

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03438

研究課題名（和文）ポスト翻訳終結イベントの調節機構及びその生理病理的意義の解明

研究課題名（英文）Analysis of post-translation termination event

研究代表者

山下 暁朗（YAMASHITA, AKIO）

琉球大学・医学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：20405020

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：遺伝性疾患やがんにおける変異の約三分の一において、結果的に異常な終止コドンが生じる。このようなmRNAは生体が有するmRNA監視機構のひとつであるNMD（nonsense-mediated mRNA decay）により積極的に分解排除される。しかし、変異mRNA由来の新生タンパク質の運命についてはほとんど分かっていない。本研究では、NMD制御因子の新規結合タンパク質を足がかりとした、異常終止コドン識別複合体形成と新生タンパク質解離、リボソーム解離の分子機構と細胞ストレスがポスト異常終止コドン識別イベントに与える影響について研究を行い、新生鎖の分解抑制がNMDを阻害する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

本研究により、PTC-mRNAがコードする新生ポリペプチドの運命とNMDによるPTC-mRNA分解が密接に関わっていることが明らかとなった。この成果は、これまでに無い方法でのNMD阻害法の開発や、異常終止コドンを有する遺伝性疾患の新たな治療法開発に繋がる。新生ポリペプチド鎖によるNMD活性の制御は、また、フレームシフトによりPTCを有するmRNAがコードするがん抗原コードペプチドの発現機構の解明にも繋がるものであり、今後の研究の進展を期待している。

研究成果の概要（英文）：Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) is an mRNA surveillance mechanism that eliminates aberrant mRNAs containing premature termination codons (PTCs). Recent studies revealed the mechanism of PTC recognition. However, post-translational regulation of nascent polypeptides encoded by PTC-containing mRNAs were not well documented. In present study, we found that the inhibition of nascent polypeptides degradation repressed NMD. This finding would provide the novel regulatory tools to modulated NMD activity. Further analysis will promotes the development of new NMD inhibitor.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：mRNA分解 mRNA翻訳 ナンセンス変異 mRNA監視機構 NMD 新生ポリペプチド

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

遺伝性疾患やがんにおける変異の約三分の一において、結果的に異常な終止コドンが生じる。異常終止コドンを有する mRNA は異常なタンパク質をコードするが、生体が有する mRNA 監視機構のひとつである NMD (nonsense-mediated mRNA decay) により分解排除されることにより、その発現が抑制される。NMD という現象は線虫の遺伝学及びヒトの遺伝性疾患の解析で 1979 年に発見されたが、その分子機構は長らく不明であった。我々は、2001 年以降、線虫の SMG 遺伝子群に着目してそのヒトホモログの生化学及び分子生物学的な解析を進め、異常終止コドン識別複合体の実態解明を通じて、NMD の分子機構の概要を明らかにした。その成果に基づくモデルが教科書に採用されている (図 1: Molecular Cell Biology, 8th Ed. 2016)。NMD は遺伝性疾患の症状と密接に関係している (総説: Schweingruber C, Yamashita A ら Biochim Biophys Acta, 2013)。また、その抑制が、がん特異的抗原の発現誘導を介してがん免疫を誘導する事もマウスモデルで示されている (Pastor F ら、Nature, 2010)。我々は、分子生物学的な阻害技術を用いて、遺伝子変異に起因する遺伝性疾患においては、排除される必要のない mRNA が NMD により排除されてしまっている例を示すと同時に、実際に、NMD の抑制により、細胞の機能回復(疾患症状の回復の可能性)が可能であることを示している (Usuki F, Yamashita A ら Proc Natl Acad Sci USA, 2013)。これらを踏まえて NMD の低分子阻害剤の開発も進められている。しかし、現段階では再現性のある特異的な阻害剤の報告はない。

NMD が “正常” な遺伝子発現を NMD が制御することも分かってきている。具体的には 3' 非翻訳領域にイントロンを持つ mRNA の終止コドンや、ストレス応答に関わる転写因子 ATF4 を含む upstream open reading frame (uORF) を有する mRNA の uORF の終止コドンは NMD における異常終止コドンとして識別される (総説: Schweingruber C, Yamashita A ら Biochim Biophys Acta, 2013)。また、ストレス依存的に起こる翻訳制御は、uORF 開始コドン由来の翻訳を抑制することで、翻訳依存的な uORF 終止コドン認識阻害を介し mRNA の蓄積を誘導する。同時に、メイン ORF の翻訳を促進することで、ストレス特異的な翻訳を誘導することも指摘されている。一方で、ストレス依存的な翻訳抑制が限定的であることも報告されており、NMD 機構自体の動的制御の存在の有無が大きな議論となっている。これらの事実は、NMD が、異常な配列を有する mRNA のみならず、生理的な mRNA の発現調節を介して、様々な生命現象に関わっていることを強く示唆している。しかし、RNA 分解の測定法の煩雑さ、転写後プロセス一般の解析法の原理的な困難さなどにより、NMD の低分子阻害剤の開発、生理的な意義、医学的な意義の解明は道半ばと言って良い。

我々は、NMD の分子機構の解析の過程で、NMD の中核をなす異常終止コドン識別複合体にリボソーム解離因子 eRF1/3 を含むこと、又その中核をなす SMG1 の酵素活性の阻害が mRNA 上にリボソームを蓄積させることを見だしている (Kashima I, Yamashita A ら Genes Dev, 2006; Yamashita A ら Genes Dev, 23, 2009; López-Perrote A, Yamashita A ら Nucleic Acids Res, 2016; Melero R, Yamashita A ら Nat Commun, 2016)。これらの事実は、mRNA 分解系の異常終止コドン識別複合体が、mRNA からのリボソーム解離にも関わることを強く示唆している。つまり、mRNA 分解系と翻訳調節系とが密接に関わっていることを強く示唆している。しかし、その実態と意義は不明である。異常終止コドンが翻訳時に読みとばされる現象 (翻訳リードスルー) も知られている。しかし、その機構との関わりも不明である。

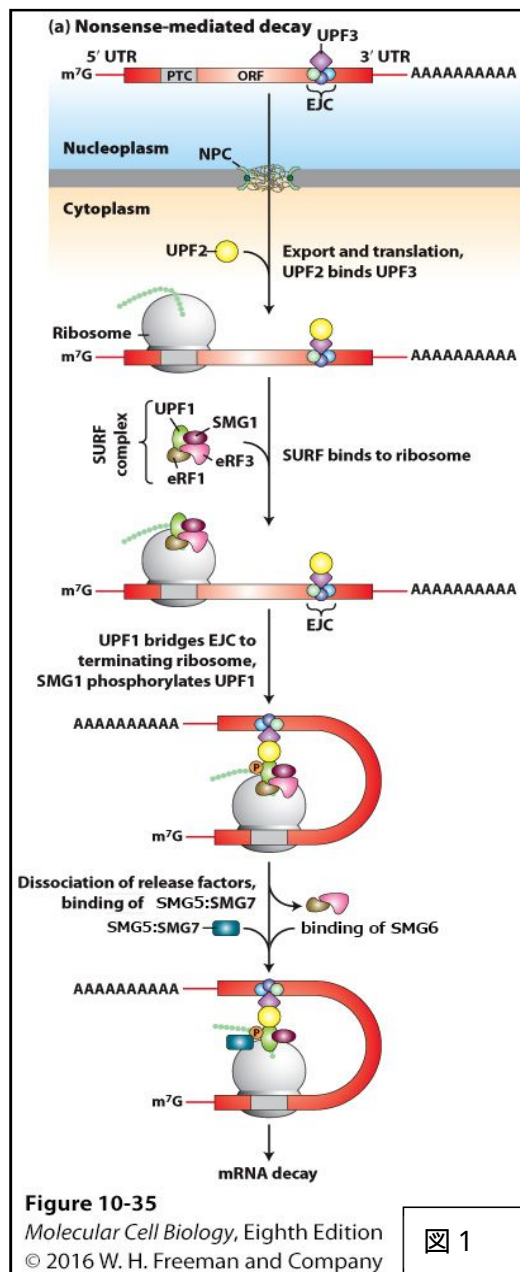
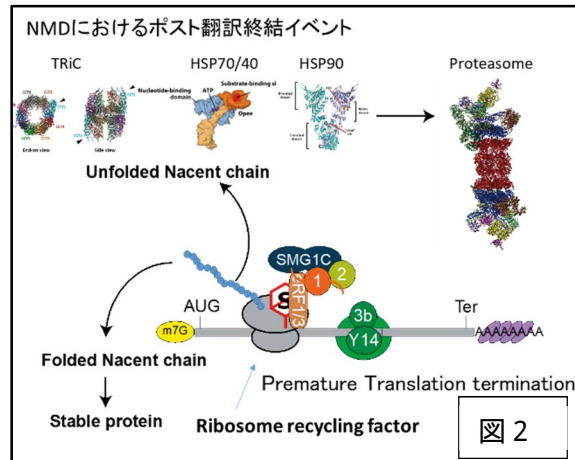


図 1

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者がこれまでに多面的に研究を進めてきた NMD 分子機構解析や NMD 制御因子の新機能に着目し、『(1) NMD 制御因子の新規結合タンパク質を足がかりとした、NMD における異常終止コドン識別複合体形成と新生タンパク質解離・リボソーム解離の分子機の解明、(2) NMD 制御因子の新機能を足がかりとした、細胞ストレスがポスト異常終止コドン識別イベントに与える影響の解明』を行う(図2)。これらの解析により、NMD を標的とした革新的新規遺伝性疾患・がん抗原となり得る変異 mRNA 由来の新生タンパク質発現亢進によるがん治療開発へ向けた基盤を確立することを目的とする。



3. 研究の方法

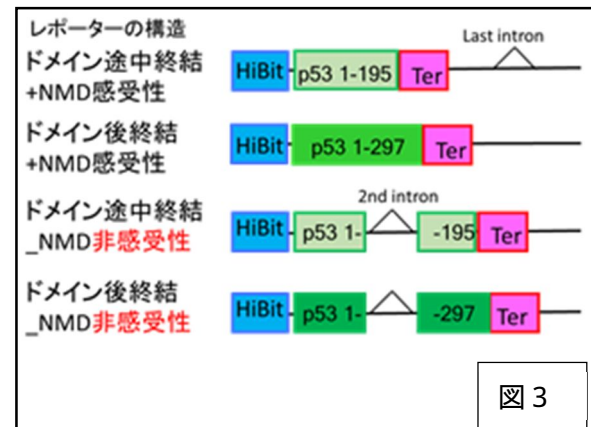
(1)発現誘導型プロモーターと Split ナノルシフェラーゼ(NLuc)である HiBit (11 アミノ酸)を用いたレポーター遺伝子を準備する HiBit を p53 cDNA コード領域の N 末端に配置し、HiBit-p53 融合タンパク質として発現する。異常終止コドンとして、p53 DNA 結合ドメインの途中で終結するもの、DNA 結合ドメインを全て含むもの、それぞれについて NMD 非感受性のものを作製する。これを用いて、mRNA の構造や新生タンパク質の構造と新生タンパク質蓄積の相関を明らかにする。

(2)複数の NMD 制御因子結合タンパク質について、これまでの研究で樹立した高精度 NMD 活性検出レポーターを用いて解析する。具体的には、阻害剤が存在するものについて、阻害剤依存的な NMD 阻害の可能性を検討する。また、各因子について合成 siRNA を用いたノックダウン解析を行い、NMD 阻害の可能性を検討する。

4. 研究成果

図3にあるレポーターを作成した。購入した p53 cDNA に問題があり実験が遅延したが、最終的に設計したレポーター構築に成功し、現在、Flp-In system による安定発現細胞の樹立を進めている。今後、これらのレポーターを用いた NMD 阻害剤や NMD 制御因子の siRNA を用いた解析を進めていく。

TP53 レポーターの構築に手間取ったため、2)の NMD 制御因子結合タンパク質に対する阻害剤や siRNA を用いた解析を優先し、研究を行った。その結果、複数の新規 NMD 制御因子の同定に成功した。そのうち 1 つの遺伝子については、阻害剤が市販されており、阻害剤を用いて、培養細胞だけでなくマウスレベルでの NMD 抑制に成功した。今後、遺伝子疾患モデルマウスを用いた疾患治療解析の POC 取得や、がん免疫依存的な自家移植マウスモデルを用いた抗がん活性の POC 取得を進めていく。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12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 10件）

1. 著者名 Haruhara Kotaro, Suzuki Toru, Wakui Hiromichi, Azushima Kengo, Kurotaki Daisuke, Kawase Wataru, Uneda Kazushi, Kobayashi Ryu, Ohki Kohji, Kinguchi Sho, Yamaji Takahiro, Kato Ikuma, Ohashi Kenichi, Yamashita Akio, Tamura Tomohiko, Tsuboi Nobuo, Yokoo Takashi, Tamura Kouichi	4. 巻 101
2. 論文標題 Deficiency of the kidney tubular angiotensin II type1 receptor-associated protein ATRAP exacerbates streptozotocin-induced diabetic glomerular injury via reducing protective macrophage polarization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 912～928
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.kint.2022.01.031	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 -
1. 著者名 Taguchi Shinya, Azushima Kengo, Yamaji Takahiro, Urate Shingo, Suzuki Toru, Abe Eriko, Tanaka Shohei, Tsukamoto Shunichiro, Kamimura Daisuke, Kinguchi Sho, Yamashita Akio, Wakui Hiromichi, Tamura Kouichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Effects of tumor necrosis factor- inhibition on kidney fibrosis and inflammation in a mouse model of aristolochic acid nephropathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 23587
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-02864-1	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 Mannen Taro, Goto Masato, Yoshizawa Takuya, Yamashita Akio, Hirose Tetsuro, Hayano Toshiya	4. 巻 32
2. 論文標題 Distinct RNA polymerase transcripts direct the assembly of phase-separated DBC1 nuclear bodies in different cell lines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 ar33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1091/mbc.E21-02-0081	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 Tsukamoto Shunichiro, Wakui Hiromichi, Azushima Kengo, Yamaji Takahiro, Urate Shingo, Suzuki Toru, Abe Eriko, Tanaka Shohei, Taguchi Shinya, Yamada Takayuki, Kinguchi Sho, Kamimura Daisuke, Yamashita Akio, Sano Daisuke, Nakano Masayuki, Hashimoto Tatsuo, Tamura Kouichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Tissue-specific expression of the SARS-CoV-2 receptor, angiotensin-converting enzyme 2, in mouse models of chronic kidney disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16843
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-96294-8	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 Miyatake Satoko, Kato Mitsuhiro et. al.	4. 巻 7
2. 論文標題 De novo ATP1A3 variants cause polymicrogyria	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabd2368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abd2368	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 Guo Youjia, Kawaguchi Atsushi, Takeshita Masaru, Sekiya Takeshi, Hirohama Mikako, Yamashita Akio, Siomi Haruhiko, Murano Kensaku	4. 巻 296
2. 論文標題 Potent mouse monoclonal antibodies that block SARS-CoV-2 infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100346 ~ 100346
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100346	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 Ura Takehiro, Yamashita Akio, Mizuki Nobuhisa, Okuda Kenji, Shimada Masaru	4. 巻 39
2. 論文標題 New vaccine production platforms used in developing SARS-CoV-2 vaccine candidates	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 197 ~ 201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vaccine.2020.11.054	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 -

1. 著者名 Shimada Masaru, Yamashita Akio, Saito Manami, Ichino Motohide, Kinjo Takao, Mizuki Nobuhisa, Klinman Dennis M., Okuda Kenji	4. 巻 10
2. 論文標題 The human papillomavirus E6 protein targets apoptosis-inducing factor (AIF) for degradation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-71134-3	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 Sasaki Kazunori, Kojitani Noriko, Hirose Hiroko, Yoshihama Yohei, Suzuki Hidefumi, Shimada Miho, Takayanagi Ayumi, Yamashita Akio, Nakaya Masa-aki, Hirano Hisashi, Takahashi Hidehisa, Ohno Shigeo	4. 巻 31
2. 論文標題 Shank2 Binds to aPKC and Controls Tight Junction Formation with Rap1 Signaling during Establishment of Epithelial Cell Polarity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 107407 ~ 107407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.02.088	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 Urate Shingo, Wakui Hiromichi, Azushima Kengo, Yamaji Takahiro, Suzuki Toru, Abe Eriko, Tanaka Shohei, Taguchi Shinya, Tsukamoto Shunichiro, Kinguchi Sho, Uneda Kazushi, Kanaoka Tomohiko, Atohe Yoshitoshi, Funakoshi Kengo, Yamashita Akio, Tamura Kouichi	4. 巻 22
2. 論文標題 Aristolochic Acid Induces Renal Fibrosis and Senescence in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12432 ~ 12432
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222212432	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 Abe Eriko, Yamashita Akio, Hirota Keigo, Yamaji Takahiro, Azushima Kengo, Urate Shingo, Suzuki Toru, Tanaka Shohei, Taguchi Shinya, Tsukamoto Shunichiro, Uehara Tatsuki, Wakui Hiromichi, Tamura Kouichi, Takahashi Hidehisa	4. 巻 12
2. 論文標題 Angiotensin II type-1 receptor-associated protein interacts with transferrin receptor-1 and promotes its internalization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17376
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-22343-5	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 Johnson Jared L., Yaron Tomer M., Cantley Lewis C. et al.	4. 巻 613
2. 論文標題 An atlas of substrate specificities for the human serine/threonine kinome	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 759 ~ 766
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-022-05575-3	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

[学会発表] 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山下 暁朗、藤原 俊伸
2. 発表標題 mRNA翻訳による生命現象制御の新展開
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山下 暁朗
2. 発表標題 mRNA監視機構制御因子SMG1キナーゼによる酸化ストレス応答制御機構
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山下 暁朗
2. 発表標題 mRNA監視機構制御因子SMG1キナーゼによる酸化ストレス応答制御機構
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山下 暁朗、藤原 俊伸
2. 発表標題 真核細胞翻訳
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水口真理子, 高橋良明, 田中礼子, 今泉直樹, 山下暁朗, 福島卓也, 田中勇悦
2. 発表標題 ATLにおけるOX40/OX40Lの役割
3. 学会等名 第8回日本HTLV-1学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今井大達, 海大介, 高橋健造, 山下暁朗
2. 発表標題 Single-step purification of endogenous ribosome-bound mRNAs using monoclonal antibody against ribosomal P-stalk.
3. 学会等名 第23回日本RNA学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 藤本明洋ら 86人	4. 発行年 2022年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 530
3. 書名 疾患原因遺伝子・タンパク質の 解析技術と創薬/診断技術への応用～エピゲノム、トランスクリプトーム、マルチオミクス、オープンデータベースの利活用～	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 転写後制御のスクリーニング方法及びシステム	発明者 山下暁朗、大野茂男	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2022-114033	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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			
米国	Weill Cornell Medicine			