

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840002

研究課題名(和文) 出芽酵母を用いたmRNA品質管理機構の反応過程における複合体の精製およびその解析

研究課題名(英文) Biochemical analysis of mRNA quality control in *S. cerevisiae*

## 研究代表者

松尾 芳隆 (MATSUO, Yoshitaka)

東北大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：00725252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内では遺伝子発現の各過程における誤りや外界からのストレスによって様々な異常mRNAや異常タンパク質が合成される。mRNAとタンパク質の品質管理機構は、このような異常産物を認識し排除することで正確な遺伝子発現を維持している。mRNA上に連続したレアコドンや連続した塩基性アミノ酸配列などが出現するとリボソームによる翻訳伸長反応が停滞する。細胞はこの翻訳停滞を異常な翻訳と認識し、翻訳中の異常mRNAの分子内切断とその異常mRNAに由来する新生ペプチド鎖の特異的分解機構を誘導する。本研究課題では、これら品質管理機構に関与する新たな因子の同定に成功した。

研究成果の概要(英文)：Aberrant and non-functional mRNA are frequently generated in the cell due to error during mRNA biogenesis process. Co-translational quality control system monitors translation and immediately eliminates aberrant or non-functional mRNA and nascent product before translation is complete. Translation of poly(A) tail is one of the aborted translation in the cell, and generates poly-lysine peptide, inducing translation arrest and rapid degradation of nascent peptides. However, the mechanism underlying recognition such as abnormal translation remain poorly understood. In this project, I have identified novel factors involved in the recognition of aborted translation and induction of quality control system to remove generating non-functional nascent products.

研究分野：分子生物学

キーワード：リボソーム 品質管理 新生鎖

## 1. 研究開始当初の背景

細胞内では、遺伝子発現の各過程における誤りや外界からのストレスによって、様々な異常 mRNA や異常タンパク質が合成される。mRNA とタンパク質の品質管理機構は、このような異常産物を認識し排除することで、正確な遺伝子発現を維持している。mRNA 品質管理機構の代表的な例としては、NMD (Nonsense Mediated mRNA Decay) や NSD (NonStop Decay)、NGD (No Go Decay) が挙げられる。mRNA の品質管理機構の研究は、当初、mRNA の分解のみに焦点が当てられていたが、近年では、mRNA から産生される新生ペプチド鎖の分解も同時に誘導されることが報告されている。いずれも翻訳反応と共役しており、翻訳の異常を認識することで誘導される。また、この機構には多くの因子が関与していることが報告されていたが、各反応過程における複合体の研究はほぼ皆無であり、詳細な作用機構については未解明なままであった。

mRNA 上に連続したレアコドンや連続した塩基性アミノ酸配列などが出現するとリボソームによる翻訳伸長反応が停滞する。細胞はこの翻訳停滞を異常な翻訳と認識し、翻訳中の異常 mRNA の分子内切断(NGD; No Go Decay)とその異常 mRNA に由来する新生ペプチド鎖の特異的分解機構(RQC; Ribosome associated quality control)を誘導する。異常新生ペプチド鎖の分解は、プロテアソームと E3 コピキチンライゲースである Ltn1 に依存している。Ltn1 は通常では形成され得ないペプチジル tRNA を含む異常な 60S サブユニットと特異的に結合することで、基質である新生ペプチド鎖をユビキチン化するモデルが提案されている。このモデルでは、翻訳停滞したリボソームが終止コドン非依存的に、かつペプチジル tRNA を保持した状態でサブユニットの乖離を引き起こす必要があるが、その機構については全く解析が進んでおらず、未解明なままであった(図 1)。

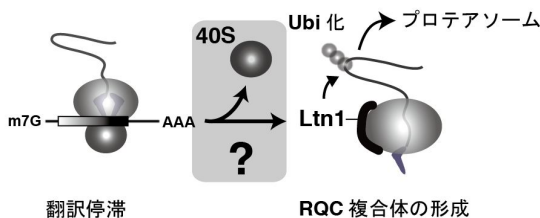


図 1 翻訳停滞に起因する新生ペプチド鎖の品質管理機構

## 2. 研究の目的

本研究課題では、翻訳伸長異常に起因する異常 mRNA およびその翻訳産物の品質管理機構の詳細な分子機構を明らかにすることを目的に解析を行った。特に、翻訳停滞したリボソームの終止コドン非依存的な乖離機構の解明を目指し、各反応過程における異常

mRNA-リボソーム-新生ペプチド複合体の精製法の確立と得られた複合体の解析を行った。

## 3. 研究の方法

翻訳の停滞は連続した塩基性配列を合成する際に生じるため、連続したアルギニンやリジンをコードするアレスト配列(それぞれ K12、R12 配列と呼ぶ)をレポーター遺伝子中に配置することで人為的に翻訳の停滞を誘導させることが可能である。そのため、翻訳停滞に起因する品質管理の解析は、アレスト配列を含むレポーター遺伝子から産生される全長タンパク質と、翻訳停滞の結果生じるアレスト配列までの翻訳産物(アレスト産物)の観察によって進められてきた。そこで、レポーター遺伝子として ProteinA-GFP-R12-GAS1 を Flag タグが融合されたりボソームタンパク質 S2 と共に細胞内で発現させ、IgG ビーズと Flag ビーズを用いた Split tag purification を行うことで翻訳停滞したリボソームの精製を行った。その概略を図 2 に示す。

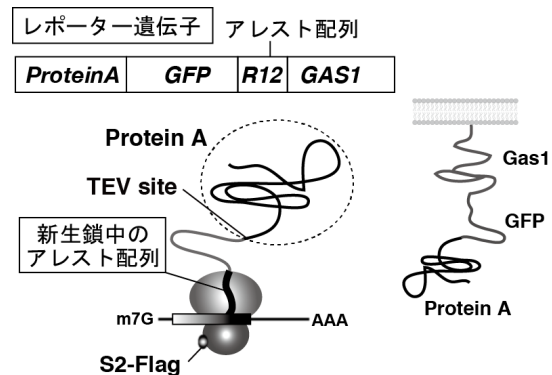


図 2 翻訳停滞したリボソームの特異的精製法

レポーター遺伝子の N 末端には Protein A が融合しており、新生ペプチド鎖は IgG ビーズによって精製可能である。さらに C 末端には GPI アンカータンパク質である GAS1 を融合させているため、アレスト配列を通過して翻訳が完了した全長タンパク質は細胞膜にアンカーされる仕組みになっている。そのため、遠心分離によって膜画分を除去することで、翻訳中のレポータータンパク質を効率良く上清に濃縮することができる。2 段階目の精製では 40S サブユニットのリボソームタンパク質である S2 を Bait としているため、最終的にレポータータンパク質を合成中のリボソームだけが精製される。

## 4. 研究成果

翻訳の伸長速度は mRNA にコードされるコドンの最適化に加え、合成された新生鎖とリボソームの相互作用によって決定される。2015 年、同種のアミノ酸をコードするコドンの最適化によって、タンパク質の正確なフォールディングや mRNA の寿命が決定される

証拠が相次いで見いだされた。このことは、翻訳の伸長速度が遺伝子発現において非常に重要な意味をもつことを強く示唆している。

mRNA とその翻訳産物の品質管理も翻訳と共役して行われており、翻訳の伸長阻害によって品質管理機構が誘導されることが知られている。我々のグループは、本研究課題の開始時期とほぼ同じ時期に、翻訳伸長阻害に起因する品質管理機構に關与する新たな E3 ユビキチンライゲースとして Hel2 を同定していた。3.研究の方法でも述べたが、翻訳停滞に起因する品質管理の解析は、アレスト配列を含むレポーター遺伝子から産生される全長タンパク質と、翻訳停滞の結果生じるアレスト配列までの翻訳産物の観察によって進められてきた。野生株では、アレスト配列(R12)をもつレポーター遺伝子の発現は強く抑えられ、アレスト産物も分解されるため観察することができないが、アレスト産物をユビキチン化する Ltn1 の欠損下では、分解が阻害されるため、観察が可能になる(図.3)。一方で、Ltn1 と Hel2 の 2 重欠損下では全長タンパク質の増加とアレスト産物の消失が観察された(図.3)。

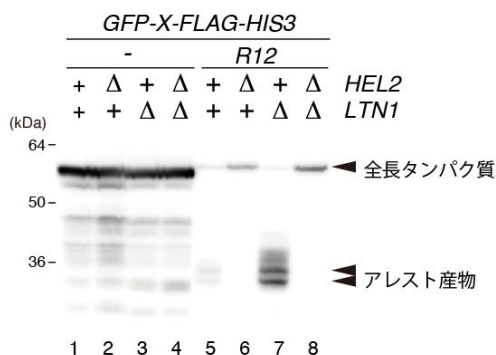


図 3 Hel2 および Ltn1 欠損下におけるレポーター解析

この結果は、Hel2 の欠損によって翻訳の停滞が生じなくなった可能性、もしくはアレスト配列上でのリボソームの解離が阻害された可能性を示唆している。そこで次にこの 2 つの可能性を検証するため、3.研究の方法で記述した停滞したリボソームの特異的な精製を行った。その結果、Hel2 の欠損下では、アレスト産物を含む停滞したリボソームが増加することから、翻訳の停滞が回避された訳ではなく、Hel2 の欠損によってリボソームの乖離が阻害されることが明らかになった。また、Hel2 は翻訳伸長中のリボソーム(ポリソーム画分)に結合しており、小サブユニットのリボソームタンパク質である RpS20 を特異的にユビキチン化すること、さらにこのユビキチン化が翻訳伸長阻害によって誘導される新生ペプチド鎖の分解機構 RQC の誘導に必須であることも見いだした。そこで、RpS20 のユビキチン化がサブユニット乖離に必須である可能性を停滞したリボソームの特異的精製によって確認したところ、Hel2 の

欠損下と同様にアレスト産物を含む停滞したリボソームの増加が観察された。以上の結果から、Hel2 による RpS20 のユビキチン化によって、停滞したリボソームのサブユニット乖離が促進される可能性が示唆された。

次に、停滞したリボソームの乖離に關与する新たな因子の同定を目指し、Hel2 を含むリボソーム複合体の精製を行い、複合体に含まれる因子を質量分析系で調べた。その結果、3 種類の新たな因子の同定に成功した。これらの因子は 3 者複合体(RQT 複合体)を形成し、いずれの遺伝子の欠損下でも、HEL2 の欠損下と同様に、停滞したリボソームの乖離が阻害されることを見いだした。そこで、Hel2 を Rqt1、新たに同定した 3 種類の因子を Rqt2, 3, 4 (Ribosome Quality control Triggering factor)と名付けた。さらに、新たに得られた RQT 因子のうち Rqt3 にはユビキチンと結合するドメインが保存されており、このドメインの機能欠損によっても、品質管理の誘導が阻害されることを明らかにした。

続いて、Hel2 (Rqt1)による停滞したリボソームの認識機構を調べるために、Hel2 (Rqt1)を含むリボソーム複合体を極低温電子顕微鏡を用いて解析した。その結果、Hel2 (Rqt1)は RpS20 の近傍に位置する mRNA の Entry site に結合すること、さらに Hel2 (Rqt1)が結合するリボソームに含まれる tRNA が A/P および P/E 部位に位置していることが明らかになった。このことは、Hel2 (Rqt1)がトランスロケーション反応中のリボソームに特異的に結合することを示している。

以上の結果より、翻訳停滞したリボソームを Hel2 (Rqt1)が特異的に認識し、RpS20 をユビキチン化すること、さらに RpS20 のユビキチン化を RQT 複合体が認識することで、サブユニット乖離が誘導される新たなモデルが示唆された(図 4)。今後はこのモデルの検証を行う予定である。

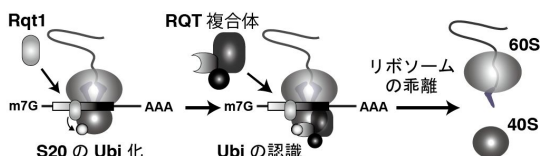


図 4 RQT 複合体による停滞したリボソームの乖離モデル

## 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)

松尾芳隆、リボソームの生合成に共役したリボソーム前駆体の品質管理機構、生化学、86 巻、2014、793-797 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

Yoshitaka Matsuo. Ubiquitination of stalled ribosome triggers ribosome quality control. Pharmaceutical Science Symposium 2015 in Sendai. 2015.11.16-17 @ Tohoku university Sakura Hall

Yoshitaka Matsuo. Hel2 ubiquitin ligase plays crucial roles in quality controls induced by translation arrest. The 17<sup>th</sup> Tokyo RNA Club. 2015.6.16 @ The university of Tokyo Nakashima Hall

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松尾 芳隆 (MATUSO YOSHITAKA)  
東北大学・大学院薬学研究科・助教  
研究者番号：00725252

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：