

機関番号：11101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21880009

研究課題名（和文）トランス翻訳の分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）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

研究成果の概要（和文）：トランス翻訳反応の初期段階における反応中間体を *in vitro* で形成するための系の確立を行った。この系を用いて、トランス翻訳反応の主役である tmRNA/SmpB の機能を明らかにした。特に SmpB の C 末端ドメインに着目し、このドメインが tmRNA のリボソーム A サイトへの収容において重要であることを示し、この際に重要な役割を果たす SmpB 上の残基を特定した。

研究成果の概要（英文）：To reveal the molecular mechanism of trans-translation, we developed *in vitro* trans-translation system using purified factors. Using this system, we showed that the C-terminal domain of SmpB plays a role in accommodation of tmRNA into the ribosomal A-site.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：農芸化学 応用生物化学

キーワード：tmRNA, SmpB, リボソーム、トランス翻訳

1. 研究開始当初の背景

これまでの研究ではトランス翻訳反応の初期段階における解析が十分に行われておらず、各因子がどのように相互作用しているのか不明であった。通常の翻訳では、リボソーム上の A サイト、P サイト、E サイトを、tRNA が A/T→A/A→A/P→P/P→P/E→E と動くのに対して、mRNA は引っ張られるように 3 塩基ずつ動く。トランス翻訳では、tRNA の 5 倍の大きさの tmRNA がどのようにしてリボソーム上を動いていくのだろうか。通常の翻訳の分子メカニズムの解明が進むにつれ、トランス翻訳の謎は深まる

ばかりである。

2. 研究の目的

トランス翻訳は、情報分子 mRNA と情報を読み取る分子 tRNA の両方の機能を果たすキメラ分子 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。一連の反応は「何らかの原因で滞ってしまった翻訳を解消し、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

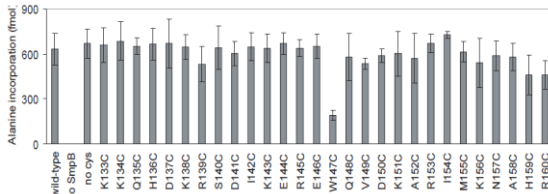
的な品質管理システム」と解釈されるが、それに加えて、カタボライト抑制、アミノ酸代謝、細胞分化、ストレス応答、胞子形成等の様々な細胞機能にも関与している。本研究は、この変則的翻訳システムの分子メカニズムの解明を目指すものである。

3. 研究の方法

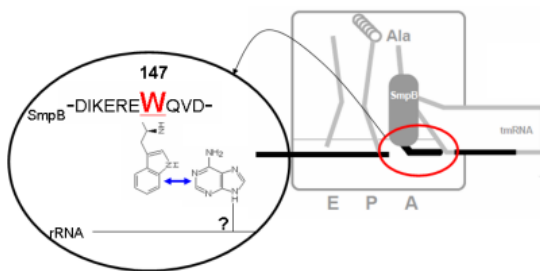
精製した因子を用いて *in vitro* でトランス翻訳反応中間体を形成させ、ペプチド転移反応活性、翻訳因子 EF-Tu による GTP 加水分解活性、tmRNA および SmpB のリボソームへの結合活性を測定した。得られた複合体に対して、部位特異的ラジカルプロービング法および部位特異的クロスリンク法により複合体の解析を行った。

4. 研究成果

In vitro トランス翻訳系を用いて、SmpB の C 末端ドメインが tmRNA の A サイトへの収容に重要であることを明らかにした。この際、C 末端ドメインの 147 番目のトリプトファンが特に重要であることを特定した。

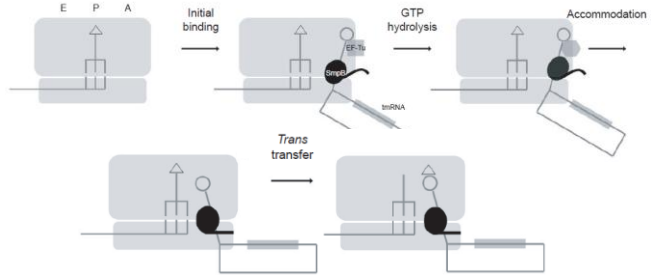


またこの部位に変異を入れても、EF-Tu による GTP 加水分解活性には影響しないことを確認している。興味深いことに、トリプトファン残基からフェニルアラニン残基に置換したところ、ペプチド転移反応の大きな活性の低下は確認されなかった。この結果はトリプトファン残基がリボソームの塩基とスタッキングによって相互作用している可能性を示唆している。

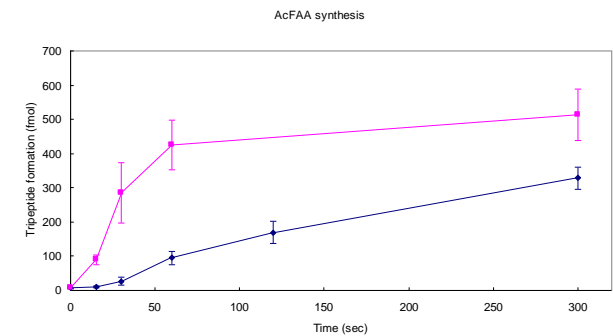


さらに C 末端ドメインについて、合成ペプチドを用いてペプチド転移反応、GTP 加水分解反応における影響を調べ、トリプトファン残基の重要性を確認した。さらに、この合成ペプチドとリボソームの複合体について 1 分子蛍光分析システムによって調べたところ、結

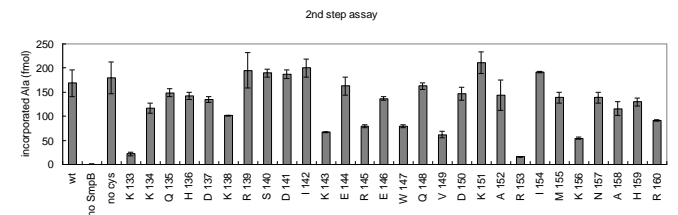
合にはトリプトファン残基が重要であることを明らかにした。これまでの結果から、SmpB の C 末端は GTP 加水分解には関与せず、その後の A サイトへの収容の際に重要な役割を果たしていると考えられる。



tmRNA/SmpB は A サイトに入った後にペプチドを受け取り、A サイトから P サイトへトランスロケーションすると考えられる。そこでトランスロケーション中間体を得るために、*in vitro* トランス・トランスレーションの系を用いて、複合体形成の条件検討を行った。その結果、ペプチド転移反応活性が認められた複合体の約 30% についてトランスロケーション活性が確認できた。通常の翻訳において、tRNA ではトランスロケーションの際に翻訳因子 EF-G を必要とする。そこで tmRNA/SmpB のトランスロケーションも EF-G によって促進されるか調べたところ、EF-G 存在下で効率的にトランスロケーションが起きることを明らかにした。



また SmpB 変異体のトランスロケーションにおける影響を調べたところ、いくつかの変異体で活性に影響することが確認された。



また SmpB のシステイン置換変異体を用いて、部位特異的クロスリンク法の系の確立を行った。条件検討の結果、数種類の変異体でリボソームタンパク質とクロスリンクしていることをウェスタンブロッティングによって確認できた。今後、このタンパク質をさらに LC/MS を用いて確認を行っていく必要がある。また様々なトランス翻訳中間体に対してこの手法を適用するには、クロスリンク産物の量的な問題があり、今後検討していく必要がある。

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 6 件)

- ① Kurita D, Muto A, Himeno H. tRNA/mRNA mimicry by tmRNA and SmpB in trans-translation. *Journal of Nucleic Acids*, 2011
- ② Himeno H, Kurita D, Muto, A.: Trans-translation by tmRNA and SmpB: a bacterial quality control system of translation. *Advances in Genetics Research*, Nova Science Publishers Inc., 2010
- ③ 姫野俵太、栗田大輔、武藤昱 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)、共立出版、2201-2206. 2010
- ④ Kurita D, Muto A, Himeno H. Role of the C-terminal tail of SmpB in the early stage of trans-translation. *RNA*, 5, 980-990. 2010
- ⑤ Une M, Kurita D, Muto A, Himeno H. Trans-translation by tmRNA and SmpB. *Nucleic Acids Symp Ser.* 53, 305-306. 2009
- ⑥ 姫野俵太、栗田大輔、武藤昱 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、共立出版、2201-2206. 2009

[学会発表] (計 14 件)

- ① 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
- ② 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, Jun. 2011
- ③ 姫野俵太、栗田大輔、宇根理高、武藤昱 tRNA/mRNA ハイブリッドと tRNA/mRNA 擬態タ

ンパク質による trans-translation. 日本分子生物学会、神戸、2010 年 12 月

- ④ Kurita D, Une M, Muto A, Himeno H. Molecular mechanism of the early stage of trans-translation. 7th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Yokohama, Japan, Nov. 2010
- ⑤ Kurita D, Muto A, Himeno H. Trans-translation by tmRNA/SmpB. The 3rd International Symposium on Protein Community, Nara, Japan, Sep. 2010
- ⑥ 栗田大輔、武藤昱、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 年 9 月
- ⑦ 栗田大輔、宇根理高、武藤昱、姫野俵太 トランス・トランスレーションの初期過程における SmpB C 末端 tail の働き 第 12 回 RNA ミーティング、東京、2010 年 7 月
- ⑧ 竹本千重、Sean R. Connell、長谷要一、直枝智恵子、王宏飛、上西達也、菊地岳志、平田侑也、栗田大輔、武藤昱、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 年 7 月
- ⑨ Kurita D, Une M, Muto A, Himeno H. Molecular mimicry by tmRNA/SmpB during trans-translation. Ribosomes 2010 meeting, Orvieto, Italy, May, 2010
- ⑩ Takemoto C, Connell SR, 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, May, 2010
- ⑪ Kurita D, Une M, Muto A, Himeno H. Molecular mimicry of tRNA/mRNA during trans-translation. ASBMB 2010 Annual meeting, Anaheim, USA. Apr. 2010
- ⑫ Kurita D, Une M, Muto A, Himeno H. Role of the C-terminal tail of SmpB during trans-translation. 23rd tRNA workshop, Aveiro, Portugal, Jan. 2010
- ⑬ Une M, Kurita D, Muto A, Himeno H. Trans-translation by tmRNA and SmpB. 6th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Takayama, Gifu, Japan, Sep. 2009
- ⑭ 菊地岳志、平田侑也、栗田大輔、長谷要一、木村天胤、武藤昱、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 年 7 月

[図書] (計 1 件)

- ① Kurita D, Muto A, Himeno H. In vitro trans-translation assays. *Methods in*

Molecular Biology, In press

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

なし。

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・研究員

研究者番号：60552651