

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月12日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2012

課題番号：21370080

研究課題名（和文） eRF3 ファミリーG タンパク質による mRNA 品質管理機構の解明

研究課題名（英文） Mechanisms of mRNA quality control by eRF3 family G proteins

研究代表者

星野 真一 (HOSHINO SHINICHI)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：40219168

研究成果の概要（和文）：

研究代表者はこれまで、正常な mRNA の分解が終止コドン上での翻訳終結と共役して開始されること、また G 蛋白質 eRF3 がその制御において中心的な役割をはたしていることを証明した。本研究においては、終止コドンをもたない異常な mRNA を分解する品質管理機構（ノンストップ型 mRNA 分解：NSD）がヒトにおいても存在し、eRF3 と相同な G 蛋白質 Hbs1 とエキソソームがそのメカニズムにおいて不可欠な役割をはたしていることを証明した。

研究成果の概要（英文）：

We have previously demonstrated that mRNA decay is initiated in couple with translation termination, where eukaryotic releasing factor eRF3 plays central roles. Here we showed that mRNA quality control mechanism eliminating aberrant transcripts lacking stop codon exists in mammalian cells, where another eRF3 family G protein Hbs1 and exosome complex play essential roles.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2011年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2012年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：mRNA 品質管理, eRF3, 翻訳終結, mRNA 分解, G タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝情報の正確な伝達は生命維持において不可欠な要素であり、mRNA レベルにおいては

異常な mRNA が生じた際に作動する mRNA 分解機構が主要な役割をはたす。この異常な mRNA を分解する機構は mRNA 品質管理機構とよばれ、真核生物においては①ナンセン

ス変異型 mRNA 分解 (NMD)、②ノンストップ型 mRNA 分解 (NSD)、③リボソーム停滞型 mRNA 分解 (NGD) の三つが知られている。NSD、NGD に関する研究の歴史は浅く始まったばかりであるが、NMD の研究は 1980 年初頭の発見以来数百件の報告があるにもかかわらず、その分解開始機構はいまだ不明な点が多い。

代表者はこれまで、正常な mRNA の分解について解析を行ってきた。その集大成として、ごく最近『mRNA 分解の開始機構』を解明することに成功した (Genes Dev, 2007)。

「mRNA 分解の律速段階はポリ A 鎖の短縮化にあり、翻訳終結反応を終えた翻訳終結因子 eRF3 がポリ(A)鎖結合蛋白質 PABP から解離することが引き金となって、ポリ(A)鎖分解酵素が PABP にリクルートされポリ(A)鎖分解 (mRNA 分解開始) が進行する」。すなわち、翻訳終結を制御する G 蛋白質 eRF3 が、翻訳終結の情報を mRNA 分解の情報に変換する情報転換因子として機能し、mRNA 分解開始を直接制御していることを初めて明らかにした。

## 2. 研究の目的

代表者らによって正常な mRNA の分解開始機構が解明された一方で、異常な mRNA を分解する三つの mRNA 品質管理機構 (NMD, NSD, NGD) においても、eRF3 ファミリーに属する G 蛋白質 (それぞれ eRF3, Ski7, HBS1) の関与が最近報告されている。したがって、これら eRF3 ファミリー G 蛋白質が mRNA 品質管理においても正常な mRNA と同様に mRNA 分解開始の直接的な制御因子としてはたらく可能性が高い。

本研究においては、正常な mRNA について申請者が独自に解明した分解開始機構の研究成果とその過程で用いた独自の研究手法を応用することで、いまだ解析の進んでいない異常な mRNA 分解 (mRNA 品質管理) の開始機構を解明し、mRNA 分解全般に共通する普遍的分子基盤を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

**①NSD 反応の開始段階・律速段階の同定**：酵母において NSD の律速段階は 3' 末端からの exosome による切断にあるとの報告に対し、ヒトにおいてはノンストップ mRNA の安定性自体正常な mRNA と変わらないという報告がなされた。申請者は、β グロビンのレポーター遺伝子を用いてノンストップ mRNA の発現系を構築し、TRex HeLa 細胞においてその安定性

について解析した結果、定常状態においてもまた半減期の解析においてもノンストップ mRNA は明らかに不安定であり、ポリ A 鎖分解の途中で急速に分解されることを見出した。そこで、この急速な分解が、(i)exosome による 3'末端からの切断、(ii)Dcp1/2 による cap 構造の切断、(iii)エンドヌクレアーゼによる切断、(iv)ポリ A 鎖分解酵素 Caf1-Ccr4 複合体/Pan2-Pan3 複合体による 3'末端からの切断である可能性について、各種 mRNA 分解酵素のドミナントネガティブ変異体および siRNA によるノックダウン法を用いて検討し、NSD の律速段階を同定した。

**②ヒトにおいて機能する Ski7 様 G 蛋白質の同定**：多細胞生物には Ski7 オーソログが存在しないことから、eRF3 ファミリーに属する他のメンバーが Ski7 の代りに機能する可能性が高い。特に GTPBP は酵母には存在せず多細胞生物に存在することから注目すべき因子であり、他のメンバーの可能性も含め①と同様の実験手法を用いて NSD への関与について検討した。

**③律速段階の反応を引き起こすメカニズムの解明**：①より解明された律速段階の反応を制御する因子と②において同定した eRF3 様 G 蛋白質との相互作用について免疫沈降法や大腸菌組換え体蛋白質を用いた GST pulldown アッセイを用いて解析した。また、NMD の場合と同様、相互作用部位の同定、翻訳と共役した結合動態の解析を行なった。ノンストップ mRNA においては、リボソームがポリ A 鎖を翻訳した後 3'末端においてストールするが、このような状況下に exosome が 3'末端からの分解を触媒するとは考えにくい。mRNA から何らかの方法でリボソームを開放するメカニズムが存在するはずである。②で同定した eRF3 様 G 蛋白質が eRF3 と同様にリボソームリサイクリングを引き起こす可能性や、エンドリボヌクレアーゼによるリボソーム周辺領域の RNA 切断反応がはたらいっている可能性について検討した。

## 4. 研究成果

酵母においては eRF3 ファミリーに属する G 蛋白質である Ski7 が NSD において中心的役

割をはたしていることが証明されているが、Ski7 はヒトにおいて存在しないこと、またヒトでは終止コドンをなくした mRNA と終止コドンのある正常な mRNA とでその定常状態の mRNA 量に違いがみられないとの報告もあり、ヒトにおいてはこれまで NSD のメカニズムが存在するかどうか異論のあるところであった。本研究では、 $\beta$  グロビン mRNA をレポーターとしてその半減期の測定を行い、終止コドンのない異常な mRNA が正常な mRNA に比べて不安定であり、半減期が明確に短いことを証明した。また、翻訳阻害剤であるシクロヘキシミドで処理するとその半減期は延長し、分解抑制がみられることから、ヒトにおいてノンストップ型 mRNA が翻訳に依存して分解されることを明らかにした。

また、ヒトでは Ski7 が存在しないため、eRF3 ファミリーに属する Hbs1 と GTPBP1 についてノックダウン法を用いて関与を検討したところ、Hbs1 のノックダウンによってノンストップ型 mRNA の半減期は増大した。このような効果は Hbs1 と複合体を形成する Dom34 のノックダウンでも観察された。さらに、酵母において NSD にはたらくエキソソームについて関与を調べたところ、エキソヌクレアーゼおよびエンドヌクレアーゼの両活性を有する Dis3 のノックダウンによってノンストップ型 mRNA の半減期が増大した。さらに、エキソソームのアクセサリ蛋白質である Ski2/Mtr4 ヘリカーゼについても同様の効果が観察された。さらに免疫沈降実験により、これらエキソソームと Ski 複合体、および Hbs1-Dom34 は一つの複合体を形成することも明らかにした。

以上の研究成果は、ヒトにおいても NSD のメカニズムが確かに存在し、翻訳に依存して Hbs1-Dom34 とエキソソーム-SKI 複合体が NSD を制御していることを示している。ヒトにおいては、ノンストップ型 mRNA 上で停滞したリボソームに Hbs1-Dom34 がエキソソーム-SKI 複合体をリクルートすることで mRNA を積極的に分解していることが強く示唆された (Saito et al., 2013)。

##### 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 8 件)

1. Saito, S., Hosoda, N., Hoshino, S. (2013) Hbs1-Dom34 functions in non-stop mRNA decay (NSD) in mammalian cells. **J Biol Chem** (in press). 査読有

2. Ogami, K., Hosoda, N., Funakoshi, N., Hoshino, S. (2013) Anti proliferative protein Tob directly regulates c-myc proto-oncogene expression through cytoplasmic polyadenylation element-binding protein CPEB. **Oncogene** (in press). 査読有

3. Ogami, K., Cho, R., Hoshino, S. (2013) Molecular cloning and characterization of a novel isoform of the non-canonical poly(A) polymerase PAPD7. **Biochem Biophys Res Commun** 432, 135-140. 査読有

4. Hashimoto, Y., Hosoda, N., Datta, P., Alnemri, E.S., Hoshino, S. (2012) Translation termination factor eRF3 is targeted for caspase-mediated proteolytic cleavage and degradation during DNA damage-induced apoptosis. **Apoptosis** 17, 1287-1299. 査読有

5. Hoshino, S. (2012) Mechanism of the initiation of mRNA decay: role of eRF3 family G proteins. **Wiley Interdiscip Rev RNA** 3, 743-757. 査読有

6. Osawa, M., Hosoda, N., Nakanishi, T., Uchida, N., Kimura, T., Imai, S., Machiyama, A., Katada, T., Hoshino, S., Shimada, I. (2012) Biological role of the two overlapping poly(A)-binding protein interacting motifs 2 (PAM2) of eukaryotic releasing factor eRF3 in mRNA decay. **RNA** 18, 1957-1967. 査読有

7. Hosoda, N., Funakoshi, Y., Hirasawa, M., Yamagishi, R., Asano, Y., Miyagawa, R., Ogami, K., Tsujimoto, M., Hoshino, S. (2011) Anti-proliferative protein Tob negatively regulates CPEB3 target by recruiting Caf1

deadenylase. **EMBO J** 30, 1311-1323. 査読有

8. Ruan, L., Osawa, M., Hosoda, N., Imai, S., Machiyama, A., Katada, T., Hoshino, S. and Shimada I. (2010) Quantitative characterization of TOB interactions provides the thermodynamic basis for translation termination-coupled deadenylase regulation. **J Biol Chem** 285, 27624-27631. 査読有

[学会発表] (計 36 件)

1. 橋本芳史、細田直、星野真一: 切断型 eRF3 によるアポトーシス阻害タンパク質 IAP を介したアポトーシス制御機構の解析、第 133 回薬学会年会、2013 年 3 月 28 日 (静岡)

2. 星野真一: 細胞内 mRNA 顆粒形成の分子メカニズム、第 133 回薬学会、シンポジウム『RNA ダイナミクスから迫る生命現象』、2013 年 3 月 29 日 (横浜) オーガナイザー兼シンポジスト

3. 星野真一: mRNA 3' 末端プロセッシングを標的とした遺伝子発現制御・RNA 品質管理機構の解明、平成 24 年度新学術領域研究『RNA 制御学』班会議、2013 年 1 月 7-9 日 (仙台)

4. 三瓶祥子、尾上耕一、星野真一: 細胞質ポリ A 鎖伸長因子 CPEB による c-myc mRNA の安定性制御、第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 15 日 (福岡)

5. 趙理海、尾上耕一、星野真一: 非正準ポリ A ポリメラーゼ PAPD5, PAPD7 の機能解析、第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 15 日 (福岡)

6. 田中麻記子、細田直、星野真一: テロメラーゼ RNA (TLC1) の成熟化機構の解析、第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 15 日 (福岡)

7. Ogami, K., Hosoda, N., Funakoshi, N., Hoshino, S.: Anti proliferative protein Tob directly regulates c-myc

proto-oncogene expression through cytoplasmic polyadenylation element-binding protein CPEB. EMBO/EMBL symposium 'The complex life of mRNA', 2012 年 10 月 7-10 日 (ドイツ、ハイデルベルク)

8. Hashimoto, Y., Hosoda, N., Datta, P., Alnemri, ES., Hoshino, S.: Translation termination factor eRF3 is targeted for caspase-mediated proteolytic cleavage and degradation during DNA damage-induced apoptosis. EMBO/EMBL symposium 'The complex life of mRNA', 2012 年 10 月 7-10 日 (ドイツ、ハイデルベルク)

9. 尾上耕一、市川史、星野真一: 非正準ポリ (A) ポリメラーゼ PAPD7 の新規アイソフォームの同定と機能解析、第 14 回日本 RNA 学会年会、2012 年 7 月 18-20 日 (仙台)

10. 尾上耕一、細田直、船越祐司、星野真一: 癌抑制遺伝子産物 Tob による転写後の c-myc 遺伝子発現調節機構、第 58 回日本薬学会東海支部大会、2012 年 7 月 9 日 (静岡)

11. 橋本芳史、細田直、星野真一: 翻訳終結因子 GSPT/eRF3 のカスパーゼ依存的切断の生理的意義の解析、第 76 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム、2012 年 5 月 26 日 (岡崎)

12. 尾上耕一、細田直、船越祐司、星野真一: 癌抑制遺伝子産物 Tob による c-myc 遺伝子の発現調節機構、第 132 回薬学会年会、2012 年 3 月 29 日 (札幌)

13. 星野真一: mRNA 3' 末端プロセッシングを標的とした遺伝子発現制御・RNA 品質管理機構の解明、平成 23 年度新学術領域研究『RNA 制御学』班会議、2012 年 1 月 6-7 日 (神戸)

14. 杉山遥、成瀬貴文、細田直、星野真一: PAM2 モチーフ含有タンパク質 USP10 のストレス顆粒形成に果たす役割、第 57 回日本薬学会東海支部大会、2011 年 7 月 9 日 (名古屋)

15. 田中麻記子、細田直、星野真一: テロメラーゼ RNA (TLC1) の成熟化機構の解明、第

57 回日本薬学会東海支部大会、2011 年 7 月 9 日（名古屋）

16. Ogami K, Hosoda N, Funakoshi Y, Hoshino S: Anti-proliferative protein Tob negatively regulates c-myc oncogene expression by accelerating mRNA deadenylation, RNA 2011 (6<sup>th</sup> annual meeting of the RNA society), 2011 年 6 月 14 日（京都）

17. Hirose, T. Nuclear body formation on the specific long noncoding RNAs. Tokyo RNA Club the 5th meeting, Tokyo, 2011. 6. 13

18. 尾上耕一、細田直、船越祐司、星野真一：癌抑制遺伝子産物 Tob は癌原遺伝子 c-myc の発現を負に制御する、第 131 回薬学会年会、2011 年 3 月 31 日（静岡）

19. 橋本芳史、細田直、星野真一：カスパーゼによる翻訳終結因子 eRF3 の分解と翻訳抑制、第 131 回薬学会年会、2011 年 3 月 30 日（静岡）

20. 星野真一：mRNA3' 末端プロセッシングを標的とした遺伝子発現制御・RNA 品質管理機構の解明、平成 22 年度新学術領域研究『RNA 制御学』班会議、2011 年 1 月 6-7 日（京都）

21. 星野真一：癌抑制遺伝子産物 Tob における mRNA 分解開始調節の分子メカニズム、“GCOE 特別セミナー”（招待講演）東京大学医科学研究所、2010 年 11 月 16 日（東京）

22. Hosoda N, Funakoshi Y, Yamagishi R, Ogami K, Hoshino S（発表者）：Anti-proliferative protein Tob negatively regulates CPEB3 target by recruiting Caf1 deadenylase. Cold Spring Harbor Meeting “Translational control”, 2010 年 9 月 14 日（New York, USA）

23. 星野真一：RNA のプロセッシングと品質管理（オーバービュー）、第 12 回日本 RNA 学会年会、2010 年 7 月 28 日（東京）

24. 尾上耕一、細田直、船越祐司、星野真一：癌抑制遺伝子産物 Tob は Ras-MAPK シグナル

の下流で c-myc mRNA の安定性を直接制御する、第 12 回日本 RNA 学会年会、2010 年 7 月 28 日（東京）

25. 橋本芳史、細田直、星野真一：アポトーシス時における翻訳終結因子 eRF3 を標的とした翻訳制御、第 12 回日本 RNA 学会年会、2010 年 7 月 28 日（東京）

26. 成瀬 貴文、的場 洋子、細田 直、星野真一：脊髄小脳変性症の原因遺伝子 Ataxin-2 がストレス顆粒形成に果たす役割、第 12 回日本 RNA 学会年会、2010 年 7 月 27 日（東京）

27. 岡本淳志、細田直、星野真一：酵母プリオン[Psi+]の表現型解析から見出した翻訳終結因子 eRF3 の新規機能、日本薬学会東海支部大会、2010 年 7 月 3 日（岐阜）

28. 堀川桂、細田直、星野真一：No go decay (NGD)による mRNA 品質管理機構の解析、日本薬学会東海支部大会、2010 年 7 月 3 日（岐阜）

29. 星野真一：癌抑制遺伝子産物 Tob による遺伝子発現制御、第 130 回薬学会、シンポジウム『RNA 研究の最前線：RNA 動態制御の分子基盤から創薬応用まで』、2010 年 3 月 29 日（岡山）オーガナイザー兼シンポジスト

30. 星野真一：mRNA3'末端ポリ A 鎖を標的とした遺伝子発現制御・RNA 品質管理機構の解明、平成 21 年度 新学術領域研究『RNA 制御学』班会議、2010 年 1 月 8-9 日（神戸）

31. 星野真一：mRNA3'末端ポリ A 鎖を標的とした遺伝子発現調節、第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 22 日（神戸）

32. 星野真一：mRNA3'末端ポリ A 鎖を標的とした遺伝子発現制御、北大農学部公開セミナー（招待講演）、2009 年 9 月 18 日（札幌市）

33. 細田直、星野真一：mRNA 品質管理機構に置く G 蛋白質 eRF3 の役割、特定領域研究「G 蛋白質シグナル」研究班会議、2009 年 9 月 10 日（千葉）

34. 山岸良多、細田直、岩松明彦、星野真一：  
癌抑制遺伝子 BTG の生理的役割の解析、日本  
薬学会東海支部大会、2009年7月11日（名  
古屋）

35. 成瀬貴文、的場洋子、細田直、星野真一：  
脊髄小脳変性症の原因遺伝子 Ataxin-2 の生  
理的役割、日本薬学会東海支部大会、2009年  
7月11日（名古屋）

36. 橋本芳史、細田直、星野真一：ストレス  
による翻訳終結因子 eRF3/GSPT1 プロセシ  
ングの分子機構、日本薬学会東海支部大会、  
2009年7月11日（名古屋）

〔図書〕（計 2 件）

1. 尾上耕一、星野真一：mRNA 分解研究と  
創薬、日本薬理学雑誌 (Folia Pharmacol.  
Jpn.) 136 : 150-154 (2010)

2. 星野真一：真核生物 mRNA 分解開始の分  
子機構、蛋白質・核酸・酵素 54 : 2066-2072  
(2009)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

星野 真一 (HOSHINO SHINICHI)  
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授  
研究者番号：40219268

### (2) 研究分担者

細田 直 (HOSHODA NAO)  
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・講師  
研究者番号：40438198