

博士論文（要約）

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

目次

第一章 序論.....	1-13
1-1. 真核細胞における翻訳反応と mRNA 品質管理機構	1
1-1-1. NMD (= Nonsense-mediated mRNA decay)	2
1-1-2. NSD (= Non-stop decay)	3
1-1-3. NGD (= No-go decay)	4
1-2. tRNA 擬態分子による翻訳制御とリボソームレスキュー反応.....	5
1-3. RQC (= Ribosome quality control)	7
1-4. 翻訳停滞認識機構	9
1-4-1. 翻訳停滞状態で検出されたユビキチン化リボソーム.....	9
1-4-2. 衝突したリボソームに見出された特徴的なインターフェース構造	11
1-5. 本研究の目的.....	12
第二章 実験材料と方法	14-23
2-1. 大腸菌株.....	14
2-2. 出芽酵母株.....	14
2-3. プラスミド.....	14
2-3-1. 大腸菌クローニングベクター	14
2-3-2. 出芽酵母発現ベクター	14
2-3-3. Yeast-two hybrid 用ベクター	15
2-4. オリゴ DNA プライマーリスト	15
2-5. 培地	17
2-5-1. 大腸菌用培地	17
2-5-2. 出芽酵母用培地	17
2-6. アッセイ株を用いたリボソームレスキュー活性評価	18
2-6-1. ストリーク法	18
2-6-2. スポット法	18

2-7. 無作為突然変異導入法によるリボソームレスキュー活性阻害変異体の分離.....	19
2-7-1. 無作為変異導入 PCR 断片の調製	19
2-7-2. アッセイ株での相同組換え	19
2-7-3. 変異部位の同定	19
2-8. Asc1 と Hel2 の相互作用解析	20
2-8-1. FLAG プルダウン法	20
2-8-2. Yeast-two hybrid 法	20
2-8-3. splitTRP1 法	20
2-8-4. リボソーム沈殿解析.....	21
2-9. ウェスタンブロットティング	21
2-10. Site-directed mutagenesis.....	22
2-11. Dom34 ノックダウンによる低温感受性解析	23
第三章 結果.....	24-72
3-1. リボソームレスキュー活性評価系の構築と変異体分離戦略.....	24
3-2. 既知の因子からの変異体分離.....	27
3-3. 既知因子 Asc1 の機能解析.....	29
3-3-1. Asc1 から得られた変異体とリボソーム構造へのマッピング	29
3-3-2. Asc1 変異体と Hel2 の相関検証.....	31
3-3-3. Asc1 と Hel2 の相互作用解析.....	32
3-4. 既知因子 S20 の機能解析.....	42
3-4-1. 新規変異部位 S20 V112	42
3-4-2. 新たな S20 変異体の探索	48
3-4-3. 衝突した2つのリボソーム間の S20 と Asc1 についての検証	52
3-4-4. S20 新規変異体群の機能検証	55
3-5. リボソームレスキュー活性に関わる新規因子の探索	59
3-6. 新規作用因子 S31 の機能解析.....	60
3-6-1. S31 ユビキチンドメインから得られた K63 以外の新たな機能性残基	60
3-6-2. S31 リボソームドメインからの変異体分離.....	64
3-6-3. S31 リボソームドメイン変異体の機能検証.....	66

第四章 考察.....	73-90
4-1. リボソームと多様な分子との相互作用のハブとなる Asc1 分子上に見出されたリボソームレスキューに関わる新規な機能領域.....	73
4-2. 新規機能領域における Asc1-Hel2 間の相互作用の意義	76
4-3. トランスナリボソームの重要性を示す S20 新規変異体群.....	78
4-4. Hel2 のリボソーム結合性・ユビキチン化活性調節モデル.....	81
4-5. リボソームレスキュー反応における新規作用因子の同定.....	83
4-6. S31 ユビキチンドメインの変異.....	83
4-7. S31 リボソームドメインの変異部位と tRNA 擬態分子複合体の機能性.....	85
4-8. ユビキチン供給に対する S31 リボソームドメインの寄与.....	87
4-9. 多様なリボソームレスキュー反応の制御に関わる S31 リボソームドメイン N 末端と Dom34 の機能的相関	88
第五章 総括と展望.....	91-93
参考文献	94-99
謝辞	100

第一章 序論

1-1. 真核細胞における翻訳反応と mRNA 品質管理機構

mRNA からタンパク質が合成される翻訳反応は、大きく分けて開始・伸長・終結の3段階の反応で構成されている。翻訳開始反応は、mRNA から合成されるタンパク質量を決める律速段階でもあり、緻密に制御されることが知られている (Shirokikh and Preiss, 2018)。また、翻訳終結反応も、合成産物であるタンパク質をペプチジル tRNA からリリースするだけでなく、次の翻訳反応へのリボソームの再利用に向けたリボソーム再生反応や終止コドン以降に存在する新たな翻訳読み枠を翻訳する再開反応との共役など生理的機能における重要性が示されている (Hellen, 2018)。一方で、翻訳伸長反応は、アミノアシル tRNA が翻訳 G タンパク質の一つである EF1A によってリボソームに運ばれ、ペプチド転移反応が連続して行われる単純な反応段階と考えられがちだが、実際には一様な反応なわけではなく、mRNA の配列情報や細胞内状況と言った様々な要因で劇的に変化している (Dever et al., 2018)。翻訳伸長速度は、合成されているタンパク質の正しいフォールディングや複数サブユニット同士の相互作用、翻訳反応と共役した翻訳後修飾などのために調節されることが知られている (Collart and Weiss, 2020)。しかし、翻訳伸長反応が致命的に阻害され、リボソームが翻訳途中の mRNA 上で予期せず停止してしまうことは、細胞内全体の利用可能なリボソームの減少や中途な新生ペプチド鎖による細胞毒性を招く恐れがあるため、翻訳伸長異常を感知し、取り除く生体システムが必要となる。このようなシステムは mRNA 品質管理機構として知られ、対応する伸長異常によって3つに分けられる。

1-1-1. NMD (= Nonsense-mediated mRNA decay)

ナンセンス変異によって翻訳読み枠中に premature termination codon (以後、PTC)が生じると、リボソームは翻訳伸長反応を続けるべき位置で翻訳終結反応に移行することとなる。当然、そのような mRNA から合成されるタンパク質は、目的のタンパク質よりも短くなり、本来の機能を失うだけでなく、有害となることも多い。このような PTC を持った異常 mRNA は NMD という mRNA 品質管理機構によって分解される(Hug et al., 2016)。NMD は、核外に輸送された mRNA が最初に経験する翻訳反応であるパイオニアラウンド翻訳時に、mRNA のスプライシング部位に存在する exon junction complex (= EJC)に含まれる NMD 因子 Upf2、Upf3 が PTC 上で翻訳終結反応に移行したリボソームに存在する Upf1 をリン酸化し、エンドヌクレアーゼである SMG6 をリクルートすることで進行する(Hug et al., 2016) (図 1-1)。

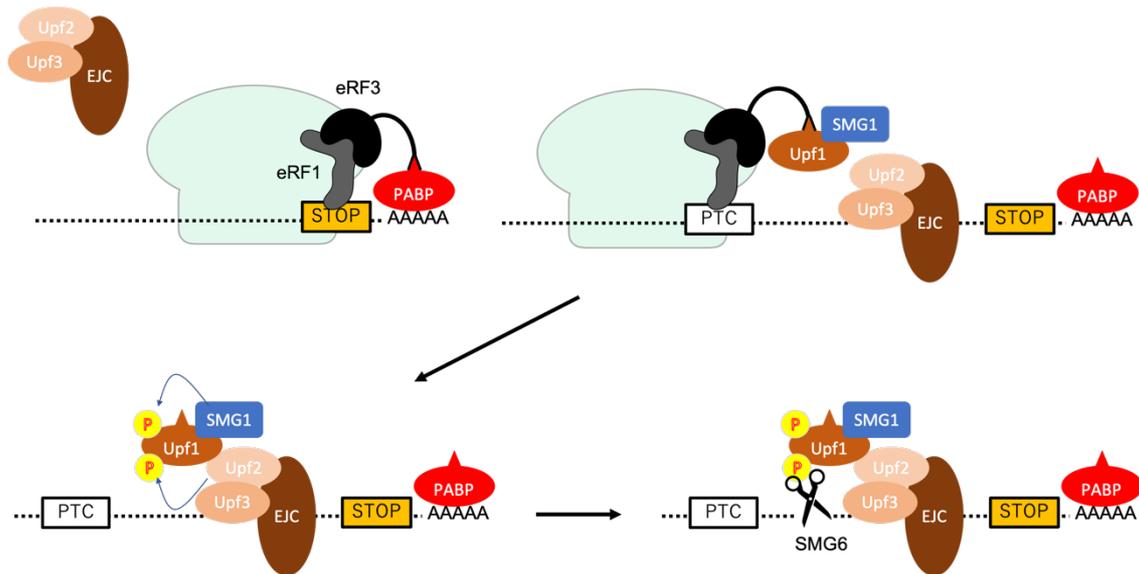


図 1-1 NMD の概略図。正常な mRNA ではパイオニアラウンド翻訳で EJC が取り除かれながら翻訳され、翻訳終結因子 eRF3 は終止コドン上で poly(A)結合タンパク質 (= PABP)と相互作用する。PTC が存在すると eRF3 は PABP ではなく NMD 因子 Upf1 と相互作用する。eRF1 によるリボソームサブユニット解離後に、Upf1 と共にリボソーム上に存在する SMG1 と EJC に含まれる Upf2、Upf3 によって Upf1 がリン酸化される。Upf1 のリン酸化が認識されて、エンドヌクレアーゼ SMG6 がリクルートされて PTC を持った異常 mRNA が分解される。

1-1-2. NSD (= Non-stop decay)

分子内切断を受けた mRNA や終止コドンが転写される前に誤って poly(A)付加反応が発生してしまった mRNA では終止コドンが欠失する(Ozsolak et al., 2010)。分子内切断された mRNA では、mRNA の 3'末端までリボソームが翻訳して停止する。また、終止コドンが存在せず poly(A)配列が翻訳されると連続した AAA コドンから正電荷を帯びたポリリシンペプチドが合成され、リボソームトンネルと相互作用することで poly(A)配列途中でリボソームが停止すると考えられている(Ito-Harashima et al., 2007)。このような mRNA を分解する mRNA 品質管理機構は NSD と呼ばれる(Frischmeyer et al., 2002)。翻訳 G タンパク質ホモログの一つである Ski7 と呼ばれる因子が、エキソヌクレアーゼ複合体である exosome を終止コドン欠失の mRNA にリクルートし、NSD を進行することが報告されている(van Hoof et al., 2000) (図 1-2)。

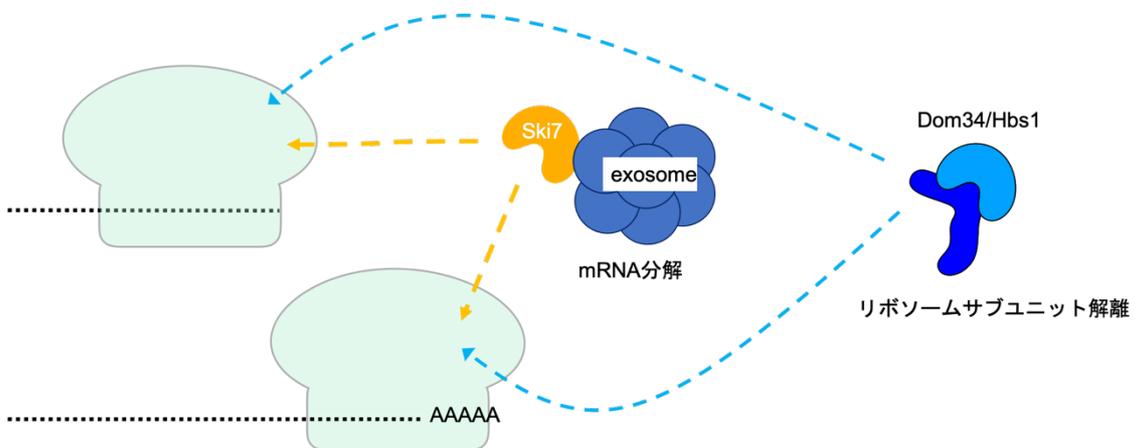


図 1-2 NSD の概略図。エンドヌクレアーゼによる分解や誤った位置での poly(A)付加反応によって終止コドンを欠失した mRNA を翻訳したリボソームは、翻訳終結反応へと移行できずに mRNA 上で停止する。そのような異常な mRNA を分解するために、停止したリボソームに Ski7 がエキソヌクレアーゼ複合体 exosome をリクルートする。また mRNA の 3'末端で停止しているリボソームは Dom34/Hbs1 複合体によってサブユニット解離される。

1-1-3. NGD (= No-go decay)

出芽酵母における CGA コドンのような著しく翻訳効率の低いレアコドンの連続や RNA 高次構造などはリボソームを翻訳読み途中で停止させる (Doma and Parker, 2006; Kuroha et al., 2010; Letzring et al., 2010; Letzring et al., 2013; Saito et al., 2015)。このような翻訳停滞状態を打開するために、NGD と呼ばれる mRNA 品質管理機構によって mRNA が分子内切断を受け、その後 5'-3' エキソヌクレアーゼである XrnI と 3'-5' エキソヌクレアーゼ複合体である exosome が mRNA を分解すると考えられている。NGD における mRNA エンドヌクレアーゼは永らく不明なままであったが、最近、出芽酵母において Cue2 が当該分子として同定された (D'Orazio et al., 2019) (図 1-3)。

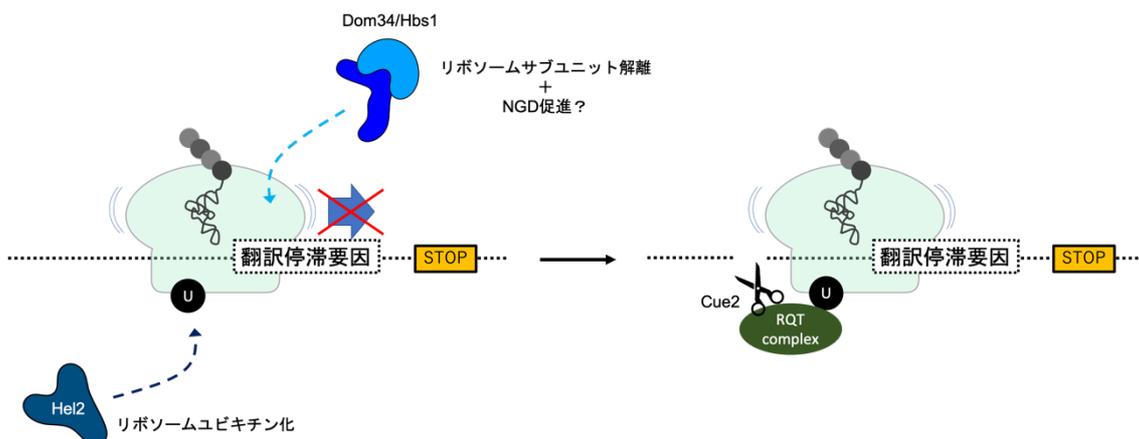


図 1-3 NGD の概略図。翻訳停滞が発生すると Hel2 によって停滞したリボソームがユビキチン化される。リボソーム品質管理機構(ribosome quality control = RQC ; 1-3 節で説明する)への移行に関わると考えられている RQT (= RQC-trigger)複合体に含まれる Cue2 が mRNA を分子内切断する。Dom34/Hbs1 複合体は停滞したリボソームをサブユニット解離するほか、NGD を促進する機能が報告されている。

NGD と先の 2 つの mRNA 品質管理機構 NMD、NSD では決定的な違いが存在する。それは、NMD、NSD が対象とするのは PTC や終止コドンの欠失という明確なエラーが存在する mRNA であるのに対し、NGD の対象となるのは遺伝情報としては「正常」であって

も翻訳停滞という「異常」な状態を引き起こした mRNA ということである。一方、細胞内でタンパク質の合成戦略上、一時的な翻訳停滞を利用している例も明らかとなってきた (Collart and Weiss, 2020)。つまり、細胞生育に必須である「正常」な翻訳停滞状態と排除すべき病的「異常」な翻訳停滞状態が識別される必要があるが、その詳細については不明なままである。

1-2. tRNA 擬態分子による翻訳制御とリボソームレスキュー反応

翻訳伸長過程ではリボソームの遺伝暗号解読部位 A サイトに提示されたコドンに対応した tRNA と運搬因子である EF1A の複合体がリクルートされ反応が進行するが、翻訳終結過程では tRNA を擬態した eRF1 と EF1A ホモログである eRF3 からなる複合体が終止コドンを選択し、反応を進行する (Hellen, 2018)。eRF1 は GGQ モチーフと呼ばれる部位でペプチジル tRNA から翻訳産物であるタンパク質をリリースするだけでなく、ABCE1 と呼ばれるリボソーム再生因子とともに翻訳反応を終えたりリボソームのサブユニット解離反応を触媒する (Pisarev et al., 2010)。また、eRF3 についても、eRF1 をリボソームにリクルートするだけでなく、NMD 因子である Upf1 との相互作用や、それと拮抗する poly(A) 配列に結合した PABP との相互作用から、PTC 認識における機能も示唆されている (Czaplinski et al., 1998; Hoshino, 2012; Singh et al., 2008) (図 1-1)。

真核生物では、もう一つの tRNA 擬態因子として Dom34 が存在し、翻訳 G タンパク質ホモログである Hbs1 の相互作用因子として見出されてきた (Carr-Schmid et al., 2002)。当初 Dom34/Hbs1 複合体の機能については不明であったが、これらの因子の欠損が NGD を阻害することが明らかとなり、翻訳停滞時に機能することが示されてきた (Doma and Parker, 2006)。また、構造解析の結果、Dom34/Hbs1 複合体は eRF1/eRF3 複合体同様に tRNA/EF1A 複合体と非常によく似た構造をとることが明らかとなった (Chen et al., 2010; Shao et al., 2016) (図 1-4)。

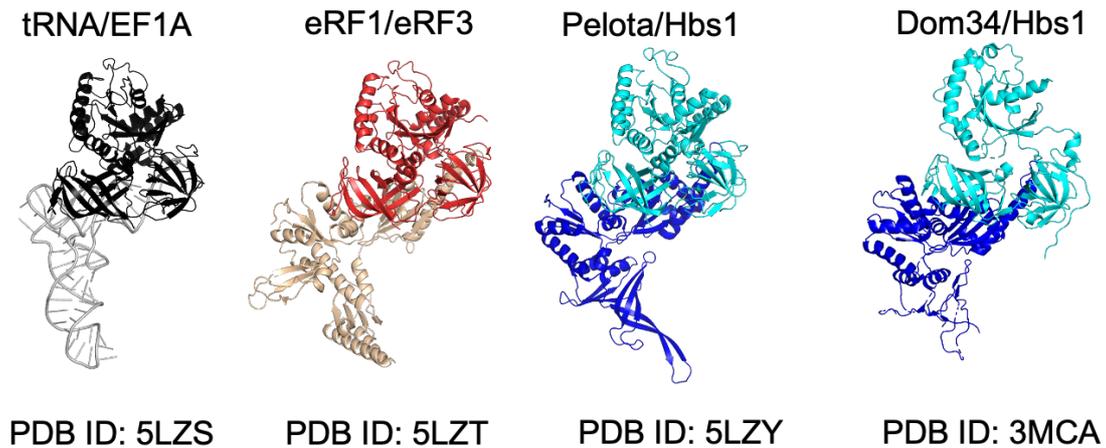


図 1-4 tRNA 擬態因子の構造。Pelota/Hbs1 複合体 (Pelota は哺乳類の Dom34 ホモログ) も翻訳終結反応を担う eRF1/eRF3 複合体と同様に tRNA/EF1A 複合体と非常に似通った構造をしている。出芽酵母の Dom34/Hbs1 複合体と Pelota/Hbs1 複合体も同様の構造をとっている。

さらに、クライオ電顕による解析で、Dom34/Hbs1 複合体がリボソーム A サイトに結合した構造が解かれ、また、*in vitro* での翻訳再構成実験で eRF1/eRF3 複合体と同様に ABCE1 と協調してリボソームサブユニット解離反応を触媒することも報告された (Becker et al., 2011; Pisareva et al., 2011)。これらのことから、NSD および NGD の対象となる mRNA 上で発生した停滞リボソームについて、Dom34/Hbs1 複合体がサブユニット解離反応を行うというモデルが提唱されている。このように、翻訳停滞してしまい mRNA 上で身動きが取れなくなったリボソームについて、本来翻訳終結反応とそれに共役したリボソーム再生反応によって翻訳を終えたリボソームが再利用されるのと同様に、リボソームサブユニットを解離させることで細胞内の利用可能なリボソーム量を保つ一連の反応はリボソームレスキュー反応と呼ばれている。

1-3. RQC (= Ribosome quality control)

Dom34 には eRF1 の GGQ モチーフにあたる部位が存在しておらず、リボソームサブユニット解離しただけでは、60S リボソームにペプチジル tRNA が挿入されたままである (図 1-5A)。また、翻訳停滞した位置までの中途な翻訳産物がリリースされると細胞にとって有害となる恐れがあるため、Ribosome quality control (以後、RQC) と呼ばれる生体システムによって、新生ペプチドの分解が行われる (図 1-5B)。RQC では、まず初めにリボソームレスキュー反応によってサブユニット解離された 60S リボソームに Rqc2 がリクルートされる (Lyumkis et al., 2014; Shao et al., 2015; Shen et al., 2015)。続いて Rqc2 が E3 ユビキチンリガーゼ Ltn1 をリクルートする (Defenouillere et al., 2013; Shao et al., 2015)。Ltn1 は新生ペプチドをユビキチン化し、このユビキチンシグナルは Rqc1 と Cdc48 によって認識される (Bengtson and Joazeiro, 2010; Brandman et al., 2012; Defenouillere et al., 2013)。AAA ファミリー ATPase である Cdc48 によってリボソームトンネルから引き抜かれたユビキチン化された新生ペプチドは、プロテアソームへと運ばれて分解される (Verma et al., 2013)。また、Cdc48 によってリボソームから新生ペプチドを引き抜くためには、ペプチジル tRNA からリリースする必要があるため、eRF1 のパラログである Vsm1 が RQC におけるペプチジル tRNA 加水分解酵素として機能していることが報告されている (Rendon et al., 2018; Verma et al., 2018)。さらに、Rqc2 はアラニンまたはスレオニンをチャージしたアミノアシル tRNA を新生ペプチドの C 末端にリクルートして CAT-tail (carboxy terminal alanine and threonine tail) と呼ばれるアラニンとスレオニンからなる配列を付加して、リボソームトンネル内の新生ペプチド領域を押し出すことが知られている (Kostova et al., 2017; Shen et al., 2015)。Ltn1 はリボソームトンネルの出口から飛び出した新生ペプチドのリシン残基を非特異的にユビキチン化するが、配列によってはユビキチン化するリシン残基がリボソームトンネル内部にのみ存在することがある。このような場合でも CAT-tail が形成されることでリボソームトンネル内に埋まっているリシン残基が外部に露出し、Ltn1 によるユビキチン化を促進す

ると考えられている (図1-5C)。また、リボソームトンネル内にもリシン残基が存在せず Ltn1 によるユビキチン化が叶わない場合であっても、CAT-tail がアミロイド様の凝集を引き起こすことでタンパク質毒性ストレスなどの別のストレス反応を惹起し、中途な翻訳産物を排除するというモデルが提唱されている (Choe et al., 2016; Defenouillere et al., 2016; Yonashiro et al., 2016)。

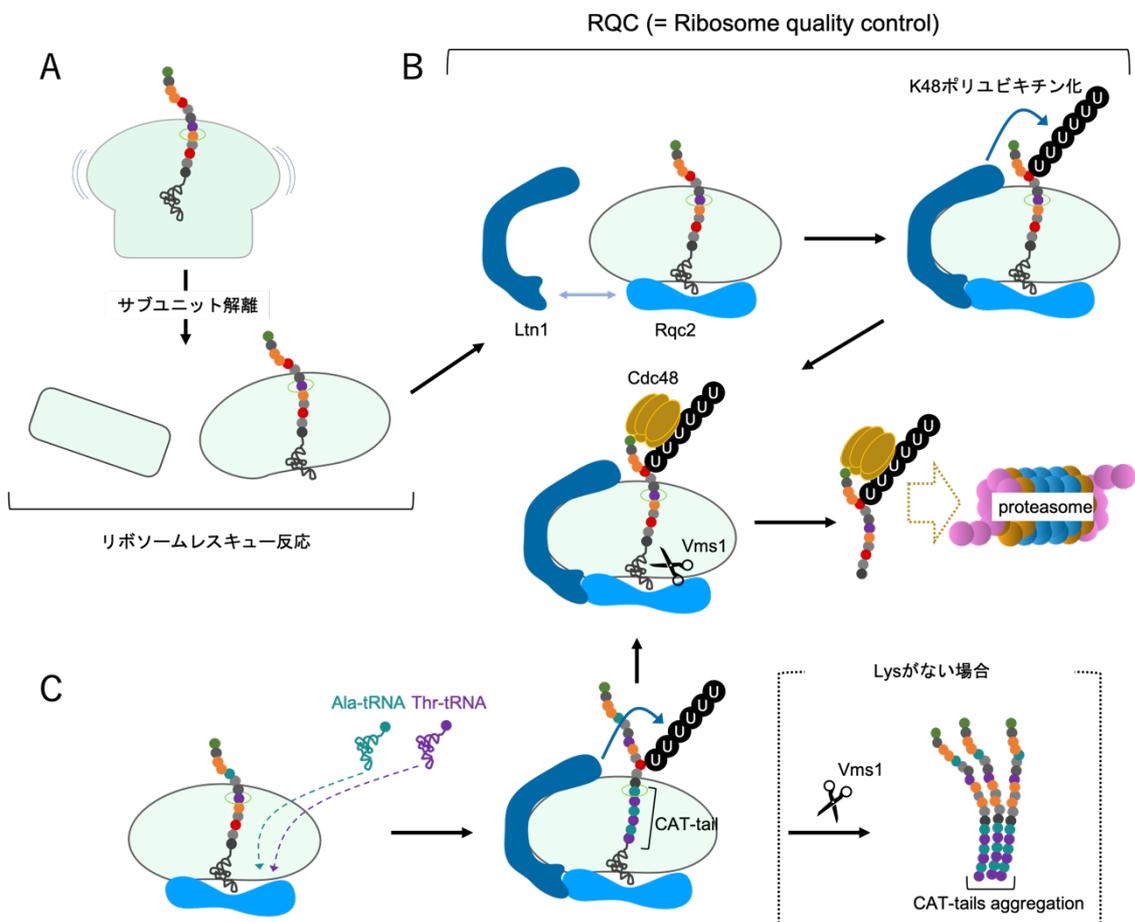


図 1-5 RQC の概略図。(A) リボソームレスキュー反応で解離された 60S リボソームには、中途な新生ペプチド鎖がペプチジル tRNA からリリースされずに残っている。(B) Rqc2 が 60S リボソームと結合し、E3 ユビキチンリガーゼ Ltn1 をリクルートする。Ltn1 は新生ペプチド鎖のリシン残基をユビキチン化する。また、ペプチジル tRNA 加水分解酵素である Vms1 が新生ペプチド鎖をリリースする。ATPase である Cdc48 は、K48 ポリユビキチン化された新生ペプチド鎖を認識して 60S リボソームから引き抜き、プロテアソームによる分解へと導く。(C) Ltn1 によってユビキチン化されるリシン残基がリボソームの外

側に露出していない場合でも、Rqc2 はアラニンもしくはスレオニンをチャージした tRNA をリクルートし CAT-tail と呼ばれるアラニンとスレオニンからなる配列を新生ペプチド鎖に付加することでリボソームトンネル内部のペプチドをリボソーム外に押し出し、露出した部分にリシン残基があれば Ltn1 によるユビキチン化が進行する。リシン残基が存在しない場合は Vms1 によって CAT-tail を付加された新生ペプチド鎖がリリースされ、CAT-tail を付加された新生ペプチド同士はアミロイド様の凝集を形成して別のストレス反応によって排除される。

1-4. 翻訳停滞認識機構

1-4-1. 翻訳停滞状態で検出されたユビキチン化リボソーム

リボソームレスキュー過程において、サブユニット解離反応や連続して発生する NGD および RQC の分子機構が明らかとなりつつある。一方で、翻訳停滞が認識される分子機構については、Dom34/Hbs1 複合体が停滞したリボソームにリクルートされるらしいという以上のことについてはわかっていなかったが、リボソームタンパク質の一つである Asc1 が介在する Dom34/Hbs1 複合体とは独立した翻訳停滞時における mRNA の分子内切断現象も報告され、翻訳停滞認識は従来考えられていたよりも複雑である可能性が示されてきた (Ikeuchi and Inada, 2016; Kuroha et al., 2010)。そのような状況の中、我々の研究室では遺伝学的な手法を用いて、E3 ユビキチンリガーゼ Hel2 と K63 ポリユビキチン化反応が Dom34/Hbs1 複合体に先んじて作用することを見出してきた (Saito et al., 2015)。また同研究で、Asc1 が Hel2 および K63 ポリユビキチン化反応よりさらに早い段階で作用することも確認され、これらの因子が翻訳停滞認識段階で機能することが強く示唆された (Saito et al., 2015) (図 1-6)。近年、酸化ストレスや小胞体ストレスによってリボソームがユビキチン化されるという知見が蓄積してきた (Higgins et al., 2015; Silva et al., 2015)。また最近になって、出芽酵母においてリボソームタンパク質 S20 を標的とした Hel2 によるリボソームユビキチン化がリボソームレスキュー過程で必須であることが明らかとなった (Matsuo et al., 2017)。当初、S20 のユビキチン化は K48 を介した反応であると報告されていたが、後

の研究では K63 ポリユビキチン化が主要な反応であると報告されている(Ikeuchi et al., 2019; Matsuo et al., 2017)。また、哺乳類培養細胞を用いた研究から、哺乳類の Hel2 ホモログである ZNF598 によるリボソームユビキチン化が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るが、この場合にはモノユビキチン化あるいは複数のリシン残基がモノユビキチン修飾されるマルチモノユビキチン化反応であると推定されている(Garzia et al., 2017; Juszkiwicz and Hegde, 2017; Sundaramoorthy et al., 2017)。以上のように、翻訳停滞時に発生しているリボソームユビキチン化状態は多様である可能性が考えられ、リボソームレスキュー過程におけるリボソームユビキチン化の重要性は明らかである一方で、依然として機能的なユビキチン修飾の形態に関する知見は不明瞭である。Hel2 と K63 ポリユビキチン化反応が重要であるという我々の報告(Saito et al., 2015)も考慮すると、少なくとも出芽酵母で報告された Hel2 による S20 の K63 ポリユビキチン化反応がリボソームレスキュー反応に必須であるというモデル(Ikeuchi et al., 2019)については妥当であると考えられる (図 1-6)。

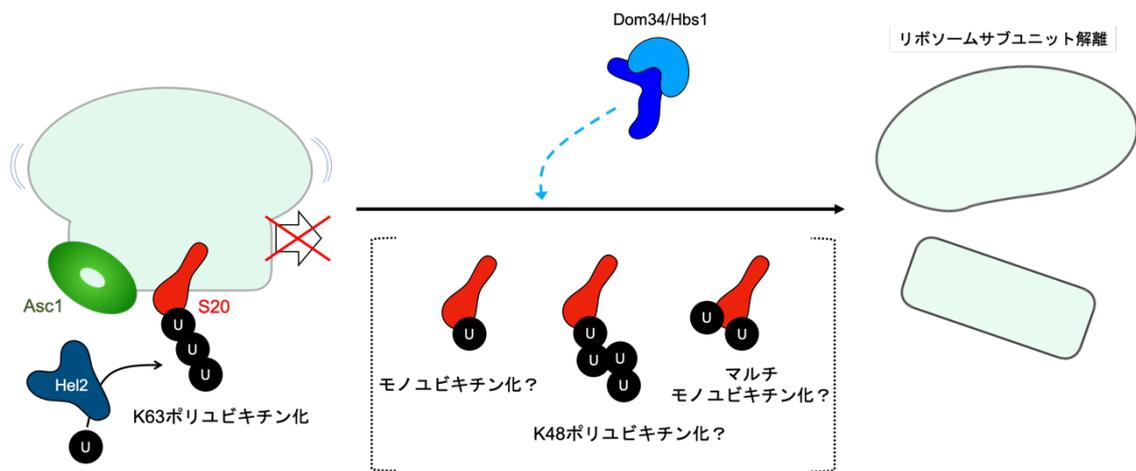


図 1-6 Hel2 によるリボソームユビキチン化モデル。翻訳停滞したリボソームの S20 は Hel2 によって K63 ポリユビキチン化され、その後リボソームサブユニット解離反応が進行する。このリボソームユビキチン化反応より早い段階で Asc1 が機能することが報告されている。また S20 は、K63 ポリユビキチン化以外にもモノユビキチン化または K48 ポリユビキチン化、マルチモノユビキチン化状態となる可能性も示唆されている。

1-4-2. 衝突したリボソームに見出された特徴的なインターフェース構造

3'-5'分解を担う exosome の活性に必須な Ski2 遺伝子をノックアウトした出芽酵母を利用した解析で、NGD による mRNA の分子内切断は翻訳停滞配列から 100 塩基ほど上流で最も高頻度に発生していることが明らかとなった (Simms et al., 2017)。また、*in vitro* で Hel2 または ZNF598 によるリボソームユビキチン化反応後にポリソーム分画することで、ユビキチン化リボソームがヌクレアーゼ耐性の disome 画分に分布することも明らかとなった (Ikeuchi et al., 2019; Juskiewicz et al., 2018)。高濃度の翻訳伸長阻害剤を使用すると全ての翻訳途中のリボソームが停止するが、低濃度で使用すると一部のリボソームだけが停止し、リボソーム同士の衝突が発生する。翻訳伸長阻害剤の高濃度処理は、ZNF598 によるリボソームユビキチン化を引き起こさないのに対し、低濃度処理を施すことによってリボソームユビキチン化が促進されることも報告された (Juskiewicz et al., 2018)。以上の知見から、翻訳停滞状態に陥って mRNA 上で停止したリボソームに後続のリボソームが衝突することが引き金となって、リボソームレスキュー過程における初期反応と考えられるリボソームユビキチン化が引き起こされるというモデルが提唱されている。また、*in vitro* 翻訳実験で翻訳停滞させたリボソームを精製し、クライオ電顕で解析すると、衝突した 2 つのリボソームが mRNA を限界まで引き合う歪なダイマー構造を形成することが確認された (Ikeuchi et al., 2019; Juskiewicz et al., 2018) (図 1-7)。この立体構造解析像には Hel2 および ZNF598 の構造は得られなかったが、衝突したリボソーム同士のインターフェース付近に、これまでに重要性が示されていた Asc1 および Hel2 によってユビキチン化される S20 が近接して存在していることが明らかとなった (Ikeuchi et al., 2019; Juskiewicz et al., 2018)。さらに、出芽酵母のリボソーム衝突ダイマーの構造においては、前後の両リボソームの Asc1 同士が直接インターフェースを形成する様子が観察され、Hel2 によって認識されるための機能構造であることが予想されている (Ikeuchi et al., 2019) (図 1-7)。

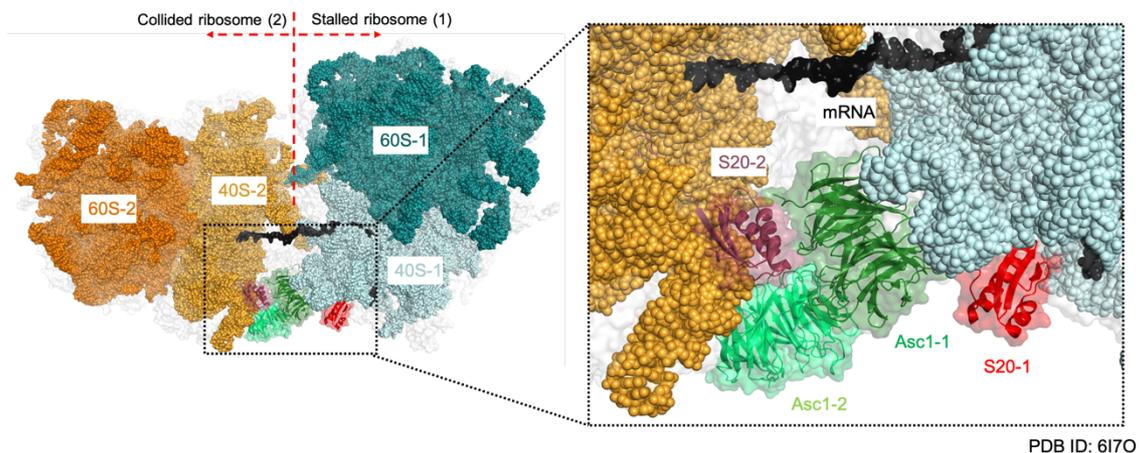


図 1-7 衝突した2つのリボソームの立体構造図。翻訳停滞状態に陥ったリボソーム(図中の Stalled ribosome)には後続のリボソーム(図中の Collided ribosome)が衝突する。衝突後も限界まで翻訳を進めた結果、mRNA を限界まで引き延ばした状態で歪なりボソームダイマー構造を形成する。衝突したインターフェースでは2つのリボソームの Asc1 同士が接しており、Hel2 によってユビキチン化される S20 も2つの Asc1 の近傍に存在している。

1-5. 本研究の目的

近年、クライオ電顕などの発達により大きく進展した構造生物学によって、これまでに生化学・分子生物学的に示されてきた細胞内イベントへの理解が裏付けられ、反応機構が原始レベルまで明らかとなる例も数多くある一方で、得られた構造から解釈された説明が十分な検証のないまま事実として受け入れられ放置される事例も存在している。Dom34/Hbs1 複合体とリボソームの相互作用構造やリボソーム衝突ダイマーの構造についても、クライオ電顕による構造が報告されているが、リボソームレスキュー過程における Dom34/Hbs1 複合体の必要性・機能性、衝突した2つのリボソーム間における相互作用インターフェースを含めた本質的な分子メカニズムについては構造からの予測の域を出ていない(Becker et al., 2011; Ikeuchi et al., 2019; Juszkiwicz et al., 2018; Kobayashi et al., 2010; Shao et al., 2016)。

NGD によって mRNA が、そして RQC によって新生ペプチドが分解されるメカニズムが明らかとなってきた。一方で、リボソームレスキュー反応において最も重要と考えられる生

理的で「正常」な翻訳停滞と病的で「異常」な翻訳停滞を見分ける認識段階については、重要因子情報と構造情報が蓄積しているものの、具体的な機能部位・反応機構については不明なままである。本研究では、過去の研究から蓄積した情報をもとにリボソーム衝突モデルの妥当性と衝突した2つのリボソームにおける既知の因子 Asc1 および S20 の機能領域、さらに翻訳停滞認識段階に関与する新規リボソーム構成因子について分子遺伝学的にリボソームレスキュー反応に関わる変異体を分離することで解析し、翻訳停滞認識に関わるリボソーム機能構造を解明することを目的とした。

第二章 実験材料と方法

2-1. 大腸菌株

大腸菌を用いた各変異体作成および発現プラスミドのクローニングには NovaBlue を用いた。

NovaBlue: *endA1 hsdR17*($r_{k12}^- m_{k12}^+$) *supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lacF'*[*proA⁺B⁺lacZΔM15::Tn10*](Tet^R)

2-2. 出芽酵母株

Yeast-two hybrid 法以外の出芽酵母を利用した実験は、BY4727 を親株とした下記の株を使用した。

BY4727: *MATα, his3 Δ 200 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 trp1 Δ 63 ura3 Δ 0*

BY4727 <i>blanc-HIS3</i> :	BY4727 HO-kanMX-TEFp-Rluc-blanc-HIS3-CYCt-HO
BY4727 <i>CGA_{x12}-HIS3</i> :	BY4727 HO-kanMX-TEFp-Rluc-CGA × 12-HIS3-CYCt-HO
BY4727 <i>GPD CGA_{x12}-HIS3</i> :	BY4727 HO-kanMX-GPDp-Rluc-CGA × 12-HIS3-CYCt-HO
BY4727 <i>CGA_{x12}-URA3</i> :	BY4727 HO-kanMX-TEFp-Rluc-CGA × 12-URA3-CYCt-HO
BY4727 <i>L25-FH</i> :	BY4727 <i>l25::L25-FLAG-His</i>
BY4727 <i>dom34-CS</i> :	BY4727 <i>dom34::delta X633 HO-kanMX-TetOFF7-Dom34-CYCt-HO RPS6A::Kl-Leu2MX</i>

Yeast-two hybrid 法では、Clontech から販売されている AH109 を使用した。

AH109: *MATα, trp1-901 leu2-3, 112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3 MEL1 GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2 URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ*

2-3. プラスミド

2-3-1. 大腸菌クローニングベクター

pT7blue アンピシリン選択マーカー
pHSG399 クロラムフェニコール選択マーカー

2-3-2. 出芽酵母発現ベクター

プロモーターの発現強度は GPD > TEF > ADH > CYC の順。

p413GPD シングルコピー (ARS CEN) HIS3 選択マーカー

p413TEF	シングルコピー (ARS CEN)	HIS3 選択マーカー
p413ADH	シングルコピー (ARS CEN)	HIS3 選択マーカー
p413CYC	シングルコピー (ARS CEN)	HIS3 選択マーカー
p414GPD	シングルコピー (ARS CEN)	TRP1 選択マーカー
p415GPD	シングルコピー (ARS CEN)	LEU2 選択マーカー
p415ADH	シングルコピー (ARS CEN)	LEU2 選択マーカー
p416GPD	シングルコピー (ARS CEN)	URA3 選択マーカー
p416TEF	シングルコピー (ARS CEN)	URA3 選択マーカー
p416ADH	シングルコピー (ARS CEN)	URA3 選択マーカー
p416CYC	シングルコピー (ARS CEN)	URA3 選択マーカー

2-3-3. Yeast-two hybrid 用ベクター

pGADT7	転写活性化ドメインベクター
pGBKT7	DNA 結合ドメインベクター

2-4. オリゴ DNA プライマーリスト

名称	配列 (5'→3')
GPDprom	GGAAAAAGCTGAAAAAAAAGGTTG
CYCter	GGGACCTAGACTTCAGGTTGTC
MG_K6R_uS10_S	TTTCAACGTGAAAAGGTTGAAGAACAA
MG_K6R_uS10_AS	CTTTTCACGTTGAAAGTCAGACATATG
MG_K8R_uS10_K6R_S	CGTGAACGTGTTGAAGAACAAGAACAA
MG_K8R_uS10_K6R_AS	TTCAACACGTTACGTTGAAAGTCAGA
MG_K8R_uS10_S	AAGGAACGTGTTGAAGAACAAGAACAA
MG_K8R_uS10_AS	TTCAACACGTTCCTTTTGAAAGTCAGA
RPS20_K6K8_overlap_F	GACTTTCAAAGGAAAAG
20_MG_V112_A_R	AACCAGGTTCAATGGT
S20_MG_V112_T_R	TACCAGGTTCAATGGT
S20_MG_V112_G_R	GACCAGGTTCAATGGT
S20_MG_V112_C_R	CACCAGGTTCAATGGT
S20_MG_V112_AT_F	ATGATGTCTGAAGTTGTT
S20_MG_V112_AC_F	ACGATGTCTGAAGTTGTT

S20_MG_V112_TT_F	TTGATGTCTGAAGTTGTT
S20_MG_V112_TG_F	TGGATGTCTGAAGTTGTT
S20_MG_V112_TC_F	TCGATGTCTGAAGTTGTT
S20_MG_V112_GT_F	GTGATGTCTGAAGTTGTT
S20_MG_V112_GG_F	GGGATGTCTGAAGTTGTT
S20_MG_V112_GC_F	GCGATGTCTGAAGTTGTT
S20_MG_V112_CT_F	CTGATGTCTGAAGTTGTT
S20_MG_V112_CC_F	CCGATGTCTGAAGTTGTT
S20_MG_V112_AA_F	AAGATGTCTGAAGTTGTT
Asc1_C_myc_R	CCGTCTGACTTACAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTC TGCTCAGAGTTAGCAGTCATAACTTGCC
MG_Asc1_D109Y_S	TATGTTATGTCCGTTGACATT
MG_RACK1_D109_AS	GGACTTGTGACCGACGAATC
Asc1_MG_27_R	AGAAGTAGCCAAAGATGT
Asc1_MG_A27F_F	TTTGGTCAACCAAACCTATT
Asc1_MG_G28F_F	GCTTTTCAACCAAACCTATTGTT
Asc1_MG_Q29A_F	GCTGGTGCACCAAACCTATTGTTGTC
Asc1_MG_247_R	AGAGAAAGCCAAAGAGAA
Asc1_MG_P247A_F	GCAAACAGATACTGGTTGG
Asc1_MG_N248A_F	CCAGCCAGATACTGGTTGGCTGC
Asc1_MG_R249A_F	CCAAACGCATACTGGTTGGCTGCTGC
Asc1_MG_296_R	AGACCAAGCCAAAGAAAC
Asc1_MG_A296F_F	TTTGACGGTCAAACCTTTGTT
Asc1_MG_D297K_F	GCTAAGGGTCAAACCTTTGTTTGCC
Asc1_MG_G298F_F	GCTGACTTTCAAACCTTTGTTTGCCGG
Hel2_C_FLAG_R	CCGTCTGACTTACTTGTCATCGTCATCCTTGTAATCA GATACACCAATGTGGAATAACA
S31_delUBI_F	CCGAATTCATATGGGTAAGAAGAGAAAGAAG
S31_del_K99_F	CCGAATTCATATGTTGGCTGTCTTGTCCTACTA

2-5. 培地

2-5-1. 大腸菌用培地

LB 培地

Difco LB Broth Lennox (BD)を 20 g/L でイオン交換水に溶解し、121°C, 20 min オートクレーブして調製した。抗生物質は、十分温度が下がってから加えた。

Difco LB Broth Lennox 20 g: Tryptone 10 g, Yeast extract 5 g, Sodium Chloride 5 g

抗生物質の最終濃度

アンピシリン : 100 µg/ml

クロラムフェニコール : 10 µg/ml

LB プレート培地

LB 培地に最終濃度 1.2%となるように TS 寒天 SSP (タイショーテクノス) を加え作成した。

2-5-2. 出芽酵母用培地

YPD 培地

D(+)-グルコース (和光純薬) 20 g/L、ポリペプトン (日本製薬) 20 g/L、Bacto Yeast extract(BD)10 g/L となるようにイオン交換水に溶解し、120°C, 10 min オートクレーブして調製した。グルコースはメイラード反応によって他の成分と反応する可能性があるため、別途オートクレーブした後、無菌的に混合した。

YPD プレート培地

YPD 培地に最終濃度 2%となるように Bacto Agar(BD)を加え作成した。

SC-X 培地

X は選択マーカーで要求性が変化するアミノ酸を示している。

D(+)-グルコース (和光純薬) 20 g/L、Difco Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids (BD) 6.7 g/L、complete supplement mixture drop-out X (Formedium)を適切な分量となるようイオン交換水に溶解し、120°C, 10 min オートクレーブして調製した。グルコースはメイラード反応によって他の成分と反応する可能性があるため、別途オートクレーブした後、無菌的に混合した。

SC-X プレート培地

SC-X 培地に最終濃度 2%となるように Bacto Agar(BD)を加え作成した。

2-6. アッセイ株を用いたリボソームレスキュー活性評価

2-6-1. ストリーク法

BY4727_{CGAx12-HIS3} のコンピテントセルを Frozen EZ (フナコシ) を用いて調製し、TRP1 選択マーカーの酵母発現プラスミド p414GPD に各因子の野生型もしくは変異体を挿入したベクターを形質転換し、30°Cで静置培養した。生育したコロニーを爪楊枝で釣菌し、コントロールプレート (SC-W) とアッセイプレート (SC-WH) にストリークし、30°Cで静置培養した。Hel2 との共発現での生育性の評価の場合には、Hel2 を URA3 選択マーカーの発現プラスミド p416GPD に挿入したベクターを各因子と共に形質転換し、同様にコントロールプレート (SC-WU) とアッセイプレート (SC-WUH) にストリークして 30°Cで静置培養した。

HIS3 選択マーカーの発現プラスミド p413TEF に TRP1N44 と Asc1 の融合タンパク質を挿入したベクターでは、ヒスチジン要求性でリボソームレスキュー活性評価が行えないので、BY4727_{CGAx12-URA3} のコンピテントセルを Frozen EZ (フナコシ) を用いて調製して使用した。形質転換体はコントロールプレート (SC-H) とアッセイプレート (SC-HU) にストリークして 30°Cで静置培養した。

2-6-2. スポット法

BY4727_{CGAx12-HIS3} のコンピテントセルを Frozen EZ (フナコシ) を用いて調製し、TRP1 選択マーカーの酵母発現プラスミド p414GPD に各因子の野生型もしくは変異体を挿入したベクターを形質転換し、30°Cで静置培養した。生育したコロニーを爪楊枝で釣菌し、1 ml の SC-W で一晩振盪培養した。翌朝、OD₆₀₀ が 0.2 となるように 1ml の SC-W に希釈し、30°Cで 6 時間振盪培養した。500 xg で遠心して菌体を回収し、滅菌水で OD₆₀₀ が 0.5 となるように懸濁した。菌懸濁液について 5 倍の段階希釈系列を作成し、コントロールプレート (SC-W) とアッセイプレート (SC-WH) に 5 µl ずつスポットし、30°Cで静置培養した。Hel2 またはユビキチン、Dom34 との共発現での生育性の評価の場合には、Hel2 およびユビキチン、Dom34 を URA3 選択マーカーの発現プラスミド p416GPD に挿入したベクターを各因子と共に形質転換し、同様にコントロールプレート (SC-WU) とアッセイプレート (SC-WUH) にスポットして 30°Cで静置培養した。

2-7. 無作為突然変異導入法によるリボソームレスキュー活性阻害変異体の分離

2-7-1. 無作為変異導入 PCR 断片の調製

変異体分離を試みる因子を p414GPD に挿入した。EmeraldAmp (Takara) 5 μ l, 10 μ M GPDprom プライマー 0.3 μ l, 10 μ M CYCter プライマー 0.3 μ l, 0.1 ng/ μ l 発現プラスミド 0.5 μ l, milliQ 3.9 μ l を混合し、増幅反応を行った。98°C 10 sec, 60°C 30 sec, 72°C 60 sec/kb を 40 サイクルした後、全量をアガロース電気泳動し、増幅したバンドをメスで切り出した。PCR フラグメントを GeneClean II (MP) で精製し、milliQ 5 μ l で溶出した。

2-7-2. アッセイ株での相同組換え

別途 EcoRI と SalI で切断した p414GPD を 50 ng/ μ l となるように調製した DNA 溶液 2 μ l と 2-7-1 で調製した PCR 断片溶液 4 μ l を Frozen EZ(フナコシ)を用いて調製した BY4727 CGAx12-HIS3 のコンピテントセル 40 μ l と混合して形質転換し、相同組換えのコントロールプレートである SC-W プレート 1 枚と変異体分離用プレートである SC-WH プレート 3 枚に播種して 30°C で静置培養した。

2-7-3. 変異部位の同定

SC-WH プレートに生育してきたコロニーを釣菌し、再度 SC-WH プレートにストリークして変異体活性を確認後、Gen とるくん(酵母用)(Takara)を使用して DNA 抽出を行い milliQ 100 μ l に溶解した。抽出した DNA を鋳型として使用し、Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (NEB)によって変異断片を再度増幅した。DNA 溶液 0.5 μ l, Q5 Reaction Buffer (5 \times) 2 μ l, 10 μ M GPDprom プライマー 0.3 μ l, 10 μ M CYCter プライマー 0.3 μ l, 2.5 mM dNTP 0.8 μ l, Q5 High-Fidelity DNA Polymerase 0.1 μ l, milliQ 6 μ l を混合した。98°C 10 sec, 60°C 30 sec, 72°C 30 sec/kb を 30 サイクルした。PCR 反応溶液を GeneClean II (MP) で精製し、milliQ 10 μ l に溶解した。精製した DNA 断片溶液 1 μ l と 2-7-2 で調製した断片化済み p414GPD 1 μ l を BY4727 CGAx12-HIS3 のコンピテントセル 10 μ l と混合して形質転換し、相同組換えのコントロールプレートである SC-W プレートに播種して 30°C で静置培養した。生育してきたコロニーを釣菌し、アッセイプレートである SC-WH プレートにストリークして 30°C で静置培養した。SC-WH プレートでの生育が見られたものについては、精製済みの DNA 断片溶液 2 μ l と BigDye™ Terminator v3.1 (Thermo Fisher)を使用してシークエンスを確認した。独立したコロニーから同一アミノ酸残基に対する変異が複数得られるまで 2-7-1 から 2-7-3 の工程を繰り返すことで、この方法での変異体取得が飽和していると判断した。

2-8. Asc1 と Hel2 の相互作用解析

2-8-1. FLAG プルダウン法

BY4727_{CGAx12-HIS3} のコンピテントセルを Frozen EZ (フナコシ) を用いて調製し、p416ADH-Hel2-FLAG と p414GPD に Myc タグ化した Asc1 変異体を挿入した発現プラスミドを形質転換し、SC-WU プレートで静置培養した。生育したコロニーを爪楊枝で釣菌し、1 ml の SC-WU で一晩振盪培養した。翌朝、OD₆₀₀ が 0.2 となるように 5 ml の SC-WU に希釈し、30°C で 6 時間振盪培養した。500 xg で遠心して菌体を回収し、1×P buffer (25 mM Tris-HCl (pH 7.2), 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT) 350 μl に懸濁した。200 μl の Glass beads (acid-washed 425-600 μm) (Sigma-Aldrich) とともにスクリーチューブへと移し、FastPrep 24 instrument (MP) で 6.0 m/sec, 30 sec で破碎した。遠心分離後に上清 200 μl と 200 μl の 1×P buffer + 1% NP-40 を混合し、10 μl の抗 DYKDDDDK タグ抗体磁気ビーズ (FUJIFILM) を加えて 4°C, 4 時間インキュベートした。1 ml の 1×P buffer + 1% NP-40 でのビーズ洗浄を 5 回行い 20 μl の 1×SDS sample buffer で溶出した。破碎液 15 μl、溶出液 20 μl を SDS-PAGE し、ウエスタンブロッティングによって検出した。

2-8-2. Yeast-two hybrid 法

AH109 のコンピテントセルを Frozen EZ (フナコシ) を用いて調製し、pGBKT7-Hel2 と pGADT7 に野生型 Asc1 および Asc1 変異体を挿入したプラスミドを形質転換し、30°C で静置培養した。生育したコロニーを爪楊枝で釣菌し、1 ml の SC-LW で一晩振盪培養した。翌朝、OD₆₀₀ が 0.2 となるように 1 ml の SC-LW に希釈し、30°C で 6 時間振盪培養した。500 xg で遠心して菌体を回収し、滅菌水で OD₆₀₀ が 0.5 となるように懸濁した。菌懸濁液について 5 倍の段階希釈系列を作成し、コントロールプレート (SC-LW) とアッセイプレート (SC-LWH) に 5 μl ずつスポットし、30°C で静置培養した。

2-8-3. splitTRP1 法

内在の野生型 Asc1 および Hel2 の作用を除くため、KanMX と hphMX マーカーを用いて BY4727 の内在 Asc1、Hel2 遺伝子をノックアウトした。BY4727 *asc1Δhel2Δ* のコンピテントセルを Frozen EZ (フナコシ) を用いて調製し、p415ADH-Hel2-TRP1C45 と p413TEF-TRP1N44 に野生型 Asc1 および Asc1 変異体を挿入したプラスミドを形質転換し、30°C で静置培養した。生育したコロニーを爪楊枝で釣菌し、1 ml の SC-LH で一晩振盪培養した。翌朝、OD₆₀₀ が 0.2 となるように 1 ml の SC-LH に希釈し、30°C で 6 時間振盪培養した。500 xg で遠心して菌体を回収し、滅菌水で OD₆₀₀ が 0.5 となるように懸濁した。菌懸濁液について 5 倍の段階希釈系列を作成し、コントロールプレート (SC-LH) とアッセイプレ

ート (SC-LHW) に 5 μ l ずつスポットし、30°Cで静置培養した。

2-8-4. リボソーム沈殿解析

BY4727_{L25-FH} のコンピテントセルを Frozen EZ (フナコシ) を用いて調製し、p415ADH-Hel2-PA と p414GPD に Myc タグ化した Asc1 変異体を挿入した発現プラスミドを形質転換し、SC-WU プレートで静置培養した。生育したコロニーを爪楊枝で釣菌し、1 ml の SC-LW で一晩振盪培養した。翌朝、OD₆₀₀ が 0.2 となるように 5 ml の SC-LW に希釈し、30°C で 6 時間振盪培養した。シクロヘキシミドを加える場合は、6 時間振盪培養後に最終濃度 5 μ g/ml となるように加え、さらに 30°C で 30 分振盪培養した。500 xg で遠心して菌体を回収し、350 μ l の 1 \times P buffer (25 mM Tris-HCl (pH 7.2), 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM DTT) に懸濁した。200 μ l の Glass beads (acid-washed 425-600 μ m) (sigma) とともにスクリーチューブへと移し、FastPrep 24 instrument (MP) で 6.0 m/sec, 30 sec で破碎した。遠心分離後に上清 200 μ l を himac 専用のチューブに移し、下層に 120 μ l の 15% sucrose cushion buffer (15w/v% sucrose, 25 mM Tris-HCl (pH 7.2), 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 2 mM DTT) を重層した。200,000 xg, 50 min の超遠心後に上清を取り除き、50 μ l の 1 \times SDS sample buffer で沈殿を溶解した。破碎液 10 μ l、超遠心後上清 15 μ l、沈殿溶解液 5 μ l を SDS-PAGE し、ウエスタンブロッティングによって検出した。

2-9. ウエスタンブロッティング

SDS-PAGE

TGX FastCast アクリルアミド溶液キット (Bio Rad) を使用してゲルを調製し、1 \times Running Buffer Solution for SDS-PAGE (ナカライ) を使用して泳動した。

メンブレンへの転写

Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio Rad) を使用して SDS-PAGE 後のゲルから PVDF メンブレンへと転写した。

ブロッキング

転写後のメンブレンを 0.05%-tTBS (pH7.4) (ナカライ) で洗浄後、Bullet Blocking One for Western Blotting (ナカライ) に浸して 5 分以上振盪した。

抗体標識

ブロッキング後のメンブレンを 0.05%-tTBS (pH7.4) で洗浄後、0.05%-tTBS (pH7.4) に 10% となるように Bullet Blocking One for Western Blotting を加えた液 (10%ブロッキング液) で抗体を希釈した抗体希釈液に浸し、1 時間以上振盪した。

一次抗体希釈倍率

Monoclonal ANTI-FLAG M2-peroxidase antibody produced in mouse (Sigma-Aldrich):
1/20,000

Anti c-Myc, Monoclonal Antibody, Peroxidase Conjugated (FUJIFILM): 1/10,000

Anti PA tag, Rat Monoclonal Antibody, Peroxidase Conjugated (FUJIFILM): 1/10,000

Phosphoglycerate kinase monoclonal antibody (Invitrogen): 1/10,000

Polyclonal Simple Antisera TRP1 POS1 rabbit (Sigma-Aldrich; カスタム Anti-TRP1N44
抗体): 1/200

Polyclonal Simple Antisera TRP1 POS4 rabbit (Sigma-Aldrich; カスタム Anti-TRP1C45
抗体): 1/200

カスタム抗体選択ペプチド

TRP1 POS1: CALDSDADLLGII

TRP1 POS4: CTNGVKDSNKIANFVKNNAKK

二次抗体標識

二次抗体が必要な抗体では、一次抗体標識後のメンブレンを 0.05%-tTBS (pH7.4)で 3 回洗浄後、10%ブロッキング液で二次抗体を希釈した抗体希釈液に浸し、1 時間以上振盪した。

二次抗体希釈倍率

ECLTM Peroxidase labelled anti-mouse antibody (GE): 1/20,000

ECLTM Peroxidase labelled anti-rabbit antibody (GE): 1/20,000

化学発光検出

抗体標識後のメンブレンを 0.05%-tTBS (pH7.4)で 3 回洗浄後、イムノスターLD (FUJIFILM)を使用して、LAS-3000 mini imaging system (FUJIFILM)で検出した。

2-10. Site-directed mutagenesis

Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (NEB)を使用した。1 pg/ μ l plasmid 0.5 μ l, Q5 Reaction Buffer (5 \times) 2 μ l, 5'末端に変異を入れた each 10 μ M primer mix 0.6 μ l, 2.5 mM dNTP 0.8 μ l, Q5 High-Fidelity DNA Polymerase 0.1 μ l, milliQ 6 μ l を混合した。98 $^{\circ}$ C 10 sec, 60 $^{\circ}$ C 30 sec, 72 $^{\circ}$ C 30 sec/kb を 30 サイクルした後、1 μ l をアガロース電気泳動し増幅を確認した。反応液に DpnI (Takara) 0.5 μ l を加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした。反応液 1 μ l, T4 PNK (Takara) 0.3 μ l, ligation high ver.2 (TOYOBO) 2.5 μ l, milliQ 3 μ l を混合し 16 $^{\circ}$ C で 1 時間イ

ンキュベートした後、コンピテントセルに形質転換し 37°Cで静置培養した。得られたコロニーからプラスミド抽出し、シーケンス解析によって目的の変異が入っていることを確認した。

2-11. Dom34 ノックダウンによる低温感受性解析

BY4727_{dom34-CS}のコンピテントセルを Frozen EZ (フナコシ) を用いて調製し、p414GPD に Dom34 また各変異体を挿入した発現プラスミドを形質転換し、SC-W プレートで静置培養した。生育したコロニーを爪楊枝で釣菌し、1 ml の SC-W で一晩培養した。翌朝、OD₆₀₀ が 0.2 となるように 1 ml の SC-W に希釈し、30°Cで 6 時間振盪培養した。500 xg で遠心して菌体を回収し、滅菌水で OD₆₀₀ が 0.5 となるように懸濁した。菌懸濁液について 5 倍の段階希釈系列を作成し、SC-W プレートと SC-W+150 mM Tet プレート 2 枚ずつに 5 µl ずつスポットし、30°Cまたは 20°Cで静置培養した。

第三章は論文投稿予定のため、インターネット公表できません。

第四章は論文投稿予定のため、インターネット公表できません。

第五章 総括と展望

本研究では、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可能な出芽酵母アッセイ株を利用することで、リボソームレスキュー過程における既知の因子である Asc1 と S20 から新規機能領域を見出すことに成功した。そして Hel2 との相互作用解析を通じて、翻訳停滞時に発生するリボソーム衝突時に特異的に形成される Asc1-S20 分子上のサーフェス構造が、Hel2 の S20 ユビキチン化活性の発現に重要であることが示唆された。しかし、リボソームレスキュー過程でリボソームユビキチン化だけが本当に重要なのだろうか。確かに、ユビキチン化されない S20 K6/8R 変異体では、アッセイ株のヒスチジン欠損培地での生育性から、ほぼ完全にリボソームレスキュー活性が阻害されているように見受けられる。しかし、細胞中の全てのレポーター mRNA が翻訳されなくとも生育に十分な量の HIS3 タンパク質は発現し得る。また、S20 V112 残基の網羅的アミノ酸置換実験からもヘテロナリボソームによるリボソームレスキュー反応の進行、つまりリボソーム衝突モデルが支持されるが、一方で、衝突リボソームの構造上で2つの S20 はそれぞれと Asc1 ほど近接しておらず、このモデルのみでヘテロ・ホモな S20 変異体によるリボソームレスキュー活性の変化は説明できない。つまり、S20 は単にユビキチン化標識されて他の因子の目印となることだけが重要ではなく、その他にも機能性を有している可能性が存在する。今回取得することは叶わなかったが、今後、ユビキチン化されない S20 K6/8R 変異体が発現した状態でもリボソームレスキュー活性を発揮するようになる変異体を分離することができれば、新たなリボソームレスキューに替わる概念を提唱できるのではないかと考えている。

また、リボソームレスキュー反応の新規因子として S31 を同定することに成功した。S31 はユビキチン前駆体としても機能しており、ユビキチンを過剰供給した実験からリボソームレスキュー過程におけるユビキチンによる制御はより複雑であることが示唆された。非ストレス時には S31 を除けば 60S リボソームを構成するタンパク質の1つをコードした

L40 遺伝子が唯一のユビキチン供給源である。リボソーム構造上 L40 は大サブユニット側で翻訳 G タンパク質 (EF1A、eRF3、Hbs1) と接する部分に存在している。ユビキチンによる複雑な制御層が予想されるリボソームレスキュー過程で活躍する因子である Dom34 および Hbs1 の両方が、それぞれユビキチン供給源である S31、L40 遺伝子産物とリボソーム上で近接して存在するということは偶然とは考えづらい。今回 L40 についてもリボソームレスキュー活性を阻害する変異体取得を目指したが、得られたのは S31 から得られたユビキチンドメインの変異部位のみであった (データ未掲載)。L40 のリボソームドメインは S31 よりもさらに短く (52 アミノ酸)、ランダム変異の導入による解析は困難かもしれない。今後、リボソームドメイン全長に渡ったアラニンスキャニングなどによって網羅的に変異体が分離できれば、Dom34/Hbs1 複合体による停滞リボソームの認識システムに関する重要な知見が得られることが期待できる。

さらに、S6A 欠損株において S31 リボソームタンパク質ドメインの N 末端変異体の発現が、Dom34 ノックダウンと同様の低温感受性を示すことを発見した。低温感受性の根底にあるメカニズムはまだ議論の余地があるが、翻訳伸長速度との関連が疑われる。最近、哺乳類において翻訳停滞状態では Hel2 ホモログである ZNF598 が、リボソームユビキチン化を進行するのに並行して、翻訳開始を阻害する 4EHP をリクルートすることで、翻訳停滞を引き起こしている mRNA にエンタリーするリボソームの量を調節するというモデルが提唱されている (Juszkiewicz et al., 2020)。出芽酵母の場合には 4EHP と相同な遺伝子は存在していないため、全く同じシステムは存在していないと思われるが、同様の概念としてリン酸化などを介した S6A による翻訳伸長速度の調節が、翻訳停滞を解消するリボソームレスキュー反応を制御している可能性は高い。また、今回得られた S31 RD の N 末端の変異は全て正電荷を持つリシン残基について電荷が変化する残基への置換であり、tRNA のリン酸骨格の持つ負電荷を考慮すると翻訳伸長速度に影響を及ぼす可能性は十分考慮され、翻訳伸長速度調節によるリボソームレスキュー制御という概念と矛盾しない。では、リボソームレ

スキュー反応が高度に制御される意味は何だろうか。NGD を阻害する因子として遺伝学的に見出され、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/Hbs1 複合体について、類似するレポーター系を用いている研究グループ間で結果が異なること、また、様々なモデル生物で新規なリボソームレスキュー反応および NGD に参加する因子の同定などが相次いだことは、リボソームレスキュー反応における多様な経路の存在を示唆している。このような多様性が存在しているのは、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推測される。翻訳停滞は、翻訳読み枠中に現れた終止コドンや終止コドンの欠失といった明確な 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」だけでないグレーゾーンが存在し、そのような状況に即した mRNA クライテリアに対しての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予想する。実験室で行われる研究は高い再現性を担保するために、レポーター遺伝子として用いる配列や培養における栄養状態など、自然界に存在しないような極端な条件であることが多い。そのため、明確な遺伝子発現の ON-OFF ではなく、微小な環境変化などに応じて遺伝子発現プロファイルを当意即妙に変化させるために存在する生体システムなどは見逃されやすいと考えられる。今後、多様なリボソームレスキュー反応を分類していく上では、実験再現性と微小な変化を検出可能な感度・解像度を両立した解析手段のブレイクスルーが必要であろう。翻訳停滞は、正しいフォールディングや翻訳反応と共役した多量体のアセンブリおよび翻訳後修飾など合成されるタンパク質の生理活性にも積極的に関わっている (Collart and Weiss, 2020)。翻訳停滞とそれを解消するリボソームレスキュー反応は、明確な「異常」を排斥する単純な品質管理システム以上に、生物の生存戦略に直結した重要な生体内反応であると考えられ、今後の研究の発展が強く望まれる分野である。

参考文献

Adams, D.R., Ron, D., and Kiely, P.A. (2011). RACK1, A multifaceted scaffolding protein: Structure and function. *Cell Communication and Signaling* 9.

Becker, T., Armache, J.P., Jarasch, A., Anger, A.M., Villa, E., Sieber, H., Motaal, B.A., Mielke, T., Berninghausen, O., and Beckmann, R. (2011). Structure of the no-go mRNA decay complex Dom34-Hbs1 bound to a stalled 80S ribosome. *Nature Structural & Molecular Biology* 18, 715-U116.

Bengtson, M.H., and Joazeiro, C.A.P. (2010). Role of a ribosome-associated E3 ubiquitin ligase in protein quality control. *Nature* 467, 470-473.

Bhattacharya, A., McIntosh, K.B., Willis, I.M., and Warner, J.R. (2010). Why Dom34 Stimulates Growth of Cells with Defects of 40S Ribosomal Subunit Biosynthesis. *Molecular and Cellular Biology* 30, 5562-5571.

Brandman, O., Stewart-Ornstein, J., Wong, D., Larson, A., Williams, C.C., Li, G.W., Zhou, S., King, D., Shen, P.S., Weibezahn, J., *et al.* (2012). A Ribosome-Bound Quality Control Complex Triggers Degradation of Nascent Peptides and Signals Translation Stress. *Cell* 151, 1042-1054.

Carr-Schmid, A., Pfund, C., Craig, E.A., and Kinzy, T.G. (2002). Novel G-protein complex whose requirement is linked to the translational status of the cell. *Molecular and Cellular Biology* 22, 2564-2574.

Chen, L.M., Muhlrads, D., Haurlyliuk, V., Cheng, Z.H., Lim, M.K., Shyp, V., Parker, R., and Song, H.W. (2010). Structure of the Dom34-Hbs1 complex and implications for no-go decay. *Nature Structural & Molecular Biology* 17, 1233-+.

Choe, Y.J., Park, S.H., Hassemer, T., Korner, R., Vincenz-Donnelly, L., Hayer-Hartl, M., and Hartl, F.U. (2016). Failure of RQC machinery causes protein aggregation and proteotoxic stress. *Nature* 531, 191-+.

Collart, M.A., and Weiss, B. (2020). Ribosome pausing, a dangerous necessity for co-translational events. *Nucleic Acids Research* 48, 1043-1055.

Czaplinski, K., Ruiz-Echevarria, M.J., Paushkin, S.V., Han, X., Weng, Y.M., Perlick, H.A., Dietz, H.C., Ter-Avanesyan, M.D., and Peltz, S.W. (1998). The surveillance complex interacts with the translation release factors to enhance termination and degrade aberrant mRNAs. *Genes & Development* 12, 1665-1677.

D'Orazio, K.N., Wu, C.C.C., Sinha, N., Loll-Krippléber, R., Brown, G.W., and Green, R. (2019). The endonuclease Cue2 cleaves mRNAs at stalled ribosomes during No Go Decay. *Elife* 8.

Defenouillere, Q., Yao, Y.H., Mouaikel, J., Namane, A., Galopier, A., Decourty, L., Doyen, A., Malabat, C., Saveanu, C., Jacquier, A., *et al.* (2013). Cdc48-associated complex bound to 60S particles is required for the clearance of aberrant translation products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 5046-5051.

Defenouillere, Q., Zhang, E., Namane, A., Mouaikel, J., Jacquier, A., and Fromont-Racine, M. (2016). Rqc1 and Ltn1 Prevent C-terminal Alanine-Threonine Tail (CAT-tail)-induced Protein Aggregation by Efficient Recruitment of Cdc48 on Stalled 60S Subunits. *Journal of Biological Chemistry* 291, 12245-12253.

Dever, T.E., Dinman, J.D., and Green, R. (2018). Translation Elongation and Recoding in Eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 10.

Doma, M.K., and Parker, R. (2006). Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature* 440, 561-564.

Frischmeyer, P.A., van Hoof, A., O'Donnell, K., Guerrero, A.L., Parker, R., and Dietz, H.C. (2002). An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science* 295, 2258-2261.

Garzia, A., Jafarnejad, S.M., Meyer, C., Chapat, C., Gogakos, T., Morozov, P., Amiri, M., Shapiro, M., Molina, H., Tuschl, T., *et al.* (2017). The E3 ubiquitin ligase and RNA-binding protein ZNF598 orchestrates ribosome quality control of premature polyadenylated mRNAs. *Nature Communications* 8.

Gressner, A.M., and Wool, I.G. (1974). PHOSPHORYLATION OF LIVER RIBOSOMAL-PROTEINS INVIVO EVIDENCE THAT ONLY A SINGLE SMALL SUBUNIT PROTEIN (S6) IS PHOSPHORYLATED. *Journal of Biological Chemistry* 249, 6917-6925.

Hellen, C.U.T. (2018). Translation Termination and Ribosome Recycling in Eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 10.

Higgins, R., Gendron, J.M., Rising, L., Mak, R., Webb, K., Kaiser, S.E., Zuzow, N., Riviere, P., Yang, B., Fenech, E., *et al.* (2015). The Unfolded Protein Response Triggers Site-Specific Regulatory Ubiquitylation of 40S Ribosomal Proteins. *Molecular Cell* 59, 35-49.

Hoshino, S. (2012). Mechanism of the initiation of mRNA decay: role of eRF3 family G proteins. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Rna* 3, 743-757.

Hug, N., Longman, D., and Caceres, J.F. (2016). Mechanism and regulation of the nonsense-mediated decay pathway. *Nucleic Acids Research* 44, 1483-1495.

Ikeuchi, K., and Inada, T. (2016). Ribosome-associated Asc1/RACK1 is required for endonucleolytic cleavage induced by stalled ribosome at the 3' end of nonstop mRNA. *Scientific Reports* 6.

Ikeuchi, K., Tesina, P., Matsuo, Y., Sugiyama, T., Cheng, J.D., Saeki, Y., Tanaka, K., Becker, T., Beckmann, R., and Inada, T. (2019). Collided ribosomes form a unique structural interface to induce Hel2-driven quality control pathways. *Embo Journal* 38.

Ito-Harashima, S., Kuroha, K., Tatematsu, T., and 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 & Development* 21, 519-524.

Juszkiewicz, S., Chandrasekaran, V., Lin, Z.W., Kraatz, S., Ramakrishnan, V., and Hegde, R.S. (2018). ZNF598 Is a Quality Control Sensor of Collided Ribosomes. *Molecular Cell* 72, 469-+.

Juszkiewicz, S., and Hegde, R.S. (2017). Initiation of Quality Control during Poly(A) Translation Requires Site-Specific Ribosome Ubiquitination. *Molecular Cell* 65, 743-+.

Juszkiewicz, S., Slodkowicz, G., Lin, Z.W., Freire-Pritchett, P., Peak-Chew, S.Y., and Hegde, R.S. (2020). Ribosome collisions trigger cis-acting feedback inhibition of translation initiation. *Elife* 9.

Kabat, D. (1970). PHOSPHORYLATION OF RIBOSOMAL PROTEINS IN RABBIT RETICULOCYTES - CHARACTERIZATION AND REGULATORY ASPECTS. *Biochemistry* 9, 4160-&.

Kobayashi, K., Kikuno, I., Kuroha, K., Saito, K., Ito, K., Ishitani, R., Inada, T., and Nureki, O. (2010). Structural basis for mRNA surveillance by archaeal Pelota and GTP-bound EF1 alpha complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 17575-17579.

Kostova, K.K., Hickey, K.L., Osuna, B.A., Hussmann, J.A., Frost, A., Weinberg, D.E., and Weissman, J.S. (2017). CAT-tailing as a fail-safe mechanism for efficient degradation of stalled nascent polypeptides. *Science* 357, 414-417.

Kuroha, K., Akamatsu, M., Dimitrova, L., Ito, T., Kato, Y., Shirahige, K., and Inada, T. (2010). Receptor for activated C kinase 1 stimulates nascent polypeptide-dependent translation arrest. *Embo Reports* *11*, 956-961.

Lacombe, T., Garcia-Gomez, J.J., de la Cruz, J., Roser, D., Hurt, E., Linder, P., and Kressler, D. (2009). Linear ubiquitin fusion to Rps31 and its subsequent cleavage are required for the efficient production and functional integrity of 40S ribosomal subunits. *Molecular Microbiology* *72*, 69-84.

Letzring, D.P., Dean, K.M., and Grayhack, E.J. (2010). Control of translation efficiency in yeast by codon-anticodon interactions. *Rna* *16*, 2516-2528.

Letzring, D.P., Wolf, A.S., Brule, C.E., and Grayhack, E.J. (2013). Translation of CGA codon repeats in yeast involves quality control components and ribosomal protein L1. *Rna* *19*, 1208-1217.

Lyumkis, D., dos Passos, D.O., Tahara, E.B., Webb, K., Bennett, E.J., Vinterbo, S., Potter, C.S., Carragher, B., and Joazeiro, C.A.P. (2014). Structural basis for translational surveillance by the large ribosomal subunit-associated protein quality control complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *111*, 15981-15986.

Matsuo, Y., Ikeuchi, K., Saeki, Y., Iwasaki, S., Schmidt, C., Udagawa, T., Sato, F., Tsuchiya, H., Becker, T., Tanaka, K., *et al.* (2017). Ubiquitination of stalled ribosome triggers ribosome-associated quality control. *Nature Communications* *8*.

Meyuhas, O. (2015). Ribosomal Protein S6 Phosphorylation: Four Decades of Research. *International Review of Cell and Molecular Biology*, Vol 320 *320*, 41-73.

Ozkaynak, E., Finley, D., Solomon, M.J., and Varshavsky, A. (1987). THE YEAST UBIQUITIN GENES - A FAMILY OF NATURAL GENE FUSIONS. *Embo Journal* *6*, 1429-1439.

Ozsolak, F., Kapranov, P., Foissac, S., Kim, S.W., Fishilevich, E., Monaghan, A.P., John, B., and Milos, P.M. (2010). Comprehensive Polyadenylation Site Maps in Yeast and Human Reveal Pervasive Alternative Polyadenylation. *Cell* *143*, 1018-1029.

Pisarev, A.V., Skabkin, M.A., Pisareva, V.P., Skabkina, O.V., Rakotondrafara, A.M., Hentze, M.W., Hellen, C.U.T., and Pestova, T.V. (2010). The Role of ABCE1 in Eukaryotic Posttermination Ribosomal Recycling. *Molecular Cell* *37*, 196-210.

Pisareva, V.P., Skabkin, M.A., Hellen, C.U.T., Pestova, T.V., and Pisarev, A.V. (2011). Dissociation by Pelota, Hbs1 and ABCE1 of mammalian vacant 80S ribosomes and stalled elongation complexes. *Embo Journal* 30, 1804-1817.

Rendon, O.Z., Fredrickson, E.K., Howard, C.J., Van Vranken, J., Fogarty, S., Tolley, N.D., Kalia, R., Osuna, B.A., Shen, P.S., Hill, C.P., *et al.* (2018). Vms1p is a release factor for the ribosome-associated quality control complex. *Nature Communications* 9.

Ruvinsky, I., Sharon, N., Lerer, T., Cohen, H., Stolovich-Rain, M., Nir, T., Dor, Y., Zisman, P., and Meyuhas, O. (2005). Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes & Development* 19, 2199-2211.

Saito, K., Horikawa, W., and Ito, K. (2015). Inhibiting K63 Polyubiquitination Abolishes No-Go Type Stalled Translation Surveillance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plos Genetics* 11.

Shao, S.C., Brown, A., Santhanam, B., and Hegde, R.S. (2015). Structure and Assembly Pathway of the Ribosome Quality Control Complex. *Molecular Cell* 57, 433-444.

Shao, S.C., 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-+.

Shen, P.S., Park, J., Qin, Y.D., Li, X.M., Parsawar, K., Larson, M.H., Cox, J., Cheng, Y.F., Lambowitz, A.M., Weissman, J.S., *et al.* (2015). Rqc2p and 60S ribosomal subunits mediate mRNA-independent elongation of nascent chains. *Science* 347, 75-78.

Shirokikh, N.E., and Preiss, T. (2018). Translation initiation by cap-dependent ribosome recruitment: Recent insights and open questions. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Rna* 9.

Silva, G.M., Finley, D., and Vogel, C. (2015). K63 polyubiquitination is a new modulator of the oxidative stress response. *Nature Structural & Molecular Biology* 22, 116-123.

Simms, C.L., Yan, L.W.L., and Zaher, H.S. (2017). Ribosome Collision Is Critical for Quality Control during No-Go Decay. *Molecular Cell* 68, 361-+.

Singh, G., Rebbapragada, I., and Lykke-Andersen, J. (2008). A competition between stimulators and antagonists of Upf complex recruitment governs human nonsense-mediated mRNA decay. *Plos Biology* 6, 860-871.

Sundaramoorthy, E., Leonard, M., Mak, R., Liao, J., Fulzele, A., and Bennett, E.J. (2017). ZNF598 and RACK1 Regulate Mammalian Ribosome-Associated Quality Control Function by Mediating Regulatory 40S Ribosomal Ubiquitylation. *Molecular Cell* 65, 751-+.

Tafelmeyer, P., Johnsson, N., and Johnsson, K. (2004). Transforming a (beta/alpha)(8)-barrel enzyme into a split-protein sensor through directed evolution. *Chemistry & Biology* 11, 681-689.

van Hoof, A., Staples, R.R., Baker, R.E., and Parker, R. (2000). Function of the Ski4p (Csl4p) and Ski7p proteins in 3'-to-5' degradation of mRNA. *Molecular and Cellular Biology* 20, 8230-8243.

Verma, R., Oania, R.S., Kolawa, N.J., and Deshaies, R.J. (2013). Cdc48/p97 promotes degradation of aberrant nascent polypeptides bound to the ribosome. *Elife* 2.

Verma, R., Reichermeier, K.M., Burroughs, A.M., Oania, R.S., Reitsma, J.M., Aravind, L., and Deshaies, R.J. (2018). Vms1 and ANKZF1 peptidyl-tRNA hydrolases release nascent chains from stalled ribosomes. *Nature* 557, 446-+.

Xu, C., and Min, J.R. (2011). Structure and function of WD40 domain proteins. *Protein & Cell* 2, 202-214.

Yerlikaya, S., Meusburger, M., Kumari, R., Huber, A., Anrather, D., Costanzo, M., Boone, C., Ammerer, G., Baranov, P.V., and Loewith, R. (2016). TORC1 and TORC2 work together to regulate ribosomal protein S6 phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* 27, 397-409.

Yonashiro, R., Tahara, E.B., Bengtson, M.H., Khokhrina, M., Lorenz, H., Chen, K.C., Kigoshi-Tansho, Y., Savas, J.N., Yates, J.R., Kay, S.A., *et al.* (2016). The Rqc2/Tae2 subunit of the ribosome-associated quality control (RQC) complex marks ribosome-stalled nascent polypeptide chains for aggregation. *Elife* 5.

謝辞

本研究は、指導教員である東京大学 新領域創成科学研究科 伊藤耕一教授のもとで行われました。研究に対する姿勢・考え方・進め方、そして分子遺伝学の真髄に至るまで、懇切丁寧なご指導、ご鞭撻をいただきましたことに、心より感謝いたします。

東京大学 新領域創成科学研究科 富田耕造教授、京都大学 理学研究科 深井周也教授、早稲田大学 先進理工学研究科 上田卓也教授には博士課程のアドバイザーとして研究について討論、ご助言いただきました。また、富田耕造教授と深井周也教授には、東京大学 医科学研究所 武川睦寛教授、東京大学 新領域創成科学研究科 小嶋徹也准教授とともに副査として予備審査会・博士論文審査会で多くのご意見をいただき、本論文作成の上で大変有意義なものとなりました。この場を借りて御礼申し上げます。

東京大学 新領域創成科学研究科 遠藤慧助教には、基本的な酵母の取り扱いを始め、実験手技のご指導をいただきました。また、日々のディスカッションを通して研究進行に有意義なご意見をいただきました。この場を借りて御礼申し上げます。

和田美紀博士にはリボソームを取り扱う実験を始め、本論文を作成する上で欠かせない実験手技について伝授していただきました。また、研究内容についても様々なご助言をいただきました。この場を借りて御礼申し上げます。

最後に日々をともに過ごしてきた伊藤研究室の皆さん、そして離れて生活していても常に私を奨励してくれた家族に感謝いたします。