



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（薬学）
報告番号	甲第1436号
学位記番号	第297号
氏名	橋本 芳史
授与年月日	平成 26 年 3 月 25 日
学位論文の題名	翻訳終結因子 eRF3 を標的とした新規遺伝子発現制御およびアポトーシス制御
論文審査担当者	主査： 頭金 正博 副査： 星野 真一， 糸 和彦， 湯浅 博昭

名古屋市立大学学位論文

翻訳終結因子 eRF3 を標的とした新規遺伝子発現制御  
およびアポトーシス制御

平成 25 年度（2014 年 3 月）

橋本 芳史

名古屋市立大学大学院薬学研究科  
医療機能薬学専攻  
遺伝情報学分野

1. 本論文は、2014年3月名古屋市立大学大学院薬学研究科において審査されたものである。

主査 頭金正博 教授

副査 糸和彦 教授、湯浅博昭 教授、星野真一 教授

2. 本論文は、学術情報雑誌に掲載された次の報文を基礎とするものである。

1) Yoshifumi Hashimoto, Nao Hosoda, Pinaki Datta, Emad S. Alnemri and Shin-ichi Hoshino

Translation termination factor eRF3 is targeted for caspase-mediated proteolytic cleavage and degradation during DNA damage-induced apoptosis

Apoptosis, 17, 1287-1299 (2012)

2) Yoshifumi Hashimoto, Naomichi Kumagai, Nao Hosoda and Shin-ichi Hoshino

The processed isoform of translation termination factor eRF3 localizes to the nucleus to interact with ARF tumor suppressor

Biochemical and Biophysical Research Communications,

doi: 10.1016/j.bbrc.2014.02.063.

3. 本論文の基礎となる研究は、星野真一教授の指導の下に名古屋市立大学大学院薬学研究科において行われた。

4. 本論文内容を以下の学会で発表した。

・2011 年 8 月 30 - 9 月 1 日     RNA フロンティアミーティング 2011

演題番号：12.2

題目：「アポトーシス時における翻訳終結因子 eRF3 のカスパーゼ依存的分解と翻訳抑制」

・2012 年 5 月 26 日     第 76 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム

演題番号：P12

題目：「翻訳終結因子 GSPT/eRF3 のカスパーゼ依存的切断の生理的意義の解析」

・2012 年 10 月 7-10 日     EMBO/EMBL symposium The Complex Life of mRNA

演題番号：143

Title: Translation termination factor eRF3 is targeted for caspase-mediated proteolytic cleavage and degradation during DNA damage-induced apoptosis

・2013 年 3 月 27- 30 日     日本薬学会第 133 年会     演題番号：28S-am27S

題目：「切断型 eRF3 によるアポトーシス阻害タンパク質 IAP を介したアポトーシス制御機構の解析」

・2013 年 7 月 24- 26 日     第 15 回日本 RNA 学会年会     演題番号：P-41

題目：「翻訳終結因子 eRF3 の細胞内局在制御」

・2013 年 9 月 11- 13 日     第 86 回日本生化学会大会     演題番号：3T11a-09

題目：「翻訳終結因子 eRF3 のプロセス体 p-eRF3 の新規機能」



本論文では、以下の略語を用いた

ARF	alternative reading frame
eIF	eukaryotic translation initiation factor
eRF	eukaryotic translation releasing factor
HtrA2	heat shock response serine protease 2
IAP	inhibitor of apoptosis protein
IBM	IAP-binding motif
NES	nuclear export signal
PABP	polyadenylate-binding protein
si-RNA	small interfering RNA
Smac	second mitochondria-derived activator of caspase
Ub	ubiquitin

目次	
要旨	6
第 1 章 序論	7
第 2 章 実験方法および材料	1 4
第 3 章 翻訳終結因子 <b>eRF3</b> を標的とした新規遺伝子発現制御機構の解析	2 2
第 4 章 <b>eRF3</b> を標的とした新規アポトーシス制御機構の解析	4 6
第 5 章 総括	6 1
参考文献	6 6
謝辞	7 4

## 要旨

**eRF3** は翻訳終結因子と知られており、第 1 の機能として、**eRF1** と共にタンパク質の翻訳終結反応を担っている。また第 2 第 3 の機能として、**eRF3** は polyA 鎖結合タンパク質 **PABP** との結合を介し、**mRNA** 分解開始や、**mRNA** 環状化による翻訳の活性化において機能している。つまり **eRF3** は、翻訳終結だけでなく、遺伝子の発現制御においても重要な役割を果たしている。

興味深いことに先の翻訳に関する機能とは別に、**eRF3** には第 4 の機能としてアポトーシスを促進する機能がある。**eRF3** はこの機能を発揮するために、N 末端領域でプロテアーゼによる切断を受け切断型 **eRF3** (**p-eRF3**) となる。**p-eRF3** は切断により露出した結合モチーフを介しアポトーシス阻害タンパク質 **IAP** と結合し、アポトーシス実行因子であるカスパーゼをその阻害因子である **IAP** から解放することでアポトーシスを促進する。しかし、この **p-eRF3** がどのような条件下で生成し機能するかは分かっておらず、実際に細胞内でどのような生理的役割を担っているか分かっていない。そこで、本研究では、**eRF3** の未解明な機能である「**p-eRF3** によりアポトーシスを制御する分子機構」の詳細を明らかにすることを目的とし、**eRF3** のストレス・アポトーシス条件下における挙動を解析した。

本研究の成果として、

- 1) **eRF3** はカスパーゼによる切断・分解を受け、アポトーシス時の遺伝子発現抑制に寄与しうることを明らかにした。これにより翻訳終結因子である **eRF3** を標的とした遺伝子発現制御機構を初めて報告した。
- 2) **p-eRF3** がカルパイン依存的に生成することを見出した。さらに、**p-eRF3** は核に移行し、癌抑制因子 **ARF** と結合することを見出した。このことから **p-eRF3** は核においても細胞死を制御しうる可能性を見出した。

またこれらの成果により、翻訳終結因子 **eRF3** はストレス・アポトーシス時に、異なる 2 種類のプロテアーゼによる修飾をうけ、それぞれが遺伝子発現制御、細胞死制御に働くという非常にユニークな性質を明らかにした。

これまで **eRF3** の研究は、翻訳終結に関わる機能を中心に行われてきたが、本研究の成果により、**eRF3** を介した遺伝子発現制御と細胞死制御という新たな **eRF3** 研究の方向性を示すことができたと考えている。

## 第 1 章 序論

---

### 1-1 翻訳終結因子 eRF3 の同定

翻訳終結因子 eRF3 (eukaryotic translation releasing factor3)は、酵母の温度感受性変異株を用いた研究から細胞周期の G1 期から S 期への移行に必須な因子 *gspt* (G1-to-S phase transition)として同定された。またこの際、GTP 結合タンパク質であること及び翻訳伸長因子 EF1a に高い相同性を持つことが見出された(Kikuchi et al., 1988)。またヒトにおいても酵母 *GSPT* のホモログが同定され、その発現が細胞周期に依存していることから細胞の増殖に関わる因子であることが予想された(Hoshino et al., 1989)。一方で eRF3 は他のグループにより、ナンセンス変異を終止コドンの種類に関係なく回復する万能型ナンセンスサプレッサー(Omnipotent suppressor) *SUP35* として同定された(Kushnirov et al., 1988)。このことから *GSPT/SUP35* 遺伝子は翻訳に関わる因子であることが予想された。その後、*GSPT/SUP35* 遺伝子産物が、既に翻訳終結因子として同定されていた eRF1 と結合することが酵母(Stansfield et al., 1995)とアフリカツメガエル(Zhouravleva et al., 1995)において報告され、*GSPT/SUP35* 遺伝子産物が翻訳終結因子として機能することが明らかとなった。ほ乳動物においては、先に同定された GSPT1(Hoshino et al., 1989)の他に GSPT2(Hoshino et al., 1998)が同定されており、後に eRF3a、eRF3b と命名された(Jakobsen et al., 2001)。

### 1-2 翻訳終結反応 eRF3 の機能

#### 1-2-1 翻訳終結反応

真核生物の翻訳過程は開始・伸長・終結・リボソームの解離の 4 つの過程に分類されており、翻訳終結因子 eRF3 は eRF1 と共に翻訳終結の過程を担う因子として機能が確立されている。eRF3 は N 末端から約 200 アミノ酸領域からなる N-domain と翻訳伸長因子 eEF1a 様の C-domain の 2 つのドメインからなり、C-domain は GTP 結合・水解触媒部位を有する G タンパク質をコードする。翻訳終結反応には C ドメインの機能が重要であり、eRF3 は C ドメインを介し

で終始コドン就直接認識する eRF1 をリボソームへとリクルートすることで翻訳終結反応を制御する。また eRF1 は単独で翻訳終結反応を担うことができるが、eRF3 による GTP 加水分解により翻訳終結反応が飛躍的に促進される (Alkalaeva et al., 2006; Salas-Marco and Bedwell, 2004) (Fig. 1-1)。

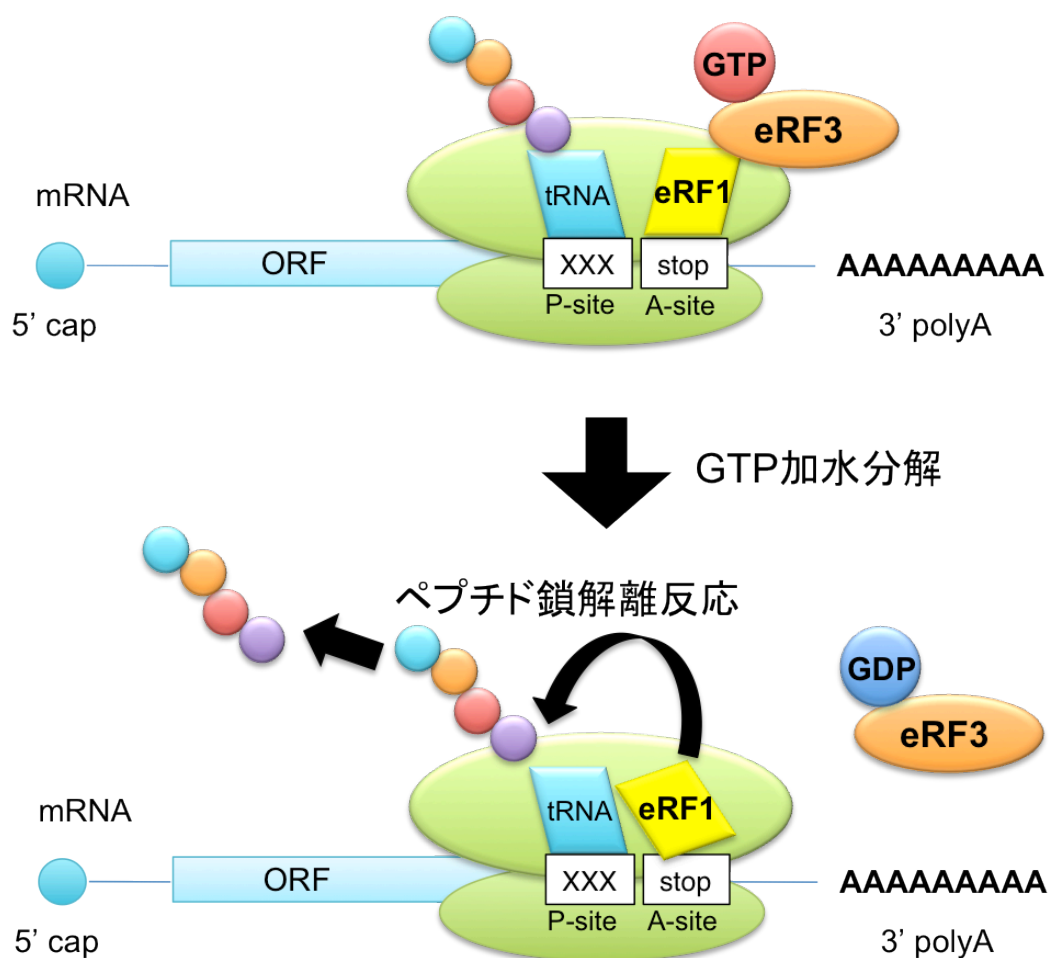


Fig. 1-1 翻訳終結反応  
eRF3によるGTP加水分解により、翻訳により合成したペプチド鎖のペプチジルtRNAからの解離 (翻訳終結)反応が促進される。

### 1-2-2 mRNA 分解開始

当研究室ではこれまでに、eRF3 が N-domain を介しポリ A 鎖結合タンパク質 PABP (poly(A)-binding protein) と結合することを見出している(Hoshino et al.,1999a; Hoshino et al.,1999b)。mRNA 分解の律速段階はポリ A 鎖分解であり、PABP はポリ A 鎖に結合することで mRNA の安定性を制御することが示されている(Bernstein et al.,1989; Kuhn and Wahle,2004)。このことから、当研究室では eRF3 が N-domain を介して mRNA 分解、特にポリ A 鎖分解を制御する可能性を検討し、酵母において eRF3 が PABP と相互作用することで、翻訳終結反応と共役してポリ A 鎖の短縮化過程を制御し、mRNA 分解を制御していることを明らかにした(Hosoda et al., 2003; Kobayashi et al., 2004)。さらに、ほ乳動物細胞において、eRF3 がポリ A 鎖分解酵素複合体(Pan2-Pan3, Tob-Caf1-Ccr4)と PABP に対して競合関係にあることを明らかにし、翻訳終結依存的に eRF3 と PABP の結合が解離することで、ポリ A 鎖分解酵素複合体が PABP と結合しポリ A 鎖が分解されるというモデルを提唱している(Funakoshi et al., 2007; Hoshino 2012) (Fig. 1-2)。

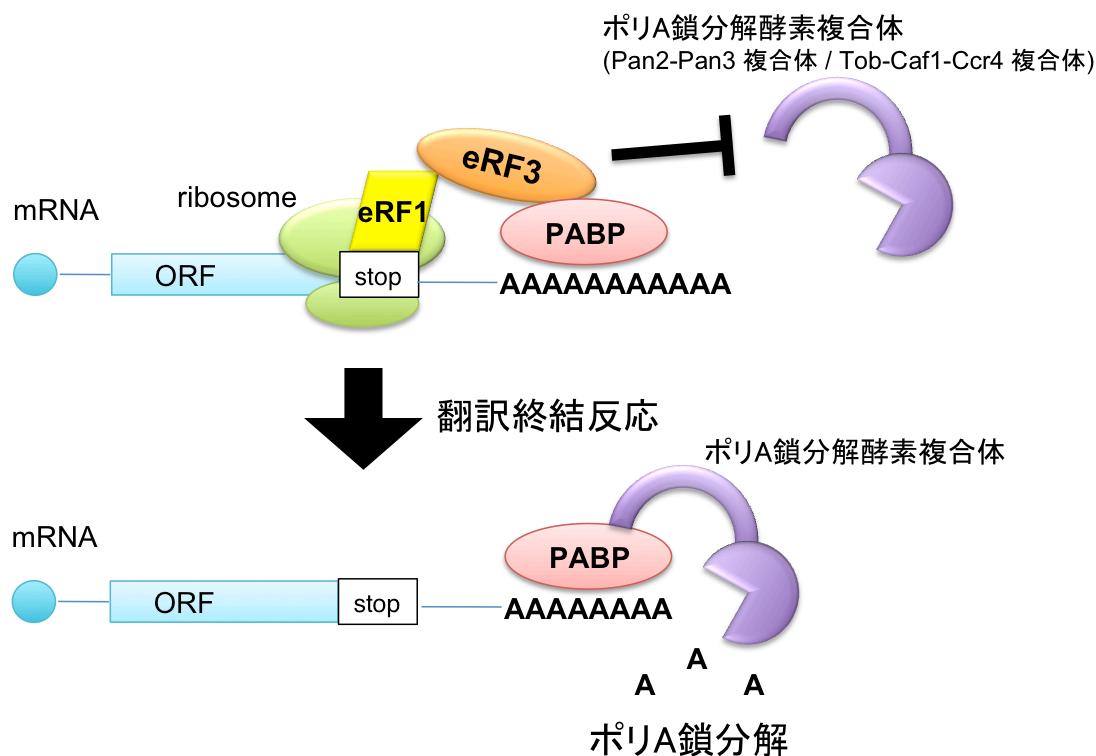


Fig. 1-2 翻訳終結反応と共役したポリA鎖分解  
翻訳終結後、ポリA鎖分解酵素複合体がPABPに結合しポリA鎖を分解する。

### 1-2-3 翻訳活性化

真核生物の mRNA は共通した構造として、5'末端キャップ構造と 3'末端ポリ A 鎖を持つ。キャップ依存的な翻訳では 5'末端キャップ構造にはキャップ結合タンパク質である翻訳開始因子 eIF4E (eukaryotic initiation factor 4E)が結合することが重要である。eIF4E はさらに eIF4G、eIF4A と共に eIF4F 複合体を形成し、scaffold タンパク質である eIF4G が 40S リボソームサブユニットと結合する eIF3 と相互作用する。キャップ依存的な翻訳ではこの一連の相互作用により 40S リボソームサブユニットが mRNA 上にリクルートされ翻訳が開始する。さらに eIF4G は、3'末端ポリ A 鎖に結合している PABP と結合する。つまり eIF4E と PABP は eIF4G を介して三者複合体を形成し、mRNA は環状化構造をとる (Uchida et al., 2002)。mRNA 環状化は翻訳を終えたりボソームを次の翻訳開始部位にリサイクルすることで翻訳開始の効率を促進し、翻訳を活性化する。

eRF3 と PABP の結合により終止コドンで翻訳を終えたりボソームとポリ A 鎖が近接して存在するようになることが予想され、さらに PABP は翻訳開始因子複合体 eIF4F と結合していることから、eRF3 と PABP、PABP と eIF4F の結合により翻訳を終えたりボソームがより効率よく次の翻訳開始段階に受け渡されると考えられる。そこで当研究室では、eRF3 と PABP の結合が翻訳の活性化過程で機能している可能性を検討し、この結合が実際にキャップとポリ A 依存的な翻訳の活性化過程において重要な役割を果たしていることを明らかにしている (Uchida et al., 2002) (Fig. 1-3)。このように eRF3 は単に翻訳終結段階を担っているだけでなく、N 末端での PABP との結合を介し、翻訳終結と共役した mRNA ポリ A 鎖分解開始や mRNA 環状化による翻訳の活性化過程においても重要な役割を果たしている。

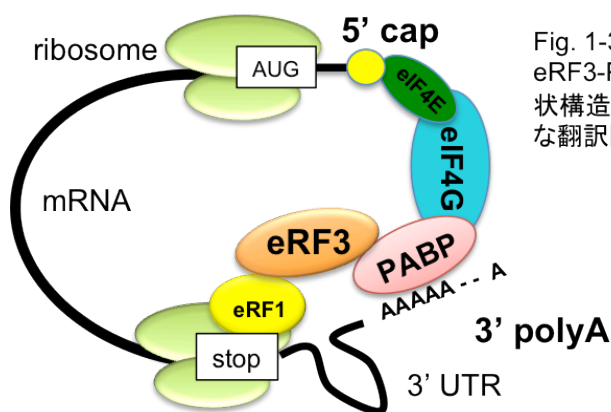


Fig. 1-3. mRNA環状化による翻訳の活性化  
eRF3-PABP-eIF4Gの結合によりmRNAが環状構造をとり、翻訳を終えたりボソームの新たな翻訳開始への再利用を促進する。

### 1-3 切断型 eRF3 (p-eRF3) の機能

当研究室と海外のグループとの共同研究により、アポトーシス阻害タンパク質 IAP (inhibitor of apoptosis protein) の新規結合因子として eRF3 の切断型アイソフォーム p-eRF3(Processed eRF3)を同定している (Hegde et al.,2003)。p-eRF3 はプロテアーゼにより N 末端から 73 番目のアラニン残基の位置で切断を受けることで生成し、切断により露出した IAP との結合モチーフ IBM (IAP-binding motif) を介して IAP と新たに結合するようになる。IAP はアポトーシスの実行因子であるカスパーゼに結合することでカスパーゼの活性化を阻害しアポトーシスの誘導を抑制している。これに対し p-eRF3 は IAP に結合することで、カスパーゼを IAP による阻害から解放することでアポトーシスを促進ことが明らかになっている (Hegde et al.,2003) (Fig. 1-4)。つまり eRF3 は翻訳終結など翻訳に関わる機能とは別に、細胞死を制御する能力を有している。しかし、p-eRF3 がどのような条件下で生成し機能しているかなど、その生理的役割は未解明のままである。

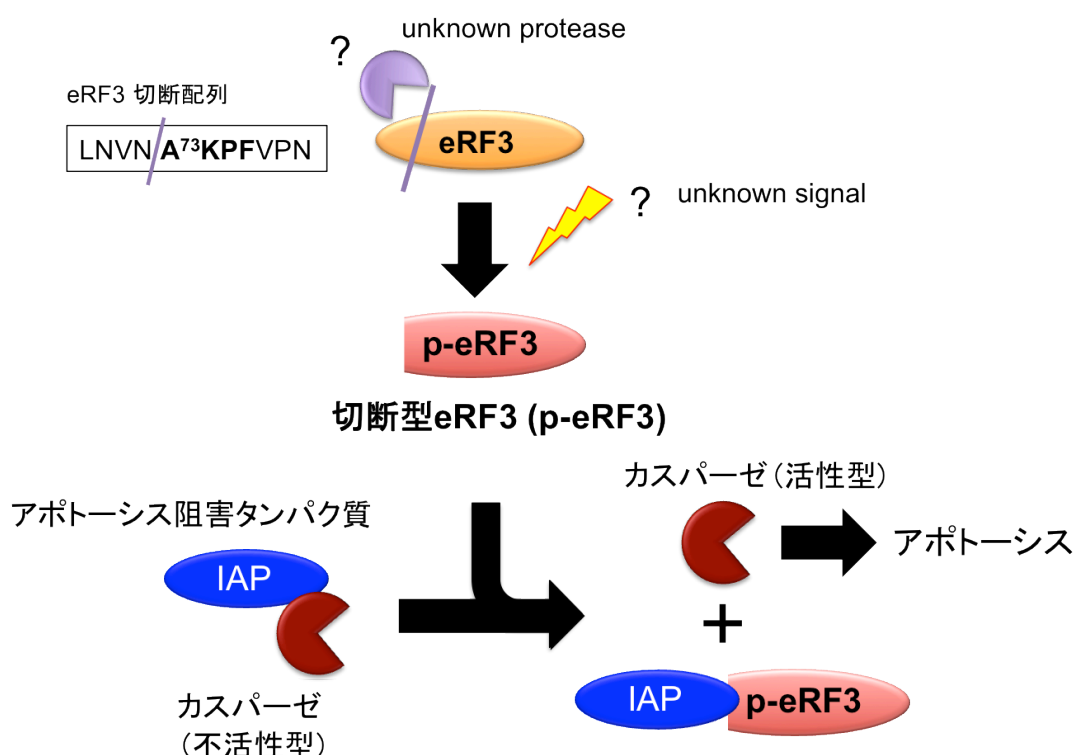


Fig1-4. p-eRF3によるカスパーゼ活性化機構  
プロテアーゼによる切断を受け生成したp-eRF3はIAPに結合することでカスパーゼをIAPから解放し、カスパーゼを活性化する。



## 1-4 eRF3 と癌の関連

ヒトの eRF3 の主要サブタイプである eRF3a の N 末端領域内にはグリシンの繰り返し配列（グリシンリピート）が存在する (Fig. 1-5)。近年、このグリシンリピートに多型が存在し、その多型が癌の発症に関与することが報告された (Brito et al., 2005; Malta-Vacas et al., 2009)。報告によると、健常人ではグリシンのリピート数が 10 であるのに対し、グリシンのリピート数が 12 のヒトでは胃癌や乳癌をはじめとする癌の発症リスクが増大する。この報告は、eRF3 が癌化の過程で何らかの機能を有している可能性を示している。グリシンリピートの機能は現在のところ分かっておらず、どのようなメカニズムで癌発症に関わっているかは不明であるが、eRF3 のアポトーシス制御に関する機能を制御していることが予想される。このことから、p-eRF3 など eRF3 の細胞死やストレス応答に関わる機能の解明が期待される。

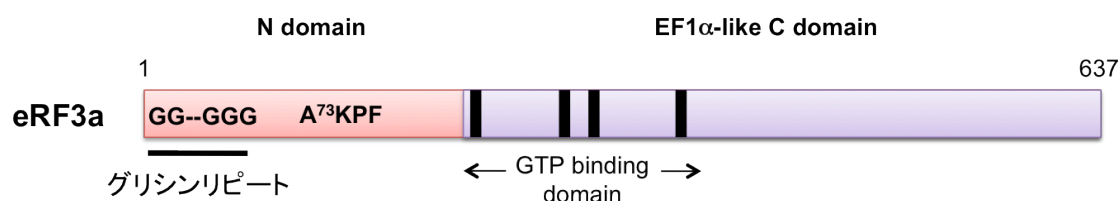


Fig. 1-5. eRF3(ヒトeRF3a)のドメイン図  
グリシンリピート配列はeRF3のN末端に存在する。

## 1-5 本研究の目的および結論

翻訳終結因子 eRF3 は、翻訳終結反応だけでなく翻訳終結と共役した mRNA 分解開始、mRNA 環状化による翻訳の活性化においても重要な役割を果たしている。さらにこれら翻訳に関する機能とは別に eRF3 は切断型 eRF3 となることで細胞死を制御する。これらの報告から eRF3 は多機能性の因子であることが明らかとなってきた。

本研究では、eRF3 において未解明な機能である p-eRF3 アイソフォームの生理的役割を明らかにすることを目的とし、p-eRF3 の生成条件および新たな機能をもつ可能性について検討を行った。その過程で以下の知見を得た。

- 1) **eRF3** がアポトーシス時にカスパーゼによる切断・分解を受け、新規切断型 **eRF3 (eRF3-cp)** が生成することを明らかにし、また **eRF3** の分解はアポトーシス時の翻訳抑制に寄与しうること明らかにした。これにより翻訳終結因子である **eRF3** を標的とした翻訳制御機構を初めて報告した。
- 2) **p-eRF3** に関する新たな知見として、**p-eRF3** はカルパイン依存的に生成することを明らかにした。さらに、**p-eRF3** は核に移行し、癌抑制因子 **ARF** と結合すること明らかにし、このことから **p-eRF3** は核においても細胞死を制御しうる可能性を見出した。

また、本研究を通して、翻訳終結因子 **eRF3** はストレス・アポトーシス時に、異なる 2 種類のプロテアーゼによる修飾をうけ、それぞれが遺伝子発現制御、細胞死制御において機能するという非常にユニークな性質を明らかにした。

## 第 2 章 実験方法および材料

---

### 1. プラスミド

(作成に用いたオリゴヌクレオチドの配列は Table. 1 に示した)

#### 1-1. 細胞発現用ベクター

hGSPT1 (eRF3a)発現ベクターは以下の手順により作成した。

##### ・ pFLAG-CMV5-hGSPT1- His6

終止コドンを含まない hGSPT1 の ORF 領域を pGH5 (Hoshino et.al., 1989) を鋳型として、オリゴヌクレオチド YH1S と YH2AS を用いて PCR 法により増幅した。これにより取得した cDNA 断片を、pGEX-6P-1- His6 (Uchida et.al., 2002) の EcoRI、SalI サイトに組み込み、そこから再び EcoRI、NotI で切り出すことで GSPT1- His6 断片を取得した。さらに取得断片の NotI 側を平滑化後 pFLAG-CMV の EcoRI、SmaI サイトに組み込むことで目的の pFLAG-CMV5-hGSPT1- His6 を作製した (Hashimoto et.al., 2012)。

##### ・ pCMV-MycFLAG

pCMV-Myc ベクター (Funakoshi et.al., 2007) の XhoI サイトにオリゴヌクレオチド NH160 と NH161 を組み込むことで作成した (Hashimoto et.al., 2012)。

##### ・ pCMV-MycFLAG-Ub-hGSPT1

HeLa 細胞より抽出した全 RNA を鋳型として、オリゴヌクレオチド NH0168 と NH0169 を用いて RT-PCR 法によってユビキチンの cDNA を得た。このユビキチン配列を鋳型として、オリゴヌクレオチド NH168 と YH6 を用いて PCR 法により、hGSPT1[aa 1-4]の cDNA 配列を 3'末端に付加したユビキチン cDNA(Ub-GSPT1[aa 1-4])を増幅した。また pFLAG-CMV5-GSPT1- His6 を鋳型とし、オリゴヌクレオチド YH5 と CMV3 を用いて PCR 法により、ユビキチン[aa 73-76]の cDNA 配列を 5'末端付加した hGSPT1 [aa 1-637]の cDNA (Ub[aa 73-76]-hGSPT1)を増幅した。さらに取得した断片(Ub-hGSPT1[aa

1-4], Ub[aa 73-76]-hGSPT1)を、オリゴヌクレオチド NH0168 と CMV3 を用いてオーバーラッピング PCR 法により繋ぎ合わせることに増幅し、Sal I で切断した後、pCMV-MycFLAG ベクターの EcoRV、Xho I サイトに挿入することにより、pCMV-MycFLAG-Ub-(1M)GSPT1 を作製した (Hashimoto et.al., 2012)。

- ・ pCMV-MycFLAG-Ub-(33Q)-hGSPT1, -(36M)-hGSPT1, -(54A)-hGSPT1, -(73A)-hGSPT1

pCMV-MycFLAG-Ub-hGSPT1 を鋳型とし、それぞれオリゴヌクレオチド YH7 と YH10, YH8 と YH10, YH9 と YH10, YH3S と YH10 を用いインバース PCR 法により作製した (Hashimoto et.al., 2012)。

- ・ pCMV-MycFLAG-Ub-hGSPT1(D25A), -hGSPT1(D29A), -hGSPT1(D32A), -hGSPT1(D35A), -hGSPT1(D25A/D29A/D32A/D35A)

pCMV-MycFLAG-Ub-hGSPT1 を鋳型とし、それぞれオリゴヌクレオチド YH14 と YH18, YH15 と YH17, YH11 と YH8, YH12 と YH8, YH16 と YH18 を用いインバース PCR 法により作製した (Hashimoto et.al., 2012)。

- ・ pFLAG-CMV2-hGSPT1 (L61A/F65A/L69A)

pFLAG-CMV2-hGSPT1 (Hoshino et.al., 1998) を鋳型とし、オリゴヌクレオチド NH149 と NH150 を用いインバース PCR 法により作製した。

- ・ pFLAG-CMV2-hGSPT1 (L61A/F65A/L69A)

pFLAG-CMV2-hGSPT1 (Hoshino et.al., 1998) を鋳型とし、オリゴヌクレオチド NH149 と NH150 を用いインバース PCR 法により作製した。

- ・ pCMV-MycFLAG-Ub-(73A)-hGSPT1-NES

pCMV-MycFLAG-NES(hGSPT1(a.a. 60-71)) を pCMV-Myc-FLAG を鋳型とし、オリゴヌクレオチド YH-61 と YH-62 を用いインバース PCR 法により作製した。そして pCMV-MycFLAG-Ub-(73A)-hGSPT1 と同様に Ub-(73A)-hGSPT1 断片を pCMV-MycFLAG-NES ベクターの EcoRV、Xho I サイトに挿入することにより、pCMV-MycFLAG-Ub-(73A)-hGSPT1-NES を作製した。

他の細胞発現用ベクターは以下の手順により作成した。

・ pCMV-5xMyc-p14ARF

p14ARF の cDNA は、HeLa 細胞より抽出した全 RNA を鋳型としランダムプライマーを用い RT-PCR 法により取得した cDNA ライブラリーを鋳型とし、オリゴヌクレオチド NH174 と NH175 を用い PCR 法により増幅することで取得した。さらに取得した断片を EcoRI で処理し、pCMV-5xMyc ベクター (Hosoda et.al., 2011) の EcoRI、EcoRV サイトに挿入することで作成した。

1-2. 大腸菌発現用ベクター

・ pColdI-hGSPT 1 (22-205)

hGSPT1(aa 22-205)領域の cDNA は pGH5 を鋳型としてオリゴヌクレオチド NH424 と NH425 を用い PCR により増幅し、断片を pColdI (宝酒造)の EcoRI、SalI サイトに組み込むことにより作製した。

・ pColdI-PABPC1

PABP の cDNA は pFlag-PABPC1 (Uchida et.al., 2002, Funakoshi et.al., 2007) を鋳型としてオリゴヌクレオチド NH347 と NH348 を用い PCR により増幅し、断片を pColdI の BamHI、SalI サイトに組み込むことにより作製した。

オリゴヌクレオチド	Sequence 5'-3'
NH149	AAC GTC AAC GCC AAG CCC TTC
NH150	GGC TTG CCG GCT GGC GGC CGC GCT GGC GTT CTC CCG CTG
NH160	TCG AGG ATT ACA AGG ATG ACG ACG ATA AGT AG
NH161	TCG ACT ACT TAT CGT CGT CAT CCT TGT AAT CC
NH168	ATC ATG CAG ATT TTC GTG AAA AC
NH169	TTA ACC ACC ACG AAG TCT C
NH174	GGC GAA TTC ATG GTG CGC AGG TTC TTG G
NH175	TCC TCA GCC AGG TCC ACG GGC
NH347	TAG CGG ATC CAT GAA CCC CAG TGC CCC CAG

NH348	CCC TGA GTC GAC TTA AAC AGT TGG AAC ACC
NH424	GCA GCG AAT TCG ACT CGG CGC CTG ACT GCT
NH425	TAC ATG GTC GAC CTT AGG AGC ACC TGG CGG
CMV3	CAC TGG AGT GGC AAC TTC CA
YH1S	ATC GAA TTC GAT CCG GGC AGT GGC
YH2AS	GTT GTC GAC GTC TTT CTC TGG AAC CAG
YH3S	GCC AAG CCC TTC GTG CCC
YH5	CTT CGT GGT GGT ATG GAT CCG GGC AGT GGC
YH6	GCC CGG ATC CAT ACC ACC ACG AAG TCT CAA
YH7	CAG GCG GAC ATG GAA GCC
YH8	ATG GAA GCC CCC GGG CCG
YH9	GCC GAG GCC CAG CGG GAG AAC
YH10	ACC ACC ACG AAG TCT CAA CAC AAG
YH11	GTC CGC CTG AGC CCA GCA GTC AGG CGC CGA GTC GCT
YH12	AGC CGC CTG GTC CCA GCA GTC AGG
YH14	GAC TGC TGG GAC CAG GCG GAC ATG GAA
YH15	GCT TGC TGG GAC CAG GCG GAC ATG GAA
YH16	GCT TGC TGG GCT CAG GCG GCT ATG GAA
YH17	AGG CGC CGA GTC GCT GCT GCT GCT GCC GCT GCT
YH18	AGG CGC CGA AGC GCT GCT GCT GCT GCC GCT GCT
YH-60	CAA CTC AAC GTC AAC GCC AAG
YH-61	GGC AAC TCA ACG TCA AGT AGT CGA GGT ACC GCG GC

Table. 1 プラスミド作成に用いたオリゴヌクレオチドの配列

## 2. プラスミド DNA 調製

・プラスミド DNA は形質転換した大腸菌 DH5a株をアンピシリン含有 2×YT 培地にて 16 時間振とう培養後、アルカリ法による少量調製、もしくはアルカリ法と塩化セシウム密度勾配超遠心法の併用による大量調製により得た。

### 3. 形質転換

・プラスミド DNA と大腸菌 DH5a株のコンピテント細胞を 30 分間氷上にて保温後、アンピシリン含有 LB プレートに塗布し、16 時間 37℃で保温して形質転換体のコロニーを取得した。

### 4. 抗体

・ 抗 hGSPT1 抗体および抗 PABP 抗体

pColdI-hGSPT 1 (22-205) および pColdI-PABPC1 を大腸菌 BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL 株(Stratagene)に形質転換し、大腸菌より His タグ付加リコンビナント蛋白質 (His6-hGSPT1(22-205)および His6-PABPC1 蛋白質)を調整し、これらのリコンビナント蛋白質をウサギに免疫することにより作製した (Hashimoto et.al., 2012)。

・ 抗 eRF3(179-190)抗体および抗 eRF1 抗体は、当研究で作成したものを用いた。(Hoshino et al.,1998)

・ 抗 FLAG 抗体は、anti-FLAG M2 mouse monoclonal antibody (SIGMA)を用いた。

・ 抗 Myc 抗体は、anti-Myc (A-14) rabbit polyclonal antibody (Santa cruz biotechnology)を用いた。

・ 抗 His6 抗体は、mouse monoclonal Tetra His antibody (QIAGEN)を用いた。

・ 抗 GAPDH 抗体は、anti-GAPDH mouse monoclonal antibody (MILLIPORE)を用いた。

・ 抗 Caspase3 抗体は、rabbit polyclonal anti-Caspase3 antibody (Cell Signaling)を用いた。

・ 抗 eIF4G 抗体は、rabbit polyclonal anti-eIF4G antibody (Cell Signaling)を用いた。

・ 抗 Mouse IgG および抗 Rabbit IgG HRP 標識 2 次抗体は、Jackson ImmunoResearch より購入したものを用いた。

・ 抗 Mouse IgG Alexa 488 2 次抗体は、invitrogen より購入したものを用いた。

## 5. 細胞培養および遺伝子導入

HeLa 細胞、HEK293T 細胞、MCF-7 細胞および SK-N-SH 細胞は 5% fetal calf serum を含んだ DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) (日水製薬) で 5% CO<sub>2</sub> 存在下 37℃ で培養した。HeLa 細胞および HEK293T 細胞に体する遺伝子導入は LipofectAMINE 2000 (Invitrogen) または Polyethyleneimine MAX (Polysciences) を用いて行った。HeLa 細胞に対する siRNA の導入は LipofectAMINE RNAiMAX (Invitrogen) を用いて行った。

THP-1 細胞、Jurkat 細胞および U937 細胞は 5% fetal calf serum を含んだ RPMI1640 (日水製薬) で 5% CO<sub>2</sub> 存在下 37℃ で培養した。THP-1 細胞への遺伝子導入は Neon<sup>TM</sup> Transfection System (Invitrogen) を用いて取扱説明書に従い行った。

NIH3T3 細胞は 5% または 10% fetal calf serum を含んだ DMEM で 5% CO<sub>2</sub> 存在下 37℃ で培養した。遺伝子導入はレンチウイルスを用いて行った。

## 6. ストレス刺激および誘導剤、阻害剤による処理

### ・ THP-1 細胞、Jurkat 細胞および U937 細胞

UV ストレスは、細胞を 10<sup>7</sup> cells/ml となるように PBS(-) で懸濁し、その懸濁液に UV cross-linker (ATTO) を用いて UV (254 nm, 100 J/m<sup>2</sup>) を照射した。その後、細胞密度が 10<sup>6</sup> cells/ml となるように 9 倍量の細胞培養液 (RPMI1640(5%FBS)) を加え、5% CO<sub>2</sub> 存在下 37℃ で培養し、所定の時間に回収した。

エトポシド、ツニカマイシン、タプシガルギン、過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)によるアポトーシス誘導は、細胞の細胞密度を 10<sup>6</sup> cells/ml に調整の後 etoposide (SIGMA)、Tunicamycin (Wako)、thapsigargin (Wako)、hydrogen peroxide (Wako) を指定の濃度となるように添加し、5% CO<sub>2</sub> 存在下 37℃ で培養し、所定の時間に回収した。プロテアーゼのインヒビターとしては AEBSF (SIGMA)、E-64 (SIGMA)、MG132 (CALBIOCHEM)、Z-VAD-FMK (R&D SYSTEMS) を用い、ストレス刺激誘導直後に添加した。

### ・ NIH3T3 細胞、MCF-7 細胞および SK-N-SH 細胞

細胞をディッシュに播いた後、70%~80%コンフルエントになるまで培養した。その後、新しい培地に交換し、指定の薬物を指定の濃度となるように添加し、



5% CO<sub>2</sub> 存在下 37℃で培養し、所定の時間に回収した。

また A23187 は Wako、Lactacystin、ALLN は CALBIOCHEM より購入した。

## 7. siRNA

siRNA は以下に示したものをを用いた。

si-luciferase : 5' r (CGU ACG CGG AAU ACU UCG A) d(TT) 3'

si-hGSPT1 : 5' r (GUC AAC CAU UGG AGG ACA A) d(TT) 3'

si-hGSPT2 : 5' r (GAA CAC GUA AAU GUA GUA U) d(TT) 3'

## 8. ウェスタンブロットサンプルの調整

ウェスタンブロットサンプルは、細胞を buffer A (50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 8 % glycerol, 2 % SDS, 2 % 2-mercaptoethanol)に可溶化することで調整した。また、必要に応じて細胞を Lysis Buffer B (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 2.5 mM EDTA, 1 % NP-40, 1 % Na-deoxycholate, 0.1 % SDS, 1 mM PMSF, 2 µg/mL Aprotinin, 2 µg/mL Leupeptin, 2 µg/mL pepstatinA, 1 mM DTT)中で 15 分間氷上にて可溶化し、15,000 rpm、4℃、15 分間遠心したものの上清に 5×bufferA を加えウェスタンブロットサンプルとした。

## 9. [<sup>35</sup>S]パルスラベル

HeLa 細胞は 22 µCi/ml の[<sup>35</sup>S]ラベルメチオニン、システインを含む 5%FBS 含有 DMEM 培地で 3 時間培養した後、細胞を PBS で洗浄し、RIPA buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 1 % Na-deoxycholate, 0.1 % SDS, 1 mM PMSF)中で 15 分間氷上にて可溶化し、15,000 rpm、4℃、15 分間遠心したものの上清をサンプルとした。そのサンプルの一部をとり 5×buffer A を加え SDS-PAGE 用のサンプルとし、12% アクリルアミドゲルを用い SDS-PAGE でタンパク質を分離後、ゲルドライヤーで乾燥させ、オートラジオグラフィーにてタンパク質への[<sup>35</sup>S]取り込み量を測定した。[<sup>35</sup>S]パルスラベルサンプルのタンパク質濃度は DC protein assay (BIO RAD)を用い、BSA を標準タンパク質として測定した。

## 10. 細胞抽出液の調整

細胞を buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol, 0.5 % NP-40 and 0.5 mM PMSF) に懸濁後、10 分間氷上で静置し、15,000 rpm, 4°C で 15 分間遠心した。これにより得られた上清を抽出液とし以降の実験に用いた。

## 11. 免疫染色

カバーガラス上で培養した細胞を 4% paraformaldehyde (PBS(-)) で 15 分処理することで固定した後、10 mM グリシンを含む PBS(-) で 2 度洗浄し、0.1 % Triton X-100、1% goat serum を含む PBS(-) で 15 分処理した。さらに PBS(-) で一度洗浄した後、1 次抗体 (抗 FLAG-抗体または抗 hGSPT1-抗体) を含む抗体液 (1% goat serum 含有 PBS(-)) に一晩処理した。翌日、3 度 PBS(-) で処理した後、2 次抗体 (抗 mouse または抗 rabbit - Alexa 488) と 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Dojindo) を含む抗体液 (1% goat serum 含有 PBS(-)) で 90 分処理した。その後、PBS(-) で 3 度洗浄し、カバーガラスを Prolong Gold (Invitrogen) を用いてスライドガラスに固定し標本とした。

## 12. 免疫沈降

HeLa 細胞を buffer A (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.5% NP-40, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 0.1 mM PMSF, 2 µg/ml aprotinin, 2 µg/ml leupeptin and 2 µg/ml pepstatin A) に懸濁後、超音波処理をし、氷上で 15 分保温した。その後 15,000 rpm, 4°C で 15 分遠心し、上清画分を取得し、その上清画分に anti-Flag IgG agarose (Sigma) を添加し、低温室で 30 分間攪拌した。その後樹脂を buffer A で 3 度洗浄し、結合しているタンパク質を SDS-PAGE sample buffer で溶出した。

# 第3章 翻訳終結因子 eRF3 を標的とした新規遺伝子発現制御機構の解析

## 3-1 序

切断型 eRF3 (p-eRF3)と同様にアポトーシス阻害タンパク質 IAP に結合しカスパーゼの活性化を促進する因子として、ヒトでは Smac/DIABLO (Du et al., 2000 ; Verhagen et al., 2000) と Omi/HtrA2 (Suzuki et al., 2001 ; Hegde et al., 2002 ; Verhagen et al., 2002; van Loo et al., 2002) の二つのタンパク質が知られている。p-eRF3 と同様にこれらの因子は共通して IAP との結合モチーフ IBM (IAP-binding motif) を有し (Table. 3-1) (Srinivasula et al., 2001) 、IAP に結合することでアポトーシスの実行因子であるカスパーゼを IAP による阻害から解放することでカスパーゼを活性化する。p-eRF3 はヒトにおいて第3の IAP 結合タンパク質として同定され、他の IAP 結合タンパク質と同様にカスパーゼを活性化しアポトーシスを促進することが証明されているが、どのような条件下において生成し機能しているかなど、実際の細胞内での生理的役割は分かっていない。そこで本研究は、まず p-eRF3 が生成する生理的条件を明らかにすることを目的とし検討を行った。

本章では、p-eRF3 の生成条件を検討する過程で新たに見出した「eRF3 のアポトーシス時におけるカスパーゼ依存的修飾」について検討した結果について報告する。また、本研究により翻訳終結因子 eRF3 を標的とした遺伝子発現抑制機構の存在を明らかとしたので合わせて考察する。

### IAP 結合タンパク質

IAP binding motif (IBM)

eRF3 (p-eRF3)	AKPF VPN
Smac	AVPI AQK
HtrA2	AVPS PPP
Caspase-9	ATPF QEG

Table. 3-1. IAP 結合タンパク質

現在知られている IAP 結合タンパク質を示す。  
全ての IAP 結合タンパク質は IAP binding motif (IBM)を持つ。

### 3-2 実験結果

#### カスパーゼによる切断により生成する新規切断型 eRF3 の同定

p-eRF3 が生成する条件として、他の IAP 結合タンパク質である Smac、Omi に着目した。これらの因子は共にミトコンドリアに局在するタンパク質であり、DNA 傷害性ストレスなどにより、ミトコンドリア依存的なアポトーシスが誘導された際にミトコンドリアから漏出しその機能を発揮することが報告されている (Fig. 3-2)。そこで本研究では、これらの因子が機能する DNA 傷害性ストレス等の条件において p-eRF3 も同様に生成する可能性について検討を行った。

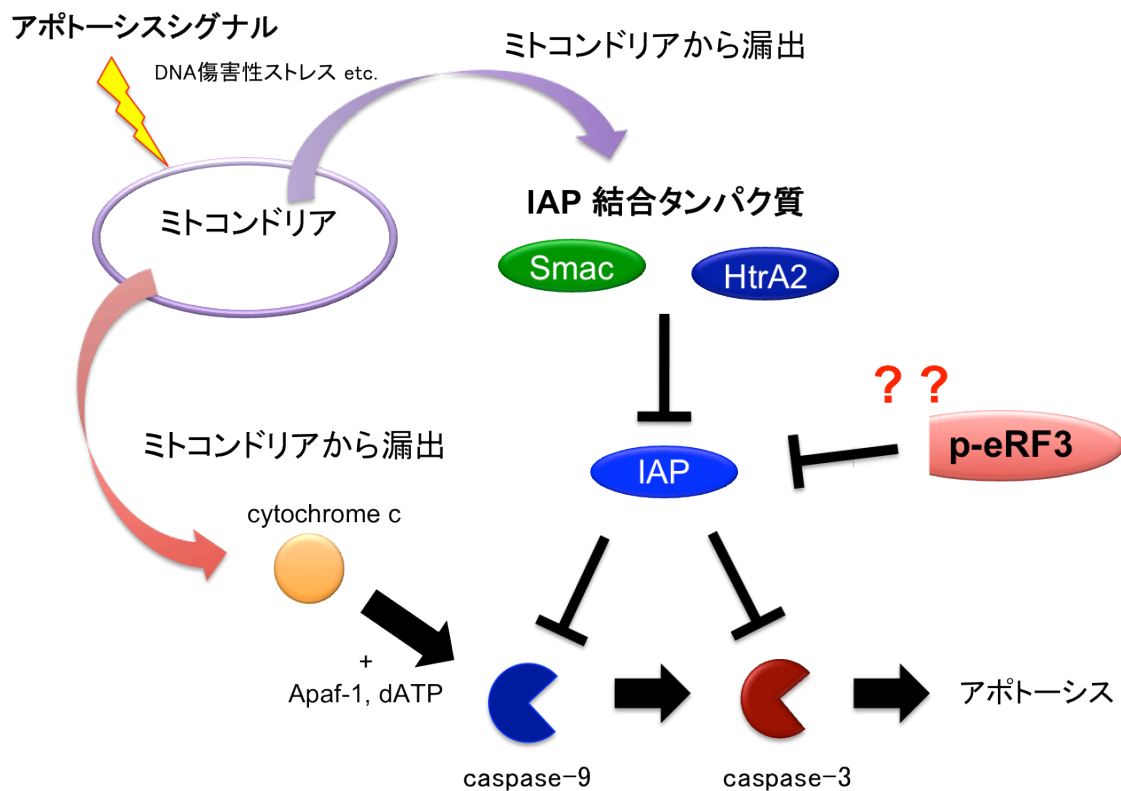
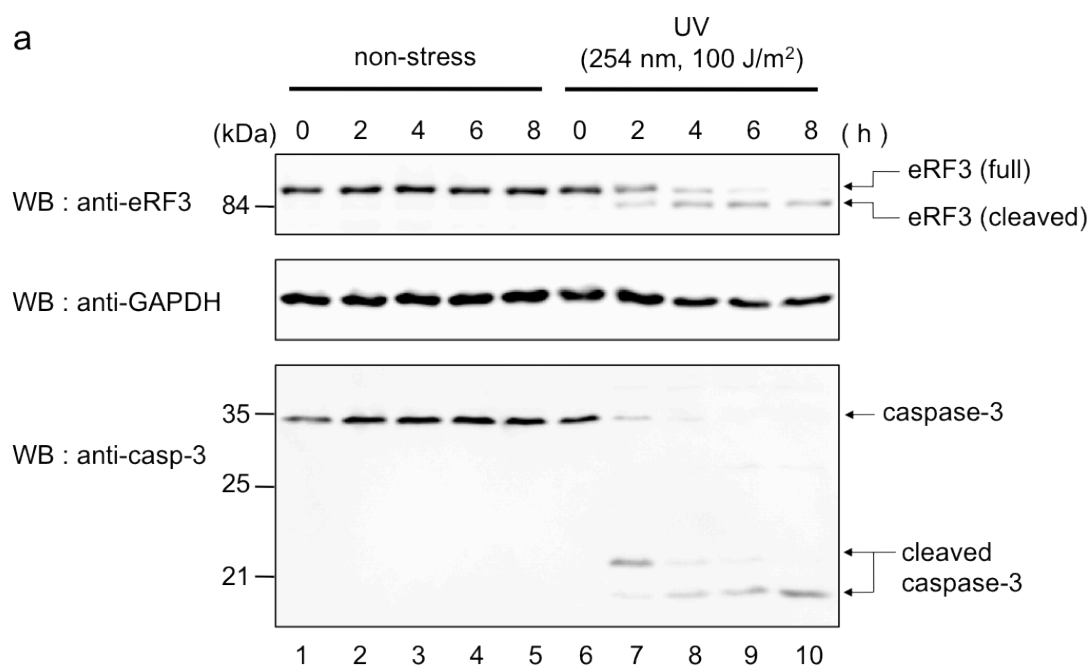


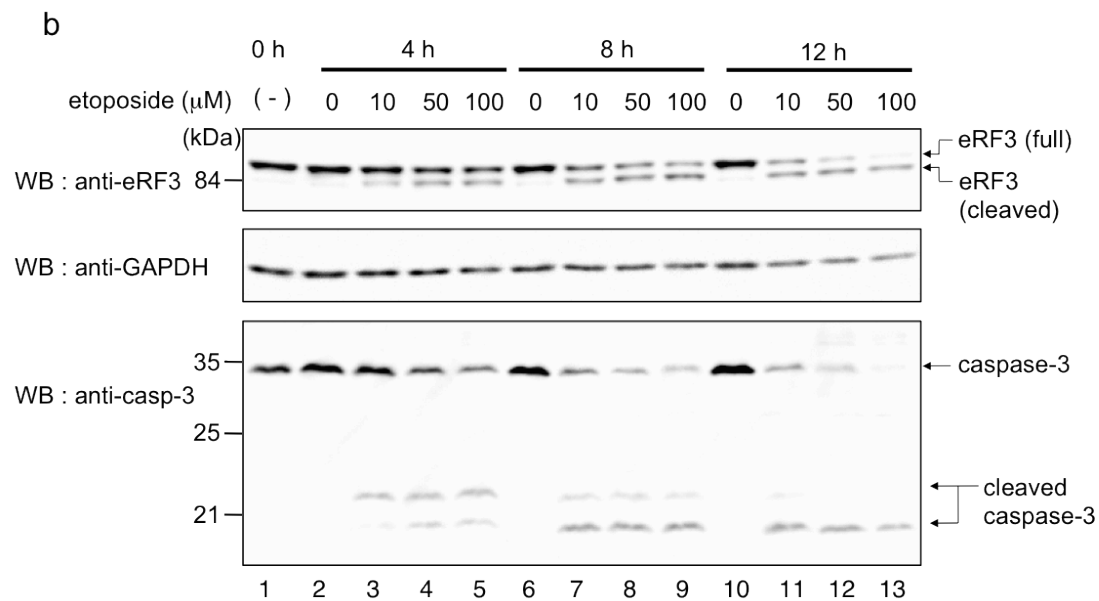
Fig. 3-2. ミトコンドリア依存的アポトーシス

### 3-2-1 アポトーシス誘導による eRF3 の切断

種々の細胞に対して DNA 傷害性ストレス等のストレス刺激を加え、eRF3 の挙動をウェスタンブロット法により解析した。その結果、特に、ヒト白血病由来の THP-1 細胞に紫外線照射(UV)による DNA 傷害性ストレスを加えた際に、切断型 eRF3 が効率よく生成することを見出した(Fig. 3-3 (a))。またその際、アポトーシスの実行因子であるカスパーゼ-3 の活性化が観察されたことから、アポトーシスが誘導されている条件下において切断型 eRF3 が生成していることが明らかとなった。

同様の結果は THP-1 細胞を他の DNA 傷害性ストレス誘導剤であるエトポシドで処理した際も同様の結果が得られた(Fig. 3-3 (b))。



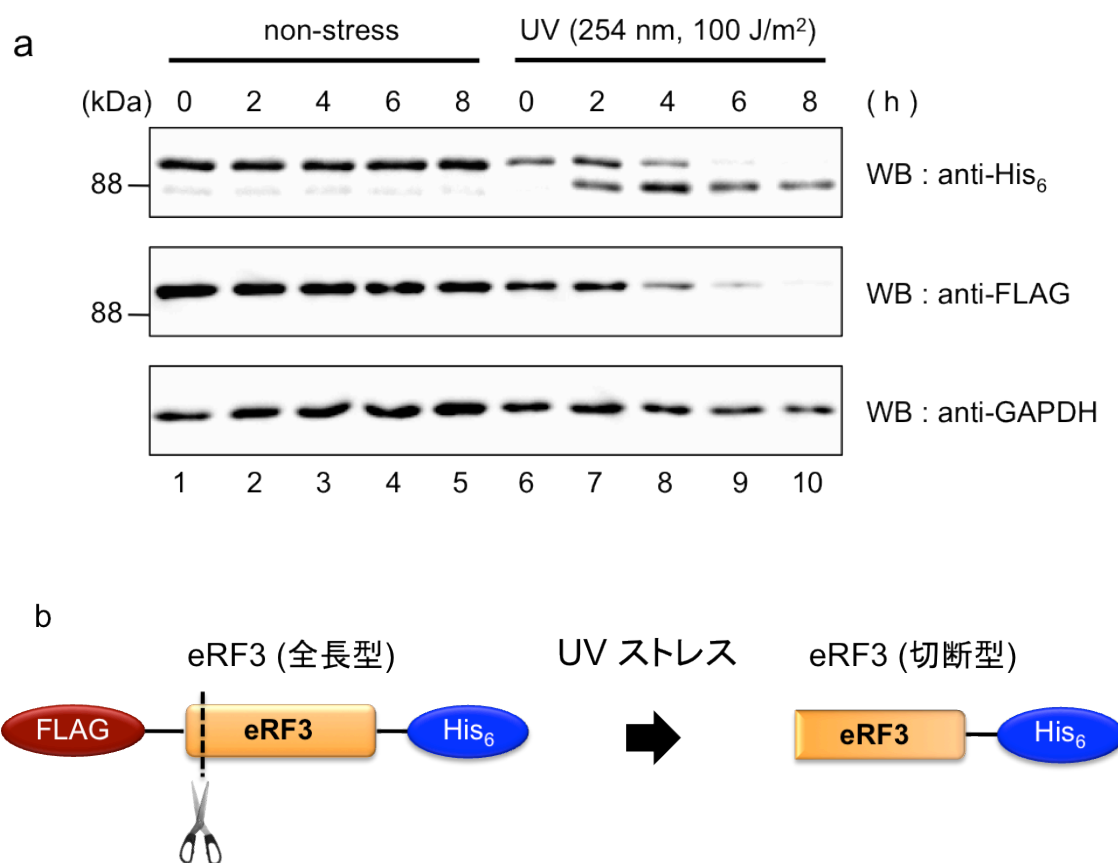


**Fig.3-2-1: アポトーシス誘導による eRF3 の切断** (a) THP-1 細胞に UV ( 254 nm, 100 J/m<sup>2</sup> ) 照射後、0, 2, 4, 6, 8 時間後に細胞を回収し (lanes 6-10)、対象群として UV 照射をしていない細胞を用意した (lanes 1-5)。回収した細胞は RIPA buffer に溶解させ、タンパク質をウェスタンブロット法により解析した。(b) THP-1 細胞を各濃度のエトポシドで処理した後(0 mM (lanes 2, 6, 10)、10 mM (lanes 3, 7, 11)、50 mM (lanes 4, 8, 12)、100 mM (lanes 5, 9, 13))、4 時間後 (lanes 2-5), 8 時間後 (lanes 6-9), 12 時間後 (lanes 10-13)に細胞を回収した。コントロールとして無処理の細胞を用意した(lane 1)。タンパク質は(a)と同様にウェスタンブロット法により解析した。

GAPDH をローディングコントロール、Caspase-3 をアポトーシスのバイオマーカーとして用いた。

### 3-2-2 N 末端領域における eRF3 の切断

eRF3 のアポトーシス時における切断についてさらに検討するため、N 末端に FLAG タグ、C 末端に His タグを付加した eRF3 を細胞に発現させ、UV 照射によりアポトーシスを誘導し eRF3 の切断を解析した。その結果 C 末端の His タグでのみ、全長型 eRF3 の消失と共に切断型 eRF3 の生成する過程が観察され、N 末端の FLAG タグでは全長型 eRF3 の消失のみが観察された(Fig. 3-4 (a))。このことから eRF3 はアポトーシス時に N 末端領域が切断されていることが明らかとなった(Fig. 3-4 (b))。



**Fig.3-2-2: N 末端領域における eRF3 の切断** (a) THP-1 細胞にエレクトロポレーション法をもちいて FLAG-eRF3 -His<sub>6</sub> を導入後、36 時間培養した。その後、細胞を回収し UV (254 nm, 100 J/m<sup>2</sup>) を照射し、0, 2, 4, 6, 8 時間後に細胞を回収した(lanes 6-10)。対象群として UV 照射をしていない細胞を用意した (lanes 1-5)。タンパク質はウェスタンブロット法により解析した。GAPDH はローディングコントロールとして用いた。(b) eRF3 切断の模式図

### 3-2-3 新規切断型 eRF3 の同定

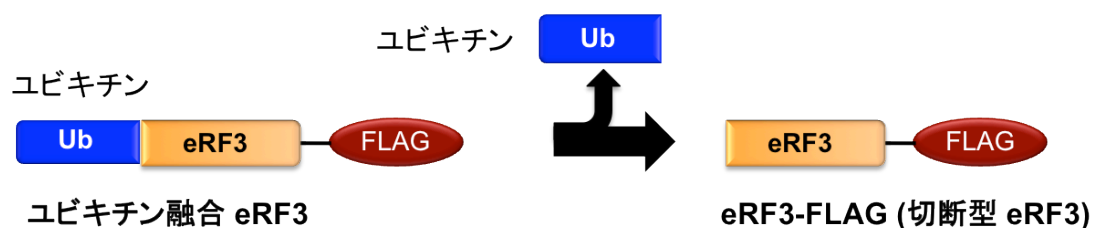
アポトーシス時に生成する切断型 eRF3 が p-eRF3 であるか検討するため、エドマン分解法により今回発見した切断型 eRF3 の N 末端配列の同定を試みたが、何らかの修飾により N 末端がブロックされているために N 末端配列を決定することができなかった。N 末端の修飾としてはピログルタミル化などが考えられる。

エドマン分解により切断型 eRF3 の N 末端配列を同定できなかったことから、次に人工的に発現させた p-eRF3 とウェスタンブロットでの泳動度の比較することでアポトーシス時に生成する切断型 eRF3 が p-eRF3 であるか検討した。

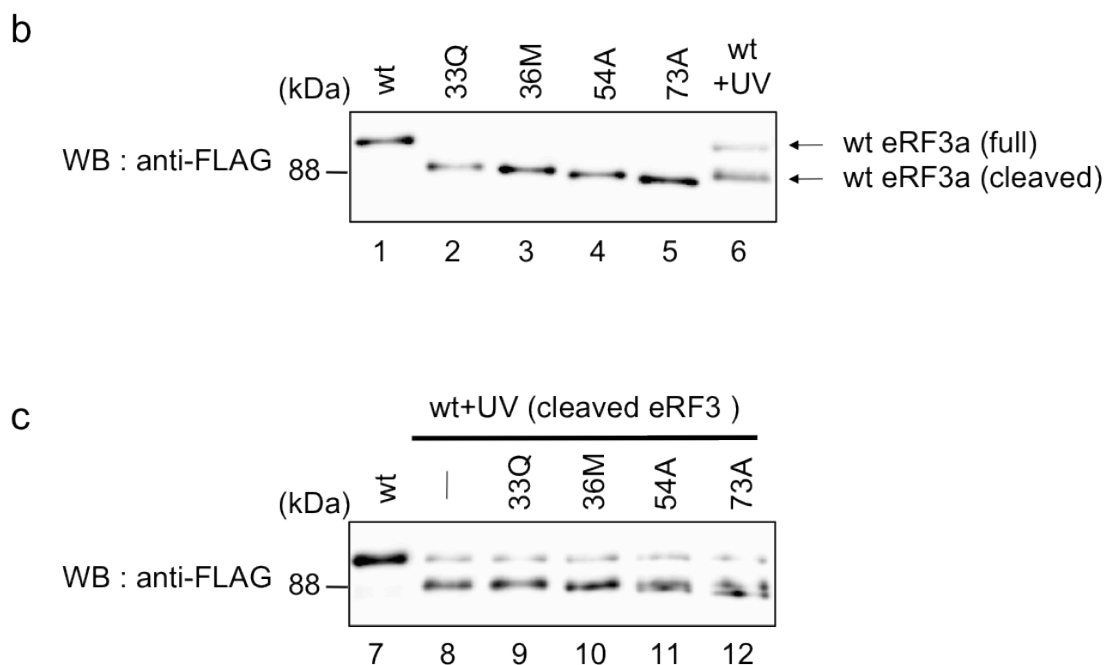
切断型 eRF3 の発現システムとして、N 末端にユビキチンを融合させた eRF3 を用いた。このユビキチン融合 eRF3 を細胞内に発現させると、ユビキチンが種々の ATP 依存性プロテアーゼにより切断除去され、任意の配列から始まる eRF3 を発現させることができる(Fig. 3-5 (a))。人工的に発現させた切断型 eRF3 としては、全長型 eRF3 に相当する(1M)-eRF3 (eRF3-wt)の他に 33Q-eRF3、36M-eRF3、54A-eRF3 および p-eRF3 に相当する 73A-eRF3 を用意した。またアポトーシス時に生成する切断型 eRF3 は(1M)-eRF3 を細胞に発現させ UV ストレスによりアポトーシスを誘導することで調整した。

アポトーシス時に生成する切断型 eRF3 と p-eRF3 のウェスタンブロットでの泳動度の比較の結果、アポトーシス時に生成する切断型 eRF3 は p-eRF3 よりも移動度の小さい位置に観察された(Fig. 3-5 (b))。そこでアポトーシス時に生成する切断型 eRF3 と人工的に発現させた各種切断型 eRF3 のサンプルを混合し、ウェスタンブロットでの泳動度を検討したところ、33Q、36M-eRF3 と泳動度が一致した(Fig. 3-5 (c))。このことからアポトーシス時に生成する切断型 eRF3 は予想に反し、p-eRF3 ではなく、N 末端から 30 アミノ酸付近で切断をうけた新規切断型 eRF3 であることが明らかとなった。

#### a 切断型 eRF3 発現システム





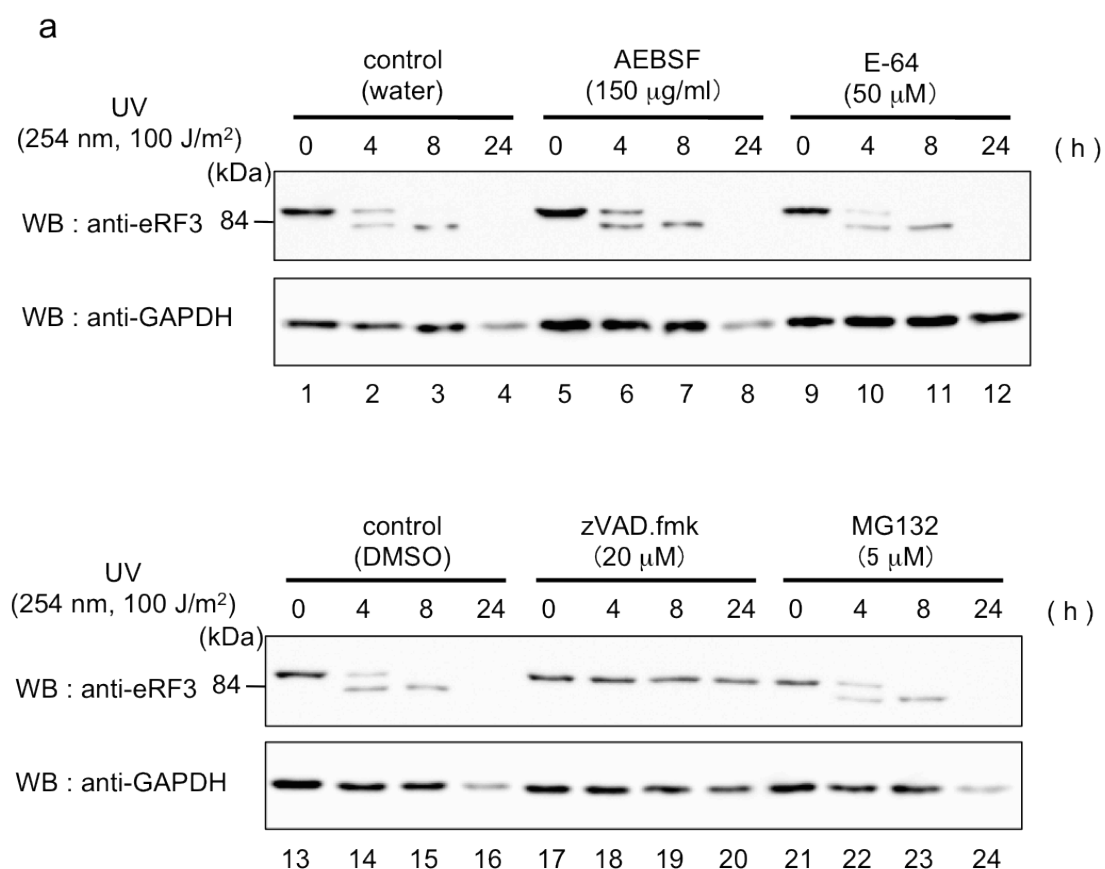


**Fig. 3-2-3: 新規切断型 eRF3 の同定** (a) 切断型 eRF3 の人工的発現システムの模式図 (b) UV ストレスにより生成する切断型 eRF3 (wt + UV) は、THP-1 細胞にエレクトロポレーション法をもちいて Ub-(wt)-eRF3a-FLAG を導入後、UV を照射することで調製した (lane 6)。切断型 eRF3 の標準サンプル Ub-(wt)/(33Q)/(36M)/(54A)(73A)-eRF3a-FLAG はそれぞれの発現ベクターを HEK293T に発現させることで調製した (lanes 1-5)。これらのサンプルの泳動度をウェスタンブロット法により解析した。(c) UV ストレスにより生成する切断型 eRF3 (wt + UV) と eRF3 切断体の標準サンプルを混合し、ウェスタンブロット法により解析した (lanes 9-12)。

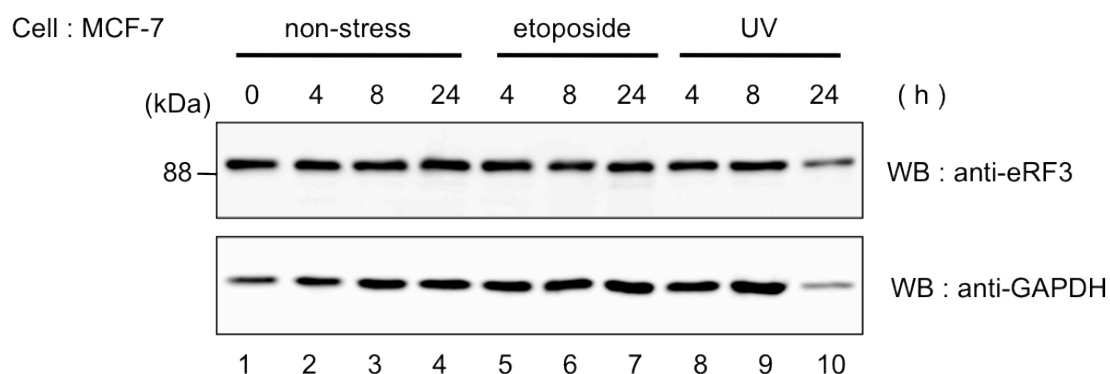
### 3-2-4 カスパーゼ依存的に eRF3 は切断を受ける。

次に新規切断型 eRF3 の切断プロテアーゼを推定する目的で、プロテアーゼインヒビターが eRF3 の切断に及ぼす効果を検討した。セリンプロテアーゼインヒビター(AEBSF)、システインプロテアーゼインヒビター(E-64)、カスパーゼインヒビター(zVAD.fmk)、プロテアソームインヒビター(MG132)の効果を検討したところ、カスパーゼインヒビターである z-VAD により eRF3 の切断が完全に抑制された(Fig. 3-6 (a))。以上の結果よりアポトーシス時の eRF3 の切断はカスパーゼ依存的であることが明らかとなり、ことから新規切断型 eRF3 を eRF3-cp と命名した(Fig. 3-6 (c))。

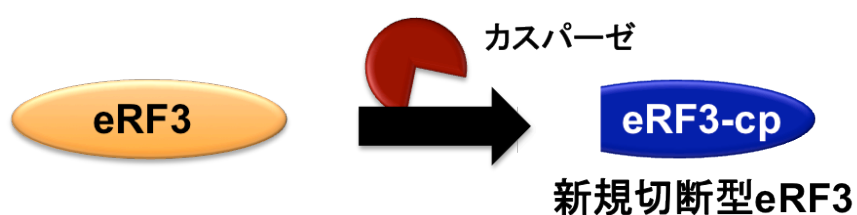
さらに、eRF3-cp の生成に対するカスパーゼの関与を検討するため、caspase-3 を欠損している細胞株である MCF-7 において eRF3 の挙動を解析したところ、eRF3-cp の生成は観察されなかった(Fig. 3-6 (b))。また後述の eRF3 の分解も観察されなかった。このことから eRF3 のアポトーシス時における修飾(eRF3-cp の生成と eRF3 の分解)に caspase-3 が関与していることが強く示唆された。



b



c

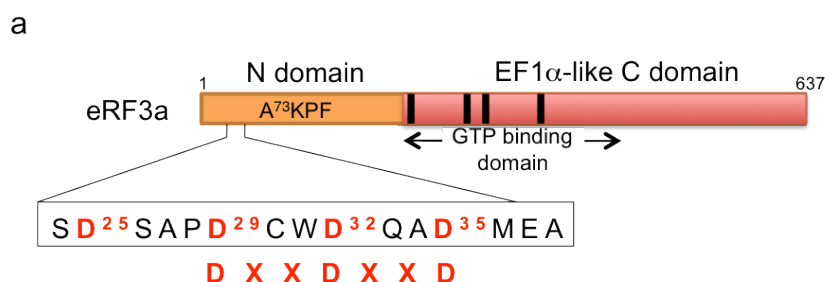


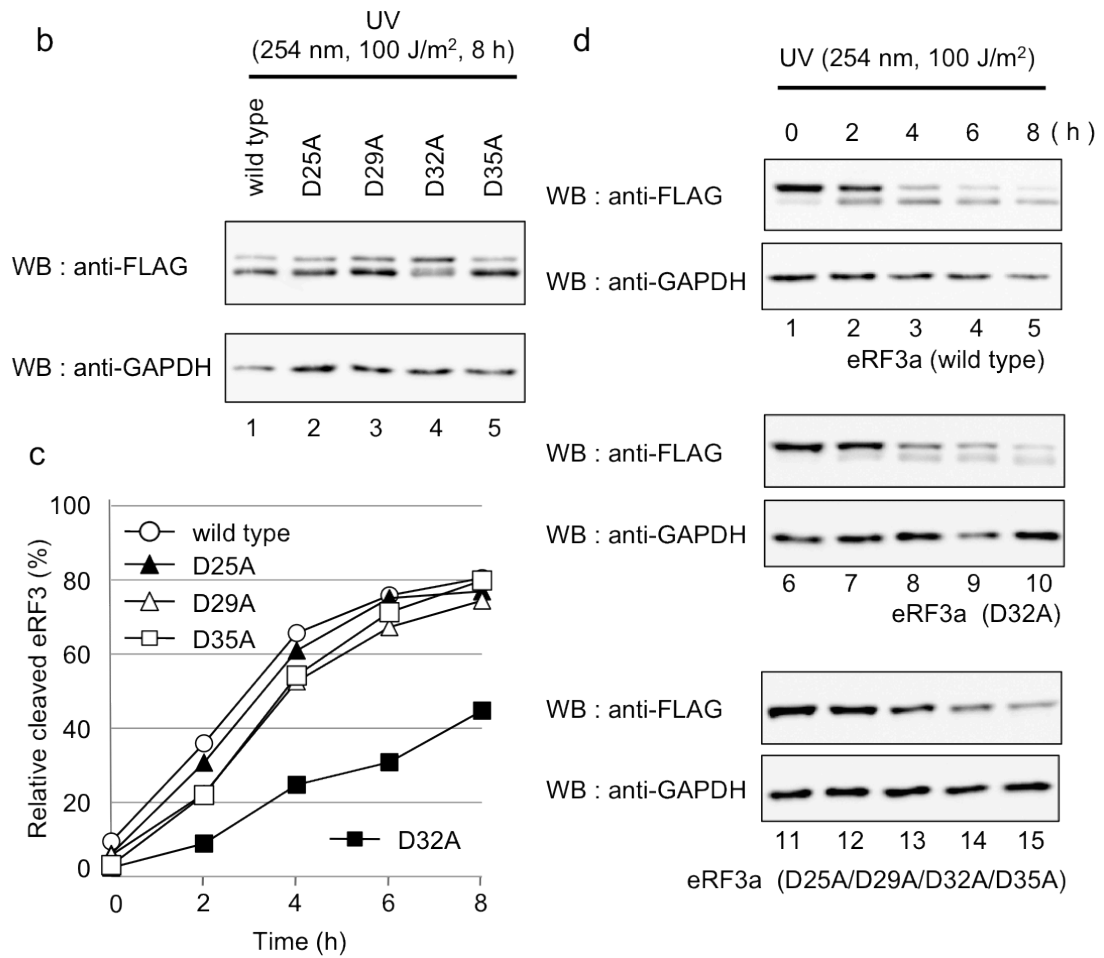
**Fig.3-2-4: カスパーゼ依存的切断型 eRF3 の生成** (a) THP-1 細胞に UV ( 254 nm, 100 J/m<sup>2</sup> ) 照射後直ちに AEBSF (150 µg/ml) (*lanes* 5-8), E-64 (50 µM) (*lanes* 9-12), zVAD.fmk (20 µM) (*lanes* 17-20), MG132 (5 µM) (*lanes* 21-24) を加え 0, 4, 8, 24 時間後に細胞を回収し、eRF3 の挙動をウェスタンブロット法により解析した。GAPDH はローディングコントロールとして用いた。(b) MCF-7 細胞をエトポシド(50 µM) (*lanes* 5-7)と UV ( 254 nm, 100 J/m<sup>2</sup> ) (*lanes* 8-10)で処理し 4, 8, 24 時間後に細胞を回収し、eRF3 の挙動をウェスタンブロット法により解析した。コントロールとして無処理の細胞を用意した(*lanes* 1-4)。GAPDH はローディングコントロールとして用いた。(c) カスパーゼによる eRF3 切断の模式図

### 3-2-5 eRF3-cp 切断部位の同定

ついで、eRF3-cp の切断部位の同定を試みた。eRF3-cp は N 末端から 30 アミノ酸付近でカスパーゼ依存的に切断を受け生成することから、この領域にカスパーゼによる切断のコンセンサス配列 DXXD (D : アスパラギン酸残基、X : 任意のアミノ酸残基)が存在するか検討したところ、重複したカスパーゼの切断配列を見出した(Fig. 3-7 (a))。カスパーゼはアスパラギン酸残基の C 末側を切断することから、推定される切断部位付近に存在するアスパラギン酸残基(D25, D29, D32, D35)をアラニン残基に置換した eRF3 変異体を作成し、切断への影響を検討した。

eRF3 の各種変異体を細胞に発現させ、UV 照射によりアポトーシスを誘導し、eRF3 の各種変異体の切断効率を検討したところ D32 への変異により切断効率が低下した(Fig. 3-7 (b, c))。しかし D32 への単独の変異では切断を完全に抑制できないことから、次に 4 カ所全てのアスパラギン酸残基をアラニン残基に置換した変異体を作成し、切断への影響を検討したところ、4 箇所全ての変異により切断は完全に抑制された(Fig. 3-7 (d))。以上の結果から、eRF3 はアポトーシス時にカスパーゼによる切断を受け、主要な切断部位は D32 であるが、その切断部位は重複して存在することを明らかになった。また、データベース解析の結果、eRF3-cp の切断部位は脊椎動物間で保存されていることを確認した(Fig. 3-7 (e))。





**e**

### カスパーゼ切断部位

MDPGSGGGGGGGGGGGSSSSGSSSS	DSAPDCWDQAD	MEAPG	human eRF3a
MDSGSSSS	DSAPDCWDQVD	MESPG	human eRF3b
MDPSSGGGGGGGGGGSSSSSS	DSAPDCWDQTD	MEAPG	mouse eRF3a
MDLGSSS	DSAPDCWDQVD	MEAPG	mouse eRF3b
MEANGSGSSS	DSAPDCWDQAD	IETGSG	chicken eRF3
MDAS	DSAPDSWEQTD	MEATE	frog eRF3
MDAI	DTAPDSWDQED	DGEAQ	zebra fish eRF3
	<b>D x x D x x D</b>		

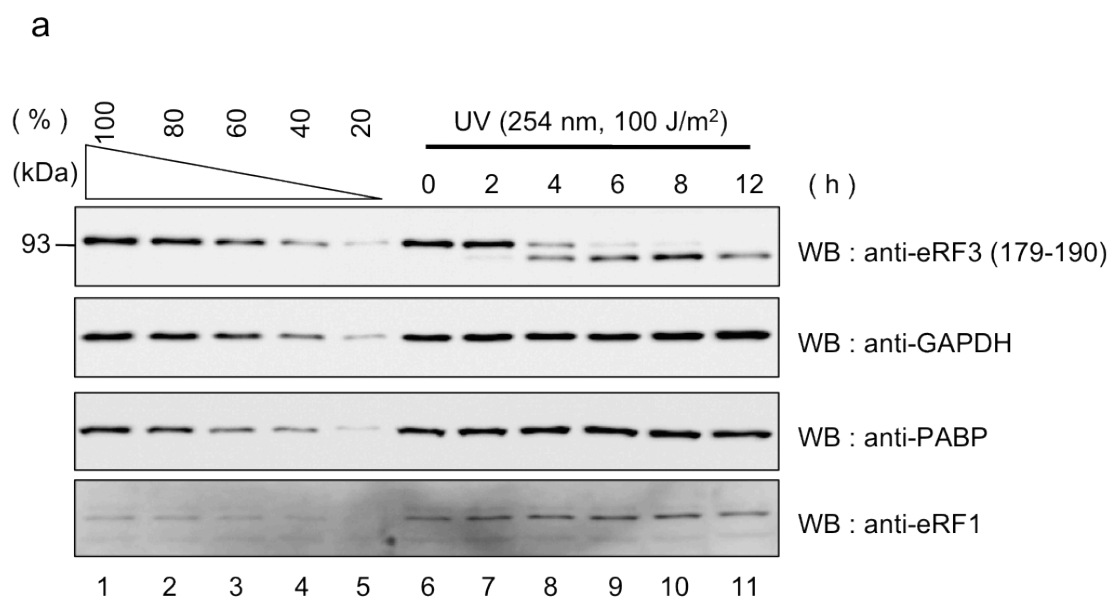
**Fig. 3-2-5: eRF3-cp 切断部位の推定** (a) eRF3a の N 末端領域の模式図 (b) eRF3a-wt および eRF3a 変異体 (D25A, D29A, D32A, D35A) をエレクトロポレーション法により THP-1 細胞に導入し、36 時間培養した。その後 UV (254 nm, 100 J/m<sup>2</sup>) を照射し、8 時間後に回収したものをウェスタンブロット法により解析した。GAPDH はローディングコントロールとして用いた。 (c) eRF3-wt および eRF3 変異体 (D25A, D29A, D32A, D35A) における UV 照射後の切断型 eRF3 の生成効率を示した。切断効率は eRF3 全体量 (全長型 + 切断型) に対する切断型 eRF3 の量 (切断型 eRF3 / eRF3 全体量) として求めた。 (d) eRF3a-wt、eRF3a(D32A) および eRF3a(D25A/D29A/D32A/D35A) をエレクトロポレーション法により THP-1 細胞に導入し、36 時間培養した。その後、細胞を回収し UV (254 nm, 100 J/m<sup>2</sup>) を照射し、0, 2, 4, 6, 8 時間後に回収したものをウェスタンブロット法により解析した。GAPDH はローディングコントロールとして用いた。 (e) ヒトおよび主要なモデル生物(脊椎動物)の eRF3 のカスパーゼによる切断配列を示した。

### 3-3 実験結果

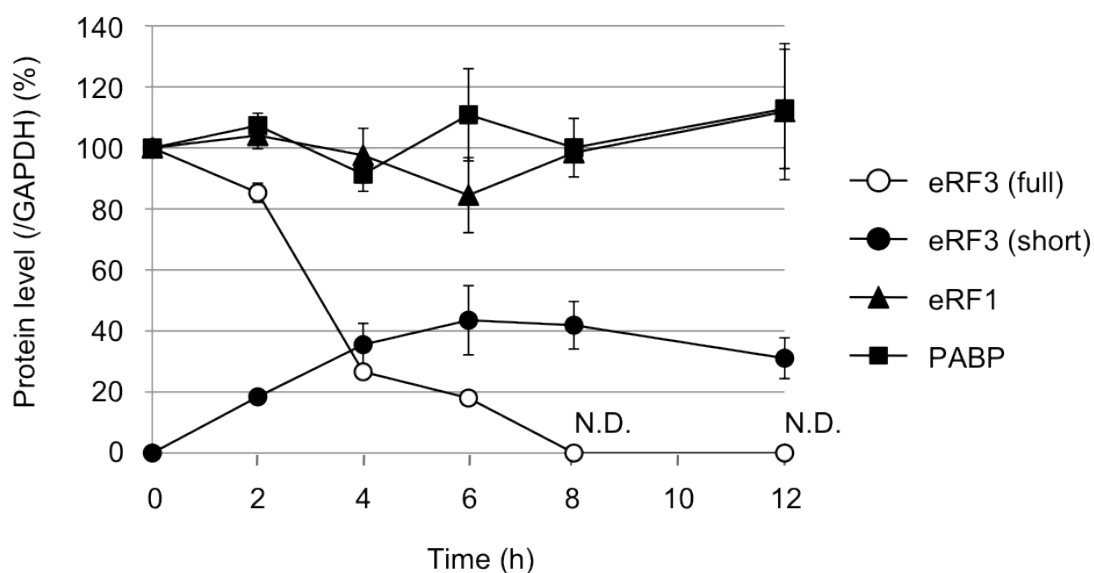
#### アポトーシス時におけるカスパーゼ依存的 eRF3 の分解と eRF3 を標的とした新規遺伝子発現制御

##### 3-3-1 アポトーシス時における eRF3-cp の生成と eRF3 の分解

eRF3-cp の解析を行う過程で、eRF3 自体の量が劇的に減少していることを見出した。そこで、eRF3 のアポトーシス時における量的変化をウェスタンブロット法により測定した。結果 eRF3-cp の出現と同時に全長型 eRF3 が急速に消失し、eRF3 の全体量もストレス誘導後、8 時間の時点で 4 割程度まで減少することが明らかとなった。また eRF3 の主要な結合因子である eRF1 と PABP についても検討した結果、eRF1 と PABP は分解を受けないことから eRF3 はアポトーシス時に特異的に分解されていることが明らかとなった。



b



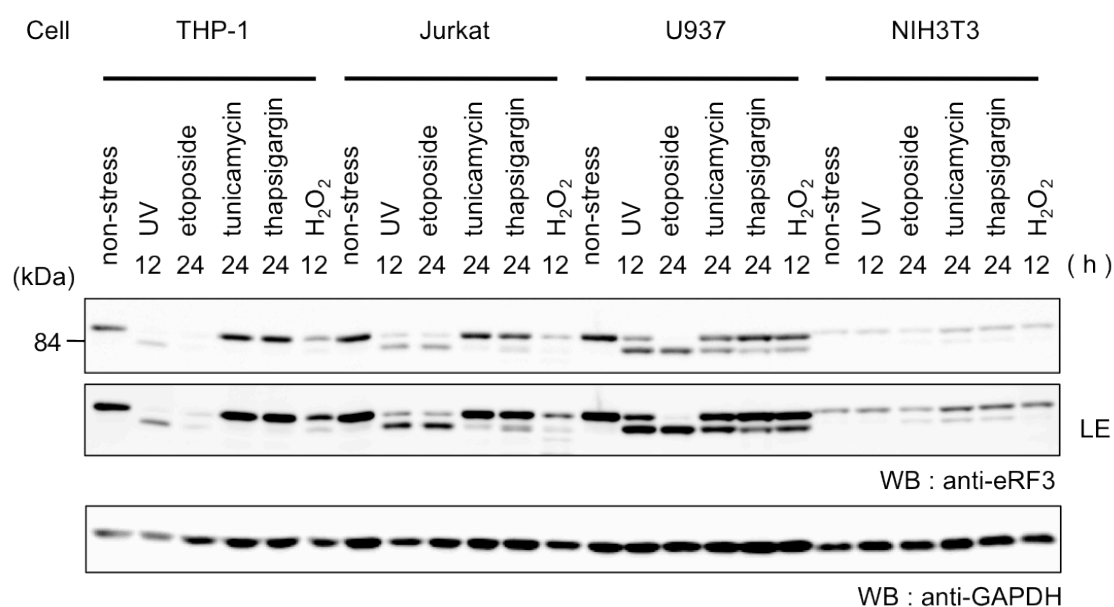
**Fig. 3-3-1: アポトーシス時における eRF3-cp の生成と eRF3 の分解** (A) THP-1 細胞に UV (254 nm, 100 J/m<sup>2</sup>) 照射後、0, 2, 4, 6, 8, 12 時間後に細胞を回収し、eRF3、PABP、eRF1 についてウェスタンブロット法により解析した(lanes 6-11)。GAPDH はローディングコントロールとして用いた。左のレーン(lanes 1-5)はそれぞれのサンプルの 0 時間のサンプルを 100%としたシグナル強度を示している。(B) 0 時間のサンプルを基準として全長型 eRF3 (eRF3 (full))、切断型 eRF3 (eRF3 (cleaved))、PABP、eRF1 タンパク質量の割合の経時的変化を示した。各タンパク質量は GAPDH のタンパク質量で補正した。



### 3-3-2 eRF3 の切断と分解はアポトーシス時に普遍的な現象である

今回発見したアポトーシス時における eRF3 の切断と分解の普遍性を検討するため、複数の細胞種において、DNA 障害ストレス、小胞体ストレス、酸化ストレスなど代表的なストレス刺激時の eRF3 の挙動を解析した。細胞は THP-1 細胞の他に Jurkat、U937 および NIH3T3 細胞を用いた。

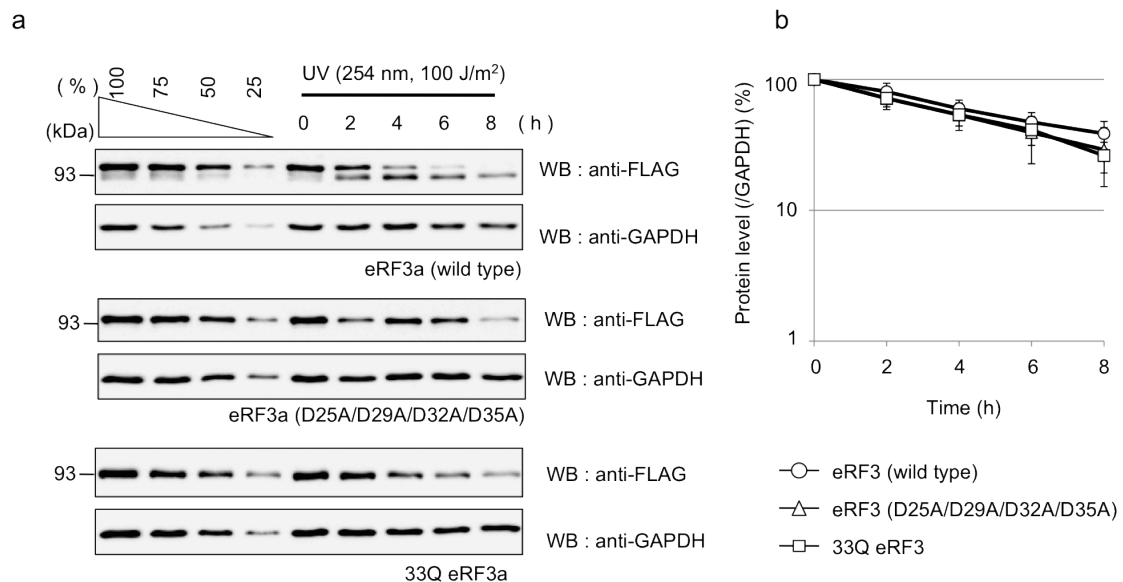
結果、細胞によりストレス応答性は異なるが、全ての細胞種、ストレス刺激により eRF3 の修飾を観察することができ、eRF3 の切断と分解はアポトーシス時に一般的に起こる現象であることを確認した。



**Fig. 3-3-2: アポトーシス時に普遍的な eRF3 の切断と分解** THP-1 細胞、Jurkat 細胞、U937 細胞および NIT3T3 細胞を UV (254 nm, 100 J/m<sup>2</sup>, 12 h)、エトポシド (100 μM, 24 h)、ツニカマイシン (5 μg/ml, 24 h)、タプシガルギン (5 μM, 24 h)、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 mM, 12 h) で処理し、ウェスタンブロット法により解析した。LE は露光時間を長くし、シグナル強度を強くしたことを示している。GAPDH はローディングコントロールとして用いた。

### 3-3-3 eRF3-cp の生成は eRF3 の安定性に影響しない

次に eRF3-cp の生成が eRF3 分解の引き金となっている可能性を検討するため、野生型 eRF3 とカスパーゼによる切断を受けない切断抵抗型 eRF3、eRF3-cp に相当する 33Q-eRF3 を細胞に発現させ、アポトーシス時における分解の程度を比較した。その結果 3 種類の eRF3 の間に分解の程度の差はみられなかった。このことから、eRF3 は eRF3-cp の生成に関わりなく分解されることが明らかとなった。

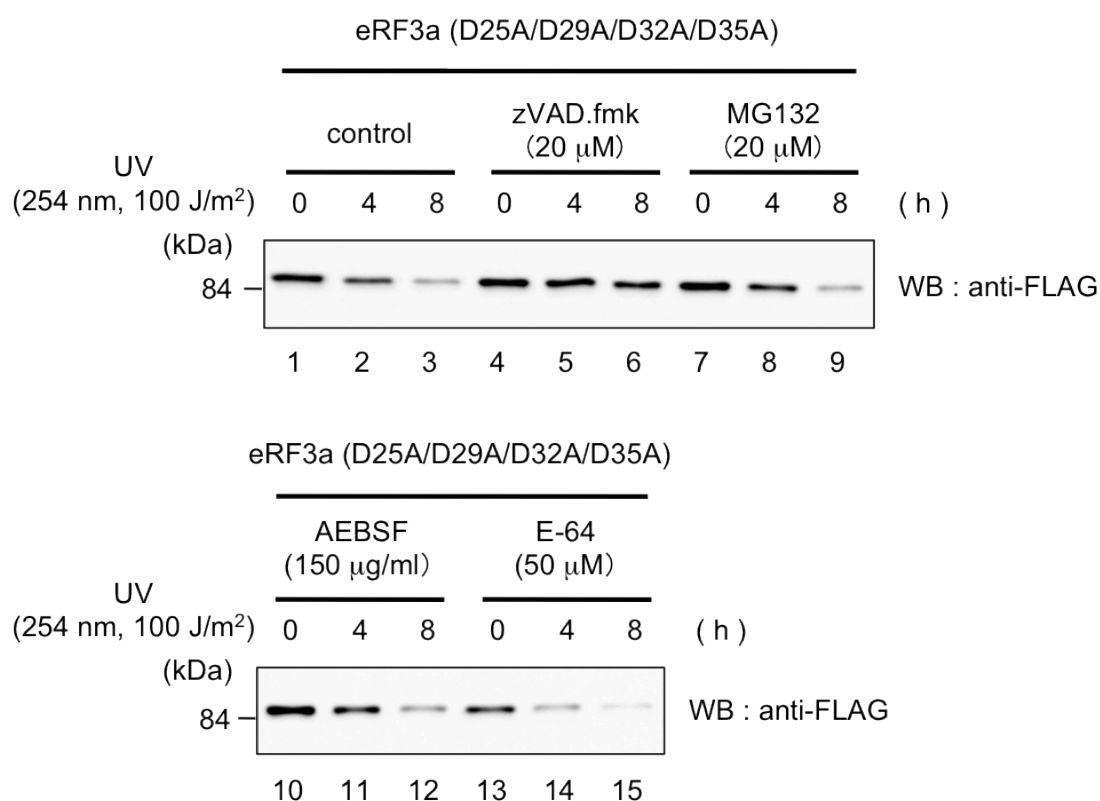


**Fig. 3-3-3: eRF3-cp の生成は eRF3 の安定性に影響しない (a)**

eRF3a-wt、 eRF3a (D25A/D29A/D32A/D35A) および 33Q-eRF3a をエレクトロポレーション法により THP-1 細胞に導入し、36 時間培養した。その後、細胞を回収し UV (254 nm, 100 J/m²) を照射し、0, 2, 4, 6, 8 時間後に回収したものをウェスタンブロット法により解析した。左のレーン(lanes 1-4)はそれぞれのサンプルの 0 時間のサンプルを 100%としたシグナル強度を示している。GAPDH はローディングコントロールとして用いた。 (b) 0 時間のサンプルを基準として各タンパク質量の割合の経時的変化を示した。各タンパク質量は GAPDH のタンパク質量で補正した。

### 3-3-4 eRF3 の分解はカスパーゼ依存的である

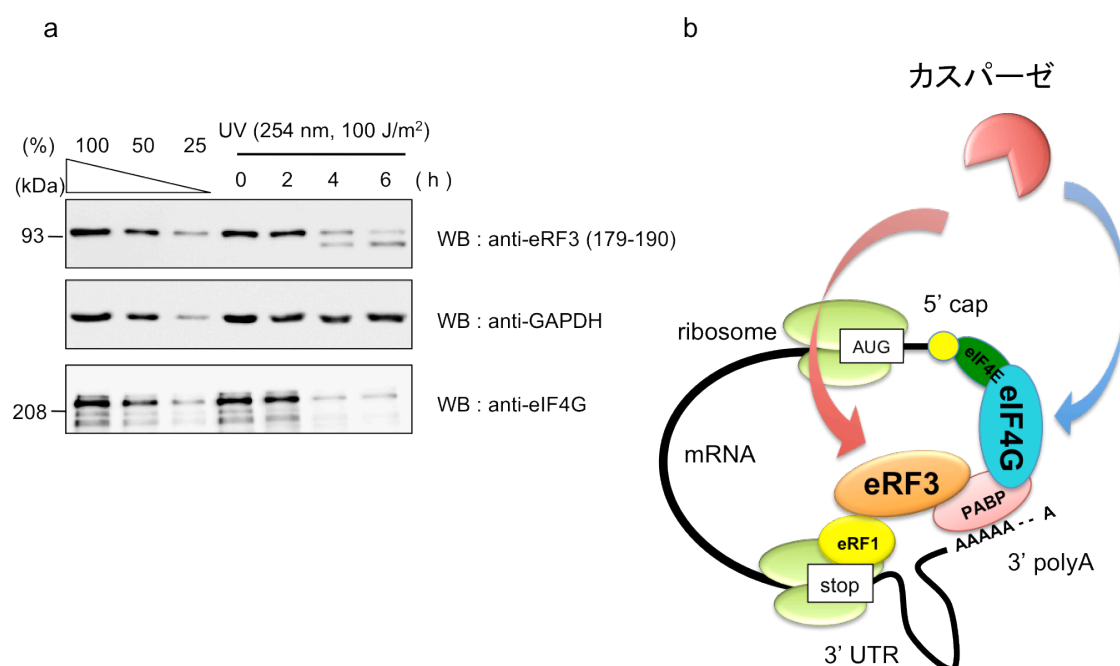
eRF3 の分解に関与するプロテアーゼを推定する目的で、切断抵抗型 eRF3 を用い、再びプロテアーゼインヒビターの効果を検討した。結果 eRF3 の切断と同様にカスパーゼインヒビターにより分解が抑制された。つまり eRF3 はアポトーシス時にカスパーゼ依存的に切断と分解の 2 種類の修飾を受けることが明らかとなった。



**Fig.3-3-4: カスパーゼ依存的切断型 eRF3 の生成** eRF3a (D25A/D29A/D32A/D35A) をエレクトロポレーション法により THP-1 細胞に導入し、36 時間培養した。その後、THP-1 細胞に UV (254 nm, 100 J/m<sup>2</sup>) 照射後直ちに zVAD.fmk (20 μM) (*lanes* 4-6), MG132 (5 μM) (*lanes* 7-9), AEBSF (150 μg/ml) (*lanes* 10-12), E-64 (50 μM) (*lanes* 13-15) を加え 0, 4, 8 時間後に細胞を回収し、eRF3 の挙動をウェスタンブロット法により解析した。また(*lanes* 1-3)はプロテアーゼインヒビターで処理しない場合の eRF3 分解の挙動を示している。

### 3-3-5 アポトーシス誘導により、eRF3 は翻訳開始因子 eIF4G と同時期に分解される

アポトーシス時における eRF3 の切断と分解の生理的意義について検討するため、まず eRF3 が分解されることに着目した。アポトーシス時において遺伝子の発現は強力に抑制される。その際、eIF4G などの翻訳開始因子がカスパーゼによる分解・切断を受けることが報告されており、遺伝子の発現抑制に働くと考えられている。このことから、eRF3 の分解もアポトーシス時における遺伝子発現抑制機構の一部を担っていること予想された。そこでアポトーシス時における eRF3 の分解と、eIF4G の切断の挙動を比較したところ、両者は同時期に分解・切断を受けたことから eRF3 の分解も遺伝子発現抑制機構に含まれることが明らかになった。

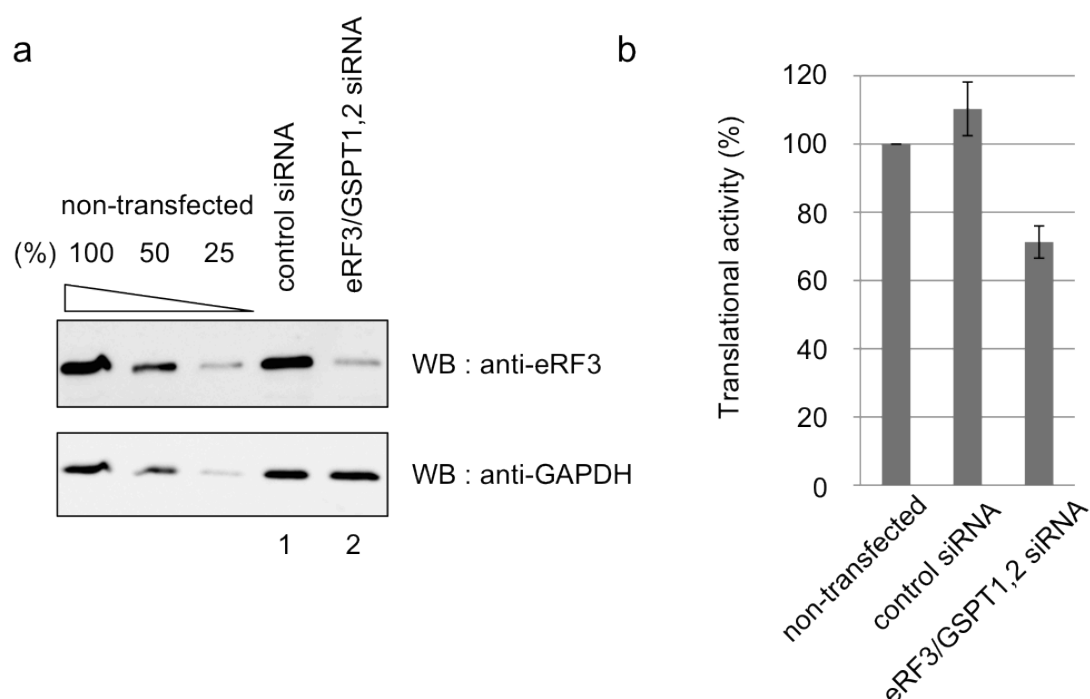


**Fig.3-3-5:** アポトーシス誘導による eRF3 の分解および翻訳開始因子 eIF4G の切断 (a) THP-1 細胞に回収した時点が 0 時間となるよう 6, 4, 2, 時間前に UV (254 nm, 100 J/m<sup>2</sup>) を照射し、eRF3、eIF4G の挙動をウェスタンブロット法により解析した。GAPDH はローディングコントロールとして用いた。 (b) アポトーシス時における eRF3、eIF4G のカスパーゼ依存的分解の模式図

### 3-3-6 eRF3 ノックダウンにより翻訳活性が低下する

eRF3 の量的減少が遺伝子発現活性に及ぼす効果を検討するため、eRF3 ノックダウンが遺伝子発現活性に及ぼす影響を検討した。アポトーシス時には eRF3 の他に eIF4G など、他の標的も修飾をうけ遺伝子の発現が抑制される。これに対し、eRF3 をノックダウンすることで、他の標的は影響を受けずに、eRF3 だけが分解された状況を再現した。

si-RNA を用い eRF3 をノックダウンし遺伝子発現活性を測定した結果、ノックダウンによる eRF3 の量的減少により実際に遺伝子発現活性が低下することを確認した。



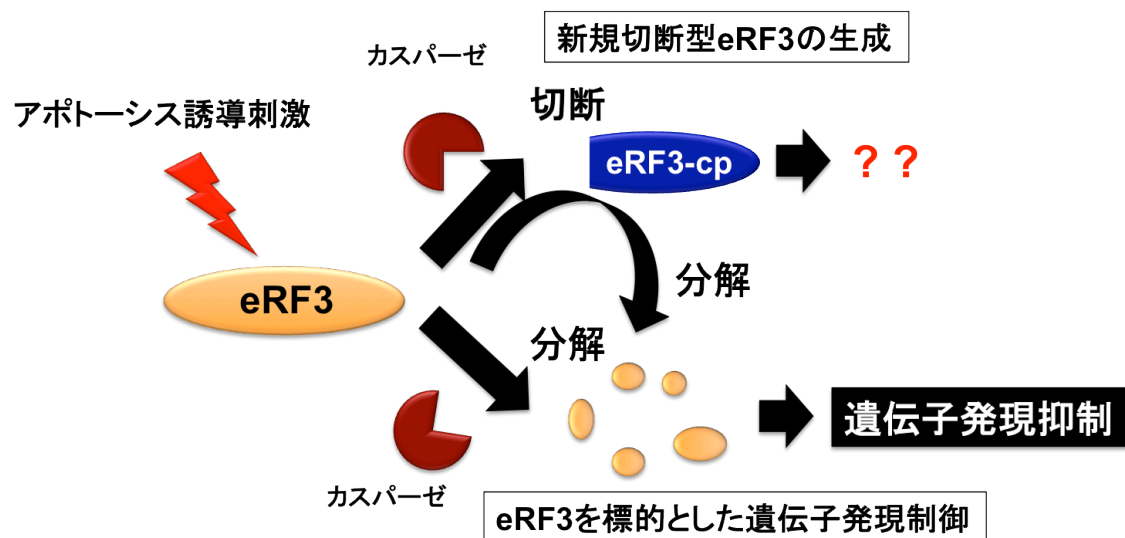
**Fig.3-3-6: eRF3 ノックダウンによる遺伝子発現活性の低下**

(a) HeLa 細胞にルシフェラーゼ(control)または eRF3(hGSPT1/2)に対する si-RNA を導入後、72 時間培養し、ウェスタンプロット法により解析した。左の 3 レーンは si-RNA をトランスフェクションしていない細胞のサンプルを 2 倍希釈したものであり、この解析が半定量的であることを示している。(b) (a)と同様に用意した細胞の遺伝子発現活性を  $[^{35}\text{S}]$  メタボリックラベル法により測定した。遺伝子発現活性はサンプルの単位タンパク質量あたりの  $[^{35}\text{S}]$  取り込み量として求め、si-RNA を導入していない細胞(non-transfected)を基準として割合を示した。

### 3-4 小括

本研究は当初、アポトーシスを促進する切断型 eRF3 (p-eRF3)の生成条件を明らかにすることを目的とし研究を開始したが、その過程で eRF3 が遺伝子発現制御の標的となっている可能性を見出したので予定を変更し検討を行った。

これまでの本研究の成果により、eRF3 がアポトーシス時に切断・分解を受け、p-eRF3 とは異なる新規切断型 eRF3 (eRF3-cp)が生成すること、また eRF3 の分解はアポトーシス時における遺伝子発現の抑制に寄与しうることを明らかにした。これまで翻訳終結因子を標的とした遺伝子発現制御機構は報告されていなかったが、アポトーシス時に翻訳終結因子 eRF3 が遺伝子発現抑制の標的になっていること、また eRF3 の量的制御が重要であることを本研究において初めて明らかにすることができた。



### 3-5 考察

#### 翻訳終結因子 eRF3 を標的とした遺伝子発現制御

翻訳終結因子 eRF3 は翻訳終結の他に mRNA 分解や mRNA 環状化による翻訳の活性化において重要な役割を果たしており(第 1 章)、遺伝子発現制御(mRNA 安定性制御や翻訳制御)の標的となりうる可能性は十分にあるが、これまで eRF3 を標的とした遺伝子発現制御の例は報告されておらず、実際に eRF3 を標的とした遺伝子発現制御機構が存在するのかは分かっていなかった。

#### ストレス・アポトーシス時における翻訳抑制機構

これまで遺伝子発現制御、特に翻訳制御に関する研究は、リボソームを mRNA にリクルートする過程を担っている翻訳開始因子を中心に行われてきた。これまでによく研究されている例としては、種々のストレスに対する初期応答として、翻訳開始因子 eIF2 $\alpha$  がリン酸化されることが挙げられる (Holcik and Sonenberg, 2005 ; Spriggs et al., 2010)。mRNA 上にリクルートされたリボソーム小サブユニットには eIF2、methionyl-tRNA<sub>i</sub>、GTP からなる三者複合体が結合し、5'UTR 上を開始コドンを認識するまで進む。eIF2 は翻訳開始により GTP が加水分解され GDP 結合型となり不活性型となるが、eIF2 $\alpha$  のリン酸化は eIF2 の再活性化に必要な GDP-GTP 交換反応を阻害することで eIF2 の再活性化を妨げ、全般的な翻訳抑制を引き起こす。この他には、4E-BP(eIF4E-binding protein)の脱リン酸化がよく知られている(Holcik and Sonenberg, 2005 ; Keith et al., 2010)。4E-BP は通常の状態では mTOR によりリン酸化されているが、ストレス時に mTOR の活性が低下すると脱リン酸化状態の割合が増える。脱リン酸化された 4E-BP は eIF4G と競合的に eIF4E と結合する。これにより eIF4F(eIF4E、eIF4G、eIF4A 複合体)の形成が阻害され、キャップ依存的な翻訳が阻害される(Marcotrigiano et al., 1999 ; Svitkin et al, 2005)。

アポトーシス時における翻訳抑制機構としては、caspase による種々の翻訳開始因子の切断が報告されている(Morley et al, 2005)。中でも caspase3 による eIF4G の切断により、eIF4E-eIF4G-PABP 相互作用による mRNA 環状化構造が解除されることによりキャップ依存的な翻訳が抑制されると考えられる(Fig 3-3-5) (Marissen and Lloyd, 1998 ; Bushell et al, 1999; Marissen et al, 2000)。

今回発見したアポトーシス時における eRF3 の分解もまた eIF4G の切断と同様にキャップ依存的な翻訳の抑制に寄与していると考えられる。eRF3 は PABP と PAM2 モチーフ (PABPC1-interacting motif) と呼ばれる結合モチーフを介して結合しているが、ポリ A 鎖分解酵素を PABP 上にリクルートする Pan3、Tob をはじめ非常に多くの因子が eRF3 と同様に PAM2 モチーフを介して PABP と結合する。PAM2 含有タンパク質と PABP の結合がどのように制御されているか不明な点もあるが、eRF3 は他の PAM2 含有タンパク質と PABP に対して競合する関係にある(Funakoshi et al., 2007)。このことから eRF3 の量的減少は他の因子との競合に対して不利に働き、eRF3 と PABP の結合は阻害されやすくなると考えられる。これにより eRF3 と PABP の結合を介したキャップ依存的な翻訳活性化(mRNA 環状化による翻訳活性化)が阻害されると考えられる。

アポトーシス時におけるカスパーゼによる eRF3 および翻訳開始因子を標的とした遺伝子発現抑制機構に関して、個々の因子の寄与率を推定することは困難であるが、複数の因子を標的とすることで確実に翻訳を抑制するため“fail-safe”機構であると考えられる。また eRF3、eIF4G 以外のカスパーゼによる切断が報告されている因子(eIF4B, eIF3j, 4E-BP)もまた eRF3、eIF4G と同様にキャップ依存的な翻訳の抑制に働くことが予想され(Bushell et al., 2001 ; Bushell et al, 2000 ; Fraser et al, 2004)、カスパーゼ依存的な翻訳抑制は特にキャップ依存的な翻訳を標的にしていると考えられる。

### 翻訳終結因子 eRF3 の量的制御

今回、eRF3 を標的とした遺伝子発現制御に関して、eRF3 の量的制御が重要であることを明らかにした。eRF3 の量的な制御に関してこれまでに当研究室と他のグループが、eRF3 の発現量が G1 から S 期に移行する際に増加することを報告しており(Hoshino et al., 1989 ; Lee et al., 2008)、eRF3 の発現量の増加が G1-S 期における翻訳の活性化に寄与している可能性がある。実際に本研究により eRF3 の発現量依存的に遺伝子発現活性が上昇することを、ルシフェラーゼレポーターを用いた実験から確認している。

さらに癌細胞において eRF3 の発現量が増加しているとの報告がある(Malta-Vacas et al., 2005)。このことから eRF3 の発現量の増加により癌細胞の



翻訳が活性化していることが予想される。癌細胞における翻訳の活性化では eIF4E の発現量が増加による例が報告されており、この翻訳活性化により癌が悪性化することが報告されている(De Benedetti and Graff, 2004)。eRF3 の発現量増加による翻訳活性化は eIF4E の場合と状況が類似しており、eRF3 の発現量増加が癌の悪性化に寄与している可能性がある。

以上のことから、eRF3 の量的制御はアポトーシス時に特異的な現象ではなく、G1-から S 期への移行期など細胞の必要に合わせて適切に調節されていると考えられる。

### カスパーゼにより生成する新規切断型 eRF3 (eRF3-cp) の生理的意義

eRF3-cp 生成の生理的意義は現在のところ分かっていないが、アポトーシス時における mRNA の急速な分解に関与する可能性を見出している。mRNA がアポトーシス初期に急速に分解されることが報告されているが(Del Prete et al., 2002)、そのメカニズムは分かっていない。本研究においても、 $\beta$ -globin mRNA を細胞に発現させ mRNA 分解の挙動を解析した際アポトーシスの誘導初期において  $\beta$ -globin mRNA が急速に消失することを確認している。これに対し、カスパーゼによる切断を受けない切断抵抗型 eRF3 変異体を発現させた際、 $\beta$ -globin mRNA の急速な分解が抑制されることを見出した。また、カスパーゼ阻害剤の添加により  $\beta$ -globin mRNA の急速な分解が抑制されることを見出している。さらに本研究ではポリソームプロファイル解析によりアポトーシス時の翻訳状況を解析したところ、アポトーシス誘導によりポリソーム画分が急速に消失し、その消失がカスパーゼ阻害剤の添加により抑制されることを見出している。このことは、アポトーシス時において活発に翻訳されている mRNA が分解の標的となっていることを示している。これは先に述べた eRF3、eIF4G 切断・分解によるキャップ依存的な翻訳の抑制と密接に関係した現象であり、今後関係解明が期待される。

以上のことから、eRF3-cp の生成もまたアポトーシス時における遺伝子発現抑制(mRNA 分解)に寄与している可能性がある。eRF3 は正常な翻訳においてポリ A 鎖分解酵素の PABP へのリクルートを制御することで mRNA 分解を制御しているが、ナンセンス変異を有する mRNA など異常な mRNA は eRF3 が直接 mRNA 分解機構を mRNA にリクルートすることで mRNA を速やかに分解

する(Nonsense-mediated mRNA decay (NMD)) (Kashima et al., 2006)。このように、eRF3 は mRNA 分解酵素を mRNA 上にリクルートする能力を有している。アポトーシス時において eRF3 が mRNA 上にリクルートする RNA 分解酵素としては RNase L が候補として挙げられる(Le Roy et al., 2005)。RNase L はストレス条件下で誘導されることが報告されている(Pandey et al., 2004)。

eRF3-cp は N 末端から 30 アミノ酸付近で切断を受け生成するが、この切断除去される配列内にはグリシンリピート配列が含まれる(第 1 章 1-4, Fig. 3-2-5 (e))。eRF3-cp の生成が mRNA 分解に寄与しているならば、グリシンリピート配列は eRF3 への RNA 分解酵素のリクルートを制御している可能性がある。さらに eRF3 にリクルートされる RNA 分解酵素は PABP と競合的な関係にあることから(Le Roy et al., 2005 ; Hoshino et al., 2012)、グリシンリピート配列の生理的意義として PABP と競合関係にある因子と eRF3 の結合を制御している可能性がある。これに関しては総括(第 5 章)においても議論したい。

アポトーシス時における mRNA 分解に関し、アポトーシスの刺激によっては翻訳開始因子の切断よりも先に mRNA が分解されることが報告されている(Bushell et al., 2004)。本研究において明らかにした eRF3 のカスパーゼによる切断サイトは複数のコンセンサス配列を含んでおり、Caspase-3 以外のカスパーゼによる切断をおける可能性があり、上記のような条件においても eRF3 の切断が起こる可能性がある。つまり、アポトーシスの条件によっては eRF3 の切断が遺伝子発現抑制機構の重要なターゲットとなっている可能性があり、今後の展開が期待される。

## 第4章 eRF3 を標的とした新規アポトーシス制御機構の解析

---

### 4-1 序

第3章において、既知の IAP 結合タンパク質である Smac や HtrA2 が機能することが報告されている条件において、p-eRF3 の生成は観察されなかった。このことは p-eRF3 と Smac・HtrA2 は異なる条件下で機能していると考えられ、細胞は状況に合わせて IAP 結合タンパク質を使い分けている可能性を示している。そこで本研究では3つの IAP 結合タンパク質の中で唯一 eRF3 のみが細胞質に局在するタンパク質であることに着目し、ミトコンドリアタンパク質である Smac、HtrA2 が機能することができない条件において、p-eRF3 が機能しているのではないかと考えた。このことから、本研究では次に、ミトコンドリア非依存的なアポトーシスの誘導が報告されている小胞体ストレス条件を検討した。

本章では次に eRF3(全長型)が細胞質のみに局在するのに対し、p-eRF3 は細胞質のみならず核にも局在することに着目した。このことは p-eRF3 が細胞質において IAP の機能を阻害することでアポトーシスを制御する一方、核においても何らかの機能を有している可能性を示している。そこで本研究では p-eRF3 が核に移行するメカニズムについて検討を行った。さらに p-eRF3 の核内における機能を検討する目的で、p-eRF3 の核内における結合因子の探索を行った。

### 4-2 実験結果 ストレス誘導による p-eRF3 生成シグナルの同定

#### ミトコンドリア依存的・非依存的アポトーシス経路

ミトコンドリア依存的なアポトーシスでは、アポトーシス誘導シグナルがミトコンドリアに伝わるとミトコンドリア内膜から cytochrome c が漏出し、細胞質において Apaf-1, dATP と共に caspase-9 を活性化する。さらに caspase-9 が主要なアポトーシスの実行因子(エフェクターカスパーゼ)である caspase-3 を活性化することでアポトーシスを実行する。これに対しミトコンドリア非依存的なアポトーシス経路では、小胞体ストレス時に caspase-12(mouse) (Nakagawa

et al., 2000)、caspase-4(human) (Hitomi et al., 2004) により caspase-9 が活性化される (Fig. 4-1)。小胞体ストレスによるアポトーシス誘導経路はミトコンドリア依存的・非依存的な経路がクロストークしているが、ミトコンドリアから cytochrome c の漏出を伴わない例も報告されている (Morishima et al., 2002)。

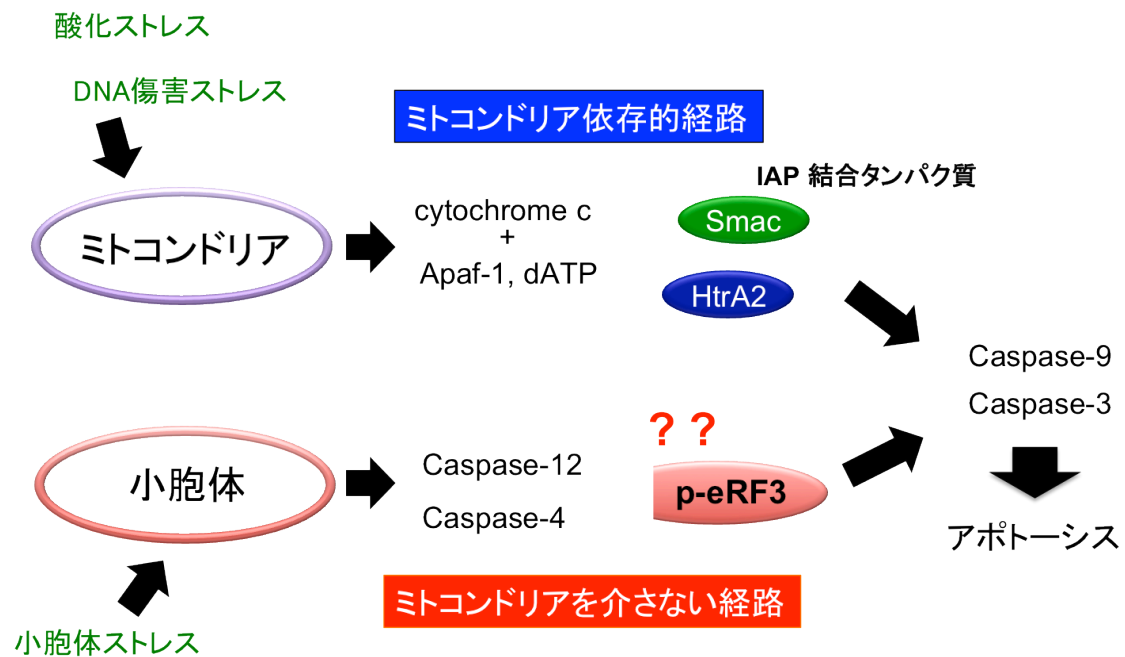


Fig. 4-1: ミトコンドリア依存的・非依存的経路模式図

#### 4-2-1 小胞体ストレスにより p-eRF3 が生成する

小胞体ストレス時の eRF3 の挙動について、ここではヒト神経芽細胞腫 SK-N-SH 細胞を一般的な小胞体ストレス誘導剤で処理した際の結果を示す (Fig. 4-2-1)。SK-N-SH 細胞では、タプシガルギン、A23187 処理により、eRF3-cp と共に p-eRF3 と考えられる切断型 eRF3 が観察された。小胞体ストレスによるアポトーシスの誘導ではミトコンドリア依存的・非依存的経路がクロストーク

しており、用いた細胞種により p-eRF3 生成の効率は異なるが、本研究ではまず、小胞体ストレスの誘導を p-eRF3 を生成するシグナルとして同定した。

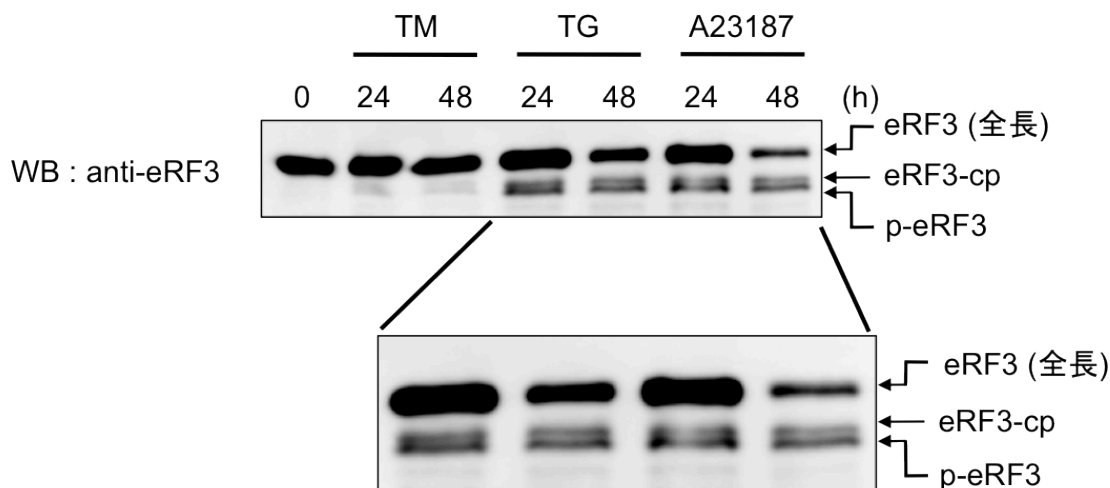


Fig. 4-2-1: 小胞体ストレス誘導による p-eRF3 の生成 SK-N-SH 細胞をツニカマイシン (TM) (1  $\mu$ g/ml)、タプシガルギン (TG) (1  $\mu$ M)、A23187 (1  $\mu$ g/ml) で処理し、24, 48 時間後に細胞を回収し、eRF3 の挙動をウェスタンブロット法により解析した。また、拡大した図を合わせて示した。

#### 4-2-2 カルパイン依存的 eRF3 の切断

p-eRF3 を生成するプロテアーゼを同定する目的で、カスパーゼ阻害剤存在条件下で小胞体ストレスを誘導し、種々のプロテアーゼ阻害剤の効果を検討した。結果、システインプロテアーゼ阻害剤 E-64 および、カルパイン特異的阻害剤 ALLN により切断が阻害されたことから、p-eRF3 はカルパイン依存的に生成することが明らかとなった(Fig. 4-2-2)。さらに、2 種類のプロテアソーム阻害剤 MG132、ラクタシスチンで処理した際 MG132 のみが切断を阻害した。MG132 はカルパインも阻害することが知られていることから、プロテアソーム

阻害剤の結果も、p-eRF3 がカルパイン依存的に生成することを支持している。

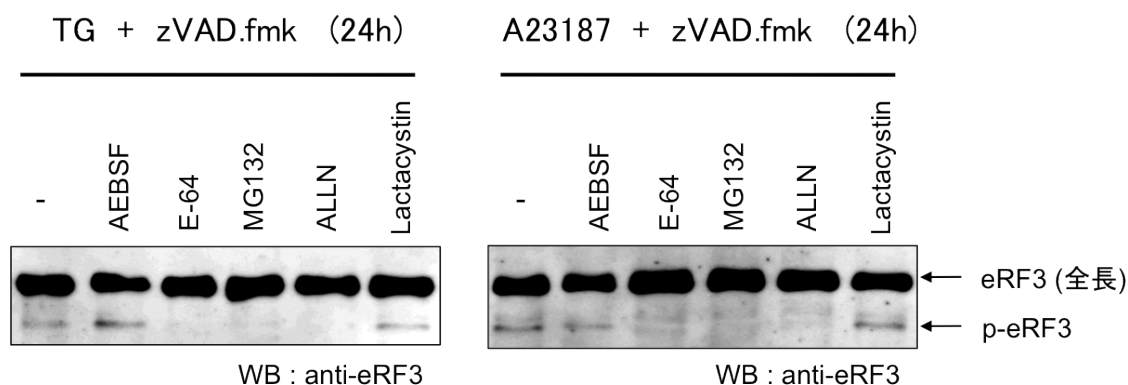


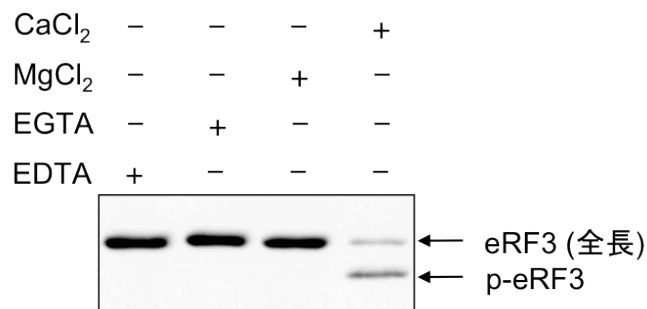
Fig. 4-2-2: カルパイン依存的 p-eRF3 の生成 SK-N-SH 細胞を zVAD.fmk (20  $\mu$ M) および、AEBSF (50  $\mu$ g/ml), E-64 (50  $\mu$ M), MG132 (10  $\mu$ M), ALLN (20  $\mu$ M), Lactacystin (5  $\mu$ M) で 30 分処理した後、タプシガルギン (TG) (1  $\mu$ M) 、A23187 (1  $\mu$ g/ml) で処理し、24 時間後に細胞を回収した。eRF3 の挙動はウェスタンブロット法により解析した。

#### 4-2-3 細胞抽出液中でのカルパイン依存的 eRF3 の切断

カルパインはカルシウム依存的に活性化することから、次に、細胞抽出液にカルシウムを添加することで、p-eRF3 が生成するか検討した。結果予想通りにカルシウムの添加により p-eRF3 が生成し(Fig4-2-3 (a))、さらにカルパイン阻害剤により p-eRF3 の生成が完全に抑制された(Fig4-2-3 (b))。

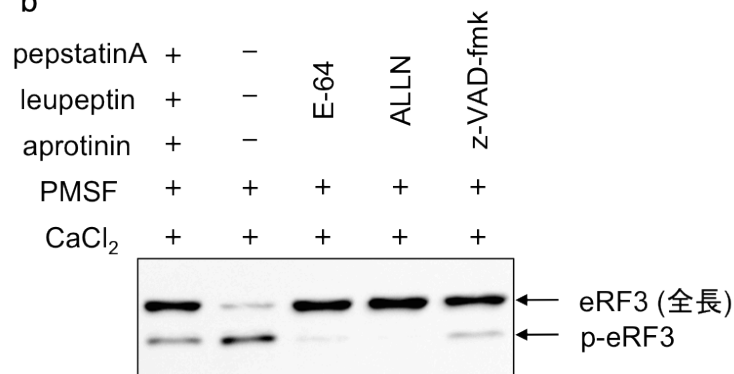
以上の結果より、アポトーシスを促進する切断型 eRF3 である p-eRF3 はカルパイン依存的に生成することが明らかになった。

a



WB : anti-eRF3

b



WB : anti-eRF3

Fig. 4-2-3: in Vitro におけるカルパイン依存的 p-eRF3 の生成 (a) THP-1 細胞の細胞抽出液をそれぞれ EDTA, EGTA, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> (各 2.5 mM) を含む抽出 buffer で調製し、eRF3 の挙動をウェスタンブロット法により解析した。(b) CaCl<sub>2</sub> (2.5 mM) と Aprotinin, Leupeptin, pepstatinA (各 2 µg/ml) または E-64 (25 µM), ALLN (25 µM), zVAD.fmk (25 µM) をそれぞれ含む抽出 buffer で THP-1 細胞の細胞抽出液を調製し、eRF3 の挙動をウェスタンブロット法により解析した。

#### 4-3 実験結果 p-eRF3 の核移行メカニズムの解明と核内における結合因子の同定

##### 4-3-1 p-eRF3 は核に局在する

eRF3 と p-eRF3 の細胞内局在について、全長型の eRF3 は細胞質のみに局在するのに対し、p-eRF3 は核にも局在する (Fig. 4-3-1) (Hegde et al.,2003)。このことは p-eRF3 が核内においても何らかの機能を持つ可能性を示している。そこで本研究では、p-eRF3 が核に局在する機構について検討を行った。

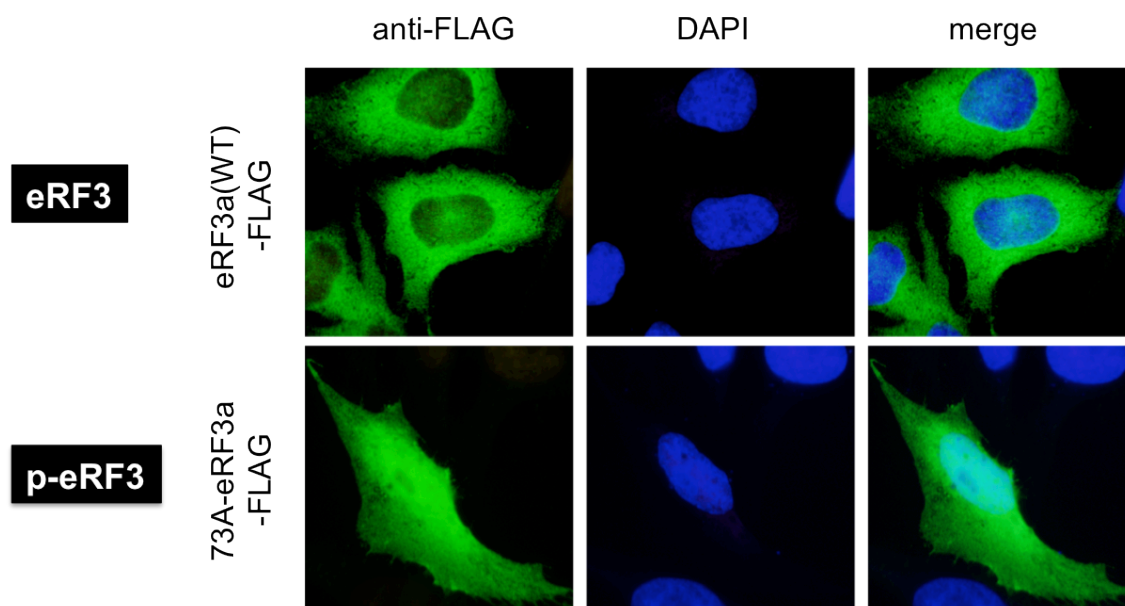


Fig. 4-3-1: p-eRF3 の核局在 HeLa 細胞に eRF3 (wt) または p-eRF3 (Ub-(wt)-hGSPT1-FLAG, Ub-(73A)-hGSPT1-FLAG)を発現させ、抗-FLAG 抗体 (2 次抗体 anti-mouse Alexa 488)を用いて免疫染色し、その細胞内局在を蛍光顕微鏡を用いて観察した。核は DAPI を用いて染色した。



#### 4-3-2 eRF3 の細胞質局在には 54-72 アミノ酸配列が必要である

p-eRF3 は N 末端から 73 番目のアミノ酸残基の位置で切断を受け生成することから、eRF3 の N 末端領域を欠失が、eRF3 の局在に及ぼす影響を検討した。本研究でこれまでに明らかにしている eRF3-cp に相当する 33Q-eRF3, 33Q と 73A のおおよそ中間にあたる 54A-eRF3 の局在をしらべたところ、共に細胞質に局在した (Fig. 4-3-2 (a))。このことから 54-72 アミノ酸残基が eRF3 の細胞質局在に必要なことが明らかになった (Fig. 4-3-2 (b))。

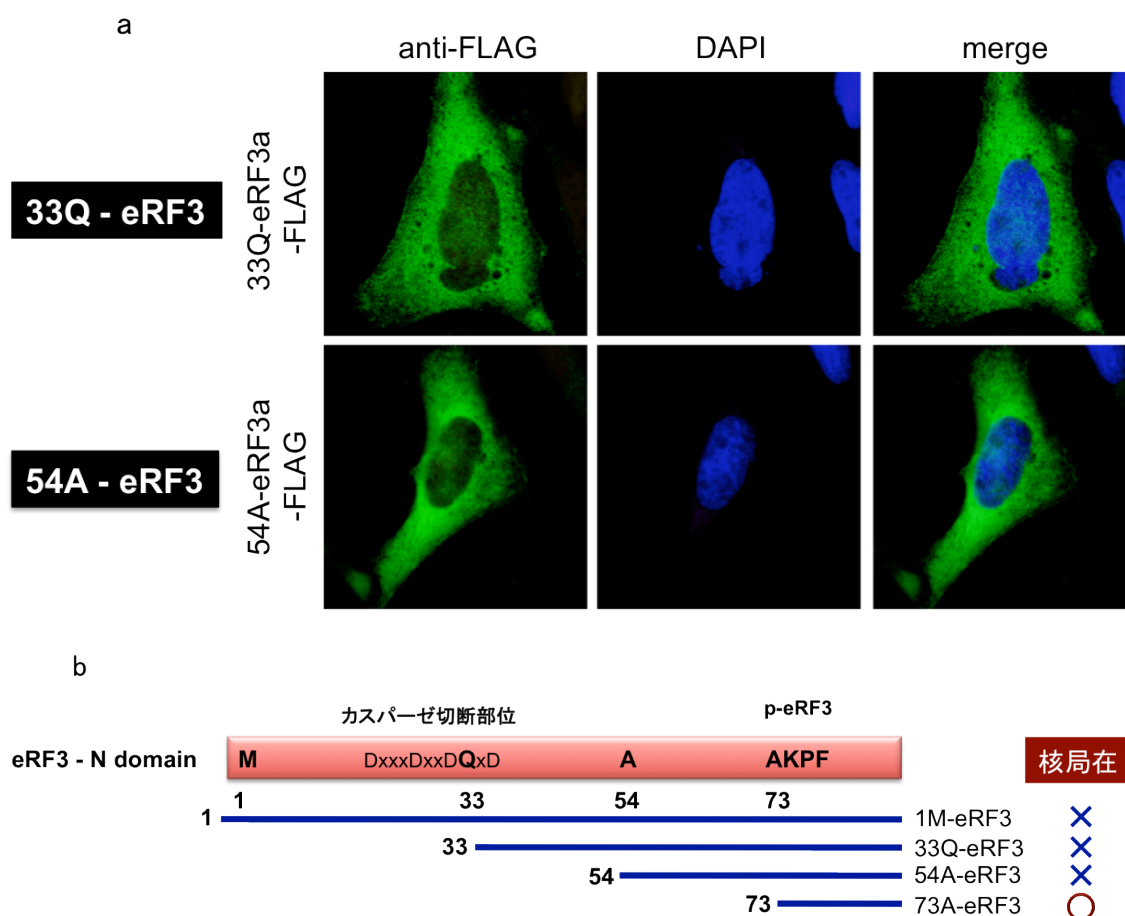


Fig. 4-3-2: eRF3 の細胞質局在に必要な領域の同定 (a) HeLa 細胞に 33Q-eRF3 または 54A-eRF3 (Ub-(33Q)-hGSPT1-FLAG, Ub-(54A)-hGSPT1-FLAG)を発現させ、抗-FLAG 抗体 (2 次抗体 anti-mouse Alexa 488)を用いて免疫染色し、その細胞内局在を蛍光顕微鏡を用いて観察した。核は DAPI を用いて染色した。(b) N 末端領域を欠失した eRF3 変異体とその細胞内局在

### 4-3-3 核排除シグナル (NES) コンセンサス配列

以上の検討より同定した 54 から 72 アミノ酸配列内に核排除シグナル(NES)が存在するか検討したところ、61 から 71 アミノ酸配列が NES のコンセンサス配列に一致することを見出した (Fig. 4-3-3 (b)) (Cour et al., 2004)。興味深いことに NES 配列は p-eRF3 の切断部位の直前に存在し、さらに脊椎動物間で保存されている (Fig. 4-3-3 (b))。

a

#### human eRF3a



b

		NES	p-eRF3 切断部位
		73	
human eRF3a	AEAQREN	<b>LSAAFSRQLNVN</b>	<b>AKPFVPNVHAAEFVPSFL</b>
human eRF3b	AEAQREP	<b>LSSAFSRKLNVN</b>	<b>AKPFVPNVHAAEFVPSFL</b>
mouse eRF3a	AEAQREN	<b>LSAAFSRQLNVN</b>	<b>AKPFVPNVHAAEFVPSFL</b>
mouse eRF3b	AEAQRKH	<b>LSLAFSSQLNIH</b>	<b>AKPFVPSVSAAEFVPSFL</b>
chicken eRF3	AEAQQEL	<b>LGAAFSRQLNVN</b>	<b>AKPFVPNVHAAEFVPSFL</b>
frog eRF3	MEATEAQ	<b>LNSSLA-QLNVN</b>	<b>AKPFVPNVHAAEFVPSFL</b>
zebra fish eRF3	EAQVDVQ	<b>LSKALTS-LNVD</b> <b>L - F/L - L - V/I</b>	<b>AKPFVPNVHAAVFVPSFQ</b>

Fig. 4-3-3: 核排除シグナル (NES) コンセンサス配列 (a) ヒト eRF3a の 54 から 72 アミノ酸配列と NES のコンセンサス配列を示した。(b) ヒトおよび主要なモデル生物(脊椎動物)の eRF3 の NES 配列と p-eRF3 の切断部位を示した。

#### 4-3-4 eRF3-NES 配列の同定（共同研究者：熊谷直道 修士）

この配列が NES として実際に機能しているか検討するため、タンパク質の核外輸送阻害剤である leptomycin B と NES のコンセンサス配列への変異が eRF3 の局在に及ぼす効果を検討した。結果、leptomycin B 処理、および NES 配列への変異により、全長型 eRF3 は核に局在するようになった(Fig. 4-3-4 (a))。さらに p-eRF3 の C 末端側に eRF3 の NES 配列を付加することで、p-eRF3 は再び細胞質のみに局在した(Fig. 4-3-4 (b))。この内容は熊谷修士の修士論文においても記載している。

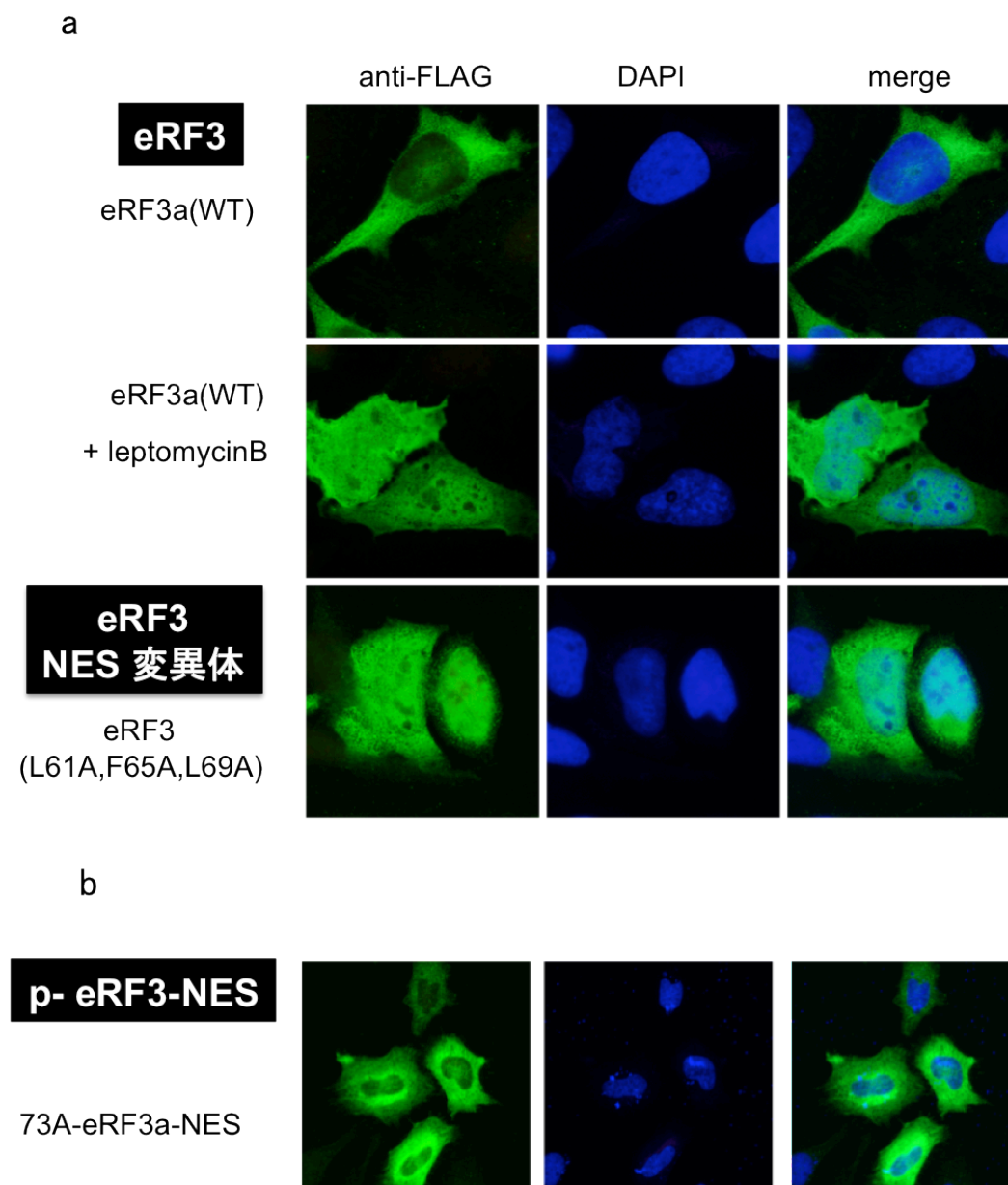


Fig. 4-3-4: eRF3-NES 配列の同定 (a) HeLa 細胞に eRF3 (wt) (FLAG-hGSPT1) を発現させ leptomycinB で処理した細胞、および FLAG-eRF3a(L61A/F65A/L69A)を発現させた細胞を抗-FLAG 抗体 (2 次抗体 anti-mouse Alexa 488) を用いて免疫染色し、その細胞内局在を蛍光顕微鏡を用いて観察した。 (b) HeLa 細胞に p-eRF3-NES (Ub-(73A)-hGSPT1-FLAG-NES) を発現させ、抗-FLAG 抗体 (2 次抗体 anti-mouse Alexa 488) を用いて免疫染色し、その細胞内局在を蛍光顕微鏡を用いて観察した。

#### 4-3-5 p-eRF3 核移行メカニズム

以上の結果より今回同定した配列が実際に NES として機能しており、全長型 eRF3 は NES による核外排除を受け細胞質のみに局在する一方で、p-eRF3 は NES が切断除去されることで核に局在することができるようになると結論付けた。

以上より、p-eRF3 の核局在型 eRF3 としての新たな性質が明らかになり、このことから次に p-eRF3 が核内において機能する可能性を検討する目的で、核内における結合因子の探索を行った。

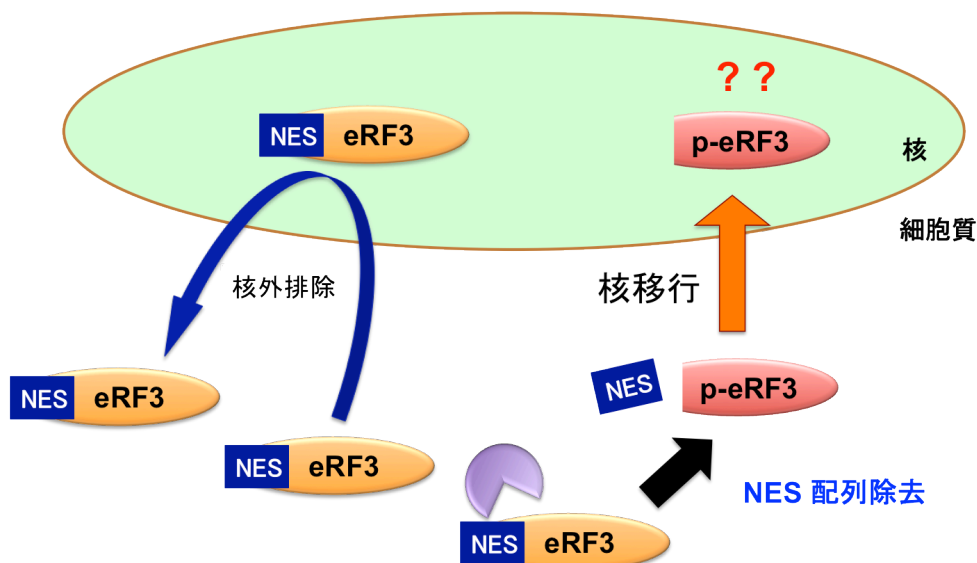


Fig. 4-3-5: p-eRF3 の核移行メカニズム

#### 4-3-6 p-eRF3 は ARF と結合する

本研究では、酵母 two-hybrid スクリーニングにより *in vitro* において eRF3 との結合が報告されているがん抑制因子 ARF との結合を検討した(Tompkins et al., 2006)。ARF は p53 の活性化において重要な役割を果たす因子として知られている(Sherr, 2006)。この eRF3 と ARF の結合に関し、ARF は核に局在するタンパク質であるため、細胞質に局在する eRF3 と局在が異なり、実際に細胞内で結合するかは分かっていない。そこで本研究では、核内に局在することができる p-eRF3 が実際に細胞内で ARF と結合する真の eRF3 アイソフォームではないかと考え検討を行った(Fig. 4-3-6)。

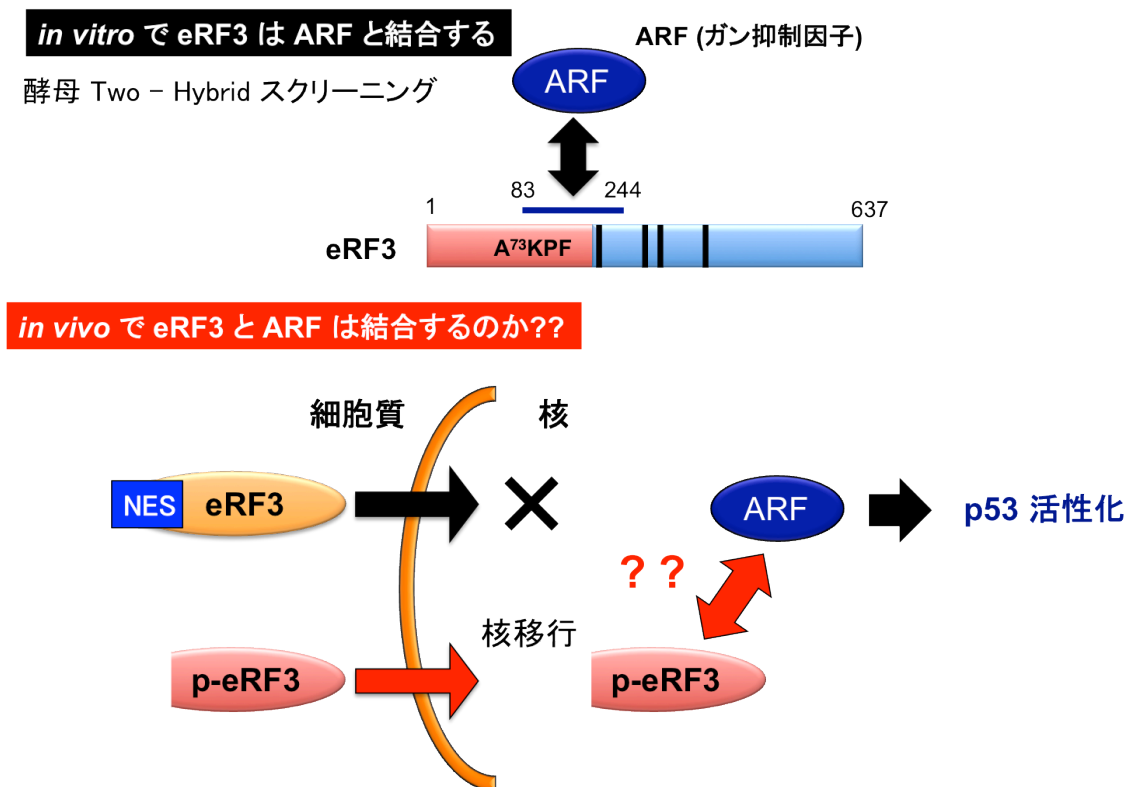


Fig. 4-3-6: *in vitro* における eRF3 と癌抑制因子 ARF

FLAG tag を付加した eRF3-wt、p-eRF3 及び Myc tag を付加した ARF を細胞に導入し、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降法によりそれぞれの結合を検討したところ、p-eRF3 の核への局在に一致し、ARF との高効率な結合が確認できた。以上の結果より、p-eRF3 の核内における結合因子として ARF を同定し、また、p-eRF3 が実際に ARF と細胞内で結合する eRF3 アイソフォームであることが明らかになった。

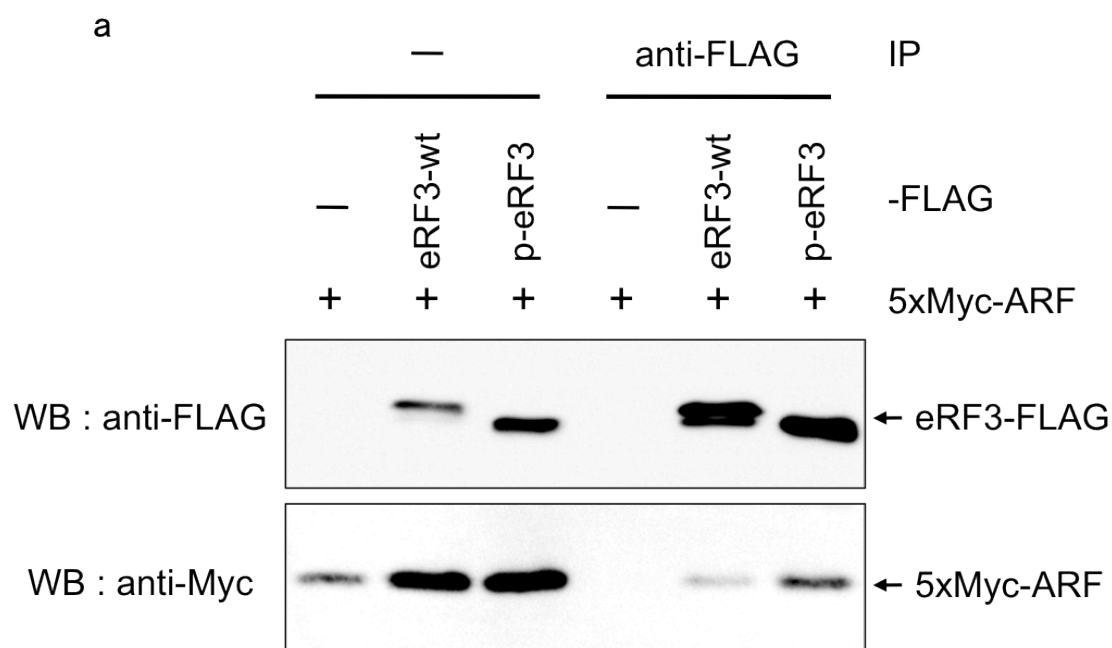


Fig. 4-3-7: p-eRF3 と ARF の結合 HeLa 細胞に 5xMyc-ARF と FLAG タグを付加した eRF3 (eRF3-wt, p-eRF3) を共導入し 24 時間培養後、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降実験により、ウェスタングロート法を用いてそれぞれの結合を解析した。

#### 4-4 小括

eRF3 は正常な条件下では細胞質において翻訳に関する機能を担っている。しかし、小胞体ストレス等のストレスによりカルパインが活性化すると、eRF3 の NES を含む N 末端領域が切断除去され、生じた p-eRF3 は細胞質において IAP と結合してアポトーシスを促進する一方、一部は核へと移行して癌抑制因子 ARF と結合することが明らかになった。このことから、p-eRF3 は複数の経路で細胞死を制御している可能性を見出した。特に p-eRF3 と ARF の結合が p53 の活性化にどのような影響を及ぼすか今後の展開が期待される。

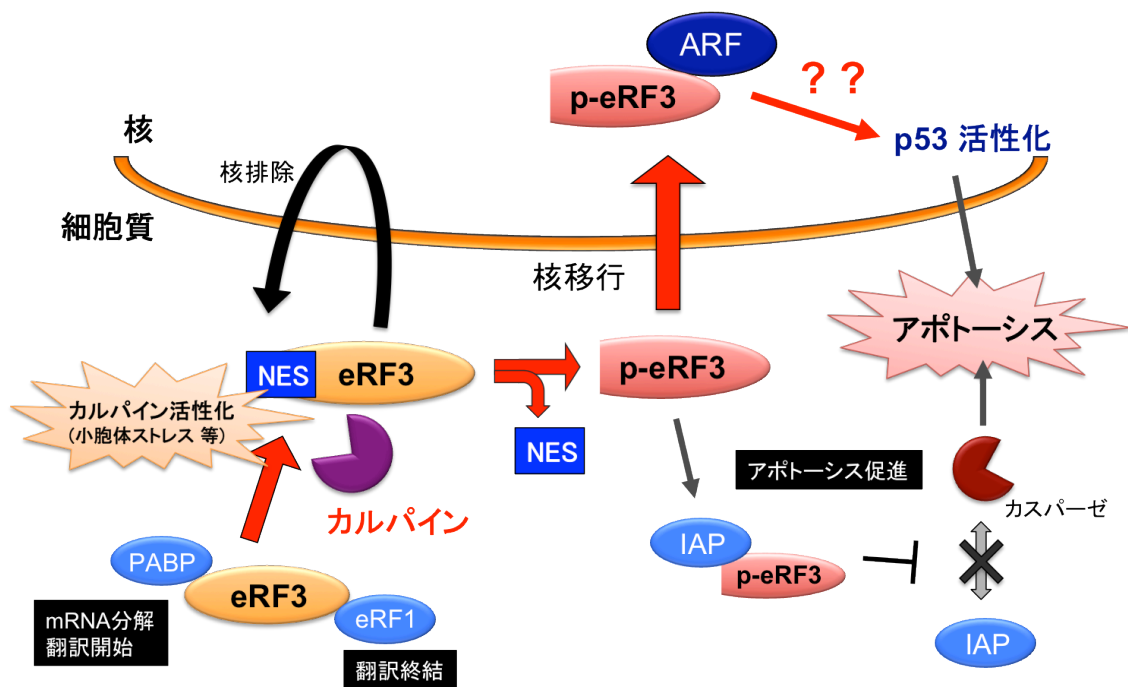


Fig. 4-4: eRF3 を標的とした新規アポトーシス制御モデル

## 4-5 考察

### ・ p-eRF3 とカルパイン依存的アポトーシス

本研究において p-eRF3 が小胞体ストレス誘導時にカルパイン依存的に生成することを明らかにした。今回同定したアポトーシスの誘導条件においてもある程度ミトコンドリア依存・非依存的経路がクロストークしていることが予想され (Hitomi et al., 2004) p-eRF3 と Smac、HtrA2 のアポトーシス誘導に対する寄与率を推定することが難しいが、少なくとも細胞に IAP (XIAP) を発現させることでカスパーゼの活性化(eRF3-cp の生成)を抑制することを確認している。このことは、今回同定したストレス条件時におけるカスパーゼの活性化に IAP の制御が必要であることを示している。そこで、IAP 結合タンパク質による IAP 阻害の重要性を調べるため、XIAP の p-eRF3 結合ドメイン(BIR3 ドメイン/IBM 含有タンパク質結合ドメイン) (Srinivasula et al., 2001) と p-eRF3 と結合しない BIR3 ドメイン変異体を細胞に発現させカスパーゼの活性化(eRF3-cp の生成)を調べたところ、XIAP-BIR3 ドメイン単独で効果があり、BIR3 ドメイン変異体では効果がなかった。さらに XIAP-BIR3 の発現により p-eRF3 の生成量が増加する傾向を見出した。このことは今回同定した条件において IBM 含有タンパク質(p-eRF3, Smac, HtrA2)による IAP 制御がカスパーゼの活性化に必要であり、実際に p-eRF3 が IAP を制御している可能性を強く示唆している。今後ミトコンドリア非依存的経路の寄与率が高いことが報告されている条件において p-eRF3 の効果を検討していく必要があると考えられる。また今回の発見により p-eRF3 が細胞質由来 IAP 結合タンパク質であること、p-eRF3 とミトコンドリアタンパク質の Smac、HtrA2 がミトコンドリア依存・非依存経路により使い分けられている可能性を指摘しておきたい。

さらに本研究では SK-N-SH 細胞を DNA 傷害性ストレス誘導剤であるエトポシドで処理した際に効率よく p-eRF3 が生成することを確認している。さらに、この条件では eRF3-cp の生成があまりみられなかった。これは第 3 章で用いた細胞において p-eRF3 の生成が認められなかったことと対照的である。このことから、細胞によりストレス応答が大きくことなり、条件により p-eRF3 がアポトーシスの初期段階において生成している可能性と p-eRF3 の生成に関してストレスの種類よりもカルパインが活性化していることが本質的に重要であることが考えられる。よって、今後は p-eRF3 の生成条件として、カルパインの活性化



が報告されている条件を検討することで、p-eRF3 の生理的役割が明らかになっていくと考えられる。

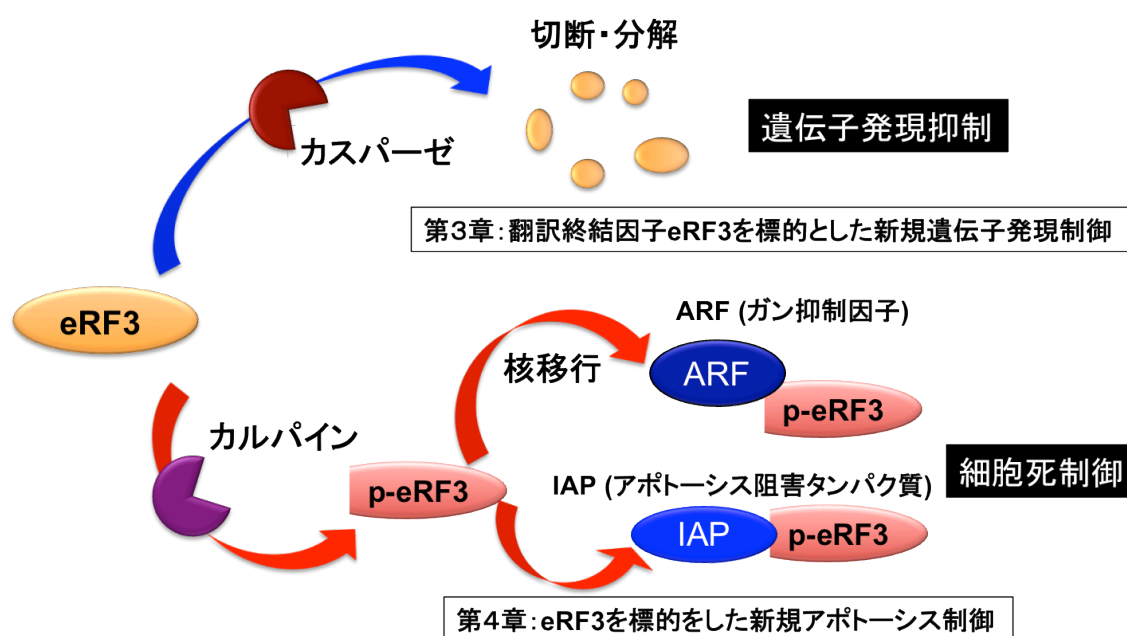
#### ・ p-eRF3 の核移行と癌抑制因子 ARF との結合

今回、同定した p-eRF3 と ARF の結合に関して、どのような状況において機能しているのか、p53 の活性化にどのような影響を及ぼすのか等は分かっていない。しかし、先に述べたように p-eRF3 が条件によっては DNA 傷害性ストレス時に生成する可能性があり、このような条件下において ARF を制御している可能性は十分にある。また p-eRF3 はカルパインが活性する条件において生成していると考えられるが、カルパインに関して、カルパインが p53 経路を制御しているとの報告は多数あり (Storr et al., 2011)、その制御機構に p-eRF3 が関与している可能性は十分にあると考えられる。特にカルパインによる p53 経路の制御機構ではカルパインは pro-survival に働くと考えられている。このことから p-eRF3 がカルパイン依存的細胞死制御機構の一部を担っているならば、p-eRF3 は細胞周期の停止のようなストレスの初期応答においては核において pro-survival に働き、ストレスの強度が強くなり細胞死が誘導されると細胞質において pro-apoptosis に働き、カルパインと共にカスパーゼを活性化するという真逆の機能を有している可能性があり非常に興味深い。実際に p-eRF3 と考えられる切断型 eRF3 が正常生育条件下で観察することができる細胞を 2 種類見出しており、それらの細胞は共に高いストレス耐性を示した。p-eRF3 と ARF の結合に関する研究は始まったばかりであるが、カルパインによる p53 経路の制御と合わせて今後の展開が期待される。

## 第5章 総括

本研究により eRF3 がアポトーシス時にカスパーゼによる切断・分解を受け、アポトーシス時の遺伝子発現抑制の標的となること、特に eRF3 の量的制御の重要性を明らかにした。また p-eRF3 がカルパイン依存的に生成すること、アポトーシス阻害タンパク質 IAP の機能を阻害することでアポトーシスを促進する一方、p-eRF3 が核に移行することで癌抑制因子 ARF と結合することを明らかにした。以上の成果により、翻訳終結因子である eRF3 がストレス／アポトーシス時に異なるプロテアーゼによる修飾を受け、新たに遺伝子発現制御および細胞死制御の双方において機能するという非常にユニークな性質が明らかになった

これまで eRF3 の研究は、翻訳終結と mRNA 分解に関わる機能を中心に行われてきたが、本研究の成果により、eRF3 を介した遺伝子発現制御と細胞死制御という全く新しい eRF3 研究の方向性を示すことができたと考えている。



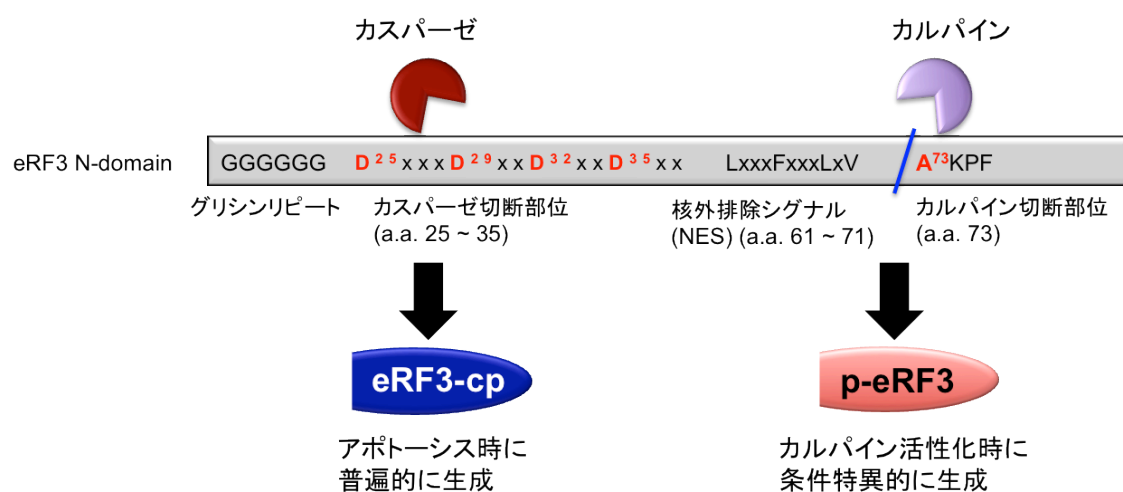
## eRF3 N-domain における 2 種類の切断 (eRF3-cp および p-eRF3 の生成)

本研究において明らかにした 2 種類の切断型 eRF3 の特徴を以下にまとめる。

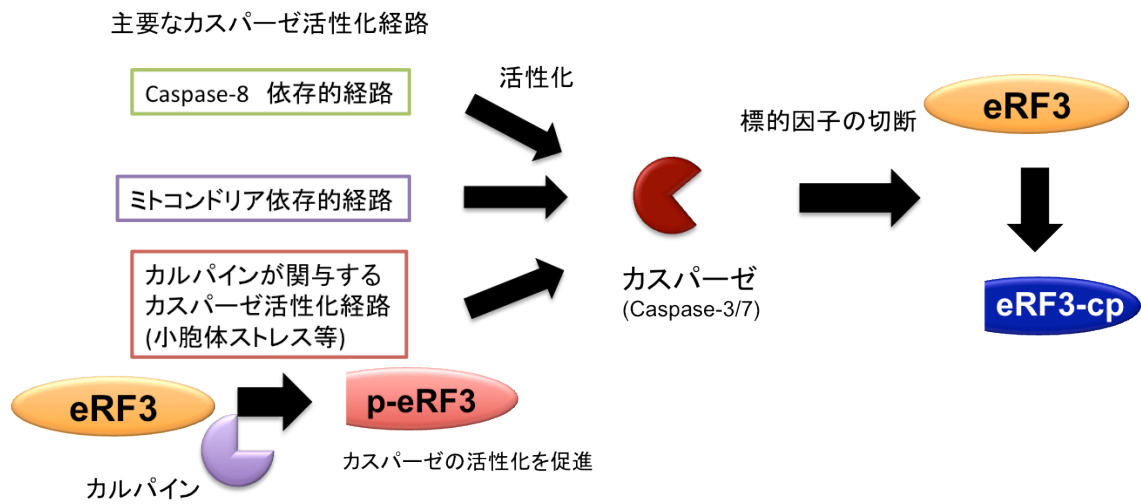
**eRF3-cp**: アポトーシス時に、eRF3 の N 末端から 30 アミノ酸付近でカスパーゼによる切断を受け生成する。またアポトーシス時の遺伝子発現制御 (mRNA 分解) に関与する可能性がある。

**p-eRF3**: 小胞体ストレス時などカルパインが活性化する条件において 73 番目のアラニン残基の位置でカルパイン依存的な切断を受け生成する。生成した p-eRF3 は IAP と結合しカスパーゼの活性化を促進する。また核に移行し癌抑制因子 ARF と結合し核においても細胞死を制御している可能性がある。

eRF3-cp と p-eRF3 の生成に関し、eRF3-cp は普遍的にアポトーシス時に生成すると考えられるが、p-eRF3 は複数あるカスパーゼ活性化経路(デスレセプター/Caspase-8 経路、ミトコンドリア経路など)の中でカルパインが関与するカスパーゼ活性化経路が働いた際に条件特異的に生成していると考えられる。また、p-eRF3 はカスパーゼ活性化の上流で生成し機能するのに対し、eRF3-cp はカスパーゼ活性化の下流でカスパーゼが標的因子である eRF3 を切断することで生成する。



eRF3 N ドメインにおける eRF3-cp、p-eRF3 切断部位の位置関係



eRF3-cp、p-eRF3 が生成し機能する条件

## 翻訳終結因子 eRF3 を標的とした遺伝子発現制御および細胞死制御

「なぜ、翻訳終結因子である eRF3 が細胞死を制御する機能を持つのか」は大きな謎である。この間に明確な答えを出すことは容易ではないが、p-eRF3 の切断部位が eRF3 の PABP 結合モチーフ(PAM2 モチーフ) 中に存在することは非常に興味深い点である。本論において核排除シグナル(NES)が p-eRF3 の切断サイトの直前に存在することを指摘したが、PAM2 モチーフは NES とも一部重複している。つまり、第3章において PABP は RNaseL などの mRNA 分解酵素と競合関係にあることに触れたが、PABP は他にも核においては核外輸送タンパク質(CRM1)と、細胞質においてはカルパインと eRF3 に対して競合的な関係にあることが予想される。このことから eRF3 と PABP の結合解離は翻訳抑制を働くと同時に p-eRF3 や RNaseL との結合など eRF3 が新たな機能を発揮するためのスイッチとして働いている可能性がある。

以上のことから eRF3 と PABP の結合が細胞内でどのように制御されているかが重要であると考えられる。ストレス時に eRF3 と PABP の解離を示す例としては、酸化ストレスなどのストレス条件時に形成されるストレスグラニュールと呼ばれる凝集体の形成がある。この凝集体に PABP は mRNA と共に局在するが(Kedersha and Anderson, 2002)、eRF3 はこの凝集体には含まれない。つまり、eRF3 は大部分が PABP と結合していない状態にあることが予想される。また、DNA 傷害性ストレスにより PABP が核に局在するようになるとの報告がある(Burges et al., 2011)。この際、eRF3 は核における CRM1 と PABP 競合により PABP と解離した状態で細胞質に放出されることが考えられる。本研究では PABP に核移行シグナルを付加し強制的に PABP を核に移行させた際の eRF3 の局在を検討しており、eRF3 は PABP の核局在の影響を受けずに細胞質に局在することを確認している。これとは逆に PABP の核局在により eRF3-NES 変異体の核局在が促進されることも確認している。このことは DNA 傷害性ストレス時に PABP が核に局在することで、全長型 eRF3 とは解離するが、NES を持たない p-eRF3 に対しては核へ移行を促進する機構として働く可能性を示しており、p-eRF3 と ARF の結合に影響する可能性があることをここで指摘しておきたい。この他に PABP は細胞周期依存的にアセチレーションやメチレーションなどの修飾を受けており、これにより PABP と eRF3 の結合が制御されている可能性が報告されている(Brook et al., 2012)。このように eRF3 と PABP の結合はストレスなどの刺激により制御を受けており、正常な条件下

では PABP と結合し翻訳に関する役割に従事しているが、ストレス時においては PABP から解放され細胞死制御因子として機能することができる。

以上のことから eRF3 を標的とした遺伝子発現制御および細胞死制御は PABP との結合制御を介して密接につながった機構であることが考えられる。eRF3 と PABP の結合は酵母からヒトまでよく保存されている機能である。また PABP は細胞内 mRNA の状態を最もよく反映する因子の一つである。このことから正常時 PABP と結合している eRF3 がストレス・細胞死制御に関わる機能を持つことで、PABP との結合制御を介し翻訳制御と細胞死制御の二つの事象をつないでいるのではないかと考えられる。

### eRF3 と癌

eRF3 の N 末端に存在するグリシンリピートが癌の発症に関わることが報告されているが(第 1 章)、グリシンリピートの生理的役割は分かっておらず、どのように癌と関連するかは不明であった。グリシンリピートの生理的役割に関し、本研究では未だ不十分ではあるものの第 3 章において eRF3-cp の生理的役割から、グリシンリピート配列の生理的意義として PABP と競合関係にある因子と eRF3 の結合を制御している可能性を指摘した。このことから PABP と競合的な関係にあることが予想されるカルパインによる eRF3 の切断(p-eRF3 の生成)もグリシンリピートによる影響を受ける可能性がある。また本研究において p-eRF3 がカルパイン依存的に生成し、核において癌抑制因子 ARF と結合することを明らかにし、p-eRF3 が実際に癌の発症に関わる可能性を見出した。このことから今後グリシンリピートの多型と p-eRF3 生成の関係解明が期待される。

最後に本研究により、これまで研究されて来なかった eRF3 のストレス・アポトーシス時における挙動を明らかにし、eRF3 を標的とした遺伝子発現制御と細胞死制御という全く新しい eRF3 研究の方向性を示すことができたと考えている。現段階においては不明な点が多く、未だ類推の域を出ないものもあるが、本研究の成果が、翻訳制御ならび細胞死制御に関する基礎研究、さらには癌治療の応用研究に発展に貢献することを願い、本稿を締めくくりたい。

## 参考文献

Alkalaeva, E.Z., Pisarev, A.V., Frolova, L.Y., Kisselev, L.L., and Pestova, T.V. (2006). In vitro reconstitution of eukaryotic translation reveals cooperativity between release factors eRF1 and eRF3. *Cell* 125, 1125-1136.

Bernstein, P., Peltz, S.W., and Ross, J. (1989). The poly(A)-poly(A)-binding protein complex is a major determinant of mRNA stability in vitro. *Mol Cell Biol* 9, 659-670.

Brito, M., Malta-Vacas, J., Carmona, B., Aires, C., Costa, P., Martins, A.P., Ramos, S., Conde, A.R., and Monteiro, C. (2005). Polyglycine expansions in eRF3/GSPT1 are associated with gastric cancer susceptibility. *Carcinogenesis* 26, 2046-2049.

Brook, M., McCracken, L., Reddington, J.P., Lu, Z.L., Morrice, N.A., and Gray, N.K. (2012). The multifunctional poly(A)-binding protein (PABP) 1 is subject to extensive dynamic post-translational modification, which molecular modelling suggests plays an important role in co-ordinating its activities. *Biochem J* 441, 803-812.

Burgess, H.M., Richardson, W.A., Anderson, R.C., Salaun, C., Graham, S.V., and Gray, N.K. (2011). Nuclear relocalisation of cytoplasmic poly(A)-binding proteins PABP1 and PABP4 in response to UV irradiation reveals mRNA-dependent export of metazoan PABPs. *J Cell Sci* 124, 3344-3355.

Bushell, M., McKendrick, L., Jänicke, R.U., Clemens, M.J., and Morley, S.J. (1999). Caspase-3 is necessary and sufficient for cleavage of protein synthesis eukaryotic initiation factor 4G during apoptosis. *FEBS Lett* 451, 332-336.

Bushell, M., Stoneley, M., Sarnow, P., and Willis, A.E. (2004). Translation inhibition during the induction of apoptosis: RNA or protein degradation?

Biochem Soc Trans 32, 606-610.

Bushell, M., Wood, W., Carpenter, G., Pain, V.M., Morley, S.J., and Clemens, M.J. (2001). Disruption of the interaction of mammalian protein synthesis eukaryotic initiation factor 4B with the poly(A)-binding protein by caspase- and viral protease-mediated cleavages. *J Biol Chem* 276, 23922-23928.

Bushell, M., Wood, W., Clemens, M.J., and Morley, S.J. (2000). Changes in integrity and association of eukaryotic protein synthesis initiation factors during apoptosis. *Eur J Biochem* 267, 1083-1091.

De Benedetti, A., and Graff, J.R. (2004). eIF-4E expression and its role in malignancies and metastases. *Oncogene* 23, 3189-3199.

Del Prete, M.J., Robles, M.S., Guáo, A., Martínez-A, C., Izquierdo, M., and Garcia-Sanz, J.A. (2002). Degradation of cellular mRNA is a general early apoptosis-induced event. *FASEB J* 16, 2003-2005.

Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102, 33-42.

Fraser, C.S., Lee, J.Y., Mayeur, G.L., Bushell, M., Doudna, J.A., and Hershey, J.W. (2004). The j-subunit of human translation initiation factor eIF3 is required for the stable binding of eIF3 and its subcomplexes to 40 S ribosomal subunits in vitro. *J Biol Chem* 279, 8946-8956.

Funakoshi, Y., Doi, Y., Hosoda, N., Uchida, N., Osawa, M., Shimada, I., Tsujimoto, M., Suzuki, T., Katada, T., and Hoshino, S. (2007). Mechanism of mRNA deadenylation: evidence for a molecular interplay between translation termination factor eRF3 and mRNA deadenylases. *Genes Dev* 21, 3135-3148.



Hashimoto, Y., Hosoda, N., Datta, P., Alnemri, E.S., and Hoshino, S. (2012). Translation termination factor eRF3 is targeted for caspase-mediated proteolytic cleavage and degradation during DNA damage-induced apoptosis. *Apoptosis* 17, 1287-1299.

Hegde, R., Srinivasula, S.M., Datta, P., Madesh, M., Wassell, R., Zhang, Z., Cheong, N., Nejme, J., Fernandes-Alnemri, T., Hoshino, S., et al. (2003). The polypeptide chain-releasing factor GSPT1/eRF3 is proteolytically processed into an IAP-binding protein. *J Biol Chem* 278, 38699-38706.

Hegde, R., Srinivasula, S.M., Zhang, Z., Wassell, R., Mukattash, R., Cilenti, L., DuBois, G., Lazebnik, Y., Zervos, A.S., Fernandes-Alnemri, T., et al. (2002). Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem* 277, 432-438.

Hitomi, J., Katayama, T., Eguchi, Y., Kudo, T., Taniguchi, M., Koyama, Y., Manabe, T., Yamagishi, S., Bando, Y., Imaizumi, K., et al. (2004). Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J Cell Biol* 165, 347-356.

Holcik, M., and Sonenberg, N. (2005). Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 318-327.

Hoshino, S. (2012). Mechanism of the initiation of mRNA decay: role of eRF3 family G proteins. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 3, 743-757.

Hoshino, S., Hosoda, N., Araki, Y., Kobayashi, T., Uchida, N., Funakoshi, Y., and Katada, T. (1999a). Novel function of the eukaryotic polypeptide-chain releasing factor 3 (eRF3/GSPT) in the mRNA degradation pathway. *Biochemistry (Mosc)* 64, 1367-1372.

Hoshino, S., Imai, M., Kobayashi, T., Uchida, N., and Katada, T. (1999b).

The eukaryotic polypeptide chain releasing factor (eRF3/GSPT) carrying the translation termination signal to the 3'-Poly(A) tail of mRNA. Direct association of erf3/GSPT with polyadenylate-binding protein. *J Biol Chem* 274, 16677-16680.

Hoshino, S., Imai, M., Mizutani, M., Kikuchi, Y., Hanaoka, F., Ui, M., and Katada, T. (1998). Molecular cloning of a novel member of the eukaryotic polypeptide chain-releasing factors (eRF). Its identification as eRF3 interacting with eRF1. *J Biol Chem* 273, 22254-22259.

Hoshino, S., Miyazawa, H., Enomoto, T., Hanaoka, F., Kikuchi, Y., Kikuchi, A., and Ui, M. (1989). A human homologue of the yeast GST1 gene codes for a GTP-binding protein and is expressed in a proliferation-dependent manner in mammalian cells. *EMBO J* 8, 3807-3814.

Hosoda, N., Funakoshi, Y., Hirasawa, M., Yamagishi, R., Asano, Y., Miyagawa, R., Ogami, K., Tsujimoto, M., and Hoshino, S. (2011). Anti-proliferative protein Tob negatively regulates CPEB3 target by recruiting Caf1 deadenylase. *EMBO J* 30, 1311-1323.

Hosoda, N., Kobayashi, T., Uchida, N., Funakoshi, Y., Kikuchi, Y., Hoshino, S., and Katada, T. (2003). Translation termination factor eRF3 mediates mRNA decay through the regulation of deadenylation. *J Biol Chem* 278, 38287-38291.

Jakobsen, C.G., Seggaard, T.M., Jean-Jean, O., Frolova, L., and Justesen, J. (2001). [Identification of a novel termination release factor eRF3b expressing the eRF3 activity in vitro and in vivo]. *Mol Biol (Mosk)* 35, 672-681.

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*

Dev 20, 355-367.

Kedersha, N., and Anderson, P. (2002). Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem Soc Trans* 30, 963-969.

Kikuchi, Y., Shimatake, H., and Kikuchi, A. (1988). A yeast gene required for the G1-to-S transition encodes a protein containing an A-kinase target site and GTPase domain. *EMBO J* 7, 1175-1182.

Kobayashi, T., Funakoshi, Y., Hoshino, S., and Katada, T. (2004). The GTP-binding release factor eRF3 as a key mediator coupling translation termination to mRNA decay. *J Biol Chem* 279, 45693-45700.

Kushnirov, V.V., Ter-Avanesyan, M.D., Telckov, M.V., Surguchov, A.P., Smirnov, V.N., and Inge-Vechtormov, S.G. (1988). Nucleotide sequence of the SUP2 (SUP35) gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 66, 45-54.

Kühn, U., and Wahle, E. (2004). Structure and function of poly(A) binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1678, 67-84.

la Cour, T., Kiemer, L., Mølgaard, A., Gupta, R., Skriver, K., and Brunak, S. (2004). Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel* 17, 527-536.

Le Roy, F., Salehzada, T., Bisbal, C., Dougherty, J.P., and Peltz, S.W. (2005). A newly discovered function for RNase L in regulating translation termination. *Nat Struct Mol Biol* 12, 505-512.

Lee, J.A., Park, J.E., Lee, D.H., Park, S.G., Myung, P.K., Park, B.C., and Cho, S. (2008). G1 to S phase transition protein 1 induces apoptosis signal-regulating kinase 1 activation by dissociating 14-3-3 from ASK1. *Oncogene* 27, 1297-1305.

Malta-Vacas, J., Aires, C., Costa, P., Conde, A.R., Ramos, S., Martins, A.P., Monteiro, C., and Brito, M. (2005). Differential expression of the eukaryotic release factor 3 (eRF3/GSPT1) according to gastric cancer histological types. *J Clin Pathol* 58, 621-625.

Malta-Vacas, J., Chauvin, C., Gonçalves, L., Nazaré, A., Carvalho, C., Monteiro, C., Bagrel, D., Jean-Jean, O., and Brito, M. (2009). eRF3a/GSPT1 12-GGC allele increases the susceptibility for breast cancer development. *Oncol Rep* 21, 1551-1558.

Marcotrigiano, J., Gingras, A.C., Sonenberg, N., and Burley, S.K. (1999). Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G. *Mol Cell* 3, 707-716.

Marissen, W.E., Gradi, A., Sonenberg, N., and Lloyd, R.E. (2000). Cleavage of eukaryotic translation initiation factor 4GII correlates with translation inhibition during apoptosis. *Cell Death Differ* 7, 1234-1243.

Marissen, W.E., and Lloyd, R.E. (1998). Eukaryotic translation initiation factor 4G is targeted for proteolytic cleavage by caspase 3 during inhibition of translation in apoptotic cells. *Mol Cell Biol* 18, 7565-7574.

Morishima, N., Nakanishi, K., Takenouchi, H., Shibata, T., and Yasuhiko, Y. (2002). An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem* 277, 34287-34294.

Morley, S.J., Coldwell, M.J., and Clemens, M.J. (2005). Initiation factor modifications in the preapoptotic phase. *Cell Death Differ* 12, 571-584.

Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B.A., and Yuan, J. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403, 98-103.

Pandey, M., Bajaj, G.D., and Rath, P.C. (2004). Induction of the interferon-inducible RNA-degrading enzyme, RNase L, by stress-inducing agents in the human cervical carcinoma cells. *RNA Biol* 1, 21-27.

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

Sherr, C.J. (2006). Divorcing ARF and p53: an unsettled case. *Nat Rev Cancer* 6, 663-673.

Spriggs, K.A., Bushell, M., and Willis, A.E. (2010). Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress. *Mol Cell* 40, 228-237.

Srinivasula, S.M., Hegde, R., Saleh, A., Datta, P., Shiozaki, E., Chai, J., Lee, R.A., Robbins, P.D., Fernandes-Alnemri, T., Shi, Y., et al. (2001). A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* 410, 112-116.

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.

Storr, S.J., Carragher, N.O., Frame, M.C., Parr, T., and Martin, S.G. (2011). The calpain system and cancer. *Nat Rev Cancer* 11, 364-374.

Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K., and Takahashi, R. (2001). A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* 8, 613-621.

Svitkin, Y.V., Herdy, B., Costa-Mattioli, M., Gingras, A.C., Raught, B., and

Sonenberg, N. (2005). Eukaryotic translation initiation factor 4E availability controls the switch between cap-dependent and internal ribosomal entry site-mediated translation. *Mol Cell Biol* 25, 10556-10565.

Tompkins, V., Hagen, J., Zediak, V.P., and Quelle, D.E. (2006). Identification of novel ARF binding proteins by two-hybrid screening. *Cell Cycle* 5, 641-646.

Uchida, N., Hoshino, S., Imataka, H., Sonenberg, N., and Katada, T. (2002). A novel role of the mammalian GSPT/eRF3 associating with poly(A)-binding protein in Cap/Poly(A)-dependent translation. *J Biol Chem* 277, 50286-50292.

van Loo, G., van Gurp, M., Depuydt, B., Srinivasula, S.M., Rodriguez, I., Alnemri, E.S., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Declercq, W., and Vandenabeele, P. (2002). The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ* 9, 20-26.

Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J., and Vaux, D.L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102, 43-53.

Verhagen, A.M., Silke, J., Ekert, P.G., Pakusch, M., Kaufmann, H., Connolly, L.M., Day, C.L., Tikoo, A., Burke, R., Wrobel, C., et al. (2002). HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem* 277, 445-454.

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.

## 謝辞

本研究を行うにあたり、最高の環境と適切な指針を与えてくださり、また、6年間にわたって熱心に研究の構想、立案をしてくださった名古屋市立大学大学院薬学研究科 遺伝情報学教室、星野真一 教授に心から感謝いたします。さらには自由に研究する機会と学会等多くのことを学ぶ機会を提供して下さり、私自身それらの機会を通して多くを学び成長することができました。

遺伝情報学教室、細田直 講師には日頃の実験を進める上で実験手技から材料の準備まで様々な面においてサポートして頂きました。また自身の経験など貴重な話をして下さり参考になりました。なによりも、最も身近な研究者の先輩として私のよい手本でありました。心から感謝いたします。

本論の審査に関わってくださった、名古屋市立大学大学院薬学研究科、糸和彦教授、頭金正博教授、湯浅博昭教授に感謝いたします。

本論前半部において御助言を賜りました。トーマスジェファーソン大学 キンメル癌センター Emad Alnemri 教授、Pinaki Datta リサーチアソシエート、私の先輩であり本論後半部の成果への貢献がありました遺伝情報学教室 熊谷直道修士に心より感謝申し上げます。

また、期間の多寡に関わらず、遺伝情報学教室においてともに研究生活に携わった皆様方に感謝いたします。

これまでの研究生活では多くの困難があり何度も挫折しそうになりました。しかしその度に博士課程の同期の頑張っている姿や、先生、研究室の同期、大学や高校の友人の期待や励ましの言葉に助けられました。今更ながら多くの人に支えられてきたことを実感しております。今後は、私が関わった人にも誇りに思ってもらえるような研究をすることで、僅かながらでも恩返しをしていきたいと思っています。

最後に、私を誰よりも温かく見守り続け、長い学生生活を支えてくださった両親に感謝いたします。

平成 26 年 3 月