

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26291002

研究課題名(和文)異常mRNA由来のタンパク質分解促進機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of protein degradation promoting mechanism derived from abnormal mRNA

研究代表者

稲田 利文(Inada, Toshifumi)

東北大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：40242812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：正確な遺伝子発現は生命現象の根幹であり、その破綻や異常は様々な疾患の原因となる。本研究課題では、最も初期のタンパク質品質管理機構である異常mRNA由来の遺伝子産物の分解機構(NMPD)を解析した。その結果、Hsp70のADP/ATPの交換因子であるSse1がUpf1による短鎖型異常タンパク質の分解促進に必要であり、Sse1とHsp70との相互作用がNMPDに必須であることを見出した。本研究により、ナンセンス変異を持った異常mRNA由来の短鎖型タンパク質分解であるNMPDの分子機構の理解が進んだ。

研究成果の概要(英文)：Accurate gene expression is the backbone of life phenomenon, and its breakdown and abnormality cause various diseases. In this research project, we aim to elucidate the degradation mechanism (NMPD) of gene products derived from abnormal mRNA, which is the earliest protein quality control mechanism. We analyzed short chain type proteolytic mechanism derived from abnormal mRNA with nonsense mutation, and obtained the following results. Sse1, an exchange factor for ADP/ATP of Hsp70, was required for promoting degradation of short chain type abnormal protein by Upf1. Mutant analysis of Sse1 revealed that interaction with Hsp70 is essential for NMPD. Moreover, it became clear that Sse1 does not promote the ubiquitination itself of short chain type abnormal protein itself. This study has led to an understanding of the molecular mechanism of NMPD, a degradation of truncated protein derived from abnormal mRNA with nonsense mutation.

研究分野：分子生物学

キーワード：遺伝子発現の品質管理 ナンセンス変異依存分解系 Upf1 Sse1 Hsp70 ユビキチン化 プロテアソーム

1. 研究開始当初の背景

正確な遺伝子発現は生命現象の根幹であり、その破綻や異常は様々な疾患の原因となる。遺伝子発現の各段階でのエラーや外界からのストレスによって、さまざまな異常 mRNA や異常タンパク質が合成されるだけでなく、タンパク質のフォールディングにも異常が生じる。細胞の保持する品質管理機構は、異常な産物を認識し排除することで、遺伝子発現の正確性を保証する。mRNA 品質管理機構は、DNA 上の変異やスプライシング反応等のエラーによって合成される様々な異常 mRNA を認識し排除することで、異常なタンパク質の合成自体を抑制する。また、タンパク質品質管理機構は、フォールディング異常を認識し排除することで、細胞全体のタンパク質の恒常性を維持している。タンパク質と mRNA の品質管理機構は、独立な研究分野として発展してきており、相互の関連は全く不明であった。

終止コドンを持たないノンストップ mRNA は、正常細胞の全 mRNA の数%を占める細胞内の主要な異常 mRNA であり、ORF 中の誤ったポリ(A)鎖付加反応によって産生される。ノンストップ mRNA は、特異的な品質管理機構である NSD (NonStop Decay) に認識され、3'末端から迅速に分解される (van Hoof ら, *Science* 2002)。研究代表者は、ノンストップ mRNA における品質管理機構について、「終止コドン非依存に翻訳がどのように終結するか」と「異常タンパク質がどのように分解されるか」を含めて解析した。その結果、真核生物の mRNA の普遍的な修飾であるポリ(A)鎖が翻訳伸長を阻害し、異常タンパク質を特異的分解経路へと導くことを見いだした (*EMBO J.*, 2005; *Genes Dev.*, 2007)。これは真核生物の普遍的な修飾であるポリ(A)鎖の全く新しい役割である。その後、新規翻訳複合体 Dom34:Hbs1 によってノンストップ mRNA からリボソームが解離することで、ノンストップ mRNA が迅速に分解されることを明らかにした (*PNAS*, 2010; *Mol. Cell*, 2012, 図1)。

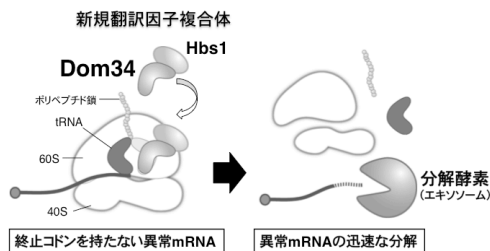


図1 新規翻訳因子Dom34:Hbs1によるノンストップmRNAの分解促進機構

NMD (Nonsense mediated mRNA decay)は、ナンセンス変異を持つ異常 mRNA に特異的な品質管理機構である。異常な位置での

翻訳終結反応に依存して、異常 mRNA 上に NMD 因子群がリクルートされ、迅速に mRNA が分解される。その一方で、ナンセンス変異を持つ異常 mRNA 由来の短鎖型のタンパク質の分解経路は全く不明であった。研究代表者は、ナンセンス変異を持つ異常 mRNA 由来の短鎖型異常タンパク質が、NMD 因子によって分解促進されることを明らかにした (*EMBO Rep.*, 2009; *JBC*, 2013)。

2. 研究の目的

正確な遺伝子発現は生命現象の根幹であり、その破綻や異常は様々な疾患の原因となる。タンパク質と mRNA の品質管理機構は、いずれも細胞内の遺伝子産物の恒常性の維持に必須であるが、独立な研究分野として発展しており、相互の関連は不明である。研究代表者は、mRNA 品質管理機構の全体像の理解をめざして研究を行った。その結果、終止コドンを持たないノンストップ mRNA の品質管理機構について①真核生物の mRNA の普遍的な修飾であるポリ(A)鎖の新規機能や、②異常 mRNA における異常翻訳の認識機構、を明らかにした。しかしながら、異常 mRNA 由来の異常タンパク質の分解系は十分解析されていない。本研究課題では、最も初期のタンパク質品質管理機構である異常 mRNA 由来の遺伝子産物の分解機構の解明を目指す。

【1】ノンストップ mRNA 由来の異常タンパク質分解機構の解明:

ノンストップ mRNA から合成される異常タンパク質が Ltn1 によってユビキチン化される際、新生鎖 (ペプチド鎖解離前) のみが基質か、もしくはポリペプチド鎖 (ペプチド鎖解離後) も基質として認識されるかは、未だ不明である (図2)。研究代表者は、新規翻訳複合体 Dom34:Hbs1 複合体がノンストップ mRNA の 3'末端で停滞したりボソームの A サイトに結合し、サブユニットの解離を担う因子であることを証明した。Dom34:Hbs1 は、リボソームを解離させることでノンストップ mRNA の迅速な分解へ導

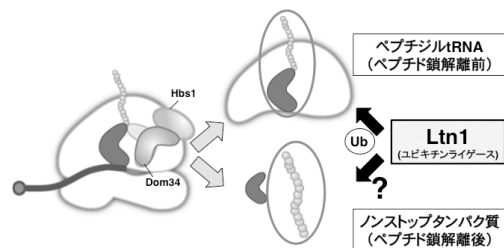


図2 ノンストップ異常タンパク質の分解経路

くと同時に、終止コドンに依存しないペプチド鎖の解離反応にも必須であるが、ペプチド鎖解離活性自体は保持しない。本研究では、ノンストップ mRNA 由来の異常タンパク質分解機構の理解に必須な、終止コドン非依存のペプチド鎖解離因子の同定を

ざす。

【2】ナンセンス変異を持った異常 mRNA 由来の短鎖型タンパク質分解機構の解明

研究代表者は、ナンセンス変異を持った異常 mRNA の分解促進に必須な NMD 因子が、異常 mRNA 由来の短鎖型異常タンパク質の分解を同時に促進することを発見した (*EMBO Rep.*, 2009)。短鎖型異常タンパク質には Hsp70 と NMD 因子が結合しているが (*JBC*, 2013)、その分解促進における機能は不明である。新生鎖の正しいフォールディングには、様々なシャペロン因子が関与する一方で、Ltn1 の様なユビキチンライゲースによって新生鎖がユビキチン化依存に分解される経路も報告されている。本研究では、ナンセンス変異を持った異常由来の異常タンパク質の特異的分解機構を目指し、「フォールディングか分解か」の運命決定に関与しうる Hsp70-Sse1 と Hsp90-Sti1 などのシャペロン関連因子の機能を明らかにする。NMD 因子が異常 mRNA のみでなく異常タンパク質の分解をも促進する分子機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

異常 mRNA 由来の遺伝子産物の分解機構の解明を目的に、以下 2 項目を行う。

【1】ノンストップ mRNA 由来の異常タンパク質分解機構の解明: ノンストップ mRNA 由来の異常タンパク質分解機構の理解に必須な終止コドン非依存のペプチド鎖解離因子の同定を行う。【2】ナンセンス変異を持った異常 mRNA 由来の短鎖型タンパク質分解機構の解明: 短鎖型異常タンパク質の分解における、Hsp70-Sse1 と Hsp90-Sti1 などのシャペロン関連因子の機能を明らかにする。また、NMD 因子によってシャペロン群の活性が制御され、短鎖型異常タンパク質が Unfold 状態に維持される結果、プロテアソームによって分解されるモデルを検証する。

4. 研究成果

【1】ノンストップ mRNA 由来の異常タンパク質分解機構の解明:

異常翻訳を認識し解消する分子機構の解析: ノンストップ mRNA から合成される異常タンパク質が Ltn1 によってユビキチン化される際、新生鎖 (ペプチド鎖解離前) のみが基質か、もしくはポリペプチド鎖 (ペプチド鎖解離後) も基質として認識されるかを解析するために、ノンストップ mRNA の末端で停滞したリボソームを解離させる Dom34 変異株において、Ltn1 によって分解される基質を同定した。その結果、新生鎖とペプチド鎖解離後のポリペプチド鎖の両方を認識することが明らかとなった。RQC における新規経路の存在を示唆する結果が得られた。

【2】ナンセンス変異を持った異常 mRNA 由来の短鎖型タンパク質分解機構の解明

ナンセンス変異を持った異常 mRNA 由来の短鎖型タンパク質分解機構を解析し、以下の結果を得た。①Upf 複合体による短鎖型異常タンパク質の分解促進におけるユビキチン化の役割: Upf 複合体による短鎖型タンパク質の分解促進には、ユビキチン化が必須である。一方、Upf は短鎖型異常タンパク質のユビキチン化自体は促進しないことが明らかになった。②短鎖型異常タンパク質の分解促進を担う因子の同定: 異常に長い 3'UTR に依存して、Upf1 と Hsp70 が短鎖型異常タンパク質と特異的に共精製された。Hsp70 の ADP/ATP の交換因子である Sse1 が Upf1 による短鎖型異常タンパク質の分解促進に必要であった。Sse1 の変異体解析の結果、Hsp70 との相互作用が NMPD に必須であることを見出した。また、Sse1 は短鎖型異常タンパク質のユビキチン化自体は促進しないことが明らかになった。本研究により、ナンセンス変異を持った異常 mRNA 由来の短鎖型タンパク質分解である NMPD の分子機構の理解が進んだ (BBRC, in press)。

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 4 件)

① Sugiyama, T., Nobuta, R., Ando, K., Matsuki, Y., *Inada, T. Crucial role of ATP-bound Sse1 in Upf1-dependent degradation of the truncated product. *BBRC* **18**, 3254-3263 (2017) 査読あり doi: 10.1016/j.bbrc.2017.05.020

② Ikeuchi, K., Yazaki, E., Kudo, K., *Inada, T. Conserved functions of human Pelota in mRNA quality controls for nonstop mRNA. *FEBS Lett.* **18**, 3254-3263 (2016) 査読あり doi: 10.1002/1873-3468.12366.

③ Tsuboi, T., Yamazaki, R., Nobuta, R., Ikeuchi, K., Makino, S., Ohtaki, Y., Suzuki, Y., Yoshihisa, T., Trotta, C., *Inada, T. The tRNA Splicing Endonuclease Complex Cleaves the Mitochondria-localized *CBP1* mRNA. *J Biol. Chem.* **290**, 16021-16030. (2015) 査読あり doi: 10.1074/jbc.M114.634592

④ Kashima I., Takahashi M., Hashimoto Y., Sakota E, Nakamura Y., *Inada T. A functional involvement of ABCE1, eukaryotic ribosome recycling factor, in nonstop mRNA decay in *Drosophila melanogaster* cells. *Biochimie* **106**, 10-16. (2014) 査読あり doi: 10.1016/j.biochi.2014.08.001.

[学会発表] (計 11 件)

①稲田利文.翻訳伸長異常に起因する品質管理機構の新展開,第10回臨床ストレス応答学会大会(招待講演),2015.11.7-7.東京農工大学140周年記念会館

② Inada, T. Novel roles of ribosome ubiquitination in quality control systems, Genetic code and translation (招待講演), 2015.7.17-18. Maritim Hotel&Internationales Congress Center Dresden, Germany

③安藤功穰.mRNA品質管理因子Upf複合体による分子シャペロンを介した異常タンパク質分解促進機構の解析,第15回日本蛋白質科学会年会,2015.6.24-26.あわぎんホール(徳島市)

④稲田利文.翻訳伸長複合体の運命決定機構,第37回日本分子生物学会年会,2014.11.25-27.パシフィコ横浜

⑤Inada, T. Ubiquitylation of ribosomal proteins governs the fate of stalled ribosomes, Joint Australia and Japan RNA meeting (招待講演), 2014.11.2-5. University of Technology, Sydney, Australia

⑥稲田利文.翻訳伸長複合体の品質管理機構におけるユビキチン化の新規機構,第87回日本生化学会大会,2014.10.15-18.国立京都国際会館・グラントプリンスホテル京都

⑦ Inada, T. Hel2 induces ribosome quality control by ubiquitination of 40S ribosomal proteins in stalled ribosomes, Translational Control (招待講演), 2014.9.2-6. Cold Spring Harbor Laboratory, NY, USA

⑧Inada, T. Ribosome associated E3 ubiquitin ligase complex is required for mRNA and protein quality control systems induced by translation arrest. Post-Transcriptional Control of Gene Expression: Mechanism of mRNA Decay, 2014.7.6-11. BigSky, Montana, USA.

⑨稲田利文.新生鎖依存の翻訳アレストによる品質管理機構におけるユビキチン因子複合体の新規機能,第14回日本蛋白質科学会年会(招待講演),2014.6.25-27.ワークピア横浜・横浜産貿ホールマリネリア.

⑩ Inada, T. Ribosome ubiquitination induces protein quality control by translation arrest. Ubiquitin and Cellular Regulation, 2014.6.15-20. Saxtons River, Vermont, USA.

⑪ Inada, T. Ribosome as a hub for protein and mRNA quality control. 第66回日本細胞生物学会大会国際シンポジウム(招待講演), 2014.6.11-13, 奈良県新公会堂・東大寺総

合文化センター

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

[http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~idenshi/inada_la_b_HP/HOME\(Japanese\).html](http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~idenshi/inada_la_b_HP/HOME(Japanese).html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲田 利文 (INADA TOSHIFUMI)
東北大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号: 40242812

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()