

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15433

研究課題名(和文)大腸菌SecMの翻訳途上鎖が協働的に翻訳アレストを安定化する分子機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanism by which the nascent chain of E. coli SecM cooperatively stabilizes translation arrest

研究代表者

丹澤 豪人(TANZAWA, Takehito)

大阪大学・蛋白質研究所・特任研究員(常勤)

研究者番号：80899328

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,400,000 円

研究成果の概要(和文):本申請研究は,タンパク質合成を一時停止させるsecM mRNAに着目し,70Sリボソーム-SecM新生鎖複合体の構造解明により,SecM翻訳アレスト機構を理解することを目的とする.
大腸菌の内在性70Sを単離し,secM mRNAのin vitro転写後,市販の大腸菌無細胞翻訳系の中で70S-SecM新生鎖複合体を調製した.ショ糖密度勾配遠心法,負染色電子顕微鏡観察およびクライオ電子顕微鏡を用いて複合体形成を確認した.SecMアレストはリボソームAサイトにtRNAが結合すると報告されており,3つのtRNAが結合した70S複合体の単粒子解析に成功した.現在,新生鎖領域の解析を継続している.

研究成果の学術的意義や社会的意義

オニールレポートの2050年問題に取り上げられているように,薬剤耐性菌感染症による死亡率上昇の危険度は高まる一方であり,新規・改良型抗生物質の開発が急務である.
本研究で注目する真正細菌リボソームは主要な創薬ターゲットであり,現存する抗生物質の実に7割以上がリボソームを標的とする.SecMは生命維持に必須なATP駆動型膜タンパク質輸送チャネル(SecA)の上流ペプチドでSecA翻訳を調節するため,SecM翻訳アレストの分子レベルでの理解は新規薬剤探索への応用が期待できる.またSecMアレスト配列は分子生物学研究で広く利用されており,本研究成果はより精密な実験系の提案にも寄与できると期待している.

研究成果の概要(英文):The objective of this application study is to better understand the SecM translational arrest mechanism by focusing on the secM mRNA, which pauses protein synthesis on ribosome, and by elucidating the structure of the 70S ribosome-SecM nascent chain complex (SecM-RNC).

I isolated intact 70S ribosome from Escherichia coli, transcribed secM mRNA in vitro, and prepared the SecM-RNC in a commercial E. coli cell-free translation system. Sucrose density gradient centrifugation, negative staining electron microscopy, and cryo-electron microscopy were used to confirm the formation of SecM-RNC. It has been reported that the SecM arrest is caused by Pro-tRNA binding to the ribosomal A site, and I have conducted the single particle analysis of the 70S ribosome in complex with three tRNAs. Analysis of the nascent chain region is currently ongoing.

研究分野: 構造生物学

キーワード: タンパク質合成 リボソーム クライオ電子顕微鏡構造解析 翻訳アレスト SecM

科研費による研究は,研究者の自覚と責任において実施するものです.そのため,研究の実施や研究成果の公表等については,国の要請等に基づくものではなく,その研究成果に関する見解や責任は,研究者個人に帰属します.

1. 研究開始当初の背景

すべての生物で保存され、生命現象の根幹であるタンパク質合成、すなわち翻訳を司る分子機械であるリボソームは mRNA の核酸配列に格納された遺伝情報を読み取り、tRNA を介してアミノ酸配列へ情報を変換し、新生ポリペプチド鎖を合成するというタンパク質を形作るうえで必要不可欠な役割を担っている。リボソームは細胞内の特定の領域に局在し、どのタンパク質を、いつ、どこで、どのように合成するかを正確に制御する一方、ストレス等による細胞内環境変化に応じて翻訳抑制方向にも制御する。このような条件下で、翻訳伸長段階もしくは翻訳終結段階において、ある特定の遺伝子配列上で一時停止する「翻訳アレスト」が起こることで遺伝子発現が管理される（図 1）。

これまでの研究から、この翻訳アレストは真正細菌と真核生物で報告されているが、興味深いことに、アレスト配列が遺伝学的に組み込まれているにもかかわらず、配列保存性は極めて低く、新生鎖ペプチド依存性のものから低分子化合物を補因子として組み込むものまで完全に異なるメカニズムで翻訳アレストを誘導することが知られている。本申請研究では最もよく特徴付けられている大腸菌 SecM に着目する。

大腸菌 SecM は 170 残基からなる分泌タンパク質で C 末端付近に 17 残基のアミノ酸で構成されるアレストモチーフ（150-FSTPVWISQAQGIRAGP-166）が存在する。翻訳伸長段階において、このモチーフをコードする mRNA 上にリボソームが到達するとアレストが誘導される。secM 遺伝子の下流には secA 遺伝子が存在し、SecM は secA の発現制御に関与することが知られている。平時では secM-secA mRNA が二次構造を形成するので、secA mRNA の Shine-Dalgarno (SD) 配列が隠れてしまい、リボソームが結合できず SecA の翻訳が開始されない（図 2 上）。一方で、SecM の翻訳途上でアレストが起きると、SD 配列が露出し SecA の翻訳が開始される（図 2 下）。以上のことから、SecM の翻訳アレストは SecA の遺伝子発現制御において必須のシステムとなっている。

SecM のアレストモチーフは翻訳されたアレストペプチドがリボソーム出口トンネル内から翻訳アレストを誘導することが知られている。1 分子 FRET の先行研究から、SecM-C 末端の新生鎖ペプチドがリボソーム出口トンネル内でコンパクトコンフォメーションを形成し、また W155 がアレストに重要であることが示された。しかしながら、当時のクライオ電子顕微鏡構造解析の結果からは、翻訳アレスト中の新生鎖のコンパクトコンフォメーションを可視化できたものではなく、SecM の翻訳アレスト機構の構造レベルでの理解には至っていない。さらに最新の研究で、SecM の翻訳アレスト中にリボソーム出口トンネルの外に露出した SecM 新生鎖が 50S サブユニットの表面に結合することが 1 分子力学測定により明らかにされた。これらの先行研究から、SecM の翻訳アレストはアレストモチーフを含む新生鎖ペプチドがリボソーム内外で複合的に協働することで安定化すると示唆される。

2. 研究の目的

本研究では、SecM 翻訳アレスト複合体のクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析・構造解析により、3 つの特徴的なアレスト協働メカニズム (1) アレストモチーフ新生鎖のコンパクトコンフォメーションの形成、(2) リボソームによる W155 の認識、(3) リボソーム外に露出した新生鎖のリボソーム表面への結合、を明らかにする。さらに SecM 翻訳アレストにおけるリボソームの動態も視野に入れることで、最終的に翻訳アレストを新生鎖ペプチドとリボソームの両側面から理解する。

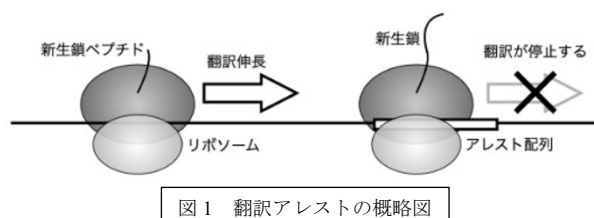


図 1 翻訳アレストの概略図

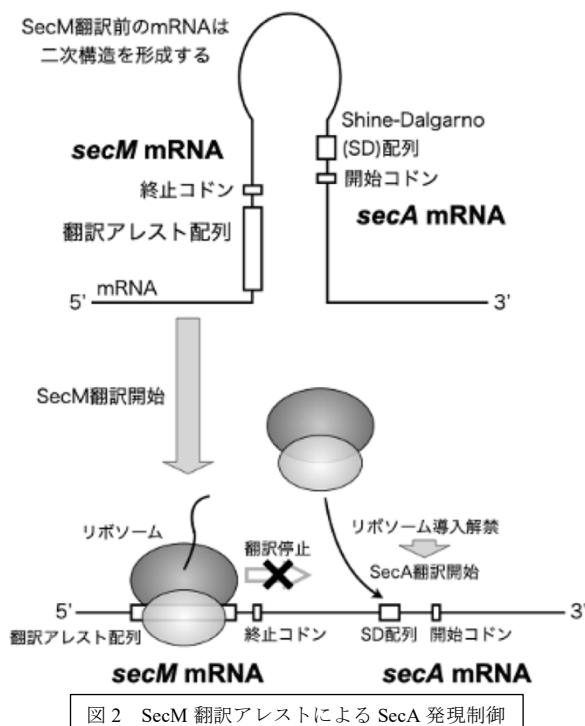


図 2 SecM 翻訳アレストによる SecA 発現制御

3. 研究の方法

1 分子 FRET と 1 分子力学測定の情報をもとに調製した大腸菌由来の野生型 *secM* mRNA および 70S リボソームを大腸菌無細胞翻訳系で反応させてリボソーム・SecM 翻訳アレスト複合体を形成させる。この複合体をショ糖密度勾配遠心法、ショ糖クッション遠心法を用いて単離・精製した後、負染色電子顕微鏡観察で確認し、クライオ電子顕微鏡を用いて高分解能での単粒子解析・構造解析を目指す。構造解析により、リボソームのペプチド転位中心およびペプチド出口トンネルのトンネル出口に焦点を当てて、SecM 新生鎖がどのようなコンフォメーションを取ることで翻訳アレストが安定化されるのかについて詳細なメカニズムを解明する。

4. 研究成果

① 大腸菌 *secM* mRNA の調製

secM mRNA をコードする DNA 配列を含むプラスミドを東京大学大学院薬学系研究科生体分析化学教室の楊倬皓博士から戴いた。このプラスミドは T7 系のベクターを基盤に *secM* mRNA および *secM* の 5' 側に 30 塩基（アミノ酸 10 残基分）からなる *myc* タグが付与されている。本研究では、*secM* の終止コドンの直下流にある制限酵素 BamHI の切断配列を同酵素で消化することによって直鎖化したプラスミドを鋳型として、CUGA7 *in vitro* Transcription Kit（ニッポンジーン）を用いて 5' 側にリボソーム結合サイト等の非翻訳領域を含む *myc-secM* mRNA を合成し、RNeasy Plus Mini Kit（QIAGEN）を用いて濃縮・精製した。

② 大腸菌リボソームの調製

大腸菌リボソームは一般に、特に経験的に MRE600 株から抽出する。本申請研究においても同様に MRE600 株を用いて無傷の野生型リボソームを単離した。研究代表者はアメリカ留学中に X 線結晶構造解析に用いるための好熱性真正細菌 *Thermus thermophilus* 由来 70S リボソームの単離方法を習熟している。しかし、研究代表者が現所属研究室に配属した当時は研究室立ち上げの最中であり、RNA 取り扱い経験者がいなかったため RNA 実験環境が整備されておらず、また超遠心機等の使用機器メーカーも異なるため、最初は RNA 調製環境を整備し、続けてリボソーム精製の条件検討から始めた。検討の詳細は割愛し、最終的な至適条件を以下に示す。

37°C, 2.5 時間培養した MRE600 株の凍結菌体を破碎し、超遠心機を用いてショ糖クッション遠心法 (P45AT: 42,000 rpm, 21 h, 4°C) を行い沈殿物を回収する。翌日、沈殿物を 1 M NH₄OAc₂ を含む高塩濃度 Buffer で振盪機 (300 rpm, 4°C) を用いて懸濁後、超遠心 (P70AT: 54,500 rpm, 2 h, 4°C) によりリボソームを沈殿させる。この操作 (高塩洗浄) を数回繰り返す。沈殿物を 100 mM NH₄OAc₂ を含む Buffer で懸濁し、ショ糖密度勾配遠心法 (P28S: 22,000 rpm, 12 h, 4°C) を行い、翌日、低温室で 70S フラクションを回収する。最後に限外濾過でショ糖の除去と濃縮を行い -80°C で保存する。

③ アレスト複合体の形成

大腸菌無細胞翻訳系 PURE_{flex} (ジーンフロンティア) に①と②で調製した *myc-secM* mRNA と 70S リボソームを加えて SecM アレスト複合体を形成させるための条件検討を行った。リボソームは *secM* mRNA 上で一時停止するため、化学量論的に、mRNA < 70S では 1 本の mRNA に対して複数個のリボソームが結合することになる。一方で、mRNA > 70S では、フリーの mRNA が多くなり、混合液内の複合体量が少なくなる。また、70S は必ず mRNA と結合するわけではなく、mRNA より 70S が少ないとフリーの 70S が多くなる可能性が示唆された。そこで、混合液中に 1 本の mRNA に 70S が 1 つ結合した複合体をより多く獲得するために反応条件を検討した。

④ 複合体形成の確認

70S/mRNA = 0.1 または 1 の条件 (37°C, 20, 30, 40 min) で反応させた後、ショ糖密度勾配遠心法を行った結果、70S と mRNA が 1:1 のときに 70S と disome (2 連リボソーム) ができるが、時間経過とともに polysome (図 3 下, 緑枠) の増加が確認された。③で述べたように、mRNA に対して 70S が少ないと、70S が複合体かフリーかの判別をつけられず (図 3 上), 最終的なクライオ電子顕微鏡撮影で得られる電頭像から粒子を抽出しても複合体が得られる確率はより低くなる。そこで、disome の先頭のリボソームも SecM アレスト複合体であることを考慮し、最終的に 70S/mRNA を 1.2 として、それ以外は PURE_{flex} のプロトコルに従い反応液を調製した。

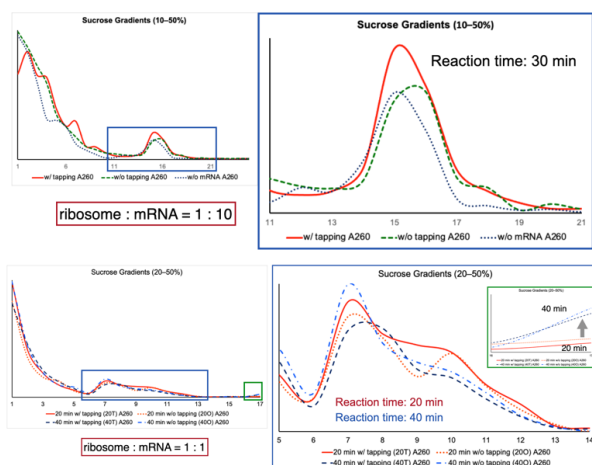


図3 ショ糖密度勾配による SecM アレスト複合体形成の確認

⑤ クライオ電子顕微鏡による単粒子解析

精製した SecM・70S 複合体を負染色電子顕微鏡観察した後、加速電圧 200 kV のクライオ電子顕微鏡 Talos Arctica G2 を用いて撮影した (図 4)。グリッドのホール内でリボソームは単分散しており、一部 2 連結から 3 連結以上の粒子が観察された (図 4 左上)。電顕像 539 枚から約 13500 の 70S 粒子が得られ、これを二次元平均画像解析において確認した (図 4 右上)。三次元再構成、三次元構造分類を繰り返すことで、幾つかの種類の 70S が得られた。先行研究から、SecM の翻訳アレストは A サイト tRNA (A-tRNA) の結合が維持されることが知られており、今回得られた 70S 粒子の中で、A-tRNA を含む 70S が 1 クラス得られた (図 4 左下)。約 42000 粒子からなるこのクラスは、70S に 3 つの tRNA が結合していたが、A-tRNA の密度マップの強度は P-tRNA や E-tRNA と比較して弱く (図 4 右下)、より分類する必要があると示唆される。また、この密度マップは Talos Arctica G2 から得られたものであり、分解能としては足りておらず、現在 300 kV のクライオ電子顕微鏡 Titan Krios G2 を用いて単粒子解析を行い、まず A-tRNA を有する 70S を得ることを目的として解析をしている。同時にリボソーム出口トンネル内の SecM 新生鎖領域の解析を継続して行っている。

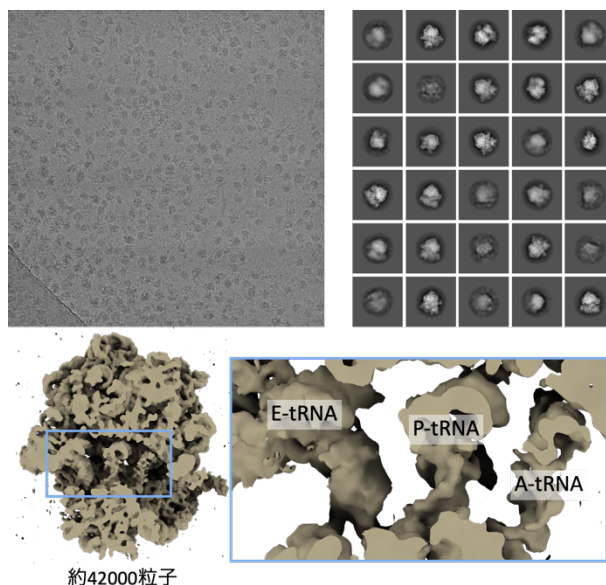


図 4 SecM アレスト複合体のクライオ電子顕微鏡観察

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1 . 発表者名 丹澤豪人
2 . 発表標題 Attempt to visualize the synthetic polypeptide during translational arrest
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

1 . 発表者名 丹澤豪人，加藤貴之
2 . 発表標題 翻訳アレスト時のポリペプチド鎖を可視化する試み
3 . 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 丹澤豪人
2 . 発表標題 Structural basis on translational arrest in ribosome
3 . 学会等名 International Symposium on Structure and Folding of Disease Related Proteins (国際学会)
4 . 発表年 2023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
---------	---------