



体)によって認識され、リボソームサブユニット解離が誘導される(Matsuo, Ikeuchi et al., 2017)。解離した大サブユニットに E3 ユビキチンライゲース Ltn1 を含む RQC 因子が結合し、合成途上の新生ペプチド鎖をユビキチン化することで分解へと導く(Brandman et al. 2012)。また、No-go mRNA decay (NGD)では、リボソーム上のユビキチンシグナルが、ユビキチン結合ドメインを持つエンドリボヌクレアーゼ Cue2 によって認識されることで mRNA がリボソーム A サイト付近で分子内切断され、最終的にエキソリボヌクレアーゼである Xrn1 および Exosome によって分解される(D' Orazio et al., 2019, Doma and Parker, 2006)。リボソームタンパク質 uS10 のユビキチン化修飾が付加されない条件下や RQT 複合体欠損の条件下では、さらなるリボソーム停滞が生じうるが、酵母においてはノンカノニカルな NGD 惹起機構を用いて翻訳異常状態を解消する。酵母における翻訳中のリボソームの多くは、mRNA 脱アデニル化や翻訳抑制の惹起を担う Ccr4-NOT 複合体の構成因子 Not4 によって、翻訳開始段階もしくは伸長停滞時にリボソーム小サブユニットタンパク質 eS7 がモノユビキチン化修飾されている。このモノユビキチン化 eS7 を Hel12 が K63 鎖ポリユビキチン化することで、リボソーム上にシグナルを付加し NGD を惹起する(Ikeuchi, Tesina et al. 2019)。

また、これらの品質管理機構においてユビキチン化修飾を受けたリボソーム自身は分解されず、脱ユビキチン化酵素によって認識、および脱シグナル化され翻訳に再利用されると考えられている。uS10 および eS7 のポリユビキチン鎖は主に Ubp3 によって脱ユビキチン化され、モノユビキチン化された eS7 は Otu2 によって脱ユビキチン化される(Takehara et al. 2021)。

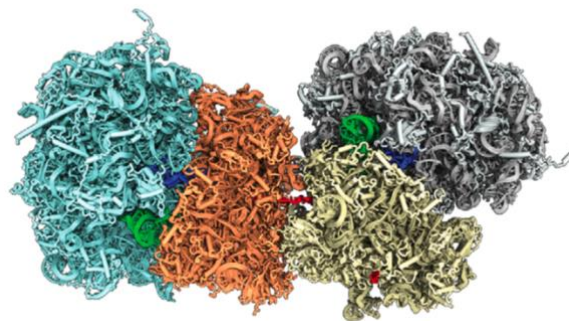
一連の品質管理機構では、まず特徴的なリボソームの構造状態を認識して品質管理因子 Hel12 や Not4 が結合し、リボソームのユビキチン化修飾を介して後続の品質管理因子(RQC-trigger 複合体, Cue2)を誘導し、異常状態の解消を行う。これらの分子機構を正確に理解するために、各段階におけるユニークなリボソームの構造を解明することが重要であると考え、本計画研究を開始した。本研究計画では、1)極低温電子顕微鏡(Cryo-EM)構造解析を用いて、停滞ポリソームの構造を解明すること、2)Cryo-EM 単粒子解析法により Hel12・Not4 が結合したリボソームの構造解析を行い、認識機序を明らかにすること、3)同構造解析手法によりユビキチン化状態のリボソームの構造を明らかにすること、を目的とした。

#### 申請時～派遣開始前の研究遂行状況

海外特別研究員申請後、試験管内翻訳系を用いて再構成した停滞ダイソーム構造を明らかになり、NGD の詳細なユビキチン化機構と合わせて EMBO Journal に発表した(Ikeuchi, Tesina et al. 2019)。またその後、前所属機関と受け入れ研究機関との共同研究により、RQC の内在標的である SDD1 mRNA 上で停滞した 3 つのリボソーム(トライソーム)構造が解明され、派遣期間中に研究論文が受理された(Matsuo, Tesina et al. 2020)。

以上の 2 報の研究論文に加え、イギリスの研究チームにより哺乳類における停滞ダイソーム構造が解明された(Juszkiewicz et al. 2018)ことから、申請時研究計画の 1)極低温電子顕微鏡(Cryo-EM)構造解析を用いて、停滞ポリソームの構造を解明すること、に関しては、派遣開始までに概ね完了したと考える。

上記 3 報により停滞したリボソームの特徴的構造が明らかになった一方で、品質管理因子である He12 および Not4 とリボソームの共構造は明らかにされておらず、ユビキチン化修飾されたリボソームの構造も明らかにされていない。派遣開始時点から、研究計画 2) および 3) に関して、予定通り計画研究を実施した。



図：停滞ダイソーム構造 (Ikeuchi, Tesina et al. 2019)

## 派遣期間中の研究遂行状況および成果

### 2) Cryo-EM 単粒子解析法による He12・Not4 が結合したリボソームの構造解析

研究計画に基づき、*HEL2* 遺伝子の 3' 側に FLAG-TEV-proitenA (FTpA) タグ付加配列を挿入した出芽酵母株から、IgG 結合ビーズを用いたアフィニティ精製とショ糖密度勾配遠心法により、内在の He12-ダイソーム複合体を特異的に精製した。精製した複合体をクライオグリッド上で凍結し、Cryo-EM 単粒子解析により構造解析を行った。3D classification 解析の結果、上述 (Ikeuchi, tesina et al., 2019) の POST+hybrid ダイソーム以外に、新たに hybrid+hybrid の組み合わせや、終止コドン上で停滞したダイソーム等、複数の状態の内在停滞ダイソーム構造に He12 が結合しうることを発見した。しかし、各ダイソーム構造上から He12 やユビキチンに相当する電子密度を発見することはできなかった。本研究期間内に He12 の構造解明に至らなかった主な原因として、He12 は C 末側に一定の構造を取らない disordered 領域を持つこと、He12 のユビキチン化標的の uS10 の N 末部分およびポリユビキチン鎖はフレキシブル領域であり、ユビキチン化反応時に He12 が複数の位置状態を取りうることが考えられる。そのため、化学架橋剤 BS3 を用いて He12-ダイソームを架橋し構造安定化したサンプルに関しても、同様に Cryo-EM 単粒子解析を行ったが、He12 の構造を得ることはできなかった。

また Not4 に関連して、受入研究機関の同僚である Buschauer を中心とした構造解析により、Ccr4-NOT 複合体の構成因子 Not5 が、A サイトに tRNA が存在しない状態のリボソームを E サイト側で識別して結合し、codon optimality 依存的な mRNA 分解に寄与する内容の論文が受理された (Buschauer et al. 2020)。本論文では、内在 Not4-FTpA タグ付加株を用いてサンプル精製を行ったが、Not4 自体の構造は明らかにされていない。そこで、本研究では別個に精製した 80S リボソームおよびリコンビナント Not4、Ubc4 を試験管内で混合し Not4-リボソーム複合体を再構成する手法を用いた。Not4 による eS7 モノユビキチン化は試験管内で効率よく進行したものの、Cryo-EM 単粒子解析では Not4 自身の構造解析には至らなかった。またモノユビキチン化された eS7 に関してもユビキチン部分のフレキシビリティが高く安定構造を得ることが困難であった。本研究 2) に関しては研究計画の 50%程度の達成率であり、今後も継続した研究によるサンプル調整手法の改善が必要であると判断する。

### 3) Cryo-EM 単粒子解析法によるユビキチン化状態のリボソームの構造解析

出芽酵母の品質管理機構におけるリボソームユビキチン化の標的タンパク質は uS10, uS3, eS7 の 3 種類存在する。これらの標的タンパク質は He12 により K63 鎖ポリユビキチン化されるが、一般にポリユビキチン鎖はフレキシビリティが高く、そのままでは Cryo-EM を用いた単粒子構造解析での構造決定が難しいと考えられる。ユビキチン鎖の動きを制限する条件下、例えばユビキチン結合タンパク質との共構造や、タンデムユビキチン結合エンティティ (TUBEs) の添加と化学架橋を用いる等の工夫が必要であった。そこで本研究ではまず、eS7 のモノユビキチン化に焦点を絞り、構造解析の検討を開始した。

出芽酵母において、eS7 のモノユビキチン化は翻訳中のリボソームに高頻度で生じ、eS7 ユビキチン化欠損となる *not4Δ* や *rps7-4KR* 変異株の細胞増殖能は著しく低下する (Ikeuchi, Tesina et al. 2019)。翻訳それ自体に非常に重要な役割を担うことが示唆される反面、NGD および codon optimality 依存の mRNA 分解への関与以外の機能は、現在まで明らかにされていない。そこで eS7 のユビキチン化状態の構造、およびモノユビキチン化された eS7 に結合する分子との共構造を明らかにすることで、構造的観点から eS7 ユビキチン化の理解を目指した。しかし、2) で記述したように、モノユビキチンであっても、そのままではユビキチンの C 末端テイルと標的分子の Lysine 側鎖のフレキシビリティが非常に高く、構造解析に至らなかったため、本研究では近年同定された eS7 の脱ユビキチン化を担う脱ユビキチン化酵素 Otu2 に着目した。

Otu2 は 80S リボソームには結合せず、翻訳終結後に解離した小サブユニットに選択的に結合し、eS7 のモノユビキチン化を解消することで、リボソームのリサイクリングに関与することが示唆されている (Takehara et al., 2021)。野生型 Otu2 では脱ユビキチンが進行してしまうため、脱ユビキチン化酵素の活性中心に変異を導入した *otu2-C178S* を用いて、1) *in vitro* 再構成した *otu2-C178S-Ub-40S* 複合体および、2) 出芽酵母から精製した *ex vivo* *otu2-C178S-40S* 複合体の Cryo-EM 単粒子構造解析を行った。解析の結果、eS7 近傍および h44, h9ES3 近傍に Otu2 および eS7 に付加されたモノユビキチン由来の電子密度が観察された。本研究で得られた Cryo-EM 構造および、クロアチア Rudjer Boskovic Institute の Dr. Nives Ivic との共同研究により得られた OTU ドメインの X 線結晶構造、AlphaFold2 による予測構造を用いて、最終的に eS7 モノユビキチン化された 40S サブユニットおよび Otu2 の構造モデルを作製した。本研究により、1) Otu2 が 60S との会合部分をユニークに認識し 40S リボソーム選択的に結合すること、2) ユビキチン化された eS7 の選択的脱ユビキチン化構造、3) 翻訳後リボソームの修飾をリセットし、リボソームをリサイクリングする機構、のそれぞれに関して生化学的・構造学的に明らかになったと考える。

これらの内容は、自身を筆頭著者とした論文として執筆が完了し、現在投稿作業中である。また 2021 年 9 月 7-10 日に開催される EMBL Conference “Protein Synthesis and Translational Control” にて同内容でのポスター発表を予定している。本研究 3) は当初ユビキチン化されたリボソームの構造解明を目的としたが、ユビキチンに加えて脱ユビキチン化酵素 Otu2 の構造も新規に明らかにしたことから、研究計画は当初の想定を超えて進行したと考える。

### 新型コロナウイルス感染症に係る特例措置に関して

本研究は当初の計画期間に加え、4 ヶ月の採用期間延長の適用を受けた。所属研究機関はドイツ

及びバイエルン州のロックダウン指針の影響により、2020年3-4月および同12月-2021年1月にそれぞれ一時閉鎖となった。サンプル作製およびEMオペレーション以外のCryo-EM単粒子構造解析はPCおよびサーバー経由で行うため、一部期間中は在宅研究が可能であった。しかしながら2020年5月以降も研究室への入室人数制限により、入室シフト制となり継続的な本研究の遂行に支障が生じていた。4ヶ月の延長期間中に上記2)の研究に関するサンプル調整と解析、および進行が遅滞していた3)の構造精密化解析とモデル作製、生化学的な構造バリデーション解析を完了し論文執筆を完了することができた。