



東京大学大学院農学生命科学研究科 小川 哲 弘

## tRNA を標的とする毒素に関する研究

## はじめに

微生物は、毒素を生産して他細胞を殺すことで、生態的優位性を獲得している。コリシンは、大腸菌およびその近縁種が生産する毒素であり、生産菌がもつ Col プラスミドに特異的インヒビターとともにコードされている。C末端に局在する活性ドメインが、大腸菌表面レセプターを介して細胞内に侵入し、標的因子に作用する。タンパク質合成を阻害するタイプの既知のコリシンは、すべて rRNA を切断してリボソームを失活させるリボヌクレアーゼ型であった。一方、コリシン E5、コリシン D は、タンパク質合成を阻害することが示唆されていたが、具体的な作用機構は不明であった。

## 1. tRNA のアンチコドンの特異的に切断する毒素の発見

翻訳を阻害するタンパク質毒素は、バクテリアに限らずこれまで多数報告されているが、ほぼすべて感受性細胞のリボソームを失活させる。これに対し、筆者らはコリシン E5 とコリシン D が、大腸菌 tRNA のアンチコドンループを特異的に切断するリボヌクレアーゼであることを明らかにした。コリシン E5 は、tRNA<sup>Tyr</sup>、tRNA<sup>His</sup>、tRNA<sup>Asn</sup>、tRNA<sup>Asp</sup> を、34 および 35 位の間（アンチコドン 1 および 2 文字目間）で切断する（図 1A）。一方、コリシン D は、4 種類の tRNA<sup>Arg</sup> アイソアセプターのうち細胞内量が最も多い tRNA<sup>Arg</sup><sub>ICG</sub> を第一標的とし、38 および 39 位間を切断する（図 1B）。以上の結果は、tRNA を標的とする生物毒として世界初の報告となった。また、RNase A や T1 などの既知の環状化リボヌクレアーゼは、切断末端に 5'-OH と 3'-リン酸基を形成する。ところが、コリシン E5、D の切断末端は、ともに 2,3'-環状リン酸であり、新規の触媒機構をもつことが示唆された。その後、酵母 *Kluyveromyces lactis* や *Pichia acaciae* が生産するキラー毒素が、それぞれ出芽酵母の tRNA<sup>Glu</sup><sub>UUC</sub>、tRNA<sup>Gln</sup> のアンチコドンループを切断することがわかった。これに加え、*prf* 遺伝子座をもつ大腸菌や、*Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2 などは、自身のもつ tRNA のアンチコドン切断するリボヌクレアーゼを発現する。以上を踏まえると、tRNA のアンチコドンループを特異的に切断するリボヌクレアーゼの一群が、自然界に広範に存在と考えられる。

## 2. コリシン E5, D の基質認識・触媒機構

コリシン E5, D の活性ドメイン（それぞれ E5-CRD, D-CRD と呼ぶ）の分子量は 1 万程度である。このようなコンパクトなタンパク質が、膨大な RNA の中からどのように標的 tRNA を認識するか、興味もたれた。生化学的実験により、E5-CRD が基質 tRNA の 34, 35 位に共通に存在する QU 配列（Q は G の修飾塩基）を認識することを明らかにした（図 1A）。また、34 位が未修飾の G である前駆体 tRNA も切断することから、Q と G とを区別しないことがわかった。特異性を保った最小基質は GpUp ジヌクレオチドであり、YGUA 配列（Y: ピリミジン）をループ内にもつヘアピン構造を最も効率良く切断する「RNA 制限酵素」であった。さらに、基質アナログ dGpdUp の結合した E5-CRD の結晶構造を決定した。その結果、E5-CRD が、RNA のワトソン・クリック塩基対と同じ化学結合で G および U を認識することがわかった。すなわち、E5-CRD は、mRNA のコドンに擬態して tRNA のアンチコドンに巧妙に認識し、切断する（図 2）。E5-CRD は、既知の環状化リボヌクレアーゼと相同性がなく、また触媒残基として共通に使われる His をもたない。代わりに Arg が必須の触媒残基として働き、転移反応による RNA 切断と、続けて起こる環状リン酸の加水分解という 2 段階の環状化リボヌクレアーゼ機構のうち、第 1 段階で反応が終了する新規の機構をもつことがわかった。さらに、D-CRD とインヒビター（ImmD）との共結晶構造を決定し、ImmD のアミノ酸残基が、基質 tRNA を分子擬態して D-CRD と結合することを明らかにした。この情報を基に、D-CRD と tRNA とのドッキングモデルを作製したところ、D-CRD が tRNA のアンチコドン 3 文字目の G36、および D アームと相互作用することが示唆され、実際、D-CRD の切断が G36 に強く依存することを実験で確認した（図 1B）。コリシン E5 とコリシン D の基質選択性は、アミノアシル tRNA 合成酵素などの翻訳に必須な酵素群に比べると厳密さに欠ける。これは、毒素であるがゆえに、認識の厳密性を二の次にして、第一標的を効率良く切断する戦略を取るためと考えられ、タンパク質・基質間の相互作用を考えるうえで重要な視点を提示した。

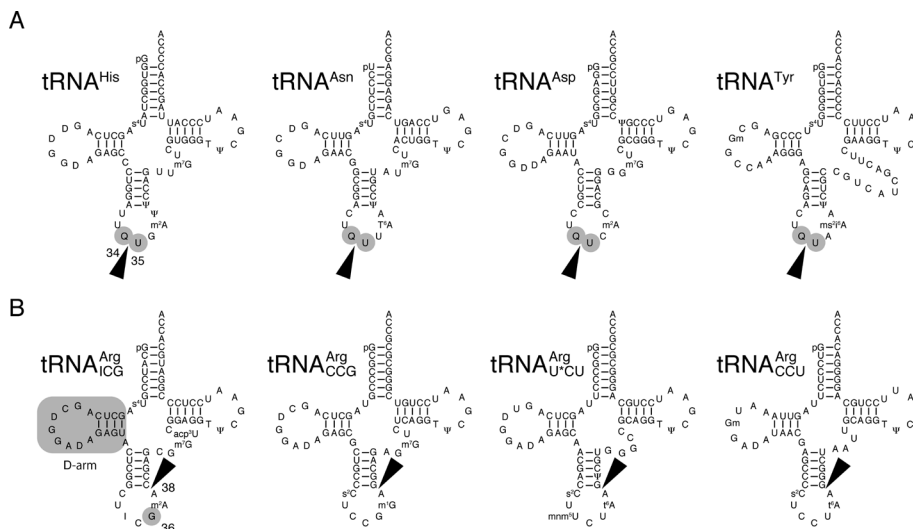


図 1 コリシン E5, D の標的 tRNA

矢印は切断部位を、塩基に添えた数字 (34, 35, 36, 38) は塩基番号を表す。認識される塩基および D アームを灰色で示した。

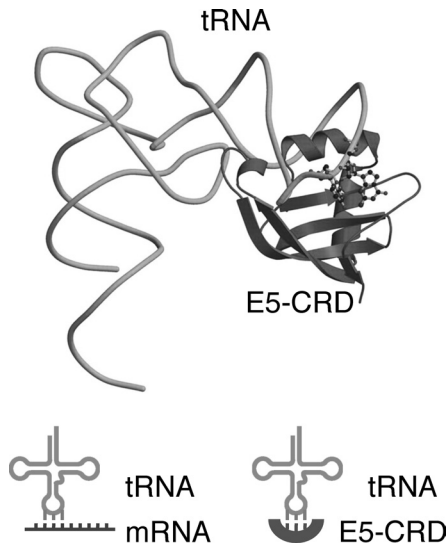


図2 E5-CRDによる分子擬態

### 3. tRNA切断による本当の翻訳阻害機構

コリシン D は、切断により tRNA<sup>Arg</sup> を分解、枯渇させて翻訳を阻害すると思われた。ところが、殺菌活性は、未切断 tRNA<sup>Arg</sup> 量には依存しなかった。また、試験管内翻訳系に対し、切断した tRNA<sup>Arg</sup> を加えると、ドミナントネガティブ様効果により翻訳が阻害された。これより、翻訳阻害は単純に tRNA 量が減少するためではないと考えた。切断された tRNA<sup>Arg</sup> は、細胞内で高次構造を維持することから、リボソームに運ばれる可能性がある。GTP で活性化された翻訳伸長因子 EF-Tu は、アミノアシル化された tRNA の 3' 末端と結合し、これをリボソーム A 部位へと運ぶ。EF-Tu と結合した tRNA のアンチコドンはむき出しになっており、コリシン D が切断できると考えた。そこで、D-CRD で切断した tRNA<sup>Arg</sup> の、EF-Tu・GTP との結合能を調べたところ、未切断 tRNA<sup>Arg</sup> と同等に結合した。また、EF-Tu・GTP・tRNA<sup>Arg</sup> 複合体中の tRNA<sup>Arg</sup> は、D-CRD により効率良く切断された。つまり、D-CRD は EF-Tu と競合せず tRNA<sup>Arg</sup> に作用する。以上より、コリシン D が切断した tRNA<sup>Arg</sup> は、EF-Tu により積極的にリボソーム A 部位へと運ばれることが推定された。しかし、切断された tRNA はペプチド転移できないため、リボソームが停滞し、翻訳が阻害されると結論した(図3)。すでに述べたとおり、E5-CRD も標的 tRNA のアンチコドンループを認識する。また、前述のキラー毒素の認識もアンチコドンループに集約されており、EF-Tu と競合せずに基質 tRNA に作用すると考えられる。したがって、ここで提唱した翻訳阻害機構は、tRNA を標的とする毒素に普遍的である可能性が高い。さらに、これら毒素の標的 tRNA は、共通して細胞内存在量が多い。このことが翻訳渋滞の重篤化をもたらし、毒素としての殺菌効果を高めていると考えられる。毒素が効率良く翻訳を阻害するうえで、「何を」「どのように」認識するか、その巧妙性を垣間見ることができた。これらの成果は、翻訳反応の動作原理を理解するうえで、重要な知見である。

### 4. tRNA を標的とする毒素の真核生物への利用

コリシン E5, D が標的とする tRNA は、生物に普遍的に存在する因子である。これに注目し、真核である出芽酵母、および HeLa 細胞内で発現させたところ、特異的 tRNA を切断して翻訳が阻害された。また、D-CRD を発現するトランスジェニックマウスを作出した結果、野生株に比べて有意に体重が減少しており、真核生物でも機能しうることがわかった。そこで、臨床への応用を目指し、ミトコンドリア病モデル細胞の樹立を試みた。ミトコンドリア病は、ミトコンドリアの機能障害が第一原因となる疾患の総称であるが、大多数の患者のミトコンドリア tRNA (mt tRNA) 遺伝子に、点変異や欠失が認められる特徴をもつ。これに対し、D-CRD を用いて mt tRNA 異常を人為的に誘発することを考えた。そこで、HeLa 細胞においてミトコンドリア移行シグナル (COX8) を融合した D-CRD を

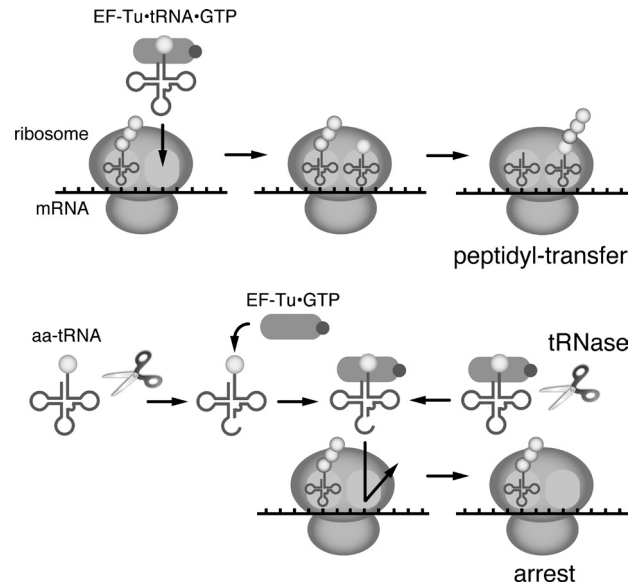


図3 tRNAの切断による翻訳阻害モデル

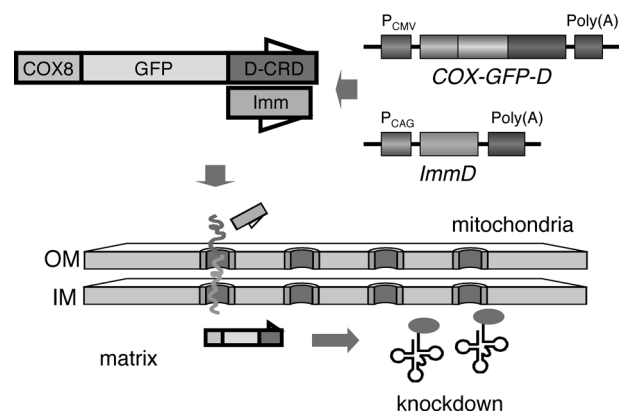


図4 D-CRDを用いたmt tRNAのノックダウン

発現させた。同時に、細胞質で ImmD を発現させて細胞質 tRNA の切断を防いだ。ミトコンドリア表層では、移行タンパク質は一端構造がほどけるため、ImmD が解離することを期待した。その結果、予想どおり D-CRD のみがミトコンドリア内へ移行した。そして、主に mt tRNA<sup>His</sup> のアンチコドンの特異的に切断し、呼吸鎖活性を低下させることに成功した(図4)。mt tRNA はミトコンドリア DNA にコードされるが、現在の技術ではミトコンドリア DNA を改変することは不可能である。本研究成果は、これに代わる mt tRNA のノックダウン技術であり、ミトコンドリア病の発症機構解明に大いに貢献すると期待される。

**謝辞** 本研究は、東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻分子育種学研究室にて行われたものです。本研究を行うにあたり、ご指導、ご鞭撻をいただきました東京大学名誉教授・魚住武司教授に厚く御礼申し上げます。また、本研究テーマを与えてくださり、終始ご指導、ご支援くださいました東京大学・正木春彦教授に深く感謝申し上げます。有意義な議論、ご協力をいただきました日高真誠准教授、中村 顕准教授に御礼申し上げます。実験全般の技術的なご指導、ご討論をいただきました渡辺公綱名誉教授、上田卓也教授、富田耕造博士に感謝申し上げます。タンパク質の結晶構造解析に関して共同研究をいただきました矢嶋俊介教授に御礼申し上げます。細胞培養およびマウス取り扱いに関してご指導をいただきました河野憲二教授、米川博通博士、岩脇隆夫博士に感謝申し上げます。研究室の諸先輩方、卒業生ならびに在校生の方々、特に、伊藤考太郎、伊藤(井上)咲良、中西孝太郎、高橋一敏各氏には深く感謝いたします。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会関東支部長・星野貴行教授ならびにご支援を賜りました諸先生方に心より御礼申し上げます。