

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770162

研究課題名(和文) 高等真核細胞における mRNA 品質管理機構による新規低分子 RNA 産生経路の検討

研究課題名(英文) Analysis of the generation of a novel small RNAs by mRNA surveillance in eukaryote cells

研究代表者

鹿島 勲 (KASHIMA, ISAO)

東北大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：60613180

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)：酵母を用いた解析から、終止コドンを欠失した mRNA を分解する、nonstop mRNA decay (NSD) 機構および nonstop mRNA から産生されるノンストップタンパク質を分解する、nonstop protein degradation (NSPD) 機構が知られる。これらの機構には、mRNA 3' 末端で停滞したリボソームの解離因子として Pelota:Hbs1、E3 ユビキチンライゲース Ltn1 がノンストップタンパク質の分解を誘導するユビキチンライゲースとして関与することが知られている。本研究課題では、酵母同様にショウジョウバエ細胞においても NSD・NSPD が存在していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Nonstop mRNA decay (NSD) is quality-control mechanism that detects and degrades mRNAs lacking stop codons. Nonstop protein degradation (NSPD) eliminates aberrant proteins derived from nonstop mRNA. The previous studies in yeast indicate that the Dom34:Hbs1 complex, which are paralogues of mammalian eRF1:eRF3 complex, promotes peptidyle-tRNA release and stalled ribosome dissociation by binding to the empty A site of the stalled ribosome. This enables access of the Ski:Exosome exonuclease complex at 3' end of nonstop mRNAs for subsequent NSD. The E3 ubiquitin ligase Ltn1 is responsible for proteasome-dependent aberrant nonstop polypeptides degradation (NSPD) following the dissociation of ribosome. Here we show that Pelota (Dom34 paralog) and Hbs1 are involved in the degradation of nonstop mRNAs in showed as well as distinct manners compared with yeast, and Ltn1 is essential for NSPD via proteasome pathway in *Drosophila Melanogaster* cells.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：分子生物学

キーワード：Nonstop mRNA decay

1. 研究開始当初の背景

申請者は、ヒトを含む真核細胞におけるゲノム情報の正確な発現を保証するシステムの一つであるナンセンスコドン依存的な mRNA 分解 (Nonsense-mediated mRNA decay; NMD) 機構の解析をこれまで行ってきた。NMD 機構は異常な位置に終止コドンを有する mRNA (ナンセンス mRNA) を排除することで、異常タンパク質断片の蓄積を防ぐ。これまでの一連の解析から、異常終止コドンの発見のためのダイナミックなタンパク質複合体リモデリング、また、その異常 mRNA の迅速な分解にはエクソンジャンクション複合体 (EJC) が足場となって機能することを明らかにしてきた (Kashima et al. *Genes and Dev.* 2010; Kashima et al. *Genes and Dev.* 2006)。エクソンジャンクション複合体とは、スプライシングを経験した成熟 mRNA 上、エクソンとエクソンの連結部にスプライシング完了の目印として結合するタンパク質複合体のことである。正常 mRNA の 5' UTR、および、翻訳領域に結合している EJC は、リボソームによる初期段階の翻訳により mRNA 上から取り除かれる。一方、終止コドンの下流に存在する EJC はリボソームによる翻訳により解離しないため、翻訳終結に伴い NMD 因子の複合体が形成される。まさに、この過程がナンセンスコドン認識であることを示した (Kashima et al., *Genes Dev.*, 2006)。申請者は、最近エクソンジャンクション複合体に結合するアミノ酸配列モチーフ (EBM) とそれを有するタンパク質 (EBM タンパク質) を見つけ出し、NMD エンドヌクレアーゼ SMG6 は SMG6N 末に存在する EBM を介して標的 mRNA に結合し mRNA の内部切断を引き起こす (Kashima et al., *Genes Dev.*, 2010)。NMD 以外にも mRNA の内部切断を引き起こす mRNA 品質管理機構として No-go mRNA decay が知られる (Harigaya and Parker, *RNA*, 2010)。上記、NMD および NGD の mRNA 内部切断により生じる 5' mRNA 断片、3' mRNA 断片はそれぞれ 3' -5' エキソヌクレアーゼ複合体である exosome、5' -3' エキソヌクレアーゼ Xrn1 により分解されることが知られる (Gatfield D & Izaurralde, *Nature*, 2004; Inada and Aiba, *EMBO*, 2005)。言い換えると、NMD および NMD の品質管理により生じる 5' mRNA 断片は、終止コドンを欠損した mRNA (Nonstop mRNA) となる。申請者が申請時に所属していた研究室では、酵母を用いて nonstop mRNA の分解に関する解析を先行して行っていた。酵母および試験管内翻訳システムにおいては、終止コドンを欠損した mRNA (nonstop mRNA) をリボソームが翻訳して、その mRNA の 3' 末端まで達すると翻訳終結因子 eRF1:eRF3 と相同な構造をとる

DOM34:HBS1 複合体がリボソームの A サイトに結合し、mRNA の 3' 末端で停滞しているリボソームの解離を行うことが明らかとなっている。翻訳終結コドンに依存せずにリボソームが mRNA から解離する仕組みが存在し、酵母においては DOM34:HBS1 がその役割を担っていることを、申請者が申請時に所属していた研究室にて明確に示されている (Tsuboi et al., *Mol Cell.*, 2013)。この翻訳終結コドンに依存しない mRNA 3' 末端からのリボソーム解離によって、3'-5' エクソヌクレアーゼが mRNA の分解を引き起こし nonstop mRNA は急速に分解される。本研究課題では、まず酵母において先行して解析が進んでいた nonstop mRNA 分解系が真核生物において進化的に保存されている品質管理機構であるかを調べるために、ハエ細胞を用いて nonstop mRNA 分解の解析系の確立を行った。まずは、nonstop mRNA 分解が存在するかを確認して、その mRNA の分解経路が先行する酵母と同じであるか確認を始めた。また、酵母において翻訳終結コドンに依存しないリボソーム解離に必要な因子、DOM34:HBS1 複合体のオーソログであるショウジョウバエ Pelota:HBS1 を中心に、どのようにして、どのような因子が翻訳終結コドンに依存せずにリボソームを解離することが出来るのか解析をすることを目的とした。

また、申請者が申請時に所属していた研究室にて、興味深いことに、DOM34 欠損酵母では終止コドンを欠損した mRNA 3' 末端でのリボソームの停滞は、さらなる内部切断 (二次内部切断を引き起こすことをレポーター遺伝子によって示唆した (Tsuboi et al., *Mol Cell.*, 2013))。これら酵母の解析から、申請者は高等真核細胞内において DOM34 は終止コドンを有さない mRNA の 3' 側末端でのリボソーム停滞による nonstop mRNA の内部切断の効率を測定すること、また、この過程がさまに新規 non-coding small RNA の生合成経路であるという作業仮説を立てた。研究開始当時、ショウジョウバエ細胞における nonstop mRNA の解析はなされておらず、本終了報告書を作成している 2014 年 4 月においても、未だ解析は発表されていない。また、mRNA 内部切断により生じる終止コドンを欠損した mRNA の内部切断による non-coding small RNA 産生の有無、およびその生理的意義の解明は全くなされていない。

2. 研究の目的

真核細胞の遺伝子発現過程において生じる mRNA 上の異常は mRNA 品質管理機構により排除される。本研究では、mRNA 監視・発現調節機構による mRNA 内部切断、および、その結果生じる終止コドンを欠失した mRNA (nonstop mRNA) の分解メカニズムの解明また、先行する酵母での知見に基づいたリボソーム翻訳停滞依存的な mRNA 内部切断片を網羅的に同定することで新規内在性 non-coding small RNA の産生経路の検討を目的として解析を始めた。

本研究課題では下記の二点を明らかにすることを目的とした。

(1) mRNA 内部切断により生じる終止コドンを欠失した mRNA 分解・翻訳制御における DOM34:HBS1 の解析
終止コドンを欠失した mRNA からのリボソーム解離に関して、酵母において先行して明らかにされている酵母 DOM34:HBS1 の機能“翻訳終結コドンに依存しないリボソームの解離”がヒトおよびハエ細胞内でも DOM34/Pelota:HBS1 が酵母同様に関与しているか解析する。

(2) 停滞リボソーム依存の mRNA 切断機構の検討

酵母の解析から示唆されたリボソーム解離因子 DOM34 の機能阻害に依存した停滞リボソーム依存の mRNA 切断機構の進化的保存性をショウジョウバエ細胞を用いて検討する。

3. 研究の方法

先行する酵母の解析をもとに、ショウジョウバエ培養細胞を用いて終止コドンを欠失した mRNA (nonstop mRNA) の分解機構を解析するためのアッセイシステムを構築した。研究計画書には、ヒト細胞も平行して解析する計画を挙げていたが、レポーター遺伝子由来の mRNA およびタンパク質の解析、また、候補因子のノックダウンの効率等を考慮した結果、ショウジョウバエ細胞をまず取り扱い nonstop mRNA の解析を行うことに決定した。酵母における解析に基づき RNA 自身が自己切断を行う配列 (ハンマーヘッドリボザイム配列) を挿入して強制的に終止コドンの欠失した GFP nonstop mRNA を産生するショウジョウバエ細胞発現ベクター pAc5.1 にクローニングした。酵母同様に、ハンマーヘッドリボザイム配列を有する転写産物が内部切断しているか否かを、ショウジョウバエ培養細

胞である S2 細胞に一過的遺伝子導入法 (トランジェントトランスフェクション法) によりハンマーヘッドリボザイム配列を有する GFP をクローニングした pAc5.1 ベクターを導入した。細胞を回収して、タンパク質解析用、および、mRNA 解析用にアイソレーションして、ウェスタンブロットイングおよびノーザンブロットイングを行った。その結果、酵母同様に、S2 細胞においてもハンマーヘッドリボザイム配列を挿入した転写産物から GFP nonstop mRNA を産生できることが明らかになった。一過的発現系 (トランジェントトランスフェクション) で解析を進めたが、トランスフェクションによる細胞へのダメージおよびトランスフェクション試薬のコストの問題などから、一過的発現系 (トランジェントトランスフェクション) ではなく S2 細胞に安定に発現する細胞株 (ステーブル細胞株) を作成した。具体的には、pAc5.1GFP-nonstop mRNA を発現するように組み込んだプラスミドベクターとプラスチジン耐性遺伝子を発現する発現ベクターを同時に S2 細胞にトランスフェクションして、プラスチジンを S2 細胞培地に処理し、プラスミド DNA が S2 細胞のゲノム DNA にインテグレーションして、安定に発現している細胞集団を選択した。同様の作業をハンマーヘッドリボザイム配列を有さない、GFP nonstop mRNA のコントロールに相当する GFP をコードし正常な翻訳終結コドンを有する mRNA を発現する S2 細胞安定発現株も作成した。まず、nonstop mRNA の分解経路を検証するために、5'-3'エクソヌクレアーゼ Xnl1 および 3'-5'分解酵素複合体 Ski:Exosome の機能破壊のための RNAi 法を用いたノックダウン条件の確立を行った。ショウジョウバエ細胞では試験管内 T7 RNA ポリメラーゼ転写によって作成した dsRNA を RNAi に用いられるが、dsRNA を大量に合成して RNAi 法を安定に安価に行うために市販の T7 RNA ポリメラーゼの利用を取りやめ、申請者が T7 RNA ポリメラーゼを T7 ファージゲノム DNA から T7 RNA ポリメラーゼを大腸菌発現ベクターにクローニングして、大腸菌からリコンビナント T7 RNA ポリメラーゼを大量精製して、ショウジョウバエ細胞での RNAi に用いる dsRNA の作成を行った。さらに、酵母および試験管内翻訳系にて終止コドンを欠失した mRNA の 3'末端で停滞したりボソームの解離に促進的に働くことが知られている因子 DOM34:HBS1 のハエホモログ Pelot:HBS1a のノックダウンを行い nonstop mRNA の分解および nonstop mRNA 由来のタンパク質の発現量を解析した。具体的には、ノックダウンを行う各

遺伝子 mRNA 配列に対応する領域を T7 転写開始配列を含むプライマーを用いて PCR 法により増幅して鋳型 DNA を作成した。その鋳型 DNA と T7 RNA ポリメラーゼを用いて dsRNA を合成した。合成後鋳型 DNA を消化するために、DNA 分解酵素処理を行った。dsRNA を生成するためにフェノール・クロロホルム抽出を行い、そのアクオフェーズを回収してエタノール沈澱法によって試験管内 T7 RNA ポリメラーゼ転写の際に用いたヌクレオチドを含む dsRNA を回収した。dsRNA から試験管内 T7 RNA ポリメラーゼ転写の際に用いたヌクレオチドを除去するために、G25 カラムを用いて dsRNA を精製した。G25 カラム精製後に、dsRNA を 95 に熱したヒートブロック、もしくは、沸騰した水(チューブの浮きを利用して浮かべた)で 5 分間インキュベーションし、その後室温にオーバーナイトで放置して dsRNA のハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションを行った dsRNA の定量及び精製度の確認ために核酸の濃度を定量することが出来る分光光度計を用いて濃度を算出し、また、アガロースゲルを用いて、収量・精製度および dsRNA の鎖長の確認を行った。上記の方法により得られた dsRNA をショウジョウバエ細胞にノックダウン初日、4 日後に dsRNA を処理してノックダウンを開始して一週間後に細胞をタンパク質解析用および RNA 解析用に回収した。dsRNA は、1000000 細胞あたり約 20 マイクログラム処理して、dsRNA 処理時には S2 細胞培養液が血清成分を除去した S2 細胞培養液中にて S2 細胞を培養した。血清成分を除去した S2 細胞培養液で約二時間インキュベーションした後、通常の S2 細胞培養液の 2 倍の血清量を含む細胞培養液を dsRNA を処理した培地に加えた。申請者が申請時に所属していた研究室で示された、エクソヌクレアーゼ Ski と dom の両方を欠損した酵母株では、終止コドンを欠失した mRNA から産生された新生ポリペプチド鎖に tRNA が結合した、ペプチジル tRNA が検出された。このことから、ヒト細胞やショウジョウバエ細胞においても DOM34 のホモログである Pelota ノックダウン時に終止コドンを欠失した nonstop mRNA からペプチジル tRNA が産生する可能性があることから、ペプチジル tRNA の検出には、通常用いられるトリス・グリシンの SDS-PAGE のシステムではなく、pH を中性付近に設定した Nu-Page 法を用いた。

4 . 研究成果

mRNA 監視・発現調節機構による mRNA 内部切断とその結果生じる終止コドンを欠

失した mRNA (nonstop mRNA) の分解メカニズムの解明を進めるために、ショウジョウバエ細胞を用いた nonstop mRNA 分解機構のアッセイ系を構築に成功した。具体的には、GFP をコードする nonstop mRNA を発現するショウジョウバエ細胞安定発現株を樹立し、GFP nonstop mRNA の分解機序の解析を行った。先行する酵母と同様に、GFP nonstop mRNA の分解は 3'-5' および 5'-3' の経路、それぞれ Ski:exosome 複合体、エクソヌクレアーゼ Xrn1 によって行われることを明らかにした。酵母においては、終止コドンを欠損した mRNA の 3'末端からのリボソーム解離には、Dom34/Pelota:Hbs1 複合体が促進的に働いていることが知られている。現在、ショウジョウバエ細胞においてリボソーム解離因子候補 Pelota、Hbs1 をノックダウンした条件下での GFP nonstop mRNA の挙動を解析することで、ショウジョウバエ細胞における終止コドン非依存のリボソーム解離因子の検証をおこなっている。研究目的 (2) 停滞リボソーム依存の mRNA 切断機構の検討に関しては、上記 (1) の解析結果から得られた情報をもとに検証を行う予定である。

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 0 件)

[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

鹿島 勲 (KASHIMA, ISAO)
東北大学・薬学研究科・助教
研究者番号：60613180