

論文の内容の要旨

論文題目 翻訳伸長因子ホモログSKI7の機能解析

氏名 堀川 航

【背景と目的】

DNA から転写された初期の mRNA は、約 30%が正常タンパク質を合成することができない異常 mRNA であると言われている。これらの異常 mRNA からは、特定の機能を失うばかりでなく、細胞内機能を阻害する有害なタンパク質を合成する可能性があるため、翻訳反応の初期段階で見極められ、合成途中のタンパク質とともに異常 mRNA は速やかに分解される経路が知られている。それらは、総じて「mRNA 品質管理機構」と呼ばれている。

スプライシングエラーなどによって生じる、終止コドンを欠いた mRNA (通称 Nonstop mRNA) は典型的な異常 mRNA であり、Nonstop decay (通称 NSD) と呼ばれる機構により速やかに分解される。Nonstop mRNA では、終止コドンがないために翻訳終結ペプチド鎖解離因子による成熟タンパク質の解離が行われないうちに mRNA の終端までリボソームが進行し停滞すると考えられるが、その後どのような仕組みで NSD 経路が促進されるのかは明らかとなっていない。

出芽酵母 SKI7 は、リボソーム A サイトにて遺伝暗号解読に関わる G タンパク質、翻訳伸長因子 EF-1 α や解離因子 eRF3 のホモログである。SKI7 は、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を持つエキソソームや、その補助因子 Ski 複合体と相互作用することが知られ、SKI7 欠損下では NSD が強く阻害されることから、mRNA 終端まで到達した停滞状態のリボソーム特異的に SKI7 が直接結合し、分解経路の促進を引き起こすと考えられている (図 1)。

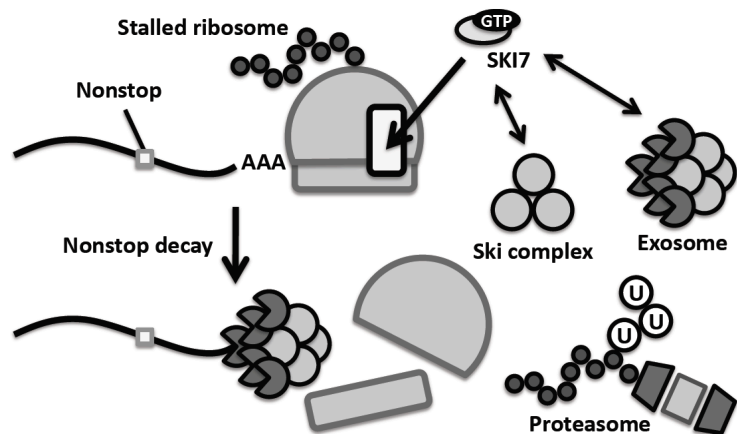


図1. Nonstop decayのモデル図。mRNAの終端にて停滞したリボソームはSKI7によって認識され、その後迅速なmRNAの分解が引き起こされる。同時に、翻訳途中のタンパク質はプロテアソームによって分解される。

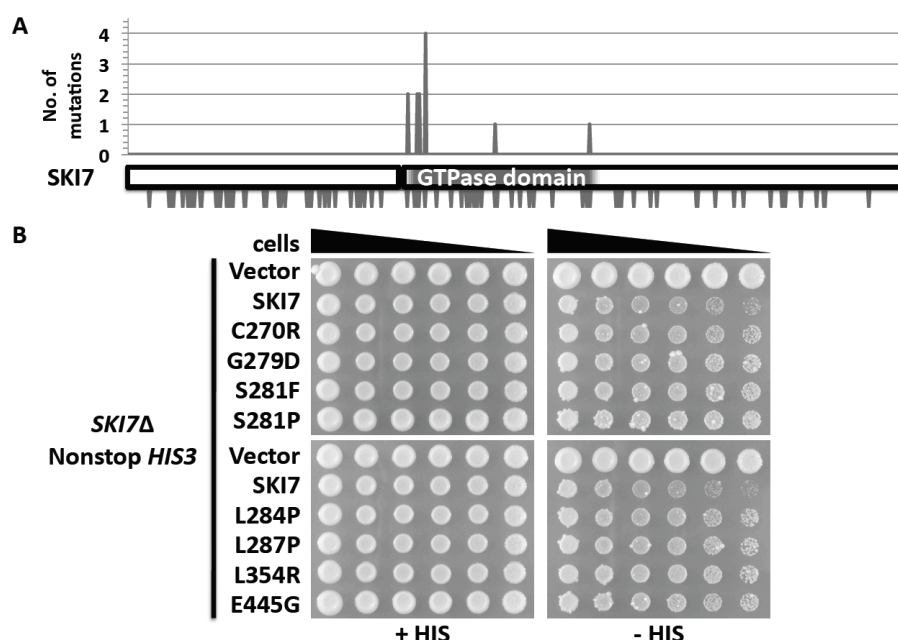
SKI7 は、他の翻訳因子との保存性が高い G ドメインが存在する C 末端領域と、ユ

ニークな N 末端領域から構成されている。翻訳伸長因子 EF-1 α や eRF3 は、それぞれ tRNA や eRF1 などの遺伝暗号解読アダプター分子と GTP 依存的にヘテロダイマーを形成し、リボソームの遺伝暗号部位へのアダプター分子の運搬を行い、GDP への加水分解により自身はリボソームから離脱するという共通した機能モードを有するが、SKI7 の C 末端領域の G ドメインは他の翻訳因子に比べて保存性が低く、またこの領域に結合するアダプター因子も知られていない。そのため、SKI7 が G タンパク質として GTP 依存的な機能モードを有するのかどうかは全く手掛かりが掴めていない。

そこで、遺伝学的・生化学的解析を駆使し、NSDにおけるSKI7の機能性を明らかにすることを目標に研究を行った。

【研究内容・結果】

SKI7 機能欠損変異体の遺伝学的単離



SKI7 は微
小な活性を
持つことな
どを理由に、
保存領域で
ある C 末端
領域や非保
存領域であ
る N 末端と
mRNA 分解
との大まか
な関係性は
議論されて
いたが、活性
に変化が認

図2. (A)無作為突然変異法によって単離されたSKI7機能欠損変異体のマッピング。
(B)Nonstop-HIS3レポーター遺伝子の発現に対するSKI7機能欠損変異体の影響。
認められる変異体は一切単離されていない。SKI7 の機能性が不明瞭な中、他の EF-1 α ホモログと同様の機能性を発揮するのかどうかを議論する上で、変異体単離は今後のSKI7 研究のブレイクスルーとなり得ると予想した。そこで、error-prone PCR 法によって無作為に変異導入した SKI7 を、SKI7 欠損条件下にて HIS3-Nonstop レポーターとともに発現させ、機能欠損変異体の単離を試みた。1 次セクションで得られた 153 クローンを再セクションによって選別した結果、7 種類の機能欠損変異体の単離に成功した (図 2)。

SKI7 立体配置予測図への変異アミノ酸部位マッピング

SKI7 は、今のところ詳細な立体構造情報は得られておらず、どのような構造をしているのか分かっていない。近年、X線結晶解析によって、古細菌 *Aeropyrum pernix* における GTP 結合フォーム状態の EF-1 α の詳細な構造が解かれた。そこで、この EF-1 α 上に得られた変異体のアミノ酸変異部位をマッピングすると、その多くが GTP、Mg²⁺ の結合ポケット近傍に集中していた (図 3)。この事実は、これまで NSD への関与の有無が不明瞭であった保存領域、すなわち G ドメインの機能が維持されており、NSD 経路での SKI7 の分子スイッチとしての役割を強く示唆するものと考えられることが出来る。

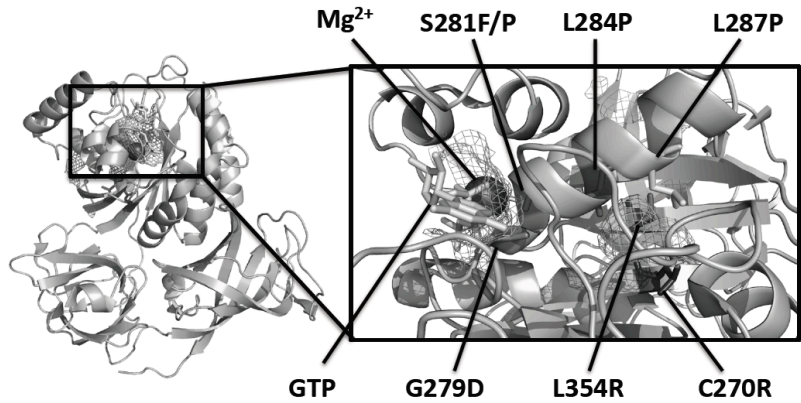


図3. *Aeropyrum pernix* の EF-1 α 上にマッピングした SKI7 機能欠損変異体のアミノ酸変異部位。その多くが GTP 結合部位近傍に位置する。

SKI7 機能欠損変異体によるドミナントネガティブ効果

得られた SKI7 変異体に更なる解釈を加えるため、野生株において HIS3-Nonstop レポーターを発現させ、そこに SKI7 変異体を発現させることによりドミナントネガティブ効果 (以後 DN 効果と記述) の有無を検証した。その結果、7 種類の変異体のうち、6 種類が DN 効果を有することが明らかとなった。この結果は、SKI7 の作用機序が連続的な機能モードによって成り立つことを意味している。

伸長因子ホモログ HBS1 と SKI7 の競合関係

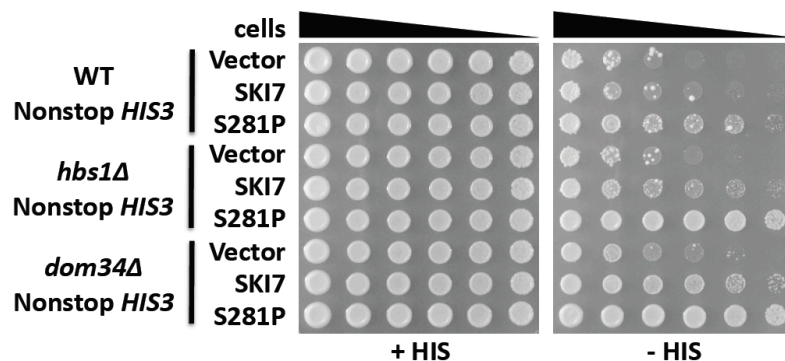


図4. 野生株、HBS1欠損株、DOM34欠損株におけるSKI7機能欠損変異体S281Pのドミナントネガティブ作用。

の解離を促進する因子であると考えられている。近年、ハンマーヘッドリボザイムによって切断され終止コドンが失われた Nonstop mRNA では、終端に到達したリボソーム

EF-1 α のホモログ因子は eRF3、SKI7 だけではなく、HBS1 もそのひとつである。HBS1 は eRF1 のホモログである DOM34 と複合体を形成し、mRNA の途中で停滞状態にあるリボソームを認識し、リボソーム

は HBS1/DOM34 複合体によって認識され、NSD によって mRNA が分解されることが明らかとなった。つまり、NSD において SKI7 は HBS1 と競合的關係に位置づけられる可能性がある。そこで、DN 効果を有する変異体を HBS1、DOM34 双方の欠損株に発現させ、HIS3-Nonstop レポーターによる mRNA 分解を評価した。すると、予想通り、野生型での影響よりも HBS1 や DOM34 欠損下での影響の方が優位であった (図 4)。この結果は、リボソームへの直接的な結合が確認されている因子との競合という観点から、SKI7 にリボソームを認識する機能があることを初めて実験的に証明するものである。

新規手法リボソーム IP の確立

SKI7 の C 末端領域の G ドメインの機能性を評価するため、機能欠損や DN 効果を有する SKI7 変異体を用いて、リボソームの認識能を検証することにした。そこで、従来の免疫沈降法 (IP) を 80S リボソームで行う新規アッセイ系、リボソーム IP を確立した。60S リボソーム表面に存在する RPL25 に FLAG タグを付加し、ゲノム上の RPL25 を RPL25-FLAG に置き換えることで、細胞内のリボソームをリボソーム-FLAG へと変換した。現在、リボソーム IP によって野生型 SKI7 とリボソームの結合が検出されており、現在、GTP 添加条件下や変異体での結合評価などを行っている。

【本研究の考察と今後の展望】

ここまでの研究により、SKI7 は、Nonstop decay (NSD) において、C 末端領域に保存されている G ドメインによって活性を制御している可能性を強く示唆する変異体の単離に成功した。SKI7 タンパク質は、mRNA 品質管理機構において、グアニンヌクレオチドと G ドメインとの結合状態に対応した機能モードスイッチを切り替えて機能する可能性が高い。また、新規なアッセイ系の構築により、SKI7 のリボソームへの結合を実験的に証明することが出来た。今後、SKI7 の G ドメインについて、具体的な機能を明らかにすべく、各種グアニンヌクレオチドの共存下におけるリボソーム IP による SKI7 の結合性や、エキソソームや Ski 複合体の構成因子との相互作用についてさらに詳細な検証する予定である。