

機関番号：11101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20380057

研究課題名（和文）トランス・トランスレーションの分子メカニズム

研究課題名（英文）Molecular Mechanism of *trans*-translation

研究代表者

姫野 俵太（HIMENO HYOUTA）

弘前大学・農学生命科学部・教授

研究者番号：80208785

研究成果の概要（和文）：

トランス・トランスレーションは、情報分子mRNAと情報を読みとる分子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。本研究は、我々が新しく提案した「tmRNA結合タンパク質SmpBがtRNAおよびmRNAを分子擬態する」という新しい概念に基づいて、この変則的翻訳システムの初期過程の分子メカニズムを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Trans-translation is an irregular translation system, in which tmRNA (transfer and messenger RNA) rescues the ribosome stalled at the 3' end of truncated mRNA lacking a termination codon to produce a chimeric polypeptide from two messages on truncated mRNA and tmRNA. It provides an incomplete nascent polypeptide from a truncated mRNA with a tag for degradation to promote degradation of truncated mRNA. This project revealed the molecular mechanism of the early stage of *trans*-translation based on our proposal that SmpB, a tmRNA binding protein, mimics both tRNA and mRNA.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2009年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2010年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

トランス・トランスレーションは、情報分子 mRNA と情報を読みとる分子 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。

2. 研究の目的

本研究は、我々が新しく提案した「tmRNA

結合タンパク質が tRNA および mRNA を分子擬態する」という新しい概念に基づいて、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ことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 翻訳因子(リボソーム、Phe-tRNA^{Phe}、mRNA、EF-Tu、EF-G)ならびにトランス・トランスレーション関連因子 (Ala-tmRNA、SmpB) を用いて、トランス・トランスレーションの各ステップにおける中間体の作成を試みた。

(2) SmpB に様々な変異を導入し、トランス・トランスレーションの第1ステップおよび第2ステップにおよぼす効果を調べた。

(3) SmpB に様々な変異を導入し、EF-Tu による GTP 加水分解活性におよぼす効果を調べた。

(4) SmpB の C 末端領域に相当するペプチドを合成し、ステップごとの反応に対する阻害効果を調べた

4. 研究成果

(1) 翻訳因子(リボソーム、Phe-tRNA^{Phe}、mRNA、EF-Tu、EF-G)ならびにトランス・トランスレーション関連因子 (Ala-tmRNA、SmpB) を用いて、トランス・トランスレーションの第1ステップ (Ala-tmRNA と SmpB が A 部位にあり、ペプチド転移直後の状態) および第2ステップ (Ala-tmRNA と SmpB が P 部位にあり、トランスロケーション直後の状態) における中間体の作成に成功した。

(2) SmpB の C 末端領域 (mRNA を分子擬態する部分) に様々な変異を導入し、ステップごとの反応速度に与える効果を解析した。C 末端領域を欠失させると、欠失させた長さに応じて第1ステップおよび第2ステップにおける反応速度がいずれも低下した。C 末端領域 (133-160) に1アミノ酸置換を導入したところ、147番目のトリプトファン残基を置換させると第1ステップにおける反応速度が著しく低下し、その一方で第1ステップにおける反応速度はほとんど低下しなかった。

(3) SmpB の C 末端領域 (mRNA を分子擬態する部分) に様々な変異を導入し、ステップごとの反応速度に与える効果を解析した。C 末端領域を欠失させると、欠失させた長さに応じて第1ステップおよび第2ステップにおける反応速度がいずれも低下した。C 末端領域 (133-160) に1アミノ酸置換を導入したところ、147番目のトリプトファン残基を置換させたときには第1ステップに

おける反応速度が著しく低下したが、EF-Tu による GTP 加水分解活性には影響を与えなかった。

(4) SmpB の C 末端領域に相当するペプチドを合成し、ステップごとの反応に対する阻害効果を調べたところ、第1ステップ全体に対しては阻害効果を示したが、EF-Tu による GTP 加水分解活性には影響を与えなかった。以上の結果は、「tmRNA 結合タンパク質が tRNA および mRNA を分子擬態する」という仮説を強く指示するものであった。

(5) C 末端領域 (mRNA を分子擬態する部分) を中心に SmpB の変異体を多数作成した。これまでの poly (Phe)あるいは poly (UUC) 依存のペプチド転移反応測定系に加えて、AcPhe-tRNA から AcPheAla-tRNA の生成反応を測定できる系を作成した。また、この反応の速度に与える効果を解析した。これらの変異体を用いて、EF-G 依存のトランスロケーションを解析したところ、トランスロケーションに特異的に影響を与えるいくつかの変異を明らかにした。

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 14 件)

- ① Kurita, D., Muto, A. & Himeno, H. tRNA/mRNA mimicry by tmRNA and SmpB in *trans*-translation. *Journal of Nucleic Acids*, **2011** (2011) Article ID 130581.
- ② Goto, S., Kato, S., Kimura, T., Muto, A. & Himeno, H. : RsgA releases RbfA from 30S ribosomal subunit during a late stage of ribosome biosynthesis. *EMBO Journal*, **30** (2011) 104-114.
- ③ Une, M., Kurita, D., Muto, A. & Himeno, H. : *Trans*-translation by tmRNA and SmpB. *Nucleic Acids Symposium Series*, **53** (2009) 305-306.
- ④ Hase, Y., Yokoyama, S., Kimura, T., Goto, S., Muto, A. & Himeno, H. : Physiological role of RsgA in ribosome biogenesis. *Nucleic Acids Symposium Series*, **53** (2009) 307-308.
- ⑤ Kurita, D., Muto, A. & Himeno, H. Role of the C-terminal tail of SmpB in the early stage of *trans*-translation. *RNA* **16** (2010) 980-990.
- ⑥ Hokii, Y., Sasano, Y., Sato, M., Sakamoto, H., Sakata, K., Shingai, R., Taneda, A., Oka, S., Himeno, H., Muto,

- A., Fujiwara, T., Ushida, C. A small nucleolar RNA functions in rRNA processing in *C. elegans*. *Nucleic Acids Research*, **38** (2010) 5909–5918.
- ⑦ Himeno, H.: Novel factor rescues ribosomes trapped on non-stop mRNAs. *Molecular Microbiology*, **78** (2010) 789–791.
- ⑧ Ujiiie, H., Matsutani, T., Tomatsu, H., Fujihara, A., Ushida, C., Miwa, Y., Fujita, Y., Himeno, H. & Muto, A.: *Trans*-translation is involved in the CcpA-dependent tagging and degradation of TreP in *Bacillus subtilis*. *Journal of Biochemistry*, **145** (2009) 59–66.
- ⑨ Hase, Y., Yokoyama, S., Muto, A. & Himeno, H. Removal of a ribosome small subunit-dependent GTPase confers salt-resistance on *Escherichia coli* cells. *RNA* **15** (2009) 1766–1774.
- ⑩ 姫野俵太、栗田大輔、武藤あきら:「2つの tRNA/mRNA ハイブリッド トランス・トランスレーション」、蛋白質核酸酵素増刊、**54** (16)、2201–2206 (2009)
- ⑪ 姫野俵太、武藤あきら:「トランストランスレーション」、蛋白質核酸酵素、**53**(8)、975、共立出版 (2008)
- ⑫ 栗田大輔、武藤あきら、姫野俵太:「mRNA を擬態するタンパク質」、化学と生物、**46**(7)、465–471 (2008)
- ⑬ Kimura, T., Takagi, K., Hirata, Y., Hase, Y., Muto, A. & Himeno, H.: Ribosome-small-subunit-dependent GTPase interacts with the tRNA binding sites on the ribosome. *Journal of Molecular Biology*, **381** (2008) 467–477.
- ⑭ Abe, T., Sakaki, K., Fujihara, A., Ujiiie, H., Ushida, C., Himeno, H., Sato, T. & Muto, A.: tmRNA-dependent *trans*-translation is required for sporulation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, **69** (2008) 1491–1498.
- [学会発表] (計 23 件)
- ① Hase, Y., Yokoyama, S., Muto, A., Himeno, H.: Removal of ribosome small subunit-dependent GTPase confers salt resistance on *Escherichia coli* cells. 4th International Congress on Stress Responses in Biology and Medicine. Sapporo, 2009.
- ② Kurita, D., Une, M., Muto, A., Himeno, H.: Role of the C-terminal tail of SmpB during *trans*-translation. 23rd tRNA Workshop. Aveiro, Portugal, 2010.
- ③ Kurita, D., Une, M., Muto, A., Himeno, H.: Molecular mimicry of tRNA/mRNA during *trans*-translation. ASBMB 2010 Annual Meeting, Anaheim, USA, 2010.
- ④ Takemoto, C., Connell, S.R., 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, 2010.
- ⑤ Kurita, D., Une, M., Muto, A., Himeno, H.: Molecular mimicry by tmRNA/SmpB during *trans*-translation. Ribosomes 2010 Meeting, Orvieto, Italy, 2010.
- ⑥ Ushida, C., Hokii, Y., Sasano, Y., Sato, M., Sakamoto, H., Himeno, H., Muto, A., Fujiwara, T.: The mutation of the *C. elegans* genomic locus encoding a snoRNA has a defect in the pre-rRNA processing. RNA2010, Fifteenth Annual Meeting of the RNA Society, Seattle, 2010.
- ⑦ Kurita, D., Une, M., Muto, A. & Himeno, H.: *Trans*-translation by tmRNA/SmpB. The 3rd International Symposium on Protein Community, Nara, 2010.
- ⑧ 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, 2010
- ⑨ 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初期過程における C 末端 tail の働き、第 12 回 RNA ミーティング (東京) 2010.
- ⑩ 竹本千重、Sean Connell、長谷要一、直枝智恵子、王宏飛、上西達也、菊池岳志、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.
- ⑪ 姫野俵太: tRNA と mRNA の両方の機能を持つ tmRNA、9 回新しい RNA/RNP を見つける会 (弘前)、2010
- ⑫ 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
- ⑬ 姫野俵太、栗田大輔、宇根理高、武藤 暎：
tRNA/mRNA ハイブリッドと tRNA/mRNA 擬態タンパク質による *trans*-translation、第 33 回日本分子生物学会 (神戸)、2010
- ⑭ Kurita, D., Konno, T., Takada, K., Muto, A., Himeno, H.：
Molecular mimicry of tRNA+mRNA during *trans*-translation. 13th Annual Meeting of the RNA Society (Berlin), 2008.
- ⑮ Une, M., Kurita, D., Muto, A., Himeno, H.：
Trans-translation by tmRNA and SmpB. The sixth International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (Takayama) 2009.
- ⑯ Hase, Y., Yokoyama, S., Kimura, T., Goto, S., Muto, A., Himeno, H.：
Physiological role of RsgA in ribosome biogenesis. The sixth International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (Takayama) 2009.
- ⑰ 長谷要一、横山晋一郎、武藤あきら、姫野俵太：
リボソーム小サブユニット依存 GTPase の欠損による塩ストレス耐性の獲得、日本農芸化学会 2009 年度大会 (福岡) 2009.
- ⑱ 長谷要一、横山晋一郎、武藤あきら、姫野俵太：
リボソーム小サブユニット依存 GTPase の欠損による塩ストレス耐性の獲得、第 11 回 RNA ミーティング (新潟) 2009.
- ⑲ 菊地岳志、平田侑也、栗田大輔、長谷要一、木村天胤、武藤あきら、姫野俵太：
部位特異的ヒドロキシラジカルプロベリングを用いた 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.
- ⑳ 高田一馬、直枝智恵子、川添将仁、横山茂之、姫野俵太、竹本千重：
tmRNA 機能解析のための無細胞翻訳実験系の構築、第 11 回 RNA ミーティング (新潟) 2009.
- 21 長谷要一・横山晋一郎・武藤あきら・姫野俵太：
リボソーム小サブユニット依存 GTPase RsgA 欠損による浸透圧耐性の獲得。第 10 回 RNA ミーティング (札幌)、2008.
- 22 栗田大輔・今野貴之・高田一馬・武藤 あきら・姫野俵太：
” tRNA+mRNA のキメラ RNA ” と ” tRNA+mRNA 擬態タンパク質 ” による *trans*-translation. 第 10 回 RNA

ミーティング (札幌)、2008.

- 23 氏家博美・松谷誠子・戸松恒・藤原愛・姫野俵太・武藤あきら：
枯草菌 tmRNA による *trans*-translation 反応のカタボライト抑制への関与。第 10 回 RNA ミーティング (札幌)、2008.

[図書] (計 6 件)

- ① 姫野俵太：
「窒素同化とアミノ酸代謝」、ベーシックマスター生化学 (大山隆監修、西川一八、清水光弘編)、オーム社、249-265、(2008)
- ② 姫野俵太、武藤あきら：
「トランスランスレーション」、キーワード：蛋白質の一生 (遠藤斗志也、小椋光、永田和宏、森和俊、田口英樹、吉田賢右編)、975、共立出版 (2008)
- ③ 渡辺公綱、鈴木勉、姫野俵太：
「翻訳」、改訂第 3 版分子生物学イラストレイテッド (田村隆明、山本雅編)、48-56、羊土社、(2009)
- ④ Himeno, H., Kurita, D. & Muto, A.：
Trans-translation by tmRNA and a protein mimicking tRNA and mRNA. In Toma E. Esterhouse & Lado B. Petrinis Eds., *Protein Biosynthesis*, pp69-107, Nova Science Publishers Inc (2009).
- ⑤ 姫野俵太、栗田大輔、武藤あきら：
「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)、2201-2206、共立出版 (2010)
- ⑥ 渡辺公綱、姫野俵太：
生命化学 II 第 2 版 - 遺伝子の働きとその応用 -、丸善 (2011).

[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〕

ホームページ等

<http://nature.cc.hirosaki-u.ac.jp/kohou2/public/oyo/h.himeno/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

姫野 俵太 (HIMENO HYOUTA)

弘前大学・農学生命科学部・教授

研究者番号：80208785

(2) 研究分担者

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