

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14925

研究課題名(和文) 翻訳因子による呼吸代謝のスイッチ機構の解明

研究課題名(英文) Study on metabolic shift regulated by translation factor

研究代表者

松山 晃久 (Matsuyama, Akihisa)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・専任研究員

研究者番号：90399444

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、翻訳因子eIF5Aにのみ起こるハイプシン化修飾の翻訳における役割を明らかにするため、ハイプシン化欠損株で発現レベルが低下するタンパク質としてスクリーニングで得られた候補タンパク質を用いて、特にそれらの配列中のどの部分がハイプシン化の影響を受けるかについて調べた。部分欠失変異体を作製し、ハイプシン化の有無でタンパク質レベルが変化するかどうかを調べた結果、最終的にいくつかの配列に絞り込まれた。しかし、それらの配列には共通性はなく、これまでeIF5Aが制御する配列として報告されている配列とも一致しないことから、eIF5Aは修飾の違いにより異なるタンパク質の翻訳を制御することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the role of hypusination, a post-translational modification specific to translation factor eIF5A, in translation, we identified several mRNA sequences whose product levels were affected by the presence or absence of hypusination. The fact that sequences whose translation require hypusination of eIF5A did not overlap with those identified as targets of eIF5A suggested that eIF5A alters target proteins according to its modification status.

研究分野：分子生物学

キーワード：翻訳

1. 研究開始当初の背景

古くに翻訳開始因子として単離された eIF5A (eukaryotic translation initiation factor 5A) は、その分子内に「ハイブシン」と呼ばれるリジン残基にスペルミジンの側鎖が結合した特殊なアミノ酸を含むタンパク質である。ハイブシン化は eIF5A にのみ起こる修飾であり、二段階の酵素反応で生成する。高等生物ではどちらの反応も生育に必須であるが、酵母では二段階目の OH 基の付加反応に欠損があっても生育できる。興味深いことに、分裂酵母では二段階目の反応をおこなう酵素 DOHH (Mmd1) の変異体において、ミトコンドリアの凝集、呼吸活性の低下などミトコンドリアに顕著な異常を生じる。なぜハイブシン化の異常がミトコンドリアの機能欠損につながるのか、そのつながりは謎であった。研究代表者は当時、eIF5A が翻訳関連因子であることから、分裂酵母の全タンパク質について、eIF5A のハイブシン化が不完全になる *mmd1* 遺伝子破壊株と野生株でそれぞれ発現させ、*mmd1* 破壊株で発現レベルに影響を受けるタンパク質を網羅的にスクリーニングしていた。その結果、呼吸鎖複合体を形成するタンパク質など、いくつかのミトコンドリア好気呼吸鎖関連タンパク質が特異的に減少することを見出した。これらの結果と、eIF5A のハイブシン化には酸素が必要であるということを考え合わせ、研究代表者は eIF5A がハイブシン化を通じて周囲の酸素環境を感知し、好気呼吸に必要なタンパク質の翻訳制御を行うことによって代謝活性を調節するという仮説を立てていた。

2. 研究の目的

(1) eIF5A が自身に起こる翻訳後修飾であるハイブシン化を通して周囲の酸素の酸素環境を感知し、嫌気(あるいは低酸素)条件下では酸素呼吸に必要な因子の翻訳を抑制するという仮説を実験的に証明する。

(2) eIF5A がどのようにして標的タンパク質のみを選択的に制御できるのか、その分子メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

まずは分裂酵母を好気条件から嫌気条件へと移した時に、確かに eIF5A の修飾状態が影響を受けることを確認する必要がある。そこで、eIF5A のハイブシン化が途中で止まり、中間体であるデオキシハイブシン化 eIF5A が生じていることを確認した。また、ハイブシン化欠損株では好気条件においても細胞内の代謝経路が嫌気条件よりシフトしていることを代謝活性を調べることに

より確認した。

さらに、ハイブシン化の欠損時に影響を受けるタンパク質の部分欠失変異体を作製することにより、eIF5A が標的としている配列を同定した。

4. 研究成果

まず始めに、eIF5A が酸素センサーとして機能するためには、その大前提として、周囲の酸素環境に応じてハイブシン化レベルが変化していなければならない。そこで、eIF5A のハイブシン化レベルを抗ハイブシン抗体を用いたウェスタンブロッティングによって調べた結果、確かに嫌気条件下では eIF5A のハイブシン化が低下することが明らかとなった(図1)。

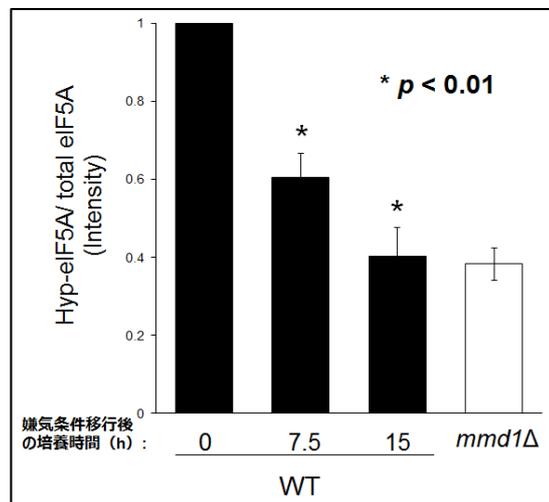


図1. 嫌気条件における eIF5A のハイブシン化レベル

また、ハイブシン欠損株である *mmd1* 遺伝子破壊株について、好気条件下でも酸素呼吸能が低下し、それを補うために解糖系・醗酵の活性が上昇しているかどうかを調べたところ、*mmd1* 遺伝子破壊株ではミトコンドリアの呼吸活性が低下し、逆にエタノール醗酵の活性化が確認された(図2)。

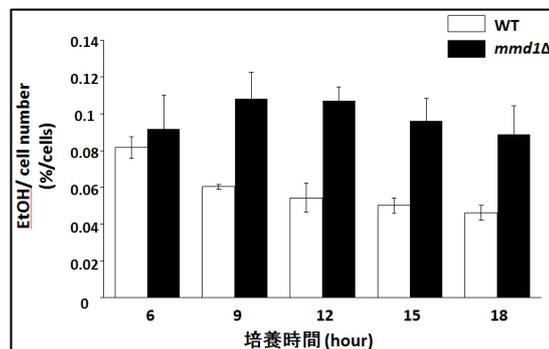


図2. *mmd1* 変異株のエタノール生産量

以上のことから、研究代表者の当初の仮説通り、*mmd1* 変異株では代謝のスイッチが起こっていることが明らかとなった。

さらに、eIF5A がどのようにして特定の標的だけを選び出して制御しているのか、そのメカニズムを明らかにするため、部分欠失変異体を作製することによって標的配列の同定を行った。その結果、いくつかのタンパク質についてハイプシン化の影響を受ける配列を絞り込むことに成功した。しかし、それらの配列には共通性がなく、さらに、近年 eIF5A の標的として報告されているいくつかの配列とも一致しなかった。そこで、リボソームプロファイリングの手法を用いて、*mmd1* 変異株特異的にリボソームが一時停止しやすい部位をスクリーニングした(図3)。

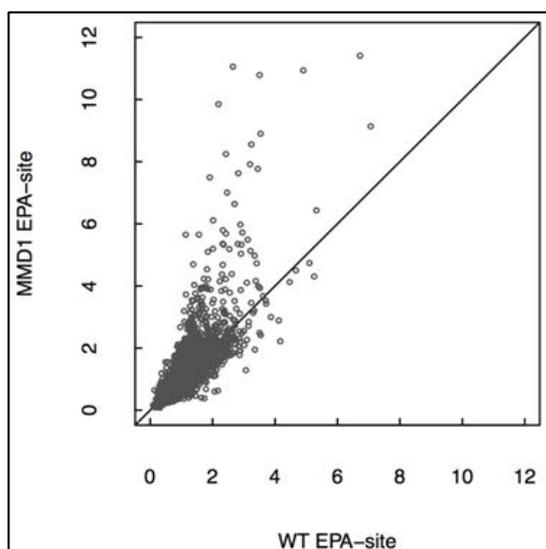


図3. リボソームプロファイリングにより明らかになった *mmd1* 変異株におけるトリペプチドの翻訳効率の偏り(各ドットが配列の異なるトリペプチドを表す)

リボソームプロファイリングの結果からも、ハイプシン化依存的に翻訳制御を受ける配列を見出すことができたが(図3において対角線から離れているペプチド)これらの配列も報告されている eIF5A の標的との一致性が低かった。

これらの結果から、eIF5A はそのハイプシン化状態に応じて標的を変えている可能性が示唆された。これまでの研究では eIF5A そのものを欠失あるいはノックダウンすることによって標的配列が検討されているため、本研究のように翻訳後修飾に注目した研究は行われておらず、本研究により初めて翻訳後修飾に依存した翻訳制御の存在が示された。

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1件)

1. “Preparation of Cell Lysates of Fission Yeast for Immunoprecipitation”
Matsuyama A., Shirai A., Yoshida M.
Methods in Molecular Biology, 1721: 125-133, 2018. 査読無
DOI: 10.1007/978-1-4939-7546-4_12

〔学会発表〕(計4件)

1. “The role of eIF5A and its post-translational modifications in protein translation”
Magpantay H., Kondo N., Matsuyama A., Yoshida M.
9th International fission yeast meeting, 2017年5月, Banff, Canada
2. “Novel mechanism regulating metabolic switch from aerobic to anaerobic respiration”
Matsuyama A.
Frontiers in aging research toward healthy longevity, 2016年11月, 東京
3. 「翻訳因子 eIF5A によるエネルギー代謝制御」
近藤 直子, 白井 温子, 松山 晃久, 夏目 徹, 堂前 直, 浜本 牧子, 吉田 稔
日本農芸化学会 2016 年度大会, 2016年3月, 札幌
4. “A role of eIF5A hypusination on an oxygen-dependent metabolic shift”
Kondo N., Shirai A., Matsuyama A., Natsume T., Hamamoto M., Yoshida M.
8th International fission yeast meeting, 2015年6月, 神戸

〔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

松山 晃久 (MATSUYAMA, Akihisa)

国立研究開発法人理化学研究所 環境資源

科学研究センター・専任研究員

研究者番号： 90399444

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()