

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 アミノ酸残基の解析

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)

Amino acid residues involved in stop codon recognition in ciliate eRF1

Ying LI¹, Oanh KIM T.P.² and Terue HARUMOTO³

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

SUMMARY

The genetic code of nuclear genes in some ciliates was found to differ from those 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, thereby, the protein is believed to play an important role in the stop codon reassignment in ciliates. In fact, eRF1 comprises three domains; the stop codon recognition site is located in domain 1. It is commonly assumed that changes in the domain 1 of ciliate eRF1s are responsible for altered stop codon recognition. To identify the residues responsible for specific recognition of ciliate eRF1, in this study, we constructed a hybrid gene that contained mutated eRF1 domain 1 from *Dileptus* fused to eRF1 domain 2 and 3 from *Saccharomyces cerevisiae*. An *in vivo* complementation test in yeast was conducted to examine whether mutated eRF1 domain 1 of *Dileptus* recognizes all three stop codons. The chimeric eRF1 was cloned into a yeast expression vector, then transformed to yeast strains containing the mutated eRF1. Our result suggests that 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、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]

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導入した。

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 15 bp をつけたセンス、アンチセンスの 2 本のプライマーを用い、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き、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。

キメラ eRF1 の作製

ヒトの eRF1 のドメイン 2-3 遺伝子 (5'側に *XhoI* 認識部位を 3'側に *SalI* 認識部位をもつ) が組み込まれている pT7 ベクター (*NdeI* 認識部位を *XhoI* 認識部位よりも上流に、また *SpeI* 認識部位を *NdeI* 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 *NdeI* と *XhoI* 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。

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。SpeI 認識部位と SalI 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 *SpeI* と *SalI* 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。

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。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。

Dual-luciferase reporter assay を用いた readthrough 試験

Dual-luciferase gene をもつ酵母内に、作製したキメラ eRF1 cDNA を導入し、発現させる。酵母自身の eRF1 の発現は高温感受性誘導により抑制しておき、キメラ eRF1 の働きによって調節される 2 種類のルシフェラーゼ、ウミシイタケルシフェラーゼとホタルルシフェラーゼの活性の値を求めることで、キメラ eRF1 の終止コドン認識能力を調べた。

[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。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ションさせたキメラ 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、R₁₂₈ と H₁₃₄ 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。

さらに、Dual-luciferase reporter assay を行った結果、readthrough の割合は K₂₅ の結果はヒト eRF1 と近い値となり、3 つの終止コドンをいずれも認識できたと考えられる。それに対し、R_{128I} と H_{134C} の場合、これら 2 つの変異を導入したことで、UGA の readthrough の値が UAA と UAG よりかなり高い値になった。つまり、R_{128I} と H_{134C} の変異により、終止コドンの認識の仕方が *Euplotes* と同様になる傾向がみられた。そして、R_{128I} だけのシングルミューテーションの場合、ダブルミューテーションと同様の結果が得られた。

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 R₁₂₈ と H₁₃₄、特に R₁₂₈ 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。

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.