

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770131

研究課題名(和文) ストレス環境下において現れる損傷mRNAを選択的に分解する分子機構

研究課題名(英文) Quality control mechanisms for aberrant mRNA that emerges under stress conditions

研究代表者

細田 直 (Hosoda, Nao)

名古屋市立大学・薬学研究科(研究院)・講師

研究者番号：40438198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳動物におけるノンストップmRNAの速やかな分解機構について解析を進めた。ノンストップmRNAは翻訳依存的に速やかに分解されること、エキソソーム複合体が速やかな分解に機能することを明らかにした。さらに、損傷mRNAの一形態であるin vitro合成mRNAを細胞に導入しその動態を検証した。このようなmRNAはポリA鎖の短縮化を経ずに速やかな分解を受けること、エキソソーム複合体がその分解に機能することを見出した。

研究成果の概要(英文)：We further confirmed quality control mechanisms for non-stop mRNA using mammalian cells. The non-stop mRNA is degraded in a translation-dependent manner. The decay requires exosome complex. In addition, we examined decay of in vitro synthesized mRNA, which is an example of aberrant mRNA. The decay does not depend on poly(A) tail shortening. The exosome functions in the mRNA decay as in the non-stop mRNA decay.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：mRNA分解 翻訳 ストレス

1. 研究開始当初の背景

翻訳領域上に終止コドンが現れることにより蛋白合成は終了する。リボソーム A サイトの終止コドン上では翻訳終結因子 eRF1-eRF3 が機能する。eRF1 は tRNA 類似構造をとり終止コドンを認識する。申請者は、G 蛋白質である eRF3 が、翻訳終結後の mRNA 動態を運命づけるコントローラーとして機能することを明らかにしてきた。さらに、翻訳終結因子 eRF1-eRF3 の類似タンパク質として Dom34-Hbs1 が知られている。eRF3 と同様に、Hbs1 は G 蛋白質である。Dom34-Hbs1 の機能は長らく不明であったが、近年、申請者を含めいくつかのグループにより、翻訳停止時における mRNA 分解制御に機能することが明らかにされつつあった。

2. 研究の目的

細胞が紫外線・オキシダントなどのストレス環境にさらされると、mRNA 塩基あるいは mRNA 鎖は損傷を受ける。蛋白質コード領域中にこの損傷が現れると、リボソームは翻訳途上で停止する。その結果、C 末端側が欠失した異常蛋白質が発現し、細胞にダメージを与える。細胞はこのような損傷 mRNA を速やかに分解することにより、ストレス環境に対応すると想定される。そこで本研究では、翻訳終結および翻訳停止を引き金とする mRNA 分解制御に関する申請者の研究実績に基づき、ストレス環境下において生ずる損傷 mRNA を検知し選択的に分解する機構を解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 哺乳動物細胞における mRNA 分解経路の解析では、テトラサイクリン存在下で発現が制御できるβグロビンレポーター遺伝子を HeLa 細胞に導入し、mRNA の半減期・3'末端 poly(A) 鎖短縮化を定量的に解析する実験系(パルス・チェース解析)を用いた。βグロビン遺伝子の終止コドンに変異を導入することにより、終止コドンリードスルー型 mRNA とした。これらレポーターについて、翻訳依存的な mRNA 分解、および siRNA による 3'→5' 方向エキソヌクレアーゼ複合体(エキソソーム)構成因子などの siRNA によるノックダウンが mRNA 分解に及ぼす影響について検証した。

(2) *in vitro* 合成 mRNA を哺乳動物細胞に導入し、その分解速度およびポリ A 鎖短縮化速度を定量する実験系を確立した。Dom34-Hbs1、エキソソーム構成因子などを siRNA によりノックダウンし、損傷 mRNA を模倣する *in vitro* 合成 mRNA

の分解速度を解析した。

4. 研究成果

(1) 終止コドンリードスルー型 mRNA の急速な分解における翻訳依存性について、さらなる確認を行った。鉄応答配列 IRE を 5' 非翻訳領域にもつβグロビンレポーター遺伝子を新たに作製した。このレポーターはヘム鉄存在下においてのみ翻訳される。IRE を 5' 非翻訳領域にもつレポーター mRNA では、ヘム鉄存在下においてのみ、終止コドンをもたない mRNA の急速な分解が観察された。翻訳依存的にこの急速な分解が引き起こされること確認された。

(2) 終止コドンリードスルー型 mRNA の急速な分解におけるエキソソーム複合体の関与について、さらなる確認を行った。エキソソーム複合体において、RNase R ファミリーに属する Dis3 および RNase D ファミリーに属する Rrp6 が 3'-5' RNA 分解活性を担っている。siRNA によるノックダウン実験により、Dis3 がこの急速な分解において主として機能することを見出した。同様のノックダウン解析により、エキソソーム制御タンパク質である RNA ヘリカーゼ Ski2 および Mtr4 が相補的に機能することを見出した。

(3) *in vitro* 合成 mRNA を HeLa 細胞に導入し、そのポリ A 鎖短縮化を検討した。レポーターとして、72 塩基のポリ A 鎖を付加した EGFP mRNA (EGFP-pA100 mRNA) を用いた。興味深いことに、導入した EGFP-pA100 mRNA では、ポリ A 鎖の短縮化を経ずに mRNA 本体が分解を受けることを見出した(図1参照)。この分解は翻訳阻害剤シクロヘキシミドにより抑制されたことから、翻訳と共役していることが示唆された。

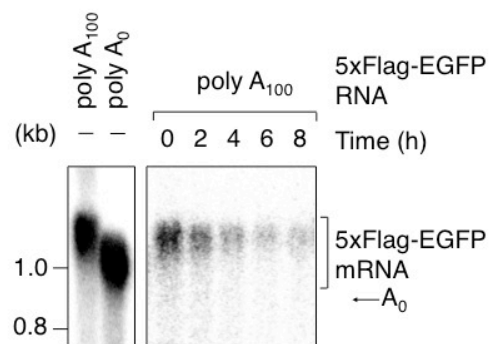


図1 *in vitro*合成mRNAは、細胞内においてポリA鎖短縮化を経ずに急速に分解される

(4) mRNA 本体の分解では 5'-3' mRNA 分解においては Xrn1 が、3'-5' mRNA 分解においてはエキソソーム複合体が機能する。Xrn1 および Dis3 のノックダウンにより、導入した mRNA の分解が抑制された。また、エキソソーム複合体結合

因子である RNA ヘリカーゼ Ski2 および Mtr4 のノックダウンにより、同様に導入した mRNA の分解が抑制された。以上の結果から、損傷 mRNA は翻訳依存的に 5'-3' および 3'-5' mRNA 分解機構を動員することにより速やかに分解されることが示唆された。

#### 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 4 件)

1. #Shyuhei Saito, #Nao Hosoda, and Shin-ichi Hoshino. (#: equal contribution)  
The Hbs1-Dom34 protein complex functions in non-stop mRNA decay (NSD) in mammalian cells.  
*J. Biol. Chem.* **288**: 17832-17843 (2013)
2. Koichi Ogami, Nao Hosoda, Yuji Funakoshi, and Shin-ichi Hoshino.  
Anti-proliferative protein Tob directly regulates c-myc proto-oncogene expression through cytoplasmic polyadenylation element-binding protein CPEB  
*Oncogene* **33**: 55-64 (2014)
3. Yoshifumi Hashimoto, Nao Hosoda, Pinaki Datta, Emad S. Alnemri, and Shin-ichi Hoshino.  
Translation termination factor eRF3 is targeted for caspase-mediated proteolytic cleavage and degradation during DNA damage-induced apoptosis.  
*Apoptosis* **17**: 1287-1299 (2012)
4. Masanori Osawa, Nao Hosoda, Tamiji Nakanishi, Naoyuki Uchida, Tomomi Kimura, Shunsuke Imai, Asako Machiyama, Toshiaki Katada, Shin-ichi Hoshino, and Ichio Shimada.  
Biological Role of the Two Overlapping Poly(A)-binding Protein Interacting Motifs 2 (PAM2) of a Eukaryotic Releasing Factor, eRF3 in mRNA decay  
*RNA* **18**: 1957-1967 (2012)

[学会発表] (計 1 3 件)

1. 細田 直、釣 真由美、尾上 耕一、星野 真一  
CPEB によって制御される mRNA ポリ A 鎖分解機構  
Mechanisms of a transcript-specific mRNA deadenylation by CPEB  
第36回日本分子生物学会年会(ワークショップ);2013年12月/神戸
2. 橋本 芳史、細田 直、星野 真一  
翻訳終結因子 eRF3 のプロセス体 p-eRF3 の新

規機能

第86回日本生化学会大会;2013年9月/横浜

3. 野木森 拓人、細田 直、星野 真一  
B型肝炎治療を目指した mRNA とランスフェクションによる高効率遺伝子発現系の確立  
日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2013;2013年11月/鈴鹿
4. 細田 直、齊藤 修平、星野 真一  
哺乳動物細胞におけるノンストップ mRNA 分解の分子機構の解析  
第15回日本 RNA 学会年会;2013年7月/松山
5. 橋本 芳史、細田 直、星野 真一  
翻訳終結因子 eRF3 の細胞内局在制御  
第15回日本 RNA 学会年会;2013年7月/松山
6. 岡本 淳志、細田 直、星野 真一  
翻訳終結因子 Sup35 の切断が酵母プリオンの出現を防御する  
第15回日本 RNA 学会年会;2013年7月/松山
7. 西浦 久達、細田 直、星野 真一  
eRF3 ファミリーに属する G タンパク質 GTPBP1 の機能解析  
日本薬学会東海支部大会;2013年7月/名古屋
8. 奥村 真由、細田 直、星野 真一  
ポリ A 鎖分解酵素 Nocturnin による mRNA 動態制御  
日本薬学会東海支部大会;2013年7月/名古屋
9. 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  
日本薬学会第133年会;2013年3月/横浜
10. 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回生化学会大会;2012年12月/福岡
11. Koichi Ogami, Nao Hosoda, Yuji Funakoshi, and Shin-ichi Hoshino.  
Anti-proliferative protein Tob directly regulates c-myc proto-oncogene expression through cytoplasmic polyadenylation element-binding protein CPEB  
The Complex Life of mRNA, EMBO Symposia, 2012 October, Heidelberg, Germany
12. Yoshifumi Hashimoto, Nao Hosoda, Pinaki Datta, Emad S. Alnemri, and Shin-ichi Hoshino.  
Translation termination factor eRF3 is targeted for caspase-mediated proteolytic cleavage and degradation during DNA damage-induced apoptosis.  
The Complex Life of mRNA, EMBO Symposia, 2012 October, Heidelberg, Germany

13. 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  
日本薬学会東海支部大会;2012 年 7 月/静岡  
岡

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/syk/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

細田 直 (HOSODA NAO)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・講師

研究者番号：40438198

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし