

# 論文内容の要旨

申請者氏名 真木 賢太郎

Eukaryotic elongation factor 2 (eEF2) は翻訳伸長過程におけるリボソーム内でのアミノアシル tRNA 転移反応を担う必須因子である。本研究の対象であるジフタミドは eEF2 のみに同定されている修飾ヒスチジンであり、修飾酵素である Dph1~Dph7 により哺乳動物では eEF2 の 715 番目ヒスチジン (H715) が多段階的に修飾されることで形成される。ジフテリア毒素等の ADP リボシル化毒素の一部はジフタミドを標的とし、eEF2 の ADP リボシル化を介したタンパク質合成の阻害、そして細胞死を誘導する。これらのことから、ジフタミドは生物の生存に不利に働くことが考えられるが、7 つもの修飾酵素を介して形成される複雑な修飾が全ての真核生物で保存されていることを考慮すると、ジフタミドは生体にとって極めて重要な未知の役割を担っていることが考えられる。しかし、ジフタミドの機能は未だ十分に解明されていない。本研究では、ジフタミド形成に影響する H715、または G717 に網羅的アミノ酸置換及び欠失変異を導入した精製ヒト eEF2 と変異型 eEF2 発現 HEK293T 細胞を作製し、ジフタミド修飾酵素欠損変異体との間に共通する表現型を見出すことでジフタミド機能の包括的な解明を試みた。

まず申請者は、ヒト翻訳再構成系を用いて各種変異ヒト精製 eEF2 活性評価を行った。その結果、H715 変異型 eEF2 では全変異体で eEF2 の翻訳伸長活性はほぼ完全に失われた。また、ジフタミド修飾を欠損した、全ての修飾酵素変異体由来 eEF2 及び G717 変異型 eEF2 においては、翻訳活性が低下していた。これらの結果から、ヒト eEF2 において H715 残基は翻訳活性に極めて重要であること、及び、ジフタミド修飾は eEF2 翻訳伸長活性に直接寄与することを初めて明らかにした。

次に申請者は、CRISPR/Cas9 ゲノム編集及びジフテリア毒素処理を組み合わせ、ジフタミド修飾を欠損した H715 変異細胞株及び G717 変異細胞株の樹立を試みた。その結果、H715 変異細胞株は生存不可であったが、G717 変異細胞株については、過去に報告例のない 7 種の新規変異体を含む 8 種類のジフタミド修飾欠損変異体の樹立に成功した。樹立したジフタミド修飾欠損 G717 変異体及びジフタミド修飾酵素変異体を用いた表現型解析の結果、全ての変異体において、タンパク合成及び細胞増殖能が低下することを明らかにした。さらに、レポーターアッセイによる解析から、樹立した全てのジフタミド修飾欠損変異体において、インフルエンザウイルス由来配列における +1 フレームシフト頻度がフレームシフトモチーフ依存的に増大しており、翻訳の正確性が低下していることを初めて明らかにした。

今回の研究により、715 番目ヒスチジンは eEF2 翻訳活性・細胞生存に極めて重要であること、ジフタミド修飾は eEF2 翻訳活性に直接寄与すること、ジフタミド修飾は細胞増殖・タンパク合成及び翻訳正確性 (+1 フレームシフト抑制) に寄与すること、の 3 点が示された。

やむを得ない事由[ 図書出版、学術雑誌等への掲載、特許・実用新案出願、個人情報等の保護、その他 ( ) ]により本要旨を非公表とする。

【 該当する事由に 印をすること】

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 真木 賢太郎

ジフタミドは全ての真核生物に保存されていることから、生体にとって極めて重要な役割を担っていると考えられる。ジフタミド機能を解明するため、先行研究において、eEF2 の 717 番目グリシンがアルギニンに置換された G717R 変異細胞株、及び、ジフタミド修飾酵素欠損細胞株の表現型解析がおこなわれ、ジフタミドは翻訳活性や翻訳正確性に寄与することが示唆されている。しかしながら、先行研究では細胞を用いた解析のみが行われており、ジフタミドが eEF2 翻訳活性に直接寄与しているかは明らかにされていない。また、G717R 変異体においてはアミノ酸置換変異による eEF2 の機能異常が起きている可能性があること、修飾酵素はジフタミド形成以外の機能も有することを考慮すると、先行研究ではジフタミド修飾欠損以外の表現型を見ていた可能性も考えられる。これらのことから、ジフタミドの機能は未だ十分に解明されていないと考えられる。そこで、申請者は、ジフタミド形成に影響する H715、または G717 に網羅的アミノ酸置換及び欠失変異を導入した精製ヒト eEF2 と変異型 eEF2 発現 HEK293T 細胞を作製した。これら変異体をジフタミド修飾酵素欠損変異体とともにヒト翻訳再構成系及び変異細胞株を用いて表現型解析を行い、全ジフタミド修飾欠損変異体に共通する表現型を見出すことでジフタミド機能の包括的な解明を試みた。

まず申請者は、ヒト翻訳再構成系を用いた各種変異ヒト精製 eEF2 の活性評価を行い、H715 変異型 eEF2 では全変異体で eEF2 の翻訳伸長活性はほぼ完全に失われること、及び、ジフタミド修飾酵素欠損変異体由来 eEF2、修飾が低下した G717 変異型 eEF2 において翻訳伸長活性が低下することを示した。これらのことより、ヒト eEF2 において H715 残基は翻訳活性に極めて重要であること、及び、これまで不明であった、ジフタミド修飾による eEF2 翻訳活性への直接的な寄与が初めて示された。

さらに、申請者は、CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いて網羅的に樹立したジフタミド修飾欠損型 eEF2 発現細胞株、及び、ジフタミド修飾酵素変異細胞株の表現型解析を行った。その結果全てのジフタミド修飾欠損細胞において、細胞増殖及びタンパク合成が低下していることを示し、ジフタミドが細胞におけるタンパク合成及び細胞増殖に寄与することを突き止めた。また、レポーターアッセイによる解析から、全てのジフタミド修飾欠損変異体において、インフルエンザウイルス由来配列のフレームシフトモチーフに依存して+1 フレームシフト頻度が上昇することを示し、ジフタミドが+1 フレームシフト抑制作用を有することを初めて示した。インフルエンザウイルス由来配列における+1 フレームシフト産物は、宿主細胞の RNA を分解することでウイルスに対する感染防御能を低下させる。本研究結果から、ジフタミドは+1 フレームシフトを抑制することで、ウイルス感染防御に寄与している可能性が初めて示唆された。

以上のように、本論文はジフタミドの生理的意義解明に向けて重要な知見を示したのみならず、ジフタミドのウイルス感染防御における役割を示唆した点でも意義のある知見であり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。

やむを得ない事由[ 図書出版、学術雑誌等への掲載、特許・実用新案出願、個人情報等の保護、その他( ) ]により本要旨を非公表とする。

【 該当する事由に 印をすること】