

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目： 基盤研究(B)
 研究期間： 2007 ～ 2009
 課題番号： 19370075
 研究課題名（和文） ポリ（A）鎖の翻訳によるノンストップ mRNA の翻訳抑制と異常タンパク質の分解機構
 研究課題名（英文） Translation arrest and degradation of aberrant protein induced by translation of poly(A) tail

研究代表者
 稲田 利文 (Toshifumi Inada)
 名古屋大学・大学院理学研究科・准教授
 研究者番号： 40242812

研究成果の概要（和文）：我々は、代表的な異常 mRNA であるノンストップ（終止コドンを持たない）mRNA における翻訳抑制と異常タンパク質分解機構について解析を行い、ポリ(A)鎖の翻訳自体が、多段階での発現抑制機構を作動させ、品質管理機構において必須な役割を果たすことを初めて明確に示した。翻訳アレストを引き起こすアミノ酸配列の特異性について解析を行った結果、塩基性新生ポリペプチド鎖の持つ正の電荷とリボソームトンネルを形成するリボソーム RNA の負の電荷の間の静電的相互作用による翻訳抑制機構が示唆された。さらに、連続した塩基性アミノ酸配列に依存する翻訳アレストは、1) 合成途中のポリペプチド鎖のプロテアソームによる迅速な分解と、2) mRNA の分子内切断を引き起こすことも明らかになっている。

研究成果の概要（英文）：Gene expression is highly accurate due to quality-control systems that prevent the expression of potentially harmful protein products. We previously reported that translation of the poly(A) tail plays a crucial role in repressing the production of aberrant proteins from nonstop mRNAs by both translation repression and proteasome-dependent nascent protein destabilization in yeast. This clearly indicates that translation arrest and protein degradation, in addition to mRNA degradation, are crucial for repressing the expression of nonstop mRNAs. We also recently reported that translation arrest caused by the presence of consecutive basic amino acids in a nascent protein induces Not4p-dependent co-translational protein degradation by the proteasome.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2008 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2009 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：遺伝子発現、品質管理、異常 mRNA、異常翻訳、プロテアソーム、リボソーム、新生ポリペプチド鎖、翻訳アレスト

1. 研究開始当初の背景

遺伝情報を正確に発現する為に、細胞は mRNA の品質を厳密に監視して不良品を速やかに除去するサーベイランス機構を保持している。ナンセンス変異を保持する mRNA は、ヒトから酵母まで普遍的に存在する NMD (ナンセンス変異依存分解系) により特異的に識別され分解される。ナンセンス変異以外にも、様々な異常 mRNA が細胞内に存在する。例えば終止コドンを含まない mRNA は、コード領域の途中でポリ(A)が付加された場合や、フレームシフト変異によって生じる可能性がある。この終止コドンを含まない mRNA (以下ノンストップ mRNA) 由来の遺伝子産物を積極的に排除するシステムは原核生物で発見され、トランス翻訳と呼ばれている。研究代表者は tmRNA が異常 mRNA の分解を促進し、異常タンパク質の合成自体を抑制することを明らかにした。本研究開始以前に、真核生物においても終止コドンを含まない mRNA を分解する系が発見され、NSD (nonstop-mediated decay) と名付けられた。終止コドンを含まない mRNA を翻訳したリボソームは、mRNA の 3' 端で停滞 (ストール) するが、このリボソーム-mRNA-ペプチジル tRNA 複合体が Ski7p により解消され、3' →5' エキソヌクレアーゼ複合体であるエキソソームによりノンストップ mRNA が分解されるモデルが提唱された。しかしながら、NSD の分子機構自体はほとんど不明であり、特に以下の点が問題点であった。

- ① 3' 端でストールしたリボソームが mRNA から解離される分子機構。
- ②デキャッピング (キャップ構造の除去) とそれに伴う 5' →3' 方向の分解系の関与。
- ③ノンストップ mRNA の翻訳が通常の終止コドンを持つ mRNA と同様に行われるか。

2. 研究の目的

研究代表者は特に②、③について解析を行い、①リボソームはノンストップ mRNA の 3'端で停滞し、ペプチジル tRNA-mRNA と複合体の状態が存在する、②Pab1p がポリ(A)鎖から解離される結果、デキャッピングとそれに伴う 5' →3'方向の分解が促進される、ことを明らかにした。本研究はこれをさらに発展させ、ノンストップ mRNA の分解と翻訳抑制の基盤となるノンストップ mRNA 上で停滞したリボソーム複合体の運命、特に新生ポリペプチド鎖の運命を明らかにしようとするものであり、独自の視点に基づいた独創的な研究であると考えられる。細胞内において異常タンパク質を感知し、その合成を抑制するシステムの理解

につなげることを目的として研究をおこなった。

3. 研究の方法

3' →5' 方向の分解の開始には停滞したリボソームが mRNA の 3' 末端から終止コドン非依存に解離する必要があるが、その分子機構は不明である。この点に焦点をあて、以下の遺伝学的実験と生化学的実験を行った。

4. 研究成果

研究代表者は、遺伝子発現の正確性を保証する品質管理機構の全体像を明らかにする目的で、代表的な異常 mRNA であるノンストップ mRNA とナンセンス変異をもつ mRNA における翻訳抑制と異常タンパク質分解機構について解析を行った。ノンストップ mRNA における翻訳抑制と異常タンパク質分解機構について解析を行った結果、通常翻訳されないポリ(A)鎖が翻訳され、1) 合成中のポリリジンとリボソームとの相互作用による翻訳アレスト (一時停止) と、2) プロテアソームによる異常タンパク質の速やかな分解を見いだした (論文 1)。この結果は、**ポリ(A)鎖の翻訳自体が、多段階での発現抑制機構を作動させ、品質管理機構において必須な役割を果たす**ことを初めて明確に示し、真核生物の mRNA の普遍的な修飾であるポリ(A)鎖が、翻訳開始と mRNA 安定性制御に加えて、品質管理機構にも重要な役割を果たすことを世界に先駆けて明らかにした。ポリ(A)鎖は真核生物の mRNA の普遍的な修飾であり、ポリ(A)結合因子(PABP)を介して、1) 翻訳開始の促進と、2) mRNA 安定化に極めて重要な役割を果たすことは広く知られている。この研究により、正常な mRNA では決して翻訳されないことがないポリ(A)鎖が、終止コドンを持たない異常 mRNA のみで翻訳されることで、翻訳伸張阻害とタンパク質の分解が起こり、**ポリ(A)鎖の翻訳自体が発現抑制を引き起こす品質管理機構として働くことが明確に示された**。ポリ(A)鎖の新しい機能を明らかにした点で、独創性の高い研究であると考えられる。

さらに最近、ポリ(A)鎖由来の連続したリジン残基のみでなく、連続したアルギニン残基によっても翻訳アレストが引き起こされることを見だし、塩基性新生ポリペプチド鎖の持つ正の電荷とリボソームトンネルを形成するリボソーム RNA の負の電荷の間の静電的相互作用による翻訳抑制機構が示唆された (論文 2)。この結果は、限定された例のみが報告されている**合成途中の新生ポリペプチド鎖とリボソームトンネル** (合成途中の新生ポリペプチド鎖が通るリボソーム中のトンネル) との相互作用による翻訳制御が普遍的であることを強く示唆する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

1. Kuroha, K., Tatematsu, T. and *Inada, T.
Upf1p stimulates proteasome-mediated degradation of the product derived from the specific nonsense-containing mRNA. *EMBO report* **10**:1265-1271. (2009)
2. Kuroha, K., Dimitrova, L., Tatematsu, T. and *Inada, T.
Nascent peptide-dependent translation arrest leads to not4p-mediated protein degradation by the proteasome. *J. Biol. Chem.* **284**: 10343-10352. (2009)
3. Endo, A., Matsumoto, M., Inada, T., Yamamoto, A., Nakayama, K.I., Kitamura, N. and Komada, M.
Nucleolar structure and function regulated by a deubiquitinating enzyme USP36. *J. Cell Sci.* **122**: 678-685. (2009)
4. Kuroha, K., Horiguchi, N., Aiba, H. and *Inada, T.
Analysis of nonstop mRNA translation in vivo. *Genes to Cells* **14**: 739-749. (2009)
5. Nukazuka, A., Fujisawa, H., Inada, T., Oda, Y., Takagi, S.
Semaphorin controls epidermal morphogenesis by stimulating mRNA translation via eIF2a in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.* **22**: 1025-1036. (2008)
6. Ito-Harashima, S., Kuroha, K., Tatematsu, T. and *Inada, T.
Translation of poly(A) tail plays crucial roles in nonstop mRNA surveillance via translation repression and protein destabilization by proteasome in yeast. *Genes Dev.* **21**: 519-524. (2007)

[学会発表] (計11件)

【シンポジウムでの講演】

- ① 稲田利文 「新生ポリペプチド鎖依存翻訳アレスト因子 RACK1 の同定」日本生物化学会シンポジウム「RNA 制御学」、平成21年10月22日、神戸
- ② 稲田利文 「Nascent peptide-dependent translation arrest leads to Not4p-mediated protein degradation by the proteasome」日本生物化学会シンポジウム「拡大する品質管理の概念」、平成20年12月9日、神戸
- ③ 稲田利文 「Novel mechanisms for quality

control to repress abnormal products from aberrant mRNAs in yeast」日英最先端シンポジウム(UK-JFOS2008) 平成20年10月5日、湘南国際村

- ④ 稲田利文 「40S ribosome-bound RACK1 functions in nascent peptide-dependent translation arrest that leads to Hbs1/Dom34-independent NGD」Translational Control, 平成20年9月5日、CSHL, USA
- ⑤ 稲田利文 「遺伝子発現の正解性を保証する mRNA 品質管理機構」第18回酵母合同シンポジウム2008(招待講演)、平成20年5月8日、甲南大学
- ⑥ 稲田利文 「生命現象の基盤である正確な遺伝子発現を保証する機構」第23回Wako ワークショップ「mRNA 品質管理と疾患」、平成19年11月16日、東京
- ⑦ 稲田利文 「Consecutive basic residues induce translation arrest and protein degradation by the proteasome in yeast」、Translational Control、平成19年9月13日、EMBL, Germany
- ⑧ 稲田利文 「Upf1p stimulates nonsense-mediated co-translational protein degradation by the proteasome in yeast」Translational Control 平成19年9月15日、EMBL, Germany
- ⑨ 稲田利文 The Ribosomes,平成19年6月6日、MA、USA

【オーガナイザー】

- ①井上邦夫、稲田利文 日本分子生物学会シンポジウム「RNA 制御学」、平成21年12月、横浜
- ②稲田利文、大野睦人 日本生物化学会シンポジウム「RNA 制御学」、平成21年10月22日、神戸
- ③遠藤斗志也、稲田利文 日本分子生物学会シンポジウム「拡大する品質管理の概念」、平成20年12月、神戸

[図書] (計6件)

- ①稲田利文 「概論：遺伝子発現制御の中核をなす RNA プログラム」蛋白質核酸酵素増刊号『多様性と非対称性を獲得する RNA プログラム』(2009)
- ②稲田利文 (2009) 「RNA プログラムを支える品質管理機構」蛋白質核酸酵素増刊号『多様性と非対称性を獲得する RNA プログラム』
- ③稲田利文 (2008) 「転写後制御を標的とした遺伝子疾患治療—異常 mRNA から正常なタンパク質を合成させる低分子化合物」実験医学増刊『RNA の機能解明と医療応用』26: 1644-1649.
- ④稲田利文 (2008) 「mRNA の動態とプロテアソーム」実験医学増刊『タンパク質の分解機

構』26: 237-241.

【著書】

⑤稲田利文、大野睦人編 蛋白質核酸酵素増刊号『多様性と非対称性を獲得するRNAプログラム』

⑥稲田利文、塩見春彦編 無敵のバイオテクニカルシリーズ『RNA 実験ノート上巻』羊土社 (2008)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://web.me.com/toshiinada/INADA_group_site/Welcome.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲田 利文 (Toshifumi Inada)
名古屋大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号：40242812

(2) 研究分担者

なし ()
研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：