

## 論文内容の要旨

### 論文題目

出芽酵母の mRNA 分解制御に介在する GTP 結合蛋白質 Ski7 の構造と機能

氏名 荒木 保弘

真核生物の遺伝子発現は、転写、mRNAのプロセッシング、核からの移行、さらに翻訳と複数の段階から成るが、これに mRNA の分解が加わる。mRNA の分解は、他の段階が正の制御であるのに対して唯一の負の制御であることから、遺伝子発現制御において極めて重要な段階であるといえる。

酵母において、mRNA の分解は主に細胞質で進行するが、始めに poly(A) 尾部が A10 残基程度にまで短縮され、この後 5' → 3'、3' → 5' の二方向から分解される。片方ずつを欠損しても酵母は成育するが、両経路とも不活化すると致死になることから、mRNA の分解制御は成育に必須である。5' → 3' 分解経路は poly(A) 尾部の短縮に引き続き、5'-キャップ構造が外れ、5' → 3' エキソヌクレアーゼにより分解される。この過程に関わる因子は既に同定され、そのメカニズムまで大きく理解が進んでいる。しかし、一方の 3' → 5' 分解経路は、関与する因子群が遺伝学的に単離されてはいるものの、その分子機構は不明のままであった。

本研究において私は、3' → 5' mRNA 分解経路に新規の G 蛋白質が介在することを示し、さらにこの G 蛋白質とこれまでに遺伝学的手法により単離されていた因子群との相互作用を検証することによって、mRNA 分解経路の新たな分子機構を明らかにした。

### 1. 翻訳終結因子 *eRF3/GSPT* に相同な機能未知因子の同定

G 蛋白質は、一般的に GTP の結合で活性化され、GTP が加水分解されて GDP になると不活性化する分子スイッチとして各反応系で機能している。G 蛋白質はスーパーファミリーを形成しており、その一つに翻訳過程に関わる G 蛋白質群がある。このファミリーは、tRNA もしくは tRNA に類似の高次構造をもつ蛋白質と EF1 $\alpha$  様ドメインで結合して、翻訳の伸長あるいは終結に関わる。翻訳終結因子 *eRF3/GSPT* はこのファミリーに属するが、N 末端側が長いという点で他にはない特

徴を有している。これまでに当研究室では eRF3 が特有の N ドメインを介して poly(A) 結合因子と相互作用することを示し、eRF3 が翻訳終結のみならず、mRNA の安定性や翻訳開始にも影響を与えて、遺伝子発現の調節に広範にわたって関与するという、既存の G 蛋白質とは異なる機能様式を有することを見出している。以上を踏まえて、私は出芽酵母ゲノムデータベースから eRF3 と高い相同性を有し、かつ長い N ドメインをもつ機能未知因子を同定した (Fig. 1)。この因子も遺伝子発現調節に多岐にわたって関与することが期待される。その EF1 $\alpha$  様ドメインは eRF3 と一次構造上高い相同性を有するものの、N ドメインでは全く相同性がないことから、eRF3 と類似の様式で作用するが、全く異なる機能を備えていることが考えられた。

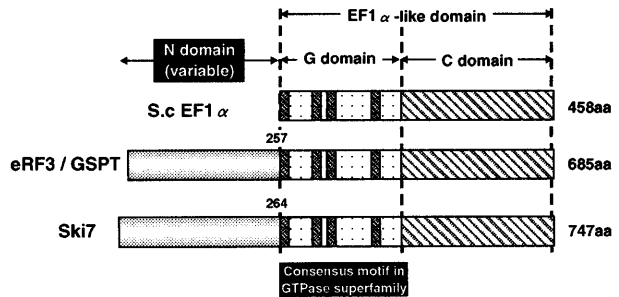


Fig. 1 Comparison of Ski7 with homologous proteins

## 2. Ski7 は mRNA の 3' → 5' 分解経路に関与する

上記の機能未知の G 蛋白質は、時期を同じくして他のグループにより、酵母二重鎖 RNA ウイルスの遺伝子発現を誘発する変異体の原因遺伝子として単離され、SKI7 と名付けられた。同じ指標で単離された SKI 遺伝子群の多くは、細胞質での mRNA 分解段階に関与するので、Ski7 も mRNA の分解段階に関与することが予想された。そこで、酵母において mRNA の分解に対する ski7 遺伝子破壊の影響を、MFA2 遺伝子に poly(G) を挿入した転写産物の分解から検討した (Fig. 2)。このノーザンプロットにおいては、poly(G) の特性によって mRNA の分解中間産物を検出することができ、その動態から分解方向を決定できる。野生株、ski7 破壊株の両方で 5' → 3' 分解には相違がなかったのに対して、ski7 破壊株でのみ poly(G) → 3' の断片が蓄積しており、その分解中間産物がスメアーとして検出された。この結果は ski7 破壊株では 3' → 5' 方向の分解経路に異常をきたしていることを意味しており、Ski7 が 3' → 5' 方向の mRNA の分解に関与することが示唆された。

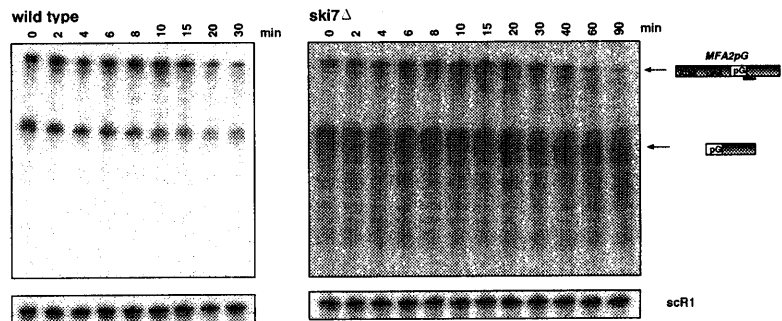
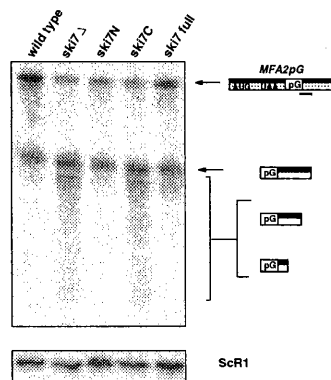


Fig. 2 ski7 $\Delta$  stabilizes the degradation of MFA2pG-mRNA intermediates

## 3. mRNA 3' → 5' 分解経路の異常は Ski7 の N ドメインのみで相補される

次に mRNA 分解における Ski7 の機能ドメインを限定することを目的に、ski7 欠損による 3' → 5' 方向の分解の異常が Ski7 の各種欠失変異体で相補されるか否かを検討した。その結果、ski7 破壊株の表現型は Ski7 N ドメインだけを発現することにより相補されたが、EF1 $\alpha$  様ドメインでは相補できなかった (Fig. 3)。すなわち、mRNA 分解には N ドメインが必要十分であり、EF1 $\alpha$  様ドメイ

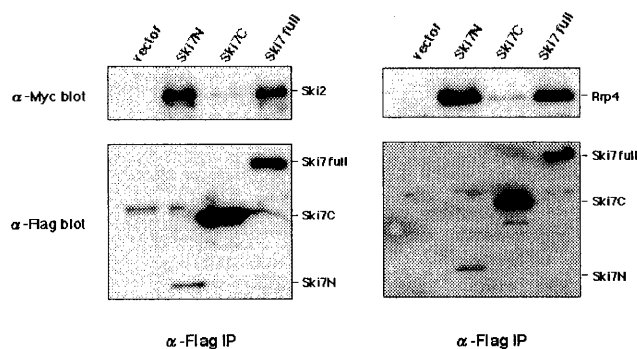
ンは必要でないことを示している。eRF3はそのNドメインで poly(A)結合因子と相互作用し、EF1 $\alpha$ 様ドメインで翻訳終結を担うという2つのドメインで異なる機能を有したが、Ski7のNドメインのみがmRNA分解に関与するという上記の知見は、これと非常によく整合性がある。



**Fig. 3 Ski7 N domain restores the degradation of 3'-trimmed RNA fragments**

#### 4. Ski7 は exosome、Ski 複合体と相互作用する

Ski7はそのNドメインでmRNAの分解に介在することが示されたが、どのような機序で関与するのであろうか。Ski7のNドメインには一次構造上、既知の機能モチーフがなく、また他の因子とも相同性が見られないことから、RNA分解に必要な活性、例えばRNA分解活性やRNA結合活性はないと考えられた。したがって、上記の様な活性をもつ蛋白質との相互作用が予想された。これまでに、3'→5'方向のmRNA分解に関わる因子群が遺伝学的に単離されている。それは10種のRNaseから成る exosome と、Ski2 (RNAヘリカーゼ)、Ski3, Ski8 から成る Ski 複合体である。そこで、Ski7が2つの複合体と相互作用するか否かを免疫沈降法で検定したところ、両複合体ともSki7のNドメインに相互作用することを見出した (Fig. 4)。これは遺伝学的にその関与が示唆されていた exosome とSki複合体を初めて生化学的に結びつけた重要な知見である。



**Fig. 4 Ski7 N domain interacts with exosome and Ski complex physically**

#### 5. Ski7N ドメインの機能発現には exosome 及び Ski 複合体との結合が必要である

Ski7NドメインのmRNA分解への寄与は exosome、Ski複合体のどちらとの相互作用によるのか、または両相互作用とも必要なのだろうか。まず、両複合体の相互作用部位をSki7Nドメイン上に限局し、exosomeとSki複合体との相互作用にSki7の異なる部位を用いていることを明らかにした (Fig. 5)。さらに、両複合体の結合部位を含む欠失変異体が、ski7欠損によるmRNAの分解異常を相補するかを検討したが、どの変異体でも相補することができなかった。しかし、野生株に、両複合体に対する結合領域のみを各々強発現すると、mRNAの分解異常を誘発することが判明した (Fig. 5)。以上から、Ski7Nドメインは、exosome、Ski複合体のどちらとも機能的に相互作用することにより、mRNA分解に貢献することが示された。

Ski7N deletion mutants	Ski2 binding	Rrp4 binding	normal decay in <i>ski7Δ</i>	abnormal decay in WT
1 ██████████ 264	Yes	Yes	Yes	No
1 ██████████ 184	Yes	Yes*	No	Yes*
1 ██████████ 96	Yes	No	No	Yes
80 ██████████ 264	No	Yes	No	Yes
80 ██████████ 168 ██████████ 264	No	Yes	No	No
80 ██████████ 184	No	Yes	No	No

\*: weak

Fig. 5 The entire Ski7 N domain is required for 3' → 5' mRNA decay

## 6. Ski7 は exosome、Ski 複合体と個別に異なる複合体を形成する

Ski7 は exosome、Ski 複合体と相互作用することが示されたが、実際にはどのような複合体を形成しているのかを明らかにするために、ゲル濾過カラムで各複合体の挙動を検討した。両複合体とも Ski7 と同じ挙動をするが、Ski7 と exosome は存在するものの Ski 複合体を含まない画分があった。これは、Ski 複合体を含まない Ski7-exosome 複合体が存在することを意味する。さらに、exosome の免疫沈降を行ったところ、共沈画分に Ski 複合体が全く存在しなかった。以上により、Ski7 は exosome、Ski 複合体の各々と異なる複合体を形成することが明らかとなった (Fig. 6)。大腸菌やミトコンドリアでの mRNA の 3' → 5' 分解においては RNase と RNA ヘリカーゼが同一複合体として機能することを考えると、酵母における以上の結果は真核生物での mRNA 分解の機序を探る上で非常に興味深い。

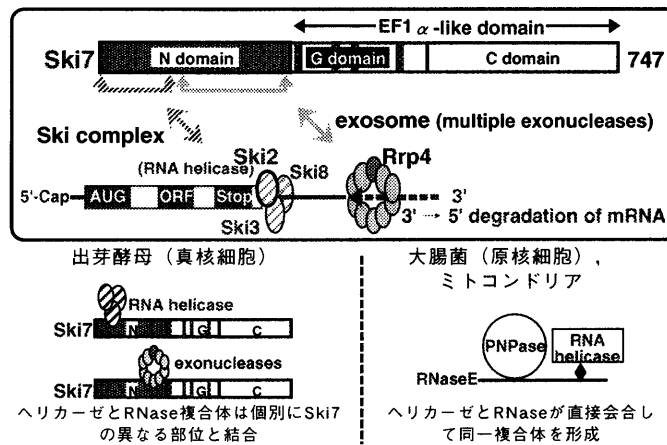


Fig. 6 Ski complex & exosome participating in 3' → 5' degradation of yeast mRNAs separately associate with different regions of Ski7 N domain

## 総括

本研究において私は、eRF3/GSPT に相同な機能未知の G 蛋白質 Ski7 が、mRNA の 3' → 5' 分解経路に参与することを遺伝学的に初めて明らかにした。さらに *ski7* 欠損株の表現型を相補することを指標に、Ski7 が mRNA の分解に参与するには N ドメインのみで必要十分であること、また同領域に RNA 分解酵素から成る exosome、RNA ヘリカーゼを含む Ski 複合体が相互作用することを示した。さらに、Ski7 は exosome、Ski 複合体とそれぞれ独立して異なる複合体を形成することを見出した (Fig. 6)。RNA ヘリカーゼ及び RNase と Ski7 が異なる領域を介して別個に複合体を形成するという今回の知見は、原核生物とは異なる極めて特徴的な性状であり、真核生物の mRNA 分解の作用機序を考える上で意義深いものである。