

令和元年5月27日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07243

研究課題名(和文) 哺乳類神経細胞におけるmRNA・新生ペプチド鎖の品質管理とその生理的意義

研究課題名(英文) Role of Ribosome-associated quality control in mammalian neurons

研究代表者

宇田川 剛 (Udagawa, Tsuyoshi)

東北大学・薬学研究科・助教

研究者番号：20644199

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では異常な翻訳に起因する品質管理機構であるRibosome-associated quality control (RQC)の哺乳類細胞、特に神経細胞における生理的意義の解明を目的として、マウス行動解析、神経突起伸長解析等を行なった。その結果、発達中の若い神経細胞においては、RQCによる異常新生鎖の除去、特に、CATtailとよばれる異常新生鎖のC末端に付加され、分解を促進するペプチドタグを含む新生鎖の除去が正常な神経細胞形態形成と生存に重要であることが明らかになった。一方、マウス生体においてはRQC誘導因子の発現抑制が長期記憶を特異的に阻害することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

翻訳の異常に起因する新生タンパク質の品質管理機構であるribosome-associated quality control (RQC)は、近年、その分子機構が出芽酵母において詳細に解析が進められているが、哺乳類細胞や個体レベルでの重要性はまだほとんど明らかにされていない。本研究ではRQC因子の脳神経系における作用解析を行い、神経突起の形態形成や神経細胞生存、また、個体レベルでは、学習と記憶、不安などの高次脳機能にRQC因子が重要な役割を果たすことが明らかにされた。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate physiological function of ribosome-associated quality control (RQC), a quality control for aberrant protein synthesis, in neurons, we have performed a series of behavioral assays and neuron morphogenesis and survival analysis. we found that clearance of the proteins with CAT-tail which is a peptide tag attached to C-terminal end of nascent peptides during RQC and promote efficient degradation of nascent peptides is crucial for the maintenance of morphology of young developing neurons. CAT-tailed products are likely prone to aggregate and eventually induce cell death. On the other hands, knockdown of RQT (RQC trigger) factors in the mouse hippocampus affected anxiety and long-term memory formation.

研究分野：分子医化学

キーワード：翻訳 品質管理 脳機能制御

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真核生物の遺伝子発現においては転写、スプライシングのエラーや遺伝子変異等により、恒常的に様々な異常 mRNA が産生される。このような異常 mRNA から翻訳される不完全な異常タンパク質は生体にとって有害となる可能性があり、速やかに分解される必要がある。異常 mRNA が異常であると認識されるためにはその mRNA は一度翻訳されなければならない。このような翻訳と共役した品質管理機構がこれまでに複数知られており、さらに mRNA 分解と並行して、翻訳途上のリボソームの解離と新生ペプチド鎖の分解も誘導されることが明らかにされている。本研究では翻訳伸長段階でのリボソームの停滞に伴うリボソームの解離と新生ペプチド鎖の分解機構 (Ribosome-associated quality control; RQC) に注目した。RQC はその分子機構の解明が近年出芽酵母を用いて精力的に進められているが、哺乳類細胞における生理的重要性の解明はほとんど進められていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、哺乳類細胞における mRNA とタンパク質の品質管理機構の分子機構の解明と、神経細胞突起伸長や高次脳機能における品質管理の重要性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

まず出芽酵母において RQC を誘導することが報告されている翻訳停滞を引き起こすレポーターを改変し、RQC 因子ホモログをノックダウン (KD) した哺乳類細胞 (HEK293T 細胞および HeLa 細胞) に導入しウエスタンブロットを行うことにより、RQC の分子機構が哺乳類細胞においても保存されていることを確認した。その後、RQC の生理的重要性が示唆されている神経細胞、およびマウス個体の高次脳機能における RQC 因子 KD の影響を確認した。また RQC 機構の生体内における標的を探索するために ribosome profiling 法による網羅的解析を試みた。

4. 研究成果

当研究室で解析が進められてきた出芽酵母の RQC 因子 He12/RQT1、Slh1/RQT2、LTN1 の哺乳類ホモログである ZNF598、ASCC3、Listerin の解析を行った。GFP および His3 遺伝子の間に、出芽酵母において RQC を誘導することが知られている連続したリジン配列 (Lys (AAA) 24) を in-frame で挿入したレポーターを HEK293T 細胞に導入し、上記因子のノックダウン (KD) の影響をウエスタンブロットにより解析した。その結果、ZNF598、および ASCC3 の KD は、いずれも Lys (AAA) 24 における翻訳停滞効率の低下、翻訳停滞による短い新生ペプチド鎖の減少が観察され、これらの因子が RQC の誘導に必須な役割を果たすことが示された。一方、Listerin のノックダウンでは Lys (AAA) 24 における翻訳停滞 (アレスト) 産物の蓄積が観察され、出芽酵母 LTN1 と同様に、Listerin が翻訳停滞産物の分解に関与することが確認された。以上の結果より、基本的な RQC の分子機構は出芽酵母から哺乳類まで保存されていることが示された。

また、出芽酵母の RQC では、mRNA から解離後の 60S リボソーム上に残された新生ペプチド鎖の C 末端に Ala, Thr からなるペプチドタグが RQC2 によって mRNA 配列非依存的に付加され、これによりリボソームトンネル内の新生ペプチド鎖が押し出され、効率良い新生鎖のエピキチン化と分解に寄与することが報告されている。しかし、CAT tail が付加した新生鎖は LTN1 欠損により RQC が破綻した際には凝集体を形成する原因となることも示されている。これまで出芽酵母以外で CAT tail が同定された例はなかったが、今回、 β -globin および GFP 遺伝子を改変し終止コドンがなくした nonstop mRNA の翻訳が哺乳類細胞において、CAT tail の付加を伴うことが示唆された。これらの nonstop 産物はウエスタンブロットにおいてスミア状に検出され、このうち高分子側の産物のみが RQC2 ホモログである NEMF の KD により減少したことから、この高分子側の産物が CAT tail が付加した産物ではないかと考えられる。また、上記の GFP-K24-HIS3 のウエスタンブロットにおいても、NEMF KD によりアレスト産物の低分子側へのシフトが確認された。現在、これらの産物を大量調製し、アミノ酸分析および質量分析により CAT tail の同定を試みている。

出芽酵母においては、nonstop 産物の蓄積は細胞質における凝集体形成を誘導し、タンパク質毒性ストレスを引き起こすこと、また、RQC2 欠失により凝集体が消失することが報告されている。一方、哺乳類細胞においては、 β -globin、および GFP の nonstop 産物は核内に凝集体を形成することが明らかになった。また、nonstop 産物の強制発現により、細胞死が惹起されることも明らかになり、RQC による異常タンパク質の除去が細胞生存に重要な働きを担うことが示された。

しかし、少なくとも HeLa 細胞においては、nonstop 産物の強制発現は細胞死を惹起するものの、通常培養条件での RQC 因子の単独 KD では細胞生存率に有意な影響をもたらさなかった。RQC 因子の Listerin はもともと進行性運動機能障害を示すマウスの順遺伝学的スクリーニングにより同定されており、また、ZNF598 は自閉症との関連も報告されている。このように RQC 因子の神経機能における重要性が示唆されていることから、次に、海馬初代培養神経細胞において ZNF598, ASCC3, LTN1, NEMF の KD を行い、神経突起伸長への影響を Sho11 解析により評価した。その結果、LTN1 KD により神経突起伸長の顕著な阻害が観察された。一方、ZNF598, ASCC3, NEMF KD では突起伸長の異常は見られなかった。これらの結果は、少なくとも今回解析した若い発達中の神経細胞においては、異常翻訳産物の分解、除去が正常な神経突起伸長に重要であることを示している。また、LTN1 KD による突起伸長の異常は NEMF KD によりレスキューされたことから、CAT tail が付加された新生鎖の蓄積が特に神経細胞形態形成に悪影響を及ぼす要因となると考えられる。Nonstop 産物の強制発現においても神経突起伸長の阻害が観察され、この阻

害は LTN1 KD により亢進され、NEMF KD により抑制された。今後は突起伸長阻害の直接の原因となっている内在性の因子の同定を進める必要がある。

上記の神経突起伸長の解析においては RQC 誘導に必須な ZNF598、ASCC3 の KD は異常を示さなかった。しかしながら、成熟神経細胞あるいはマウス成体においてはこれらの因子が重要な役割を果たすことが十分考えられる。そこでこれらの因子に対する shRNA を発現する AAV ベクターを作製し、6 週齢の生体マウス海馬に注入し、海馬特異的 KD マウスを作製した。LTN1 KD では予想通り、海馬の脱落が観察された。NEMF KD は初代培養神経細胞の上記の突起伸長の解析条件においては生存率に有意な影響を及ぼさなかったが、成体マウス海馬における KD では LTN1 KD と同様に海馬の脱落を示す予備的データがこれまでに得られている。一方、RQC 誘導に関わる ZNF598 の KD では外見上、海馬自体の異常はほとんど見られなかった。そこで、ZNF598 KD マウスの高次脳機能解析を行なったところ、ZNF598 KD マウスは不安の亢進、長期記憶の障害を示すことが明らかになった。一方、短期記憶、作業記憶は正常に保たれていた。これらの結果は ZNF598 がタンパク質合成依存的なシナプス可塑性に関わることが示唆している。実際に、ZNF598 は細胞体だけでなくシンプスにおいても検出され、NMDA によるシナプス刺激や KC1 による脱分極に応答してその発現が低下することが明らかになった。また、ZNF598 KD 時のタンパク質合成を Puromycin 取り込みにより評価したところ、ZNF598 は成熟神経細胞においてはタンパク質合成の抑制に関わることが示唆された。ZNF598 は翻訳開始因子 eIF4E と相互作用することも知られており、ZNF598 KD による行動異常が RQC 誘導阻害によるのか、RQC とは別の翻訳制御機能によるのかは今のところ不明である。ZNF598 KD 神経細胞を用いた Ribosome profiling では、少なくとも遺伝子レベルでは ZNF598 KD による特異的な発現変動をこれまで確認できておらず、今後、ZNF598 による翻訳制御機構をより多角的に検討する必要がある。リボソームの解離に関わると考えられる ASCC3 の KD マウスは ZNF598 KD マウスと同様に長期記憶の障害を示し、全タンパク質合成を抑制することを示唆するデータが得られている。一方、ASCC3 KD マウスでは短期記憶の障害も観察された。また、海馬の脱落や脊椎後弯を示す個体がしばしば見られており、RQC 以外の機能として、ASCC3 が核内における DNA 損傷応答に関わることも報告されているため、今後さらなる解析が必要である。

以上のように、本研究では、RQC 機構が哺乳類細胞において保存されていること、また、特に神経細胞の発達初期においては、RQC による異常翻訳産物の分解が正常な形態形成、細胞生存に重要な役割を果たすことが明らかになった。一方、成熟神経細胞においては、RQC 誘導に関わる因子が、シナプス可塑性や高次脳機能制御に関わることが示唆され、RQC 因子の哺乳類神経細胞における生理的重要性の概要が明らかにされた。今後はさらに RQC 阻害による細胞死誘導の原因因子の同定、高次脳機能障害の分子機構の詳細、また、神経疾患との関連について解析を進める必要がある。

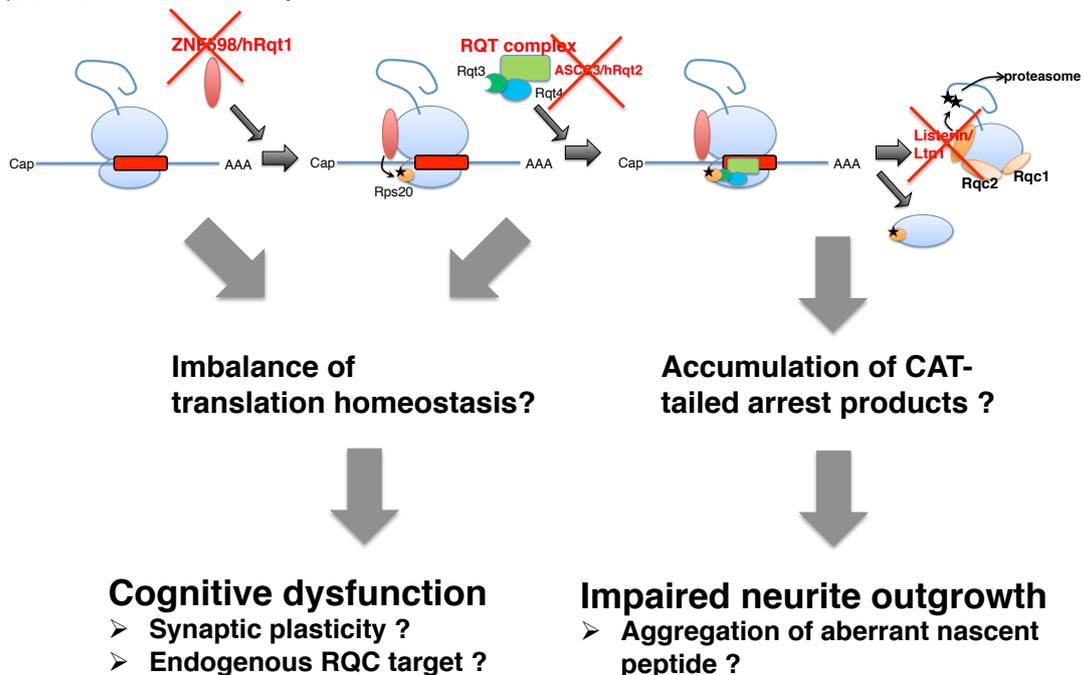


図. RQCの分子機構およびRQC破綻による神経機能障害

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Matsuo Y, Ikeuchi K, Saeki Y, Iwasaki S, Schmidt C, Udagawa T, Sato F, Tsuchiya H, Ando K, Becker T, Tanaka K, Ingolia NT, Beckmann R, Inada T. Ubiquitination of stalled

ribosome triggers ribosome-associated quality control. Nat. Commun. 8 159, 2017
doi: 10.1038/s41467-017-00188-1. (査読有り)

〔学会発表〕 (計 3 件)

1. Tsuyoshi Udagawa, 'Clearance of translation arrest products by ribosome-associated quality control is critical for neuron morphogenesis and Survival' 第20回武田科学振興財団科学シンポジウム、大阪、2019年 (ポスター)
2. 宇田川剛、奥山卓、関萌香、稲田利文、Ribosome-associated quality control (RQC) 因子は神経突起伸長と認知機能を特異的に制御する、第20回日本RNA学会年会、大阪、2018年 (口頭)
3. 宇田川剛、リボソームユビキチン化と共役した mRNA/タンパク質品質管理の神経機能および生存における影響、第39回日本神経科学大会、パシフィコ横浜、2016年 (口頭)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。