

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
翻訳終結制御機構の解析

長井 陸

目次

1	序説.....	4
1.1	酵母におけるタンパク質合成.....	4
1.2	翻訳終結機構.....	5
1.3	Premature termination (中途翻訳終結).....	17
1.4	本研究の目的.....	18
2	方法.....	19
2.1	実験材料と試薬調製.....	19
2.1.1	実験材料.....	19
2.1.2	鋳型 DNA の調製.....	20
2.1.3	mRNA の調製.....	22
2.1.4	翻訳因子の調製.....	22
2.2	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.....	23
2.2.1	nanoLuciferase の合成.....	23
2.2.2	マルチラウンドオリゴペプチド合成.....	24
3	結果.....	26
3.1	CrPV IRES を用いたタンパク質合成系における eEF1A および eEF3 の効果.....	26
3.2	連続 CGA 配列において eRF1 依存的な premature termination が起きる.....	32
3.2.1	連続 CGA 配列における premature termination の発見.....	32
3.2.2	連続 CGA 配列における premature termination の因子依存性の解析.....	35
3.2.3	eIF5A が eRF1 依存的な premature termination に与える影響の解析.....	39
3.2.4	マルチラウンドオリゴペプチド合成系を利用した 連続 CGA 配列における premature termination の解析.....	42
3.3	終止コドンにおいて eRF1 非依存的な終結が起きる.....	44
3.3.1	終止コドンにおける eRF1 非依存的な終結の発見.....	44
3.3.2	eIF5A が eRF1 非依存的な終結に与える影響の解析.....	46
3.3.3	マルチラウンドオリゴペプチド合成系を利用した eRF1 非依存的な終結の解析.....	47

4	考察.....	51
4.1	本研究のまとめ	51
4.2	翻訳終結制御機構を解析するための <i>in vitro</i> 再構成型翻訳系の確立.....	52
4.3	eRF1 による CGA コドンの認識.....	53
4.4	eRF1 非依存的な翻訳終結の分子機構.....	57
4.5	eIF5A が翻訳に与える影響について.....	60
4.6	Premature termination の生理的意義	62
5	参考文献	64
6	謝辞.....	71

略語

aa-tRNA : aminoacyl-tRNA

CrPV IRES : Cricket Paralysis Virus Internal Ribosome Entry Site

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

KOAc : Potassium acetate

Mg(OAc)₂ : Magnesium acetate

nLuc : nanoLuciferase

NMD : Nonsense-mediated mRNA decay

Pgk : Phosphoglycerate kinase

PMSF : Phenylmethylsulfonyl fluoride

PPiase : Pyrophosphatase

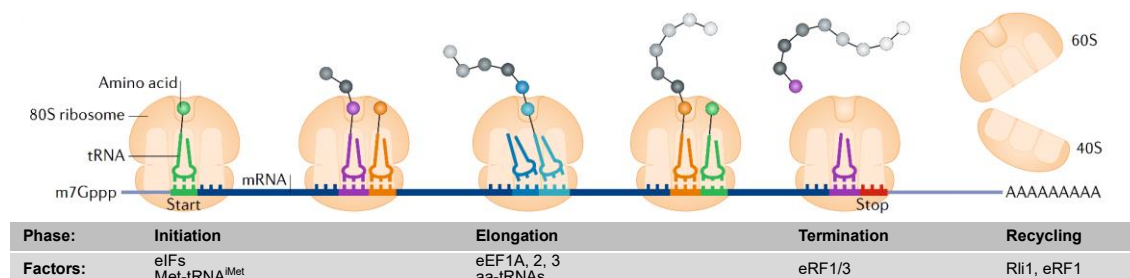
PTC : Peptidyl Transferase Center

SPD : Spermidine

1 序説

1.1 酵母におけるタンパク質合成

タンパク質合成（翻訳）は、開始、伸長、終結、リボソーム再生（解離）の4つの過程からなる（図1）。真核生物の開始反応では、まず、開始因子を介して、mRNAの5'キャップ構造がリボソーム40Sサブユニットに認識される。その後、40Sが5'非翻訳領域をスキッピングした後、開始コドンを認識し、60Sと会合することで、翻訳伸長過程へと推移する⁽¹⁾。酵母における翻訳伸長過程では、3つの必須の伸長因子（eEF1A, eEF2, および真菌特異的な伸長因子 eEF3）が関与する。まず、伸長因子 eEF1A・GTP・アミノアシル tRNA により形成される三者複合体がリボソーム A-site に運ばれる。アミノアシル tRNA が A-site に結合するには、E-site が空である必要がある⁽³⁾。真菌特異的な伸長因子 eEF3 は E-site デアシル tRNA を解離させることで、A-site へのアミノアシル tRNA の結合を促進する。eEF3 は、自身の ATPase 活性依存的に、リボソームタンパク質 L1 の構造を開いた構造に変化させることで、E-site tRNA のリリースを促進すると考えられている^(3,4)。アミノアシル tRNA が A-site に結合して eEF1A による GTP 加水分解が起きると、eEF1A・GDP 型が解離し、A-site tRNA の CCA 末端が peptidyl transferase center (PTC) に配向され、ペプチド転移が起こる⁽²⁾。その後、伸長因子 eEF2 が、A-site と P-site の tRNA をそれぞれ P-site と E-site へと移動させるトランスロケーション反応を促進する⁽⁵⁾。リボソームが終止コドンに到達すると、終結因子 eRF1・eRF3 がリボソームに結合し、ペプチジル tRNA からペプチドを解離させ、翻訳が終結する。eRF3 の解離後、eRF1 と協調して、リボソーム解離因子 Rli1 がリボソームを解離させ、1 ラウンドの翻訳が終了する⁽⁶⁾。



Schuller, A. P. and Green, R. (2018) Nat. Rev. Mol. Cell Biol. より改変引用。

図1 出芽酵母における翻訳過程の模式図。

1.2 翻訳終結機構

(1) 翻訳終結機構

翻訳終結反応は、mRNA の終止コドン (UAG、UGA、UAA) がリボソーム A-site に到達することで起こる。真核生物の翻訳終結は、終結因子 eRF1 と eRF3 によって行われる。eRF3 が eRF1 をリボソーム A-site に運ぶ⁽⁶⁾。続いて、eRF1 がリボソーム A-site の終止コドンを認識し、P-site でのペプチジル tRNA のペプチドの解離を引き起こす⁽⁶⁾ (図 2C)。

eRF1 は、3 つのドメイン (amino-terminal domain (N)、middle domain (M)、carboxy-terminal domain (C)) から構成される (図 2A)。N 末端ドメインは、終止コドン認識に関与する⁽⁷⁾。M ドメインは、ペプチド解離を引き起こす GGQ (Gly-Gly-Gln) モチーフを含む⁽⁸⁾。C 末端ドメインは、eRF3 や Rli1 に結合する^(9,10)。eRF1 は全ての終止コドン (UAG、UGA、UAA) を認識する。一方で、細菌では、2 つの eRF1 ホモログ (RF1、RF2) が存在し、それらの終結因子はそれぞれ認識する終止コドンが異なる (RF1:UAA/UAG、RF2:UAA/UGA)。また、終結因子によるペプチド解離の機構は、真核細胞と細菌で類似しているが、終止コドン認識の様式は、大きく異なっている⁽²⁾。

eRF3 は、2 つのドメイン (N-terminal extension domain (NED)、C-terminal domain (CTD)) から構成される (図 2B)。NED は、保存されておらず、eRF3 の終結における働きには不要であるが、酵母において poly(A)-binding protein への結合やプリオン化に関与する^(2, 11)。CTD は、真核細胞で広く保存されており、GTP 結合ドメイン (domain G) と 2 つのβ バレルドメイン (domain 2, 3) を持つ。CTD は、eRF3 と同じリボソーム結合型 GTPase、eEF1A や Non-Stop mRNA におけるリボソームレスキュー因子 Hbs1 に保存されている⁽¹²⁻¹⁴⁾。eRF3 の G ドメインには、すべての GTPase に保存された、GTP の結合と加水分解に必須な switch I、switch II とよばれる領域があり、ヌクレオチド依存的な eRF3 の構造状態を制御している⁽⁶⁾。

真核細胞の終結では、I) eRF1 が正しく終止コドンを経験後、II) eRF1 の GGQ モチーフがペプチド解離できない構造状態 (pre-accommodated 状態) から、ペプチド解離可能な構造状態 (accommodated 状態) へと大きな構造変化を伴って、正しいコドン認識とペプチジル tRNA のペプチド解離が連動する。

以下に終結因子による終止コドンを経験とペプチド解離反応の詳細を述べる。

(I) 終止コドン認識

真核細胞の終止コドンの認識では、eRF1 の NIKS モチーフ (酵母:58-61 残基、ヒト:61-64 残基) が 1 塩基目の Uridine (+1 U) を (図 3A、B)、Y-C-F モチーフ (酵母:Y¹²²-C¹²⁴-F¹²⁸、ヒト:Y¹²⁵-C¹²⁷-F¹³¹) 及び E⁵² (酵母:52 残基、ヒト:55 残基) が 2、3 塩基目の purine 塩基 (+2 R、+3 R) を認識する⁽¹⁵⁾ (図 3A、C)。また、真核細胞の終結では、リボソーム A-site において mRNA の +2 R 塩基と +3 R 塩基のスタッキングに伴い、A-site の mRNA が小さく折り畳まれた構造をとることが知られている⁽¹⁵⁾ (図 3C、D)。この mRNA 構造の維持には、mRNA の +2 R、+3 R 塩基と小サブユニット 18S rRNA h44 の塩基 A1756 (ヒト:A1825, 大腸菌:A1493) とのスタッキング相互作用に加え、eRF1 の NIKS モチーフと mRNA の +1 U 塩基骨格との相互作用が重要であると考えられている^(15,16) (図 3B、C)。また、この構造は、真核細胞の終結に特異的であり、アミノアシル tRNA のデコーディングやバクテリアの終結では見られない。さらに、この構造は、eRF1 の解離まで維持される⁽¹⁷⁾。

以下で、真核細胞において、eRF1 がセンスコドンを経験する機構についてまとめる。

終止コドン 1 塩基目 +1 U のカルボニル基は、NIKs モチーフの N⁵⁸、K⁶⁰ 側鎖と水素結合を形成する⁽¹⁵⁾ (図 3B)。しかし、1 塩基目 +1 C (cytidine) の場合は、cytidine と N⁵⁸・K⁶⁰ 間の距離の問題から水素結合を形成しづらと考えられている⁽¹⁵⁾。また、1 塩基目が purine 塩基 (+1 A あるいは +1 G) の場合は、立体障害の問題から、水素結合を形成できないと考えられている⁽¹⁵⁾。

終止コドン 2、3 塩基目 +2 R、+3 R は、rRNA の塩基 A1756 と共に、スタ

ッキング相互作用を形成する⁽¹⁵⁾ (図 3C)。さらに、このスタッキング相互作用は、eRF1 の Y-C-F モチーフの C¹²⁴ が A1756 と水素結合を形成することで安定化される⁽¹⁵⁾ (図 3C)。このスタッキング相互作用形成に伴って、eRF1 の E⁵² の側鎖が+2 A 塩基あるいは+3 A 塩基と水素結合を形成できるようになる⁽¹⁵⁾ (図 3C、D)。この水素結合形成は、pyrimidine 塩基とは起こらず⁽¹⁵⁾、コドン 2、3 塩基目に C、U を含むセンスコドンを除くのに利用されている。

また、コドン 2、3 塩基目に C、U を含まないトリプトファン UGG コドンが終止コドンとして認識されないのも、コドン 2、3 番目の塩基が eRF1 の E⁵² と水素結合を形成できないためだとされている⁽¹⁵⁾ (図 3D 最下)。連続する G 塩基 (+2 G、+3 G) 同士の静電的反発に加え、負電荷の E⁵² との静電的反発が起こる為、+2 G-+3 G 塩基間のスタッキング相互作用が安定的に形成されず、結果として、コドン 2、3 番目の塩基が eRF1 の E⁵² と水素結合を形成できない⁽¹⁵⁾ (図 3D 最下)。また、*in vitro* の解析により、eRF1 は UGG コドンに結合はするが、ペプチド解離活性は示さないことが明らかになっている^(18,19)。

このように、真核生物の終止コドン認識において、i) コドン 1 塩基目 (+1 U) と NIKS の水素結合および、ii) コドン 2、3 塩基目 (+2 R、+3 R) と rRNA の塩基 A1756 によるスタッキング相互作用 (結果として、+2 R、+3 R が eRF1 の E⁵² と水素結合)、が形成されることが重要である。

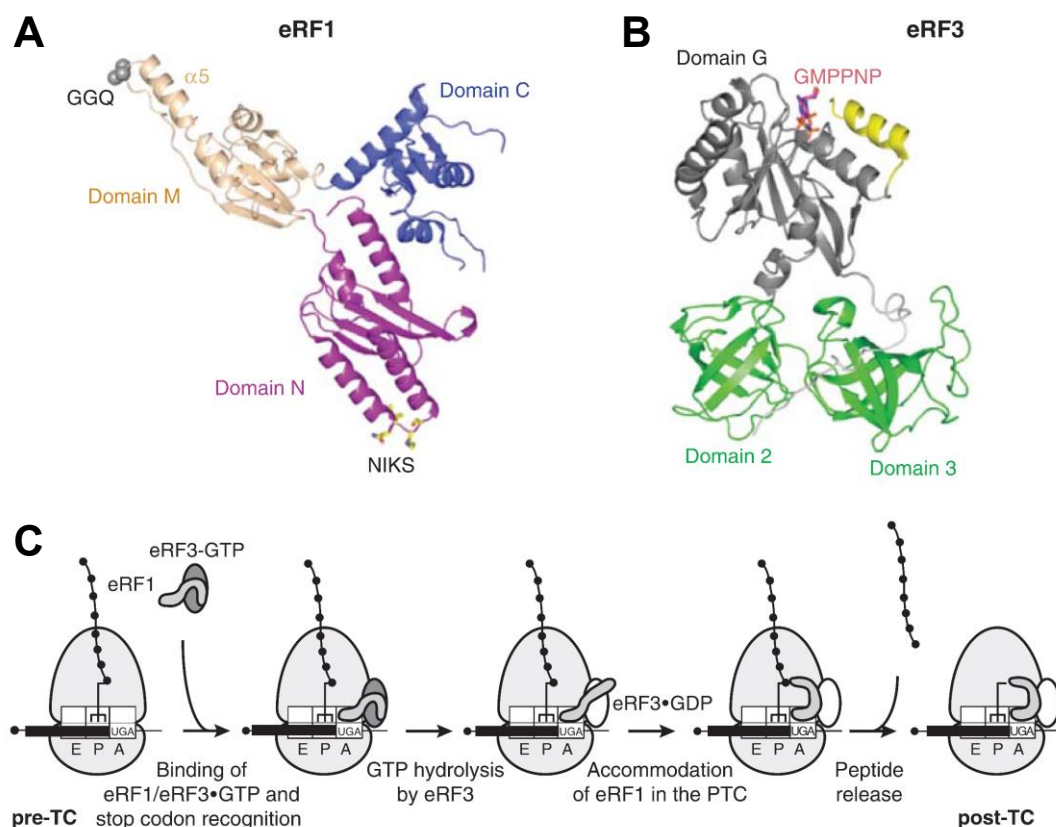
(II) GGQ モチーフを介したペプチド解離反応

GGQ モチーフは全ての生物種の終結因子に保存されている。GGQ モチーフは、リボソーム大サブユニットの PTC (peptidyl transferase center) に配向し、PTC および P-site tRNA A76 との相互作用を通して、求核攻撃を行う水分子を正しく配向する (図 4B、C)。これによって、P-site のペプチジル tRNA から水分子へペプチドが転移され、ペプチドの解離が引き起こされる (図 4C)。

eRF3 の GTP 加水分解前の eRF1・eRF3 が結合した終結前リボソーム複合体 (pre-termination complex、pre-TC) において、eRF1 の M ドメイン先端にある GGQ モチーフが、eRF3 のドメイン 2-ドメイン G 間の switch I 領域近くに固定化されている^(6,17) (図 4A、eRF1 は pre-accommodated 状態)。この固定化は、eRF1 の終止コドン認識後、eRF3 の GTP 加水分解が起こったのち、switch 領域

の構造変化が起こることによって解消される^(6,17)。これに伴い、自由に動けるようになった GGQ モチーフが、80 Å (N ドメインを軸に 140°) 移動して、PTC に配位する^(6,17) (図 4B、eRF1 は accommodated 状態)。PTC において、GGQ モチーフの Q が PTC 近傍の rRNA 塩基と協同的に、攻撃水分子を P-site ペプチジル tRNA CCA 末端 A76 塩基の 2' OH に配位することで、水分子へペプチドが転移される⁽²⁰⁾ (図 4C)。

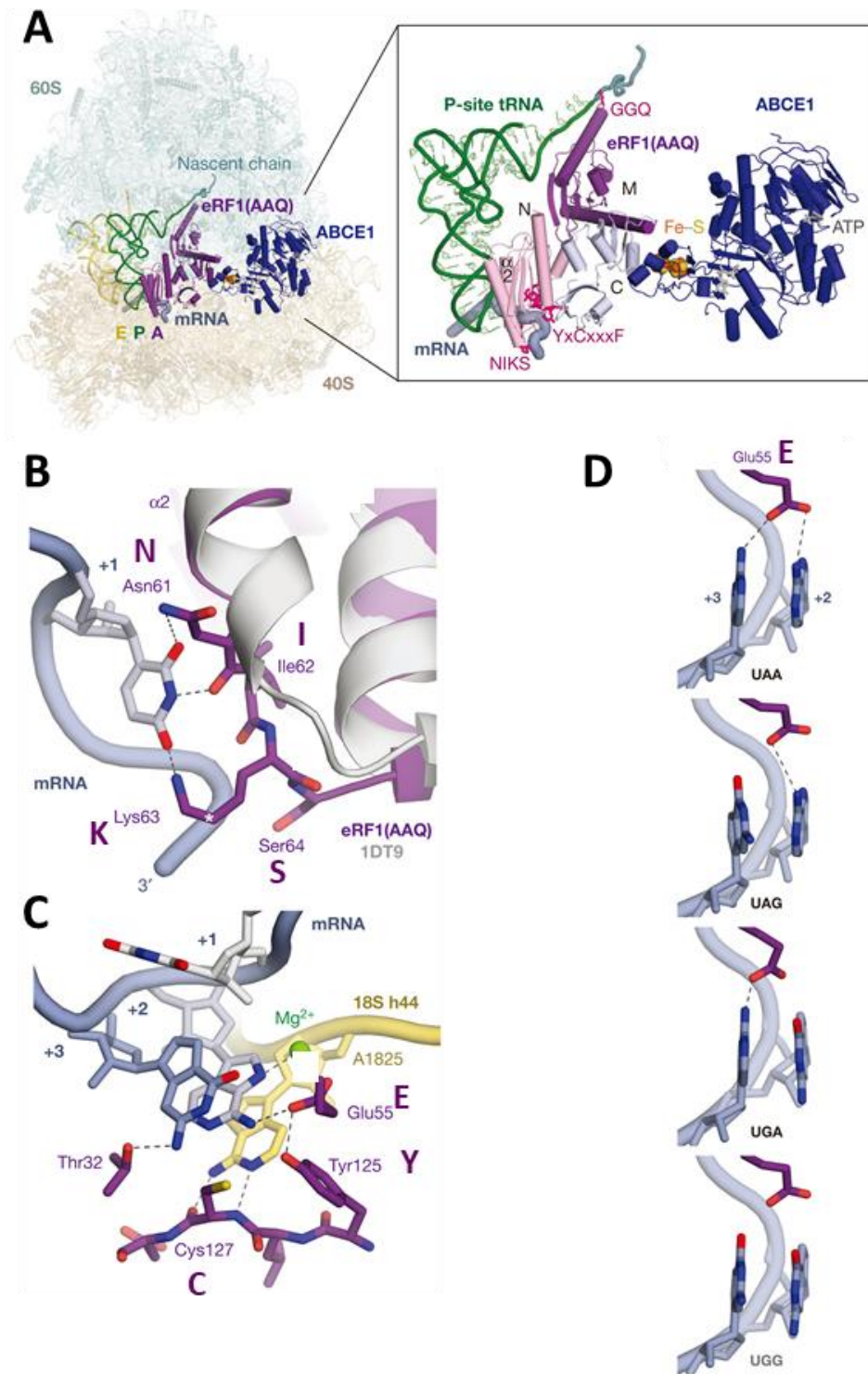
eRF1 は、単独でペプチド解離を引き起こすことが出来るが、eRF3 によってその活性が強く促進される⁽²¹⁾。また、eRF3 の GTPase 活性は、eRF1 による終止コドン認識とペプチド解離を共役する働きがあると考えられている⁽²²⁾。この効果は、eRF3 が、eRF1 の、終結前リボソーム複合体 pre-TC へのリクルートを促進した結果か、あるいは、ペプチド解離の触媒反応速度を向上させたことによると考えられている⁽²³⁾。eRF1 の pre-TC への結合によって、+2 nt のトープリントシフトが確認されており、これは、先述した真核細胞特有の終止コドン認識における小さく折り畳まれた mRNA 構造が形成されていることを意味する^(15, 21)。また、eRF3 が、野生型 eRF1 によって引き起こされるそのトープリントシフトを促進し、また、幾つかの eRF1 変異体の存在下でも促進することが明らかになっている⁽²⁴⁾。このことから、eRF3 は、終止コドン認識を促進するか、あるいは、pre-TC を安定化していると考えられている。終結反応の促進に加えて、eRF3 は、終止コドン認識とペプチド解離反応の間に、不可逆的な GTP 加水分解の段階を設けることによって、ある種の proofreading 機構としての役割を果たし、終結の精度を向上させている可能性が示唆されている⁽⁶⁾。実際に、真核細胞では、eRF3 欠乏株において、終止コドンの読み飛ばしが増加することが知られている⁽²²⁾。



Hellen, C. U. (2018) Cold Spring Harb. Perspec. Biol. より引用。

図 2 真核細胞の翻訳終結。

- A: 溶液中遊離 eRF1 の構造 (human, PDB code: 1DT9)。N ドメイン先端の NIKS モチーフは、リボソーム A-site デコーディングセンターにおいて、終止コドン を認識する。M 末端ドメイン先端の GGQ モチーフが PTC において、ペプチド解離を引き起こす。
- B: 溶液中遊離 eRF3 · GMPPNP (GTP 非加水分解アナログ) の構造 (*Schizosaccharomyces pombe*, PDB code: 1R5B)。215–662 アミノ酸からなる N 末の非保存領域は欠損してある。
- C: 真核細胞の翻訳終結機構の概要図。終結前リボソーム複合体 (pre-termination complex, pre-TC) の P-site には、ペプチジル tRNA が存在する。eRF1 · eRF3 · GTP からなる三者複合体が、pre-TC の A-site に結合し、eRF1 が終止コドン を認識する。eRF1 の M 末端ドメインが、eRF3 の switch I/switch II 領域から解離し、eRF3 の GTP 加水分解後、PTC に配位し、ペプチド解離を引き起こす。終結後リボソーム複合体 (post-termination complex, post-TC) において、eRF1 及び、恐らく eRF3 · GDP 型の結合は維持される。



Brown, A. (2015) Nature より改変引用。

図 3 終止コドン認識時のデコーディングセンターの構造。

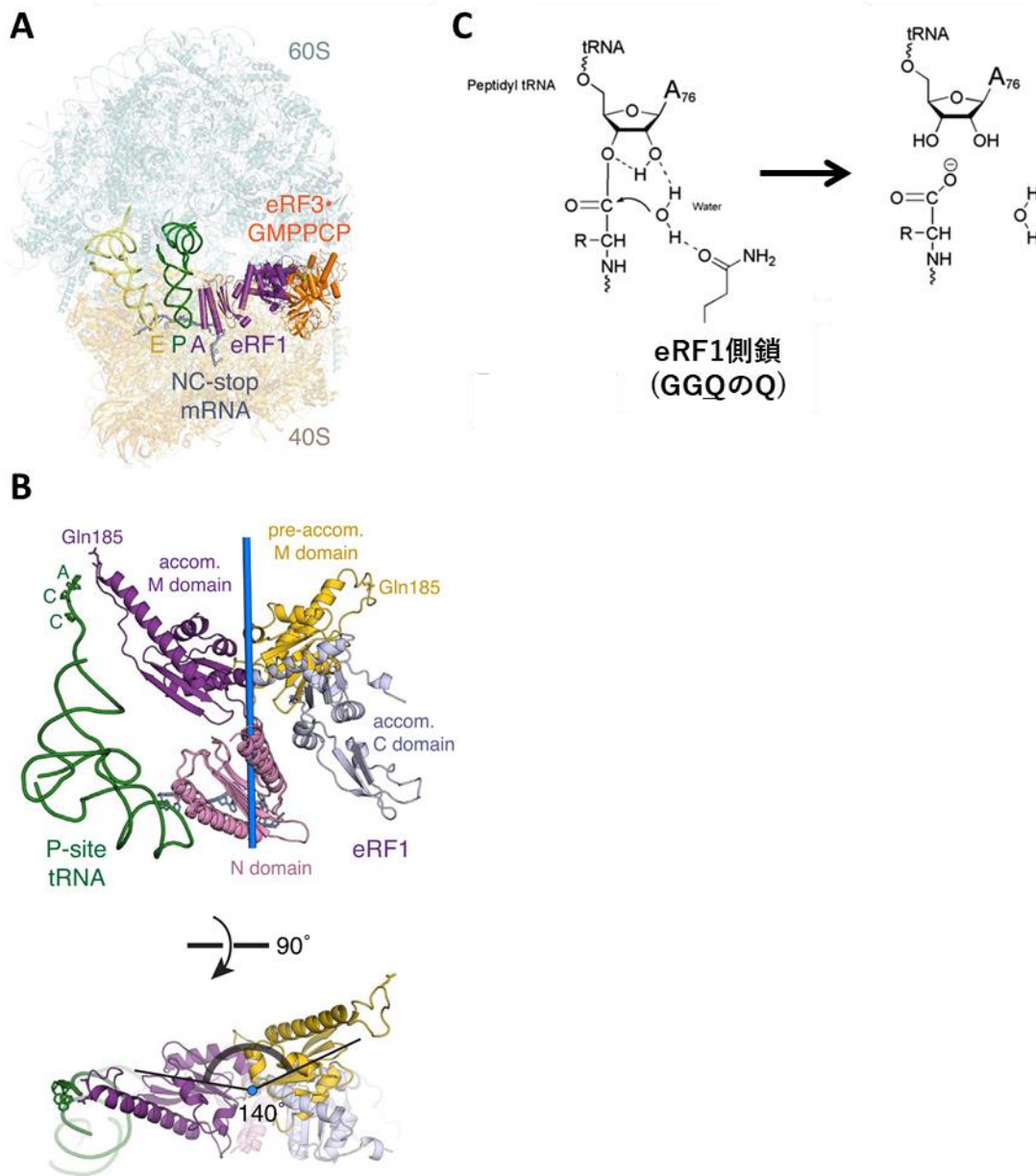
A: (左図) 終止コドン（UAG）を認識した eRF1 が結合した翻訳終結リボソーム・新生鎖複合体（human）。A-site に終止コドン（UAG）が存在し、それをペプチドリリース活性不全変異体 eRF1(AAQ) が認識し、結合している。また、ABCE1（酵母 Rli1 のヒトホモログ）が GTPase センターに結合している。E-site にデアシル tRNA、P-site にペプチジル tRNA（新生鎖+P-site tRNA）が結合している。eRF1 は、M ドメイン先端の GGQ モチーフが P-site tRNA と新生鎖の境に位置しており、ペプチド解離可能な構造状態をとっている（accommodated 状態）。

(右図) eRF1(AAQ) の拡大図。ペプチド解離を担う GGQ モチーフ、終止コドン認識を担う NIKS、及び Y-C-F モチーフが示されている（ピンク）。

B: eRF1 によるコドン 1 塩基目の認識。図 3A のリボソーム・新生鎖複合体のデコーディングセンターにおいて、eRF1 の NIKS モチーフと+1 U 間で水素結合ネットワークが形成される。

C: eRF1 によるコドン 2、3 塩基目の認識。図 3A のリボソーム・新生鎖複合体のデコーディングセンターにおいて、終止コドン+2 R 塩基が、rRNA の A1825 塩基とのスタッキング相互作用により安定化され、+3 R 塩基とスタッキング相互作用を形成する。eRF1 の Y-C-F モチーフと E⁵⁵ は、+2 R、+3 R と水素結合ネットワークを形成する。

D: eRF1 によるセンスコドン（UGG）の排除機構のモデル。eRF1 の E⁵⁵ は、終止コドンのスタッキングした+2 R、+3 R 塩基とは水素結合を形成できるが（上から UAA、UAG、UGA）、センスコドン UGG (Trp) とは水素結合を形成できない（最下 UGG）。



A, B: Shao, S. (2016) Cell より改変引用。

C: Shaw, J. J. (2012) Chem. Biol. より改変引用。

図 4 アコモデーション前、後の eRF1 の GGQ モチーフの位置の変化。

A: eRF1 (pre-accommodated 状態) と eRF3 が結合した翻訳終結リボソーム・新生鎖複合体 (human)。

B: pre-accommodated 状態と accommodated 状態の eRF1 の M ドメインの構造の違い。pre-accommodated 状態の eRF1 では、GGQ モチーフを持つ M ドメインが

eRF3 に固定化されている (図 4B、黄)。eRF1 の M ドメインは、eRF3 の GTP 加水分解後、eRF3 から解離し、N ドメインを軸に 140° 回転して、GGQ モチーフが PTC に配位される (accommodated 状態、図 4B、紫)。

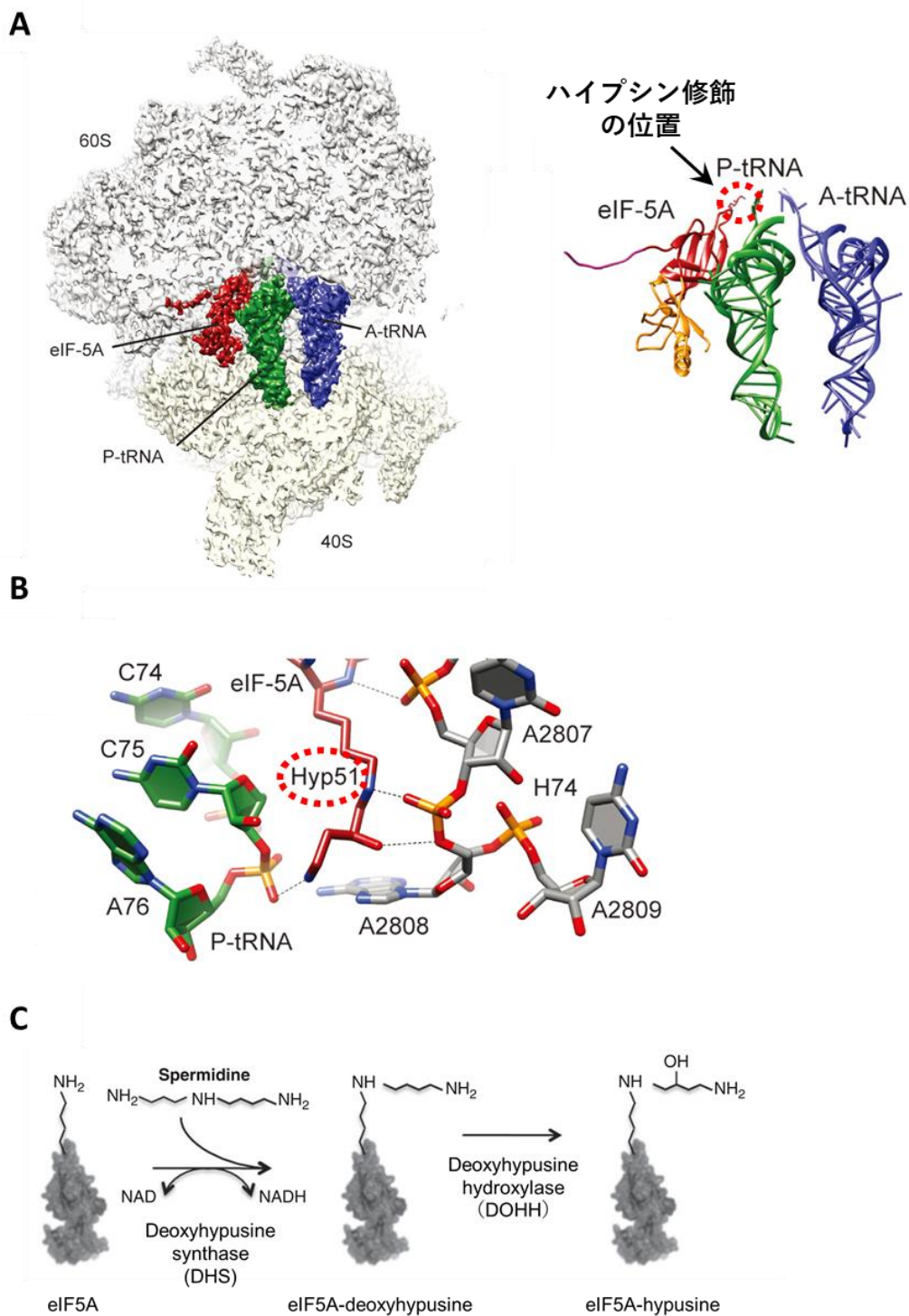
C: ペプチド転移反応における GGQ の Q による攻撃水分子のペプチジル tRNA への配位。

(2) 翻訳終結における eIF5A の機能

eIF5A は、バクテリア EF-P の真核細胞ホモログで、翻訳抑制配列として知られる連続プロリン配列の翻訳を促進する (図 5A, B)。最近の研究で、連続プロリン配列の他にも多様な標的配列があることや、翻訳終結反応を促進することも明らかにされている⁽²⁵⁻²⁷⁾。このことから、翻訳においてグローバルに機能する翻訳伸長因子として理解されている^(26, 28)。

eIF5A は、ハイプシンという翻訳後修飾を有する細胞で唯一のタンパク質である (図 5)。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^(29, 30) (図 5C)。はじめに deoxyhypusine synthase (DHS) によってスペルミジンが切断され、その 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ることで deoxyhypusine が形成される (図 5C)。その後、deoxyhypusine hydroxylase (DOHH) によって deoxyhypusine にヒドロキシ基が付加され、hypusine に変換される (図 5C)。特に出芽酵母では DHS が必須遺伝子であることから⁽²⁴⁾、hypusine 修飾は細胞の生育に必須と知られている⁽³¹⁻³³⁾。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ことが知られている⁽³⁴⁾。eIF5A はリボソームの E-site に結合し、ハイプシン修飾を介して、ペプチジル tRNA の CCA 末端を安定化することで PTC における遅いペプチド転移を促進すると考えられている^(35, 36) (図 5A, B)。

eIF5A が翻訳終結に与える影響の解析は、主に再構成型の *in vitro* ペンタペプチド合成系を用いて行われている⁽²⁶⁾。当該系において、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、ハイプシン修飾依存的に促進することが報告されている。また、生体内において、eIF5A 欠乏株で、終止コドンにリボソームが蓄積することがわかっている。このように eIF5A が、翻訳終結も促進することが明らかにされているが⁽²⁸⁾、これはバクテリア EF-P が連続プロリン配列特異的に作用するのとは対照的である。eIF5A が終結反応を含めた PTC における遅いペプチド転移反応を全般的に促進する正確な分子メカニズムは不明である。



A, B: Schmidt, C. (2016) *Nucleic Acids Res.* より改変引用。

C: Mathews, M. B. and Hershey, J. W. B. (2015) *Biochim. Biophys. Acta.* より改変引用。

図 5 eIF5A とハイプシン修飾。

- A: 酵母 80S リボソームに結合した eIF5A の構造。eIF5A は、P-, E-site の間に結合する。ハイプシン修飾は、E-site 側から P-site tRNA と相互作用する。
- B: ハイプシン修飾の P-site tRNA との相互作用。図 5A での eIF5A-80S 複合体における、ハイプシン修飾近傍の構造を示している。ハイプシン修飾は、P-site tRNA の CCA 末端と rRNA H74 の塩基により形成されるポケットに入り込む。ハイプシン修飾先端の 4-アミノ基が P-site tRNA の CCA 末端 A76 の骨格と接触し、水素結合を形成する。(緑：P-site tRNA CCA 末端、灰：rRNA H74 塩基、赤：eIF5A)
- C: ハイプシン修飾の生合成。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が切断され、その 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ることで deoxyhypusine が形成される。その後、deoxyhypusine hydroxylase (DOHH) によって deoxyhypusine にヒドロキシ基が付加され、hypusine に変換される。

1.3 Premature termination (中途翻訳終結)

ナンセンス変異によって ORF 内部に終止コドンが生じた場合、その終止コドン上で中途翻訳終結が起こる。このような ORF 内部での翻訳終結が生じると、短いポリペプチド鎖が細胞内に蓄積し、小胞体ストレスをはじめとして、細胞に毒性を示す可能性がある。また、このような ORF 内部の終止コドンが原因で、多くの遺伝病が生ずることがわかっている^(37,38)。

一方、センスコドン上で中途翻訳終結 (premature termination) が起こる例も知られている。大腸菌において、コドン 3 塩基目 (wobble 塩基) が終止コドンと異なるセンスコドン (UAU (Tyr)) で premature termination が起こりやすいことが知られている^(39,40)。また、バクテリアと真核細胞では、終結因子による終止コドン 3 塩基目の認識が似ていることから、真核細胞でも UAU (Tyr) コドンが認識される可能性が示唆されているが⁽³⁹⁾、真核細胞では、eRF3 によって厳格なコドン識別が促進されるため、バクテリアと比べて、認識されづらいと考えられている^(22,39)。

最近になって、アカパンカビとショウジョウバエにおいて、レアコドンにおいて eRF1 が premature termination を引き起こし、それが翻訳効率の制御 (翻訳抑制) に寄与していることが示された⁽⁴¹⁾。アカパンカビやショウジョウバエ S2 細胞抽出液を用いた *in vitro* 翻訳系では、レアコドンを含んだレポーター mRNA を翻訳すると、premature termination 産物が生じる⁽⁴¹⁾。同研究において、アカパンカビでは、CGA レアコドンを含むレポーター mRNA で、eRF1 依存の premature termination が起こることが明らかになっている⁽⁴¹⁾。

また、ヒト細胞において、アミノ酸 (ロイシン) 飢餓時に、アミノ酸飢餓応答を起こさない変異体 (GCN2 ノックアウト株) ヒト細胞において、デアシル tRNA^{Leu} の増加を伴って、リボソームが翻訳停止することが、リボソームプロファイリングによる解析などで明らかになっている⁽⁴²⁾。また、この時、ロイシン UUG コドンで premature termination が起こることがレポーターアッセイを用いて明らかになっているが、premature termination を引き起こしている因子は不明である⁽⁴²⁾。

ヒト由来再構成型無細胞翻訳系において、ウイルス由来の 2A 配列においてセンスコドン (プロリン) 上で、eRF1 非依存の終結が起こることが知られている⁽⁴³⁾。2A 配列は、ウイルスゲノムをはじめとしてトリパノソーマのゲノム中

のリピート配列にも見出される、約 19 アミノ酸からなる配列で、C 末端に -D₁₂(V/I)EXNPGP₁₉- のモチーフをもつ⁽⁴⁴⁾。2A ペプチドは、リボソームトンネルと相互作用して翻訳を停止させる。さらに、2A 配列のプロリンコドン上で、終結因子依存の終結が起き、その後、同一のプロリンコドンから翻訳が再開されるので、結果として 1 つの ORF から 2 つのタンパク質が生じる。

更に、リボソーム結合シャペロン Ssb 欠損株では、連続リジン配列 (AAA、AAG-AAG-AAA、あるいは AAG コドンが 12 個連続で並んだ配列) において、eRF3 依存の premature termination が生じることがわかっている^(45, 46)。これは、リボソーム生合成に参与する Ssb を欠損したことで、リボソームの構造異常 (特に PTC と decoding center の異常) が生じたためであると考えられている⁽⁴⁶⁾。

現在のところ、これらの premature termination の分子機構やその制御機構の詳細についてはあまり理解されていない。

1.4 本研究の目的

以上のように、真核生物の翻訳終結反応における終止コドン認識は、終結因子、mRNA、rRNA 間の相互作用が複雑に関与しており、厳密に制御されている。また翻訳終結反応はリボソーム結合シャペロンなど様々な制御因子によっても制御を受け、更に新生ペプチド鎖の長さや配列による影響も受けることがわかっている⁽⁴⁷⁾。しかし、これまでのところ、終結反応の制御機構の詳細は不明である。従来、翻訳終結の生化学的解析は、短いペプチドの合成系を用いて行われてきた⁽²⁶⁾。単離した翻訳伸長複合体に終結因子を作用させるこの解析系では、終結因子と競合する因子が限定されており、例えばアミノアシル tRNA や eEF1A は存在しない。また新生ペプチド鎖の長さや配列にも制限があった。そこで、本研究では、当研究で開発された、全長のタンパク質が合成可能な、酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系を用いて^(48, 49)、翻訳終結反応、特に premature termination の機構を解析した。さらに、翻訳促進因子 eIF5A が premature termination に与える影響も解析した。

2 方法

2.1 実験材料と試薬調製

2.1.1 実験材料

PCR で用いた DNA 合成酵素は、KOD-Plus-Neo (KOD-401) は TOYOBO 社から、PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase (600672) は Agilent 社から購入した。制限酵素 *Dpn* I (DPN-101) は TOYOBO 社から購入した。DNA の精製に使用した PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit (K210011) は Thermo Fisher SCIENTIFIC 社から、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (A9281) は Promega 社から、それぞれ購入した。

mRNA の調製に用いた Recombinant RNase Inhibitor (RRI, 2313) は TAKARA 社から、ATP (RB010)、CTP (RB020)、GTP (RB030)、UTP (RB040) は GeneACT 社から購入した。鋳型 PCR 産物の分解に使用した TURBO DNase (AM2238) は Invitrogen 社から購入した。mRNA の精製で使用した、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。

酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系で用いた ATP lithium salt (11 140 965 001)、GTP lithium salt (11 140 967 001) は Roche 社から購入した。

翻訳産物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。

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⁽⁵⁰⁾。

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。

ウェスタンブロッ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 鋳型 DNA の調製

酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系で用いた鋳型 DNA の配列情報を表 1 に示した。当研究室の卒業生である近友文と島崎俊太が作製したベクター (no motif の配列が pCR4-TOPO に挿入されたもの) を鋳型にして、Forward プライマー 5'- TTGGGCCTAATACGACTCACTATAG -3' と、HA タグが 3' 末に付加されている reverse プライマー 5'- TTACGCGTAGTCTGGGACGTCGTATG GGTAAGCCAAAATTCTTTTCGCA -3' (鋳型 DNA (i)、(ii) 用)、reverse プライマー 5'- GAGAGAGAGAGAGAGAGTTACATGAAGAAGAAGAAAGGTAAATTTCT TAGGTTTTTC -3' (鋳型 DNA (iii) 用)、あるいは reverse プライマー 5'- GAG AGAGAGAGAGAGTCGTCGTCGTCGTCGTCGCATGAAGAAGAAGAAAGGTAA ATTTCTTAGGTTTTTC -3' (鋳型 DNA (iv) 用) を用いて PCR を行った。PCR では、DNA 合成酵素 KOD-Plus-Neo (TOYOBO 社) を用い、鋳型 DNA 終濃度 0.5 ng/μl、各プライマー終濃度 0.3 μM 条件下で、メーカープロトコルに準拠して、反応を行った (1: 94°C 2 min、2: 98°C 10 sec、3: 57°C 15 sec、4: 68°C 30 sec (鋳型 DNA (i) (ii)) / 15 sec (鋳型 DNA (iii) (iv))、Repeat 2-4、30 times、5: 4°C ∞)。反応後、反応液 100 μl に対して 2 μl の *DpnI* (TAKARA 社) を加えて 37°C で 1 時間反応させた。その後、反応液を Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega 社) を用いて精製した。

<p>(i) FLAG-Pgk-nLuc-HA_ [-] (no motif):</p> <p>5'-GGGCCTAATACGACTCACTATA<u>GGAGACCGGAATTC</u>AAAGCAAAAATGTGATCTTGCTTGAAATACAATTTGAGAGGTTAA TAAATTACAAGTAGTGCATTTTTGTATTTAGGTTAGCTATTTAGCTTTACGTTCCAGGATGCCTAGTGGCAGCCCCACAATATCCA GGAAGCCCTCTCTGCGGTTTTTCAGATTAGGTAGTCGAAAAACCTAAGAAATTTACCTgctatggattacaaggacgacgacaagGAAT ATCTTCAAAGTTGTCTGTCCAAGATTTGGACTTGAAGGACAAGCGTGTCTTCATCAGAGTTGACTTCAACGTCCTCATTGGACGG TAAGAAGATCAGCTTCTACGGTTTTACCTTGGAAAGATTTGTTGGTATTGGAGACAACTGCTGGTTACAATTTGGATCAAGT CTTGGAAACAAGTGGTGTCTCTTCTTTGTTTCAAAACTTGGGTGTTTCCGTTACCCCAATCCAAGAATAGTTTTGTCTGGTGA AAACGGTTTGAAGATCGATATCCATGTTATCATCCCATACGAAGGTTTGCAGGTGATCAAATGGGTCAAATCGAAAAGATCTT CAAGGTTGTTACCCAGTTGATGATCACCCTTTAAGGTTATCTTGCACCTACGGTACTTTGGTCATTGGTGTACTCCAAA CATGATCGATTACTTTGGTAGACCTTACGAAGGATTGCTGTTTTCGATGGTAAGAAGATTACTGCTACTGGTACTTTGTGGAA CGGTAAACAAAATTATCGACGAAAGATTGATCAACCCAGACGGTCTTTTGTTCAGAGTTACTATTAACGGTGTACCGGTT GGAGATTGTGCGAAAGAATTTGGCTtaccatacgacgtcccagactacgogTAA-3'</p> <p>(G, T7 開始; 下線, CrPV IRES; 小文字, FLAG- or HA-tag; 二重下線, pgk; 太字, nLuc)</p> <p>ORF のアミノ酸配列: AMDYKDDDDKELSSKLSVQDLDLKDKRVFIRVDFNPLDGKKITSTVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNLGVSVT PIQRIVLSGENGLKIDHVIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHFKVILHYGTLVIDGVTNPMIDYFGRPYEGIAVFDGKKITVTGL WNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAYPYDVPDYA</p>
<p>(ii) FLAG-Pgk-nLuc-HA_ P[CGA x6]:</p> <p>5'-GGGCCTAATACGACTCACTATA<u>GGAGACCGGAATTC</u>AAAGCAAAAATGTGATCTTGCTTGAAATACAATTTGAGAGGTTAA TAAATTACAAGTAGTGCATTTTTGTATTTAGGTTAGCTATTTAGCTTTACGTTCCAGGATGCCTAGTGGCAGCCCCACAATATCCA GGAAGCCCTCTCTGCGGTTTTTCAGATTAGGTAGTCGAAAAACCTAAGAAATTTACCTgctatggattacaaggacgacgacaagGAAT ATCTTCAAAGTTGTCTGTCCAAGATTTGGACTTGAAGGACAAGCGTGTCTTCATCAGAGTTGACTTCAACGTCCTCATTGGACGG TAAGAAGATCAGCTTCTCGACGACGACGACGACGAACGGTTTTACCTTGGAAAGATTTGTTGGTATTGGAGACAACTGCTG GTTACAATTTGGATCAAGTCTTGGAAACAAGGTTGCTCTCTTTGTTTCAAAACTTGGGTGTTTCCGTTACCCCAATCCA GAATAGTTTTGTCTGGTGAACCGGTTTGAAGATCGATATCCATGTTATCATCCCATACGAAGGTTTGCAGGTGATCAAATGG GTCAAATCGAAAAGATCTTCAAGGTTGTTACCCAGTTGATGATCACCCTTTAAGGTTATCTTGCACCTACGGTACTTTGGTCA TTGATGGTGTACTCCAAACATGATCGATTACTTTGGTAGACCTTACGAAGGATTGCTGTTTTCGATGGTAAGAAGATTACTG TCACTGGTACTTTTGGAAACGGTAACAAAATTATCGACGAAAGATTGATCAACCCAGACGGTCTTTTGTTCAGAGTTACT ATTAACGGTGTACCGGTTGGAGATTGTGCGAAAGAATTTGGCTtaccatacgacgtcccagactacgogTAA-3'</p> <p>(G, T7 開始; 下線, CrPV IRES; 小文字, FLAG- or HA-tag; 二重下線, pgk; 網掛け, 連続 CGA; 太字, nLuc)</p> <p>ORF のアミノ酸配列: AMDYKDDDDKELSSKLSVQDLDLKDKRVFIRVDFNPLDGKITSRRRRRRTVFTLEDFVGDWRQTAGYNLDQVLEQGGVSSLFQNL LGVSVTPIQRIVLSGENGLKIDHVIIPYEGLSGDQMGQIEKIFKVVYPVDDHFKVILHYGTLVIDGVTNPMIDYFGRPYEGIAVFDGKKI TVTGTLWNGNKIIDERLINPDGSLFRVTINGVTGWRLCERILAYPYDVPDYA</p>
<p>(iii) F4M-Stop:</p> <p>5'-GGGCCTAATACGACTCACTATA<u>GGAGACCGGAATTC</u>AAAGCAAAAATGTGATCTTGCTTGAAATACAATTTGAGAGGTTAA TAAATTACAAGTAGTGCATTTTTGTATTTAGGTTAGCTATTTAGCTTTACGTTCCAGGATGCCTAGTGGCAGCCCCACAATATCCA GGAAGCCCTCTCTGCGGTTTTTCAGATTAGGTAGTCGAAAAACCTAAGAAATTTACCTTTCTTCTTCTCATGTAACCTCTCTCTCT CTCTC-3'</p> <p>(G, T7 開始; 下線, CrPV IRES; 太字, FFFFM オリゴペプチド; 二重下線, 終止コドン)</p> <p>ORF のアミノ酸配列: FFFFM</p>
<p>(iv) F4M-[CGA x6]:</p> <p>5'-GGGCCTAATACGACTCACTATA<u>GGAGACCGGAATTC</u>AAAGCAAAAATGTGATCTTGCTTGAAATACAATTTGAGAGGTTAA TAAATTACAAGTAGTGCATTTTTGTATTTAGGTTAGCTATTTAGCTTTACGTTCCAGGATGCCTAGTGGCAGCCCCACAATATCCA GGAAGCCCTCTCTGCGGTTTTTCAGATTAGGTAGTCGAAAAACCTAAGAAATTTACCTTTCTTCTTCTCATGCGACGACGACGA CGACGACTCTCTCTCTCTC-3'</p> <p>(G, T7 開始; 下線, CrPV IRES; 太字, FFFFMRRRRR オリゴペプチド)</p> <p>ORF のアミノ酸配列: FFFFMRRRRR</p>

表 1 翻訳反応に使用した鋳型 DNA の配列情報

2.1.3 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 μ M)、PPiase (3.1 μ M) を T7 RNAP reaction buffer (40 mM Tris-HCl pH8.0、22 mM MgCl₂、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°C で 4 時間の反応を行った。TURBO DNase (0.02 U/ μ L) を添加して 37°C で 15 分の反応により転写反応を止めた。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 は Micro Bio-Spin Columns P-30 Tris RNase Free を用いて脱塩処理を行い、-30°C で保存した。

2.1.4 翻訳因子の調製

酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系で用いる因子、eEF1A、eEF2、eEF3、eRF1、eRF3 Δ 165、Rli1、Dom34、Hbs1、eIF5A は、当研究室の阿部 (2018 年卒) の博士論文の方法に従って調製した^(48, 49, 51)。基本的には、6x His タグ融合タンパク質として発現させ、金属キレートアフィニティークロマトグラフィー後、イオン交換クロマトグラフィーを行うことで精製した。

eEF1A、eEF2、Rli1 は、酵母で、eEF3、eRF1、eRF3 Δ 165、Dom34、Hbs1、eIF5A は、リコンビナントタンパク質として大腸菌で発現させた。

酵母 tRNA は、当研究室の阿部 (2018 年卒) の博士論文の方法に従って調製した。基本的には、野生型 W303 酵母株からフェノールクロロホルム抽出及びイオン交換クロマトグラフィーを行うことで精製した。

アミノアシル tRNA、およびアミノアシル化に使用した S100 酵母抽出液は、当研究室の阿部 (2018 年卒) の博士論文の方法に従って調製した。アミノアシル化反応は、500 nM [³⁵S] メチオニン存在下で行った。

酵母 80S リボソームは、原則、当研究室の阿部 (2018 年卒) の博士論文の

方法に従って、野生型 W303 酵母株から調製した。但し、粗リボソーム調製法において、イオン交換クロマトグラフィーによる精製から、スクロースクッションによる精製に変更した。具体的には、細胞抽出液 21 mL を 2.5 mL の sucrose cushion buffer (20 mM HEPES-KOH (pH7.5)、20 mM MgCl₂、100 mM KCl、1 M sucrose、2 mM DTT、0.1 mM PMSF、0.5 mg/mL Heparin) に重層し、Type 70 Ti rotor (Beckman 社) で超遠心した (60,000 rpm (100,000 xg)、2 h、4 °C) のち、リボソームペレットを回収し、puromycin 処理を行うようにした。

2.2 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

2.2.1 nanoLuciferase の合成

酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系の反応量 (20 μL) の溶液の組成を以下に示す。

50 mM HEPES-KOH pH 7.6、100 mM potassium glutamate、5 mM Mg(OAc)₂、0.25 mM SPD、1 mM DTT、0.15 mM 各アミノ酸 (但し、メチオニンとシステインを除く)、0.05 mM メチオニン、0.1 mM システイン、1 mM ATP、1 mM GTP。

酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系の反応量 (20 μL) に含まれる因子を以下に示す。

20 mM creatine phosphate、100 nM creatine kinase、20 nM myokinase、15 nM nucleoside-diphosphate kinase、15 nM pyrophosphatase、5.0 μM eEF1A、0.5 μM eEF2、0.5 μM eEF3、0.5 μM eRF1、0.5 μM eRF3Δ165、0.5 μM Dom34、0.5 μM Hbs1、0.5 μM Rli1、0.5 μM 80S ribosome、アミノアシル tRNA 0.125 A₂₆₀ units、0.5 μM mRNA。以上で構成される反応液を 30 °C で、任意の時間 (1–4 時間) 反応させた。

(i) nanoLuciferase 活性の測定

翻訳反応後、氷上で、2 μL の反応液と 18 μL の 0.1 mg/mL RNaseA 溶液 (20 mM HEPES-KOH pH7.5、100 mM KOAc、2 mM Mg(OAc)₂) を混合し、反応を停止させた。この反応停止液 (20 μL) と 20 μL の基質 (Nano-Glo Luciferase assay buffer : substrate = 50 : 1 の混合液) (Promega 社) を混合したのち、室温で 17 min 反応後、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) を用いて GloMax-96 Microplate Luminometer (Promega 社) を利用して、nanoLuciferase 活性を測定した。

(ii) [³⁵S] メチオニンで標識された翻訳産物の検出

翻訳反応後、10 μ L の反応液を終濃度 0.1 mg/mL RNase A で 30°C で 10 min 処理した。等量の 2x LiDS sample buffer (40 mM Tris-HCl pH 6.8、2% (w/v) lithium dodecyl sulfate (LiDS)、10% (v/v) glycerol、0.01% (w/v) bromophenol blue、350 mM 2-mercaptoethanol) を加え、Tricine SDS-PAGE によって翻訳産物を展開した。^[35S] メチオニンが取り込まれた翻訳産物は、イメージアナライザー (BAS-5000、富士フィルム社) を用いて検出した。

2.2.2 マルチラウンドオリゴペプチド合成

合成された短いペプチドを酢酸エチルを用いて抽出し、液体シンチレーションで合成量を測定した。

短いペプチドが合成される F4M-Stop mRNA や F4M-[CGA x6] mRNA を用いて (表 1)、酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系で翻訳反応を行った。翻訳系の溶液および因子の組成、反応温度は原則として、2.2.1 に示した通りであるが、変更した点を以下に示す。

eIF5A がリボソーム E-site に安定的に結合し機能できるように、eEF3 の混入を最小限に抑える為、系中の eEF1A 濃度を 2.5 μ M に下げ、eEF3 を系中から除いた。精製された eEF1A には、1% 以下の割合で酵母内在性 eEF3 が混入している⁽⁴⁸⁾。また、eEF3 は、eIF5A とリボソームへの結合において競合する⁽⁵²⁾。

また、翻訳終結反応を律速にする為、eRF1 濃度を 0.25 μ M に下げた。

翻訳反応後、反応液 10 μ L と等量の 1 N HCl を加え、激しく振盪した。その後、10 倍量の酢酸エチルを加え、激しく振盪し、氷上で 10 min 静置した後、遠心した (15,000 xg、5 min、4°C)。遠心後、上清には遊離したペプチドが存在し、アミノアシル tRNA やタンパク質は沈殿している。上清を 160 μ L 分取し、5 mL の液体シンチレーションカクテル Ultima Gold (Perkin Elmer 社) と混ぜ、振盪後、液体シンチレーションカウンター (LSC-6100、HITACHI 社) 用いて、

[³⁵S] メチオニンのペプチドへの取り込みを測定した。

酵母から精製した翻訳因子に含まれた内在性 eRF1 を検出する為に行なったウェスタンブロッティングの手法を以下に示す。

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 (GE Healthcare 社) にタンパク質を転写した。定電圧 10 V、メンブレン面積 (cm²) x 1.5 mA で 50 min、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 4°C で一晩反応させた。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 分間洗浄を 3 回繰り返したのち、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 (GE Healthcare 社) をメンブレンに滴下し、ImageQuant LAS 4000 を用いて検出した。

3 結果

3.1 CrPV IRES を用いたタンパク質合成系における eEF1A および eEF3 の効果

当研究室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には、翻訳伸長因子 (eEF1A、eEF2、eEF3)、翻訳終結・リボソームリサイクル因子 (eRF1、eRF3、Dom34、Hbs1、Rli1)、酵母 80S リボソーム、アミノアシル tRNA、mRNA が含まれている^(48,49)。mRNA の 5' 側に、Cricket Paralysis Virus (CrPV) の Internal Ribosomal Entry Site (IRES) を有し、翻訳開始因子非依存で翻訳が開始する。CrPV IRES の下流には、発光タンパク質 nanoLuciferase (nLuc) がコードされており、合成産物の発光量により、翻訳量を評価できる (図 6A)。

CryoEM や蛍光一分子観察による解析によって、CrPV IRES 依存的な翻訳開始のメカニズムは次のように説明されている^(53, 54)。80S リボソームの CrPV IRES への結合時、tRNA を模倣した CrPV IRES のシュードノット構造 (pseudoknot I, PK I) がリボソーム A-site を占有している。次に、eEF2 は、80S:CrPV IRES 複合体上で、PK I の A-site から P-site へのトランスロケーションを引き起こす。ポリペプチド鎖合成は、eEF1A によって A-site tRNA が 80S:CrPV IRES 複合体に結合することで始まり、また 0 frame での翻訳開始が優位に起こる。つまり、これは、eEF1A による最初の tRNA のデリバリーによって読み枠が定義され、また、開始の効率が決まることを意味する。

そこで翻訳終結反応を解析するのに先立ち、eEF1A および eEF3 が翻訳系に与える効果を調べた。

異なる読み枠の翻訳を検出する為の mRNA コンストラクトを作製した (図 6A)。“none”、“+C”、“+CC” mRNA は、それぞれ、0、+1、-1 フレームのリーダー配列の後に nLuc がコードされている。C 挿入コンストラクトは、リーダー配列内で、CrPV IRES 非依存の内部翻訳開始が起こった場合、あるいは、フレームシフトが起こった場合にのみ、nLuc 活性が発現する。当該コンストラクトを、5 μ M eEF1A (リボソームに対して 10 倍量) (図 6B)、あるいは、0.5 μ M eEF1A

(リボソームと等量) (図 6C) 存在下で翻訳し、nLuc 活性を測定した。また、eEF1A による A-site tRNA の結合を促進する、翻訳伸長因子 eEF3 の効果を調べた^(4, 54) (図 6B, 6C、no eEF3)。

5 μ M eEF1A かつ 0.5 μ M eEF3 存在下では、0 frame mRNA において、効率よく nLuc が合成されていた (図 6B、0 frame, 0.5 μ M eEF3)。Out-of-frame (+1 or -1)mRNA における nLuc 合成量は、0 frame mRNA における nLuc 合成量の 1/10 以下に抑制されていた (図 6B、+1 & -1 frame, 0.5 μ M eEF3；図 6D、5 μ M eEF1A, eEF3 (+))。また、eEF3 を系中から除いても、合成量は変わらなかった (図 6D、5 μ M eEF1A, eEF3 (-) vs (+))。これは、精製された eEF1A には、1% 以下の割合で酵母内在性 eEF3 が混入していることがわかっており、それが系に持ち込まれた結果、系中に eEF3 が存在するためであると考えている⁽⁴⁸⁾。もしくは、系に十分量の eEF1A が含まれている場合は、eEF3 非存在下でも CrPV IRES 依存の翻訳開始が効率良く起こる可能性もある。

一方で、0.5 μ M eEF1A 存在下では、5 μ M eEF1A 存在下に比べて、nLuc 合成量は、約 1000 倍減少していた (図 6C；図 6D、5 μ M vs 0.5 μ M eEF1A)。これは、おそらく、高濃度 eEF1A が、IRES 依存の翻訳開始に必要であったと推察した。さらに、0.5 μ M eEF1A 存在下では、5 μ M eEF1A 存在下と比べると、0 frame mRNA における nLuc 合成量に対する、out-of-frame (+1 or -1) mRNA における nLuc 合成量が著しく多かった (図 6D、5 μ M vs 0.5 μ M eEF1A)。また、eEF3 非存在下において、out-of-frame (+1 or -1) mRNA における nLuc 合成量は、0 frame mRNA における nLuc 合成量と同等であった (図 6D、0.5 μ M eEF1A, eEF3 (-))。

これらの結果から、eEF1A と eEF3 が CrPV IRES 依存の翻訳開始に与える影響を次のように推察した (図 6E)。i) 5 μ M eEF1A 存在下において、CrPV IRES 依存的な翻訳開始が優位である。ii) 0.5 μ M eEF1A 存在下において、CrPV IRES 依存的な翻訳開始はかなり非効率であり、低い割合ではあるが、主に CrPV IRES 非依存的なランダムな内部翻訳開始が起こる。eEF3 存在下において、CrPV IRES 非依存の内部翻訳開始よりも、CrPV IRES 依存の翻訳開始が、恐らく促進され、優位になる。

次に、マルチラウンドオリゴペプチド合成系に与える eEF1A の効果を調べた。³⁵S メチオニン存在下で、短いオリゴペプチドがコードされた mRNA を翻

訳し、その合成産物の放射活性を測定することで翻訳量を評価した (図 7)。すると、マルチラウンドオリゴペプチド合成系では、0.5 μM eEF1A 存在下でも、十分に効率のいい翻訳が行われた (図 7、nLuc 合成量 : 0.1 nM (5 μM eEF1A 且つ 0.5 μM eEF3 存在下、反応開始 240 分後)、オリゴペプチド合成量 : 0.6 nM (0.5 μM eEF1A 存在下、反応開始 60 分後))。また、5 μM eEF1A 存在下におけるペプチド合成量は、0.5 μM eEF1A 存在下におけるペプチド合成量の約 4.5 倍しか増加しなかった (図 7)。

nLuc 合成において、5.0 μM の高濃度 eEF1A が必要であったのは、nLuc をコードする長い mRNA では、i) 三者複合体 (eEF1A \cdot aa-tRNA \cdot GTP) が内部翻訳開始により消費され、CrPV IRES 依存の翻訳開始が阻害される為、あるいは、ii) 翻訳開始や伸長を阻害する 2 次構造が形成される為、であると考えている。

このように翻訳開始反応に CrPV IRES を利用している本系においては、nLuc の合成では、高濃度 eEF1A 条件下で、IRES 依存の開始を優位にすることで、Out-of-frame 翻訳の割合を減少させるのが重要である。後述するように、フレームシフトを考慮する必要がある場合には、この実験条件を適用することが重要である。

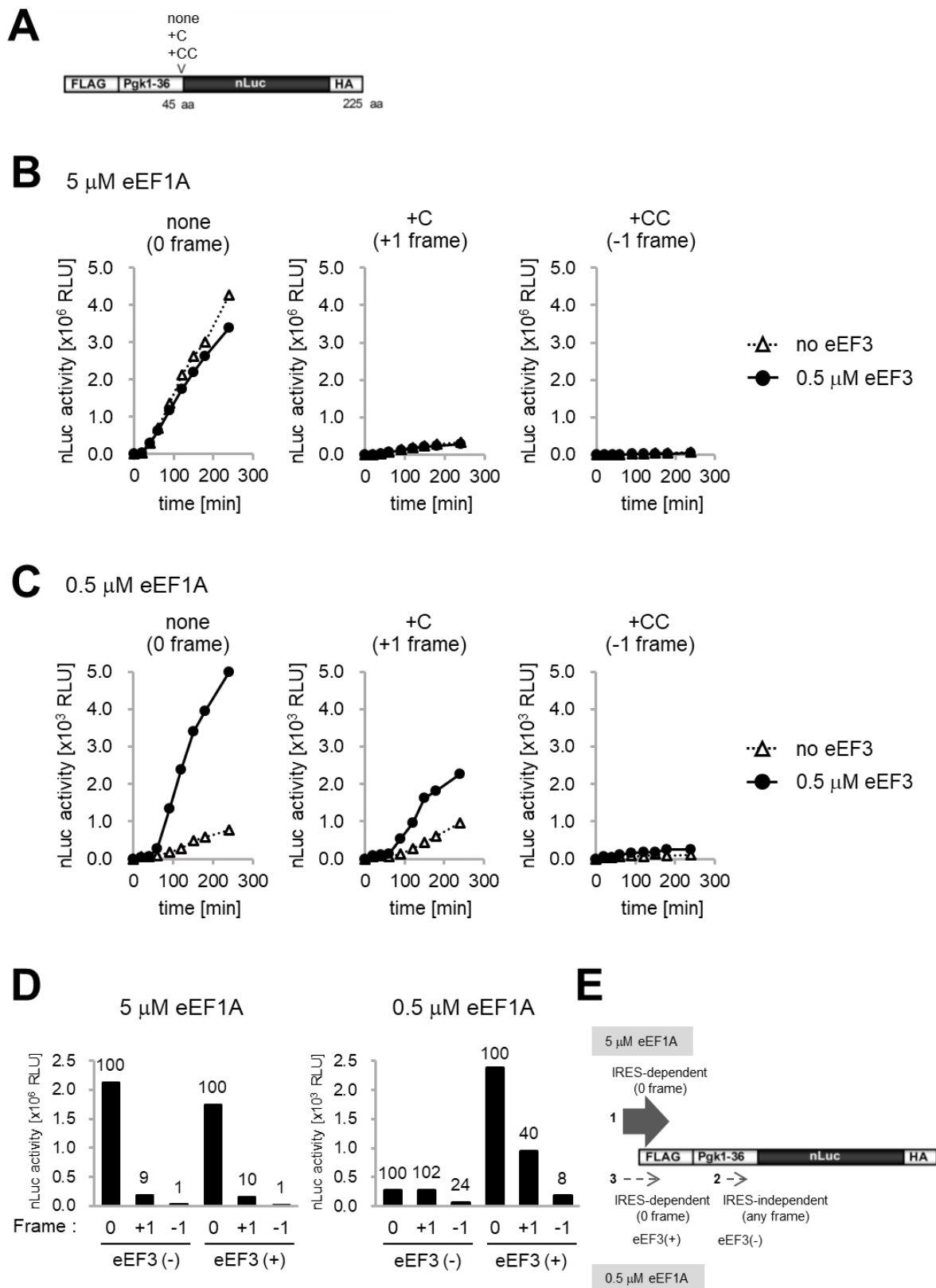


図 6 CrPV IRES を用いた nLuc 合成系における eEF1A および eEF3 の効果。

- A: 本解析で用いた mRNA の模式図。+C、+CC :ヌクレオチド C あるいは CC が、リーダー配列と nLuc の配列の間に挿入されている。リーダー配列は、FLAG タグ、酵母 Pgk1 の N 末端の 36 アミノ酸 (Pgk1-36) がコードされている。+C、+CC は、それぞれ、リーダー配列で生じた+1 あるいは-1 フレームでの翻訳を検出するのに用いる。
- B,C: 5 μ M eEF1A 存在下 (B)、または、0.5 μ M eEF1A 存在下 (C)、における nLuc の合成。翻訳反応は、(A) で示されている mRNA を用いて行った。明記されている場合、eEF3 を翻訳反応系から除いた。示されている反応時間、翻訳反応を行ったのち、nLuc 活性を測定した。 Δ : eEF3 非存在下、● : 0.5 μ M eEF3 存在下。5 μ M eEF1A 存在下、且つ eEF3 存在下の、反応開始 240 分後における nLuc 合成量は、約 0.1 nM であった。
- D: (B) および (C) の反応における、反応開始 150 分後における nLuc 活性。0 フレームに対する、+1 あるいは-1 フレームの nLuc 合成量の比率が棒上に示されている。0 フレームでの相対的な nLuc 活性を 100 とした。翻訳反応における eEF1A 及び eEF3 の濃度条件を明記した。
- E: eEF1A 濃度が翻訳開始に与える影響の模式図。5 μ M eEF1A 存在下において、CrPV IRES 依存の開始が優位になる (矢印 1)。0.5 μ M eEF1A 存在下において、CrPV IRES 依存の翻訳開始は極めて少なく、CrPV IRES 非依存のランダムな翻訳開始が低い割合ではあるが生じている (矢印 2)。eEF3 存在下において、おそらく CrPV IRES 依存の翻訳開始が促進されている (矢印 3)。それぞれの矢印の太さは、翻訳開始の効率を示している。

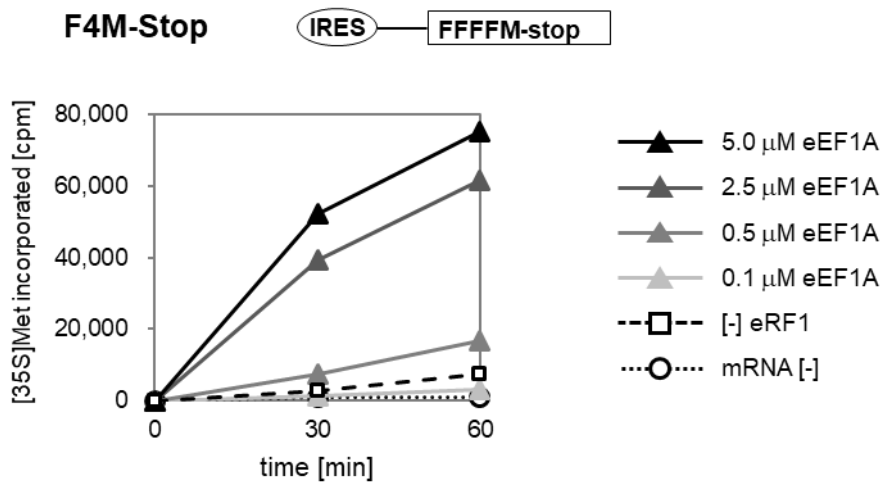


図 7 マルチラウンドオリゴペプチド合成系における eEF1A の効果。

本解析で用いた mRNA の模式図 (上)。ペンタオリゴペプチド (FFFFM) が CrPV IRES の下流にコードされている。翻訳反応は、³⁵S メチオニンでラベルされたアミノアシル tRNA を用いて行った。示されている反応時間、示されている eEF1A 濃度条件下で、翻訳反応を行ったのち、合成されたオリゴペプチドを酢酸エチル抽出によって回収し、合成されたオリゴペプチドの量を ³⁵S メチオニンのペプチドへの取り込みによって評価した。mRNA [-] と [-] eRF1 は、それぞれ、mRNA 非存在下と eRF1 非存在下において、0.5 μM eEF1A 存在下で翻訳反応を行った。マルチラウンドオリゴペプチド合成系は、eRF1 依存的にペプチド合成が行なわれる (図 11)。0.5 μM eEF1A 存在下の、反応開始 60 分後における FFFFM オリゴペプチドの合成量は、約 0.6 nM である。

3.2 連続 CGA 配列において eRF1 依存的な premature termination が起きる

3.2.1 連続 CGA 配列における premature termination の発見

酵母では、アルギニンをコードする CGA コドンの連続配列において、リボソームが翻訳停止し、フレームシフトが引き起こされることが報告されている^(55,56)。連続 CGA 配列における翻訳を解析する為に、連続 CGA 配列を nLuc の直前に挿入した mRNA コンストラクトを作製した (図 8A)。当該コンストラクトを用いて翻訳反応を行った所、翻訳が抑制された (挿入のない no motif mRNA に対して、1/100) (図 8B、no motif の翻訳量 >> CGA x6 の翻訳量)。次に、35S メチオニンで標識されたアミノアシル tRNA を翻訳系に添加し、Tricine SDS-PAGE により翻訳産物を検出した。挿入のない no motif mRNA を翻訳すると、全長の翻訳産物を含むペプチジル tRNA が検出された (図 8C、レーン 1, Full-length peptidyl-tRNA)。このことから、本系において、終止コドンにおけるペプチド解離の効率が低いことが示唆された。同サンプルを RNase A で処理すると、tRNA が分解され、バンドが低分子側に移動する (図 8C、レーン 2, Full-length)。次に連続 CGA 配列を挿入した mRNA を用いて翻訳産物を解析したところ、短い翻訳産物が検出された (図 8C、レーン 3)。このバンドは、RNase A で処理しても、バンドの位置が変化しないことから、tRNA 成分を含まないペプチドであることがわかった (図 8C、レーン 4)。この短いペプチドは、i) CGA センスコドン上で生じた premature termination 産物、あるいは、ii) CGA 配列でフレームシフトを起こしたことによって、ORF 上に現れた終止コドンで生じた終結産物である可能性が考えられた。以上の仮説を検証するために、フレームシフト翻訳を評価できる系を用いた (図 6、5.0 μ M eEF1A, 0.5 μ M eEF3 条件)。CGA の直後に、シトシン (+C、+CC) を挿入したコンストラクトを作製し、翻訳反応を行った (図 8A, 8D, 8E)。すると、シトシンを挿入したコンストラクトにおいて、全長にあたる翻訳産物は検出されず、全てのコンストラクト (0、+C、+CC) において、長さの同じ短いペプチドリリース産物が検出された (図 8E)。従って、連続 CGA 配列では、センスコドン上で premature termination が起こっていることが明らかとなった。(フレームシフトが起こった場合には、全長翻訳産物が検出されるはずであった。)

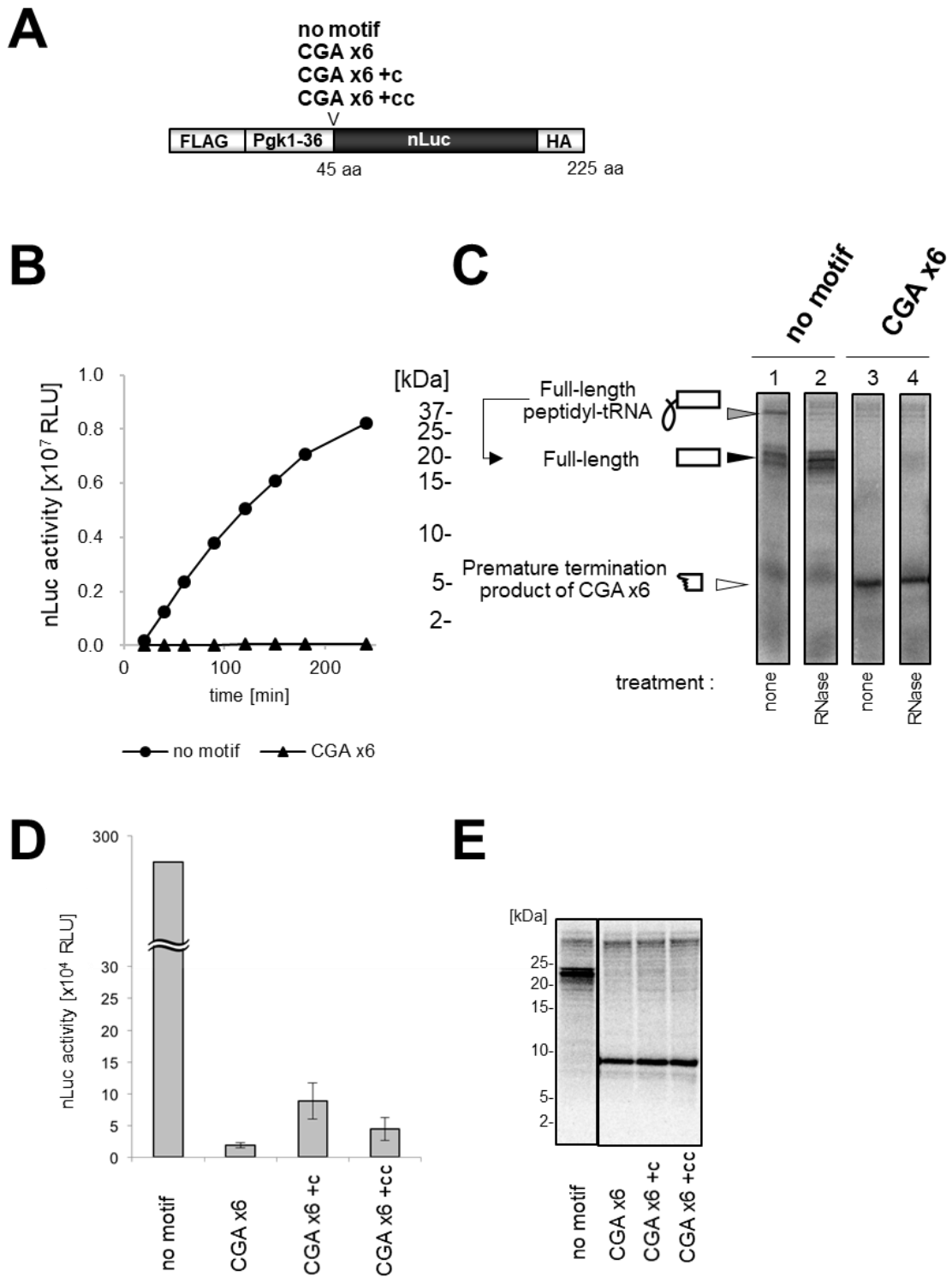


図 8 連続 CGA 配列における premature termination の発見。

- A: 本解析で用いた mRNA の模式図。no motif: リーダー配列と nLuc の配列の間に、挿入のない mRNA。CGA x6: リーダー配列と nLuc の配列の間に、6 連続で CGA コドンが挿入された mRNA。CGA x6 +C、CGA x6 +CC: CGA x6 mRNA の連続 CGA 配列と nLuc の配列の間に、ヌクレオチド C あるいは CC が挿入された mRNA。CGA x6 +C、CGA x6 +CC は、それぞれ、+C、+CC の挿入より上流で生じた+1 あるいは-1 フレームでの翻訳を検出するのに用いる。
- B: no motif mRNA と CGA x6 mRNA の nLuc 活性の経時測定。示されている反応時間、翻訳反応を行ったのち、nLuc 活性を測定した。●: no motif、▲: CGA x6。
- C: CGA x6 mRNA における翻訳産物の解析。翻訳反応開始 240 分後における、翻訳反応液を未処理 (none)、あるいは、RNase A で処理 (RNase) し、Tricine SDS-PAGE にて、翻訳産物を展開した。なお、翻訳産物の解析では、翻訳系に [³⁵S] メチオニンで標識されたアミノアシル tRNA を添加しており、[³⁵S] メチオニンが取り込まれた翻訳産物を検出する。黒矢印: 全長翻訳産物、灰矢印: 全長翻訳産物ペプチジル tRNA、白矢印: CGA コドンで生じる premature termination 産物。
- D,E: 連続 CGA 配列では premature termination が生じる。翻訳反応開始 120 分後における、nLuc 活性を測定した。エラーバーは、独立した 3 回の実験値の標準偏差 (D)。同じサンプルの残りを、RNase A で処理後、Tricine SDS-PAGE を用いて、翻訳産物を解析した (E)。

3.2.2 連続 CGA 配列における premature termination の因子依存性の解析

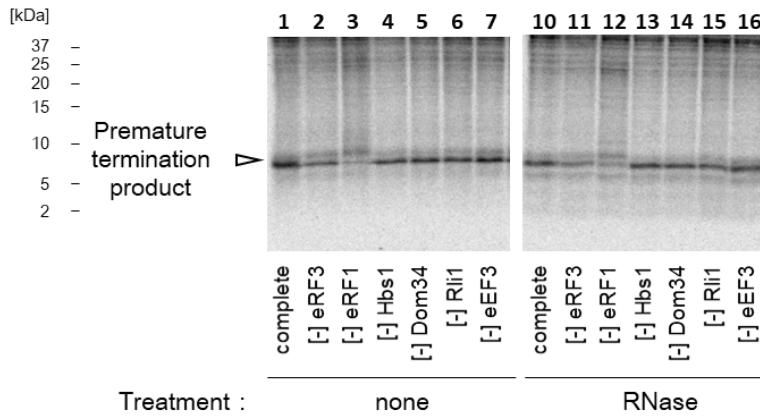
連続 CGA 配列において premature termination を引き起こしている因子の同定を行った (図 9)。翻訳終結因子 eRF1、eRF3 に加えて、リボソーム解離因子が premature termination 産物に与える影響を調べた。Dom34 (哺乳類 Pelota) は、3' 端にポリ A 配列がない終止コドンに欠いた Non-Stop mRNA の 3' 末端で停止した、つまり、A-site に mRNA がないリボソームの解離因子である⁽⁴⁷⁾。Dom34 は、eRF1 と構造的に似ているが、i) 終止コドンを認識する NIKS モチーフを含むドメインが存在せず、ii) ペプチド解離を触媒する GGQ モチーフを持たず、iii) リボソーム結合型 GTPase Hbs1 (哺乳類 Hbs1) によりリボソーム A-site にデリバリーされるといふ点が異なる。Rli1 (哺乳類 ABCE1) は、Dom34、あるいは、eRF1 と協調して、リボソーム解離を促進する因子である^(47,57)。また、翻訳終結反応において、Rli1 は、eRF3 と解離した後の eRF1 とリボソーム上で相互作用し、eRF1 のペプチド解離反応を促進する^(47,58)。ABCE1-eRF1-80S 複合体の cryo-EM 構造では、ABCE1 が eRF1 を accommodated 状態構造に安定化することがわかっている^(47, 59)。eEF3 は、翻訳終結後リボソーム複合体 (post-termination complex, post-TC) に作用し、ATP 依存的にリボソームを解離することが示唆されている⁽⁶⁰⁾。また、eEF3 のホモログ New1 は、直前に塩基性アミノ酸がある終止コドンにおける翻訳終結を促進する⁽⁶¹⁾。

これらの因子を翻訳反応液中から除いて、翻訳反応を行った。ペプチド解離活性を持つ翻訳終結因子 eRF1 を系から除いた場合に、premature termination 産物が消失した (図 9A, B、レーン 3)。即ち、連続 CGA 配列における premature termination は、eRF1 によって促進されていることが明らかとなった。Rli1 を系から除いた場合に、premature termination 産物が減少しなかった (図 9A, B、レーン 6)。一方で、eRF3 を系から除いた場合に、premature termination 産物が減少した (図 9A, B、レーン 2)。Rli1 は、eRF1 のペプチド解離反応を促進すると考えられている。一方、eRF3 は、eRF1 の A-site へのデリバリーを促進し、eRF1 のデコーディング速度を向上させる。本系においては、CGA コドン上への eRF1 のデコーディング速度が遅いことが推察された。

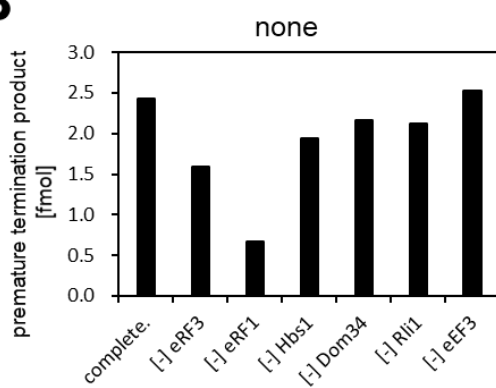
また、eRF1 を系から除いた場合でも、連続 CGA 配列の nLuc 合成量 (6.0×10^5 RLU) が no motif mRNA の nLuc 合成量 ($\approx 3.0 \times 10^6$ RLU, データ示さず) までは増加しなかった (図 8D)。連続 CGA 配列で翻訳停止したリボソームの A-site において mRNA 構造の異常が確認されており、アミノアシル tRNA が結合できないと考えられている⁽⁶²⁾。このことから、連続 CGA 配列では、アミノアシル tRNA のデコーディング不全による翻訳停止に伴い premature termination が起こっていることが推察された。

通常センスコドン上では終結因子はアミノアシル tRNA との競合に負ける。しかし連続 CGA 配列ではアミノアシル tRNA が A-site に結合できないため、eRF1・eRF3 が A-site に結合し、さらに eRF1 が CGA コドンを終止コドンとして認識したため、premature termination が起きたと考えている (図 9E)。

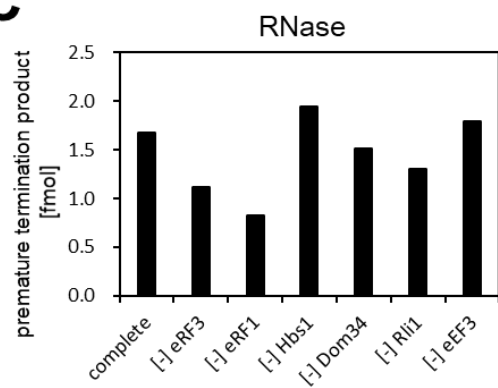
A



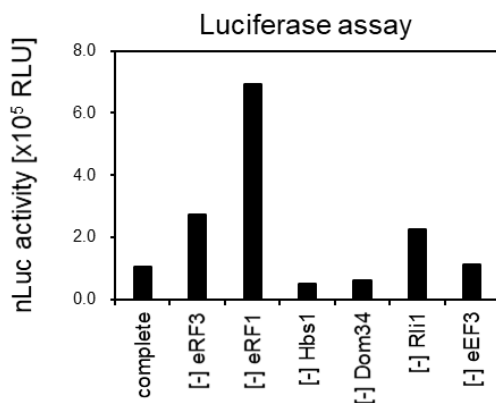
B



C



D



E

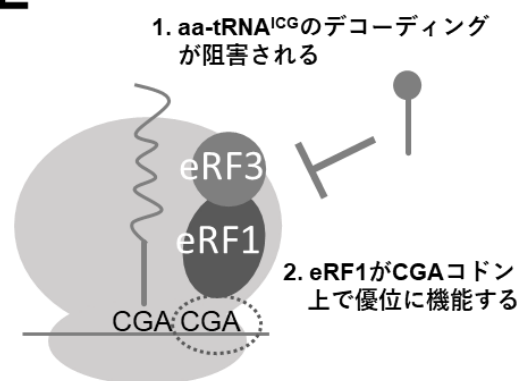


図 9 連続 CGA 配列における premature termination は eRF1・eRF3 によって引き起こされる。

- A: 翻訳終結に関与する翻訳因子が premature termination 産物量に与える効果。示された各翻訳因子を翻訳反応系中から除いて、CGA x6 mRNA を用いて翻訳反応を行った。翻訳反応開始 180 分後に、翻訳反応液を未処理 (none)、あるいは、RNase A で処理 (RNase) し、Tricine SDS-PAGE にて、翻訳産物を展開した。complete: どの因子も系中から除いていない翻訳反応系。白矢印: CGA コドンで生じる premature termination 産物。
- B,C: (A) における、premature termination 産物量のバンド定量。(A) において、premature termination 産物のバンドを定量した。Tricine SDS-PAGE の各レーンにアプライした反応液 10 μ L における、premature termination 産物量が示されている。
- D: (A) における、各サンプルの nLuc 活性。(A) において、翻訳反応開始 180 分後における、nLuc 活性を測定した。
- E: eRF1 \cdot eRF3 による CGA コドンにおける premature termination 機構のモデル。連続 CGA 配列では、アミノアシル tRNA のデコーディングが阻害されていることがわかっている。その為、eRF1 \cdot eRF3 が A-site に結合し、さらに eRF1 が CGA コドンを終止コドンとして認識した結果、premature termination が起きたと考えている。

3.2.3 eIF5A が eRF1 依存的な premature termination に与える影響の解析

リボソームと等量の eIF5A (0.5 μ M) 存在下で、連続 CGA 配列を挿入した mRNA を翻訳した。ハイプシン修飾 eIF5A、および、デオキシハイプシン修飾 eIF5A 存在下において、premature termination 産物の量が増加した (図 10D、レーン 5 vs レーン 6, レーン 7)。また、未修飾 eIF5A (0.5 μ M) 存在下においても、premature termination 産物の量が増加した (図 10D、レーン 5 vs レーン 8)。即ち、eIF5A 存在下において、ハイプシン修飾非依存で、連続 CGA 配列における eRF1 依存の premature termination が促進される可能性が示唆された。これについて、後述するマルチラウンドオリゴペプチド合成系を利用して更に検証することとした。

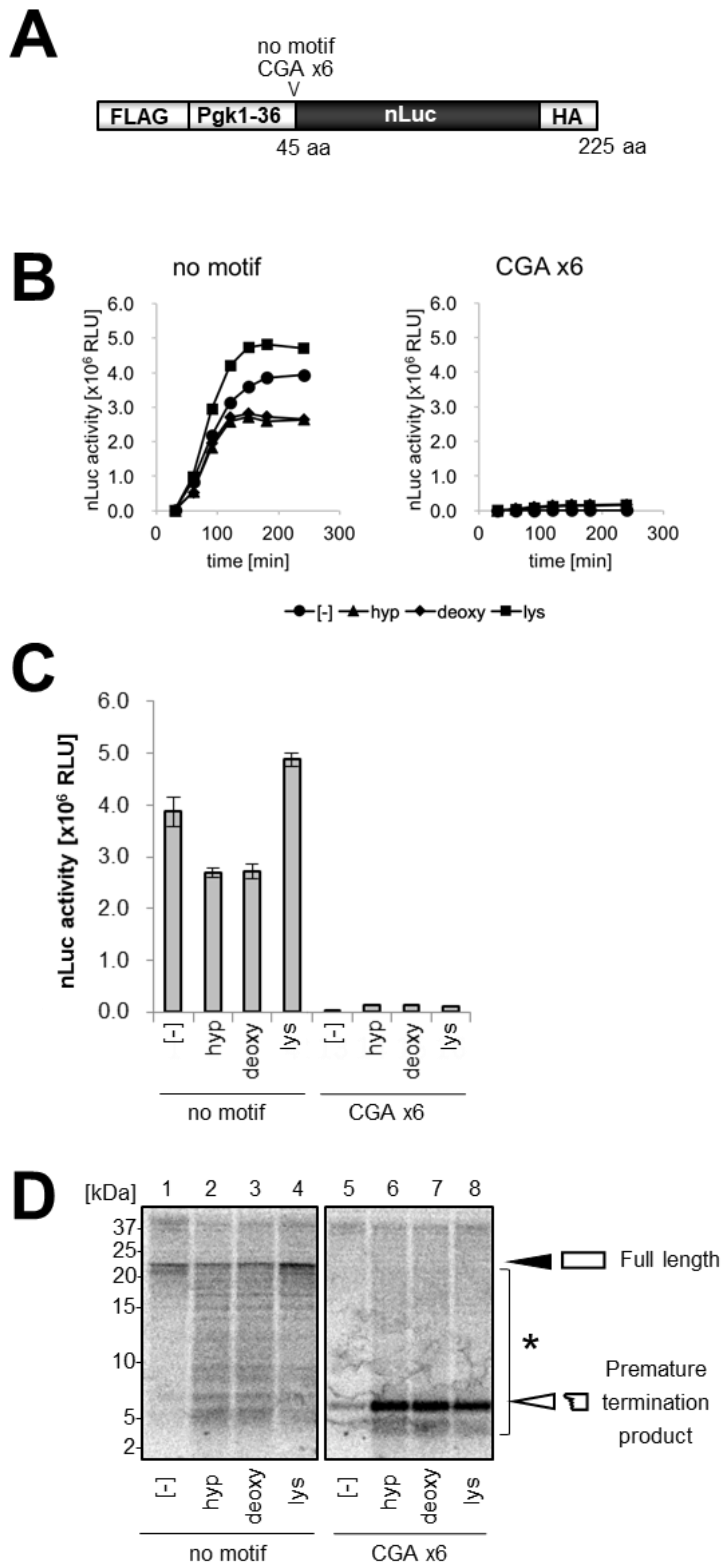


図 10 eIF5A が翻訳に与える影響の解析。

- A: 本解析で用いた mRNA の模式図。
- B: 示された mRNA を用いて、0.5 μ M eIF5A (リボソームと等量) 存在下において、翻訳反応を行った。示されている反応時間、翻訳反応を行ったのち、nLuc 活性を測定した。[-]: eIF5A 非存在下、hyp: hypusine 修飾 eIF5A、deoxy: deoxyhypusine 修飾 eIF5A、lys: 未修飾 eIF5A。
- C: 翻訳反応開始 150 分後の nLuc 活性。エラーバーは、独立した 3 回の実験値の標準偏差。
- D: 翻訳反応開始 240 分後、サンプルを RNase A で処理し、Tricine SDS-PAGE を用いて、翻訳産物を解析した。黒矢印: 全長翻訳産物、白矢印: CGA コドンで生じる premature termination 産物。(*) は、ORF 上の複数個所で生じた premature termination 産物と考えており、eIF5A 存在下において特異的に生ずる。

3.2.4 マルチラウンドオリゴペプチド合成系を利用した連続 CGA 配列における premature termination の解析

IRES の下流に FFFFM-Stop 配列をもつ F4M-Stop mRNA を用意した(図 11A)。終止コドン (Stop) の代わりに、CGA_{x6} 配列を挿入した F4M-[CGA_{x6}] mRNA を用意した (図 11A)。翻訳反応を HCl で停止させた後、リボソーム上から解離したペプチドを酢酸エチルで抽出した。この抽出されたペプチドの放射線量を測定することにより、³⁵S メチオニンで標識されたアミノアシル tRNA のペプチドへの取り込み量を評価した。尚、リボソーム上から解離していないペプチドや遊離アミノアシル tRNA は HCl 処理で沈殿するため抽出されない。

F4M-[CGA_{x6}] mRNA を翻訳すると、eRF1 非存在下では、mRNA [-] と同等の放射線量を示すことから、シングルラウンドで翻訳が停止し、ペプチド解離が起こっていないことが推察される (図 11C、eRF1 [-] の [-] eIF5A のペプチド合成量 = mRNA [-] の値)。しかし、eRF1 存在下において翻訳量が増加した (図 11C、eRF1 [+] の [-] eIF5A のペプチド合成量 > eRF1 [-] の [-] eIF5A のペプチド合成量)。これは、eRF1 存在下において、連続 CGA 配列における premature termination が起こり、翻訳がマルチラウンドで行われるようになった為であると考えられた。

F4M-[CGA_{x6}] の翻訳時に、リボソームと等量の eIF5A (0.5 μM) を添加しても、ペプチド合成量は有意には増加しなかった (図 11C、eRF1 [+] の [+] hyp あるいは [+] lys のペプチド合成量 ≈ eRF1 [+] の [-] eIF5A のペプチド合成量)。eIF5A が翻訳に与える影響については、4.5 で考察する。

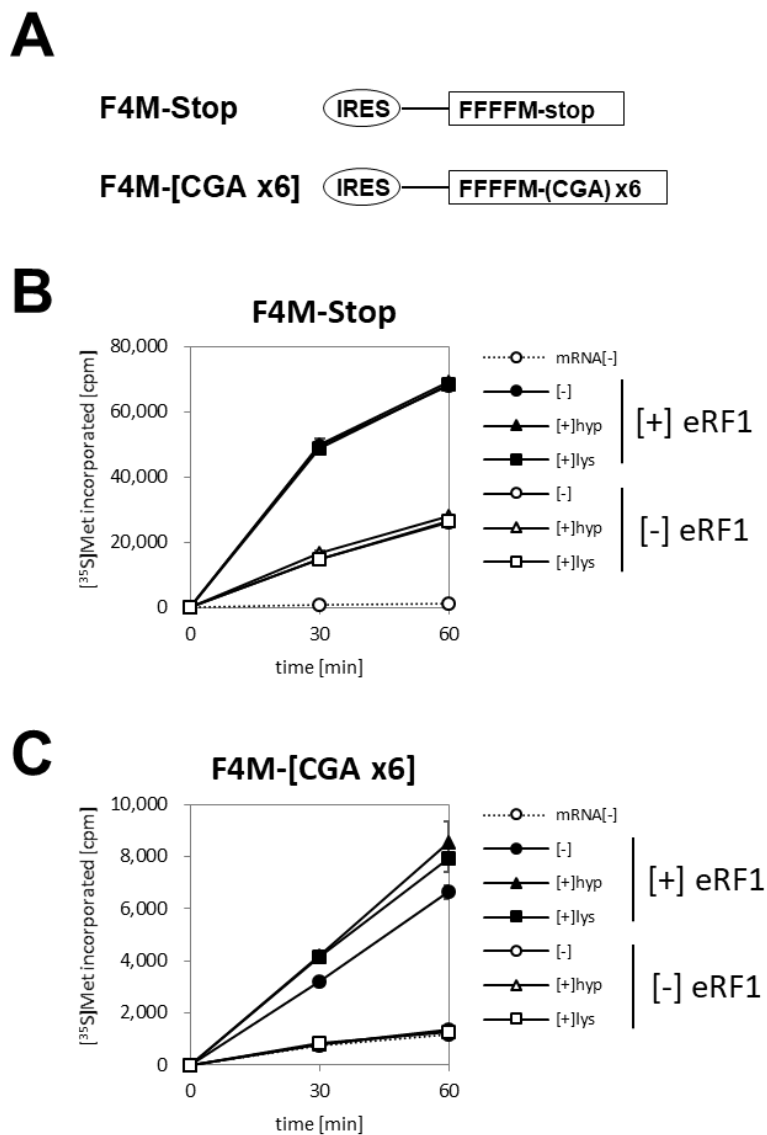


図 11 マルチラウンドオリゴペプチド合成系を利用した premature termination の解析。

A: 本解析で用いた mRNA の模式図。

B: F4M-Stop mRNA では、ペントペプチド FFFFM が合成され、eRF1 存在下において、そのすぐ下流の終止コドンで効率のいい翻訳終結が生じる。一方で、eRF1 非存在下において、eRF1 非依存の翻訳終結が生じる。

C: F4M-[CGA x6] mRNA では、ペントペプチド FFFFM が合成され、そのすぐ下流の CGA コドンでリボソームが翻訳停止する。eRF1 存在下において、eRF1 依存の premature termination が生じる。

3.3 終止コドンにおいて eRF1 非依存的な終結が起きる

3.3.1 終止コドンにおける eRF1 非依存的な終結の発見

nLuc の直前に終止コドン (UAA、UAG、UGA) をリーダー配列と nLuc の配列の間に挿入した mRNA を用意した (図 12A)。当該コンストラクトを eRF1 存在下で翻訳したところ、挿入のない no motif mRNA に対して、nLuc 活性が著しく減少した (図 12D 右図、eRF1 [+], [-] eIF5A (Δ))。これは、ORF 内部に挿入した終止コドン上で、eRF1 による終結が生じたためであると考えられた。また、eRF1 非存在下で、終止コドンを ORF 内に挿入した mRNA を翻訳した場合、挿入のない no motif mRNA に対して、nLuc 活性が著しく減少した (図 12D 左図、eRF1 [-], [-] eIF5A (Δ))。これは、ORF 内部の終止コドンで翻訳停止したリボソーム・新生鎖複合体が形成されているためであると予想された。

終止コドンにおける翻訳停止の状況を確認する為に、上述したコンストラクトを用いて翻訳し、翻訳産物を解析した (図 12E)。eRF1 存在下で、ORF 内部に終止コドンを挿入した mRNA を翻訳し、翻訳産物を解析すると、短い翻訳産物が検出された (図 12E、レーン 11)。これは、RNase A 処理においてもバンドの位置が変化しないことから、tRNA 成分を含まないペプチドであることがわかった (図 12E、レーン 11 vs レーン 15)。つまり、eRF1 によって、挿入された終止コドン上で生じた翻訳終結産物であると考えられた。このバンドの分子量は、図 7C で見られた連続 CGA 配列における premature termination 産物の大きさとほぼ一致する (図 8C、図 10D)。また、eRF1 非存在下において、終止コドンを ORF 内に挿入した mRNA を翻訳すると、短いペプチドが検出された (図 12E、レーン 9)。つまり、eRF1 非依存的な翻訳終結が起こっていることが示唆された。また、どの終止コドン (UAA、UAG、UGA) を ORF 内に挿入した場合においても、eRF1 非依存的な終結が起こることを確認した (図 12F, G)。

終止コドンにおける翻訳停止の状況をさらに確認する為、挿入のない no motif mRNA を用いて、eRF1 に依存しない翻訳終結が生じるか検証した。no motif mRNA を用いて、eRF1 非存在下で翻訳すると、nLuc 活性は、eRF1 存在下と同等であった (図 12B、左図、eRF1 [-], [-] eIF5A (Δ) = 右図、eRF1 [-], [-] eIF5A (Δ))。このことから、本系ではシングルラウンドの翻訳が起こっていることが示唆された。次に、翻訳産物を解析した (図 11C)。eRF1 存在下で、no

motif mRNA を翻訳すると、ペプチド解離した全長の翻訳産物が検出された (図 12C、レーン 3)。これは、eRF1 によって、終止コドン上で翻訳終結が起きたことを意味する。また、eRF1 非存在下において、no motif mRNA を翻訳すると、全長の翻訳産物が検出された (図 12、レーン 1)。つまり、eRF1 非依存的な翻訳終結が起こっていることが示唆された。

翻訳反応系中に、酵母内在性 eRF1 が混入しているか確認した。翻訳系中に含まれる、酵母から精製している翻訳因子 (eEF1A、eEF2、Rli1、80S リボソーム) に含まれている酵母内在性 eRF1 の量を、抗 eRF1 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより定量した。その結果、酵母から精製している因子への内在性 eRF1 の混入量は検出限界以下であった (図 13)。

3.3.2 eIF5A が eRF1 非依存的な終結に与える影響の解析

eRF1 非存在下で生じる翻訳終結に eIF5A が与える影響を解析するために、終止コドン挿入した mRNA と挿入のない no motif mRNA をそれぞれ、eIF5A 存在下で翻訳した (図 12)。

no motif mRNA を用いて、eRF1 存在下で、リボソームと等量の eIF5A (0.5 μ M) を添加して翻訳反応を行うと、全長の翻訳産物の量が増加した (図 12C、レーン 3 vs レーン 4)。すなわち、eIF5A が eRF1 によるペプチド解離を促進した可能性が示唆された。同 mRNA を用いて、eRF1 非存在下で、リボソームと等量の eIF5A (0.5 μ M) を添加して翻訳反応を行うと、eRF1 非依存的な翻訳終結産物の量が増加した (図 12C、レーン 1 vs レーン 2)。

UAG 終止コドン挿入した mRNA を用いて、eRF1 存在下で、リボソームと等量の eIF5A (0.5 μ M) を添加して翻訳反応を行うと、内部翻訳終結産物の量が増加した (図 12E、レーン 11 vs レーン 12)。すなわち、eIF5A が内部の終止コドンにおける eRF1 によるペプチド解離を促進した可能性が示唆された。同 mRNA を用いて、eRF1 非存在下で、リボソームと等量の eIF5A (0.5 μ M) を添加して翻訳反応を行うと、eRF1 非依存的な内部翻訳終結産物の量が増加した (図 12E、レーン 9 vs レーン 10)。

以上の結果から、eIF5A は、eRF1 非依存的な終結を促進する可能性が示唆された。これについて、マルチラウンドオリゴペプチド合成系を利用して更に検証した。

3.3.3 マルチラウンドオリゴペプチド合成系を利用した eRF1 非依存的な終結の解析

マルチラウンドオリゴペプチド合成系を用いて、F4M-Stop mRNA を eRF1 存在下で翻訳するとペプチドの合成が検出された (図 11B、eRF1 [+] の [-] eIF5A のペプチド合成量 >> eRF1 [-] の [-] eIF5A のペプチド合成量)。その合成量は、F4M-[CGA x 6] mRNA の場合のおよそ 10 倍であり、eRF1 が効率良く終止コドンを認識してペプチドを解離し、マルチラウンドに翻訳が行われたことを意味する。

一方で、eRF1 非存在下においても mRNA [-] に比べて有意にペプチド合成がみられた (図 11B、eRF1 [-] の [-] eIF5A のペプチド合成量 >> mRNA [-] の値)。これは、eRF1 非存在下において、終止コドンにおいてペプチドが解離し、さらにマルチラウンドに翻訳が行われていることを意味する。

また、eRF1 非存在下において、リボソームと等量の eIF5A (0.5 μ M) 存在下では、ペプチド合成量が増加しないことも明らかとなった (図 11B、eRF1 [-] の [+] hyp あるいは [+] lys のペプチド合成量 = eRF1 [-] の [-] eIF5A のペプチド合成量)。eIF5A が翻訳に与える影響については、4.5 で考察する。

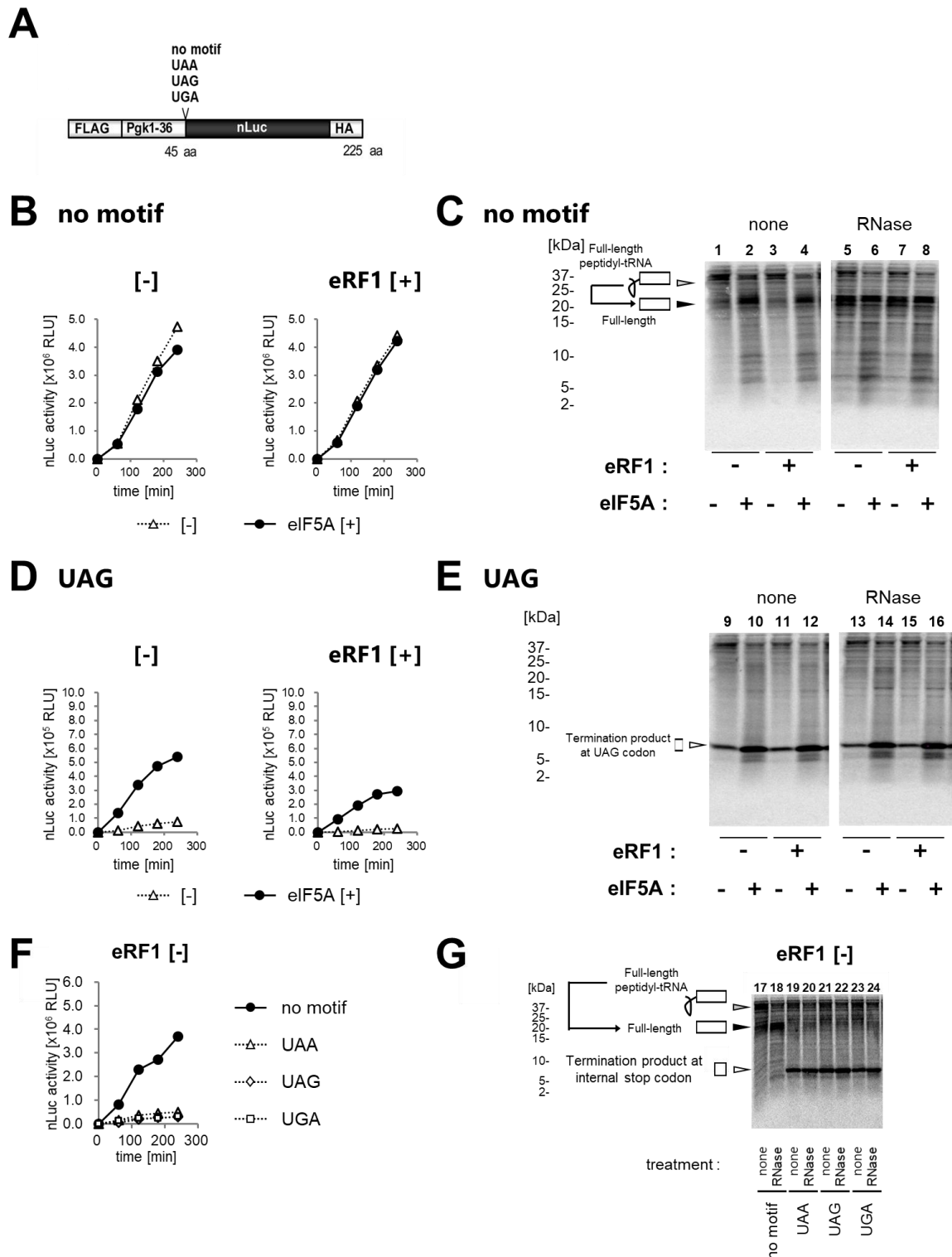


図 12 終止コドンにおける eRF1 非依存な終結の発見。終止コドンにおける eRF1 非依存な終結に与える eIF5A の効果。

- A: 本解析で用いた mRNA の模式図。リーダー配列と nLuc の配列の間に終止コドン (UAA、UAG、または UGA) が挿入されている。
- B,C: no motif mRNA における eIF5A が翻訳に与える影響。nLuc 活性の経時測定 (B) と、反応開始 240 分後における eRF1 非依存的な翻訳終結産物の Tricine SDS-PAGE による解析 (C)。(B) 示されている反応時間、翻訳反応を行ったのち、nLuc 活性を測定した。[-]: eRF1 非存在下、eRF1 [+]: eRF1 存在下、△: eIF5A 非存在下、●: 0.5 μM hypusine 修飾 eIF5A 存在下。(C) none (RNase 未処理) で現れる full-length のバンドが eRF1 非依存の終結産物 (レーン 1)。黒矢印: 全長翻訳産物、白矢印: 全長翻訳産物ペプチジル tRNA。
- D,E: UAG 挿入 mRNA における eIF5A が翻訳に与える影響。nLuc 活性の経時測定 (D) と、反応開始 240 分後における eRF1 非依存的な翻訳終結産物の Tricine SDS-PAGE による解析 (E)。(D) 示されている反応時間、翻訳反応を行ったのち、nLuc 活性を測定した。[-]: eRF1 非存在下、eRF1 [+]: eRF1 存在下、△: eIF5A 非存在下、●: 0.5 μM hypusine 修飾 eIF5A 存在下。(E) none (RNase 未処理) で現れる短いバンド (Termination product at UAG codon) が eRF1 非依存の終結産物 (レーン 9)。白矢印: CGA コドンで生じる premature termination 産物。
- F,G: 終止コドン (UAA、UAG、または UGA) 挿入 mRNA を用いた翻訳における、nLuc 活性の経時測定 (F) と、反応開始 240 分後における eRF1 非依存的な翻訳終結産物の Tricine SDS-PAGE による解析 (G)。(F) 示されている反応時間、翻訳反応を行ったのち、nLuc 活性を測定した。●: no motif mRNA、△: UAA 挿入 mRNA、◇: UAG 挿入 mRNA、□: UGA 挿入 mRNA。(G) none (RNase 未処理) で現れる短いバンド (Termination product at internal stop codon) が eRF1 非依存の終結産物 (レーン 17, 19, 21, 23)。黒矢印: 全長翻訳産物、灰矢印: 全長翻訳産物ペプチジル tRNA、白矢印: CGA コドンで生じる premature termination 産物。

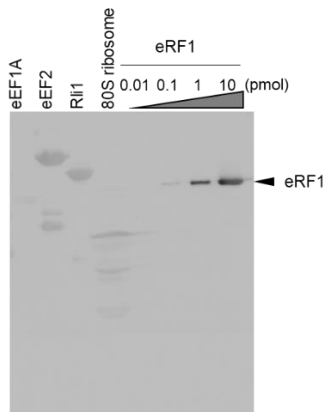


図 13 酵母から精製されている因子への内在性 eRF1 の混入の確認。

翻訳反応系に含まれる酵母から精製された翻訳因子、各 100 pmol に対して、含まれている酵母内在性 eRF1 の量を、抗 eRF1 抗体を用いたウェスタンプロットで定量した。右レーンには、精製された eRF1 を左から順に、0.01、0.1、1、10 pmol ずつ SDS-PAGE のウェルにアプライしており、酵母から精製してきた因子に含まれる内在性 eRF1 の定量に用いた。

4 考察

4.1 本研究のまとめ

本研究では、酵母由来再構成型無細胞翻訳系を利用して翻訳終結反応を解析した。このシステムは、eRF1 によるペプチド解離反応と競合する因子やイベントの存在下で解析することができ、翻訳終結反応の制御の解明に有効である。

はじめに eEF1A 及び eEF3 濃度を調節することによって、フレームシフト翻訳を正しく評価できる翻訳条件を決定した(図 6)。その翻訳条件下で連続 CGA 配列の翻訳抑制について解析することにより、premature termination が起こることを明らかにした(図 8)。また、premature termination は、翻訳終結因子 eRF1・eRF3 によって引き起こされることを示した(図 9)。さらに、マルチラウンドオリゴペプチド合成系を利用して、連続 CGA 配列では eRF1 依存の premature termination が起こることが支持された(図 11C)。

また、終止コドンにおける eRF1 非依存の終結を発見した(図 12)。さらに、マルチラウンドオリゴペプチド合成系を利用して、終止コドンにおいて eRF1 非依存の終結が起こることが支持された(図 11B)。

また、終止コドンにおける eRF1 非依存的な終結を引き起こしている因子は不明であるが、near-cognate デアシル tRNA が終結を引き起こしていると仮説を立てている。

4.2 翻訳終結制御機構を解析するための *in vitro* 再構成型翻訳系の確立

これまでの翻訳終結の生化学的解析は、終結因子と競合する因子が限定された条件下で行われていた。本解析では、酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系を利用することで、翻訳終結因子 eRF1 によるペプチド解離反応と競合する因子やイベントの存在下で解析できるシステムを確立した。本解析の結果から、CGA コドン上では、“アミノアシル tRNA と eRF1 との競合”、終止コドン上では、恐らく、“near-cognate デアシル tRNA と eRF1 との競合”、が起こる。生体内においても、翻訳終結過程では、様々な A-site 結合因子の競合が起こっているはずである。確立した本システムは、このような生体内の翻訳終結における競合反応を再現することが可能であり、本研究は真核生物における翻訳終結制御、例えば、終止コドンにおける翻訳終結に加えて、終止コドンの読み飛ばし、センスコドン上における中途翻訳終結、の機構を解明するための基盤となる。また、out-of-frame 翻訳の割合が低下した翻訳系を構築できたことは、フレームシフトをはじめとした翻訳伸長制御機構の解析の基盤技術としても有用である。

本解析の結果、CrPV IRES を用いた nLuc 合成系において、過剰量（リボソームの 10 倍量）の eEF1A が必要であることがわかった（図 6）。生体内において、三者複合体（eEF1A・aa-tRNA・GTP）として翻訳過程で機能している eEF1A の量は不明であるが、本系が生体のリボソーム A-site における、翻訳に関与する因子の競合反応を再現出来ていない可能性がある。その為、今後は、eEF1A 濃度を下げた条件で、効率のいい翻訳開始が起こる系を構築することが課題である。例えば、5' キャップ構造に依存した翻訳開始反応を再構築し、翻訳開始の効率を eEF1A 非依存的に向上させる必要がある。または、翻訳効率が良い変異体 CrPV IRES の利用も検討する⁽⁶³⁾。

4.3 eRF1 による CGA コドンの認識

eRF1 による終止コドンの認識機構に基づいて⁽¹⁵⁻¹⁷⁾、eRF1 による CGA コドンの認識機構について考察する。終止コドンの 1 塩基目の U の認識には、eRF1 の NIKS⁵⁸⁻⁶¹ モチーフとの相互作用 (N⁵⁸, K⁶⁰ と U のカルボニル基との水素結合) が重要である(図 3B)。また、先行研究の eRF1・リボソーム複合体の構造解析により、一文字目が pyrimidine 塩基 (U, C) の場合は、NIKS モチーフとの立体障害は起こらないことが示唆されている⁽¹⁵⁾。また、CGA コドンは、UGA 終止コドンと 2、3 文字目は同じであり、終止コドン識別において重要な 2-3 塩基間のスタッキング相互作用は形成されていることが予想される^(15,16) (図 3D)。

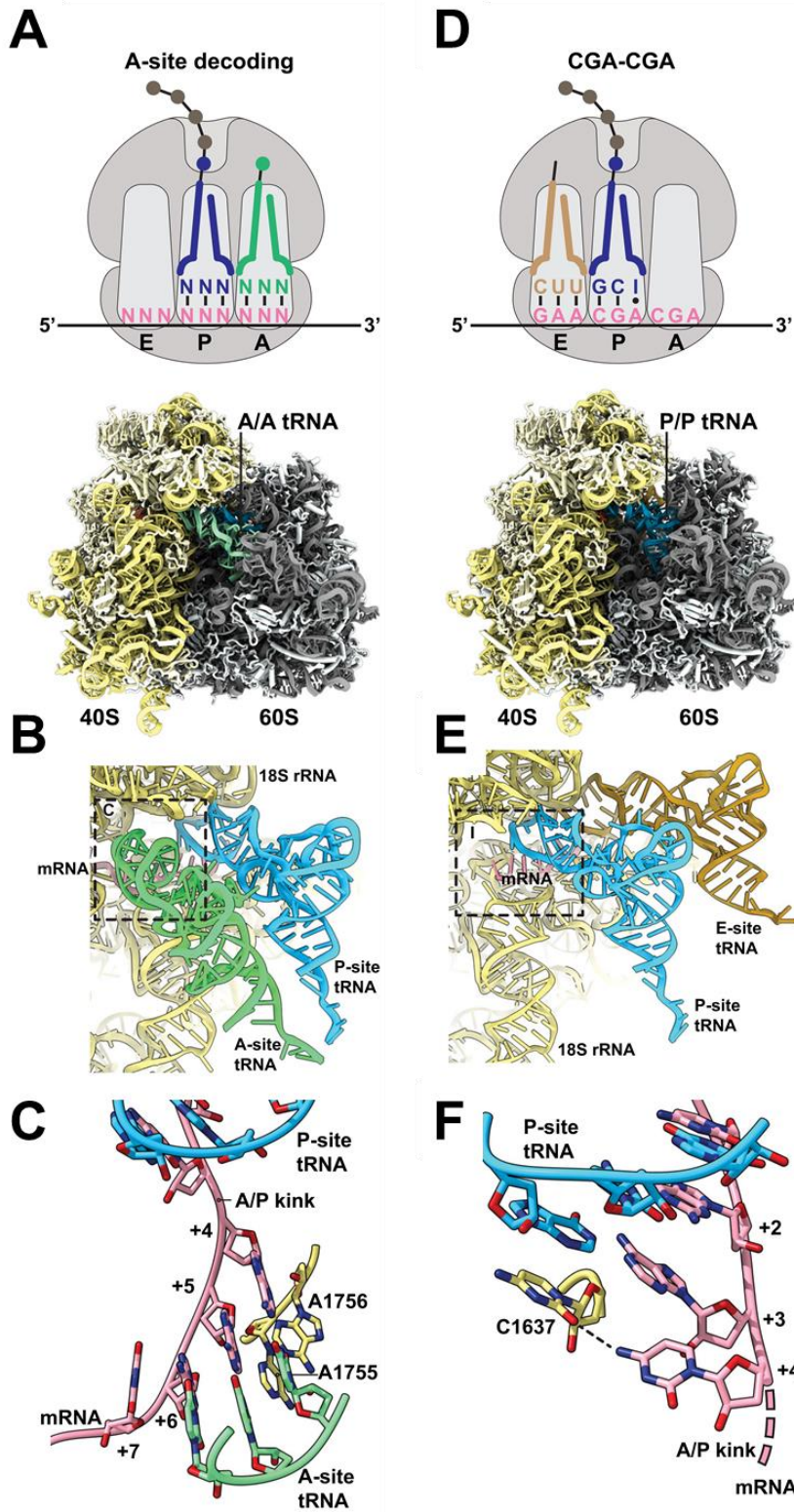
連続 CGA 配列で翻訳停止したリボソームの構造解析により、A-site において mRNA 構造の異常が確認されている⁽⁶²⁾ (図 14D-F)。P、A-site を、それぞれ、CGA コドンが占有している時、P-site の A・I wobble 塩基対合とのスタッキング相互作用により安定化された 18S rRNA の塩基 C1637 が、A-site コドンの 1 文字目 C と水素結合を形成する (図 14F、+4 塩基)。それに伴い、通常リボソーム A-P サイト間にあるねじれ構造 (A/P kink) が、A-site コドンの 1 文字目と 2 文字目の間に生じる (図 14F)。このように、特に A-site コドン 1 文字目 C の配向異常が原因で、A-site では mRNA がアミノアシル tRNA と対合できないと考えられている (図 14D-F)。

連続 CGA 配列では、この mRNA の異常構造が起因して、A-site コドン 1 塩基目 C が eRF1 の N⁵⁸, K⁶⁰ と水素結合を形成したため、eRF1 が CGA コドンを終止コドンとして誤認識したと考えられる。

今後の課題は、eRF1 による CGA コドンの認識機構を明らかにすることである。連続 CGA 配列で翻訳停止した新生ペプチド鎖・リボソーム複合体に、ペプチド解離能を失った eRF1 変異体を結合させたリボソーム複合体の構造を決定する必要がある (図 15)。

最近、生体内において、連続 CGA 配列で eRF1・eRF3 依存の premature termination が起こることが明らかにされた⁽¹⁶⁾。その解析において、野生型 eRF1、または、UGA 終止コドンを認識しやすい eRF1 変異体 (L123F、Y-C-F の Y の次の残基 Leu123 を Phe に置換した変異体) と、eRF3 の共大量発現によって、CGA コドンでの premature termination が促進されることが明らかになっている。eRF3 は、eRF1 のコドン認識に影響を与える^(16,22,64)。今後、eRF3 の酵素

活性に関する生化学的な解析と合わせて、eRF3 が eRF1 のコドン認識に与える影響についても解析をおこなう必要がある。



Tesina, P. (2019) EMBO J. より改変引用。

図 14 連続 CGA 配列特有のデコーディングを阻害する異常な mRNA 構造。

A–C: デコーディングセンターに A-site tRNA を持ったりボソーム・新生鎖複合体の Cryo-EM 構造の特徴。(A) (上図) デコーディングの状況の模式図。(下図) デコーディングセンターに A-site tRNA を持ったりボソーム・新生鎖複合体の分子モデル。(B) A/A、P/P tRNA を持った A、P、E-site と mRNA の全体像。(C) A-site における mRNA の構造の詳細。18S rRNA の塩基 A1755 および A1756 が、tRNA デコーディング時の、A-site の tRNA-mRNA 相互作用の副溝を認識する。

D–F: CGA-CGA コドンで翻訳停止したりボソーム・新生鎖複合体の Cryo-EM 構造の特徴。(D) (上図) 翻訳停止の状況の模式図。(下図) CGA-CGA コドンで翻訳停止したりボソーム・新生鎖複合体の分子モデル。(E) A/A、P/P tRNA を持った A、P、E-site と mRNA の全体像。(F) A-site における mRNA の構造の詳細。mRNA の、+2 塩基 (P-site コドン 2 塩基目) から +4 塩基 (A-site コドン 1 塩基目) における相互作用が示されている。C+4 塩基が P-site A:I wobble 塩基対合側に約 95° 移動し、18S rRNA の塩基 C1637 との相互作用で安定化される。これに伴い、通常、A-、P-site 間 (+3、+4 塩基間) に生じる mRNA のねじれ構造 (A/P kink) が +4、+5 塩基間で生じる。A/P kink は、A-site における tRNA の proof-reading、つまり near-cognate tRNA の排除に重要であると考えられている^(62, 65)。

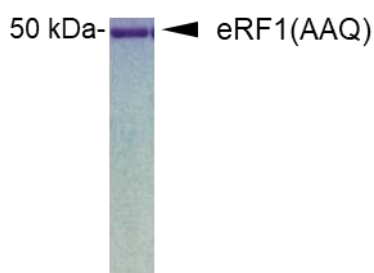
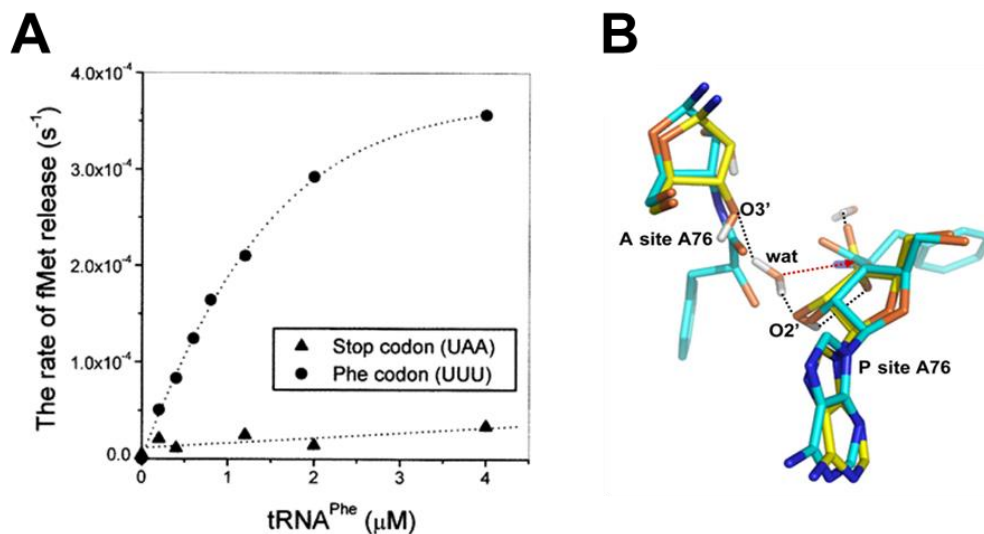


図 15 ペプチド解離能を失った eRF1(AAQ) 変異体。

C 末 6x His タグ融合タンパク質として発現・精製した、ペプチド解離を引き起こす GGQ モチーフの変異体。終止コドン認識の機構は野生型 eRF1 と変わらないが、GGQ モチーフの活性残基 Q が PTC 上で P-site ペプチジル tRNA に接近できず、攻撃水分子を正しく配位できない。eRF1・翻訳終結リボソーム複合体 (図 3A) における、リボソーム上の accommodated 状態の eRF1 の固定化にはこの変異体を用いており、さらに Rli1 (ABCE1) によりその構造が安定化されている。

4.4 eRF1 非依存的な翻訳終結の分子機構

大腸菌の再構成型翻訳系において、A-site の cognate デアシル tRNA が終結因子と同等の終結効率を有することが報告されている⁽⁶⁶⁻⁶⁸⁾ (図 16)。本研究で見出された終止コドンにおける eRF1 非依存の終結は、near-cognate なデアシル tRNA が引き起こしていると仮説を立てており、今後、マルチラウンドオリゴペプチド合成系を利用して検証する必要がある。*in vitro* 転写した F と M の tRNA (図 17) をアミノアシル化し、さらにデアシル tRNA を除く。このようにして調製したアミノアシル tRNA を用いて F4M-Stop mRNA を翻訳した際に、eRF1 非依存の終結が起きないことを検証する。また、生体内では、終止コドン認識において、near-cognate tRNA より eRF1 が優位に働くことが予想される。



A: Zavialov, A.V. (2002) Mol. Cell より引用。

B: Trobro, S. and Aqvist, J. (2007) Mol. Cell より引用。

図 16 デアシル tRNA による翻訳終結の機構。

- A: デアシル tRNA^{Phe} による終結の速度論的解析。fMet-tRNA^{Met} が P-site にプログラムされたりボソーム (A-site が、Stop UAA(▲)、あるいは、Phe UUU(●)) に、デアシル tRNA^{Phe} を反応させる。A-site が Phe UUU のリボソームの場合、cognate なデアシル tRNA^{Phe} はペプチド解離を引き起こすことができる。
- B: A-site デアシル tRNA の O3' が、P-site ペプチジル tRNA の O2' 近傍に、攻撃水分子を適切に配位し、ペプチドの解離を引き起こす⁽⁶⁸⁾。A-site アミノアシル tRNA では、O3' にアミノ酸が結合しており、ペプチドの転移が生ずる。黄色：A-site デアシル tRNA による、P-site ペプチジル tRNA への攻撃水分子の配位 (MD シミュレーション)、シアン：A-site アミノアシル tRNA アナログを用いたペプチド転移時の A-、P-site tRNA の構造 (1VQN)、wat：攻撃水分子。

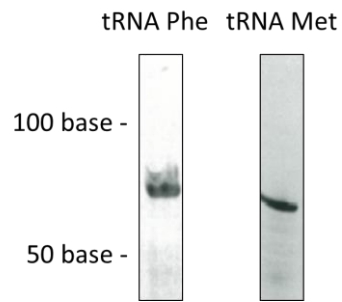


図 17 調製された *in vitro* 転写 tRNA。

in vitro 転写 tRNA は 5' リーダー配列を持つ前駆体 tRNA を T7 RNA ポリメラーゼを用いて合成し、続いて M1 RNA および C5 Protein によってプロセッシングした。更に陰イオン交換カラムによって成熟 tRNA を精製した。

4.5 eIF5A が翻訳に与える影響について

マルチラウンドオリゴペプチド合成系において、eIF5A は、eRF1 存在下での連続 CGA 配列、および、eRF1 非存在下での終止コドン、におけるペプチド合成を促進しなかった (図 11B, C)。翻訳終結過程は、“eRF1 による終止コドンのデコーディング”のステップと、“eRF1 の A-site におけるアコモデーションおよびペプチド解離反応”の 2 つのステップからなる。*in vitro* で eIF5A がペプチド解離反応の速度を促進させることは明らかにされている⁽²⁶⁾。しかし、本系では、eIF5A のペプチド解離の促進は評価できなかった。これは、本系において、CGA コドンにおける eRF1 依存的な終結と、終止コドンにおける eRF1 非依存的な終結では、反応の律速段階は、“eRF1 による終止コドンのデコーディング”段階にあった為であると考えている。また、eIF5A は、“eRF1 による終止コドンのデコーディング”を促進しなかったと考えている。

一方 eIF5A は、HIV-IRES 依存の翻訳開始を促進することが知られている⁽⁶⁹⁾。nLuc 合成において、eIF5A が premature termination 産物と eRF1 非依存終結産物の量を増加させたのは、eIF5A が IRES 依存の翻訳開始を促進した為であると考えられた (図 10D、図 12C, E, G)。

eIF5A は、no motif mRNA の翻訳を抑制する (図 10C)。これは、eIF5A が mRNA の ORF の複数箇所でも中途翻訳終結を促進したと考えている。実際に、eIF5A 存在下では、様々な長さのペプチドが蓄積する (図 10D の*)。連続 CGA 挿入や終止コドン挿入配列では、翻訳される ORF の長さが短く中途翻訳終結する箇所は少ない。一方、no motif mRNA における nLuc 合成では、ORF の長さが長い為、中途翻訳終結する箇所が多く、eIF5A 存在下で全長 nLuc を合成できるリボソームが減少したと考えている。中途翻訳終結を起こした因子は、不明であるが、cognate デアシル tRNA、あるいは、特定のコドンでは、eRF1 が認識・終結を起こした可能性がある。今後、本解析系から、これらの因子を除いた場合に、これらの中途翻訳終結産物の量が減少するか確認することで、因子依存性を明らかにする必要がある。また、最近、アカパンカビとショウジョウバエにおいて、レアコドンにおいて eRF1 が premature termination を引き起こし、それが翻訳効率の制御 (翻訳抑制) に寄与していることが示された⁽⁴¹⁾。アカパンカビやショウジョウバエ S2 細胞抽出液を用いた *in vitro* 翻訳系では、レアコドンを含んだ内在性遺伝子をコードするレポーター mRNA を翻訳すると、premature

termination 産物が複数個所で生じるが、ORF 上のコドンに至適コドンへと変更することで、premature termination 産物が消失する⁽⁴¹⁾。本系の nLuc の ORF 上のコドンは全て出芽酵母に至適化されているが、系内におけるアミノアシル tRNA、デアシル tRNA、eRF1 の存在比は、生体内とは異なる可能性がある。即ち、本系における、リボソーム A-site でのこれらの因子の競合反応は、生体内を再現出来ていない可能性がある。今後、これらの因子濃度条件を検討し、eIF5A が ORF の複数個所で premature termination を促進するかについて、検証する必要がある。この現象のメカニズムが明らかになった場合には、この現象の意義や、あるいは、そのような現象を防ぐシステムが存在するかについて、さらなる検証が必要である。

4.6 Premature termination の生理的意義

真核生物では、本来の終止コドンの上流に終止コドンを持つ異常 mRNA は、Nonsense-mediated mRNA Decay (NMD) と呼ばれる機構で分解される。出芽酵母における、正常な終止コドンと異常終止コドンとの区別は、終止コドンから 3' 末端のポリ A 鎖までの距離の違いにより説明されている⁽⁷⁰⁾。正常な終止コドンでの終結反応では、eRF1・eRF3 とポリ A 鎖結合タンパク質 PABP とが相互作用する。一方で、異常終止コドンでの終結反応では、eRF1・eRF3 と PABP との距離が遠く、相互作用が阻害され、代わりに Upf と呼ばれる NMD の誘導因子がリクルートされる。Upf は、その後、デキャッピング因子やエキソヌクレアーゼをリクルートし、異常 mRNA は分解される。このように、元々、NMD は、ナンセンス変異を持つ異常 mRNA の分解機構として理解されてきたが、最近になって、正常な mRNA でも機能していることがわかってきた⁽⁷¹⁾。このことから、NMD は、真核生物の遺伝子発現にとって重要な転写後制御機構であると予想されている。また、NMD が働く正常な mRNA では、NMD が働かない mRNA に比べて、至適コドンの割合が低く、翻訳効率が低い^(41,71)。さらに、アカパンカビやショウジョウバエでは、CGA のようなレアコドンにおいて eRF1 依存の premature termination が生じ、翻訳効率を低下させることが示されている⁽⁴¹⁾。また最近になって、生体内においても、連続 CGA 配列において eRF1・eRF3 による premature termination が起こることがわかった⁽¹⁶⁾。以上の研究から、連続 CGA コドンをもつ遺伝子では eRF1・eRF3 依存の premature termination に伴い、NMD と同様の機構で遺伝子発現が抑制されている可能性があると考えている。今回、本解析の結果から、センスコドン上におけるデアシル tRNA による premature termination を介した遺伝子発現制御もあることが予想される。この仮説が立証された場合には、生体内でそのようなデアシル tRNA による翻訳終結反応を防ぐ仕組みがあるのかについて今後検証する必要がある。

このような、センスコドン上における中途翻訳終結が、どのような遺伝子の発現制御に関与しているかは、これまでのところ不明である。最近、ヒト細胞において、アミノ酸（ロイシンやアルギニン）飢餓時に、アミノ酸飢餓応答を起こさない変異体 (GCN2 ノックアウト株) ヒト細胞において、飢餓状態にしたアミノ酸に対応するデアシル tRNA の増加を伴って、リボソームが翻訳停止し、premature termination が起こることが明らかになっている。また、この premature

termination を引き起こしている因子は同定されていない⁽⁴²⁾。このような、特定のストレス条件下において、特に、素早く環境変化に応答する必要がある場合に、通常は防がれているはずの、センスコドン上における premature termination が、特定の遺伝子発現を制御する可能性がある。また、連続 CGA コドン上における、eRF1 による比較的効率のいい終結を考慮すると⁽¹⁶⁾、生体内の恒常的な遺伝子発現制御において、センスコドン上における翻訳終結が利用されている可能性もあるだろう^(41, 71)。

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*, a011544.
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. Triana-Alonso, F. J., Chakraborty, K. and 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.
4. 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. and Beckmann, R. (2006) Structure of eEF3 and the mechanism of transfer RNA release from the E-site. *Nature* *443*, 663–668.
5. Achenbach, J. and Nierhaus, K. H. (2015) The mechanics of ribosomal translocation. *Biochimie* *114*, 80–89.
6. Hellen, C. U. T. (2018) Translation Termination and Ribosome Recycling in Eukaryotes. *Cold Spring Harb. Perspec. Biol.* *10*, a032656.
7. Bertram, G., Bell, H. A., Ritchie, D. W., Fullerton, G. and Stansfield, I. (2000) Terminating eukaryote translation: Domain 1 of release factor eRF1 functions in stop codon recognition. *RNA* *6*, 1236–1247.
8. Frolova, L. Y., Tsivkovskii, R. Y., Sivolobova, G. F., Oparina, N. Y., Serpinsky, O. I., Blinov, V. M., Tatkov, S. I. and Kisselev, L. L. (1999) Mutations in the highly conserved GGQ motif of class 1 polypeptide release factors abolish ability of human eRF1 to trigger peptidyl-tRNA hydrolysis. *RNA* *5*, 1014–1020.
9. Song, H., Mugnier, P., Das, A. K., Webb, H. M., Evans, D. R., Tuite, M. F., Hemmings, B. A. and Barford, D. (2000) The crystal structure of human eukaryotic release factor eRF1—Mechanism of stop codon recognition and peptidyl-tRNA hydrolysis. *Cell* *100*, 311–321.
10. Mantsyzov, A. B., Ivanova, E. V., Birdsall, B., Alkalaeva, E. Z., Kryuchkova, P. N., Kelly, G., Frolova, L. Y. and Polshakov, V. I. (2010) NMR solution structure and function of the C-terminal domain of eukaryotic class 1 polypeptide chain release factor. *FEBS J.* *277*, 2611–2627.

11. Cosson, B., Couturier, A., Chabelskaya, S., Kiktev, D., Inge-Vechtomov, S., Philippe, M. and Zhouravleva, G. (2002) Poly(A)-binding protein acts in translation termination via eukaryotic release factor 3 interaction and does not influence [PSI⁺] propagation. *Mol. Cell. Biol.* 22, 3301–3315.
12. Kong, C., Ito, K., Walsh, M. A., Wada, M., Liu, Y., Kumar, S., Barford, D., Nakamura, Y. and Song, H. (2004) Crystal structure and functional analysis of the eukaryotic class II release factor eRF3 from *S. pombe*. *Mol. Cell* 14, 233–245.
13. Atkinson, G. C., Baldauf, S. L. and Hauryliuk, V. (2008) Evolution of nonstop, no-go and nonsense-mediated mRNA decay and their termination factor-derived components. *BMC Evol. Biol.* 8, 290.
14. van den Elzen, A. M., Henri, J., Lazar, N., Gas, M. E., Durand, D., Lacroute, F., Nicaise, M., van Tilbeurgh, H., Séraphin, B. and Graille, M. (2010) Dissection of Dom34–Hbs1 reveals independent functions in two RNA quality control pathways. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 1446–1452.
15. Brown, A., Shao, S., Murray, J., Hegde, R. S. and Ramakrishnan, V. (2015) Structural basis for stop codon recognition in eukaryotes. *Nature* 524, 493–496.
16. Wada, M. and Ito, K. (2018) Misdecoding of rare CGA codon by translation termination factors, eRF1/eRF3, suggests novel class of ribosome rescue pathway in *S. cerevisiae*. *FEBS J.* 286, 788–802.
17. Shao, S., Murray, J., Brown, A., Taunton, J., Ramakrishnan, V. and Hegde, R. S. (2016) Decoding mammalian ribosome-mRNA states by translational GTPase complexes. *Cell* 167, 1229–1240.e15.
18. Chavatte, L., Frolova, L., Laugâa, P., Kisselev, L. and Favre, A. (2003) Stop codons and UGG promote efficient binding of the polypeptide release factor eRF1 to the ribosomal A site. *J. Mol. Biol.* 331, 745–758.
19. Frolova, L., Le Goff, X., Rasmussen, H. H., Cheperegin, S., Drugeon, G., Kress, M., Arman, I., Haenni, A. L., Celis, J. E., Philippe, M., Justesen, J. and Kisselev, L. (1994) A highly conserved eukaryotic protein family possessing properties of polypeptide chain release factor. *Nature* 372, 701–703.
20. Shaw, J. J., Trobro S., He, S. L., Åqvist, J. and Green R. (2012) A Role for the 2' OH of Peptidyl-tRNA Substrate in Peptide Release on the Ribosome Revealed through RF-Mediated Rescue. *Chem. Biol.* 19, 983–993.

21. Alkalaeva, E. Z., Pisarev, A. V., Frolova, L. Y., Kisselev, L. L. and Pestova, T. V. (2006) In vitro reconstitution of eukaryotic translation reveals cooperativity between release factors eRF1 and eRF3. *Cell* 125, 1125–1136.
22. Salas-Marco, J. and Bedwell, D. M. (2004) GTP hydrolysis by eRF3 facilitates stop codon decoding during eukaryotic translation termination. *Mol. Cell. Biol.* 24, 7769–7778.
23. Eyler, D. E., Wehner, K. A. and 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.
24. Kryuchkova, P., Grishin, A., Eliseev, B., Karyagina, A., Frolova, L. and Alkalaeva, E. (2013) Two-step model of stop codon recognition by eukaryotic release factor eRF1. *Nucleic Acids Res.* 41, 4573–4586.
25. Gutierrez, E., Shin, B. S., Woolstenhulme, C. J., Kim, J. R., Saini, P., Buskirk, A. R. and Dever, T. E. (2013) eIF5A promotes translation of polyproline motifs. *Mol. Cell* 51, 35–45.
26. Schuller, A. P., Wu, C. C., Dever, T. E., Buskirk, A. R. and Green, R. (2017) eIF5A Functions Globally in Translation Elongation and Termination. *Mol. Cell* 66, 194–205.
27. Shin, B. S., Katoh, T., Gutierrez, E., Kim, J. R., Suga, H. and Dever, T. E. (2017) Amino acid substrates impose polyamine, eIF5A, or hypusine requirement for peptide synthesis. *Nucleic Acids Res.* 45, 8392–8402.
28. Pelechano, V. and 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.
29. Mathews, M. B. and Hershey, J. W. B. (2015) The translation factor eIF5A and human cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* 1849, 836–844.
30. Sasaki, K., Abid, M. R. and Miyazaki, M. (1996) Deoxyhypusine synthase gene is essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 384, 151–154.
31. Magdolen, V., Klier, H., Wohl, T., Klink, F., Hirt, H., Hauber, J. and Lottspeich, F. (1994) The function of the hypusine-containing proteins of yeast and other eukaryotes is well conserved. *Mol. Gen. Genet.* 244, 646–52.

32. Schnier, J., Schwelberger, H. G., Smit-McBride, Z., Kang, H. A. and 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.
33. Park, M. H., Joe, Y. A. and Kang, K. R. (1998) Deoxyhypusine synthase activity is essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *273*, 1677–1683.
34. 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. and 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.
35. Schmidt, C., Becker, T., Heuer, A., Braunger, K., Shanmuganathan, V., Pech, M., Berninghausen, O., Wilsonm D. N. and Beckmann, R. (2016) Structure of the hypusinylated eukaryotic translation factor eIF-5A bound to the ribosome. *Nucleic Acids Res.* *44*, 1944–1951.
36. Melnikov, S., Mailliot, J., Shin, B. S., Rigger, L., Yusupova, G., Micura, R., Dever, T. E. and Yusupov, M. (2016) Crystal Structure of Hypusine-Containing Translation Factor eIF5A Bound to a Rotated Eukaryotic Ribosome. *J. Mol. Biol.* *428*, 3570–3576.
37. Frischmeyer, P.A. and Dietz, H.C. (1999) Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Hum. Mol. Genet.* *8*, 1893–1900.
38. Keeling, K. M. and Bedwell, D. M. (2011) Suppression of nonsense mutations as a therapeutic approach to treat genetic diseases. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* *2*, 837–852.
39. Svidritskiy, E., Demo, G. and Korostelev, A. A. (2018) Mechanism of premature translation termination on a sense codon. *J. Biol. Chem.* *293*, 12472–12479.
40. Freistoffer, D. V., Kwiatkowski, M., Buckingham, R. H. and Ehrenberg, M. (2000) The accuracy of codon recognition by polypeptide release factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *97*, 2046–2051.
41. Yang, Q., Yu, C., Zhao, F., Dang, Y., Wu, C., Xie, P., Sachs, M.S. and Liu, Y. (2019) eRF1 mediates codon usage effects on mRNA translation efficiency through premature termination at rare codons. *Nucleic Acids Res.* *47*, 9243–9258.
42. Darnell, A. M., Subramaniam, A. R. and O'Shea, E. K. (2018) Translational Control through Differential Ribosome Pausing during Amino Acid Limitation in Mammalian

- Cells. *Mol. Cell* 71, 229–243.e11.
43. Machida, K., Mikami, S., Masutani, M., Mishima, K., Kobayashi, T. and Imataka, H. (2014). A Translation System Reconstituted with Human Factors Proves that Processing Encephalomyocarditisvirus Proteins 2A and 2B Occurs in the Elongation Phase of Translation without Eukaryotic Release Factors. *J. Biol. Chem.* 289, 31960–31971.
 44. Doronina, V. A., Wu, C., de Felipe, P., Sachs, M. S., Ryan, M. D. and Brown, J. D. (2008) Site-specific release of nascent chains from ribosomes at a sense codon. *Mol. Cell. Biol.* 28, 4227–4239.
 45. Chiabudini, M., Tais, A., Zhang, Y., Hayashi, S., Wolfle, T., Fitzke, E. and Rospert, S. (2014) Release factor eRF3 mediates premature translation termination on polylysine-stalled ribosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Boil.* 34, 4062–4076.
 46. Gribling-Burrer, A. S., Chiabudini, M., Zhang, Y., Qiu, Z., Scazzari, M., Wölfle, T., Wohlwend, D. and Rospert, S. (2019) A dual role of the ribosome-bound chaperones RAC/Ssb in maintaining the fidelity of translation termination. *Nucleic Acids Res.* 47, 7018–7034.
 47. Schuller, A. P. and Green, R. (2018) Roadblocks and resolutions in eukaryotic translation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 526–541.
 48. Abe, T., Nagai, R., Imataka, H. and Takeuchi-Tomita, N. (2020) Reconstitution of yeast translation elongation and termination in vitro utilizing CrPV IRES-containing mRNA. *J. Biochem.* (in press).
 49. Abe, T., Nagai, R., Shimazaki, S., Kondo, S., Nishimura, S., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Imataka, H., Tomita, K. and Takeuchi-Tomita, N. (2020) *in vitro* yeast reconstituted translation system reveals function of eIF5A for synthesis of long polypeptide. *J. Biochem.* (in press).
 50. Shimizu, Y., Inoue, A., Tomari, Y., Suzuki, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K. and Ueda, T. (2001) Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nat. Biotechnol.* 19, 751–755.
 51. Hayashi, H., Nagai, R., Abe, T., Wada, M., Ito, K. and Takeuchi-Tomita, N. (2018) Tight interaction of eEF2 in the presence of Stm1 on ribosome. *J. Biochem.* 163, 177–185.
 52. Kasari, V., Margus, T., Atkinson, G. C., Johansson, M. J. O. and Hauryliuk, V. (2019)

- Ribosome profiling analysis of eEF3-depleted *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci. Rep.* *9*, 3037.
53. Petrov, A., Grosely, R., Chen, J., O'Leary, S. E. and Puglisi, J. D. (2016) Multiple Parallel Pathways of Translation Initiation on the CrPV IRES. *Mol. Cell*, *62*, 92–103.
 54. Abeyrathne, P. D., Koh, C. S., Grant, T., Grigorieff, N. and Korostelev, A. A. (2016) Ensemble cryo-EM uncovers inchworm-like translocation of a viral IRES through the ribosome. *Elife*, e14874.
 55. Wolf, A. S. and Grayhack, E. J. (2015) Asc1, homolog of human RACK1, prevents frameshifting in yeast by ribosomes stalled at CGA codon repeats. *RNA* *21*, 935–945.
 56. Wang, J., Zhou, J., Yang, Q. and Grayhack, E. J. (2018) Multi-protein bridging factor 1(Mbf1), Rps3 and Asc1 prevent stalled ribosomes from frameshifting. *Elife*, e39637.
 57. Pisareva, V. P., Skabkin, M. A., Hellen, C. U., Pestova, T. V. and Pisarev, A. V. (2011) Dissociation by Pelota, Hbs1 and ABCE1 of mammalian vacant 80S ribosomes and stalled elongation complexes. *EMBO J.* *30*, 1804–1817.
 58. Shoemaker, C. J. and 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*, E1392–1398.
 59. Preis, A., Heuer, A., Barrio-Garcia, C., Hauser, A., Eyler, D. E., Berninghausen, O., Green, R., Becker, T. and Beckmann, R. (2014) Cryoelectron microscopic structures of eukaryotic translation termination complexes containing eRF1-eRF3 or eRF1-ABCE1. *Cell Rep.* *8*, 59–65.
 60. Kurata, S., Shen, B., Liu, J. O., Takeuchi, N., Kaji, A. and Kaji, H. (2013) Possible steps of complete disassembly of post-termination complex by yeast eEF3 deduced from inhibition by translocation inhibitors. *Nucleic Acids Res.* *41*, 264–276.
 61. Kasari, V., Pochopien, A. A., Margus, T., Murina, V., Turnbull, K., Zhou, Y., Nissan, T., Graf, M., Nováček, J., Atkinson, G. C., Johansson, M. J. O., Wilson, D. N. and Hauryliuk, V. (2019) A role for the *Saccharomyces cerevisiae* ABCF protein New1 in translation termination/recycling. *Nucleic Acids Res.* *47*, 8807–8820.
 62. Tesina, P., Lessen, L. N., Buschauer, R., Cheng, J., Wu, C. C., Berninghausen, O., Buskirk, A. R., Becker, T., Beckmann, R. and Green, R. (2019) Molecular mechanism of translational stalling by inhibitory codon combinations and poly(A) tracts. *EMBO J.*, e103365.

63. Kerr, C. H., Ma, Z. W., Jang, C. J., Thompson, S. R. and Jan, E. (2016) Molecular analysis of the factorless internal ribosome entry site in Cricket Paralysis virus infection. *Sci. Rep.* *6*, 37319.
64. Saito, K. and Ito, K. (2015) Genetic analysis of L123 of the tRNA-mimicking eukaryote release factor eRF1, an amino acid residue critical for discrimination of stop codons. *Nucleic Acids Res.* *43*, 4591–4601.
65. Keedy, H. E., Thomas, E. N. and Zaher, H. S. (2018) Decoding on the ribosome depends on the structure of the mRNA phosphodiester backbone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *115*, E6731–E6740.
66. Caskey, C. T., Beaudet, A. L., Scolnick, E. M. and Rosman, M. (1971) Hydrolysis of fMet-tRNA by peptidyl transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *68*, 3163–3167.
67. Zavialov, A. V., Mora, L., Buckingham, R. H. and Ehrenberg, M. (2002) Release of Peptide Promoted by the GGQ Motif of Class 1 Release Factors Regulates the GTPase Activity of RF3. *Mol. Cell* *10*, 789–798.
68. Trobro, S. and Aqvist, J. (2007) A model for how ribosomal release factors induce peptidyl-tRNA cleavage in termination of protein synthesis. *Mol. Cell* *27*, 758–766.
69. Liu, J., Henao-Mejia, J., Liu, H., Zhao, Y. and He, J. J. (2011) Translational regulation of HIV-1 replication by HIV-1 Rev cellular cofactors Sam68, eIF5A, hRIP, and DDX3. *J. Neuroimmune Pharmacol.* *6*, 308–321.
70. Shoemaker, C. J. and Green, R. (2012) Translation drives mRNA quality control. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *19*, 594–601.
71. Celik, A., Baker, R., He, F. and Jacobson, A. (2017) High-resolution profiling of NMD targets in yeast reveals translational fidelity as a basis for substrate selection. *RNA* *23*, 735–748.

6 謝辞

東京大学大学院 新領域創成科学研究科 メディカル情報生命専攻准教授
富田 野乃 先生には、指導教員として、本研究の遂行にあたって、終始懇切なる
ご指導とご鞭撻を賜り、本論文をまとめるに際して、親身なご助言と力強い励ま
しを頂きました。心より感謝を申し上げます。

筆者が博士2年目まで同専攻教授、現在、早稲田大学大学院 先進理工学研
究科 生命理工学専攻教授 上田 卓也 先生には研究に関する有益なご討論ご助
言を頂きました。ここに感謝の意を表します。

東京大学大学院 新領域創成科学研究科 メディカル情報生命専攻教授
伊藤 耕一 先生、同専攻教授 富田 耕造 先生、産業技術総合研究所 バイオメデ
ィカル研究部門 副研究部門長、兼、分子細胞育種研究グループ 研究グループ長
本田 真也 先生、並びに、東京大学 生産技術研究所 物質・環境系部門 分子細
胞工学分野准教授 池内 与志穂 先生には副査としてご助言を頂くとともに本
論文の細部にわたりご指導を頂きました。ここに深謝の意を表します。

本専攻分子医科学分野の各位には、研究遂行にあたり日頃より有益なご討
論ご助言を頂きました。ここに感謝の意を表します。

最後に、これまで私を温かく応援してくれた家族に深く感謝致します。