

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 2 月 28 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25870761

研究課題名(和文) NMD-小胞体品質管理クロストーク機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the role of RNA surveillance on protein quality control in the endoplasmic reticulum

研究代表者

神 建二郎 (Sakaki, Kenjiro)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：70509968

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子の機能発現は、その過程の随所に品質管理機構と呼ばれる監査システムを置いて遺伝子産物をチェックすることで、精度の高い遺伝子機能発現調節を実現している。これら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おり、生体のストレス応答の包括的な理解において重要な研究といえる。本研究ではRNA監査機構(NMD)と小胞体タンパク質品質管理の相互作用(NMD-小胞体品質管理クロストーク)について、線虫*C.elegans*を用いて解析を行い、NMD不全によるUPRの活性化に対するサプレッサー遺伝子の同定、並びにNMD関連遺伝子のUPR活性化における役割の解明に取り組んだ。

研究成果の概要(英文)：Intracellular quality control system surveys gene products to ensure the accuracy of gene expression. Furthermore, interaction of quality control systems promotes cell adaptation in various stress conditions. Because intracellular quality control is tightly associated with many diseases including diabetes, neuronal degeneration and tumorigenesis, the molecular mechanism of quality control systems is expected to be elucidated.

We recently published the novel interaction of RNA surveillance system and protein quality control in the endoplasmic reticulum (ER) that is known as ER quality control. The defects in nonsense-mediated mRNA decay (NMD) provokes UPR activation in the both of mammalian cells and the nematode *C.elegans*.

In here, we analyzed the role of NMD-associated genes by using *C.elegans*, and revealed that the expand of UPR activation by NMD deficiency depends on mutant alleles. This observation might be important to elucidate its role and mechanism in UPR activation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞内品質管理機構 小胞体ストレス応答

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、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、精度の高い遺伝子機能発現調節を実現させている。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。このような「細胞内品質管理ネットワーク」の解明は生体のストレス応答の包括的な理解において重要な研究といえる。

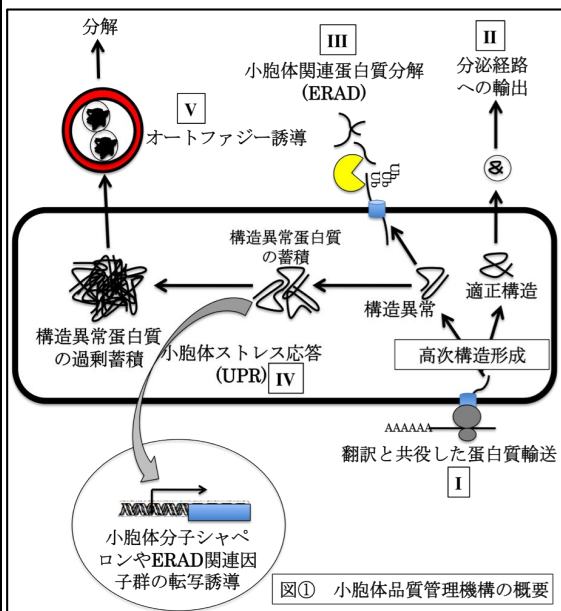
代表者は近年の研究から、RNA 監査機構として RNA 品質管理において重要な役割を持つことが知られているナンセンス変異依存 mRNA 分解 (nonsense-mediated mRNA decay : NMD) が、小胞体におけるタンパク質品質管理機構 (小胞体品質管理機構) と連携して小胞体機能の恒常性維持に関わることを発見した (Sakaki et al PNAS 2012)。更に細胞内品質管理ネットワークのひとつとして、その分子機構を明らかにすべく研究を開始した。また、代表者が過去に参画した研究 (Shen et al, *PLoS Genet.* 2005; Zhang et al; *Cell* 2006) 等から、小胞体品質管理が分泌組織の発生に必須であり、その破綻が糖尿病等の疾患と深く関与することが示されている。また、NMD 阻害剤は筋ジストロフィーの特効薬としての応用が提唱されており、2つの品質管理のクロストーク機構の解明は、個々の品質管理の包括的理解に加え、疾患の発症機構の解明や治療薬開発への応用も期待できると考えた。

小胞体品質管理機構

代表者はこれまでに、小胞体品質管理機構に関する研究で業績を挙げてきた。真核細胞における分泌蛋白質の多くは、小胞体膜の蛋白質透過装置を介して翻訳共役的に小胞体へ輸入され、分子シャペロンの働きにより構造形成がなされる (図 - I)。小胞体品質管理機構は分泌蛋白質の構造状態を監査し、適正な蛋白質をゴルジ体へ輸出する (図 - II)。一方で、小胞体品質管理機構は、以下に記す段階的な防御機構を働かせて、構造

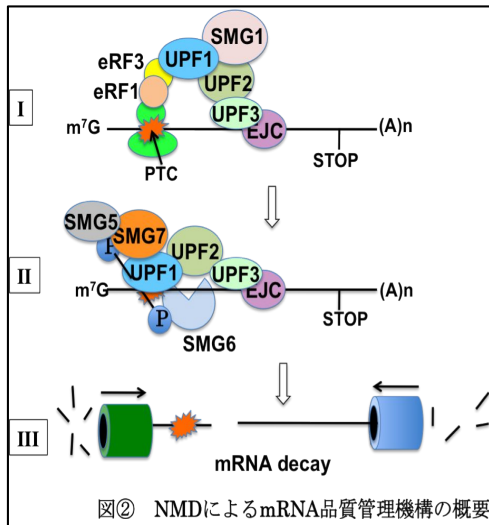
異常蛋白質の発生・蓄積から細胞を守ると考えられている。

小胞体関連蛋白質分解 (ERAD) を介した、構造異常蛋白質の除去 (図 - III)。環境・遺伝的要因による構造異常蛋白質の過剰発生 (小胞体ストレス) に対する小胞体ストレス応答 (UPR) の活性化を介した、小胞体分子シャペロンや ERAD 関連因子群の転写誘導 (図 - IV)。代表者等の解析から示された、重篤な小胞体ストレスにおけるオートファジーの誘導による、UPR や ERAD では対処不能に蓄積した異常蛋白質の処理 (Sakaki et al, *JBC* 2008 & *Autophagy* 2008) (図 - V)。



ナンセンス変異依存 mRNA 分解

上記の知見に加えて代表者は、RNA 監査機構である Nonsense-mediated RNA decay (NMD) が小胞体品質管理において重要な働きをすることを新たに突き止めた。NMD を介した RNA 品質管理では、新生 mRNA において検出されたナンセンス変異 (PTC) に対し、NMD 制御因子群が PTC 近傍で複合体を形成する (図 - 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 - II) 異常 mRNA はエキソソームにより分解される (図 2 - III)。



2. 研究の目的

代表者は線虫 *C. elegans* と哺乳動物系培養細胞を用いた解析から NMD 不全による小胞体ストレスの惹起ならびに、小胞体ストレス条件下での脆弱性の増大が認められることを新たに発見し、論文報告を行った (Sakaki et al PNAS 2012)。さらにこの「NMD-小胞体品質管理クロストーク」分子機構の解明が、数々の小胞体ストレス関連疾患の原因究明に繋がると考え、これを明らかにすべく研究を開始した。

3. 研究の方法

NMD-小胞体品質管理クロストークの実体を明らかにすべく、線虫を用いた「NMD 関連遺伝子欠損変異株における小胞体ストレス発生を抑制するサプレッサー遺伝子の同定」ならびに「小胞体の恒常性維持における NMD 関連遺伝子の機能解析」の2つのアプローチを試みた。

(1) サプレッサー遺伝子については、小胞体関連遺伝子群を中心に系統的に RNAi スクリーニングを行なった。ここで得られた遺伝子群については、更に NMD 関連遺伝子欠損株との二重遺伝子欠損株を作成して解析を行った。

(2) NMD 制御遺伝子について、既存の遺伝子欠損変異に加えて、ゲノム編集法を用いるなど新規変異株を作成し、UPR ならびに NMD の活性強度について評価を行なった。

(3) 小胞体発生については、代表的な UPR 応答遺伝子である *hsp-4* のプロモーター制御下で緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現する蛍光レポーター株 (*zcls4*) との交配株、ならびに応答遺伝子の内在発現についての定量 RT-PCR 解析を用いて評価を行なった。NMD 活性については、変異遺伝子の転写産物が NMD 基質となるような遺伝子変異株を用いて表現型で解析を行うと共に、これら遺伝子の内在性転写産物の安定性についての定量 RT-PCR 法解析を用いて評価を行なった。

4. 研究成果

(1) サプレッサー遺伝子については、RNAi スクリーニングの時点で複数の遺伝子において、その発現抑制による GFP 蛍光の減弱が確認された。更に、これら候補遺伝子について、各遺伝子欠損変異株と NMD 関連遺伝子欠損変異株との二重変異株を作成したところ、1つの遺伝子が候補として残っている。

この遺伝子単独では NMD 不全における UPR 活性化に対する抑圧効果が観察されない。しかし、この遺伝子には複数のアイソフォームの存在が示されており、特に相同性の高いアイソフォームについては、候補遺伝子と同時に RNAi によってノックダウンされている可能性が示唆される。今後、当該するアイソフォームを含めた三重遺伝子欠損を作成するなどして、その抑圧効果についての最終的な結論を得たいと考えている。

(2) NMD 関連遺伝子変異株について UPR の活性強度を比較したところ、ある遺伝子については変異アリル間で大きく異なることが分かった。現在、当該遺伝子について、UPR の活性化に重要な領域の同定を進めており、外部発現によるレスキュー実験や哺乳動物細胞を用いた解析などを通して、小胞体品質管理における役割と分子機構の解明に向けてさらなる研究を進めていきたいと考えている。

またここ数年の論文報告などから、NMD については UPR を含めたストレス応答遺伝子群を天然基質としており、その転写産物の安定性制御を通して、ストレス応答の調節に関わっていることが明らかとなりつつある。また NMD の機能低下に伴うストレス遺伝子の恒常的な発現が細胞の腫瘍化にも影響を与え

ることが報告されており、このようなストレス応答や関連疾患との関係性についても理解を深めていきたいと考えている。

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 1 件)

Kenjiro Sakaki# and Randal J. Kaufman
“Interaction of quality control systems for ER protein folding and RNA biogenesis” (#corresponding author)
Worm Vol.2(2) e23005 (2013)査読あり

[学会発表](計 1 件)

榊 建二郎

「RNA 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 65 回日本細胞生物学会年会
2013年6月20日
ウインクあいち (愛知県名古屋市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

榊 建二郎 (Kenjiro Sakaki)
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

なし

(4)研究協力者

三谷 昌平 (Shohei Mitani)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号：90192757

茂泉(吉名)佐和子 (Sawako Moizumi-Yoshina)

東京女子医科大学・医学部・講師
研究者番号：00424672