

博士論文

酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系を利用した  
eIF5A の機能解析

阿部 大翔

# 目次

1. 序説 .....	1
1.1 真核細胞のタンパク質合成反応 .....	1
1.2 代表的な翻訳抑制配列 .....	3
1.3 連続プロリン配列の翻訳促進に関わる eIF5A の概要 .....	6
1.4 eIF5A の hypusine 修飾 .....	7
1.5 eIF5A とリボソーム複合体の構造 .....	9
1.6 再構成型生体外タンパク質合成系を用いた解析 .....	16
1.7 本研究の目的 .....	17
2. 方法 .....	18
2.1 実験材料と試料調製 .....	18
2.1.1 実験材料 .....	18
2.1.2 翻訳因子発現用プラスミドと菌株 .....	20
2.1.3 <i>In vitro</i> 翻訳反应用プラスミドの構築 .....	22
2.1.4 <i>In vitro</i> 翻訳反应用 DNA 断片の調製 .....	32
2.1.5 <i>In vitro</i> 翻訳反应用 mRNA の調製 .....	32
2.1.6 出芽酵母の破碎方法 .....	33
2.1.7 翻訳因子の調製 .....	34
2.1.7.1 酵母リボソームの調製 .....	34
2.1.7.2 酵母 tRNA mix の調製 .....	35
2.1.7.3 eEF1A の調製 .....	36
2.1.7.4 eEF2 の調製 .....	37
2.1.7.5 eEF3 の調製 .....	38
2.1.7.6 eRF1 の調製 .....	39
2.1.7.7 eRF3 の調製 .....	40
2.1.7.8 Rli1 の調製 .....	41
2.1.7.9 Dom34 の調製 .....	42

2.1.7.10 Hbs1 の調製 .....	44
2.1.7.11 eIF5A の調製 .....	45
2.1.8 tRNA アミノアシル化反应用 S100 Lysate の調製 .....	45
2.1.9 アミノアシル tRNA の調製 .....	46
2.2 酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系と生化学実験の方法 ...	48
2.2.1 酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系による タンパク質合成 .....	48
2.2.2 [ <sup>35</sup> S]メチオニンを用いた翻訳反応 .....	49
2.2.3 SDS-PAGE による放射性同位体標識された翻訳産物の解析 ...	49
2.2.4 Tricine SDS-PAGE による 放射性同位体標識された翻訳産物の解析 .....	50
2.2.5 翻訳産物 (nLuc) の酵素活性測定 .....	50
2.2.6 ショ糖密度勾配遠心法を用いたペプチド解離解析 .....	51
2.2.7 ウェスタンブロッティング .....	52
2.2.8 翻訳反応後のペプチジル tRNA の解析 .....	52
3. 結果 .....	53
3.1 CrPV IRES を利用した <i>In vitro</i> 翻訳系の構築 .....	53
3.2 酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系による nLuc の合成 ...	56
3.3 酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系の因子依存性の確認 ...	58
3.4 DNA start 翻訳系では翻訳停止が観察されない .....	63
3.5 mRNA start 翻訳系では 連続プロリン配列依存の翻訳抑制が観察されない .....	65
3.6 低 Mg <sup>2+</sup> 低ポリアミン濃度において 連続プロリン配列の翻訳が抑制される .....	67
3.7 mRNA, aa-tRNA start 翻訳系を用いた翻訳停止の観察 .....	71
3.8 mRNA, aa-tRNA start 翻訳系で因子依存性の確認 .....	71
3.9 解析に用いた eIF5A .....	73

3.10 低濃度の eIF5A は hypusine 修飾依存的に連続プロリン配列の翻訳を促進	75
3.11 リボソームと等量の未修飾 eIF5A は 連続プロリン配列の翻訳を促進	77
3.12 Tricine SDS-PAGE で翻訳停止配列依存の翻訳停止を確認	79
3.13 連続プロリン配列で停止したペプチジル tRNA は Pth 感受性を示す	79
3.14 連続プロリンペプチジル tRNA はリボソームから解離している	84
3.15 連続トリプトファン配列で停止したペプチジル tRNA は Pth 感受性を示さない	86
4. 考察	90
4.1 本研究のまとめ	90
4.2 真核細胞における連続プロリン配列の翻訳停止メカニズム	92
4.3 hypusine 修飾のタンパク質合成における役割	93
4.4 未修飾 eIF5A のタンパク質合成における役割	96
4.5 原核細胞と真核細胞の連続プロリン配列の翻訳メカニズムの比較	99
4.6 eIF5A の翻訳抑制効果	101
4.7 eIF5A および hypusine 修飾に関する今後の課題	103
4.8 酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系の応用	105
5. 参考文献	107
6. 謝辞	117



## 略語

aa-tRNA	: aminoacyl-tRNA
APS	: Ammonium persulfate
ARS	: aminoacyl-tRNA synthetase
CBB	: Coomassie Brilliant Blue
CrPV IRES	: Cricket Paralysis Virus Internal Ribosome Entry Site
CV	: column volume
DHS	: Deoxyhypusine synthase
DOHH	: Deoxyhypusine hydroxylase
DTT	: Dithiothreitol
eEF1A	: eukaryotic Elongation Factor 1A
eEF2	: eukaryotic Elongation Factor 2
eEF3	: eukaryotic Elongation Factor 3
eIF5A	: eukaryotic Initiation Factor 5A
eRF1	: eukaryotic Release Factor 1
eRF3	: eukaryotic Release Factor 3
EtBr	: Ethidium Bromide
IRD	: Intrinsic Ribosome Destabilization
KOAc	: Potassium acetate
Mg(OAc) <sub>2</sub>	: Magnesium acetate
nLuc	: nanoLuciferase
NMD	: Nonsense-mediated mRNA decay
NSD	: non-stop mRNA decay
Pgk	: Phosphoglycerate kinase
PMSF	: Phenylmethylsulfonyl fluoride
PPiase	: Pyrophosphatase
PTC	: Peptidyl Transferase Center
Pth	: peptidyl tRNA hydrolase
RQC	: Ribosome-mediated Quality Control
SPD	: spermidine
TEMED	: N,N,N',N',-Tetramethyl ethylenediamine
Ub	: ubiquitin
uORF	: upstream open reading frame

# 1 序説

## 1.1 真核細胞のタンパク質合成反応

生物のタンパク質合成反応（翻訳）は開始、伸長、終結、再生の4つの過程で行われる。真核細胞の開始過程では、多くの開始因子の仲介により mRNA の5'キャップ構造をリボソーム 40S サブユニットが認識する。その後、5'非翻訳領域をスキッピングすることで開始コドンを確認し、リボソーム 60S サブユニットと会合して伸長過程へと進行する<sup>(1)</sup>。伸長過程では(図 1)、アミノアシル tRNA と GTP の三者複合体を形成した伸長因子 eEF1A が、アミノアシル tRNA をリボソームの A-site に運ぶ。mRNA のコドンに対応するアンチコドンを持つアミノアシル tRNA が A-site に収まる（アコモデーション）と 60S サブユニットのペプチジルトランスフェラーゼセンター (PTC) の活性によりペプチド転移が起こる。ペプチド転移後、GTP 結合型の伸長因子 eEF2 の働きによりリボソームサブユニットのねじれが一方向に固定され、A-site と P-site の tRNA が P-site と E-site にそれぞれ移動するトランスロケーションが起こる。空になった A-site に、再びアミノアシル tRNA が運ばれてきて、一連の反応が繰り返される<sup>(2,3)</sup>。この伸長過程は A-site に終止コドンが現れるまで続く。さらに、真菌には第3の伸長因子 eEF3 が特異的に存在し、伸長過程に必須である<sup>(4)</sup>。eEF3 はリボソームの E-site 付近に結合し、リボソーマルタンパク質 L1 の開いた状態を安定化する働きがある。これにより E-site のデアシル tRNA が解離すると考えられている<sup>(5)</sup>。終結過程では(図 2)、A-site に現れた終止コドンを終結因子 eRF1 が認識する。GTP 結合型の終結因子 eRF3 は eRF1 のリボソームとの相互作用を促進する。終止コドンを確認した eRF1 は P-site ペプチジル tRNA に作用しペプチド解離反応が起こる。その後 eRF3 はリボソームから解離し、ATP 結合型のリボソーム再生因子 Rli1 が 80S リボソームをサブユニットに解離させ、1 ラウンドの翻訳反応が完結する。このように、翻訳反応は多くの因子が関わる多段階反応であり複雑である。そして真核細胞の翻訳素過程には不明な点が多く残されている。

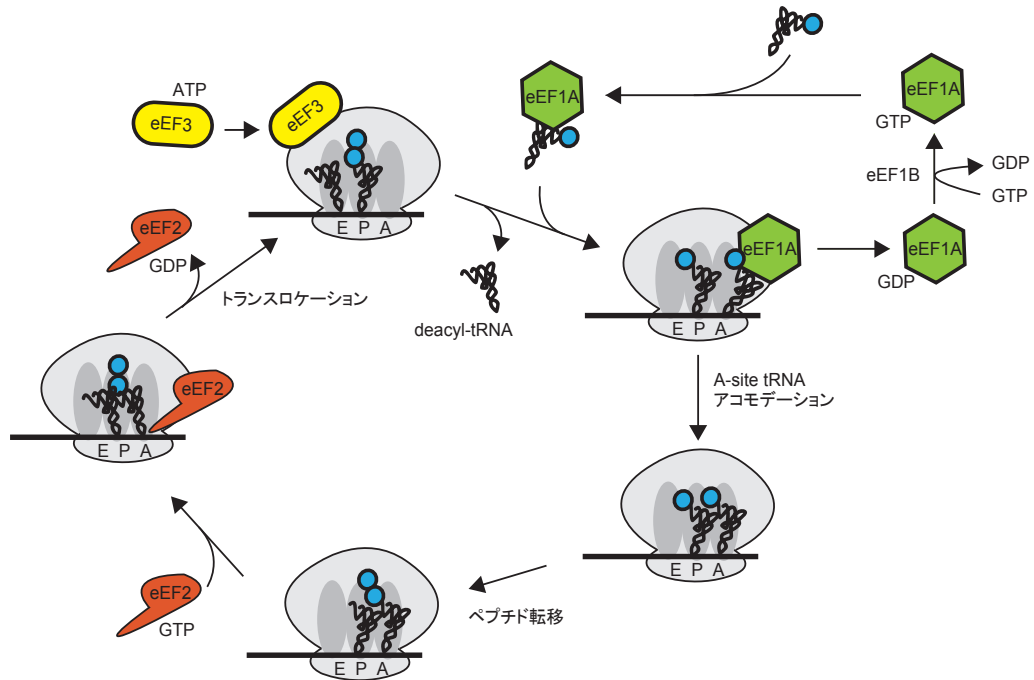


図 1. 出芽酵母の翻訳伸長過程の模式図

Dever T.E. et al. (2012) *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*より改変引用

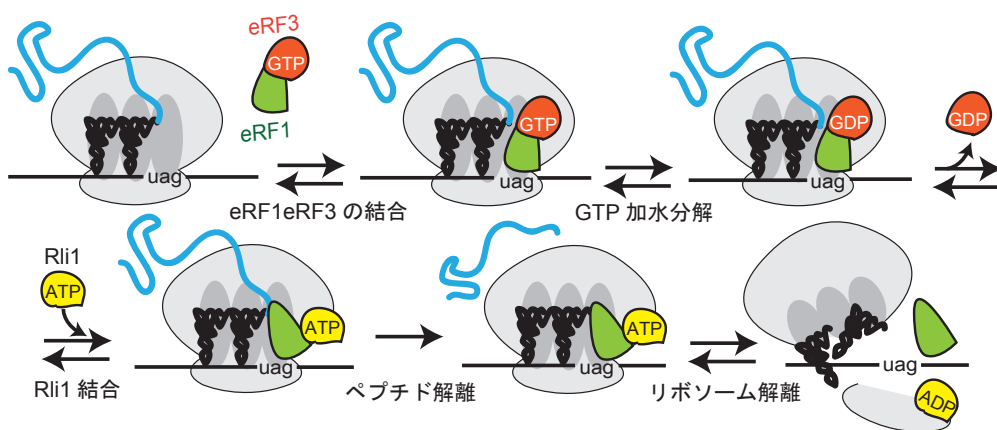


図 2. 真核細胞の翻訳終結過程の模式図

Dever T.E. et al. (2012) *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*より改変引用

## 1.2 代表的な翻訳抑制配列

翻訳伸長過程は一定のリズムで反応が進むように思われるが、実際には様々な要因によってそのリズムは変化する。翻訳伸長速度が変化する要因は mRNA や新生ポリペプチド鎖の配列によるものと翻訳補助因子の作用によるものが知られている。

多くの生物において、塩基性アミノ酸であるリジンの連続する配列は、翻訳伸長が起こりにくいと考えられている<sup>(6,7,8,9)</sup>。これは負電荷を持つリボソームのペプチドトンネルと正電荷をもつリジンが相互作用して、翻訳伸長が阻害されることが原因だと考えられている (図 3A)。

連続プロリン配列もまた翻訳伸長が起こりにくいと考えられている<sup>(10,11,12,13,14,15,16)</sup>。これは、ポリプロリンによって P-site に存在するポリプロリン tRNA の配向が乱れ、ペプチド転移が阻害されることが原因だと考えられている<sup>(12,13,14)</sup> (図 3B)。プロリンは、主鎖の N 原子と側鎖が共有結合した環を持つユニークなアミノ酸である。このため、プロリン部分のペプチド結合は、他のアミノ酸の場合にはほとんど見られない C-N 結合を基準にしたときの C $\alpha$ 原子が *cis* 位にあるペプチド結合を形成できる。これにより、立体障害を引き起こしペプチド転移の阻害が起こると推察される<sup>(12)</sup>。加えて、プロリン特有の 5 員環構造を変化させた非天然アミノ酸による解析から、5 員環を 4 員環に変化させると翻訳抑制効果が減少すると報告されている<sup>(14)</sup>。従って、プロリン特有の環状構造の硬さが翻訳抑制の原因であると考えられている。

酵母において、連続 CGA 配列は翻訳伸長が起こりにくいと知られている<sup>(17,18,19)</sup>。CGA コドンに対応する酵母の tRNA はアンチコドンに ICG を持ち、A-I という wobble 対合が形成される。そのため A-site への tRNA のアコモデーションが起こりにくく、翻訳伸長が阻害されると考えられている<sup>(17)</sup> (図 3C)。

以上の 3 つが機序の異なる代表的な翻訳抑制配列である。近年の研究によって、上記の配列以外にも様々な翻訳抑制配列が同定されている<sup>(12,16,18)</sup>。

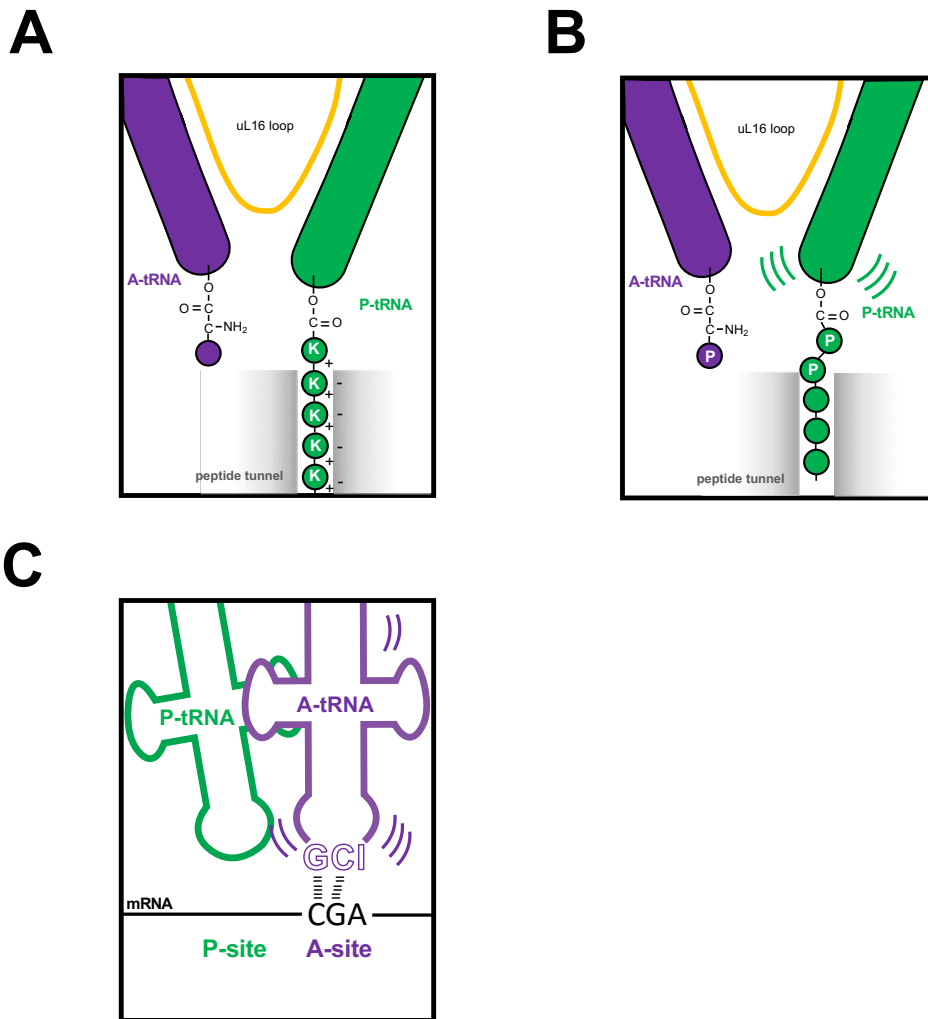


図 3. 代表的な酵母の翻訳停止配列の停止機序

A: poly(A)配列の翻訳停止について、ペプチジルトランスフェラーゼセンターの模式図で示した。近年 poly(A)配列での翻訳停止にはリボソーマルタンパク質の Ub 化が重要であることが示唆され、今後このモデルは大きく変わる可能性がある。B: 連続プロリン配列の翻訳停止について、ペプチジルトランスフェラーゼセンターの模式図で示した。C: 連続 CGA 配列の翻訳停止について、デコーディングセンターの模式図を示した。

翻訳伸長速度の低下は、mRNA や新生ポリペプチド鎖の品質管理、翻訳と共役した膜輸送<sup>(20,21,22)</sup>、翻訳過程と連携した発現制御<sup>(23,24)</sup>など、様々な高次生命現象の引き金となることがわかってきた。mRNA や新生ポリペプチド鎖の品質管理機構を例にあげると、変異やスプライシングの異常によって終止コドンを持たない mRNA は、異常な mRNA として品質管理機構に認識される<sup>(7,8,19,25)</sup>。この機構では、mRNA の 3'末端に存在する poly(A)tail で翻訳停止したりボソームを識別することが知られている。poly(A)配列はポリリジンが合成されるため、図 3A で示した翻訳停止が引き起こされる。停止したりボソームは Dom34 と Hbs1 に認識され、Rli1 と共にリボソームの解離を行う<sup>(26,27,28,29)</sup>。終止コドンが欠けた mRNA は nonstop decay (NSD) と呼ばれる品質管理機構によって分解され<sup>(30,31)</sup>、合成された新生ポリペプチドは ribosome-mediated quality control (RQC) によってユビキチン化されプロテアソームによる分解が起こる<sup>(25,32,33,34,35)</sup>。さらに、最近の研究によって翻訳停止にはリボソーマルタンパク質の Ub 化が必要であることも示唆された<sup>(25,36,37,38)</sup>。従って、翻訳伸長速度の低下したりボソームを Ub 化することで積極的に停止させる機構が存在することも明らかになってきた。このように、翻訳伸長速度の調節が様々な細胞機能の制御に関わっていることが明らかにされており、その分子機構の解明は重要な研究課題となっている。

図 3A,C で示した配列は翻訳停止に伴い、上記のような品質管理機構によって新生ポリペプチドとそれをコードする mRNA が分解される。一方、図 3B で示した連続プロリン配列は翻訳停止配列として知られているが、通常細胞内では翻訳停止することなく翻訳伸長が起こる。それは、原核細胞では EF-P が、真核細胞では eIF5A が連続プロリン配列の翻訳伸長を補助するからだ知られている。

### 1.3 連続プロリン配列の翻訳促進に関わる eIF5A の概要

本研究では、eIF5A の連続プロリン配列に対する機能に着目した。連続プロリン配列は翻訳停止配列であることを述べたが、細胞内では連続プロリン配列は問題なく翻訳伸長が行われる。これは原核細胞では EF-P が、真核細胞では eIF5A が翻訳を促進させるからだと知られている<sup>(10,11,15,16)</sup>。eIF5A は真核細胞に広く保存された必須なタンパク質で、原核細胞 EF-P の真核細胞ホモログである。

初期の研究において、eIF5A は IF-M2B $\alpha$  や eIF4D と呼ばれていた。eIF5A を含む 8 個の翻訳開始因子が、硫酸沈殿、DEAE-cellulose や Phosphocellulose を用いたイオン交換クロマトグラフィー、ショ糖密度勾配遠心を利用してウサギ網状赤血球ライセートから精製されていた<sup>(39-41)</sup>。In vitro で 80S 開始複合体を再構成する研究によって、eIF5A は Met-tRNA や mRNA のリボソームへの結合と、リボソームサブユニットの会合には関与せず、メチオニルピューロマイシン形成反応を促進することが示された<sup>(39-41)</sup>。このようにして、eIF5A は翻訳開始過程後期に最初のペプチド結合形成を促進する因子として同定され、開始因子のグループに属された。その後、10 mM Mg<sup>2+</sup>存在下の poly(U)mRNA 依存ポリフェニルアラニン合成は伸長因子のみで起こるが、2 mM Mg<sup>2+</sup>存在下では eIF5A を含む開始因子が合成反応に必要なだと報告された<sup>(39,45,93)</sup>。加えて、スペルミン非存在下の Globin mRNA 依存ポリペプチド合成において、eIF5A は合成に最適な Mg<sup>2+</sup>濃度を下げる効果があると報告された<sup>(40)</sup>。これにより、eIF5A の翻訳伸長過程に対する役割や、ポリアミンのような役割があると考えられるようになった<sup>(45)</sup>。

近年の研究になって In vitro でオリゴペプチド合成が可能になった。mRNA や開始メチオニル tRNA、精製された開始因子(eIF1, eIF1A, eIF2, eIF5, eIF5B) を用いて In vitro で 80S 開始複合体を形成させ、形成した 80S 開始複合体をショ糖密度勾配遠心によって回収し、精製された 80S 開始複合体と伸長因子を混ぜることで翻訳伸長反応を起こしている。この In vitro オリゴペプチド合成系によって、eIF5A は hypusine 修飾依存的に MPPK や MPPPK のような連続プロリンモチーフの翻訳を促進することが示された<sup>(14,15,16)</sup>。現在では eIF5A 依存的に翻訳促進が行われる連続プロリン以外の配列も同定されている<sup>(13,16)</sup>。加えて、eIF5A は翻訳終結におけるペプチド解離反応も促進することが示された<sup>(16,42)</sup>。

## 1.4 eIF5A の hypusine 修飾

eIF5A は翻訳後修飾である hypusine を有する細胞で唯一のタンパク質として知られている<sup>(45,46)</sup>。hypusine 修飾は 2 段階の酵素反応によって形成される (図 4)。はじめに deoxyhypusine synthase (DHS) によってスペルミジンの 4-アミノブチル基が eIF5A の保存された 51 位のリジンの $\epsilon$ -アミノ基に付加され、deoxyhypusine が形成される。続いて、deoxyhypusine hydroxylase (DOHH) によって deoxyhypusine が hypusine に変換される。高等多細胞生物では DHS と DOHH は必須遺伝子であり、酵母では DHS のみ必須遺伝子である<sup>(47)</sup>。従って hypusine 修飾は細胞の生育に必須と知られている<sup>(48-51)</sup>。

hypusine 修飾はリボソーム結合能を向上させる<sup>(52-54)</sup>。 *In vitro* 翻訳系を用いた解析によって、メチオニルピューロマイシン形成反応を促進すること<sup>(39-41,55,56)</sup>、MFF トリペプチドの合成を促進すること<sup>(42)</sup>、MF ジペプチジル tRNA や MFK トリペプチジル tRNA を基質とした eRF1 によるペプチド解離反応を促進すること<sup>(16,42)</sup>も示されている。さらに、*In vitro* ペンタペプチド合成系を用いた解析によって、連続プロリン配列の翻訳は eIF5A によって hypusine 修飾依存的に促進されるが<sup>(14-16)</sup>、連続アスパラギン酸配列の翻訳は未修飾 eIF5A によって効率よく促進されることが示されている<sup>(16)</sup>。

上記のように、eIF5A とその hypusine 修飾の生化学的機能解析は *In vitro* オリゴペプチド合成系で行われてきた。オリゴペプチド合成系はタンパク質の N 末端領域の翻訳伸長過程を再現しており、ペプチジル tRNA のドロップオフを含む様々な現象が反映されると考えられた。特に、プロリンを含む翻訳停止配列をオリゴペプチド合成系で解析した場合、翻訳停止とペプチジル tRNA のドロップオフが混在した結果が得られる<sup>(16)</sup>と考えられた。従って、現在のところ翻訳開始の影響が無視される領域での翻訳伸長過程において、連続プロリン配列依存の翻訳停止と、それに対する eIF5A や hypusine 修飾の役割は不明なままである。



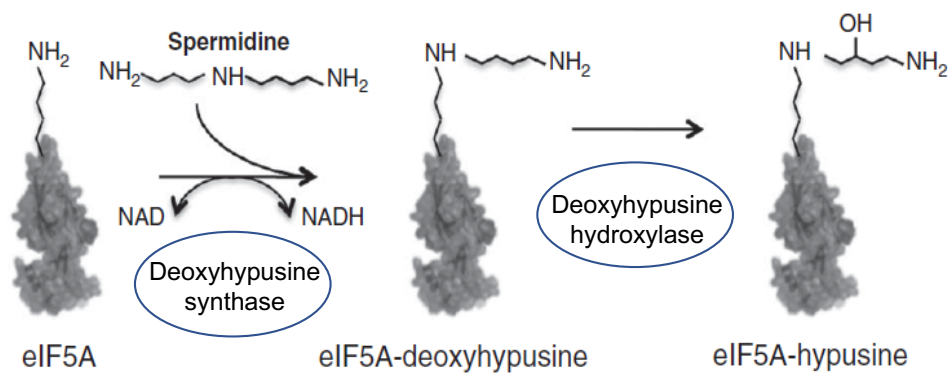


図 4. hypusine 修飾の反応

Rossi D. *et al.* (2014) *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* より引用

## 1.5 eIF5A とリボソーム複合体の構造

Cryo-EM による構造解析によって平均  $3.9 \text{ \AA}$  の分解能で eIF5A が結合した酵母のリボソームの像が報告されている<sup>(43)</sup> (図 5B,D)。この研究で解析されたリボソームは、シクロヘキシミド処理をしてアフィニティータグが融合された Ski3 をプルダウンすることで得られた。シクロヘキシミドは E-site tRNA CCA 末端の A76 の位置と重なるように真核細胞のリボソームに結合するため、P-site tRNA が E-site にトランスロケーションするのを防ぐ。シクロヘキシミド未処理で同様の実験を行っても eIF5A の結合したリボソームが得られないことから、P-site に tRNA が存在し E-site が空のリボソームが eIF5A の基質になることが示唆された<sup>(43)</sup>。報告された eIF5A とリボソームの相互作用は下記の通りである。eIF5A のドメイン I は 25S rRNA のヘリックス H74 と H93 と主に相互作用しており、H68 と H70 とも弱く相互作用することが示唆された<sup>(43)</sup>。特に、eIF5A ドメイン I の  $\beta 3$ - $\beta 4$  ループ内の正電荷の側鎖と H74 内の 2806-2808 と H93 内の 2963-2968 との水素結合ネットワーク相互作用が観察された<sup>(43)</sup> (図 6D)。eIF5A のドメイン II は uL1 のドメイン 1 とドメイン 2 の間に挿入され、eEF2 存在下で観察される L1 ストークの構造に類似したクローズド構造を誘発することが示唆された<sup>(43)</sup> (図 6B)。eIF5A は、aIF5A や EF-P には存在しない N 末端領域を持ち、uL1 と eL42 に挟まれた状態をとることで、L1 ストークの eIF5A 結合構造を安定化していた<sup>(43)</sup> (図 6A)。上記のようなりボソームとの相互作用は eIF5A と EF-P で類似していたが、ドメイン I の配向と、eIF5A の N 末端領域の相互作用は異なる点である<sup>(43)</sup> (図 5A-D)。報告された eIF5A と P-site tRNA の相互作用は、eIF5A の Arg27 と P-site tRNA の G4-C5 の骨格の水素結合が観察された<sup>(43)</sup> (図 6C)。EF-P のドメイン I は P-site tRNA のアクセプターシステムと 9 つの水素結合を形成することから、P-site tRNA との相互作用は EF-P と eIF5A で類似していないと考えられた<sup>(43)</sup>。ハイプシン修飾は  $\beta 3$ - $\beta 4$  ループの先端に位置しており、P-site tRNA の CCA 末端と H74 内のヌクレオチド骨格によって形成されたポケット内に挿入される構造を取っていた<sup>(43)</sup> (図 7B)。

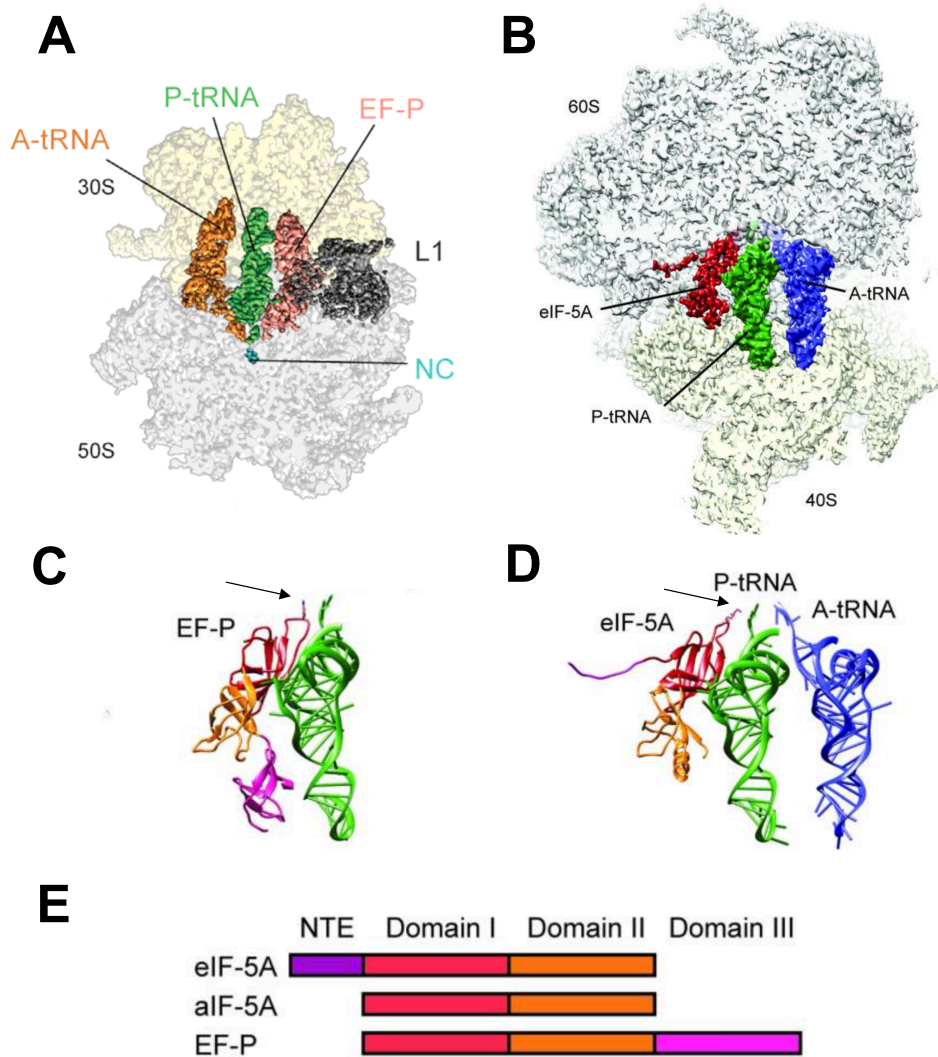


図 5. EF-P と eIF5A の構造比較

A は Huter P. *et al.* (2017) **Mol. Cell** より引用

B-E は Schmidt C. *et al.* (2016) **Nucleic Acids Res.**より引用

A: EF-P が相互作用した 70S リボソームの Cryo-EM 構造解析の結果。B: eIF5A が相互作用した 80S リボソームの Cryo-EM 構造解析の結果。C: EF-P とリボソームの結合面、矢印はβ-リジル化の位置。D: eIF5A とリボソームの結合面、矢印は hypusine 修飾の位置。E: 真核細胞の eIF5A、アーキアの aIF5A、原核細胞の EF-P のドメイン構造の模式図。eIF5A には N 末端に延長配列があり L1 との相互作用に関わる。EF-P にはドメイン III があり、P-site tRNA アンチコドンステムループとの相互作用に関わる。

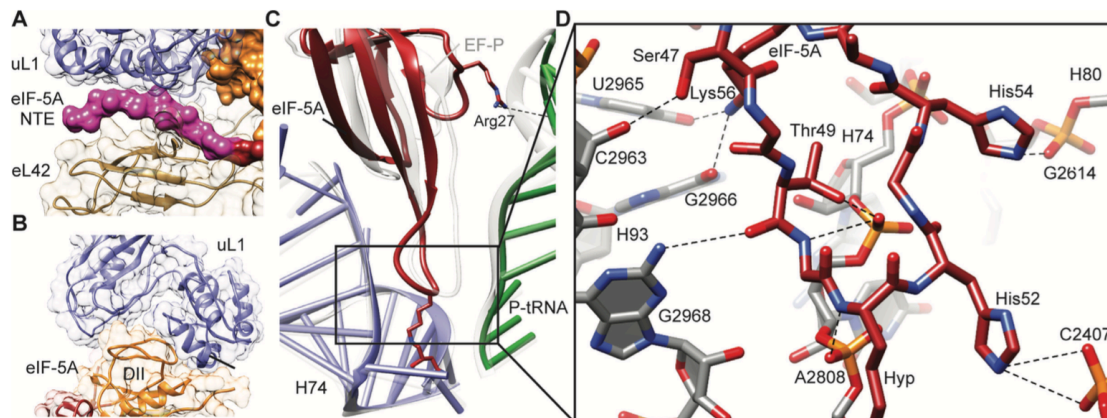


図 6. eIF5A とリボソーム、P-site tRNA との相互作用

Schmidt C. *et al.* (2016) ***Nucleic Acids Res.***より引用

A: eIF5A の N 末端領域とリボソームマルタンパク質との相互作用領域の Cryo-EM 構造解析の結果。青色は uL1、淡い茶色は eL42、ピンク色は eIF5A の N 末端領域、オレンジ色は eIF5A のドメイン II を示している。B: eIF5A のドメイン II と uL1 の相互作用領域の Cryo-EM 構造解析の結果。C: eIF5A のドメイン I (赤) と 25S rRNA のヘリックス 74 (青)、P-site tRNA (緑) との相互作用領域の Cryo-EM 構造解析の結果。D: eIF5A のドメイン I と 25S rRNA のヌクレオチド間の水素結合 (点線) の可能性を示した図。

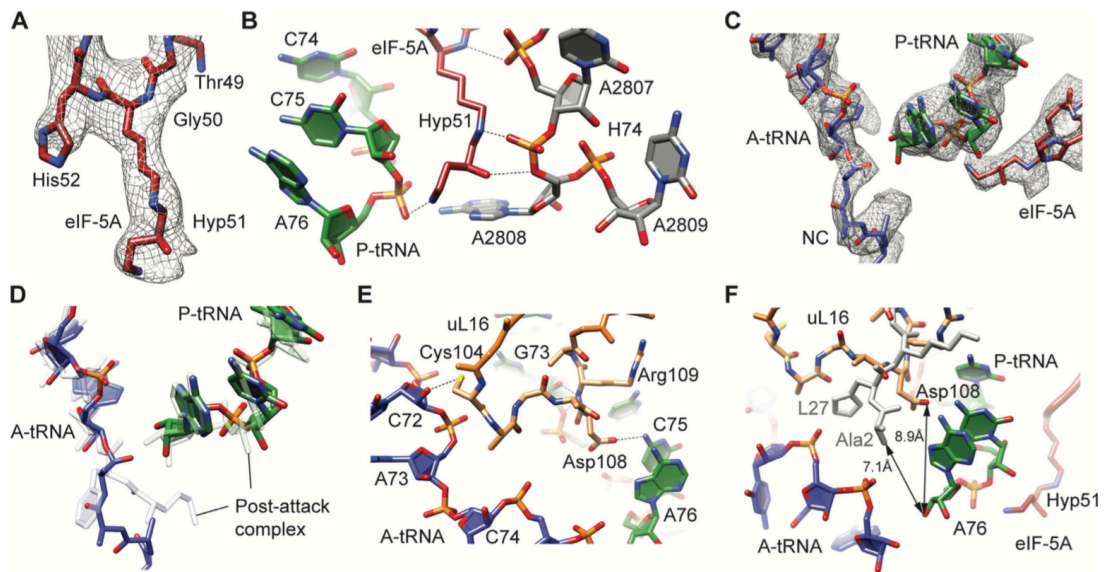


図 7. eIF5A のハイプシン修飾と

リボソームのペプチジルトランスフェラーゼセンターの構造

Schmidt C. *et al.* (2016) **Nucleic Acids Res.**より引用

A: eIF5A のハイプシン修飾の電子密度 (灰色) と分子モデル (赤色)。B: eIF5A (赤色) のハイプシン修飾 (Hyp51)、P-site tRNA (緑色) の CCA 末端、25S rRNA のヘリックス H74 (灰色) の水素結合 (点線) の可能性。C: P-site tRNA の CCA 末端、A-site の新生ポリペプチド鎖 (NC) の付加された tRNA、eIF5A (赤) の電子密度 (灰色) と分子モデル。D: Polikanov Y.S. *et al.* (2014) **Nat. Struct. Mol. Biol.** で報告された Post-attack complex と eIF5A-80S 複合体から得られた A-site と P-site の tRNA の構造比較。E: uL16 のループ構造 (オレンジ色)、A-site tRNA (青色)、P-site tRNA (緑色) の水素結合相互作用 (点線) の可能性。F: eIF5A-80S 複合体の uL16 ループ構造 (オレンジ色) と Polikanov Y.S. *et al.* (2014) **Nat. Struct. Mol. Biol.** で報告された pre-attack complex の L27 (灰色) の比較。A-site tRNA (青色)、P-site tRNA (緑色)、eIF5A (赤色) で示されている。D-E は考察の項 (4.3) の図 38 で説明。

結晶構造解析によって 3.25 Å の分解能で eIF5A が結合した酵母のリボソームの像が報告されている<sup>(44)</sup>。この研究で解析されたリボソームは、グルコース飢餓の酵母細胞から精製され、eIF5A と Stm1 が相互作用していた。結晶化後の処理で eIF5A が抜け落ちるようで、実際の解析はリコンビナント eIF5A を結晶に補充していた。報告されたリボソームには A-site と P-site の tRNA が存在しなかったが、eIF5A は P-site に隣接する位置に結合しており、L1 ストック、25S rRNA のヘリックス H69、サブユニット間の境界面に相互作用していた<sup>(44)</sup> (図 8B)。ハイプシンの正電荷の κ-アミノ基は P-site tRNA の CCA 末端に向かった方向を向いていた<sup>(44)</sup>。この領域は Cryo-EM の結果<sup>(43)</sup>と比べて、より 25S rRNA の A2808 の方向にシフトしていたが、結晶構造の解析結果と Cryo-EM の解析結果は類似していた<sup>(44)</sup> (図 8 B,C)。加えて、eIF5A とリボソームの Mg<sup>2+</sup>を介した 2 つの間接的な相互作用が観察され、eIF5A の N 末端の負電荷を帯びた領域と rRNA の間の相互作用を可能することが示唆された<sup>(44)</sup> (図 9A)。観察されたリボソームは rotated state であり、H69 が eIF5A の結合領域に近寄っていた<sup>(44)</sup> (図 9 B,C)。H69 の動きは翻訳伸長におけるリボソームの構造変化が原因と考えられ、eIF5A の結合領域の構造が調節されていると示唆された<sup>(44)</sup>。

上記のように、Cryo-EM 構造解析 (図 5-7) および X 線結晶構造解析 (図 8,9) によって、eIF5A はリボソームの E-site に結合し、P-site ペプチジル tRNA の CCA 末端を安定化すると示唆されている<sup>(43,44)</sup>。そのようにして eIF5A はリボソームのペプチジルトランスフェラーゼセンターにおける遅いペプチド転移反応を促進し、翻訳伸長過程から終結過程まで幅広く働く因子であると考えられている<sup>(13,16)</sup>。現在のところ、eIF5A とリボソーム、eIF5A と P-site tRNA の相互作用が示されたが、いつ、どのようにして、どのリボソームの構造が eIF5A をリクルートするかはわからないままである。また新生ポリペプチド鎖の像は観察されない、または解像度が低く、ストールしたリボソームでの新生ポリペプチド鎖やペプチジルトランスフェラーゼの構造と、それに作用する eIF5A の構造も不明なままである。

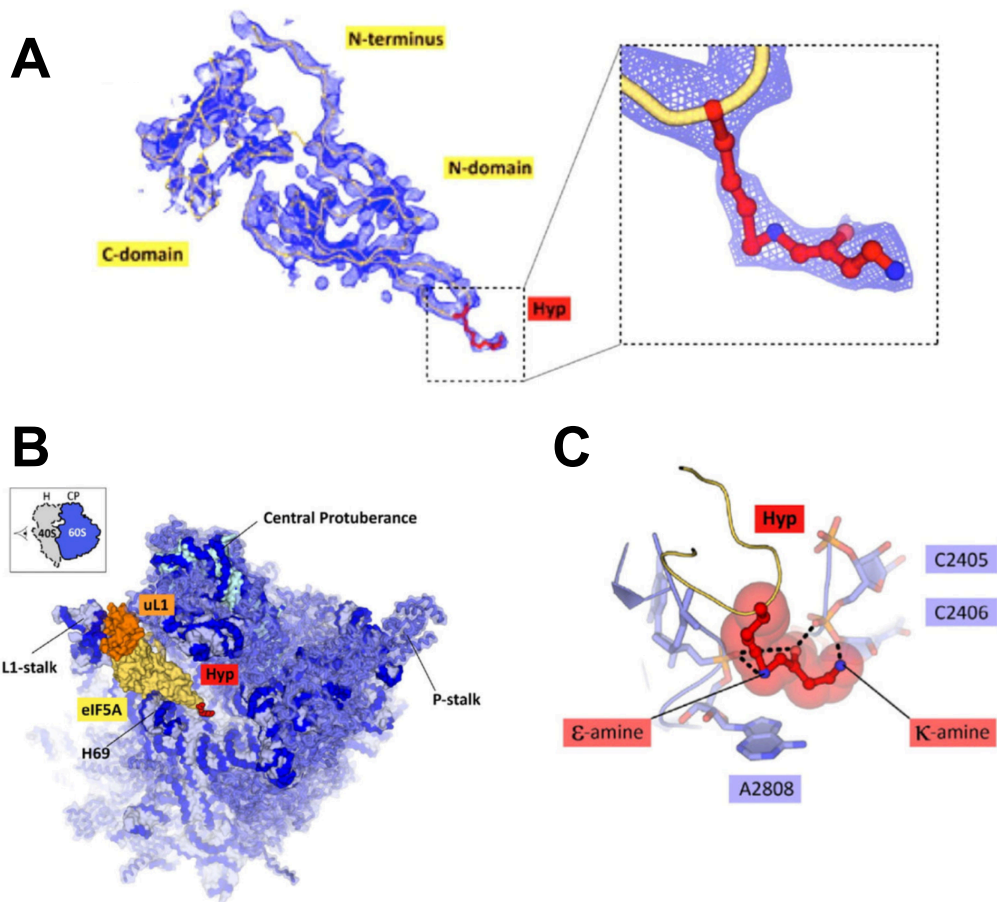


図 8. eIF5A-リボソーム複合体の結晶構造解析

Melnikov S. *et al.* (2016) *J. Mol. Biol.*より引用

A: リボソームに結合した eIF5A の電子密度 (青色)。黄色は C $\alpha$ 原子、赤色はハイプシン修飾を示している。B: eIF5A (赤色) とリボソームの複合体の 60S サブユニットからの像。黄色は eIF5A、赤色はハイプシン修飾、オレンジ色は uL1、青色はリボソームを示している。C: ハイプシン修飾の構造。赤色はハイプシン修飾、青色は 25S rRNA を示している。



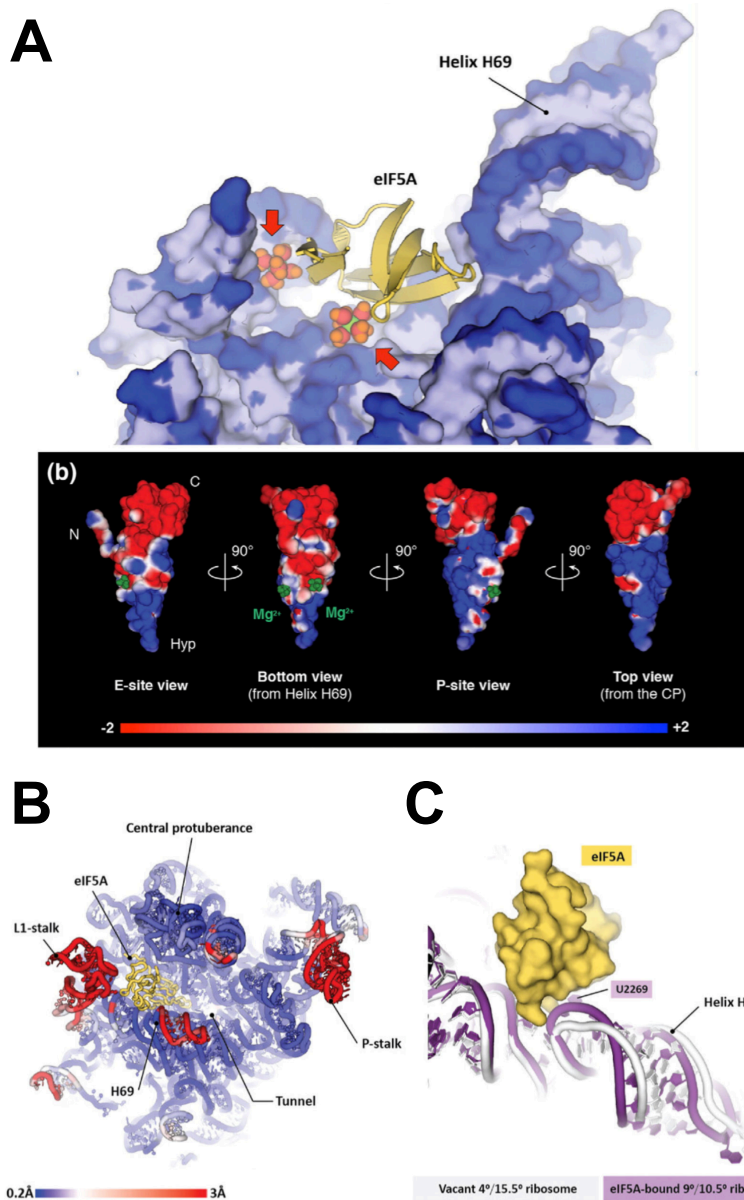


図 9. eIF5A-リボソーム複合体の結晶構造解析

Melnikov S. *et al.* (2016) *J. Mol. Biol.*より引用

A 上:  $Mg^{2+}$  を介した eIF5A とリボソームの相互作用。黄色は eIF5A、赤色は  $Mg^{2+}$  を示している。A 下:  $Mg^{2+}$  が eIF5A の負電荷領域に結合している様子。赤色は eIF5A の負電荷領域、青色は eIF5A の正電荷領域、緑色は  $Mg^{2+}$  を示している。B: eIF5A 結合リボソームと eIF5A が結合していないリボソームとの構造比較。両者を比べた結果、変化の少ない領域は青色、変化の大きい領域は赤色で示されている。C: eIF5A とヘリックス H69 の相互作用領域の拡大図。黄色は eIF5A、紫色は eIF5A 結合リボソームのヘリックス H69、白色は eIF5A が結合していないリボソームのヘリックス H69 の構造を示している。



## 1.6 再構成型生体外タンパク質合成系を用いた解析

清水らは、精製された大腸菌の翻訳因子を用いて試験管内で翻訳反応を再現し、酵素活性を有するタンパク質合成を可能にした<sup>(57,58)</sup>。これにより原核細胞の翻訳反応をボトムアップに解析することが可能になった。また、精製された最小限の因子からなる翻訳系であるため、細胞抽出液翻訳系にくらべて夾雑物が少なく、解析したい因子の効果をより明確に観察できると考えられた。

真核細胞の研究では、開始過程、伸長過程、終結再生過程について、個々に *In vitro* 解析がされていた<sup>(14,15,16,39,40,41,42,55,56)</sup>。注目したい点は、伸長過程はオリゴペプチドの合成反応に限定されていた点である<sup>(14,15,16)</sup>。オリゴペプチド合成系は翻訳開始直後の翻訳伸長過程を再現しており、複数の現象が含まれると考えられる。特に、ペプチジル tRNA のドロップオフが引き起こされることが知られており<sup>(16)</sup>、翻訳停止とドロップオフの現象が混在する。従って、翻訳開始直後の影響が無くなる領域で翻訳伸長を解析することが望まれる。

最近、町田らは精製されたヒト細胞の翻訳因子を用いて試験管内で翻訳反応を再現し、酵素活性を有するタンパク質合成を起こすことに成功した<sup>(59)</sup>。町田らの報告したような解析系では、タンパク質内部の翻訳伸長まで解析できることが予想された。そこで本研究では、取り扱いが容易であり遺伝学的知見を利用できる理由から、生物種として出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を選択し、出芽酵母の翻訳因子を用いてタンパク質内部での翻訳伸長が解析できる反応系の構築を目指した。目的因子の機能を解析する場合、反応系はできる限り単純であるべきという考えから、最小限の因子による出芽酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系の構築を目指した。

## 1.7 本研究の目的

eIF5A および hypusine 修飾の機能について、数多くの生化学的解析がされ多くの知見が集まってきた。しかしながら、どの *In vitro* 解析も、翻訳が開始してから数アミノ酸の間の現象解析にとどまっている。翻訳開始直後の伸長反応では、ペプチジル tRNA のドロップオフを含む様々な現象が混在していると考えられ、翻訳停止を評価することは困難だと思われる。そこで本研究は、翻訳開始直後の影響を無視できる領域で、翻訳停止に対する eIF5A および hypusine 修飾の効果を解析し、連続プロリン配列依存の翻訳停止とその翻訳停止を解除する eIF5A の作用機序について明らかにすることを目的とした。解析系として、酵素活性を有するタンパク質全長を合成可能な酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系の構築を行い、翻訳停止配列の挿入位置を注意深く検討したレポーター遺伝子を用いて、eIF5A および hypusine 修飾の効果を解析した。これにより、以前とは異なる着眼点で eIF5A の翻訳伸長に対する考察を行えると期待した。これまで、連続プロリン配列依存の翻訳停止はペプチジル tRNA の配向の乱れに着目され、その翻訳停止を解消する eIF5A および hypusine 修飾の効果もペプチジル tRNA の配向を正すことに着目されていた。本研究では、新生ポリペプチド鎖とリボソームのペプチドトンネルの相互作用が十分に起こる条件で解析するため、ペプチジル tRNA は比較的安定に存在することが予想された。従って新生ポリペプチド鎖とリボソーム、特にペプチジルトランスフェラーゼセンターとの相互作用に着目した翻訳停止を考察できると期待した。また、eIF5A の hypusine 修飾の役割は多くの報告がされているが、eIF5A 本体の役割については不明な点が多い。そこで、eIF5A 本体の役割についても考察できることを期待した。

## 2 方法

### 2.1 実験材料と試料調製

#### 2.1.1 実験材料

PCR で使用した KOD-Plus-Neo (KOD-401) は TOYOBO 社から購入し、PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase (600672) は Agilent 社から購入した。In-Fusion HD Cloning Kit (Z9633N) は TAKARA 社から購入し、Dpn I (DPN-101) は TOYOBO 社から購入した。クイックチェンジで使用した T4 Polynucleotide Kinase (PNK-111) は TOYOBO 社から購入し、DNA Ligation Kit (6023) は TAKARA 社から購入した。TA cloning で使用した TOPO TA Cloning Kit は Invitrogen 社から購入した。

*In vitro* 転写反応や翻訳反応に用いた Recombinant RNase Inhibitor (RRI, 2313A) は TAKARA 社から、ATP lithium salt (11 140 965 001)、GTP (11 140 967 001)、CTP (11 140 922 001)、UTP (11 140 949 001) は Roche 社から購入した。鋳型 DNA の分解に使用した TURBO DNase (AM2238) は Invitrogen 社から購入した。DNA や mRNA の精製に使用した Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (A1460) と Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (A9281) は Promega 社から、Micro Bio-Spin Columns P-30 Tris RNase-Free (732-6250) は BIO-RAD 社から、NAP-5 Columns (17-0853-02) は GE Healthcare 社からそれぞれ購入した。

酵母の破碎で用いた Y-PER Yeast Protein Extraction Reagent (#78990) は Thermo 社から購入し、cOmplete Mini, EDTA-free Protease inhibitor cocktail tablets (11836170001) は Roche 社から購入した。リボソームの精製で用いた Puromycin Dihydrochloride (166-23153) は Wako 社から、Guanosine 5'-triphosphate sodium salt hydrate (GTP, G8877-250MG) は SIGMA 社から購入した。因子の精製で使用した Guanosine 5'-diphosphate sodium salt (GDP, G7127) と、Adenosine 5'-diphosphate sodium salt (ADP, A2754) は SIMGA 社から購入した。

合成するタンパク質の放射性同位体標識に用いた Methionine, L-[35S]-

(>37TBq/mmol, 400MBq/mL, NEG009A) は PerkinElmer 社から購入した。

C 末端 His タグ融合 eEF2 発現株である出芽酵母 TKY675 は、ペンシルバニア大学の梶昭教授よりご恵与いただいた。ヒトアミノアシル tRNA 合成酵素ミックス (human ARS mix) は、兵庫県立大学の今高寛晃教授よりご恵与いただいた<sup>(59)</sup>。エネルギー再生系として用いた His-tagged creatine kinase、His-tagged myokinase、His-tagged nucleoside-diphosphate kinase、His-tagged pyrophosphatase と、転写反応を担う His-tagged T7 RNA polymerase は清水らが報告したものを使用した<sup>(58)</sup>。本研究で用いた 5 種類の eIF5A は、当研究室の卒業生である西村聡が精製したものを利用した。

T7 プロモーターを有する CrPV IRES の鋳型 DNA は、ペンシルバニア大学の梶昭教授よりご恵与いただいた。

翻訳産物である nanoLuc の酵素活性測定に用いた Nano-Glo® Luciferase Assay System (N1110) は Promega 社から購入した。

ペプチジル tRNA の状態解析に用いた Peptidyl tRNA hydrolase (Pth) は上田卓也教授に精製していただいた。RNase A (0675-500MG) は AMRESCO 社から購入した。

ウェスタンブロットティングで使用した 1 次抗体は、ジャパン・バイオシーラム社に委託して作成した。2 次抗体は Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP conjugate (65-6120) を Invitrogen 社から購入し利用した。Hybond ECL nitrocellulose membranes (RPN303D) は GE healthcare 社から購入した。シグナル検出に用いた ECL Western Blotting Detection Reagents (RPN2109) は GE Healthcare 社から購入した。

### 2.1.2 翻訳因子発現用プラスミドと菌株

eEF3 の発現精製には、当研究室の卒業生である林光が作成した eEF3-6x His/pET29b を用いた。作成方法を簡単に述べると、pET29b (Novagen 社) の *Nde* I、*Xho* I 切断部位の間に出芽酵母 W303 の *YEF3* の ORF が挿入されている。作成された eEF3-6x His/pET29b は大腸菌 JM109(DE3)pRARE に形質転換した。

eRF1 の発現精製には、当研究室の卒業生である高柳健人が作成した eRF1-6x His/pET21a を用いた。作成方法を簡単に述べると、pET21a (Novagen 社) の *Xho* I、*Nde* I 切断部位の間に出芽酵母 YPH499 の *SUP45* の ORF が挿入されている。作成された eRF1-6x His/pET21a は大腸菌 Rosetta(DE3)pLysS に形質転換した。

eRF3Δ165 の発現精製には、当研究室の卒業生である小谷哲也が作成した eRF3Δ165-6x His/pET21a を用いた。作成方法は Green らの報告に基づいている<sup>(65)</sup>。簡単に述べると、pET21a の *Nco* I、*Xho* I 切断部位の間に出芽酵母 YPH499 の *SUP35* の ORF (166-685 位のアミノ酸配列) が挿入されている。1-165 位の領域を欠損させている理由は、eRF3 全長の精製を行うと分解産物が目立つため、Green らの報告を参考にした<sup>(65)</sup>。1-165 位の領域はプリオンドメインであり酵素活性には影響がないとされている。作成された eRF3Δ165-6x His/pET21a は大腸菌 JM109(DE3)pRARE に形質転換した。

Rli1 の発現精製には、当研究室の卒業生である石橋正成が作成した Rli1-6x His/pYES2 を用いた。作成方法は Green らの報告に基づいている<sup>(66)</sup>。簡単に述べると、プラスミド pYES2 (Invitrogen 社) の *Sac* I、*Xho* I 切断部位の間に出芽酵母 S288C 株の *RLI1* の ORF が挿入されている。作成された Rli1-6x His/pYES2 は出芽酵母 INVSc1 (Invitrogen 社) に形質転換した。

Dom34 の発現精製には、当研究室の卒業生である小谷哲也が作成した Dom34-6x His/pET29b を用いた。作成方法を簡単に述べると、pET29b の *Nde* I、*Sal* I 切断部位の間に出芽酵母 (W303) の *DOM34* の ORF が挿入されている。作成された Dom34-6x His/pET29b は大腸菌 Rosetta(DE3)pLysS に形質転換した。

Hbs1 の発現精製には、富田野乃准教授が作成した Hbs1-6x His/pETDuet1 を用いた。作成方法を簡単に述べると、pETDuet1 (Novagen 社) の *Nco* I、

*BamH I* 切断部位の間に出芽酵母(W303)の *HBS1* の ORF が挿入されている。作成された *Hbs1-6x His/pETDuet1* は大腸菌 BL21 (DE3)に形質転換した。

出芽酵母を用いた eIF5A の発現精製には、当研究室の卒業生である西村聡が作成した eIF5A(WT)-6x His/pYES2、eIF5A(K51R)-6x His/pYES2 が用いられている。作成方法を簡単に述べると、プラスミド pYES2 の *Hind III*、*Xho I* 切断部位の間に出芽酵母の発現にコドン最適化 (Thermo Fisher Scientific 社) を行った *HYP2* の ORF が挿入されている。作成された各プラスミドは出芽酵母 INVSc1 に形質転換されている。

大腸菌を用いた eIF5A の発現精製には、当研究室の卒業生である西村聡が作成した eIF5A/pET29b、eIF5A\_DHS/pET29b、eIF5A\_DHS\_DOHH/pET29b が用いられている。作成方法を簡単に述べると、プラスミド pET29b の *Xba I* と *BamH I* の切断部位の間に *HYP2*、*EcoR I* と *SalI* の切断部位の間に *DYS1*、*Hind III* と *Xho I* の切断部位の間に *LIA1* の ORF が挿入されている。各 ORF の配列は大腸菌の発現にコドン最適化 (Thermo Fisher Scientific 社) がされている。作成された各プラスミドは大腸菌 Rosetta(DE3)pLysS に形質転換されている。

### 2.1.3 *In vitro* 翻訳反応用プラスミドの構築

本研究で用いたプライマーの情報を表 1 に示した。

プライマー		配列	
Forward primer 1	5'	GATGGATTACAAGGATGACGATGACAAGATGGTTTTTCACCTTGAAGATTTTCG	3'
Forward primer 2	5'	GGGCCTAATACGACTCACTATAGATGGATTACAAGGATGACGATGACAAG	3'
Forward primer 3	5'	CGAAAAACCTAAGAAATTACCTGCTATGGATTACAAGGATGACGATGAC	3'
Forward primer 4	5'	TTGGGCCTAATACGACTCACTATAG	3'
Reverse primer 1	5'	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAGCCAAAATCTTTTCGCACAATCTC	3'
Reverse primer 2	5'	AGCAGGTAATTTCTTAGGTTTTTCG	3'
Reverse primer 3	5'	TTACGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTAAGCCAAAATCTTTTCGCA	3'

表 1. 本研究で用いたプライマー配列

酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系の翻訳反応に用いた各鋳型 DNA は nanoLuc luciferase (Promega 社、N1001) を骨格に作成した。nanoLuc (nLuc) をコードするプラスミドは、出芽酵母の翻訳系に至適化されたコドンで構成されたものを Invitrogen 社の GeneArt 人工遺伝子合成サービスに委託して作成した。

図 10 に示した Leaderless FLAG\_nLuc\_A<sub>36</sub> は 2 段階の PCR によって調製した。1 段階目の PCR によって、nLuc の 5' 側に FLAG タグと、3' 側に AAA x12 から成る poly(A)tail を付加し、2 段階目の PCR によって FLAG タグの 5' 側に T7 promoter を付加した。1 段階目の PCR では、nLuc の開始コドンから始まるアニーリング配列の 5' 側に ATGGATTACAAGGATGACGATGACAAG を付加した Forward primer 1 と、終止コドンを含むアニーリング配列の 3' 側に AAA x12 を付加した Reverse primer 1 を用いて、nLuc の人工遺伝子を鋳型に PCR を行った。2 段階目の PCR では、Forward primer 2 と Reverse primer 1 を用いて、1 段階目の PCR 産物を鋳型に PCR を行った。作成された直鎖 DNA は TOPO TA Cloning Kit を用いて pCR4-TOPO に挿入した。

TA Cloning について簡単に述べると、Blend Taq を用いた PCR 反応を 1 サイクル行ったのち、PCR Clean-Up System を用いて PCR 産物を精製した。末端に A を付加した PCR 産物と pCR4-TOPO vector を混合しライゲーション反応を行った。





図 11 に示した CrPV IRES\_FLAG\_nLuc\_A<sub>36</sub> は、FLAG\_nLuc\_A<sub>36</sub> の PCR 産物と、T7 プロモーターを有する CrPV IRES (T7\_IRES) の PCR 産物を鋳型としたオーバーラップエクステンション PCR によって作成した。FLAG\_nLuc\_A<sub>36</sub> の PCR は、開始コドンから始まるアニーリング配列の 5'側に CrPV IRES の 3'側領域とオーバーラップする配列を付加した Forward primer 3 と Reverse primer 1 を用いて行った。T7\_IRES の PCR は、T7 プロモーターの 5'側にアニーリングする Forward primer 4 と、CrPV IRES の 3'側にアニーリングする Reverse primer 2 を用いて行った。次に、得られた 2 つの PCR 産物を鋳型に、T7 プロモーターの 5'側にアニーリングする Forward primer 4 と終止コドンを含むアニーリング配列の 3'側に AAA x12 を付加した Reverse primer 1 で PCR を行った。作成された直鎖 DNA は TOPO TA Cloning Kit を用いて pCR4-TOPO に挿入した。

50

GGGCCTAATA CGACTCACTA TA G GGAGACC GGAATTCAAA GCAAAAATGT

T7 Promoter *Eco*R I CrPV IRES 100

GATCTTGCTT GTAAATACAA TTTTGAGAGG TTAATAAATT ACAAGTAGTG

150

CTATTTTTGT ATTTAGGTTA GCTATTTAGC TTTACGTTCC AGGATGCCTA

200

GTGGCAGCCC CACAATATCC AGGAAGCCCT CTCTGCGGTT TTTCAGATTA

250

GGTAGTCGAA AAACCTAAGA AATTTACCTG GCT ATGGATTA CAAGGATGAC

*FLAG* 300

*GATGACAAGA* TGGTTTTTAC CTTGGAAGAT TTCGTTGGTG ATTGGAGACA

**nLuc** 350

**A**ACTGCTGGT TACAATTTGG ATCAAGTCTT GGAACAAGGT GGTGTCTCTT

400

**CTTTGTTTCAAAA**CTTGGGT GTTTCCGTTA CCCCAATCCA AAGAATAGTT

450

**TTGTCTGGTG AAAACGGTTT** GAAGATCGAT ATCCATGTTA TCATCCATA

500

**CGAAGGTTTG TCAGGTGATC** AAATGGGTCA AATCGAAAAG ATCTTCAAGG

550

**TTGTTTACCC AGTTGATGAT** CACCACTTTA AGGTTATCTT GCACTACGGT

600

**ACTTTGGTCA TTGATGGTGT** TACTCCAAAC ATGATCGATT ACTTTGGTAG

650

**ACCTTACGAA GGTATGCTG** TTTTCGATGG TAAGAAGATT ACTGTCACTG

700

**GTACTTTGTG GAACGGTAAC** AAAATTATCG ACGAAAGATT GATCAACCCA

750

**GACGGTTCTT TGTTGTTTCAG** AGTTACTATT AACGGTGTTA CCGGTTGGAG

800

**ATTGTGCGAA AGAATTTTGG** CTAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

poly(A)tail

AAAAAAAAAAAA AAA

図 11. T7\_CrPV IRES\_FLAG\_nLuc\_A<sub>36</sub> (IRES)の配列情報  
Gは T7 RNA polymerase の転写開始の位置、GCTは CrPV IRES の開始コドン



50

GGGCCTAATA CGACTCACTA TA G GGAGACC GGAATTCAAA GCAAAAATGT

T7 Promoter *EcoR* I CrPV IRES 100

GATCTTGCTT GTAAATACAA TTTTGAGAGG TTAATAAATT ACAAGTAGTG

150

CTATTTTTGT ATTTAGGTTA GCTATTTAGC TTTACGTTCC AGGATGCCTA

200

GTGGCAGCCC CACAATATCC AGGAAGCCCT CTCTGCGGTT TTTCAGATTA

250

GGTAGTCGAA AAACCTAAGA AATTTACCTG GCT ATGGATTA CAAGGACGAC

*FLAG* 300

GACGACAAGG AATTATCTTC AAAGTTGTCT GTCCAAGATT TGGACTTGAA

Pgk1-36 350

GGACAAGCGT GTCTTCATCA GAGTTGACTT CAACGTCCCA TTGGACGGTA

400

AGAAGATCAC TTCTACGGTT TTCACCTTGG AAGATTTTCGT TGGTGATTGG

nLuc 450

AGACAAACTG CTGGTTACAA TTTGGATCAA GTCTTGGAAC AAGGTGGTGT

500

CTCTTCTTTG TTTCAAAACT TGGGTGTTTC CGTTACCCCA ATCCAAAGAA

550

TAGTTTTGTC TGGTGAAAAC GGTTTGAAGA TCGATATCCA TGTTATCATC

600

CCATACGAAG GTTTGT CAGG TGATCAAATG GGTCAAATCG AAAAGATCTT

650

CAAGGTTGTT TACCCAGTTG ATGATCACCA CTTTAAGGTT ATCTTGC ACT

700

ACGGTACTTT GGTCA TTGAT GGTGTTACTC CAAACATGAT CGATTACTTT

750

GGTAGACCTT ACGAAGGTAT TGCTGTTTTC GATGGTAAGA AGATTACTGT

800

CACTGGTACT TTGTGGAACG GTAACAAAAT TATCGACGAA AGATTGATCA

850

ACCCAGACGG TTCTTTGTTG TTCAGAGTTA CTATTAACGG TGTTACCGGT

900

TGGAGATTGT GCGAAAGAAT TTTGGCTTAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

poly(A)tail

AAAAAAAAA AAAA

図 12. T7\_CrPV IRES\_FLAG\_Pgk1-36\_nLuc\_A36 ( [-] ) の配列情報  
G は T7 RNA polymerase の転写開始の位置、GCT は CrPV IRES の開始コドン

50

GGGCCTAATA CGACTCACTA TA G GGAGACC GGAATTCAAA GCAAAAATGT

T7 Promoter *EcoR I* CrPV IRES 100

GATCTTGCTT GTAAATACAA TTTTGAGAGG TTAATAAATT ACAAGTAGTG

150

CTATTTTTGT ATTTAGGTTA GCTATTTAGC TTTACGTTCC AGGATGCCTA

200

GTGGCAGCCC CACAATATCC AGGAAGCCCT CTCTGCGGTT TTTCAGATTA

250

GGTAGTCGAA AAACCTAAGA AATTTACCTG CT ATGGATTA CAAGGACGAC

*FLAG* 300

GACGACAAGG AATTATCTTC AAAGTTGTCT GTCCAAGATT TGGACTTGAA

Pgk1-36 350

GGACAAGCGT GTCTTCATCA GAGTTGACTT CAACGTCCCA TTGGACGGTA

400

AGAAGATCAC TTCT CCTCCC CCACCGACGG TTTTCACCTT GGAAGATTC

*Pro x4* nLuc 450

GTTGGTGATT GGAGACAAAC TGCTGGTTAC AATTTGGATC AAGTCTTGGA

500

ACAAGGTGGT GTCTCTTCTT TGTTCAAAA CTTGGGTGTT TCCGTTACCC

550

CAATCCAAAG AATAGTTTTG TCTGGTGAAA ACGGTTTGAA GATCGATATC

600

CATGTTATCA TCCCATACGA AGGTTTGTCA GGTGATCAAA TGGGTCAAAT

650

CGAAAAGATC TTCAAGGTTG TTTACCCAGT TGATGATCAC CACTTTAAGG

700

TTATCTTGCA CTACGGTACT TTGGTCATTG ATGGTGTTAC TCCAAACATG

750

ATCGATTACT TTGGTAGACC TTACGAAGGT ATTGCTGTTT TCGATGGTAA

800

GAAGATTACT GTCACCTGGTA CTTTGTGGAA CGGTAACAAA ATTATCGACG

850

AAAGATTGAT CAACCCAGAC GGTTCTTTGT TGTTCAAGT TACTATTAAC

900

GGTGTACCG GTTGAGATT GTGCGAAAGA ATTTTGGCTT AAAAAAAAAA

poly(A)tail

AAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA

図 13. T7\_CrPV IRES\_FLAG\_Pgk1-36\_Pro x4\_nLuc\_A36 (Pro x4) の配列情報  
G は T7 RNA polymerase の転写開始の位置、CT は CrPV IRES の開始コドン

50

GGGCCTAATA CGACTCACTA TA G GGAGACC GGAATTCAAA GCAAAAATGT

T7 Promoter *EcoR* I CrPV IRES 100

GATCTTGCTT GTAAATACAA TTTTGAGAGG TTAATAAATT ACAAGTAGTG

150

CTATTTTTGT ATTTAGGTTA GCTATTTAGC TTTACGTTCC AGGATGCCTA

200

GTGGCAGCCC CACAATATCC AGGAAGCCCT CTCTGCGGTT TTTCAGATTA

250

GGTAGTCGAA AAACCTAAGA AATTTACCTG CT ATGGATTA CAAGGACGAC

*FLAG* 300

GACGACAAGG AATTATCTTC AAAGTTGTCT GTCCAAGATT TGGACTTGAA

Pgk1-36 350

GGACAAGCGT GTCTTCATCA GAGTTGACTT CAACGTCCCA TTGGACGGTA

400

AGAAGATCAC TTCT CGACGA CGACGACGAC GAACGGTTTT CACCTTGGAA

*CGA x6* nLuc 450

GATTTCGTTG GTGATTGGAG ACAAACCTGCT GGTTACAATT TGGATCAAGT

500

CTTGGAACAA GGTGGTGTCT CTTCTTTGTT TCAAAACTTG GGTGTTTCCG

550

TTACCCCAAT CCAAAGAATA GTTTTGTCTG GTGAAAACGG TTTGAAGATC

600

GATATCCATG TTATCATCCC ATACGAAGGT TTGTCAGGTG ATCAAATGGG

650

TCAAATCGAA AAGATCTTCA AGGTTGTTTA CCCAGTTGAT GATCACCCT

700

TTAAGGTTAT CTTGCACTAC GGTACTTTGG TCATTGATGG TGTTACTCCA

750

AACATGATCG ATTACTTTGG TAGACCTTAC GAAGGTATTG CTGTTTTCGA

800

TGGTAAGAAG ATTACTGTCA CTGGTACTTT GTGGAACGGT AACAAAATTA

850

TCGACGAAAG ATTGATCAAC CCAGACGGTT CTTTGTGTTT CAGAGTTACT

900

ATTAACGGTG TTACCGTTG GAGATTGTGC GAAAGAATTT TGGCTTAAAA

AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

poly(A)tail

図 14. T7\_CrPV IRES\_FLAG\_Pgk1-36\_CGA x6\_nLuc\_A36 (CGA x6) の配列情報  
Gは T7 RNA polymerase の転写開始の位置、G CTは CrPV IRES の開始コドン

50

GGGCCTAATA CGACTCACTA TA G GGAGACC GGAATTCAAA GCAAAAATGT

T7 Promoter *EcoR I* CrPV IRES 100

GATCTTGCTT GTAAATACAA TTTTGAGAGG TTAATAAATT ACAAGTAGTG

150

CTATTTTTGT ATTTAGGTTA GCTATTTAGC TTTACGTTCC AGGATGCCTA

200

GTGGCAGCCC CACAATATCC AGGAAGCCCT CTCTGCGGTT TTTCAGATTA

250

GGTAGTCGAA AAACCTAAGA AATTTACCTG CT ATGGATTA CAAGGACGAC

*FLAG* 300

GACGACAAGG AATTATCTTC AAAGTTGTCT GTCCAAGATT TGGACTTGAA

Pgk1-36 350

GGACAAGCGT GTCTTCATCA GAGTTGACTT CAACGTCCCA TTGGACGGTA

400

AGAAGATCAC TTCT CCTCCC CCACCGCCTC CCCCACCGCC TCCCCACCG

*Pro x12* 450

ACGGTTTTCA CCTTGGAAGA TTTTCGTTGGT GATTGGAGAC AAAC TGCTGG

nLuc 500

TTACAATTTG GATCAAGTCT TGGAACAAGG TGGTGTCTCT TCTTTGTTTC

550

AAAAC TTGGG TGTTC CGTT ACCCCAATCC AAAGAATAGT TTTGTCTGGT

600

GAAAACGGTT TGAAGATCGA TATCCATGTT ATCATCCCAT ACGAAGGTTT

650

GTCAGGTGAT CAAATGGGTC AAATCGAAAA GATCTTCAAG GTTGTTTACC

700

CAGTTGATGA TCACCACTTT AAGGTTATCT TGCACTACGG TACTTTGGTC

750

ATTGATGGTG TTA CTCCAAA CATGATCGAT TACTTTGGTA GACCTTACGA

800

AGGTATTGCT GTTTTCGATG GTAAGAAGAT TACTGTCACT GGTACTTTGT

850

GGAACGGTAA CAAAATTATC GACGAAAGAT TGATCAACCC AGACGGTTCT

900

TTGTTGTTCA GAGTTACTAT TAACGGTGTT ACCGGTTGGA GATTGTGCGA

952

AAGAATTTTG GCTTAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AA

poly(A)tail

図 15. T7\_CrPV IRES\_FLAG\_Pgk1-36\_Pro x12\_nLuc\_A36 (Pro x12) の配列情報  
G は T7 RNA polymerase の転写開始の位置、CT は CrPV IRES の開始コドン

50

GGGCCTAATA CGACTCACTA TA G GGAGACC GGAATTCAAA GCAAAAATGT

T7 Promoter *EcoR* I CrPV IRES 100

GATCTTGCTT GTAAATACAA TTTTGAGAGG TTAATAAATT ACAAGTAGTG

150

CTATTTTTGT ATTTAGGTTA GCTATTTAGC TTTACGTTCC AGGATGCCTA

200

GTGGCAGCCC CACAATATCC AGGAAGCCCT CTCTGCGGTT TTTCAGATTA

250

GGTAGTCGAA AAACCTAAGA AATTTACCTG CT ATGGATTA CAAGGACGAC

*FLAG* 300

GACGACAAGG AATTATCTTC AAAGTTGTCT GTCCAAGATT TGGACTTGAA

Pgk1-36 350

GGACAAGCGT GTCTTCATCA GAGTTGACTT CAACGTCCCA TTGGACGGTA

400

AGAAGATCAC TTCT **TGGTGG TGGTGGTGGT GGTGGTGGTG GTGGACGGTT**

*Trp x10* nLuc 450

**TTCACCTTGG AAGATTTTCGT TGGTGATTGG AGACAACTG CTGGTTACAA**

500

**TTTGATCAA GTCTTGGAAC AAGGTGGTGT CTCTTCTTTG TTTCAAACT**

550

**TGGGTGTTTC CGTTACCCCA ATCCAAAGAA TAGTTTTGTC TGGTGAAAAC**

600

**GGTTTGAAGA TCGATATCCA TGTATCATC CCATACGAAG GTTTGTGAGG**

650

**TGATCAAATG GGTCAAATCG AAAAGATCTT CAAGGTTGTT TACCCAGTTG**

700

**ATGATCACCA CTTTAAGGTT ATCTTGCACT ACGGTACTTT GGTCATTGAT**

750

**GGTGTTACTC CAAACATGAT CGATTACTTT GGTTAGACCTT ACGAAGGTAT**

800

**TGCTGTTTTTC GATGGTAAGA AGATTACTGT CACTGGTACT TTGTGGAACG**

850

**GTAACAAAAT TATCGACGAA AGATTGATCA ACCCAGACGG TTCTTTGTTG**

900

**TTCAGAGTTA CTATTAACGG TGTACCAGG TGGAGATTGT GCGAAAGAAT**

**TTTGGCTTAAA**

poly(A)tail

図 16. T7\_CrPV IRES\_FLAG\_Pgk1-36\_Trp x10\_nLuc\_A<sub>36</sub> (Trp x10) の配列情報  
Gは T7 RNA polymerase の転写開始の位置、G CTは CrPV IRES の開始コドン



#### 2.1.4 *In vitro* 翻訳反応用 DNA 断片の調製

Leaderless FLAG\_nLuc\_A36 と CrPV IRES\_FLAG\_nLuc\_A36 は、T7 プロモーターの 5'側にアニーリングする Forward primer 4 と終止コドンを含むアニーリング配列の 3'側に AAA x12 を付加した Reverse primer 1 を用いて、それぞれのプラスミドを鋳型に PCR を行った。得られた PCR 産物は、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System を用いて精製した。

翻訳停止配列解析用コンストラクトである T7\_IRES\_FLAG\_Pgk1-36\_nLuc\_HA は、pCR4-TOPO/T7\_IRES\_FLAG\_Pgk1-36\_nLuc\_A36 を鋳型として、T7 プロモーターの 5'側にアニーリングする Forward primer 4 と、終止コドン直前までのアニーリング配列の 3'側に HA タグ (TACCCATACGACGTC CCAGACTACGCGTAA) を付加した Reverse primer 3 を用いて PCR を行った。T7\_IRES\_FLAG\_Pgk1-36\_Pro x4\_nLuc\_HA と T7\_IRES\_FLAG\_Pgk1-36\_CGA x6\_nLuc\_HA も同様に pCR4-TOPO/T7\_IRES\_FLAG\_Pgk1-36\_Pro x4\_nLuc\_A36 または pCR4-TOPO/T7\_IRES\_FLAG\_Pgk1-36\_CGA x6\_nLuc\_A36 を鋳型として PCR を行った。T7\_IRES\_FLAG\_Pgk1-36\_Pro x12\_nLuc\_HA と T7\_IRES\_FLAG\_Pgk1-36\_Trp x10\_nLuc\_HA も同様に pCR4-TOPO/T7\_IRES\_FLAG\_Pgk1-36\_Pro x12\_nLuc\_A36 または pCR4-TOPO/T7\_IRES\_FLAG\_Pgk1-36\_Trp x10\_nLuc\_A36 を鋳型として PCR を行った。得られた PCR 産物は、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System を用いて精製した。

#### 2.1.5 *In vitro* 翻訳反応用 mRNA の調製

T7 RNA polymerase を用いた *In vitro* 転写反応によって、mRNA を調製した。鋳型となる DNA の PCR 産物 (1.65 mg/mL)、T7 RNA polymerase (1.23  $\mu$ M)、PPiase (3.1  $\mu$ M) を T7 RNAP reaction buffer (40 mM Tris-HCl pH8.0, 22 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM SPD, 5 mM DTT, 3.75 mM ATP, 3.75 mM GTP, 3.75 mM CTP, 3.75 mM UTP, 0.01% BSA, 0.4 U RRI) と混合し、37 度 4 時間の反応を行った。DNase TURBO (0.02 U/ $\mu$ L) を添加して 37 度 15 分の反応により *In vitro* 転写反応を止めた。1/10 量の反応停止 buffer (5 M Ammonium acetate, 100 mM EDTA) を添加し DNase 反応を止めた。サンプルと等量の水飽和フェ

ノールとよく混合して、除タンパクを行った。サンプルと等量のクロロホルムとよく混合しフェノールを除いた。サンプルの2倍量の氷冷100%エタノールとよく混合し、mRNAのエタノール沈殿を行った。得られた沈殿は氷冷70%エタノールでリンスした。得られた沈殿を水に溶かした。得られた mRNA 水溶液は Micro Bio-Spin Columns P-30 Tris RNase Free を用いて脱塩処理を行い、-30度で保存した。

### 2.1.6 出芽酵母の破碎方法

出芽酵母の細胞抽出液の調製は、伸長因子 eEF2 と tRNA mix の精製を除いて、凍結粉碎にて行った。破碎方法は Schultz M.C.らの報告を参考に行った(67,68,69)。1% KCl でよく洗った酵母ペレットを、ペレット 1 g に対して 1 mL の Lysis buffer で懸濁した。酵母懸濁液を液体窒素で満たされた容器の中へ滴下し、ドロップ状の凍結酵母懸濁液(酵母ドロップ)を作成した。酵母ドロップを、液体窒素で容器をよく冷やした Mortar Grinder RM 200 (Retsch 社)を用いて15分間凍結粉碎を行った。この時、2分に1回程度グラインダーの容器を液体窒素で満たし、酵母破碎粉末の温度が上がらないように注意した。一方、液体窒素で容器が満たされている時、酵母粉末が液体中で舞うため破碎効率は下がると考えられた。従って液体窒素が蒸発した後、1分ほど破碎を続けることが効率よく破碎するためには重要だと考えられた。破碎された凍結粉末は、4度で放置し解凍した。得られる上清を細胞抽出液とした。破碎後に生じるデブリが肌色の場合、破碎が不十分であるため、さらに Digital Sonifier 450 (BRANSON 社)を用いて超音波破碎を行った。破碎後のデブリ 1 g に対して 1 mL の Lysis buffer で再懸濁し、80 W, 5分 (on pulse 2 sec, off pulse 4 sec) で超音波破碎した。

伸長因子 eEF2 精製用の細胞抽出液は、Y-PER Yeast Protein Extraction Reagent を用いて調製した。1% KCl でよく洗った酵母ペレットを、ペレット 1 g に対して 2.5 mL の Y-PER (10  $\mu$ M GDP, 5 mM DTT, 0.2 mM PMSE, Protease inhibitor cocktail 粒/20 mL) を混合し、室温で20分間かき混ぜた。得られる上清を細胞抽出液とした。

## 2.1.7 翻訳因子の精製

### 2.1.7.1 酵母リボソームの精製<sup>(70,71,72,73,74)</sup>

出芽酵母 W303 を YPD 液体培地中で 30 度一晩培養した。本培養は YPD 液体培地 0.9 L につき前培養液 20 mL を植え継ぎ、30 度で培養した。OD<sub>600</sub>=1.0 になるまで培養を行ったのち、集菌し、1% KCl で菌体をよく洗った。洗浄した菌体を ribosome 用 lysis buffer (20 mM HEPES-KOH pH7.5, 2.5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 100 mM KOAc pH7.5, 2 mM DTT) で置換し、酵母ドロップを作成し、5.4 L 分の菌体を Mortar Grinder による凍結粉碎を行った。未破碎菌体を遠心 (9,000 xg, 10 min, 4 °C) によって上清と沈殿に分けた。沈殿を ribosome 用 lysis buffer で再懸濁して遠心 (9,000 xg, 10 min, 4 °C) によって上清と沈殿に分けた。2 回の遠心によって得られた上清に、1.25 μL / 10 mL lysate の DNase TURBO を混合した。さらに細かいデブリを除くために Type 70 Ti rotor (Beckman 社) で超遠心 (21,000 rpm ≈ 32,000 xg, 30 min, 4 °C) を行った。得られた上清に MgCl<sub>2</sub> と KCl を添加して、Mg<sup>2+</sup>を終濃度 20 mM、K<sup>+</sup>を終濃度 400 mM にした。次に、CIMmultus QA カラム (8 mL, BIA Separations GmbH 社) を用いたイオン交換クロマトグラフィーによる精製を行った。CIM Q buffer (20 mM HEPES-KOH pH7.5, 400 mM KCl, 20 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 2 mM DTT) で平衡化したカラムにサンプルを導入し、CIM Q buffer でカラムを洗浄した。KCl 濃度を 400 mM から 650 mM に上げて溶出し、A<sub>260</sub> の吸光が確認される画分を回収した。溶出画分が GTP の終濃度 0.5 mM、Mg<sup>2+</sup>の終濃度 50 mM になるように GTP と MgCl<sub>2</sub> を添加し、0.5 mM puromycin と 27 度 15 分反応させた。反応後に (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を終濃度 1.4 M になるように混合した。次に、HiTrap Butyl FF カラム (5 mL x2, GE Healthcare 社) を用いた逆相クロマトグラフィーによる精製を行った。Butyl A buffer (20 mM HEPES-KOH pH7.5, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.4 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 mM DTT) で平衡化したカラムにサンプルを導入し、Butyl A buffer 中の (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 濃度を段階的に下げる (1.4, 0.98, 0.88 M) ことによってカラムを洗浄した。(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 濃度を下げるために Butyl B buffer (20 mM HEPES-KOH pH7.5, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT) を使用した。カラム洗浄後、0.88 M から 0.7 M までの (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 濃度勾配を 100 mL (10 xCV) でかけて、溶出した。80S ribosome が含まれる画分を A<sub>260</sub> の吸光で確認し、A<sub>260</sub> の値が

1.0以上を主要画分として回収した。Type 45 Ti rotor (Beckman 社) のチューブに、20 mL の sucrose cushion buffer (20 mM Hepes-KOH pH7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 1 M sucrose, 2 mM DTT) が下層に、サンプルが上層になるように充填し、超遠心 (36,000 rpm $\approx$ 100,000 xg, 16 hr, 4 °C) を行い 80S ribosome を沈殿させる。沈殿は 5/100 buffer (20 mM Hepes-KOH pH7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl, 0.25 mM EDTA, 2 mM DTT) で溶かしたのち、液体窒素で凍結して-80 度で保存した。

#### 2.1.7.2 酵母 tRNA mix の精製<sup>(75)</sup>

出芽酵母 YPH499 を YPD 液体培地中で 30 度一晩培養した。本培養は YPD 液体培地 1 L につき前培養液 20 mL を植え継ぎ、30 度で培養した。OD<sub>600</sub>=4.0 になるまで培養を行ったのち、集菌し、1% KCl で菌体をよく洗い、tRNA 用 lysis buffer (1 mM Tris-HCl pH7.4, 10 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>) で置換した。菌体体積の 2 倍量の tRNA 用 lysis buffer で懸濁し、そのサンプルと等量の tRNA 用 lysis buffer 飽和フェノールを混合し、室温で一晩、混ぜながら反応した。遠心 (9,000 xg, 10 min, 4 °C) を行ったのち、水層を回収した。得られたサンプルに 0.5 M の NaCl を添加し、サンプル 2 倍量の 100%エタノールと混合したのち、遠心 (9,000 xg, 30 min, 25 °C) を行った。上清を除去し、沈殿を 20 mL の 1 M NaCl に溶かし、遠心 (9,000 xg, 30 min, 25 °C) を行った。rRNA や mRNA は沈殿するため除去した。回収した上清にサンプル 2 倍量の 100%エタノールを混合し、遠心 (9,000 xg, 30 min, 25 °C) を行った。上清を除去し、沈殿を 8 mL の 1.8 M Tris-HCl (pH8.0)に溶かし、37 度 1 時間半反応を行いデアシル化した。反応後、0.8 mL の 5 M NaCl と 20 mL の 100%エタノールを混合し、遠心 (9,000 xg, 30 min, 25 °C) を行った。上清を除去し、沈殿を 40 mL の tRNA 用 AKTA buffer (20 mM Tris-HCl pH7.5, 0.1 mM EDTA, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 M NaCl) に溶かした。次に mono Q 4.6/100 PE カラム (GE Healthcare 社) を用いたイオン交換クロマトグラフィーによる精製を行った。tRNA 用 AKTA buffer で平衡化したカラムにサンプルを導入し、tRNA 用 AKTA buffer の NaCl 濃度を段階的に上げる (0.36, 0.48, 0.56, 1.0 M) ことによってカラムの洗浄と tRNA の溶出を行った。tRNA が含まれる画分は 10% PAGE 8M-Urea で確認し、回収画分に 1/10 量の 3 M NaOAc (pH5.5)を混合したのち、サンプル等量のイソプロパノ

ールを添加した。遠心 (9,000 xg, 60 min, 4 °C) を行い、沈殿を回収する。沈殿に 100%エタノールを添加し、遠心 (9,000 xg, 10 min, 4 °C) を行い、沈殿を回収する。沈殿を 1 mL の水に溶かしたのち、-30 度で保存した。

### 2.1.7.3 eEF1A の精製

出芽酵母 YPH499 を YPD 液体培地中で 30 度一晩培養した。本培養は YPD 液体培地 1 L につき前培養液 20 mL を植え継ぎ、30 度で培養した。OD<sub>600</sub>=3.0 になるまで培養を行ったのち、集菌し、1% KCl で菌体をよく洗った。洗浄した菌体を eEF1A 用 lysis buffer (60 mM Tris-HCl pH7.5, 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA pH8.0, 10% glycerol, 20 μM GDP, 2 mM DTT, 0.2 mM PMSF, Protease inhibitor cocktail 粒/20 mL) で置換し、酵母ドロップを作成し、12 L 分の菌体を Mortar Grinder による凍結粉碎を行った。未破碎菌体を遠心 (9,000 xg, 10 min, 4 °C) によって上清と沈殿に分ける。沈殿を eEF2 用 lysis buffer で再懸濁して遠心 (9,000 xg, 10 min, 4 °C) によって上清と沈殿に分ける。2 回の遠心によって得られた上清を、さらに細かいデブリを除ために Type 70 Ti rotor で超遠心 (45,000 rpm ≈ 150,000 xg, 3 hr, 4 °C) を行い、得られた上清を 0.45 μm フィルターに通した。eEF1A 用 lysis buffer で洗浄した Q sepharose Fast Flow (CV=1 mL/1 g cell, GE Healthcare 社) とサンプルを混合し、1 時間 4 度でかき混ぜた。フロースルーを目的画分として回収した。次に、HiTrap SP HP カラム (5 mL x4, GE Healthcare 社) を用いたイオン交換クロマトグラフィーによる精製を行った。eEF1A 用 SP buffer (20 mM Tris-HCl pH7.5, 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 25% glycerol, 10 μM GDP, 0.5 mM DTT, 0.1 mM PMSF) で平衡化したカラムにサンプルを導入し、eEF1A 用 SP buffer の KCl 濃度を 100 mM に上げてカラムの洗浄を行い、100 mM から 500 mM までの KCl 濃度勾配を 300 mL (15x CV) でかけて、溶出した。eEF1A が含まれる画分を 10% SDS-PAGE と CBB 染色によって確認し、回収したサンプルに (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を終濃度 1.4 M になるように加えた。次に、HiTrap Butyl FF カラム (5 mL x4) を用いて逆相クロマトグラフィーによる精製を行った。eEF1A 用 butyl buffer (20 mM HEPES-KOH pH7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.4 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10% glycerol, 10 μM GDP, 2 mM DTT) で平衡化したカラムにサンプルを導入し、eEF1A 用 butyl buffer の (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 濃度を 1.33 M に下げてカラムを洗浄した。

1.33 M から 0 M までの $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度濃度勾配を 300 mL (15x CV) でかけて、溶出した。eEF1A が含まれる画分を 10% SDS-PAGE と CBB 染色によって確認し、回収したサンプルを eEF1A stock buffer (20 mM Tris-HCl pH7.5, 100 mM KCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 25% glycerol, 10  $\mu\text{M}$  GDP, 0.5 mM DTT, 0.1 mM PMSF) に対して透析を行ったのち、液体窒素で凍結して-80 度で保存した。

#### 2.1.7.4 eEF2 の精製<sup>(76,77)</sup>

出芽酵母 TKY675 を YPD 液体培地中で 30 度一晩前培養した。本培養は YPD 液体培地 1 L につき前培養液 5 mL を植え継ぎ、30 度で培養した。OD<sub>600</sub>=4.0 になるまで培養を行ったのち、集菌し、1% KCl で菌体をよく洗った。6 L 分の菌体を Y-PER による破碎を行い、未破碎菌体を遠心 (9,000 xg, 10 min, 4 °C) によって除去した。得られた上清を eEF2 用 wash buffer A (50 mM HEPES-KOH pH7.5, 150 mM KCl, 20 mM imidazole, 1 mM DTT, 0.2  $\mu\text{M}$  PMSF, 10  $\mu\text{M}$  GDP) で洗浄した Ni-NTA Agarose (QIAGEN 社) 1 mL に導入した。一度目のフロースルーをもう一度カラムに導入したのち、eEF2 用 wash buffer A でカラムを洗浄、eEF2 用 wash buffer B (50 mM HEPES-KOH pH7.5, 500 mM KCl, 20 mM imidazole, 1 mM DTT, 0.2 mM PMSF, 10  $\mu\text{M}$  GDP) でカラムを洗浄、eEF2 用 wash buffer A で再びカラムの洗浄を行った。その後、eEF2 用 elution buffer (50 mM HEPES-KOH pH7.5, 150 mM KCl, 150 mM imidazole, 1 mM DTT, 0.2  $\mu\text{M}$  PMSF, 10  $\mu\text{M}$  GDP) で溶出し、eEF2 が含まれる分画を 12% SDS-PAGE と CBB 染色によって確認し、回収したサンプルを eEF2 用透析 buffer (20 mM HEPES-KOH pH7.5, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.2 mM PMSF, 10  $\mu\text{M}$  GDP) に対して透析を行った。次に、HiTrap Q HP カラム (5 mL, GE Healthcare 社) を用いたイオン交換クロマトグラフィーによる精製を行った。eEF2 用 AKTA buffer (20 mM HEPES-KOH pH7.5, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 10% Glycerol, 7 mM 2-mercaptoethanol, 10  $\mu\text{M}$  GDP) で平衡化したカラムにサンプルを導入し、100 mM から 250 mM までの KCl 濃度勾配を 75 mL (15x CV) でかけて、溶出した。eEF2 が含まれる画分を 12% SDS-PAGE と CBB 染色によって確認し、回収したサンプルを eEF2 stock buffer (20 mM HEPES-KOH pH7.5, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.2 mM PMSF, 1 mM DTT, 10  $\mu\text{M}$  GDP) に対して透析を行ったのち、液体窒素で凍結して-80 度で保存した。

### 2.1.7.5 eEF3 の精製

pET29b/eEF3-6x His を形質転換した大腸菌 JM109(DE3)pRARE を 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  アンピシリンと 1% グルコースを添加した LB 液体培地中で 30 度一晩前培養した。本培養は、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  アンピシリンと 1% グルコースを添加した 2x YT 液体培地 1 L につき、前培養液 10 mL を植え継ぎ、37 度で培養した。対数増殖期 ( $\text{OD}_{660}=0.5$ ) に、0.1 mM IPTG を加えて発現誘導を行った。発現誘導から 2 時間 37 度で培養後、集菌した。6 L 分の菌体を 4 mL/1 g 菌体の eEF3 用 lysis buffer (50 mM Hepes-KOH pH7.5, 500 mM KCl, 10% glycerol, 0.2 mM PMSF, 7 mM 2-mercaptoethanol) で懸濁し、Digital Sonifier 450 を用いて 80 W, 10 分 (on pulse 2 sec, off pulse 8 sec) の超音波破碎を行った。未破碎菌体を遠心 (9,000 xg, 30 min, 4 °C) によって上清と沈殿に分ける。沈殿を eEF3 用 lysis buffer で再懸濁して遠心 (9,000 xg, 10 min, 4 °C) によって上清と沈殿に分ける。2 回の遠心によって得られた上清を eEF3 用 wash buffer (50 mM Hepes-KOH pH7.5, 1000 mM KCl, 20 mM imidazole, 10% glycerol, 0.2 mM PMSF, 7 mM 2-mercaptoethanol) で洗浄した Ni-NTA Agarose 5 mL と混合し、1 時間 4 度でかき混ぜた。500 mL (100x CV) の eEF3 用 wash buffer でカラムを洗浄した。eEF3 用 elution buffer (50 mM Hepes-KOH pH7.5, 100 mM KCl, 250 mM imidazole, 10% glycerol, 0.2 mM PMSF, 7 mM 2-mercaptoethanol) で溶出し、eEF3 が含まれる分画を 10% SDS-PAGE と CBB 染色によって確認し、回収したサンプルを eEF3 用透析 buffer (20 mM Hepes-KOH pH7.5, 150 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 10% glycerol, 5 mM 2-mercaptoethanol) に対して透析を行った。次に、HiTrap Q HP カラム (5 mL) を用いたイオン交換クロマトグラフィーによる精製を行った。eEF3 用 AKTA buffer (20 mM Hepes-KOH pH7.5, 150 mM KCl, 10% Glycerol, 5 mM 2-mercaptoethanol) で平衡化したカラムにサンプルを導入し、eEF3 用 AKTA buffer でカラムの洗浄を行った。eEF3 は洗浄画分で溶出するため、12% SDS-PAGE と CBB 染色によって確認し、回収したサンプルを eEF3 stock buffer (20 mM Hepes-KOH pH7.5, 100 mM KCl, 10% Glycerol, 3.5 mM 2-mercaptoethanol) に対して透析を行ったのち、液体窒素で凍結して -80 度で保存した。

#### 2.1.7.6 eRF1 の精製

pET21a/eRF1 を形質転換した大腸菌 Rosetta(DE3)pLysS を 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  アンピシリン、12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  クロラムフェニコール、1% グルコースを添加した LB 液体培地中で 37 度一晩前培養した。本培養は、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  アンピシリン、12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  クロラムフェニコール、1% グルコースを添加した LB 液体培地 1 L につき、前培養液 10 mL を植え継ぎ、37 度で培養した。対数増殖期 ( $\text{OD}_{660}=0.5$ ) に、0.1 mM IPTG を加えて発現誘導を行った。発現誘導から 18 度で一晩培養を行い、集菌した。3 L 分の菌体を 150 mL の eRF1 用 lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH7.5, 100 mM KCl, 10% glycerol, 0.1 mM PMSF, 3.5 mM 2-mercaptoethanol) で懸濁し、Digital Sonifier 450 を用いて 80 W, 15 分 (on pulse 2 sec, off pulse 8 sec) の超音波破碎を行った。未破碎菌体を遠心 (9,000  $\times g$ , 30 min, 4  $^{\circ}\text{C}$ ) によって除去し、得られた上清を eRF1 用 wash buffer (50 mM Tris-HCl pH7.5, 1 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 mM imidazole, 10% glycerol, 3.5 mM 2-mercaptoethanol) で洗浄した Ni-NTA Agarose 10 mL と混合し、5 分間 4 度でかき混ぜた。1 L (100x CV) の eRF1 用 wash buffer でカラムを洗浄した。eRF1 用 elution buffer (50 mM Tris-HCl pH7.5, 100 mM KCl, 200 mM imidazole, 10% glycerol, 3.5 mM 2-mercaptoethanol) で溶出し、eRF1 が含まれる分画を 12% SDS-PAGE と CBB 染色によって確認し、回収したサンプルを eRF1 用透析 buffer (20 mM HEPES-KOH pH7.5, 100 mM KCl, 10% glycerol, 7 mM 2-mercaptoethanol) に対して透析を行った。次に、HiTrap Q HP カラム (5 mL) を用いたイオン交換クロマトグラフィーによる精製を行った。eRF1 用 AKTA buffer (20 mM HEPES-KOH pH7.5, 100 mM KCl, 10% Glycerol, 7 mM 2-mercaptoethanol) で平衡化したカラムにサンプルを導入し、eRF1 用 AKTA buffer 中の KCl 濃度を段階的に上げて (100, 200, 300 M) カラムを洗浄した。300 mM から 600 mM までの KCl 濃度勾配を 75 mL (15x CV) でかけて、溶出した。eRF1 が含まれる画分は 12% SDS-PAGE と CBB 染色によって確認し、回収したサンプルを eRF1 stock buffer (20 mM HEPES-KOH pH7.5, 100 mM KCl, 10% Glycerol, 7 mM 2-mercaptoethanol) に対して透析を行ったのち、液体窒素で凍結して-80 度で保存した。



#### 2.1.7.7 eRF3 の精製<sup>(65)</sup>

pET21a/eRF3 $\Delta$ 165 を形質転換した大腸菌 JM109(DE3)pRARE を 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  アンピシリン、12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  クロラムフェニコール、1% グルコースを添加した LB 液体培地中で 37 度一晩前培養した。本培養は、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  アンピシリン、12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  クロラムフェニコール、1% グルコースを添加した 2x YT 液体培地 1 L につき、前培養液 10 mL を植え継ぎ、37 度で培養した。対数増殖期 ( $\text{OD}_{660}=0.5$ ) に、0.1 mM IPTG を加えて発現誘導を行った。発現誘導から 18 度で一晩培養を行い、集菌した。3 L 分の菌体を 150 mL の eRF3 用 lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH7.5, 100 mM KCl, 7 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10% glycerol, 10 mM imidazole, 50  $\mu\text{M}$  GDP, 0.1 mM PMSF, 3.5 mM 2-mercaptoethanol, protease inhibitor cocktail 粒/20 mL) で懸濁し、Digital Sonifier 450 を用いて 80 W, 15 分 (on pulse 2 sec, off pulse 8 sec) の超音波破碎を行った。未破碎菌体を遠心 (9,000 xg, 30 min, 4 °C) によって除去し、得られた上清を eRF3 用 wash buffer (50 mM Tris-HCl pH7.5, 1 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 7 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10% glycerol, 10 mM imidazole, 50  $\mu\text{M}$  GDP, 3.5 mM 2-mercaptoethanol) で洗浄した Ni-NTA Agarose 10 mL と混合し、5 分間 4 度でかき混ぜた。1 L (100x CV) の eRF3 用 wash buffer でカラムを洗浄した。eRF3 用 elution buffer (50 mM Tris-HCl pH7.5, 100 mM KCl, 7 mM  $\text{MgCl}_2$ , 150 mM imidazole, 10% glycerol, 50  $\mu\text{M}$  GDP, 3.5 mM 2-mercaptoethanol) で溶出し、eRF3 が含まれる分画を 12% SDS-PAGE と CBB 染色によって確認し、回収したサンプルを eRF3 用透析 buffer (20 mM HEPES-KOH pH7.5, 100 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10% glycerol, 0.1 mM EDTA, 50  $\mu\text{M}$  GDP, 7 mM 2-mercaptoethanol) に対して透析を行った。次に、HiTrap Q HP カラム (5 mL) を用いたイオン交換クロマトグラフィーによる精製を行った。eRF3 用 AKTA buffer (20 mM HEPES-KOH pH7.5, 100 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10% glycerol, 50  $\mu\text{M}$  GDP, 7 mM 2-mercaptoethanol) で平衡化したカラムにサンプルを導入し、100 mM から 300 mM までの KCl 濃度勾配を 75 mL (15x CV) でかけて、溶出した。eRF3 が含まれる画分は 12% SDS-PAGE と CBB 染色によって確認し、回収したサンプルを eRF3 stock buffer (20 mM HEPES-KOH pH7.5, 100 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10% glycerol, 0.1 mM EDTA, 50  $\mu\text{M}$  GDP, 7 mM 2-mercaptoethanol) に対して透析を行ったのち、液体窒素で凍結して -80 度で保存した。

#### 2.1.7.8 Rli1 の精製<sup>(66)</sup>

Rli1 発現株である INVSc1 の培養は、ウラシルを除いた最少完全培地 (SC-Ura) を用いた。SC-Ura 培地調製に用いた Drop out mix (-Ura) は、0.5 g Adenine Hydrochloride, 2 g myo-Inositol, 2 g L-Alanine, 2 g L-(+)-Arginine monohydrochloride, 2 g L-Asparagine monohydrate, 2 g L-Aspartic acid, 2 g L-Cysteine, 2 g L-Glutamine, 2 g L-Glutamic acid, 2 g Glycine, 2 g L-Histidine monohydrochloride monohydrate, 2 g L-Isoleucine, 10 g Leucine, 2 g L-Lysine monohydrochloride, 2 g L-Methionine, 2 g L-Phenylalanine, 2 g L-Proline, 2 g L-Serine, 2 g L-Threonine, 2 g L-Tryptophan, 2 g L-Tyrosine, 2 g L-Valine, 0.2 g p-Aminobenzoic acid を乳鉢で砕きながら混ぜ合わせて調製した。800 mL の SC-Ura 液体培地は、5.33 g の Difco Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids (Becton, Dickinson 社)、1.54 g の Drop out mix (-Ura) を、水 600 mL に溶かして調製し、約 20 mL の 1 N NaOH を添加して pH を中性にした。ラフィノースやガラクトースは、フィルター滅菌した 10-20% のストック溶液を調製し、オートクレーブによる滅菌済み SC-Ura 液体培地に添加した。全ての試薬を混ぜ合わせて、液体培地が 800 mL になるようにした。

pYES2/ 6x His Rli1 を形質転換した出芽酵母 INVSc1 を 1% ラフィノースを添加した Sc-Ura 液体培地中で 30 度二晩培養した。本培養は 1% ラフィノースを添加した Sc-Ura 液体培地 800 mL につき、前培養液 60 mL を植え継ぎ、30 度で培養した。培養開始 2 時間後に終濃度 2% になるように、培地にガラクトースを添加し発現誘導を行った。OD<sub>600</sub>=6.0 を超えたら集菌し、1% KCl で菌体をよく洗う。洗浄した菌体を Rli1 用 lysis buffer (75 mM HEPES-KOH pH8.0, 1 M NH<sub>4</sub>Cl, 20 mM imidazole, 20% glycerol, 5 mM 2-mercaptoethanol, 0.1 mM PMSF, Protease inhibitor cocktail 粒/20 mL) で置換し、酵母ドロップを作成し、6 L 分の菌体を Mortar Grinder による凍結粉砕を行った。未破砕菌体を遠心 (9,000 xg, 10 min, 4 °C) によって除去し、さらに Type 70 Ti rotor による超遠心 (15,200 rpm ≈ 17,000 xg, 30 min, 4 °C) で細かいデブリを除去した。得られた上清を Rli1 用 wash buffer (50 mM HEPES-KOH pH8.0, 1 M NH<sub>4</sub>Cl, 20 mM imidazole, 20% glycerol, 1% Tween 20, 5 mM 2-mercaptoethanol) で洗浄した Ni-NTA Agarose 10 mL と混合し、1 時間 4 度でかき混ぜた。1 L (100x CV) の Rli1 用 wash buffer でカラムを洗浄した。Rli1 用 elution buffer (50 mM HEPES-KOH pH8.0, 1 M NH<sub>4</sub>Cl, 300 mM imidazole, 20% glycerol, 5 mM

2-mercaptoethanol) で溶出し、Rli1 が含まれる分画を 12% SDS-PAGE と CBB 染色によって確認し、回収したサンプルを Rli1 用透析 buffer (30 mM HEPES-KOH pH7.0, 100 mM KCl, 25% glycerol, 0.1 mM EDTA, 7 mM 2-mercaptoethanol, 0.1 mM PMSF) に対して透析を行った。Rli1 用透析 buffer で洗浄した Q sepharose Fast Flow (CV=1.5 mL) にサンプルを導入し、フロースルーを目的画分として回収した。次に、HiTrap SP HP カラム (5 mL) を用いたイオン交換クロマトグラフィーによる精製を行った。Rli1 用 AKTA buffer (30 mM HEPES-KOH pH7.0, 100 mM KCl, 25% glycerol, 0.1 mM EDTA, 7 mM 2-mercaptoethanol) で平衡化したカラムにサンプルを導入し、Rli1 用 AKTA buffer の KCl 濃度を 150 mM に上げてカラムの洗浄を行い、150 mM から 500 mM までの KCl 濃度勾配を 75 mL (15x CV) でかけて、溶出した。Rli1 が含まれる画分を 12% SDS-PAGE と CBB 染色によって確認し、回収したサンプルを Rli1 stock buffer (20 mM HEPES-KOH pH7.5, 200 mM KCl, 25% glycerol, 0.1 mM EDTA, 7 mM 2-mercaptoethanol, 0.1 mM PMSF, 20  $\mu$ M ADP) に対して透析を行ったのち、液体窒素で凍結して-80 度で保存した。

#### 2.1.7.9 Dom34 の精製

pET29b/Dom34-6x His を形質転換した大腸菌 Rosetta(DE3)pLysS を 25  $\mu$ g/mL カナマイシン、12.5  $\mu$ g/mL クロラムフェニコール、1% グルコースを添加した LB 液体培地中で 37 度一晩前培養した。本培養は、25  $\mu$ g/mL カナマイシン、12.5  $\mu$ g/mL クロラムフェニコール、1% グルコースを添加した 2x YT 液体培地 1 L につき、前培養液 10 mL を植え継ぎ、37 度で培養した。対数増殖期 ( $OD_{660}=0.5$ ) に、0.1 mM IPTG を加えて発現誘導を行った。発現誘導から 18 度で一晩培養を行い、集菌した。3 L 分の菌体を 150 mL の Dom34 用 lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH7.5, 100 mM KCl, 10% glycerol, 0.1 mM PMSF, 3.5 mM 2-mercaptoethanol) で懸濁し、Digital Sonifier 450 を用いて 80 W, 15 分 (on pulse 2 sec, off pulse 8 sec) の超音波破碎を行った。未破碎菌体を遠心 (9,000 xg, 30 min, 4  $^{\circ}$ C) によって除去し、得られた上清を Dom34 用 wash buffer (50 mM Tris-HCl pH7.5, 1 M  $NH_4Cl$ , 10 mM imidazole, 10% glycerol, 3.5 mM 2-mercaptoethanol) で洗浄した Ni-NTA Agarose 10 mL と混合し、30 分間 4 度でかき混ぜた。1 L (100x CV) の Dom34 用 wash buffer でカラムを

洗浄した。Dom34 用 elution buffer (50 mM Tris-HCl pH7.5, 100 mM KCl, 200 mM imidazole, 10% glycerol, 3.5 mM 2-mercaptoethanol) で溶出し、Dom34 が含まれる分画を 12% SDS-PAGE と CBB 染色によって確認し、回収したサンプルを Dom34 用透析 buffer (20 mM Hepes-KOH pH7.5, 200 mM KCl, 10% glycerol, 7 mM 2-mercaptoethanol) に対して透析を行った。次に、HiTrap Q HP カラム (5 mL x4) を用いたイオン交換クロマトグラフィーによる精製を行った。Dom34 用 AKTA buffer (20 mM Hepes-KOH pH7.5, 200 mM KCl, 10% Glycerol, 7 mM 2-mercaptoethanol) で平衡化したカラムにサンプルを導入し、200 mM から 500 mM までの KCl 濃度勾配を 300 mL (15x CV) でかけて、溶出した。Dom34 が含まれる画分は 12% SDS-PAGE と CBB 染色によって確認し、回収したサンプルを Dom34 stock buffer (20 mM Hepes-KOH pH7.5, 200 mM KCl, 10% Glycerol, 7 mM 2-mercaptoethanol) に対して透析を行った。さらに精製度を上げるため、HiLoad Superdex200 prep grade カラム (120 mL, GE Healthcare 社) を用いたサイズ排除クロマトグラフィーによる精製を行った。カラムは、事前に Dom34 stock buffer で平衡化し、サンプルを導入、溶出は Dom34 stock buffer で 0.5 mL/min の一定流速で行った。Dom34 が含まれる画分を 12% SDS-PAGE と CBB 染色によって確認し、回収したサンプルを液体窒素で凍結して-80 度で保存した。

#### 2.1.7.10 Hbs1 の精製

pETDuet/Hbs1-6x His を形質転換した大腸菌 BL21 (DE3)を 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  アンピシリンを添加した 2x YT 液体培地中で 37 度一晩前培養した。本培養は、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  アンピシリン、12.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  クロラムフェニコール、1% グルコースを添加した 2x YT 液体 1 L につき、前培養液 10 mL を植え継ぎ、37 度で培養した。対数増殖期 ( $\text{OD}_{660}=0.5$ ) に、0.1 mM IPTG を加えて発現誘導を行った。発現誘導から 18 度で一晩培養を行い、集菌した。3 L 分の菌体を 150 mL の eRF3 用 lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH7.5, 100 mM KCl, 7 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10% glycerol, 10 mM imidazole, 50  $\mu\text{M}$  GDP, 0.1 mM PMSF, 3.5 mM 2-mercaptoethanol, protease inhibitor cocktail 粒/20 mL) で懸濁し、Digital Sonifier 450 を用いて 80 W, 10 分 (on pulse 2 sec, off pulse 8 sec) の超音波破碎を行った。Type 45 Ti rotor による超遠心 (16,000 rpm $\approx$  20,000 xg, 30 min, 4  $^{\circ}\text{C}$ ) で未破碎菌体を除去し、得られた上清を Hbs1 用 wash buffer (50 mM Tris-HCl pH7.5, 1 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 7 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10% glycerol, 10 mM imidazole, 50  $\mu\text{M}$  GDP, 3.5 mM 2-mercaptoethanol) で洗浄した Ni-NTA Agarose 10 mL と混合し、5 分間 4 度でかき混ぜた。1 L (100x CV) の Hbs1 用 wash buffer でカラムを洗浄した。Hbs1 用 elution buffer (50 mM Tris-HCl pH7.5, 100 mM KCl, 7 mM  $\text{MgCl}_2$ , 150 mM imidazole, 10% glycerol, 50  $\mu\text{M}$  GDP, 3.5 mM 2-mercaptoethanol) で溶出し、Hbs1 が含まれる分画を 12% SDS-PAGE と CBB 染色によって確認し、回収したサンプルを Hbs1 用透析 buffer (20 mM HEPES-KOH pH7.5, 100 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10% glycerol, 0.1 mM EDTA, 50  $\mu\text{M}$  GDP, 7 mM 2-mercaptoethanol) に対して透析を行った。次に、HiTrap Q HP カラム (5 mL x2) を用いたイオン交換クロマトグラフィーによる精製を行った。Hbs1 用 AKTA buffer (20 mM HEPES-KOH pH7.5, 100 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1 mM EDTA, 10% glycerol, 50  $\mu\text{M}$  GDP, 7 mM 2-mercaptoethanol) で平衡化したカラムにサンプルを導入し、Hbs1 用 AKTA buffer 中の KCl 濃度を 250 mM に上げてカラムの洗浄を行った。250 mM から 600 mM までの KCl 濃度勾配を 150 mL (15x CV) でかけて、溶出した。Hbs1 が含まれる画分は 12% SDS-PAGE と CBB 染色によって確認し、回収したサンプルを Hbs1 stock buffer (20 mM HEPES-KOH pH7.5, 100 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10% glycerol, 0.1 mM EDTA, 50  $\mu\text{M}$  GDP, 7 mM 2-mercaptoethanol) に対して透析を行ったのち、液体窒素で凍結して-80 度で保存した。

#### 2.1.7.11 eIF5A の精製

本研究で用いた 5 種類の eIF5A は、当研究室の卒業生である西村聡が精製したものを利用した。西村聡の修士論文に書かれた精製方法を簡単にまとめた。

eIF5A(WT)-6x His/pYES2 または eIF5A(K51R)-6x His/pYES2 を形質転換した出芽酵母 INVSc1 を 1% ラフィノースと 2% ガラクトースを添加した Sc-Ura 液体培地で培養した。得られた菌体は液体窒素を用いて凍結粉砕した。未破砕菌体を除去し、得られた上清から Ni-NTA Agarose を用いて eIF5A を粗精製した。次に HiTrap Q HP カラムを用いたイオン交換クロマトグラフィーによる精製を行った。回収したサンプルを eIF5A stock buffer (20 mM Hepes-KOH pH7.6, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT) に対して透析を行ったのち、液体窒素で凍結して-80 度で保存した。

eIF5A/pET29b、eIF5A\_DHS/pET29b、eIF5A\_DHS\_DOHH/pET29b を形質転換した大腸菌 Rosetta(DE3)pLysS を 2x YT 液体培地 37 度で培養した。対数増殖期 ( $OD_{660}=0.5$ ) に、0.1 mM IPTG を加えて発現誘導を行った。発現誘導から 18 度で一晩培養を行い、集菌した。得られた菌体は超音波破砕を行った。得られた上清から Ni-NTA Agarose を用いて eIF5A を粗精製した。次に HiTrap Q HP カラムを用いたイオン交換クロマトグラフィーによる精製を行った。回収したサンプルを eIF5A stock buffer (20 mM Hepes-KOH pH7.6, 100 mM KCl, 10% glycerol, 7 mM 2-mercaptoethanol) に対して透析を行ったのち、液体窒素で凍結して-80 度で保存した。

#### 2.1.8 tRNA アミノアシル化反応用 S100 Lysate の調製

出芽酵母 YPH499 を YPD 液体培地中で 30 度一晩培養した。本培養は YPD 液体培地 1 L につき前培養液 20 mL を植え継ぎ、30 度で培養した。OD<sub>600</sub>=4.0 になるまで培養を行ったのち、集菌し、1% KCl で菌体をよく洗った。洗浄した菌体を Lysate 用 lysis buffer (60 mM Tris-OAc pH7.0, 50 mM NH<sub>4</sub>Cl, 5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 10% glycerol, 2 mM spermidine, 10 mM 2-mercaptoethanol, 0.1 mM PMSF) で置換し、菌体 1 g につき 1.5 mL の Lysate 用 lysis buffer で菌体を懸濁したのち、酵母ドロップを作成した。12 L 分の菌体を Mortar Grinder による凍結粉砕を行った。未破砕菌体を遠心 (1,000 xg,

10 min, 4 °C) によって除去し、超遠心 (20,000 xg, 30 min, 4 °C) を行い上清 (S20 lysate) を得た。さらに超遠心 (65,000 xg, 5 h, 4 °C) を行い上清 (S100 lysate) を得た。得られた S100 lysate を Lysate 用透析 buffer (20 mM Hepes-KOH pH 8.0, 5 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 10% glycerol, 1mM DTT, 0.1 mM PMSF, Protease inhibitor cocktail) に対して透析を行った。透析された S100 lysate は、Lysate 用透析 buffer で洗浄した Q sepharose Fast Flow (CV=1 mL) に導入し、S100 Lysate elution buffer (20 mM Hepes-KOH pH8.0, 250 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 10% glycerol, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, Protease inhibitor cocktail 粒/20 mL) で溶出した。Bradford 法でタンパク質濃度を測定し 5 mg/mL 以上の画分を回収し、液体窒素で凍結して-80 度で保存した。

### 2.1.9 アミノアシル tRNA の調製

tRNA のアミノアシル化反応は、タンパク質 2 mg/mL 分の S100 Lysate, 0.5 μM eEF1A, 100 nM creatine kinase, 20 nM myokinase, 60 nM nucleoside-diphosphate kinase, 30 nM pyrophosphatase, 6.23 A.u. /mL (~10 μM) yeast tRNAs を tRNA charging buffer (50 mM Hepes-KOH pH7.6, 100 mM potassium glutamate, 9 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 2 mM spermidine, 0.1 mM spermine, 1 mM DTT, 0.15 mM each 18 amino acids(Met と Cys を除く), 0.1 mM Cysteine, 0.05 mM Methionine, 2 mM ATP, 2 mM GTP, 1 mM CTP, 1 mM UTP, 20 mM creatine phosphate) と混合し、30 度 30 分の反応を行った。

1 mL の反応ボリュームで tRNA のアミノアシル化を行った場合の精製は、下記の手順で行った。反応後に buffer (4 M Guanidine thiocyanate, 25 mM sodium citrate pH7.0, 0.5% sarcosyl, 85 mM 2-mercaptoethanol) を 3 mL を混合し、速やかに 300 μL の 2 M NaOAc pH4.0 を添加する。続いてサンプル等量の 50 mM NaOAc pH5.0 飽和フェノールとよく混合し、960 μL の CIA (49:1 の割合で混合したクロロホルムとイソアミルアルコール) を混合したのち、遠心 (20,000 xg, 5 min) を行った。上層を回収し、サンプル等量のイソプロパノールを混合して、遠心 (20,000 xg, 30 min, 4 °C) を行った。上清を除去し、沈殿を 50 mM KOAc pH5.5 に溶かした。aa-tRNA 用 elution buffer (0.3 M KOAc pH5.5, 5% isopropanol) で平衡化した NAP-5 Columns にサンプルを導入し、

メーカープロトコルに従って、aa-tRNA 用 elution buffer を用いて溶出した。アミノアシル tRNA の含まれる画分と等量のイソプロパノールを混合し、遠心 (20,000 xg, 30 min, 4 °C) を行った。上清を除去し、氷冷 70%エタノールを加えて、遠心 (20,000 xg, 5 min, 4 °C) を行った。上清を除去し、100  $\mu$ L の 50 mM KOAc pH5.5 に溶かして、-80 度で保存した。調製された 100  $\mu$ L のアミノアシル tRNA mix は酵母再構成型生体外タンパク質合成系の反応液 1 mL 分として利用した。



## 2.2 酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系と生化学実験の方法

### 2.2.1 酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系によるタンパク質合成

本研究では 3 種類の酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系によるタンパク質合成を行った。

tRNA のアミノアシル化反応、転写反応、翻訳反応が共役した酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系（以下、DNA start と表記）は下記の手順で調製した。それぞれ 0.5  $\mu\text{M}$  の伸長因子（eEF1A, eEF2, eEF3）, 終結・リボソーム再生因子（eRF1, eRF3, Rli1, Dom34, Hbs1）, 80S リボソームと、1 nM DNA、6.23 A.u. /mL ( $\sim 10 \mu\text{M}$ ) yeast tRNAs、100 nM T7 RNA polymerase、0.053 mg/mL human ARSs、100 nM creatine kinase、20 nM myokinase、60 nM nucleoside-diphosphate kinase、30 nM pyrophosphatase を DNA start buffer（50 mM HEPES-KOH pH 7.6, 100 mM potassium glutamate, 11 mM  $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ , 2 mM spermidine, 0.1 mM spermine, 1 mM DTT, 0.15 mM each 18 amino acids (Met と Cys を除く), 0.1 mM Cysteine, 0.05 mM Methionine, 2 mM ATP, 2 mM GTP, 1 mM CTP, 1 mM UTP, 20 mM creatine phosphate) 内で混合した。

tRNA のアミノアシル化反応と翻訳反応が共役した酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系（以下、mRNA start と表記）は下記の手順で調製した。それぞれ 0.5  $\mu\text{M}$  の eEF1A, eEF2, eEF3, eRF1, eRF3, Rli1, Dom34, Hbs1, 80S リボソーム, mRNA と、6.23 A.u. /mL ( $\sim 10 \mu\text{M}$ ) yeast tRNAs、0.053 mg/mL human ARSs、100 nM creatine kinase、20 nM myokinase、60 nM nucleoside-diphosphate kinase、30 nM pyrophosphatase を mRNA start buffer（50 mM HEPES-KOH pH 7.6, 100 mM potassium glutamate, 9 mM  $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ , 2 mM spermidine, 0.1 mM spermine, 1 mM DTT, 0.15 mM each 18 amino acids (Met と Cys を除く), 0.1 mM Cysteine, 0.05 mM Methionine, 2 mM ATP, 2 mM GTP, 1 mM CTP, 1 mM UTP, 20 mM creatine phosphate) 内で混合した。

tRNA のアミノアシル化と転写反応を共役させない最小限の酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系（以下、mRNA, aa-tRNA start と表記）は下記の手順で調製した。下記の buffer 組成は、マグネシウム濃度とポリアミン濃度を最適化した  $[\text{Mg}/\text{SPD}/\text{SP}]=[5/0.25/0]$  mM を記載した。5.0  $\mu\text{M}$  eEF1A、それぞ

れ 0.5  $\mu\text{M}$  の eEF2, eEF3, eRF1, eRF3, Rli1, Dom34, Hbs1, 80S リボソーム, mRNA と、反応ボリューム 1/10 量のアミノアシル tRNA mix、100 nM creatine kinase、20 nM myokinase、60 nM nucleoside-diphosphate kinase、30 nM pyrophosphatase を mRNA, aa-tRNA start buffer (50 mM Hepes-KOH pH 7.6, 100 mM potassium glutamate, 5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 0.25 mM spermidine, 1 mM DTT, 0.15 mM each 18 amino acids (Met と Cys を除く), 0.1 mM Cysteine, 0.05 mM Methionine, 1 mM ATP, 1 mM GTP, 20 mM creatine phosphate) 内で混合した。

上記のように調製された酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系は 30 度でタンパク質合成反応を行った。

### 2.2.2 [<sup>35</sup>S]メチオニン (>37TBq/mmol, 400MBq/mL) を用いた翻訳反応

翻訳産物をゲル電気泳動で解析する場合、酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系の 0.05 mM メチオニンを 500 nM [<sup>35</sup>S]メチオニンに変更して翻訳反応を行い、放射性同位体標識された翻訳産物の検出を行った。アミノアシル tRNA による最小限の翻訳系の場合は、アミノアシル化反応の 0.1 mM メチオニンを 500 nM [<sup>35</sup>S]メチオニンに変更して調製したアミノアシル tRNA を用いて翻訳反応を行い、放射性同位体標識された翻訳産物の検出を行った。

### 2.2.3 SDS-PAGE による放射性同位体標識された翻訳産物の解析

サンプルに 5x LiDS (5% w/v Lithium dodecyl sulfate, 25% v/v glycerol, 100 mM Tris-HCl pH6.8, 0.025% w/v Bromophenol Blue, 875 mM 2-mercaptoethanol) を混合した後、15% SDS-PAGE ゲルに導入した。150 V の定電圧で 1 時間 45 分の電気泳動を行なったのち、脱染液 (10% acetic acid, 10% methanol) にゲルを 30 分浸し、脱染液を取り替えてゲルを 30 分浸した。さらに平衡化液 (40% methanol, 10% acetic acid, 3% glycerol) にゲルを 30 分浸したのち、ゲルをろ紙とラップで挟み、RapiDry ゲルドライヤー (ATTO 社) で 60 度 1 時間の乾燥処理を行った。乾燥させたゲルと、 [<sup>35</sup>S]メチオニンの希釈系列を 10  $\mu\text{L}$  ずつスポットした検量線用紙をカセットに挟んで、IP プレートを一晩露光した。IP プレートを BAS-5000 (富士フィルム社) によって検出し、Multi Gauge (富士フィルム社) を用いて解析した。

## 2.2.4 Tricine SDS-PAGE による放射性同位体標識された翻訳産物の解析

アクリルアミドストック (6% C) は、48 g のアクリルアミドと 1.5 g のビスアクリルアミドを水に溶かし 100 mL に調製した。アクリルアミドストック (3% C) は、46.5 g のアクリルアミドと 3.0 g のビスアクリルアミドを水に溶かし 100 mL に調製した。ゲル緩衝液 (3 M Tris-HCl pH8.45, 0.3% SDS)、陽極側緩衝液 (0.2 M Tris-HCl pH8.9)、陰極側緩衝液 (0.1 M Tris-HCl pH8.25, 0.1 M Tricine, 0.1% SDS) も調製した。

分離ゲル (16.5% T, 6% C) は、4 mL のアクリルアミドストック (6% C)、4 mL のゲル緩衝液、1.6 g のグリセロール、2.4 mL の水、20  $\mu$ L の 30% APS、6  $\mu$ L の TEMED を混合して調製した。スぺーサーゲル (10% T, 3% C) は、1.22 mL のアクリルアミドストック (3% C)、2 mL のゲル緩衝液、2.78 mL の水、6.67  $\mu$ L の 30% APS、2  $\mu$ L の TEMED を混合して調製した。濃縮ゲル (4% T, 3% C) は、0.4 mL のアクリルアミドストック (3% C)、1.24 mL のゲル緩衝液、3.36 mL の水、20  $\mu$ L の 30% APS、6  $\mu$ L の TEMED を混合して調製した。スぺーサーゲル層は 1 cm になるように分離ゲルと濃縮ゲルの間に重層した。

サンプルに 5x LiDS を混合した後、ゲルに導入した。25 kDa のマーカーがスぺーサーゲルを越えるまで 100 V の定電圧で電気泳動を行い、75 kDa のマーカーがスぺーサーゲルを完全に越えるまで 150 V の定電圧で電気泳動を行った。脱染液 (10% acetic acid, 10% methanol) にゲルを 30 分浸し、脱染液を取り替えてゲルを 30 分浸した。さらに平衡化液 (40% methanol, 10% acetic acid, 3% glycerol) にゲルを 30 分浸したのち、ゲルをろ紙とラップで挟み、RapiDry ゲルドライヤーで 60 度 1 時間の乾燥処理を行った。乾燥させたゲルと、 $^{35}\text{S}$ メチオニンの希釈系列を 10  $\mu$ L ずつスポットした検量線用紙をカセットに挟んで、IP プレートを一晩露光した。IP プレートを BAS-5000 によって検出し、Multi Gauge を用いて解析した。

## 2.2.5 翻訳産物 (nLuc) の酵素活性測定

翻訳産物である nLuc の酵素活性を Nano-Glo<sup>®</sup> Luciferase Assay System を用いて測定した。Nano-Glo<sup>®</sup> Luciferase Assay System は、メーカープロトコルに基づき、Nano-Glo<sup>®</sup> Luciferase Assay Buffer と Nano-Glo<sup>®</sup> Luciferase

Assay Substrate を 50:1 で混合したものを用事調製した。氷上で 2  $\mu$ L の酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系反応液と 18  $\mu$ L の反応停止 buffer (20 mM HEPES-KOH pH7.5, 100 mM KOAc, 2 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 0.1 mg/mL RNaseA) 混合し、その後 20  $\mu$ L の Nano-Glo® Luciferase Assay System を混合した。サンプルを室温に移してから、96 ウェルハーフエリアホワイトマイクロプレート (Corning 社, #3693) にサンプルを導入した。室温に移してから 17 分後に GloMax®-96 Microplate Luminometer (Promega 社) を利用して、Integration time を 1 秒に設定して測定した。

### 2.2.6 ショ糖密度勾配遠心法を用いたペプチド解離解析

酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系において終結過程に伴うペプチド解離反応が起こるかを確認するために、10-30%ショ糖密度勾配遠心を用いて翻訳反応液のタンパク質を分画した。

SW41 Ti Swinging-Bucket Rotor (Beckman Coulter 社) 用チューブに、下層に 5.7 mL の 30% SDG solution (50 mM HEPES-KOH pH7.5, 100 mM potassium glutamate, 11 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 2 mM spermidine, 1 mM DTT, 30% sucrose)、上層に 5.7 mL の 10% SDG solution (50 mM HEPES-KOH pH7.5, 100 mM potassium glutamate, 11 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 2 mM spermidine, 1 mM DTT, 10% sucrose) を重層した後、GRADIENT MASTER IP Model 107 (BIOCOMP 社) を用いて、プログラム Long Sucr 10-30% w/w (step1: 60° 5 sec 25 rpm, step2: 82° 39 sec 25 rpm) を実行して 10-30%ショ糖密度勾配を作成した。

作成した 10-30%ショ糖密度勾配液に、2 時間反応させた転写翻訳共役型酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系を 100  $\mu$ L 重層した後、超遠心 (39,000 rpm  $\approx$  187,000 xg, 135 min, 4 °C) を行った。超遠心したサンプルは Piston Gradient Fractionator Model 152 (BIOCOMP 社) を用いて speed 0.24 で回収し、BIO-MINI UV MONITOR (AC-5200S, ATTO 社) で 260 nm の吸光を測定しながら FC 203B Fraction Collector (GILSON 社) を用いて 20 分画 (0.24 min/tube) に分けた。分画したサンプル 40  $\mu$ L について、0.1 mg/mL の RNase A を添加して 30 度 10 分の反応を行った後、15% SDS-PAGE を用いて翻訳産物の有無を解析した。

### 2.2.7 ウェスタンブロッティング

セミドライトランスファー装置 (BE-300、バイオクラフト社) を用いて、Transfer buffer (1x PBS, 10% methanol, 0.01 % SDS) 中で、SDS-PAGE ゲルから Hybond ECL nitrocellulose membranes にタンパク質を転写した。定電圧 10 V、メンブレン面積 (cm<sup>2</sup>) x1.5 mA で 50 分のメンブレン転写を行ったのち、blocking buffer (1x PBS, 0.1% Tween 20, 5% skim milk) と一晩 4 度で反応させた。blocking buffer に 1/1000 量の 1 次抗体を添加し 1 時間室温で反応させた。Wash buffer (1x PBS, 0.2% Tween 20) でメンブレンを 5 分間 x3 回洗浄したのち、blocking buffer に 1/5000 量の 2 次抗体を添加し 1 時間室温で反応させた。Wash buffer でメンブレンを 5 分間洗浄を 3 回繰り返したのち、ECL detection reagents をメンブレンに滴下し、ImageQuant LAS 4000 を用いて Chemiluminescence を検出した。

### 2.2.8 翻訳反応後のペプチジル tRNA の解析<sup>(78)</sup>

Pth と RNase A を利用して、酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系反応後のペプチジル tRNA の状態を解析した。tRNA のアミノアシル化と転写反応を共役させない最小限の酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系による翻訳反応を 4 時間行った後、10  $\mu$ L ずつ分注し、30  $\mu$ M Pth を添加し 30 度 10 分反応したサンプル、0.1 mg/mL RNase A を添加し 30 度 10 分反応したサンプル、何も処理をしなかったサンプルを用意した。サンプルは Tricine SDS-PAGE によって分画し、<sup>35</sup>S メチオニンラベルされた産物の検出によって解析した。

## 3 結果

### 3.1 CrPV IRES を利用した *In vitro* 翻訳系の構築

本研究で構築を目指した酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系は、翻訳因子 eIF5A の機能解析に用いることを目的とした。因子の機能解析を行う場合、系に含まれる因子は最小限である方が、解析したい因子の効果は観察しやすい。そのため、反応系が煩雑になることを避けるために、開始因子非依存の翻訳開始が起こることが知られている CrPV IRES<sup>(61,62,63)</sup> を利用した翻訳系構築を目指した。

Cricket Paralysis Virus (CrPV) mRNA の Intergenic region に存在する Internal Ribosome Entry Site (IRES) は開始因子非依存の翻訳開始が起こることが知られている<sup>(61,62,63)</sup> (図 17)。CrPV IRES の開始では、IRES と 40S サブユニットの結合が起こり、これを 60S サブユニットが認識して IRES 上でリボソームサブユニットの会合が起こる。この時、IRES の構造は P-site tRNA と A-site tRNA を模倣しており、eEF2 の作用によりトランスロケーションが起こる。その後、空になった A-site には CrPV IRES の翻訳開始点である GCT コドンが位置し、アラニル tRNA が A-site にアコモデーションされる。このようにして開始因子非依存でリボソームは mRNA を認識し、伸長過程へと進行する。本研究では CrPV IRES の翻訳開始点はネイティブの配列を利用したため GCT コドンが位置しているが、全てのコドンで翻訳開始が起こると予想される<sup>(63)</sup>。

精製した酵母の翻訳因子は、翻訳伸長因子 eEF1A, eEF2, eEF3、翻訳終結・再生因子 eRF1, eRF3, Dom34, Hbs1, Rli1、80S リボソームと tRNA mix である。精製した翻訳因子のゲル写真を図 18 に示した。

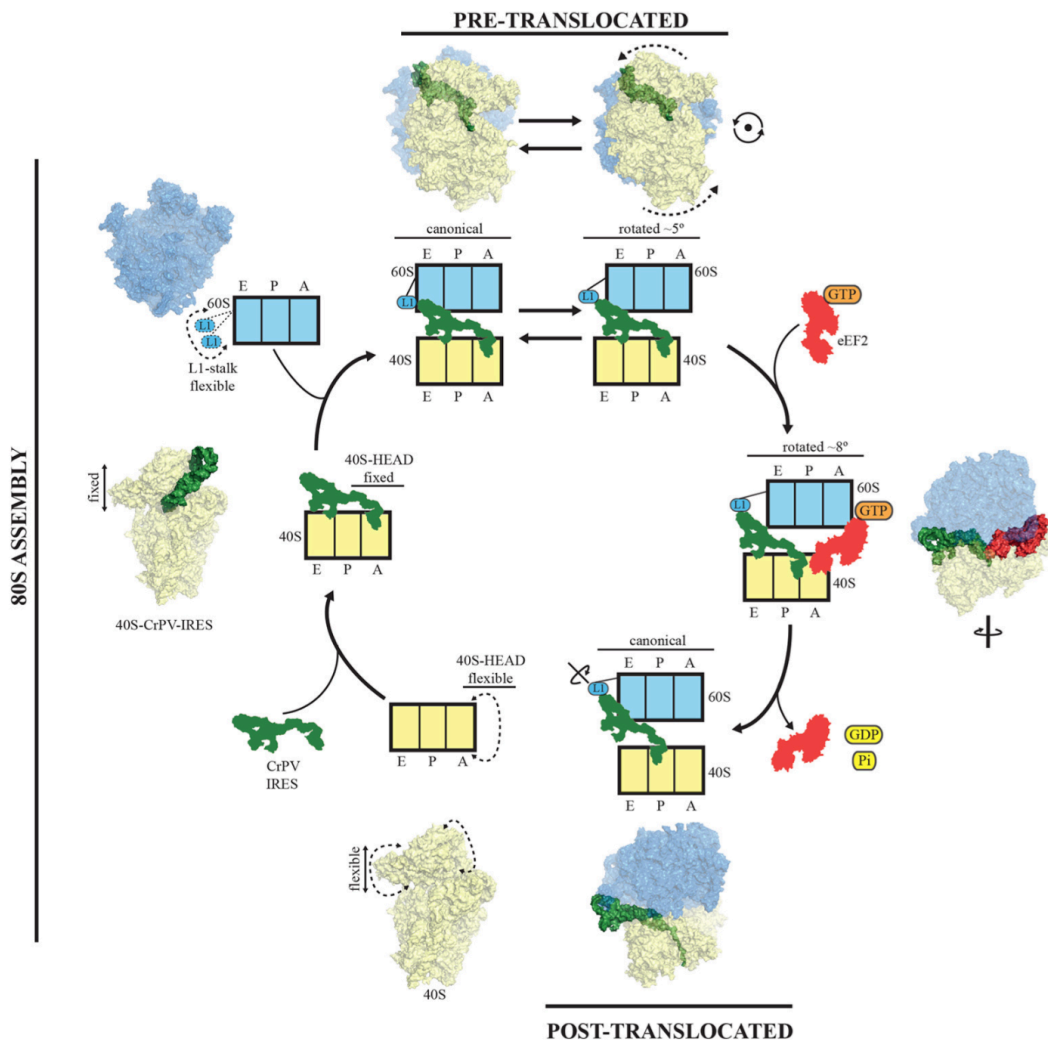


図 17. CrPV IRES の翻訳開始機構のモデル

Murray J. *et al.* (2016) *eLife* より引用

左下の図から右下の図に向かって反応が進行している。右下の図では A-site が空になっていることがわかり、ここにアミノアシル tRNA がアコモデーションされると翻訳伸長が開始される。

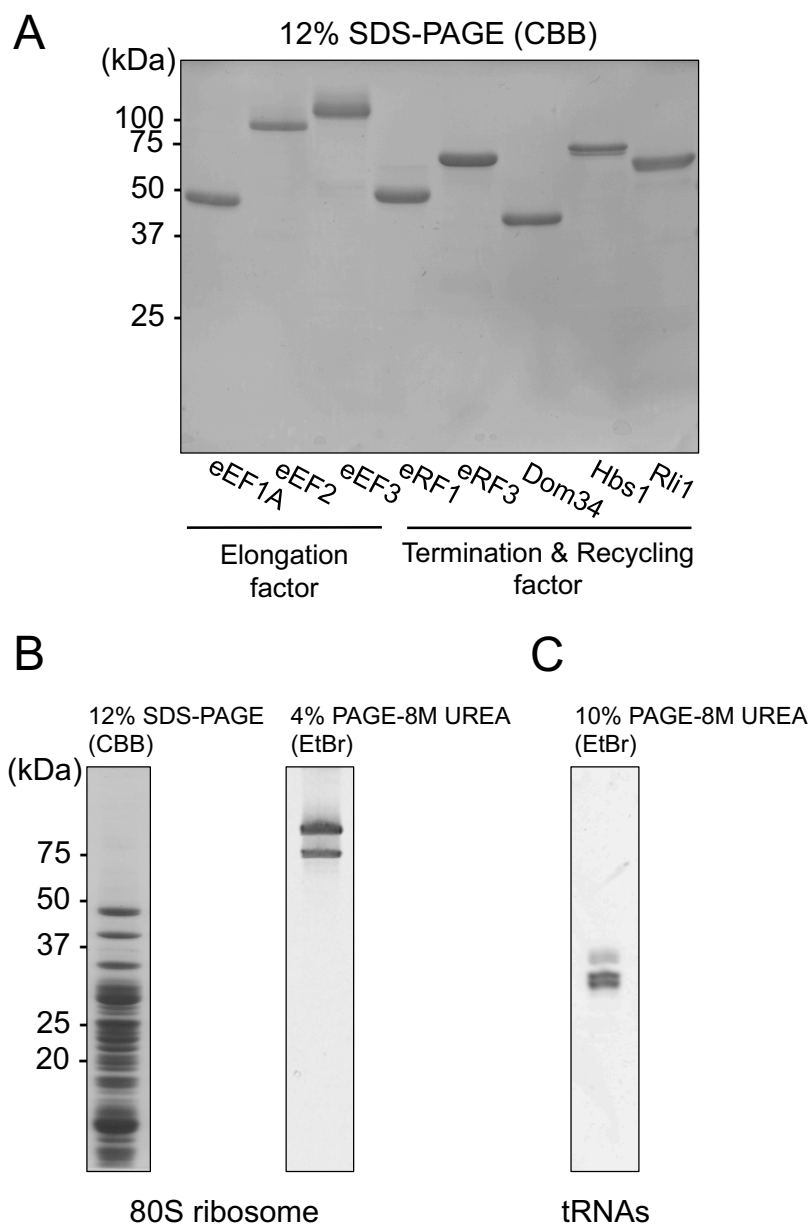


図 18. 酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系に用いた翻訳因子のゲル写真  
 A: 各因子 2  $\mu\text{g}$  を 12% SDS-PAGE で分画し、CBB 染色して確認した。B 左: 80S リボソーム 10 pmol を 12% SDS-PAGE で分画し、CBB 染色で確認した。B 右: 80S リボソーム 10 pmol から rRNA を抽出し、4% PAGE-8M UREA で分画し、EtBr 染色して確認した。C: tRNA mix 16 pmol を 10% PAGE-8M UREA で分画し、EtBr 染色で確認した。



### 3.2 酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系による nLuc の合成

図 18 で示した翻訳因子に加え、ヒト ARS mix<sup>(59)</sup>、T7 RNA polymerase<sup>(57,58)</sup>、エネルギー再生系の因子<sup>(57,58)</sup>を用いて、CrPV IRES の下流に FLAG-nLuc をコードする DNA (図 19A) からの翻訳反応を試みた。15% SDS-PAGE による解析の結果、IRES 依存的な翻訳産物が検出された(図 19B)。翻訳産物である nLuc の酵素活性を Luciferase Assay によって調べた結果、発光が確認された(図 19B)。以上の結果から、酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系を用いて酵素活性を有する nLuc の合成に成功したと結論づけた。

T7 RNA polymerase を除いた酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系に、あらかじめ *In vitro* 転写した mRNA (図 19A) を用いて翻訳反応を行ったところ、DNA を用いた時と同様に酵素活性を有する nLuc の合成が確認された(図 19C)。これ以降、DNA を用いた転写翻訳共役型酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系は”DNA start“と表記し、mRNA を用いた転写翻訳非共役型酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系は”mRNA start”と表記する。

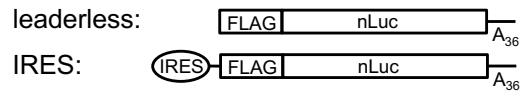
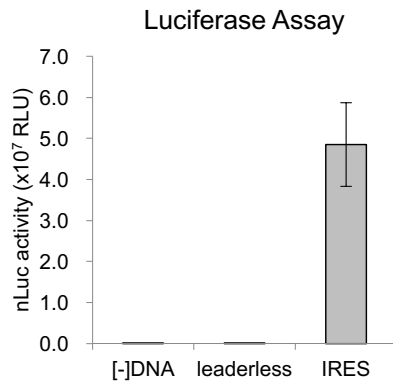
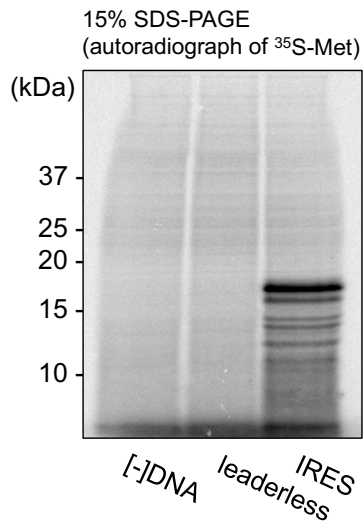
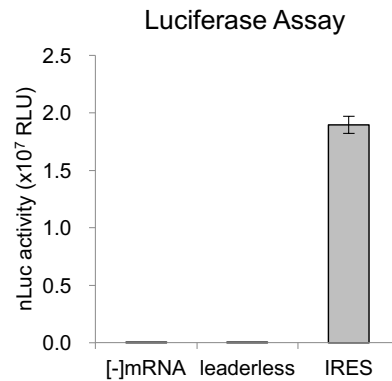
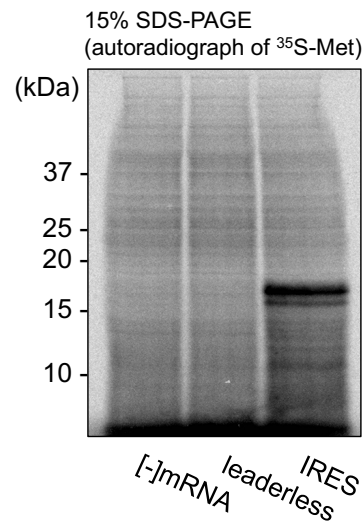
**A****B****C**

図 19. 酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系の構築

A: 翻訳に用いたコンストラクトの模式図を示した。B 上: DNA start での翻訳を 15% SDS-PAGE にて確認した。B 下: DNA start での翻訳を Luciferase Assay にて確認した。C: mRNA start での翻訳を 15% SDS-PAGE にて確認した。C 下: mRNA start での翻訳を Luciferase Assay にて確認した。エラーバーは独立した 3 回の実験結果の標準誤差を示した。

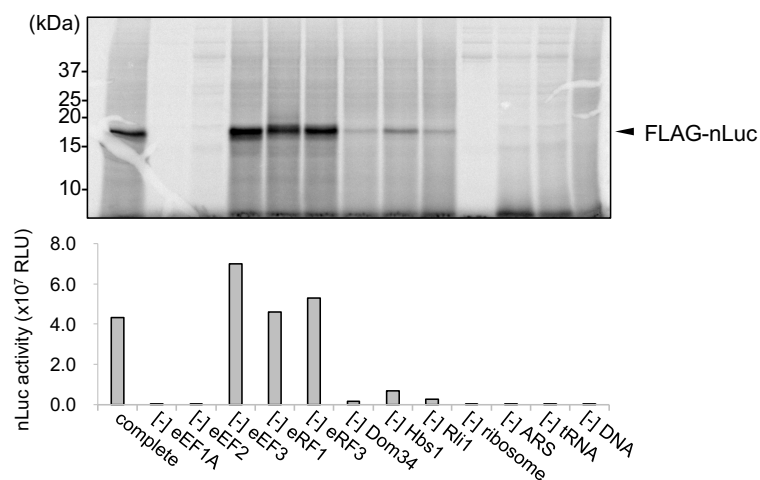
### 3.3 酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系の因子依存性の確認

酵素活性を有する nLuc の合成が確認された酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系の因子依存性を確認した。DNA start での因子依存性は図 21A に示し、mRNA start での因子依存性は図 20B に示した。その結果、伸長因子 eEF1A と eEF2、80S リボソーム、tRNA mix、ヒト ARS mix を除くと翻訳産物は検出されなかった。終結・再生因子 Dom34, Hbs1, Rli1 を除くと、complete と比べて検出される翻訳産物が減った。伸長因子 eEF3、終結因子 eRF1, eRF3 を除くと、complete と同レベルの翻訳産物が検出された。また上記の結果は、DNA start と mRNA start の両方で同様に見られた。

終結因子 eRF1 と eRF3 の依存性が確認されなかった点は、予想と一致していた。なぜなら、終結因子非存在下でも 1 ラウンドの翻訳は可能だからである。そして、complete と [-]eRF1 または [-]eRF3 の翻訳量がほぼ同レベルであることから、現在の酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系は 1 ラウンドだけ翻訳反応が起こっていると示唆された。

しかしながら、終結・再生因子 Rli1 については依存性が確認され、予想外であった。なぜなら Dom34, Hbs1, Rli1 を除いても 1 ラウンドの翻訳は可能であり、[-]eRF1 や [-]eRF3 と同レベルに翻訳が起こると考えられたからである。従って、Dom34, Hbs1, Rli1 が除かれると翻訳量が減少するのは、CrPV IRES による翻訳開始が抑制されたからだと考えた。DNA start と mRNA start で  $Mg^{2+}$  濃度は、それぞれ 11 mM と 9 mM であり、リボソームサブユニットの解離と会合の平衡は会合に偏っていると考えられた。リボソームはサブユニットごとに CrPV IRES を認識するため<sup>(61)</sup>、CrPV IRES の翻訳開始ではリボソームがサブユニットに解離する必要がある。Dom34, Hbs1, Rli1 はリボソームのサブユニット化を促進することで翻訳開始を促進し<sup>(29)</sup>、翻訳量の増加に関わったことが示唆された。本論文の後半で述べられている  $Mg^{2+}$  が 5 mM の条件では、Dom34, Hbs1, Rli1 の依存性は見られない (図 30) ことから、上記のモデルが支持された。

### A. DNA start



### B. mRNA start

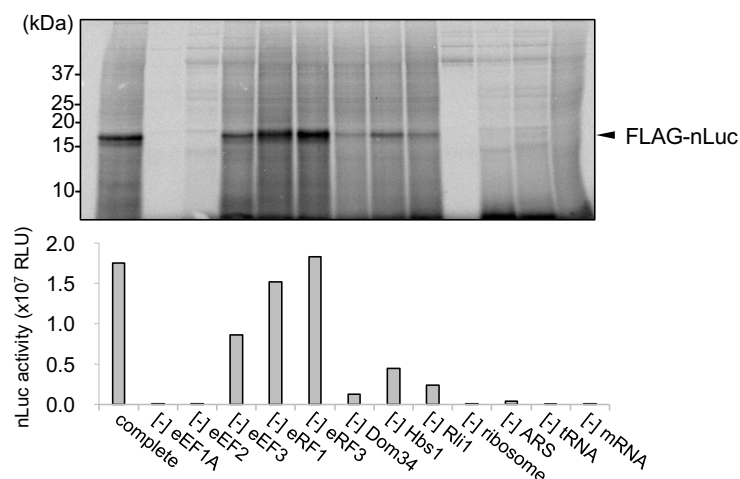


図 20. 酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系の因子依存性の確認

A: DNA start による酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系(complete)から表示された因子を除いて 30 度 4 時間の翻訳反応を行った。反応に用いた鋳型 DNA は図 19A に示されている。0.1 mg/mL の RNaseA を添加して翻訳停止処理をした後、翻訳反応液 20  $\mu$ L は 15% SDS-PAGE にて解析し、翻訳反応液 2  $\mu$ L は Luciferase Assay にて解析した。B: mRNA start による酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系(complete)から表示された因子を除いて 30 度 4 時間の翻訳反応を行った。反応に用いた mRNA は図 19A に示されている。解析は図 20A と同様に行った。

eRF1 によるペプチド解離反応がされているかを確認するために、DNA start による翻訳反応後に、ショ糖密度勾配遠心法を用いて翻訳産物を分画し、解離した翻訳産物の解析を行った (図 21)。ショ糖密度勾配遠心法で翻訳産物を分画すると、ペプチド解離された翻訳産物は密度の小さいフラクションから検出され、ペプチド解離のされていない翻訳産物はリボソームフラクションから検出される。その結果、eRF1 存在下では翻訳産物が密度の小さいフラクションから検出され (図 21A)、eRF1 非存在下では翻訳産物がリボソームフラクションから検出された (図 21B)。従って、eRF1 によるペプチド解離反応は起きていることが示された。

eEF3 は真菌特異的に存在する翻訳伸長因子であり、翻訳伸長に必須だと報告されている<sup>(4,5)</sup>。しかしながら、構築された酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系では eEF3 の依存性が確認されず、精製した翻訳産物のどれかに eEF3 が混入していることが予想された。従って、酵母発現系を用いて精製した翻訳因子の eEF3 の混入について、anti-eEF3 抗体を用いたウェスタンブロッティングにて解析した。その結果、eEF1A に 1/100 量の eEF3 が混入していることが示された (図 22)。この結果は、5  $\mu$ M の eEF1A から 0.05  $\mu$ M の eEF3 が系に混入したことを示している。恐らく混入した eEF3 だけで十分に翻訳反応が起こるため、eEF3 依存性が見られなかったと考えられた。eEF1A に混入する eEF3 を減らすために eEF1A の精製方法を検討したが、現在のところ eEF3 の依存性が見られるほど混入量を減らすことに成功していない。eEF3 の C 末端 (775-1044 残基) は eEF1A と相互作用することが知られているため、eEF1A に混入する eEF3 を無くすことは難しいと考えられた<sup>(79)</sup>。しかしながら、本研究の目的は eIF5A の機能解析であるため、eEF3 の依存性が確認されないことは問題にならないと結論づけた。

最後に、酵母発現系を用いて精製した翻訳因子の eIF5A の混入について、anti-eIF5A 抗体を用いたウェスタンブロッティングにて解析した。その結果、eIF5A の混入量はウェスタンブロッティングの検出限界以下であることが示された (図 23)。従って、本研究で構築された酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系で eIF5A の機能解析が可能であることが示唆された。まとめると、本研究で構築された酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系では、eEF1A, eEF2 による翻訳伸長反応と eRF1 によるペプチド解離反応が行われていた。また CrPV IRES の翻訳開始のために、Dom34, Hbs1, Rli1 が翻訳促進的に働いていることも示された。

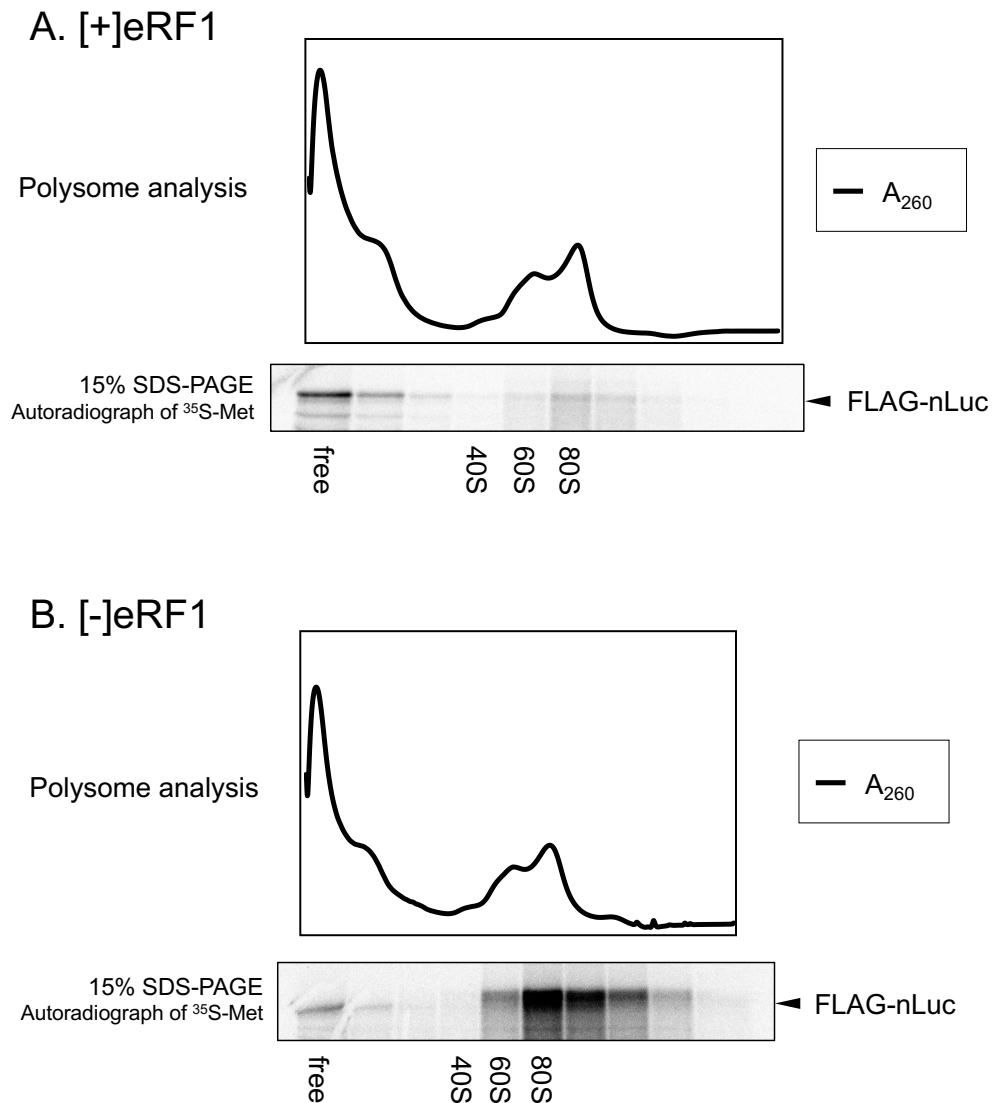


図 21. *eRF1* によるペプチド解離反応の確認

A: *eRF1* 存在下の DNA start 翻訳産物を 10-30% ショ糖密度勾配遠心法で分画し、各分画に含まれる翻訳産物は RNaseA 処理した後 15% SDS-PAGE を用いて解析した。反応に用いた鋳型 DNA は図 19A に示されている。リボソーム分画は 260 nm の吸光度を測定することで確認した。B: *eRF1* 非存在下の DNA start 翻訳産物を図 21A と同様に解析した。

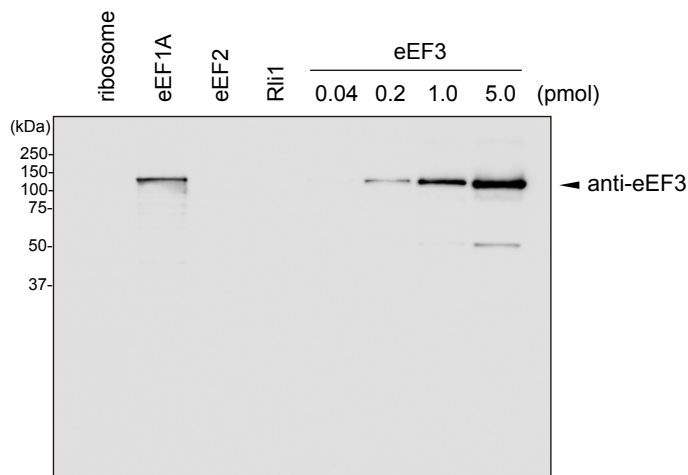


図 22. ウェスタンブロッティングによる eEF3 混入の確認

酵母から精製した因子であるリボソーム(10 pmol)、eEF1A(100 pmol)、eEF2(10 pmol)、Rli1(10 pmol)について 12% SDS-PAGE で分画した後、anti-eEF3 抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。0.04, 0.2, 1.0, 5.0 pmol の eEF3 は検量線作成のためのサンプルである。

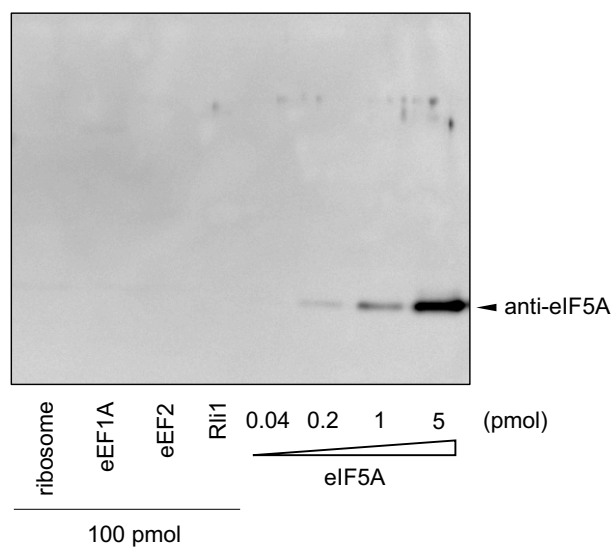


図 23. ウェスタンブロッティングによる eIF5A 混入の確認

酵母から精製した因子であるリボソーム、eEF1A、eEF2、Rli1 を 100 pmol ずつ 15% SDS-PAGE で分画した後、anti-eIF5A 抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。0.04, 0.2, 1.0, 5.0 pmol の eIF5A は検量線作成のためのサンプルである。

### 3.4 DNA start 翻訳系では翻訳停止が観察されない

酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系を用いて酵素活性を有する nLuc の合成に成功したので、次に翻訳停止配列を有するコンストラクトの翻訳反応を試みた。本研究で構築された酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系と、これまでに報告されている *In vitro* ペンタペプチド合成系<sup>(14,15,16)</sup>の違いは、タンパク質内部での翻訳停止配列の影響を観察できる点である。従って、本研究ではペプチドトンネルから新生ポリペプチド鎖が露出する位置に翻訳停止配列を挿入した翻訳停止配列解析用コンストラクト (図 24A) を用いることにした。

翻訳停止配列解析用コンストラクトは、FLAG タグと Pgc1-36 から成る 45 アミノ酸のリーダー配列と nLuc の間に、6 連続の CGA を挿入したコンストラクト (CGA x6)、または CCTCCCCACCG を挿入したコンストラクト (Pro x4) である。Pgc1-36 は N 末端に Glu を付加した 3-phosphoglycerate kinase の 3rd から 36th アミノ酸配列であり、二次構造を取らないと報告されている<sup>(22)</sup>。また 45 アミノ酸が翻訳されると、新生ポリペプチド鎖はペプチドトンネルから露出すると報告されている<sup>(22)</sup>。このようなコンストラクトを用いて翻訳反応を行い、翻訳停止配列の下流にコードされた nLuc の合成量を Luciferase Assay にて検出することで翻訳停止を評価した。

まず翻訳停止配列解析用コンストラクトを DNA stat の酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系で翻訳させたところ、CGA x6 依存的な翻訳抑制は確認されたが、Pro x4 依存的な翻訳抑制は確認されなかった (図 24B)。これは転写される mRNA 量の違いが原因であると考えられた。実際に当研究室の卒業生である近友文が mRNA start の翻訳系を用いて mRNA の添加量を検討したところ、コンストラクトの種類によって mRNA 添加量と翻訳量の関係が異なることを示した (図 25)。翻訳停止配列を含まない mRNA は 0.5 µg の添加で最大の翻訳量を示し、2.5 µg 以上では翻訳が確認されなかった。しかし AAA x12 が挿入された mRNA は、添加量 10 µg まで mRNA の添加量に比例して翻訳量も増加することが確認された。これらの結果から、翻訳停止を観察するためには、mRNA の添加量を揃えて解析する必要があると考えられた。



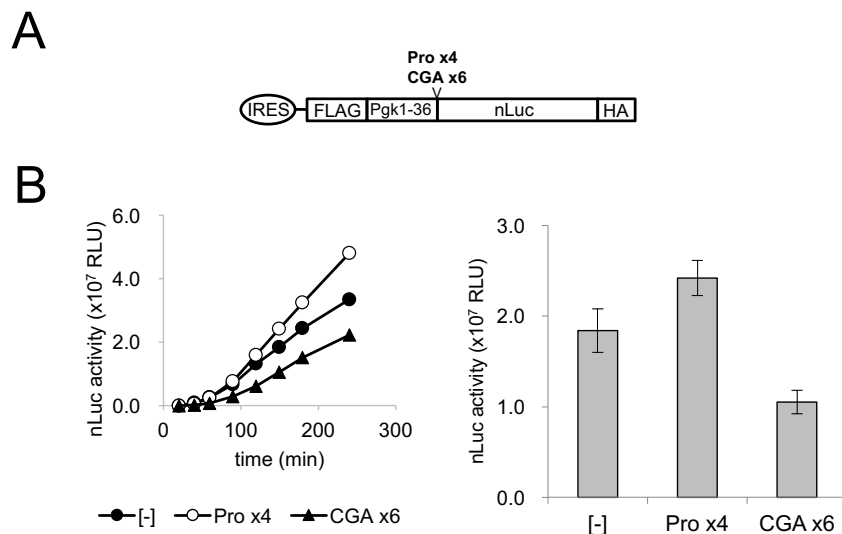


図 24. DNA start 翻訳系を用いた翻訳停止の観察

A: 翻訳停止解析用コンストラクトの模式図。[-]は挿入なしを示している。B 左: DNA start 翻訳系で図 24A に示したコンストラクトを翻訳させ、翻訳量のタイムコース解析をした結果を示した。B 右: 反応 150 分での翻訳量の比較を示した。エラーバーは 3 回の独立した実験結果の標準誤差を示した。

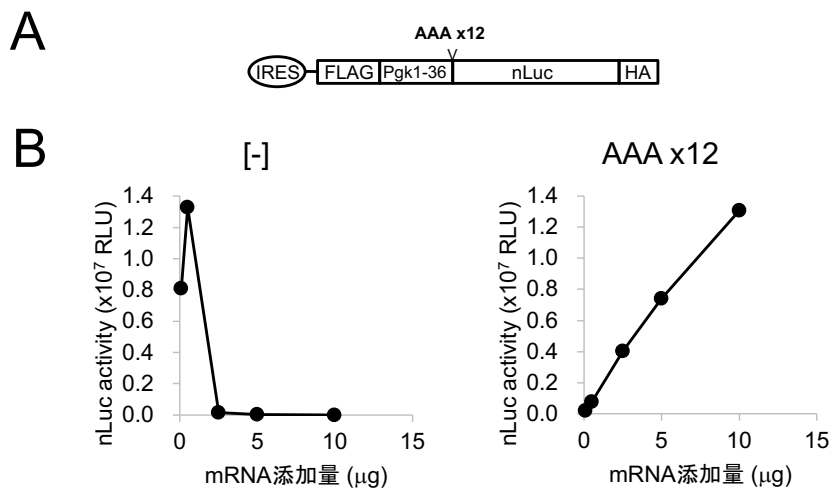


図 25. mRNA 量と翻訳量の関係 (2015 年卒 近友文 修士論文より改変引用)

A: mRNA の模式図。B 左: 20  $\mu$ L の mRNA start 翻訳系に翻訳停止配列を含まない mRNA を 0.1, 0.5, 2.5, 5.0, 10  $\mu$ g で添加して 120 分の翻訳反応を行った。翻訳反応液 2  $\mu$ L について Luciferase Assay を行った結果を示した。B 右: 図 25A で示したコンストラクトについて図 25B 左と同様の実験を行った結果を示した。

### 3.5 mRNA start 翻訳系では連続プロリン配列依存の翻訳抑制が観察されない

DNA start 翻訳系では、転写される mRNA 量の違いが原因で Pro x4 配列依存の翻訳抑制が確認されなかったと考えられたため、mRNA start 翻訳系で翻訳停止配列を有する mRNA の添加量を揃えて翻訳反応を解析した。その結果、CGA x6 依存的な翻訳抑制は確認されたが、Pro x4 依存的な翻訳抑制は確認されなかった (図 26)。従って、転写される mRNA 量の違い以外に Pro x4 依存の翻訳抑制を観察できない原因があることが示唆された。そこで、Pro x4 依存の翻訳抑制を観察できるように、酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系の反応条件の検討を行うことにした。

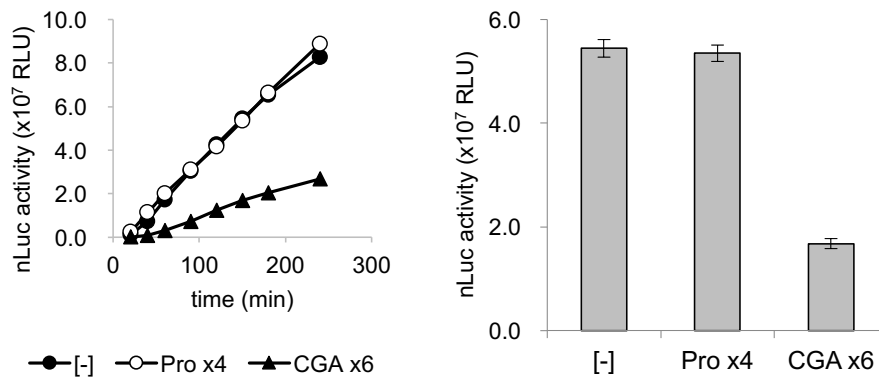


図 26. mRNA start 翻訳系を用いた翻訳停止の観察

左: mRNA start 翻訳系で図 24A に示したコンストラクトを翻訳させ、翻訳量のタイムコース解析をした結果を示した。右: 反応 150 分での翻訳量の比較を示した。エラーバーは 3 回の独立した実験結果の標準誤差を示した。

### 3.6 低 $Mg^{2+}$ 低ポリアミン濃度において連続プロリン配列の翻訳が抑制される

Hetrick B.らの報告<sup>(64)</sup> (図 27) によって、翻訳の正確性や反応効率は、 $Mg^{2+}$ 濃度とポリアミン濃度によって変化することが示されている。

Hetrick らは、A site に UUU コドンが位置するように mRNA をプログラムされたリボソームに、UUU コドンに対応する  $tRNA^{Phe}$  がアコモデーションされる反応を測定した (図 27A-C 上パネル)。また、A-site に CUC コドンが位置するように mRNA をプログラムされたリボソームに、UUU コドンに対応する  $tRNA^{Phe}$  がアコモデーションされる反応も測定した (図 27A-C 下パネル)。前者は Cognate tRNA のアコモデーション効率を測定しており、後者は Near-cognate tRNA のアコモデーション効率を測定していた。Cognate tRNA と Near-cognate tRNA のアコモデーション効率を、ポリアミンであるスペルミン (図 27A) とスペルミジン (図 27B) 濃度、また  $Mg^{2+}$ 濃度 (図 27C) を変化させて解析を行った。その結果、 $Mg^{2+}$ 、スペルミジン、スペルミンの濃度は、高くなるにつれて Cognate tRNA のアコモデーション効率が高くなるが、同時に Near-cognate tRNA のアコモデーション効率も高くなることが示された。これは、 $Mg^{2+}$ 、スペルミジン、スペルミンの濃度を高くすると、翻訳効率は上がるが、同時に翻訳の正確性が低くなることを意味している。

次に、翻訳の正確性を維持しつつ翻訳効率を上げるためには、 $Mg^{2+}$ 、スペルミジン、スペルミンの濃度をどのように設定するとよいかの調査を行った (図 27D,E)。図 27D に示された反応条件で *In vitro* ジペプチド反応を行い、正確な翻訳が起こった場合は fMet-Phe が合成され、間違った翻訳が起こった場合は fMet-Leu が合成されるような解析系となっている (図 27E)。その結果、 $Mg^{2+}$ 濃度を高くすると fMet-Ler が合成されるが、ポリアミン濃度を高くしても fMet-Ler はあまり合成されない事が示された (図 27E)。これらの結果から、翻訳の正確性を保ちながら翻訳効率を上げるには、 $Mg^{2+}$ 濃度は低く設定し、ポリアミン濃度を上げていき最適化するのが良いと考えられた<sup>(64)</sup>。以上の報告を考慮し、酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系を用いてプロリン連続配列依存の翻訳抑制を観察するために、反応系の  $Mg^{2+}$ 濃度とポリアミン濃度を検討することにした。

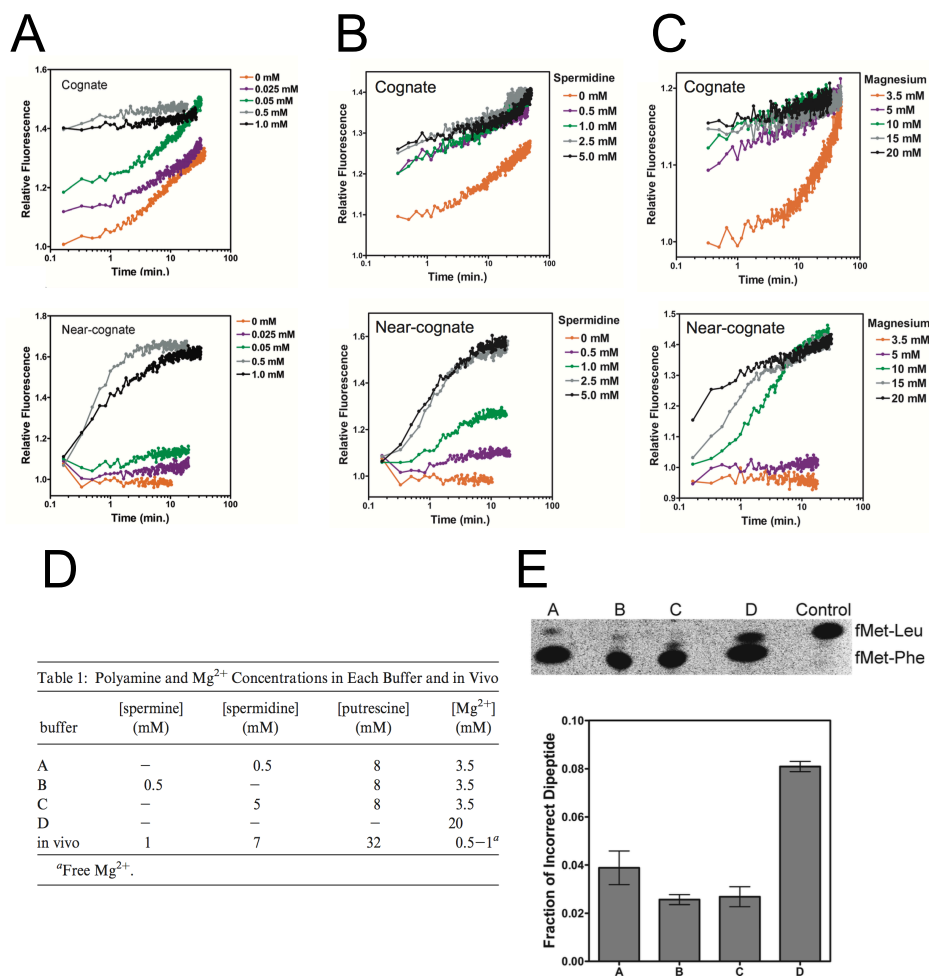


図 27. Mg<sup>2+</sup>, ポリアミン濃度の翻訳効率と正確性への影響

Hetrick B *et al.* (2010) *Biochemistry* より引用

A-C は、tRNA が A-site にアコモデーションすると縦軸の値が上昇する。横軸は時間経過を示している。A 上: スペルミン濃度と Cognate tRNA アコモデーション効率の関係。A 下: スペルミン濃度と Near-cognate tRNA アコモデーション効率の関係。B 上: スペルミジン濃度と Cognate tRNA アコモデーション効率の関係。B 下: スペルミジン濃度と Near-cognate tRNA アコモデーション効率の関係。C 上: Mg<sup>2+</sup>濃度と Cognate tRNA アコモデーション効率の関係。C 下: Mg<sup>2+</sup>濃度と Near-cognate tRNA アコモデーション効率の関係。D: 図 11E の実験条件と、報告されている *In vivo* の濃度。E 上: 図 11D で示された条件で *In vitro* ジペプチド合成を行い TLC で翻訳産物を解析、上のシグナルは Near-cognate tRNA の取り込まれた産物。E 下: Near-cognate tRNA による翻訳産物の合成された割合。

Mg<sup>2+</sup>濃度とスペルミジン、スペルミン濃度を検討するにあたり、酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系から転写反応だけでなく、tRNAのアミノアシル化反応も分離した最小限の翻訳系で実験を行うことにした。Mg<sup>2+</sup>の実効濃度はヌクレオチドの消費によって変化することが考えられるため、ヌクレオチド消費の原因となる転写反応とtRNAのアミノアシル化反応を分離させる必要があると考えたからである。以降、あらかじめアミノアシル化したtRNAとmRNAを添加する最小限の酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系を”mRNA, aa-tRNA start”と表記する。mRNA, aa-tRNA start 翻訳系は、T7 RNA polymerase やヒト ARS mix は含まれない。また、転写反応のために加えていたCTPやUTPも除き、ヌクレオチドは1 mM ATPと1 mM GTPが添加されている。

DNA start 翻訳系ではMg<sup>2+</sup>濃度、スペルミジン濃度、スペルミン濃度はそれぞれ11 mM, 2 mM, 0.1 mM（以下、[11/2/0.1]と表記）であり、mRNA start 翻訳系では[9/2/0.1]であった。そこで、mRNA, aa-tRNA start 翻訳系を用いてMg<sup>2+</sup>濃度は11, 9, 7, 5 mM、スペルミジン濃度は2, 0.25, 0 mM、スペルミン濃度は0.1, 0 mMの間で反応条件検討を行い、プロリン連続配列依存の翻訳抑制が観察される条件の探索を行った（図28）。その結果、Mg<sup>2+</sup>濃度が低くなるほど、ポリアミン濃度が低くなるほど、プロリン連続配列依存の翻訳抑制が観察されることが示された。DNA start 翻訳系やmRNA start 翻訳系はMg<sup>2+</sup>濃度もポリアミン濃度も高めで反応を行っており、それが原因でプロリン連続配列依存の翻訳抑制が観察されなかったことが示唆された。以降、プロリン連続配列依存の翻訳抑制を観察するために、翻訳の精度を保ちつつ翻訳速度を担保できる条件として、Mg<sup>2+</sup>濃度は下げポリアミンは添加する条件である[5/0.25/0]で解析を行うこととした。

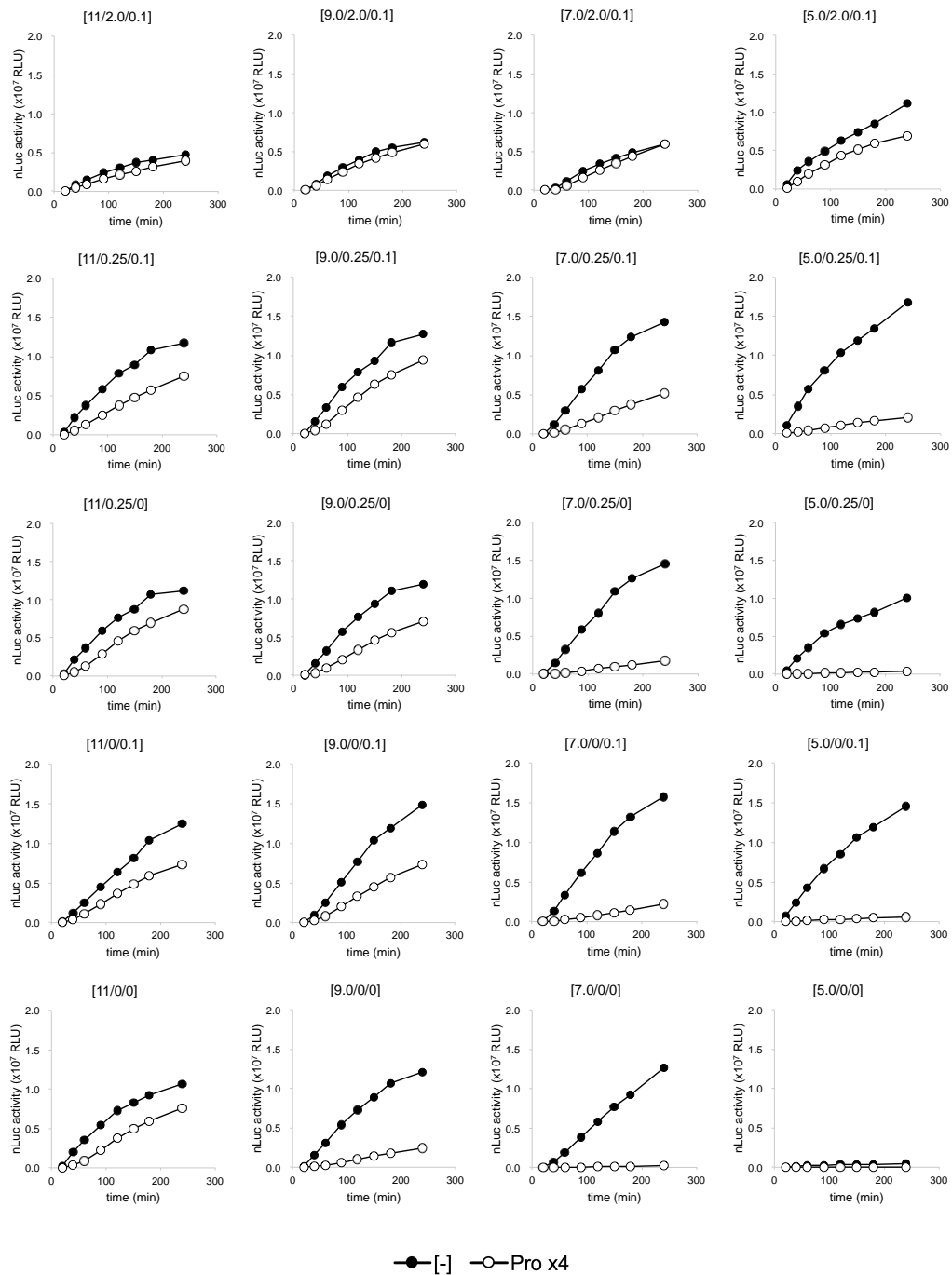


図 28.  $Mg^{2+}$  とポリアミン濃度の検討

表記された条件で mRNA, aa-tRNA start 翻訳系を用いて、図 24A に示した Pro x4 コンストラクトと挿入なし (-) コンストラクトの翻訳反応を行い、タイムコース解析の結果を示した。[ $Mg^{2+}$ /スペルミジン/スペルミン] mM で反応条件を示した。

### 3.7 mRNA, aa-tRNA start 翻訳系を用いた翻訳停止の観察

連続プロリン配列依存の翻訳停止を観察するために、mRNA, aa-tRNA start 翻訳系を用いて、 $[Mg^{2+}/スペルミジン/スペルミン] = [5/0.25/0]$  mM の反応条件で解析することに決定した。決定された最新の反応条件で翻訳停止配列を有するコンストラクトの翻訳反応を試みた。その結果、Pro x4 と CGA x6 の両方の配列において、依存的な翻訳抑制が確認された (図 29)。

### 3.8 mRNA, aa-tRNA start 翻訳系で因子依存性の確認

決定された最新の条件における酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系の因子依存性を確認した (図 30)。その結果、伸長因子 eEF1A と eEF2、80S リボソーム、aa-tRNA mix を除くと翻訳産物は検出されなかった。伸長因子 eEF3、終結・再生因子 eRF1, eRF3, Dom34, Hbs1, Rli1 を除くと、complete と同レベルの翻訳産物が検出された。DNA start 翻訳系や mRNA start 翻訳系の因子依存性の結果と比べると、Dom34, Hbs1, Rli1 を除いて、同様の傾向が見られた。DNA start 翻訳系や mRNA start 翻訳系では Dom34, Hbs1, Rli1 を除くと翻訳量の低下が観察されたが (図 20)、mRNA, aa-tRNA start 翻訳系では Dom34, Hbs1, Rli1 を除いても翻訳量に変化は見られなかった (図 30)。これは  $Mg^{2+}$  濃度が 9-11 mM から 5 mM に下がったことで、リボソームサブユニットの会合と解離の平衡が解離に偏り、リボソーム解離因子非存在下でも CrPV IRES の開始が効率良く起こったからだと示唆された。結果をまとめると、mRNA, aa-tRNA start 翻訳系を用いて連続プロリン配列依存の翻訳抑制の観察に成功し、eIF5A の機能解析を行う実験材料が整った。



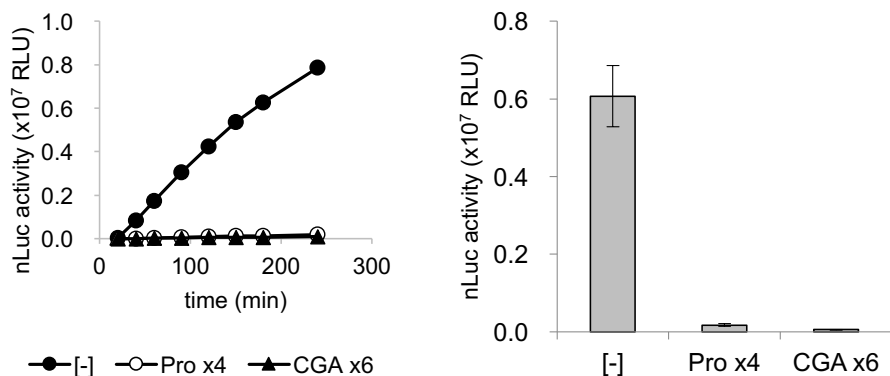


図 29. 最新の反応条件で翻訳停止配列解析用コンストラクトを翻訳  
 左: [5/0.25/0]の条件で mRNA, aa-tRNA start 翻訳系を用いて図 24A に示したコンストラクトを翻訳させ、翻訳量のタイムコース解析の結果を示した。右: 反応 150 分での翻訳量の比較を示した。エラーバーは 3 回の独立した実験結果の標準誤差を示した。

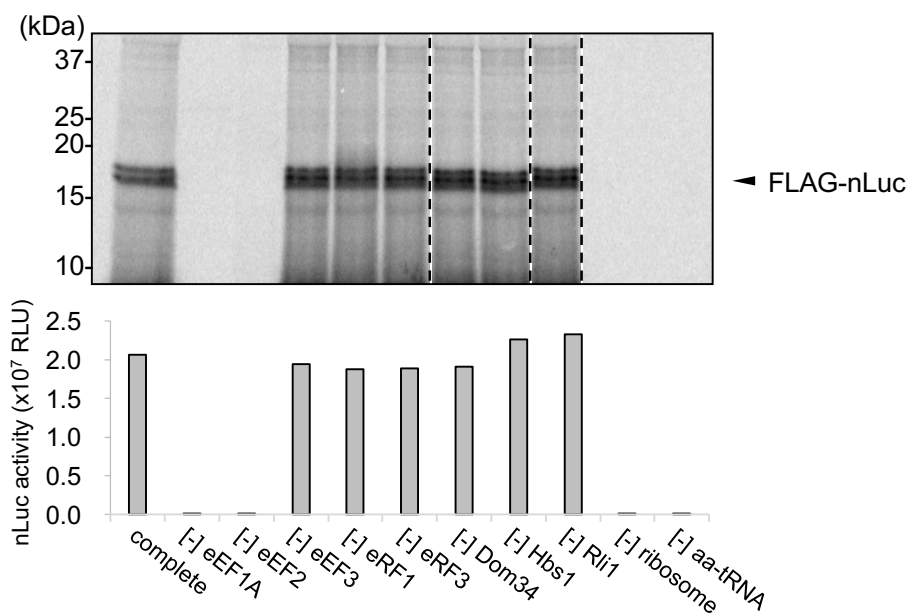


図 30. mRNA, aa-tRNA start 翻訳系の因子依存性の確認  
 [5/0.25/0]の条件で mRNA, aa-tRNA start による酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系 (complete) から表示された因子を除いて 30 度 4 時間の翻訳反応を行った。反応に用いた鋳型 DNA は図 19A に示されている。0.1 mg/mL の RNaseA を添加して翻訳停止処理をした後、翻訳反応液 20  $\mu$ L は 15% SDS-PAGE にて解析し、翻訳反応液 2  $\mu$ L は Luciferase Assay にて解析した。

### 3.9 解析に用いた eIF5A

本研究では、以下の 5 種類の eIF5A を解析に使用した。DHS や DOHH との大腸菌共発現系を用いて調製された hypusine 修飾 eIF5A (hyp)、deoxyhypusine 修飾 eIF5A (deoxy)、未修飾 eIF5A (lys)、さらに酵母から精製した野生型 eIF5A (WT) と hypusine 修飾がされる 51 番目のリジンをアルギニンに置換した eIF5A (K51R) である。これら 5 種類の eIF5A は当研究室の卒業生である西村聡が精製したものを使用した (図 31)。大腸菌から精製された eIF5A はタグが付加されていないが、酵母から精製された eIF5A には C 末端に His タグが付加されている。

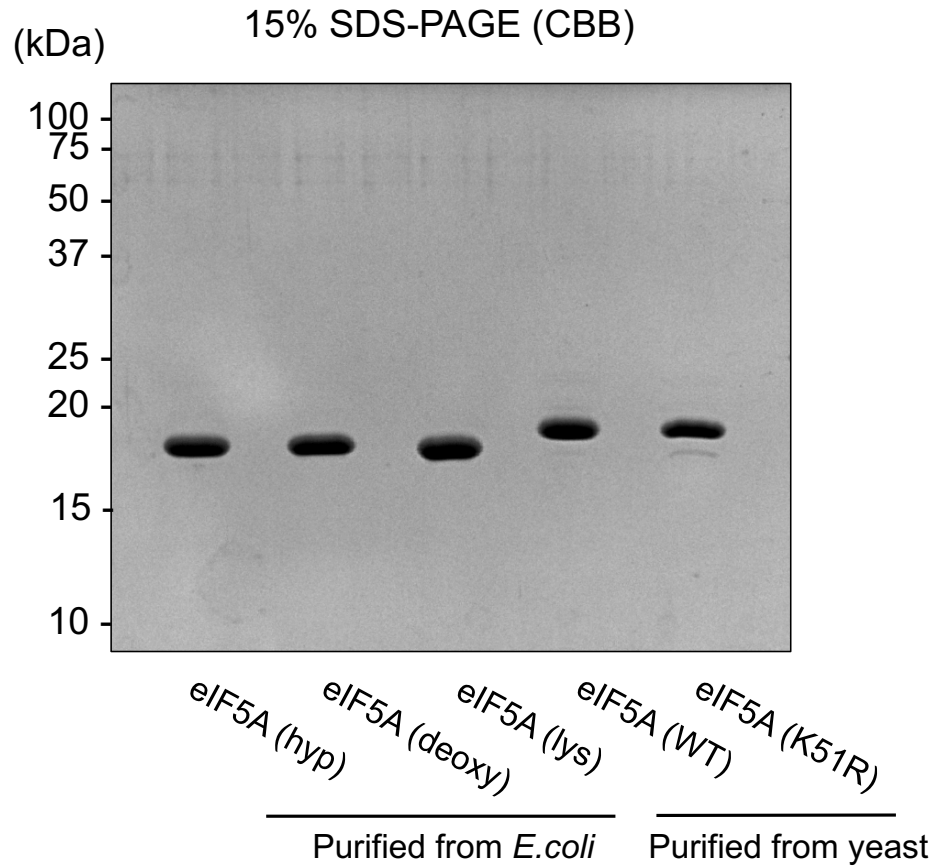


図 31. 本研究で使用した eIF5A のゲル写真

大腸菌から精製された hypusine 修飾 eIF5A (hyp)、deoxyhypusine 修飾 eIF5A (deoxy)、未修飾 eIF5A (lys) を 3  $\mu$ g について 15% SDS-PAGE で分画した。酵母から精製された野生型 eIF5A (WT)、hypusine 修飾のされる Lys を Arg に置換した eIF5A (K51R) を 3  $\mu$ g について 15% SDS-PAGE で分画した。CBB 染色でバンドを検出した。

### 3.10 低濃度の eIF5A は hypusine 修飾依存的に連続プロリン配列の翻訳を促進

まずリボソームに対して 1/50 量 (0.01  $\mu\text{M}$ ) の eIF5A について、連続プロリン配列の翻訳に対する効果を検証した (図 32)。0.01  $\mu\text{M}$  という濃度は、hypusine 修飾 eIF5A が連続プロリン配列の翻訳抑制を解除するのに十分な最小の濃度である。その結果、連続プロリン配列依存の翻訳抑制は、0.01  $\mu\text{M}$  の eIF5A (hyp) と eIF5A (deoxy) の添加によって解消され、0.01  $\mu\text{M}$  eIF5A (lys) によっては解消されないことが示された (図 32A,B)。1 段階目の修飾である deoxyhypusine 修飾された eIF5A と 2 段階目の修飾である hypusine 修飾された eIF5A で同様の効果を示したことは、出芽酵母において 1 段階目の修飾酵素 DHS の遺伝子を欠損できないが、2 段階目の修飾酵素 DOHH の遺伝子は欠損できることと一致する結果だと考えられる。対照的に、未修飾 eIF5A は連続プロリン配列の翻訳促進を行えないことも、これまでの報告と一致する結果となった。加えて、連続プロリン配列の翻訳抑制は、0.01  $\mu\text{M}$  の eIF5A (WT) の添加によって解消され、0.01  $\mu\text{M}$  の eIF5A (K51R) では解消されない結果を得て、酵母から精製した eIF5A においても同様の結果となった (図 32C,D)。一方、連続 CGA 配列依存の翻訳抑制は、どの eIF5A によっても解消されることはなかった。以上の結果は、リボソームに対して eIF5A 濃度が低い条件下では、hypusine 修飾依存的に連続プロリン配列の翻訳促進が行われることを示唆した。そして、eIF5A は連続 CGA 配列の翻訳抑制には効果を示さないことから、翻訳抑制には eIF5A によって解消される種類と解消されない種類が存在することが示された。

細胞内では、eIF5A は比較的豊富に存在するタンパク質と知られており、少なくともリボソームの 2 倍量の eIF5A が存在すると報告されている<sup>(54)</sup>。従って、次はリボソームと等量か、それ以上の濃度の eIF5A について、連続プロリン配列の翻訳に対する効果を検証することにした。

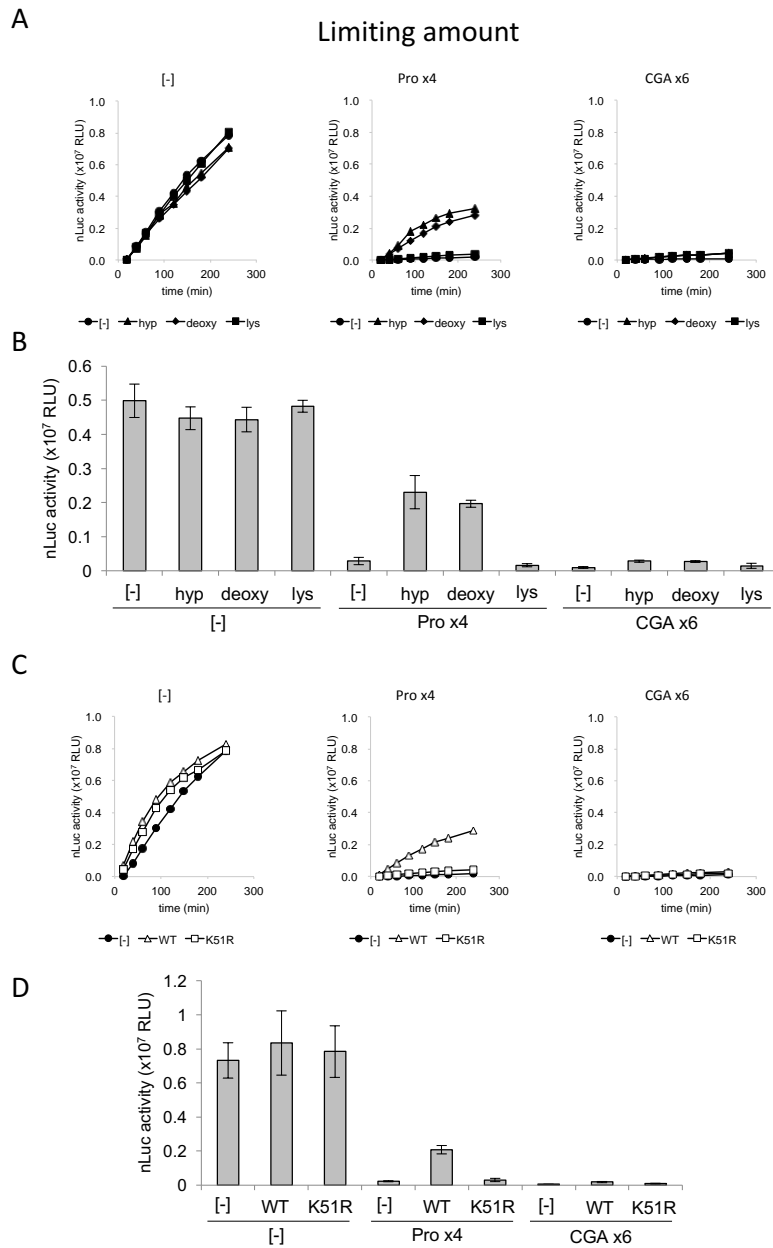


図 32. 連続プロリン配列の翻訳に対する eIF5A の効果（濃度制限条件）

A: タイムコース解析の結果。[5/0.25/0] mRNA, aa-tRNA start 翻訳系に大腸菌から精製された各 eIF5A 0.01  $\mu$ M を添加して、図 24A に示した mRNA を翻訳させた。B: 反応 150 分での翻訳量で比較。C: タイムコース解析の結果。[5/0.25/0] mRNA, aa-tRNA start 翻訳系に酵母から精製された各 eIF5A 0.01  $\mu$ M を添加して、図 24A に示した mRNA を翻訳させた。D: 反応 150 分での翻訳量で比較。示されたエラーバーは独立した 3 回の実験結果の標準誤差を示した。

### 3.11 リボソームと等量の未修飾 eIF5A は連続プロリン配列の翻訳を促進

リボソームに対して等量 (0.5  $\mu\text{M}$ ) の eIF5A について、連続プロリン配列の翻訳に対する効果を検証した (図 33)。その結果、連続プロリン配列依存の翻訳抑制は、全ての種類の eIF5A によって解消された (図 33A,B)。加えて、連続プロリン配列の翻訳抑制は、2.5  $\mu\text{M}$  の eIF5A (WT) や eIF5A (K51R) の添加によっても解消される結果を得た (図 33C,D)。一方、連続 CGA 配列依存の翻訳抑制は、どの eIF5A によっても解消されることはなかった。以上の結果は、十分量の eIF5A 存在下では、連続プロリン配列の翻訳促進に hypusine 修飾が不要であることを示唆した。上記の結果は、これまで報告された eIF5A の効果とは異なる新しい知見となった。

次に、酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系で合成された翻訳停止配列解析用コンストラクトからの翻訳産物がどのような状態かを調べるために、翻訳産物を Tricine SDS-PAGE を用いて解析することにした。

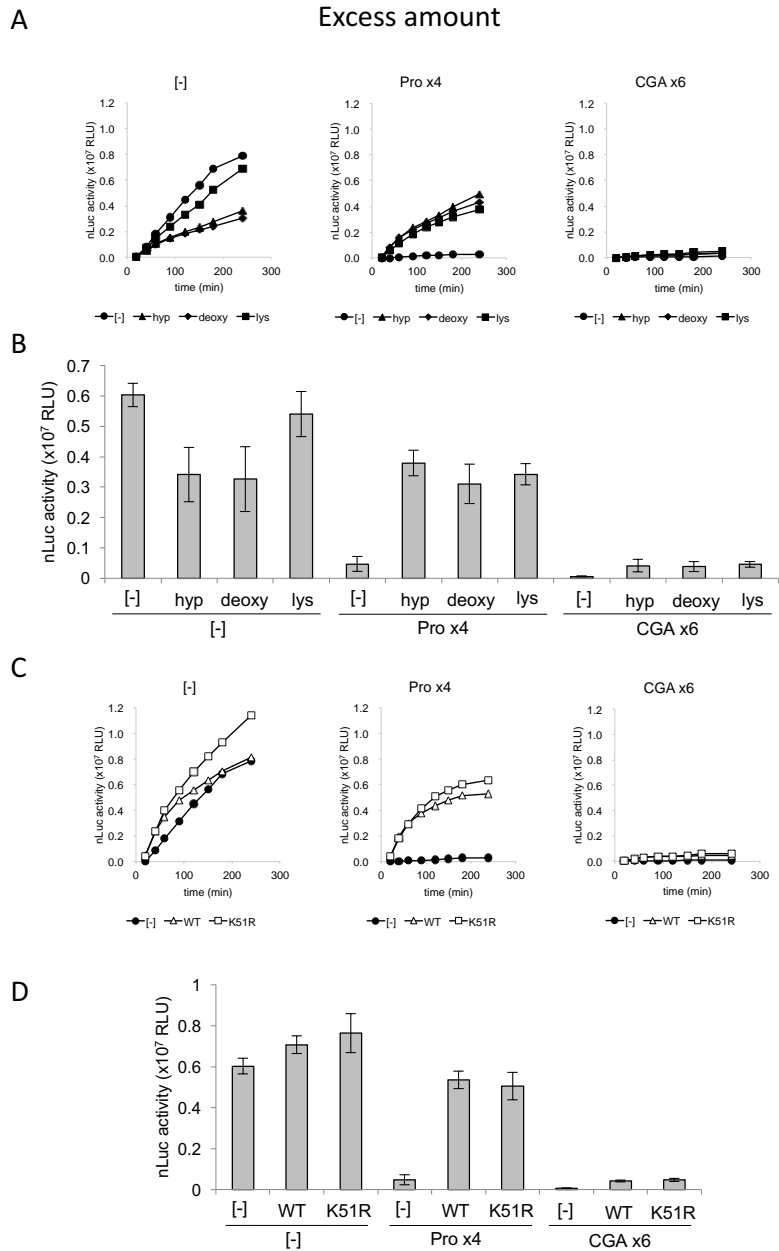


図 33. 連続プロリン配列の翻訳に対する eIF5A の効果（濃度過剰条件）

A: タイムコース解析の結果。[5/0.25/0] mRNA, aa-tRNA start 翻訳系に大腸菌から精製された各 eIF5A 0.5  $\mu$ M を添加して、図 24A に示した mRNA を翻訳させた。B: 反応 150 分での翻訳量で比較。C: タイムコース解析の結果。[5/0.25/0] mRNA, aa-tRNA start 翻訳系に酵母から精製された各 eIF5A 2.5  $\mu$ M を添加して、図 24A に示した mRNA を翻訳させた。D: 反応 150 分での翻訳量で比較。示されたエラーバーは独立した 3 回の実験結果の標準誤差を示した。

### 3.12 Tricine SDS-PAGE で翻訳停止配列依存の翻訳停止を確認

酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系を用いて、連続プロリン配列や連続 CGA 配列依存の翻訳抑制が観察された。観察された翻訳抑制が、翻訳停止配列を挿入した位置での翻訳停止によるものかを確認するために、翻訳産物を Tricine SDS-PAGE で分画し、解析を行った。図 34A は挿入なしコンストラクトの翻訳産物について、図 34B は Pro x4 挿入コンストラクトについて、図 34C は CGA x6 挿入コンストラクトについてゲル写真の結果を示した。

挿入なしコンストラクトからの翻訳産物の予測分子量は 25.3 kDa である。図 34A で示されたように、分子量マーカーの 20-25 kDa の位置に現れるバンドが全長合成産物 (FL) であると考えられる。挿入なしコンストラクトの翻訳では、0.5  $\mu$ M eIF5A (hyp) を添加することによって、全長合成産物の合成量が同レベルか少し低くなることが観察された。また、0.5  $\mu$ M eIF5A (hyp) を添加することによって、スメアバンド (\*) が検出されるようになった。これは、現在の翻訳条件において、翻訳停止配列以外の翻訳に対して eIF5A が負の効果を持つことを示している (図 34)。この点については、考察の項目で述べる。

Pro x4 挿入コンストラクトから全長合成されると分子量は 25.3 kDa で、挿入されたプロリンの 49 アミノ酸の位置で翻訳が停止すると分子量は 5.53 kDa と予測された。図 34B で示されたように、eIF5A (hyp) 非存在下で Pro x4 挿入コンストラクトを翻訳すると、分子量マーカーの 5-10 kDa の位置にバンドが生じることから、連続プロリン配列で翻訳停止したことが示唆された。eIF5A (hyp) 非存在下で Pro x4 挿入コンストラクトを翻訳すると、全長合成産物は全く検出されなかったが、0.5  $\mu$ M eIF5A (hyp) 存在下では全長合成産物が検出されるようになった。この結果から、Pro x4 依存の翻訳抑制は Pro x4 上で翻訳停止が起きたことが原因であり、その翻訳停止を eIF5A は解除することが示された。そして図 32 や図 33 で示された Luciferase Assay による解析結果と Tricine SDS-PAGE による解析結果は一致することが示された。0.5  $\mu$ M eIF5A を添加するとスメアバンド (\*) が検出されるようになったが、図 34A の結果と同様であるため、連続プロリン配列とは無関係な現象だと考えられた。

CGA x6 挿入コンストラクトから全長合成されると分子量は 26.3 kDa で、挿入されたアルギニンの 51 アミノ酸の位置で翻訳が停止すると分子量は 6.14 kDa と予測された。図 34C で示されたように、eIF5A の有無に関わらず分子量



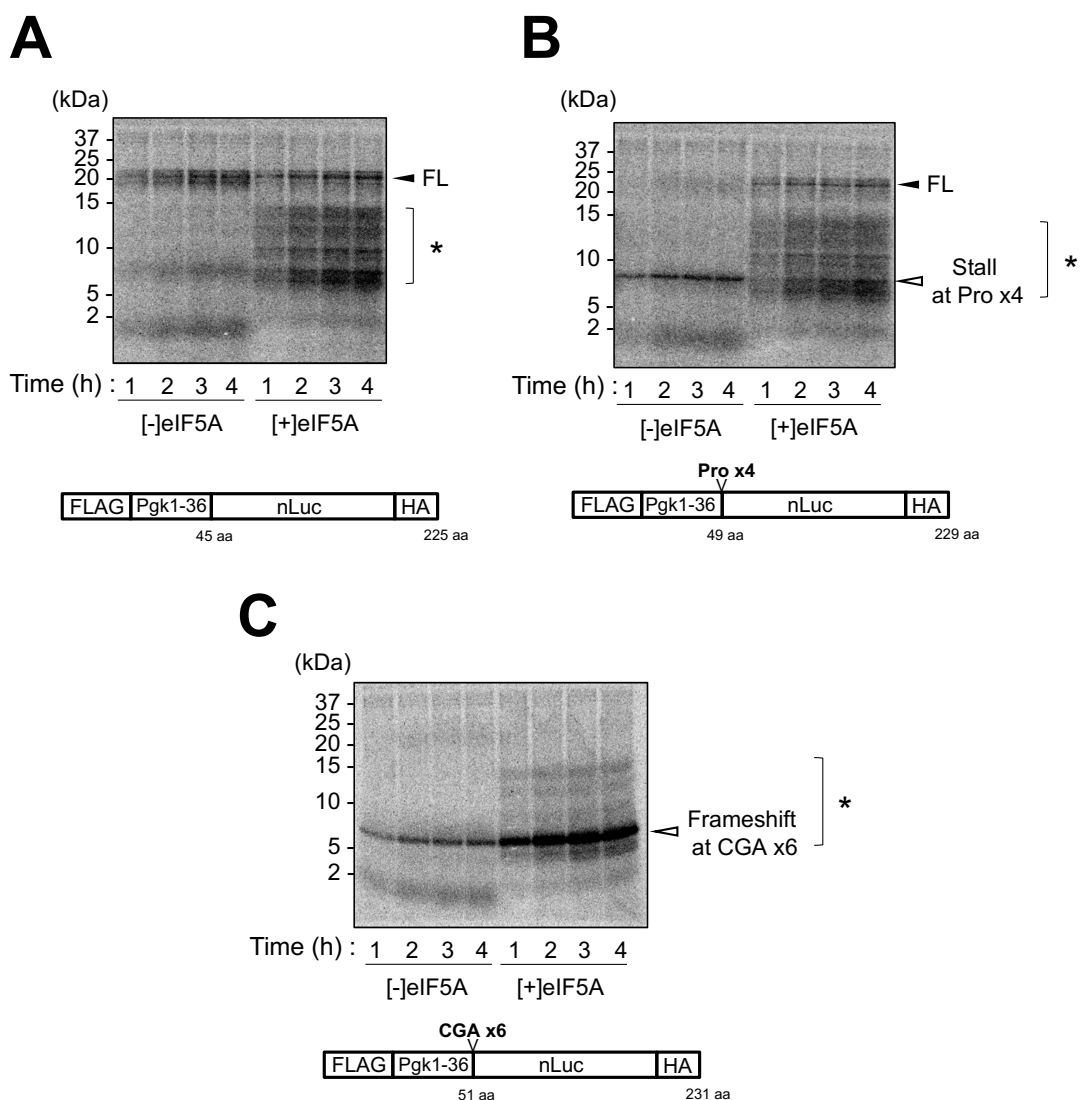


図 34. Tricine SDS-PAGE による翻訳停止配列を含む翻訳産物の解析

A: 図 24A に示した挿入なし mRNA を[5/0.25/0] mRNA, aa-tRNA start 翻訳系で翻訳させ、0.5  $\mu$ M eIF5A (hyp) の効果を検証した。反応 1, 2, 3, 4 時間後に 0.1 mg/mL RNaseA 処理を行い、10  $\mu$ L のサンプルを Tricine SDS-PAGE を用いて解析した。下の図は反応に用いた mRNA の模式図である。(FL) は Full length 翻訳産物の位置を示し、アスタリスク (\*) は翻訳停止配列以外の領域でフレームシフトを起こしたと示唆された産物である。B: 図 24A に示した Pro x4 を挿入した mRNA について図 34A と同様の解析をした。下の図は反応に用いた mRNA の模式図である。C: 図 24A に示した CGA x6 を挿入した mRNA について図 34A と同様の解析をした。下の図は反応に用いた mRNA の模式図である。

マーカーの 5-10 kDa の位置にバンドが生じることから、連続 CGA 配列で翻訳停止したことが示唆された。この結果からも、eIF5A は連続 CGA 配列の翻訳停止に対して効果を示さないことが示された。

翻訳停止配列解析用コンストラクトの翻訳反応で見られる翻訳抑制は、挿入された配列上での翻訳停止によると示唆されたので、最後に翻訳停止したりボソーム上でペプチジル tRNA がどのような状態かを調べることにした。

### 3.13 連続プロリン配列で停止したペプチジル tRNA は Pth 感受性を示す

翻訳停止したりボソーム上でペプチジル tRNA がどのような状態かを調べるために、翻訳反応後に RNaseA 処理したサンプル、ペプチジル tRNA ハイドロレース (Pth) 処理をしたサンプル、何も処理をしないサンプルを Tricine SDS-PAGE で分画して解析を行った。Pth はリボソームから遊離したペプチジル tRNA を加水分解し、RNaseA は全ての RNA を分解する。従ってリボソーム上に存在するペプチジル tRNA は、RNaseA 処理では分解されるが、Pth 処理では分解されないと予想される。

まず翻訳停止配列挿入なしコンストラクトを eIF5A 非存在下で翻訳した産物について解析したところ (図 35A)、何も処理をしないサンプルからは、ペプチド解離された全長合成産物 (\*) と、全長合成されていると思われるペプチジル tRNA (\*\*) が検出された。全長合成されたペプチジル tRNA は Pth 処理によってバンド強度が半分ほどに減少し、RNaseA 処理によってほぼ全てが消失した。未処理サンプルから検出される全長合成ペプチジル tRNA のうち、半分は終止コドン上でリボソームに結合した状態で存在しており、残りはリボソームの run off によってペプチジル tRNA が遊離して存在していることを示唆した。Pth 処理をしたサンプルのペプチド解離した全長合成産物のバンドが歪んでいるのは、添加した Pth (21.1 kDa) が原因である。一方 eIF5A 存在下で翻訳した産物について解析したところ、何も処理をしないサンプルからは、全長合成されていると思われるペプチジル tRNA (\*\*) と、フレームシフト産物と思われる中間産物 (図 34A のアスタリスクで示したシグナルと同様) が検出された。ペプチジル tRNA の状態で存在している場合、20 kDa 以上の位置に検出されると考えられるため、未処理で検出された中間産物はペプチド解離した状態で存在していると考えられた。従って、フレームシフトが起き、下流に現れた未成熟

終止コドン (premature termination codon) でペプチド解離が起きていることを示唆した。加えて、eIF5A 存在下では非存在下に比べて全長合成されたペプチジル tRNA が少なく検出されており、eIF5A が eRF1 によるペプチド解離反応を促進するという報告と一致した<sup>(16,42)</sup>。

次に連続プロリン配列が挿入されたコンストラクトを eIF5A 非存在下で翻訳した産物について解析したところ (図 35B)、何も処理をしないサンプルからは、Pro x4 で翻訳停止したと思われるペプチジル tRNA (\*\*\*\*) が検出された。このペプチジル tRNA (\*\*\*\*) は RNaseA 処理によって分解され、約 6 kDa の位置 (\*\*\*) にバンドシフトしたことから、Pro x4 で翻訳停止したペプチジル tRNA であることが示された。予想外なことに、Pro x4 で翻訳停止したペプチジル tRNA (\*\*\*\*) は Pth によって切断を受け、約 6 kDa の位置 (\*\*\*) にバンドシフトした。これは、連続プロリンペプチジル tRNA によってストールしたリボソームは構造的に不安定になり、ペプチジル tRNA が Pth の作用を受けるようになったことが示唆された。eIF5A 存在下で翻訳した産物について解析したところ、ペプチド解離した全長合成産物 (\*) が確認された。eIF5A 非存在下と同様に Pth 感受性を示す Pro x4 で翻訳停止したペプチジル tRNA (\*\*\*\*) も確認された。また、eIF5A を添加することによってフレームシフト産物と思われる中間産物 (図 34B のアスタリスクで示したシグナルと同様) が検出されたが、図 35A から同様の傾向のバンドが検出されているため、連続プロリン配列とは無関係であることが示唆された。

最後に、連続 CGA 配列が挿入されたコンストラクトを eIF5A 非存在下で翻訳した産物について解析したところ (図 35C)、何も処理をしないサンプルから、約 6 kDa の位置にバンドが検出された。このバンドは Pth 処理や RNaseA 処理に関わらず、全てのサンプルから同様に検出された。従って、連続 CGA 配列の翻訳停止に伴いフレームシフトが起き、連続 CGA 配列の下流に生じる未成熟終止コドンによってペプチド解離が起きていることを示唆した。eIF5A 存在下で翻訳した産物についても同様で、連続 CGA 配列によるフレームシフト産物が検出された。また図 35A,B と同様に、eIF5A の添加によって連続 CGA 配列とは無関係なフレームシフト産物 (図 34C のアスタリスクで示したシグナルと同様) も検出された。

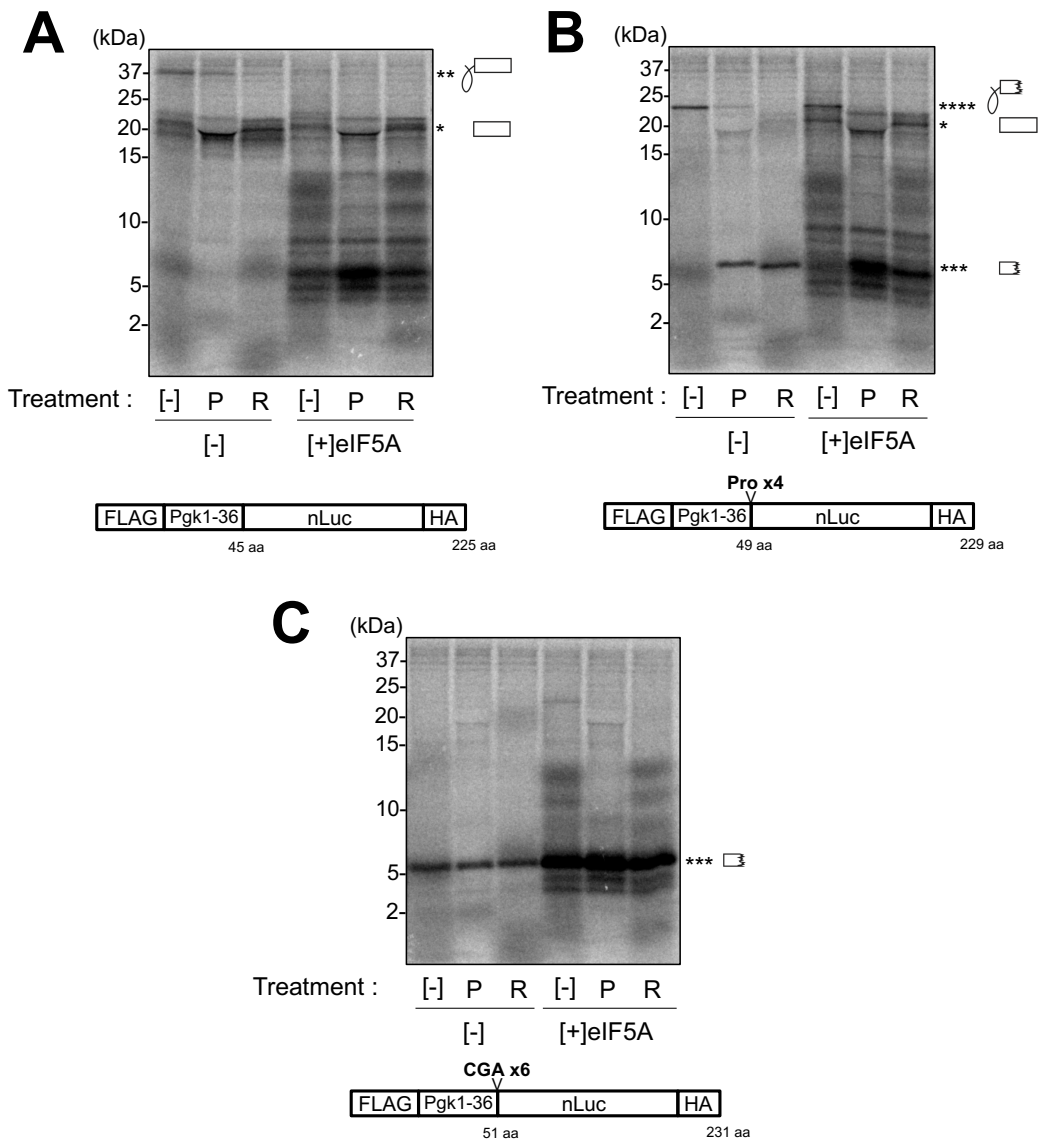


図 35. 翻訳停止したリボソーム上でのペプチジル tRNA の状態解析

図 24A に示した mRNA を [5/0.25/0] mRNA, aa-tRNA start 翻訳系で翻訳させ、0.5  $\mu$ M eIF5A (hyp) の効果を検証した。反応 4 時間後に 0.1 mg/mL RNaseA 処理、または 30  $\mu$ M Pth 処理を行い、10  $\mu$ L のサンプルを Tricine SDS-PAGE を用いて解析した。下の図は反応に用いた mRNA の模式図である。(\*) はペプチド解離された全長合成産物、(\*\*) は全長合成されたペプチジル tRNA、(\*\*\*) はペプチド解離された翻訳停止産物、(\*\*\*\*) は翻訳停止したペプチジル tRNA を示した。A: 挿入なしコンストラクトについて解析した。B: Pro x4 について解析した。C: CGA x6 について解析した。

結果をまとめると、連続プロリン配列で翻訳停止して生じたペプチジル tRNA は Pth 感受性を示すことが示された。連続 CGA 配列の翻訳ではフレームシフトが起き、連続 CGA 配列下流に生じた未成熟終止コドンによるペプチド解離が起きており、ペプチジル tRNA の状態で存在しないことも示された。

### 3.14 連続プロリンペプチジル tRNA はリボソームから解離している

ペプチジル tRNA が Pth 感受性を示すということは、リボソームがサブユニットに解離していることを示唆する。連続プロリンペプチジル tRNA がリボソームから解離しているかを確かめるために、連続プロリン配列が挿入されたコンストラクトを eIF5A 非存在下で翻訳したのち、ショ糖密度勾配遠心を用いて翻訳産物を分画して解析を行った。リボソームがサブユニットに解離し、さらにショ糖密度勾配遠心の過程でペプチジル tRNA がリボソームから解離する場合、ペプチジル tRNA はショ糖密度の低いトップフラクションから検出される。また、ペプチジル tRNA がリボソーム上に存在する場合、ペプチジル tRNA は 80S リボソームが検出されるフラクションから検出される。

ショ糖密度勾配遠心によって分画した翻訳産物を Tricine SDS-PAGE を用いて解析した結果、トップフラクションから 25 kDa の位置にシグナルが検出された (図 36A)。検出されたシグナルは Pth 処理を行うと約 7 kDa の位置にシフトすること (図 36B) から、連続プロリン配列で停止したペプチジル tRNA であることが示された。これらの結果から、本研究で観察された連続プロリンペプチジル tRNA は翻訳停止に伴い、リボソームをサブユニットに解離していることが示唆された。またショ糖密度勾配遠心の過程でペプチジル tRNA が脱離したと考えられた。

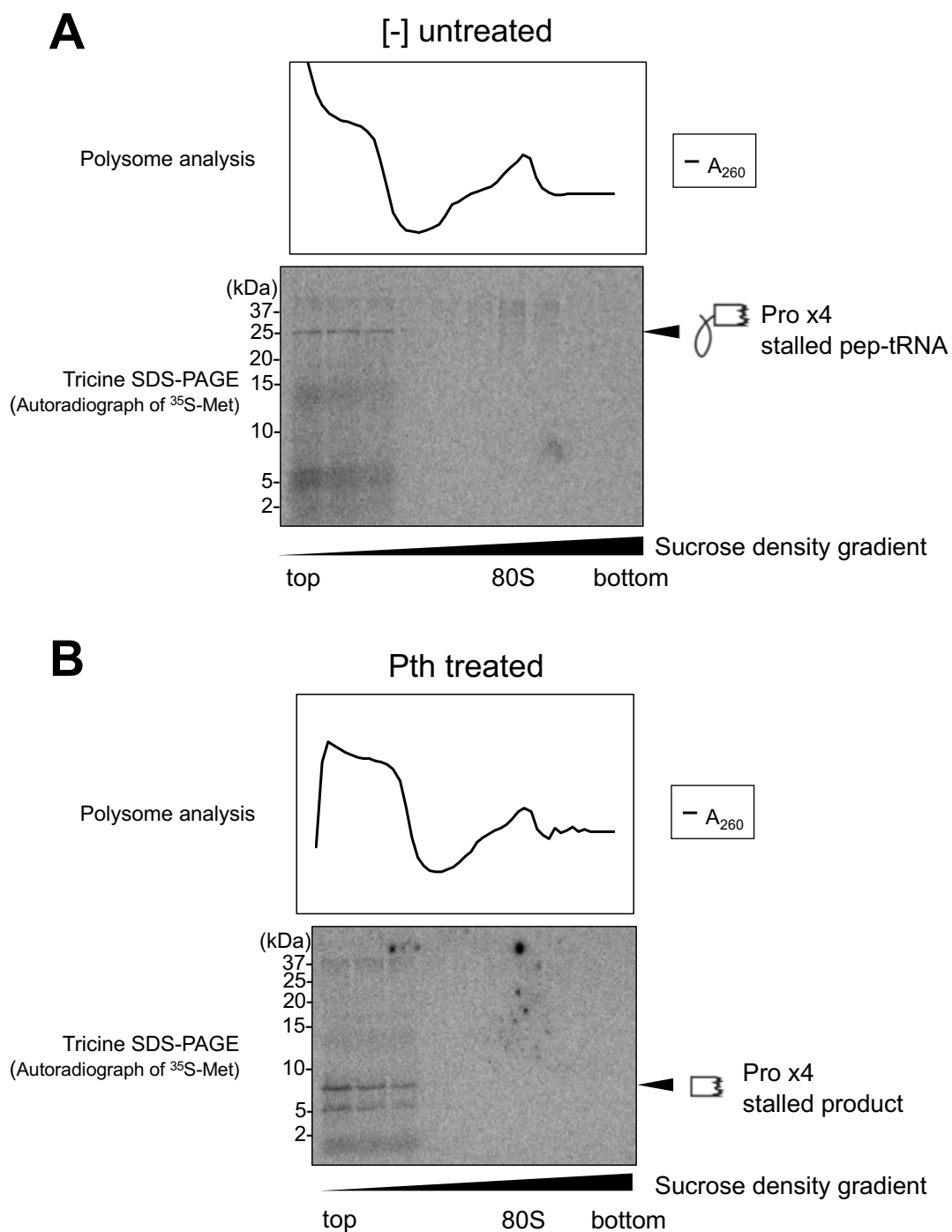


図 36. ペプチジル tRNA がリボソーム上に存在するかの解析

eIF5A 非存在下 [5/0.25/0] mRNA, aa-tRNA start 翻訳系で図 24A に示した Pro x4 mRNA を翻訳させ、反応 4 時間後に何も処理をしない (図 36A)、または 30  $\mu\text{M}$  Pth 処理 (図 36B) を行い、サンプルを調製した。サンプルを 10-30% ショ糖密度勾配遠心法によって 20 分画に分け、Tricine SDS-PAGE を用いて解析した。リボソーム分画は 260 nm の吸光度を測定することで確認した。

### 3.15 連続トリプトファン配列で停止したペプチジル tRNA は Pth 感受性を示さない

最後に、連続プロリン配列で生じるペプチジル tRNA が、プロリン以外の配列で停止しているペプチジル tRNA と比べて、有意に Pth 感受性かどうかを解析した。これまで、連続プロリン配列とは翻訳停止メカニズムが異なる配列として連続 CGA 配列を用いて来た。しかしながら、図 35C の結果から、連続 CGA 配列によってフレームシフトが誘発され、それによって生じた未成熟終止コドンでのペプチド解離反応が起きている事が示唆された。従って、連続 CGA 配列を用いても、翻訳停止したペプチジル tRNA を観察する事が出来ない。

そこで、*In vivo* 解析によって酵母では弱いストール配列として報告されている連続トリプトファン配列<sup>(19)</sup> (Trp x10) を用いて翻訳停止産物を得て、連続トリプトファン配列で生じるペプチジル tRNA の Pth 感受性を解析することにした。また、翻訳停止配列を含まない mRNA からの翻訳産物も、終止コドン上でペプチジル tRNA として存在していると示唆される産物が検出された (図 35A)。終止コドン上で停止しているペプチジル tRNA についても Pth 感受性を解析することにした。

eIF5A 非存在下で図 37A に示した mRNA を翻訳させて、反応後に何も処理をしないサンプル (-)、Pth 処理をしたサンプル (P)、RNaseA 処理をしたサンプル (R) について Tricine SDS-PAGE による解析を行った (図 37B)。得られたゲル写真について、全長合成されたペプチジル tRNA (\*\*) と翻訳停止したペプチジル tRNA (\*\*\*\*) のバンド強度を Multi Gauge で解析した。Pth 耐性のペプチジル tRNA を、Pth 処理バンド / 未処理バンド (%) で評価し、3回の独立した実験結果の標準誤差で示した (図 37D)。

[9/2/0.1]の条件において4連続プロリン配列は停止しなかったが、さらに多くのプロリンが連続した配列では翻訳停止が起これると予想された。この条件ではマグネシウム濃度やポリアミン濃度が高いため、リボソームは構造的に安定である事が予想された。従って、[9/2/0.1]の条件で停止させた連続プロリン配列のペプチジル tRNA は、Pth 感受性は示さないと予想された。そこで、[9/2/0.1]の反応条件についても図 37B と同様の実験を行った (図 37C,D)。

[5/0.25/0]の反応条件で、挿入なしコンストラクト (No motif) と Pro x4 を含むコンストラクトの翻訳産物を解析したところ (図 37B)、図 35A,B で示され

た結果を再現した。バンド強度を定量した結果、全長合成されたペプチジル tRNA (\*\*) は  $62\pm 3.6\%$  が Pth 耐性を示し、Pro x4 で翻訳停止したペプチジル tRNA (\*\*\*\*) は  $2.4\pm 0.64\%$  が Pth 耐性を示した (図 37D)。全長合成されたペプチジル tRNA は終止コドンで run off していることを考慮しても、半数が Pth 耐性を示した。一方、Pro x4 で翻訳停止したペプチジル tRNA は、ほとんどが Pth 感受性を示した。次に、Pro x12 を含むコンストラクトの翻訳産物を解析したところ、Pro x4 を含むコンストラクトの結果と傾向が一致した (図 37B)。バンド強度を定量した結果、Pro x12 で翻訳停止したペプチジル tRNA (\*\*\*\*) は  $0.79\pm 0.71\%$  が Pth 耐性を示した (図 37D)。従って、ほとんどの Pro x12 で停止したペプチジル tRNA は Pth 感受性を示した。最後に、連続トリプトファン配列が挿入されたコンストラクトを eIF5A 非存在下で翻訳した産物について解析したところ (図 37B)、何も処理をしないサンプルからは、Trp x10 で翻訳停止したと思われるペプチジル tRNA (\*\*\*\*) が検出された。このペプチジル tRNA (\*\*\*\*) は RNaseA 処理によって分解され、約 8 kDa の位置 (\*\*\*) にバンドシフトしたことから、Trp x10 で翻訳停止したペプチジル tRNA であることが示された。注目したい点は、Trp x10 で翻訳停止したペプチジル tRNA (\*\*\*\*) は Pth によって切断を受けなかった点である (図 37B)。バンド強度を定量した結果、Trp x10 で停止したペプチジル tRNA (\*\*\*\*) は  $90\pm 6.1\%$  が Pth 耐性を示した (図 37D)。以上の結果をまとめると、連続プロリン配列で翻訳停止したペプチジル tRNA は有意に Pth 感受性を示しており、ポリプロリン tRNA によってリボソームが不安定化したことを支持した。このリボソームの不安定化は連続プロリン配列特異的であることも示された。

[9/2/0.1]の反応条件において、Pro x4 が挿入されたコンストラクトを eIF5A 非存在下で翻訳した産物について解析したところ (図 37C)、全長合成されていると思われるペプチジル tRNA (\*\*) が検出された。Pth 処理や RNaseA 処理を行っても、翻訳停止産物 (\*\*\*) が検出されないことから、[9/2/0.1]の反応条件では翻訳停止が起こらない事を確認した。挿入なし (No motif) と Pro x4 について、全長合成されたペプチジル tRNA (\*\*) の Pth 耐性を評価すると、それぞれ  $88\pm 0.58\%$  と  $99\pm 7.4\%$  であった (図 37D)。一方、Pro x12 が挿入されたコンストラクトを eIF5A 非存在下で翻訳した産物について解析したところ (図 37C)、何も処理をしないサンプルからは、Pro x12 で翻訳停止したと思われるペプチジル tRNA (\*\*\*\*) が検出された。このペプチジル tRNA (\*\*\*\*) は RNaseA



処理によって分解され、約 10 kDa の位置 (\*\*\*\*\*) にバンドシフトしたことから、Pro x12 で翻訳停止したペプチジル tRNA であることが示された。注目したい点として、[9/2/0.1]の条件において Pro x12 で翻訳停止したペプチジル tRNA (\*\*\*\*\*) は Pth によって切断を受けなかった点である。Pro x12 で翻訳停止したペプチジル tRNA の Pth 耐性を評価すると、 $105 \pm 8.9\%$  という値を示し、全く Pth の作用を受けないことを示した (図 37D)。加えて、RNaseA 処理によって出現した Pro x12 の翻訳停止産物は[5/0.25/0] と[9/2/0.1]の反応条件によって分子量が異なった。これらの結果をまとめると、[9/2/0.1]の条件ではマグネシウム濃度やポリアミン濃度が高いためリボソームは不安定化しにくく、連続プロリン配列はある程度翻訳されたと考えられた。その結果、長く連なったプロリン配列がリボソームトンネルでつまり翻訳停止を引き起こしたので、Pro x12 の翻訳停止産物は[5/0.25/0] と[9/2/0.1]の反応条件によって分子量が異なると示唆された。そして、[9/2/0.1]の条件において連続プロリン配列で停止したリボソームは不安定化していないため、リボソーム上のペプチジル tRNA は Pth 感受性を示さないことを示唆した。予想外なことに、[9/2/0.1]の条件において連続トリプトファン配列を含むコンストラクトの翻訳産物を解析したところ、RNaseA 処理で切断を受ける翻訳停止産物が確認されなかった (図 37C)。これは、マグネシウム濃度やポリアミン濃度が高い場合、連続トリプトファン配列も翻訳停止しない事を示唆した。

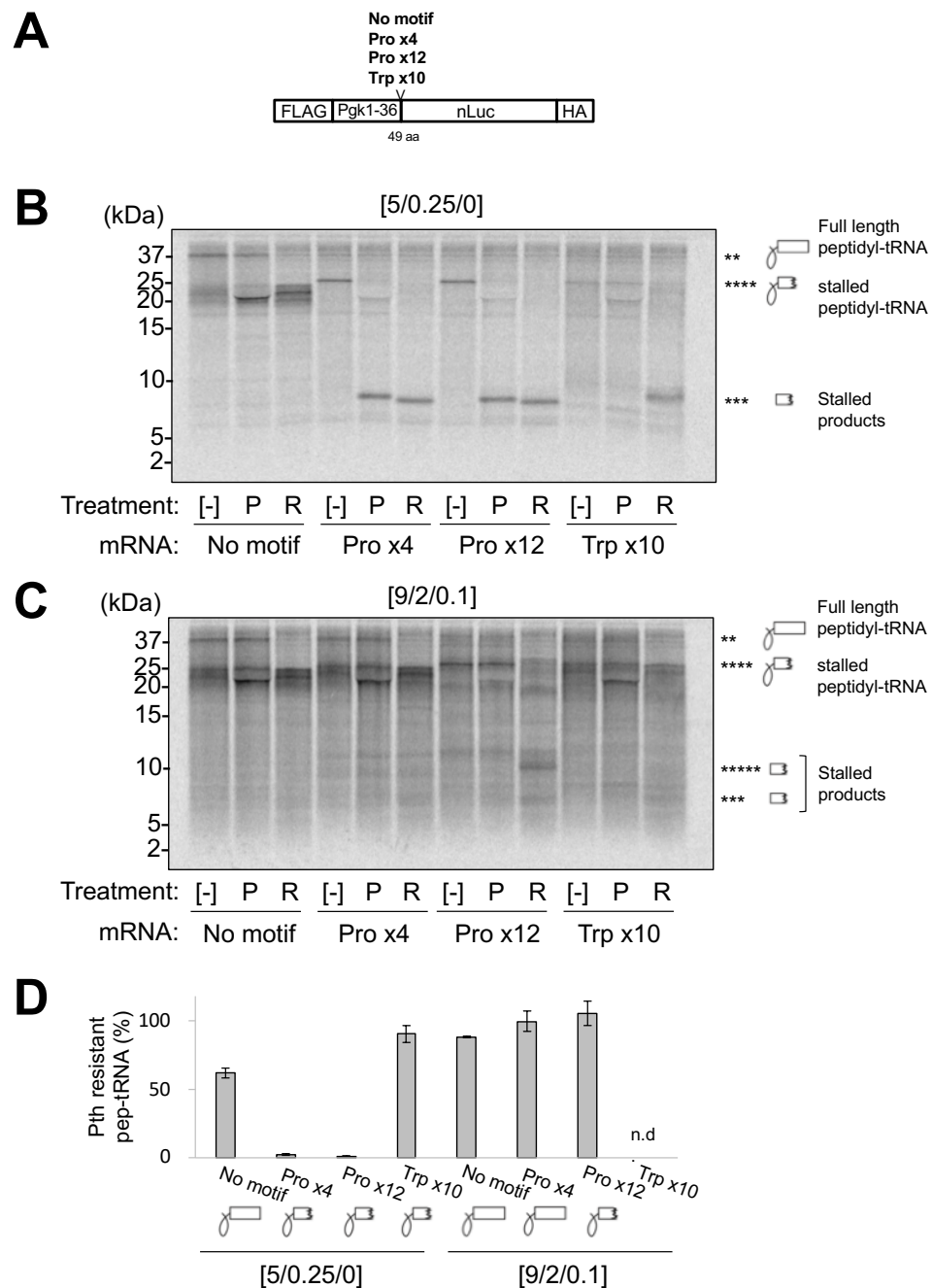


図 37. ポリプロリン tRNA の Pth 感受性の有意性の確認

A: 解析に用いたコンストラクトの模式図。B: eIF5A 非存在下、[5/0.25/0]の反応条件で図 37A に示した mRNA を翻訳させて、反応 4 時間後に何も処理をしない ([-])、30  $\mu$ M Pth 処理 (P)、または 0.1 mg/mL RNaseA 処理 (R) を行い、10  $\mu$ L のサンプルを Tricine SDS-PAGE を用いて解析した。C: [9/2/0.1]の反応条件で図 37B と同様の実験を行った。D: 全長合成されたペプチジル tRNA (\*\*) と翻訳停止したペプチジル tRNA (\*\*\*\*) のバンド強度を Multi Gauge で解析した。Pth 耐性のペプチジル tRNA を、Pth 処理バンド / 未処理バンド (%) で評価し、3 回の独立した実験結果の標準誤差で示した。

## 4 考察

### 4.1 本研究のまとめ

- ・精製された酵母の因子を用いた再構成型生体外タンパク質合成系を構築した。酵素活性を有する nLuc の合成に成功した (図 19)。
- ・再構成型生体外タンパク質合成系を用いて連続プロリン配列依存の翻訳抑制を観察することに成功した (図 28)。
  - ▶Mg<sup>2+</sup>とポリアミン濃度が低い時に、連続プロリン配列で強く翻訳停止する。  
▶4章2節で考察
- ・リボソームと等量の eIF5A 存在下では hypusine 修飾非依存的に連続プロリン配列の翻訳を促進した (図 33)。
  - ▶タンパク質内部の連続プロリン配列の翻訳抑制を解消する eIF5A の効果は hypusine 修飾を必要としない。  
▶4章3節、4章4節、4章5節で考察
- ・連続プロリン配列で停止したペプチジル tRNA は Pth 感受性を示した (図 35)。
  - ▶連続プロリンペプチジル tRNA は Pth の作用を受けるようなリボソームの状態、特に PTC の構造の乱れを誘発する。  
▶4章2節で考察
- ・連続トリプトファン配列で停止したペプチジル tRNA は Pth 感受性をしめさなかった (図 37)
  - ▶連続プロリン配列の翻訳停止は PTC の構造の乱れが原因であり  
その PTC の構造の乱れは未修飾 eIF5A 本体の作用によって解消される。  
▶4章4節、4章5節で考察

本研究では、精製された酵母の因子を用いて酵素活性を有する nLuc の合成が可能な再構成型生体外タンパク質合成系の構築を行った。この系を用いて、タンパク質内部に挿入した連続プロリン配列による翻訳停止と、それを解消する eIF5A および hypusine 修飾の機能解析を行った。その結果、Mg<sup>2+</sup>やポリアミン濃度が低い場合、連続プロリンペプチジル tRNA はリボソームの PTC の構造を乱し、それに伴い翻訳停止を引き起こすことが示唆された。加えて、連続プロリン配列依存の翻訳停止を解消するのに eIF5A は hypusine 修飾が不要であったため、未修飾 eIF5A の本体が乱れた PTC の構造を正し、翻訳停止を解消することが示唆された。PTC の構造に着目し、連続プロリン配列の翻訳停止とそれを解消する未修飾 eIF5A の作用機序を考察した例はこれまでにない新しい知見である。以上の考察をもとに、真核細胞と原核細胞の連続プロリン配列による翻訳停止機構と、それを解消する eIF5A や EF-P の作用機序について比較しながら考察を行った。

## 4.2 真核細胞における連続プロリン配列の翻訳停止メカニズム

本研究によって、マグネシウム濃度とポリアミン濃度が低い反応条件において連続プロリン配列依存の翻訳停止が観察され (図 28,29)、連続プロリン配列で停止したペプチジル tRNA は Pth 感受性を示した (図 35-37)。連続プロリン配列は、開始コドンから 45 アミノ酸下流に挿入したため、リボソームのペプチドトンネルは新生ポリペプチド鎖が埋まった状態で翻訳停止していると考えられた<sup>(22)</sup>。そのような状況において、翻訳停止した連続プロリンペプチジル tRNA は Pth の作用を受けた。これは、立体障害を引き起こす連続プロリン領域<sup>(14)</sup>とペプチドトンネルが衝突することで通常とは異なる PTC の構造を誘発し、それに伴うリボソームの不安定化によって連続プロリンペプチジル tRNA は Pth 感受性を示したと考えられた。最近、原核細胞のリボソームは、プロリンと酸性アミノ酸の混合した連続配列を翻訳すると不安定化が起こると報告された<sup>(78)</sup>。茶谷らは、大腸菌由来の *In vitro* 翻訳系で、10 連続のアスパラギン酸配列やグルタミン酸配列を挿入したレポーターコンストラクトを翻訳させると、Pth 感受性の挿入配列で停止したペプチジル tRNA が検出されることを見つけた<sup>(78)</sup>。この現象は **Intrinsic Ribosome Destabilization (IRD)** と名付けられた<sup>(78)</sup>。そして、IRD はバクテリアにおいて低  $Mg^{2+}$ 濃度を感知し、マグネシウムトランスポーター **MgtA** の発現制御に利用されることが報告された<sup>(78)</sup>。マグネシウムトランスポーター **MgtA** の発現制御は、**MgtA** の上流に存在する **MgtL** の翻訳によって制御を受ける<sup>(78,81)</sup>。**MgtL** は、プロリン、アスパラギン酸、グルタミン酸を豊富に含む配列であり、 $Mg^{2+}$ 濃度の高いときは **EF-P** 依存的に合成される<sup>(78,81)</sup>。この時、翻訳しているリボソームによって mRNA の構造が変化し、転写終結因子 **Rho** の認識領域が露出すると、**MgtA** のコード領域まで転写が行われず **MgtA** の発現が抑えられる<sup>(78,81)</sup>。一方、 $Mg^{2+}$ 濃度が低いとき、リボソームは不安定化 (IRD) し **MgtL** の下流まで翻訳が行われない<sup>(78)</sup>。この時、mRNA の構造が変化し **Rho** 認識領域が二次構造を形成するため、**MgtA** のコード領域まで転写が行われ **MgtA** の発現が行われる<sup>(78,81)</sup>。注目したい点は、原核細胞の **IRD** を引き起こす配列<sup>(78)</sup>と真核細胞の **eIF5A** が作用する配列<sup>(13,16)</sup>は、プロリンやアスパラギン酸が含まれており類似する点である。これらの報告をまとめると、本研究で観察された連続プロリン配列の翻訳停止は、連続プロリンペプチジル tRNA によって PTC の構造が乱れ、IRD のようなリボソームの不安定化に

よって引き起こされたことが示唆された。一方、マグネシウム濃度やポリアミン濃度が高い場合は、マグネシウムやポリアミンがリボソームや P-site tRNA に結合することで PTC の構造安定化に寄与し、連続プロリン領域の立体障害が解消され、翻訳伸長が起こったと考えられた。ポリアミンは PTC や P-site tRNA と相互作用することで、翻訳伸長の正確性の向上や伸長速度の上昇に寄与することが報告されている<sup>(14,64,88)</sup>。これまで、真核細胞における連続プロリン配列の翻訳停止は、P-site ペプチジル tRNA の配向の乱れが主な原因と考えられてきた。しかし本研究の結果から、立体障害を引き起こす連続プロリン領域とペプチドトンネルが衝突することで PTC の構造が乱れ、リボソームの不安定化が起こることで翻訳が停止するという新たなモデルが示唆された。

#### 4.3 hypusine 修飾のタンパク質合成における役割

これまで eIF5A の *In vitro* による機能解析は、*In vitro* ペンタペプチド合成系を用いた解析が報告されていたが<sup>(14,15,16)</sup>、長いペプチド合成における eIF5A の機能解析をした例は 1 つもなかった。ペンタペプチド合成系のような短いペプチド合成では、ペプチドトンネルと新生ポリペプチド鎖の相互作用は弱いと考えられ、P-site ペプチジル tRNA は非常に不安定であることが予想された<sup>(12,16,43)</sup>。

Schmidt C.らの報告によると、P-site ペプチジル tRNA は A-site tRNA が存在するとき、リボソーマルタンパク質 uL16 と相互作用して安定化される<sup>(43)</sup> (図 38A)。このとき A-site tRNA の C72 は uL16 の Cys104 と水素結合を形成し、P-site ペプチジル tRNA の G73, C75 は uL16 の Arg109, Asp108 とそれぞれ水素結合を形成していると報告された<sup>(43)</sup> (図 7E,38A)。一方 A-site tRNA が存在しない場合、uL16 は P-site ペプチジル tRNA と相互作用できない構造になり、P-site ペプチジル tRNA はとりわけ不安定な状態になる<sup>(43)</sup> (図 7F,38B)。このような状況では、eIF5A の hypusine 残基が E-site 側から P-site ペプチジル tRNA の CCA 末端と相互作用することで、P-site ペプチジル tRNA を安定化すると報告された<sup>(43)</sup> (図 38C)。

これらの報告を考え合わせると、ペプチドトンネルと新生ポリペプチド鎖の相互作用が弱い条件である *In vitro* ペンタペプチド合成において、連続プロリン配列による翻訳停止を引き起こすと、P-site tRNA は非常に不安定な状態に

なることが予想され、それに伴う翻訳停止やペプチジル tRNA の脱離(drop off) が起きると考えられた。実際に、Schuller A.P.らもペプチジル tRNA の脱離が生じていることを言及していた<sup>(16)</sup>。そのような極めて不安定な P-site の連続プロリンペプチジル tRNA を安定化し翻訳を促進するためには、hypusine 修飾のされた eIF5A が必要であったと考えられた (図 38B,C)。実際に、MPPK や MPPPK のような短いペプチド合成<sup>(14,15,16)</sup>に加えて、メチオニルピューロマイシン形成反応<sup>(55,56)</sup>や MFF トリペプチド合成反応<sup>(42)</sup>もハイプシン修飾依存的に eIF5A によって促進されることが報告されている。これらについても、リボソームのペプチドトンネルとペプチジル tRNA の相互作用が弱い場合、とりわけ不安定な状態である P-site ペプチジル tRNA を支える eIF5A の作用が結果に現れたと示唆された。

しかし本研究では、ペプチドトンネルから新生ポリペプチド鎖が露出する位置で連続プロリン配列による翻訳停止を解析したため、ペプチドトンネルと新生ポリペプチド鎖の相互作用が十分に形成され、P-site ペプチジル tRNA は安定であると予想された (図 38D)。このような条件では、A-site tRNA が存在せず、uL16 が P-site ペプチジル tRNA と相互作用できない状況でも、P-site ペプチジル tRNA は比較的安定だったと考えられた。加えて、本研究で観察された連続プロリン配列による翻訳停止は、P-site ペプチジル tRNA の配向の乱れが原因というより、PTC の構造の乱れによるリボソームの不安定化が原因であると示唆された (図 35-37)。そのような連続プロリン配列によって乱れた PTC の構造を正し、翻訳を促進する効果は hypusine 修飾を必要としなかったと考えられた (図 38E)。

hypusine 修飾は eIF5A のリボソーム結合能を向上させることが知られている<sup>(52-54)</sup>。本研究において、低濃度の eIF5A は hypusine 修飾依存的に連続プロリン配列の翻訳を促進したが (図 32)、リボソームと等量の eIF5A は未修飾でも連続プロリン配列の翻訳を促進した (図 33)。これらの結果から、hypusine 修飾の役割を考える場合、リボソーム結合とペプチド転移は分けて考える必要があると示唆された。

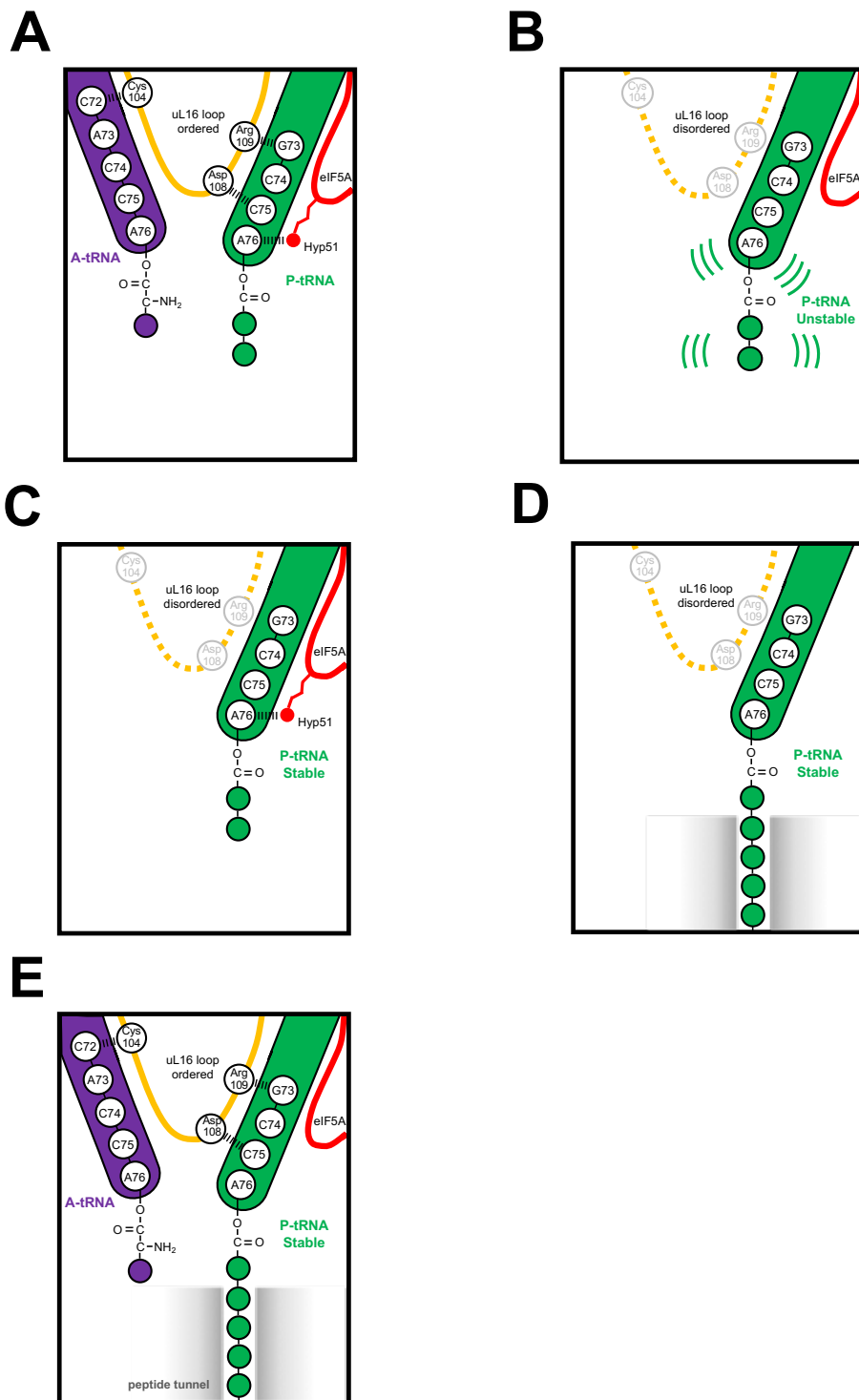


図 38. hypusine 修飾の役割 (Schmidt C. *et al.*, 2016 より改変引用)  
 緑色は P-site ペプチジル tRNA、赤線は eIF5A、赤丸は hypusine 修飾、黄破線はリボソ  
 ーマルタンパク質 uL16、灰色の編掛けはペプチドトンネルを表した。



#### 4.4 未修飾 eIF5A のタンパク質合成における役割

真核細胞の eIF5A は原核細胞の EF-P に存在しない N 末端領域を持つ (図 5E)。この N 末端領域はリボソーマルタンパク質 uL1 や eL42 と相互作用しており<sup>(43)</sup> (図 5C,D, 6A)、L1 ストークとの強い相互作用が示唆された。そして eIF5A が結合したリボソームでは、L1 ストークはクローズドな状態を取ることが報告された<sup>(43)</sup>。また、eIF5A の  $\beta 3$ - $\beta 4$  ループと H74 のヌクレオチド 2806-2808、H93 のヌクレオチド 2963-2968 間の水素結合のネットワークが観察されており<sup>(43)</sup>、PTC の安定化に重要な相互作用だと予想された。

上記のような eIF5A とリボソームの相互作用は hypusine 修飾が関わらないという予想を支持する報告がされている。eIF5A の構造を模倣するドメインを持つタンパク質として、リボソーム生合成に関わる因子 Nmd3 が知られている<sup>(85,86)</sup>。Nmd3 のアミノ酸配列 255 から 401 が eIF5A の構造と類似しており、Nmd3 のアミノ酸配列 289-326 と eIF5A のアミノ酸配列 66-97 は配列類似性も確認された<sup>(85)</sup> (図 39A-C)。Nmd3 は新生 60S リボソーム前駆体の核外搬出に関わる特異的なアダプタータンパク質であり、成熟した PTC の構造を認識することによって新生 60S サブユニットの PTC の成熟化を監視する役割があると考えられている<sup>(85,86)</sup>。最近、TAP (tandem affinity purification) タグが付加された Nmd3 を精製することで得られた Nmd3-60S サブユニット複合体<sup>(86)</sup>と、精製された Nmd3 と 60S サブユニットを *In vitro* で反応させて得られた Nmd3-60S サブユニット複合体<sup>(85)</sup>の Cryo-EM 構造解析が報告された。Nmd3 の eIF5A 様ドメインに含まれるオリゴヌクレオチド結合ドメインは uL1 と eL42 と強く相互作用しており (図 39C)、60S サブユニット生合成の後期における eL42 の組み込みに役割があることが示唆された<sup>(86)</sup>。加えて、Nmd3 が 60S サブユニットに結合している時、L1 ストークのクローズドな状態が観察された<sup>(85)</sup>。また、Nmd3 の eIF5A 様ドメインに含まれる RNA 結合ドメイン II の Arg303 は、ヘリックス H74 の塩基 G2418 やヘリックス H93 の塩基 U2965 とスタッキングが観察された<sup>(86)</sup> (図 39D,E)。注目したい点は、Nmd3 は eIF5A と類似した構造をとる一方、eIF5A の hypusine 修飾とその修飾が含まれる  $\beta 3$ - $\beta 4$  ループは存在しない点である<sup>(85)</sup> (図 39A,B)。hypusine 修飾を含む領域を持たない Nmd3 が、L1 ストークをクローズドな状態にして、H74 や H93 と相互作用することで PTC に影響を与えられるということは、eIF5A の hypusine 修飾以外の領域

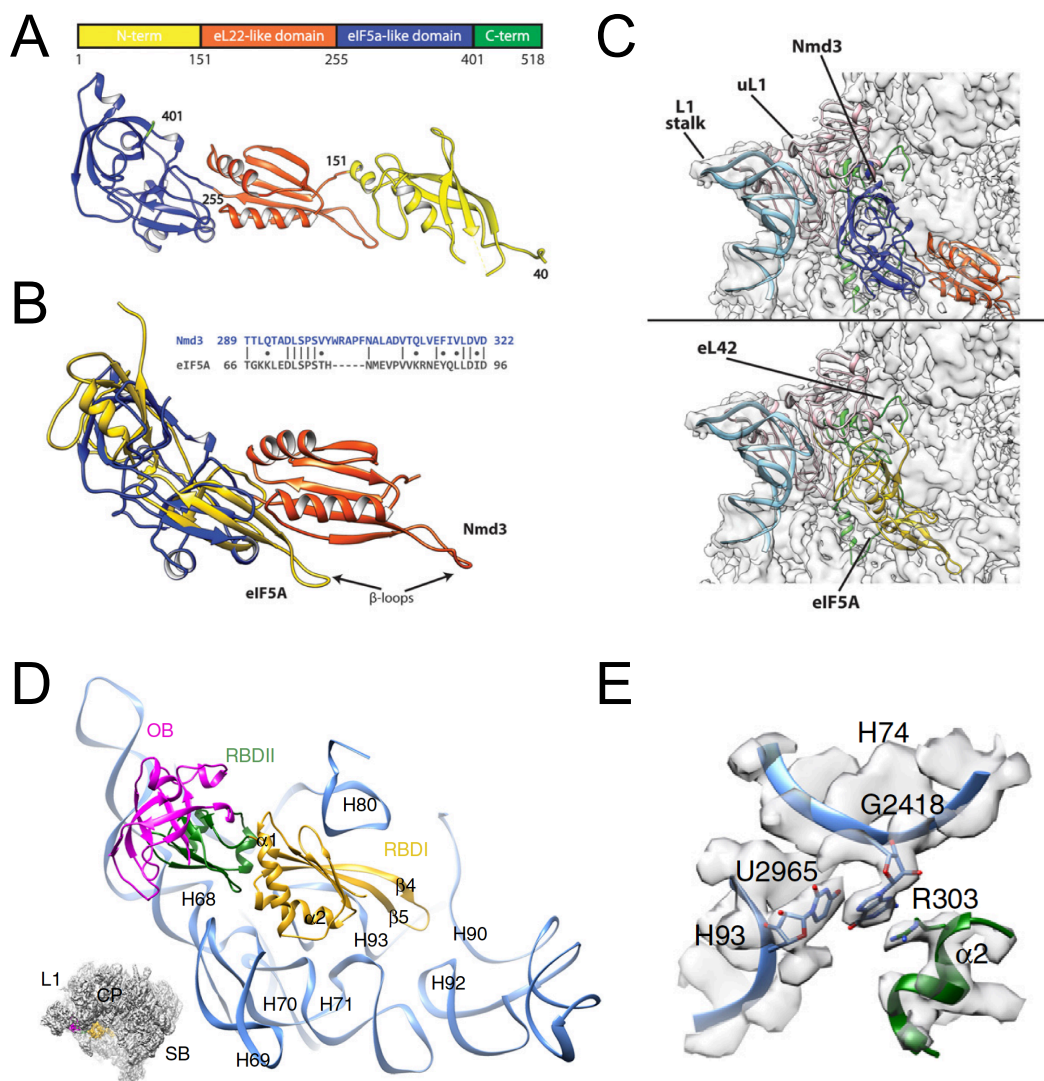


図 39. Nmd3 と eIF5A の構造類似性

A-C は Malyutin A.G. *et al.* (2017) *EMBO J.*より引用

D,E は Ma C. *et al.* (2017) *Nat. Struct. Mol. Boil.*より引用

A 上: Nmd3 のドメイン構造の模式図。A 下: Nmd3 の構造。B 上: Nmd3 と eIF5A のアミノ酸配列類似性。B 下: eIF5A (黄色) と Nmd3 (青は eIF5A 様ドメイン、オレンジは eL22 様ドメイン) の構造比較。C 上: 60S-Nmd3 複合体の Cryo-EM 構造解析の結果。水色は L1 ストック、ピンク色は uL1、緑色は eL42、青色とオレンジ色は Nmd3 を示している。C 下: 60S-eIF5A 複合体の Cryo-EM 構造解析の結果<sup>(43)</sup> (PDB: 5gak)。水色は L1 ストック、ピンク色は uL1、緑色は eL42、黄色は eIF5A を示している。D: 60S サブユニット前駆体と Nmd3 の複合体を左下の図の向きで解析した Cryo-EM 構造の結果。Nmd3 と 25S rRNA の相互作用領域を示している。ピンク色と緑色が eIF5A 様ドメインに相当する。E: ヘリックス H74 や H93 と Nmd3 の R303 との相互作用領域を示している。

には Nmd3 と同様の役割を持つことが示唆された。

これらの知見をまとめると、本研究で観察された未修飾 eIF5A による連続プロリン配列での翻訳停止の解消は、ハイプシン修飾以外の eIF5A の領域とリボソーム間の相互作用が、連続プロリンペプチジル tRNA によって引き起こされる PTC の構造の乱れを防ぐことによって行われたと示唆された。

#### 4.5 原核細胞と真核細胞の連続プロリン配列の翻訳メカニズムの比較

EF-P は、eIF5A には存在しないドメイン III が存在し、ドメイン III と P-site tRNA のアンチコドンシステムが相互作用することによって P-site tRNA の安定化に寄与すると報告されている<sup>(42)</sup>。加えて、EF-P のドメイン I は P-site tRNA のアクセプターシステムと 9 つの水素結合を形成することも報告されている<sup>(43,87)</sup>。一方、eIF5A はドメイン III を持たないため、P-site アンチコドンシステムとの相互作用は形成されない。また、eIF5A と P-site tRNA のアクセプターシステムとの相互作用は、eIF5A の Arg27 と P-site tRNA の G4-C5 の骨格の水素結合だけが報告されている<sup>(43)</sup> (図 6C)。これらの報告から、EF-P は eIF5A と比べて P-site tRNA と強く相互作用することが示唆された。

原核細胞の EF-P と真核細胞の eIF5A は機能ホモログであり、両者の特徴は類似する点が多いと考えられてきた。しかしながら、これまでの報告と本研究の結果を考え合わせると、原核細胞と真核細胞では連続プロリン配列の翻訳停止メカニズムに違いがあり、それを解消する EF-P と eIF5A の作用機序にも違いがあることが示唆された。

まず、原核細胞と真核細胞の連続プロリン配列の翻訳停止メカニズムの違いについて考察する (図 40)。茶谷らは、連続プロリン配列で停止したペプチジル tRNA は Pth 感受性を示さないことを報告しており、原核細胞のリボソームは連続プロリン配列では不安定化しないと考えられる<sup>(78)</sup>。一方、本研究によって、真核細胞のリボソームは連続プロリン配列によって不安定化することが示された。これらの結果から、原核細胞における連続プロリン配列の翻訳停止メカニズムは、連続プロリン領域によって P-site ペプチジル tRNA の配向が乱れることで引き起こされるという以前から提唱されているモデルで説明される。一方、真核細胞における連続プロリン配列の翻訳停止メカニズムは、連続プロリン領域によって PTC の構造が乱れることで引き起こされるという本研究で提唱されたモデルで説明された。まとめると、連続プロリン配列の翻訳停止は、原核細胞では P-site ペプチジル tRNA の配向の乱れが原因であり、真核細胞では PTC の構造の乱れが原因であると考えられた。

次に、上記で述べた原核細胞と真核細胞の連続プロリン配列の翻訳停止メカニズムを踏まえて、EF-P と eIF5A の作用機序について考察する (図 40)。原核細胞では、連続プロリン配列によって配向が乱れた P-site ペプチジル tRNA

## 連続プロリン配列による翻訳停止 翻訳停止の解除

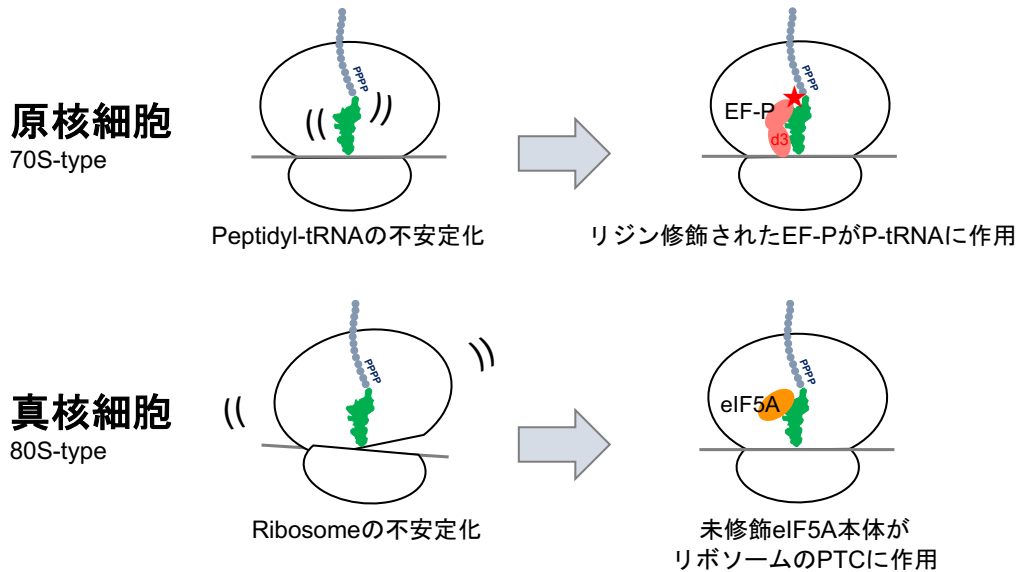


図 40. 原核細胞と真核細胞の連続プロリン配列における翻訳伸長機構のモデル  
上の図は、原核細胞における連続プロリン配列での翻訳停止と、その翻訳停止を解除する EF-P についての作用モデルを示した。原核細胞の 70S リボソームは、連続プロリン配列によってペプチジル tRNA の不安定化が起こり、翻訳停止を引き起こす。不安定化したペプチジル tRNA に対してリジン修飾（赤星印）のされた EF-P が作用し、加えてドメイン III (d3) が P-site ペプチジル tRNA のアンチコドンステムループ (ASL) を安定化させることで翻訳停止が解除される。下の図は、真核細胞における連続プロリン配列での翻訳停止と、その翻訳停止を解除する eIF5A についての作用モデルを示した。真核細胞の 80S リボソームは、連続プロリン配列によってリボソームの PTC の不安定化が起こり、翻訳停止を引き起こす。不安定化した PTC に対して未修飾 eIF5A 本体が作用し、ペプチド結合形成に好ましい PTC の構造に整えることで翻訳停止が解除される。

を EF-P が整え、翻訳停止を解消する。この EF-P の効果は翻訳後修飾であるβ-リジル依存である。一方、真核細胞では、連続プロリン配列によって構造が乱れた PTC を eIF5A が整え、翻訳停止やそれに伴うペプチジル tRNA の脱離を防ぐ。この eIF5A の効果は翻訳後修飾である hypusine 非依存である。このように、原核細胞と真核細胞では連続プロリン配列の翻訳停止メカニズムに違いがあり、EF-P と eIF5A はそれぞれの翻訳停止に特化した作用を獲得したと示唆された。

#### 4.6 eIF5A の翻訳抑制効果

翻訳停止配列挿入なしコンストラクトを翻訳させると、eIF5A (hyp) 非存在下より eIF5A (hyp) 存在下のほうが翻訳量は低いという結果が得られた (図 27AB)。加えて、翻訳産物をゲル写真で解析すると、eIF5A (hyp) 存在下ではフレームシフト産物と考えられるスメアバンドが観察された (図 32、33)。このような、eIF5A の翻訳に対する阻害効果は、CrPV IRES の開始反応におけるトランスロケーションを、E-site に結合する eIF5A が阻害的に作用したことが主な原因と考えられる。

E-site を CrPV IRES と eIF5A が競合した結果、CrPV IRES 依存の翻訳開始は起こるがフレームシフトするリボソームや、CrPV IRES 非依存のインターナルな翻訳開始をランダムなフレームで起こすリボソームが現れたと考えられる。一分子蛍光共鳴エネルギー移動 (smFRET) を利用した CrPV IRES の翻訳開始の解析から、0 frame で翻訳開始する主要経路以外に、+1 frame で翻訳開始する第二経路の存在が報告されている<sup>(94)</sup>。また、最初の CrPV IRES のトランスロケーションのあと、自発的にリバーストランスロケーションが起こることも示唆された<sup>(94)</sup>。実際に CrPV IRES 依存の翻訳初期伸長過程の速度論解析から、テトラペプチドまではペプチジル tRNA のトランスロケーションは遅いことが報告されており<sup>(95)</sup>、CrPV IRES がリボソームと相互作用している間はトランスロケーションが起こりと言える。この時、eIF5A が E-site に結合していると、CrPV IRES の翻訳開始は妨げられ、翻訳量の低下が観察されたと示唆された。しかしながら、観察されたスメアバンドは CrPV IRES の開始点のずれでは説明できない。本研究で用いたコンストラクトでは、+1 frame で CrPV IRES の開始が起きた場合、23 コドン目で終止コドンが現れ 2.7 kDa のペプチドが合

成され、-1 frame で CrPV IRES の開始が起きた場合、33 コドン目で終止コドンが現れ 3.5 kDa のペプチドが合成されるからである。従って、eIF5A の添加によって CrPV IRES の翻訳開始が阻害されたことで、IRES 非依存の internal な翻訳開始が上昇したことが予想された。hypusine 修飾のされた eIF5A は不安定な P-site tRNA を支える効果があると考えられ、internal に結合したリボソームの P-site にアミノアシル tRNA が安定して存在できるようになり、翻訳開始が起こったと予想される。

また、解析した本研究で用いたコンストラクトには eIF5A によって翻訳抑制を受ける配列が存在していた可能性もある。近年、SKE, SNE, SPE, SRE に代表される SXE というアミノ酸配列モチーフを含むタンパク質は、eIF5A 存在下で翻訳量が低下すると報告された<sup>(13)</sup>。上記のような eIF5A の翻訳抑制効果が、フレームシフト産物として検出されたと考えられた。今後の研究によって、eIF5A の翻訳抑制の作用機序や、eIF5A によって発現抑制を受ける遺伝子の同定が待たれる。

#### 4.7 eIF5A および hypusine 修飾に関する今後の課題

本研究では、連続プロリン配列依存の翻訳抑制は hypusine 修飾非依存的に未修飾 eIF5A によって解消される結果を得た。この結果は酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系の翻訳条件における限定的な現象である可能性や、本研究で用いた mRNA 配列限定的な現象である可能性は排除できない。本研究の翻訳条件と細胞内の条件に、どれほどの差異があるかを実験的に測定することは困難だと予想される。Mg<sup>2+</sup>やポリアミンの濃度について限定しても、細胞内において Mg<sup>2+</sup>やポリアミンは様々な因子と結合しており、細胞内での実効濃度を知ることは困難だと考えられる。また本研究ではプロリン 4 連続配列を解析に用いたが、真核細胞は 10 連続以上のプロリン配列を含むタンパク質合成も行われており<sup>(80)</sup>、強い翻訳抑制を解除するために hypusine 修飾が必須である可能性がある。従って、eIF5A および hypusine 修飾の役割を理解するためには、さらなる解析が必要である。

1 つ目の課題は、eIF5A がリボソームに作用する条件やタイミングの解明である。eIF5A は翻訳伸長から終結まで幅広く働く因子であること<sup>(13,16,42)</sup>や、eIF5A が作用する配列モチーフは多数同定されていること<sup>(13,16)</sup>から、eIF5A は頻繁にリボソームと相互作用することが示唆される。しかしながら、eIF5A は翻訳伸長の毎サイクルにおいて E-site に結合するのか、または特定の状態をとったリボソームに結合するのかについては不明なままである。本研究では、連続プロリン配列は IRD 現象を引き起こし eIF5A によって翻訳促進されたが、連続トリプトファン配列は IRD 現象を引き起こさず eIF5A によって翻訳促進されなかった。この 2 つの翻訳停止配列は、リボソームの PTC やペプチドトンネルに干渉することで翻訳停止すると予想されるが、それぞれの配列で停止したリボソームや新生ポリペプチドの構造はよくわかっていない。連続プロリン配列と連続トリプトファン配列で停止したリボソームの構造の違いが明らかになると、eIF5A が作用するリボソームの構造が解明されると予想される。今後の生化学解析や構造解析によって、eIF5A が認識するリボソームの特徴やタイミングの解明が待たれる。

2 つ目の課題は、hypusine 修飾依存的に発現制御される遺伝子の同定と、その発現制御機構の解明である。酵母のプロテオーム解析によると、少なくとも 1 つの 3 連続プロリンモチーフを含むタンパク質は 5886 個中 549 個存在する



と報告されている<sup>(45)</sup>。しかしながら本研究では、4連続プロリン配列の翻訳は hypusine 修飾非依存的に未修飾 eIF5A が促進することが示され、上記の 549 タンパク質の翻訳において hypusine 修飾は不要であると示唆された。従って、細胞内では hypusine 修飾依存的に発現制御される遺伝子の存在が予想される。バクテリアでは 4 章 2 節で述べたように、マグネシウムトランスポーター MgtA の発現制御は、MgtA の上流に存在する MgtL の翻訳によって制御を受けることが報告されている<sup>(78,81)</sup>。真核生物では多くの遺伝子が upstream open reading frame (uORF) を持つことが知られている。従って、uORF の翻訳制御を hypusine 修飾された eIF5A が行うことで、発現制御を受ける遺伝子が存在することを期待した。eIF5A によって発現制御される遺伝子の候補として、酵母のマグネシウムトランスポーター Alr1 や、ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構 (Nonsense-mediated mRNA decay, NMD) に機能を持つ因子が考えられた。Alr1 については、Mg<sup>2+</sup>濃度を翻訳系が感知することで発現制御するというバクテリアと類似した機構が存在することが予想されたからである。NMD 関連因子については、eIF5A をノックダウンした時に発現量が増加する mRNA と、NMD に機能を持つ因子 Upf1 をノックダウンした時に減少する mRNA が類似すると報告されており<sup>(83)</sup>、eIF5A が NMD 関連因子の発現調節に関連することが示唆されたからである。実際に、NMD 関連因子である Upf2 は ORF 中に 40 アミノ酸以上のアスパラギン酸グルタミン酸の連続配列が存在している。アスパラギン酸連続配列は eIF5A によって翻訳促進が行われることを Schuller A.P.らが報告している<sup>(16)</sup>。

3 つ目の課題は、hypusine 修飾の翻訳以外の機能解析である。哺乳類細胞を用いた実験によって、eIF5A は核と細胞質を行き来するタンパク質として報告されている<sup>(83,84)</sup>。興味深いことに、DHS と DOHH をノックダウンすると eIF5A は核に蓄積し、hypusine 修飾のされるリジンがアルギニンに置換した eIF5A (K50R, 哺乳類では K50 に hypusine 修飾が付加される) も核に蓄積することが示された<sup>(83)</sup>。加えて eIF5A は、hypusine 修飾とは相互排他的に 47 番目のリジンがアセチル化されることが示されており、アセチル化された eIF5A が核に蓄積すると考えられている<sup>(83)</sup>。また eIF5A の核外輸送を行うエクスポーチンは Xpo4 であることが報告され、Xpo4 と hypusine 修飾は相互作用に重要だと示唆された<sup>(84)</sup>。これらの結果は、eIF5A の局在制御に hypusine が重要な働きを持つことを示唆しており、翻訳以外の機能の候補と考えられる。さらに、

eIF5A の核内での機能はよくわかっていないが、eIF5A と構造がよく似ている Nmd3 はリボソーム 60S サブユニットの成熟過程で働くことが知られており<sup>(85)</sup>、eIF5A もリボソームの生合成に対して機能を持つことも予想される。

hypusine 修飾が生育に必須である理由は様々な可能性が考えられるが、翻訳停止配列の翻訳促進に対する寄与が大きいと考えられてきた。しかしながら本研究では、4連続プロリン配列の翻訳促進に hypusine 修飾は不要であることが示された。この知見により、hypusine 修飾が必要となるような発現制御を受ける遺伝子の同定や、翻訳以外での eIF5A の機能解析を進めることの重要性を示されたのではないだろうか。

#### 4.8 酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系の応用

精製された酵母の因子を用いて、酵素活性を有するタンパク質全長を合成した報告はこれまでになく、酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系は新規の *In vitro* 翻訳系である。これまでに報告されている酵母細胞抽出液翻訳系にくらべて夾雑物が少ないため、真核生物の翻訳伸長過程の解析に有用であると考えられた。酵母は液胞を持つため、液胞内に含まれるプロテアーゼやヌクレアーゼから解析対象や目的産物をいかに守るかが課題であった。この点を克服するために、酵母の破碎方法や因子の精製方法の改良を重ね、プロテアーゼやヌクレアーゼの混入が可能な限り少ない翻訳系の確立を行った。これにより、0.5  $\mu\text{M}$  の mRNA を利用しても再現性のよい結果が得られる翻訳系が確立された。

本研究では反応系が煩雑にならないように、開始因子非依存で翻訳が開始される CrPV IGR IRES を利用した。加えて、転写や tRNA のアミノアシル化も反応系から分離することで、最小限の因子による翻訳伸長反応で酵素活性を有するタンパク質全長の合成に成功した。構築された翻訳系は、以前から翻訳伸長過程の解析で用いられてきた poly(U) mRNA 依存ポリフェニルアラニン合成系と比べると、コドンやアミノ酸配列依存の翻訳伸長現象が解析可能になった。また *In vitro* オリゴペプチド合成系と比べると、長いポリペプチドが合成可能なため、翻訳開始複合体の影響を受けることがなく、リボソームのペプチドトンネルと新生ポリペプチド鎖がよく相互作用する条件で翻訳伸長を解析できるようになった。上記の特徴のおかげで、真核細胞での連続プロリン配列依存の翻訳停止と eIF5A の機能について作用機序の新たなモデルを提唱することができた

と考えられる。本研究で構築された翻訳系を用いれば、連続プロリン配列以外の翻訳停止機構<sup>(9,89)</sup>の解析やフレームシフト<sup>(90,91,92)</sup>の評価、リボソームと相互作用するシャペロンの翻訳伸長に対する機能解析<sup>(9,21,22,89,90,91)</sup>、翻訳伸長反応と密接に関わる mRNA や新生ポリペプチド鎖の品質管理機構<sup>(25,32-38)</sup>の解析にも応用できることが期待される。翻訳中のリボソームについて Cryo-EM を用いた構造解析を行う場合、細胞抽出液から精製した翻訳中のリボソーム複合体よりも、酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系に含まれるリボソーム複合体の方が夾雑物は少なく、解像度のよい結果が得られることが期待される。再構成された系であるため、ボトムアップな実験デザインが可能であり、例えば新生ポリペプチドの品質管理機構が働くリボソームの中間体を得て Cryo-EM によるスナップショットを得ることも可能だと考えられる。

真核細胞の再構成型生体外タンパク質合成系は、本研究で構築された酵母由来の翻訳系以外に、ヒト由来の翻訳系が報告されている<sup>(59)</sup>。両者を比較した時、酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系の方が、準備にかかる費用が抑えられ比較的容易に調製可能な点と、これまでに報告されている遺伝学的知見を利用して実験系を組み立てられる点で差別化を図れると考えている。創薬の領域では、ヒト由来と酵母由来の再構成型生体外タンパク質合成系を利用することで、ヒトの翻訳系には作用しない抗真菌薬の開発に応用できることが期待でき、両者の再構成型生体外タンパク質合成系が共に発展していくことを期待する。

## 5. 参考文献

1. Hinnebusch, A.G., and Lorsch, J.R. (2012). The mechanism of eukaryotic translation initiation: new insights and challenges. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *4*, 4.
2. Dever, T.E., and Green, R. (2012). The elongation, termination, and recycling phases of translation in eukaryotes. *Cold Spring Harb. Perspec. Biol.* *4*, a013706.
3. Achenbach, J., Nierhaus, K.H. (2015). The mechanics of ribosomal translocation. *Biochimie.* *114*, 80-89.
4. Triana-Alonso, F.J., Chakraborty, K., Nierhaus, K.H. (1995). The elongation factor 3 unique in higher fungi and essential for protein biosynthesis is an E site factor. *J. Biol. Chem.* *270*, 20473-20478.
5. Andersen, C.B., Becker, T., Blau, M., Anand, M., Halic, M., Balar, B., Mielke, T., Boesen, T., Pedersen, J.S., Spahn, C.M., Kinzy, T.G., Andersen, G.R., Beckmann, R. (2006). Structure of eEF3 and the mechanism of transfer RNA release from the E site. *Nature* *443*, 663-668.
6. Koutmou, K.S., Schuller, A.P., Brunelle, J.L., Radhakrishnan, A., Djuranovic, S., Green, R. (2015). Ribosomes slide on lysine-encoding homopolymeric A stretches. *eLife* *4*, 4.
7. Harashima, S.I., Kuroha, H., Tatematsu, T., Inada, T. (2007). Translation of the poly(A) tail plays crucial roles in nonstop mRNA surveillance via translation repression and protein destabilization by proteasome in yeast. *Genes Dev.* *21*, 519-24.
8. Matsuda, R., Ikeuchi, K., Nomura, S., Inada, T. (2014). Protein quality control systems associated with no-go and nonstop mRNA surveillance in yeast. *Genes Cells.* *19*, 1-12.
9. Chiabudini, M., Tais, A., Zhang, Y., Hayashi, S., Wolfle, T., Fitzke, E., Rospert, S. (2014). Release factor eRF3 mediates premature translation termination on polylysine-stalled ribosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Boil.* *34*, 4062-76.
10. Doerfel, L.K., Wohlgemuth, I., Kothe, C., Peske, F., Urlaub, H., Rodnina,

- M.V. (2013). EF-P is essential for rapid synthesis of proteins containing consecutive proline residues. *Science* *339*, 85-88.
11. Ude, S., Lassak, J., Starosta, A.L., Kraxenberger, T., Wilson, D.N., Jung, K., (2013). Translation elongation factor EF-P alleviates ribosome stalling at polyproline stretches. *Science* *339*, 82-85.
  12. Huter, P., Arenz, S., Bock, L.V., Graf, M., Frister, J.O., Heuer, A., Peil, L., Starosta, A.L., Wohlgemuth, I., Peske, F., Novacek, J., Berninghausen, O., Grubmuller, H., Tenson, T., Beckmann, R., Rodnina, M.V., Vaiana, A.C., Wilson, D.N. (2017). Structural Basis for Polyproline-Mediated Ribosome Stalling and Rescue by the Translation Elongation Factor EF-P. *Mol. Cell* *68*, 515-527.
  13. Pelechano, V., Alepuz, P., (2017). eIF5A facilitates translation termination globally and promotes the elongation of many non polyproline-specific tripeptide sequences. *Nucleic Acids Res.* *45*, 7326-7338.
  14. Shin, B.S., Katoh, T., Gutierrez, E., Kim, J.R., Suga, H., Dever, T.E. (2017). Amino acid substrates impose polyamine, eIF5A, or hypusine requirement for peptide synthesis. *Nucleic Acids Res.* *45*, 8392-8402.
  15. Gutierrez, E., Shin, B.S., Woolstenhulme, C.J. Kim, J.R., Saini, P., Buskirk, A.R., Dever, T.E. (2013). eIF5A promotes translation of polyproline motifs. *Mol. Cell* *51*, 35-45.
  16. Schuller, A.P., Wu, C.C., Dever, T.E., Buskirk, A.R., Green, R. (2017). eIF5A Functions Globally in Translation Elongation and Termination. *Mol. Cell* *66*, 194-205.
  17. Letzring, D.P., Dean, K.M., Grayhack, E.J. (2010). Control of translation efficiency in yeast by codon-anticodon interactions. *RNA* *16*, 2516-2528
  18. Gamble, C.E., Brule, C.E., Dean, K.M., Fields, S., Grayhack, E.J. (2016). Adjacent Codons Act in Concert to Modulate Translation Efficiency in Yeast. *Cell* *166*, 679-690.
  19. Dimitrova, L.N., Kuroha, K., Tatematsu, T., Inada, T. (2009). Nascent peptide-dependent translation arrest leads to Not4p-mediated protein degradation by the proteasome. *J. Biol. Chem.* *284*, 10343-10352.
  20. Lakkaraju, A.K., Mary, C., Scherrer, A., Johnson, A.E., Strub, K. (2008). SRP keeps polypeptides translocation-competent by slowing translation to

- match limiting ER-targeting site. *Cell* *133*, 440-451.
21. Zhang, Y., Berndt, U., Golz, H., Tais, A., Oellerer, S., Wolfle, T., Fitzke, E., Rospert, S. (2012). NAC functions as a modulator of SRP during the early steps of protein targeting to the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* *23*, 3027-3040.
  22. Zhang, Y., Wolfle, t., Rospert, S. (2013). Interaction of nascent chains with the ribosomal tunnel proteins Rpl4, Rpl17, and Rpl39 of *S. cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *288*, 33697-33707.
  23. Presnyak, V., Alhusaini, N., Chen, Y.H., Martin, S., Morris, N., Kline, N., Olson, S., Weinberg, D., Baker, K.E., Graveley, B.R., Collier, J. (2015). Codon optimality is a major determinant of mRNA stability. *Cell* *160*, 1111-1124.
  24. Radhakrishnan, A., Chen, Y.H., Martin, S., Alhusaini, N., Green, R., Collier, J. (2016). The DEAD-Box Protein Dhh1p Couples mRNA Decay and Translation by Monitoring Codon Optimality. *Cell* *167*, 122-132.
  25. Matsuo, Y., Ikeuchi, K., Saeki, Y., Iwaki, S., Schmidt, C., Udagawa, T., Sato, F., Tsuchiya, H., Becker, T., Tanaka, K., Ingolia, N.T., Beckmann, R., Inada, T. (2017). Ubiquitination of stalled ribosome triggers ribosome-associated quality control. *Nat. Commun.* *8*, 159.
  26. Shoemaker, C.J., Eyler, D.E., Green, R. (2010). Dom34:Hbs1 promotes subunit dissociation and peptidyl-tRNA drop-off to initiate no-go decay. *Science* *330*, 369-372.
  27. Tsuboi, T., Kuroha, K., Kudo, K., Makino, S., Inoue, E., Kashima, I., Inada, T. (2012). Dom34:hbs1 plays a general role in quality-control systems by dissociation of a stalled ribosome at the 3' end of aberrant mRNA. *Mol. Cell* *46*, 518-29.
  28. Shoemaker, C.J., Green, R. (2011) Kinetic analysis reveals the ordered coupling of translation termination and ribosome recycling in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 1392-1398.
  29. Pisareva, V.P., SkaBkin, M.A., Hellen, C.U., Pestova, T.V., Pisarev, A.V. (2011). Dissociation by Pelota, Hbs1 and ABCE1 of mammalian vacant 80S ribosomes and stalled elongation complexes. *EMBO J.* *30*, 1804-1817.
  30. Inada, T., Aiba, H. (2005). Translation of aberrant mRNAs lacking a

- termination codon or with a shortened 3'-UTR is repressed after initiation in yeast. *EMBO J.* *24*, 1584-1595.
31. van Hoff, A., Frischmeyer, P.A., Dietz, H.C., Parker, R. (2002). Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science* *295*, 2262-2264.
  32. Brandman, O., Stewart-Ornstein, J., Wong, D., Larson, A., Williams, C.C., Li, G.W., Zhou, S., King, D., Shen, P.S., Weibezahn, J., Dunn, J.G., Rouskin, S., Inada, T., Frost, A., Weissman, J.S. (2012). A ribosome-bound quality control complex triggers degradation of nascent peptides and signals translation stress. *Cell* *151*, 1042-1054.
  33. Shen, P.S., Park, J., Qin, Y., Li, X., Parsawar, K., Larson, M.H., Cox, J., Cheng, Y., Lambowitz, A.M., Weissman, J.S., Brandman, O., Frost, A. (2015). Protein synthesis. Rqc2p and 60S ribosomal subunits mediate mRNA-independent elongation of nascent chains. *Science* *347*, 75-78.
  34. Choe, Y.J., Park, S.H., Hassemer, T., Korner, R., Vincenz-Donnelly, L., Hayer-Hartl, M., Hartl, F.U. (2016). Failure of RQC machinery causes protein aggregation and proteotoxic stress. *Nature* *531*, 191-195.
  35. Kostova, K.K., Hickey, K.L., Osuna, B.A., Hussmann, J.A., Frost, A., Weinberg, D.E., Weissman, J.S. (2017). CAT-tailing as a fail-safe mechanism for efficient degradation of stalled nascent polypeptides. *Science* *357*, 414-417.
  36. Sundaramoorthy, E., Leonard, M., Mak, R., Liao, J., Fulzele, A., Bennett, E.J. (2017). ZNF598 and RACK1 Regulate Mammalian Ribosome-Associated Quality Control Function by Mediating Regulatory 40S Ribosomal Ubiquitylation. *Mol. Cell* *65*, 751-760.
  37. Juskiewicz, S., Hegde, R.S. (2017). Initiation of Quality Control during Poly(A) Translation Requires Site-Specific Ribosome Ubiquitination. *Mol. Cell* *65*, 743-750.
  38. Simms, C.L., Yan, L.L., Zaher, H.S. (2017). Ribosome Collision Is Critical for Quality Control during No-Go Decay. *Mol. Cell* *68*, 361-373.
  39. Kemper, W.M., Berry, K.W., Merrick, W.C. (1976). Purification and properties of rabbit reticulocyte protein synthesis initiation factors M2Bplpha and M2Bbeta. *J. Biol. Chem.* *251*, 5551-5557.

40. Schreier, M.H., Erni, B., Staehelin, T. (1977). Initiation of mammalian protein synthesis. I. Purification and characterization of seven initiation factors. *J. Biol. Chem.* *116*, 727-753.
41. Benne, R., Hershey, J.W. (1978). The mechanism of action of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes. *J. Biol. Chem.* *253*, 3078-3087.
42. Saini, P., Eyler, D.E., Green, R., Dever, T.E. (2009). Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. *Nature* *459*, 118-121.
43. Schmidt, C., Becker, T., Heuer, A., Braunger, K., Shanmuganathan, V., Pech, M., Berninghausen, O., Wilsonm D.N., Beckmann, R. (2016). Structure of the hypusinylated eukaryotic translation factor eIF-5A bound to the ribosome. *Nucleic Acids Res.* *44*, 1944-1951.
44. Melnikov, S., Mailliot, J., Shin, B.S., Rigger, L., Yusupova, G., Micura, R., Dever, T.E., Yusupov, M. (2016). Crystal Structure of Hypusine-Containing Translation Factor eIF5A Bound to a Rotated Eukaryotic Ribosome. *J. Mol. Biol.* *428*, 3570-3576.
45. Dever, T.E., Gutierrez, E., Shin, B.S. (2014). The hypusine-containing translation factor eIF5A. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Boil.* *49*, 413-425
46. Park, M.H., Nishimura, K., Zanelli, C.F., Valentini, S.R. (2010). Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes. *Amino Acids* *38*, 491-500.
47. Wolff, E.C., Kang, K.R., Kim, Y.S., Park, M.H. (2007). Posttranslational synthesis of hypusine: evolutionary progression and specificity of the hypusine modification. *Amino Acids* *33*, 341-50.
48. Magdolen, V., Klier, H., Wohl, T., Klink, F., Hirt, H., Hauber, J., Lottspeich, F. (1994). The function of the hypusine-containing proteins of yeast and other eukaryotes is well conserved. *Mol. Gen. Genet.* *244*, 646-52.
49. Schnier, J., Schwelberger, H.G., Smit-McBride, Z., Kang, H.A., Hershey, J.W. (1991). Translation initiation factor 5A and its hypusine modification are essential for cell viability in the yeast *saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* *11*, 3105-3114.
50. Park, M.H., Joe, Y.A., Kang, K.R. (1998). Deoxyhypusine synthase activity is essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol.*



- Chem. *273*, 1677-1683.
51. Sasaki, K., Abid, M.R., Miyazaki, M. (1996). Deoxyhypusine synthase gene is essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* *384*, 151-154.
  52. Jao, D.L., Chen, K.Y. (2006). Tandem affinity purification revealed the hypusine-dependent binding of eukaryotic initiation factor 5A to the translating 80S ribosomal complex. *J. Cell Biochem.* *97*, 583-598.
  53. Zanelli, C.F., Maragno, A.L., Gregio, A.P., Komili, S., Pandolfi, J.R., Mestriner, C.A., Lustri, W.R., Valentini, S.R. (2006). eIF5A binds to translational machinery components and affects translation in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *348*, 1358-1366.
  54. Barbosa, N.M., Boldrin P.E., Rossi, D., Yamamoto, P.A., Watanabe, T.F., Serrao, V.H., Hershey, J.W., Fraser, C.S., Valentini, S.R., Zanelli, C.F. (2016) Mapping surface residues of eIF5A that are important for binding to the ribosome using alanine scanning mutagenesis. *Amino Acids* *48*, 2363-2374.
  55. Park, M.H. (1989). The essential role of hypusine in eukaryotic translation initiation factor 4D (eIF-4D). Purification of eIF-4D and its precursors and comparison of their activities. *J. Biol. Chem.* *264*, 18531-18535.
  56. Park, M.H., Wolff, E.C., Wmit-McBride, Z., Hershey, J.W., Folk, J.E. (1991) Comparison of the activities of variant forms of eIF-4D. The requirement for hypusine or deoxyhypusine. *J. Biol. Chem.* *266*, 7988-7994.
  57. Shimizu, Y., Inoue, A., Tomari, Y., Suzuki, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K., Ueda, T. (2001). Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nat. Biotechnol.* *19*, 751-755.
  58. Shimizu, Y., Kanamori, T., Ueda, T. (2005). Protein synthesis by pure translation systems. *Methods* *36*, 299-304.
  59. Machida, K., Mikami, S., Masutani, M., Mishima, K., Kobayashi, T., Imataka, H. (2014). A translation system reconstituted with human factors proves that processing of encephalomyocarditis virus proteins 2A and 2B occurs in the elongation phase of translation without eukaryotic release factors. *J. Biol. Chem.* *289*, 31960-71.
  60. Abeyrathne, P.D., Koh, C.S., Grant, T., Grigorieff, N., Korostelev, A.A.

- (2016). Ensemble cryo-EM uncovers inchworm-like translocation of a viral IRES through the ribosome. *eLife* *5*, e14874.
61. Murray, J., Savva, C.G., Shin, B.S., Dever, T.E., Ramakrishnan, V., Fernandez, I.S. (2016). Structural characterization of ribosome recruitment and translocation by type IV IRES. *eLife* *5*, e13567.
62. Zhang, H., Ng, M.Y., Chen, Y., Cooperman, B.S. (2016). Kinetics of initiating polypeptide elongation in an IRES-dependent system. *eLife* *5*, e13429.
63. Hodgman C.E., Jewett, M.C. (2014). Characterizing IGR IRES-mediated translation initiation for use in yeast cell-free protein synthesis. *N. Biotechnol.* *31*, 499-505.
64. Hetrick, B., Khada, P.K., Lee, K., Stephen, J., Thomas, A., Joseph, S. (2010). Polyamines accelerate codon recognition by transfer RNAs on the ribosome. *Biochemistry* *49*, 7179-89.
65. Eyler, D.E., Wehner, K.A., Green, R. (2013). Eukaryotic release factor 3 is required for multiple turnovers of peptide release catalysis by eukaryotic release factor 1. *J. Biol. Chem.* *288*, 29530-29538.
66. Shoemaker, C.K., Green, R. (2011). Kinetic analysis reveals the ordered coupling of translation termination and ribosome recycling in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 1392-8.
67. Schultz, M.C. (1999). Chromatin assembly in yeast cell-free extracts. *Methods* *17*, 161-172.
68. Mohammad-Qureshi, S.S., Haddad, R., Palmer, K.S., Richardson, J.P., Gomez, E., Pavitt, G.D. (2007). Purification of FLAG-tagged eukaryotic initiation factor 2B complexes, subcomplexes, and fragments from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* *431*, 1-13.
69. Goode, B.L. (2002). Purification of yeast actin and actin-associated proteins. *Methods Enzymol.* *351*, 433-441.
70. Leshin, J.A., Rakauskaitė, R., Dinman, J.D., Meskauskas, A. (2010). Enhanced purity, activity and structural integrity of yeast ribosomes purified using a general chromatographic method. *RNA Biol.* *7*, 354-360.
71. Munoz, A.M., Yourik, P., Rajagopal, V., Nanda, J.S., Lorsch, J.R., Walker, S.E. (2017). Active yeast ribosome preparation using monolithic anion

- exchange chromatography. *RNA Biol.* *14*, 188-196.
72. Algire, M.A., Maag, D., Savio, P., Acker, M.G., Tarun, S.Z. Jr., Sachs, A.B., Asano, K., Nielsen, K.H., Olsen, D.S., Phan, L., Hinnebusch, A.G., Lorsch, J.R. (2002). Development and characterization of a reconstituted yeast translation initiation system. *RNA* *8*, 382-397.
73. Eyler, D.E., Green, R. (2011). Distinct response of yeast ribosomes to a miscoding event during translation. *RNA* *17*, 925-932.
74. Shin, B.S., Dever, T.E. (2007). Molecular genetic structure-function analysis of translation initiation factor eIF5B. *Methods Enzymol.* *429*, 185-201.
75. Zubay, G. (1962). The Isolation and Fractionation of soluble ribonucleic acid. *J. Mol. Biol.* *4*, 347-356.
76. Jorgensen, R., Carr-Schmid, A., Ortiz, P.A., Kinzy, T.G., Andersen, G.R. (2002). Purification and crystallization of the yeast elongation factor eEF2. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* *58*, 712-715.
77. Demeshkina, N., Hirokawa, G., Kaji, A., Kaji, H. (2007). Novel activity of eukaryotic translocase, eEF2: dissociation of the 80S ribosome into subunits with ATP but not with GTP. *Nucleic Acids Res.* *35*, 4597-4607.
78. Chadani, Y., Niwa, T., Izumi, T., Sugata, N., Nagao, A., Suzuki, T., Shiba, S., Ito, K., Taguchi, H. (2017). Intrinsic Ribosome Destabilization Underlies Translation and Provides an Organism with a Strategy of Environmental Sensing. *Mol. Cell* *68*, 528-539.
79. Anand, M., Balar, B., Ulloque, R., Gross, S.R., Kinzy, T.G. (2006). Domain and nucleotide dependence of the interaction between *saccharomyces cerevisiae* translation elongation factors 3 and 1A. *J. Biol. Chem.* *281*, 32318-32326.
80. Munoz-Soriano, M., Doming-Muelas, A., Li, T., Gamero, E., Bizy, A., Farinas, I., Alepuz, P., Paricio, N. (2017). Evolutionary conserved role of eukaryotic translation factor eIF5A in the regulation of actin-nucleating formins. *Sci. Rep.* *7*, 9580.
81. Park, S.Y., Cromie, M.J., Lee, E.J, Groisman, E.A. (2010). A bacterial mRNA leader that employs different mechanisms to sense disparate intracellular signals. *Cell* *142*, 737-748.

82. Hoque, M., Park, J.Y., Chang, Y.J., Luchessi, A.D., Cambiaghi, T.D., Shamanna, R., Hanauske-Abel, H.M., Holland, B, Pe'ery, T., Tian, B., Mathews, M.B. (2017). Regulation of gene expression by translation factor eIF5A: Hypusine-modified eIF5A enhances nonsense-mediated mRNA decay in human cells. *Translation (Austin)* 5, e1366294.
83. Ishfaq, M., Maeta, K., Maeda, S., Natsume, T., Ito, A., Yoshida, M. (2012). Acetylation regulates subcellular localization of eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A). *FEBS Lett.* 586, 3236-3241.
84. Aksu, M., Trakhanov, S., Gorlich, D. (2016). Structure of the exportin Xpo4 in complex with RanGTP and the hypusine-containing translation factor eIF5A. *Nat. Commun.* 7, 11952.
85. Malyutin, A.G., Musalgaonkar, S., Patchett, S., Frank, J., Johnson, A.W. (2017). Nmd3 is a structural mimic of eIF5A, and activates the cpGTPase Lsg1 during 60S ribosome biogenesis. *EMBO J.* 36, 854-868.
86. Ma, C., Wu, S., Li, N., Chen, Y., Yan, K., Li, Z., Zheng, L., Lei, J., Woolford, J.L. Jr., Gao, N. (2017). Structural snapshot of cytoplasmic pre-60S ribosomal particles bound by Nmd3, Lsg1, Tif6 and Reh1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24, 214-220.
87. Blaha, G., Stanley, R.E., Steitz, T.A. (2009). Formation of the First Peptide Bond: The Structure of EF-P Bound to the 70S Ribosome. *Science* 325, 966-970.
88. Quigley, G.J., Teeter, M.M., Rich, A. (1978). Structural analysis of spermine and magnesium ion binding to yeast phenylalanine transfer RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 64-68.
89. Chiabudini, M., Conz, C., Reckmann, F., Rospert, Sabine. (2012). Ribosome-associated complex and Ssb are required for translational repression induced by polylysine segments within nascent chains. *Mol. Cell Biol.* 32, 4769-4779.
90. Muldoon-Jacobs, K.L., Dinman, J.D. (2006). Specific effects of ribosome-tethered molecular chaperones on programmed -1 ribosomal frameshifting. *Eukaryot. Cell* 5, 762-770.
91. Lee, K., Sharma, R., Shrestha, O.K., Bingman, C.A., Craig, E.A. (2016). Dual interaction of the Hsp70 J-protein cochaperone Zuo1 with the 40S

- and 60S ribosomal subunits. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *23*, 1003-1010.
- 92.Ortiz, P.A., Ulloque, R., Kihara, G.K., Zheng, H., Kinzy, T.G. (2006). Translation elongation factor 2 anticodon mimicry domain mutants affect fidelity and diphtheria toxin resistance. *J. Biol. Chem.* *281*, 32639-32648.
- 93.Merrick, W.C. (1979). Purification of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes. *Methods Enzymol.* *60*, 101-108.
- 94.Petrov, A., Grosely, R., Chen, J., O'Leary, S.E., Puglisi, J.D. (2016). Multiple parallel pathways of translation initiation on the CrPV IRES. *Mol. Cell* *62*, 92-103.
- 95.Zhang, H., Ng, M.Y., Chen, Y., Cooperman, B.S. (2016). Kinetics of initiating polypeptide elongation in an IRES-dependent system. *eLife* *2*, e13429.

## 6. 謝辞

本研究を支えてくださった先生方に、厚く御礼申し上げます。

ペンシルバニア大学教授の梶昭先生、ならびに梶日出子先生には貴重な実験材料である **eEF2** 発現株、**CrPV IRES** をコードするプラスミドを提供していただきました。また **eEF3** に関わる実験結果について熱い議論を交わしていただき、また多くのご指導をいただきました。

兵庫県立大学教授の今高寛晃先生もまた貴重な実験材料である精製されたヒト **ARS mix** を提供していただきました。また兵庫県立大学の町田幸大先生とは、真核生物の再構成型生体外タンパク質合成系に関して数々の貴重なアドバイスをいただきました。

東北大学教授の稲田利文先生には、翻訳抑制配列や **eIF5A** の *In vivo* 解析などで多くのアドバイスをいただきました。菅野支保博士、岸田さん、牧野さんとは共同研究をさせていただき、**SDS-PAGE** やウェスタンブロッティングなど、基本的な実験操作についても貴重なアドバイスをいただきました。

東京工業大学教授の田口英樹先生、ならびに茶谷悠平博士には、翻訳停止配列におけるリボソームの不安定化や **eIF5A** の機能に関して、貴重なアドバイスをいただきました。

東京大学教授の伊藤耕一先生、ならびに和田美紀博士には、酵母の遺伝学に関する実験で大変お世話になりました。また **Luciferase** の発光測定装置をご提供いただきました。この装置のおかげで、再現性のある実験結果を安定して得ることが可能になりました。伊藤耕一先生には、私が修士課程の学生の頃から副査をしてくださり、多くのアドバイスをいただきました。

東京大学教授の富田耕造先生には、**Luciferase** の発光測定装置をご提供いただきました。また富田耕造先生も、私が修士過程の頃から副査をしてくださり、そして日頃から多くのアドバイスをいただきました。

副査をしてくださった泊幸秀先生、鈴木勉先生、岩崎信太郎先生にも、この場をお借りして感謝申し上げます。

上田研究室の皆様にも、この場を借りて感謝申し上げます。

多くの先輩方が運んできたバトンを私が受け取って、酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系の構築という研究がスタートしました。高柳さん、宇都宮さん、石橋さん、小谷さん、林さん、西村さんが行った研究の土台があったからこそ、本研究はまとまりました。この場を借りて感謝申し上げます。

また学年は1つ下でしたが、田中さんと近友さんは同期として、共に研究を発展させました。3年間、隣り合わせの席で過ごし、研究に関して多くの議論を行い、多くのことを田中さんと近友さんから学びました。さらに後輩にあたる長井くん、鈴木くん、島崎くんには、大変お世話になりました。研究室の雑用を快く引き受けてくれ、とてもハードな実験もこなし、そして多くの実験結果やコンストラクト、プライマーをわかりやすく整理してくれました。長井くんの助けがあって、鈴木くんの頑張りがあって、そして島崎くんの発見があったからこそ、本研究をまとめることができました。感謝申し上げます。今年から仲間に加わった近藤さんと日野さんには、酵母翻訳系の研究に興味を持ってくれたことに感謝します。先輩から受け継いだバトンを渡すことができました。

教授の上田卓也先生には、セミナーを通して多くのアドバイスをいただきました。私が上田研究室に所属していた5年間、何一つ不自由を感じることなく、快適に研究生活を送ることができました。また、上田先生が精製してくださった Pth のおかげで、最後の figure を完成させることができました。この場を借りて感謝申し上げます。

指導教官である富田野乃先生には、私の研究生活の全てを支えていただきました。研究を開始したころ、コンストラクト作成のための PCR や、SDS-PAGE の行い方といった実験の基礎から指導をしていただきました。研究に対して漠然とした面白さしか感じていなかった私に、真理を追求するとはどういうことか、を常に問いかけていただきました。その結果、私は博士課程に進学することを決め、本研究をここまで進めることができました。私は、富田野乃先生が思い描くストーリーを理解するだけで精一杯で、研究に対して頼りっぱなしだったと思います。しかし、本研究を開始した頃に比べると、とても成長したと実感しており、それは富田野乃先生のご指導のおかげです。多くの学びと経験に導いてくださったことを心より感謝申し上げます。