

織毛虫における翻訳終結因子 eRF1 の終止コドン認識機構解明へ向けての解析

キム ワン^{1,2}, 由良 敬^{2,3}, 郷 信弘^{4,5}, 春本 晃江⁶

(¹奈良女子大・院・共生自然, ²原子力機構原研・量子生命, ³JST・CREST,
⁴原子力機構・中性子生命科学, ⁵奈良先端大・情報, ⁶奈良女子大・理・生物)

Sequencing and bioinformatics analyses of ciliate eRF1s toward understanding
stop codon recognition

Oanh T. P. KIM^{1,2}, Kei YURA^{2,3}, Nobuhiro GO^{4,5} and Terue HARUMOTO⁶

(¹Div. Human Environ. Sci., Nara Women's Univ., ²Quan. Bioinfor., Jpn. At. Ener. Agen.,
³CREST, JST, ⁴Comput. Biol. Gr. Jpn At. Ener. Agen., Jpn, ⁵Bioinfor. U., Nara Inst. Sci. Tech., ⁶Biol.
Sci., Nara Women's Univ.)

SUMMARY

Eukaryotic release factor 1 (eRF1) is believed to play an important role in the stop codon reassignment in ciliates. To clarify the specificity of stop codon recognition in ciliate eRF1s, we have sequenced eRF1 genes from four ciliate species. Phylogenetic and structure-based analyses of eRF1s have been carried out. We have statistically analyzed protein-RNA complexes available in a structure database (Protein Data Bank) and obtained a propensity for each amino

acid residue being located in the RNA-binding sites. Using the RNA-binding propensity, we have suggested areas on the protein surface that are important for stop codon recognition in ciliate eRF1s.

[目的] 真核生物の eRF1 は、3種類の終止コドン (UAA、UAG、UGA) を認識して翻訳を終結させる。この因子のドメイン1が終止コドンの認識に関わっているが、どのアミノ酸残基が終止コドンを認識しているのかはまだ明らかではない。繊毛虫において普遍的な遺伝暗号から逸脱した終止コドンをもつものは、eRF1 が変異していると考えられる。これまでに 28S rRNA 遺伝子を用いた系統樹により、終止コドンの変異は繊毛虫の進化の過程で数回、独立に起こったとされており (1)、eRF1 の系統樹を用いた解析でも少なくとも 2 回独立に起こったとされている (2)。

今回、繊毛虫原始大核綱の *Loxodes striatus*、旋毛綱の *Blepharisma musculus*、リトストマ綱の *Dileptus margaritifer* および *Didinium nasutum* より eRF1 遺伝子を単離し塩基配列を決定し系統樹を描いた。また、ホモロジーモデリングを用い、終止コドンを認識している可能性の高い部位を推定した。

[方法] *Blepharisma musculus* の Lenin 株、*Didinium nasutum* の 777 株 (ATCC 30399)、*Dileptus margaritifer* の L 株を用いた。*Loxodes striatus* は三宅章雄博士よりいただいた。培養した細胞 ($1 \times 10^5 - 10^6$ 細胞) より total RNA を抽出し cDNA を合成して PCR のテンプレートとした。eRF1 でよく保存されているアミノ酸配列をもとに作製した degenerate primer を用いて、まず部分的な断片を増幅した。その配列から種特異的プライマーを作製し、RACE-PCR 法により全長の配列を決定した。eRF1 の系統樹は近隣結合法により描いた。ホモロジーモデリングは、ヒトの eRF1 をテンプレートとして用い 3 D-JIGSAW (3) により行った。

[結果と考察] *Loxodes striatus* と *Blepharisma musculus* と *Dileptus margaritifer* の eRF1 遺伝子は 436 アミノ酸、*Didinium nasutum* の eRF1 遺伝子は 437 アミノ酸をコードしていた。これまでにわかっている繊毛虫やその他さまざまな生物の eRF1 とともに系統樹を描いたところ、原生動物の eRF1 は動物、植物、菌類

の eRF1 に比べて深く分岐しており多様性が大きいことがわかった。終止コドンの認識に変異をもつ種は、繊毛虫の系統樹の中でクラスターを作ってはならず、UGA を唯一の終止コドンとする系統は少なくとも 3 回独立に生じ、UAA と UAG を終止コドンとする系統は少なくとも 2 回独立に生じたと考えられた。

次に、ヒトの eRF1 をテンプレートとして今回明らかになった繊毛虫の eRF1、およびこれまでに報告されている *Arabidopsis thaliana*、*Saccharomyces cerevisiae*、*Tetrahymena thermophila*、*Stylonychia lemnae*、*Euplotes octocarinatus* のホモロジーモデリングを行った。モデリングされた eRF1 の立体構造において、20 種類のアミノ酸の各残基を RNA との相互作用の程度 (RNA binding propensity) に応じて色分けした。終止コドンと相互作用する可能性のあるドメイン1について、繊毛虫類とそれ以外の生物の RNA binding propensity を比較したところ、 $\alpha 1$ -helix と $\alpha 4$ -helix の C 末端部位と、 $\beta 4$ -鎖部位で異なっていることが明らかになった。これらの部位が終止コドンを認識している可能性がある。しかし、今回はこれらの部位と終止コドンの認識の様式をはっきりと関連付けられなかった。繊毛虫において、終止コドンの変異している種は系統樹で分散していることから、同様の終止コドンを認識する場合でも、系統によって異なる部位で認識しているという可能性もある。今後はこれらの部位を人為的に変異させた eRF1 分子を作製し、それらがどのように終止コドンを認識するかを調べ、eRF1 の終止コドン認識部位を明らかにしていきたい。

[文献]

- 1) Tourancheau, A. B., Tsao, N., Klobutcher, L. A., Pearlman, R. E. & Adoutte, A. (1995) EMBO J., 14, 3262-3267.
- 2) Inagaki, Y., Blouin, C., Doolittle, W. F. & Roger, A. J., (2002) Nucleic Acids Res., 30, 532-544.
- 3) Bates, P. A., Kelly, L. A., MacCallum, R. M. & Sternberg, M. J. E. (2001) Proteins, 5, 39-46.