

モデルフィッティングによる真核生物における 新生ペプチド依存的な翻訳アレストの解析

○今道 朋哉 (Tomoya IMAMICHI)¹, 高松 世大 (Seidai TAKAMATSU)¹, 尾之内 均 (Hitoshi ONOUCHI)^{2,3,4}, 山下 由衣 (Yui YAMASHITA)^{2,3,4}, 内藤 哲 (Satoshi NAITO)^{1,3,4}

¹北海道大学 大学院生命科学院 生命科学専攻,²北海道大学 大学院農学院 生命フロンティアコース,

³北海道大学 農学部 応用生命科学科,⁴北海道大学 大学院農学研究院 応用生命科学分野

1. 序論

生物の生命活動は遺伝子発現によって成し遂げられている。一般的に、遺伝子発現とは、遺伝子の本体である DNA を鋳型にして RNA が合成され (転写), RNA のうち、特にメッセンジャーRNA (mRNA) の情報を基にタンパク質が合成される (翻訳) ことである。合成されたタンパク質は特定の機能を持ち、生命現象の担い手として働く。これまで遺伝子発現制御については主に転写段階での制御に焦点が置かれ、様々な研究が行われてきた。しかし、近年では翻訳段階での制御にも注目が集まっている。翻訳装置であるリボソームは mRNA の 3 塩基の組み合わせを一単位として読み取って塩基の組み合わせに応じたアミノ酸を繋げていく。こうしてタンパク質が合成される過程が翻訳であるが、いくつかの遺伝子ではリボソームが mRNA を翻訳している途上で一時停滞 (アレスト) してしまうことが報告されている¹⁻⁹ (図 1)。この翻訳途上でのリボソーム停滞は翻訳アレストと呼ばれ、様々な生化学的・構造学的解析により、翻訳アレストの原因の一つはリボソームで合成されたアミノ酸が繋がった鎖 (新生ペプチド) とリボソーム内にある新生ペプチドの通り道である出口トンネルとの相互作用であることが見出されている¹⁰⁻¹³ (図 2)。しかしながら、既存の定性的な解析は翻訳アレストが起こっているまさにその瞬間を観測したものがほとんどであり、そのような解析から得られる知見には限界がある。また、翻訳アレストを引き起こす新生ペプチド (アレストペプチド) は別々の研究グループが独立に解析してきたものであり、その解析方法も異なることから、それぞれのアレストペプチドを単純に比較することは難しい⁷。そこで、本研究では、特定の実験条件に基づいた数理モデルを構築することにより、これらのアレストペプチドの定量的解析法の確立とアレストペプチドの生化学的性質の比較を目的とした。

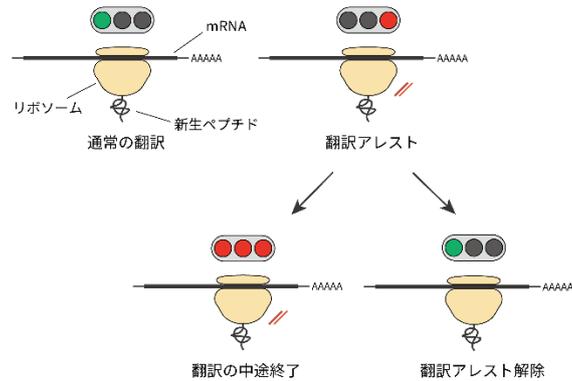


図 1. 翻訳アレストとその後の経路

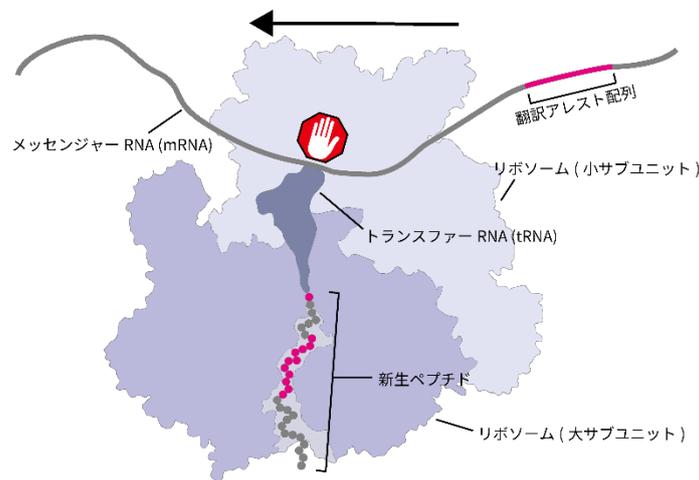


図 2. 新生ペプチドによる翻訳アレスト

2. 方法

2-1. タイムコース実験

実測値を得るための実験手法について述べる。一般に、翻訳アレストの解析は細胞抽出液や試験管内再構成系といった無細胞翻訳系、あるいは培養細胞のような一過的発現系を用いて行われる。本研究でもコムギの細胞抽出液であるコムギ胚芽抽出液を用いた。コムギ胚芽抽出液には翻訳装置であるリボソームやその他の翻訳に必要な因子が含まれている。そこに、解析したいアレスト配列を含んだ mRNA を混ぜると翻訳反応が始まり、時間経過に伴って翻訳産物が蓄積していく (図 3)。翻訳アレストが起こった場合、翻訳反応液を電気泳動して反応液中のタンパク質を分離し、抗体を用いて目的のタンパク質だけを検出するウエスタン解析という手法を用いると 2 本のバンドが検出される (図 3)。1 本は反応液に混ぜた mRNA を翻訳し終えるこ

とでできる完全な翻訳産物，もう 1 本は翻訳アレストが起こることによってできる翻訳の中間産物であり，新生ペプチドとトランスファーRNA (tRNA)が結合した状態のものである．翻訳反応液を経時的にサンプリングすると，ウエスタン解析で得られる画像から，翻訳の中間産物が蓄積し始め，それが減り始めるとともに完全な翻訳産物が蓄積していく様子がわかる (図 3)．このとき，インプット，つまり翻訳開始が続くとモデルが煩雑になってしまうため，翻訳反応開始から 1 分後に翻訳開始を阻害する薬剤を反応液に添加した．このときのバンドの輝度を定量することで完全な翻訳産物と翻訳の中間産物の経時変化を数値で表すことができる．

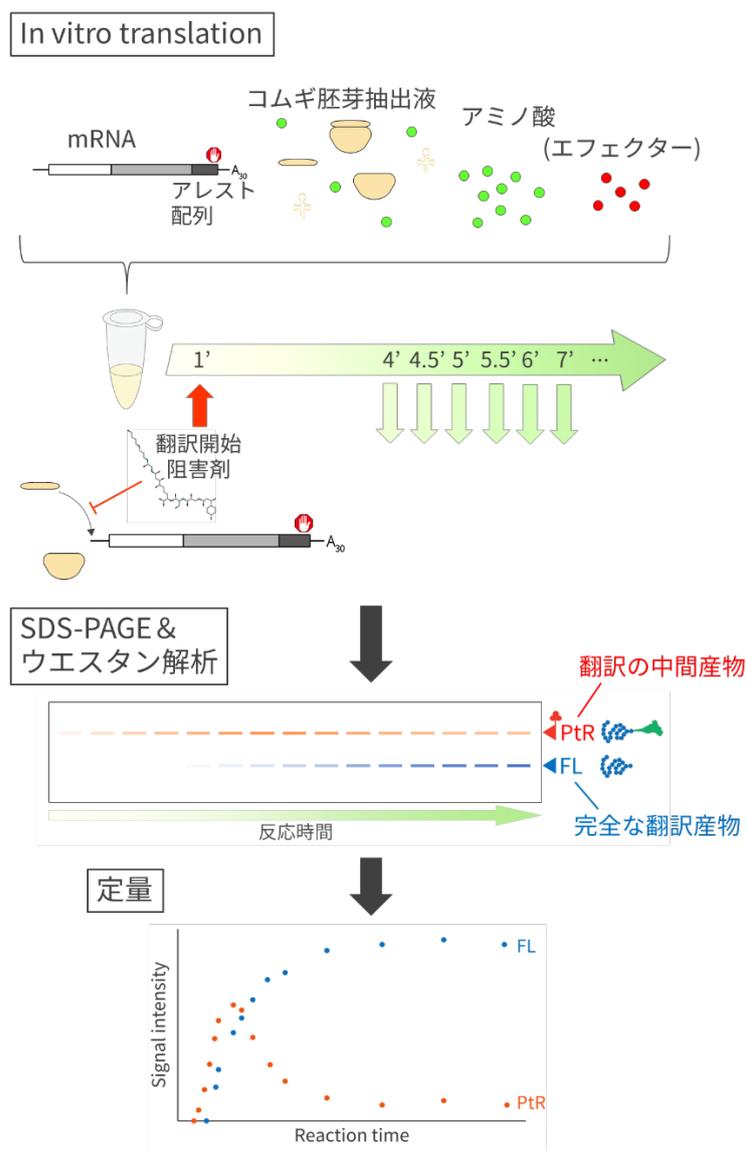


図 3. タイムコース実験

しかし，完全な翻訳産物と翻訳の中間産物の物理的・化学的性質は異なるため，ウエスタン

解析ではそれぞれの検出のされやすさに違いがあり，得られたバンドの定量値はそれらの分子数を正確には反映していない．そこで，完全な翻訳産物と翻訳の中間産物の検出効率を求めるための方法を確立した (図 4)．この方法は RNA 分解酵素 (RNase) によって翻訳の中間産物の tRNA 部分が分解され，結果的に翻訳の中間産物のバンドが完全な翻訳産物のバンド位置にシフトすることを利用している．これによって得られた検出効率を上記のウエスタン解析で得られた定量値に掛け合わせることで完全な翻訳産物と翻訳の中間産物の分子の蓄積量を求めることができる．このようにして得られた実測値をフィッティングに用いる．

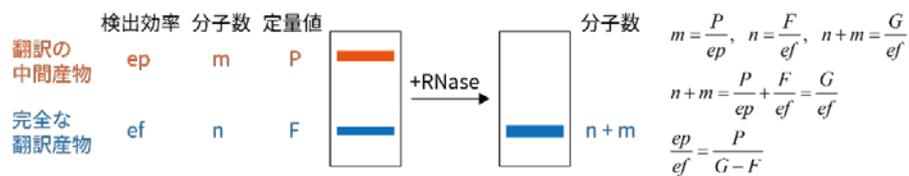


図 4. 検出効率の測定

2-2. 数理モデル

上記のタイムコース実験に沿ったモデルを構築した (図 5)． $I(t)$ という頻度で翻訳を開始したリボソームは T_1 分かけて翻訳アレスト位置: $S(t)$ まで到達し， r の確率で一時停止する．一時停止したリボソームの大多数は翻訳を再開し，完全な翻訳産物ができるまで残りの mRNA を翻訳する．だが，一部のリボソームは翻訳を再開することはなく，停止状態を維持する．一方で $S(t)$ で一時停止しないリボソームはそのまま翻訳を行い，完全な翻訳産物を産生する．なお，今回用いた翻訳アレスト配列は翻訳アレスト位置と正常に翻訳を終了する mRNA 上の位置が限りなく近いいため新生ペプチド部分は事実上同一であり，上述の検出効率を求めることができる．

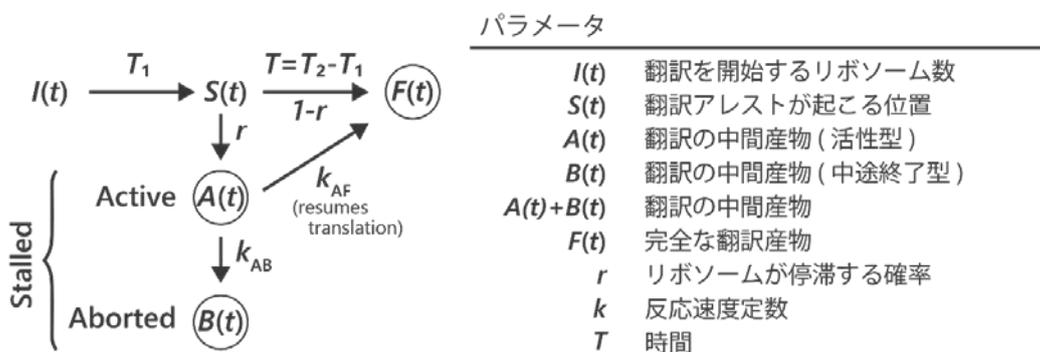


図 5. 数理モデル

翻訳の中間産物の蓄積量の変化量は

$0 \leq t < T_1$ のとき

$$\frac{d[A(t)]}{dt} = 0$$

$$\frac{d[B(t)]}{dt} = 0$$

$t \geq T_1$ のとき

$$\frac{d[A(t)]}{dt} = rI(t)|_{t=T_1} - k_{AF}[A(t)] - k_{AB}[A(t)]$$

$$\frac{d[B(t)]}{dt} = k_{AB}[A(t)]$$

となる。一方、完全な翻訳産物の蓄積量の変化量は

$0 \leq t < T_2$ のとき

$$\frac{d[F(t)]}{dt} = 0$$

$t \geq T_2$ のとき.

$$\frac{d[F(t)]}{dt} = (1-r)I(t)|_{t=T_2} + k_{AF}[A(t)]|_{t=T_2+T_1}$$

となる。

$I(t)$ は最初、一定 (I_0) である：

$t < T_d$ のとき

$$I(t) = I_0$$

翻訳開始阻害剤を翻訳開始から $t = T_d$ の時点で添加すると、 $t > T_d$ 以降に翻訳を開始するリボソーム数は減衰係数 k_E で減少していく(図6)：

$t \geq T_d$ のとき

$$I(t) = I_0 \exp\{-k_E(t - T_d)\}$$

翻訳アレストが起こらない ($r=0$)、すなわち、完全な翻訳産物のみができると仮定した場合、リボソームが mRNA を読み取って完全な翻訳産物を作るのに要する時間は T_2 である。 $t = T$ で

翻訳を開始したリボソーム由来の完全な翻訳産物は $t = T + T_2$ のときにバンドとして見えてくるため、

$t < T_0$ のとき、

$$\int I(t)dt = 0$$

$T_0 \leq t < T_0 + T_d$ のとき、

$$\int I(t)dt = I_0(t - T_2)$$

$T_0 + T_d \leq t$ のとき

$$\int I(t)dt = \frac{I_0[1 - \exp\{-k_E(t - T_2)\}]}{k_E} + I_0T_d$$

となる (図 6)。この翻訳を開始するリボソーム数は実験によって求めることができる。翻訳アレスト配列を含まない mRNA を「2.1 タイムコース実験」と同様の方法で翻訳し、完全な翻訳産物の蓄積量の変化を経時的に調べた。後述のとおり、得られた実測値と理論値とのフィッティングを行い、各パラメータを推定した。

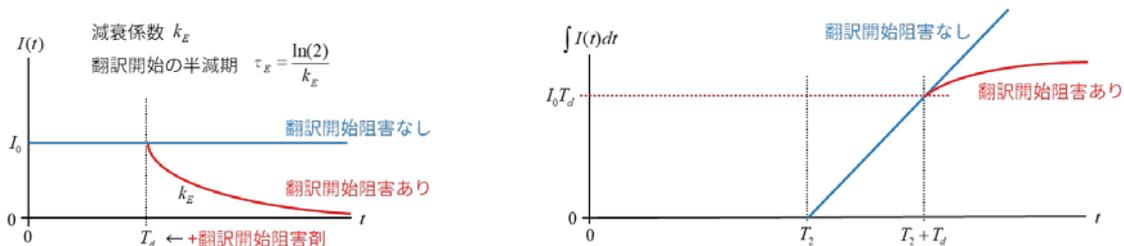


図 6. 翻訳を開始したリボソーム数の測定 (翻訳アレストが起こらない実験条件で測定)

以上を踏まえ、翻訳の中間産物の蓄積量は

$t < T_1$ のとき

$$[A(t)] = 0, [B(t)] = 0$$

$T_1 \leq t \leq T_1 + T_d$ のとき

$$[A(t) + B(t)] = \frac{rI_0}{k_{AB} + k_{AF}} \{1 - \exp(-(k_{AB} + k_{AF})(t - T_1))\} + \frac{k_{AB}}{k_{AB} + k_{AF}} rI_0(t - T_1) - \frac{k_{AB}}{(k_{AB} + k_{AF})^2} rI_0 \{1 - \exp(-(k_{AB} + k_{AF})(t - T_1))\}$$

$t \geq T_1 + T_d$ のとき

$$\begin{aligned}
[A(t) + B(t)] &= \frac{rI_0}{k_{AB} + k_{AF} - k_E} \{ \exp(-k_E(t - T_1 - T_d)) - \exp(-(k_{AB} + k_{AF})(t - T_1 - T_d)) \} \\
&+ \frac{rI_0}{k_{AB} + k_{AF}} \{ 1 - \exp(-(k_{AB} + k_{AF})T_d) \} \exp(-(k_{AB} + k_{AF})(t - T_1 - T_d)) \\
&+ \frac{k_{AB}}{k_{AB} + k_{AF}} rI_0 T_d + \frac{k_{AB}}{k_E(k_{AB} + k_{AF} - k_E)} rI_0 \{ 1 - \exp(-k_E(t - T_1 - T_d)) \} \\
&- \frac{k_{AB}}{(k_{AB} + k_{AF})(k_{AB} + k_{AF} - k_E)} rI_0 \{ 1 - \exp(-(k_{AB} + k_{AF})(t - T_1 - T_d)) \} \\
&- \frac{k_{AB}}{(k_{AB} + k_{AF})^2} rI_0 \{ 1 - \exp(-(k_{AB} + k_{AF})T_d) \} \exp(-(k_{AB} + k_{AF})(t - T_1 - T_d))
\end{aligned}$$

となり、完全な翻訳産物の蓄積量は

$t < T_2$ のとき

$$[F(t)] = 0$$

$T_2 \leq t < T_2 + T_d$ のとき

$$\begin{aligned}
[F(t)] &= (1-r)I_0(t - T_2) + \frac{k_{AF}}{k_{AB} + k_{AF}} rI_0(t - T_2) \\
&- \frac{k_{AF}}{(k_{AB} + k_{AF})^2} rI_0 \{ 1 - \exp(-(k_{AB} + k_{AF})(t - T_2)) \}
\end{aligned}$$

$t \geq T_2 + T_d$ のとき

$$\begin{aligned}
[F(t)] &= (1-r)I_0 T_d + \frac{k_{AF}}{k_{AB} + k_{AF}} rI_0 T_d + \frac{1}{k_E} (1-r)I_0 \{ 1 - \exp(-k_E(t - T_2 - T_d)) \} \\
&+ \frac{k_{AF}}{k_E(k_{AB} + k_{AF} - k_E)} rI_0 \{ 1 - \exp(-k_E(t - T_2 - T_d)) \} \\
&- \frac{k_{AF}}{(k_{AB} + k_{AF})(k_{AB} + k_{AF} - k_E)} rI_0 \{ 1 - \exp(-(k_{AB} + k_{AF})(t - T_2 - T_d)) \} \\
&- \frac{k_{AF}}{(k_{AB} + k_{AF})^2} rI_0 \{ 1 - \exp(-(k_{AB} + k_{AF})T_d) \} \exp(-(k_{AB} + k_{AF})(t - T_2 - T_d))
\end{aligned}$$

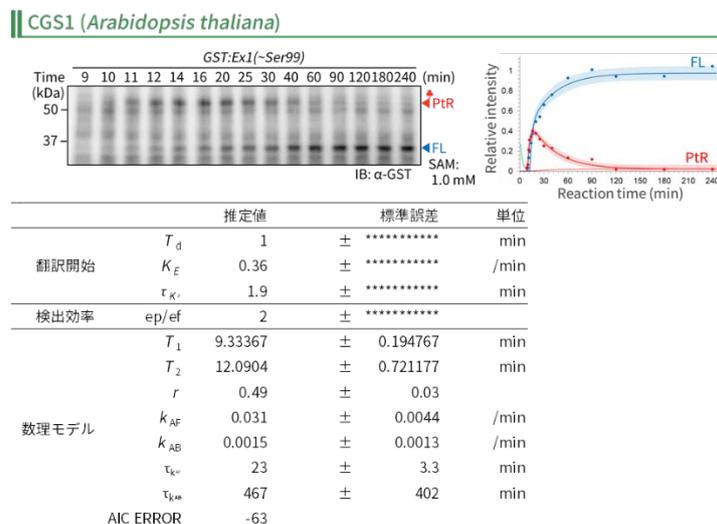
となる。

2-3. フィッティング

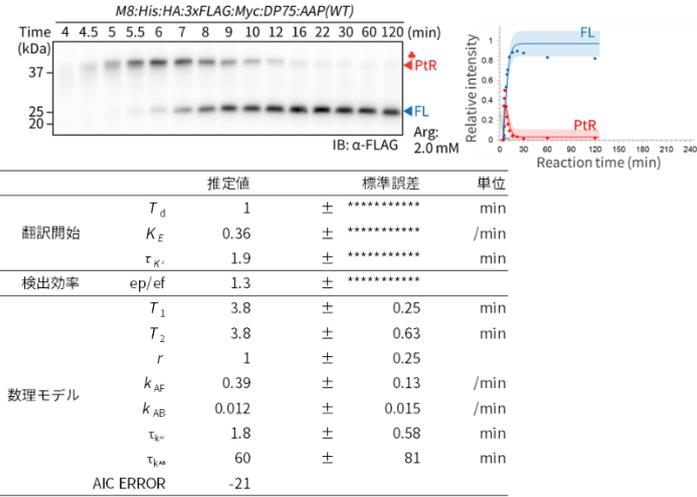
Mathematica を用いて、翻訳アレスト配列を含まない mRNA を翻訳したときに得られる完全な翻訳産物の実測値と対応する式とのフィッティングを行った。さらに、それによって得られたパラメータ値を導入して、翻訳アレスト配列を含む mRNA を翻訳したときに得られる完全な翻訳産物の実測値および翻訳の中間産物の実測値とそれぞれに対応する式とのフィッティングを行い、パラメータを推定した。

3. 結果と考察

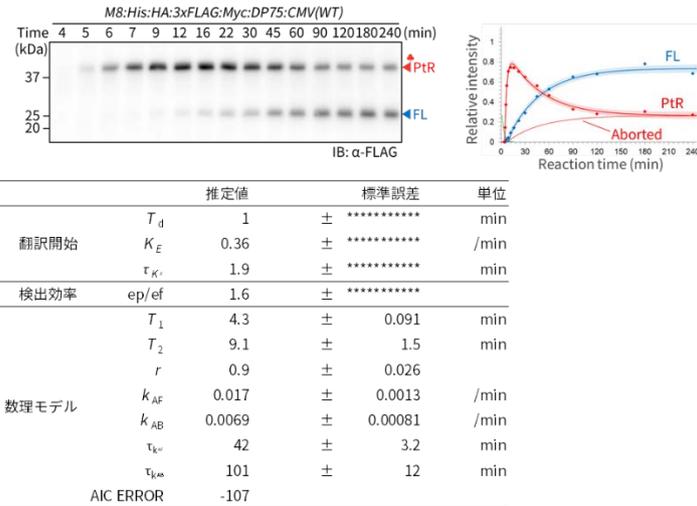
本研究では真核生物における翻訳アレストを引き起こす代表的な配列として、シロイヌナズナの CGS1, アカパンカビの AAP, ヒトサイトメガロウイルスの hCMV, 手足口病ウイルスの 2A という 4 つを解析に用いた。実測値と数理モデルとのフィッティングによってそれぞれの翻訳アレストシステムにおけるパラメータを推定したところ (図 7), アレスト配列間で一部のパラメータが大きく異なることが明らかになった。このことから、アレスト配列ごとにリボソームの挙動が異なることが示唆される。今後、この実験系を活かし、翻訳アレストについてのさらなる解明が望まれる。また、同じ翻訳アレストを引き起こすのにもかかわらず、それぞれのアレスト配列はバラバラであり、現在までに規則性は見出せていないことを考えると、本研究のような翻訳アレストに対するこのような定量的なアプローチによって得られた知見は翻訳アレスト配列の規則性を見出すための手がかりになるだろう。



AAP (*Neurospora crassa*)



hCMV (Human cytomegalovirus)



2A (Foot-and-mouth disease virus)

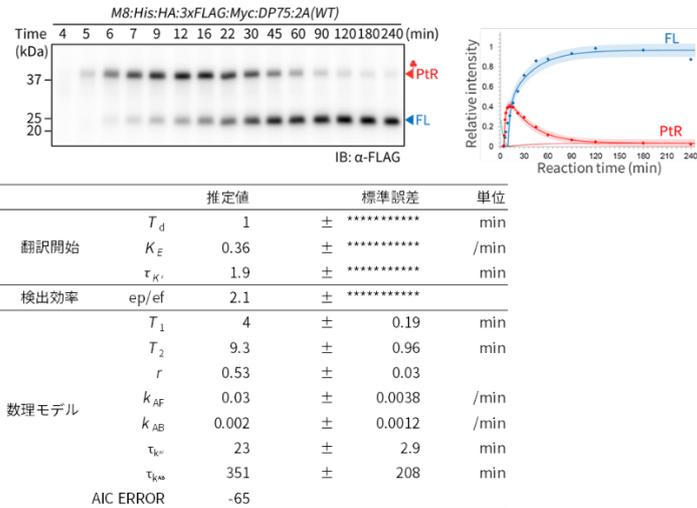


図 7. 各アレストシステムのフィッティング結果

*まだデータが取れていない部分は***で表している

参考文献

1. Cao, J. and Geballe, A.P. (1996) Coding sequence-dependent ribosomal arrest at termination of translation. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 603-608.
2. Wang, Z., Fang, P. and Sachs, M.S. (1998) The evolutionarily conserved eukaryotic arginine attenuator peptide regulates the movement of ribosomes that have translated it. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 7528-7536.
3. Law, G.L., Raney, A., Heusner, C. and Morris, D.R. (2001) Polyamine regulation of ribosome pausing at the upstream open reading frame of *S*-adenosylmethionine decarboxylase. *J. Biol. Chem.*, **276**, 38036-38043.
4. Onouchi, H., Nagami, Y., Haraguchi, Y., Nakamoto, M., Nishimura, Y., Sakurai, R., Nagao, N., Kawasaki, D., Kadokura, Y. and Naito, S. (2005) Nascent peptide-mediated translation elongation arrest coupled with mRNA degradation in the *CGS1* gene of *Arabidopsis*. *Genes Dev.*, **19**, 1799-1810.
5. Tanaka, M., Takano, J., Chiba, Y., Lombardo, F., Ogasawara, Y., Onouchi, H., Naito, S. and Fujiwara, T. (2011) Boron-dependent degradation of *NIP5;1* mRNA for acclimation to excess boron conditions in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **23**, 3547-3559.
6. Sharma, P., Yan, F., Doronina, V. A., Escuin-Ordinas, H., Ryan, M.D. and Brown, J.D. (2012) 2A peptides provide distinct solutions to driving stop-carry on translational recoding. *Nucleic Acids Res.*, **40**, 3143-3151.
7. Ito, K. and Chiba, S. (2013) Arrest peptides: *cis*-acting modulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.*, **82**, 171-202.
8. Uchiyama-Kadokura, N., Murakami, K., Takemoto, M., Koyanagi, N., Murota, K., Naito, S. and Onouchi, H. (2014) Polyamine-responsive ribosomal arrest at the stop codon of an upstream open reading frame of the *AdoMetDC1* gene triggers nonsense mediated mRNA decay in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, **55**, 1556-1567.
9. Yamashita, Y., Takamatsu, S., Glasbrenner, M., Becker, T., Naito, S. and Beckmann, R. (2017) Sucrose sensing through nascent peptide-mediated ribosome stalling at the stop codon of *Arabidopsis bZIP11* uORF2. *FEBS Lett.*, **591**, 1266-1277.
10. Nakatogawa, H. and Ito, K. (2002) The ribosomal exit tunnel functions as a discriminating gate. *Cell*, **108**, 629-636.
11. Cruz-Vera, L. R., Rajagopal, S., Squires, C. and Yanofsky, C. (2005) Features of ribosome-peptidyl-tRNA interactions essential for tryptophan induction of *tna* operon expression. *Mol. Cell*, **19**, 333-343.
12. Chiba, S., Kanamori, T., Ueda, T., Akiyama, Y., Pogliano, K. and Ito, K. (2011) Recruitment of a species-specific translational arrest module to monitor different cellular processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **108**, 6073-6078.
13. Takamatsu, S., Ohashi, Y., Onoue, N., Tajima, Y., Imamichi, T., Yonezawa, S., Morimoto, K., Onouchi, H., Yamashita, Y. and Naito, S. (2019) Reverse genetics-based biochemical studies of the ribosomal exit tunnel constriction region in eukaryotic ribosome stalling: spatial allocation of the regulatory nascent peptide at the constriction. *Nucleic Acids Res.*, [Epub ahead of print] PubMed PMID: 31875230 DOI: 10.1093/nar/gkz1190