

令和 5 年 5 月 7 日現在

機関番号：34304

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15020

研究課題名（和文）次世代型TnDR法による新生鎖動的挙動の網羅的解析

研究課題名（英文）Next generation TnDR for proteome-wide profiling of co-translational protein dynamics

研究代表者

藤原 圭吾 (Fujiwara, Keigo)

京都産業大学・生命科学部・研究員

研究者番号：10814907

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は翻訳アレスト配列を「新生鎖の動的挙動センサー」として応用し、トランスポゾンと次世代シーケンサー技術を活用することで、細胞内における新生鎖動態をプロテオームワイドに検出するTnDR-seq法の技術基盤を確立した。複数の分泌タンパク質や膜タンパク質において共通して、分泌や膜組込による特徴的な新生鎖動態が見られた。また、細胞内の可溶性タンパク質についても特徴的な動態を示すものが複数見つかった。さらに、新生鎖動態を感知する鍵であるアレスト配列について、新規のものを10以上見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究のTnDR-seqを活用することで、今後、co-translationalな成熟・局在化の普遍的な法則性や、それに対する環境変動の影響などを見出せるようになることが期待できる。それらはタンパク質科学における基礎的な重要知見となり、タンパク質合成における様々な細胞内現象の理解を補助したり、有用タンパク質の効率的な大量生産に貢献したりすることで、種々の社会的問題の解決策へつながることが期待される。

研究成果の概要（英文）：This study developed a fundamental framework for TnDR-seq that enables the comprehensive detection of co-translational protein dynamics at the proteome level. This was achieved by utilizing a force-sensing arrest peptide with a transposon and deep-sequencing system. Our findings indicate a shared pattern of co-translational movement among secretory proteins and membrane proteins. Additionally, distinct co-translational dynamics have been observed for several cytosolic soluble proteins. Moreover, through bioinformatic analysis, novel candidate arrest peptides have been identified.

研究分野：分子生物学

キーワード：新生鎖 翻訳アレスト MifM Tn-seq co-translational 枯草菌

1. 研究開始当初の背景

新生ポリペプチド鎖が機能的なタンパク質へと成熟する過程、また適切な場所へ局在化する過程は生命活動に必須である。それらの過程は新生鎖がリボソームで合成されている途上から始まり得る。この co-translational なタンパク質の成熟化が一部のタンパク質の安定性や機能発現に重要であることも示唆されていた。それらはモデルタンパク質における研究でわかってきた知見であるが、co-translational な成熟化が細胞内でどれほど一般的に起きているものなのか、網羅的な調査がほぼなされていない。その要因として、翻訳と成熟化はどちらもダイナミックであり、両者の協調を効率的に捉える有効な手立てがほとんどないことが考えられた。

大腸菌の SecM や枯草菌の MifM などはアレスト配列を持ち、自身を合成するリボソームに作用して翻訳を一時停止させる。このアレスト配列はフォースセンサーとしての性質を持ち、N 末端側から引っ張られると翻訳アレストが解除され、翻訳が再開する。アレスト配列の N 末端側にモデルタンパク質配列を融合し、その配列の成熟過程が進行して引っ張り力が生じると、翻訳アレストが解除される。そのような特徴を持つアレスト配列の C 末端側にレポーター配列を融合しておくことで、タンパク質の成熟化過程を検出することができる。研究代表者らは先行研究で、この「ダイナミクスレポーター」をトランスポゾンにより様々なタンパク質 N 末端側配列と融合し、細胞内で動的な挙動を示すタンパク質を網羅的に決定する手法、TnDR (transposable protein dynamics reporter) 法を開発した。TnDR 法を用いることで、co-translational な膜透過や膜組込、複合体形成をダイナミクスレポーターで検出できることがわかった。しかしスループット性に欠けたため、新生鎖がどこまで合成されたら co-translational な局在・成熟化が始まるのか、またどの程度のタンパク質で起きているのか、網羅的な理解は得られなかった。

これまでの研究で、アレスト配列には個性があり、フォールディングセンサーとしての特性が異なることが示唆されてきた。例えば枯草菌 MifM は膜透過の検出に優れており、フォールディングの検出に不向きと考えられ、大腸菌リボソームではほとんどアレストしない。大腸菌 SecM はフォールディングの検出が可能で、膜透過の検出には不向きであり、枯草菌リボソームを強くアレストできない。また SecM ホモログには大腸菌 SecM よりアレスト強度の強いものがあり、比較解析することで引っ張り力の強度の違いを解析できる。TnDR 法に異なる個性のアレスト配列を用いることで、新生鎖の動態やその力学的特性を多様に理解できる可能性が考えられる。しかしフォースセンサー型のアレスト配列と考えられるものはこの 20 年で 6 つしか見出されておらず、利用の幅が限られる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、TnDR 法をハイスループット化した TnDR-seq を確立し、細胞内で起きる新生鎖の動的挙動の規模とその発生メカニズムを網羅的に理解することを目指した。

3. 研究の方法

MifM の翻訳アレスト配列を用いた TnDR-seq を行なった。MifM の翻訳アレスト配列とスペクチノマイシン耐性遺伝子を融合したダイナミクスレポーターをトランスポゾンで染色体 DNA に挿入した細胞ライブラリを作成した。この細胞ライブラリをスペクチノマイシン存在下で培養した。トランスポゾン挿入位置を Tn-seq 法によりゲノムワイドに同定し、トランスポゾン挿入位置ごとに培養前後でどのくらい増幅したかを計算した。これにより、ダイナミクスレポーターの N 末端側に融合した時に翻訳アレストを解除できる領域とそうでない領域をプロテオームワイドに同定した。

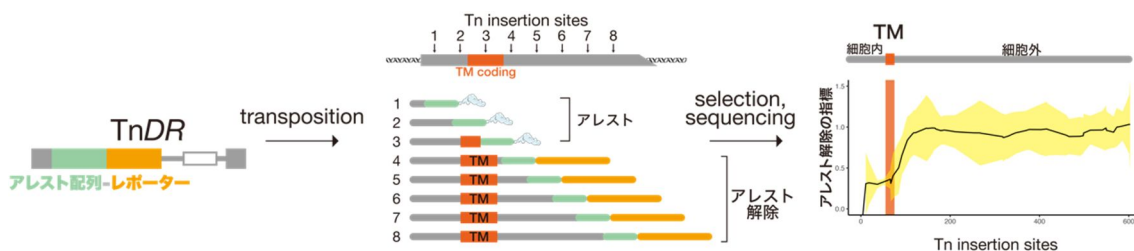
また、翻訳アレストを起こす配列候補を探索するため、バインフォマティクス解析を行なった。Genome taxonomy database の representative genome 情報をダウンロードし、放線菌の ApcA, ApdA および根粒菌の ApdP が見出された先行研究で使われたクライテリアを用いてアレスト配列候補を選択した。得られた候補因子について翻訳アレストを起こすか解析するため、in vitro の精製再構成翻訳システムである PURE system を活用した。大腸菌リボソームを用いたオリジナルの PURE system と、リボソームのみを枯草菌のものに置き換えたハイブリッド PURE system を用いた。また、翻訳アレストが起きる位置を特定するため toeprinting 解析を行なった。枯草菌と大腸菌の in vivo で翻訳アレスト解析を行うために、LacZ を用いたレポーターアッセイを行なった。

4. 研究成果

(1) TnDR-seq 基盤技術の確立

MifM の翻訳アレスト配列を用いた TnDR 挿入細胞ライブラリを解析した結果、約 90% のタンパク質と、少なくとも 1 個所以上でダイナミクスレポーターと融合していた。1 回膜貫通タンパク質や 2 回膜貫通タンパク質、分泌タンパク質などに注目してデータ解析を行った結果、細胞外へと移行する領域とダイナミクスレポーターが融合していると翻訳アレストが解除され、細胞外へ

移行しない部分では翻訳アレストが解除されにくい傾向が示された。複数の分泌タンパク質や膜タンパク質において共通して、分泌や膜組込による特徴的な新生鎖動態が見られた。これらの結果から、TnDR-seq で新生鎖の動的挙動を捕捉できることが強く示唆された。一部の分泌タンパク質においては例外的な挙動を示す可能性も示唆された。そのほか、細胞内の可溶性タンパク質についても特徴的な動態を示すものが見つかった。同様の実験を同じトランスポゾンや変異を入れたトランスポゾンで繰り返し、TnDR-seq の再現性が確認できた。これらの結果から、TnDR-seq が細胞内で起きる多様な新生鎖動態を検出できる有効な手法であると考えられる。この研究の結果、TnDR-seq により、千以上のタンパク質について、どこまで合成されたら成熟・局在化を起こすのかという情報をハイスループットに得ることができるようになった。今後、個性の異なるアレスト配列を TnDR-seq に適用し、新生鎖が見せる多様なダイナミクスの網羅的なプロファイリングを目指す。



(2) 新規翻訳アレスト因子の探索

TnDR-seq に応用できるようなフォースセンサー型の新規翻訳アレスト因子の探索をおこなった。約 30000 のバクテリアゲノム情報を活用し、*secA*, *secDF*, *yidC* 上流に存在する uORF から、新規翻訳アレスト因子を探索した。その結果、10 以上のアレスト因子候補を見出した。それらの因子は水平伝播の可能性を否定できないが、配列の類似性が低く、進化的に独立して出現したものである可能性が高いと考えられた。既知のアレスト因子である大腸菌 *SecM* や放線菌の *ApcA*, *ApdA* および根粒菌の *ApdP* と類似したモチーフを持つものや、全く新規のモチーフを持つものが見出された。当初の予想以上に、翻訳アレスト因子の研究においても重要な発見になると考えられたため、それらの翻訳アレストについての実験的解析を行なった。

In vitro 精製再構成系翻訳システムを用いた解析の結果、それらの因子が枯草菌リボソームと大腸菌リボソームの両方、あるいはどちらか一方で翻訳アレストを起こした。Toeprinting 解析により、翻訳アレストが起きるコドンについて特定した。多くのものは翻訳伸張の段階でアレストを起こすが、一部については翻訳集結の段階でアレストを起こすことが示唆された。また、枯草菌と大腸菌における in vivo でのレポーター解析から、細胞内環境においても翻訳アレストを起こすことが示された。変異解析を行うことで、翻訳アレストに重要な残基を特定した。さらに、枯草菌と大腸菌ゲノムから類似のモチーフを持つ配列を探索することで、枯草菌においても新規の翻訳アレスト因子を見出した。

この新規翻訳アレスト因子の研究成果は、貴重な情報となるため、論文の投稿準備中である。また、TnDR-seq への応用が期待できる。そのためには今後、フォースセンサーとしての性質を確認する必要がある。

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 Chiba Shinobu, Fujiwara Keigo, Chadani Yuhei, Taguchi Hideki	4. 巻 173
2. 論文標題 Nascent chain-mediated translation regulation in bacteria: translation arrest and intrinsic ribosome destabilization	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 227 ~ 236
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvad007	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤原圭吾、千葉志信
2. 発表標題 TnDR 法による新生鎖の動的挙動のプロテオームワイドな検出
3. 学会等名 第68回日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原圭吾、赤岡大暉、千葉志信
2. 発表標題 TnDR-seq による新生鎖の動的挙動の網羅的検出
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 藤原圭吾、千葉志信
2. 発表標題 モデル細菌における新生鎖ダイナミクスの網羅的検出
3. 学会等名 第15回 小胞体ストレス研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原圭吾、千葉志信
2. 発表標題 TnDR-seq による新生鎖挙動の検出
3. 学会等名 2022年度グラム陽性菌ゲノム機能会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原圭吾、千葉志信
2. 発表標題 TnDR-seq による新生鎖挙動の網羅的検出
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 藤原圭吾、千葉志信
2. 発表標題 TnDR-seqによる新生鎖挙動の検出
3. 学会等名 第3回マルチファセットプロテインズ領域会議
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
---------	---------