

# 小胞体タンパク質の翻訳と協調した複合体形成

## Co-translational assembly of ER proteins

所属機関： ハイデルベルク大学      代表研究者氏名：伊藤 進也  
研究期間： 2021年4月1日～2021年9月30日

滞在研究機関： Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg,  
DKFZ-ZMBH Allianz, Im Neuenheimer Feld 282, 69120,  
Heidelberg, Germany

共同研究者等： Prof. Bernd Bukau

The folding of newly synthesized proteins to the native state is a major challenge within the crowded cellular environment, as non-productive interactions can lead to misfolding and aggregation. Although most of the proteome performs its function by forming oligomeric assemblies, many questions remain about the final step of folding, the assembly of polypeptides into functional complexes. I studied the mechanism of protein assembly that are translocated across or inserted into the endoplasmic reticulum (ER) membranes using Ribosome profiling technique. Prolyl-4-hydroxylase complex was identified as a candidate that assemble in co-translational manner in the ER.

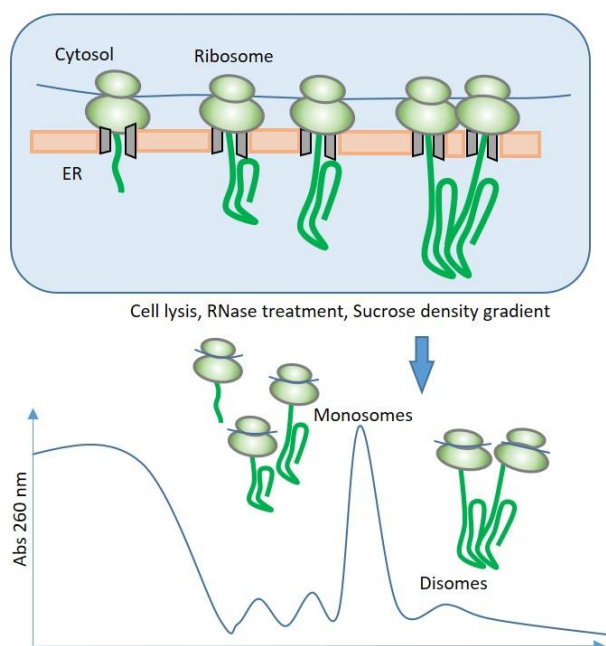
### 海外研究活動概要

細胞内には非常に多くのタンパク質が存在しており、その環境の中で、タンパク質が翻訳、フォールディング、輸送、分解を正しく受けることにより生命の恒常性が保たれている。タンパク質によっては、ホモ二量体を形成し、細胞外に分泌するタンパク質や、他のタンパク質とアッセンブルしヘテロ複合体を形成したのち機能する膜タンパク質もある。近年、大腸菌の同一オペロンで連続して二つの異なるタンパク質が翻訳されることが、それらタンパク質のヘテロ複合体形成に重要であることが示された。新生鎖と呼ばれる翻訳途上のポリペプチド鎖がそのペアとなるタンパク質と相互作用することが、複合体の正しいアッセンブルに不可欠であることが明らかになった。この翻訳と協調した複合体形成の仕組みは酵母やヒトの細胞でも保存されていることが報告され、タンパク質のアッセンブルの新たな仕組みが明らかになりつつある。

新生鎖の相互作用解析が可能になった背景にはリボソームプロファイリング法という技術の発達がある。この技術は、薬剤で翻訳を停止させ、リボヌク

レアーゼ処理後、リボソームを精製し、リボソームによって分解から免れた mRNA 配列をシーケンスすることで、翻訳していたリボソームの位置(フットプリント)を mRNA 上にマッピングする方法である。例えば、複合体を形成するタンパク質同士が翻訳と協調して相互作用しているかどうかを、ペアを形成する片方のタンパク質で免疫沈降した後に、リボソームプロファイリング法で相手側の mRNA 上のリボソームを調べることで、新生鎖のどの翻訳段階で複合体を形成しているかを解析できる。この方法は SeRP(Selective Ribosome Profiling)と呼ばれる。また、リボヌクレアーゼ処理後、ショ糖密度勾配遠心にかけると、80S リボソームの高密度側に Disome (di-ribosome)の小さいピークが観察される。この画分は衝突した2つのリボソーム及び新生鎖間で相互作用している2つのリボソームを含んでいることが明らかになった。ホモ二量体を形成するいくつかのサイトゾルのタンパク質は翻訳と協調しながら新生鎖間で既に二量体を作っていることが示唆された。この解析方法は DiSP(Disome specific profiling)と呼ばれる(次ページ・下図)。

### Disome selective profiling (DiSP)



小胞体は分泌タンパク質や膜タンパク質合成の場合である。小胞体へのシグナル配列を有した分泌タンパク質は、リボソームとトランスロコンという小胞体膜上の翻訳の場から新生鎖が翻訳と協調して小胞体内に挿入される。小胞体膜内腔への新生鎖の挿入と小胞体内腔側での複合体形成が翻訳と協調した形で行われているか調べることを目的とした。

### 成果

前述の DiSP を用いた新生鎖の相互作用を解析する方法はサイトゾルのタンパク質の解析に適したものであったため、小胞体タンパク質複合体の解析用に修正し、DiSP 法で小胞体タンパク質複合体形成が新生鎖間相互作用を介して行われているかを調べた。予備的な解析結果ながら、DiSP 法により、いくつかの小胞体タンパク質が翻訳と協調して複合体を形成していることが示唆された。特に、プロリン水酸化酵素(Prolyl-4-hydroxylase, P4H)を翻訳と協調して複合体を形成する有力な候補として、解析を進めた。P4H 複合体は2つの P4H と2つの PDI(protein disulfide

isomerase)のヘテロ 4 量体であり、小胞体内腔でプロコラーゲンの水酸化反応を行っており、コラーゲンの生合成を介して脊椎動物の発生に必須の酵素である。大腸菌で全長の P4H を発現精製することは難しいことなど、P4H は単独では不安定であることが知られており、P4H の 2 量体形成ドメインのみ結晶構造が報告されている。DiSP においては Monosome のフットプリントに対する Disome のフットプリントの割合を各コドンに対してプロットし、どの位置から新生鎖を介した Disome 形成が始まるかを可視化することができる。P4H の場合、2 量体形成ドメインの翻訳の完了とともに Disome の割合が増加していたことから、翻訳と協調しながら、小胞体内腔側で新生鎖を介したホモ二量体形成が行われていることが示唆された。

### 今後の展望

現在、P4H のホモ二量体形成が新生鎖間の相互作用により行われていることが示唆されているが、P4H 複合体は2つの P4H と2つの PDI の複合体である。P4H および PDI に対する抗体で免疫沈降し、SeRP を行うことで、新生鎖との相互作用によってヘテロ複合体形成がなされているかを検証している。今回、P4H を例にしたが、他の複合体についても、同様の解析を行い、翻訳と協調して小胞体膜に挿入されながら、小胞体内腔側でタンパク質複合体にアッセンブルされる仕組みを明らかにしたい。これまで、小胞体のタンパク質複合体は新生鎖が小胞体内腔側に挿入され、タンパク質の翻訳が完了した後にアッセンブルが行われるものと漠然と考えられてきたが、タンパク質が混雑した細胞内において、複合体形成が効率的に行われるためには、新生鎖の相互作用が鍵となることを示したいと考えている。

### 研究の発表

口頭発表、誌上発表 現時点でなし