

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：13901  
研究種目：若手研究  
研究期間：2019～2022  
課題番号：19K16516  
研究課題名(和文)m7GTP capを介した新規翻訳制御機構の解明

研究課題名(英文)m7GTP cap-mediated translation control

**研究代表者**

浜口 知成 (Hamaguchi, Tomonari)

名古屋大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号：90812149

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒ素依存性にGEMIN4と結合するタンパク質を網羅的解析のうえ同定した。内在性GEMIN4とm7GTPの結合はヒ素やメタンサルホン酸メチルで促進し、メチル化阻害剤で抑制された。レポーターアッセイおよびpulsed SILAC法を用いて、GEMIN4がヒ素濃度依存的に翻訳量を調整するか、もしくはタンパク質分解システムを調整しているかの可能性が示唆された。しかし、共同研究協力のもと実施したRibosomal profilingでは、翻訳調整を支持するデータを得られなかった。総じてメチル化反応を介してGEMIN4はmRNAのm7GTPと結合した。しかし生物学的意義は未解明である。

**研究成果の学術的意義や社会的意義**

ストレス応答におけるm7GTP capの動静はわかっていなかった。ヒ素ストレスにてGEMIN4とm7GTPの結合が示唆された。本研究では、GEMIN4とmRNAの関係に注目して解析を始めた。ヒ素ストレスがGEMIN4のメチル化修飾を介して、m7GTPとGEMIN4の結合が進むことが明らかとなった。ストレス下におけるGEMIN4と相互作用するタンパク質を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We identified GEMIN4-binding proteins under arsenic state by LC/MS/MS. Binding of endogenous GEMIN4 to m7GTP was promoted by arsenite and methyl methanesulfonate and inhibited by methylation inhibitors. Using reporter assays and the pulsed SILAC method, we obtained data showing that GEMIN4 suppressed translation or protein degradation in an arsenic concentration-dependent manner. However, Ribosomal profiling, performed in collaboration with a collaborator, did not provide data supporting translational repression. In general, GEMIN4 bound to m7GTP cap of mRNA via methylation reaction. However, the biological significance remains unresolved.

研究分野：分子生物

キーワード：GEMIN4 mRNA m7GTP

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

古くから m7GTP cap を介した翻訳制御について研究はなされており、翻訳開始の分子メカニズムについて焦点を当てた研究が盛んである。しかし、ストレス応答における m7GTP cap の動静はわかっていなかった。GEMIN4 は、mRNA スプライシングに不可欠な survival motor neurons (SMN) 複合体の構成分子として同定された、機能未知な脊椎動物固有のタンパク質である (Gregory RI, *Cell*, 2005; Charroux B, *J Cell Biol*, 2000)。GEMIN4 は SMN 複合体や RISC の構成成分であると報告されている。AGO2 との結合を通して遺伝子サイレンシングに関与していることが示唆されている (Gibbins D, *Nat Cell Biol*, 2015)。GEMIN4 の変異が発癌に関与するといくつかの臨床研究が報告されている (Horikawa Y, *Clin Cancer Res*, 2008; Liu J, *DNA Cell Biol*, 2012)。最近の臨床研究で、GEMIN4 変異は神経変性疾患 (global developmental delay) 発症に関与する事が指摘されている。しかし、GEMIN4 の生理的役割は不明である。申請者は、GEMIN4 が細胞内で翻訳を司るリボソーム RNA と結合している事を発見した。さらにヒ素ストレス依存性に、細胞周期や細胞増殖に関わる遺伝子 mRNA の 5' cap に GEMIN4 が結合する事を発見した。これらの知見は、GEMIN4 の翻訳制御への関与を強く示唆した。

## 2. 研究の目的

本研究では、細胞内での GEMIN4 の生理的役割を明らかにすることを目指した。ヒ素ストレスによる GEMIN4 の挙動を調べた。

## 3. 研究の方法

### GEMIN4の結合タンパク質の探索

GEMIN4と結合するタンパク質を調べるために、GEMIN4抗体を用いた免疫沈降実験を行い、LC/MS/MSで網羅的に探索した。免疫沈降物を In gel法 (ポリアクリルアミドで電気泳動後にゲルから溶出する方法) と In solution法 (溶液のまま前処理を行う方法) の2つを行なった。Mascot Searchを行って、GEMIN4 結合タンパク質を同定した。

### m7GTPとGEMIN4のストレス因子の探索

どんなストレスがGEMIN4とm7GTPを結合に関わるか模索した。ヒ素以外に、UV照射、過酸化水素投与、高温環境でストレス刺激をかけた。また、アルキル化剤を用いて内在性GEMIN4とm7GTP beadsの結合実験を行なった。ヒ素と共にメチル化阻害剤添加、およびメチオニンフリーの培地を利用して同様の実験を実施した。

### GEMIN4による、ストレス環境下におけるProtein turnover制御の検討

GEMIN4がヒ素刺激によってタンパク質の存在量を制御するかどうか模索した。GEMIN4をノックダウンさせて、比較プロテオミクスを行なった。Pulsed SILAC (stable isotope labeling by amino acids in cell culture) 法は、安定同位体を用いたプロテオミクスであり、生きた細胞におけるタンパク質の動的な回転速度を研究するために用いられる手法である (Schwanhäusser B, *Proteomics*, 2009)。これにより、GEMIN4ノックダウンとヒ素投与を組み合わせた実験条件下でのタンパク質とその回転率を相対的に定量化した。そして、変化量の多い遺伝子を抽出した。

### GEMIN4による、ストレス環境下における翻訳制御の検討

GEMIN4 をノックダウンさせてリボソームプロファイリングを行なった (Ingolia NT, *Nat Protoc*. 2012)。これは、mRNA に対するリボソームの翻訳ダイナミクスと活性をゲノムワイドに解析する手法である。GEMIN4 ノックダウンとヒ素投与を組み合わせ、翻訳効率を計

測した。また併せて RNA-seq を実施した。

#### 4. 研究成果

GEMIN4 との結合タンパク質を網羅的に調べた。In gel 法では複数の EIF3 タンパクが検出された。EIF3 は翻訳開始因子として細胞増殖制御因子の翻訳活性や抑制に関わっていることが報告されている (Lee A. S, *Nature*, 2015)。In solution 法では SMN complex 構成タンパク質、および Spliceosomal RNP が検出された。両手法とも検出されたのは、GEMIN3、RBM4、SH3KBP-1、KCTD1 であった。SMN complex 構成タンパク質の GEMIN3 および Spliceosomal RNP の検出は既知であるが、RBM4 と SH3KBP-1、KCTD1 はユニークな結果である。

内在性 GEMIN4 と m7GTP の結合は、UV 照射、過酸化水素投与および高温環境下で増強が認められなかった。一方で、アルキル化剤メタンスルホン酸メチルでは強まった (図 1)。

また、Cycloleucin や Adenosine Dialdehyde (AdOx) といったメチル化阻害剤投与および Methionin free conditional medium 存在下においては、ヒ素を投与しても結合は認められなかった (図 2)。

以上よりメチル化ストレスによって GEMIN4 と m7GTP が結合することが示唆された。GEMIN4 のメチル化修飾が m7GTP との結合を強めることが示唆された。

Pulsed SILAC 法で、GEMIN4 をノックダウン細胞においてヒ素刺激後の各遺伝子のタンパク量を検討した。12 時間および 24 時間の両条件下においても、真核生物翻訳開始因子や伸長因子、またリボソームタンパクのタンパク質量が GEMIN4 ノックダウン細胞で増えていた。以上より、ヒ素刺激において GEMIN4 はこれら遺伝子の翻訳量を調整するか、もしくはタンパク質分解システムを調整しているかの可能性が示唆された。

と同じ条件のもと、リボソームプロファイリングおよび RNA-seq を実施した。定常状態およびヒ素刺激において GEMIN4 ノックダウン細胞は翻訳効率および転写産物量を変えなかった (図 3)。GEMIN4 が翻訳を制御する可能性は薄まった。

GEMIN4 が一部を成す SMN complex は、ヒ素ストレス下での挙動はまだわかっていない。Sm-class snRNA は 5' 末端に cap 構造を保有する。ヒ素ストレスによる SMN complex の snRNP 形成の変化を捉えられるかもしれない。今後は、別のアプローチで GEMIN4 の生物学的役割を推し量る必要がある。

図 1. ストレス下の GEMIN4 -m7GTP 結合実験

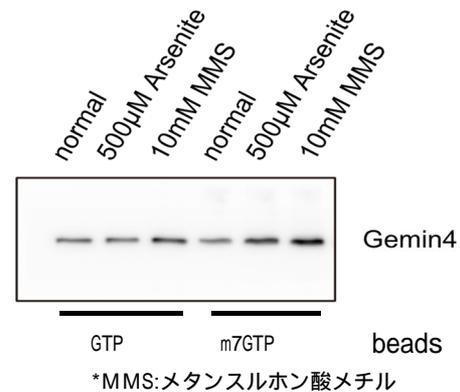


図 2. メチル化誘導時の GEMIN4 -m7GTP 結合実験

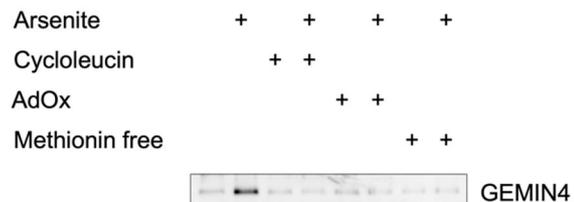
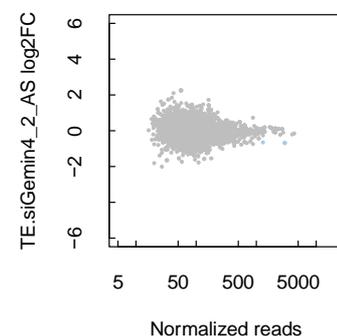


図 3. リボソームプロファイリング



GEMIN4 ノックダウンは翻訳効率(TE)を変えなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------