

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 6 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23780099

研究課題名(和文)大腸菌トランス・トランスレーションの分子メカニズムの解明

研究課題名(英文)Understanding the molecular mechanism of trans-translation

研究代表者

栗田 大輔(Kurita, Daisuke)

弘前大学・農学生命科学部・助教

研究者番号：60552651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：原核・真核生物を問わず、タンパク合成中にリボソームがmRNA上で停滞することが知られている。このような異常事態を解決するシステムとして、バクテリアではtmRNAによるトランス・トランスレーションが存在する。本研究では、どのようにしてtmRNAが翻訳停滞リボソームを認識し、翻訳伸長中のリボソームと区別しているのが明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Ribosomes stalled at the 3' end of a truncated mRNA lacking a stop codon are rescued by trans-translation mediated by tmRNA and a partner protein SmpB. We revealed how tmRNA and SmpB preferentially recognize stalled ribosomes and not actively translating ones.

研究分野：生化学

キーワード：リボソーム tmRNA SmpB タンパク合成 トランスレーション 翻訳

1. 研究開始当初の背景

トランス・トランスレーションは、tRNA と mRNA の両方の機能を果たすキメラ分子 tmRNA によって、2 本の RNA 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。一連の反応は、停滞した翻訳を解消し、そこから生じる異常タンパク質を処理する真正細菌に普遍的に存在するタンパク質品質管理機構と解釈されている。近年では、ストレス応答、カタボライト抑制、アミノ酸代謝、胞子形成等の様々な細胞機能にも関与している。また病原菌の増殖やウイルスの宿主感染にも関与することが報告されている。本研究は、この変則的翻訳システムの分子メカニズムの解明を目指すものである。

2. 研究の目的

トランス・トランスレーションは、不完全な mRNA から生じる異常タンパク質に分解の目印(タグペプチド)を与え、停滞したリボソームの再利用を可能にし翻訳効率を高めるシステムである。その中心的な役割を果たす分子が tmRNA である。tmRNA は tRNA ドメインと mRNA ドメインを巧妙に協調させながら、既存の mRNA から翻訳を引き継ぐ。しかしながら、トランス・トランスレーションの詳細な分子メカニズムはわかっておらず、不明な点が多い。具体的には次のような点が挙げられる。どのようなメカニズムで tmRNA が停滞したリボソームを選択するのだろうか？翻訳因子 EF-Tu の GTP 加水分解は何が引き金となって起こるのか？tmRNA も tRNA と同じように A/T A/A A/P P/P P/E E という素過程を経て、リボソーム上を移動するのか？その際、tmRNA はどのように構造を変化させていくのか？既存の mRNA および tRNA はどの段階でリボソームから解離するのか？これらの疑問に答えるためには、トランス・トランスレーションの分子メカニズムの解明が必要である。

3. 研究の方法

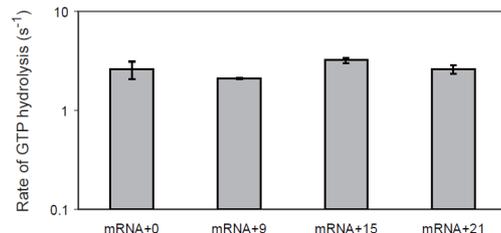
トランス・トランスレーションの各ステップにおける分子メカニズムを解明するために、まず精製した因子によるトランス・トランスレーション反応の各ステップの中間体を *in vitro* で形成させ、次に結合活性・GTP 加水分解活性・ペプチド転移活性を測定し、各中間体の評価およびその効率化を行う。複合体解析は生化学的手法を中心とし、複数の手法によって構造解析を行っていく。本研究室で既に確立されているタンパク質-RNA 間の相互作用解析だけでなく、タンパク質-タンパク質間の相互作用解析を視野に入れて、部位特異的クロスリンク法の系の確立を目指す。また蛍光

標識した SmpB を用いた一分子蛍光分析によって、各ステップにおける SmpB の蛍光強度および偏光解消を測定し、動的構造変化を調べる。

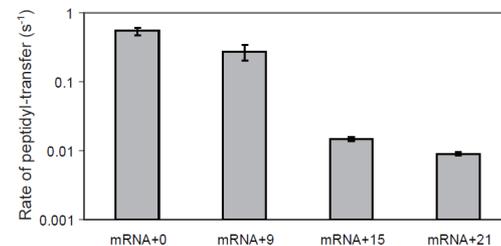
4. 研究成果

従来の *in vitro* トランス・トランスレーション系は、翻訳とトランス・トランスレーションがカップルしていたため、後者だけを調べることが事実上できなかった。そこで fMet-tRNA を用いた *in vitro* トランス・トランスレーション系を立ち上げた。薄層クロマトグラフィによって Met-tRNA のホルミル化を、限外濾過によってリボソームへの結合活性を測定した。前者の反応は 90%以上の効率でホルミル化されており、今後の複合体形成を行う上で十分な収量であると考えられる。リボソーム結合活性については、反応条件の最適化によって約 99%まで効率をあげることに成功した。

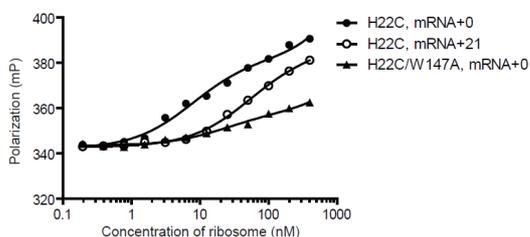
この系を用いることで、tmRNA/SmpB/EF-Tu/GTP 複合体による GTP 加水分解活性を測定することが可能になった。四者複合体がどのようなリボソームに対して働くか明らかにするために、用いる mRNA の種類を変えることで様々な翻訳停滞リボソームを *in vitro* で作製した。これらのリボソームに対してクエンチフロー法による GTP 加水分解活性の速度論解析を行った。その結果、mRNA の 3' 末端の長さに関係なく GTP 加水分解の速度定数は一定であった。



一方、ペプチド転移反応の速度を求めたところ、速度定数は mRNA の 3' 末端の長さに大きく依存した。



次に蛍光偏光解析を行い、リボソーム結合活性を評価した。その結果、mRNA の 3' 末端が短いリボソームに対して、蛍光標識した SmpB 複合体は高いアフィニティを示したのに対し、3' 末端が長いリボソームに対しては結合活性の低下が見られた。



これらの結果から、「tmRNA/SmpB/EF-Tu/GTP 複合体はトランス・トランスレーションの初期段階、すなわち解離・会合の段階ではリボソームの状態を見分けていない」と考えられる。tmRNA/SmpB 複合体はリボソームに入ってきて GTP 加水分解を行った後に mRNA の 3' 末端の状態を認識し、3' 末端が存在する場合はリボソームから解離していく、という新しいモデルを示唆するものである。

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7件)

1. Himeno H, Nameki N, Kurita D, Muto A, Abo T. Ribosome rescue systems in bacteria. *Biochimie*. 査読有, 1-11, 2014
2. Kurita D, Chadani Y, Muto A, Abo T, Himeno H. ArfA recognizes the lack of mRNA in the mRNA channel after RF2 binding for ribosome rescue. *Nucleic Acids Research*. 査読有, 42, 13339-13352, 2014
3. Kurita D, Miller M, Muto A, Buskirk A, Himeno H. Rejection of tmRNA·SmpB after GTP hydrolysis by EF-Tu on ribosomes stalled on intact mRNA. *RNA*, 査読有, 20, 1706-1714, 2014
4. Himeno H, Kurita D, Muto A. tmRNA-mediated trans-translation as the major ribosome rescue system in a bacterial cell. *Frontiers in Genetics*. 査読有, 5, 66, 2014
5. Himeno H, Kurita D, Muto A. Mechanism of trans-translation revealed by in vitro studies. *Frontiers in*

Microbiology. 査読有, 5, 65, 2014

6. 姫野 依太、栗田大輔、武藤 昱 2 つの機能を有する tmRNA による細菌の翻訳停滞解消システム、*実験医学*, 査読無, 31 巻・7号、54-60、2013
7. Kurita D, Muto A, Himeno H. In vitro trans-translation assays. *Methods in Molecular Biology*, 査読有, 905, 311-325, 2012

[学会発表](計7件)

1. 栗田大輔、武藤 昱、阿保達彦、姫野 依太 ArfA と RF2 による翻訳停滞リボソームの解消機構の解明 第3回 Ribosome meeting、宮崎、2015年3月(口頭発表)
2. 後藤史門、長谷要一、菊地岳志、栗田大輔、武藤 昱、竹本千重、横山茂之、Connell S, Fucini P, 姫野 依太 RsgA(リボソーム小サブユニット依存GTP加水分解酵素)の機能およびリボソームとの相互作用 第15回 RNA ミーティング、愛媛、2013年7月(ポスター発表)
3. Kurita D, Miller MR, Muto A, Buskirk AR, Himeno H. Recognition of mRNA length on the ribosome by tmRNA and SmpB. Ribosomes conference 2013, Napa Valley, USA, Jul. 2013. (ポスター発表)
4. 栗田大輔、Mickey Miller、武藤 昱、Allen Buskirk、姫野 依太 tmRNA/SmpB による停滞したリボソームの認識機構 第2回 Ribosome meeting、東京、2013年3月(ポスター発表)
5. 高田一馬、栗田大輔、直枝智恵子、横川隆志、川添将仁、武藤 昱、横山茂之、姫野 依太、竹本千重 The first translocation in trans-translation. 第14回 RNA ミーティング、仙台、2012年7月(ポスター発表)
6. Himeno H, Kurita D, Muto A. Molecular mechanism of trans-translation

mediated by tmRNA/SmpB. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, Japan, Sep. 2011 (口頭発表)

7. Kurita D, Hattori Y, Muto A, Himeno H. Molecular mechanism of the early stages of trans-translation by tmRNA/SmpB. 16th Annual meeting of the RNA society, Kyoto, Japan, Jun. 2011 (ポスター発表)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗田 大輔 (Kurita Daisuke)
弘前大学・農学生命科学部・助教
研究者番号：60552651