

論文の内容の要旨

論文題目 真核細胞における翻訳停滞を提示するリボソーム機能構造の解明

氏名 大塚 衆志

【研究背景・目的】

タンパク質合成途中のリボソームは、翻訳読み枠中に現れる解読効率の悪いレアコドンの連続やリボソームの進行を妨げる RNA 高次構造など様々な要因で容易に停滞する (= 翻訳停滞)。翻訳停滞は、正しいタンパク質のフォールディングや翻訳反応と共役した合成途中タンパク質の修飾、複数サブユニット同士の相互作用を促進するために利用されている (図 1)。一方で、予期しない位置で致命的な翻訳停滞状態に陥ることは、細胞内の利用可能な翻訳装置の減少をもたらし、タンパク質合成能の非効率化につながるため細胞にとって有害となる。真核細胞では、このような状況を解消するため、tRNA 運搬因子 EF1A のホモログである Hbs1 が、tRNA を分子擬態した Dom34 をリボソーム遺伝暗号解読部位 (A サイト) にリクルートすることで翻訳装置を再利用する“リボソームレスキュー反応”が引き起こされる。近年、Dom34/Hbs1 複合体の作用に先立ち、E3 ユビキチンリガーゼ Hel2 がリボソームタンパク質 S20 を K63 ポリユビキチン化することが報告された (図 1)。また、翻訳停滞したリボソームには後続のリボソームが衝突し、それが Hel2 による S20 のユビキチン化の引金となることが明らかとなった。過去にリボソームレスキュー反応に必須であることが報告されていた Asc1 について、衝突した両方のリボソームの Asc1 同士が S20 付近で接していることも確認され、Asc1 同士のインターフェース構造が Hel2 によって認識されユビキチン化が進行すると予測がされていた。

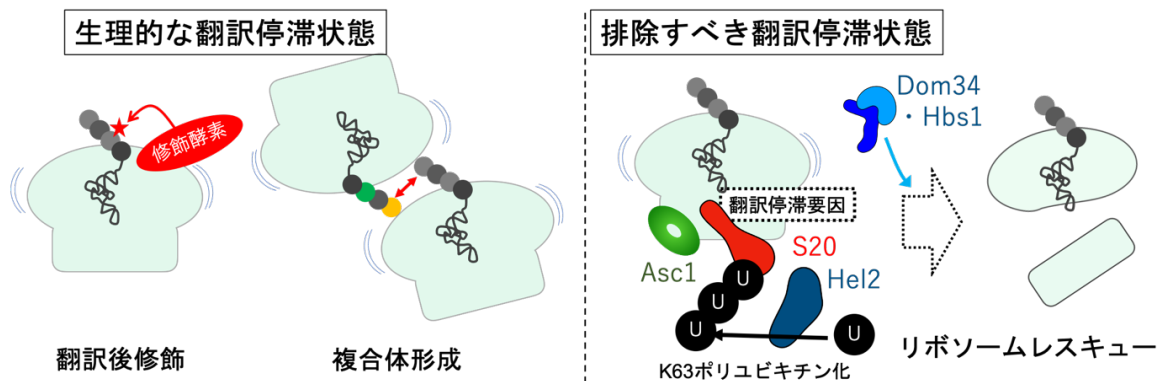


図1 多様な翻訳停滞状態とリボソームレスキュー

翻訳停滞は、翻訳反応と共役した翻訳後修飾や複合体形成に利用される。一方で、不必要な翻訳停滞状態は細胞の生育を阻害するため、リボソームレスキュー反応によって取り除かれる。翻訳停滞が発生すると Hel2 によって S20 が K63 ポリユビキチン化され、その後 Dom34/Hbs1 複合体によってリボソームサブユニット解離反応が進行すると考えられている。

翻訳停滞解消における最大の謎は、タンパク質合成戦略上利用されている翻訳停滞と排除すべき翻訳停滞がどのように認識されているかということである。Asc1 や S20、Hel2 といった重要因子情報や衝突した2つのリボソームなどの構造情報が蓄積しているが、具体的な機能領域や相互作用などは明らかとなっていない。本研究では、これまでに蓄積した情報をもとに、多因子間の機能相関、および生体高分子の機能領域同定を得意とする分子遺伝学的手法を用いた、翻訳停滞認識段階に関与する新規リボソーム機能領域の同定、および新規なりボソーム構成因子の探索を目的とした。

【研究方策・結果】

本研究では、(1) 翻訳停滞認識によって引き起こされるリボソームレスキュー反応の活性の増減で生育が変化する出芽酵母アッセイ株を樹立し、(2) 既知の因子である Asc1 および S20 からリボソームレスキュー活性を阻害するドミナントネガティブ変異体を分離することで具体的な作用部位・相互作用を同定し、(3) さらに未知のリボソームドメインについても変異体分離を行うことで新規なりボソームレスキュー作用因子の探索を目指した。

(1) リボソームレスキュー活性評価アッセイ株の樹立

出芽酵母ではアルギニンをコードする CGA コドンは著しく解読効率の低いレアコドンとして知られており、このコドンが連続する配列領域 (=アレスト配列) は、効率的にリボソーム停滞を引き起こす。通常、アレスト配列下流に接続された読み枠は上流におけるレスキュー反応によってほとんど翻訳されないが、何らかの要因でレスキュー活性が低下すると解読反応を再開したりボソームが下流の読み枠も継続して翻訳するようになる。そこで、ヒスチジン合成酵素である HIS3 をアレスト配列である CGA の連続 (CGA×12) の下流に接続したレポーター遺伝子を安定にゲノムに保持し、ヒスチジン要求性を指標にリボソームレスキュー活性を検出することが出来るアッセイ株を樹立した (図 2 A)

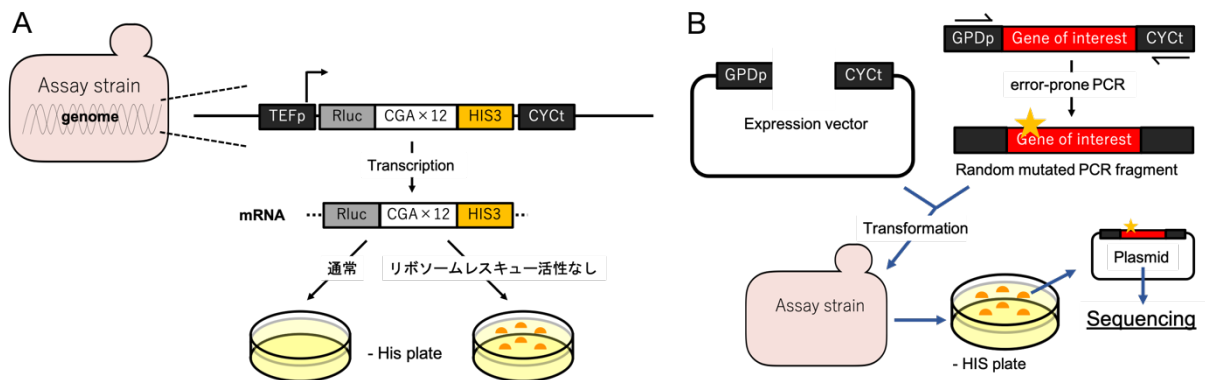
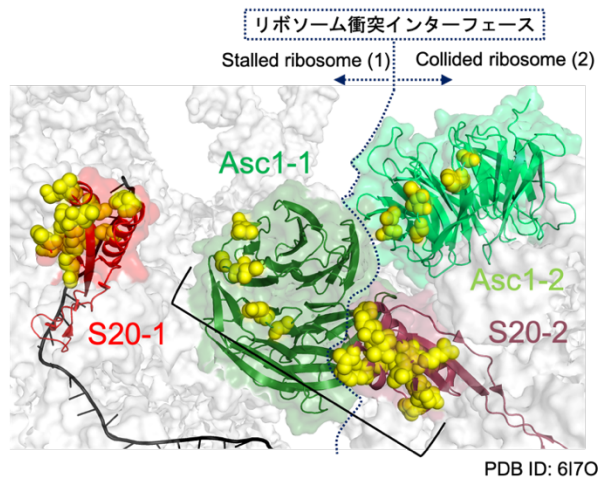


図 2 アッセイ株と変異体分離の概要

(A) アッセイ株のゲノムには、出芽酵母で強い翻訳停滞状態を引き起こす連続 CGA 配列にヒスチジン合成酵素 HIS3 を接続したレポーター遺伝子を組み込んでいる。リボソームレスキュー活性が低下すると停滞した翻訳が再開して下流の HIS3 が合成されることでヒスチジン欠乏培地で生育可能となる。(B) error-prone PCR 法によってランダム変異を含んだ PCR フラグメントと、それと相同な領域を持った制限酵素処理済みの発現ベクターを同時にアッセイ株に形質転換する。出芽酵母の高い相同組み換え活性によって変異を含んだプラスミドが再構成され、ヒスチジン欠乏培地で生育可能となったコロニーからプラスミドを抽出し、シーケンス解析で変異部位を同定する。

(2) 既知因子 Asc1 および S20 からの変異体分離と機能解析

リボソームレスキュー過程に必須であることが既知な因子である Asc1 および S20 について、正確性の低い DNA ポリメラーゼを利用した error-prone PCR 法によってランダムな塩基置換変異を導入し、アッセイ株を形質転換することでヒスチジン欠乏培地に生育可能となるドミナントネガティブ変異体を分離した (図 2 B)。ここで得られるドミナントネガティブ変異体は、ゲノム上の野生型ターゲット遺伝子の存在下でも形質を示すことから、野生型と競合してリボソームに取り込まれて機能することが保証されており、得られた変異部位は、翻訳停滞したりボソーム上において実際にリボソームレスキュー反応で機能するアミノ酸残基であることが期待できる。Asc1 と S20 からは共にリボソーム表面に露出した領域に集中した複数の変異体の取得に成功した。翻訳停滞時に発生することが予想されているリボソーム衝突構造上に、これらの変異部



位を図示すると、先行していた停滞リボソームの Asc1 と後続の衝突リボソームの S20 の変異部位が2つのリボソームにまたがった連続した面に存在していた (図3)。

図3 Asc1 および S20 変異体マッピング

Asc1 および S20 から得られた変異部位を黄色の spheres モデルでリボソーム衝突構造 (PDB ID : 6I7O) 上に図示した。停滞リボソームの Asc1 (図中 Asc1-1) と衝突リボソームの S20 (図中 S20-2) の変異部位が、リボソーム表面に露出した連続した領域に存在していた。

Hel2 によってユビキチン化される基質である S20 とリボソームレスキュー反応に必須な因子である Asc1 が、翻訳停滞時に形成されるリボソーム衝突構造上で機能性残基が連続した面に集中することから、この2つのトランスナリボソームの Asc1 と S20 からなるサーフェス構造が、Hel2 によって認識される機能構造であるという仮説を立てた。翻訳停滞によるリボソーム衝突が発生する細胞質内での Asc1 と Hel2 の相互作用を検証するために、従来の核内での分割した GAL4 融合タンパク質による再構成活性を検出する yeast-two hybrid 法に替えて、分割したトリプトファン合成酵素 TRP1 融合タンパク質の再構成活性を検出する splitTRP1 法を使用した。その結果として、Asc1 変異体は、Hel2 との相互作用が減少することが明らかとなった。また、低濃度シクロヘキシミド処理によって擬似的な翻訳停滞状態を蓄積させると S20 変異体も Asc1 と Hel2 との相互作用を減少させることも明らかとなった。さらに、ショ糖溶液と超遠心を用いたリボソーム沈殿解析によって、翻訳停滞時には Asc1 および S20 変異体が存在すると実際にリボソーム内の Hel2 量が減少していることが確認された。

(3) リボソームレスキュー新規作用因子の探索

リボソームレスキュー反応における重要性が既知の因子である Asc1 および S20、Dom34 の3因子に近接する8つのリボソームタンパク質 (S3, S10, S16, S17, S23, S29, S30, S31) について error-prone PCR とアッセイ株を用いた変異体分離を行ったところ、唯一 S31 のみからリボソームレスキュー活性を阻害するドミナントネガティブ変異体を得られた。得られた変異部位をリボソーム構造上に図示すると Dom34 と近接していることが明らかとなった (図4)。

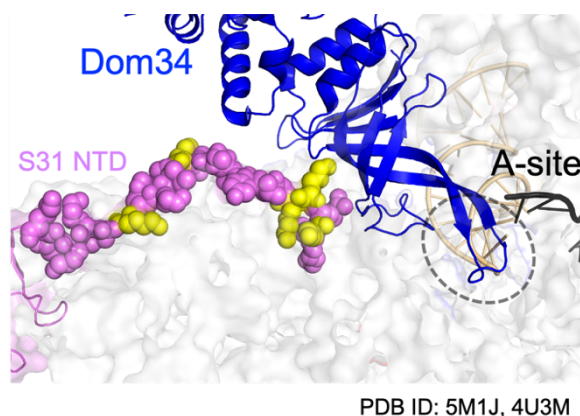


図4 S31 変異体マッピング

S31 から得られた変異部位を黄色の spheres モデルで Dom34 との共構造 (PDB ID : 5M1J, 4U3M) 上に図示した。S31 の変異部位は N 末端側 (S31 NTD) に集中しており、A サイト付近で Dom34 と近接していた。

S31 と Dom34 との機能的な相関が推測されたので、Dom34 の機能について *in vivo* で表現型を検出できるほぼ唯一の方法である S6A 欠失時の Dom34 ノックダウンによる低温感受性について確認した。結果として、S31 変異体を発現させることで Dom34 ノックダウンと同様の低温感受性を示すことが明らかとなった。

【考察・展望】

本研究で樹立したアッセイ株を用いた変異体分離実験によって、既知の重要因子であった Asc1 および S20 から新規機能領域を、また未知のリボソームドメインから新規作用因子として S31 を同定することに成功した。

Asc1 と S20 から得られた変異体は、リボソーム衝突構造上で連続したりボソーム表面領域に存在しており、また、Asc1 と Hel2 の相互作用を減弱させ、さらに翻訳停滞時特異的にリボソーム内に存在する Hel2 量を減少させることが明らかとなった。以上のことから、翻訳停滞時に発生する特異的なリボソーム衝突構造上に形成される2つのトランスナリボソームの Asc1 と S20 によるサーフェス構造に Hel2 がドッキングされて、本来構造をとらないような S20 の N

末端ドメインを Hel2 が捕捉することでリボソームレスキュー反応に必須な S20 の K63 ポリユビキチン化反応が進行するというモデルを提唱する(図5)。

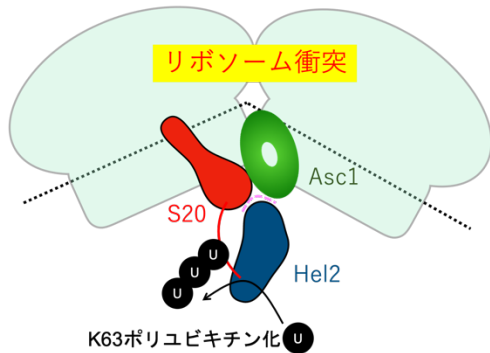


図5 トランスリボソームの Asc1 と S20 が形成するサーフェス構造への Hel2 ドッキングモデル

翻訳停滞時に特異的に発生する衝突リボソームダイマー中の停滞リボソーム Asc1 と衝突リボソーム S20 が形成するサーフェス構造に Hel2 がドッキングされて S20 の N 末端を Hel2 が捕捉することで K63 ポリユビキチン化反応が進行する。

また、S31 変異体の発現は Dom34 のノックダウンと同様に S6A 欠失時に低温感受性を示すことが明らかとなった。低温感受性となるメカニズムについては議論の余地が残っているが、S6A 欠失時に翻訳伸長速度が上昇するという報告や翻訳伸長速度の致命的な低下の結果として発生する翻訳停滞を解消するリボソームレスキュー反応に関わる Dom34 や S31 の N 末端領域の欠失・機能阻害が低温感受性を示すという事実を考慮すると「翻訳伸長速度」が重要なキーワードであると示唆される。近年、リボソームレスキュー反応の主体として考えられていた Dom34 を必要としない経路の存在が明らかとなり、リボソームレスキューは従来考えられていたよりも多様な反応の総体であると考えられている。なぜこのような多様性が存在しているのだろうか。単純なシステムとしてのロバスト性も考えられるが、それ以上に翻訳停滞という現象の性質によるものと考えられる。翻訳停滞は、明確な mRNA の異常からではなく、本来正常なはずの mRNA が状況に応じて異常として感知される。そこには明確な「異常」と「正常」だけでない領域が存在し、それぞれに即した振る舞いとして多様なリボソームレスキュー反応が存在しているのではと考えられる。この際の mRNA クライテリアが「翻訳伸長速度」をもとに決定されているのではと予想する。Dom34 と共に「翻訳伸長速度」に関係することが予想される本研究で取得した S31 変異体は、今後、多様なリボソームレスキュー反応を詳細に分類していくための重要な手がかりの1つとなると期待される。

本研究では、既知の因子の重要領域を同定し、機能解析を進めることで、翻訳停滞を示すリボソーム機能構造の一端を明らかとすることができた。また、リボソームレスキューに関わる新規因子の探索および Dom34 との機能相関解析から、これまでに予想されていた多様なリボソームレスキュー反応について解析を進めるための重要な新規知見を得ることに成功した。