

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：34506

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24750156

研究課題名(和文) 翻訳反応中に起こる異常終結の検出とその解消機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the aberrant translational stall and its release during translation reaction.

研究代表者

高橋 俊太郎 (Takahashi, Shuntaro)

甲南大学・先端生命工学研究所・講師

研究者番号：40456257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：DNAの遺伝情報はmRNAに転写された後、タンパク質へと翻訳される。翻訳過程では様々な要因でタンパク質の合成速度が変化し、翻訳反応が途中で異常に止まったり、また再開していると考えられている。本研究では翻訳の異常な終結と再開を観察する手法を水晶発振子マイクロバランスを利用することで実現した。その結果、遺伝子によっては翻訳の異常終結の起きやすさが異なることが分かった。さらに人為的に異常終結させた翻訳反応の再開実験から、翻訳の異常終結と再開のメカニズムを提唱した。

研究成果の概要(英文)：Genetic information on DNA is transcribed into mRNA and then translated into protein. During translation process, the rate of synthesis of protein was varied by various factors. Thus, it has been supposed that the translation reaction possibly stalls aberrantly and restarts from stalling. In this study, we established the methodology by using quartz-crystal microbalance to monitor the aberrant translational stall and its release. As a result, we found that the frequency of translational stall depends on each sequence of genes. Moreover, we proposed a novel mechanism of translational stall and restart from the experimental results of translational restart from the artificially translational stall.

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：翻訳 翻訳終結 遺伝子 リボソーム 水晶発振子 リアルタイム測定

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は mRNA からリボソームによって翻訳されることで合成される。生体内では、翻訳異常終結と呼ばれる、コード領域の途中でリボソームがストールしてしまう現象とその解消機構が存在し、近年疾病との関連性も指摘され、非常に注目されている。これは、翻訳速度が極端に低下したとき、新生ポリペプチド鎖がリボソームと強く相互作用することが理由の一つとして考えられている。よってメカニズムの理解には種々の遺伝子をリアルタイムかつ系統的に解析し、ストールする配列の規則性を調査する必要がある。しかし翻訳の実時間観察、任意のタンパク質の翻訳過程を観察する方法論が無いのが現状であった。

そのため、申請者はタンパク質合成の解析にナノグラムレベルの微量天秤である水晶発振子マイクロバランス法 (QCM) の利用を考案した。最近、RI 等のラベルを使うことなくリアルタイムに大腸菌の無細胞タンパク質合成を観察できる手法を初めて開発した。“質量変化”というユニバーサルな単位で測定するため、本法を応用すれば、いかなるタンパク質でも一連の合成反応を追跡可能になる。そこで、翻訳反応を観察する過程で異常に終結したリボソームを定量化できれば、新生ポリペプチド配列依存的な翻訳異常終結の検出ができ、さらに引き続き異常終結産物の解消機構も連続的に調べることができると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、水晶発振子を利用して、一遺伝子の翻訳中に異常に終結したリボソームを検出し、新生ポリペプチド配列依存性を調査し、その解消機構の観察に応用していくことを目的とした。再構成型の無細胞系では予め終結因子 (RF1、RF2) を系内から除く事が可能であるので、終止コドンまで進んだりリボソームを一時的安定に維持できる。そこに RF を添加することで翻訳が完全に進んだりリボソームは RF により新生ペプチドが切り離され、結果として基板から解離する。一方、異常に終結したものは RF で反応せず基板に残るため、その重さから一遺伝子発現当たりの異常終結産物を定量化する。そこで様々な大腸菌由来のタンパク質を無作為に選択し、翻訳成功率を網羅的に算出する。合成途中のポリペプチド鎖とリボソームの相互作用に着目し、合成されたポリペプチド鎖の二次構造や親疎水性といったパラメータと解析した翻訳成功率と相関付け、翻訳異常終結に陥りやすい傾向を調査する。

3. 研究の方法

(1) 一連の翻訳反応のリアルタイム測定と翻訳異常終結の検出

一連の翻訳反応を評価するために、N 末端に Streptavidin binding peptide (SBP) 終

止コドン UAG を融合した様々な目的遺伝子を作製した (図 1)。この反応を RF1 を除いた無細胞系で満たした Streptavidin 固定化 QCM セル内で行うことで、リボソーム複合体が生成し、基板上に結合させた。その後正常な翻訳終結を起こす RF1、異常終結産物を解消する Puromycin を添加することで翻訳異常終結率を算出した。

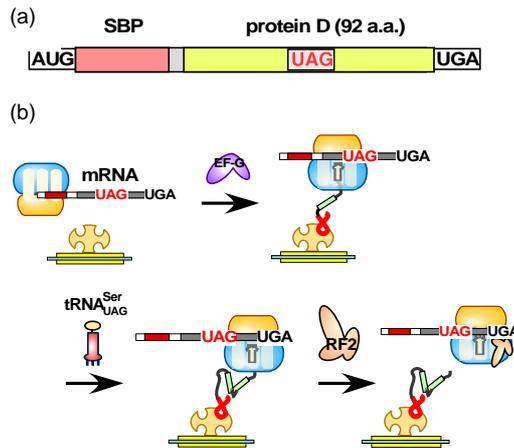


図 1 本研究で構築した翻訳異常終結のセンシングシステム (a)翻訳産物を proteinD とした際の mRNA の配列 (b) QCM 基板上でのリボソームのストールとサブレッサー tRNA 添加による翻訳再開及び終結過程の概略図。

(2) 翻訳調節の人為的制御による異常終結に関わるメカニズムの解明

mRNA の任意の部位に UAG コドンを導入し、アンバーサブレッサー tRNA 非存在下において翻訳反応を行った。翻訳反応を進行させてからアンバーサブレッサー tRNA を添加させることで翻訳反応を再開させ、その再開効率を (1) で確立した RF1 と Puromycin を添加した際の振動数変化から求めた (図 2)。

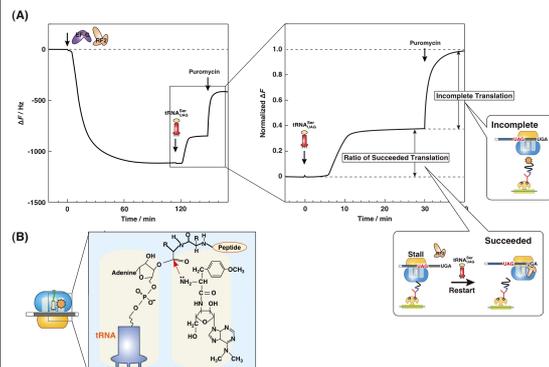


図 2 (A) サブレッサー tRNA を添加してから増加した振動数と、サブレッサー tRNA を添加した時点の振動数と Puromycin 添加後の振動数の差の割合を翻訳成功率とした。(B) Puromycin が反応する様子の模式図。

4. 研究成果

まず、一連の翻訳反応のリアルタイム測定と翻訳終結過程の観察法を確立した。用いた

遺伝子として N 末端側に Streptavidin binding peptide(SBP)、ラムダファージ由来の ProteinD、および終止コドン UAG を連結したものを作製した。この反応を終結因子 RF1 を除いた無細胞系で満たした Streptavidin 固定化 QCM セル内で行ったところ、リボソーム複合体が生成し、基板上に結合するため振動数減少が観察された(質量 増加)。その後翻訳反応が終了し、振動数が一定になったところで RF1 を添加すると、tRNA から切り離されたポリペプチド鎖が基板上に残り、巨大なリボソームが解離したことによる振動数増加(質量減少)が観察された(図 3)。続いて、ProteinD の代わりにいくつかの天然、非天然の遺伝子を連結し同様の実験を行ったところ、RF1 添加による振動数増加量が翻訳された遺伝子によって異なることが見出された。すなわち翻訳の途中で反応が異常に終結したことを意味する、翻訳成功率が遺伝子によって異なることが明らかになった。評価した結果を比較すると、翻訳成功率は翻訳される遺伝子長に応じて減少すること、連続したレアコドンによって減少することが明らかになった。一方で、それだけでは説明がつかない結果も得られており、遺伝子配列依存的な翻訳異常終結への影響も示唆された。

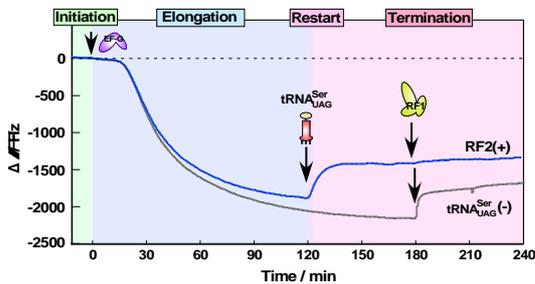


図 3 サプレッサー tRNA 添加による翻訳再開に伴うリボソームの基板からの解離を観察した QCM チャート。

続いて、mRNA 上のレアコドンによって翻訳速度が低下することが知られている CATIII 遺伝子をターゲットとして翻訳の異常終結反応を評価した。具体的に、N 末端に T7 タグが融合した CATIII 配列内に、ストール部位としてストップコドン(UAG)を導入した mRNA を設計した。作成した mRNA を用いて、T7-tag 抗体を固定した QCM セル内で無細胞翻訳を行うことで、T7-tag 融合 CATIII を提示したリボソームを基板に結合させた。その後、UAG ストップコドンを認識するサプレッサー tRNA(tRNA Ser) を添加し、翻訳反応の再開を観察、評価した。その結果、mRNA 末端の UGA ストップコドンを認識する RF2 を予め添加しておくことで、tRNA Ser 添加からしばらくして振動数が増加した。これはストール部位で一時的に停止していたリボソームが翻訳反応を再開し、基板から解離したためである。CATIII の様々な位置にストール部位を導入し、翻訳の一時停止と再開を観察すると、

CATIII 配列内のレアコドンクラスターの終盤のコドンにおいて顕著に翻訳再開速度が増加した(図 4)。つまり、レアコドンクラスター領域通過により一度低下したリボソームの翻訳速度を、その領域の最後で回復させる効果があることを意味した。このような反応性の違いは、系統的な変位導入解析により、翻訳されたタンパク質とリボソームの直接的な相互作用が深く関わっていることが示唆された(図 5)。以上の結果より、mRNA 上の配列は翻訳速度を低下させる他にも、一度停滞して異常終結しそうなりボソームを活性化するような情報も含まれていることが示唆された。

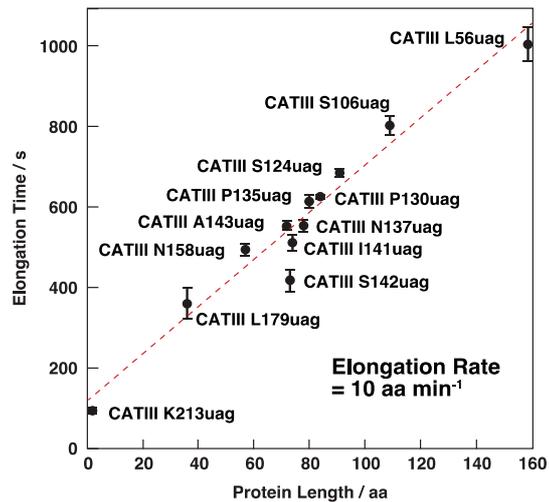


図 4 様々な位置にストール部位を導入した CATIII 遺伝子の翻訳伸長時間とストール部位から終始コドンまでのアミノ酸数の関係(点線は近似直線)

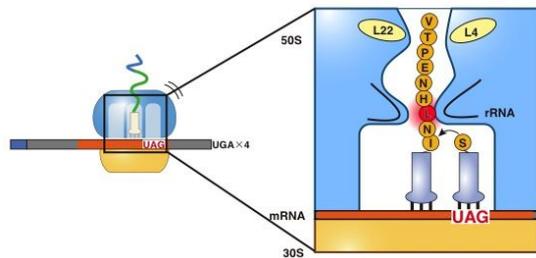


図 5 CATIII 遺伝子における L139 がリボソームと相互作用し、翻訳再開反応が起こりやすくなっている様子の模式図。

レアコドン以外にも mRNA の二次構造によって翻訳反応が影響されることが考えられる。核酸構造は物理的および化学的な環境変化によってその構造安定性が変化する。そこで、環境変化の一例として圧力変化による核酸構造安定性の変化が引き起こす翻訳反応への影響についても検討を行った。DNA を用いた予備的な研究結果から、標準的な DNA 二重鎖構造は圧力に対してほとんど影響を受けなかったのに対し、四重鎖構造などの非標準構造は圧力によって大きくその安定性が変化した(図 6)。今後、高圧力下での翻訳

反応に及ぼす影響を検討していく予定である。

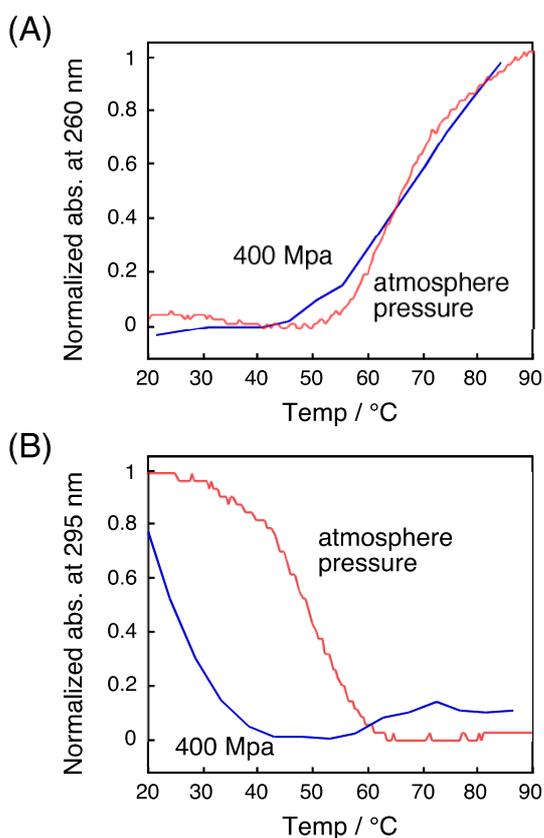


図6 高圧力下での(A)二重鎖DNAおよび(B)グアニン四重鎖DNAのUVメルティング測定

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 4件)

- 1) M. Yamada, S. Takahashi, Y. Okahata, Y. Doi, and K. Numata
Monitoring and kinetic analysis of the molecular interactions by which a repressor protein, PhaR, binds to target DNAs and poly[(R)-3-hydroxybutyrate]
AMB Express, **3**, 6 (2013), doi: 10.1186/2191-0855-3-6, 査読有
- 2) S. Takahashi, H. Isobe, T. Ueda, and Y. Okahata
Direct monitoring of initiation factor dynamics through formation of 30S and 70S translation-initiation complexes on a quartz crystal microbalance
Chem. Eur. J., **19**, 6807-6816 (2013), 査読有
- 3) S. Takahashi, H. Furusawa, T. Ueda, and Y. Okahata
Translation enhancer improves the

ribosome liberation from translation initiation

J. Am. Chem. Soc., **135**, 13096-13106 (2013), 査読有

- 4) S. Takahashi, K. Tsuji, T. Ueda, and Y. Okahata
Traveling time of a translating ribosome along mRNA monitored directly on a quartz crystal microbalance
J. Am. Chem. Soc., **134**, 6793-6800 (2012), 査読有

[学会発表](計 6件)

- 1) 高橋 俊太郎、杉本 直己、生命分子の挙動に及ぼす分子環境の効果(47) 圧力変化による i-motif DNA の構造安定性制御、日本化学会第 94 春季年会(2014)、2014 年 3 月 27 日~2014 年 3 月 30 日、名古屋大学
- 2) 高橋 俊太郎、杉本 直己、擬似細胞環境下での DNA 四重鎖構造の熱安定性に対する圧力効果、第 54 回高圧討論会、2013 年 11 月 14 日~2013 年 11 月 16 日、朱鷺メッセ
- 3) 高橋 俊太郎、廣瀬 敦、岡畑 恵雄、翻訳終結因子が関与する遺伝子発現制御の解析、日本化学会第 93 春季年会(2013)、2013 年 3 月 22 日~2013 年 3 月 25 日、立命館大学
- 4) Shuntaro Takahashi, Naoki Sugimoto, Yoshio Okahata, The regulation mechanism of gene expression in translation termination, The First International Symposium on Biofunctional Chemistry (ISBC2012), 2012 年 11 月 28 日~2012 年 11 月 30 日、東京工業大学
- 5) 高橋 俊太郎、杉本 直己、岡畑 恵雄、合成途中のタンパク質が及ぼす翻訳終結速度への影響、第 6 回バイオ関連シンポジウム、2012 年 9 月 6 日~2012 年 9 月 8 日、北海道大学
- 6) 高橋 俊太郎、上田 卓也、岡畑 恵雄、mRNA 配列に制御された翻訳終結反応の解析、第 14 回 RNA ミーティング、2012 年 7 月 18 日~2012 年 7 月 20 日、東北大学

[図書](計 2件)

- 1) 岡畑 恵雄、森 俊明、古澤 宏幸、高橋 俊太郎、講談社サイエンティフィック、バイオセンシングのための水晶共振子マイクロバランス法—原理から応用例まで、

250-267、(2013)

- 2) 岡畑 恵雄、高橋 俊太郎(日本化学会編)、
化学同人、CSJ カレントレビュー10 ここ
まで進んだバイオセンシング・イメージ
ング 1 分子から細胞、脳まで、55-61、
(2012)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

甲南大学先端生命工学研究所・講師
高橋 俊太郎 (Shuntaro Takahashi)
研究者番号：40456257

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：