

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07751

研究課題名(和文)核内リボソーム生合成と細胞質翻訳の機能的連携による新規細胞増殖制御機構の解明

研究課題名(英文)Studies of novel mechanisms regulating cell growth by functional cooperation between nuclear ribosome biogenesis and cytoplasmic translation

研究代表者

灘野 大太(Nadano, Daita)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：00228074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：リボソームを巡る核内外連携細胞増殖制御機構を解明するためリボソーム構成因子の網羅的探索を行い、mRNA結合能を有するSerbp1を細胞質リボソームの小サブユニットにmRNA非依存的に会合する因子として見出した。このタンパク質には複数のアイソフォームが存在することを示し、アイソフォームに関わらず核内ではリボソーム生合成の場である核小体に、核外では盛んなタンパク質合成を反映するポリソームを含めリボソームに局在することを原理の異なる手法の組み合わせによって示した。他にもリボソーム(前駆体)結合を介してリボソーム生合成と翻訳と結びつけるタンパク質の同定および解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞増殖において各種転写因子による転写制御やタンパク質リン酸化等の翻訳後修飾の重要性には膨大な知見の蓄積がある。しかしながらその間に位置する翻訳については、リボソームが進化的に高度に保存されているがゆえに不変であり、よってダイナミックな制御とは無関係と長年信じられてきた。我々は哺乳類リボソームに構造不均一性を見出しこの見方に疑問を投げかけ、今回独自に見出した細胞増殖に関わるリボソーム会合因子により「ふぞろいなリボソーム」をさらに深化・展開させた。こうした新たなメカニズムの解明は翻訳亢進との関係から有用タンパク質産生、またがん細胞増殖との関係から新たな診断・治療への基盤となる。

研究成果の概要(英文)：To study the mechanisms regulating cell growth by functional cooperation between nuclear ribosome biogenesis and cytoplasmic translation, we comprehensively analyzed the protein constituents of mammalian ribosomes. Serbp1, known as an mRNA-binding protein, was identified to be associated with the ribosomal small subunit in an mRNA-independent manner. Microscopic and biochemical analyses of Serbp1 indicated that this protein was mainly located in the nucleolus, a place where ribosome biogenesis occurs, within the nucleus and included in cytoplasmic polysomes including translating ribosomes. In addition, we identified and analyzed the novel proteins potentially involved in the mechanisms.

研究分野：哺乳類の生化学・分子細胞生物学

キーワード：リボソーム 翻訳 リボソーム生合成 細胞増殖 哺乳類

1. 研究開始当初の背景

細胞の増殖においては、染色体 DNA の倍化のみならず、細胞を構成する細胞器官やその構成分子を同様に増加させなければならない。哺乳類細胞において細胞質リボソームは 40S (S は沈降係数) 小サブユニットおよび 60S 大サブユニットが一つずつ会合した 80S の細胞器官であり、4 種類のリボソーム RNA および約 80 種類のタンパク質からなる巨大複合体である。細胞質リボソームは mRNA からのタンパク質合成すなわち翻訳の場として機能する。増殖亢進時には、細胞器官の一つとして増殖に伴う細胞質での翻訳亢進 (mRNA 上でのポリソームの形成) のために多数のリボソームが必要とされる。一方、真核細胞の細胞質リボソームは、核小体を中心とする核内で生合成される。この生合成には多くのエネルギーを要し、たとえば増殖期の酵母の場合、細胞全体の転写の約 60% がリボソーム RNA の合成に費やされると見積もられている [1]。新規合成されたリボソームタンパク質の核内への能動輸送や核小体で組み立てられたリボソームサブユニットの核外輸送も必要である。換言すると、細胞増殖に不可欠なリボソームであっても作りすぎは細胞にとってエネルギーの浪費となる。では、細胞内環境に応じて必要なリボソームの数はどのようにして決められているのであろうか。この増殖の根幹にも関わる問いに関する明確な答えは不明なままであった。

2. 研究の目的

研究代表者らは、上述の問題を解く鍵を思いがけず得た。すなわち、核小体タンパク質としてリボソーム生合成に関与するジンクフィンガータンパク質 Lyar が、リボソーム 60S サブユニット前駆体に結合したまま核外に出て、翻訳および細胞増殖を促進した [2]。従来、真核細胞においてリボソーム生合成に関わるタンパク質 (200 種類以上とされる) は、リボソームの核外輸送に関与する一部の因子を除いて核小体あるいは核質に存在するとされ、完成品である細胞質リボソームにはリボソーム RNA 以外には既知のいわゆるリボソームタンパク質しかないと言われてきた。この知見はリボソーム生合成促進と翻訳亢進の二役をもつタンパク質の発見である。さらに Lyar は翻訳の開始反応に関わった後、その核移行シグナルを利用して、核小体に速やかに戻ることが示唆されている。したがって、核小体 (リボソーム生合成) と細胞質リボソーム (翻訳) の間を行き来するタンパク質 (以下シャトル因子と呼ぶ) が存在し、単なるリボソームという物質の核外への一方的な輸送だけでなく、核膜をはさんだ両領域を往復しながら細胞増殖のため機能的な連携を図る可能性が考えられた。以上の検討を今回の研究の目的とした。

3. 研究の方法

研究代表者らは翻訳制御の重要性が示唆されている精巢に着目し、Lyar を含め独自のリボソーム構成因子を同定してきた [2-5]。よってマウスおよびラットの精巢を用いて、核小体および細胞質リボソームに共通して存在する (いわゆるリボソームタンパク質以外の) タンパク質、すなわち新規シャトル因子の探索、ならびにこれらの解析に取り組んだ。その成果の一例として mRNA 結合タンパク質 Serbp1 [6] について記述する。Serbp1 の解析方法として具体的には、組織・細胞からの RNA の単離および逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)、哺乳類細胞におけるタンパク質発現用ベクターの作製、哺乳類細胞の培養、哺乳類細胞への遺伝子導入および酸化ストレス誘導、哺乳類細胞での生化学的細胞分画、免疫プロットティング、蛍光抗体法を含む蛍光顕微鏡観察、ならびにプロフィール解析を含む哺乳類細胞のリボソーム分析を行った。これらの材料や手順を含む詳細については文献 [6] に記載した。

4. 研究成果

(1) 新規リボソーム構成タンパク質としての Serbp1 の同定

前項で記載したとおり、研究代表者らによって構築されたリボソーム構成タンパク質の網羅的同定法をラット精巢細胞質画分から精製されたリボソームに適応して解析を進めた結果、Serbp1 が同定された。この発見を確認し、かつ Serbp1 を含むリボソーム複合体を調べる目的で、ラット精巢細胞質リボソームのショ糖密度勾配超遠心法によるプロフィール解析を行った。その結果 Serbp1 は 40S 小サブユニットに会合し、そのまま 80S リボソームおよび翻訳中のポリソームに含まれることが示唆された。ポリソームに含まれることは Serbp1 が翻訳促進、さらには細胞増殖に寄与することを想像させた。さらに細胞増殖との関連からヒトがん細胞 (HeLa 細胞) における Serbp1 を分析した結果、ここでも同様な Serbp1 とリボソームの会合が示された。

Serbp1 (別名 CGI 55、PAI RBP1) はラット肝がん細胞において plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI 1) mRNA に結合するタンパク質のひとつとして見出され、細胞質においてこの mRNA を安定化することが示された。その後 Serbp1 は DNA 切断および組換え、クロマチン再構成、転写、細胞質でのプロゲステロン関連情報伝達等に関わる多機能タンパク質と認識されている (詳しくは文献 [6] の緒言に記載)。Serbp1 については興味深いことにその発現が核内でのリボソーム生合成に影響を与えることが示唆されていたが、細胞質でのリボソームとの関係については不明な点が多く、さらに解析を進めることとした。

(2) Serbp1 の mRNA 非依存的なリボソームとの会合

上記のとおり Serbp1 は mRNA 結合タンパク質である。したがって、リボソームとの会合は mRNA を介しての間接的なものであり、リボソームそのものとの相互作用はない可能性が考えられた。この点を検討するため 2 種類の実験を行った。まず、細胞質リボソームをエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) で処理した後リボソームのプロフィールを解析した。EDTA 処理によりリボソームの大小サブユニットの会合に必要なマグネシウムイオンがキレートされるため、mRNA を含むポリソームや 80S リボソームは解離していずれも大小計 2 つの遊離サブユニットとなる。この条件下においても Serbp1 は 40S 小サブユニットとともに共沈降した。次に mRNA の限定分解による解析を行った。限定分解の方法としてリボソームプロファイリング、すなわち mRNA のリボソームでの結合状態の解析、での手技を応用した。細胞内のポリソームを単離し、あらかじめ検討した条件において限定的にエンド型 RNA 分解酵素 (RNase) で処理すると、80S リボソームは複合体として維持され、またポリソームに含まれる mRNA においてリボソームによって保護された部分は未分解のままリボソームと会合し残る。他方リボソームと直接会合していない mRNA 部分は溶媒に露出するため RNase によって分解が進む。この酵素処理後に超遠心法により沈殿 (処理抵抗性の保護 mRNA 断片を含む 80S リボソーム) および上清 (消化によりリボソームから遊離した分子群) に分画した。これにより mRNA と関係なくリボソームに会合することでポリソームに含まれていたタンパク質 (mRNA 非依存的会合) は沈殿画分に、mRNA に結合することで間接的にポリソームに取り込まれたタンパク質 (mRNA 依存的会合) は上清画分に検出される。酵素消化・超遠心後、コントロールとして mRNA 非依存的会合を示すリボソームタンパク質 S6 および L10 が処理後も沈殿画分に検出されること、および mRNA 依存的会合を示すとされる mRNA 結合タンパク質の G3BP およびポリ A 結合タンパク質 (PABP) の一部が処理により上清画分に移行することを確認した。次に Serbp1 を観察したところ Serbp1 はリボソームタンパク質と同様にすべて沈殿画分に検出され、酵素消化によっても上清からは検出されなかった。

以上の実験から、Serbp1 は mRNA 結合タンパク質であるが mRNA に依存することなく細胞質リボソームと会合しうることが明らかにされた。

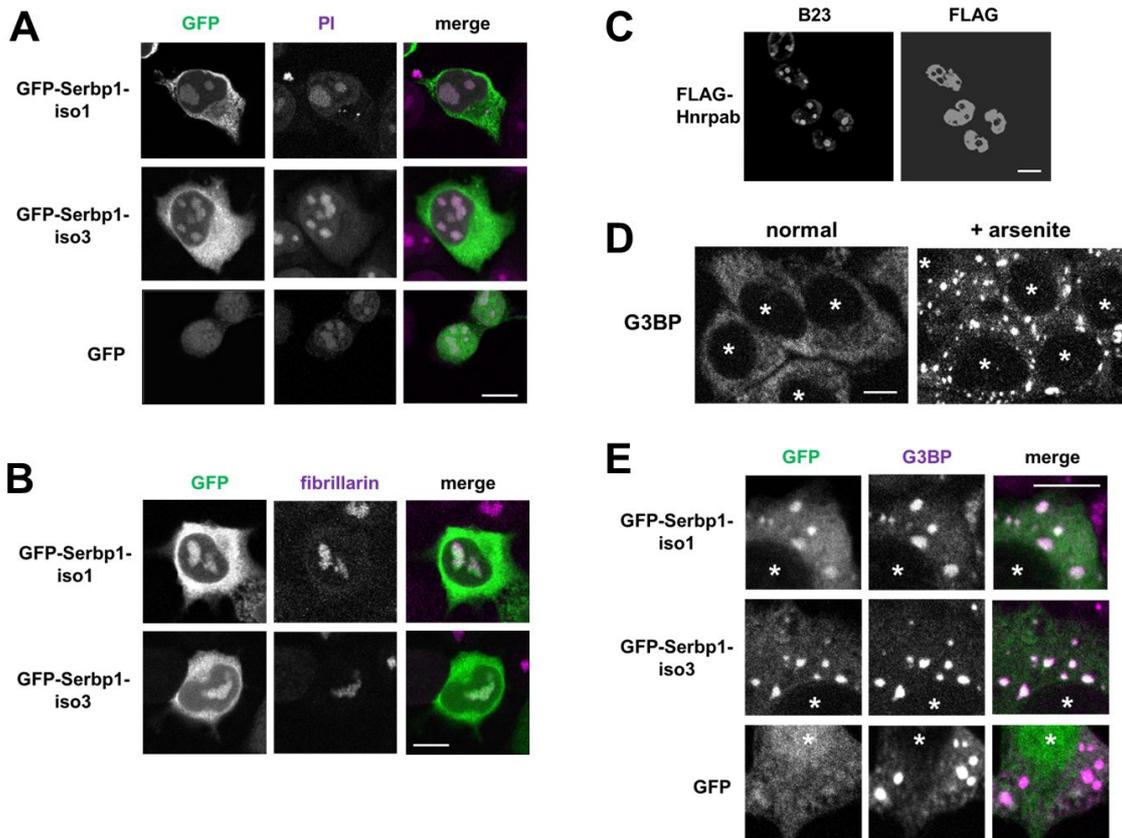


図 1 . N 末端 GFP 融合マウス Serbp1 (アイソフォーム 1 および 3) の細胞内局在観察。(A) 各融合タンパク質をヒトがん細胞において発現させ、共焦点レーザー顕微鏡によって観察した。PI は核染色用のヨウ化プロピジウム。(B) 核内の Serbp1 は主に核小体 (マーカー: フィブリラリン) に局在した。(C) 同様に核内で mRNA (前駆体) に結合するタンパク質 Hnrnpk (FLAG タグ付) は過剰発現させても核小体 (マーカー: B23) に局在しなかった。(D) ストレス顆粒観察像 (マーカー: G3BP)。(E) 酸化ストレスにより Serbp1 はストレス顆粒に強く検出された。星印は核を示し、スケールバーはいずれも 10 μ m。John Wiley and Sons 社より許諾を得て文献 [6] より転載。

(3) シャトル因子として観点からの Serbp1 の解析

上記のとおり Serbp1 は核内外において様々な役割を果たすことが推察されているが、これまでの研究はそれぞれの役割に焦点を当てた機能関連であり、一般的なこの分子の細胞内局在については不明な点が多かった。これに加えて公的データベース (NCBI Gene) において Serbp1 の複数のアイソフォームの存在が示唆されていた。たとえばげっ歯類およびヒトにおいて選択的スプライシングの違いにより一つの Serbp1 遺伝子から 4 種類のアイソフォームが生成するとされている。過去の論文を精査したところ、これまでの Serbp1 に関する報告は総じて最も鎖長の短いアイソフォーム 4 に関してであった。一方今回げっ歯類精巣リボソームから同定されたアイソフォームは、同定時の質量分析において検出されたペプチド断片からアイソフォーム 4 ではないと推定された。このことは、データベース上で推察されたより鎖長の長いアイソフォームが実際にタンパク質レベルで存在すること、さらにアイソフォームの違いにより細胞内局在や機能が異なる可能性が考えられた。今回の研究では核内外を行き来する因子の焦点を当てていることからアイソフォームの網羅的スクリーニングおよび各フォームの細胞内局在を観察することとした。

まず、マウス精巣 cDNA を用いて、すべてのアイソフォーム全長を増幅可能なプライマーペアを設計し、PCR により Serbp1 の cDNA を増幅した。その結果最も鎖長の長いアイソフォーム 1 およびアイソフォーム 3 が得られ、Serbp1 のこれまで未報告のアイソフォームの発現が示された。

次にこれら 2 種類のアイソフォームに緑色蛍光タンパク質 (GFP) を融合したタンパク質の哺乳類細胞用発現ベクターを作製し、培養細胞に導入した。全長タンパク質の発現を免疫ブロッキングで確認後、細胞内局在を蛍光顕微鏡を用いて観察した。その結果、いずれのアイソフォームにおいても核内および細胞質に強い局在が見られた (図 1 A)。核内の強いシグナルは核小体に検出された (同図 B) この局在は GFP の融合位置が Serbp1 のアミノ末端でもカルボキシ末端でも同様であった。なお同図 C に一例 (Hnrnpk) [7] を示したように、核内の mRNA (前駆体) 結合タンパク質は過剰発現においても必ずしも核小体に蓄積されないことを付記する (この例ではむしろ排除されており、相転移を含む核小体形成や、mRNA が RNA ポリメラーゼ II によって合成されるのに対しリボソーム RNA は核小体に局在する RNA ポリメラーゼ I によって合成されることと関係があるのかもしれない)。

次に細胞内局在を別の相補的な方法から検討する目的で、生化学的細胞分画を行った。過剰発現が細胞内局在に影響することが懸念されたため、ここでは過剰発現に加えて内在性の Serbp1 を解析対象とした。超遠心法を含む一連の遠心分画により得られた画分を各画分のマーカータンパク質に対する抗体を用いた免疫ブロッキングにより解析し、適切な分画が示された。Serbp1 は、過剰発現および内在性のいずれも核画分およびリボソームを含む画分に主に検出された。よって上記の顕微鏡観察の結果を裏付けるとともに、Serbp1 とのリボソームとの会合を支持する結果となった。

(4) Serbp1 のリボソーム・翻訳との関連はストレス顆粒の観察によっても示された

ストレス顆粒は熱ショックなどの細胞ストレスにตอบสนองして細胞質において光学顕微鏡レベルで観察可能な生体膜をもたない顆粒状の構造体である (総説 [8])。これは細胞ストレスに対する対応として、細胞全体の翻訳が一時的に停止することの反映とされている。ストレス顆粒の形成は可逆的であり、細胞がストレスから解放されると速やかに消失する。このような一過性の翻訳制御は、異常タンパク質の蓄積を速やかに防ぐなどストレスで生じる細胞損傷を最小限にし、またストレス回避後の迅速な回復を可能にする細胞恒常性維持のための重要なメカニズムである。

今回の実験により Serbp1 が mRNA 非依存的にリボソームの 40S 小サブユニットに会合することが示された。前段落で記述した特性を反映して、ストレス顆粒は 40S 小サブユニットを含む翻訳関連因子から構成されることが知られている。以上を踏まえ、またストレス顆粒の生化学的解析には課題点が指摘されていることから [8]、ストレス顆粒形成時における Serbp1 を顕微鏡により観察した。

ストレス顆粒の培養細胞での誘導法としていくつかの方法が知られているが、ここでは汎用されている酸化ストレスを用いた。同顆粒のマーカー G3BP を用いた顕微鏡観察 (図 1 D) により GFP 融合 Serbp1 の局在を調べた。酸化ストレス条件下において細胞質の Serbp1 はストレス顆粒に強く検出された (同図 E)。アイソフォーム 1 および 3 のいずれでも同様の局在変化が見られた。この結果は Serbp1 のリボソームとの会合、そしてリボソームを介しての翻訳への関与を支持する。

(5) 結語：当初予期されなかった知見を含め

本研究の成果として公表された Serbp1 [6] に今回焦点を当てた。本論文は米国科学アカデミー紀要 (PNAS) に引用されたり [9]、リボソーム付加因子の例として総説 [10] で挙げられるなど着実に評価を受けている。Serbp1 のリボソームとの会合については、構造解析において見解が分かれていたが [11, 12]、今回の論文はこの状態に別のアプローチから一石を投じたと思われる。Serbp1 の会合が示されなかった論文 [12] の実験条件を改めて読み直すと、栄養飢餓状態の細胞からリボソームを単離していた。栄養飢餓状態においては翻訳に関わる各種因子や翻訳後修飾がリボソームにおいて見られないことから構造上均一なリボソームを得るには適切な条件と思

われる。しかしながら翻訳亢進関連の要因は失われるわけで、この知見も間接的ながら哺乳類の Serbp1 が細胞増殖に関わることを支持する。また Serbp1 が核小体でのリボソーム生合成に関与するメカニズムに興味を持たれる。Serbp1 に mRNA 結合能があり、かつ今回示されたように細胞質においてリボソームに会合することを踏まえると、ひとつの可能性として Serbp1 がその標的 mRNA と選択的に結合することによる寄与(標的 mRNA のリボソームへのターゲティング促進や安定性増加等)が想定される。しかしながらこの仮説では Serbp1 自身の核小体での存在(図 1 B) が十分に説明できない。上記のとおり Serbp1 が細胞内の様々な場所で多様な機能を発揮している点を考慮すると、複合的な核-細胞質間の機能連携が存在するのかもしれない。

最後に、研究代表者らの同様のスクリーニングにおいて、細胞質(すなわち核外)でリボソームに会合するタンパク質として Serbp1 以外にも mRNA 結合能を有するタンパク質が思いがけず複数同定された。たとえば mRNA (前駆体)の核内から核膜孔を通しての輸送への関与が示唆されているものがあり、関連して RNA-タンパク質複合体の単離ならびに次世代シーケンシングを含む RNA-seq による標的 RNA の解析系の構築にも成功している。リボソームを含む翻訳系は、核内でのリボソーム生合成に加え、その鋳型となる mRNA の制御とも連携していると推察され、新たな展望をも開示できたと思われる。

<引用文献>

1. Warner, J. R. (1999) *Trends Biochem. Sci.* **24**, 437-440
2. Yonezawa, K., Sugihara, Y., Oshima, K., Matsuda, T., and Nadano, D. (2014) *Mol. Cell. Biochem.* **395**, 221-229
3. Sugihara, Y., Honda, H., Iida, T., Morinaga, T., Hino, S., Okajima, T., Matsuda, T., and Nadano, D. (2010) *J. Proteome Res.* **9**, 1351-1366
4. Sugihara, Y., Sadohara, E., Yonezawa, K., Kugo, M., Oshima, K., Matsuda, T., and Nadano, D. (2013) *Gene* **521**, 91-99
5. 灘野大太・杉原圭彦 (2016) *化学と生物* **54**, 77-79
6. Muto, A., Sugihara, Y., Shibakawa, M., Oshima, K., Matsuda, T., and Nadano, D. (2018) *Cell Biochem. Funct.* **36**, 312-322
7. Taga, Y., Miyoshi, M., Okajima, T., Matsuda, T., and Nadano, D. (2010) *Cell Biochem. Funct.* **28**, 321-328
8. Mahboubi, H., and Stochaj, U. (2017) *Biochim. Biophys. Acta* **1863**, 884-895
9. Ma, X. R., Ibrahim, F., Kim, E. J., Shaver, S., Becker, J., Razvi, F., Cerny, R. L., and Cerutti, H. (2020) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **117**, 761-770
10. Ferretti, M. B., and Karbstein, K. (2019) *RNA* **25**, 521-538
11. Anger, A. M., Armache, J. P., Berninghausen, O., Habeck, M., Subklewe, M., Wilson, D. N., and Beckmann, R. (2013) *Nature* **497**, 80-85
12. Khatteer, H., Myasnikov, A. G., Natchiar, S. K., and Klaholz, B. P. (2015) *Nature* **520**, 640-645

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Muto Akiko, Sugihara Yoshihiko, Shibakawa Minami, Oshima Kenzi, Matsuda Tsukasa, Nadano Daita	4. 巻 36
2. 論文標題 The mRNA-binding protein Serbp1 as an auxiliary protein associated with mammalian cytoplasmic ribosomes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Biochemistry and Function	6. 最初と最後の頁 312 ~ 322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbf.3350	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 Jiang Long, Li Tao, Zhang Xingxia, Zhang Beibei, Yu Changping, Li Yang, Fan Suixing, Jiang Xiaohua, Khan Teka, Hao Qiaomei, Xu Peng, Nadano Daita, Huleihei Mahmoud, Lunenfeld Eitan, Wang P. Jeremy, Zhang Yuanwei, Shi Qinghua	4. 巻 27
2. 論文標題 RPL10L Is Required for Male Meiotic Division by Compensating for RPL10 during Meiotic Sex Chromosome Inactivation in Mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Curr. Biol.	6. 最初と最後の頁 1498 ~ 1505.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2017.04.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

高等動物における翻訳 (タンパク質合成) 制御の解明 http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~molreg00/translation.html

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
---------------------------	-----------------------	----