

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570205

研究課題名(和文) 翻訳が滞ったリボソームの t m R N A 非依存的な新規レスキュー機構の解析

研究課題名(英文) Functional analysis of a codon-independent release factor YaeJ

研究代表者

行木 信一 (Nameki, Nobukazu)

群馬大学・理工学研究院・准教授

研究者番号：80302959

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、翻訳停滞解消因子YaeJのリボソーム上での分子メカニズムを明らかにするために変異体解析を行った。その結果、リンカー領域 Arg105およびC末端領域 Arg118, Leu119, Lys122, Lys129, Arg132にそれぞれ変異を与えると、ペプチジルtRNA加水分解活性(PTH活性)が著しく低下することが明らかとなった。さらに、シヨ糖密度勾配法によって、これらの変異体はリボソームへの結合能が低下していることが示された。以上のことから、C末端領域に存在する限られた数のアミノ酸残基がリボソームと直接結合して、翻訳が滞ったリボソームのA-siteに入るモデルが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The YaeJ protein is a codon-independent release factor with peptidyl-tRNA hydrolysis (PTH) activity, and functions as a stalled-ribosome rescue factor in *Escherichia coli*. To identify residues required for YaeJ function, we performed mutational analysis for *in vitro* PTH activity towards rescue of ribosomes stalled on a nonstop mRNA, and for ribosome binding efficiency. We focused on residues conserved among bacterial YaeJ proteins. While no YaeJ-specific residues important for PTH activity occur in the structured GGQ domain, Arg118, Leu119, Lys122, Lys129, and Arg132 in the following C-terminal extension were required for PTH activity. All of these residues are completely conserved among bacteria. Single amino acid substitutions for each of these residues significantly decreased ribosome binding efficiency. These biochemical findings provide clues to understanding how YaeJ enters the A-site of stalled ribosomes.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：翻訳停滞解消因子 リボソームレスキュー

1. 研究開始当初の背景

細胞内では様々な理由により翻訳が滞る。例えば終止コドンを失うなどした不良 mRNA が生じた場合やマイナーコドンが続いたクラスター配列をもつ mRNA の場合、リボソームによる翻訳が滞ってしまい、結果としてポリソームのまま多くのリボソームをトラップした状態となる。これまでの知見では、この滞ったリボソームの解消(レスキュー)には、真正細菌では transfer-messenger RNA (tmRNA) という tRNA と mRNA の両方の機能を有した特徴的な低分子 RNA によって行われるとされてきた。tmRNA は、SmpB という蛋白質と複合体を形成して滞ったリボソームに tRNA として入り、変則的な翻訳 (*trans-translation*) を行うことで、(通常の終結過程を経て)滞った翻訳を解消する。その結果、開放されたリボソームは再利用される。生じた異常蛋白質は、C 末端に tmRNA 内の mRNA として機能する領域が翻訳される形で tag-peptide が付加されており、それが目印となって細胞内の ATP 依存性プロテアーゼで速やかに分解される。申請者らは、これまで tmRNA の *trans-translation* の分子メカニズムの研究を行ってきた (Nameki et al., J. Mol. Biol. 1999a, 1999b; Nucleic Acids Res. 1999; FEBS Lett. 2000, 2003)。

しかし、最近では大腸菌 tmRNA 欠損株においても、滞ったリボソームが効率よくレスキューされるといった結果が複数の実験から示されており、tmRNA 非依存的なリボソームレスキュー機構の存在が示唆されていた。申請者らは、この新規のリボソームレスキュー機構に直接に関与するのが、YaeJ 蛋白質であることを報告した (Handa, Inaho, and Nameki, Nucleic Acid Res. 2011)。この論文は、その originality と重要性を評価され “Featured Articles (the top 5% of NAR papers)” に選ばれている。

まず、申請者らは YaeJ 蛋白質 (140 残基) が翻訳終結因子 (RF; 365 残基) の触媒ドメインとほぼ相同な構造をしており、また tRNA の 3'-CCA 末端とポリペプチド鎖との結合を切断する活性部位配列 (特に重要な保存残基 Gly-Gly-Gln から GGQ モチーフとよばれる) を有していることを示した (Handa, Nameki et al., J. Mol. Biol. 2010)。

次に申請者らは、大腸菌無細胞蛋白質合成系を用いて、YaeJ 蛋白質が終止コドンをもたない mRNA (以下 nonstop mRNA) あるいはマイナーコドンクラスターをもつ mRNA が原因で滞ったリボソーム上のペプチジル tRNA を加水分解 (peptidyl-tRNA hydrolysis: 以下 PTH 反応) することで、リボソームをレスキューすることを示した。さらに、シヨ糖密度勾配遠心法を用いて YaeJ とリボソームとの相互作用を検出した。YaeJ は、70S リボソームとポリソーム画分に最も強く検出され、素通り画分にはまったく検出されなかった。サブユニットとしては、30S にも YaeJ の結合

が見られ、加水分解すべきペプチジル tRNA が存在する 50S では結合は検出されなかった。また、YaeJ の C 末端には塩基性アミノ酸に富む領域 (溶液中では構造を取らない) があるが、この領域を欠損させるとリボソーム結合能を失うことも明らかにした。これらの結果から、「YaeJ 蛋白質は、常時リボソームと結合しており、mRNA が滞った時にのみ peptidyltransferase center (PTC) に移動し PTH 反応を起こし、翻訳の停滞を解消した後 (サブユニット解離後) は 30S サブユニットに結合したままである」というモデルを提示した。このモデルによれば、YaeJ はリボソームに内蔵されたレスキュー装置と考えることができるが、その全容を明らかにするには多くの実験が必要となる。

一方、最近になって、synthetic lethal screening 法を使った実験から、YhdL (ArfA) という蛋白質もまた tmRNA 非存在下で nonstop mRNA によって滞ったリボソームをレスキューできることが報告された (Chandani et al., 2010)。この蛋白質は GGQ モチーフをもたないことから、それ自身 PTH 活性はないと考えられる。なお、YhdL は腸内細菌類にしか保存されていない。YaeJ と YhdL の発見は、細菌の細胞には複数のリボソームレスキューのメカニズムが存在していることを示しており、リボソームレスキュー機構の全体像を大幅に書き換える必要性を提起するものとなった。

2. 研究の目的

本研究では YaeJ を中心に tmRNA 非依存的なリボソームレスキュー機構の解明を行う。具体的には、変異体解析により様々な真正細菌の YaeJ で保存されている残基に変 YaeJ におけるリボソームとの機能部位の同定し、リボソーム上での機能モデルを構築する。

3. 研究の方法

YaeJ の変異体を作製・精製して、PUREsystem に加えて PTH 反応を測定する。活性をもたない場合、シヨ糖密度勾配法によりリボソームとの結合を YaeJ 抗体で検出することで、活性の消失が変異によりリボソームへの結合能を失ったことによるものかどうかを確かめる。

(1) 変異体の作製

YaeJ 遺伝子のアミノ酸残基の改変は、オーバーラップ PCR 法 (Higuchi et al., 1988) を基にした QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) と、プラスミド DNA 全長を鋳型として逆方向に設定した 2 種類のプライマーを用いて増幅をおこなう Inverse 法を用いて、変異導入をおこなった (Williams et al., 2007)。

変異箇所は、YaeJ の生物種間のアミノ酸相同配列比較の結果から、GGQ ループ以外に高い保存性を示したアミノ酸をアラニン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、リジン、

アルギニンや欠損とそれぞれ保存残基を改変した。

(2) PUREsystem を用いた PTH の測定

PTH 測定には PUREsystem (New England Biolabs) を応用した実験をおこなった。テンプレートに、終止コドンを欠損させた crp がコードされている翻訳停滞用 DNA テンプレートを用いた。この DNA が Run-off で転写されることで、終止コドン欠損の mRNA が合成され、翻訳において効果的にリボソームを停滞の状況をつくることのできるものが既に報告されている (Kuroha et al., 2009; Shimizu and Ueda, 2002)。また、このシステムは翻訳停滞解消因子 tmRNA や yaeJ などを含まないため、必要因子以外の影響をできるだけ取り除くことができる (Shimizu et al., 2001)。

まず、終止コドンを欠損させた crp 遺伝子をテンプレートとして、37 °C で 15 分間保温し、人工的に翻訳停滞状況を作り出した。その後 PUREsystem 反応液に、あらかじめ FluoroTect GreenLys tRNA を使わずに PUREsystem を用いて合成した YaeJ 蛋白質および変異体を、定量した合成量を基に 5 μl あたり 2.5 μM になるように調整した反応液、または His-tag YaeJ 蛋白質を添加して 5 分間 37 °C で保温することで PTH 反応を行った。PTH 反応液を NuPAGE で泳動し、ImageQuant LAS 4010 と ImageQuant TL を使用して解析した。

解析は、以下の式で行い、PTH 活性を測定した (図 1)。

ペプチジル tRNA 加水分解活性 (PTH) 活性 = 翻訳停滞解消されたシグナル強度 (a) / (翻訳停滞解消されたシグナル強度 (a) + ペプチジル tRNA のシグナル強度 (b))

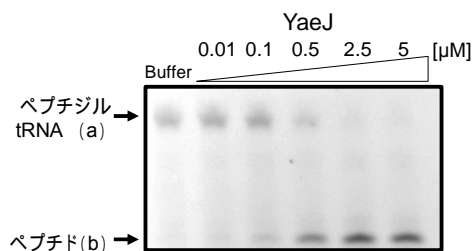


図1 His-tag YaeJのPTH活性を示す電気泳動図

(3) ショ糖密度勾配遠心分離によるリボソーム分画

yaeJ 株の大腸菌を LB 培地で対数増殖期 (OD600 = 0.6 ~ 0.8) まで培養し、遠心分離機によって集菌した。その後、Wash buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 15 mM 酢酸マグネシウム, 100 mM 酢酸アンモニウム] を用いて再懸濁をおこない、50ml 遠心管に移し替え、再び遠心分離によって集菌した。Buffer を取り除き、湿菌の重さを計測した。湿菌は氷上で静置し、そこに湿菌と同量のガラスビーズ (250 - 425 microns, 富士理化

学工業) と Lysis buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 15 mM 酢酸マグネシウム, 100 mM 酢酸アンモニウム, 1 mM AEBSF, 1 mM DTT] を加えた。そして、細胞膜の破碎し、大腸菌リボソームを抽出するために、ボルテックスミキサー (Taitec) によって 30 秒間よく攪拌し、氷上で 30 秒間の静置を 15 分程度繰り返した。この抽出液をガラスビーズごと 2 ml チューブに移し、電子天秤で重さを合わせた上で遠心分離 (12,000 rpm, 30 分, 4 °C) によって細胞破片を分離した。上清をリボソーム抽出液とした。その次に、チューブ 1 ml 中にリボソーム抽出液と組換え蛋白質を混ぜて、凝集物を遠心分離 (12,000 rpm, 30 分, 4 °C) によって除いた。

ショ糖密度勾配にはグラジエントミキサー (Advantec) を使用し、5% と 20% のショ糖溶液 [10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM 塩化マグネシウム, 50 mM 塩化アンモニウム] を 40PA チューブに上部から 6 mm になるまでグラジエントミキサーを使って 5 ~ 20% の勾配ができるよう充填した。このショ糖密度勾配ができたチューブの上からリボソーム抽出液と組み換え蛋白質の混合サンプルを 1 ml ゆっくりと添加した。超遠心分離には P28S ローター (Hitachi Koki) を使用し、超遠心分離機 CP80WX (Hitachi Koki) を用いて遠心 (112,700 ×g, 3 時間, 4 °C) をおこない、遠心終了後ペリスタポンプ (Atto) を使用して 1 ml ずつ分画した。分画したショ糖溶液に対し、それぞれ A260 の吸光度を測定し、さらにウエスタンプロットを行った。

4. 研究成果

本研究において、YaeJ の機能メカニズムは C 末端領域に依存して翻訳停滞したリボソームを解放することを示した。YaeJ の異生物種間の C 末端領域で完全に保存された Arg105, Arg118, Leu119, Lys122, Lys129, Arg132 の 6 つのアミノ酸残基が PTH 活性およびリボソーム結合に影響を及ぼしていた (図 2, 3)。この理由として、変異によってリボソームの結合能が低下を示し、これが PTH 活性の低下につながったことが考えられる。またこれらの結果から、C 末端領域に変異が入ったため、変異体が滞ったリボソームの A サイトに入るのが困難になったか、あるいは、A サイトに入れたとしても、PTH 反応前に A サイトから離れ易くなってしまいか、あるいは活性部の

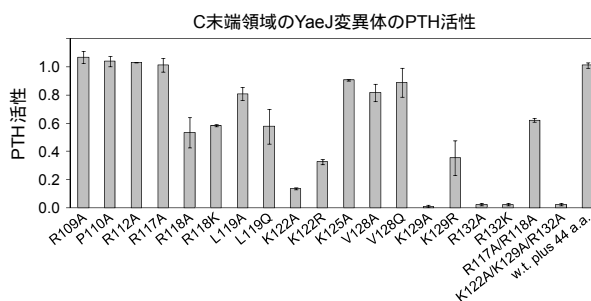


図2 PUREsystemで発現させたYaeJ変異体のPTH活性

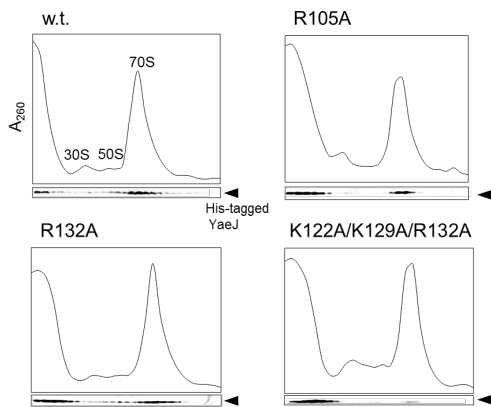


図3 YaeJタンパク質変異体のリボソーム結合

形成が効率よくできないことが示唆された。

YaeJ とリボソームの共結晶構造によって (Gagnon et al., Science 2012), Arg118, Leu119, Lys122 の変異による PTH 活性の低下やリボソームの結合能の低下は, 30S サブユニットの mRNA entry channel 内にある塩基やアミノ酸との相互作用が失ったことで説明することができる。Arg118 は 16S rRNA の 530 番目のグアニンと カチオン相互作用している。また, Leu119 と Lys122 は, 16S rRNA の 1397 番目のシトシンと 1196 番のウリジンと相互作用できる位置にある。一方 Pro110 と Arg117(保存は両方ともされていない)は, 共結晶によると 30S サブユニットと相互作用しているとされているが, 塩基置換をしても活性に低下がみられなかった。これらの矛盾は, 大腸菌と高度好熱菌のヘテロな系での結晶によるアーティファクトな相互作用が引き起こしているかもしれない。また, 結晶構造解析の結果より, YaeJ が機能する上で PTC に達するための C 末端領域での活性ドメインと ヘリックスとの間の距離, すなわちリンカー領域の長さが重要であることを示した。これは, 共結晶構造でよく説明ができる(図 4)。

しかし, 他の 3 つのアミノ酸に関しては, 共結晶構造からは, なぜそのアミノ酸残基に変異を与えたら PTH 活性やリボソーム結合能が低下したか, 適切な説明はできない。共結晶構造では, mRNA entry channel を突き抜けた Lys129 と Arg132 は周囲に隣接する核酸やリボソーム蛋白質が存在しておらず, 相互作

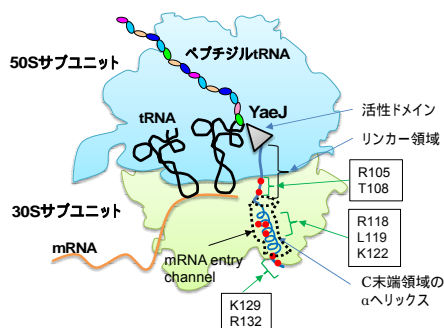


図4 70SリボソームにおけるYaeJのPTH活性に必要なアミノ酸残基の模式図
大腸菌YaeJと高度好熱菌70Sリボソームの共結晶構造解析(4DH9)を基に作成した模式図に, 本研究結果より示されたPTH活性に必要なアミノ酸残基をマッピングをした。

用相手がなく(但し, その周辺には, 16S rRNA pseudoknot がある)。同様にリンカー領域にある Arg105 と Thr108 は, 明らかに相互作用する部位はない。したがって, これらの塩基は, YaeJ が滞ったリボソームの A サイトに入るときに何らかの役割があると予想される。

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4件)

行木信一, 細菌・ミトコンドリアにおける tmRNA 非依存的な翻訳停滞解消機構 [総説], 生化学, 査読無, 86, 2014, 86-91.

Kogure, H., Handa, H., Nagata, M., Kanai, N., Güntert, P., Kubota, K., Nameki, N., Identification of residues required for stalled-ribosome rescue in the codon-independent release factor YaeJ., Nucleic Acids Res., 査読有, 42, 2014, 3152-3163, doi: 10.1093/nar/gkt1280.

Kogure, H., Hikawa, Y., Hagihara, M., Tochio, N., Koshiba, S., Inoue, Y., Güntert, P., Kigawa, T., Yokoyama, S., Nameki, N., Solution structure and siRNA-mediated knockdown analysis of the mitochondrial disease-related protein C12orf65., Proteins, 査読有, 80, 2012, 2629-2642, doi: 10.1002/prot.24152.

Hagihara, M., Takei, A., Ishii, T., Kubota, K., Wakamatsu, K., Nameki, N., Inhibitory effects of choline-*O*-sulfate on amyloid formation of human islet amyloid polypeptide., FEBS Open Bio., 査読有, 2, 2012, 20-25, doi: 10.1016/j.fob.2012.02.001.

[学会発表](計12件)

小暮裕幸, 半田佳宏, 金井直人, 岸本宏基, 今泉友紀, 永田昌弘, 窪田健二, 行木信一, Functional analysis of stalled-ribosome rescue factors ICT1 and C12orf65 in mitochondria, 第7回 International Conference on Advanced Micro-Device Engineering, 2013年12月19日, 桐生市市民文化会館(群馬県)

半田佳宏, 小暮裕幸, 樋川雄介, Peter Güntert, 井上裕介, 栃尾尚哉, 行木信一, Solution structure of the GGQ domain of the ICT1 protein that is

essential for cell vitality and mitochondrial function, 第 7 回 International Conference on Advanced Micro-Device Engineering, 2013 年 12 月 19 日, 桐生市市民文化会館 (群馬県)

金井直人, 小暮裕幸, 永田昌弘, 半田佳宏, 行木信二, YaeJ タンパク質の機能解析, 2013 年 9 月 19 日, ろうきん研修所富士センター (静岡県)

小暮裕幸, 半田佳宏, 井上裕介, 行木信二, ミトコンドリアにおける翻訳停滞解消機構の解析, 第 6 回 RNA Frontier Meeting, 2013 年 9 月 3 日, ラフォーレ修善寺 (静岡県)

小暮裕幸, 半田佳宏, 井上裕介, 行木信二, ミトコンドリアにおける翻訳停滞解消因子 ICT1 および C12orf65 の機能解析, 第 15 回 日本 RNA 学会年会, 2013 年 7 月 24 日, 県民文化会館・ひめぎんホール (愛媛県)

千葉麻里子, 今泉友紀, 行木信二, 翻訳停滞解消に関わる yICT1 と yICT2 遺伝子欠損による酵母ミトコンドリアへの影響, 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 11 日, 福岡国際会議場

金井 直人, 小暮裕幸, 稲穂紀幸, 半田 佳宏, 行木 信二, 変異体解析による YaeJ タンパク質の機能解析, 平成 24 年度日本生化学会関東支部例会, 2012 年 06 月 23 日, 群馬大学 昭和キャンパス

千葉麻里子, 小椋義俊, 行木信二, 大腸菌における yaeJ ホモログ遺伝子の機能解明, 平成 24 年度日本生化学会関東支部例会, 2012 年 06 月 23 日, 群馬大学 昭和キャンパス

樋川雄介, 小暮裕幸, 井上裕介, 行木信二, Transcriptional analysis of the gene encoding the mitochondrial protein C12orf65, 第 34 回 日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 13 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)

行木信二, 細菌・ミトコンドリアにおける翻訳停滞解消 (ribosome rescue) 機構の新展開, 東京理科大学 総合研究機構 RNA 科学総合研究センター 公開セミナー (招待講演), 2011 年 10 月 13 日, 東京理科大学 野田キャンパス

稲穂紀幸, 半田佳宏, 金井直人, 小暮裕幸, 行木信二, 翻訳の滞りを解消する YaeJ タンパク質の機能解析, 第 5 回 日本ゲノム微生物学会 若手の会 研究会, 2011 年 9 月 29 日, ろうきん研修所富士

センター (静岡県)

Hiroyuki Kogure, Yoshihiro Handa, Yusuke Hikawa, Yusuke Inoue, Nobukazu Nameki, Transcriptional Analysis of the Gene Encoding the Mitochondrial Protein ICT1, The 16th Annual Meeting of the RNA Society and The 13th Annual Meeting of the RNA Society of Japan, 2011 年 6 月 14 日, 国立京都国際会館 (京都府)

〔図書〕(計 1 件)

Nameki, N., Someya, T., Kawai, G. [著書, 分担], Translational control with small RNAs. In: Dubitzky W, Wolkenhauer O, Cho K-H, Yokota H. (editors), Encyclopedia of Systems Biology, Springer New York, 2013, 2289-92.

〔その他〕

ホームページ等

行木研ホームページ

<http://molbio.chem-bio.st.gunma-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

行木 信一 (NAMEKI, Nobukazu)

群馬大学・理工学研究院・准教授

研究者番号: 80302959

(2) 研究分担者

姫野 俵太 (HIMENO, Hyota)

弘前大学・農学生命科学部・教授

研究者番号: 80208785