

令和元年6月10日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15073

研究課題名（和文）翻訳速度リズムの変動が翻訳共役的フォールディングに与える影響

研究課題名（英文）Influence of the change in the dynamics of the protein translation on the translation-coupled folding

研究代表者

丹羽 達也 (Niwa, Tatsuya)

東京工業大学・科学技術創成研究院・助教

研究者番号：50588530

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）：タンパク質翻訳の速度変化のリズムがタンパク質フォールディングに与える影響を網羅的に調べるために、プロリンが連続する配列の翻訳を促進する因子であるEF-Pの有無、および細胞内のコピー数が少ないtRNA（レアtRNA）の補完による影響をショットガンプロテオミクスなどの手法で解析した。しかしながら、EF-Pについてはフォールディングに影響するようなモデルタンパク質を見つけることができず、レアtRNA補完ではそもそも翻訳速度リズム変化があまり起きていないことが確認された。一方、リボソーム上で合成される新生ポリペプチド鎖とリボソームトンネルとの相互作用を改変させることで影響を与える可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質翻訳と共役したフォールディングという新たな考えについて、タンパク質の翻訳を改変するような条件を設定し、タンパク質全体（プロテオーム）の変化の解析を試みた。その結果、タンパク質の翻訳機構が非常に複雑であるせいか、その条件を設定すること自体が難しいことが明らかとなった。しかしながら、タンパク質翻訳の「場」であるリボソームと新しく作られる途上のポリペプチド鎖との相互作用が新たな「鍵」となる因子である可能性が示唆された。これらの結果は、タンパク質翻訳およびフォールディングという基礎的な学問領域において新しい視点を生み出しているものである。

研究成果の概要（英文）：To analyze the influence of the change in the dynamics of the protein translation on the translation-coupled folding, we observed the proteomic changes by the deletion of a specific translation factor and an addition of the specific tRNAs. However, we could not observe a specific change by the change in the translation dynamics. On the other hand, we found that the disruption of the interaction between a newly synthesized polypeptide and a ribosome tunnel altered the translation dynamics on some proteins. This observation suggests that the interaction between a newly synthesized polypeptide and a ribosome tunnel may be another factor of the change in translation-coupled protein folding via the alternation of the translation dynamics.

研究分野：生化学

キーワード：タンパク質フォールディング タンパク質翻訳 ショットガンプロテオミクス

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質はすべての生物において様々な機能を担う非常に重要な生体高分子であり、その種類も非常に多岐にわたる。ほとんどのタンパク質において、その機能を発揮するためには自身のアミノ酸配列によって決められた固有の立体構造を形成する(フォールディングする)ことが必要である。しかしすべてのタンパク質が自分でフォールディングできるわけではなく、多くのタンパク質が分子シャペロンと呼ばれる補助因子を必要とすることが知られている。分子シャペロンにも多くの種類があり、それぞれの作用メカニズムや、どのような種類のタンパク質に作用しやすいかなどについて、古くから盛んに研究がおこなわれてきている。

近年、リボソーム上で行われるタンパク質合成(翻訳)の局所的な速度の変化が一部のタンパク質のフォールディングに大きく関与するという報告がいくつかなされてきており、分子シャペロン以外のタンパク質フォールディングの成否に関わる新たな要因としてタンパク質翻訳の速度変化(リズム)が注目されはじめてきている。しかしながら、まだ特定のタンパク質について個別の知見が得られ始めている段階で、全体論として翻訳のリズムがタンパク質フォールディングに与える影響についてはほとんど議論されていない状況である。

2. 研究の目的

上記のような背景のもと、本申請では LC-MS/MS を利用した定量プロテオミクス解析を利用することで、人為的に翻訳のリズムを改変させた際に細胞内タンパク質全体がどのように変化するかを調べ、この課題に対して新しい知見を得ることを目指した。LC-MS/MS を用いたプロテオミクス解析はここ 10 年くらいの間に急速に発展してきている手法であり、細胞内のタンパク質全体(プロテオーム)の発現量変化を一度に網羅的に解析することができるため、細胞内全体でどのようなことが起きているかを調べるための非常に強力な手法の 1 つとなっている。

3. 研究の方法

翻訳のリズムを改変する方法として、プロリン連続配列の翻訳を促進する因子である EF-P をコードする遺伝子の欠損による影響と、大腸菌内でのコピー数が少ない tRNA (レア tRNA) をプラスミド DNA で補完することによる影響、の 2 種類について評価を行うことにした。これらの大腸菌株を作成・準備し、定量プロテオミクス解析に用いた。またタンパク質フォールディングの変化をより直接的に捉えることを目指し、大腸菌細胞質の主要なプロテアーゼ(タンパク質分解酵素)である Lon をコードする遺伝子の欠損も併せて利用することとした。

LC-MS/MS を利用した定量プロテオミクス解析を行うために、比較的最近開発された手法である SWATH-MS 法を採用した。この手法は定量性が良いだけでなく、ラベルフリーで定量することが可能であるため、菌体の生育条件などの制限が少なく、使い勝手のよい定量法である。

4. 研究成果

(1) *efp* 欠損株およびレア tRNA 発現プラスミドの導入によるプロテオーム変化

まず EF-P をコードする遺伝子である *efp* を欠損させた株についてのプロテオーム変動を調べたところ、約 800 種類のタンパク質について野生型に対する発現量の変化を定量化することができた。連続プロリン (PP) 配列を含んだ特定の配列モチーフ (XPPY および PPP) を持つもので発現量の低下が見られる傾向があるという過去の報告に倣い、それらの配列を含むものの発現量変化を調べたところ、例外もいくつかみられるが、全体的にみると発現量が減少する傾向にあることが確認された(図 1 左)。しかしながら、同様の解析を、Lon プロテアーゼをコー

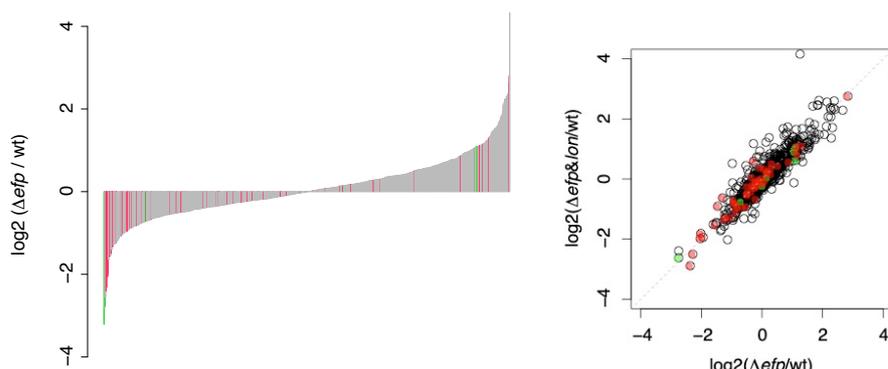


図 1

efp 欠損株におけるプロテオーム変化
左: 野生株に対する変化量の分布
右: *efp* 単独欠損と *efp*&*lon* 欠損による変化量の比較

それぞれ赤は XPPY モチーフ、緑は PPP モチーフを持つものを示している

ドする遺伝子 *lon* を同時に欠損させた株を用いて行なったところ、配列モチーフの有無に関わらずほぼすべてのタンパク質の発現量変化が *efp* 単独欠損株とほぼ一致した (図 1 右)。このことから、これらの中に大きなフォールディング状態の変化を伴うようなものは存在しないと考えられる。実際に *efp* 欠損株で発現量が増減したものを調べてみると、約 80 種類のタンパク質で発現量が 2 倍以上に増加、約 40 種類のタンパク質で発現量が 2 倍以下に減少するなど、比較的大きなプロテオーム変動がみられているものの、いずれも糖代謝やクエン酸回路に関わる酵素群などが主であり、フォールディング以外の影響 (おそらく配列モチーフを持ったものの発現量低下に伴う二次的な変化) による変化ばかりが色濃く見えてしまっていることが考えられる。

尚、*efp* 欠損株のプロテオーム解析については、LC-MS/MS 測定のための前処理の操作が当初の予想以上に安定しなかったことに加え、復帰突然変異体の出現などによって、予定していたよりも多くの時間を費やすこととなってしまった。復帰突然変異体については、興味深い挙動を示すことが示唆されているため、今後もその解析を継続して行なっていくつもりである。

レア tRNA 発現プラスミドの導入によるプロテオーム変化についても *efp* 欠損株と同様に解析した結果、1,000 種類を超えるタンパク質について定量値を得ることができた (図 2)。レア tRNA の増加による変化は、レアコドンに局所的に多く含んだタンパク質でより強く起こるだろうと考え、自作のプログラムを用いて各遺伝子からレアコドンが密集する部位 (レアコドンクラスター) を抽出して、プロテオーム変動との比較を行なった。レアコドンクラスターは「連続する 9 アミノ酸の中にレアコドンが 4 つ以上」という比較的緩やかな定義で選抜をおこなった。しかしながら、レアコドンクラスターを持つものは機能未知タンパク質やプロファージ領域に存在するものが多いせいか、選抜した 118 種類のタンパク質のうちプロテオームで再現よく発現が確認できたものは 14 種類しかなく、さらにそれらの中でレア tRNA 発現プラスミドの補完によって発現量の増加がみられたものはわずか 3 種類であった。その 3 種類のうち 2 種類は翻訳に共役したフォールディングのモデルとは無関係だと考えられる内膜タンパク質とペリプラズムのタンパク質であり、残りの 1 つも過去の網羅解析でシャペロンがなくても可溶するという結果が確認されているタンパク質であった。

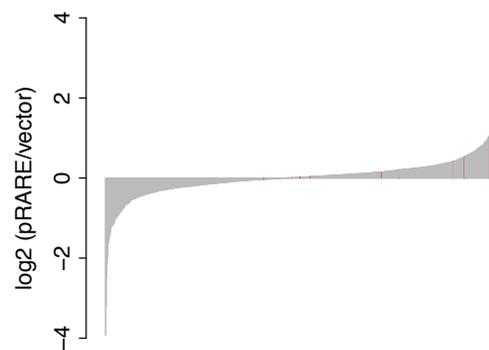


図 2 レア tRNA 補完による発現量変化の分布
赤はレアコドンクラスターを持つもの

レアコドンクラスターを考慮せず、単にプロテオームの変動としてみた場合、発現量が 2 倍以上に増加および減少したものがそれぞれ約 30 種類程度と、*efp* 欠損株と比べると全体的な変化は小さいものであった。大きく変動したタンパク質について調べてみると、*efp* 欠損株と同様、代謝に関わる酵素群が多く含まれていたことから、レアコドンの読み方の変化による変動というよりは、レア tRNA を追加で発現させたことによる代謝の細かい変動を捉えてしまっている可能性が高いと考えられる。

(2) リボソームプロファイリング法を用いた解析

上述したように、LC-MS/MS を用いた定量プロテオミクス解析では当初想定したような変化を検出することが困難である可能性が高いと考え、タンパク質翻訳の動態をコドンレベルで調べることができる手法であるリボソームプロファイリング法を用いることにした。リボソームプロファイリング法による解析については、理化学研究所の岩崎信太郎主任研究員に協力していただいた。また *efp* 欠損株については既に他のグループによる解析結果が報告されていたため解析は行わなかった。

レア tRNA を補完した条件でリボソームプロファイリング法を行なったところ、2,000 種類を超える遺伝子についてデータを取得することができた。プロテオームデータに対する解析と同様に、レアコドンクラスターを持つものについて調べてみたところ、やはり発現量が少ない (もしくは実際に発現していない) ものが多いせいか、シグナルを得ることができたのは 25 種類にとどまった。これら 25 種類について実際のシグナルを確認したが、いずれもレア tRNA の補完の有無による特徴的な変化はみられなかった。またレアコドンクラスターの有無とは関係なしに、64 コドンごとの総リード数の変化や、Assymetry Score を用いた解析、Gini Index を用いた解析なども行なってみたが、いずれの結果も、レア tRNA 補完による翻訳動態の特徴的な変化を捉えることができず、レア tRNA 補完による翻訳動態の変化自体がほとんど起きていないことを強く示唆する結果となった。

これらを踏まえて考えると、(少なくとも対数増殖期で順調に増えている) 大腸菌細胞内においては、レアコドンクラスターに起因する翻訳動態の積極的な制御はほとんど行われていないだろう、という結論に至った。

(3) リボソームトンネル内を改変した大腸菌変異株の解析

上述したように、EF-P やレア tRNA 補完による効果をうまく捉えることができなかったため、タンパク質翻訳の速度リズムに影響を与えうる別の要因として、新しく作られたポリペプチド鎖(新生鎖)とリボソームトンネルとの相互作用に着目をした。具体的には、トンネルの中で新生鎖と相互作用する部位を改変した株を作成し、その細胞内での挙動を調べることで、翻訳リズムの変化がタンパク質フォールディングに与える影響の評価に繋がらないかと考えた。

はじめに SWATH-MS 法による定量プロテオミクス解析を行なったところ、1,000 種類以上のタンパク質について野生型に対する発現量の変化を定量することができた。しかしながら、*efp* 欠損やレア tRNA 補完の結果と同様、大きな変化を示したものの多くは様々な酵素であり、二次的な変化が主に捉えられている可能性が高いと考え、リボソームプロファイリング法を用いて翻訳動態が本当に変化しているかを直接調べることにした。その結果、レア tRNA 補完の解析結果とは異なり、数十種類程度の遺伝子について、リボソームトンネル内の改変に由来すると思われる大きな翻訳動態の変動を確認することができた。図3に代表的な例を示した。このように、実際に変動が確認できた遺伝子については、その産物のフォールディングの性質や翻訳と共役させた際のフォールディング能などについて今後詳細に調べて行く予定である。

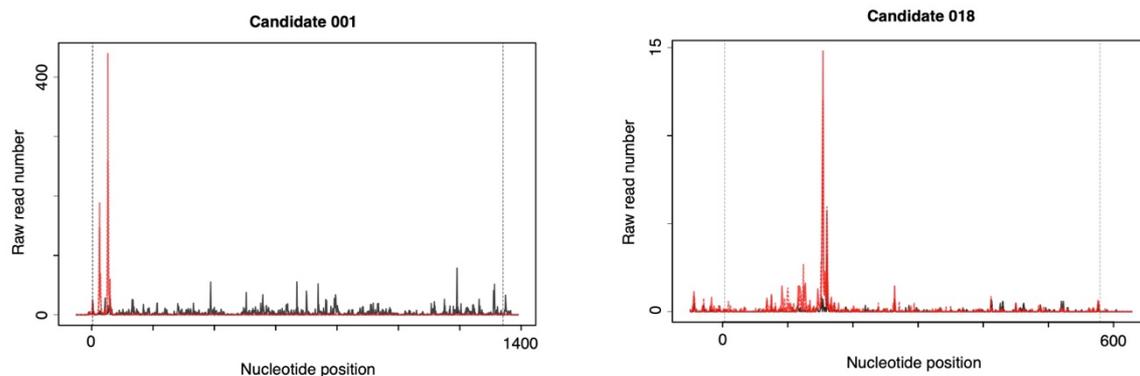


図3 リボソームトンネル内を改変した変異株で確認されたタンパク質翻訳動態の変動の例
それぞれ黒が野生株、赤が変異株におけるリボソームフットプリントを表している

(4) まとめと今後の展望

翻訳速度リズムの変化がタンパク質フォールディングに与える影響を網羅的に評価するために、プロリン連続配列の翻訳を促進する因子である EF-P の有無、および細胞内のコピー数が少ない tRNA (レア tRNA) のプラスミドによる補完の有無、の2つの条件について実際に解析を行なったが、どちらの条件でもグローバルな変化を捉えることはできなかった。この結果から考えられることとしては、EF-P については単なる連続プロリン配列に対する促進効果自体が弱いこと、また特に効果があると考えられるモチーフを持つもの (XPPY および PPP) はその数自体が少なく、この中からは翻訳共役的なフォールディングが重要であるものがそもそも存在しない可能性が示唆された。またレア tRNA 補完の有無についても、大腸菌の遺伝子自体が進化的にレア tRNA に対応するコドンを使用しないように選択圧がかかけられているためか、特定の外来タンパク質には効果があるとしても、内在性のタンパク質については翻訳速度リズムを変動させるほどの影響を与えない可能性が示唆された。その一方で、タンパク質合成途上の新生ポリペプチド鎖とリボソームトンネルとの相互作用の改変では翻訳速度リズムの変化が確認されたことから、翻訳速度リズムの変化が様々な要因によって複合的に引き起こされている可能性が強く示唆された。このような考え方を基に、今後はリボソームトンネルの改変体を用いた解析を引き続き行なっていくとともに、上記の因子が複合して起こるようなものを配列などから予測するなどの配列解析や、上記以外の因子の可能性も視野に入れながら、細胞内での翻訳速度リズムと翻訳共役的なフォールディングとの関わりについてより深く調べていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計0件）

〔学会発表〕（計0件）

〔図書〕（計0件）

〔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：

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：

国内外の別：

〔その他〕

網羅解析によって得られた実験データについては、成果を論文としてまとめて報告をした後、速やかに公共のデータレポジトリで公開する予定である。

6. 研究組織

(1) 研究分担者：なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名： 田口 英樹 教授（東京工業大学 科学技術創成研究院）

ローマ字氏名： Hideki Taguchi

研究協力者氏名： 茶谷 悠平 博士（東京工業大学 科学技術創成研究院）

ローマ字氏名： Yuhei Chadani

研究協力者氏名： 岩崎 信太郎 主任研究員（理化学研究所 開拓研究本部）

ローマ字氏名： Shintaro Iwasaki

※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、研究者個人に帰属されます。