

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15015

研究課題名（和文）リボソームストークをハブとする翻訳関連因子プールの機能動態解明

研究課題名（英文）Investigation of translational factor pool formed around the ribosomal P-stalk

研究代表者

今井 大達（Imai, Hirotatsu）

琉球大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：00866668

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、遺伝情報の翻訳が効率よく進行するための反応場を形成するリボソームタンパク質複合体P0、P1、P2複合体（Pストーク）に焦点をあて、Pストークの新規結合タンパク質の探索と、翻訳全般におけるPストークの機能解明を目的とした。近位依存性ビオチン標識法を用いることで、これまで知られていたEF1AやEF2などの翻訳伸長因子だけでなく、翻訳開始因子やアミノアシルtRNA合成酵素、RNA結合タンパク質、リボソーム不活化タンパク質、そして機能未知タンパク質がPストーク近傍に局在することを見出し、Pストークが翻訳全般で担う多様な役割を解明するための情報基盤として重要な知見となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝情報の翻訳は最も基本的な細胞内プロセスの一つであり、その反応には多種多様な分子が関わる。本研究では、翻訳に必須である分子装置Pストークのはたらきを理解するための情報の基盤を構築した。本研究を足がかりとした「翻訳が滞りなく進行するための分子基盤」の解明により、（1）細胞システムの成り立ちの理解と、（2）翻訳の破綻が原因で生じる疾患の原因究明や治療法の確立において重要な知見が得られるようになることを期待される。

研究成果の概要（英文）：In this project, we focused on the ribosomal P-stalk, which consists of ribosomal proteins P0, P1, and P2, that form translational GTPase factor pool for efficient translation. We tried to identify novel P-stalk binding proteins and to elucidate the general role of the P-stalk in translation. Using proximity labeling, we found that not only translational GTPase factors such as EF1A and EF2, but also translation initiation factors, aminoacyl-tRNA synthetase, RNA-binding proteins, ribosome-hibernation proteins and functionally unknown proteins localize near P-stalks. This finding is important as basic information for understanding of the multiple roles of P-stalks in translation.

研究分野：分子生物学

キーワード：翻訳 リボソーム RNA

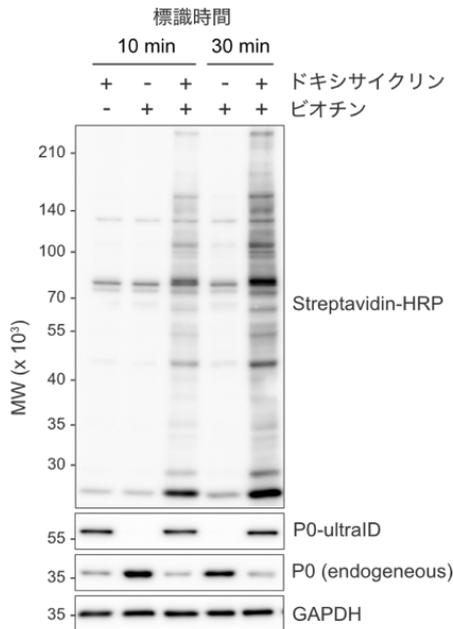


図2. ultraIDによる内在タンパク質のビオチン標識

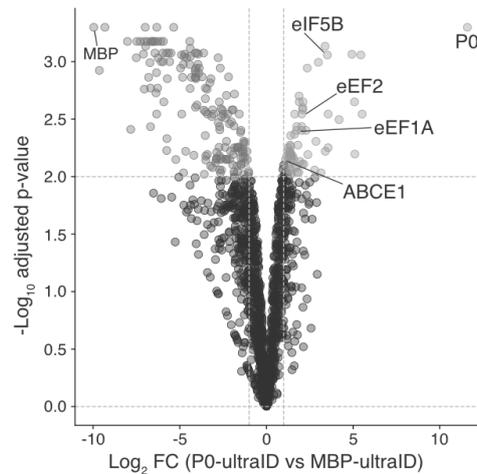


図3. 近位依存ビオチン標識法により同定されたタンパク質の比較

次に、コントロールとして、マルトース結合タンパク質 (MBP) に ultraID を融合した MBP-ultraID を安定発現する 293 細胞株を用意した。P0-ultraID でビオチン標識されたタンパク質と MBP-ultraID でビオチン標識されたタンパク質をそれぞれストレプトアビジンビーズで精製後、トリプシン消化を行い、Orbitrap LC-MS/MS を用いてマスペクトルデータを得た。MaxQuant v2.1 および proDA v3.18 を用いて P0-ultraID および MBP-ultraID 近傍に存在するタンパク質を同定した (図 3)。重要なことに、P0-ultraID によりビオチン標識されたタンパク質として、これまで P ストックと結合し活性が制御される既知の翻訳因子 (eIF5B、eEF1A、eEF2、ABCE1) が検出され、本研究で確立した実験系が P ストック結合性を示すタンパク質の探索に有効であることが示された。

P ストックと結合性を示す既知の翻訳因子の他、(1) いくつかの翻訳開始因子、(2) アミノアシル tRNA 合成酵素、(3) 翻訳品質管理因子、(4) いくつかの RNA 結合タンパク質、(5) 機能未知タンパク質が、P0-ultraID に標識されたタンパク質として同定され、ヒトにおいて P ストックが翻訳プロセスの様々な段階で機能していることを示唆するデータを得た。特に、異常終止コドンを持つ mRNA を選択的に分解するナンセンス変異依存 mRNA 分解 (NMD) を誘導するタンパク質が複数同定され、NMD において P ストックが重要な役割を担う可能性が浮上した。さらに、リボソームの活性を負に制御するリボソーム不活化タンパク質が複数同定され、P ストックは翻訳の促進のみならず、場合によっては翻訳の抑制にも寄与する可能性が示唆された。

近位依存ビオチン標識法では、ビオチンリガーゼの近傍約 10 nm 以内に存在するタンパク質がビオチン標識される。そのため、今回同定されたタンパク質が P ストックと直接結合するかどうかについて検証する必要がある。そこで、(1) すでに P ストックと結合することが既知のもの、(2) ストックと結合することが少数のグループから報告されているが他のグループから再現報告がないもの、(3) これまでの経験から P ストックと結合する可能性が高いと予想されたもの、(4) 機能未知のものを含む 21 種類のタンパク質をさらなる解析対象とし、タンパク質発現・精製系の確立を試みた。これまで 13 種類は大腸菌発現系を、7 種類はヒト培養細胞系を用いて可溶性タンパク質として発現させることができることを確認したが、残り 1 種類のタンパク質についてはどちらの系を用いても発現を確認することができなかった。現在、これらのタンパク質の精製方法についての条件検討を行っている。今後、同定されたタンパク質と P ストックの結合性と、それによる活性制御を生化学的に検証していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Imai Hirotatsu, Utsumi Daisuke, Torihara Hidetsugu, Takahashi Kenzo, Kuroyanagi Hidehito, Yamashita Akio	4. 巻 51
2. 論文標題 Simultaneous measurement of nascent transcriptome and translome using 4-thiouridine metabolic RNA labeling and translating ribosome affinity purification	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 e76 ~ e76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkad545	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 今井 大達	4. 巻 94
2. 論文標題 リボソームの触手による翻訳因子の収集機構	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 739 ~ 742
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940739	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 -
1. 著者名 Imai Hirotatsu, Utsumi Daisuke, Torihara Hidetsugu, Takahashi Kenzo, Kuroyanagi Hidehito, Yamashita Akio	4. 巻 -
2. 論文標題 Simultaneous measurement of nascent transcriptome and translome using 4-thiouridine metabolic RNA labeling and translating ribosome affinity purification	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 1 ~ 33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2023.02.15.525786	査読の有無 無
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 Yang Lei, Lee Ka-Ming, Yu Conny Wing-Heng, Imai Hirotatsu, Choi Andrew Kwok-Ho, Banfield David K, Ito Kosuke, Uchiumi Toshio, Wong Kam-Bo	4. 巻 50
2. 論文標題 The flexible N-terminal motif of uL11 unique to eukaryotic ribosomes interacts with P-complex and facilitates protein translation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 5335 ~ 5348
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkac292	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 今井 大達, 内海 大介, 鳥原 英嗣, 高橋 健造, 黒柳 秀人, 山下 暁朗
2. 発表標題 Simultaneous measurement of nascent transcriptome and translatoe using 4-thiouridine metabolic RNA labeling and translating ribosome affinity purification
3. 学会等名 第24回日本RNA学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 今井 大達, 内海 大介, 鳥原 英嗣, 高橋 健造, 黒柳 秀人, 山下 暁朗
2. 発表標題 小胞体ストレス応答におけるRNAの新規合成量と翻訳量の同時測定
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Imai Hirotatsu, Utsumi Daisuke, Torihara Hidetsugu, Takahashi Kenzo, Kuroyanagi Hidehito, Yamashita Akio
2. 発表標題 Simultaneous measurement of nascent transcriptome and translatoe using 4-thiouridine metabolic RNA labeling and translating ribosome affinity purification
3. 学会等名 RNA2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 今井 大達、内海 利男、古寺 哲幸
2. 発表標題 High-speed AFM visualizes translational GTPase factor pool formed around the ribosomal P-stalk
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 山下 暁朗、今井 大達	4. 発行年 2022年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 15
3. 書名 疾患原因遺伝子・タンパク質の解析技術と創薬/診断技術への応用（分担：10節 mRNA転写後制御の様々な生命現象，疾患における役割）	

〔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
---------	---------