

論文の内容の要旨

論文題目 特異構造をもつミトコンドリア tRNA の翻訳機能

氏名 花田 孝雄

1. 緒言

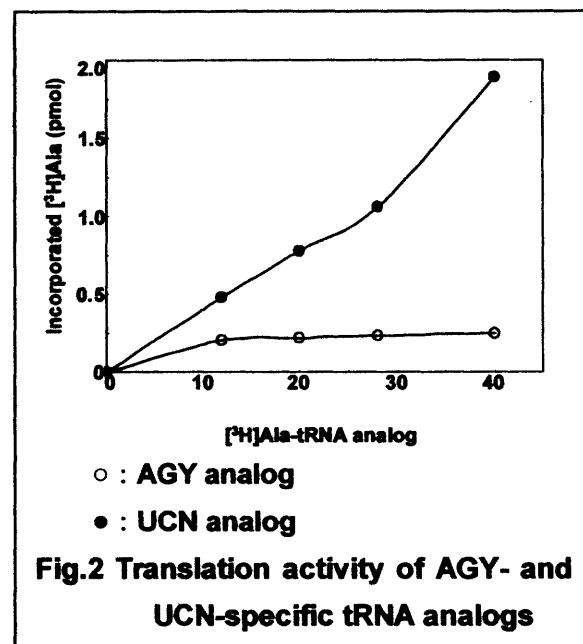
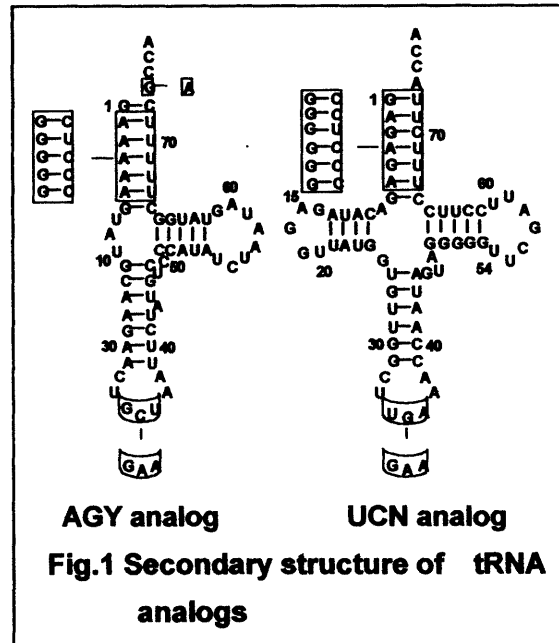
tRNA は特定のアミノ酸と結合してコドン-アンチコドンの対合により mRNA の遺伝情報を変換し、タンパク質として発現させる重要な分子である。一般的な tRNA の 2 次構造はクローバーリーフ様の構造をとり、3 次元構造は L 字型構造をとる。しかし、ミトコンドリア tRNA には通常の tRNA とは異なる 2 次構造をもつものが存在する。特に哺乳動物ミトコンドリアではセリンをコードするコドン AGY(Y=U,C)に対応する tRNA^{Ser}(GCU)は D ループが大きく欠けている。またアイソアクセプター tRNA であるコドン UCN(N=A,G,C,U)に対応する tRNA^{Ser}(UGA)は、クローバーリーフ型であるが、アンチコドンが 1 塩基対長いという特徴をもっている。これらの tRNA も立体構造上は通常の tRNA に類似した L 字型構造に近い構造をとることが示唆されている。これまで、これらの tRNA の翻訳における機能に関しては、主にアミノアシル化効率が調べられているのみで、翻訳活性についてはほとんど調べられていなかった。

本研究では tRNA^{Ser} の翻訳活性を調べることにより、特異構造をもつ tRNA の分子機能についての研究を行うことを目的とした。ウシ肝臓ミトコンドリアから調製した伸長因子とリボソームを用いて、これらの tRNA の *in vitro* の翻訳実験を行い、さらに翻訳反応における素過程での解析も行った。これらの結果をもとに、特異構造をもつ tRNA の翻訳機能について考察を行った。

2. *in vitro* ウシミトコンドリア翻訳系

翻訳実験に用いる tRNA は T7 RNA ポリメラーゼを用いた *in vitro* 転写合成により調製した (Fig.1)。tRNA に受容させるアミノ酸がセリンでは翻訳反応の検出において、生成したペプチドが酸不溶性画分とならないため、大腸菌のアラニール-tRNA 合成酵素の基質認識部位である 3G・U70 ウォブルペアをアクセプタ-ステムに導入しアラニンを受容させることにした。また転写効率を上昇させるためにアクセプタ-ステムをすべて G-C ペアとした。さらにアンチコドンを GAA とし、アンチコドンループの配列を揃えるとともに、mRNA として用いる poly(U) を翻訳出来るようにした (以下、簡単のために tRNA^{Ser}(GCU) に対応する tRNA を AGY アナログ、tRNA^{Ser}(UGA) に対応する tRNA を UCN アナログと呼ぶ)。

アミノアシル化の効率は AGY アナログ、UCN アナログがそれぞれ、~10%、~50% だった。予備実験の段階において、アミノアシル化されていない tRNA が反応液中に過剰に存在すると翻訳反応が阻害されることが明らかとなったので、アミノアシル化した tRNA を過ヨウ素酸で処理後、ヒドラジンで固定化したカラムにより精製し、アミノアシル tRNA の割合を 90% とした。これらの tRNA を用いて、ウシ肝臓より調製した伸長因子 (mt EF-Tu/Ts, mt EF-G)、リボソーム (mt ribosome) から構成される *in vitro* のウシミトコンドリア翻訳系で翻訳反応を行い酸不溶性画分に取り込まれた [³H]Ala の放射能を比較したところ、AGY アナログは UCN アナログに比べて非常に翻訳活性が低いことが分かった (Fig.2)。



3. 翻訳生成物の解析

翻訳反応によって生成したペプチドの長さや量を調べるために、HPLC を用いてペプチドの解析を行った。翻訳反応を行った後、アルカリ処理によりペプチドを tRNA から遊離させ、逆相カラムにより分析を行った。その結果、UCN アナログはヘキサマー以上のペプチドも生成しているのに対して、AGY アナログではテトラマーより長いペプチドはほとんど生成していなかった (Fig.3)。 *in vitro* の翻訳実験において、酸不溶性画分として検出したペプチドの長さを明らかにするため、UCN アナログを用いた翻訳反応の酸不溶性画分を同様に HPLC によって解析した。その結果、酸不溶性画分となるペプチドはヘキサマー以上のものであることが明らかになった。この結果から、AGY アナログはたしかに翻訳能をもつものの、UCN アナログに比べて短いペプチドしか生成できていないことから、翻訳反応の過程で律速となる段階が存在しているのではないかと示唆された。

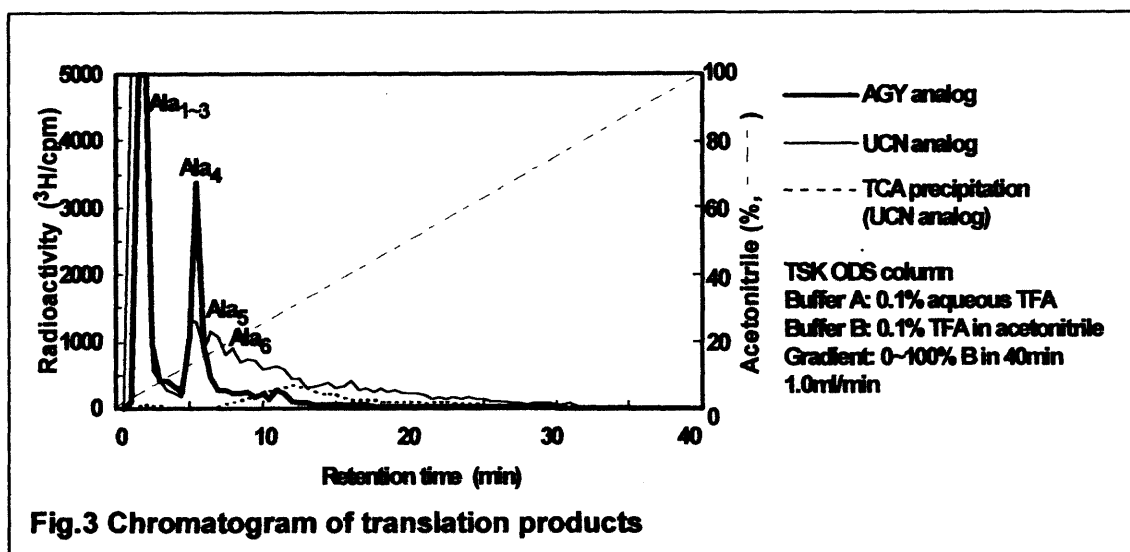
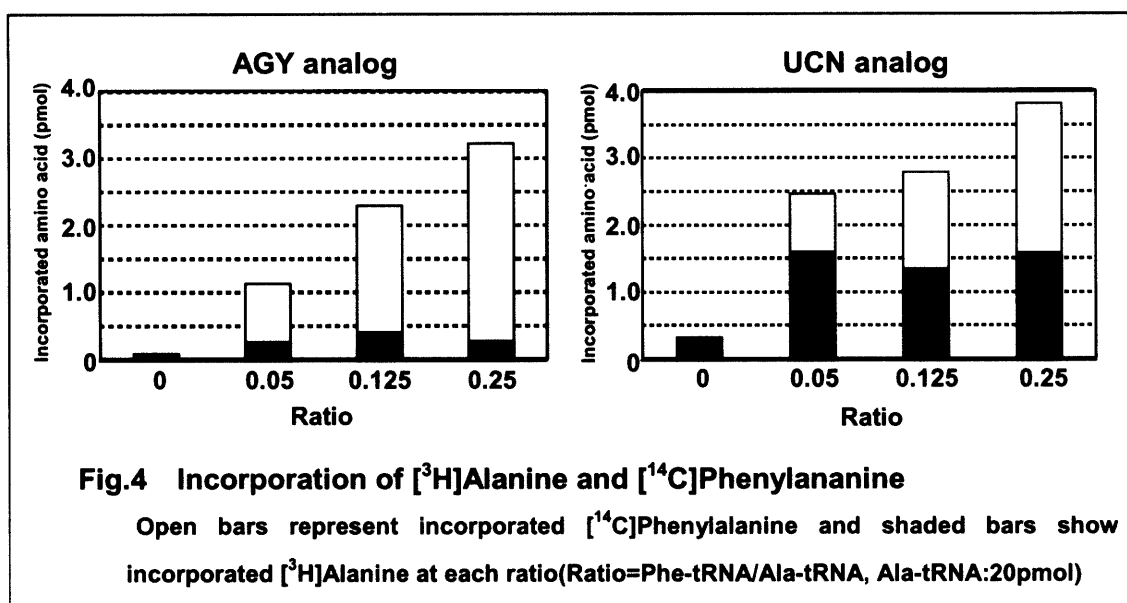


Fig.3 Chromatogram of translation products

4. 大腸菌 tRNA とミトコンドリア tRNA の混合翻訳実験

以上の実験では、単独の tRNA を用いて翻訳を行っているため、D ループの欠けた tRNA がリボソーム上に並ぶことによる活性の低下が原因ではないかと考えられた。そこで、大腸菌のフェニルアラニル(Phe)-tRNA を反応系に加え、通常のコラーリーフ型 tRNA とミトコンドリア tRNA をランダムにリボソームへエントリーさせる条件で実験を行った。その結果、ミトコンドリア tRNA 単独で反応を行うよりも、アラニンの取り込みは上昇した。しかし、取り込みの上昇の割合は UCN アナログに比べ AGY アナログでは低かった (Fig.4)。Phe-tRNA を加えた場合のそれぞれの比率における生成したペプチドの量は AGY、UCN アナログともほとんど変わらないことから、AGY アナログによるアミノ酸の取り込みが低い理由として、tRNA のリボソームへのエントリー能が低いのではないかと考えられた。反応系に少ない割合で加えられている大腸菌 tRNA によるアミノ酸の取り込みの方がミトコンドリア tRNA によるものよりも高いことは、大腸菌 tRNA はミトコンドリア tRNA に比べて翻訳活性が高いという報告を確認する結果となった。

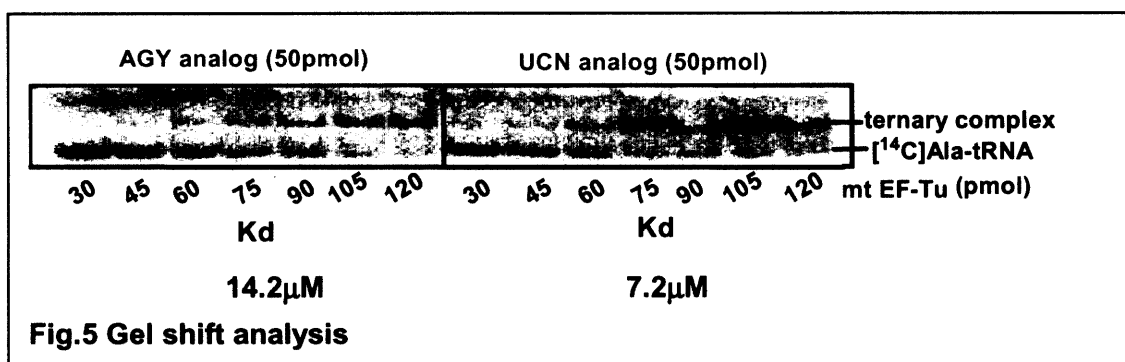


5. 翻訳の素過程における実験

翻訳の伸長反応の素過程は 1) アミノアシル-tRNA と EF-Tu · GTP との ternary complex 形成 2) A サイト binding 3) ペプチジルトランスファー 4) トランスロケーション と大きく分けられる。AGY アナログが UCN アナログに比べ、どの素過程に問題があるのかを調べるため、まず ternary complex 形成能から検討を行った。

5-1. Ternary complex 形成能

ternary complex 形成能はアミノアシル-tRNA が GTP 存在下に EF-Tu とコンプレックスを形成することでゲルでの移動が遅れることを利用したゲルシフトアッセイによって評価を行った。EF-Tu は加水分解しない GTP アナログである GDPNP と結合したミトコンドリア EF-Tu (mt EF-Tu · GDPNP) を用い、[¹⁴C]で放射能ラベルされたアラニンを受容した tRNA を用いて実験を行った。その結果、解離定数は AGY アナログが 14.2μM、UCN アナログが 7.2μM とおよそ 2 倍の差があった(Fig.5)。この結果は AGY アナログの翻訳能が低下する原因となる可能性はあるが、通常、翻訳反応にはアミノアシル-tRNA に対して過剰量の EF-Tu を加えているため、これだけでペプチド生成量の低下を招いたとは考えられない。次に、tRNA のリボソームに対する binding 能についての検討を行った。



5-2 リボソームを用いた binding 実験

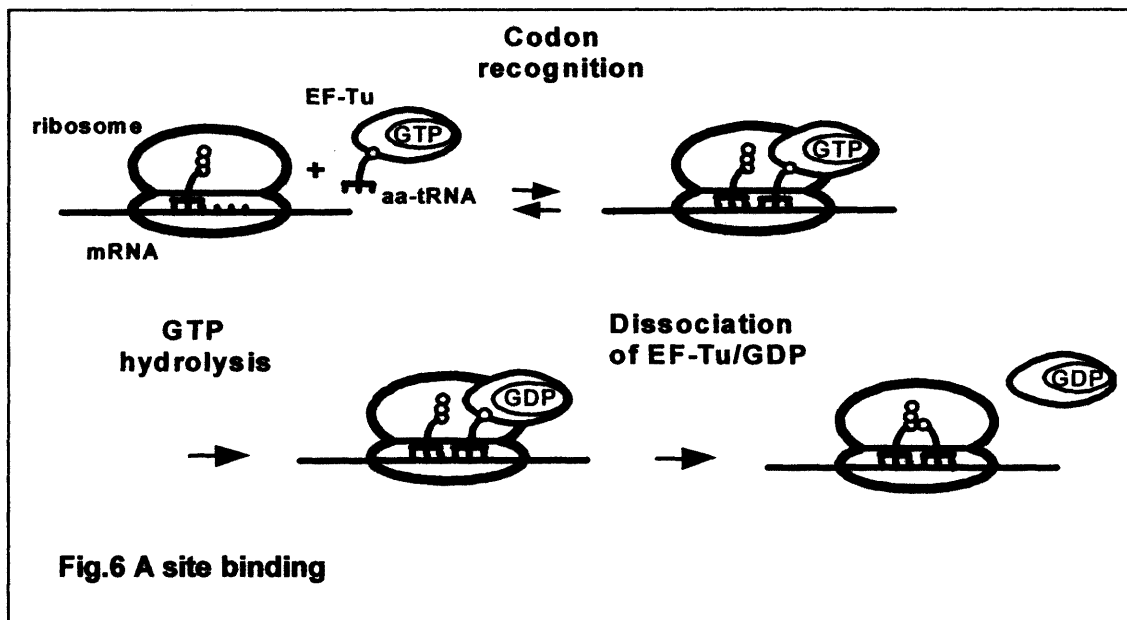
リボソームを用いた素過程を追う実験においてはショ糖密度勾配遠心法によって精製されたリボソームが必要となる。ミトコンドリアリボソーム (55S) を必要量、調製するのは大変困難であるため、調製の容易な大腸菌のリボソーム (70S) を用いることにした。使用にあたって、まず *in vitro* の翻訳実験を行い、ミトコンドリア由来の tRNA アナログと翻訳因子を用いる限り、ミトコンドリアリボソームを用いた実験と同様の結果が得られることを確認し、さらに HPLC による解析によっても同様の結果を得た。この結果によって、AGY アナログの翻訳能の低さはミトコンドリアリボソーム特有の現象ではなく、tRNA 自身に起因していると考えられた。

P サイト binding 実験

アミノアシル化されていない tRNA すなわち、デアシル-tRNA はまずリボソームの P サイトに結合することが分かっている。AGY アナログと UCN アナログの P サイトへの結合能を調べたところ、ともに同程度の結合能をもつことが分かった。そこでさらに、A サイトへのアミノアシル-tRNA の結合能を調べた。

A サイト binding 実験

A サイトへの結合は細かく分けると、1) ternary complex のリボソームへの結合 2) コドン-アンチコドンの対合 3) GTP の加水分解 4) EF-Tu・GDP のリボソームからの解離とアミノアシル-tRNA の A サイトへの結合 である(Fig.6)。



リボソームの P サイトを *E.coli* deacyl-tRNA^{Phe} で埋めることにより自発的なトランスロケーションが起こらないようにしておくことで、A サイトへの結合能を評価する実験を行った。GTP の加水分解についての実験を行ったところ、AGY アナログ、UCN アナログともに同等の GTP の加水分解が起こっていた(Fig.7a)。このことから、コドン-アンチコドンの対合

は同程度の効率で起こっているものと考えられる。次に EF-Tu・GTP に依存的するアミノアシル-tRNA の A サイトへの結合をフィルターアッセイによって調べたところ、AGY アナログは UCN アナログの約 1/3 程度しかリボソームへ結合しなかった(Fig.7b)。また、EF-Tu・GDPNP を用いたフィルターアッセイによっても同様の結果を得た。さらに、非酵素的な A サイトへのアミノアシル-tRNA の結合を調べたところ、AGY アナログはほとんど結合しなかった(Fig7c)。P サイトへの結合能は AGY, UCN アナログともに同等であることから、翻訳効率の低下は AGY アナログの A サイトに対するアフィニティーの低さに起因することが強く示唆された。

