

## 審査の結果の要旨

氏 名 小 林 哲 夫

真核細胞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、eIF2 及び EF1 $\alpha$  と EF2 という G タンパク質が介在するが、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、最近になって同定された。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、終止コドンを認識してそれと結合する eRF1 が GSPT と複合体を形成して進行すると考えられる。さらに、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 が同定され、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が明らかにされた。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、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、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。「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」と題する本論文においては、出芽酵母をモデル系に、翻訳終結と mRNA 分解を共役させる GSPT/eRF3 の新しい役割について解析している。

### 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 と直接結合するが、GSPT へのグアニンヌクレオチドの結合によってそれら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って GSPT と eRF1 の C 末端に epitope tag 配列を付加した酵母株を作製し、細胞抽出液を調製して免疫沈降を行った。GSPT と eRF1 の結合量は GTP 及びその類似体の GTP $\gamma$ 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。この結合特性を種々の条件下で検討した結果、生理的な濃度の Mg<sup>2+</sup> 及び GTP が必要であった。さらに、GTP 結合ドメインに点変異 (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 の結合については、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 の結合を必要とするが、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。

### 2. GSPT への GTP 結合を要求する翻訳終結反応

GTP 結合ドメインに変異をもつ GSPT/N406I 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*) にレポーター遺伝子及び GSPT を導入して翻訳終結能を観察した結果、野生型 GSPT/wt を導入した株では翻訳終結反応が進行したが、変異型 GSPT/N406I を導入した株では翻訳終結能が著しく低下し、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 への GTP 結合を要求する mRNA 分解反応

GSPT は Pab1p との相互作用を介して mRNA の分解を制御することが見出されている。そこで、GSPT への変異 (N406I) 導入による 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 mRNA の分解遅延という null 表現型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。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 への変異 (N406I) 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。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。Pab1p 及び Upf1p との結合が GSPT へのグアニンヌクレオチドの結合に非依存的であるにも関わらず、mRNA 分解が異常となることは、mRNA 分解に関わる両経路が共に翻訳終結反応に依存して進行することを意味している。

### 4. 翻訳終結反応と mRNA 分解の連関を仲介する GSPT

終止コドンを認識する eRF1 の過剰発現は、GSPT の温度感受性変異株である *gst1* 株の 37°C における増殖停止を抑圧し、さらに *gst1* 株の翻訳終結不全をほぼ改善することが見出された。すなわち、eRF1 の過剰発現株においては GSPT の介在なしに翻訳終結が進行した。そこで、翻訳終結反応に依存すると考えられた mRNA の分解が GSPT を要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。その結果、通常の mRNA 分解経路及び NMD 経路の両者において、mRNA 分解は抑制されたままであった。以上から、翻訳終結反応に依存する mRNA の分解は、翻訳終結という素反応だけでは進行せず、GSPT を必要とすることが示された。

本研究は、翻訳終結反応に介在する G タンパク質 GSPT/eRF3 のヌクレオチド結合と相互作用分子との会合動態、及び mRNA 分解との関連について解析し、1) GTP 結合型の GSPT と終止コドン認識する eRF1 が複合体を形成してリボソームの A サイトに入り、2) GSPT の GTPase 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 に伝達され mRNA の分解が進行するという、翻訳終結反応と共役した mRNA の分解に関わる新しいモデルを提唱している。これらの研究成果は、真核生物における広義の遺伝子発現機構の理解にとって有用な知見を提供しており、博士 (薬学) の学位として十分な価値があるものと認められる。