

令和 3 年 5 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06054

研究課題名(和文) 哺乳類ミトコンドリアの新生ペプチド鎖リボソーム複合体の構造解析

研究課題名(英文) Structural analysis of the ribosome nascentpeptide-chain complex of mammalian mitochondria

研究代表者

富田 野乃(竹内野乃) (Tomita-Takeuchi, Nono)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号：80323450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ミトコンドリアリボソームのペプチドトンネルの構造を明らかにし、新生ペプチド鎖とペプチドトンネルの相互作用について知見を得ることを目指すものである。哺乳類ミトコンドリア翻訳系を再構築し、連続プロリン配列を介した翻訳停止を利用して新生ペプチド鎖リボソーム複合体(ribosome-nascentchain complex, RNC)を形成することに成功した(Lee, 2021)。新生ペプチド鎖の長さについて検討したところ、新生ペプチド鎖の長さが約80アミノ酸以上でそのN末端がミトコンドリアリボソームのペプチドトンネルの外に露出す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

近年、ミトコンドリアのリボソームや翻訳因子に誤作用して副作用をもたらす薬剤が多く報告されている。また、リボソームのペプチドトンネルは、新生ペプチド鎖のプロセッシングや折りたたみ、細胞内輸送などの制御をになう場であり、ペプチドトンネルは多くの抗生物質の結合部位となっている。本研究により、新生ペプチド鎖の配列や長さを制御しながらミトコンドリアのRNCを調製することが可能になった。今後様々なRNCの構造を決定することにより、薬剤デザイン等に有用な知見が得られると期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aims to clarify the structure of the peptide tunnel of the mammalian mitochondrial ribosome and to gain insight into the interaction between the nascent peptide-chain and the peptide tunnel. We have reconstituted the mammalian mitochondrial translation system and successfully formed a ribosome-nascentchain complex(RNC) utilizing translation arrest via a polyproline sequence (Lee, 2021). By examining the length of the nascent peptide-chain, we demonstrated that the N-terminus of the nascent peptide-chain is exposed outside the peptide tunnel when the length of the nascent peptide-chain is more than approximately 80aa.

研究分野：生化学・分子生物学

キーワード：翻訳 哺乳類ミトコンドリア リボソーム 新生ペプチド鎖

## 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアのタンパク質合成系の異常は様々なヒト疾患と関わっており、またミトコンドリアのリボソームや翻訳因子に誤作用して副作用をもたらす薬剤が多く報告されている。このような背景から、現在世界で精力的にミトコンドリアリボソームの構造解析が進められている。リボソームで合成された新生ペプチド鎖は、ペプチドトンネルを通過してリボソームの外へ出る。ペプチドトンネルは、新生ペプチド鎖のプロセッシングや折りたたみ、細胞内輸送などの制御を司る場である。バクテリアのリボソームではペプチドトンネルは多くの抗生物質の結合部位となっており、医療応用の観点からもその構造を理解することは重要である。哺乳類ミトコンドリアのリボソームで合成されるタンパク質はすべて膜タンパク質であり、翻訳と共役して膜に挿入される。これに関連して、ミトコンドリアリボソームのペプチドトンネルはミトコンドリアリボソームに特化したリボソームタンパク質を含むユニークな構造をもつことが示唆されている。現在のところペプチドトンネルの候補として、2つのトンネルが見いだされているが、どちらのトンネルが利用されているのか、使い分けはあるのか、など詳細は不明である (Greber BJ., 2014; Brown A., 2014; Itoh Y., 2021)。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、哺乳類ミトコンドリアリボソーム・新生ペプチド鎖複合体 (Ribosome Nascent peptide-chain Complex, RNC) の構造を決定し、ミトコンドリアリボソームのペプチドトンネルの構造を明らかにするとともに、新生ペプチド鎖とペプチドトンネルの相互作用について知見を得ることを目指す。成果は薬剤デザインなどに直ちに結びつくと期待される。

## 3. 研究の方法

### (1) 哺乳類ミトコンドリア翻訳系の再構築

はじめに、ミトコンドリアのタンパク質合成に必要なすべての翻訳因子を精製し、試験管内で再構成した *in vitro* 翻訳系を構築することとした。リボソームは豚肝臓ミトコンドリアから精製し、翻訳因子 (IF2mt, IF3mt, EF-Tu<sub>mt</sub>, EF-Ts<sub>mt</sub>, EF-G1<sub>mt</sub>, RF1L<sub>mt</sub>, EF-G2<sub>mt</sub>, RRF<sub>mt</sub>) は大腸菌で組み換え体を発現し精製した。tRNA はミトコンドリア由来のものを十分量調製することが困難なため、酵母 tRNA を利用した。

### (2) ミトコンドリア RNC の形成

構築した翻訳系を利用してリポータータンパク質であるナノルシフェラーゼの合成を確認したのち、ミトコンドリア RNC の形成条件の検討を行なった。翻訳中のリボソームを mRNA 上の特定の位置で安定に停止させるため、i) 翻訳終結因子 RF1L<sub>mt</sub> の除去、ii) 翻訳停止配列 (連続プロリン配列) の利用、を検討した。さらにリボソームが mRNA 上で翻訳停止したのち、新生ペプチド鎖が解離せずにリボソーム上で安定に保持される条件を検討した。特に翻訳反応における Mg およびポリアミン濃度の検討を行なった。

### (3) ミトコンドリア RNC の精製

RNC は、新生ペプチド鎖の N 末端に Flag タグを配することにより、anti-FLAG 抗体結合磁気ビーズを用いてアフィニティー精製することとした。Flag タグがリボソームトンネルから十分に露出される新生ペプチド鎖の長さを検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 哺乳類ミトコンドリア翻訳系の再構築

哺乳類ミトコンドリア翻訳系の再構築に成功した。この翻訳系はナノルシフェラーゼをはじめとした様々なリポータータンパク質の合成が可能である (Lee, 2021)(図 1)。

### (2) ミトコンドリア RNC の形成

翻訳停止リボソーム複合体を得るため、i) 翻訳終結因子 RF1L<sub>mt</sub> の除去、ii) 翻訳停止配列 (連続プロリン配列) の利用、を検討した。その結果、i) による手法では、リボソームは終止コード上で翻訳停止するが、殆どのペプチジル tRNA が加水分解されて新生ペプチド鎖が解離して

しまうことが明らかとなった。一方、ii)の手法では、ミトコンドリアリボソームが確かに連続プロリン配列上で翻訳を停止し、さらに翻訳反応条件を適切に設定（高Mg濃度、ポリアミンフリー）することにより、ほぼ全てのペプチジル tRNA がリボソーム上に安定に保持されることが明らかとなった (Lee, 2021) (図 2)。

### (3) ミトコンドリア RNC の精製

バクテリアや真核細胞細胞質のリボソームでは、新生ペプチド鎖の長さが約 50 アミノ酸以上でその N 末端がペプチドトンネルの外に露出することが知られている。新生ペプチド鎖の N 末に FLAG 配列を配し、さらに新生ペプチド鎖の長さがそれぞれ 50,60,70,80,90 アミノ酸となるように 5 種類の RNC を形成させ、anti-FLAG 抗体結合磁気ビーズを用いてアフィニティー精製をこころみた。その結果、新生ペプチド鎖がおおよそ 80 アミノ酸以上で FLAG 配列がリボソームの外に露出し、RNC が anti-FLAG ビーズと結合することが明らかになった(未発表データ)。このことは、ミトコンドリアリボソームのトンネル出口の vestibule 構造がバクテリアや真核細胞細胞質のリボソームのそれと比べて広く、新生鎖が vestibule ですでにフォールディングを開始する可能性を示唆する。

本研究課題により、新生ペプチド鎖の配列や長さを制御しながら RNC を効率よく調製することが可能になった。異なる配列の新生ペプチド鎖を有した様々な RNC を調製し、CryoEM による構造解析を進める。構造解析は Prof/Dr Spahn (Institute of Medical Physics and Biophysics, Charité, 独)との共同研究である。

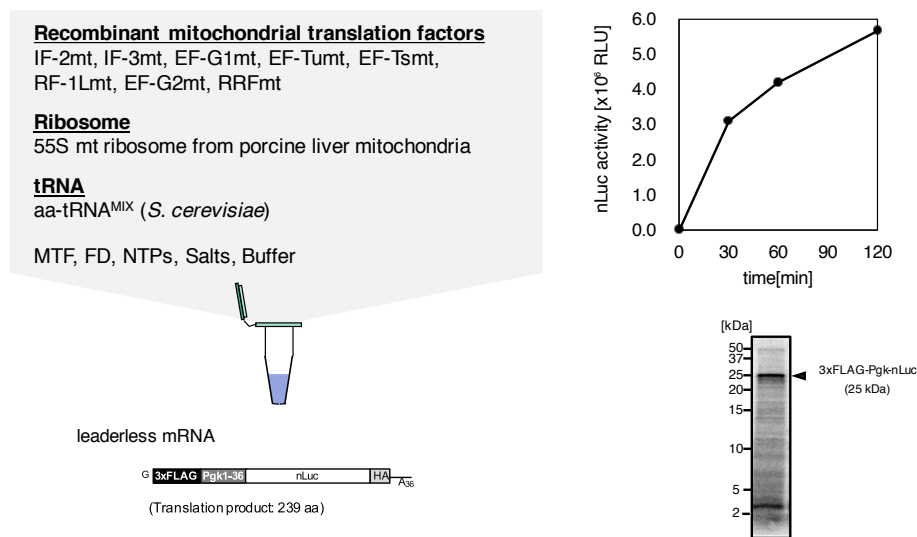
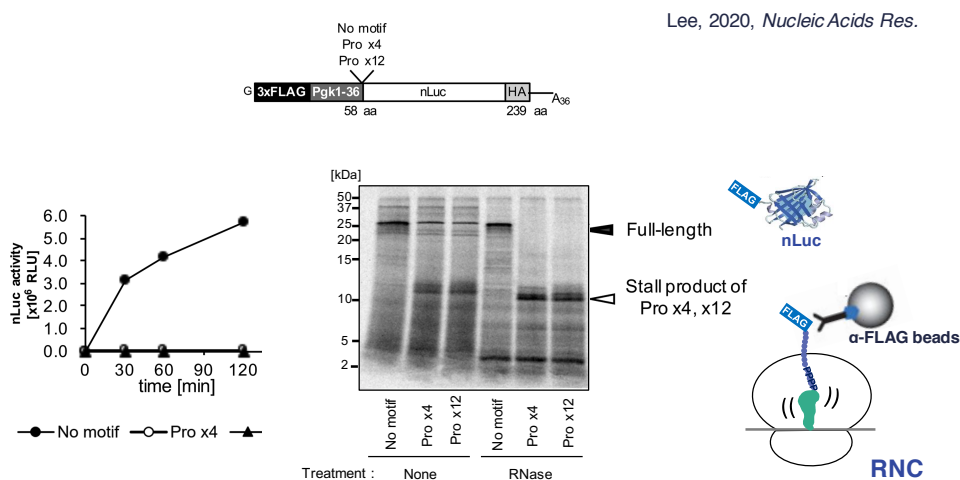


図 1: 哺乳類ミトコンドリア翻訳系の再構築



◆ The lengths and sequences of the nascent peptide chains can be controlled.

図 2: 連続プロリン配列を利用したミトコンドリア RNC の形成

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Lee Muhoon, Matsunaga Noriko, Akabane Shiori, Yasuda Ippei, Ueda Takuya, Takeuchi-Tomita Nono	4. 巻 49
2. 論文標題 Reconstitution of mammalian mitochondrial translation system capable of correct initiation and long polypeptide synthesis from leaderless mRNA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 371 ~ 382
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkaa1165	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 -

1. 著者名 Abe Taisho, Nagai Riku, Shimazaki Shunta, Kondo Shunta, Nishimura Satoshi, Sakaguchi Yuriko, Suzuki Tsutomu, Imataka Hiroaki, Tomita Kozo, Takeuchi-Tomita Nono	4. 巻 167
2. 論文標題 In vitro yeast reconstituted translation system reveals function of eIF5A for synthesis of long polypeptide	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 451 ~ 462
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvaa022	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 -

1. 著者名 Abe Taisho, Nagai Riku, Imataka Hiroaki, Takeuchi-Tomita Nono	4. 巻 167
2. 論文標題 Reconstitution of yeast translation elongation and termination in vitro utilizing CrPV IRES-containing mRNA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 441 ~ 450
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvaa021	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4件（うち招待講演 2件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 安田 一平、上田 卓也、富田 野乃
2. 発表標題 哺乳類ミトコンドリアの新生ペプチド鎖リボソーム複合体の機能構造動態
3. 学会等名 第21回日本RNA学会年会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nono Takeuchi-Tomita
2. 発表標題 IRD-like mechanism of polyproline-mediated ribosome stalling and function of eIF5A
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nono Takeuchi-Tomita
2. 発表標題 IRD-like mechanism of polyproline-mediated ribosome stalling and function of eIF5A
3. 学会等名 Translational control（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 富田 野乃
2. 発表標題 哺乳類ミトコンドリアタンパク質合成系の試験管内再構成と分子機構
3. 学会等名 日本ミトコンドリア学会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------