

## 論文の内容の要旨

論文題目 翻訳終結と共役した mRNA 分解制御機構の解析

氏 名 船越 祐司

### 【序】

生物において mRNA は蛋白質合成の鋳型として機能し、一定の翻訳を終え必要量の蛋白質を合成したのちには分解される。しかしながら、翻訳を終えた mRNA が何をきっかけに分解されるのか、その分子機構については不明であった。真核生物の mRNA 分解は、通常 3' 末端の poly(A) 鎖の短縮化を開始段階として進行し、

この段階が律速となっている。先に当研究室では、翻訳終結因子 eRF3 がその N 末端領域を介して、poly(A) 鎖を覆っている Pab1 (poly(A)-binding protein) と相互作用することで、poly(A) 鎖短縮化過程において mRNA 分解を制御していることを見出した。すなわち、eRF3 を介した翻訳終結が mRNA 分解の引き金となっていることを明らかにした (Fig. 1)。

一方、上記のような正常な mRNA の分解の他に、生体には異常な mRNA を積極的に除去する mRNA 監視機構が存在する (Fig. 2)。mRNA 上の翻訳領域の途中にナンセンス変異などに由来する終止コドン (Premature Termination Codon : PTC) が挿入された mRNA は急速に分解されることが知られており、Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) と呼ばれている。これにより、C 末端側が欠損した異常なタンパク質が合成されるのを防いでいる。また、最近

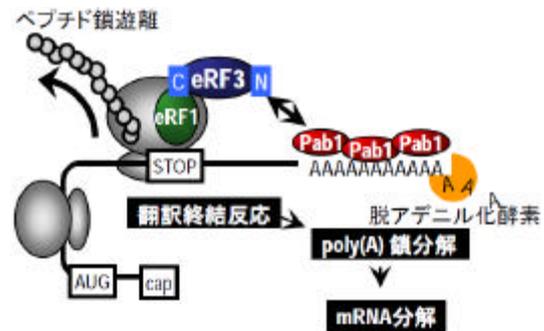


Fig. 1 翻訳終結と共役した mRNA 分解

新たな mRNA 監視機構として、終止コドンの存在しない mRNA を特異的に急速に分解する経路 Non-stop mRNA decay も報告された。そして、両分解経路とも翻訳過程が必要であること、つまり、翻訳されることで異常と認識され、急速に分解されることが示されている。

このように、通常の mRNA 分解、mRNA 監視機構ともに翻訳と密接に関連しており、その分解の鍵となっているのは終止コドンである。そこで私は、mRNA 分解制御機構を理解する上で、翻訳終結反応との関係を詳細に記述することが重要と考え、1) 翻訳終結と共役した poly(A) 鎖分解機構において、これまで不明であった、poly(A) 鎖分解の実体である脱アデニル化酵素と eRF3 との関係、2) 2つの mRNA 監視機構における eRF3 の関与について、真核生物のモデル系である出芽酵母を用いて解析を行った。

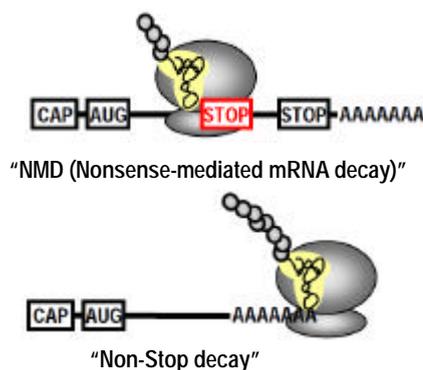


Fig. 2 mRNA 監視機構

## 【結果】

### 1. 翻訳終結と共役した poly(A) 鎖分解機構：脱アデニル化酵素の同定と eRF3 との関係

出芽酵母には 2 種の脱アデニル化酵素が存在する。Pan2 と Pan3 からなる PAN 複合体と Ccr4-Caf1 複合体である。両酵素を欠損する株では poly(A) 鎖が全く分解されないことから、出芽酵母において poly(A) 鎖分解を担っているのはこの 2 つであると考えられる。これらの酵素と eRF3、Pab1 との関係を調べるために、eRF3 と Pab1 との結合を阻害しその機能を阻害する eRF3 の N 末端領域過剰発現株、それぞれの酵素の触媒サブユニットである Pan2 および Ccr4 の破壊株を作製し、poly(A) 鎖の分解について解析した。

#### 1-1) Pan2 破壊株、eRF3 N 末過剰発現株では通常よりも長い poly(A) 鎖が蓄積している

poly(A) 鎖分解における各因子の関係を調べるため、まず、上記の各変異株の定常状態における poly(A) 鎖の解析を行った (Fig. 3)。酵母より調製した total RNA の poly(A) 鎖の長さの分布を、polyacrylamide gel により分離し解析した結果、pan2 破壊株、eRF3 N 末過剰発現株では poly(A) 鎖分解の異常によると思われる長い poly(A) 鎖の蓄積が観察された。一方、ccr4 破壊株では、短い部分が分解されないことによる短い poly(A) 鎖が消失し、Pan2 破壊株とは表現型が異なっていた。さらに、pan2 破壊株、ccr4 破壊株に eRF3 の N 末端領域を過剰発現した場合には、pan2 破壊株では表現型の顕著な亢進は認められず、一方の ccr4 破壊株では ccr4 欠損と eRF3 N 末過剰発現の両方に起因するような表現型を示した。この結果は、eRF3 が主に PAN 複合体に作用していることを示している。

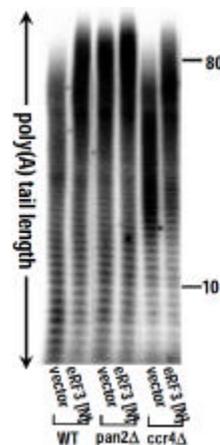


Fig. 3 定常状態における poly(A) 鎖の解析

### 1-2) Ccr4 破壊株、eRF3 N 末過剰発現株では poly(A) 鎖の分解が抑制されている

次に、転写停止後の MFA2 の poly(A) 鎖の経時変化を追うことで、実際に poly(A) 鎖分解の速度を比較した (Fig. 4)。その結果、eRF3 N 末過剰発現株、ccr4 破壊株において、野生株と比較し poly(A) 鎖の分解が抑制されているのが観察された。しかしながら、pan2 破壊株では、定常状態において poly(A) 鎖に異常がみられたにもかかわらず、野生株と比較して poly(A) 鎖の分解速度に顕著な差は認められなかった。この Pan2 破壊株に対し、eRF3 の N 末を過剰発現させたところ、poly(A) 鎖分解の抑制がみられた。これは、eRF3 の N 末過剰発現によって、もう一方の脱アデニル化酵素 Ccr4-Caf1 が阻害されたためと考えられる。

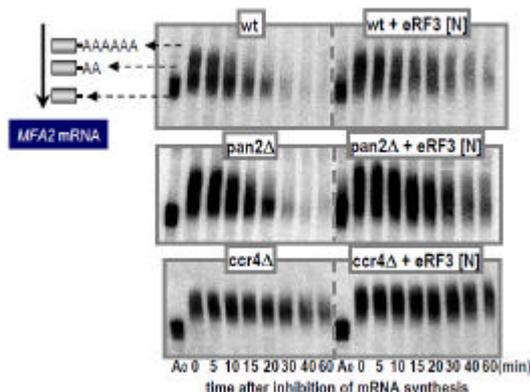


Fig. 4 ccr4<sup>-</sup>, eRF3 N 過剰発現株において poly(A) 鎖分解が阻害されている

以上の結果より、poly(A) 鎖分解の律速となっているのは Ccr4-Caf1 による分解過程であること、および、eRF3 が poly(A) 鎖分解過程において Pan2、Ccr4 の両方を制御していることが明らかとなった。また、両変異株の表現型から、poly(A) 鎖分解において PAN 複合体は poly(A) 鎖分解の初期段階を、Ccr4-Caf1 はそれ以降の分解を主に担っていることが推測される。

### 1-3) eRF3 は Pan3、Caf1 と複合体を形成する

上記のように、eRF3 は PAN 複合体、Ccr4-Caf1 の両方を制御していることが示されたことから、これらの因子の分子的な関係を明らかにするため、両酵素と eRF3 との物理的な相互作用について検討した。内在の eRF3 に Myc-tag を付加した酵母株に Flag-Pan3、あるいは Flag-Caf1 を発現させた株において抗 Flag 抗体により免疫沈降を行ったところ、Pan3、Caf1 とともに eRF3

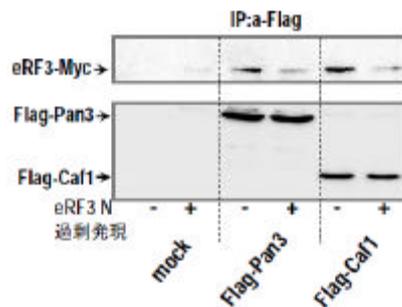


Fig. 5 eRF3 は Pan3、Caf1 と結合する

との間に相互作用が認められた (Fig. 5)。さらに、これらの株において eRF3 の N 末端領域を過剰発現させたところ、Pan3 および Caf1 と eRF3 との結合が阻害されていた。すなわち、eRF3 はその N 末端領域を介して Pan3、Caf1 と相互作用していると考えられる。これらの結果より、eRF3 はその N 末端領域を介して両酵素と複合体を形成することで poly(A) 鎖分解を制御していることが示された。

## 2. mRNA 監視機構における eRF3 の関与の検討

### 2-1) NMD においても eRF3 の N 末端領域を介した mRNA 分解機構が機能している

NMD では、以前より知られていた poly(A) 鎖分解非依存の decapping による 5' → 3' 方向の分解促進に加え、最近、poly(A) 鎖分解の促進とそれに続く 3' → 5' 方向の分解が促進

していることが示されている。このことから、通常の mRNA 分解同様、PTC から poly(A) 鎖分解をつなぐ機構の存在が示唆される。しかしながら、NMD における eRF3 の関与は不明である。そこで、私は 3' 5' 方向の NMD における eRF3 の関与を検討した。そのために、eRF3 の温度感受性変異株である *gst1* 株において 5' 3' 方向のエキソヌクレアーゼである Xrn1 を破壊した株を作製し、PTC の入った PGK1 の mRNA 動態について解析を行った(Fig. 6)。その結果、eRF3 の野生型を導入した株と比較して、vector のみ、または eRF3 の N 末端領域を欠損した変異体を導入した株では、PTC の入った mRNA 分解が抑制されており、NMD に異常が認められた。この結果より、NMD においても eRF3 の N 末端領域を介した mRNA 分解機構が機能していることが示唆された。

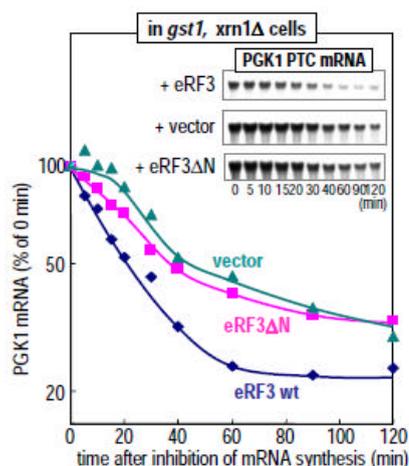


Fig. 6 eRF3 の NMD への関与  
この結果より、NMD においても eRF3 の N 末端領域を介した mRNA 分解機構が機能していることが示唆された。

## 2-2) Non-stop decay には eRF3 は関与しない。

次に、翻訳依存でありながら、通常の終結反応のおこらない Non-stop decay への eRF3 の関与を検討するために、終止コドンの存在しない Luciferase mRNA の発現ベクターを作製し、出芽酵母に導入し、その mRNA 動態を解析した(Fig. 7)。Non-stop decay に関与することが知られている *ski7* の破壊株では野生株と比較して、Non-stop RNA の分解が抑制されていた。しかしながら、*gst1* 株ではこのような分解の抑制は観察されず、野生株と同様に分解されていた。この結果より、eRF3 を介した mRNA 分解は non-stop decay には関与しないことが明らかとなった。すなわち、eRF3 による mRNA 分解には終止コドン及び翻訳終結反応が必要と考えられた。

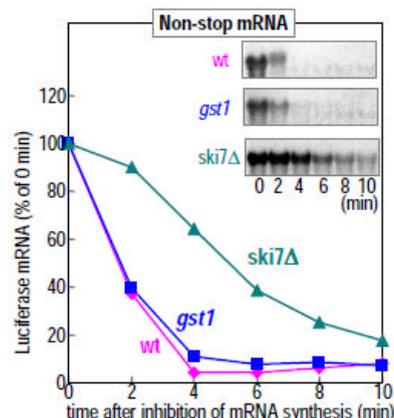


Fig. 7 eRF3 は Non-stop decay に関与しない

## 【まとめ】

本研究から、翻訳終結と共役した poly(A) 鎖の分解において、eRF3 は PAN 複合体と Ccr4-Caf1 の両者を制御することが明らかにされた。また、各種変異株を用いた表現型の解析から、eRF3 は翻訳終結と共役して、まず PAN 複合体を活性化して始めの十数塩基を分解し、その後 Ccr4-Caf1 を介してさらに poly(A) 鎖の分解を制御すると考えられた。また、NMD においても eRF3 によって制御される分解機構が存在すること、その一方で終止コドンの存在しない Non-stop decay には eRF3 は関与しないことを明らかにし、mRNA 分解の鍵となっている終止コドンを介した mRNA 分解において eRF3 が機能することを明らかにした。