

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 20 日現在

機関番号：11301
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23770198
 研究課題名（和文） mRNA 品質管理機構における翻訳アレストと異常タンパク質分解機構の解析

研究課題名（英文） Mechanism of translation arrest and degradation of aberrant products in mRNA quality control systems

研究代表者：黒羽 一誠 (KUROHA KAZUSHIGE)
 東北大学・大学院薬学研究科・研究支援者
 研究者番号：50580015

研究成果の概要（和文）：本研究は 2 つの代表的な異常 mRNA（ノンストップ mRNA とナンセンス変異を保持する mRNA）で起こる翻訳異常の識別機構と、異常タンパク質の分解促進機構について解析し、1) ノンストップ mRNA の分解を促進する因子（Dom34:Hbs1 複合体）の作用機序、2) 異常タンパク質（PTC 産物）のフォールディング異常が Upf 因子による分解促進に重要であることを、明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We have analyzed two major of aberrant mRNAs, stop codon-less mRNA and nonsense-containing mRNA, to reveal the mechanism of the aberrant translation recognition and stimulation of aberrant products degradation. We found that mechanism of stop codon-less mRNA degradation by Dom34:Hbs1 complex. We also found that the mis-folded conformation of PTC products is important for leading to its degradation by Upf factors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：mRNA 品質管理、mRNA 分解、タンパク質分解

1. 研究開始当初の背景
 遺伝情報の担い手である mRNA の合成と機能には、強制的に制御された一連の反応 (mRNA 前駆体合成、核内でのプロセッシング、核孔複合の通過とそれに続く特定の細胞質区画への局在、翻訳、そして最終的な分解) が重要である。これら多段階におよぶ mRNA の一生は、その各過程で異常な mRNA を合成してしまう可能性をはらんでいる。mRNA 合成過程の異常に起因して生産される異常 mRNA は、生命活動を担うタンパク質を正常に合成できないばかりでなく、細胞に対して毒性を発揮する異常タンパク質を発現させる可能性がある。しかしながら細胞は、異常 mRNA を選択的かつ速やかに消去する品質管品質管

理機構を進化させてきた。この機構により、細胞における mRNA の品質は厳密に管理され、遺伝子発現の異常を回避している。ナンセンス変異はヒト遺伝病の主要原因の一つであるが、NMD (Nonsense-Mediated mRNA Decay) と呼ばれる特異的分解系によって異常 mRNA が排除されることで、細胞への悪影響が回避されている。また、終止コドンを含まない異常 mRNA は NSD (NonStop Decay) によって分解される。

(1) ナンセンス変異依存品質管理 (NMD) の分子機構：

NMDは真核生物に普遍的に存在する mRNA 品質管理機構であり、ナンセンス変異により生じた遺伝子コード領域中の終止コドン (premature termination codon: PTC) を保持する mRNA を選択的に分解除去する機構である。正常よりも上流で起こる PTC での異常な翻訳終結が、NMD に必須な因子である Upf 因子をリボソーム上に招集し、異常 mRNA を迅速に分解する引き金となっている。

PTC と正常な終止コドンは、mRNA の 3' 末端からの距離の違いによって識別されるモデルが提唱されている。ポリ(A)結合タンパク質 (PAB) は翻訳終結因子との相互作用を介して正常な翻訳終結を促進する。しかしながら、正常より長い 3' 非翻訳領域 (3'-UTR) を持つ PTC においては、PAB が近接していないため、この反応効率が減少している。結果として、翻訳終結因子は Upf 因子と結合し NMD が惹起される、と考えられている。

これまで我々は、PTC を保持する mRNA 由来の短鎖型異常タンパク質 (以下 PTC 産物) の発現を抑制する、mRNA 分解 (NMD) 以外の機構が存在するか否か、を検証するため PTC 産物の定量解析を行った。その結果、mRNA 分解だけでなく、Upf 因子がプロテアソームによる PTC 産物の分解を促進することにより、特定の位置に PTC を持つ mRNA 由来の PTC 産物量を顕著に低下させていることを見いだした。また、この Upf 因子による PTC 産物の分解促進には、プロテアソーム活性だけでなく、長い 3'-UTR を必要とした。これらは、異常タンパク質の分解促進という Upf 因子の新しい機能を示すだけでなく、mRNA の構造自体が、合成されるタンパク質の安定性に影響を及ぼすという新たな概念を提示している。

(2) ノンストップ mRNA 特異的分解系 (NSD) の分子機構:

NSD は終止コドンを欠失した異常 mRNA (ノンストップ mRNA) を分解する、酵母からヒトまで保存された機構である。これまで、真核生物においてノンストップ mRNA の 3' 末端に停滞したリボソームを認識する因子 (Ski7) によって、3' 末端から mRNA を分解する因子 (エキソソーム) が招集されるモデルが提唱されている。

一方我々は、ノンストップ mRNA を翻訳するリボソームが通常翻訳されることのないポリ(A)鎖まで翻訳を進行させた結果、1) 合成途上のポリリジンとリボソームの相互作用により翻訳が抑制され、2) リボソーム上に停滞した異常タンパク質がプロテアソームによって速やかに分解されることを見いだした。これは真核生物における普遍的な修飾であるポリ(A)鎖が、発現制御カスケードを駆動する鍵として機能し、品質管理機構において必須の役割を果たすことを初めて明確

に示した。

また、新生ポリペプチド鎖において、3) 連続した塩基性アミノ酸 (ポリリジン、ポリアルギニン) が合成された場合、翻訳伸長の一時停止 (翻訳アレスト) と、それに共役して Not4 依存的にプロテアソームによる異常タンパク質の分解が引き起こされることを明らかにした。さらに我々は、この新生ポリペプチド鎖依存的な翻訳アレストに関与する新規の因子として RACK1 を同定すると共に、4) RACK1 の 40S リボソームに対する結合活性が翻訳アレストの誘起に重要であること、5) 連続した塩基性アミノ酸による翻訳アレストが mRNA 分子内切断を引き起こし、RACK1 がこの反応を促進することを明らかにした。このように、ノンストップ mRNA の解析から新たな生命現象の発見に至ったことを付け加えておく。

2. 研究の目的

上述のように我々は、二つの異常 mRNA (ノンストップ mRNA とナンセンス変異を保持する mRNA) の解析を通じて、mRNA 分解に加え、翻訳抑制とプロテアソームによる異常タンパク質の分解促進が、異常 mRNA の発現抑制に重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。しかしながら、どのように異常 mRNA で起こる翻訳異常が認識され、それが引き金となって異常タンパク質の分解が促進されるのか、についてはほとんど明らかではない。従って本研究は、2つの異常 mRNA で起こる翻訳異常の認識機構とプロテアソームによる異常タンパク質の分解促進機構について、詳細な分子メカニズムを明らかにすることを目標として解析を行った。

3. 研究の方法

本研究はすべて、出芽酵母 (*S. cerevisiae*) をモデル生物として行われた。出芽酵母の野生株および mRNA 品質管理に関わる因子の変異株に、異常 mRNA を発現するレポーター遺伝子を導入し、生化学的解析により、異常 mRNA および異常タンパク質の分解機構を解析した。

4. 研究成果

ノンストップ発現抑制機構の解析:

ノンストップ mRNA を翻訳するリボソームは、必然的に 3' 末端まで翻訳を進行し、最終的に末端で停滞してしまう。3' 末端に停滞したリボソームは、エキソソームのアクセスを阻害するため、ノンストップ mRNA の効率的な分解を妨げている。これまで 3' 末端に停滞したリボソームは Ski7 によって解離するというモデルが提唱されているものの、このモデルを指示する研究報告はなく、3' 末端で停滞したリボソームが解離される分子機構は不明

であった。

翻訳伸長の停滞に伴う mRNA 分子内切断 (No-Go decay) に必須な因子として、翻訳終結因子 eRF1 と相同性を示す Dom34、および eRF3 と相同性を示す GTP 結合因子 Hbs1 が同定されている。以前我々の研究グループは、高熱性古細菌における Dom34:Hbs1 複合体の結晶構造解析と、出芽酵母を用いた系統的変異解析により、Dom34:Hbs1 複合体が停滞したリボソームの空の A 部位を認識し、終止コドン非依存的な翻訳終結反応に関与する可能性を示してきた。

本研究で我々は、Dom34:Hbs1 複合体が mRNA の 3' 末端に停滞したリボソームを解離させることを明確に示した。また、この解離反応が、エキソソームによるノンストップ mRNA の分解を促進させていることを明らかにした。これらの結果から我々は、ノンストップ mRNA 分解機構 (NSD) について新たなモデルを提唱した (図 1, *Mol. Cell* 2012)。

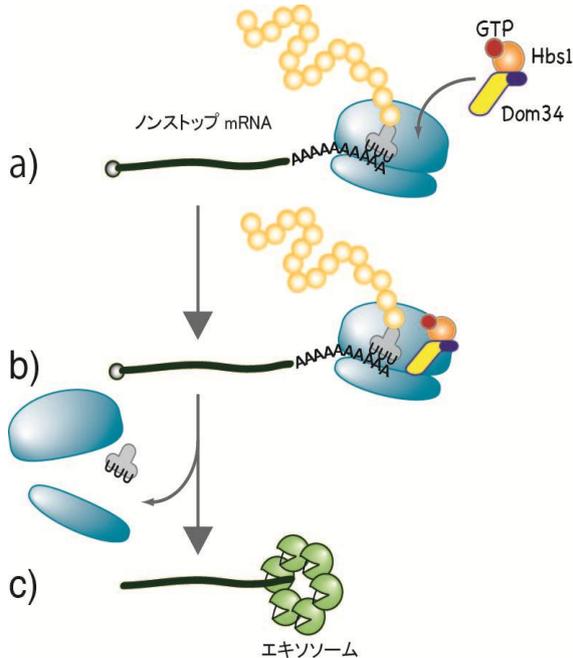
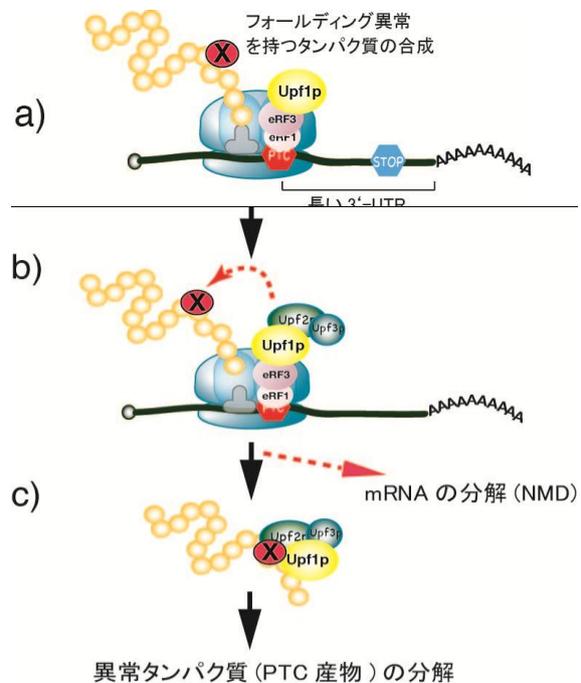


図 1、本研究から得られたノンストップ mRNA 分解機構の新たなモデル。a) ノンストップ mRNA には終止コドンが存在しないため、リボソームは 3' 末端まで翻訳を進行し、そして停止する。b) このリボソームの A 部位にはコドンが存在しないため翻訳終結因子やアミノアシル tRNA 結合できない。そのため、この A 部位には Dom34:Hbs1 複合体が結合し、リボソームをノンストップ mRNA から解離させる。c) 3' 末端が解放された結果、エキソソームがノンストップ mRNA を 3' 末端から効率的に分解する。

ナンセンス mRNA 発現抑制機構の解析：

上述したように、Upf 因子は、プロテアソームを介して PTC 産物の分解を促進させている。また、この Upf 因子による PTC 産物の分解促進には、長い 3'-UTR という mRNA 上の特徴を必要とした。PTC での異常な翻訳終結を引き金として、どのように Upf 因子が PTC 産物を特異的に認識し、その分解を促進させているのか、についてはこれまでほとんど明らかにできていなかった。

本研究で我々は、PTC 産物は効率的なユビキチン化を受けるものの、Upf 因子はユビキチン化産物の分解を促進しないことを明らかにした。次に、Upf 因子が異常タンパク質との相互作用を介してその分解を促進する可能性を検証するため、Upf 因子と異常タンパク質の結合を免疫沈降法を用いて検証した。その結果、Upf 因子と異常タンパク質の共沈効率が、タンパク質の分解効率と非常に相関性が高いことを明らかにした。また、フォールディング異常を示すヒト VHL タンパク質の分解も Upf 因子と長い 3' UTR に依存して促進され、その分解効率が Upf 因子との共沈効率和比例することを明らかにした。これらの結果は、Upf 因子が異常タンパク質のフォールディング異常を認識し、プロテアソームによる分解を促進していることを示唆している (図 2、論文投稿中)。



2 図、本研究から得られた PTC 産物の分解促進モデル。a) 正常な終止コドンより上流に位置する異常な終止コドン(PTC)での翻訳終結が、Upf 因子をリボソーム上にリクルートする。合成された PTC 産物がフォールディング異常を持つ場合、b) Upf 因子との複合体が形成される。c) この複合体形成は、PTC 産物がリボソームから解離した後も維持され、プロテアソームによる分解促進の引き金となると考えられる。Upf 因子が PTC 産物のフォールディング異常を直接認識しうるモチーフなどを持っていないことから、タンパク質の構造を直接認識する X 因子と Upf 因子の結合を予想している。

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 2 件)

1. 井澤俊明、坪井達久、黒羽一誠、稲田利文、西川周一、遠藤斗志也、Roles of dom34:hbs1 in nonstop protein clearance from translocators for normal organelle protein influx、*Cell Reports*、査読あり、2 巻、2012 年、447-453
DOI: 10.1016/j.celrep.2012.08.010.
2. 坪井達久、黒羽一誠、工藤和兵、牧野支保、井上絵里、鹿島勲、稲田利文、Dom34:Hbs1 plays a general role in quality control systems by dissociation of a stalled ribosome at the 3' end of aberrant mRNA、*Molecular Cell*、査読有、46 巻、2012 年、1-12
DOI: 10.1016/j.molcel.2012.03.013.

[学会発表] (計 6 件)

1. 黒羽一誠、稲田利文、NMD(ナンセンス変異依存 mRNA 分解)における異常タンパク質分解機構の解析、RNA フロンティアミーティング、2012 年 9 月 19 日~21 日、メルパルク熊本
2. 黒羽一誠、稲田利文、Quality control systems for aberrant products derived from mRNAs containing a specific premature termination codon in yeast、Translational Control、2012 年 9 月 4 日~8 日、Coldspring Harbor、アメリカ
3. 黒羽一誠、稲田利文、NMD(ナンセンス変異依存 mRNA 分解)における異常タンパク

質分解機構の解析、RNA meeting Tohoku、2012 年 7 月 18 日~20 日、東北大学萩ホール

4. 黒羽一誠、稲田利文、NMD(ナンセンス依存 mRNA 分解)における異常タンパク質分解機構の解析、Ribosome meeting、2012 年 3 月 15 日~16 日、広島大学生物生産学部
5. 黒羽一誠、稲田利文、NMD(ナンセンス変異依存 mRNA 分解)における異常タンパク質分解機構の解析、日本生化学会 東北支部会、2011 年 7 月 23 日、東北大学さくらホール
6. 黒羽一誠、稲田利文、Quality control systems for aberrant products derived from mRNAs containing a specific premature termination codon in yeast、RNA2011、2011 年 6 月 14 日~18 日、国立京都国際会館

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

東北大学薬学研究科遺伝子制御薬学分野
[http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~idenshi/inada_lab_HP/HOME\(Japanese\).html](http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~idenshi/inada_lab_HP/HOME(Japanese).html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒羽一誠 (KUROHA KAZUSHIGE)

東北大学・大学院薬学研究科・研究支援者
研究者番号：50580015

研究者番号：

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：