

80. 翻訳制御と RNA 品質管理の連携機構

富田 野乃

Key words : 翻訳, RNA 品質管理, *in vitro* 翻訳系

*東京大学
大学院新領域創成科学研究科
メデイカルゲノム専攻

緒言

真核細胞の遺伝子発現においては、プロセッシングや翻訳の過程で欠陥を伴う異常な RNA は、「RNA 品質管理機構」によって認識され分解される。例えば、ナンセンス変異を持った mRNA は、NMD (nonsense-mediated decay) によって速やかに分解される。終止コドンを持たない異常 mRNA は、NSD (nonstop decay) によって分解される。また NGD (no-go decay) では、翻訳伸長阻害に伴って mRNA の分解が引き起こされる。機能に異常をきたしているリボソームの rRNA は NRD (non-functional rRNA decay) により分解を受ける。いずれも翻訳と連動して RNA の品質が管理されているが、その分子機構の詳細はあまり理解されていない。これまで翻訳と RNA 品質管理の連携機構の研究は、主に遺伝学的手法によって進められて来たが、生化学的手法を導入することは重要である。今回我々は、はじめに酵母由来再構築型生体外翻訳システムの開発を行った。精製した酵母翻訳因子 (eEF1A, eEF2, eRF1, eRF3, Rli1 など)、大腸菌由来の tRNA とアミノアシル tRNA 合成酵素 (ARS)、および酵母 80S リボソームを利用して、CrPV-IRES 依存的な翻訳システムを構築した。更に、ヒト由来の ARS と酵母由来の tRNA を利用することによりホモロガスな翻訳系を構築し、酵母細胞における翻訳伸長速度により近づけた翻訳系を確立した。

方法および結果

CrPV IRES の下流に nanoLuciferase (nLuc) をコードした mRNA を用いて再構築型翻訳系によるタンパク質合成を行った。その結果、CrPV IRES 依存的な翻訳が確認され (図 1)、また nLuc の発光も確認された。

次に翻訳系に含まれる 6 つの翻訳因子を 1 つずつ除いて翻訳を行い、系における翻訳因子依存性について調べた。その結果、伸長因子 (eEF1A, eEF2, eEF3) はいずれも必須であること、終結因子 eRF3 が不要であること、終結因子 eRF1 およびリボソーム再生因子 Rli1 は必須であることが明らかとなった (図 2, 上段)。

終結因子やリボソーム再生因子を除いた場合には 1 ラウンド分の翻訳反応が進むことを期待したが、eRF1 および Rli1 を除いた条件下で全く反応が進まなかった。eRF1 と Rli1 は翻訳終結反応 (ペプチド解離反応) に続いてリボソームの解離反応を担うことが知られている。このことから eRF1 と Rli1 がリボソームをサブユニットに解離することが翻訳開始に必要であると考えられた。

Dom34 は eRF1 のホモログであり、ペプチド解離反応には関わらないが、Rli1 とともにリボソームを解離することが知られている。そこで系に Dom34 を添加した効果を調べた。その結果、翻訳効率が上昇し、更に eRF1 非存在下においても翻訳が進むことが確認された (図 2, 下段)。これらの結果から、確立した翻訳系においては、リボソームのサブユニット化が翻訳開始に必要であることが支持された。

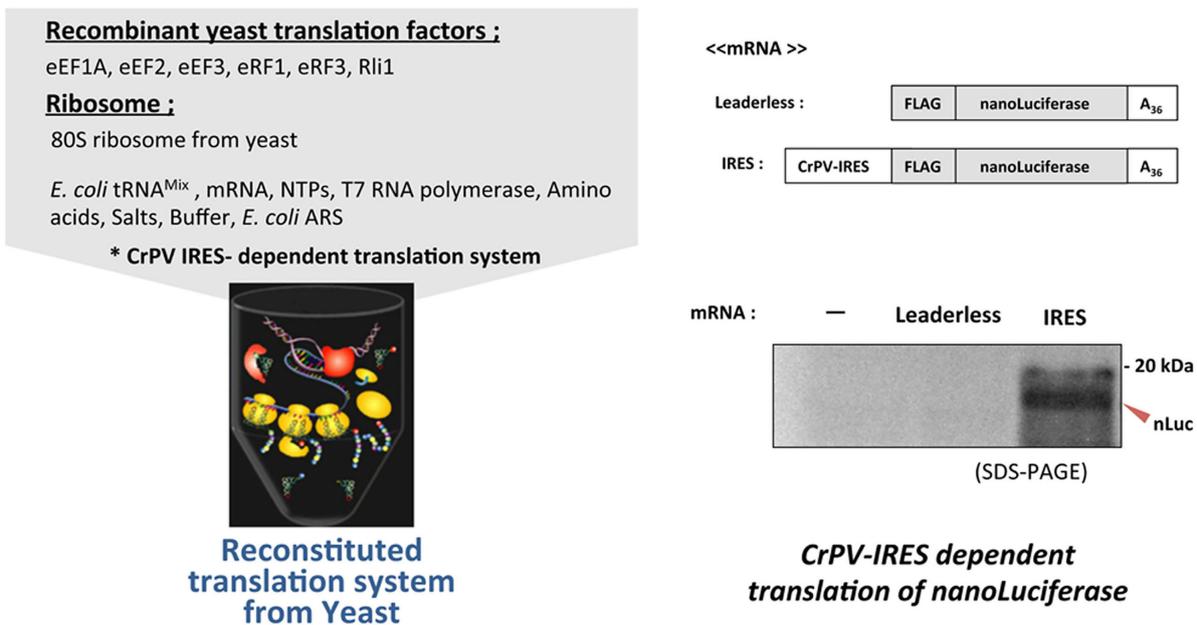


図1. 酵母由来再構築型生体外翻訳系の構築.

図で示した mRNA を用いて, ³⁵S]メチオニン存在下で翻訳反応 (25°C, 2 時間) を行い, 翻訳産物を SDS-PAGE で分画したのち, イメージングプレートで解析した.

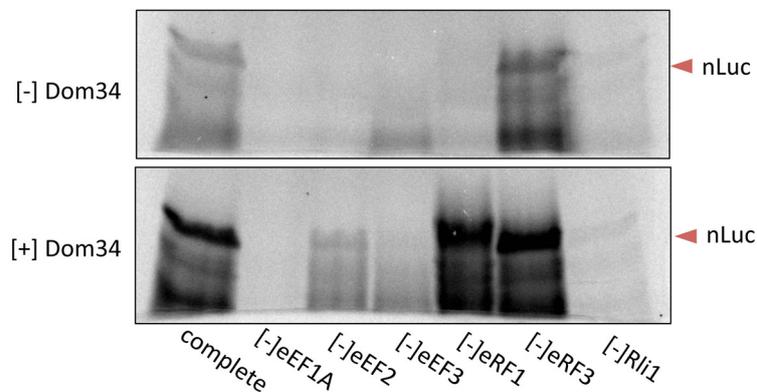


図2. 酵母由来再構築型生体外翻訳系における翻訳因子依存性の解析.

系を構成する翻訳因子を1つずつ除いて nLuciferase の翻訳反応を行った. 上) Dom34 非存在下 (図1 と同じ条件), 下) Dom34 存在下.

大腸菌由来の tRNA と ARS を用いて翻訳系を構築したが, 生体における翻訳伸長速度をより正確に反映させるため, 出芽酵母由来の tRNA を用いた翻訳系を構築することとした. ヒトの ARS¹⁾ と出芽酵母の tRNA を利用したところ, nLuc の合成が確認され, これにより酵母因子を利用した完全にホモガスな翻訳系が確立できた. また, 大腸菌由来の tRNA を用いた翻訳系と出芽酵母由来の tRNA を用いた翻訳系を比較した. その結果, 酵母細胞で翻訳停止配列として知られる (CGA)₆ 配列において, 出芽酵母由来の tRNA を利用した場合のみ翻訳停止が観察されることが確認された (図3).

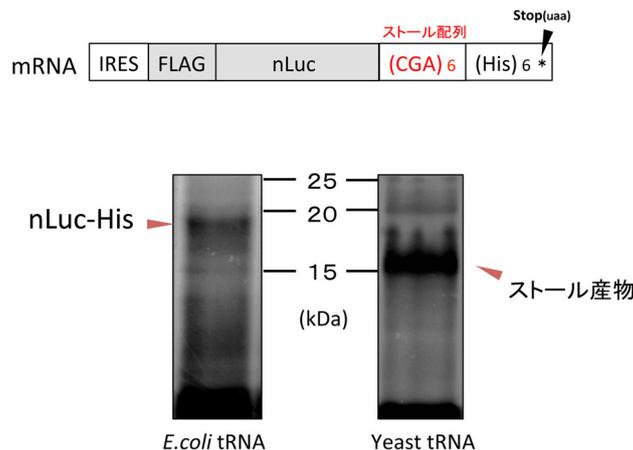


図3. 大腸菌と酵母の tRNA を用いた翻訳系の比較.

nLuc の下流に翻訳停止配列 (CGA)₆ を挿入した mRNA を、大腸菌と酵母の tRNA を用いた翻訳系でそれぞれ翻訳した。酵母 tRNA を利用した場合に、(CGA)₆ における翻訳停止がみられる。

考 察

近年、翻訳伸長速度は一定ではなく、伸長速度を柔軟に変化させることで、正しくタンパク質合成を行ったり、タンパク質の局在化を制御したりすることが分かってきている²⁾。RNA 品質管理機構では、翻訳停止に伴って品質管理に関わる因子がリボソームに集積される。今回我々は酵母由来再構築型生体外タンパク質合成系を確立し、この翻訳系が酵母細胞における翻訳伸長制御を反映できることを示した。すなわち、mRNA 中の (CGA)₆ における翻訳停止が観察され、確立した翻訳系が翻訳制御と RNA 品質管理の連携機構の解析に有効であることが示唆された。現在構築した系に、RNA 品質管理に関わる翻訳伸長制御因子を添加し、それらの効果を調べている。未だ翻訳伸長過程における正確な役割が不明な eEF3³⁾ についても機能解析を進めている。更に、翻訳停止時にフレームシフトを誘導させる因子も見いだしており、その作用機序の詳細について解析を進めている。

文 献

- 1) Machida, K., Mikami, S., Masutani, M., Mishima, K., Kobayashi, T. & Imataka, H. : A translation system reconstituted with human factors proves that processing of encephalomyocarditis virus proteins 2A and 2B occurs in the elongation phase of translation without eukaryotic release factors. *J. Biol. Chem.*, **289** : 31960-31971, 2014.
- 2) 富田 (竹内) 野乃, 上田卓也 : 翻訳伸長制御のメカニズムとその意義. 実験医学増刊号『生命分子を統合する RNA』, 羊土社, 東京, **31** : pp1108-1116, 2013.
- 3) Kurata, S., Shen, B., Liu, J. O., Takeuchi, N., Kaji, A. & Kaji, H. : Possible steps of complete disassembly of post-termination complex by yeast eEF3 deduced from inhibition by translocation inhibitors. *Nucleic Acids Res.*, **41** : 264-276, 2013.