

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 2 日現在

機関番号：34304

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657095

研究課題名(和文)新しい機能を持つ翻訳途上鎖の探求

研究課題名(英文)Identification of nascent polypeptides with novel functions

研究代表者

千葉 志信(CHIBA, Shinobu)

京都産業大学・総合生命科学部・助教

研究者番号：20523517

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：翻訳途上で機能する蛋白質性の因子が近年見出されつつある。そのような背景を受け、新しい機能を持つ翻訳途上鎖の探索を目指した。その過程で、一般的なタンパク質が驚くほど高頻度で翻訳伸長の一時停止をしている事を見出しつつある。一方、このことが、翻訳途上でのみ働く新規因子の同定を困難にしている。既に同定した翻訳途上で働く因子の改変から、新しいセンサーを作成した。また、オリジナルのセンサーが膜組込機構の解析に有用であることを示した。

研究成果の概要(英文)：We tried to identify novel nascent polypeptide chains that function during being synthesized. In the course of our screening, we are realizing that vast majority of cellular proteins undergo transient pauses during translation elongation. These results are challenging our conventional view of translation elongation, while, at the same time, they are displaying too many candidates for novel regulatory nascent chains. Genetic modification of previously-identified regulatory nascent chain allowed to invent novel sensors. Original native sensors also found to function a powerful research tool to investigate molecular mechanisms of a protein membrane insertion machinery.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：蛋白質膜組込 翻訳アレスト

1. 研究開始当初の背景

蛋白質の合成中間体である翻訳途上鎖は機能を持たないものと見なされてきたために、翻訳途上鎖の生理機能に着目した研究は全くといってよいほど行われてこなかった。近年、研究代表者らは、翻訳途上の状態で機能する因子を MifM 同定し、それらの因子が、それぞれ蛋白質の膜組込の活性をモニターしていることを見いだした。このような背景をうけ、このような因子は、細胞内でタンパク質の局在化装置の活性をモニタリングする研究ツールとして利用できる可能性があるとの着想を得た。

2. 研究の目的

本研究では、(1) 新規機能を持つ翻訳途上鎖の探索と、(2) 既に同定されたアレスト因子 MifM や SecM の遺伝学的改変による、新規機能を持つ翻訳途上鎖のデザインの可能性を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

新規機能を持つ翻訳途上鎖の探索は、これらの因子が共通に持つ、翻訳の途上で翻訳伸長をアレストするという特徴を足がかりとして行った。翻訳伸長の途上で、合成中のタンパク質は、C 末端に tRNA を共有結合したペプチジル tRNA の状態で存在する。翻訳アレストを強固に起こす因子は、単一な長さのペプチジル tRNA を生成する事が予想された。そこで、*in vivo*、*in vitro* で合成されたタンパク質から、C 末端に tRNA を結合しているものを単離することで、翻訳アレスト因子を特異的に抽出することが出来ると考えた。全てのタンパク質は、合成途上でペプチジル tRNA 状態を必ず経由するが、その場合、ポリペプチド部分の長さが常に伸長し続けるため、電気泳動で単一なバンドとして検出されることはない。一方、アレスト因子は、ある特定の場所で翻訳伸長が停止するため、特定の長さのペプチジル tRNA のみが蓄積する。そのようなものは、電気泳動でバンドとして検出出来ると期待した。

遺伝子改変によって新規機能を持つアレスト因子を人工構築するために、SecM や MifM の N 末端の局在化シグナルを改変したものを各種作製した。N 末端に新たに加えたシグナルによって翻訳アレストが解除されるかどうかは、それらの因子の下流に融合したマーカー遺伝子の発現でモニターした。

4. 研究成果

新規機能を持つ翻訳アレスト因子の探索をするために、タンパク質の集団からペプチジル tRNA のみを単離する方法の確立を試みた。タンパク質とペプチジル tRNA の違いは RNA 部分の有無であるため、RNA 用精製カラムを用いることで、タンパク質を除去しつつペプチジル tRNA を精製出来ると考えた。市

販の RNA 精製用カラムを用い、結合条件や溶出条件を検討したところ、精製度の改善は見られたが、分子量の大きなタンパク質は、RNA を持たないにもかかわらず RNA 精製用カラムに結合することが分かった。逆に、タンパク質が結合しづらい条件では、ペプチジル tRNA も結合しづらい事が分かった。これは、ペプチジル tRNA の RNA 部分が比較的短いためであると推定された。この精製法は、一定の精製度を簡便な方法で達成できる方法であると思われるが、同時に、別の精製法を組み合わせる必要があることが分かった。検討すべき方法とは、リボソーム分画法や、RNA を沈降するために用いられる CTABr 沈降法、以前我々が開発した、翻訳途上鎖と翻訳完了鎖を区別して電気泳動できる Nascentome 二次元電気泳動法などがある。

大腸菌の遺伝子を *in vivo* および *in vitro* で翻訳したものを、個別に単離し、その翻訳伸長の過程で均一な長さのペプチジル tRNA が蓄積するかどうかを電気泳動で観察する方法を開発した。*in vitro* では、PURE system と呼ばれる完全精製再構成翻訳系を用い、遺伝子一つずつ翻訳した。一方、*in vivo* では、ASKA クローンと呼ばれる、個々の大腸菌の遺伝子の N 末端に His6 タグを融合したクローンを一つずつ大腸菌細胞内で発現させ、His6 タグを利用して精製し、電気泳動で解析した。このような解析を、網羅的に行い、現在 1000 遺伝子以上を解析した。その結果、*in vivo* でも *in vitro* でも、8 割以上の遺伝子が、翻訳途上で少なくとも 1 回以上一時停止するとの結果が得られつつある。このことは、翻訳伸長速度の変動が、これまで考えられていた以上に一般的に起こることを示唆する驚くべき結果であり、そのメカニズムや生物学的意味合いを調べるのが非常に重要である。一方、あまりにも多くの遺伝子が翻訳途上で一時停止するとの予想外の結果は、これらの遺伝子の中で、翻訳アレストを利用して翻訳途上で機能するものを探索するという当初のアプローチを困難にした。しかしながら、翻訳伸長が変動するという現象がグローバルに起こっているという発見は、非常に大きなインパクトを秘めているため、今後、この翻訳の一時停止現象について探求することで、翻訳の真の姿が明らかになるとともに、新規翻訳アレスト因子の発見にも繋がるものと期待される。特に、翻訳アレスト因子は、往々にして、ピューロマイシンに対して耐性を示す。今回の解析でも、翻訳の一時停止がピューロマイシンで解除されるかどうかを合わせて解析した。この結果は、新規翻訳アレスト因子の探索に利用可能な有用な情報である。

既に見出されている SecM や MifM の N 末端改変により、新規機能を持つアレスト因子を探索した。MifM の N 末端の膜貫通領域は、YidC

依存的な膜組込によって MifM が膜に組み込まれると、MifM の C 末端で起こる翻訳アレストを解除する。このことが、MifM が YidC 膜組込装置の活性をモニターするのに必要な性質である。この N 末端膜組込シグナルを、分泌シグナルへと置き換えたものは、分泌経路をモニターする様にその性質を変えた。さらに、様々な構造や物理化学的性質を持つ疎水性領域を N 末端に融合したものを作製したところ、そのうち幾つかは、タンパク質の膜組込や分泌経路によって翻訳アレストが解除されたことが示唆されるような結果を得た。このことは、これらの人工因子が YidC 依存膜組込経路以外のプロセスをモニターしている可能性を示唆している。今後、その詳細を検討していく必要がある。その次の段階として、蛋白質膜組込経路のみならず、細胞質に存在する ATP 依存性プロテアーゼやシャペロンなどの細胞装置をモニターする因子を作製したいとの目論見があったが、プロテアーゼやシャペロンの認識配列として報告されているものとの人工融合タンパク質を作製したところ、翻訳アレストが解除されているとの結果は現時点では得られていない。翻訳アレストの解除について、もしかしたらまだ明らかにされていない条件や、分子機構が存在している可能性も否定できず、この分子機構の基本的な部分をさらに追求していく必要があることが、再確認された。

SecM 分子を網羅的に遺伝解析したところ、N 末端シグナル配列と、C 末端の翻訳アレスト配列以外にも、翻訳アレストの制御に関与するかも知れない領域がある可能性が浮上した。すなわち、この両モチーフに挟まれた中間領域の、ある特定の配列を欠失もしくはアミノ酸置換することで、翻訳アレストが安定化すると結果が得られた。どのような分子機構でこの新たに同定されたモチーフが翻訳アレストの安定性に寄与するのかは、今後追求していく必要があるが、*in vivo* および *in vitro* の解析を総合すると、この領域は、単に翻訳アレストそのものの安定性に影響を与えているだけであるという考えでは説明することが出来ない。むしろ、SecM の分泌に伴う翻訳アレストの解除の場面で、そのアレストの安定性もしくは解除の効率化に影響を与えているものと考えられる。

以上、新規翻訳アレスト因子の探索および人工構築を目指して行われた本研究において、まず、ペプチジル tRNA の精製法に進展が見られた。次に、翻訳プロファイルのシステムティックな解析から、翻訳伸長の一時停止が、これまで我々が認識している以上に頻りに細胞内で起こっていることが明らかになってきた。このことは、本研究の当初の目的である、アレスト因子のスクリーニングを困難にするものであったが、一方で、翻訳伸長速度の変動がこれほどまでにグローバル

な現象であったという新たな発見は、遺伝情報の機能発現において生物学的に重要な意味合いを持つ可能性があり、将来的には、当初想定していたもの以上の大きな発見に繋がるきっかけになるかも知れない。今後、この問題を継続的に研究する必要がある。また、その試みの延長上に、今回の目標であった新規アレスト因子の発見も見えてくるものと思われる。新規機能を持つアレスト因子の人工構築については、蛋白質の局在化をモニターする因子を複数構築する事に成功した。一方、タンパク質の局在化装置以外の細胞装置をモニターするようなアレスト因子の構築には、さらなる検討が必要であることが分かった。例えば、SecM の遺伝学的解析から明らかになってきた、翻訳アレスト解除に関与する新たな領域の存在など、アレスト装置の人工構築を行う上で我々が理解しておくべき事がまだ隠されている可能性も一方では浮上した。翻訳アレストの分子機構とその解除のメカニズムの全貌を明らかにすることが、翻訳アレスト因子を自在に改変応用するために必要であることが再認識された。

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 2件)

Ito, K. and Chiba, S. (2013) Arrest peptides: cis-acting modulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* 82, 171-202. 査読有り
DOI:
10.1146/annurev-biochem-080211-105026.

Chiba, S. and Ito, K. (2012) Multisite ribosomal stalling: A unique mode of regulatory nascent chain action revealed for MifM. *Mol. Cell* 47, 863-872. 査読有り
DOI: 10.1016/j.molcel.2012.06.034.

(学会発表)(計 7件)

千葉志信、伊藤維昭「翻訳アレストを介した枯草菌 MifM による蛋白質膜組込因子 YidC の制御」グラム陽性菌ゲノム機能会議、2013 年 9 月 7 日～9 日(筑波)
千葉志信、伊藤維昭「枯草菌 MifM は、ユニークな翻訳アレストを介して蛋白質膜組込因子の発現量を調節する」第 7 回細菌学若手コロッセウム、2013 年 8 月 7 日～9 日(広島市)
千葉志信、伊藤維昭「MifM induces multisite ribosome stalling in monitoring membrane protein biogenesis」Ribosome Conference 2013、2013 年 7 月 9 日～12 日(Napa Valley, California, USA)

千葉志信、伊藤維昭「枯草菌 MifM によるユニークな翻訳アレストと蛋白質膜組込因子の制御」、第 10 回 21 世紀大腸菌研究会、2013 年 6 月 20 日～21 日(静岡県・修善寺)

千葉志信、伊藤維昭「枯草菌 MifM によるユニークな翻訳アレスト様式を利用した蛋白質膜組込のモニタリング」、Ribosome meeting、2013 年 3 月 28 日～29 日(東京)

千葉志信、伊藤維昭「枯草菌膜組込モニター-MifM のユニークな翻訳アレスト機構」、グラム陽性菌ゲノム機能会議、2012 年 8 月 31 日～9 月 1 日(焼津)

千葉志信、伊藤維昭「合成途上鎖の働きと運命」第 12 回蛋白質科学会年会、2012 年 6 月 20 日～22 日(名古屋)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉 志信 (CHIBA, Shinobu)

京都産業大学・総合生命科学部・助教

研究者番号：20523517