

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K05421

研究課題名(和文) 酸素環境を感知し、代謝制御につなげる翻訳制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Study on oxygen-dependent translational control for metabolic regulation

研究代表者

松山 晃久 (Matsuyama, Akihisa)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・専任研究員

研究者番号：90399444

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ハイプシン化と呼ばれる特殊な翻訳後修飾を受ける唯一のタンパク質eIF5Aは、特定のアミノ酸配列を有するタンパク質の翻訳を促進する必須タンパク質である。ハイプシン化修飾は二段階の反応で起こり、酵母では二段階目の反応(デオキシハイプシン残基の水酸化)は生育に必須ではないが、周囲の酸素濃度のセンサーとして機能すると推測される。

本研究では非標識プロテオミクス解析により、ハイプシン化不全を示すmmd1遺伝子破壊株で発現レベルが低下するタンパク質をスクリーニングした結果、30タンパク質余りが同定され、eIF5Aのハイプシン残基の水酸化がこれらのタンパク質の翻訳に関与していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

スベルミンやスベルミジン等のポリアミンは、老化に伴って細胞内濃度が減少する一方、癌細胞では高濃度で存在することが知られており、健康寿命や癌との関連性が示唆されている。eIF5Aはスベルミジンを基質として、その活性に必須なハイプシン化修飾を受ける唯一のタンパク質であり、癌の転移などにも重要であることから、老化や癌の研究において重要な研究対象となっている。これまでの研究はeIF5Aそのもの、あるいはハイプシン化の一段階目の反応に注目したものであり、本研究では二段階目の水酸化反応により制御を受けるタンパク質を同定したことから、eIF5Aの機能の全容を明らかにする手掛かりとなると考えられる。

研究成果の概要(英文)：eIF5A is an essential protein that promotes the translation of proteins with specific amino acid sequences. eIF5A undergoes a specific post-translational modification called hypusination. This modification occurs in a two-step reaction, and in yeast, the second step (hydroxylation of deoxyhypusine) is not essential for growth, but is postulated to function as a sensor of oxygen concentration.

In this study, non-labeled proteomics was used to screen for proteins whose expression levels are reduced in the mmd1 disruptant showing defective hypusination, and more than 30 proteins were identified, indicating that hydroxylation of the eIF5A hypusine residue is involved in the translation of these proteins.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：翻訳 翻訳後修飾

## 1. 研究開始当初の背景

翻訳伸長因子である eIF5A (eukaryotic translation initiation factor 5A) はハイブシン化という特殊な翻訳後修飾を受ける唯一のタンパク質である。もともとは翻訳のペプチド結合形成のモデルアッセイであるメチオニル-ピューロマイシンアッセイにおいて活性を示すことから翻訳開始因子と考えられていたが、その後の研究で、連続したプロリンをコードする配列など、リボソームが翻訳しづらい配列の翻訳を促進する役割を担うことが明らかにされている。しかし、eIF5A による制御は、必ずしも配列に依存しておらず、どのようなタンパク質が eIF5A による翻訳制御を受けているのかについては配列から判断するのは不可能であり、その翻訳制御のメカニズムについては不明な点が多く残されている。

ハイブシン化は、デオキシハイブシン合成酵素 (DHS: Deoxyhypusine synthetase) がスベルミジンのアミノブチル基をリジンのアミノ基に転移して生じるデオキシハイブシン残基に対し、デオキシハイブシン水酸化酵素 (DOHH: Deoxyhypusine Hydroxylase) が水酸基を付加して完了する二段階の翻訳後修飾である。eIF5A は生育に必須のタンパク質であるが、eIF5A のハイブシン化も生育に必須であり、ハイブシン化の一段階目の修飾を担う DHS は必須タンパク質である。したがって、この修飾が eIF5A の機能にとって非常に重要であると考えられる。DOHH は高等生物では必須であるが、酵母ではデオキシハイブシン基の水酸化がない状態でも致死にはならない。しかし、分裂酵母の DOHH をコードする *mmd1* 遺伝子の変異体は、ミトコンドリアの凝集や好気呼吸活性の低下など、ミトコンドリアに関連したプロセスに異常を示すことが知られている。eIF5A の機能から考えると、*mmd1* 変異株ではミトコンドリアの機能に関連するタンパク質の翻訳が影響を受け、その結果、ミトコンドリア関連の表現型が生じていることが予想される。

研究代表者らは、これまで eIF5A によるタンパク質の翻訳制御を解明する研究の過程で、分裂酵母の全遺伝子ライブラリーを用いて、*mmd1* 遺伝子破壊株において発現レベルに影響を受けるタンパク質の網羅的スクリーニングを行っていたが、その結果、呼吸鎖複合体など、いくつかのミトコンドリアの好気呼吸関連タンパク質が *mmd1* 遺伝子破壊株で特異的に減少することを見出していた。しかし、これらのタンパク質のアミノ酸配列中には、eIF5A が翻訳に関わるとされる連続したプロリン等のアミノ酸配列がほとんど含まれておらず、eIF5A がどのようにして特定のタンパク質の翻訳だけを選択的に制御しているのかについては大きな謎として残っていた。また、DHS の遺伝子破壊株と DOHH の遺伝子破壊株との表現型の違いから、未修飾の eIF5A とデオキシハイブシン化された中間体 eIF5A はそれぞれ異なるグループのタンパク質の翻訳を制御しているのではないかという仮説を立てたが、eIF5A による翻訳制御に関しては、野生株と eIF5A の条件特異的変異株との間の比較、すなわち、eIF5A そのものを欠失した場合に何が起こるのかに着目した研究がほとんどであり、eIF5A の修飾状態の違いに着目して翻訳制御を解析している例はほとんどない。特に、ハイブシン化の二段階目の反応であるデオキシハイブシン残基の水酸化に欠損がある場合に翻訳にどのような影響が起こるのかについては極めて知見が乏しい状況であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、DHS と DOHH との遺伝子破壊株の表現型の違いに着目し、特にこれまであまり注目されていない、ハイプシン化の二段階目の反応に焦点を当て、eIF5A による翻訳制御のメカニズムを明らかにするための研究を行うことにした。特に、これは二段階目の水酸化の反応が起こらなくても生育可能であるという酵母の特徴を利用できるという点が高等生物にはない利点である。

本研究では、まずデオキシハイプシンの水酸化が起こらない *mmd1* 変異株を中心に、ハイプシン化の一段階目の反応を触媒する DHS の条件特異的変異株、野生株との比較により、ハイプシンの水酸基が欠失することでタンパク質レベルに影響を受けるタンパク質を同定し、そこから eIF5A のハイプシン化修飾の役割を明らかにすることを目指した。

また、eIF5A はアセチル化を受けることも分かっているが、その役割については細胞内局在に関連した研究以外ほとんど未解明である。これまでの研究から、eIF5A のハイプシン化に欠損があるとアセチル化が上昇するということがわかっており、ハイプシン化とアセチル化の間にも何らかの制御関係があると考えられることから、ハイプシン化の機能を解析する上で、アセチル化修飾との関連性も考慮にいれて解析を行い、eIF5A のハイプシン化、およびアセチル化が翻訳制御においてどのような役割を担っているのかを明らかにすることを目指した。

### 3 . 研究の方法

分裂酵母の DOHH をコードする *mmd1* の遺伝子破壊株は生育可能であることから、そのまま *mmd1* 遺伝子破壊株を利用できる。しかし、DHS をコードする *dhs1* 遺伝子は生育に必須であることから、条件特異的に活性を不活化できるような株を作製する必要がある。このため、*dhs1* はオーキシン依存的にタンパク質分解を誘導する実験系である AID タグを利用し、不活化することにした。また、eIF5A タンパク質そのものの制御を受けるタンパク質の解析も行うため、チアミンの存在下で転写を抑制可能な *nmt1* プロモーターで発現制御を行うことにした。これらの株を用い、リボソームプロファイリング解析によってどのような配列の翻訳に eIF5A が関与しているのかを明らかにすることを目指した。リボソームプロファイリング解析は、リボソームに結合している mRNA を抽出・精製し、次世代シーケンサーで解析することで、mRNA のどの領域にどれだけリボソームが存在するのかをコドンレベルで網羅的かつ定量的に解析する方法である。すなわち、eIF5A に何らかの欠損があれば、リボソームプロファイリング解析では、タンパク質の翻訳効率の変化と共に、eIF5A の機能を必要とする配列について、リボソームが一時停止を示す配列として検出される。

### 4 . 研究成果

DHS を条件特異的に不活化するために、AID を用いてオーキシン依存的なノックダウン系の作製を試みたが、他のタンパク質では AID の実験系そのものは機能したものの、*dhs1* 遺伝子に様々な AID タグを融合してノックダウンを試しても、特に生育に影響を示す株は見出せなかった。また、*nmt1* プロモーターを用いたシャットオフ株の作製も行い、こちらもある程度の生育速度の低下は観察されたが、*dhs1* 遺伝子の機能が完全に抑制された株は作製できなかった。そこで、*dhs1* についてはさらに PCR によりランダムに変異を導入す

ることにより、温度感受性変異株も作製した。この株に関しては制限温度では完全に生育が阻害され、*dhs1* 遺伝子を不活化できることがわかったが、許容温度においてもやや生育不全を示し、eIF5A のアセチル化も亢進していたことから、活性がやや低下していると考えられ、解析は *mmd1* 遺伝子破壊株を中心に行った。リボソームプロファイリング解析を行った結果、*mmd1* 遺伝子の欠失により翻訳効率が低下するタンパク質として、転写因子 Fil1、ATPase のサブユニット Atp2 やサイクリン様タンパク質 Clg1 などにおいて、野生株と比較して統計的に有意に翻訳効率の変化が見られた。これらのタンパク質に関しては、それぞれをコードするゲノム上の遺伝子に直接タグを融合し、ウェスタンブロットングによる確認を試みたが、タンパク質の発現量の問題から、検出が困難なタンパク質が多かった。その中でも Atp2 に関しては、*mmd1* 依存的にタンパク質レベルの変化が見られ、Atp2 が eIF5A のハイプシン化に依存した翻訳制御を受けていることが示唆された。*mmd1* 変異株は好気呼吸活性低下の表現型を示すことから、Atp2 がその表現型の一因を担っていることが推測される。

一方、このような研究を遂行する上で、リボソームプロファイリング解析が抱える問題点に気づいた。本研究では、翻訳に影響を受けるタンパク質のスクリーニングの指標として、翻訳効率を用いていたが、翻訳効率は、ORF 全体に結合しているリボソームの量で値を決めているため、リボソームの一時停止を調べるのに必ずしも適していない。そこで、細胞内のタンパク質量を網羅的に調べるために、野生株と *mmd1* 遺伝子破壊株から得られたペプチド断片を LC-MS/MS により解析し、出力データを直接比較してタンパク量を同定するラベルフリー定量的プロテオミクス解析を行なった。全体の約三分の一に当たる 1,500 タンパク質が検出できたが、その中から野生株と比較して *mmd1* 破壊株において減少するタンパク質をスクリーニングした結果、30 タンパク質余りが同定され、eIF5A のハイプシン残基の水酸化がこれらのタンパク質の翻訳に関与していることが明らかになった。

一方、表現型を元に、遺伝学的な解析を通じて eIF5A の修飾がどのような役割を果たしているのかも検討した。上述したように、*mmd1* 遺伝子破壊株は好気呼吸活性低下の表現型を示し、生育にミトコンドリアの電子伝達系を必要とする生育条件である低グルコース培地では生育不全を示す。しかし、アセチル化部位に変異を導入すると、この生育不全の表現型が抑圧されることから、好気呼吸活性の低下はハイプシン化の欠損ではなく、それによって引き起こされるアセチル化が原因であることが明らかとなった。しかし、アセチル化部位に変異を入れても、*dhs1* の不活化によりハイプシン化そのものを消失させた場合は生育不能の表現型は抑圧されなかった。

以上の結果を総合すると、翻訳されてそのまま未修飾の eIF5A、DHS によりデオキシハイプシン化のみ起こっている eIF5A、そして DOHH によりハイプシン化が完了した成熟型 eIF5A に加え、それぞれについてアセチル化の有無が組み合わせられた様々な状態の eIF5A がそれぞれ別々の標的の翻訳制御を担っているのではないかという考えに至ったが、その検証にはさらなる研究が必要だと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsuyama Akihisa, Hashimoto Atsushi, Nishimura Shinichi, Yoshida Minoru	4. 巻 13
2. 論文標題 A set of vectors and strains for chromosomal integration in fission yeast	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9295
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-36267-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Akihisa Matsuyama, Minoru Yoshida
2. 発表標題 Development of NanoBiT-based 2- and 3-hybrid system in fission yeast
3. 学会等名 2019 Cold Spring Harbor Asia Conference on Chemical Biology and Drug Discovery（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinichi Nishimura, Akifumi Suganaga, Akihisa Matsuyama, Minoru Yoshida
2. 発表標題 Comprehensive analysis of the mechanism of action of theonellamides, marine-derived antifungals, based on fission yeast ORFeome
3. 学会等名 2019 Cold Spring Harbor Asia Conference on Chemical Biology and Drug Discovery（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松山 晃久、橋本 敦史、西村 慎一、吉田 稔
2. 発表標題 分裂酵母の新規染色体挿入型ベクターの開発
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 松山晃久・吉田稔	4. 発行年 2018年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 523
3. 書名 生体の科学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------