

令和 3 年 5 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06080

研究課題名(和文) 真核生物停滞リボソーム上におけるペプチジルtRNA分解のメカニズム解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of peptidyl-tRNA hydrolysis in the stalled eukaryotic ribosome

研究代表者

伊東 孝祐 (Ito, Kosuke)

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：20502397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：生体内では様々な要因で翻訳はしばしば異常停止し、合成途中の未成熟ペプチドがtRNAに結合したままのペプチジルtRNAが産生される。この状況は、ペプチジルtRNAがペプチドとtRNAに加水分解されることで解消するが、停滞リボソーム中においてペプチジルtRNAが分解される仕組みは真核生物においては未だ明らかにされていない。本研究で我々は、真核生物の停滞リボソーム中のペプチジルtRNAの加水分解は、現在同定されているVms1のみでは不十分であることを示す結果を得た。また、本研究で我々は、細胞質でペプチジルtRNAを分解するPthの基質認識と活性発現の構造基盤を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

翻訳の品質管理機構の不全はアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患を引き起こす。そのため、本研究結果はそれら病気の治療法の開発に繋がるものである。一方、抗生物質の開発研究においては、Pthが新規ターゲットタンパク質として注目されているが、今回我々がPthの基質認識や活性発現の構造基盤を明らかにしたことにより、Pthをターゲットにした薬剤の開発研究が加速することになる。

研究成果の概要(英文)：During the course of protein synthesis, ribosomes occasionally stall due to various reasons and thus produce peptidyl-tRNAs, which are immature translation products. This unfavorable situation is solved by hydrolyzing the peptidyl-tRNA into the peptide and tRNA components. However, the mechanism of the peptidyl-tRNA hydrolysis in the stalled ribosome still remains unclear in eukaryotes. Our study revealed that Vms1 is not sufficient to hydrolyze the peptidyl-tRNA in the stalled ribosome. We also clarified the structural basis of the substrate recognition and the hydrolysis reaction of Pth, which acts in the cytosol to hydrolyze the peptidyl-tRNAs.

研究分野：構造生物化学

キーワード：翻訳 ペプチジルtRNA 分子遺伝学的解析 X線結晶構造解析

### 1. 研究開始当初の背景

遺伝子発現における翻訳過程は、リボソーム中において tRNA 上にアミノ酸が伸長し、終始コドンが存在するとタンパク質が tRNA から切り離されて正常に終了する。しかし、mRNA の損傷等、生体内では様々な要因で翻訳は異常停止し、合成途中の未成熟ペプチドが tRNA に結合したままのペプチジル tRNA が停滞リボソーム内に産生される。このような状態は細胞にとって有害であり、翻訳品質管理機構によって解消されなければならない。現在までの研究により、産生されたペプチジル tRNA が停滞リボソームから細胞質に放出された場合、ペプチジル tRNA はペプチジル tRNA 加水分解酵素 (Peptidyl-tRNA hydrolase、以下 Pth) の働きでペプチドと tRNA に分解されることがわかっている (図 1A)。そのことで、tRNA は翻訳の材料として再び使用可能な状態になり、以後翻訳が滞りなく進行する。なお、Pth はアミノ酸配列と立体構造から Pth1 と Pth2 に分類されており、真正細菌は Pth1 を、真核生物は Pth1 と Pth2 の両方を保有していることが知られている。

一方、産生されたペプチジル tRNA が細胞質に放出されず停滞リボソーム中に留まった場合、上記とは違った品質管理機構が働くことが知られている。真正細菌の場合、停滞リボソーム中のペプチジル tRNA は ArfA-RF2 や ArfB の働きでペプチドと tRNA に分解され、その後ペプチドと tRNA がそれぞれリボソームから放出されて翻訳停滞が解消される。また、真正細菌には SmpB-tmRNA の作用により停滞リボソームがレスキューされる経路が存在することも知られている。一方、真核生物の場合は、まずペプチジル tRNA のペプチド部位が停滞リボソーム上でユビキチン化され、その後は真正細菌同様、ペプチジル tRNA は停滞リボソーム上でペプチドと tRNA に分解されて翻訳停滞は解消に導かれる。しかし、真核生物においては、停滞リボソーム中においてペプチジル tRNA をペプチドと tRNA に分解する機序は未だ未解明な点が多い (図 1B)。

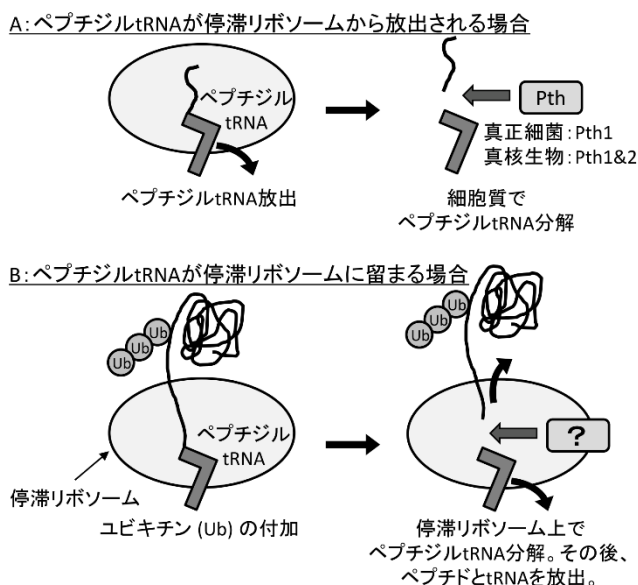


図1 ペプチジルtRNAの分解機構

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、真核生物の停滞リボソーム中において、ペプチジル tRNA をペプチドと tRNA に分解する因子を同定することである。また、Pth1 や Pth2 について、ペプチジル tRNA の認識と加水分解の構造基盤を明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

- (1) 真核生物の停滞リボソーム中においてペプチジル tRNA を分解する因子の探索。  
 出芽酵母 W303-1A 株を使用し、停滞リボソーム中でペプチジル tRNA を分解する候補因子の遺伝子破壊株を作製した。そして、それら株の中で長鎖のペプチジル tRNA を産生するようなストップコドンを欠損した nonstop mRNA を発現させて株の生育を観察した。
- (2) Pth1 や Pth2 の活性発現の構造基盤の解明  
 大腸菌を用いて目的タンパク質を発現させ、各種クロマトグラフィーにより目的タンパク質を精製して X 線結晶構造解析により構造を決定した。

### 4. 研究成果

- (1) 真核生物の停滞リボソーム中においてペプチジル tRNA を分解する因子の探索。  
 現在までに、停滞リボソーム中でペプチジル tRNA をペプチドと tRNA に分解する因子の 1 つとして Vms1 が報告されているが、我々はあるタンパク質 X もまた停滞リボソーム中でペプチジル tRNA の加水分解に関与しているのではと考え、以下の実験を行った。  
 まず、出芽酵母 W303-1A 株を材料とし、Vms1 あるいはタンパク質 X の遺伝子を破壊した

$\Delta$ Vms1 株および $\Delta$ X 株、さらにそれらどちらの遺伝子も破壊した $\Delta$ Vms1 $\Delta$ X 株を作製した。これら遺伝子破壊株を液体培地で培養し、OD<sub>600</sub> 値を揃えたうえで寒天培地にスポットして生育状況を観察した。その結果、 $\Delta$ X 株は WT 株と比較して生育にほとんど差は無かったが、 $\Delta$ Vms1 株では若干の生育低下が観察された。また、 $\Delta$ Vms1 $\Delta$ X 株では、 $\Delta$ Vms1 株よりも更に生育が低下していることが観察された。これらの結果は、生体内でのペプチジル tRNA の分解には Vms1 だけでは不十分であり、Vms1 とタンパク質 X の両者の働きが必要であることを示している。次に我々は、Vms1 とタンパク質 X の両者の働きが必要なのが停滞リボソーム中なのかを確かめるため、上記の株に、長鎖ペプチジル tRNA を産生するような nonstop mRNA を発現するプラスミドを導入して生育実験を行った。その結果、 $\Delta$ X+nonstop mRNA 株は WT+nonstop mRNA 株と比較して生育にほとんど差は無かった一方、 $\Delta$ Vms1+nonstop mRNA 株では若干の生育低下が観察された。また、 $\Delta$ Vms1 $\Delta$ X+nonstop mRNA 株では、 $\Delta$ Vms1+nonstop mRNA 株よりも更に生育が低下していることが観察された。これらの結果は、停滞リボソーム中でのペプチジル tRNA の分解にも Vms1 だけでは不十分であり、Vms1 とタンパク質 X の両方が必要であることを示すものである。

## (2) Pth1 や Pth2 の活性発現の構造基盤の解明

真核生物の Pth1 は細菌の Pth1 と高いホモロジーを持つ。そのため、我々は構造解析を容易にするため、真核生物の Pth1 の代わりに、タンパク質の安定な高度好熱菌由来の Pth1 の構造解析をすることにした。まず、大腸菌を使用して数種類の高度好熱菌由来の Pth1 の発現実験を試みた。その後、各種カラムクロマトグラフィーにより目的タンパク質を精製し、様々な結晶化溶液を使用して蒸気拡散法により目的タンパク質の結晶化を試みた。その結果、*Thermus thermophilus* 由来の Pth1 を使用することで良質な結晶を得ることができた。この結晶に高エネルギー加速器研究機構にて X 線を照射し、得られたデータセットを用いて構造解析を行った結果、1.0 Å の高分解能で構造を決定することができた (図 2A)。そして、得られた構造より、Pth1 は活性ポケット周辺および C 末端ヘリックス ( $\alpha$ 6) の揺らぎが大きいことが明らかになった (図 2B)。また、得られたデータが 1.0 Å と高分解能だったため、温度因子を異方的に精密化計算することができた。そして、各部位の揺らぎの方向も明らかにすることができた (図 2C)。

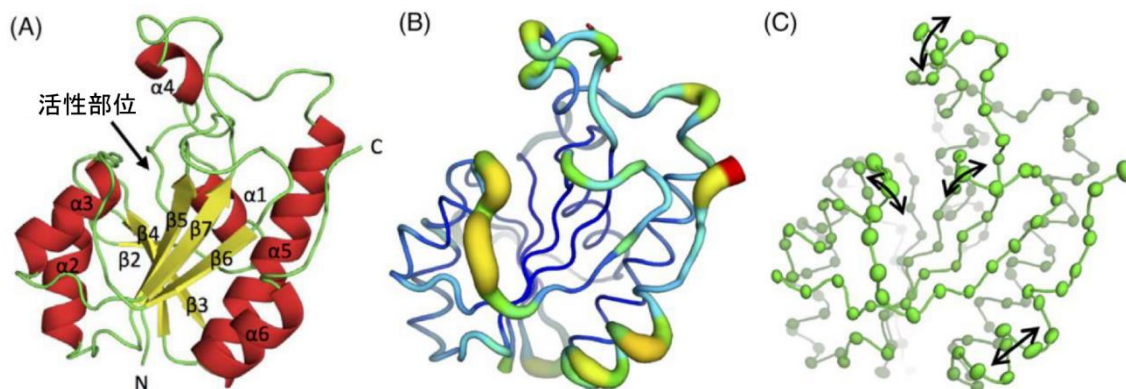


図 2 (A) *T. thermophilus* 由来 Pth1 の全体構造：全体構造をリボンモデルで表示している。リボンモデルは、二次構造により色分けして表示している。(B) 分子の可塑性：可塑性の低い方から高い方へ青色から赤色のグラデーションで表示している。また、可塑性の低い部分は細く、高い部分は太く表示している。(C) 運動の方向：C $\alpha$  原子の異方性温度因子を楕円球で表示している。また、矢印で各部位の動きの方向を示している。

次に我々は、Pth1 と基質の相互作用様式を明らかにするため、まず tRNA の 3'末端 (76 番目のアデノシン：A76) のアナログ化合物である adenosine triphosphate (AMP) との複合体の構造解析に取り組んだ。その結果、同じく *Thermus thermophilus* 由来の Pth1 を使用することで 1.6 Å の分解能で Pth1•AMP 複合体の構造を決定することに成功した (図 3A)。また、我々は、結晶中で隣の分子の C 末端の 3 残基が活性ポケットに結合した構造 (以下 Pth1•tri-peptide 複合体) も 2.1 Å の分解能で決定することができた (図 3B)。そして、Pth1•AMP 複合体と Pth1•tri-peptide 複合体を重ね合わせた結果、AMP と tri-peptide は、AMP の 3'-OH と tri-peptide の C 末端のカルボキシル基がエステル結合を形成できるポジションに存在していることが明らかになった (図 3C)。このことは、Pth1•AMP 複合体と Pth1•tri-peptide 複合体はそれぞれ、基質の tRNA 3'末端部位と Pth1、および基質のペプチド部位と Pth1 との相互作用を表した構造であることを示している。すなわ

ち、本研究で得られた Pth1•AMP 複合体と Pth1•tri-peptide 複合体の構造により、基質の peptidyl-A76 部位と Pth1 の相互作用様式が明らかになったと言える。

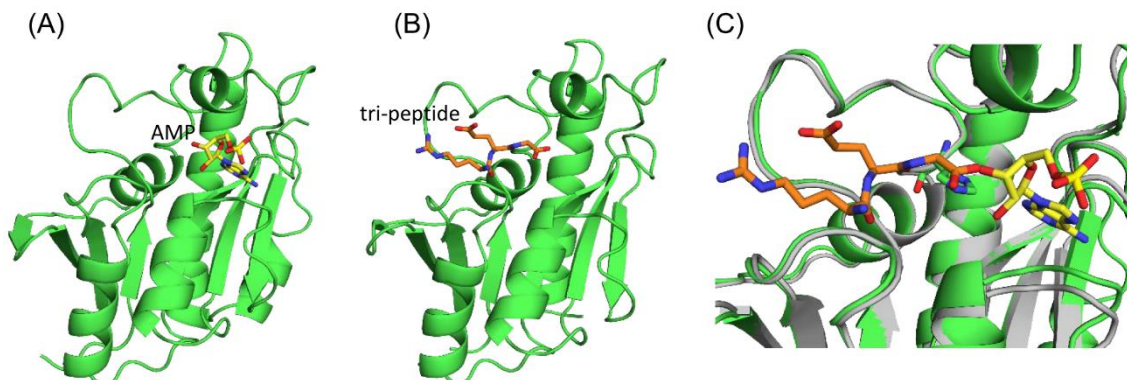


図 3 (A) Pth1•AMP 複合体の全体構造：Pth1 はリボンモデルで、AMP はスティックモデルで表示している。(B) Pth1•tri-peptide 複合体の全体構造：Pth1 はリボンモデルで、tri-peptide はスティックモデルで表示している。(C) Pth1•AMP 複合体と Pth1•tri-peptide 複合体の重ね合わせ：Pth1•AMP 複合体の Pth1 を緑色で、Pth1•tri-peptide 複合体の Pth1 を灰色で表示している。AMP と tri-peptide は A、B と同様にスティックモデルで表示している。AMP と tri-peptide はそれぞれ、AMP の 3'-OH と tri-peptide の C 末端のカルボキシル基がエステル結合を形成できるポジションに存在している。

さらに我々は、Pth1 と peptidyl-A76 の相互作用様式が明らかになったことから、Pth1 の加水分解機構について考察することができた。具体的には、反応は以下のように 3 段階からなるものと考えられる (図 4)。1 段階目はヒスチジンが水分子を分極させることにより起こるエステル結合への求核攻撃である。2 段階目は四面体中間体の形成である。3 段階目は四面体中間体の崩壊によるエステル結合の分解である。我々は、反応に関与すると予測したアミノ酸残基の変異体を作製して実際に酵素活性測定を行ったところ、大幅に活性が低下する結果を得ている。この結果は、我々の反応機構モデルを支持するものである。

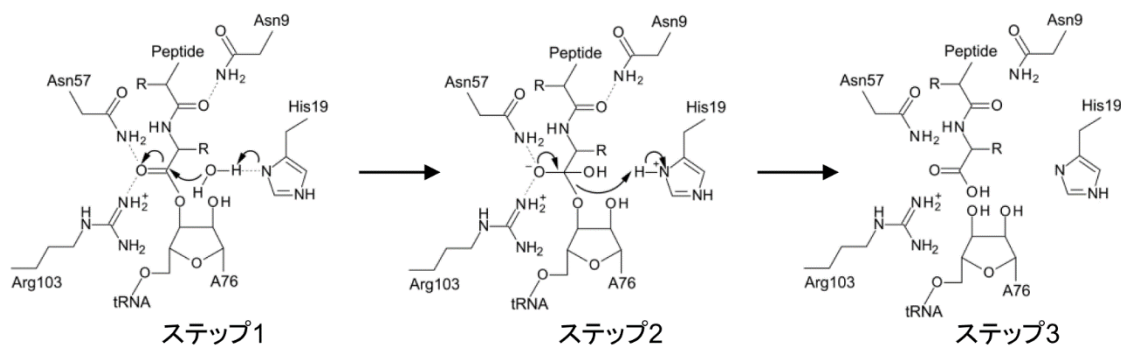


図 4 Pth1 の反応機構モデル

その他、我々は Pth2 についても酵素基質複合体の X 線結晶構造解析に取り組んだ。その結果、peptidyl-A76 類似体との複合体、および tRNA との複合体の立体構造を決定することに成功している。また、我々は真核生物の Pth2 が、プロテアソーム輸送因子である Dsk2 の UBL ドメインと直接相互作用することを明らかにしているが、本研究では Pth2 と Dsk2 の UBL ドメインとの複合体の結晶構造解析にも成功している。

### (3) 今後の展望

本研究では、停滞リボソーム上でのペプチジル tRNA の分解には Vms1 以外の他の因子も関与することを示す結果を得た。今後は、酵母内のペプチジル tRNA を検出することで、この因子が実際にペプチジル tRNA の分解に関与するのかを調べる予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsumoto A., Uehara Y., Shimizu Y., Ueda T., Uchiumi T., Ito K.	4. 巻 87
2. 論文標題 High-resolution crystal structure of peptidyl-tRNA hydrolase from <i>Thermus thermophilus</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proteins	6. 最初と最後の頁 226,235
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/prot.25643	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 茅原真晃、今井大達、内海 利男、伊東 孝祐
2. 発表標題 ペプチジルtRNA加水分解酵素Pth2・tRNA複合体の構造解析
3. 学会等名 第15回無細胞生命科学研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 茅原真晃、中筋航、上原祐二、内海利男、伊東孝祐
2. 発表標題 ペプチジルtRNA加水分解酵素Pth2の構造・機能解析
3. 学会等名 第60回新潟生化学懇話会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 茅原真晃、中筋航、上原祐二、市邨晃久、今井大達、内海利男、伊東孝祐
2. 発表標題 ペプチジルtRNA加水分解酵素Pth2の構造・機能解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 市邨晃久、笠原杏子、今井大達、上原祐二、西川周一、内海利男、伊東孝祐
2. 発表標題 ペプチジルtRNA加水分解酵素・プロテアソーム輸送タンパク質複合体のX線結晶構造解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 茅原真晃、中筋航、上原祐二、内海利男、伊東孝祐
2. 発表標題 ペプチジルtRNA加水分解酵素Pth2の構造・機能解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

#### 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	西川 周一  (Nishikawa Shuh-Ichi)  (10252222)	新潟大学・自然科学系・教授   (13101)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携 研究者	内海 利男  (Uchiumi Toshio)  (50143764)	新潟大学・自然科学系・フェロー   (13101)	

#### 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------