

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657117

研究課題名(和文)ベロ毒素によって損傷したリボソームを検知し分解する新規機構の解明

研究課題名(英文)Quality control system that monitors ribosomes damaged by verotoxin

研究代表者

北島 真 (Kitabatake, Makoto)

京都大学・ウイルス研究所・助教

研究者番号：10321754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：腸管出血性大腸菌の産生するベロ毒素は、宿主リボソームRNAのSRL (Sarcin-Ricin Loop)とよばれる塩基配列を損傷する。しかし特定のヌクレオチドの損傷がリボソーム全体の機能にどのような影響を与え、細胞のどのような応答を引き起こすかについては、はっきりわかっていない。本研究では出芽酵母をモデルに、SRLに異常があるリボソームが生体内で機能不全となること、品質管理機構により分解を受けること、その分解に複数の因子が関わっていること、などを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Verotoxin is produced by enterohemorrhagic *E. coli*. It targets a small domain called SRL (Sarcin-Ricin Loop) in the host ribosomal RNA. The target site of this toxin was precisely determined; however, the consequence of this damage, including the effect on the ribosomal function and the cellular stress-response systems, has not been explored extensively. In this research, we tackled this problem using *S. cerevisiae* system as a model. We revealed that 25S rRNA with a mutation in SRL is nonfunctional and selectively degraded in vivo. From 5000 mutant strains of the yeast knock-out collection, we identified several strains that accumulate the SRL mutant 25S rRNA. Interestingly, the genes involved in the degradation of the SRL mutant are partially overlapped with those involved in 25S NRD (degradation pathway for another type of nonfunctional 25S rRNA). These results suggest a general quality control mechanism that monitors a wealth of defects caused by a number of reasons.

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：リボソーム

1. 研究開始当初の背景

腸管出血性大腸菌の産生するペロ毒素の標的が、細胞中のリボソームであり、その標的部位が 28S rRNA の SRL と呼ばれる重要ドメインにある特定のヌクレオチドであることはすでに報告されていた。しかしこのヌクレオチドの損傷がその後どのような細胞傷害を誘導し、疾病へつながるかについてははっきりわかっていなかった。一方で出芽酵母を用いた解析から rRNA に点変異をもち、機能不全となったリボソームが細胞内で特異的に認識され、ユビキチン化に依存して分解される、という品質管理の系をわれわれのグループは明らかにしてきた。

本研究では、出芽酵母の研究によって得られていた、rRNA への変異導入や安定性の検出方法、関与する因子のスクリーニングなど、多数の解析ツールを生かして、ペロ毒素により SRL を損傷したリボソームが細胞内でどのような運命をたどるかの解明を目指した。そのためにまず出芽酵母における SRL 損傷リボソームのモデルを作成して、その細胞内での安定性を確認し、品質管理機構により分解に導かれる場合にはどのような因子が関与しているのかを明らかにすることを目標とした。さらに動物細胞としてはペロ毒素の感受性が比較的高いことが知られている HeLa 細胞を材料に、毒素の投与が損傷 rRNA に対して分解を誘導するかどうかを検証すること、この分解（あるいはダメージの蓄積）に対して、出芽酵母で知見の得られた機能不全リボソームに対する応答機構が、どのように関与しているかを、遺伝子ノックダウンや阻害剤の投与などさまざまな方法で検証することとした。

2. 研究の目的

細胞の中で損傷を受け、機能不全となったリボソームがその後どのような処置を受けるか、そのようなリボソームの存在に対して細胞がどのような応答反応を示すかを明らかにし、特にペロ毒素による rRNA 損傷の系を例として細胞のストレス応答の分子基盤を明らかにする。過去の研究から、活性中心（ペプチジルトランスフェラーゼ中心）に変異を持つ 25S rRNA が選択的な分解を受けることは明らかになってきており、われわれのグループでもこの分解におけるユビキチンリガーゼの関与などの新しい知見を報告している。SRL 損傷モデル 25S rRNA の安定性を出芽酵母の中で検証した後に、分解が見られる場合、スクリーニングによって分解に関与する因子を探索し、メカニズムの解明を行う。このことによって機能不全リボソームの分解に対し、常に同じユビキチンリガーゼが関与しているか、あるいは損傷の部位によって異なるシステムが使用されているのか、などの重要な点を明らかにすることができ

る。さらに動物細胞での実験からは、これらのリボソーム品質管理機構が高等真核生物の中でどのような役割を果たすかを明らかにすることができるかと期待される。

3. 研究の方法

これまでに損傷リボソームの品質管理機構の解明に効果的に使われてきた、出芽酵母の実験系を利用して、機能不全リボソームの認識と分解に関わる新たな因子を網羅的にスクリーニングする。具体的にはまず、25S rRNA の 5' 末端付近に存在する、あまり進化的に保存されていない領域に、25S rRNA の機能に影響のない短い(18塩基の)「タグ配列」を導入する。同時に、SRL 領域の保存された塩基に対し、それぞれ順番に点変異を導入していく。こうしてつくられた「タグ」つきの変異 25S rRNA は、35S rRNA の全長の形でプラスミドにクローニングされ、RNA ポリメラーゼ II のプロモーターである、Gal17 プロモーターの制御下に置かれる。こうすることで、培地中のガラクトースに依存して、変異 25S rRNA を発現誘導することが可能になる。

このようにして発現させた変異 25S rRNA は、培地をグルコース培地にすることで、発現をシャットオフすることが可能である。発現を停止して一定時間後に細胞を回収して RNA を精製し、「タグ」つき 25S rRNA の量をノザンプロットングで調べることにより、SRL に導入した変異によってその 25S rRNA がどのように安定性を変化させたかを知ることができる。野生型 25S の場合には 4 時間後でも分解を検出できないほど安定であるが、ペプチジルトランスフェラーゼ中心に変異を持つ 25S の場合には半減期 40 分程度で分解していくことがすでに確認されている。SRL の変異の場合にも同様の方法で半減期を確定する。

分解が見られる場合は、「タグ」を標的としたノザンプロットングのシグナルが弱くなると期待される。この場合、このプラスミドを 5000 株からなる出芽酵母の遺伝子破壊株コレクションに導入し、発現させることで、分解に関与する因子のスクリーニングを行う。これらに含まれる変異株の中で、分解に必要な因子が欠損しているものでは、「タグ」を持つ変異 25S の分解が行われず、結果として「タグ」由来のシグナルが強くなる。スクリーニングを繰り返していくことで擬陽性の株を排除し、関与因子を同定する。

得られた因子に対しては、ホモログ等を探し、ペロ毒素により損傷を受けたりボソームが細胞内でどのように処理されるか、その処理に対して同定された因子がどのように関わるかを詳しく解析する。

本研究では HeLa 細胞を使った動物細胞のアッセイを行うことも計画している。これはすでに、培地にペロ毒素を投与する実験が報告されているので、それらの報告どおりの濃

度で投与を行う。またペロ毒素による rRNA の損傷を検出する方法についても、すでに qRT-PCR を用いた定量方法が確立している。これらの方法を利用して、ペロ毒素の効果を HeLa 細胞で定量的に追跡できる系を確立する。上記の出芽酵母で明らかになった関与因子を、HeLa 細胞でノックダウンしたり、あるいは既知の阻害剤がある場合にはそれをペロ毒素と同時に投与するなどして、rRNA の損傷効率に与える影響や、損傷部位以外の rRNA の量（すなわち、損傷によって誘導される rRNA 分解の効率）に対する影響を調べる。こうした実験により、出芽酵母と動物細胞で、リボソームの品質管理機構にどのような共通点・相違点があるかを調べることを計画した。

4. 研究成果

ペロ毒素により損傷を受ける 60S 中の RNA ドメイン SRL は、出芽酵母の 60S でも配列が完全に保存されている。そこでまず酵母のこの SRL 配列に塩基置換を導入し、ペロ毒素損傷を模擬した 60S 変異体を作成することを試みた。数種類の変異体を作成されたが、そのほとんどのものは 60S としての機能を失った変異体であることが、相補実験を用いて確認された。このことは SRL が種を超えて配列として保存されているだけでなく、機能的に重要なドメインとして共通の役割を保存している可能性を示唆するきっかけである。

機能を失った SRL 変異体を材料に、野生型酵母を用いて、変異 25S rRNA の安定性を *in vivo* で解析した。その結果、機能を失う変異が SRL に導入された場合には、その 25S rRNA は選択的な分解を受ける、ということが明らかになった。これは以前にわれわれのグループが明らかにしてきた、25S rRNA の活性中心（ペプチジルトランスフェラーゼ中心：PTC）に変異を持つ機能不全 25S rRNA のふるまいと同様であった。この結果は、真核生物の細胞が SRL の損傷に対して選択的な分解機構を発動する、未知の品質管理機構をもっていることを明らかにする成果である。

この未知の品質管理機構の実体を明らかにするため、この SRL 変異体を、出芽酵母の遺伝子破壊株コレクション 5000 株にトランスフォームし、さまざまな変異体の中での SRL 変異体の安定性を追跡した。この結果、SRL 変異体の分解に必要な因子が明らかになってきた。ひとつのグループは、PTC 変異体の分解に必要なことがわかっていた Mms1 とその関連因子であった。もうひとつは、細胞内の数多くの因子のリン酸化を行い、多様な経路に関与するカゼインキナーゼ複合体のサブユニット、Cka2 であった。

過去の研究を参考に、Cka2 の活性中心残基を置換したところ、活性を失う変異を持つ Cka2 は、SRL 変異体の分解を補助することができない、という結果を得た。このことから、

これまでに知られていない「リン酸化シグナル」が機能不全リボソームの分解に必要であることが強く示唆された。細胞内には多くのリボソームがあるが、それらは常にさまざまなストレスに暴露され、損傷を受け続けている。それまでふつうに働いていたリボソームが急に機能不全になった場合、細胞はすみやかにそのリボソームの使用を中止し、分解に導く必要があると考えられる。一方で、正常なリボソームについては、それが非常に巨大で合成に多大なエネルギーが必要であることから、できるだけ安定に長期間使用する必要がある。このような「分解」「安定性」のスイッチの厳密な切り替えの機構は現在のところ不明であるが、Cka2 の関与は、このような切り替え機構に翻訳後修飾による情報伝達が関わっている可能性を強く示唆しており、システム全体の理解のために重要な成果であると考えられる。

本研究では平行して、動物細胞の例として、ペロ毒素の感受性が比較的高いことが知られている HeLa 細胞に、ペロ毒素を投与する実験を行った。ペロ毒素を投与すると、投与量および投与後の時間に応じて、28S rRNA の特定部分（損傷の標的となる塩基）において qRT-PCR のシグナルが減少することを確認し、実験系が十分に鋭敏であることがわかった。この系を利用して、カゼインキナーゼの阻害剤である TBB が、rRNA の分解を遅延する効果があるかどうかをおおまかに検討した。現在までにまだはっきりとした結論はでておらず、TBB がカゼインキナーゼの rRNA 安定性に対する効果を見るために最適な薬剤かどうか未だにわからない。しかしペロ毒素の効果自体は再現性よく測定されるようになっており、近い将来に出芽酵母で得られた知見を高等動物細胞で確認するためのよいモデルになるだろうと結論している。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 「真核生物リボソーム RNA の機能を検査し、不良品を分解する共通のメカニズム」北

皇真
日本分子生物学会年会
2013 年 12 月 4 日 神戸

2. 「真核生物リボソームの品質管理」北

皇真
国立遺伝学研究所研究会「単細胞システムの細胞構築・運動・増殖機構の研究」
2014 年 3 月 25 日 国立遺伝学研究所講堂

〔図書〕(計 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

北島 真 (KITABATAKE,

Makoto)

京都大学・ウイルス研究所・助教

研究者番号：10321754

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：