

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：14603

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：26116006

研究課題名(和文)mRNAの局在化に働く新生鎖の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of nascent peptides regulating mRNA localization

研究代表者

河野 憲二(Kohno, Kenji)

奈良先端科学技術大学院大学・研究推進機構・特任教授

研究者番号：50142005

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 109,590,000円

研究成果の概要(和文):小胞体ストレスを解消するために働くXBP1蛋白質は、蛋白質の合成途上で一時休止し、それを利用して自身のmRNAを小胞体上に運ぶという性質を持っていることを見出した。何故このようなことが起きるかを調べた結果、C末端側にある一時休止配列(PS)により翻訳が止まると、疎水性領域HR2がリボソームトンネルの外に出てSRPに結合し、SRP経路を使って自身のmRNAを小胞体膜上に運ぶこと、また休止配列はリボソームトンネルを構成するリボソーム蛋白質と相互作用し翻訳の一時休止を起こすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

蛋白質は合成されてから正しい立体構造を取り機能するが、小胞体ストレス応答に関与するXBP1u蛋白質は合成途上で翻訳休止(ポーシング)し、その状態で自身のmRNAを小胞体膜上に連れて行くという重要な生理機能を持ち、翻訳された後には核に移行して働くという特徴を持つ。本研究により、小胞体膜上に移動するために必要なXBP1の領域とそれに関与する分子を同定し、また、どのような機構で翻訳休止をしているのかを分子レベルで初めて明らかにした。以上の研究成果は、小胞体ストレス応答破綻により起こる糖尿病・神経変性疾患などの原因究明と、それらの治療薬開発に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文):XBP1 protein, which could mitigate endoplasmic reticulum (ER) stress, carries its own mRNA to the ER membrane due to ribosomal stalling caused by translational pausing sequence (PS) located to the C-terminal region of XBP1. We clarified the molecular mechanism of XBP1 mRNA recruited to the ER membrane. During translational stalling by PS, the hydrophobic region HR2 in XBP1u localized just outside the ribosome tunnel, is recognized by SRP; thereafter, the SRP-ribosome nascent chain complex is co-translationally recruited to the ER through the SRP pathway. Some amino acids of PS is interacted with ribosomal protein in the ribosome tunnel, which is one of the reasons to cause ribosome stalling.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：蛋白質 翻訳ポーシング リボソーム 小胞体 品質管理 ストレス応答 細胞質スプライシング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

蛋白質の翻訳は、DNAの遺伝情報を実際に細胞内で働く蛋白質に変換することであり、60年以上前から分子レベルでの詳細な解析が行われてきた。今までの翻訳過程は、遺伝子情報を伝える mRNA からリボソームという蛋白質製造機を用いて、ポリペプチド鎖が均一なスピードで合成されてくると考えられていた。しかし最近の研究により、その速度は一定でなく、極端な場合は停止する現象も報告されてきた。この速度の緩急が、合成途上のポリペプチド鎖の立体構造形成(フォールディング)を助けたり、場合によっては自身の mRNA の局在化を助けていることもわかってきた。また、特異的なアミノ酸配列により翻訳速度が遅くなったり、極端な場合には停止すること、停止した場合にはそれ以上ペプチド合成ができなくなり細胞としては非常に不都合な状況になること、そのような場合にその状況を解消するような細胞側の機構があることも明らかとなってきた。すなわち、翻訳時に起こる新しい細胞側の品質管理機構の理解が必要となってきた訳である。私達は、細胞内オルガネラである分泌蛋白質の生産工場にあたる「小胞体」に、合成した蛋白質が構造異常蛋白質として蓄積する「小胞体ストレス」状態の時に、細胞がそれを解消するための小胞体ストレス応答を起こすことを見出し、その応答機構を分子レベルで研究してきた。その過程で、ストレス応答時に重要な役割を演じる転写因子前駆体である XBP1u 蛋白質が、翻訳途上で一時停止し(翻訳休止)自身の疎水性領域 HR2 を利用して、XBP1u mRNA を効率よく小胞体膜上に運んでいるという興味深い現象を見出した。これはまさに、翻訳途上のペプチド鎖が、翻訳終了を待たずに生理的な機能を持っていることを示している。そこでこの系を用いて、新生鎖の新しい役割を解析し、小胞体ストレス応答の経路の詳細を明らかにすることを試みた。

## 2. 研究の目的

(1) 翻訳休止による XBP1u mRNA の小胞体膜への標的化機構の解明: XBP1u の HR2 配列を利用し、小胞体局在化に必要な因子を単離同定する。in vitro 翻訳系を利用してその詳細な機構を明らかにすると共に、in vivo でもそれらの分子が必要かどうか、実際に働いているかどうかを検証する。

(2) 翻訳休止の分子機構解析: 翻訳休止は、XBP1u蛋白質のC末側にある翻訳休止配列(PS)により引き起こされる。翻訳休止を起こす時には、PS領域はリボソームトンネル内にあることから、当然rRNAやリボソームタンパク質との直接的相互作用により翻訳休止が起こることが予想される。この相互作用する分子を見出し、翻訳休止機構を詳細に解析する。

## 3. 研究の方法

(1) 2つのタグをN末に付加した3Flag-8His-XBP1u(FH-XBP1u)をHEK293T細胞に発現させ、細胞を可溶化し、その液をanti-Flag agaroseで免疫沈降し、Flag ペプチドで溶出、さらにニッケル-agaroseに吸着し、特異的に結合した分子をイミダゾールで溶出、それぞれ濃縮したものを質量分析し、HR2と相互作用する分子を同定する。候補の分子が実際に機能しているかどうかを、種々の生化学的手法で確認する。

(2) FH-XBP1uをHEK293T細胞に発現し、PSとリボソームトンネル内で相互作用する因子を光架橋し、抗Flag抗体により免疫沈降したものを質量分析する。得られた候補分子が実際にXBP1uと相互作用することを、部位特異的変異導入により確認する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 翻訳休止による XBP1u mRNA の小胞体膜への標的化機構の解明

XBP1u の疎水性領域 HR2 と相互作用する分子を質量分析したところ、シグナル認識粒子 (SRP) と小胞体膜にある蛋白質輸送装置 (Sec61) が候補にあがってきたので、SRP 経路を介して小胞体膜に輸送されてくる可能性を検証した。 XBP1u の翻訳休止の強さは、XBP1u(S255A) > 野生型

XBP1u > XBP1u(W256A) の順に強く、XBP1u と分泌経路に重要な役割をする SRP 及びトランスロコンとの結合を免疫沈降により調べた所、これらのコンポーネントも同じ傾向を示した。翻訳休止を起こさない

XBP1u(W256A) では、両者との結合は見られなかった。同様に上記の XBP1u を培養細胞に発現し、その細胞内局在を蛍光抗体染色により調べた所、翻訳休止の強さに比例して小胞体膜に局在化することが明らかとなった。小麦胚芽抽出液を用いた *in vitro* 翻訳系に SRP とミクロソーム膜画分を加え、新生鎖と mRNA との膜画分への移行が SRP 依存しているかどうかを調べた所、SRP に依存して膜画分へ移行することを証明した。

以上をまとめると、XBP1u は C 末側の PS により翻訳休止が起きるとちょうど HR2 部分がリボソームトンネルの外に局在化し (図 1)、SRP が HR2 に結合することができるようになり、その結果 SRP 経路を使って小胞体膜蛋白質輸送装置に運ばれてくること明らかとなった。本結果により、SRP 経路に入るためには翻訳休止が必要なこと、XBP1u は SRP 経路を介して小胞体膜の蛋白質輸送装置に運ばれることを示したこと、また翻訳休止が生理的に有用な機能を果たしていることを明確に示すことができた。これらは本研究による重要な成果である。さらに、SRP 経路を介して運ばれるにも関わらず、小胞体内には効率よく輸送されないことがわかっており、その詳細な機構に関しては今後の課題である。

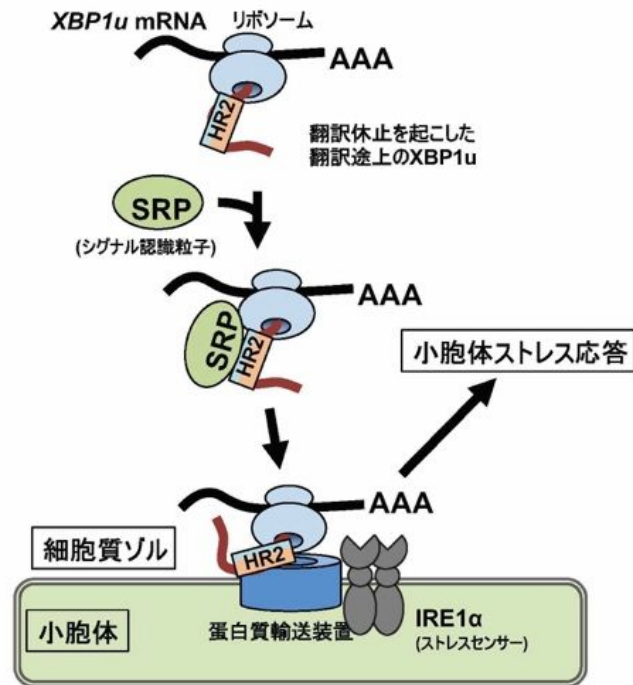


図1 XBP1u mRNAが小胞体膜に標的化される模式図

##### (2) 翻訳休止の分子機構解析

光架橋及び質量分析の結果、XBP1u の PS はリボソーム蛋白 uL4 と強く相互作用していることが示唆された。クライオ電顕の結果から uL4(Arg71) と相互作用している可能性が示唆されていたので、uL4 と XBP1u の PS に変異を導入し実際に相互作用しているかどうかを検証した。

uL4(WT), uL4(R71K) の時には休止したが、R71G, A, E, W に変異すると休止しなくなったことから側鎖の長さや陽イオンが関係していることが示唆された。クライオ電顕の結果から XBP1u(P243) と uL4(R71) が相互作用している結果が得られていたので、その前後のアミノ酸 (Q242L/P244L or Q242L/P244G) に変異を導入したところ、翻訳休止が起こらなくなったことか

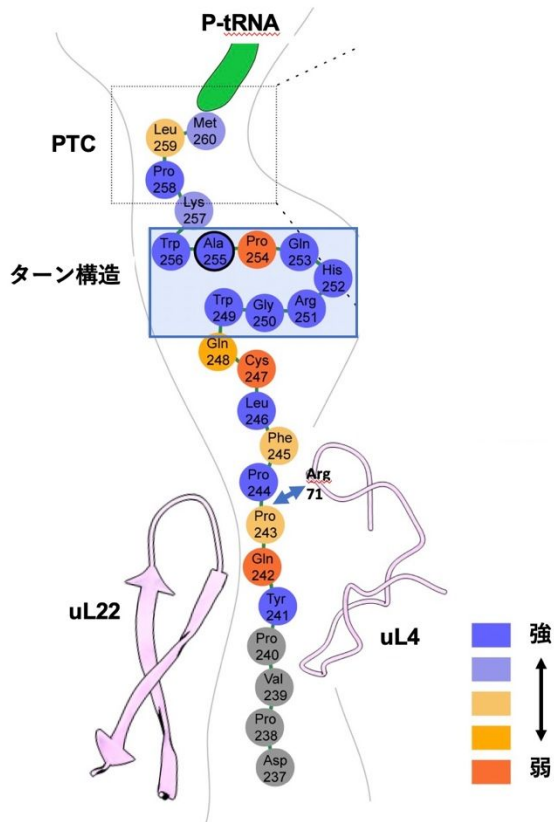


図2 リボソームトンネル内でXBP1uが翻訳停止をした時の停止ペプチドの模式図  
 アミノ酸に記入された数字は、XBP1uアミノ末端からの残基数。260番目のメチオニン(Met)がPサイトで停止している。青色から赤色への変化は、そのアミノ酸が翻訳停止にどれほど大きく貢献しているかを強から弱の順で表している。薄い青色で示したアミノ酸8残基がループ構造を形成している。

休止が解除されるという事実がある。このことは上流のアミノ酸とのリボソーム蛋白質との相互作用が翻訳休止の最初のトリガーとなっている可能性があることを示唆しており、今後検討する課題の一つである。さらにこの翻訳休止は一時的であり、その後解除されることがわかっている。どのような機構で解除されるのかも今後の課題である。

ら、予想を支持する結果を得た。クライオ電顕解析結果から、PSのW249とW256の間でターン構造を取り(図2青枠)、リボソームトンネルと強く相互作用していることが最終的に休止を起こしている要因であることが明らかとなった。

哺乳動物細胞を用いてリボソーム蛋白質に変異を入れ翻訳途上で停止した蛋白質の翻訳停止を解除したのは、おそらく初めての報告になるので重要な成果である。翻訳休止配列の一部がターン構造を取り、それが最終的な翻訳休止の要因であることが明らかとなったが、その上流のアミノ酸を1つ変えるだけでも翻訳

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Han, P., Mito, M., Shichino, Y., Hashimoto, S., Udagawa, T., Kohno, K., Yoshida, M., Mishima, Y., Inada, T., Iwasaki, S.	4. 巻 31
2. 論文標題 Genome-wide survey of ribosome collision.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020/107610	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shanmuganathan Vivekanandan, Schiller Nina, Magoulopoulou Anastasia, Cheng Jingdong, Braunger Katharina, Cymer Florian, Berninghausen Otto, Beatrix Birgitta, Kohno Kenji, von Heijne Gunnar, Beckmann Roland	4. 巻 8
2. 論文標題 Structural and mutational analysis of the ribosome-arresting human XBP1u	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.46267	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Fujimoto Takushi, Nakamura Oriie, Saito Michiko, Tsuru Akio, Matsumoto Masaki, Kohno Kenji, Inaba Kenji, Kadokura Hiroshi	4. 巻 293
2. 論文標題 Identification of the physiological substrates of PD1p, a pancreas-specific protein-disulfide isomerase family member	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 18421 ~ 18433
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.003694	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tsuchiya Yuichi, Saito Michiko, Kadokura Hiroshi, Miyazaki Jun-ichi, Tashiro Fumi, Imagawa Yusuke, Iwawaki Takao, Kohno Kenji	4. 巻 217
2. 論文標題 IRE1-XBP1 pathway regulates oxidative proinsulin folding in pancreatic cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 1287 ~ 1301
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.201707143	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kanda Satoshi, Yanagitani Kota, Yokota Yukiko, Esaki Yuta, Kohno Kenji	4. 巻 113
2. 論文標題 Autonomous translational pausing is required for XBP1u mRNA recruitment to the ER via the SRP pathway	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 E5886 ~ E5895
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1604435113	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsuru Akio, Imai Yasutaka, Saito Michiko, Kohno Kenji	4. 巻 6
2. 論文標題 Novel mechanism of enhancing IRE1 -XBP1 signalling via the PERK-ATF4 pathway	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 24217(1-8)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep24217	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mathuranyanon R., Tsukamoto T., Takeuchi A., Ishiwata-Kimata Y., Tsuchiya Y., Kohno K., Kimata Y.	4. 巻 128
2. 論文標題 Tight regulation of the unfolded protein sensor Ire1 by its intramolecularly antagonizing subdomain	5. 発行年 2015年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 1762 ~ 1772
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.164111	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計91件 (うち招待講演 13件 / うち国際学会 14件)

1. 発表者名 大古殿美加、曾川愛守榮、柳谷耕太、木俣行雄、河野憲二
2. 発表標題 XBP1u translational pausing requires the interaction between own nascent chain and uL4
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小池雅昭、河野憲二
2. 発表標題 重複機能ドメインの解析から得られたXBP1遺伝子の起源と進化
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大古殿美加、曾川愛守榮、柳谷耕太、木俣行雄、河野憲二
2. 発表標題 XBP1u翻訳休止におけるリボソームタンパク質uL4の関与
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kenji Kohno
2. 発表標題 The role and the mechanism of XBP1u-translational pausing in the ER stress signaling
3. 学会等名 International Symposium on "Proteins; from the Cradle to the Grave" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomoko Komatsu, Akio Tsuru, Kou bun Yasuda, Tomohiro Yoshimoto, Kenji Nakanishi, Kenji Kohno
2. 発表標題 Requirement of ER stress response for nematode expulsion through mature mucin production by IRE1b specific pathway
3. 学会等名 International Symposium on "Proteins; from the Cradle to the Grave" (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masaaki Koike, Kenji Kohno
2. 発表標題 XBP1 encodes SRP recognition motif and transactivation domain in a conserved dual-coding frame
3. 学会等名 International Symposium on "Proteins; from the Cradle to the Grave" (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuichi Tsuchiya, Michiko Saito, Hiroshi Kadokura, Jun-ichi Miyhazaki, Takao Iwawaki, Kenji Kohno
2. 発表標題 IRE1 -XBP1 pathway regulates oxidative proinsulin folding in pancreatic cells
3. 学会等名 International Symposium on "Proteins; from the Cradle to the Grave" (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Miku Ohfurudono, Ashway Sogawa, Kota Yanagitani, Yukio Kimata, Kenji Kohno
2. 発表標題 XBP1u translational pausing requires the interaction between own nascent chain and ribosomal proteins
3. 学会等名 International Symposium on "Proteins; from the Cradle to the Grave" (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenji Kohno
2. 発表標題 The role and mechanism of XBP1u-translational pausing in the ER stress signaling
3. 学会等名 EMBO workshop: Endoplasmic Reticulum function and disease (国際学会)
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 Miku Ohfurudono, Ash-way Sogawa, Yukio Kimata, Kenji Kohno
2. 発表標題 Molecular mechanism of XBP1u translational pausing
3. 学会等名 EMBO Conference: Protein quality control (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kenji Kohno
2. 発表標題 Translational pausing in the ER stress signaling
3. 学会等名 International Symposium on Protein Quality Control (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kenji Kohno
2. 発表標題 Translational pausing in the ER stress signaling
3. 学会等名 FASEB Science Research Conferences (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masaaki Koike, Satoshi Kanda, Kota Yanagitani, Kenji Kohno
2. 発表標題 The role of translational pausing in the delivery of XBP1u mRNA to the ER via the SRP pathway
3. 学会等名 第17回日本蛋白質科学会ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kenji Kohno
2. 発表標題 Autonomous translational pausing is required for XBP1u mRNA recruitment to the ER via the SRP pathway
3. 学会等名 Nascent Chain Biology International Symposium (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Satoshi Kanda, Kota Yanagitani, Yukio Kimata, Kenji Kohno
2. 発表標題 Autonomous translational pausing is required for XBP1u mRNA recruitment to the ER via the SRP pathway
3. 学会等名 Nascent Chain Biology International Symposium
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Masaaki Koike, Satomi Nukada, Reina Yamada, Takashi Akanuma, Michiko Saito, Masahito Ikawa, Kenji Kohno
2. 発表標題 Studies on physiological meanings of diphthamide in eEF2
3. 学会等名 Nascent Chain Biology International Symposium
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Miku Ohfurudono, Ash-way Sogawa, Yukio Kimata, Kenji Kohno
2. 発表標題 Molecular mechanism of XBP1u translational pausing
3. 学会等名 Nascent Chain Biology International Symposium
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Ash-way Sogawa, Kota Yanagitani, Kenji Kohno
2. 発表標題 Novel physiological roles of RQC in the ER of mammalian cells
3. 学会等名 Nascent Chain Biology International Symposium
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Kenji Kohno
2. 発表標題 The role of translational pausing in the delivery of XBP1u mRNA to the ER via the SRP pathwa
3. 学会等名 EMBO conferences “Structure and function of the endoplasmic reticulum” (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Ash-way Sogawa, Kota Yanagitani, Kenji Kohno
2. 発表標題 Novel physiological roles of RQC in the ER of mammalian cells.
3. 学会等名 EMBO conferences “Structure and function of the endoplasmic reticulum” (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Akio Tsuru, Yasutaka Imai, Michiko Saito, Kenji Kohno
2. 発表標題 PERK-ATF4 branch of the unfolded protein response is required for the full activation of IRE1a-XBP1 signaling
3. 学会等名 FASEB Science Research Conferences, “From Unfolded Proteins in the ER to Disease” (国際学会)
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 Satoshi Kanda, Kota Yanagitani, Kenji Kohno
2. 発表標題 A novel role of SRP pathway for efficient ER-targeting of translation-paused XBP1u in ER homeostasis
3. 学会等名 Gordon Research Conferences "Stress Proteins in Growth, Development & Disease" (国際学会)
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 Kenji Kohno
2. 発表標題 Importance of translation pausing in unfolded protein response
3. 学会等名 Temasek Lifescience Laboratory Seminar (招待講演)
4. 発表年 2015年

1. 発表者名 Kenji Kohno
2. 発表標題 Autonomous translational pausing is required for ER targeting and cytoplasmic splicing of XBP1u mRNA.
3. 学会等名 NAIST International Workshop "New era of pre-mRNA splicing world" (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Kenji Kohno
2. 発表標題 Efficient targeting of translation-paused XBP1u to the ER in unfolded protein response.
3. 学会等名 九州大学国際シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2015年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Yanagitani, K. and Kohno, K.	4. 発行年 2014年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 315 (291-310)
3. 書名 Regulatory Nascent Polypeptides	

1. 著者名 Kimata, Y., Nguyen, T.M.P., and Kohno, K.	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 259 (161-188)
3. 書名 Stress response mechanisms in fungi -Theoretical and practical aspects-	

〔産業財産権〕

〔その他〕

河野特任研究プロジェクト <a href="http://www.naist.jp/iri/kouno/">http://www.naist.jp/iri/kouno/</a> 河野特任研究プロジェクト <a href="https://www.facebook.com/naist.kohnolab/">https://www.facebook.com/naist.kohnolab/</a>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	木俣 行雄  (Kimata Yukio)  (60263448)	奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・准教授    (14603)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	小池 雅昭  (Koike Masaaki)		
研究協力者	都留 秋雄  (Tsuru Akio)		
研究協力者	柳谷 耕太  (Yanagitani Kota)		
研究協力者	曾川 愛守榮  (Sogawa Ashuei)		
研究協力者	大古殿 美加  (Ohfurudono Miku)		