

論文の内容の要旨

論文題目 真核ペプチド鎖解離因子 eRF3 におけるアミノ末端拡張領域 (NED) を介した結合因子による機能制御機構

N-terminal extension domain of eRF3 (NED) regulates translation termination through protein stability control mediated by factor binding

氏名 小玉裕之

研究の背景・目的

遺伝子にコードされた遺伝暗号は A、T、G、C の 4 種類の塩基が 3 文字のコドンで対応するアミノ酸を規定する。翻訳の開始、および伸張段階では、アダプター分子である tRNA が対応するコドンを認識してアミノ酸運搬を担うが、翻訳の終結を規定する三種類のコドンは tRNA ではなく、タンパク質因子であるペプチド鎖解離因子により解読される。

ペプチド鎖解離因子は、tRNA 様の機能構造ドメインを持ち、終止コドンの認識、および新生ポリペプチド鎖の解離を触媒するクラス I 解離因子、そして tRNA を運搬する伸張因子ホモログであり、GTP 依存的に終結反応を促進するクラス II 解離因子に分類される。真核生物では、それぞれ eRF1、および eRF3 が対応し、いずれも必須因子である。GTP 結合部位を含む、eRF3 の主要機能部位は分子のカルボキシ末端側に存在し、伸張因子と相同な領域である。一方、その N 末端側には解離反応、および生育に必須ではない約 200 残基の領域が存在する (N-terminal extension domain : NED)。このような領域は伸張因子や、原核生物クラス II 解離因子には見出されないが、ほぼ全ての真核生物 eRF3 がこの領域を保持している。配列保存性が低いものの、アミノ酸組成が偏った、一定の高次構造を取りにくい領域である点で共通しており、真核生物の翻訳終結に特異的な機能領域であることを示唆する。

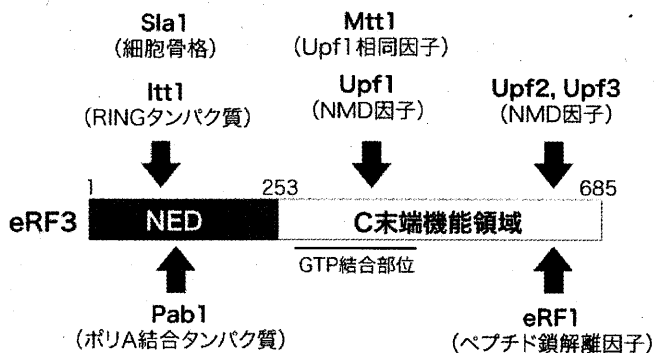


図1: 出芽酵母 eRF3 の一次構造および主な結合因子

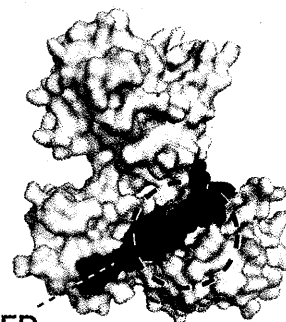


図2: 分裂酵母 eRF3 の X 線結晶構造。eRF1 結合部位を破線で示す。

近年、eRF3 には様々な結合因子が報告され、終止コドン認識・翻訳終結と、高次制御機能の共役を実現する分子であることが示唆されている (図 1)。真核生物に共通してみられる Upf 因子群との結合は、異常 mRNA を特異的に分解する NMD 機構を担い、ポリ A 結合タンパク質との結合は、翻訳の進行と共役して mRNA 分解を促進するなど、mRNA 動態の制御を実現する。さらに出芽酵母では、C 末端領域への Upf1 相同因子 Mtt1 の結合、そして NED とアクチン凝集制御因子 Sla1、機能未知因子 Itt1 との結合が報告されているが、その意義は未解明である。近年、分裂酵母由来 eRF3 の X 線結晶構造が解かれたが、興味深い事に C 末端領域の機能に必須な eRF1 結合部位が、結晶構造中で NED により覆われていた (図 2)。これは、非必須領域である NED が C 末端領域の機能発現に関与することを強く示唆する。そこで筆者はこの領域の機能解明を目的とし、eRF3 結合因子に着目した分子遺伝学的解析を行ない、eRF3 機能への結合因子の影響、および NED の意義について研究を行った。

新たな eRF3 機能評価系の開発と結合因子の作用検証

これまで、翻訳終結関連因子の機能は、主にナンセンスサプレッション法を用い、翻訳終結効率の増減から評価されて来た。しかし、この方法は解離因子の分子機能を一面でしか評価できず、個々の結合因子の機能解析は不可能であった。そこで筆者は、結合因子による eRF3 機能への作用を詳細に解析するためには、新たな eRF3 機能評価系の構築が必要であると考へた。まず、C 末端領域の GTP 結合部位中に点変異を有する、出芽酵母 eRF3 高温感受性変異株を解析し、eRF3 との協働因子である eRF1 の過剰発現により、高温感受性が抑圧されたことから、この株は生育を指標に eRF3 機能向上を検出できることが示唆された。そこで、この変異体 (eRF3ts) の発現量を調整することで生育温度感受性の異なる評価株シリーズを作成し、eRF3 機能の増減による生育をモニターすることで、結合因子の機能を解析する系を構築した。

実際に結合因子による eRF3 機能への影響を評価するため、この評価株シリーズを用いて、NED 結合因子である Itt1、Pab1、Sla1、そして C 末端領域への結合因子である Mtt1、Upf1、Upf2、Upf3 について、過剰発現・遺伝子破壊を行ない、評価株の生育をモニターした。その結果、NED 結合因子である Itt1 過剰発現、および *sla1* 遺伝子破壊下において評価株の生育が低下した。一方、その他の因子による生育へ影響は見られなかった。

Upf 因子群の破壊はナンセンスサプレッションを引き起こすことが報告されていたが、これは NMD の抑制により、ナンセンス変異を含むレポーター遺伝子 mRNA が安定化したことに起因すると考えられる。また、Pab1 の過剰発現によるアンチサプレッションは、Pab1 と翻訳開始因子 eIF4G との結合がもたらす mRNA 環状構造が、解離因子の効率的なりサイ

クルを実現した結果と推測出来る。また、Mtt1 によるナンセンスサプレッションは、結合因子の過剰発現により、解離因子の翻訳機構への移行が阻害された結果と考えられる。以上のように、開発した系を用いることで、eRF3 自身の機能への作用、そして他の翻訳機構への作用による表現型を、明確に分けて議論することが可能となった。

eRF3 の機能に顕著な影響を示したのはいずれも NED 結合因子であったことから、NED による eRF3 機能への影響を検証したところ、eRF3ts は NED 非存在下では生育を維持できず、さらに完全長に比べ、約 7 倍の速度でタンパク質分解を受けるという、野生型には見られない特性を明らかにした ($t_{1/2}$ (Full) = 407 min, $t_{1/2}$ (Δ NED) = 60 min)。また、eRF3ts は野生型 eRF3 ($t_{1/2}$ = 630 min) と比較して不安定であることも明らかとなった。

以上より、Itt1 が eRF3 機能の低下、Sla1 が eRF3 機能の維持・向上に機能すること、NED は eRF3 タンパク質の安定化に機能する領域であることが示された。eRF3ts の不安定な性質が、本来 NED が持つ機能を顕在化させたと考えられる。

eRF3 機能制御とタンパク質分解系との共役

NED 結合因子による eRF3 機能制御の機構を明らかにするため、評価株シリーズにおける細胞内 eRF3ts タンパク質の定量を行なった。その結果、評価株シリーズ (HK100E, HK100S, HK100M) は eRF3 の発現量に応じた 3 段階のタンパク質存在量を示すが、Itt1 の過剰発現、および *sla1* 遺伝子の破壊により、細胞内の eRF3 タンパク質存在量が著しく低下することが明らかとなった (図 3)。このことは、結合因子による eRF3 機能制御は、細胞内 eRF3 タンパク質の安定制御が主要因であり、Itt1 は eRF3 を不安定化、Sla1 は eRF3 を安定化することを示す。

eRF3 タンパク質を不安定化した Itt1 は、機能未知因子であるが、E3 ユビキチンリガーゼに特徴的な Zn²⁺ 結合性 RING モチーフを保持する。このことから、Itt1 は eRF3 を基質として、積極的にタンパク質分解へと移行させていることが推測された。そこで Itt1 による eRF3 不安定化へのタンパク質分解系の関与を検証する目的で、主要なタンパク質分解経路であるオートファジー・液胞、およびユビキチン・プロテアソーム制御因子を、評価株の遺伝子破壊により抑制し、Itt1 過剰発現下による生育をモニターした。その結果、液胞プロテアーゼの遺伝子破壊により、評価株は Itt1 発現下での生育を維持した。以上の結果から、eRF3 は Itt1 によりタンパク質分解経路への移行が促進され、分解を受けていることが明らかとなった。

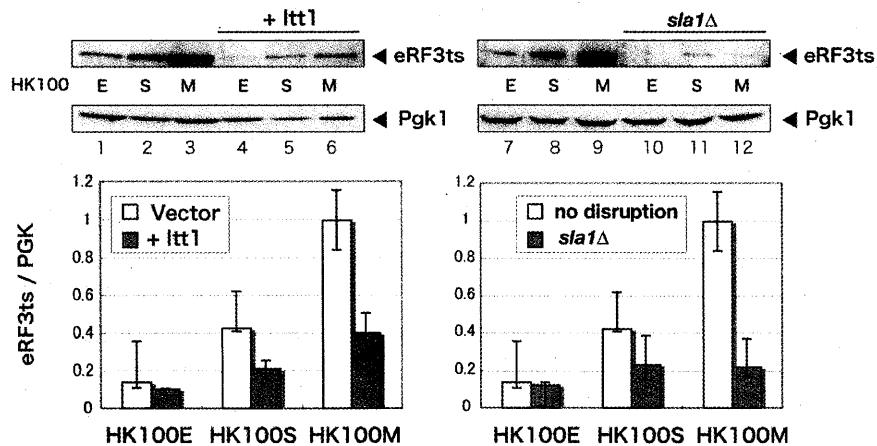


図3: Itt1 過剰発現・*sla1* 遺伝子破壊による細胞内 eRF3ts タンパク質量低下

NED を介した結合因子による eRF3 機能制御

本研究で新たに開発した eRF3 機能評価系による検証から、結合因子 Itt1 および Sla1 により、eRF3 機能・安定性が制御されることを明らかとした。興味深い事に、これら二つの因子はいずれも機能が未解明な NED との結合因子であった。アクチン制御因子である Sla1 は細胞骨格へ局在しており、多くのリボソームタンパク質との結合性も示唆されている。Sla1 が eRF3 の翻訳装置への分配や局在を促進することで、結果として eRF3 の機能向上、および安定化が引き起こされることが推測できる。また、Itt1 は実際に eRF3ts タンパク質の分解を促進することが明らかとなった。以上の結果より、NED は様々な生理活性因子との結合を通して、C 末端の解離因子機能を制御する「要」領域であることが推察され、新たな eRF3 機能制御モデルを提唱した (図 4)。

翻訳終結は、タンパク質合成に必須な、生命維持の普遍的機構である。しかし同時に、翻訳終結効率の低下は、ナンセンスサプレッションや翻訳フレームシフトなど、終止コドンの回避によるタンパク質発現 (リコーディング) を促進させるなど、制御段階としても機能する。実際に、フレームシフトによるアンチザイム合成促進は、細胞内のポリアミン濃度を抑制し、細胞増殖を抑制するというストレス応答を実現する。反対に、翻訳終結効率の向上は、終止コドン回避による発現を必要とする、HIV などレトロウィルスの増殖を抑制する。近年、このような発現調節が、解離因子の機能制御によって直接的に行なわれる例が報告されて来ている。本研究で明らかとなった eRF3 の機能制御は、ストレスや細胞周期、細胞内局在下などの環境に応答した発現調節を実現している可能性を強く示唆する。今後、生理活性因子を介した詳細なプロセス、および生理的意義のさらなる解明が求められるが、翻訳反応自体に必須ではない様々な因子が、NED との相互作用を介して解離因子の機能制御を実現していることを明らかとした、本研究の意義は大きい。

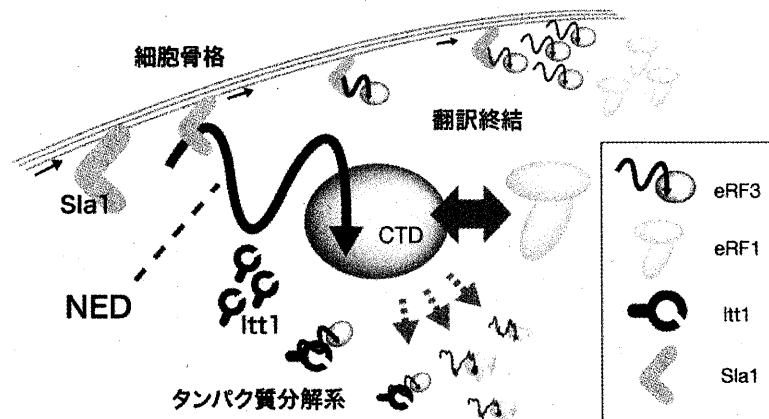


図4: NED を介した結合因子による eRF3 機能制御