

令和元年6月3日現在

機関番号：11301

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2014～2018

課題番号：26116003

研究課題名(和文)mRNAとタンパク質の品質管理機構における新生鎖の新規機能の解明

研究課題名(英文)Analysis of novel functions of nascent-chain in quality controls of mRNA and protein

研究代表者

稲田 利文(Inada, Toshifumi)

東北大学・薬学研究科・教授

研究者番号：40242812

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 213,400,000円

研究成果の概要(和文): 正確な遺伝子発現は生命現象の根幹であり、その破綻や異常は様々な疾患の原因となる。正確な翻訳伸長反応を保證するシステムとして、細胞は異常な翻訳伸長阻害を認識し排除する品質管理機構を保持している。我々は、翻訳伸長中に停滞したリボソームを認識し解離させる分子機構を解析し、停滞したリボソームの特異的構造を認識するメカニズムを解明した。また、様々な発現異常の原因となる機能欠損リボソームを認識し排除する品質管理機構に必須なリボソーム修飾を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

正確な遺伝子発現はすべての生命現象の根幹であり、その破綻や異常は様々な疾患の原因となる。同義コドンへの置換であるサイレント変異が疾患の原因となることは、翻訳伸長反応の精密な制御が、正確な遺伝子発現に極めて重要であることを示している。本研究により、新生鎖の新規機能と新生鎖の運命決定の分子機構の実体が解明された。本研究の成果により、遺伝子発現の正確性を保證するmRNAとタンパク質の品質管理機構の理解が飛躍的に進んだ。神経細胞における局所翻訳を含む様々な高次生命現象の理解にも大きく貢献するのみでなく、翻訳伸長異常に起因する疾患の発症機構の解明に大きく寄与すると期待される。

研究成果の概要(英文): Accurate gene expression is the basis of life phenomena, and its failure and abnormalities cause various diseases. Cells maintain a quality control mechanism that recognizes and eliminates aberrant translational elongation inhibition. We have analyzed the molecular mechanism that recognizes and dissociates the stalled ribosome. We have elucidated the molecular mechanism by which E3 ubiquitin ligase Hel2/ZNF598 recognizes the specific structure of the stalled ribosome. We also found ribosome modifications that are essential for quality control mechanisms that recognize and eliminate functionally defective ribosomes responsible for various expression abnormalities.

研究分野：分子生物学

キーワード：品質管理 リボソーム ユビキチン化 翻訳異常 異常リボソーム ストレス応答

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

mRNA の情報がポリペプチド鎖へと変換される過程で、全ての細胞内のタンパク質は翻訳途上の新生ポリペプチド鎖（新生鎖）の状態を経過する。従来、新生鎖はポリペプチド合成反応の単なる中間体として理解されてきた。しかし最近、新生鎖が自分自身の機能化や品質管理も含めて、細胞全体の生命現象の制御と調節に関わることが明確になっている。リボソームによって合成される新生鎖自体がリボソームの活性と構造を制御し、翻訳伸長速度が調節される結果、タンパク質が正しくフォールディングされる。正確な遺伝子発現は生命現象の根幹であり、その破綻や異常は様々な疾患の原因となる。遺伝子発現の各段階でのエラーや外界からのストレスによって、さまざまな異常 mRNA や異常タンパク質が合成されるだけでなく、タンパク質のフォールディングにも異常が生じる。細胞の保持する mRNA 品質管理機構は、DNA 上の変異やスプライシング反応等のエラーによって合成される様々な異常 mRNA を認識し排除する。タンパク質の品質も新生鎖の段階から監視されるが、新生鎖と mRNA の品質管理の関係に注目する研究は皆無であった。研究代表者は、異常な mRNA 由来の新生ポリペプチド鎖の新規分解機構と mRNA 切断における新生鎖の機能を明らかにした。連続した塩基性配列を持った新生鎖が翻訳伸長反応を停止（翻訳アレスト）させる結果、mRNA 切断（NGD）と新生鎖のコピキチン化とプロテアソームによる迅速な分解（RQC）が起こることを見いだした。RQC においては、リボソームが各サブユニットに解離し、60S サブユニット上の新生鎖がコピキチン化された後にプロテアソームによって迅速に分解される。研究代表者は、この異常新生鎖による翻訳アレストの結果として mRNA とタンパク質の品質管理機構が作動するためには、E3 コピキチンライゲース Hel2 による停滞したリボソーム上の標的因子のコピキチン化が必須であることを見出した。

### 2. 研究の目的

正確な遺伝子発現はすべての生命現象の根幹であり、その破綻や異常は様々な疾患の原因となる。同義コドンへの置換であるサイレント変異が疾患の原因となることは、翻訳伸長反応の精密な制御が、正確な遺伝子発現に極めて重要であることを示している。本研究は、新生鎖の新規機能と新生鎖の運命決定の分子機構の実体解明を目的とする。本研究の成果により、遺伝子発現の正確性を保証する mRNA とタンパク質の品質管理機構の理解が飛躍的に進む事が期待される。また、リボソームのコピキチン化によるリボソームの活性制御の実体が本研究により解明されることで、神経細胞における局所翻訳を含む様々な高次生命現象の理解にも大きく貢献するのみでなく、翻訳伸長異常に起因する疾患の発症機構の解明に大きく寄与すると期待される。

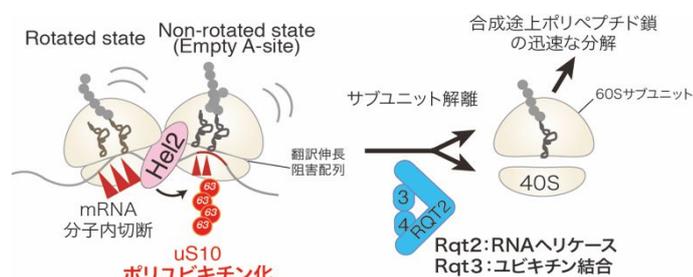
### 3. 研究の方法

本研究では、遺伝子発現の正確性を保証する mRNA とタンパク質の品質管理機構における、新生鎖の新規機能と新生鎖の運命決定機構の解明を目的とした。以下の項目を解析することで、新生鎖を介した遺伝子発現制御とその生理機能の解明という本領域の目的の達成に貢献することを目標とした。研究代表者は、翻訳異常を感知し異常 mRNA とタンパク質の分解を引き起こす品質管理である RQC と NGD の分子機構の解明を目標に、以下の項目を解析した。特異的配列を持つ新生鎖による翻訳アレスト認識機構における Hel2 の機能解明。停滞したリボソームの解離因子の同定。翻訳アレストに起因する mRNA と新生鎖の品質管理機構の普遍性。

マウス海馬での RQC/NGD 因子の発現低下による行動異常の解析。神経初代培養細胞での RQC/NGD 因子の発現低下に伴う翻訳異常の解析。また研究分担者の長尾は、細胞内の peptidyl-tRNA の網羅的解析により、drop off のメカニズム解明を解析した。また研究分担者の岩川は、植物の RISC(miRNA-induced silencing complex)が標的 mRNA のタンパク質コード領域に結合してリボソームの停滞を引き起こすか、そのリボソーム停滞によって品質管理が誘導されるか検証した。

### 4. 研究成果

代表者の稲田は、翻訳伸長中に停滞したリボソームを認識し解離させる分子機構を解析し、E3 ユビキチンライゲース RQT1(RQC-Triggering factor 1)/HEL2 が翻訳伸長中に停滞したリボソームの特異的な構造を認識し、リボソームタンパク質 Rps20 をユビキチン化することが RQC に必須であることを発見した(*Nature Commun*, 2017)。また停滞した 80S リボソームを各サブユニットに解離する新規 RQT2/3/4 複合体を世界で初めて同定した(*Nature Commun*, 2017)。さらに NGD と RQC が共役した品質管理機構であり、停滞した 2 つのリボソームを 1 つの単位(Disome)として起こることを見出した(右図)(*EMBO J.*, 2019)。また、様々な発現異常の原因となる機能欠損リボソームを認識し排除する品質管理機構である 18S NRD を解析した。その結果、リボソームタンパク質 uS3 のユビキチン化が必須であることを証明し、必須な E3 ユビキチンライゲース群を同定した(*Cell Rep.*, 2019)。



RQCにおけるRqt1の認識機構とRQT2/3/4によるサブユニット解離反応の分子基盤の解明

分担者の長尾は、バクテリアの翻訳初期段階においてリボソームから脱落する伸長途中の pep-tRNA を同定するために、液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC/MS) と tRNA 単離法を駆使して、個々の pep-tRNA のペプチド部分のアミノ酸配列を同定した。その結果、pep-tRNA 加水分解酵素 (Pth) 温度感受性株を用いて、翻訳初期に脱落した pep-tRNA の解析系を確立し、最終的に約 800 種類の pep-tRNA の配列同定に成功した。さらに、その多くが tRNA のミスデコーディングに起因することを突き止めた。さらにレポーターアッセイによって、翻訳初期段階ではミスデコーディングによって noncognate pep-tRNA が生じてしまった場合、リボソームから脱落させることによってそれらを翻訳系から排除し、翻訳精度を維持する機構があるということを見出した。

分担者の岩川は、植物の RISC が標的 mRNA のタンパク質コード領域に結合すると、リボソームの停滞を引き起こすことを見出した。本研究で、試験管内系を用いた生化学、および植物個体を用いたリボソームプロファイリングにより、効率的にリボソームを停滞させるためには、二本鎖結合タンパク質である SGS3 と植物 RISC が複合体を形成する必要があること明らかにした。

## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 26 件)

稲田利文 (研究代表者) (雑誌論文計 16 件、すべて査読あり)

1. Hashimoto, S., Nobuta, R, Izawa, T. and \*Inada, T. Translation arrest as a protein quality control system for aberrant translation of the 3'-UTR in mammalian cells. *FEBS Letters* **593**, 777-787. doi: 10.1002/1873-3468.13362 (2019)
2. [Review] \*Inada, T. The mechanism for recycling tRNAs on stalled ribosomes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **26**, 340-342. doi: 10.1038/s41594-019-0222-1. (2019)
3. Sugiyama, T., Li, S., Kato, M., Ikeuchi, K., Ichimura, A., Matsuo, Y. and \*Inada, T. Sequential ubiquitination of ribosomal protein uS3 triggers the degradation of non-functional 18S rRNA. *Cell Reports* **26**, 3400-3415. doi: 10.1016/j.celrep.2019.02.067. (2019)
4. Ikeuchi, K., Tesina P, Matsuo Y, Sugiyama T, Cheng J, Saeki Y, Tanaka K, Becker T, \*Beckmann R, \*Inada, T. Collided ribosomes form a unique structural interface to induce Hel2-driven quality control pathways. *EMBO J.* **38**, e100276. doi: 10.15252/embj.2018100276. (2019)
5. [Review] Ikeuchi, K., Izawa, T. and \*Inada, T. Recent Progress on the Molecular Mechanism of Quality Controls Induced by Ribosome Stalling. *Front Genet.* **9**, 743. doi: 10.3389/fgene.2018.00743. (2019)
6. Matsuo, Y., Ikeuchi, K., Saeki, Y., Iwasaki, S., Schmidt, C., Udagawa, T., Sato, F., Tsuchiya, H., Becker, T., Tanaka, K., Ingolia, NT., Beckmann, R. and \*Inada, T. Ubiquitination of Stalled

- Ribosome Triggers Ribosome-associated Quality Control. *Nat. Commun.* **8**, 159. doi: 10.1038/s41467-017-00188-1 (2017)
7. Sugiyama T, Nobuta R, Ando K, Matsuki Y, [\\*Inada, T.](#) Crucial role of ATP-bound Sse1 in Upf1-dependent degradation of the truncated product. *Biochem Biophys Res Commun.* **488**, 122-128. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.05.0 (2017)
  8. [Review] [\\*Inada, T.](#) The ribosome as a platform for mRNA and nascent polypeptide quality control *Trends Biochem. Sci.* **42**, 5-15. doi: 10.1016/j.tibs.2016.09.005. (2017)
  9. Ikeuchi, K., Yazaki, E., Kudo, K. and [\\*Inada, T.](#) Conserved functions of human Pelota in mRNA quality controls for nonstop mRNA. *FEBS Let.* **18**, 3254-3263. doi:10.1002/1873-3468.12366. (2016)
  10. Ikeuchi, K. and [\\*Inada, T.](#) Ribosome-associated Asc1/RACK1 is required for endonucleolytic cleavage induced by stalled ribosome at the 3' end of nonstop mRNA. *Sci. Rep.* **6**, 28234. doi: 10.1038/srep28234. (2016)
  11. Tsuboi, T., Yamazaki, R., Nobuta, R., Ikeuchi, K., Makino, S., Ohtaki, Y., Suzuki, Y., Yoshihisa, T., Trotta, C. and [\\*Inada, T.](#) The tRNA Splicing Endonuclease Complex Cleaves the Mitochondria-localized *CBP1* mRNA. *J Biol. Chem.* **290**, 16021-16030. doi: 10.1074/jbc.M114.634592 (2015)
  12. Makino, S., Mishima, Y., Inoue, K. and [\\*Inada, T.](#) Roles of mRNA-fate modulators Dhh1 and Pat1 in TNRC6-dependent gene silencing recapitulated in yeast. *J Biol. Chem.* **290**, 8331- 8347. doi: 10.1074/jbc.M114.615088. (2015)
  13. Udagawa, T., Fujioka, Y., Tanaka, M., Honda, D., Yokoi, S., Riku, Y., Ibi, D., Nagai, T., Yamada, K., Watanabe, H., Katsuno, M., [Inada, T.](#), Ohno, K., Sokabe, M., Okado, H., Ishigaki, S., Sobue, G. FUS regulates AMPA receptor function and FTL/ALS-associated behaviour via GluA1 mRNA stabilization. *Nat. Commun.* **6**, 7098. doi: 10.1038/ncomms8098. (2015)
  14. Kashima I, Takahashi M, Hashimoto Y, Sakota E, Nakamura Y. and [\\*Inada, T.](#)  
A functional involvement of ABCE1, eukaryotic ribosome recycling factor, in nonstop mRNA decay in *Drosophila melanogaster* cells. *Biochimie* **106**, 10-16. doi: 10.1016/j.biochi.2014.08.001. (2014)
  15. Matsuda, R., Ikeuchi, K., Nomura, S. and [\\*Inada, T.](#) Protein quality control systems associated with No-Go and Nonstop mRNA surveillance in yeast. *Genes Cells* **19**, 1-12. doi: 10.1111/gtc.12106. (2014)

長尾 翌手可(査読有1件、査読無1件)

1. Chadani Y, Niwa T, Izumi T, Sugata N, [Nagao A](#), Suzuki T, Chiba S, [\\*Ito K](#), [\\*Taguchi H](#). Intrinsic ribosome destabilization underlies translation and provides an organism with a strategy of environmental sensing. *Mol Cell* **68**, 528-539. doi: 10.1016/j.molcel.2017.10.020. (2017)

岩川弘宙 計9件(査読有9件、査読無0件)

1. Tomari Y, [\\*Iwakawa HO](#). In vitro analysis of microRNA-mediated translational repression in plants. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 1640, 55-71, doi: 10.1007/978-1-4939-7165-7\_4. (2017).
2. Baeg K, [\\*Iwakawa HO](#), [\\*Tomari Y](#). The poly(A) tail blocks RDR6 from converting self mRNAs into substrates for gene silencing. *Nature Plants*, Vol. 3 | Article number: 17036, doi:10.1038/nplants.2017.36. (2017).
3. [Iwakawa HO](#), [\\*Tomari Y](#). The Functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression. *Trends in Cell Biology*, Vol. 25 (11), 651-665, doi: 10.1016/j.tcb.2015.07.011. (2015)
4. [#Fukaya T](#), [#Iwakawa HO](#), [\\*Tomari Y](#). MicroRNAs block assembly of eIF4F translation initiation complex in *Drosophila*. *Molecular Cell*, Vol. 56, 67-78, doi: 10.1016/j.molcel.2014.09.004. (2014).

[学会発表](計101件)

- ① [稲田利文](#) Multiple-step ubiquitination of stalled ribosomes induces endonucleolytic cleavages of mRNA FASEB Ubiquitin and Cellular Regulation 2018年
- ② [稲田利文](#) 品質管理と翻訳制御における3'非翻訳領域の新規機能 第18回日本蛋白質科学会年会 2018年
- ③ [稲田利文](#) A Novel Complex Targets Ubiquitinated Ribosome to Ribosome Quality Control Protein quality control: Success and failure in health and disease 2017年

- ④ 稲田利文 Molecular mechanism of biological control and information conversion by RNA 第 69 回日本細胞生物学会大会 2017 年
- ⑤ 稲田利文 Ubiquitination of uS10 by Hel2 and RQT complex triggers Ribosome-associated Quality Control Summer School Dynamics of Translation 2017 年
- ⑥ 稲田利文 リボソームユビキチンコードによる翻訳品質管理の分子機構 酵母遺伝学フォーラム第 50 回研究会報告会 2017 年
- ⑦ 稲田利文 Ubiquitylation of stalled ribosome triggers ribosome quality control Protein Homeostasis in Health and Disease 2016 年
- ⑧ 稲田利文 Ubiquitylation of ribosomal protein uS10 is crucial for ribosome-associated quality control UBIQUITIN&CELLULAR REGULATION 2016 年
- ⑨ 稲田利文 Co-translational quality controls of mRNA and protein RNA2016 satellite-symposium Nascent biology and Ribosome functions 2016 年
- ⑩ 稲田利文 Ribosome-associated quality control(RQC)requires the ubiquitylation of the ribosomal protein uS10 and novel RQC-triggering factors RNA2016 2016 年
- ⑪ 稲田利文 Ubiquitylation of Stalled Ribosome Triggers Ribosome Quality Control Ribosome Structure and Function 2016 2016 年
- ⑫ 稲田利文 T25.Ubiquitylation of ribosomal proteins play crucial roles in quality controls induced by aberrant translation Post-transcriptional control of gene expression:Mechanisms of RNA decay 2016 年
- ⑬ 稲田利文 Crucial roles of ribosome ubiquitination in quality controls and stress response NASCENT CHAIN BIOLOGY 2016 2016 年
- ⑭ 稲田利文 Ubiquitination of stalled ribosome triggers ribosome-associated quality control Translational Control 2016 2016 年
- ⑮ 稲田利文 リボソーム修飾シグナルによる翻訳の動的制御 第 4 回 RIBOSOME MEETING 2016 年
- ⑯ 稲田利文 Novel regulatory roles of ribosomes in global gene expression 第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年
- ⑰ 稲田利文 翻訳伸長複合体の運命決定機構におけるリボソームユビキチン化の新規機能 第 67 回 日本細胞生物学会大会 2015 年
- ⑱ 稲田利文 Novel roles of ribosome ubiquitination in quality control systems Genetic code and translation 2015 年
- ⑲ 稲田利文 Ubiquitylation of ribosomal proteins governs the fate of stalled ribosomes Protein Synthesis and Translational Control 2015 年
- ⑳ 稲田利文 Ubiquitylation of Ribosomal Proteins Play Crucial Roles in Translation Surveillance Systems Ubiquitin and ubiquitin-like modifiers 2015 年
- ㉑ 稲田利文 Ubiquitylation of Stalled Ribosome Triggers Ribosome Quality Control 第 38 回日本分子生物学会年会第 88 回日本生化学大会・合同大会 2015 年
- ㉒ 稲田利文 Ribosome associated E3 ubiquitin ligase complex is required for mRNA and protein quality control systems induced by translation arrest Post-Transcriptional Control of Gene Expression: Mechanism of mRNA Decay 2014 年
- ㉓ 稲田利文 Hel2 induces ribosome quality control by ubiquitination of 40S ribosomal proteins in stalled ribosomes Translational Control 2014 年
- ㉔ 稲田利文 翻訳伸長複合体の品質管理機構におけるユビキチン化の新規機構 第 87 回日本生化学会大会 2014 年
- ㉕ 稲田利文 Ubiquitylation of ribosomal proteins governs the fate of stalled ribosomes Joint Australia and Japan RNA meeting 2014 年
- ㉖ 稲田利文 翻訳伸長複合体の運命決定機構 第 3 7 回日本分子生物学会年会 2014 年

(図書)(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等 [http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~idenshi/inada\\_lab\\_HP/](http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~idenshi/inada_lab_HP/)

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名:長尾 翌手可

ローマ字氏名:Asuteka Nagao

所属研究機関名:東京大学

部局名:大学院工学系研究科化学生命工学専攻

職名:助教

研究者番号(8桁):30588017

研究分担者氏名:岩川 弘宙

ローマ字氏名:Iwakawa Hirooki

所属研究機関名:東京大学

部局名: 定量生命科学研究所

職名:講師

研究者番号(8桁):60710415