

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06556

研究課題名(和文) 分泌モニタータンパク質VemPの翻訳アレスト解除の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of translation arrest-cancellation of the secretion monitor VemP

研究代表者

森 博幸 (Mori, Hiroyuki)

京都大学・医生物学研究所・准教授

研究者番号：10243271

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：分泌モニター因子VemPは、菌の膜透過能を感知し、自身の翻訳停止を介して同一オペロン下流遺伝子secD2/F2の発現を制御する。膜透過能が回復した際には翻訳停止は解除されるが、その分子機構は不明である。本研究ではこの問題の解明を目指した。部位特異的in vivo光架橋実験を用いたVemP新生鎖と相互作用する因子の網羅的な解析から、シグナル認識粒子とペリプラズムシャペロンPpiDを見出した。また、生化学的解析から、前者はVemPの膜への標的化に、後者は、翻訳停止の解除に必須の役割を持つことを示した。更に翻訳停止の解除に関わるVemP分子内のcis因子としてArg-85残基を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内で作られたタンパク質の中には細胞の外や表面に運ばれて初めて役に立つ物も少なくありません。そのため、新しく作られたタンパク質を効率良く細胞の外に運ぶことは、細胞が生きて行く上で大変重要です。細胞は、今自分がどの程度タンパク質を運ぶ能力を持っているのかを感知して、その力が下がっていた場合には、輸送に働く別の装置を新たに作ることで機能を回復させるという巧妙な仕組みを持っています。この研究はその仕組みを明らかにすることを目指しています。具体的には、感知に働くVemPという分子が、輸送される時に結合するタンパク質を見つけその役割を調べました。この研究により、感知の方法の一端が明らかになりました。

研究成果の概要(英文)：The secretion monitor, VemP senses protein translocation activity of cells and regulates the expression of the downstream genes secD2/F2 in the same operon through its translation elongation arrest. When protein translocation is restored, the translation arrest is canceled, but the molecular mechanism remains unsolved. This study aimed to elucidate this issue. Comprehensive analysis of factors interacting with the VemP nascent chain using site-specific in vivo photocross-linking experiments revealed that the nascent VemP interacts with signal recognition particle (SRP) and the periplasmic chaperone PpiD during its maturation processes. Biochemical analysis showed that the former plays an essential role in targeting VemP to the SecY/E/G translocon, while the latter plays a crucial role in the cancellation of translational arrest. Furthermore, we identified the Arg-85 residue as a cis factor in VemP involved in the cancellation of translational arrest.

研究分野：生化学、分子生物学

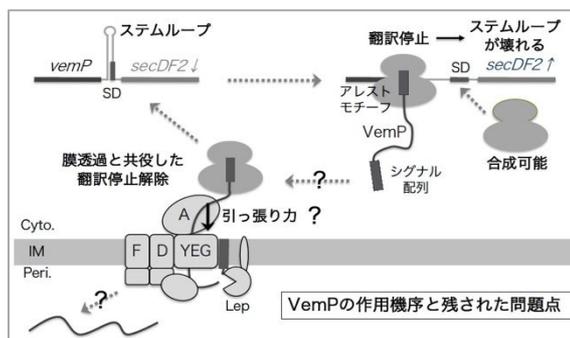
キーワード：VemP 翻訳停止 SecD/F タンパク質膜透過 分泌 PpiD SRP

1. 研究開始当初の背景

細胞質内で合成されるタンパク質の約 1/3 は、細胞膜を横切り、細胞内外の適切な場所に運ばれて初めて生理的機能を発揮する。タンパク質の膜透過は、普遍的な生命現象であり、その分子機構の解明は細胞生物学の基礎的かつ重要な研究課題の一つである。

タンパク質の膜透過は「SecY/E/G トランスロコン」を介して起こる。真性細菌においては、必須の駆動因子 SecA ATPase に加えて、膜タンパク質複合体 SecD/F も効率よいタンパク質の膜透過に必要である。SecD/F は細胞質膜を挟んで形成された一価カチオン濃度勾配エネルギーを用いて、自身のドメインの一部を構造変化させることにより、膜透過途上の基質タンパク質を引っ張り出すと考えられている¹⁾。

タンパク質の膜透過反応は細胞機能に必須であるため、細胞は自身のタンパク質膜透過状態をモニターし、その活性を高く維持する機構を有している。実際、ビブリオ属細菌は、カチオン特異性を異にする2種の SecD/F パラログを持ち、タンパク質膜透過能が低下した際には、H⁺駆動型の SecD/F2 を特異的に発現誘導し、Sec 膜透過装置を再編成することでタンパク質膜透過能を維持する²⁾。この SecD/F2 の発現制御システムには、同一オペロン上流遺伝子によりコードされる分泌タンパク質 VemP (*Vibrio* protein export monitoring polypeptide)が必須の役割を持つ。VemP は、菌のタンパク質膜透過能を自身の翻訳伸長停止(翻訳アレスト)状態の安定性に変換し、SecD/F2 の発現量を制御するユニークな特徴を持つ(右図)²⁾。即ち、膜透過不全状態では、リボソーム排出トンネル内壁と VemP のアレストモチーフの間の特異的相互作用により、VemP の翻訳伸長停止状態は安定化されるが³⁾、膜透過が正常な場合には、膜透過反応により合成途上の VemP ポリペプチド鎖がリボソーム外部に引っ張られ翻訳停止は速やかに解除され、*secD/F2* の発現は抑制される。しかしながら、VemP 合成途上鎖のトランスロコンへの標的化の機構は解っていない。加えて、翻訳停止の解除が、物理的な引っ張り力だけで十分なのか？それとも、何らかの細胞内因子との特異的な相互作用が必要なのかという点も含め、翻訳停止解除の分子機構の詳細は不明である。



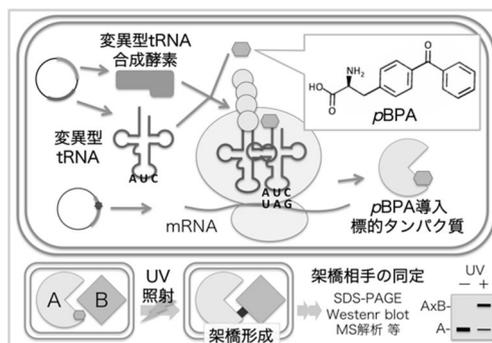
2. 研究の目的

本研究では、VemP による SecD/F2 発現制御機構の全体像を理解することを最終目標とし、特に翻訳停止解除の分子機構に着目して解析を進めた。具体的には、1)我々が最近開発した高空間・時間分解能を持つ *in vivo* 光架橋実験法(PiXie 法)⁴⁾を用いて、合成途上の新生 VemP 鎖が、トランスロコンに標的化し、翻訳停止の解除を受け、膜透過を完了するまでの一連の過程で生じる細胞内因子との相互作用を網羅的に解析した。2)新たに同定した相互作用因子をコードする遺伝子の発現制御株や欠失株を作製し、それらを用いた VemP の細胞内胴体を解析することを通して、VemP の標的化や翻訳停止解除過程における各相互作用因子の役割を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

最初に、本研究1)で使用した高空間・時間分解能を持つ *in vivo* 光架橋実験法(PiXie 法)を概説する。

in vivo 光架橋法は、光反応性アミノ酸アナログ *p*-benzoyl phenyl-alanine (*p*BPA)を持つタンパク質を発現する細胞に紫外線 (UV)を直接照射し、導入した *p*BPA の近傍に存在する因子との間で共有結合を形成させることにより、近接因子を同定する実験手法である⁵⁾(右下図)。アンバーサプレッションを利用して、解析対象タンパク質の任意の位置に導入した *amber* コドンの部位に *in vivo* で *p*BPA を効率良く取り込ませることができる(右上図)為、網羅的な解析に適している。生細胞内で生じるタンパク質間相互作用をアミノ酸残基レベルの高い空間分解能で解析できる優れた手法である。近年我々は、工業用の超強力 UV 照射装置の使用により架橋形成に要する UV 照射時間を従来の 1/100 以下に短縮することに成功した⁴⁾。更に、pulse-chase 実験と組み合わせることで、高い時間分解能も併せ持つ PiXie 法を開発した⁴⁾。本手法は、新生タンパク質の成熟化過程で生じる一過的な相互作用を高感度で捕捉できる方法であり、本研究目的に合致していることから、この手法を駆使して解析を進めた。



本研究では、以下の4つの研究項目を順次遂行し、幾つかの重要な成果を得た(詳細は結果の項に記載した)。

1) VemP タンパク質の全領域を対象とした *in vivo* 光架橋実験: *vemP* 遺伝子(159 コドン)を対象に、翻

訳停止モチーフ(139-157)を除くほぼ全てのコドンに *amber* に改変した変異型 *vemP* 遺伝子を持つ plasmid を構築し、網羅的 *in vivo* 光架橋実験を行った。この際、合成途上鎖と翻訳完了鎖を明確に区別する為に *VemP* の C 末端に 3 x (FLAG)-Myc (F_3M) タグを付加した誘導体を材料として用いた。短寿命の新生 *VemP* 鎖の動的挙動を追跡するため、 ^{35}S -Met を用いて短時間放射標識した *VemP*(*pBPA*)- F_3M 発現細胞に対して、上述の超強力 UV 照射装置を用いて *in vivo* 光架橋実験を行った。*VemP* に対する抗体を用いた免疫沈降法 (Immunoprecipitation: IP) により架橋産物を精製後、SDS-PAGE で展開することで架橋複合体形成の有無を評価した。多くの部位で *VemP* 合成途上鎖との間で多数の架橋産物が形成される事を確認した。

2) 架橋相手の同定: 放射標識した極微量サンプルを用いて光架橋解析を行う為、質量分析による架橋相手の同定は容易ではない、そこで、以下の3つの方法を組み合わせる事で、架橋相手を同定した。i) 架橋産物の移動度から候補タンパク質を推定し、その抗体を用いた IP により検証した。ii) (非必須因子の場合) 候補因子をコードする遺伝子の欠失株を作成・使用し、架橋産物の消失により判断した。iii) (必須因子の場合や候補因子の抗体が入手困難な場合) 候補因子に His₁₀ タグ配列を付加した誘導体を発現する大腸菌株を新たに構築し、タグ配列を利用した pull down 実験により検証した。これらの手法により、想定された相互作用因子に加え、新規の細胞内因子 (Ffh, PpiD) の同定に成功した(後述)。

3) *pBPA* スキャンングによる *VemP*(*pBPA*)体の機能評価: 1) で作製した *pBPA* 導入変異体の翻訳停止解除の kinetics を pulse-chase 実験により調べた。*VemP* 翻訳停止の安定性が大きく低下した Arg-85 残基については、他の天然アミノ酸に置換した変異体を6種類作成し、より詳細な解析を行った。これらの解析により、*VemP* の翻訳停止の安定性に寄与する必須の *cis* 因子 Arg-85 残基の同定に成功した(後述)。

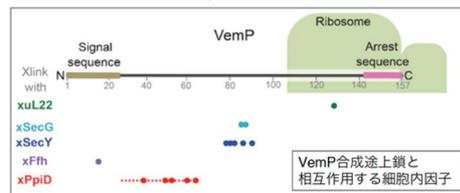
4) *VemP* 生合成における相互作用因子の機能の評価: 2) で同定した新規細胞因子 Ffh の発現制御株と、PpiD の欠失株を用いて、それらの株中での *VemP* 翻訳停止鎖の動態を pulse-chase 実験により調べた。Ffh は、トランスロコンへの標的化に、PpiD は *VemP* 翻訳アレスト解除に必須の役割を持つ事を明らかにした(後述)。PpiD と複合体を形成することが示唆されていた機能未知因子 YfgM の解析も進め、PpiD/YfgM の相互作用の詳細を明らかにすると共に、この分子シャペロン複合体が *VemP* の翻訳アレスト解除に必須の役割を持つことを明らかにした(後述)。

(参考文献) 1) Tsukazaki *et al.* (2011) *Nature* **474**, 235-238; 2) Ishii *et al.* (2015) *PNAS* **112**, E5513-E5522; 3) 3) Mori *et al.* (2018) *JBC* **293**, 2915-2926; 4) Miyazaki *et al.* (2018) *JBC* **293**, 677-686; 5) Chin & Schultz. (2002) *ChemBioChem* **11**, 1135-1137

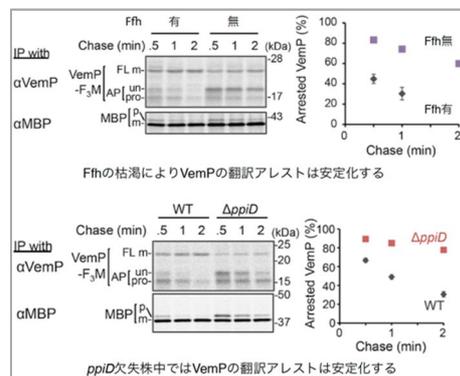
4. 研究成果

PiXie 解析による *VemP* 新生鎖の相互作用因子解析

1) *VemP* 分子全体を対象とした網羅的 PiXie 解析の結果から、合成途上の *VemP* 新生鎖は、リボソームタンパク質 uL22, SecY/E/G トランスロコンの構成因子である SecY, SecG に加え、膜タンパク質のトランスロコンへの標的化に働くシグナル認識粒子 (SRP) のタンパク質成分である Ffh やペリプラズムシャペロン PpiD と近接している事を明らかにした(右図)。これまでの知見から *VemP* との相互作用が想定された因子リボソームタンパク質、SecY, SecG が相互作用因子として同定されたことから、本実験手法により生体内で生じる相互作用を正しく検出できていると考えられ、新たな相互作用因子 Ffh と PpiD の役割に興味を持たれた。



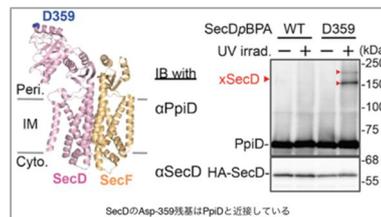
2) 上記2つの新たな細胞内因子 (Ffh, PpiD) の *VemP* 生合成における役割を調べるために以下の *in vivo* 解析を行った。Ffh 発現制御株を用いた pulse-chase 実験の結果から、Ffh が枯渇した条件下においては、シグナル配列が切断を受けていない *VemP* 翻訳アレスト体が安定化された(右上図)。また、架橋形成の kinetics 解析の結果から、*VemP* と Ffh との架橋形成は、*VemP* と SecY もしくは SecG との架橋よりも早い段階で生じていた(結果は省略)。よって、SRP は *VemP* のトランスロコンへの標的化に重要な役割を持つと結論した。



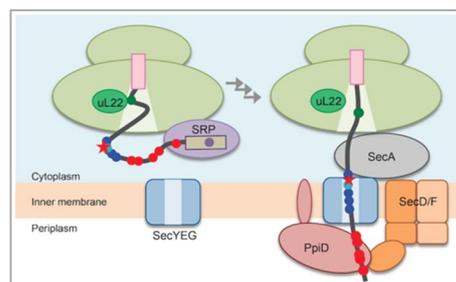
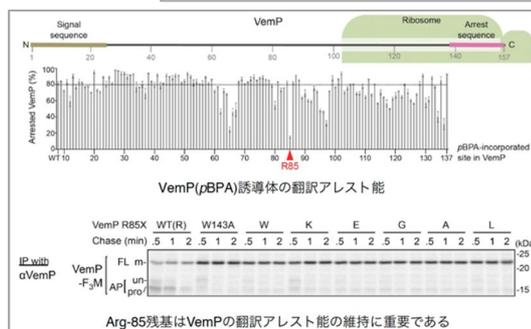
一方、*VemP* を発現する $\Delta ppiD$ 株を用いた pulse-chase 実験の結果から、PpiD の欠失によりシグナル配列が切断を受けた *VemP* 翻訳アレスト体が安定化される事が示された(右下図)。この結果は、*VemP* 合成途上鎖はトランスロコンまで標的化され、膜透過反応は(シグナル配列が切断を受けるまで)ある程度進行しているものの、PpiD の欠失により翻訳アレストの解除が遅延している事を示す。よって、PpiD は *VemP* の膜透過反応の後期過程で生じる翻訳アレスト解除に重要な役割を持つ。

3) SecD 分子を対象とした *in vivo* 光架橋実験から、SecD 分子内の大きなペリプラズムドメイン

内の Asp-359 残基と PpiD は物理的に近接している事が明らかになった(右図)。また、VemP の翻訳アレスト解除には、SecD/F と PpiD の両因子が存在している事が必要で、一方の過剰発現によって他方の機能不全を相補できない事が解った(データは省略)。よって、VemP の翻訳アレスト解除には SecD/F と PpiD が共同的に働く事が必要であると考えられる。

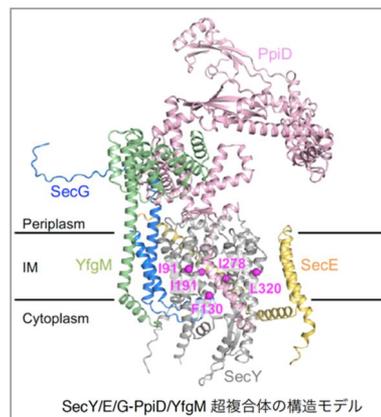


4) VemP(*pBPA*) 誘導体の pulse-chase 実験から、Arg-85 残基を *pBPA* に置換した VemP 誘導体では、翻訳アレスト状態が著しく不安定になることを見出した(右上図)。この部位を性質の異なる6種類の天然アミノ酸に置換した場合においても同じく翻訳アレストの不安定化が見られた(右下図)。これに対して、シグナル配列の除去によりトランスロコンに標的化されなくなったΔSS-VemP(R85W)変異体においては、翻訳アレストは安定に維持されていた(データは省略)。よって、Arg-85 残基は翻訳アレストの形成には関与していないこと、このアミノ酸残基の作用点が SecY/E/G トランスロコン上にあることが明らかになった。以上の結果から、VemP 分子内の Arg-85 残基は、トランスロコン上で適切に翻訳アレストを解除するのに必須の役割を持つ *cis* エlementであると結論した。以上の実験結果に基づき、VemP の合成開始から翻訳アレスト解除、膜透過の完了に至る成熟化過程における各因子との相互作用の移り変わり(右図)と各々の因子の生理的役割を議論すると共に、Arg-85 残基の役割についても考察した。これらの内容を、2020年に *eLife* 誌に報告した。



PpiD/YfgM 複合体の相互作用解析・生理機能解析

VemP の翻訳アレスト解除に PpiD が必須であるとの上記発見に端を発して、PpiD と複合体を形成する機能未知因子 YfgM との相互作用様式の検討を進めた。具体的には、YfgM 分子全体を対象とした網羅的な部位特異的 *in vivo* 光架橋実験を行い、PpiD 近接部位を多数同定した。一方、PpiD 側からの YfgM 近接部位は、AlphaFold2 を用いた構造予測モデルに従った部位特異的 *in vivo* 光架橋実験により決定した。更に、*ppiD* 欠質株、*yfgM* 欠失株、二重変異株を用いた *in vivo* 機能解析から、PpiD/YfgM 複合体の生理的意義について検討し以下の成果を得た。1) PpiD と同様に YfgM も VemP の翻訳アレスト解除に重要な役割を持つ。2) PpiD/YfgM 複合体の形成は、SecY/E/G との機能的な相互作用に必要である。3) PpiD との相互作用には、YfgM のペリプラズム領域の大半を占める TPR domain 全体が重要な役割を持つ。これらの結果に基づき SecY/E/G-PpiD/YfgM 複合体のモデル構造を予測し(右図) VemP 翻訳停止解除における PpiD/YfgM 複合体の役割についての作業仮説を提案した。以上の結果を 2022年に *JBC* 誌に報告した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|-------------------------------|
| 1. 著者名 Miyazaki Ryoji, Ai Mengting, Tanaka Natsuko, Suzuki Takehiro, Dhomae Naoshi, Tsukazaki Tomoya, Akiyama Yoshinori, Mori Hiroyuki | 4. 巻 298 |
| 2. 論文標題 Inner membrane YfgM-PpiD heterodimer acts as a functional unit that associates with the SecY/E/G translocon and promotes protein translocation | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry | 6. 最初と最後の頁 102572 ~ 102572 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.102572 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Miyazaki Ryoji, Mori Hiroyuki, Akiyama Yoshinori | 4. 巻 2548 |
| 2. 論文標題 A Photo-Crosslinking Approach to Monitoring the Assembly of an LptD Intermediate with LptE in a Living Cell | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Methods Mol. Biol. | 6. 最初と最後の頁 97 ~ 107 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-2581-1_7 | 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 Miyazaki Ryoji, Akiyama Yoshinori, Mori Hiroyuki | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Fine interaction profiling of VemP and mechanisms responsible for its translocation-coupled arrest-cancelation | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 eLife | 6. 最初と最後の頁 e62623 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.62623 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Daimon Yasushi, Narita Shin-ichiro, Miyazaki Ryoji, Hizukuri Yohei, Mori Hiroyuki, Tanaka Yoshiki, Tsukazaki Tomoya, Akiyama Yoshinori | 4. 巻 117 |
| 2. 論文標題 Reversible autoinhibitory regulation of Escherichia coli metalloprotease BepA for selective barrel protein degradation | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences | 6. 最初と最後の頁 27989 ~ 27996 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2010301117 | 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 Miyazaki Ryoji, Akiyama Yoshinori, Mori Hiroyuki | 4. 巻 1864 |
| 2. 論文標題 A photo-cross-linking approach to monitor protein dynamics in living cells | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects | 6. 最初と最後の頁 129317 ~ 129317 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2019.03.003 | 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 Miyata Makoto, Robinson Robert C., Uyeda Taro Q. P., Mori Hiroyuki, et al. (計28人) | 4. 巻 25 |
| 2. 論文標題 Tree of motility - A proposed history of motility systems in the tree of life | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Genes to Cells | 6. 最初と最後の頁 6 ~ 21 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12737 | 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 1件 / うち国際学会 0件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 石井英治、秋山芳展、森博幸 |
| 2. 発表標題 翻訳アレストペプチドVemPを介した遺伝子発現制御における転写産物の動態解析 |
| 3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 池田優希、秋山芳展、森博幸 |
| 2. 発表標題 VemP-Blaレポーター系を用いた分泌モニター因子VemPの翻訳停止の解除に関わる cis-element, trans因子の道程とその作用機序の解明 |
| 3. 学会等名 第18回21世紀大腸菌研究会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Ai Mengting, 宮崎亮次、秋山芳展、森 博幸 |
| 2. 発表標題 部位特異的 in vivo 光架橋法によるタンパク質膜透過促進因子 SecD/F と膜結合型分子シャペロン PpiD/YfgM 複合体の相互作用解析 |
| 3. 学会等名 第17回21世紀大腸菌研究会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 石井英治、秋山芳展、森 博幸 |
| 2. 発表標題 新生ポリペプチド鎖依存的な膜局在化による mRNA 分解促進 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 宮崎亮次、吉谷亘平、森 博幸、秋山芳展 |
| 2. 発表標題 細菌の外膜生合成と品質管理に関わる2機能性プロテアーゼ BepA の基質認識機構 |
| 3. 学会等名 第93回日本生化学会大会、web開催 |
| 4. 発表年 2020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 |
|---------|---------|
|---------|---------|