

論文の内容の要旨

論文題目 酵母におけるnon-canonicalな翻訳伸長制御因子Stm1の機能解析
氏名 林 光

1. 背景・目的

翻訳伸長速度の調節は遺伝子発現の様々な場面において積極的に利用されている。蛋白質の細胞内輸送システム、RNA や新生ペプチド鎖の品質管理システム等が、翻訳と共役して制御されていることが明らかになってきている。真核細胞では2つの canonical な翻訳伸長因子(eEF1A と eEF2)の働きによって翻訳伸長反応が進む。一方、真核細胞に特異的に存在する non-canonical な翻訳伸長因子が翻訳速度を調節することも示唆されている。代表的な non-canonical な翻訳伸長因子としては、Stm1、eIF5A、eEF3 等が挙げられる。これらは翻訳伸長の毎サイクルには必要ではないが、特定のペプチド伸長反応を制御すると考えられている。これまで翻訳伸長速度については、主に新生ペプチドとリボソームトンネルの相互作用を介した調節機構を中心に研究が進められてきた。上述の non-canonical な翻訳伸長因子は、いずれも新生ペプチドを介さずに翻訳伸長速度を調節することが示唆されている点で大変ユニークである。

酵母 Stm1(Suppressor of TOM1)は、真核細胞で広く保存されたおよそ 43kDa のリボソーム結合能をもつ蛋白質である(図1)。これまでにアポトーシスをはじめとして細胞周期制御、mRNA 分解、栄養飢餓応答、など、様々な生命現象に関与することが報告されている。その作用機序については酵母抽出液を用いた *in vitro* 翻訳系を利用して解析が行われており、Stm1 濃度依存的な翻訳伸長の阻害が見られている(Balagopal V *et al.*2011)。しかし、抽出液を用いた解析では内在性の Stm1 や共役する因子の影響を排除することができず、Stm1 の作用機序の詳細は未だ不明である。本研究では Stm1 の作用機序と生理的役割について解析を行った。真核細胞における non-canonical な翻訳伸長制御因子を介した翻訳伸長速度の調節機構とその生理的意義について理解を深めることを目指した。

はじめに我々が構築した酵母由来の再構築型無細胞翻訳系を用いて、Stm1 による翻訳伸長抑制機構を解析した。続いて Stm1 の生体内での役割について解析を進めた。これまでに Stm1 欠損株ではラパマイシン感受性を示すことが報告されていた(Natalya Van Dyke *et al.* 2006)。ラパマイシンは TOR(Target of rapamycin) kinase を阻害することで、オートファジーを含む栄養飢餓応答を惹起する薬剤である。さらに、Stm1 がモノユビキチン化修飾を受けることも報告されていた(Natalya Van Dyke *et al.* 2013)。モノユビキチンは、エンドサイトーシスを介した液

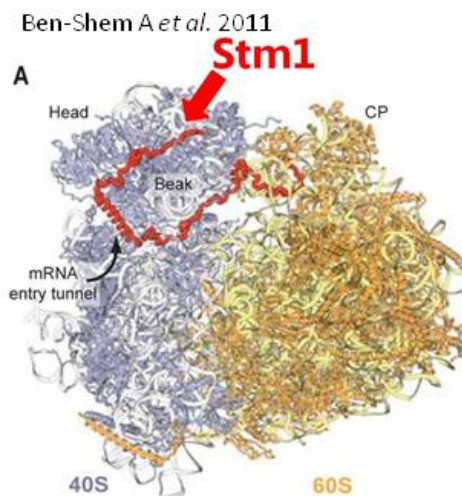


図1 リボソーム上でのStm1の構造

胞やリソソームへのタンパク輸送に関わることが知られている。そこで『栄養飢餓状態において80S上でモノユビキチン化された Stm1 が、リボファジー（液胞におけるリソソームの選択的分解）を促進する。』という仮説をたてて検証を進めた。

2. 実験結果

1) 80S リボソーム上での Stm1 の機能

酵母由来の再構築型無細胞翻訳系（poly(U)依存 poly(Phe)合成系）での Stm1 の効果を調べた。この時、内在性の Stm1 の影響を完全に排除するため、Stm1 欠損株 (stm1 Δ 株) から調製したリボソームを使用した。その結果、Stm1 の濃度依存的な翻訳抑制がみられ、Stm1 が翻訳伸長反応を抑制することが明確にされた (図 2)。

次に、スクロース密度勾配遠心法を用いて 80S リボソームのサブユニット間の会合に対する Stm1 の影響を調べた。その結果、低 Mg 濃度条件下において、Stm1 非存在下の 80S はサブユニットに解離するのに対し、Stm1 存在下では 80S の形成が維持されることが分かった。これより、Stm1 がリボソームサブユニット間の会合を固定する役割があることが明らかとなった。

2) Stm1 機能ドメインの決定

Stm1 の N 末端及び C 末端の系統的欠失体を作成し、それぞれの Poly(U)依存 poly(Phe)合成系での阻害能とリボソームへの結合能を解析した。その結果、Stm1 の翻訳抑制能とリボソーム結合能には相関がみられた。さらにそれは、Stm1 のコア領域(47-133aa)によって担われることが明らかとなった。

3) 翻訳伸長抑制における Stm1 の作用機序

各翻訳伸長素過程における Stm1 の効果を調べるため、まず、peptide transfer assay を用いてペプチド転移反応における効果を解析した。Peptide transfer assay では、Stm1 存在下、および非存在下での Poly(U)依存 Poly(Phe)系で合成したポリペプチドに対するピューロマイシンへのペプチド転移効率を比較した。その結果、Stm1 はペプチド転移反応を阻害しないことが明らかになった。

次に、*in vitro* translocation assay を用いて eEF2 依存的なシングルラウンドのトラン

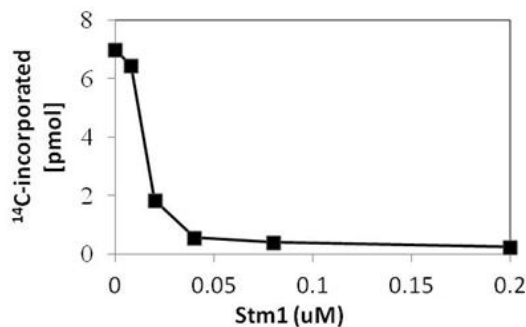


図2 Stm1濃度依存的な翻訳抑制

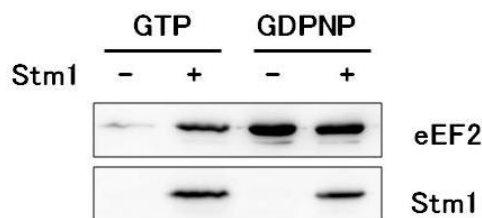


図3 Stm1・GTP存在下での、リボソームへの eEF2の結合量

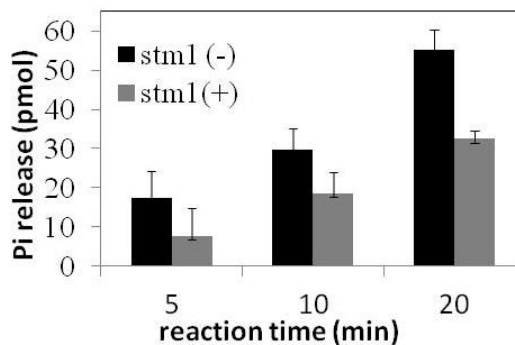


図4 Stm1存在下でのeEF2の80S依存的な GTP加水分解活性

スロケーションにおける *Stm1* の効果を解析した。その結果、シングルラウンドのトランスロケーションにおいても *Stm1* は顕著な抑制効果を示さないことが分かった。しかし、トランスロケーション反応の前後における *eEF2* のリボソーム結合量を調べたところ、*Stm1* 存在下において *eEF2* のリボソーム結合量が増大していることが見いだされた。

そこで、*eEF2* のリボソーム結合に *Stm1* が響ぼす効果について更に詳細に調べた。様々なグアニンヌクレオチド存在下で *eEF2* と *Stm1* をリボソームとインキュベートした後、反応液をスクロースクッションに通し、ペレット（リボソーム画分）を回収した。リボソームに結合している因子の量をウェスタン解析により調べたところ、*Stm1*・GTP 存在下において *eEF2* のリボソームへの結合量の増加が見られた。一方で、GDPNP 存在下では *Stm1* による *eEF2* の結合量に影響は見られなかった(図 3)。このことから、*eEF2* の GTP 加水分解に伴うリボソームからの解離を *Stm1* が抑制していると示唆された。

また、*Stm1* 存在下での *eEF2* の 80S 依存的な GTP 加水分解活性を調べた。その結果、*Stm1* は *eEF2* による GTP 加水分解活性を完全に抑制せず、*Stm1* 存在下でも *eEF2* は 80S 上で GTP 加水分解を続けることが明らかになった(図 4)。*Stm1* 存在下では、*eEF2* が 80S 上で GTP 加水分解を行うと、GDP は GTP にリボソームに結合した *eEF2* 上で置換され、GTP 加水分解が進行し続けることが示唆された。

4) *Stm1* の生理的役割

Stm1 のリボファジーへの関与を確かめるために、WT 株および *Stm1* 欠損株でのリボファジーの検出を行った。リボファジーを検出するために、60S サブユニットの L25 タンパク (*Rpl25p*) に GFP をタグ付けした。通常の栄養状態では、*Rpl25p*-GFP を含む 80S リボソームは細胞質中に存在する。しかし、飢餓状態に 15~20 時間程度さらされると、リボファジーが誘導され、リボソームは液胞へと運ばれた後にプロテアーゼによる分解を受ける。しかし、*Rpl25p* から切り出された GFP は液胞内の蛋白質分解酵素に耐性を示すため安定的に液胞へ蓄積する(Claudine Kraft *et al.*2008)。このため、*RPL25*-GFP と切り出された GFP の量比によってリボファジーの進行を評価できる。WT 株および *Stm1* 欠損株を栄養飢餓状態に移行してリボファジーの進行を解析した。その結果、WT 株でと比べて *Stm1* 欠損株においては、有意にリボファジーが抑制されていることが明らかとなった(図 5)。

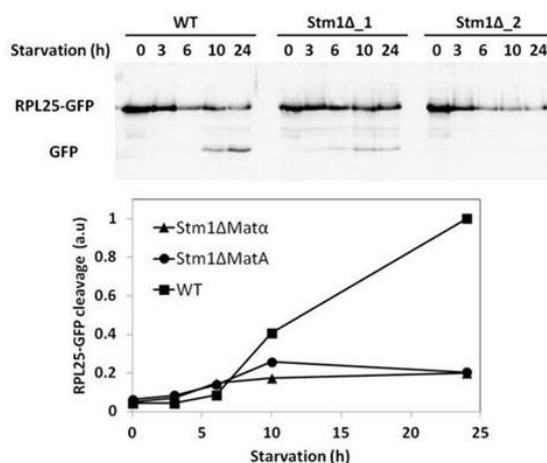


図5 WT,*Stm1*欠損株でのリボファジーの検出

3. まとめと考察

本研究では、翻訳伸長抑制における *Stm1* の機能および生理的役割の解析を行った。

Poly(U)Poly(Phe)合成系における解析により *Stm1* による翻訳伸長抑制能が明確にされた。さらに、*Stm1* は 80S リボソームのサブユニット会合活性をもつことが明らかになった。また、*Stm1* の翻訳抑制能とリボソームへの結合能はコア領域(47-143aa)によって担われていることが示唆された。

さらに、各翻訳伸長ステップにおける *Stm1* の効果を調べたところ、ペプチド転移効率や *eEF2* 依存的なシングルラウンドのトランスロケーションにおいて、*Stm1* による抑制効果は見られなかった。しかし、*Stm1* が *eEF2* をリボソーム上に安定化することが示唆された。*Stm1* は GTP 存在下で *eEF2* のリボソームへの結合量を増加させ、一方で、GDPNP 存在下では *Stm1* による *eEF2* のリボソーム結合の促進は見られなかった。すなわち *eEF2* の GTP 加水分解に伴うリボソームからの解離を *Stm1* が抑制していることが示唆された。また、*eEF2* による 80S 依存的な GTP 加水分解速度は、*Stm1* 存在下においても完全に抑制されなかった。*Stm1* 存在下では、*eEF2* が 80S 上で GTP 加水分解を行うと、GDP は GTP にリボソームに結合した *eEF2* 上で置換され、GTP 加水分解が進行し続けると示唆された。以上から、翻訳伸長過程における *Stm1* の作用機序について下記のような仮説を提唱する(図 6)。

『*Stm1* は、*eEF2* の GTP 加水分解や Pi-release 自体を阻害することはできないが、*eEF2* の Pi-release に伴う構造変化を阻害し、リボソームからの解離を抑制することで翻訳阻害を引き起こす。』つまり、*Stm1* はフシジン酸に類似した機能をもつ制御因子であると考えられる。フシジン酸は EF-G を A-site 上で固定化することで、*eEF1A*・aa-tRNA・GTP の結合を阻害しタンパク合成を停止させる抗生物質である。

さらに、WT および *Stm1* 欠損株でのリボファジーを解析した結果、*Stm1* 欠損株では栄養飢餓状態においてリボファジーが抑制されていることが明らかとなった。これにより、生体内の役割として *Stm1* はリボファジーに関与することが示唆された。これらの結果から『*Stm1* は栄養飢餓状態において、80S リボソーム上で *eEF2* をトラップすることで翻訳伸長を停止させた後、ユビキチン化をうけることでリボソームをリボファジーに誘導する因子である』と提唱したい。今後は、*Stm1* のユビキチン化および脱ユビキチン化酵素の同定を行うとともに *Stm1* のユビキチン化とリボファジーの関係を調べ、このモデルを検証してゆく予定である。

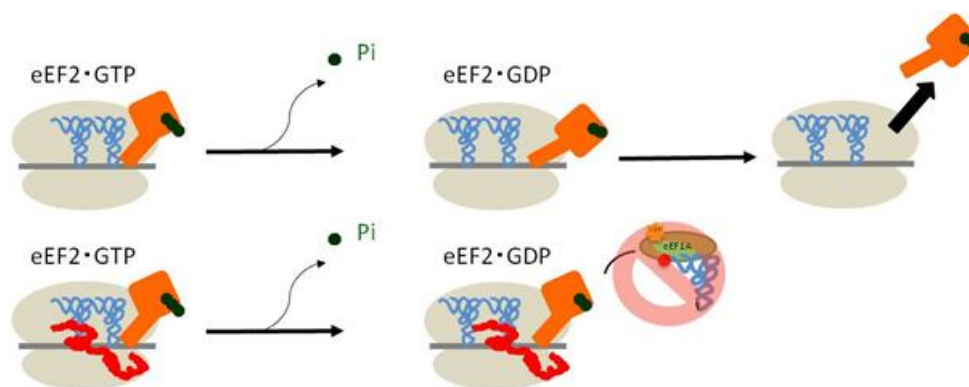


図6 翻訳抑制における*Stm1*の機能仮説