

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23380045

研究課題名(和文)トランス翻訳の分子機構と生理機能

研究課題名(英文)Molecular mechanism and physiological roles of trans-translation

研究代表者

武藤 あきら (Akira, Muto)

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) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：トランス翻訳は、mRNAとtRNAの両機能を持つキメラ分子tmRNAの働きによる変則的翻訳機構で、真性細菌に普遍的に存在する。本研究では反応に関わる単離した成分のみによる試験管内トランス翻訳系を用いて、反応各ステップの中間体を作成し、そこでのtmRNA、SmpB(トランス翻訳因子)のリボソームとの相互作用の位置をprobing法やFRET測定を用いて決定し、反応過程における各分子の動きを明らかにした。またtmRNA/SmpB/EF-Tu/GTP複合体はリボソーム入り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ことを示した。

研究成果の概要(英文)：tmRNA, which functions as both tRNA and mRNA, is involved in an abnormal translation process, trans-translation, to rescue stalled ribosomes in eubacterial cells. We have developed an in vitro system to investigate the molecular mechanism of trans-translation using purified necessary components for the reaction. Using this system, we determined the relative positions of tRNA/smpB on the ribosome in each steps of trans-translation process by hydroxyl-radical probing experiment and FRET measurements. We also indicated that tmRNA/SmpB/EF-Tu/GTP complex recognizes the ribosomal state whether the 3'end of mRNA remains on the A-site of ribosome, and when the 3'end of mRNA remains on A-site, the complex releases ribosomes after GTP hydrolysis.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：trans-translation tmRNA tRNA mRNA ribosome EF-Tu SmpB ribosome rescue

1. 研究開始当初の背景

トランス翻訳は、tRNA と mRNA の両方の機能を果たすキメラ分子 tmRNA によって、結合タンパク SmpB との複合体として、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。またトランス翻訳の上記以外の生理的働きについても解析を行う。

2. 研究の目的

トランス翻訳は、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ことが知られている。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、トランス翻訳の分子メカニズムの解明が必要である。

また、我々は tmRNA 本来の機能では説明のつかない表現型をもつ変異体を見つけている。それらの解析を通して、新しい機能発見に結びつけたい。

3. 研究の方法

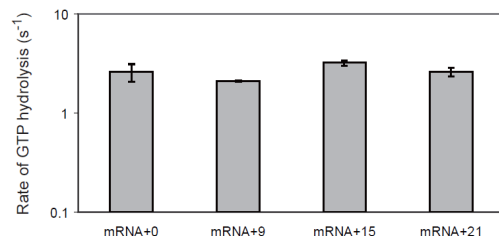
トランス翻訳の各ステップにおける分子メカニズムを解明するために、まず精製した因子によるトランス翻訳反応の各ステップの中間体を *in vitro* で形成させ、次に結合活性・GTP 加水分解活性・ペプチド転移活性を測定し、各中間体の評価およびその効率化を行う。複合体解析は生化学的手法を中心とし、複数の手法によって構造解析を行っていく。本研究室で既に確立されているタンパク質-RNA 間の相互作用解析

だけではなく、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

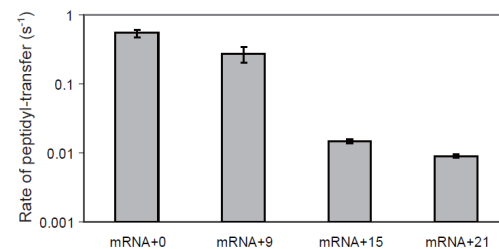
精製した成分のみによる *in vitro* トランス翻訳系を用いて、反応過程の各ステップでの tmRNA/SmpB のリボソーム上での相互位置を解析したところ、SmpB 本体(N端側)は tmRNA の昼間部と結合し、先ず 30S リボソーム A-site の本来 tRNA のアンチコドンアームが結合する位置にあり、SmpB の C 端の尻尾が 30S リボソームの mRNA-path に位置しており、次のステップで P-site 側に移ることを明らかにした。

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 複合体はトランス翻訳の初期段階、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った。

枯草菌でtmRNAが存在する時のみ温度感受性を示す変異体を単離してその変異遺伝子を探索したところ ser-tRNA synthetase(SerS)であることを見つけた。温度感受性の原因を調べるため、その回復株を複数株とり、その遺伝子同定を進めている。

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)

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

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

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