

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18486

研究課題名(和文) 出芽酵母における翻訳停滞に起因する品質管理機構の解明

研究課題名(英文) Mechanistic insight into the ribosome quality control

研究代表者

松尾 芳隆 (Matsuo, Yoshitaka)

東北大学・薬学研究科・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)：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、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。新生ペプチド鎖の分解機構であるRQC機構は、E3ユビキチンライゲースであるRqt1に依存しており、リボソームタンパク質であるS20の特異的ユビキチン化によって誘導される。本課題では、ユビキチン結合タンパク質を含む新規複合体(RQT複合体)の機能解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Co-translational quality control system monitors mRNA translation and immediately eliminates aberrant mRNA and partially synthesized nascent peptides 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. Indeed, 12 polybasic amino acids coding segment such as poly-lysine and poly-arginine are efficient to induce ribosome stalling and subsequent proteasome mediated degradation of partially synthesized nascent peptide, which is called RQC: Ribosome Quality Control. E3 ubiquitin ligase Rqt1 ubiquitinates ribosomal protein S20 to induce RQC pathway, and we further have identified novel novel three factors (I named Rqt2, 3, 4, respectively) are enriched in the Rqt1-ribosome complex. Thus, we have analyzed the function of them in this project.

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 の品質管理機構の研究は、当初、異常な 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発動す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。

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。近年、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ている。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。

実際に、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し、翻訳中の mRNA の分子内切断(NGD; No Go Decay)とそれ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)が誘導される。RQCによる新生ペプチド鎖の分解は、プロテアソームと E3 ユビキチンライゲースである Ltn1 に依存しており、Cryo 電子顕微鏡による構造解析では、Ltn1 が通常では形成され得ないペプチジル tRNA を含む 60S サブユニットと特異的に結合することが観察されている。このことは、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ことを示しているが、その機構についてはあまり解析が進んでいなかった(図 1)。

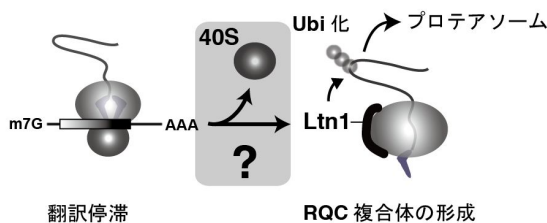


図 1 翻訳停滞に起因する新生ペプチド鎖の品質管理機構

研究代表者は、本研究課題を始めるにあたって、この終止コドン非依存的なリボソームの乖離反応に関与する可能性を示す新たな因子群(RQT: Ribosome quality control Trigger factors)を見いだしており、その機能解析を進めていた。

## 2. 研究の目的

翻訳停滞に起因する品質管理機構は、先にも述べたが、mRNA 上で停滞したリボソームがサブユニットへと乖離することで誘導される。途中まで合成された新生ペプチド鎖は乖離した 60S サブユニット上に保持され、E3 ユビキチンリガーゼ Ltn1 によってユビキチン化後、プロテアソームによって分解される。つまり、停滞したリボソームを認識し、終止コドン非依存的に乖離させる過程は、一連の反応を誘導するか否かを決定する重要なステップであるわけだが、その分子機構については未だ不明な点が多い。

また、同品質管理機構の標的因子の同定は、迅速に分解されるという特性上非常に困難を極めており、現在でも全く報告例がない。そのため、人工的に設計したアレスト配列をレポーター遺伝子中に配置させ、その挙動を観察する解析が主流であり、分子メカニズムの解明に比べて、その生理的意義はほとんどわかっていない。

そこで本研究では、停滞したリボソームの認識・乖離機構を明らかにすることを目的とし解析を始めた。

## 3. 研究の方法

本研究では、2.研究の目的の達成のため、出芽酵母を材料に以下の項目を行った。

Rqt1 による S20 のユビキチン化が RQT 複合体をリクルートする可能性の検証。

RQT 因子の欠損下における翻訳停滞したリボソームの観察。

Cryo 電子顕微鏡による Rqt1-リボソームの構造解析

## 4. 研究成果

本研究課題に先駆けて、新たに見いだした 4 種の RQT 因子の解析を既に開始しており、研究開始時には、以下の結果から図 2 のモデルを予想していた。

E3 ユビキチンリガーゼである Rqt1 によるリボソームタンパク質 S20 のユビキチン化がリボソームの乖離に必須である。

リボソームの乖離に関する 3 種類の新規 RQT 因子(Rqt2;RNA ヘリカーゼ, Rqt3; ユビキチン結合タンパク質, Rqt4; zinc-finger タンパク質)は 3 者複合体(RQT 複合体)を形成し、Rqt2 の ATP 加水分解能と Rqt3 のユビキチン結合能がリボソームの乖離に必須である。

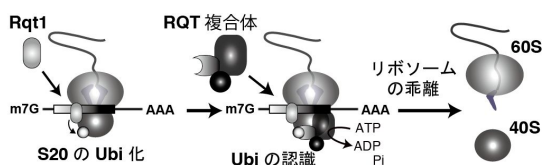


図 2 RQT 複合体による停滞したリボソームの乖離モデル

Rqt1 による S20 のユビキチン化が RQT 複合体をリクルートする可能性の検証。

Rqt1 を Bait に用いた免疫沈降では、Rqt1 とリボソームの複合体中に Rqt2, Rqt3, Rqt4 がリクルートされることが確認されていた。そこでまず、Rqt1 による S20 のユビキチン化が RQT 複合体をリクルートする可能性を調べた。ユビキチン化されない S20 の変異体を用いて、Rqt1 の免疫沈降を行ったところ、RQT 複合体のリクルートに S20 のユビキチン化が必須ではないことが明らかになった。しかし、Rqt3 のユビキチン化結合能がリボソームの乖離に必須であることから、S20 のユビキチン化が Rqt2 を活性化する可能性が高いことが示唆された。

RQT 因子の欠損下における翻訳停滞したリボソームの観察。

RQT 複合体がリボソームの乖離を直接誘導する可能性を調べるために、停滞したリボソームの特異的な精製を行った。その結果、*rqt2*, *rqt3*, *rqt4* のいずれの欠損下でも、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、RQT 複合体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。

Cryo 電子顕微鏡による Rqt1-リボソームの構造解析

Rqt1 とリボソームの構造解析の結果、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(図 3)。このことは、

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。しかし、残念ながら今回の解析では、Rqt1 の可視化は達成できなかった。

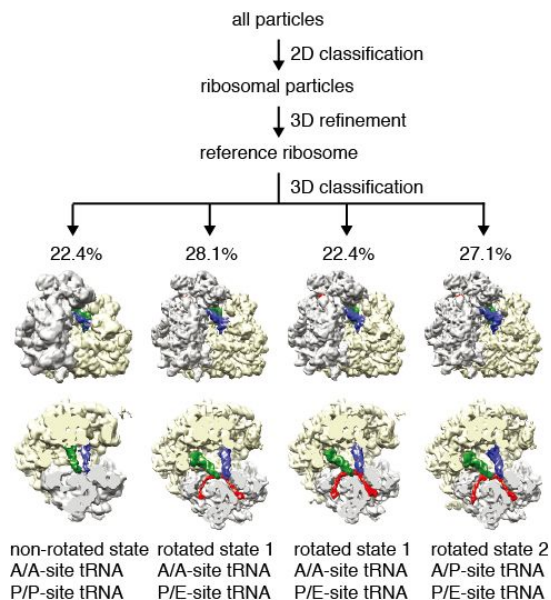


図 3 Rqt1 とリボソームの構造解析

## 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)

Matsuo Y, Ikeuchi K, Saeki Y, Iwasaki S, Schmidt C, Udagawa T, Sato F, Tsuchiya H, Becker T, Tanaka K, Ingolia NT, Beckmann R & Inada T. Ubiquitination of stalled ribosome triggers ribosome-associated quality control. **Nat Commun** (2017). 8. 159. 査読有り

[学会発表](計 5 件)

Matsuo Y, Ikeuchi K, Saeki Y, Iwasaki S, Schmidt C, Udagawa T, Sato F, Tsuchiya H, Becker T, Tanaka K, Ingolia NT, Beckmann R, Inada T. Ubiquitination of stalled ribosome triggers ribosome-associated quality control. 第19回日本RNA学会年会 2017.7.19-21 富山国際会議場

Yoshitaka Matsuo, Ken Ikeuchi,  
Yasushi Saeki, Christian Schmidt,  
Thomas Becker, Keiji Tanaka, Roland  
Beckmann and Toshifumi Inada.  
Mechanistic insight into recognition  
and dissociation of stalled ribosome to  
induce ribosome associated quality  
control system. 生化学会  
2016.9.25-27 仙台国際センター

Yoshitaka Matsuo, Ken Ikeuchi,  
Yasushi Saeki, Christian Schmidt,  
Thomas Becker, Keiji Tanaka, Roland  
Beckmann and Toshifumi Inada.  
Mechanistic insight into recognition  
and dissociation of stalled ribosome to  
induce ribosome associated quality  
control system. Ribosome meeting.  
2016.9.17-18 大阪医科大学 看護学部  
講堂

Yoshitaka Matsuo, Toshifumi Inada.  
Crucial roles of ribosome  
ubiquitination in quality controls and  
stress response. 14th international  
congress on Yeast (国際会議).  
2016.9.11-15. Awaji Yumebutai

Yoshitaka Matsuo, Yasushi Saeki,  
Keiji Tanaka and Toshifumi Inada.  
Identification of novel factors  
involved in the primary step to induce  
ribosome-associated quality control  
system. The 21st Annual Meeting of  
the RNA Society (RNA 2016) (国際会  
議) 2016.6.28-2. Kyoto international  
conference center.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 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 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 (Matsuo, 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：

(4)研究協力者 ( )