

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780102

研究課題名（和文）

バクテリアにおける翻訳途中脱離ペプチジル tRNA の産生メカニズムの解明

研究課題名（英文） Elucidation of production mechanism of peptidyl-tRNAs dropped from ribosomes in bacterial translation system

研究代表者

長尾 翌手可 (NAGAO ASUTEKA)

東京大学・大学院工学系研究科・助教

研究者番号：30588017

研究成果の概要（和文）：細胞内の翻訳途中脱離ペプチジル tRNA を調べるために、RNA 単離技術と LC/MS 解析法を確立した。その結果、様々なペプチジル tRNA の同定に成功した。各 pep-tRNA を単離し詳細に解析した結果、大腸菌遺伝子にはコードされていない配列をもつ pep-tRNA が見つかった。このことは誤って生成された pep-tRNA はペプチジル転移反応以降に新規の翻訳精度維持機構によって翻訳系から排除されるといったシステムの存在を示唆するものである。

研究成果の概要（英文）：We directly analyzed and characterized peptidyl-tRNAs which were dissociated from the ribosome during elongation by using LC/MS analyses and RNA isolation technique. When each individual pep-tRNA was isolated and analyzed in detail, we found that noncognate peptidyl-tRNAs whose nascent chains didn't match any of *E.coli* genes were also dropped from the ribosome. This suggested a novel quality control mechanism after peptidyltransfer reaction, namely noncognate peptidyl-tRNAs can be rejected from the ribosome.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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・翻訳

1. 研究開始当初の背景

細胞内ではその生命活動を維持するために様々な物質、分子が合成され、分解・代謝されている。特に、RNA やタンパク質は巨大であるためその合成過程において異常な分子ができる可能性は高く、その代謝は細胞

にとって重要な課題である。タンパク質の合成は、DNA 上の遺伝情報を転写した mRNA にリボソーム、開始メチオニル tRNA、翻訳開始因子からなる翻訳開始複合体が結合するところから始まり（翻訳開始）、翻訳伸長、翻訳終結・再生といったステップにより厳密

に行われる。しかし、翻訳伸長へと移行したリボソームが全て翻訳終結・再生に至るわけではない。近年のバクテリア翻訳系の研究により、約10%の翻訳開始後リボソームにおいて新生ペプチド鎖合成中の tRNA (ペプチジル tRNA: pep-tRNA) が翻訳初期段階でリボソームから脱離し、その翻訳が中断される現象、drop off が起きていることが分かった。この drop off により生じた pep-tRNA は peptidyl-tRNA hydrolase (PTH) によって tRNA の3'末端とペプチド部分が加水分解され、ペプチド部分はプロテアーゼにより代謝され、tRNA は再度アミノアシル化され翻訳系にリサイクルされる。PTH が大腸菌において必須遺伝子であることから drop off は細胞内で頻発している現象であると考えられる。また、PTH 遺伝子は真核生物全般にも保存されており、drop off は翻訳系において一般的な現象であると推測される。PTH が細胞内で失活すると、pep-tRNA の蓄積が起これ、翻訳に参加できる遊離 tRNA が枯渇し全体の翻訳が停止するため死滅すると考えられている。この際、枯渇する遊離 tRNA の中でも tRNA^{Lys} の枯渇が最も早いことが観察されている。以上のように、drop off は通常の翻訳過程で恒常的に起きていると考えられ、その産生物である pep-tRNA の代謝は細胞にとって重要な課題になっていると考えられる。

所属研究室(東京大学工学部化学生命工学科鈴木研究室)では、生体内 RNA の質量分析法を長年研究開発しており、現在はナノフロー LC/質量分析法により微量なサンプル中に含まれる RNA 分子の同定を行うことができるレベルに達している(RNA-MS)。本研究では、この RNA-MS を応用して細胞内の pep-tRNA の検出を行う。既存の細胞内 pep-tRNA を観察する方法としては、電気泳動による検出方法しかなく、pep-tRNA の泳動度はそのペプチドを構成するアミノ酸の種類や数によって様々であり実際はスミアバンドとして検出されるため、ペプチド部分を構成するアミノ酸配列についての情報を得ることができない。このような技術的な限界から細胞内 pep-tRNA の全体像を観察する研究はこれまでなかった。本研究では、pep-tRNA の3'末端アデノシンにはペプチドが付加しており、他の RNA 由来のヌクレオチドとは異なった特徴的な分子量を持つことに着目し、ペプチド部分の分子量から構成するアミノ酸配列を予測することができると考えた。質量分析法を駆使することで、今まで得ることができなかった細胞内 pep-tRNA の内部配列の情報を得ることができるということを強調したい。

2. 研究の目的

本研究は、細胞内に存在する pep-tRNA の

質と量の両面における傾向を観察することで、drop off の要因となるコドン配列、アミノ酸配列、アミノ酸数、tRNA・rRNA の構造的要素、関連するタンパク質などについて絞り込みを行うことができると考えている。このようにして得られた知見をもとに、pep-tRNA が産生されるメカニズムを解明し、翻訳開始後に関わる因子が翻訳効率や遺伝子構成(コドン配列の制約)の進化にどのような影響を及ぼしているのかについて研究し、全く新しい遺伝子発現調節機構についての概念を確立したいと考えている。

1) 細胞内における pep-tRNA のプロファイリング

大腸菌の PTH 温度感受性株を用いて細胞内に蓄積した pep-tRNA の分布を観察し、どのようなアミノ酸で構成された pep-tRNA が多いのかプロファイリングすることで、drop off が起きる mRNA やコドン配列の傾向を明らかにすることができる。また、各 tRNA を pep-tRNA の状態で単離・解析することで、同じアミノ酸を担当するが、違うコドンを読む tRNA (アイソアクセプター tRNA) 同士を比較することができ、より詳細な傾向が明らかになる。

2) drop off を引き起こす tRNA、rRNA の構造的要素の特定

tRNA と rRNA 上にはメチル化などの修飾塩基が存在し、それらはコドン-アンチコドン対合形成やペプチジル転移反応を担う領域に多いことが知られている。しかし、その機能は明確になっていないものが多く、実際その修飾反応を担う酵素は非必須遺伝子であることが多い。また、リボソームには合成中の新生ペプチド鎖が通るトンネル構造があり、新生ペプチドが相互作用することが知られている。本研究では、drop off の観点から tRNA、rRNA の構造的要素の機能を考え、その意義について新しい知見を得る。

3. 研究の方法

(1) 質量分析を用いた細胞内 pep-tRNA の検出と解析

本研究では pep-tRNA のペプチド部分が固有の分子量を持つことに着目し、質量分析法によって個々の pep-tRNA を同定することを試みる。pep-tRNA のペプチド部分と tRNA の結合は非常に不安定であるが、細胞からの抽出を全て低温、酸性条件下で行った後、無水酢酸を用いて N 末端アミノ酸の α -アミノ基をアセチル化し安定化することで全ての pep-tRNA を解離させることなく調製でき、その後の解析に用いることができる。ペプチド部分の同定は、アセチル化 pep-tRNA (Ac-pep-tRNA) を RNase で消化すると、各

Ac-pep-tRNA の3'末端に由来するアセチルペプチジルアデノシン (Ac-pep-Ado) が遊離し、液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS) 解析することで行うことができる。また、トリペプチド以上の pep-tRNA に関しては、MS/MS 解析を行い配列を決定する必要があると考えている。また、当研究室で開発された往復循環クロマトグラフィーRNA 単離精製装置により、個々の tRNA を pep-tRNA の状態で単離・解析することが可能である。この方法により、アイソアクセプターtRNA を区別した解析を行えるのに加えて、個々の pep-tRNA を濃縮できるメリットがあり全 RNA 画分からでは検出できない pep-tRNA が検出できると考えている。次に、以上の方法により検出された pep-tRNA が実際に drop off による産物であるかどうか検証する。4、5 アミノ酸残基からなる pep-tRNA はそのアミノ酸配列から候補遺伝子を 1~2 つに絞ることができるため、その候補遺伝子を欠損させた株からは検出されないことを確認する。

(2) drop offに関わる tRNA、rRNA の構造的要素の特定

drop off が生じる要因として mRNA と tRNA のコドン-アンチコドン対合形成、ペプチジル転移反応の影響が挙げられる。これらを行う tRNA、rRNA の塩基には修飾を受けているものが多く、修飾酵素も同定されているが、drop off との関連性を示した報告はない。そこで、目的の修飾酵素欠損株に PTH 温度感受性の形質を導入し、pep-tRNA プロファイリングを行うことにより tRNA、rRNA 上の修飾塩基と drop off の関係性を明らかにすることができる。所属研究室は大腸菌遺伝子欠損ライブラリーを所有しており、形質導入は PTH^{TS} 株由来の P1 ファージを用いて P1 トランスダクションによって行うため、システムティックに目的の PTH^{TS} 形質をもった修飾酵素欠損株を作成することができる。また、新生ペプチド鎖の通り道であるリボソーム内のトンネル構造も drop off と関連していると考えられる。トンネル構造改変リボソームを持つ株を作成し、トンネル構造と drop off 効率や特異性についての解析も行う予定である。

4. 研究成果

(1) 細胞内 pep-tRNA の直接的検出とプロファイリング

大腸菌 Pth 温度感受性株を非許容温度で培養した際に細胞内に蓄積した pep-tRNA の抽出方法、ペプチジル部分の安定化、LC/MS での検出法などを検討した結果、細胞内 pep-tRNA のキャラクター化とプロファイリングに成功した。図1は30~43℃で培養した Pth 温度感受性株に蓄積した

di pep-tRNA のマスクロマトグラフィーを示しているが、30℃でも僅かな di pep-tRNA を検出できるが、43℃ではほとんどのメチオンから始まる di pep-tRNA を示すシグナルを観察することができる。これらの di pep-tRNA は確かに 43℃で蓄積しているものであることが分かる。また、通常培養温度である 37℃においても多くの di pep-tRNA が観察できることから drop off は熱ストレスなどによるものではなく通常培養条件下でも起きていることが証明できた。また、非許容温度で培養した Pth 温度感受性株から特定の tRNA を単離精製することで細胞内に微量に存在する 4~6 ペプチドからなる pep-tRNA の検出に成功した。新生鎖の配列を知るために MSMS 解析を行ったところ、図2のように配列依存的なプロダクトイオンが検出され、これらを全て帰属することでアミノ酸配列情報を得ることができたことが判明した。以上のようにして、細胞内に蓄積した pep-tRNA のプロファイリングに成功した。

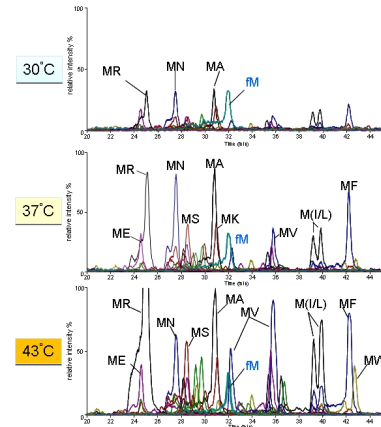


図1. di pep-Ado のマスクロマトグラフ

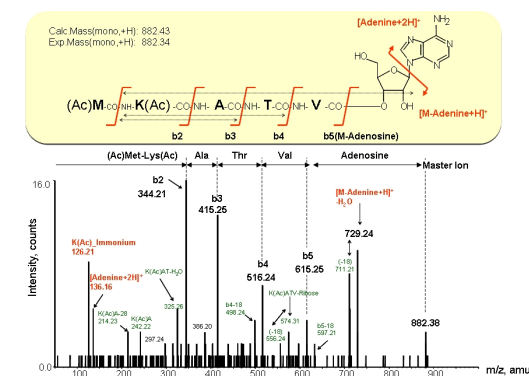


図2. MKATV-Ado のマスマスペクトル

(2) 細胞内 pep-tRNA のキャラクター化

MSMS 解析によってペプチド部分を同定できることが判明したため、次に大腸菌細胞内の全 48 種類の tRNA を pep-tRNA の状態で

単離精製し個々の tRNA について解析を行った。その結果、多くの種類の pep-tRNA を同定することに成功した。その一部を表 1 に示す。ペプチドの長さでは 7 ペプチドの pep-tRNA まで検出することができた。また、ペプチド鎖が 4 残基以上の場合、drop off 由来遺伝子を特定することができ、その遺伝子の欠損株に Pth 温度感受性形質を導入した株では野生型で見られていた pep-tRNA が観察できなかったことから、本研究で観察している pep-tRNA は実際に mRNA を翻訳している中途に脱落したものであることが実証された。また、単離解析の結果から、大腸菌の遺伝子には存在しない配列をもつ 5pep-tRNA が複数検出された (表 1)。これらの pep-tRNA も上と同様に欠損株を作成し解析を行ったところ、特定の遺伝子由来であることが分かった。このことから、停滞したリボソーム上で A サイトコドンと対応していないアミノアシル tRNA が A サイトに入り、ペプチジル転移反応によって P サイトのペプチドを引き受けた後 drop off している可能性があることが分かった。デコーディングの精度維持機構としてはアミノアシル tRNA・EF-Tu・GTP の三者複合体が A サイト上で行うイニシャルセレクションと GTP 加水分解後のアコモデーションによるプルーフリーディングの 2 つが主にチェックポイントとして働くというのが定説であるが、本研究の結果から、ペプチジル転移反応後にも誤って生成した pep-tRNA を翻訳系から排除する精度維持機構が存在することが示唆された。

tRNA	Nascent peptide	Candidate gene
tRNA ^{Thr1}	MKAT	<i>lpp</i> (murein lipoprotein)
tRNA ^{Val1} tRNA ^{Val2}	MQVSV	<i>tig</i> (peptidyl-prolyl cis/trans isomerase (trigger factor))
tRNA ^{Ile1}	MLTGI	<i>yfjD</i> (pyruvate formate lyase subunit)
tRNA ^{Ala2}	METIA	<i>rplV</i> (50S ribosomal subunit protein L22)
tRNA ^{Ser1} tRNA ^{Ser2}	MYVVS	<i>gatY</i> (D-tagatose 1,6-bisphosphate aldolase 2, catalytic subunit)
tRNA ^{Thr1} tRNA ^{Glu} tRNA ^{Gln} tRNA ^{Leu1} tRNA ^{Asp} tRNA ^{Trp} tRNA ^{Ser1} tRNA ^{Val1}	MKATT MKATE MKATQ MKATL MKATD MKATW MKATS MKATV	none

表 1. 4~5pep-tRNA と由来遺伝子

(3) drop off を亢進する rRNA 変異体の獲得

Drop off に関わる rRNA の構造的要因の一つとして新生ペプチド鎖が通るリボソームトンネルがある。リボソームトンネルの大部分は rRNA で構成されている。本研究では、翻訳初期段階では新生ペプチド鎖が短くリボソームと十分な相互作用を築けないことが drop off を誘発すると考え、リボソームトンネル入り口付近を構成する rRNA に変異を入れ、その変異リボソームが drop off にどのように影響するかを調べた。計 18 種類のリボソーム変異株を作成し、温度感受性変化、

ペプチジル tRNA プロファイリングを解析した結果、3 つの変異体について drop off が亢進することが分かった。これらの変異体は Pth が野生型ゲノムを持つ株では温度感受性に変化がないことから drop off 変異体であるといえる。これまで drop off に影響を与えるような rRNA 変異は知られておらず、翻訳初期において短い新生ペプチド鎖とリボソームトンネル入り口との相互作用によって安定化されていることを示唆すると考えられる。

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 件)

[学会発表] (計 件)

①長尾翌手可 翻訳初期段階におけるペプチジル tRNA の脱落と校正機構 第 14 回日本 RNA 学会年会 2012 年 7 月 18~20 日 東北大学

②長尾翌手可 翻訳初期段階におけるペプチジル tRNA の脱落と校正機構 第 2 回 RIBOSOME MEETING 2013 年 3 月 28~29 日 東京農工大学

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長尾 翌手可 (NAGAO ASUTEKA)

東京大学・大学院工学系研究科・助教

研究者番号：30588017