



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on the Eukaryotic Ribosomal Exit Tunnel Function in Nascent Peptide-Mediated Ribosome Stalling [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	高松, 世大
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第13953号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78046
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Seidai_TAKAMATSU_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士(生命科学) 氏 名 高 松 世 大

学 位 論 文 題 名

Studies on the Eukaryotic Ribosomal Exit Tunnel Function in Nascent Peptide-Mediated Ribosome Stalling

(新生ペプチド鎖が司るリボソーム停滞における真核生物リボソーム出口トンネル機能の研究)

かつてリボソームにはタンパク質合成装置としての機能しか考えられていなかったが、近年の研究により、リボソームは mRNA の翻訳を自律的に制御し得ることが明らかとなってきた。合成途上のポリペプチド鎖は、自身を合成中のリボソームによる翻訳反応を制御しうる。そのような制御性ペプチド鎖は、翻訳反応中に新生ペプチド鎖依存的なリボソーム停滞 (nascent peptide-mediated ribosome stalling; NPmRS) を誘導する。真核生物の mRNA の 5'-非翻訳領域には小さな読み枠 (uORF) が存在することがあるが、リボソーム停滞は主要 ORF と uORF のどちらでも誘導されうる。いずれの場合も、停滞したリボソームによって他のリボソームによる翻訳反応が阻害されるため、mRNA の翻訳は負に制御される。

翻訳伸長において、新たなペプチド結合はリボソーム大サブユニットに位置するペプチジルトランスフェラーゼセンターで形成され、合成された新生ペプチド鎖は大サブユニットを貫く「出口トンネル」を通して細胞質へ排出される。出口トンネルはおよそ 100 Å の長さであり、内部には新生ペプチド鎖のうち 30-40 アミノ酸残基が含まれる。多くの場合、制御性ペプチド鎖は 20-30 アミノ酸残基で構成され、出口トンネルの内部で機能して NPmRS を誘導する。出口トンネルの中ほどにはトンネルが狭まった部分があり、狭窄部位と呼ばれる。原核生物における遺伝学的研究から、狭窄部位は新生ペプチド鎖と相互作用し、リボソーム停滞において「関所」として機能することが示唆されている。このことは、停滞したリボソームを対象とした凍結電子顕微鏡を用いた構造生物学的研究によっても支持されている。しかしながら、原核生物と異なり真核生物では、新生ペプチド鎖と狭窄部位との相互作用がリボソーム停滞の結果でなく原因であることを示す遺伝学的証拠がないことに加えて、リボソーム自身を対象とした遺伝学的解析もなされていない。本学位論文では、真核生物の NPmRS 系について逆遺伝学に基づく生化学的な解析を行い、リボソーム停滞におけるリボソーム狭窄部位の関与を明らかにした。

第 1 章では、序論として、これまでに報告されている主な NPmRS 系の知見をまとめた。

第 2 章では、研究に用いた 6 つの新生ペプチド鎖がシロイヌナズナ由来のリボソームに対して NPmRS を誘導することを示した。研究対象とした NPmRS 系は真菌、ウイルス、動物および植物という幅広い真核生物に由来し、NPmRS を引き起こすペプチド鎖のアミノ酸配列やその長さもそれぞれ異なる。このうちの 4 つは新生ペプチド鎖の長さが 20 アミノ酸残基以上であるが、別の 1 つはこれまで同定された中で最も短い 6 アミノ酸残基からなる新生ペプチド鎖に依存した制御である。さらに、これら 5 つに加えて開始コドンと終止コドンのみからなる uORF に依存したリボソーム停滞を解析した。この最小 uORF はメチオニンのみをコードすることから新生ペプチド鎖依存的な制御ではないが、本研究では、ネガティブコントロールとした。

シロイヌナズナ野生型株から試験管内翻訳系 (Arabidopsis Cell-free Extract; ACE) を調製し、試

試験管内翻訳を行った結果、制御性ペプチド鎖をコードする mRNA を翻訳させた場合には、新生ペプチド鎖依存的にペプチジル-tRNA が翻訳反応の中間体として蓄積した。また、リボソーム停滞に関わる uORF を含む 5'-非翻訳領域をレポーター遺伝子の上流に融合した場合には、リボソーム停滞によってレポーター遺伝子の発現が抑制されることが示された。これらのことから、解析した全ての NPmRS 系が ACE 翻訳系を用いた試験管内翻訳反応で再現されることを示した。

第 3 章では、NPmRS の誘導における出口トンネル狭窄部位の寄与を解析した。リボソームタンパク質 uL4 は出口トンネル内に突き出た β ループ構造をもち、リボソームタンパク質 uL22 の β ループとともに狭窄部位を形成する。シロイヌナズナでは、uL4 は *uL4A* と *uL4D* の 2 つの遺伝子によってコードされるが、これらの 2 重欠損変異株は致死である。そのため、使用したシロイヌナズナ株では、*uL4D* 遺伝子欠損変異株に FLAG タグを融合した変異型 *uL4D:FLAG* 遺伝子が導入されている。本研究では 2 種類の *uL4D* 変異体を使用した。これらは β ループの頂点近傍にアミノ酸置換 [*uL4D(R77A)* 変異] あるいは 2 アミノ酸残基の欠失 [*uL4D(Δ TV)* 変異] をもち、後者では狭窄部位周辺の空間構造が変化すると考えられる。

ACE を用いて変異型 *uL4D:FLAG* タンパク質を持つリボソームのポリソームへの結合を解析した結果、変異型リボソームが野生型リボソームと同等の翻訳活性を持つことが示された。また、生理学的解析を行った結果、*uL4D:FLAG* 遺伝子の発現により *uL4D* 遺伝子欠損株の表現型が相補されたことから、*in vivo* において変異型リボソームが翻訳活性をもち、実際に翻訳反応に参加することが示された。そこで、次に変異型 *uL4D:FLAG* を発現するシロイヌナズナ株から ACE 翻訳系を調製して試験管内翻訳を行い、NPmRS の誘導における上記 2 種類の *uL4D* 変異の影響を評価した。

ACE 翻訳系を用いた生化学的解析の結果、20 アミノ酸残基以上からなる 4 つの新生ペプチド鎖では、*uL4D(Δ TV)* 変異をもつリボソームで NPmRS が弱まることが示された。さらに、そのうち 2 つのリボソーム停滞は *uL4D(R77A)* 変異によっても抑制された。このような 2 種類の *uL4D* 変異の効果における質的な違いは、構造生物学的研究の結果とも一致した。また、興味深いことに、*uL4D(Δ TV)* 変異の影響は 4 つの新生ペプチド鎖ごとに量的な違いを示し、これは、未だ立体構造が報告されていないリボソーム停滞システムを含め、停滞したリボソーム内部での新生ペプチド鎖の空間的な位置関係を反映するものと考えられた。一方、6 アミノ酸残基からなる新生ペプチド鎖に依存したリボソーム停滞では、いずれの *uL4D* 変異でも影響を受けなかった。これは、コードされる新生ペプチド鎖がリボソーム内部で狭窄部位に届かないほど短いためと考えられた。これらの結果から、解析した NPmRS 系が実際に *uL4D* 変異によって抑制されたことが示された。

第 4 章では、総合的な考察を行った。本研究により新生ペプチド鎖が狭窄部位に届くほど十分長い場合には、NPmRS の誘導に uL4 の β ループ構造を含む狭窄部位が重要である一方、その寄与の仕方は一様でなく、それぞれに異なることが明らかになった。また、狭窄部位に届かない短いペプチド鎖の場合には、狭窄部位に依存せずに NPmRS が誘導されることが明らかとなった。これらの結果は、新生ペプチド鎖がリボソームに対して多様な機構で作用することを示すものである。また、原核生物を含めて特定のリボソーム変異の影響を幅広く解析した研究はほとんど行われておらず、本研究の成果は新生ペプチド鎖が司るリボソーム停滞の研究に新たな知見を与えるものである。