



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (薬学)
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

氏名	はしもと よしふみ 橋本 芳史
学位の種類	博士（薬学）
学位の番号	薬博第 297 号
学位授与の日付	平成 26 年 3 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	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
論文審査委員	(主査) 教授 頭金 正博 (副査) 教授 星野 真一・教授 糸 和彦・教授 湯浅 博昭

論文内容の要旨

【序論】

翻訳終結因子 eRF3 は、酵母において細胞周期の 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 GTP 結合タンパク質である。また 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ナンセンスサプレッサー (Omnipotent suppressor) *SUP35* として同定された。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、現在までに翻訳終結因子 eRF1 と共に翻訳終結因子としての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 からなる。eRF3 は C-domain を介し eRF1 と結合し、翻訳終結反応を担っている。一方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 と結合することを見出し、eRF3 が PABP との結合を介して、翻訳終結と共役した mRNA 分解開始 (ポリ (A) 鎖分解) や翻訳の活性化において機能していることを明らかにしている。つまり eRF3 は、翻訳終結だけでなく、mRNA 分解開始、翻訳開始において遺伝子発現制御に重要な役割を果たしている。

また、当研究室と海外のグループとの共同研究により、eRF3 には N 末端領域内でプロテアーゼによる切断を受けた切断型アイソフォーム (Processed eRF3/p-eRF3) が存在することを明らかにしている。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アポトーシスを促進する。つまり eRF3 は遺伝子発現に関わる機能とは別にアポトーシス制御機能をも有している。しかし、p-eRF3 の機能に関して、どのような条件下で生成し機能しているかなど、その生理的意義は未解明のままである。eRF3 のアポトーシス制御に関わる機能を示唆する報告として、近年、eRF3 の N 末端領域内に存在するグリシンの繰り返し配列 (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。このことは、eRF3 が癌化の過程で何らかの機能を有していることを示しており、eRF3 のアポトーシス制御に関する機能の生理的 중요を示している。

本研究では、eRF3 において未解明な 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。また、p-eRF3 の生成条件を検討する過程で、eRF3 を標的とした新たな遺伝子発現制御の存在を見出したので併せて検討を行った。

【本論】

1) 翻訳終結因子 eRF3 を標的とした新規遺伝子発現制御

1-1) 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 と同様に IAP と結合し、カスパーゼの活性化を促進する因子として、Smac と Omi が知られている。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、アポトーシス時にミトコンドリアから漏出しその機能を発揮す

る。本研究ではまず、Smac、HtrA2 が機能するストレス条件において p-eRF3 が生成し機能している可能性について検討した。

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ところ、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 が生成することを見出した。(Fig1) そこで、アポトーシス時に生成する切断型 eRF3 と遺伝子導入により人工的に発現させた p-eRF3 のウェスタンブロットでの泳動度を比較したところ、アポトーシス時に生成する切断型 eRF3 のバンドが p-eRF3 よりも移動度の小さい位置に観察された。このアポトーシス時に生成する切断型 eRF3 は、p-eRF3 とは別の新規切断型 eRF3 アイソフォームであった。この新規切断型 eRF3 はカスパーゼ依存的に生成することから eRF3-cp と命名した。eRF3-cp の切断部位は、ウェスタンブロットの泳動度による検討から eRF3 の N 末端から 30 アミノ酸付近の位置にあることが予測された。そこで、この領域にカスパーゼによる切断を受けうるコンセンサス配列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。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。その結果 D32 への変異により切断効率が低下することを見出した。また 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ところ切断は完全に抑制された。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、新規切断型アイソフォーム eRF3-cp が生成すること、またその切断部位は重複して存在し、特に主要な切断サイトは D32 であることを明らかにした。データベース解析の結果、p-eRF3 の切断部位と同様に 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。

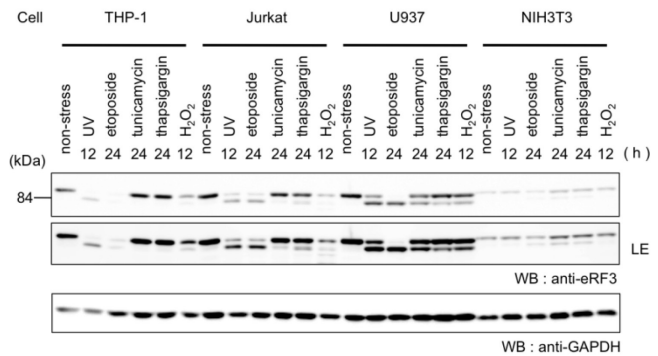


Fig1. 種々の細胞に各種アポトーシス誘導刺激を加えた際のeRF3の切断・分解 (LE: long exposure), GAPDH: ローディングコントロール

1-2) 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

eRF3-cp の解析を行う過程で、アポトーシスの誘導により eRF3-cp の出現と同時に eRF3 自体の量が劇的に減少することを見出した。そこで eRF3-cp の生成と eRF3 の分解の関係を調べるために、野生型 eRF3 とカスパーゼによる切断を受けない eRF3 変異体を細胞に発現させ、アポトーシス時における挙動を比較したところ、カスパーゼによる切断の有無に関わりなく eRF3 は分解を受けることが明らかとなった。またこの eRF3 の分解はカスパーゼインヒビターにより完全に抑制された。つまり eRF3 はアポトーシス時に共にカスパーゼ依存的であるがそれぞれ独立した機構で切断と分解を受けることが明らかとなった。

次に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、複数の翻訳開始因子がカスパーゼによる切断を受けることが報告されており、翻訳抑制に働くと考えられている。また、mRNA が急速に分解されることも報告されている。よって eRF3 の分解は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が予想された。そこで eRF3 の切断・分解と翻訳開始因子 (eIF4G) の切断のアポトーシス時における挙動を比較したところ、同時期に切断・分解を受けることが明らかとなった。また eRF3 を siRNA によりノックダウンすることで遺伝子発現活性が低下することも確認した。(Fig2) 以上のことから本研究では 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ていると結論付けた。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

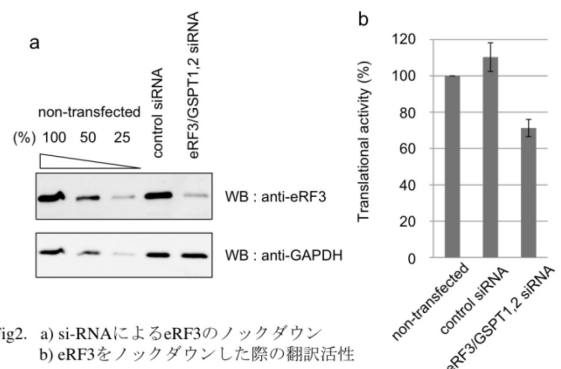


Fig2. a) si-RNAによるeRF3のノックダウン
b) eRF3をノックダウンした際の翻訳活性

たが、翻訳終結因子 eRF3 を標的とした遺伝子発現調節機構が存在し 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。

eRF3 切断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。実際 eRF3 はその N ドメインを介して mRNA 分解酵素を mRNA 上にリクルートする能力を有しており、eRF3 の N 末端切断により影響をうける可能性が示唆される。また、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。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、複数のカスパーゼによる切断をおける可能性がある。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。

2) p-eRF3 の新規アポトーシス制御機構の解析

2-1) eRF3 の核外排除シグナル(NES)の同定と p-eRF3 の核内局在機構

eRF3 の細胞内局在性について解析したところ、eRF3 全長は細胞質のみに局在を示すのに対し、p-eRF3 は細胞質と核の双方に局在することを見出した。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唆している。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 末端領域を欠失した eRF3 変異体等を作製し、eRF3 の局在に及ぼす影響を検討したところ、54-72 アミノ酸残基が eRF3 の細胞質局在に必要であることが明らかとなった。一般的にタンパク質の核外排除機構としては、核外輸送蛋白質 CRM1 依存的機構が最もよく知られている。そこで細胞を CRM1 の阻害剤である Leptomycin B で処理し eRF3 の局在を調べたところ、eRF3 は細胞質だけでなく核にも局在した。このことから eRF3 は核-細胞質間シャトルタンパク質であり、CRM1 依存的に核外へ排出されることが明らかとなった。また eRF3 の 54-72 アミノ酸の領域には、CRM1 依存的核排除シグナル(NES)のコンセンサス配列が存在することを見出した。さらに、NES 配列の重要なアミノ酸残基への変異導入により全長型 eRF3 は核にも局在するようになり、同定した NES 配列を p-eRF3 に付加することで p-eRF3 は細胞質のみに局在するようになった。以上の結果から、eRF3 には核排除シグナル NES が存在すること、また、p-eRF3 は切断サイトの直前に存在する NES 配列が切断除去されることで核へと局在化することが明らかとなった。

2-2) p-eRF3 は核内において癌抑制因子 ARF と結合する

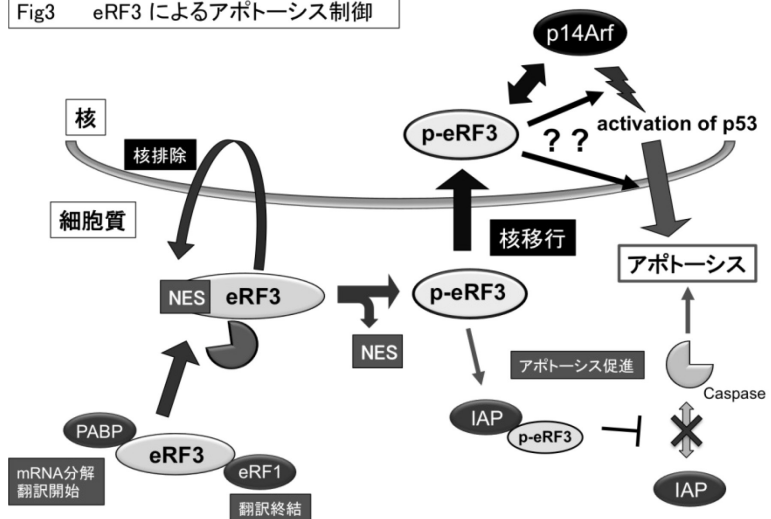
酵母 two-hybrid スクリーニングにより eRF3 と結合する因子として癌抑制因子 ARF が報告されている。しかしながら、

ARF は核タンパク質であり、細胞質に局在する eRF3 と細胞内局在性が異なることなどからその結合の生理的意義については不明であった。本研究において p-eRF3 が核内に局在化することから、p-eRF3 が核内において ARF と結合する可能性が示唆された。この可能性を検討するため、細胞に全長型 eRF3 あるいは p-eRF3 と ARF を共発現させ免疫沈降法により eRF3 と ARF の結合を検討した。その結果、細胞内での局在を反映し p-eRF3 のみが ARF と結合することが確認された。以上の結果より、p-eRF3 の核内における結合因子として ARF を同定した。

【総括】

本研究により 1) eRF3 がアポトーシス時に切断・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 2) 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 が遺伝子発現制御およびアポトーシス制御の双方において

Fig3 eRF3 によるアポトーシス制御



機能することを初めて明らかにした。さらに、eRF3 はストレス/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、切断型 eRF3 として新たな機能を獲得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。しかし、本研究の成果により、eRF3 を介した遺伝子発現制御とアポトーシス制御という全く新しい eRF3 研究の方向性が示された。

【基礎となる報文】

1. Y. Hashimoto, N. Hosoda, P. Datta, E.S. Alnemri and S. 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. Y. Hashimoto, N. Kumagai, N. Hosoda, and S. Hoshino
The processed isoform of translation termination factor eRF3 localizes to the nucleus to interact with ARF tumor suppressor
Biochemical and Biophysical Research Communications, 445(3):639-44(2014)

論文審査の結果の要旨

橋本芳史は、翻訳終結因子 eRF3 を標的としたストレス応答制御について解析を行い、主として以下の点を明らかにした。

(1) DNA 傷害ストレスをはじめとするアポトーシス誘導性ストレス刺激に反応して eRF3 がカスパーゼにより Asp32 を含む領域で切断・分解を受け、アポトーシス時の翻訳停止に大きく寄与する。

(2) 小胞体ストレスなどのカルシウムを流入するストレス刺激においては、カルパインが活性化され、Ala73 で切断を受けた eRF3 が細胞質で IAP と結合しカスパーゼを活性化するとともに核内にも移行して癌抑制因子 ARF と結合し、アポトーシスを制御する。

以上のように、各種ストレス時において eRF3 はプロテアーゼにより切断を受けることで、遺伝子発現およびアポトーシスの制御をおこなうという非常にユニークな制御機構を解明することに成功した。

審査結果

1月10日の公開発表会の後、主査・副査の審査委員との面談を行い、3月6日の最終審査会を経て、本博士論文には、大学院博士後期課程の研究として十分な研究成果が含まれていると判断し、論文審査委員全員一致で合格と判定した。