

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23657071

研究課題名(和文) tRNA擬態複合体分子による普遍遺伝暗号解読機構の解明

研究課題名(英文) A functional study on the tRNA mimicry complexes in genetic decoding.

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) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：我々は遺伝暗号解読ならびにmRNA品質管理機構におけるtRNA擬態分子の性質を明らかにするために以下の研究を行った。1. 万能型古細菌aEF1とtRNA擬態分子との新規複合体結晶構造解明と生化学解析、2. 新たな遺伝学系の構築と解析。その結果、tRNA擬態分子複合体形成に関わる結合インターフェースの新知見、ならびに、tRNA分子のアンチコドンループに擬態するtRNA擬態分子のコドン認識部位の極近傍に存在する新たな機能部位などを明らかにすることができた。これらの新規な機能領域はリボソームの遺伝暗号解読機構や、mRNA品質管理機構において翻訳GTPaseスイッチによる制御に関わるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the molecular characteristics of tRNA-mimicking proteins involved in genetic decoding and mRNA surveillance, we have conducted following experiments. (i) Structural and Biochemical analyses for the complexes of omnipotent archaeal translation elongation factor (aEF1 $\alpha$ ) with tRNA mimicry proteins (aRF1, aPelota). (ii) Genetic analyses for the functionality of tRNA-mimicking complex on the ribosome. These analyses revealed that the specific regions are located in the binding interface of the tRNA-mimicking complexes and that a novel functional site adjacent to the codon recognition site, on the tip domain that mimics the tRNA anticodon-loop is crucial for their functionality. These novel domains likely participate in decoding and mRNA surveillance, coupled with the GTPase switch function on the ribosome.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：タンパク質合成 tRNA分子擬態 遺伝暗号 mRNA品質管理 Gタンパク質 リボソーム 翻訳終結 翻訳調節

## 1. 研究開始当初の背景

終止コドン解読と tRNA 擬態タンパク質：申請者はこれまで、なぜ終止コドンの解読のみが tRNA を必要としないのかという難題を解決するために、ペプチド鎖解離因子 (= 以後、解離因子、RF) が tRNA の構造と機能をまねることでリボソーム機能の巧みな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 (PNAS 93: 5543-5448 (1996)) 精力的にその実証を進めてきた。昨年、真核生物の終止コドン解読において、tRNA 擬態性解離因子 eRF1 と G タンパク質解離因子 eRF3 が、tRNA とそのリボソームへの運搬因子である EF1 (EF-Tu) との複合体に酷似する構造を形成することを示した (Genes&Dev 23:1106-1118 (2009))。これにより真核生物の遺伝暗号解読は「G タンパク質因子 + tRNA (tRNA 擬態タンパク質)」という普遍機構 (狭義の遺伝暗号解読機構) で触媒されることが明らかになり、タンパク質によるリボソーム乗っ取りの分子基盤が初めて明らかにされた。

遺伝暗号解読における古細菌 EF1 の万能性の発見：その一方で、真核生物に類似する翻訳因子群を保持する古細菌の各種ゲノム解析では、tRNA 擬態タンパク質 eRF1 の相同因子 (aRF1) の高度な保存性に対して eRF3 対応する G タンパク質の不在が指摘された。本年、我々は遺伝生化学的解析により、真核 eRF3 に対応する古細菌 G タンパク質因子は EF1 そのものであることを発見した。さらに、真核生物で mRNA 品質管理機構への関与が示された Pelota (酵母では Dom34) タンパク質も、対応する G タンパク質 (Hbs1) が古細菌では不在とされていたが、古細菌由来 Pelota が tRNA および aRF1 と競合的に EF1 と結合し、それぞれ 3 者とも酷似する複合体を形成することも実証した。これは、真核生物で 3 種類の EF1 ファミリー-G タンパク質が別々に行う mRNA 遺伝暗号の解読過程を、古細菌では一つの EF1 で行う (= 万能性) という新発見である。また、翻訳伸長、翻訳終結、mRNA 品質管理の 3 過程の普遍分子機構基盤の存在も示唆する

## 2. 研究の目的

リボソームの全原子構造が決定された現代においても mRNA 上の終止コドンを読替える遺伝暗号読替機構 (RECODING) や、不良 mRNA の選別分解により健全な細胞状態を保つ mRNA 品質管理機構などの高次の遺伝暗号解読機構の分子理解は遅れている。これらは、高等動物の疾患発症にも深く関わり医学応用的観点からも解明は急がれる。申請者は、これらの高次機能発現に関わる翻訳タンパク質因子群 (そ

れぞれ、eRF1/eRF3 および、HBS1/Pelota) の間に普遍的な G タンパク質・tRNA 擬態タンパク質複合体構造 (Genes & Dev 23:1106-1118 (2009)) を見いだした。本研究は、この新知見の生化学的・分子遺伝学的な検証を行う事で、tRNA 群に tRNA 擬態タンパク質群を加えた、タンパク質合成の高次機能発現を可能にする新概念 "広義の遺伝暗号解読" システムを解析しその分子基盤を明らかにする。

## 3. 研究の方法

本研究計画は、申請者らによって真核生物・古細菌に見いだされた翻訳伸長因子 EF1 と tRNA 擬態複合体とによる擬態構造形成とその作用機作の分子基盤を解明するための実験を計画する。具体的には、以下の項目に大別して実施する。

【1】tRNA 擬態複合体による mRNA 品質管理機構の分子機序解明：遺伝学解析系や生化学解析系を構築し、上記知見も応用し、EF1 (Hbs1)・Pelota (Dom34) 複合体によるリボソーム遺伝暗号翻訳機能への作用を解明する。

【2】EF1 上の共通結合インターフェースの分子レベル解明：X 線結晶構造解析 (文献 1, 2) で明らかにした新規構造をもとに、古細菌 EF1 が、なぜ共通の結合領域で核酸 (tRNA) とタンパク質 (aRF1, Pelota) 双方を結合することが出来るかを詳細に解析し、真核生物での EF1 の機能分化とターゲット (tRNA・tRNA 擬態タンパク質) 特異性の分子機構を解明する。

## 4. 研究成果

構造生物学研究グループ (東大・理・濡木理教授) との共同研究により aRF1・aEF1・GTP の結晶構造の決定に成功した (Nucleic Acids Res. 40: 9319-28 (2012))。この複合体結晶により、単体 aRF1 および、aPelota・aEF1・GTP 複合体から推測された、aRF1 と aEF1 の 2 カ所の主要結合インターフェース部位、Site 1, Site 2 の結合様式が確認された。また、それと同時に、本研究で目標とした、EF1 上の共通結合インターフェースについての詳細な分子レベル情報に基づく解析が可能となった。

これまでに aEF1 上の結合インターフェース部位に見いだされた aRF1, aPelota それぞれに対する特異的なアミノ酸残基間の相互作用に関して、変異の導入を行い、in vivo, in vitro 実験で検証した。これらの検証から、aEF1 の tRNA 及び二つの tRNA 擬態分子 aRF1, aPelota に対する共通結合インターフェースには、全ての因子に共通する機能部位が保存される一方で、それぞれの因子との結合に特異性を付与する相互作用に関わるアミノ酸

残基が存在することが明瞭になった。この新知見は、翻訳伸長 (tRNA)、翻訳終結 (eRF1)、mRNA 品質管理機構 (aPelota) のそれぞれの分子過程が、リボソームの共通する触媒分子機構を共有することで実現されていること、さらには、古細菌と真核細胞に共通する進化初期段階から今日に至るまでの間に、高機能なタンパク質合成制御を可能にするべく、万能な祖先型 EF1 (aEF1) から、それぞれ個別の過程専用に機能する翻訳 GTPase が分化してきた仮説を強く支持するものである。

一方、核酸分子を含まない遺伝暗号解読に関わる tRNA 擬態複合体がリボソーム上でどのように機能するかという問題は、構造生物学的なアプローチにより推測され仮説が立てられてきたが、具体的に、リボソーム上のどの部位の機能性が重要であるか、また、tRNA による遺伝暗号解読機構との類似点、相違点について等についてはこれまで手がかりが得られていなかった。

今回我々は、これらの点について新たな手がかりを得るために、酵母由来の tRNA 擬態分子との機能協調性に欠損を示す異種由来の翻訳 GTPase を用い、ヘテロ種から構成される tRNA 擬態複合体分子全領域に分離されるサプレッサー変異体を用いた新たな系を構築し解析を進めた (Nucleic Acids Res. In press (2014))。

その結果、リボソーム上で tRNA 擬態複合体による機能発現に関わる機能領域を新たに特定することができた。具体的には、tRNA 擬態分子である eRF1 の tRNA のアンチコドンステムループ (ASL) 領域に相当するアンチコドン機能部位の近傍に存在する機能領域、および、eRF1 の複合体形成に関わる二つの構造ドメインを連結するヒンジ領域である。前者は、これまでバクテリア解離因子において報告してきたリボソーム RNA の重要機能領域に相互作用する部位に対応することが期待される。後者は、mRNA 品質管理において機能する Pelota にも共通して保存される領域であり、この領域が、mRNA 品質管理機構の分子機序を理解する上でも重要であることを強く示唆する。

また、上述の結合インターフェースにも数多くの特徴的な変異が分離された。変異体の機能評価により、これまで複合体の結合強度と翻訳終結活性の相関性が必ずしも正しくないことが、変異体の翻訳終結活性測定と酵母 2 ハイブリッド法による結合強度測定の比較により明らかとなった。このことは、翻訳伸長でみられているような、リボソーム結合前の翻訳 GTPase と tRNA の強固な結合を前提とせず、tRNA 擬態分子と GTPase が部分的な相互作用の状態、もしくは分離した状態でリボソームに結合し、その後のコドン認識と

GTPase 活性発現の際に、より密接な機能協調により GTPase 発現を行う興味深い可能性を示唆するものである。

これらの知見は、tRNA 擬態分子が tRNA 機能・形態への擬態を通して、リボソーム上に存在する機能部位を tRNA と共有しつつも、タンパク質固有の方法で拡張する分子機構の存在を示すものであると考えられる。

## 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)

Wada M, Ito K: 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.* in press (2014) (査読有)

DOI:10.1093/nar/gku493

Li Y, Kim OT, Ito K, Saito K, Suzaki 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.* 164: 440-9 (2013) (査読有)

DOI:10.1016/j.protis.2013.02.004

Ishikawa K, Ito K, Inoue JI, Semba K.: Cell growth control by stable Rbg2/Gir2 complex formation under amino acid starvation. *Genes Cells.* 18:859-872 (2013) (査読有)

DOI:10.1111/gtc.12082

Kobayashi K, Saito K, Ishitani R, Ito K, Nureki O.: Structural basis for translation termination by archaeal RF1 and GTP-bound EF1 complex. *Nucleic Acids Res.* 40: 9319-28 (2012) (査読有)

DOI:10.1093/nar/gks660

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

[学会発表](計 12 件)

斎藤和紀、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

堀川航、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、愛媛県民文化会館・ひめぎんホール 松山市道後

Saito 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

Horikawa W, 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

Saito K, 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

Wada M, Genetic Analyses of Critical Sites for eRF1-eRF3 Interplay in Translation Termination, June 12-18, 2011, Kyoto, Kyoto International Conference Center

〔図書〕(計 4 件)

Asano, K. Ito, K.: Translation Elongation, In Werner Dubitzky, Olaf Wolkenhauer, Kwang-Hyun Cho, Hiroki Yokota (Eds.), Encyclopedia of systems biology, New York: Springer (2013)

Saito, K. Ito, K.: Translation Termination, In Werner Dubitzky, Olaf Wolkenhauer, Kwang-Hyun Cho, Hiroki Yokota (Eds.), Encyclopedia of systems biology, New York: Springer (2013)

Saito, K. Ito, K.: Ribosome Recycling, In Werner Dubitzky, Olaf Wolkenhauer, Kwang-Hyun Cho, Hiroki Yokota (Eds.), Encyclopedia of systems biology, New York: Springer (2013)

Saito, K. Ito, K.: Evolution of Elongation Factor 1 Alpha, In Werner Dubitzky, Olaf Wolkenhauer, Kwang-Hyun Cho, Hiroki Yokota (Eds.), Encyclopedia of systems biology, New York: Springer (2013)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：