

## 科学研費助成事業（科学研費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 3日現在

機関番号：12601  
 研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22310134  
 研究課題名（和文）  
 終止コドン多義性を実現するペプチド鎖解離因子のスイッチ制御機構の解明研究  
 研究課題名（英文）  
 Molecular switch mechanism for stop codon versatility by release factors (RF)  
 研究代表者  
 伊藤耕一（ITO KOICHI）  
 東京大学・新領域創成科学研究科・教授  
 研究者番号：10262073

## 研究成果の概要（和文）：

我々は tRNA 擬態分子である真核生物（古細菌）解離因子による終止コドンの解読制御機構を明らかにするために、古細菌由来因子による単体・複合体結晶構造に基づく分子機構解明を行った。その結果、古細菌の翻訳系では、伸長因子 aEF1α が tRNA に加え、解離因子 aRF1 および古細菌 Pelota と結合機能する新事実を明らかにした。この知見は全ての遺伝暗号解読段階において GTP 結合因子のリボソーム上での普遍的な作用機構を示唆する。

## 研究成果の概要（英文）：

Here we solved the first crystal structure of aRF1 and aPelota from an archaeon, *Aeropyrum pernix* (ape-aRF1) complexed with archaeal translation elongation factor aEF1α. Our biochemical and genetic analyses revealed that the authentic archaeal EF1α acts as a carrier GTPase for aRF1, and surprisingly, for aPelota, which functions in the mRNA surveillance pathways via tRNA mimicry. Our results revealed novel aspects of GTP switch mechanism for stop codon recognition.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2011年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2012年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

## 研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：翻訳終結、リボソーム、tRNA、分子擬態、ペプチド鎖解離因子、遺伝暗号解読、タンパク質合成

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝暗号 64 通りのうち 3 つの終止コドンのみは tRNA が存在せず、タンパク質であるペプチド鎖解離因子 (RF、以後、解離因子)

が解読する。申請者は、これまでに解離因子が tRNA の構造と機能をまねることで巧みなリボソーム機能の乗っ取りが可能になり、終止コドンの解読が遂行されるという「解離因子-tRNA 擬態仮説」を提唱し (Ito et al. *PNAS*,

93:5543-5448 (1996)) 精力的にその実証を進めてきた。爾来、自ら原核解離因子 (RF1, RF2) 上の「ペプチドアンチコドン」の世界初の特定 (Ito et al. *Nature*, 403:680-684 (2000)) をはじめ、様々な機能ドメインの発見とその作用機序解明を行ってきた。グループ内外の検証により解離因子の tRNA 擬態性は、リボソームとの複合体構造など最新の構造生物学的知見でも再確認され、分子生物学の基礎概念として確立した。

真核生物における終止コドン解読は、二種のペプチド鎖解離因子 eRF1 と eRF3 によって遂行される。eRF1 は、コドン特異性を実現する機能ドメインをもち (Ito et al. *PNAS*, 99:8494-8499 (2002)) リボソーム小サブユニット側におけるコドン認識と、大サブユニットのペプチド鎖転移活性中心におけるペプチド鎖解離 (加水分解反応) を共役する tRNA 擬態タンパク質と目され、eRF3 は、EF-1 $\alpha$  (原核: EF-Tu) に相同性がきわめて高い GTP 結合タンパク質である (研究成果: *RNA* 4:958-972 (1998), *Mol Cell* 11:103-112 (2004) など)。終止コドン解読においては、eRF3 と eRF1 が、あたかも EF-1 $\alpha$  と tRNA のように結合し、タンパク質のみによる遺伝暗号解読を実現していると推定してきた。

しかしながら、tRNA 系と比較すると無視できない相違点も存在する。EF-1 $\alpha$  は GTP の存在下で、CCA 端がアミノアシル化された tRNA のみを特異的に結合することで協調的に三者複合体を形成し機能する。一方、eRF1 はアミノアシル化された tRNA の CCA 端を擬態する領域として最初から GGQ モチーフが分子上に存在し、tRNA のアミノアシル化に相当するステップが存在しない。このことは、GTP 結合タンパク質である eRF3 の ON/OFF が何を契機に制御されるかという分子メカニズムの説明に支障となってきた。申請者は、eRF3 に

よる翻訳終結制御機構を明らかにするために、まず、単体 eRF3 の立体構造の解明を行い (*Mol Cell* 14:233-245 (2004))、EF-1 $\alpha$  には存在せず、eRF3 分子に普遍的に存在する N 末端に付加する機能領域が、eRF1 との結合モードを直接制御するというモデルを提唱し、それを実証してきた。しかし、このモデルのみでは、eRF1 と eRF3 の複合体がどのように GTPase 機能制御を受けるかという点を説明できなかった (*Genes Cells*, 12: 639-65 (2007))。

## 2. 研究の目的

「なぜタンパク質が終止コドン解読するのか？」に答える: 本申請では、解離因子複合体の機能構造解明により、真核生物 (古細菌) における新しい翻訳終結機能モデルを構築しすることを目的とする。そして、この制御モデルから医工学応用への重要な手がかりとして、既知の終止遺伝暗号読み替え機構 (リコーディング: セレノシステイン挿入やフレームシフト発現機構など) や NMD などの mRNA 品質管理機構など終止コドンと共役する高次機能に関わるスイッチ機構への手がかりを得ることを目標とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、真核解離因子 eRF1-eRF3 複合体の終止コドン認識と共役する GTPase 分子の活性化分子機構解明のための以下の実験を実施した。

- (1) 古細菌種より真核解離因子 eRF1 とペアで機能する G タンパク質因子の探索と分子遺伝学・生化学的手法による機能検証。および、立体構造解明。
- (2) eRF1-eRF3 複合体上の結合部位 Site 2 に関する生化学解析と、高精度の立体構造

情報を得るための構造生物学的解析。

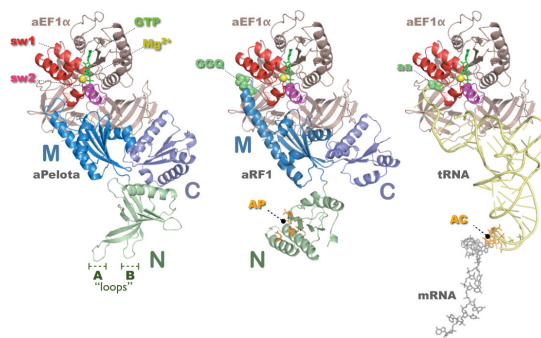
- (3) 上記分子機構に関わるコドン認識機構の分子機構解明を、変則的終止コドン運用する絨毛虫類由来因子の探索と解析。

#### 4. 研究成果

古細菌ゲノムにはこれまで eRF3 相当因子は見いだされていなかったが、我々は、古細菌では翻訳伸長因子 aEF-1 $\alpha$  が tRNA に加え、翻訳終結のための tRNA 擬態タンパク質である aRF1 と、さらには、mRNA 品質管理機構に関与する Pelota タンパク質双方と結合することを発見した。このことは、リボソームの A サイトの遺伝暗号解読状態に対応し、真核生物では3つの異なる EF-1 $\alpha$  様 GTPase (EF-1 $\alpha$ , eRF3, Hbs1) がそれぞれ翻訳伸長、終結、mRNA 品質管理機構で機能しているのに対し、古細菌では単一の EF-1 $\alpha$  に機能集約されている事を意味している。これに合わせ、それぞれの因子複合体の立体構造情報解明を濡木研究室（東大・理・生化）との共同研究により成功した。以上の実験結果をもとに、既存の低解像度の eRF1-eRF3 複合体情報と共に真核生物・古細菌に共通する、複合体の結合界面や、GTP 活性化機構についての知見を大幅に刷新することができた。

また、変則的な終止遺伝暗号をもつ様々な絨毛虫由来 eRF1 と、全能型ヒト、酵母由来の eRF1 の比較解析により、詳細なコドン認識部位が明らかとなり、また、リボソームドッキングモデルなどの併用により、遺伝暗号解読と GTPase 活性化スイッチの機能性についての作用モデル構築が可能になった。

以上の新知見により、終止コドンを含めた全ての遺伝暗号と、mRNA の品質管理に関わる反応過程が tRNA の構造及び機能性を軸とした共通の分子スイッチ機構で進行することが強く示された。



図：古細菌における伸長因子（上部）aEF1 $\alpha$  と、aPelota(左)、aRF1 (中)、tRNA (いずれも下部)の複合体モデル。(文献6をもとに作成)

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

1. Li Y, Kim OT, Ito K, Saito K, Suzuki T, Harumoto T.: A Single Amino Acid Substitution Alters Omnipotent eRF1 of Dileptus to Euplotes-type Dualpotent eRF1: Standard Codon Usage May be Advantageous in Raptorial Ciliates. *Protist.* (2013) [Epub ahead of print], 査読有  
DOI: 10.1016/j.protis.2013.02.004
2. Kobayashi K, Saito K, Ishitani R, Ito K, Nureki O.: Structural basis for translation termination by archaeal RF1 and GTP-bound EF1 $\alpha$  complex. *Nucleic Acids Res.* 40: 9319-28 (2012), 査読有  
DOI: 10.1093/nar/gks660
3. Zhou ZP, Shimizu Y, Tadakuma H, Taguchi H, Ito K, Ueda T.: Single molecule imaging of the trans-translation entry process via anchoring of the tagged ribosome. *J Biochem* 149:609-618 (2011), 査読有  
DOI: 10.1093/jb/mvr010
4. Nakamura, Y., Ito, K.: tRNA mimicry in translation termination and beyond. *Wiley Interdiscip Rev (WIREs) RNA.* 2:647-668 (2011), 査読有  
DOI: 10.1002/wrna.81
5. Kobayashi K, Kikuno I, Kuroha K, Saito K, Ito K, Ishitani R, Inada T, and Nureki O: Structural Basis for mRNA Surveillance by Archaeal Pelota and GTP-bound EF1 $\alpha$  Complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107: 19242-19247 (2010)., 査読有  
DOI: 10.1073/pnas.1009598107

6. Saito K, Kobayashi K, Wada M, Kikuno I, Takusagawa A, Mochizuki M, Uchiumi T, Ishitani R, Nureki O and Ito K: An omnipotent role of archaeal EF1 $\alpha$  in translational elongation and termination, and quality control of protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107: 17575-17579 (2010)., 査読有  
DOI: 10.1073/pnas.1009599107

[学会発表] (計 11 件)

1. Saito K., Ito K., “Analysis of stop codon decoding in eukaryotes.” 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月11日~2012年12月14日, 福岡、福岡国際会議場、マリンメッセ福岡

2. Saito K., Ito K., “3' to 5' mRNA degradation activating factor SKI7 contains a conserved functional motif in its N-terminal domain.” 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月11日~2012年12月14日, 福岡、福岡国際会議場、マリンメッセ福岡

3. Kan Kobayashi, Kazuki Saito, Ryuichiro Ishitani, Koichi Ito, and Osamu Nureki, “Structural basis for translation termination by archaeal RF1 and GTP-bound EF1 $\alpha$  complex”, XXIV tRNA Conference, 2012年12月02日~2012年12月06日, Chile.

4. Ryuichiro Ishitani, Kan Kobayashi, Izumi Kikuno, Kazushige Kuroha, Kazuki Saito, Koichi Ito, Toshifumi Inada, and Osamu Nureki, “Structural basis for mRNA surveillance by Archaeal Pelota and GTP-bound EF1 $\alpha$  complex”, XXIV tRNA Conference, 2012年12月02日~2012年12月06日, Chile.

5. Kan Kobayashi, Kazuki Saito, Ryuichiro Ishitani, Koichi Ito, Osamu Nureki, Structural Basis for Translation Termination by Archaeal RF1 and GTP-bound EF1 $\alpha$  Complex, The 16th Annual Meeting of The RNA Society (June 12-18, 2011), Kyoto, Kyoto International Conference Center

6. Kazuki Saito, Kan Kobayashi, Miki Wada, Izumi Kikuno, Akira Takusagawa, Masahiro Mochizuki, Toshio Uchiumi, Ryuichiro Ishitani, Osamu Nureki, Koichi Ito, Omnipotent Role of Archaeal Elongation Factor 1 Alpha in Translation Elongation, and Termination, and Quality Control of Protein Synthesis, The 16th Annual Meeting of The RNA Society (June 12-18, 2011), Kyoto, Kyoto International Conference Center

7. Osamu Nureki<sup>1</sup>, Kan Kobayashi<sup>1</sup>, Kazuki Saito, Toshio Uchiumi, Ryuichiro Ishitani, Toshifumi Inada, koichi ito, Archaeal elongation factor acts as an omnipotent carrier GTPase in translational elongation, termination and mRNA surveillance, The 16th Annual Meeting of The RNA Society (June 12-18, 2011), Kyoto, Kyoto International Conference Center

8. Kosuke Ishikawa, Koichi Ito, Kentaro Semba, A Translational Fine-tuning by The Drg2-GTPase/Dfrp2 Complex, The 16th Annual Meeting of The RNA Society (June 12-18, 2011), Kyoto, Kyoto International Conference Center

9. Wada M, Nakamura Y, Ito K, Genetic Analyses of Critical Sites for eRF1-eRF3 Interplay in Translation Termination, The 16th Annual Meeting of The RNA Society (June 12-18, 2011), Kyoto, Kyoto International Conference Center

10. Horikawa W, Ito K, Establishment of a novel dual luciferase reporter assay for No-go decay mRNA quality control. 2011/12/13-16, 日本分子生物学会年会, 横浜、パシフィコ横浜

11. 伊藤耕一, 真核生物型翻訳終結機構と G タンパク質分子機構の普遍性, 第33回日本分子生物学会年会, 2010年12月7日, 神戸

[その他]

ホームページ等

[http://www.k.u-tokyo.ac.jp/mgs/mgs\\_info/molgenet/research.html](http://www.k.u-tokyo.ac.jp/mgs/mgs_info/molgenet/research.html)

## 6. 研究組織

### (1) 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