

機関番号：10101
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20370016
 研究課題名（和文）メチオニン生合成のフィードバック制御に関わる新生ペプチドによる翻訳停止の分子機構
 研究課題名（英文）Molecular Mechanism of Nascent Peptide-Mediated Translation Arrest Involved in Feedback Regulation of Methionine Biosynthesis
 研究代表者
 内藤 哲 (NAITO SATOSHI)
 北海道大学・大学院農学研究院・教授
 研究者番号：20164105

研究成果の概要（和文）：高等植物でメチオニン生合成の鍵段階を触媒するシスタチオニン γ -シンターゼ（CGS）をコードする *CGS1* 遺伝子は *CGS1* mRNA の分解段階で S-アデノシルメチオニン（SAM）によってフィードバック制御される。この制御機構を解析した結果、*CGS1* mRNA を翻訳中のリボソーム、もしくはリボソーム内の新生ペプチドのコンフォメーションに SAM に応答した変化が生じることを明らかにした。また、この制御にリボソームの「出口トンネル」を構成するタンパク質が関与することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Cystathionine γ -synthase (CGS) catalyzes the first committed step of methionine biosynthesis in plants, and is encoded by *CGS1* gene in Arabidopsis. Expression of *CGS1* is feedback-regulated at the step of *CGS1* mRNA degradation and S-adenosyl-L-methionine (SAM) acts as an effector. We found that, when ribosome translates the *CGS1* mRNA in the presence of SAM, either the ribosome itself or the nascent peptide within the ribosomal exit tunnel changes its conformation. We also obtained evidence suggesting that the ribosomal proteins that constitute the exit tunnel is involved in this regulation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2009年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

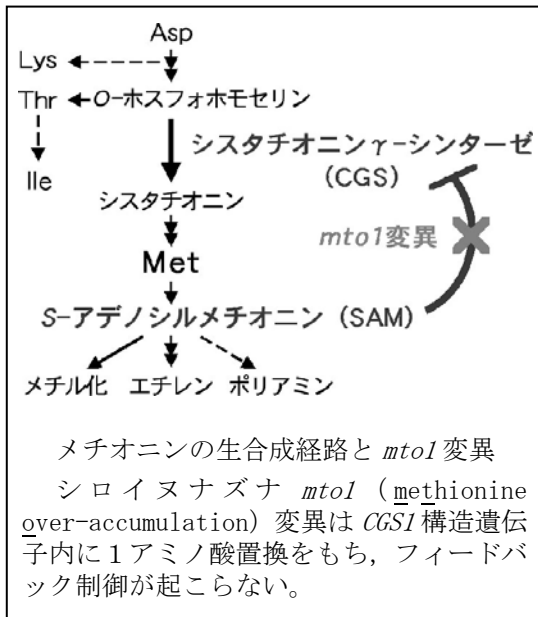
研究分野：分子遺伝学・植物生理学

科研費の分科・細目：基礎生物学 植物分子生物・生理学

キーワード：シロイヌナズナ，メチオニン，翻訳制御，フィードバック制御，新生ペプチド，試験管内翻訳系

1. 研究開始当初の背景

メチオニンはタンパク質を構成するのみならず、SAM を経て細胞内の様々な反応に関与する。植物におけるメチオニンの生合成については1970-80年代に行われた研究により、メチオニンの生合成経路が他のアミノ酸から分岐した最初の段階を触媒する CGS のステップでフィードバック制御されることが示された。しかしながら、CGS はアロステリック酵素ではなく、メチオニン生合成のフィードバック制御機構は謎であった。



我々は遊離メチオニンを過剰に蓄積するシロイヌナズナ *mto1* 変異株を分離した。*mto1* 変異を用いた解析により、CGS をコードする *CGS1* 遺伝子の発現が mRNA の分解段階でフィードバック制御されており、しかもこの制御に MTO1 領域と名付けた CGS 自身のアミノ酸配列が関与しているというユニークな制御機構の存在を明らかにした (1,2)。また、メチオニンの生合成はメチオニン自身がフィードバック制御に関わると報告されていたが、我々は、これが誤りであり、制御のエフェクターは SAM であることを明らかにした (3)。

この制御は翻訳中に起こり (4)、コムギ胚芽の試験管内翻訳系で再現される (3)。試験管内翻訳系を用いた解析により、*CGS1* mRNA の分解に先だって SAM に応答した翻訳停止が起きていることを見いだした。即ち、SAM 存在下では MTO1 領域の直後の Ser-94 コドンで翻訳の停止が起こり、ペプチジル

-tRNA^{Ser} が蓄積する。このとき、リボソームは転座の段階で停止しており、ペプチジル-tRNA^{Ser} はリボソームの A 部位を占める (5)。

CGS1 遺伝子における新生ペプチドによる翻訳伸長の停止と共役した mRNA 分解は真核生物で初めての発見である。

- (1) *Science* 286: 1371-4, 1999.
- (2) *J. Biol. Chem.* 277: 36380-6, 2002.
- (3) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 10225-30, 2003.
- (4) *Plant Cell Physiol.* 44: 893-900, 2003.
- (5) *Genes Dev.* 19: 1799-810, 2005.

2. 研究の目的

CGS1 mRNA における翻訳停止と共役した mRNA 分解機構は、(A) SAM に応答した翻訳停止と、(B) これと共役した mRNA 分解の2つの段階に分けて考えることができる。本研究は、(A) の段階にターゲットを絞り、SAM が如何にして Ser-94 の位置で翻訳停止を引き起こすのかを明らかにすることを目的とする。

リボソームで合成された新生ペプチドは、大サブユニットを貫く「出口トンネル」を通過してリボソームの外に出てくる。この出口トンネルは 100Å ほどの長さがあり、新生ペプチドの 30-40 アミノ酸残基が入るとされている。一方、*CGS1* mRNA を SAM 存在下で翻訳させると、MTO1 領域の直後で翻訳が一時停止する。

したがって、Ser-94 で翻訳停止が起きたとき、シス配列である MTO1 領域の新生ペプチドは出口トンネル内に位置すると考えられる。即ち、*CGS1* mRNA を翻訳しているリボソームにおいて、MTO1 領域の新生ペプチドが出口トンネル内に位置するとき、SAM が高濃度で存在すると Ser-94 で翻訳が停止すると考えることができる。本研究は、この可能性を検証しようとするものである。

3. 研究の方法

(1) 出口トンネルの狭窄部位を構成するリボソームタンパク質の関与

リボソームの出口トンネルは直径がおおよそ 20Å 程度であるが、トンネル内にリボソ-

ムタンパク質が突出して狭まった、「狭窄部位」と呼ばれる部位が存在する。この狭窄部位は、リボソームタンパク質 L17 と L4 が関わっている。

L17 および L4 タンパク質の出口トンネル内に突出した部位のアミノ酸残基を欠失させた遺伝子を導入したシロイヌナズナ株を用いて、*CGSI* mRNA の翻訳における SAM に応答した翻訳停止への効果を解析する。

(2) MTO1 領域のアミノ酸残基の機能

MTO1 領域のアミノ酸配列を変化させ、SAM に応答した翻訳停止の効率に対する効果を、試験管内翻訳系を用いて解析する。様々なアミノ酸残基に置換することにより、各位置のアミノ酸残基の機能を考察する。また、ピアコア等を用いて、SAM との結合能の有無を解析する。

(3) リボソーム出口トンネル内での MTO1 新生ペプチドの構造に関する解析

リボソームの出口トンネルは約 100 Å の長さがあり、「伸びた」状態のペプチドであれば 30-40 アミノ酸残基が存在しうるとされる。一方、出口トンネル内で α -ヘリックス構造を取るとの報告もある。

SAM に応答して翻訳停止したリボソームにおいて MTO1 新生ペプチドが何らかの構造変化を起こしている可能性を調べる。同時に、リボソーム側の変化を調べるため、ジメチル硫酸を用いたフットプリント解析により、リボソーム RNA のコンフォメーション変化を解析する。

市販のコムギ胚芽野試験管内翻訳系は、内在性の mRNA を失活させるために、マイクロコッカルヌクレアーゼ処理が施されており、これに伴って、「傷ついた」リボソームが含まれる。そこで、これらの解析には、ヌクレアーゼ処理を行わない自作のコムギ胚芽野試験管内翻訳系を用いる。

4. 研究成果

(1) 出口トンネルの狭窄部位を構成するリ

ボソームタンパク質の関与

リボソームタンパク質 L4 と L17 のトンネル内に突出している領域のアミノ酸配列に部分的な欠失を持つ変異型トランスジェニック・シロイヌナズナ株を構築した。トンネル内突出部位に大きな欠失を導入したシロイヌナズナ株では、変異型遺伝子の発現量が極めて低かった。これは、大きな欠失がリボソームの機能に悪影響をもたらすため、導入した変異型遺伝子の発現レベルが低い株のみが生き残ったと考えられる。

一方、突出部位に短い欠失を導入したシロイヌナズナ株では内在遺伝子と同等の発現が認められた。以後、短い欠失を導入した株を用いて解析を行った。野生型株と変異型株のシロイヌナズナについて調べた結果、変異型では *CGSI* mRNA 分解中間体の蓄積が減少していた。このことは、翻訳停止についても、変異型株では SAM への応答が弱くなっていることが考えられる (投稿準備中)。

これらの結果から、リボソームタンパク質 L4 と L17 のトンネル内に突出している領域が、*CGSI* の翻訳制御ならびに mRNA 分解に重要な機能をもつと考えられた。一方、リボソームタンパク質遺伝子に大きな欠失変異を導入したトランスジェニックシロイヌナズナ株は、導入遺伝子の発現が低かったことから、変異型リボソームタンパク質が機能を持ったリボソームに取り込まれていることの証明が必要であると考えられる。また、変異型リボソームタンパク質を持ったリボソームにおける翻訳機能自体の評価も必要であると考えられた。

(2) MTO1 領域のアミノ酸残基の機能

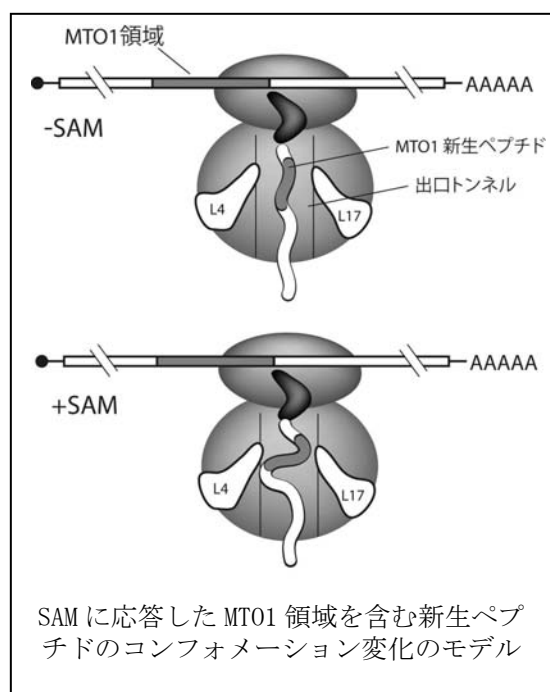
MTO1 領域のうち、Asn-82 と Gln-87 をそれぞれ、Gln と Asn に置換しても、SAM に応答して、弱いながらも翻訳停止が観察された。このことは、これらのアミノ酸残基が水素結合の形成に関与している可能性を示唆する。

一方、ピアコアを用いた解析および等温

カロリー滴定法による解析では、MTO1領域の合成ペプチドとSAMとの結合活性は認められなかった。少なくとも、水溶液中での状態では、MTO1領域のペプチドとSAMは相互作用しないと判断された。

(3) リボソーム出口トンネル内でのMTO1新生ペプチドの構造に関する解析

SAMに反応して翻訳停止した状態のリボソーム:mRNA:新生ペプチドの3者複合体をショ糖密度勾配遠心によって調製し、リボソーム内における新生ペプチドのコンフォメーションを解析した。



ポリエチレングリコールマレイミド (PEG-MAL) は、システイン残基と容易に反応して共有系都合を形成し、通常のゲル電気泳動において約20kDaに相当するゲルシフトを生じる。SAMに反応して翻訳停止した時に、リボソームの出口トンネルの出口付近になる位置にシステイン残基を導入しておき、SAMの有無でのPEG-MALとの反応性を解析した。伸びた構造を取ればPEG-MALとの反応性が高く、縮んだ構造を取れば反応しにくくなる。解析の結果、野生型のMTO1領域を持つ場合には、SAMに反応してMTO1領域を含む新生ペプチドが縮

んだ構造を取ることが示された。一方、MTO1領域に変異を持つ場合には、SAMに反応した変化は観察されなかった (*J. Biol. Chem.*, 2011)。

また、これと呼応する形で、ジメチル硫酸によるフットプリント解析、およびUVクロスリンク解析でも、リボソームトンネル近傍のリボソームRNAの反応性がSAMに反応して変化した。この結果は、リボソームトンネルを形成するリボソームRNAがSAMに反応してコンフォメーション変化を起こしていることを示唆する。ただし、トンネル内の新生ペプチドのコンフォメーション変化に伴って、反応性が変化した可能性も考えられる (*J. Biol. Chem.*, 2011)。

5. 主な発表論文等

(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1件)

1. Noriyuki Onoue, Yui Yamashita, Nobuhiro Nagao, Derek Goto, Hitoshi Onouchi and Satoshi Naito: *S*-Adenosyl-L-methionine Induces Compaction of Nascent Peptide Chain inside the Ribosomal Exit Tunnel upon Translation Arrest in *Arabidopsis CGS1*. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(17): 14903-14912 (2011). (査読あり)

[学会発表] (計21件)

1. 山下由衣, S-アデノシルメチオニンはシロイヌナズナCGS1新生ペプチドに縮んだ構造をとらせる. 第52回日本植物生理学会年会, 2011年3月11日, 年会 (仙台, 東北大学) は地震により中止となったが, 要旨集の公開をもって成立の扱いとされた (学会HP <http://www.jspp.org/> 参照).
2. 尾上典之, CGS1遺伝子発現制御における翻訳伸長停止時のリボソーム出口トンネル内部の変化と新生ペプチドの二次構造形成. 第12回日本RNA学会年会, 2010年7月27日, 東京, 一橋記念講堂.
3. Satoshi Naito, From inside the darkness of the ribosomal exit tunnel: Feedback regulation of methionine biosynthesis in higher plants. 第10回日本蛋白質科学会年会, ノーベル賞特別

- シンポジウム「タンパク質合成装置リボソームの最新像」2010年6月18日, 札幌, 札幌コンベンションセンター. (招待講演)
4. 山下由衣, シロイヌナズナ *CGS1* mRNA の翻訳停止における新生ペプチドのフォールディングの解析, **第10回日本蛋白質科学会年会**, 2010年6月17日, 札幌, 札幌コンベンションセンター.
 5. 山下由衣, Folding of nascent peptide is important for translation arrest in Arabidopsis *CGS1* mRNA. **21st International Conference on Arabidopsis Research**, 2010年6月9日, 横浜, パシフィコ横浜.
 6. 山下由衣, 新生ペプチドのフォールディングがシロイヌナズナ *CGS1* mRNA の翻訳停止に与える影響. **第32回日本分子生物学会年会**, 2009年12月11日, 横浜, パシフィコ横浜.
 7. Noriyuki Onoue, Translation arrest by *CGS1* nascent peptide and S-adenosylmethionine in *Arabidopsis*. **21st IUBMB · 12th FAOBMB Conference**, 2009年8月4日, Shanghai, China.
 8. 西口達也, 植物の翻訳アレストにおけるリボソーム exit トンネルの役割. **第11回日本 RNA 学会年会**, 2009年7月28日, 新潟, 朱鷺メッセ.
 9. 尾上典之, リボソームの翻訳制御: シロイヌナズナ *CGS1* 遺伝子の新生ペプチドと *S*-アデノシルメチオニンによる翻訳伸長停止機構の解析. **第11回日本 RNA 学会年会**, 2009年7月27日, 新潟, 朱鷺メッセ.
 10. 内藤 哲, 新生ペプチドによる翻訳伸長の停止と共役した mRNA 分解. **第50回日本植物生理学会年会 シンポジウム「表現型と遺伝子型の接点を探る RNA 研究」**, 2009年3月24日, 名古屋, 名古屋大学. (オーガナイザー)
 11. 尾上典之, *CGS1* 遺伝子の新生ペプチドと *S*-アデノシルメチオニンによるリボソームの翻訳アレスト機構. **第50回日本植物生理学会年会**, 2009年3月24日, 名古屋, 名古屋大学.
 12. 森本恭子, シロイヌナズナ *CGS1* 遺伝子における転写後制御: 翻訳停止における MTO1 新生ペプチドの機能解析. **第50回日本植物生理学会年会**, 2009年3月22日, 名古屋, 名古屋大学.
 13. 長谷川傑, リボソームから見たシスタチオニン γ -シンターゼ遺伝子の転写後制御機構. **第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会**, 2008年12月12日, 神戸, ポートピア.
 14. 十倉絵理, シスタチオニン γ -シンターゼ遺伝子の転写後制御における翻訳停止位置決定に関する要因. **第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会**, 2008年12月12日, 神戸, ポートピア.
 15. 尾上典之, *AtCGS1* 遺伝子の新生ペプチドと *S*-アデノシルメチオニンによるリボソームの翻訳アレスト機構. **第10回日本 RNA 学会年会**, 2008年7月24日, 札幌, 札幌コンベンションセンター.
 16. 室田勝功, シロイヌナズナ細胞抽出液を用いたシスタチオニン γ -シンターゼの転写後制御機構の遺伝生化学的解析. **第10回日本 RNA 学会年会**, 2008年7月23日, 札幌, 札幌コンベンションセンター.
- [その他]
ホームページ等
<http://arabi4.agr.hokudai.ac.jp/>
6. 研究組織
 - (1) 研究代表者
内藤 哲 (NAITO SATOSHI)
北海道大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号: 20164105
 - (2) 研究分担者
なし
 - (3) 連携研究者
なし