

# 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網羅的解析

●武藤 あきら ◆姫野 俵太

弘前大学農学生命科学部

## 〈研究の目的と進め方〉

tmRNA (10Sa RNA)は真正細菌に存在する安定なRNAで、tRNAとmRNAの両機能を合わせ持ち、trans-translation (トランス翻訳) という特殊な翻訳に関与する。その反応はアラニンをチャージしたtmRNAが翻訳が滞ったりリボソームに入り、出来かけのペプチドを受け取り、次にそのRNAがコードするタグペプチドを翻訳付加して翻訳を完了させる。できたペプチドは特殊なタンパク質分解酵素(Fts, Clpなど)で分解される。この反応は、停滞したりリボソームの再利用による翻訳の効率化と不完全に合成されたペプチドを分解するタンパク質の品質管理に働くと考えられている。本研究では大腸菌と枯草菌のtmRNA変異株を用いて各種生理的条件下でのこの分解系の標的となるタンパク質を網羅的に同定し、そのトランス翻訳位置を生化学的に解析することにより、トランス翻訳の生理的意義ならびに分子機構を解明し、さらにこの反応の新しい遺伝子発現制御機構としての意義を明らかにすること目的とする。

## 〈研究開始時の研究計画〉

大腸菌と枯草菌それぞれにタグペプチドのC-端のアミノ酸に変えることによりタグが付加したペプチドが分解されず、さらにタグの内部配列をヒスチジン6個を並べたHis-tag配列を持たせた変異体tmRNA遺伝子を導入する。His-tagをもつトランス翻訳産物は分解されず細胞内に蓄積されるので、全タンパク質からニッケルカラムを用いてHis-tagを持つペプチドを分離し、それを1次元および2次元アクリルアミドゲル電気泳動で分画し、抗His-tag抗体を用いたWestern-blottingによりHis-tagを付加

されたタンパク質を検出・単離する(図)。そのN-端のアミノ酸配列を決定しデータベースで検索することにより同定する。さらに、その産物のマスペクトルによる分析で、タグ付加位置を決定することにより、何故トランス翻訳が起きたかを推測し、その生理的意義を明らかにする。また、トランス翻訳を受けるmRNAの切断位置もノーザン法、S1-mapping法などをもちいて決定する。

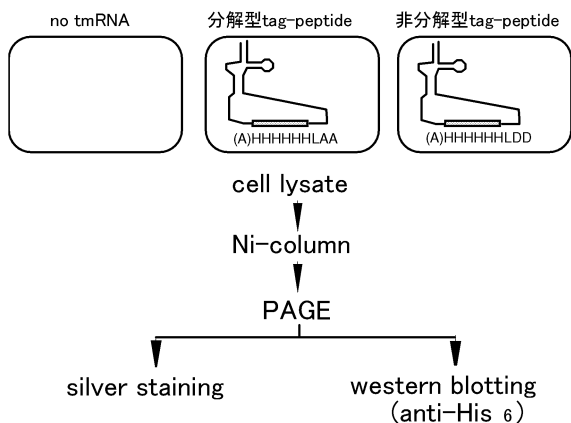
## 〈研究期間の成果〉

2000年度は計画どおり大腸菌と枯草菌で上記の変異体tmRNA遺伝子を組み込んだ株を作成し、in vivoにおけるトランス翻訳反応産物を検出する系を確立し、種々の培養条件下での反応産物の量と質の違いを解析した。また、高温などのストレス条件下ではtmRNA合成量が増加する事を明らかにした。2001年度は本格的に反応産物の分離・同定を目的とした解析を進めた。単離した産物のN端アミノ酸配列を決定することにより、枯草菌で8種、大腸菌で約10種の標的タンパク質を同定することに成功した。また枯草菌では高温ストレス下ではtmRNA量の増加と対応してトランス翻訳産物の量が顕著に増加すること、標的タンパク質の種類も変化することを明らかにした。標的タンパク質の種類から、トランス翻訳はカタボライト抑制、アミノ酸合成、高温、酸化等のストレス応答などに関与していることが示唆された(0202051625)。それらの現象にどのように関与するかが、課題として取り上げることとなった。反応産物のマスペクトルによる分析は、産物を量的にとる段階で問題があり、タグを含むペプチドを量的に濃縮する手法の改良を行った。

また、枯草菌におけるトランス翻訳のメカニズムに関して、タグペプチドの翻訳切り換え位置の決定と枯草菌tmRNAが大腸菌の中でも機能する事を明らかにした(0205101745)。大腸菌の多数のtmRNA変異体とin vitroトランス翻訳系を用いた解析から、tRNA及びmRNAとしての機能に必要な部位の特定を行った(0202051636; 0202051647)。

## 〈国内外での成果の位置づけ〉

2001年秋に米国MITのグループが大腸菌でほぼ同様の系を用いたトランス翻訳産物の解析結果を報告した。彼らは数種類の標的タンパク質を同定しているが、それらは我々の解析結果とは一致していないし、それらの生理的意味についての解析は行われていない。その点に関して競合することになったが、そのグループは現時点まで続報はない。また、tmRNAに依存した種々の現象(ファージの増殖、細胞周期、DNA複製、運動性、胞子形成などの異常など)が報告されているが、何が直接原因かはいずれも明かではない。現在、トランス翻訳の生理的機能の多くは、ペプチドの分解よりはリボソームの再利用による翻訳の効率化に依存しているという考えが支配的である。



図の説明： tmRNAのタグコード領域にHis-tag配列をいれ、さらにC-端の配列をプロテアーゼ分解型のLeu-Ala-Alaから非分解型のLeu-Asp-Aspに変えることによりtrans-translation産物が分解されないようにする。産物をニカラム、PAGEで精製し、N-端アミノ酸配列から標的タンパク質を同定する。

#### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

翻訳切り替えの位置を決定するためにはトランス翻訳産物のマスペクトルによる解析が必要だが、産物の量が予想以上に少なかったため結果が2001年時点では達成できなかった。その後、枯草菌では反応産物解析をTrePタンパク質にしぼり、大量調製法を開発し、その位置を決定を行っている。大腸菌では標的タンパク質のひとつMetEについて大量発現系を用いて、反応産物の解析を行っている。

また、トランス翻訳を受けたmRNAの切断位置を決定するために様々な方法を用いたが、これも量的・技術的な問題での困難により成功しなかった。

#### 〈今後の課題〉

同定した標的タンパク質の中にはストレス応答遺伝子産物、catabolite repressionを受ける遺伝子産物など興味深いものが含まれている。今後はこれら個々の標的タンパク質についてそのトランス翻訳を受ける生理的意味を明らかにしてゆく。現在、標的タンパク質のいくつかのN端配列に対するペプチド抗体を作成しておりそれらとHis-tag抗体を併用して、培養条件による反応産物の消長を解析することにより、標的タンパク質遺伝子の発現との関連を明らかにする。また他の反応産物のマスペクトルによるタグ付加位置の解析も進め、トランス翻訳が起きる一般則を明らかにしてゆきたい。

#### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. 0202051625

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. 0202051636

Lee, S., Ishii, M., Tadaki, T., Muto, A., Himeno, H.: Determinants on tmRNA for initiating efficient and precise trans-translation: some mutants upstream of the tag-encoding sequence of *Escherichia coli* tmRNA shift the initiation point of trans-translation in vitro. *RNA*, 7:999-1012 (2001)

3. 0202051647

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 (2001)

4. 0205101745

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