

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 18 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440004

研究課題名(和文)ベロ毒素により損傷したリボソームを認識するメカニズムの解析

研究課題名(英文) Recognition of ribosomes damaged by vero-toxin

研究代表者

北畠 真 (Kitabatake, Makoto)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・助教

研究者番号：10321754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ベロ毒素により損傷したリボソームの細胞内運命を調査する目的で、出芽酵母の系を用いて、損傷部位に塩基置換を持つ機能不全rRNAを発現させ、このRNAが短い時間で分解されること、既知の品質管理機構Nonfunctional 25S rRNA decay (NRD)の関連タンパク質Mms1が関わっていること、などを手がかりに解析を行った。

本研究ではMms1複合体に結合する新たな因子を見出し、その因子のリボソームとの結合性を確認した。また新規の因子としてリン酸化酵素の同定に成功し、その活性が分解に必要とされることを明らかにした。リボソームの品質管理について本質的な理解を深めることに成功した。

研究成果の概要(英文)：To understand the fate of nonfunctional ribosomal RNAs damaged by Vero-toxin, we created a mutant 25S rRNA which has a point mutation in the Vero-toxin target site. In a *S. cerevisiae* model strain, this mutant RNA was degraded by Mms1-dependent pathway. We identified novel factors related to this pathway. We found that one factor is physically associating to Mms1 complex (E3 ligase) and the ribosomes, indicating that this will be a bridge protein between the two complex. The other factor we newly identified was a kinase. We revealed that the active site mutation of this kinase completely abrogated the degradation of the mutant RNA, showing that the signal transduction system is involved in the elimination of nonfunctional ribosomes. Taken together, a series of experiments shed light on these unappreciated factors involved in this pathway.

研究分野：RNA

キーワード：リボソーム 品質管理 ユビキチン

1. 研究開始当初の背景

(1) 病原性大腸菌の産生するベロ毒素は、細胞に取り込まれた後、リボソームの60Sサブユニットを構成する28S rRNAの特定のアデニン塩基を損傷することで細胞毒性を生じさせることが明らかになっている。しかしこの損傷がリボソームの機能に与える影響や、細胞が損傷リボソームをどのように扱うか、細胞毒性に至るまでの作用機序の詳細は分かっていなかった。近年、ベロ毒素を原因とした食中毒の発生がしばしば報告され、いくつかのケースにおいては死亡者も出ている深刻な状況である。しかしながら感染者に対して直接的に毒素の作用を防ぐような有効な手立てはいまだに報告されていない。ベロ毒素の作用による細胞の損傷や応答機構を詳しく知ることにより、これらの問題に対して有効な手段を開発する基盤を構築する必要があった。

(2) われわれは出芽酵母のモデルを用いて、リボソームに損傷が起きた場合の細胞の応答機構を研究してきた。これまでに、ペプチジル基転移中心(タンパク質合成反応に直接関与するリボソーム中の重要な部位)に変異を持つ25S rRNAが機能不全となること、そのようなRNAが細胞内で選択的に分解を受けること、等を明らかにしてきた。またわれわれは、この分解にMms1による60Sサブユニットのコピキチン化が関わっていることも明らかにした。出芽酵母を利用したこのシステムは機能不全リボソームの細胞内動態を評価し、関連因子を解析するための、現状では唯一のシステムであった。

2. 研究の目的

(1) 本研究ではまず、出芽酵母のモデルシステムを利用して、ベロ毒素による損傷リボソームの動態を観察するための実験系の構築に挑戦した。そのためにベロ毒素による損傷を受けることが分かっているアデニンの相同塩基を出芽酵母の25S rRNA上でさまざまに変異させたものを作成し、酵母で発現をさせるシステムを構築した。新たに構築した実験系を用いて、損傷RNAが細胞内で分解されるかどうかを検証する。

(2) 分解される場合にはその分解に関わる因子をスクリーニングし、機構を解明することを目指した。

(3) 動物細胞の培養細胞を用いてベロ毒素による細胞障害を実際に生じさせ、上記で確認されたRNAの分解が観察できるかどうか、関与する因子の阻害によりRNAの分解が抑制できるかどうかを調べることを目指した。

3. 研究の方法

(1) ベロ毒素により損傷を受ける28S rRNAのアデニン塩基がすでに解明されている。この塩基に相当する出芽酵母の25S rRNAの塩基にさまざまな塩基置換を導入し、細胞内で発現させた上で、それらの変異RNAの安定性をノザンハイブリダイゼーションやqRT-PCRなどの既存の方法で検証することにする。さらに、ショ糖密度勾配遠心法によりリボソームの画分を分離して変異RNAの大きさを調べることで、変異RNAがリボソームの60Sサブユニットに取り込まれるか、80Sの形成まで完了するか、などの基礎的な知見を得ることとする。変異を導入したRNAが正しく25S rRNAとして機能するか、機能不全になるかについては、出芽酵母のRNAポリメラーゼI温度感受性株を用いて、ゲノム上のrRNAの転写を停止させ、酵母の生育がプラスミドから導入した変異rRNAに依存するような状況を作ることによって確認する。(プラスミドから発現させるrRNAはRNAポリメラーゼIIのプロモータの下流に挿入しておく。)

(2) 上記の系の構築後に、酵母にさまざまな遺伝子破壊を加え、分解に与える影響を調べる。これまでにペプチジル基転移中心に変異を持つ機能不全rRNAの分解機構がある程度明らかになってきている。この経路に関わるE3リガーゼなどの因子が、新たに構築した変異RNAの分解に与える影響を順次調べ、スクリーニングにより新規関連遺伝子の同定を試みる。

(3) ヒトの培養細胞にベロ毒素を投与して損傷を与えた後、一定時間ごとにRNAを回収してqRT-PCRで損傷部位の定量を試みる。損傷によるシグナルの減弱、その後の分解による減弱などの観察に挑戦する。

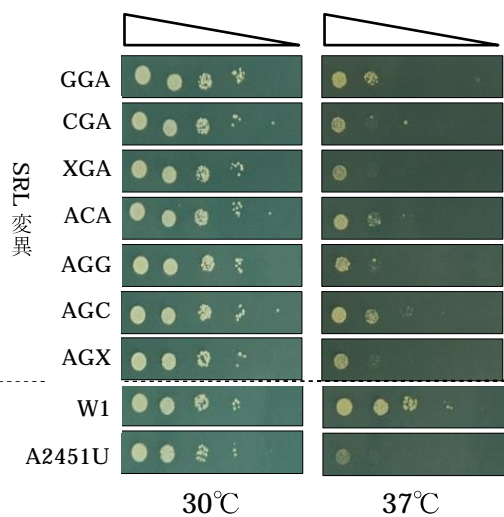
4. 研究成果

(1) ベロ毒素による損傷リボソームの動態を出芽酵母で観察する

変異体の作成と活性の喪失の有無

上述の通り、損傷部位にあるアデニンの前後は、すべての生物のリボソームで非常によく保存されている。本研究ではこのアデニンに加え、隣接した系3塩基(AGA、下線部が損傷部位)に点変異や欠損変異を導入した変異体を7種類作成した。これは、特定の塩基の特定の置換だけでなく、さまざまな理由によりこの位置の塩基に損傷が起こった場合について、リボソームの機能に与える影響や、分解の有無に対する影響を観察したいという意図による。

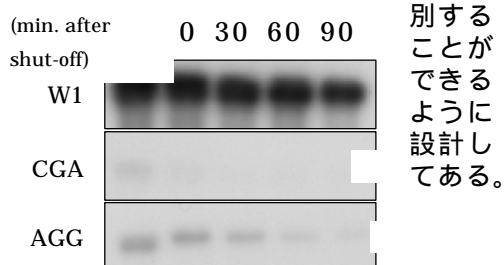
これらの変異 RNA を RNA ポリメラーゼ I の温度感受性株である出芽酵母で発現させ、さまざまな段階に希釈した後、プレートにスポットした。それらのプレートを 30 あるいは 37 で培養したのが以下の結果である。



ここで W1 は野生型 25S rRNA 発現プラスミドを入れた場合であり、きれいに相補活性が観察されていることが分かる。活性中心の変異がある A2451U では相補活性がなく、37 で致死となっている。目的の変異体 (SRL 領域と呼ばれる位置への変異なので SRL 変異と総称している) の場合は、ほとんど全てのケースで活性の低下が見られ、とくに一文字目のアデニンが欠損した XGA の場合や、ピリミジンに置換した CGA の場合にはほぼ活性の喪失が認められた。以上の結果から、出芽酵母においても、ペロ毒素の標的になるアデニンがリボソームの活性に必須の塩基であることが明らかになった。

変異 25S rRNA の細胞内での分解

上記の変異 rRNA の活性が失われたことから、われわれのこれまで研究してきた「リボソームの品質管理機構 (nonfunctional rRNA decay, NRD)」によりこれらの rRNA が分解を受ける可能性が浮上した。プラスミドからの転写を停止させた後、一定時間後に RNA の回収を行い、プラスミド由来の rRNA の存在量をノザンハイブリダイゼーションで検証することにより、分解の有無を確認した。なおプラスミド由来の 25S rRNA には、機能に影響を与えない位置に 18-nt の短い「タグ」配列を挿入してあり、内在性のリボソームと区



図に示した通り、機能を失った 2 つの変異体を調べたところ、どちらも野生型 rRNA に比べて極めて短時間で分解を受けることが明らかになった。

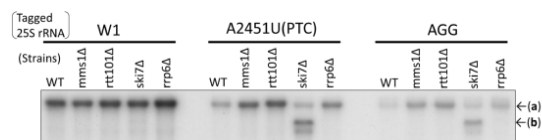
(2) 分解に関わる因子の探索

25S NRD 関連因子の関与を発見

当初の予定では、25S rRNA に挿入した「タグ」配列を MS2 結合配列に置換したプラスミドを作成し、これを発現した株に同時に GST-MS2coat protein を発現させることで、変異 rRNA を持つリボソームのみを精製するという手法を応用して関連因子の探索を行うようになっていた。しかしながら、細胞内での変異 25S rRNA の分解が思った以上に迅速であり (ノザンハイブリダイゼーションの図を参照) このまま野生株に発現させてもほとんど変異リボソームが存在せず、精製して生化学的な解析を行うのに十分な量と純度を得ることができない、という問題に直面した。

なんらかの方法で分解を止めることができれば、変異リボソームの細胞内での存在量を増やすことができ、関連因子の解明に道が開かれるものと期待された。そのため、生化学的アッセイをまず後にまわすこととして、既存の変異株でこれらの変異 rRNA の分解が停止したものがいないかどうかを調べていくことにした。

まず、シヨ糖密度勾配遠心法により変異 rRNA の大きさを確認した (図は省略)。この結果、分解されている変異 rRNA も、その大部分のシグナルは 60S と 80S の画分に存在される、ということが明らかになった。このことは、変異 rRNA が単純にリボソームサブユニットのアセンブリの不調によって分解されているのではなく、きちんと成熟したサブユニットまでは完成したものの、その後の品質管理機構で分解されている、という可能性を示唆している。この結果からわれわれは、これまでペプチジル基転移中心の変異を認識して分解すると考えられていた Mms1 などの 25S NRD 因子が、これらの異なる部位の変異にも働くのではないかと、という仮説を立て、これらの因子のノックアウト株における変異 rRNA の安定性の変化を調べてみた。



その結果、図に示したとおり、SRL 領域の変異 (ここでは AGG の例を示す) の場合も、A2451U の場合と全く同様に、25S NRD に関連

する因子の欠損株で分解が抑制され、細胞内に蓄積する、ということが明らかになった。このことは異なる部分の変異であれ、結果として機能を失ったリボソームが同じメカニズムにより認識されて分解される、ということを示すはじめてのケースである。

その他の因子の探索

以上の結果から、25S NRD がこれらの変異リボソームの分解にも共通して働いているということが明らかになった。そこでここからは、この両者に対して働く機構の解明を、それぞれの変異 rRNA を使って進めていくこととした。

これまでに A2451U を用いて MS2coat protein によるプルダウンを行い、質量分析により結合タンパク質を分析したことがあった。この結果、いくつかのリボソーム結合タンパク質が、特に変異リボソームでは濃縮している、ということが示唆されていた。これらのタンパク質は、どれかが機能不全リボソームに直接結合するもので、残りはその状態の複合体に付加的に結合してくるものかもしれない、と考えた。本質的な結合タンパク質を同定するため、候補の遺伝子を 20 弱ほど決めた上で、それぞれ無細胞翻訳系を使って 35S 標識したタンパク質を作成した。出芽酵母から精製した E3 複合体（これが機能不全リボソームを認識して選択的にユビキチン化を行うことは以前の研究で解明した）を使って、結合の有無を検証する実験を行った。

その結果、興味深いことに、ひとつのタンパク質が機能不全リボソームに優先的に濃縮されるのみならず、E3 複合体にも結合する、ということが明らかになった。このタンパク質は機能不全リボソームと E3 複合体を物理的に結びつけるブリッジになって働く因子であると想定された。このことを証明するためにこの因子のノックアウト株を作成し、機能不全リボソームの分解が停止するかどうか、選択的ユビキチン化が消失するかどうかのアッセイを行った。結果は示さないが、期待どおり、この因子がない株では機能不全リボソームのユビキチン化は消失し、分解は全く起こらないことが分かった。

この因子が選択的に結合することが、機能不全リボソームの「目印」になっていることが示唆されたので、この因子のリボソーム上での結合部位や、E3 複合体との結合ドメイン、また、リボソーム上のユビキチン化部位の同定を進めた。それらの一連の解析から、機能を失ったリボソームがどのようなルールによってこの因子の結合を受けるのか、細胞の品質管理の仕組みが明らかになりつつあるところである。

(3) 動物細胞の系を使って

当初の予定では、(2)までの実験で得られた成果を動物細胞の培養細胞で、実際にペロ毒素を投与して確認することを計画していた。実験において、購入したペロ毒素により HeLa 細胞が効率的に死滅すること、rRNA の分解が遅いながら観察されること、などが明らかになったが、上述の分解メカニズムの解明に時間を集中的に投資したため、動物細胞での確認にまでは手が回らなかったのが実情である。

近年になって、損傷 RNA をリアルタイム PCR を用いて感度よく検出する方法がいくつか報告されている。これらを応用することで、より正確にペロ毒素による損傷 RNA の量と時間経過による動態を確認することができるようになると思われる。今後これらの手法を試してみると同時に、これまでに得られた因子のノックダウンに挑戦したい。

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 1 件)

Sakata T., Fujii K., Ohno M., and Kitabatake M.
Biochem Biophys Res Commun. (2015) 457(1):90-4.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X14022542>
doi: 10.1016/j.bbrc.2014.12.072.

[学会発表](計 5 件)

1. 北畠真、坂田知子、藤井耕太郎、大野睦人
「真核生物 60S リボソームの品質管理とストレス応答経路との関わり」
第三回リボソームミーティング 2015年3月17日-3月18日 ANA ホリデイ・イン リゾート宮崎(宮崎市)
2. Kitabatake M., Sakata T., Fujii K., Ohno M.
“Crt10 directs the cullin-E3 ligase Rtt101 to nonfunctional 25S rRNA decay”
EMBO conference on Ribosome Synthesis 2015.8.19-8.23 Brussels (Belgium)
3. Kitabatake M.
“Quality Control of Eukaryotic Ribosomes”
Tokyo RNA Club, 2016年1月14日 東京大学武田ホール(東京)
4. Kitabatake, M., Sakata, T., and Ohno M.

“ Selective ubiquitination and degradation of defective 60S particles ”
RNA2016 satellite-symposium 'Nascent biology and ribosome function 2016. 6. 27
芝蘭会館 (京都市)

5. Kitabatake M., Sakata T., and Ohno M.
“ A bridge that links an E3 ubiquitin ligase complex and nonfunctional 60S ribosomal particles ”
RNA society meeting, 2016 年 6 月 28 日-7 月 2 日 京都国際会議場 (京都市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

北畠 真 (KITABATAKE, Makoto)
京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・助教
研究者番号 10321754