

XBP1u の翻訳休止におけるリボソームタンパク質の関与

大古殿 美加
奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 ストレス微生物科学講座
(木俣 行雄 准教授)

平成 30 年 3 月 12 日提出

目次

略語一覧	5
1) 序論	6
2) 材料と方法	10
2-1) プラスミド DNA の構築	
2-2) <i>in vitro</i> における Mal-PEG を用いた Cys 残基の修飾	
2-3) <i>in vitro</i> 実験	
2-4) NuPAGE 電気泳動	
2-5) Western Blotting	
2-6) 光架橋実験における培養細胞へのトランスフェクション	
2-7) 光反応性アミノ酸 L-Photo-Methionine を用いた光架橋実験	
2-8) FLAG tag 抗体を用いた免疫沈降, 及び CTAB 精製による光架橋産物の精製	
2-9) 質量分析用 NuPAGE 電気泳動と Flamingo 試薬によるゲル染色	
2-10) 質量分析	
2-11) siRNA による遺伝子ノックダウンと培養細胞へのトランスフェクション	
2-12) 細胞回収と NuPAGE 用タンパク質抽出	
2-13) 細胞回収と SDS-PAGE 用タンパク質抽出	
2-14) SDS-PAGE 電気泳動	
2-15) FACS 解析における siRNA による遺伝子ノックダウンと培養細胞へのトランスフェクション	
2-16) FACS 解析	
2-17) リボソームタンパク質ノックダウン条件下における ³⁵ S-Met/Cys を用いたタンパク質合成活性の測定	
2-18) リボソームタンパク質ノックダウン条件下における Harringtonine-chase 実験	
2-19) Flp-In™ System を使用したリボソームタンパク質 Stable transfectant 株の作製と目的遺伝子の発現誘導	
2-20) Myc tag 抗体を用いた Myc tag 融合 RPL4 Stable transfectant 株におけるリボソーム複合体形成の確認	
2-21) Myc tag 融合 RPL4 Stable transfectant 株における siRNA による内在性 RPL4 ノックダウン実験	

- 2-22) リボソームタンパク質ノックダウン条件下における *XBPlu* mRNA の
スプライシング効率の検証
- 2-23) 抗体一覧
 - 2-23-1) 一次抗体
 - 2-23-2) 二次抗体

3) 結果 20

- 3-1) *XBPlu* 翻訳休止時におけるリボソームトンネル内に収まるアミノ酸残
基数の決定
- 3-2) *XBPlu* 翻訳休止時における *XBPlu* 新生ポリペプチド鎖と近接するリ
ボソームタンパク質の同定
- 3-3) リボソームタンパク質 RPL3, RPL4, 及び RPL7 が *XBPlu* の翻訳休止
に与える影響
 - 3-3-1) RPL3 ノックダウンが *XBPlu* の翻訳休止に与える影響
 - 3-3-2) RPL4 ノックダウンが *XBPlu* の翻訳休止に与える影響
 - 3-3-3) RPL7 ノックダウンが *XBPlu* の翻訳休止に与える影響
- 3-4) リボソームトンネルを構成するリボソームタンパク質 RPL39 が *XBPlu*
の翻訳休止に与える影響
- 3-5) リボソームタンパク質 RPL3, RPL4, RPL7, 及び RPL39 ノックダウン条
件下における *XBPlu* 翻訳休止の単一細胞レベルでの解析
- 3-6) リボソームタンパク質ノックダウン条件下におけるタンパク質合成活性
- 3-7) リボソームタンパク質ノックダウン条件下における *XBPlu* 翻訳休止産
物の経時的変化
 - 3-7-1) 0 時間後から 8 時間後までの経時的変化
 - 3-7-2) 0 分後から 40 分後までの経時的変化
- 3-8) リボソームタンパク質ノックダウンが正電荷クラスターによる翻訳停止
に与える影響
- 3-9) Myc tag 融合 RPL4 Stable transfectant 株における内在性 RPL4 ノックダ
ウンが *XBPlu* の翻訳休止に与える影響
- 3-10) リボソームタンパク質ノックダウンが *XBPlu* 翻訳休止の生理的意義
に与える影響
- 3-11) 翻訳停止補助因子 ZNF598 が *XBPlu* の翻訳休止に与える影響

4) 考察 33

- 4-1) リボソームトンネル内における *XBPlu* 新生ポリペプチド鎖の挙動
- 4-2) *XBPlu* 新生ポリペプチド鎖とリボソームタンパク質との相互作用
- 4-3) リボソームタンパク質ノックダウンによる *XBPlu* 翻訳休止の阻害

4-4) リボソームタンパク質ノックダウン条件下で起こる IRE1 α による
XBP1u mRNA のスプライシング効率の低下

4-5) XBP1u 新生ポリペプチド鎖と翻訳停止補助因子 ZNF598 との相互作用

5) 図・表 38

謝辞 89

参考文献 90

略語一覽

CTAB : Cetyltrimethylammonium Bromide

DTT : Dithiothreitol

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

HEPES : 4- (2-Hydroxyethyl) -1-piperazineethanesulfonic acid

IRE1 : Inositol-requiring enzyme 1

Mal-PEG : Maleimide PEG

MOPS : 3-Morpholinopropanesulfonic acid

NuPAGE : Neutral polyacrylamide gel electrophoresis

PMSF : Phenylmethylsulfonyl fluoride

RPL : Ribosomal protein L

SDS : Sodium dodecylsulfate

Tris : 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1, 3-diol

XBP1 : X-box binding protein 1

ZNF598 : Zinc finger protein 598

1) 序論

ポリペプチド鎖伸長反応は、タンパク質合成装置であるリボソームが mRNA 上を移動しながら遺伝情報 (コドン) に対応するアミノ酸を選び、一つずつ付加していく反応である。一般的に、この反応はリボソームが mRNA 上をスムーズに進行し行われると考えられている。しかし、近年の酵母を用いた研究により、mRNA の成熟過程で生じた不良な mRNA がコードする連続した正電荷アミノ酸 (正電荷クラスター) や mRNA の二次構造などが存在した場合に、リボソームがその部位で捕らえられ、伸長反応が進行できなくなる「翻訳停止」という現象が報告されている (Lu, J. *et al.*, 2008). このような翻訳停止が起こると、酵母においては、Dom34 (哺乳動物においては Pelota) / Hbs1 (哺乳動物においては HBS1L) や Asc1/RACK1 といった複数の因子が、リボソームの解離を引き起こし、翻訳途中の異常な新生ポリペプチド鎖 (翻訳停止産物) と異常な mRNA の分解を惹起する (Dimitrova, L. N. *et al.*, 2009; Kuroha, K. *et al.*, 2010; Tsuboi, T. *et al.*, 2012; Ikeuchi, K. *et al.*, 2016). また、哺乳動物細胞において、正電荷クラスターによって引き起こされる翻訳停止には、翻訳停止補助因子 ZNF598 が関与していることが報告された (Juszkiewicz, S. *et al.*, 2017; Sundaramoorthy, E. *et al.*, 2017). ZNF598 はリボソームへと働きかけ、翻訳停止が起こるのを補助するとともに、リボソームのユビキチン化を介してリボソームの解離を引き起こす。このように、細胞内で異常な現象として認識される翻訳停止に関しては、その機構や関与する因子について詳細な研究が行われている。

本研究室では、哺乳動物細胞において、異常な現象としてではなく生理的意義 (機能性) を有する翻訳の一時的な停止が転写因子 XBP1u で引き起こされることを見出した (Figure 1A) (Yanagitani, K. *et al.*, 2011). なお、XBP1u においては翻訳が一時的に停止した後に翻訳が再開し、全長の XBP1u が合成されることから「翻訳休止」と呼ぶ。この翻訳休止は小胞体内に蓄積した構造異常タンパク質を処理するシステムである小胞体ストレス応答 (Unfolded Protein Response : UPR) に深く関与している。XBP1u mRNA 上で翻訳休止が起こると、その休止時間を利用して、三者複合体 (mRNA-Ribosome-Nascent chain Complex : R-RNC) を形成したまま小胞体膜上に移動する。さらに、小胞体ストレス条件下では、XBP1u mRNA が小胞体ストレスセンサー IRE1 α によるスプライシングを受けることで成熟型の XBP1s mRNA, 及び活性型転写因子 XBP1s の合成が効率よく引き起こされる (Figure 1B). また、全長の XBP1u が合成されることから、翻訳休止が起こるにもかかわらず、XBP1u mRNA の分解が促進されないことが示唆される。この発見により、翻訳停止、及び翻訳休止には、前述の正電荷クラスターのように細胞内で異常と認識されるものと XBP1u のように生理的機能があると認識されるものが存在することが強く示唆される。

これまでに、XBP1u の翻訳休止が起こっている際には、その 260 番目の Met 残基がペプチジル転移中心 (Peptidyl Transferase Center : PTC) の P サイトに位置しており、翻訳休止に必須である最小翻訳休止配列 (236 番目-261 番目の 26 アミノ酸残基) は、

リボソームトンネル内に収まることが示唆されている (Figure 1CI, II). また, XBP1u の最小翻訳休止配列について個々のアミノ酸残基の重要性を調べるために 1 つずつ Ala に置換し, 翻訳休止に与える影響を検証した結果, 255 番目の Ser 残基を Ala に置換した場合, 翻訳休止が強くなった. 一方, 256 番目の Trp 残基を含む 14 のアミノ酸残基をそれぞれ Ala に置換した場合は, 翻訳休止が弱くなった (Figure 1D). この Ala スキャニングにより, 翻訳休止の程度の変化が特に大きかった 255 番目と 256 番目のアミノ酸残基について, 翻訳休止を起こす場合の側鎖の性質を明らかにするために, 255 番目を Ala と Ser 以外の全アミノ酸に, 256 番目を Ala と Trp 以外の全アミノ酸に置換し, 翻訳休止の強さを調べた (Figure 1E). その結果, Wild type, S255A, 及び S255G では Wild type と同程度以上の翻訳休止産物が検出されるのに対し, その他の変異体では翻訳休止が弱くなった. XBP1u の翻訳休止に必須な 255 番目のアミノ酸残基 (Ser, Ala, Gly) には, 静電的な共通点は見られないが, ファンデルワールス半径が全アミノ酸中, 最も小さい 3 つのアミノ酸という特徴がある (Figure 1F). また, 256 番目には, 全アミノ酸で唯一インドール環を持つ Trp が必須であった. この結果より, アミノ酸残基の側鎖の大きさや構造といった物理的な要因が, 翻訳休止を起こすために重要であると考えられる (大古殿修士論文). 大腸菌, 及び酵母を用いた研究では, 新生ポリペプチド鎖とリボソームトンネル内のリボソーム RNA, 及びリボソームタンパク質が空間的に近接し相互作用することにより, 翻訳停止が起こる例が報告されている (Seidelt, B. *et al.*, 2009; Zhang, Y. *et al.*, 2013). また, 大腸菌における分泌モニタータンパク質 SecM の翻訳停止は, 17 アミノ酸残基からなる翻訳停止配列が, リボソームトンネルと密接に相互作用することにより起こることが報告されている (Muto, H. *et al.*, 2006; Tsai, A. *et al.*, 2014).

これらのことから, XBP1u の翻訳休止に関しても, XBP1u の最小翻訳休止配列を構成するアミノ酸残基が個々に, 且つ密接にリボソームトンネル内と物理的に相互作用することで翻訳休止を引き起こしている仮説が考えられるが, 機構に関わる詳細な研究は未だ行われていない. また, 前述の通り, 細胞内で正電荷クラスター等の翻訳停止が起こる際には, 複数の因子が働き, リボソームの解離や新生ポリペプチド鎖の分解等を惹起することが分かっている. もし, これらの因子が翻訳停止, 及び翻訳休止という現象を認識し働くならば, XBP1u の翻訳休止にも関与している仮説が考えられる.

これまでの知見では成熟したタンパク質が機能を発揮すると考えられてきたが, この XBP1u の例では「新生ポリペプチド鎖が独自の機能を発揮する」という新たな知見が示されている. 2011 年には, マウスの ES 細胞についてリボソームプロファイリングが行われ, 発現量の高い遺伝子 4994 個のうち, 1100 個の遺伝子で翻訳停止が起こることが報告された (Ingolia, N. T. *et al.*, 2011). このことから, 翻訳休止, 及び翻訳停止といった現象は特別なものではなく普遍的な生命現象であると考えられ, 今後は XBP1u 以外の遺伝子でも新生ポリペプチド鎖が翻訳停止という現象を介して生理的意義を持つ例の発見が期待される. 本研究によって明らかになった XBP1u 翻訳休止

とリボソームタンパク質との関与は、XBP1u の翻訳休止機構解明の一端を担うとともに、「機能性翻訳休止」という知見を一般化する上で非常に重要な知見になり得ると考えている。

そこで本研究では、哺乳動物細胞における XBP1u の翻訳休止機構解明を目指し、XBP1u 新生ポリペプチド鎖とリボソームトンネルの構成因子であるリボソームタンパク質との物理的相互作用に着目し研究を行った。この目的を達成するために、まず、XBP1u の翻訳休止が起こっている際に、リボソームトンネル内に収まるアミノ酸残基数を決定した。先行研究において、翻訳中にリボソームトンネル内に収まるアミノ酸残基数は 30-40 個とされており、厳密には決定されていない (Nissen, P. *et al.*, 2000; Jenni, S. *et al.*, 2003; Voss, N. R. *et al.*, 2006; Wilson, D. N. *et al.*, 2011; Ito, K. *et al.*, 2013)。2015 年にヒトリボソームの構造が解明され、リボソームトンネルを構成するリボソーム RNA やリボソームタンパク質 (RPL4, 及び RPL39) についても報告された (Khatter, H. *et al.*, 2015)。しかし、これらと相互作用する新生ポリペプチド鎖の具体的な相互作用部位については言及されていない。もし、リボソームトンネル内に収まる厳密なアミノ酸残基数が明らかになれば、翻訳休止中にリボソームトンネル内のどの位置にどのアミノ酸残基が存在するのか推測できると考えた。

続いて、翻訳休止中に、XBP1u 新生ポリペプチド鎖特異的に近接するリボソームタンパク質の同定を行った。先行研究により、リボソームトンネル内の新生ポリペプチド鎖の立体的な配置 (Conformation) は、新生ポリペプチド鎖自身の持つアミノ酸配列の親水性度や疎水性度の違いによって異なることが明らかになっている (Zhang, Y. *et al.*, 2013)。このことから、前述のリボソームトンネルを構成するリボソームタンパク質 (RPL4, 及び RPL39) 以外にも XBP1u 新生ポリペプチド鎖と特異的に相互作用するリボソームタンパク質があるのではないかと考えた。本研究において、XBP1u 新生ポリペプチド鎖に近接するリボソームタンパク質として同定された RPL3, RPL4, 及び RPL7 については、ロックダウン実験を行い、XBP1u の翻訳休止に与える影響を検証した。これに加えて、リボソームトンネルを構成することが分かっている RPL39 についてもロックダウン実験を行い、XBP1u の翻訳休止に与える影響を検証した。RPL39 は、リボソームトンネルを構成するにもかかわらず、XBP1u 新生ポリペプチド鎖には近接しないタンパク質である。このことから、RPL39 のロックダウン実験は、RPL3, RPL4, 及び RPL7 のロックダウン実験におけるネガティブコントロールになると考えた。さらに、XBP1u 以外の翻訳停止にもこれらのリボソームタンパク質が関与するか否かを正電荷のアミノ酸である Arg を 30 個連続させた正電荷クラスター (R30) を使用して検証した。この実験により、本研究で新生ポリペプチド鎖と相互作用することが示唆された 3 つのリボソームタンパク質 (RPL3, RPL4, 及び RPL7) が XBP1u の翻訳休止特異的に相互作用するのか、もしくは他の翻訳停止にも相互作用し得るのかを検証できると考えた。

最後に、哺乳動物細胞における翻訳停止補助因子である ZNF598 について、XBP1u の翻訳休止に関与するか否かを ZNF598 のロックダウン実験により検証した。この実

験により, リボソームタンパク質のみならずその他の因子も XBP1u の翻訳休止に
与する可能性があるかを調べることができると考えた.

2) 材料と方法

2-1) プラスミド DNA の構築

XBP1u の 220 番目, 221 番目, 222 番目, 223 番目, 224 番目, 225 番目, 226 番目, 227 番目, 228 番目, 229 番目, 230 番目, 235 番目, 及び 240 番目のアミノ酸残基をそれぞれ Cys 残基に置換したプラスミド DNA を作製した (Table 1). まず, FLAG tag-XBP1u-HA tag [SSS]/pBSII SK (SSS mutant) を鋳型として Table 1 に示すプライマーを用いて, inverse PCR により変異が導入された PCR 産物を増幅した. サーマルサイクラーの設定は, 98°C10 秒, 68°C10 分を 25 サイクルとした. 鋳型として使用した SSS mutant は, Wild type の XBP1u に含まれる 204 番目, 215 番目, 及び 247 番目の Cys を全て Ser に置換した変異体である. なお PCR には, PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase (TaKaRa 社) を使用した. PCR 産物に含まれている鋳型 DNA は Dpn I (TaKaRa 社) 処理により消化した. 得られた PCR 産物をヒートショック法により大腸菌 (DH5 α) に導入し Large preparation 法によりプラスミド DNA の精製を行った.

光架橋実験に用いるプラスミド DNA を Table 2 に示した. まず, Wild type の XBP1u に含まれる 260 番目の Met を Gln, His, Leu, ILe, Phe, Lys に置換したプラスミド DNA を作製した (Table 2). 3xFLAG tag-8xHis tag-XBP1u-HA tag/pcDNA3.1 を鋳型として Table 2 に示すプライマーを用いて, inverse PCR により変異が導入された PCR 産物を増幅した. サーマルサイクラーの設定は, 98°C10 秒, 68°C10 分を 25 サイクルとした. なお PCR には, PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase を使用した. PCR 産物に含まれている鋳型 DNA は Dpn I 処理により消化した. 得られた PCR 産物をヒートショック法により大腸菌 (DH5 α) に導入し Large preparation 法によりプラスミド DNA の精製を行った. 次に, 得られた 3xFLAG tag-8xHis tag-XBP1u-HA tag [M260Q]/pcDNA3.1 (M260Q) を鋳型として Table 2 に示すプライマーを用いて, 236 番目, 237 番目, 238 番目, 239 番目, 242 番目, 248 番目, 及び 254 番目が Met に置換されたプラスミド DNA を M260Q と同様の方法で作製した.

Myc tag 融合 RPL4 のプラスミド DNA の作製に用いた鋳型とプライマーを Table 3 に示した. HEK293T 細胞より抽出した RNA を鋳型としてランダムプライマーおよび逆転写酵素 M-MLV Reverse Transcriptase, RNase H Minus, Point Mutant (Promega 社) により cDNA の合成を行った. 得られた cDNA を鋳型として Table 3 に示すプライマーを用いて RPL4 を増幅した. このとき, 末端に制限酵素サイト (BamHI, XhoI) を導入した. pcDNA3.1 と得られた RPL4 を BamHI, XhoI (TaKaRa 社) で処理し, pcDNA3.1 をベクター, RPL4 をインサートとしてライゲーションした. 得られた産物はヒートショック法により大腸菌 (DH5 α) に導入し Mini preparation 法によりプラスミド DNA の精製を行った. 得られた RPL4/pcDNA3.1 を Table 3 に示すプライマーを用いてリニア化し, 3xMyc tag を含む GbsonAssemblyFlagmentRPL4 (5' ctcggatccaccatggagcagaagctgatctcagaggaggacctggagcagaagctcatttccgaggaggacctcgagcagaa

gctgatctctgaggaggaccttggtggaggcggttcaggcggagggtggctctgcgtgtgctcgccca 3' [IDT 社]) をインサートとして NEBuilder HiFi DNA assembly (NEB 社) でアッセンブルした. 得られた産物はヒートショック法により大腸菌 (DH5 α) に導入し Mini preparation 法によりプラスミド DNA の精製を行った. 得られた 3xMyc tag-RPL4/pcDNA3.1 に Table 3 に示すプライマーを用いて inverse PCR により siRNA の認識を避けるためのサイレントミューテーションを導入し, PCR 産物をヒートショック法により大腸菌 (DH5 α) に導入し Mini preparation 法によりプラスミド DNA の精製を行った. サイレントミューテーションを導入した 3xMyc tag-RPL4 (for#2)/pcDNA3.1 を Table 3 に示すプライマーを用いて断片化し, リニア化した FRT/pcDNA5 とアッセンブルした. 得られた産物をヒートショック法により大腸菌 (DH5 α) に導入し Large preparation 法によりプラスミド DNA の精製を行った.

その他使用したプラスミド DNA を以下に示す.

FLAG tag-XBP1u-HA tag [SSS]/pBSII SK (SSS mutant)
FLAG tag-XBP1u-HA tag [SCS]/pBSII SK (SCS mutant)
FLAG tag-XBP1u-HA tag [Wild type]/pBSII SK
FLAG tag-XBP1u-HA tag [S255A]/pBSII SK
FLAG tag-XBP1u-HA tag [W256A]/pBSII SK
3xFLAG tag-8xHis tag-XBP1u-HA tag [S255A]/pcDNA3.1
3xFLAG tag-8xHis tag-XBP1u-HA tag [W256A]/pcDNA3.1
3xFLAG tag-8xHis tag-XBP1 [u+s] -HA tag [Wild type]/pcDNA3.1
3xFLAG tag-8xHis tag-XBP1 [u+s] -HA tag [W256A]/pcDNA3.1
3xFLAG tag-8xHis tag-XBP1 [u+s] -HA tag [R30]/pcDNA3.1
pEGFP-C1
pmCherry-C1
EGFP-XuC53 [Wild type]-mCherry/pcDNA3.1
EGFP-XuC53 [S255A]-mCherry/pcDNA3.1
EGFP-XuC53 [W256A]-mCherry/pcDNA3.1
pOG44

2-2) *in vitro* における Mal-PEG を用いた Cys 残基の修飾

Table 1 に示したプラスミド DNA を用いて *in vitro* transcription, *in vitro* translation および Mal-PEG による Cys 修飾を行った.

まず, *in vitro* transcription に必要な SP6 promotor 領域を 2-1) で構築したプラスミド DNA に付加するための PCR を行った. プライマーには, SP6-pBSKII (+)-polyA-S, 及び Nonstop-XBP1u-AS-New を使い, PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase による PCR を行った. プライマーの配列は Table 4 に記載している. サーマルサイクラーの

設定は、98°C10 秒, 68°C1 分を 30 サイクルとした。PCR 産物は精製した後, Dpn I 処理による鋳型 DNA の消化を行い, 再び精製し, DEPC 水に溶解した。

次に, 得られたリニア DNA をテンプレートとして, SP6 RNA polymerase (Promega 社) により 37°C, 2 時間処理することで *in vitro* transcription を行った。含まれているリニア DNA は RQ DNase (Promega 社) で 37°C, 30 分処理することで消化した。合成された mRNA を Isogen-LS (ニッポンジーン社) および 2-propanol により単離, 回収した。回収した mRNA は DEPC 水に溶解させ定量を行い, 濃度調整を行った。

続いて, 濃度調整済み mRNA およびウサギの網状赤血球抽出液 (Rabbit Reticulocyte Lysate : RRL [Promega 社]) を用いて *in vitro* translation, 及び Mal-PEG による Cys 残基の修飾を行った。RRL solution にプロテアソーム阻害剤 MG132 (終濃度 40 μ M) を添加後, 濃度調整済み mRNA を添加し 30°C で 10 分間インキュベーションした。続いて, タンパク質合成阻害剤である Cycloheximide (: CHX [nacalai tesque 社]) (終濃度 1 mM) を添加し 30°C で 5 分間インキュベーションした。その後, Mal-PEG (SNBRIGHT ME-020MA [NOF CORPORATION 社]) (終濃度 10 mM) を添加し, 氷上で 15 分間インキュベーションすることにより Cys 残基の修飾を行った。修飾反応は DTT (終濃度 50 mM) を添加し, 氷上で 5 分間インキュベーションすることにより終了させ, サンプル回収を行った。

最後に, 得られたサンプルは Lysis buffer① (0.35 M Bis-Tris [pH 6.5], 2% SDS, 10% Glycerol, 20 μ M MG132, 1 mM PMSF, 10 mg/ml pepstatin A, 1 mM Benzamide, 10 mg/ml Leucine) と混合し 37°C で 30 分インキュベーションした後, Sample buffer① (2% SDS, 0.625 M Bis-Tris [pH 6.5], 20% Glycerol) と 0.1 M DTT を加えて室温で 30 分間処理することでサンプル化を行った。

2-3) *in vitro* 実験

Table 2 に示したプラスミド DNA を用いて *in vitro* transcription および *in vitro* translation を行った。

まず, *in vitro* transcription に必要な SP6 promotor および poly-A 領域を 2-1) で構築したプラスミド DNA に付加するための PCR を行った。プライマーには, SP6-pcDNA3.1 (MCS) -S, 及び pcDNA3.1-polyA-AS を用い, PrimeSTAR® HS DNA Polymerase による PCR を行った。プライマーの配列は Table 4 に記載している。サーマルサイクラーの設定は, 98°C10 秒, 68°C1 分を 30 サイクルとした。PCR 産物は精製した後, Dpn I 処理による鋳型 DNA の消化を行い, 再び精製し, DEPC 水に溶解した。

次に, 得られたリニア DNA を鋳型として SP6 RNA polymerase により 37°C, 2 時間処理することで *in vitro* transcription を行った。含まれているリニア DNA は RQ DNase で 37°C30 分処理することで消化した。合成された mRNA を Isogen-LS および 2-propanol により単離, 回収した。回収した mRNA は DEPC 水に溶解させ定

量を行い、濃度調整を行った。

続いて、濃度調整済み mRNA およびウサギの網状赤血球抽出液 (RRL) を用いて *in vitro* translation を行った。RRL solution にプロテアソーム阻害剤 MG132 (終濃度 40 mM) を添加後、濃度調整済み mRNA を添加し 30°C で 5 分間インキュベーションした。続いて、翻訳開始阻害剤 Harringtonine (終濃度 8 mg/ml) を添加し。その後、15 分後と 30 分後にそれぞれサンプルを回収した。

最後に、得られたサンプルは Lysis buffer①と混合し 37°C で 30 分インキュベーションした後、Sample buffer①と 0.1 M DTT を加えて室温で 30 分間処理することでサンプル化を行った。

2-4) NuPAGE 電気泳動

翻訳停止産物である翻訳途中の新生ポリペプチド鎖と tRNA 間のアミノアシル結合は塩基性溶液下で分解される。翻訳休止産物の検出にはこの結合の保持が必要であるため、中性ゲルである NuPAGE ゲル (0.35 M Bis-Tris [pH 6.5], 10% Acrylamide) を用いて電気泳動を行った。泳動バッファーには MOPS buffer (50 mM MOPS [pH 7.7], 50 mM Tris Base, 0.1% SDS, 1 mM EDTA) を用い、55 mA で電気泳動を行った。

2-5) Western Blotting

Nu PAGE ゲルから Immobilon-P 膜 (MILLIPORE 社) へのブロッティングは、セミドライ式ブロッティング装置 (ATTO 社) を用いて 1.0 mA/cm² で 90 分間行った。その後、Immobilon-P 膜を抗体反応用に 5% skim milk 溶液中において室温で 1 時間もしくは 4°C で一晩浸すことによりブロッキングを行った。

ブロッキング後、5% skim milk / TBST [137mM NaCl, 2.7mM KCl, 25mM Tris-Cl, 0.1% Tween20] 溶液で 1000 倍希釈した 1 次抗体を室温で 1 時間反応させた後、TBST 溶液で 5 分間 x3 回洗浄した。次に、5% skim milk / TBST 溶液で 5000 倍希釈した 2 次抗体を室温で 1 時間反応させ、TBST 溶液で 5 分間 x5 回洗浄した。抗体と反応させた Immobilon-P 膜を ECL Prime Western blotting detection reagent, 及び ECL Western blotting detection reagent (GE Healthcare 社) で化学発光させ検出した。

なお、ZNF598 抗体のみ 500 倍希釈で使用した。

2-6) 光架橋実験における培養細胞へのトランスフェクション

HEK293T 細胞を、100 mm Dish に 3.0×10^5 cells/ml となるように播種し、10%ウシ胎児血清を含む Dullbecco's modified Eagle's medium (: DMEM [nacalai tesque 社]) 中、37°C, 5% CO₂ 下で 24 時間培養した。

この細胞に PEI-Max (Polyethylenimine “Max” [Polysciences 社]) -プラスミド DNA

混合溶液を添加し、10%ウシ胎児血清を含む DMEM 中、37°C、5% CO₂ 下で培養することにより遺伝子発現を行った。

なお、各サンプルにつき 100 mm Dish を 10 枚使用した。

2-7) 光反応性アミノ酸 L-Photo-Methionine を用いた光架橋実験

1xPBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄) で細胞洗浄を行った後、L-Leucine (nacalai tesque 社)、L-Photo-Methionine (Thermo 社)、及び透析済み血清である Fetal Bovine Serum, dialyzed (Thermo 社) を含む Dullbecco' s Modified Eagle' s Limiting Medium (: DMEM-LM [Thermo 社]) で培地交換を行い、37°C、5% CO₂ 下で2時間培養した。2時間後、1xPBS で細胞洗浄を行い、Cycloheximide を含む1xPBS を添加し37°C、5% CO₂ 下で15分間培養した。この細胞に紫外線照射 (365 nm) を15分間行った後、1xPBS により細胞を剥離した。

2-8) FLAG tag 抗体を用いた免疫沈降、及び CTAB 精製による光架橋産物の精製

光架橋産物のみを得るために FLAG tag 抗体を用いた免疫沈降、及び tRNA 画分のみを精製するための CTAB 精製を行った。まず、光架橋後回収した細胞を Lysis buffer② (50 mM HEPES-KOH [pH 7.4], 150 mM NaCl, 1% NP-40, 20 μM MG132, 1 mM PMSF, 10 μg/ml Pepstatin A, 1 μM Benzamide, 10 μg/ml Leupeptin) により懸濁し、得られた細胞懸濁液に ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel (SIGMA 社) を添加し、4°Cで1.5時間ローテートした。遠心分離によりビーズ画分を回収し、Wash buffer (50 mM HEPES-KOH [pH 7.4], 150 mM NaCl, 1% NP-40) で3回洗浄した。再び遠心によりビーズ画分を回収し、Elution buffer (0.35M Bis-Tris [pH 6.5], 2% SDS, 0.1 M DTT, 20 μM MG132, 1 mM PMSF, 10 μg/ml Pepstatin A, 1 μM Benzamide, 10 μg/ml Leupeptin) を添加後、37°Cで1時間インキュベートすることにより溶出した。これを遠心し上清のみを回収した。

回収した上清に 2% CTAB 溶液 (Wako 社) 及び yeast tRNA (Invitrogen 社)/0.5 M NaAC 溶液を添加し、30°Cで10分間インキュベートした。これを15,000 rpm、室温、30分間で遠心分離し、tRNA 画分を含む沈殿を回収し Lysis buffer① による懸濁を行なった。懸濁後、Amicon Ultra 0.5 ml (MILLIPORE 社) を用いて溶液の濃縮を行なった。得られたサンプルに Sample buffer① および 0.1 M DTT を加えて室温で30分間処理した。

2-9) 質量分析用 NuPAGE 電気泳動と Flamingo 試薬によるゲル染色

質量分析結果へのケラチンの混入を防ぐためにプレキャストゲル (NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Gel [Invitrogen 社])を使用した。泳動バッファーには MOPS buffer を

用い, 55 mA で電気泳動を行った.

得られたゲルを固定液 (40% Ethanol, 10% 酢酸) 中で2時間, 室温で震盪した後, 1x Flamingo 試薬 (Flamingo™ Fluorescent Gel Stain [BIO RAD 社]) 中で一晩, 室温で染色した.

2-10) 質量分析

ゲルを DTT とヨードアセトアミドで還元アルキル化の後, トリプシンで一晩ゲル内消化した. 回収した消化液を 0.45 μm フィルターでろ過し, サンプルとした. 得られたサンプルはリニアイオントラップ-電場型フーリエ変換質量分析計 LTQ-Orbitrap XL (Thermo 社) により分析した.

分析で得られた raw data を, Mascot でデータベース解析した.

なお, 質量分析に関しては, 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科技術職員の倉田理恵さん, 大久保弘子さんに行って頂いた.

2-11) siRNA による遺伝子ノックダウンと培養細胞へのトランスフェクション

HEK293T 細胞を, 6 well plate に 2.0×10^4 cells/ml, もしくは 12 well plate に 1.5×10^5 cells/ml となるように播種し, 1xOpti-MEM® (gibco 社), Lipofectamine® RNAi MAX (Invitrogen 社), 及び siRNA からなる混合溶液を添加した. これを 10%ウシ胎児血清を含む Dullbecco's modified Eagle's medium 中, 37°C, 5% CO₂ 下で 48 時間培養した.

48 時間後, PEI-Max -プラスミド DNA 混合溶液を添加し, 10%ウシ胎児血清を含む DMEM 中, 37°C, 5% CO₂ 下で 24 時間培養することにより遺伝子発現を行った.

プラスミド DNA は 3xFLAG tag-8xHis tag-XBP1 [u+s] -HA tag [Wild type]/pcDNA3.1, 3xFLAG tag-8xHis tag-XBP1 [u+s] -HA tag [W256A]/pcDNA3.1, 及び 3xFLAG tag-8xHis tag-XBP1 [u+s] -HA tag [R30]/pcDNA3.1 を使用した. R30 は XBP1u の翻訳休止配列 (C 末端から 53 アミノ酸残基) を 30 個の Arg に置換したものである. また, 使用した siRNA については Table 5 に記載した.

2-12) 細胞回収と NuPAGE 用タンパク質抽出

HEK293T 細胞への遺伝子導入の 22 時間後に培地交換を行い, 37°C, 5% CO₂ 下で 2 時間培養した後, 細胞回収を行った. 細胞回収は, 1xPBS で細胞洗浄を行った後, Trypsin (0.01% Trypsin, 2 mM Cycloheximide) 添加により plate から剥離した細胞を培地で懸濁し, 500 g で 5 分間遠心することにより行った. 沈殿として回収した細胞は Lysis buffer①で懸濁した. マイクロプレートリーダー (Thermo 社) により総タンパク濃度を測定した後に濃度調整を行い, Sample buffer①, 及び 0.1 M DTT を加えて室温で 30 分間処理した.

2-13) 細胞回収と SDS-PAGE 用タンパク質抽出

1xPBS で細胞洗浄を行った後, Lysis buffer^③ (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 150 mM NaCl, 1% TritonX-100, 0.5% SDS, 1/100 Protease Inhibitor Cocktail, 10 μ M MG132, 1 mM PMSF) で細胞の剥離および懸濁を行なった. マイクロプレートリーダーにより総タンパク濃度を測定した後に濃度調整を行い, Sample buffer^② (2% SDS, 0.05 M Tris-HCl [pH 6.8], 10% Glycerol), 及び 0.1 M DTT を加えて室温で 30 分間処理した.

2-14) SDS-PAGE 電気泳動

SDS-PAGE ゲル (0.375 M Tris-HCl [pH 8.8], 10% Acrylamide, 0.1% SDS) を用いて電気泳動を行った. 泳動バッファー (25 mM Tris base, 192 mM Glycine, 0.1% SDS) を用い, 20 mA で電気泳動を行った.

リボソームタンパク質や ZNF598 のノックダウン効率の確認には SDS-PAGE を用いた.

2-15) FACS 解析における siRNA による遺伝子ノックダウンと培養細胞へのトランスフェクション

HeLa 細胞 (CLONTECH 社) を, 6 well plate に 1.25×10^5 cells/ml となるように播種し, 1xOpti-MEM[®], Lipofectamine[®] RNAi MAX, 及び siRNA からなる混合溶液を添加した. これを 10%ウシ胎児血清を含む Dullbecco's modified Eagle's medium 中, 37°C, 5% CO₂ 下で 48 時間培養した.

48 時間後, PEI-Max -プラスミド DNA 混合溶液を添加し, 10%ウシ胎児血清を含む DMEM 中, 37°C, 5% CO₂ 下で 24 時間培養することにより遺伝子発現を行った.

プラスミド DNA は pEGFP-C1, pmCherry-C1, EGFP-XuC53 [Wild type]-mCherry/pcDNA3.1, [S255A]-mCherry/pcDNA3.1, EGFP-XuC53 [W256A]-mCherry/pcDNA3.1 を使用した. また, 使用した siRNA については Table 5 に記載した.

2-16) FACS 解析

HeLa 細胞への遺伝子導入の 22 時間後に培地交換を行い, 37°C, 5% CO₂ 下で 2 時間培養した後, 細胞回収を行った. 細胞回収は, 1xPBS で細胞洗浄を行った後, Trypsin 添加により plate から剥離した細胞を培地で懸濁し 500 g で 5 分間遠心することにより行った. 沈殿として回収した細胞は 1xPBS で懸濁し, サンプル化を行った.

得られたサンプルは, FACSAria[™] II (BD 社) を用いて解析した. 測定の際に検出器として Octagon [488 nm blue laser] を, フィルターとして, FITC (蛍光波長 : 530/30 nm [BD 社]) および PE-Texas Red[®] (蛍光波長 : 610/20 nm [BD 社]) を用いた.

2-17) リボソームタンパク質ノックダウン条件下における ³⁵S-Met/Cys を用いたタンパク質合成活性の測定

HEK293T 細胞を, 12 well plate に 1.5×10^5 cells/ml となるように播種し, siRNA により標的遺伝子 (RPL3, RPL4, RPL7, RPL39) をそれぞれノックダウンした. 48 時間後にサンプル間での細胞数を合わせ, その 24 時間後に Met/Cys free DMEM ([Gibco 社] 10%FCS, 2mM L-Glutamine, 1x ピルビン酸ナトリウム) に交換し, 37°C, 5% CO₂ 下で 30 分間培養した. 続いて, 740 kBq/ml ³⁵S-Met/Cys を含む Met/Cys free DMEM (10%FCS, 2mM L-Glutamine, 1x ピルビン酸ナトリウム) に交換し, 37°C, 5% CO₂ 下でラベルを 30 分間行った. 1xPBS で細胞洗浄を行った後, Lysis buffer②で懸濁し, 総タンパク濃度を測定した後に濃度調整を行った. TCA 処理した Transfer filter にサンプルをトラップし, 5% TCA, 及び 95% エタノールで洗浄後, 乾燥した. これに液体シンチレーションカクテルを添加し, 液体シンチレーションカウンターで放射線量を測定した.

また, 得られたサンプルを SDS-PAGE し, オートラジオグラフィーにより検出した.

2-18) リボソームタンパク質ノックダウン条件下における Harringtonine-chase 実験

HEK293T 細胞を, 12 well plate に 1.5×10^5 cells/ml となるように播種し, siRNA により標的遺伝子 (RPL3, RPL4, RPL7, RPL39) をそれぞれノックダウンした. 62 時間後に培地交換を行い 37°C, 5% CO₂ 下で 2 時間培養した後, 翻訳開始阻害剤である Harringtonine [終濃度 2µg/ml] を含む培地に交換し, 37°C, 5% CO₂ 下で培養した. 翻訳開始阻害後, 10 分, 20 分, 30 分, 40 分で培地を除去し Lysis buffer③で懸濁した. 総タンパク濃度を測定した後に濃度調整を行い, Sample buffer②, 及び 0.1 M DTT を加えて室温で 30 分間処理した. なお, Harringtonine による処理時間が 2 時間, 4 時間, 6 時間, 8 時間の場合については, 全長タンパク質や翻訳放棄産物の分解を避けるため, 培地交換の際に 20 µM MG132 を添加した. その他の操作については同様の操作を行った.

得られたサンプルは NuPAGE, 及び Western Blotting により分析した.

2-19) Flp-In™ System を使用したリボソームタンパク質 Stable transfectant 株の作製と目的遺伝子の発現誘導

転写活性遺伝子座に単一の安定な FRT サイトが組み込まれている Flp-In™ T-REx™ 293 Cell Line (Thermo 社) に トランスフェクション試薬である PEI-Max を使用して Myc-tag とリボソームタンパク質の遺伝子を融合した Flp-In 発現ベクターと Flp リコンビナーゼベクターである pOG44 を共発現させた. なお, Flp-In 発現ベクターには hygromycin B 耐性遺伝子が組み込まれており, 目的遺伝子が導入され

た細胞は hygromycin B を含む選択培地での選抜が可能になる。トランスフェクションの 24 時間後、培地交換を行い、更にその 24 時間後、50 μ g/ml hygromycin B を含む DMEM に交換し、薬剤耐性マーカーによる選抜を行うことにより安定発現株を樹立した。

今回用いている T-RExTM 細胞株は基礎発現レベルが低く、Tetracycline や Doxycycline により誘導されると高い発現を示す。そのため、解析に用いる前に Doxycycline を 10 ng/ml 含む培地に交換し、目的遺伝子の発現を誘導した。

2-20) Myc tag 抗体を用いた Myc tag 融合 RPL4 Stable transfectant 株におけるリボソーム複合体形成の確認

樹立した Myc tag 融合 RPL4 Stable transfectant 株が他のリボソームタンパク質と複合体を形成しているか否かを検証するために、Myc tag 抗体を用いて共免疫沈降 (Co-IP; Co-Immunoprecipitation) を行った。

Doxycycline 添加により予め目的遺伝子の発現を誘導しておいた細胞を Lysis buffer④ (50 mM HEPES-KOH [pH 7.4], 150 mM NaCl, 1% NP-40, 20 μ M MG132, 1 mM PMSF, 10 μ g/ml Pepstatin A, 1 μ M Benzamide, 10 μ g/ml Leupeptin, 1 mg/ml Cycloheximide) により懸濁し、得られた細胞懸濁液に Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare 社) を添加し、プレクリアを行った。遠心分離により上清を回収し、Myc-Tag (9B11) Mouse mAb (Cell Signaling 社) を 1/1000 量添加し、4 $^{\circ}$ Cで一晩ローテートした。続いて、Protein G Sepharose 4 Fast Flow を添加し、4 $^{\circ}$ Cで 30 分間ローテートした後、遠心分離によりビーズ画分を回収し、Wash buffer で 4 回洗浄した。再び遠心によりビーズ画分を回収し、Sample buffer①と 0.1 M DTT を添加後、37 $^{\circ}$ Cで 30 分間インキュベートすることにより溶出した。これを遠心し上清のみを回収した。

得られたサンプルは NuPAGE, 及び Western Blotting により分析した。

2-21) Myc tag 融合 RPL4 Stable transfectant 株における siRNA による 内在性 RPL4 ノックダウン実験

Doxycycline 添加により予め目的遺伝子の発現を誘導しておいた細胞を使用した。siRNA による遺伝子ノックダウンとトランスフェクションの方法は、HEK293T 細胞で行う場合 (2-11) と同様の方法で行った。なお、細胞回収や NuPAGE は 2-12 と同様の方法で行った。

2-22) リボソームタンパク質ノックダウン条件下における XBP1 mRNA のスプライシング効率の検証

HEK293T 細胞を、12 well plate に 1.5 x 10⁵ cells/ml となるように播種し、siRNA に

より標的遺伝子 (RPL3, RPL4, RPL7, RPL39) をそれぞれノックダウンした. 62 時間後に培地交換を行い 37°C, 5% CO₂ 下で 2 時間培養した後, 小胞体ストレス誘導剤である Tunicamycin (終濃度 2µg/ml) を含む培地に交換し, 37°C, 5% CO₂ 下で培養した. ストレス誘導後, 2 時間, 4 時間, 6 時間, 8 時間で培地を除去し, Isogen-LS, 及び 2-propanol により RNA の抽出を行った. 含まれている DNA を DNase I で 37°C, 30 分処理することにより消化し, 再び Isogen-LS および 2-propanol により RNA の抽出を行った. 回収した RNA は DEPC 水に溶解させ定量を行い, 濃度調整を行った.

得られた RNA を鋳型として, ランダムプライマーおよび逆転写酵素 M-MLV Reverse Transcriptase, RNase H Minus, Point Mutant により cDNA の合成を行った. cDNA 合成後, 含まれている RNA は RNase H (TaKaRa 社) で 37°C, 20 分処理することにより消化した. 得られた cDNA を鋳型として, ヒト XBP1 特異的プライマー (F6 5x [5' GAACCAGGAGTTAAGACAGC 3'] と R6 3x [5' AGTCAATACCG CCAGAATCC 3']) により XBP1u, 及び XBP1s を増幅した. サーマルサイクラーの設定は, 25°Cで 10 秒, 68°Cで 1 分を 30 サイクルとした.

PCR 産物を 10xLoading buffer (TaKaRa 社) によりサンプル化し, 6%ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動を行った. ゲルをエチジウムブロマイドにより染色し, LAS-4000 による検出を行った.

2-23) 抗体一覧

2-23-1) 一次抗体

ANTI-FLAG M2 Monoclonal Antibody, Purified IgG (SIGMA 社)

Purified anti-HA. 11 Epitope Tag Antibody (Covance 社)

GAPDH (14C10) Rabbit mAb (Cell Signaling 社)

Anti-RPL3 antibody (ab154882) (abcam 社)

Anti-RPL4 antibody [EPR12304] (ab154882) (abcam 社)

Anti-RPL7 antibody (ab72550) (abcam 社)

Anti-RPL39 antibody (ab74740) (abcam 社)

Anti-ZNF598 antibody (ab135921) (abcam 社)

Myc-Tag (9B11) Mouse mAb (Cell Signaling 社)

IRE1α (14C10) Rabbit mAb (Cell Signaling 社)

2-23-2) 二次抗体

Goat anti-mouse IgG HRP (Jackson 社)

anti-rabbit IgG (H+L chain)-HRP (MBL 社)

3) 結果

3-1) XBP1u 翻訳休止時におけるリボソームトンネル内に収まるアミノ酸残基数の決定

XBP1u の翻訳休止が起こっている際、リボソームトンネル内にいくつのアミノ酸残基が収まった状態にあるのかを決定した。方法としては、FLAG tag-XBP1u-HA tag /pBSII SK を鋳型として *in vitro* transcription により mRNA を合成し、この mRNA をウサギの網状赤血球抽出液 (RRL) を用いて *in vitro* translation し、合成されつつある新生ポリペプチド鎖に含まれる Cys 残基を Mal-PEG を用いて修飾した。今回用いたコンストラクションは、XBP1u に含まれる 3 つの Cys 残基 (204 番目, 215 番目, 247 番目) を全て Ser に置換した SSS mutant を鋳型にして XBP1u の 220 番目から 240 番目のアミノ酸残基をそれぞれ 1 つずつ Cys に置換したものを使用した。また、Mal-PEG により 1 つの Cys 残基 (215 番目) が修飾を受けるポジティブコントロールとして SCS mutant を用いた。修飾を受けないネガティブコントロールとしては SSS mutant を用いた。Cys 残基がリボソームトンネルから露出している場合には、Mal-PEG による修飾を受け、XBP1u の翻訳休止産物に Mal-PEG の分子量 (約 2 kDa) が加わったバンドが修飾産物として見られる (Figure 2)。一方、Cys 残基がリボソームトンネルから露出していない場合には、Mal-PEG による修飾を受けないため、修飾産物は見られない。

まず、220 番目の Leu 残基から 240 番目の Pro 残基について 5 アミノ酸残基間隔で Cys に置換した L220C, P225C, S230C, Q235C, 及び P240C について 修飾産物の有無を検証した。翻訳休止産物の tRNA は強塩基性条件下で分解されてしまうため、中性ゲルを用いた電気泳動である NuPAGE による分離を行い、Western Blotting による検出を行った (Figure 3)。Figure 3 に示されている Western Blotting の結果は、FLAG tag 抗体により検出したものである。50 kDa に見られるバンド (青矢頭) は、その分子量から未修飾の翻訳休止産物と考えられる。なぜならば、翻訳休止産物は Peptidyl-tRNA を形成しているため、全長タンパク質の分子量 (30 kDa) に tRNA の分子量 (16-18 kDa) が加わった 46-48 kDa と推定されるためである。また、上に見られるバンド (緑矢頭) は、修飾を受けた翻訳休止産物と考えられる。修飾効率は検出された全タンパク質に対する修飾産物の割合として算出した (Figure 3)。一ヶ所修飾を受ける変異体である SCS mutant では、修飾産物の割合が 86% であり、L220C では SCS mutant に次いで高い値である 67% であった。これに対し、P225C では 17% と修飾効率が大きく低下していることが分かった。また、S230C, Q235C, 及び P240C の修飾産物の割合は、修飾を受けない SSS mutant とほぼ同程度である 3-7% にまで低下していることが分かった。この結果より、Mal-PEG による修飾を受けるか否かの境界、すなわち、リボソームトンネルから露出しているか否かの境界が、L220 から S230 の間にあると考え、221 番目の Pro 残基から 229 番目の Ser 残基についても Cys に置換した変異体を作製し、Mal-PEG による修飾効率を検証することにした。

Figure 4 に L220C, P221C, Q222C, S223C, L224C, P225C, A226C, W227C, R228C, S229C, 及び S230C についての結果を示している. 先程と同様に, L220C の修飾効率は SCS mutant に次いで高い値である 71%であった. P221C, Q222C, 及び S223C では L220C の約半分の値である 35-52%に低下していた. 加えて, L224C, P225C, A226C, 及び W227C ではさらに低下し, 18%-24%という値を示した. また, R228C を境に殆ど修飾産物を検出できず, R228C, S229C, 及び S230C では SSS mutant と同程度の 4-6%という値を示した.

これらの結果より, XBP1u の翻訳休止が起こっている際, 220 番目の Leu 残基はリボソームトンネルの外に露出しており, 228 番目の Arg 残基はリボソームトンネル内に収まっている可能性が示唆された. つまり, 哺乳動物細胞における XBP1u の翻訳休止時には, 33-40 個のアミノ酸残基がトンネル内に収まっていると考えられる. 221 番目の Pro 残基から 227 番目の Trp 残基については修飾される場合とされない場合があるが, このような現象が起こる理由については考察で詳細を述べる.

3-2) XBP1u 翻訳休止時における XBP1u 新生ポリペプチド鎖と近接するリボソームタンパク質の同定

XBP1u の翻訳休止が起こっている際に, XBP1u 新生ポリペプチド鎖と近接するリボソームタンパク質の同定を光反応性の Met (Figure 5) を用いた光架橋法, 及び質量分析法を用いて行った.

まず, 使用するコンストラクションについての検討を行った. Wild type の XBP1u は開始アミノ酸である Met 残基を含めて 5 つの Met 残基を持ち, 翻訳休止時には, 260 番目の Met 残基がリボソームトンネル内に存在すると考えられる (Figure 6). 本実験では, 初めに, 260 番目の Met 残基を他のアミノ酸 (Gln, His, Leu, Ile, Phe, Lys) に置換することで翻訳休止時に Met 残基がリボソームトンネル内に存在しないコンストラクションを作製した (M260X series [Figure 6]). M260X series について, Wild type と同程度の翻訳休止が起こるか否かを, *in vitro* transcription, 及びウサギの網状赤血球抽出液 (RRL) を用いた *in vitro* translation により検証した (Figure 7). Western Blotting の結果は FLAG tag 抗体, 及び HA tag 抗体により検出したものである. 37 kDa 付近のバンド (白矢頭) は FLAG tag 抗体と HA tag 抗体の両方で検出されていることから, 全長タンパク質であると考えられる. 一方, HA tag 抗体では検出されず FLAG tag 抗体でのみ検出されている 50 kDa 付近のバンド (赤矢頭) は, 翻訳休止産物由来のバンドであると考えられる. なお, 翻訳休止産物の方が全長タンパク質に比べて分子量が大きい理由は, 翻訳途中の新生ポリペプチド鎖の C 末端に tRNA (分子量 : 16-18 kDa) が共有結合しているためである. コントロールとして, Wild type, 翻訳休止の強い変異体である S255A, 翻訳休止の弱い変異体である W256A を用いた. S255A では Wild type に比べ, 翻訳時間が 15 分と 30 分の両方で翻訳休止産物が強く検出されており, 翻訳休止が強くなっていることが確認できた. 一方, W256A で

は Wild type に比べ、翻訳休止産物の検出強度が低下しており、翻訳休止が弱くなっていた。また、Wild type, S255A 及び W256A の HA tag 抗体による検出結果から、全長タンパク質の検出強度は翻訳休止の強さに逆相関しており、翻訳休止の弱い W256A で最も強く検出されている。M260X series においては、その全てで翻訳休止産物を確認できた。しかし、M260H, M260L, M260I, 及び M260K では、翻訳時間が 30 分になると Wild type に比べて翻訳休止産物の検出強度が低下していることから、翻訳休止の強さが弱くなっていると考えられる。一方、M260Q, 及び M260F では、翻訳時間が 15 分と 30 分の両方で Wild type と同程度の翻訳休止産物が検出されていることから、Wild type と同程度の翻訳休止が起きていると考えられる。特に、M260Q では、HA tag 抗体による検出において Wild type と同程度の全長タンパク質が検出されていた。これらの結果から、M260Q が最も翻訳休止の強度に影響を与えない変異体であると考えられる。続いて、M260Q を鋳型にして XBP1u の最小翻訳休止配列の Ala スキャニングで影響を受けなかった 7 つのアミノ酸残基 (236 番目の Lys 残基, 237 番目の Asp 残基, 238 番目の Pro 残基, 239 番目の Val 残基, 242 番目の Gln 残基, 248 番目の Gln 残基, 及び 254 番目の Pro 残基 [Figure 1D]) をそれぞれ Met に置換したコンストラクションを作製した (M260Q series [Figure 8]). M260Q series を使用することにより、翻訳休止時、リボソームトンネル内に収まっている XBP1u 新生ポリペプチド鎖には Met 残基が 1 つのみ存在することになるため、光反応性の Met が取り込まれ架橋される位置の違いにより、異なるリボソームタンパク質を同定することができると考えた。これらの変異体においても、Wild type と同程度の翻訳休止が起こるか否かを *in vitro* transcription, 及び RRL を用いた *in vitro* translation により検証した (Figure 9). その結果、7 つの変異体において、その全てで Wild type と同程度の翻訳休止産物 (赤矢頭) を確認できた。よって、これらの変異体を光架橋実験に用いることにした。

作製した M260Q series を哺乳動物細胞に一過的に発現させ、光反応性 Met を含む培地で培養し、XBP1u 新生ポリペプチド鎖中に光反応性 Met を取り込ませた。そこに UV を照射し、XBP1u 新生ポリペプチド鎖中の光反応性 Met と近接するリボソームタンパク質間で共有結合を形成させた。このようにして得られた光架橋産物を FLAG tag 抗体を用いた免疫沈降 (IP), 及び CTAB 精製により XBP1u 新生ポリペプチド鎖・リボソームタンパク質複合体のみを回収した。陽イオンの界面活性剤である CTAB を用いることにより、tRNA 画分のみ、つまり XBP1u 新生ポリペプチド鎖由来の産物のみを精製することができる。翻訳休止産物の tRNA は強塩基性条件下で分解されてしまうため、得られたサンプルは中性ゲルを用いた電気泳動である NuPAGE による分離を行い、Flamingo 染色により光架橋産物の確認を行った (Figure 10). 50 kDa 付近に見られるバンド (赤矢頭) がその分子量から翻訳休止産物であると考えられ、翻訳休止産物よりも分子量が大きい位置に見られるバンド (黄矢頭) が他のタンパク質と翻訳休止産物 (XBP1u 新生ポリペプチド鎖) との複合体 (光架橋産物) であると考えられる。M260Q series においては光架橋産物と思われるバンドが

複数検出され、XBP1u 新生ポリペプチド鎖は翻訳休止時に複数のタンパク質と近接することが示唆された。ネガティブコントロールである光架橋していない Wild type, 及び光架橋した W256A (翻訳休止の弱い変異体) においては、50 kDa より大きいタンパク質は強く検出されなかった。これらのサンプルについて、質量分析によって検出されたリボソームタンパク質を Table 6 に示した。2つのネガティブコントロールにおいて、リボソームタンパク質は検出されなかった。一方、M260Q series においては RPL3, RPL4, RPL6, RPL7, RPL13, RPL18, RPL19, 及び RPL22 が検出された。特に、RPL3, RPL4 及び RPL7 に関しては、ほぼ全ての変異体で検出されており、翻訳休止時に XBP1u 新生ポリペプチド鎖と近接することが強く示唆された。なお、リボソームトンネル内において XBP1u 新生ポリペプチド鎖が持つ Met 残基が 1 つであるにもかかわらず、複数のリボソームタンパク質が架橋され、同定された理由については考察で詳細を述べる。

3-3) リボソームタンパク質 RPL3, RPL4, 及び RPL7 が XBP1u の翻訳休止に与える影響

翻訳休止時に XBP1u 新生ポリペプチド鎖に近接するリボソームタンパク質として同定された RPL3, RPL4, 及び RPL7 についてノックダウン実験を行った。哺乳動物細胞において RPL3, RPL4, 及び RPL7 をそれぞれ siRNA によりノックダウンし、Figure 11 に示した XBP1u コンストラクションを一過的に発現させ、細胞ライセートを回収しサンプル化した。本実験では、全長タンパク質、翻訳休止産物、翻訳放棄産物の同定を容易にするために XBP1u の終止コドンに Cytosine (C) を挿入し、フレームシフトを起こすことで下流に融合した XBP1s の C 末端の配列が翻訳されるコンストラクションを使用した (曾川愛守榮作製, Figure 11)。なお、翻訳休止産物の tRNA は強塩基性条件下で分解されてしまうため、中性ゲルを用いた電気泳動である NuPAGE による分離を行い、Western Blotting により翻訳休止産物の検出を行った。また、リボソームタンパク質のノックダウン効率については、SDS-PAGE, 及び Western Blotting により確認した。その際、RPL3 抗体, RPL4 抗体, 及び RPL7 抗体を使用した。

なお、使用した siRNA の名前, ID, 及び配列は Table 5 に記載した。コントロールとして使用した Silencer[®] Select Negative Control #1 siRNA はマウス, ラット, 及びヒトの遺伝子配列との有意な配列類似性を持たず、遺伝子発現, 及び細胞表現型へ有意な影響を及ぼさない。

3-3-1) RPL3 ノックダウンが XBP1u の翻訳休止に与える影響

まず、siRPL3 を用いてノックダウンを行った場合の RPL3 の発現量の変化を確認した (Figure 12)。コントロールとして Silencer[®] Select Negative Control #1 siRNA を用いた場合 (Control) と比較して、#1 では 3 割程度、#2 では 8 割程度まで RPL3 の発現

量が減少していた。続いて、RPL3 ノックダウンが XBP1u の翻訳休止に与える影響を確認した (Figure 13)。W256A では Control と siRPL3 を用いた場合とで全長タンパク質 (白矢頭) の検出強度に大きな差は見られず、RPL3 ノックダウンがリボソームの翻訳自体に影響を与えているとは考えられなかった (Figure 13A)。なお、全長タンパク質が2本のバンドとして検出されるが、上のバンドは糖鎖修飾を受けた全長タンパク質、下のバンドは非糖鎖修飾の全長タンパク質由来のものである。Wild type においては、Control と比較して siRPL3 を用いた場合に、翻訳休止産物 (赤矢頭) の検出強度が低下していた。特に、ノックダウン効率の良い#1 においては大きく低下していた。また、翻訳休止産物の検出強度の低下に伴って翻訳放棄産物 (黒矢頭) の検出強度も低下していることが分かった。翻訳休止産物の検出強度を定量した結果、ノックダウン効率の低い#2 では Control と同程度の翻訳休止の強さを示したが、ノックダウン効率の高い#1 では4割程度にまで低下していた (Figure 13B)。また、全長タンパク質、翻訳休止産物、翻訳放棄産物の合計に対する全長タンパク質、翻訳休止産物、及び翻訳放棄産物の割合をそれぞれ算出した結果、ノックダウン効率の高い#1 では翻訳休止産物と翻訳放棄産物が減少するのに伴って全長タンパク質が増加していた (Figure 13C)。これらの結果より、RPL3 ノックダウンにより、翻訳休止産物が減少することが示され、RPL3 が XBP1u の翻訳休止に関与することが示唆された。

3-3-2) RPL4 ノックダウンが XBP1u の翻訳休止に与える影響

RPL3 ノックダウン時と同様に siRPL4 を用いてノックダウンを行った場合の RPL4 の発現量の変化を確認した (Figure 14)。#1、#2 ともにノックダウン効率が非常に高く、#2 においては RPL4 はほぼ発現していなかった。続いて、RPL4 ノックダウンが XBP1u の翻訳休止に与える影響を確認した (Figure 15)。W256A では、Control と siRPL4 を用いた場合とで全長タンパク質 (白矢頭) の検出強度に大きな差は見られず、RPL4 ノックダウンがリボソームの翻訳自体に影響を与えているとは考えられなかった (Figure 15A)。一方、Wild type においては、Control と比較して siRPL4 を用いた場合には翻訳休止産物 (赤矢頭) の検出強度が低下していた。また、翻訳休止産物の検出強度の低下に伴って翻訳放棄産物 (黒矢頭) の検出強度も低下していることが分かった。翻訳休止産物の検出強度を定量した結果、Control と比較して#1 では4割程度、よりノックダウン効率の高い#2 では3割程度にまで低下していた (Figure 15B)。また、全長タンパク質、翻訳休止産物、翻訳放棄産物の合計に対する全長タンパク質、翻訳休止産物、及び翻訳放棄産物の割合をそれぞれ算出した結果、#1、#2 ともに翻訳休止産物と翻訳放棄産物が減少するのに伴って全長タンパク質が増加していた (Figure 15C)。これらの結果より、RPL4 ノックダウンにより、翻訳休止産物が減少することが示され、RPL3 と同様に RPL4 が XBP1u の翻訳休止に関与することが示唆された。

3-3-3) RPL7 ノックダウンが XBP1u の翻訳休止に与える影響

siRPL7 を用いてノックダウンを行った場合の RPL7 の発現量の変化を確認した (Figure 16). Control と比較して#1 では 4 割程度, #2 では 1 割程度まで RPL7 の発現量が減少していた. 続いて, RPL7 ノックダウンが XBP1u の翻訳休止に与える影響を確認した (Figure 17). W256A では, Control と siRPL7 を用いた場合とで全長タンパク質 (白矢頭) の検出強度に大きな差は見られず, RPL7 ノックダウンがリボソームの翻訳自体に影響を与えているとは考えられなかった (Figure 17A). 一方, Wild type においては, Control と比較して siRPL7 を用いた場合には翻訳休止産物 (赤矢頭) の検出強度が低下していた. また, 翻訳休止産物の検出強度の低下に伴って翻訳放棄産物 (黒矢頭) の検出強度も低下していることが分かった. 翻訳休止産物の検出強度を定量した結果, Control と比較して#1 では 3 割程度, #2 では 2 割程度にまで低下していた (Figure 17B). また, 全長タンパク質, 翻訳休止産物, 翻訳放棄産物の合計に対する全長タンパク質, 翻訳休止産物, 及び翻訳放棄産物の割合をそれぞれ算出した結果, #1, #2 とともに翻訳休止産物と翻訳放棄産物が減少するのに伴って全長タンパク質が増加していた (Figure 17C). これらの結果より, RPL7 ノックダウンにより, 翻訳休止産物が減少することが示され, RPL3, RPL4 と同様に RPL7 が XBP1u の翻訳休止に関与することが示唆された.

3-4) リボソームトンネルを構成するリボソームタンパク質 RPL39 が XBP1u の翻訳休止に与える影響

序論でも述べたように, 2015 年, ヒトリボソームの構造が解明され, リボソームトンネルを構成するリボソームタンパク質として RPL4, 及び RPL39 が同定された (Khatler, H. *et al.*, 2015). 本研究により XBP1u 新生ポリペプチド鎖と近接するリボソームタンパク質として RPL4 は同定されたが, RPL39 は同定されなかった. そこで, RPL39 のノックダウン実験が, 本研究で行った RPL3, RPL4 及び RPL7 のノックダウン実験に対するネガティブコントロールになると考え, これら 3 つのノックダウン実験と同様に RPL39 のノックダウン実験を行った.

まず, siRPL39 を用いてノックダウンを行った場合の RPL39 の発現量の変化を確認した (Figure 18). Control と比較して#1 では 2 割程度, #2 では 7 割程度まで RPL39 の発現量が減少していた. 続いて, RPL39 ノックダウンが XBP1u の翻訳休止に与える影響を確認した (Figure 19). W256A では, Control と siRPL39 を用いた場合とで全長タンパク質 (白矢頭) の検出強度に大きな差は見られず, RPL39 ノックダウンがリボソームの翻訳自体に影響を与えているとは考えられなかった (Figure 19A). Wild type においては, Control と siRPL39 を用いた場合とで翻訳休止産物 (赤矢頭) の検出強度に大きな差は見られなかった. また, 翻訳放棄産物 (黒矢頭) についても大きな差は見られなかった. 翻訳休止産物の検出強度を定量した結果, ノックダウン効率の高い#1 においても, Control と比較して 7 割程度の翻訳休止産物が検出され, RPL3, RPL4,

及び RPL7 に比べ翻訳休止に与える影響が小さいことが示唆された (Figure 19B). また, 全長タンパク質, 翻訳休止産物, 翻訳放棄産物の合計に対する全長タンパク質, 翻訳休止産物, 及び翻訳放棄産物の割合をそれぞれ算出した結果, ノックダウン効率の高い#1 についても Control との間に大きな差は見られなかった (Figure 19C). これらの結果より, RPL39 のノックダウンによる翻訳休止産物の検出強度の変化は, RPL3, RPL4, 及び RPL7 と比較すると小さいことが分かり, RPL39 の XBP1u の翻訳休止への関与が RPL3, RPL4, 及び RPL7 に比べ小さいことを示唆している.

3-5) リボソームタンパク質 RPL3, RPL4, RPL7, 及び RPL39 ノックダウン条件下における XBP1u 翻訳休止の単一細胞レベルでの解析

リボソームタンパク質ノックダウン条件下における XBP1u 翻訳休止の NuPAGE, 及び Western Blotting による解析に加えて, フローサイトメトリー (FACS Aria™ II) を用いた単一細胞レベルでの解析も行った. FACS は個々の細胞が発する蛍光強度を測定することができ, タンパク質の発現レベル等を定量的に解析することができる. 本研究では, これら2つの実験手法により得られた結果が一致するか否かを検証した.

哺乳動物細胞において RPL3, RPL4, RPL7, 及び RPL39 をそれぞれ siRNA によりノックダウンし, Figure 20 に示した EAC (EGFP-Arrest sequence-mCherry) [Wild type] を一過的に発現させた. この細胞を FACS を用いて単一細胞レベルで解析した. 加えて, コントロールとしてノックダウンをしていない哺乳動物細胞において 翻訳休止の弱い EAC [W256A] と翻訳休止の強い EAC [S255A] を一過的に発現させたものについても解析した. EAC は XBP1u の翻訳休止配列の上流に EGFP を, 下流に mCherry を融合している. 翻訳休止が弱い場合は翻訳休止による発現抑制が起こらないために, 緑色蛍光と赤色蛍光が強く, 且つ細胞内のほとんどが全長タンパク質となるため, 緑色蛍光と赤色蛍光が同じ比率で発現し, 直線状に並んだ細胞集団が検出される. 一方, 翻訳休止が強い場合は翻訳休止による発現抑制が引き起こされ, 翻訳休止が起こらない場合に比べて緑色蛍光と赤色蛍光が弱くなり, 且つ EAC の全長タンパク質に対して翻訳休止中の産物が多くなり, 赤色蛍光に比べて緑色蛍光が強い細胞集団が検出される.

解析の結果, EAC [W256A] では, 翻訳休止が弱く翻訳が効率良く行われるため, 緑色蛍光と赤色蛍光が強く, かつ緑色蛍光と赤色蛍光が同じ比率で発現していることを示すように直線状に細胞集団が検出された (Figure 21). 一方, EAC [Wild type] では強い蛍光強度を示す細胞集団が減少することに加え, 直線状に分布する細胞集団が減少していた. 翻訳休止の強い EAC [S255A] では, さらに強い蛍光強度を示す細胞集団が減少し, 直線状に分布する細胞集団も減少していた.

これらのコントロールを参考に, リボソームタンパク質ノックダウン条件下における結果を検証すると, Silencer® Select Negative Control #1 siRNA をノックダウンに使用した Control では EAC [Wild type] とほぼ同じパターンでプロットが分布してい

るのに対し, siRPL3, siRPL4, 及び siRPL7 では強い蛍光強度を示す細胞集団が増加し, 直線状にプロットが分布する傾向にあることが示された (Figure 22). 特に, ノックダウン効率が良く, NuPAGE・Western Blotting による検証において翻訳休止に与える影響が大きいことが示唆された siRPL3#1, siRPL4#1, siRPL4#2, siRPL7#1, siRPL7#2 においては Control と比較して直線状に分布する細胞集団が増えていることが示された. 一方, siRPL39 では siRPL3, siRPL4, 及び siRPL7 と比較して直線状に分布する細胞集団が少ないことが示された.

これらの結果は, RPL3, RPL4, 及び RPL7 が XBP1u の翻訳休止に関与している可能性が高く, RPL39 はその可能性が低いことを示唆しており, NuPAGE・Western Blotting で得られた結果と一致する.

3-6) リボソームタンパク質ノックダウン条件下におけるタンパク質合成活性

リボソームタンパク質ノックダウンが XBP1u の翻訳休止のみならず全体のタンパク質合成活性に影響を与えているか否かをラジオアイソトープ (RI) を用いて検証した.

哺乳動物細胞において RPL3, RPL4, 及び RPL7 をそれぞれ siRNA によりノックダウンし, 飢餓状態にした後, ³⁵S-Met/Cys によるラベルを行い, 細胞ライセートを回収しサンプル化した. 得られたサンプルに液体シンチレーションを添加し, シンチレーションカウンターにより放射線量を測定した. また, 得られたサンプルは SDS-PAGE し, オートラジオグラフィーにより検出した.

Non-knockdown, 及び Silencer[®] Select Negative Control #1 siRNA をノックダウンに使用した Control はほぼ同程度の放射線量を示した (Figure 23). ノックダウン効率が良く, 且つ XBP1u の翻訳休止に与える影響が大きい siRPL3#1, siRPL4#1, siRPL4#2, siRPL7#1, siRPL7#2 では Non-knockdown や Control に比べ, 放射線量が 3, 4 割程度まで低下, すなわちタンパク質合成活性が 3, 4 割程度まで低下していることが分かった. 一方, siRPL3#2, siRPL39#1, siRPL39#2 では, 放射線量が Non-knockdown や Control に比べ 7, 8 割程度まで低下しているが, ノックダウン効率の良い siRPL3#1, siRPL4#1, siRPL4#2, siRPL7#1, siRPL7#2 と比較すると高いタンパク質合成活性を持つことが分かった. これらの結果より, リボソームタンパク質のノックダウン効率とタンパク質合成活性が相関していることが示唆された.

3-7) リボソームタンパク質ノックダウン条件下における XBP1u 翻訳休止産物の経時的变化

リボソームタンパク質ノックダウンによる XBP1u の翻訳休止への影響を経時的に検証するために, 翻訳開始阻害剤である Harringtonine 添加後, 経時的に全長タンパク質と翻訳休止産物の割合を調べた.

哺乳動物細胞において RPL3, RPL4, RPL7, 及び RPL39 をそれぞれ siRNA によりノックダウンし, Figure 11 に示した XBP1u コンストラクションをトランスフェクションした後, 培養液に Harringtonine を添加し, 経時的に細胞ライセートを回収しサンプル化した. なお, 0 時間後から 8 時間後までの経時的変化を検証した実験においては, ノックダウン効率の高い siRPL3#1, siRPL4#2, siRPL7#2, 及び siRPL39#1 のみを使用した. 翻訳休止産物の tRNA は強塩基性条件下で分解されてしまうため, 中性ゲルを用いた電気泳動である NuPAGE による分離を行い, Western Blotting により翻訳休止産物の検出を行った.

3-7-1) 0 時間後から 8 時間後までの経時的変化

初めに, Non-knockdown 条件下における Wild type, S255A, W256A の翻訳休止の経時的変化を 0 時間後から 2 時間毎に 8 時間後まで検証した (Figure 24). Wild type, S255A では 8 時間後まで翻訳休止産物 (赤矢頭) が検出されるのに対し, W256A では 0 時間の時点で翻訳休止産物を殆ど検出できなかった. また, Harringtonine 添加時にプロテアソームインヒビターを添加していないため時間経過に伴って全長タンパク質 (白矢頭) と翻訳放棄産物 (黒矢頭) は分解された.

続いて, リボソームタンパク質ノックダウン条件下における Wild type の翻訳休止の経時的変化を 0 時間後から 2 時間毎に 8 時間後まで検証した (Figure 25, 26). Silencer[®] Select Negative Control #1 siRNA をノックダウンに使用した Control においては, 0 時間の時点で翻訳休止産物の割合が約 30%であるのに対し, siRPL3#1, siRPL4#2, siRPL7#2 の場合, 約 10-20%に減少していた. 一方, 全長タンパク質の割合は Control が約 50%であるのに対し siRPL3#1, siRPL4#2, siRPL7#2 では約 80%だった. 2 時間後になると Control では約 22-27%の翻訳休止産物を保持しているのに対し, siRPL3#1, siRPL4#2, siRPL7#2 の場合, 4-8%まで減少し, 8 時間後までこの値から大きな変化は無かった. また, 翻訳休止産物の経時的な減少に伴い, 全長タンパク質が増加した. siRPL39#1 では, 0 時間の時点で翻訳休止産物の割合が約 30%であり, 2 時間後には約 19%まで減少するが, その後は 16-19%の翻訳休止産物を保持していた (Figure 26).

3-7-2) 0 分後から 40 分後までの経時的変化

0 時間後から 8 時間後までの経時的変化の検証において, リボソームタンパク質ノックダウン条件下における翻訳休止産物の検出強度が 0 時間後から 2 時間後にかけて減少していたため, さらに初期の翻訳休止の経時的変化についても検証した.

Control では 0 分後から 40 分後まで翻訳休止産物 (赤矢頭) の割合が約 30%, 全長タンパク質 (白矢頭) の割合が約 50%を維持しているのに対し, ノックダウン効率が良く, かつ XBP1u の翻訳休止に与える影響が大きい siRPL3#1, siRPL4#1, siRPL4#2, siRPL7#1, siRPL7#2 では 0 分の時点で翻訳休止産物の割合が 16-21%に減少し, 全長タンパク質は 70-76%に増加していた (Figure 27-29). また, 40 分後までに翻訳休止産物

の割合が約 3-7%減少することに伴って全長タンパク質の割合が約 3-8%増加していた。siRPL3#2, siRPL39#1, siRPL39#2 では、翻訳休止産物と全長タンパク質の両方で Control との間に大きな差は見られなかった (Figure 27, 30)。

3-8) リボソームタンパク質ノックダウンが正電荷クラスターによる翻訳停止に与える影響

RPL3, RPL4, RPL7 が関与する翻訳休止が XBP1u 特異的か否かを検証するために、Arg を 30 個連続させた正電荷クラスター (R30) による翻訳停止にこれらのリボソームタンパク質が関与するか否かを検証した。哺乳動物細胞において RPL3, RPL4, RPL7, 及び RPL39 をそれぞれ siRNA によりノックダウンし、Figure 11 に示した R30 コンストラクションを一過的に発現させ、細胞ライセートを回収しサンプル化した。翻訳休止産物の tRNA は強塩基性条件下で分解されてしまうため、中性ゲルを用いた電気泳動である NuPAGE による分離を行い、Western Blotting により翻訳休止産物の検出を行った。なお、リボソームタンパク質ノックダウンには、ノックダウン効率の高い siRPL3#1, siRPL4#2, siRPL7#2, 及び siRPL39#1 のみを使用した。

siRPL3#1, siRPL4#2, siRPL7#2, siRPL39#1 では Control と比較して翻訳休止産物 (赤矢頭), 及び翻訳放棄産物 (黒矢頭) が減少していた (Figure 31A)。翻訳休止産物の検出強度を定量した結果、Control と比較して siRPL3#1, 及び siRPL4#2 では 2 割程度、siRPL7#2 では 1 割程度、siRPL39#1 では 4 割程度にまで低下していた (Figure 31B)。また、全長タンパク質 (白矢頭), 翻訳休止産物, 翻訳放棄産物の合計に対する全長タンパク質, 翻訳休止産物, 及び翻訳放棄産物の割合をそれぞれ算出した結果、全てのノックダウン条件下で翻訳休止産物が減少するのに伴って全長タンパク質が増加していた (Figure 31C)。これらの結果より、R30 による翻訳停止には RPL3, RPL4, RPL7 に加えて RPL39 も関与していることが示唆された。

3-9) Myc tag 融合 RPL4 Stable transfectant 株における内在性 RPL4 ノックダウンが XBP1u の翻訳休止に与える影響

リボソームタンパク質のノックダウン実験により得られた結果が siRNA のオフターゲット効果によるものでないことを証明するためにレスキュー実験を行う必要があると考えた。そこで、siRNA の認識を受けないサイレントミュートーションを導入した Myc tag 融合 RPL4 遺伝子を Flp-In™ System によりゲノムに組み込んだ細胞株を樹立し、薬剤 (Doxycycline) によりその発現を誘導した後、siRNA によって内在性のリボソームタンパク質をノックダウンした際に XBP1u の翻訳休止強度が回復しているか否かを検証した。

まず、樹立した Myc tag 融合 RPL4 の Stable transfectant 株において Myc-tag 融合 RPL4 が他のリボソームタンパク質と複合体を形成し、リボソームとして機能し得る

か否かを検証した。Myc tag 融合 RPL4 の Stable transfectant 株 1, 2, 3 において Doxycycline による発現誘導を行った後、細胞ライセートを回収し、Myc tag 抗体を用いた共免疫沈降法 (Co-IP) を行うことにより、Myc tag 融合 RPL4 と生理的相互作用するタンパク質を回収した。得られたサンプルは、NuPAGE による分離を行い、Western Blotting により検出を行った。その結果、Co-IP 産物では、Myc tag 融合 RPL4 の生理的相互作用の標的としてリボソーム大サブユニットタンパク質である RPL3 とリボソーム小サブユニットタンパク質である RPS3 が検出された (Figure 32)。一方、コントロールである GAPDH は Co-IP 産物では検出されず、Input でのみ検出された。この結果より、Myc tag 融合 RPL4 はリボソーム複合体を形成していることが示唆された。

この結果を受けて、Myc tag 融合 RPL4 の Stable transfectant 株を用いたレスキュー実験を行った。Myc tag 融合 RPL4 の Stable transfectant 株 1, 2, 3 において Doxycycline による発現誘導を行い、siRPL4#2 を用いて内在性の RPL4 をノックダウンし、Figure 11 に示した XBP1u コンストラクションを一過的に発現させ、細胞ライセートを回収しサンプル化した。翻訳休止産物の tRNA は強塩基性条件下で分解されてしまうため、中性ゲルを用いた電気泳動である NuPAGE による分離を行い、Western Blotting により翻訳休止産物の検出を行った。内在性の RPL4 をノックダウンした siRPL4#2 では、予め Doxycycline により Myc tag 融合 RPL4 の発現を誘導した場合と誘導していない場合とを比較した結果、誘導した場合には翻訳休止産物 (赤矢頭) の割合が約 2, 3 倍増加し、全長タンパク質 (白矢頭) は減少していた (Figure 33)。一方、内在性の RPL4 をノックダウンしていない Control では翻訳休止産物、及び全長タンパク質の割合に大きい変化は見られなかった (Figure 33)。

この結果より、Myc tag 融合 RPL4 を安定発現させた場合には XBP1u の翻訳休止の強さが回復したことが示唆された。

3-10) リボソームタンパク質ノックダウンが XBP1u 翻訳休止の生理的意義に与える影響

RPL3, RPL4, RPL7, 及び RPL39 ノックダウンが XBP1u の翻訳休止の下流の現象である XBP1u mRNA の IRE1 α によるスプライシングにも影響を与えるか否かを検証した。先行研究により、翻訳休止の弱い W256A 変異では IRE1 α によるスプライシング効率が低下することが明らかになっているため、リボソームタンパク質ノックダウンによる翻訳休止の阻害によってもスプライシング効率が低下するのではないかと考えた (Yanagitani, K. *et al.*, 2011)。

哺乳動物細胞において RPL3, RPL4, 及び RPL7 をそれぞれ siRNA によりノックダウンし、小胞体ストレス誘導剤である Tunicamycin を添加した。Tunicamycin 添加後、0 時間後から 2 時間毎に 8 時間後まで細胞を回収し、RNA の抽出を行い、cDNA 合成後、PCR により XBP1 を増幅した。得られた PCR 産物は PAGE し、エチジウム

ブロマイドによる検出を行った。なお、リボソームタンパク質ノックダウンには、ノックダウン効率の高い siRPL3#1, siRPL4#2, siRPL7#2, 及び siRPL39#1 のみを使用した。

Silencer[®] Select Negative Control #1 siRNA によるノックダウンを行った Control では、小胞体ストレス誘導剤 Tunicamycin 添加後、2 時間でスプライシングが行われ始め、6 時間で約 85%がスプライシングを受けた (Figure 34)。一方、siRPL3#1, siRPL4#2, siRPL7#2 ではスプライシングが 4 時間後にしかみられず、6 時間後でも約 70-80%しかスプライシングを受けなかった。ノックダウン効率が高いにもかかわらず XBP1u の翻訳休止に殆ど影響を与えない siRPL39#1 では 2 時間から 4 時間にかけてスプライシングが行われ、6 時間で Control と同程度の約 85%がスプライシングを受けた。これらの結果から、リボソームタンパク質ノックダウンにより XBP1u の翻訳休止が阻害されると IRE1 α による XBP1u mRNA のスプライシング効率も低下することが示唆された。

3-11) 翻訳停止補助因子 ZNF598 が XBP1u の翻訳休止に与える影響

序論でも述べたように、2017 年、哺乳動物細胞における翻訳停止補助因子として ZNF598 が報告された (Juszkiewicz, S. *et al.*, 2017; Sundaramoorthy, E. *et al.*, 2017)。ZNF598 は正電荷クラスターによって引き起こされる翻訳停止に関与するが、もし、ZNF598 が翻訳停止という現象を総じて認識し働くならば、XBP1u の翻訳休止にも関与する可能性があると考え、ZNF598 のノックダウン実験を行った。

哺乳動物細胞において ZNF598 を siRNA によりノックダウンし、Figure 11 に示した XBP1u コンストラクションを一過的に発現させ、細胞ライセートを回収しサンプル化した。翻訳休止産物の tRNA は強塩基性条件下で分解されてしまうため、中性ゲルを用いた電気泳動である NuPAGE による分離を行い、Western Blotting により翻訳休止産物の検出を行った。

まず、siZNF598 を用いてノックダウンを行った場合の ZNF598 の発現量の変化を確認した (Figure 35)。Silencer[®] Select Negative Control #1 siRNA によるノックダウンを行った Control と比較して #1 と #2 の両方で 8 割程度しか ZNF598 の発現量が減少していなかった。続いて、ZNF598 ノックダウンが XBP1u の翻訳休止に与える影響を検証した (Figure 36)。W256A では、Control と siZNF598 を用いた場合とで全長タンパク質 (白矢頭) の検出強度に大きな差は見られなかった (Figure 36A)。一方、Wild type においては、siZNF598 を用いた場合、ノックダウン効率が高くなかったにもかかわらず、Control と比較して翻訳休止産物 (赤矢頭) の検出強度が低下していた。特に #1 では大きく低下していた。また、リボソームタンパク質をノックダウンしたときには、翻訳休止産物の検出強度の低下に伴って翻訳放棄産物 (黒矢頭) の検出強度も低下していたが、ZNF598 ノックダウンでは大きな変化は見られなかった。翻訳休止産物の検出強度を定量した結果、Control と比較して #1 では 5 割程度、#2 では 7 割程度にまで低

下していた (Figure 36B). また, 全長タンパク質, 翻訳休止産物, 翻訳放棄産物の合計に対する全長タンパク質, 翻訳休止産物, 及び翻訳放棄産物の割合をそれぞれ算出した結果, #1 では翻訳休止産物が減少するのに伴って全長タンパク質が増加していることが分かった (Figure 36C). これらの結果より, ZNF598 ノックダウンにより, 翻訳休止産物が減少することが示され, ZNF598 が XBP1u の翻訳休止に関与していることが示唆された.

4) 考察

4-1) リボソームトンネル内における XBP1u 新生ポリペプチド鎖の挙動

Mal-PEG を用いた Cys 残基の修飾実験により、翻訳休止中の XBP1u 新生ポリペプチド鎖においては、260 番目の Met 残基から約 33-40 個のアミノ酸残基がリボソームの中に収まっていることが示唆された。この個数は、XBP1u の翻訳休止に必須である C 末端の最小翻訳休止配列 (26 アミノ酸残基) に加えてこの配列よりも上流の 7-14 個のアミノ酸残基がリボソームトンネル内に収まっていることを示している。XBP1u の翻訳休止は 260 番目の Met 残基がペプチジル転移中心 (PTC) の P サイトに入ったときに起こることから、リボソームトンネル出口付近には、最小翻訳休止配列には含まれない 7-14 個のアミノ酸残基が位置していることが予想される。一方、翻訳休止に必須である最小翻訳休止配列は、リボソームトンネル入口 (PTC) から中央付近に位置していることが予想される。ヒトリボソームトンネルの内壁は RPL4 や RPL39 といったリボソームタンパク質に加え、リボソーム RNA により構成されている (Behrmann, E. *et al.*, 2015)。このことから XBP1u 新生ポリペプチド鎖は、リボソームタンパク質に加えてリボソーム RNA とも相互作用し、翻訳休止を引き起こしている可能性が考えられるため、XBP1u 新生ポリペプチド鎖とリボソーム RNA の相互作用についても解明する必要があると考えられる。方法としては、XBP1u 新生ポリペプチド鎖と近接するリボソーム RNA 間を架橋し、toeprinting assay によりプライマーの伸長が阻害される位置、つまりリボソーム RNA の架橋された位置を同定する方法を利用できると考えている。

また、リボソームトンネルから完全に露出しているアミノ酸残基 (220 番目の Leu 残基) とトンネル内に完全に収まっているアミノ酸残基 (228 番目の Arg 残基) に加えて、トンネルの中と外の両方に存在し得るアミノ酸残基 (221 番目の Pro 残基から 227 番目の Trp 残基) が存在している理由については以下のことが考えられる。Cys 残基の修飾実験の結果より、修飾される割合の変化が数段階にわかれていることから、XBP1u の翻訳休止自体が数段階にわかれて行われている可能性が示唆される。実際に、大腸菌における SecM と呼ばれる分泌モニタータンパク質では段階的に翻訳停止が起きている。まず、SecM 新生ポリペプチド鎖がリボソーム大サブユニットのタンパク質である L4 と L22 から構成される狭窄部位と相互作用し翻訳停止を引き起こす。その後、15 番目の Arg 残基がトンネル入口と相互作用し、ペプチドの結合形成を遅らせる。さらに、ペプチド鎖に取り込まれるのが遅い Pro 残基により翻訳が遅れ、最終的には 1 時間もの間翻訳反応が失速していることが報告されている (Muto, H. *et al.*, 2008; Wohlgemuth, I. *et al.*, 2008; Pavlov, M. Y. *et al.*, 2009; Tsai, A. *et al.*, 2014)。もし、XBP1u においても SecM のような機構で翻訳休止が起きているならば、Cys 残基の修飾実験によって得られた結果も理にかなったものなのではないかと考えられる。また、本研究で用いた Mal-PEG による Cys 残基の修飾実験は、リボソームトンネル内における XBP1u 新生ポリペプチド鎖のさらに詳細な挙動を知る上で有効な

方法であると考えている。Wild type の XBP1u と翻訳休止が強い変異体 S255A や翻訳休止が弱い変異体 W256A の間ではリボソームトンネル内との物理的な相互作用をする部位やその数に違いがあるのではないかと考えている。つまり、S255A はたくさんの相互作用部位を持っており、それに伴ってリボソームトンネル内に収まるアミノ酸残基数が多くなる。一方、W256A は Wild type や S255A に比べ相互作用部位をあまり持たないため、リボソームトンネル内に収まるアミノ酸残基数が少なくなる、という仮説を立てた。S255A や W256A についても Wild type と同様に Mal-PEG による Cys 残基の修飾実験を行い、リボソームトンネル内に収まるアミノ酸残基数を比較することにより、この仮説を検証することができると考えている。この仮説の検証は、XBP1u の翻訳休止が、リボソームトンネル内との物理的相互作用によるものであるという意見をサポートするものであると考えている。

続いて、XBP1u のアミノ酸配列が二次構造を形成するか否かを、タンパク質の二次構造予測ツールである PSIPRED (UCL Department Of Computer Science) により検証した。その結果、XBP1u の翻訳休止配列よりも 6-9 残基上流に位置する 225 番目の Pro 残基から 230 番目の Ser 残基にかけて α -ヘリックス形成が行われることが示唆された。この結果と Cys 残基の修飾実験をあわせて考察すると、 α -ヘリックスはリボソームトンネル出口付近で形成されると考えられる。細菌や真核生物におけるリボソームトンネルの出口付近は、新生ポリペプチド鎖の α -ヘリックス形成が行われるほどに広がった構造を持っていることが明らかになっており、ヒトリボソームにおいても同じような構造を持つのであれば、XBP1u 新生ポリペプチド鎖がリボソームトンネル出口付近で α -ヘリックスを形成する可能性も考えられる (Wilson, D. N. *et al.*, 2011)。海洋ビブリオ菌において機能性翻訳停止を起こす分泌タンパク質 VemP においても、翻訳停止に必須な配列 (131 番目の Phe 残基から 157 番目の Phe 残基までの 27 残基) の 2-11 残基上流に位置するアミノ酸残基 (120 番目の Met 残基から 129 番目の Ser 残基まで) がリボソームトンネル出口付近で α -ヘリックスを形成し、且つリボソームタンパク質である uL22 (真核生物では L17e) と相互作用することが報告されており、これは XBP1u 新生ポリペプチド鎖がリボソームトンネル内でとり得る挙動に共通すると考えられる (Ishii, H. *et al.*, 2015; Su, T. *et al.*, 2017)。このことから、先行研究で明らかにされた最小翻訳休止配列だけでなく、リボソームトンネル内に収まり得る翻訳休止配列の上流のアミノ酸残基においてもリボソームトンネルを構成するタンパク質や RNA と相互作用し、XBP1u の翻訳休止に寄与することが考えられる。

4-2) XBP1u 新生ポリペプチド鎖とリボソームタンパク質との相互作用

本研究により、XBP1u 新生ポリペプチド鎖は複数のリボソームタンパク質 (RPL3, RPL4, 及び RPL7) と近接し、さらに相互作用することが示唆された。光架橋産物の質量分析により、XBP1u の最小翻訳休止配列における 1 つのアミノ酸残基と複数のリボ

ソームタンパク質が近接していることが示唆され、XBP1u の最小翻訳休止配列を構成するアミノ酸残基は、リボソームトンネル内の複数の場所で段階的に物理的な相互作用をすることにより、翻訳休止を引き起こしているのではないかと考えられる。前述した SecM のように XBP1u の場合にも、複数のアミノ酸残基がリボソームトンネル内の複数の場所で段階的に相互作用し翻訳休止を引き起こしているならば、光架橋産物の質量分析やノックダウン実験により得られた結果も理にかなったものなのではないかと考えられる。

XBP1u 新生ポリペプチド鎖と相互作用するリボソームタンパク質として RPL3, RPL4, 及び RPL7 が同定されたが、現時点では RPL3, RPL7 についてはヒトリボソームトンネルを構成するタンパク質であるか明らかではない。ヒトリボソームトンネルを構成するリボソームタンパク質として報告されているのは RPL4, 及び RPL39 であり、RPL3 と RPL7 については記載されていなかった。そこで、PDB (Protein Data Bank), 及び分子グラフィックスツールである PyMOL (Schrödinger 社) を用いて新生ポリペプチド鎖, RPL4, 及び RPL39 と本研究で同定された RPL3 と RPL7 の位置関係を確認した (Figure 37)。その結果, RPL3, RPL4, 及び RPL39 は新生ポリペプチド鎖と相互作用し得る場所に位置していたが, RPL7 は 新生ポリペプチド鎖, すなわちリボソームトンネルから離れた場所に位置し, RPL4 に近接していた。このことから, RPL7 のノックダウン実験により得られた結果は, RPL4 を介した間接的な影響によるものであると考えられる。しかし, 前述のように, XBP1u の新生ポリペプチド鎖はリボソームトンネル内で α -ヘリックスを形成し得るが, シミュレーションに用いた新生ポリペプチド鎖は二次構造を形成していないため, 両者を単純に比較できない。XBP1u の新生ポリペプチド鎖のように二次構造を持つ場合, RPL7 に近接している可能性もあるが, 今回の PyMOL によるシミュレーションにより確認することは不可能だった。

また, リボソームトンネル内壁に露出し, 新生ポリペプチド鎖と相互作用するとされている RPL4 の 71 番目の Arg 残基の位置を確認してみたところ, PTC から新生ポリペプチド鎖のアミノ酸残基を数えて 10 番目のアミノ酸残基に近接することが示唆された。これを XBP1u 新生ポリペプチド鎖に置き換えると 251 番目の Arg 残基に当たる。251 番目の Arg 残基は先行研究の Ala スキャニングにより Ala に置換した場合, 翻訳休止が弱くなるアミノ酸残基である。加えて, RPL3 は PTC から新生ポリペプチド鎖のアミノ酸残基を数えて 5 番目のアミノ酸残基に近接することが示唆され, XBP1u 新生ポリペプチド鎖に置き換えると 256 番目の Trp 残基に当たる。256 番目の Trp 残基は Ala に置換した場合, 最も翻訳休止が弱くなるアミノ酸残基である。これらのシミュレーションより, RPL3, 及び RPL4 についてはリボソームトンネルを構成し, 且つトンネル内に露出する部位を持ち XBP1u 新生ポリペプチド鎖と相互作用することが示唆された。また, RPL3, 及び RPL4 が相互作用すると推測される 256 番目の Trp 残基と 251 番目の Arg 残基はどちらも Ala スキャニングにより翻訳休止の強さに影響を及ぼしたアミノ酸残基であることから, 本研究で得られた結果をサポ

ートすると考えられる。

4-3) リボソームタンパク質ノックダウンによる XBP1u 翻訳休止の阻害

Harringtonine-chase 実験により, Non-knockdown 条件下では Harringtonine 添加後 8 時間が経過しても XBP1u の翻訳休止を検出することができた。一方, RPL3, RPL4, 及び RPL7 をノックダウンした場合, Harringtonine 添加直後に翻訳休止が弱化していることから, リボソームタンパク質をノックダウンした状態では, 翻訳休止する時間が短くなったのではなく翻訳休止が起こらなくなっているのではないかと考えられる。リボソームノックダウン条件下では, 細胞内に正常なリボソームと RPL3, RPL4, もしくは RPL7 が欠損したリボソームが混在しているため, ノックダウン効率に相関して翻訳休止が弱化すると考えられる。

また, RPL3, RPL4, RPL7 の全てについて, ノックダウン効率が高い程, 翻訳休止の阻害が著しいことからオフターゲットにより阻害されているわけではないと考えられる。加えて, Myc tag 融合 RPL4 の Stable transfectant 株において内在性の RPL4 をノックダウンした場合でも, Myc tag 融合 RPL4 の発現誘導を行っていれば翻訳休止産物の検出強度が回復することから, ノックダウン実験により得られた結果は siRNA のオフターゲットによるものではないと考えられる。

RPL3, RPL4, RPL7 をノックダウンした細胞はそのノックダウン効率に応じて全般的なタンパク質合成活性も低下する。一方, RPL39 をノックダウンした細胞についてはノックダウン効率が高い場合でも全般的なタンパク質合成活性の低下はみられない。本研究ではこれらの影響が XBP1u の翻訳休止の弱化の原因になることが懸念されるが, リボソームタンパク質ノックダウン条件下で R30 の翻訳停止を検証した実験においては, RPL3, RPL4, RPL7 のみならず RPL39 のノックダウンにおいても翻訳停止が阻害されたことから, 全般的なタンパク質合成活性の低下が XBP1u の翻訳休止の弱化の原因になる可能性は低いと考えられる。

4-4) リボソームタンパク質ノックダウン条件下で起こる IRE1 α による XBP1u mRNA のスプライシング効率の低下

本研究でリボソームタンパク質をノックダウンした場合, 小胞体ストレスセンサーである IRE1 α による XBP1u mRNA のスプライシング効率が低下することが示された。このような結果が得られた理由として, RPL3, RPL4, 及び RPL7 をノックダウンし翻訳休止が阻害されることにより, mRNA, リボソーム, 新生ポリペプチド鎖から成る三者複合体として XBP1u mRNA を小胞体膜へと運ぶ十分な時間が得られず, IRE1 α によるスプライシングを受け辛い状況になっていると考えられる。実際に, 先行研究により, XBP1u の翻訳休止が弱い変異体である W256A では, Wild type に比べ IRE1 α による XBP1u mRNA のスプライシング効率が低下することが分かっ

り、XBP1u の翻訳休止が効率の良いスプライシングに必要であることを示している (Yanagitani, K. *et al.*, 2011). 本研究で得られた結果は、XBP1u 新生ポリペプチド鎖とリボソームタンパク質との相互作用が翻訳休止を介して XBP1u の持つ生理的意義に寄与することを示唆している。

4-5) XBP1u 新生ポリペプチド鎖と翻訳停止補助因子 ZNF598 との相互作用

ZNF598 は正電荷クラスターによって引き起こされる翻訳停止に関与するが、本研究によって XBP1u の翻訳休止にも関与していることが示唆された。ZNF598 ノックダウン条件下において、XBP1u の翻訳休止が弱化したことから、正電荷クラスターによる翻訳休止と同様に、XBP1u の翻訳休止も ZNF598 により認識され、リボソームのユビキチン化、及び解離が行われている可能性が考えられる。本研究のリボソームタンパク質ノックダウンでは、翻訳休止産物の検出強度の低下に伴い、翻訳放棄産物の検出強度の低下が見られた。これは、Wild type の XBP1u の翻訳休止が起こる際には ZNF598 が働きリボソームが解離することにより、翻訳がその場で放棄されて翻訳放棄産物が生まれる状態にあることを示唆している。その一方で XBP1u の場合、翻訳休止の後に翻訳が再開され全長タンパク質が合成されることから、ZNF598 による認識をある程度回避している可能性も考えられる。XBP1u の翻訳休止と ZNF598 の関係については、正電荷クラスターにより引き起こされる翻訳停止に ZNF598 が与える影響との比較を行うことにより明らかにしたいと考えている。

現在、XBP1u のように機能性翻訳休止を持つ遺伝子は哺乳動物細胞において例が少なく、翻訳休止機構に関する研究も十分に行われていない。そのため、本研究で XBP1u の翻訳休止機構の一端が解明されることにより、新たな機能性翻訳休止を持つ遺伝子の発見に繋がることを期待される。序論でも述べたが、マウスの ES 細胞の約 22%の遺伝子で翻訳停止が起こり、この中には発生や分化等に必須な転写因子も含まれていることが報告された (Ingolia, N. T. *et al.*, 2011)。タンパク質合成は生体内の生理現象を維持するための根幹であり、今後、機能性翻訳停止の破綻を原因とする異常が細胞レベル、器官レベル、そして生体レベルで発見され、機能性翻訳停止をもとにした様々な現象が見出されてくる可能性がある。そのとき、本研究はそのような現象を解明する上で有用な知見となり得ると考えている。

5) 図・表

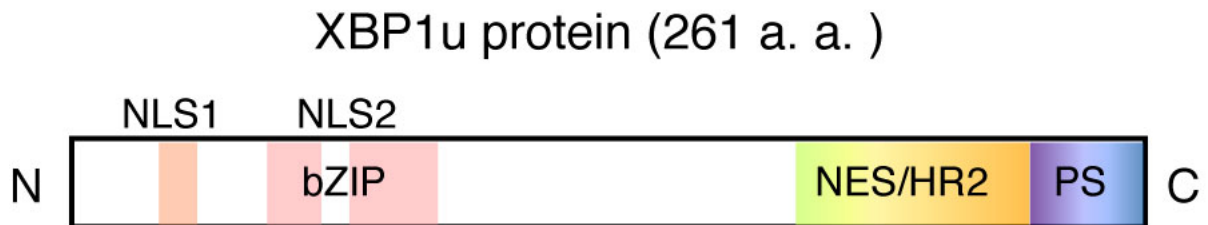


Figure 1A. XBP1u タンパク質のドメイン構造

XBP1u は N 末端側に核移行シグナル NLS1 (Nuclear localization signal 1), NLS2 (Nuclear localization signal 2), 及び塩基性ロイシンジッパー (Basic leusine zipper : bZIP) を持つ. C 末端側には, 核外排出シグナル (Nuclear export signal : NES), 疎水性領域 (Hydrophobic Region 2 : HR2), 及び翻訳休止配列 (Translational pausing sequence : PS) を持つ (Lee, A. H. *et al.*, 2003; Tirosh, B. *et al.*, 2006; Yoshida, H. *et al.*, 2006; Yanagitani, K. *et al.*, 2011) .

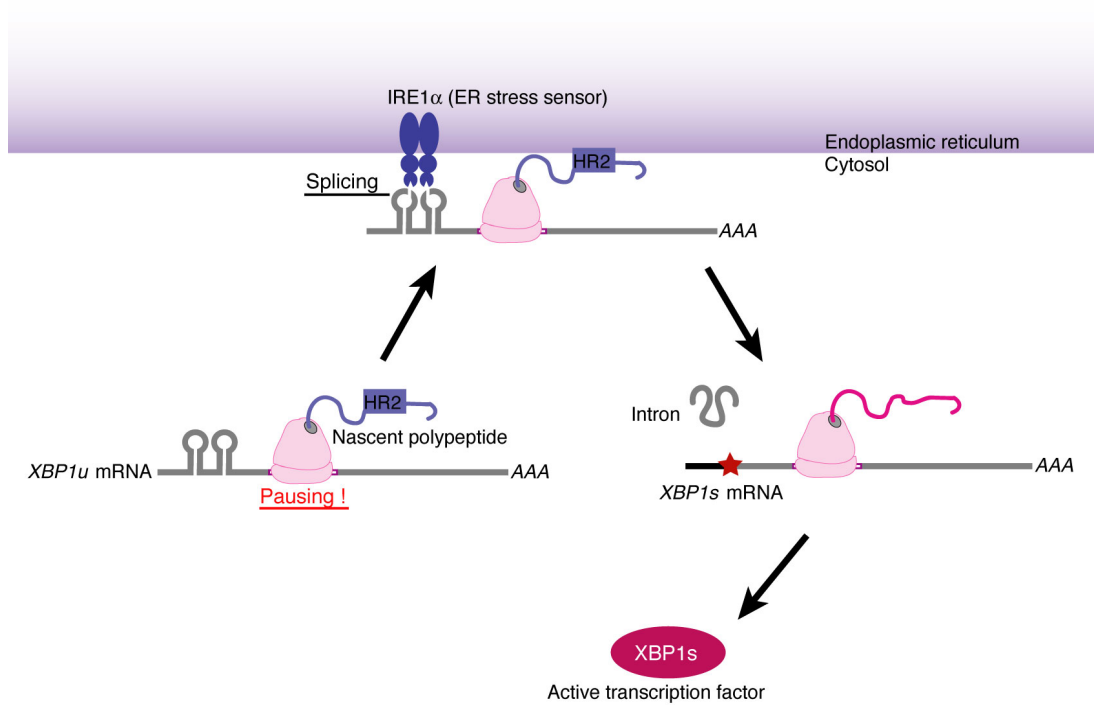


Figure 1B. XBP1u により引き起こされる生理的意義を有する翻訳休止反応

XBP1u mRNA 上で翻訳休止が起こると, *XBP1u* mRNA, リボソーム, 新生ポリペプチド鎖による三者複合体 (R-RNC) の状態を保持したまま小胞体膜上に移動し, *XBP1u* mRNA が小胞体ストレスセンサー IRE1α によるスプライシングを受ける. スプライシングを受けた成熟型の *XBP1s* mRNA が翻訳されることにより活性転写因子 XBP1s の合成が引き起こされ, 小胞体ストレス応答を促進する (Yanagitani, K. *et al.*, 2011).

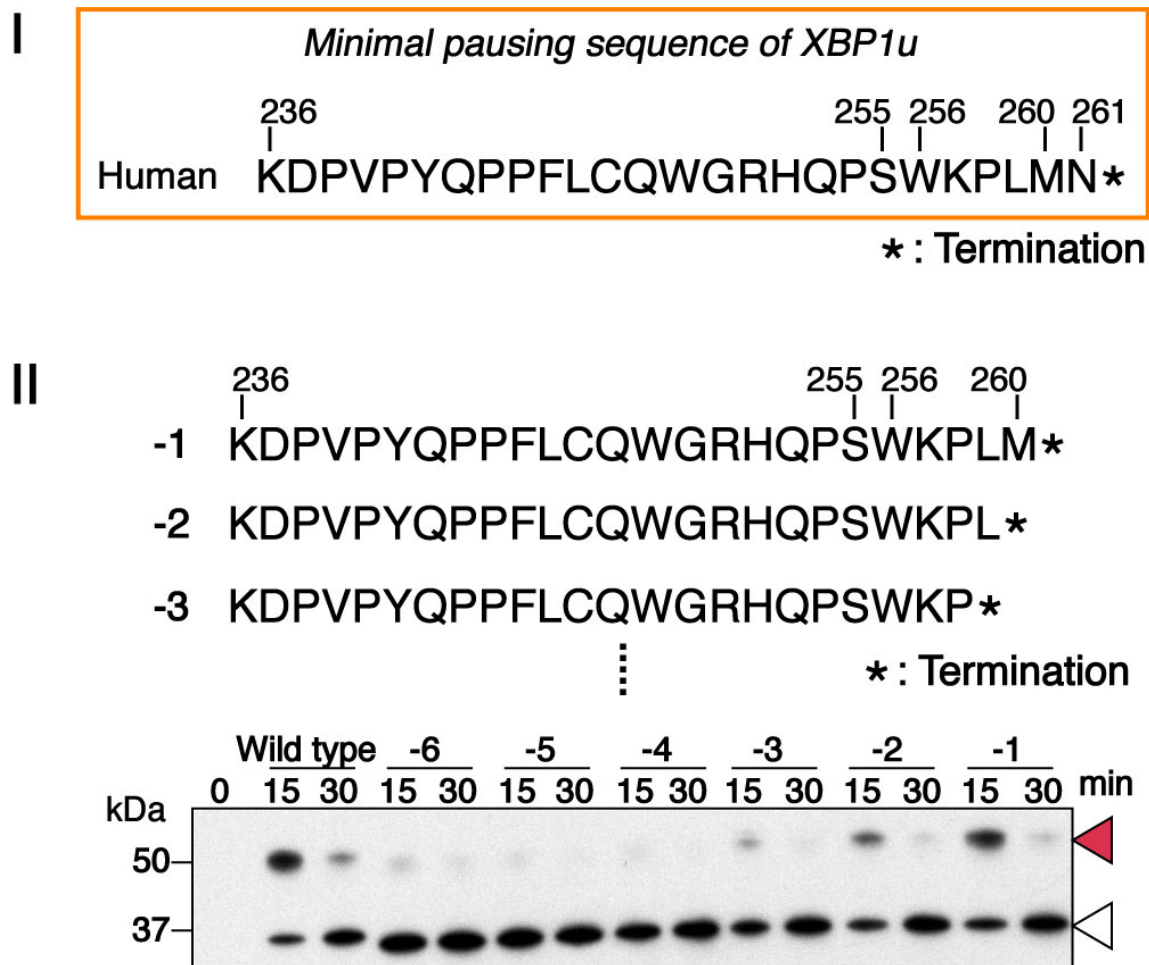
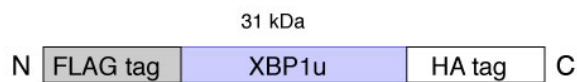
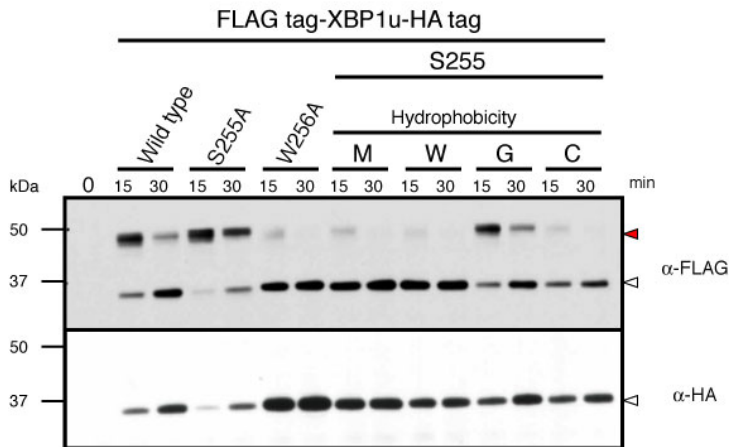
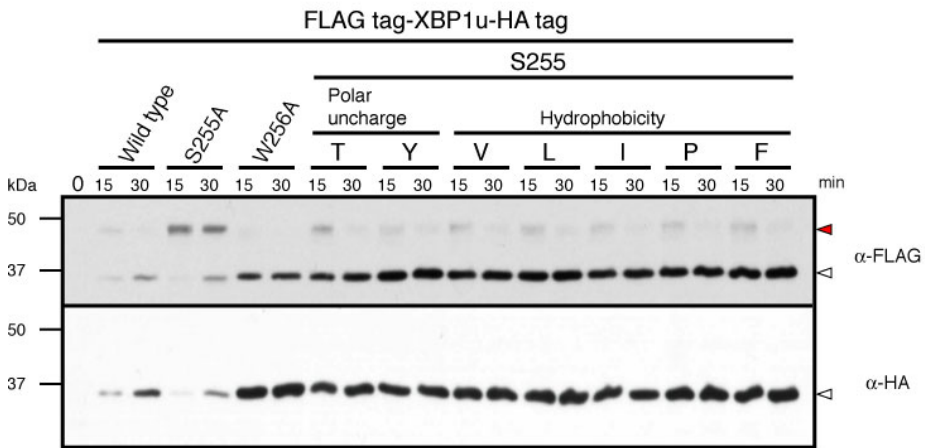
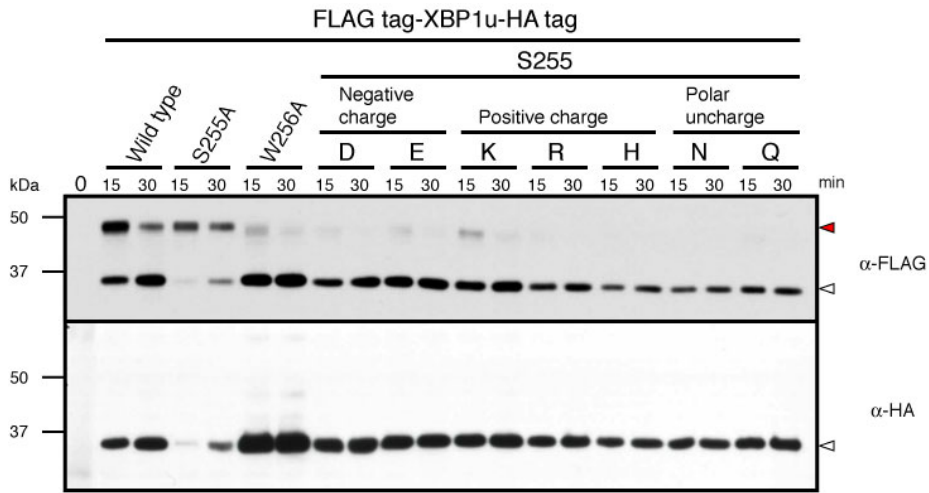


Figure 1C. XBP1u の最小翻訳休止配列と翻訳休止が起こる位置

I) XBP1u の翻訳休止が起こるためには、C 末端からの 26 アミノ酸残基で構成される最小翻訳休止配列が必須である (Yanagitani, K. *et al.*, 2011).

II) C 末端より 1 アミノ酸残基ずつ欠失させた mRNA を合成した後、RRL を使用した *in vitro* 翻訳を行った。翻訳開始後 15 分、及び 30 分で翻訳産物を回収し、NuPAGE、及び Western Blotting により翻訳休止産物の検出を行った。抗体は FLAG tag 抗体を使用した。C 末端から 1 アミノ酸残基のみを欠失させた -1 においては Wild type と同程度の翻訳休止産物が検出された。しかし、C 末端から 2 アミノ酸残基以上欠失させると翻訳休止の強度は低下した (吉田雅美データ)。この結果より、XBP1u の翻訳休止が起きる際、260 番目の Met 残基がペプチジル転移中心 (PTC) の P サイトに位置していることが示唆された。

赤矢頭は翻訳休止産物を、白矢頭は全長タンパク質を示している。



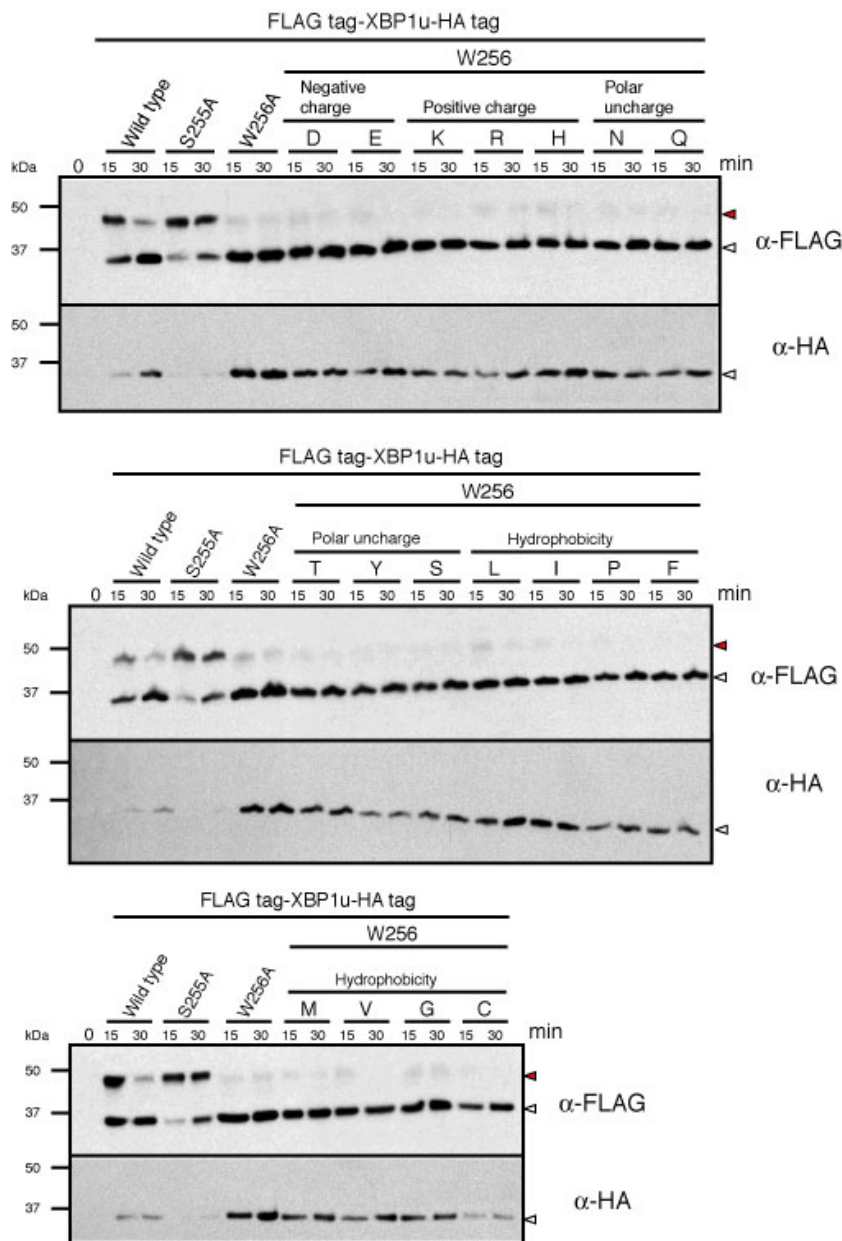


Figure 1E. 255 番目, 及び 256 番目のアミノ酸残基が XBP1u の翻訳休止に与える影響

Ala スキャニングにより, XBP1u の翻訳休止に特に重要であることが示唆された 255 番目の Ser 残基と 256 番目の Trp 残基を他の全アミノ酸に置換し, それぞれの翻訳休止の強さを検証した. *in vitro* transcription により mRNA を合成し, RRL を用いた *in vitro* translation を行った. 翻訳開始後 15 分, 及び 30 分で翻訳産物を回収し, NuPAGE, 及び Western Blotting により翻訳休止産物, 及び全長タンパク質の検出を行った. 翻訳休止産物の検出には FLAG tag 抗体を, 全長タンパク質の検出には HA tag 抗体を用いた. (大古殿修士論文). その結果, 255 番目が Ser, Ala, Gly であり, 256 番目が Trp である場合に Wild type と同程度以上の翻訳休止が起こることが分かった.

赤矢頭が翻訳休止産物, 白矢頭が全長タンパク質を示している.

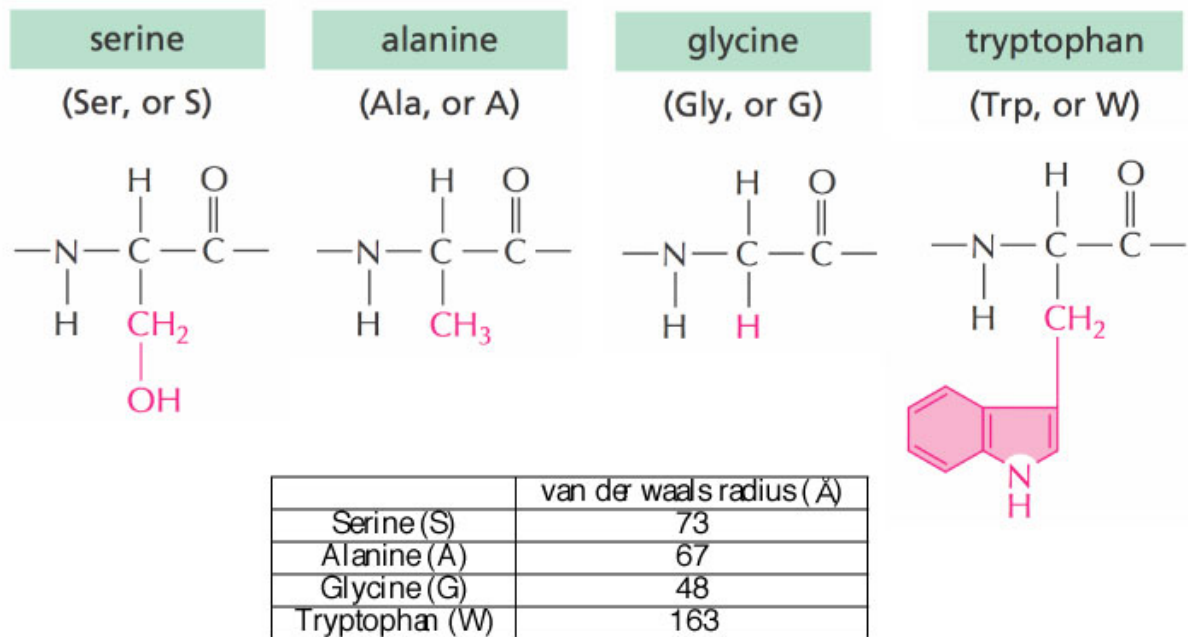


Figure 1F. XBP1u の翻訳休止に関与するアミノ酸残基

255 番目の Ser 残基を Ala, もしくは Gly に置換した場合, Wild type と同程度以上の翻訳休止の強さを示す. これらのアミノ酸残基側鎖は非電荷で側鎖構造が小さいという共通性がある. 一方, 256 番目は Trp 残基以外のアミノ酸に置換した場合, 翻訳休止を殆ど起こさなくなる. Trp の側鎖は全アミノ酸の中でも環構造を 2 つ持つという非常に特徴的な構造を持っている.

表にはアミノ酸の大きさを示すファンデルワールス半径を記載した (Darby N. J. *et al.*, 1993).

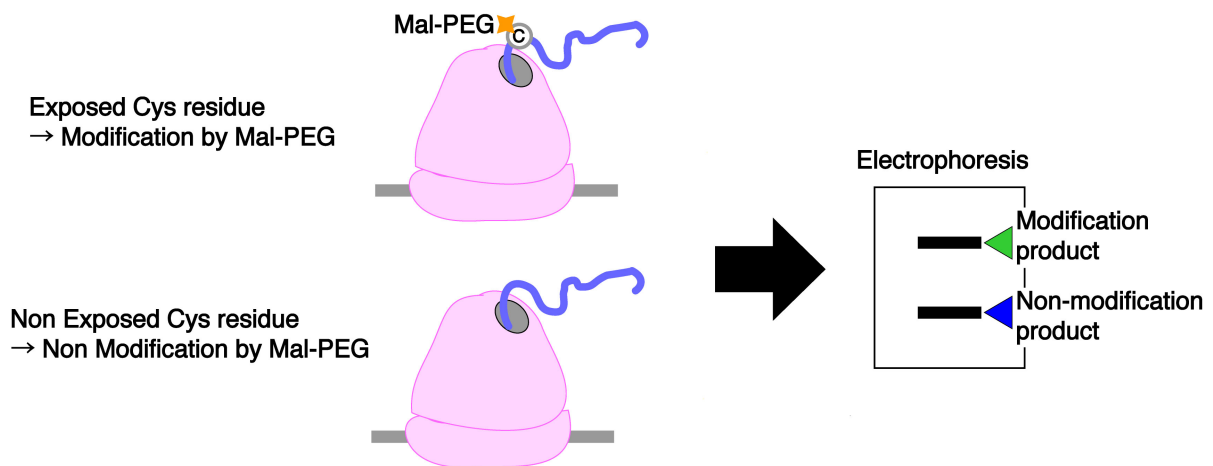


Figure 2. Mal-PEG によるリボソームトンネル外に存在する Cys 残基の修飾

in vitro translation 中に Mal-PEG を添加し氷上で反応させると、リボソームトンネルの外に露出した Cys 残基は Mal-PEG により修飾される。一方、リボソームトンネルの中に収まっている Cys 残基は修飾を受けない。得られた翻訳産物を電気泳動することにより修飾産物と非修飾産物に分離することができる。

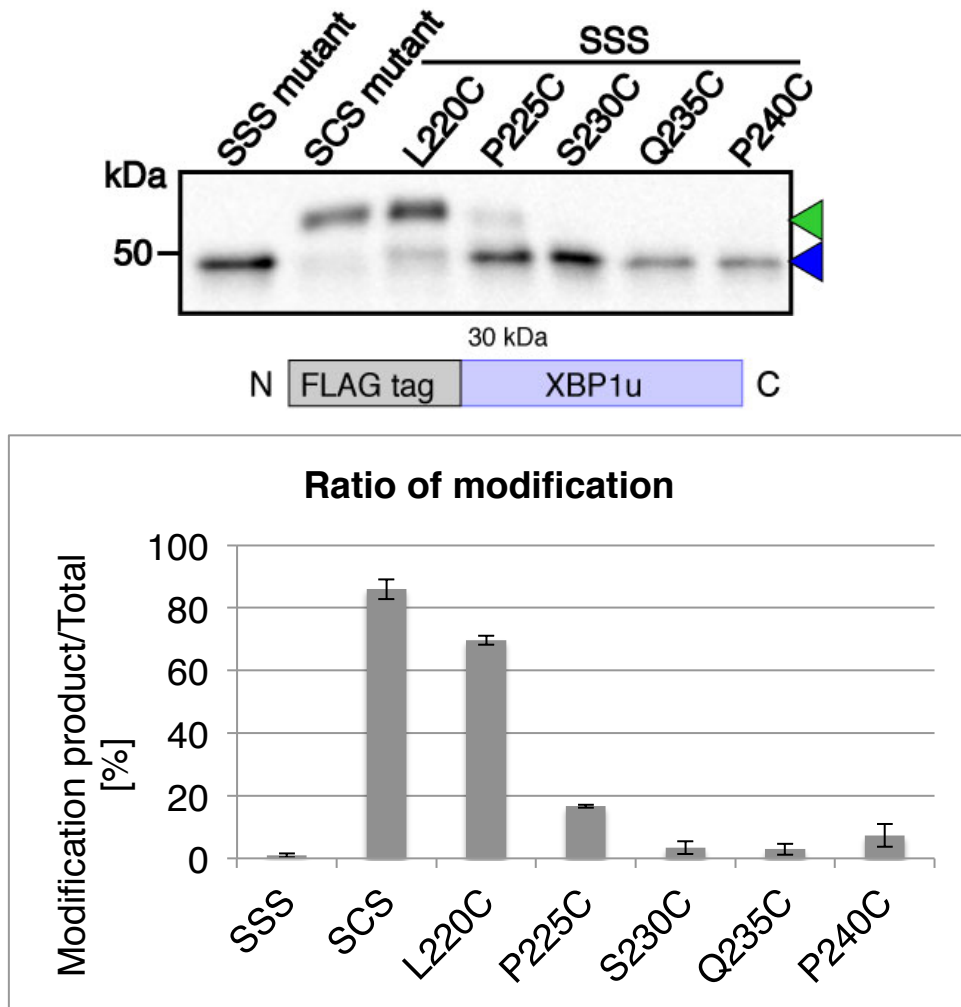


Figure 3. 220 番目から 240 番目に存在する Cys 残基の Mal-PEG による修飾

Wild type の XBP1u が持つ Cys 残基 (204 番目, 215 番目, 及び 247 番目) を全て Ser に置換した SSS mutant を鋳型として 220 番目から 240 番目のアミノ酸残基をそれぞれ Cys に置換したコンストラクションを使用し, *in vitro* transcription により mRNA を合成し, RRL を用いた *in vitro* translation を行った. *in vitro* translation を行っている際, Mal-PEG を添加した. 翻訳産物は NuPAGE, 及び Western Blotting を行うことにより修飾産物, 及び非修飾産物の検出を行った. 検出には FLAG tag 抗体を用いた.

SSS mutant は修飾を受けないコントロールとして, SCS mutant は 204 番目と 247 番目の Cys 残基を Ser に置換し, 1 ヶ所のみ修飾を受けるコントロールとして使用した. コンストラクションにおいては, XBP1u の上流に FLAG tag が融合してあり, 全長タンパク質の分子量は約 30 kDa と推定される. また, 本実験には終止コドンを持たない mRNA (nonstop mRNA) を用いており, XBP1u の 260 番目の Met 残基までが翻訳されている.

$[\text{Modification product}/(\text{Non modification product} + \text{Modification product})] \times 100 [\%]$ の式を用いて修飾を受ける割合をそれぞれの変異について算出しグラフ化した. 実験は 3 回行い, 平均値と標準偏差で表している. 緑矢頭は修飾産物を, 青矢頭は非修飾産物を示している.

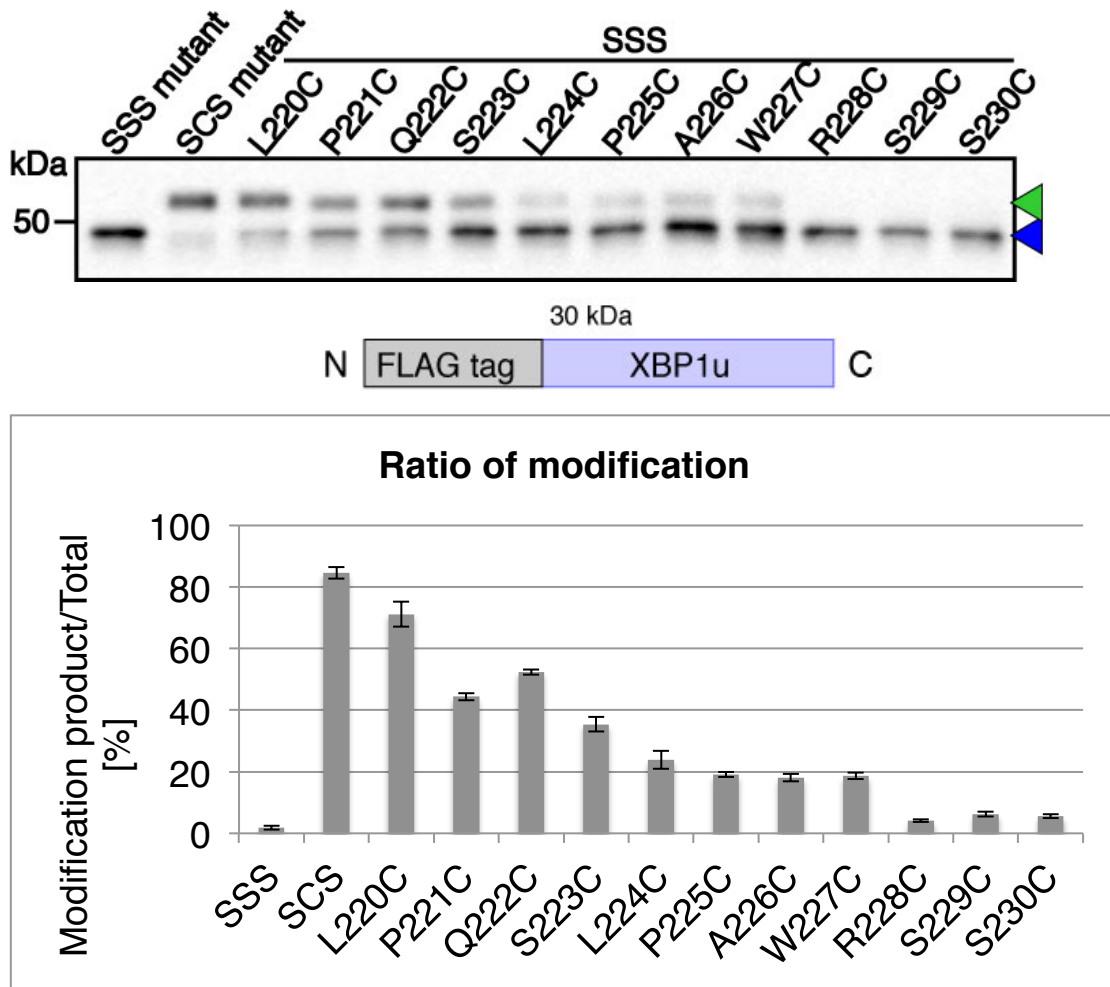


Figure 4. 220 番目から 230 番目に存在する Cys 残基の Mal-PEG による修飾

Wild type の XBP1u が持つ Cys 残基 (204 番目, 215 番目, 及び 247 番目) を全て Ser に置換した SSS mutant を鋳型として 220 番目から 230 番目のアミノ酸残基をそれぞれ Cys に置換したコンストラクションを使用し, *in vitro* transcription により mRNA を合成し, RRL を用いた *in vitro* translation を行った. *in vitro* translation を行っている際, Mal-PEG を添加した. 翻訳産物は NuPAGE, 及び Western Blotting を行うことにより修飾産物, 及び非修飾産物の検出を行った. 検出には FLAG tag 抗体を用いた.

SSS mutant は修飾を受けないコントロールとして, SCS mutant は 204 番目と 247 番目の Cys 残基を Ser に置換し, 1 ヶ所のみ修飾を受けるコントロールとして使用した. コンストラクションにおいては, XBP1u の上流に FLAG tag が融合してあり, 全長タンパク質の分子量は約 30 kDa と推定される. また, 本実験には終止コドンを持たない mRNA (nonstop mRNA) を用いており, XBP1u の 260 番目の Met 残基までが翻訳されている.

$[\text{Modification product}/(\text{Non modification product} + \text{Modification product})] \times 100 [\%]$ の式を用いて修飾を受ける割合をそれぞれの変異について算出しグラフ化した. 実験は 3 回行い, 平均値と標準偏差で表している. 緑矢頭は修飾産物を, 青矢頭は非修飾産物を示している.

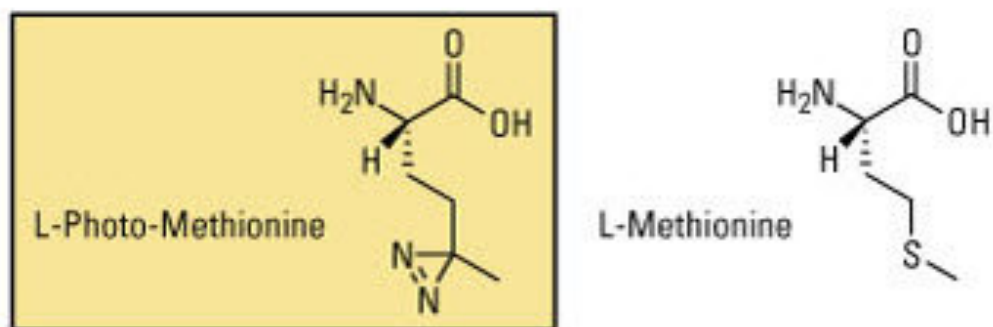


Figure 5. 光反応性 Met (L-Photo-Methionine)と L-Methionine の構造

L-Photo-Methionine の持つジアリジン環が 365 nm の紫外線を照射することによりタンパク質と架橋される (Thermo 社). L-Photo-Methionine は哺乳動物細胞の機能を損なわず使用することができる.

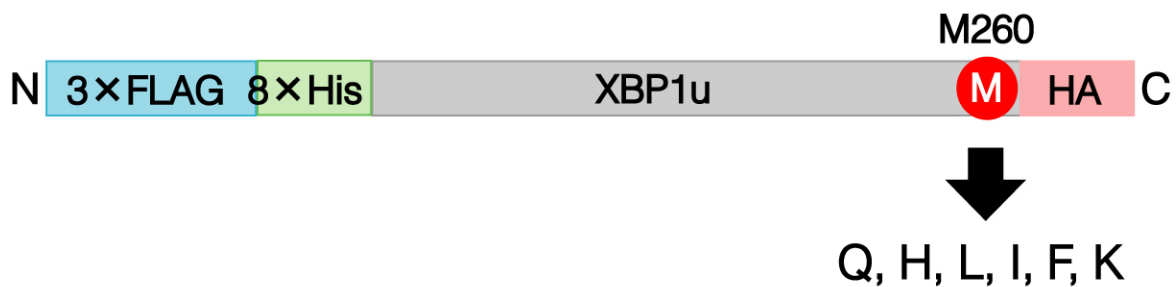


Figure 6. 翻訳休止中リボソームトンネル内に位置する 260 番目の Met 残基と光架橋実験に使用するコンストラクション

光架橋実験にはコンストラクションとして 3xFLAG tag-8xHis tag-XBP1u-HA tag を使用する. Wild type の XBP1u には, 開始アミノ酸であるものも合わせて Met 残基が 39 番目, 95 番目, 139 番目, 260 番目の合計 5 つ存在しており, その中の 260 番目の Met 残基は翻訳休止中にリボソームトンネル内に存在する. 本実験では, 260 番目の Met 残基による光架橋を避けるため, この Met 残基を Gln, His, Leu, Ile, Phe, 及び Lys に置換した (M260X series). なお, これらの 6 つのアミノ酸を選んだ理由はファンデルワールス半径が Met と同程度であったためである. ファンデルワールス半径は, Met が 124 Å であるのに対し, Gln は 114 Å, His は 118 Å, Leu と Ile は 124 Å, Phe と Lys は 135 Å である.

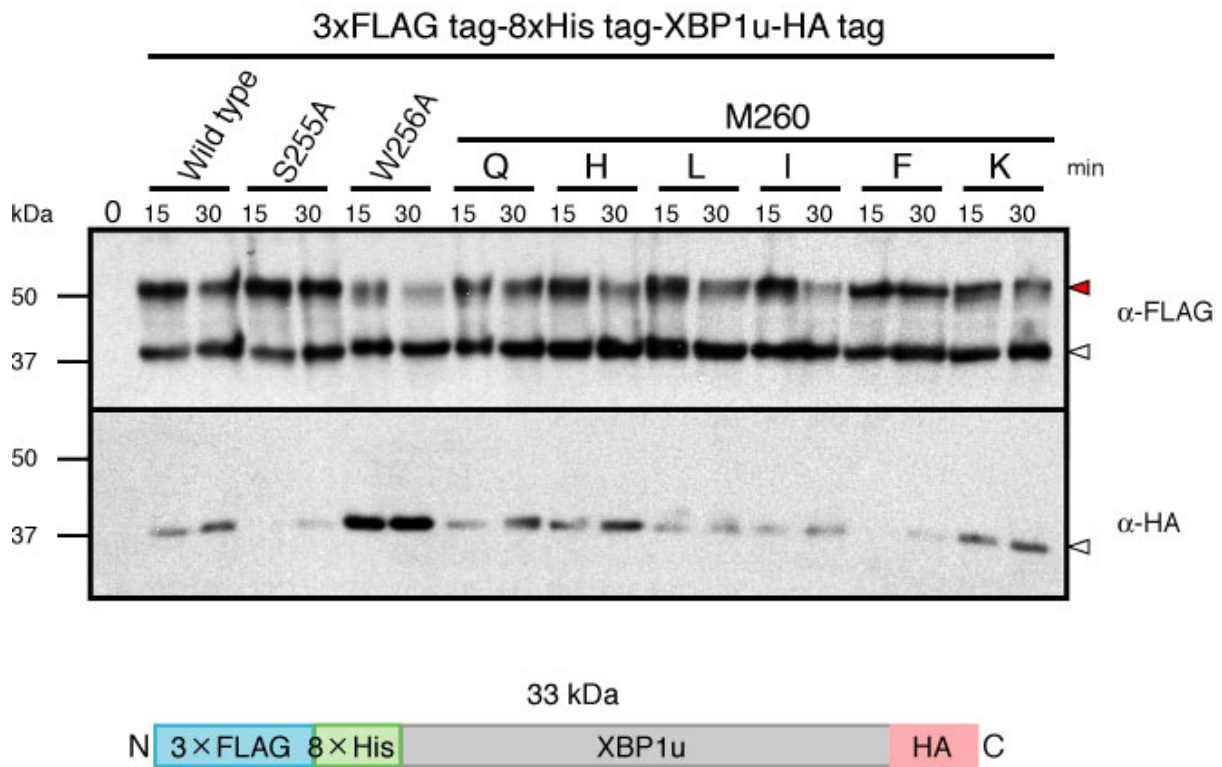


Figure 7. M260X series における翻訳休止産物の有無の確認

Wild type の XBP1u に存在する 260 番目の Met 残基を Gln, His, Leu, Ile, Phe, Lys に置換した変異体 (M260X series) を鋳型として *in vitro* transcription により mRNA を合成し, RRL を用いた *in vitro* translation を行った. 翻訳開始後 15 分, 及び 30 分で翻訳産物を回収した. 翻訳産物は NuPAGE, 及び Western Blotting を行うことにより翻訳休止産物, 及び全長タンパク質の検出を行った. 翻訳休止産物の検出には FLAG tag 抗体を, 全長タンパク質の検出には HA tag 抗体を用いた. コントロールとしては Wild type, 翻訳休止が強い変異体である S255A, 及び翻訳休止が弱い変異体である W256A を使用した. 全てのコンストラクションにおいて XBP1u の上流に 3xFLAG tag-8xHis tag, 下流に HA tag が融合してあり, 全長タンパク質の分子量は約 33 kDa であると推定される.

赤矢頭は翻訳休止産物を, 白矢頭は全長タンパク質を示している.

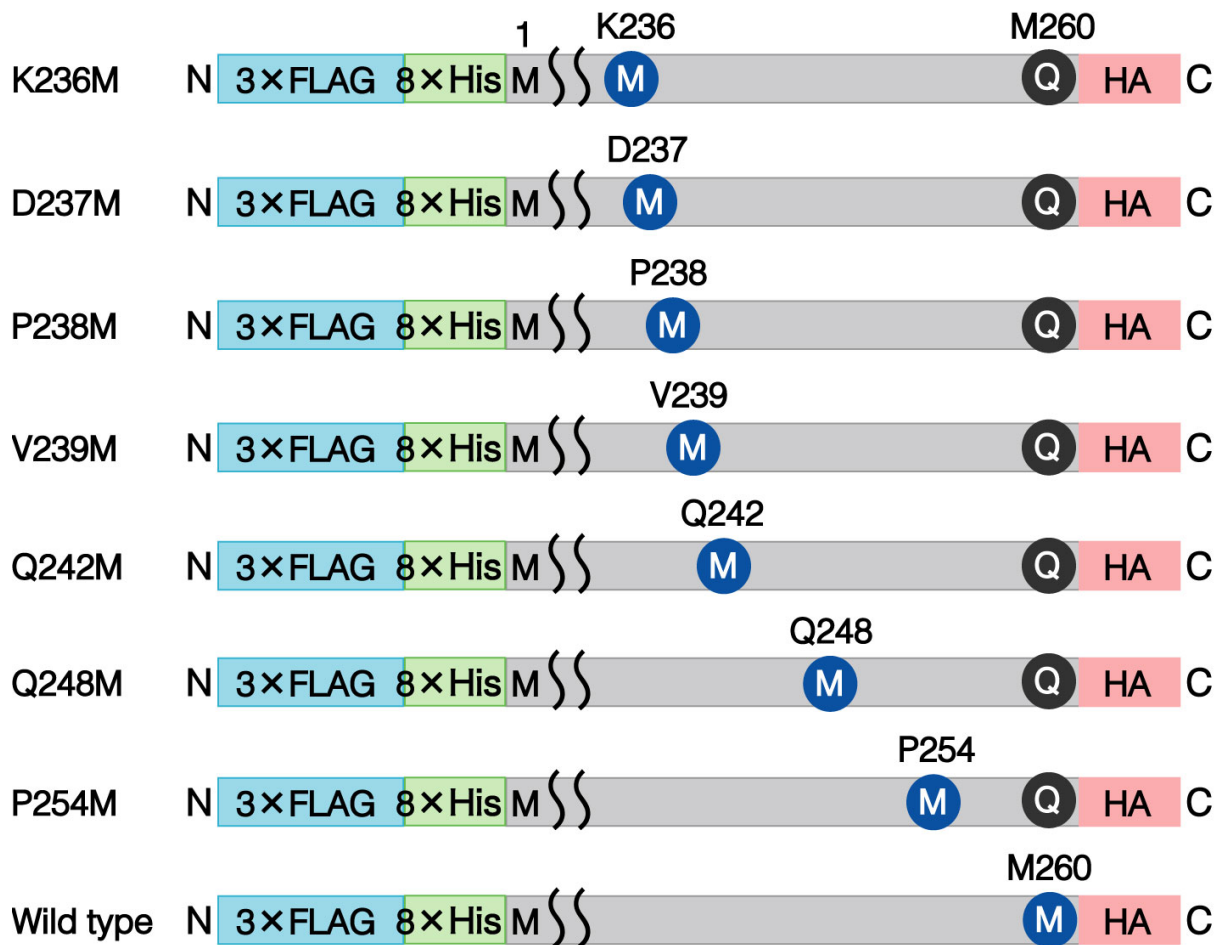


Figure 8. 光架橋実験に使用するコンストラクション (M260Q series)

260 番目の Met 残基を Gln に置換した M260Q を鋳型として 236 番目の Lys 残基, 237 番目の Asp 残基, 238 番目の Pro 残基, 239 番目の Val 残基, 242 番目と 248 番目の Gln 残基, 及び 254 番目の Pro 残基をそれぞれ Met に置換したコンストラクション (M260Q series) を光架橋実験に用いた.

置換した全てのアミノ酸残基は全て最小翻訳休止配列に含まれており, 且つ Ala スキャニングにおいて翻訳休止の強さに影響を及ぼさなかったアミノ酸残基である (Figure 1D).

全てのコンストラクションにおいて XBP1u の上流に 3xFLAG tag-8xHis tag, 下流に HA tag が融合してある.

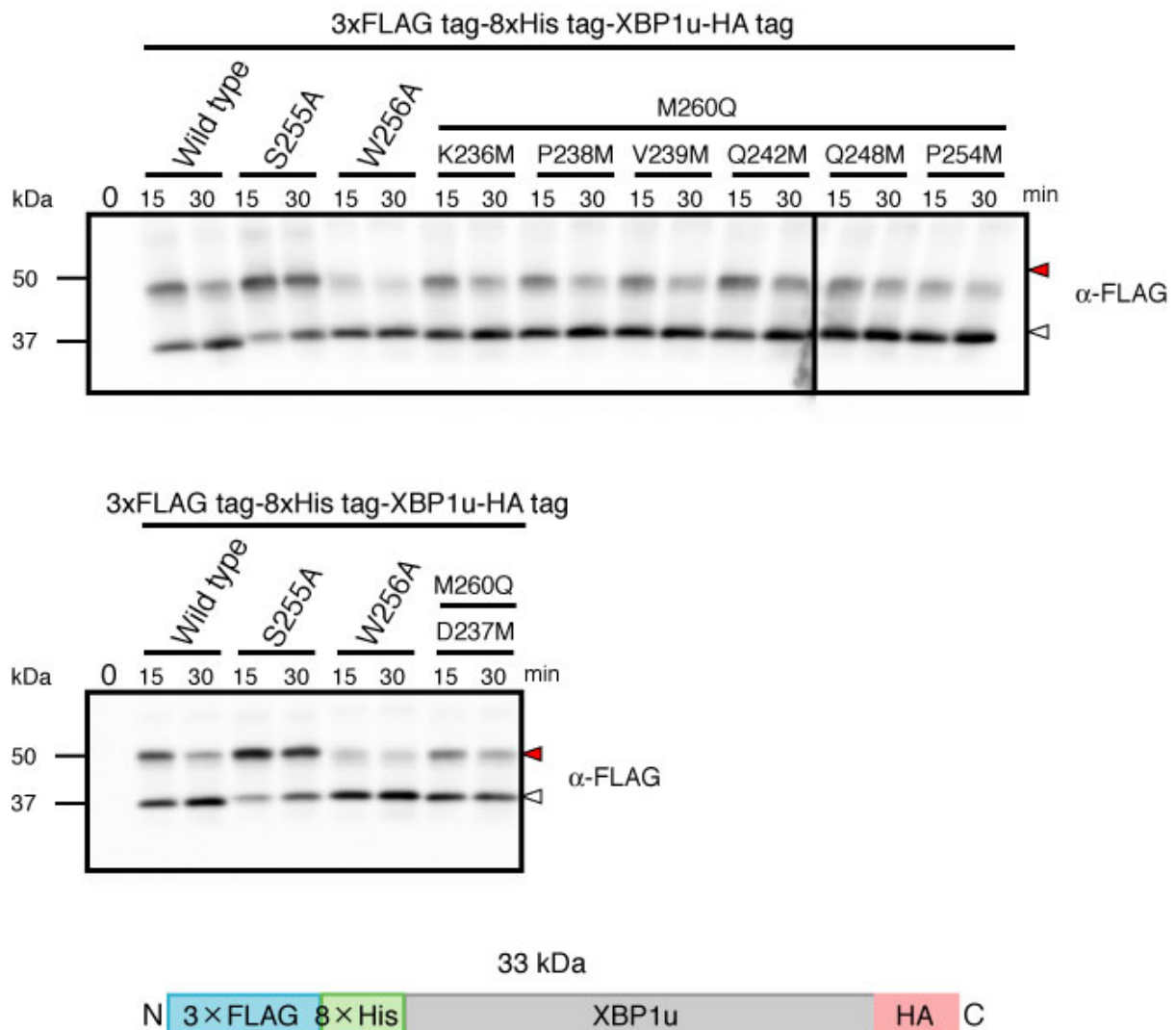


Figure 9. M260Q series における翻訳休止産物の有無の確認

Figure 8. に示した M260Q series を鋳型として *in vitro* transcription により mRNA を合成し, RRL を用いた *in vitro* translation を行った. 翻訳開始後 15 分, 及び 30 分で翻訳産物を回収した. 翻訳産物は NuPAGE, 及び Western Blotting を行うことにより翻訳休止産物の検出を行った. 翻訳休止産物の検出には FLAG tag 抗体を用いた. コントロールとしては Wild type, 翻訳休止が強い変異体である S255A, 及び翻訳休止が弱い変異体である W256A を使用した. 全てのコンストラクションにおいて XBP1u の上流に 3xFLAG tag-8xHis tag, 下流に HA tag が融合してあり, 全長タンパク質の分子量は約 33 kDa であると推定される.

赤矢頭は翻訳休止産物を, 白矢頭は全長タンパク質を示している.

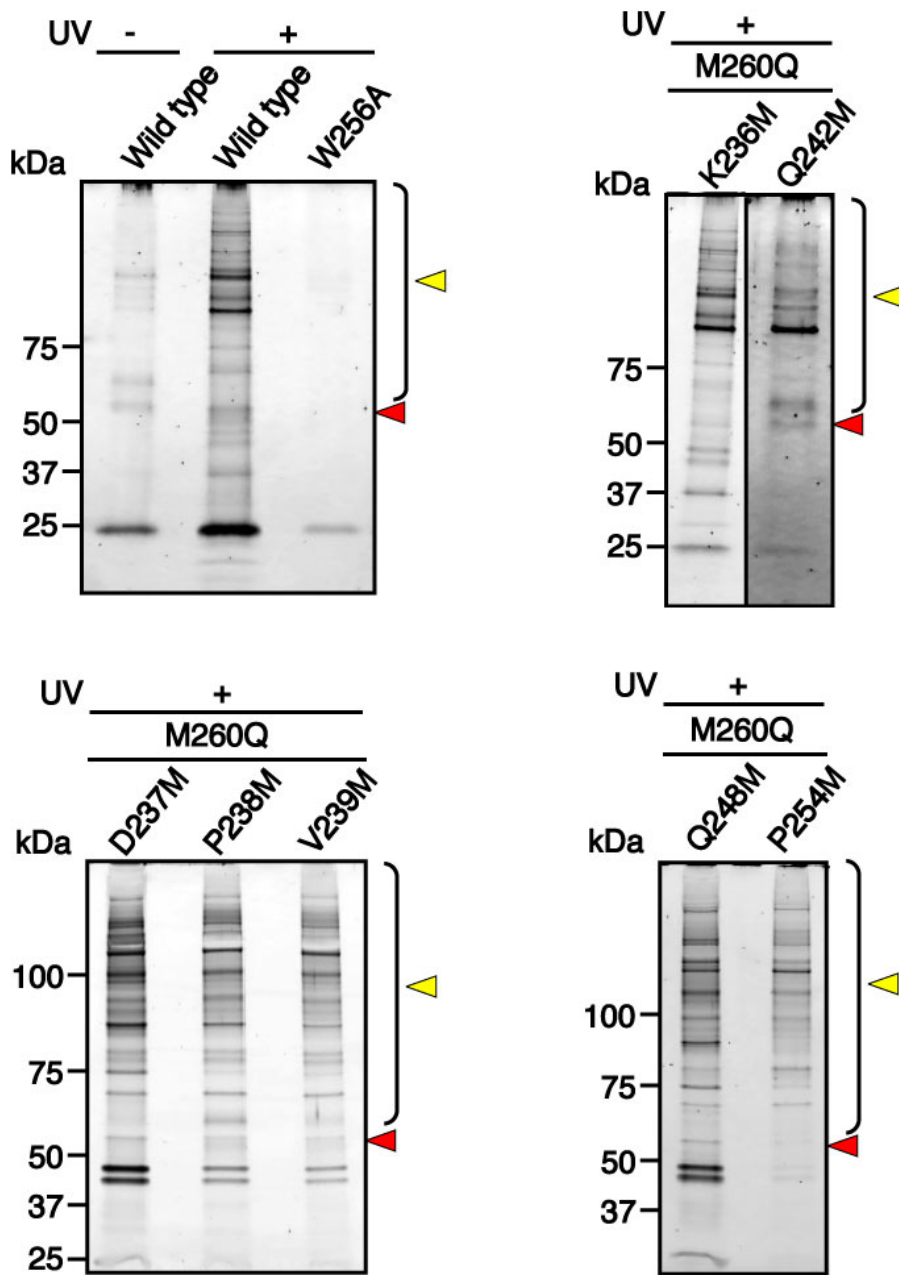


Figure 10. M260Q series における光架橋産物の確認

Figure 8. に示した M260Q series をそれぞれ HEK293T 細胞内で発現させ、光反応性の Met (L-Photo-Methionine) を添加した 2 時間後、光架橋を行った。FLAG tag 抗体を用いた免疫沈降、及び CTAB 精製により光架橋産物を精製し、NuPAGE、及び Flamingo 染色によりその検出を行った。コントロールとして光架橋していない Wild type、及び光架橋した W256A (翻訳休止の弱い変異体) を使用した。

UV+, 及び UV-は紫外線照射の有無を示している。

赤矢頭は翻訳休止産物を、黄矢頭は光架橋産物を示している。

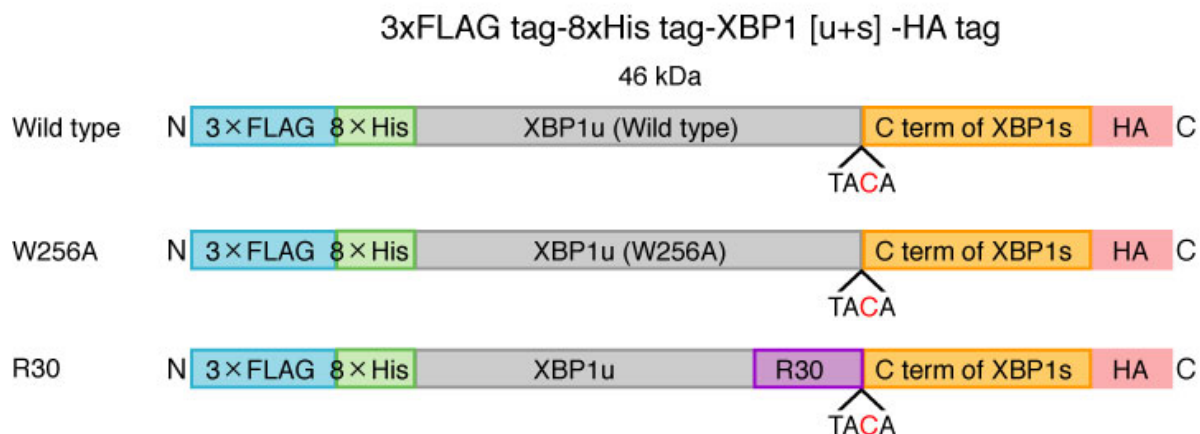


Figure 11. ノックダウン実験に用いたコンストラクション (3xFLAG tag-8xHis tag-XBP1 [u+s] -HA tag)

Wild type, 及び W256A は XBP1u の終止コドンに Cytosine (C) を挿入してあるためフレームシフトが起こり, XBP1u の下流に融合している XBP1s の C 末端の配列, 及び HA tag まで翻訳される. これにより, 電気泳動を行った際に翻訳休止産物, 全長タンパク質, 翻訳放棄産物が異なる分子量に現れそれぞれの同定が容易になる (曾川愛守榮作製). また, 全長タンパク質の分子量は約 46 kDa であると推定される.

R30 においては XBP1u の C 末端に存在する翻訳休止配列 (53 アミノ酸残基) が 30 個連続した Arg (正電荷クラスター) に置換してある (曾川愛守榮作製). なお, R30 においても, Wild type, 及び W256A と同様に終止コドンに Cytosine (C) を挿入してあるためフレームシフトが起こり, 下流に融合している XBP1s の C 末端の配列, 及び HA tag まで翻訳される.

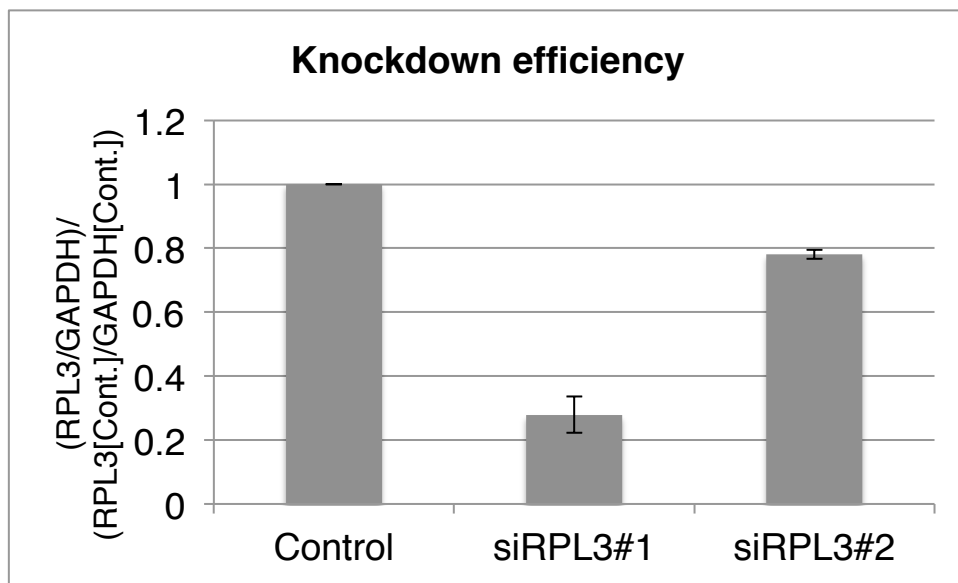
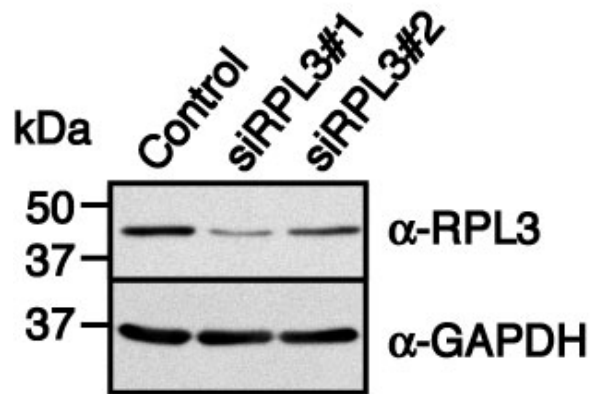


Figure 12. siRPL3による RPL3 のノックダウン効率

HEK293T 細胞において *Silencer*[®] Select Negative Control #1 siRNA (Control), siRPL3#1, 及び siRPL3#2 によるノックダウンを行い, 細胞ライセートを回収しサンプル化した後, SDS-PAGE, 及び Western Blotting により RPL3 の検出を行った. Western Blotting には RPL3 抗体とローディングコントロールとして GAPDH 抗体を使用した.

$(RPL3/GAPDH)/(RPL3 [Control]/GAPDH [Control])$ の式を用いてノックダウン効率を算出しグラフ化した.

実験は3回行い, 平均値と標準偏差で表している.

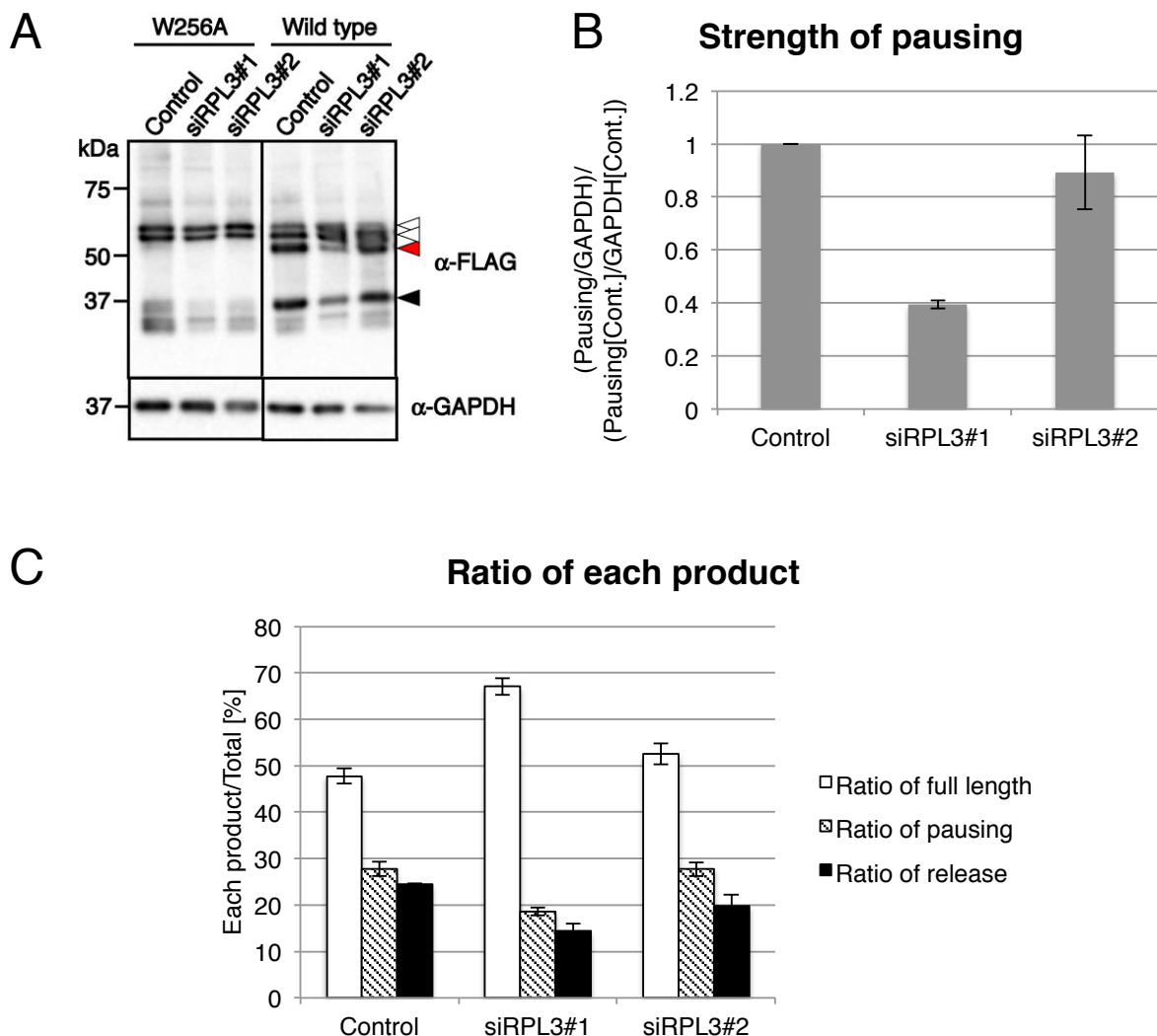


Figure 13. RPL3 のノックダウンが XBP1u の翻訳休止に与える影響

A) HEK293T 細胞において *Silencer*^B Select Negative Control #1 siRNA (Control), siRPL3#1, 及び siRPL3#2 によるノックダウンを行い, Figure 11 に示した XBP1u コンストラクションをトランスフェクションし, 細胞ライセートを回収しサンプル化した. 得られたサンプルを用いて NuPAGE, 及び Western Blotting を行い, 全長タンパク質, 翻訳休止産物, 及び翻訳放棄産物の検出を行った. Western Blotting には FLAG tag 抗体とローディングコントロールとして GAPDH 抗体を使用した.

白矢頭は全長タンパク質を, 赤矢頭は翻訳休止産物を, 黒矢頭は翻訳放棄産物を示している.

B) $(\text{Pausing}/\text{GAPDH})/(\text{Pausing} [\text{Control}]/\text{GAPDH} [\text{Control}])$ の式を用いて翻訳休止産物の検出強度を算出しグラフ化した.

C) 全体の産物に対する全長タンパク質, 翻訳休止産物, 及び翻訳放棄産物の割合をグラフ化した. 全て実験は 3 回行い, 平均値と標準偏差で表している.

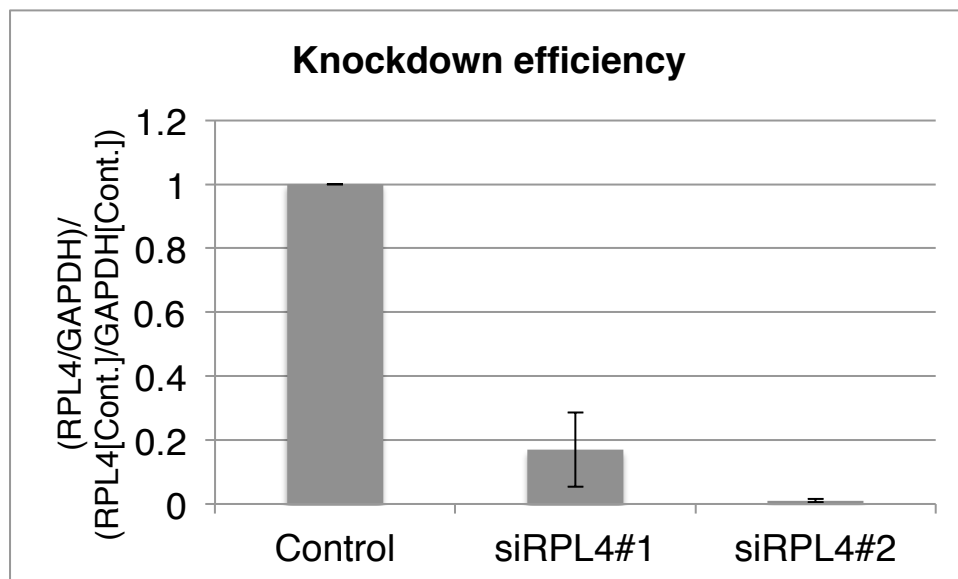
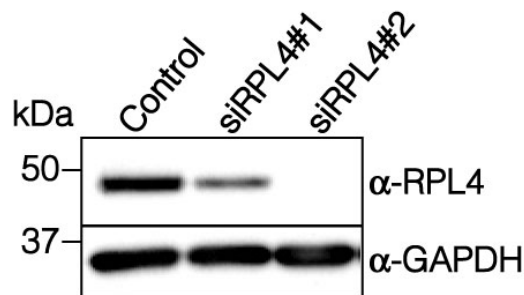


Figure 14. siRPL4による RPL4 のノックダウン効率

HEK293T 細胞において *Silencer*[®] Select Negative Control #1 siRNA (Control), siRPL4#1, 及び siRPL4#2 によるノックダウンを行い、細胞ライセートを回収しサンプル化した後、SDS-PAGE, 及び Western Blotting により RPL4 の検出を行った. Western Blotting には RPL4 抗体とローディングコントロールとして GAPDH 抗体を使用した.

$(RPL4/GAPDH)/(RPL4 [Control]/GAPDH [Control])$ の式を用いてノックダウン効率を算出しグラフ化した.

実験は3回行い、平均値と標準偏差で表している.

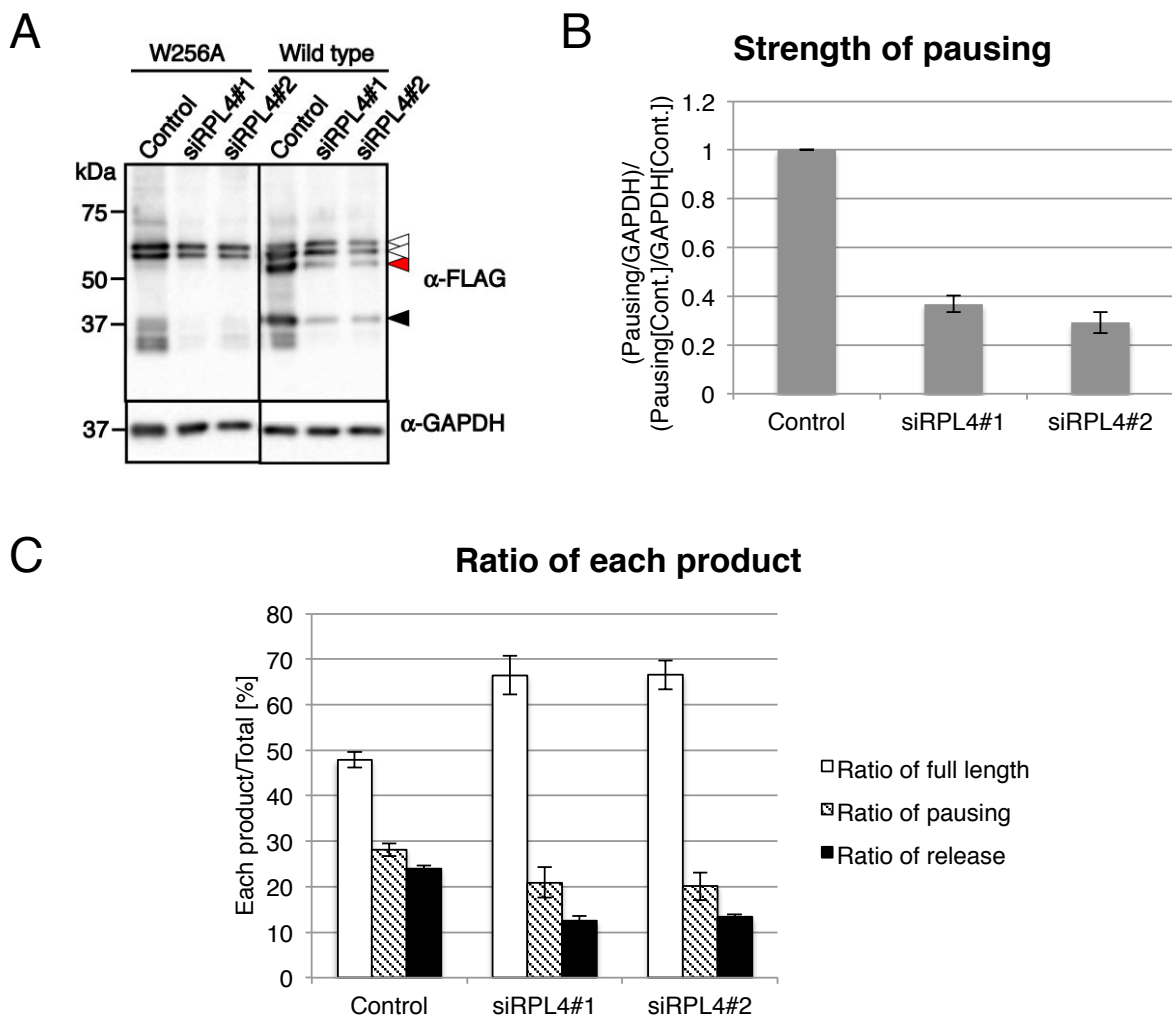


Figure 15. RPL4 のノックダウンが XBP1u の翻訳休止に与える影響

A) HEK293T 細胞において *Silencer*^B Select Negative Control #1 siRNA (Control), siRPL4#1, 及び siRPL4#2 によるノックダウンを行い, Figure 11 に示した XBP1u コンストラクションをトランスフェクションし, 細胞ライセートを回収しサンプル化した. 得られたサンプルを用いて NuPAGE, 及び Western Blotting を行い, 全長タンパク質, 翻訳休止産物, 及び翻訳放棄産物の検出を行った. Western Blotting には FLAG tag 抗体とローディングコントロールとして GAPDH 抗体を使用した.

白矢頭は全長タンパク質を, 赤矢頭は翻訳休止産物を, 黒矢頭は翻訳放棄産物を示している.

B) $(\text{Pausing}/\text{GAPDH})/(\text{Pausing} [\text{Control}]/\text{GAPDH} [\text{Control}])$ の式を用いて翻訳休止産物の検出強度を算出しグラフ化した.

C) 全体の産物に対する全長タンパク質, 翻訳休止産物, 及び翻訳放棄産物の割合をグラフ化した. 全て実験は 3 回行い, 平均値と標準偏差で表している.

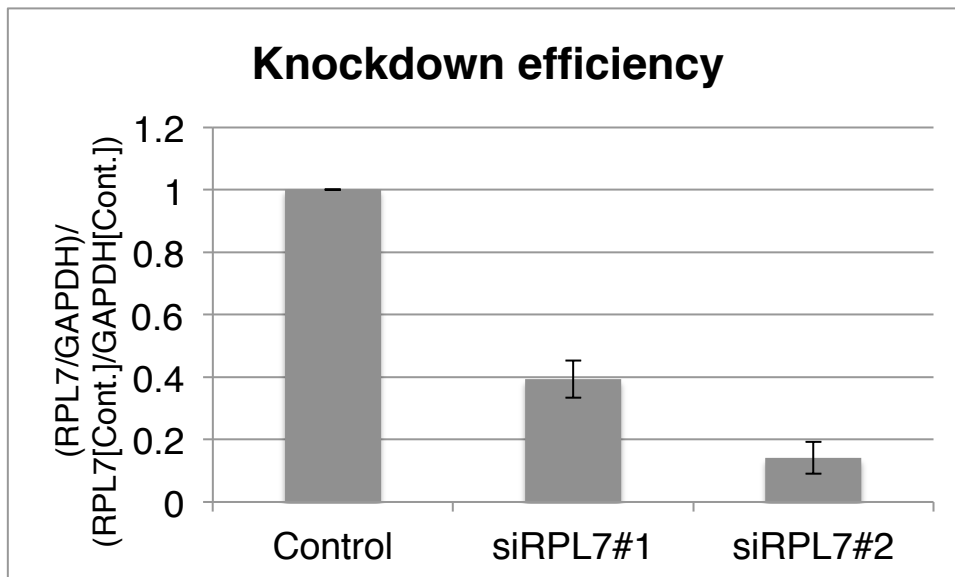
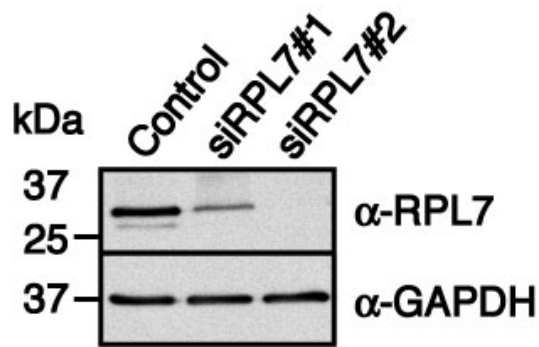


Figure 16. siRPL7によるRPL7のノックダウン効率

HEK293T細胞において *Silencer*[®] Select Negative Control #1 siRNA (Control), siRPL7#1, 及び siRPL7#2 によるノックダウンを行い, 細胞ライセートを回収しサンプル化した後, SDS-PAGE, 及び Western Blotting により RPL7 の検出を行った. Western Blotting には RPL7 抗体とローディングコントロールとして GAPDH 抗体を使用した.

$(RPL7/GAPDH)/(RPL7 [Control]/GAPDH [Control])$ の式を用いてノックダウン効率を算出しグラフ化した.

実験は3回行い, 平均値と標準偏差で表している.

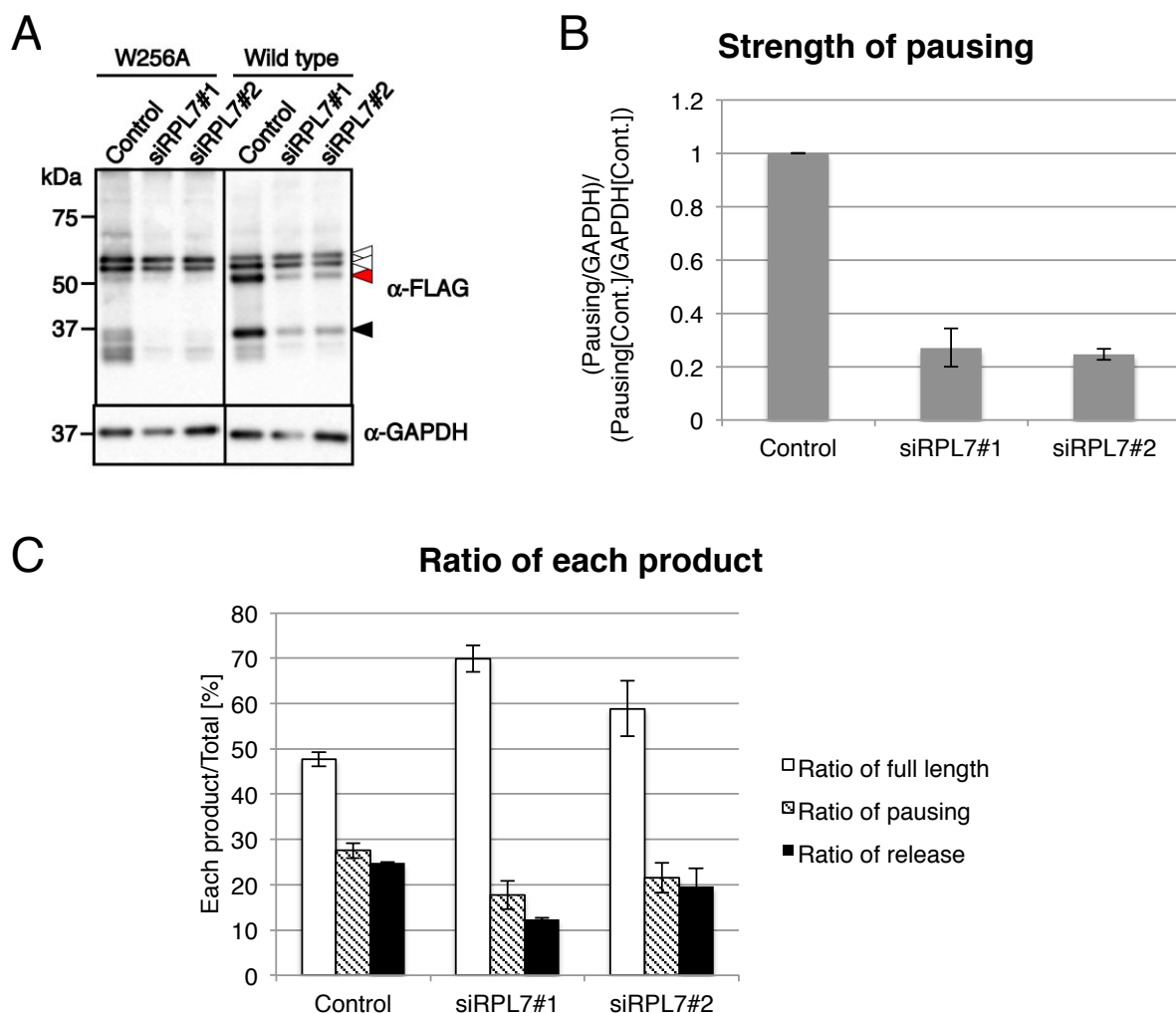


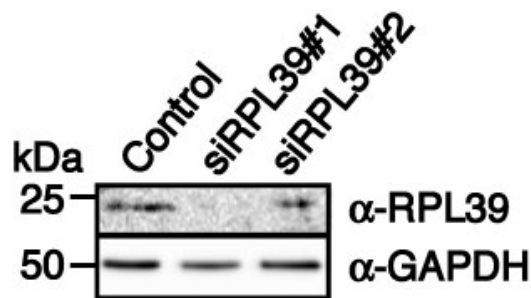
Figure 17. RPL7のノックダウンが XBP1u の翻訳休止に与える影響

A) HEK293T 細胞において *Silencer^B Select Negative Control #1* siRNA (Control), siRPL7#1, 及び siRPL7#2 によるノックダウンを行い, Figure 11 に示した XBP1u コンストラクションをトランスフェクションし, 細胞ライセートを回収しサンプル化した. 得られたサンプルを用いて NuPAGE, 及び Western Blotting を行い, 全長タンパク質, 翻訳休止産物, 及び翻訳放棄産物の検出を行った. Western Blotting には FLAG tag 抗体とローディングコントロールとして GAPDH 抗体を使用した.

白矢頭は全長タンパク質を, 赤矢頭は翻訳休止産物を, 黒矢頭は翻訳放棄産物を示している.

B) $(\text{Pausing}/\text{GAPDH})/(\text{Pausing} [\text{Control}]/\text{GAPDH} [\text{Control}])$ の式を用いて翻訳休止産物の検出強度を算出しグラフ化した.

C) 全体の産物に対する全長タンパク質, 翻訳休止産物, 及び翻訳放棄産物の割合をグラフ化した. 全て実験は3回行い, 平均値と標準偏差で表している.



	Control	siRPL39#1	siRPL39#2
Knockdown efficiency	1.00	0.22	0.67

Figure 18. siRPL39 による RPL39 のノックダウン効率

HEK293T 細胞において *Silencer^B Select Negative Control #1* siRNA (Control), siRPL39#1, 及び siRPL39#2 によるノックダウンを行い、細胞ライセートを回収しサンプル化した後、SDS-PAGE, 及び Western Blotting により RPL39 の検出を行った。Western Blotting には RPL39 抗体とローディングコントロールとして GAPDH 抗体を使用した。

(RPL39/GAPDH)/(RPL39 [Control]/GAPDH [Control]) の式を用いてノックダウン効率を算出し、表に示した。

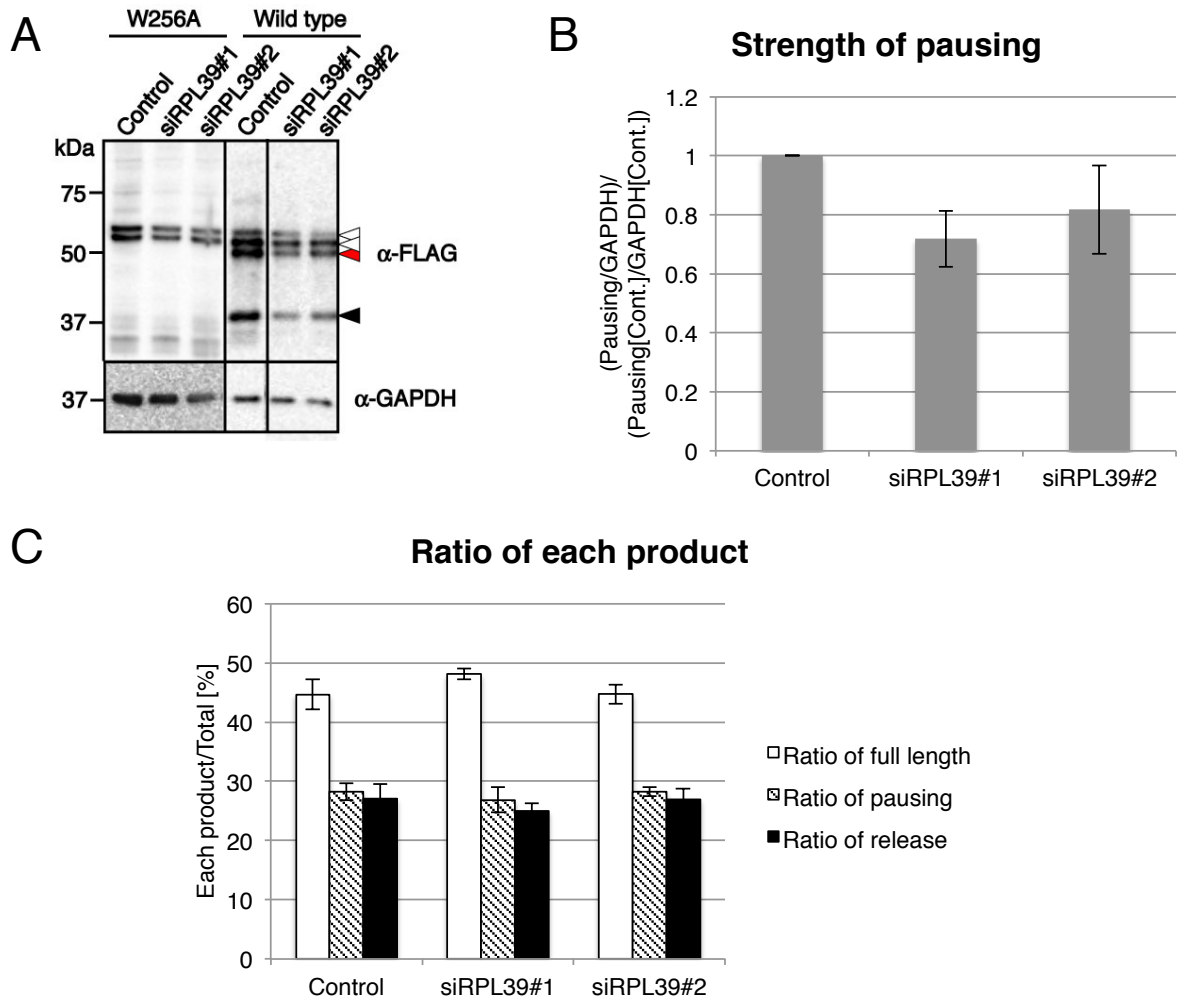


Figure 19. RPL39 のノックダウンが XBP1u の翻訳休止に与える影響

A) HEK293T 細胞において *Silencer*^B Select Negative Control #1 siRNA (Control), siRPL39#1, 及び siRPL39#2 によるノックダウンを行い, Figure 11 に示した XBP1u コンストラクションをトランスフェクションし, 細胞ライセートを回収しサンプル化した. 得られたサンプルを用いて NuPAGE, 及び Western Blotting を行い, 全長タンパク質, 翻訳休止産物, 及び翻訳放棄産物の検出を行った. Western Blotting には FLAG tag 抗体とローディングコントロールとして GAPDH 抗体を使用した.

白矢頭は全長タンパク質を, 赤矢頭は翻訳休止産物を, 黒矢頭は翻訳放棄産物を示している.

B) $(\text{Pausing}/\text{GAPDH})/(\text{Pausing} [\text{Control}]/\text{GAPDH} [\text{Control}])$ の式を用いて翻訳休止産物の検出強度を算出しグラフ化した.

C) 全体の産物に対する全長タンパク質, 翻訳休止産物, 及び翻訳放棄産物の割合をグラフ化した. 全て実験は 3 回行い, 平均値と標準偏差で表している.

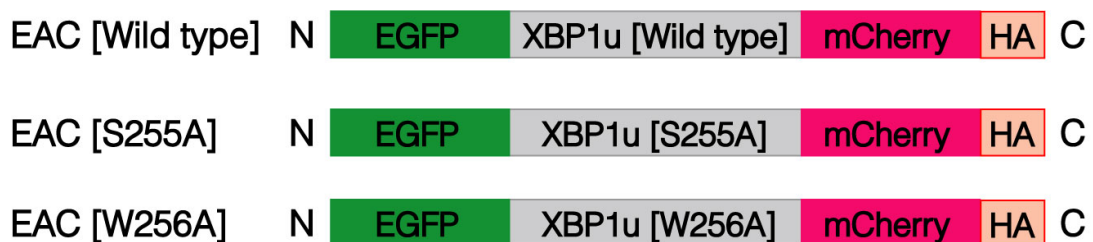


Figure 20. 融合遺伝子 EAC (EGFP-Arrest sequence-mCherry) を応用したコンストラクション

XBP1u の翻訳休止配列 (Arrest sequence) の上流に緑色蛍光タンパク質 EGFP, 下流に赤色蛍光タンパク質 mCherry, 及び HA tag が融合してある. 上流と下流に融合した蛍光タンパク質の色が異なることにより, 翻訳休止産物と全長タンパク質を蛍光の色により区別することができる.

FACS 解析を目的として XBP1u の Wild type の配列, 翻訳休止が強い S255A 変異を持つ配列, 翻訳休止が弱い W256A 変異を持つ配列を導入したものを使用した. なお, Arrest sequence の部分には XBP1u の翻訳休止産物配列を含む C 末端の 53 アミノ酸残基のみを導入している.

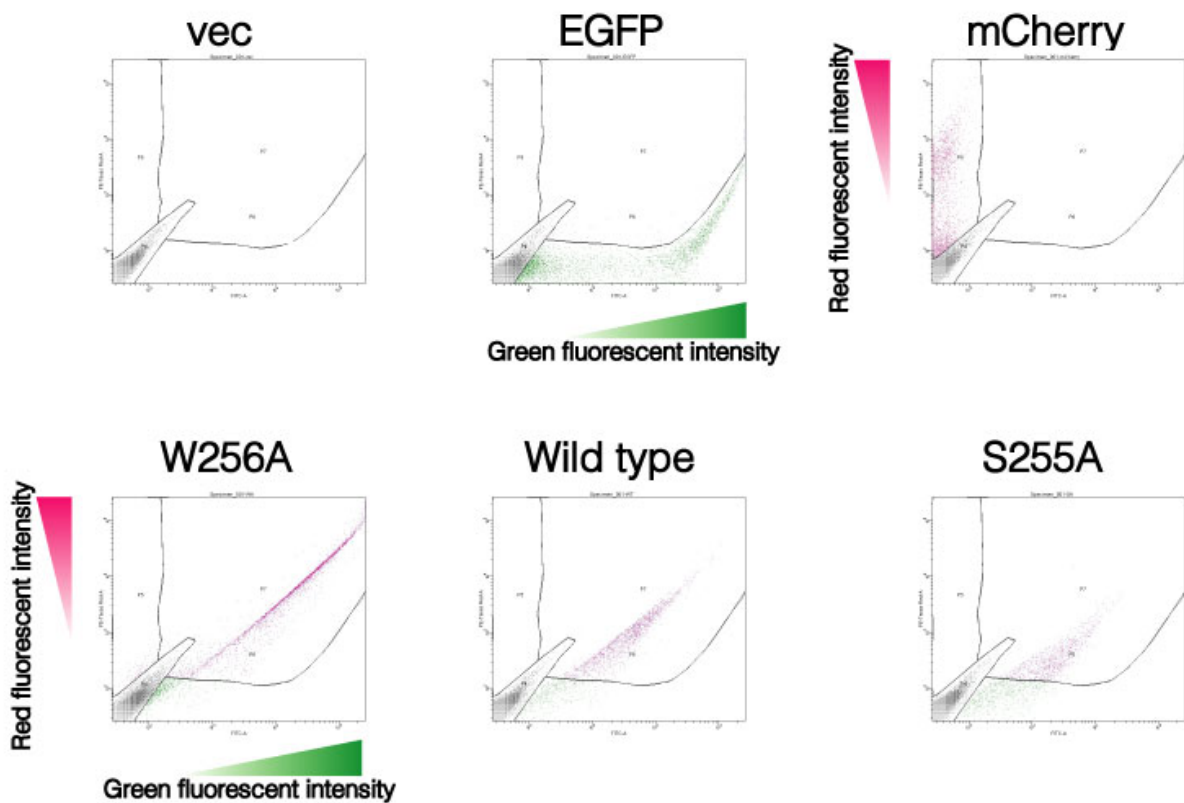


Figure 21. FACS による XBP1u 翻訳休止の検出

HeLa 細胞に pcDNA3.1 (+) (vec), pEGFP-C1 (EGFP), pmCherry-C1 (mCherry), Figure 20 に示した EAC [W256A], EAC [Wild type], 及び EAC [S255A] をトランスフェクションし, FACS による解析を行った. 解析に用いた細胞の数は 20,000 個である.

横軸は FITC のフィルターにより検出した緑色蛍光強度を, 縦軸は PE-Texas Red[®] のフィルターにより検出した赤色蛍光強度を示している.

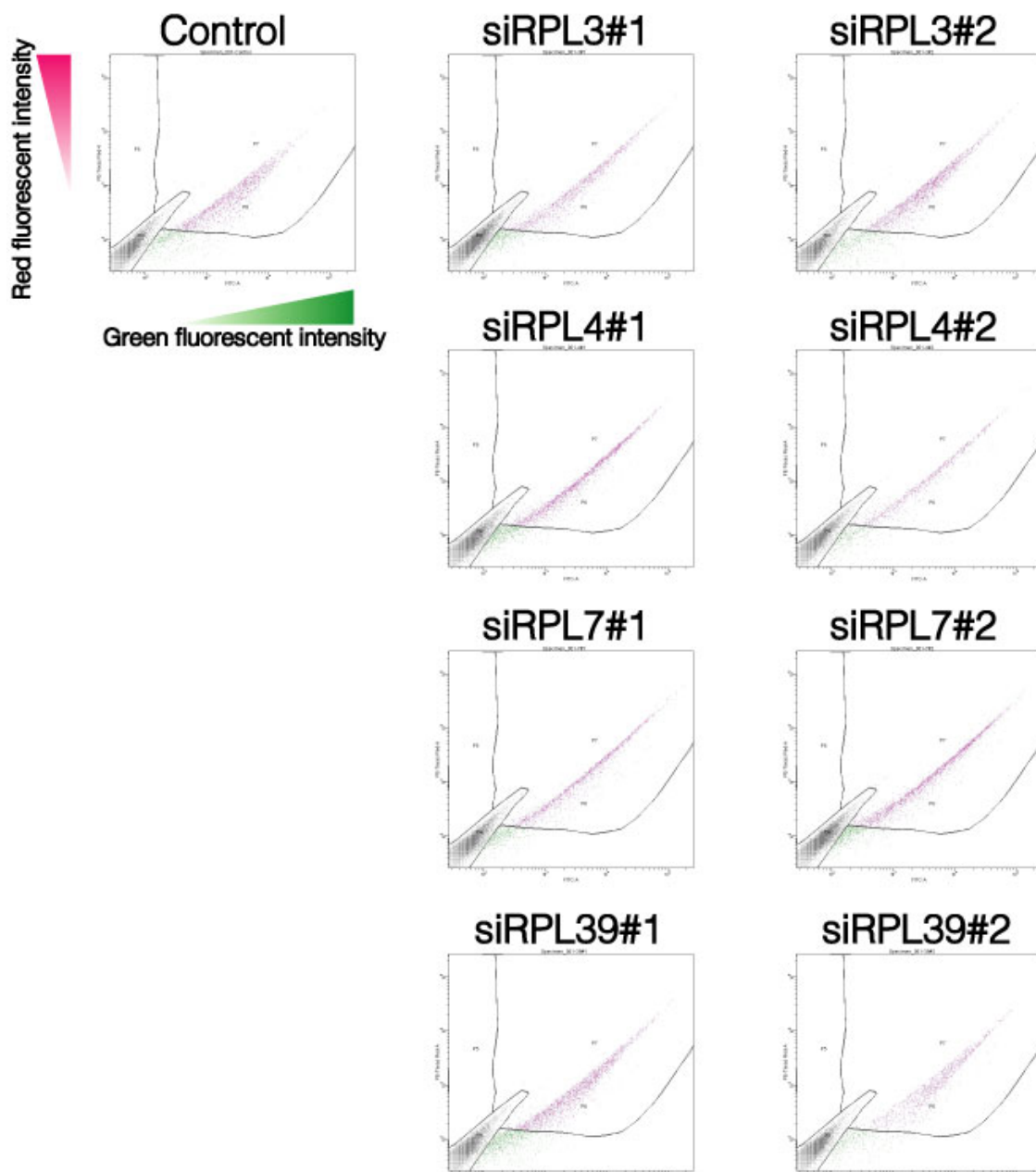
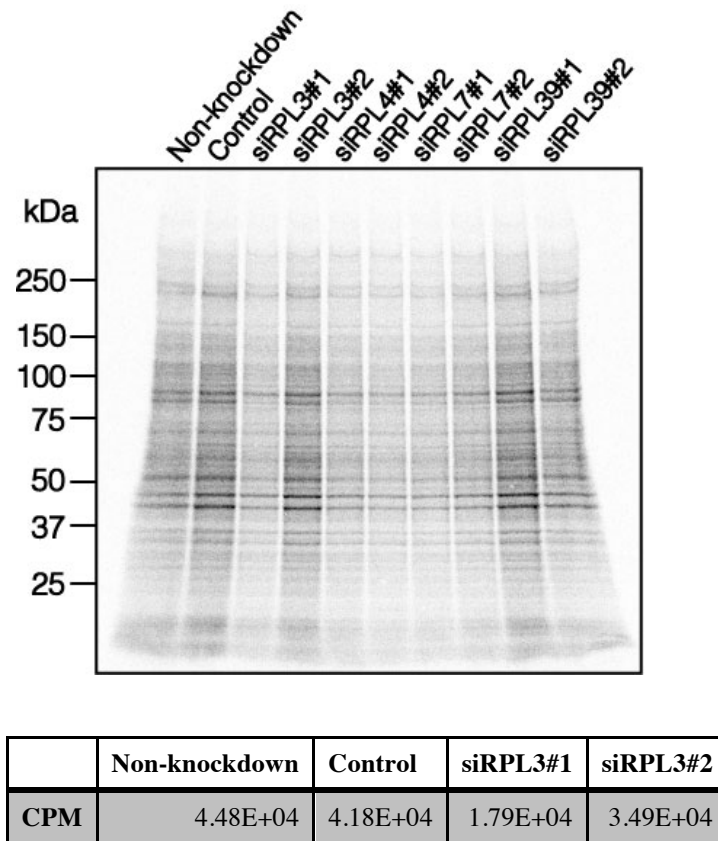


Figure 22. リボソームタンパク質ノックダウン条件下における FACS による翻訳休止強度の検出

Silencer^B Select Negative Control #1 siRNA (Control), siRPL3#1, siRPL3#2, siRPL4#1, siRPL4#2, siRPL7#1, siRPL7#2, siRPL39#1, 及び siRPL39#2 によるノックダウンを行った HeLa 細胞に EAC [Wild type] をトランスフェクションし, FACS による解析を行った. 解析に用いた細胞の数は 20,000 個である.

横軸は FITC のフィルターにより検出した緑色蛍光強度を, 縦軸は PE-Texas Red[®] のフィルターにより検出した赤色蛍光強度を示している.



	siRPL4#1	siRPL4#2	siRPL7#1	siRPL7#2	siRPL39#1	siRPL39#2
CPM	1.80E+04	1.48E+04	1.54E+04	1.97E+04	3.44E+04	3.03E+04

Figure 23. リボソームタンパク質ノックダウン条件下におけるタンパク質合成活性

Silencer^B Select Negative Control #1 siRNA (Control), siRPL3#1, siRPL3#2, siRPL4#1, siRPL4#2, siRPL7#1, siRPL7#2, siRPL39#1, 及び siRPL39#2 によるノックダウンを行った HEK293T 細胞を Met, 及び Cys を含まない培地で培養し飢餓状態にした後, ³⁵S-Met/Cys によるラベルを行い, 細胞ライセートを回収し, サンプル化した. サンプルを SDS-PAGE し, オートラジオグラフィーによりラベルされたタンパク質の検出を行った. また, サンプルをトラップした Transfer filter に液体シンチレーションカクテルを添加し, 液体シンチレーションカウンターで放射線量を測定した. なお, Non-knockdown についてはノックダウン処理を行っていない (未処理) の HEK293T 細胞を用いた.

放射線量は 1 分間あたりの放射線計測回数である「CPM (Count Per Minute)」を用いて表している.

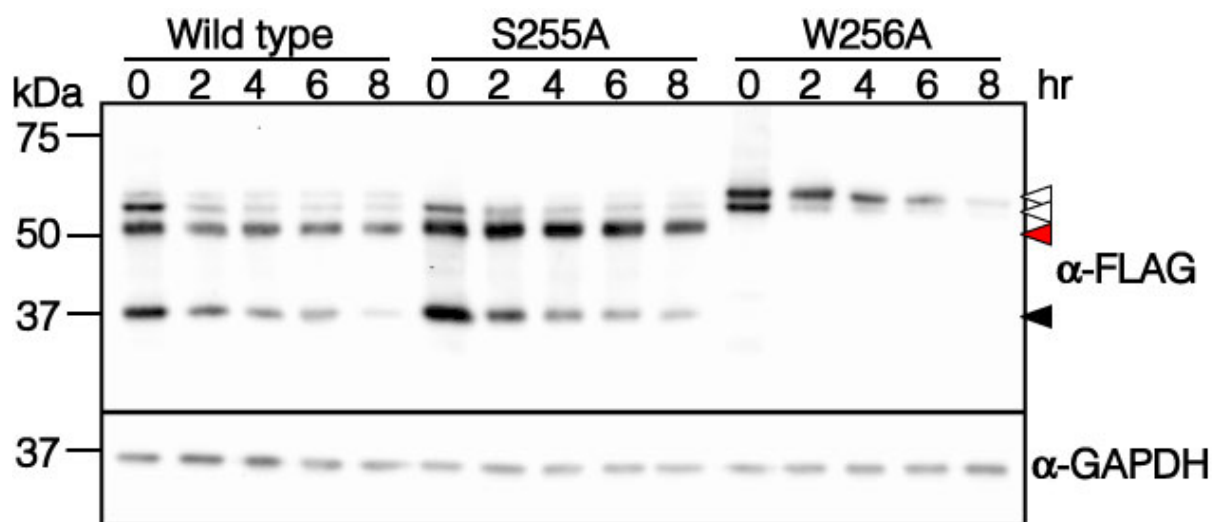


Figure 24. Non-knockdown 条件下における XBP1u 翻訳休止の Harringtonine-chase 実験

HEK293T 細胞に Wild type, 翻訳休止の強い変異体である S255A, 翻訳休止の弱い変異体である W256A をトランスフェクションした後, 翻訳開始阻害剤である Harringtonine を添加しその後の全長タンパク質, 翻訳休止産物の経時的变化を調べた. Harringtonine 添加後 0 時間から 8 時間まで 2 時間毎に細胞ライセートを回収しサンプル化を行った. 得られたサンプルを用いて NuPAGE, 及び Western Blotting を行った. Western Blotting には FLAG tag 抗体とローディングコントロールとして GAPDH 抗体を使用した.

白矢頭は全長タンパク質を, 赤矢頭は翻訳休止産物を, 黒矢頭は翻訳放棄産物を示している.

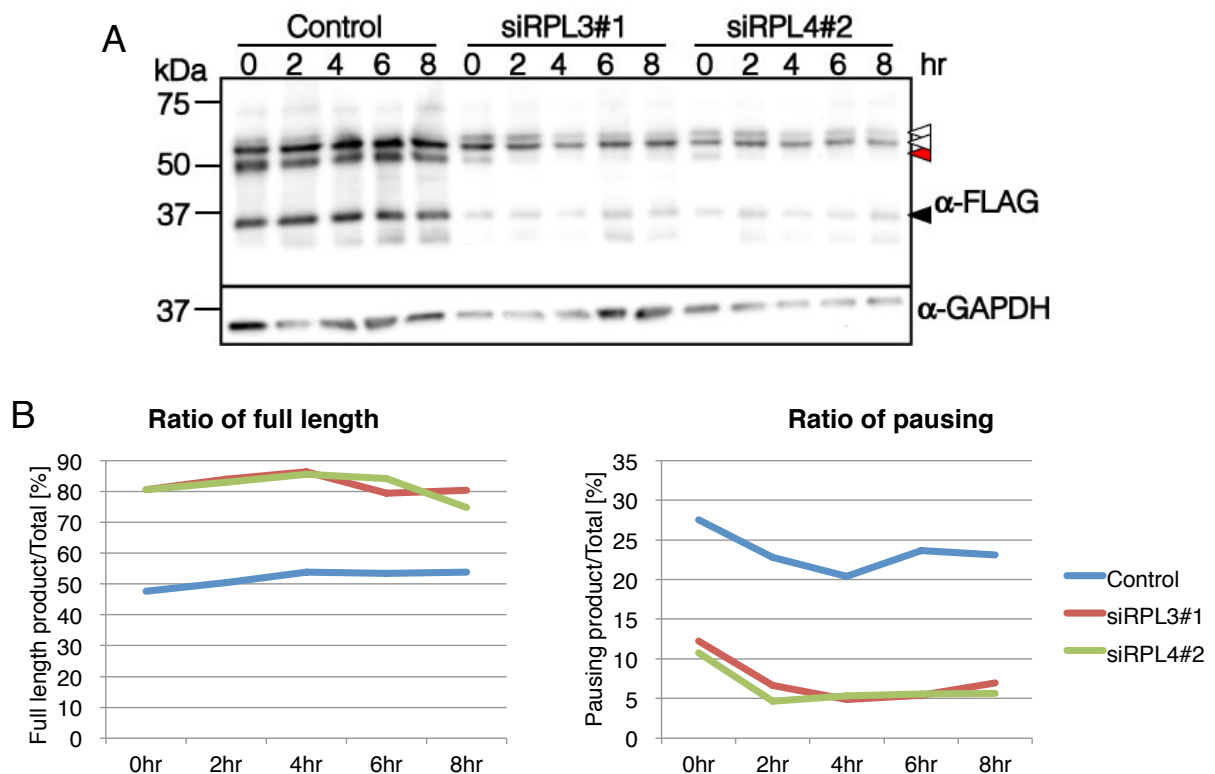


Figure 25. RPL3, RPL4 ノックダウン条件下における XBP1u 翻訳休止の Harringtonine-chase 実験

A) HEK293T 細胞において *Silencer*^B Select Negative Control #1 siRNA (Control), siRPL3#1, 及び siRPL4#2 によるノックダウンを行い, Figure 11 に示した XBP1u コンストラクション [Wild type] をトランスフェクションした後, 翻訳開始阻害剤である Harringtonine を添加しその後の全長タンパク質, 翻訳休止産物の経時的変化を調べた. Harringtonine 添加後 0 時間から 8 時間まで 2 時間毎に細胞ライセートを回収しサンプル化を行った. 得られたサンプルを用いて NuPAGE, 及び Western Blotting を行った. Western Blotting には FLAG tag 抗体とローディングコントロールとして GAPDH 抗体を使用した.

白矢頭は全長タンパク質を, 赤矢頭は翻訳休止産物を, 黒矢頭は翻訳放棄産物を示している.

B) 全体の産物に対する全長タンパク質, 及び翻訳休止産物の割合をグラフ化した.

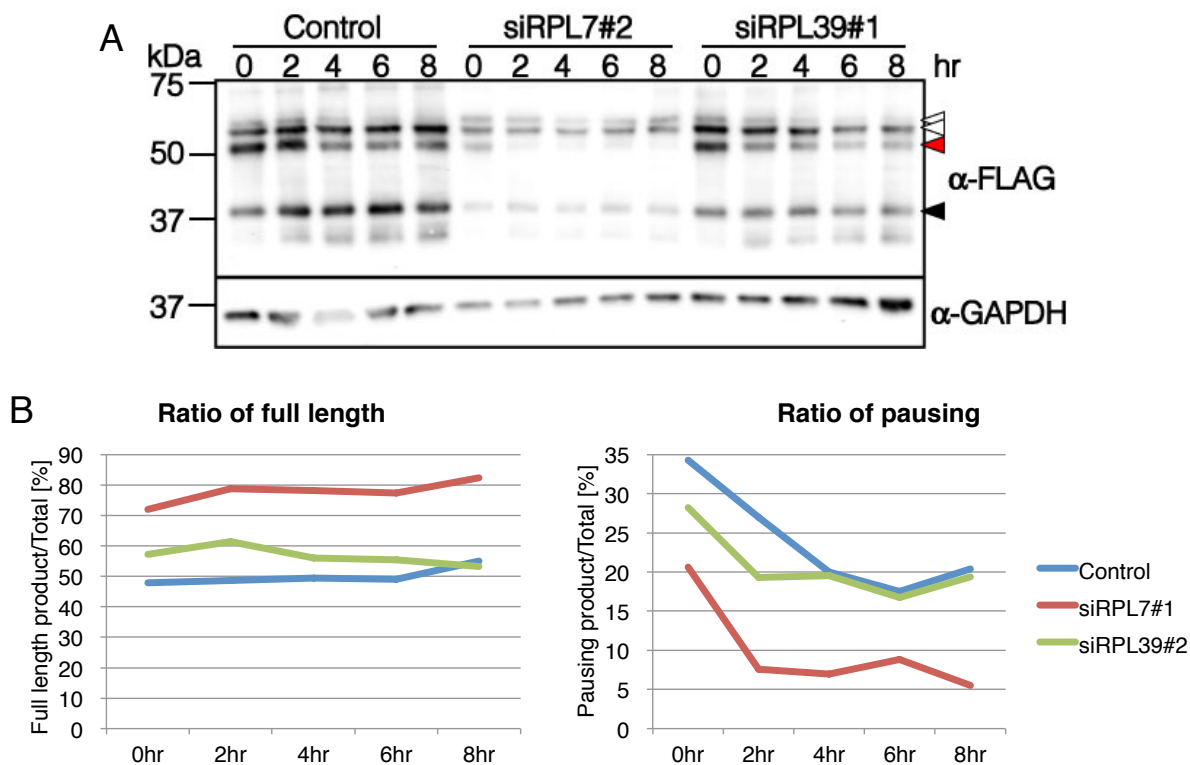


Figure 26. RPL7, RPL39 ノックダウン条件下における XBP1u 翻訳休止の Harringtonine-chase 実験

A) HEK293T 細胞において *Silencer^B Select Negative Control #1* siRNA (Control), siRPL7#2, 及び siRPL39#1 によるノックダウンを行い, Figure 11 に示した XBP1u コンストラクション [Wild type] をトランスフェクションした後, 翻訳開始阻害剤である Harringtonine を添加しその後の全長タンパク質, 翻訳休止産物の経時的変化を調べた. Harringtonine 添加後 0 時間から 8 時間まで 2 時間毎に細胞ライセートを回収しサンプル化を行った. 得られたサンプルを用いて NuPAGE, 及び Western Blotting を行った. Western Blotting には FLAG tag 抗体とローディングコントロールとして GAPDH 抗体を使用した.

白矢頭は全長タンパク質を, 赤矢頭は翻訳休止産物を, 黒矢頭は翻訳放棄産物を示している.

B) 全体の産物に対する全長タンパク質, 及び翻訳休止産物の割合をグラフ化した.

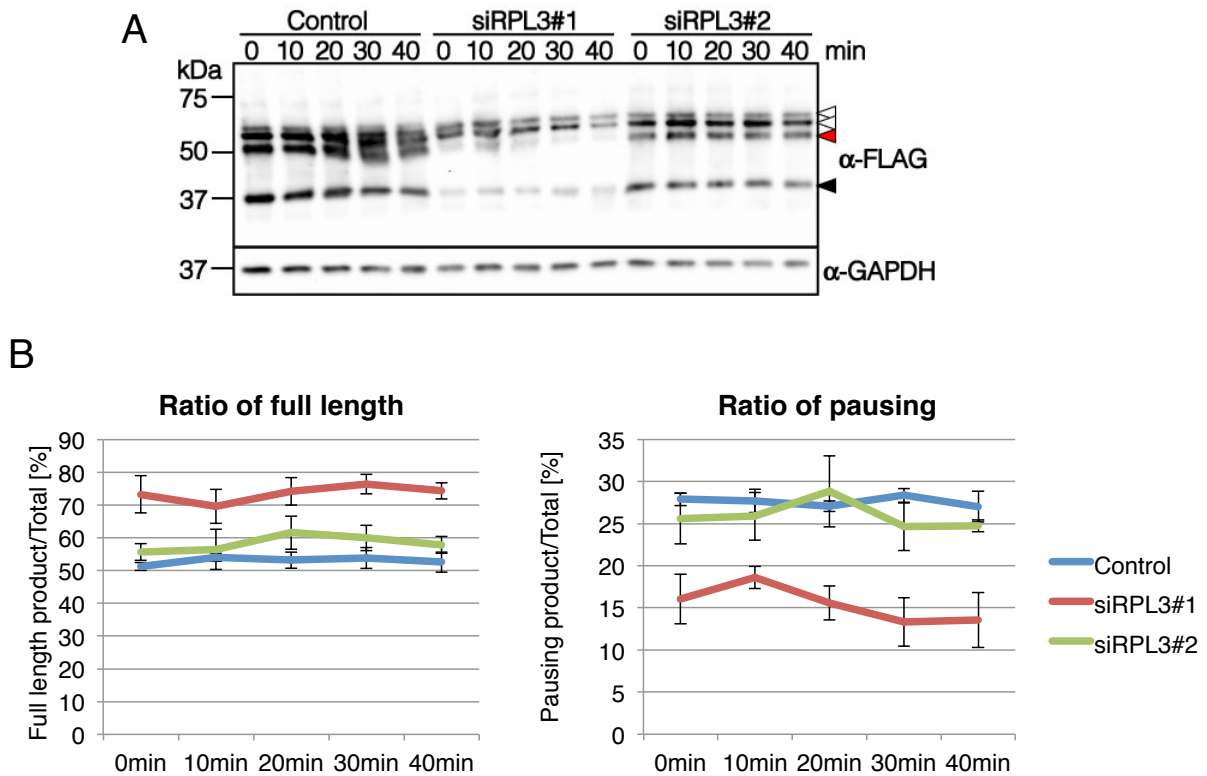


Figure 27. RPL3 ノックダウン条件下における XBP1u 翻訳休止の Harringtonine-chase 実験

A) HEK293T 細胞において *Silencer^B Select Negative Control #1* siRNA (Control), siRPL3#1, 及び siRPL3#2 によるノックダウンを行い, Figure 11 に示した XBP1u コンストラクション [Wild type] をトランスフェクションした後, 翻訳開始阻害剤である Harringtonine を添加しその後の全長タンパク質, 翻訳休止産物の経時的変化を調べた. Harringtonine 添加後 0 分から 40 分まで 10 分毎に細胞ライセートを回収しサンプル化を行った. 得られたサンプルを用いて NuPAGE, 及び Western Blotting を行った. Western Blotting には FLAG tag 抗体とローディングコントロールとして GAPDH 抗体を使用した.

白矢頭は全長タンパク質を, 赤矢頭は翻訳休止産物を, 黒矢頭は翻訳放棄産物を示している.

B) 全体の産物に対する全長タンパク質, 及び翻訳休止産物の割合をグラフ化した.

全て実験は 3 回行い, 平均値と標準偏差で表している.

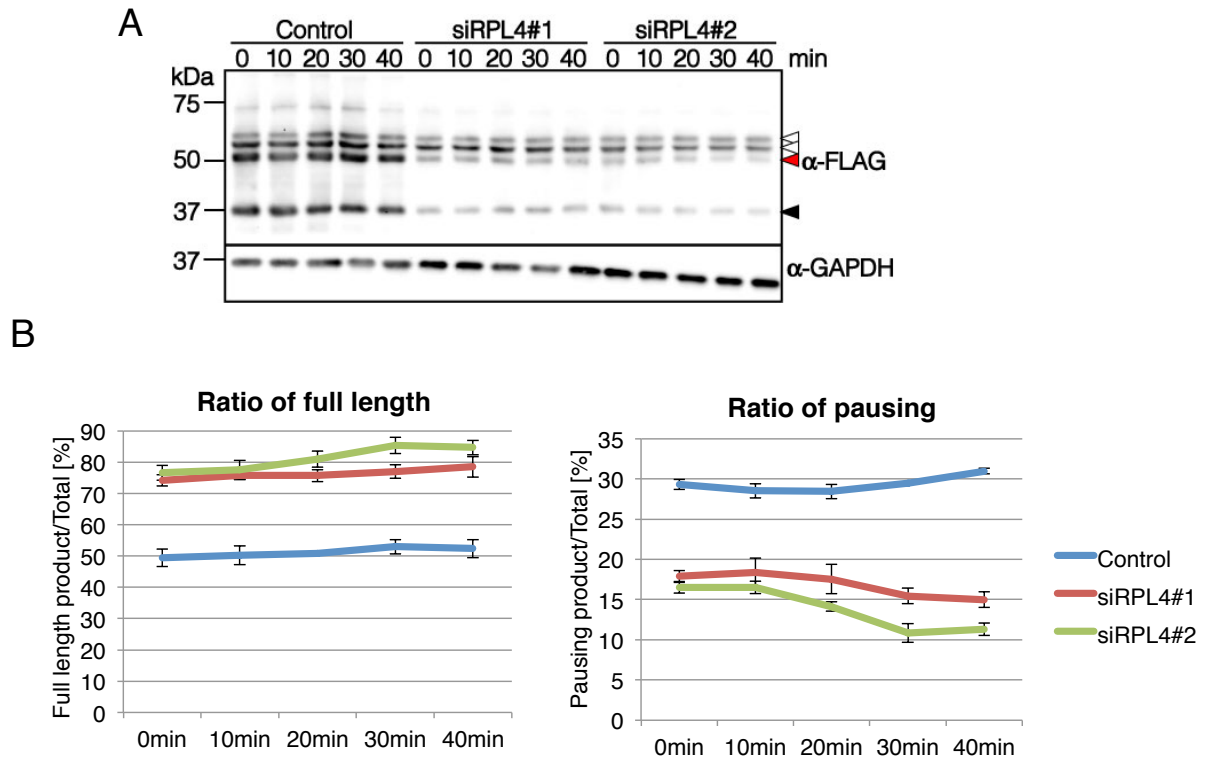


Figure 28. RPL4 ノックダウン条件下における XBP1u 翻訳休止の Harringtonine-chase 実験

A) HEK293T 細胞において *Silencer^B Select Negative Control #1* siRNA (Control), siRPL4#1, 及び siRPL4#2 によるノックダウンを行い, Figure 11 に示した XBP1u コンストラクション [Wild type] をトランスフェクションした後, 翻訳開始阻害剤である Harringtonine を添加しその後の全長タンパク質, 翻訳休止産物の経時的変化を調べた. Harringtonine 添加後 0 分から 40 分まで 10 分毎に細胞ライセートを回収しサンプル化を行った. 得られたサンプルを用いて NuPAGE, 及び Western Blotting を行った. Western Blotting には FLAG tag 抗体とローディングコントロールとして GAPDH 抗体を使用した.

白矢頭は全長タンパク質を, 赤矢頭は翻訳休止産物を, 黒矢頭は翻訳放棄産物を示している.

B) 全体の産物に対する全長タンパク質, 及び翻訳休止産物の割合をグラフ化した.

全て実験は 3 回行い, 平均値と標準偏差で表している.

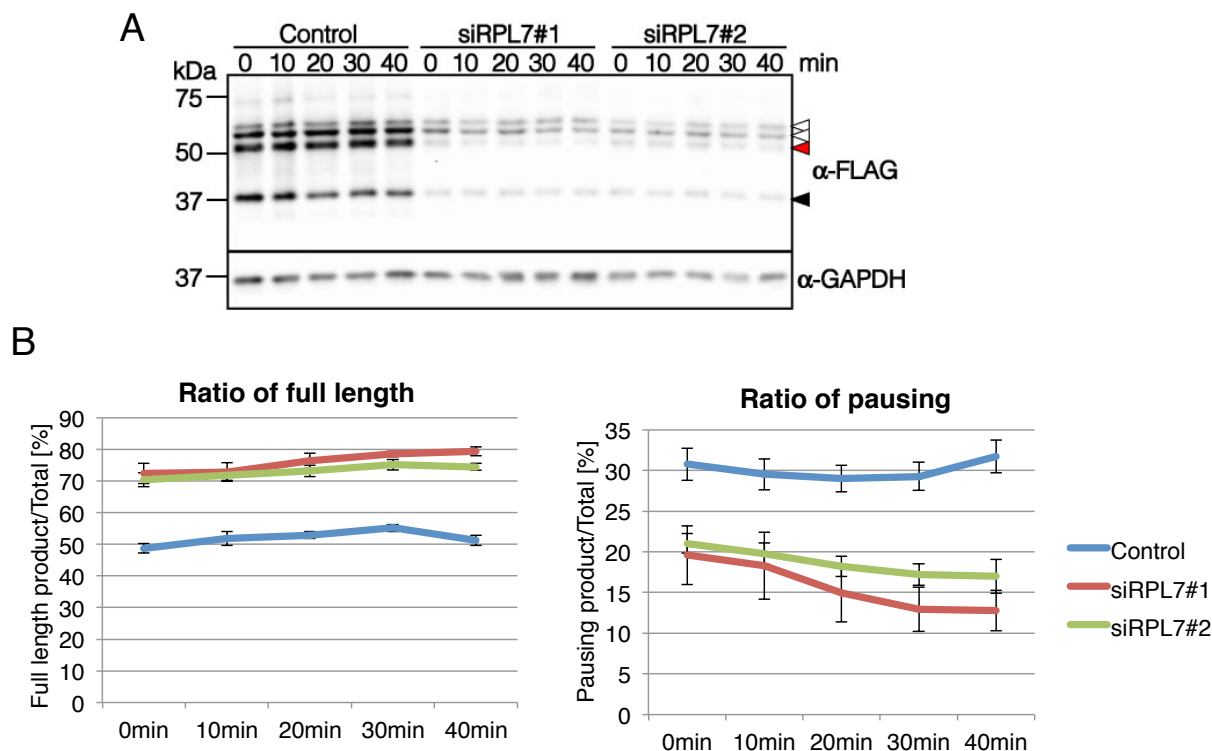


Figure 29. RPL7 ノックダウン条件下における XBP1u 翻訳休止の Harringtonine-chase 実験

A) HEK293T 細胞において *Silencer*^B Select Negative Control #1 siRNA (Control), siRPL7#1, 及び siRPL7#2 によるノックダウンを行い, Figure 11 に示した XBP1u コンストラクション [Wild type] をトランスフェクションした後, 翻訳開始阻害剤である Harringtonine を添加しその後の全長タンパク質, 翻訳休止産物の経時的変化を調べた. Harringtonine 添加後 0 分から 40 分まで 10 分毎に細胞ライセートを回収しサンプル化を行った. 得られたサンプルを用いて NuPAGE, 及び Western Blotting を行った. Western Blotting には FLAG tag 抗体とローディングコントロールとして GAPDH 抗体を使用した.

白矢頭は全長タンパク質を, 赤矢頭は翻訳休止産物を, 黒矢頭は翻訳放棄産物を示している.

B) 全体の産物に対する全長タンパク質, 及び翻訳休止産物の割合をグラフ化した.

全て実験は 3 回行い, 平均値と標準偏差で表している.

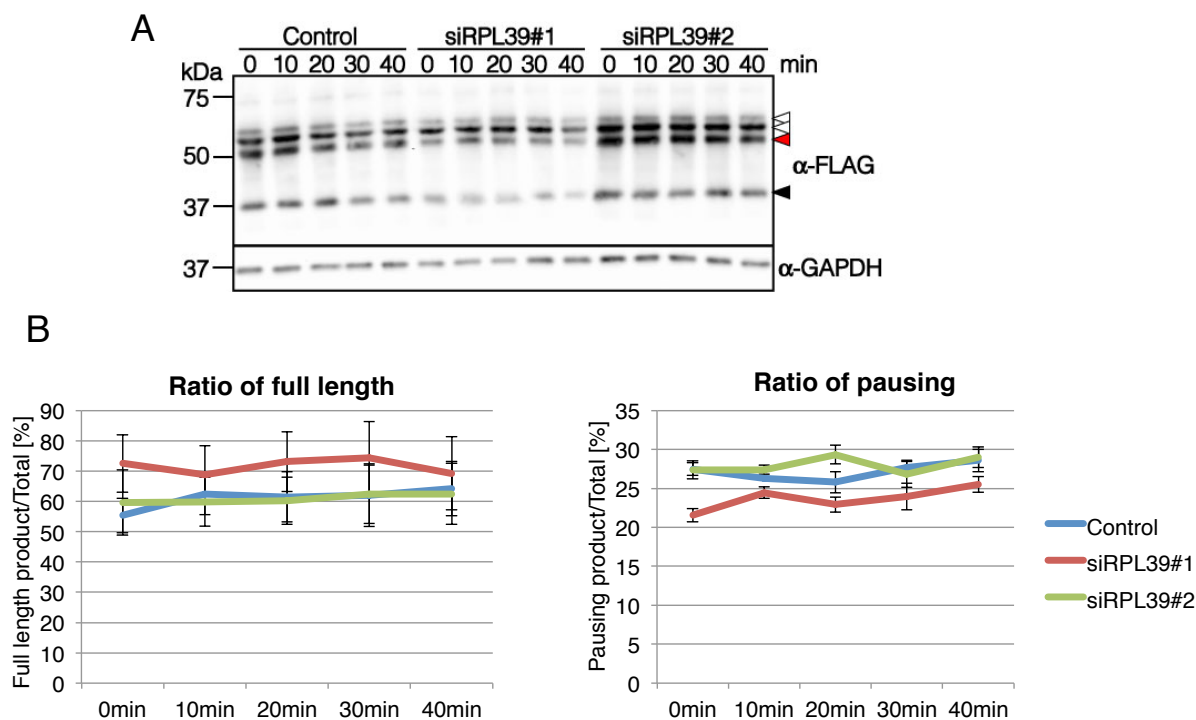


Figure 30. RPL39 ノックダウン条件下における XBP1u 翻訳休止の Harringtonine-chase 実験

A) HEK293T 細胞において *Silencer*^B Select Negative Control #1 siRNA (Control), siRPL39#1, 及び siRPL39#2 によるノックダウンを行い, Figure 11 に示した XBP1u コンストラクション [Wild type] をトランスフェクションした後, 翻訳開始阻害剤である Harringtonine を添加しその後の全長タンパク質, 翻訳休止産物の経時的変化を調べた. Harringtonine 添加後 0 分から 40 分まで 10 分毎に細胞ライセートを回収しサンプル化を行った. 得られたサンプルを用いて NuPAGE, 及び Western Blotting を行った. Western Blotting には FLAG tag 抗体とローディングコントロールとして GAPDH 抗体を使用した.

白矢頭は全長タンパク質を, 赤矢頭は翻訳休止産物を, 黒矢頭は翻訳放棄産物を示している.

B) 全体の産物に対する全長タンパク質, 及び翻訳休止産物の割合をグラフ化した.

全て実験は 3 回行い, 平均値と標準偏差で表している.

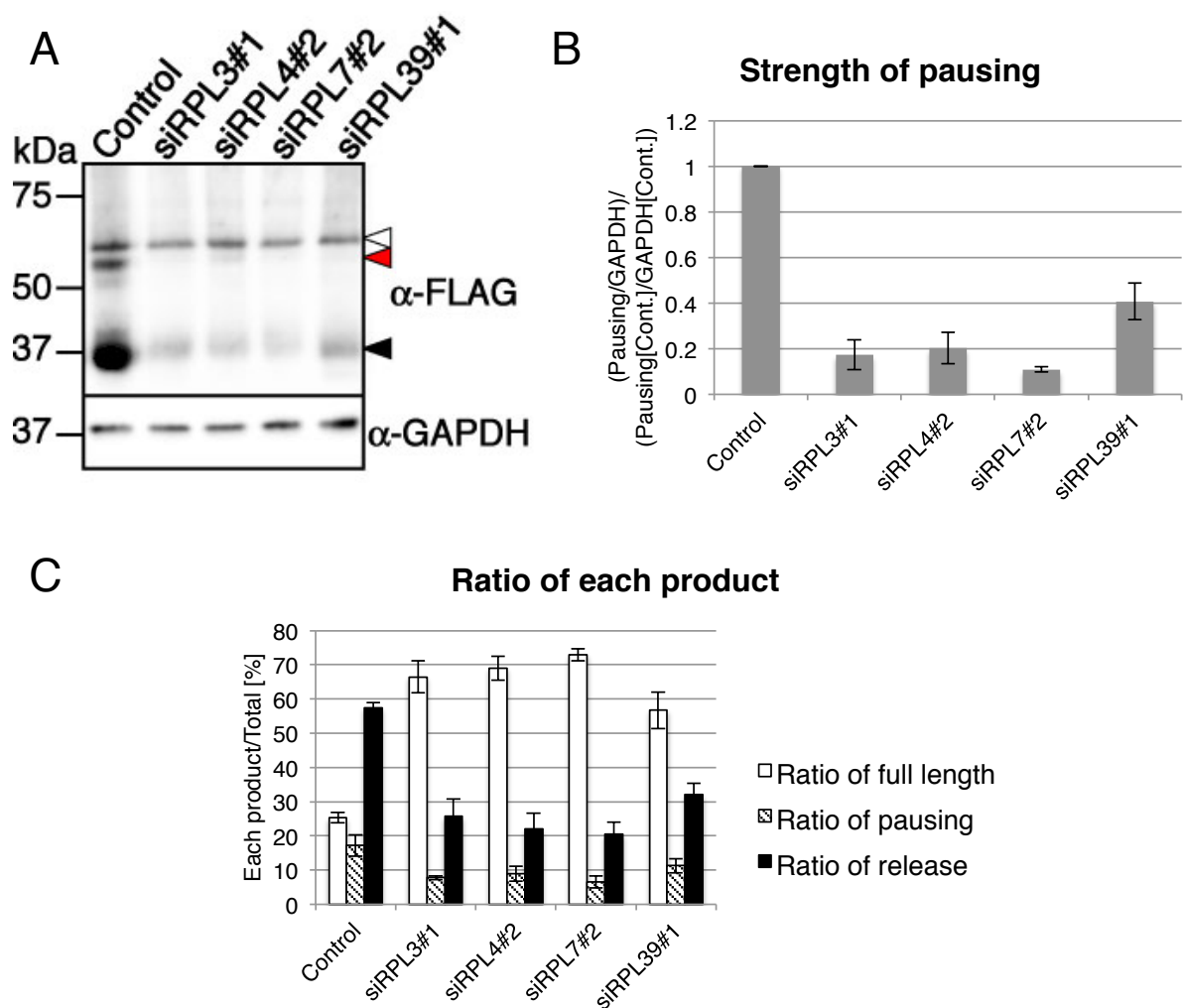


Figure 31. リボソームタンパク質ノックダウン条件下における正電荷クラスター (R30) による翻訳停止強度の検証

A) HEK293T 細胞において *Silencer*^B Select Negative Control #1 siRNA (Control), siRPL3#1, siRPL4#2, siRPL7#2, 及び siRPL39#1 によるノックダウンを行い, Figure 11 に示した R30 コンストラクションをトランスフェクションし, 細胞ライセートを回収しサンプル化した. 得られたサンプルを用いて NuPAGE, 及び Western Blotting を行い, 全長タンパク質, 翻訳停止産物, 及び翻訳放棄産物の検出を行った. Western Blotting には FLAG tag 抗体とローディングコントロールとして GAPDH 抗体を使用した.

白矢頭は全長タンパク質を, 赤矢頭は翻訳停止産物を, 黒矢頭は翻訳放棄産物を示している.

B) $(\text{Pausing}/\text{GAPDH})/(\text{Pausing} [\text{Control}]/\text{GAPDH} [\text{Control}])$ の式を用いて翻訳停止産物の検出強度を算出しグラフ化した.

C) 全体の産物に対する全長タンパク質, 翻訳停止産物, 及び翻訳放棄産物の割合をグラフ化した. 全て実験は 3 回行い, 平均値と標準偏差で表している.

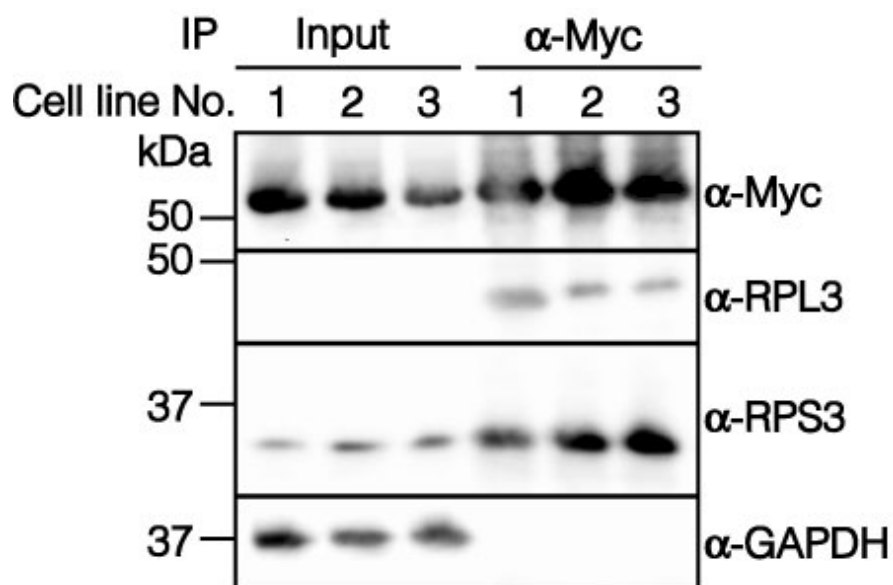
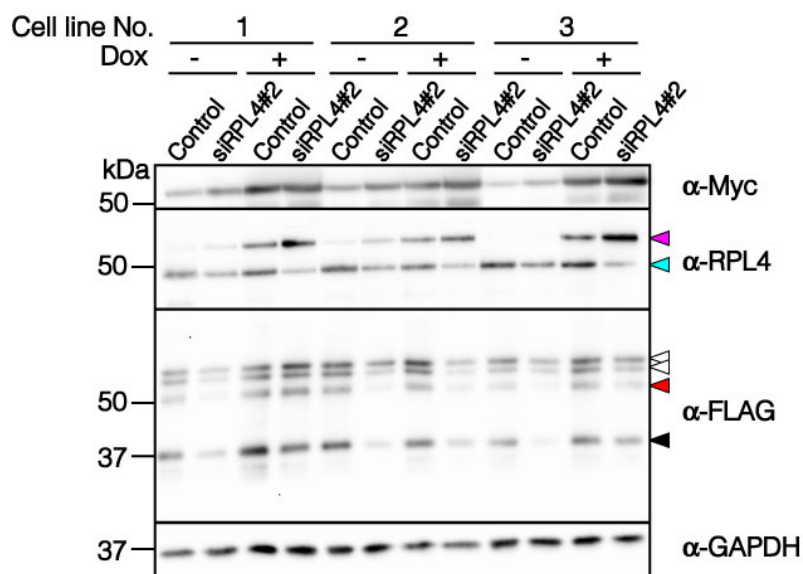


Figure 32. Myc tag 融合 RPL4 のリボソーム複合体形成能の確認

Myc tag 融合 RPL4 Stable transfectant 株 1, 2, 3 において Doxycycline による Myc tag 融合 RPL4 の発現誘導を行った後、細胞ライセートを回収し、Myc tag 抗体を用いた共免疫沈降 (Co-IP) を行った。得られたサンプルを用いて NuPAGE, 及び Western Blotting を行い、Myc tag 融合 RPL4, RPL3, RPS3, 及び GAPDH の検出を行った。Western Blotting には Myc tag 抗体, RPL3 抗体, RPS3 抗体, GAPDH 抗体を使用した。なお, Input は 6% である。



Control

No.	Dox	Full length product/ Total [%]	Pausing product/ Total [%]
1	-	60.1	13.7
	+	60.1	16.2
2	-	65.9	15.2
	+	69.3	12.5
3	-	71.4	9.2
	+	71.1	13.2

siRPL4#2

No.	Dox	Full length product/ Total [%]	Pausing product/ Total [%]
1	-	79.0	6.3
	+	65.6	15.9
2	-	94.0	2.2
	+	74.2	7.7
3	-	95.1	3.2
	+	76.9	8.2

Figure 33. Myc tag 融合 RPL4 Stable transfectant 株における内在性のリボソームタンパク質ノックダウン

Myc tag 融合 RPL4 Stable transfectant 株 1, 2, 3 において Doxycycline による Myc tag 融合 RPL4 の発現誘導を行った後, *Silencer*^B Select Negative Control #1 siRNA (Control), 及び siRPL4#2 によるノックダウンを行い, Figure 11 に示した XBP1u コンストラクションをトランスフェクションし, 細胞ライセートを回収しサンプル化した. 得られたサンプルを用いて NuPAGE, 及び Western Blotting を行い, Myc tag 融合 RPL4, 内在性 RPL4, 全長タンパク質, 翻訳停止産物, 及び翻訳放棄産物の検出を行った. Western Blotting には Myc tag 抗体, RPL4 抗体, FLAG tag 抗体, 及びローディングコントロールとして GAPDH 抗体を使用した. なお, Doc-は Doxycycline による Myc tag 融合 RPL4 の発現誘導を行っていないことを示している.

紫矢頭は Myc tag 融合 RPL4, 水色矢頭は内在性 RPL4, 白矢頭は全長タンパク質, 赤矢頭は翻訳停止産物, 黒矢頭は翻訳放棄産物を示している.

Control, 及び siRPL4#2 によるノックダウン条件下における全長タンパク質の割合と翻訳停止産物の割合を表に示した.

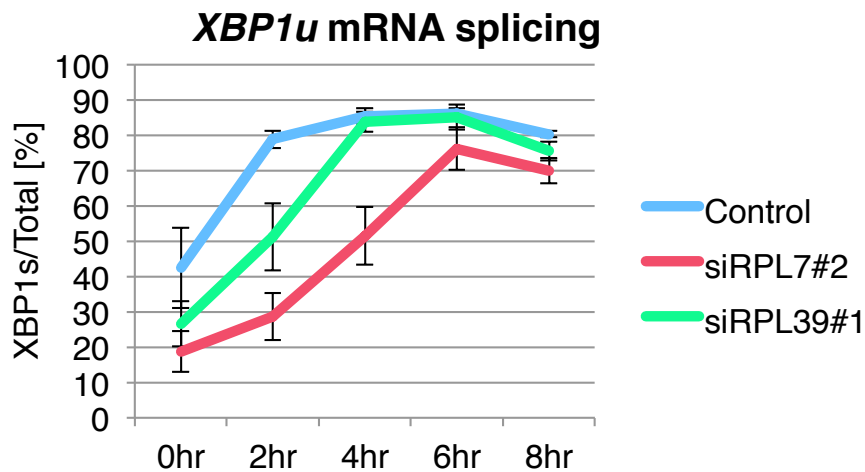
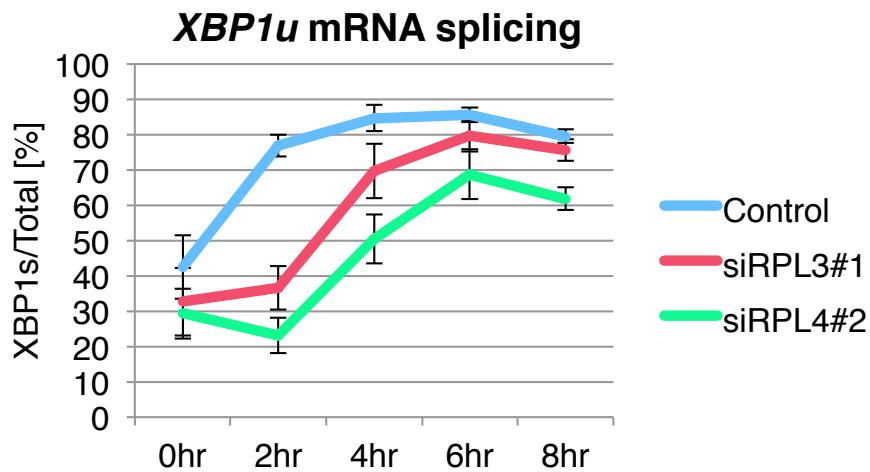
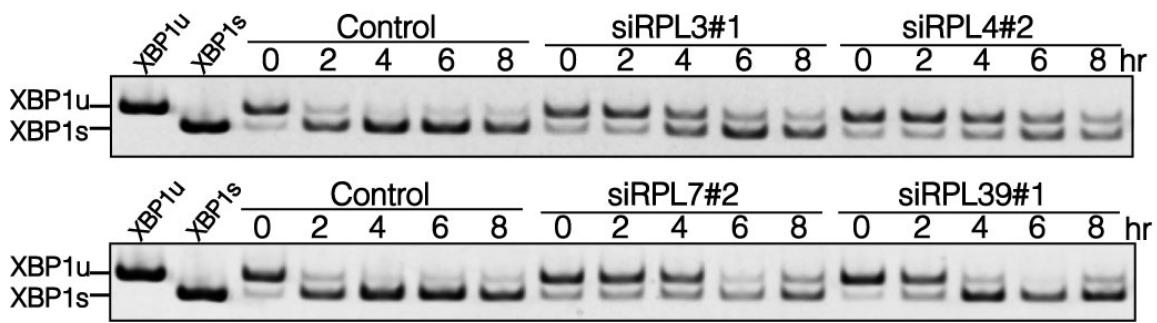
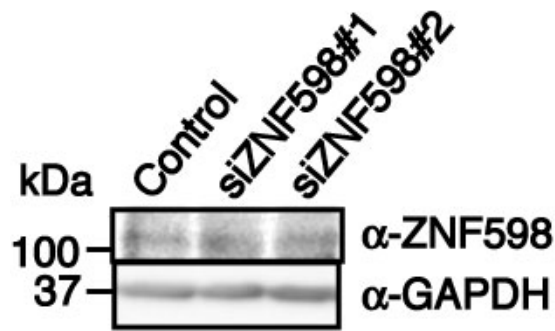


Figure 34. リボソームタンパク質ノックダウンが小胞体ストレス応答へ与える影響

HEK293T 細胞において *Silencer*^B Select Negative Control #1 siRNA (Control), siRPL3#1, siRPL4#2, siRPL7#2, 及び siRPL39#1 によるノックダウンを行った後, 小胞体ストレス誘導剤である Tunicamycin を添加した. Tunicamycin 添加後, 0 時間から 8 時間まで 2 時間毎に細胞を回収し, RNA の抽出を行った. 得られた RNA を鋳型として cDNA の合成と PCR による XBP1 の増幅を行いサンプル化した. 得られたサンプルを用いて PAGE を行った.

全体の産物 (XBP1u+XBP1s) に対する XBP1s の割合をグラフ化した.



	Control	siZNF598#1	siZNF598#2
Knockdown efficiency	1.00	0.75	0.82

Figure 35. siZNF598 による ZNF598 のノックダウン効率

HEK293T 細胞において *Silencer*^B Select Negative Control #1 siRNA (Control), siZNF598#1, 及び siZNF598#2 によるノックダウンを行い, 細胞ライセートを回収しサンプル化した後, SDS-PAGE, 及び Western Blotting により ZNF598 の検出を行った. Western Blotting には ZNF598 抗体とローディングコントロールとして GAPDH 抗体を使用した.

$(\text{ZNF598}/\text{GAPDH})/(\text{ZNF598} [\text{Control}]/\text{GAPDH} [\text{Control}])$ の式を用いてノックダウン効率を算出しグラフ化した.

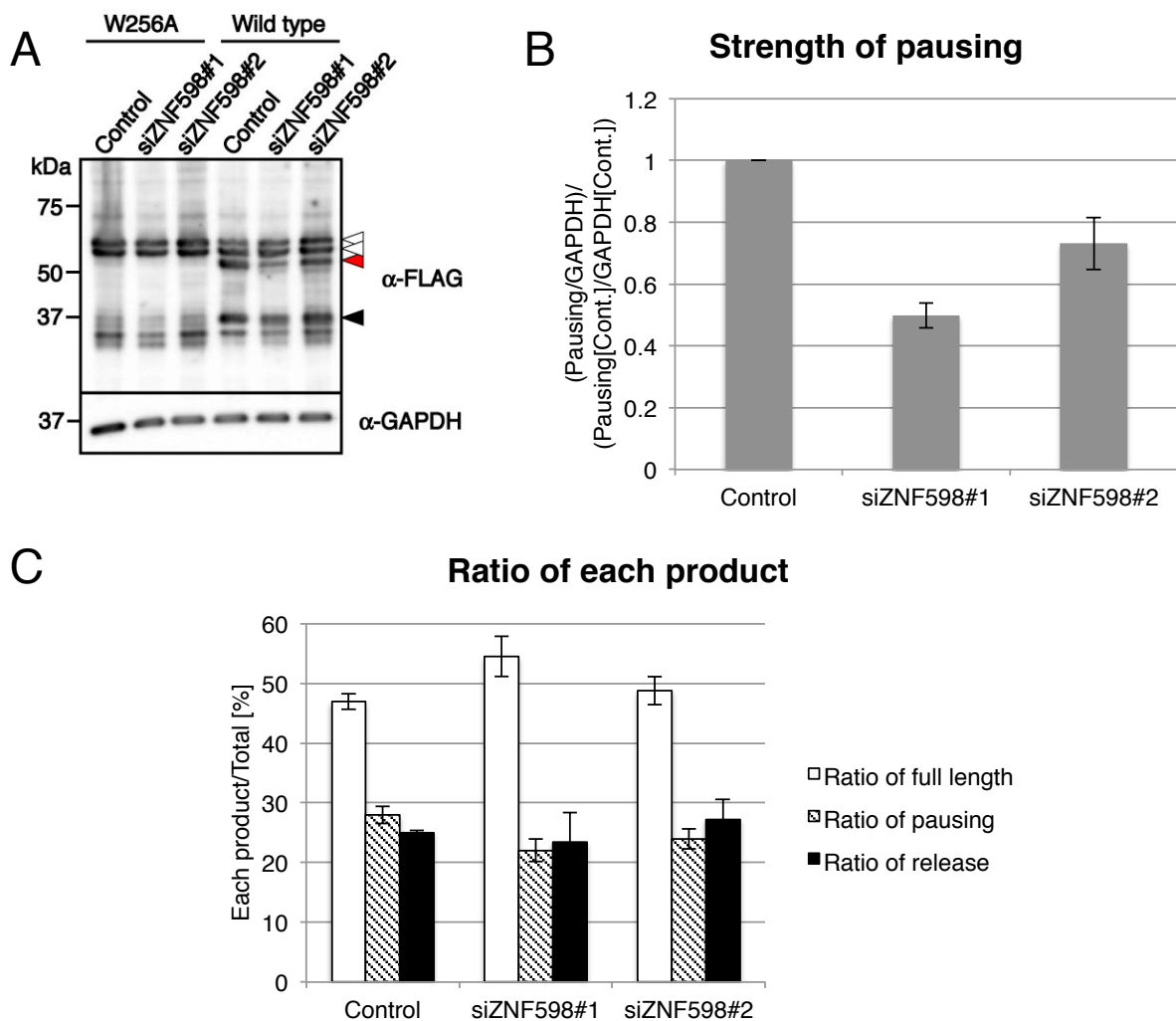


Figure 36. ZNF598 のノックダウンが XBP1u の翻訳休止に与える影響

A) HEK293T 細胞において *Silencer*[®] Select Negative Control #1 siRNA (Control), siZNF598#1, 及び siZNF598#2 によるノックダウンを行い, Figure 11 に示した XBP1u コンストラクションをトランスフェクションし, 細胞ライセートを回収しサンプル化した. 得られたサンプルを用いて NuPAGE, 及び Western Blotting を行い, 全長タンパク質, 翻訳休止産物, 及び翻訳放棄産物の検出を行った. Western Blotting には FLAG tag 抗体とローディングコントロールとして GAPDH 抗体を使用した.

白矢頭は全長タンパク質を, 赤矢頭は翻訳休止産物を, 黒矢頭は翻訳放棄産物を示している.

B) $(\text{Pausing}/\text{GAPDH})/(\text{Pausing} [\text{Control}]/\text{GAPDH} [\text{Control}])$ の式を用いて翻訳休止産物の検出強度を算出しグラフ化した.

C) 全体の産物に対する全長タンパク質, 翻訳休止産物, 及び翻訳放棄産物の割合をグラフ化した. 全て実験は 3 回行い, 平均値と標準偏差で表している.

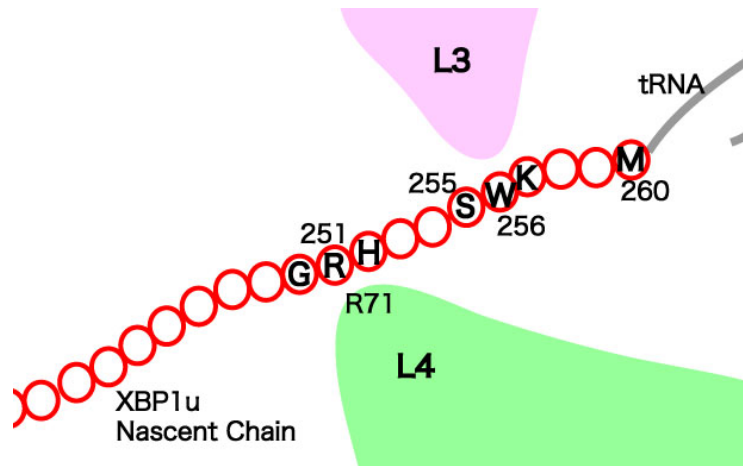


Figure 37. XBP1u 新生ポリペプチド鎖と相互作用し得るリボソームタンパク質

XBP1u Nascent Chain (XBP1u 新生ポリペプチド鎖) の赤い球はアミノ酸残基を表しており, XBP1u 新生ポリペプチド鎖の 251 番目の Arg 残基は RPL4 (緑色) の 71 番目の Arg 残基と相互作用し得る距離に位置していた. また, XBP1u 新生ポリペプチド鎖の 256 番目の Trp 残基は L3 (ピンク色) と相互作用し得る距離に位置していた.

PDB (ID : 5aj0) と PyMOL より得られた 3D イメージをもとに作製した.

Table 1. *Mai*-PEG によるシステイン残基の修飾実験に用いたプラスミド DNA, 及びプラスミド DNA の作製に用いたプライマー一覧

プラスミド DNA 名	テンプレート	プライマー名	プライマーの配列
FLAG tag-XBP1u-HA tag [SSS, L220C]/pBSII SK (L220C)	FLAG tag-XBP1u-HA tag [SSS]/pBSII SK (SSS mutant)	P220C (SSS) -S	5' cttcaaatgcctgccccagagcctgcc 3'
		P220C (SSS) -AS	5' ggcaggctctggggcaggcatttgaag 3'
FLAG tag-XBP1u-HA tag [SSS, P221C]/pBSII SK (P221C)	"	P221C (SSS) -S	5' cttcaaatgccctttgccagagcctgccagcc 3'
		P221C (SSS) -AS	5' ggctggcaggctctggcaaagggcatttgaag 3'
FLAG tag-XBP1u-HA tag [SSS, Q222C]/pBSII SK (Q222C)	"	Q222C (SSS) -S	5' caaatgcccttccctgcagcctgccagcctgg 3'
		Q222C (SSS) -AS	5' ccaggctggcaggctgcagggaagggcatttg 3'
FLAG tag-XBP1u-HA tag [SSS, S223C]/pBSII SK (S223C)	"	S223C (SSS) -S	5' gcccttccccagtgctgccagcctggagg 3'
		S223C (SSS) -AS	5' cctccaggctggcaggcactgggaagggc 3'
FLAG tag-XBP1u-HA tag [SSS, L224C]/pBSII SK (L224C)	"	L224C (SSS) -S	5' cttccccagagctcccagcctggaggagc 3'
		L224C (SSS) -AS	5' gctcctccaggctggcagctctgggaag 3'
FLAG tag-XBP1u-HA tag [SSS, P225C]/pBSII SK (P225C)	"	P225C (SSS) -S	5' cttccccagagcctgtgcgctggaggagctcc 3'
		P225C (SSS) -AS	5' ggagctcctccaggcgcacaggtctgggaag 3'
FLAG tag-XBP1u-HA tag [SSS, A226C]/pBSII SK (A226C)	"	A226C (SSS) -S	5' cagagcctccatgctggaggagctcccag 3'
		A226C (SSS) -AS	5' ctgggagctcctccagcatggcaggtctg 3'
FLAG tag-XBP1u-HA tag [SSS, W227C]/pBSII SK (W227C)	"	W227C (SSS) -S	5' cagagcctgccagcctgcaggagctcccagagg 3'
		W227C (SSS) -AS	5' cctctgggagctcctgcaggctggcaggctctg 3'
FLAG tag-XBP1u-HA tag [SSS, R228C]/pBSII SK (R228C)	"	R228C (SSS) -S	5' cctgccagcctggtgcagctcccagaggtc 3'
		R228C (SSS) -AS	5' gacctctgggagctgcaccaggtctggcagg 3'
FLAG tag-XBP1u-HA tag [SSS, S229C]/pBSII SK (S229C)	"	S229C (SSS) -S	5' ctgccagcctggaggtgctcccagaggtctacc 3'
		S229C (SSS) -AS	5' ggtagacctctgggagcacctccaggtggcag 3'

プラスミド DNA 名	テンプレート	プライマー名	プライマーの配列
FLAG tag-XBP1u-HA tag [SSS, S230C]/pBSII SK (S230C)	FLAG tag-XBP1u-HA tag [SSS]/pBSII SK (SSS mutant)	S230C (SSS) -S	5' ccagcctggaggagctgccagaggtctaccag 3'
		S230C (SSS) -AS	5' ctggtagacctctggcagctcctccagctgg 3'
FLAG tag-XBP1u-HA tag [SSS, Q235C]/pBSII SK (Q235C)	//	Q235C (SSS) -S	5' ctcccagaggtctacctgcaaggaccagttcc 3'
		Q235C (SSS) -AS	5' ggaactgggtccttgcaggtagacctctgggag 3'
FLAG tag-XBP1u-HA tag [SSS, P240C]/pBSII SK (P240C)	//	P240C (SSS) -S	5' cagaaggaccagttgtctaccagcctcccttc 3'
		P240C (SSS) -AS	5' gaaagggaggctggtagcaaactgggtcctctg 3'

Table 2. 光架橋実験に用いたプラスミド DNA, 及びプラスミド DNA 作製に用いたプライマー一覧

プラスミド DNA 名	テンプレート	プライマー名	プライマーの配列
3xFLAG tag-8xHis tag-XBP1u-HA tag [M260Q]/pcDNA3.1 (M260Q)	3xFLAG tag-8xHis tag-XBP1u-HA tag/pcDNA3.1	M260Q-S	5' ccaagctggaagccattacagaactaccatac 3'
		M260Q-AS	5' gtatggtagttctgtaatggcttcagcttg 3'
3xFLAG tag-8xHis tag-XBP1u-HA tag [M260H]/pcDNA3.1 (M260H)	"	M260H-S	5' ccaagctggaagccattacacaactaccatac 3'
		M260H-AS	5' gtatggtagttgtgtaatggcttcagcttg 3'
3xFLAG tag-8xHis tag-XBP1u-HA tag [M260L]/pcDNA3.1 (M260L)	"	M260L-S	5' ccaagctggaagccattactgaactaccatac 3'
		M260L-AS	5' gtatggtagttcagtaatggcttcagcttg 3'
3xFLAG tag-8xHis tag-XBP1u-HA tag [M260I]/pcDNA3.1 (M260I)	"	M260I-S	5' ccaagctggaagccattaatcaactaccatac 3'
		M260I-AS	5' gtatggtagttgattaatggcttcagcttg 3'
3xFLAG tag-8xHis tag-XBP1u-HA tag [M260F]/pcDNA3.1 (M260F)	"	M260F-S	5' ccaagctggaagccattattcaactaccatac 3'
		M260F-AS	5' gtatggtagttgaataatggcttcagcttg 3'
3xFLAG tag-8xHis tag-XBP1u-HA tag [M260K]/pcDNA3.1 (M260K)	"	M260K-S	5' ccaagctggaagccattaagaactaccatac 3'
		M260K-AS	5' gtatggtagttcttaatggcttcagcttg 3'
3xFLAG tag-8xHis tag-XBP1u-HA tag [K236M, M260Q]/pcDNA3.1 (K236M, M260Q)	3xFLAG tag-8xHis tag-XBP1u-HA tag [M260Q]/pcDNA3.1 (M260Q)	K236M+M260Q-S	5' cagaggtctaccagatggaccagttccttac 3'
		K236M+M260Q-AS	5' gtaaggaactgggtccatctggtagaccttg 3'
3xFLAG tag-8xHis tag-XBP1u-HA tag [D237M, M260Q]/pcDNA3.1 (D237M, M260Q)	"	D237M+M260Q-S	5' ggtctaccagaagatgccagttcctaccag 3'
		D237M+M260Q-AS	5' ctggaaggaactggcatctctggtagacc 3'

プラスミド DNA 名	テンプレート	プライマー名	プライマーの配列
3xFLAG tag-8xHis tag-XBP1u-HA tag [P238M, M260Q]/pcDNA3.1 (P238M, M260Q)	3xFLAG tag-8xHis tag-XBP1u-HA tag [M260Q]/pcDNA3.1 (M260Q)	P238M+M260Q-S	5' ctaccagaaggacatggtccttaccagcc 3'
		P238M+M260Q-AS	5' ggctggtaaggaaccatgctctctgggtag 3'
3xFLAG tag-8xHis tag-XBP1u-HA tag [V239M, M260Q]/pcDNA3.1 (V239M, M260Q)	//	V239M+M260Q-S	5' ctaccagaaggaccaatgccttaccagcctc 3'
		V239M+M260Q-AS	5' ggaggctggtaaggcattgggtcctctgggtag 3'
3xFLAG tag-8xHis tag-XBP1u-HA tag [Q242M, M260Q]/pcDNA3.1 (Q242M, M260Q)	//	Q242M-S	5' gaccagttccttacatgcctcccttctctgtag 3'
		Q242M-AS	5' ctgacagagaaaggagcatgtaaggaactgg gtc 3'
3xFLAG tag-8xHis tag-XBP1u-HA tag [Q248M, M260Q]/pcDNA3.1 (Q248M, M260Q)	//	Q248M-S	5' cctcccttctctgtatgtgggacgtcatcag
		Q248M-AS	5' ctgatgacgtcccccacatacagagaaggagg 3'
3xFLAG tag-8xHis tag-XBP1u-HA tag [P254M, M260Q]/pcDNA3.1 (P254M, M260Q)	//	P254M+M260Q-S	5' tgggacgtcatcagatgagctggaagccattac ag 3'
		P254M+M260Q-AS	5' ctgtaatggctccagctcatctgatgacgtcccca 3'

Table 3. Flp-In™ System を用いた Myc tag 融合リボソームタンパク質安定発現株樹立のためのコンストラクションに用いたプライマー一覧

目的	テンプレート	プライマー名	プライマーの配列
RPL4DNA 配列の増幅	cDNA	BamHI-Kozak-RPL4-S	5' cgcgatccaccatggcgtgtgctcgcccactg 3'
	//	RPL4-XhoI-AS	5' ccgctcgagttatgcagcaggcttctctc 3'
DNA のリニア化	RPL4/pcDNA3.1	RPL4-S for Gibson assembly	5' gcgtgtgctcgcccactg 3'
	//	RPL4-AS for Gibson assembly	5' catggtggatccgagctcg 3'
サイレント変異の導入	3xMyc tag-RPL4 /pcDNA3.1	RPL4exon7mutant-S(for#2)	5' ttgaaatccaactacaatcttcccatgcaac 3'
	//	RPL4exon7mutant-AS(for#2)	5' actggcagctttacccaagtgcctgac 3'
DNA の断片化	3xMyc tag-RPL4 (for#2)/pcDNA3.1	pcDNA5-3Myc-S	5' accgagctcggatccatggagcagaagctgatctcagagg 3'
	//	pcDNA5-3Myc-RPL4-AS	5' gcagaattccaccacttatgcagcaggcttctctcctctg 3'
DNA のリニア化	FRT/pcDNA5	pcDNA5-S	5' gtggtggaattctgcagatattccagc 3'
	//	pcDNA5-AS	5' ggatccgagctcgggtaccaag 3'

Table 4. *in vitro* 実験に用いたプライマー一覧

	プライマー名	配列
1	SP6-pBSKII (+) -S	5' atttagtgacactatagaagaggaata 3'
2	Nonstop-XBP1u-AS-New	5' cattaatggctccagcttgg 3'
3	SP6-pcDNA3.1 (MCS) -S	5' atttagtgacactatagaagagacc 3'
4	pcDNA3.1-polyA-AS	5' ttttttttttttttttttttttttca 3'

Table 5. リボソームタンパク質, 及び ZNF598 のノックダウン実験に用いた siRNA 一覧

siRNA 名	siRNA ID	配列 (Sense)
siRPL3#1	s12142	5' ggcauaaaucuaagaagaatt 3'
siRPL3#2	s57789	5' gcuucaugggaccacugatt 3'
siRPL4#1	s12149	5' ggccgaauguugcaccaatt 3'
siRPL4#2	s12150	5' ccgcuuccucaagaguaatt 3'
siRPL7#1	s352	5' cucgaucucuugguaaaauatt 3'
siRPL7#2	s353	5' cacuaucacaaggaauauatt 3'
siRPL39#1	s194755	5' ggagauuucgacguguuuutt 3'
siRPL39#2	n317377	5' cccucccaauaacacuugatt 3'
siZNF598#1	s40509	5' gcagcaagaaggtacacatt 3'
siZNF598#2	s40510	5' ggactactacagcactattt 3'

これらの siRNA に加え, コントロールとして *Silencer*^B Select Negative Control #1 siRNA を使用した. なお, 使用した全ての siRNA は Thermo 社の *Silencer*^B Select siRNAs である.

Table 6. 光架橋産物の質量分析結果

	UV +	+	+	+	+	+	+	+	Control	
									+	-
	K236M	D237M	P238M	V239M	Q242M	Q248M	P254M	野生型 (M260)	W256A (M260)	野生型 (M260)
RPL3	-	○	○	○	○	○	○	○	-	-
RPL4	○	○	○	○	○	○	○	○	-	-
RPL6	-	○	○	○	-	-	-	-	-	-
RPL7	○	○	○	○	○	○	○	○	-	-
RPL13	-	○	○	○	-	○	-	-	-	-
RPL18	○	○	-	-	-	-	-	○	-	-
RPL19	-	○	-	-	-	○	-	-	-	-
RPL22	○	-	-	-	-	-	-	-	-	-

○は同定されたことを,-は未同定を示している.

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始ご指導ご助言を頂きました木俣行雄准教授、高木博史教授、河野憲二特任教授をはじめ、各研究室員に心より感謝いたします。

また、本研究のアドバイザーとしてご意見をいただきました遺伝子発現制御研究室の別所康全教授、分子医学細胞生物学研究室の末次志郎教授、機能ゲノム医学研究室の石田靖雅准教授に深く感謝致します。

参考文献

- Behrmann, E., Loerke, J., Budkevich, T. V., Yamamoto, K., Schmidt, A., Penczek, P. A., Vos, M. R., Bürger, J., Mielke, T., Scheerer, P., and Spahn, C. M. (2015). Structural snapshots of actively translating human ribosomes. *Cell* 161 (4), 845-857.
- Darby, N. J., and Creighton, T. E. (1993). Protein Structure (In Focus).
- Dimitrova, L. N., Kuroha, K., Tatematsu, T., and Inada, T. (2009). Nascent peptide-dependent translation arrest leads to Not4p-mediated protein degradation by the proteasome. *J. Biol. Chem.* 284 (16), 10343-10352.
- Ikeuchi, K., and Inada, T. (2016). Ribosome-associated Asc1/RACK1 is required for endonucleolytic cleavage induced by stalled ribosome at the 3' end of nonstop mRNA. *Sci. Rep.* 6, 28234.
- Ingolia, N. T., Lareau, L. F., and Weissman, J.S. (2011). Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes. *Cell* 147 (4), 789-802.
- Ishii, E., Chiba, S., Hashimoto, N., Kojima, S., Homma, M., Ito, K., Akiyama, Y., and Mori, H. (2015). Nascent chain-monitored remodeling of the Sec machinery for salinity adaptation of marine bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112 (40), E 5513-5522.
- Ito, K., and Chiba, S. (2013). Arrest peptides: cis-acting modulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* 82, 171-202.
- Jenni, S., and Ban, N. (2003). The chemistry of protein synthesis and voyage through the ribosomal tunnel. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13, 212-219.
- Juszkiewicz, S., and Hegde, R. S. (2017). Initiation of Quality Control during Poly(A) Translation Requires Site-Specific Ribosome Ubiquitination. *Mol. Cell* 65 (4), 743-750.
- Kuroha, K., Akamatsu, M., Dimitrova, L., Ito, T., Kato, Y., Shirahige, K., and Inada, T. (2010). Receptor for activated C kinase 1 stimulates nascent polypeptide-dependent translation arrest. *EMBO Rep.* 11 (12), 956-961.

- Lee, A. H., Iwakoshi, N. N., Anderson, K. C., and Glimcher, L. H. (2003). Proteasome inhibitors disrupt the unfolded protein response in myeloma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (17), 9946-9951.
- Lu, J., and Deutsch, C. (2008). Electrostatics in the ribosomal tunnel modulate chain elongation rates. *J. Mol. Biol.* 384 (1), 73-86.
- Muto, H., Nakatogawa, H., and Ito, K. (2006). Genetically encoded but nonpolypeptide prolyl-tRNA functions in the A site for SecM-mediated ribosomal stall. *Mol. Cell* 19; 22 (4), 545-552.
- Muto, H., and Ito, K. (2008). Peptidyl-prolyl-tRNA at the ribosomal P-site reacts poorly with puromycin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 366, 1043
- Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* 289, 920-930
- Pavlov, M. Y., Watts, R. E., Tan, Z., Cornish, V. W., Ehrenberg, M., and Forster, A. C. (2009). Slow peptide bond formation by proline and other N-alkylamino acids in translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (1), 50-54.
- Seidelt, B., Innis, C. A., Wilson, D. N., Gartmann, M., Armache, J. P., Villa, E., Trabuco, L. G., Becker, T., Mielke, T., Schulten, K., Steitz, T. A., and Beckmann, R. (2009). Structural insight into nascent polypeptide chain-mediated translational stalling. *Science* 4; 326 (5958), 1412-1415.
- Su, T., Cheng, J., Sohmen, D., Hedman, R., Berninghausen, O., von, Heijne, G., Wilson, D. N., and Beckmann, R. (2017). The force-sensing peptide VemP employs extreme compaction and secondary structure formation to induce ribosomal stalling. *Elife* 6. pii : e25642.
- Sundaramoorthy, E., Leonard, M.1., Mak, R., Liao, J., Fulzele, A., and Bennett, E. J. (2017). ZNF598 and RACK1 Regulate Mammalian Ribosome-Associated Quality Control Function by Mediating Regulatory 40S Ribosomal Ubiquitylation. *Mol. Cell* 16; 65 (4), 751-760.
- Tirosh, B., Iwakoshi, N. N., Glimcher, L. H., and Ploegh, H. L. (2006). Rapid turnover of unspliced Xbp-1 as a factor that modulates the unfolded protein response. *J. Biol. Chem.* 281, 5852-5860.

- Tsai, A., Kornberg, G., Johansson, M., Chen, J., and Puglisi, J. D. (2014). The dynamics of SecM-induced translational stalling. *Cell Rep.* 12; 7 (5), 1521-1533.
- Tsuboi, T., Kuroha, K., Kudo, K., Makino, S., Inoue, E., Kashima, I., and Inada, T. (2012). Dom34:hbs1 plays a general role in quality-control systems by dissociation of a stalled ribosome at the 3' end of aberrant mRNA. *Mol. Cell* 46 (4), 518-529.
- Voss, N. R., Gerstein, M., Steitz, T. A., and Moore, P. B. (2006). The geometry of the ribosomal polypeptide exit tunnel. *J. Mol. Biol.* 360, 893-906.
- Wohlgemuth, I., Brenner, S., Beringer, M., and Rodnina, M. V. (2008). Modulation of the rate of peptidyl transfer on the ribosome by the nature of substrates. *J. Biol. Chem.* 283 (47), 32229-32235.
- Wilson, D. N., and Beckmann, R. (2011). The ribosomal tunnel as a functional environment for nascent polypeptide folding and translational stalling. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 21 (2), 274-282.
- Yanagitani, K., Kimata, Y., Kadokura, H., and Kohno, K. (2011). Translational pausing ensures membrane targeting and cytoplasmic splicing of XBP1u mRNA. *Science* 331 (6017), 586-589.
- Yoshida, H., Oku, M., Suzuki, M., and Mori, K. (2006). pXBP1 (U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1 (S) in mammalian ER stress response. *J. Cell Biol.* 172, 565-575.
- Zhang, Y., Wölfle, T., and Rospert, S. (2013). Interaction of nascent chains with the ribosomal tunnel proteins Rpl4, Rpl17, and Rpl39 of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 288 (47), 33697-33707.
- 大古殿 美加 (2015). XBP1u タンパク質の翻訳停止機構の解析 (修士論文)