

## 論文の内容の要旨

### 論文題目 tRNA 擬態分子によるリボソーム再生機構の研究

指導教官 中村 義一 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成十年四月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 藤原 俊伸

#### [1] 序論

染色体 DNA 上のアミノ酸配列の遺伝情報は mRNA に転写される。翻訳とはこの mRNA 上の塩基配列情報を、蛋白質合成装置であるリボソーム上で、アダプター因子 tRNA の媒介によりアミノ酸配列へ変換する過程である。そのメカニズムはこれまで、翻訳の開始、ペプチド鎖の伸長、翻訳の終結（成熟ペプチド鎖の解離）に大別されてきた。コドンの解読反応は開始、伸長反応では、核酸分子である tRNA がコドン配列とアミノ酸を対応付けるアダプター分子として機能し、蛋白質因子である翻訳蛋白質因子群がそれを制御、補助する。一方終結過程では、核酸である tRNA は用いられず、真核・原核を問わずペプチド鎖解離因子（polypeptide-chain release factor : RF）と呼ばれる一群の蛋白質因子が tRNA の様に終止コドンを読み、成熟ペプチド鎖を解離させる。

しかしながら、これで翻訳の全過程が終了なのかということ実はそうではない。ペプチド鎖解離後には、リボソーム、mRNA、脱アシル化された tRNA からなる終結複合体が残される。この複合体の効率の良い解体再生過程は原核生物から真核高等動物まで、全ての蛋白質発現系に必須であると考えられる。では、どのようなメカニズムが関与しているのだろうか。

最も研究の進んでいる原核生物の場合、この分解過程を触媒する中心的蛋白質因子として、リボソーム再生因子 RRF（Ribosome Recycling Factor）が 1970 年代に大腸菌から生化学的に同定された。RRF は原核生物の成育に必須であり、原核生物のみならず、酵母からヒトなどのオルガネラ原核遺伝子発現系にまで高度に保存されている。GTP 結合性翻訳因子である EF-G 及び GTP を必要とすることも明らかとなっているが、その作用機序の解明は未解決である。本研究では、この理解が遅れているリボソーム再生過程の分子機構解明を目指し、その中心的因子である RRF の遺伝学的・生化学的手法による解析から機能ドメインを特定する。そして、その構造的特徴の本質の解明を試み、蛋白質と tRNA 間の分

子擬態という生物学の新しい概念に理解を深めることを目的とした。

## [2] 遺伝学的アプローチによる RRF 機能ドメインの同定

RRF 蛋白質の機能領域に関しては本研究以前には殆ど具体的な知見が得られていなかった。蛋白質因子の機能ドメインを同定する手段として分子遺伝学的手法は極めて効率がよい。そして、RRF の条件致死変異株は、遺伝学的手法により、様々な RRF 変異体の活性評価を簡便に行いかつ、スクリーニングする上で必須である。そこで、P1 フェージ形質導入を用いた localized mutagenesis 法により、高温致死性アンバー変異 RRF 遺伝子株を分離し、*in vivo* 機能評価系を確立した。

まず最初に、機能解析のターゲットとする領域を決定する為に、本研究以前までに報告された種々の RRF のアミノ酸配列を比較検討した。そして、C 末端領域に核酸や蛋白質との相互作用に関わりうる荷電アミノ酸が極度に集中することを見出した。さらに、上記高温致死性変異株は C 末端領域中の変異により機能を欠損することも明らかにした。これらの知見から、C 末端領域が機能上重要な役割に関わっているのではないかと予想し、この領域の機能解析を試みた。

そこで、RRF 分子の C 末端からの系統的な欠損変異体シリーズを作成し、大腸菌の生育に最低限必要な C 末端長を決定した。その結果、活性を失ったもののうち、最も表現系の閾値が復帰変異体の遺伝学的選択に有利と考えられたのは、9 アミノ酸残基の欠損体 (RRF $\Delta$ 9) であった。そして、RRF $\Delta$ 9 遺伝子発現ベクターに PCR で変異を導入し、C 末端欠損に加えて変異が導入されることで機能が回復した RRF 変異体の分離を試みた。

得られる復帰変異体は、変異導入によって RRF の持つ機能が強化された結果、C 端欠損による機能欠損を他の機能領域の強化により補って生育性を回復したものであることが想定できる。従って、得られた復帰変異体の変異導入部位の解析からそれら機能ドメインを特定することができ、これまでにほとんど具体的な知見が得られていない RRF の機能構造領域について知見が得られる。

そしてスクリーニングの結果、数百の復帰変異体を得、その幾つかは C 末端領域に隣接し、 $\alpha$ -helix 構造をとることが強く予想される領域に集中することを見出した。しかしながら、それ以外の変異部位の機能構造はこの時点での知見では不明であった。

## [3] RRF 機能ドメインの生化学的解析

次に、これら復帰変異が局在する領域の持つ機能的役割を解明するために、RRF の示す基本的性質であるリボソーム結合能への影響を評価することが必要と考えた。

本研究までに RRF とリボソームの単独 2 者を用いた結合素過程解析系は構築されていなかった。そこでまず、シヨ糖密度勾配遠心法により RRF とリボソームの 2 者間の結合を観察した。シヨ糖密度勾配遠心法は、リボソームのサブユニットのサイズ分画に適しており、分画された 70S リボソームを解析することでこれに結合している分子を同定できる。そしてその結果、70S リボソーム画分に RRF が存在し、RRF がリボソーム結合能を持つことを証明した。そこでより簡便に、かつ系統的に 2 者間の結合を解析できる *in vitro* RRF - リボソーム 2 者結合系の構築を行った。この系では、各種改変 RRF と野生型 RRF を用いた結合活性測定を簡便かつ系統的に行う。そして、この系を用いた実験の結果、

RRF $\Delta$ 9 のリボソームへの親和性は著しく低下しており、復帰変異体ではこれが回復していることが明らかとなった。このことは、*in vitro* でポリソームをモノソームへと変換するという古典的 RRF 活性測定系において、RRF $\Delta$ 9 が活性を失っていることと符合する。この様に、C 末端欠損による RRF の機能欠損がリボソーム結合の欠損に起因することが明らかとなった。

#### [4] RRF の tRNA 擬態性と機能ドメイン

これらの変異の機能的意義を明らかにするためには、RRF 蛋白質分子の立体構造の解明が必須と考えられた。そのために高度好熱菌 *Thermus thermophilus* 由来 RRF 遺伝子のクローニングを行い、過剰生産精製系を確立した。DNA 塩基配列決定の結果、高度好熱菌 RRF は、アミノ酸レベルで大腸菌の RRF 遺伝子と 44% の同一性、68% の類似性を示した。そして、構造生物学グループとの共同研究による構造解析の結果、RRF は 2 ドメインで構成され、形状、サイズともに tRNA と酷似する tRNA 擬態分子であることが判明した (図 1)。そして、これまでの解析で得られた機能ドメイン情報を RRF の立体構造と対応づけた時、C 末端領域、そして復帰変異体の変異導入部位が担う機能が次の様に一目瞭然となり、RRF の tRNA 擬態性に関して重要な知見を得ることができた。

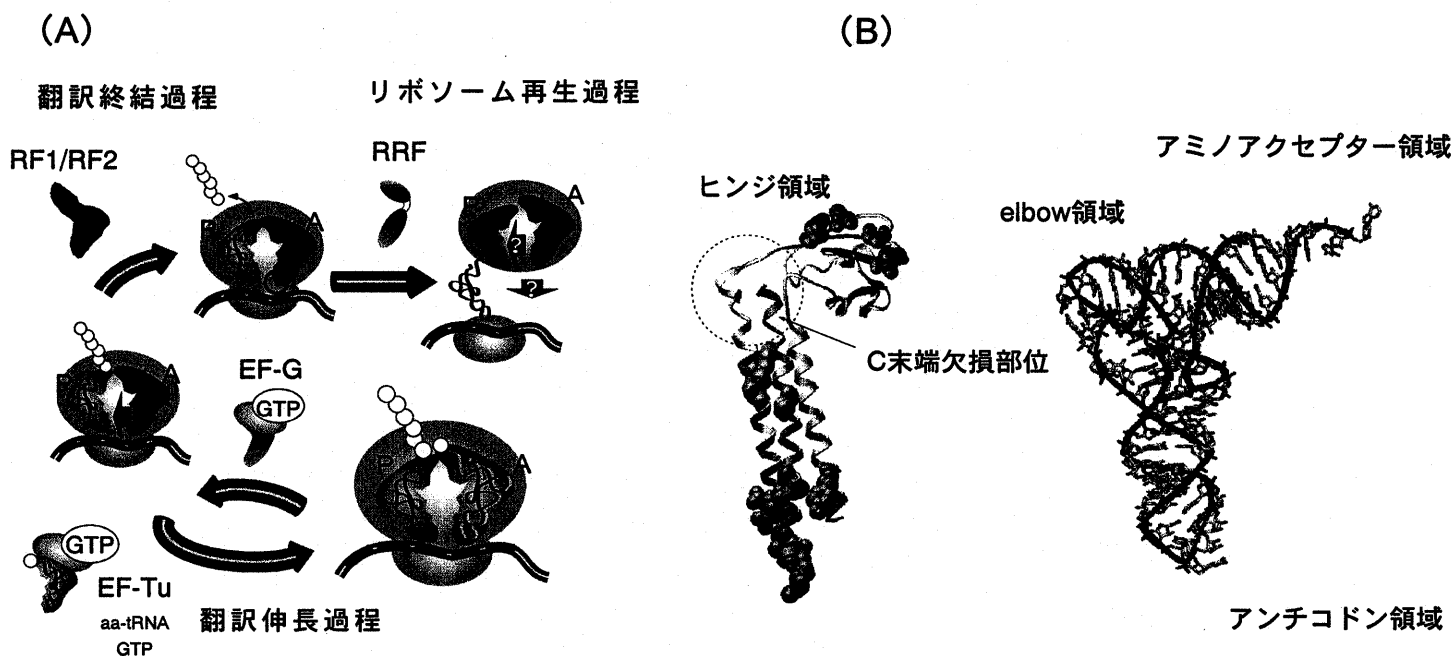
まず第一の知見として、この C 末端領域は立体構造上 2 つのドメインをつなぐヒンジ領域を形成するということである。共同研究者による立体構造に基づいた分子遺伝学的解析で、RRF はこのヒンジ領域で tRNA とは全く異なる可動性を持ち、この可動性が RRF の機能発現に必須であることも判明した。従って、RRF は tRNA 擬態分子であるが、リボソーム上で機能するために核酸である tRNA では成し得ない蛋白質独自の特性を持つと考えられる。一方、復帰変異体の変異部位が tRNA の特徴的な機能構造領域であるアンチコドン領域、elbow 領域、CCA 末端のそれぞれに相当する部位に局在するという重要な知見を得た (図 1)。アンチコドン領域はリボソームの A 部位 30S 側へドックする領域であり、50S 側に配位される CCA 末端は tRNA がアミノ酸を付加する領域である。これらの部位に相当する領域に変異が集中することから、RRF の tRNA と同様な機能性が強く示唆される。このように、遺伝学的・生化学的解析を 3 次元構造に適用することで形態の類似性だけでなく機能面においても tRNA との類似性が示された。これにより、リボソーム中の 50S 及び 30S にまたがる tRNA が立体配置される空間に、RRF も同様に配置され、tRNA とは異なる機能性で作用することが強く示唆された。

#### [5] 総括

翻訳の分子機構解明において、最難関であった蛋白質合成装置であるリボソームの X 線結晶構造が解明され、これまでの遺伝学的・生化学的アプローチに加え、翻訳研究における構造生物学的視点が重要となった。様々な翻訳因子による「tRNA 分子擬態」は蛋白質でありながら、核酸である tRNA に形態的に擬態し、リボソーム上で有利な機能性を獲得するという概念である (図 2)。翻訳機構の機能構造を理解する上で、翻訳因子群による「tRNA 分子擬態」の概念は、蛋白質による新たな機能構造構築原理の発見、更には翻訳の普遍的メカニズムを解明する重要な鍵として注目されるが、RRF においてはその意義はこれまでのところ明らかでなかった。しかしながら以上の実験結果から、RRF がリボソ-

ム上で機能する上で、RRFの擬態構造とtRNAとの相関性・相違性の双方が具体的に検証され、RRFの持つ高次機能の一端が明らかになった。RRFが最も効率よく機能するためには、リボソームにおけるtRNAと共通の部位に結合することが必要であり、そのためリボソームと立体障害を起こさないようにtRNAのアンチコドンステムに酷似した構造を獲得したと考えられる。また、リボソーム結合した後は、核酸であるtRNAにはない機能性を発揮するために、Tステムに相当する部位でtRNAとは異なる可動性が必要であったのだろう。

現在のところ、RRFの触媒するリボソーム再生反応の分子機構は依然として不明である。しかしながら、本研究によりRRFの機能構造領域が明らかとなり、RRFをtRNA擬態分子という側面から機能解析するための手がかりが得られた。今後、他の翻訳因子群及び各種抗生物質を用いたリボソーム結合系、化学架橋法による相互作用部位の決定等の実験によって、リボソーム再生の素過程が分子レベルで解明され、リボソーム内のどの部位と相互作用するのかが明らかとなるであろう。更に、RRFをモデル研究として、蛋白質とtRNAの間の分子擬態という生物学の新しい概念に関して理解を深めることができると考える。



(A) リボソームA部位は、コドンを解読し、P部位に存在する合成途中のペプチド鎖にアミノ酸を供与する為にtRNAがアクセスする部位である。この部位にはtRNAばかりではなく、tRNA擬態性を獲得した蛋白質もアクセスする。リボソーム上に確立されたtRNAの形をしたコクピットはリボソームの機能発現部位にアクセスする最適部位であり、翻訳因子が異なる目的のためにtRNAに擬態し、アクセスすることがいかに有利であるかを物語っている。

(B) L字型を示すtRNAの両端には、アミノ酸受容部位、アンチコドン部位が存在する。tRNAはこれらを介してそれぞれリボソームの50S、30Sサブユニットに架橋的に結合する。一方、RRFに遺伝学的・生化学的に特定された機能部位はtRNAの機能領域に構造上対応し、リボソーム結合に必要な領域であることが示された。tRNAのL字形はelbowの部位を形成するTステム、Dステムの構造領域が組合わさった強固な構造領域である。これに対してRRFの2つのドメインを繋ぐ2本のループ構造(点線円)は可動性を持つことが機能上重要である。矢印でRRFを失活させるC末端9アミノ酸残基の欠損を示し、球は本研究で明らかとなったRRFの機能部位上の変異の局在を表す。