

## 論文の内容の要旨

論文題目 哺乳動物ミトコンドリアtRNAのアミノアシル化と翻訳精度維持機構

氏名 長尾 翌手可

### 序論

mRNAの遺伝情報がタンパク質へと翻訳される過程は精度の高い反応であり、一般にそのエラー頻度は $10^{-4}$ ~ $10^{-5}$ 程度であると見積もられている。翻訳精度を保つ主な仕組みとしては、tRNAが正しいアミノ酸を受容するアミノアシル化過程と正確なコドン-アンチコドン対合を保つための校正機構が知られている。tRNAのアミノアシル化はアミノアシルtRNA合成酵素(aaRS)によって触媒され、そのエラー頻度はタンパク合成のエラー頻度とほぼ同程度であることが知られていることから、tRNAのアミノアシル化は翻訳精度の要であると言える。これまで、aaRSはtRNAそれぞれに備わっている特徴的な塩基や配列、高次構造などからなる「tRNAアイデンティティー決定因子」を認識し、対応するtRNAと他のtRNAを厳密に識別することでその精度を保っていると信じられてきた。しかし、当研究室の研究で、哺乳類ミトコンドリアの系において、セリルtRNA合成酵素(SerRS)が、セリンのtRNAだけでなく、グルタミンのtRNAをも誤認識し、セリル化するというミスアミノアシル化の現象が観測された。このような同一系内でのミスアミノアシル化は細胞内では翻訳精度を低下させ致命的な事態を引き起こすと考えられる。しかし、ミトコンドリアの翻訳精度が維持されていることを考えると、従来のtRNAアイデンティティーによる識別機構だけでは不十分であり、他の新たな翻訳精度維持機構が存在することを示唆している。私はミトコンドリアの翻訳精度を維持するしくみとして、次の二つのシステムを提唱した(図1)。①aaRS同士が基質となるtRNAに対して競争的に反応し、正し

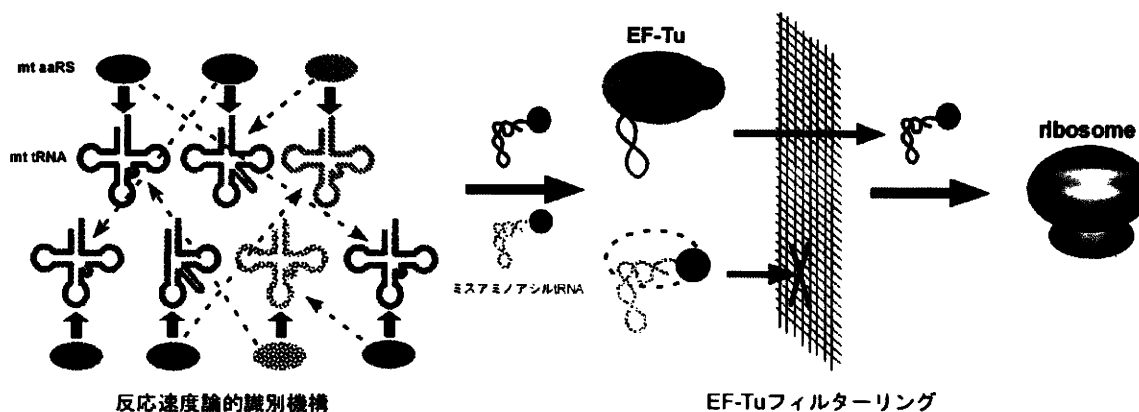


図1：反応速度論的識別機構とEF-Tu フィルターリング

い反応の反応速度が大きいために優先的に正しいアミノアシル tRNA が作られるといった aaRS-tRNA ネットワークにおける反応速度論的識別機構。②aaRS-tRNA ネットワークを潜り抜けたミスアミノアシル化 tRNA を伸長因子 EF-Tu が排除するといった EF-Tu によるフィルターリング機構である。本研究では哺乳類ミトコンドリア翻訳系を題材とし、これらの二つのシステムが連動して翻訳精度維持を達成しているという全く新しい概念の確立を目指した。

## 本論

### ミスアミノアシル化反応の探索

本研究では、まず、哺乳類ミトコンドリア aaRS がどの程度ミスアミノアシル化を引き起こす可能性があるのかを観察するために、aaRS としてヒトミトコンドリア aaRS の組み換え体を、tRNA として野生型ウシミトコンドリア tRNA を用いて、全通りのアミノアシル化反応を行いミスアミノアシル化反応の探索を行った。みられたミスアミノアシル化反応については反応速度論的な解析をするとともに、伸長因子 EF-Tu への結合能の解析を行った。

野生型 tRNA は本来の tRNA 構造形成に必要な修飾塩基を含んでいるため、正確なアミノアシル化反応の検証には必要であると考えている。

その結果、5種類の aaRS (SerRS、LysRS、LeuRS、AlaRS、ThrRS、GluRS) についてミスアミノアシル化反応が観測された (図 2:

seryl-tRNA<sup>Gln</sup> は S-tRNA<sup>Gln</sup> と表記。他も同様に表記した)。これは予想以上の高い頻度であり、哺乳類ミトコンドリア tRNA アイデンティティが弱体化していることを示唆しており、哺乳類ミトコンドリア tRNA が一般的な tRNA 構造から逸脱していることに起因していると考えられる。次に、これらのミスアミノアシル化反応について反応速度パラメーターを決定したところ、GluRS 以外はいずれもミスアミノアシル化活性は正しいアミノアシル化活性よりも著しく低かった (表 1)。このことから、これらのミスアミノアシル tRNA は反応速度論的識別機構によって翻訳系から排除さ

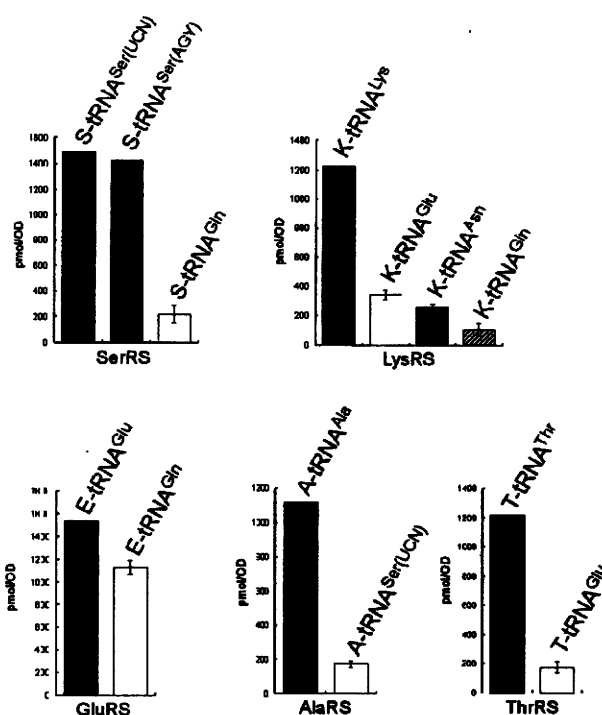


図 2 ミスアミノアシル化(反応 1 時間後)

aaRS	tRNA	Km ( $\mu$ M)	Kcat	Kcat/Km (relative)
AlaRS	Ala	0.783	0.144	1
	Ser(UCN)	ND	ND	ND
GluRS	Glu	0.28	0.34	1
	Gln	1.52	0.76	0.41
LysRS	Lys	0.6	0.44	1
	Glu	8.24	0.00106	1/5700
	Gln	48.9	0.00223	1/16100
	Asn	ND	ND	ND
SerRS	Ser(UCN)	0.29	0.67	1
	Ser(AGY)	0.35	0.64	0.79
	Gln	3.7	0.0024	1/3560

表 1 反応速度パラメーター

SerRS については(Shimada et al., 2001)を参考

れると考えられる。GluRS については後述する。

### EF-Tu によるフィルターリング

次に、これらのミスアミノアシル tRNA について EF-Tu との相互作用を tRNA 加水分解プロテクションアッセイを用いて検証した。それぞれのアミノアシル tRNA について得られた加水分解速度を EF-Tu 濃度に対してプロットした結果、正しいアミノ酸を受容したアミノアシル tRNA は EF-Tu 濃度依存的に加水分解速度が低下していることから EF-Tu に対して一定の結合能を持つと考えられる。一方、ミスアミノアシル化した K-tRNA<sup>Glu</sup> と A-tRNA<sup>Ser(UCN)</sup> については正しいアミノアシル tRNA と同様の EF-Tu 結合能を示した (図 3 C、D)。E-tRNA<sup>Gln</sup>、S-tRNA<sup>Gln</sup>、K-tRNA<sup>Gln</sup> に関しては、

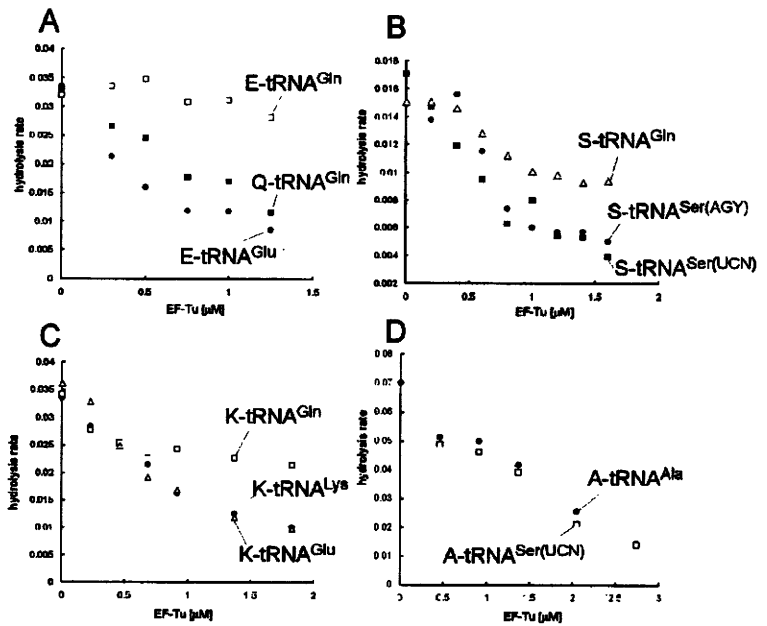


図 3 各アミノアシル tRNA の EF-Tu 結合能

GluRS(A)、SerRS(B)、LysRS(C)、AlaRS(D)によって生じたミスアミノアシル tRNA (白抜き) と正しいアミノアシル tRNA (黒塗り) の加水分解速度の EF-Tu 用量作用曲線

EF-Tu に対する結合能が低いことが判明した (図 3 A、B、C)。tRNA<sup>Gln</sup> については EF-Tu に対する tRNA 自体の結合能が低く、EF-Tu がミスアミノアシル化された tRNA<sup>Gln</sup> をタンパク合成に組み込まれないようにするフィルターとしての役割を果たしている可能性が示唆された。

これらの結果から、tRNA アイデンティティーが弱体化した哺乳類ミトコンドリア翻訳系では、いくつかの aaRS については潜在的に対応しない tRNA をアミノアシル化してしまうがそれらの反応活性は低く、反応速度論的識別機構によって事実上排除されるということが示唆できる。また、EF-Tu フィルターリングは tRNA<sup>Gln</sup> に機能していると考えられ、これは比較的 tRNA<sup>Gln</sup> がミスアミノアシル化されやすい性質との相関が示唆できるものである。次に、tRNA<sup>Gln</sup> が例外的にその T ループに本来の保存配列を有していることから、これらの結果と tRNA<sup>Gln</sup> における T ループ配列の保存との関連性を調べるために tRNA<sup>Gln</sup> に焦点を絞ってさらに研究を進めた。

### 哺乳類ミトコンドリア Q-tRNA<sup>Gln</sup> 生

#### 合成

#### 緒言

古細菌や多くのバクテリア、または植

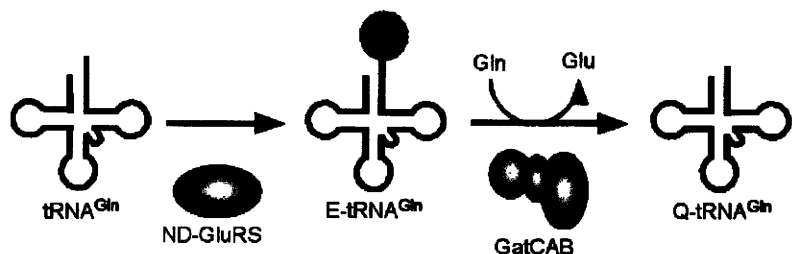


図 4 GlnRS 非存在下の Q-tRNA<sup>Gln</sup> 合成機構 (AdT 経路)

物のクロロプラスト、ミトコンドリアといったオルガネラではQ-tRNA<sup>Gln</sup>生合成にtRNA依存アミドトランスフェラーゼ

(AdT)を介するQ-tRNA<sup>Gln</sup>生合成経路が用いられている(図4:AdT経路)。哺乳類ミトコンドリアではGlnRSに相当するタンパク質が存在しないことから、AdT経路が暗示されてきたが、確証的な研究はなされていない。

GluRSがtRNA<sup>Glu</sup>、tRNA<sup>Gln</sup>をグルタミル化したことからGluRSはND-GluRSであるということが判明した。次に、哺乳類ミトコンドリアでのAdT経路の存在を確認するために、バクテリアAdTのヒト相同性タンパク質であるmGatCABの同定を行ったところ、mGatCABはミトコンドリアに局在し、その組み換え体はE-tRNA<sup>Gln</sup>を基質として、Q-tRNA<sup>Gln</sup>の形成を行うことがわかった。

(図5A)。また、RNA干渉法を用いてmGatCABを発現抑制したHeLa細胞からミトコンドリアtRNA<sup>Gln</sup>をアミノ酸が受容した状態で単離し、そのアミノ酸をLC/MS解析によって調べたところ、グルタミン酸を結合したtRNAの末端塩基を検出することに成功した(図5B)。これは、mGatCABを発現抑制したためにQ-tRNA<sup>Gln</sup>の中間体であるE-tRNA<sup>Gln</sup>の蓄積が起きていること示唆するものである。以上の結果から、哺乳類ミトコンドリアではAdTを介する経路でQ-tRNA<sup>Gln</sup>が合成されていることをつきとめた。

古細菌のGatCAB相同性タンパク質であるGatDEについてはtRNA<sup>Gln</sup>との共結晶構造解析が行われており、GatDEはtRNA<sup>Gln</sup>のDループ-Tループ相互作用と接触していることが分っている。この観察がmGatCABについても当てはまると仮定すると、哺乳類ミトコンドリアtRNA<sup>Gln</sup>はmGatCABに認識されるためにDループ-Tループ相互作用が必要でありTループの保存配列を有していたという推測ができる。

### 考察

哺乳類ミトコンドリアtRNAの大きな特徴として、Dループ-Tループ相互作用に必要なとされる塩基が保存されていないことがある。酵母ミトコンドリアtRNAが大腸菌などのtRNAとほぼ同様な特徴を備えていることから、本来ミトコンドリアtRNAは他の生物や細胞質と同じtRNA構造を持っていたと推測できる。しかし、ミトコンドリアの進化の過程でtRNA<sup>Ser</sup>がそのアイデンティティー決定因子である長いバリアブルアームを失い、

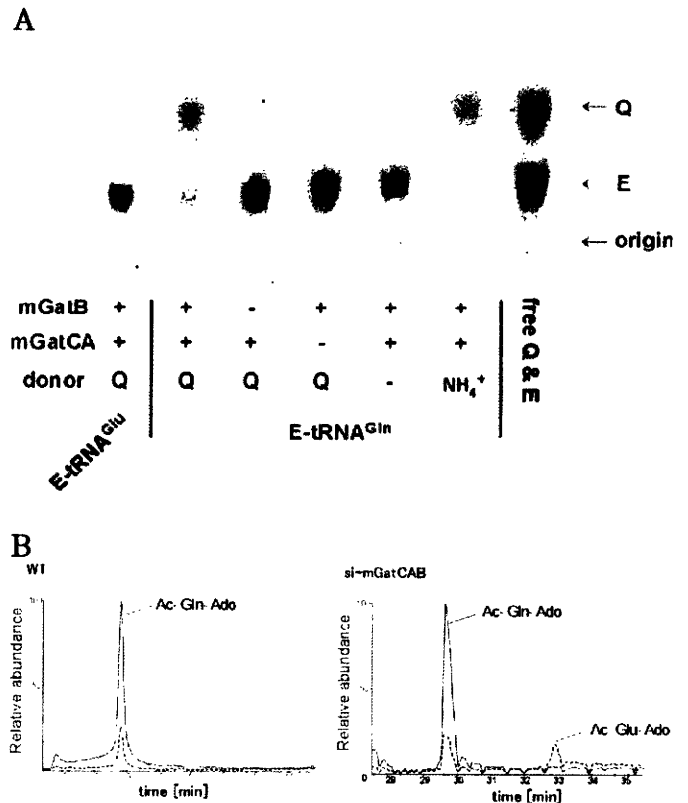


図5 mGatCABの同定

mGatCABの試験管内AdT反応系構築(A)

LC/MSによるtRNA<sup>Gln</sup>受容アミノ酸の解析(B)

SerRS が tRNA 共通構造の一つである T ループ保存配列を認識することになった。その結果、この配列を持つ他の tRNA はミスセリル化を避ける必要があり、T ループ保存配列を変化させ翻訳精度を維持したと考えられる。また、本来の T ループ構造が保存されているもう一つの tRNA である tRNA<sup>Gln</sup> については、本研究の結果から、Q-tRNA<sup>Gln</sup> 生合成の必要性によりこの構造を保持していることが示唆される。元来、tRNA 本体の EF-Tu への結合能が弱くミスセリル化が許容されることが T ループ構造の保持を可能にした大きな要因と考えられる。

このようにミトコンドリア tRNA は翻訳精度維持の危機に対処してきたが、tRNA アイデンティティー決定因子だけではアミノアシル化精度を保てなくなったため、aaRS-tRNA ネットワークによる反応速度論的識別機構および EF-Tu によるフィルターリング機構を連動させることで、翻訳精度を維持するしくみを独自に進化させたと考えられる。この機構は単にミトコンドリアの特徴に留まらず、他のシステムでも同様な状況に置かれた場合機能を発揮するものであると考えている。