

アミノ酸配列の「並び」で拡張される遺伝情報のダイナミクス

Deciphering the new genetic information encoded within
the context of amino acid sequences.

(日本遺伝学会推薦)

代表研究者 岡山大学 茶谷 悠平 Okayama University Yuhei Chadani

This study investigated how nascent polypeptide sequences regulate translation dynamics and expand the coding potential of genomic DNA. Focusing on Intrinsic Ribosome Destabilization (IRD), a phenomenon triggered by acidic amino acid clusters, we systematically analyzed premature translation termination events across the *E. coli* proteome. By isolating peptidyl-tRNA and performing LC-MS/MS, we identified 599 truncated peptide fragments originating from 253 ORFs, terminated independently of stop codons. The C-terminal sequences of these truncated peptides were enriched in acidic residues, implicating IRD in their generation. Some of these peptides were stably expressed, suggesting that IRD may act as a pseudo-stop mechanism contributing to gene regulation. We further found that two ABCF-family translation factors, YbiT and EttA, suppress IRD, with each acting at different translation stages. Conversely, YheS and Uup promoted the translation of other "hard-to-translate" amino acid motifs, highlighting the functional divergence within the ABCF family. Additionally, two small ORFs (*pepNL* and *nanCL*) were discovered to induce translation arrest at their stop codons. Cryo-EM analysis revealed that PepNL forms a hairpin-like structure within the ribosomal tunnel, obstructing release factor binding. This arrest mechanism is favored under nutrient-limited conditions as like as IRD, indicating the importance of translation regulations in cellular stress adaptation.

研究目的

細胞内装置リボソームで合成途上にあるタンパク質(新生ペプチド鎖)は単なる中間産物ではなく、リボソームとの相互作用を介してさまざまにその機能を制御する情報物質でもあることが明らかとなってきた。例えば、負電荷アミノ酸に富む配列の合成は、リボソーム複合体の不安定化: Intrinsic Ribosome Destabilization (IRD)によるタンパク質合成(翻訳)の異常終結を引き起こす(参考文献-1)。こうした IRD のリスクを伴うアミノ酸モチーフは、生物の遺伝子の半数近くに出現する。また注目すべき点として、IRD の結果生じる短いポリペプチド断片は、積極的に分解されず細胞内に蓄積する。そのため、負電荷アミノ酸に富む配列は擬似的に終止コドンとして機能し、新たなタンパク質アイソフォームを発現させている可能性が考えられた。本研究は、新生ペプチド配列に依存して発現する新規タンパク質分子の存在を検討し、その全体像解明を目的とした。

研究経過

1. IRD 依存的に発現する短い遺伝子産物の探索

新生ペプチド(IRD)による翻訳の異常終結が起った場合、合成途上だったタンパク質はペプチド鎖と tRNA が連結したペプチジル tRNA としてリボソーム複合体から脱離し、その後 Pth (peptidyl-tRNA hydrolase)による切断を受け、発現することとなる。そのため、Pth の機能を破綻させると、異常終結を起こした翻訳産物はペプチジル tRNA として蓄積することとなる。これを利用し、大腸菌 *pth* 温度感受性株を失活条件(42°C)に短時間暴露し(参考文献-2)、同条件でのみ蓄積するペプチジル tRNA 分子を質量分析で同定した。ペプチジル tRNA のみを解析する目的で、フェノール抽出とカラム精製を組み合わせた PETEOS 法(参考文献-3)を利用し、サンプルの調整を行った。LC-MS/MS 解析によってペプチド断片の同定を行ったところ、対象実験である野生型大腸菌ではほとんどペプチジル tRNA 由来のペプチド断片は

検出されなかった。これは通常条件では Pth が速やかにペプチジル tRNA を分解しているためと考えられ、これまでの報告と合致している。一方、599 種のペプチド断片が Pth 失活条件特異的に検出された。これらのペプチド断片は 253 の大腸菌遺伝子に帰属し、様々な遺伝子で翻訳の異常終結が発生していることが明らかとなった。またその C 末端アミノ酸配列に着目して解析したところ、負電荷アミノ酸(D,E)に富んでいることが判明した。これは、IRD が負電荷アミノ酸に富む配列を合成する途上、あるいは負電荷アミノ酸直後の重合過程で発生することと符合している。

次に、これら本来の遺伝子配列 (ORF: open reading frame) より短いポリペプチド産物が、細胞内で安定に存在できるか、すなわち三次構造を形成できているかを個別に検討した。論文として未発表のため、ここでは遺伝子名は伏せさせていただくが、途上終結によって生じるポリペプチド産物 44 候補について検討し、うち 13 種が安定に蓄積、発現することが明らかとなった。

2. IRD などの翻訳異常を抑制する翻訳因子の同定

IRD をはじめとした新生ペプチド配列に依存した翻訳の異常は、リボソーム内部の合成途上産物ペプチジル tRNA が異常な歪みをきたすことで発生する。一方で、こうしたリボソーム内の異常に作用して問題を回避させる因子の存在も明らかとなってきた。本研究では、リボソーム内部に作用することが示唆されながら、その機能が未解明だった ABCF (ATPase Binding Cassette subfamily-F) タンパク質に注目し、負電荷アミノ酸など翻訳異常を引き起こす配列モチーフの合成に与える影響を評価した。その結果、大腸菌に保持される 4 種の ABCF タンパク質のうち、YbiT, EttA が負電荷アミノ酸による翻訳の異常終結 (IRD) を予防する活性を持つことが明らかとなった（誌上発表-2）。一方、これら二種にも機能的差異が見

出された。YbiT は翻訳伸長のいかなる段階でも翻訳異常を抑制できる一方、EttA は翻訳開始直後の新生ペプチドが短い段階でのみ、負電荷アミノ酸による IRD を抑制した。これは、トンネル内新生ペプチド鎖の短い段階で負電荷アミノ酸に富む配列を合成すると、高頻度に異常終結を引き起こすため（参考文献-4）、可能な限り異常終結を抑制するよう、より多くの翻訳因子を進化の中で獲得してきたものと考えられる。

一方、残り二種の ABCF タンパク質 YheS, Uup は負電荷アミノ酸による異常を抑制する活性は持たず、全く異なるアミノ酸配列モチーフによって引き起こされる翻訳の停滞を解消することが明らかとなった。それぞれの ABCF タンパク質の三次元構造は非常に近似するものの、アミノ酸配列レベルでは 50%以下の相同性を持つにとどまる。これらのことから、

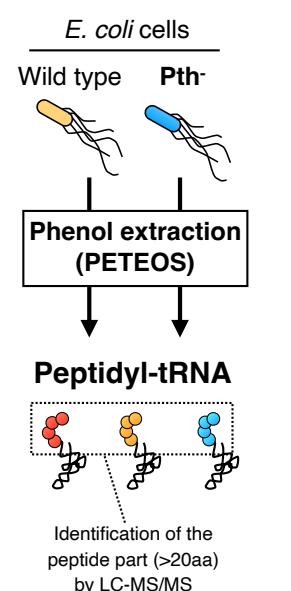


Fig.1. Strategy for identifying prematurely terminated translation products.

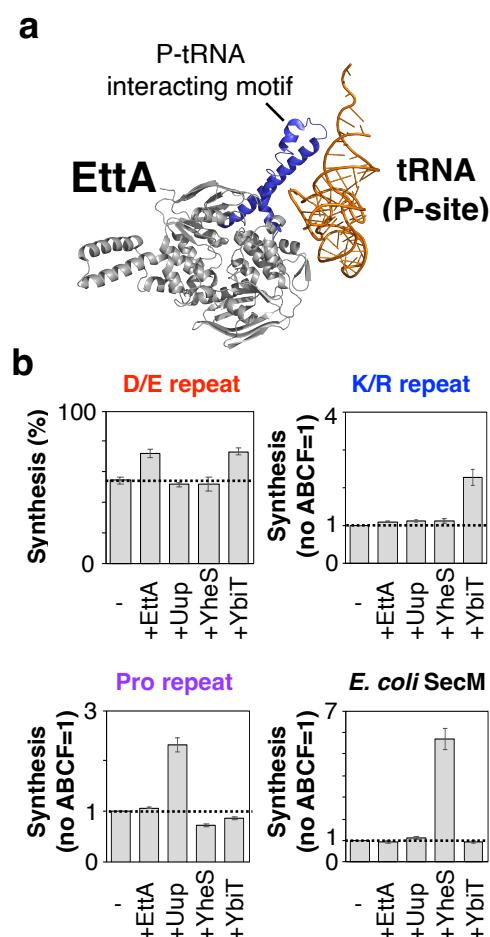


Fig.2. *E. coli* ABCF proteins alleviate "hard-to-translate" nascent peptide sequences.

- a. Structure of EttA, an *E. coli* ABCF proteins, shown interacting with P-site tRNA (PDB: 3J5S).
- b. Translation of "hard-to-translate" sequences are promoted by individual ABCF proteins.

ABCF タンパク質は細部のアミノ酸配列、構造の違いの積み重ねから、自身が対処する合成困難なアミノ酸配列モチーフを定義しているものと予想される。

3. 遺伝情報として機能する新規ペプチド配列の同定

項目-1で行った PETEOS 解析では、原理上極端に短い ORF (20 アミノ酸以下, small ORF: sORF)での異常終結を検知することが困難である。そのため、sORFについても個別解析を行い、IRD による異常終結の広がりを検討することとした。大腸菌ゲノムから新規に同定された sORF をクローニングし、その合成過程で異常終結など非典型的な翻訳が起こっているかを検討した。38 の候補配列について検討したところ、異常終結ではなく翻訳の異常停止が発生する ORF として *pepNL*, *nanCL* を同定するに至った。これらの ORF は 14 アミノ酸のみをコードし、その終止コドンでの翻訳終結反応が阻害され、停滞が起こることが明らかとなった。

この現象の分子機構を明らかにすべく、東京大学 濡木理研究室との共同研究で Cryo-EM 構造解析を行い、*PepNL* 新生ペプチド鎖によって反応が停滞したリボソームの三次元構造を平均分解能 2.8Å の分解能で取得した。得られた構造情報から、*PepNL* 新生ペプチド鎖はリボソームトンネル内でヘアピンのように折れ曲がった構造を取り、トンネル内部で詰まりを起こしていることが判明した。それだけではなく、上記の詰まりが後続の新生ペプチド部分に異常な歪みを生じさせ、C 末端から二番目の Ile13 残基が異常な方向に突出していた。この突出した Ile 残基は、本来なら翻訳終結因子 RF2 の GGG loop が配置するポケットに入り込み、RF2 の正常な配置

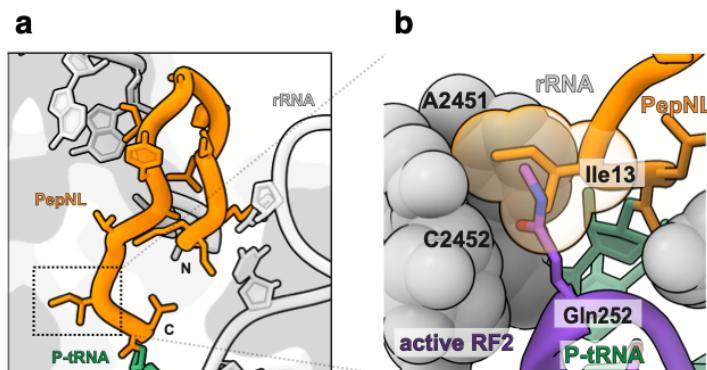


Fig.3. *E. coli* PepNL nascent peptide forms a mini-hairpin-like structure and blocks the function of RF2.
a. Structure of the PepNL nascent peptide within the ribosome tunnel.
b. The distorted Ile13 residue of PepNL interferes with proper accommodation of release factor 2 (RF2), resulting in ribosome stalling.

を阻害することが明らかとなった。また *PepNL* のような特異な新生ペプチド構造の形成は、アミノ酸が枯渇するなど翻訳システム全体が停滞に向かっている状況で起こりやすいことも明らかとなった。(誌上発表-4)

考察

本研究より、負電荷アミノ酸による翻訳の異常終結は、数百規模の遺伝子発現の途上で発生していることが明らかとなった。リボソームを不安定化させる負電荷アミノ酸に富む配列は、配列に基づく予測に基づくと、生物種を問わず半数以上の遺伝子に出現する。今回質量分析で同定されたペプチド断片の多くは C 末端付近に負電荷アミノ酸を多く含む傾向にあった。加えて、途上終結によって生じたポリペプチドの一部は、細胞内で安定に発現、蓄積したことから、機能的な構造を形成し、ORF 全長産物とは異なる機能を何らか発揮していると予想される。この点については今後更なる解析を行い、どのような目的からこうした「規格外」タンパク質を発見させているかを明らかにしていく必要がある。

また別軸の解析から、負電荷アミノ酸に富む配列が引き起こす翻訳の異常終結は、栄養枯渇や熱ショックなど、ストレス条件でより高頻度で発生することも明らかとなっている(誌上発表-1)。今後、これらのストレス条件でも今回と同様の解析を進めていき、状況特異的に発現する短いポリペプチド産物の全体像を明らかすることで、新たな機能を持つタンパク質の発見などにつながると期待される。またこうした「ストレス(加齢)」と翻訳制御の関連性は、他グループの研究からも報告されているほか(参考文

献-5)、思ひぬ形で同定に至った *PepNL* も、翻訳の遅延が制御に重要な点は興味深い。アミノ酸枯渇などによる翻訳システム全体の機能低下が、通常条件では抑制できていた様々な翻訳の異常を顕在化させ、通常とは異なるプロテオームレパートリーの発現などを通じて、ストレス環境への適用に貢献している可能性も考えられる。今後、本研究で同定した短いタンパク質産物の機能解析などを通じて、DNA ではなくアミノ酸配列にコードされる拡張型遺伝情報の実体に迫り、遺伝学、タンパク質科学に新たなパラダイムを提示することを目指していく。

参考文献

- Chadani, Y. et al. Intrinsic Ribosome Destabilization Underlies Translation and Provides an Organism with a Strategy of Environmental Sensing. *Mol. Cell* **68**, 528–539.e5 (2017).
- Yamakawa, A., Niwa, T., Chadani, Y., Kobo, A. & Taguchi, H. A method to enrich polypeptidyl-tRNAs to capture snapshots of translation in the cell. *Nucleic Acids Res.* **51**, e30–e30 (2023).
- Cruz-Vera, L. R., Toledo, I., Hernández-Sánchez, J. & Guarneros, G. Molecular basis for the temperature sensitivity of *Escherichia coli pth(Ts)*. *Journal of Bacteriology* **182**, 1523–1528 (2000).
- Chadani, Y. et al. Nascent polypeptide within the exit tunnel stabilizes the ribosome to counteract risky translation. *EMBO J.* **40**, e108299 (2021).
- Stein, K. C., Morales-Polanco, F., Lienden, J. van der, Rainbolt, T. K. & Frydman, J. Ageing exacerbates ribosome pausing to disrupt cotranslational proteostasis. *Nature* **601**, 637–642 (2022).

研究の発表

口頭発表

- 難翻訳アミノ酸配列の解読とその制御技術の開発、茶谷 悠平、第 19 回 無細胞生命科学研究会
2025 年 3 月 5 日
- アミノ酸配列にコードされる「遺伝暗号」の解読と制御を目指して、茶谷 悠平、RNA フロンティアミーティング

2024 年 10 月 28 日

- アミノ酸配列に秘匿された新たな遺伝情報の解読と制御、茶谷 悠平、日本遺伝学会 第 96 回大会 日本遺伝学会奨励賞受賞講演

2024 年 9 月 6 日

- タンパク質合成を保証する「タンパク質」の解析、茶谷 悠平、第 97 回日本細菌学会総会 選抜ワークショップ

2024 年 8 月 8 日

- タンパク質の安定的発現を保証するタンパク質の解析、茶谷 悠平、第 18 回 無細胞生命科学研究会 2024 年 3 月 14 日

誌上発表

- Chadani, Y. et al. Mechanistic dissection of premature translation termination induced by acidic residues-enriched nascent peptide. *Cell Rep.* **42**, 113569 (2023).
- Chadani, Y. et al. The ABCF proteins in *Escherichia coli* individually cope with ‘hard-to-translate’ nascent peptide sequences. *Nucleic Acids Res.* **52**, 5825–5840 (2024).
- Kobo, A., Taguchi, H. & Chadani, Y. Non-specific N-terminal tetrapeptide insertions disrupt the translation arrest induced by ribosome arresting peptide sequences. *J. Biol. Chem.* 107360 (2024) doi:10.1016/j.jbc.2024.107360.
- Ando, Y. et al. A mini-hairpin shaped nascent peptide blocks translation termination by a distinct mechanism. *Nat. Commun.* **16**, 2323 (2025)