

学 位 論 文 題 名

The control of translational fidelity
by translational apparatuses

（翻訳関連因子による翻訳精度の制御機構）

学位論文内容の要旨

mRNA へと転写された遺伝情報は、リボソームがアダプター分子であるアミノアシル (aa-) tRNA を介して mRNA 上のコドンに対応したアミノ酸を正確に重合させていくことによって、最終的に目的のタンパク質分子の合成・発現へと至る。これらの過程は数多くの翻訳関連因子の協調的な作用により、非常に高い精度を維持しながら、環境に応じて柔軟かつ速やかに制御されている。本研究では特に tRNA のアミノアシル化反応の精度維持機構、および翻訳開始位置認識機構に焦点を当て、それぞれの過程で中心的に作用する分子であるアラニル tRNA 校正ドメインおよび a/eIF2 の構造学的解析を行い、2 つの異なる側面から翻訳精度維持・制御機構の分子基盤を明らかにした。以下に論文の内容に沿った要旨を示す。

遺伝暗号におけるコドンとアミノ酸の対応は、各アミノ酸に対応した 20 種類のアミノアシル tRNA シンセターゼ (aaRS) の基質選択性によって直接的に決定・維持されているため、aaRS の基質認識精度は翻訳反応全体の正確性に根本的に重要である。しかし、一部の aaRS においてアミノアシル化サイトのアミノ酸選択性が目的のアミノ酸とよく似たアミノ酸を完全に識別するには不十分であるため、誤ってチャージされた産物のみを特異的に加水分解する付加的な校正ドメインによる 2 段階のアミノ酸選別機構によって最終的な精度が維持されている。これまでに様々な aaRS の校正機構について詳細に研究されているが、Ala-tRNA シンセターゼ (AlaRS) の校正機構については余り明らかではない。AlaRS のアミノアシル化サイトでは、目的の Ala に加えて Ala より大きく親水性の Ser やより小さな Gly も誤って受容されうることから、校正サイトではこれらのアミノ酸から Ala のみを除外して加水分解する必要があるが、このようなアミノ酸の識別は他の aaRS の校正サイトでよく見られるような単純な立体障害では説明できない。本研究ではアラニル化システムにおけるアミノ酸識別機構を明らかにするため、AlaRS 校正ドメインのホモログである AlaX と $_{\text{L}}\text{Ser}$ の複合体構造解析および変異体解析を行った。Ser 分子は AlaX 分子中央のくぼみに結合しており、主鎖部分を保存的された亜鉛結合モチーフ、側鎖 $\gamma\text{-OH}$ 基を反対側の親水性ポケットに向けていた。特に親水性ポケットの入り口付近において、保存された

Thr30 の側鎖 OH 基が Ser 分子側鎖のβ炭素 (Ala の側鎖に相当) とファンデルワールス半径に近い 3.7Å の距離に位置していたことから, Ala がβ-炭素と Thr30-OH 間の化学的反発力によって校正サイトから排除されるのに対して, Ser はγ-OH 基と親水性ポケットの密な水素結合によってβ-炭素の不利な相互作用を埋め合わせることで受容される「Chemical discrimination」モデルが示唆された. この仮説を確かめるため Thr30-OH のサイズを変えずに疎水基へと置換させた T30V 変異体のアミノ酸特異性を調べたところ, Ser に対する受容能をそのままに Ala を受容するようになったことから, Thr30-OH 基が確かに Ala と Ser の識別に重要であることが明らかとなった. また, AlaRS においても AlaX-Thr30 に相当する Gln633 が完全に保存されており, 同様に疎水基に置換した Q633M 変異体がやはり Ala を受容するようになったことから, Chemical discrimination モデルは AlaRS でも保存されていることが示唆された.

aaRS により正確に合成された aa-tRNA は, いわゆる伸長過程において mRNA のコドンに対応して次々とリボソームへと運搬されペプチド鎖へと変換されていく. コドントリプレットの読み枠は, 開始段階において開始因子と呼ばれるタンパク質群の働きによって翻訳開始位置が厳密に認識されることによって決定される. また開始段階は様々な外部ストレスやあるいは発生過程の違いによって複雑に調節されており, 翻訳過程において最も複雑なステップとなっている. eIF2 は真核生物の開始段階で中心的な役割を果たす開始因子で, GTP 依存的に開始 Met-tRNA_i をリボソームに運搬し, 開始コドンの認識に伴って GTP を加水分解し, 遊離する. 3 つのサブユニット, α, β, γそれぞれの解析からγサブユニットが Met-tRNA_i と GTP 結合, αが調節, βが他の因子の足場として重要であることが判明しているが, これらがどのように協調的に作用して, Met-tRNA_i を結合・解離するのか, あるいはどのように開始コドン認識シグナルから GTP 加水分解, 因子の遊離に至るのかはほとんど明らかではない. 本研究では古細菌由来ホモログである aIF2βγ複合体を GDP 存在下で構造解析することに成功し, βサブユニットがγサブユニットの GDP 結合サイトを取り囲むように結合することを明らかにした. また, βサブユニットのコアドメインはγサブユニットと局所的な相互作用のみで結合しており, γサブユニットと強く結合している N 末端領域とは長いループでつながれていたことと, βサブユニットコアドメインが単体の構造と比較して全体に大きく構造変化していたことから, βサブユニットの大きな可動性とそれに伴う結合様式の変化が機能性に重要であることが強く示唆された. 特に最も大きく構造変化していた C 末端の亜鉛結合ドメインが溶媒側に露出していたことと, このドメインの変異が GTPase 活性を促進させることから, おそらくリボソームを介して開始コドン認識シグナルが亜鉛結合ドメインの構造変化を引き起こし, 最終的に GTP の加水分解を促進するものと思われる. またさらに変異体解析により, βサブユニットの結合によって大きく構造変化していたγサブユニットの switch 1 モチーフが Met-tRNA_i 結合に非常に重要であることを明らかにした. 以上のことから, a/eIF2 の機能性には特にβ, γ双方のサブユニットの可動領域が重要であると推察される.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 勲
副 査 教 授 河 野 敬 一
副 査 助 教 授 福 井 彰 雅
副 査 助 教 授 渡 邊 信 久

学 位 論 文 題 名

The control of translational fidelity by translational apparatuses

(翻訳関連因子による翻訳精度の制御機構)

mRNA へと転写された遺伝情報は、リボソームがアミノアシル (aa-) tRNA を介してコドンに対応したアミノ酸を正確に重合させていくことによって、最終的に目的のタンパク質分子の合成・発現へと至る。これらの過程は数多くの翻訳関連因子の協調的な作用により、非常に高い精度を維持しながら制御されている。本研究は、特に tRNA のアミノアシル化反応の精度維持機構、および翻訳開始位置認識機構に焦点を当て、それぞれの過程で中心的に作用する分子であるアラニル tRNA 校正ドメインおよび a/eIF2 の構造学的解析を行い、2つの異なる側面から翻訳精度維持・制御機構の分子基盤を明らかにしたものである。

遺伝暗号は、アミノアシル tRNA シンセターゼ (aaRS) の基質選択性によって直接的に決定されているため、aaRS の基質認識精度は翻訳反応全体の正確性に強く影響する。しかし、一部の aaRS はアミノアシル化サイトのアミノ酸選択性が類似のアミノ酸を完全に識別するには不十分であるため、誤ってチャージされた産物のみを特異的に加水分解する付加的な校正ドメインによる 2 段階のアミノ酸選別機構によって最終的な精度を維持している。Ala-tRNA シンセターゼ (AlaRS) のアミノアシル化サイトでは、目的の Ala に加えて Ser や Gly も誤って受容されうることから、校正サイトではこれらのアミノ酸から Ala のみを除外して加水分解する必要があるが、このようなアミノ酸の識別を単純に説明することはできない。本研究ではアラニル化システムにおけるアミノ酸識別機構を明らかにするため、AlaRS 校正ドメインのホモログである AlaX と γ -Ser の複合体構造解析および変異体解析を行った。Ser 分子は AlaX 分子中央のくぼみに結合しており、主鎖部分を保存的された亜鉛結合モチーフ、側鎖 OH 基を反対側の親水性ポケットに向けていた。特に親水性ポケットの入り口付近において、保

存された Thr30 の側鎖 OH 基が Ser 分子側鎖の β 炭素 (Ala の側鎖に相当) とファンデルワールス半径に近い $3.7\text{\AA}$ の距離に位置していたことから, Ala が β -炭素と Thr30-OH 間の化学的反発力によって校正サイトから排除されるのに対して, Ser は γ -OH 基と親水性ポケットの密な水素結合によって β -炭素の不利な相互作用を埋め合わせることで受容される「Chemical discrimination」モデルが示唆された. この仮説を確かめるため Thr30-OH のサイズを変えずに疎水基へと置換させた T30V 変異体のアミノ酸特異性を調べたところ, Ser に対する受容能をそのままに Ala を受容するようになったことから, Thr30-OH 基が確かに Ala と Ser の識別に重要であることが明らかとなった. また, AlaRS においても AlaX-Thr30 に相当する Gln633 が完全に保存されており, 同様に疎水基に置換した Q633M 変異体がやはり Ala を受容するようになったことから, Chemical discrimination モデルは AlaRS でも保存されていることが示唆された.

翻訳反応におけるコドントリプレットの読み枠は, 開始段階において開始因子と呼ばれるタンパク質群の働きによって翻訳開始位置が厳密に認識されることによって決定される. また開始段階は様々な状況によって複雑に調節されており, 翻訳過程において最も複雑なステップとなっている. eIF2 は真核生物の開始段階で中心的な役割を果たす開始因子で, GTP 依存的に開始 Met-tRNA_i をリボソームに運搬し, 開始コドンの認識に伴って GTP を加水分解し, 遊離する. 3 つのサブユニット, α , β , γ それぞれの解析から γ サブユニットが Met-tRNA_i と GTP 結合, α が調節, β が他の因子の足場として重要であることが判明しているが, これらがどのように協調的に作用して, Met-tRNA_i を結合・解離するのか, あるいはどのように開始コドン認識シグナルから GTP 加水分解に至るのかは不明である. 本研究では古細菌由来 aIF2 $\beta\gamma$ 複合体を GDP 存在下で構造解析することに成功し, β サブユニットが γ サブユニットの GDP 結合サイトを取り囲むように結合することを明らかにした. また, β のコアドメインは γ と局所的な相互作用のみで結合しており, γ サブユニットと強く結合している N 末端領域とは長いループでつながれていることと, β コアドメインが単体の構造と比較して全体にわたり大きく構造変化していたことから, β の大きな可動性とそれに伴う結合様式の変化が機能性に重要であることが強く示唆された. 特に最も大きく構造変化していた C 末端の亜鉛結合ドメインが溶媒側に露出していることと, このドメインの変異が GTPase 活性を促進させることから, おそらくリボソームを介した開始コドン認識シグナルが亜鉛結合ドメインの構造変化を引き起こし, 最終的に GTP の加水分解を促進するものと思われる. またさらに変異体解析により, β の結合によって大きく構造変化していた switch 1 モチーフが Met-tRNA_i 結合に非常に重要であることを明らかにした. 以上のことから, a/eIF2 の機能性には β , γ 双方のサブユニットの可動性が重要であることが示唆された.

以上, 本研究は, 2 種類の重要な翻訳因子の複合体構造および変異解析により,

翻訳反応の精度維持・制御機構を研究したものである。本研究が生物科学に及ぼす貢献には多大なものがあると考えられ、よって審査員一同は申請者が博士（理学）の学位を得る十分の資格があるものと認めた。