

論文の内容の要旨

論文題目 セリン特異性をもつ EF-Tu の発見とそのセリル tRNA 認識機構の解明

氏 名 佐藤 文

【序論】

tRNA は翻訳系において、mRNA の暗号配列に従ってタンパク合成の場であるリボソームへアミノ酸を運ぶアダプター分子として働いている。また、Elongation Factor Tu (EF-Tu)は、アミノアシルtRNA と結合してアミノアシル tRNA をリボソームへと運ぶ役割をしているタンパク質である。EF-Tu は、通常、tRNA のアクセプターステムと T アームを認識部位とし、一種類で全てのアミノアシル tRNA に対応することが知られている。

通常の tRNA はクローバーリーフ型の二次構造をとっているが、動物ミトコンドリアにおいては異常に短縮された構造を持つ tRNA が存在することが知られており、それらは一般的な EF-Tu によって認識されるのは難しいと考えられる。なかでも線形動物ミトコンドリアでは極度の短縮化が見られ、異常な形をした 2 種類の tRNA のみが存在することが知られている。線形動物ではミトコンドリア tRNA22 種類のうち 20 種類は二次構造において T アームが欠けており、残りの 2 種類はセリンに対応する tRNA で、D アームが欠けている上 T アームも短くなっている (図 1)。

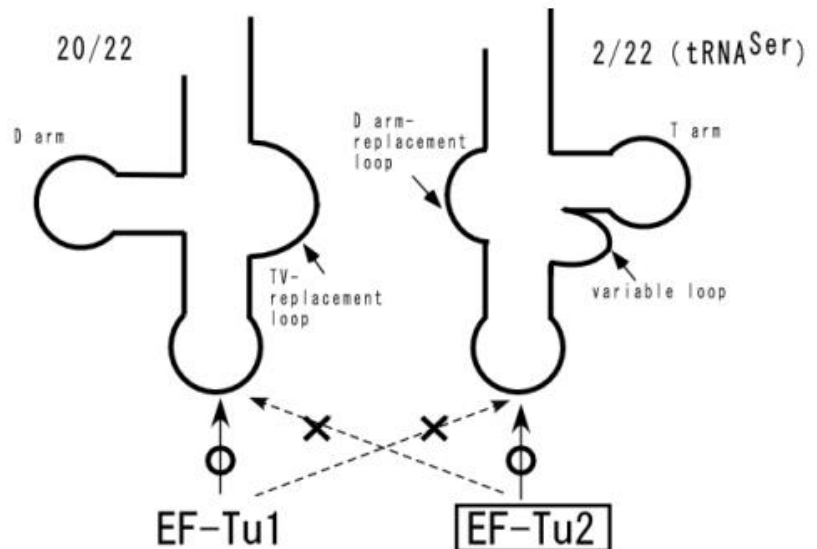


図1 線形動物ミトコンドリアtRNA

線形動物のミトコンドリアゲノムはミトコンドリアゲノムの中でも最小の部類であり、tRNA の短縮化もこのことに関係していると思われる。ただし、短縮した tRNA が機能するためには、tRNA と共同で機能を果たす EF-Tu などの翻訳因子が tRNA の短縮を補うような共進化を遂げていることが不可欠と思われる。これらの異常に短縮した tRNA に結合する EF-Tu は当研究室で解析され、以下のようなことが既に分かっていた。通常の翻訳系では EF-Tu は 1 種類であるが、線形動物 *Caenorhabditis elegans* には、2 種類の EF-Tu (EF-Tu1 および EF-Tu2) が存在している。EF-Tu1 は、T アームの欠けた tRNA と結合し D アームの欠けた tRNA には結合できない。EF-Tu1 は、通常の EF-Tu と比べ C 末端に 57 残基の延長部分を持っており、この延長部分は tRNA との結合において T アームの欠失を構造的に補完していると考えられる。そして、EF-Tu2 は D アームの欠けたセリンの tRNA には結合し、T アームの欠けた tRNA には結合できない。

この EF-Tu2 について、本研究では以下の 2 つの特徴に着目した。1) EF-Tu2 のアミノ酸配列を結晶構造の解かれている細菌の EF-Tu と比較すると、アミノアシル tRNA のアクセプターステムや T ア

ームとの結合に関わる部分には保存性があるが、アミノ酸部分との結合に関わる残基には保存性が全く見られない。2) EF-Tu2 が結合する D アームの欠けた tRNA は 2 種類存在するが、両方ともセリンに対応する tRNA である。これらの特徴から、EF-Tu2 は Ser-tRNA のセリン部分を特異的に認識するのではないかと予想した。通常の EF-Tu はアミノアシル tRNA のアミノ酸側鎖部分に対して特異性を持たないことが知られているため、EF-Tu2 がセリン特異性を持っていれば非常に独特な EF-Tu であると言える。

本研究では、線形動物ミトコンドリア EF-Tu2 がセリン特異的であることを証明し、さらにこの特殊な EF-Tu について詳細な解析を行い、その構造やアミノアシル tRNA の認識機構について明らかにしていくことを目的とした。

【結果】

1. 線形動物ミトコンドリアEF-Tu2 のセリン特異性の証明

同一の D アーム欠失型 tRNA に種々のアミノ酸をチャージさせ、それぞれと EF-Tu との結合活性を測定し比較した。同一の配列の tRNA を用いることでアミノアシル tRNA のアミノ酸部分の影響のみを比較することができる。

(1) セリル tRNA および、アラニル tRNA に対する EF-Tu2 の結合の比較

まず、実験に用いる tRNA として、*Ascaris suum* ミトコンドリア tRNA^{Ser_{UCU}} に変異を導入し、2 種類のアミノ酸(セリン、アラニン)を受容できるような tRNA をデザインした(図 2)。アクセプターステムの C3-G48 ペアを G-U ペアに変えることにより、セリンの tRNA が *E. coli* のアラニル tRNA 合成酵素に認識されるようになって、同一の tRNA にセリンとアラニンをチャージ出来るようになる。この tRNA を T7 RNA ポリメラーゼを用いて転写合成し、精製した tRNA をそれぞれ *A. suum* ミトコンドリア由来のセリル tRNA 合成酵素を用いてセリル化、大腸菌由来のアラニル tRNA 合成酵素を用いてアラニル化した。

調製したアミノアシル tRNA に対する EF-Tu の結合活性を測定する実験として、加水分解プロテクションアッセイを行った。加水分解プロテクションアッセイは、アミノアシル tRNA のデアシル反応をどのくらい抑制するかによって EF-Tu の結合活性を評価する方法である。

この実験の結果、コントロールとして用いた *Thermus thermophilus* の EF-Tu ではセリル tRNA とアラニル tRNA とも結合活性が見られたのに対し、EF-Tu2 ではセリル tRNA との結合活性は見られたが、アラニル tRNA との結合活性は見られなかった(図 3)。

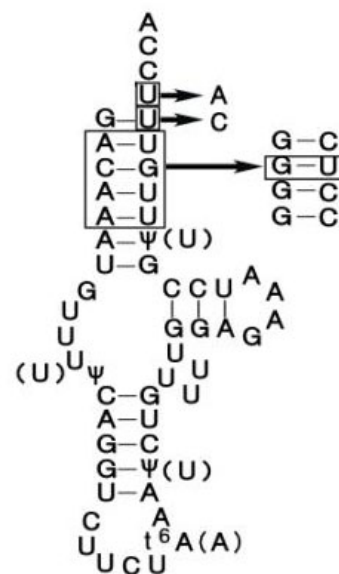


図2 *A. suum* mt tRNA^{Ser_{UCU}} derivative with alanine identity

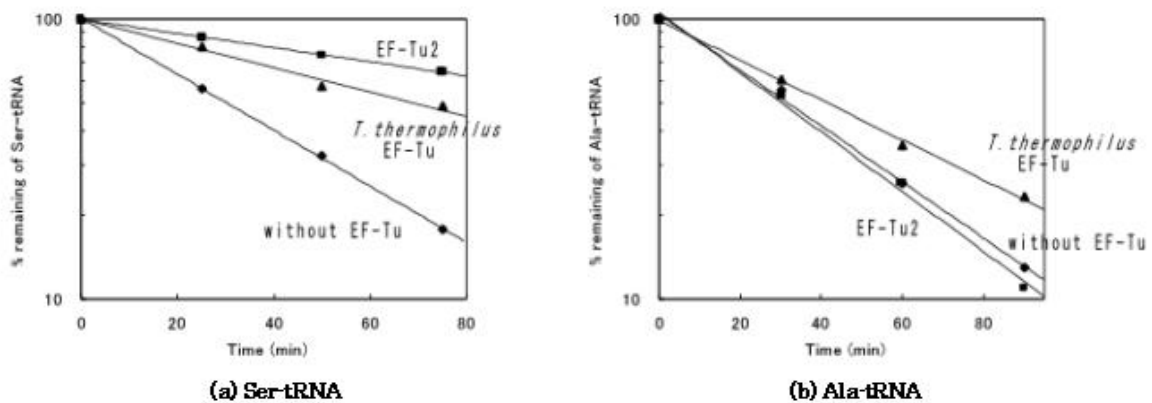


図3 セリルtRNA、アラニルtRNAに対するEF-Tuの結合活性の測定

(2) セリル tRNA とバリル tRNA を用いた EF-Tu2 への結合競争実験

セリル tRNA とバリル tRNA との EF-Tu2 の結合に関して競争実験を行った。バリル tRNA は化学合成法により調製した。このアッセイでは様々なバリル tRNA 濃度のもとでセリル tRNA に対する EF-Tu2 の結合活性について測定した。

この結果、バリル tRNA の濃度が上がるにつれて *T. thermophilus* の EF-Tu では EF-Tu によるセリル tRNA のデアシル反応抑制の度合いが低下するのに対し、セリル tRNA に対する EF-Tu2 の結合は過剰量のバリル tRNA によってもまったく影響を受けなかった。これは EF-Tu2 がバリル tRNA とアフィニティを持っていないことを示している (図4)。

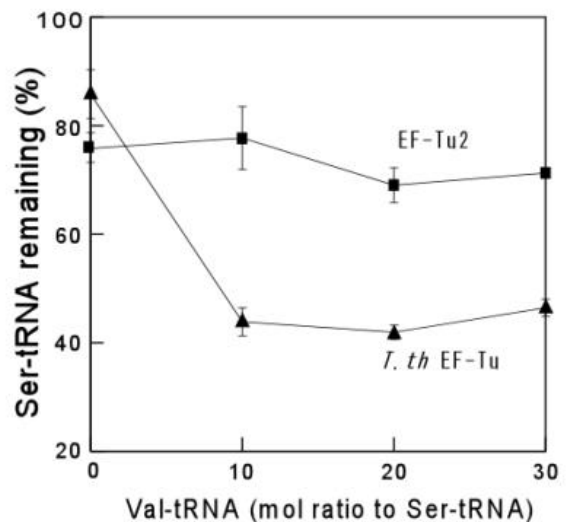


図4 過剰量のバリルtRNAによるEF-TuとセリルtRNAとの結合の阻害効果

2. セリン特異性に寄与するアミノ酸残基の解析

C. elegans mt EF-Tu2 において、一般的な EF-Tu で保存されているアミノアシル tRNA のアミノ酸との結合に関わる残基を *C. elegans* mt EF-Tu2 の対応する部分と組み換えた変異体、逆に標準的な EF-Tu において、対応するアミノ酸残基を *C. elegans* mt EF-Tu2 のものに改変した変異体を作成し、加水分解プロテクションアッセイによりそのアミノ酸特異性を解析した。これによって *C. elegans* mt EF-Tu2 のセリン特異性に寄与するアミノ酸残基について検証した。

(1) *T. thermophilus* EF-Tu 変異体

一般的な EF-Tu として構造が安定な *T. thermophilus* EF-Tu をベースにし、アミノアシル tRNA のアミノ酸との結合に関わる残基を EF-Tu2 の対応する部分と組み換えた変異体を作成した (図5)。

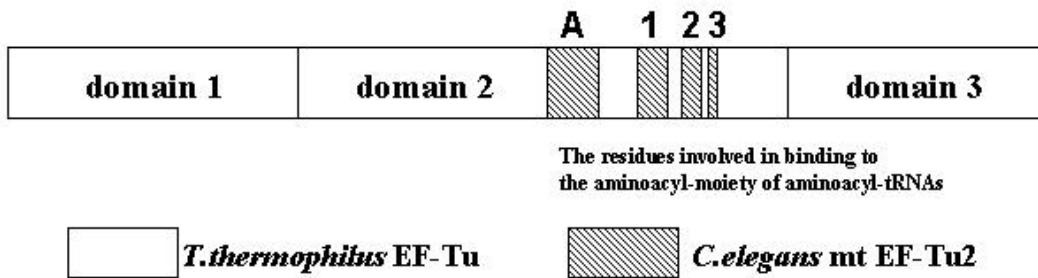


図5 *T.thermophilus* EF-Tu変異体

15種類の変異体を作成し、アミノアシルtRNAに対する結合活性を測定した。ここでは酵母 tRNA^{Phe}に変異を導入し、3種類のアミノ酸（セリン、フェニルアラニン、アラニン）をチャージ出来るようにしたtRNAを用いた(図6)。加水分解プロテクションアッセイを行い、セリンに対する特異性を、セリルtRNAとフェニルアラニルtRNA(或いはアラニルtRNA)における加水分解速度定数(kはEF-Tu存在下、k_fはEF-Tu非存在下での加水分解速度定数)の比によって評価した(図7)。 図7においてEF-Tu変異体は、thA1は図5におけるAと1の部分をも*C.elegans* EF-Tu2の配列に組み換えた変異体というように、組み換えた部分をA、1、2、3で示してある。

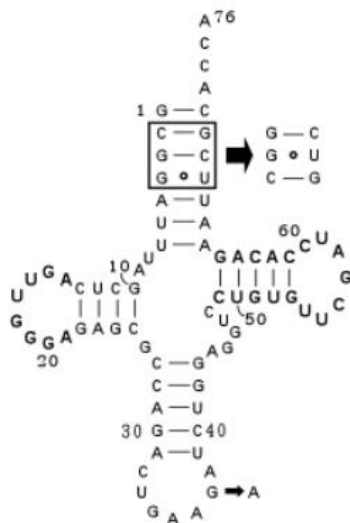


図6 yeast tRNA^{Phe} derivative

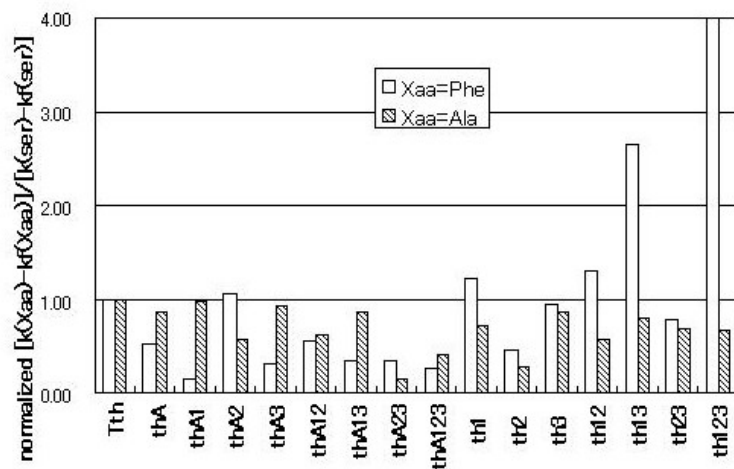


図7 *T.thermophilus* EF-Tu変異体のセリン特異性の評価

ここで特にセリン特異性が高いと評価される thA23 という変異体のプロテクションアッセイの結果を示すと、野生型に比べると結合活性が落ちているものの、セリル tRNA には結合し、フェニルアラニル tRNA とアラニル tRNA にはまったく結合しておらず、確かにセリン特異性を持っていると考えられる(図8)。

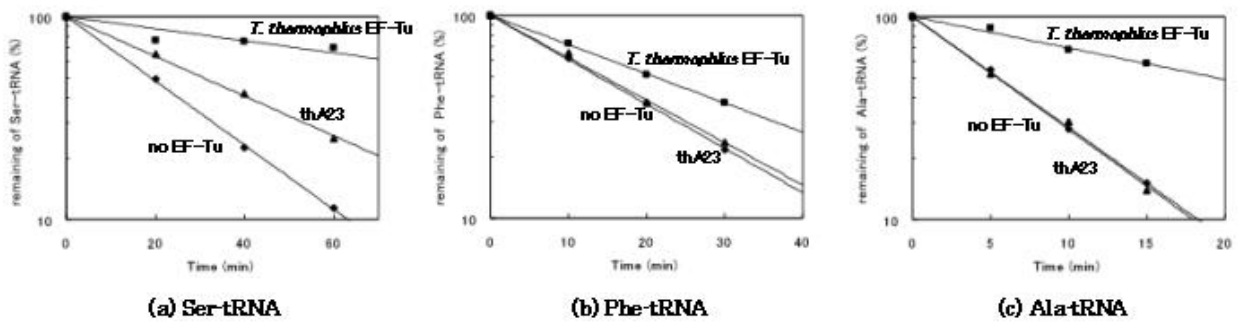


図8 *T. thermophilus* EF-Tu変異体thA23の結合活性

(2) *C. elegans* EF-Tu2 変異体

(1)とは逆に *C. elegans* EF-Tu2 をベースとし、アミノ酸との結合に関わる残基を *T. thermophilus* EF-Tu のものに組み換えた変異体を作成し、結合活性を測定した。アミノアシル tRNA には 1-(1)と同じものを用いた。

この結果、*C. elegans* EF-Tu2 はアラニル tRNA には結合しないのに対し、変異体ではアラニル tRNA に対する結合活性が見られた。すなわちセリン特異性を持たなくなった *C. elegans* EF-Tu2 変異体が得られたといえる。

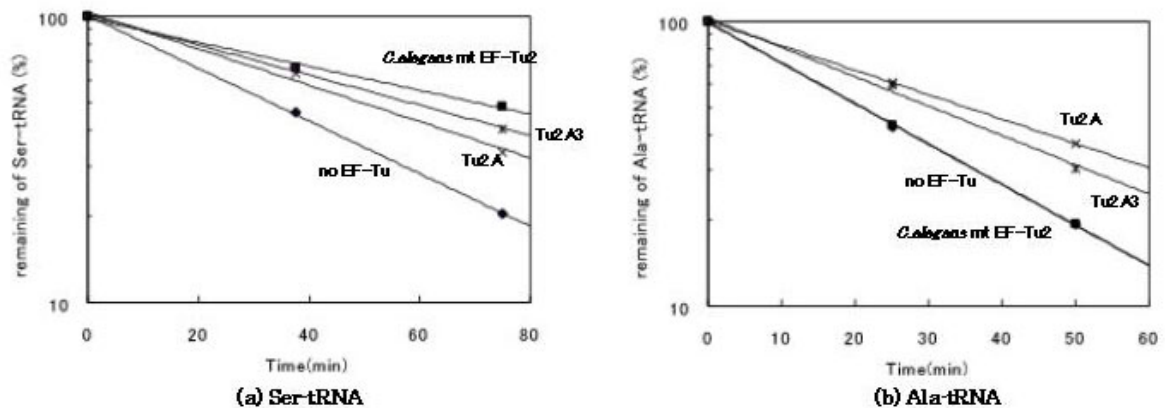


図9 *C. elegans* EF-Tu変異体の結合活性の測定

【結論】

加水分解プロテクションアッセイ、結合競争実験の結果から線形動物ミトコンドリア EF-Tu2 がセリン特異的であることが強く示唆された。

また、EF-Tu 変異体の結合活性から *C. elegans* EF-Tu2 の A の残基(245-ASKTAITGRGTVIV-258)、2 の残基(V298R299)、3 の残基 (H303) がセリン特異性に大きく寄与していると考えられる。

このようなまったく新しい EF-Tu のアミノアシル tRNA の認識機構というのは、多様な動物ミトコンドリア tRNA の構造欠損を補うメカニズムの一つだと考えられる。