

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月25日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22770129

研究課題名（和文） 翻訳停止を感知し mRNA 分解経路を規定する分子基盤

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of mRNA decay that is triggered by translation arrest.

研究代表者

細田 直 (HOSODA NAO)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・講師

研究者番号：40438198

研究成果の概要（和文）：本研究では、哺乳動物細胞における終止コドンリードスルー型 mRNA 動態について解析を進めた。終止コドンリードスルー型 mRNA は翻訳依存的に速やかに分解され、ここでは翻訳終結因子 eRF3-eRF1 に類似した Hbs1-Dom34 が機能することを明らかにした。また、この mRNA から産生される異常タンパク質は、E3 ユビキチンリガーゼである Listerin によりユビキチンが付加され速やかに分解されることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）： In this study, we examined quality control mechanisms for mRNA lacking in-frame termination codons (non-stop mRNA) using mammalian cells. The non-stop mRNA is unstable and degraded in a translation-dependent manner. The decay requires another eRF3-eRF1 family member Hbs1-Dom34. Also, the elimination of aberrant proteins produced from the non-stop transcripts requires Listerin, which functions as an E3 ubiquitin ligase.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物学

キーワード：mRNA 分解、翻訳制御、G 蛋白質、リボソーム

1. 研究開始当初の背景

翻訳領域上に終止コドンが現れることにより蛋白合成は終了する。終止コドン上では翻訳終結因

子 eRF1-eRF3 が機能する。tRNA 類似構造をとる eRF1 は終止コドンを認識し、G 蛋白質である eRF3 は分子スイッチとなりその後の mRNA 動態を運命づける。

成熟 mRNA は1回目の翻訳過程において、その蛋白質コード領域内に異常な終止コドンであるナンセンスコドンの存在がチェックされる。ナンセンスコドンが見出されると、その mRNA は速やかに分解される。正常な mRNA も複数回の翻訳過程を経て十分量蛋白質を産生すると、その寿命を全うする時がやってくる。正常な mRNA 分解の律速段階は poly(A)鎖の短縮化である。poly(A)鎖は翻訳終結段階と共役して徐々に短縮する。先に我々は、これら mRNA 分解において、eRF3 が重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

mRNA の構造的異常や外因性ストレスなどにより、リボソームが翻訳途上において停止することがある。近年、このような mRNA は速やかに分解されることが報告された。終止コドンリードスルー型 mRNA 分解(Non-stop decay; NSD)、リボソーム停止型 mRNA 分解(No-go decay; NGD)と呼ばれている。これらは、出芽酵母を用いた解析により明らかにされた。哺乳動物細胞においてこれら機構が存在するかどうか、また詳細な分子機構については不明な点が多く残されていた。本研究では、翻訳停止 mRNA の動態を規定する分子基盤について、翻訳終結と翻訳停止の類似性に着目して解析を行った。哺乳動物細胞を用い、終止コドンリードスルー型 mRNA 動態について中心に解析を進めた。

3. 研究の方法

- (1) 哺乳動物細胞における mRNA 分解経路の解析では、テトラサイクリン存在下で発現が制御できるβグロビンレポーター遺伝子を HeLa 細胞に導入し、mRNA の半減期・3'末端 poly(A)鎖短縮化を定量的に解析する実験系(パルス・チェース解析)を用いた。βグロビン遺伝子の終止コドンに変異を導入することにより、終止コドンリードスルー型 mRNA とした。これらレポーターについて、翻訳阻害剤シクロヘキシミド、および siRNA による eRF3-eRF1 の類似蛋白質である Hbs1-Dom34、3'→5' 方向エキソヌクレアーゼ複合体(エキソソーム)構成因子、E3 ユビキチンリガーゼ Listerin などのノックダウンが mRNA 分解に及ぼす影響について検証した。
- (2) (1)において作製したレポーター遺伝子からのタンパク産生量について半定量的に解析した。同様に siRNA によるノックダウンが及ぼす影響について検証した。
- (3) Hbs1-Dom34 とエキソソーム複合体の相互作用

用について、免疫沈降法により解析を行った。

4. 研究成果

- (1) 哺乳動物細胞において、終止コドンリードスルー型 mRNA 量は正常 mRNA と比較して、48±6%まで減少していた。この減少は Hbs1 ノックダウンにより抑制された。
- (2) 終止コドンリードスルー型 mRNA からのタンパク質産生は、正常 mRNA と比較して 24±7%まで減少した。この減少は Hbs1 および E3 ユビキチンリガーゼ Listerin のノックダウンにより抑制された。
- (3) 終止コドンリードスルー型 mRNA は、初期段階では正常 mRNA で認められるものと同様の poly(A)鎖短縮化に依存した分解が起こる一方、後期段階では poly(A)鎖短縮化に依存しない急速な分解が観察された(図1参照)。この急速な分解は翻訳阻害剤シクロヘキシミドにより抑制さ

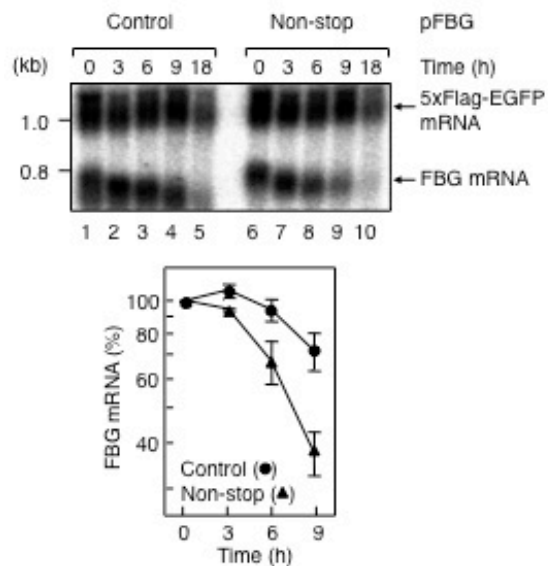


図1 哺乳動物細胞における終止コドンリードスルー型 mRNA の速やかな分解

- れた。
- (4) (3)で認められた急速な mRNA 分解は、Hbs1 もしくは Dom34 のノックダウンにより抑制されるものの、eRF1 もしくは eRF3 のノックダウンでは抑制は認められなかった。
 - (5) (3)で認められた急速な mRNA 分解は、エキソソームの構成因子である Ski2、Rrp44/Dis3 もしくは Rrp6 のノックダウンにより抑制された。
 - (6) Hbs1-Dom34 は Dis3 および Ski2 と相互作用することを免疫沈降法により見出した。

これらの結果より、哺乳動物細胞における終止コドンリードスルー型 mRNA 動態について、以下

の分子機構を想定している。終止コドンリードスルー型 mRNA では、リボソームは mRNA の 3' 末端 poly(A) 鎖に到達するまで翻訳を続ける。一部のリボソームは poly(A) 鎖上で停止するが、この停止したリボソームに何らかの分子機構により eRF3 が作用し、この mRNA は poly(A) 鎖短縮化を引き金とした正常な mRNA と類似の形態により分解を受ける。一方、停止したリボソーム上に残されたタンパク質は、E3 ユビキチンリガーゼである Listerin によりユビキチンが付加され速やかに分解される。リボソームが mRNA の 3' 末端まで達すると、これを Hbs1-Dom34 が翻訳終結反応に類似した機構で検知する。Hbs1 は、エキソソーム複合体を mRNA の 3' 末端にリクルートすることにより、3' → 5' 方向への急速な分解へと導く。

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 2 件)

1. #Nao Hosoda, #Yuji Funakoshi, Masato Hirasawa, Ryota Yamagishi, Yukako Asano, Ryu Miyagawa, Koichi Ogami, Masafumi Tsujimoto, and Shin-ichi Hoshino. (#: equal contribution)
Anti-proliferative protein Tob negatively regulates CPEB3 target by recruiting Caf1 deadenylase.
EMBO J. **30**: 1311-1323 (2011)
2. Lin Ruan, Masanori Osawa, Nao Hosoda, Shunsuke Imai, Asako Machiyama, Toshiaki Katada, Shin-ichi Hoshino, and Ichio Shimada.
Quantitative Characterization of Tob Interactions Provides the Thermodynamic Basis for Translation Termination-coupled Deadenylase Regulation.
J. Biol. Chem. **285** (36): 27624-27631 (2010)

[学会発表] (計 14 件)

1. 尾上耕一、細田直、船越祐司、星野真一
癌抑制遺伝子産物 Tob による c-myc 遺伝子の発現調節機構
日本薬学会 132 年会; 2012 年 3 月 / 札幌
2. 橋本芳史、細田直、星野真一
アポトーシス時における翻訳終結因子 eRF3 のカスパーゼ依存的分解と翻訳制御
RNA フロンティアミーティング 2011; 2011 年 8 月 / 名古屋
3. 田中麻記子、細田直、星野真一

- テロメラーゼ RNA 成熟化の分子機構
RNA フロンティアミーティング 2011; 2011 年 8 月 / 名古屋
4. Koichi Ogami, Nao Hosoda, Yuji Funakoshi, Shin-ichi Hoshino
Anti-proliferative Protein Tob Negatively Regulates c-myc Oncogene Expression by Accelerating mRNA Deadenylation
RNA2011, the 16th Annual Meeting of the RNA Society, 2011 June, Kyoto
 5. 杉山遥、成瀬貴文、細田直、星野真一
PAM2 モチーフ含有タンパク質 USP10 のストレス顆粒形成に果たす役割
日本薬学会東海支部大会; 2011 年 7 月 / 名古屋
 6. 田中麻記子、細田直、星野真一
テロメラーゼ RNA (TLC1) の成熟化機構の解明
日本薬学会東海支部大会; 2011 年 7 月 / 名古屋
 7. 尾上耕一、細田直、船越祐司、星野真一
癌抑制遺伝子産物 Tob は癌原遺伝子 c-myc の発現を負に制御する
日本薬学会 131 年会; 2011 年 3 月 / 静岡
 8. 橋本芳史、細田直、星野真一
カスパーゼによる翻訳終結因子 eRF3 の分解と翻訳抑制
日本薬学会 131 年会; 2011 年 3 月 / 静岡
 9. Nao Hosoda, Yuji Funakoshi, Masato Hirasawa, Ryota Yamagishi, Yukako Asano, Ryu Miyagawa, Koichi Ogami, Masafumi Tsujimoto, Shin-ichi Hoshino.
Anti-proliferative protein Tob negatively regulates CPEB3 target by recruiting Caf1 deadenylase
CSHL Meeting on Translational Control, 2010 Sep, Cold Spring Harbor, NY
 10. 尾上耕一、細田直、船越祐司、星野真一
癌抑制遺伝子産物 Tob は Ras-MAPK シグナルの下流で c-myc mRNA の安定性を直接制御する
第12回日本 RNA 学会年会; 2010 年 7 月 / 東京
 11. 橋本芳史、細田直、星野真一
アポトーシス時における翻訳終結因子 eRF3 を標的とした翻訳制御
第12回日本 RNA 学会年会; 2010 年 7 月 / 東京
 12. 成瀬貴文、的場洋子、細田直、星野真一
脊髄小脳変性症の原因遺伝子 Ataxin-2 がストレス顆粒形成に果たす役割
第12回日本 RNA 学会年会; 2010 年 7 月 / 東京
 13. 岡本淳志、細田直、星野真一
酵母プリオン[PSI+]の表現型解析から見出した翻訳終結因子 eRF3 の新規機能
日本薬学会東海支部大会; 2010 年 7 月 / 岐阜

14. No go decay (NGD)による mRNA 品質管理
機構の解析

堀川桂、細田直、星野真一

日本薬学会東海支部大会;2010年7月/岐阜

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/syk/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細田 直 (HOSODA NAO)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・講師

研究者番号：40438198

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし