

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24657114

研究課題名(和文)新しいtRNA様低分子RNAの機能解析

研究課題名(英文)Function of a novel tRNA-like small RNA

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：大腸菌ゲノムに高度に保存されているtRNA様配列を発見し、その配列を含む遺伝子とその産物を解析した。その結果、その配列はtRNA様低分子RNAではなく、短いペプチドをコードする遺伝子(txpA)の一部であることが判明した。その遺伝子欠失株と野生株の増殖を種々の条件下で培養比較すると、欠失株では30SリボソームのA部位に特異的に働く抗生物質(ストレプトマイシン、カナマイシン等)への感受性が高くなることがわかり、翻訳過程に何らかの関与をしていることが示された。

研究成果の概要(英文)：We have found a tRNA-like sequence, which is highly conserved in the genomes of all the strains of Escherichia coli. Experiments to see the product of the sequence revealed that this is a part of a gene encoding a short protein. This is the first discovery of the bacteria gene including tRNA-like sequence.

We have prepared the mutant strain lacking the tRNA-like sequence, and the growth of the deletion mutant was compared with the wild-type strain under various culture conditions. The results showed that the deletion mutant cells are more sensitive to several antibiotics, such as streptomycin, kanamycin etc., which specifically interact with A-site of 30S ribosome, suggesting that the gene product is somehow involved in the translation process in the cell.

研究分野：分子遺伝学

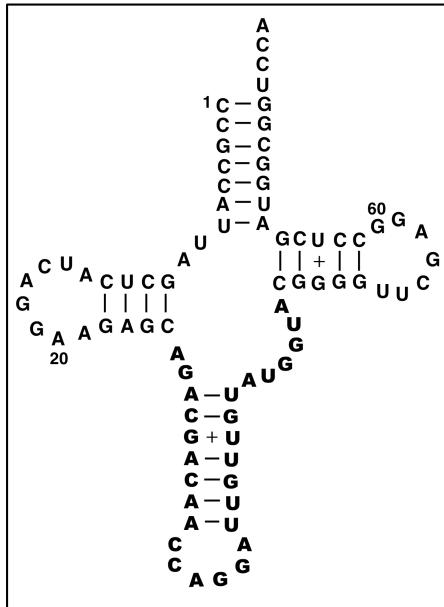
キーワード：tRNA mRNA small RNA E. coli translation transcription

1. 研究開始当初の背景

tRNA は進化的にもっとも古い分子と考えられており、生物のゲノム中には tRNA 遺伝子を起源とする配列が多数存在する。既に tRNA 様配列が遺伝子発現や DNA 複製に関与している例が知られており、また、tRNA 様配列を含む新しい低分子 RNA も見つかっている。申請者らは tRNA 遺伝子のデータベースを作成する過程で、多くの tRNA 様配列を見つけた。多くは偽遺伝子と考えられるが、中には種間や株間でよく保存されている配列が見つかる。それらに注目して、tRNA を起源とする新しい RNA やタンパク遺伝子を見つけ出そうと試みた。

2. 研究の目的

本研究はすべての大腸菌株に広く保存されている tRNA 様配列の発見を出发点として、その配列を含む遺伝子の同定とその機能を明らかにする事を目的とした。先ず、目的の tRNA 様配列(txRNA と仮称)が細胞中で発現しているかを転写レベル確かめるため、その産物を検出する。次に産物が低分子 RNA であるか、または mRNA の一部または発現調節部位に存在するかを明らかにする。発現が確認できれば、遺伝子の変異、欠損株を作成し、その影響を in vivo, in vitro で調べることにより、その機能を追求する。



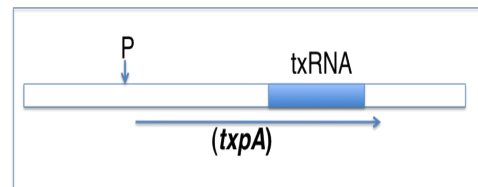
3. 研究の方法

(1) 分子遺伝学的方法：先ず txRNA 配列を欠失させた変異株(Δ tx 株)を作成し、その特性を増殖、ストレス、抗生物質等の条件下で調べる。また当該遺伝子の過剰生産株を作成する。機能が判明すれば、遺伝子の様々な部位での変異を作成し、機能構造を明らかにする。
 (2) 生化学的方法：先ずノーザン解析で、この配列が低分子 RNA をコードするか、mRNA をコードする川調べ、結果によって次の解析につなげる。
 機能未知の遺伝子なので、その機能解明のた

め遺伝学的手法と生化学的手法を臨機応変に使う予定であった。

4. 研究成果

(1) txRNA 配列は mRNA の一部である：目的の tRNA 様配列は O157 株等の病原大腸菌、および病原ファージに特異的に存在するアルギニン tRNA(CGC)と高い類似性を示す。当初、この配列は新しい tRNA 様配列を持った低分子 RNA であろうと予想して実験を行ったが、結果は予想に反して短いペプチドをコードする mRNA の一部だとの結果を得た。その根拠は txRNA の逆配列を probe としたノーザン解析の結果、転写産物はその配列を含む約 200 塩基長であり、その 5'端は txRNA 配列 5'側上流約 100 塩基対上流のプロモーター配列下流の A(TG)である。プロモーター下流に lacZ 遺伝子をつなぎ、翻訳活性を見たところ、翻訳が 5'端 ATG で開始していることを確かめた。以上の結果と前後の配列から、txRNA 配列はペプチドをコードする mRNA の一部であり、その mRNA は leader-less であることが証明された。tRNA 様配列を丸ごと含む mRNA の発見はこれが最初であり、この遺伝子を txpA と名付けた。



(2) TxpA は翻訳過程に關与する：txRNA 配列を欠損した変異株(Δ tx 株)を作成し、野生株と種々の条件下で培養し、その増殖速度を測定した。欠損株は野生株と比較して通常の生育条件では増殖に変化は見られなかった。とくに種々のストレス下(高温ショック、低温ショック、高塩ショック、アミノ酸飢餓など)での増殖、各種抗生物質に対する抵抗性の度合いを網羅的に解析した。その結果、リボソーム上でタンパク合成を阻害することが知られている数種の抗生物質にたいする感受性が欠損株では明らかに増加する(抵抗性が低下する)ことが見つかった。すなわち、野生株で増殖阻害が起きる濃度より低い濃度において、増殖速度の差が見られる。それらはストレプトマイシン(Sm)、カナマイシン(Km)、スペクチノマイシン(Spc)などで、いずれも 30S リボソームの A-site に結合することが知られている。一方、50S リボソーム上に結合する抗生物質(クロラムフェニコール(Cm)やエリスロマイシン(Er))に対しては感受性に変化はない。また転写過程を阻害するリファンピシン(Rf)や DNA 複製を阻害する抗生物質に対しても増殖速度の変化は見られない。これらの結果から、TxpA タンパクは翻訳過程において、30S リボソ

ームの A-site 近傍を標的とした何らかの作用を持つことが強く示唆された。TpxA は発現量が極めて低いタンパク質で、発現量の多いリボソーム粒子に結合して作用するとは考えにくく、何らかの触媒的な作用(化学修飾等)に関与しているものと思はれる。より詳細な機能を知るために、現在、変異株(Δ tx 株)から synthetic-lethal 株の単離を試みている。それはこの変異株にもう一つ別の変異を加えると増殖阻害が起きる変異株で、その変異遺伝子が同定できれば、TpxA 機能解明に大きなヒントが得られると予想される。

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 8 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. Taniguchi T, Miyauchi K, Nakane D, Miyata M, Muto A, Nishimura S, Suzuki T. Decoding system for the AUA codon by tRNA^{Ile} with the UAU anticodon in *Mycoplasma mobile*. *Nucleic Acids Research*. 査読有, 41, 2621-2631, 2013
7. 姫野 俵太, 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
 8. 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 俵太 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 俵太 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 俵太 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 俵太, 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)

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：
出願年月日：
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 昱 (Akira Muto)
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

牛田 千里 (Chisato Ushida)
弘前大学・農学生命科学部・准教授
研究者番号：50250593

(3)連携研究者

姫野 俵太 (Hyouta Himeno)
弘前大学・農学生命科学部・教授