

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 4 月 14 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06047・19K21179

研究課題名（和文）生細胞内での翻訳途上ポリペプチド鎖の相互作用・フォールディング様態の解析

研究課題名（英文）Analysis of dynamic interaction and folding process of a nascent polypeptide in living cells

研究代表者

宮崎 亮次（Miyazaki, Ryoji）

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・特定研究員

研究者番号：30827564

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、翻訳伸長停止配列を融合して構築した翻訳途上鎖を細胞内で発現させ、in vivo光架橋法によりその相互作用やフォールディングを調べることで、生細胞内でタンパク質の翻訳の各ステップでの振る舞いを解析可能な手法の構築を試みた。翻訳伸長停止配列の導入部位により、構築した翻訳途上鎖の細胞内での安定性が変化するため、提案した手法の構築は困難であることが分かった。そこで、翻訳伸長停止配列を有するタンパク質であるVemPの細胞内動態をin vivo光架橋法で解析した。その結果、VemP翻訳途上鎖の相互作用やその動態を追跡できることを見出し、細胞内で翻訳途上鎖の分子動態を解析できることを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質の機能を明らかにするためには、成熟体が構築した後の振る舞いだけでなく、リボソームと結合した翻訳途上ポリペプチド鎖の動態を理解しなければならないという認識が徐々に強まってきている。しかしながら、細胞内での翻訳途上鎖の分子動態を解析できる手法はほとんどなかった。そこで、本研究では、in vivo光架橋法を利用して翻訳途上鎖の相互作用やフォールディングを解析可能な手法の構築を試みた。その結果、翻訳伸長反応が安定に停止する「翻訳停止配列」を有するタンパク質をモデル基質として利用することで、細胞内で翻訳途上鎖の動的な相互作用を解析できることを示せ、タンパク質研究の基盤となり得る基礎を築いた。

研究成果の概要（英文）：In this study, I attempted to develop a method for analyzing the behavior of proteins at each step of translation in a living cell.

To this end, I constructed a nascent polypeptide by fusing a translation arrest sequence to target proteins, and carried out the in vivo photo-cross-linking experiments to analyze folding/interaction of the nascent polypeptide. It was found to be difficult to perform the above approach because the stability of the constructed nascent polypeptides in a living cell was altered by the introduction site of the arrest sequence. Therefore, I analyzed the intracellular behavior of VemP that contains its original arrest sequence. I found that an in vivo photo-cross-linking approach can analyze the dynamic interaction of a VemP nascent polypeptide, and demonstrated that the molecular behavior of nascent polypeptide can be analyzed in a living cell.

研究分野：細胞内生化学

キーワード：翻訳停止配列 in vivo光架橋法 翻訳途上ポリペプチド鎖 タンパク質相互作用 フォールディング

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

多くの新生タンパク質の成熟過程（局在化・構造形成）は、種々の因子が翻訳途上ポリペプチド鎖に相互作用することで進行する。この過程が損なわれるとタンパク質は正常に機能できず、重大な疾病を引き起こす原因ともなる。最近では、翻訳途上鎖自体が機能を有することが見出されてきた。例えば、大腸菌の SecM は翻訳伸長反応が一時的に停止し、それを利用して下流遺伝子の発現を制御するが、この翻訳停止とその解除は翻訳途上鎖と多因子の相互作用によって行われる。このような重要性から、翻訳途上鎖のフォールディング・相互作用動態の研究が精力的に行われており、*in vitro* 解析によって翻訳途上鎖の動態を分子レベルで解析した報告もある。しかしながら、生細胞内で翻訳途上鎖動態を解析したものはほとんどなく、「生きた細胞の中で翻訳途上のポリペプチド鎖がどのような振る舞いをするのか」という根本的な問題は未知の部分が多く残されていた。

2. 研究の目的

本研究は、細胞内で翻訳途上ポリペプチド鎖の相互作用・フォールディング動態を解析できる新たな実験手法を構築することを目的としたもので、上述した問題を克服し、翻訳途上鎖の研究に新たな視点を提供するものである。

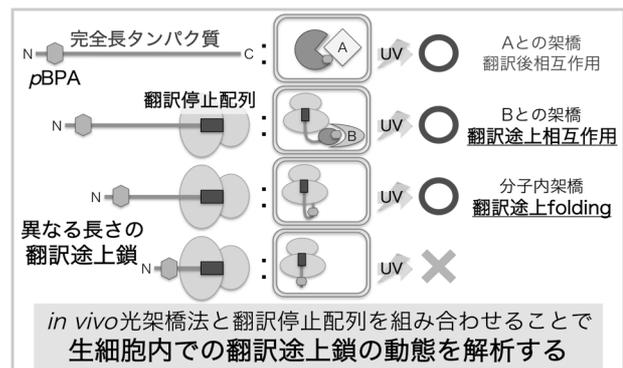
3. 研究の方法

以下のユニークかつ強力な実験手法を組み合わせることで研究を進める。

(1) *in vivo* 光架橋法：生細胞内(*in vivo*)での一過的なタンパク質間相互作用をアミノ酸残基レベルの空間分解能で調べることができる、画期的な手法である。古細菌由来の変異型 tRNA 合成酵素と変異型 tRNA の発現細胞を用いることで、任意の *amber codon* 導入部位に *pBPA* 等の光架橋性非天然アミノ酸を導入した標的タンパク質を細胞内で発現することができる。その細胞に UV 照射することで架橋複合体を形成させ、架橋相手を同定することで、生細胞内で、高い空間分解能でタンパク質間相互作用解析が可能となる。また、分子内架橋を指標に標的タンパク質のフォールディング様態を解析することもできる。申請者はこの手法を改良することで、標的タンパク質の迅速な成熟過程の解析に成功している。

(2) 翻訳停止配列を用いた細胞内での翻訳途上鎖の合成：大腸菌の SecM、ビブリオ菌の VemP、ほ乳動物の XBP1u 等で、翻訳を途中で停止させるアミノ酸配列がいくつか報告されている。この翻訳停止配列を標的タンパク質内に導入することで、タンパク質の翻訳を導入箇所まで停止させ、リボソーム-タンパク質翻訳途上鎖複合体を細胞内で蓄積させることができる。翻訳途上鎖複合体の有効な手法として用いられつつあり、翻訳途上の各段階でのタンパク質の相互作用・フォールディング状態の詳細解析が可能となると考えられる。

上記2つの手法を組み合わせることで新たな実験手法を構築する（下図）。即ち、標的タンパク質中に翻訳停止配列を導入し、翻訳途上鎖を系統的に作成する。構築した翻訳途上鎖中の異なる位置に光反応性アミノ酸を導入し、*in vivo* 光架橋解析を行うことで、これまで解析がほとんどされてこなかった生きた細胞内で標的タンパク質が翻訳の各段階でどのような因子と相互作用し、どのような構造状態を取るのかという問題を明らかにすることを目指した。



4. 研究成果

(1) *in vivo* 光架橋法と翻訳停止配列を組み合わせた生細胞内での翻訳途上鎖動態解析

これまで報告されてきた中で、最も短く、強力に翻訳を停止させることが可能な *M. succiniciproducens* 由来の SecM 翻訳停止配列を鋳型に用いて、その上流に HA タグ、下流に SPA タグと異なるタグ配列を付加した「翻訳アレストカセット配列」を構築した。このように、翻訳停止配列の上流と下流に異なるタグ配列をつけることにより、細胞内で蓄積したものが翻訳途上鎖か、翻訳が完了して生じた産物であるかを容易に識別することが可能となる。

さらに、翻訳停止配列の上流に、異なる長さの標的タンパク質を融合させ、その融合タンパク質を細胞内で発現させ、翻訳途上鎖が安定に蓄積するかを調べた。その結果、一部の翻訳途上鎖は安定に蓄積していたが、翻訳途上鎖が安定に蓄積しないものも多くあることを見出した。翻訳停止配列を導入する部位によって翻訳途上鎖の安定性が変化してしまうというこの結果は、その長さの翻訳途上鎖の自発的なフォールディング反応や他因子との相互作用で翻訳停止が解除されてしまうという示唆を与える。一方で、提案した手法が限られた翻訳途上鎖の解析にしか適さないという可能性を呈するものであった。

(2) 翻訳停止配列を有する VemP の相互作用動態解析

上述のように新たな実験系の構築過程で、安定に翻訳途上鎖が蓄積しないという問題が生じ、そのような翻訳途上鎖の細胞内動態を解析するのは困難であるという懸念があった。そこで、*in vivo* 光架橋法を用いて、不安定な翻訳途上鎖の解析ができるかを検証した。

VemP は *Vibrio* 属細菌が有している膜透過モニター因子であり、翻訳停止配列を有している。細胞の膜透過活性が低下する条件では、VemP は翻訳停止を安定に起こし、膜透過を促進する下流遺伝子の発現を誘導する。一方で、正常の生育条件では、VemP は翻訳停止を起こすものの、直ぐに細胞質膜上の SecYEG トランスロコンへと輸送され、膜透過に伴う引っ張り力によって翻訳停止が解除される。このような翻訳停止が解除されるまでの、翻訳途上 VemP に相互作用する因子の同定とその相互作用動態の解析を試みた。

VemP の翻訳停止は迅速に解除されるため、以下の解析では申請者が以前に報告した *in vivo* 光架橋法と pulse-chase 法を組み合わせた手法を用いて、合成直後の VemP 翻訳停止が保持されている状態で解析を行った。VemP の全領域を対象に pBPA を導入し、*in vivo* 光架橋解析を行ったところ、相互作用が予想されたりボソームタンパク質や SecYEG トランスロコンの構成タンパク質に加えて、未知の相互作用相手が存在することが示唆された。更なる解析から、その未知因子がシグナル認識粒子の構成タンパク質である Ffh であることを見出し、VemP がシグナル認識粒子により膜上のトランスロコンへと輸送されることを示唆する結果を得た。また、翻訳途上 VemP と同定した各因子の相互作用のタイミングを精査したところ、リボソームタンパク質や Ffh (SRP) が初期に相互作用し、その後、SecYEG トランスロコンと相互作用するという翻訳途上鎖の動的な相互作用を捕らえることができ、VemP 翻訳停止解除の全体像も明らかにできつつあった。

以上のように、残念ながら本申請で提案する手法の構築を達成することはできなかった。しかしながら、別の因子を用いた異なるアプローチから生細胞内で翻訳途上ポリペプチド鎖の相互作用動態を解析できることを実証できており、今後の科学の発展の基盤となり得る研究と思われる。

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 0件）

1. 著者名 Ryoji Miyazaki, Yoshinori Akiyama, Hiroyuki Mori	4. 巻 1864(2)
2. 論文標題 A photo-cross-linking approach to monitor protein dynamics in living cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbagen.2019.03.003.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ryoji Miyazaki, Yoshinori Akiyama, Hiroyuki Mori
2. 発表標題 Analysis of cis and trans factors involved in export and translation arrest of VemP by an in vivo photo cross-linking approach
3. 学会等名 International symposium Proteins: From the Cradle to the Grave (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮崎亮次、秋山芳展、森博幸
2. 発表標題 改良型部位特異的in vivo光架橋法による生細胞内での翻訳途上ポリペプチド鎖の相互作用動態解析
3. 学会等名 第92回 日本生化学会大会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----