

研究課題別評価書

1. 研究課題名

終止コドンを経した mRNA 動態制御機構の解明と応用

2. 氏名

伊藤 耕一

3. 研究のねらい

現存する生命は、終止コドンに様々な意味を付け加え多様な新機能性を獲得してきましたが、そのメカニズムは未解明です。終止コドンは、核酸であるtRNAではなく、ペプチド鎖解離因子と呼ばれるtRNA擬態タンパク質によって解読されます。本研究では、真核細胞におけるペプチド鎖解離因子の関わる多彩なRNA制御機能を解析し、RNAとタンパク質の世界をつなぐ生命原理の基盤を明らかにし、さらにその応用を目指します。

4. 研究成果

我々は、tRNAの機能・構造を模倣することで、終止コドンの解読を媒介するタンパク質因子、ペプチド鎖解離因子をtRNA擬態タンパク質として位置づけ、その分子機構解明のための研究をすすめてきた。これまで先行して行ってきたバクテリア解離因子の研究から、タンパク質が実際にtRNA様の機能性を発揮する分子機構が数々明らかになっている。バクテリアの終止遺伝暗号解読は、(1)終止コドン特異性を示す解離因子がリボソームの遺伝暗号解読部位(DC)において、担当するコドンの解読を行うという点、(2)リボソームのペプチド転移活性中心部位(PTC)の活性化を伴うという点でtRNAに類似する一方、(3)翻訳伸長因子EF-TuのようなキャリアGタンパク質を必要としないという点で根本的な相違点が見られる。その後の機能・構造解析では、リボソーム機能時のバクテリアペプチド鎖解離因子の構造は、tRNAの主要な機能部位を模倣しつつ、単独でリボソームに結合し機能する特殊な構造を発達させたことが明らかになってきた。

一方、真核生物の翻訳終結においては、上記の、tRNAによる遺伝暗号解読機能との共通点(1)(2)を示す、ペプチド鎖解離因子eRF1に加え、(3)に関しても、EF-Tu(真核生物ではEF-1 α)に高い相同性をもち、必須な第二の解離因子サブユニットeRF3が存在しeRF1と結合することで複合体を形成し機能するという共通点が見られる。

バクテリアと真核生物の解離因子は、アミノ酸配列上の相同性が乏しく、反応の詳細も上述のように異なり、進化の途上全く異なる経路で確立したシステムと考えられた。このように真核生物の終止コドン解読機構は最後に残された未解明の遺伝暗号解読機構といえる。同時に、終止コドンの認識を介して引き起こされる遺伝子発現制御であるリコーディング機構や、NMDなどのmRNA品質管理機構を解明し、新規タンパク質合成や制御や疾病治療等、医工学的に応用する期待が高まっており、eRF1およびeRF3の機能構造解明を急ぐ必要があった。

我々は、まず、真核生物解離因子の複合体構造解明を試み、eRF1-eRF3の複合体構造をX線結晶解析と、X線小角散乱法を組み合わせた補完手法で解明した。複合体構造に見られた

特徴的部位の機能解析を実施し、検証した結果、これまでに明らかにしていた単体立体構造からでは理解できなかった解離因子固有の機能モードを分子レベルで解明する決定打を得ることに成功した。以下のように要約される。

【1】真核生物eRF1-eRF3複合体のEF-Tu+tRNAシステム形態擬態性

eRF1とeRF3・GTPの複合体は、EF-Tu+tRNA・GTP複合体に酷似する立体構造をとり、tRNA同様に、eRF1のコドン解読部位と、大サブユニット側のペプチド鎖転移活性中心で機能するGGQモチーフがtRNA機能部位と対応して配向する(図A参照)。EF-Tu様のキャリアGタンパク質を必要としないバクテリアとは全く異なり、真核生物では終止コドンの解読も、リボソームへの解読因子の運搬と終止コドンのブルーフリーディングといったtRNAと同様なGタンパク質制御システムを持つことが強く示唆される。

【2】eRF1のコドン認識機能ポケットの同定

新規eRF1結晶構造上のtRNAのアンチコドン対応部位にヌクレオチド結合部位(ATPポケット)を同定した(図A)。この結合部位のアミノ酸残基置換により、終止コドン2番目と3番目の塩基特異性を改変することが可能になった。また、3つの終止コドンのうち、異なる終止コドン特異性を保持する二つの変異体型ヒトeRF1を同時に酵母内で発現することにより、真核生物においてバクテリアライクな終止コドン運用が実現可能なことを示した("Dual eRF1 System")。Dual eRF1 Systemは、本研究において、真核生物で初めて実現可能なことが示されたバクテリア様終止コドン認識システムであり、終止コドン特異的なリコーディングを個別に解析したり、リコーディング機構を応用した新規なタンパク質産生に活用することができる。また、この技術を用いる事で、1アミノ酸残基が異なるだけのeRF1どうしの比較解析でコドン認識状態(Cognate vs Non-cognate)の比較解析が可能になった。自然界に存在する変則的遺伝暗号認識を示すeRF1はこのポケット部位の制御を行う事で変則性を獲得したものと考えられる。

【3】複合体上に見いだされた2カ所の主要なeRF1-eRF3結合インターフェース領域

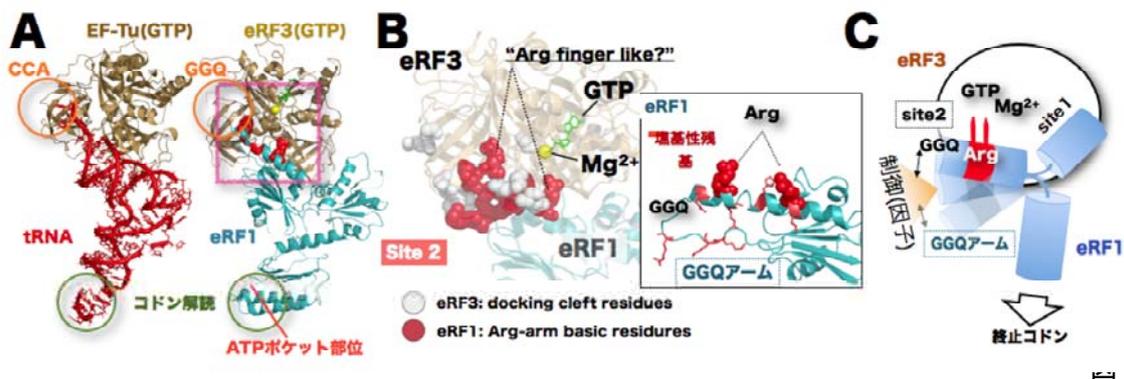
eRF1とeRF3の結合部位は、eRF3上の2箇所(Site1, Site2; 図C)に明確に分割され、細胞質ではSite1での結合のみが優先的にグアニンヌクレオチド非依存的に起きている。Site2には、tRNAのCCAアームに対応するeRF1の可動性ドメイン(GGQアーム)が結合しうが、細胞質中のeRF3は、GDPフォームに偏っておりリボソーム上で初めてGTPの結合促進が起きると想定されている。そのため、eRF1の可動性の高いドメイン間連結構造によりGGQアームはフリーな可動性を維持する。この可動構造により、tRNAシステムのような、リボソーム上で正しい終止コドン認識とGTPase活性発現がカップルした機能の実現可能になると考えられると同時に、リボソームAサイトで終止コドン認識を行った後で、accommodationステップとして、tRNAがCCAアームを向けPTCの活性化によるペプチド転移を受けるのと同様な機能性が発揮できるのだと思われる。

【4】eRF1タンパク質によるeRF3-GAP機能モデル

Site2にGGQアームが結合した後のeRF3のGTPase活性発現は、eRF1のArg-richアームからeRF3の活性中心方向に突き出た、保存性アルギニン残基が重要である(図B)。これは、Ras-RasGAPタンパク質間のGTPase活性化機構において、RasGAPからRasの提示されることで

電化の中和とGTPaseの促進化を引き起こすアルギニン残基(Arg-finger)を想起させる。このことによりコドン認識が正しく起きてもGGQアームがSite2にアクセスしない限り、リボソーム上でのGTPase活性が正しく促進されないため、これまでに示唆されてきた解離因子に結合する。機能制御因子はこの構造上の遊びをターゲットにする可能性が高い(図C)。これにより、アミノアシル化がなくともリボソーム上で3者複合体が適切に形成されたときに初めてGTPaseが誘引されることが合理的に説明できる。

上記、【3】【4】で示された構造と機能モデルは、これらの結合インターフェースが、本研究で目標にしてきた、eRFの機能性をターゲットとする創薬研究の重要部位であることを示唆するものである。



(A) 伸長因子EF-Tu・tRNA (GTP) の立体構造(左)と、本研究で得られたeRF1・eRF3 (GTP) の立体構造モデル。eRF1・eRF3(GTP)の立体構造は、全体として酷似した形態をとり、真核生物においては、バクテリアよりも終止コドンの解読がtRNAに類似することを強く示唆した。本研究では、tRNA(左)に示した、コドン解読部位(緑○)であるアンチコドンに対応した部分にATP分子が結合した立体構造を取得し、その機能解析を行い、この部位は実際にコドン識別に関与を示すことができた。(B)(C)詳細は本文参照。

5. 自己評価

本研究では、「なぜ、どのようにタンパク質が終止コドンを解読するのか？」に答えるために、真核生物ペプチド鎖解離因子eRF1およびeRF3の複合体構造を解明することで、そこから得られた新しい翻訳終結機能モデルや、新概念・モデルの実証を行ってきた。新知見によるモデルは、これまでにバクテリア研究で得られていた解離因子のtRNA擬態性の通常概念を破る側面を示しており、これまでの相違点を包括的に説明することができる。タンパク質がタンパク質合成のために、RNAではなし得なかった巧みな制御機能構造を進化させた筋道は印象深く、特にGTPaseの活性化機構は、その他の生理機能に関わる数多くのGTP結合性タンパク質の機能性を考える上で重要な手がかりを提供できたと思う。これらは、今後終止遺伝暗号と共役する生命機能をターゲットとする、医工学的応用のターゲット部位として重要であると考えられる。

6. 研究総括の見解

mRNA上のコドンの内、終止コドンはtRNAではなく、ペプチド鎖解離因子と呼ばれるタンパク質に認識される。ペプチド鎖解離因子は、tRNA擬態タンパク質として知られている。本研究では、真核

細胞における、終止コドンを紹介したmRNA動態制御機構の解明を目指した。真核細胞の翻訳終結においては、ペプチド鎖解離因子eRF1と解離因子サブユニットeRF3が結合した複合体が機能することが明らかになっていた。そこで、本研究では、eRF1-eRF3の複合体構造をX線結晶解析とX線小角散乱法を組み合わせで解明し、複合体構造に見られた特徴的部位の機能解析を行い、終止コドン認識システムなど、解離因子固有の機能解明を進めたものである。本研究で明らかとなった成果は、今後終止コドンと共役する生命機能をターゲットとした応用研究の基盤として貢献するものと期待される。

7. 主な論文等

A. さきがけ個人研究者主導で得られた成果で主なもの

①論文

1. Zhihong Cheng, Kazuki Saito, Andrey V. Pisarev, Miki Wada, Vera P. Pisareva, Tatyana V. Pestova, Michal Gajda, Adam Round, Chunguang Kong, Mengkiat Lim, Yoshikazu Nakamura, Dmitri I. Svergun, Koichi Ito, and Haiwei Song Structural insights into eRF3 and stop codon recognition by eRF1 *Genes & Development* 23: 1106–1118 (2009)
2. Kodama, H., Ito, K., Nakamura, Y. The role of N-terminal domain of translational release factor eRF3 for the control of functionality and stability in *S. cerevisiae* *Genes Cells*. 5 639–650 (2007).

②著書

1. 翻訳調節における翻訳終結制御機構の新知見
伊藤 耕一 *実験医学* 25(1), 19–24, 2007

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

①論文

1. Oanh Thi Phuong Kim, Aki Sakurai, Kazuki Saito, Koichi Ito, Kenji Ikehara, Terue Harumoto Ciliates use both variant and universal genetic codes: Evidence of omnipotent eRF1s in the class Litostomatea *Gene*. 417 51–58 (2008)