

令和元年6月3日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04760

研究課題名(和文) tRNA擬態タンパク質による例外的遺伝暗号認識解読機構の解明

研究課題名(英文) Molecular analyses of tRNA mimicry proteins for alternative mRNA decoding in protein synthesis

研究代表者

伊藤 耕一 (Ito, Koichi)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：10262073

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質合成におけるmRNA遺伝暗号解読には、センスコドンに対するアダプター分子である核酸分子tRNAに加え、翻訳終結コドンの解読や、異常mRNA翻訳中に停滞したリボソームの救済に関わるtRNA擬態タンパク質群が存在している。本研究では、真核細胞とバクテリア双方のtRNA擬態タンパク質の比較解析も平行して行い、真核細胞におけるmRNAシステムにおける、tRNAと協調して機能する伸長因子EF1AのホモログでもあるGTP結合タンパク質Ski7の機能性を実証するとともに、真核生物ではこれまで報告されていなかった解離因子(eRF1/eRF3)に関わるリボソーム救済機構を見いだす事に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

mRNAからのタンパク質合成の高次機能発現制御機構の解明は、生命に普遍的な分子機構の理解のみならず、新規機能性タンパク質の人工合成方法の開発や癌をはじめとする多くの遺伝疾患の発症機構の解明や創薬・治療方法の開発に必須な知見となる。本研究成果は、細胞内におけるタンパク質合成におけるリボソームの翻訳反応に関わりその高次機能発現への拡張を可能にするtRNA擬態タンパク質による高次機能発現機構の分子メカニズムの解明により、その医学的応用研究への手がかりを与えた。

研究成果の概要(英文)：In addition to the nucleic acid molecule tRNA, which is an adapter molecule in genetic decoding for sense codons, for decoding mRNA by ribosomes in protein synthesis, a set of tRNA mimicry proteins are known, such as for the decoding of translation termination codon and for the rescue of ribosomes stalled on aberrant mRNA. In this study, by comparative analysis of both eukaryotic and bacterial tRNA mimicry proteins, we have demonstrated the novel functionality of a eukaryote specific GTP binding protein, Ski7. We also succeeded in finding novel ribosome rescue mechanism including the poly peptide-chain release factors (eRF1/eRF3) that has not been reported so far in eukaryotes.

研究分野：分子生物学

キーワード：リボソーム 翻訳制御 品質管理 遺伝暗号 分子擬態

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

tRNA によるペプチド鎖の逐次伸長機構は遺伝暗号解読の原則的機構であるが、遺伝暗号解読には例外的な側面も知られている。たとえば、終止コドンは tRNA ではなくタンパク質であるペプチド鎖解離因子 (= RF、以後"解離因子") に解読される。さらに、真核細胞では終止コドンが有害タンパク質を生成する異常 mRNA の目印としても機能し NMD (Nonsense Mediated mRNA Decay) などの mRNA 品質管理機構を誘導する。また、遺伝暗号解読速度は一様ではなく、様々な要因に支配されタンパク質合成制御に多様性をもたらしている。進行が著しく抑制されるリボソーム停滞現象は、分泌タンパク質などの発現制御に積極的に関わる反面、細胞活動の妨げとなる無益な停滞状態では、未知の分子機構の認識により伸長が放棄され、その後リボソームレスキュー機構が分解再生する。これらの例外的な遺伝暗号解読機構は、その重要性に比して分子機構解明が立ち後れている。

2. 研究の目的

細胞内のタンパク質合成系における、(i)終止コドンの解読や、(ii)不良 mRNA の品質管理機構における停滞リボソームの救済(レスキュー)には、『例外的な遺伝暗号解読機構』として tRNA ではなく一群の tRNA 擬態タンパク質が機能する。これらは様々な生命活動に必須な高次タンパク質発現制御機構の分子基盤を理解するための要として注目されている。近年、真核生物(古細菌)と真正細菌それぞれの例外的遺伝暗号解読機構では、関わる tRNA 擬態タンパク質分子の種類や分子機構について多くの相違が指摘され、より俯瞰的で包括的な分子機構解明が必要である。

本研究は、真核生物(古細菌)と真正細菌という異なる生物ドメイン間での比較解析という複眼的視点による研究実施体制により、【1】tRNA 擬態タンパク質が停滞リボソームをどのような分子機構で認識するのか、【2】巨大分子複合体であるリボソームのいずれの基本機能構造領域がその分子機構に関わるのか、【3】リボソーム停滞の分子機構と mRNA シグナルの全体像等、基礎生物学根幹の謎解明を目的とする研究計画を提案する。例外的遺伝暗号解読機構の理解は、未解明の基礎生物学的難題に答えるだけでなく、関連遺伝子に生じた変異に起因する遺伝性疾患の異常な遺伝子発現プロファイルの理解や新規な治療法の開発、有用な機能性タンパク質合成系開発など医工学分野に大きく資することが期待される。

3. 研究の方法

本研究計画では、真核生物(古細菌)と真正細菌という生物ドメインを網羅するタンパク質合成系の比較解析という複眼的視点と、分子遺伝学的手法を基軸に、構造生物学的手法、生化学的手法、インフォマティクス的手法を横断的に用いる研究体制を構築し、目的に掲げた項目に対応する以下の実験計画を実施する。

【1】例外的遺伝暗号解読に関わる tRNA 擬態タンパク質の機能構造領域探索

【2】例外的遺伝暗号解読に関わるリボソーム構成因子・機能ドメインの探索

【3】tRNA 擬態タンパク質が認識するリボソーム停滞の分子機構と誘引 mRNA シグナルの網羅解析

これらの研究成果を統合することで tRNA 擬態分子による例外的な遺伝暗号解読機構における普遍的かつ包括的理解を達成する。

4. 研究成果

品質管理機構を遺伝学的に評価し、変異体分離を行う系の作成を行いこれまでに、翻訳 G タンパク質ホモログであり、mRNA 品質管理機構を制御することが知られているものの、G ドメインの保存性が低く、グアニンヌクレオチド結合性も示されていない、出芽酵母 Ski7 タンパク質について、酵母の分子遺伝学手法を用いることにより、多数の変異体を分離し、機能解析することに成功した。得られた変異を X 線結晶構造上にマップすることにより、これらの変異体が Ski7 の G ドメイン保存モチーフや関連する立体構造部位に集中することが判明した。これにより、Ski7 タンパク質が mRNA 品質管理に関わるためには G ドメイン(おそらくはグアニンヌクレオチドの結合)モードによりリボソームへの結合性や、関連諸因子との機能制御をスイッチするという新しい機能制御モデルを考案することができた。新たな遺伝学評価系は、本研究課題の変異体分離や機能検証に広く応用することが示されたといえる。一方、Ski7p タンパク質の N 末端領域に初めて見いだされた機能欠損点変異について一段と掘り下げた解析を行った。この領域は、エキソソーム複合体との相互作用を媒介しリボソームへのリクルートさせる機能領域であることが予想されていたが、これまで機能欠損につながるアミノ酸側鎖情報が得られていなかった。20通りのアミノ酸に置換した Ski7 変異体遺伝子を構築し、mRNA 品質管理機構への影響を検証した。同時に他グループから報告のあった、Ski7p-エキソソーム複合体の部分高次構造情報における同残基部位の情報と合わせ、この残基が Ski7p とエキソソーム複合体との疎水性相互作用領域に形成されたピット構造に適合するための重要残基であることが明瞭になった。また、tRNA 擬態タンパク質複合体である Hbs1p-Dom34p 複合体とリボソームとの作用機構を解明する目的で構築した新規リボソーム停滞評価アッセイ系を用いたリボソーム変異のパイロット選択実験を実施した。

本研究計画の重要な成果としては、真核細胞モデル系である出芽酵母の系において、停滞リボソームの解消に関わる新規な分子機構の存在を強く示唆する結果を得、モデルとして公表したことが挙げられる。

バクテリアの停滞リボソームの再生反応過程では、標準的なペプチド鎖解離因子 RF1/RF2 もしくは、リボソーム大サブユニットでペプチド鎖解離反応を触媒する GGQ モチーフをもつ解離因子ホモログにより、ペプチド鎖解離反応を経る分子作用機序で最終的に解体反応に至ることが知られている。一方、これまで真核細胞ではこのような経路は知られておらず、停滞リボソームは、tRNA 擬態タンパク質複合体である HBS1/Dom34 複合体により認識され、Dom34 がペプチド鎖解離反応を引き起す、取り残されたリボソームを ATPase である RL11(ABCE1)が認識し ATP 依存的に解体反応を触媒することが報告されてきた。

今回、翻訳効率の著しく低い出芽酵母のレアコドンである CGA コドンを採用したアッセイ系で、CGA におけるリボソーム停滞では、解離因子によるコドン誤読により停滞状況が解消されることを多角的な検証により示すことに成功しモデルを公表した。現在、先行して公表した上記成果の一般化と詳細な分子機構についての成果の最終的な取りまとめを行っている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Miki Wada, **Koichi Ito**, Misdecoding of Rare CGA Codon by Translation Termination Factors, eRF1/eRF3, Suggests Novel Class of Ribosome Rescue Pathway in *S. cerevisiae* The FEBS Journal, 査読有、Volume286, Issue4 (2019 年) Pages 788-802
doi.org/10.1111/febs.14709

Hayashi H, Nagai R, Abe T, Wada M, **Ito K**, Takeuchi-Tomita N, Tight interaction of eEF2 in the presence of Stm1 on ribosome. Journal of Biochemistry, 査読有、163(3) (2018 年) 177-185
doi.org/10.1093/jb/mvx070

Horikawa W, Endo K, Wada M, **Ito K**, Mutations in the G-domain of Ski7 cause specific dysfunction in non-stop decay. Scientific Reports, 査読有、volume 6, Article number: 29295 (2016 年)
doi: 10.1038/srep29295

[学会発表](計 6 件)

出芽酵母における CGA アルギニンコドン誤読とリボソームレスキュー
和田 美紀、**伊藤 耕一**
第 41 回日本分子生物学会 2018 年 11 月 30 日

RNA 結合タンパク質の mRNA 結合に依存する新奇な翻訳開始反応の分子メカニズム解明
堀江 史博、遠藤 慧、**伊藤 耕一**
第 41 回日本分子生物学会 2018 年 11 月 29 日

翻訳終結因子による CGA センスコドンの解読の意義
和田 美紀、**伊藤 耕一**
2017 年度生命科学系学会合同年次大会(ConBio2017) 2017 年 12 月 6 日 ~ 2017 年 12 月 9 日 神戸ポートアイランド 2017 年 12 月 6 日

タンパク質と mRNA の結合に依存する新奇な翻訳開始反応の成立要件検証と一般化
堀江 史博、遠藤 慧、**伊藤 耕一**
2017 年度生命科学系学会合同年次大会(ConBio2017) 2017 年 12 月 6 日 ~ 2017 年 12 月 9 日 神戸ポートアイランド 2017 年 12 月 6 日

センスコドン CGA の翻訳終結因子 eRF1 による誤読はリボソーム停滞の解消に機能し得る
和田 美紀、**伊藤 耕一**
第 39 回 日本分子生物学会年会 (2016 年 11 月 30 日 ~ 2016 年 12 月 2 日 パシフィコ横浜) 2016 年 11 月 30 日

シロイヌナズナ由来二量体型チロシル tRNA 合成酵素の機能解析
豊田 陽平、川島 萌華、佐賀 裕亮、和田 美紀、**伊藤 耕一**、久城 哲夫
第 39 回 日本分子生物学会年会 (2016 年 11 月 30 日 ~ 2016 年 12 月 2 日 パシフィコ横浜) 2016 年 11 月 30 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。