

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19167

研究課題名(和文)非メチオニン翻訳開始大腸菌の創出から捉える開始メチオニンの意義

研究課題名(英文)exploring the significance of initiation methionine by creation of non-methionine translation initiation E. coli

研究代表者

長尾 翌手可(Nagao, Asuteka)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・助教

研究者番号：30588017

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文):タンパク質合成はメチオニンから始まるということは生物の普遍的な事象の一つであるが、その理由については明らかになっていない。今回、細胞内の全開始tRNAを改変しメチオニン以外のアミノ酸でタンパク質合成が開始するような大腸菌を創出し、遺伝子発現や表現型の異常を観察することで開始メチオニンの役割や意義を解明することを試みた。実験系の構築は成功したが、全タンパク質合成での開始メチオニンの置換を試みると細胞が生存できなくなることが判明した。一方、開始tRNA上の37位塩基の変異によって非AUG開始遺伝子の翻訳が減少することが分かり、37位塩基が翻訳開始に重要な役割を持つことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内の全開始tRNAを目的の改変型にするために、大腸菌ゲノムを改変しカウンターセクション法によって変異型tRNA発現プラスミドと完全に置き換える方法を確立した。これまで変異tRNAを発現させる方法はあったが、完全に置換する方法はなく、目的tRNAが細胞内で機能するかどうかの判別に有効である。今回、目的の変異開始tRNAは獲得できず開始メチオニンの重要性を強調する結果となったが、その過程でこれまで報告がないような37位の塩基が翻訳開始に重要な役割を示唆することができた。また、タンパク質N末端解析の必要性から、合成中新生鎖の質量分析解析法といった新しい検出法を確立し、学会等で報告している。

研究成果の概要(英文):The fact that protein synthesis begins with methionine is one of universal facts in living cells. However, the reason has not been elucidated. In this study, we attempted to elucidate the significance and function of initial methionine in protein synthesis by modifying initiator tRNA to charge amino acid other than methionine and creating E. coli cells in which protein synthesis begins with non-methionine amino acids. As a result, although we succeeded to construct the assay system for our purpose, it was found that the replacement of initial methionine caused the cell death, suggesting the essentiality of initial methionine in protein synthesis. On the other hand, in the process of this research, we found that mutations at position 37 of initiator tRNA reduced translation efficiency of non-AUG start mRNA, indicating that A37 of initiator tRNA plays an important role in translation initiation.

研究分野：分子生物学

キーワード：タンパク質合成 tRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質発現の制御機構を理解することはあらゆる生命現象を解明する上で重要な糸口となる。タンパク質合成は、翻訳開始因子タンパク質のサポートのもと、リボソームとメチオニンを受容した開始 tRNA が開始コドンを認識するところからスタートする。そのため、全てのタンパク質はメチオニンから合成される。この全てのタンパク質合成がメチオニンから始まるということは生物の普遍的な事象の一つであり、その役割を明らかにすることはタンパク質を基盤にする生命現象の解明につながるだけでなく、遺伝子の開始点を規定するという観点から、いわば遺伝子の成り立ちといった根本的な課題を理解する糸口となることが期待できる。しかし、これまでタンパク質合成開始にメチオニンが使われることの意義については明確な答えが出ていない。進化学的な観点からは、タンパク質合成を何かのアミノ酸で始めなければならず、たまたまメチオニンが選ばれ進化の過程で固定されてしまったのではないかと考えられているが、その意義については未解明である。このようなことを鑑みるに、この普遍的な事象について多くの人が当たり前に考え議論されず通り過ぎてきたか、あるいは過去の研究が失敗に終わり全く知見が得られなかったのではないかと推測された。開始メチオニンの機能については、タンパク質の構造解析では一般的に末端部分は不安定であるためアミノ末端のメチオニンを観察するのが難しく、また、タンパク質の機能解析についての生化学的な実験で開始コドンに対して変異を入れるようなことはまずないため、開始メチオニンの機能を探求するようなことについては行われていない。このように、何故タンパク質はメチオニンから始まるのかという疑問に取り組んだ研究はこれまでになく、この全生物に共通する原理の解明は宙に浮いた状態である。

2. 研究の目的

本研究では、何故タンパク質合成はメチオニンから開始するのかという疑問に取り組むために、全タンパク質合成がメチオニン以外のアミノ酸から始まる細胞を作成し、その細胞にどのような異変が起きるか観察することで本来の開始メチオニンの役割や意義について理解することを目的とする。本研究の目的を達成するためには、タンパク質内部のメチオニンやメチオニンに関わる代謝経路に影響せず、タンパク質の開始メチオニンのみを置換する必要がある。本研究では、タンパク質合成開始に使われるメチオニンが開始 tRNA によって開始コドンに運ばれることに注目し、開始 tRNA の改変によって他のアミノ酸を運搬させることで、全てのタンパク質をメチオニン以外のアミノ酸から始まる細胞を作成できるのではないかと考えた。こうすることで、タンパク質内部のメチオニンやメチオニンの代謝経路などへの影響は極力妨げられ、タンパク質の開始アミノ酸による影響のみを知ることができる。開始 tRNA にメチオニン以外のアミノ酸を受容させるためにはそれを担うアミノアシル tRNA 合成酵素の性質上、そのアンチコドンを変更しなければならないが、アンチコドンを変更させると開始コドンを認識できなくなる危惧がある。しかし、通常の遺伝暗号解読はリボソーム A サイトで起き、その識別は厳格であるが、開始 tRNA は唯一 A サイトを経験しない tRNA であるため、アンチコドンを変更しても開始因子に認識されれば開始コドンを認識できるのではないかと予想された。実際、大腸菌では遺伝子の約 10% が開始コドンとして AUG ではなく GUG、UUG を採用している事実もこの予想を支持するものであると考えられた。以上のようなバクテリアの翻訳開始メカニズムについての考察とその脆弱性の予想に基づいて、本研究ではメチオニン以外のアミノ酸を受容し、かつ細胞内で実際に機能するような開始 tRNA の探索を可能とする実験系の構築を先ず目指すことにした。

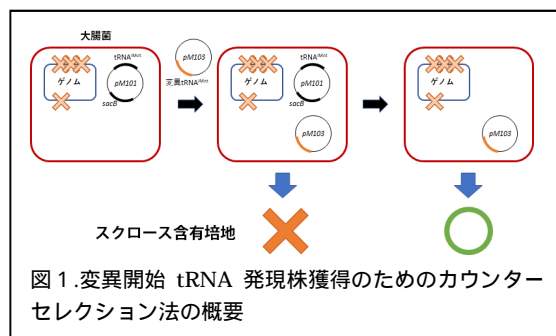
3. 研究の方法

本研究では先ず大腸菌を用いて目的の改変開始 tRNA 変異株の作成を試みる。方法としては、遺伝子工学的手法を用いて、大腸菌ゲノムにコードされている 4 種類全ての開始 tRNA 遺伝子を欠失させ、プラスミドにコードした開始 tRNA によって生存できるような大腸菌細胞を作成する。このプラスミドを、変異型開始 tRNA 遺伝子をコードするプラスミドによって置き換えることで、細胞内の全ての開始 tRNA が変異型開始 tRNA とすることができる(カウンターセレクト)

オン法)。変異箇所をライブラリー化することによって網羅的な変異型開始 tRNA 配列の探索が可能になり、変異株はプラスミド由来の開始 tRNA に依存しているため、変異型開始 tRNA が機能するかどうかは細胞の生死で判別することができる。目的の変異株が作成できた場合、網羅的な mRNA の発現量解析や翻訳効率解析、プロテオーム解析、様々な表現型解析を行い、遺伝子発現状態や代謝経路に生じている異変を詳細に観察し、開始メチオニン置換による影響を追求する。また、作成した変異株の応用面での利用を考慮し、新しいタンパク質発現系としての利用法についても探索する。

4. 研究成果

まず、目的の変異開始 tRNA を獲得するための実験系を構築した(図1)。大腸菌の開始 tRNA 遺伝子は4コピーがゲノム上に存在するが、野生型開始 tRNA をコードしたプラスミド(pM101)によって開始 tRNA を相補しつつゲノム上の開始 tRNA 遺伝子全てを欠損させ、pM101 由来の開始 tRNA によって生存するような大腸菌を作成した。次に、細胞内で変異型開始 tRNA を発現させその機能を調べるため



には、pM101 を変異型開始 tRNA をコードしたプラスミド(pM103)によって完全に置換する必要がある。そのため、pM101 上に sacB 遺伝子を挿入し恒常的に発現させ、pM101 が細胞内に残存している場合スクロース含有培地では生存できないように工夫した(カウンターセクション法)。以上のようにして、変異型開始 tRNA が細胞内で機能した場合にのみ生存してくる大腸菌を獲得できる実験系を構築した(図1)。ネガティブコントロールとして、アンチコドン領域を欠落した変異開始 tRNA を発現させた場合、生育する大腸菌が出現しなかったため実験系構築は成功したと考えた。次に、開始 tRNA のアンチコドン部位を中心に塩基を改変し、生育可能な変異開始 tRNA の探索を進めた。まず、アンチコドンを1塩基ずつ元の開始 tRNA と異なる塩基に改変していったところ、全ての場合について生育可能な変異 tRNA は得ることができなかった。次に、アンチコドンを中心に3,5,7塩基についてランダム化を行った。その結果、計9種類の変異開始 tRNA の配列をもつ開始 tRNA 変異細胞を単離することができたが、得られた変異体では複数種のプラスミドが共存した状態で生存していることが判明した。それらを分離し個々のプラスミドから発現する変異開始 tRNA の機能の解析を繰り返し試みたが、これらの変異体は変異開始 tRNA プラスミドの共存状態を維持しないと生存できないことが分かった。これらの変異体では、翻訳開始においてお互いに機能を補っている可能性が示唆された。また、単離に成功した変異体の変異開始 tRNA が受容しているアミノ酸の解析を行った結果、グルタミンを受容していることが分かった。次に、細胞内タンパク質のN末端アミノ酸の解析を質量分析によって試みた。N末端アミノ酸は合成直後に酵素的に除去されてしまうため、検出できるN末端断片は少なかったが、一部のタンパク質はグルタミンから開始していることが観察できたものの、メチオニンから開始していたものも複数観察された。後の解析で、このプラスミドには野生型開始 tRNA 遺伝子が挿入されており、恐らく pM101 から偶然的に組み変わってしまったと考えられた。このように複数種のプラスミドの共存や組み変わりが発生したため、使用するプラスミドのコピー数にその原因があると考え、低コピー数のプラスミドを使用して実験系を再構築した。その結果、複数種のプラスミドが共存する現象は低下したが、得られた変異開始 tRNA はメチオニンを受容するものであった。このように今回、目的の開始 tRNA を獲得することができず、開始メチオニンの重要性を強調するものとなった。

しかし、その過程で獲得した変異開始 tRNA の中で、37位の塩基に変異が入ったものや化学修飾が施されるような変異開始 tRNA を発現する変異細胞では、低温感受性を示すなどの生育異常がみられた。特に、化学修飾が付加された変異体についてはリボソームプロファイリング解

析を行ったところ、翻訳開始位置でのリボソームの蓄積が遺伝子全体に見られた(図2)。また、プロテオーム解析を行うと、非AUG開始遺伝子において顕著な翻訳量の低下が観察された(図2)。これは、37位塩基が翻訳開始、特に非AUG開始遺伝子の翻訳開始に重要な役割を果たしている可能性を示唆するものであった。37位の塩基が細胞内のタンパク質合成に影響しているといった報告はこれまでなく、翻訳開始メカニズムの理解の上で興味深い知見を得たと考えている。また、上述したように、タンパク質N末端メチオニンの多くは合成直後除去されてしまうため、成熟したタンパク質ではN末端のアミノ酸解析は難しい。そのため、本研究では、合成中の新生タンパク質をペプチジル tRNA の状態で抽出し、質量分析によって解析する系の構築を試みた。その結果、大腸菌の500種類近くの合成中タンパク質の同定に成功し、N末端についてもホルミル基が付加した状態での新生ペプチド鎖を検出することができた。これによって、除去される前のN末端アミノ酸を網羅的に解析することができると考えており、タンパク質合成についての新たな解析手法となることが期待できる。

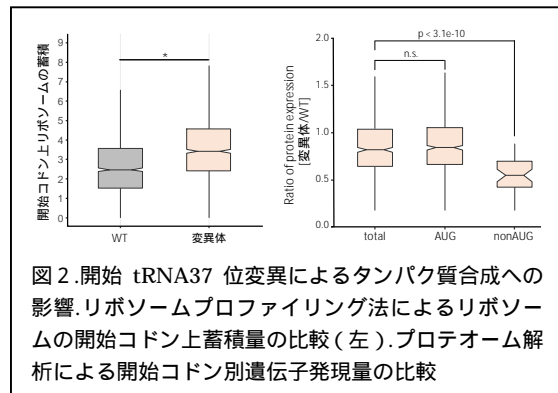


図2.開始 tRNA37 位変異によるタンパク質合成への影響. リボソームプロファイリング法によるリボソームの開始コドン上蓄積量の比較(左). プロテオーム解析による開始コドン別遺伝子発現量の比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西あゆみ、阿曾直文、長尾翌手可、鈴木勉
2. 発表標題 翻訳伸長過程におけるリボソーム内ペプチジルtRNAの網羅的解析
3. 学会等名 第21回日本RNA学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西あゆみ、秋山奈穂、阿曾直文、長尾翌手可、鈴木勉
2. 発表標題 Global analysis of peptidyl-tRNAs and translational regulation mediated by nascent chains during elongation
3. 学会等名 第26回Tokyo RNA Club
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考