

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17日現在

機関番号：11301
 研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22370062
 研究課題名（和文） 新生ポリペプチド鎖依存の翻訳アレストにおける RACK1 の機能解明

研究課題名（英文） Analysis of RACK function in specific nascent peptide-dependent translation arrest

研究代表者 稲田 利文（INADA TOSHIFUMI）
 東北大学・大学院薬学研究科・教授
 研究者番号： 40242812

研究成果の概要（和文）：

新生ポリペプチド鎖依存の翻訳アレストに必須な因子として、RACK1 を同定し、RACK1 の 40S リボソームへの結合が翻訳アレストに重要性であることを示した。RACK1 は、60S リボソームサブユニットと結合する E3 ユビキチンライゲース Ltn1 依存の新生ポリペプチド鎖の分解にも RACK1 が必須である事を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

The receptor for activated C kinase (RACK1) was identified as a factor required for nascent peptide-dependent translation arrest, and the binding of RACK1 to 40S subunit is crucial for translation repression by poly-basic amino acid sequence. Two E3 ubiquitin ligases, Ltn1 and Not4, are involved in proteasomal protein degradation coupled to translation arrest, and translation arrest by RACK1 is required for Ltn1-dependent protein degradation.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2010年度 | 5,200,000 | 1,560,000 | 6,760,000 |
| 2011年度 | 4,600,000 | 1,380,000 | 5,980,000 |
| 2012年度 | 4,600,000 | 1,380,000 | 5,980,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 14,400,000 | 4,320,000 | 18,720,000 |

研究分野：遺伝子発現制御、mRNA 分解と翻訳制御、異常タンパク質分解

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、翻訳アレスト、新生ポリペプチド鎖、mRNA 分子内切断、ユビキチン化、プロテアソーム、リボソーム、リボソーム解離因子

1. 研究開始当初の背景

ノンストップ mRNA は細胞内の主要な異常 mRNA であり、ORF 内でのポリ(A)鎖付加によって合成される。研究代表者は、ノンストップ mRNA の翻訳抑制と異常タンパク質分解機構を解析し、真核生物の mRNA の普遍的な修飾である **ポリ(A)鎖の全く新しい機能** を見いだした。ポリ(A)鎖は正常な mRNA では翻訳されないが、ノンストップ mRNA では翻

訳される結果、1) ポリ(A)鎖にコードされるポリリジン残基とリボソームとの相互作用による訳伸長反応の一時停止（翻訳アレスト）と、2) プロテアソームによる異常タンパク質の速やかな分解、が起こることを見いだした。また、連続した塩基性アミノ酸配列により翻訳アレストが引き起こされ、新生ポリペプチド鎖がプロテアソームにより迅速に分解されることを示した (*J. Biol. Chem.*,

2009; *Genes Cells*, 2009)。研究代表者は、新生ポリペプチド鎖に依存した翻訳アレストに欠損を示す変異株 (*nad* 変異株) を単離し、翻訳アレストに必須な因子として出芽酵母 RACK1 を同定した。

2. 研究の目的

RACK1 は種々のシグナル伝達系に關与すると同時に、40S リボソームサブユニットに結合して翻訳開始に關与することが報告されている。研究代表者は、新生ポリペプチド鎖の配列に依存した翻訳アレストの分子機構と、RACK1 依存の翻訳アレストの生理的意義の解明を本研究課題の目的とした。

3. 研究の方法

【1】新生ポリペプチド鎖依存の翻訳アレストの分子機構：連続した塩基性アミノ酸配列を持つ新生ポリペプチド鎖による翻訳アレストの分子機構における RACK1 の機能を明らかにしたい。具体的には、①RACK1 の40S リボソームへの結合の重要性、②リボソームタンパク質変異体の分離と解析、③RACK1 と相互作用する因子の同定と翻訳アレストにおける機能解析を行う。これらの解析により、40S サブユニットに結合する RACK1 が、60S サブユニットに存在するリボソームトンネルにおける新生ポリペプチド鎖の認識機構にどのように機能するかを明らかにする。

【2】翻訳アレストに共役したタンパク質と mRNA 安定性制御の分子機構とその生理的意義：研究代表者は、翻訳アレストに伴って、翻訳に共役したタンパク質の分解と mRNA の分子内切断が起こることを見いだした (*J. Biol. Chem.*, 2009)。翻訳に共役したタンパク質分解の際には Not4p が E3 ユビキチンライゲースとして機能するが、特異的な基質認識機構は不明である。既にリボソームに結合した Not4 が、翻訳アレストによってリボソーム上に繋留された新生ポリペプチド鎖を、効率よくユビキチン化する可能性を検証する。また、翻訳アレストに伴う mRNA の分子内切断は、mRNA の2次構造による分子内切断に關与する既知因子 (Hbs1/Dom34) には依存しない。新生ポリペプチド鎖依存の翻訳アレストによる mRNA 分子内切断を担う新規因子の同定を行い、生理的意義を明らかにする。

4. 研究成果

【1】新生ポリペプチド鎖依存の翻訳アレストの分子機構：アレストに必須な因子として、RACK1 を同定し、RACK1 の40S リボソームへの結合が翻訳アレストに重要性であることを示した(図1 ; *EMBO Rep.*, 2010)。また新規翻訳アレスト因子 Nad2 を同定した結果、過剰なヒストンの分解に關与する E3 ユ

ビキチンライゲース Hel2 であった (図2)。Hel2 は翻訳アレストのみでなく、mRNA の分子内切断にも必須であった。Hel2 の E2 として機能する Ubc4 も同様の表現型を示した。これは RACK1 が翻訳アレスト産物の分解に必須であるが、mRNA の分子内切断には必須でな

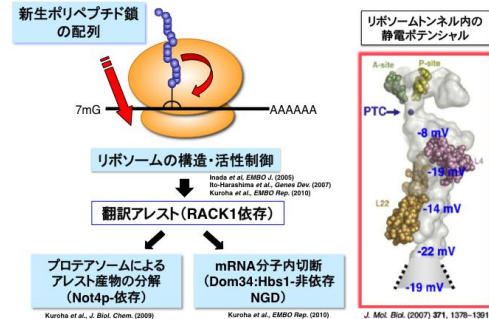


図1 新生ポリペプチド鎖による発現制御

い結果と対照的であり、2つの翻訳アレスト因子がタンパク質分解と mRNA 分子内切断に独立の経路で機能する可能性を示唆している。

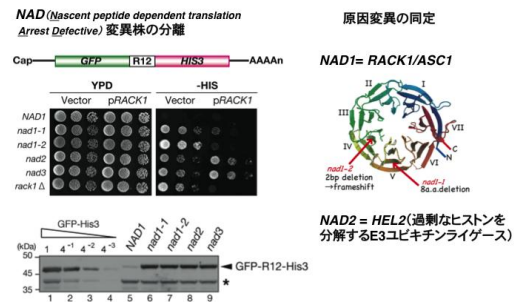


図2 RACK1とHEL2は塩基性アミノ酸配列依存の翻訳抑制に必要

【2】翻訳アレストに共役したタンパク質と mRNA 安定性制御の分子機構とその生理的意義：連続した塩基性アミノ酸配列による翻訳伸長阻害に伴い、新生ポリペプチド鎖が分解される。この新生ポリペプチド鎖の分解には、リボソームと相互作用する E3 ユビキチンライゲース Not4 が關与する。この異常タンパク質の分解は品質管理機構として重要であるのみならず、翻訳に共役した新生ポリペプチド鎖のユビキチン化という点でも新しい分子機構であり、世界的にも独自の系である。この分解系には、もう1つの E3 ユビキチンライゲース Ltn1 が作用する (*Nature*, 2010)。共同研究により、翻訳アレストに伴う新生ポリペプチド鎖に關与する新規因子

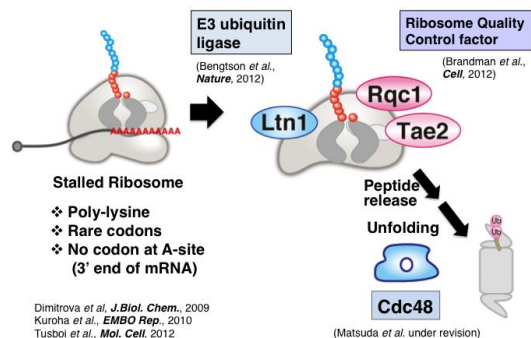


図3 翻訳アレストに共役した新生ポリペプチド鎖の分解機構

Rqc1 と Tae2 を同定した (*Cell*, 2012)。①これらの因子の機能と、②Ltn1 と Not4 の2つの E3 ユビキチンライゲースの基質認識機構の解明が、翻訳アレストに伴う新生ポリペプチド鎖分解機構の解明に必須であり、今後の重要な課題である。【1】翻訳異常の認識機構の研究結果と総合して、本研究課題により明らかとなった翻訳アレスト依存の新生ポリペプチド鎖分解機構の全体像を図3に示す。

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6件)

①Brandman, O., Ornstein, JS., Wong, D., Larson, A., Williams, C.C, Li, G.W., Zhou, S., King, D., Shen, P.S, Weibezahn, J., Dunn, J.G, Rouskin, S., Inada, T., Frost, A., Weissman, JS. A ribosome-bound quality control complex triggers nascent peptides and signals translation stress. *Cell* **151**, 1042-1054 (2012) 査読あり
doi: 10.1016/j.cell.2012.10.044.

② Tsuboi, T., Kuroha, K., Kudo, K., Makino S., Inoue, E., Kashima, I. and *Inada, T. Dom34:Hbs1 Plays a General Role in Quality Control Systems by Dissociation of Stalled Ribosome at 3' End of Aberrant mRNA. *Mol. Cell* **26**, 518-529 (2012) 査読あり
doi: 10.1016/j.molcel.2012.03.013.

③ Izawa, T. Tsuboi, T. Kuroha, K. Inada, T. Nishikawa, SI. Endo, T. Roles of Dom34:Hbs1 in Nonstop Protein Clearance from Translocators for Normal Organelle Protein Influx. *Cell Rep.* **2**, 447-453 (2012) 査読あり
doi: 10.1016/j.celrep.2012.08.010.

④ Kuroha, K., Akamatsu, M., Dimitrova, L., Ito, T., Kato, Y. Shirahige, K. and *Inada, T. RACK1 stimulates nascent polypeptide-dependent translation arrest. *EMBO Rep.* **11**, 956-961 (2010) 査読あり
doi: 10.1038/embor.2010.169.

⑤ Mori T, Ogasawara C, Inada, T. Englert M, Beier H, Takezawa M, Endo T, Yoshihisa T. Dual functions of yeast tRNA ligase in the unfolded protein response: unconventional cytoplasmic splicing of HAC1 pre-mRNA is not sufficient to release translational attenuation. *Mol Biol Cell.* **21**, 3722-3734 (2010) 査読あり
doi: 10.1091/mbc.E10-08-0693.

⑥ Kobayashi, K. Kikuno, I. Kuroha, K. Saito, K. Ito, K. Ishitani, R. Inada, T. and Nureki, O. Structural Basis for mRNA Surveillance by Archaeal Pelota and GTP-bound EF1 α Complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 17575-17579 (2010) 査読あり
doi: 10.1073/pnas.1009598107.

[学会発表] (計5件)

①稲田利文 Novel roles of Dom34:Hbs1 and RACK1 in mRNA quality control systems. 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月11-14日、福岡国際会議場

② Inada, T. Protein quality control systems coupled with No-Go and Non-Stop mRNA surveillance in yeast. EMBO meeting on 'Quality control' 2012.9.19-22. EMBL, Heidelberg, Germany.

③Inada, T. Dom34:Hbs1 Plays a General Role in Quality Control Systems by Dissociation of a Stalled Ribosome at the 3' End of Aberrant mRNA. "Protein synthesis and translational control" 2012.9.4-8. Cold Spring Harbor, New York, USA.

④Inada, T. Quality control of mRNA and protein in eukaryotes. The 22nd CDB meeting on "RNA Sciences in Cell and Developmental Biology II" 2012. 6. 11-13. Kobe, Japan.

⑤Inada, T. Stalled ribosomes induce mRNA and protein quality control systems. Jacques Monod conferences 25th anniversary, 2012.6.2-6. Roscoff, France

[図書] (計2件)

① 塩見春彦、稲田利文、泊幸秀、廣瀬哲郎編 (2013) *実験医学増刊号『生命分子を統合するRNA』* 31, 976-1198. 羊土社

② 稲田利文 (2012) 「RNA品質管理機構における停滞リボソーム解離複合体の普遍的機能」*生化学* 84:790-793 日本生化学学会

③ 稲田利文 (2011) 「RNA品質管理機構とあらたな遺伝子疾患治療薬の開発」*医学のあゆみ『RNA医学・医療-あらたな診断・治療を拓く』* 238:413-417. 医歯薬出版株式会社

④ 塩見春彦、塩見美喜子、稲田利文、廣瀬哲郎編(2010) *実験医学増刊号「拡大・進展を続けるRNA研究の最先端」* 28, 1490-1676. 羊土社

[産業財産権]

○出願状況（計0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0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

[http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~idenshi/inada_lab_HP/HOME\(Japanese\).html](http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~idenshi/inada_lab_HP/HOME(Japanese).html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

稲田 利文 (INADA TOSHIFUMI)
東北大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：40242812

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

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