

平成 21 年 4 月 10 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19770143  
 研究課題名（和文）トランス翻訳特異的な蛋白質 SmpB が引き起こすリボソームの動態解析  
 研究課題名（英文）Investigation of the ribosome dynamics generated by trans-translation specific SmpB protein  
 研究代表者  
 清水 義宏（SHIMIZU YOSHIHIRO）  
 東京大学・大学院新領域創成科学研究科・助教  
 研究者番号：90401231

## 研究成果の概要：

トランス翻訳特異的な蛋白質 SmpB が引き起こすリボソームのダイナミクスを解析するために、複数の SmpB 変異体を用いた生化学的解析を行い、SmpB のアミノ酸残基がリボソームダイナミクスに及ぼす影響を測定した。またそれらをより詳細に解析するために一分子イメージング技術を用いた SmpB/tmRNA 複合体及びリボソームの相互作用を解析する基盤構築を行った。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	0	2,600,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	270,000	3,770,000

## 研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：生体高分子構造・機能、リボソーム、トランス翻訳、翻訳、tmRNA、SmpB

## 1. 研究開始当初の背景

細胞内において蛋白質合成を司る翻訳システムは、最も解析がなされている生体内のシステムの一つである。それにも関わらず、蛋白質合成の主役であるリボソームが、その巨大さゆえに構造解析が進まず、詳細な分子メカニズムを議論するには至らなかった。しかしながら、近年、Steitz や Ramakrishnan などのグループによってリボソームの X 線結晶構造が明らかにされ、リボソームを中心とした翻訳システムのダイナミクスが明らか

にされつつある。本研究は、こうした研究の流れを背景として、近年発展している技術である一分子イメージングを用いて、トランス翻訳における tmRNA/SmpB 複合体のリボソーム A サイトエントリーにおける挙動を調べることにより、翻訳システム、特にリボソームのダイナミクスを分子レベルで明らかにすることを目指した。

## 2. 研究の目的

原核生物の翻訳システムにはトランス

ランスレーションと呼ばれるバイパスシステムが存在し、翻訳異常の救済システムとして機能する。この際、通常の tRNA と同様に、tmRNA と呼ばれる RNA がリボソーム A サイトにエンターし、後、mRNA として機能することが知られている。tRNA のリボソーム A サイトへのエンターに際しては伸長因子 EF-Tu 及び GTP との三者複合体がリボソーム A サイトにて mRNA のコドンと相互作用するのに対して、tmRNA にはコドンと相互作用可能なアンチコドンが存在せず、どのようなメカニズムで EF-Tu と協調してリボソームにエンターするのか不明であった。本研究では、このステップにおいてトランスランスレーション特異的な蛋白質 SmpB がどのような機能を担っているかについて生化学的解析、一分子イメージング解析の両面から明らかにしていくことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) SmpB 変異体の生化学解析

SmpB の C 末端アミノ酸配列は原核生物の多くの生物種でよく保存されている。これらのアミノ酸残基にアラニン置換変異または欠失変異を施し、これらを用いて tmRNA がリボソーム A サイトにエンターする際の EF-Tu に結合した GTP 加水分解活性を測定することにより、トランスランスレーションにおける SmpB の C 末端残基の機能を明らかにする。

#### (2) ガラス基板上へのリボソームの固定化及び tmRNA または SmpB の蛍光標識、一分子イメージング観察

リボソーム RNA もしくはリボソームタンパク質に変異を持つリボソームを調製し、ビオチン化 BSA を固定化したガラス基板に対して、ストレプトアビジンを介した固定化の検討を行う。また非特異吸着を防ぐためのブロッキング剤について検討を行う。また、tmRNA もしくは SmpB に蛍光標識を導入することにより、一分子イメージング解析を行う基盤を構築し、蛍光顕微鏡により、リボソームと SmpB または tmRNA との相互作用を観察する。

### 4. 研究成果

#### (1) SmpB の変異体解析

SmpB の C 末端配列の変異体を 10 種類構築し、tmRNA がリボソームにエンターする際の EF-Tu 依存的な GTP 加水分解活性、tmRNA

のリボソームエンター効率をそれぞれ測定した。その結果、C 末端配列における変異や欠失が GTP 加水分解活性を低下させること、特に、C 末端配列が欠失した SmpB は tmRNA をリボソームにエンターさせないことを明らかにした (図 1、2)。また、GTP の加水分解反応に対する EF-Tu 濃度・tmRNA 濃度・SmpB 濃度の影響を測定し、反応のターンオーバーレートを算出し、通常の EF-Tu または EF-G が引き起こすリボソーム上での反応と同様の反応が新興していることを示唆するデータを得た。

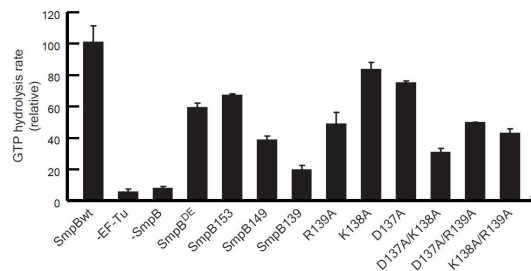


図 1 各種変異体の EF-Tu 依存的な GTP 加水分解活性

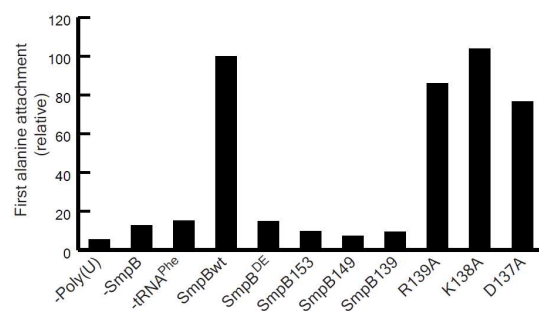


図 2 各種変異体を用いた tmRNA のリボソームエンター

#### (2) ガラス基板上へのリボソームの固定化及び tmRNA または SmpB の蛍光標識、一分子イメージング観察

リボソーム RNA に余分な RNA 配列を付加したリボソームを用いて、その RNA 配列に相補的なオリゴ DNA に Cy5 及びビオチン標識したものをアニールさせ、ストレプトアビジンを介してガラス基板上のビオチン化 BSA に固定化した。しかしながら、この方法では基板上へのリボソームの非特異的な吸着が多く観察される、オリゴ DNA とリボソームとの相互作用が弱いなどの欠点があったため、以下に示した方法を試みた。リボソームタンパク質 S2 にアビジンタグが付加されたリボソームを用いて、ストレプトアビジンを介してガラス基板上のビオチン化 BSA に固定化した。基板を PMB80 ポリマーでコーティングすることにより、非特異吸着の改善が見られた (図 3)。

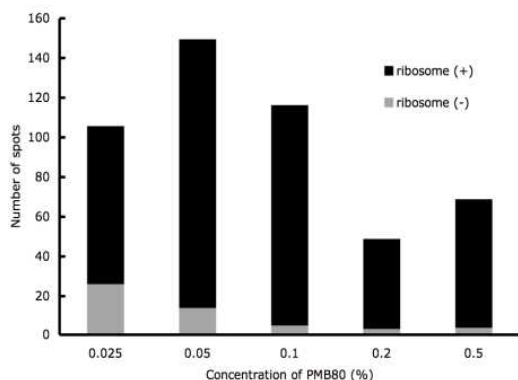


図3 PMB80 ポリマーによる非特異吸着の改善

tmRNA もしくは SmpB への蛍光標識については、SmpB の N 末端に Cys を導入した SmpB を用いて Cy3 ラベルを行ったが、この方法では基板への SmpB の非特異吸着が多く観察されたため、tmRNA への蛍光標識を検討した。tmRNA への蛍光標識導入は、当初、非天然アミノ酸である BODIPY-アミノフェニルアラニンを用いて、イベントを観察したが、アミノ酸部位の分子量が大きいため、満足のいくイベント数が観察されなかった。そこで、tmRNA 上のグアニン残基にランダムに Cy3 を導入し、その結果、tmRNA 及びリボソームの特異的な相互作用が観察された。

#### 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6件)

1. Eriko Osada, Yoshihiro Shimizu, Bintang K. Akbar, Takashi Kanamori, Takuya Ueda, Epitope mapping using ribosome display in reconstituted cell-free protein synthesis system. *J. Biochem.* (査読有) 145, 2009, 693-700
2. Sotaro Uemura, Ryo Iizuka, Taro Ueno, Yoshihiro Shimizu, Hideki Taguchi, Takuya Ueda, Joseph D. Puglisi, Takashi Funatsu, Single molecule imaging of full protein synthesis by immobilized ribosomes. *Nucleic Acids Res.* (査読有) 36, 2008, e70
3. Shuntaro Takahashi, Ryoko Akita, Hisao Matsuno, Hiroyuki Furusawa, Yoshihiro Shimizu, Takuya Ueda, Yoshio Okahata, 70S ribosomes bind to Shine-Dalgarno sequences without required

dissociations. *ChemBiochem* (査読有) 9, 2008, 870-873

4. Yoshio Doi, Takashi Ohtsuki, Yoshihiro Shimizu, Takuya Ueda, Masahiko Sisido, Elongation factor Tu mutants expand amino acid tolerance of protein biosynthesis system. *J. Am. Chem. Soc.* (査読有) 9, 2008, 870-873
5. Kazunori Watanabe, Yukimatsu Toh, Kyoko Suto, Yoshihiro Shimizu, Natsuhisa Oka, Takeshi Wada, Kozo Tomita, Protein-based peptide bond formation by aminoacyl-tRNA protein transferase. *Nature* (査読有) 449, 2007, 867-871
6. Hao Qi, Yoshihiro Shimizu, Takuya Ueda, Ribosomal protein S1 is not essential for the trans-translation machinery. *J. Mol. Biol.* (査読有) 368, 2007, 845-852

[学会発表](計6件)

1. 清水義宏、Reconstitution of tRNA in a cell-free protein synthesis system. 第17回理研CDBミーティング、2008年10月14日、神戸
2. Yoshihiro Shimizu, Reconstitution of tRNA in a cell-free protein synthesis system. *Synthetic Biology 4.0*, 2008年10月10日、香港
3. 清水義宏、再構築型無細胞蛋白質合成システムの開発とその応用、大阪大学蛋白質研究所セミナー、2008年9月25日、大阪
4. 清水義宏、無細胞タンパク質合成系におけるtRNAの再構成、第10回RNAミーティング、2008年7月23日、札幌
5. 清水義宏、大腸菌 trans-translation における SmpB の機能解析、第2回無細胞生命科学研究会、2007年10月19日、柏
6. Yoshihiro Shimizu, Application of PURE system, the reconstituted cell-free protein synthesis system. *Synthetic Biology 3.0*, 2007年6月25日、Zurich

[図書](計1件)

1. 清水義宏、上田卓也、羊土社、RNA 実験ノート上巻、2008年、128-130

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

清水 義宏 ( SHIMIZU YOSHIHIRO )  
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・助教  
研究者番号：9 0 4 0 1 2 3 1

### (2)研究分担者

### (3)連携研究者