

論文の内容の要旨

論文題目 真核生物遺伝子翻訳終結因子GSPT/eRF3の機能と構造解析
氏名 中西 民 二

(1) 遺伝子翻訳終結とGSPT/eRF3

タンパク質合成の最終段階は、ペプチジル tRNA のエステル結合加水分解と新生ポリペプチド鎖のリボソームからの解離からなる。この反応は解離因子(releasing factor: RF)と呼ばれる分子によって担われており、真核生物では eRF1 および GSPT/eRF3 の2分子が同定されている。eRF1 は3種類すべてのストップコドンを認識し、リボソームによるペプチジル tRNA のペプチド結合加水分解を引き起こす。さらに、この加水分解は、eRF1 が GTPase である GSPT と相互作用することで GTP 依存的に進行することが知られている。

近年GSPTが、mRNAの3'末端に位置するpoly-A RNAと相互作用するタンパク質、PABPと相互作用することが示された。PABPはmRNAの3'末端に位置するpoly-A RNAに結合することでmRNAの安定化に関与することが知られている。このことはGSPTが、翻訳終結反応に関与するとともにmRNAの安定性の制御にも関与していることを示唆する。しかし、GSPTのが有する立体構造およびPABPとの相互作用メカニズムについては不明の点が多く、またその機能発現メカニズムについて詳細も不明であった。そこで本研究では、主としてNMR法を用をもちいることでGSPTの立体構造およびPABPとの相互作用様式の解明を行った。

(2) GSPT-PABP相互作用解析

GSPTは一次構造上、C末端領域には翻訳伸長因子であるeEF1Aと高度に類似したGTPaseドメイン(アミノ酸配列相同性>90%)を有しており、このCドメインを介してeRF1と相互作用する。一方で、N末端領域にはPABPと相互作用するNDドメインが位置する。NDドメインは、既知のタンパクとは相同性が見られないことから新規フォールドを有すると考えられ、まず本研究ではNDドメインの立体構造を解析することにした。

GSPTは、これまでにヒトおよびマウスでGSPT1、GSPT2の2種類が存在することが知られている。そこでGSPT1およびGSPT2の大量発現系を構築し、得られたタンパク質を用いてNMRおよびCDによる解析を行った。その結果、GSPT1、GSPT2ともに、単独では一定の立体構造をとらないことが明らかとなった(図1参照)。さらにこれらアンフォールド状態にあるタンパクが、PABPとの相互作用活性を有することをSPR法により明らかにした。

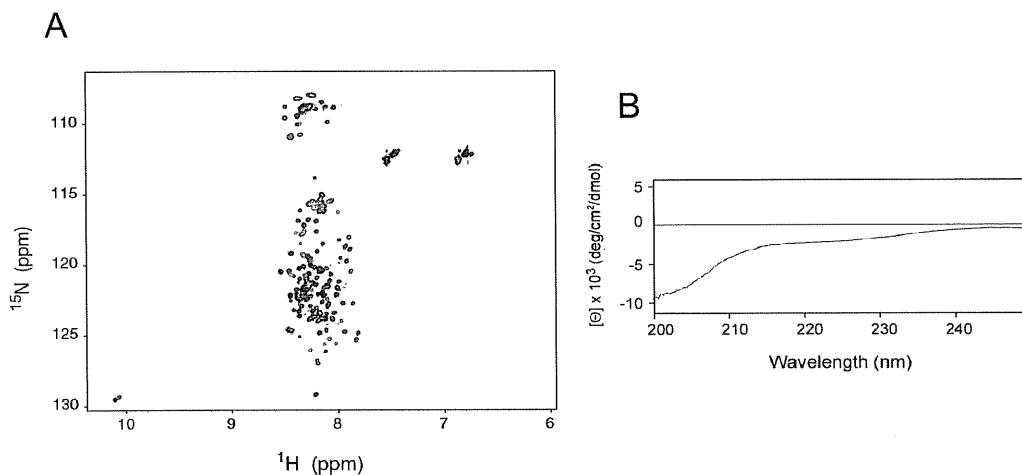


図1 : GSPTのNDドメインは、溶液中で一定の立体構造をとっていない。

(A)GSPT1 NDドメインの¹H-¹⁵N HSQCスペクトル。アミドプロトンの化学シフトが非常に限定された領域に分布している。(B)Aと同一サンプルのCDスペクトル。2次構造の存在を示すスペクトルパターンは得られない。

次に詳細なGSPTとPABPの相互作用様式をあきらかにするため、それぞれの分子における相互作用領域の同定を行った。

すでにyeast two-hybrid法によりGSPT結合領域として同定されていたPABPのC末端領域(アミノ酸番号371-636)と、その領域に含まれる構造ドメインPABC(アミノ酸番号541-623)からなるタンパクをそれぞれ調製し、GSPT NDドメインとの相互作用をSPR法により比較した。結果、それぞれの結合親和性は同程度であることが示され、GSPTはPABPに含まれるドメインPABCとのみ相互作用することが明らかとなった。

また、GSPT側の結合部位は、GSPTにPABCを混合することで生じるGSPT側の化学シフト変化を指標として求めた。その結果、GSPTのアミノ酸番号64から94番の領域がPABCとの結合に関与していることが明らかとなった。また同時に、GSPTの一部のNMRシグナルのみが広幅化する現象も観測された。

分子の特定の領域にのみ観測されるシグナルの広幅化は、化学交換現象の存在を示すものである。このことと、PABC結合領域(アミノ酸番号64から94の領域)に見られた配列パターン([AxxFxFP])の重複から、GSPTにはPABC結合配列が2個含まれることが考えられた。そこで、重複した配列パターンのうち一方のみを含むフラグメントを調製しPABCとの相互作用を観測した。結果、調製した2個のフラグメントがそれぞれPABC結合活性を示した。つまり、GSPTには2個のPABC認識部位があると結論づけた(表1参照)。さらに、GSPT結合状態におけるPABCのNMRシグナルの線幅の解析から、1分子のGSPTに対し2分子のPABCが相互作用することを示した。

PABC recognition sequence

AxxFxFP AxxFxFP

Ligand	Bindin to	K_D (M)
GSPT1(51-102)	PABC	$(5.13 \pm 0.11) \times 10^{-6}$
GSPT1(64-82)	PABC	$(23.4 \pm 7.22) \times 10^{-6}$
GSPT1(79-94)	PABC	$(112 \pm 6.71) \times 10^{-6}$

表1. GSPTに含まれるPABC認識配列とPABCの親和性

PABC認識領域を含むフラグメントGSPT1(51-102)および、重複した配列パターン[AxxFxFP]のうち一方のみを含むフラグメント(GSPT1(64-82)、GSPT1(79-94))とPABCの解離定数。重複した認識配列は、それぞれ独立にPABCと結合する。

次に、GSPT-PABC複合体における、PABC側の相互作用界面を同定するため、 ^{15}N 標識したPABCに対し非標識GSPTフラグメント(GSPT1(64-82)およびGSPT1(79-94))を添加し、 ^1H - ^{15}N HSQCスペクトルで観測される化学シフト変化を調べた。結果、PABCのhelix1からhelix2のリンカー領域およびhelix3、5を中心に化学シフト変化が観測された。とくにhelix3と5からなる領域は、PABC分子表面上でくぼみが形成されており、この領域にGSPTが埋没する形で相互作用すると考えられた(図2参照)。

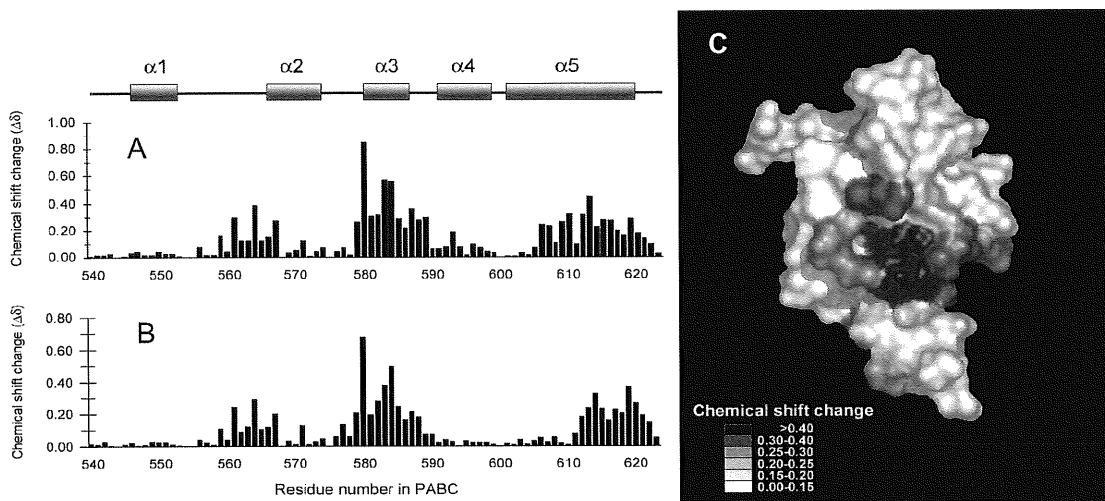


図2. PABC分子上のGSPT結合部位

(A)GSPT1(64-82)結合にともなうPABCの主鎖アミドプロトンの化学シフト変化。

$\Delta\delta = ((\Delta\delta_{HN})^2 + (\Delta\delta_N/5)^2)^{1/2}$ にしたがって求めた。 $(\Delta\delta_{HN}, \Delta\delta_N)$ は、それぞれアミドプロトン、アミド窒素の化学シフト変化値に対応。

(B)GSPT1(79-94)結合にともなうPABCの化学シフト変化。

(C)PABC分子表面にAで得られた結果をマッピングした図。図中で分子の右下に位置するPABC分子表面のくぼみに、GSPTが埋没する形で結合すると考えられる。色づけは、図中の分類に従った。

同様に ^{15}N 標識したGSPT1(64-82)を用いることで、複合体中のGSPT分子を観測した。結果、単独では非常に限定された領域に分布していた主鎖アミドプロトンの化学シフトが、PABCとの複合体の形成に伴い、その分布が大きく広がった(図3参照)。これは、PABCと結合することで、単独ではアンフォールド状態にあったGSPTが高次構造形成を起こしたことを示すものである。そこで、さらに複合体状態のGSPT分子内NOEを観測し、複合体中のGSPTにベータターン構造が形成されていることがあきらかにした。

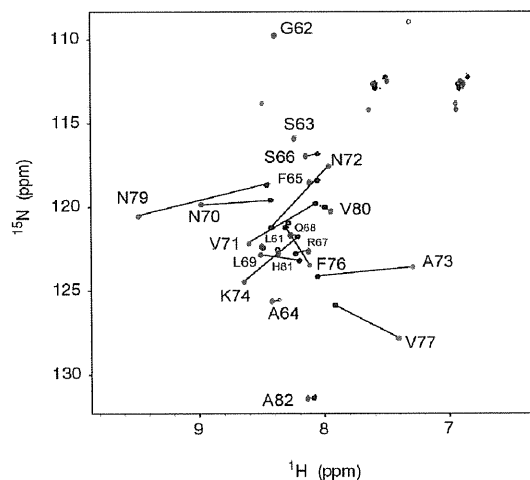


図3. GSPTは、PABC結合にともない高次構造形成をする。

^{15}N で均一に安定同位体標識したGSPT1(64-82)と非標識PABCとの複合体の ^1H - ^{15}N HSQCスペクトル(赤)とGSPT1(64-82)単独のスペクトル(黒)の重ね合わせ。シグナルに対応するアミノ酸残基をラベルした。

(3) タンパク質複合体の界面を同定する NMR 測定法の開発

ここまでの研究は、各タンパクの相互作用ドメインのみを用いた解析であるため、生体内の環境とは違う条件で観測している可能性が考えられる。とくに、PABP は poly-A RNA 上で隣接して複数個結合するという特異な環境におかれている。このため、今後は poly-A RNA と結合した状態の PABP と GSPT との相互作用など、より生体内の環境に近い条件で観測する必要がある。そこで、従来困難であったこのような高分子量複合体の系を、直接観測できる方法の開発をすすめることにした。

一方これまでに、複合体の相互作用界面を同定する NMR 測定法(交差飽和法)を開発し報告した。しかし、この方法では複合体状態の NMR シグナルを観測するため、複合体の分子量が ~100kDa を超えるような分子には適応ができなかった。そこで、この方法をさらに発展させることで、より高分子量の相互作用系にも適用できる方法へと改良することにした。

方法の開発にあたり、複合体分子量が 164kDa である、プロテイン A の B ドメイン(FB)とマウス IgG1 からなる FB-IgG 複合体を取り上げた。なお、FB-IgG 複合体の FB 側結合界面はすでに同定されている。まず、観測側の分子である FB を ^2H と ^{15}N で均一標識し、非標識の IgG と混合する。このとき、FB-IgG の相互作用は十分に弱いため($K_D=26.2\mu\text{M}$)、FB を IgG に対して過剰量存在させることで、非結合状態の FB 分子のみを選択的に観測することが可能となった。この複合体に対し、交差飽和実験を行った結果、IgG 分子との結合状態で受けた交差飽和の影響を、非結合状態の FB 分子で観測することができた。さらに、交差飽和によって求められた結合界面が、既知の結合界面と一致することを明らかにし、この方法の妥当性を確認した(図4参照)。転移型交差飽和法(transferred Cross-saturation)は、非結合状態にある分子を選択的に観測することで、複合体の分子間界面を同定する方法である。つまり、複合体の分子量に依存しないため、これまで困難だった高分子複合体にも適用できる。

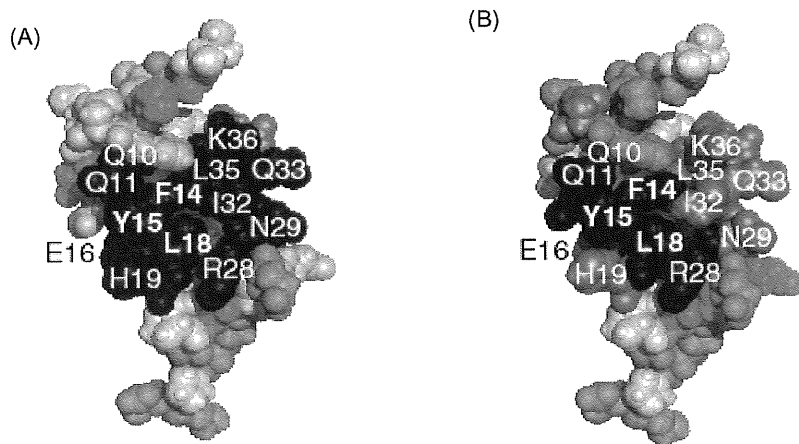


図4. FB上のIgG結合界面

(A)すでに明らかとなっているFB-human Fc γ 1複合体(64kDa)での交差飽和によりシグナル強度比をFB分子上に色づけして示した。(B)FB-mouse IgG1複合体(164kDa)での交差飽和の結果。(シグナル強度比を<0.5, 0.5-0.6, 0.6-0.7, 0.7-0.8に分類し、それぞれ、赤、オレンジ、黄色、緑、青で色づけした。)両者で求められた、結合界面はほぼ一致する。