

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03180

研究課題名（和文）真核細胞リボソーム遺伝暗号解読における終結・再生過程の分子認識機序の解明

研究課題名（英文）Study of molecular mechanisms for translation termination and ribosome recycling by eukaryotic ribosome

研究代表者

伊藤 耕一（ITO, KOICHI）

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：10262073

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：真核細胞のタンパク質合成系における、eRF1-eRF3、Pelota-HBS1などのtRNA-伸長因子複合体擬態蛋白質や、リボソーム再生因子、品質管理因子が関わる翻訳終結機構・蛋白質合成品質管理機構の詳細な分子機構を明らかにするために、関連する因子の遺伝学スクリーニング系、および、リボソームの状態をモニターする新規アッセイ系を構築した。その結果、リボソーム因子ASC1およびS20上の新規機能領域を特定し、これらが協調的に形成するHel2の結合インターフェースを明らかにし、それが関わる新規作用機序モデルを提案した。この知見は、翻訳終結の分子機構解明と創薬標的探索に貢献することが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

mRNA上の遺伝暗号をタンパク質に翻訳するのは（翻訳反応）、タンパク質合成の中心装置であるリボソームと無数の翻訳関連因子群です。近年、必要なタンパク質を適切に合成するために、異常な遺伝情報やそこから合成される有害なタンパク質の発現による弊害を抑制する仕組みとして翻訳終結に連動した品質管理機構に関心が高まっています。本研究は、それに関わる基本的な因子群の分子機構の一つを明らかにしました。

研究成果の概要（英文）：Translation termination, a critical step in protein synthesis in eukaryotes, involves the interplay of various factors, including tRNA-elongation factor complex mimicking proteins (eRF1-eRF3, Pelota-HBS1), ribosome recycling factors, and quality control factors. To unravel the intricate molecular mechanisms underlying this process, we developed genetic screening systems and novel assay systems to monitor ribosome status. Our investigations led to the identification of novel functional domains on ribosomal factors ASC1 and S20. These domains act in concert to form a binding interface for Hel2, a ubiquitin ligase that targets ribosome-associated proteins for degradation. We propose a novel mechanistic model, highlighting the cooperative role of these newly identified domains. These findings provide significant insights into the molecular basis of translation termination and hold promise for identifying novel drug target to address various human diseases.

研究分野：分子生物学

キーワード：リボソーム tRNA擬態タンパク質 タンパク質合成 翻訳終結 品質管理 リボソーム再生反応 翻訳再開反応

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年急速な機能・構造理解が進んだイメージがある遺伝暗号解読機構ではあるが、真核細胞においてのタンパク質合成終了反応からリボソーム再生反応が含まれる『翻訳終結過程』の分子機構の包括的理解は集積しつつある重要性の指摘に反してひときわ立ち後れている。

核酸分子である tRNA の機能・構造を擬態する tRNA 擬態タンパク質 (eRF1 および Pelota) は、リボソームや普遍的なリボソーム再生因子である ABCE1 と協調しながら、mRNA 上の遺伝暗号翻訳過程において (i) 終止コドンの正確な解読を伴う『正常なタンパク質合成終結』、および (ii) mRNA の品質管理機構の発動を伴う『異常なタンパク質合成終結』をそれぞれ tRNA 擬態因子 eRF1, Pelota が識別し遂行する。両因子が諸因子とそれぞれリボソームの状況を識別し、終結過程に移行する前後の分子機構には多くの謎が残されている。

2. 研究の目的

翻訳終結の各過程に関わる因子は膨大であり、これまでの生化学解析では個々の因子やその機能ドメイン・残基の探索が難航しており、また、リボソーム複合体の構造解析から得られる情報も、多段階のスナップショット間を補完できる知見が得られていない。提唱されている作用モデルについて変異体解析などを行うことで地道に検証しなければ包括的な理解に至らないが、現時点では検証実施のための各種評価系が不足している。そのため、多様な生理機能に参与する新規な因子やその機能ドメインの探索も遅れており、巨大な RNA-タンパク質複合体分子リボソームの機能性の解明も不十分である。また、mRNA 上の翻訳の「伸長」から「終結」のモード移行において機能するリボソーム上の領域や諸因子の関連性については不明な点が多い。

本研究では、申請者独自の翻訳終結の分子機構に関する先行研究を基盤とし、上述の【1】翻訳終結状態を識別する分子機構の分子遺伝学、【2】 mRNA 上の翻訳終結のための因子群の動態を可視化する新規手法開発の2側面から実施することで、研究の核心的な問いに答えることを第一の目的とする。

3. 研究の方法

本研究計画は、分子遺伝学手法の特性などを考慮し、計4年間で実施する計画として進めてきた。具体的には、以下のとおり。

1. reverse genetics 法による機能検証実験：生化学・構造生物学的解析から得られている情報を活用し、正常・異常な翻訳終結に関わる因子群の変異体作成と機能解明を行う。これまでに細胞中の翻訳終結機能、品質機能を個別に評価するために、細胞の生育性やレポーター遺伝子の生化学活性によるアッセイ系の構築を行い、それを用いた成果を公表しているが、レポーター遺伝子の種類が限られており、検出感度のレンジが狭い。そのため、広い領域で機能性を評価するために、検出感度の異なるアッセイ系も構築する。これらの系を用い、ペプチド鎖解離因子 (eRF1, eRF3)・リボソーム再生因子 (ABCE1, 酵母名称は RL11) など、さらにはリボソーム複合体構造中の各構成要素のスナップショットの差分比較による機能ドメインの機能性の有無が検証できると考えられる。

2. reverse genetics 法による機能検証実験：これまでに指摘の無かった新規機能構造、因子の探索を行う。これらは、翻訳終結に中心的な動きをするリボソーム遺伝暗号解読機能との密接な連携機能部位であることが期待される。こうした解析を、さらにリボソーム RNA や関連性が予想される因子群に広げ、解析[1-1]とも合わせこれまでにない詳細な機能構造の解明が期待される。mRNA 上の翻訳終結のための因子群の動態を可視化する新規手法開発

3. NGS を用いた NGS 解析などを用いたデータサイエンス解析手法により、既知因子の細胞内、mRNA 上での振る舞いを網羅的に可視化しつつ、新規因子の同定を試みる。

4. 研究成果

分子遺伝学的手法 (forward/reverse genetics 法) で、tRNA 擬態蛋白質が関わる翻訳終結機構・蛋白質合成品質管理機構をモニターするアッセイ株の構築を行い、関連する新規因子およびその機能部位探索を実施した結果、翻訳終結 (停滞) 状態識別時にユビキチン化のターゲット部位として機能すると考えられているリボソーム因子 ASC1 および S20 の分子表面上に、ユビキチンリガーゼ蛋白質 Hel2 の結合インターフェースとなることが強く示唆された機能性残基クラスター領域を見出すことに成功した。これらの領域は、異常翻訳停止状態の、先行リボソームと後続リボソームの衝突状態 (リボソーム 2 量体) として得られている構造情報上、前後のリボソーム間で近接部位に位置することが判明した。一方、立体構造からの推測で ASC1 および S20 や周辺サブサブユニットに示唆されている相互作用領域とは全く異なることから、既知の知見を検証しつつ新規領域の機能検証を網羅的に実施した。その結果、今回新たに得られた領域が特に顕著な影響を持つ領域であり、これらの近接する領域は協調してユビキチンリガーゼの Hel2 のような第三の因子を衝突リボソーム耕造上に受け入れるドックのような領域を形成していることが強く示唆された。このことを具体的に検証するために新規なアッセイ系の構築を行った。具体的

には、リボソーム停滞による翻訳終結に関わるリボソームタンパク質の網羅的検索により、いくつかの新規機能ドメインを特定することに成功した。split-TRP1 assay 法を用いて、近接する前後のリボソーム間の相互作用を検出する手法を開発した。この新手法を用いながら新たに特定した因子および機能ドメインに対して、公表済みの機能ドメインレベルの解析を実施した。具体的には、上記探索により明らかにされたリボソーム小サブユニット上の Asc1、S20 タンパク質のそれぞれに TRIP1 タンパク質の N 末端側ドメインと C 末端側ドメインを融合したタンパク質発現系を酵母細胞株に導入し、リボソーム停滞誘導下で mRNA の前後するリボソーム間の両タンパク質の近接が起きることを示した。これらの成果を総合し、それぞれのタンパク質の分子表面上に、ユビキチン化に関与する Hel2 がアクセスする領域が形成されることを明らかにし、論文として公表した。これらの研究成果は、翻訳終結の分子機構の解明に貢献するだけでなく、創薬の標的候補の探索にも役立つことが期待される。

現在、初期スクリーニングで得られた Asc1、S20 以外の因子変異体についても同様な解析を進め、論文の取りまとめを行っている（業績欄参照）。また、CGA リピート配列上において、異常な翻訳停止状態を引き起こす細胞要因として、tRNA-Arg(ICG)とその修飾因子の新規アッセイ系の構築、再生因子である ABCE1 についての種間機能解析系を構築し基本的解析を行い、いずれも論文として公表している（業績参照）（業績欄参照）。後者をもとにした、翻訳伸長-終結-再生-再開過程の詳細データ解析についてもデータ取得を一通り終え、成果公表の準備を進めている。これらの新知見をもとに今後の研究提案に進めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Wada Miki, Ito Koichi	4. 巻 290
2. 論文標題 The CGA codon decoding through tRNAArg(ICG) supply governed by Tad2/Tad3 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 3480-3489
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.16760	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Otsuka Hiroshi, Endo Kei, Wada Miki, Ito Koichi	4. 巻 290
2. 論文標題 Systematic genetic identification of functional domains on collided di-ribosomes responsible for rescue pathways upon translation arrest in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 3748-3763
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.16781	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wada Miki, Ito Koichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Human ABCE1 exhibits temperature dependent heterologous co-functionality in <i>S. cerevisiae</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 1782~1787
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.13463	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Niwa Tatsuya, Nakazawa Koki, Hoshi Kensuke, Tadakuma Hisashi, Ito Koichi, Taguchi Hideki	4. 巻 9
2. 論文標題 Application of fluorescence correlation spectroscopy to investigate the dynamics of a ribosome-associated trigger factor in <i>Escherichia coli</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Biosciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmolb.2022.891128	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fumihiko Horie, Kei Endo, Koichi Ito	4. 巻 9
2. 論文標題 Artificial Protein-Responsive Riboswitches Upregulate Non-AUG Translation Initiation in Yeast	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Synthetic Biology	6. 最初と最後の頁 1623-1631
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssynbio.0c00206	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 和田 美紀、伊藤 耕一
2. 発表標題 出芽酵母におけるCGAコドン解読制御の検証
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 遠藤 慧、伊藤 耕一
2. 発表標題 RNA-タンパク質相互作用を細胞質内で評価する Yeast Casplay System の開発
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中田 絵理子、遠藤 慧1、伊藤 耕一
2. 発表標題 リボソーム再生反応におけるATP加水分解酵素ABCE1の相互作用ドメインの解明
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 毛 嘉麒, 伊藤耕一, 遠藤 慧
2. 発表標題 セレノステイン取り込みを制御するSECIS-アプタマーリボスイッチ設計の解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 曹 沢宇, 伊藤 耕一, 遠藤 慧
2. 発表標題 出芽酵母におけるCrPV IRESを介した翻訳活性のアップレギュレーションに向けた系統的な遺伝子スクリーニング
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関