

*Didinium nasutum*のeRF1の終止コドン認識解析への試み櫻井 昭<sup>1</sup>, キム ワン<sup>2</sup>, 春本 晃江<sup>3</sup>(<sup>1</sup>奈良女子大・院・人間文化, <sup>2</sup>奈良女子大・理・化学 (JSPS), <sup>3</sup>奈良女子大・理・生物)*In vivo* complementation test of *Didinium nasutum* eRF1 in yeast for understanding stop codon usage in this speciesAki SAKURAI<sup>1</sup>, Oanh T.P.KIM<sup>2</sup>, Terue HARUMOTO<sup>3</sup>(<sup>1</sup>Grad.School Human Cul.,Nara Women's Univ., <sup>2</sup>Chem.Sci.,Nara Women's Uni.,(JSPS),<sup>3</sup> Bio.Sci.,Nara Women's Univ.)

## SUMMARY

In some ciliates, the specificity of the stop codon recognition by eRF1 has been altered, and it does not respond to all universal stop codons. In *Didinium nasutum*, eRF1 is known to recognize UAA. However, it is still unknown whether *Didinium* eRF1 recognizes UAG and/or UGA as stop codons. In this study, we aim to examine the release activity of *Didinium* eRF1. The crystal structure of human eRF1 has been determined, and it is composed of three domains. The stop codon recognition sites have been located in domain 1 of eRF1. We have constructed a chimeric eRF1 from *Didinium* domain 1 and human domains 2-3. An *in vivo* complementation in yeast was carried out to examine whether *Didinium* eRF1 domain 1 recognizes all three stop codons. The chimeric eRF1 was cloned into a yeast expression vector, and then transformed to yeast strains containing the mutated eRF1. The chimeric eRF1 was able to complement a defect in yeast eRF1 *in vivo*. Our result suggests that *Didinium* eRF1 can recognize all three stop codons (UAA, UAG and UGA).

[目的] 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。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。この因子は3つのドメインに分かれており、ドメイン1が終止コドンの認識に、ドメイン2が tRNAの解離に作用し、そしてドメイン3がeRF3の結合部位として働いていることが確かめられている (1)。ま

た、繊毛虫リトストマ綱の*Didinium nasutum* は、UAAを終止コドンとして認識していることが確かめられているが、UAG,UGAについては確かめられていない (2)。そこで、本研究では、*D.nasutum*のeRF1のドメイン1をもつeRF1が、*in vivo*において正常な認識を行うかどうか調べるために、ヒトのeRF1のドメイン2-3と*D.nasutum* のeRF1のドメイン1によるキメラeRF1を作製し、酵母での相補性試験を行った。

**[方法] *D.nasutum*のeRF1のドメイン1 遺伝子の作製** *D.nasutum* のcDNAから、ドメイン1の5'側に *Nde* I 認識部位を、3'側に *Xho* I 認識部位をもつようにプライマーを設計し、PCRでドメイン1遺伝子のみを増幅させ、TOPOベクターに組込ませた。

**キメラeRF1の作製** ヒトのeRF1のドメイン2-3遺伝子(5'側に *Xho* I 認識部位を3'側に *Sal* I 認識部位をもつ)が組み込まれているpT7ベクター(*Nde* I 認識部位を*Xho* I 認識部位よりも上流に、また*Spe* I 認識部位を*Nde* I 認識部位よりも上流にもつ)を用いた。TOPOベクターとpT7ベクターを*Nde* Iと*Xho* Iで処理し、TOPOベクターから切り出した *D.nasutum* のeRF1のドメイン1 遺伝子を、pT7ベクター断片とligationさせることにより、キメラeRF1遺伝子をもつpT7ベクターを作製した。

**酵母ベクターへのキメラeRF1の組み込み** 3種類の酵母ベクター p416CYC1, p416 ADH, p416GPD (URA3マーカーをもつセントロメア型ベクター. プロモーターとして CYC1, ADH, GPDをそれぞれ持つ。*Spe* I 認識部位と *Sal* I 認識部位をもつ)(3)と、キメラeRF1遺伝子が組み込まれているpT7ベクターを*Spe* Iと*Sal* Iで処理し、pT7ベクターから切り出されたキメラeRF1遺伝子を、3種類の酵母ベクターにそれぞれ組み込ませた。

**酵母を用いた相補性試験** キメラeRF1を組み込んだ3種類のベクターを、*Saccharomyces cerevisiae*の*SUP45* *ts*株(温度感受性: 37°C条件下ではeRF1が転写されず生育することができない)と*P<sub>tet</sub>SUP45*株(テトラサイクリン遺伝子発現誘導系: ドキシサイクリン存在下ではeRF1が転写されず生育することができない)に導入し、ウラシル要求性を利用したポジティブセレクションにより、形質転換体を得た。そして、形質転換体*SUP45 ts*株を37°Cの条件下で、形質転換体*P<sub>tet</sub>SUP45*株をドキシサイクリン(10µg/ml)添加培地で、3~4日間培養し、コロニー形成の有無を確認した。

**[結果と考察]** 酵母を用いた相補性試験の結果、形質転換体*SUP45 ts*株37°C培養において、キメラeRF1が導入された酵母はすべて正常なコロニーを形成した。また、形質転換体*P<sub>tet</sub>SUP45*株ドキシサイクリン(10µg/ml)添加培地での培養においても、キメラeRF1が導入された酵母はすべて正常なコロニーを形成した。

これらの結果より、*D.nasutum* のeRF1のドメイン1から作製したキメラeRF1は、宿主酵母のeRF1の働きを完全に相補したと考えられる。これまでに、UGAを終止コドンとして認識するが、UAAとUAGはグルタミンに翻訳されてしまうことが知られている*Tetrahymena*のeRF1を用いた同様な相補性試験では、相補がまったく見られていない(4)。これらのことから、*D.nasutum*のeRF1はUAA,UAG,UGAを終止コドンとして認識すると示唆される。

今後、作製したキメラeRF1の酵母内での発現をウェスタンプロティング法などで確認するとともに、*in vitro*の実験系でもキメラeRF1の終止コドン認識を確かめる予定である。

この研究は、東京大学医科学研究所 基礎医科学大部門 遺伝子動態分野 伊藤耕一先生との共同研究によるものである。

#### [文献]

- 1) Song H. Mugnier P. Das A K. Webb H M. Evans D R. Tuite M F. Hemmings B A. and Barford D. (2000) *Cell*, 100, 311-321.
- 2) Kim O T P. Yura K. Go N. and Harumoto T. (2005) *Gene*, 436, 277-286.
- 3) Mumberg D. Muller R. and Funk M. (1995) *Gene*, 156, 119-122.
- 4) Ito K. Frolova L. Seit-Nebi A. Karamyshev A. Kisselev L. and Nakamura Y. (2002) *PNAS*, 99, 8494-8499.