

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05954

研究課題名（和文）tRNA使用頻度による新規翻訳調節機構の探索とメカニズムの解明

研究課題名（英文）investigation of a novel translational regulatory mechanism based on tRNA usage

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）・講師

研究者番号：30588017

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）：本研究では、タンパク質合成の際、複数のtRNAによって翻訳されるコドンがどのような割合でそれぞれのアイソデコーダーtRNAによって解読されているのか、つまりそのtRNA使用頻度について理解するために、細胞内または無細胞翻訳系の翻訳伸長中のペプチジルtRNAの解析方法を確立し、その測定を行った。その結果、tRNA使用頻度はtRNAプール存在比とは異なり、コドン種によって様々であることが判明し、tRNA使用頻度に基づいた翻訳調節機構を示唆することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、細胞内のtRNAのバランスが翻訳効率や速度に関わっており、最終的なタンパク質の産生量やフォールディングに影響を及ぼすことが分かってきた。しかし、これまで各tRNAがコドンを読む実際の頻度などについては調べられていない。このような状況で、本研究によって構築された翻訳中ペプチジルtRNAの解析方法や、得られたtRNA頻度の実態は上述のメカニズムの理解に貢献するものであり、その成果はこれからのタンパク質合成研究において新たな方法論と知見を提供するものであると考えている。また、今回の成果は、tRNA修飾の役割や遺伝子構築の進化を理解する研究においても今後展開が期待できるものである。

研究成果の概要（英文）：In this study, to understand the frequency with which each isodecoder tRNA reads its corresponding codon during protein synthesis, i.e., tRNA usage, we successfully established a method to analyze peptidyl-tRNAs during translation elongation in cells and cell-free translation systems and measured the tRNA usages for each codon. The results showed that the tRNA usages did not correlate with the relative abundance of each tRNA in tRNA pool and varied depending on the codon species. These findings indicate a mechanism of translation regulation based on the tRNA usage.

研究分野：分子生物学

キーワード：タンパク質合成 tRNA 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

遺伝子の発現制御機構を解き明かすことは様々な生命現象を理解する手掛かりになる。タンパク質合成において翻訳開始過程の制御機構はよく知られているが、翻訳伸長過程における制御機構は未だ不明な点が多い。特に、翻訳速度はタンパク質の産生量だけでなく適切なフォールディング形成にも関与しその最終的な機能にも影響している。一つのコドンを読み解く tRNA が複数ある場合 (アイソデコーダー tRNA)、その使用頻度に差が生まれるため、それら tRNA 種間の存在量や特徴、あるいはコドンコンテキストによって使用頻度が異なる可能性があり、そこでの翻訳伸長が調節されることが予想される。例えば、大腸菌では GCU コドンは tRNA(Ala1) と tRNA(Ala2) の 2 種類の tRNA によって読み解かれるとされているが、細胞内でこの 2 つの tRNA が実際にどれくらいの割合で GCU コドンを読み解いているのかについて分かっていない。このように、比較的翻訳系が簡素化されている大腸菌でも、61 個のセンスコドンのうち 14 個のコドンがアイソデコーダー tRNA の対象となっている。また、酵母やヒトでは tRNA 遺伝子数も増えるため、アイソデコーダー tRNA も多くなっている。しかし、これまで、実際の細胞内において、遺伝子上のどのコドンがどの tRNA によってどのくらいの頻度で読み解かれているについて明確な答えを出した研究はない。

2. 研究の目的

本研究では、翻訳中の tRNA を直接解析することによって、コドン種ごとに細胞内での tRNA 使用頻度を体系的に測定し、遺伝子上の tRNA 使用頻度がタンパク質の発現量や質にどう関わるかを明らかにする。そして、最終的に tRNA 使用頻度が関わる翻訳伸長調節機構の提唱とその検証を行う。もし、生物が自身の遺伝子発現の量や質を制御あるいは維持するために、tRNA 使用頻度を利用しているとすれば、コドン種やコンテキストごとに存在する tRNA 使用頻度の実態やその特徴を明らかにすることは、遺伝子構築の進化の理解にとって新たな概念として重要な知見になると期待される。このような目標に基づいて、本研究では、レポーター遺伝子など特定の遺伝子発現系を用いて、tRNA 使用頻度についての解析系を構築し、対象となる各コドン種についての tRNA 使用頻度を測定することで、まずはその実態をとらえることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では大腸菌を用いて解析系の構築や課題の解明についての実験を行う。まず、解析系の構築について、細胞内で翻訳中のペプチジル tRNA の調整法を検討する。一般的に、tRNA は AGPC 法を用いて抽出精製するが、翻訳伸長中の長いペプチドを有するペプチジル tRNA は AGPC 法ではフェノール層に溶解するため、効率的に抽出するのは難しい。そこで、細胞破砕溶液から調整したポリソーム画分をプロテアーゼによってリボソームトンネルの外に出ている新生ペプチド鎖を消化することで、ペプチド鎖を短鎖化し、その後の AGPC 法によってペプチジル tRNA の抽出精製を試みる。次に、検証するコドン (テストコドン) 上での tRNA の使用頻度を測定するためのレポーター遺伝子を設計する。リボソームトンネルは約 30 アミノ酸残基を収容できることから、テストコドンの直前に Myc タグと FLAG タグとをリンカーを介して直列につなげた配列 (計 23 残基) を配置したレポーター遺伝子発現系を構築し、それぞれのタグ配列に対して免疫沈降を行うことで目的のペプチジル tRNA を精製する方法を検証する。精製したペプチジル tRNA 画分は、アルカリ処理によって完全にペプチド部分を解離し、tRNA 部分を次世代シーク

エンスによって tRNA 種ごとに定量を行い、対象テストコドンを読み解いていたアイソデコーダー tRNA の比較することで tRNA 使用頻度を算出する。顕著な特徴が観察されたコドンについては、遺伝子上にマップし、その発現量やフォールディングへの関りを調査する。また、環境ストレスに対しての細胞内 tRNA バランスや tRNA 使用頻度の変化を観察し、ストレスに対応した翻訳調節の可能性を探る。

4. 研究成果

まず、細胞内で翻訳中のペプチジル tRNA の調整法を検討した。上述したように、長鎖ペプチドを有するペプチジル tRNA は AGPC 法によって効率的に抽出回収できないため、細胞から調整したポリソーム画分をプロテアーゼによって消化しリボソーム内のペプチジル tRNA のペプチド部分を短鎖化することで、効率的にペプチジル tRNA を抽出する方法を検討した。プロテアーゼによる消化反応が進みすぎるとリボソームの構造が崩壊し、中のペプチジル tRNA が反応系内に溶出してプロテアーゼによって消化されてしまうことが予想されたため、穏和な消化条件が必要となる。調整したポリソーム画分を用いて、適切なプロテアーゼ処理条件について検討を行ったところ、一般的な反応条件よりも低温かつ短時間(16°Cで 30 分)処理することによって目的の長さのペプチジル tRNA を

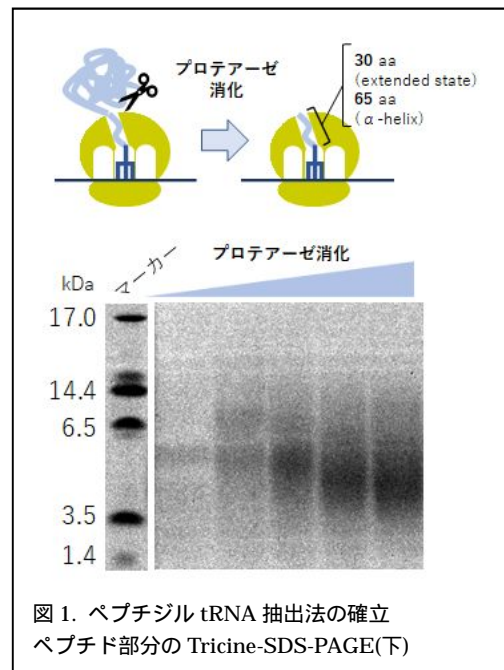


図 1. ペプチジル tRNA 抽出法の確立
ペプチド部分の Tricine-SDS-PAGE(下)

効率的に抽出回収できることが判明した(図 1)。その後、ペプチド部分の質量分析によってそれらが翻訳中のペプチジル tRNA であることが確認できた。また、その再現性についても確認ができたことから、細胞内で翻訳伸長中のペプチジル tRNA の抽出法の確立に成功した(図 1)。

次に、Myc タグ-リンカー-FLAG タグとなる配列(エピトープタグ配列)の直後にテストコドン配置したレポーター遺伝子を構築した。エピトープタグ配列は 23 アミノ酸残基で構成されており、テストコドンがリボソーム P サイトに存在する時はリボソームトンネルに完全に覆われていると予想される。このレポーター遺伝子を発現させた大腸菌細胞から、翻訳伸長中ペプチジル tRNA 画分を上記の方法で抽出し、Myc タグ抗体を用いたノースウエスタン法を行ったところ、デアシル tRNA 画分よりも移動度が小さい位置に Myc タグが検出できたことから、目的のエピトープタグ配列を有したペプチジル tRNA を確認できた。しかし、タンデム免疫沈降法によって目的のペプチジル tRNA の濃縮には成功したものの、非特異的に抗体あるいは樹脂に結合したと考えられるデアシル tRNA やアミノアシル tRNA の混入が多く見られた。細胞内のほとんどの tRNA はアミノアシル化され遊離しており、リボソーム内に存在する翻訳伸長中の tRNA はごくわずかであると考えられている。目的のペプチジル tRNA 以外の tRNA の混入は、以降の次世代シーケンスの解析に大きな悪影響を及ぼす。そのため、ポリソーム画分の調整時にスクロースクッションを用いることや、免疫沈降前に電気泳動法や限外ろ過法などによってできるだけ遊離 tRNA の混入を抑制しようと試みたが、完全に取り除くことができなかった。以上のように、エピトープタグペプチジル tRNA の免疫沈降法による単離精製法と次世代シーケンスを組み合わせた解析方法について困難な課題が浮上し、その妥当性について問題が生じた。

そこで、方針を変更し、各アミノ酸のコドンを 1 種類に限定したレポーター遺伝子(コ

ニコドンレポーター遺伝子)を細胞内で発現、あるいは無細胞翻訳系によって翻訳させ、抽出したペプチジル tRNA の tRNA 部分を次世代シーケンスにより配列解析することによってアイソデコーダーの使用頻度を算出する方法に取り組んだ。また、これに並行して、細胞内で翻訳初期に脱落したペプチジル tRNA についても tRNA 種ごとに精製し、ペプチド部分の解析から由来となる遺伝子を同定し脱落直前に解読していたコドン进行を特定することで、コドン種ごとにアイソデコーダー-tRNA の使用頻度の算出を試みた。ユニコドンレポーター遺伝子については、対象となるコドンのアミノ酸のうち7アミノ酸について1種類のコドン(1アミノ酸につき最大3コドン)にしたレポーター遺伝子を3種類設計した(unirep1-3)。例えば、アラニンコドンは unirep1 では GCT、unirep2 では GCC、unirep3 では GCG の1種類となるように設計した。また、上述したように細胞内または無細胞翻訳系において tRNA のほとんどは遊離したアミノアシル tRNA またはデアシル tRNA であり、これらの混入は次の次世代シーケンス解析に悪影響を及ぼす。そこで、銅イオンを用いて選択的にアミノアシル tRNA のみをデアシル化し、過ヨウ素酸酸化処理によってデアシル tRNA の 3'末端を開裂することで次世代シーケンスに必要なアダプター結合を阻害し、ペプチジル tRNA のみをライブラリー調整することを試みた。まず、アミノアシル tRNA の選択的デアシル化の条件検討については、細胞内から抽出したアミノアシル tRNA と PTH 失活細胞から抽出した脱落ペプチジル tRNA を用いて、デアシル化処理後のそれぞれの量を質量分析によって評価することで最適な条件を決定した。その後のアダプターライゲーション反応において、ペプチジル tRNA 存在下でのみ反応物が観察されたことから、ペプチジル tRNA の選択的なライブラリー作成方法の確立に成功した。次に、上記の3種類のユニコドンレポーター遺伝子は大腸菌細胞または無細胞翻訳系によってそれぞれ発現させ、ペプチジル tRNA を抽出し、次世代シーケンス解析によって各 tRNA の定量解析を行った。この時、tRNA プール中の各 tRNA の存在量比を測定するため、未処理の tRNA 画分についての定量解析も同時並行で行った。その結果、無細胞翻訳系では、特定のアイソデコーダー-tRNA にしか読まれないコドンを有したレポーター遺伝子ではそれぞれ対応する tRNA の相対量が顕著に高く検出されたことから、実験系が機能していることが証明できた。一方、大腸菌細胞のデータではそのような差が見られなかった。これはレポーター遺伝子の発現量が内在遺伝子の発現量を凌駕できずそれら由来のペプチジル tRNA によるものと考えられた。そのため、ACA 特異的に切断する RNase をレポーター遺伝子と共発現させるなどして、内在 mRNA を分解することを試みたが成果は得られなかった。無細胞翻訳系による翻訳途中のペプチジル tRNA を解析した結果、翻訳中の tRNA の他に、レポーター遺伝子中に存在しないコドンを解読する tRNA(Cys,Ile2)についても割合は低い有意に検出された。この事実は、無細胞翻訳系における誤翻訳頻度の高さを示唆しており、この実験系を用いることの妥当性に関わる問題を示した。しかし、シーケンシングの問題によることも考えられたため、大腸菌の全ての tRNA を高純度に単離精製し、それらを等量混ぜたサンプルを調整し同様の次世代シーケンス解析を行った。その結果、tRNA 種によってそのシーケンシング効率は 0.6~6 倍のバイアスがあることが判明した。この結果を利用してバイアスを補正した結果、tRNA(Cys,Ile2)の割合が非常に低いことが分かり、実験系の妥当性が確認された(図 2)。バイアス補正後、tRNA プール内の相対量を考慮して各アイソデコーダー-tRNA のコドン解読効率を解析した。U3 コドン(コドン 3 文字目が U のコドン)と C3 コドンについて、G34-tRNA(34 位が G の tRNA)と cmo5U34tRNA の解読効率の差はコドン種によって大きく異なり、それぞれ 1.5-12.5 倍、4-9 倍程度 G34-tRNA が大きいことが分かった。また、G3 コドンについては、C34tRNA と cmo5 または xm5 修飾 U34tRNA との競合になるが、cmo5U34tRNA の効率が C34tRNA に対し 0.25-0.5 倍と低いのに対し、xm5 修飾 U34tRNA の効率は高く、C34tRNA と同程

度あるいはそれ以上であることが分かった(図 2)。また、この解析と並行して、翻訳初期に脱落したペプチジル tRNA についても、全ての tRNA 種を単離精製し、そのペプチド配列から脱落箇所のコドンを特定した結果、アイソデコーダー tRNA 間のコドン解読効率について上の翻訳中 tRNA と同様の結果を得ることができた。今回得られた結果から、アイソデコーダー tRNA 間のコドン解読については共通した傾向があるものの、その差はコドン種によって大きく異なることが分かった。特に、解読効率の差が大きいコドンについては、各アイソデコーダー

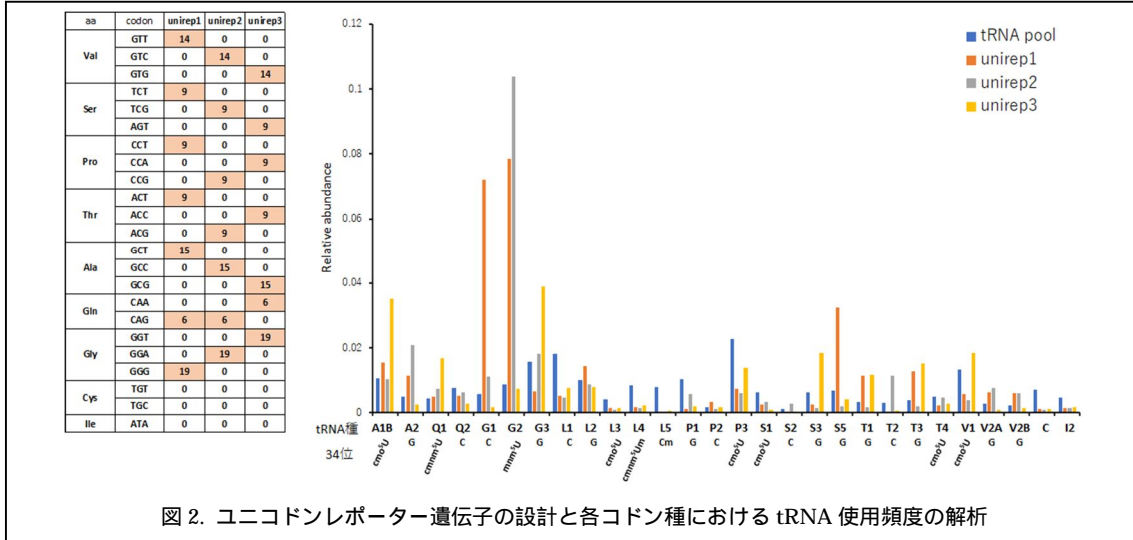


図 2. ユニコドンレポーター遺伝子の設計と各コドン種における tRNA 使用頻度の解析

tRNA の発現量によって大きく翻訳速度や効率が影響される可能性があり、tRNA 使用頻度に基づいた翻訳調節のメカニズムを示唆することができたと考えている。

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 Nagao Asuteka, Nakanishi Yui, Yamaguchi Yutaro, Mishina Yoshifumi, Karoji Minami, Toya Takafumi, Fujita Tomoya, Iwasaki Shintaro, Miyauchi Kenjyo, Sakaguchi Yuriko, Suzuki Tsutomu	4. 巻 14
2. 論文標題 Quality control of protein synthesis in the early elongation stage	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	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） 10.1038/s41467-023-38077-5	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2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Asuteka Nagao
2. 発表標題 Quality control of protein synthesis in the early elongation of bacterial translation
3. 学会等名 30th Tokyo RNA Club（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Asuteka Nagao
2. 発表標題 Quality control of protein synthesis in the early elongation stage
3. 学会等名 28th tRNA conference（国際学会）
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
---------	---------