

異常翻訳に起因する品質管理機構の解析

橋本 怜史

正確なタンパク質発現は生命現象の根幹であり、異常なタンパク質の産生やその蓄積を抑制する品質管理機構は生体の恒常性を担保する上で必須の機構である。品質管理機構の破綻は神経変性疾患等の疾病の原因となることから、創薬の標的としても重要である。

品質管理機構の一つに、翻訳停滞に起因する品質管理機構(RQC: Ribosome-associated Quality Control)がある(Inada, 2020; Sitron & Brandman, 2020; Vind et al., 2020)。RQC は、連続した塩基性アミノ酸配列等で停滞した先頭のリボソームに、後続のリボソームが衝突し、disome あるいは trisome と呼ばれる特異的な構造を形成することで引き起こされる(Ikeuchi et al., 2019; Juskiewicz et al., 2018)。RQC の分子メカニズムは、出芽酵母を用いて詳細な解析がなされており、主に、i) 翻訳停滞したリボソームのユビキチン化 ii) ユビキチン化されたリボソームの各サブユニットへの解離 iii) 60S サブユニット上の新生ポリペプチド鎖の分解の3つの段階からなることが明らかになっている(図 1. A)。しかしながら、ヒトにおける RQC のメカニズムは、iii)の段階を除いて不明な点が多く残っていた(図 1. B)。また、ヒトにおける RQC の内在性標的は、ポリ A 配列以外には明らかになっていなかった。本研究では、ヒト培養細胞を用いて、RQC の分子メカニズム(Hashimoto et al., 2020)とその内在性標的を解明すること(Hashimoto et al., 2019)を目的に解析を行った。

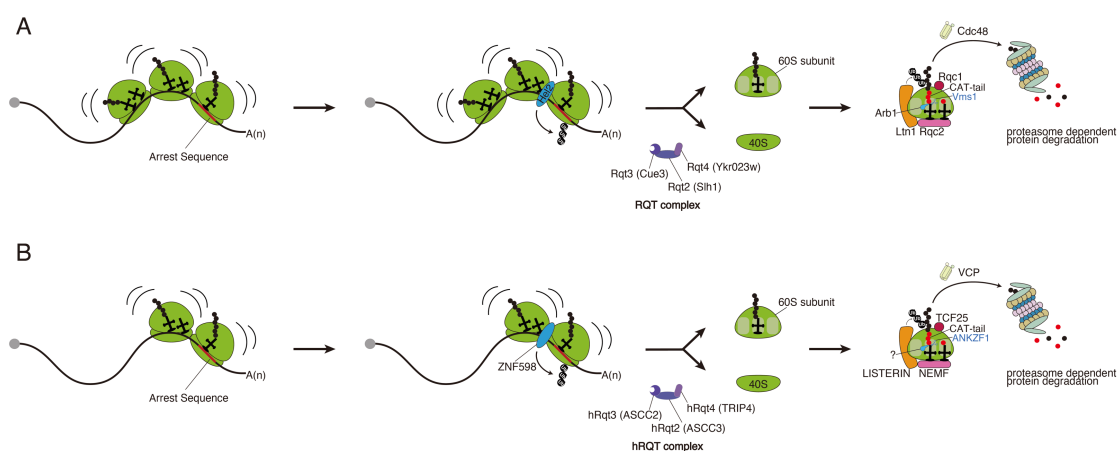


図 1. 出芽酵母(A)及びヒト(B)における RQC の分子機構

i) 翻訳停滞したリボソームのユビキチン化

RQC の最初の段階は、翻訳停滞したリボソームの Hel2 (ヒト, ZNF598)によるユビキチン化であり(Juszkiewicz & Hegde, 2017; Matsuo et al., 2017; Sundaramoorthy et al., 2017)、出芽酵母では、uS10 の K6/8 残基が(Matsuo et al., 2017)、ヒトでは、eS10 の K138/139 残基がユビキチン化されることで RQC が誘導される(Garzia et al., 2017)。

ii) ユビキチン化されたリボソームの各サブユニットへの解離

出芽酵母では、停滞し、ユビキチン化されたリボソームは、RNA helicase Slh1, ubiquitin binding protein Cue3, 機能未知の Zinc-finger domain を含むタンパク質 Rqt4 からなる 3 者複合体(Matsuo et al., 2017), RQC-trigger (RQT) complex によって認識され、サブユニットへと解離する(Matsuo et al., 2020)。一方、ヒトにおいて同様の機能を担う複合体(**hRQT-complex**)は同定されていなかった。

iii) 60S サブユニット上の新生ポリペプチド鎖の分解

リボソームがそれぞれのサブユニットへと解離すると、Rqc2 (ヒト, NEMF)が 60S ribosome-nascent chain complexes (60S-RNCs)中の tRNA にサブユニットの会合面で結合し、40S との再会合を阻害する(Lyumkis et al., 2014; Shao et al., 2015; Shen et al., 2015)。また、Rqc2 は E3 ユビキチンリガーゼ Ltn1 (ヒト Listerin)の 60S-RNCs への結合を促進する(Lyumkis et al., 2014; Shao et al., 2015)。E3 ユビキチンリガーゼ Ltn1 (ヒト Listerin)は、Rqc2 (ヒト NEMF)と 60S サブユニットとに結合し(Doamekpor et al., 2016; Lyumkis et al., 2014; Shao et al., 2015; Shen et al., 2015)、リボソーム出口トンネルの隣に位置する RING domain を用いて、60S-RNCs 上の新生ポリペプチド鎖を K48 鎖型でポリユビキチン化する(Bengtson & Joazeiro, 2010; Kostova et al., 2017)。ヒトの場合には、Transcription factor 25 (TCF25, 酵母 Rqc1)によって、K63 鎖型ユビキチン鎖の形成が阻害されることで選択的なユビキチン鎖の形成が促進される(Kuroha et al., 2018)。ユビキチン化された nascent chain (NC)-tRNA complexes を、tRNA エンドヌクレアーゼ Vms1 (ヒト, ANKZF1)が tRNA の 3'末端から 3 塩基上流で切断することで、60S サブユニット内の NC-tRNA complexes からユビキチン化された新生ポリペプチド鎖が遊離する(Kuroha et al., 2018; Su et al., 2019; Verma et al., 2018; Yip et al., 2019; Zurita Rendón et al., 2018)。遊離した新生ポリペプチド鎖は、AAA ATPase Cdc48 (ヒト, VCP)によってリボソームから引き抜かれ、プロテアソームによって分解される(Defenouillère et al., 2013; Joazeiro, 2019; Verma et al., 2013)。

第 1 章では、RQC の分子機構を「ii) ユビキチン化されたリボソームの各サブユニットへの解離」の段階に着目して解析し、ヒトにおいて RQC を誘導するのに必要な新規複合体として ASCC3/ASCC2/TRIP4 からなる hRQT complex を同定した(図 1. B)。また、ASCC3 の ATPase 依存 helicase 活性が RQC 誘導に必要であり、ASCC2 のユビキチン結合活性及び TRIP4 が RQC 誘導に部分的に寄与していることを示す。さらに、ZNF598 の出芽酵母におけるオーソログである Hel2 が、衝突したリボソームを K63 鎖型でポリユビキチン化すること(Ikeuchi et al., 2019; Matsuo et al., 2017)、ASCC2 が K63 鎖型ポリユビキチンに選択的に結合すること(Brickner et al., 2017)から、ユビキチン化された 80S リボソームが ASCC2 によって認識された後、ASCC3 によって 40S と 60S サブユニットに解離するというモデルを提唱する(図 1. B)。

第 2 章では、ヒトにおける内在性の RQC 標的を同定するために、強い翻訳停滞を引き起こす配列の探索を行った。翻訳停滞を引き起こすことが想定される配列として、終止コドンの欠失変異(リードスルー変異)が遺伝病の原因となる 76 遺伝子の 3' UTR 配列(Hamby et al., 2011)に着目した(図 2)。これは、3' UTR が想定外に翻訳されると、タンパク質や mRNA の発現量低下などを引き起こし、生体にとって悪影響を及ぼすことが知られていたため、3' UTR に強い翻訳停滞を引き起こす配列が存在する可能性が高いと考えたからである(Arribere et al., 2016; Inada & Aiba, 2005; Shibata et al., 2015)。3' UTR における翻訳停滞効率を測定するために、*GFP-2A-X-2A-RFP* dual fluorescence reporter (Joazeiro, 2017; Sundaramoorthy et al., 2017)を構築し、X の領域に解析対象配列を挿入した(図 2)。このレポーターに含まれている 2A 配列は、翻訳中のリボソームからペプチド鎖の遊離を誘導するが、リボソームの解離は引き起こさないため、2A 配列の前の配列を翻訳していたリボソームと同じリボソームが下流の配列を翻訳する(Dimitrova et al., 2009; Kim et al., 2011)。したがって、このレポーターを用いて、RFP と GFP の蛍光強度の比を算出することで翻訳停滞効率を測定することができる(図 2)。

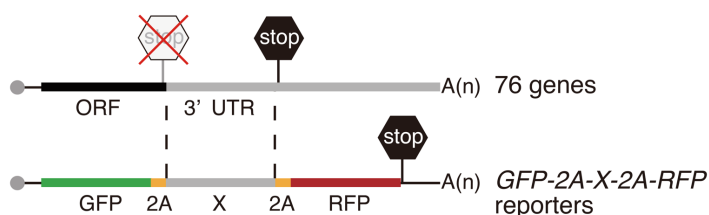


図 2. *GFP-2A-X-2A-RFP* dual fluorescence reporter の模式図

解析の結果、23 遺伝子の 3' UTR 配列には、翻訳停滞を誘導する配列が存在しており、それらの配列における翻訳停滞効率がアミノ酸配列の局所的な疎水性度と相関することが明らかになった。また、この理由は、リボソームの狭窄部位(**constriction**)に新生ポリペプチド鎖の局所的疎水性領域が存在することで、疎水性領域とリボソームトンネルとの間に疎水性相互作用が生じて、翻訳停滞が引き起こされているからであると考えられる。

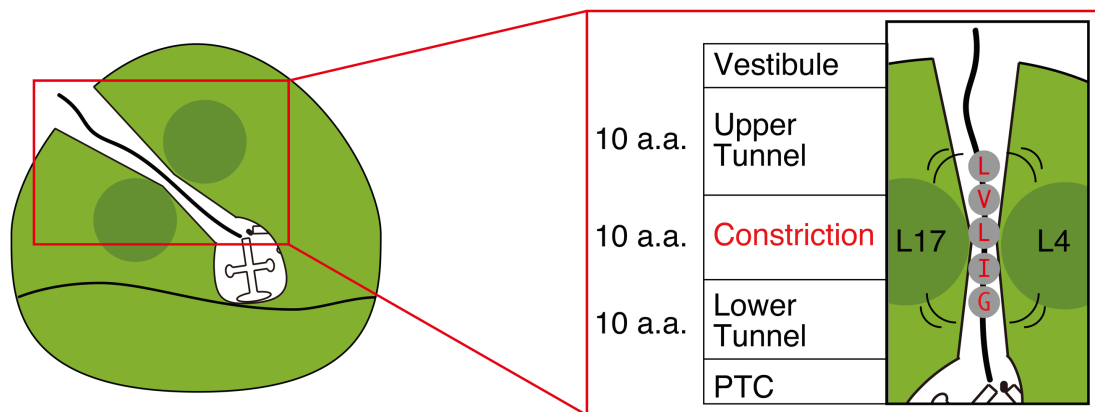


図 3. 新生ポリペプチド鎖の局所的疎水性領域とリボソームトンネルとの疎水性相互作用が翻訳停滞を引き起こす

さらに、これらの配列は、翻訳停滞を引き起こすことによって異常タンパク質の発現を翻訳段階で抑制していた。すなわち、3'UTR において翻訳停滞を誘導することで、リードスルー変異によって終止コドンが欠失した結果恒常的に産生される C 末が延長した異常タンパク質の発現を抑制している。これは、生体の恒常性を維持する上で重要な品質管理機構であり、3'UTR を介した新たな品質管理機構の存在が示唆される。

RQC の分子機構及び RQC の標的となるための条件を解明することで、RQC の標的となるような翻訳停滞を遺伝子特異的に誘導し、特定の遺伝子の発現を抑制する化合物の探索が可能になる。これは、RQC を基盤とした新たな創薬であり、翻訳と共役した品質管理機構に対する理解を深めることで、創薬研究の新たな道が切り開かれる。

論文提出者: 橋本 怜史

論文審査委員 (主査): 平澤 典保

論文題目: 異常翻訳に起因する品質管理機構の解析

翻訳途上の新生ポリペプチド鎖は、細胞全体の生命現象の制御と調節に重要な役割を果たす。論文提出者の所属研究室では、翻訳伸長阻害に起因する品質管理を網羅的に解析し、その分子機構を明らかにしてきた。特に、連続した塩基性配列を持った新生鎖が翻訳伸長反応を停止 (翻訳アレスト) させる結果、リボソームが各サブユニットに解離し、合成途中の新生ポリペプチド鎖が分解される翻訳品質管理機構 (Ribosome Quality Control: RQC) を発見した。まず、翻訳伸長途中で停滞した 80S リボソームと後続のリボソームが衝突して形成される特徴的な構造が、E3 ユビキチンライゲース ZNF598 で認識される。その後、特異的なリボソームタンパク質がユビキチン化された衝突リボソームが各サブユニットへ解離した後、60S サブユニット上の新生ポリペプチド鎖がユビキチン化され、最終的にプロテアソームによって迅速に分解される分子機構が明らかになっている。

本研究では、哺乳細胞における異常翻訳に起因する品質管理機構の解明をめざし、翻訳アレストを引き起こす配列の同定と、RQC におけるユビキチン化したリボソームの乖離反応を担う因子の同定を行った。まず、細胞は、3' UTR を翻訳した場合の異常産物による細胞毒性を回避するため、翻訳停滞を引き起こし、異常産物の産生自体が抑制される可能性を検討した。翻訳停滞を引き起こすことが想定される配列として、終止コドンの欠失変異 (リードスルー変異) が遺伝病の原因となる 76 遺伝子の 3' UTR 配列に着目した。解析の結果、23 遺伝子の 3' UTR 配列が翻訳停滞を誘導し、その翻訳停滞効率がアミノ酸配列の局所的な疎水性度と相関することが明らかになった。リボソームの狭窄部位 (constriction) と合成途中の新生ポリペプチド鎖の疎水性領域間での疎水性相互作用により、翻訳停滞が引き起こるモデルが提唱された。次に、ヒトのユビキチン化したリボソームの乖離反応を担う因子の同定を行い、新規複合体として ASCC3/ASCC2/TRIP4 からなる新規複合体 hRQT を同定した。ASCC3 の ATPase 依存 helicase 活性が RQC 誘導に必要であり、ASCC2 のユビキチン結合活性及び TRIP4 が RQC 誘導に部分的に寄与していた。さらに、ユビキチン化された衝突リボソームが hRQT 複合体の構成因子 ASCC2 のユビキチン結合活性を介して認識された後、ASCC3 に依存の RNA ヘリカーゼ活性依存に 40S と 60S サブユニットに解離される分子機構が強く示唆された。

これらは、哺乳細胞における翻訳アレスト誘導配列を同定し、ユビキチン化リボソームの乖離を担う新規複合体を初めて明らかにした極めて独創性の高い研究である。この知見は世界初であり、翻訳伸長複合体の運命決定機構を解明したのみでなく、翻訳異常に起因する疾患の発症メカニズムの理解に大きく貢献する点で特筆すべき研究成果である。よって、本論文は博士 (薬学) の学位論文として合格と認める。