

論文内容の要旨

論文題目 leaderless mRNA の翻訳開始機構の解析

氏名 宇田川 剛

1. 序論

翻訳開始は遺伝子発現制御に関与する重要なステップである。そのメカニズムは真核生物、原核生物、古細菌で異なっているが、翻訳過程における遺伝子発現調節は、一般的に mRNA のリボソームへの結合、開始コドンの選択を伴う開始複合体の形成に依存している。原核生物では翻訳開始は大きく 3 つのステップに分けられる。まず、70S リボソームが開始因子 IF3、IF1 によって、30S 及び 50S サブユニットに解離される。次に、mRNA と fMet-tRNA-IF2 複合体がランダムな順序で 30S サブユニットに結合し 30S 開始複合体が形成される。最後に、50S サブユニットが 30S 開始複合体に会合し、70S 開始複合体が形成される。この複合体はアミノアシル tRNA を A サイトに受容し、ペプチド鎖伸長のプロセスへと移行する。

このような翻訳開始経路のモデルは開始コドン上流に 5'リーダー配列を伴う典型的な mRNA をもとに構築されてきた。特に原核生物において SD 配列は翻訳開始の効率に大きく寄与するものと考えられてきた。しかしながら、全ての生物界において 5'リーダー配列をもたず 5'末端に開始コドンが位置する mRNA (leaderless mRNA) の存在が報告されている。これらの mRNA は明確なリボソーム結合部位をもたないにも関わらず生体内で効率よく翻訳される。leaderless mRNA の翻訳開始機構は未だ明確ではないが、これまでの研究から以下の 2 つのモデルが提唱されている。

- 1) leaderless mRNA の翻訳は開始因子 IF3 とリボソームタンパク質 S1 またはそのいずれか欠いた 30S サブユニットによって開始される。
- 2) leaderless mRNA の翻訳は解離していない 70S リボソームによって直接開始される。

いて検討した。その結果、この複合体は開始因子非存在下でも伸長過程に移行できることが明らかになった。一方、リーダー配列をもつ mRNA の場合、開始因子非存在下では翻訳活性を示さなかった。そこで次に、leaderless mRNA の翻訳が 30S サブユニットと 70S リボソームのどちらで効率よく開始されるのかを、同様の手法で調べた (Fig.2)。まず、30S サブユニット或いは 70S リボソームと、mRNA、fMet-tRNA で複合体を形成し、そこに伸長に必要な因子と、30S サブユニットで複合体を形成させた場合には 50S サブユニットを共に加え、single-round の翻訳を行った。その結果、5'リーダー配列を持つ mRNA (Fig.2C、E) は 30S、70S のどちらの複合体を形成しても翻訳効率に差はなかったのに対し、leaderless mRNA (Fig.2B、D) の翻訳は 30S サブユニットの場合に著しく低下した。

これらの結果は、leaderless mRNA の翻訳はサブユニットの解離を経ずに 70S リボソームによって開始されることを強く示唆している。一方、5'リーダー配列をもつ mRNA の翻訳は、既知のモデルのように 30S サブユニットによって開始されると考えられる。

2.3. leaderless mRNA の翻訳における開始因子の影響

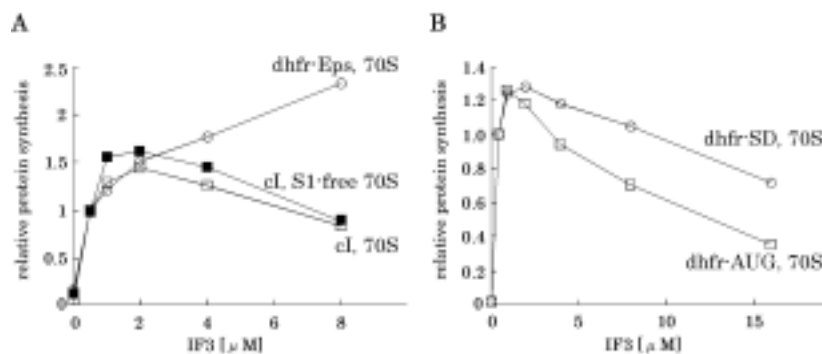


Fig.3 Effect of IF3 and the ribosomal protein S1 on the translation of leaderless and leadered mRNAs

現することによって阻害されることが報告されている。Blasi らは、これは 30S 開始複合体形成において IF3 が 5'末端の開始コドンで正規なものとして認識しないためであると考えられている。また、この阻害にはリボソームタンパク質 S1 が必要とされることから、彼らは leaderless mRNA の翻訳開始が IF3 と S1 或いはそのいずれかを欠いた 30S サブユニットによって行われるというモデルを提唱している。しかし、彼らは IF3 と S1 の関係について複合体形成の実験のみを行っているにすぎず、翻訳レベルで検証を行っていない。そこで、leaderless mRNA の翻訳における IF3 の影響を S1-free リボソームを用いて検討した (Fig.3)。その結果、高濃度の IF3 は leaderless mRNA の翻訳を阻害したものの、Blasi らのモデルに反してその阻害は S1-free リボソームでも回復しなかった。この結果は、IF3 による leaderless mRNA の翻訳阻害が、30S 開始複合体形成の阻害によるものではないことを示唆している。むしろ、これは過剰な IF3 による 70S リボソームのサブユニット化によるものと考えられる。実際、leaderless mRNA の翻訳阻害がおこる IF3 の濃度以上ではショ糖連続密度勾配遠心による解析で、70S リボソームのサブユニット化が観察された。

開始因子 IF2 はホルミル化されたαアミノ基を認識して fMet-tRNA をリボソームに運び、サブユニットの会合を促進する因子である。leaderless mRNA の翻訳は IF2 によって特異的に促進されることが報告されている。本研究でも、leaderless mRNA はリーダー配列をもつ mRNA に比

開始因子は 70S リボソームの 30S、50S サブユニットへの解離、開始 tRNA、適切な開始コドンの選別に重要な役割を担っている。IF3 はこれら全てに関わる因子と考えられている。一方、leaderless mRNA の翻訳は IF3 を強制発

べ IF2 依存性が高いことが示された。さらにホルミル基転移酵素の基質となるホルミルドナーを除いて翻訳を行うと leaderless mRNA の翻訳のみが顕著に阻害された。

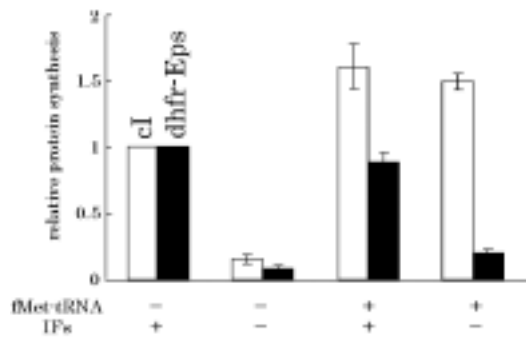


Fig.4 Requirement for IFs of cl and dhfr-Eps mRNA translation in the presence or absence of excess fMet-tRNA amounts.

開始 tRNA は伸長 tRNA との競合が無い条件ではそれ自身で P サイトに適切に結合することができる。そこで、過剰な fMet-tRNA 存在下の翻訳における開始因子の要求性を検討した。その結果、leaderless mRNA の翻訳は過剰な fMet-tRNA によって選択的に促進され、その条件では開始因子非存在下でも効率よく翻訳が行われることが明らかになった (Fig.4)。一方、リーダー配列をもつ mRNA の翻訳活性は fMet-tRNA の濃度にほとんど変化を受けなかった。

これらの結果は、leaderless mRNA の翻訳は fMet-tRNA のリボソームへの結合に大きく依存しており、70S-fMet-tRNA 複合体が十分に形成されていれば、開始因子を必要としないことを示している。さらに、開始因子を必要としないという結果は、サブユニットの解離を経ず、70S リボソームによる翻訳が開始されることを示唆している。一方、リーダー配列をもつ mRNA では、その開始コドン及び開始コドン上流の配列を 30S サブユニット上に適切に配置させるのに開始因子によるサブユニット化が必要なのだと考えられる。

2.4. まとめ

本研究では leaderless mRNA の翻訳が 70S リボソームのサブユニットへの解離を経ずに、mRNA が直接 70S リボソームに結合し開始することを明らかにした。また、leaderless mRNA の翻訳開始においては fMet-tRNA が 70S リボソームに結合し、その後に leaderless mRNA が結合するというステップで進行することが示唆された (Fig.5)。これは 5'リーダー配列をもつ mRNA がランダムな結合プロセスを経るのと対照的である。おそらく、明確なリボソーム結合部位をもたない leaderless mRNA の場合、fMet-tRNA のアンチコドンによる 5'末端の開始コドンの認識が翻訳開始において重要なステップとなるのだろう。

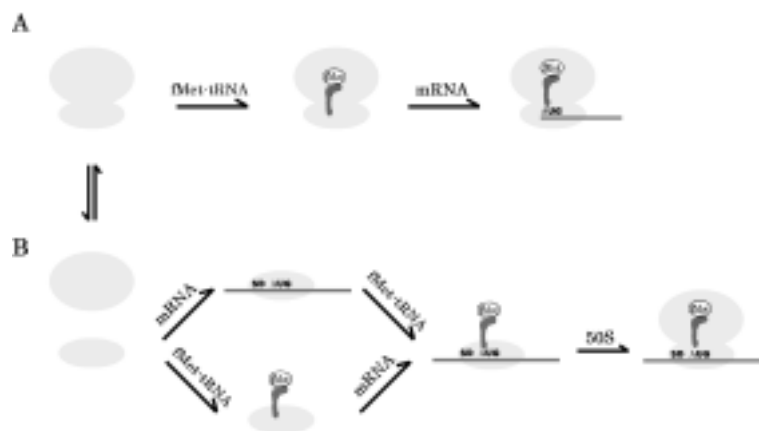


Fig.5 Simplified model describing the translation initiation pathways used by leaderless (A) and leadered mRNA (B).