

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15715

研究課題名（和文）in vivo光架橋法による生細胞内での新生ポリペプチド鎖の迅速な動態変化の解析

研究課題名（英文）In vivo photo-crosslinking analysis of dynamic interactions of a nascent polypeptide in a living cell

研究代表者

宮崎 亮次（Miyazaki, Ryoji）

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教

研究者番号：30827564

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）：タンパク質の多くは成熟過程で、リボソームと結合した新生ポリペプチド鎖の状態では様々な因子と連続的に相互作用する。しかし、生細胞内で新生鎖の迅速な相互作用動態はほとんど解析されていない。

本研究では、新生ポリペプチド鎖状態が安定なVemPをモデルとし、細胞内での相互作用動態をin vivo光架橋法によって解析した。そして、VemP新生鎖がリボソームやSecトランスロコンに加えて、SRPやPpiDと連続的に相互作用し、膜透過されることを示した。また、新規膜透過関連タンパク質PpiDに着目し、そのパートナー因子YfgMとの相互作用様式を明らかにし、PpiD/YfgM複合体の細胞内構造の手がかりを得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リボソームによって翻訳されている途上の新生ポリペプチド鎖はタンパク質成熟過程で必ず経る状態である。この新生鎖の品質管理機構が疾病と密接に関わること等から、新生鎖研究は学術的だけでなく医学を含めた社会的な重要性が高まっている。本研究は、in vivo光架橋法およびその改良法を用いて、困難であった生細胞内で新生鎖の迅速な相互作用動態の解析を達成した。これは今後の新生鎖研究における有用な解析手法の例として意義深い。

また、この研究過程で予想外にも、タンパク質の膜透過反応に関わる新たな因子を同定した。この発見は、生物に普遍的に保存されているタンパク質膜透過反応を理解するための基盤となる発見である。

研究成果の概要（英文）：Many proteins sequentially interact with various factors during their maturation processes in the form of nascent polypeptides bearing from ribosomes. However, there are limited analyses on the rapid and dynamic interactions of nascent polypeptides in living cells. In this study, we used the in vivo photo-crosslinking to analyze the intracellular dynamic interactions of VemP, which is stable in the nascent polypeptide state. We showed that the VemP-nascent polypeptide continuously interacts with SRP and PpiD, as well as a ribosome and the Sec translocon, to be membrane-translocated. We also focused on PpiD, a novel protein translocation-related membrane protein, and elucidated its interaction mode with its partner factor YfgM, providing clues to the intracellular structure of the PpiD/YfgM complex.

研究分野：細胞内生化学

キーワード：新生ポリペプチド鎖 in vivo光架橋法 VemP 翻訳停止配列 Secトランスロコン PpiD YfgM Alpha Fold 2

1. 研究開始当初の背景

多くの新生タンパク質の成熟過程（局在化・構造形成）は、種々の因子が新生ポリペプチド鎖に相互作用することで進行する。この過程が損なわれるとタンパク質は正常に機能できず、重大な疾病を引き起こす原因ともなる。最近では、新生鎖自体が機能を有することが見出されてきた。例えば、本研究で解析対象とする VemP 等は翻訳伸長反応が一時的に停止し、それを利用して下流遺伝子の発現を制御するが、この翻訳停止とその解除は新生鎖と多くの因子との相互作用を介して行われる。このような重要性から、新生鎖動態の研究が精力的に行われているものの、その多くは *in vitro* で再構成された限定的な環境下で解析されたものであり、生理的環境下で新生鎖のダイナミックな動態変化を解析したものはほとんどない。そのため、「生細胞中で新生ポリペプチド鎖がどのような振る舞いをするのか」という根本的な問題は未知の部分が多く残されている。

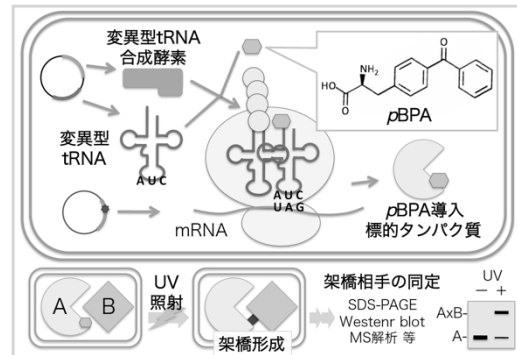
2. 研究の目的

本研究は後述する *in vivo* 光架橋法を用いて、新生ポリペプチド鎖状態が比較的安定に持続する VemP をモデル基質として利用し、生細胞内で新生ポリペプチド鎖の相互作用動態を分子レベルで解明することを目的とする。これにより上述した問題を克服し、新生鎖の研究に新たな視点を提供し得るものである。

3. 研究の方法

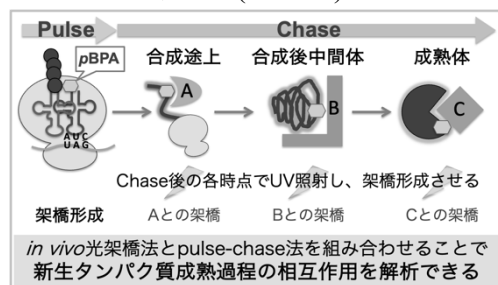
本研究では、「*in vivo* 光架橋法」とその応用法である「PiXie 法」を利用する。

(1) *in vivo* 光架橋法：生きた細胞内(*in vivo*)での一過的なタンパク質間相互作用をアミノ酸残基レベルの空間分解能で調べることができる、手法である。古細菌由来の変異型 tRNA 合成酵素と変異型 tRNA を発現し、これらを利用して、任意の *amber* コドン導入部位に pBPA 等の光架橋性非天然アミノ酸を導入した標的タンパク質を細胞内で発現することができる(右上図)。



その細胞に UV 照射することで架橋複合体を形成させ、架橋相手を同定することで、高空間分解能で生細胞内でのタンパク質間相互作用解析が可能となる⁽¹⁾。この手法を用いて新生鎖のどの部位にどのような因子が相互作用するかを調べた。

(2) PiXie 法：上述のように、*in vivo* 光架橋法は非常に有用な手法である。しかしながら、従来法では、架橋形成に数分以上の UV 照射が必要であり、秒単位で進行する迅速なタンパク質間相互作用変化を追跡することは不可能であった。我々は強力な UV 照射器を用いることで必要な照射時間を 1 秒まで短縮できることを見出した。さらに、pulse-chase 法と組み合わせた PiXie 法と名付けた新たな手法を構築した(右下図)⁽²⁾。この手法を用いて標的タンパク質の架橋動態を調べることで、生細胞内で合成された新生タンパク質の成熟過程における迅速な相互作用・フォールディングの変化を追跡できる。この手法を用いて新生鎖が合成後にどのように連続的な相互作用をするかを調べた。

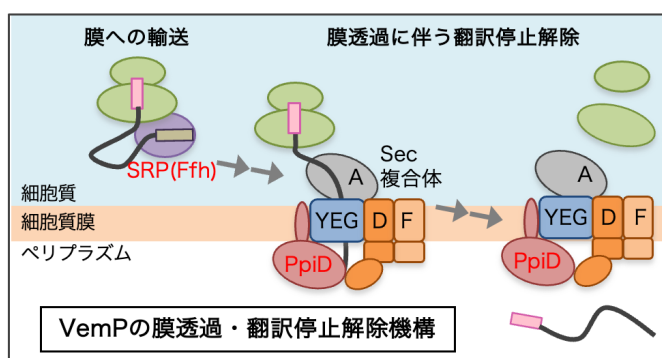


4. 研究成果

(1) 翻訳停止配列を有する膜透過モニター因子 VemP の相互作用動態解析

VemP は *Vibrio* 属細菌が有する膜透過モニター因子であり、翻訳停止配列を持つ。細胞の膜透過活性が低下する条件では、VemP は翻訳停止を起こし、膜透過を駆動する下流遺伝子の発現を誘導する⁽³⁾。一方で、正常の生育条件では、VemP は翻訳停止を起こすものの、直ぐに細胞質膜上の SecYEG トランスロコンへと輸送され、膜透過に伴う引っ張り力によって翻訳停止が解除される。このような翻訳停止が解除されるまでの、翻訳途上 VemP に相互作用する因子の同定とその相互作用動態の解析を試みた。

VemP の翻訳停止は迅速に解除されるため、PiXie 法を用いて、合成直後の VemP 翻訳停止が保持されている状態で解析を行った。VemP の全領域を対象に pBPA を導入し、それらを用いて解析したところ、既に相互作用することが予測されたリボソームや Sec トランスロコンに加えて、シグナル認識粒子(SRP)の構成タンパク質 Ffh や機能未知膜タンパク質 PpiD が VemP 新生鎖と相互作用することが示唆された。Ffh や PpiD の変異によって、VemP の膜透過とそれに伴う翻訳停止の解除が不全となることから、これらが VemP の膜透過に関わることも明らかになった。また、VemP 新生鎖と各因子の相互作用のタイミングを精査したところ、まずリボソームや Ffh と、そして SecYEG トランスロコンと、最後に PpiD と順次相互作用していく様子が観察された。この結果は、VemP 新生鎖がシグナル認識粒子により膜上の Sec トランスロコンへと輸送され、ある程度膜透過反応が進行した後に PpiD と相互作用して膜透過・翻訳停止解除が起こるといふ VemP の膜透過・翻訳停止解除の全体像(右図)を示すものである。そして、*in vivo* 光架橋法を用いることで、困難であった生細胞内での新生鎖の動態を解析できることを実証した。

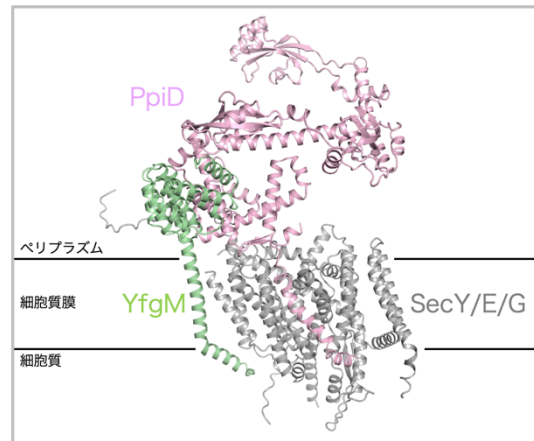


(2) 新規膜透過関連因子 PpiD の解析

上記研究から、PpiD という内膜タンパク質が、VemP 新生鎖と直接相互作用し、その膜透過を促進することを新たに見出した。PpiD は、YfgM という機能未知の内膜タンパク質と複合体を形成すると報告されていた。そこで、YfgM の機能・構造の解析を行った。

yfgM 変異株では、*ppiD* 変異株と同様に、VemP 新生鎖の膜透過が不全となること、PpiD が部分的に不安定化することを見出した。このことから、PpiD は単独ではなく、YfgM と複合体を形成して機能することが示唆された。そこで、PpiD と YfgM がどのような様式で相互作用するかを、pBPA を導入した YfgM 変異体を用いた *in vivo* 光架橋解析で調べた。その結果、AlphaFold 2 等のタンパク質立体構造予測⁽⁴⁾から「手のひら」のような構造を取ると予測される TPR ドメインの手のひらの内側で PpiD と固く相互作用することが明らかとなった。また、YfgM が SecY/E/G トランスロコンと直接

相互作用する残基も同定し、報告されたこれまでの架橋解析の結果が全て、PpiD/YfgM と SecY/E/G の AlphaFold 2 の予測構造（右図）と一致することも見出し、この予測構造が妥当であるという実験的な証拠が得られた。以上のように、PpiD/YfgM 複合体が新生ポリペプチド鎖の膜透過に働き、その際の SecY/E/G トランスロコンとの相互作用の分子様式を明らかにした。



以上のように、本申請で提案した研究内容を達成し、生細胞内で翻訳途上の新生ポリペプチド鎖の相互作用動態を解析できることを実証できた。また、新生鎖の膜透過に関わる新たな因子も同定することができた。これらのことから、今後の科学の発展の基盤となり得る研究と思われる。

<引用文献>

- (1) Chin, J. W., and Schultz, P. G. (2002) *ChemBioChem* 3, 1135–1137
- (2) Miyazaki, R., *et al.* (2018) *J. Biol. Chem.* 293, 677–686
- (3) Ishii, E., *et al.* (2015) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E5513–E5522
- (4) Jumper, J., *et al.* (2021) *Nature* 596, 583–589

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Miyazaki Ryoji, Watanabe Tetsuro, Yoshitani Kohei, Akiyama Yoshinori	4. 巻 10
2. 論文標題 Edge-strand of BepA interacts with immature LptD on the β -barrel assembly machine to direct it to on- and off-pathways	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e70541
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.70541	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, 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 metallopeptidase BepA for selective β -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, MORI Hiroyuki, AKIYAMA Yoshinori	4. 巻 61
2. 論文標題 PiXie Analysis for Monitoring Dynamic Protein Interaction and Folding in a Living Cell	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Seibutsu Butsuri	6. 最初と最後の頁 036 ~ 039
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2142/biophys.61.036	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, 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 in Molecular Biology: Lipopolysaccharide Transport	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	4. 巻 4
2. 論文標題 Analyzing protein intermediate interactions in living E. coli cells using site-specific photo-crosslinking combined with chemical crosslinking	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 102178 ~ 102178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2023.102178	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 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 宮崎亮次
2. 発表標題 in vivo光架橋法による内膜タンパク質複合体PpiD/YfgMの機能解析
3. 学会等名 2021年度国立遺伝学研究所研究会「単細胞システムの複製と維持における生体高分子の機能」(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮崎 亮次、鈴木 健裕、堂前 直、塚崎 智也
2. 発表標題 タンパク質膜透過・輸送に関わるPpiD/YfgM複合体のin vivo光架橋解析
3. 学会等名 第22回 日本蛋白質科学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮崎 亮次、鈴木 健裕、堂前 直、塚崎 智也
2. 発表標題 in vivo光架橋法によるタンパク質膜透過関連因子PpiDの相互作用解析
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 宮崎 亮次、鈴木 健裕、堂前 直、塚崎 智也
2. 発表標題 PpiD/YfgM複合体はSec複合体とDsbAを連結する
3. 学会等名 2022年度国立遺伝学研究所研究会「単細胞生物に見られる生体プロセスの恒常性維持システム」（招待講演）
4. 発表年 2023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
---------	---------