

機関番号：11101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20580068

研究課題名（和文） tmRNAによるトランス翻訳の新しい生理機能の解明

研究課題名（英文）

Novel physiological functions of trans-translation mediated by tmRNA

研究代表者

武藤 あきら (MUTO AKIRA)

弘前大学・農学生命科学部・研究員

研究者番号：80034635

研究成果の概要（和文）：

トランス翻訳は、情報分子 mRNA と情報を読みとる分子 tRNA の両方の機能を持つ tmRNA の働きにより、終止コドンに欠いた mRNA の 3' 端で停滞した翻訳を解消し、翻訳途中の不完全なペプチドを分解に導く変則的翻訳システムである。本研究では、枯草菌においてこのシステムが（1）孢子形成に必須であり、（2）カタボライト抑制にも関与していること、を明らかにし、多様な生理現象に関わっていることを示した。

研究成果の概要（英文）：

Trans-translation is an irregular translation system, in which tmRNA (transfer and messenger RNA) rescues the ribosome stalled at the 3' end of truncated mRNA lacking a termination codon to produce a chimeric polypeptide from two message on truncated mRNA and tmRNA. It provides the incomplete nascent polypeptide from a truncated mRNA with a tag for degradation. In this study, we have demonstrated that the trans-translation system is involved in (1) endospore formation and (2) catabolite repression in *Bacillus subtilis*.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2009年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2010年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：トランス翻訳、tmRNA、枯草菌、孢子形成、カタボライト抑制、シグマ因子、ccpA

1. 研究開始当初の背景

トランス翻訳は、mRNA と tRNA の両方の機能を果たす tmRNA の働きにより、停滞した翻訳を解消し、結果として2本の情報分子から1本のキメラペプチドを合成する変則的翻訳システムである。そして、この変則的翻訳により生じた異常タンパク質に分解の目印を与える。その細胞内での機能は停滞した翻

訳の効率化と出来損なったタンパク質の分解だと考えられてきた。

2. 研究の目的

我々は枯草菌でトランス翻訳が種々のストレス下での増殖に必要であること、またトランス翻訳が特定培養条件下で特定のタンパク質を標的にして起きることを見つけた。本

研究では(1)栄養枯渇(ストレス)下での胞子形成に tmRNA が必要であること、(2)トランス翻訳がその主要標的タンパク質である TreP (トレハロース。パーミアーズ)の発現においてカタボライト抑制と関連していること、の発見をもとに、それらのメカニズムを解明し、トランス翻訳の多様な生理機能の実態を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 胞子形成：枯草菌の胞子形成はシグマカスケードと呼ばれる、一連の転写調節過程を経て達成される。tmRNA 欠失株において顕微鏡観察や各シグマ因子の発現を指標となる遺伝子に lacZ をフュージョンさせた株を用いた解析で、形成過程のどの段階で阻害が起きるかを調べ、その原因を追及する。

(2) カタボライト抑制：TreP はグルコース存在下で発現が抑制される。枯草菌のカタボライト抑制は cre 配列と呼ばれる DNA 上の位置にリプレッサー CcpA が結合することによる転写阻害によること、treP 遺伝子のコード領域に cre 配列が存在することも知られている。細胞内でトランス翻訳を受けた TreP の断片を単離し、そのタグ配列が付いた位置を決定することにより、翻訳停止位置を決定し、cre 配列との関連を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 胞子形成：顕微鏡による観察と各シグマ活性の測定から胞子形成過程後期に発現するシグマ K の発現が特異的に抑制されていることをまず明らかにした。さらにこの抑制はシグマ K 遺伝子形成のための組み替え酵素(recombinase)の翻訳が抑制されていることを明らかにした。これは発現量の少ない recombinase が、tmRNA 欠失による翻訳の低下の影響を強く受けるためと解釈された(Abe et al. *Mol. Microbiol.* 2009)。

(2) カタボライト抑制：TreP の tmRNA によるタグ付加が、カタボライト抑制のリプレッサーである CcpA に依存して起きることを明かにし、その際の mRNA 切断位置と TreP 断片のタグ付加位置を決定した。その結果、CcpA が treP 遺伝子の cre 配列に結合して転写阻害を起こして生じた不完全 mRNA を標的としてトランス翻訳が起きることが判明した。枯草菌において、CcpA によるカタボライト抑制により生じた不完全ペプチドの分解にこの反応が一般的に使用されていることも明らかにした(Ujiie et al., *J. Biochem.*, 2010)。

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 15 件)

- ① Kurita, D., Muto, A. & Himeno, H. tRNA/mRNA mimicry by tmRNA and SmpB in trans-translation. *Journal of Nucleic Acids*, **2011** (2011) Article ID 130581.
- ② Abe, T., Ikemura, T., Sugahara, J., Kanai, A., Ohara, Y., Uehara, M., Kinouchi, M., Kanaya, S., Yamada, Y., Muto, A. & Inokuchi, H.: tRNADB-CE 2011: tRNA gene database curated manually by experts. *Nucleic Acids Res.*, **39** (Database Issue), D210-D213 (2011).
- ③ Goto, S., Kato, S., Kimura, T., Muto, A. & Himeno, H.: RsgA releases RbfA from 30S ribosomal subunit during a late stage of ribosome biosynthesis. *EMBO Journal*, **30** (2011) 104-114.
- ④ Une, M., Kurita, D., Muto, A. & Himeno, H.: Trans-translation by tmRNA and SmpB. *Nucleic Acids Symposium Series*, **53** (2009) 305-306.
- ⑤ Hase, Y., Yokoyama, S., Kimura, T., Goto, S., Muto, A. & Himeno, H.: Physiological role of RsgA in ribosome biogenesis. *Nucleic Acids Symposium Series*, **53** (2009) 307-308.
- ⑥ Kurita, D., Muto, A. & Himeno, H. Role of the C-terminal tail of SmpB in the early stage of trans-translation. *RNA* **16** (2010) 980-990.
- ⑦ Hokii, Y., Sasano, Y., Sato, M., Sakamoto, H., Sakata, K., Shingai, R., Taneda, A., Oka, S., Himeno, H., Muto, A., Fujiwara, T., Ushida, C. A small nucleolar RNA functions in rRNA processing in *C. elegans*. *Nucleic Acids Research*, **38** (2010) 5909-5918.
- ⑧ Ujiie, H., Matsutani, T., Tomatsu, H., Fujihara, A., Ushida, C., Miwa, Y., Fujita, Y., Himeno, H. & Muto, A.: Trans-translation is involved in the CcpA-dependent tagging and degradation of TreP in *Bacillus subtilis*. *Journal of Biochemistry*, **145** (2009) 59-66.
- ⑨ Abe, T., Ikemura, Ohara, Y., Uehara, M., Kinouchi, M., Kanaya, S., Yamada, Y., Muto, A. & Inokuchi, H.: tRNADB-CE:tRNA gene database curated manually by experts. *Nucleic Acids Res.*, **37** (Database Issue), D163-D168 (2009).

- ⑩ Hase, Y., Yokoyama, S., Muto, A. & Himeno, H. Removal of a ribosome small subunit-dependent GTPase confers salt-resistance on *Escherichia coli* cells. *RNA* **15** (2009) 1766-1774.
- ⑪ 姫野俵太、栗田大輔、武藤あきら：「2つの tRNA/mRNA ハイブリッド - トランス・トランスレーション」、蛋白質核酸酵素増刊、**54** (16)、2201-2206 (2009)
- ⑫ 姫野俵太、武藤あきら：「トランストランスレーション」、蛋白質核酸酵素、**53**(8)、975、共立出版 (2008)
- ⑬ 栗田大輔、武藤あきら、姫野俵太：「mRNA を擬態するタンパク質」、化学と生物、**46**(7)、465-471 (2008)
- ⑭ Kimura, T., Takagi, K., Hirata, Y., Hase, Y., Muto, A. & Himeno, H. : Ribosome-small-subunit-dependent GTPase interacts with the tRNA binding sites on the ribosome. *Journal of Molecular Biology*, **381** (2008) 467-477.
- ⑮ Abe, T., Sakaki, K., Fujihara, A., Ujiie, H., Ushida, C., Himeno, H., Sato, T. & Muto, A. : tmRNA-dependent *trans*-translation is required for sporulation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, **69** (2008) 1491-1498.
- ④ Kida, Y., Soma, A., Iyoda, S., Kurihara, N., Muto, A., Ohonishu, M., Abe, H., Tobe, T. & Sekine, Y. : Functional analysis of non-coding RNAs with tRNA-like structure specific to *E. coli* O157:H7 Sakai, 23rd tRNA Workshop. Aveiro, Portugal, 2010.
- ⑤ Kurita, D., Une, M., Muto, A., Himeno, H. : Molecular mimicry of tRNA/mRNA during *trans*-translation. ASBMB 2010 Annual Meeting, Anaheim, USA, 2010.
- ⑥ Takemoto, C., Connell, S. R., Hase, Y., Naoe, C., Wang, H., Kaminishi, T., Kikuchi, T., Hirata, Y., Kurita, D., Muto, A., Muto, Y., Yokoyama, S., Himeno, H. : Structural studies for RsgA/YjeQ, a ribosome maturation factor. Ribosomes 2010 Meeting, Orvieto, Italy, 2010.
- ⑦ Kurita, D., Une, M., Muto, A., Himeno, H. : Molecular mimicry by tmRNA/SmpB during *trans*-translation. Ribosomes 2010 Meeting, Orvieto, Italy, 2010.
- ⑧ Ushida, C., Hokii, Y., Sasano, Y., Sato, M., Sakamoto, H., Himeno, H., Muto, A., Fujiwara, T. : The mutation of the *C. elegans* genomic locus encoding a snoRNA has a defect in the pre-rRNA processing. RNA2010, Fifteenth Annual Meeting of the RNA Society, Seattle, 2010.
- ⑨ Kurita, D., Une, M., Muto, A. & Himeno, H. : *Trans*-translation by tmRNA/SmpB. The 3rd International Symposium on Protein Community, Nara, 2010.
- ⑩ Kurita, D., Une, M., Muto, A. & Himeno, H. : Molecular mechanism of the early stage of *trans*-translation. 7th
- [学会発表] (計 29 件)
- ① Hase, Y., Yokoyama, S., Muto, A., Himeno, H. : Removal of robosome small subunit-dependent GTPase confers salt resistance on *Escherichia coli* cells. 4th International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine. Sapporo, 2010.
- ② Kurita, D., Une, M., Muto, A., Himeno, H. : Role of the C-terminal tail of SmpB during *trans*-translation. 23rd tRNA Workshop. Aveiro, Portugal, 2010.
- ③ Abe, T., Ikemura, T., Sugahara, J., Kanai, A., Ohara, Y., Uehara, M., Kinouchi, M., Kanaya, S., Yamada, Y., Muto, A. & Inokuchi, H. : tRNADB-CE 2011: tRNA gene database curated manually by experts. 23rd tRNA Workshop. Aveiro, Portugal, 2010.

- International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Yokohama, 2010
- ⑪ 栗田大輔、宇根理高、武藤あきら、姫野俵太: トランス・トランスレーション初期過程における C 末端 tail の働き、第 12 回 RNA ミーティング (東京) 2010.
- ⑫ 相馬亜希子、伊予田淳、武藤あきら、須藤直樹、大島拓、徐麻由美、大戸結衣、喜田祐介、戸邊亮、大西真、小椋義俊、林哲也、関根靖彦、病原性大腸菌 0157:H7sakai 株の small RNA の機能解析、第 12 回 RNA ミーティング (東京) 2010.
- ⑬ 谷口貴昭、宮内健常、宮田真、武藤あきら、西村進、鈴木勉、obble 位修飾を用いない AUA コドン翻訳機構の解析、第 12 回 RNA ミーティング (東京) 2010.
- ⑭ 阿部貴志、井口八郎、上原啓史、山田優子、武藤あきら、池村淑道、tRNADB-CE を用いた次世代シーケンサー配列データに対する新規分子系統マーカーとしての tRNA 遺伝子の利用、第 12 回 RNA ミーティング (東京) 2010.
- ⑮ 竹本千重、Sean Connell、長谷要一、直枝智恵子、王宏飛、上西達也、菊池岳志、平田侑也、栗田大輔、武藤あきら、武藤裕、横山茂之、Paola Fucini、姫野俵太: リボソーム成熟因子 RsgA/YjeQ の構造機能解析、第 12 回 RNA ミーティング (東京) 2010.
- ⑯ 姫野俵太: tRNA と mRNA の両方の機能を持つ tmRNA、9 回新しい RNA/RNP を見つける会 (弘前)、2010
- ⑰ 栗田大輔、武藤あきら、姫野俵太: 無細胞トランス・トランスレーション系における SmpB の C 末端 tail の働き、第 5 回無細胞生命科学研究会 (岡山)、2010
- ⑱ 姫野俵太、栗田大輔、宇根理高、武藤あきら: tRNA/mRNA ハイブリッドと tRNA/mRNA 擬態タンパク質による trans-translation、第 33 回日本分子生物学会 (神戸)、2010
- ⑲ Kurita, D., Konno, T., Takada, K., Muto, A., Himeno, H.: Molecular mimicry of tRNA+mRNA during trans-translation. 13th Annual Meeting of the RNA Society (Berlin), 2008.
- ⑳ Une, M., Kurita, D., Muto, A., Himeno, H.: Trans-translation by tmRNA and SmpB. The sixth International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (Takayama) 2009.
- 21 Hase, Y., Yokoyama, S., Kimura, T., Goto, S., Muto, A., Himeno, H.: Physiological role of RsgA in ribosome biogenesis. The sixth International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (Takayama) 2009.
- 22 長谷要一、横山晋一郎、武藤あきら、姫野俵太: リボソーム小サブユニット依存 GTPase の欠損による塩ストレス耐性の獲得、日本農芸化学会 2009 年度大会 (福岡) 2009.
- 23 長谷要一、横山晋一郎、武藤あきら、姫野俵太: リボソーム小サブユニット依存 GTPase の欠損による塩ストレス耐性の獲得、第 11 回 RNA ミーティング (新潟) 2009.
- 24 菊池岳志、平田侑也、栗田大輔、長谷要一、木村天胤、武藤あきら、姫野俵太: 部位特異的ヒドロキシラジカルプロービングを用いた RsgA とリボソームの相互作用の解析、第 11 回 RNA ミーティング (新潟) 2009.
- 25 阿部貴志、池村淑道、小原康雄、上原啓史、平野晋也、木ノ内誠、金谷重彦、菅原潤一、金井明夫、山田優子、武藤あきら、井口八郎、第 11 回 RNA ミーティング (新潟) 2009.
- 26 高田一馬、直枝智恵子、川添将仁、横山茂之、姫野俵太、竹本千重: tmRNA 機能解析のための無細胞翻訳実験系の構築、

- 第11回 RNA ミーティング (新潟) 2009.
- 27 長谷要一・横山晋一郎・武藤あきら・姫野俵太: リボソーム小サブユニット依存 GTPase RsgA 欠損による浸透圧耐性の獲得. 第10回 RNA ミーティング (札幌)、2008.
- 28 栗田大輔・今野貴之・高田一馬・武藤あきら・姫野俵太: "tRNA+mRNA のキメラ RNA" と "tRNA+mRNA 擬態タンパク質" による *trans*-translation. 第10回 RNA ミーティング (札幌)、2008.
- 29 氏家博美・松谷誠子・戸松恒・藤原愛・姫野俵太・武藤あきら: 枯草菌 tmRNA による *trans*-translation 反応のカタボライト抑制への関与. 第10回 RNA ミーティング (札幌)、2008.

〔図書〕 (計3件)

- ① 姫野俵太、武藤あきら: 「トランスランスレーション」、キーワード: 蛋白質の一生 (遠藤斗志也、小椋光、永田和宏、森和俊、田口英樹、吉田賢右編)、975、共立出版 (2008)
- ② Himeno, H., Kurita, D. & Muto, A. *Trans*-translation by tmRNA and a protein mimicking tRNA and mRNA. In Toma E. Esterhouse & Lado B. Petrinos Eds., *Protein Biosynthesis*, pp69-107, Nova Science Publishers Inc (2009).
- ③ 姫野俵太、栗田大輔、武藤あきら: 「2つの tRNA/mRNA ハイブリッド - トランス・トランスレーション-」、mRNA プログラム多様性と非対称性の獲得戦略 (稲田利文、大野睦人編)、2201-2206、共立出版 (2010)

○出願状況 (計0件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 出願年月日:
 国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 取得年月日:
 国内外の別:

〔その他〕
 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武藤 あきら (MUTO AKIRA)
 弘前大学・農学生命科学部・研究員
 研究者番号: 80034635

(2) 研究分担者

姫野 俵太 (HIMENO HYOUTA)
 弘前大学・農学生命科学部・教授
 研究者番号: 80208785