

トランス・トランスレーションの分子メカニズム

姫野 俵 太¹, 栗田 大 輔¹, 高田 一 馬¹, 今野 貴 之¹,
塙 (末次) 京 子², 竹本 千 重², 川添 将 仁², 横山 茂 之²,
行木 信 一³, 河合 剛 太⁴, 武藤 昱¹

トランス・トランスレーションは、情報分子 mRNA と情報を読みとる分子 tRNA のキメラ RNA である tmRNA がその両方の機能を果たすことにより mRNA から翻訳を引き継ぎ、結果として2本の RNA から1本のキメラペプチドを合成する変則的翻訳システムである。これにより何らかの原因で滞ってしまった翻訳は解消され、そこから生じる異常タンパク質は分解の目印が与えられる。一連の反応は「何らかの原因で滞ってしまった翻訳を解消し、そこから生じる異常タンパク質を処理する真正細菌に特異的な細胞内品質管理システム」と解釈されるが、それだけではなく、様々な細胞機能に関係していることがわかってきた。リボソーム上において、tRNA と mRNA がキメラ分子 tmRNA に翻訳を受け渡す巧妙な仕組みが、今解き明かされようとしている。

1. tmRNA

tmRNA の存在は、大腸菌においてすでに1979年に Ray

と Apirion¹⁾によって明らかにされていた。現在ではその機能から tmRNA, あるいは遺伝子名から SsrA RNA と呼ばれているが、当初はその大きさ(沈降定数)から 10Sa RNA と呼ばれていた。

1994年になって、筆者ら²⁾および井口ら³⁾は、tmRNA の両末端からなる二次構造が tRNA の一部と似た構造をとることを発見した。その後、塩基配列比較および酵素あるいは化学試薬に対する抵抗性の解析をもとに tmRNA の二次構造モデルを提唱した⁴⁾ (図 1a)。

tmRNA の両末端は tRNA の半分 (アミノ酸受容ステム + 3'末端 CCA 配列 + T アーム) と良く似た二次構造をとる (tRNA ドメイン), そこには tRNA に普遍的に存在する二つの修飾塩基が存在する⁵⁾。tmRNA の前駆体からのプロセッシングには、tRNA のプロセッシングを司る RNase P が関わる³⁾。報告されている全ての tmRNA には、tRNA^{Ala} のアイデンティティ決定部位であるアミノ酸受容ステムの第3番目の G-U 塩基対と 3'末端から4番目の A が保存されている (図 1a, 2)。一方、タグペプチドをコードする領域 (mRNA ドメイン) は、tRNA ドメインの一端から派生するバルジを含む長いヘリックスの先端部分を作る大きなループの中の四つのシュードノット構造 (PK1-PK4) に囲まれるように存在している⁶⁾。

¹ 弘前大学農学生命科学部応用生命工学科 (〒036-8561 弘前市文京町 3)

² 理化学研究所ゲノム科学総合研究センター (〒230-0045 横浜市鶴見区末広町 1-7-22)

³ 群馬大学工学部生物化学工学科 (〒376-8515 群馬県桐生市天神町 1-5-1)

⁴ 千葉工業大学工学部生命環境科学科 (〒275-0016 千葉県習志野市津田沼 2-17-1)

Molecular mechanism of *trans*-translation

¹ Hyouta Himeno, ¹ Daisuke Kurita, ¹ Kazuma Takada,

¹ Takayuki Konno, ² Kyoko Hanawa-Suetsugu, ² Chie Takemoto, ² Masahito Kawazoe, ² Shigeyuki Yokoyama,

³ Nobukazu Nameki, ⁴ Gota Kawai, ¹ Akira Muto (¹ Department of Biochemistry and Biotechnology, Faculty of Agriculture and Life Science, Hirosaki University, Bunkyo-cho 3, Hirosaki 036-8561, Japan; ² RIKEN Genomic Sciences Center, 1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi, Yokohama 230-0045, Japan; ³ Department of Biological and Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Gunma University, Kiryuu 376-8515, Japan; ⁴ Department of Life and Environmental Sciences, Faculty of Engineering, Chiba Institute of Technol-

ogy, Chiba 275-0016, Japan)

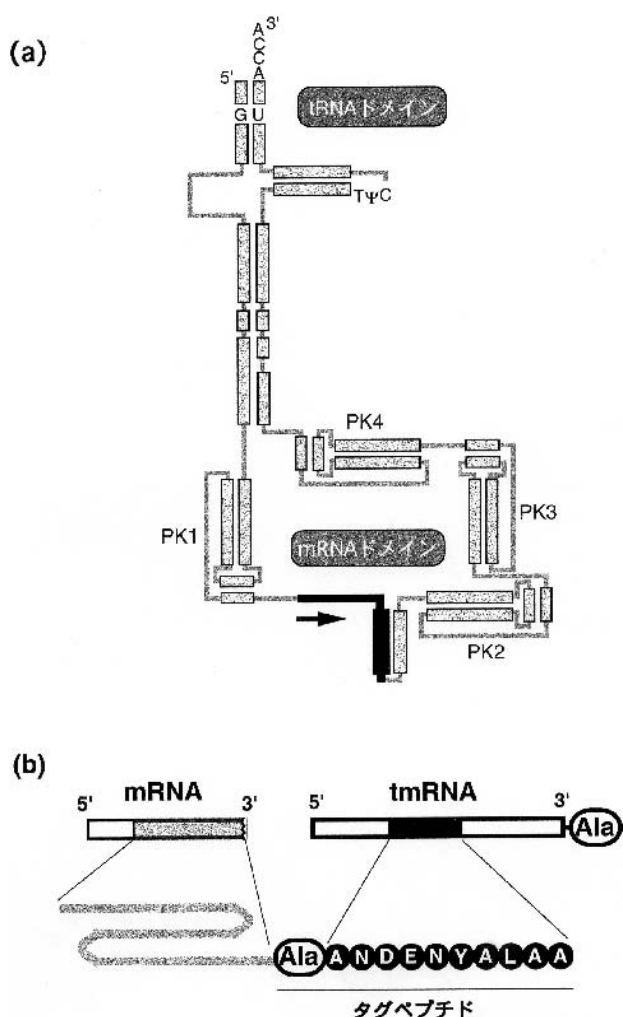


図1 (a) tmRNAの二次構造。タグペプチドコード領域は黒および矢印で示した。tRNAドメインには、二つの修飾塩基Tと Ψ が存在する。(b) 2分子のRNAから1分子のポリペプチドを合成する変則的翻訳、トランス・トランスレーション。タグペプチドコード領域は黒で示した。

細胞内小器官やシアノバクテリアなどでは、二つのRNA断片が部分的に塩基対を形成することで、一つのtmRNAとして機能するようになる例が知られている⁷⁾。

2. tmRNAの機能—tRNAとしての機能と mRNAとしての機能—

筆者らは、tmRNAが部分的にtRNAと似た二次構造をとることに加えてtRNA^{Ala}のアイデンティティ決定部位を持つおかげで、tRNAと同じようにアラニルtRNA合成酵素(AlaRS)の基質となって3'末端にアラニンを結合することを明らかにした²⁾。さらに、tmRNAがリボソームに結合すること、そして、リボソームへの結合能はアミノ酸結合能の有無に依存すること、を明らかにした⁸⁾。これらの結果は、tmRNAがtRNAとしての機能の一部を有することを示したもので、tmRNAの翻訳への関与を示唆する

ものであった。その一方で、tRNAとは異なり、タンパク質合成の場であるポリソームにはほとんど結合していないという結果も得られており⁸⁾、翻訳への関与があるとしても、それほど単純なものではないと予想された。

tmRNAのmRNAとしての機能の発見は、1995年のTuらの報告⁹⁾がきっかけとなった。「大腸菌内で大量発現させた異種翻訳産物の途中のいたるところから、特定の11アミノ酸(タグペプチド)に置き換わる」という内容であった。そして、タグペプチドのうちの最初のアラニンを除く10アミノ酸の配列は大腸菌のtmRNAの塩基配列の一部をアミノ酸配列に読み替えたものと一致していた。tmRNA遺伝子を欠損させた大腸菌ではこの現象が見られないことから、タグペプチドはtmRNAあるいはtmRNA遺伝子に由来しているものと考えられた。ただし、最初のアミノ酸であるアラニンはここにはコードされていない。この報告をもとに、Keilerらは*in vivo*において、「終止コドンを欠くように設計したmRNAを鋳型にして合成された翻訳産物のC末端側にはタグペプチドが付加されていること」¹⁰⁾を示し、筆者らは、以下に述べるように、*in vitro*において「tmRNAがtRNAとしての機能とmRNAの機能の両方を持つこと」、また「mRNAとして働くためにはtRNAとしての機能が必須であること」を示した^{11,12)}。これらは、トランス・トランスレーションという新しい変則的翻訳の発見にとっての重要な基礎となった。

3. 大腸菌粗抽出液を用いた生体外翻訳系を用いたトランス・トランスレーションの証明

Tuらの報告⁹⁾を受けて筆者らは、tmRNAの役割について以下のような作業仮説を立てた。アラニンを結合したtmRNAがtRNA^{Ala}のようにタンパク質合成の途中のリボソームに入り込み、次の段階としてそれまでであったmRNAを追い出して自分自身mRNAとして働く。その結果として、tmRNAにアミノアシル化されたアラニンは、もとのmRNA由来のペプチドとタグペプチドのつながりとなる。このように考えればタグペプチドの最初のアラニンがなぜtmRNAにコードされていないのかという疑問は解決する。そして、tmRNAがポリソームに含まれていないという実験結果は、mRNAを追い出すということで矛盾なく説明できる。

この仮説が正しいとすると、tmRNAはリボソーム上でtRNAとmRNAの両方の機能を同時に果たすということになる。そこで、大量発現させた大腸菌tmRNAを用いて、*in vitro*でpoly(U)依存の各種アミノ酸の取り込みを調べたところ、poly(U)にコードされているフェニルアラニンに加えて、アラニンやチロシンなどタグペプチドを構成するアミノ酸の取り込みが、反応系に加えたtmRNAの量に依存して見られた¹²⁾。取り込まれたアミノ酸のモル比はタ

ゲペプチドを構成するアミノ酸のモル比と一致しており、タグペプチドを構成するアミノ酸以外のアミノ酸の取り込みは見られなかった。したがって、取り込まれたアミノ酸は *in vitro* において tmRNA を鋳型として合成されたタグペプチドに由来しているものと考えられる。この取り込みは poly(U) を系に加えていないときには見られないことから、tmRNA が単に通常の mRNA として働いているという単純なものではないことがわかる。おそらく poly(Phe) の C 末端側にタグペプチドが付加された融合ペプチドが合成されたものと考えられる。さらにアラニン結合のためのアイデンティティー決定因子である G-U 塩基対を A-U に変換することでアラニン結合能を失った tmRNA の変異体を用いたところ、アラニンやチロシンの取り込みは見られないことから、この反応にとって tmRNA がアミノアシル化されていることが必須であることも明らかになった。アミノアシル化されていることは tmRNA のリボソームへの結合にも必須であった。以上の結果は、tmRNA が「tRNA と mRNA の二つの機能を持っていること」、「mRNA として働くためには tRNA として機能することが必須であること」を示したもので、当初の仮説が妥当なものであったことを支持する。すなわち、「2 分子の RNA から 1 分子のポリペプチド」というトランス・トランスレーションの概念が浮かび上がってきたのである (図 1b)。

筆者らはさらに、tmRNA が受容するアミノ酸の種類をアラニンからヒスチジンに変換するように tmRNA のアミノ酸受容システムの配列を変化させた¹³⁾。この変異体は予想通りアラニンではなくヒスチジンを受容するようになったが、それと同時に、この変異体を作るタグペプチドにはヒスチジンが含まれるようになった。この結果は、tmRNA にアミノアシル化されたアミノ酸が確かにタグペプチドへ取り込まれていることを示しており、mRNA にも tmRNA にもコードされていないタグペプチドの最初のアラニンが tmRNA にアミノアシル化されたアラニンであることが明らかになった。この結果は、トランス・トランスレーション反応にとって tmRNA の 3' 末端に結合するアミノ酸が必ずしもアラニンである必要がないことも示している。

4. トランス・トランスレーションの生理的役割

Keiler らは、C 末端にタグペプチドを持ったトランス・トランスレーション産物が、細胞内で優先的に分解を受けることを示した¹⁰⁾。その後、分解酵素として、細胞質では ClpAP および ClpXP、細胞膜では FtsH、ペリプラズムでは Tsp、が特定された^{14,15)}。Tsp 以外は ATP 依存性タンパク質分解酵素である。タグペプチドには SspB という ClpXP の認識を強めるタンパク質が特異的に結合するが、そのため細胞質におけるトランス・トランスレーション産物のほとんどは ClpXP によって分解される¹⁶⁾。

一連のトランス・トランスレーション反応は「何らかの原因で滞ってしまった翻訳を解消し、そこから生じる異常タンパク質に分解の目印を与える真正細菌に特異的な細胞内品質管理システム」と解釈される。細胞にとっては、「翻訳の停滞により不足するリボソームの再利用」と「不完全タンパク質の分解」という二つの意味を持つ^{6,17)}。それに加えて、トランス・トランスレーションは mRNA の分解を促進する¹⁸⁾。不要な mRNA は早く処理してしまうことで、無駄なタンパク質の合成を回避しようという戦略である。

このような一般的な役割に加えて、あるいはそれを通して、トランス・トランスレーションは、様々な細胞の機能に関わることがわかってきた¹⁹⁾。tmRNA を欠損させた場合、致死 (*Neisseria*)²⁰⁾、運動能力の減少 (大腸菌)³⁾、ストレス下での増殖速度の減少 (大腸菌、枯草菌)²¹⁾、ファージの誘導阻害 (大腸菌)^{22,23)}、病原性の低下 (サルモネラ)²⁴⁾、リプレッサー活性の上昇 (大腸菌)²⁵⁾、細胞周期 (DNA 合成のタイミング) のずれ (*Caulobacter*)²⁶⁾、胞子形成の異常 (枯草菌) など、様々な表現型の異常が観察されている。

tmRNA の欠損は、高温、エタノール、重金属などのストレス条件下における枯草菌の増殖に大きな影響をもたらす²¹⁾。ストレス条件下においては通常よりも頻繁に翻訳の中断が起こるために、tmRNA の欠損が増殖に対して通常よりも大きな影響を与えるのであろう。一方、ストレス条件下では細胞内の tmRNA 量は顕著に増加し、トランス・トランスレーション産物も数倍多くなる²⁷⁾。数々のストレスの中を生き抜いてこなければならなかった細菌の進化の過程において、トランス・トランスレーションは大きく貢献してきたに違いない。だからこそ、この機構が真正細菌に広く保存されているのであろう。

tmRNA は真正細菌に普遍的に存在する他、一部の葉緑体⁷⁾やミトコンドリア²⁸⁾にもその存在が確認されている。これらの生物や細胞内小器官では、翻訳停滞の解消システムとしてトランス・トランスレーションが機能しているものと考えられる。真核生物 (細胞質) では tmRNA に相当する分子は報告されていないが、かわりに nonstop mRNA decay (NSD: 終止コドンがない場合の mRNA 分解システム)²⁹⁾ および no-go mRNA decay (NGD: 途中で翻訳が停滞した場合の mRNA 分解システム)³⁰⁾ と名付けられた翻訳停滞の解消システムの存在が指摘されている。

5. tmRNA 結合タンパク質

tmRNA に結合するタンパク質としては、RNase P、AlaRS、EF-Tu、S1、SmpB をあげることができる。

RNase P は tmRNA のプロセッシングに関わり、AlaRS は tmRNA へのアラニンの結合を触媒する。いずれも、tRNA ドメインを認識する (図 2)。

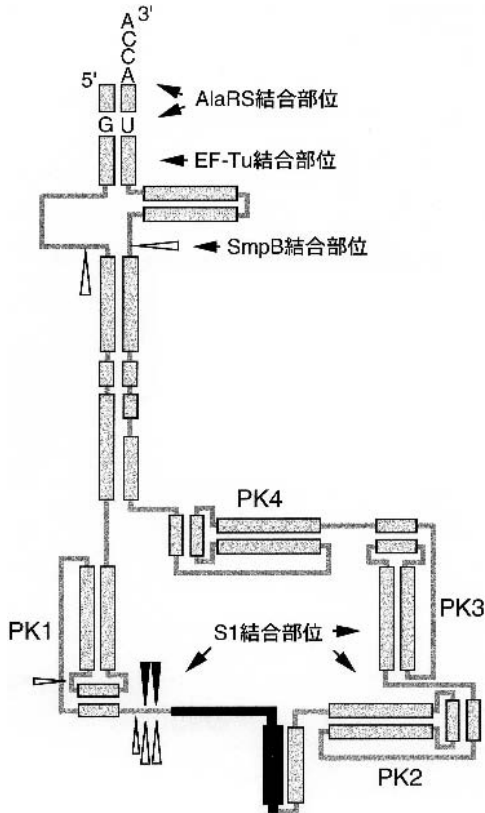


図2 tmRNA 結合タンパク質の結合部位 (矢印) および機能部位 (矢頭)

塩基置換により、トランス・トランスレーションの効率に影響を与える部位を白矢頭で、翻訳再開地点をシフトさせる部位を黒矢頭で示した。矢頭の大きさは、影響の大きさを表す。

通常の翻訳過程において、GTP を結合した EF-Tu はアミノアシル化した tRNA (aa-tRNA) のアミノアシル末端と T ステムを認識し、3 者複合体 (EF-Tu/aa-tRNA/GTP) としてリボソーム上の A サイトに運ばれる。EF-Tu は、aa-tRNA の場合と同じようにアミノアシル末端と T ステムを持つ Ala-tmRNA を認識する (図 2)³¹⁾。

リボソームタンパク質 S1 は、リボソームの小サブユニットに弱く結合するタンパク質で、多くは細胞質に存在する。特に SD 配列を持たない mRNA をリボソームに運び、その mRNA の翻訳開始の効率を高める働きがあるものと考えられている³²⁾。また、シュードノット構造を持つ mRNA に結合しやすいという報告もある。クロスリンク実験から、S1 は tmRNA 上のタグペプチドコード領域、PK2、PK3 と近接していることが示唆されている (図 2)³³⁾。

SmpB は、分子量約 18kDa の塩基性のタンパク質で、NMR によって *Aquifex aeolicus*³⁴⁾ および *Thermus thermophilus*³⁵⁾ の SmpB の構造が決定されている (図 3a)。SmpB をコードする遺伝子はゲノム上の tmRNA 遺伝子のすぐ上流にコードされている。SmpB を細胞から欠失させると、トランス・トランスレーションは起こらなくなるし、

tmRNA はリボソームと結合できなくなる³⁶⁾。

大腸菌内で SmpB を大量発現させた細胞から SmpB と tmRNA を含む複合体を精製したところ、そこには tmRNA および S1 の他に、PrsA (ホスホリボシルピロリン酸合成酵素)、VacB (RNase R)、YfbG というタンパク質が含まれていた³⁷⁾。RNase R は、トランス・トランスレーションとカップルして終止コドンを欠いた mRNA を 3' 末端から分解していく³⁸⁾。また *Caulobacter* では、RNase R と SmpB がそれぞれ tmRNA の分解と保護に関わることで細胞周期を調節している³⁹⁾。

6. 精製した因子を用いての *in vitro* トランス・トランスレーション系

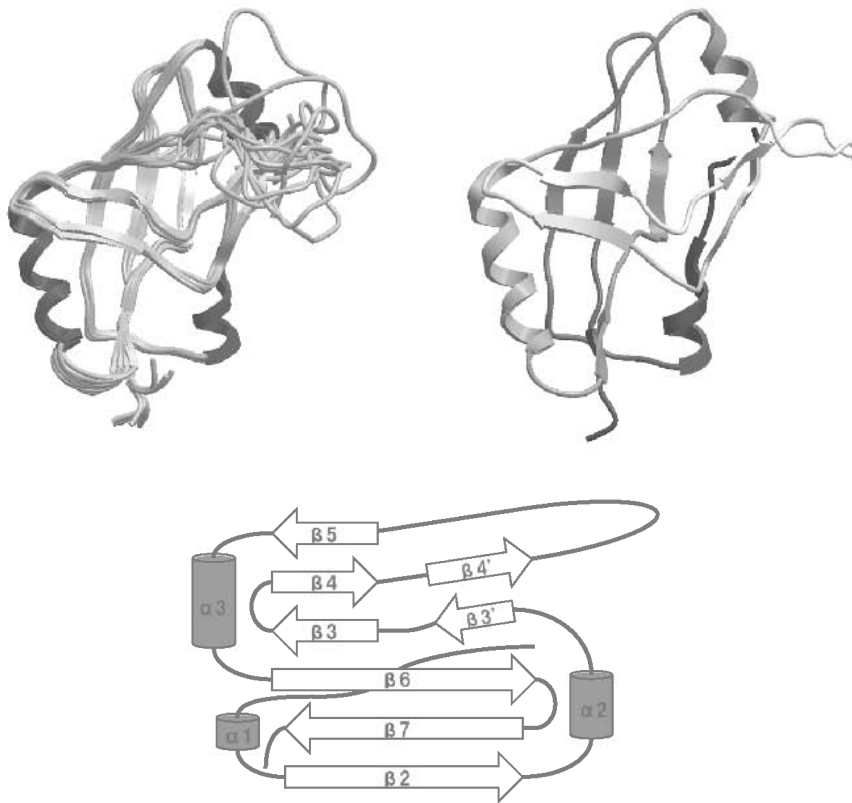
前述したように筆者らは、大腸菌細胞抽出液を用いて poly(U) 依存の poly(Phe) 合成とカップルさせた形で、tmRNA 由来のタグペプチド合成、すなわちトランス・トランスレーションを *in vitro* で再現させることに成功した¹²⁾。その後、筆者らを含むいくつかのグループは、精製した大腸菌あるいは好熱菌由来の翻訳因子を用いてトランス・トランスレーションを *in vitro* で行わせることに成功している^{40~42)}。*in vitro* でトランス・トランスレーションを行わせるには、通常の *in vitro* 翻訳系に必要な因子 (リボソーム、mRNA、アミノアシル tRNA、EF-Tu、EF-G、場合によっては開始因子や終結因子) に加えて Ala-tmRNA と SmpB が必要であり、またそれで十分である。

精製した因子を用いる系の利点は、トランス・トランスレーションにとっての必要最小限の因子を特定できることに加えて、必要な因子を系から除くことで反応の中間体を得ることが可能になること、必要な因子の種類や量を調節することで速度論解析を初めとした様々な反応機構の解析が可能になること、等である。例えば、poly(U) あるいは (UUC)₁₀ を mRNA として用い、リボソーム、Phe-tRNA^{Phe}、EF-Tu、EF-G を加えることで、mRNA の 3' 末端で poly(Phe) の合成が止まってしまったリボソームを得ることができる。そこに、Ala-tmRNA と SmpB を加えることにより、最初のペプチド転移後の (poly(Phe)-Ala-tmRNA を含む) 中間体が形成される⁴²⁾。さらに、そこに Ala-tRNA^{Ala} を加えることにより、最初のトランスロケーション後の (poly(Phe)-Ala-Ala-tRNA^{Ala} を含む) 中間体が形成される。筆者らはこの系を用いて、トランス・トランスレーションの分子メカニズムの解明に挑んだ。

7. トランス・トランスレーションの分子メカニズムにおける謎

通常、リボソーム上の A サイト、P サイト、E サイトを、構造の固い tRNA は A/T→A/A→A/P→P/P→P/E→E と転がるように動くのに対して、柔らかい mRNA は tRNA

(a)



(b)

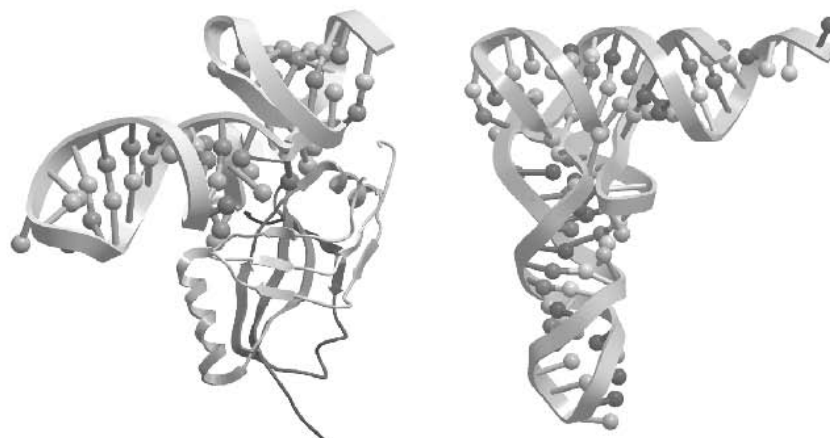


図3 (a)NMRで決定された*T. thermophilus* SmpBの立体構造 (PDB ID: 1J1H)³⁵⁾。左上は構造計算によって得られた10個の構造, 右上は平均構造, 下は二次構造。β4'とβ5の間のループについては, 構造が揺らいでいることがわかる。また, C末端の約20残基については, NMRシグナルからランダムコイル状態であることが示されており, これらの図には含めていない。(b)X線結晶回折で決定された*A. aeolicus* SmpB・tRNAドメイン複合体 (左:PDB ID: 1P6V)³³⁾と酵母tRNA (右:PDB ID: 6TNA)。tRNAドメインのアミノ酸受容ステムとtRNAのアミノ酸受容ステムを重ね合わせると, SmpBはtRNAの下半分と重なる。なお, tRNAドメインのアミノ酸受容ステムの末端付近は構造が見えていない。また, ここでもSmpBのβ4'とβ5の間のループの一部は構造が見えていない。つまり, このループは結晶中でも揺らいでいる。また, SmpBのC末端20残基程度についても構造が見えておらず, 構造が揺らいでいることがわかる。

に引っ張られるように3塩基ずつ動く。トランス・トランスレーションにおいては、tRNAの5倍の大きさのtmRNAがtRNAドメインとmRNAドメインを巧みに連動させながら、既存のmRNA+tRNAから翻訳を引き継ぐ。その途中、tmRNAのtRNAドメインがAサイトにある時、mRNAドメインではコドン・アンチコドン相互作用はない。通常の翻訳に照らし合わせてみると、以下に記すように多くの謎が見えてくる。

- ・tmRNAがストールしたリボソームを選択するメカニズムとは？
- ・tmRNAの最初のコドンが選択されるメカニズムとは？
- ・二次構造上では遠く離れたtRNAドメインとmRNAドメインとの間の三次構造的なつながりとは？
- ・リボソーム上におけるtmRNAの動的構造変化とは？
- ・Aサイトにおいてコドン・アンチコドン相互作用がないtmRNAにとっての最初のトランスロケーションとは？

8. tmRNAはどのような状態のリボソームを標的とするのか？

当初、Ala-tmRNAは「終止コドンのないmRNAの3'端で翻訳が停止したリボソームのAサイト」を標的とすることを想定していたが、それだけでなく、レアコドン(対応するtRNAが極微量であるため、出現頻度が極端に低いコドン)が連続した場所⁴³⁾や通常の終止コドン⁴⁴⁾をも標的とすることがわかってきた。終止コドンの中でも、直前にレアコドンやプロリンがある終止コドンや、終止効率が低いUGAにおいて、トランス・トランスレーションが起こりやすい^{45,46)}。

人工mRNAおよび精製した翻訳因子を用いた*in vitro*トランス・トランスレーション系においても、トランス・トランスレーションはAサイトおよびその下流にmRNAがあっても起こりうる^{41,42)}。Aサイトをめぐって、アミノアシル-tRNA、RF、RRF、Ala-tmRNAの間で常に競合が起こっている、と解釈される。この考えは、*in vivo*の実験からも支持される⁴⁷⁾。ただし、mRNAのAサイトからの下流部分が長くなるにつれて、Ala-tmRNAはアミノアシル-tRNAやRFと比べて不利になる傾向にある。おそらく、Aサイトにおいては、mRNAとtmRNAは物理的に共存できないに違いない。そして、下流部分が長くなるにつれて、AサイトにおけるmRNAのふらつきが少なくなり、その結果tmRNAが入る効率が悪くなっていくものと考えられる。

最近、RelE⁴⁸⁾やMazF(ChpAK)⁴⁹⁾といったAサイトのコドン特異的RNaseという因子の存在が明らかになってきた。RelEやMazFは、通常はアンチトキシンによってその働きがマスクされているが、飢餓時にはアンチトキシンがはずれて、翻訳が停滞しているリボソームのAサイト

にあるmRNAを切断する。細胞内ではこのようなRNaseがAサイトにおける競合に加わり、実質上、「翻訳停滞→mRNA切断→トランス・トランスレーション」という流れが主流になっていると考えられる。なお、上述の*in vitro*トランス・トランスレーション系においては、トランス・トランスレーションの過程でmRNAが切断を受けることはなかった⁴²⁾。

9. 翻訳再開地点はどのようにして決定されるのか？

tmRNA上には通常の翻訳開始を指定するSD配列やAUGコドンは存在しない。しかも、最初のトランスロケーションが起こるまでは、コドン・アンチコドンの相互作用も存在しない。それでは、どのようにして最初のコドンが規定される(トランスロケーション直後に、最初のGCAコドンがAサイトに正確に位置するようになる)のであろうか？ tmRNAに特徴的に存在する4個のシュードノット構造に着目して実験を行ったところ、コード領域よりも下流にあるPK2、PK3、PK4は、トランス・トランスレーションにとって必須ではないことが明らかになった⁵⁰⁾。唯一、翻訳再開地点(タグペプチドをコードする領域の最初の塩基)から12塩基上流のPK1が、トランス・トランスレーションの効率に大きく関わるものであることが明らかになった(図2)^{51,52)}。ただし、PK1直後の塩基欠失が翻訳再開地点をシフトさせなかったことから、翻訳再開地点の決定にはPK1そのものというよりもPK1の下流領域が関与しているものと考えられた。そして、翻訳再開地点から2~5塩基上流の配列がトランス・トランスレーションの開始に大きく関わるということが明らかになった(図2)⁵³⁾。この配列中の塩基を置換すると、トランス・トランスレーションの効率の低下だけでなく、翻訳再開地点のシフト(多くは-1)が観察される(図2)。

翻訳再開地点のシフトは、リボソーム小サブユニット上のAサイトに結合するアミノグリコシドの添加^{54,55)}、あるいはSmpBのアミノ酸の置換(今野ら、投稿中)、によっても引き起こされる。これらのシフトは、tmRNA、SmpB、Aサイトの間の分子間相互作用が何らかの影響を受けた結果と考えられる。分子間相互作用の観点から具体的にそれぞれのシフトの原因を追求することで、翻訳再開地点決定のメカニズムの解明につながるものと期待される。筆者らは、SmpBと翻訳再開地点上流との間の相互作用がこの部分の塩基置換による翻訳再開地点のシフトと深く関わることを確認している(今野ら、投稿中)。

10. トランス・トランスレーションにおけるS1の働き

S1が翻訳再開地点の上流領域とクロスリンクするとい

う Wower らの報告³³⁾, あるいは tmRNA への S1 の結合が mRNA ドメイン周辺に構造変化をもたらすという報告^{56,57)} は, S1 が翻訳再開に直接関与する可能性を示唆する. その一方で, 「低 G+C 含量のグラム陽性菌においては, S1 が存在しないにもかかわらず tmRNA は存在するし, トランス・トランスレーションも行われている」という事実や, 「S1 が存在する大腸菌においても存在しない枯草菌においても, 枯草菌 tmRNA は同じ地点からトランス・トランスレーションを行う能力がある」という筆者らの実験結果⁵⁸⁾, あるいは「S1 に欠失変異を与えても *in vivo* でのトランス・トランスレーションは影響を受けない」という報告⁵⁹⁾ など, トランス・トランスレーションにおける S1 の重要性を疑問視する向きもある. なお, 低温電子顕微鏡像では, リボソーム上において S1 は, mRNA の出口付近, すなわち tmRNA が働くと考えられるところとはかなり離れた場所に位置する⁶⁰⁾.

筆者らは, S1 を除いたリボソームを含む好熱菌由来の精製した翻訳因子を用いて, トランス・トランスレーションに対する S1 の効果を *in vitro* で調べた. トランス・トランスレーションにおける最初のペプチド転移反応 (ペプチジル-tRNA から Ala-tmRNA へのペプチド転移反応) から 2 回目のペプチド転移反応 (ペプチジル-Ala-tmRNA からアミノアシル-tRNA へのペプチド転移反応) にかけての過程にとって, S1 添加の必要性および効果は認められなかった⁶¹⁾.

11. SmpB の多様な機能

筆者らは, 大腸菌 SmpB 欠失株から調製した細胞抽出液を用いて *in vitro* トランス・トランスレーション活性を調べた⁶²⁾. SmpB が存在しないので poly(U) 依存のタグペプチド合成は起こらなかったが, 通常の翻訳は正常に行われた. この系に精製した SmpB を加えると, 加えた量に応じてタグペプチド合成が起こった. また, 外部から SmpB を加えたときに限って, tmRNA はリボソームと結合できるようになった. さらに, SmpB が *in vitro* において tmRNA のアミノアシル化を数倍活性化する働きがあること^{31,40,62)}, そして *in vivo* において tmRNA を安定化 (分解から保護) する働きがあること^{38,62)} を明らかにした.

さらに, tmRNA の tRNA ドメインにおける 19 位あるいは 334 位 (図 2) の塩基置換が, SmpB との結合に加えて SmpB の三つの機能を全て失わせることを明らかにした^{62,63)}. これらの塩基もしくはその周辺が SmpB と相互作用していることは, フットプリンティング⁶⁴⁾, 紫外吸収スペクトル⁶⁴⁾, NMR⁶⁴⁾ および SmpB・tRNA ドメイン複合体の X 線結晶構造解析 (図 3b)⁶⁵⁾ により支持された.

以上を総合すると, SmpB は, tmRNA の tRNA ドメインに結合することにより, tmRNA がリボソームに運ばれ

るまでの過程において, tmRNA の安定化, tmRNA のアミノアシル化の活性化, tmRNA のリボソームへの結合, という三つの働きをしていることになる. また, SmpB は tmRNA のプロセッシングを促進するという報告もある⁶⁶⁾. 以下に述べるように, SmpB はリボソーム上でさらに重要な働きをしていることが明らかになってきた.

12. リボソームにおける SmpB の驚くべき機能 (アミノ酸をコードするタンパク質)

SmpB は単独でも (tmRNA がなくても) リボソームに結合することが可能である⁶⁷⁾. そこで, トランス・トランスレーションの経路, すなわち SmpB がリボソームに結合してからそこに tmRNA が結合するのか, SmpB が tmRNA と複合体を形成してリボソームに結合するのか, あるいはその両方ともが成立し得るのか, という点が問題になってくるが, 現在のところ統一の見解が得られておらず, 今後の検討課題となっている.

SmpB は, C 末端約 30 残基を欠失させると, tmRNA への結合能力は失わないが, トランス・トランスレーションを起こす能力はなくなる^{68,69)}. C 末端部分のリボソーム中での重要性を示唆する結果である. なお, C 末端部分由来の NMR シグナルはランダムコイル状態であることを示していることから³⁵⁾, この部分は, 溶液中では特定の構造を形成しておらず, リボソームとの相互作用によってはじめて構造を形成するものと思われる.

筆者らは, 部位特異的ヒドロキシラジカルプロービング法を用いて, リボソームと SmpB の相互作用を調べたところ, A サイトと P サイトの合計 2 箇所 SmpB 結合部位を特定した (栗田ら, 投稿中). どちらのサイトの SmpB も翻訳中の tRNA のアンチコドンアームに相当する部分を占める. 報告されている SmpB・tRNA ドメイン複合体の X 線結晶構造を当てはめてみると, どちらの SmpB を基準にしても, tRNA ドメインの CCA 末端はちょうどペプチジルトランスフェラーゼセンター (ペプチド転移反応の触媒部位) に向かう. さらに興味深いことに, SmpB の C 末端が, リボソーム上の mRNA の通り道に沿って位置していた. つまり, A サイトにおいても, P サイトにおいても, 「tRNA ドメイン + SmpB = tRNA + mRNA」ということになる. SmpB の固い本体は tRNA のアンチコドンに相当し, 柔らかい C 末端部分は mRNA に相当する (図 4). 解析した複合体には tmRNA は含まれていないが, 二つの SmpB の結合様式はトランス・トランスレーションにおける二つの重要なステップ (トランスロケーションの前と後) を反映しているものと考えられる. 実際にトランス・トランスレーションが起こる状態を想定して, この系に SD 配列から P サイトまでの mRNA と P サイトのコドンに対応する tRNA を加えたところ, 予想通り, P サイトにおける

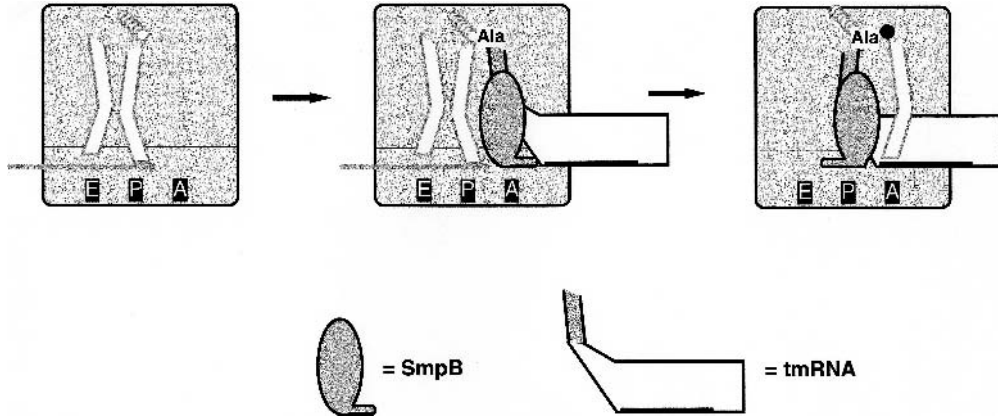


図4 リボソーム中におけるトランス・トランスレーションの素過程の新しいモデル
SmpBの本体がtRNAの下半分，C末端がmRNAを分子擬態している。

SmpBのシグナルは消え，AサイトにおけるSmpBのシグナルだけが残った。

つい最近発表された *T. thermophilus* 由来の tmRNA・SmpB・リボソーム・EF-Tu (GDP)・キロマイシン複合体の低温電子顕微鏡像では，一つの複合体中に2分子のSmpBが存在している⁷⁰⁾。2分子のSmpBのうちの一つは，筆者らが見ているAサイトのSmpBと矛盾しないが，ここではC末端は見えていないし，SmpB本体の方向も特定できていない。もう一つのSmpBはGTPaseセンター近くに位置しているもので，キロマイシンを加えていない複合体には存在しないことから，EF-Tuの解離と同時にリボソームから解離するという仮説が提唱されている。なお，このSmpBは，筆者らの部位特異的ヒドロキシラジカルプロベリングでは確認されない。

「tmRNAもSmpBも，トランス・トランスレーションの過程において，tRNAとしての機能とmRNAとしての機能のどちらをも果たす」という全く新しい概念が見えてきた。SmpBは，構造的にも機能的にも「tRNA+mRNAを分子擬態するタンパク質」と呼ぶに相応しい。すなわち，mRNAにもtmRNAにもコードされていないと思われていたタグペプチドの最初のアラニンは，SmpB (C末端領域)にコードされていたことになる。tRNA部分に着目すると，上半分(アミノ酸の受容)はtmRNA，下半分(コドン認識)はSmpBである。mRNA部分に着目すると，mRNA→SmpB→tmRNAという2段階の切替えが起こることになる。この切替えは，どのように起こるのであろうか？ tmRNAのtRNAドメイン以外の部分(全体の90%を占める)はどのように動いていくのであろうか？ 解決しなければならない諸問題が，より具体的な形となって浮かび上がってきた。

文 献

- 1) Ray, B.K. & Apirion, D. (1979) *Mol. Gen. Genet.*, 174, 25-32.
- 2) Ushida, C., Himeno, H., Watanabe, T., & Muto, A. (1994) *Nucleic Acids Res.*, 22, 3392-3396.
- 3) Komine, Y., Kitabatake, M., Yokogawa, T., Nishikawa, K., & Inokuchi, H. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 9223-9227.
- 4) Felden, B., Himeno, H., Muto, A., McCutcheon, J., Atkins, J. F., & Gesteland, R.F. (1997) *RNA*, 3, 89-103.
- 5) Felden, B., Hanawa, K., Atkins, J.F., Himeno, H., Muto, A., Gesteland, R.F., McClosky, J.A., & Crain, P.F. (1998) *EMBO J.*, 17, 3188-3196.
- 6) Muto, A., Ushida, C., & Himeno, H. (1998) *Trends Biochem. Sci.*, 23, 25-29.
- 7) Keiler, K.C., Shapiro, L., & Williams, K.P. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 7778-7783.
- 8) Tadaki, T., Fukushima, M., Ushida, C., Himeno, H., & Muto, A. (1996) *FEBS Lett.*, 399, 223-226.
- 9) Tu, G.F., Reid, G.E., Zhang, J.G., Moritz, R.L., & Simpson, R. J. (1995) *J. Biol. Chem.*, 270, 9322-9326.
- 10) Keiler, K.C., Waller, P.R.H., & Sauer, R.T. (1996) *Science*, 271, 990-993.
- 11) Muto, A., Sato, M., Tadaki, T., Fukushima, M., Ushida, C., & Himeno, H. (1996) *Biochimie*, 78, 985-991.
- 12) Himeno, H., Sato, M., Tadaki, T., Fukushima, M., Ushida, C., & Muto, A. (1997) *J. Mol. Biol.*, 268, 803-808.
- 13) Nameki, N., Tadaki, T., Muto, A., & Himeno, H. (1999) *J. Mol. Biol.*, 289, 1-7.
- 14) Gottesman, S., Roche, E., Zhou, Y., & Sauer, R.T. (1998) *Genes Dev.*, 12, 1338-1347.
- 15) Herman, C., Thevenet, D., Bouloc, P., Walker, G.C., & D'Ari, R. (1998) *Genes Dev.*, 12, 1348-1355.
- 16) Levchenko, I., Seidel, M., Sauer, R.T., & Baker, T.A. (2000) *Science*, 289, 2354-2356.
- 17) Withey, J.H. & Friedman, D.I. (2003) *Annu. Rev. Microbiol.*, 57, 102-123.
- 18) Yamamoto, Y., Sunohara, T., Jojima, K., Inada, T., & Aiba, H. (2003) *RNA*, 9, 408-418.
- 19) Retallack, D.M. & Friedman, D.I. (1995) *Cell*, 83, 227-235.

- 20) Huang, C., Wolfgang, M.C., Withey, J., Koomey, M., & Friedman D.I. (2000) *EMBO J.*, **19**, 1098–1107.
- 21) Muto, A., Fujihara, A., Ito, K., Matsuno, J., Ushida C., & Himeno, H. (2000) *Genes Cells*, **5**, 627–636.
- 22) Withey, J. & Friedman, D.J. (1999) *J. Bacteriol.*, **181**, 2148–2157.
- 23) Ranquet, C., Geiselman, J., & Toussaint, A. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 10220–10225.
- 24) Julio, S.M., Heithoff, D.M., & Mahan, M.J. (2000) *J. Bacteriol.*, **182**, 1558–1563.
- 25) Retallack, D.M. & Friedman, D.I. (1995) *Cell*, **83**, 227–235.
- 26) Keiler, K.C. & Shapiro, L. (2003) *J. Bacteriol.*, **185**, 573–580.
- 27) Fujihara, A., Tomatsu, H., Inagaki, S., Tadaki, T., Ushida, C., Himeno, H., & Muto, A. (2002) *Genes Cells*, **7**, 343–350.
- 28) Jacob, Y., Seif, E., Paquet, P.O., & Lang, B.F. (2004) *RNA*, **10**, 605–614.
- 29) Frischmeyer, P.A., van Hoof, A., O'Donnell, K., Guerrero, A. L., Parker, R., & Dietz, H.C. (2002) *Science*, **295**, 2258–2261.
- 30) Doma, M.K. & Parker, R. (2006) *Nature*, **440**, 561–564.
- 31) Barends, S., Karzai, A.W., Sauer, R.T., Wower, J., & Kraal, B. (2001) *J. Mol. Biol.*, **314**, 9–21.
- 32) Tedin, K., Resch, A., & Blasi, U. (1997) *Mol. Microbiol.*, **25**, 189–199.
- 33) Wower, J., Zwieb, C., Guven, S.A., & Wower, I. (2000) *EMBO J.*, **19**, 6612–6621.
- 34) Dong, G., Nowakowski, J., & Hoffman, D.W. (2002) *EMBO J.*, **21**, 1845–1854.
- 35) Someya, T., Nameki, N., Hosoi, H., Suzuki, S., Hatanaka, H., Fujii, M., Terada, T., Shirouzu, M., Inoue, Y., Shibata, T., Kuramitsu, S., Yokoyama, S., & Kawai, G. (2003) *FEBS Lett.*, **535**, 94–100.
- 36) Karzai, A.W., Susskind, M.M., & Sauer, R.T. (1999) *EMBO J.*, **18**, 3793–3799.
- 37) Karzai, A.W. & Sauer, R.T. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 3040–3044.
- 38) Richards, J., Mehta, P., & Karzai, A.W. (2006) *Mol. Microbiol.*, **62**, 1700–1712.
- 39) Hong, S.J., Tran, Q.A., & Keiler, K.C. (2005) *Mol. Microbiol.*, **57**, 565–575.
- 40) Shimizu, Y. & Ueda, T. (2002) The role of SmpB protein in trans-translation. *FEBS Lett.*, **514**, 74–77.
- 41) Ivanova, N., Pavlov, M.Y., Felden, B., & Ehrenberg, M. (2004) *J. Mol. Biol.*, **338**, 33–41.
- 42) Asano, K., Kurita, D., Takada, K., Konno, T., Muto, A., & Himeno, H. (2005) *Nucleic Acids Res.*, **33**, 5544–5552.
- 43) Roche, E.D. & Sauer, R.T. (1999) *EMBO J.*, **18**, 4579–4589.
- 44) Roche, E.D. & Sauer, R.T. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 28509–28515.
- 45) Hayes, C.S., Bose, B., & Sauer, R.T. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 3440–3445.
- 46) Hayes, C.S., Bose, B., & Sauer, R.T. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 33825–33832.
- 47) Collier, J., Binet, E., & Boulloc, P. (2002) *Mol. Microbiol.*, **45**, 745–754.
- 48) Pedersen, K., Zavialov, A.V., Pavlov, M.Y., Elf, J., Gerdes, K., & Ehrenberg, M. (2003) *Cell*, **112**, 131–140.
- 49) Christensen, S.K., Pedersen, K., Hansen, F.G., & Gerdes, K. (2003) *J. Mol. Biol.*, **332**, 809–819.
- 50) Nameki, N., Tadaki, T., Himeno, H., & Muto, A. (2000) *FEBS Lett.*, **470**, 345–349.
- 51) Nameki, N., Felden, B., Atkins, J.F., Gesteland, R.F., Himeno, H., & Muto, A. (1999) *J. Mol. Biol.*, **286**, 733–744.
- 52) Nameki, N., Chattopadhyay, P., Himeno, H., Muto, A., & Kawai, G. (1999) *Nucleic Acids Res.*, **27**, 3667–3675.
- 53) Lee, S., Ishii, M., Tadaki, T., Muto, A., & Himeno, H. (2001) *RNA*, **7**, 999–1012.
- 54) Takahashi, T., Konno, T., Muto, A., & Himeno, H. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 27672–27680.
- 55) Konno, T., Takahashi, T., Kurita, D., Muto, A., & Himeno, H. (2004) *Nucleic Acids Res.*, **32**, 4119–4126.
- 56) Bordeau, V. & Felden, B. (2002) *Biochimie*, **84**, 723–729.
- 57) Valle, M., Gillet, R., Kaur, S., Henne, A., Ramakrishnan, V., & Frank, J. (2003) *Science*, **300**, 127–130.
- 58) Ito, K., Tadaki, T., Lee, S., Takada, K., Muto, A., & Himeno, H. (2002) *FEBS Lett.*, **516**, 245–252.
- 59) McGinness, K.E. & Sauer, R.T. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 13454–13459.
- 60) Sengupta, J., Agrawal, R.K., & Frank, J. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 11991–11996.
- 61) Takada, K., Takemoto, C., Kawazoe, M., Konno, T., Hanawa-Suetsugu, K., Lee, S., Shirouzu, M., Yokoyama, S., Muto, A., & Himeno, H. (2007) *RNA*, in press.
- 62) Hanawa-Suetsugu, K., Takagi, M., Inokuchi, H., Himeno, H., & Muto, A. (2002) *Nucleic Acids Res.*, **30**, 1620–1629.
- 63) Hanawa-Suetsugu, K., Bordeau, V., Himeno, H., Muto, A., & Felden, B. (2001) *Nucleic Acids Res.*, **29**, 4663–4673.
- 64) Nameki, N., Someya, T., Okano, S., Suemasa, R., Kimoto, M., Hanawa-Suetsugu, K., Terada, T., Shirouzu, M., Hirao, I., Takaku, H., Himeno, H., Muto, A., Kuramitsu, S., Yokoyama, S., & Kawai, G. (2005) *J. Biochem.*, **138**, 729–739.
- 65) Gutmann, S., Haebel, P.W., Metzinger, L., Sutter, M., Felden, B., & Ban, N. (2003) *Nature*, **424**, 699–703.
- 66) Wower, I.K., Zwieb, C., & Wower, J. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 54202–54209.
- 67) Hallier, M., Ivanova, N., Rametti, A., Pavlov, M., Ehrenberg, M., & Felden, B. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 25978–25985.
- 68) Sundermeier, T.R., Dulebohn, D.P., Cho, H.J., & Karzai, A.W. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 2316–2321.
- 69) Jacob, Y., Sharkady, S.M., Bhardwaj, K., Sanda, A.A., & Williams, K.P. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 5503–5509.
- 70) Kaur, S., Gillet, R., Li, W., Gursky, R., & Frank, J. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 16484–16489.