

ポリ(A)鎖短鎖化複合体とリボソーム結合因子 Asc1/RACK1 の 遺伝子発現における機能解析

遺伝子制御薬学分野 牧野 支保

遺伝子の発現は、転写と転写後の2つの段階で厳密に制御されている。mRNAは、microRNA(miRNA)と呼ばれる22塩基程度の小分子RNAによって、配列依存的に転写後の段階で負に制御される。また、終止コドンの欠失や翻訳伸長阻害による異常なmRNAは、転写後の段階で品質管理機構によって負に制御される。近年の研究により、miRNAや品質管理機構による発現制御の破綻が、癌や神経変性疾患をはじめとする重篤な疾患に関連することが示されている。本研究ではmiRNAによる発現制御で中心的な役割を果たすポリ(A)鎖短鎖化複合体の機能と、翻訳停滞に起因する品質管理機構において必須なリボソーム結合因子Asc1/Rack1の機能を明らかにすることを目的とした。

1. miRNA発現制御機構におけるポリ(A)鎖短鎖化複合体の機能解析

miRNAは単独で機能するのではなく、発現抑制の中心となるTNRC6がポリ(A)鎖短鎖化複合体CCR4-NOTと直接結合し、①標的mRNAのポリ(A)鎖の短鎖化と不安定化、および②翻訳抑制という2つの異なる分子機構により標的遺伝子の発現を制御する。しかし、miRNAによる標的mRNA本体の分解と翻訳抑制の詳細な分子機構は不明であった(図1)。本研究では、miRNA制御機構をもたない出芽酵母*S. cerevisiae*において、ゼブラフィッシュのTNRC6をmRNAに人工的に係留させてCCR4-NOT複合体を呼び込みmiRNAによる発現抑制を再現する実験系を構築することに成功した。遺伝学的な解析が容易な出芽酵母を用いることで、これまで未解明であったmiRNAによる標的mRNA本体の分解と翻訳抑制の分子機構を解き明かすことを目的とした。

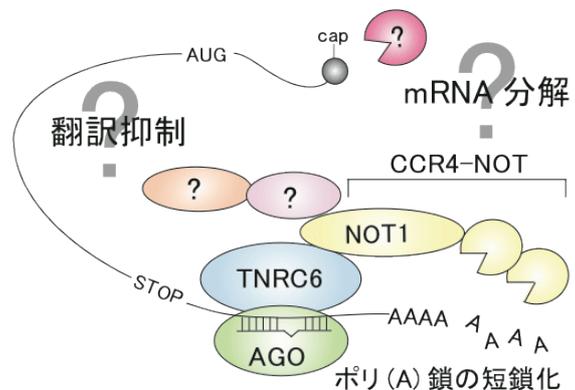


図1. miRNAによる翻訳抑制及びmRNA分解の促進機構は不明である

TNRC6-CCR4-NOT 複合体は、翻訳とポリ(A)鎖の短鎖化とは独立して、エキソリボヌクレアーゼである Xrn1 による 5'末端側から mRNA の分解を促進することが明らかとなった。この mRNA 分解経路はゼブラフィッシュにおける miRNA 発現抑制機構でも保存された機構であることが示唆された（共同研究者 東大分生研三嶋博士による解析）。さらに、mRNA 安定性制御因子である Dhh1 と Pat1 が重複して mRNA の分解促進に寄与していた。TNRC6 はポリ(A)鎖短鎖化複合体を介してキャップ構造の除去反応（デキャッピング）を促進する因子を呼び込むことで、mRNA 本体の分解を促進することを明らかにした。

さらに、TNRC6 はポリ(A)鎖短鎖化複合体を介して翻訳の開始段階を阻害しており、その活性にデキャッピング促進因子 Dhh1 と Pat1 が必須であることを見出した。また、TNRC6 による翻訳抑制には CCR4-NOT 複合体の構成因子である Caf1 と Ccr4 も必須であり、ポリ(A)鎖短鎖化には依存しないことが明らかとなった。TNRC6-CCR4-NOT 複合体による発現抑制を再現した本実験系は、他の生物種にも保存された Not1/CNOT1 の構造が TNRC6 と結合することで、キャップ構造の除去の促進とその後の mRNA 本体の分解促進、さらには翻訳抑制を誘導することが明らかとなった（図

2）。TNRC6 による mRNA 分解促進と翻訳抑制に関与する CCR4-NOT 複合体やデキャッピング促進因子は、出芽酵母から高等真核生物まで広く保存されている。従って、本研究で明らかにしたメカニズムは、他の生物種における miRNA 発現抑制機構においても保存された一般的な機構であることが強く示唆された。

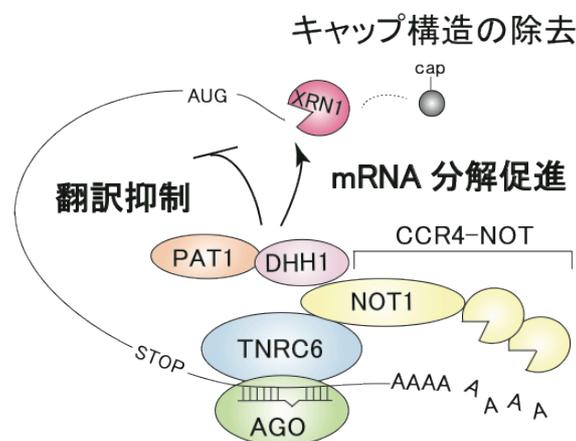


図 2. mRNA 安定性制御因子 Dhh1 と Pat1 は TNRC6 依存的な発現抑制機構に必須である

2. 品質管理機構におけるリボソーム結合因子 Asc1/RACK1 の機能解析

翻訳領域で出現頻度の低いレアコドンや連続した塩基性アミノ酸をコードする配列は、リボソームの停滞を引き起こして翻訳を阻害（翻訳アレスト）する。研究室での先行実験により、アルギニンが連続した配列(R12)における翻訳アレ

ストの結果、①mRNA の分子内切断 (NGD)、および②合成途中の新生鎖のプロテアソームによる迅速な分解(RQC: Ribosome Quality Control)、が起こることが明らかとなった。RQC では、停滞したリボソームが各サブユニットに解離し、60S サブユニット上の新生鎖が Ltn1 依存にユビキチン化を受け、プロテアソームによって迅速に分解される(図 3)。さらに、遺伝学的なスクリーニングによって、新生ポリペプチド鎖に依存した翻訳アレストに必須な因子としてリボソーム結合因子

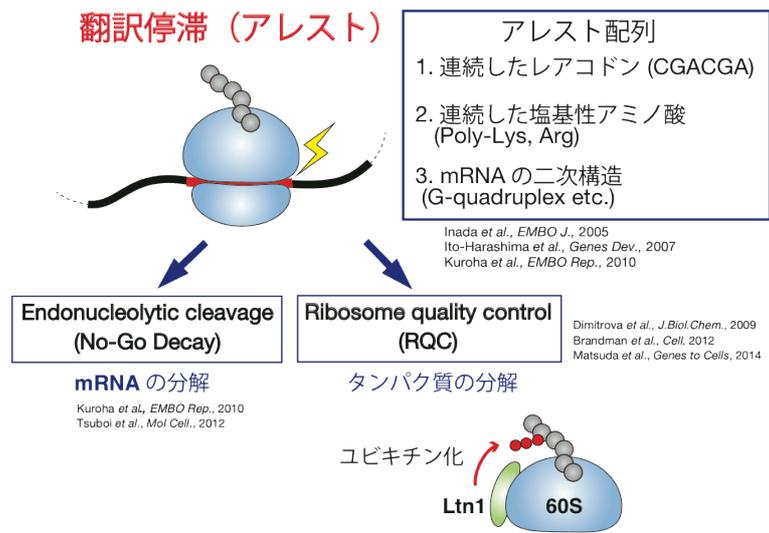


図 3. 翻訳停滞に起因する品質管理機構

Asc1/RACK1 を同定した(図 4)。本研究では、Asc1 欠損株で検出される翻訳アレスト配列由来の異常翻訳産物の解析を行った。

R12 配列を挿入したルシフェラーゼポーターの発現量を Asc1 欠損株で解析した結果、①レアコドン CGA の配列で+1 フレームシフトの頻度は上昇し、②対応する tRNA の存在量が多い最適コドン AGA の連続した配列では高頻度の+1 フレームシフトは観察されないことが明らかとなった。従って、Asc1 は、コドン適応度の低い塩基性アミノ酸配列におけるフレームの維持に必須であることを見出した。次に、Asc1 のフレーム維持機構における eIF5A の機能を解析した。eIF5A は連続したプロリン配列の翻訳を促進する活性があり、Asc1 と eIF5A の二重欠損株は合成致死となる。CGA の連続した配列を挿入したルシフェラーゼポーターの発現量を eIF5A 過剰発現下で Asc1 欠損株において解析した結果、eIF5A による+1 フレームシフトの促進が観察された。さらに、その+1 フレームシフト促進は、正常な翻訳反応における eIF5A の機能に必要なハイプシン化修飾に依存していることが分かった。よって、Asc1 欠損株における高頻度な+1

フレームシフトに、ハイプシン化された eIF5A が関与することが示唆された (図 5)。

当研究室ではこれまでに、Asc1 とリボソームの相互作用が①R12 配列における翻訳アレスト、および②+1 フレームシフトの抑制に必須であることを明らかにしている。しかし、翻訳アレストと+1 フレームシフトにおける Asc1 とリボソームの相互作用の役割は未だ不明である。そこで、翻訳アレストと+1 フレームシフトのコドン適応度との関係性について検証し

た。興味深いことに、コドン適応度の高い AGA の連続配列では翻訳アレストと+1 フレームシフト産物は観察されず、RQC は誘導されないことが分かった。一方で、コドン適応度の低い CGA の連続配列では翻訳アレストと+1 フレームシフト産物が観察された。さらに、CGA の連続配列における翻訳アレスト産物の Ltn1 による分解は、Asc1 とリボソームの相互作用に依存していることが示された。以上より、レアコドンがリボソームの P-site に位置した場合に生じる+1 フレームシフトを、Asc1 が抑制して正常な読み枠を維持する分子機構と、翻訳アレストと+1 フレームシフトの関係性に関する新たな知見が得られた。

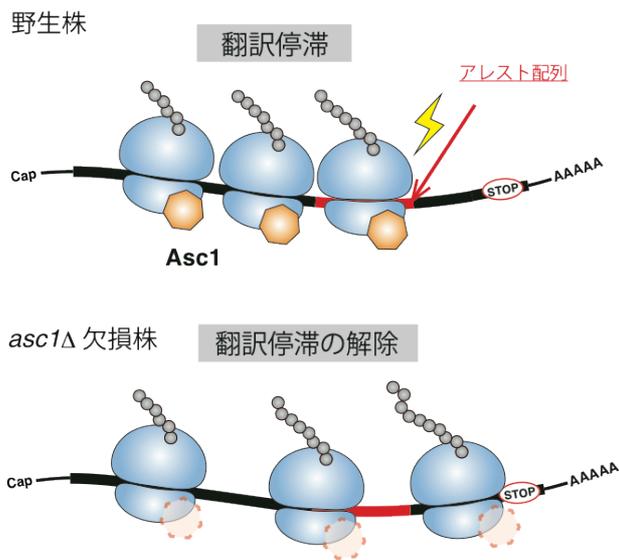


図 4. Asc1 は翻訳停滞に起因する品質管理機構に必須である

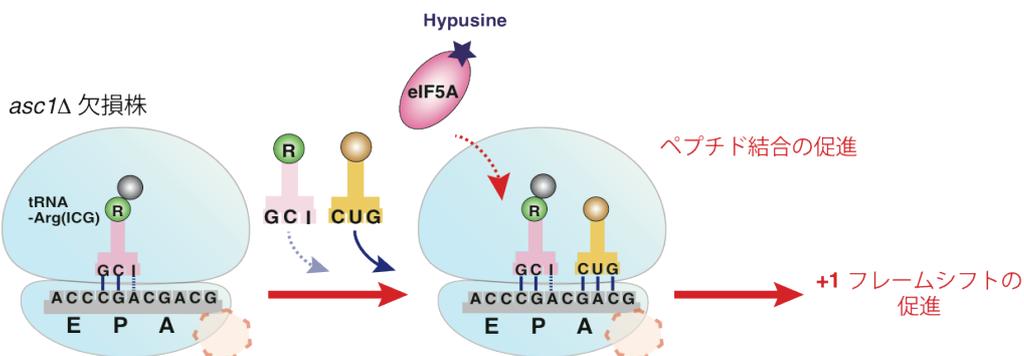


図 5. Asc1 は適応度の低いコドンにおける+1 フレームシフトを抑制し、正常な読み枠を維持する