

論文題目 哺乳動物ミトコンドリアのセリル tRNA 合成酵素による tRNA 認識機構
氏名 島田 信量

【緒言】

タンパク質合成(翻訳)の精度は、tRNA が対応するアミノ酸を受容する段階(アミノアシル化過程)で決定され、基本的にこれ以降は翻訳の校正機構が存在しないと考えられている。20 種類のアミノアシルtRNA 合成酵素(aaRS)が、互いに似通った構造を持つtRNA 群の中から対応するtRNA のみを正確に識別するために、個々のtRNA には特徴的な配列、構造から成る「tRNA アイデンティティー(アミノ酸特異性)決定因子」が備わっている。これまでの研究により、tRNA アイデンティティー決定因子は通常 tRNA のアンチコドン部位またはアクセプターステム上に存在することが知られている。しかし例外的にセリン tRNA は、特徴的な長いエキストラアーム領域でセリル tRNA 合成酵素(SerRS)の認識を受けることが原核生物及び真核生物の細胞質の翻訳系において明らかにされている。

哺乳動物ミトコンドリアの翻訳系には AGY(Y=U, C)コドンに対応する tRNA^{Ser}GCU と UCN(N=A, U, C, G)コドンに対応する tRNA^{Ser}UGA の 2 種類のセリン tRNA が存在し、前者は D ループをほぼ完全に欠き、後者は長いアンチコドンステムを持つなど、共に通常のクローバー葉型構造とは異なる特徴的な二次構造を持つことが知られている(図 1)。加えて両者ともにエキストラアームが短く、他の生物のセリン tRNA とは SerRS による認識様式が明らかに異なることが予想されるが、両者の間には tRNA アイデンティティー決定因子と思われるような共通部位が殆ど存在しない。これまでに単一の aaRS が構造の異なる複数の tRNA 群を認識するという報告例はなく、単一のミトコンドリア SerRS(mtSerRS)が両者を認識するならば、あらゆる生体高分子相互作用の中でも他に類を見ない非常にユニークなケースであると言える。

そこで本研究では、哺乳動物 mtSerRS のセリン tRNA 認識機構を解明するために様々な生化学的解析を行った。この特異な aaRS-tRNA 相互作用機構の研究を通じて、哺乳動物ミトコンドリアが非常に興味深い翻訳精度維持機構を備えていることが示唆された。

【実験と結果】

【1】野生型 mtSerRS のキャラクタリゼーション

既に当研究室の横川が、ウシ肝臓からほぼ単一の野生型のウシ mtSerRS を精製することに成功している。そこで、この野生型酵素を用いてゲルシフトアッセイを行った。いずれのセリン tRNA 存在下でも mtSerRS のバンドがシフトして、複合体と思われるバンドを形成した(図 2)。さらにアミノアシル化反応の活性測定を行い、単一の哺乳類 mtSerRS が異なる構造を持つ 2 種類のセリン tRNA をほぼ同等の活性でセリル化することを証明した。

次に、ウシ cDNA ライブラリーからのスクリーニング、RT-PCR、5'-RACE を行い、最終的にウシ mtSerRS をコードする塩基配列の全長(1557 bp)を決定した。

【2】mtSerRS による tRNA 認識機構

【2]-1 ウシ mtSerRS 大量発現系の構築

生化学的解析に十分な量の野生型酵素をウシ肝臓から精製することは困難なため、mtSerRS の大腸菌内での大量発現系の構築を行った。N 末端にヒスチジンタグを付加して大腸菌内で発現させて、Ni²⁺カラムでほぼ単一に精製した。次いで組換え酵素の活性測定を行い、組換え酵素が野生型酵素とほぼ同じ性質を持つことを確認した。以下の実験は全て組換え酵素を用いて行った。

【2]-2 フットプリント法による tRNA 上の結合部位の同定

リン酸基のアルキル化試薬であるエチルニトロソウレアを用いて、tRNA フットプリントを行った。その結果、tRNA^{Ser}GCU のリン酸基は 57-58 位と 64-67 位の 2 箇所(図 3A, C 左)、tRNA^{Ser}UGA のリン酸基もほぼ同じ位置(55-59 位と 65-67 位; 図 3B, C 右)で、mtSerRS と結合することが分かった。この結果から、mtSerRS は 2 種類のセリン tRNA に対して共通に、TΨC ループとアクセプターステムの根元の 2 箇所²で結合していることが明らかになった。この内、アクセプターステムへの結合は SerRS がアミノアシル化反応を行う上での必要なプロセスと考えられ、残る TΨC ループがセリン tRNA の認識に関与すると考えられる。

[2]-3 変異 tRNA を用いた tRNA アイデンティティー決定因子の同定

[2]-3-1 tRNA^{Ser}UGA のアイデンティティー

次に、変異 tRNA を用いてアイデンティティー決定因子の同定を行った。tRNA フットプリントでの考察に従い、TΨC ループを中心に変異を導入した tRNA^{Ser}UGA を試験管内転写反応により調製した。次いで、変異 tRNA のアミノアシル化活性を測定した。

顕著に活性が低下した変異は G19C、C56G、U54A、A58U、U54A・A58U の 5 種類であった(図 4)。このことから mtSerRS は tRNA^{Ser}UGA の TΨC ループ領域を配列特異的に認識していることが分かった。加えて、G19C・C56G の塩基置換により活性が完全に回復したことから、G19:C56 を中心とする D ループ-TΨC ループ間の三次元相互作用が TΨC ループの認識に必須であることも明らかになった。

[2]-3-2 tRNA^{Ser}GCU のアイデンティティー

変異 tRNA^{Ser}GCU の調製は、当研究室の林らによって完成された、大腸菌内での tRNA^{Ser}GCU の大量発現系を用いて行った。tRNA^{Ser}UGA の場合と同様の部位に変異を導入し、精製した変異 tRNA の活性を測定した。

tRNA^{Ser}UGA の場合と異なり、擬似 D ループ上の変異は活性に殆ど影響を与えなかった。しかし、TΨC ループ上の変異の殆ど(A57U、A58U、U54A・A58U、U59A・A60_AU; 図 4)が顕著に活性を低下させた。このことから、mtSerRS が認識の際に TΨC ループ上の 57 位から 60 位付近の塩基だけを特異的に認識していることが分かった。中でも A57 と A58 は mtSerRS の結合部位であるため(図 3A, C 左)、A57 と A58 が tRNA^{Ser}GCU のアイデンティティー決定因子であることが強く示唆された。

[2]-4 mtSerRS の tRNA 認識機構

以上の実験により、mtSerRS はどちらのセリン tRNA に対しても TΨC ループを配列特異的に認識して結合するという、認識機構の「共通性」が明らかになった。しかし、D ループ-TΨC ループ間の三次元相互作用は tRNA^{Ser}UGA 認識の場合にのみ必要であることから、mtSerRS は 2 種類のセリン tRNA の TΨC ループを「異なった」メカニズムで認識している可能性が示唆された。具体的には、tRNA^{Ser}GCU は TΨC ループ単独で mtSerRS の tRNA 認識部位と強い結合を組むことができるが、tRNA^{Ser}UGA の TΨC ループは結合力が弱いので、D ループの一部の塩基が TΨC ループを空間的に支えることで mtSerRS との結合を促進しているのではないかと考えられる。

[3] 哺乳動物ミトコンドリアにおける翻訳精度維持機構

[3]-1 mtSerRS によるグルタミン tRNA のミスアミノアシル化

mtSerRS の認識にはセリン tRNA の TΨC ループ配列が重要であることが示されたので、次に他のミトコンドリア tRNA の中に類似した配列を持つものが存在するかどうか調べたところ、tRNA^{Ser}GCU に関しては存在しなかった。一方 tRNA^{Ser}UGA については、グルタミン tRNA が同じ TΨC ループ配列を、グルタミン酸 tRNA とチロシン tRNA がそれ

ぞれ 1、2 塩基異なるもののよく似た配列を持つことが分かった。そこでウシ肝臓から精製した野生型の tRNA を用いて活性を測定したところ、mtSerRS はグルタミン酸 tRNA とチロシン tRNA を全くアミノアシル化しなかったが、驚くべきことにグルタミン tRNA を有意にミスアミノアシル化することがわかった(図 5)。

[3]-2 アミノアシル tRNA 合成酵素-tRNA 間ネットワークによって支配される新規の翻訳精度維持機構(kinetic discrimination)の提唱

このように tRNA の識別が曖昧な aaRS が翻訳系に存在する場合に、どのようにして翻訳の精度は保たれているのだろうか。mtSerRS-グルタミン tRNA のミスアミノアシル化の反応速度は、tRNA^{Ser}UGA を基質とした場合の約 4000 分の 1 しかない。実際の生体内にはグルタミン tRNA 合成酵素(mtGlnRS)が存在するので、グルタミン tRNA を共通の基質とする競争反応が mtSerRS と mtGlnRS の間で生じ、反応速度的に劣るミスアミノアシル化反応の効率が一般的な翻訳のエラー頻度($10^{-4} \sim 10^{-5}$)以下にまで抑えられるのではないかと考えられる。

tRNA 認識の曖昧さは哺乳動物ミトコンドリア aaRS の一般的な特性である可能性が高い。もしそうだと仮定するならば、ミトコンドリア翻訳系においては基質となる tRNA に対する aaRS 同士の競争反応によってミスアミノアシル化を抑え、その結果翻訳精度が維持されている (kinetic discrimination) と考えられる。