

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25291020

研究課題名(和文) tRNA擬態タンパク質・翻訳Gタンパク質複合体によるリボソーム機能拡張機構の解明

研究課題名(英文) Study of functional interplay of tRNA mimicry proteins and translational GTPase proteins.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：真核細胞におけるtRNA擬態分子複合体の機能インターフェース解明を行った。まず、出芽酵母では不活性な異種eRF3を用いた変異体分離と解析を行い、tRNA擬態分子eRF1とeRF3およびリボソームとの分子間機能相互作用部位を同定した。次に、リボソーム上でのeRF1によるコドン特異的認識機構の解明のために、保存性eRF1-L123アミノ酸残基の網羅的変異体解析を行った。その結果一連の変異体は、一残基部位のみの変異で新規な終止コドン認識パターンを示した。eRF1とリボソームとのドッキングモデルから、この残基がリボソーム遺伝暗号解読部位のRNA機能残基との相互作用により機能することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We performed genetic mapping and analyses of critical sites that contribute to functional complementation with exceptionally nonfunctional heterologous eRF3 in yeast, and clarified the functional interplay among the tRNA mimic eRF1, its carrier protein eRF3 and ribosome. To elucidate the molecular roles of this residue in codon discrimination, we conducted systematic mutagenesis of 123rd amino acid and applied to stop codon specificity analyses in vivo. We found that a simple rule could explain sub-specific patterns of 123th residues in codon discrimination, and that the residue contributed to functional coupling with eRF3, suggesting that the 123th residue is a novel class of functional residue. Furthermore, our structural modeling of eRF1 in the quasi-A/T state also suggested a distinctive role for the 123th residue in the putative molecular interplays on the ribosomal decoding site. We also proposed a model for the putative role of the 123th residue in stop codon discrimination.

研究分野：分子生物学

キーワード：リボソーム 翻訳制御 遺伝暗号 直行性 タンパク質合成 tRNA擬態タンパク質 翻訳終結 mRNA品質管理

1. 研究開始当初の背景

普遍遺伝暗号表上の遺伝暗号 64 通りのうち、翻訳反応の終結を意味する 3 つの終止コドンのみには、対応する tRNA が存在せず、タンパク質であるペプチド鎖解離因子 (= RF = polypeptide-chain release factor、以後、解離因子) に解読される。また、終止コドンは、翻訳終結のみならず、RECODING (= 遺伝暗号の読替え反応: フレームシフト、セレノシステイン挿入など) もしくは NMD (nonsense mediated mRNA decay) mRNA 品質管理機構などと密接に関連し、リボソームの遺伝暗号解読機能を高次生命機能に拡張する多義的な遺伝暗号であることが注目されている。

申請者は、これまでに「なぜ終止コドンのみがタンパク質に解読されるのか」という問いに、解離因子が tRNA の構造と機能をまねることで巧みにリボソーム機能を乗っ取り、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 K et al. *PNAS*, 93:5543-5448 (1996)) 精力的にその実証を進めてきた。それ以来、バクテリア解離因子 (RF1, RF2) 上の「ペプチドアンチコドン」の世界初の特異性 (Ito K et al. *Nature*, 403:680-684 (2000)) をはじめ、多角的な作用機序解明を進めてきた。

直前の先行研究では、真核生物・古細菌解離因子へと研究対象を拡張し、国内外の構造解析グループとの密接な連携体制によりバクテリアとは全く独立な分子進化により獲得された高度な tRNA 分子擬態を解明した。

伸長課程では、G タンパク質である伸長因子 EF1 α がアダプター分子である tRNA と複合体形成し、適切な配向で結合することでリボソーム触媒部位との連携駆動を可能にするが、真核生物型解離因子による翻訳終結課程では、EF1 α のホモログである解離因子 eRF3 と tRNA 擬態分子である eRF1 との複合体が EF1 α /tRNA 複合体の立体機能構造をまるごと模倣する形で終止コドン解読を行う (= tRNA 擬態分子複合体)。

一方、古細菌では、eRF3 のかわりに、伸長因子でもある aEF1 が機能することが判明した。同時に、真核細胞に高度に保存される、EF1 ホモログ Hbs1 も古細菌には存在しない代わりに、その結合パートナー分子である aPelota 分子と tRNA 擬態分子複合体を形成することが判明した。

これまでの申請者らの基礎研究により、主要な生物ドメインでの tRNA 擬態タンパク質による終止コドン解読の仕組みのアウトラインが確立されたと言える。しかしながら、真核生物で新たに見いだされた tRNA 擬態分子複合体がどのように互いの分子インターフェースで相互作用し、かつ複合体としてリボソーム機能部位と相互作用するかなどの

基本的な分子メカニズムは不明であり、その解明が急がれた。

2. 研究の目的

生命進化の中で tRNA 擬態タンパク質の出現により、遺伝暗号解読機能が拡張され高能化へと発達させた生命戦略を理解し、かつ共通の分子基盤であるリボソームの触媒機能性を理解する。さらに医工学の発展に資する有益タンパク質の合成系構築等の基礎技術開発を目的とする。

3. 研究の方法

本研究計画では、真核生物・古細菌に見いだされた新たな tRNA 擬態分子の機能解明と応用研究のための研究を行う。具体的には、

(1) 真核生物・古細菌 EF1 型 G タンパク質のアダプター分子認識と直交性の分子基盤解明

EF1 および分化派生した相同因子 eRF3, Hbs1 が、それぞれのアダプター分子である tRNA および tRNA 擬態分子を、高度な保存性アミノ酸領域で識別する分子機構を古細菌、真核生物側双方から解析するための、遺伝学・生化学解析を実施し、また、古細菌 aEF1 の万能性等を応用し新規な試験管内タンパク質合成系を構築する。

(2) 第三の遺伝暗号解読の分子作用機構解明:

新たな tRNA 擬態分子複合体 (Hbs1/Pelota) のリボソーム作用の分子機構解明の為に、先行研究での解離因子解析結果との比較解析しながら、分子遺伝学手法を基軸に、構造生物学的な手法と生化学的手法を横断的に用いる事で計画を実施する

4. 研究成果

(1) 真核生物 tRNA 擬態タンパク質因子の翻訳 GTPase との“共通インターフェース”を介した直交性機能発現構造を詳しく理解するために、これを解析するための新たな遺伝学解析系を考案した。

まず最初に、真菌類縁である日和見病原体 *P. carinii* 由来のペプチド鎖解離因子 eRF3 (Pc-eRF3) が、分裂酵母、ほ乳動物など既知の eRF3 オーソログとは異なり酵母細胞内で酵母の eRF1 (Sc-eRF1) と協調的に機能しないことを見いだした。次ぎに、この発見をもとに、Pc-eRF3 / sc-eRF1 が酵母内で機能性を獲得する遺伝学的変異体を多数分離し解析した。

予想通り変異体は Pc-eRF3 / sc-eRF1 複合体が酵母内での翻訳終結機能を獲得していたが、複合体の形成能の著しい低下を引き起こすものが見いだされた。これまでに、明ら

かにした、eRF1/eRF3 複合体への変異部位マッピングおよび、eRF1/eRF3 複合体とリボソームドッキングモデルでの解釈により、インターフェースの結合性とリボソーム機能部位での機能発現に関する領域が同定できた。

(2) 真核生物の tRNA 擬態タンパク質であるペプチド鎖解離因子 eRF1 の L123 残基 (出芽酵母での残基番号) は、これまでに明らかにした eRF1、およびその古細菌オースログ aRF1 に配列が保存され、変則的な終止コドン暗号認識を行う織毛虫類 eRF1 の終止コドン特異性との相関性が高い。

この残基は立体構造上、我々のグループが予測した終止コドン塩基に対する直接結合部位と近接するものの、いずれの eRF1 単体 / 複合体構造においてもドメイン外に突出して配向する性質を示していた。一方、これまでに明らかにした eRF1/eRF3 (古細菌 aRF1/eEF1A) とリボソームのドッキングモデルの観察から、この L123 残基は eRF1 と終止コドン塩基との複合体形成インターフェースではなく、tRNA のコドンと mRNA 上のアンチコドンとの正しい対合状態を感知するリボソーム機能残基との相互作用に関わることが示唆された。

この L123 残基機能性を詳細に解明するため、出芽酵母 eRF1 とヒト由来 eRF1 の相当部位との双方に対し網羅的アミノ酸置換体を作成し、酵母内での機能解析を行った。その結果、この L123 残基について、側鎖の物理化学的・立体化学的特性とコドン認識能の間には密接な関連性が存在すること、L123 残基変異体の示すコドン認識機能は、これまでに分離された塩基認識部位のコドン認識変異体とは異なり、eRF3 との適切な相互作用を前提として機能すること、が明らかになった。このことは、eRF1 と eRF3 との結合インターフェースにおける適切な相互作用が、最終的に eRF1 のコドン認識部位の機能を介して、tRNA 同様にリボソームの機能部位に感知され、その結果リボソームの大小サブユニットのアロステリック構造変換を引き起こすことで、正しい終止コドン認識が行われるという新規なモデルの提案につながった。

(3) mRNA 品質管理機構における Pelota-HBS1tRNA 擬態分子複合体と同様な機能性を発揮すると考えられている EF1 ホモログである出芽酵母 Ski7 タンパク質は、これまでにおおまかな機能ドメイン解析しかされていなかったため、mRNA 品質管理機構の分子機序を推測する上で支障となっていた。

これに対し、系統的な変異導入実験もしくは分子遺伝学的な変異選択系の構築をおこなうことにより、N 末端領域、C 末端領域における NSD 関与アミノ酸残基を特定することに成功した。Ski7 の特定の機能性アミノ酸残基が同定されたのはこれが初めてである。

これらの変異体の多くは、ドミナントネガ

ティブに NSD を阻害すること、また、その効果は HBS1-Pelota タンパク質複合体非存在下で増強することなどを見いだした。これらの事実は、Ski7 がリボソーム上で機能するうえで、 Guanine nucleotide dependent に結合をオン / オフする仕組みを備えていることや、その結合モードが HBS1/Pelota 複合体とも競合していることを示唆している。

一方、立体構造データを用いた議論から、Ski7 の G ドメインの GTP 結合想定領域に隣接する領域が NSD 制御に関わることが判明した。

これらの実験結果から、C 末端側での Guanine nucleotide 結合モードと N 末端側での分子間相互作用が共役する分子作用モデルを提案した。

(4) タンパク質合成過程における品質管理機構は、異常な翻訳が生じた際に、監視機構により検知し、合成中のタンパク質合成装置であるリボソーム複合体の解体 (リボソームレスキュー) とペプチド鎖をプロテアソームにより速やかに分解する。これらの分子機構に関わるユビキチンライゲースやタンパク質の分解経路は明らかになってきたが、監視機構が最初に検知する分子種やそのメカニズムは依然と不明であった。

我々は出芽酵母を用いた異常停滞の分子遺伝学モデルシステムを構築し、特定のリジン残基を系統的にアラニン残基に置換したユビキチン変異体のシリーズを作成し、特定のリジン残基部位の結合によるポリユビキチン鎖伸長が阻害した影響を検討した。

その結果、K63A タイプのポリユビキチン鎖のみが、細胞内で過剰発現させたときに特異的にリボソーム異常翻訳の検視機構を阻害することが明らかになった。さらに、K63 以外のユビキチンのリジン残基をアラニンに置換した変異体では、同様な阻害効果はみられないため、この品質管理機構の発現には、K63 タイプのポリユビキチンが関わることが初めてしめされた。

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) K Saito, W Horikawa, K Ito "Inhibiting K63 Polyubiquitination Abolishes No-Go Type Stalled Translation Surveillance in *Saccharomyces cerevisiae*" *PLoS Genet.*, 査読有, 11 巻:e1005197. (2015 年)
doi: 10.1371/journal.pgen.1005197

(2) K Saito, K Ito "Genetic analysis of L123 of the tRNA-mimicking eukaryote release factor eRF1, an amino acid residue critical for discrimination of stop

codons” Nucleic Acids Res, 査読有, 43 巻, P4591-601. (2015 年)
doi: 10.1093/nar/gkv376

(3) 伊藤耕一、和田美紀、遠藤慧 “真核生物の tRNA 分子擬態複合体による遺伝暗号解読機構 (特集 パラダイムシフトする翻訳制御研究)” 細胞工学, 査読無, 34 巻, P745-749. (2015 年)

(4) M Wada, K Ito “A genetic approach for analyzing the co-operative function of the tRNA mimicry complex, eRF1/eRF3, in translation termination on the ribosome.” Nucleic Acids Res., 査読有, 42 巻, P7851-7866. (2014 年)
doi: 10.1093/nar/gku493

(5) K Ishikawa, K Ito, J Inoue, K Semba “Cell growth control by stable Rbg2/Gir2 complex formation under amino acid starvation” Genes to Cells, 査読有, 18 巻, P859-872 (2013 年)
doi: 10.1111/gtc.12082

(6) Y Li, OTP Kim, K Ito, K Saito, T Suzuki, T Harumoto “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, 査読有, 164 巻, P440-449 (2013 年)
doi: 10.1016/j.protis.2013.02.004.

〔学会発表〕(計 8 件)

(1) 奥村知之、田村浩二、伊藤耕一 “eIF4A ファミリータンパク質の機能ドメインの互換性検証” 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会 2015 年 12 月 1 日-12 月 4 日 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

(2) 伊藤耕一 “tRNA 擬態タンパク質による遺伝暗号解読システムの拡張” 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会 2015 年 12 月 1 日-12 月 4 日 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

(3) 堀川航、伊藤耕一 “伸長因子 EF1- α ホモログ G タンパク質 Ski7 の変異体解析” 第 16 回日本 RNA 学会 2014 年 7 月 23 日-7 月 25 日 ウィンクあいち (愛知県名古屋市)

(4) 和田美紀、伊藤耕一 “真核生物翻訳終結複合体 eRF1/eRF3 の協調的機能領域の新規同定” 第 16 回日本 RNA 学会 2014 年 7 月 23 日-7 月 25 日 ウィンクあいち (愛

知県名古屋市)

(5) Kazuki Saito, Wataru Horikawa, Koichi Ito “Role of polyubiquitination specific for control of stalled translation” EMBL Symposia The Complex Life of mRNA 2014 年 10 月 5 日-10 月 8 日 Heidelberg (ドイツ国)

(6) 斎藤和紀、伊藤耕一 “終止コドン解読における eRF1 と eRF3 の共役の解析” 第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 5 日 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

(7) 小林幹、斎藤和紀、石谷隆一郎、伊藤耕一、濡木理 “古細菌由来 aRF1-aEF1-GTP 複合体による翻訳終結機構の構造基盤” 第 15 回日本 RNA 学会年会 2013 年 7 月 24 日~7 月 24 日、愛媛県民文化会館-ひめぎんホール (愛媛県松山市)

(8) 堀川航、和田美紀、伊藤耕一 “出芽酵母における EF-1 ホモログ G タンパク質 Ski7 の機能ドメイン解析” 第 15 回日本 RNA 学会年会 2013 年 7 月 24 日~7 月 24 日、愛媛県民文化会館-ひめぎんホール (愛媛県松山市)

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号: