

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翻訳終結制御機構の解析

氏名 長井 陸

1. 背景・目的

タンパク質合成において、リボソームが mRNA の終止コドンに到達すると、ペプチド解離因子によってペプチド鎖が放出され翻訳が終結する。タンパク質合成における翻訳終結反応は、mRNA や新生ペプチド鎖の品質管理の制御とも密接に関連したプロセスであり、その厳密な制御は重要である。終結反応は様々な制御因子によって制御され、また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⁽¹⁻⁵⁾。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。これまで、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が、この解析系では新生ペプチド鎖の長さや配列に制限があった⁽⁶⁾。そこで、本研究では、当研究室で開発された酵母由来再構成型生体外タンパク質合成系を用いて、翻訳終結制御機構を解析した。特に、翻訳終結制御因子 eIF5A が、センスコドン上における中途翻訳終結 (Premature Termination) に与える影響を解析し、その機序を解明することを目指した。

2. 結果

連続 CGA 配列における Premature Termination の解析

2.1 フレームシフト翻訳を評価する系の構築

当研究室で構築された Yeast PURE は、酵母由来の再構築型無細胞タンパク質合成系である。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。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 (Fig1A)。

異なる読み枠の翻訳を検出する為に、nLuc の直前に C (シトシン) を挿入した mRNA コンストラクトを作製した。C1 つの挿入は、+1 フレームでの翻訳、C2 つの挿入は、-1 フレームでの翻訳を検出できる (Fig1A)。Fig1A に示すコンストラクトを翻訳したところ、+1 フレームが 0 フレームよりも高い効率で翻訳されていた (Fig1B)。Out-of-frame の翻訳が多かった原因として、IRES による翻訳開始効率が悪く、5' 末端以外から内部翻訳開始したリボソームによる out-of-frame の翻訳を評価していたという仮説を立てた (Fig1E)。これを解決するため、IRES の開始頻度を高めることにした。IRES の正確な開始反応にはアミノアシル tRNA が高い頻度で A サイトに入ることが重要である⁽⁷⁾。そこで eEF1A および eEF3 に注目した。eEF1A はアミノアシル tRNA を A サイトに運ぶ因子である。eEF3 は E-site tRNA のリリースを促進することにより、アミノアシル tRNA の A サイトへの結合を促進する⁽⁸⁾。eEF3 はさらに、リボソームタンパク質 L1 と IRES の相互作用を変化させて、IRES の開始頻度を高めることが期待される⁽⁹⁾。eEF1A の濃度を高め、eEF3 を添加したところ、out-of-frame の翻訳量は、変わらないことがわかった (Fig1C)。これは、内部翻訳開始したリボソーム量は変わっていないことを意味する (Fig1E)。一方で、in-frame の翻訳量のみが 100 倍も増加し (Fig1C)、IRES 依

存の翻訳開始だけが増加したことが示唆された (Fig1E)。これに伴い基底レベルの Out-of-frame 翻訳の割合も低レベルに改善された。これをもって、フレームシフト翻訳を適切に評価できる系が構築で

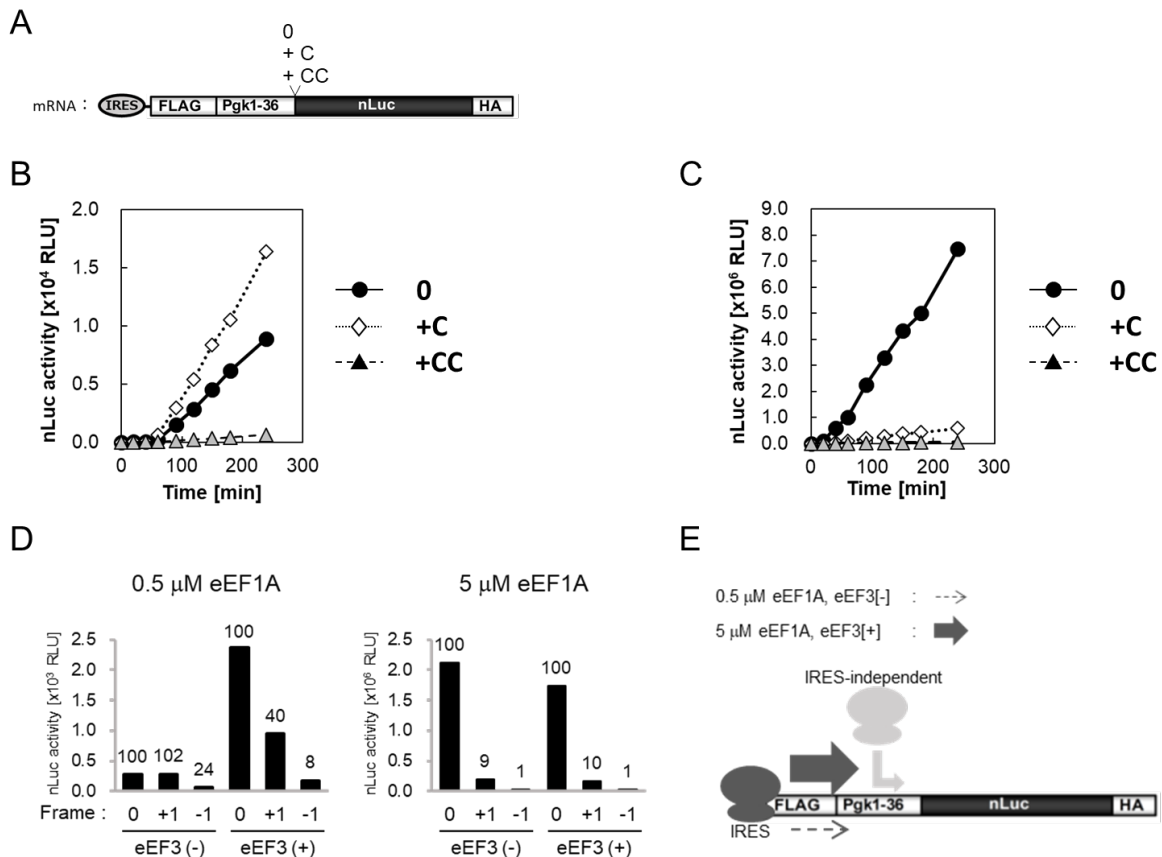


Fig1フレームシフト翻訳を評価する系

- A. Out-of-frame翻訳を検出するmRNA
 B. 0.5 μ M eEF1A, eEF3 [-]条件 (従来)のnLuc活性の経時測定による翻訳産物の解析
 C. 5 μ M eEF1A, 0.5 μ M eEF3条件 (改変後)のnLuc活性 (改変後)の経時測定による翻訳産物の解析
 D. 従来と改変後の系のin-frame翻訳量とout-of-frame翻訳量 (反応開始2時間後)
 E. 従来と改変後の系でのIRES依存翻訳開始効率の模式図

きたと判断した。

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

連続 CGA 配列における翻訳抑制機構を明らかにするため、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 (Fig2A)。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、約 1/300) (Fig2B)。また、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ところ、短いペプチドリリース産物が検出された (Fig2C レーン 2)。この短いペプチドは、「① 翻訳速度が遅い CGA センスコドン上で生じた premature termination 産物」、あるいは、「② CGA 配列でフレームシフトを起こしたことによって⁹⁾、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、out-of-frame を検出する系を用いた。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 (Fig2A)。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 (Fig2C レーン 2-4)。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。)

2.3 Premature termination の因子依存性の解析

次に、連続 CGA 配列における premature termination の因子依存性を確認した (Fig3)。ペプチドリリース活性を持つ翻訳終結因子 eRF1 (原核生物の RF1、RF2 のホモログ) を系から除いた場合に、premature termination 産物が消失した (Fig3 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。また、eRF1 による終結を促進することが知られる eRF3 を系から除いた場合に、premature termination 産物が減少した (Fig3 レーン 2)。以上から、連続 CGA 配列における premature termination は、eRF1 及び eRF3 によって促進されることが明らかとなった。

2.4 翻訳促進因子 eIF5A が premature termination に与える影響の解析

翻訳促進因子 eIF5A (原核生物の EF-P のホモログ) は、E サイトに結合し、PTC の構造を維持することで、翻訳伸長時のペプチド転移反応及び、eRF1 依存の翻訳終結を促進することが知られている^(6,10)。また、eIF5A は、ハイプシンという翻訳後修飾を介してペプチジル tRNA の CCA 末端を安定化し、遅いペプチド転移反応を促進することが知られている^(11,12)。eIF5A 存在下で、連続 CGA 配列を挿入した mRNA を翻訳した所、premature termination 産物の量が増加した (Fig4 レーン 2)。また、未修飾 eIF5A 存在下においても同様に、premature termination 産物の量が増加した (Fig4 レーン 3,4)。即ち、eIF5A は、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 を促進することが明らかとなった。

3. 考察・展望

本解析では、フレームシフト翻訳を評価できる系を構築した。すなわち、基底レベルの out-of-frame 翻訳の割合を抑制した系の確立に成功した。本系を利用して、連続 CGA 配列の翻訳について調べたところ、eRF1 依存的な Premature Termination が起きることを発見した。さらに未修飾 eIF5A がその Premature Termination を促進することを明らかにした。連続 CGA 配列では、A サイトにおける mRNA の異常構造が原因で、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⁽¹³⁾。その為、A サイトにおいて、アミノアシル tRNA との競合に eRF1 が打ち勝つことで、終結が起きたと考えられる。また、最近、生体内においても連続 CGA 配列で eRF1・eRF3 依存の Premature Termination がおきることが報告されている⁽¹⁴⁾。eIF5A は、これまでハイプシン修飾の重要性が示唆されてきたが、当研究室の先行研究により、eIF5A はハイプシン修飾非依存の様式で、Peptidyl Transferase Center (PTC) の構造を維持し、遅いペプチド転移反応を促進することが明らかとなっている。また本研究では、eIF5A がハイプシン修飾非依存的に Premature Termination を促進することを示した。すなわち、ペプチド転移反応に加えて、翻訳終結反応においても eIF5A 本体の機能が重要であることを示した。Premature termination においても eIF5A の本体が、PTC の構造を維持し、A サイトにおける eRF1 のアコモデーションを促進した結果、センスコドン上での遅いペプチドリリース反応が促進されたと考えられる。

今後は、Premature Termination に関して、コドン依存性を確認し、さらに eIF5A の促進効果についても検証する予定である。

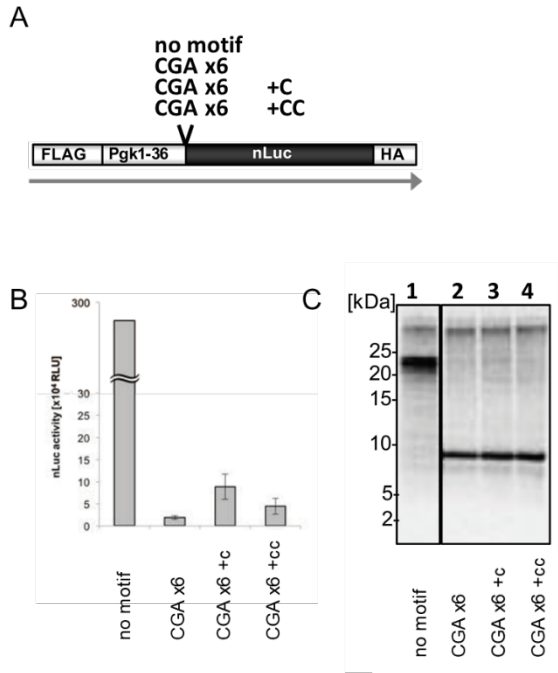


Fig2. 連続CGA配列におけるPremature Terminationの発見
 A. 連続CGA配列がコードされたmRNA
 B. nLuc活性測定による翻訳産物の解析 (翻訳反応2時間後)
 C. Tricine SDS-PAGEによる翻訳産物の解析 (翻訳反応2時間後)

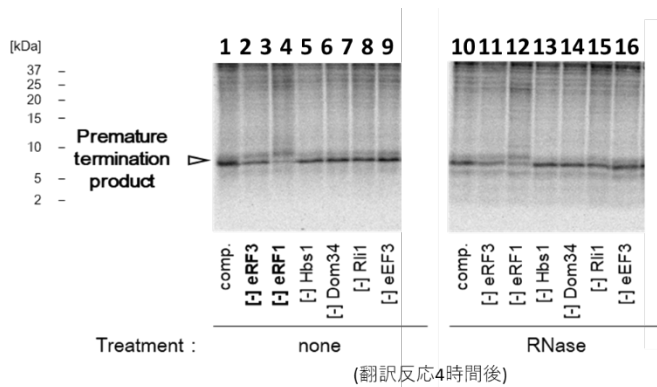


Fig3. 連続CGA配列におけるpremature terminationの因子依存性の解析

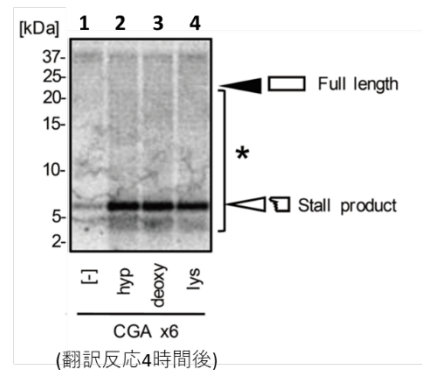


Fig4. eIF5Aがpremature terminationに与える影響の解析

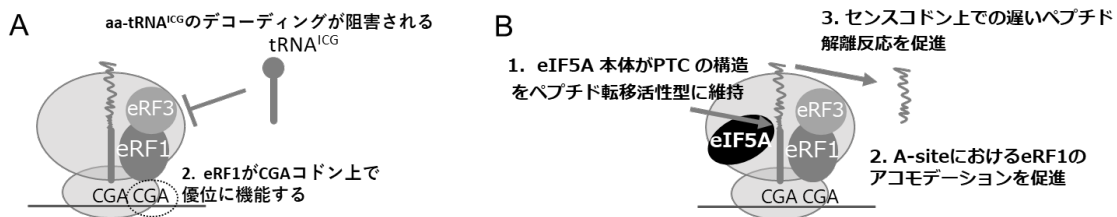


Fig4 Premature terminationのモデル/eRF1非依存的翻訳終結のモデル

- A. Premature terminationのモデル
 B. eIF5AがPremature Terminationを促進するモデル