

論文の内容の要旨

論文題目: tRNA 擬態によって翻訳を調節するタンパク質に関する構造生物学的研究

(Structural study of tRNA-mimicry proteins involved in translation regulation)

氏名: 小林 幹

DNA にコードされた遺伝情報は mRNA への転写を経てタンパク質へと翻訳されることで発現する。翻訳における制御機構を図 1 に示す。まずリボソームが mRNA と開始 tRNA に結合し、翻訳が開始する。次に伸長因子がアミノ酸を結合した tRNA (aa-tRNA) をリボソームの A site に運び込む。その後リボソームは mRNA 上のコドンをもつ A site を 1 つ移動し、A site には新たな aa-tRNA が運び込まれる。これを繰り返すことでリボソームは取り込んだアミノ酸を重合し、タンパク質を合成する。そして通常リボソームは最終的に終止コドンに達し、A site に終結因子が相互作用することで完成したタンパク質が放出される。しかし、二次構造や終止コドンの欠失などの異常を含む mRNA を翻訳することでリボソームが mRNA 上で動けなくなった場合には、リボソームレスキュー因子が相互作用し、動けなくなったリボソームを異常 mRNA から解離させる。

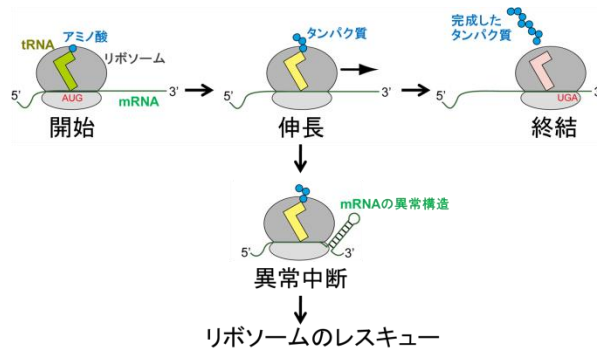


図 1 翻訳における制御機構

真核生物と古細菌における翻訳終結とリボソームレスキュー

真核生物では eRF3 が eRF1 を終止コドンに達したリボソームの A site に運び込むことで翻訳を終結させ、Hbs1 が異常 mRNA 上で動けなくなったリボソームの A site に Dom34 を運び込むことでリボソームをレスキューすることが分かっている。eRF3 と Hbs1 は真核生物由来伸長因子 eEF1 α と同様 eEF1 α -like GTPase family タンパク質であり、GTP 依存的にそれぞれの反応を行うと考えられている。しかし翻訳終結やリボソームレスキューにおけるそれらの因子の作用機構は理解されていなかった。一方古細菌では eRF3 と Hbs1 のオースログは存在しないが、その代わりに古細菌由来伸長因子 aEF1 α が tRNA だけでなく eRF1, Dom34 それぞれの古細菌ホモログである aRF1, aPelota とも GTP 依存的に結合し、伸長、終結、リボソームレスキューの全てに関わっていることを以前に我々は報告した (Saito, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010)。そこで本研究では伸長因子であるはずの aEF1 α が tRNA だけでなく aRF1 や aPelota とも結合する構造的根拠、さらにはこれらの複合体による翻訳終結、リボソームレスキューの機構を解明することを目指し、X 線結晶構造解析による aRF1·aEF1 α ·GTP 複合体及び aPelota·aEF1 α ·GTP 複合体の構造決定を行った。2.3 Å の分解能で決定したそれぞれの構造はいずれも真正細菌由来伸長因子 EF-Tu の、tRNA と、GTP の非水解アナログである GDPNP との複合体構造 (Nissen, *et al.*, *Science* 1995)とよく似ていた (図 2)。このことから aRF1 と aPelota は tRNA の形状を擬態することで aEF1 α の tRNA 認識部位と結合してリボソームの A site へと運ばれ、翻訳終結及びリボソームレスキューを引き起こすことが明らかとなった。

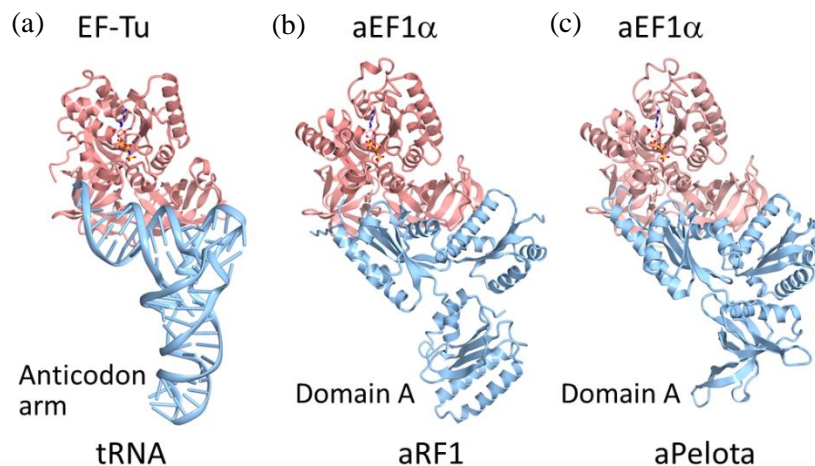


図 2 (a) tRNA·EF-Tu·GDPNP 複合体の構造
(b) aRF1·aEF1 α ·GTP 複合体の構造
(c) aPelota·aEF1 α ·GTP 複合体の構造

しかし、aRF1 と aPelota は、aEF1 α と結合するドメインの構造は似ているものの、tRNA のアンチコドンアームに対応する先端のドメイン A の構造は大きく異なる (図 2b, 2c). aRF1 はドメイン A で終止コドン进行認識し、一方 aPelota はドメイン A で停止したリボソーム进行認識すると考えられているため、このドメイン A の違いが翻译终结を行う aRF1 とリボソームレスキューを行う aPelota の機能の違いを反映していると考えられる. tRNA によるコドン解読においては、GTP を結合した EF-Tu によって翻译伸长过程のリボソームの A site に運ばれた tRNA はフレキシブルなアンチコドンアームを約 30° 湾曲させて A/T state と呼ばれる构造をとることでコドン-アンチコドン对合进行形成する (Schmeing *et al.*, *Science* 2009). するとこの A/T tRNA はリボソームの Decoding center (DC) と相互作用できるようになり、リボソームの构造变化を通じて EF-Tu の GTP 加水分解を引き起こすことでポリペプチドの伸长が起こる. そのため tRNA のアンチコドンアームのフレキシビリティは tRNA がコドン依存的に DC と相互作用してコドンを解読する上で非常に重要である. aEF1 α に結合した aRF1 の构造を以前に我々が决定した aRF1 の単体构造 (Saito, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010) と比较したところ、tRNA のアンチコドンアームに対応して終止コドンを认识する aRF1 のドメイン A は、tRNA と同様にフレキシブルに動くことが分かった. このことから、aRF1 はリボソームの A site で tRNA と同様フレキシブルなドメイン A を動かすことで終止コドンを认识し、終止コドン依存的に GTP を加水分解して翻译を終結させると考えられる. 一方 aPelota のドメイン A は他のドメインとの分子内相互作用によって固く固定されており、その构造は遊離型の tRNA よりもアンチコドンアームを湾曲させてコドンと結合した A/T tRNA の构造をより擬態していた. mRNA の二次构造や終止コドンの欠失などによるリボソームの停止は、A site 中のコドンとは無関係に起こる. このことから、aPelota は A/T tRNA の构造を予め擬態することでリボソームの A site でコドン非依存的に DC と相互作用し、GTP を加水分解してリボソームをレスキューすると考えられる.

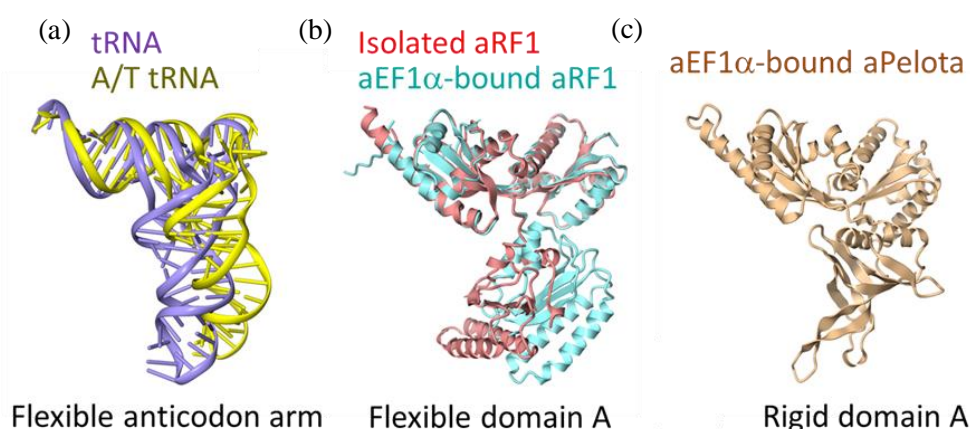


図3 (a) tRNA と A/T tRNA の构造比较
(b) aEF1 α と結合した aRF1 と遊離型 aRF1 の构造比较
(c) aEF1 α と結合した aPelota の构造

Kobayashi *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 2012 より引用・改変

真正細菌におけるリボソームレスキュー

一方、リボソームレスキュー機構は真正細菌にも存在する。真正細菌においてリボソームが異常 mRNA 上で動けなくなった場合には tmRNA と呼ばれる RNA がそのレスキューを行う。しかしプロリンが 3 つ以上連続した配列を合成する時にも、リボソームの停止が起こる。これはプロリンがタンパク質に取り込まれる速度が遅いためと考えられている。この場合にはバクテリア由来伸長因子 EF-P がリボソームに作用し、タンパク質へのプロリンの取り込みを促進することで翻訳を再開させる。EF-P も aRF1 や aPelota と同様に tRNA の形状を擬態したタンパク質であり、保存されたリシン残基がリシル化と水酸化を受けることで活性化する。本研究では EF-P の水酸化を行うタンパク質である YfcM が EF-P を水酸化する機構の解明を目指し、X 線結晶構造解析によって YfcM の構造を 1.45 Å の分解能で決定した (図 4a)。

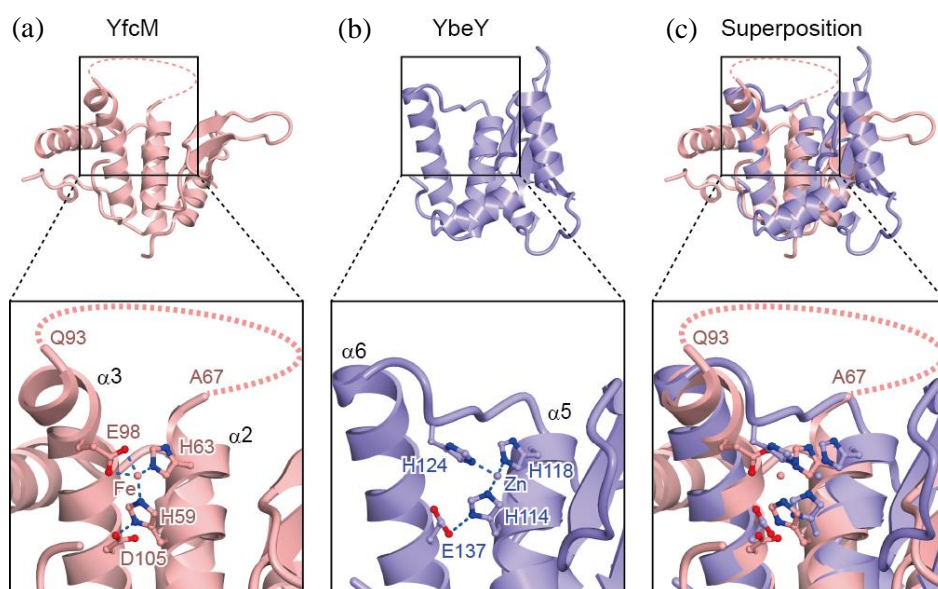


図 4 (a) YfcM の構造と 2-His-1-carboxylate モチーフ
ディスオーダーした領域は点線で示してある。

(b) YbeY の構造と 3 つのヒスチジン残基モチーフ

(c) YfcM と YbeY の重ねあわせ

YfcM の構造は他の水酸化酵素とは大きく異なるが、2 価金属イオン依存的なヌクレアーゼである YbeY と似た構造をとっている (Zhan *et al.*, *Acta Crystallogr. F* 2005) (図 4b, 4c)。また YfcM は水酸化酵素の活性部位を形成する 2-His-1-carboxylate モチーフで Fe(II) イオンを配位している。YfcM と YbeY の構造を重ねてみると YfcM の 2-His-1-carboxylate モチーフは YbeY において 2 価金属イオンを配位する 3 つのヒスチジン残基とよく重なる (図 4c)。このことから、YfcM は YbeY に似た構造を取りながら 2 価金属イオンを配位する 3 つのヒスチジン残基モチーフを 2-His-1-carboxylate モチーフにすることで EF-P のリシン残基の水酸化を行うと考えられる。