

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：34506

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22655057

研究課題名（和文） Protein Folding Codon によるタンパク質機能調節機構の解明

研究課題名（英文） Analyses of Protein Folding Codon affecting protein functions

研究代表者

杉本 直己 (SUGIMOTO NAOKI)

甲南大学・フロンティアサイエンス学部・教授

研究者番号：60206430

研究成果の概要（和文）：

本研究では、翻訳の伸長反応に焦点をあて、反応の進行を継時的に解析できる手法を確立した。その手法を適用した結果、mRNA 中に存在するレアコドン（存在比率が低いコドン）や安定な RNA 構造が、翻訳伸長反応を停滞させることを見出した。また、核酸結合タンパク質による核酸の熱安定性への寄与を定量的に解析した。これらの結果は、mRNA の構造安定性や、タンパク質の結合に伴う RNA 構造の安定性変化が、翻訳伸長反応への影響を介してタンパク質の構造にまで影響を及ぼす可能性を示している。さらに、転写により産生される mRNA の熱安定性と転写反応産物量との相関についても明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Synchronized translation, which enables time-course analyses of translation elongation, was constructed using *in vitro* translation system. The synchronized translation revealed that rare codons and stable RNA structures in open reading frame of mRNA temporarily stall the translation elongation. Contribution of protein binding to thermostability of particular nucleic acid structure was quantitatively evaluated under molecular crowding condition. Results from these analyses indicate that stabilities of mRNA structures possibly affect not only translation elongation process but also folding process of nascent proteins. In addition, correlation of thermostability of nascent mRNA structure and transcription efficiency was revealed by analyses of *in vitro* transcription.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	0	1,900,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	360,000	3,460,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：Protein Folding Codon、翻訳速度、mRNA 高次構造、熱力学的安定性、タンパク質構造、分子クラウディング

1. 研究開始当初の背景

セントラルドグマは生命の根幹を成す生

命情報→機能変換システムであり、生命情報 (DNA) は mRNA へ転写後、機能分子 (タ

ンパク質)へと翻訳される。特に、情報から機能への直接的な変換を行う翻訳反応では、mRNA の塩基配列に保存されたコドンに従いアミノ酸が重合され、新生ポリペプチドが生成される。ポリペプチドとして産生されたタンパク質は、それぞれに固有の高次構造へと折りたたまれることによりその機能を発揮できるようになる。従来、タンパク質の構造はアミノ酸配列に依存するものと考えられてきたことから、タンパク質の構造および機能は、塩基配列上のコドンにコードされていると受け入れられてきた。しかしながら、新生ポリペプチドの折り畳みに関しては、翻訳反応と同時に進行する構造形成機構 (co-translational folding) が知られている。一方で、mRNA 高次構造やレアコドンがリボソームによる翻訳速度を変化させることも知られつつある。

近年、mRNA の構造とタンパク質ドメイン構造との相関、そして翻訳速度の違いによるタンパク質構造の相違というものが示唆され始めている。これは、「mRNA の高次構造が積極的に翻訳速度を規定し、しいてはタンパク質の構造と機能までを調節しているのではないだろうか?」という新たな視点を与えているように推察できる。つまり、セントラルドグマの中には、RNA の構造によってタンパク質の構造が規定される「Protein Folding Codon」という新たなコードが存在し、進化の過程の中で数多くの RNA 上に保存されている可能性がある。しかしながら、mRNA 中の高次構造による翻訳速度への影響がタンパク質の構造やその機能にどの程度寄与しているのかに関しては議論がなされていない。これはひとえに、「mRNA はアミノ酸配列を規定する」という従来の概念にとらわれていたためである。

2. 研究の目的

本研究では、mRNA 中の RNA 高次構造が、翻訳伸長過程の調節によりタンパク質の高次構造を決める役割を担っていると想定し、Protein Folding Codon という新たなセントラルドグマコードの存在について検証を行う。

3. 研究の方法

mRNA の高次構造による翻訳伸長反応への影響を評価するために、まず、翻訳の伸長反応過程にのみ焦点を当て、翻訳伸長速度の評価を可能にする手法を構築する。次に、翻訳反応が一定速度で進行するのではなく、mRNA 上の特定の RNA 高次構造の位置で速度変化することを示す。

(1) 翻訳伸長反応過程の解析手法の確立

翻訳反応を解析する場合、一般的に in

vitro 翻訳による実験系が用いられる。この in vitro 翻訳では反応の律速段階が翻訳の開始過程に存在するため、翻訳の伸長反応過程を継時的に解析するのは困難である。そこで、翻訳反応を開始したリボソームを mRNA 上の特定の位置で一旦停止させることで全てのリボソームを同調させ、翻訳反応を再開させた後の継時的な翻訳伸長過程を解析する手法 (Synchronized Translation) を確立する (図 1)。

① 再構成型無細胞翻訳系を用いて翻訳反応を行う。この時、翻訳反応溶液から特定のアミノアシル tRNA 合成酵素を取り除いておくことで、特定のコドンの手前で翻訳反応を一旦停止させる。また、mRNA 中に UAG 終始コドンを導入し、対応する非天然蛍光アミノ酸でアミノアシル化した tRNA を加えておくことで、翻訳反応産物に蛍光分子を導入する。

② 翻訳を一旦停止させた後、翻訳反応に必要な全ての因子を含む反応溶液を加えることで、翻訳反応を再開させる。翻訳伸長反応の再開後、時間経過に伴う翻訳伸長反応産物を、液体窒素を用いて凍結することにより回収する。

③ 回収した翻訳伸長反応産物を SDS-PAGE で分離することにより、継時的な翻訳の伸長過程を確認する。

④ 翻訳伸長反応産物を精製し、分子量測定を行うことで、翻訳がどこまで伸長されているのかを確認する。

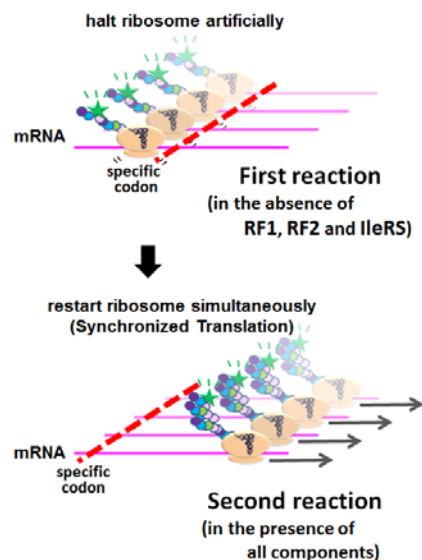


図 1. Synchronized Translation の概念図

(2) mRNA 中の RNA 高次構造による翻訳伸長反応への影響の解析

RNA の高次構造として、グアニンに富んだ配列が形成する四重鎖構造に着目し、mRNA 中の RNA 四重鎖構造が、翻訳伸長反

応にどの程度影響を及ぼすのかを解析する。

① 大腸菌の全ゲノム配列、約 440 万塩基対を利用し、翻訳領域中に RNA 四重鎖構造を形成し得ると考えられる、グアニンに富んだ配列（グアニンリッチ配列）を有する mRNA を検索する。

② 検索条件に該当するグアニンリッチ配列を mRNA の 3'末端側に挿入したモデル mRNA を作製し、(1)–①から④の流れに従い、Synchronized Translation による翻訳伸長過程の解析を行う。

③ グアニンリッチ配列を有する、天然の完全長 mRNA を作製し、同様に Synchronized Translation による翻訳伸長過程の解析を行う。

以上の研究で得られる、mRNA 構造による遺伝子発現過程への影響についての理解をより深めるために、RNA 高次構造の安定性に影響を与え得る化学的要因について、分子クラウディングなどの細胞内類似環境において解析を行う。さらに、転写反応と共に形成される RNA 高次構造による遺伝子発現過程への影響についても評価する。

(3) 分子クラウディング環境下におけるタンパク質 - 核酸相互作用の解析

四重鎖構造を形成する核酸とそれに対して特異的に結合するタンパク質との相互作用を、物理化学的に定量解析する。特に、相互作用と核酸の熱安定性に影響する水分子の影響を解析する。

① 既に複合体構造が知られているトロンピン-DNA 四重鎖アプタマー(TBA)をモデルに、分子クラウディング環境における結合親和性変化を測定する。

② 分子クラウディング環境における浸透圧変化(a_w 変化)と会合定数変化との相関性を解析し、トロンピンと TBA 間の結合における水和変化を解析する。

(4) 転写後新生 RNA の構造による転写反応への影響解析

転写過程において産出される RNA (転写後新生 RNA) の構造が転写活性に及ぼす影響を解析する。

① 異なるステム長の RNA ヘアピンを形成すると考えられる配列を含んだ鋳型 DNA を設計する。

② 各鋳型 DNA について、T7 RNA ポリメラーゼによる転写反応を行う。一定時間の転写反応後、転写産物量を各鋳型 DNA 間で比較する。

③ 各鋳型 DNA から転写される RNA のヘアピン構造に関して、その熱力学的安定性を測定する。

④ 転写後 RNA の熱安定性と、転写産物量とを比較する。

4. 研究成果

(1) Synchronized Translation の確立

これまで、翻訳の伸長反応過程を解析する手法としては、翻訳開始数分後に翻訳開始過程の阻害剤を添加する手法がとられてきた。しかしながらこの場合、極短い時間軸における翻訳伸長反応過程を追跡することはできない。本研究では、翻訳を開始したリボソームを特定の位置で一時的に停止させることにより、完全に翻訳反応を同調させる Synchronized Translation の確立を試みた。これは、これまでも例のない試みである。

翻訳させるモデル mRNA として *Staphylococcal protein A* 由来の B-domain をコードする mRNA を作製し、イソロイシル tRNA 合成酵素 (IleRS) と終結因子 (RF1, RF2) を取り除いた翻訳溶液を用いて翻訳反応を行った。その結果、イソロイシンコドンの手前で翻訳反応を強制的に停止させることに成功した (図 2, S)。また、翻訳に必要なすべての因子を含む溶液を追加することにより、一旦停止中の翻訳反応を再開させることにも成功した。翻訳再開後 1 分間における継時的な翻訳伸長過程を SDS-PAGE で確認したところ、48 アミノ酸を翻訳伸長させる過程において、3 カ所で翻訳伸長が停滞しつつ (図 2, A, B, C)、mRNA の 3'末端まで翻訳が進行することが明らかとなった (図 2, D)。これら 3 カ所について、分子量解析により翻訳伸長反応が停滞している位置の正確な同定を行ったところ、3 カ所中の 2 カ所は、レアコドンの手前に位置していることを見出した。このことは、Synchronized Translation が翻訳の伸長過程の解析手法として適したものであることを示している。また、これまでに 1 分以内の継時的な翻訳伸長反応過程を正確に解析できた例はなく、リボソームを完全に同調させることで初めて可能になったと考えられる (N. Sugimoto, *et al.*, *Anal. Chem.*, **84**, 857–861 (2011))。これにより、今後、翻訳伸長反応過程に影響する様々な因子 (mRNA の高次構造や mRNA へのタンパク質の結合など) について解析を進めることが可能となった。

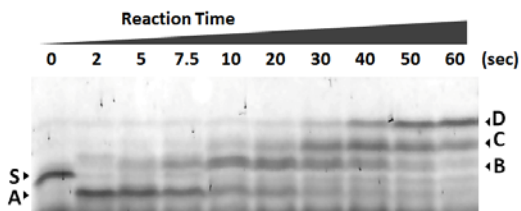


図 2. Synchronized Translation による継時的な翻訳浸透過程の解析

(2) RNA 四重鎖構造による翻訳反応の停滞
 グアニンリッチ配列が形成する四重鎖構造は、生理的な溶液条件下において極めて高い熱安定性を示す。加えて、我々はこれまでに、細胞内のような分子が密に込み合った環境（分子クラウディング環境）において、四重鎖構造がさらに安定化されることを示している。そのため、mRNA 中の四重鎖構造は、その高い熱安定性から、翻訳伸長反応に影響を及ぼすことが想定される。

大腸菌のゲノム配列からグアニンリッチ配列を検索した結果、5つの遺伝子の翻訳領域中から検索条件に該当するグアニンリッチ配列を見出した。これらの配列について、UV 融解測定および円二色性測定により四重鎖構造を形成するかどうかの確認を行った。その結果、全ての配列が 100 mM KCl の生理的塩濃度条件において四重鎖構造を形成することを確認した。また、これらのグアニンリッチ配列を有する mRNA を作製し、Synchronized Translation による翻訳伸長反応過程の解析を行ったところ、全ての配列においてグアニンリッチ配列の手前で翻訳伸長反応が停滞することが確認された。また、グアニンリッチ配列の挿入位置をずらした mRNA を用いた解析から、翻訳伸長反応、グアニンリッチ配列から 5-7 塩基の配列を挟んだコドンの位置で停滞することを見出した（図 3）（論文作成準備中）。四重鎖構造の場合、翻訳伸長反応が 5 分以上にわたり停滞しており、レアコドンと比較しても長期にわたり翻訳伸長反応が影響を受けていた。また、モデル mRNA だけではなく、完全長の mRNA を翻訳した場合にも、四重鎖構造の手前で翻訳伸長反応が停滞した。そのため、mRNA の翻訳領域に存在する四重鎖構造が、翻訳伸長過程を調節することにより新生タンパク質の構造や機能にまで影響している可能性が示唆される。

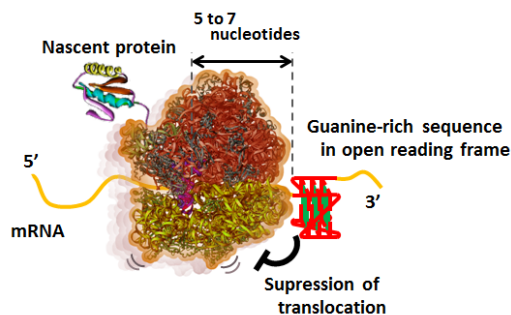


図 3. mRNA 四重鎖構造による翻訳伸長反応の停滞の概念図

(3) タンパク質 - 四重鎖核酸相互作用における水分子の寄与

DNA 四重鎖に対するトロロンビンの結合は、DNA 四重鎖を安定化させることを示し、これらの安定化に対する核酸塩基の影響も明らかにした (Sugimoto, *et al.*, *Biochimie*, 93, 1231-1238 (2011)). また、この相互作用は、分子クラウディング環境下でその結合親和性が低下した。さらに水の活量変化と会合定数変化の相関関係より、DNA 四重鎖はトロロンビンとの結合において水分子を取り込むことが明らかとなった (N. Sugimoto, *et al.*, *ChemBioChem*, 12, 1822-1826 (2011))。一般的に、二重鎖 DNA とタンパク質との結合においては、水分子が放出されることが知られている。そのため、特定の構造を有する一本鎖核酸へのタンパク質の結合は、二重鎖 DNA とタンパク質との相互作用で得られている知見とは逆の挙動を示すことが示唆される。この挙動は mRNA とタンパク質との相互作用にも当てはまると考えられ、タンパク質による RNA 構造の安定性への寄与と翻訳反応への影響を考慮するうえでの重要な知見となる。

(4) RNA の構造安定性による転写反応への影響

各鋳型 DNA から転写される RNA は、それぞれ異なるヘアピン構造（ステム長が 7 塩基対、5 塩基対、3 塩基対、2 塩基対）を形成するように配列設計した。各ヘアピン配列のオリゴ RNA に関して、CD スペクトル測定を行った結果、A 型二重鎖と考えられるスペクトルが観察された。さらにそのスペクトル強度は、7 塩基対 > 5 塩基対 > 3 塩基対 > 2 塩基対の順で小さくなり、設計通り、ステム長の異なるヘアピン RNA であることが確かめられた。さらに、各ヘアピン RNA の構造安定性を UV 融解温度曲線より解析したところ、熱力学的安定性は 7 塩基対 > 5 塩基対 > 3 塩基対 > 2 塩基対の順で低下した。

一方で、各鋳型 DNA に対する T7 RNA ポリメラーゼの転写活性について、転写産物量が飽和に達する時間での転写量から比較を行った。その結果、転写産物量は RNA ヘアピンの順で増加した。このことから、RNA ヘアピンの構造安定性が高くなるほど、転写産物量が低下することが明らかとなった (N. Sugimoto, *et al.*, *Chem. Commun.*, 48, 5121-5123 (2012))。したがって、転写後新生 RNA のヘアピン形成は、転写活性を低下させると考えられる。原核生物などでは、転写反応と翻訳反応とが同時に進行する。そのため、新生 RNA の構造、およびその熱安定性が、転写反応への影響を介して翻訳反応やタンパク質構造にも影響を及ぼす可能性が示唆される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 20 件)

- ① S. Nagatoishi, R. Ono, and N. Sugimoto, The yield of transcripts for RNA polymerase regulated by hairpin structures in nascent RNA, *Chem. Commun.*, **48**, 5121-5123 (2012), 査読有
DOI: 10.1039/c2cc31657a
- ② T. Endoh, Y. Kawasaki and N. Sugimoto, Synchronized Translation for Detection of Temporal Stalling of Ribosome during Single-Turnover Translation, *Anal. Chem.*, **84**, 857-861 (2012), 査読有
DOI: 10.1021/ac202712g
- ③ S. Nagatoishi, N. Isono, K. Tsumoto, N. Sugimoto, Hydration is required in DNA G-quadruplex-protein binding, *ChemBioChem*, **12**, 1822-1826 (2011), 査読有
DOI: 10.1002/cbic.201100264
- ④ 杉本直己、ポストゲノム時代の生命化学と次世代スパコン、*化学*, **4**, 31-33 (2011)、査読無
- ⑤ S. Nagatoishi, N. Isono, K. Tsumoto, and N. Sugimoto, Loop residues of thrombin-binding DNA aptamer impact G-quadruplex stability and thrombin binding, *Biochimie*, **93**, 1231-1238 (2011), 査読有
DOI: 10.1016/j.biochi.2011.03.013
- ⑥ 杉本直己、遠藤玉樹、タンパク質の合成を制御する環境 - 分子クラウディングによる時間概念 -、*現代化学*, **472**, 26-31 (2010)、査読無
- [学会発表] (計 52 件)
- ① 川崎悠・遠藤玉樹・杉本直己、天然mRNAの翻訳領域におけるRNA四重鎖の形成、日本化学会第91春季年会、2012年3月26-29日、神奈川
- ② 遠藤玉樹・川崎悠・杉本直己、天然mRNAの翻訳領域中に形成されるRNA四重鎖構造を介した翻訳伸長反応の抑制、日本化学会第91春季年会、2012年3月26-29日、神奈川
- ③ 杉本直己、標的核酸や核酸医薬の構造と機能に及ぼす分子環境の影響、第9回分子複合核酸研究会、2012年3月7日、大阪
- ④ 川崎悠・遠藤玉樹・杉本直己、天然mRNAのグアニンリッチ配列によるRNA四重鎖構造を介した翻訳伸長反応の抑制、第6回無細胞生命科学研究会、2011年11月16-17日、兵庫
- ⑤ S. Nagatoishi, N. Isono and N. Sugimoto, Role of hydration effect in interaction between DNA G-quadruplex and thrombin, The 38th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2011, 2011年11月9-11日、Hokkaido
- ⑥ 小野領也・長門石暁・杉本直己、RNAのhairpin構造形成による転写活性変化、第5回バイオ関連化学シンポジウム、2011年9月12-14日、茨城
- ⑦ 川崎悠・遠藤玉樹・杉本直己、Synchronized translationによるmRNA構造と翻訳反応の相関評価、第5回バイオ関連化学シンポジウム、2011年9月12-14日、茨城
- ⑧ S. Nagatoishi, N. Isono, and N. Sugimoto, Effect of Loop residues of thrombin-binding DNA aptamer on its G-quadruplex stability and thrombin binding, 4th European Conference on Chemistry for Life Sciences, 2011年8月31日-9月3日、Hungary
- ⑨ N. Sugimoto, Interaction of DNA G-quadruplex with Water, Cations, and its Binding Protein, The 3rd International Meeting on G-Quadruplex and G-assembly (招待講演)、2011年6月28日-7月1日、Italy
- ⑩ 長門石暁・磯野伸・津本浩平・杉本直己、Thrombin結合によるDNA四重鎖構造の安定化メカニズムの解明、日本化学会第91春季年会、2011年3月26-29日、横浜
- ⑪ 川崎悠・遠藤玉樹・杉本直己、mRNAの高次構造が影響する翻訳伸長反応の解析手法の構築、日本化学会第91春季年会、2011年3月26-29日、横浜
- ⑫ S. Nagatoishi, N. Isono, K. Tsumoto, and N. Sugimoto, DNA G-quadruplex

formation with its binding protein in crowded environment、The 37th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2010、2010年11月10-12日、Yokohama

- ⑬ 長門石 暁・磯野 伸・津本 浩平・杉本 直己、タンパク質と四重鎖DNAの相互作用における分子クラウディング効果、第4回バイオ関連化学シンポジウム、2010年9月24-26日、大阪
- ⑭ 川崎悠・村上健太郎・遠藤玉樹・杉本直己、mRNAの熱安定性が及ぼす翻訳反応への影響、第4回バイオ関連化学シンポジウム、2010年9月24-26日、大阪
- ⑮ S. Nagatoishi, N. Isono, and N. Sugimoto、G-quadruplex stability in the presence of its binding protein under a molecular crowding condition、IRT 2010 - XIX International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids Lyon、2010年8月29日-9月3日、France
- ⑯ 長門石暁・杉本直己、RNAサイレンシング関連蛋白質の核酸結合における溶媒効果、第10回日本蛋白質科学会年会、2010年6月16-18日、札幌

[図書] (計2件)

- ① 杉本直己、化学同人(日本化学会編)、核酸化学の定量的基礎と仮説: 核酸化学のニュートレンド(CSJカレントビュー)、2011年、10-17頁

[その他]

ホームページ等

<http://www.konan-fiber.jp/activities/search.php>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉本 直己 (SUGIMOTO NAOKI)

甲南大学・フロンティアサイエンス学部・教授

研究者番号: 60206430

(2) 研究分担者

遠藤 玉樹 (ENDO TAMAKI)

甲南大学・先端生命工学研究所・講師

研究者番号: 90550236

長門石 暁 (NAGATOISHI SATORU)

甲南大学・先端生命工学研究所・助教

研究者番号: 30550248