

審査の結果の要旨

氏名 高橋 真也

遺伝子発現は、DNA を鋳型として mRNA が転写され、その mRNA を用いて蛋白質が翻訳されることで遂行される。正常に転写、スプライシングを受けた mRNA からは正常な機能蛋白質が産生され、本来の機能を遂行する。しかしながら、転写、スプライシング時にエラーが起き、蛋白質の読み枠に不適切な翻訳終結コドン、すなわちナンセンス変異が含まれてしまった場合、そのような mRNA からは不完全な蛋白質が産生される。このような蛋白質は生体内で不完全な機能しか果たせないため、真核細胞においては、このような異常な mRNA を速やかに分解する機構が備わっている。Nonsense-mediated mRNA decay、NMD 経路と呼ばれる機構である。

NMD 経路は、ナンセンス変異の認識過程と mRNA 分解過程の両過程に分けられる。NMD 必須因子である Upf1 は、ナンセンス変異の認識に関与する翻訳終結因子 eRF3 及び mRNA 分解酵素群と相互作用することから、Upf1 はナンセンス変異認識過程と mRNA 分解過程の両過程を共役する因子であることが予想された。しかしながら、Upf1 を取り巻く因子群の相互作用並びに Upf1 自身の生化学的意義に関しては未解明であった。「ナンセンス変異を含む mRNA の分解経路に介在する Upf 因子群の新規活性化機構の解析」と題した本論文においては、Upf1 が RING finger 型ユビキチンリガーゼ E3 であることを解明し、その活性が NMD 経路において重要な役割を果たすことを見出している。

1. Upf1 はユビキチンリガーゼ E3 活性を有する

Upf1 の一次構造に着目したところ、N 末端領域にユビキチン修飾経路におけるユビキチンリガーゼ (E3) に特徴的な RING ドメインを想起させる配列を見出した。ユビキチン修飾経路とは、標的蛋白質がそれぞれの特異的 E3 によりユビキチン化され、そのユビキチンがシグナルとなりプロテアソームにより分解される、もしくは多様な情報を伝える経路である。酵母細胞内から精製したリコンビナント Upf1 を用いて *in vitro* ユビキチン化アッセイを行ったところ、自己ユビキチン化を示す Upf1 の高分子側へのシフトが検出された。また、このようなシフトは RING ドメインを欠いた Upf1 では検出されなかった。さらに、RING ドメインを形成していると考えられる、システイン及びヒスチジンに点変異を与えたリコンビナント Upf1 もまた、自己ユビキチン化能を有さないことがわかった。これらの結果から、Upf1 RING ドメインは、自身のユビキチンリガーゼ活性において重要であることが示唆された。

2. Upf1 RING ドメインは NMD 経路の活性化に重要である

Upf1 の RING ドメインが NMD 経路において必要か否かを検出した。内在の Upf1 を欠損させた細胞に正常及び変異 RING ドメインを有する Upf1 を導入したところ、正常な Upf1 及びユビキチンリガーゼ活性を有する Upf1 では NMD 経路の欠損が抑制されるのに対し、ユビキチンリガーゼ活性を有さない Upf1 では抑制できなかった。Upf1 ユビキチンリガーゼ活性は NMD 経路活性化に必要であることが強く示唆された。

3. Upf1 ユビキチンリガーゼ活性には Upf3 が必要である

Upf1 ユビキチンリガーゼ活性における他の Upf 因子群の寄与を調べる目的で、UPF2 もしくは UPF3 を欠いた細胞からリコンビナント Upf1 を調製し、*in vitro* ユビキチン化アッセイを行った。その結果、UPF2 を欠いた細胞から調製した Upf1 は野生細胞から調製した Upf1 と同等にユビキチンリガーゼ活性を有したが、UPF3 を欠いた細胞から調製した Upf1 はユビキチンリガーゼ活性を示さなかった。さらに、Upf3 の発現を救助した細胞では、Upf1 ユビキチンリガーゼ活性は正常に回復した。これらの結果から、Upf1 のユビキチンリガーゼ活性において Upf3 の存在が重要であることが示された。

4. Upf1 ユビキチンリガーゼ活性には Upf3 の相互作用が必要である

Upf 因子群は複合体として存在していること報告されていたが、詳細な結合様式に関しては不明であった。そこで、Upf1-Upf3 間の相互作用を免疫沈降法により検討したところ、野生型 Upf1 と Upf3 の相互作用は認められたが、ユビキチンリガーゼ活性を欠く RING 変異体 Upf1 では、Upf3 との相互作用が完全に抑制されていた。また、*upf2* 破壊細胞を用いて同様の検討を行ったところ、Upf1 と Upf3 の物理的相互作用は維持されることが示された。一方、先に Upf1 と相互作用することが知られている eRF3 については、野生型及び RING 変異体 Upf1 とともに相互作用に変化は認められなかった。したがって、Upf1 の RING ドメインは Upf3 との相互作用に重要であり、Upf1 ユビキチンリガーゼ活性は Upf3 との相互作用によって、特異的にもたらされる可能性が考えられた。

5. Upf1 は Upf3 のユビキチン化に寄与する

Upf1 のユビキチンリガーゼ活性が NMD 経路において機能するならば、NMD 経路活性化時において、実際にユビキチン化される基質の存在が考えられる。先の解析により、Upf1 免疫沈降画分で Upf3 がブロードなバンドとして検出されることから、Upf3 自身が Upf1 の基質である可能性を考え、Upf3 のユビキチン化状態を正常細胞及び *upf1* 破壊細胞において検出した。その結果、正常な細胞において認められる、モノユビキチン化された Upf3 が *upf1* 破壊細胞では検出されなかった。以上から、Upf1 は自身のユビキチンリガーゼ活性に Upf3 を必要とするだけでなく、Upf3 そのものを基質としてユビキチン化している可能性が考えられた。

[総括]

本研究において得られた知見から、以下のような NMD 経路活性化メカニズムが考えられた。まず、ナンセンス変異の認識時に、Upf1 は翻訳終結因子 eRF3 からのシグナルを受け、Upf3 をリクルートする。次に、Upf3 と相互作用した Upf1 は Upf3 自身をユビキチン化し、最終的にこのシグナルが mRNA 分解酵素群へと伝わり、NMD 経路を活性化するというモデルである。本論文は Upf1 ユビキチンリガーゼ活性の解析を通じて、NMD 経路制御機構の解明における新たな手掛かりを明らかにしており、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。