

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840001

研究課題名(和文) ショウジョウバエ細胞における新規ペプチド鎖解離因子の探索

研究課題名(英文) Investigation of novel polypeptide chain releasing factors in Drosophila cells

研究代表者

鹿島 勲 (KASHIMA, Isao)

東京大学・教養学部・特任准教授

研究者番号：60613180

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：真核細胞は遺伝情報の維持・発現の過程で生じる異常mRNAを認識・分解する仕組み「mRNA品質管理機構」を備えている。本研究では、高等真核細胞における翻訳終結コドンを欠失したノンストップmRNAの分解機構解明を目的とした。その結果、ノンストップmRNA分解経路がショウジョウバエ細胞にも保存されていること、また、ABCE1(リボソーム解離因子)が関与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. This study showed that Pelota (Dom34 paralog) and Hbs1 are involved in the degradation of nonstop mRNAs and Ltn1 is essential for NSPD via proteasome pathway in Drosophila Melanogaster cells.

研究分野：RNA Biology

キーワード：translation termination

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 mRNA 品質管理機構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) 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もつ 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)。申請者は、最近エクソ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 担当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 の分子内切断を引き起こすことを明らかにした (Kashima et al., *Genes Dev.*, 2010)。NMD 以外にもリボソームの翻訳停滞により mRNA 分子内切断が引き起こされる No-go mRNA decay (NGD) が酵母において知られている (Harigaya and Parker, *RNA*, 2010)。また、遺伝子発現調節および外来生物感染からの生体防御機構として非常によく解析されている RNAi においても mRNA の分子内切断が引き起こされることが明らかとされている。上記、NMD、NGD および RNAi 経路による mRNA 分子内切断により生じる 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 XrnI により分解されることが知られている (Gatfield D & Izaurralde, *Nature*, 2004; Doma, *Nature*, 2006; Orban and Izaurralde, *RNA*, 2005)。分子内切断によって生じる 5'断片はキャップ構造と開始コドンをもつ、翻訳終止コドンを欠失した異常な mRNA (ノンストップ mRNA) となる。酵母においてノンストップ mRNA は急速に分解されることから (ノンストップ mRNA decay; NSD) (Inada and Aiba, *EMBO*, 2005)、細胞には異常翻訳伸長を検出して mRNA を分解へと導く仕組みが備わっていると考えられてきた。先行研究によって、翻訳終止因子 eRF1:eRF3 と相同性をもつ DOM34:HBS1 が翻訳伸長複合体の A 部位に結合し、酵母細胞におけるノンストップ mRNA の 3'末端に達したリボソームの翻訳終止非依存の解離を促進して mRNA 分解を誘導することを明らかにした。(Tsuboi et al., *Mol. Cell*, 2012)。この発見によりは、酵母において異常翻訳伸長を認識している実態は、リボソーム A 部位結合する DOM34:HBS1 であることが示された。申請者はこれら酵母の

知見に基づき、DOM34:HBS1 による翻訳終止コドン非依存の翻訳終止 (ペプチド鎖解離とリボソーム解離) がショウジョウバエ細胞においても進化的に保存されている分子機構であるか検証することを最初の目的とした。

2. 研究の目的

真核細胞は遺伝情報の維持・遺伝子発現の過程において生じた異常 mRNA を認識し分解する仕組み“ mRNA 品質管理機構 ”を備えている。この mRNA 品質管理機構はリボソームによる翻訳伸長・終止での異常を感知することで、遺伝子変異や mRNA 成熟過程において産生される異常 mRNA を検出・分解する。また、遺伝子発現調節および外来生物感染からの防御機構として small interfering RNA (siRNA; RNA 干渉) による遺伝子発現抑制機構も備えている。これら一見異なる mRNA 分解機構は mRNA の分子内切断により標的 mRNA の分解を引き起こす共通点を有する。本研究では、高等真核細胞における mRNA 監視・発現調節機構による mRNA 分子内切断、その結果生じる mRNA 断片の分解メカニズムの解明を目的とする。

3. 研究の方法

申請者は、下記の三点を明らかにするためにショウジョウバエ培養細胞を用いて解析を行うことを計画した。

(1) RNAi ライブラリーを用いた新規ペプチド解離因子の探索

新規ペプチド解離因子の探索

申請者は既に翻訳終止コドン非依存の翻訳終止を RFP および GFP の蛍光強度により間接的に観察することが出来るレポーターアッセイ系を既に構築した。このレポーターアッセイ系を利用し、ゲノムワイド RNAi ライブラリーを用いて新規ペプチド解離因子の探索を行う。

新規ペプチド鎖解離因子候補の検証

スクリーニングで得られた新規ペプチド鎖解離因子候補の検証を培養細胞を用いて行う。

新規ペプチド解離因子の進化的保存性の解析

ショウジョウバエ細胞において探索・検証された新規ペプチド解離因子の機能が進的に保存されているか確認する。ヒト培養細胞を用いて翻訳終止コドン非依存の翻訳終止 (ペプチド鎖解離・リボソーム解離) に新規ペプチド解離因子のヒト相同因子が関与しているか解析する。

(2) 翻訳終結コドン非依存のリボソーム解離の重要性の検討

高等真核細胞における翻訳終結非依存のリボソーム解離の解離が細胞内のどのような生命現象に重要な働きをしているのか検証する。具体的には、mRNA 品質管理機構 NMD や遺伝子発現抑制機構 siRNA 経路から生じるノンストップ mRNA の安定性をまずリボソーム解離因子 Pelota:HBS1 にて解析する。

(3) 翻訳異常に起因したポリペプチド鎖分解機構の解析

最近、酵母において翻訳伸長・終結の異常が原因となり、その異常状態にあるリボソームが保持しているポリペプチド鎖がユビキチンライゲース Ltn1 によってユビキチン化されプロテアソーム経路により急速に分解されることがわかってきた。これは異常翻訳によって mRNA 品質管理とタンパク質の品質管理が同時に働くことを示している。この酵母における観察事実が、ショウジョウバエ細胞においても保存されているか検討する。

4. 研究成果

真核細胞は遺伝情報の維持・遺伝子発現の過程において生じた異常な mRNA を認識し分解する仕組み「mRNA 品質管理機構」および、遺伝子発現調節、外来生物感染からの防御機構として RNAi による遺伝子発現抑制機構を備えている。「mRNA 品質管理機構」はリボソームによる翻訳促進・終結過程での異常を感知することで、遺伝子変異や mRNA 成熟異常に起因して産生される異常 mRNA を検出・分解することがわかりつつある。また、さまざまな理由で生じうる内在性および、外来性の二重鎖 RNA が siRNA の供給源となり、RNAi 機構によって標的 mRNA 内切断を引き起こす。その結果、終結コドンを欠失した mRNA (ノンストップ mRNA) を産生しうる共通点を有する。本研究では、高等真核細胞における mRNA 品質管理・発現調節機構によって引き起こされる mRNA 内部切断、その結果産生されるノンストップ mRNA の分解機構解明および、ノンストップ mRNA の 3' 末端に達したリボソームの翻訳終結コドンに依存しない解離反応の分子機構解明を目的として解析を行った。その結果、酵母における先行研究で既に明らかにされていたノンストップ mRNA 分解経路がショウジョウバエ細胞にも保存されていること、ならびに、これまで報告がなかった ABCE1 (リボソーム解離因子) がノンストップ mRNA 分解に関与することを明らかにした。

これまでの本研究課題の解析は、翻訳コドンを欠失した mRNA (ノンストップ mRNA) および、ノンストップ mRNA から産生されるポリペプチドの蓄積量や安定性の解析には、酵母の先行研究により詳細に解析がなされている GFP ノンストップ mRNA 発現レポーターシステム

(GFP-Rz) をショウジョウバエ細胞用へ改変して利用してきた。その中で、本研究課題を進める上で下記に挙げた二つの重要な疑問が生じた。ショウジョウバエ細胞における GFP-Rz mRNA およびポリペプチドの蓄積量や安定性から得られた結果は、内在遺伝子由来の mRNA が細胞質中で内部切断されることにより生じるノンストップ mRNA にも共通して観察される現象であるか？ それとも GFP ノンストップ mRNA 発現レポーターシステム固有の現象であるか？ Rz (リボザイム) による mRNA の内部切断効率が非常によいことから、GFP ノンストップ mRNA 発現レポーターシステム由来のノンストップ mRNA は核内において生じている可能性が高い。核内におけるポリ A 鎖を欠失した mRNA は、核内の 3'-5' エクソヌクレアーゼによって急速に分解される。また、核内においてポリ A は、mRNA を細胞質へ輸送する非常に重要な ID の一つとして知られる。現段階では、ショウジョウバエ細胞において、ノンストップ mRNA の核内での安定性および、細胞質への輸送機構の詳細は明らかとなっていない。ノンストップ mRNA の翻訳に依存した細胞質中での安定性、および、そのノンストップ mRNA 由来のポリペプチド鎖の安定性に焦点を当てた解析を進めるために、ショウジョウバエ細胞におけるノンストップ mRNA レポーターシステムの構築および、詳細な解析検討の必要性が出てきた

そこで、ショウジョウバエ細胞を用いた過去の文献の中から、細胞内在遺伝子由来の mRNA で、かつ、細胞質中で内部切断されることが明らかとなっている遺伝子の検索を行った。この文献調査から、ショウジョウバエ細胞においてノンストップ mRNA 分解機構で分解されている可能性のある遺伝子を見つけることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kashima, I., Takahashi, M., Hashimoto, Y., Sakota, E., Nakamura, Y., and Inada, T. (2014). A functional involvement of ABCE1, eukaryotic ribosome recycling factor, in nonstop mRNA decay in *Drosophila melanogaster* cells. *Biochimie* 106, 10-16. (査読あり)

〔学会発表〕(計 1 件)

鹿島勲、迫田絵里、中村義一、稲田利
A pivotal role for ABCE1, eukaryotic ribosome recycling factor, in nonstop mRNA decay, 日本 RNA 学会、2014 年 7 月 24、ウインク愛知 (愛知県名古屋市)

〔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
<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/rnaikagaku/introduction.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鹿島 勲 (KASHIMA, Isao)
東京大学・教養学部・特任准教授
研究者番号：60613180