

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570008

研究課題名(和文) 終止コドン非依存的翻訳終結の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of stop codon-independent translation termination

研究代表者

阿保 達彦 (ABO, Tatsuhiko)

岡山大学・自然科学研究科・准教授

研究者番号：90303601

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：大腸菌リボソーム解放因子ArfAによるリボソームの解放に、クラスI終結因子RF2が必須であることを明らかにした。また、ArfAの一時構造上、特徴的にリシン残基が多く見られる領域の正荷電がArfAのリボソームとの結合、リボソームの解放に重要であることを示した。さらに、ラジカルプロービング法によりArfAとリボソームとの結合様式を明らかにし、ArfAによるリボソーム解放の分子機構の解明の端緒とした。

研究成果の概要(英文)：I have shown that, 1) ArfA cooperates with RF2 to release the ribosomes stalled at the end of non-stop mRNAs, 2) overall positive charge of the lysine-rich region of ArfA is important for its binding with ribosome, 3) ArfA binds to the rRNA regions corresponding to the position of mRNA path and decoding center. These findings may help understanding further how ArfA releases the ribosome stalled at the end of non-stop mRNAs.

研究分野：分子生物学

キーワード：ArfA リボソーム 翻訳 大腸菌 バクテリア

1. 研究開始当初の背景

終止コドンを持たない mRNA (non-stop mRNA) の末端で立ち往生したリボソームの解放機構としてバクテリアの trans-translation が発見されてから 10 年以上たち、その重要性が認識されているにもかかわらず、リボソーム解放の生理学的意義に関して不明な点が残されていた。申請者は trans-translation を行えない大腸菌変異株の生育に必要とされる因子の探索を行い、大腸菌リボソーム解放因子 ArfA を見出した。trans-translation を行えない大腸菌変異株は、ArfA を失うと生存出来ず、リボソーム解放の生理学的意義が証明できた。しかし、ArfA によるリボソーム解放の分子機構は不明であった。

2. 研究の目的

ArfA によるリボソーム解放の分子機構の解明という最終目標を目指し、その端緒としてリボソーム解放に必要な条件や因子の探索、ArfA とリボソームの相互作用の様式の解明を試みた。

3. 研究の方法

以下の二つの観点から解析を行った。

(1) in vitro でのリボソーム解放評価系を確立し、それをを用いて ArfA によるリボソーム解放に必要な条件や因子を同定した。具体的には大腸菌抽出液中で人工的に生成した non-stop mRNA を翻訳させ、その末端にリボソームが立ち往生する状況を再現し、そこに ArfA を加えてリボソームの挙動、翻訳中間産物の挙動を解析し、リボソーム解放活性を評価した。さらに、精製した翻訳因子のみからなる in vitro 翻訳系、PURE System を利用して同様の解析を行った。後者の系では、一つ一つの因子の有無がリボソーム解放活性に与える絵依拠を詳細に評価することが可能であった。

(2) ArfA とリボソームとの相互作用の様式を解明するために、ArfA にアミノ酸置換変異を導入した際のリボソーム解放活性とリボソームとの相互作用を調べる、ケミカルプロービング法でリボソームと ArfA の結合様式を調べる、などの解析を行った。では ArfA の全領域にわたってアミノ酸残基をアラニンに置換する、いわゆるアラニンスキッピングを行い、また、特に注目した部位・領域に関してはより多様なアミノ酸への置換を行い、リボソーム解放活性とリボソームとの結合を解析した。ではケミカルプロービング法に必要とされるシステイン置換変異体の、導入したシステイン残基が rRNA のどの部分に近接しているかを解析した。

4. 研究成果

(1) ArfA によるリボソーム解放にはクラス I 翻訳終結因子のひとつ、RF2 が必須であることを明らかにした。その際、クラス I 翻訳終結因子に共通に見られ、P サイトにおけるペプチジル tRNA の加水分解に直接関与するとされるいわゆる GGQ モチーフが重要な役割を果たすことを見出した。ArfA と RF2 は直接には結合しないことから、おそらくは ArfA が non-stop mRNA の末端で立ち往生したリボソームを認識し、それに結合することで RF2 をリクルートし、RF2 の GGQ モチーフによるペプチジル tRNA の加水分解を引き起こすことでリボソームを解放するというモデルを提唱した。RF1 は ArfA のリボソーム解放活性に関与しなかった。また、この RF2 の特異性には、RF の認識する終止コドンの種類は関係なく、より全体的な両者の立体構造の違いが関与していることが示唆された。興味深いことに、この ArfA と RF2 によるリボソーム解放は、in vitro では tRNA 分子の存在によって亢進した。その理由は現在解析中である。

(2) ArfA の一時構造上リシンを多く含む領域の正電荷がリボソームとの結合に重要であることを示した。また、リボソームとの結合には大きな影響を与えないもののリボソーム解放活性を大きく減ずる変異体が存在し、その置換部位が ArfA の N 末端側に多く見られることを見出した。これは、ArfA が機能上リボソームとの結合と、それ以外の役割 (RF2 のリクルート、立ち往生したリボソームと通常の翻訳中のリボソームの区別など) の二つ (またはそれ以上) の領域に分けて考えられることを示唆する結果であった。

(3) ケミカルプロービング法を用いて ArfA をリボソームの結合様式を解析した。non-stop mRNA の末端でリボソームが立ち往生している状況を in vitro で人工的に再構成し、そこにシステイン残基を一つだけ導入した ArfA を作用させ、そのシステイン残基が rRNA 上のどの部分に近接しているかを、RF2 の存在下、非存在下で解析した。その結果、ArfA がリボソームの mRNA path に相当する領域と decoding center に相当する領域に結合することを示す結果が得られた。また、ArfA と RF2 が直接は相互作用せず、リボソームを仲介して相互に機能していることを示した。

以上の結果から、ArfA によるリボソーム解放の分子機構として以下のような仮説を立てた。すなわち、ArfA は non-stop mRNA の末端で立ち往生したリボソームを何らかの方法で認識し、RF2 をリクルートする。リクルートされた RF2 は GGQ モチーフに依存してペプ

チジル tRNA を加水分解し、翻訳を終止コドン非依存的に終結させる。一連の過程で立ち往生したりボソームの認識、リボソームとの結合、RF2 のリクルートにはそれぞれ ArfA の異なる部位が関与する。

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3件)

Daisuke Kurita, Yuhei Chadani, Akira Muto, Tatsuhiko Abo and Hyouta Himeno. ArfA recognizes the lack of mRNA in the mRNA channel after RF2 binding for ribosome rescue. *Nucleic Acids Research*, **42**: 13339-13352 (2014)
doi: 10.1093/nar/gku1069

Tatsuhiko Abo and Yuhei Chadani. The fail-safe system to rescue the stalled ribosomes in *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, **5**:156
doi:10.3389/fmicb.2014.00156 (2014) (査読付 review article)

Yuhei Chadani, Koreaki Ito, Kazuhiro Kutsukake and Tatsuhiko Abo. ArfA recruits release factor 2 to rescue stalled ribosomes by peptidyl-tRNA hydrolysis in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, **86**: 37-50 (2012)
doi:10.1111/j.1365-2958.2012.08190.x

[学会発表](計7件)

阿保達彦
大腸菌 ArfA タンパク質アミノ酸置換変異体とリボソームとの相互作用
第3回リボソームミーティング(宮崎市)
2015年3月17日

森木省伍, 花房賢, 天野剛志, 廣明秀一, 阿保達彦
大腸菌リボソーム解放因子 ArfA アミノ酸置換変異体の解析
日本遺伝学会第86回大会(長浜市)
2014年9月18日

阿保達彦, 茶谷悠平, 柴谷知宏, 大川成美
大腸菌 ArfA タンパク質のリボソーム結合能
第16回日本 RNA 学会年会(名古屋市)
2014年7月23日

阿保達彦, 茶谷悠平, 沓掛和弘
大腸菌 ArfA によるリボソームレスキュー
日本遺伝学会第85回大会(横浜市)

2013年9月19日

阿保達彦, 岸本真幸, 茶谷悠平, Pajak Aleksandra
変異導入による大腸菌 ArfA タンパク質の解析
第15回日本 RNA 学会年会(松山市)
2013年7月26日

Yuhei Chadani, Katsuhiko Ono, Emi Matsumoto, Masayuki Kishimoto, Kosuke Nishioka, Kazuya Nishigaki, Yuma Oka, Junki Morikawa and Tatsuhiko Abo
ArfA-mediated ribosome rescue in *Escherichia coli*
Symposium on Interdisciplinary Researches in Okayama(岡山市)
2012年11月20日

岸本真幸, 茶谷悠平, 森川淳基, 阿保達彦
アラニンスキャニングによる大腸菌 ArfA の機能構造解析
日本遺伝学会第84回大会(福岡市)
2012年9月26日

[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
<http://www.biol.okayama-u.ac.jp/kutukake/nadyn.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者
阿保達彦(Tatsuhiko Abo)

岡山大学大学院自然科学研究科・准教授
研究者番号：90303601

(2)研究分担者
無し

(3)連携研究者
無し