

# 論文の内容の要旨

論文題目 リボソームタンパク質の脱ユビキチン化による翻訳制御機構の解明

氏名 竹原 由香

## 【序論】

リボソームは、生体のあらゆる生命活動を司るタンパク質を mRNA から翻訳・合成する、生命の根幹を担うオルガネラである。その重要さゆえ、リボソームにおいては複数の品質管理機構が働いている。それらの機構において、リボソームタンパク質のユビキチン化が、機構発動に重要な役割を果たすという報告が複数なされてきた。また、ある種の癌ではリボソームタンパク質のユビキチン化が亢進しているという報告があるなど、疾患との関連も報告されている。さらに、ユビキチン化はユビキチンを基質に付加する一連の酵素群 (E1、E2、E3) と、ユビキチン化を解消する脱ユビキチン化酵素により制御されているが、リボソームにおける脱ユビキチン化の意義を明らかにした報告は少ない。

そこで、出芽酵母における網羅的探索からリボソーム結合タンパク質として同定された脱ユビキチン化酵素 Otu2 に着目した。Otu2 は ovarian tumor-like (OTU) superfamily に属する脱ユビキチン化酵素に分類されているが、その基質や生体内での機能は全く明らかになっていない。本研究では Otu2 によるリボソームタンパク質やその関連因子の脱ユビキチン化を介した翻訳制御機構の解明を目指した。

## 【結果・考察】

### 1. Otu2 は 60S サブユニット解離後から翻訳開始前の 40S リボソーム複合体中に存在する

リボソームタンパク質は、複合体が形成される途中の形成中間体、40S・60S サブユニット、80S モノソーム、ポリソームのいずれかに存在する。まず Otu2 がどの状態のリボソームタンパク質と相互作用し得るのか密度勾配遠心法を用いて確かめた。その結果、Otu2 は 40S サブユニットが含まれる分画にのみ存在することがわかった (Fig. 1A)。

40S サブユニットの状態には、翻訳過程の進行に伴って変化する幾つかの段階が存在する (Fig. 1B)。Otu2 がどの段階の 40S サブユニットと相互作用するかをさらに詳細に明らかに

するため、各段階の 40S サブユニットと特異的に結合するタンパク質と Otu2 との共免疫沈降実験を行った。その結果、Otu2 は翻訳終結後複合体から 43S 翻訳開始前複合体に含まれる Rli1、eIF3A、eIF5 と結合している一方で、eIF4A、eIF4E のような 48S 翻訳開始前複合体の構成因子とは結合が観察されなかった (Fig. 1C)。

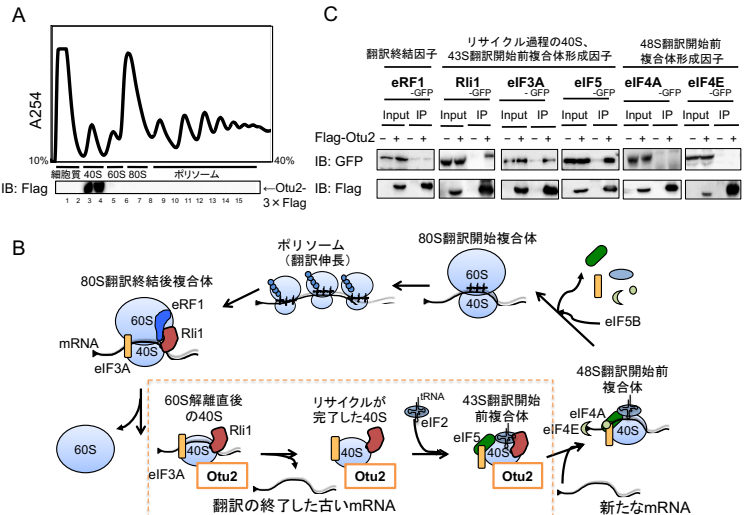
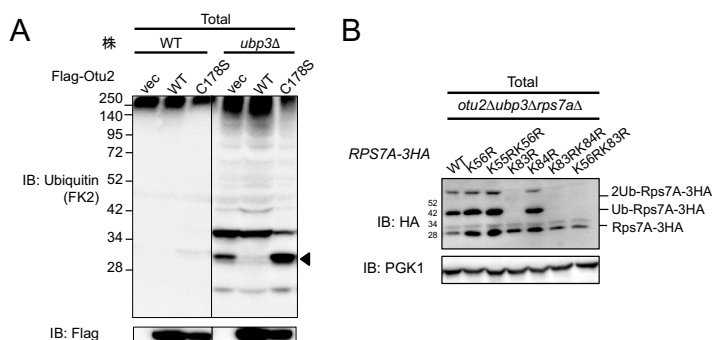


Fig. 1 Otu2は60Sサブユニット解離後の40Sリボソーム複合体と相互作用する (A) Otu2-3×Flag株の細胞破砕液をショ糖密度勾配遠心法により分画し、抗Flag抗体でイムノブロットを行った。 (B) 翻訳終結からリサイクル、翻訳開始・伸長までの模式図。 (C) Flag-Otu2を過剰発現させ、抗Flagビーズで免疫沈降を行い、表記の抗体でイムノブロットを行った。

この結果から Otu2 は主に 80S から 60S サブユニットが解離後、次の翻訳のための mRNA が結合していない状態の 40S リボソーム複合体と相互作用することが示唆された。

## 2. Otu2 は Ubp3 と共に Rps7A の Lys83 残基を脱ユビキチン化する

Otu2 の機能を探索する目的で、Otu2 欠損変異と他の脱ユビキチン化酵素欠損変異との網羅的な二重変異の組み合わせを行ったところ、Otu2 と Ubp3 との二重欠損が増殖遅延を起こすことが明らかとなった。Ubp3 欠損株内で Otu2 活性中心欠失体 (Otu2-C187S) を一過的に過剰発現させた際にユビキチン化が亢進するタンパク質を Otu2 と Ubp3 の共通基質と予想し、このタンパク質を精製し同定した (Fig. 2A)。その結果、40S リボソームサブユニットを構成する Rps7A が同定され、83 番目のリジン (K83) がユビキチン化されていた。K83 をアルギニンに変異 (K83R) させると二重欠損株で蓄積したユビキチン化 Rps7A が消失し、Otu2 と Ubp3 は Rps7A の脱ユビキチン化に関わっていることが確認された (Fig. 2B)。

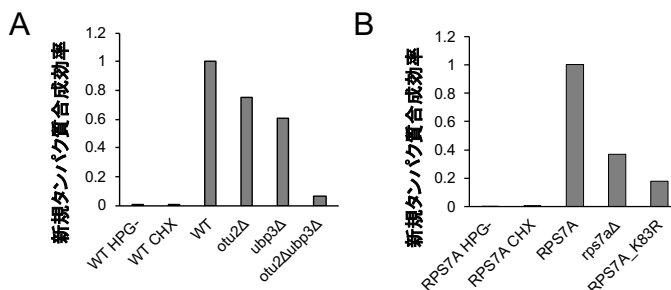


**Fig. 2 Otu2はUbp3と共にRps7A\_K83を脱ユビキチン化する**

- (A) 野生型株、*ubp3Δ*株にOtu2またはOtu2活性欠損体 (Otu2-C187S) を過剰発現させ、細胞破砕液を表記の抗体でイムノプロットを行った。  
 (B) *otu2Δubp3Δrps7aΔ*株にRPS7Aまたは各RPS7A-KR変異体を入れ戻し、表記の抗体でイムノプロットを行った。K83R以外のものについては、コントロールとして用いた。

## 3. Rps7A の Lys83 残基のユビキチン化と脱ユビキチン化の両方が、翻訳に必要である

Otu2 と Ubp3 の二重欠損株の密度勾配遠心法において、ポリソームの減少が観察されたことから、翻訳との関連を考えた。タンパク質の新規合成効率を測定すると、Otu2 と Ubp3 の二重欠損株で顕著に低下したことから、Rps7A の脱ユビキチン化が翻訳に必要であることが示唆された (Fig. 3A)。一方、Rps7A-K83R 変異体でも翻訳抑制が見られたことから、Rps7A が K83 でユビキチン化されることも、翻訳に必要であると考えられた (Fig. 3B)。

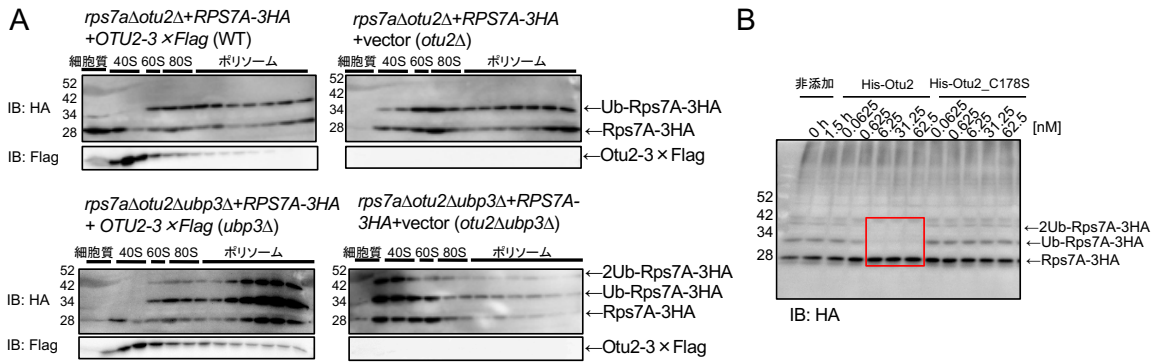


**Fig. 3 Rps7Aのユビキチン化と脱ユビキチン化は共に翻訳に重要である**

- (A) 野生型株 (WT)、各単独欠損株 (*otu2Δ*、*ubp3Δ*)、二重欠損株 (*otu2Δubp3Δ*) における新規合成効率をClick-iT HPG®により測定した。  
 (B) Rps7A欠損株 (*rps7aΔ*) にRPS7AまたはRPS7A変異体 (RPS7A-K83R) を入れ戻し、新規合成効率をClick-iT HPG®により測定した。

## 4. Otu2 は 40S サブユニット中の Rps7A を脱ユビキチン化する

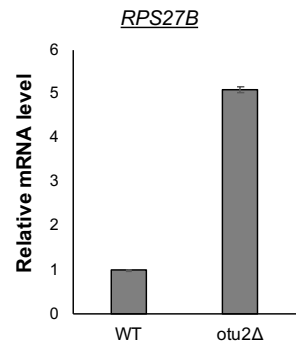
Rps7A のユビキチン化状態を密度勾配遠心法によってリボソームを分画して調べると、野生型株では 80S モノソームとポリソームにおいてモノユビキチン化されていることが確認された。一方、Otu2 単独欠損株では、40S リボソーム画分においてもユビキチン化 Rps7A の蓄積が観察された。またその蓄積は Otu2 と Ubp3 との二重欠損株においてより顕著であった (Fig. 4A)。さらにユビキチン化 Rps7A が蓄積した 40S リボソーム画分に大腸菌から精製した Otu2 を加えると Rps7A のユビキチン化は解消した (Fig. 4B)。これより Otu2 は 40S サブユニットの Rps7A を直接、脱ユビキチン化することが示唆された。



**Fig. 4 Otu2は40Sサブユニット中のRps7Aを脱ユビキチン化する**  
 (A) 野生型株 (WT)、各単独破壊株 (*otu2Δ*、*ubp3Δ*)、二重破壊株 (*otu2Δubp3Δ*) の細胞破砕液をシヨ糖密度勾配遠心法により分画し、表記の抗体でイムノブロットを行った。  
 (B) *otu2Δubp3Δ* 株、*RPS7A-3HA* 株の細胞破砕液をシヨ糖密度勾配遠心法で分画し、40Sサブユニットの含まれる画分に精製した Otu2または変異型 Otu2 (Otu2-C178S) を添加し、1.5時間反応後、抗HA抗体でイムノブロットを行った。

### 5. Otu2 はリサイクル過程における 40S サブユニットからの mRNA の解離に重要である

Otu2 が 40S サブユニット中の Rps7A を脱ユビキチン化する生理学的意義として、翻訳終了後の 40S サブユニットのリサイクル、もしくは新たな翻訳開始前複合体形成への関与が推測された。まず 40S サブユニットのリサイクル過程では、翻訳終了した 80S リボソームが 60S と 40S サブユニットに解離した直後には、40S サブユニットには mRNA が結合しているが、新たな mRNA を翻訳するためには 40S サブユニットから古い mRNA を解離させる必要がある。そこで野生型株と Otu2 単独欠損株における解離した 40S サブユニットに結合している mRNA 量を、定量 RT-PCR 法により測定した。その結果、野生型株と比較し、Otu2 単独欠損株においては mRNA の結合したままの 40S サブユニットが顕著に蓄積することが明らかとなった。Otu2 欠損により新規タンパク質合成効率が低下することとあわせて、Otu2 はリサイクル過程の 40S サブユニットから翻訳が終了した mRNA を解離させる機能があることが示唆された。



**Fig. 5 Otu2単独欠損株においては、mRNAが結合したままの状態の40Sサブユニットが蓄積する**  
*Rps13*に3×Flagタグの組み込まれた野生型株、または Otu2単独欠損株の細胞破砕液をシヨ糖密度勾配遠心法により分画し、40Sサブユニットの含まれる画分より抗Flagビーズで免疫沈降を行った。RNAを抽出後、定量 RT-PCRを行い、18S rRNAで標準化した。

#### 【総括】

本研究で私は、Otu2 がリサイクル過程から翻訳開始前段階の 40S リボソーム複合体と相互作用することを明らかとした。そして Rps7A を脱ユビキチン化することによって 40S サブユニットの正常なリサイクルを完了させることが、その生理学的意義であると結論づけた。

また本研究において、翻訳中のリボソームにおける Rps7A は常にユビキチン化されており、これもまた翻訳に重要であることを明らかとした。これらより、翻訳中のリボソームでは Rps7A はユビキチン化され、翻訳が終了したのちにはそのユビキチンが外されて新たな翻訳開始進行に繋げるといふ、Rps7A のユビキチン化と脱ユビキチン化の両方を介したりボソームにおける翻訳制御機構が存在することを提唱した。