

論文の内容の要旨

Role of GI Domain, a Novel Protein-protein Interaction Module, in Stress Responsive Translational Regulation

(ストレス応答性翻訳制御における新規 GI ドメインの役割)

久保田 浩行

哺乳類ゲノム中には、片親から受け継いだアレルしか発現しない『刷り込み遺伝子 (imprinted genes)』が少数存在することが知られている。今までに同定された刷り込み遺伝子の多くは細胞の増殖や分化と密接に関係しており、個体レベルでは発生、成長そして行動の制御に関与することが示されている。実際、ヒトにおけるインプリンティングの異常は様々な特徴的先天性疾患のみならず、種々の悪性腫瘍、そして糖尿病、アトピー、躁鬱病などの多因子性疾患の発症にも関与することが明らかにされつつある。

Impact は我々の研究室でマウスから単離された父性発現のインプリント遺伝子である。*Impact* は原核生物から真核生物にまで高度に保存された特徴的ドメインを持つ蛋白質をコードしているにも関わらず、その機能は全く不明の遺伝子であった。そこで私は *Impact* さらにはこのファミリーの生物学的機能を探る目的で、その酵母ホモログ *YIH1* (Yeast Impact Homologue 1) を採り上げてその機能解析を行った。

YIH1 の機能解析の一環として私は *Yih1* と相互作用する蛋白質を探索する目的でこれを bait とした 2 ハイブリッドスクリーニングを行なった。その結果、*Yih1* が後述するアミノ酸合成の一般制御現象の必須因子 *Gcn1* と相互作用することを見い出した。そこで *Yih1* の *Gcn1* 相互作用領域を検討したところ、原核細胞にまで高度に保存された C 末端ドメインではなく、真核生物にのみ保存されている N 末端領域であることが明らかになった。興味深いことに、*Yih1* の *Gcn1* 結合領域を用いて PSI-BLAST によるホモロジー検索を行ったと

ころ、この領域は Impact のみならず各種由来の Gcn2 を含む様々なタンパク質と特徴的な 3 種類のモチーフ様配列を共有していることが判明した。私はこの領域が Gcn2 と Impact 中に見い出されたことに因んで GI ドメインと名付けた。

GCN2 も GCN1 と同様にアミノ酸合成の一般制御現象の必須因子 (General Control Nonderepressible) として同定された遺伝子である。アミノ酸合成の一般制御現象 (General Control of Amino Acid Synthesis) とは、特定単一アミノ酸の欠乏に晒された酵母がそのアミノ酸のみならず様々なアミノ酸の合成に関与する遺伝子の発現を誘導する現象である。現在までに分かっている知見を要約すると以下の様になる。『アミノ酸欠乏によって細胞内に蓄積した uncharged tRNA がシグナルとなって、Gcn1 依存的に eIF2 α キナーゼ Gcn2 を活性化する。活性化された Gcn2 は翻訳開始因子 eIF2 α をリン酸化する。リン酸化された eIF2 α は、その GDP 結合型でグアニンヌクレオチド交換因子である eIF2B と複合体を形成し eIF2B 活性を阻害する。その結果、eIF2 α の GDP 結合型から GTP 結合型へのリサイクルが障害され、翻訳開始に必須である Met-tRNA \cdot eIF2 α \cdot GTP 複合体の細胞内濃度が減少し、翻訳が全般に阻害される。この際に 5'-UTR に特殊な構造を持ち通常は翻訳が抑制されている GCN4 mRNA のみは選択的に翻訳が誘導 (脱抑制) される。そして転写因子 Gcn4 は各種のアミノ酸合成系遺伝子の転写を誘導する。』この一連の機構のうち、Gcn2 による eIF2 α のリン酸化以降は近年の研究でその詳細が分子レベルで明らかにされてきた。一方、Gcn2 自身の活性化に関しては遺伝学的に GCN1 が必要であることが示されてはいたものの、その詳細な分子機構は不明のままであった。

Yih1 と Gcn1 の相互作用を司る GI ドメインが、Gcn2 上にも存在するという知見は、Gcn2 も同じく GI ドメインを介して Gcn1 と直接相互作用する可能性を示唆する。そこで私はこの可能性を検証すべく、酵母 2 ハイブリッドシステムと組み換え蛋白質を用いた *in vitro* 結合実験で Gcn1 と Gcn2 の相互作用に検討を加えた。その結果、Gcn2 の N 末端に位置する GI ドメイン (a.a. 1-125) が Gcn1 の C 末端領域 (a.a. 2048-2382) に直接結合することが明らかになった。更に、この相互作用における GI ドメインの役割を明らかにするために、このドメイン中で高度に保存されているアミノ酸を置換した変異体 Gcn2 (E18A、E18K、Y74A、Y74A Δ P75A) を作製し、Gcn1 との結合能を同様の手法で検討したところ、いずれの変異蛋白質も Gcn1 との結合能を欠くことが示された。興味深いことに、同様なアミノ酸置換を持った Yih1 も Gcn1 との結合出来なかった。以上の結果は、GI ドメインが Gcn1 との結合を媒介する必須最少要素であることを示している。

次にこの GI ドメインを介した Gcn1-Gcn2 相互作用の生物学的役割を検討するために、上記の実験で Gcn1 との相互作用を障害することが示された Y74A 変異をゲノム上の GCN2 遺伝子に導入した *gcn2-Y74A* 株を作成した *gcn2-Y74A* 株においても GCN2 株と同等の Gcn2

タンパク質が存在することが示され、この変異が蛋白質を不安定化しないことが確認されたので以下の解析を行った。まずアミノ酸合成の一般制御障害の指標として用いられる 3-アミノトリアゾール (3-AT) 感受性を検討したところ、変異株は高感受性を示し、アミノ酸合成の一般制御系が障害されていることが明らかになった。そこでアミノ酸合成系遺伝子の発現を司る *GCN4* の翻訳を、この mRNA の 5'-UTR に *lacZ* を接続した翻訳レポーター遺伝子を用いて検討したところ、変異株では *GCN4* mRNA の翻訳脱抑制が障害されていることが確認された。最近、Gcn2 の活性化を介さずに *GCN4* の翻訳を脱抑制する経路の存在も示されて来たので、最後に Gcn2 の活性化をリン酸化 eIF2 α 特異的抗体を用いて検討した。その結果 *gcn2-Y74A* 株では eIF2 α のリン酸化が確かに障害されていることが判明した。この事実は酵母細胞唯一の eIF2 α キナーゼである Gcn2 の活性化が障害されていることを意味する。以上の結果は、GI ドメインを介した Gcn1 との結合が Gcn2 の *in vivo* における活性化に必須であることを示している。

上記の説を更に実証する為に、私は Gcn1 の Gcn2 結合能を障害する変異を 2 ハイブリッド法を応用してスクリーニングした。その結果、同定した F2290L 変異をゲノム中の *GCN1* 遺伝子に導入した *gcn1-F2290L* 株を作成した。この変異株について、Gcn1 タンパク質が不安定化していないことをウェスタンブロットングで確認した上で、3AT 感受性、GCN4 翻訳の脱抑制、そして eIF2 α のリン酸化を検討したところ、*gcn2-Y74A* 株と同様の結果が得られた。これにより、上記の仮説を裏付けることが出来た。

さらに Gcn2 の GI ドメインならびに Gcn1 上の Gcn2 結合ドメインを *GALI* プロモーターによって過剰発現させたところ、その誘導に依存的にドミナントネガティブ効果が生じて細胞は 3AT 感受性を示した。また Gcn1 結合能を失った Gcn2-GI ドメインの過剰発現ではこの効果は観察されなかった。

以上、一連の *gcn2*, *gcn1* 変異体および過剰発現実験の結果は一致して、『GI ドメインを介した Gcn2 の Gcn1 への結合は Gcn2 の活性化、そしてそれが惹起するアミノ酸合成の一般制御に必須である。』ことを示しており、これまで不明であった Gcn1 による Gcn2 活性化機構の一端が初めて明らかになった。

さて Gcn2 と同様に GI ドメインを持つ Yih1 も Gcn1 上の同じ領域に結合することから Yih1 が Gcn1 による Gcn2 の活性化を競合的に阻害する可能性が示唆される。そこで Yih1 の過剰発現の効果を検討したところ全長または GI ドメインを含む N 末端領域では酵母細胞は 3AT 感受性を示したが、これを含まない C 末端の過剰発現では 3-AT 感受性が誘導されなかった。この結果は Gcn1-Gcn2 相互作用の重要性を更に支持するのみならず、Yih1 自身がアミノ酸合成の一般制御機構の負の調節因子として機能し得る可能性も示唆しており、今後この視点からの変異株の解析を行う予定である。

また最近、*GCN2* のマウスホモログが、アミノ酸欠乏に応答して転写因子 *ATF6* の翻訳を脱抑制することが示され、酵母と同様の系が哺乳類でも作動していることが明らかにされ、哺乳類 *Gcn1* の機能解析および *YIH1* の機能に関する上記仮説の *Impact* における検証も可能になりつつある。*Impact* が哺乳類においても *eIF2 α* のリン酸化の負の制御因子として作用するならば、それは翻訳抑制による増殖停止を解除する方向に機能することになり、他の多くの父性発現インプリント遺伝子同様、細胞増殖を基本的には正に制御する機能を持つ可能性もあり、今後の実験的検証が待たれる。

なお本研究で見い出された GI ドメインは *GCN2*、*Impact* 以外にも様々なタンパク質中に見い出されることから、タンパク質相互作用のモジュラードメインであると考えられる。それぞれの GI ドメインの結合標的領域の同定は、GI ドメインによる分子認識機構をより明瞭にし、相互作用ルールの定式化に繋がると思われる。シグナル伝達におけるモジュラードメインの重要性を鑑みると GI ドメインの発見そしてその解析は意義の深いものになると期待される。