

論文の内容の要旨

論文題目 mRNA の安定性を制御する脱キャップ酵素 Dcp1 の進化的保存性及びその翻訳終結反応への寄与に関する解析

氏 名 作野 剛士

はじめに

真核生物における適切な遺伝子発現制御の履行には、転写レベルや翻訳後修飾を通じてその最終産物であるタンパク質を、必要な時期に必要な量だけ生産する機構が必須である。しかしながら、転写段階で厳密な制御を受けて生産された mRNA からタンパクが翻訳された後にも、mRNA はその鋳型として機能してしまうため、mRNA の安定性を翻訳の状況に対応させて制御する機構が重要となる。

そのような制御を理解する上で注目すべき視点の一つは、真核生物を通じて共通に存在する mRNA の 5' 末端のキャップ (CAP) 構造である。キャップ構造は mRNA の安定性制御という観点からは mRNA の 5' 末端に存在することで、5' -エキソヌクレアーゼ (Xrn1) による分解から mRNA 本体を守る機能を担う。翻訳

制御においては、翻訳開始因子 (eIF) 群の標的となり翻訳開始に必要な機能を果たすと共に、キャップを介して mRNA を環状化させることで、リボソームを効率よく再利用する機構の足場としても機能しており重要な構造体であるといえる (図 1)。キャップ構造は Dcp1 を

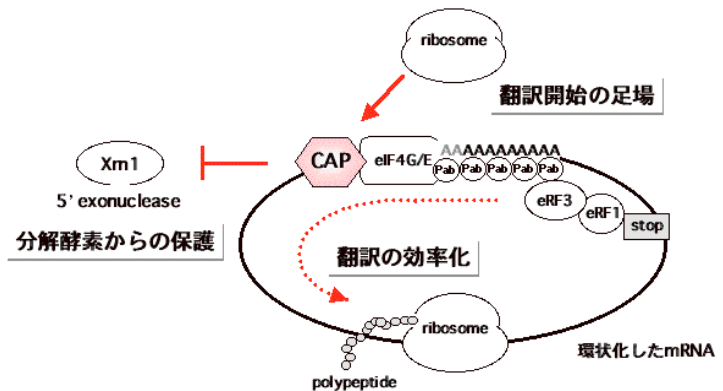


図 1 mRNA 分解と翻訳制御における Cap 構造の意義

含む脱キャップ因子群により切断される。キャップが切断されると 5' 端から分解を受けやすくなり環状構造も崩壊する。したがって、タンパク質の生産に連動した mRNA の安定性制御を考える上で、そのキャップ構造を mRNA から切り離す酵素である decapping 因子の機能を理解することが重要である。その decapping 因子を解析する上で、1) Dcp1 の進化的保存性、2) decapping 因子の有する decapping 活性以外の機能、以上 2 点に着目し、遺伝学的な解析が有利な酵母を用いて解析を行い以下の知見を得た。

結果

1-1) Dcp1 の分裂酵母ホモログの単離

キャップ構造が真核生物に共通に存在し、キャップの除去された mRNA が 5' 側から分解を受けるといった分解機構も共通に存在するにも関わらず、これまで decapping 因子が単細胞の真核モデル生物である出芽酵母 (*S. cerevisiae*) のみでしか同定・解析されていなかった。そこで、その高等真核生物の相同因子を単離し、進化を通じた decapping 因子の機能について理解することを目指した。出芽酵母の decapping 因子 Dcp1 (以下 Sc Dcp1 と表記) のアミノ酸配列を元に高等な生物種に対して相同性因子の検索を行ったが、顕著な配列を同定できなかった。そこで、出芽酵母と同様に単細胞であるが、進化的にはより高等と考えられている分裂酵母 (*S. pombe*) を用いて、Sc Dcp1 の破壊株が示す増殖遅延表現型の抑圧能を指標として機能面からの単離を試み、SPBC3B9.21 (pombe Dcp1 と表記) を同定した (図 2A)。pombe Dcp1 は Sc Dcp1 と部分的に相同な領域をもつ 127 アミノ酸の因子で、出芽酵母 (231 残基) の半分程度の長さである。pombe Dcp1 は Sc Dcp1 破壊株が示す 5' 側からの mRNA 分解遅延の表現型についても抑圧した。また、分裂酵母細胞自身での pombe Dcp1 の機能を検証した結果、生育に必須な因子であること、およびその温度感受性変異株は非許容温度下で、Sc Dcp1 破壊と同様に mRNA 分解の遅延を示すことを見出した (図 2B)。以上の結果から、pombe Dcp1 は分裂酵母の decapping 因子であると結論した。

1-2) Dcp1 のヒトホモログの単離

pombe Dcp1 の配列を元にさらに高等真核生物について検索を行い、ヒトを含めた複数の生物種で N 末領域が高度に保存された因子を単離した (図 3A)。そこで、ヒト Dcp1 の機能を検討し、ヒト Dcp1 は pombe Dcp1 破壊株の致死性を相補できるのに対して、Sc Dcp1 破壊株の増殖遅延を相補できないという知見を得た。この結果は、ヒト Dcp1 は pombe Dcp1 と機能的にもより近縁であることを示唆している。次にヒト Dcp1 を pombe Dcp1 破壊株に導入し、mRNA の分解動態を検証した結果、pombe Dcp1 の野生型導入株と同様な半減期であり、h Dcp1

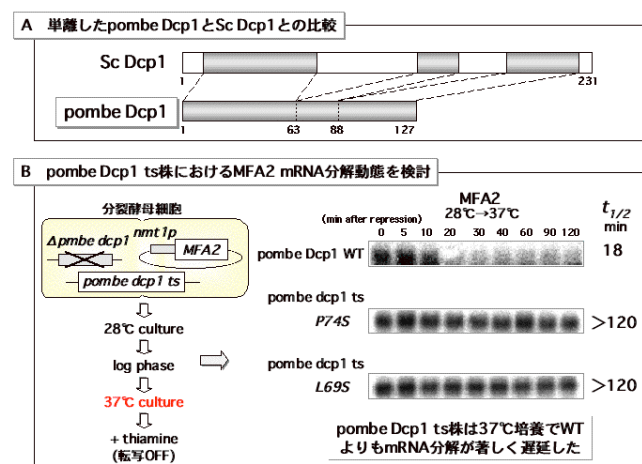


図 2 pombe Dcp1 の単離と mRNA 分解能の検証

は同様な mRNA 分解能を示した。また、ヒト Dcp1 の相同性の高い N 末領域のみでも全長の場合と同程度の mRNA 分解能を示すことから、ヒト Dcp1 はその N 末領域で decapping 因子として機能することが示された (図 3B)。以上の結果から、これまでその存在が明らかにされていなかった decapping 因子の高等真核ホモログが、実際に種を越えて保存されていること、さらに出芽酵母と分裂酵母以降の種間において

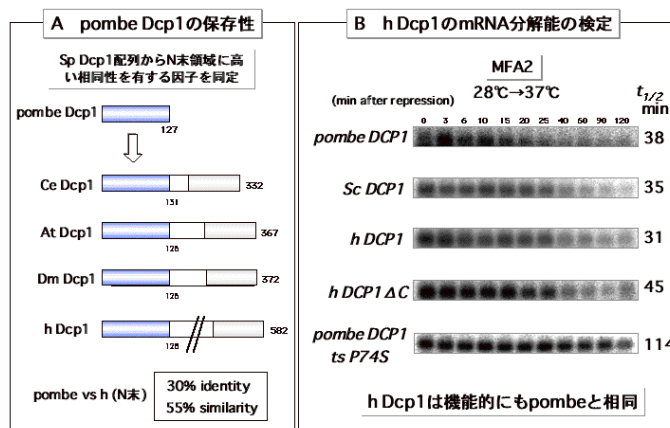


図 3 h Dcp1 の単離と mRNA 分解能の検証

decapping 因子は異なる制御を受ける可能性が示唆された。したがって、これまで未知であった高等真核生物の decapping 反応を介した mRNA 分解制御機構を理解する上で、分裂酵母は有用なモデル系と考えられる。

2-1) decapping とは独立した Dcp1 の翻訳終結反応への寄与

decapping 因子の機能を理解する上で重要と考えられるもう一つの視点は、Dcp1 と翻訳終結反応との関係である。これまで decapping 因子は、翻訳の終結と共に短くなっていくポリ A 鎖の長さに応答しキャップを切断するという機能のみを有すると考えられてきた。しかし decapping 活性の発揮に翻訳の終結が重要ならば、decapping 因子が積極的に翻訳終結にも関与するという新しい制御機構の存在が考えられる。そこで終止コドンの読み飛ばし頻度を、コロニーの呈色でモニターできるナンセンス変異の抑圧

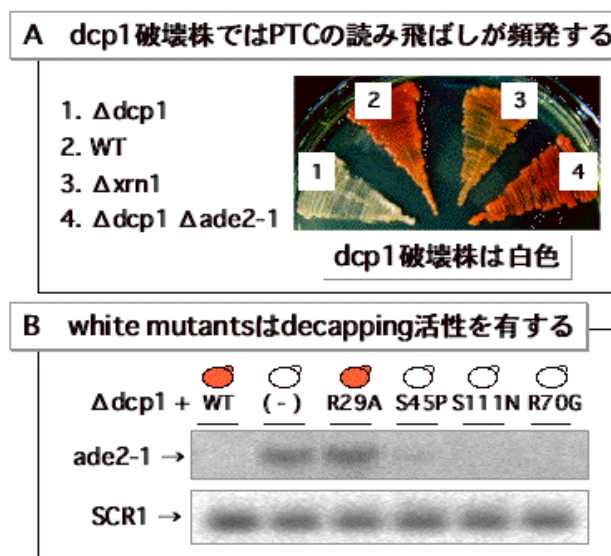


図 4 Dcp1 は翻訳終結反応制御機能を有す

系 (赤 : 読み飛ばし低頻度、白 : 読み飛ばし高頻度) を作製し、出芽酵母の Dcp1 破壊株における効果を検証した。その結果、Dcp1 破壊株は白色を呈し、読み飛ばし頻度が上昇していることが明らかになった (図 4A)。Dcp1 破壊株と同様に mRNA が蓄積する Xrn1 の破壊株では赤色であったことから、翻訳終結には decapping (mRNA 分解) とは異なる機能が関与すると推察された。また新たに単離した読み飛ばし頻度の上昇する (白色を示す) Dcp1 点変異体 (S45P, S111N, R70G) は、decapping 機能を野生型と同程度保持していた (図 4B)。よって、Dcp1 は decapping と独立に翻訳終結に関与すると考えられた。

2-2) Dcp1による翻訳終結の制御に介在する因子の同定

上記で見出された Dcp1 の新しい翻訳終結の制御機能は、翻訳終結反応やそれに依存した mRNA の分解制御に関わる因子を介して発現すると予想される。そこで各種の翻訳終結及び mRNA 分解因子群と Dcp1 との物理的相互作用について検討を行った。その結果、Dcp1 は細胞内において、Pab1 と相互作用することを見いだした (図 5 A)。Pab1 はポリ A 鎖に結合する因子でポリ A 分解酵素による攻撃からポリ A を保護するだけでなく、翻訳終結因子である eRF3 との結合を介して翻訳終結を制御にも機能している (図 5 B)。また、その相互作用は白色を示す点変異体間 (S45P, S111N, R70G) では観察されなくなることから (図 6)、翻訳終結を制御する Dcp1 の機能は Pab1 との相互作用を介して発揮されている可能性が示唆された (図 7)。

まとめ

本研究において私は、タンパク質の生産に連動した mRNA の安定性制御を考える上で重要である Dcp1 の高等真核生物ホモログを新規に同定した。また、分裂酵母以降の種では出芽酵母とは異なった制御様式の存在を示唆し、その機能解析に分裂酵母 Dcp1 が有用であることを示した。よって今後、分裂酵母 Dcp1 を用いて解析を行うことで、より高等な真核生物における mRNA 分解機構の理解が進むことが想像され、この点で本研究は意義深いと考える。

さらに、decapping にのみ機能すると考えられてきた Dcp1 が、decapping 活性とは独立に翻訳終結反応を制御しうることを示した。また、その機能の発揮には Pab1 という翻訳の終結に必須な機能を果たす因子が必要であることを見出した。Pab1 が翻訳終結を制御する上

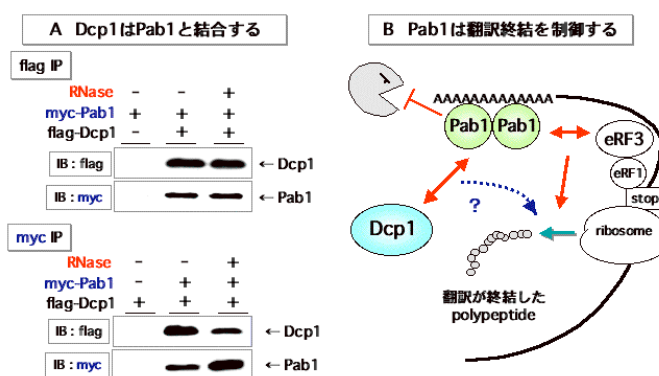


図 5 Dcp1 は翻訳終結に機能する Pab1 と相互作用する

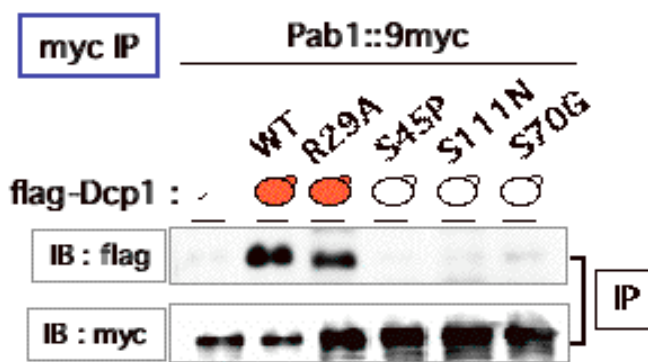


図 6 white mutants は Pab1 と結合しない

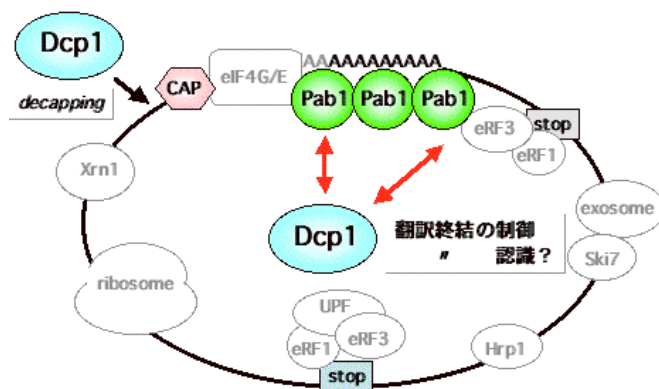


図 7 Dcp1 は Pab1 との相互作用を介して翻訳終結を制御する機能をもつ

で必要な機能、すなわち eRF3 との相互作用に対し作用することで Dcp1 は翻訳終結反応を制御していると予想される。また、細胞質中に無数に存在するキャップ構造の中で Dcp1 により切断をうけるべきキャップ構造は翻訳終結反応が起きている mRNA 上に存在すると予想される。よって、decapping を担う Dcp1 が同時に翻訳終結反応をも制御する、という本研究における結果は、Dcp1 を切断するべきキャップ構造を有する mRNA 上に局在化させるという意味があると考えられる。よって、本研究の結果は、Dcp1 を介した翻訳に連動する mRNA の安定性制御の理解の上で、新たな視点を加えており今後の研究の方向性に対して重要な知見を提供している。