

論文の内容の要旨

論文題目 翻訳終結と mRNA 分解を制御する G タンパク質 GSPT/eRF3 の
GTP 依存性と共役機構の解析
氏 名 小林 哲夫

はじめに

真核細胞でのタンパク質生合成における翻訳の開始及びポリペプチド鎖の伸長過程には、それぞれ eIF2 及び EF1 α 、EF2 と呼ばれる G タンパク質が介在するが、翻訳の終結過程にその関与が推定されていた別種の G タンパク質 GSPT/eRF3 は、近年当研究室において同定された。リボソームから新生ポリペプチド鎖を解離させる終結反応は、終止コドンを確認してそれと結合する eRF1 が GSPT と複合体を形成することによって進行すると考えられる。さらに当研究室では、GSPT の新たな相互作用分子として、mRNA の 3'-poly(A) 鎖を覆って mRNA を安定化するポリ(A)結合タンパク質 Pab1p を同定し、両者の結合が通常の mRNA 分解の第一段階であるポリ(A)鎖の短縮化を惹起することを明らかにした。一方、ナンセンス変異を含む mRNA は、NMD (Nonsense-mediated mRNA decay) 経路で分解されるが、この NMD 経路においてはポリ(A)鎖の短縮を伴わずに mRNA が分解される。最近、NMD 経路に必須な因子である Upf1p も GSPT と結合することが示された。このように、GSPT は翻訳終結反応と 2 種の mRNA 分解経路を制御する多機能性の因子と考えられるが (Fig. 1)、それらの機能が G タンパク質である GSPT の GTP/GDP 結合型のコンホメーション転換を介してどのように調節されるか、また終結反応と mRNA 分解の関連については不明な点が多い。本研究において私は、出芽酵母をモデル系に、翻訳終結反応と mRNA 分解における GSPT の役割について解析したので報告する。

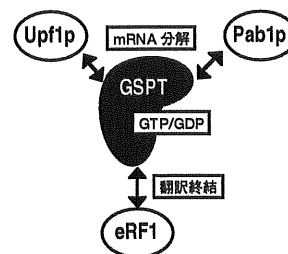


Fig.1 GSPT and its interaction molecules.

1. GSPT と eRF1、Pab1p、Upf1p との結合におけるグアニンヌクレオチド要求性

GSPT は eRF1, Pab1p, Upf1p と相互作用するが、GSPT へのグアニンヌクレオチドの結合によって相互作用分子との会合がどのような影響を受けるかを先ず検討した。酵母染色体上への相同組み替えにより、GSPT と eRF1 の C 末端に epitope tag 配列を付加した酵母から細胞抽出液を調製し、免疫沈降を行った。GSPT と eRF1 の結合量は GTP 及びその類似体の GTP γ S を添加した時に増加したが、GDP 及び他のヌクレオチド添加時には減少した (Fig. 2A)。この結合の特性を種々の条件下で検討した結果、生理的な濃度の Mg $^{2+}$ 及び GTP が必要であった (Fig. 2B, C)。さらに、GTP 結合ドメインに変異 (N406I, D409N) を導入してグアニンヌクレオチドとの結合親和性を低下させた GSPT は、*in vitro* の結合実験系において、eRF1 との結合能が著しく低下した。

一方、GTP を要求した eRF1 との結合とは対照的に、GSPT と Pab1p 及び GSPT と Upf1p の相互作用については、グアニンヌクレオチドの添加及び GTP 結合ドメインの変異による影響が認められなかった。以上の結果から、GSPT と eRF1 の結合は GSPT への GTP の結合が必要であるが、GSPT と Pab1p 及び Upf1p の結合は GSPT に結合するグアニンヌクレオチドの種類に依存しないことが示された。

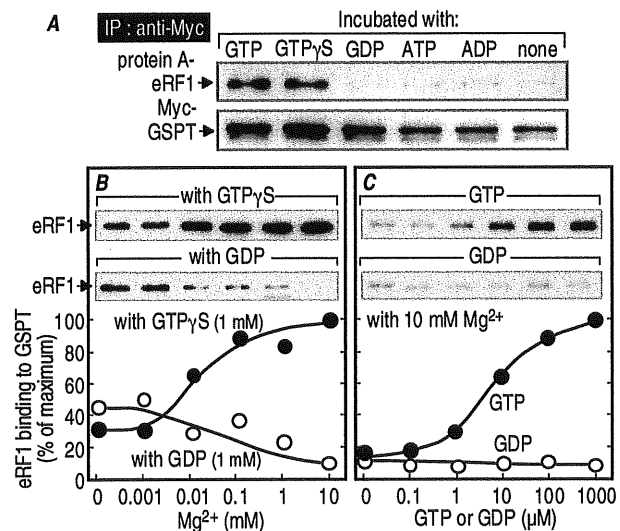


Fig.2 GTP- and Mg $^{2+}$ - dependent interaction of GSPT with eRF1.

2. GSPT の GTP との結合親和性が低下する変異 (N406I) は、翻訳終結反応の異常 (終止コドンの読み飛ばし: read-through) を引き起こす

GSPT の GTP 結合ドメイン変異体 N406I においては、eRF1 との結合能が低下したことから、酵母にこの変異体を導入して翻訳終結反応への影響を検討した。GSPT 温度感受性変異株 (*gst1*) に、Fig. 3A に示すレポーター遺伝子及び GSPT を導入し、37°C におけるルシフェラーゼ活性を測定した。終止コドン入りのレポーター (CSIF) のルシフェラーゼは、正常に終結反応が進行した場合は発現しないが、終結反応に異常が生じて終止コドンを read-through した場合には発現する。Fig. 3 に見られるように、野生型 GSPT/wt を導入した

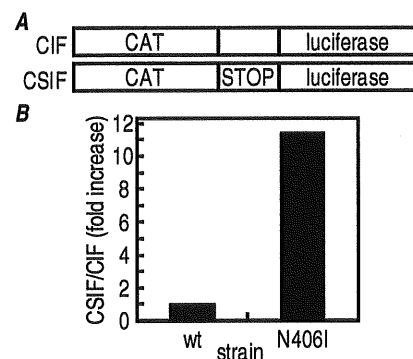


Fig.3 Mutation in GTP-binding motif of GSPT induces nonsense suppression.

株では翻訳終結反応が進行したが、変異型 GSPT/N406I を導入した株では著しく read-through が増加した。この結果から、翻訳終結反応には GSPT への GTP 結合が必要であることが示された。

3. GSPT/N406I により mRNA 分解は異常をきたす

先に当研究室では、GSPT が Pab1p との相互作用を介して mRNA の分解を制御することを見出した。そこで、GSPT の変異 (N406I) に伴う mRNA 分解への影響を検討した。転写停止後の *PGK1* mRNA 量の経時変化を Northern blot により解析した結果、変異型 GSPT/N406I は、*gst1* の null 表現型 (mRNA の分解異常) を相補することが出来ず、mRNA の分解は抑制されたままであった (Fig. 4A)。次に、

Upf1p との結合を介して GSPT が関与することが示唆されている NMD 経路についても、同様に GSPT の N406I 変異体導入の影響を検討した。NMD 経路で分解されることが知られている *CYH2* pre-mRNA の蓄積を Northern blot により解析した結果、*gst1* 株においては *CYH2* pre-mRNA が蓄積し NMD 経路に異常があることが確認できた。この異常は野生型 GSPT/wt によって相補されたが、変異型 GSPT/N406I では相補されなかった (Fig. 4B)。これらの結果から、GSPT の GTP 結合ドメインの変異は、通常の mRNA 分解経路と NMD 経路の両者において異常を引き起こすことが示された。GSPT と Pab1p 及び Upf1p との結合は GSPT へのグアニンヌクレオチド結合に非依存的であるにも関わらず、mRNA 分解に異常が見られたことから、両者の mRNA 分解経路は共に翻訳終結反応に依存して進行すると考えられる。

4. GSPT 非依存的な翻訳終結反応は mRNA 分解を引き起こさない

GSPT の温度感受性変異株である *gst1* 株の 37°C における増殖停止は、終止コドンを認識する eRF1 の過剰発現により抑圧されることを見出した。翻訳終結反応について解析した結果、eRF1 の過剰発現によって *gst1* 株の read-through はほぼ改善されたことから、eRF1 の過剰発現株においては GSPT が存在しなくても翻訳終結反応が進行すると考えられた。そこで、翻訳終結反応に依存することが示された mRNA の分解が GSPT を要

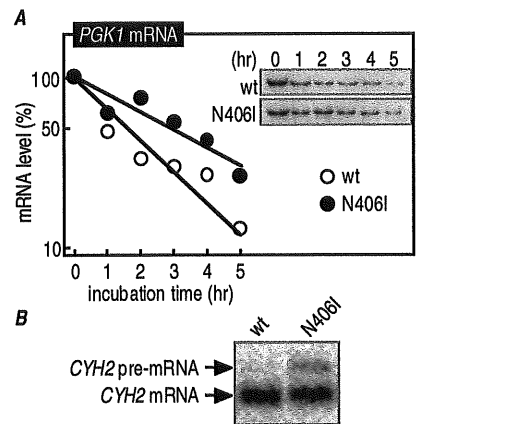


Fig.4 Mutation in GTP-binding motif of GSPT inhibits decay of (A) wild-type mRNA and (B) nonsense-containing mRNA.

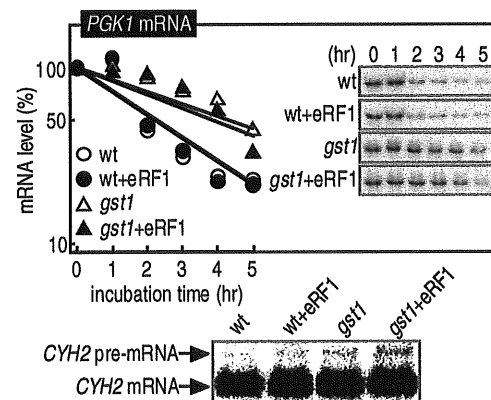


Fig.5 eRF1 overexpression does not suppress the mRNA decay defect in the *gst1* mutant.

求するかどうかを探る目的で、この eRF1 過剰発現株における mRNA 動態を検討したところ、Fig. 5 に見られるように、通常の mRNA 分解経路（上段）及び NMD 経路（下段）の両者において、mRNA 分解抑制の eRF1 過剰発現による回復は認められなかった。この結果から、翻訳終結反応依存的な mRNA 分解には、翻訳終結反応だけでなく GSPT が必要であることが明らかとなった。

まとめ

本研究において私は、1) GSPT はグアニンヌクレオチド型の変換により eRF1 との結合を介して翻訳終結反応を制御すること、2) mRNA 分解が翻訳終結反応依存的に進行すること、さらに (3) 翻訳終結反応依存的な mRNA 分解を引き起こすには GSPT が必要であることを示した。これらの結果から、翻訳終結反応とそれに共役した mRNA の分解の機構として、1) GTP 型の GSPT と eRF1 の複合体が終止コードを認識してリボソームの A サイトに入り、2) GSPT の GTPase の作用によって新生ポリペプチド鎖と eRF1 が解離した後、3) 翻訳終結のシグナルが GSPT のコンホメーション変換を介して Pab1p や Upf1p に伝わることで mRNA が分解される、というモデルが想定された (Fig. 6)。

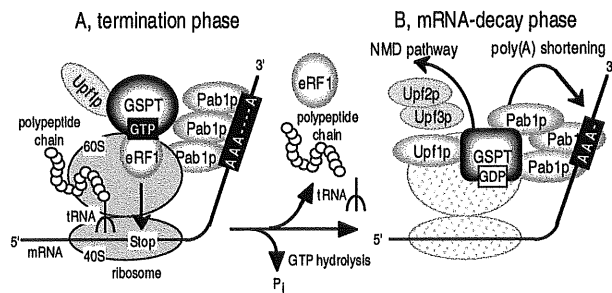


Fig.6 A proposed model for the processes from translation termination to mRNA degradation mediated through GSPT.