

論文内容の要旨

論文題目 翻訳終結制御機構に関わるリボソーム機能ドメインの解析

(Functional study of *E. coli* ribosomal domains that affect translation termination)

氏名 佐藤 華江

序

あらゆる生命体に共通する蛋白質分子の生合成は、DNA から mRNA への転写と、それに続く mRNA の遺伝暗号 (コドン) の翻訳によって行われる。遺伝暗号解読過程は、開始、伸長、終結、の 3 過程に大別され、開始・伸長過程における 20 種類のアミノ酸に対応するセンスコдонはアダプター核酸分子 tRNA が介在し、終結過程における終止コドンでは蛋白質であるペプチド鎖解離因子 (RF) が核酸である tRNA 機能を擬態することで解読する。

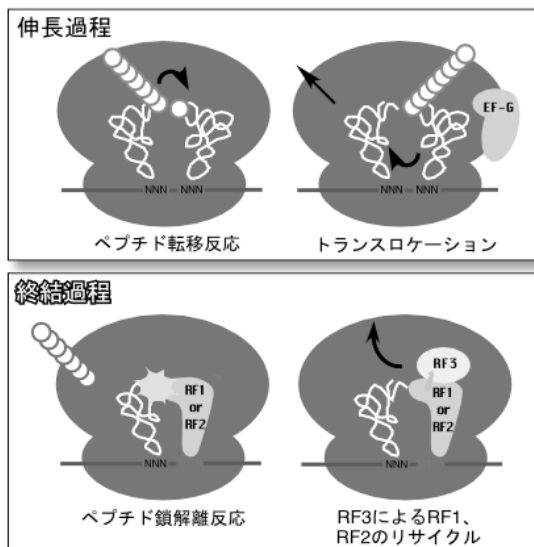


図 1. tRNA を擬態するペプチド鎖解離因子：終結過程では、終止コドンのアダプターとして蛋白質分子であるペプチド鎖解離因子が機能する。ペプチド鎖解離因子は終止コдонを認識し、ペプチド鎖解離反応を触媒するクラス I 解離因子 (原核生物; RF1/RF2、真核生物; eRF1) とその機能を促進させるクラス II 解離因子 (原核生物; RF3、真核生物; eRF3) に分類される。

伸長過程では、tRNA がペプチド鎖転移反応中心の活性化によるペプチド結合形成と協調し、GTP 結合性蛋白質である伸長因子 EF-G によりフレームを維持しながら正確に解読する。一方、終結過程では

RF が、(1) コドン特異性、(2) ペプチド鎖転移反応中心の活性化、(3) GTP 結合性蛋白質 RF3 との連携など、tRNA 様の機能を発揮する (図 1)。遺伝暗号解読の最終段階である終結過程が、なぜ蛋白質に託されたのか。リボソームを中心とした RF による翻訳終結機構の問題は、現存の全生命に普遍的な遺伝暗号解読機構の完全理解への重要な鍵を担うと考えられる。

伸長過程における tRNA の遺伝暗号解読は RNA と RNA の相互作用の問題であるのに対し、RF による終止コドン認識は、蛋白質と RNA の相互作用の問題である。RF は塩基対合則に基づいてコдонを解読する tRNA との競合環境の中で、tRNA 擬態性を巧みに利用する一方で、終止

コドンを読解するための解離因子特異的な『蛋白質』としての特性を持つ事が予測される。つまり、塩基対合則によるコドン認識を行わない解離因子が正確な終止コドン読解を実現するためには、リボソームと解離因子の相互作用による適切な分子配向の誘導が行われていると予測される。

これまでに tRNA との機能的な類似性にもとづいた RF の機能ドメインの解明が中心に進められたが、核酸とは異なるこれらの蛋白質ドメインの機能発現を実現するリボソーム側からの解析が必要とされた。解離因子による翻訳終結反応に影響するリボソーム因子として、リボソーム蛋白質 L11 がこれまでに注目されて、L11 が RF1 の翻訳終結効率を促進させるが RF2 の翻訳終結効率は低下させるという L11 のコドン特異的作用が示されていたが、(1)リボソーム因子欠損による翻訳反応全体への多大な影響により翻訳終結特異性が評価できない、(2)モデル生物としての大腸菌の解離因子機能の特殊性を考慮に入れていない、(3)近年開発された、より忠実な *in vitro* 評価系での再現性が報告されていない、などの既存の解析系の問題を解決する必要がある。

本研究では、RF の機能に作用するリボソーム解析を開始するにあたり、高温致死変異体 RF2 の高温での生育を回復させる変異としてリボソーム蛋白質 L11 変異体が分離されていたことを機会に、L11 変異導入プラスミドライブラリーからの L11 変異体スクリーニングを実施し、分離された L11 変異体の機能解析を行った。本研究の結果として明らかになった、L11 による UAG(RF1 により認識)と UGA(RF2 により認識)コドンにおける翻訳終結効率への影響は、過去の報告の L11 のコドン特異的作用と矛盾していた。ペプチドアンチコドンによって定義されると考えられた RF のコドン特異性という性質が、リボソーム蛋白質によって調節されるという過去の報告は、tRNA 機能の擬態、終結反応の正確性などから考えても疑問であった。そこで、上記(1)から(3)の問題点を改善する事で検証した。

翻訳終結特異的なリボソーム機能解析の戦略と実践

効率的・網羅的な新規スクリーニング系の開発：新規機能解析の戦略として、i) 大腸菌 RF 高温感受性変異株の高温生育能および、*lacZ* ナンセンス変異での終結効率を指標としたプラスミドライブラリーによる効率的、かつ網羅的な遺伝学的検索、ii) オペロン構成を維持した L11 発現システムを利用することによるリボソーム因子欠損を回避した新規スクリーニングにより、翻訳終結活性を促進、または低下させる 21 種類の L11 変異体分離に成功した。*lacZ* ナンセンス変異部位におけるリードスルー効率測定から、これら全ての L11 変異は RF1 と RF2 に等しく作用していることが明らかとなった。

クラス II 解離因子 RF3 との協調性検証：L11 は GTP 結合性翻訳因子の機能部位である GTPase Center の構成因子である事から、L11 変異体の示す翻訳終結機構への作用には、GTP 結合性蛋白質 RF3 の関与が予測された。しかしながら、RF3 ノックアウト株における同様なリードスルー効率測定から、全ての L11 変異体の翻訳終結効率への影響は RF3 を介さずに RF1 および、RF2

に対して発揮される RF1 と RF2 への直接的作用である事が明らかとなった。

L11 変異体の作用機構解析：リボソーム蛋白質遺伝子発現には複雑なフィードバック制御が存在する。分離された変異体が実際にリボソーム上で機能している事を、タグ付き L11 変異体蛋白質を発現させた株からの精製リボソームにより確認した。その結果、ほとんどの L11 変異体がリボソームに取り込まれて機能する事を確認した。一方で、翻訳終結効率を低下させる L11 変異体の一部はリボソームへの取込みが確認されなかった。ナンセンス変異を含むこれらの変異体の一つが L11 の備えるオペロン翻訳フィードバック制御機構に影響する変異と一致していた事から、これらは L11 の発現量に影響する変異である事が予測された。そこで、これらの変異体形質転換体での精製リボソームにおける L11 定量を実施したところ、これらの変異体では細胞内の L11 欠損リボソーム濃度の増加により翻訳終結効率が低下した事を明らかにした。さらに、In vivo 実験系での過去の報告との矛盾も、発現系の違いによるものであると予測されたため、オペロン構造を改変した発現系により解析系の有効性を検証した。その結果、L1 を下流に持つ L11 の機能発現には、オペロン翻訳フィードバック制御機構の維持が重要である事を明らかにし、L11 単独発現を用いていたこれまでの解析系では、リボソーム生合成など翻訳終結過程以外へ影響している可能性が示唆され、オペロン構造を維持した本研究の発現システムの有効性を証明した。

L11 機能性の in vitro 解析系の再構築：上記の結果から、L11 欠損は RF1 と RF2 の翻訳終結効率を低下させると考えられたが、*E.coli* RF2 は RF1 と比較して著しい活性低下を起こす *E.coli* 特有のアミノ酸置換があり、in vitro 系での RF1 との機能比較解析は難しい。そこで、該当アミノ酸部位以外は、大腸菌 RF2 とほぼ同一アミノ酸配列をもち、RF1 と対等な活性強度を示す *S.typhimurium* 由来の RF2 を使用し、RF1 と RF2 の活性差による評価系の非対称性を打開した。さらに、in vitro ペプチド解離活性測定法の改良により、近年開発された in vitro 評価系で、in vivo の結果を実証する事に成功した。以上の結果から、過去の報告との矛盾を解決し、L11 のリボソーム結合時のコドン非特異的促進機能を証明した。

考察

立体構造上の変異部位と L11 作用モデル：L11 変異体の立体構造へのマッピングから、L11 変異部位は C 末端ドメインの rRNA 結合領域や可動性が予測される N 末端ドメインの分子表面に局在した。rRNA 結合領域に局在する変異は、その結合様式を変化させると予測されるアミノ酸の変化であった。さらに、N 末端ドメインの分子表面に存在する変異は、負電荷アミノ酸から正電荷アミノ酸、もしくは非電荷アミノ酸へ変化していた事から、L11 は N 末端ドメインとの電荷を介した直接的相互作用により RF を感知し、rRNA-L11 間の相互作用によりリボソームによる RF の再配置を誘導する事で RF のリボソームへの侵入を促進する、いわば『ドアノブ』のような機能を維持していると考えられた。

伸長過程では、アミノアシル tRNA が A site に結合する前に二段階のコードン識別機構により正確な蛋白質合成を実現させると考えられている。第一段階として、tRNA に対応したコードン（コグネートコードン）と対応しないコードン（ノンコグネートコードン）の識別を行い、GTP 加水分解を伴った第二段階の識別において、コグネートコードンと類似しているがコグネートコードンとは異なるニアコグネートコードンの識別を行っている。終結過程においても、コードン非依存的な第一段階のリボソーム結合（Initial binding）が報告されており、同様な正確性メンテナンスともいえる作用機構の存在が予測される。本研究で明らかにされた L11 の新規機能は解離因子特異的なコードン非特異的リボソーム結合に貢献するリボソーム因子であり、解離因子のリボソーム内への侵入の際、解離因子の適切なリボソーム内の再配置を促すと考えられる。

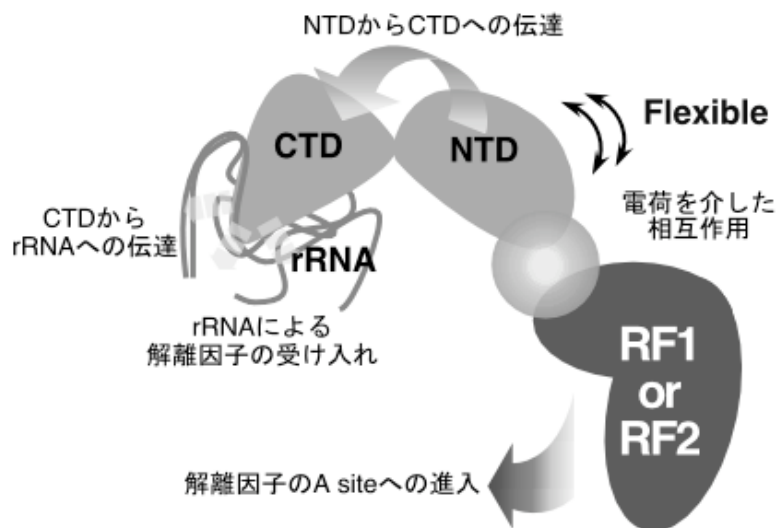


図2. RFに作用するL11機能モデル

NTD; N末端ドメイン、CTD; C末端ドメイン。L11はRFのリボソーム侵入の際、rRNAに積極的な解離因子受入環境を促す事で、解離因子の機能性を促進していると考えられる。

このような終結過程特有のリボソーム制御機構の解明は、リボソームを中心とした複合な翻訳装置の分子レベルでの機能性

の理解、終止コードンを取り巻く様々な翻訳制御システムの解明、高等生物での普遍性比較による進化論的考察や人為的遺伝子発現制御の実現を可能にする。立体構造解析は非常に有力な分子機能予測を可能にするが、リボソームのような超高分子において、構造変化を伴う複雑な連携反応を予測するには限界がある。本研究では、分子遺伝学と生化学、構造生物学を組み合わせた解析により、リボソームの立体構造からでは予測不可能な機能領域の特定を実現し、RFの促進的な機能発現に貢献するL11の作用を修正・再評価し、具体的な作用モデルを構築した。