

論文の内容の要旨

論文題目 1 分子力学測定による SecM 翻訳アレスト解除機構の解析

氏 名 楊 倬皓

【序論】

近年、翻訳途上のポリペプチド鎖がリボソームトンネルと相互作用し、翻訳を停止させ（翻訳アレスト）、遺伝子発現の制御を行う例が複数報告されている。その代表例が、大腸菌の分泌タンパク質 SecM である。SecM は C 末端付近に、アレスト配列と呼ばれる翻訳アレストを誘起する配列を持つ。アレスト配列が翻訳され、リボソームトンネルと相互作用することで、リボソームの P サイトのペプチジル-tRNA から A サイトのプロリン-tRNA へのペプチジル転移反応が阻害され、翻訳が停止する（図 1 A）。その結果、mRNA の構造変化が誘起され、同一オペロンの下流遺伝子 *secA* の発現が誘導される（図 1 B）。SecM の翻訳アレスト

は、翻訳途上の SecM の N 末端側が Sec 膜透過装置により物理的に引っ張られることで解除されると考えられている。この翻訳アレストが解除されるまでの時間が下流遺伝子の発現量を決める鍵である。しかし、SecM の翻訳アレストがどの程度安定で、どれくらいの負荷で解除されるかについては、まだ分かっていない。そのため本研究では、翻訳アレストの安定性を定量的に評価し、光ピンセットおよび磁気ピンセットを用いて人工的に翻訳アレスト解除を試みることで、その力学的機構を 1 分子レベルで明らかにすることを目的とした。

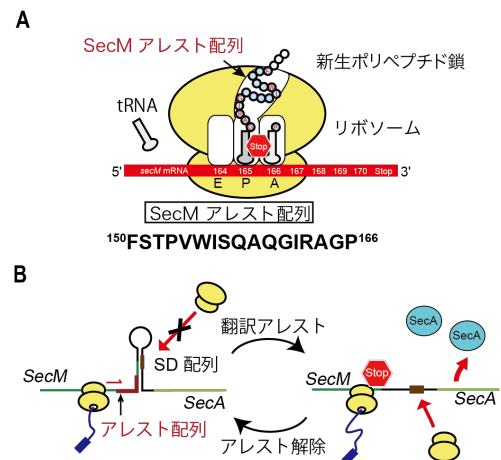


図 1 SecM 翻訳アレスト

(A) SecM 翻訳アレスト配列および翻訳アレスト機構

(B) 翻訳アレストによる下流遺伝子の発現制御機構

【本論】

1. 翻訳アレストの安定性はリボソーム外領域の新生ポリペプチド鎖に依存する

SecM 翻訳アレストの安定性を評価するために、翻訳アレストが自発的に解除されるまでの時間(アレスト寿命)を測定した。HaloTag タンパク質の下流にリンカーを介して SecM の C 末端領域(133-170 番目のアミノ酸配列; SecM₁₃₃₋₁₇₀)が連結された各種コンストラクト(図 2 A)を *in vitro* で翻訳し、翻訳アレスト複合体を調製した。中性条件下で SDS-PAGE を行い、HaloTag に結合した蛍光リガンドを検出することで、新生ポリペプチド鎖の検出・定量を行った。中性条件下ではペプチジル-tRNA が保持されるため、翻訳アレスト複合体由来の新生ポリペプチド鎖は、tRNA (15 kDa 程度)が付加されて検出される。反応溶液中に Puromycin を添加することで、翻訳アレストの解除に伴って新生ポリペプチド鎖がリボソームから速やかに放出される。そのため、ポリペプチジル-tRNA のバンドを定量し、その残存率の時間変化を調べることで、アレスト寿命を算出することができる(図 2 B)。

各種コンストラクトについて測定を行った結果、翻訳アレスト時のリボソーム外領域がアレスト寿命を大きく変えることが見出された。HaloTag と SecM₁₃₃₋₁₇₀ の間に長さの異なる GS リンカー(8 aa, 17 aa, 26 aa)を入れたところ、8 aa のリンカーではほとんど翻訳アレストが検出できず、リンカーが長くなるにつれてアレスト寿命が 5.7 min, 11 min と伸びていった。また、GS リンカーより長い、硬い構造をとる Protein D (90 aa)を入れたとき、寿命は 9.4 min だった。一方、全長の SecM を用いた場合は、アレスト寿命が 51 min となり、最も安定だった(図 2 B, C)。以上の結果から、リボソーム表面の新生ポリペプチド鎖のフォールディングや熱ゆらぎによる力が翻訳アレストを解除しうることを、全長の SecM は、そのリボソーム外領域が翻訳アレストの安定化に寄与していることが示された。

これまでの、SecM のアレスト配列のみで翻訳が安定に止まると考えられてきたが、本研究により、翻訳アレストの安定性は新生ポリペプチド鎖のリボソーム外領域に依存していることが分かった。

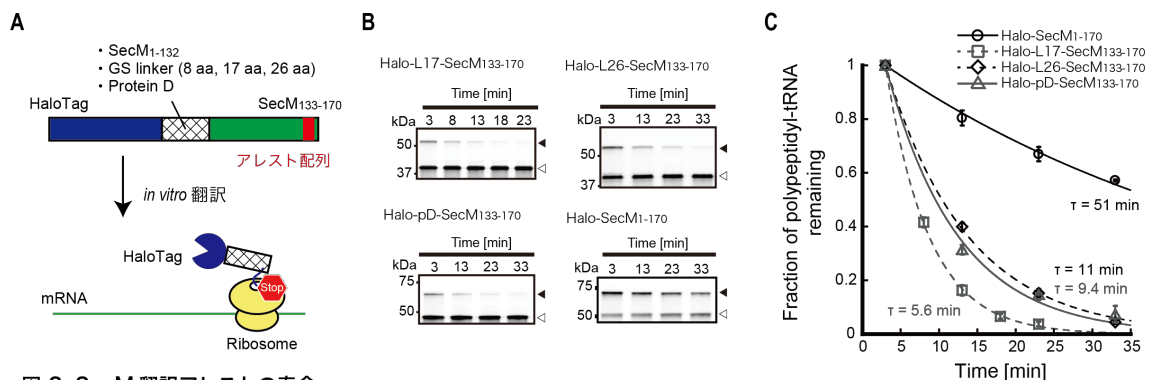


図 2 SecM 翻訳アレストの寿命

(A) 実験に用いたコンストラクト (B) 中性 SDS-PAGE による一定時間おきのタンパク質-tRNA (黒三角で示す) の検出

(C) 翻訳アレスト複合体の残存率の時間変化および 1 次の指数関数によるフィッティング

2. 新生鎖を引っ張りながらリボソームの翻訳を1分子で観察する

次に、物理的な負荷による SecM 翻訳アレストの解除機構を調べるために、新生ポリペプチド鎖を引っ張りながら、リボソームの翻訳を可視化できる1分子測定系の構築を行った。まず、光ピンセットを用いて、翻訳アレスト複合体の新生ポリペプチド鎖と mRNA をそれぞれ逆向きに引っ張りながら、リボソームの動きを検出できることを確かめた。

HaloTag の下流に SecM の C 末端領域および LacZ を連結したコンストラクトを用いて、*in vitro* 転写により mRNA を合成した。5'末端を Digoxigenin 標識した DNA ハンドルを mRNA のアレスト配列の下流とハイブリダイゼーションさせ、Anti-digoxigenin ビーズに固定した。無細胞タンパク質合成系を用いて、ビーズ表面に固定された mRNA を翻訳させ、HaloTag-リボソーム-mRNA の翻訳アレスト複合体をビーズ上に提示した。HaloTag に Biotin リガンドを結合させ、Streptavidin ビーズに連結した。光ピンセットを用いて、2つのビーズを逆向きに引っ張ることで、ビーズ間に連結された翻訳アレスト複合体の新生ポリペプチド鎖に負荷を加えた（図3A）。2つのビーズ間距離の時間変化をモニターすることで、リボソームの翻訳を可視化できる。

一定時間経過後にリボソームが翻訳を再開し、SecM の下流に導入した LacZ を翻訳する様子が観察できた（図3B）。3 pN 程度の負荷を加えても、リボソームは mRNA を翻訳することが可能であった。この結果から、本研究で構築した1分子測定系を用いて、新生ポリペプチド鎖を引っ張りながら、リボソームの翻訳を1分子レベルで可視化できることが確かめられた。

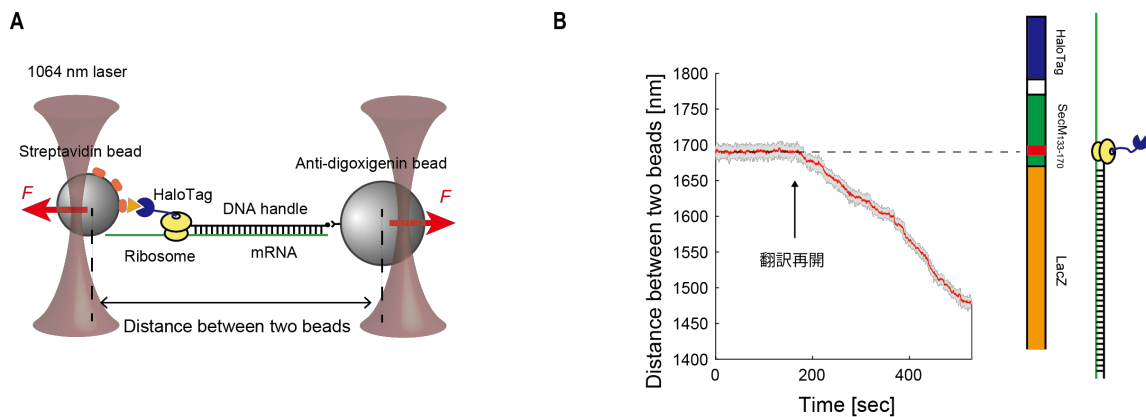


図3 光ピンセットによるリボソームの翻訳の可視化

(A) 光ピンセットを用いた1分子力学測定系 (B) 負荷による SecM 翻訳アレストの解除および LacZ の翻訳の観察

1. 人工的な負荷によって SecM 翻訳アレストを解除する

SecM の翻訳アレスト解除の負荷依存性について調べるために、多数の翻訳アレスト複合体に同時に負荷を印加し、翻訳を検出できる1分子測定系を、磁気ピンセットを用いて構築した。アレスト複合体の HaloTag を Streptavidin を介してガラス基板上に固定し、mRNA は DNA ハンドルを介して磁気ビーズに結合させた。磁石を用いて測定範囲内の全てのビーズに一斉に負荷を印加し（図4A）、磁気ビーズの回折パターンから z 軸方向の

位置を測定することで (図 4 B), リボソームの翻訳を可視化した。自発的な翻訳アレスト解除が起こりにくい SecM 全長配列の翻訳アレスト複合体に数 pN の負荷を印加すると、数分で翻訳アレストが解除され、ビーズが基板に近づくように動く様子が観察できた (図 4 C)。これは、SecM の全長配列による翻訳アレストが負荷で解除され、下流遺伝子 LacZ が翻訳されたことを表している。アレスト配列の下流遺伝子を変えても、同様に翻訳アレストが解除され、翻訳を観察することができた。また、翻訳の終結反応や抗生物質の反応、配列特異的な翻訳停止の観察にも成功した。動きが観察されたビーズについて、翻訳アレストが解除されるまでの時間を求め、ヒストグラムを作成して 1 次の指数関数でフィッティングすることにより、アレスト寿命を求めた。負荷を加えるとアレスト寿命は数 min になり、無負荷時に比べて大幅に短縮されることが分かった。また、負荷が大きくなるに従って、アレスト寿命は少しずつ減少した。この結果から、SecM 全長配列の翻訳アレストは、数 pN 程度の比較的弱い負荷によって効率よく解除されることが示された。

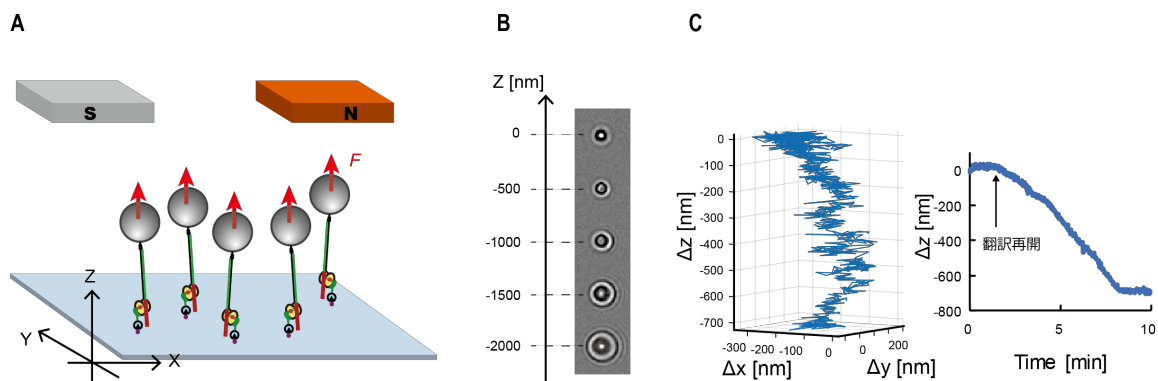


図 4 磁気ピンセットによる SecM 翻訳アレストの解除

(A) 磁気ピンセットを用いた翻訳アレスト解除の測定系 (B) 磁気ビーズの回折パターンによる z 軸方向の変位の検出

(C) 磁気ピンセットで測定されたビーズの 3 次元の動きおよび Z 方向の動きの時間変化

【総括および展望】

本研究では、様々なコンストラクトを作製して、SecM の翻訳アレスト寿命を測定することで、リボソーム外領域の新生ポリペプチド鎖が翻訳アレストの安定性を変えることを見出した。また、天然の SecM のリボソーム外領域が翻訳アレストの安定化に寄与していることを明らかにした。本研究の結果から、SecM の安定な翻訳アレストは、アレスト配列とリボソーム外領域との協調によって成り立っていることが示された。

次に、SecM の翻訳アレストが物理的な負荷によって解除されるかどうかについて調べた。光ピンセットおよび磁気ピンセットを用いた 1 分子力学測定系を構築し、新生ポリペプチド鎖を引っ張ることで翻訳アレストを解除し、下流遺伝子の翻訳を観察することに成功した。SecM 全長配列の翻訳アレストは、数 pN の負荷によって効率よく解除されることが確かめられた。

本研究の手法により、SecM を用いて翻訳の安定な停止と迅速な再開が可能となった。今後、SecM を利用した翻訳の研究へと応用されていくことが期待できる。