

論文の内容の要旨

論文題目 バクテリアペプチド鎖解離因子のリボソーム結合ドメインの機能解析

氏名 吉村邦泰

研究の背景・目的

翻訳過程は開始、伸長、終結の3つの反応に大別され、これらの反応は全て mRNA 上の塩基配列（コドン）によって支配されている。翻訳終結反応において終止コドンの認識は、センスコドンの認識と異なり、tRNA のような核酸分子ではなく、ペプチド鎖解離因子（Polypeptide-Chain Release Factor：以下、解離因子）と呼ばれる蛋白質因子によって行われる。解離因子は、リボソーム A サイトにおいて終止コドンを認識し、リボソームのペプチジルトランスフェラーゼセンターによるペプチド鎖の解離反応を触媒するという、終結暗号解読のアダプター分子である。原核生物では RF1, RF2 という二種類の解離因子が存在し、RF1 は UAG と UAA を、RF2 は UGA と UAA をそれぞれ特異的に認識する。蛋白質性の遺伝暗号解読分子である RF1, RF2 は、核酸分子 tRNA との機能的類似性が幾つか示唆されている。特にコドン認識機構については、tRNA のアンチコドンに相当し終止コドンを識別する「ペプチドアンチコドン」と呼ばれる領域が、コドン識別を行うことが明らかにされている。一方、リボソーム結合に関しては、tRNA は EF-Tu によってリボソームに運搬されるのに対し、RF は単独で結合するという相違点があり、このリボソーム結合様式や、それにかかわる機能ドメインについては、これまでほとんど解析されていなかった。リボソームによる伸長反応もしくは終結反応の発動は、リボソーム上の遺伝暗号に応じた tRNA または解離因子との競合・選択的な結合によって決定されることから、解離因子の分子動態をそのリボソーム結合

様式の側面から明らかにすることは、翻訳研究全般に重要である。そこで筆者は、解離因子のリボソーム結合性に関する新たな機能的側面を明らかにすることを目的として、RF1, RF2 の終止コドン特異性に着目した分子遺伝学的解析を行い、解離因子のリボソーム結合領域の特定と、その結合特性についての研究を行った。

解離因子のリボソーム結合領域の検索

本研究では、まず分子遺伝学的手法に則り、RF1, RF2 のコドン特異性の壁を越えた変異体として、今回新たに、RF1 が認識する終止コドン UAG のナンセンスサプレッサーとして機能する優性 RF2 変異体、即ち野生型 RF1 に対して阻害的に働く RF2 変異体 (cross suppressor mutant: *csu*) の分離を行い、9 つの独立したクローンを得た。9 つのクローンうち 4 つはナンセンス変異体であり、5 つがミスセンス変異体であった。これらの変異体の塩基配列を調べたところ、変異アミノ酸はすべて RF 遺伝子のの後半部分にマッピングされ、RF1, RF2 両方で極めて保存性の高いアミノ酸であった。このことから、RF2^{*csu*} 変異体は RF1, RF2 に共通な終結反応素過程に支障を来した変異体であることが示唆された。加えてナンセンス変異体が分離されたことから、この *csu* 表現型 (野生型 RF1 の翻訳終結阻害) は RF2 の C 端側領域の機能欠損により N 端側が単独で機能することによって引き起こされることが示された。続いて RF2^{*csu*} 変異体の性状解析を行ったところ、RF2^{*csu*} 変異体は UAG コドンにおいてリボソームに結合することが推察された。そこで、両端からの系統的な欠失解離因子シリーズを作製し、*csu* 表現型を指標に、リボソーム結合に必要な最小機能領域の検索を行った。

その結果、ペプチドアンチコドンを含む 20 アミノ酸長の RF2 断片が、UAG サプレッション活性を示す *csu* 表現型を引き起こす最小機能領域であることを明らかにした。

興味深いことに、これらの RF2 断片は UAG だけでなく RF2 が本来認識する UGA コドンに対してもサプレッション活性を示すことが明らかになった。この RF2 断片はペプチドアンチコドン領域を含むものの、もはやコドン特異性を失い、終止コドン非特異的なリボソーム結合性をしめすことにより、結果として、野生型の RF1 と RF2 の両方に対して阻害的に作用する。この最小機能領域のうち、非特異的結合に関わるアミノ酸残基部位を明らかにするために、続いて、分子遺伝学的手法に基づき、*csu* 表現型の失活変異体の分離を行い、ペプチドアンチコドンと重複する 5 アミノ酸残基を特定した。

RF2 の断片化によってその領域の機能を観察できたことから、RF2 断片が、その機能を保持した安定な機能性ペプチドとして生体内で機能することが明らかとなった。さらに、コドン特異性を決定するという機能によって発見されたペプチドアンチコドンが、終止コドン非特異的なリボソーム結合を行う領域として特定できたという事実は、解離因子のコドン特異性には、近傍配列に加えさらに、今回同定したペプチド領域の外側に存在する比較的大きな機能領域に関わることが明らかである。このことは、tRNA のコドン特異性が 3 残基目のウォブル塩基を含め、主に塩基対合ルールで決定されているのに較べると顕著な特徴といえる。

RF2^{csu} 変異体のリボソーム結合性の解析

解離因子のリボソーム結合様式の詳細な解析のためには、解離因子とリボソームの結合素過程を *in vitro* で再構成し、直接検出するリボソーム結合解析系の導入が必要である。しかしながら、定量的な解析を可能とする *in vitro* 解離因子-リボソーム結合反応解析系は確立されていなかった。そこで筆者は、定量性を持つ新規な *in vitro* リボソーム結合系の構築を行い、その有効性を確認するとともに、この実験系を用いて、解離因子のリボソーム結合性について多角的な検討を行った。

これまでの *in vitro* ペプチド鎖解離活性測定などから得られている終結反応の分子機構を、今回新たに構築した *in vitro* リボソーム結合解析の結果と照らし合わせることで、解離因子については、この *in vitro* リボソーム結合系が定量的な解析を可能とするものであることが確認された。RF1 と RF2 のコドン特異的なリボソーム解離定数を算出し、比較したところ、RF1 が RF2 に比べて十倍以上高いリボソーム親和性を示し、また tRNA の三分の一程度であることが明らかとなった ($K_{d_{RF1}} = 350 \pm 36$ nM, $K_{d_{RF2}} = 2.52 \pm 0.12$ μ M, $K_{d_{tRNA}} = 103 \pm 19$ nM) 更にこの系の導入によって、リボソーム結合において RF1 は RF2 よりも厳密なコドン特異性を有していること、また、RF1 と RF2 のペプチド鎖解離活性がリボソーム結合強度との強い相関性が新たに明らかになった。そこで、先の RF2^{csu} 変異体を用いてコドン特異的なリボソーム結合性を検証した。UAG コドンと UGA コドンに対するリボソーム結合強度を測定し比較することで、この RF2^{csu} 変異体が、リボソーム結合においてコドン特異性の低下した変異体であることが明らかとなった。このことから、RF2^{csu} 変異体が、当初の予想通り、特異性の異なるコドンに対してもリボソームに結合することが確認された。UAG コドンに対して、この RF2^{csu} 変異体がペプチド鎖解離活性を示さないことと合わせて考えると、RF2^{csu} 変異体は、特異性の異なるコドンにおいてリボソームから遊離することができない変異体であると結論することができ、解離因子による終結反応において、終止コドン非特異的にリボソームに結合する反応段階が存在することが強く示唆される。

解離因子による終止コドン認識の効率化

本研究によって、解離因子による終結反応において、ペプチドアンチコドン隣接領域が、終止コドン非特異的なリボソーム結合を行う領域であることが明らかになった。したがって、終止コドン非特異的なリボソーム結合の意義として、このリボソーム結合を介した終止コドン認識の効率化が行われているという仮説を提唱する。伸長反応では、EF-Tu が同様のコドン非依存的なリボソーム結合を行うことで、まず、大まかなコドン認識が行われていることが明らかとなっている。終止コドン認識においても、このリボソーム結合段階が存在することが明らかとなったことから、第一段階のコドン選別として、センスコドンと終止コドンの認識が行われていることが推察される。本研究で分離した RF2^{csu} 変異体は、二段階目の厳密な終止コドン認識の後にリボソームから解離できない変異体であると結論付けられる。EF-Tu は、空間的に離れた tRNA のアンチコドンによるコドン認識を、アロステリックに調節していると考えられるが、解離因子は、このペプチドアンチコドンの隣接領域が mRNA との非特異的結合を行い、さらに

は、直接終止コドンとの位置関係を決定しているという、伸長反応のアダプター分子とは、根本的に異なった方法でコドン識別効率を実現していることが推察される。本研究によって、コドン識別段階での解離因子の独自性が確認されたことは、翻訳反応における終結反応の位置づけを、その普遍性からだけでなく、独自性に着目して理解することの必要性を改めて示すものである。

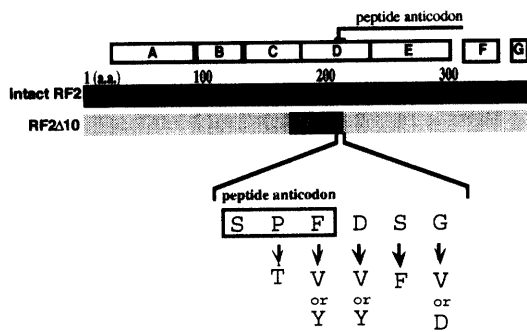


図1: クラスI解離因子の終止コドン非特異的リボソーム結合にかかわるアミノ酸の特定

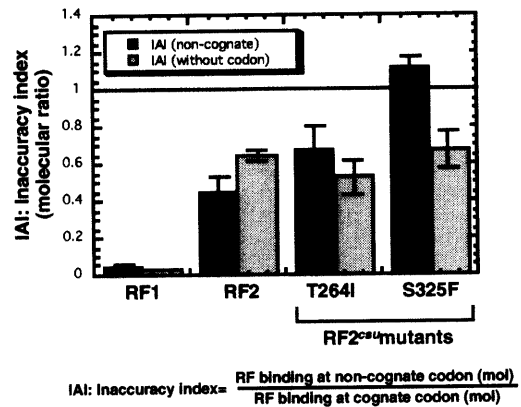


図2: RF2^{CSU}変異体のUAG, UGAコドンにおける *in vitro* リボソーム結合の終止コドン特異性