

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月17日現在

機関番号：11301

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2008～2012

課題番号：20112006

研究課題名（和文）遺伝子発現の正確性を保証するmRNA品質管理機構

研究課題名（英文）mRNA surveillance system to ensure the fidelity of gene expression

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

研究成果の概要（和文）：生命現象の基盤となる遺伝子発現の正確性は、様々な品質管理機構によって保証される。異常 mRNA の品質はリボソームにより感知され、異常な翻訳終結が引き金となって分解が促進される。本研究では、①異常翻訳の認識と解消機構、②異常 mRNA と異常タンパク質の迅速な分解機構が明らかになり、品質管理機構の全体像の解明に貢献した。

研究成果の概要（英文）：

Cells have mRNA surveillance systems to recognize aberrant translation elongation and termination, and eliminate aberrant mRNAs. We have identified the novel factors to recognize and eliminate aberrant translation. We have demonstrated that rapid proteasomal degradation of aberrant proteins derived from aberrant mRNAs plays an important role in preventing the expression of abnormal proteins as well as rapid mRNA decay.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	21,800,000	6,540,000	28,340,000
2009年度	17,000,000	5,100,000	22,100,000
2010年度	20,900,000	6,270,000	27,170,000
2011年度	25,500,000	7,650,000	33,150,000
2012年度	25,500,000	7,650,000	33,150,000
総計	110,700,000	33,210,000	143,910,000

研究分野：多様性と非対称性を獲得する RNA プログラム (RNA 制御学)

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、翻訳アレスト、新生ポリペプチド鎖、mRNA 分子内切断、ユビキチン化、プロテアソーム、リボソーム、リボソーム解離因子

1. 研究開始当初の背景

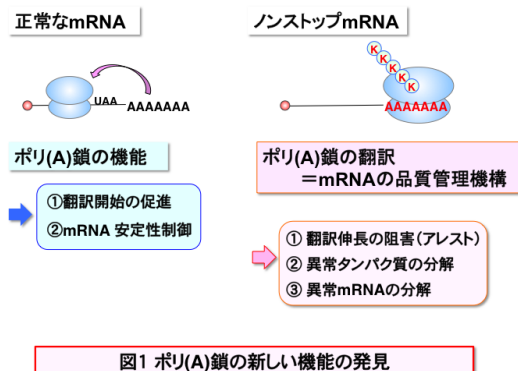
生命現象の基盤である遺伝子発現の正確性は、様々な品質保証機構により保証される。多様性獲得の過程で合成される異常 mRNA は、異常な翻訳が引き金となって分解が促進される。研究代表者は、[特定領域研究 (RNA 情報網) 計画分担、H14-18；JST さきがけ、H17.10-21.3] において、終止コドンを持たな

いノンストップ mRNA の品質保証機構を解析した。その結果、通常翻訳されないポリ(A)鎖がノンストップ mRNA では翻訳され、①翻訳伸張阻害 (アレスト) と②プロテアソームによる異常タンパク質分解、がおこることを明らかにし、真核生物の mRNA の普遍的な修飾であるポリ(A)鎖の全く新しい役割を見いだした (EMBO J., 2005; Genes&Dev., 2007)。

また研究代表者は、遺伝病の主要な原因変異であるナンセンス変異を持つ mRNA 由来の異常タンパク質の発現について解析し、NMD (ナンセンス変異依存 mRNA 分解系) に必須な Upf 複合体が、異常タンパク質のプロテアソームによる分解を促進することを見いだした。これは、「異常タンパク質の分解促進」という Upf 複合体の全く新しい役割を示すとともに、翻訳に共役した異常タンパク質分解が品質保証機構の普遍的な分子機構であることを示唆する。

2. 研究の目的

研究代表者は、真核生物の mRNA の普遍的な修飾であるポリ(A)鎖の全く新しい役割を見いだした (図1)。本研究課題では、遺伝子発現の品質保証プログラムの全体像を理解することを目的として、1) 翻訳異常の認識機構、2) 異常タンパク質の分解機構、について解析する。本研究により、「非対称性」と「多様性」の獲得機構を支える「品質保証」システムの分子基盤である **RNA プログラム** の解明を目指す。



3. 研究の方法

(1) 翻訳異常の認識機構

①連続した塩基性アミノ酸配列による翻訳アレストの分子機構：連続した塩基性アミノ酸配列による翻訳伸長阻害(アレスト)について、リボソームトンネルと新生ポリペプチド鎖との静電的相互作用により翻訳アレストが起こる可能性を、リボソーム変異体の分離等により検証を行う。さらに翻訳アレストに伴う mRNA の分子内切断を担う新規因子の同定を行う。

②ノンストップ mRNA 品質管理機構(NSD)における Dom34/Hbs1 複合体の機能：ノンストップ mRNA の迅速な分解(NSD)には、ノンストップ mRNA の 3'末端で停滞したリボソームが mRNA から解離することが必須であるが、その分子機構は不明である。研究代表者

は、リボソームが mRNA の末端で停滞した場合に、翻訳終結因 eRF1/eRF3 複合体と相同性を示す Dom34/Hbs1 複合体がリボソームの A サイトに結合し、リボソームを解離させる可能性について検証をおこなった。

(2) 異常タンパク質の分解機構

①翻訳アレストに伴う新生ポリペプチド鎖分解機構：研究代表者は、連続したリジン残基による翻訳伸長阻害に伴い、新生ポリペプチド鎖が分解されることを見いだした。新生ポリペプチド鎖はプロテアソームによって分解されるため、ユビキチン化の E3 酵素の候補である Not4p の役割を解析する。

②異常 mRNA 由来の短鎖型タンパク質の分解促進機構：ナンセンス変異 mRNA 由来異常タンパク質：プロテアソームによる短鎖型異常タンパク質の分解を、Upf 複合体が促進する分子機構について解析を行う。

4. 研究成果

生命現象の基盤となる遺伝子発現の正確性は、細胞の保持する様々な品質管理機構によって保証される。mRNA プロセッシング過程でのエラーによって合成された異常 mRNA は、特異的な品質管理機構によって認識され排除される。研究代表者は、異常 mRNA 由来のタンパク質の発現を抑制する品質管理機構の全体像を明らかにする目的で研究を行い、mRNA の分解促進に加えて、翻訳抑制と異常タンパク質の分解が異常 mRNA 由来の遺伝子産物の発現抑制に重要であることを世界に先駆けて明らかにしてきた。以下は、本研究課題の研究成果の概要である。

【1】翻訳異常の認識機構：

(1) 連続した塩基性アミノ酸配列による翻訳アレストの分子機構：ノンストップ mRNA は細胞内の主要な異常 mRNA であり、ORF 内でのポリ(A)鎖付加によって合成される。研究代表者は、ノンストップ mRNA の翻訳抑制と異常タンパク質分解機構を解析し、真核生物の mRNA の普遍的な修飾であるポリ(A)鎖の全く新しい機能を見いだした。ポリ(A)鎖は正常な mRNA では翻訳されないが、ノンストップ mRNA では翻訳される結果、1)ポリ(A)鎖にコードされるポリリジン残基とリボソームとの相互作用による訳伸長反応の一時停止(翻訳アレスト)と、2)プロテアソームによる異常タンパク質の速やかな分解、が起こることを見いだした。また、連続した塩基性アミノ酸配列により翻訳アレストが引き起こされ、新生ポリペプチド鎖

がプロテアソームにより迅速に分解されることを示した (*J. Biol. Chem.*, 2009; *Genes Cells*, 2009)。また、このアレストに必須な因子として、RACK1 を同定し、RACK1 の 40S リボソームへの結合が翻訳アレストに重要性であることを示した(*EMBO Rep.*, 2010)。

(2) ノンストップ mRNA 品質管理機構 (NSD)における Dom34/Hbs1 複合体の機能：ノンストップ mRNA の迅速な分解(NSD)には、ノンストップ mRNA の 3'末端で停滞したリボソームが mRNA から解離することが必須であるが、その分子機構は不明であった。研究代表者は、リボソームが mRNA の末端で停滞した場合に、翻訳終結因子 eRF1/eRF3 複合体と相同性を示す Dom34/Hbs1 複合体が A サイトに結合し、リボソームを解離させる事を明らかにした。 (*PNAS*, 2010; *Mol. Cell*, 2012)。さらに、Dom34/Hbs1 複合体がノンストップ mRNA の迅速な分解に必須であることを証明した (図 2 : *Mol. Cell*, 2012)。

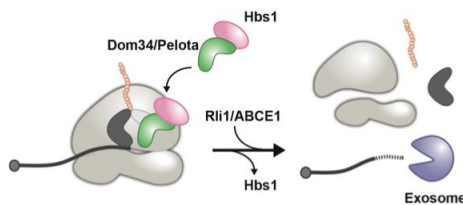


図2 Dom34:Hbs1は、ノンストップmRNAの3'末端で停滞したリボソームを解消し、エキソソームによる分解を促進する

【2】異常タンパク質の分解機構

(1) 翻訳アレストに伴う新生ポリペプチド鎖分解機構：連続した塩基性アミノ酸配列による翻訳伸長阻害に伴い、新生ポリペプチド鎖が分解されることを見いだした(*J. Biol. Chem.*, 2009)。この新生ポリペプチド鎖の分解には、リボソームと相互作用する E3 ユビキチンライゲース Not4 が関与する。この異常タンパク質の分解は品質管理機構として重要であるのみならず、翻訳に共役した新生ポリペプチド鎖のユビキチン化という点でも新しい分子機構であり、世界的にも独自の系である。この分解系には、もう1つの E3 ユビキチンライゲース Ltn1 が作用する (*Nature*, 2010)。Ltn1 と Not4 の2つの E3 ユビキチンライゲースの基質認識を含め、翻訳アレストに伴う新生ポリペプチド鎖分解の分子機構の解明が今後の課題である。【1】翻訳異常の認識機構の研究成果と総合して、本研究課題により明らかとなったノンストップ

ップ mRNA 品質管理機構の全体像を図 3 に

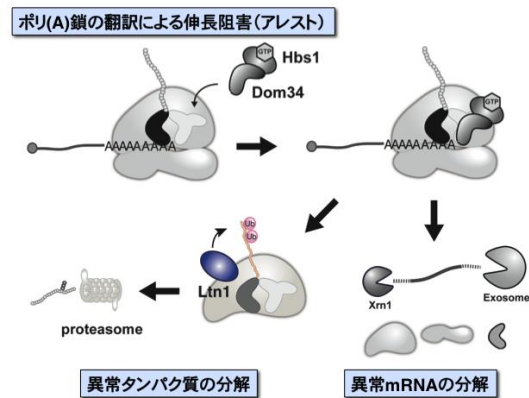


図3 終止コドンを持たないmRNAの新たな品質管理機構

示す。

(2) 異常 mRNA 由来の短鎖型タンパク質の分解促進機構：Upf1/2/3 複合体は、未成熟終止コドン(PTC)を持つ異常 mRNA の分解促進に必須である。研究代表者は、Upf1/2/3 複合体が PTC を持つ異常 mRNA 由来の短鎖型タンパク質のプロテアソームによる分解を促進することを見いだした(*EMBO Rep.*, 2009)。この結果により、「異常タンパク質の分解促進」という Upf 複合体の全く新しい機能が明らかとなった (図 4)。

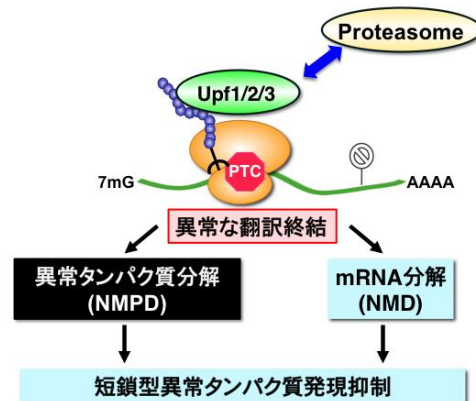


図4 異常mRNA由来の短鎖型タンパク質の発現抑制機構

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 2 件)

①Brandman, O., Ornstein, JS., Wong, D., Larson, A., Williams, C.C, Li, G.W., Zhou, S., King, D., Shen, P.S, Weibezahn, J., Dunn, J.G, Rouskin, S., Inada, T., Frost, A., Weissman, JS. A

ribosome-bound quality control complex triggers nascent peptides and signals translation stress. *Cell* **151**, 1042-1054 (2012) 査読あり
doi: 10.1016/j.cell.2012.10.044.

② Tsuboi, T., Kuroha, K., Kudo, K., Makino S., Inoue, E., Kashima, I. and *Inada, T. Dom34:Hbs1 Plays a General Role in Quality Control Systems by Dissociation of Stalled Ribosome at 3' End of Aberrant mRNA. *Mol. Cell* **26**, 518-529 (2012) 査読あり
doi: 10.1016/j.molcel.2012.03.013.

③ Izawa, T. Tsuboi, T. Kuroha, K. Inada, T. Nishikawa, SI. Endo, T. Roles of Dom34:Hbs1 in Nonstop Protein Clearance from Translocators for Normal Organelle Protein Influx. *Cell Rep.* **2**, 447-453 (2012) 査読あり
doi: 10.1016/j.celrep.2012.08.010.

④ Kuroha, K., Akamatsu, M., Dimitrova, L., Ito, T., Kato, Y. Shirahige, K. and *Inada, T. RACK1 stimulates nascent polypeptide-dependent translation arrest. *EMBO Rep.* **11**, 956-961 (2010) 査読あり
doi: 10.1038/embor.2010.169.

⑤ Mori T, Ogasawara C, Inada, T. Englert M, Beier H, Takezawa M, Endo T, Yoshihisa T. Dual functions of yeast tRNA ligase in the unfolded protein response: unconventional cytoplasmic splicing of HAC1 pre-mRNA is not sufficient to release translational attenuation. *Mol Biol Cell.* **21**, 3722-3734 (2010) 査読あり
doi: 10.1091/mbc.E10-08-0693.

⑥ Kobayashi, K. Kikuno, I. Kuroha, K. Saito, K. Ito, K. Ishitani, R. Inada, T. and Nureki, O. Structural Basis for mRNA Surveillance by Archaeal Pelota and GTP-bound EF1 α Complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 17575-17579 (2010) 査読あり
doi: 10.1073/pnas.1009598107.

⑦ Tsuboi, T. and *Inada, T. Tethering of poly(A) binding protein interferes with non-translated mRNA decay from 5' end in yeast. *J. Biol. Chem.* **285**, 33589-33601 (2010) 査読あり
doi: 10.1074/jbc.M110.117150.

⑧ Kuroha, K., Tatematsu, T. and *Inada, T. Upf1p stimulates proteasome-mediated degradation of the product derived from the specific nonsense-containing mRNA. *EMBO Rep.* **10**, 1265-1271 (2009) 査読あり
doi: 10.1038/embor.2009.200.

⑨ Dimitrova, L., Kuroha, K., Tatematsu, T. and *Inada, T. Nascent peptide-dependent translation arrest leads to not4p-mediated protein degradation by the proteasome. *J. Biol. Chem.* **284**, 10343-10352 (2009) 査読あり
doi: 10.1074/jbc.M808840200.

⑩ Endo, A., Matsumoto, M., Inada, T., Yamamoto, A., Nakayama, K.I., Kitamura, N. and Komada, M. Nucleolar structure and function regulated by a deubiquitinating enzyme USP36. *J. Cell Sci.* **122**, 678-685 (2009) 査読あり
doi: 10.1242/jcs.044461.

⑪ Kuroha, K., Horiguchi, N., Aiba, H. and *Inada, T. Analysis of nonstop mRNA translation in the absence of tmRNA in *E.coli*. *Genes Cells* **14**, 739-749 (2009) 査読あり
doi: 10.1111/j.1365-2443.2009.01304.

⑫ Nukazuka, A., Fujisawa, H., Inada, T., Oda, Y., Takagi, S. Semaphorin controls epidermal morphogenesis by stimulating mRNA translation via eIF2 α in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.* **22**, 1025-1036 (2008) 査読あり
doi: 10.1101/gad.1644008.

[学会発表] (計40件)

① 稲田利文 Novel roles of Dom34:Hbs1 and RACK1 in mRNA quality control systems. 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月11-14日、神戸ポートアイランド、神戸

② Inada, T. Protein quality control systems coupled with No-Go and Non-Stop mRNA surveillance in yeast. EMBO meeting on 'Quality control' 2012.9.19-22. EMBL, Heidelberg, Germany.

③ Inada, T. Dom34:Hbs1 Plays a General Role in Quality Control Systems by Dissociation of a Stalled Ribosome at the 3' End of Aberrant mRNA. "Protein synthesis and translational control" 2012.9.4-8. Cold Spring Harbor, New York, USA.

④ Inada, T. Quality control of mRNA and protein in eukaryotes. The 22nd CDB meeting on "RNA Sciences in Cell and Developmental Biology II" 2012. 6. 11-13. Kobe, Japan.

⑤ Inada, T. Stalled ribosomes induce mRNA and protein quality control systems. Jacques Monod conferences 25th anniversary, 2012.6.2-6. Roscoff, France

〔図書〕（計5件）

①稲田利文（2012）「RNA 品質管理機構における停滞リボソーム解離複合体の普遍的機能」**生化学** 84:790-793、日本生化学学会

②稲田利文（2011）「RNA 品質管理機構とあらたな遺伝子疾患治療薬の開発」**医学のあゆみ『RNA 医学・医療-あらたな診断・治療を拓く』** 238:413-417. 医歯薬出版株式会社

③稲田利文、大野睦人編(2009)**蛋白質核酸酵素増刊号『mRNA プログラム-多様性と非対称性の獲得戦略-』**54, 2013-2252. 共立出版

④稲田利文（2008）「転写後制御を標的とした遺伝子疾患治療—異常 mRNA から正常なタンパク質を合成させる低分子化合物」**実験医学増刊『RNA の機能解明と医療応用』** 26: 1644-1649. 羊土社

⑤稲田利文（2008）「mRNA の動態とプロテオソーム」**実験医学増刊『タンパク質の分解機構』** 26: 237-241. 羊土社

〔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：