

# 枯草菌と大腸菌におけるトランス・トランスレーションの標的タンパク質の解析

●姫野俵太 ◆武藤 昱 (あきら)

弘前大学農学生命科学部

## ＜研究の目的と進め方＞

細菌は外的環境の変化に対応して、特定のタンパク質を合成し分解する。特定のタンパク質合成制御に関する研究は非常に進んでいるが、分解制御に関してはまだ不明な点が多い。最近、我々の研究を中心として、tmRNA (10Sa RNA)が関与する新しいタンパク質分解系の存在が明らかにされつつある。tmRNAは真正細菌に存在する安定なRNAで、両末端からなるtRNAに類似する構造をもち、3'末端にアラニンを結合しアラニル-tmRNAを形成する。そして翻訳中のmRNAが何らかの原因によりリボソーム上で翻訳が中断すると、アミノアシル-tRNAに代わってアラニル-tmRNAがリボソームに入る。次に、tmRNAの内部配列の一部が新しいmRNAとして働いて中断していた翻訳を引き継ぎ、そのC末端に11アミノ酸（大腸菌）からなるペプチド（タグ）を合成付加する。このmRNAの切り替えによるキメラペプチドの合成はトランス・トランスレーションと呼ばれ、タグペプチドは特異的タンパク質分解酵素（Fts, Clp proteaseなど）の標的となりすみやかに分解される。このシステムはすべての真正細菌に存在することから、細菌にとって重要な生理的役割を果たしていることが示唆される。

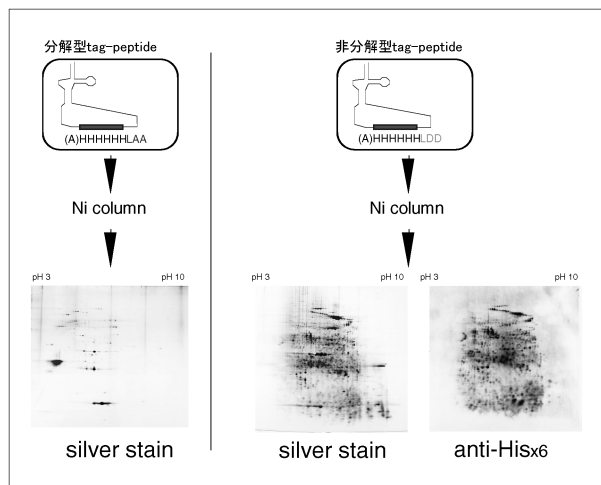
近年、トランス・トランスレーション機構は一般的な不完全ペプチドの分解だけではなく、特定の標的タンパク質を分解するというデータが蓄積してきた。我々は、枯草菌のtmRNA欠失株および変異株を用いて、このRNAが各種ストレス（高温など）下での菌の増殖に必須であり、しかもストレス下で転写が促進されるストレス応答遺伝子（ClassIV）であることを明らかにした。さらにtmRNA欠失株では胞子形成が阻害されることも明らかにした。これらの過程にはATP依存タンパク質分解酵素系が関与し、特定のタンパク質の選択的分解を伴うことが知られている。ATP依存タンパク質分解酵素遺伝子自身もまたClassIIIまたはIVのストレス応答遺伝子群に属し、tmRNAと同様な発現制御を受けていることから、胞子形成の過程にトランス・トランスレーションを介した特定のタンパク質の分解が関与している可能性は高い。このようなtmRNAが特定の生命現象に関与している事を示すデータは、これまで考えられてきたようにトランス・トランスレーションが偶然に壊されたmRNA上で中断している翻訳を処理するという消極的なものとしてだけではなく、積極的に遺伝子発現制御に関わっているという可能性を示唆するものである。

本研究では、全ゲノム配列が決定されている枯草菌と大腸菌においてtmRNA変異株を用いて、各種生理的条件下（主にストレス下）でのtmRNAの標的タンパク質（遺伝子）を網羅的に同定する。そのために、標的タンパク質を特異的に検出する系を枯草菌および大腸菌において確立し、それぞれ異なる条件下で複数の標的タンパク質を同定する。より多くの標的タンパク質を同定することによりタンパク質分解のネットワークを明らかにするとともに、それらの生理的意義を解明することを通してトランス・トランスレーションの新しい遺伝子発現機構と

しての位置を確立する。また、翻訳がmRNAからtmRNAへと切り替わる位置を解析することにより、トランス・トランスレーションにおけるmRNA翻訳切り替えの機構についても新しい知見が得られることが期待できる。

## ＜研究開始時の研究計画＞

標的タンパク質の検出と単離：tmRNAはトランス・トランスレーションにおいて標的となるタンパク質のmRNAの翻訳を自身のコードするタグペプチドの翻訳に切り替え、その結果合成されたキメラペプチドを標的としてプロテアーゼが分解する。tmRNAがコードするタグペプチドのアミノ酸配列は、大腸菌ではAANDENYALAAでありことが判っており、また枯草菌ではAGKTNSFNQNALAAと予想される。タグペプチドのC末端の疎水性アミノ酸は細胞内のATP依存タンパク質分解酵素の標的となっており、結果としてトランス・トランスレーション産物は選択的に分解される。そこでタグペプチドのC末端のAA配列を親水性のDDに変換することで、分解を受けないタグペプチドをコードするtmRNAを設計する。さらに、トランス・トランスレーション産物の精製を容易にするべく、タグペプチドの内部配列としてヒスチジンを6個並べた配列（His-tag）を加える。具体的には大腸菌ではAAHHHHHHLDD、枯草菌ではAGKTHHHHHHVALDDのタグ配列をもつ変異体tmRNA遺伝子を合成する。これを、大腸菌では変異体遺伝子をlow copyプラスミド（pMW）に組み込みtmRNA欠失株に導入し、枯草菌では発現調節用プラスミド（pMUTIN）を用いて変異体遺伝子をPspacプロモーター制御下にゲノム上で置き換えることにより導入し、発現を誘導・制御できるようにする。種々の培養条件下で変異体tmRNAをもつ菌を培養し、その全タンパク質からニッケルカラムを用いてHis-tagをもつペプチドを分画する。それを1次元または2次元ゲル電気泳動で分画した後、His-tag抗体を用いたWestern-blottingによりHis-tagラベルされたタンパク質を検出する。



## 標的タンパク質の同定

2次元電気泳動のゲルから単離した各タンパク質のN末端アミノ酸配列をペプチドシーケンサーで決定した結果、あるいは単離したタンパク質の酵素消化断片を質量分析計で解析した結果を、データベースで検索することによりそのタンパク質が何であるかを同定する。

## 標的タンパク質の解析

単離したタンパク質を数種類のエンドペプチダーゼで分解した断片を、あるいはその分解物からニッケルカラムを用いてHis-tagすなわちタグペプチドを含むペプチド断片を精製したものを、マスペクトル等で解析することによって翻訳切り替え位置を決定する。

## 標的タンパクの生理的意義の解明

同定した標的タンパク質の抗体を作成し、それを用いてtmRNAの有無を初めとした様々な条件下で細胞内存在量を測定し、そのタンパク質の遺伝子発現におけるトランス・トランスレーションの生理的意義を明らかにする。特異的トランス・トランスレーション産物の生成機構の解析

複数の標的タンパク遺伝子の翻訳切り替え位置の決定と、mRNAのノーザンハイブリダイゼーションによる切断位置との関係を調べる。それにより、トランス・トランスレーションがmRNAの特異的切断によるものなのか、あるいはそれ以外の原因によるものなのかを明らかにする。

## <研究期間の成果>

まず本研究を開始するに当たって、枯草菌におけるトランス・トランスレーション産物を解析することで、枯草菌tmRNAのタグペプチドのアミノ酸配列が予想通りであったことを確認した(文献番号3)。この情報を元にして枯草菌tmRNAのcoding領域を確定し、枯草菌および大腸菌のそれぞれにおいてトランス・トランスレーション産物を特異的に検出、単離するシステムを開発した(文献番号1)。AAHHHHHLLDDおよびAGKTHHHHHVALDDのタグ配列をもつ変異体tmRNAが、それぞれ大腸菌および枯草菌において発現していることを確認し、またそれぞれトランス・トランスレーションを起こすことを確認した。

それぞれAAHHHHHLLDDおよびAGKTHHHHHVALDDのタグ配列をもつ変異体tmRNAを発現させた大腸菌および枯草菌の細胞抽出液から、ニッケルカラムを用いてトランス・トランスレーション産物を粗精製し、二次元電気泳動を行った後、His-tagに対する抗体を用いて、複数のトランス・トランスレーション産物のスポットを検出した。複数の特定のスポットとしてシグナルが検出されることから、特定のタンパク質の特定の位置においてトランス・トランスレーションが頻繁に起こっているものと考えられ、トランス・トランスレーションが、偶然に分解されたmRNA全般に対して起こっていることに加えて、特定の遺伝子発現に関わっていることが示唆された。また、生理的条件の違いによって、標的タンパク質が異なることを明らかにした(文献番号1)。例えば、枯草菌の標的タンパク質は通常のと高温では大きく異なり、また、全体として高温のときほど、トランス・トランスレーションが盛んに起こっていた。また、枯草菌のtmRNA遺伝子は、それ自身ストレス応答遺伝子であり、ストレス下での増殖等に必要であることを明らかにした(文献番号5)。

次に、枯草菌および大腸菌のそれぞれにおけるトランス・トランスレーション産物を二次元電気泳動の各スポットから単離・精製した。N末端アミノ酸配列の分析か

ら、枯草菌では8種類の標的タンパク質(YqaP, YtoQ, TreP, YloN, PerR, TufA, FolA, GsiB)を明らかにした(文献番号1)。この中で、4種類(YqaP, TreP, YloN, TufA)は遺伝子配列から推定される分子量よりも電気泳動から推定される分子量の方が明らかに小さいので、mRNAのコード領域の途中でトランス・トランスレーションが起こっているものと予想された。また、8種類の標的遺伝子のうちの3種類(YtoQ, TreP, FolA)までもが、カタボライト抑制を受けるCre配列を持っていた。

そこで、まず枯草菌TreP(トレハロースの細胞内への取り込みに関する酵素)のトランス・トランスレーション産物について詳細な解析を行った。TreP-非分解型タグペプチド融合タンパク質をいくつかのプロテアーゼで消化し、その断片の中からC末端断片をニッケルカラムを用いて精製した。その後、MALDI TOF MASSを用いてアミノ酸配列を解析し、TrePのどの部分からタグペプチドに置き換わっているのかを明らかにした。TrePのトランス・トランスレーションはtreP遺伝子の内部に存在するCre配列(カタボライト抑制に関わるリプレッサータンパク質CcpAの認識配列)のすぐ上流から起こっていた。そこでCcpAを欠損株させたところ、予想通りTrePのトランス・トランスレーション産物は消失した。すなわち、CcpAがtreP遺伝子の内部に存在するCre配列に結合することで、転写をブロックすることが原因でトランス・トランスレーションを起こすものと考えられた。

CcpA欠損株におけるトランス・トランスレーション産物を二次元電気泳動で解析したところ、TreP以外にもトランス・トランスレーション産物の多くが消失していた。この結果は、トランス・トランスレーション反応がCcpAを介したカタボライト抑制全般に関与する可能性を示唆する。

次に、ストレス応答遺伝子である枯草菌PerRのトランス・トランスレーション産物についても解析を行った。その細胞内における存在量は、高温で培養した場合の方が圧倒的に多いことが明らかになった。

一方、大腸菌ではトランス・トランスレーションの標的として6種類のタンパク質(TnaA, Fad, GatD, YfiA, RpsF, MetE)を明らかにした。これらのトランス・トランスレーション産物の標的遺伝子をクローン化し、標的タンパク質の大量発現系の構築を試みた。これまでに、TnaA, MetE, YfiAに関して、大量発現を確認している。メチオニン生合成系の酵素であるMetEのトランス・トランスレーション産物を解析したところ、MetE内部の複数の地点からトランス・トランスレーションが起こっていることがわかった。

## <国内外での成果の位置づけ>

トランス・トランスレーションが「どのようなときに」「どのような目的で」「どのようなメカニズム」で起こるかという点が争点となっている。「どのようなときに」「どのような目的で」という点に関しては、これまでトランス・トランスレーションは「偶然に起こってしまった問題を、場当たりに対処するというシステム」という消極的なイメージで捉えられてきた。本研究は、トランス・トランスレーションが「細胞内における遺伝子発現制御に積極的に関わる」ことを示したものである。なお、トランス・トランスレーションとカタボライト抑制の関係については、我々の提唱が初めてである。

## <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

単離・精製されてくるトランス・トランスレーション

産物の量が予想以上に少なく、解析が困難であった。特に、トランス・トランスレーション産物のマスペクトルによる解析では、サンプルの量が少ないので再現性ある結果を得るのに苦労した。そこで、大腸菌においては標的タンパク質の大量発現を試みており、いくつかの標的タンパク質は大量発現に成功したが、プロモーター領域を強力なものに置き換えても発現が確認出来ないものがあった。大量発現のできない標的タンパク質はその発現が翻訳レベルで調節されている可能性も考えられ、トランス・トランスレーションによる調節との関係も興味深いところであるが、依然として解析の困難さは解消されていない。一方、枯草菌では大腸菌のように標的タンパク質の大量発現が確立しておらず、解析の困難さは解消されていないままである。以上のような問題が解決されないため、当初予定していた網羅的解析とはいかず、限られた数のトランス・トランスレーション産物の解析およびその機構の解析にとどまらざるを得ない状況となってきた。

また、mRNAのノーザンハイブリダイゼーションによる切断位置の特定についても苦戦を強いられている。これは、細菌におけるmRNAの分解が激しいことに加えて、トランス・トランスレーションを起こす原因と考えられる不完全なmRNAが、トランス・トランスレーションを起こさない完全長mRNAに比べて不安定かつ少量であることに起因するものと考えられる。現在、RT-PCR等を用いて、微量のmRNAの検出・定量を試みているところである。

#### <今後の課題>

我々が見つけた数種類の標的mRNAのそれぞれが、どのようなメカニズムでトランス・トランスレーションを起こすのか、それら多様と考えられるメカニズムの中から何らかの共通性を見いだせるのか、等について調べていく。最近、我々は無細胞タンパク質合成系を用いて、mRNAの途中において、mRNAの分解を伴わない形で、トランス・トランスレーションが起こりうることを示した (Asano, K., Kurita, D., Takada, K., Konno, T., Muto, A. and Himeno, H. (2005) Competition between trans-translation and termination or elongation of translation. *Nucleic Acids Res.* 33, 5544-5552)。このようなメカニズムが、我々が見つけた個々の標的mRNAにおいても働いているのかどうかについても明らかにしていきたい。

トランス・トランスレーションの生理的意義については、今回カタボライト抑制への関与が明らかになったが、TrePの解析に加えて、CcpA欠損株におけるTreP以外のトランス・トランスレーション産物の解析等を通して、更にその関係についての理解を深めていきたい。一方、枯草菌PerRの解析を通してトランス・トランスレーションとストレス応答との関係について明らかにしていく予定である。また、我々が見つけた個々の標的mRNAの解析を通して、カタボライト抑制やストレス応答以外における生理的意義についても明らかにしていきたい。

#### <研究期間の全成果公表リスト>

1. 205101738

Fujihara, A., Tomatsu, H., Inagaki, S., Tadaki, T., Ushida, C., Himeno, H. & Muto, A. Detection of tmRNA-mediated trans-translation products in *Bacillus subtilis*. *Genes to Cells* 7, 343-350 (2002).

2. 205101741

Hanawa-Suetsugu, K., Bordeau, V., Himeno, H., Muto, A. &

Felden, B. Importance of the conserved nucleotides around the tRNA-like structure of *Escherichia coli* transfer-messenger RNA for protein tagging. *Nucleic Acids Res.* 29, 4663-4673 (2002).

3. 205101745

Ito, K., Tadaki, T., Lee, S., Takada, K., Muto, A. & Himeno, H. Trans-translation mediated by *Bacillus subtilis* tmRNA. *FEBS Lett.* 516, 245-252 (2002).

4. 303211421

Takada, K., Hanawa, K., Lee, S., Himeno, H. & Muto, A. The structure and function of tmRNA. *Nucleic Acids Res. Supplement* 2, 65-66 (2002).

5. 303211443

武藤あきら、姫野倭太：tmRNAによるトランス翻訳と生理的機能、蛋白質核酸酵素別冊「RNAの細胞生物学」、48(4)、346-356 (2003) .

6. 401051445

Takahashi, T., Konno, T., Muto, A. & Himeno, H. Various effects of paromomycin on tmRNA-directed trans-translation. *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 27672-27680.

7. 401051450

Konno, T., Takahashi, T., Muto, A. & Himeno, H. Various effects of paromomycin on tmRNA-mediated trans-translation. *Nucleic Acids Res. Supplement* 3 (2003) 235-236.

8. 401051454

Takada, K., Hori-Takemoto, C., Kawazoe, M., Lee, S., Shirouzu, M., Yokoyama, S., Muto, A. & Himeno, H. In vitro analysis of the initial steps of trans-translation. *Nucleic Acids Res. Supplement* 3 (2003) 287-288.

9. 409122051

Konno, T., Takahashi, T., Kurita, D., Muto, A. & Himeno, H. A minimum structure of aminoglycosides that causes an initiation shift of trans-translation. *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) 4119-4126.

10. 501072124

Himeno, H., Hanawa-Suetsugu, K., Kimura, T., Takagi, K., Sugiyama, W., Shirata, S., Mikami, T., Odagiri, F., Osanai, Y., Watanabe, D., Goto, S., Kalachnyuk, L., Ushida, C. & Muto, A. A novel GTPase activated by the small subunit of ribosome. *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) 5303-5309.

11. 501072130

Konno, T., Kurita, D., Takahashi, T., Muto, A. & Himeno, H. Initiation shift of trans-translation by aminoglycosides. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 48 (2004) 299-300.