

論文内容の要旨

論文題目: 遺伝学的手法によるドロップオフ反応に関する
バクテリア翻訳因子 RF3 の機能解析

訳: Genetic study of bacterial translation factor RF3
for the peptidyl-tRNA drop-off reaction.

氏 名 渡 辺 裕 也

【序】 タンパク合成において成熟ペプチド鎖を切り離す終結過程は、2つのクラスに分類されるペプチド鎖解離因子によって触媒されている。クラス I 解離因子はリボソーム上で終止コドンを直接認識し、ペプチジル tRNA の加水分解反応を触媒する。クラス II 解離因子は、GTP 加水分解機能を持ち、終結反応を促進する。このクラス II 解離因子として、原核生物には RF3、真核生物には eRF3 が存在するが、eRF3 が eRF1 と結合して協調的に機能するのに対し、RF3 は RF1・RF2 と結合せずに、ペプチド鎖解離後のリボソームから積極的に RF1・RF2 を放出する機能を持つことが知られるなど両者の反応様式は大きく異なることが知られている。

原核生物の翻訳機構には、開始因子 IF2、伸長因子 EF-Tu、伸長因子 EF-G といった、グアニンヌクレオチド結合ドメイン (G ドメイン) に相同性を持つ翻訳 GTPase ファミリーのタンパク質が存在し、RF3 もその一員である。しかしながら、GTP 結合型でリボソームに結合し機能する IF2、EF-Tu、EF-G と異なり、RF3 は GDP 結合型でリボソームに結合する例外的な分子機構が提唱されている。

RF3 には、終結過程の反応以外に、翻訳途中にリボソーム上の未成熟ペプチジル tRNA をリボソームから解離するペプチジル tRNA ドロップオフ反応にも関わっていることが報告されている。このドロップオフ反応は、翻訳伸長反応初期過程で何らかの理由で停止してしまったリボソームからペプチジル tRNA を脱離する反応と考えられている。リボソームからドロップオフしたペプチジル tRNA はそのままでは再利用できないため、必須因子

のペプチジル tRNA 加水分解酵素 (PTH) がペプチドを切り離してフリーの tRNA に再生する。これまでに、*in vivo* と *in vitro* 翻訳系において、RF3 がリボソーム再生因子 RRF や EF-G と協調してドロップオフ反応を促進することが示されてきた。

近年、RF3 とリボソーム複合体のクライオ電顕の解明や、RF3・GDP 複合体の X 線結晶構造が明らかにされ、リボソーム上のドメインの立体配向の他の翻訳因子との比較解析なども進められている。しかしながら、RF3 に特有な機能を説明する分子メカニズムの詳細は謎が多く残されている。

分子レベルでの反応機構解明のためには、それに関与するアミノ酸残基部位の特定を行う事が有用であると考え、本研究では、PTH 機能欠損大腸菌株にドロップオフを促進させる *minigene* を組み合わせたドロップオフ検出系を作製し、それを用いて積極的にドロップオフを抑制する変異体 RF3 (drop-off dominant-inhibitory RF3, RF3^{DDI}) の網羅的な分離を行い、機能ドメインおよび分子機構の解明を試みた。

【実験系の構築】 まず、ドロップオフを頻発するラムダファージ *bar* 遺伝子 (*bar minigene*) をモデルに、IPTG 添加量でドロップオフ反応の感受性をコントロールできるプラスミド pBar1 を作製した (図 1A)。次にこのプラスミドを、ドロップ反応によって生じたペプチジル tRNA の分解反応に欠損をもつ *pth(ts)* 変異を保持する大腸菌、YW1 株に形質転換し、IPTG で細胞内での tRNA ドロップオフ反応を増強すると、YW1 形質転換株は顕著な致死性を示した。この細胞株内で、更にドロップオフにより枯渇する tRNA(Lys) を補うと阻害が見られなくなることから (図 1B)、この生育阻害が実際に、過剰なドロップオフ反応によってもたらされたものであることが確認された。以下、YW1 (pBar1) 株を用いて変異体を分離した。

【RF3^{DDI} 変異体の分離】
 化学変異源であるヒドロキシアミン処理や error-prone PCR 法によって RF3 遺伝子 ORF に変異が導入された RF3 発現プラスミドライブラリーを YW1 (pBar1) 株に形質転換し、IPTG による *bar* 遺伝子の発現誘導下でも、生育可能な変異体 RF3 を分離した。これらのプラスミド上の RF3 変

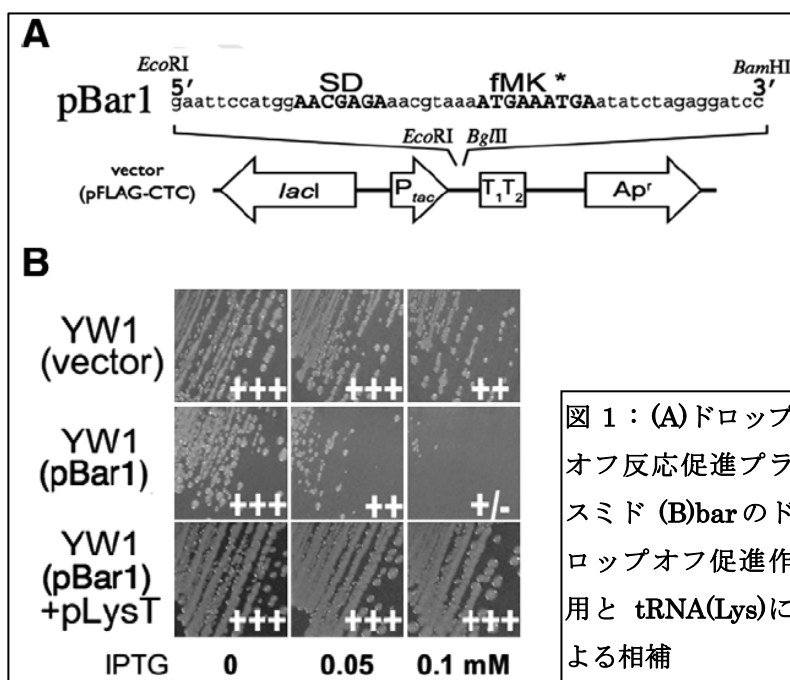


図 1 : (A)ドロップオフ反応促進プラスミド (B)bar のドロップオフ促進作用と tRNA(Lys)による相補

異体は、大腸菌染色体上の野生型 RF3 によるドロップオフ反応促進機能に拮抗し、優性にドロップオフ反応を抑圧し細胞致死を回避することができるため **drop-off dominant-inhibitory RF3, RF3^{DDI}** と名付けられた。最終的に、独立な 42 個の変異体 RF3 を分離することに成功した (図 2A に抜粋)。次に、これら、全ての DDI 変異体について、翻訳終結能の評価をするために、温度感受性 RF1、RF2 株の相補試験や、β ガラクトシダーゼのナンセンス変異株での活性を指標とするリードスルーアッセイを行った。

【変異部位の立体構造へのマッピングと考察】 RF3 の X 線構造図上に DDI 変異をマッピングすると、変異は G ドメインおよびドメイン II-III の境界部に集中することが分かった (図 3)。特に、G ドメインの変異は GTPase ファミリーに高度に保存される配列であるグアニンヌクレオチドモチーフの G1・G2・G3 の内部か近傍に分離されており (図 2B)、グアニンヌクレオチドとの結合性や GTPase 活性に影響を与えることが示唆される。例えば T30I、V33E、L34V、L34P (G1) 近傍に位置する K32 は、GTPase 活性に影響を及ぼす EF-G の R29 に相当する。また、RF3^{DDI} の D58G、D88A は、EF-Tu において GTPase 活性の補助因子である Mg²⁺ イオンと相互作用する部位である。また、D88A、T89I、P90L が分離されたスイッチ 2 領域には、EF-Tu にて GDP 親和性および GTPase 活性への関与が示された H92 が存在する。A43D、S57L、D58G、W59L、E63D、E63G が分離されたスイッチ 1 領域は RF3 構造が確定していないが、EF-Tu・tRNA・GTP 構造上ではスイッチ 2 領域と相互作用している (図示せず)。以上から G ドメインの RF3^{DDI} は RF3 の GTP 結合モードを損なうことが示唆される。高保存性のモチーフ近傍の変異は明らかに DDI 性を示す変異が多い。興味深いことに、ほぼ全ての RF3^{DDI} で G ドメインの欠損と引き換えに、翻訳終結能が増強することが明らかになった。このことは、RF3 の GTP および、GDP 二つの結合モードが、それぞれドロップオフ、翻訳終結反応と対応するリボソーム作用モードであることを強く示唆する。

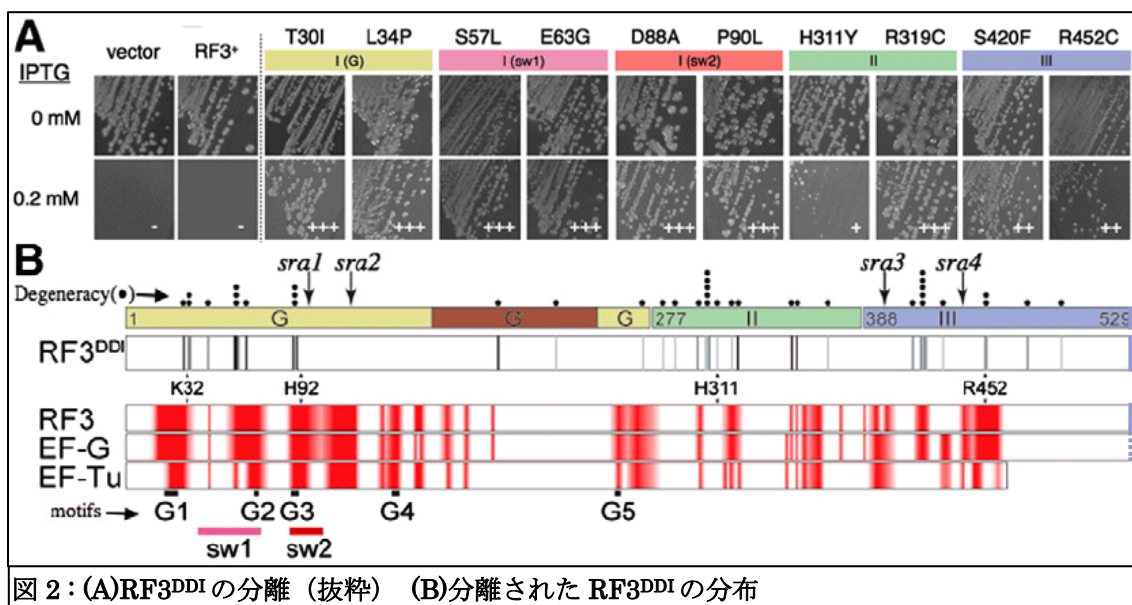


図 2: (A) RF3^{DDI} の分離 (抜粋) (B) 分離された RF3^{DDI} の分布

一方、その他の RF3^{DDI}は、ドメイン II-III 境界付近にて、構造上リボソームとの結合が想定される側の表面部に多く分布していた。リボソーム結合モデルでは、II-III 付近の大きな構造変化が予測されており、H311 と R452 のアラニン置換が GDP 結合親和性を大きく上昇することを考えると、II-III がリボソームの状態と RF3 機能モードとを密接に関係させていることが示唆される。

【まとめ】 クラス I 解離因子 RF1、RF2 のリサイクル因子としての RF3 の機能モデルでは、GDP 結合型でもっぱらリボソームに結合するという翻訳因子としては例外的な機構によるとされている。しかし

ながら、本研究で、tRNA ドロップオフを積極的に抑制する RF3^{DDI} の分離と機能解析を行うことで、明らかにドロップオフ抑制機能を示す変異が、因子のヌクレオチドモードに影響を与えることを示唆する部位に集中した。それらは実際にクラス I 解離因子リサイクル機能の一般的な上昇として現れた。このことにより、RF3 の通常の機能として、グアニンヌクレオチド結合型の違いに対応し、ペプチジル tRNA ドロップオフの基質となるリボソームに親和性の高い状態、およびクラス I 解離因子リサイクルの基質となるリボソームに親和性の高い状態の、二つの機能モードが存在するという新規な機能モデルを考案した (図 4)。

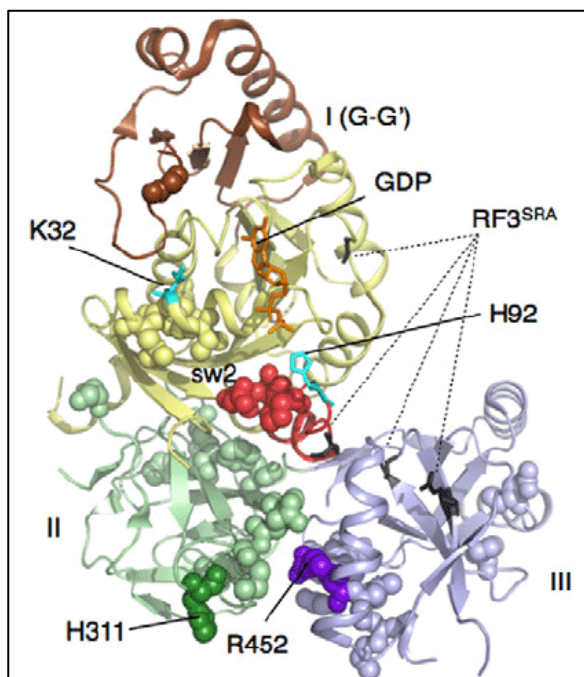


図 3 : RF3 構造[PDB.2H5E] 上の変異配置
球表示が RF3^{DDI} 変異体部位を表す。

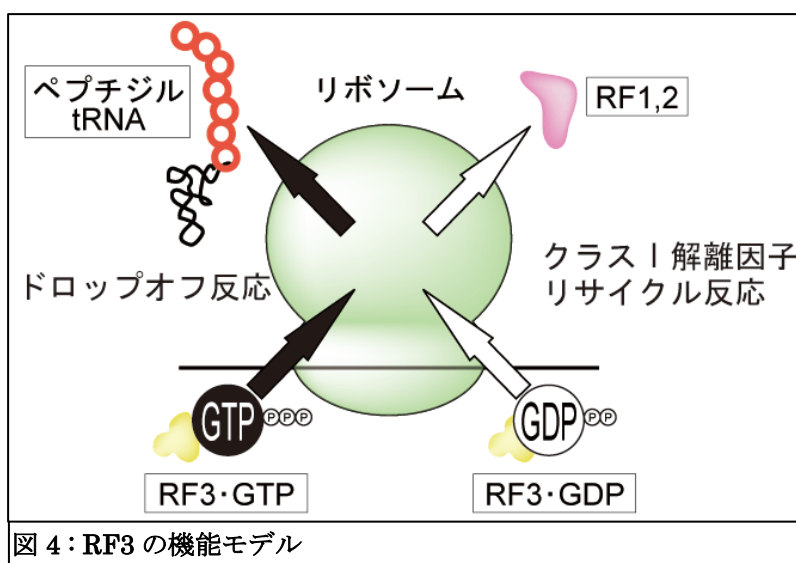


図 4 : RF3 の機能モデル