

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20947

研究課題名(和文) non-stop mRNAの品質管理機構およびその生理的意義の解明

研究課題名(英文) Analyses of a mechanism and physiological significance of NSD.

研究代表者

橋本 芳史 (Hashimoto, Yoshifumi)

東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号：80734540

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)：Nonstop mRNA decay (NSD)は終止コドンを持たない異常なmRNAを速やかに分解する機構である。本研究は、高等真核生物におけるNSD分子機構の全容解明と共に、NSDの内在性標的mRNAの解明を目的とし研究を行った。

本研究の成果として、高等真核生物におけるNSD分子機構において重要な因子を明らかにした。さらにNSDの標的となるmRNAとして他のmRNA分解機構で生じる分解中間産物を同定した。この成果はNSDが他のmRNA分解機構で生成するmRNA中間産物を分解するために必要な、普遍的なmRNA分解機構であることを示している。

研究成果の概要(英文)：Nonstop mRNA decay (NSD) is a mechanism that immediately degrades aberrant mRNAs lacking stop codon. In this study, we attempted to reveal a mechanism of NSD in higher eukaryote and endogenous targets of NSD.

As a result, we revealed pivotal factors of NSD in higher eukaryote. Furthermore, we identified mRNA intermediates produced in other mRNA degrading mechanisms as endogenous NSD targets. These results indicate that NSD is generally required to eliminate mRNA intermediates produced in other mRNA degrading mechanisms.

研究分野：分子生物学

キーワード：NSD NMD RNAi

1. 研究開始当初の背景

真核生物には異常な mRNA を速やかに分解する mRNA の品質管理機構が存在し、異常な mRNA 由来のタンパク質の産生を抑制している。このような異常な mRNA の品質管理機構として急速に研究が進んでいるのが「終止コドンを持たない non-stop mRNA」の品質管理機構 (NSD = nonstop mRNA decay) である。該当分野は酵母中心に精力的に進められ、酵母において NSD の分子機構モデルが提唱されている。しかし、高等真核生物における NSD の研究はほとんどなされておらず、酵母における分子機構モデルがどの程度保存されているか不明である。特に、酵母 NSD において中心的な役割を果たすと報告されている因子の高等真核生物におけるホモログが存在しないことから、真核生物の NSD は酵母の NSD と異なる点を有すると考えるのが自然である。次に NSD 研究の課題として、NSD の研究は人工レポーターを用いて進められており、内在における NSD の標的 mRNA としては mRNA の ORF 中での分子内切断やプライミングエラーによる ORF 中へのポリ A 鎖付加などが考えられているものの、内在における NSD の標的 RNA の全体像が明確に示されていないことが挙げられる。

2. 研究の目的

本研究では NSD 研究の明らかな課題である「高等真核生物における NSD 分子機構解明」と「NSD の内在性標的 RNA の全体像の解明」を目的とし検討を行う。また、NSD 機構の全容解明および、NSD の内在性標的 RNA を同定することで NSD の生理的意義の解明を目的とする。

3. 研究の方法

当研究質では高等真核生物のモデルとして「ショウジョウバエ細胞における NSD の品質管理機構」の解析系を確立しており、この系を用いた dsRNA を用いたノックダウンを行

うことで NSD 関連因子の機能を解析する。また、酵母 NSD ではリボソーム解離因子が重要な役割を果たしていることから、ショ糖密度勾配遠心法によりポリソームを分画することで、NSD 標的 mRNA とリボソームの結合状態を解析する。

4. 研究成果

本研究の成果として「NSD の分子機構解明」に関し、ショウジョウバエ細胞を用いて詳細な分子機構を明らかにした。まず、酵母と共通する点として、NSD 分子機構を特徴づける因子であるリボソーム解離因子 Pelota / Hbs1 の関与を明らかにした。また他のリボソーム解離因子である ABCE1 も Pelota / Hbs1 と同等に関与していることを明らかにした。興味深いことに、これらの因子を単独でノックダウンしても NSD への影響はほとんど観察することが出来ないが、3つの因子の内2つを同時にノックダウンすると NSD が効率的に阻害される。さらに Pelota/Hbs1/ABCE1 をノックダウンし NSD が抑制されている条件において nonstop mRNA は高度にリボソームが結合した状態で維持されていることを明らかにした。このことは Pelota/Hbs1/ABCE1 が実際に nonstop mRNA からのリボソームの解離に重要な役割を果たしており、リボソームの解離が抑制されることで nonstop mRNA の分解 (NSD) が抑制されていることを示している。本研究では Pelota/Hbs1/ABCE1 の他に 5'側からの mRNA 分解を担う Ski 複合体が nonstop mRNA の分解に重要な役割を果たしていることも明らかにした。このこととは逆に、酵母と異なる点として NSD の標的 mRNA を分解する際に 3'側からの分解が観察されないことを明らかにした。つまり高等真核生物における NSD では 5'側からのみ mRNA が分解されており Pelota / Hbs1/ABCE1 によるリボソームの解離が NSD のトリガーとしてより重要になってい

ることを意味している。さらに Pelota/Hbs1/ABCE1 と Ski 複合体の因子を同時にノックダウンした際 NSD がほぼ完全に破綻することを見いだした。このことは Pelota/Hbs1/ABCE1 および Ski 複合体の重要性をさらに裏付けている。

ついで、「NSD の内在性標的 mRNA、およびその生理的意義の解明」に関し、NSD の内在性標的 mRNA として、ナンセンス変異を持つ mRNA を分解する機構(nonsense mRNA decay (NMD))と siRNA による mRNA の切断により生成する 5'側の mRNA 断片を同定した。重要なことに NMD ではナンセンス変異となる終止コドンの前後で切断が起きることが報告されているが、Pelota/Hbs1/ABCE1 のノックダウン条件化では終止コドンより上流の末端を持つ mRNA 断片(=nonstop mRNA)だけが分解されずに蓄積する。

最後に NSD の生理的意義として、NSD は NMD や RNAi と共役して、分解中間産物を素早く、完全に分解するために必要であることが明らかになった。本研究では mRNA の切断をトリガーとし mRNA を急速に分解する機構の代表として NMD と RNAi を検討したが、NSD は切断を受けた mRNA の分解に広く関与するものと予想される。つまり NSD は切断を伴う mRNA の分解に広く関わる非常に普遍的な mRNA 分解機構であると考えられる。

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)

Yoshifumi Hashimoto, Masaki Takahashi, Eri Sakota, Yoshikazu Nakamura

Nonstop-mRNA decay machinery is involved in the clearance of mRNA 5'-fragments produced by RNAi and NMD

in *Drosophila melanogaster* cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, [査読あり]. 484(1):1-7 (2017)

DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.01.092

Yoshifumi Hashimoto, Hiroto Inagaki, Shin-ichi Hoshino

Calpain mediates processing of the translation termination factor eRF3 into the IAP-binding isoform p-eRF3. *FEBS Letters*, [査読あり], 589: 2241-2247 (2015)

DOI: 10.1016/j.febslet.2015.06.041

[学会発表](計 4 件)

Yoshifumi Hashimoto, Masaki Takahashi, Eri Sakota, Yoshikazu Nakamura

「Nonstop mRNA decay machinery is crucial for the clearance of 5'-mRNA products generated by siRNA and NMD cleavage」 『RNA2016』, Kyoto, Japan, (June 28 – July 2, 2016)

Masaki Takahashi, Yoshifumi Hashimoto, Eri Sakota, Yoshikazu Nakamura

「Development of an efficient Cell-SELEX to generate RNA aptamers against a cell surface protein of interest」, 『The Oligonucleotide Therapeutics Society 11th Annual Meeting』, Stadspodia, Leiden, Netherlands, (Oct 11 – 14, 2016)

Yoshifumi Hashimoto, Masaki Takahashi, Eri Sakota, Yoshikazu Nakamura

「The fate of naturally truncated nonstop mRNA in *Drosophila* cells」, 『第 17 回日本 RNA 学会年会』, 札幌, 15-17, July, 2015

Yoshifumi Hashimoto, Masaki
Takahashi, Eri Sakota, Yoshikazu
Nakamura

「The fate of naturally truncated nonstop
mRNA in *Drosophila* cells」、『第15回東京
大学生命科学シンポジウム』、東京、2015年
6月27日

〔その他〕

ホームページ等

東京大学医科学研究所 RNA 医科学社会連携
研究部門ホームページ

[http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/rnaikagaku/t
op.html](http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/rnaikagaku/top.html)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

橋本 芳史(HASHIMOTO Yoshifumi) 東京
大学医科学研究所・特任研究員
研究者番号：80734540