

機関番号：32653  
研究種目：若手研究（B）  
研究期間：2010～2011  
課題番号：22770198  
研究課題名（和文） 遺伝子機能発現における、2段階サーベイランス機構の解明および疾患治療への応用  
研究課題名（英文） Analysis for dual-step surveillance system in gene expression  
研究代表者  
榊 建二郎（SAKAKI KENJIRO）  
東京女子医科大学・医学部・講師  
研究者番号：70509968

## 研究成果の概要（和文）：

遺伝子の機能発現は、転写調節に始まり、その翻訳産物や非コードRNAによる絶妙な調和の基で制御され、生命活動を根底から支えている。また、随所に品質管理機構と呼ばれる監査システムを置くことで、より精度の高い遺伝子機能発現調節を実現させており、これらの品質管理機構の相互作用は生体の環境変化やストレスに対する柔軟な適応を可能にしている。本研究では、RNA品質管理機構であるナンセンス変異RNA分解（NMD）が、小胞体における分泌蛋白質生合成を監査する小胞体品質管理において重要な働きをしていることが明らかした。

## 研究成果の概要（英文）：

Accuracy of gene expression is guaranteed by quality control systems that inspect their transcriptional or translational products at the multiple steps through the process of gene expression. And “interplays” of each quality control system give the adaptation of organs to diverse environmental changes and stress conditions. Herein, we revealed that nonsense-mediated RNA decay (NMD), one of RNA surveillance systems, significantly functions in ER quality control system (ERQC) that inspect folding status of secretive proteins in the endoplasmic reticulum (ER).

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：生物学

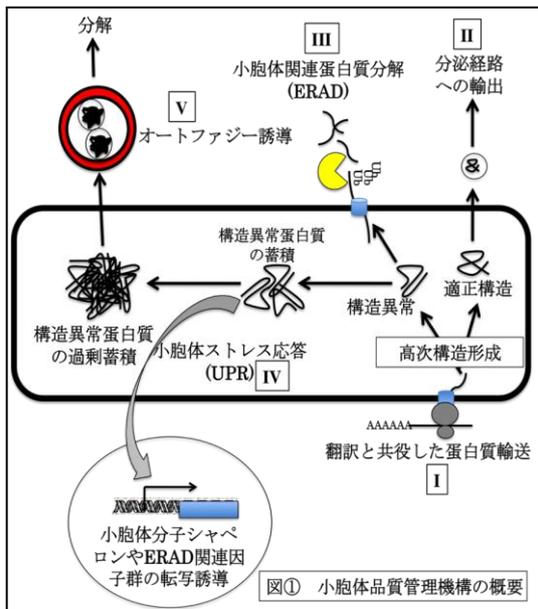
科研費の分科・細目：生物科学、細胞生物学

キーワード：タンパク質分解、小胞体ストレス、品質管理、NMD

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝子の機能発現は、転写調節に始まり、その翻訳産物や非コードRNAによる絶妙な調和の基で制御され、生命活動を根底から支えている。また、随所に品質管理機構と呼ばれる監査システムを置くことで、より精度の高

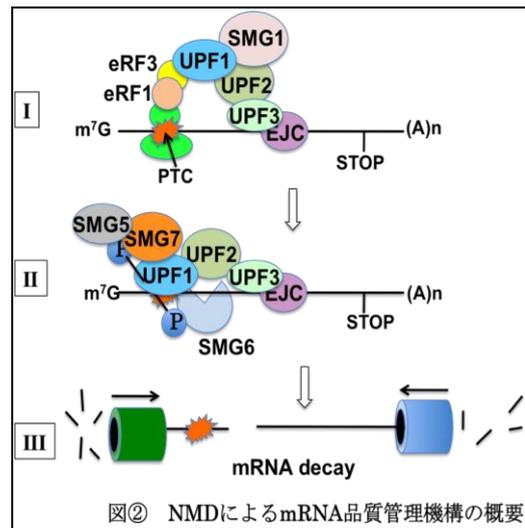
い遺伝子機能発現調節を実現させており、これらの品質管理機構の相互作用は生体の環境変化やストレスに対する柔軟な適応を可能にしている。代表者は、このような品質管理機構の1つであり、真核細胞生物における分泌蛋白質生合成を監査する「小胞体品質管



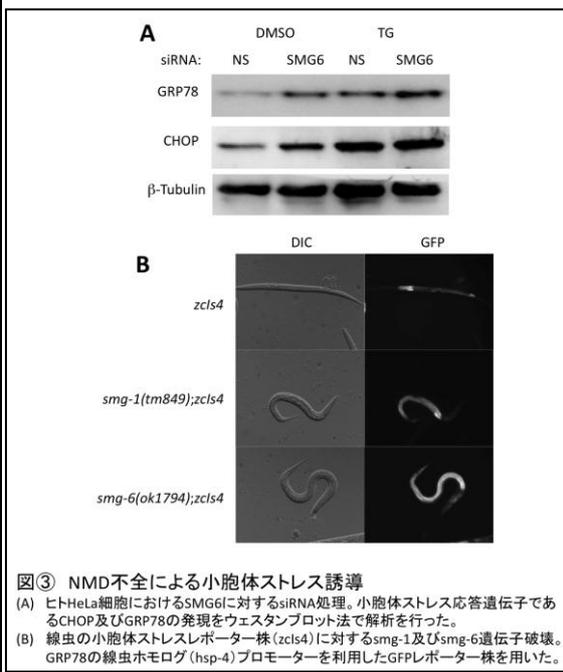
図① 小胞体品質管理機構の概要

理機構」について解析を行った。小胞体は分泌蛋白質の生合成及び高次構造形成の場である。翻訳と共役して小胞体へ輸入された新生蛋白質は小胞体分子シャペロン等の働きを介して高次構造を形成するが (図①-I)、そのフォールディング状態を監査するシステムとして小胞体品質管理が存在する。小胞体品質管理機構は、適正な分泌系蛋白質を sele 的にゴルジ体以降の分泌経路へ輸出する (図①-II)。一方、構造異常蛋白質の発生及び蓄積に対しては、小胞体関連蛋白質分解 (ERAD) を介したユビキチン-プロテアソーム系による分解 (図①-III) や小胞体ストレス応答 (UPR) を介した小胞体分子シャペロンや ERAD 制御因子の転写誘導 (図①-IV)、オートファジーを介した小胞体の大規模分解 (図①-V) などの防御システムを用いることにより、蛋白質フォールディングや異常蛋白質分解を始めとする小胞体機能の恒常性の維持を司っている。また、小胞体品質管理機構は、ヒトにおける糖尿病や神経変性疾患等の遺伝性疾患の発症機構における重要性が明らかにされており、その全容解明が期待されている。

我々は小胞体品質管理における遺伝学的解析モデル生物である線虫 *C. elegans* を用いた解析から、UPR 不全変異株 (*ire-1* 遺伝子欠損) と合成致死を示す遺伝子として、3' -5' エキソソームの構成要因である DIS3 および EXOSC3 の相同遺伝子 (F48E8.6、*exos-3*) を同定した。エキソソームは RNA 分解を介して様々な細胞機能に関与するが、RNA 品質管理においても重要な役割を担っていることから、RNA 品質管理の不全が小胞体機能に及ぼす影響について解析を行った結果、NMD 不全により小胞体ストレスが誘発されることを発見した。NMD を介した RNA 品質管理では、新生 mRNA に対する初期翻訳反応



図② NMDによるmRNA品質管理機構の概要



図③ NMD不全による小胞体ストレス誘導  
(A) ヒトHeLa細胞におけるSMG6に対するsiRNA処理。小胞体ストレス応答遺伝子であるCHOP及びGRP78の発現をウェスタンブロット法で解析を行った。  
(B) 線虫の小胞体ストレスレポーター株 (*zcls4*) に対する *smg-1* 及び *smg-6* 遺伝子破壊。GRP78の線虫ホモログ (*hsp-4*) プロモーターを利用したGFPレポーター株を用いた。

において検出されたナンセンス変異 (PTC) に対し、PTC 近傍で NMD 制御因子複合体が形成される (図②-I)。続いて SMG1 による UPF1 のリン酸化や SMG6 による mRNA 切断を経て (図②-II)、異常 mRNA はエキソソームにより分解される (図②-III)。

我々の解析の結果、線虫においては、*smg-1* および *smg-6* 遺伝子欠損による恒常的な小胞体ストレスの発生が観察された (図③-A)。また、哺乳動物細胞においても、SMG1 及び SMG6 遺伝子の発現抑制により小胞体ストレス応答を活性化することが分かった (図③-B)。更に、NMD 制御因子群によって捕捉された異常 mRNA を分解系に送り込む段階での律速因子でもある SMG6 については、小胞体ストレスにより発現が誘導されることが分かった。これらの観察結果から、NMD が小胞体品質管理において重要な役割を果たしていると共に、それぞれの品質管理機構の間に

相互制御機構が存在すると考え、その詳細な分子機構について解析を行うべく、本研究に着手した。

## 2. 研究の目的

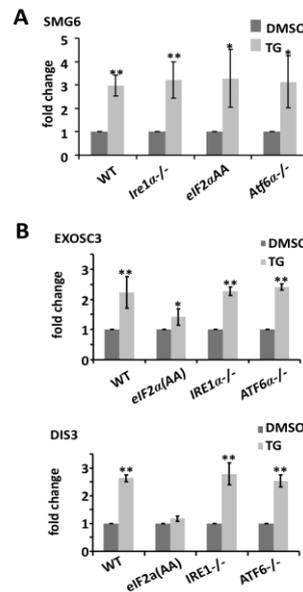
本研究においては、線虫 *C. elegans* を用いた遺伝学的解析および、哺乳動物系培養細胞を用いた細胞生物学的解析を行い、NMD による RNA 品質管理機構と小胞体品質管理機構との相互制御について、詳細な特性解析を行うことを目標にして、各種解析を行った。

## 3. 研究の方法

小胞体ストレスにおける NMD の活性化の状態を解析するべく、①ルシフェラーゼを用いた NMD レポーター解析により、小胞体ストレス状況下におけるナンセンス変異 RNA の蓄積状態を通して NMD の活性について検討した。②小胞体ストレスにおける NMD 制御因子複合体の形成状況および UPF1 のリン酸化状態について免疫沈降法で検討した。③SMG6 遺伝子の小胞体ストレスにおける SMG6 遺伝子の発現誘導について、UPR 経路に対する依存性を検討した。④小胞体ストレス状況下における、NMD 制御因子群の細胞内局在について、間接免疫蛍光法により細胞染色を行った。

## 4. 研究成果

解析の結果、①ヒト上皮細胞系 HeLa 細胞においては、小胞体機能阻害剤処理により、ナンセンス変異 mRNA が顕著に蓄積することが明らかになった。②免疫沈降法により UPF1 及び結合蛋白質を回収して解析を行った結果、小胞体機能阻害剤処理条件下における NMD 複合体の形成および UPF1 のリン酸化は共に影響が観察されなかった。③変異マウス由来肝細胞を用いた解析から、UPR 制御因子 IRE1a 及び ATF6a に対する遺伝子欠損あるいは eIf2a リン酸化不全 (eIf2a [S51A]) 変異は小胞体ストレスにおける SMG6 遺伝子の発現誘導に影響を与えなかったことから、UPR 経路非依存的な経路を介した発現制御が予測された (図④-A)。これに加え、線虫を用いた網羅的 RNAi 解析により *ire-1* 遺伝子欠損との合成致死性が観察された 3' -5' エキソソーム構成因子の哺乳動物ホモログである DIS3 及び EXOSC3 両遺伝子についても小胞体ストレスにより発現が誘導されることが新たに分かった。これらの遺伝子の発現誘導については、eIf2a [S51A] 細胞において小胞体機能阻害剤による発現誘導が抑えられたことから、PERK-eIf2a 経路を介した発現制御が行われていることが示唆されたとなった (図④-B)。④コンフォーカルレーザー顕微鏡を用いた解析から、NMD 制御因子である SMG6 および UPF3B については、内在性蛋白質の恒常的な小胞体局在が観察された。



図④ 小胞体ストレスによるSMG6およびエキソソーム構成因子の発現誘導  
マウス肝細胞に対して小胞体機能阻害剤 (Thapsigargin : TG) 処理を行い、SMG6 (A) および、3'-5'エキソソーム構成因子DIS3並びにEXOSC3 (B)の発現量を定量的RT-PCRで解析を行った。

更に、NMD 不全が小胞体ストレスに対する細胞の生存に与える影響について検討を行った結果、SMG6 遺伝子の発現が生存に必須であることが示されたことから、NMD が正常に機能することが小胞体ストレスにおける細胞の適応生存に重要であることが示された。

以上の結果から、小胞体ストレスにおいては、PTCに対する認識及び補足に関わる NMD 複合体形成は影響を受けないが、ナンセンス変異 RNA の切断・分解に関わる段階については、SMG6 およびエキソソーム構成因子の発現誘導を介した異常 RNA の速やかな分解が促進されることが推測される。さらに、NMD 制御因子群は恒常的に小胞体に局在していることから、小胞体膜上において RNA 品質管理と小胞体品質管理が連携して働いていることが示唆される。今後は NMD 制御因子と小胞体品質管理関連因子との相互作用について解析を行い、その実態の解明に向けて研究を展開したいと考えている。また、SMG6 については発現誘導に関わる制御因子群の同定を行い、その制御機構を解明したい。

## 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. Sakaki, K., Yoshina, S., Shen, X., Han, J., DeSantis, MR., Xiong, M., Mitani S. and Kaufman, RJ.: RNA surveillance is required for endoplasmic reticulum homeostasis. 査読有 *Proc Natl Acad Sci U S A.* in press. \* corresponding author

2. Yoshina, S., Sakaki, K., Yonezumi-Hayashi, A., Gengyo-Ando, K., Inoue, H., Iino, Y. and Mitani, S. : Identification of a novel ADAMTS9/GON-1 function for protein transport from the ER to the Golgi. 査読有 Mol. Biol. Cell in press.

[学会発表] (計4件)

1. Kenjiro Sakaki Comprehensive RNAi analysis for discovery of novel UPR-associated genes. The Conference on Quality Control, Folding, Degradation of Proteins in the Endoplasmic Reticulum (Ascona, Switzerland) 2011年9月11-16日
2. Kenjiro Sakaki, Sawako Yoshina, Xiaohua Shen, Shohei Mitani and Randal J. Kaufman: Comprehensive RNAi analysis for discovery of novel UPR-associated genes. The 50th Annual Meeting of American Society for Cell Biology (Philadelphia, USA) 2010年12月11-15日
3. 榊 建二郎 mRNA 品質管理と小胞体品質管理を結ぶインターフェイスの解析 第5回小胞体ストレス研究会 (東京) 2010年10月19日
4. Kenjiro Sakaki Comprehensive RNAi analysis for discovery of novel UPR-associated genes. The 3rd International Symposium on Protein Community (奈良) 2010年9月13-16日

[その他]

ホームページ等

<http://gyoseki.twmu.ac.jp/twmhp/KgApp?kvoInId=yimdeyyokggk>

<http://www.twmu.ac.jp/Basic/physiol2/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

榊 建二郎 (SAKAKI KENJIRO)  
東京女子医科大学・医学部・講師  
研究者番号：70509968

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

吉名 佐和子 (YOSHINA SAWAKO)  
東京女子医科大学・医学部・助教  
研究者番号：00424672