

論文内容の要旨

論文題目

大腸菌蛋白質合成過程におけるリボソーム再生機構の解明

氏名 梅影創

序論

原核生物における蛋白質合成システム（翻訳）は、開始、伸長、終結、リサイクリングの4つの反応から構成される。生体内では、一つの mRNA 上にいくつものリボソームが連続して翻訳しているため、翻訳過程が終結したリボソームの mRNA 上からの解離は、スムーズな翻訳サイクルを保障する。また、原核生物においては、一つの mRNA 上に複数の遺伝子が連続してコードされている場合が多く、上流遺伝子の翻訳終結とその直下の遺伝子の開始反応は連動していると考えられており、リサイクリング過程はスムーズな翻訳サイクルを保障すると同時に、下流遺伝子の翻訳制御を担う重要な過程であると考えられている。

ポリペプチド鎖の伸長とそれに続く加水分解（終結反応）の後のリボソーム複合体、すなわち P サイトに deacylated tRNA が位置し、ストップコドンが A サイト上に位置するポスト終結複合体（PTC）がリサイクリング過程の出発点となる。このポスト終結複合体の解体には、リボソーム再生因子（RRF）と elongation factor G（EF-G）による GTP 加水分解が必須であると知られている。RRF は PTC の A/P サイト近傍に結合し、EF-G と協同的にリボソームを mRNA 上から放す役割を持つが、詳細な反応機構については十分に把握されていない。また、リボソームの mRNA からの解離様式に関しても、1) 70S として解離する、2) サブユニットとして解離するがただちに再会合して 70S となる、3) 50S のみが mRNA 上から解離し、30S は mRNA 上に結合したままである、の3つの説が存在している状態である。このような相違が生じた原因としては、材料調製法すなわち PTC の調製法に違いがあるためである。PTC は非常に不安定であるため、ポリペプチド鎖が加水分解される寸前の終結複合体（TC）を調製する必要があるが、終結因子（RF）の存在下では TC は速やかに PTC になるために、生体内から、あるいは従来の菌体抽出液由来の生体外蛋白質合成系をもちいて TC を調製することは原理的に困難（RF やヌクレアーゼの排除が不可能）であることに起因する。したがって、詳細なメカニズムを解明するためには、新たな手法を確立することが必要となる。

本研究では、RF の含まない RF-free system を確立し、単一なナチュラル mRNA を有する TC を調製することに成功した。これによって得られた TC を用いてリボソームのリサイクリング過程を

段階を追って観察することに成功した。

1、終結因子を含まない生体外タンパク質合成系(RF-free system)の確立

当研究室で開発された、必須因子のみから構成される生体外蛋白質合成系である PURESYSYSTEM を改良することを行った。通常のリボソーム調製法では終結因子が付着した状態で得られるため、この調製法を検討し終結因子や他の翻訳因子の含まないリボソーム調製法を確立した。RF を含まないリボソームを使うことで RF-free system が確立された。この系では、翻訳が 1 ラウンドでストップしている、つまりリボソームが mRNA 上にストールしているが、新たに RF を添加することによって終結、リサイクリングが起こりマルチラウンドの翻訳の回復が見られた。このことから、この RF-free システムではリボソームはストップコドン上でしっかりストールした状態、すなわち終結複合体 (TC) を形成していることが示された (図 1-1 レーン 5)。また、このシステムによって翻訳した後、ショ糖密度勾配遠心 (SDG) することで反応系の翻訳因子などを除き、TC を含む disome 画分 (1 つの mRNA に対してリボソームが 2 個結合しており、内 1 つが TC) を回収した。得られた TC は、mRNA とリボソームが除かれている PURESYSYSTEM において、TC 由来の mRNA から翻訳産物が合成されたことから、不活化されることなく TC が回収されていることを確認した (図 1-2)。

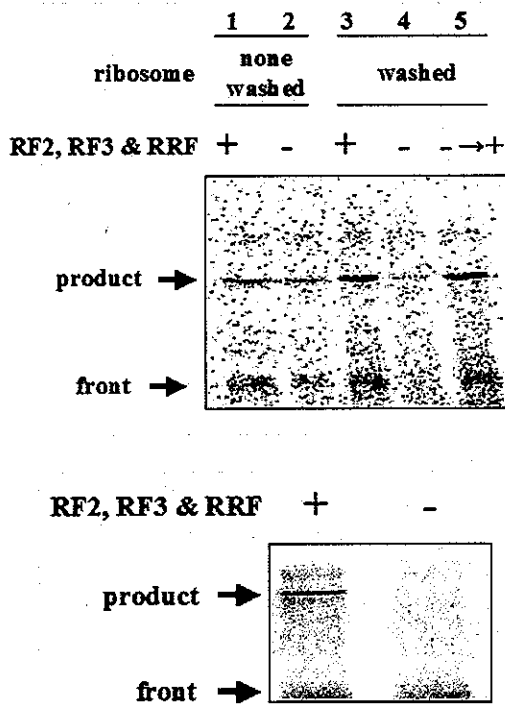


図 1-1 RF-free system

レーン 1, 2 はこれまでの調製法のリボソームであり、3, 4, 5 は新たな調製法による RF-free リボソームを使用している。レーン 4 では翻訳過程は 1 ラウンドであることを示している。レーン 5 ではレーン 4 と同条件で反応させた後、新たに RF を加え翻訳を続けたもの。

図 1-2 得られた TC はアクティブである

SDG によって単離された TC をリボソームと mRNA を除いた PURESYSYSTEM に投入し、反応させたもの。TC が確かに TC であり活性を持つなら TC 由来のリボソームによって TC 由来の mRNA が翻訳に使われる。

2、サイクリング過程の解析

終結複合体 (TC) に終結反応に必要な RF2 と RF3 を添加させポスト終結複合体 (PTC) にし、RRF と EF-G などの因子を加え、SDG することで、リボソームの解離に必要な因子を検討したところ、RRF と EF-G が必須であるのに対して、IF3 は必要ではないことが明らかとなった (図 2-1)。リボソームの解離には EF-G による GTP 加水分解が必須であることを確認するとともに、チオストレプトンがリサイクリング過程を阻害する要因はこれまでの推定とは異なり、EF-G の PTC への結合を阻害することが原因であることを支持する結果を得た。また、反応時間と共に 70S 画分は上昇するが、サブユニット画分の変化は見られないことから、50S のみが解離するというモデルを支持しない結果となった。リサイクリングで 70S として解離した後、IF3 によってサブユニット化され、開始反応へリボソームがリサイクルされるというモデルが存在するが、PURESYSYSTEM 上での IF3 の最適量 (図 2-2) や生体内での存在量を考慮すると、IF3 によるサブユニット化は殆ど起こらないことが示された。したがって、70S のまま開始反応へリサイクルされることが示唆された。

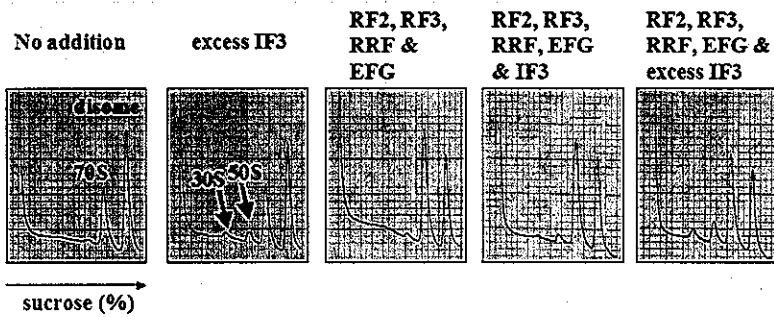


図 2-1 disome break down assay

disome と翻訳因子を作用させた後、SDG したものを。各反応条件はクロマトグラム上部に記載。RRF と EF-G によって 70S として解離するが、そのサブユニット化には多量の IF3 が必要。

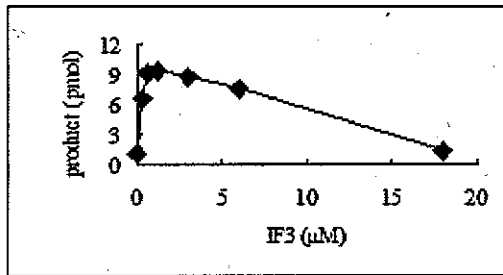


図 2-2 IF3 の添加効果

IF3 は添加しなくても翻訳が可能である。リボソーム 1 に対して IF3 が 1 ないし 2 の時の合成量が最も高い。IF3 の量が過剰であると翻訳阻害が生じる。

3. リボソームの解離様式

PTC からリボソームは 70S で解離するという仮説と、サブユニットとして解離後ただちに再会合し 70S を形成するという仮説に決着をつけるため、50S サブユニットにヒスチジンタグでラベルしたものをリサイクリング過程に共存させ、70S 画分への取り込みを調べた。その結果、70S リボソームはそれ自体、翻訳因子非依存的にサブユニット交換が起こるものの、リサイクリング過程では 70S として解離することが確実なものとなった(図 3)。

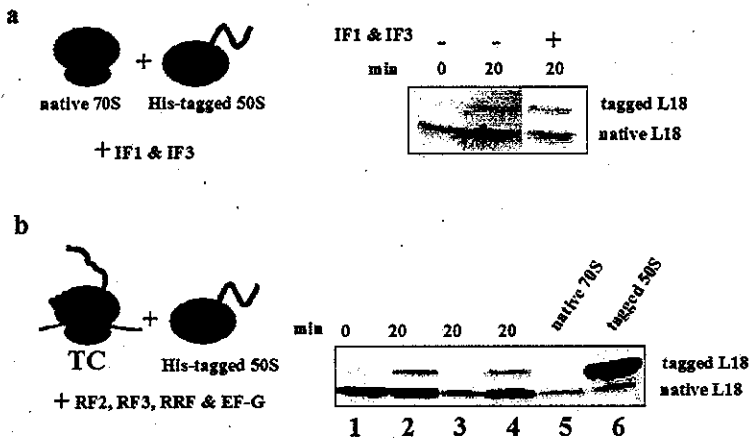


図 3 サブユニット交換実験

ヒスチジンタグは 50S サブユニットの L18 についている。いずれも SDG 後に 70S 画分の L18 に対するウエスタンブロットを行ったもの。

- a) 因子依存的にサブユニット交換が起こらないことを示す。
- b) disome break down assay にタグ付 50S を加えて実験したもの。レーン 1, 2 は自発的サブユニット交換 (a と同様の実験) を示し、レーン 3 は TC のみ、レーン 4 は TC とタグ付 50S を反応させたもの、レーン 5, 6 はコントロールを示す。

結論

翻訳終了後、リボソームの mRNA 上からの解離は RRF と EF-G による GTP 加水分解が必要である。リボソームはサブユニット化することなく 70S フォームのまま mRNA から解離する。IF3 は、解離したリボソームに残っている tRNA の排除を行うことで、新たな翻訳過程へのリサイクルを保障する側面も有する。解離したフリーな状態の 70S リボソームは、それ自身が翻訳因子非依存的にサブユニット交換を起こし、IF3 非依存的な開始反応の可能性が示唆された。これまで、翻訳の開始は、IF3 によるサブユニット化が必須なステップであるとされていたが、サブユニット化することなく、開始反応へリボソームがリサイクルされる、つまり終了から開始へはリボソームは殆ど 70S としてリサイクルされることが示唆された。以上の発見は、これまでの翻訳過程に関する教科書のモデルを刷新するモデル(図 4)であると確信している。また、今回のリサイクリング過程はモノシストロニックな mRNA の場合であるが、ポリシストロニックな mRNA の場合のリサイクリング過程や終了反応と下流遺伝子の開始反応がオーバーラップしたトランスレーショナルカップリング機構解明の足がかりとなることが期待される。

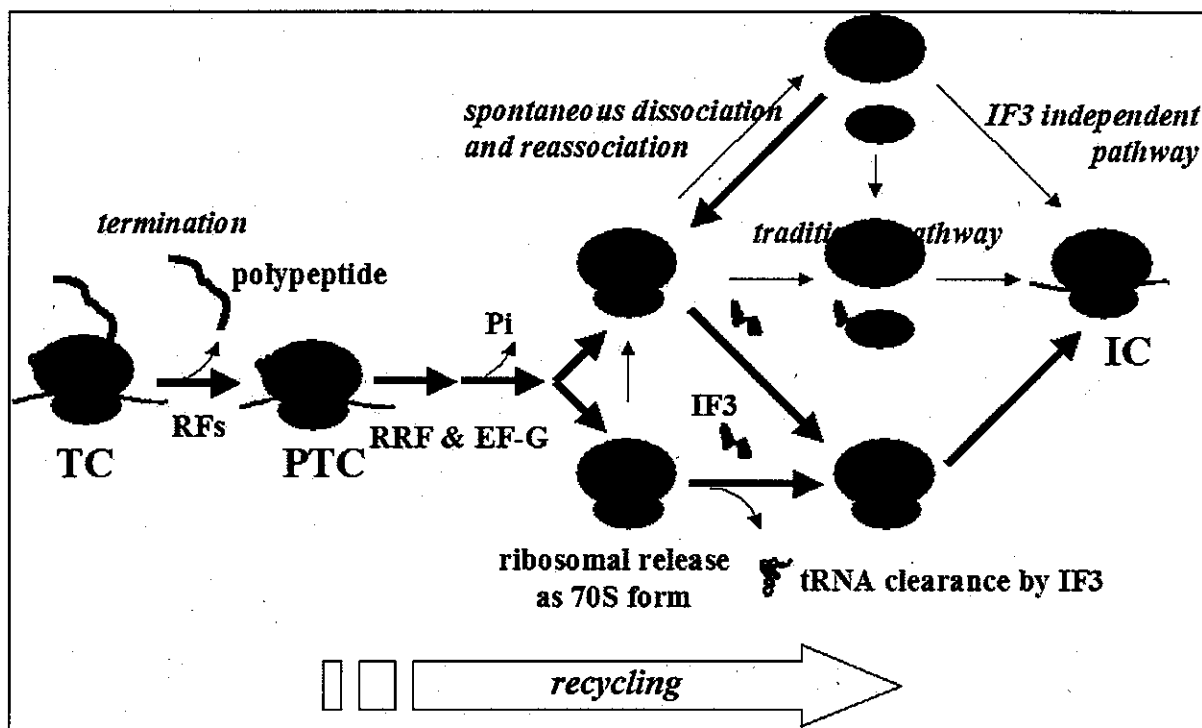


図4 リボソームリサイクリングモデル

TC, PTC & ICはそれぞれ終結複合体、ポスト終結複合体、開始複合体を示す。