

博士論文を要約したもの

博士論文題目

ゲノム編集及びヒト再構成型蛋白質合成系を用いた eEF2-ジフタミドの機能解析

氏名 真木 賢太郎

(要約)

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 eEF2 の 715 番目のヒスチジン (H715) が多段階的に修飾されることで形成される。興味深いことに、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。

当研究室の先行研究において、酵母 eEF2 のジフタミドに変換されるヒスチジンを他の 19 種のアミノ酸に置換したところ、13 種の変異細胞株は生存可能であり、酵母においてジフタミドは生存に必須でないことを報告している。一方で、ハムスター由来の CHO 細胞を用いたジフテリア毒素耐性変異体スクリーニングの研究においては、ジフタミド修飾酵素の変異体及び eEF2 の 717 番目のグリシンがアルギニンに置換された G717R 変異体が取得されており、これまでにこれらの変異体細胞の解析を通してジフタミドは翻訳活性や翻訳の正確性に寄与することが示唆されている。しかしながら、修飾酵素はジフタミド形成以外の機能も有していること、また、G717R 変異体においてはアミノ酸置換変異による eEF2 自体の機能異常やジフタミドの機能補完が起きている可能性を否定できず、ジフタミドの機能は十分に解明されているとは言えない。そこで本研究では、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変異を導入した精製 eEF2 と変異型 eEF2 発現 HEK293T 細胞を樹立した。これらの精製 eEF2、そして変異型 eEF2 発現細胞と当研究室で作製していたジフタミド修飾酵素欠損細胞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、ジフタミド欠損 eEF2 の in vitro 翻訳活性を調べるため、H715 及び G717

にアミノ酸変異及び欠失を導入した精製 FLAG-eEF2 を作製し、ヒトの転写・翻訳反応再構成系を用いて翻訳活性を評価した。その結果、H715 及び G717 変異体では、ジフタミド形成量の変動とともに、eEF2 の翻訳活性が大きく変動していることが明らかとなった。このことから、ヒトの eEF2 では H715 残基、及びジフタミド修飾が翻訳伸長活性に寄与することが示された。

次に、CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いた eEF2 変異体細胞株の樹立を試みた。本研究では、ジフテリア毒素がジフタミドを介して細胞死を誘導する特性を利用し、ゲノム編集とジフテリア毒素を用いたジフタミド欠損型細胞の高効率樹立法を用いて、eEF2 の標的アミノ酸 (H715, G717) に網羅的に変異導入を行った。その結果、これまで報告されていない変異体を含む複数のジフタミド欠損型変異細胞株の樹立に成功した。続いて、ジフタミドの機能を明らかにするため、樹立したジフタミド欠損型変異体及びジフタミド修飾酵素 Dph1 または Dph2 欠損細胞を用いて、細胞増殖能及びタンパク質合成活性を検討した。その結果、ジフタミドは正常な細胞増殖及びタンパク質合成活性に重要であることが強く示唆された。次に、eEF2 はタンパク質合成過程の翻訳伸長反応に直接関与するため、コドン配列依存的な伸長反応や伸長過程の正確性、または伸長速度の変化を検出するレポーターの作成を行った。具体的には二つのルシフェラーゼ遺伝子 (Rluc, Fluc) の間に、全 64 コドンの連続 20 コドンの繰り返し配列や、伸長過程 (フレームシフトや翻訳休止) に影響を及ぼすことが報告されている mRNA もしくはアミノ酸配列を挿入し、野生型及びジフタミド欠損細胞株に一過性に発現させた後、Rluc 及び Fluc 活性の比を比較することで各種配列における伸長活性を評価した。その結果、コドン繰り返し配列や翻訳休止誘導配列においては全てのジフタミド欠損細胞間で共通した変化は認められず、本研究ではジフタミドがこれらの配列の伸長活性に寄与しているか明らかにすることはできなかった。一方で、フレームシフト誘導配列については、全ジフタミド欠損細胞株において野生型と比較して有意にフレームシフト誘導頻度が上昇していること、また、誘導配列に変異を導入することでフレームシフト頻度上昇の抑制が生じることを見出した。本結果から、eEF2 のジフタミドは翻訳伸長過程におけるフレームシフトの抑制、つまり翻訳の正確性に重要であることが示唆された。

以上のように、本研究では新たなジフタミド欠損変異体を作製し、全ての変異体で共通する表現型を見出すことで、ジフタミドは正常な翻訳活性と細胞増殖に必要であること、及び、フレームシフトの抑制に寄与することを明らかにした。