

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05806

研究課題名（和文）新生鎖による翻訳促進機構に関する研究

研究課題名（英文）Analysis of the translation acceleration by nascent polypeptide chain

研究代表者

加藤 晃代（Kato, Teruyo）

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：40727640

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究においては、申請者がこれまでの研究過程で見出した翻訳促進新生鎖であるSKIKペプチド配列の翻訳促進作用について、そのメカニズムを明らかにし、タンパク質を簡単かつ大量に生産するための基盤技術の構築を目指した。その結果、翻訳を停止させることで知られる翻訳アレストペプチド（AP）との組み合わせ実験により、MSKIKという新生ペプチドが、大腸菌のAP（SecMおよびCmlA leader）による翻訳停止を打ち消す作用を有することを明らかとした。また、MSKIKとAPの距離により、その翻訳停止の打ち消し効果が異なることが示され、生命に普遍的な翻訳工程において未知の制御機構が存在することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、数アミノ酸からなる新生ペプチドが、翻訳を停止させるアレストペプチドの作用を打ち消すことを見出した。本成果は、遺伝子のコードするアミノ酸の組成が、翻訳効率ひいては目的タンパク質の生産性に影響しうる、ということを示す。これは、生命に普遍的な翻訳工程に、未知の制御機構が存在することを示しており、その基本原理を理解するための一助となるものであると考えられ、学術的観点からも重要な知見である。また、今回得られた知見は、持続可能なバイオ産業・研究におけるタンパク質や新規なバイオマテリアルの生産性向上に資することから、社会的な意義も大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, the authors conducted experiments with the aim of clarifying the mechanism of the translation-promoting effect of the SKIK peptide sequence, a translation-promoting nascent chain discovered by the authors in the previous research, and to establish a basic technology for production of the recombinant proteins. As a result, combination experiments with translation-arresting peptides (APs), which are known to cause ribosomal stalling on the mRNA, revealed that the nascent peptide MSKIK can cancel ribosomal stalling by known APs such as SecM and CmlA leader sequences. The strength of cancelation of ribosomal stalling was affected by the distance between MSKIK and AP, suggesting the existence of an unknown regulatory mechanism in the translation process, which is universal in life.

研究分野：応用微生物学

キーワード：新生鎖 翻訳促進 ペプチド 大腸菌

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

酵素、抗体などのタンパク質（機能的タンパク質）を、組換え発現系を用いて安価・簡単・大量に生産する技術は、バイオエコノミーを支える柱の一つであり、その重要性はますます高まっている。申請者は、これまでの研究過程で、大腸菌において発現困難なタンパク質の N 末端に **Ser-Lys-Ile-Lys** をコードするタグ配列 (**SKIK** ペプチドタグ) を付加し発現させることにより、その生産量を数十倍にも増大可能であることを独自に見出し、そのメカニズム解明に取り組んできた。その結果、塩基配列ではなくペプチドとしての配列が重要である可能性を見出した。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、数アミノ酸からなるペプチドによるタンパク質生産向上効果について、より詳細に解析し、特に、翻訳初期に生じる新生鎖がどのようにその後の翻訳工程を制御しうるか解明することを目的とした。本研究で得られる知見を活かし、細菌、酵母などの微生物や動物細胞などの宿主にて、欲しいタンパク質を簡単かつ大量に生産するための基盤技術構築に役立てることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 翻訳促進新生鎖配列がアレストペプチド SecM の翻訳に与える影響の検証

翻訳効率を促進させる新生鎖配列と、大腸菌において翻訳を停止させることの知られるアレストペプチド SecM を融合発現させ、翻訳促進新生鎖が翻訳停止ペプチドの合成に与える影響を調べた。ここでは、既に翻訳促進することが分かっている SKIK ペプチド配列を使用した。翻訳促進配列と SecM 配列の距離や並びを 10 パターン程度変えたコンストラクトを作製し評価することにより、双方の真逆の機能をもつ翻訳中間物が、お互いにどのように干渉しうるかを解析した。

(2) 様々なアレストペプチドへの作用検討

大腸菌で報告されているアレストペプチドである SecM に加え、クロラムフェニコールに誘導される CmlA leader 配列、人工的に設計された WPPP 配列等と組み合わせ、翻訳促進配列である SKIK ペプチド配列が、それらのアレストペプチドに対しどのような影響をもたらすか検討した。また、酵母にて報告されているアレストペプチドにどのような影響をもたらすかについても検討した。

4. 研究成果

(1) SKIK ペプチドと secM の翻訳停止に必要な領域(secM AP)を様々な位置関係とした遺伝子を構築し、無細胞タンパク質合成系でのタンパク質合成と Western Blotting にて評価した(図 1)。その結果、N 末端に SKIK が存在すると、secM AP があるいずれの場合でも、タンパク質全長の合成量が増大した(図 1, sample2 および 6)。このとき、SKIK と secM AP の距離が近い、sample 6 にてその効果が顕著であることがわかった。また、N 末端ではなく、遺伝子の内部に SKIK または MSKIK を配置させたサンプルにおいても、タンパク質合成量が増加した(sample 7 および 8)。そして、secM AP の下流に SKIK または MSKIK を挿入したものは検出限界以下であった。以上の結果から、アレストペプチドである secM AP の直ぐ上流に (M)SKIK というペプチド配列が存在すると、secM AP に起因する翻訳停止効果が打ち消されやすいというユニークな現象を見出すことに成功した。アレスト配列の下流に (M)SKIK が存在しても、翻訳は促進されなかったことから、本結論が支持されるものと考えた。

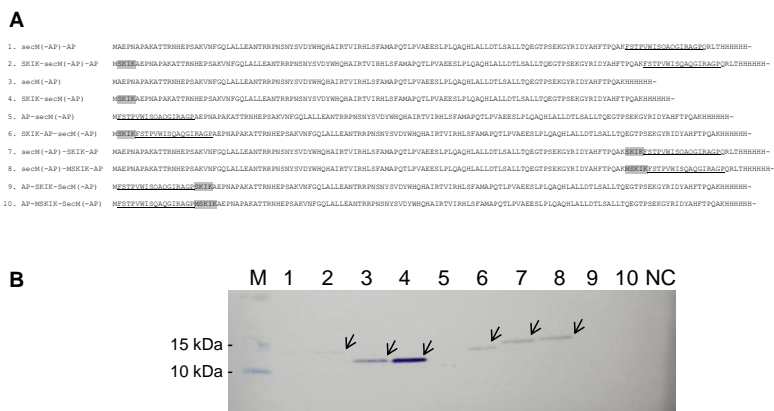


図1. SKIKがアレストペプチドSecMに与える効果の検証

A: 構築した遺伝子に対応するアミノ酸配列

B: Western Blottingによる評価結果(数字はAの1~10に対応, M: サイズマーカー, NC: ネガティブコントロール)

(2) 様々なアレストペプチドへの作用検討

図2に示すような遺伝子を構築し、SKIKがsecM以外のアレスト配列に対しどのように作用するかを無細胞タンパク質合成系にて検討した結果、secM APおよびCmlA leaderによる翻訳停止を打ち消すような効果があることがわかった。一方、WPPPに対しては効果がないこともわかった。

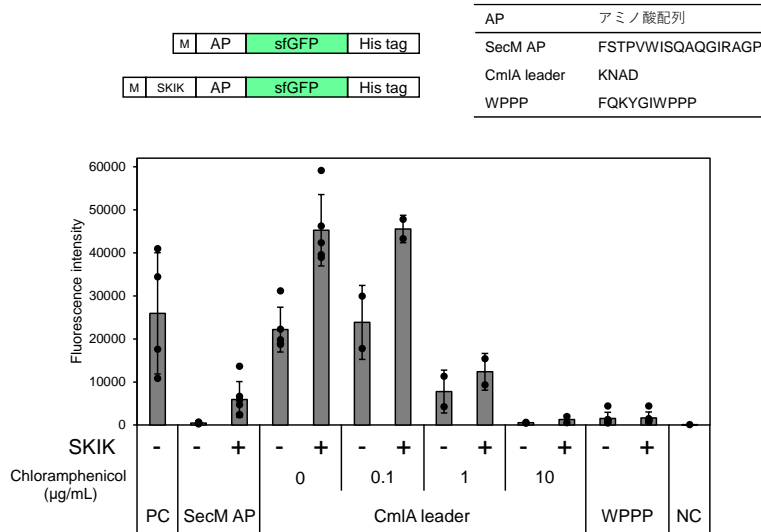


図2. 様々なアレストペプチドに対するSKIKペプチドの効果

PC: APなしのポジティブコントロール (sfGFP-Hisのみ), NC: ネガティブコントロール

また、出芽酵母にて報告されているアレストペプチド *sdd1p* (アミノ酸配列 FFYEDYLIFDCRAKRRK) をモデルとして、SKIKがその翻訳停止に与える影響を検討した。蛍光タンパク質 sfGFP をレポーター遺伝子としたところ、寒天プレート上での差は認められなかったが、蛍光の定量およびフローサイトメーターによる解析によると、SKIKペプチドを付加した場合、全体の蛍光強度が増大していた (図3)。このことから、酵母においても、短いSKIKのようなペプチドがその後のアレストペプチドの作用になんらかの影響を与える可能性が示唆された。

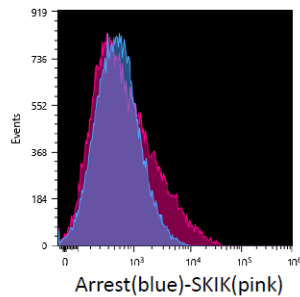


図3. 出芽酵母のアレストペプチドに対するSKIKペプチドの効果

以下の配列を有する出芽酵母のFACS解析結果を示す。

青: Sdd1p AP-sfGFP-His

ピンク: SKIK-Sdd1p AP-sfGFP-His

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Ojima-Kato Teruyo, Nishikawa Yuma, Furukawa Yuki, Kojima Takaaki, Nakano Hideo	4. 巻 299
2. 論文標題 Nascent MSKIK peptide cancels ribosomal stalling by arrest peptides in Escherichia coli	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 104676 ~ 104676
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2023.104676	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 間部悟司、加藤晃代、中野秀雄
2. 発表標題 出芽酵母における翻訳促進ペプチドタグの応用
3. 学会等名 日本農芸化学会2023大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 古川 裕貴, 加藤 晃代, 中野 秀雄
2. 発表標題 タンパク質生産量を増大させるN末端SKIKペプチドタグ配列に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会 中部支部第187回支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西河佑馬、古川裕貴、兒島孝明、加藤晃代、中野秀雄
2. 発表標題 ペプチドタグによるタンパク質生産増大機構に関する研究
3. 学会等名 日本農芸化学会 中部支部 第193回例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤晃代、西河佑馬、古川裕貴、中野秀雄
2. 発表標題 MSKIKペプチドタグはsecMの翻訳停止を解除する
3. 学会等名 生物工学若手研究者の集い夏のオンラインセミナー2022
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
---------	---------