

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K06487

研究課題名(和文) 真核生物リボソームの品質管理における基質認識機構の解明

研究課題名(英文) Substrate recognition system for quality control of eukaryotic ribosome

研究代表者

北畠 真 (Makoto, Kitabatake)

京都大学・医生物学研究所・助教

研究者番号：10321754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：リボソームRNAの品質管理の分子機構に関与が知られていなかった因子を新たに同定し、この因子が品質管理の開始に必要なことをヒントに、どのようにこの因子が品質管理機構に関わっているのかを調査した。この因子に部位特異的に結合するたんぱく質が複数存在することが部位特異的クロスリンク法により明らかになり、主にそのN末端側に重要な相互作用因子が存在することが分かったが、その同定には至っていない。またこの因子には複数のリン酸化部位が知られているが、このうちN末側に存在する2つが品質管理に必要なことも分かり、活性制御に関わる可能性が浮かび上がった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リボソームは細胞内のたんぱく質合成装置であり、すべての細胞の生存に必須なものである。リボソームの不具合による遺伝病や、リボソームを標的としてペロ毒素やリシンなどの毒素が知られており、リボソームの機能を細胞内で正常に保つことは重要である。しかしながら細胞内でどのようにそれが達成されているかは分かっていない。リボソームはその巨大なサイズから、合成するのに非常に多くのエネルギーが必要であり、したがって一度作られた分子はきわめて長い時間使用される。この間に蓄積される障害をどのように細胞が検出し対処しているかを知ることは、さまざまな疾患に対処するための方法論を構築するため大きな役割を持つ。

研究成果の概要(英文)：We worked on elucidating the molecular mechanism of ribosomal RNA quality control. We identified a new factor that had not been previously known to be involved, and based on the hint that this factor is necessary for the initiation of quality control, we investigated how this factor is involved in the quality control mechanism. Site-specific crosslinking revealed that there are multiple proteins that specifically bind to this factor, and it was found that important interaction factors are mainly located on its N-terminal side, although they have not yet been identified. Furthermore, it was discovered that among the several known phosphorylation sites on this factor, two located on the N-terminal side are necessary for quality control, suggesting their potential involvement in activity regulation.

研究分野：分子生物学

キーワード：リボソーム

1. 研究開始当初の背景

リボソームは真核生物の細胞内でタンパク質合成を行う分子機械であり、その構成要素は4本のRNAと80個のタンパク質からなる。このリボソームの主な活性を担うのはRNAであり、重要な塩基に一つの変異が入るだけでリボソームの機能は失われることが知られている。われわれは、「機能不全リボソーム」が細胞内でどのように選択的に分解されるかという品質管理機構に注目し、出芽酵母をモデル生物として研究を進めてきた。特に、「機能不全リボソームを選択的にユビキチン化するE3リガーゼ」の同定に成功するなど、これまでに重要な成果を上げてきた。

これまでの研究から、E3リガーゼの関与からCdc48複合体の寄与、プロテアソームによるたんぱく質分解の必要性など、機能不全リボソームを分解する段階での分子機構は比較的明らかになってきている。しかし、品質管理の初期段階で「細胞が機能不全リボソームをどのように見分けるか」についてはほとんど解明されていなかった。Mms1を含むE3ユビキチンリガーゼは、どのような特徴を手がかりにして機能不全リボソームを細胞内で見つけ出し、選択的にユビキチン化するのだろうか。本研究では、申請者が見いだした新規因子Plg1を手がかりに、この未解明の初期過程を明らかにすることを目的とした。Plg1はMms1複合体に結合する性質があると同時に、免疫沈降によりリボソームを共沈降させることができ、しかも共沈降するリボソームの効率率は、そのリボソームが機能不全rRNA変異を持っている場合に数倍に上昇する(つまり、機能不全リボソームに選択的に結合している)。この因子がMms1複合体を呼び込むと考えられることから、われわれはこの因子に結合する相互作用因子がメカニズム解明の鍵を握ると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、出芽酵母を用いて機能不全リボソームに選択的に結合する因子群を探索し、リボソームの品質管理の初期過程を解明することである。特に、新規因子Plg1を手がかりに、リボソームの品質管理機構のメカニズムを詳細に理解することを目指す。具体的にはPlg1と相互作用する因子をさまざまな方法で探索し、関連するたんぱく質の遺伝子をノックアウトするなどして機能不全リボソームの分解に関わる新たな因子の解明を行うのが目的であった。

3. 研究の方法

本研究では以下の二つの方法を用いて、Plg1と協力してMms1複合体をリボソームに呼び込むタンパク質を同定することを目的とした。

生化学的方法によるスクリーニング:

Plg1に結合するたんぱく質のスクリーニングを行う。データベースや文献調査などから想定された候補因子について、それぞれの遺伝子をPCRで増幅し、無細胞翻訳系で翻訳産物を生成し、Mms1複合体との相互作用を免疫沈降で検証する。また、並行してPlg1との相互作用も検証する。

部位特異的光架橋法の利用:

部位特異的非天然アミノ酸導入システムを用いて、Plg1のさまざまな部位にBpa(パラベンゾイルフェニルアラニン)を導入する。紫外線照射によりBpaは近傍のたんぱく質と架橋産物を形成する。この方法により物理的にPlg1と標的たんぱく質の架橋産物を生成し、Plg1のC末端に付与したHis6タグにより変性条件下でプルダウンし、SDS-PAGEにより分離してサイズを確認する。架橋産物はサイズが大きくなるため、バンドのサイズで判断し、これらを質量分析により同定する。

4. 研究成果

生化学的方法によるスクリーニングの結果:

Plg1に結合するたんぱく質のスクリーニングにより、60Sリボソームの生合成に関わるさまざまな因子がPlg1と直接的あるいは間接的に相互作用することが明らかになった。それぞれの因子のノックアウト株を作成した実験では、これらの因子が欠損するとリボソームの合成が遅延すると同時に、リボソームのユビキチン化がMms1依存的に亢進することが明らかになった。以上の結果はリボソームの品質管理が、その生合成の段階ですで行われていることを意味して

おり、これまでの予想と異なる結果となった。

部位特異的光架橋法の結果:

はじめに、部位特異的光架橋実験のため、Plg1 の C 末端側に His6 タグを付加する必要があった。これは、UAG ストップコドンのサブレッサー-tRNA によるサブレクションにより Bpa が目的位置に挿入されるため。サブレクションの起きたたんぱく質のみが C 末の His6 タグを合成できるため、後の過程で全長 Plg1 だけを回収することで Bpa が確実に挿入された Plg1 バリエーションを解析することができる。このため単純に Plg1 の C 末に His6 タグをつけた酵母株を作ったが、この His6 タグにより Plg1 の機能が阻害されてしまい、このままでは品質管理における Mms1 依存性リボソームのコピキチン化ができない、ということが明らかになった。そのため、当初の予定を変更し、まず、Plg1 の C 末側のさまざまな位置を His6 タグになるように変異導入を行い、表現型により「Plg1 の機能を損なわない His6 タグ挿入」が可能になる場所をスクリーニングすることから実験を始めることになった。6 通りのバリエーションが作られたが、いくつかは(程度によるが)機能不全リボソームの分解(つまり、もともとの Plg1 の機能)が果たせるということが分かった。そこで、もっとも C 末側に挿入されたものを Plg1-His6 として選択し、この遺伝子にさらに UAG コドンをもつさまざまな位置に入れていく、という順番を踏むことになった。

Plg1 の合計 9 箇所 Bpa を挿入する実験を行い、そのうち 8 個については anti-His6 によるウエスタンブロッティングで発現が確認された。つまりこれらについてはサブレクションが起こっており、Bpa の効率的な挿入が期待できる。これら 8 個のバリエーションについて、それぞれ 2L の酵母を培養して回収し、紫外線による架橋実験を行った。酵母を破砕して変性条件下で NiNTA ビーズによる His6 たんぱく質の精製を行い、Plg1 およびそれに共有結合したたんぱく質を回収し、SDS-PAGE によりその長さを解析した。これらの解析により、さまざまな架橋産物が生成されることが分かったが、特に効率的に架橋産物ができるのは N 末側に Bpa を挿入したバリエーションであった。さらに詳しい状況を明らかにするため、特に N 末に限定して新たに 6 個のバリエーションを作成し、同様の実験を繰り返した。しかし、原因は分からないが、これは再現性に欠け、質量分析での同定には至らなかった。

リン酸化の影響:

Plg1 にはいくつかのリン酸化されるアミノ酸があり、これらは主に N 末に集まっている。これらの修飾が、上記アッセイで明らかになった N 末結合たんぱく質との相互作用に必要かもしれない、という仮説を立て、実験を行った。リン酸化を受けるセリン残基をアラニンに変化させた変異体シリーズを作成し、その結果、特に N 末側のセリンが機能不全リボソームの分解に重要であることが明らかになった。この部位がリン酸化されることで、Plg1 はパートナーたんぱく質と結合し、機能不全リボソームのコピキチン化を誘導することが示唆された。

もともと、機能不全リボソームのコピキチン化にはたんぱく質リン酸化酵素の一つが必須であることがわれわれの解析から明らかになっていた(未発表)。今回明らかになった Plg1 に存在するセリン残基のリン酸化が、このリン酸化酵素に認識されている可能性が考えられる。この結果から、Plg1 にはリン酸化を通じた新たなレイヤーの制御が行われている可能性が示唆される。品質管理が細胞の中で行われる際のさまざまな情報伝達経路との関係が今後明らかになる可能性が考えられる。

これらの研究成果は、リボソームの品質管理にとどまらず、他の多くの巨大分子複合体の品質管理メカニズムの解明にも波及効果をもたらすと期待される。

その他の結果

本研究では多くのプラスミドを作成して多くのアッセイを同時並行で行った。この際に、以前より検討を行っていた、相同組換えによる DNA クローニングシステム「SLiCE」を使用していた。しかしその後の研究から、この SLiCE の分子機構を突き止めるに至り、さらには必要な酵素だけを使用して安価に簡単に相同組換えクローニングが可能であることを示すことができた。この手法を多くの人たちに使ってもらうため、論文を作成し公表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Liu Alexander Y., Koga Hiroto, Goya Chihiro, Kitabatake Makoto	4. 巻 28
2. 論文標題 Quick and affordable DNA cloning by reconstitution of Seamless Ligation Cloning Extract using defined factors	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 553 ~ 562
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.13034	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 北島 真
2. 発表標題 出芽酵母のリボソーム合成経路における品質管理
3. 学会等名 第88回 酵母研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Liu Alexander Y., Koga Hiroto, Goya Chihiro, Kitabatake Makoto
2. 発表標題 Quick and affordable DNA cloning by reconstitution of Seamless Ligation Cloning Extract (SLiCE) using defined factors
3. 学会等名 第46回 日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 北島 真（他、合計73名）	4. 発行年 2023年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 411
3. 書名 mRNAの制御機構の解明と治療薬・ワクチンへの活用	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------