

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 阿部大翔

<<背景と目的 >>

近年、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。本研究では、酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系を構築し、Eukaryotic Initiation Factor 5A (eIF5A)の機能解析を行った。

eIF5A は真核細胞で広く保存された必須なタンパク質で、バクテリアの Elongation Factor P (EF-P) の真核細胞ホモログである。eIF5A は Met-tRNA から Puromycin へのペプチド転移を促進する因子として同定された(Kemper *et al.*, 1976; Schreier *et al.*, 1977; Benne *et al.*, 1978)。その後、連続プロリン配列の翻訳を促進することが示され(Gutierrez *et al.*, 2013)、さらに最近では、eIF5A 依存的に翻訳が促進される配列が連続プロリン配列の他にも見出されている(Schuller *et al.*, 2017; Alepuz *et al.*, 2017)。また eIF5A は翻訳終結におけるペプチド解離反応も促進する (Saini *et al.*, 2009; Schuller *et al.*, 2017)。X 線結晶構造解析および CryoEM 構造解析によって、eIF5A はリボソームの E-site に結合し、ペプチジル tRNA の CCA 末端を安定化すると示唆されている (Schmidt *et al.*, 2015; Melnikov *et al.*, 2016)。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活性中心における遅いペプチド転移反応を促進し、翻訳において広く伸長および終結過程ではたらく因子であると考えられている (Schuller *et al.*, 2017; Alepuz *et al.*, 2017)。

eIF5A は翻訳後修飾であるハイプシンを有する細胞で唯一のタンパク質として知られている(Dever *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2010)。ハイプシン修飾は2段階の酵素反応によって形成される。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ε-アミノ基に付加され、デオキシハイプシンが形成される。続いて、Deoxyhypusine hydroxylase (DOHH)によってデオキシハイプシンがハイプシンに変換される。ハイプシン修飾は細胞の生育に必須である (Magdolen *et al.*, 1994; Schnier *et al.*, 1991; Park *et al.*, 1998; Sasaki *et al.*, 1996)。またハイプシン修飾は eIF5A のリボソーム結合能を向上させる (Jao *et al.*, 2006; Zanelli *et al.*, 2006; Rossi *et al.*, 2016)。In vitro 翻訳系を用いた解析によって、Met-Puromycin 形成反応を促進すること (Park *et al.*, 1989; Park *et al.*, 1991)、MFF トリペプチドの合成を促進すること (Saini *et al.*, 2009)、MF ジペプチジル tRNA や MFK トリジペプチジル 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 (Saini *et al.*, 2009; Schuller *et al.*, 2017)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 によってハイプシン修飾依存的に促進されるが(Gutierrez *et al.*, 2013; Schuller *et al.*, 2017; Shin *et al.*, 2017)、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 (Schuller *et al.*, 2017)。現在のところ、ハイプシンの作用機序の詳細はよく分かっていない。

本研究では、確立した酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系を用いて、翻訳停止配列(連続プロリン配列や連続 CGA コドン)を有するリポーター遺伝子を翻訳し、eIF5A およびハイプシン修飾の効果を調べた。

<<結果>>

①酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系の構築

Cricket Paralysis Virus (CrPV)の Internal Ribosomal Entry Site (IRES)を介する翻訳を利用して、翻訳開始因子非依存のタンパク質合成系を構築した。CrPV IRES の下流に nanoLuciferase (nLuc) をコードした mRNA、酵母 80S リボソーム、予めチャージした酵母アミノアシル tRNA、翻訳伸長因子 (eEF1A、eEF2、eEF3)、および翻訳終結・リボソーム再生因子 (eRF1、eRF3、Dom34、Hbs1、Rli1) を用いて酵母タンパク質合成系を再構成し、活性のある nLuc の合成に成功した。

②翻訳停止配列の翻訳におけるマグネシウムおよびポリアミン濃度の検討

解析に用いた翻訳停止配列を含むレポーターmRNA を図 1 に示した。FLAG タグと Pgc1-36 (二次構造を取らないアミノ酸配列) から成るリーダー配列と nLuc の間に翻訳停止配列を挿入し、nLuc 活性によって翻訳停止を評価できるようにした。リーダー配列の長さ (45 アミノ酸) は、翻訳が停止した時に FLAG タグがリボソームトンネルから露出するように設計した(Zhang *et al.*, 2013)。

はじめに Mg^{2+} 濃度、スペルミジン濃度およびスペルミン濃度をそれぞれ 9 mM、2 mM、0.1 mM (以下、 $[Mg/SPD/SP] = [9/2/0.1]$ と表記)で翻訳を行ったところ、連続 CGA コドンによる翻訳抑制はみられたが、連続プロリン配列依存の翻訳抑制が確認されなかった (図 2)。そこで翻訳の反応条件の検討を行ったところ、 Mg^{2+} 濃度が低くなるほど、そしてポリアミン濃度が低くなるほど、連続プロリン配列依存の翻訳抑制が起こることが示された。

以降、連続プロリン配列依存の翻訳抑制を観察するために、翻訳の精度を保ちながら翻訳効率を担保できる条件、すなわち Mg^{2+} 濃度を低くし、ポリアミンを添加する条件を採用することとした (Byron *et al.*, 2010)。すなわち、 $[Mg/SPD/SP] = [5/0.25/0]$ で解析を行うことに決定した (図 3)。

③eIF5A の機能解析

続いて翻訳停止配列の翻訳における eIF5A およびハイプシン修飾の影響を調べた。本研究では次の 5 種類の eIF5A を解析に使用した(西村聡 修士論文)。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 Lys を Arg に置換した eIF5A(K51R)である。

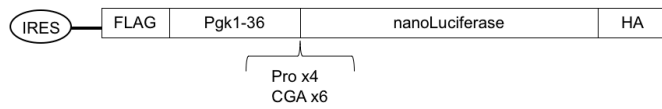


図 1 : mRNA概要図

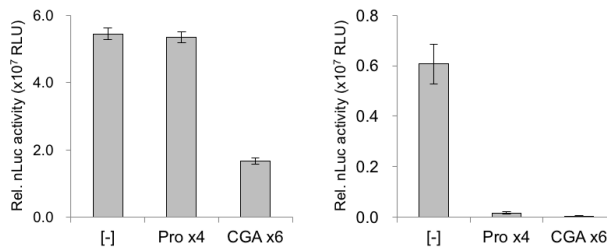


図 2 : $[9/2/0.1]$ における翻訳 図 3 : $[5/0.25/0]$ における翻訳

図 1 に示した mRNA を用いて 30 ° C, 150 min の翻訳反応を行い翻訳産物を Nano-Glo Luciferase Assay にて検出した。

リボソームと等量の eIF5A(各 0.5 μM)を用いて翻訳停止配列を有するリポーター mRNA の翻訳を行った。連続プロリン配列をもつ mRNA の翻訳において、全ての種類の eIF5A によって翻訳促進効果がみられた

(図 4)。この結果は、連続プロリン配列における翻訳抑制を解除するのにハイブ

シリン修飾は不要であることを示しており、これまでに報告のない新たな知見である。

一方、連続 CGA コドンの翻訳は eIF5A によって促進されないことが明らかとなった。

④トリシン PAGE による翻訳産物の解析

[³⁵S]Met 存在下で翻訳停止配列を有するリポーター mRNA の翻訳を行ったのち、翻訳産物をトリシン PAGE によって解析した。翻訳停止したリボソームにおいて、ペプチジル tRNA がどのような状態か調べるため、翻訳反応後に反応液を RNase 処理したもの、Peptidyl-tRNA hydrolase(PTH)で処理したもの、何も処理しなかったもの、を解析した。PTH はリボソームから解離したペプチジル tRNA を加水分解できる。

連続プロリン配列をもつ mRNA の翻訳産物を解析したところ、連続プロリン配列で翻訳停止がおきてリボソーム上にポリプロリン tRNA が存在していること、eIF5A が連続プロリン配列における翻訳停止を解消していることが明らかになった。さらに、ポリプロリン tRNA が PTH 感受性を示すことから、翻訳停止したリボソームはポリプロリン tRNA によって不安定化されていることが示唆された。

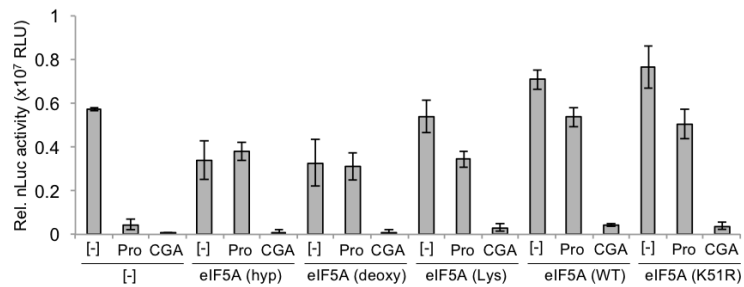


図 4 : eIF5A濃度過剰条件下での翻訳量

示されたeIF5Aを含む[5/0.25/0]における翻訳系で、図 1 に示したmRNAを用いて30 ° C, 150 min の翻訳反応を行い翻訳産物をNano-Glo Luciferase Assayにて検出した。

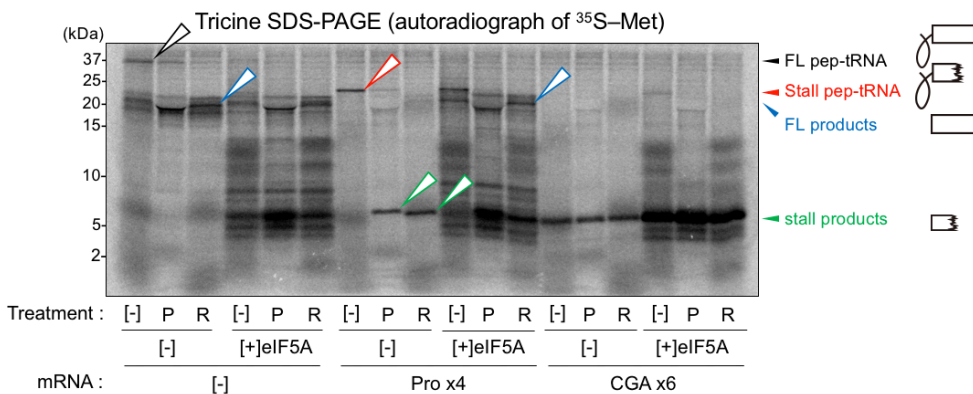


図 5 : トリシンPAGEによる翻訳産物の解析

[5/0.25/0]における翻訳系で0.5 μM eIF5A(hyp)の効果を解析した。図 1 に示した mRNAを用いて30 ° C, 240 min の翻訳反応を行った後、30 μM PTH処理 (P) または0.1 mg/mL RNase A 処理 (R) をした。放射ラベルされた翻訳産物はトリシンPAGEで分画後、イメージングプレートで解析を行った。

一方、連続 CGA コドンをもつ mRNA の翻訳産物を解析したところ、連続 CGA コドンにおける翻訳停止に伴いフレームシフトが起き、さらに連続 CGA コドンの下流に出現する終止コドンでペプチドが解離されていることが示唆された。

<<考察と展望>>

本研究では、連続プロリン配列における翻訳停止が未修飾 eIF5A によって効率よく解消されることが示され(図 4)、これはこれまでの報告とは異なる知見である。ハイプシン修飾の役割について、次のように考察した。

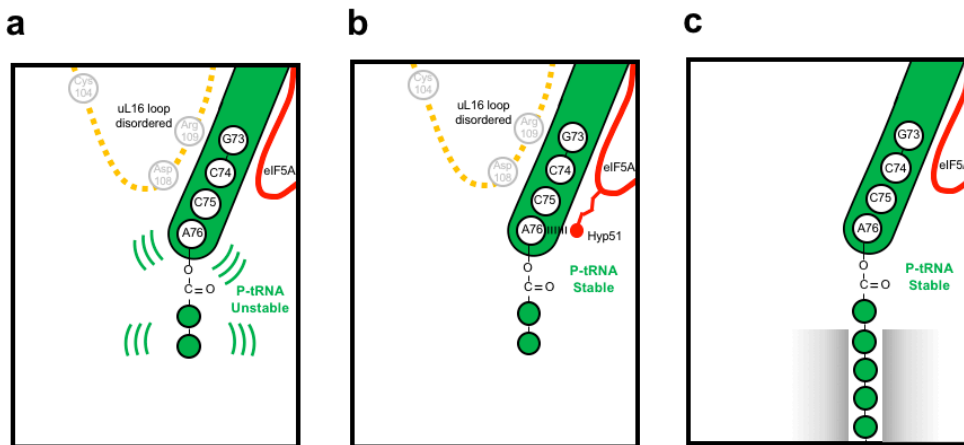


図 6：ハイプシン修飾の役割(Schmidt *et al.*, 2016 より改変引用)

緑色はP-site ペプチジルtRNA、赤線はeIF5A、赤丸はハイプシン修飾
黄破線はリボソームマルタンパク質のuL16、灰色の網掛けはリボソームトンネルを表している。

これまで eIF5A の機能解析は、*In vitro* ペンタペプチド合成系を用いており、リボソーム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解析されていた。この条件では、P-site の pep-tRNA は不安定であり、翻訳停止以外に pep-tRNA のドロップオフが起きていたと考えられる。そのような不安定な P-site pep-tRNA を支えるためには、ハイプシン修飾のされた eIF5A が E-site 側から P-site pep-tRNA の支える必要があったと考えられる(図 6ab)。しかし本研究では、リボソームトンネルから新生ポリペプチド鎖が露出する位置で翻訳停止を解析したため、P-site pep-tRNA は安定であると予想される。それゆえ、プロリンによる P-site pep-tRNA の配向の乱れを正し、翻訳を促進する効果はハイプシン修飾を必要としないと考えられる(図 6c)。当研究室では、連続プロリン配列を IRES 直下に挿入したりポーター mRNA を翻訳したところ、eIF5A が翻訳を促進するが、より強いハイプシン依存性を示すという結果をえている。これは上述のモデルを支持している。ペプチド解離反応について、短いペプチジル tRNA を基質とした反応は eIF5A によってハイプシン依存的に促進される事が報告されている(Saini *et al.*, 2009; Schuller *et al.*, 2017)。長いペプチジル tRNA が基質の場合には、ペプチド解離反応もハイプシン非依存的に促進されると予想しており検証したい。

現在のところ、以上のようなハイプシンの機能を考慮しても、ハイプシン修飾がなぜ細胞の生育に必須なのかはよく説明できない。今後は、ハイプシン修飾された eIF5A 依存的に発現制御される遺伝子の同定や、その発現制御機能の解析が待たれる。