

繊毛虫の翻訳終結因子 (eRF1) における終止コドン認識に関わる残基の解析

李 英¹, キム ワン², 春本 晃江³ (¹奈良女子大学大学院人間文化研究科生物科学専攻, ²ベトナム科学技術学士院バイオテクノロジー研究所, ³奈良女子大学理学部生物科学科)

Investigation of amino acid residues of eRF1 which are responsible for stop codon recognition in ciliates

Ying LEE¹, Oanh T. P. KIM² and Terue HARUMOTO³

(¹Department of Biological Science, Graduate School of Human Culture, Nara Women's University, ²Applied DNA Technology Lab., Institute of Biotechnology, Vietnamese Academy of Science and Technology, Vietnam, ³Department of Biological Science, Faculty of Science, Nara Women's University)

SUMMARY

The genetic code of nuclear genes in some ciliates differs from that of other organisms in the assignment of UGA, UAG, and UAA codons, which are normally assigned as stop codons. However, *Dileptus margaritifer* was found to use universal stop codons. Eukaryotic release factor 1 (eRF1) is a key protein in stop codon recognition, and is believed to play an important role in stop codon reassignment in ciliates. eRF1 is composed of three domains, and the stop codon recognition site is located in domain 1. It is commonly assumed that changes in domain 1 of ciliate eRF1s are responsible for altered stop codon recognition. To identify the residues that are responsible for specific recognition of ciliate eRF1, we made hybrid proteins that contained mutated eRF1 domain 1 from *Dileptus* fused to eRF1 domains 2 and 3 from *Saccharomyces cerevisiae*. An *in vivo* complementation in yeast was carried out to examine whether mutated eRF1 domain 1 of *Dileptus* 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. Our result suggests that, in particular, R₁₂₈ of the *Dileptus* eRF1 plays an important role in stop codon recognition.

[目的] 真核生物では、eRF1が3種類の終止コドン(UAA,UAG,UGA)のうちのいずれかを認識することにより、翻訳が終結する。eRF1は3つのドメインから成り¹⁾、ドメイン1が終止コドンの認識に関与することがわかっている。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。しかし、繊毛虫*Dileptus margaritifer*は、ほかの繊毛虫と違い、多くの真核生物と同じように3つの終止コドンを認識することが報告されている^{2,3)}。そこで、本研究では、3つの終止コドンを認識する*Dileptus*のeRF1を基に、変異を導入したeRF1を作製し、酵母のバイオアッセイ系を用いて特異的な認識に関わるアミノ酸残基を明らかにしようと試みた。

[方法]

I アミノ酸配列のアラインメントとコンピューター解析による終止コドン認識に重要な残基の予測

Dileptus eRF1のドメイン1のアミノ酸配列を他の真核生物や、*Euplotes*のようにUAA、UAGのみを認識する繊毛虫グループとアラインメントした。他の真核生物ではよく保存されているが繊毛虫では保存されておらず、しかも*Dileptus*と*Euplotes*の間で異なる残基を探索し、さらに、KYGソフト (<http://yayoi.kansai.jaea.go.jp/qbg/kyg/>)⁴⁾で、ドメイン1の表面に位置し、RNAとも結合しやすい部位の残基を選

んだ。今回の実験では、25番目のリシンと、128番目のアルギニンと134番目のヒスチジンに着目し、この3つの残基をそれぞれ*Euplotes*と同じ残基になるように変異を起こした。

II *Dileptus*のeRF1のドメイン1に変異を導入

Dileptus eRF1 ドメイン1を組み込んだプラスミドに、変異を入れる部位を真ん中にして前後に15bpをつけたセンス、アンチセンスの2本のプライマーを使い、PCRにより、目的の変異部位を持つプラスミドを増幅させた。酵素処理により元のテンプレートを除去し、大腸菌に形質転換し、シーケンスを行って目的の変異部位をもつプラスミドを得た。

III 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*Dileptus*のeRF1のドメイン1遺伝子を、pT7ベクター断片とライゲーションさせることにより、キメラeRF1遺伝子をもつpT7ベクターを作製した。

IV キメラeRF1 cDNAの酵母発現ベクターへの組み込み

3種類の酵母発現ベクターp416CYC、p416ADH、

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をそれぞれもつ。*Spe* I認識部位と*Sal* I認識部位をもつ)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種類の酵母発現ベクターにそれぞれ組み込んだ。

V 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) 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、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]

繊毛虫*Dileptus* eRF1 ドメイン1のアミノ酸配列において、25番目のリシン(K)をアスパラギン(N)に変異させたところ、コロニーが正常にできた。このことから、キメラeRF1は、酵母eRF1の働きを完全に相補できたといえる。従って、25番目のKをNに変異させたキメラeRF1は、UAA、UAG、UGAの3つの終止コドンのいずれをも認識する能力があると考えられる。一方で、128番目のアルギニン(R)をイソロイシン(I)に、134番目のヒスチジン(H)をシステイン(C)に変異させたところ、コロニーが形成されなかったため、酵母eRF1の働きを相補できなかったと考えられる。従って、R_{128I}とH_{134C}をダブルミューテージ

ンさせたキメラeRF1は、3つの終止コドンのうち少なくとも1つを認識できなかったと考えられる。

次に、R_{128I}とH_{134C}のそれぞれシングルミューテーションを起こさせたところ、H_{134C}の場合はコロニーができたのに対し、R_{128I}の場合は細胞がほとんど生育しなかったことから、H_{134C}は終止コドン認識にほとんど影響を及ぼさないが、R_{128I}の変異は終止コドンの認識能力に影響すると考えられる。

以上のことから、繊毛虫*Dileptus* eRF1のドメイン1においては、アミノ酸残基のR_{128I}とH_{134C}、特にR_{128I}が終止コドン認識の特異性を決めているのではないかと考えられる。

今後は、3つの終止コドンUAA,UAG,UGAのそれぞれに対するキメラeRF1の認識能力を*in vitro*の実験系で調べる予定である。

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* 346: 277-286.
- 3) Kim, O.T.P., Sakurai, A. and Harumoto, T. (2008) *Gene* 417: 51-58.
- 4) Kim, O.T.P., Yura, K. and Go, N. (2006) *Nucleic Acids Res.* 34: 6450-6460.