

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24310148

研究課題名(和文)mRNAと新生ペプチドの局所構造による翻訳効率変化のゲノムワイド解析

研究課題名(英文)Genome wide analysis of translation efficiency by local structure of mRNA and nascent peptide

研究代表者

中東 憲治(Nakahigashi, Kenji)

慶應義塾大学・政策・メディア研究科・特任准教授

研究者番号：70322740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,700,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子mRNAからタンパク質が翻訳される状況を新しい実験手法で解析し、ゲノム全体の遺伝子を見た場合、翻訳開始の構造が翻訳の効率に大きな影響を与えることを明らかにした。対して、翻訳伸長の効率にも差はあったが、遺伝子全体の翻訳効率に大きな影響は与えていなかった。

また、コドン-アンチコドンの3文字目の認識や、small RNA/Hfqによる翻訳制御の実体など、ネイティブな翻訳関連因子の性質についてや、様々な抗生物質の作用機序など、これまで知られていなかった性質を示す新たな知見を得た。

研究成果の概要(英文)：We performed genome wide analysis of efficiency in mRNA translation to protein, employing new method. We experimentally showed that rate of initiation largely affected the overall efficiency of a gene, while difference in elongation efficiency by codon usage did exist but the effect was much smaller.

We also found new insights in the nature of translation apparatus and factors, such as efficiency of non-canonical codon-anticodon recognition at 3rd letter and translational regulation by sRNA/Hfq, as well as effect of nascent-peptide sequence on specificity of various antibiotics.

研究分野：システム生物学

キーワード：リボソームプロファイリング ゲノム解析技術 リボソーム 翻訳 翻訳制御 コドン

1. 研究開始当初の背景

細胞システムを定量的にとらえるには、細胞を構成する物質の存在量を明らかにするだけでは不足で、各物質がどれだけ合成または取り込まれ、どれだけ分解または排出されるかを知る必要がある。タンパク質は細胞活動の中心的機能を担っており、その合成と分解の過程を定量的かつゲノムワイドに理解することが非常に重要である。

我々は細胞の代謝システムを理解する一環として、タンパク質の分解速度の網羅的解析を行ってきた。分解と対になる、mRNA からのタンパク質の翻訳効率の網羅的解析については、これまで、プロテオームとトランスクリプトームの絶対定量から求められた例はあったが、両者のプラットフォームの違いによるバイアスや、網羅性、定量性の違いから、信頼性のあるデータを得ることは難しかった。

しかし、新世代シーケンサーの発達により、mRNA 上のリボソームの位置を網羅的に解析するリボソームプロファイルと呼ばれる手法が発表され、この結果と RNA-seq の結果を用いることで網羅的、かつ詳細に翻訳効率を明らかにできると考えられたことから、本研究を立案した。

2. 研究の目的

リボソームの mRNA 上での挙動を網羅的、かつ詳細に解析することで、遺伝子毎の翻訳効率の違いや、それをもたらす mRNA、新生ペプチドの局所構造を明らかにする。また、このデータを基に、翻訳装置や small RNA 等の翻訳制御機構の基本的性質、抗生物質による翻訳阻害の特異性について明らかにする。

3. 研究の方法

リボソームプロファイルという新しい手法を用い mRNA 上各位置のリボソーム量を網羅的、かつ精細に定量する方法を中心に用いた。具体的には、細胞から翻訳中のポリソームを抽出し、RNase 処理してリボソームにプロテクトされていないフリーの mRNA(領域)を分解、残った mRNA を small RNA シーケンスの手法を用いて高速シーケンサーで解析することで、mRNA 上の各部分の定量を行った。このデータを統計的に処理することで、特定の mRNA 構造や新生ペプチドの構造によるリボソーム密度の変化を推定する他、通常の mRNA-seq 結果と比較することで遺伝子単位のリボソーム密度を得た。

解析対象として大腸菌を用い、特定の翻訳関連装置(遺伝子)を欠損した株や、抗生物質存在下でのリボソームプロファイルの変化を解析する他、精製した大腸菌翻訳装置を用いた in vitro 翻訳系を用いたリボソームプロファイルを解析して、in vivo の結果との比較も行った。

4. 研究成果

(1) 遺伝子毎の翻訳効率

これまで、遺伝子発現の調節を行う機構として最も研究が進んでいるのは転写レベルでの調節である。転写後調節の行われている遺伝子の例も多く知られてはいるものの、前述のようにゲノムワイドに翻訳効率を調べることはこれまで難しかった。RNA-seq とリボソームプロファイルのデータを用いて解析した今回の結果では、大腸菌遺伝子の mRNA 量は上下 10%を除いて約 500 倍の差があるが、mRNA 上のリボソーム密度は 7 倍程度の差しか無く、翻訳レベルでは転写量のように大きな差はない事が分かった。

標準から外れた翻訳効率の遺伝子群を検索し、そのアノテーションを解析したところ、翻訳、DNA 複製など、基本的な生命現象に関わる遺伝子が有意に多いことが分かった。これらの遺伝子の転写単位を解析したところ、リボソームタンパク質とその修飾酵素など、必要とされる量が異なるが、同調して調節することが望ましい遺伝子が同一のオペロンをなしている率が高かった。すなわち、転写的にカップルしつつ、異なった量のタンパク質を合成するための仕組みとして、翻訳レベルの調節が使われていると考えられた。

(2) コドン毎の翻訳効率と翻訳開始効率、翻訳伸長効率

遺伝子の翻訳効率に影響する一般的な要素として、翻訳開始の効率、翻訳伸長の効率が挙げられてきた。先の章では、翻訳開始効率の上昇によって mRNA 上のリボソーム密度が上昇するという(本研究の結果検証された)仮定に基づいた計算である。一方、翻訳伸長効率とリボソーム密度の関係を調べるため、61 種類のコドンそれぞれについて A-site でのリボソーム密度を求め、同義コドン間の比較をしたところ、ほとんどのアミノ酸について、高頻度で使われるコドンはリボソーム密度が低いことが分かった(図 1)。一方で、高頻度で使用されるコドンに高い点数を与えた遺伝子毎のコドン頻度の指標である Codon Adaptation Index(CAI)とリボソーム密度を比較したところ、CAI とリボソーム密度には正の相関がある事が分かった(図 2)。2 つの結果は一見矛盾するが、コドン毎のリボソーム密度の差は僅かであり、遺伝子全長に渡って効率の悪いコドンを使ったとしても、遺伝子単位のリボソーム密度は倍にもならないことから、CAI と遺伝子毎のリボソーム密度の差は主に翻訳開始効率の差によって生じていると考えられた。即ち、ゲノムワイドに見た場合、遺伝子の翻訳効率を主に支配しているのは翻訳開始の効率であり、コドン組成による翻訳効率の違いは、通常、大きな影響を与えないことが実証された。一方で、異種タンパク質の大量発現を試みた際などで、

使用頻度の低いレアコドンの存在が発現に大きく影響することがよく知られている。この矛盾を検証するため、同じタンパク質をコードしながら、連続する5つのアルギニンコドンだけを頻度の違うコドンに置き換えた、2種類の遺伝子を導入して高発現させた大腸菌株を構築し、該当するコドンでのリボソーム密度を比較した。高頻度で使われるコドンを使った遺伝子を高発現させても殆ど影響がないものの、レアコドンを高発現させた株では、該当コドンのリボソーム密度がゲノム全体で数十倍以上に上昇していた。即ち、コドン毎の翻訳効率通常の状態ではそれほど変わらないが、コドンの使用状況が大きく変わった場合にはレアコドンの翻訳効率が極端に悪くなるのが分かった。

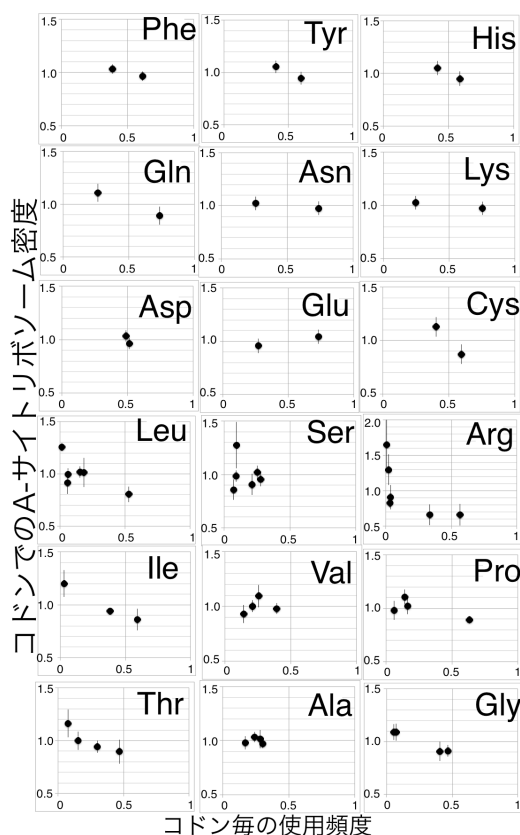


図1 コドン使用頻度とA-サイトリボソーム密度

(3) コドン、アンチコドン認識様式の解析

tRNA アンチコドンによるコドンの認識ではコドン3塩基目とアンチコドン1塩基目にワトソン・クリックペア以外のウォブルペアが許されることで、複数のコドンを1つのtRNAで認識できる。通常、ウォブルで許されるのはG:Uの対合と考えられているが、アンチコドン塩基の修飾によってこれ以外のペアも許される場合がある事が *in vitro* の研究で明らかになってきている。例えば、4コドン属のアミノ酸では、一文字目UのアンチコドンのtRNAが三文字目A, Gだけでなく、U, Cのコドンとも対合する(例、ProはCCNの4つのコドンにコードされるが、UGGのアンチコドンが4コドン全てに対合する)可能性が指摘されている。しかし、多くの生物ではG:U

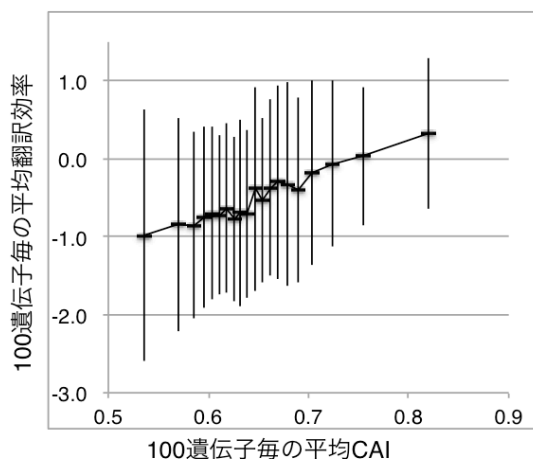


図2 遺伝子毎のCAIと翻訳効率の関係

ウォブルで説明できるだけのtRNA種が存在する(Proの例では、GGGのアンチコドンのtRNAが存在して、CCC, CCUのコドンを担当できる)ため、*in vivo*でG:U以外のウォブルペアの効率を調べることはできなかった。そこで、一文字目Uのアンチコドンを持つtRNA以外の遺伝子をゲノムから削除することで、一文字目UのtRNAだけで4コドンをデコードしなければ生存できない大腸菌株を作製し、この株を用いてコドン毎のリボソーム密度測定を試みた。多くの4コドン属アミノ酸でtRNAを一種類だけにすることができ、各コドン上のアミノ酸密度の測定からは、U:UペアではG:UやA:Uと変わらない効率でデコードが行われることを示す結果が得られた。C:Uペアについては、実験を行っていないアミノ酸でもリボソーム密度の上昇が見られることから、他の対合に比べてデコーディングの効率が悪いと考えられた。U:Nの対合とデコーディングが*in vivo*でも生育に十分な効率で行われていることを示した、これまでのコドン認識の教科書的知識を覆す結果と考えている。

(4) sRNAによる翻訳制御の解析

近年small RNAによる遺伝子発現調節が注目されている。バクテリアのsmall RNAはRNAシャペロンの機能を持つHfqと結合した後にターゲットのmRNA(主に翻訳開始領域)に結合し、翻訳効率やmRNA分解により発現調節変化をもたらす例がよく知られている。本研究では、野生株と*hfq*欠損株についてリボソームプロファイル、mRNA-seqの他、small RNA量のシーケンス解析を行って、Hfqによるsmall RNA量や遺伝子翻訳効率の変化を解析した。Hfq欠損により既知sRNAの1/3程度で量が減少したが、それらsRNAのターゲットとして知られているmRNAでは翻訳効率の変化よりもmRNA量の減少の効果が大きかった。この結果は、これまで考えられていたように翻訳抑制がsRNAの機能の主体でないことを示しており興味深い。しかし、翻訳効率の低下によりmRNAが分解に曝されやすくなった効果も含まれていると考えられるので、さら

に詳しい解析が必要である。

(5) 抗生物質の効果

多くの抗生物質がリボソームをターゲットとしている。様々な作用機序で翻訳を抑制することで効果を発揮していると考えられているが、これについて詳細に知ることが求められている。近年、構造解析等による結合部位の解析が行われるようになったが、それだけで正しく作用機序を解明することは難しい。本研究では、抗生物質の作用機序について新たな知見を得るため、計9種類の抗生物質を作用させた状態でリボソームプロファイルを取得し、薬剤無しの結果と比較して各薬剤の特徴を解析した。ここでは、大きく2つの特徴について報告する。

数種類の薬剤では、開始コドンがリボソームの P-サイトに位置する状態で停止しているリボソームの割合が極端に高く、特にテトラサイクリンでは全シグナルの1/2程度がこの状態であった。このパターンからは翻訳開始複合体を形成した状態で翻訳が停止している事が予想され、以降の過程が阻害されていると考えられる。テトラサイクリンはアミノアシル tRNA のリボソームへの結合を阻害することで伸長を阻害すると考えられており、両結果を矛盾無く説明できるような阻害機構を今後再考する必要がある。

翻訳伸長中のリボソームの停止により生じるリボソームプロファイルは、それぞれの薬剤で異なったパターンを示しており、とくに、翻訳中の A-サイトよりも mRNA の 5' 側の 10 数塩基に特徴的なパターンが現れていること、同義コドン間で同じパターンを示すことが殆どなことから、翻訳された新生ペプチドの構造によって各薬剤の翻訳阻害効果が異なることを反映していると考えられる。

(6) 翻訳開始部位の特定

ゲノムシーケンスが簡単に解析できるようになった現在でも、開始コドンの位置を情報的に正確に予想する事は難しい。前章で述べた、テトラサイクリンによる翻訳開始部位特異的なシグナルは、リボソームプロファイルによって開始コドンの位置を網羅的に高精度で明らかにできることを示している。そこで、当初の計画にはなかったものの、この情報を利用して大腸菌の翻訳開始部位の再アノテーションを試みた。2005年度版のアノテーション情報を基に、テトラサイクリン存在下でのリボソームプロファイルデータを用いて翻訳開始部位の再アノテーションを行ったところ、全部で約4000の遺伝子のうち、約150で情報とは異なる翻訳開始部位が使われていると予想された。様々な文献データを基に再アノテーションが行われた2014年版のゲノム情報と照会すると、本研究から予測した約150遺伝子のうち、60では予想した翻訳開始部位に修正されており、我々の推定が正しかったことが分かった。残りのうち半数

近くについても、予想が正しいことを示すデータを得ている。従って、テトラサイクリンを用いたリボソームプロファイルがバクテリアのゲノムアノテーションに極めて有効である事を示すことができた。

以上のように、今回の研究により、遺伝子毎の翻訳効率を網羅的に解析し、グローバルにその翻訳効率の差異に影響している構造が翻訳開始部位の構造である事、同義コドンによる翻訳伸長効率の差は存在するが、通常状態では遺伝子全体の翻訳効率を作用するほどの差では無いことをネイティブなゲノムを用いて実験的に示した。

また、これまで *in vivo* では解析されていなかった tRNA のウォブリング認識、small RNA/Hfq による翻訳制御などのネイティブな翻訳関連因子の性質について新たな知見を得た他、各種抗生物質の効果について、既存の手法による解析では得られなかった情報を得ることができた。

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 5件)

- ① Otsuka Y, Muto A, Takeuchi R, Okada C, Ishikawa M, Nakamura K, Yamamoto N, Dose H, Nakahigashi K, Tanishima S, Suharnan S, Nomura W, Nakayashiki T, Aref WG, Bochner BR, Conway T, Gribskov M, Kihara D, Rudd KE, Tohsato Y, Wanner BL & Mori H, GenoBase: comprehensive resource database of Escherichia coli K-12. *Nucleic Acids Research*, 審査有、43, D1, 2015, pp. D606-D617
- ② Nakahigashi K, Takai Y, Shiwa Y, Wada M, Honma M, Yoshikawa H, Tomita M, Kanai A and Mori H, Effect of codon adaptation on codon-level and gene-level translation efficiency *in vivo*. *BMC Genomics*, 審査有、15, 2014, 1115

[学会発表] (計 7件)

- ① 松井 求他、Hfq とデグラドソーム変異による sRNA と mRNA 翻訳への影響、第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25日、パシフィコ横浜(横浜)
- ② 野呂 絵美子他、大腸菌の増殖を抑制する人工低分子 RNA とその制御メカニズム、第16回日本 RNA 学会年会、2014年7月23-25日、ウイックあいち(名古屋)
- ③ 中東憲治 他、遺伝子レベル、コドンレベルでの翻訳効率解析、第8回ゲノム微生物学会、2014年3月8日、東京農業大学(東京)
- ④ 中東憲治 他、Ribosome profiling によ

る翻訳開始部位の精密マッピング、第7
回ゲノム微生物学会、2013年3月10日、
長浜バイオ大学(長浜)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中東 憲治 (NAAHIGASHI, Kenji)

慶應義塾大学・政策・メディア研究科・特
任准教授

研究者番号：70322740

(2) 研究分担者

森 浩禎 (Mori, Hirotada)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ
エンス研究科・教授

研究者番号：90182203

金井 昭夫 (KANAI, Akio)

慶應義塾大学・環境情報学部・教授

研究者番号：60260329