

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06615

研究課題名（和文）新生ペプチド鎖品質管理機構の破綻による細胞死誘導機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of cell death induction by the failure of ribosome-associated quality control pathway

研究代表者

宇田川 剛 (Udagawa, Tsuyoshi)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（薬学）・准教授

研究者番号：20644199

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では異常な翻訳停滞により誘導される新生タンパク質品質管理機構であるRQC（ribosome-associated quality control）による異常新生タンパク質の分解機構とその破綻による細胞死誘導機構の解明を目的として、異常新生タンパク質のC末端に付加されるペプチドタグの同定とその機能および毒性機構の解明を試みた。その結果、アラニンを主成分とし他に複数のアミノ酸を含むペプチド鎖がRQC標的となる終止コドンを欠失したmRNAの翻訳産物に付加されることが明らかとなり、このペプチド鎖が異常タンパク質蓄積レベルの違いによりタンパク質分解、あるいは凝集・細胞死を誘導することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、新生タンパク質の品質管理がタンパク質恒常性の維持に重要な役割を果たし、その異常が神経・精神疾患、がん、生活習慣病などさまざまなヒト疾患にも関与することが示唆されている。本研究では異常な翻訳停滞によって誘導される新生タンパク質分解機構RQC（ribosome-associated quality control）に注目し、神経変性疾患の原因となりうるということが報告されていた異常新生タンパク質の末端修飾（CATテイル）の同定とCATテイル化タンパク質の蓄積が細胞死を誘導する際の配列依存性を解明することに成功した。

研究成果の概要（英文）：In this study we aimed to elucidate the mechanism of nascent protein degradation and cell death induction by the execution and the failure of ribosome-associated quality control, RQC, pathway which targets the stalled ribosomes on the aberrant mRNAs. Especially we focused on identifying the peptide tag, called CAT-tail, added to the C-terminal end of the aberrant nascent peptides and elucidated its impact on the nascent peptide degradation and its potential toxic effect when accumulated in mammalian cells. We found that mammalian CAT-tails were mainly composed of alanine with several other amino acids including glycine and threonine and alanine-tailing promoted the degradation of the tailed proteins when they are expressed at a relatively low level, but formed protein aggregates and induced apoptotic cell death when expressed at high level or upon the failure of RQC.

研究分野：分子生物学

キーワード：翻訳 品質管理 リボソーム タンパク質凝集体 タンパク質分解 神経変性

## 1. 研究開始当初の背景

近年、翻訳停滞に起因する新生タンパク質品質管理機構である Ribosome-associated quality control(RQC)の分子機構が出芽酵母を用いて明らかにされつつあり、さらに、RQC 機構の破綻がプロテオスタシスの異常を惹起し、ヒトにおいても様々な疾患の原因となることが示唆されてきた。哺乳類細胞においても RQC の主要経路が保存されていることは前課題において明らかにしたが、RQC において異常新生タンパク質を分解に導く E3 コピキチンリガーゼ LTN1 の機能欠損が神経変性を惹起することが報告されていたものの、RQC 機構の破綻による毒性機構の解明には至っていなかった。

出芽酵母では RQC において異常新生鎖の C 末端にアラニンとスレオニンからなるペプチド鎖、CAT(C-terminal Alanine and Threonine)テイルが翻訳停滞後に解離した 60S リボソームサブユニット上で mRNA 配列非依存のペプチジルトランスフェラーゼ活性により付加されることが報告されている。CAT テイルは異常新生鎖の分解を促進するが、LTN1 欠損等により CAT 付加産物が過剰に蓄積するとタンパク質凝集体を形成し、プロテオスタシスの異常を惹起することが報告されている。哺乳類細胞における RQC 阻害による神経変性にも CAT テイルが関わることが予想されていたが、哺乳類細胞における CAT テイルの存在、機能、細胞死誘導との関連はこれまで明らかにされておらず、特に、CAT テイルの出芽酵母以外の生物種における存在は長年議論となっておりその同定が待たれていた。

## 2. 研究の目的

これまでに終止コドン欠失した mRNA( Nonstop mRNA )の翻訳産物が哺乳類細胞の RQC 機構の主要な標的となることを見出し、Nonstop mRNA の強制発現により細胞死が誘導されること、カスパーゼ阻害剤(アポトーシス阻害剤)Z-VAD-FMK の添加により細胞死が抑制されることを示す予備的データを得ていた。そこで本研究では、Nonstop mRNA を用いて RQC 機構の破綻によるタンパク質凝集体形成と細胞死誘導の分子機構の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

まず、哺乳類細胞における CAT テイルの存在を明らかにするために、Nonstop mRNA 翻訳産物の精製と質量分析を行なった。配列未知のペプチド鎖を定量的に質量分析で測定することは非常に困難であるため、並行して、翻訳停滞したリボソーム中に含まれる tRNA の定量解析も試みた。また、CAT テイルによる毒性機構を明らかにするため、人工 CAT テイルを付加した GFP レポーターを作成し、タンパク質凝集体の形成と細胞死誘導のアミノ酸配列依存性を確認した。当初予定ではその後、Nonstop 翻訳産物の蓄積のゲノムワイドな影響の解明と細胞死誘導のシグナル経路の同定等を行う予定であったが、課題実施途中、我々の CAT テイル同定の報告後に、海外グループより、我々の結果と一部合致しない報告がなされたため、その検証を行なった。CAT テイルは新生鎖をリボソームトンネルから押し出すことによりタンパク質分解を促進することが示されており、また、過剰に蓄積すると細胞質に凝集体を形成することが出芽酵母において報告されていた。Joazeiro らのグループはテイルそのものがタンパク質分解のシグナル、すなわちデグロンとして機能することを示し、そのためのコピキチン化酵素を同定した。そこで急遽、この検証を行うこととした。

## 4. 研究成果

はじめに、停滞したリボソーム上で新生タンパク質のカルボキシ末端に付加される CAT テイルの哺乳類細胞における同定を行った。Nonstop mRNA が哺乳類細胞における RQC の主要な標的となることをすでに明らかにしていたため、Nonstop mRNA レポーターの翻訳産物の質量分析、および CAT テイル化を担う因子 NEMF とリボソーム、Nonstop mRNA、新生ペプチド鎖の複合体中に含まれる tRNA の定量解析を行うことによりテイルの組成を検証したところ、哺乳類細胞における CAT テイルは大部分がアラニンからなり、他にグリシン、スレオニン等がわずかに含まれることが明らかにされた。また、Nonstop 翻訳産物の過剰発現は核小体にタンパク質凝集体を蓄積させること、細胞死を誘導することを明らかにした。また、NEMF 発現抑制により凝集体の蓄積と細胞死誘導が顕著に抑制された。さらに人工 CAT テイル化 GFP タンパク質を用いた解析により凝集性と細胞死誘導はアラニンの連続配列によって誘導され、グリシン、スレオニン等のアミノ酸が間に含まれることにより顕著に抑制されることが明らかにされた。同様の機構は細菌においても存在することが近年明らかにされており、細菌のアラニンテイルリングがその起源となっていると考えられるが、過剰なアラニンテイルリングによるタンパク質凝集を防ぐためにその他のアミノ酸が含まれることで毒性が緩和されるよう進化してきた可能性が示唆される。

以上の結果を 2021 年に報告したが (Udagawa *et al.*, Cell Rep, 2021) その後、Joazeiro らのグループが我々の結果とは一部異なる結果を報告した (Thrun *et al.*, Mol Cell, 2021)。彼らも我々と同様に Nonstop mRNA 翻訳産物が哺乳類細胞においても C 末端修飾を受けることを

明らかにしたが、テイルのアミノ酸組成はアラニンのみからなることを報告しており、さらにこのタンパク質 C 末端のアラニンテイルが E3 ユビキチンリガーゼ Pirh2 と KLHDC10 の標的となり、ユビキチン化・プロテアソーム依存分解を受けること、すなわち、アラニンテイルがタンパク質安定性を決定付ける、いわゆる C エンドルールとして機能することを報告した。

この結果は我々の結果とは異なるためその検証を行う必要が生じた。検討の結果、タンパク質の発現が低い場合には、彼らの報告通り、人工的なアラニンテイルはタンパク質分解を促進することが確認された。一方で、我々が報告した通り、アラニンテイル化されたタンパク質が過剰に蓄積するとタンパク質凝集体を形成し細胞死を誘導することが確認され、結果の相違はタンパク質の発現レベルの違いによる可能性が示唆された。しかし、より慎重な検討を行ったところ、RQC の内在の標的となる Nonstop mRNA を用いた場合には、Joazeiro らが同定したアラニンテイルを標的とするユビキチンリガーゼ Pirh2 や KLHDC10 では CAT テイル化 Nonstop 翻訳産物は分解されないことが確認された。このことは CAT テイル化タンパク質が彼らが報告するようにアラニンのみからなるのではない可能性を示唆している。また、アラニンテイルのタンパク質分解効果が見られる低発現条件においては、Nonstop mRNA は mRNA 自体が NSD (Nonstop mRNA decay) 経路と思われる分解経路により十分効率よく分解されることが確認され、これらのユビキチンリガーゼの効果は限定的であることが確認された。以上のように、我々の報告と Joazeiro らの報告での結論の違いは、発現レベルの違いによること、また、内在の RQC 標的を用いるか人工 CAT テイル化タンパク質化のみを用いて分解の効果を確認するかによることが明らかとなり、我々の結論には矛盾がないことが確認された。

以上のように、本研究では異常新生タンパク質分解機構 RQC による異常タンパク質の末端修飾の機能と RQC 破綻による CAT テイル化タンパク質の凝集体形成、細胞死誘導機構の一部を明らかにした。当初予定していたシグナル経路の同定や、神経・精神疾患をはじめとするさまざまなヒト疾患における RQC の影響の解明は今後の課題である。

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 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tsuyoshi Udagawa, Moeka Seki, Toshifumi Inada	4. 巻 2(3)
2. 論文標題 Optimized protocol for tRNA identification in the ribosomal complexes from human cell lines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 100615
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xpro.2021.100615	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 Udagawa Tsuyoshi, Seki Moeka, Okuyama Taku, Adachi Shungo, Natsume Tohru, Noguchi Takuya, Matsuzawa Atsushi, Inada Toshifumi	4. 巻 34
2. 論文標題 Failure to Degrade CAT-Tailed Proteins Disrupts Neuronal Morphogenesis and Cell Survival	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108599 - 108599
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2020.108599	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tsuyoshi Udagawa, Moeka Seki, Taku Okuyama, Shungo Adachi, Tohru Natsume, Takuya Noguchi, Atsushi Matsuzawa, Toshifumi Inada
2. 発表標題 Failure to Degrade CAT-Tailed Proteins Disrupts Neuronal Morphogenesis and Cell Survival
3. 学会等名 第22回日本RNA学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tsuyoshi Udagawa, Moeka Seki, Taku Okuyama, Shungo Adachi, Tohru Natsume, Takuya Noguchi, Atsushi Matsuzawa, Toshifumi Inada
2. 発表標題 異常翻訳に対する品質管理機構RQCによる不良新生タンパク質のクリアランスは神経細胞生存に重要である
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宇田川剛、奥山卓、関萌香、稲田利文
2. 発表標題 異常翻訳の品質管理因子による認知機能制御
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔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