

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16052

研究課題名（和文）Vms1によるCATテイリング制御機構および内在性RQC標的配列の生理学的意義

研究課題名（英文）Regulatory mechanism of CAT-tailing by Vms1 and role of an endogenous sequence for RQC

研究代表者

井澤 俊明 (Izawa, Toshiaki)

東北大学・薬学研究科・助教

研究者番号：60837871

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）：リボソームのストールによって作られる異常なタンパク質にはCATテイルと呼ばれる特殊なペプチド鎖が付加される。しかし、CATテイルの付加がどのような分子機構によって制御されているのかはよくわかっていない。本研究では出芽酵母を研究材料として、CATテイルの付加の制御に関わる因子であるVms1の作用機序について解析を行った。

また、最近の研究により、細胞の中にはリボソームのストールをわざと引き起こすようなタンパク質が存在することがわかってきたが、その生理的意義はよくわかっていない。本研究ではその意義の解明を目指して研究を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

異常なタンパク質の蓄積は細胞機能の破綻を引き起こし、様々な疾患の原因にもなる。健康な細胞では通常、異常タンパク質を除去する品質管理機構が備わっており、それにより細胞の恒常性が保たれている。本研究では、最近新たに見つかった品質管理機構であるリボソーム関連品質管理（RQC）の分子機構について、その一端を明らかにした。本研究成果は、将来的に異常タンパク質の蓄積を起因とする疾患の発症機構を理解するための分子基盤になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Aberrant proteins produced by ribosome stalling can be modified by the addition of CAT-tail. However, the molecular mechanism for regulation of CAT-tailing is not well understood. In this study, using yeast cells, I analyzed the regulatory mechanism of CAT-tailing by focusing on a key factor Vms1.

A recent study has demonstrated that yeast cells have a protein that can cause ribosome stalling. However, why yeast cells have preserved such stalling sequence is not well understood. This study aimed to uncover its physiological role.

研究分野：細胞生物学、生物化学

キーワード：タンパク質品質管理 リボソーム RQC Vms1

1. 研究開始当初の背景

異常タンパク質の蓄積は細胞のホメオスタシスの破綻を引き起こし、様々な疾患の原因となる。異常タンパク質の作られる分子機構の解明は、疾患の発症機構を理解する上でも重要である。異常タンパク質は様々な原因によって産生されるが、近年、翻訳終結の失敗によって作られる異常なポリペプチド鎖がその原因の1つになることが分かってきた。翻訳終結の失敗は、例えば、終止コドンを持たない異常な mRNA の産生によって引き起こされる。このような異常 mRNA が翻訳されると、リボソームは正常な翻訳終結ができずに mRNA の 3'末端で異常停滞(ストール)を引き起こす。この時に生じた合成途上の不完全なポリペプチド鎖は、リボソームが解離した後に 60S リボソーム上において Ribosome-associated quality control (RQC) 複合体の標的となる。RQC 複合体の構成因子の1つである Ltn1 は E3 ユビキチンリガーゼであり、異常なポリペプチド鎖をユビキチン化することによりプロテアソームによる分解を促進する。もう1つの RQC 複合体の構成因子である Rqc2 は、異常なポリペプチド鎖の C 末端にアラニン (Ala) とスレオニン (Thr) を不規則に付加するという、大変ユニークな酵素であることが 2015 年に発見された(図 1)。この反応は CAT テイリングと呼ばれている。CAT テイリングは tRNA を用いて行われるが、鑄型となる mRNA を必要としない特殊なペプチド鎖合成反応である。興味深いことに、Rqc2 は出芽酵母からヒト、植物まで真核生物に普遍的に保存されている。しかし、CAT テイリングがどのような分子機構によって制御されているのか、また、なぜ細胞は CAT テイリングという機構を備えているのか、その生理的役割についてはよく分かっていない。

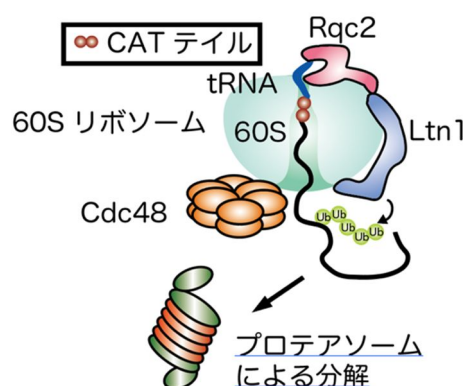


図 1 RQC の分子機構

2. 研究の目的

1) Vms1 による CAT テイリングの制御機構の解析

CAT テイリングにおいては、Rqc2 が Ala-tRNA と Thr-tRNA を選択的にリクルートし、異常なポリペプチド鎖の C 末端に Ala と Thr をランダムに付加する。最近私は、CAT テイリングの阻害因子として Vms1 を同定した。しかし、Vms1 はどのような分子機構によって CAT テイリングを抑制するのかについてはよくわかっていなかった。本研究では、あらかじめ取得していた Vms1-60S リボソーム-ペプチジル tRNA 複合体の構造解析の結果に基づいて、Vms1 が CAT テイリングを阻害する仕組みを明らかにすることを目的とした。

2) 内在性の RQC 標的配列の生理的意義

当研究室では最近、リボソームのストールを引き起こす配列が内在性のタンパク質に存在することを見出している。当研究室で同定したタンパク質である Trq1(Target of RQC)は、通常時はリボソームがストールすることによって恒常的に分解されているが、RQC がうまく働かなくなると安定化する。それでは、なぜこのタンパク質は RQC の標的となるような配列をわざわざ保持しているのだろうか？本研究では、Trq1 がこのような内在性の RQC 標的配列を持つことの生理的意義の解明を目的とした。

3. 研究の方法

1) Vms1 による CAT テイリングの制御機構の解析

Vms1-60S リボソーム-ペプチジル tRNA 複合体を精製し、そこに結合している tRNA の種類をノーザンブロット解析によって調べる。Vms1 の変異体を作成し、どのアミノ酸残基の変異によって tRNA がトラップされるのかを調べる。さらに、トラップされる tRNA の種類について各種 tRNA プロブを用いて調べる。

2) 内在性の RQC 標的配列の生理的意義

先行研究により、Trq1 がミトコンドリアタンパク質の輸送異常を抑制する活性があることが報告されているので、ミトコンドリアタンパク質の輸送異常をウエスタンブロット解析によって調べる。また、Trq1 の細胞内局在を蛍光顕微鏡を用いて解析する。局在パターンを手がかりに、

Trq1 の機能について解析を行う。

4 . 研究成果

1) Vms1 による CAT テイリングの制御機構の解析

まず、あらかじめ取得していた Vms1-60S リボソーム-ペプチジル tRNA 複合体の構造解析に基づいて、CAT テイリングの制御に必要な Vms1 のアミノ酸残基に関する論文をまとめた。別のグループにより、Vms1 は tRNA から CCA 末端を切り離す内部切断酵素であることが発表されたことから、本研究では次に、細胞抽出液から Vms1-60S リボソーム-ペプチジル tRNA 複合体を精製し、そこに含まれる tRNA をノーザンブロットにより解析する実験系を構築した。野生型の Vms1 においては、tRNA が切断されてリリースされるため、tRNA の蓄積は観察されない。一方、tRNA の切断に関与するアミノ酸残基の変異体においては、tRNA が複合体にトラップされるため、tRNA の蓄積が観察される。この実験系を用いて解析を行なったところ、Vms1 の Y285A と G295L のそれぞれの変異体において Ala(AGC)-tRNA が蓄積する様子が観察された。さらに、Y285A と G295L の両方の変異を導入した変異体においては、Ala(AGC)-tRNA がさらに顕著に蓄積することが明らかとなった。一方、解析を行ったそれ以外の tRNA の蓄積はほとんど観察されなかった。このことから、Vms1 は 285 番目のチロシンと 295 番目のロイシンを介して Ala(AGC)-tRNA を選択的に切断していることが示唆された。また、この変異体では出芽酵母における CAT テイリングの抑制が全く観察されなかった。このことから、285 番目のチロシンと 295 番目のグリシンを介した Ala(AGC)-tRNA の切断が CAT テイリングの抑制に必要なことが示唆された。

2) 内在性の RQC 標的配列の生理的意義

先行研究により、Trq1 の過剰発現によってミトコンドリアへのタンパク質輸送に異常を示す変異体の生育異常が回復することが報告されている。そこで、ミトコンドリアタンパク質の輸送に異常を示す変異体を用い、Trq1 の過剰発現によってミトコンドリアタンパク質の輸送異常が回復するかを解析した。ミトコンドリアの輸送異常は、ミトコンドリアのマトリクスタンパク質である Hsp60 の前駆体の蓄積を指標として評価を行なった。その結果、Trq1 の過剰発現によって Hsp60 の前駆体の蓄積量に変化は観察されなかった。よって、Trq1 はミトコンドリアへのタンパク質の輸送異常を回復させるわけではないことが考えられた。

次に、Trq1 の機能に関する手がかりを得るため、Trq1 の細胞内局在を調べた。Trq1 に GFP を融合させたタンパク質 GFP-Trq1 を構築し、出芽酵母に発現させてその局在を蛍光顕微鏡を用いて調べた。野生型の細胞では、GFP-Trq1 は恒常的に分解されるため、そのシグナルはほとんど検出されなかった。一方、RQC の欠損細胞においては、GFP-Trq1 は安定化し、核に局在することが明らかとなった。このことから、Trq1 は RQC がうまく働けなくなった時に核に局在し、なんらかの機能を発揮する可能性が考えられた。過去の文献により、テロメアの長さを制御する因子のスクリーニングによって Trq1 が同定されている。そこで、RQC を欠損させた場合（すなわち Trq1 が核に局在する場合）と、Trq1 を欠損させた場合においてテロメアの長さをサザンブロットングにより比較した。その結果、テロメアの長さに変化は観察されなかった。

本研究では、RQC がうまく機能しない場合に発現がオンになり核に蓄積するタンパク質が存在することを示した。Trq1 の機能については現在までに明らかとなっていないが、今後その機能を明らかにすることにより、Trq1 が RQC 標的配列を保持することの意義が明らかになると期待される。

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Su T, Izawa T, Thoms M, Yamashita Y, Cheng J, Berninghausen O, Hartl FU, Inada T, Neupert W, Beckmann R.	4. 巻 570
2. 論文標題 Structure and function of Vms1 and Arb1 in RQC and mitochondrial proteome homeostasis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 538-542
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41586-019-1307-z	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井澤俊明
2. 発表標題 tRNAエンドヌクレアーゼVms1による新生ポリペプチド鎖の品質管理とミトコンドリア恒常性の維持機構
3. 学会等名 第21回日本RNA学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井澤俊明
2. 発表標題 tRNAエンドヌクレアーゼVms1による新生ポリペプチド鎖の品質管理とミトコンドリア恒常性の維持機構
3. 学会等名 日本生化学会東北支部 第85回例会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

神経変性疾患の発症機構理解に光！ 細胞をタンパク質の凝集から守る新しい仕組みを解明
<https://www.tohoku.ac.jp/japanese/2019/06/press20190626-03-shinkei.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
---------	---------