

博士論文

翻訳伸長因子ホモログ Ski7 の機能解析

東京大学大学院 新領域創成科学研究科

メディカルゲノム専攻

生命分子遺伝学分野

堀川 航

目次

第 1 章 背景.....	1 ~ 20
1-1. mRNA 品質管理機構	1
1-1-1. Nonsense-mediated mRNA decay (NMD).....	2
1-1-2. Nonstop decay (NSD).....	3
1-1-3. No-go decay (NGD).....	5
1-1-4. mRNA 品質管理機構と共役した新生ペプチド鎖の分解機構	8
1-2. mRNA 品質管理機構における翻訳 G タンパク質群.....	10
1-2-1. 翻訳終結因子 eRF3	12
1-2-2. No-go decay 因子 Hbs1.....	12
1-2-3. Nonstop decay 因子 Ski7.....	14
1-3. Ski7 研究によるこれまでの知見.....	14
1-3-1. Ski7 の種間保存性とその機能性領域.....	15
1-3-2. Ski7 の構造情報	15
1-3-3. Ski7 の系統保存性	17
1-3-4. Ski7 の C 末端領域における相互作用因子.....	17
1-3-5. Ski7 の翻訳 G タンパク質相同ドメインの特徴	18
1-3-6. Ski7 の N 末端領域における相互作用因子	19
1-4. 本研究の意義.....	20
第 2 章 実験材料と実験手法.....	21 ~ 30
2-1. 菌株	21
2-1-1. 大腸菌株とその遺伝型.....	21
2-1-2. 酵母菌株とその遺伝型.....	21

2-2. プラスミド.....	21
2-3. オリゴ DNA プライマーリスト.....	22
2-4. 培地.....	24
2-5. Ski7 変異体の作製（部位特異的変異導入法）.....	25
2-6. Ski7 変異体の活性評価（ストリーク法）.....	25
2-7. Ski7 領域間の独立的機能評価（ストリーク法）.....	25
2-8. Ski7 変異体のドミナントネガティブ特性評価（ストリーク法）.....	26
2-9. Ski7 変異体の活性評価（スポット法）.....	26
2-10. Ski7 変異体のドミナントネガティブ特性評価（スポット法）.....	26
2-11. 無作為突然変異導入法による Ski7 の機能欠損変異体分離.....	27
2-11-1. 相同性組換えに用いる DNA 断片調製.....	27
2-11-2. NSD アッセイ株での相同性組換え.....	27
2-11-3. プラスミド抽出と Ski7 機能欠損変異体の確認.....	27
2-11-4. Ski7 機能欠損変異体のアミノ酸置換部位の特定.....	27
2-12. 定量 PCR.....	27
2-12-1. 酵母細胞からの RNA 抽出.....	27
2-12-2. Total RNA 中の DNA 除去反応.....	28
2-12-3. 逆転写反応.....	28
2-12-4. 定量 PCR.....	28
2-12-5. データ解析.....	28
2-13. ウェスタンブロッティング.....	28
2-13-1. 酵母細胞からのタンパク質抽出.....	28
2-13-2. メンブレン転写.....	29
2-13-3. タンパク質検出.....	29
2-14. Yeast two-hybrid (Y2H)法.....	29

2-15. タンパク質の構造情報.....	29
第3章 結果.....	31 ~ 75
3-1. Ski7-NSD 評価アッセイ系の確立.....	31
3-2. 既知の Ski7 の機能領域	33
3-3. Ski7 の N 末端領域における機能性アミノ酸残基の探索.....	34
3-4. Ski7 の N 末端保存アミノ酸残基のアラニンスキャニング変異体の機能解析	36
3-5. 機能性アミノ酸残基 Phe ²⁰⁷ の重要性.....	38
3-6. 既知の EF-1 α ホモログタンパク質変異体と Ski7 の同一性の検証.....	39
3-7. Nonstop- <i>URA3</i> レポーターアッセイ株の構築	40
3-8. Ski7 における C 末端領域の機能性の再検証.....	42
3-9. Ski7 機能欠損変異体の分離のための戦略	44
3-10. Ski7 機能欠損変異体の分離のためのスクリーニング	46
3-11. Ski7 機能欠損変異体の個別解析.....	48
3-12. 新たに得られた Ski7 の C 末端領域の機能欠損変異と N 末端領域変異	49
3-13. Ski7 構造における機能性アミノ酸残基の部位	50
3-14. Ski7 機能欠損変異体におけるドミナントネガティブ効果	54
3-15. Ski7 変異体のドミナントネガティブ効果の再検証.....	55
3-16. Ski7 における Glu ³²⁷ と Asp ³⁵⁶ のドミナントネガティブ効果	57
3-17. Ski7 の N 末端領域におけるドミナントネガティブ効果.....	59
3-18. Ski7 の N 末端領域機能性アミノ酸残基 Phe ²⁰⁷ のドミナントネガティブ効果	62
3-19. Ski7 の C 末端領域のみの機能性評価.....	64
3-20. 様々な遺伝背景における Ski7 変異体のドミナントネガティブ効果.....	66
3-21. Hbs1 変異体による NSD への影響.....	67
3-22. Ski7 と ski complex および exosome の相互作用	69

3-23. Ski7 変異体と exosome の相互作用.....	72
3-24. Ski7 変異体と ski complex の相互作用	74
第 4 章 考察.....	76 ~ 94
4-1. Ski7 の N 末端領域と C 末端領域の機能性の相違.....	76
4-2. Ski7 の N 末端領域における機能性アミノ酸残基 Phe ²⁰⁷ の機能性	77
4-3. EF-1 α ホモログタンパク質としての Ski7 に存在する GTPase ドメインの意義	79
4-4. 遺伝学的に分離された Ski7 の GTPase ドメイン変異の重要性.....	80
4-5. 野生型 Ski7 のドミナントネガティブ効果.....	86
4-6. Ski7 機能欠損変異体のドミナントネガティブ効果.....	88
4-7. Ski7 の N 末端領域の振る舞い	89
4-8. Ski7 の新規機能モデル	92
第 5 章 展望.....	95 ~ 97
第 6 章 参考文献.....	98 ~ 107
謝辞	

第1章 背景

1-1. mRNA 品質管理機構

細胞内では、DNA にコードされた遺伝情報は、RNA ポリメラーゼによる転写反応を介して mRNA に転写され、さらにこの mRNA を鋳型として、リボソームによる翻訳反応が促進することでタンパク質が合成される。セントラルドグマと呼ばれる遺伝子情報の発現経路の各ステップの中では、各反応を触媒する酵素の正確性は極めて高いが、その正確さは 100%ではなく、偶発的なエラーが生じてしまう。例えば、転写反応による mRNA 合成過程では、塩基を誤って取り込むことが古くから知られている。mRNA の転写後過程では、スプライシング反応により成熟型 mRNA が生成するが、その際にも、本来の終止コドンの上流側に終止コドンをもつような異常 mRNA が合成されてしまうことも知られている (Lewis BP *et al.*, 2003)。異常 mRNA をリボソームが翻訳してしまうと、そこから合成されたタンパク質には長さが異なるなどの異常が生じる。その結果、一部のタンパク質は正常な生体システムによる反応を阻害し、生命活動維持において致命的なダメージを与える可能性がある。しかし、実際の細胞内では、このような有害なタンパク質の合成は極めて低く抑えられており、そのための仕組みがあるのではないかと考えられてきた。この仕組みを説明するものとして、近年、異常 mRNA を検出し、正常な mRNA よりも早く分解除去することが分かってきた。異常 mRNA の分解機構は mRNA 品質管理機構と総称され、遺伝子発現の品質を保つための主要な機能であり、細胞の機能維持には欠かせない機構であると考えられ始めている。

一概に異常 mRNA と言っても、異常な終止コドンが本来の終止コドンの上流に存在するもの、終止コドンが失われたもの、立体障害などによって終止コドンに到達できずにリボソームが停滞してしまうものなどが存在し、それぞれの異常 mRNA が異なる経路を経て分解されることが分かってきた。既知の mRNA 品質管理機構に共通する特徴は、リボソームによる翻訳反応と共役的に mRNA の異常を検出し、異常が認められた mRNA を分解へと導く経路であるという点である (Isken O and Maquat LE., 2007)。

mRNA 品質管理機構は多くの生体内分子種が関わるため、その成り立ちは大変複雑であり、現状として、どのようなメカニズムで異常 mRNA の認識、その後の mRNA の分解が進行するのかについては未知の部分が多く残されている。

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

mRNA 品質管理機構の中で、最も多くの研究が報告されているのは Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) と呼ばれる機構である。一般に、細胞内 mRNA は DNA に比べて分解されやすいが、この特性は mRNA の安定性の制御を介して臨機応変に細胞内量を制御するのに適した特性でもある。通常の mRNA には、5'末端のキャップ構造、3'末端のポリ A 鎖構造が存在し、これらが目印となり翻訳反応が効率よく行われると共に、核酸分解酵素による分解を阻害することで、安定化が図られている (Coller J and Parker R., 2004 ; Mangus DA *et al.*, 2003)。ところが、真核生物において、mRNA のナンセンス変異やスプライシングエラーなどによって、本来の終止コドンの上流側に終止コドン (以後、未成熟終止コドン (PTC = premature termination codon)) が出現する場合には、mRNA 上にキャップ構造やポリ A 鎖構造が存在するにもかかわらず、正常な mRNA よりも速やかに分解される (Chang JC and Kan YW., 1979)。このような PTC を持った mRNA に対する mRNA 品質管理機構を NMD と呼ぶ。

転写されたばかりの未成熟 mRNA はスプライシング機構によってイントロンが切り出され、エキソン同士の連結が起きる。これらの加工を経た成熟 mRNA のエキソン連結部位付近にはエキソン連結部複合体 (以後、EJC : Exon-Exon junction Complex) が残留して結合していることが知られており (Le Hir H *et al.*, 2000a ; Le Hir H *et al.*, 2000b)、初期の mRNA 翻訳過程ではリボソームは、これらのエキソン連結部複合体を引き剥がしながら翻訳伸長反応を行うと考えられている。ところが、mRNA 内に PTC が存在する場合、EJC よりも上流で翻訳終結反応が行われることになる。PTC における翻訳終結反応においても、解離因子 eRF3/eRF1 複合体が終止コドンを認識し、リボソーム P サイトのペプチジル tRNA を加水分解することでペプチド鎖をリボソームから解離させる。加えて、PTC における翻訳終結反応では、eRF3/eRF1 複合体は NMD 因子

である Upf1 や SMG1 と相互作用して SURF 複合体を形成し、下流の EJC と相互作用した NMD 因子 Upf2 や Upf3 による Upf1 のリン酸化を介してエンドヌクレアーゼである SMG6 を呼び込み、mRNA 分解を引き起こす一連の NMD 機構が促進される (図 1-1.) (Kashima I *et al.*, 2006 ; Eberle AB *et al.*, 2009 ; Kashima I *et al.*, 2010)。

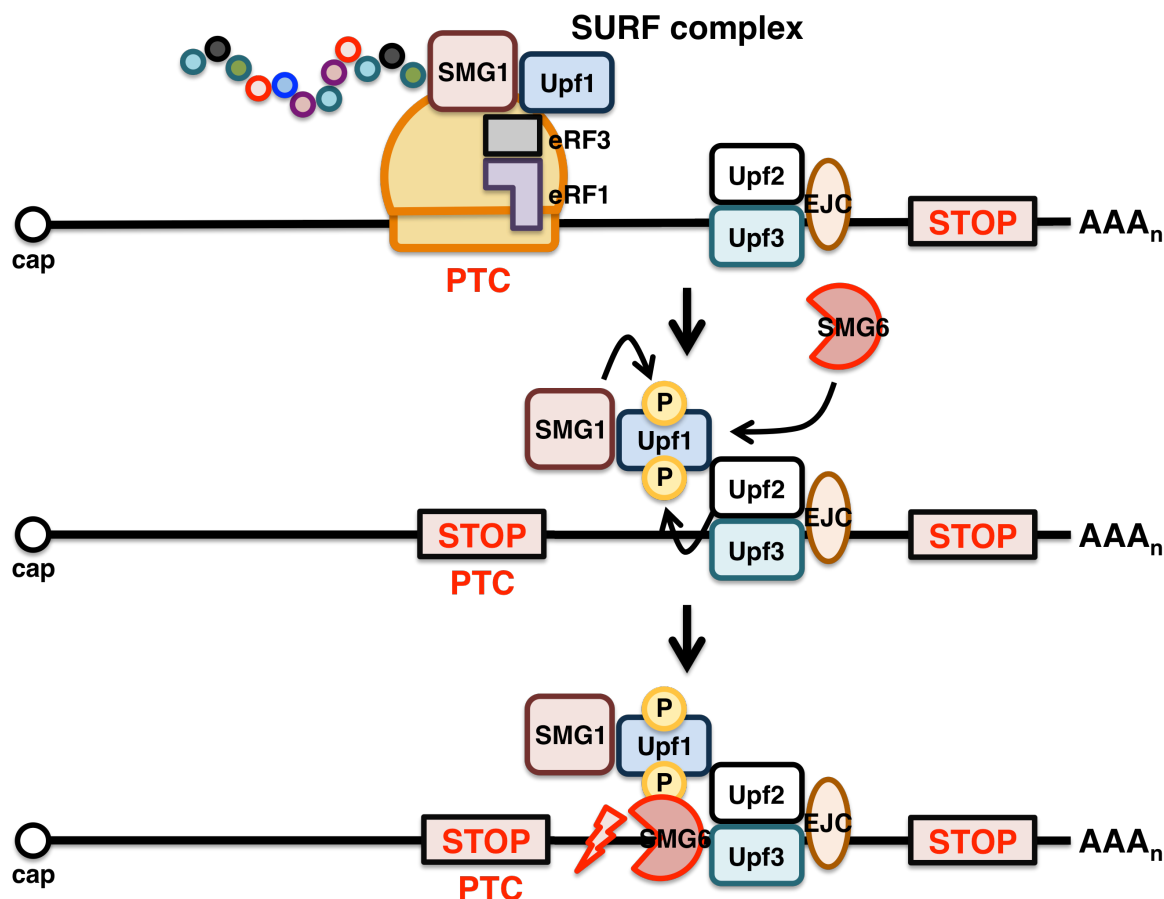


図 1-1. Nonsense-mediated mRNA decay (NMD)の概略図。PTC を eRF3/eRF1 複合体が認識すると、eRF3 に相互作用している Upf1 は、SMG1 や下流の EJC に相互作用している Upf2 や Upf3 によってリン酸化され、その反応に伴ってエンドヌクレアーゼ SMG6 が Upf1 に相互作用し、近傍の異常 mRNA を切断する。その後、エキソヌクレアーゼによって異常 mRNA が分解されることで NMD が進行する。

1-1-2. Nonstop decay (NSD)

RNA ポリメラーゼによる転写過程において、終止コドン自体の変異によって終止コドンが失われるなど、一定の頻度で終止コドンのない mRNA が合成される。加えて、ORF の途中の配列が

ポリ A 鎖付加シグナルとして誤認識され、ポリ A 鎖が付加する遺伝子が複数見つかっており (Edwalds-Gilbert G *et al.*, 1997 ; Oszolak F *et al.*, 2010)、このような翻訳開始部位からの読み枠に終止コドンに現れない mRNA は nonstop mRNA と呼ばれている。Nonstop mRNA からは C 末端側に余分なアミノ酸配列が付加されたタンパク質が合成されるため、正常なタンパク質とは異なる性質を発揮する可能性がある。

Nonstop mRNA は、NMD と同様に、通常の mRNA と比べて非常に不安定であり、細胞内で速やかに分解される (Frischmeyer PA *et al.*, 2002)。この事実は同時に、nonstop mRNA を特異的に分解する mRNA 品質管理機構が存在することを示唆している。このような nonstop mRNA を標的とする mRNA 品質管理機構は、nonstop decay (NSD) と呼ばれている (van Hoof A *et al.*, 2002)。

Nonstop mRNA 上でリボソームが翻訳を開始すると、翻訳過程が終了することなく mRNA の 3'末端へとリボソームが到達し、リボソームはそのまま停滞してしまうと考えられており、このような停滞状態のリボソームを mRNA 分解のシグナルとして識別する機構が予測されている (Shoemaker CJ and Green R., 2012)。また、nonstop mRNA を翻訳するリボソームは 3'末端に到達するまで、ポリ A 鎖上の AAA コドンを連続で解読することになる。AAA コドンによって指定されるアミノ酸はリジンであり、プラスの電荷をもつペプチド鎖が合成される。この連続したリジン残基 (以後、ポリリジン) がマイナスの電荷を帯びたアミノ酸残基が多いリボソームの Exit トンネルと相互作用することでリボソームの停滞が引き起こされるという報告もある (Inada T and Aiba H., 2005 ; Ito-Harashima S *et al.*, 2007)。どちらのモデルにおいても、nonstop mRNA は、リボソームの停滞によって mRNA の分解が引き起こされる (図 1-2.)。このリボソームの停滞状態を認識する分子の一つが、コドンに対応する tRNA をリボソームの暗号解読部位に運搬する GTP 結合性翻訳伸長因子 EF-1 α のホモログである Ski7 であると提唱されている (van Hoof A *et al.*, 2002)。しかし、どのように Ski7 が停滞するリボソームを認識するのかは全く明らかとなっておらず、Ski7 によるリボソーム認識後、エキソヌクレアーゼ exosome によって nonstop mRNA が分解されるまでの分子機構は不明である。

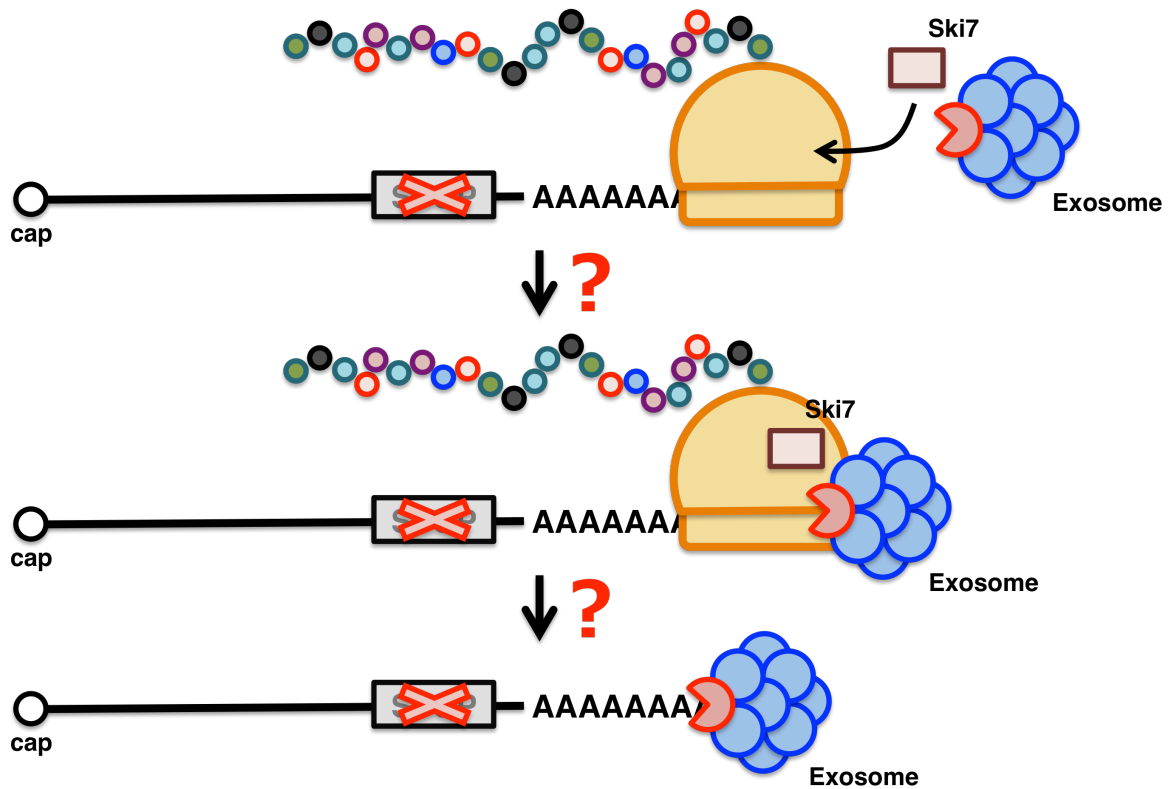


図 1-2. Nonstop decay (NSD)の概略図。Nonstop mRNA を翻訳するリボソームは、ポリ A 鎖末端まで到達し翻訳停滞を引き起こす。すると、Ski7 は翻訳停滞状態のリボソームに対して特異的に結合し、その後の mRNA の分解を促進すると考えられている。

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

mRNA 上でタンパク質合成における翻訳伸長反応が停滞した場合、この翻訳中の mRNA の分解促進を引き起こす機構は No-go decay (以後、NGD) として知られる (Doma MK and Parker R. 2006)。このような停滞は、強固な 2 次構造を形成する mRNA 上の立体障害などによって引き起こされることが知られており、本来の長さと比較すると短いタンパク質が合成される。また、細胞内にタンパク質の合成不良に陥ったリボソームが蓄積してしまう。mRNA の読み砕途中で配置したステムループ構造を形成しうる RNA 配列を含むレポーター遺伝子由来の mRNA 上での翻訳伸長反応は、ステムループ形成による立体障害によりリボソームの進行が停滞する。その際に mRNA 上で分子内切断が生じ、その後 mRNA 分解が促進されることが示されたことで、最初に NGD 機構の存在が明らかにされた (Doma MK and Parker R. 2006)。同時に、このような mRNA の分子内切断および分解促進は、それまで機能が未知であった 2 つの因子 Hbs1 や Dom34 欠損

下では阻害されることが判明した。その後の研究により、具体的な翻訳停滞シグナルとして、ステムループのような強固な2次構造 (Doma MK and Parker R. 2006)、NSDでも触れた読み枠内に存在する連続的な塩基性アミノ酸残基 (ポリリジンやポリアルギニン) (Dimitrova LN *et al.*, 2009; Kuroha K *et al.*, 2010)、連続的なレアコドン (CGA コドン) (Letzring DP *et al.*, 2010; Letzring DP *et al.*, 2013) などが判明しており、いずれの場合であっても、Hbs1/Dom34 複合体がその後の mRNA 分解反応に深く関わっていることが分かっている。このことは、翻訳伸長反応中のリボソームが mRNA の中間地点で翻訳伸長反応を阻害するような要因に遭遇した場合には、同様のメカニズムを経て品質管理が行われていることを強く示唆している。

Hbs1 は、eRF3 や Ski7 と同様に EF-1 α のホモログ因子であり、相互作用因子 Dom34 と複合体を形成した Hbs1/Dom34 複合体は、EF-1 α /tRNA 複合体や eRF3/eRF1 複合体とよく似た形態を有する (図 1-3; Kobayashi K *et al.*, 2010; Saito K *et al.*, 2010)。このため、EF-1 α /tRNA 複合体や eRF3/eRF1 複合体と同様にリボソームの A サイトでの機能が推測された。近年、クライオ電子顕微鏡による解析によって、Hbs1/Dom34 複合体がリボソームの A サイトに結合している様子が捉えられており (Becker T *et al.*, 2011)、Hbs1/Dom34 複合体は A サイトにおいて翻訳停滞状態のリボソームを認識する分子であることが強く示唆された。また、*in vitro* での翻訳過程を再構成した解析によって、Dom34 は ATP 結合ドメインを有する Rli1 (高等生物では ABCE1) と協同的に機能してリボソームのサブユニット解離反応を促進することが示され (Pisareva VP *et al.*, 2011; Shoemaker CJ and Green R., 2011)、その後、クライオ電子顕微鏡による解析によって Rli1 がリボソームに結合する様子も捉えられている (Becker T *et al.*, 2012)。

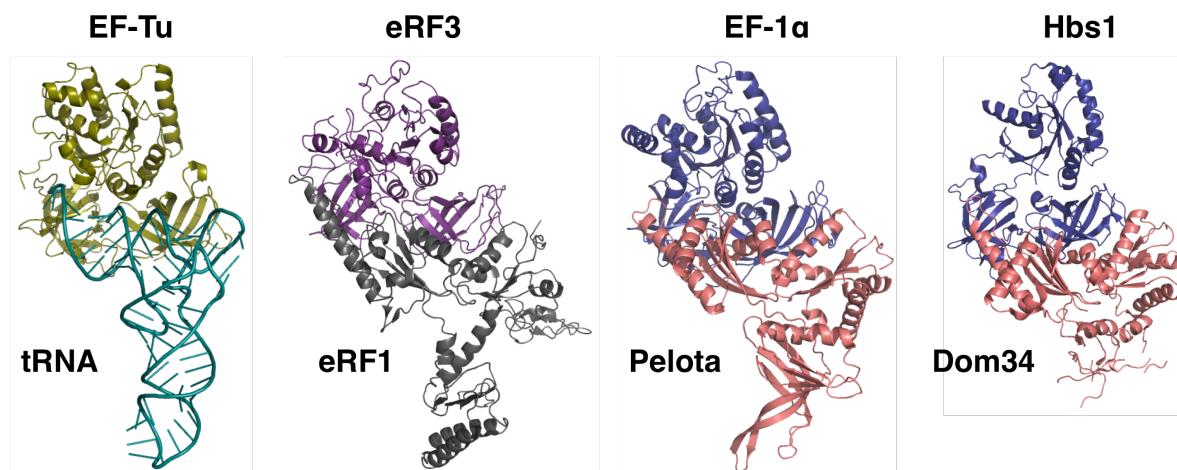


図 1-3. mRNA 品質管理機構に参与する伸長因子 EF-1 α のホモログタンパク質。EF-1 α (原核生物では EF-Tu) は tRNA と複合体を形成する (PDB accession code : 1TTT)。EF-1 α のホモログである eRF3 や Hbs1 は、eRF1 や Dom34 とそれぞれ結合し、EF-1 α /tRNA 複合体と酷似した形状の複合体を形成する (PDB accession code : 4CRN、3MCA)。古細菌では EF-1 α が Pelota (出芽酵母では Dom34) と複合体を形成する (PDB accession code : 3WXM)。

現在のモデルでは、mRNA の途中で停滞したリボソームの A サイトを Hbs1/Dom34 複合体が認識し、リボソームの近傍で未知のエンドヌクレアーゼによって mRNA は分子内切断を受ける。その後、Hbs1 は Dom34 から解離し、リボソーム内に内包されている Dom34 と Rli1 との相互作用によりペプチジル tRNA の解放やリボソームのサブユニット解離が促され、切断された mRNA はエキソヌクレアーゼ活性をもつ Xrn1 や exosome によって分解されることが考えられている (図 1-4.)。

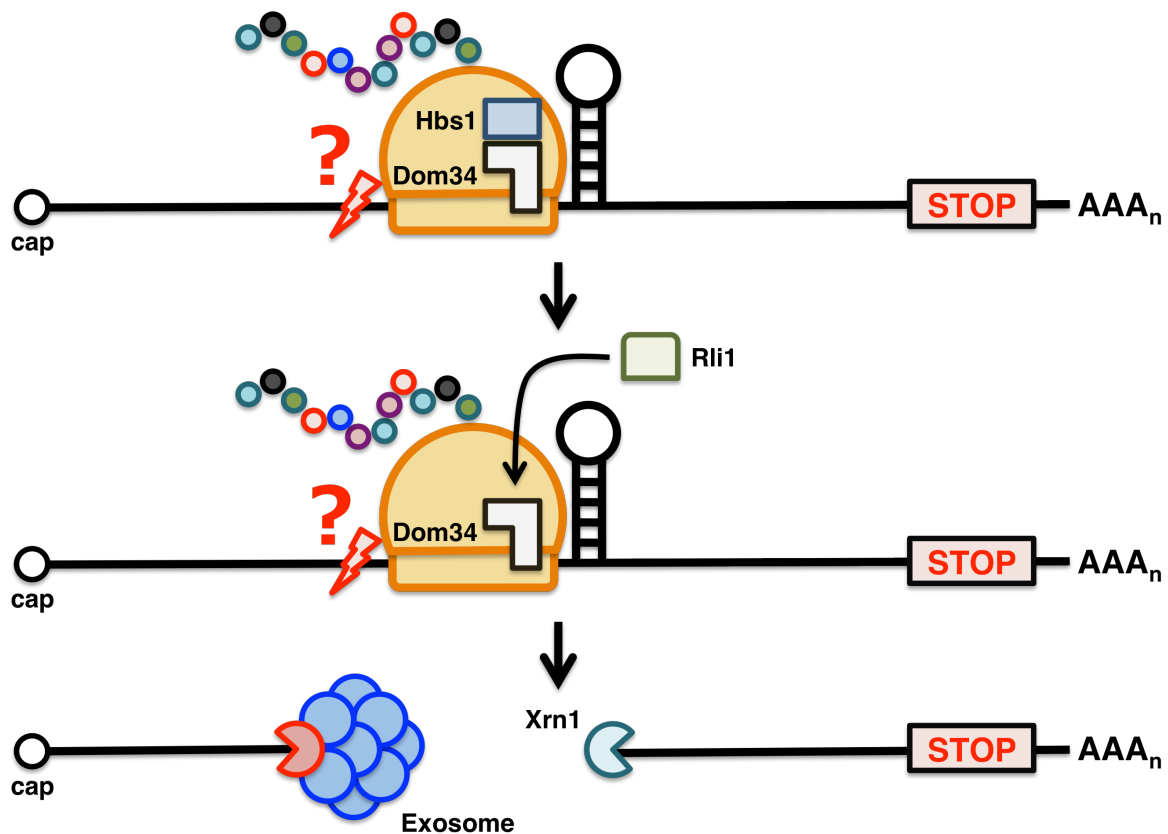


図 1-4. No-go decay (NGD)の概略図。mRNA を翻訳するリボソームが立体障害などによって強制的に翻訳停滞状態に陥ると、そのようなリボソームを Hbs1/Dom34 複合体が特異的に認識し、エンドヌクレアーゼによって mRNA は切断される。その後、エキソヌクレアーゼによって異常 mRNA は分解されることで NGD が進行する。

mRNA 品質管理機構は、リボソームによる翻訳反応と共役的に機能するという点で非常に興味深い。3つの主な mRNA 品質管理機構である NMD、NSD、NGD では、いずれも翻訳 G タンパク質 EF-1 α のホモログである eRF3、Ski7、Hbs1 が異常 mRNA を翻訳しているリボソームを識別していると考えられているが、それぞれの素過程の詳細な解析は始まったばかりである。

1-1-4. mRNA 品質管理機構と共役した新生ペプチド鎖の分解機構

mRNA 品質管理機構による異常 mRNA の分解機構に関して、次々に新規知見が得られているが、異常 mRNA を翻訳した際に生じる新生ペプチド鎖の分解機構についても研究が進んでいる。

Nonstop mRNA によって合成された新生ペプチド鎖は、60S サブユニットに結合する E3 ユビ

キチンリガーゼ *Ltn1* によってユビキチン化を受け、その後プロテアソームによって分解されることが報告され、リボソームの機能と共役した異常 mRNA の監視機能が、効率的な有害タンパク質の分解機構とも連携して機能していることが示唆された (Bengtson MH and Joazeiro CA., 2010)。ストレス応答に関与する因子の網羅的解析および生化学的検証から、*Ltn1* は新生ペプチド鎖のユビキチン化を行う傍ら、*Tae2* や *Rqc1*、*Cdc48* などと共に解離したリボソームの 60S サブユニットに結合して Ribosome Quality Control Complex (RQC) という複合体を形成し、新生ペプチド鎖を分解へと誘導することが示された (Brandman O *et al.*, 2012)。RQC は、NGD と NSD の双方で生じた新生ペプチド鎖の分解に機能することが示され、リボソームによる翻訳停滞後の新生ペプチド鎖の分解は、共通の仕組みによって引き起こされることが明らかとなった (Brandman O *et al.*, 2012 ; Defenouillere Q *et al.*, 2013)。

最新の知見では、リボソームが翻訳停滞を引き起こすと、その後サブユニットの解離が引き起こされるが、*Tae2* は tRNA が残された 60S サブユニットのサブユニット界面に結合し、40S サブユニットの再会合を防ぐと共に、*Ltn1* の安定的な結合を促すことが明らかとなった (Lyumkis D *et al.*, 2014 ; Shao S *et al.*, 2015) さらに驚くべきことに、*Tae2* は、60S サブユニットに残された新生ペプチド鎖に対して、mRNA や 40S サブユニット非依存的にアラニンもしくはスレオニンによる翻訳伸長反応 (CAT tail) を促進させることが見出された (Shen PS *et al.*, 2015)。この予期せぬ新規タンパク質合成メカニズムによる CAT tail は、その後の新生ペプチド鎖の分解シグナルではないかと推測されている (図 1-5.)。

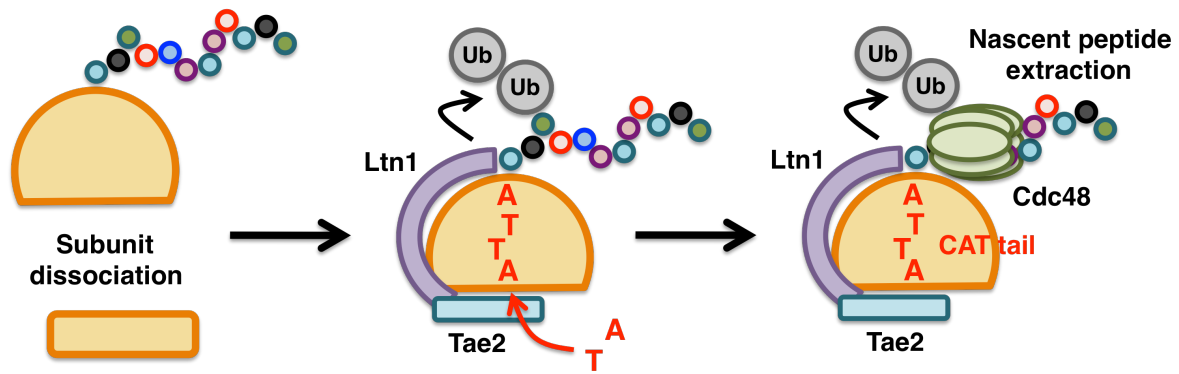


図 1-5. mRNA 品質管理機構と共役した新生ペプチド鎖の分解機構のモデル。翻訳停滞を引き起こしたリボソームは、サブユニットの解離が促される。その後、60S サブユニットに Tae2 や Ltn1 が結合し、新生ペプチド鎖はユビキチン化を受ける。さらに、Tae2 は新生ペプチド鎖の C 末端にアラニンもしくはスレオニンを付加し、翻訳伸長反応を促進する。その後、RQC を形成する Cdc48 などがリボソームに結合することで新生ペプチド鎖の分解が引き起こされる。

1-2. mRNA 品質管理機構における翻訳 G タンパク質群

翻訳伸長過程において、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では、EF-1 α が tRNA や GTP と 3 者複合体を形成し、tRNA をリボソームの A サイトに運搬する (Riis B *et al.*, 1990)。その際に、リボソームの A サイト遺伝暗号解読部位に提示されたコドンが、対応する tRNA のアンチコドンと正しく塩基対合すると EF-1 α に結合した GTP が GDP に加水分解され、立体構造変換を引き起こし、tRNA をその場に残したまま EF-1 α はリボソームから遊離する (Pape T *et al.*, 1998)。その後、リボソーム上に残された tRNA は、リボソーム内で配向を変え、ペプチド転移反応活性中心でアミノ酸転移反応が触媒される。この反応を繰り返すことで、ペプチド鎖は伸長する。リボソームから解離した EF-1 α は、EF-1 β によるヌクレオチド交換反応を経て GTP 結合モードに変換され (Moazed D and Noller HF., 1989)、新たな tRNA と結合することにより翻訳過程でリサイクルされる。

出芽酵母においては、EF-1 α とアミノ酸配列において高い相同性を有するタンパク質 eRF3、Hbs 1、Ski7 の存在が知られており、興味深いことに、それぞれが翻訳過程における特異なリボソームを認識することによって、mRNA 品質管理機構を促進することが分かってきた (図 1-1.、図 1-2.、図 1-4.) (Parker R., 2012; Hoshino S., 2012)。

EF-1 α ホモログタンパク質 (EF-1 α 、eRF3、Hbs1、Ski7) の特筆すべき特徴として、高く保存された GTPase ドメインが挙げられる。GTPase ドメインとは、GTP 結合および加水分解活性を行うためのドメインである。GTPase ドメインの中には特に重要なグアニンヌクレオチド結合モチーフが存在し、G1、G2、G3、G4、G5 と呼ばれ、アミノ酸配列やその立体配置が非常に高度に保存されている (図 1-6.) (Bourne HR. *et al.*, 1991)。この特徴から、EF-1 α ホモログタンパク質には特定のグアニンヌクレオチド結合状態に依存した機能モードが存在し、リボソームにおける分子スイッチとしての役割を果たしている。

そこで、mRNA 品質管理機構との関与が指摘されている EF-1 α ホモログタンパク質 eRF3、Hbs1、Ski7 の特徴を後述する。

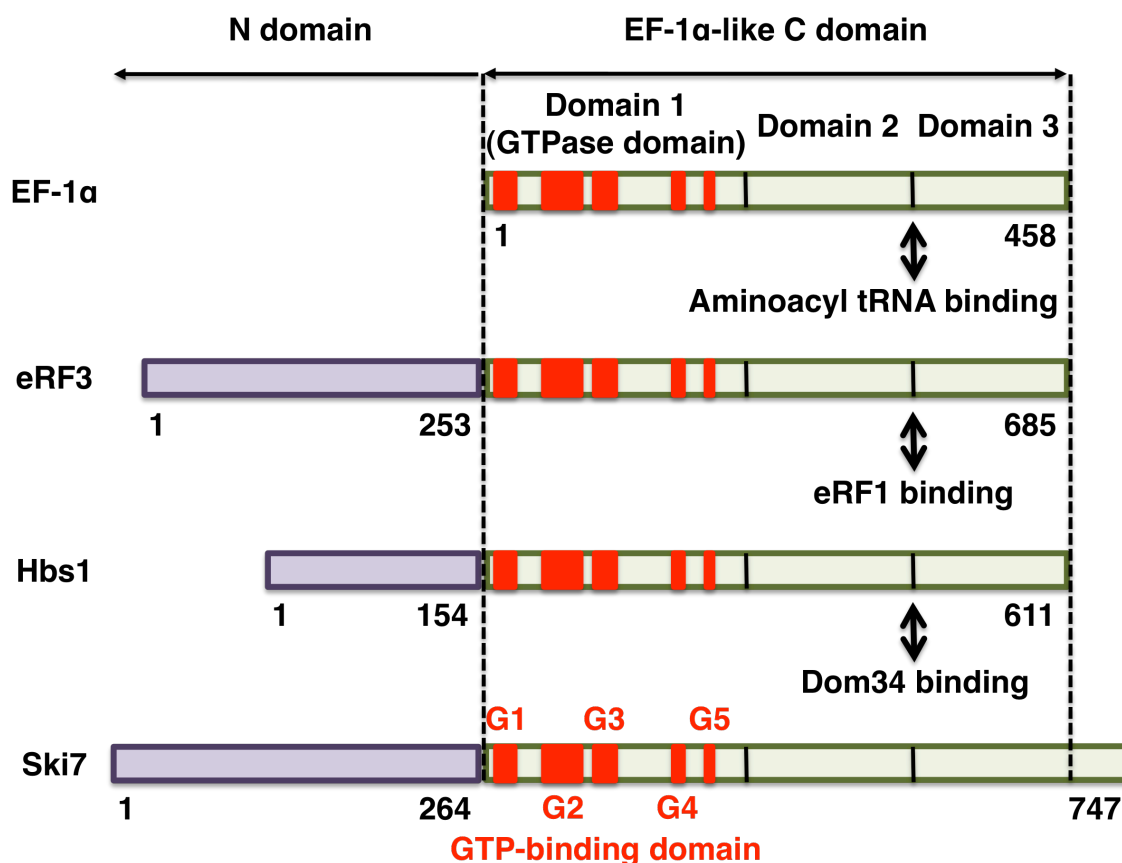


図 1-6. EF-1 α ホモログタンパク質の類似性の比較。緑で示された領域は、ホモログタンパク質間で共通したドメイン構造をもつ C 末端領域。GTPase ドメイン内の GTP 結合ドメイン G1~G5 は赤いボックスで示した。複合体を形成する相互作用因子は、いずれもドメイン 2 や 3 と相互作用している。N 末端領域を紫で示し、アミノ酸配列やその長さに保存性は認められない。

1-2-1. 翻訳終結因子 eRF3

センスコドンでは、EF-1 α が tRNA、GTP との 3 者複合体を形成して遺伝暗号解読に機能するのに対し、eRF3 は eRF1 と GTP による 3 者複合体を形成して終止コドンを認識し、リボソーム内でのペプチド解離反応を促進する (Zhouravleva G *et al.*, 1995 ; Stansfield I *et al.*, 1995)。また同時に、eRF3/eRF1 複合体はリボソームの A サイトにおける結合を介して mRNA 品質管理機構 NMD における異常 mRNA の認識機構としての役割も兼ね備えており、性質の異なった 2 つの高次機能を担っている (Kashima I *et al.*, 2006 ; Eberle AB *et al.*, 2009 ; Kashima I *et al.*, 2010)。eRF3 は終止コドン認識という極めて普遍的な機能に関わるため、これまで解析がなされた全ての真核生物に保存されたタンパク質であり、出芽酵母の生育にも必須である。eRF3 のアミノ酸配列の特徴として、C 末端領域に EF-1 α と相同性が認められるドメインを有する一方で、N 末端領域には、酵母の生育には必須ではなく eRF3 同士の保存性も低い non essential domain (NED)を備えている (Ter-Avanesyan MD *et al.*, 1993)。NED 領域に関しては、プリオン様特性に由来する終止コドンの読み飛ばし機構などをはじめとして、生理学的な意義を見出す解析が積極的になされてきたが (Kodama H *et al.*, 2007)、C 末端領域の終止コドン認識能と比較するとその重要性は低いと考えられている。

eRF3 の C 末端領域はアミノ酸配列 254~685 に相当し、EF-1 α とのアミノ酸の同一性は 36% であるが、GTPase ドメイン (アミノ酸配列 262~454) に限定すると、その同一性は 47% に上昇する。この事実は、eRF3 におけるグアニンヌクレオチド結合モチーフの重要性を強く示唆しており、実際に eRF3、eRF1、GTP による 3 者複合体での終止コドン認識およびペプチド鎖の解離は GTP の加水分解によって促進される。

1-2-2. No-go decay 因子 Hbs1

出芽酵母において、SSB 遺伝子によってコードされるシャペロンタンパク質 Hsp70 には 2 種類のサブファミリー SSB1、SSB2 が存在し、2 重欠損株は致死ではないものの低温条件下での生育が抑制される現象が見出されていた (Craig EA and Jacobsen K., 1985)。その後、過剰発現に

よって生育の抑制を脱抑制するサプレッサータンパク質として新規の EF-1 α 様タンパク質である Hbs1 (Hsp70 subfamily B suppressor 1) が同定された (Nelson RJ *et al.*, 1992)。HBS1 は生育に必須な遺伝子ではないが、ヒトやマウス (Wallrapp C *et al.*, 1998)、ショウジョウバエや分裂酵母 (Inagaki Y and Ford Doolittle W., 2000) にも存在し、進化的に高度に保存されている事実から、重要な役割を持つのではないかと推測されてきた。Ssb タンパク質は恒常的に発現されているシャペロンタンパク質であり、翻訳伸長過程におけるリボソームに局在し新生ペプチド鎖の正常なフォールディングを促進する (Nelson RJ *et al.*, 1992; Pfund C *et al.*, 1998)。Ssb 非存在下では、リボソームの Exit チャンネルから出てくる新生ペプチド鎖の停滞が引き起こされ、トランスロケーションが滞った結果としてリボソームの A サイトに EF-1 α /tRNA 複合体が結合できなくなるという仮定のもと、最も初期の機能モデルでは、Hbs1 は翻訳伸長過程の滞りを解消する因子ではないかと推測されていた (Pfund C *et al.*, 1998)。

その後、リボソームタンパク質 RPS30A と HBS1 の 2 重欠損株では、低温条件下での生育が抑制され、その生育抑制は Hbs1 の全長および C 末端領域 (アミノ酸配列 162-611) のみによって相補されることが明らかになり、加えて、GTP 結合能の同定と G1 ドメインと G3 ドメイン内の保存されたアミノ酸の置換による機能欠損変異体 (V176G、H225E) の分離がなされた (Carr-Schmid A *et al.*, 2002)。これによって、Hbs1 は EF-1 α や eRF3 と同様に、GTP 結合依存的に機能する分子であることが強く示唆された。さらに、Yeast two-hybrid (Y2H) 法を利用して、Hbs1 の結合因子として Dom34 が同定され、その結合には Hbs1 の C 末端領域が必要であることが明らかとなった (Carr-Schmid A *et al.*, 2002)。

Hbs1 の翻訳型 G タンパク質としての特性が明らかになる一方で、翻訳過程での機能は明らかにならなかった。しかし、2006 年、Parker らは、強固なステムループ構造を内包する mRNA はリボソームの停滞を誘発するが、そのような mRNA は Hbs1/Dom34 複合体によるリボソームの認識を介した分子内切断を受けて迅速に分解されることを報告し、このような新規 mRNA 品質管理機構を no-go decay (NGD) と名付けた (図 1-4.) (Doma MK and Parker R., 2006)。

1-2-3. Nonstop decay 因子 Ski7

dsRNA ウイルス L-A や M は出芽酵母における内在性の毒素、キラ毒素をコードし、細胞外にキラ毒素を分泌することで他の酵母を排除することが可能である (Wickner RB., 1996 ; Magliani W *et al.*, 1997)。Ski タンパク質 (Super killer) は、キラ毒素をコードする dsRNA ウイルスのコピー数を抑制するタンパク質として同定された (Toh-E A *et al.*, 1978 ; Ridley SP *et al.*, 1984)。実際、*SKI2*、*SKI3*、*SKI4*、*SKI6*、*SKI7*、*SKI8* の変異体では、dsRNA ウイルス M によって産生されるキラ毒素の発現レベルが上昇することが確かめられた (Toh-E A *et al.*, 1978 ; Ball SG *et al.*, 1984 ; Ridley SP *et al.*, 1984 ; Widner WR and Wickner RB., 1993)。

その後、*SKI7* の遺伝子はクローニングされ、アミノ酸配列が EF-1 α 、eRF3、Hbs1 と相同性が高く GTPase ドメインが保存されていること (図 1-6.)、また、Ski7 欠損株において、キラ毒素をコードする dsRNA と同様な特徴をもつ、ポリ A 鎖のない mRNA に由来するタンパク質の発現が上昇することが明らかになった (Benard L *et al.*, 1999)。さらに、Ski7 欠損株では、ハイグロマイシン B やシクロヘキシミドへの感受性が高まることが示され、翻訳型 G タンパク質との相同性を有することから、Ski7 のリボソームへの機能性が示唆された (Benard L *et al.*, 1999)。

Ski2、*Ski3*、*Ski6*、*Ski8* によるポリ A 鎖のない mRNA の分解への寄与が明らかになっていたなか (Anderson JS and Parker R., 1998)、2002 年、Parker らは、Ski7 が終止コドンのない mRNA (nonstop mRNA) の分解に必要であり、翻訳型 G タンパク質である特徴から、nonstop mRNA を翻訳するリボソームを Ski7 が認識することによって mRNA の分解が促進される nonstop decay (NSD) という新規 mRNA 品質管理機構を提唱した (図 1-2.) (van Hoof A *et al.*, 2002)。

1-3. Ski7 研究によるこれまでの知見

本節では、これまでに明らかにされている Ski7 に関する知見を概説する。

1-3-1. Ski7 の種間保存性とその機能性領域

出芽酵母の野生株では、nonstop mRNA は、終止コドンが存在する正常な mRNA と比較して、迅速に分解される (Frischmeyer PA *et al.*, 2002)。Ski7 欠損株では、mRNA の半減期は大幅に増加することが認められた (van Hoof A *et al.*, 2002)。同様な現象は、他の Ski タンパク質 Ski2、Ski3、Ski8 の欠損株でも報告されている (van Hoof A *et al.*, 2002)。

他の Ski 因子と比べ、Ski7 の特筆すべき点は、真核生物のほぼすべての種に高度に保存される EF-1 α 、eRF3、Hbs1 と相同性をもつ翻訳型 G タンパク質 (EF-1 α ファミリー) のホモログであるという点である (図 1-6.) (Benard L *et al.*, 1999)。そして、EF-1 α と eRF3 に関して、欠損すると細胞が致死になるような主要な機能性領域は、グアニンヌクレオチド結合モチーフが保存されている C 末端領域であることが確認されている (Bourne HR. *et al.*, 1991 ; Ivanov PV *et al.*, 2008 ; Carr-Schmid A *et al.*, 2002)。しかし、これまでの NSD 活性評価系における mRNA 分解経路に必要とされる Ski7 の機能性領域は、この C 末端領域ではなく、Ski7 に特徴的な配列から構成されている N 末端領域のみからなる C 末端領域欠失体で十分に示された (van Hoof A *et al.*, 2002)。グアニンヌクレオチド結合モチーフが保存されている C 末端領域の寄与は厳密な半減期の測定によってもわずかに確認されたのみであった (van Hoof A *et al.*, 2002)。これにより、NSD における Ski7 の機能性領域は N 末端領域であるとされており、C 末端領域がどのような機能を発揮するのかは全く分かっていない。

1-3-2. Ski7 の構造情報

センスコドン解読を担う EF-1 α /tRNA/GTP 複合体と、終止コドン解読を担う eRF3/eRF1/GTP 複合体は、立体構造上の形状が酷似している (図 1-3.)。この性質は、tRNA 擬態分子である解離因子 eRF1 タンパク質の tRNA と対応する機能部位をリボソームの遺伝暗号解読部位で適切に機能させるために重要であると考えられている (Nakamura Y and Ito K., 2011)。このような立体構造の模倣は「解離因子-tRNA 分子擬態」(Ito K *et al.*, 1996) という概念で捉えられ、真核生物のみならずバクテリアの遺伝暗号系にも共通して認められる (Nakamura Y and Ito K., 2011)。

では、遺伝暗号の解読に関わる EF-1 α および eRF3 との相同性を保持し mRNA の品質管理機構に
関与するホモログである Hbs1 や Ski7 では立体構造の類似は認められるのだろうか。

種々の全ゲノム解析プロジェクトにより古細菌には、EF-1 α は存在するが eRF3 や Hbs1 に対
応するホモログ遺伝子は存在しないことが明らかになっていた。その後、古細菌では EF-1 α は
tRNA に加えて、eRF1 や Pelota (出芽酵母では Dom34) と相互作用することが明らかとなり、
各複合体の結晶構造が GTP 結合様式で解かれた (Kobayashi K *et al.*, 2010 ; Saito K *et al.*,
2010)。その結果、eRF1 に加え、Pelota は tRNA に酷似した形状を有し、Hbs1/Dom34 複合体
も EF-1 α /tRNA/GTP 複合体と酷似した形状を示すことが実証された (図 1-3.)。加えて、
Schizosaccharomyces pombe の Hbs1/Dom34 複合体の結晶構造も解かれ、予想通り、
eRF3/eRF1/GTP 複合体と全体的な形状が類似していることが示された (Chen L *et al.*, 2010)。
また、単独ではあるが *Thermoplasma acidophilum* 由来の Pelota (Lee HH *et al.*, 2007) や出芽
酵母由来の Dom34 (Graille M *et al.*, 2008) の結晶構造も解かれており、それぞれが eRF1 の構
造に類似していることから、Hbs1/Dom34 複合体が tRNA 擬態因子であるということを強く示
唆している。

Ski7 以外の因子は、リコンビナントの発現・精製が比較的容易であるため立体構造解析が捗々
しかつたが、Ski7 はタンパク質精製が非常に困難であることが知られており、結晶化が難しいと
言われてきた。ところが、つい最近になって、X 線結晶構造解析によって出芽酵母の Ski7 の構造
が解かれた (Kowalinski E *et al.*, 2015)。その結果、他のホモログタンパク質と同じように、Ski7
は EF-1 α と立体構造が類似していることが明らかとなった (図 1-7.)。

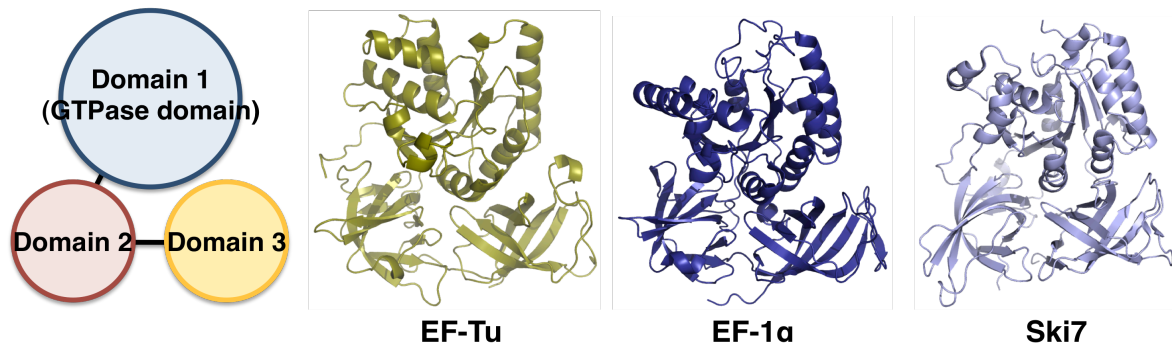


図 1-7. 出芽酵母由来の Ski7 の結晶構造。左から、*Thermus aquaticus* 由来の EF-Tu (PDB accession code : 1TTT)、*Aeropyrum pernix* 由来の EF-1 α (PDB accession code : 3WXM)、*Saccharomyces cerevisiae* 由来の Ski7 (PDB accession code : 4ZKE) の構造。ホモログである翻訳伸長因子 EF-1 α (原核生物では EF-Tu) と比較すると、各ドメインの立体配置が類似しており、Ski7 も分子擬態タンパク質であることが明らかになった。

1-3-3. Ski7 の系統保存性

Ski7 は、原核生物や古細菌はおろか、ヒトをはじめとする多くの真核生物においても保存されておらず、近縁の酵母種のみに見られるタンパク質であるとされてきた (Atkinson GC *et al.*, 2008)。出芽酵母におけるアライメント比較解析および進化系統樹解析の結果より、進化的に Hbs1 グループより分岐して出現したと考えられている。ごく一般的な考え方に則れば、ゲノム DNA の倍加現象である whole genome duplication (WGD) によって Hbs1 から Ski7 が誕生し、双方が保持されてきたと考えられる。しかし実際には、Ski7 は whole genome duplication (WGD) が起こるよりも古く、*Kluyveromyces waltii* と出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の分岐以前から存在していたと考えられている (Kellis M *et al.*, 2004 ; Atkinson GC *et al.*, 2008)。この事実を支持するかのように、最新の研究結果において、近縁の酵母菌以外にも Ski7 様タンパク質の存在が確認され、最も遠縁では、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* に Ski7 であると推察されるタンパク質の存在が明らかとなっている (Marshall AN *et al.*, 2013)。

1-3-4. Ski7 の C 末端領域における相互作用因子

eRF3、Hbs1 の C 末端領域は、3 つの構造ドメイン (domain 1、domain 2、domain 3) から構成されており、GTPase ドメインは domain 1 に含まれ、グアニンヌクレオチドの結合により他

のドメインを含めた構造との立体配向を制御している (図 1-6.、図 1-7.)。それぞれの eRF1 および Dom34 との複合体形成には、domain 2、3 を含めた全てのドメインの相互作用が必須である。ここで、Ski7 のアミノ酸配列に注目すると、Ski7 も例に漏れず、他の EF-1 α ホモログタンパク質と同様に 3 つの構造ドメインに対応するアミノ酸領域が高度に保存されている (Benard L *et al.*, 1999 ; Carr-Schmid A *et al.*, 2002)。GTPase ドメイン以外の C 末端領域も保存されていることから、Ski7 も他の EF-1 α ホモログタンパク質と同じような相互作用因子の存在が推測される。事実、mRNA 品質管理機構のレビューには相互作用因子の存在が前提でモデルが描かれていることも多い (Shoemaker CJ and Green R., 2012)。しかし、現在までに tRNA もしくは擬態因子タンパク質 eRF1 や Dom34 のように Ski7 とペアになって機能する因子の報告はない。また、結晶構造解析によると、Ski7 のドメイン 2 やドメイン 3 の表面に露出しているアミノ酸残基の電荷は他の EF-1 α ホモログタンパク質と異なっていた。さらには、Ski7 単独による GDP 結合様式の形態が、他の EF-1 α ホモログタンパク質が GTP やパートナータンパク質と 3 者複合体を形成したときの形態に酷似していた。これらの理由から最新の研究では、以前の主張とは異なり、ペアとなるパートナータンパク質の存在はないと推測されている (Kowalinski E *et al.*, 2015)。

1-3-5. Ski7 の翻訳 G タンパク質相同ドメインの特徴

EF-1 α 、eRF3、Hbs1 は、翻訳 G タンパク質として GTP を結合することでパートナータンパク質との複合体形成が促進され、この複合体とリボソームとの相互作用に共役する形で GTP の加水分解反応を引き起こす。GTP の加水分解反応では、GTP 結合部位に隣接する G3 ドメイン内のヒスチジン残基が、反応中間体の安定化に寄与することで GTP の加水分解反応を促進していると考えられている (Liljas A *et al.*, 2011)。この推測に一致して、EF-Tu (真核生物では EF-1 α)、eRF3、Hbs1 では、それぞれのヒスチジン残基における変異体は、共通して機能欠損を引き起こす (Cool RH and Parmeggiani A., 1991 ; Zeidler W *et al.*, 1995 ; Carr-Schmid A *et al.*, 2002 ; Salas-Marco J and Bedwell DM., 2004 ; Kobayashi K *et al.*, 2010)。

EF-1 α と他の EF-1 α ホモログタンパク質の GTPase ドメイン一帯におけるアミノ酸の同一性

はそれぞれ、eRF3 では 47%、Hbs1 では 30%と高い一方で、Ski7 では 13%と低くなっている。また興味深いことに、Ski7 においては、GTP 加水分解に重要な役割を果たす上述のヒスチジン残基は保存されておらず、セリン残基へと置換されている。実際に精製された Ski7 を用いて *in vitro* で Ski7 の GTP 加水分解活性を測定したところ、リボソームの共存下であっても GTP 加水分解活性を示さなかった。つまり、Ski7 は GTP に結合するが加水分解活性はもたないという、他の EF-1 α ホモログタンパク質とは異なる特徴が明らかになった (Kowalinski E *et al.*, 2015)。

1-3-6. Ski7 の N 末端領域における相互作用因子

一般的な正常 mRNA は、ポリ A 鎖の一定長の短鎖化が引き金となり、5'キャップ構造の除去が行われ、5'から 3'に向かってエキソヌクレアーゼ Xrn1 によって mRNA が促進され分解される (Decker CJ and Parker R., 1993 ; Hsu CL and Stevens A., 1993 ; Muhlrads D *et al.*, 1994 ; Muhlrads D *et al.*, 1995)。その後、3'から 5'に向かって mRNA が分解される経路が指摘され、Ski2、Ski3、Ski4、Ski6、Ski7、Ski8 や Rrp4 が関与していることが判明した。このうち、Ski6 や Rrp4 は、exosome と呼ばれる複合体を形成し、5.8 rRNA の成熟過程に関与すること (Mitchell P *et al.*, 1997 ; Butler JS., 2002) や、*in vitro* において、3'から 5'へのエキソヌクレアーゼ活性が示されており (Mitchell P *et al.*, 1997)、この exosome が 3'から 5'へ mRNA を分解する主要なエキソヌクレアーゼであることが明らかとなった (Anderson JS and Parker R., 1998 ; van Hoof A *et al.*, 2000b)。また、Ski2、Ski3、Ski8 は exosome とは別に ski complex と呼ばれる複合体を形成していることが示された (Brown JT *et al.*, 2000)。現在では、ski complex は、exosome による 3'から 5'への mRNA 分解経路における補助因子であると考えられている (van Hoof A *et al.*, 2000a)。

NSD の発見以前、3'から 5'への mRNA 分解経路は、Ski7 の N 末端領域のみで促進されることや、exosome の構成因子 Ski6、Rrp4、ski complex 構成因子 Ski2、Ski8 と相互作用し、N 末端領域のみでもその機能が維持されることが明らかとなっていた (Araki Y *et al.*, 2001)。これらの知見から、NSD において、Ski7 は C 末端領域で停滞しているリボソームを特異的に認識する際、

N 末端領域にて exosome や ski complex を引き連れ、効率的に mRNA 分解酵素を呼び込むことで異常 mRNA の分解を促進していると考えられている (Maquat LE., 2002)。

1-4. 本研究の意義

近年、様々な mRNA 品質管理機構の存在が明らかになってきている。異常 mRNA の監視を担う存在はいずれも EF-1 α ホモログタンパク質であり、これら翻訳型 G タンパク質がどのように特異なリボソームに対する認識機能を発達させていったのか、という究極の問いに対する答えは、まず、各 mRNA 品質管理機構の素過程を理解することから始まるはずである。

これまで述べたように、EF-1 α ホモログタンパク質のなかで、Ski7 は最も理解が進んでいないタンパク質である。その要因として、Ski7 は広く保存されておらず、研究を行える生物種が限定的であることや、活性が微少なために、研究に適した実験系の構築が容易ではないこと挙げられる。また、最大の要因は、NSD でのリボソーム認識機構から始まる mRNA 分解経路と、一般的な mRNA の分解経路の双方に Ski7 が関与していると考えられており、その区別が *in vivo* の解析系で非常に困難な点に集約される。

しかしながら、遺伝学的な実験手法を駆使することで、Ski7 の微小な活性を再現性よく評価することができるようになった。そこで本研究では、NSD 素過程の理解に向けて、Ski7 がどのような振る舞いをするタンパク質であるかを明らかにする目的で研究を行い、論文として纏めるとにした。

第2章 実験材料と実験手法

2-1. 菌株

2-1-1. 大腸菌株とその遺伝型

大腸菌を用いた全ての組換え体プラスミド、変異体プラスミドの構築に用いた。

NovaBlue : *endA1 hsdR17* ($r_{K12}^- m_{K12}^+$) *supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F'* [*proA*⁺*B*⁺ *lacI*^q Δ *M15::Tn10*]

出典 : Novagen より。

(http://www.emdmillipore.com/US/en/product/NovaBlue-Singles™-Competent-Cells,EMD_BIO-70181)

2-1-2. 酵母菌株とその遺伝型

BY4727 株 (Brachmann CB *et al.*, 1998) は、ほとんど全ての系統株の親株であり、文中では野生型 (WT) と記載。

(A) 基本的な Isogenic parental 株

BY4727: MAT α , *his3* Δ 200 *leu2* Δ 0 *lys2* Δ 0 *met15* Δ 0 *trp1* Δ 63 *ura3* Δ 0

BY4727 *ski7* Δ : MAT α , *his3* Δ 200 *leu2* Δ 0 *lys2* Δ 0 *met15* Δ 0 *trp1* Δ 63 *ura3* Δ 0 *ski7::hphMX*

BY4727 *hbs1* Δ : MAT α , *his3* Δ 200 *leu2* Δ 0 *lys2* Δ 0 *met15* Δ 0 *trp1* Δ 63 *ura3* Δ 0 *hbs1::hphMX*

BY4727 *dom34* Δ : MAT α , *his3* Δ 200 *leu2* Δ 0 *lys2* Δ 0 *met15* Δ 0 *trp1* Δ 63 *ura3* Δ 0 *dom34::hphMX*

(B) Nonstop decay アッセイ株

上記の株をもとに

BY4727 nonstop-*his3* (NSD-WT) : BY4727 HO-kanMX-TEF-HIS3-E12ns-HIS3t-HO

BY4727 *ski7* Δ nonstop-*his3* (NSD-*ski7* Δ) : BY4727 HO-kanMX-TEF-HIS3-E12ns-HIS3t-HO *ski7* $\Delta::hphMX$

BY4727 *hbs1* Δ nonstop-*his3* (NSD-*hbs1* Δ) : BY4727 HO-kanMX-TEF-HIS3-E12ns-HIS3t-HO *hbs1* $\Delta::hphMX$

BY4727 *dom34* Δ nonstop-*his3* (NSD-*dom34* Δ) : BY4727 HO-kanMX-TEF-HIS3-E12ns-HIS3t-HO *dom34* $\Delta::hphMX$

BY4727 *ski7* Δ nonstop-*ura3* (NSD-*ski7* Δ) : BY4727 HO-kanMX-TEF-URA3ns-HIS3t-HO *ski7* $\Delta::hphMX$

(C) Yeast two-hybrid (Y2H) アッセイ株

AH109 : MAT α *trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4* Δ *gal80* Δ *LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3*
MEL1 GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ

出典 : AH109 はクロンテックより。BY4727 は研究室ストックより。それ以外は本研究で定法により構築した。

2-2. プラスミド

(A) 大腸菌クローニングベクター

pT7Blue (Novagen)

pHOTEF (明示的にでてこない)

(B) 酵母発現ベクター (Mumberg D *et al.*, 1995)

プロモーター強度は4種類。発現強度はCYC (低発現)、ADH、TEG、GPD (高発現) の順。コピー数と選択マーカー遺伝子を示す。

p413CYC シングルコピー (ARS Cen)、HIS3 選択マーカー
 p414CYC シングルコピー (ARS Cen)、TRP1 選択マーカー
 p416CYC シングルコピー (ARS Cen)、URA3 選択マーカー
 p414ADH シングルコピー (ARS Cen)、TRP1 選択マーカー
 p414TEF シングルコピー (ARS Cen)、TRP1 選択マーカー
 p416TEF シングルコピー (ARS Cen)、URA3 選択マーカー
 p414GPD シングルコピー (ARS Cen)、TRP1 選択マーカー
 p424GPD マルチコピー (2 μ)、TRP1 選択マーカー

(B) Yeast two-hybrid アッセイベクター (Chien CT *et al.*, 1991)

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

(C) Hbs1 野生型および変異体発現ベクター

p414GPD/HBS1

p414GPD/HBS1-T232A

p414GPD/HBS1-H255A

※Hbs1 変異体の発現ベクターは、研究室の共著論文 (Kobayashi K *et al.*, 2010) に基づき稲田利文教授 (東北大学大学院薬学研究科) から分与された。

2-3. オリゴ DNA プライマーリスト

名称	配列 (5' to 3')
RT-ACT1-F	TTGCCGAAAGAATGCAAAAAG
RT-ACT1-R	GGAAGGTAGTCAAAGAAGCCAAGA
RT-HIS3-F	GACGACCATCACACCACTGAA
RT-HIS3-R	TCATCCAAAGGCGCAAATC
SKI3A	GGGAATTCGCCATGGCGGATATTAACAGCTATTGAAGG
SKI3B	CCCTCGAGTTAGAAACATTCGTTTAGCGCC
SKI4A	GGGAATTCATATGGCATGCAATTTTCAGTTTCC
SKI4B	GGGTGCACTCAAAAAGGTTTGGCACATTTG
SKI7A	GGACTAGTGGATCCATATGATGTCGTTATTAGAGCAATTAGCAAG
SKI7B	GGGTGCACTTACTGGCATGCAATTCCTGC
SKI7-C-F	GGACTAGTGGATCCATATGCCTCTGAATTTGACATGTTTGTTC
SKI7-N-R2	GGGTGCACTTAATGGGTGGCAATGAATGAATGAATA
SKI7-m1-F	AGTCCTGATGATATAATAACAATCGG
SKI7-m1-R	TGGTCTATTGAAATTCTCAATGGCT
SKI7-K180A-F	CATCATTTCTGTCCTTAGCAAAGCATAACAATGAGCTCC
SKI7-K180A-R	GGAGCTCATTGTTATGCTTTGCTAAGGACAGAAATGATG
SKI7-E185A-F	GTCCTTAAAAAAGCATAACAATGCGCTCCTTGGTATTT
SKI7-E185A-R	AAATACCAAGGAGCGCATTGTTATGCTTTTTTAAGGAC
SKI7-P192A-F	GCTCCTTGGTATTTTTGTGGCTTGTAACCTGCCGAAAAAC

名称	配列 (5' to 3')
SKI7-P192A-R	GCTCCTTGGTATTTTTGTGGCTTGTAACCTGCCGAAAAC
SKI7-K197A-F	GTGCCTTGTAACCTGCCGGCAACAACTCGTAAAGTAGCC
SKI7-K197A-R	GGCTACTTTACGAGTTGTTGCCGGCAGGTTACAAGGCAC
SKI7-R200A-F	AACCTGCCGAAAACAACCTGCTAAAGTAGCCATTGAGAAT
SKI7-R200A-R	ATTCTCAATGGCTACTTTAGCAGTTGTTTTCGGCAGGTT
SKI7-K201A-F	CTGCCGAAAACAACCTCGTGCAGTAGCCATTGAGAATTC
SKI7-K201A-R	GAAATTCTCAATGGCTACTGCACGAGTTGTTTTCGGCAG
SKI7-E205A-F	ACTCGTAAAGTAGCCATTGCGAATTTCAATAGACCAAGT
SKI7-E205A-R	ACTTGGTCTATTGAAATTCGCAATGGCTACTTTACGAGT
SKI7-N206A-F	CGTAAAGTAGCCATTGAGGCTTTCAATAGACCAAGTCCT
SKI7-N206A-R	AGGACTTGGTCTATTGAAAGCCTCAATGGCTACTTTACG
SKI7-F207A-R	TGGTCTATTGGCATTCTCAATGGCT
SKI7-R209A-F	GCCATTGAGAATTTCAATGCACCAAGTCCTGATGATATA
SKI7-R209A-R	TATATCATCAGGACTTGGTGCATTGAAATTTCTCAATGGC
SKI7-P210A-F2	ATTGAGAATTTCAATAGAGCAAGTCCTGATGATATAATA
SKI7-P210A-R2	TATTATATCATCAGGACTTGCTCTATTGAAATTTCTCAAT
SKI7-S211A-F	GCTCCTGATGATATAATACAATCGG
SKI7-P212A-F2	GAATTTCAATAGACCAGGTGCTGATGATATAATACAATC
SKI7-P212A-R2	GATTGTATTATATCATCAGCACTTGGTCTATTGAAATTC
SKI7-D213A-F	AGTCCTGCTGATATAATACAATCGG
SKI7-D214A-F	AGTCCTGATGCTATAATACAATCGG
SKI7-Q220A-F2	TGATATAATACAATCGGCCGCACTTAATGCTTTCAATGAA
SKI7-Q220A-R2	TTCATTGAAAGCATTAAAGTGCGGCCGATTGTATTATATCA
SKI7-F224A-F	TCGGCCCAACTTAATGCTGCCAATGAAAAATTAGAAAAC
SKI7-F224A-R	GTTTTCTAATTTTTTCATTGGCAGCATTAAAGTTGGGCCGA
SKI7-E229A-F	GCTTTCAATGAAAAATTAGCAAACCTTAAATATCAAATCT
SKI7-E229A-R	AGATTTGATATTTAAGTTTGCTAATTTTTTCATTGAAAGC
SKI7-C270R-F	CCATCCTCTGAATTTGACACGTTTGTTCCCTCGGTGATAC
SKI7-C270R-R	GTATCACCGAGGAACAAACGTGTCAAATTCAGAGGATGG
SKI7-G279D-F	CTCGGTGATACAAACGCAGACAAATCCACTTTGCTTGGT
SKI7-G279D-R	ACCAAGCAAAGTGGATTTGTCTGCGTTTGTATCACCGAG
SKI7-S281P-F	TGATACAAACGCAGGCAAACCCACTTTGCTTGGTCATCT
SKI7-S281P-R	AGATGACCAAGCAAAGTGGGTTTGCCTGCGTTTGTATCA
SKI7-L284P-F (P689 ski7-m1u)	GGCAAATCCACTTTGCCTGGTCATCTTTTATATG
SKI7-L284P-R (P690 ski7-m1r)	CATATAAAAGATGACCAGGCAAAGTGGATTTGCC
SKI7-L287D-F (P703 ski7-M4U)	ACTTTGCTTGGTCATGATTTATATGATCTAAACG
SKI7-L287D-R (P704 ski7-M4R)	CGTTTAGATCATATAAATCATGACCAAGCAAAGT
SKI7-L287P-F	TCCACTTTGCTTGGTCATCCTTTATATGATCTAAACGAA
SKI7-L287P-R	TTCGTTTAGATCATATAAAGGATGACCAAGCAAAGTGGA
SKI7-E327G-F	CTAGACAATACAAAACAGGAAGAGAAAATGGATTTTCC

名称	配列 (5' to 3')
SKI7-E327G-R	GGAAAATCCATTTTCTCTTCCTGTTTTGGTATTGTCTAG
SKI7-L354R-F	CCATCATCAACCTTGACGCGTATAGACACTCCTGGTAGT
SKI7-L354R-R	ACTACCAGGAGTGTCTATACGCGTCAAGGTTGATGATGG
SKI7-D356N-F	ATCAACCTTGACGCTTATAAACACTCCTGGTAGTATCAA
SKI7-D356N-R	TTGATACTACCAGGAGTGTTTATAAGCGTCAAGGTTGAT
SKI7-S360A-F	CTTATAGACACTCCTGGTGCTATCAAATACTTCAATAAAA
SKI7-S360A-R	TTTATTGAAGTATTTGATAGCACCAGGAGTGTCTATAAG
SKI7-S360H-F	CTTATAGACACTCCTGGTCATATCAAATACTTCAATAAAA
SKI7-S360H-R	TTTATTGAAGTATTTGATATGACCAGGAGTGTCTATAAG
SKI7-K428E-F2	CTTGATAATTCTTTTGAATGAGGCAGATCTAATTAGTTG
SKI7-K428E-R2	CAACTAATTAGATCTGCCTCATTCAAAGAATTATCAAG
SKI7-R438G-F	GGACTAGAAATGATTCAGTCTGAGC
SKI7-R438G-R	GTGCTTATCCCAACTAATTAGATCT
SKI7-E445G-F	GAAATGATTCAGTCTGGGCTAAATTATGTGTTGAAGG
SKI7-E445G-R	CCTTCAACACATAATTTAGCCCAGACTGAATCATTTTC
SKI7-RM-TEF prom.-F	CTAGGGTGTCTCGTTAATTACCCGTAC
SKI7-RM-TEF prom.-R	CTGAAACTTGAGAAATTGAAGACCG
SKI7-RM-URA3-F-2	CGCAATGTCAACAGTACCCTTAGTA
SKI7-RM-URA3-R-2	ACAGTCAAATTGCAGTACTCTGCGG

2-4. 培地

大腸菌培養用培地

LB 培地

1% Bacto Tripton (DIFCO)、0.5% Yeast Extract (DIFCO)、0.5% NaCl (和光)
 抗生物質の濃度は、アンピシリン(Amp) (50 mg/L)とする。

LB プレート

LB 培地 + 2% 寒天 SSP (三井製糖)

抗生物質の濃度は、アンピシリン(Amp) (50 mg/L)とする。

酵母培養用培地

完全栄養培地

YPD 培地

2% D-Glucose (ナカライテスク)、2% Bact Peptone (DIFCO)、1% Bact Yeast Extract (DIFCO)

YPD プレート

YPD 培地 + 2% Bact Agar (DIFCO)

合成選択培地 (プラスミドマーカースelection培地)

SC-X 培地 (X はマーカースelectionに必要な要素)

2% D-Glucose (ナカライテスク)、0.67% Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids (DIFCO)、0.15% COMPLETE SUPPLEMENT MIXTURE (CSM) DROP-OUT: -XXX (FORMEDIUM)

SC-X プレート (Xはマーカー選択に必要な要素)

SC-X 培地 + 2% Bact Agar (DIFCO)

2-5. Ski7 変異体の作製 (部位特異的変異導入法)

pT7Blue/SKI7 を 1 μ l、変異を導入するためのプライマー (10 pmol/ μ l) を 1 μ l ずつ、dNTP (10 mM) を 2 μ l、5 \times Phusion HF Reaction Buffer を 2.5 μ l、Phusion DNA Polymerase を 0.25 μ l、RO を 17.25 μ l のオーダーで Inverse PCR によって DNA 断片の増幅を行った。条件は 98 $^{\circ}$ C (5 分)、98 $^{\circ}$ C (10 秒)、55 $^{\circ}$ C (30 秒)、72 $^{\circ}$ C (6 分 30 秒)、72 $^{\circ}$ C (7 分)、4 $^{\circ}$ C (10 分) で 25 サイクル行う (囲み線部分が繰り返される)。反応溶液を 3 μ l 程度用いて、アガロースゲル電気泳動 (100V/30 分) にて DNA 断片の増幅を確認した。

残りの反応溶液に DpnI を 1 μ l 加えて穏やかに混合し、37 $^{\circ}$ C にて 2 時間静置する。その後、コンピテントセルを 80 μ l 加えて形質転換し、37 $^{\circ}$ C にて一晚静置培養する。

得られたコロニーを液体培養後、mini-prep によってプラスミドを精製し、シーケンス解析によって変異導入されたことを確認する。作製に成功した Ski7 変異体は、特定の制限酵素で切り出し、各種発現ベクターに挿入する。

2-6. Ski7 変異体の活性評価 (ストリーク法)

Ski7 の活性評価に用いる菌株 (NSD-*ski7* Δ) のコンピテントセルを Frozen-EZ Solution III (フナコシ) を用いて作製する。コンピテントセルに発現ベクターを形質転換し、SC-W (-Trp) プレート上で形質転換体を取得する。ストリークによる Ski7 の活性評価では、p414CYC (single copy, weak expression) に野生型 Ski7 および Ski7 変異体を挿入した発現ベクターを使用した。

SC-W (-Trp) プレート上に生育してきたコロニーを楊枝で拾い上げ、コントロールプレート SC-W (-Trp) プレートとアッセイプレート SC-HW (-His, -Trp) プレート上にストリークし、30 $^{\circ}$ C にて静置培養した。

また、nonstop-*URA3* をレポーター遺伝子として用いる場合、p413CYC (single copy, weak expression) に野生型 Ski7 および Ski7 変異体を挿入した発現ベクターを使用した。形質転換体は SC-H (-His) プレート上に生育してきたコロニーを楊枝で拾い上げ、コントロールプレート SC-H (-His) プレートとアッセイプレート SC-H (-His) (+0.1% 5-FOA) プレートにストリークし、30 $^{\circ}$ C にて静置培養した。

2-7. Ski7 領域間の独立的機能評価 (ストリーク法)

NSD-*ski7* Δ (nonstop-*ura3* version) 株のコンピテントセルを Frozen-EZ Solution III (フナコシ) を用いて作製する。コンピテントセルに発現ベクターを形質転換し、SC-HW (-His, -Trp) プレート上で形質転換体を取得する。形質転換では、p413CYC/Ski7 Δ C (single copy, weak expression) に加えて、p414CYC (single copy, weak expression)、p414ADH (single copy, medium expression)、p414TEF (single copy, strong expression)、p414GPD (single copy, strongest expression) に Ski7 Δ N を挿入した発現ベクターを同時に用いた。

SC-HW (-His, -Trp) プレート上に生育してきたコロニーを楊枝で拾い上げ、コントロールプレ

ート SC-HW (-His, -Trp)プレートとアッセイプレート SC-HW (-His, -Trp) (+0.1% 5-FOA)プレートにストリークし、30℃にて静置培養した。

2-8. Ski7 変異体のドミナントネガティブ特性評価 (ストリーク法)

Ski7 のドミナントネガティブ特性評価に用いる菌株 (NSD-WT) のコンピテントセルを Frozen-EZ Solution III (フナコシ)を用いて作製する。コンピテントセルに発現ベクターを形質転換し、SC-W (-Trp)プレート上で形質転換体を取得する。ストリークによる Ski7 のドミナントネガティブ特性評価では、p424GPD (multicopy, strongest expression)に野生型 Ski7 および Ski7 変異体を挿入した発現ベクターを使用した。

SC-W (-Trp)プレート上に生育してきたコロニーを楊枝で拾い上げ、コントロールプレート SC-W (-Trp)プレートとアッセイプレート SC-HW (-His, -Trp)プレート上にストリークし、30℃にて静置培養した。

2-9. Ski7 変異体の活性評価 (スポット法)

Ski7 の活性評価に用いる菌株 (NSD-*ski7*Δ) のコンピテントセルを Frozen-EZ Solution III (フナコシ)を用いて作製する。コンピテントセルに発現ベクターを形質転換し、SC-W (-Trp)プレート上で形質転換体を取得する。スポットによる Ski7 の活性評価では、p414CYC (single copy, weak expression)に野生型 Ski7 および Ski7 変異体を挿入した発現ベクターを使用した。形質転換体を SC-W (-Trp)液体培地 3 ml にて一晩震盪培養 (30℃) する。

翌日、SC-W (-Trp)液体培地 3 ml に、一晩震盪培養させた培養液を 300 μl 加え、OD₆₀₀ が 1.0 に達するまで 30℃にて震盪培養する。1.5 ml チューブに OD₆₀₀=1.0 の培養液を 1.5 ml 加え、遠心 (12000 rpm/1 分) で集菌し上清を捨て、20 μl の SC-W (-Trp)液体培地 (10% Glycerol) を加えて懸濁する。懸濁した培養液 5 μl に 20 μl の SC-W (-Trp)液体培地 (10% Glycerol) を加えて懸濁する。この操作を 5 回繰り返す。

5 倍ずつ希釈された培養液 3 μl をコントロールプレート SC-W (-Trp)プレートとアッセイプレート SC-HW (-His, -Trp)プレート上に滴下し、30℃にて静置培養した。

2-10. Ski7 変異体のドミナントネガティブ特性評価 (スポット法)

Ski7 のドミナントネガティブ特性評価に用いる菌株 (NSD-WT, NSD-*hbs1*Δ, NSD-*dom34*Δ) のコンピテントセルを Frozen-EZ Solution III (フナコシ)を用いて作製する。コンピテントセルに発現ベクターを形質転換し、SC-W (-Trp)プレート上で形質転換体を取得する。スポットによる Ski7 のドミナントネガティブ特性評価では、p414GPD (single-copy, strongest expression)に野生型 Ski7 および Ski7 変異体を挿入した発現ベクターを使用した。形質転換体を SC-W (-Trp)液体培地 3 ml にて一晩震盪培養 (30℃) する。

翌日、SC-W (-Trp)液体培地 3 ml に、一晩震盪培養させた培養液を 300 μl 加え、OD₆₀₀ が 1.0 に達するまで 30℃にて震盪培養する。1.5 ml チューブに OD₆₀₀=1.0 の培養液を 1.5 ml 加え、遠心 (12000 rpm/1 分) で集菌し上清を捨て、20 μl の SC-W (-Trp)液体培地 (10% Glycerol) を加えて懸濁する。懸濁した培養液 5 μl に 20 μl の SC-W (-Trp)液体培地 (10% Glycerol) を加えて懸濁する。この操作を 5 回繰り返す。

5 倍ずつ希釈された培養液 3 μl をコントロールプレート SC-W (-Trp)プレートとアッセイプレート SC-HW (-His, -Trp)プレート上に滴下し、30℃にて静置培養した。

2-11. 無作為突然変異導入法による Ski7 の機能欠損変異体分離

2-11-1. 相同性組換えに用いる DNA 断片調製

制限酵素処理を行い断片化した p416TEF (50 ng/μl) を 8 μl、SKI7-RM-TEF prom.-R プライマーと SKI7-RM-URA3-F-2 (10 pmol/μl) を 8 μl ずつ、dNTP (2.5 mM) を 16 μl、5× Phusion GC Reaction Buffer を 40 μl、Phusion DNA Polymerase を 2 μl、RO を 118 μl のオーダーで PCR によって DNA 断片の増幅を行う。条件は 98°C (5 分)、94°C (30 秒)、58°C (30 秒)、72°C (4 分 30 秒)、72°C (7 分)、4°C (10 分) で 35 サイクル行う (囲み線部分が繰り返される)。反応溶液を 3 μl 程度用いて、アガロースゲル電気泳動 (100V/30 分) にて DNA 断片の増幅を確認する。増幅した DNA 断片 (TEF prom.-URA3) はエタノール沈殿を行い、RO 100 μl に溶かす。

p416TEF/SKI7 を 8 μl、SKI7-RM-TEF prom.-F プライマーと SKI7-RM-URA3-R-2 (10 pmol/μl) を 8 μl ずつ、dNTP (2.5 mM) を 16 μl、10× Ex Taq Buffer を 20 μl、TaKaRa Ex Taq Polymerase を 2 μl、RO を 138 μl のオーダーで 20 μl ずつ分注し PCR によって DNA 断片の増幅を行う。条件は 98°C (5 分)、94°C (30 秒)、58°C (30 秒)、72°C (5 分)、72°C (7 分)、4°C (10 分) で 33 サイクル行う (囲み線部分が繰り返される)。反応溶液を 3 μl 程度用いて、アガロースゲル電気泳動 (100V/30 分) にて DNA 断片の増幅を確認する。増幅した DNA 断片 (TEF prom.-SKI7-URA3) はエタノール沈殿を行い、RO 100 μl に溶かす。

2-11-2. NSD アッセイ株での相同性組換え

Ski7 の活性評価に用いる菌株 (NSD-*ski7Δ*) のコンピテントセルを Frozen-EZ Solution III (フナコシ) を用いて作製する。コンピテントセルに TEF prom.-URA3 断片 (10 倍希釈) を 2 μl、TEF prom.-SKI7-URA3 断片を 5 μl 用いて形質転換し、SC-HW (-His, -Trp) プレート上において 30°C で静置培養する。静置培養 4 日目以降で生育してきた形質転換体に対して、SC-HW (-His, -Trp) プレートでレプリカを作製する。

2-11-3. プラスミド抽出と Ski7 機能欠損変異体の確認

SC-HW (-His, -Trp) プレートで生育してきたレプリカから、Gen とるくん (酵母用) High Recovery (TaKaRa) を用いてプラスミド DNA を回収し、エレクトロポレーション法を用いて大腸菌 Nova Blue に形質転換し、アンピシリン添加された LB プレート上で 37°C にて静置培養する。

得られたコロニーを液体培養後、mini-prep によってプラスミドを精製し、Ski7 の活性評価に用いる菌株 (NSD-*ski7Δ*) に形質転換し、SC-W (-Trp) プレート上で形質転換体を取得する。

SC-W (-Trp) プレート上に生育してきたコロニーを楊枝で拾い上げ、コントロールプレート SC-W (-Trp) プレートとアッセイプレート SC-HW (-His, -Trp) プレート上にストリークし、30°C にて静置培養し、Ski7 活性の低下を確認する。

2-11-4. Ski7 機能欠損変異体のアミノ酸置換部位の特定

精製したプラスミドの *SKI7* 配列を確認し、アミノ酸が置換した部位を特定する。

2-12. 定量 PCR

2-12-1. 酵母細胞からの RNA 抽出

形質転換体を一晩震盪培養し、培養液 1 ml を液体培地 10 ml に加え、OD₆₀₀ が 1.0 に達するま

で培養する。培養液 5 ml を遠心 (3000 rpm/3 分) で集菌し上清を捨て TE Buffer 500 μ l で懸濁する。再度、遠心 (3000 rpm/3 分) で集菌し上清を捨て、RNAiso Plus (TaKaRa) を 500 μ l 加えて懸濁する。懸濁した酵母溶液をガラスビーズで破碎する。破碎溶液に対して、クロロホルム 100 μ l を加えて混和し、遠心 (12000 rpm/5 分) で 3 層に分離させ、上層の水層に対してイソプロパノール 500 μ l を用いて RNA を沈殿させる。抽出した total RNA は DDW で懸濁する。

2-12-2. Total RNA 中の DNA 除去反応

抽出した total RNA を 10 μ l、RQ1 DNase 10 \times Reaction Buffer (Promega)を 10 μ l、RQ1 RNase-Free DNase (Promega)を 4 μ l、DDW を 80 μ l を混和させ、37 $^{\circ}$ Cにて 1 時間静置する。反応終了後、酸性フェノールを 100 μ l 加えて懸濁し、遠心 (12000 rpm/2 分) で 2 層に分離させ、上層の水層に対して 100%エタノールを 250 μ l 加えてよく混和させ、遠心 (12000 rpm/15 分) 行い、total RNA を沈殿させる。そこへ DDW を 50 μ l 加えて溶かす。

2-12-3. 逆転写反応

Total RNA の濃度を 50 ng/ μ l に調製し、1 サンプル当たり total RNA (50 ng/ μ l)を 1 μ l、5 \times PrimeScript RT Master Mix (Takara Bio)を 2 μ l、DDW を 7 μ l のオーダーで逆転写反応を行う。反応条件は 37 $^{\circ}$ C (15 分)、85 $^{\circ}$ C (5 秒)、4 $^{\circ}$ C (固定) で行う。検量線に用いるサンプルでは、2 倍量で反応させる。

2-12-4. 定量 PCR

逆転写反応溶液を 10 倍希釈する (total RNA 換算で 0.5 ng/ μ l)。希釈した反応溶液を 2 μ l、検出に用いるプライマー (10 pmol/ μ l) を各 1 μ l ずつ、Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)を 10 μ l、DDW を 6 μ l のオーダーで 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)で検出する。反応条件は、95 $^{\circ}$ C (10 分)、95 $^{\circ}$ C (15 秒)、60 $^{\circ}$ C (1 分)で 40 サイクル行う (囲み線部分が繰り返される)。検量線に用いるサンプルは 10 倍希釈を 3 回繰り返し、定量 PCR を行う。

2-12-5. データ解析

定量 PCR による Ct 値の 3 回の平均値を算出する。コントロールとなる条件を用いて検量線を引き、Ct 値から目的の mRNA 量を算出する。算出した mRNA 量をコントロール遺伝子 *ACT1* から同様に算出した mRNA 量をもとに正規化した。最後に Vector 条件の値を 1 に正規化したときの各条件での mRNA 量を定量した。この操作を 3 回行った。

2-13. ウェスタンブロッティング

2-13-1. 酵母細胞からのタンパク質抽出

形質転換体を一晚震盪培養し、培養液 300 μ l を液体培地 3 ml に加え、OD₆₀₀ が 1.0 に達するまで培養する。1.5 ml チューブに OD₆₀₀=1.0 の培養液を 1.5 ml 加え、遠心 (12000 rpm/1 分) で集菌し上清を捨て、RO 100 μ l 加えて混和させる。さらに、0.2N NaOH を 100 μ l 加え、よく混和させる。常温にて 5 分間静置させた後、遠心 (12000 rpm/2 分) にてタンパク質を沈殿させ、上清を除く。1 \times Sample Buffer を 50 μ l 加え懸濁し、78 $^{\circ}$ Cで 3 分間反応させる。

2-13-2. メンブレン転写

調整したタンパク質を適切な濃度のアクリルアミドゲルにアプライし、電気泳動(150V・75分)を行う。電気泳動後のゲルは、Transfer Buffer を用いてバッファー置換する。TRANS-BLOT SD SEMI-DRY TRANSFER CELL の上に、Transfer Buffer に浸したろ紙 (Extra Thick Blot Paper) (Bio-Rad)、メタノールに浸した PVDF メンブレン (Immobilon-P Transfer Membrane) (MILLIPORE)、ゲル、Transfer Buffer に浸したろ紙 (Extra Thick Blot Paper) (Bio-Rad) の順に重ね、メンブレンへのタンパク質の転写を行う (15V/100 mA/1 時間)。

2-13-3. タンパク質検出

転写後のメンブレンを TBS-T で洗浄後、5%スキムミルク/TBS-T で 2 時間震盪させる。震盪させたメンブレンを数回 TBS-T で洗浄し、適量の TBS-T と、適切な濃度になるように一次抗体を加えて 2 時間常温で振盪させる。振盪後、メンブレンを数回 TBS-T で洗浄し、適量の TBS-T と、適切な濃度になるように検出用二次抗体を加えて 1 時間振盪させる。振盪後、メンブレンを TBS-T で数回洗浄し、ECL Prime (GE Healthcare)を用いて検出する。

一次抗体 (希釈倍率)

Anti-Ski7 (103~119) (1/1000)

Anti-Ski7 (479~495) (1/1000)

Anti-GAL4-TA (GAL4-TA (C10), Santa CruzBiotechnology) (1/500)

Anti-GAL4-DBD (GAL4 (DBD) (RK5C1), Santa CruzBiotechnology) (1/500)

Anti-PGK (Phosphoglycerate Kinase Antibody (22C5D8), invitrogen) (1/3000)

※Ski7 抗体は、富田野乃准教授 (東京大学大学院新領域創成科学研究科) から分与された。

二次抗体 (希釈倍率)

Anti-Mouse IgG, HRP-Linked Whole Ab Sheep, GE Healthcare (1/5000)

Anti-Rabbit IgG, HRP-Linked Whole Ab Donkey, GE Healthcare (1/5000)

2-14. Yeast two-hybrid (Y2H)法

AH109 株のコンピテントセルを Frozen-EZ Solution III (フナコシ)を用いて作製する。コンピテントセルに pGADT7 と pGBKT7 を用いて形質転換し、SC-LW (-Leu, -Trp)プレート上で形質転換体を取得する。本研究では、pGADT7 に野生型 Ski7 および Ski7 変異体、pGBKT7 に相互作用検証タンパク質をそれぞれ導入したアッセイベクターを使用した。

SC-LW (-Leu, -Trp)プレート上に生育してきたコロニーを楊枝で拾い上げ、コントロールプレート SC-LW (-Leu, -Trp)プレートとアッセイプレート SC-LWH (-Leu, -Trp, -His)プレート上にストリークし、30°Cにて静置培養した。

2-15. タンパク質の構造情報

本論の議論に用いたタンパク質の構造情報の生物種および Protein data bank (PDB)の ID を列挙する。

<i>Aeropyrum pernix</i>	EF-1 α /Pelota	(PDB accession code : 3WXM)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	eRF3/eRF1	(PDB accession code : 4CRN)

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hbs1/Dom34	(PDB accession code : 3IZQ)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ski7	(PDB accession code : 4ZKE)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	eRF3	(PDB accession code : 1R5B)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Hbs1/Dom34	(PDB accession code : 3MCA)
<i>Thermus aquaticus</i>	EF-Tu/Phe-tRNA	(PDB accession code : 1TTT)
<i>Thermus thermophilus</i>	EF-Tu	(PDB accession code : 1EXM)

本論の議論に用いた構造情報の生物種および 3-dimensional electron microscopy (3D-EM) の ID を列挙する。

Saccharomyces cerevisiae Hbs1/Dom34/80S ribosome (3D-EM accession code : EMD1811)

第3章 結果

3-1. Ski7-NSD 評価アッセイ系の確立

Ski7 の発見からしばらくの間、その活性評価を行える簡便な評価アッセイ系がなかったが、Ski7 欠損下では 3'から 5'への mRNA の分解が抑制されることが分かり (van Hoof A *et al.*, 2000b)、その後、Ski7 は終止コドンの欠落した nonstop mRNA を特異的に認識する因子の一つとして位置付けられた (van Hoof A *et al.*, 2002)。

通常、mRNA から欠失や置換によって終止コドン消失させても、その読み枠の延長上の 3' UTR の中に終止コドンに相当する塩基配列 (UAA、UAG、UGA) が出現することがほとんどである。しかし、ヒスチジン合成に関与する出芽酵母 *HIS3* 遺伝子は終止コドンにおける一塩基欠失変異により終止コドンが消失した場合、ポリ A 鎖付加部位まで終止コドンが登場せず (Mahadevan S *et al.*, 1997)、その後も 3'端までポリ A すなわちポリリジンの読み枠となるため NSD mRNA 品質管理の対象となる nonstop RNA となる。このアリの特性を利用し、Ski7 を始めとする NSD 因子の活性を、nonstop-*HIS3* レポーター遺伝子由来の His3 タンパク質の活性を指標として、ヒスチジン欠乏培地上での生育で判断できるようになった (van Hoof A *et al.*, 2002)。

そこで、先行研究の知見をもとに、この nonstop-*HIS3* レポーター遺伝子を任意の *HIS3* 欠損株の *HO* 遺伝子座位に安定に組み込み、NSD による Ski7 評価アッセイ系を確立することにした (図 3-1.)。

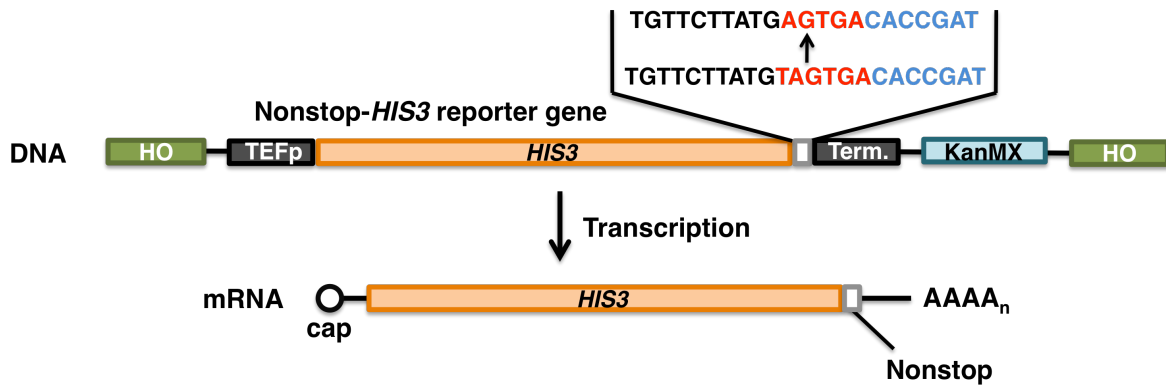


図 3-1. Nonstop-*HIS3* レポーター遺伝子の概略図。相同性組み換えにより、nonstop-*HIS3* レポーター遺伝子が *HO* 遺伝子に挿入された株を薬剤選択マーカーの活性を指標に選択する。Nonstop-*HIS3* 遺伝子は TEF プロモーターから恒常的に細胞内に発現する。黒字の塩基は ORF、赤字の塩基は終止コドン、青字の塩基は 3' UTR をそれぞれ示している。転写された nonstop-*HIS3* mRNA は下部に示した。なお、本研究でこのアッセイ系に用いる酵母株はレポーター構造と相同組み換えを起こさないように基本的に染色体上の *HIS3* コード領域を完全欠失した変異アリルを持つ株 (*his3Δ0*) を用いた (詳しくは菌株を参照)。

NSD 野生株では、nonstop-*HIS3* mRNA は NSD の標的となり、Ski7 によって活性化された exosome が nonstop-*HIS3* mRNA を 3' から 5' に向かって分解するため、細胞内でこの mRNA 由来の翻訳産物である His3 タンパク質の量が著しく減少し、最低限の生育に必要なヒスチジンが合成されず、その結果、ヒスチジン欠乏寒天培地上では致死になる。一方、Ski7 を含む NSD 因子の欠損下では、exosome が活性化されず nonstop-*HIS3* mRNA は分解を免れるため、His3 タンパク質の合成量が向上し、ヒスチジン欠乏寒天培地上でも生育が可能となる (van Hoof A *et al.*, 2002) (図 3-2.)。

まず、本研究でデザインした nonstop-*HIS3* レポーター遺伝子が、報告のあった nonstop-*HIS3* 変異株 (van Hoof A *et al.*, 2002) 同様に、Ski7 活性評価に適しているかを検討するため、NSD 野生株 (BY4727、菌株参照) と Ski7 欠損株 (BY4727 *ski7::hphMX*) に、この nonstop-*HIS3* レポーター遺伝子を組み込み、ヒスチジン欠乏寒天培地上での生育を検証した。その結果、Ski7 欠損株でのみ生育が確認された。これにより本アッセイ系を既存の様々な遺伝背景の酵母株に組み込み、ヒスチジン欠乏培地での生育性により NSD 活性を判定できることが明らかになった (図 3-2.)。

本研究では、この nonstop-*HIS3* レポーター遺伝子用い、Ski7 の活性評価を行った。以後、nonstop-*HIS3* レポーター遺伝子を組み込んだアッセイ株について、NSD 野生型の場合は、NSD-WT、また、Ski7 欠損を持つ場合は NSD-*ski7Δ* のように表記する。

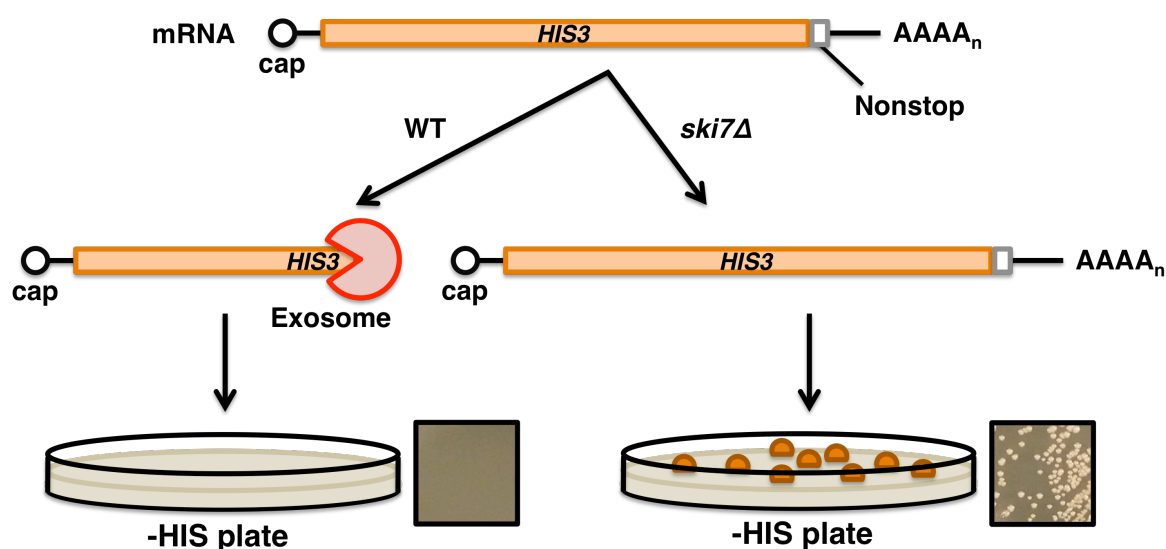


図 3-2. Nonstop-*HIS3* レポーター遺伝子による Ski7 評価アッセイ株の概要。Nonstop-*HIS3* mRNA は、NSD によって分解の対象となるため、野生株では exosome によって分解され His3 が合成されない。一方、Ski7 欠損株では exosome が活性化させないために nonstop-*HIS3* mRNA は分解されずに His3 が合成されるため、ヒスチジン欠乏寒天培地上にて生育が確認される。下部の写真は、野生株および Ski7 欠損株での生育の様子を示している。

3-2. 既知の Ski7 の機能領域

これまでの報告では、Ski7 の N 末端領域のみで NSD に機能すると報告されている (van Hoof A *et al.*, 2002)、最初に、N 末端領域および C 末端領域の欠失体の発現系の構築を行い、この先行研究による結果の再現性を検証した。

Ski7 の全長 (Ski7⁺)、N 末端領域 (1-264: Ski7 ΔC)、C 末端領域 (265-747: Ski7 ΔN) を、シングルコピーベクター上で発現するプラスミドを構築し、NSD-*ski7Δ* を用いて形質転換した株により Ski7 欠失表現型 (*ski7Δ*) の相補性を確認した。飽和培養液の 5 倍希釈ごとにスポットするアッセイによって生育性を評価したところ、Ski7 欠損株が示す NSD 阻害によるヒスチジン欠乏培地上での生育 (vector) は、野生型の Ski7 の導入により NSD が復帰するため相補され、生

育が著しく低下する。次に、N 末端領域 (1-264: Ski7 ΔC)、C 末端領域 (265-747: Ski7 ΔN) の発現プラスミドの導入によりそれぞれの NSD の相補性を確認した。その結果、先行研究の結果同様、N 末端領域 (Ski7 ΔC) の発現では十分な相補が確認できたものの、C 末端領域 (Ski7 ΔN) の発現では全く相補相補がみられなかった (図 3-3.)。

図 3-3.に示した実験結果において、Ski7 全長に比べて、N 末端領域のみの場合は若干の生育が認められた。これは、先行研究の細胞内 mRNA 半減期測定の結果から推定された、NSD における Ski7 の C 末端領域の関与の可能性を示唆する考察とも符合する (van Hoof A *et al.*, 2002)。しかしながら、大幅なタンパク質領域の欠損は、タンパク質の様々な性質に大きく影響するために、いずれのアッセイにおいても、このことが C 末端ドメインの積極的な関与を示唆するものとは言えない。

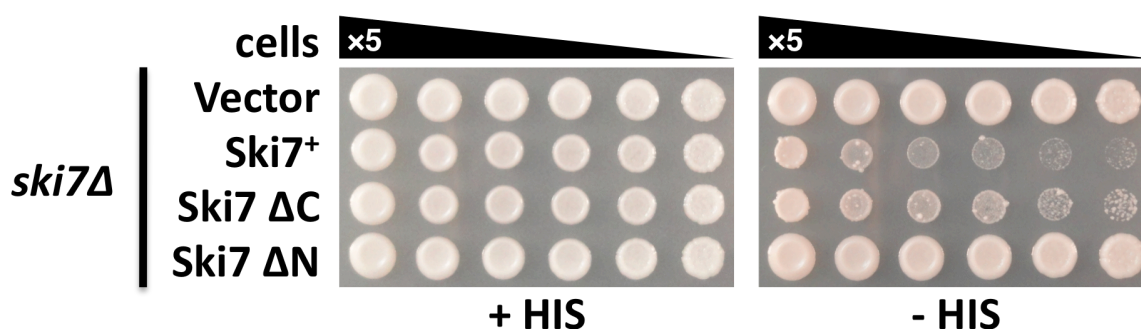


図 3-3. Ski7 の機能性領域。NSD- *ski7Δ*において、Ski7 全長、N 末端領域 (1-264: Ski7 ΔC)、C 末端領域 (265-747: Ski7 ΔN) をシングルコピーベクターからそれぞれ発現させ、飽和培養液の 5 倍希釈ごとにスポットし 30°C で 4 日間静置培養した。なお、寒天培地はベクターの選択マーカーであるトリプトファンおよびヒスチジンの欠乏培地を使用した。

3-3. Ski7 の N 末端領域における機能性アミノ酸残基の探索

これまで Ski7 の NSD 活性に関してはタンパク質機能ドメインに関する情報を与えるような点変異などの分離は報告されておらず、前節でも述べたように、NSD における Ski7 の機能性は、N 末端領域と C 末端領域に関して大まかな検証しかされていなかった。そのため、本研究では、Ski7 の活性に影響を与える 1 アミノ酸置換を伴う *SKI7* 遺伝子の点変異の探索を試みた。

背景 (1-2.) でも述べたように、Ski7 タンパク質は EF-1 α ホモログタンパク質に属し、EF-1 α 、eRF3、Hbs1 は GTPase ドメインのある C 末端領域が主要な機能性領域である。しかし、これまでの報告から、NSD での Ski7 の主要な機能は N 末端領域に集約していることが推定される。そこで、N 末端領域のうちどのアミノ酸残基がその機能性に深く関わるかを、相同タンパク質間でのアミノ酸配列保存性を指標に探索することにした。

Ski7 の N 末端領域のみのアミノ酸配列データを用いて、登録されている全てのタンパク質のアミノ酸配列に対して BLASTP 検索をしたところ、20 アミノ酸程度の保存領域 (ENFxxPSPDDIIxxAQxxAF) の存在が明らかになった(図 3-4.)。これらの主要なものは Ski7 のホモログをコードしている遺伝子の対応部位の相同領域として見出され、生物種としては、*Kazachstania africana*、*Kluyveromyces lactis*、*Meyerozyma guilliermondii*、*Naumovozya castelli*、*Tetrapisispora phaffii*、*Torulasporea delbrueckii*、*Zygosaccharomyces rouxii*、*Yarrowia lipolytica*、*Lachancea thermotolerans*、*Debaryomyces hansenii* および *Candida glabrata* のような出芽酵母近縁種などに加えて、やや遠縁の分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* においても確認され子囊菌門 (*Ascomycota*) に比較的広く保存されていることが判明した (図 3-4.)。最近、本研究と同様な手法による報告で、この領域は Ski7 特有の保存領域・モチーフ S3 として提唱された (Marshall AN *et al.*, 2013) が、この領域の機能性に関する検証はなく、明確な役割は分かっていない。

<i>S. cerevisiae</i>	196	PKTT--RKVAIENFNRPSPDDIIQSAQLNAF-----NE-----KLEN	230
<i>S. arboricola</i>	189	PKTS--RDKAIENFSNPSDDVIESAQLNAF-----NE-----NLAN	223
<i>T. phaffii</i>	340	NKTV--KQKVIENFNKPSDDIILTAQKNAF-----NQ-----VQEN	376
<i>C. glabrata</i>	198	NKSA--RKKSIEGFHKPSDDIVLAAQEQVF-----QA-----VTEN	232
<i>K. africana</i>	222	PRSK--KNKIAENFKKPSDDIILMAQEKAF--DEIND-----KVSK	259
<i>N. castellii</i>	196	PSNK--KTKIRENFGEPSDDIILNAQLLAF-----ND-----VHEK	230
<i>Z. rouxii</i>	86	SEAA--KTKAVENFKKPSDDVVLEAQSRL-----DN-----VTEN	120
<i>T. delbrueckii</i>	203	VKAT--QQSA-ANFKKPSDDIILNAQASVF-----NE-----VKDK	236
<i>K. lactis</i>	5	AAES--AKASAKSFAGPSDDIVLAKQQQAK-IGALTS-----NLGN	43
<i>Y. lipolytica</i>	198	SPQK--ISKAQSNFEGSPDDTILNAQKQAF-----QG-----DFEN	232
<i>M. guilliermondii</i>	291	NRVV--KKQAIANFSKPSDDVVINQKAAFEVDKIKE-----KVAD	331
<i>L. thermotolerans</i>	87	KTEA--KKQAVSNFQKSPDDVVLEAQQKAF-----EDVEKTTKGVEN	127
<i>D. hansenii</i>	84	TNNT--TKKVSNFDEPSPDDEIINAQKNAF-----EK-----NMGS	118
<i>S. pombe</i>	72	PSTSNAQKTAAESFSKLSQDQLLSLQLNNV-----QE-----SVFQ	108
<i>S. pombe</i>	195	EIHL--SKSSLLGFNAPSPDDIVLMAQSKSK-----SF-----QKHKR	230

図3-4. Ski7のN末端領域内に見られるアミノ酸保存領域。最上部の青字の配列は出芽酵母のSki7、その下に相同性の高い領域をもつタンパク質を列挙した。赤字で示されたアミノ酸は出芽酵母のSki7と同一の配列を示している。

3-4. Ski7のN末端保存アミノ酸残基のアラニンスキャニング変異体の機能解析

Ski7のN末端領域内のモチーフS3は、その保存性からSki7に関わる特定の機能性に深く関与する可能性が高く、その一つとしてNSD機能性が容易に推定される。そこで、特に保存されているアミノ酸残基やその近接した電荷を帯びたアミノ酸残基を一律にアラニン残基に置換するアラニンスキャニング法を用いて機能性を検証した。

Ski7のモチーフS3領域内および周辺で15アミノ酸残基（Lys¹⁹⁷、Arg²⁰⁰、Lys²⁰¹、Glu²⁰⁵、Asn²⁰⁶、Phe²⁰⁷、Arg²⁰⁹、Pro²¹⁰、Ser²¹¹、Pro²¹²、Asp²¹³、Asp²¹⁴、Gln²²⁰、Phe²²⁴、Glu²²⁹）をそれぞれアラニンに置換した変異体を作製し、NSD-*ski7Δ*においてシングルコピーベクターから各変異体を発現させたところ、Phe²⁰⁷をアラニンに置換した変異体（F207A変異体）においてSki7の機能低下を示す、顕著な生育が認められた（図3-5. B）。

Ski7はnonstop mRNAを認識して分解を促進する機能を有すると考えられているが、アラニンスキャニング法によって得られた変異体F207Aの影響は出芽酵母の生育のみを評価の指標としているため、His3タンパク質の細胞内量によって引き起こされている可能性を排除することができない。そこで、F207A変異体がnonstop-*HIS3* mRNAの分解に関与する機能が阻害された変異体であるのかどうかを定量PCRによって検証した。その結果、NSD-*ski7Δ*にF207A変異体を

発現させると、野生型 Ski7 を発現させたときに比較して、わずかではあるが Nonstop-*HIS3* mRNA の細胞内量が増加していることが明らかとなった (図 3-5. C)。

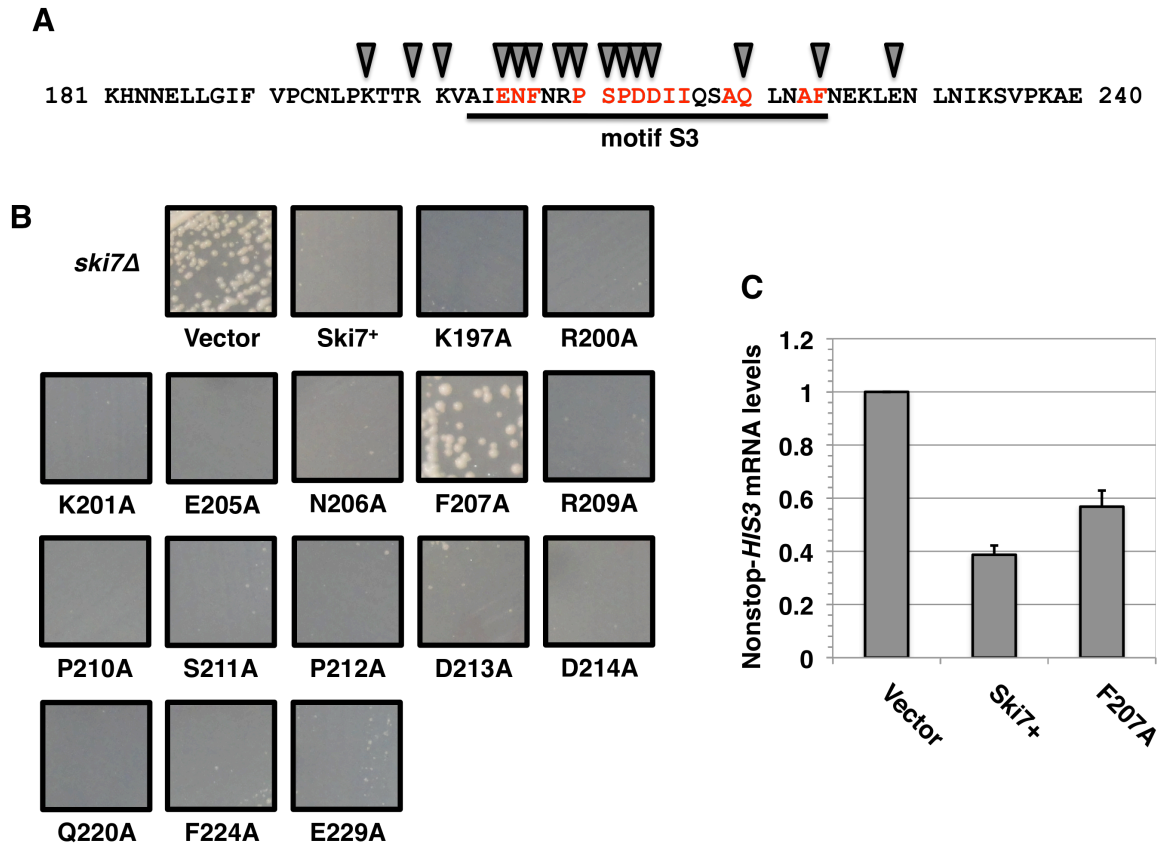


図 3-5. Ski7 の N 末端保存領域内における機能性アミノ酸残基探索。(A) Ski7 のモチーフ S3 周辺のアミノ酸配列。赤字は特に保存性が高いアミノ酸を示し、アラニンスキャニング法を行ったアミノ酸は下向きの黒矢印 (▼) を上部に記した。(B) NSD-*ski7Δ* において、各アラニン置換変異体をシングルコピーベクターからそれぞれ発現させ、30°C で 7 日間静置培養した。なお、寒天培地はベクターの選択マーカーであるウラシルおよびヒスチジンの欠乏培地を使用した。(C) 定量 PCR を用いて定量した細胞内 nonstop-*HIS3* mRNA 量。NSD-*ski7Δ* において、野生型 Ski7 および F207A 変異体をシングルコピーベクターからそれぞれ発現させて培養後、抽出した mRNA を用いて定量 PCR を行った。その際、正規化を行うためのコントロール遺伝子として *ACT1* を用いた。

Ski7 には、本研究で見出した S3 を含めて他の 2 つの保存モチーフ S1、S2 が指摘されている (Marshall AN *et al.*, 2013)。そこで、S3 モチーフ同様の機能低下が他のモチーフでも見られるかを検証するために、S2 モチーフのなかで特に保存されているアミノ酸残基に関してアラニンス

キャンピング法にて機能性アミノ酸残基を探索した。

Ski7 のモチーフ S2 領域内で 3 アミノ酸残基 (Lys¹⁸⁰、Glu¹⁸⁵、Pro¹⁹²) をアラニンに置換した変異体を作製し、NSD-*ski7Δ* においてシングルコピーベクターから各変異体を発現させ生育を確認したが、機能低下が認められる変異体を分離することはできなかった (図 3-6. B)。

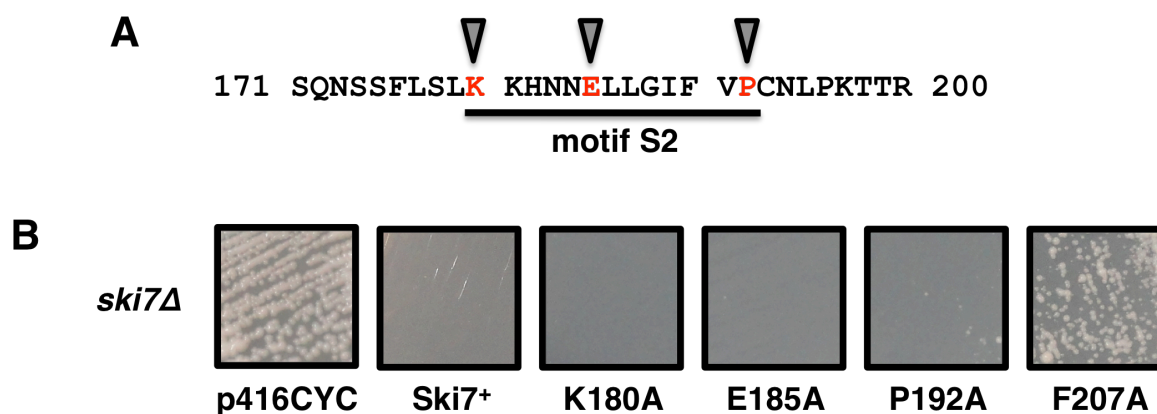


図 3-6. Ski7 の N 末端保存領域内における機能性アミノ酸残基。(A) Ski7 のモチーフ S2 周辺のアミノ酸配列。赤字は特に保存性が高いアミノ酸を示し、アラニンスキャンピング法を行ったアミノ酸は下向きの黒矢印 (▼) を上部に記した。(B) NSD-*ski7Δ* において、各アラニン置換変異体をシングルコピーベクターからそれぞれ発現させ、30°C で 7 日間静置培養した。なお、寒天培地はベクターの選択マーカーであるウラシルおよびヒスチジンの欠乏培地を使用した。右端の F207A 変異体は、ポジティブコントロールとして、同一条件で生育を観察したものである。

3-5. 機能性アミノ酸残基 Phe²⁰⁷ の重要性

Ski7 の N 末端領域内の Phe²⁰⁷ は NSD における機能性アミノ酸残基であることが明らかとなった。過去の研究において、Ski7 は N 末端領域のみ (SKI7 ΔC) でも NSD における機能性を発揮することが指摘されている (van Hoof A *et al.*, 2002)。そこで、N 末端領域のみ (SKI7 ΔC) の NSD 機能における Phe²⁰⁷ の役割を検証した。

これまでの相補実験同様、NSD-*ski7Δ* において、Ski7 の全長、F207A 変異体、N 末端領域のみ (SKI7 ΔC) およびその F207A 変異体 (F207A ΔC) をシングルコピーベクターから発現させ生育を観察した。すると、N 末端領域のみ (SKI7 ΔC) であっても、F207A 変異体では NSD における機能性が失われていることが示された (図 3-7.)。

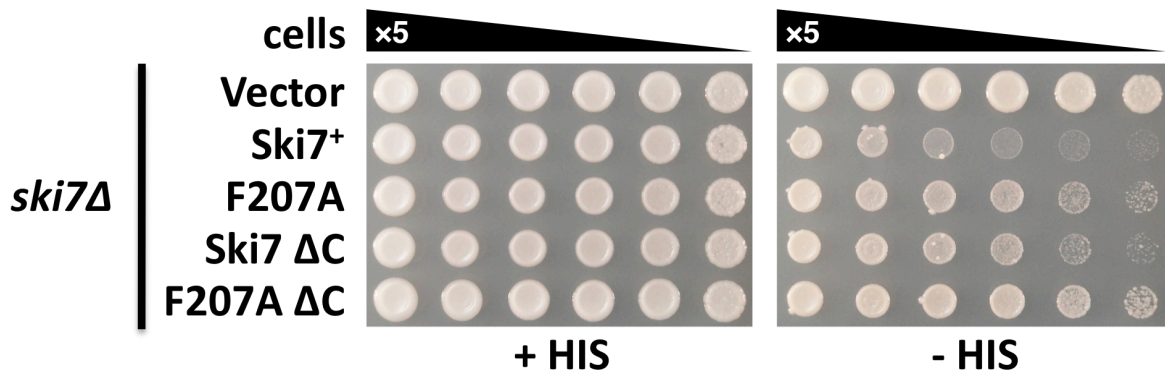


図 3-7. Ski7 の Phe²⁰⁷ の N 末端領域限定的な機能性。NSD-*ski7Δ*において、Ski7 全長、および Ski7 変異体をシングルコピーベクターからそれぞれ発現させ、飽和培養液の 5 倍希釈ごとにスポットし 30°C で 3 日間静置培養した。なお、寒天培地はベクターの選択マーカーであるトリプトファンおよびヒスチジンの欠乏培地を使用した。

3-6. 既知の EF-1 α ホモログタンパク質変異体と Ski7 の同一性の検証

NSD における主要な機能性領域である N 末端領域では、アラニンスキャニング法によって得られた機能欠損変異体は F207A のみであり、Ski7 の機能性に迫るための有用な情報を多くは得られなかった。そこで、C 末端領域の保存領域である機能未知の GTPase ドメインについて変異体の探索を行った。

前述のとおり、Ski7 では、他の翻訳型 G タンパク質にとって GTP 加水分解触媒活性に重要と指摘されているヒスチジン残基がセリン残基 (Ser³⁶⁰) に置換されている (図 3-8. A)。そこで、このセリン残基が酵母 Ski7 の NSD 活性において積極的な機能性を担っているかを検証するため、アラニン置換変異体 S360A、そして、ヒスチジン置換変異体 S360H を作製し、NSD-*ski7Δ*においてシングルコピーベクターから各変異体を発現させ生育を確認し、Ski7 変異体の機能性を検証した (図 3-8. B)。

また、解離因子 eRF3 において、EF-1 α (EF-Tu) の機能欠損変異体と同一の G ドメインモチーフ内のアミノ酸置換を導入することによって機能低下を引き起こすことが報告されている (Salas-Marco J and Bedwell DM., 2004)。なかでも、生育阻害を引き起こす eRF3 の K407E、R419G 変異体に相当するアミノ酸残基は Ski7 においても Lys⁴²⁸、Arg⁴³⁸ として保存されている。

ていること、そして保存モチーフ内から機能性アミノ酸残基 Phe²⁰⁷ を特定するに至った。しかし、nonstop-*HIS3* レポーター遺伝子を用いた検証では、Ski7 の C 末端領域の機能性を明確に示唆するデータを得ることはできなかった。そこで、これまでとは異なった種類の nonstop mRNA レポーター遺伝子を構築し、Ski7 の C 末端領域の機能性の有無を再検証することにした。

出芽酵母の遺伝学的検証においては *URA3* 遺伝子が両選択性のレポーター遺伝子としてよく用いられる。Ura3 はウラシル合成経路にて必須の酵素であり、本研究の *HIS3* 遺伝子同様にその欠損遺伝背景株で、発現と生育性との正の相関性のレポーターとして用いることができる。加えて、Ura3 は 5-FOA という化合物に対しても触媒活性を示し、最終代謝産物として 5'-fluoro-uridine monophosphate (5-FUMP) を合成する。5-FUMP はチミジル酸の合成を阻害するため、結果として酵母は致死となる。そのため、5-FOA 天下培地上では、Ura3 をより多く発現する細胞はより強く生育感受性を示すことになる。従って、発現と生育性との負の相関性のレポーターとして機能する。この負の相関性の性質を利用し、Ski7 の活性を詳しく検証することにした。

過去の知見では、Ski7 の全長と N 末端領域のみが発揮する活性は同一であると考えられている。しかし、仮に C 末端領域が関わっているとしたら、わずかではあるがその活性に差が生じるはずである。培地における 5-FOA 濃度に対して至適条件を見つければ、生育速度の差によって Ski7 の全長と N 末端領域の活性の差を見出すことができるかもしれないと考えた。そこで、nonstop-*HIS3* レポーター遺伝子と同様に、nonstop-*URA3* レポーター遺伝子を *HO* 遺伝子に組み込むことで Ski7 評価アッセイ系を確立した (図 3-9.)。また、このアッセイ株では、あらかじめ *URA3* 遺伝子が欠損した株を使用している。

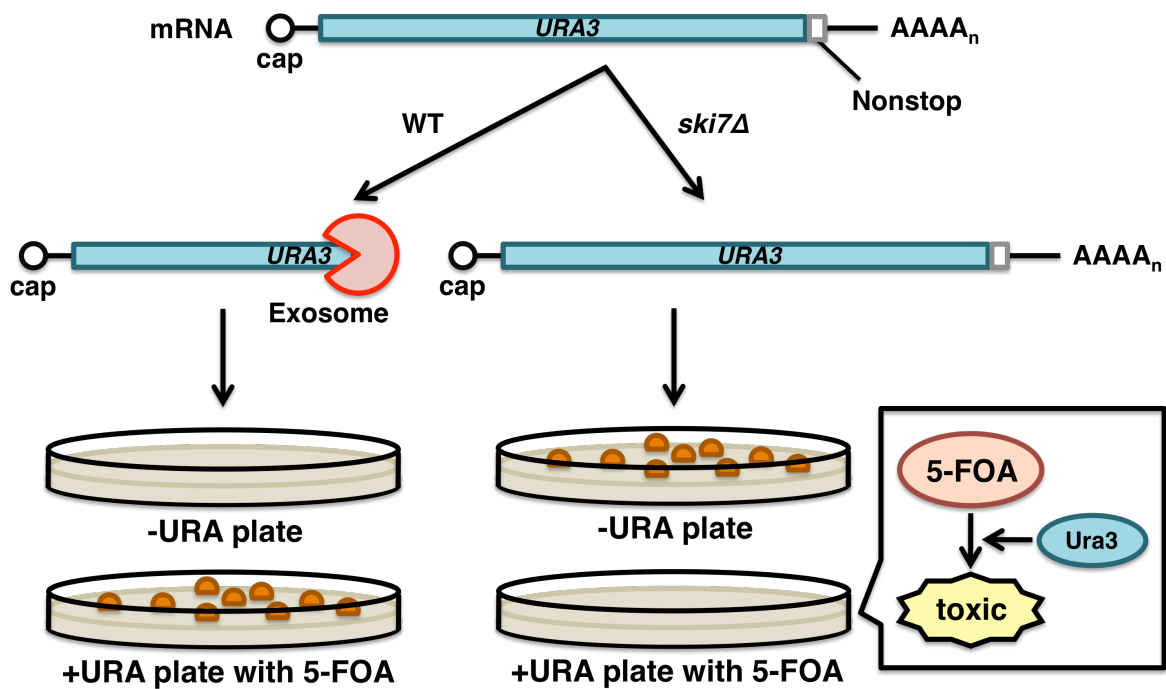


図 3-9. Nonstop-*URA3* レポーター遺伝子による Ski7 評価アッセイ株の概要。Nonstop-*URA3* mRNA は、野生株では NSD によって exosome による分解の対象となるが、Ski7 欠損株では exosome が活性化しないために分解されず、ウラシル欠乏寒天培地上にて生育が確認される。また、5-FOA 添加時には、5-FOA は *URA3* 遺伝子産物によって毒性を示す化合物へと変換されるため、野生株においてより生育性が向上する。

3-8. Ski7 における C 末端領域の機能性の再検証

新規に構築した Nonstop-*URA3* レポーター遺伝子による Ski7 の評価のため、5-FOA 濃度を段階的に設定し、NSD-*ski7Δ* (nonstop-*URA3*)において活性を評価した。0.05% 5-FOA 添加時には、Ski7 全長と N 末端領域のみを発現させたときに NSD が起きることが示され (図 3-10. A)、nonstop-*HIS3* レポーター株のときの結果と判定は一致する (図 3-3.)。しかし、より強い生育抑制条件である 0.1% 5-FOA 添加時には、Ski7 全長のみがかろうじて生育することが確認され、N 末端領域のみの発現時よりも全長の Ski7 を発現させた方がより強く NSD が起きていることが示唆された (図 3-10. A)。つまり、Ski7 の N 末端領域の機能性に若干ではあるが C 末端領域が寄与している可能性が考えられる。そこで、各領域の機能が独立した機能性を発揮するのかどうかを確かめるため、N 末端領域と C 末端領域を同時に発現させ、Ski7 全長と同程度の活性になるのかどうかを確かめた。別の言い方をすれば、0.1% 5-FOA の添加条件で Ski7 全長が生育可能とな

るプロモーターと同一のプロモーターから N 末端領域のみを発現させ、そこへさらに C 末端領域のみを共発現させることによって、ひとつのタンパク質のなかに各領域が存在する必要性を検証できるのではないかと考えた。

0.1% 5-FOA の添加時に、NSD-*ski7Δ* (nonstop-*URA3*)において、Ski7 全長で生育が確認できたプロモーター強度由来の Ski7 の N 末端領域と、そこに発現強度の異なるプロモーターから C 末端領域を同時に発現させ、生育を確認した。その結果、Ski7 の N 末端領域と C 末端領域を別々に細胞内で発現させても、Ski7 全長と同等の活性にはならず、Ski7 の C 末端領域が N 末端領域の活性に寄与している可能性が示唆された (図 3-10. B)。

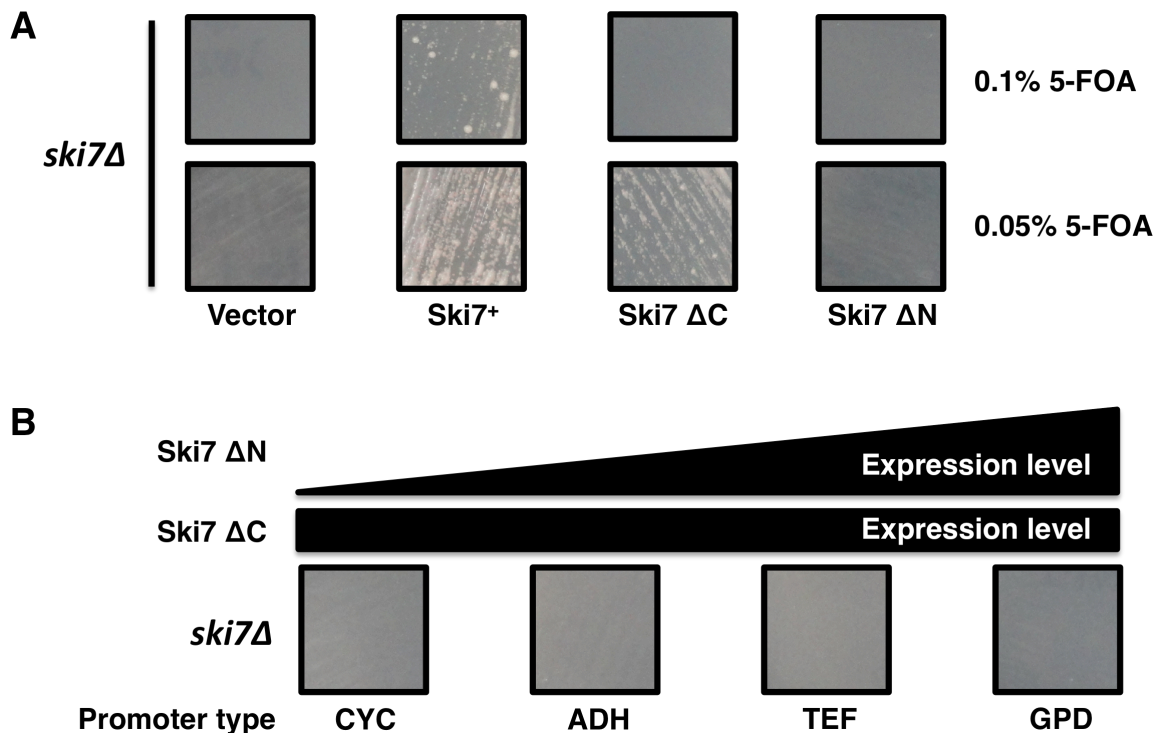


図 3-10. Nonstop-*URA3* レポーター遺伝子による Ski7 の NSD 活性評価。(A) 5-FOA 添加条件下 (0.1%および 0.05%) での Ski7 活性測定。NSD-*ski7Δ* (nonstop-*URA3*)において、Ski7 全長、N 末端領域 (1-264 : Ski7 ΔC)、C 末端領域 (265-747 : Ski7 ΔN) をシングルコピーベクターからそれぞれ発現させ、30°C で 7 日間静置培養した。(B) 5-FOA 添加条件下 (0.1%) において、Ski7 の N 末端領域を同一のプロモーターで発現させ、同時に C 末端領域を様々なプロモーター強度で発現させた。プレートは 30°C で 7 日間静置培養した。なお、寒天培地はベクターの選択マーカーであるトリプトファンとヒスチジンの欠乏培地を使用した。

3-9. Ski7 機能欠損変異体の分離のための戦略

前節までに Ski7 タンパク質に関して種間での保存アミノ酸配列領域への変異体を作製し、遺伝学的に Ski7 の活性評価および機能性アミノ酸残基の特定を行ったが、機能性の手がかりとなるような有用な Ski7 変異体を十分に得ることはできなかった。そこで、Phe²⁰⁷ 以外の機能性アミノ酸残基を探索するため、先述の nonstop-*HIS3* mRNA を発現する NSD レポーター株（以後、NSD-*ski7Δ*）を用いた Ski7 機能欠損変異体の遺伝学的分離を試みた。

最初の試みとして、図 3-11. に示すように、Ski7 発現ベクターを鋳型としてベクター配列部分に設計した DNA プライマーを用い、error-prone PCR 法によって無作為に変異を導入した *SKI7* 遺伝子領域を増幅した。また、同時に、制限酵素処理によって断片化させた空発現ベクターを調整した。その後、2 種類の DNA 断片を NSD-*ski7Δ* に同時に導入し、ベクター配列部分での相同性組換えにより環状の *URA3* マーカー選択性の Ski7 発現ベクターを再構成し、かつ Ski7 に機能欠損変異が導入されることでレポーターの nonstop-*HIS3* mRNA が NSD を引き起こさずヒスチジン非要求性になった株を、ヒスチジン、ウラシル欠乏培地で選択した。そして、これらの株から DNA を精製し、大腸菌の形質転換によりプラスミドを回収した。これらのプラスミドクローン上の *SKI7* 遺伝子配列を DNA シーケンサーで確認した（図 3-11.）。

取得された約 20 クローンのプラスミド上の *SKI7* 遺伝子のシーケンス解析を行ったところ、予想に反して変異が導入されていないものが多く存在した。これより、実験失敗の主な理由として以下のことを考察した。①組換えに使用したベクターが制限酵素処理されておらず、空ベクターがそのまま導入され形質転換体が生育した。②組換えに使用したベクターがセルフライゲーションによって環状化し、空ベクターを保持した形質転換体が生育した。③組み換わったベクターに変異が生じ、Ski7 が適切に発現しなかった。④使用するレポーター遺伝子が単純かつ単一であり、スクリーニング系に薬剤などが併用されていないため、復帰変異株が生じやすかった。

主な理由のうち、①と②に該当する *SKI7* 遺伝子が挿入されていないベクターによる影響を低減するため、スクリーニング系を改良することにした。

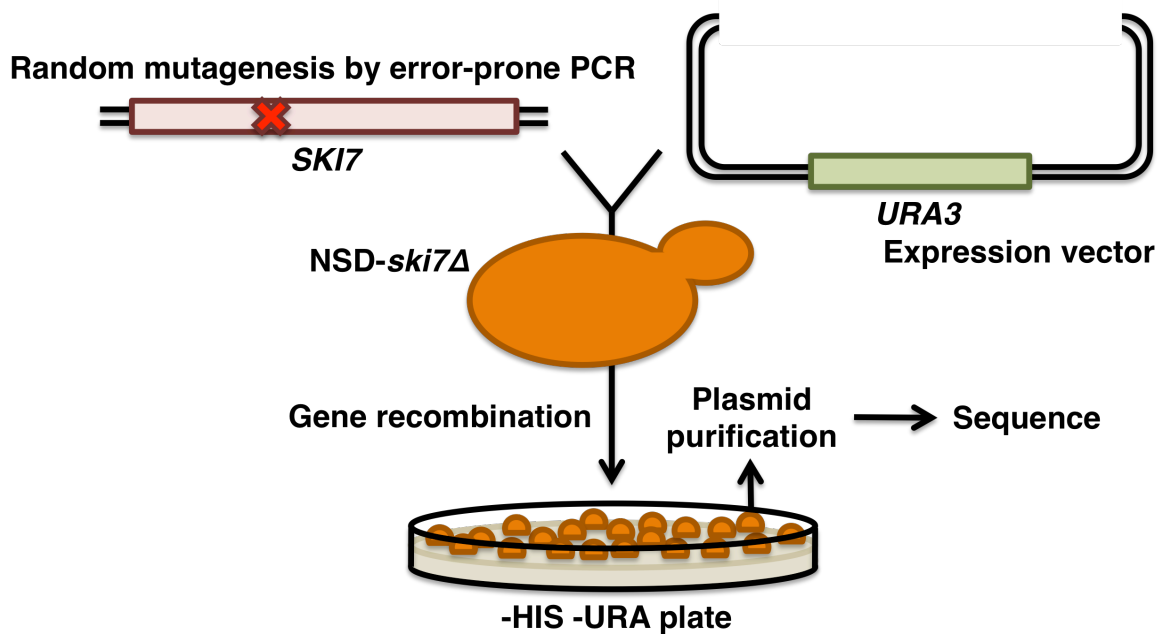


図 3-11. Ski7 機能欠損変異体分離のための戦略。無作為突然変異導入と発現ベクターを用いて出芽酵母による相同性組み換えを利用し、Ski7 機能欠損変異体を単離する（詳細は本文参照）。

これまでの変異体の活性の検証でもわかるように、NSD-*ski7Δ*において、発現ベクターのみを導入した場合が最も生育速度がよい。はじめに行ったスクリーニングでは、*URA3* 遺伝子をベクターの遺伝子マーカーとして用いているため、安定的に Ura3 が発現されれば、*SKI7* 遺伝子の組換えの有無に関わらず、Ski7 が発現していなくても生育してしまう。そこで、相同性組換えが生じたときのみ Ura3 が発現するように改良を試みることにした。

まず、*URA3* 遺伝子を遺伝子マーカーにもつ発現ベクターに *SKI7* 遺伝子を挿入する。この発現ベクターを鋳型として、*SKI7* 遺伝子から *URA3* 遺伝子の中間部位までの領域を error-prone PCR によって増幅させる。また、error-prone PCR で増幅させなかった、プロモーター部位から *URA3* 遺伝子の中間部位までの領域には、変異が生じないように校正機能の高いポリメラーゼを用いて増幅させる。その後、NSD-*ski7Δ*を用いて、2種類の DNA 断片を用いた相同性組換えを起こさせ、ヒスチジン、ウラシル欠損寒天培地で生育してきたコロニーからプラスミドを回収し *SKI7* 遺伝子の配列を確認することにした（図 3-12.）。

このスクリーニング系では、適切な部位で組換えが生じて Ura3 が発現されるようにならない限り NSD-*ski7Δ*が生育してくることはなく、ベクターに由来する偽陽性の可能性を排除できる

と考えられた。

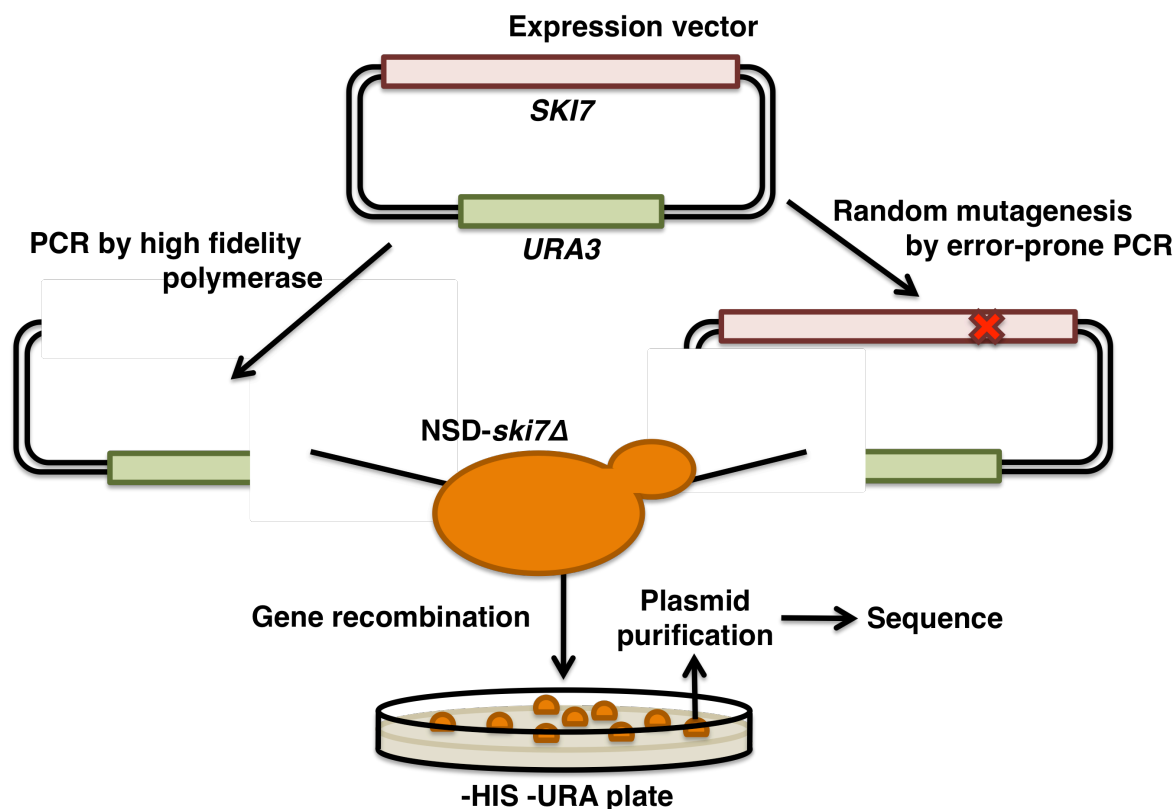


図 3-12. Ski7 機能欠損変異体分離のための新たな戦略。2 種類の異なった DNA 断片を用いて出芽酵母による相同性組み換えを利用し、Ski7 機能欠損変異体を単離する（詳細は本文参照）。

3-10. Ski7 機能欠損変異体の分離のためのスクリーニング

新たに構築した選択系を用いて、選択された独立の *NSD-ski7Δ* の株由来のプラスミド計 153 クローンのシーケンス解析を行った。すると、多くのクローンにおいて *SKI7* 遺伝子内に複数の変異が導入されていたが、それらの情報を総合すると変異部位に若干の偏りが確認された（図 3-13.）。また、その際の変異導入は *SKI7* 遺伝子の全体に一樣に確認され、変異導入効率は一定であることが推測された（図 3-13.）。そこで、得られたクローンが陽性であるかどうかを判断するため、精製したプラスミドを用いて再度 *NSD-ski7Δ* を形質転換し、Ski7 活性の低下を検証した。すると、再度の検証でも陽性であるクローンには、Ski7 の GTPase ドメイン内に変異が 1 つ以上導入されているものが多かった。

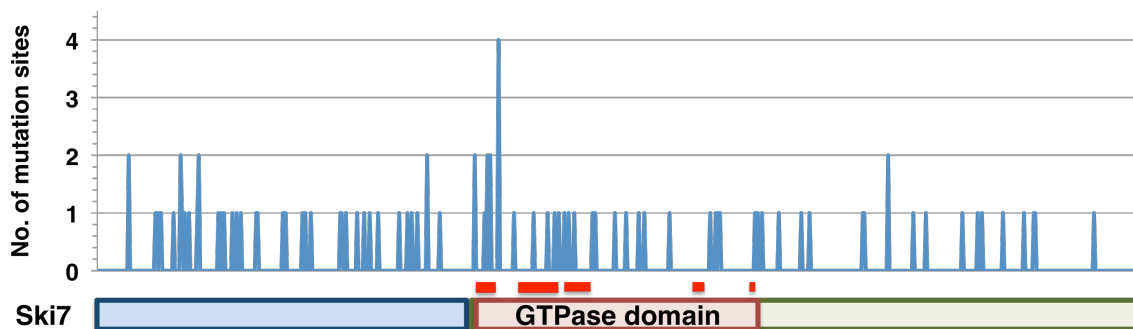


図 3-13. Ski7 機能欠損変異体のスクリーニング結果。Ski7 の概略図の上部にスクリーニングによって得られた変異の部位と個数を示した。Ski7 に関して、N 末端領域は青、C 末端領域は緑で示し、その中の GTPase ドメインは赤で示した。また、GTPase ドメインの上部に G1 から G5 領域までを赤いボックスで表記した。

以上の情報から、GTPase ドメイン内の変異について単独の Ski7 変異体を作製し、再度 NSD-*ski7Δ* を形質転換して、変異体が実際に機能欠損を引き起こすのかを確認した。その結果、複数の GTPase ドメインの中に生じた変異によって、NSD-*ski7Δ* の生育の向上が確認された (図 3-14.、3-15. A)。シーケンス解析結果から推測される偽陽性率の高さと、単独の変異体作製の手間を考慮し、これ以上のクローン分離実験を行わず、以後分離されたクローンの詳細な解析を行うこととした。ただし、同一の変異部位をもつクローンが複数のものに関しては、すべて機能欠損の検証を行った (データ未記載)。

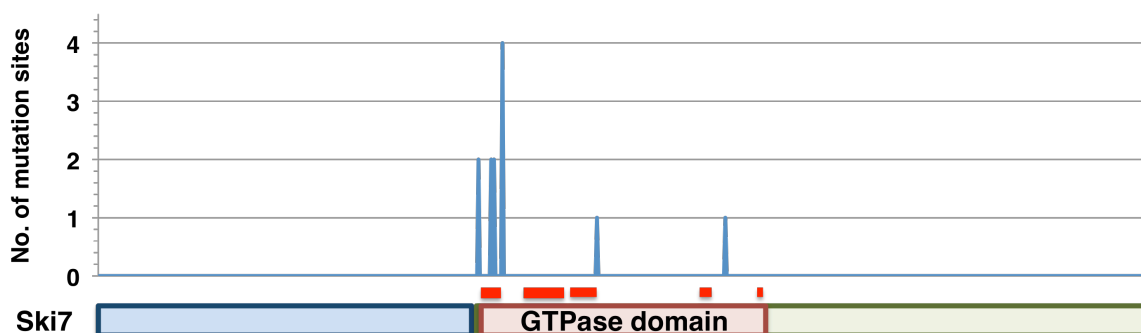


図 3-14. Ski7 機能欠損変異体の再スクリーニング結果。Ski7 の概略図の上部にスクリーニングによって得られた変異の部位と個数を示した。Ski7 に関して、N 末端領域は青、C 末端領域は緑で示し、その中の GTPase ドメインは赤で示した。また、GTPase ドメインの上部に G1 から G5 領域までを赤いボックスで表記した。

3-11. Ski7 機能欠損変異体の個別解析

前節で述べたように、遺伝学的選択により最終的に Ski7 機能欠損変異体として、C270R、G279D、S281F、S281P、L287P、L354R、E445G の 7 つが分離された。変異はいずれも GTPase ドメインの保存モチーフ周辺に集中していた。そこで、G1 ドメインに着目し、過去の eRF3 などの変異体の情報などを参考にいくつか追加の変異体を作製したところ、L284P も同様に機能欠損変異体であった。これにより、L284P を含めて 8 つの機能欠損変異体を単離に成功した。

Nonstop-*HIS3* レポーター株である NSD-*ski7*Δにおいて、Ski7 の全長、および分離した 8 つの変異体をシングルコピーベクターから発現させヒスチジン欠乏培地上での生育をスポットアッセイにより確認すると、野生型 Ski7 と比較して、8 つの変異体では生育が向上することが確認された (図 3-15.)。

しかし、F207A 変異体のときと同様に、分離された変異体の影響は nonstop-*HIS3* mRNA の細胞内量には依存せず、His3 タンパク質の細胞内量によって引き起こされている可能性を排除することができない。そこで、8 つの Ski7 変異体が nonstop-*HIS3* mRNA の分解に関与する機能が阻害された変異体であるのかどうかを定量 PCR によって検証した。その結果、NSD-*ski7*Δに 8 つの変異体を発現させると、野生型 Ski7 を発現させたときに比較して、nonstop-*HIS3* mRNA の細胞内量が増加していることが明らかとなった (図 3-15. B)。

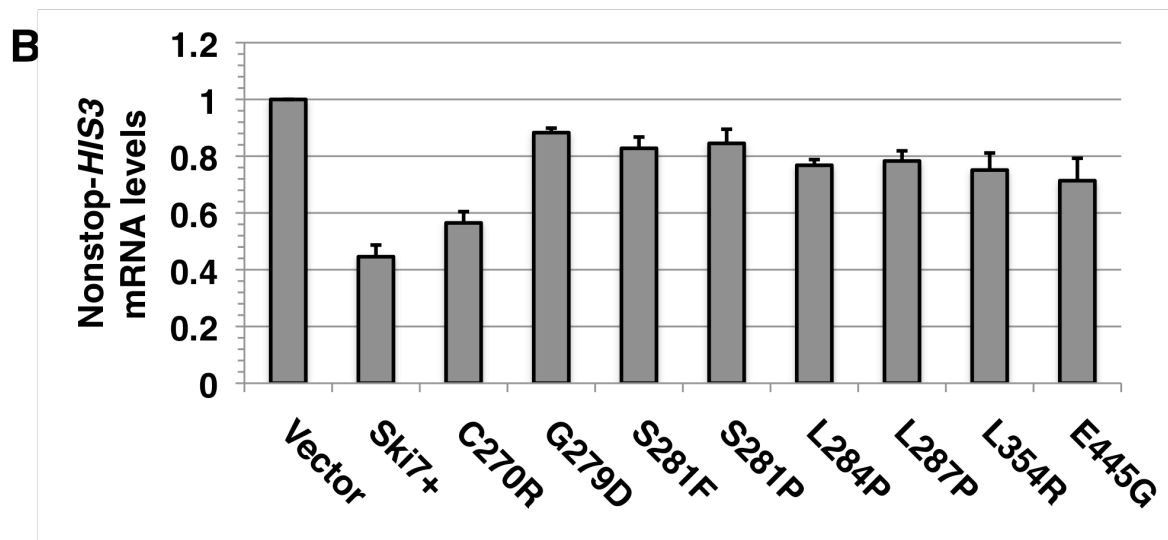
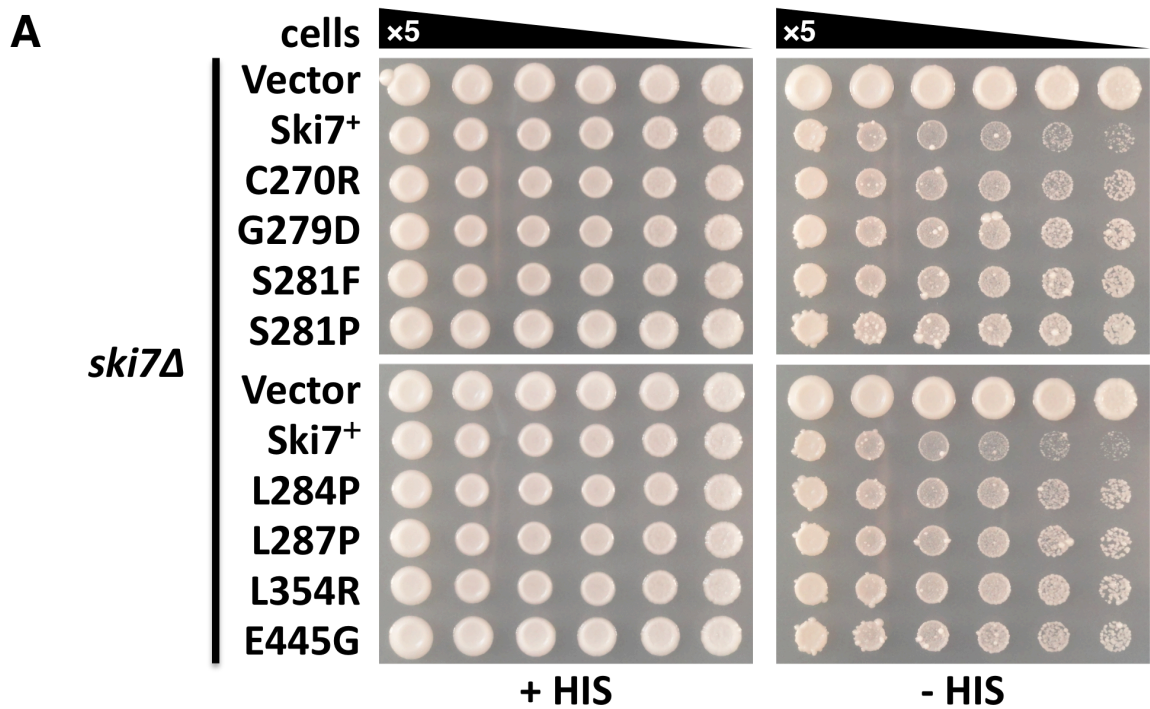


図 3-15. 分離された Ski7 変異体の活性。(A) NSD-*ski7Δ*において、野生型 Ski7 および Ski7 変異体をシングルコピーベクターからそれぞれ発現させ、飽和培養液の 5 倍希釈ごとにスポットし 30°C で 4 日間静置培養した。なお、寒天培地はベクターの選択マーカーであるトリプトファンおよびヒスチジンの欠乏培地を使用した。(B) 定量 PCR を用いて定量した細胞内 nonstop-*HIS3* mRNA 量。NSD-*ski7Δ*において、野生型 Ski7 および Ski7 変異体をシングルコピーベクターからそれぞれ発現させて培養後、抽出した mRNA を用いて定量 PCR を行った。その際、正規化を行うためのコントロール遺伝子として *ACT1* を用いた。

3-12. 新たに得られた Ski7 の C 末端領域の機能欠損変異と N 末端領域変異

これまで、Ski7 の N 末端領域の機能性アミノ酸残基のひとつとして、Phe²⁰⁷ を同定した (図

3-5. B)。しかし、網羅的機能欠損変異体の分離では、N 末端領域内でのさらなる機能欠損変異を見出すことはできなかった。これは、N 末端領域では 1 カ所のみの点変異で活性が低下する変異体がほとんどないことを意味しているのかもしれない。

一方、それとは対照的に、C 末端領域の GTPase ドメイン内に多くの機能性アミノ酸残基を特定することができた (図 3-14.、3-15.)。もし、N 末端領域の機能性に C 末端領域の GTPase ドメインが独立的に関与しているのであれば、2 重変異体ではその NSD への影響が増強されるはずである。GTPase ドメイン内の変異のなかで、Ser²⁸¹ に関しては S281F と S281P の複数の変異体が得られ、GTP 結合部位の最も近傍にある。そこで、F207A と S281P の 2 重変異体で NSD への影響を評価した。

NSD-*ski7Δ* において、Ski7 の全長、F207A 変異体、S281P 変異体および、F207A と S281P との 2 重変異体をシングルコピーベクターから発現させ生育を確認した。その結果、単独の変異体での生育と比較して、F207A と S281P との 2 重変異体ではわずかではあるが生育速度が上昇し、相乗的な Ski7 の NSD 活性の低下が示された (図 3-16.)。

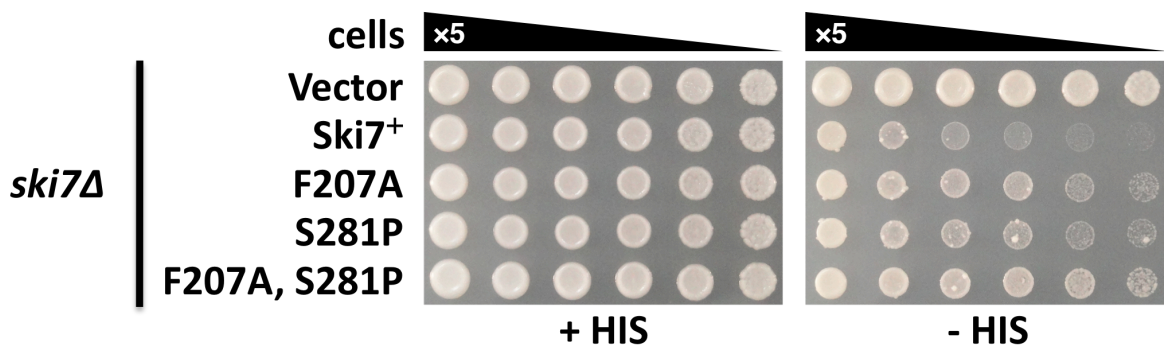


図 3-16. Ski7 機能欠損 2 重変異体の活性。NSD-*ski7Δ* において、野生型 Ski7、および Ski7 変異体をシングルコピーベクターからそれぞれ発現させ、飽和培養液の 5 倍希釈ごとにスポットし 30°C で 3 日間静置培養した。なお、寒天培地はベクターの選択マーカーであるトリプトファンおよびヒスチジンの欠乏培地を使用した。

3-13. Ski7 構造上における機能性アミノ酸残基の部位

Ski7 機能欠損変異体として得られた C270R、G279D、S281F/P、L284P、L287P、L354R、

E445Gの変異部位を他のEF-1 α ホモログタンパク質とのアライメント上に図示した(図3-17.)。

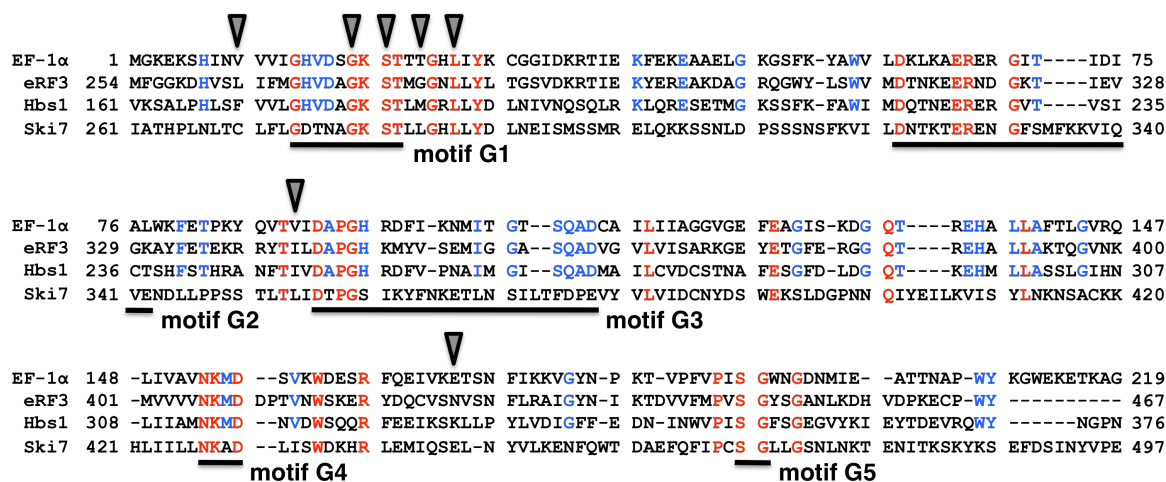


図 3-17. 出芽酵母における EF-1 α ホモログタンパク質のアライメント上にマッピングした Ski7 機能欠損変異体の変異部位。赤字は全てのタンパク質で保存されているアミノ酸配列、青字は Ski7 以外のタンパク質で保存されているアミノ酸配列をそれぞれ示している。配列上部の下向きの黒矢印 (▼) は、Ski7 機能欠損変異体によるアミノ酸置換部位を表している。

前述の通り、G1 ドメイン周辺に多くの変異部位が見られる。スクリーニングから得られた変異部位の偏りと、GTP 結合には G1、G2 ドメインが大きく関与するという過去の EF-1 α や EF-Tu の知見から総合的に判断して、これらの変異部位は GTP 結合部位特異的である可能性が示唆される。

本論の背景 (1-3-2.) でも触れたように、GTPase ドメインはアミノ酸配列と立体配置が高度に保存されているため (図 1-7.)、Ski7 の変異部位情報を他の EF-1 α ホモログタンパク質の構造上へマッピングすることが可能であると考えられる。幸運なことに、古細菌の EF-1 α の結晶構造は GTP 結合モードで解かれていたために、この結晶構造に対して得られた Ski7 変異部位情報のマッピングを行うことで新たな情報を得ようとしてきた (図 3-18. A および 図 3-19. A)。しかし、つい最近になって出芽酵母の Ski7 の C 末端領域の結晶構造が解かれ、その立体配置の全貌が明らかとなった。そこで、古細菌の EF-1 α の結晶構造に加えて出芽酵母の Ski7 にも変異部位情報をマッピングし、これまで行ってきた検証の妥当性を確認すると同時に、Ski7 構造情報へのマッ

ピングを行った (図 3-18. B および 図 3-19. B)。

aEF-1 α および Ski7 の構造上に SKI7 変異体の変異部位をマッピングした結果、Cys²⁷⁰、Gly²⁷⁹、Ser²⁸¹、Leu²⁸⁴、Leu²⁸⁷、Leu³⁵⁴ は GTP 結合部位の近傍に集中していることが分かった。とりわけ、Gly²⁷⁹、Ser²⁸¹ は、GTP や Mg²⁺ の結合部位に最も近接していた (図 3-18. A と B)。

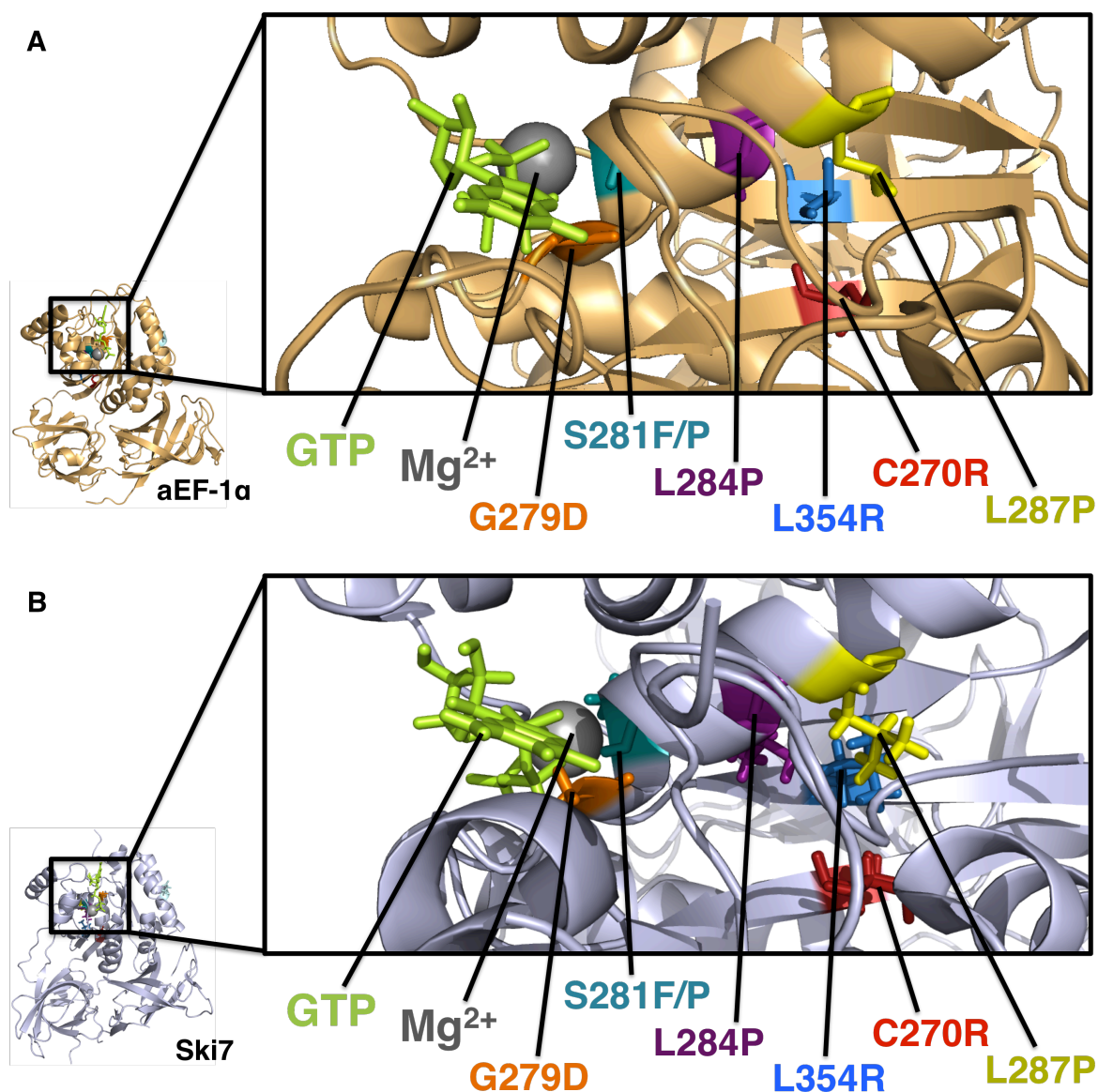


図 3-18. aEF-1 α および Ski7 の構造上にマッピングした Ski7 機能欠損変異体の変異部位。(A) 左に aEF-1 α の構造を示し、右に GTPase ドメイン部位を拡大した図を表示した。(B) 左に Ski7 の構造を示し、右に GTPase ドメイン部位を拡大した図を表示した。(A) (B) ともに、GTP は緑、Mg²⁺ は灰色で示し、SKI7 の各変異部位はそれぞれ色づけし、下に変異部位のアミノ酸番号を表記している。

その一方で、Glu⁴⁴⁵ は、最も外側の α -ヘリックス構造の中にあることがわかり、GTP 結合との直接的な影響はなさそうな部位に変異が導入されていることが明らかになった (図 3-19. A と B)。これら変異体の性質については、後の考察にて議論する。

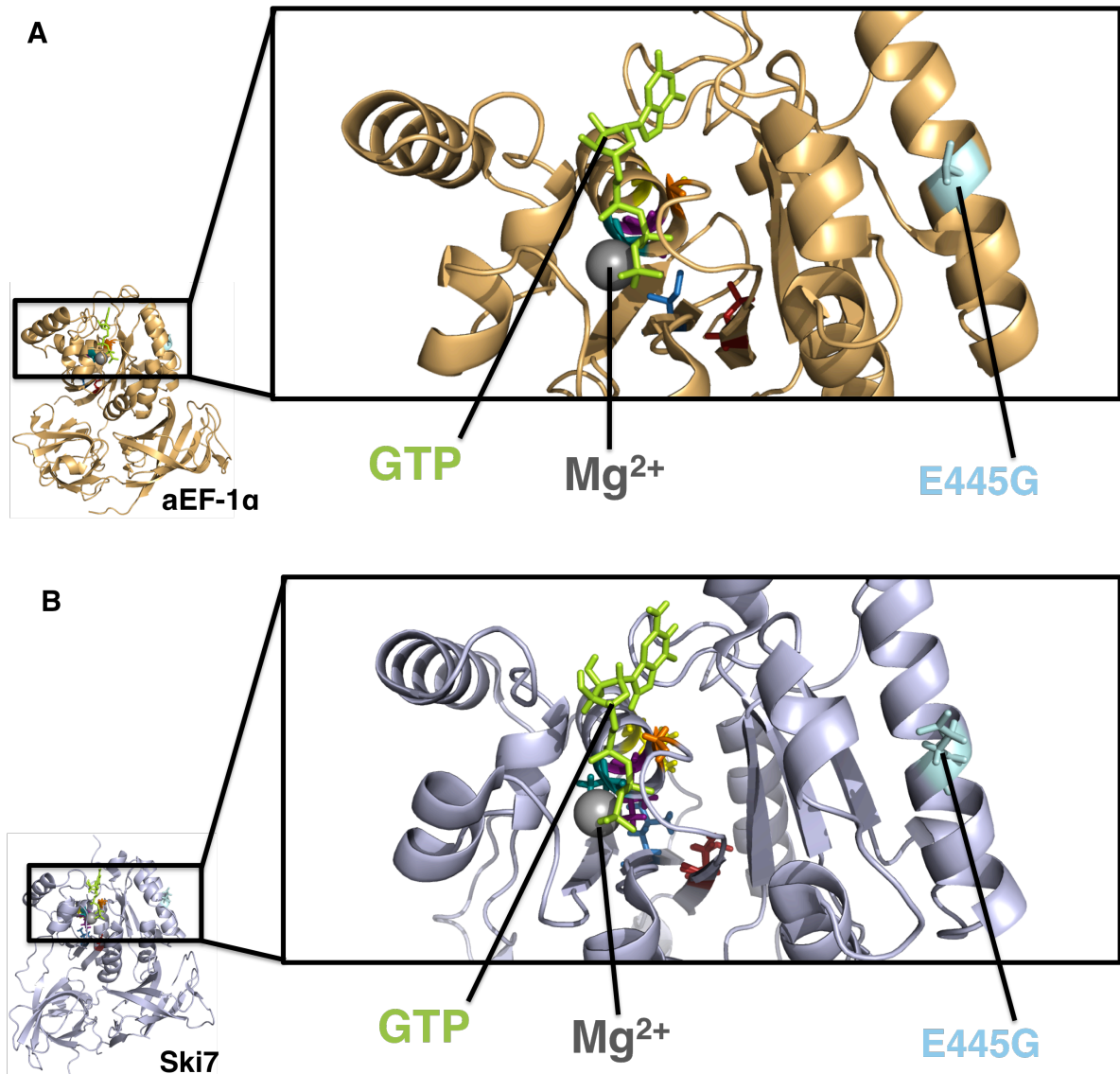


図 3-19. aEF-1 α および Ski7 の構造上にマッピングした Glu⁴⁴⁵ の変異部位。(A) 左に aEF-1 α の構造を示し、右に GTPase ドメイン部位を拡大した図を表示した。(B) 左に Ski7 の構造を示し、右に GTPase ドメイン部位を拡大した図を表示した。(A) (B) ともに、GTP は緑、Mg²⁺ は灰色で示し、下に色づけした変異部位のアミノ酸番号を表記している。

3-14. Ski7 機能欠損変異体におけるドミナントネガティブ効果

タンパク質が多量体などの複合体の一部として機能するとき、変異タンパク質が複合体を形成すると、その多量体全体の機能が失われるなどの性質を示すことが知られており、このような、野生型のタンパク質の機能を阻害するような性質を示す変異体はドミナントネガティブ変異体と呼ばれている。

分離した 8 つの Ski7 機能欠損変異体の GTPase ドメインの機能に対して、特定の機能のみが失われている場合、リボソームとの結合、もしくは exosome や ski complex との結合の際にドミナントネガティブな影響（以下、ドミナントネガティブ効果）を引き起こす可能性が考えられる。特に、EF-Tu において、一部の变異体ではリボソームの A サイト内で機能不全を引き起こし、翻訳過程を阻害することによってドミナントネガティブ効果を発揮することが知られている。そこで、過去の知見を踏まえて、内在性の Ski7 存在下にて、Ski7 変異体が NSD の促進にドミナントネガティブ効果を与えるかどうか検証した。

NSD-WT において、Ski7 の全長、および単離した 8 つの変異体をシングルコピーベクターから発現させ生育を確認すると、復帰変異の影響によって生育の違いを区別しにくい、野生型 Ski7 と比較して、C270R 以外の変異体では、ドミナントネガティブ効果を示す、わずかな生育の上昇が確認された（図 3-20. A）。確認されたドミナントネガティブ効果が、野生型 Ski7 と Ski7 変異体の発現量の差によって生じた可能性を検証するため、ウェスタンブロットイングによって Ski7 変異体の発現量を確認した（図 3-20. B）。その結果、野生型 Ski7 と Ski7 変異体の間に顕著な発現量の差は確認されなかったため、Ski7 変異体によるドミナントネガティブ効果は、単独のアミノ酸置換による変異によって引き起こされていることが強く示唆された。

ネガティブ効果は増強される可能性がある。そこで、前述の検証よりもより高発現に Ski7 変異体を発現させてドミナントネガティブ効果を確認した。

NSD-WT において、Ski7 の全長、遺伝学的に分離された Ski7 変異体、および作製した Ski7 変異体をマルチコピーベクターから発現させ生育を確認すると、Ski7 機能欠損変異体として単離した 8 つの変異体に加えて、新たに機能欠損の特徴を示さなかった L287D、E327G、D356N の変異体においてドミナントネガティブ効果が見られた (図 3-21.)。また、唯一ドミナントネガティブ効果が確認できなかった機能欠損変異体 C270R に関して、シングルコピーベクターでは影響は確認されなかったが、マルチコピーベクターから発現させることによってドミナントネガティブ効果が顕在化した (図 3-21.)。

変異体分離後の再確認では、L287D、E327G、D356N は機能欠損を示さなかったが (データ未記載)、細胞内に極めて過剰に発現されることでドミナントネガティブ効果を発揮する新たな変異体であることが分かった (図 3-21.)。

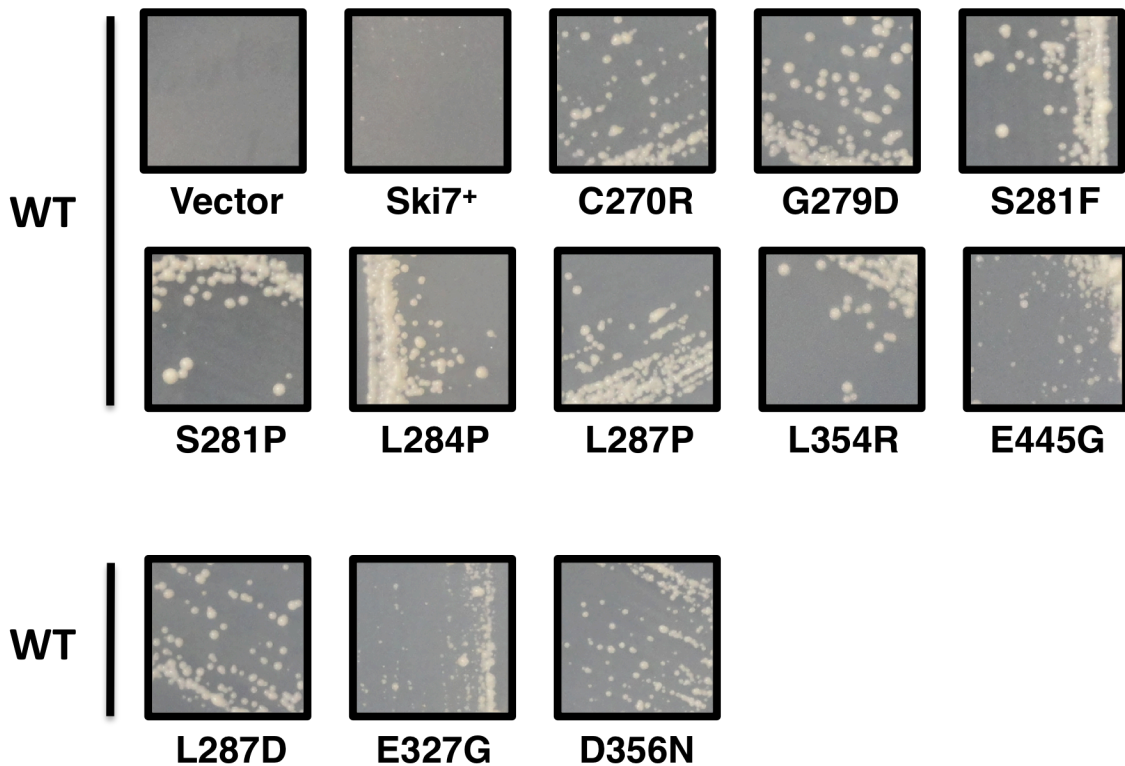


図 3-21. Ski7 変異体のドミナントネガティブ効果。NSD-WT において、野生型 Ski7、および Ski7 変異体をマルチコピーベクターからそれぞれ発現させ、30°C で 6 日間静置培養した。なお、寒天培地はベクターの選択マーカーであるトリプトファンおよびヒスチジンの欠乏培地を使用した。

3-16. Ski7 における Glu³²⁷ と Asp³⁵⁶ のドミナントネガティブ効果

Ski7 の変異体のなかには、ドミナントネガティブ効果のみを示す変異体 L287D、E327G、D356N があることがわかった。Leu²⁸⁷ に関しては、別のアミノ酸置換変異体である L287P では機能欠損変異体になることから、Leu²⁸⁷ が NSD において何らかの関与をしていることは間違いないと思われる。しかし、E327G と D356N はそれぞれ機能欠損の特徴を示さないため（データ未記載）、どのような特徴を持つのか興味深い。

EF-1 α ホモログタンパク質間のアライメント比較によると、Glu³²⁷ と Asp³⁵⁶ は、双方が高度に保存されているアミノ酸であることがわかった（図 3-22. A）。また、Ski7 構造へマッピングしてみると、多くの機能欠損変異体に見られるアミノ酸変異部位が GTP 結合部位の近傍に位置するのとは違って、Glu³²⁷ と Asp³⁵⁶ はどちらかと言えば Mg²⁺ の近傍に位置することが明らかとなった（図 3-22. B）。

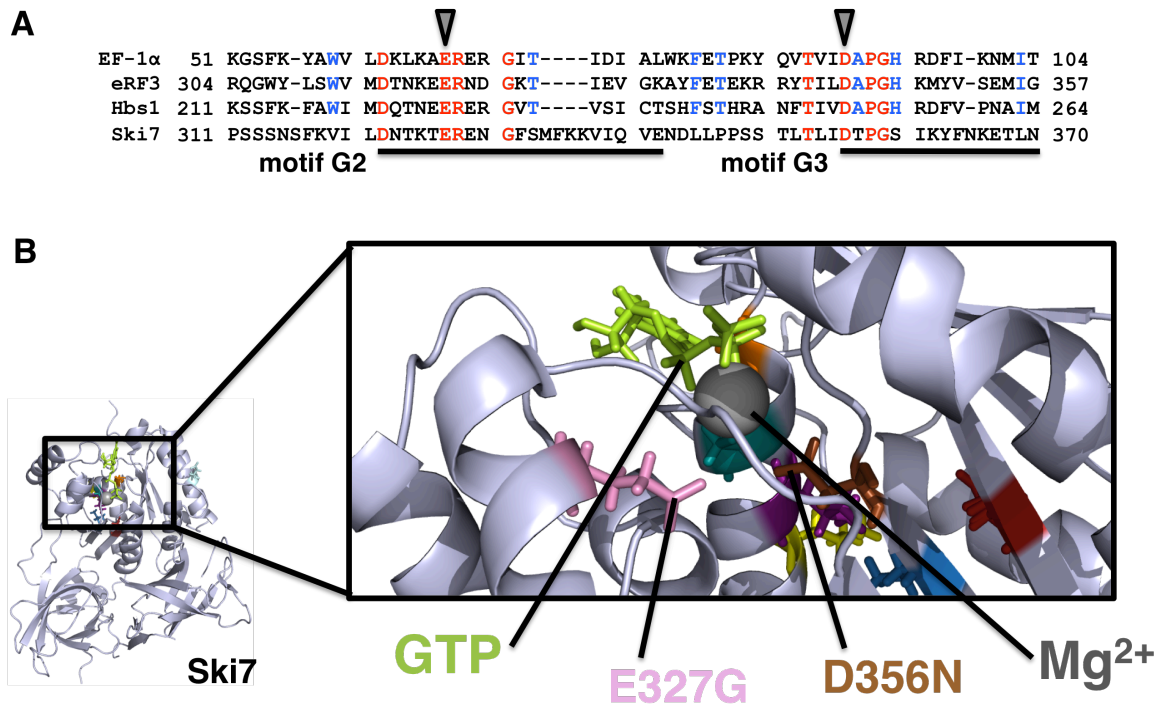


図 3-22. ドミナントネガティブ効果を示すアミノ酸残基 Glu³²⁷ と Asp³⁵⁶。(A) EF-1 α ホモログタンパク質のアライメント上にマッピングした Ski7 ドミナントネガティブ変異体の変異部位。赤字は全てのタンパク質で保存されているアミノ酸配列、青字は Ski7 以外のタンパク質で保存されているアミノ酸配列をそれぞれ示している。配列上部の下向きの黒矢印 (▼) は、Ski7 ドミナントネガティブ変異体によるアミノ酸置換部位を表している。(B) Ski7 の構造上へマッピングしたドミナントネガティブ変異体の変異部位。左に Ski7 の構造を示し、右に GTPase ドメイン部位を拡大した図を表示した。GTP は緑、Mg²⁺ は灰色で示し、下に色づけした変異部位のアミノ酸番号を表記している。

Glu³²⁷ と Asp³⁵⁶ が Ski7 の機能低下を引き起こす可能性を探るため、E327G と D356N の単独の変異ではなく、2 重変異体ではどのような特徴を示すのか確かめることにした。

NSD-WT において、Ski7 の全長、Ski7 変異体をマルチコピーベクターから発現させてドミナントネガティブ効果を確認すると、E327G では非常に弱いわずかな、D356N でははっきりとしたドミナントネガティブ効果が確認された。これに対し、E327G と D356N の 2 重変異体でも影響が確認されたが、単独の D356N 変異体との差は認められなかった (図 3-23. A)。

一方、NSD-*ski7* Δ において、Ski7 の全長、Ski7 変異体をシングルコピーベクターから発現させ生育を確認すると、E327G と D356N の単独の変異では生育は認められないが、E327G と D356N の 2 重変異体では若干の生育が確認され、わずかではあるが 2 重変異体が機能欠損変異体

であることが示唆された (図 3-23. B)。

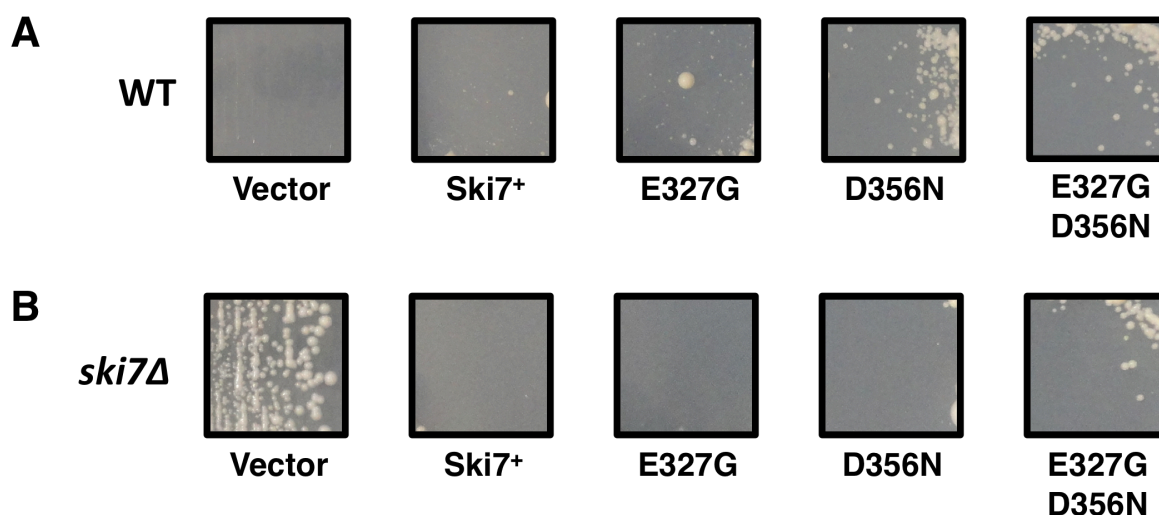


図 3-23. Ski7 における E327G と D356N の 2 重変異体の影響。(A) NSD-WT において、野生型 Ski7、および Ski7 変異体をマルチコピーベクターからそれぞれ発現させ、30°C で 6 日間静置培養した。(B) NSD-*ski7*Δ において、野生型 Ski7、および Ski7 変異体をシングルコピーベクターからそれぞれ発現させ、30°C で 6 日間静置培養した。なお、寒天培地はベクターの選択マーカーであるトリプトファンおよびヒスチジンの欠乏培地を使用した。

3-17. Ski7 の N 末端領域におけるドミナントネガティブ効果

これまでの研究の過程で、多くの Ski7 変異体は、野生型 Ski7 存在下でも NSD 機能を阻害するというドミナントネガティブ効果を有することが明らかとなった (図 3-20. A, 3-23.)。そこで、そもそも Ski7 の N 末端領域や C 末端領域のそれぞれはドミナントネガティブ効果を示すのかを検証した。

NSD-WT において、野生型 Ski7 全長、N 末端領域 (1-264)、C 末端領域 (265-747) をシングルコピーベクターからそれぞれ発現させ、30°C で 4 日間静置培養し生育を確認した。すると、Ski7 全長でわずかなドミナントネガティブ効果が見られ、同じような影響が N 末端領域のみの場合でも見られたが、C 末端領域のみでは全く影響が見られなかった (図 3-24. A)。

Ski7 は、mRNA の末端にて翻訳停滞状態に陥ったリボソームの A サイトを認識すると考えられているが、Hbs1/Dom34 複合体についても、同様にリボソームの A サイトを認識すると考えら

れている。つまり、Ski7 と Hbs1/Dom34 複合体の間では、リボソームの A サイトに競合的に作用している可能性がある。そこで、NSD-*hbs1* Δ や NSD-*dom34* Δ において、Ski7 のドミナントネガティブ効果がどのように発揮されるのか検証することにした。

NSD-*hbs1* Δ において、同様に野生型 Ski7 全長、N 末端領域 (1-264)、C 末端領域 (265-747) をシングルコピーベクターからそれぞれ発現させ、30°C で 3 日間静置培養し生育を確認した。その結果、NSD-WT で観察されたよりも顕著な生育の差が確認され、Ski7 全長よりも N 末端領域によるドミナントネガティブ効果が大きいことが明らかとなった (図 3-24. B)。また、NSD-*dom34* Δ においても、NSD-*hbs1* Δ で検証したときと同様の結果が確認された (図 3-24. C)。

野生型 Ski7 全長、N 末端領域 (1-264)、C 末端領域 (265-747) に関して、C 末端領域だけではドミナントネガティブ効果を発揮しないことが示唆されたが、それぞれの細胞内発現量を確認していないので、C 末端領域のみではドミナントネガティブ効果を発揮しないとは断定できない。そこで、細胞内の発現量をウエスタンブロッティングによって確認することにした。

検証の結果、細胞内において野生型 Ski7 全長、N 末端領域 (1-264)、C 末端領域 (265-747) の全てが発現していることが明らかとなり、野生型 Ski7 の C 末端領域のみにはドミナントネガティブ効果がないことが強く示唆された (図 3-25)。

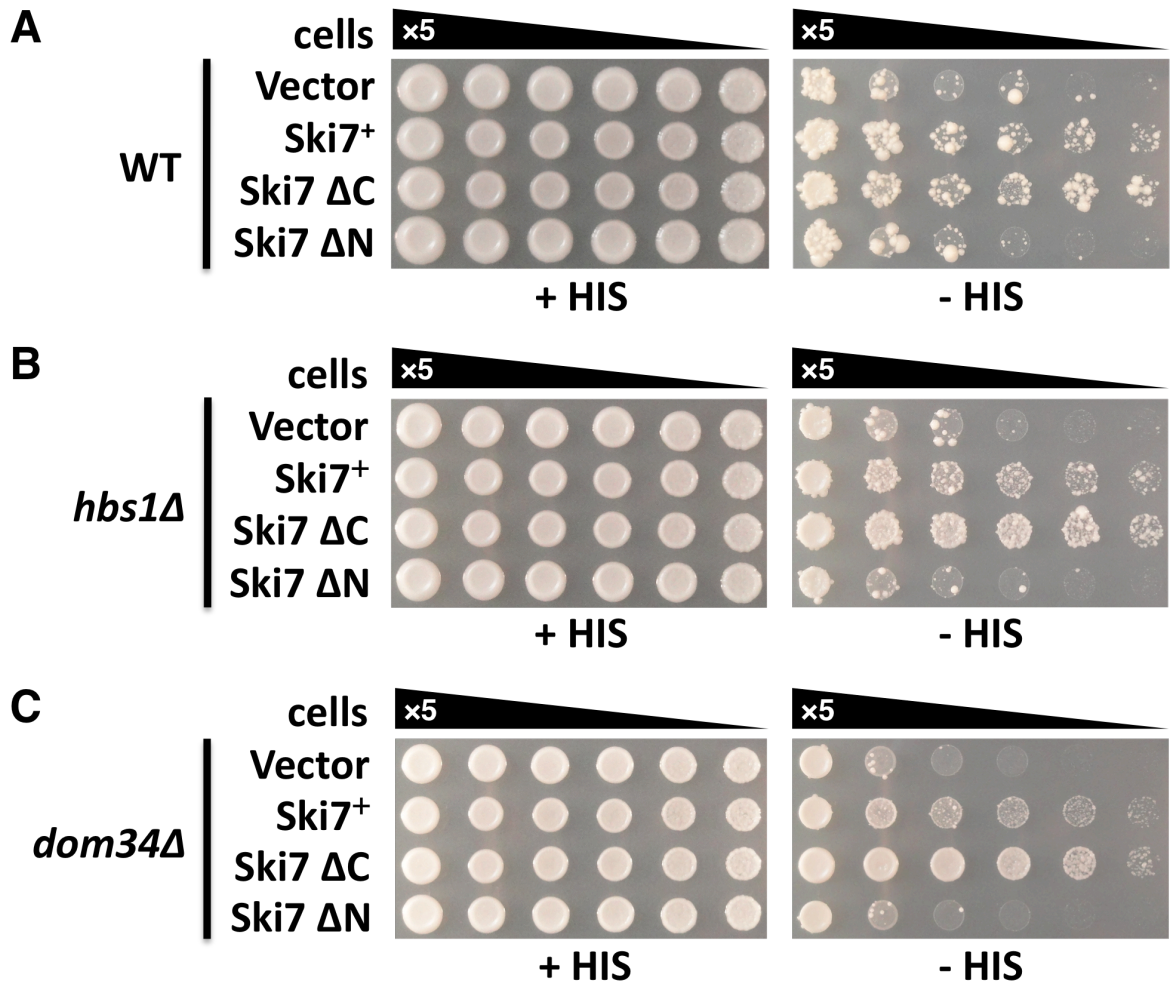


図 3-24. Ski7 の全長および N 末端領域と C 末端領域のドミナントネガティブ効果。(A) NSD-WT において、野生型 Ski7 全長、N 末端領域 (1-264)、C 末端領域 (265-747) をシングルコピーベクターからそれぞれ発現させ、飽和培養液の 5 倍希釈ごとにスポットし 30°C で 4 日間静置培養した。(B) (C) においても同様の実験操作を行い、それぞれ NSD-*hbs1*Δ と NSD-*dom34*Δ を用いた。また、いずれも 3 日間の静置培養を行った。なお、(A) (B) (C) で共通して寒天培地はベクターの選択マーカーであるトリプトファンおよびヒスチジンの欠乏培地を使用した。

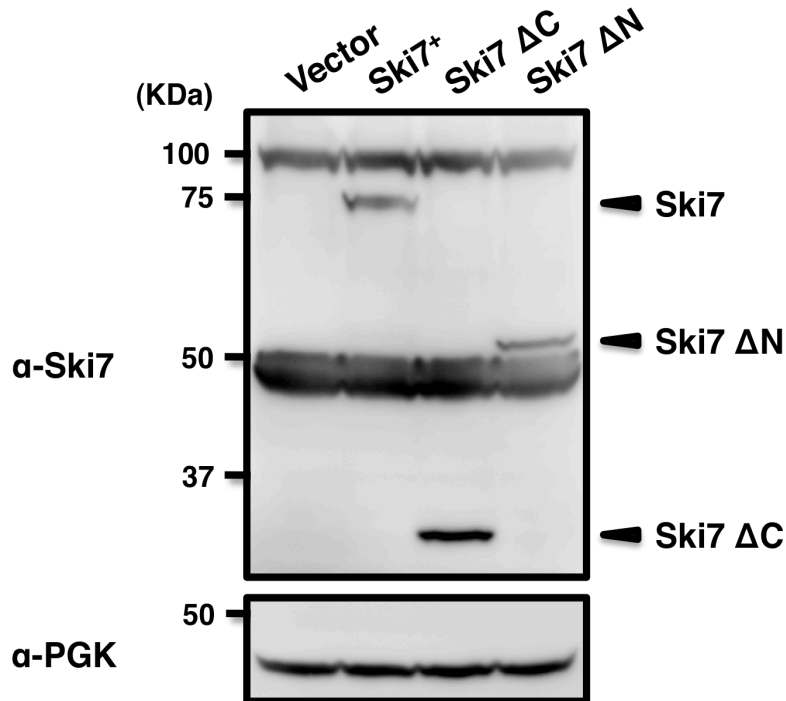


図 3-25. Ski7 全長および N 末端領域と C 末端領域の細胞内発現量。NSD-WT において、野生型 Ski7 全長、N 末端領域 (1-264)、C 末端領域 (265-747) をシングルコピーベクターからそれぞれ発現させ、タンパク質を抽出後、Ski7 抗体を用いたウエスタンブロッティングによって細胞内発現量を検出した。

3-18. Ski7 の N 末端領域機能性アミノ酸残基 Phe²⁰⁷ のドミナントネガティブ効果

これまでの結果から、NSD における主要な機能性領域の Ski7 の N 末端領域単体では、強いドミナントネガティブ効果も示すことが明らかとなった (図 3-24. A, B, C)。また、その影響は、NSD-*dom34Δ* において最も顕著に確認された。N 末端領域がドミナントネガティブ効果を示すのであれば、F207A 変異体も同様の効果を示すのではないかと考えた。そこで、前述の N 末端領域の変異体 F207A がこのドミナントネガティブ効果に与える影響も検証した。

NSD-*dom34Δ* において、Ski7、F207A 変異体、N 末端領域 (1-264)、F207A 変異を有する N 末端領域 (1-264) をシングルコピーベクターからそれぞれ発現させ、30°C で 2 日間静置培養し生育を確認した。すると、F207A 変異体は、ドミナントネガティブ効果を示すことが明らかとなった一方で、F207A 変異を有する N 末端領域のみではその影響が見られなくなった (図 3-26. A)。

F207A 変異を有する N 末端領域のみを発現させるとドミナントネガティブ効果が見られなくなったが、この変異体特異的に細胞内発現量が著しく低下することでその影響が確認できなかった可能性がある。そこで、細胞内の発現量をウエスタンブロッティングによって確認することにした。その結果、N 末端領域のみの発現量は変異の有無にかかわらずほぼ同一であることが示され、Ski7 の N 末端領域のみが有するドミナントネガティブ効果が F207A 変異によって打ち消されることが明らかとなった (図 3-26. B)。

NSD-*ski7Δ*における Ski7 活性の検証では、F207A の全長と F207A 変異を有する N 末端領域のみが共に活性の低下を示したことを考えると (図 3-7.)、ドミナントネガティブ効果の結果は相反する結果のように思えることから、この現象は非常に興味深い。

ドミナントネガティブ効果に N 末端領域が必要なのか、もしくは変異を保持する C 末端領域のみでもドミナントネガティブ効果を示すのかを検証してみた。

GTPase ドメイン内の変異による機能欠損変異体の変異部位は、GTP の結合部位からの距離で分類すると近接、近傍、遠位の 3 つに分類可能であり、Ser²⁸¹ は近接、Leu³⁵⁴ は近傍、Glu⁴⁴⁵ は遠位に位置している。そこで、これら 3 つの変異体 S281P、L354R、E445G を変異の代表として選び、ドミナントネガティブ効果を検討した。

最もドミナントネガティブ効果に感受性の高い NSD-*dom34Δ*において、Ski7 全長、C 末端領域 (265-747)、変異を有する C 末端領域 (265-747) をシングルコピーベクターからそれぞれ発現させ、30°C で 3 日間静置培養し生育を確認した。その結果、3 種類のいずれの変異によっても C 末端領域のみではドミナントネガティブ効果を示さなかった (図 3-27. A)。プレート上の生育の評価だけでは、変異を有する C 末端領域は発現量が極めて低くなった結果、細胞内にほとんど存在しないためにドミナントネガティブ効果が見られなかったという可能性を否定できない。そこで、ウエスタンブロッティングによって細胞内発現量を検証した。その結果、野生型の C 末端領域に比べて多少発現量が減少する傾向があるが、検出には十分な量の発現量が確認された (図 3-27. B)。

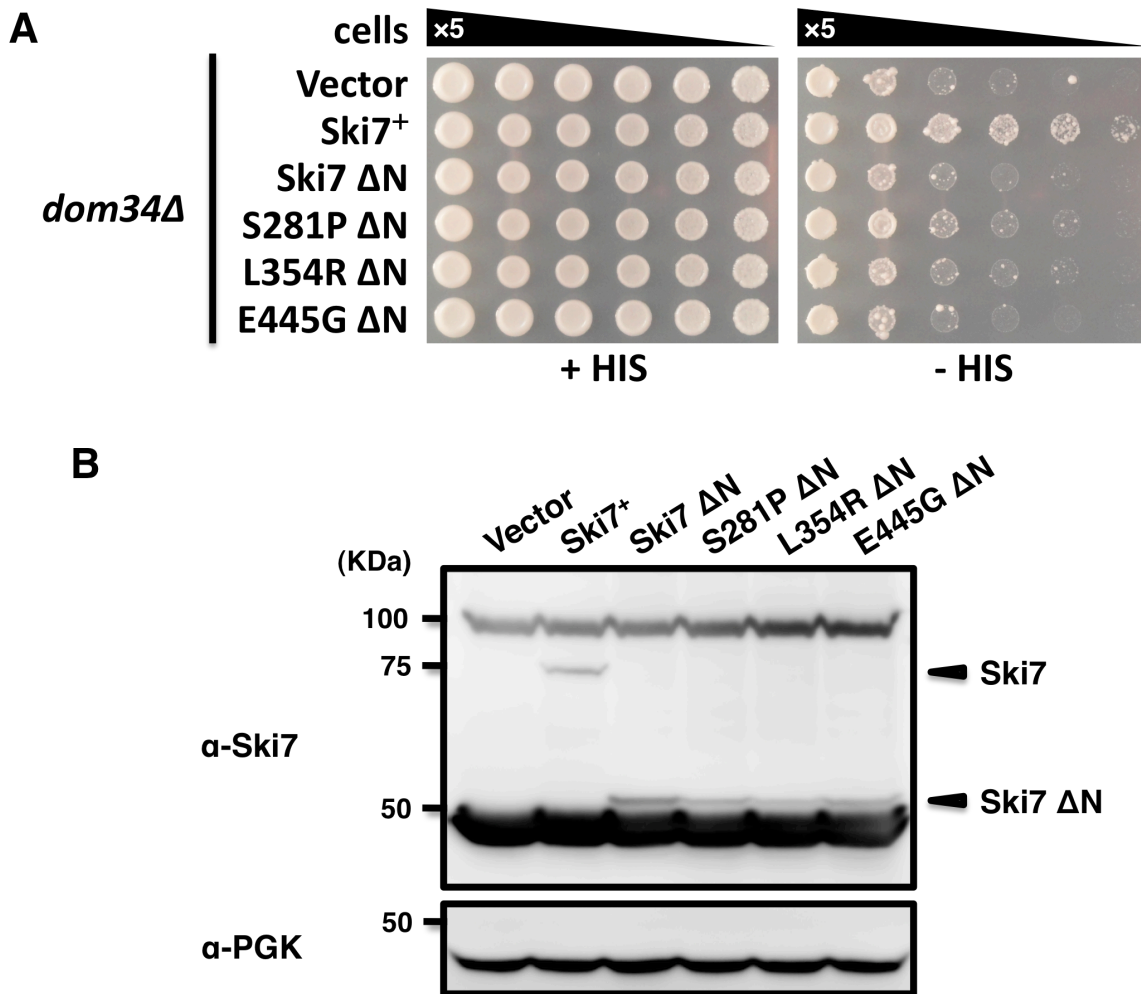


図 3-27. Ski7 の C 末端領域のみの変異体によるドミナントネガティブな影響の検証。(A) NSD-*dom34Δ*において、Ski7 全長、C 末端領域 (265-747)、変異を有する C 末端領域 (1-264) をシングルコピーベクターからそれぞれ発現させ、飽和培養液の 5 倍希釈ごとにスポットし 30°C で 3 日間静置培養した。なお、寒天培地はベクターの選択マーカーであるトリプトファンおよびヒスチジンの欠乏培地を使用した。(B) (A) の実験に用いた出芽酵母からタンパク質を抽出後、Ski7 抗体を用いたウエスタンブロッティングによって細胞内発現量を検出した。

3-20. 様々な遺伝背景における Ski7 変異体のドミナントネガティブ効果

Ski7 変異体によるドミナントネガティブ効果は、NSD-WT、NSD-*hbs1Δ*、NSD-*dom34Δ* のいずれでも検出できる。仮に Ski7 と Hbs1/Dom34 複合体が競合的に作用するなら、NSD-*hbs1Δ* や NSD-*dom34Δ* では、Ski7 変異体のドミナントネガティブ効果はより顕著に検出される可能性が高い。そこで、様々な遺伝背景によって Ski7 のドミナントネガティブ効果の強弱が異なるのかどうかを検証することにした。

NSD-WT、NSD-*hbs1*Δ、NSD-*dom34*Δにおいて、Ski7 全長、S281P 変異体をシングルコピーベクターからそれぞれ発現させ、30°Cで3日間静置培養し生育を確認した。すると、予想通り、競合が予想される Hbs1 や Dom34 の非存在下では S281P 変異体のドミナントネガティブ効果は増強された (図 3-28.)。

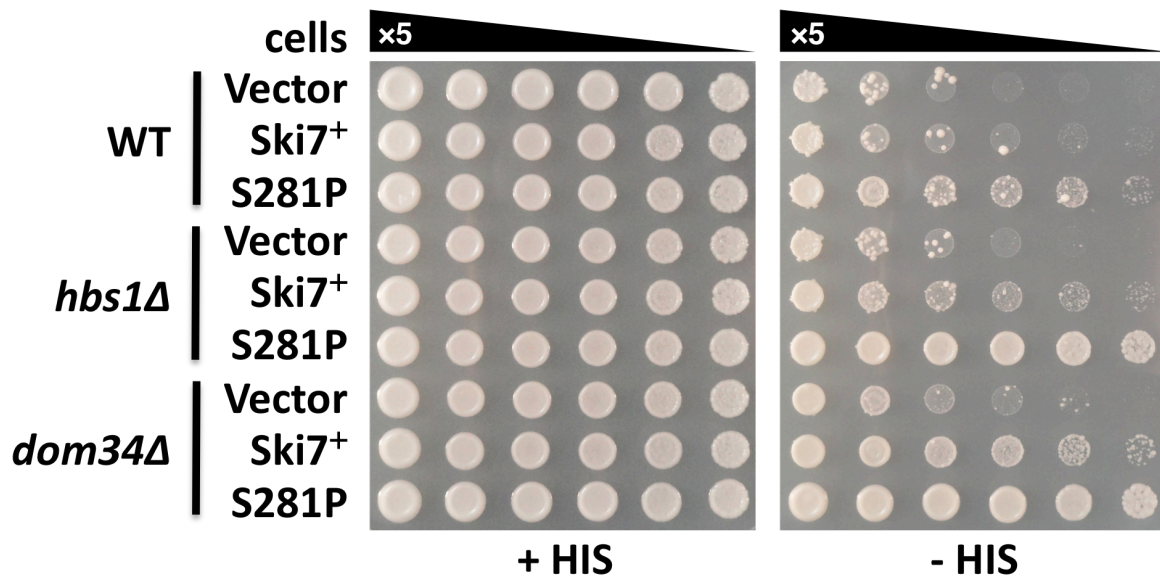


図 3-28. 様々な遺伝背景における S281P 変異体のドミナントネガティブ効果。NSD-WT、NSD-*hbs1*Δ、NSD-*dom34*Δにおいて、Ski7 全長、S281P 変異体をシングルコピーベクターからそれぞれ発現させ、飽和培養液の 5 倍希釈ごとにスポットし 30°Cで3日間静置培養した。なお、寒天培地はベクターの選択マーカーであるトリプトファンおよびヒスチジンの欠乏培地を使用した。

3-21. Hbs1 変異体による NSD への影響

Ski7 と Hbs1 は共に GTPase ドメインを有し、リボソームの A サイトに対して競合的に機能している可能性が高い。それを裏付けるように、Hbs1 欠損下では、nonstop-*HIS3* レポーター遺伝子を指標とした、Ski7 変異体のドミナントネガティブ効果が増強されることが分かった (図 3-24. および 3-28.)。では、Hbs1 変異体は NSD に対してどのような振る舞いをするのだろうか。

過去の報告にて、NGD における Hbs1 機能欠損変異体として、T232A と H255A が知られている (Kobayashi K *et al.*, 2010)。そこで、NSD における Hbs1 変異体 T232A と H255A の性質を探ることにした。

NSD-WT、NSD-*hbs1*Δ、NSD-*dom34*Δにおいて、野生型 Hbs1 と 2 種類の Hbs1 機能欠損変異体 T232A、H255A をシングルコピーベクターからそれぞれ発現させ、30°C で 3 日間静置培養し生育を確認した。また、NSD-*ski7*Δにおいては、同様の実験手法で 2 日間静置培養し生育を確認した。その結果、Hbs1 や Dom34 欠損下において、コントロールである空発現ベクターのときに生育しないことから、NSD における Hbs1/Dom34 複合体の関与を示すことができなかった (図 3-29. B、C)。さらに、NSD-WT において Hbs1 の機能欠損変異体はドミナントネガティブ効果を示さないことがわかり (図 3-29. A)、相互作用因子 Dom34 の欠損下でもその影響は確認されなかった (図 3-29. C)。ところが、Ski7 欠損下では、T232A 変異体のみでわずかながら生育が遅くなることが確認された (図 3-29. D)。

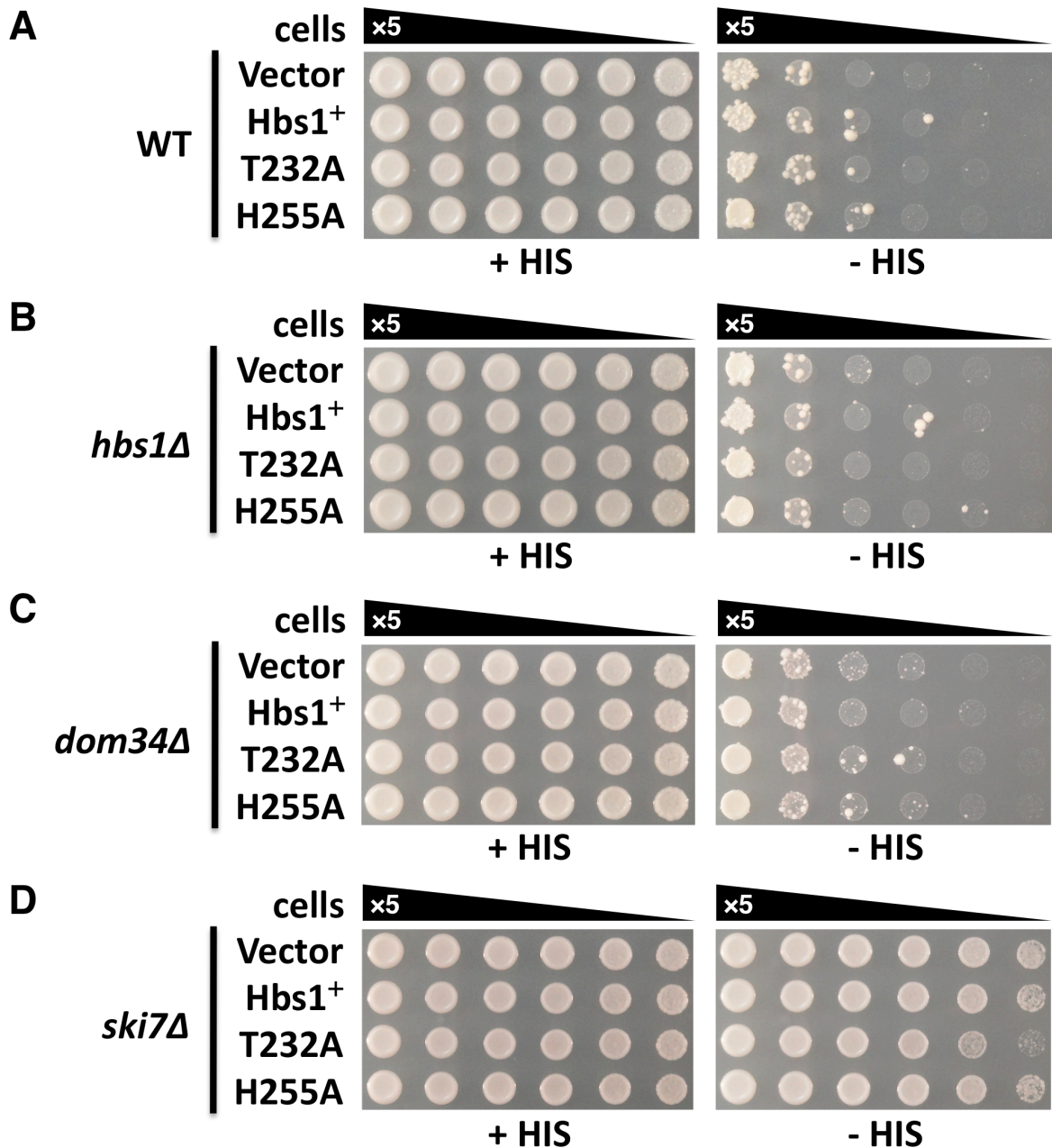


図 3-29. Hbs1 変異体による NSD への影響。(A) NSD-WT において、野生型 Hbs1、2 種類の機能欠損変異体 T232A、H255A をシングルコピーベクターからそれぞれ発現させ、飽和培養液の 5 倍希釈ごとにスポットし 30°C で 3 日間静置培養した。(B) (C) NSD-*hbs1*Δ と NSD-*dom34*Δ において、(A) と同様の実験手法を用いて行った。(D) NSD-*ski7*Δ において、(A) と同様の実験手法を用いて行ったが、培養条件は 2 日間の静置培養とした。なお、寒天培地はベクターの選択マーカーであるトリプトファンおよびヒスチジンの欠乏培地を使用した。

3-22. Ski7 と ski complex および exosome の相互作用

上述のように、Ski7 によるドミナントネガティブ効果は、リボソームの A サイトへの結合能を

示す Hbs1 や Dom34 欠損下において増強されるなど、Ski7 はリボソームの A サイトへの相互作用が想定される (van Hoof A *et al.*, 2002)。しかし、Ski7 には他にも既知の相互作用因子として ski complex や exosome が知られている (Araki Y *et al.*, 2001 ; van Hoof A *et al.*, 2002 ; Wang L *et al.*, 2005)。exosome は、分子量がおおよそ 440 kDa の巨大なタンパク質複合体因子であり、3'から 5'のエキソヌクレアーゼ活性により mRNA を分解することから、得られた Ski7 変異体との相互作用の検証によって、実際の mRNA 分解経路での Ski7 の役割を明らかにすることができるかもしれない。

そこで、Ski7 全長、N 末端領域のみ、および C 末端領域のみと ski complex 構成因子の 1 つである Ski3、および exosome 構成因子の 1 つである Ski4 との相互作用を検証した。過去の知見では、主に免疫沈降法を用いて相互作用の検証が行われていたが (Araki Y *et al.*, 2001 ; van Hoof A *et al.*, 2002)、*in vivo* での挙動を反映させるため、今回の相互作用の検証では、遺伝学的な手法である Yeast two-hybrid 法 (以後、Y2H 法) を用いることにした。

定法に従い、活性化ドメイン (AD) と Ski7 の N 末端、DNA 結合ドメイン (BD) と相互作用因子 Ski3 もしくは Ski4 の N 末端をそれぞれ融合したアッセイプラスミド 2 種を同時にアッセイ株 AH109 株 (「実験材料と実験手法、菌株参照」) に導入し、30°C で 5 日間静置培養してアッセイ株の *HIS3* レポーター遺伝子の発現による生育性を指標に相互作用の確認をした。すると、過去の免疫沈降法による検証報告と同様に、Ski7 と Ski3 および Ski4 の相互作用が確認された (Araki Y *et al.*, 2001 ; van Hoof A *et al.*, 2002, 図 3-30.)。同様の結果は N 末端領域のみでも確認できたが、C 末端領域のみを用いたアッセイでは、Ski3 および Ski4 との相互作用は検出されなかった (図 3-30.)。

細胞内において、それぞれの融合タンパク質が安定的に発現しているのかどうかを確認するため、各融合タンパク質の細胞内の発現量をウエスタンブロッティングによって確認した。その結果、全てのタンパク質が細胞内において発現している様子が確認された (図 3-31.)。しかし、発現はしているものの、Ski7 全長、N 末端領域のみ、C 末端領域のみでは全く発現量が異なっていることが明らかになった (図 3-31. A)。

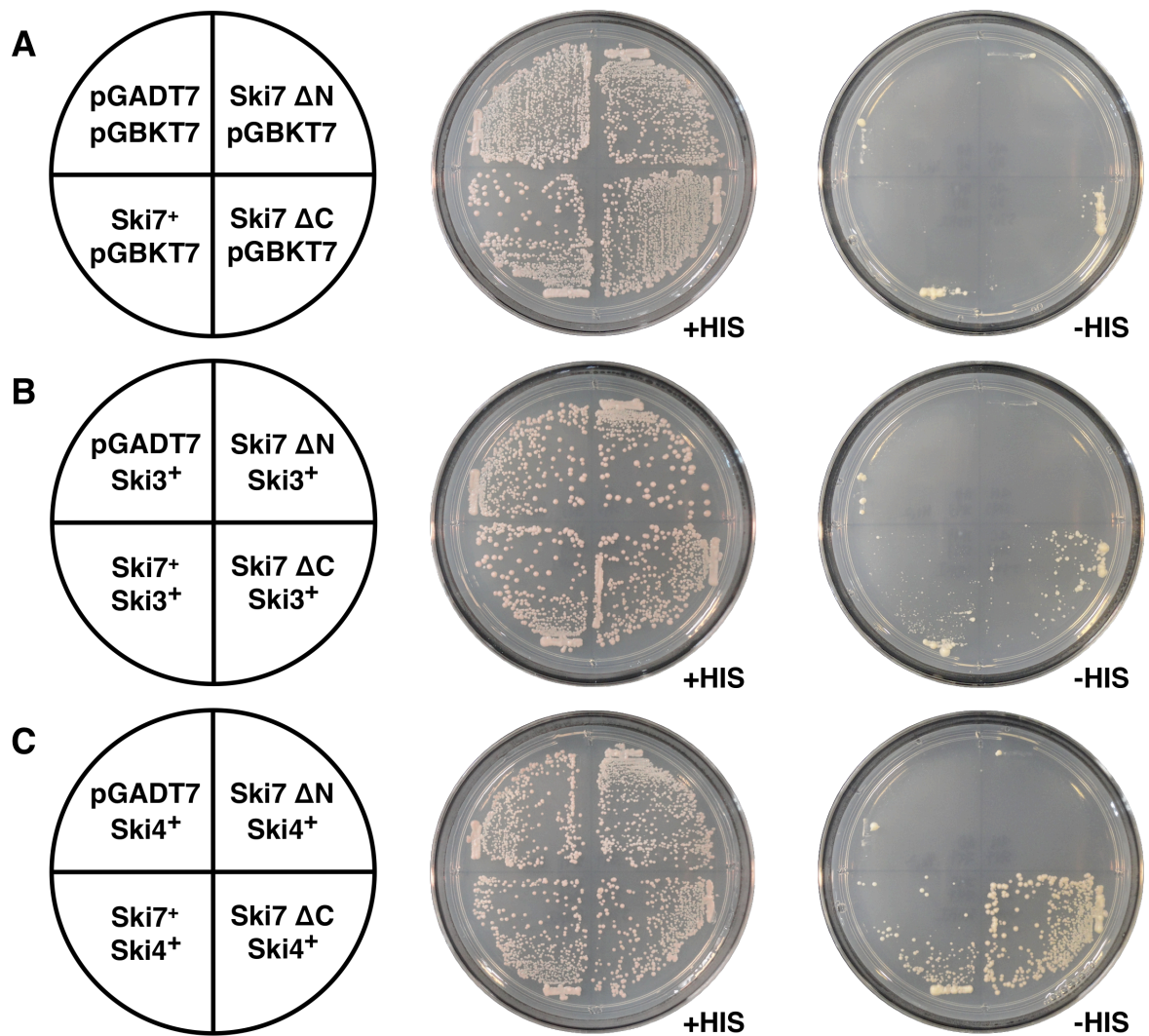


図 3-30. Ski7 と ski complex 構成因子 Ski3 および exosome 因子 Ski4 の相互作用。AH109 株にて、Ski7 全長、N 末端領域のみ (Ski7 ΔC)、C 末端領域のみ (Ski7 ΔN) と ski complex 構成因子 Ski3 もしくは exosome 因子 Ski4 を共発現させ、30°C で 6 日間静置培養した。(A) 空発現ベクターを用いたネガティブコントロールの検証。(B) (C) それぞれ Ski7 全長、N 末端領域のみ (Ski7 ΔC)、C 末端領域のみ (Ski7 ΔN) と Ski3 および Ski4 との相互作用を検証した。なお、寒天培地はベクターの選択マーカーであるロイシン、トリプトファン、Y2H レポーター遺伝子であるヒスチジンの欠乏培地を使用した。

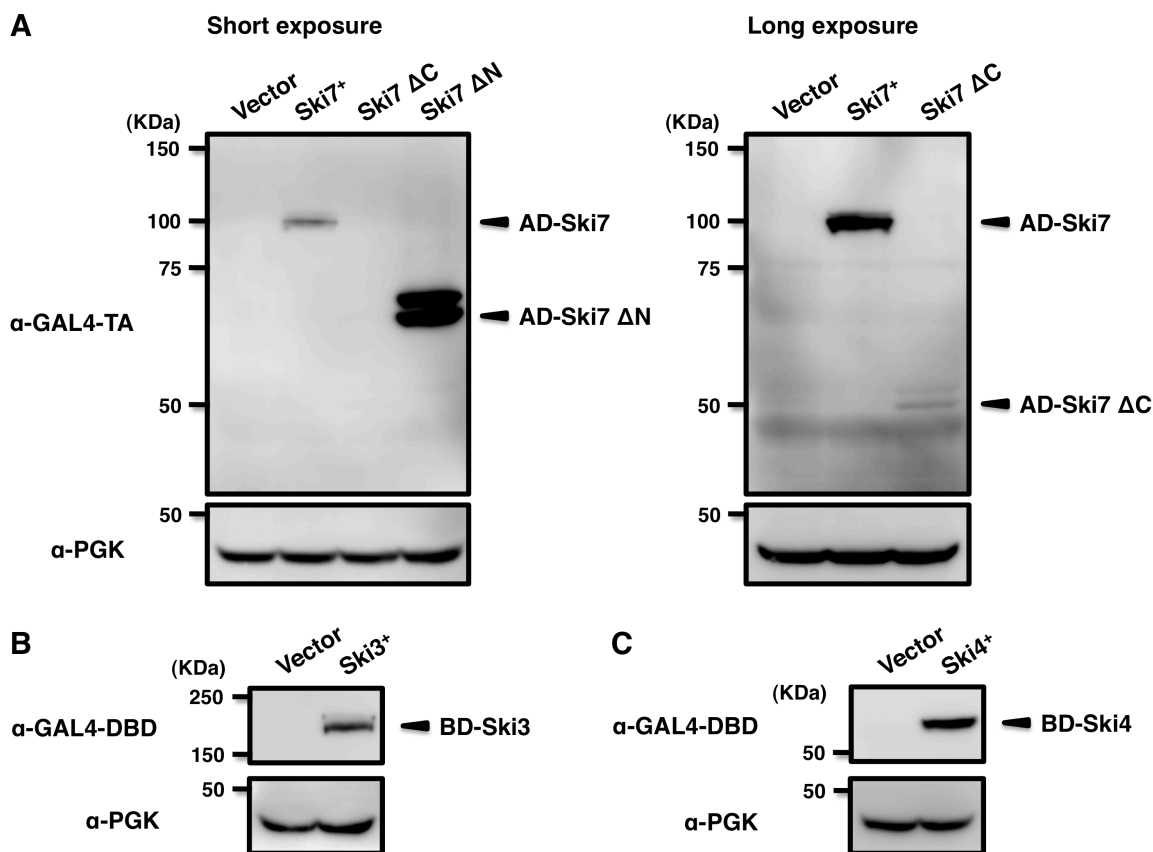


図 3-31. Y2H 法で用いた各種融合タンパク質の細胞内発現量。(A) 実験に使用した発現ベクターを用いて形質転換体を作製し、培養後、タンパク質を抽出してウエスタンブロッティングによって細胞内発現量を検出した。活性化ドメインに対しては GAL4-TA 抗体、DNA 結合ドメインに対しては GAL4-DBD 抗体を用いた。

3-23. Ski7 変異体と exosome の相互作用

Y2H 法を用いた実験系により、各種 Ski7 変異体と Ski4 との定性的な結合性評価が可能になった。そこで、Ski7 の F207A、S281P、L354R、E445G 各機能欠損変異体を用いて exosome の相互作用を検証した。

野生型 Ski7 と同様に、各種 Ski7 変異体を Ski4 とともに AH109 株内で共発現させ、30°C で 5 日間静置培養し生育を観察した。F207A 変異は、exosome との相互作用部位が存在する N 末端領域の変異であるため、複合体形成における結合力の低下を予想したが、実際には野生型と同程度の生育性を示した (図 3-32. C)。一方、Ski7 の GTPase ドメイン内に生じた S281P 変異では若干の生育性の向上が認められた (図 3-32. C)。また、このような傾向は L354R 変異や E445G

変異においてもわずかながら確認され、GTP 結合部位に近い変異ほど生育性の向上が認められた (図 3-32. C)。この結果から、GTPase ドメイン内の変異は、exosome との相互作用を促進している可能性が示唆された。

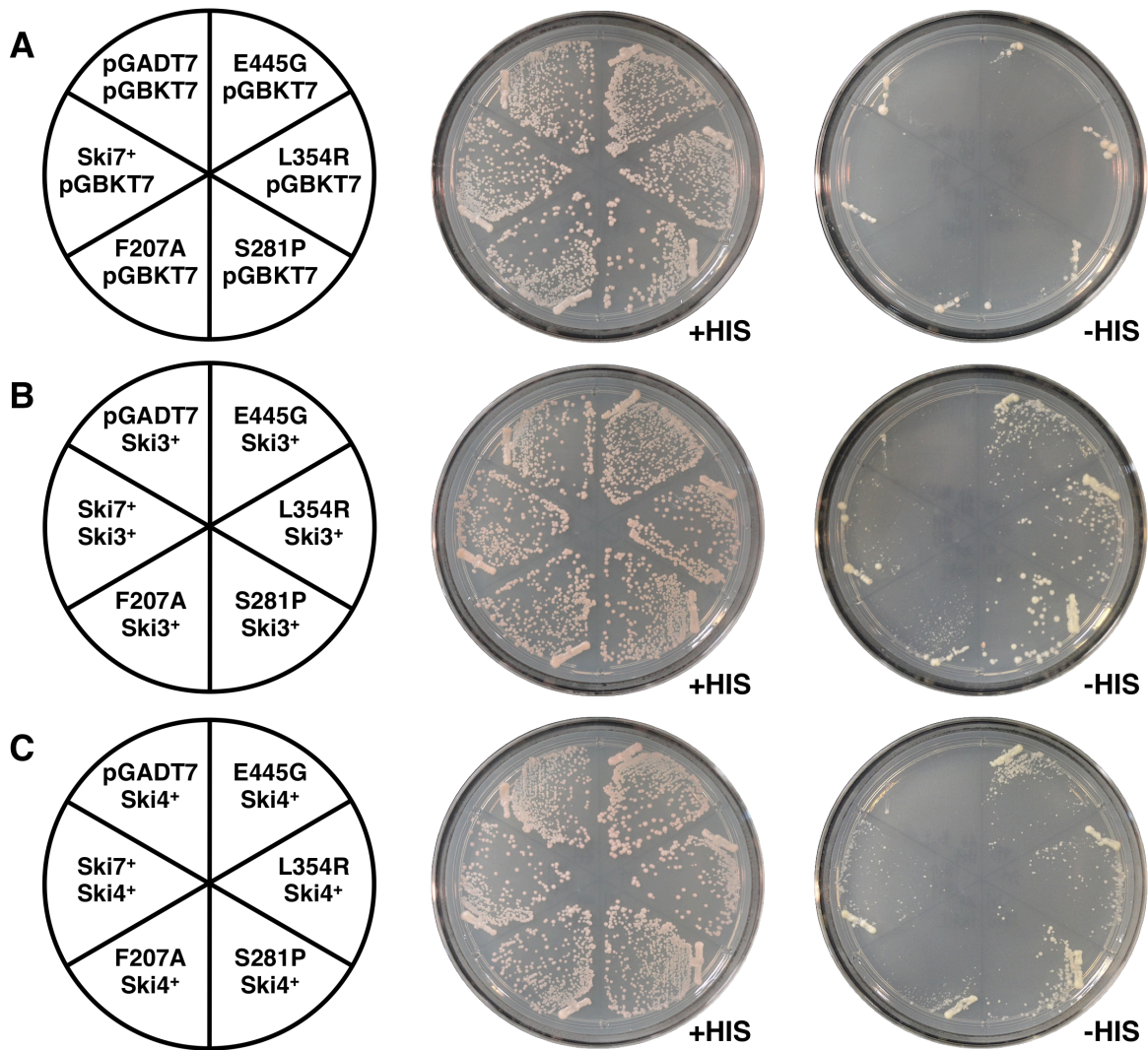


図 3-32. Ski7 変異体と ski complex 構成因子 Ski3 および exosome 因子 Ski4 の相互作用。AH109 株にて、Ski7 全長もしくは Ski7 変異体と、ski complex 構成因子 Ski3 もしくは exosome 因子 Ski4 を共発現させ、30°C で 7 日間静置培養した。(A) 空発現ベクターを用いたネガティブコントロールの検証。(B) (C) それぞれ Ski7 全長および Ski7 変異体と Ski3 もしくは Ski4 との相互作用を検証した。なお、寒天培地はベクターの選択マーカーであるロイシン、トリプトファン、Y2H レポーター遺伝子であるヒスチジンの欠乏培地を使用した。また、(C) については、培養条件を 5 日間の静置培養とした。

3-24. Ski7 変異体と ski complex の相互作用

Ski7 と exosome 因子 Ski4 は相互作用し、興味深いことに、その相互作用は GTPase ドメイン内の変異によって増強される可能性が示唆された (図 3-32. C)。Exosome の活性化には ski complex が不可欠であると考えられており、ski complex の構成因子である Ski2、Ski3、Ski8 のいずれが欠損しても mRNA の分解が抑制されることが知られている (Anderson JS and Parker R., 1998)。Ski7 は、この ski complex とも相互作用することが知られており、これまでに ski complex 因子 Ski3 と Ski7 の相互作用解析が Y2H 法を用いて示されている (Wang L *et al.*, 2005)。そこで、Ski7 の F207A、S281P、L354R、E445G 機能欠損変異体を用いて ski complex 因子 Ski3 への相互作用の影響について Y2H 法を用いて検証することにした。

AH109 株にそれぞれのアッセイベクターを導入し、30°C で 7 日間静置培養して生育を観察したところ、exosome 因子 Ski4 との相互作用の検証で見られた結果と同じように、野生型 Ski7 や F207A 変異体に比べて、S281P、L354R、E445G 変異体では 7 日の時点で顕著な生育性の促進が観察された (図 3-32. B)。

興味深いことに、G ドメイン内の変異は相互作用因子との相互作用に影響を与えることが明らかになったが、細胞内の発現量や安定性が上昇した結果、これらの影響が確認された可能性がある。そこで、実際に活性化ドメインに融合された各種 Ski7 の細胞内の発現量をウエスタンブロッティングによって確認した。

発現量を調べてみると、G ドメイン内の変異体の中で、GTP 結合部位に近い S281P と L354R 変異体のみ、細胞内の発現量が低いことが明らかとなった (図 3-33.)。つまり、細胞内量が低下したにもかかわらず Ski7 変異体と exosome や ski complex との相互作用が増強されたことを意味している。これは、G ドメイン内の変異が exosome や ski complex などの相互作用に影響し、その影響は GTP 結合部位に近い程大きいことを示唆する結果であると考えられる。

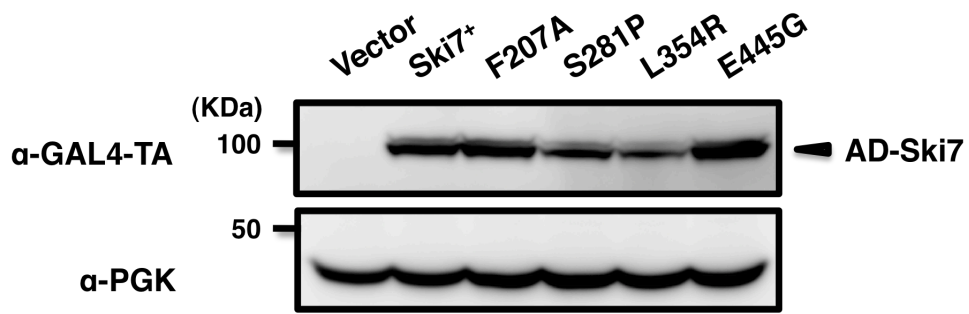


図 3-33. Y2H 法で用いた活性化ドメインが融合した Ski7 の細胞内発現量。実験に使用した発現ベクターを用いて形質転換体を作製し、培養後、タンパク質を抽出して GAL4-TA 抗体を用いたウエスタンブロッティングによって細胞内発現量を検出した。

第4章 考察

本研究では、Nonstop decay (NSD)における主要因子であり、EF-1 α ホモログタンパク質である Ski7 がどのような機能性を持ち NSD に関与するのかを明らかにするため、分子遺伝学を主軸とした切り口で解析を行った。

本章では、最近明らかになった Ski7 の立体構造 (Kowalinski E *et al.*, 2015) の知見と本研究の Ski7 の解析から、NSD における N 末端領域に加えて、保存性があるのにもかかわらず機能性が未知であった C 末端領域に存在する GTPase ドメイン相同領域が積極的に NSD に関与することについて考察をする。

4-1. Ski7 の N 末端領域と C 末端領域の機能性の相違

これまで、既知の Ski7 が関与する mRNA 分解経路においては、Ski7 の主たる機能領域は N 末端領域であるとされ、保存された GTPase ドメインを内包する C 末端領域の存在意義は分からずにいた。しかしながら、Ski7 は 747 アミノ酸から構成されており、N 末端領域 (アミノ酸番号 1~264) は独自の特徴的な配列をもつ一方で、C 末端領域 (アミノ酸番号 265~747) は翻訳伸長因子 EF-1 α とアミノ酸の同一性が高い (図 1-6.)。加えて、その立体構造は EF-1 α ホモログタンパク質間において極めて類似しているため (図 1-7.)、機能に積極的に貢献しない領域がこれほどまで保存されているというのは不自然であり、何らかの機能を有しているのではないかと推測されてきた。そこで、N 末端領域に対する C 末端領域の存在意義を考察することにした。

Nonstop-*HIS3* レポーター遺伝子を組み込んだ NSD-*ski7 Δ* において、Ski7 全長および N 末端領域のみを発現させた場合を比較すると、Ski7 全長の方が NSD はわずかながら強く引き起こされていた (図 3-3.)。同様の現象を、*URA3* 遺伝子の 5-FOA によるネガティブ選択系を応用した、nonstop-*URA3* レポーター遺伝子を組み込んだ NSD-*ski7 Δ* における 0.1% 5-FOA 添加条件での生育において、逆の生育性を示すことで確認することができた (図 3-10. A)。極端に異なる鎖長や非相同的なタンパク質発現下では、転写強度を揃えるのみでは細胞内タンパク質量は揃わない

ので、機能性の優劣を安易には比較はできないが、過去の知見で指摘されていた、NSDにおけるC末端領域の一定の必要性については再現できたと考えられる。加えて、同じ nonstop-*URA3* レポーター株で、上述の 0.1% 5-FOA 添加条件で、Ski7 全長を発現させたときに用いたプロモーターから N 末端領域を発現させ、同じ細胞内で C 末端領域をトランスに低発現から高発現まで様々な強度のプロモーターから発現させたが、この場合は、わずかな生育の違いも確認できなかった (図 3-10. B)。以上の結果から、Ski7 には C 末端領域が分子内に存在するときに N 末端領域と協調的に働くという、C 末端領域のシス機能性が示唆された。この可能性については、他の EF-1 α ホモログタンパク質の構造情報などを引用しながら、詳しく後述する。

一方、一般的な翻訳 G タンパク質の基本特性から考えると、GTPase ドメインを含む C 末端領域は、グアニンヌクレオチドの結合状態により立体構造変換を受け、リボソームとの相互作用により機能する分子スイッチとしての役割が予想される。しかし、最近報告された X 線結晶構造解析による Ski7 の立体構造は、結合しているグアニンヌクレオチドが GTP と GDP のいずれの場合も立体構造の差は認められなかった。加えて、EF-1 α には tRNA、eRF3 や Hbs1 には eRF1、Dom34 がそれぞれ結合し、機能発揮がなされている。しかしながら、Ski7 では、未だに他の EF-1 α ホモログタンパク質には存在する相互作用因子が報告されていない (Kowalinski E *et al.*, 2015)。この実験的事実を踏まえた上で、まず考えるべきことは、C 末端領域に備わっていると思われる分子スイッチがシス機能性を発揮し、N 末端領域の活性を制御する領域なのではないかという可能性である。少なくとも、N 末端領域のみで NSD が促進されるため、C 末端領域はすでに活性を持つ N 末端領域のみによる機能性の前提条件となる機能を持つことは考えにくい。従って、Ski7 の C 末端領域は、特定の細胞機能性に関わる N 末端領域の機能性を制御する分子スイッチとして機能すると推定できる。

4-2. Ski7 の N 末端領域における機能性アミノ酸残基 Phe²⁰⁷ の機能性

Nonstop mRNA の品質管理において、3'から 5'への mRNA 分解経路は exosome によって行われており、Ski7 非存在下ではこの経路は強く抑制される。Exosome は Ski7 の N 末端領域と相互

作用することで活性化すると考えられている。しかしながら、N 末端領域の具体的な機能性や必須アミノ酸残基に関する知見も乏しい状態であった。そこで、この領域について何らかの新規の知見を得ることができれば、推定した C 末端領域との関わりを詳細に解析できるはずだと考えた。

まず、Ski7 の N 末端領域内保存モチーフにおいてアラニンスキャニング法を行い、Phe²⁰⁷ が機能性アミノ酸残基の 1 つであることを明らかにした (図 3-5. A, B)。F207A 変異体は、nonstop-*HIS3* レポーター遺伝子の mRNA 量において若干の影響を与えたことから (図 3-5. C)、Ski7 の Phe²⁰⁷ は相互作用因子でありエキソヌクレアーゼ活性を持つ exosome やその補因子 ski complex との結合に関与していると推定した。このことを Yeast two-hybrid (Y2H)法を用いて、F207A 変異体と exosome 因子 Ski4 や ski complex 因子 Ski3 との相互作用を評価することで検証したが、野生型 Ski7 と F207A 変異体の結合強度に差は認められず (図 3-32.)、今回の結果のみから議論すれば、Ski7 の Phe²⁰⁷ は相互作用因子との直接的な相互作用には関与しないことが示唆された。しかし、Y2H 法は、核内で生じるタンパク質間相互作用に由来する転写反応をもとに検出を行うため、実際に NSD が生じる細胞質での相互作用と相関しない可能性は否定できない。もし仮に、Phe²⁰⁷ が exosome や ski complex との相互作用に影響を及ぼさないとすれば、Phe²⁰⁷ 残基については相互作用因子結合後の立体配向や、その他の相互作用などに関わる機能性などが想定される。F207A 変異体では、適切な相互作用が阻害された結果、Ski7、exosome、ski complex からなる 3 者複合体の立体構造がわずかに歪むなどの弊害が生じ、その後の exosome の活性化もしくはリボソームとの結合などに影響を与えている可能性が考えられる。これについては、今後、定量的に評価可能な生化学的な検証を用いて、F207A 変異体と exosome 因子、ski complex 因子、リボソームなどとの相互作用を詳細に検証し実証する必要がある。

F207A 変異体は、nonstop-*HIS3* レポーター遺伝子に由来する His3 タンパク質の合成量を指標にして同定された。これまでの知見では、Ski7 は mRNA の分解に関与することが指摘されてきたが、それと同時に、新生ペプチド鎖の分解に関与している可能性も考えられる。異常 mRNA の分解と共役した新生ペプチド鎖の分解は、リボソームのサブユニット解離後の 60S リボソーム上で促進されると考えられている (図 1-5. ; Lyumkis D *et al.*, 2014 ; Shao S *et al.*, 2015 ; Shen

PS *et al.*, 2015)。我々はこれまでに Ski7 とリボソームの結合は免疫沈降法を用いて確認しているが（データ未記載）、どのような状態のリボソームに結合するのかについては検証を終えていない。仮に、Ski7 が 60S リボソームへ安定的に結合するのなら、可能性のひとつとして、新生ペプチド鎖の分解に Ski7 の N 末端領域が関与することが有り得るかもしれない。

4-3. EF-1 α ホモログタンパク質としての Ski7 に存在する GTPase ドメインの意義

近年の報告では、Ski7 は mRNA 品質管理機構における主要因子とされたが、長らく G タンパク質としての機能性は全く議論されてこなかった。しかし、GTP および GDP と結合状態にある Ski7 の構造が明らかになったことで、他の翻訳型 G タンパク質との比較が可能となり、今後は飛躍的に議論が加速することが期待される（Kowalinski E *et al.*, 2015）。本研究では、他の EF-1 α ホモログタンパク質においては何らかの機能欠損を示す GTPase ドメイン変異を Ski7 に導入し活性を評価したが、機能欠損を狙って意図的に作出した S360A、K428E、R438G の全て変異は NSD 活性に影響を与えなかった（図 3-8.）。この結果は、他の EF-1 α ホモログタンパク質で共通して見られる GTP 加水分解反応機構を、Ski7 が保持しているグアニンヌクレオチド結合モチーフが保持していない可能性を示唆する。この可能性を支持するデータとして、*in vitro* における精製 Ski7 による GTP 加水分解能の測定では、GTP から GDP への加水分解は認められなかったことが報告されている（Kowalinski E *et al.*, 2015）。また、G1 から G5 までの保存アミノ酸残基について、Ski7 のみが大きな置換が生じていることから（図 3-17.）、GTP 加水分解反応機構が失われている可能性は容易に推測できる。

Ski7 は、進化系統的に翻訳伸長因子 EF-1 α から派生したと考えられる G タンパク質 Hbs1 から分岐している。Hbs1 も mRNA 品質管理に関わるが、EF-1 α および Hbs1 をはじめとする翻訳 G タンパク質に共通して高度に保存された GTP 加水分解反応機構の重要ヒスチジン残基が、Ski7 ではセリン残基（Ser³⁶⁰）に置換している。実際に、翻訳 G タンパク質 EF-1 α 、eRF3、Hbs1 のいずれでも、このヒスチジン残基の変異体は機能失活を引き起こすことも知られている。Ski7 において、この Ski7 の Ser³⁶⁰ をアラニンやヒスチジンへの置換変異を導入し活性の変化を検証

したが、この単変異による Ski7 活性の変化は全く確認できなかった (図 3-8.)。一方、例外的ではあるが、Ski7 以外にも、*Thermus thermophilus* や *Mycobacterium smegmatis*、*Mycobacterium tuberculosis* の翻訳 G タンパク質 EF-G2 に関してはヒスチジン残基保存されておらず、チロシンに置換されてしまっている。ところが、*T. thermophilus* の EF-G2 は単独で GTP 加水分解活性を示し (Connell SR *et al.*, 2007)、*M. smegmatis* の EF-G2 は GTP 加水分解能こそないものの GTP との結合は確認されている (Seshadri A *et al.*, 2009)。これらの知見から、Ski7 の GTPase ドメインのセリン残基 (Ser³⁶⁰) への置換が、必ずしも GTPase ドメインの GTP 加水分解活性が存在しないことを意味しているわけではない。また、*in vivo* で認められるタンパク質の活性と *in vitro* での再構築系で測定される活性が必ずしも同一であるとは限らない。そのため、*in vitro* における精製 Ski7 の GTP 加水分解活性が認められないという事実だけをもって、*in vivo* における Ski7 の GTP 加水分解活性を否定することは適切ではないと考えられる。例えば、Ski7 の GTP 加水分解活性を発揮するには、Ski7 と 80S リボソーム以外に GAP 分子のような GTPase の活性を促進する別の因子が必要となる可能性や、細胞内に存在する Ski7 には特殊な修飾がなされている可能性など、何らかの要因が抜けていることで Ski7 の GTP 加水分解活性が検出できない可能性もある。

しかしながら、Ski7 の GTPase ドメインに関して、単純に GTP の結合状態と非結合状態という形態変化によって N 末端領域の活性をシスに制御する分子スイッチ領域であると捉えることもでき、GTP 加水分解活性が失われているだろうという推測を否定することもできないことから、今後のさらなる詳細な解析が待たれるところである。

4-4. 遺伝学的に分離された Ski7 の GTPase ドメイン変異の重要性

過去の研究において、Ski7 の C 末端領域の機能性に影響するアミノ酸残基置換変異の報告は皆無であったが、本研究では、C 末端領域に存在する GTPase ドメイン内に生じた 1 アミノ酸置換変異によって、N 末端領域だけで促進されるはずの NSD が抑制されることを見出した (図 3-15. A)。加えて、これらの Ski7 変異体は mRNA の安定性に影響を与えることも確認した (図 3-15. B)。

この結果は、Ski7のC末端領域にはmRNAの分解に対して積極的な機能が存在することを強く示唆している。また、変異部位をSki7の立体構造上にマッピングすると、明らかにGTP結合部位の近傍に集中していることから（図3-18.）、グアニンヌクレオチド結合モチーフは、保存モチーフとして少なくとも一部の機能性を保持しており、そのことがSki7のmRNA分解促進への機能性に寄与していることを強く示唆している。

では、Ski7のC末端領域におけるGTPとの結合と共役した機能性は、どのように分子スイッチとして振る舞うのであろうか。以下、これまでのSki7変異の機能欠損性の知見に基づき考察する。

Ski7は、リボソーム、exosome、ski complexのいずれとも結合性を示すが（図3-30.）、常に同時に結合し続けることは考えにくい。ため、機能性発現に至るまでにそれぞれの状態に応じた機序が想定できる。そこで、これまで提唱されているモデルのように、円滑なmRNA分解反応を引き起こすため、Ski7のC末端領域は、N末端領域で結合したexosome、ski complexとの複合体がリボソームまで運ぶ際にその機能発現を制御する基本的なモデルの骨格を想定した（図4-1.）。

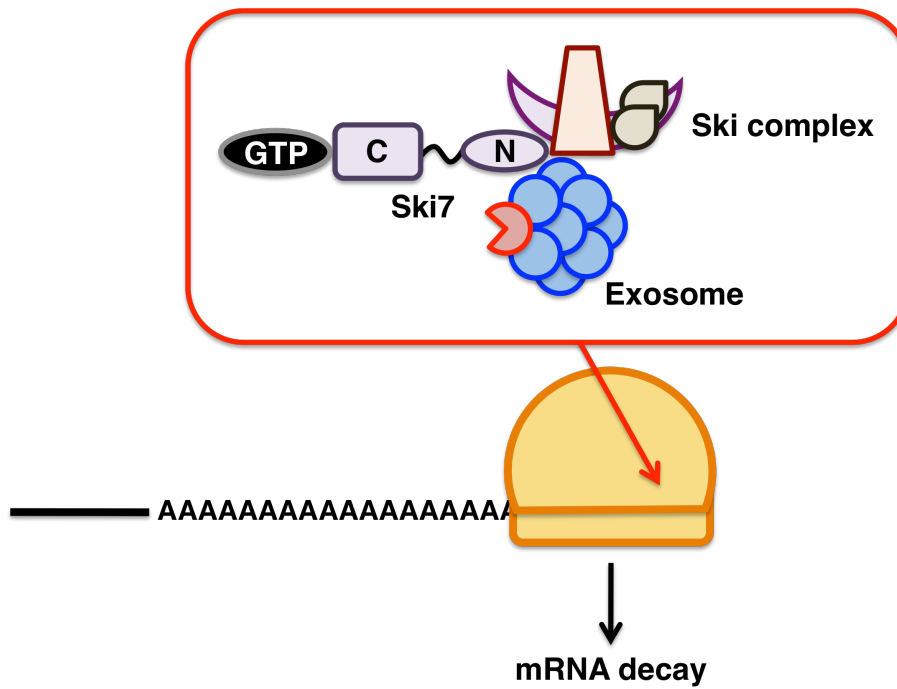


図 4-1. Nonstop decay (NSD)における Ski7 の既存の機能モデル。Ski7 は停滞したリボソームに対して、exosome や ski complex と複合体を形成しながら結合し、円滑な mRNA の分解を誘導する。

Y2H 法を用いて、本研究で分離された Ski7 機能欠損変異体である S281P、L354R、E445G 変異体と exosome や ski complex の結合を評価したところ、野生型と比較して、変異体ではわずかながら結合性の増大を示す生育性の向上が確認された(図 3-32.)。この傾向は、exosome 因子 Ski4 に比べて、ski complex 因子 Ski3 との結合の方が顕著であった(図 3-32. B、C)。また、GTP 結合部位に最も近接している S281P 変異体を用いたときに生育速度の差は最大であり、E445G 変異体では野生型と同程度であった。

Y2H 法での融合タンパク質の細胞内発現量を比較してみると、S281P、L354R 変異体では明らかに発現量が低下しており、細胞内発現量が低下したにもかかわらず結合状態が促進したことになる。これは、明らかに GTP との結合に影響を与える可能性の高い部位ほど、N 末端領域の相互作用因子との相互作用に大きな変化が生じていることを示唆している。それと同時に、S281P および L354R 変異体と E445G 変異体では、NSD の異なる段階の作用機序が阻害されている可能性が推測される。可能性のひとつとして、E445G は最も外側の α -ヘリックス構造内に生じた

変異であることから、分子内の他のドメインもしくは他因子との相互作用に関与するのかもしれない。

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* における EF-1 α ホモログタンパク質 eRF3 と Hbs1 に関して、リボソームに結合した状態の eRF1/eRF3 複合体および Hbs1/Dom34 複合体の様子が捉えられている (Preis A *et al.*, 2014 ; Becker T *et al.*, 2011)。図 4-2. で示したが、eRF3 の GTPase ドメイン領域にて、赤で示した部位はパートナータンパク質である eRF1 と相互作用している部位である。この領域はいずれもスイッチ領域と呼ばれており、非常に柔軟性に富み、GTP 結合および GTP 加水分解において極めて重要な領域とされている。また、青に着色した領域はリボソーム RNA との相互作用が確認された部位であり、リボソームへの結合が翻訳終結反応の促進に寄与していると考えられている (Preis A *et al.*, 2014)。

eRF3 と同様に、Hbs1 における Dom34 相互作用部位 (図 4-2. : 赤) とリボソーム RNA との相互作用部位 (図 4-2. : 青) を比較してみると、eRF3 と非常に類似していることがわかる (図 4-2.)。また、Hbs1 にはリボソームタンパク質との相互作用部位が存在する (図 4-2. : 紫)。この部位に関しては、eRF3 ではリボソーム RNA、Hbs1 ではリボソームタンパク質が相互作用することによって、同一の機能を果たしていることが推測される。

このような知見を踏まえて、最も外側の α -ヘリックス構造内にある変異部位 Glu⁴⁴⁵ の機能を推測してみると、第一に、リボソーム RNA やリボソームタンパク質との相互作用が考えられる。eRF3 や Hbs1 のリボソームの A サイト結合立体構造モデルでは、Ski7 の Glu⁴⁴⁵ が存在する α -ヘリックス部位は、リボソーム RNA やリボソームタンパク質とは接していない (図 4-2.)。しかし、隣接する領域はリボソーム RNA と接していることから、Ski7 の Glu⁴⁴⁵ がリボソーム結合時にはリボソーム RNA と相互作用する可能性も残されている。また、後述するが、Ski7 の N 末端領域は非常に柔軟な構造領域であることが示唆されており、N 末端領域と C 末端領域が分子内相互作用する可能性も残されている。どちらの推測が正しいのか現段階では言及することができないが、今後の Ski7 とリボソーム複合体の構造解析が重要になると考えられる。

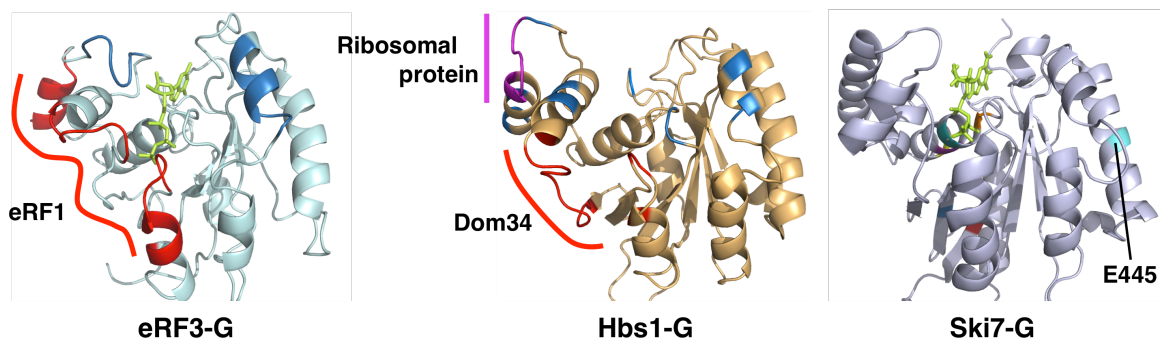


図 4-2. EF-1 α ホモログタンパク質の GTPase ドメインにおける相互作用部位。左から *Saccharomyces cerevisiae* 由来の eRF3 (PDB accession code : 4CRN)、Hbs1 (PDB accession code : 3IZQ)、Ski7 (PDB accession code : 4ZKE) の GTPase ドメイン領域の構造。eRF3 および Hbs1 の赤色の部位は、それぞれのパートナータンパク質である eRF1 および Dom34 と相互作用している部位を示す。また青色の部位は、リボソームの A サイトでの結合時にリボソーム RNA と相互作用している部位を示す。Hbs1 にはリボソームタンパク質と相互作用している部位があり、紫色で示した。Ski7 の構造に関して、本研究によって明らかになった機能性アミノ酸残基 Cys²⁷⁰、Gly²⁷⁹、Ser²⁸¹、Leu²⁸⁴、Leu²⁸⁷、Leu³⁵⁴、Glu⁴⁴⁵ をそれぞれ赤、橙、緑、紫、黄、青、水色で示した。

本研究で明らかになった Ski7 の機能欠損を引き起こすアミノ酸置換部位の大半は、GTP の結合部位の近傍であった。G タンパク質の研究の歴史は古く、GTP が GTPase ドメイン内のどの部位のアミノ酸残基と相互作用しているのかが明らかになっている (Berchtold H *et al.*, 1993 ; Song H *et al.*, 1999)。そこで、*Thermus thermophilus* の EF-Tu に GppNHp (GTP アナログ) が結合した結晶構造情報 (Berchtold H *et al.*, 1993) を基に、相互作用を示すアミノ酸残基を紫に着色し GTP 結合部位拡大した (図 4-3. A)。

Ski7 の機能欠損を引き起こすアミノ酸変異部位を拡大すると、Gly²⁷⁹ (橙) と Ser²⁸¹ (緑) は、EF-Tu の構造情報と重ね合わせてみても、GTP と相互作用するアミノ酸残基であることが分かる (図 4-3. A、B)。その他の近傍のアミノ酸変異部位は、スイッチ領域などではないため、直接的ではないが GTP 結合の安定化などに寄与する部位であると推測される。

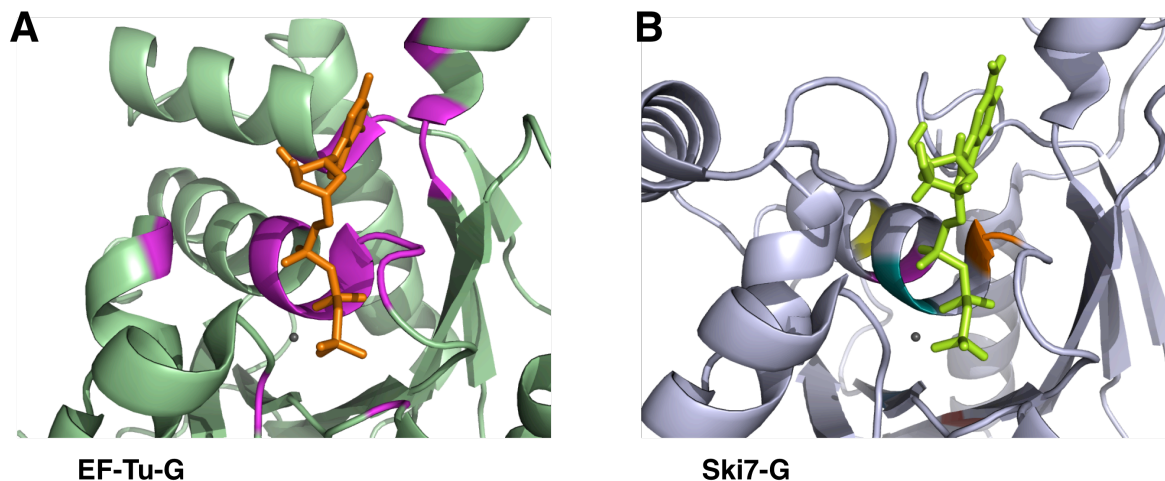


図 4-3. EF-Tu および Ski7 の GTP 結合部位。(A) *Thermus thermophilus* 由来の EF-Tu (PDB accession code : 1EXM) の GTP 結合部位の近接図。GppNHp (GTP アナログ) は橙、Mg²⁺は灰色で示している。(B) *Saccharomyces cerevisiae* 由来の Ski7 (PDB accession code : 4ZKE) の GTP 結合部位の近接図。GTP は黄緑、Mg²⁺は灰色で示している。また、本研究によって明らかになった機能性アミノ酸残基は、図 4-2.と同様に着色した。

Y2H の結果から、Ski7 では、GTPase ドメインの状態によって相互作用因子との結合性が変化することが強く示唆されたことから、exosome や ski complex との結合性の変化が、Ski7 自体の NSD における機能低下を招いたと考えられる。つまり、Ski7 の C 末端領域の分子スイッチは、GTP やリボソームとの結合と共役した形で、exosome や ski complex との結合を制御するのではないだろうか。

Ski7 による NSD の促進反応には Ski7、exosome、ski complex からなる複合体の形成が必須であると考えられている。Ski7 の N 末端領域は、その領域だけでも exosome、ski complex 双方と結合が可能であり (図 3-30.)、この点において NSD 促進反応の大きな必要条件が満たされ、NSD は促進される (図 3-3.)。しかし、この NSD モデルでは、Ski7 が NSD の対象となるリボソームの選別に積極的に関与する仕組みを説明できない。後述するが、Ski7 はリボソームの A サイトへ結合する可能性が極めて高いことから、NSD の正しい理解には、Ski7/exosome/ski complex 複合体の形成とリボソームへの結合を組み込む必要があるだろう。

4-5. 野生型 Ski7 のドミナントネガティブ効果

Ski7 の GTPase ドメイン内における変異は、単純な機能欠損だけではなく、野生型 Ski7 存在下でのドミナントネガティブな機能阻害を示すことも明らかになった (図 3-20.)。その影響は、野生株の遺伝背景よりも Hbs1 や Dom34 の欠損下において、より顕著であった (図 3-24.)。Ski7 のドミナントネガティブ効果は、基本となる既存の NSD モデルにどのような側面を付け加えることができるであろうか。

出芽酵母を用いた GFP 融合タンパク質による細胞内での局在、分子数を集計した網羅的解析の結果によると、1 細胞当たり Ski7 は 233 分子程度と見積もられているが、Hbs1 およびその結合パートナーの Dom34 はそれぞれ 2570、1720 分子程度と報告されている (Huh WK *et al.*, 2003)。単純に考えれば、Hbs1/Dom34 複合体は Ski7 の約 10 倍の頻度でリボソームの A サイトへ侵入することができるはずである。つまり、Hbs1 や Dom34 の欠損下でのドミナントネガティブ効果の増大は、リボソームの A サイトにおける Ski7 の拮抗相手がなくなったことによって大きくなったと推測できる。このことから、Ski7 のリボソームにおける結合部位は、Hbs1 や他の EF-1 α ホモログ同様にリボソームの A サイトであると強く示唆される。

一般的に、翻訳 G タンパク質におけるドミナントネガティブ効果は、リボソームの A サイト内で翻訳 G タンパク質が次のステップへの反応促進が行えず、リボソーム内に留まってしまうことによって引き起こされることが知られている。しかし、野生型 Ski7 によるドミナントネガティブ効果は、リボソームへの結合が想定されていない N 末端領域のみによっても確認された (図 3-24.)。この結果は、Ski7 はリボソームと結合するときに加えて、exosome や ski complex と結合するときにもドミナントネガティブ効果が生じることを示唆しているように思える。

そこで、Ski7 のもつ機能を、N 末端領域で exosome や ski complex と相互作用する機能と、リボソームの A サイトに結合する機能を分けて考えるため、図 4-2. に示すようにそれぞれを 1 と 2 とし、以後詳細に考察したい。その際、Ski7 は N 末端領域で複合体を形成し、適切な立体配置を形成したとき mRNA の分解を促進することができること、そして、C 末端領域は GTP との結合によってリボソームとの結合を制御しつつ Ski7 自体の細胞内リサイクルに関与していると仮

定とする。

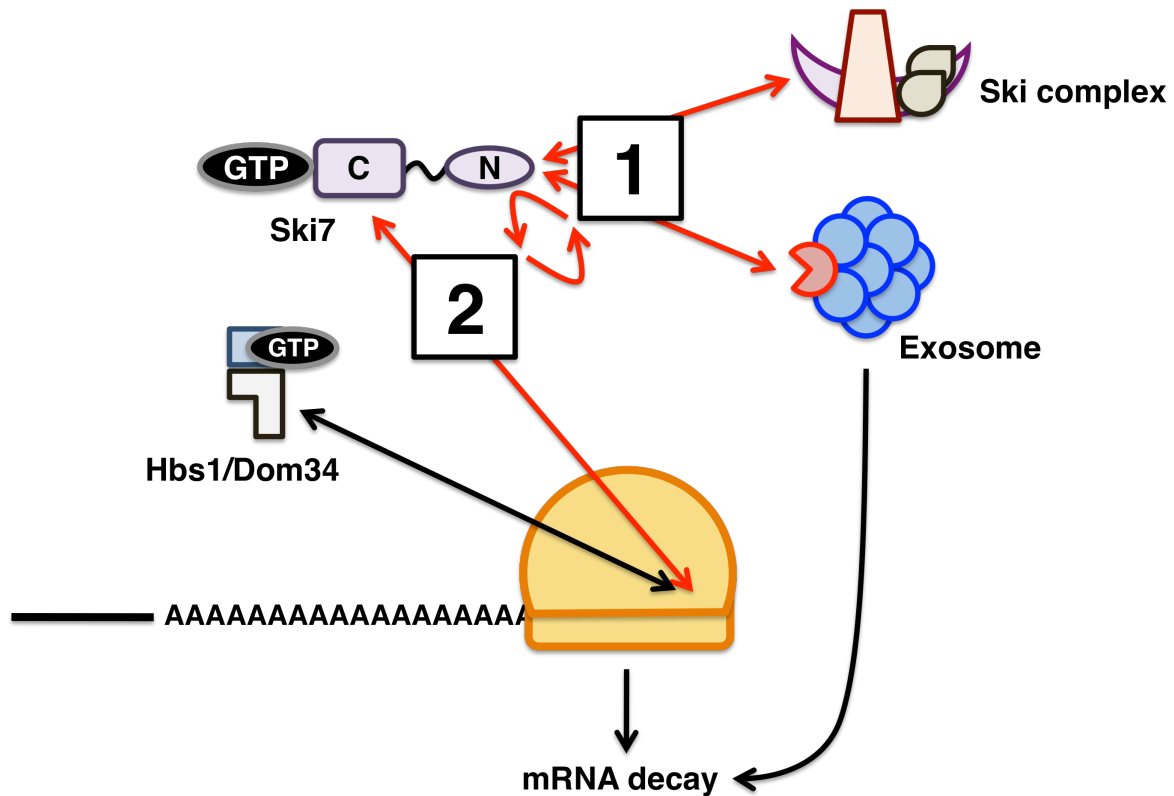


図 4-4. Nonstop decay (NSD)における Ski7 の機能モデル。N 末端領域は exosome の活性化を促進し、C 末端領域はリボソームへの結合と同時に Ski7 の細胞内リサイクル効率を高めている。

実験結果から、変異のない Ski7 全長や N 末端領域のみを発現させるだけでドミナントネガティブ効果が発揮される(図 3-24.)。Ski7 全長では、細胞内に過剰に発現された Ski7 全長が exosome や ski complex の一方のみと結合した状態で存在し、Ski7/exosome/ski complex 複合体の形成頻度の低下が引き起こされる。その結果、exosome の活性化が引き起こされることなく mRNA の分解が抑制されてしまうことで、ドミナントネガティブ効果に繋がるのではないだろうか。

興味深いことに、N 末端領域のみで確認されたドミナントネガティブ効果は、Ski7 全長に比べて大きな影響を与えている(図 3-24.)。Ski7 と exosome 因子 Ski4 や ski complex 因子 Ski3 との結合を確認するため、Y2H 法の結果を比較すると、Ski7 全長と比べて、N 末端領域のみの方が exosome 因子 Ski4 や ski complex 因子 Ski3 との結合が安定していることが示唆された(図 3-30.)。Y2H 法に用いる Ski7 の発現量を確認してみると、Ski7 全長よりも N 末端領域のみは非

常に発現量が低いことが明らかになった (図 3-31. A)。このことを考慮すれば、N 末端領域のみの場合の方が相互作用因子との結合が強くなり起きていることが示唆される。結論として、変異のない Ski7 で確認されたドミナントネガティブ効果は、Ski7 全長と N 末端領域のみのいずれの場合も、exosome や ski complex との結合状態が持続してしまうことで引き起こされる、1 に起因するドミナントネガティブ効果である可能性が高いと判断した。

ここから、Ski7 の効率的な細胞内リサイクルは NSD にとって重要だということが強く示唆された。

4-6. Ski7 機能欠損変異体のドミナントネガティブ効果

GTPase ドメイン内に変異をもつ S281P 変異体は野生型 Ski7 と比較すると顕著なドミナントネガティブ効果を示す (図 3-28.)。この S281P 変異体は、野生型 Ski7 と共通の N 末端領域を持つため、ここで確認されるドミナントネガティブ効果は、N 末端領域に起因するものとは別の要因が考えられる。Hbs1 や Dom34 欠損下での影響に着目すると、その影響は増大していることから (図 3-28.)、S281P 変異体のドミナントネガティブ効果はリボソームへの結合に依存していると推測することが可能である。つまり、1 と 2 の両方でドミナントネガティブ効果が発揮されていることが示唆される。

前述の通り、Ski7 の GTPase ドメイン内の変異の多くは、GTP との結合と解離の状態に何らかの不具合が起きていることが考えられる。その結果、Ski7 によるリボソームへの結合もしくは解離に適した立体構造を維持できなくなり、Ski7 がリボソーム内に留まってしまい、ドミナントネガティブ効果が発揮されているのではないだろうか。

4-5.にて議論したように、N 末端領域における exosome や ski complex との結合が増強されたことでドミナントネガティブ効果が引き起こされたという解釈は可能である。ところが、不思議なことに、野生型 Ski7 全長、F207A 変異体全長、野生型 N 末端領域のみでドミナントネガティブ効果が確認されるのにもかかわらず、F207A 変異をもつ N 末端領域のみではドミナントネガティブ効果は確認されなかった (図 3-26. A)。そこで、Ski7 の Phe²⁰⁷ が exosome の活性化に必要な

なステップに加えて、4-2.で言及したように新生ペプチド鎖の分解に寄与し、Phe²⁰⁷ はリボソーム表面への結合に伴って機能アミノ酸残基であると仮定してみる。すると、F207A 変異体全長では exosome 活性化までのステップにおいてドミナントネガティブ効果が見られるが、F207A 変異をもつ N 末端領域のみは、新生ペプチド鎖の分解促進時に行われるリボソームへの結合が不可能となり、野生型 Ski7 との競合がなくなる。そのため、F207A 変異をもつ N 末端領域のみを発現させたときのみ、ドミナントネガティブ効果が見られなかったという可能性も考えられる。しかし、F207A 変異があったとしても、N 末端領域のみで exosome や ski complex との相互作用時にドミナントネガティブ効果が引き起こされるはずであり、現時点においてこの現象を完全に理解することは困難であると考えている。

検証を試みた Ski7 変異体のなかで、E327G 変異体や D356N 変異体に関しては、シングルコピーベクター上からの発現では顕著な NSD 機能欠損の性質は示さなかったが、マルチコピーベクターからの過剰発現条件下ではドミナントネガティブ効果を示した (図 3-21.、図 3-23. A)。この 2 つのアミノ酸残基の位置は Mg²⁺ の近傍であったことから、Ski7 の機能性には Mg²⁺ の結合よりも、GTP との結合による Ski7 の立体構造の維持の方が重要であることを示唆しているのかもしれない。おそらく、厳密には E327G 変異体や D356N 変異体でも機能低下を招いており、今回の研究で用いたアッセイ系では野生型 Ski7 との活性の差を検出できなかったということだと推測される。

また、興味深いことに、S281P、L354R、E445G 変異体は、全長では顕著なドミナントネガティブ効果が確認される一方で、C 末端領域のみではドミナントネガティブ効果は全く示さなかった (図 3-27.)。つまり、N 末端領域依存的に GTPase ドメインの変異に由来するドミナントネガティブ効果が発揮されていることを強く示唆する。このことは、Ski7 リボソームの結合には N 末端領域が必要であることを示唆しているのかもしれない。

4-7. Ski7 の N 末端領域の振る舞い

本節では、Ski7 の N 末端領域の機能性を考察する上で、他の EF-1 α ホモログタンパク質にも

存在する N 末端領域との比較による検証を行いたい。まず、いずれのタンパク質においても、N 末端領域に関する構造情報は非常に乏しい。しかしながら、以前に我々が明らかにした *Schizosaccharomyces pombe* の eRF3 の結晶構造では、N 末端領域の一部がドメイン 2 や 3 と相互作用している様子が捉えられている (Kong C *et al.*, 2004) (図 4-5. A)。また、Ski7 の結晶構造中에서도、N 末端領域の一部がドメイン 2 と相互作用している様子が確認されている (Kowalinski E *et al.*, 2015) (図 4-5. B)。これらの知見は、細胞中でも Ski7 の N 末端領域が C 末端領域に直接的に相互作用する可能性があることを示す興味深い事実と捉えることが可能である。

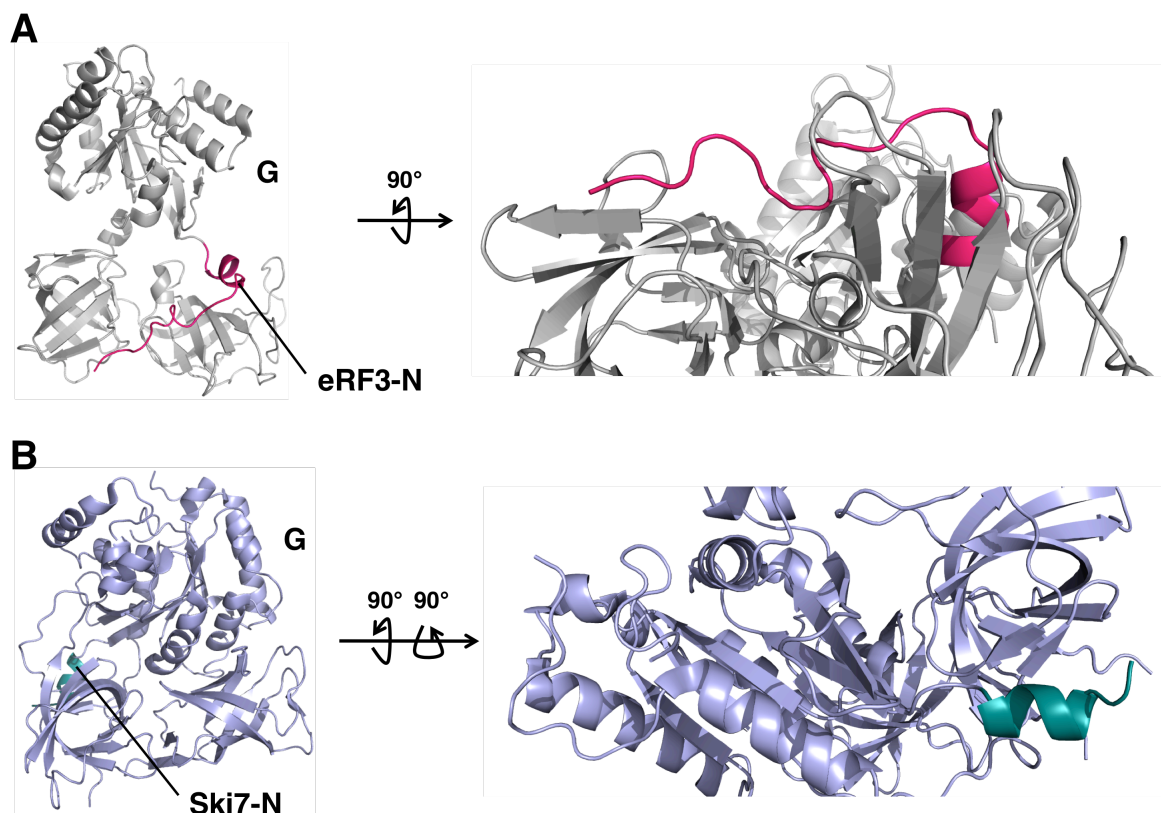


図 4-5. eRF3 および Ski7 の N 末端領域の構造。(A) *Schizosaccharomyces pombe* 由来の eRF3 (PDB accession code : 1R5B) の構造。C 末端領域を灰色、N 末端領域をピンクでそれぞれ示した。(B) *Saccharomyces cerevisiae* 由来の Ski7 (PDB accession code : 4ZKE) の構造。C 末端領域を紫、N 末端領域を緑でそれぞれ示した。

また、Hbs1 の N 末端領域においては、その先端部が mRNA 進入部位に存在するリボソーム

RNA h16 やリボソームタンパク質 rpS3 と相互作用している様子が捉えられている (図 4-6. A)。

中間領域にあたる構造が未同定な部分は直線距離で約 78Åであり、これは、N 末端領域が非常に柔軟で様々な構造を形成することができる証拠のひとつであると考えられる。これまで比較対象としてきた eRF3、Hbs1、Ski7 のうち、拡張領域である N 末端領域が最も長いのは Ski7 であることや、Ski7 全長では、C 末端領域のみに比べてタンパク質精製が容易ではない物理的性質が知られている。これらの状況証拠から考えると、Ski7 の N 末端領域に対して、C 末端領域が GTP に依存的なシス作動的機能を各領域間の相互作用を通じて担う可能性は十分に考えられる。

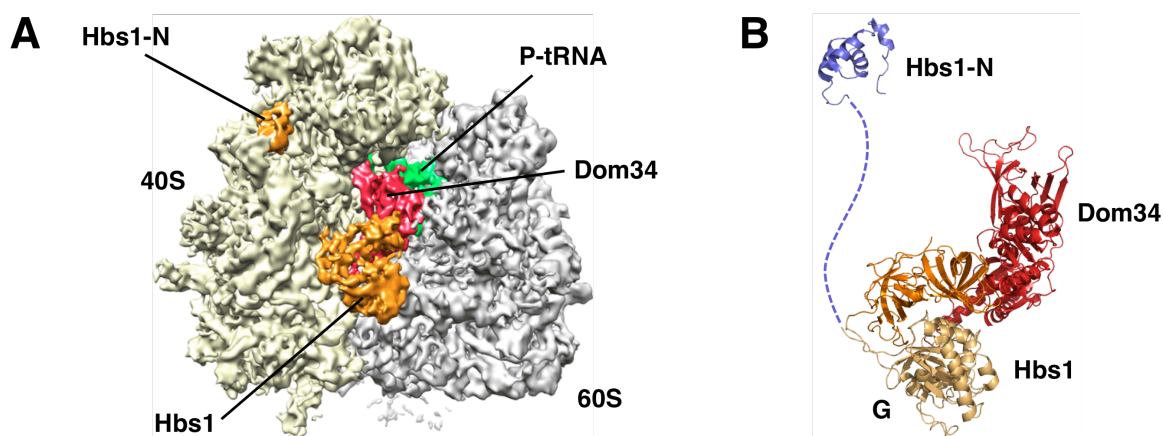


図 4-6. リボソームに結合した Hbs1/Dom34 複合体。(A) クライオ電子顕微鏡によって明らかになったリボソームと Hbs1/Dom34 複合体の結合の様子 (3D-EM accession code : EMD1811)。P サイトに結合した tRNA を緑、A サイトに結合した Dom34 を赤、Hbs1 を橙で示した。(B) Hbs1/Dom34 複合体の構造。Dom34 は赤、Hbs1 の C 末端領域を橙 (ドメイン 2 とドメイン 3 は濃い橙、GTPase ドメインは薄い橙)、N 末端領域を紫でそれぞれ示した。N 末端領域内での構造が未同定の部分は点線で示した。

そこで、Ski7 のリボソームへの結合に N 末端領域が関与している可能性があり、F207A と S281P の 2 重変異体では、それぞれの単変異による機能欠損によりも大きな影響が現れることから (図 3-16.)、各領域の機能性は独立していることが示唆されるため、Ski7 は GTP との結合状態では N 末端領域と C 末端領域が分子内で相互作用すると仮定した。この仮定を支持するかのよう、GTPase ドメイン領域内の変異をもつ Ski7 変異体のドミナントネガティブ効果は、N 末端領域が存在するときのみ確認されることから (図 3-27. A)、Ski7 によるリボソームへの適切な

結合に N 末端領域が必要であることが示唆される。加えて、E445G 変異体はタンパク質の安定性に関して S281P や L354R 変異体とは明らかに異なった挙動を示し (図 3-33.)、Glu⁴⁴⁵ の位置は GTP 結合部位からは程遠く、タンパク質の最も外側に位置していた事実も示唆に富んでいる (図 3-19. B)。

そこで、Ski7 が N 末端領域と C 末端領域において分子内相互作用しているタンパク質である可能性を考慮し、Ski7 の新規機能モデルを提唱する。

4-8. Ski7 の新規機能モデル

NSD における過去の実験結果で示されたように、Ski7 や ski complex 因子の欠損によって exosome による mRNA 分解は抑制されてしまうことから、通常の細胞内に存在する exosome は NSD に対して不活性化型であると推測される。そこで、再度、Ski7 の機能モデルを考える上でポイントとなる実験結果を列挙する。①Ski7 の N 末端領域のみで exosome は活性化型へと変化する (図 3-3.)。②Ski7 の GTPase ドメインの変異のみによって exosome の活性化が阻害される (図 3-15.)。③N および C 末端領域それぞれの機能欠損変異 F207A、S281P に由来する 2 重変異体において機能欠損は増大する (図 3-16.)。すなわち、各領域の機能性は独立している。④最も外側の α -ヘリックス上の Glu⁴⁴⁵ において機能欠損変異体が同定されており (図 3-19.)、ドミナントネガティブ効果は N 末端領域が存在するときのみ確認される。すなわち、前述の議論にもあるように、Ski7 には領域間分子内相互作用の可能性がある。これらの実験的証拠と過去の知見を基にした推測から、Ski7 には N および C 末端領域間の相互作用による立体構造変化に伴う exosome の活性化機構があるのではないかと推測した (図 4-7. A)。

本研究によって分離した C270R、G279D、S281F/P、L284P、L287P、L354R 機能欠損変異体は、GTP 結合状態に不具合をもたらす可能性が極めて高い。これらのアミノ酸残基の機能は、GTP との結合によって、Ski7 がリボソームへの結合に適した構造を保持すると同時に、Ski7 自体の機能モードの変換効率を高めている可能性がある。さらに、exosome の活性化には N 末端領域が必要であることを考えると、Ser²⁸¹ や Leu³⁵⁴ などの GTP 結合部位近傍のアミノ酸残基は、

リボソーム結合後に GTP との結合に連動した N 末端領域と C 末端領域の相互作用解消に寄与している可能性も考えられる。

E445G 機能欠損変異体は、GTP 結合部位からは離れた部位に位置するアミノ酸残基由来の変異体である。このことから、Glu⁴⁴⁵ はリボソーム RNA との相互作用の可能性に加えて、N 末端領域と C 末端領域の領域間相互作用に直接的に影響を与える可能性がある。つまり、各領域の相互作用の解消に寄与することで、Ski7 の機能性を維持している可能性が考えられる。また、Phe²⁰⁷ は exosome や ski complex との相互作用に影響を与えないことから（図 3-32.）、Glu⁴⁴⁵ と同様に N 末端領域と C 末端領域の相互作用の解消に機能するアミノ酸残基なのかもしれない。

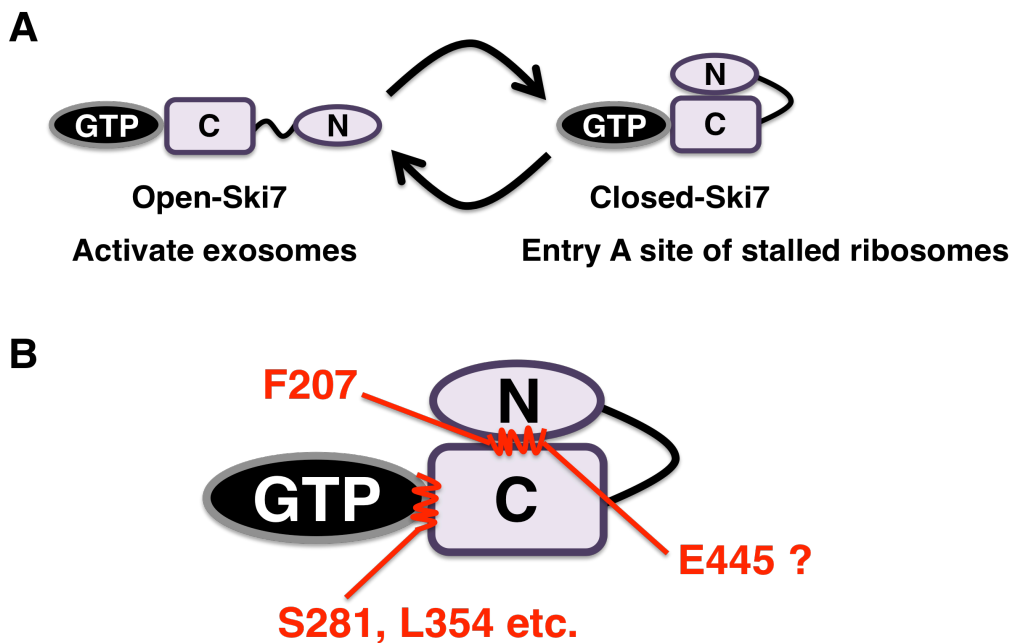


図 4-7. 立体構造変化を伴う Ski7 の機能モデル。(A) Ski7 は exosome の活性化を可能にする相互作用を解消した構造と、リボソームへの結合に適した相互作用を維持した構造を有している。

(B) Ser²⁸¹、Leu³⁵⁴ などの GTP 結合部位近傍のアミノ酸残基は、GTP との適切な結合状態を維持する機能を果たすことが示唆された。また、Phe²⁰⁷ や Glu⁴⁴⁵ は各領域の相互作用解消による立体構造変化に関与するアミノ酸残基である可能性がある。

考察のまとめとして、更なる検証が必要ではあるが、本研究から示唆される NSD 経路での Ski7 の機能モデルを考案した。

Ski7 は、GTP と結合し、立体構造変化を伴って N 末端領域と C 末端領域の相互作用が引き起

こされる。次に、不活性型 exosome と ski complex が Ski7 の N 末端領域へと結合し、Ski7/GTP/exosome/ski complex からなる複合体が形成される。その後、複合体は翻訳停滞を引き起こしたリボソームに特異的に結合し、結合後に N 末端領域と C 末端領域の相互作用が解消される。リボソームの外側へと Ski7 の N 末端領域が露出すると、不活性型 exosome は活性型へと変化する。異常 mRNA の近傍で活性化した exosome は、異常 mRNA 特異的に分解を促進し、NSD が進行する (図 4-8.)。

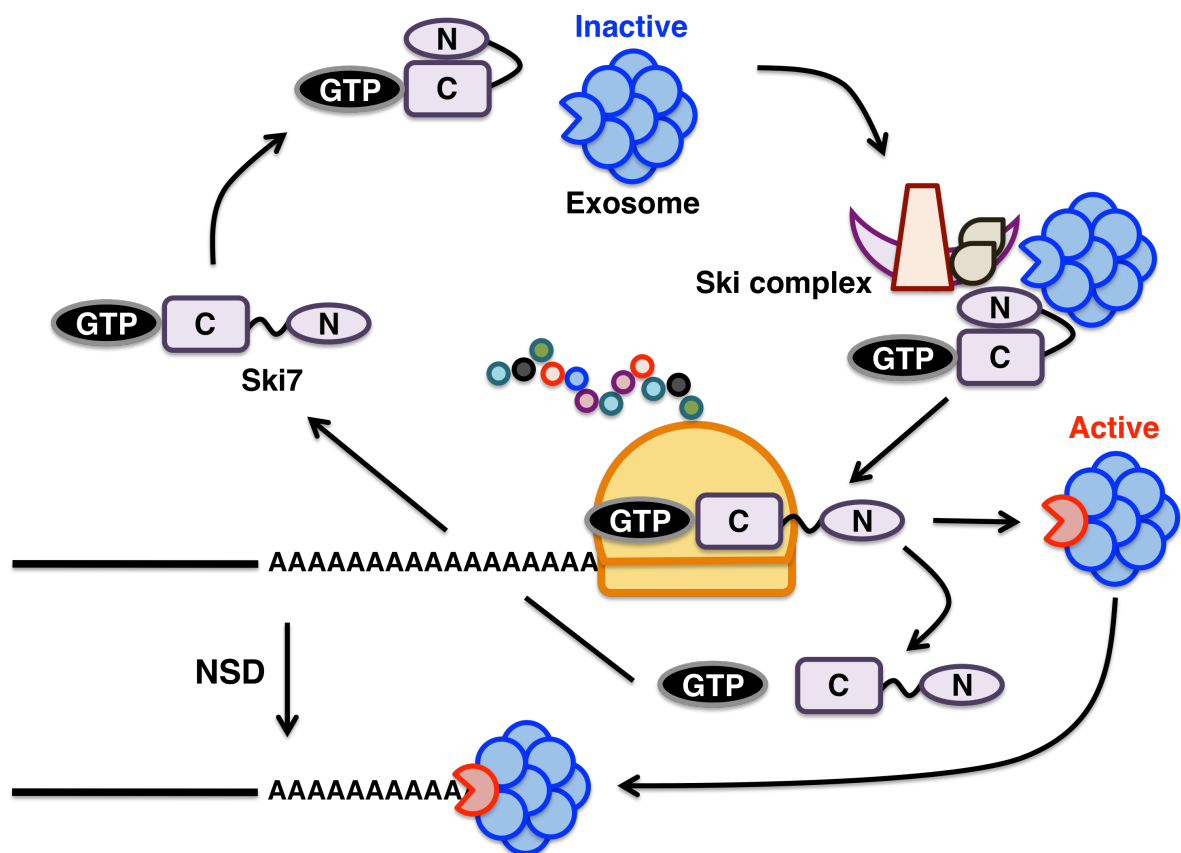


図 4-8. Ski7 を介した NSD の分子メカニズム。Ski7 は、GTP と結合し、分子内相互作用に伴った立体構造変化を引き起こす。Ski7 は exosome や ski complex と N 末端領域で相互作用し、ポリ A 鎖末端において翻訳停滞を引き起こしたリボソームに結合する。その後、Ski7 の N 末端領域と C 末端領域の相互作用解消に付随して exosome の活性化を引き起こし、NSD を促進する。

第5章 展望

第1章で述べたように、EF-1 α はtRNA、eRF3はeRF1、Hbs1はDom34とそれぞれ複合体を形成し、その類似した形態によってリボソームのA部位で遺伝暗号解読に共通する機能性を発揮するとされている。当然の問いとして、Ski7にはパートナータンパク質が存在するのか、という疑問が浮かび上がる。これまでのところ、Ski7のパートナータンパク質に関する報告は何もなく、最新の研究では、他のEF-1 α ホモログタンパク質とSki7のタンパク質表面の構造や電荷の違いから、Ski7のパートナータンパク質は存在しないと推測されている (Kowalinski E *et al.*, 2015)。しかし、提唱したSki7の機能モデルをより確実にするため、パートナータンパク質に関して考察する。

ここで着目すべき知見は、Ski7はHba1から進化系統的に派生したタンパク質であるという点である (Atkinson GC *et al.*, 2008)。また、Ski7 オースログがゲノム上に見当たらないヒトでは、Hbs1/Perota 複合体 (Pelota は酵母における Dom34) がエキソヌクレアーゼ Dis3 (酵母でのエキソソーム因子 Rrp44) や ski complex 因子 Ski2 と相互作用し、NSD を促進することが近年になって報告された (Saito S *et al.*, 2013)。この報告では、ヒトでは酵母などと異なり Hbs1/Pelota 複合体が NSD に積極的に関与していることを示している。また最新の知見では、ヒトの Pelota は Hbs1 だけではなく、Hbs1 ホモログ因子 GTPBP2 と相互作用し、停滞したりボソームの解離に関与する可能性が示唆された (Ishimura R *et al.*, 2014)。つまり、ヒトの Pelota には複数の相互作用タンパク質が存在するということになる。

このような知見から、酵母では、Dom34はHbs1だけでなくSki7とも相互作用するのではないかという推測し、Y2H法を利用してSki7とDom34の相互作用を検証した。しかしながら、Dom34はHbs1とは結合するが、Ski7とは結合するという結果は得られなかった (データ未記載)。

次に、Hbs1/Dom34複合体が停滞したりボソームで作用し、Hbs1がリボソームから遊離した後、Rli1と競合しながらSki7がリボソーム内でDom34と結合する可能性を想定し (図1-4.)、

NSD において Hbs1 の関与を見出すことができないかと nonstop-*HIS3* レポーター遺伝子で Hbs1 の関与を検証した。しかしながら、Hbs1 欠損株、Dom34 欠損株のどちらでも NSD は引き起こされており、既知の NGD を阻害する Hbs1 機能欠損変異体もドミナントネガティブ効果を示すことはなかった (図 3-29.)。このことは、Dom34 が Ski7 のパートナータンパク質である可能性が低いことを示すと同時に、Hbs1 と Ski7 とは異なる機序でリボソームに結合していることを示唆している。

図 3-29. D では、Ski7 欠損下において、Hbs1-T232A 変異体が NSD を野生型よりも若干促進し Ski7 様の活性を示す結果が得られたが、Hbs1 の GTPase ドメインにおける点変異 (T232A) のみで、exosome を活性化することができるようになるとは考えにくい。このことから、この Hbs1 変異体は、mRNA の分解ではなく、リボソーム解離などその他の経路を増強することで NSD を全体的に加速する機能獲得変異体として機能していると考えられる。

網羅的な Yeast two-hybrid (Y2H)法によって、出芽酵母におけるタンパク質間の相互作用マップがこれまでに報告されている (Fromont-Racine M *et al.*, 1997)。これをもとに、Lsm タンパク質群に対して相互作用因子の特定が行われ (Fromont-Racine M *et al.*, 2000)、Lsm8 と Ski7 が相互作用することが確認された。また、フェージディスプレイと Y2H 法を組み合わせた結合分子の網羅的スクリーニングも実施され、Hse1 が Ski7 と相互作用する因子として報告されている (Tong AH *et al.*, 2002 ; Tonikian R *et al.*, 2009)。

本研究では、これらの情報をもとに、Y2H 法を用いて個別に再確認を行った。ところが、Lsm8 と Ski7 の相互作用は確認されず、Hse1 と Ski7 の相互作用に関しては、Hse1 は空ベクターとの組み合わせによっても生育してしまうので、偽陽性であったと結論付けた (データ未記載)。

結論として、網羅解析データからは、Ski7 のパートナータンパク質を絞り込むことはできなかった。

Ski7 は過剰発現が困難なタンパク質として知られていたが、近年では C 末端領域のみに限れば X 線結晶構造解析に用いることのできる分量のタンパク質精製も可能になってきている (Kowalinski E *et al.*, 2015)。今後は、本研究で分離した Ski7 機能欠損変異体を個別に精製し、

GTP 結合強度などの特性を測定することで、より詳細な Ski7 の機能メカニズムの推定も可能になるだろう。さらに、本研究にて予測された Ski7 の各領域間の相互作用についても検証が可能となり、ダイナミックな Ski7 の機能メカニズムが解き明かされることを期待したい。

近年では、クライオ電子顕微鏡を用いた研究によって、eRF3/eRF1 複合体や Hbs1/Dom34 複合体がリボソームに結合する様子が高解像度で捉えられている (Preis A *et al.*, 2014 ; Becker T *et al.*, 2011)。つまり、Ski7 の精製が可能になったことで、クライオ電子顕微鏡を用いれば、Ski7 とリボソームが結合する様子を解析することができるはずである。近い将来、パートナータンパク質がなくとも Ski7 はリボソームに結合することが可能なのか、どのように結合しているのかなど、多くの疑問に結論が導き出されるだろう。

翻訳制御機構に関する網羅解析のひとつに、リボソームプロファイリングと呼ばれる手法が存在する (Ingolia NT *et al.*, 2009)。この手法の画期的な点は、翻訳途中のリボソームが解読中の mRNA 配列を次世代シーケンサーによって解析することで、*in vivo* でのリボソームの動態を詳細に明らかにすることができる点である。この方法を用い、人工的な遺伝子を発現させて機能評価されていた Hbs1/Dom34 複合体が、実際には、ポリ A 鎖付近で翻訳停滞を引き起こしているリボソームに作用し、停滞した翻訳の状態を解消していることが既に示されている (Guydosh NR. and Green R., 2014)。同様の解析は、基本的にはどのようなタンパク質にも応用が可能である。つまり、Ski7 に関しても、細胞内の Ski7 の有無によって、翻訳途中のリボソームがどのように変化しているのかをリボソームプロファイリングを用いて解析することによって、Ski7 の内在性の標的遺伝子や標的となるような新規な現象を見出すことができるのではないかとと思われる。

最後に、Ski7 は他の EF-1 α ホモログタンパク質とは異なった性質を兼ね備えた翻訳 G タンパク質であり、まだまだ謎に満ちていることから、研究対象として非常に魅力的なタンパク質であると一言添えさせて頂きたい。

第 6 章 参考文献

Anderson, J.S., and Parker, R.P. (1998). The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *Embo J* 17, 1497–1506.

Araki, Y., Takahashi, S., Kobayashi, T., Kajiho, H., Hoshino, S., and Katada, T. (2001). Ski7p G protein interacts with the exosome and the Ski complex for 3'-to-5' mRNA decay in yeast. *Embo J* 20, 4684–4693.

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.

Ball, S.G., Tirtiaux, C., and Wickner, R.B. (1984). Genetic control of L-A and L-(Bc) dsRNA copy number in killer systems of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 107, 199–217.

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, 715–720.

Becker, T., Franckenberg, S., Wickles, S., Shoemaker, C.J., Anger, A.M., Armache, J.-P., Sieber, H., Ungewickell, C., Berninghausen, O., Daberkow, I., et al. (2012). Structural basis of highly conserved ribosome recycling in eukaryotes and archaea. *Nature* 482, 501–506.

Benard, L., Carroll, K., Valle, R.C., Masison, D.C., and Wickner, R.B. (1999). The ski7 antiviral protein is an EF1- α homolog that blocks expression of non-Poly(A) mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Virol.* 73, 2893–2900.

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.

Berchtold, H., Reshetnikova, L., Reiser, C.O., Schirmer, N.K., Sprinzl, M., and Hilgenfeld, R. (1993). Crystal structure of active elongation factor Tu reveals major domain rearrangements. *Nature* 365, 126–132.

Bourne, H.R., Sanders, D.A., and McCormick, F. (1990). The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 348, 125–132.

Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., and Boeke, J.D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of

- strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* *14*, 115–132.
- 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.
- Brown, J.T., Bai, X., and Johnson, A.W. (2000). The yeast antiviral proteins Ski2p, Ski3p, and Ski8p exist as a complex in vivo. *RNA* *6*, 449–457.
- Butler, J.S. (2002). The yin and yang of the exosome. *Trends Cell Biol.* *12*, 90–96.
- 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.
- Chang, J.C., and Kan, Y.W. (1979). beta 0 thalassemia, a nonsense mutation in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* *76*, 2886–2889.
- Chen, L., Muhrad, D., Hauryliuk, V., Cheng, Z., Lim, M.K., Shyp, V., Parker, R., and Song, H. (2010). Structure of the Dom34–Hbs1 complex and implications for no-go decay. *Nature Structural & Molecular Biology* *17*, 1233–1240.
- Cheng, Z., Saito, K., Pisarev, A.V., Wada, M., Pisareva, V.P., Pestova, T.V., Gajda, M., Round, A., Kong, C., Lim, M., et al. (2009). Structural insights into eRF3 and stop codon recognition by eRF1. *Genes & Development* *23*, 1106–1118.
- Chien, C.T., Bartel, P.L., Sternglanz, R., and Fields, S. (1991). The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* *88*, 9578–9582.
- Coller, J., and Parker, R. (2004). Eukaryotic mRNA decapping. *Annu. Rev. Biochem.* *73*, 861–890.
- Connell, S.R., Takemoto, C., Wilson, D.N., Wang, H., Murayama, K., Terada, T., Shirouzu, M., Rost, M., Schüler, M., Giesebrecht, J., et al. (2007). Structural basis for interaction of the ribosome with the switch regions of GTP-bound elongation factors. *Molecular Cell* *25*, 751–764.
- Cool, R.H., and Parmeggiani, A. (1991). Substitution of histidine-84 and the GTPase mechanism of elongation factor Tu. *Biochemistry* *30*, 362–366.

- Craig, E.A., and Jacobsen, K. (1985). Mutations in cognate genes of *Saccharomyces cerevisiae* hsp70 result in reduced growth rates at low temperatures. *Molecular and Cellular Biology* 5, 3517–3524.
- Decker, C.J., and Parker, R. (1993). A turnover pathway for both stable and unstable mRNAs in yeast: evidence for a requirement for deadenylation. *Genes & Development* 7, 1632–1643.
- Defenouillère, Q., Yao, Y., 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 110, 5046–5051.
- Dimitrova, L.N., Kuroha, K., Tatematsu, T., and Inada, T. (2009). Nascent peptide-dependent translation arrest leads to Not4p-mediated protein degradation by the proteasome. *J. Biol. Chem.* 284, 10343–10352.
- Doma, M.K., and Parker, R. (2006). Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature* 440, 561–564.
- Eberle, A.B., Lykke-Andersen, S., Mühlemann, O., and Jensen, T.H. (2009). SMG6 promotes endonucleolytic cleavage of nonsense mRNA in human cells. *Nature Structural & Molecular Biology* 16, 49–55.
- Edwards-Gilbert, G., Veraldi, K.L., and Milcarek, C. (1997). Alternative poly(A) site selection in complex transcription units: means to an end? *Nucleic Acids Research* 25, 2547–2561.
- Fleischer, T.C., Weaver, C.M., McAfee, K.J., Jennings, J.L., and Link, A.J. (2006). Systematic identification and functional screens of uncharacterized proteins associated with eukaryotic ribosomal complexes. *Genes & Development* 20, 1294–1307.
- Frischmeyer, P.A. (2002). An mRNA Surveillance Mechanism That Eliminates Transcripts Lacking Termination Codons. *Science* 295, 2258–2261.
- Fromont-Racine, M., Mayes, A.E., Brunet-Simon, A., Rain, J.C., Colley, A., Dix, I., Decourty, L., Joly, N., Ricard, F., Beggs, J.D., et al. (2000). Genome-wide protein interaction screens reveal functional networks involving Sm-like proteins. *Yeast* 17, 95–110.
- Fromont-Racine, M., Rain, J.-C., and Legrain, P. (1997). Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. *Nature Genetics* 16, 277–282.
- Godefroit, P., Sinitisa, S.M., Dhouailly, D., Bolotsky, Y.L., Sizov, A.V., McNamara, M.E., Benton, M.J., and Spagna, P. (2014). A Jurassic ornithischian dinosaur from Siberia with both feathers and scales. *Science* 345, 451–455.

- Graille, M., Chaillet, M., and van Tilbeurgh, H. (2008). Structure of Yeast Dom34: A protein related to translation termination factor Erf1 and involved in No-Go decay. *J. Biol. Chem.* *283*, 7145–7154.
- Guydosh, N.R., and Green, R. (2014). Dom34 rescues ribosomes in 3' untranslated regions. *Cell* *156*, 950–962.
- Hoshino, S.-I. (2012). Mechanism of the initiation of mRNA decay: role of eRF3 family G proteins. *WIREs RNA* *3*, 743–757.
- Hsu, C.L., and Stevens, A. (1993). Yeast cells lacking 5'→3' exoribonuclease 1 contain mRNA species that are poly(A) deficient and partially lack the 5' cap structure. *Molecular and Cellular Biology* *13*, 4826–4835.
- Huh, W.-K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S., and O'Shea, E.K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* *425*, 686–691.
- Inada, T., and Aiba, H. (2005). Translation of aberrant mRNAs lacking a termination codon or with a shortened 3'-UTR is repressed after initiation in yeast. *Embo J* *24*, 1584–1595.
- Inada, T., Winstall, E., Tarun, S.Z., Yates, J.R., Schieltz, D., and Sachs, A.B. (2002). One-step affinity purification of the yeast ribosome and its associated proteins and mRNAs. *RNA* *8*, 948–958.
- Inagaki, Y., and Ford Doolittle, W. (2000). Evolution of the eukaryotic translation termination system: origins of release factors. *Mol. Biol. Evol.* *17*, 882–889.
- Ingolia, N.T., Ghaemmaghami, S., Newman, J.R.S., and Weissman, J.S. (2009). Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science* *324*, 218–223.
- Isken, O., and Maquat, L.E. (2007). Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. *Genes & Development* *21*, 1833–3856.
- Ito, K., Ebihara, K., Uno, M., and Nakamura, Y. (1996). Conserved motifs in prokaryotic and eukaryotic polypeptide release factors: tRNA-protein mimicry hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* *93*, 5443–5448.
- 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.

Ivanov, P.V., Gehring, N.H., Kunz, J.B., Hentze, M.W., and Kulozik, A.E. (2008). Interactions between UPF1, eRFs, PABP and the exon junction complex suggest an integrated model for mammalian NMD pathways. *Embo J* 27, 736–747.

Kashima, I., Jonas, S., Jayachandran, U., Buchwald, G., Conti, E., Lupas, A.N., and Izaurralde, E. (2010). SMG6 interacts with the exon junction complex via two conserved EJC-binding motifs (EBMs) required for nonsense-mediated mRNA decay. *Genes & Development* 24, 2440–2450.

Kashima, I., Yamashita, A., Izumi, N., Kataoka, N., Morishita, R., Hoshino, S., Ohno, M., Dreyfuss, G., and Ohno, S. (2006). Binding of a novel SMG-1-Upf1-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. *Genes & Development* 20, 355–367.

Kellis, M., Birren, B.W., and Lander, E.S. (2004). Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 428, 617–624.

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 α complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 107, 17575–17579.

Kodama, H., Ito, K., and Nakamura, Y. (2007). The role of N-terminal domain of translational release factor eRF3 for the control of functionality and stability in *S. cerevisiae*. *Genes to Cells* 12, 639–650.

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*. *Molecular Cell* 14, 233–245.

Kowalinski, E., Schuller, A., Green, R., and Conti, E. (2015). *Saccharomyces cerevisiae* Ski7 is a GTP-binding protein adopting the characteristic conformation of active translational GTPases. *Structure* 23, 1336–1343.

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* 1–6.

Le Hir, H., Izaurralde, E., Maquat, L.E., and Moore, M.J. (2000a). The spliceosome deposits multiple proteins 20–24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *Embo J* 19, 6860–6869.

Le Hir, H., Moore, M.J., and Maquat, L.E. (2000b). Pre-mRNA splicing alters mRNP composition: evidence for stable association of proteins at exon-exon junctions. *Genes & Development* 14, 1098–1108.

- Lee, H.H., Kim, Y.-S., Kim, K.H., Heo, I., Kim, S.K., Kim, O., Kim, H.K., Yoon, J.Y., Kim, H.S., Kim, D.J., et al. (2007). Structural and functional insights into Dom34, a key component of no-go mRNA decay. *Molecular Cell* *27*, 938–950.
- 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.
- Lewis, B.P., Green, R.E., and Brenner, S.E. (2003). Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. *100*, 189–192.
- Liljas, A., Ehrenberg, M., and Aqvist, J. (2011). Comment on “The Mechanism for Activation of GTP Hydrolysis on the Ribosome.” *Science* *333*, 37–37.
- Lyumkis, D., Oliveira dos Passos, D., 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. *111*, 15981–15986.
- Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D., and Polonelli, L. (1997). Yeast killer systems. *Clin. Microbiol. Rev.* *10*, 369–400.
- Mahadevan, S., Raghunand, T.R., Panicker, S., and Struhl, K. (1997). Characterisation of 3' end formation of the yeast HIS3 mRNA. *Gene* *190*, 69–76.
- Mangus, D.A., Evans, M.C., and Jacobson, A. (2003). Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome Biology* *4*, 223.
- Maquat, L.E. (2002). Molecular biology. Skiing toward nonstop mRNA decay. *Science* *295*, 2221–2222.
- Marshall, A.N., Montealegre, M.C., Jiménez-López, C., Lorenz, M.C., and van Hoof, A. (2013). Alternative splicing and subfunctionalization generates functional diversity in fungal proteomes. *PLoS Genet* *9*, e1003376.
- Mitchell, P., Petfalski, E., Shevchenko, A., Mann, M., and Tollervey, D. (1997). The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'→5' exoribonucleases. *Cell* *91*, 457–466.

- Moazed, D., and Noller, H.F. (1989). Intermediate states in the movement of transfer RNA in the ribosome. *Nature* *342*, 142–148.
- Muhrad, D., Decker, C.J., and Parker, R. (1994). Deadenylation of the unstable mRNA encoded by the yeast MFA2 gene leads to decapping followed by 5'→3' digestion of the transcript. *Genes & Development* *8*, 855–866.
- Muhrad, D., Decker, C.J., and Parker, R. (1995). Turnover mechanisms of the stable yeast PGK1 mRNA. *Molecular and Cellular Biology* *15*, 2145–2156.
- Mumberg, D., Müller, R., and Funk, M. (1995). Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* *156*, 119–122.
- Nakamura, Y., and Ito, K. (2011). tRNA mimicry in translation termination and beyond. *WIREs RNA* *2*, 647–668.
- Nelson, R.J., Ziegelhoffer, T., Nicolet, C., Werner-Washburne, M., and Craig, E.A. (1992). The translation machinery and 70 kd heat shock protein cooperate in protein synthesis. *Cell* *71*, 97–105.
- Nissen, P., Kjeldgaard, M., Thirup, S., Polekhina, G., Reshetnikova, L., Clark, B.F., and Nyborg, J. (1995). Crystal structure of the ternary complex of Phe-tRNA^{Phe}, EF-Tu, and a GTP analog. *Science* *270*, 1464–1472.
- 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.
- Pape, T., Wintermeyer, W., and Rodnina, M.V. (1998). Complete kinetic mechanism of elongation factor Tu-dependent binding of aminoacyl-tRNA to the A site of the *E. coli* ribosome. *Embo J* *17*, 7490–7497.
- Parker, R. (2012). RNA Degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *191*, 671–702.
- Pfund, C., Lopez-Hoyo, N., Ziegelhoffer, T., Schilke, B.A., Lopez-Buesa, P., Walter, W.A., Wiedmann, M., and Craig, E.A. (1998). The molecular chaperone Ssb from *Saccharomyces cerevisiae* is a component of the ribosome-nascent chain complex. *Embo J* *17*, 3981–3989.
- 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 J* *30*, 1804–1817.

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.

Ridley, S.P., Sommer, S.S., and Wickner, R.B. (1984). Superkiller mutations in *Saccharomyces cerevisiae* suppress exclusion of M2 double-stranded RNA by L-A-HN and confer cold sensitivity in the presence of M and L-A-HN. *Molecular and Cellular Biology* *4*, 761–770.

Riis, B., Rattan, S.I.S., Clark, B.F.C., and Merrick, W.C. (1990). Eukaryotic protein elongation factors. *Trends Biochem. Sci.* *15*, 420–424.

Saito, K., Kobayashi, K., Wada, M., Kikuno, I., Takusagawa, A., Mochizuki, M., Uchiumi, T., Ishitani, R., Nureki, O., and Ito, K. (2010). Omnipotent role of archaeal elongation factor 1 alpha (EF1 α) in translational elongation and termination, and quality control of protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* *107*, 19242–19247.

Saito, S., Hosoda, N., and Hoshino, S.I. (2013). The Hbs1-Dom34 protein complex functions in non-stop mRNA decay in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* *288*, 17832–17843.

Salas-Marco, J., and Bedwell, D.M. (2004). GTP hydrolysis by eRF3 facilitates stop codon decoding during eukaryotic translation termination. *Molecular and Cellular Biology* *24*, 7769–7778.

Seshadri, A., Samhita, L., Gaur, R., Malshetty, V., and Varshney, U. (2009). Analysis of the *fusA2* locus encoding EFG2 in *Mycobacterium smegmatis*. *Tuberculosis* *89*, 453–464.

Shao, S., Brown, A., Santhanam, B., and Hegde, R.S. (2015). Structure and assembly pathway of the ribosome quality control complex. *Molecular Cell* *57*, 433–444.

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

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–E1398.

Shoemaker, C.J., and Green, R. (2012). Translation drives mRNA quality control. *Nature Structural & Molecular Biology* *19*, 594–601.

Song, H., Parsons, M.R., Rowsell, S., Leonard, G., and Phillips, S.E. (1999). Crystal structure of intact elongation factor EF-Tu from *Escherichia coli* in GDP conformation at 2.05 Å resolution. *J. Mol. Biol.* *285*, 1245–1256.

- Stansfield, I., Jones, K.M., Kushnirov, V.V., Dagkesamanskaya, A.R., Poznyakovski, A.I., Paushkin, S.V., Nierras, C.R., Cox, B.S., Ter-Avanesyan, M.D., and Tuite, M.F. (1995). The products of the SUP45 (eRF1) and SUP35 genes interact to mediate translation termination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 14, 4365–4373.
- Ter-Avanesyan, M.D., Kushnirov, V.V., Dagkesamanskaya, A.R., Didichenko, S.A., Chernoff, Y.O., Inge-Vechtomov, S.G., and Smirnov, V.N. (1993). Deletion analysis of the SUP35 gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* reveals two non-overlapping functional regions in the encoded protein. *Mol. Microbiol.* 7, 683–692.
- Toh-E, A., Guerry, P., and Wickner, R.B. (1978). Chromosomal superkiller mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 136, 1002–1007.
- Tong, A.H.Y., Drees, B., Nardelli, G., Bader, G.D., Brannetti, B., Castagnoli, L., Evangelista, M., Ferracuti, S., Nelson, B., Paoluzi, S., et al. (2002). A combined experimental and computational strategy to define protein interaction networks for peptide recognition modules. *Science* 295, 321–324.
- Tonikian, R., Xin, X., Toret, C.P., Gfeller, D., Landgraf, C., Panni, S., Paoluzi, S., Castagnoli, L., Currell, B., Seshagiri, S., et al. (2009). Bayesian modeling of the yeast SH3 domain interactome predicts spatiotemporal dynamics of endocytosis proteins. *PLoS Biol* 7, e1000218.
- van Hoof, A. (2002). Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science* 295, 2262–2264.
- van Hoof, A., Lennertz, P., and Parker, R. (2000a). Yeast exosome mutants accumulate 3'-extended polyadenylated forms of U4 small nuclear RNA and small nucleolar RNAs. *Molecular and Cellular Biology* 20, 441–452.
- van Hoof, A., Staples, R.R., Baker, R.E., and Parker, R. (2000b). Function of the ski4p (Csl4p) and Ski7p proteins in 3'-to-5' degradation of mRNA. *Molecular and Cellular Biology* 20, 8230–8243.
- Wallrapp, C., Verrier, S.B., Zhouravleva, G., Philippe, H., Philippe, M., Gress, T.M., and Jean-Jean, O. (1998). The product of the mammalian orthologue of the *Saccharomyces cerevisiae* HBS1 gene is phylogenetically related to eukaryotic release factor 3 (eRF3) but does not carry eRF3-like activity. *FEBS Letters* 440, 387–392.
- Wang, L. (2005). Domain interactions within the Ski2/3/8 complex and between the Ski complex and Ski7p. *RNA* 11, 1291–1302.
- Wickner, R.B. (1992). Double-stranded and single-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Microbiol.* 46, 347–375.

Widner, W.R., and Wickner, R.B. (1993). Evidence that the SKI antiviral system of *Saccharomyces cerevisiae* acts by blocking expression of viral mRNA. *Molecular and Cellular Biology* *13*, 4331–4341.

Zeidler, W., Egle, C., Ribeiro, S., Wagner, A., Katunin, V., Kreutzer, R., Rodnina, M., Wintermeyer, W., and Sprinzl, M. (1995). Site-directed mutagenesis of *Thermus thermophilus* elongation factor Tu. Replacement of His85, Asp81 and Arg300. *Eur. J. Biochem.* *229*, 596–604.

Zhouravleva, G., Frolova, L., Le Goff, X., Le Guellec, R., Inge-Vechtomov, S., Kisselev, L., and Philippe, M. (1995). Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3. *Embo J* *14*, 4065–4072.

追記：本学位論文の3章の結果、および4章の考察の一部は、下記論文で公表済みである。

Horikawa, W., Endo, K., Wada, M., Ito, K. (2016) Mutations in the G-domain of Ski7 cause specific dysfunction in non-stop decay.

Scientific Reports 6, Article number: 29295, doi:10.1038/srep29295

謝辞

本研究は、指導教官である東京大学新領域創成科学研究科の伊藤耕一教授の指導のもとで行われました。出芽酵母の扱い方から始まり分子遺伝学の神髄を骨身に沁みるまで、終始、御懇切なる御指導を賜りましたことを心から感謝致します。

東京大学医科学研究所在籍時、素晴らしい研究環境を整えて頂き、時には大きな激励を下さいました中村義一東京大学名誉教授（現 株式会社リボミック代表取締役社長）に心より感謝致します。

本研究の遂行にあたり、Ski7 抗体を含めた研究材料の提供や熱心かつ有益な御討論をして下さいました、東京大学新領域創成科学研究科の富田野乃准教授に感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、Hbs1 発現ベクターを快く提供して下さいました東北大学大学院薬学研究科の稲田利文教授に感謝申し上げます。

日頃より、有益な御助言、御討論をして頂きました和田美紀博士、遠藤慧博士、斎藤和紀博士を始めとする生命分子遺伝学分野の皆様へ深く感謝致します。特に、5年間もの長期にわたって、実験指導から実験結果の解釈まで多くの時間を共有し、私を成長させて下さいました斎藤和紀博士に格別な感謝を申し上げます。

そして、どのような状況に陥っても、辛抱強く優しい眼差しで学生生活全般を支えてくれた両親に心から感謝致します。