研究進捗状況を把握し、研究グループ間の連携、融合をさらに強化を図っていく予定である。研究成果等の外部への広報では、本年度が研究期間の最終年度であることから毎年実施してきた国際シンポジウムを取りやめ、これまでの研究成果を公表する公開研究成果発表会を開催し、国内外に研究成果の最新情報を発信する予定である。さらに、前年度までに実施してきた、ホームページの更新や「リボゾームニュースレター」の発行を引き続き行う予定である。

2. サブテーマ間の連携

本課題は、3つのサブテーマから構成されており、サブテーマ毎に研究グループが組織され、各研究グループはグループリーダーの指導のもとに、グループ内・グループ間のセミナー、勉強会等での討議を踏まえ融合研究目標の達成に努めている。グループ間の連携については、研究総括責任者が主宰する融合研究グループ会議が開催され、各研究グループの研究計画・成果の検討を行うとともに、中間成果検討会を開催し研究の進捗状況を把握し、グループ（サブテーマ）間の連携、融合を図っている。

平成 14 年度は、これまで同様に融合研究グループ会議を中心に各研究グループ間の連携をさらに充実させ、研究成果の目標達成に向けて尚一層の研究推進を図る。さらに、本年度は研究期間の最終年度であるため、各研究グループ合同の最終成果検討会を開催し、研究成果の取りまとめ、公表に努める。

3. 融合への取り組み

融合研究を円滑に推進するにあたり、推進委員会で両研究所間での合意事項が決定され、研究所間の協力体制を確立するとともに、推進委員会及び評価委員会の意見や評価等によるコメントを参考に、研究総括責任者は適切な措置を講じ、開放的で弾力的な運営がなされてきた。具体的には、研究相談役としてリボゾーム専門家で構成されるアドバイザー制の導入や、サブテーマ毎に研究グループを組織し、研究グループ内にチーム制を導入し研究を推進している。研究員の交流では両研究所の研究員受け入れ制度を活用して、相互に研究員の交流が行われている。研究施設についても研究員の交流に伴い施設の相互利用が図られている。評価委員会の評価結果を参考に、研究総括責任者は予算の重点配分や研究課題の変更を行ってきた。さらに、融合研究推進事務局を設置し、融合研究推進上の研究事務、

所内事務運営、両研究所間の連絡調整並びに海外事務連絡が行われ、研究者側の負担が軽減され研究に専念できる体制が確立している。

平成14年度は、これまでの方針に従い尚一層融合研究の円滑な推進にあたる。

4. 融合研究推進委員会における支援の取り組み

融合研究機関である両研究所の代表者によって構成されている推進委員会は、融合研究を円滑に推進するために、随時開催し、必要事項を定め、全面的に本研究を支援している。具体的には、推進委員会によって、研究総括責任者の指名、融合研究マネージメントのオフィスのスペース及

び人員の配置、併任等の人事措置に特別の配慮、大型装置を優先的に使用できる配慮、研究スペースの優先的な割り当て等の決定を行い、両研究所はそれに基づいて支援を実行している。特に食品総合研究所では、推進委員会の協力により融合関係の研究者が一同に会して共同研究ができる「複合領域研究センター」が新設され、各研究グループの所内及び所間融合研究が一層開放的に円滑に推進されるようになった。

平成14年度も、引き続き推進委員会を開催し、融合研究を円滑に推進するために、全面的に支援していくこととなっている。

3. 年次計画

研究項目	10年度	11年度	12年度	13年度	14年度
1. 微生物のリボゾーム機能の解明					
(1) リボゾームタンパク質の機能解明	← リボゾームタンパク質の機能解明 →				
(2) リボゾーム関連機能の解明	← リボゾーム関連機能の解明 →				
※2. 動物細胞の翻訳制御とガン細胞の細胞死回避のメカニズム					
(1) 動物細胞におけるリボゾームタンパク質の機能解明	← 動物細胞におけるリボゾームタンパク質の機能解明 →				
(2) ガン細胞の細胞死回避のメカニズムとタンパク修飾	← ガン細胞の細胞死回避のメカニズムとタンパク修飾 →				
(3) リボゾーム変異とガン関連遺伝子の発現制御	← リボゾーム変異とガン関連遺伝子の発現制御 →				
2. リボゾームの構造と機能の解明					
(1) リボゾーム及びリボゾーム関連因子の構造解析	← リボゾーム及びリボゾーム関連因子の構造解析 →				
(2) 構造解析に基づくリボゾーム機能の改変	← 構造解析に基づくリボゾーム機能の改変 →				
※3. リボゾーム工学の構築と潜在能力の開発					
(1) 改造型リボゾームの構築	← 改造型リボゾームの構築 →				
(2) 改造型リボゾームの機能解析	← 改造型リボゾームの機能解析 →				
3. リボゾーム工学の構築と潜在能力の開発					
(1) 改造型リボゾーム活用システムの構築	← 改造型リボゾーム活用システムの構築 →				
(2) リボゾーム工学によるタンパク質生産システムの構築	← リボゾーム工学によるタンパク質生産システムの構築 →				
所要経費(合計)	459百万円	371百万円	373百万円	350百万円	297百万円

※ 研究評価小委員会による中間評価の指摘を踏まえ、後期2年間においては、動物リボゾーム関連のサブテーマ2及びサブテーマ3の課題を、リボゾーム本来の機能であるタンパク質合成系の改良を目指した課題に変更し、融合研究の明確化及びリボゾーム工学の確立に向けての強化をはかった。

II 平成14年度における実施体制

研究総括責任者：佐々木 堯（元農林水産省食品総合研究所長）

研 究 項 目	担 当 機 関	研究担当者
1. 微生物のリボゾーム機能の解明 (1) リボゾームタンパク質の機能解明 (2) リボゾーム関連機能の解明	独立行政法人食品総合研究所 食品総合研究所 食品総合研究所	○越 智 幸 三 岡 本 晋 伊 藤 康 博
2. リボゾームの構造と機能の解明 (1) リボゾーム及びリボゾーム関連因子の構造解析 (2) 構造解析に基づくリボゾーム機能の改変	理化学研究所 理化学研究所 理化学研究所	○横 山 茂 之 竹 本 千 重 白 水 美 香 子
3. リボゾーム工学の構築と潜在能力の開発 (1) 改造型リボゾーム活用システムの構築 (2) リボゾーム工学によるタンパク質生産システムの構築	食品総合研究所 理化学研究所 食品総合研究所 理化学研究所	○越 智 幸 三 ○横 山 茂 之 岡 本 仁 子 木 川 隆 則

（注：○はサブテーマ責任者）

III 融合研究評価委員会・融合研究推進委員会

(1) 融合研究評価委員会

委 員	所 属
○福 井 俊 郎	大阪大学 名誉教授
新 井 賢 一	東京大学 医科学研究所 所長
別 府 輝 彦	日本大学 生物資源科学部生命科学研究所 所長
三 浦 謹 一 郎	東京大学 名誉教授
山 根 國 男	筑波大学 生物科学系 教授
渡 辺 公 綱	東京大学 大学院新領域創成科学研究科 教授
Alexander S. Spirin	ロシア ロシア科学院タンパク研究所 所長
Mervyn J. Bibb	イギリス 前ジョンイネス研究所 教授

（注：○は研究評価委員長）

(2) 融合研究推進委員会

委 員	所 属
井 上 頼 直	理化学研究所 理事
小 林 幹 彦	食品総合研究所 生物機能開発部長
鈴 木 建 夫	食品総合研究所 理事長
花 岡 文 雄	理化学研究所 細胞生理学研究室 主任研究員
春 見 隆 文	食品総合研究所 企画調整部長

（注：○は研究推進委員長）