

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月17日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2008～2012

課題番号：20247020

研究課題名（和文）

Nascent Chain（合成途上鎖）の分子生物学

研究課題名（英文）

Nascent chain biology

研究代表者

伊藤 維昭 (ITO KOREAKI)

京都産業大学・総合生命科学部・教授

研究者番号：90027334

研究成果の概要（和文）：「合成途上鎖の分子生物学」の開拓と推進を行った。機械的で単調なものと思われていた翻訳伸長過程が、緩急の制御を伴って進行することを示し、その分子機構と生物学的意義の解明を行った。翻訳を一時停止することによって働く制御タンパク質 SecM や MifM の作用機構を解明した。また、より一般的にタンパク質の合成途上鎖（nascentome と命名）を検出して、翻訳進行の実像を明らかにする実験系を開発した。

研究成果の概要（英文）： We develop a new area of research, which might be called "nascent chain biology" by addressing a concept that translation elongation speed is fine-tuned by the amino acid sequences of the nascent polypeptide as well as by dynamic behaviors of the extra-ribosomal portion of the same nascent chain. We identified regulatory nascent polypeptides such as SecM and MifM that function in accordance with this principle and studied molecular mechanisms and physiological outcomes of the regulation. Also, we have developed an experimental method that enables us to display cellular polypeptidyl-tRNAs, obligatory but poorly studied intermediates in translation, which we have proposed to call "nascentome".

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2009年度	15,400,000	4,620,000	20,020,000
2010年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2011年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2012年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
総計	32,400,000	9,720,000	42,120,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：翻訳

1. 研究開始当初の背景

大腸菌においてタンパク質を細胞質から細胞膜を越えて運ぶ Sec タンパク質膜透過装置の中でタンパク質膜駆動因子 SecA は多様な構造と細胞内局在性を取り、その発現は細胞のタンパク質分泌能が低下したとき翻訳レベルで上昇する。secM は secA の上流に位置して secA とオペロンを形成し、分泌モニタータンパク質をコードする。我々は、SecM

は翻訳アレストを起こすアミノ酸配列持ち、それがリボソームの脱出トンネルの狭窄部位などと相互作用して伸長アレストを起こすことを発見した。分泌欠損状態ではアレスト状態が持続し、立ち停まったリボソームが secM-secA 間の mRNA 二次構造を破壊して secA の翻訳開始配列を露出させて新たなリボソームによる secA の翻訳を促進することが考えられ、実際 SecM は正常細胞における

SecA 翻訳の基底レベルの維持、および低温などでの分泌欠損に応じた *secA* の発現上昇に必須の役割をもつことが解明された。一方、SecM は翻訳途上に膜透過装置と相互作用するによって *secM-secA* mRNA を膜の近傍に局在化し、SecA ポリペプチドが機能的な構造を取るのを助ける「cis-chaperone 機能」を持つことも示唆された。このような SecM による SecA の発現制御の研究から、リボソームはどのようなアミノ酸配列でも滞りなく翻訳できるわけではないこと、そしてリボソームに繋がれた合成途上鎖が細胞の生理的状态をモニターする機能を持ち得るといふ新しい知見・概念がもたらされた。

2. 研究の目的

本研究では、リボソームに繋がれた合成途上鎖が遺伝子発現制御機能を発揮することがあるとの新発見を発展させ、合成途上タンパク質の動態と機能をより一般的に解明することを目的とする。そして、SecM および他の調節性アレストタンパク質の翻訳アレスト制御の分子機構と cis-シャペロン機能の分子実体を明らかにし、翻訳のスピード制御を介したタンパク質の機能発現制御と遺伝子発現制御の一般性を明らかにすることにより、「合成途上鎖の分子生物学」とでも言うべき新たな研究分野・パラダイムを開拓する。

3. 研究の方法

(1) 合成途上の SecM において、C 末端付近のアレスト配列とリボソームトンネル成分との相互作用によって翻訳伸長アレストを起こすが、既にリボソームの外に出ている N 末端領域が Sec 膜透過装置と相互作用して分泌系路に乗ることによって解除される。この翻訳伸長アレストの機構とアレスト解除の機構を *in vivo* における変異解析、*in vitro* における分子解析を組み合わせて追求する。

(2) SecM が SecA の合成を膜近傍に局在化することにより SecA の活性構造の獲得を助ける機能 (cis-シャペロン機能) の分子的な実体を明らかにする。

(3) 合成途上 polypeptidyl-tRNA を検出する実験方法を開発して、翻訳途上にあるタンパク質の全体像とその動的な変化を記述する。

(4) 上記の polypeptidyl-tRNA を検出する実験方法などを用いて、大腸菌および他の原核生物において、翻訳アレストを起こすタンパク質あるいはアミノ酸配列を新たに同定する。

(5) 翻訳伸長アレストがどのように制御され、どのような翻訳制御あるいは翻訳後制御としてアウトプットされるのかを追求する。

4. 研究成果

(1) Sec 膜透過装置の構造と機能の解析。SecM は SecA の発現 (翻訳および機能発現) を制

御する一方、Sec 装置による膜透過反応を受けることにより翻訳アレストを解消する。このため、SecA および SecYEG トランスロコンの構造・機能相関の解明に取り組んだ。①高度好熱菌を用いて SecYE 複合体の結晶構造を連携研究者森博幸、共同研究者塚崎智也、瀧木理博士などとの共同研究によって決定した。SecA は SecYE と相互作用することによって構造変化を起こし、その ATP 加水分解活性が促進されることが明らかとなった。このとき SecYE 側にも構造変化が引き起こされることも見いだした。②SecYEG による膜透過を促進する因子 SecDF の立体構造を高度好熱菌を用いて決定した。その結果 SecDF のペリプラズム領域が二つの異なる構造をとり得ること、変性タンパク質結合能をもつことを見いだし、SecDF はペリプラズム側から基質を結合してプロトン駆動力によって膜透過を促進するとのモデルを提唱した。これらの結果はいずれも Nature 誌に発表され、タンパク質の膜透過装置の理解に重要な進展をもたらしたものと国際的に認められている。

(2) SecM の翻訳伸長アレスト機構とその解除機構の解析。①細胞内での分泌と翻訳アレストをアッセイする実験方法を検討し、細胞内で生成した peptidyl-tRNA を免疫ブロットおよび免疫沈降によって検出することに成功した。これらの方法により SecM は膜透過経路に乗ることによって速やかな分解を受けることを示した。②SecM の翻訳伸長アレストした状態では、リボソームの A 部位に prolyl-tRNA が存在するが P 部位の peptidyl-glycyl-tRNA からのペプチド転移を受け付けない。また、プロリンは P 部位に於いても A 部位に存在するピューロマイシンへのペプチド転移能が低いとの特異な性質をもつことを発見した。SecM が関わる調節機構にはアミノ酸の中で特殊な構造をとるプロリンの性質が寄与していることが示唆された。この成果はプロリンの翻訳における特異な性質を記載した 4 報ほどの論文の一つとして国際的に認められている。③SecM のアレスト解除には、シグナル配列以外にアレストしたリボソームの外に位置するアミノ酸配列が必要とされることを見いだした。

(3) 枯草菌 MifM の翻訳伸長アレスト機構とその解除機構の解析。①膜タンパク質組込み装置の制御に関して、枯草菌を用いた解析により、組込み装置 YidC2 の翻訳が SecM と類似の翻訳アレストによって制御されていることを見いだした。枯草菌の MifM は、C 末端付近にリボソームのトンネルと相互作用する翻訳アレスト配列を、N 末端に膜組込疎水配列を持つ。膜組込因子 YidC1 の基質として

振る舞い、自身が正しく局在化されると翻訳アレストが解除される。局在化の過程に異常が生じると翻訳停止が継続し、停止したリボソームによる mRNA の二次構造破壊を介して、yidC2 の翻訳を促進する。この EMBO Journal に発表された研究により、合成途上鎖のダイナミズムを感知する翻訳アレストタンパク質として SecM に加えて MifM が同定され、新たな翻訳制御機構の一般性が明らかとなった。②MifM の翻訳伸長が従来知られていない複数箇所での連続したアレストという様式で起こることを見いだした。この伸長アレストは、C 末端近くの連続した 4 つのコドンで複数回起こり、そのためにはアレスト部位に近い位置に複数の酸性アミノ酸が存在することが必要であることを示した。従来、アレストを起こすポリペプチドの合成途上鎖は翻訳伸長の過程でリボソームのトンネルの残基と複数箇所での特異的相互作用を起こすことによってペプチジル転移活性を阻害するため、アレストは一カ所でのみ起こると考えられてきた。しかし、この Molecular Cell に発表された研究によって、MifM は伸長アレストを複数回起こすことによって、リボソームが mRNA 上に留まって二次構造をほぐす時間を確保しているとの新たな機構の存在が初めて明らかになった。

(4) 合成途上の polypeptidyl-tRNA (nascentome) の解析。①細胞内の合成ポリペプチド鎖を検出し、その動的全体像を観察する実験方法を開発した。polypeptidyl-tRNA のポリペプチド部分と tRNA 間のエステル結合を保持する中性 PH 条件下で一次元目の電気泳動を行い、切り出したゲルレーンに加水分解する高温・アルカリ性条件で処理した後に二次元目の泳動を行う方法である。そのため、エステル結合の安定性を系統的に調べた結果、加水分解を受けにくい peptidyl-tRNA (最後のアミノ酸が Ile, Val, Pro, (Asp) の場合) が存在することを見いだした。このような、polypeptidyl-tRNA をも加水分解するが、電気泳動に悪影響を与えない条件を設定して、2次元電気泳動法を確立した。通常の(翻訳が完了した)タンパク質は対角線の上に泳動されるが、この主要対角線の下側に合成途上鎖が期待通りラインを形成することがわかった。②この方法を用いて polypeptidyl-tRNA の chemical amount はごく微量であること、中間体としての polypeptidyl-tRNA をパルスチェイス実験と組み合わせて追跡することができることを示した。そして、細胞内の合成途上鎖 (polypeptidyl-tRNA) を「nascentome」と呼ぶことを提唱した。③個々のプロテオームメンバーが辿る合成途上状態を示す

“sub-nascentome”を解析する方法を開発した。N末端に His6 タグを持つ ASKA クローンを用いて、大腸菌の各タンパク質がどのような合成途上鎖を生ずるのかを、精製翻訳因子を用いる試験管内翻訳系、および生細胞を用いたパルスラベル法、ニッケル親和性単離、電気泳動による polypeptidyl-tRNA の検出によって調べた。その結果、SecA タンパク質を始め予想以上に多くのタンパク質において翻訳伸長の一時停止が起こっていることを見いだした。そして、現在進めている網羅的な翻訳 pausing のデータ取得と pausing メカニズムの分類が可能となった。④リボソーム救出機構欠損変異株中ではデッドエンド状態の polypeptidyl-tRNA (deadend nascentome) が蓄積することを明らかにした。岡山大学のグループとの共同研究により、大腸菌細胞は終止コドンを欠く異常な mRNA の生成によるものと思われる空回り翻訳を高頻度で行っているが、最低2種類存在するリボソーム救援機構によって処理されていることを解明した。上記のうち①, ②, ④は PLoS One に発表され、従来研究の盲点となっていた合成途上鎖を直接検出したものとして、nascentome の命名とともに世界に先駆ける成果となった。

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 18 件)

1. Ito, K., and Chiba, S. Arrest peptides: cis-acting modulators of translation. 査読あり、Annu. Rev. Biochem. 82, in press (2013)
2. Chiba, S. and Ito, K. Multisite ribosomal stalling: a unique mode of regulatory nascent chain action revealed for MifM. 査読あり、Mol. Cell 47, 863-872 (2012) DOI: 10.1016/j.molcel.2012.06.034
3. Chadani, Y., Ito, K., Kutsukake, K. and Abo T. ArfA recruits release factor 2 to rescue stalled ribosomes by peptidyl-tRNA hydrolysis in Escherichia coli. 査読あり、Mol. Microbiol. 86, 37-50 (2012) DOI: 10.1111/j.1365-2958.2012.08190.x
4. Ito, K., Chadani, Y., Nakamori, K., Chiba, S., Akiyama, Y., and Abo, T., Nascentome analysis uncovers futile protein synthesis in Escherichia coli. 査読あり、PLoS ONE 6, e28413 (2011) DOI: 10.1371/journal.pone.0028413
5. Saito, A., Hizukuri, Y., Matsuo, E., Chiba,

- S., Mori, H., Nishimura, O., Ito, K. and Akiyama, Y., Post-liberation cleavage of signal peptides is catalyzed by the site-2 protease (S2P) in bacteria. 査読あり、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108, 13740-13745 (2011) DOI: 10.1073/pnas.1108376108
6. Tsukazaki, T., Mori, H., Echizen, Y., Ishitani, R., Fukai, S., Tanaka, T., Perederina, A., Vassilyev, D. G., Kohno, T., Maturana, A. D., Ito, K., and Nureki, O., Structure and function of a membrane component SecDF that enhances protein export. 査読あり、Nature 474, 235-238 (2011) DOI: 10.1038/nature09980
 7. Chiba, S., Kanamori, T., Ueda, T., Akiyama, Y., Pogliano, K. and Ito, K., Recruitment of a species-specific translational arrest module to monitor different cellular processes. 査読あり、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108, 6073-6078 (2011) DOI: 10.1016/j.molcel.2012.06.034
 8. Ron, D. and Ito, K., A translational pause to localize. 査読なし、Science 331, 543-544. (2011) DOI: 10.1126/science.1202075
 9. Ito, K., Chiba, S. and Pogliano, K., Divergent stalling sequences sense and control cellular physiology. 査読あり、Biochem. Biophys. Res. Commun. 393, 1-5 (2010) DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.01.073
 10. Chiba, S., Lamsa, A. and Pogliano, K. A ribosome-nascent chain sensor of membrane protein biogenesis in *Bacillus subtilis*. 査読あり、EMBO J. 28, 3461-3475. (2009) DOI: 10.1038/emboj.2009.280
 11. Inaba, K., Murakami, S., Nakagawa, A., Iida, H., Kinjo, M., Ito, K. and Suzuki, M., Dynamic nature of disulphide bond formation catalysts revealed by crystal structures of DsbB. 査読あり、EMBO J. 28, 779-791 (2009) DOI: 10.1038/emboj.2009.21
 12. Ito, K., Editing disulphide bonds: error correction using redox currencies. 査読あり、Mol Microbiol. 75, 1-5 (2009) DOI: 10.1111/j.1365-2958.2009.06953.x
 13. Tsukazaki, T., Mori, H., Fukai, S., Ishitani, R., Mori, T., Dohmae, N., Perederina, A., Sugita, Y., Vassilyev, D.G., Ito, K. and Nureki, O., Conformational transition of Sec machinery inferred from bacterial SecYE structures. 査読あり、Nature 455, 988-991 (2008) DOI: 10.1038/nature07421
 14. Muto, H. and Ito, K., Peptidyl-prolyl-tRNA at the ribosomal P site reacts poorly with puromycin. 査読あり、Biochem. Biophys. Res. Commun. 366, 1043-1047 (2008) DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.12.072
 15. Koide, K., Ito, K. and Akiyama, Y., Substrate recognition and binding by RseP, an *Escherichia coli* intramembrane protease. 査読あり、J. Biol. Chem. 283, 9562-9570 (2008) DOI: 10.1074/jbc.M709984200
 16. Inaba, K. and Ito, K., Structure and mechanisms of the DsbB-DsbA disulfide generation machine. 査読あり、Biochim. Biophys. Acta. 1783, 520-529 (2008) DOI: 10.1016/j.bbamcr.2007.11.006
 17. Ito, K. and Inaba, K., The disulfide bond formation (Dsb) system. 査読あり、Curr. Opin. Struct. Biol. 18, 450-458 (2008) DOI: 10.1016/j.sbi.2008.02.002
 18. Inaba, K., Suzuki, M., Maegawa, K., Akiyama, S., Ito, K. and Akiyama, Y., A pair of circularly permuted PDZ domains control RseP, the S2P family intramembrane protease of *Escherichia coli*. 査読あり、J. Biol. Chem. 283, 35042-35052 (2008) DOI: 10.1074/jbc.M806603200
- [学会発表] (計 18 件)
1. 伊藤維昭 翻訳のスピード制御について。独創的発想に富む科学者育成プログラム「出る杭を伸ばすヘリックスプロジェクト」採択事業 七人の侍による記念講演会, 2012.10.24, 秋田
 2. Ito, K. Analysis of cellular polypeptidyl-tRNAs. SFB594-3rd International Symposium "Molecular Machines in Protein Folding and Translocation", July 23-25, 2012, Bavarian Academy of Sciences, Munich, Germany
 3. 千葉志信, 伊藤維昭 合成途上鎖の働きと運命 12 回 蛋白質科学会年会 2012. 6. 20-22, 名古屋
 4. Ito, K.: Analysis of "nascentome", cellular polypeptidyl-tRNAs. CECAM Workshop "Ribosome-associated protein folding: Translation, auxiliary factors, and translocation". May 29-31, 2012, Lausanne, Switzerland.
 5. 伊藤維昭: 合成途上鎖のバイオロジー. 九州大学グローバル COE プログラム 理医連携特別講演会, 2012.2.29, 福岡市,
 6. Chiba, S., Kanomori, T., Ueda, T., Akiyama, Y., Pogliano, K. and Ito, K.: In vitro study of translation arrest of MifM, a regulatory nascent chain that monitors membrane protein biogenesis in *Bacillus subtilis*. 第34回日本分子生物学会年会 Symposium "Regulatory

- Systems Mediated by Programmed Ribosomal Stalling”, 横浜, 2011.12.13-16
7. 森博幸、塚崎智也、越前友香、秋山芳展、濡木理、伊藤維昭: 蛋白質膜透過を促進する膜内在性因子 SecDF の構造と機能. 第 84 回日本生化学会大会シンポジウム「生体膜エネルギー変換装置の超分子科学」, 京都, 2011 年 9 月 21-24 日
 8. 森博幸、塚崎智也、越前友香、濡木理、伊藤維昭: プロトン駆動力を用いた SecDF による蛋白質膜透過の昂進機構. 第 11 回日本蛋白質科学会年会ワークショップ「細胞膜ダイナミクス: In vitro 再構成系によるアプローチ」, 大阪, 2011 年 6 月 7-9 日
 9. Ito, K., Chadani, Y., Nakamori, K., Chiba, S., Akiyama, Y. and Abo, T.: Visualization of cellular polypeptidyl-tRNAs uncovers futile protein synthesis in *E. coli*. Cold Spring Harbor Asia Conference Protein Homeostasis in Health and Disease, September 26-30, 2011, Suzhou, China
 10. Ito, K., Tsukazaki, T., Mori, H. and Nureki, O.: Structure, function and regulation of bacterial Sec machinery. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Symposium Bacterial Protein Transport. September 6-10, 2011, Sapporo.
 11. Ito, K.: Controlling epigenetic connectivity in proteins. Microbial Genetics and Genomics IV. April 29-May 1, 2011, Harvard Medical School, Boston, U.S.A.
 12. 伊藤維昭: タンパク質誕生の初期における出来事. 2011.3.10, 京都産業大学総合生命科学部開設記念シンポジウム. 京都市
 13. Ito, K.: From SecY to nascent chain biology. International Symposium on Protein Community. September 13-16, 2010, Nara (Japan).
 14. Ito, K., Chiba, S., Akiyama, Y. and Abo, T.: Visualizing dynamic nascentome of the cell. FASEB Summer Research Conference Protein Folding in the Cell. July 25-30, 2010, Saxtons River, Vermont (USA)
 15. Ito, K.: Structure, function and regulation of the Sec translocation system. International Symposium “Life of Proteins” in Honor of the 1st Retirement of Professor Kazuhiro Nagata, March 18, 2010, Kyoto (Japan).
 16. 伊藤維昭、森博幸、塚崎智也、濡木理: Sec 膜透過装置の構造、機能および制御 九州大学 P&P 合同公開シンポジウム「生命活動を制御する高次複合体の構造と機能」 2009 年 12 月 22-23 日、福岡
 17. Ito, K. Quality control pathways used to monitor membrane protein abnormalities and roles of translocon in the correct biogenesis of membrane proteins. Symposium "Insertion, Folding, Assembly and Quality Control", 108th ASM General Meeting, June 5, Boston, U.S.A., 2008
 18. Ito, K. Structure of bacterial SecY translocon and its interaction with SecA. Beckwith Reunion Meeting "Microbial Genetics and Genomics" 16-19, May, Cassis, France, 2008
- [図書] (計 3 件)
1. Akiyama, Y., and Ito, K. HtpX. pp. 683-685, Handbook of Proteolytic Enzymes 3rd ed. (ed. Rawlings, N. D. and Salvesen, G.) Academic Press (2013)
 2. Hizukuri, Y., Ito, K., and Akiyama, Y. RseP. pp. 1545-1550, Handbook of Proteolytic Enzymes 3rd ed. (ed. Rawlings, N. D. and Salvesen, G.) Academic Press (2013)
 3. Ito, K. and Mori, H., The Sec protein secretion system. pp. 3-22, in Bacterial Secreted Proteins, Ed. K. Wooldridge, Caister Academic Press, Norfolk, UK (2009)
- [その他]
ホームページ等
<http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~k4563/index-j.html>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
伊藤 維昭 (ITO KOREAKI)
京都産業大学・総合生命科学部・教授
研究者番号: 90027334
 - (2) 研究分担者
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
(平成 21→22 年度: 研究分担者)
 - (3) 連携研究者
秋山 芳展 (AKIYAMA YOSHINORI)
京都大学・ウイルス研究所・教授
研究者番号: 10192460

森 博幸 (MORI HIROYUKI)
京都大学・ウイルス研究所・准教授
研究者番号: 10243271