

令和 4 年 4 月 14 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06481

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誘導メカニズムの解明

研究課題名(英文) The mechanistic insight into the ribosome splitting event to initiate the RQC pathway

研究代表者

松尾 芳隆 (Matsuo, Yoshitaka)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：00725252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、異常な翻訳停滞を識別する分子機構、ならびにその後の終止コドン非依存型サブユニット解離機構の解明を目指して研究を進めてきた。その結果、翻訳停滞からユビキチン化を介したサブユニット解離までの多段階反応を試験管内で再現することに成功した。得られた結果では、翻訳停滞によって衝突したリボソーム特異的にuS10のユビキチン化が観察され、さらに、ユビキチン化されたTrisome 構造体(3つのリボソームからなる構造体)が、RQT複合体の作用によって特異的にサブユニット解離することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質の合成途中のエラーによる翻訳停止はタンパク質の機能の重大な欠陥を引き起こし、タンパク質の恒常性の破綻につながります。タンパク質の恒常性の破綻は、更に不良なタンパク質の蓄積やオルガネラの損傷、シグナル伝達経路の攪乱など、広範な細胞機能の障害を引き起こすため、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患の原因になると考えられています。本研究では、細胞の持つ品質管理の仕組みを分子レベルで解明しました。本成果は、神経変性疾患の原因となる異常タンパク質の合成を効率的に抑制する治療薬の開発に貢献する事が期待されます。

研究成果の概要(英文)：Ribosome-associated quality control (RQC) represents a rescue pathway in eukaryotic cells triggered upon translational stalling. However, the mechanism underlying the ubiquitin-dependent ribosome dissociation remain poorly understood. In the project, we established the in vitro system, which enabled the reconstitution of Hel2-dependent poly-ubiquitination of collided tri-ribosomes. This system showed that the collided ribosome were efficiently recognized by Hel2 and ubiquitinated. Subsequently, the Slh1 helicase subunit of the RQC trigger (RQT) complex preferentially dissociates the first stalled poly-ubiquitinated ribosome in an ATP-dependent manner. Together, these findings provide fundamental mechanistic insights into RQC and its physiological role in maintaining cellular protein homeostasis.

研究分野：生化学・分子生物学

キーワード：リボソーム ユビキチン化 品質管理

1. 研究開始当初の背景

翻訳停滞に起因する品質管理機構は、翻訳伸長の停滞を異常と認識し、その産物を分解する機構である。翻訳停滞とは、翻訳の伸長速度が著しく低下した状態をさし、連続したレアコドンや、合成された新生ペプチド鎖中の塩基性アミノ酸とリボソームトンネル内の強い相互作用などによって生じる。この状況下では、一定の割合で翻訳の強制終了を意味するリボソームのサブユニット解離が起こり、途中まで合成されたペプチド鎖は解離後の 60S サブユニット上に保持される。保持された新生ペプチド鎖は、E3 ユビキチンリガーゼである Ltn1 によってユビキチン化され、プロテアソームによって分解される (図 1)。この品質管理機構の誘導には、E3 ユビキチンリガーゼである Hel2/Rqt1 (Ribosome Quality control Trigger factor 1) によるリボソームタンパク質 uS10 のユビキチン化が必須である (図 1)。新生ペプチド鎖をユビキチン化し分解へと導く Ltn1 の欠損下では、正常に翻訳を終結した全長タンパク質と、途中で合成が終了した短鎖型タンパク質が観察されるが、そこに Hel2/Rqt1 の欠損や uS10 のユビキチン化部位への変異を加えると、短鎖型タンパク質の消失と全長タンパク質の増加が観察される。つまり、細胞はサブユニット解離させるべきリボソームにユビキチン化という目印を付け、積極的に翻訳を強制終了させていることが推測できる (図 1)。一方で、翻訳の伸長速度は、mRNA の安定性や新生ペプチド鎖の折りたたみとも密接に関わっており、翻訳伸長速度の低下が必ずしも異常な翻訳というわけではない。また、同一の mRNA を翻訳するリボソームも全てがサブユニット解離を起こしているわけではないことから、解離させるべきリボソームを厳密に識別する機構が存在するはずであるが、その分子機構は未解明のままであった (図 1)。

通常の翻訳終結は、終止コドンに依存しており、新生ペプチド鎖が遊離したのちにサブユニットの解離が起こる。一方で品質管理機構を誘導するリボソームのサブユニット解離は、ORF 中で起こる現象であり、終止コドンには依存しない。さらに、新生ペプチド鎖の分解のためにはペプチジル tRNA が解離した 60S サブユニット上に保持される必要があるため、通常の翻訳終結とは異なる分子機構が存在するはずであるが、その機構は全く明らかにされていなかった (図 1)。

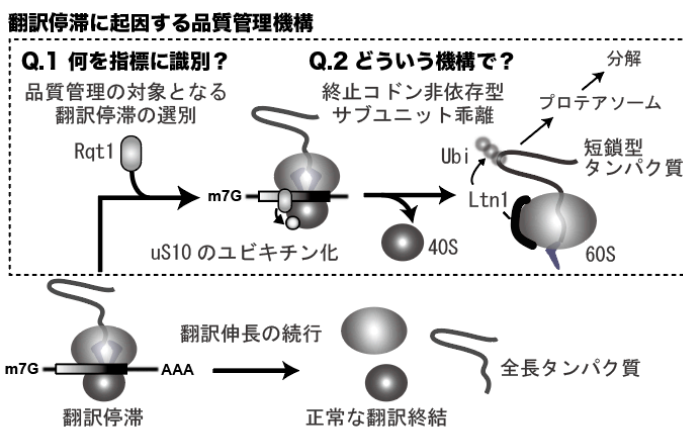


図 1 翻訳停滞に起因する品質管理機構

2. 研究の目的

本研究では、ORF 中で翻訳停滞したリボソームを品質管理機構の対象として識別する機構、およびそれに続く終止コドン非依存のサブユニット解離の分子機構を解明するため、試験管内再構築系の確立を目指す。

3. 研究の方法

出芽酵母の細胞抽出液を用いた、無細胞タンパク質合成系によって、翻訳停滞からサブユニット解離までの一連の反応を再現する実験系を構築する。

4. 研究成果

無細胞タンパク質合成系によって翻訳停滞を再現するためには、効率よく翻訳を停滞させる配列をもった mRNA の構築が必須である。そこで、まず初めに、強い翻訳停滞を引き起こす内在性遺伝子の探索を試みた。2つの連続した CGA レアコドンは翻訳の伸長反応を著しく阻害することがわかっていたため、「CGACAG」配列をもつ出芽酵母の遺伝子をリスト化し、品質管理機構の対象になりうるか調べた。その結果、強い翻訳停滞を引き起こし、品質管理機構の対象となる *SDD1* 遺伝子の同定に成功した。

次に、無細胞タンパク質合成系を用いて、*SDD1* mRNA 上での翻訳停滞の再構築を試みた。翻訳停滞の状態を安定に維持できる場合、後続のリボソームが先頭のリボソームに追いつ

き、リボソームの交通渋滞が形成されるはずである。実際に、再構成系では、3つのリボソームが衝突して形成される Trisome 構造体が観察され、さらにその詳細な構造を、Cryo 電子顕微鏡による単粒子解析によって明らかにすることができた(図2)。

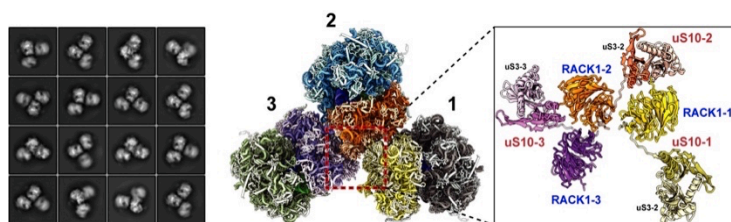


図2 Trisome 構造体

また、面白いことに、He12によるuS10のユビキチン化は、Trisome構造体にもみ特異的に観察された(図3)。つまり、He12は、翻訳停滞したリボソームと後続のリボソームの衝突によって形成されるTrisome構造体を、異常な翻訳停滞と認識していることがわかる。先行研究では、He12によるユビキチン化に依存したリボソームのサブユニット解離に関与する因子として、RQT複合体を同定している。そこで、*SDD1* mRNAを用いた無細胞タンパク質合成系で形成されるTrisome構造体に、精製したRQT複合体を添加し、サブユニット解離の有無を調べた。その結果、RQT複合体の添加によって、ユビキチン化されたTrisome構造体がサブユニットへ解離することが明らかになった(図3)。

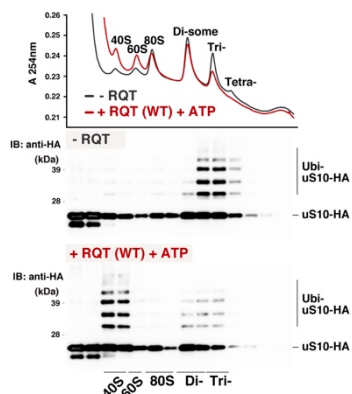


図3 RQT 複合体によるサブユニット解離

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Matsuo Yoshitaka, Inada Toshifumi	4. 巻 34
2. 論文標題 The ribosome collision sensor Hel2 functions as preventive quality control in the secretory pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108877
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2021.108877	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takehara Yuka, Yashiroda Hideki, Matsuo Yoshitaka, Zhao Xian, Kamigaki Akane, Matsuzaki Tetsuo, Kosako Hidetaka, Inada Toshifumi, Murata Shigeo	4. 巻 24
2. 論文標題 The ubiquitination-deubiquitination cycle on the ribosomal protein eS7A is crucial for efficient translation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102145
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2021.102145	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Matsuki Yasuko, Matsuo Yoshitaka, Nakano Yu, Iwasaki Shintaro, Yoko Hideyuki, Udagawa Tsuyoshi, Li Sihan, Saeki Yasushi, Yoshihisa Tohru, Tanaka Keiji, Ingolia Nicholas T., Inada Toshifumi	4. 巻 10
2. 論文標題 Ribosomal protein S7 ubiquitination during ER stress in yeast is associated with selective mRNA translation and stress outcome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19669
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-76239-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Matsuo Yoshitaka, Tesina Petr, Nakajima Shizuka, Mizuno Masato, Endo Akinori, Buschauer Robert, Cheng Jingdong, Shounai Okuto, Ikeuchi Ken, Saeki Yasushi, Becker Thomas, Beckmann Roland, Inada Toshifumi	4. 巻 27
2. 論文標題 RQT complex dissociates ribosomes collided on endogenous RQC substrate SDD1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Structural & Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 323-332
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41594-020-0393-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Robert Buschauer*, Yoshitaka Matsuo* (*Co-first author), Takato Sugiyama, Ying-Hsin Chen, Najwa Alhusaini, Thomas Sweet, Ken Ikeuchi, Jingdong Cheng, Yasuko Matsuki, Risa Nobuta, Andrea Gilmozzi, Otto Berninghausen, Petr Tesina, Thomas Becker, Jeff Collier, Toshifumi Inada and Roland Beckmann.	4. 巻 368
2. 論文標題 The Ccr4-Not complex monitors the translating ribosome for codon optimality.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 eaay6912
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.aay6912	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 松尾芳隆、Petr Tesina、Roland Beckmann、稲田利文
2. 発表標題 RQT 複合体による異常な翻訳停滞の解消機構
3. 学会等名 第53回酵母遺伝学フォーラム報告会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 Yoshitaka Matsuo, Robert Buschauer, Takato Sugiyama, Jeff Collier, Roland Beckmann, Toshifumi Inada.
2. 発表標題 The Ccr4-Not complex monitors the translating ribosome for codon optimality
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 Yoshitaka Matsuo and Toshifumi Inada
2. 発表標題 Ribosome collision sensor Hel2 recognizes mistargeting secretory ribosome-nascent chain complexes
3. 学会等名 第15回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 松尾芳隆
2. 発表標題 RQT complex dissociates ribosomes collided on endogenous RQC substrate
3. 学会等名 第21回日本RNA学会年会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Yoshitaka Matsuo, Toshifumi Inada
2. 発表標題 The ribosome collision sensor Hel2 functions as preventive quality control in the secretory pathway
3. 学会等名 第22回日本RNA学会年会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 松尾芳隆 稲田利文
2. 発表標題 異常翻訳を標識するリボソームユビキチンコードの作動機構
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年～2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

タンパク質の配送異常を排除するしくみ ～ 翻訳に共役した品質管理機構の新たな機能を解明～
<https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2021/03/press20210324-02-protein.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------