

審査の結果の要旨

氏名 竹原 由香

本論文は、生命現象の根幹を担うリボソームにおけるユビキチン化と脱ユビキチン化による新たな翻訳制御機構の解明を目的としたものである。40S リボソームと結合することが知られているにも関わらず機能未知であった出芽酵母の脱ユビキチン化酵素 Otu2 に着目し、Otu2 の脱ユビキチン化基質の同定や Otu2 結合タンパク質の質量分析による網羅的な解析等から、翻訳中にはユビキチン化されるべき 40S リボソーム構成タンパク質の一つ、Rps7A の 83 番目のリジン残基が、翻訳終了後の 40S リボソームにおいては Otu2 によって脱ユビキチン化される必要があり、それによりリボソームをリサイクルして新たな翻訳に繋げている可能性を見出した。

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。それゆえ、リボソームにおける品質管理機構や制御は重要である。近年リボソームにおいて、リボソームタンパク質のユビキチン化や脱ユビキチン化が重要なシグナル伝達としての役割を持つことが複数報告されてきた。例えば、翻訳途中に異常を生じたリボソームを分解除去するための品質解離機構発動のためのリボソームサブユニットを解離させるシグナルや、栄養飢餓時に 60S リボソームを分解することで恒常性維持を担うリボファジーと呼ばれる制御機構発動のシグナルとなることで生命維持に重要な働きを示すことが報告されている。しかし、ユビキチン化されるリボソームタンパク質は 100 以上も知られているにも関わらず、これらのユビキチン化が担う役割は報告され始めたばかりであり、その多くは未解明である。出芽酵母の脱ユビキチン化酵素 Otu2 は 40S リボソーム結合タンパク質として同定されていたが、その基質や生体内での機能は全く明らかにされていなかった。そこで Otu2 が 40S リボソームと相互作用する生理学的意義の解明により、新たな翻訳制御機構の解明を目指した。

本研究では、まず Otu2 が 40S リボソームと相互作用しているかを調べる目的で、Otu2 に内在性に 3×Flag タグを付加した細胞を作製した。密度勾配遠心法を用いて分画して調べると、Otu2 は 80S リボソームを構成していないフリーの 40S リボソームが含まれる画分にのみ局在が確認された。また Otu2 結合タンパク質の質量分析による網羅的な探索においても、多数の 40S リボソームタンパク質が同定され、Otu2 は 40S リボソームと相互作用することが明らかとなった。

次に 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い、Otu2 と Ubp3 との二重欠損が増殖遅延を起こすことを明らかとした。この株で蓄積するユビキチン化タンパク質の質量分析を行い、Otu2 と Ubp3 に共通する脱ユビキチン化基質として、40S リボソーム構成タンパク質の一つ Rps7A を同定し、83 番目のリジン (K83) がユビキチン化されることを確認した。

Otu2 と Ubp3 の二重欠損株の密度勾配遠心法を行うとポリソームの減少が観察されており、翻訳との関連が考えられたことから、タンパク質の新規合成効率を測定した。その結果、Otu2 と Ubp3 の各単独欠損株においても翻訳効率は低下しており、Otu2 と Ubp3 の二重欠損株ではより顕著に低下していた。このことから、Rps7A の脱ユビキチン化が翻訳に必要なことが示唆された。一方で、Rps7A の K83 をアルギニンに変異 (K83R) させた Rps7A-K83R 変異体でも翻訳効率は低下していたことから、Rps7A が K83 でユビキチン化されることも、翻訳に必要なと考えられた。

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のみモノユビキチン化されていることが確認さ

れ、一方で 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。60S、80S、ポリソームと相互作用することの報告されている Ubp3 の単独欠損株では、60S、80S、ポリソームにおいてのみポリユビキチン化 Rps7A が観察され、40S リボソーム画分におけるユビキチン化 Rps7A は観察されなかったことから、40S リボソームの Rps7A の脱ユビキチン化は Otu2 に依存するものであると考えられた。実際に、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、Otu2 の活性中心変異体 (Otu2-C178S) の添加では解消されなかった。これより Otu2 は 40S リボソームの Rps7A を直接、脱ユビキチン化することが明らかとなった。さらに翻訳効率の低下している Otu2 と Ubp3 の二重欠損株より酵母翻訳ライセートを調整し、合成 mRNA と大腸菌から精製した Otu2 を添加すると翻訳効率は増加したことから、Otu2 は *in vitro* においても翻訳促進に寄与することが示唆された。

Otu2 は 40S リボソームと相互作用するが、40S リボソーム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。Otu2 がどの段階の 40S リボソームと相互作用するかをさらに詳細に明らかにすることを目的として、各段階の 40S リボソーム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 翻訳開始前複体に含まれる Hcr1、Rli1、eIF3A、eIF5 と結合している一方で、eIF4A、eIF4E のような 48S 翻訳開始前複体の構成因子とは結合が観察されなかった。この結果から Otu2 は主に 80S リボソームから 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。

以上の結果より、Otu2 が 40S リボソーム中の Rps7A を脱ユビキチン化する生理学的意義として、翻訳終結後の 40S リボソームのリサイクル、もしくは新たな翻訳開始前複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、翻訳終結した 80S リボソームが 60S リボソームと 40S リボソームに解離した直後には、40S リボソームには mRNA が結合しているが、新たな mRNA を翻訳するためには 40S リボソームから古い 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 リボソームに結合している 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 リボソーム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 リボソーム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。

以上の研究から、竹原由香は以下の成果を示した。まず Otu2 と重複して機能する脱ユビキチン化酵素の探索により、他の脱ユビキチン化酵素 Ubp3 を同定した。そして Otu2 は Ubp3 と共に 40S リボソームを構成するタンパク質である Rps7A を翻訳サイクルの異なる局面において脱ユビキチン化し、翻訳の促進に寄与していることを明らかにした。さらに、Rps7A のユビキチン化部位を決定し、翻訳中の 80S リボソームの Rps7A のユビキチン化が翻訳に重要である一方で、翻訳が終了し 60S リボソームが解離した 40S リボソームにおいては Otu2 により脱ユビキチン化されていることを明らかにした。Otu2 欠損により Rps7A の脱ユビキチン化を阻害すると翻訳終了後のリサイクル過程にある 40S リボソームから mRNA が解離しにくくなっており、Otu2 は 40S リボソームのリサイクルを完了させ、新たな翻訳に繋げる機能を持つと思われる。

本論文で示す Rps7A のユビキチン化と脱ユビキチン化による正常な翻訳の制御は新規の翻訳制御機構であると考えられ、リボソームにおけるユビキチンを介した新たな翻訳制御の重要性の理解に繋がると考えられる。

よって本論文は博士（薬学）の学位請求論文として合格と認められる。