

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：24506

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660082

研究課題名(和文) 遺伝子暗号に従わない翻訳終結/再開のメカニズムの解明：試験管内再構成系を用いて

研究課題名(英文) Elucidating the mechanism by which translation stops and goes without translation initiation and termination factors: use of a translation system reconstituted with human factors

研究代表者

今高 寛晃 (Imataka, Hiroaki)

兵庫県立大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50201942

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト因子由来再構成型タンパク質合成システムを樹立した。この系で、脳心筋炎ウイルスの2A2B領域をコードする部分を翻訳すると、2Aと2Bが分断されて合成されてきた。このことは2A2Bの分断には特別な因子を必要としていないことを示している。更に、翻訳終結因子eRF1, eRF3を除いてもこの現象が起こることから、2A2Bの翻訳終結・再開はペプチド鎖伸長の際に起こることが証明された。また、この現象のメカニズムを解明するために、様々な変異を2A2Bの分断部位に施した。特記すべきことに、所謂NPGP配列をNPGGやNPGQに変異させてもでは80%近くの分断率を示した

研究成果の概要(英文)：We established an in vitro protein expression system reconstituted human translation factors. When the 2A2B region of encephalomyocarditisvirus was translated with this system, the 2A and 2B proteins were separately generated, indicating that this processing does not require any special factor. Even when eRF1/3 was omitted from this system, the 2A2B processing was observed, suggesting that this processing occurred during the elongation of the peptide by the ribosome (J. Biol. Chem. 289: 31960-31971). To further explore the mechanism of this processing, we examined various mutations of the amino acid sequence of the 2A2B region. Notably, when the NPGP sequence was mutated into NPGG or NPGQ, the processing occurred with a high efficiency.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：翻訳 タンパク質合成 再構成 翻訳開始 翻訳終結 ペプチド鎖伸長 ウイルスタンパク 新生ペプチド

1. 研究開始当初の背景

我々はヒト細胞抽出液由来の試験管内タンパク質合成システムを開発し (Mikami et al, *Protein Expr Purif* 46:348) (Mikami et al, *Protein Expr Purif* 62:190) このシステムを用いてピコルナウイルスの一種である脳心筋炎ウイルス (EMCV) を試験管内で合成することに成功した (Kobayashi et al, *J Virol Methods* 142:182) (Kobayashi et al, *Biotechnol Letters* 34:67)。このウイルス合成の研究過程で我々は遺伝子暗号に従わない翻訳終結/再開を発見した。EMCV のゲノム RNA は ORF(L-1A-1B-1C-1D-2A-2B-2C-3A-3B-3C-3D) をコードし、翻訳後プロテアーゼにより多くのポリペプチドに分断される。しかし、EMCV ポリプロテインが最初に分断される箇所: 2A と 2B の間の分断はプロテアーゼに依らないことがわかってきた。この現象はプロテアーゼに依るものでなく、翻訳という過程で起こるものであることがわかった。さらに分断には 2A と 2B の全領域が必要なのではなく、2A の C 末側 18 アミノ酸と 2B の先頭アミノ酸であるプロリンだけで十分であることもわかってきた。

2. 研究の目的

そこでこの 2A2B の分断、すなわち翻訳終結・再開のメカニズムを探ることにした。

3. 研究の方法

我々がこれまで用いていたヒト細胞抽出液由来の試験管内タンパク質合成システムはすべての因子が含まれており、メカニズムの解析には向かない。そこで、まず、再構成型翻訳システムを樹立し、そこで、2A2B を翻訳し、分断に必要な因子を決定する、という方法を取った。

4. 研究成果

(1) ヒト因子由来再構成型翻訳システムを完成させた。このシステムはヒト由来の翻訳開始因子 (eIFs)、伸長因子 (eEF1, eEF2)、終結因子 (eRF1,3)、リボソーム、tRNA、20 種類のアミノアシル tRNA 合成酵素 (ARS) としてアミノ酸、ATP などから成る。このシステムで luciferase, PABP, beta-Gal など 120 kDa くらいのタンパク質までを合成できた。各因子をそれぞれ除くと、タンパク質の合成は無くなることから、このシステムは上の因子に完全に依存した翻訳系であることがわかった (*J. Biol. Chem.* 289: 31960-31971)。

(2) このヒト因子由来再構成型翻訳システムを用いて、2A2B 領域を翻訳させると 2A と 2B が分断されて合成されてきた。このことから 2A2B の分断には特別な因子を必要としないことがわかった。そして翻訳終結因子 eRF1, eRF3 を除いてもこの現象が起こることから、2A2B の翻訳終結・再開はペプチド鎖

伸長の際に起こることが証明された (*J. Biol. Chem.* 289: 31960-31971)。

この現象のメカニズムを更に解明するために、様々な変異を 2A2B の分断部位に施した。所謂 NPGP 配列 (2A の最後の 3 アミノ酸が NPG、2B の最初のアミノ酸が P) をそれぞれ A に変えると、NPG の場合 (APGP, NAGP, NPAP) はいずれも分断が起きなかったが、NPGA では分断は 50% で起こった。そこで A だけでなく他のすべてのアミノ酸に置換すると NPGG や NPGQ でも 80% 近くの分断率を示した。このことは従来の考え方「プロリンの脱プロトン化が起こりにくい核攻撃が遅く、2A ペプチドの影響で活性化された水分子が P サイトにあるペプチジル tRNA のエステル結合を先に攻撃し、ペプチドが離れる」には合致せず、新たなモデルの必要性が提示された。

更に、アミノ酸置換を 2A の C 末 18 アミノ酸にも施し分断率を測定すると、特に、疎水性アミノ酸の G への置換が分断を阻止することがわかった。これは、リボソームのペプチドトンネルの疎水性部位との 2A 末端との相互作用の重要性を示唆している。

5. 主な発表論文等 査読有

(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 4 件)

1. Kodai Machida and Hiroaki Imataka (2015)

Production methods of virus particles.

Biotechnology Letters 37: 753-760 査読有

doi: 10.1007/s10529-014-1741-9

2. Kodai Machida, Satoshi Mikami, Mamiko

Masutani, Kurumi Mishima, Tominari Kobayashi,

and Hiroaki Imataka (2014) A translation system

reconstituted with human factors proves that

processing of encephalomyocarditisvirus proteins

2A and 2B occurs in the elongation phase of

translation without eukaryotic release factors

J. Biol. Chem. 289: 31960-31971 査読有

doi:10.1074/jbc.M114.593343

3. Mamiko Masutani, Kodai Machida, Tominari

Kobayashi, Shigeyuki Yokoyama, and Hiroaki

Imataka (2013) Reconstitution of eukaryotic

translation initiation factor 3 by co-expression of

the subunits in a human cell-derived in vitro

protein synthesis system

Protein Expr. Purif 87: 5-10 査読有

doi: 10.1016/j.pep.2012.10.001

4. Tominari Kobayashi, Jun Yukigai, Kosaku Ueda, Kodai Machida, Mamiko Masutani, Yuri Nishino, Atsuo Miyazawa and Hiroaki Imataka (2013) Purification and visualization of encephalomyocarditisvirus synthesized by an in vitro protein expression system derived from mammalian cell extract

Biotechnology Letters 35: 309-314. 査読有

doi: 10.1007/s10529-012-1086-1

〔学会発表〕(計 22 件)

1. 試験管内ウイルス合成

町田 幸大、重田 友明、今高 寛晃

日本農芸化学会2016年大会シンポジウム 2016年 3月30日 札幌コンベンションセンター (札幌市) 招待講演

2. ヒト因子由来完全再構成型無細胞翻訳系の樹立

重田 友明、町田 幸大、今高 寛晃

日本農芸化学会2016年大会 2016年 3月28-30日 札幌コンベンションセンター (札幌市)

3. 翻訳開始因子に依存したヒト由来再構成型翻訳系

重田 友明、町田 幸大、石井 陽子、玉越 智也、向田 芳純、今高 寛晃

第38回 日本分子生物学会年会 2015年 1月1-4日 神戸ポートアイランド (神戸市)

4. ヒト因子由来再構成型タンパク質合成/フォールディング共役システムによる人工細胞の創出

町田 幸大、重田友明、榎本愛、島田将行、湊元幹太、今高 寛晃

第38回 日本分子生物学会年会 2015年 1月1-4日 神戸ポートアイランド (神戸市)

5. 翻訳開始に依存したヒト因子由来再構成型翻訳系の樹立

重田 友明、町田 幸大、石井 陽子、玉越 智也、向田 芳純、今高 寛晃

細胞を創る研究会 8.0 2015年 11月 12-13日 大阪大学吹田キャンパス銀杏会館 (吹田市)

6. ヒトの人工細胞構築に向けたヒト因子由来再構成型翻訳/フォールディング共役系の樹立

町田 幸大、重田友明、榎本愛、島田将行、湊元幹太、今高 寛晃

細胞を創る研究会 8.0 2015年 11月 12-13日 大阪大学吹田キャンパス銀杏会館 (吹田市)

7. ヒト因子由来再構成型翻訳系の樹立

重田 友明、町田 幸大、石井 陽子、玉越 智也、向田 芳純、今高 寛晃

第67回日本生物工学会大会 2015年 10月 26-28日 城山観光ホテル(鹿児島市)

8. 人工ヒト細胞の創出に向けて

町田 幸大、重田友明、榎本愛、島田将行、湊元幹太、今高 寛晃

第67回日本生物工学会大会 2015年 10月 26-28日 城山観光ホテル(鹿児島市)

9. 翻訳開始因子を含むヒト因子由来完全再構成型翻訳系の樹立

重田 友明、町田 幸大、石井 陽子、玉越 智也、向田 芳純、今高 寛晃

第10回無細胞生命科学研究会 理化学研究所(横浜市) 2015年 10月 13-14日

10. ヒトの再構成型タンパク質合成/フォー

ルディング共役系を内在したヒト人工細胞の創出

町田 幸大, 重田友明、榎本愛、島田将行、湊元幹太、今高 寛晃

第10回無細胞生命科学研究会 理化学研究所 (横浜市) 2015年 10月 13-14日

11. 翻訳開始を含むヒト因子由来再構成型翻訳システムの樹立: RNA ウイルス合成に向けて

重田 友明、町田 幸大、石井 陽子、玉越 智也、向田 芳純、今高 寛晃

第17回日本RNA学会年会

2015年 7月15-17日 ホテルライフオー
札幌 (札幌市)

12. 再構成型翻訳・フォールディングシステムの樹立: 人工ヒト細胞構築に向けて

町田 幸大、重田友明、榎本愛、島田将行、湊元幹太、今高 寛晃

第17回日本RNA学会年会

2015年 7月15-17日 ホテルライフオー
札幌 (札幌市)

13. A New Experimental Tool: Translation System Reconstituted with Purified Human Factors.

Hiroaki Imataka, Kodai Machida and Tomoaki Shigeta

Protein & Peptide Conference 2015 4月25-28日

Nanjing International Youth Conference Hotel (南京、中国) 招待講演

14. 真核細胞のコトランスレーショナル、ポストトランスレーショナルなイベントの解析: 再構成型タンパク質合成システムを用いて

今高 寛晃 町田幸大

第87回日本生化学会 2014 10月 15-18
京都国際会議場 (京都市) 招待講演

15. ヒト因子由来再構成型タンパク質合成システムを利用したシャペロニン CCT と補因子の相互作用解析

町田幸大, 今高 寛晃

第9回無細胞生命科学研究会 大阪大学医学部銀杏会館 (吹田市) 2014年 10月8-9日

16. 試験管内ウイルス合成

今高 寛晃 町田幸大

第66回生物工学会 2014 9月 9-11日
札幌コンベンションセンター (札幌市)
招待講演

17. 真核細胞のタンパク質合成

今高 寛晃

東京慈恵会医科大学 (品川区 東京)
ポリアミンと核酸の共進化 第13回
シンポジウム
2014年 6月28日 招待講演

18. ヒト因子由来再構成型タンパク質合成システムの開発と応用

町田幸大, 今高 寛晃

第61回日本生化学会近畿支部例会 2014
5月30日 京都産業大学(京都市)

19. 標準的なコドンが必要としないタンパク質合成の終結と再開始: ヒト因子由来再構成型翻訳系を利用した解析

町田幸大, 木下裕司, 今高寛晃

第36回 日本分子生物学会年会 2013年 12月3-6日 神戸ポートアイランド(神戸市)

20. ヒト因子由来再構成型タンパク質合成装置: ウイルス合成に向けて

今高 寛晃

細胞を創る研究会6.0 2013 11月 14-15
鶴岡市先端研究産業支援センター (鶴岡)

市) 招待講演

21. 標準的なコドンが必要としないタンパク質合成の終結と再開: ヒト因子由来再構成型翻訳系を利用した解析

町田幸大, 木下裕司, 今高寛晃

第8回無細胞生命科学研究会 新潟大学
中央図書館(新潟市) 2013年 10月 21,22日

22. 終止コドンも開始コドンも必要としない翻訳終結と再開: ヒト因子由来再構成型翻訳システムを用いた解析

町田幸大, 三島胡桃, 舩谷真美子, 今高寛晃

第15回日本RNA学会年会
2013年 7月24-26日 愛媛県民文化会館(松山市)

〔図書〕(計1件)

1. Tominari Kobayashi, Kodai Machida and Hiroaki Imataka (2014)
Human cell extract-derived cell-free systems for virus synthesis. In: Alexandrov, K. and Johnston, W.A. (Eds.), Methods in Molecular Biology 1118, Cell-free protein synthesis: Methods and Protocols. Humana Press, pp149-156.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
今高 寛晃 (IMATAKA HIROAKI)
兵庫県立大学・工学研究科・教授

研究者番号: 50201942

(2) 研究分担者
()

研究者番号:

(3) 連携研究者
()

研究者番号: