

繊毛虫原始大核綱に属する *Loxodes striatus* の翻訳終結因子 (eRF1) における
終止コドン認識能力の解析

李 英¹, Do Thi HONG¹, Oanh T.P. KIM², 春本 晃江³
(¹奈良女子大・院人間文化・共生自然科学, 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・理・生物科学)

Study on the stop codon recognition of eRF1 in *Loxodes striatus*

Ying LI¹, Do Thi HONG¹, Oanh T.P. KIM² and Terue HARUMOTO³
(¹Dept. Biol. Sci., Grad. Sch. Human Culture, Nara Women's Univ., ²Inst. Biotech., Vietnam Acad.
Sci. Technol., ³Dept. Biol. Sci., Fac. Sci., Nara Women's Univ.)

SUMMARY

The genetic code of nuclear genes in some ciliates was found to differ from that of other organisms in the assignment of UGA, UAG, and UAA codons, which are normally assigned as stop codons. In this study, we examined the release activity of *Loxodes striatus* eRF1. 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. Actually, eRF1 comprises three domains. The stop codon recognition site is located in domain 1. We constructed a hybrid gene that contained eRF1 domain 1 from *Loxodes* fused to eRF1 domain 2 and 3 from *Homo sapiens*. An *in vivo* complementation test in yeast was conducted to examine whether eRF1 domain 1 of *Loxodes* recognizes only UGA. The chimeric eRF1 was cloned into a yeast expression vector; then transformed to yeast strains containing the mutated eRF1. Our result suggests that *Loxodes striatus* eRF1 recognizes the stop codon UGA, but not UAA and UAG.

【目的】 真核生物では、翻訳終結因子 (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。しかし、繊毛虫の eRF1 の終止コドンの認識能力は、他の真核生物と

比べ独特で、3つの終止コドンすべてを認識する種は少ない¹⁾。原始大核綱は繊毛虫の中で進化的に最も起源が古いとされ、*Loxodes striatus* は3つの終止コドンのうち、UGAのみを終止コドンとして認識していることが推測されている²⁾。しかし、これまでにUGAのみを認識することがわかっている繊毛虫のeRF1とは配列がかなり異なっており、3つの終止コドン認識する他の真核生物のeRF1と配列が似ている部分も多い³⁾。そこで我々は、*Loxodes* のeRF1の終止コドン認識能力を確かめることにした。

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³⁾。そこで、本研究では、*Loxodes* eRF1のドメイン1と3つの終止コドン認識するヒトeRF1のドメイン2-3とのキメラeRF1を作製し、酵母のバイオアッセイ系を用いて*Loxodes* eRF1の終止コドン認識能力を調べた。

[方法]

Loxodes eRF1のドメイン1の読み枠にある UAA, UAGをセンスコドンに変換

Loxodes eRF1のドメイン1にある、Glnのコドンとして読まれていると考えられるUAA, UAGをそれぞれCAG, CAAへとsite-directed mutagenesisによって、変異を入れた。すなわち、*Loxodes* eRF1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デザインした相補的なセンス、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去し、大腸菌に形質転換し、シークエンスを行って目的の変異部位をもつことを確認した。

キメラeRF1の作製

ヒトのeRF1のドメイン2-3遺伝子が組み込まれているpT7ベクターに*Loxodes* のeRF1のドメイン1遺伝子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

酵母発現ベクター 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GPDをもつ) と、キメラeRF1遺伝子が組み込まれているpT7ベクターを制限酵素で処理し、pT7ベクターから切り出されたキメラeRF1遺伝子を、酵母発現ベクターに組み込んだ。

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SUP45ts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PtetSUP45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。形質転換体SUP45ts株を37°Cの条件下で、形質転換体PtetSUP45株をドキシサイクリン(10 µg/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。

Dual-luciferase reporter assayを用いた read-through 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、発現させた。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評価した。

[結果と考察] 酵母を用いた相補性試験の結果、形質転換体SUP45ts株の37°C培養において、キメラeRF1が導入された酵母はコロニーが形成されず、また、形質転換体PtetSUP45株をドキシサイクリン(10 µg/ml)添加培地で培養においても、コロニーが形成されなかった。

この結果より、*Loxodes* 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の働きを相補できず、3つの終止コドンのうち少なくとも一つを認識できなかったと考えられる。

さらに、Dual-luciferase reporter assayを行った結果、*Loxodes* のeRF1のドメイン1から作製したキメラeRF1においては、UAAとUAGのreadthrough率はポジティブコントロールのヒトeRF1よりもかなり高いが、UGAのreadthrough率は比較的低いことがわかった。

以上の結果から、*L. striatus* のeRF1のドメイン1から作製したキメラeRF1は、3つの終止コドンのうち、UGAのみを認識できると考えられる。*Loxodes* は繊毛虫の中でも起源が古いとされ、他の真核生物のeRF1とも配列が似ているにも関わらず1つの終止コドンのみを認識することから、*L. striatus* はeRF1の終止コドン認識に関わる部位を調べるための優れた材料となることが期待できる。

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

[文献]

- 1) Kim et al. (2005) Gene, 346, 277-286.
- 2) Tourancheau et al. (1995) EMBO J., 14, 3262-3267.
- 3) Song et al. (2000) Cell, 100, 311-321.