

自己評価報告書

平成23年3月31日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2012

課題番号：20247020

研究課題名（和文） Nascent Chain（合成途上鎖）の分子生物学

研究課題名（英文） Molecular biology of nascent chains

研究代表者

伊藤 維昭（ITO KOREAKI）

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：90027334

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：翻訳、シャペロン

1. 研究計画の概要

本研究は、大腸菌の SecM の研究から明らかになりつつある、遺伝情報発現制御に於ける新たな概念（下記）について、SecM における検証と分子機構の追求を行うと同時に、そのような制御機構がゲノムの情報発現にも一般的な重要性を追求するものである。

【SecM がもたらした概念】合成途上ポリペプチド鎖の C 末端近くの「アレスト配列」がリボソーム内部のトンネルと相互作用して翻訳伸長アレストを起こす、N 末端側はリボソームの外で他の細胞成分（SecM の場合は膜透過装置）と相互作用する。相互作用が生産的に起これば、翻訳伸長アレストは解除される。この機構により、ある生物機能（SecM の場合はタンパク質分泌活性）がモニターされ、異なるレベルの発現制御としてフィードバック的にアウトプットされる。そのアウトプットとは、SecM の場合であれば、同一 mRNA の下流域からコードされる膜透過駆動 ATPase SecA の翻訳量の分泌活性に応じた制御、および SecA の翻訳を膜（トランスロコン）の近傍という環境で起こさせることによる新生 SecA 分子の機能的構造の獲得を促進することである。一般化すれば、翻訳アレストを起こさせることによって、「翻訳途上で起こることによって効率的あるいは正しく実現できる事象」を促進するという、新たな制御様式である。本研究は、SecM の翻訳アレスト制御の分子機構と cis-シャペロン機能の分子実体を明らかにすること、および翻訳アレストあるいは局所的翻訳を介したタンパク質の機能発現制御の一般性を明らかにするものである。

2. 研究の進捗状況

SecM による制御の対象である SecA の構

造・機能相関の解明を進めた。SecA と SecYE トランスロコン複合体との機能的相互作用のインターフェイスを SecA と SecY の部位特異的架橋によって同定し、高度好熱菌を用いて SecYE 複合体の結晶構造を決定した。SecM の翻訳アレスト機構に関しては、リボソームの P 部位に存在する peptidylprolyl-tRNA から A 部位に存在するピューロマイシンへのペプチド転移能が低いことを発見し、SecM における Gly-Pro ペプチド結合形成の不全にアミノ酸の中で特殊な構造をとるプロリンの性質が寄与することを示唆した。また、枯草菌の MifM が SecM に類似の機構でタンパク質の膜組込をモニターし、YidC2 の発現を制御することを示した。MifM の翻訳アレスト配列は枯草菌のリボソームのみに特異的に作用することを見いだした。さらに MifM の N 末端に存在する膜挿入・配列を分泌シグナル配列によって置き換えることにより、その機能を分泌モニターへと変換させることに成功した。合成途上鎖の分子生物学を推進する上で必須となる、細胞内の polypeptidyl-tRNA を検出する方法の開発も行った。Polypeptidyl-tRNA を通常の完成したタンパク質と分離することができる 2 次元電気泳動法を開発し、合成途上鎖の全体像を観察することを可能とした。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

【理由】SecM のシスシャペロン機能については、SecA の機能状態を詳しく調べることが前提となるため、まず、SecA の機能状態の分子実体の解明をすすめて、SecYEG トランスロコンとの相互作用の解明で格段の進展があった。しかし、研究に投入できる人的資

源が限られていたこともあり、当初の計画通りシスシャペロン機能の実体解明には至らなかった。一方で、翻訳伸長アレスト機構、アレスト解除機構の解明は、当初の計画以上に進展している。これは、枯草菌の MifM という新たな実験系が開発されたため、当初の計画にはない有効な研究展開が可能となったためである。Nascent Chain の分子生物学という新分野を新たに開発し、推進する点において、一部は当初の計画以上に進展しているが、新たな翻訳アレスト系の同定に関しては当初計画に達していない。これは、細胞内での polypeptidyl-tRNA の検出という基本的なことが、国際的にも全く手がつけられていない現状の打破を優先したためである。新たな二次元電気泳動法を開発し、当初の計画にはなかった研究方法を使用できるようになった。以上のように、当初計画を上回る成果が得られた面と、まだ達成できていない面が混在している状況であり、平均すれば概ね順調に進展していると自己評価できる。

4. 今後の研究の推進方策

(1) SecM のシスシャペロン機能の実体解明については、In vitro 翻訳系や in vivo 合成途上鎖の解析手法も取り入れて、推進することを計画している。(2) 翻訳伸長アレスト機構、アレスト解除機構の解析では、引き続き SecM、MifM 両実験系を対比しつつ、当初計画を進める(3) Nascent Chain の分子生物学の新たな開発と推進については、細胞内 polypeptidyl-tRNA を nascentome と名付けて、種々タンパク質の細胞に於けるポリペプチド鎖完成過程の記述、分子シャペロンの効果などの研究に発展させる。また、デッドエンド状態の polypeptidyl-tRNA の解析による翻訳の品質管理の解明も行う。新たな翻訳アレスト系の同定に関しては in vitro 翻訳系を用いて取り組む計画である。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

1. Chiba, S., Kanamori, T., Ueda, T., Akiyama, Y., Pogliano, K. and Ito, K.: Recruitment of a species-specific translational arrest module to monitor different cellular processes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108, *in press* (2011) 査読有
2. Ito, K., Chiba, S. and Pogliano, K.: Divergent stalling sequences sense and control cellular physiology. Biochem. Biophys. Res. Commun. 393, 1-5 (2010) 査読有
3. Chiba, S., Lamsa, A., Pogliano, K.: A

ribosome-nascent chain sensor of membrane protein biogenesis in *Bacillus subtilis*. EMBO J 28: 3461-3475 (2009) 査読有

4. Tsukazaki, T., Mori, H., Fukai, S., Ishitani, R., Mori, T., Dohmae, N., Perederina, A., Sugita, Y., Vassilyev, D.G., Ito, K. and Nureki, O.: Conformational transition of Sec machinery inferred from bacterial SecYE structures, Nature 455, 988-991 (2008) 査読有
5. Muto, H. and Ito, K.: Peptidyl-prolyl-tRNA at the ribosomal P site reacts poorly with puromycin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 366, 1043-1047 (2008) 査読有

[学会発表] (計 29 件)

1. 千葉志信、金森崇、上田卓也、伊藤維昭: 枯草菌翻訳アレスト因子 mifM の in vitro 翻訳系による解析. 平成 22 年度グラム陽性菌ゲノム会議. 南木曾, 2010.
2. Ito, K., Chiba, S., Akiyama, Y. and Abo, T.: Visualizing dynamic "nascentome" of the cell. The International Symposium on Protein Community, Nara, 2010.
3. Ito, K.: From SecY to nascent chain biology. International Symposium on Protein Community. Nara, 2010.
4. Ito, K., Chiba, S., Akiyama, Y. and Abo, T.: Visualizing dynamic "nascentome" of the cell. FASEB Summer Research Conference "Protein Folding in the Cell", Saxtons River, U.S.A., 2010.
5. 千葉志信、伊藤維昭、秋山芳展、Kit Pogliano: 枯草菌において蛋白質膜組込のセンサーとして働く翻訳途上鎖. 2009 年度グラム陽性菌ゲノム機能会議、神戸、2009.

[その他]

ホームページ

http://www.kyoto-su.ac.jp/department/nls/news/20110328_news.html

<http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~k4563/index-j.html>