

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660053

研究課題名(和文) 翻訳伸長初期における新規翻訳精度維持機構の提唱

研究課題名(英文) Quality control of protein synthesis by peptidyl-tRNA drop off in the early elongation stage

研究代表者

長尾 翌手可 (Nagao, Asuteka)

東京大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30588017

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：バクテリア翻訳系では、翻訳伸長初期段階において、合成中のペプチドがtRNAに結合した状態でリボソームから脱離する現象(drop off)が恒常的に起きている。既存の実験手法ではペプチジルtRNAのペプチド部分を同定することが難しく、そのメカニズムは未だ明らかになっていない。本研究では、質量分析法によってrRNA変異体やtRNA修飾変異体の細胞内ペプチジルtRNAを定性的・定量的に解析を行い、drop offに関わるrRNAやtRNA分子の構造的要素を特定した。その結果、これまで知られていなかったRNA分子の機能を見出すことができ、翻訳過程について新たな知見を提示できたと考えている。

研究成果の概要(英文)：In bacteria, peptidyl-tRNAs are frequently dissociated from the ribosome in the early stage of translation elongation, which is called as peptidyl-tRNA drop off. However, little is known about the molecular mechanism and a physiological role of this event. In this study, we established a method for direct analysis and profiling of pep-tRNAs accumulated in the cell using mass spectrometry. Moreover, using *E. coli* rrn strain and tRNA modification enzyme deletion strains, we are looking for the point mutations in rRNAs and the modified bases in tRNAs that affect the pep-tRNA drop off, and found several mutations in the peptide tunnel of 23S rRNA and in the decoding center of 16S rRNA and several modifications in D- or T-loop of tRNA, suggesting that these bases are involved in stabilizing tRNA in ribosome during translation. These observations raise the possibility of a novel quality control mechanism to maintain the fidelity of protein synthesis.

研究分野：分子生物学

キーワード：翻訳 tRNA リボソーム

1. 研究開始当初の背景

翻訳伸長を開始したリボソーム全てが翻訳終結に至るとは限らない。バクテリア翻訳系では翻訳伸長の初期段階、およそ7アミノ酸残基以下のペプチドでは、伸長中のペプチジル tRNA(pep-tRNA)がペプチドを付加したままリボソームから脱離する drop off という現象が恒常的に起きていることが知られている。私たちはこれまで RNA 単離技術と質量分析法を駆使し、大腸菌細胞内で産生される pep-tRNA の詳細な解析を行い、その結果、遺伝暗号通りの配列を持つ pep-tRNA(cognate pep-tRNA)と内在遺伝子にコードされていない配列を持つ pep-tRNA (noncognate pep-tRNA) の2種類の pep-tRNA が産生されていることを見出した。特に noncognate pep-tRNA の発見は、誤翻訳によってできた pep-tRNA を drop off によって翻訳系から排除するといった全く新しい翻訳精度維持機構を示唆するものである。しかし、これまでペプチジル転移反応以降の校正機構は証明されておらず、この新規翻訳精度維持機構が既存の概念に基づいた分子メカニズムでは説明がつかない可能性が出てきた。

2. 研究の目的

上記の背景から、私たちは翻訳伸長初期では drop off による翻訳精度維持機構が働いており、そのメカニズムの解明には関連する翻訳因子の同定と翻訳反応の基盤となる RNA 分子機能の理解が必要であると考えた。rRNA や tRNA 塩基の構造的要素が翻訳の中核の多くを担うことは通説だが、その機能が明確に証明されているものは少なく、多くのものが機能未知であると言ってよい。そこで、本研究では、drop off に影響する翻訳因子や rRNA・tRNA 塩基を同定し、その分子機構を明らかにすることで伸長初期における新規翻訳精度維持機構の提唱を目指す。

3. 研究の方法

本研究では全ての実験においてリソースや遺伝子操作法が最も開発されたバクテリアである大腸菌を用いて行った。細胞内で産生された pep-tRNA は速やかにペプチジル tRNA 加水分解酵素 (PTH) によって分解されるため、PTH を細胞内で失活させなければその後の質量分析による解析を行うことはできない。しかし、PTH は大腸菌では必須遺伝子でありその欠損株は作成できないため温度感受性株を作成し、この温度感受性株から得られた P1 ファージを利用して目的の

rRNA 変異株、tRNA 修飾遺伝子欠損株に PTH 温度感受性形質を導入した。rRNA 変異株については、大腸菌ゲノム上の7つの rRNA オペロンを欠失させ、一つの rRNA オペロンをコードしたプラスミドによってそれを相補した *rrn7* 株を使用した。このプラスミド上の rRNA 遺伝子に目的の変異を PCR によって導入し、カウンターセクションによってそれを元のプラスミドと入れ替えることで細胞内の全てのリボソームが目的の変異を持ったものになるような変異株を作成した。tRNA 修飾遺伝子については非必須遺伝子であるものから PTH 温度感受性形質を導入した。遺伝子欠損株は所属する東京大学工学部鈴木研究室が所有する KO コレクションを利用した。導入した変異あるいは遺伝子欠損によって pep-tRNA drop off が細胞内で亢進した場合、過剰に産生した pep-tRNA を PTH が処理しきれなくなるため、PTH 温度感受性も亢進すると予測し、先ず作成した変異体の温度感受性を高温条件での寒天培地上の生育能で評価した。感受性が亢進または低下したものについては drop off 変異体として細胞内 pep-tRNA のプロファイリング解析に進めた。細胞内 pep-tRNA の解析については、非許容温度で培養した各 PTH 温度感受性変異株から酸性条件で RNA を抽出し、ペプチド部分を安定化するために無水酢酸を用いてペプチドのアミノ末端の α -アミノ基をアセチル化する。その後、RNase を用いて消化し、その産物を質量分析によって解析を行った。より詳細な解析を行う際は、RNase 消化の前に固相化プローブ法を用いた方法によって各 tRNA を単離し RNase 消化を行い同様に解析した。単離することで特定の tRNA について濃縮することができ、少量の pep-tRNA についてどのようなペプチドが付加しているか詳細に観察できた。rRNA 変異体については、各変異体からリボソームを精製して *in vitro* 系により、tRNA との相互作用を評価する実験を行った。

4. 研究成果

(1) drop off に影響する rRNA 変異体

リボソームは大小2つのサブユニットからなるタンパク質合成装置で、アミノ酸を結合させていくペプチジル転移反応は大サブユニット内で進行していく。伸長するペプチドは大サブユニットのトンネル構造を通過してリボソームの外へ出て行き、細胞質に放出される。このペプチジル転移反応はリボソームのペプチジル転移反応中心と呼ばれる RNA で

形成されている。一方、小サブユニットでは mRNA のコドンと tRNA のアンチコドンがコドン - アンチコドン対合を形成し、リボソームは遺伝暗号解読中心と呼ばれる RNA が正しいコドン - アンチコドン対合を形成できるような場を提供している。今回は大サブユニットについてはペプチジル転移反応中心近傍のトンネルの入り口、小サブユニットについては遺伝暗号解読中心やその近傍の構造を形成する rRNA に注目し解析を行った。まず、大サブユニット rRNA では、計 18 種類の変異体を作成した。これらの変異体について各温度における生育能を観察し、温度感受性を比較した結果、トンネル構造に結合したタンパク質合成を阻害する抗生物質であるマクロライドの結合位置である A2058 や、これまでに大腸菌 TnaC ペプチド配列との相互作用が示唆されている A2059, U2586, U2609 の 3 塩基、比較的 PTC に近い U2584 などの塩基に変異を導入した場合では、温度による生育能の変化は見られなかった。しかしながら、G2502A, A2503G, C2610A の 3 種の変異体については温度感受性の亢進が観測された。従って、これらの塩基はリボソーム内での pep-tRNA の保持に重要な役割を担っていることが示唆された。A2503, C2610 の 2 塩基は、ErmCL と呼ばれるペプチド配列との相互作用が報告されている。また G2502 はトンネル内壁に露出しておらず、これまでにその機能などについて報告もされていない。興味深いことに、同じ塩基であっても C2610U の変異においては温度感受性に変化は見られなかった。そこで次に、温度感受性の亢進が見られた G2502A, A2503G, C2610A の 3 つの変異体、及び変化が見られなかった C2610U, U2586C の 2 つの変異体について細胞内の drop off プロファイルを取得した。その結果、温度感受性の亢進が見られた変異体では複数のジペプチド鎖をもつ pep-tRNA の脱落が増加していた。逆に温度感受性に変化の無かった 2 つの変異体では drop off の増加が見られなかったことから、プレート上での生育能と細胞内での drop off の亢進には明確な相関があることが分かった。これらの結果から、drop off はリボソーム構造と新生ペプチド鎖のアミノ酸配列とが密接に関わり合って生じる現象であることが示唆された。次に、小サブユニット rRNA については、42 種類の変異のうち、7 つの変異体で温度感受性の亢進がみられ、1 つの変異体で温度感受性の低下が観測された。これらの drop off 変異体の細胞内に蓄積した pep-tRNA を解析した結果、

温度感受性が亢進した A サイトの 2 つの変異 (G1491C, C1397A) と、P サイトの 1 つの変異 (C1496U) で、pep-tRNA の蓄積量が顕著に増加していることが判明した。特に C1496U 変異体では許容温度 (30 °C) において蓄積がみられたことから、この変異体は特に pep-tRNA の脱落が激しく生じていることを示唆している。これらの結果は、A サイト、P サイトの変異が共に pep-tRNA の脱落に寄与しており、これらの塩基が通常 pep-tRNA をリボソーム上で安定化させる役割を担っていることを示唆している。また、興味深いことに、E サイトの変異体 (A1503U) では温度感受性が緩和され、pep-tRNA の蓄積量が減少することが判明した。この結果から野生型の A1503 は pep-tRNA の drop off をある程度促す働きがあると考えられる。次に、*in vitro* 系で各変異型リボソーム (G1491C, C1496U, A1503U) の P サイト、A サイトにおける tRNA と mRNA の結合能を調べる実験を行った。その結果、A サイトの G1491C 変異体では A, P 両サイトの tRNA 結合能が低下する結果が得られた。また P サイトの C1496U 変異体について若干であるものの野生型リボソームと比較して tRNA の結合能が下がる傾向が観測された。このことから、これらの塩基は通常 tRNA とリボソームの結合を安定化する役割を果たしていると考えられる。一方、E サイトの A1503U 変異は P サイトにおける tRNA の結合能を増加させた。A1503 は通常 tRNA とリボソームの結合を不安定化していると考えられ、リボソームからスムーズに tRNA を排出する役割があると考えられる。また、先の A1503 における変異が drop off を減少させることと合わせると、リボソームには元々 pep-tRNA の drop off をある程度許容する性質があることが考えられ、リボソームが pep-tRNA を基底レベルで drop off させることで翻訳の品質管理をしている可能性も示唆された。

(2) drop off に影響する tRNA 修飾塩基

tRNA は酵素によって様々な転写後修飾を受け、大腸菌では 40 種類以上の修飾塩基が知られている。特にコドン 3 文字目と対合するアンチコドン 1 文字目は wobble 位と呼ばれ多くの修飾を受け暗号解読能を制御している。tRNA はクローバー型の二次構造をとるが、生体内では折り畳まれて L 字型三次構造をとって存在しており、アンチコドン領域以外の修飾塩基がその構造形成や tRNA の安定性やリボソームとの相互作用等に寄与している。大腸菌において tRNA 修飾関連遺伝子

は 54 種類知られており、そのほとんどは非必須遺伝子である。今回はその内 30 種類の修飾酵素遺伝子についてその欠損株を保有する遺伝子欠損株コレクションから入手し、PTH 温度感受性形質を導入した。得られた tRNA 修飾欠損 PTH 温度感受性変異体の温度感受性の変化を観察したところ、5 つの株で顕著な感受性の亢進が見られ、特に 3 つはアンチコドン領域ではなく L 字型三次構造の角 (elbow) に存在する修飾塩基であった。次に、この 3 つの温度感受性が亢進した変異株について、細胞内で、drop off した pep-tRNA の蓄積量に変化があるかどうかについて解析した結果、pep-tRNA の蓄積が観察された。さらに各修飾遺伝子の二重及び三重欠損株を作成したところ、感受性の著しい亢進が観察され、細胞内 pep-tRNA 蓄積量の増加も観察された。また、より詳細な解析を行うために、各修飾塩基を有している tRNA とそうでない tRNA をそれぞれ単離しそのペプチジル tRNA の割合を測定したところ、元来修飾塩基を有している tRNA においてはその修飾塩基が欠失すると pep-tRNA の割合が増加することが分かった。以上の結果から、elbow 領域の tRNA 修飾は翻訳伸長初期段階において pep-tRNA の drop off を抑制する働きがあることが強く示唆された。tRNA がリボソームを移動する際に大きな構造変化が伴うことが知られているが、elbow 領域の修飾塩基が tRNA のリボソーム上での振る舞いや構造変化にどのような役割があるかは未だ知られていないが、drop off という現象を切り口にそれらの機能が明らかになると考えている。

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 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

長尾 翌手可 (代表)

翻訳初期段階におけるペプチジル tRNA の脱落と校正機構

日本 RNA 学会

2013 年 7 月 24 日 ~ 26 日

愛媛県・県民文化会館

長尾 翌手可 (代表)

Quality control of protein synthesis by peptidyl-tRNA drop off in the early elongation stage

日本分子生物学会

2013 年 12 月 3 日 ~ 6 日

兵庫県・神戸ポートアイランド

唐牛 南 (代表)

翻訳伸長初期段階における 16S rRNA 暗号解読中心の機能解析

日本 RNA 学会

2014 年 7 月 23 日 ~ 25 日

愛知県・ウインクあいち

高柳 麻由香 (代表)

Novel function of tRNA elbow modifications at the early stage of translation elongation

日本分子生物学会

2014 年 11 月 25 日 ~ 27 日

神奈川県・パシフィコ横浜

〔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:

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

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