

リボソームのユビキチン化による
翻訳品質管理の分子基盤の解明

令和2年度

東北大学大学院薬学研究科

生命薬科学専攻

遺伝子制御薬学分野

B8YD1010 杉山 誉人

◆目次

目次	3
第 0 章 要旨	9
第 1 章 序論	14
1-1 細胞が備える RNA/タンパク質の分解機構	
1-2 翻訳停止に依存した細胞内機能制御	
1-3 出芽酵母における Ribosome-associated Quality Control (RQC)の分子機構	
1-4 出芽酵母における No-Go Decay (NGD)の分子機構	
1-5 翻訳伸長阻害に起因する品質管理機構	
1-6 参考文献	
第 2 章 リボソームタンパク質 uS3 のユビキチン化を介した 機能不全リボソームの分解系 18S Nonfunctional Ribosomal RNA Decay (18S NRD)の解析	84
2-1 序論	85
2-1-1. リボソームの活性と翻訳における重要性	
2-1-2. 翻訳サイクルとリボソーム	
2-1-3. リボソーム A-site における分子スイッチとしての Decoding Center	
2-1-4. Nonfunctional Ribosomal RNA Decay: NRD	
2-1-5. 25S Nonfunctional Ribosomal RNA Decay: 25S NRD	
2-1-6. 18S Nonfunctional Ribosomal RNA Decay: 18S NRD	
2-1-7. その他のリボソームの分解経路	

2-1-8. リボソームタンパク質の欠失や変異に起因する疾患: リボソーム病

2-2 目的 110

2-3 結果 112

2-3-1. リボソームタンパク質 uS3 の K212 残基におけるユビキチン化は 18S NRD の惹起に必須である

2-3-2. E3 ユビキチンリガーゼ Mag2 は uS3 をモノユビキチン化することで 18S NRD を誘導する

2-3-3. Mag2 による uS3 のモノユビキチン化は K63 型ポリユビキチン鎖の形成を促進する

2-3-4. 18S NRD における Mag2 による uS3 のモノユビキチン化は Hel2 による K63 型ポリユビキチン鎖の形成に必須である

2-3-5. E3 ユビキチンリガーゼ Rsp5 は Hel2 と同様にかつ相加的に 18S NRD に関与する

2-3-6. E3 ユビキチンリガーゼ Hel2 と Rsp5 は、Mag2 によるモノユビキチン化された uS3 を基質として、多段階のポリユビキチン化反応を行う

2-3-7. リボソームタンパク質 Asc1 は uS3 の効率的なユビキチン化に関与する

2-4 考察 149

2-4-1. 機能不全リボソームはリボソームタンパク質 uS3 の K212 残基においてユビキチン化され、18S NRD により分解誘導される

2-4-2. 18S NRD における uS3 のユビキチン化は複数の E3 リガーゼによる多段階反応であり、それによる K63 型ポリユビキチン鎖の形成が 18S NRD の惹起に必須である

2-4-3. 機能不全リボソームは uS3 のユビキチン化依存的にサブユニット解離し、40S サブユニット中の変異型 18S rRNA の選択的な分解を可能にする

2-4-4. 多様なリボソーム品質管理とリボソーム病の原因としての翻訳活性不全

2-5 参考文献 163

第 3 章 リボソームタンパク質 eS7 のユビキチン化を介した

コドン至適度依存 mRNA 分解系 Codon optimality-dependent mRNA

Decay の解析 172

3-1 序論 173

3-1-1. コドン至適度(Codon optimality)、偏り(Codon bias)、使用頻度(Codon usage)

3-1-2. コドン効果と翻訳伸長反応

3-1-3. コドン効果と mRNA の翻訳効率

3-1-4. コドン効果とタンパク質のフォールディング

3-1-5. コドン効果と mRNA の安定性

3-1-6. コドン効果の生理学的意義

3-1-7. 遺伝子発現を広く制御する Ccr4-Not 複合体

3-1-8. 核内における Ccr4-Not 複合体の機能

3-1-9. 細胞質内における Ccr4-Not 複合体の機能

3-2 目的 202

3-3 結果 204

3-3-1. Ccr4-Not 複合体は至適度が低いコドン上のリボソームを認識し結合する

3-3-2. Not4 を介したリボソームタンパク質 eS7 のユビキチン化は、コドン至適度に依存した mRNA 分解系に必要である

3-3-3. Ccr4-Not 複合体は Not5 の N 末端領域を介してリボソームの E-site に結合する

3-3-4. Ccr4-Not 複合体は、翻訳開始過程後期及び翻訳伸長反応中のリボソームに結合する

3-3-5. Not5 の N 末端領域はリボソームタンパク質 eS25 との相互作用により、安定に E-site に結合する

3-3-6. リボソームタンパク質 eS25 により安定化される Not5 の N 末端領域の E-site へ

の結合は、コドン至適度に依存した mRNA 分解系に關与する

3-3-7. Not4 による eS7 のユビキチン化は、Not5 の N 末端領域の E-site への結合に必須である

3-3-8. Not4 による eS7 のモノユビキチン化が、コドン至適度に依存した mRNA 分解に必須である

3-3-9. Not4 による eS7 のユビキチン化と Not5 の N 末端領域の E-site への結合は、Dhh1 のリボソームへの結合に必須である

3-3-10. Not4 による eS7 のユビキチン化と Not5 の N 末端領域の E-site への結合の阻害は、デキャッピング反応を介した mRNA 分解を抑制する

3-4 考察 **247**

3-4-1. Ccr4-Not 複合体は、コドン至適度に依存したリボソームの動的な速度変化をモニターする重要なセンサーである

3-4-2. Not4 によるリボソームタンパク質 eS7 のユビキチン化は、様々な応答を即座に指令するための、前処置のような反応である可能性がある

3-4-3. Not5 と eIF5A は微細な基質の違いを見極めてリボソームの E-site に結合する

3-4-4. Not5 の N 末端領域を介したリボソームへの結合は、哺乳類細胞においても保存され、この結合活性の欠損が様々な疾患発症に關与している可能性がある

3-5 参考文献 **260**

第 4 章 リボソームタンパク質 uS10 のユビキチン化を介した

リボソームの異常停止に起因する新生ペプチド鎖の分解系

Ribosome-associated Quality Control (RQC)の解析 **280**

4-1 序論 **281**

4-1-1. 哺乳類細胞におけるリボソームの停止、衝突

4-1-2. 衝突リボソームに目印をつける E3 ユビキチンリガーゼ ZNF598

4-1-3. 出芽酵母 RQT 複合体と高いホモロジーを有する 3 者複合体	
4-1-4. 合成途上の新生ペプチド鎖の分解と RQC 複合体	
4-1-5. Disome profiling による内在性 RQC 標的配列 <i>Xbplu</i> mRNA の同定	
4-1-6. リボソームの衝突と細胞内応答	
4-2 目的	305
4-3 結果	307
4-3-1. <i>Xbplu</i> mRNA 上でリボソームは停止し衝突する	
4-3-2. E3 リガーゼ ZNF598 は衝突リボソーム上のリボソームタンパク質 uS10 および eS10 をポリユビキチン化する	
4-3-3. E3 リガーゼ ZNF598 は、衝突したリボソームを認識しリボソームタンパク質 uS10 をポリユビキチン化する	
4-3-4. ZNF598 は、RQC の標的となる衝突リボソーム上のリボソームタンパク質 uS10 および eS10 を K63 型ポリユビキチン化する	
4-3-5. ASCC3-ASCC2-TRIP4 により構成される hRQT 複合体は衝突リボソームの解離に関与する	
4-3-6. hRQT 複合体は K63 型ポリユビキチン鎖に高い親和性を持つ	
4-3-7. hRQT 複合体は K63 型ポリユビキチン鎖依存に衝突リボソームの解離に関与する	
4-4 考察	333
4-4-1. 哺乳類細胞における RQC の惹起において、衝突リボソームは ZNF598 により K63 型ポリユビキチン化を受け、hRQT 複合体依存に解離される	
4-4-2. Tri-, Tetra-some: 哺乳類細胞における RQC を介した分解ユニット	
4-4-3. RQC による新生ペプチド鎖 XBP1u の分解の生理学的意義	
4-5 参考文献	340

第 5 章 総括	348
第 6 章 材料と実験方法	354
6-1 出芽酵母株	
6-2 プラスミド	
6-3 抗体	
6-4 プローブ	
6-5 プライマー	
6-6 出芽酵母を用いた実験方法	
6-7 哺乳類細胞を用いた実験方法	
6-8 タンパク質精製法	
6-9 試験管内反応法	
第 7 章 謝辞	396
第 8 章 副論文	401

8-1 **Sugiyama T***, Li S*, Kato M*, Ikeuchi K, Ichimura A, Matsuo Y, Inada T.
Sequential ubiquitination of ribosomal protein uS3 triggers the degradation of
non-functional 18S rRNA.

Cell Reports 26(12), 3400-3415.e7. (2019) (第 2 章に対応)

8-2 Buschauer R*, Matsuo Y*, **Sugiyama T**, Chen YH, Alhusaini N, Sweet T,
Ikeuchi K, Cheng J, Matsuki Y, Nobuta R, Gilmozzi A, Berninghausen O,
Tesina P, Becker T, Collier J, Inada T, Beckmann R.

The Ccr4-Not complex monitors the translating ribosome for codon optimality.

Science 368(6488), eaay6912. (2020) (第 3 章に対応)

0. 要旨

生物を形作るタンパク質は、DNA を鋳型として転写された mRNA がリボソームによって正確に翻訳されることで産生される。この遺伝子発現の過程ではある頻度でエラーが生じてしまうが、このようなエラーを検知して、産生された異常 mRNA やそれ由来の誤ったペプチド鎖を細胞内から迅速に除去する仕組みとして、生体には品質管理機構が備わっている。本博士論文では、異常翻訳の品質管理を含め、細胞内で生じるリボソームの動的変化に依存した多様な分解機構に着目して解析を行った。

タンパク質の合成過程である翻訳反応は、巨大な RNA-タンパク質複合体であるリボソームによって行われる。リボソームは、①mRNA にコードされた遺伝暗号をコドンと呼ばれる読み枠に従って解読し、②アミノ酸へと変換することでペプチド鎖を合成する、という翻訳反応に必須な 2 つの活性を持つ。これまで、特異的な mRNA の翻訳により、もしくはそれ由来のペプチド鎖の影響によって、上述した翻訳活性が阻害され、リボソームが停止するという現象が報告されてきた(Inada and Aiba, 2005; Dimitrova *et al.*, 2009; Yanagitani *et al.*, 2011; Chandrasekaran *et al.*, 2019; Shanmuganathan *et al.*, 2019)。mRNA 上でのリボソームの停止は、その mRNA 由来の合成途上のペプチド鎖が産生されないだけでなく、後続のリボソームによる翻訳を阻害するために、細胞にとって有害である。このため、細胞内には Ribosome-associated Quality Control (RQC) と呼ばれる品質管理機構が備わっており、RQC は合成途上のペプチド鎖を迅速に分解を誘導するのみならず、停止したリボソームを解離することで異常翻訳の解消を導いている。これまで、RQC の分子機構については、主に出芽酵母を用いて研究が進められており、その結果、RQC の惹起には、停止したリボソームと後続のリボソームの衝突が必須であることが明らかになっている(Matsuo *et al.*, 2017;

Juszkiewicz *et al.*, 2018; Ikeuchi *et al.*, 2019)。さらに、当研究室では、リボソームの衝突センサーとして E3 ユビキチンリガーゼである Hel2 がリボソームタンパク質 uS10 に K63 型ポリユビキチン鎖を伸長することで、翻訳異常に陥ったリボソームに対して目印をつけることを報告した(Ikeuchi *et al.*, 2019; Matsuo *et al.*, 2020)。その後、uS10 のユビキチン化依存的に、停止リボソームの解離を担う RQT 複合体がリクルートされ、解離後の 60S サブユニットを舞台として、合成途上のペプチド鎖が分解へと誘導される(Shao and Hegde, 2014; Shao *et al.*, 2015; Shen *et al.*, 2015; Matsuo *et al.*, 2020)。このように、RQC においては、リボソームユビキチン化が引き金となり、停止リボソームの解離と合成途上のペプチド鎖の分解が誘導され、異常翻訳が解消されることが明らかになっている。

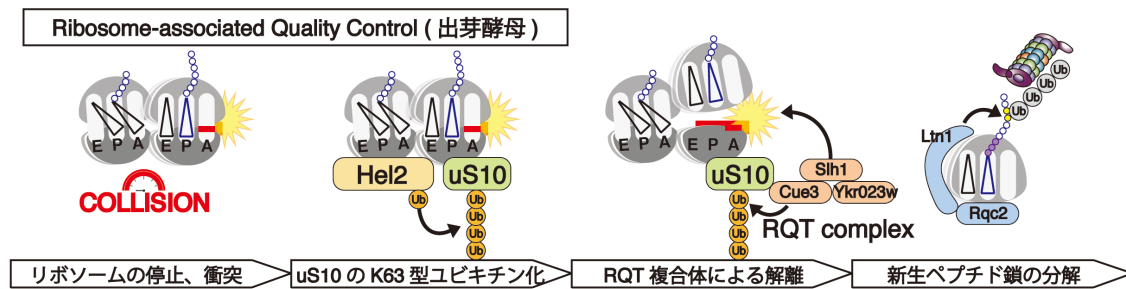


図 1. 出芽酵母における RQC を介した翻訳停止の解消機構

本研究では、はじめに、リボソームのユビキチン化の種間での保存性について検討を行った。これまで、哺乳類細胞における RQC の研究は、出芽酵母において同定された因子群の機能的ホモログを同定するまでにとどまっており、その活性については不明な点が多く残されていた。そこで、内在性の RQC 標的配列として同定された *Xbp1u* mRNA(Han *et al.*, 2020)上でのリボソームの停止を *in vitro* で再現し、これまでに同定した Hel2 のホモログである ZNF598(Garzia *et al.*, 2017; Matsuo *et al.*, 2017; Sundaramoorthy *et al.*, 2017; Juszkiewicz *et al.*, 2018)、RQT 複合体と高いホモロジーを持つ ASCC3-ASCC2-TRIP4 三者複合体(Hashimoto *et al.*, 2020)について、RQC 反応の再構築を行うことでそれらの活性評価を行なっ

た。その結果、哺乳類細胞においても、*Xbp1u* mRNA 上で停止したリボソームは、後続のリボソームと衝突することを明らかにした。また、出芽酵母 Hel2 と同様に、ZNF598 は、衝突リボソームに対しユビキチン鎖という目印をつけること、その標的はリボソームタンパク質 uS10 および eS10 であること、さらに ZNF598 はより強いリボソームの衝突を標的とし、uS10 に K63 型ポリユビキチン鎖を伸長することを見出した。さらに、ASCC3-ASCC2-TRIP4 からなる三者複合体が ZNF598 により形成された K63 型ポリユビキチン鎖に依存したリボソームのサブユニット解離を行うことを明らかにした。このようにして、リボソームのユビキチン化を引き金とする RQC を介した異常翻訳の解消は、出芽酵母から哺乳類細胞まで、種間で高く保存されていた(Sugiyama *et al.*, unpublished data)。

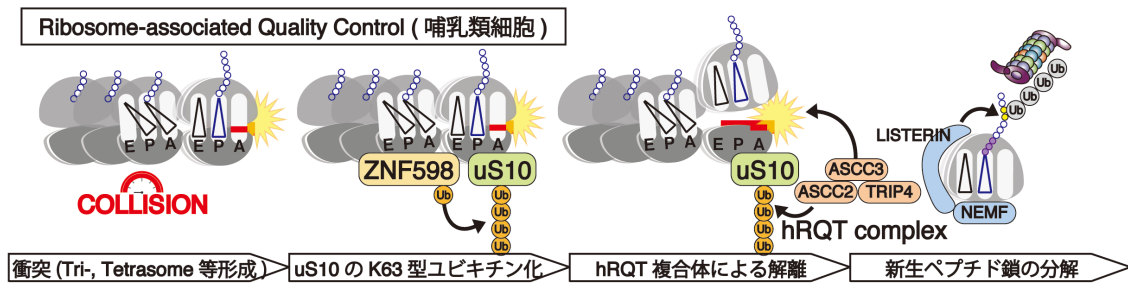


図 2. 哺乳類細胞における RQC を介した翻訳停止の解消機構

これまで特異的な mRNA やペプチド鎖により翻訳活性が阻害され、リボソームが停止する例に着目してきたが、リボソーム自身の活性不全によってもその異常停止が惹起されると考えられる。次に、コドン解読に必須なリボソームの活性部位である Decoding Center(DC)に変異を有し、翻訳活性不全を誘発する機能不全リボソームに焦点を当てた。先行研究により、出芽酵母において DC に変異を持つリボソーム RNA(rRNA)は、18S Nonfunctional Ribosomal RNA Decay (18S NRD)と呼ばれる経路によって、細胞内で迅速にかつ特異的に分解を受けることが報告されていた(LaRiviere *et al.*, 2006)。このため、18S NRD においても RQC と同様に、リボソームのユビキチン化が関与すると想定し解析を行った。その

結果、18S NRD の惹起には、リボソームタンパク質 uS3-K212 残基のユビキチン化が必須であることを明らかにした。さらに、18S NRD における uS3 のユビキチン化は、非常に特殊な多段階反応であり、E3 リガーゼ Mag2 によってモノユビキチン化された uS3 を基質にして、E3 リガーゼ Hel2 や Rsp5 が K63 型ポリユビキチン化を行うことを明らかにした。また、当研究室では、uS3 のユビキチン化が機能不全リボソームのサブユニット解離に必須であることを明らかにしており、このようにして、解離後の変異を有する 40S サブユニット中の 18S rRNA に対して、特異的に RNase がアクセスし、選択的な分解が可能になる、と考えられる(Sugiyama *et al.*, 2019)。

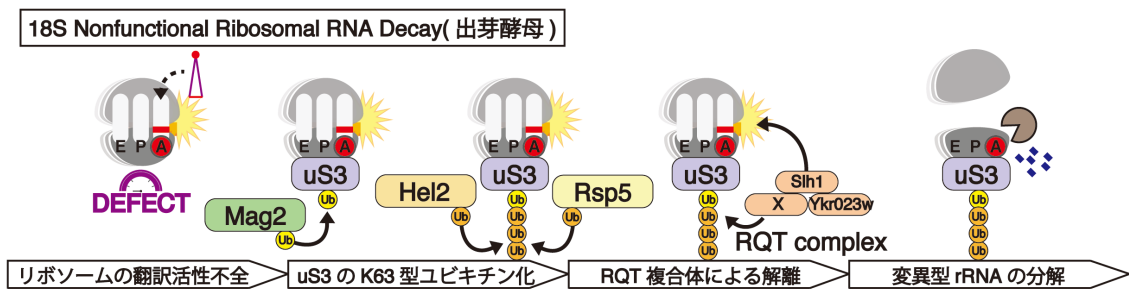


図 3. 出芽酵母における 18S NRD を介した翻訳活性不全リボソームの分解機構

リボソームによる翻訳反応は一定の速度ではなく、緩急をつけて行われている。この翻訳速度は「リボソームへのアミノアシル tRNA のリクルートのしやすさ」に依存しており、この指標はコドン至適度として定義づけられている(Pechmann and Frydman, 2013)。さらに先行研究によって、コドン至適度が低く翻訳速度が遅延した mRNA の安定性は相対的に低いことが報告されていた(Presnyak *et al.*, 2015)。しかしながら、どのような因子群がリボソームの速度変化をモニターし、mRNA 分解を誘導するのかは明らかになっていなかった。本研究の結果、リボソームの翻訳速度遅延は、遺伝子発現を広範に制御する Ccr4-Not 複合体の構成成分である Not5 の N 末端領域により検知されることが明らかになった。そこで、翻訳遅延が生じたリボソームのユビキチン化に着目し

解析を行った結果、Not4 によるリボソームタンパク質 eS7 のユビキチン化が、Not5 の N 末端領域を介したリボソームへの安定な結合、およびそれによる非至適 mRNA の分解に関与することが明らかになった。さらに、Not5 の N 末端領域を介したリボソームへの結合は、mRNA 分解活性化因子 Dhh1 のリクルートを惹起しており、これら一連の反応によって、コドン至適度に依存した mRNA 分解が誘導されることが明らかになった(Buschauer *et al.*, 2020)。

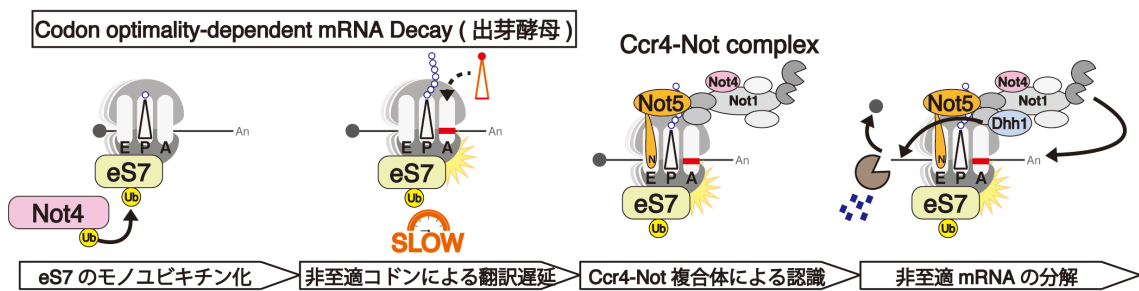


図 4. 出芽酵母における翻訳遅延に伴う非至適 mRNA の分解機構

以上のように、本研究では、リボソームの異常衝突、翻訳不全、速度遅延、といった特徴的な反応に依存して誘導されるペプチド鎖分解、rRNA 分解、mRNA 分解が、リボソームのユビキチン化により惹起されることを明らかにした。このように、これまで遺伝子発現の過程における翻訳マシンとして知られていたリボソームが、細胞内で生じた緊急事態に応答するために、自身にユビキチン鎖という目印をつけることで、異常翻訳に陥った mRNA-リボソーム-新生ペプチド鎖複合体の存在を細胞内に知らせ、それらの選択的かつ迅速な分解を惹起することが明らかになった。

第 1 章
序論

1-1. 細胞が備える RNA/タンパク質の分解機構

1-1-1. 遺伝子発現の正確性を保証する品質管理機構

タンパク質情報をコードする DNA は、核内において RNA ポリメラーゼにより mRNA に転写される。転写された未成熟 mRNA は、5'末端への Cap 構造の付加や 3'末端への poly(A)鎖の付加を受け、さらにイントロンの除去を伴うスプライシング等のプロセッシングを経て、成熟型 mRNA となり核膜孔を通過して細胞質に運ばれる。細胞質に運ばれた mRNA は、巨大な RNA-タンパク質複合体である翻訳装置リボソームによって翻訳されることでタンパク質が合成される。

生物の遺伝情報を正確に維持、伝達することが必須である一方で、DNA の複製過程では $1/10^6$ 、mRNA への転写過程は $1/10^5$ 、mRNA の翻訳過程では $1/10^4$ と、ある頻度でエラーが生じていることが知られている。さらに、近年行われた、出芽酵母や大腸菌を用いた Deep proteomics の結果、転写時のエラーは約 25000 塩基に 1 回とされていたのに対し、翻訳時のエラーは約 1000 アミノ酸に 1 回起こるということが明らかになっている(Traverse and Ochman, 2016; Mordret *et al.*, 2019)。このように、遺伝子発現の過程では、ある頻度のエラーが起き、異常 mRNA および異常タンパク質が産生される。例えば、mRNA の塩基置換によってアミノ酸をコードするコドンが終止コドンへと変化するナンセンス変異、塩基置換により異なるアミノ酸が合成されるミスセンス変異、さらに、mRNA 中の一塩基挿入もしくは欠失によりコドンの読み枠が変化してしまうフレームシフト変異等により、異常産物が生じる。これらの異常産物は、細胞にとって有害である可能性があり、合成されてしまった異常産物の分解を誘導する品質管理機構は、生体の恒常性を維持する上で必須である。

本博士論文では、翻訳反応過程における変化や異常を感知して、産生された異常 mRNA やその mRNA 由来の誤ったペプチド鎖、さらには、翻訳不全に陥っ

たりボソーム自身を除去する仕組みとしての品質管理機構について着目する。

詳細は 1-3 以降で後述するが、ナンセンス変異により本来よりも早期に終止コドンが出現することで異常翻訳終結をする mRNA は、Nonsense-mediated mRNA Decay (:NMD)により、また、それ由来の短鎖型タンパク質は、Nonsense-mediated Protein Degradation (:NMPD)により迅速に分解される。さらに、終止コドンの欠失により、本来翻訳されるはずのない mRNA の 3'末端に存在する poly(A)鎖が翻訳されてしまうノンストップ mRNA は、Non-Stop Decay (:NSD)により、それ由来のタンパク質は、Ribosome-associated Quality Control (:RQC)によって生体内から除去される。また、特異的な mRNA 配列やアミノ酸配列から構成されるペプチド鎖の合成過程で、リボソームが翻訳途上であるにも関わらず異常停止した場合には、このような異常翻訳停滞の解消のために、翻訳されていた mRNA は、No-Go Decay (:NGD)により内部切断を受けて分解誘導され、合成途上の新生ペプチド鎖は、Ribosome-associated Quality Control (:RQC)によって迅速に生体内から除去される。前述した数例は、生体内に存在する品質管理機構の一部に過ぎず、これらの分子基盤の解明に向けた研究が、近年精力的に行われている。

1-1-2. mRNA 分解機構

真核生物では、まれな例外を除き、mRNA の 5'末端には Cap 構造、3'末端には poly(A)鎖を有しており、これらは mRNA の安定化と翻訳反応の促進に寄与する。5'末端の Cap 構造は、翻訳開始因子 eIF4E が、3'末端の poly(A)鎖にはその結合タンパク質である PABP が結合する。これら両者を足場タンパク質である eIF4G が繋留するようにして複合体を形成することで、mRNA は closed loop と呼ばれる環状化構造をとることが知られている。このような構造をとることで、翻訳終結部位と翻訳開始部位を空間的に近接させ、翻訳終結をしたリボソームが、次の翻訳開始反応へと直接リサイクルされることで、翻訳反応の促進に寄

与している。さらに、closed loop の形成や Cap 構造、poly(A)鎖の付加は、mRNA の両末端からのエキソヌクレアーゼによる分解を防ぎ、mRNA 自身の安定性を維持し、転写後の遺伝子発現に大きく寄与している。

そのため、mRNA の分解を行うには、mRNA の末端に付加されている Cap 構造や poly(A)鎖を除去する必要がある。一般的に、mRNA 分解経路の律速反応は poly(A)鎖の短鎖化 (デアデニレーション:deadenylation)であり、続いて、Cap 構造の除去(デキャッピング:decapping)が起こる。デアデニレーションは、poly(A)鎖に結合する主要なタンパク質である PABP の結合を減少させ、mRNA の環状化を緩めることで、翻訳開始速度を低下させる。その後、Cap 構造近傍の mRNP (messenger RiboNucleoProtein)の構造が変化し、デキャッピングが促進される。

一般的な mRNA の分解過程において、poly(A)鎖を分解するデアデニレーションが律速段階である。翻訳終結因子 eRF1-eRF3 は、翻訳終結時にペプチド鎖を解離する活性を持ち、さらに eRF3 の N 末端ドメインは poly(A)鎖上の PABP と相互作用することで、翻訳終結と共役したデアデニレーションの開始を制御している。真核生物において、デアデニレーションを担う酵素群は 4 種存在しており、(1)遺伝子発現を広く制御する多機能複合体 Ccr4-Not の構成因子である Caf1/Pop2-Ccr4、(2)比較的初期段階のデアデニレーションに関与する PAN 複合体の Pan2-Pan3、(3)poly(A)特異的エキソヌクレアーゼである PARN (Poly(A)-specific RiboNuclease)、(4) Caf1-Ccr4 と同じ EEP ヌクレアーゼである Nocturnin や Angell1/2 が知られる。Ccr4-Not 及び PAN 複合体は、出芽酵母やヒトを含め、多くの真核生物において保存されている主要な酵素であり、種間を超えたデアデニレーション機構である一方で、PARN 等は哺乳類細胞で発見されているものの、他の真核生物においても保存されているかは明らかになっていない(Yamashita *et al.*, 2005; Funakoshi *et al.*, 2007; Goldstrohm and Wickens, 2008; Norbury, 2013; Shirai *et al.*, 2014; Bresson and Tollervey, 2018; Yi *et al.*, 2018)。デア

デニレーションの過程は、大きく 3 つに分かれており、その初期段階では、PAN 複合体が約 100 塩基程度まで素早く poly(A)鎖を分解する。PAN 複合体は、Pan2 及び Pan3 から構成されており、Pan2 は RNaseD ファミリーに属するエキソヌクレアーゼドメインをもち、Pan3 は Pan2 に相互作用する因子として同定されている。この過程では、Pan2 と相互作用する Pan3 が自身の PAM2 (PABP-binding Motif 2)を介して PABP の C 末端領域ドメインと結合し、PABP に結合する翻訳終結因子 eRF3 と入れ替わるようにして、翻訳終結と共役した素早いデアデニレーションを誘導するというモデルが提唱されている(Funakoshi *et al.*, 2007)。その後、Ccr4-Not (Carbon Catabolite Repression4-Negative On TATA-less complex)複合体の構成因子である Caf1/Pop2-Ccr4 がデアデニレーションを行う(Collart, 2003, 2016; Denis and Chen, 2003; Collart and Timmers, 2004; Collart and Panasenko, 2012; Miller and Reese, 2012; Shirai *et al.*, 2014)。Ccr4-Not 複合体はデアデニレーションのみならず、遺伝子発現を広く制御する因子群であるが、詳細は第 3 章で後述する。デアデニレーション過程では、Caf1/Pop2 は PABP が結合していない領域を、Ccr4 は PABP が結合している領域を特異的に削り込むことで、ほぼ全ての poly(A)鎖、及びそれに結合する PABP の除去を行う。この際には、Pan2 が Pan3 を介して PABP と相互作用することと同様に、Caf1 は Tob と呼ばれる因子を介して PABP と相互作用することで PABP を poly(A)鎖上から離脱させる。Pan3 と同様に、Tob や翻訳終結因子である eRF3 も PAM2 モチーフを有し、これらの因子は PABP との結合において競合関係にある。このために、翻訳終結反応に伴い eRF1- eRF3 が PABP から解離すると、それが引き金となって Pan3 あるいは Tob が PABP と会合し、poly(A)鎖分解酵素である Pan2 や Caf1 が mRNA 上にリクルートされる。このようにして、デアデニレーションが引き起こされたのち、残存した 3'末端から SKI-エキソソーム複合体や Dis3 エキソヌクレアーゼが 3'-5'方向へと mRNA の分解を進める(Houseley, LaCava and Tollervey, 2006; Halbach *et al.*, 2013; Labno,

Tomecki and Dziembowski, 2016)。この間には、TUTase と呼ばれる酵素群が残存した poly(A)鎖をウリジル化することで分解反応を促進することもある。エキソソームは、少なくとも 10 種類のサブユニットからなる巨大なタンパク質複合体であり、10 種類全てのサブユニットが 3'-5'エキソヌクレアーゼ触媒活性をもつ。また細胞質中においてエキソソームの補助因子として SKI 複合体が存在し、DExH RNA ヘリカーゼである Ski2-Ski3-Ski8 複合体、及び GTPase 活性をもつ EF-1 α 様の Ski7 が、エキソソームによる mRNA 分解に必要である。Ski2 は RNA ヘリカーゼとして、Ski3 は Ski 複合体の足場タンパクとして機能し、WD repeat ドメインをもつ Ski8 は Ski2 及び Ski3 と相互作用する事が明らかになっている。このようにして、SKI 複合体の有するヘリカーゼ活性によってほどかれた mRNA は、エキソソームの持つヌクレアーゼ活性によって迅速に分解される。

mRNA がデアデニレーションを受けると、5'-3'及び 3'-5'方向の双方向からの mRNA 分解経路が活性化される。このうち、5'-3'方向の分解が主要な経路であり、5'末端に付加された Cap 構造の除去と、それに伴う 5'-3'エキソヌクレアーゼである Xrn1 による mRNA の分解が起こる。以上のことから、5'-3'及び 3'-5'方向の双方向からの mRNA 分解経路が存在するものの、どちらに対しても律速反応は、3'末端の poly(A)鎖の除去であることが知られている。

mRNA のデキャッピングは、Dcp1 と Dcp2 により行われ、Cap 構造が取り除かれる。その後、5'-3'エキソヌクレアーゼである Xrn1 によって mRNA の分解が進行する。デキャッピング酵素は、Dcp1 と Dcp2 の 2 つのサブユニットからなり、Dcp2 が触媒サブユニットである(Song, Li and Kiledjian, 2010)。また、Dcp1 は Dcp2 に直接結合して、触媒活性を促進する活性をもつ。デアデニレーションに伴い PABP とともに eIF4F が mRNA から解離すると、Dcp1-Dcp2 複合体が mRNA に結合し、N7 位メチル化された Cap 構造を特異的に認識し、m⁷GDP を解離させる。

1-1-3. タンパク質分解機構

細胞内において不要なタンパク質は絶えず分解を受けており、主要なタンパク質分解経路としてユビキチン-プロテアソーム系 (Ubiquitin-Proteasome System: UPS)がある。プロテアソームは、ユビキチン化されたタンパク質を標的として認識し分解する。ユビキチン化による標的タンパク質の標識はタンパク質の恒常性維持において非常に重要である。

ユビキチンは、E1(ユビキチン活性化酵素)、E2(ユビキチン結合酵素)、E3(ユビキチン転移酵素: ユビキチンリガーゼ)の3種の酵素群の働きにより連続的に、かつ可逆的な酵素反応が引き起こることでタンパク質に付加される。E3 ユビキチンリガーゼは、標的タンパク質のリジン残基のアミノ基にユビキチンを共有結合させる活性を有し、結合したユビキチンのリジン残基に、さらにユビキチンが付加する活性を持つ。このようにして形成されるポリユビキチン鎖は、それを構成するユビキチン分子同士の連結様式に依存して細胞内に多種多様なシグナルを伝達する。詳細は 1-1-4 で後述するが、ユビキチン分子中の 48 番目のリジン残基を介して連結した K48 型ポリユビキチン鎖は、プロテアソームによる選択的なタンパク質分解の識別シグナルとなる。E3 ユビキチンリガーゼは、ヒトでは 700 種類以上存在し、ユビキチン修飾系における基質の多様性と特異性を決定する重要な酵素である。さらに E3 ユビキチンリガーゼは、その活性中心の構造によって大別され、HECT 型、RING 型、U ボックス型の 3 グループに分類される。

プロテアソームは、主に K48 型ポリユビキチン化された標的タンパク質を選択的に分解する。真核生物のプロテアソームは、通常、不活性型の 20S プロテアソームとして細胞内に存在しており、それぞれ 7 種のサブユニットから構成される α リングと β リングが $\alpha\beta\beta\alpha$ の順に会合した円筒形の構造をしている。触

媒粒子の 20S プロテアソームに調節粒子の 19S 複合体が会合することで、ATP 依存性プロテアーゼである活性化型の 26S プロテアソームとなる。19S 複合体の基底部は ATPase 活性をもち、ATP 加水分解に由来するエネルギーを用いて標的タンパク質の構造を変化させることで、それを解きながらプロテアソーム内部までの到達を促進させる。

1-1-4. 多彩な機能を持つユビキチン化修飾

ユビキチン分子は 76 アミノ酸からなる小分子タンパク質であり、ユビキチン化修飾は、真核生物において広く保存されており多彩な機能を持つ。

ユビキチンは、E1 ユビキチン活性化酵素のシステイン残基に結合し、E2 ユビキチン結合酵素のシステイン残基に受け渡される。E2 は、E3 ユビキチンリガーゼ上のドメインに結合し、E3-E2 複合体を形成する。この複合体は、E3 を介して基質タンパク質と結合し、E3 を足場とすることで E2 から基質のリジン残基にユビキチンが付加される(図 1-1A)。非常に稀な例であるが、場合によっては、E4 ユビキチン鎖伸長酵素が基質に結合し、E2 を介してポリユビキチン鎖をさらに伸長することもある。

ユビキチンは、基質タンパク質の主にリジン残基や、ユビキチン分子自身のリジン残基や N 末端のメチオニン残基に結合する。また、このようにして形成されたポリユビキチン鎖には、その連結様式に応じて、M1 鎖、K6 鎖、K11 鎖、K27 鎖、K29 鎖、K33 鎖、K48 鎖、K63 鎖が存在する(図 1-1B)。それぞれのポリユビキチン鎖ごとに、下流へと伝達されるシグナルが異なり、K48 型ポリユビキチン鎖は、タンパク質分解酵素複合体であるプロテアソームによる分解のシグナルとなる一方で、K63 型ポリユビキチン鎖は、遺伝子発現制御やシグナル伝達、オートファジー等を誘導するとされている。そのため、必要に応じて、活性を持つ E3 が基質へとリクルートされ、意義のあるモノユビキチンもしくは

ポリユビキチン鎖を付加、伸長する事が、細胞内応答を制御する上で必須である。

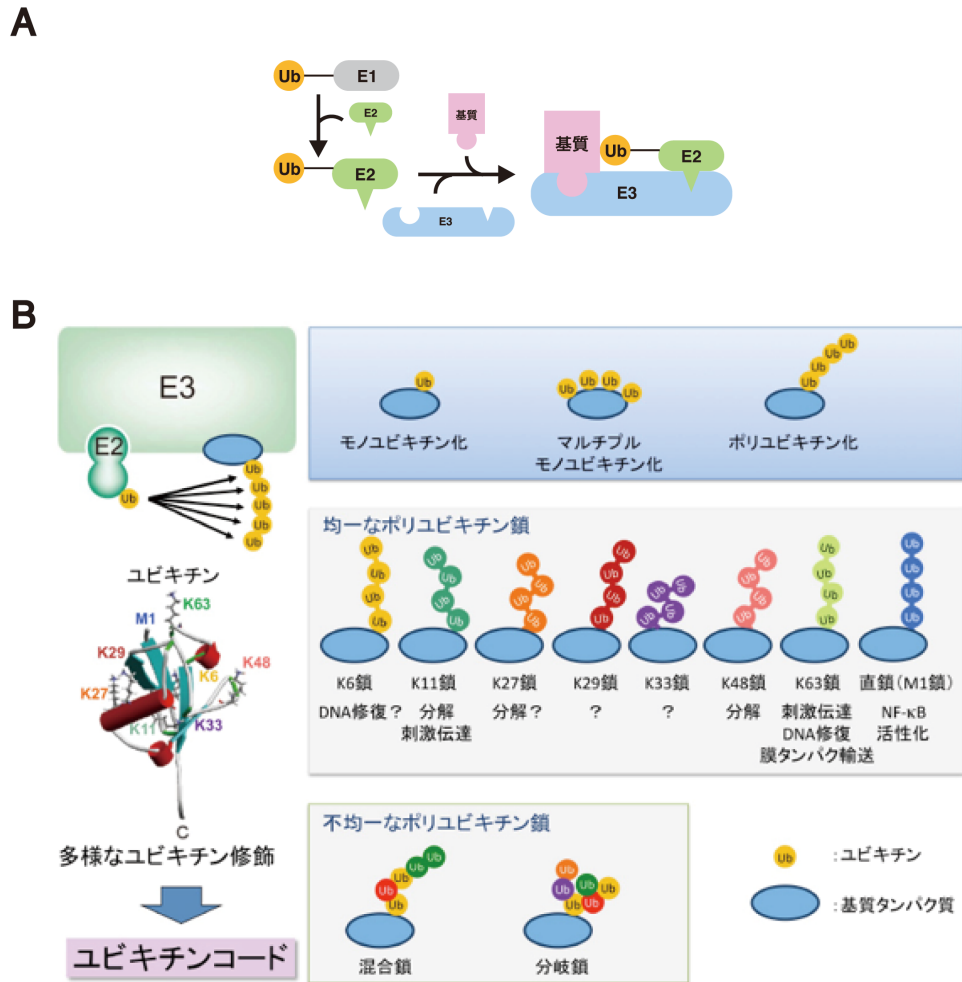


図 1-1. ユビキチン化の多様性

A) ユビキチン化反応は複数の酵素群による連続的な反応によって起こる。

B) ポリユビキチン鎖の持つ機能の多様性はその連結様式に依存する。(東京都医学総合研究所 蛋白質代謝研究室 HP より引用)

1-2 翻訳停止に依存した細胞内機能制御

1-2-1. 翻訳アレスト

これまで、生命現象を司るタンパク質は、DNA-mRNA を介して伝達された塩基配列をもとに合成され、翻訳反応が完了したのちに機能的な構造を形成し、生体内で機能する、と考えられてきた。しかしながら、近年、次世代シーケンサーを駆使した Ribosome profiling 法を用いた解析によって、翻訳伸長反応は必ずしも一定速度ではなく、緩急をつけて進行しており、時には一時停止することが明らかになってきた。驚くべきことに、大腸菌を用いた網羅的解析では、細胞内の 8 割以上のタンパク質の合成過程で、リボソームが 1 回以上停止することが報告されている(Chadani *et al.*, 2016)。さらに、翻訳の一時停止は、シャペロンの不足や異常タンパク質の蓄積等に由来するタンパク質毒性条件や、熱ストレス条件でグローバルに誘発されることが報告されている(Liu, Han and Qian, 2013; Shalgi *et al.*, 2013)。

一方で、翻訳途上で自身の合成反応を一時停止(アレスト)させることで形成される合成途中の新生ペプチド鎖が、細胞内の機能調節に関わることが報告されている(Tenson and Ehrenberg, 2002; Ito, Chiba and Pogliano, 2010; Wilson and Beckmann, 2011; Ito and Chiba, 2013; Chiba, 2018)。以下に示すように、多種多様なアレストペプチドが、アミノ酸配列依存的にリボソームのペプチド出口トンネルや活性部位である PTC (Peptidyl Transfer Center) と相互作用することで、翻訳伸長反応を一時停止させ、細胞内の遺伝子発現制御、機能的制御を行なっていることが示唆されている。それらにおける翻訳の一時停止は、翻訳反応と共役した新生ペプチド鎖のフォールディングや局在化を促進し、細胞が置かれた環境に適応するという点で必須であり、生理学的に意義のある現象であると考えられる。機能性翻訳停滞における代表的な研究として、本項ではタンパク質分

泌経路における *SecM-SecA* mRNA (Oliver *et al.* 1998)と、UPR (Unfolded Protein Response)における *XBP1u* mRNA について触れる。

1-2-2. *SecM* mRNA を介したタンパク質分泌活性制御

細胞質で合成された一部のタンパク質は、生物が有する分泌経路を介して細胞外へと輸送される(Park and Rapoport, 2012)。大腸菌の *SecM* は、細胞のタンパク質分泌活性をモニターし、その活性が不足した場合に膜透過を駆動する *SecA* ATPase の発現を誘導することで、細胞の持つ分泌能を一定以上に維持している。大腸菌における主要な分泌経路である *Sec* トランスロコンを介した *Sec* 経路において、*SecA* は自身の ATPase 活性を駆使し、分泌タンパク質を細胞内から外へと押し出すモータータンパク質として働く。*SecM* の ORF は、*SecA* の上流にコードされており、この位置関係が *SecM* による *SecA* を介したタンパク質分泌能制御を可能にしている。原核生物における翻訳開始反応では、リボソームが Shine-Dalgarno(SD)配列を認識することが必要だが、通常、*SecM-SecA* mRNA はこの SD 配列を含むようにしてステムループ構造を形成しているため、SD 配列を介したリボソームのリクルートがされず、*SecA* mRNA の翻訳開始は阻害されている。しかしながら、*SecM* は、N 末端に膜輸送に関与するシグナル配列、終止コドン手前の C 末端領域に翻訳アレストを引き起こすアレスト配列を有するため、翻訳途上のリボソームは、*SecM* mRNA 上に留まり、ステムループ構造の形成を阻害し開裂させる。このような特徴的な翻訳反応により、*SecM* mRNA の下流に位置する *SecA* mRNA からの翻訳開始が可能となっている(Nakatogawa and Ito, 2001)。この翻訳停止反応は、*SecM* の新生ペプチド鎖が *SecA* を介した膜透過反応により物理的に引っ張られることで解除されることから、細胞の分泌活性が高いときには、*SecM* の翻訳停止はごく短時間であり、これに依存した *SecA* の翻訳反応は少量に過ぎない。一方で、分泌能が低いときには、*SecM* の

翻訳停止は長時間におよび、SecA の翻訳反応が促進される。したがって、SecM は翻訳途上の状態で、自身の分泌量および SecA により引っ張られる物理的作用により、細胞の分泌活性を感知し、下流に位置する SecA の翻訳制御を行う機能性アレストペプチドとして知られている(図 1-2A)。

この特徴的なリボソームの停止は、166 番目の Pro コドンが A-site で Proryl-tRNA と相互作用した状態で起こり、合成途中の新生ペプチド鎖が、リボソームのペプチド出口トンネルやリボソーム中の活性部位である PTC と相互作用することで惹起されることが報告されている。このように、リボソームのペプチド出口トンネルが単なる物理的なトンネルではなく、翻訳制御に関与する重要な翻訳制御成分である(Nakatogawa and Ito, 2002)。

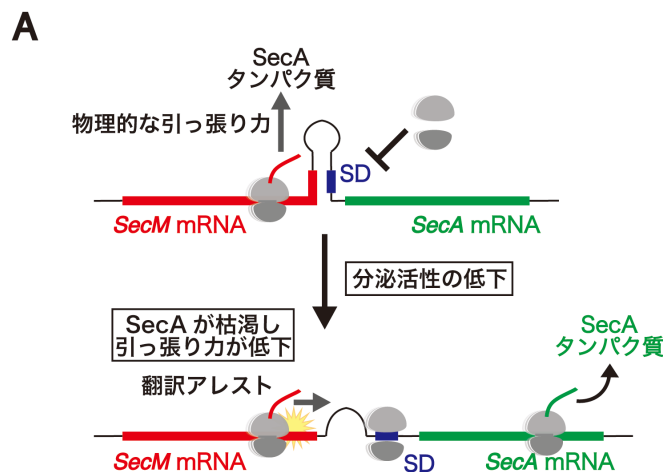


図 1-2. SecM mRNA を介したタンパク質分泌活性制御

A) SecM は翻訳途上の状態で、自身の分泌量および SecA により引っ張られる物理的作用により、細胞の分泌活性を感知し、下流に位置する SecA の翻訳制御を行う機能性アレストペプチドとして知られている。

1-2-3. 原核生物におけるその他の機能性アレストペプチド

1-2-2 において、大腸菌 *SecM* mRNA におけるアレスト依存的なタンパク質分泌経路の制御について論じた。細菌における膜タンパク質の膜への取り込み経路は複数の報告があるが、主要経路は分泌経路と同じ Sec トランスロコンを介したものである。一方で、Sec に依存しない膜タンパク質の挿入経路として YidC 経路が知られている(Kuhn, Koch and Dalbey, 2017)。YidC は、非チャネル型の膜取り込み装置であり、枯草菌においては恒常的に発現する SpolIII と、この発現が低下したときに発現誘導される YidC2 がある(Rubio, Jiang and Pogliano, 2005)。この発現誘導を行うのが *MifM* mRNA から合成されるアレストペプチドである(Chiba, Lamsa and Pogliano, 2009; Chiba and Ito, 2015)。SecM-SecA と同様に、MifM-YidC2 は同じオペロン上に存在し、*MifM* mRNA における翻訳アレストによって、ステムループにより隠されていた YidC2 の SD 配列が開裂し、露出することで、YidC2 mRNA の翻訳開始が可能になる。さらに、MifM の N 末端領域は膜貫通ドメインを有し、YidC 依存的に膜挿入されることで、*MifM* mRNA 上でのアレストが解除される点も、SecM-SecA の反応と酷似している。このようにして、SpolIII の活性が不足する場合には、*MifM* mRNA 上におけるアレストが長時間解除されず、YidC2 の発現が上昇することで、枯草菌は YidC の発現の恒常性を維持している(Chiba, Lamsa and Pogliano, 2009; Chiba and Ito, 2015)。

また、海洋性ビブリオ菌における VemP も、タンパク質分泌に関与するアレストを引き起こす(Ishii *et al.*, 2015)。VemP は、SecM と同様に分泌駆動因子である SecDF2 複合体の発現量を調節し、海洋性ビブリオ菌が多様な食塩濃度の環境に適応するために必須であることが報告されている。SecDF2 は、低ナトリウムイオン環境において発現が低下する SecDF1 の機能を補う分泌装置として発現誘導されるが、これも *SecM* mRNA や *VemP* mRNA における翻訳アレストと類似した機構により引き起こされる。

以上のように、SecM、MifM、VemP はいずれも N 末端領域に局在シグナルを有し、Sec 分泌経路や YidC 膜挿入経路の基質として機能する一方で、C 末端領域にアレストモチーフを持つ。これらのアレストモチーフにおけるリボソームの一時停止により、同一オペロン上にコードされた下流の遺伝子発現を誘導することが報告されている。クライオ電子顕微鏡を用いた解析から、SecM mRNA における翻訳アレストは、その新生ペプチド鎖とリボソームのペプチド出口トンネルや PTC 付近との相互作用により、ペプチジル転位反応が阻害されるために、(Bhushan *et al.*, 2011)、MifM mRNA や VemP mRNA の場合には、同様にして、リボソーム A-site へのアミノアシル tRNA の結合が阻害されるために(Sohmen *et al.*, 2015)、誘発されることが示唆されている。いずれの場合にも、合成途上の新生ペプチド鎖が膜透過や膜挿入され局在化し、物理的にアレストペプチドが引っ張られることが、翻訳アレストの解除に必須である。つまり、このような引っ張り力が生じうる細胞内システムであれば、未知のアレストペプチドを介した細胞内機能制御が存在する可能性がある。

以上の他にも、細胞内トリプトファン濃度をモニターする大腸菌 TcaC(Gong *et al.*, 2001)や、抗生物質を感知し薬剤耐性遺伝子を誘導するグラム陰性菌 *cat* 遺伝子(Alexieva *et al.*, 1988; Rogers *et al.*, 1990)や大腸菌 *cmlA* 遺伝子(Gu *et al.*, 1994)、*ermA*、*ermB*、*ermC*、*ermD* 遺伝子(Nora, Celine and Alexander, 2008; Ramu, Mankin and Vazquez-Laslop, 2009)も、細胞内代謝物や低分子化合物を感知して翻訳アレストを引き起こすことで知られている。

1-2-4. Xbp1u mRNA を介したタンパク質分泌活性制御

アレストペプチドの多くは、特定の条件下で翻訳の一時停止を誘発し、解除をも行うことで細胞内外の環境センサーとして機能する。一方で、以下に示す Xbp1u mRNA はセンサーとして機能するわけではなく、翻訳の一時停止を巧妙

に利用し、自身の mRNA を小胞体膜上へと局在化させている。

熱ストレス等によってミスフォールディングを引き起こしたタンパク質が小胞体に蓄積し、小胞体ストレスが生じた場合には、分子シャペロンや異常タンパク質の分解促進因子の発現を誘導し、ストレスを緩和する機構である小胞体ストレス応答 (Unfolded Protein Response : UPR) が惹起される。この UPR により発現誘導される転写活性化因子の一つが XBP1 である (Yoshida *et al.*, 2001)。XBP1 の前駆体 mRNA である *Xbplu* mRNA には、26 塩基からなるイントロンが含まれており、その下流には開始コドンに対し、-1 フレーム分ずれた読み枠で転写活性化ドメインがコードされている。

小胞体ストレス応答時には、未成熟型 *Xbplu* mRNA がスプライシングを受け、イントロンが除去されることで、成熟型 *Xbpls* mRNA が産生される。このようにして、スプライシングを受け成熟型 mRNA へと変換されることで、開始コドンのコドンフレームと転写活性化ドメインのコドンフレームが一致し、転写活性化因子としての活性を発揮できるようになる。

以上のような、*Xbplu* mRNA のスプライシングは、小胞体ストレス応答時に活性化される小胞体タンパク質 IRE α により行われる。小胞体膜上に存在する IRE1 α は、小胞体ストレスによって自己(相互)リン酸化およびホモ二量体化することで活性化し、活性型 IRE1 α は、自身の細胞質側ドメインが有する RNase 活性を駆使することで *XBPlu* mRNA のスプライシングを行う。

そのため、*Xbplu* mRNA が効率の良いスプライシングを受けるためには、IRE α が位置する小胞体膜近傍に局在化される必要がある。*Xbplu* mRNA の終止コドン直前には、リボソームを停止させるアレストモチーフが存在し、さらに、その N 末端側には HR2 と呼ばれる疎水性アミノ酸残基に富んだ領域を持つ、この領域は SRP 依存的に小胞体膜へと局在させる役割を担う。つまり、翻訳されリボソームトンネル内から細胞質へと露出した HR2 により小胞体膜上へとター

ゲッティングされた *Xbp1u* mRNA-リボソーム-新生ペプチド鎖からなる三者複合体を、アレストモチーフ上での翻訳アレストにより長時間維持することで、効率のよい小胞体膜上への局在化とそれによるスプライシングを可能にしている(Yanagitani *et al.*, 2009, 2011; Han *et al.*, 2020)。詳細は第 4 章で論じる。

1-2-5. 真核生物における誘導性アレストペプチド

真核生物においても、誘導性の翻訳アレストを利用したいくつかの細胞内機能制御が知られている。

アカパンカビ *arg-2* は、アルギニンの生合成時に機能するカルバモイルリン酸合成酵素の小サブユニットをコードしている。ARG2 は、細胞内アルギニン量の不足を感知して合成誘導され、過剰な場合には合成が抑制される。*arg-2* の上流には、upstream ORF (uORF) が存在しており、AAP(Arginine Attenuator Peptide) と呼ばれる 24 アミノ酸からなるペプチドを合成するが、アルギニン過剰生産条件では、リボソームは A-site に終止コドン位置させながら翻訳終結することなく停止する(Wang and Sachs, 1997)。この結果、uORF の下流に位置する *arg-2* mRNA の翻訳が阻害される。このような翻訳制御機構は、アカパンカビのみならず、出芽酵母にも保存されており、uORF におけるリボソームの停止による main ORF の翻訳阻害のみならず、1-5 で後述する NMD によって mRNA 分解も誘導される(Gaba, Jacobson and S. Sachs, 2005)。

原核生物の場合には、上流の ORF におけるリボソームの一時停止は、下流の ORF の SD 配列を露出させ、翻訳開始を正に制御するが、これに対して、真核生物においては、下流の ORF のスキャニングを阻害し、翻訳開始を負に制御する。これは、原核生物の翻訳開始ではリボソームが SD 配列を認識してリクルートされる一方で、真核生物においては 5'末端の Cap 構造にリボソームがリクルートされ、その後スキャニングを開始するという、翻訳開始機構の違いを反映

した結果であると考えられる。

さらに、シロイヌナズナ *CGSI* は、翻訳アレストを利用してメチオニン生合成経路を調節しており、メチオニン誘導体である S-adenosyl-L-methionine (SAM もしくは AdoMet)により発現制御を受ける。*CGSI* における SAM 依存的な翻訳アレストは、翻訳伸長阻害のみならず、後述する mRNA の切断をも惹起することで、メチオニン生合成経路の初期を担う *CGSI* 合成酵素の合成量を低下させる (Haraguchi *et al.*, 2008)。

1-2-6. 創薬ターゲットとしての翻訳アレスト

2017 年に血漿中の LDL コレステロールを低下させる化合物として PF-06446846 が報告された。PF-06446846 は、血漿中の LDL コレステロール量を正に制御する PCSK9(Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 9)をコードする *PCSK9* mRNA における特異的な翻訳アレストを誘導する PCSK9 特異的合成阻害剤として合成され、高コレステロール血症の治療薬として期待されている (Lintner *et al.*, 2017)。目的タンパク質の特定の立体構造やモチーフを標的とする現状の創薬アプローチでは、特異性の高い薬剤を同定、合成することが困難であるが、翻訳アレストという新規でかつ特徴的な現象にアプローチすることが、創薬の観点においても新たな切り口になる可能性がある。

1-2-7. 翻訳停滞を誘発する翻訳アレスト配列の特徴

これまで、細胞の環境適応に必須な機能性アレストペプチドについて論じてきたが、生体内には様々なアレストモチーフが存在しており、それ由来のリボソームの異常停止が異常翻訳を検知するシグナルとなることが明らかになっている。1-1-2 に前述したように、終止コドンに欠失した異常 mRNA が翻訳されると、その下流にインフレームで終止コドンが存在しない限り、mRNA の 3'末端

に存在する poly(A)鎖が翻訳されてしまう。このような poly(A)鎖の翻訳反応は、細胞内で異常翻訳と検知されるために、そのノンストップ mRNA の翻訳が抑制されることが明らかになっている(Inada and Aiba, 2005)。さらに、リジン残基やアルギニン残基が連続した塩基性アミノ酸配列の翻訳は、正電荷を帯びたポリリジンやポリアルギニンペプチドを産生する。産生された正電荷ペプチドと、新生ペプチド鎖が通過するリボソームトンネル内腔を構成する rRNA の負電荷が静電的相互作用を生じるために、翻訳伸長阻害が起きるとされている(Ito-Harashima *et al.*, 2007; Lu, R.Kobertz and Deutsch, 2007; Lu and Deutsch, 2008; Dimitrova *et al.*, 2009; Kuroha *et al.*, 2010)。

また、レアコドンクラスターにおいても翻訳アレストが誘発される。レアコドンとは、ゲノム中に出現する頻度が低く、さらにコドンに対応する tRNA の分子数が極端に少ないコドン種を指す。出芽酵母において、CGA コドンに対応する tRNA には、完全一致の tRNA^{Arg} (UCG)が存在しないため、細胞は tRNA^{Arg} (ACG)から産生される tRNA^{Arg} (ICG)を使用して翻訳を進める。しかしながら、tRNA アンチコドンループのイノシン(I)は wobble 位となり CGA コドンのアラニン(A)との相互作用が弱い。そのため、mRNA 上に CGA コドンが出現すると翻訳伸長速度が遅延し、さらに CGA コドンが連続しクラスターを形成すると、翻訳アレストを引き起こす(Doma and Parker, 2006; Chen *et al.*, 2010a; Letzring *et al.*, 2013)。

さらに、翻訳アレストは、ステムループ構造やグアニン四重鎖構造を含む強固で安定な mRNA 二次構造(Doma and Parker, 2006; Kuroha *et al.*, 2010; Tsuboi *et al.*, 2012)、酸化修飾を受けた RNA(Simms *et al.*, 2014)や inhibitory di-codon pairs と呼ばれる翻訳を阻害するコドンの組み合わせ(Gamble *et al.*, 2016)によっても起こる。また、アミノ酸飢餓(Guydosch and Green, 2014)や tRNA の不足(Ishimura *et al.*, 2014)、酸化ストレス(Simms *et al.*, 2014)や遺伝子変異(LaRiviere *et al.*, 2006)に

よっても翻訳アレストが誘発されることが知られている。

1-3 出芽酵母における Ribosome-associated Quality Control (RQC)の分子機構

1-3-1. リボソームの停滞により惹起される品質管理機構: RQC と NGD

前述した *SecM* mRNA や *Xbp1u* mRNA における機能性アレストは、環境適応後の物理的な引っ張り力によって解除される。しかしながら、異常翻訳を検知し、リボソームが停止した際には、その由来となる異常翻訳を解除、除去する必要がある。この際には、停滞したリボソームは解離され、合成途上の新生ペプチド鎖はプロテアソーム依存に、異常 mRNA はヌクレアーゼにより分解を受ける。このような異常翻訳によるリボソームの停止に起因した、合成途上の新生ペプチド鎖の分解系は、RQC (Ribosome-associated Quality Control)、異常 mRNA の分解系は、NGD (No-Go Decay) と呼ばれる。

1-3-2. 停滞リボソームの衝突、認識と E3 ユビキチンリガーゼ Hel2

YKR017C、*YDR266C* は酵母細胞内のヒストンタンパク質量を制御する E3 ユビキチンリガーゼとして同定され、それぞれヒストン E3 リガーゼ *HEL* (*Histon E3 Ligase*)1、*HEL2* と命名された (Singh *et al.*, 2012)。ヒストンタンパク質が過剰に生産されると、細胞質に遊離ヒストンタンパク質が生成され、その塩基性に富む性質によって様々なタンパク質や RNA、RNP と結合し正常な細胞機能に障害をきたすと考えられる。過剰生産されたヒストン H3/H4 は E3 ユビキチンリガーゼ Hel1、Hel2、Pep5、Snt2 によるユビキチン化を受け、プロテアソームによる分解制御を受けることで、ヒストンタンパク質の発現量は厳密に制御されている。

Hel2 は、RING 型 E3 ユビキチンリガーゼであり、RING ドメインを介して E2 ユビキチン結合酵素 Ubc4 及び Ubc5 と結合する。また、Hel2 は RNA 結合タンパク質としての活性も有し、*in vivo* UV クロスリンクと質量分析を用いた網羅的

な解析により、翻訳中の mRNA や 18S rRNA と相互作用することや、リボソームタンパク質 Asc1 や 18S rRNA と相互作用することで安定にリボソーム 40S サブユニットに結合することが示されている(Winz *et al.*, 2019)。さらに、当研究室では、Hel2 は連続した塩基性アミノ酸配列依存的な翻訳アレストに必須な因子であることを *nad* 変異株スクリーニングにより同定し、Jonathan S. Weissman 研究室との共同研究により報告している(Brandman *et al.*, 2012)。

当研究室で行われた *nad* 変異株スクリーニング及び *in vivo* における遺伝学的解析の結果、翻訳アレストに必須な因子としてリボソームタンパク質 Asc1 と E3 ユビキチンリガーゼ Hel2 が同定された。さらに、これらは RQC 及び NGD の誘導にも必須であることが明らかになっている(Kuroha *et al.*, 2010; Brandman *et al.*, 2012; Letzring *et al.*, 2013; Matsuda *et al.*, 2014; Saito, Horikawa and Ito, 2015; Wolf and Grayhack, 2015; Matsuo *et al.*, 2017; Sitron, Park and Brandman, 2017; Ikeuchi *et al.*, 2019; Ikeuchi, Izawa and Inada, 2019; Inada, 2020)。

まず、以下では Hel2 や Asc1 の RQC における活性に着目して論じる。Hel2 は、ユビキチン化反応において基質特異性を決定する E3 ユビキチンリガーゼとしての活性を有し、Hel2 の E3 活性は翻訳アレストにより惹起される品質管理機構 RQC の誘導に必須である(Matsuo *et al.*, 2017)。Hel2 は、翻訳中のリボソームに結合しており、質量分析及び遺伝学的解析の結果から、Hel2 はリボソームタンパク質 uS10 及び uS3、eS7 をユビキチン化することが明らかになった。このうち、Hel2 による uS10 の K6/8 残基における K63 型ポリユビキチン鎖の形成が RQC の誘導に必須であることを報告した(Matsuo *et al.*, 2017; Ikeuchi *et al.*, 2019)。また、Asc1 は、リボソームを構成するタンパク質の 1 つであり、Hel2 のユビキチン化標的である uS10 や uS3 の近傍に位置する。Asc1 は、真核生物で広く保存されている WD40 repeat ファミリーの 1 つであり、ヒトにおける RACK1(Receptor for Activated C Kinase 1)の出芽酵母ホモログである(Nilsson *et al.*, 2004)。さらに、

Asc1 は、 β プロペラ構造の WD40 repeat が 7 つ、ほぼ点対称に並んだ王冠状の構造を取り (Sengupta *et al.*, 2004; Coyle, Gilbert and Doudna, 2009)、これによって様々なタンパク質ドメインとの結合能を持つことで、種々のシグナリングにおける足場タンパク質として機能することで知られる。

近年の遺伝学、構造学的所見から、「リボソームの衝突」が RQC の引き金となると考えられている。試験管内翻訳系とクライオ電子顕微鏡を用いた構造解析の結果、出芽酵母において翻訳アレストを惹起するレアコドンを含み、ポリアルギニンをコードする (CGACCG)repeat を翻訳したリボソームは、2 つのリボソームが衝突した disome (di-ribosome) 構造を形成することが明らかになった (Ikeuchi *et al.*, 2019) (図 1-3A,D)。このうち、先頭で停滞したリボソーム (leading ribosome) は tRNA を P-及び E-site に含み、A-site が空である classical POST-translocation state であり、これに衝突した後続のリボソーム (colliding ribosome) は A/P-及び P/E-tRNA という Hybrid tRNAs を含む PRE-rotated state を形成することが報告された (図 1-3B)。一方で、Hel2 と共精製されるリボソームは hybrid tRNA を含む PRE-rotated state を形成していたことから (Matsuo *et al.*, 2017)、Hel2 は、hybrid tRNAs を含む colliding ribosome を好んで認識、結合し、RQC を誘導することが示唆されている。また、*nad* 変異株スクリーニングにより同定されたもう一つの因子である Asc1 についても、クライオ電子顕微鏡を用いた解析から、disome 内でそれぞれのリボソーム中の Asc1 同士が直接相互作用していることが明らかになった (Ikeuchi *et al.*, 2019) (図 1-3C)。したがって、「リボソームの衝突」が RQC を惹起する必要条件であり、これにより形成される hybrid tRNAs を含む安定な PRE-rotated state、及びこの際に特異的に形成される Asc1-Asc1 の直接相互作用を、Hel2 が特異的に認識することで RQC を誘導することが示唆されている。

これを支持するように、出芽酵母ライセートを用いた試験管内翻訳系と試験

管内ユビキチン化反応を共役させた実験系では、Hel2 は、停滞した leading monosome と比較して、衝突した collided disome に対しポリユビキチン鎖を形成することが示されている(Ikeuchi *et al.*, 2019) (図 1-4A)。

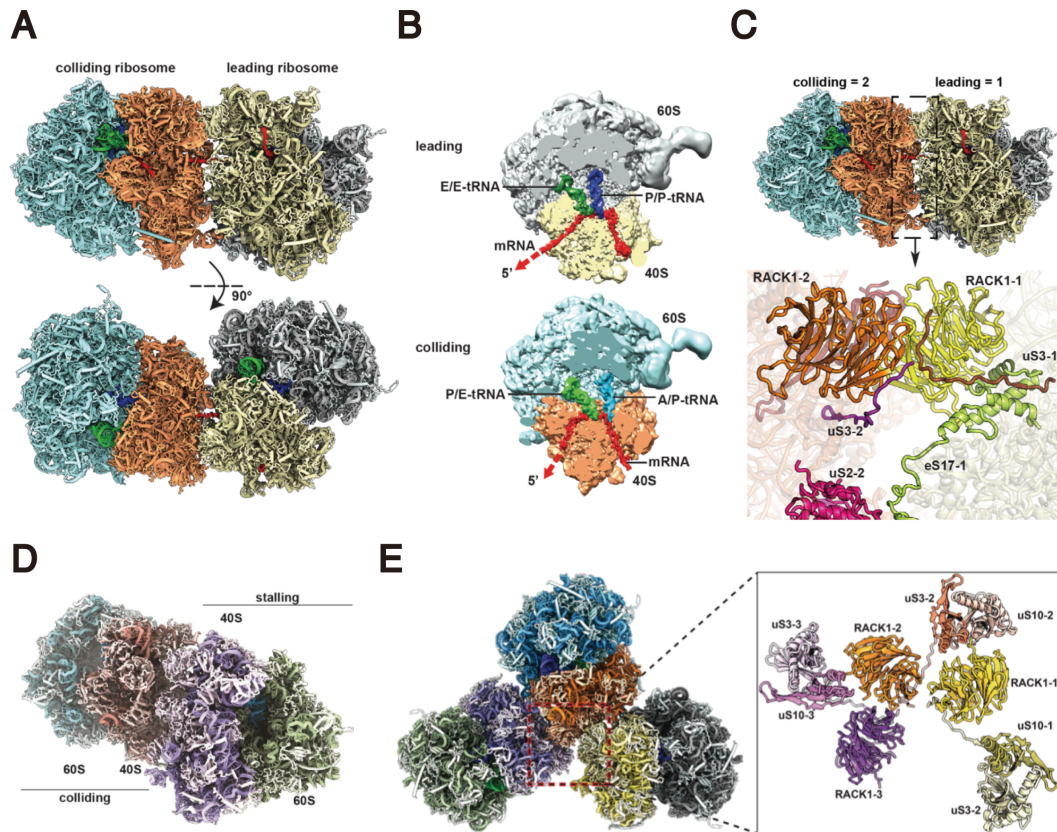


図 1-3. クライオ電子顕微鏡による衝突リボソームの検出

A-C) レアコドン上で衝突した Disome。(Ikeuchi *et al.*, 2019) より引用。

D) poly(A)上で衝突した Disome。(Tesina *et al.*, 2020) より引用。

E) 内在性 RQC 標的配列 SDD1 mRNA 上で衝突した Trisome。(Matsuo *et al.*, 2020) より引用。

1-3-3. 停滞リボソームの解離と RQT 複合体

1-3-4 で後述するが、RQC において新生ペプチド鎖の分解に必須な E3 ユビキチンリガーゼ Ltn1 は、合成途上の新生ペプチド鎖が繫留された 60S サブユニットに対し特異的に結合する。したがって、Hel2 によってユビキチン化されたりボソームは、何らかの機構によって、それぞれのサブユニットに解離する必要がある。

RQC における解離因子の同定を目的とし、当研究室松尾講師は、Hel2 と共精製されるタンパク質群を質量分析により解析し、RQC の誘導に関与する RQT(Ribosome-associated Quality control Trigger)複合体を同定した。出芽酵母における RQT 複合体は、ATP 依存性 RNA ヘリカーゼである Slh1、ユビキチン結合ドメインを有す Cue3、機能未知の yKR023W からなる(Matsuo *et al.*, 2017; Sitron, Park and Brandman, 2017)。それぞれの欠損株を用いた遺伝学的解析の結果、Slh1 は Hel2 と同程度に、Cue3 と yKR023W は Hel2 と比較して弱いながらも RQC の誘導に必要であることが明らかになった。これらの因子は、uS10 のユビキチン化には関与せず、さらに、Slh1 の ATPase 活性、Cue3 のユビキチン結合活性が RQC の誘導に必須であることから、RQT 複合体は、uS10 のユビキチン化依存にリボソームの解離反応に関与することが示唆された(Matsuo *et al.*, 2017)。

また、1-3-5 で後述するが、当研究室では、RQC の内在性標的配列として、SDD1 を同定している。SDD1 mRNA を用いた試験管内再構成実験の結果、SDD1 mRNA を翻訳したリボソームは、3つのリボソームが衝突した trisome(tri-ribosome)を形成しており、Hel2 は trisome 中のリボソームタンパク質 uS10 を特異的にユビキチン化することが明らかになった(図 1-3E)。さらに、RQT 複合体は、Slh1 の ATPase 活性依存に、Hel2 によってポリユビキチン化された trisome 中の、先頭で停滞した leading ribosome を 40S と 60S の各サブユニットに解離させる活性を持つ(Matsuo *et al.*, 2020)。したがって、RQT 複合体は、uS10 上のポリユビキチ

ン鎖を目印に認識、結合し、自身の ATPase 活性を駆使して、停滞したリボソームを解離させることで、下流の RQC 経路へと導く活性があることが明らかになった(図 1-4A)。

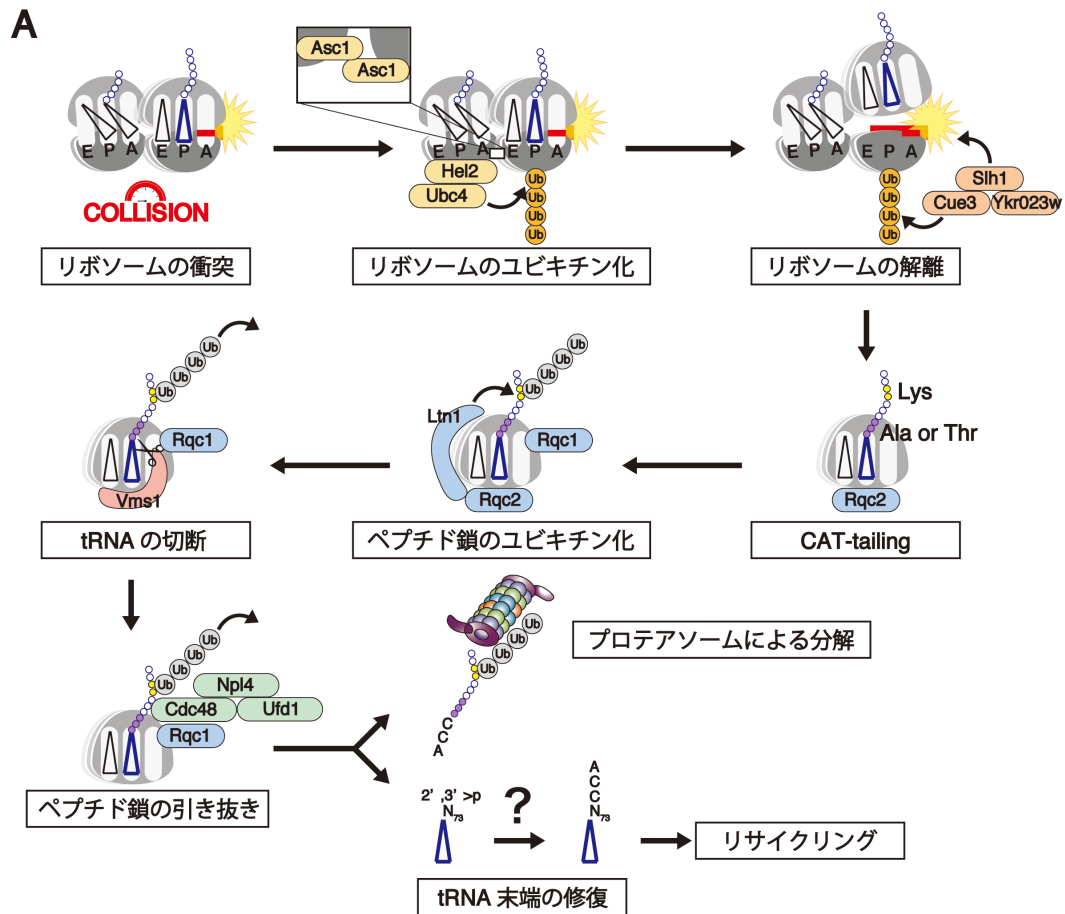


図 1-4. クライオ電子顕微鏡による衝突リボソームの検出

A) 出芽酵母における RQC の分子機構。

1-3-4. 合成途上の新生ペプチド鎖の分解と RQC 複合体

合成途上の新生ペプチド鎖を繫留した解離後の 60S サブユニット上では、RQC 複合体が形成される。RQC 複合体は Ltn1、Rqc1、Rqc2、Cdc48 から構成される (Shao, von der Malsburg and Hegde, 2013; Shao and Hegde, 2014)。Ltn1 は、哺乳類細胞においても LISTERIN として保存されており、その変異マウスである *lister mice* は、運動神経障害や神経変性を引き起こす (Chu *et al.*, 2009)。Ltn1 は、RING ドメインを有する E3 ユビキチンリガーゼであり、新生ペプチド鎖に K48 型ポリユビキチン鎖を伸長することで、プロテアソーム依存的な分解へと導く (Brandman *et al.*, 2012; Defenouillère *et al.*, 2013, 2017; Shao, von der Malsburg and Hegde, 2013; Shao and Hegde, 2014; Shao *et al.*, 2015; Brandman and Hegde, 2016)。この反応をより効率良く行うために、RQC 複合体中の構成因子は、非常に巧妙かつ特徴的な役割を担う (図 1-4A)。

Rqc2 は、解離後の 60S サブユニットのペプチジル tRNA 界面に結合し、40S サブユニットとの再会合を防ぐだけではなく、さらに 60S サブユニットへの Ltn1 のリクルートを促進している (Lyumkis *et al.*, 2014; Shao *et al.*, 2015)。また、Rqc2 は CAT (Carboxy-terminal Alanine and Threonine residues)-tailing に必須な因子である。CAT-tailing は、mRNA 配列や 40S サブユニット非依存的に、解離後の 60S サブユニット上の合成途上の新生ペプチド鎖の C 末端にアラニンやスレオニン残基が付加される反応であり、分解の目印として機能する、RQC 経路特有の現象である (Shen *et al.*, 2015)。CAT-tailing には、新生ペプチド鎖のリジン残基をリボソームトンネル内腔から細胞質へと物理的に押し出すことで、Ltn1 による新生ペプチド鎖のユビキチン化の効率を高める役割がある、と考えられている (Kostova *et al.*, 2017; Osuna *et al.*, 2017)。Ltn1 によるユビキチン化を受けた新生ペプチド鎖には、AAA+ATPase である Cdc48 がリクルートされ、コファクターである Ufd1 及び Npl4 とともに、Cdc48 がユビキチン化されたペプチド鎖を 60S

サブユニットから引き抜き、プロテアソームによる分解へと導く (Brandman *et al.*, 2012; Defenouillère *et al.*, 2013; Verma *et al.*, 2013)。Rqc1 は、当初ユビキチン化された 60S RNC(Ribosome-Nascent chain Complex)に Cdc48 をリクルートすることが示唆されていたが (Brandman *et al.*, 2012; Defenouillère *et al.*, 2013)、加えて、Ltn1 によるユビキチン化の速度を亢進すること (Osuna *et al.*, 2017)、Ltn1 によるユビキチン鎖の組成を K48 型ポリユビキチン鎖に限定する機能をもつことが報告されている (Kuroha *et al.*, 2018)。以上のようにして、Rqc2 が触媒する CAT-tailing による新生ペプチド鎖と Ltn1 の空間的近接効果、Rqc1 によるユビキチン鎖の限定効果等により、60S サブユニットに結合した Ltn1 は効率よく新生ペプチド鎖をユビキチン化する。このように、合成途上の新生ペプチド鎖は 60S サブユニット上から Cdc48 によって引き抜かれ、プロテアソームにより分解される一方で、残存したペプチジル tRNA からペプチド鎖が切り離される過程については明らかになっていなかった。

翻訳終結因子である eRF1 と類似したドメインを有する Vms1 は、ペプチド鎖をリボソーム上から切り離すペプチジル tRNA の加水分解酵素として報告され (Verma *et al.*, 2018; Zurita Rendón *et al.*, 2018)、その後、tRNA エンドヌクレアーゼとしての活性が報告された (Kuroha *et al.*, 2018; Su *et al.*, 2019)。Vms1 は、CAT-tailing を終えた Rqc2 を 60S サブユニットから引き離すようにして、同様の結合位置にリクルートされ、リボソーム A-site と相互作用する。また、ATPase 活性を持つコファクターである Arbl は E-site に結合し、Vms1-Arb1 によって P-site に存在するペプチジル tRNA を挟み込むようにして、tRNA の 3'末端に付加されている CCA 末端の 5'側を特異的に切断する。このようにして、ペプチジル tRNA から切り離された新生ペプチド鎖は、Cdc48 によってリボソームトンネルから引き抜かれることが可能になる (Su *et al.*, 2019)。哺乳類細胞では、CCA 末端が除去された tRNA の修復酵素として TRNT1 や ELAC1 が同定されており、

修繕された tRNA はアミノアシル化を受け、再度翻訳反応に利用される(Yip *et al.*, 2019, 2020)。以上のように、多数の因子による緻密かつ巧妙な反応の連続によって、停滞したリボソーム上の合成途上の新生ペプチド鎖の分解系 RQC が進行する。さらに、上述した RQC 関連因子群は、出芽酵母から哺乳類細胞に至るまで広く保存されている(図 1-5A)。

一方で、原核生物の場合には、Rqc2 の機能的ホモログである RqcH が、新生ペプチド鎖の C 末端に Alanine-tail を付加する(Lytvynenko *et al.*, 2019)。これは、CAT-tailing のように、mRNA 配列や 40S サブユニット非依存的に付加されるが、CAT-tailing とは異なり、付加された Alanine-tail がデグロンとして働き、直接分解のシグナルになる。そのため、原核生物には Ltn1 による新生ペプチド鎖のユビキチン化のような反応は存在しない。Alanine-tail の付加反応に関与する因子として、YabO が同定されており、これは C 末端にアラニンが付加されたペプチジル tRNA の移動を、YabO 自身のリボソームへの結合と解離によって制御することで、効率的な RqcH による Alanine-tail 付加反応を促進している(Crowe-McAuliffe *et al.*, 2020; Filbeck *et al.*, 2021)。その後、Alanine-tail を付加された新生ペプチド鎖は、プロテアソームではなく ClpXP と呼ばれる ATP 依存性のプロテアーゼの複合体により、除去される。

A

機能	出芽酵母	哺乳類細胞
衝突リボソームのユビキチン化における E3 酵素	Hel2	ZNF598
衝突リボソームのユビキチン化における E2 酵素	Ubc4	UBE2D3
衝突リボソームにおける特異的相互作用	Asc1	RACK1
RQT 複合体中の RNA ヘリカーゼ	Slh1	ASCC3
RQT 複合体中のユビキチン結合	Cue3	ASCC2
RQT 複合体中の機能未知因子	Ykr023w	TRIP4
解離後のサブユニット同士の再会合阻害、Ltn1 のリクルート、CAT-tailing	Rqc2	NEMF
Cdc48 のリクルート、Ltn1 によるユビキチン化促進、ユビキチン鎖の限定	Rqc1	TCF25
リボソームトンネルからの新生ペプチド鎖の引き抜きにおける AAA+ ATPase	Cdc48	p97/VCP
リボソームトンネルからの新生ペプチド鎖の引き抜きにおける補因子	Npl4	NPLOC4
リボソームトンネルからの新生ペプチド鎖の引き抜きにおける補因子	Ufd1	UFD1L
新生ペプチド鎖のユビキチン化	Ltn1	LISTERIN
新生ペプチド鎖と tRNA の CCA 末端の切断における tRNA エンドヌクレアーゼ	Vms1	ANKZF1
新生ペプチド鎖と tRNA の CCA 末端の切断における補因子	Arb1	?
切断後の tRNA 末端の 2' 3' >p を除去する tRNA の修復酵素	?	ELAC1
切断後の tRNA 末端に CCA を再付加する tRNA の修復酵素	?	TRNT1
mRNA の切断におけるエンドヌクレアーゼ	Cue2	N4BP2?
切断後の mRNA 断片の末端のリン酸化	Trl1	?
切断後の mRNA 断片のトリミング	Dxo1	?

図 1-5. RQC/NGD 因子の出芽酵母と哺乳類細胞における保存性

1-3-5. 出芽酵母における RQC の内在性標的配列 SDD1

これまで、出芽酵母を用いた RQC の分子機構の解明には、レアコドンクラスターである(CGA)repeat や連続した塩基性アミノ酸配列である poly(A)鎖がテスト配列として用いられてきた。しかしながら、RQC の内在性標的配列は同定されておらず、RQC の生理学的意義の解明は困難であった。そのため、当研究室において行われた CGA-CGA di-codon に着目した遺伝学的スクリーニングの結果、RQC の標的配列として SDD1 mRNA が同定された(Matsuo *et al.*, 2020)。遺伝学的解析や個々の mRNA の翻訳状態を検出する ribosome profiling 法の結果、SDD1 mRNA 上において、翻訳中のリボソームは、3 つのリボソームが衝突した trisome を形成して安定に停止しており、これは Hel2 を介した uS10 のユビキチン化や RQT 複合体による解離、Ltn1 による RQC の標的となることが明らかになった(図 1-3E)。停滞に必須な最小領域として、196-FFYEDYLIFDCRAKRRK-212 のアミノ酸配列が同定され、先頭のリボソームは、210 番目の R(CGA)コドンが P-site、211 番目の R(CGA)コドンが A-site に位置した際に、CGA-CGA inhibitory di-codon 上で停滞していることが明らかになった(Gamble *et al.*, 2016; Tesina *et al.*, 2020)。また、クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析の結果、SDD1 mRNA 上で停滞したリボソームのうち、先頭の leading ribosome は P-site にペプチジル tRNA を含み、空の A-site を持つ POST-translocation state、これに衝突した 2 番目、3 番目の colliding ribosome は、共に A/P-及び P/E-site に hybrid tRNA を含む PRE-rotated state であった。この結果は、disome を形成する(CGACCG)repeat mRNA を翻訳中に停滞したリボソームの構造学的所見と一致しており、RQC の基質となるリボソームの衝突の際には、先頭の leading ribosome は空の A-site を持つ POST-translocation state、衝突した colliding ribosome は hybrid tRNAs を含む PRE-rotated state を形成することが明らかになった(図 1-3E)。一方で、disome 形成の際に特徴的であった、先頭の leading ribosome 中の Asc1 と衝突した colliding

ribosome 中の Asc1 の直接相互作用は、trisome 形成の場合には 2 つ目と 3 つ目の衝突した colliding ribosome のみの間で起こっていた(図 1-3E)。さらに、構造解析の結果、アミノ酸側鎖の立体障害が大きい 197-FY-198 は、リボソームのペプチド出口トンネル中の狭窄部位に位置するリボソームタンパク質 uL4 や uL22 と相互作用し、211-RK-212 のうち CGA²¹¹ と AAA²¹² の最初の A は、18S rRNA 中の C1623、A1756 と six-base π -stack 構造を形成する(Chandrasekaran *et al.*, 2019; Tesina *et al.*, 2020)。以上をはじめとして、18S rRNA 中のデコーディングセンター(Decoding Center: DC)や 25S rRNA 中のペプチジルトランスフェラーゼセンター(Peptidyl Transferase Center: PTC)、ペプチド出口トンネルの狭窄部位と *SDD1* mRNA もしくはそれ由来の新生ペプチド鎖が、特異的かつ強力な相互作用を生むことで、リボソームの停滞が起こることが報告された。

さらに、*SDD1* mRNA を用いた試験管内再構成実験の結果、*SDD1* mRNA を翻訳したリボソームは、3 つのリボソームが衝突した trisome(tri-ribosome)を形成しており、Hel2 は trisome 中のリボソームタンパク質 uS10 を特異的にユビキチン化することが明らかになった。さらに、RQT 複合体は、Slh1 の ATPase 活性依存に、Hel2 によってポリユビキチン化された trisome 中の、先頭で停滞した leading ribosome を 40S と 60S の各サブユニットに解離させる活性を持つことが報告された(Matsuo *et al.*, 2020)

1-4 出芽酵母における No-Go Decay (NGD)の分子機構

1-4-1. mRNA 分子内切断; NGD

これまで、リボソームの異常停滞に伴う新生ペプチド鎖の分解は RQC 経路を介して行われることを論じてきた。一方で、翻訳されている異常 mRNA は NGD 経路により迅速に分解される。

NGD は、安定でかつ強固な mRNA 二次構造であるステムループ構造を mRNA 中に挿入することで発見され、リボソームの異常停止は mRNA 分解をも導くことが明らかになった(Doma and Parker, 2006)。その後、ステムループ構造のみならず、レアコドンクラスター、連続した塩基性アミノ酸配列、安定な mRNA 高次構造であるグアニン四重鎖構造、8-oxoguanosine と呼ばれる mRNA の酸化障害によっても、NGD が惹起されることが報告された(Doma and Parker, 2006; Kuroha *et al.*, 2010; Tsuboi *et al.*, 2012; Simms *et al.*, 2014)。通常、mRNA は 5'末端の Cap 構造や 3'末端の poly(A)鎖によって、エキソヌクLEASEによる mRNA 末端からの分解を回避しているが、翻訳途中のリボソームが異常停止した場合には、停滞したリボソームの近傍で mRNA がエンドヌクLEASEによって内部切断を受け、mRNA 断片のうち 5'側断片は 3'末端から SKI-エキソソーム複合体により、3'側断片は 5'末端から Xrn1 により、露出した mRNA 末端からエキソヌクLEASEによって分解される。切断された mRNA 断片のうち、3'側断片の 5'末端はヒドロキシル基が露出しており、これをリン酸化酵素 Trl1 がリン酸化することで Xrn1 による分解が促進されること(Navickas *et al.*, 2020)や、Xrn1 不活化細胞では 5'-3'RNase 活性を持つ Dxo1 が 3'側断片の 5'末端からトリミングする(Chang *et al.*, 2012; Doamekpor *et al.*, 2020; Navickas *et al.*, 2020)こと等、詳細な分子機構が報告されている。このような mRNA の内部切断を伴う異常 mRNA 分解は NGD と呼ばれている。NGD は、出芽酵母を用いて発見され、ハエや植物

には保存されていることが明らかになっているが、哺乳類細胞における保存性については、未だ明らかになっていない(Passos *et al.*, 2009; Szádeczky-Kardoss *et al.*, 2018)。

前述した RQC に必須である Hel2 及び Asc1 は、NGD においても不可欠な因子であり、これらの欠損株においては mRNA の切断が起こらない(Kuroha *et al.*, 2010; Ikeuchi and Inada, 2016; Simms, Yan and Zaher, 2017; Ikeuchi *et al.*, 2019)。このため、RQC と同様に Hel2 によるリボソームのユビキチン化が、NGD の惹起に必須であると考えられており、詳細は 1-4-2 で後述する。

1-5-2 において後述する Dom34-Hbs1 複合体も NGD の惹起に関与する。

Dom34-Hbs1 は、翻訳終結因子である eRF1-eRF3 と構造相同性を示し、mRNA 末端で停滞したリボソームの解離を行う因子として報告されている。NGD においても、Dom34-Hbs1 は、翻訳アレストに伴う mRNA 分子内切断を促進し、NGD の結果として産生された 5'側断片の 3'末端で停滞したリボソームを解離させることで、停滞したリボソームにより阻害されていたノンストップ mRNA の 3'末端を露出させ、エキソソームによる分解を促進させることが明らかにされている(Kobayashi *et al.*, 2010; Izawa *et al.*, 2012; Tsuboi *et al.*, 2012; van den Elzen *et al.*, 2014)。しかしながら、DOM34 や HBS1 の欠損株においても、mRNA の内部切断は引き起こされていたため、Dom34-Hbs1 は、NGD において mRNA の切断を促進するものの必須ではないことが示されている(Kuroha *et al.*, 2010; Brandman *et al.*, 2012; Tsuboi *et al.*, 2012)。

1-4-2. NGD における Hel2 の機能と切断点の異なる 2 つの NGD

mRNA を 3'から 5'方向に分解する SKI 複合体の構成因子である SKI2 欠損下において 3'RACE を行なった報告によると、大部分の検出された 5'側 mRNA 断片は、翻訳停滞部位の上流にマッピングされたことから、リボソームの停滞位

置近傍における複数のリボソームの蓄積が、効率的な NGD を誘導するために必要であることを示唆している(Simms, Yan and Zaher, 2017)。これらと一致して、リボソームの停滞部位が、開始コドンから 105nt 以上下流でなければ、mRNA 切断は観察されず、さらに、mRNA に低いリボソーム密度をもたらす *rpl1b* 変異株は NGD 効率を有意に低下させることが報告された(Simms, Yan and Zaher, 2017)。以上の報告から、リボソームの停滞を引き起こした mRNA の分子内切断は、高い密度でリボソームが衝突、蓄積した際に誘導されることが明らかになっている。

これまで、NGD の解析は、レアコドンクラスター等を含むレポーター遺伝子を用いて行われてきたが、近年、5' hydroxyl RNA sequencing (5'OH-seq)や ribosome profiling と呼ばれる網羅的解析により、内在性の mRNA 断片が検出されている(Peach, York and Hesselberth, 2015; Guydosh *et al.*, 2017; Ibrahim *et al.*, 2018)。また、酸化損傷を受けた mRNA は塩基対形成に異常をきたし、翻訳伸長不全を起こすことから、酸化された mRNA についても NGD により切断を受けることが報告されている(Simms *et al.*, 2014)。

前述したように、このようなリボソームの異常停滞とそれに起因する衝突は、Hel2 が認識し、ユビキチン化を行う基質として報告されている(Matsuo *et al.*, 2017; Sitron, Park and Brandman, 2017; Ikeuchi *et al.*, 2019)。これと一致して、Hel2 の E3 活性は、NGD の惹起に必要であり、mRNA の安定性にも寄与していた(Sitron, Park and Brandman, 2017; Ikeuchi *et al.*, 2019)。また、K63 型ポリユビキチン鎖を形成できない *ubi-K63R* 変異株においては、RQC と同様に NGD も誘導されないことから、NGD の惹起にも Hel2 による K63 型ポリユビキチン鎖の形成が必須である(Ikeuchi *et al.*, 2019)。これは、NGD が惹起される酸化ストレス時に、リボソームタンパク質や翻訳因子等の K63 型ポリユビキチン化が亢進する報告と一致している(Silva, Finley and Vogel, 2015)。

RQC の惹起において、Hel2 によるリボソームタンパク質 uS10 のユビキチン化が必須であった一方で、NGD においては uS10 のユビキチンが進行しないユビキチン化部位の変異体 *uS10-K6/8R* 株でも mRNA の切断は生じていた。しかしながら、さらなるノーザンブロットや primer extension による解析の結果、野生株における切断点と比較して *uS10-K6/8R* 株における切断点はリボソームの停止位置近傍から上流側 (5'側) にシフトしていることが明らかになっている。さらに、RQC は誘導しないが NGD は誘導する *Hel2-(1-315)* 変異株や、RQC において停滞したリボソームの解離を行う *SLH1* の欠損株においても、切断点の上流側へのシフトが観察されている。以上の結果から、RQC が起こらない条件では NGD による切断点が上流方向にシフトすることが明らかになり、RQC と共役した NGD (以下、NGD-RQC+) と RQC とは共役せず独立した NGD (以下、NGD-RQC-) という切断点の異なる 2 つのタイプの NGD が存在することが報告された (Ikeuchi *et al.*, 2019; Yan and Zaher, 2019)。また、さらなる解析により、RQC-NGD+ では、uS10 の K6/8 残基における K63 型ポリユビキチン鎖の形成が必須である一方で、RQC-NGD- では、リボソームタンパク質 eS7 の K83/84 残基における K63 型ポリユビキチン鎖の形成が必須であることが明らかになっている (Ikeuchi *et al.*, 2019) (図 1-6A,B)。

リボソームタンパク質 eS7 は、リボソーム小サブユニット構成タンパク質であり、出芽酵母からヒトまで広く保存されているが、原核生物にはホモログが存在しない。eS7 は eS7A と eS7B の 2 つのパラログから構成され、eS7-ORF 内の一塩基置換変異でダイヤモンドブラックファン貧血 (DBA) を発症することから、リボソーム病との関連も示唆されている。出芽酵母においては、このうち eS7A が E3 ユビキチンリガーゼである Not4 によりユビキチン化される (Panassenko and Collart, 2012; Preissler *et al.*, 2015; Panassenko *et al.*, 2019; Matsuki *et al.*, 2020)。

In vivo 及び *in vitro* での反応解析により、eS7 のユビキチン化は非常に特有の多段階反応であることが明らかになっている。Not4 は eS7 をモノユビキチン化する活性を持ち、Hel2 は Not4 非存在下では反応できない。しかしながら、Hel2 は Not4 によりモノユビキチン化された eS7 に対して、K63 型ポリユビキチン鎖を形成できる。したがって、NGD-RQC-における eS7 のユビキチン化は、Not4 と Hel2 による多段階反応であることが示唆された。実際に、RQC-NGD+を誘導できないが RQC-NGD-を誘導できる Hel2-(1-315)変異体は、uS10 はユビキチン化できないが eS7 をユビキチン化できる。さらに、uS10 及び eS7 のユビキチン化が起きない出芽酵母変異株においては、著しく mRNA の切断断片量が低下することが示されている。

以上の結果と primer extension の詳細な帰属結果から、RQC と共役した NGD-RQC+では、Hel2 は uS10 を K63 型ポリユビキチン化し、disome 内部での mRNA 切断を誘導する一方で、RQC とは独立した NGD-RQC-においては、Hel2 は Not4 によりモノユビキチン化された eS7 を K63 型ポリユビキチン化し、disome より上流側に衝突したリボソームの間における切断を誘導することが報告されている(Ikeuchi *et al.*, 2019; Yan and Zaher, 2019)。

1-4-3. エンドヌクレアーゼ Cue2

Hel2 による NGD の惹起機構については、このようにして明らかになってきたが、実際に mRNA を切断する酵素については不明なままであった。NGD はリボソームの衝突による物理的作用により切断が生じる、という示唆的な報告もあったが(Simms, Yan and Zaher, 2017)、近年、Rachel Green 研究室から NGD における mRNA エンドヌクレアーゼとして、ユビキチン結合ドメインとヌクレアーゼ活性部位を持つ Cue2 が同定された(D'Orazio *et al.*, 2019)。Cue2 は、N 末端に 2 つの CUE ユビキチン結合ドメインをもち、それとは別にユビキチン結合ドメイ

ンと推測される部位を 2 つ含む。このように、Cue2 は計 4 つのユビキチン結合ドメインに加え、さらに C 末端に SMR ドメインを持つ。SMR ドメインは、バクテリアの RNaseE と構造学的に類似しており、RNA エンドヌクレアーゼ活性を有する可能性が示唆されている(Fukui and Kuramitsu, 2011; Zhou *et al.*, 2017)。

Cue2 の SMR ドメインは、バクテリアの翻訳開始因子 IF3 の C 末端ドメインと高いホモロジーを示しており、IF3 と同様にリボソームの P-もしくは A-site に結合することが推定される。実際に、Cue2 の SMR ドメインは、レアコドンクラスターを含む mRNA の NGD に必須であり、ribosome profiling や *in vitro* 切断アッセイの結果からも衝突したリボソームの A-site 近傍で mRNA を切断することが報告された(D’Orazio *et al.*, 2019)。さらに、内在性のノンストップ mRNA である *RNAI4* mRNA や *YAP1* mRNA 上においても、Cue2 依存の mRNA の切断が検出されており、リボソームの停滞、衝突に起因した mRNA 切断機構である NGD に Cue2 が必須であることが報告されている(D’Orazio *et al.*, 2019)。出芽酵母のみならず、線虫における Cue2 のホモログである NONU-1 は、NGD における mRNA 切断に関与することが報告されている(Glover *et al.*, 2020)一方で、Cue2 の哺乳類細胞におけるホモログは N4BP2 とされているが、現状では活性について報告はない。

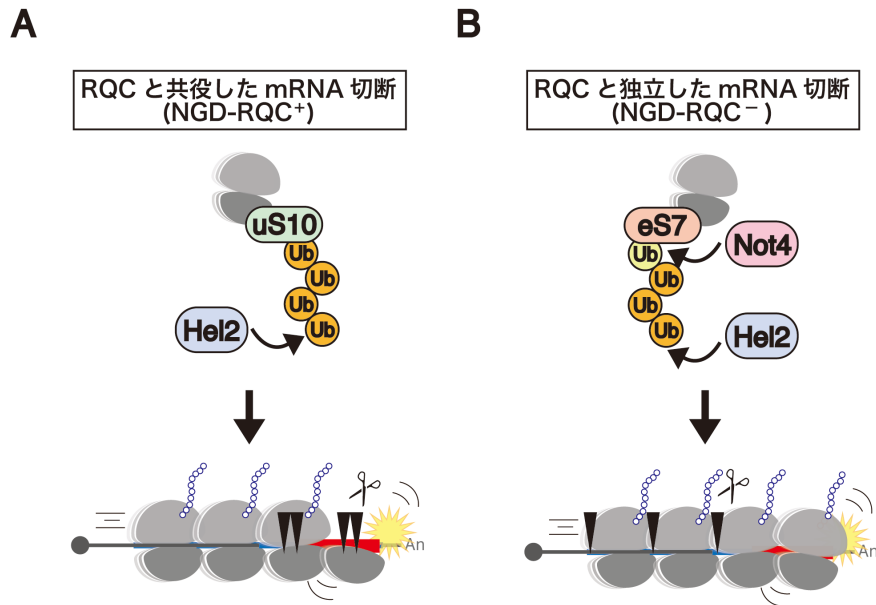


図 1-6. 2種類の NGD。

A) RQC と共役した NGD は、uS10 のユビキチン化に依存し、異常 mRNA は停滞したりポソームの内部で切断される。

B) RQC と独立した NGD は、eS7 のユビキチン化に依存し、異常 mRNA は停滞したりポソームの間で切断される。

1-5 翻訳伸長阻害に起因する品質管理機構

1-5-1. Nonsense-mediated mRNA Decay: NMD

ナンセンス変異は、アミノ酸に対応するコドンが終止コドンに置換してしまう変異である。ナンセンス変異により生じた終止コドンは未成熟終止コドン (Premature Termination Codon: PTC) と呼ばれ、PTC より下流の翻訳が生じなくなると、短鎖型タンパク質が産生されることから、ミスセンス変異と比較してタンパク質の機能や構造にとって影響の大きい変異である。

遺伝性疾患の約70%はナンセンス変異が原因であるとされ(Mendell and Dietz, 2001)、ディシェンヌ型筋ジストロフィーや β サラセミア、色素性乾皮症などが代表例としてあげられる(Atkinson and Martin, 1994)。前述したように、ナンセンス変異による遺伝性疾患は、全長タンパク質には存在していた活性ドメインが翻訳されないことで、短鎖型のタンパク質が活性を失っているか、後述するmRNA品質管理機構のNMDによってmRNAが分解され、タンパク質量が劇的に減少してしまうことが発症の原因とされる。

現在、ナンセンス変異を原因とする遺伝性疾患として、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いたエキソンスキッピングやリードスルー剤投与によるPTCの読み飛ばしが、特定の遺伝性疾患において細胞レベルで効果があることが報告されている(Goyenvalle *et al.*, 2004; Welch *et al.*, 2007)。しかし、リードスルー効率が終止コドンの種類に依存して大きく異なるなど、問題点も存在し実用化には至っていない。

NMD は、酵母からヒトまで真核生物に広く保存される最も代表的な mRNA品質管理機構である。Upf1、Upf2、Upf3 からなる Up-framdshift (Upf)複合体が、ナンセンス変異を持つ mRNA を認識し、急速に分解することで、異常タンパク質の発現を抑制している。

NMD の分子機構モデルとしてスプライシング依存の EJC model とスプライシング非依存の faux-3'UTR model が提言されている。EJC model は、酵母において発見され(Gonzales *et al.*, 2005)、その後哺乳類においても EJC model が提言された(Isken and Maquat, 2007)。mRNA のスプライシング過程において、エキソン-エキソン結合の約 20~30 塩基上流に Y14、MAGOH、barensz を主要構成成分とする EJC が形成される。正常な mRNA の翻訳において、リボソームは最初の翻訳で mRNA 上に形成された EJC を mRNA 上から除去しながら翻訳を進めるが、EJC の結合した exon-exon junction の 50-55nt 以上上流に生じた PTC で翻訳が終結する場合、下流の EJC が除去されずに残存してしまう。この EJC に依存するモデルでは、最終イントロンから 55 塩基以上上流に終止コドンが存在する場合には、翻訳終結時における EJC の残存を異常と認識し、NMD の標的とする。リボソームが終止コドンまで翻訳すると、NMD の制御因子である SMG1(Suppressor of morphogenetic protein kinase)、UPF1(Up-frameshift 1)、翻訳終結因子である eRF1、eRF3 からなる SURF(SMG1-UPF1-Release Factor)複合体がリボソーム上に形成される(Yamashita *et al.*, 2001; Amrani, Sachs and Jacobson, 2006)。リボソーム-SURF 複合体よりも 3'側に EJC が存在する場合、SURF 複合体中の UPF1 が EJC 中の UPF2-UPF3 と結合することで活性型となり、リボソーム-SURF-EJC 複合体からなる DECID (Decay Inducing) 複合体が mRNA 上で形成される。DECID 複合体形成後に、NMD の律速段階である SMG1 による UPF1 のリン酸化が誘導され、このリン酸化は UPF1 の ATPase 活性及びヘリカーゼ活性を活性化する。リン酸化型 UPF1 は、EJC にリクルートされたエンドヌクレアーゼ活性を持つ SMG6 あるいは SMG5-SMG7 と相互作用をすることで mRNA 分解へと導く(Amrani, Sachs and Jacobson, 2006; Kashima *et al.*, 2006)。SMG6 もしくは SMG5-7 は、リン酸化型 UPF1 に結合し、脱リン酸化を促進することで UPF1 のリサイクルを行っている。

一方で、EJC に依存しない Faux-3'UTR model が提唱されている。このモデルでは、正常な翻訳終結と比較して PTC が生じた場合には相対的に 3'UTR が長鎖化することを利用して、終止コドンから 3'末端の poly(A)鎖までの距離の異常を認識し、正常な終止コドンと PTC を区別する(Linde *et al.*, 2007; Hogg and Goff, 2010)。延長した 3'UTR をもつ mRNA は、酵母をはじめとして、ヒト、ショウジョウバエ、植物においても NMD の基質となることが知られている。正常翻訳終結においては、終止コドンを認識したリボソームにリクルートされる翻訳終結因子 eRF3 と、ポリ A 鎖に結合した PABP が相互作用するが、本来の終止コドンよりも上流の ORF 中で異常な翻訳終結が生じると、正常翻訳の場合と比べて 3'UTR が異常に長くなる。出芽酵母では、3'UTR の長鎖化により、リボソームにリクルートされた eRF3 と PABP が相互作用できなくなり、Upf 因子が eRF3 と結合することで PTC を認識し、NMD が起こると考えられている。したがって、Faux 3'UTR model では、終止コドンと PABP との距離の違いを検知し、異常な翻訳終結を引き起こした mRNA を分解へと導いていると考えられている(Muhlrad and Parker, 1999; Amrani *et al.*, 2004)。近年では、3'UTR の長鎖化は、PABP と終結因子の相互作用を阻害するだけではなく、遺伝子発現を抑制する効果を持つ microRNA の 3'UTR への結合効率を高める、という報告もあり、現在も様々な分子機構が提唱されている(Park *et al.*, 2019)。

Upf1 は、システインとヒスチジンに富む CH ドメインを介して E2 ユビキチン結合酵素である Cdc34 と相互作用することが知られている。NMD に必須な Upf1 の自己ユビキチン化には Upf3 との相互作用が必要であることが示されている(Takahashi *et al.*, 2008)。また、Upf1 は CH ドメインを介してリボソームタンパク質 eS26 と直接相互作用し、この相互作用が NMD の惹起にも必須であるが、NMD におけるユビキチン化活性の重要性は明らかになっていない。

1-5-2. Nonsense-mediated Protein Degradation: NMPD

当研究室における出芽酵母を用いた研究により、Upf タンパク質がナンセンス変異を含む異常 mRNA の分解のみならず、異常 mRNA 由来の短鎖型タンパク質の分解にも必須であることが明らかになった(Kuroha, Tatematsu and Inada, 2009)。この短鎖型タンパク質の分解系は、Nonsense-mediated Protein Degradation (NMPD)と呼ばれる。NMPD は、PTC に由来するタンパク質自身の構造異常と 3'UTR の長鎖化に由来する NMD の両方に依存した経路であることが明らかになっており、Upf1 がこの惹起に必須である。また、NMPD の基質となる短鎖型タンパク質特異的に Hsp70 が結合していることが報告されている(Kuroha *et al.*, 2013)。Hsp70 は代表的な分子シャペロンであり、細胞内でタンパク質のフォールディングを補助する機能を持つ。Hsp70 ファミリーは、代表的な熱ショックタンパク質であり、タンパク質のフォールディングや熱ショック応答の制御など、多彩な機能を持つ(Saibil, 2013)。Hsp70 は熱ストレスにより発現が誘導される一方、構造及び機能が非常に酷似した Hsc70 は細胞内で恒常的に発現している。出芽酵母においても代表的な分子シャペロンとして、哺乳類の Hsc70 にあたる Ssa1、Ssa2 や Hsp70 にあたる Ssa3、Ssa4、さらにリボソームに結合する Ribosome-associate complex(RAC)に含まれる Ssb1、Ssb2 などが存在している(Willmund *et al.*, 2013)。Hsp70 は、ATP/ADP と相互作用するヌクレオチド結合部位と、タンパク質と相互作用する基質結合部位の 2 つの主要なドメインが構造的に自由度の高いリンカーで繋がれている。多くのシャペロンは補助因子(コシャペロン)の存在によって正常に機能することが知られている。HSP70 に結合してはたらくコシャペロンとして、HSP40 と NEF(Nucleotide Exchange Factor) が知られている。HSP40 は基質と結合した後、基質を HSP70 へリクルートし、HSP70 の ATPase 活性を促進しタンパク質のフォールディングを補助していると考えられている(Kelley, 1998)。真核生物における NEF の代表的な因子は HSP110 ファ

ミリーであり、ATP と ADP の交換を行うことで HSP70 の活性を制御する (Harrison *et al.*, 1997; Polier *et al.*, 2008; Schuermann *et al.*, 2008)。出芽酵母における HSP110 ファミリーの Sse1 は、HSP70 のヌクレオチド結合部位に直接相互作用することが明らかにされている。当研究室では、Hsp70 及び Hsp110/Sse1 が NMPD の誘導に関与することを明らかにし、ATP 結合型 Hsp110/Sse1 は、Hsp70 や標的とする短鎖型タンパク質と相互作用することで、ペプチドの可溶性を維持し、NMPD を促進することを報告した (Sugiyama *et al.*, 2017)。したがって、分子シャペロンである Hsp70 は、コファクターである Hsp110/Sse1 と協調することで、標的ペプチドをリフォールディングするのみならず、分解をも誘導することが示唆されている (Sugiyama *et al.*, 2017)。HSP70 を標的とした阻害剤として、既に低分子化合物が発見されており、HSP70 阻害剤が抗腫瘍効果を示す報告もされている (Galluzzi, Giordanetto and Kroemer, 2009; Leu *et al.*, 2009)。遺伝病の原因変異の大半を占めるナンセンス変異による疾患の治療に向けて、HSP70 の阻害剤が治療法開発の一助になる可能性がある。

1-5-3. Non Stop Decay: NSD

NSD は、終止コドンに欠失した異常 mRNA の品質管理機構である。終止コドンに欠失した mRNA はノンストップ mRNA と呼ばれ、これを翻訳するリボソームは、mRNA の 3'末端に付加されている poly(A)鎖まで翻訳伸長反応を続けるが、終止コドンが存在しないために翻訳終結反応ができない。さらに、poly(A)鎖が翻訳されると、ポリリジン配列が合成されるために、この新生ペプチド鎖の正電荷とリボソームトンネル内腔の負電荷との静電相互作用のためにリボソームが停滞することが報告されている。一方で、mRNA のプロセシングのエラーによる ORF 途中での poly(A)鎖の異常付加や、mRNA の分子内切断の結果生じる 5'側断片もノンストップ mRNA の一種である。前述した mRNA 品質管理

機構 NGD における mRNA 分子内切断や、siRNA による標的 mRNA の切断などにより生じる 5'側断片もノンストップ mRNA であり、これらの場合には、A-site にコドンが存在しなくなるためにリボソームが異常停止する。これらのノンストップ mRNA は、NSD により迅速に分解される(Frischmeyer *et al.*, 2002; Hoof *et al.*, 2002)。NSD は、酵母からヒトまで広く保存されている一方で、原核生物では後述する特有の経路によって翻訳停止を解消することから、真核生物においては、異常なノンストップ mRNA を迅速に分解することで、下流の異常タンパク質の合成を抑制する品質管理が、進化的に獲得されたと考えられる(Isken and Maquat, 2007)。

原核生物においては、mRNA の 3'末端で異常停止したリボソームに対し、1 分子で tRNA と mRNA の両方の性質を持つキメラ状の tmRNA (Transfer-Messenger RNA)がリクルートされ、tmRNA がコードするタグペプチドの翻訳を続けることで、新生ペプチド鎖の C 末端にタグペプチドが付加される(Keiler, Waller and Sauer, 1996; Himeno *et al.*, 1997)。tmRNA はアンチコドンを持たないため、tmRNA に特異的に結合する SmpB がアンチコドンに相当する役割を担い、tmRNA のアミノアシル化を促進するほか、アミノアシル tRNA に擬態してリボソームの A-site に結合することが知られている(Karzai, Susskind and Sauer, 1999; Hanawa-Suetsugu *et al.*, 2002; Bessho *et al.*, 2007)。このような反応を、トランストランスレーションと呼び(Huang *et al.*, 2000; Kurita *et al.*, 2007; Moore and Sauer, 2007; Himeno, Kurita and Muto, 2014; Huter *et al.*, 2017)、これは mRNA の末端で停滞したリボソームのレスキュー機構として知られている。さらに、ノンストップ mRNA は最終的にその 3'末端から RNaseR によって、新生ペプチド鎖は tmRNA にコードされるタグペプチドの付加によってプロテアーゼによって分解される。また、tmRNA-SmpB 経路のバックアップ機構として、ArfA(Chadani *et al.*, 2010)や YaeJ/ArfB(Chadani *et al.*, 2011; Handa, Inaho and

Nameki, 2011)を介した翻訳停滞の解消機構が報告されているが、tmRNA-SmpB 経路ではリボソームの停滞が解消され、かつ異常 mRNA 及び新生ペプチド鎖が分解を受けるのに対し、ArfA 経路や YaeJ/ArfB 経路では、リボソームの停滞が解消されるのみで、新生ペプチド鎖は分解されない。原核生物ではこのように mRNA の末端でのリボソームの異常停止に対し、3 つの特異的な解消機構を有している(Goralski, Kirimanjeswara and Keiler, 2018; Inada, 2020)。

原核生物における tmRNA-SmpB のように、真核生物においても、ノンストップ mRNA 上に形成された空の A-site を認識することで、停滞したリボソームを解消し異常なノンストップ mRNA の分解を誘導する因子が同定されている。出芽酵母において、mRNA の 3'末端に停滞した 80S リボソームの空の A サイトは、エキソソーム結合因子である Ski7 の C 末端ドメイン (CTD : C terminal domain) により認識されることが報告された(Frischmeyer *et al.*, 2002; Hoof *et al.*, 2002)。Ski7 は、リボソームの A サイトを認識する翻訳伸長因子 1A (eEF1A)や翻訳終結因子(eRF3)に含まれる GTPase ドメインに類似した構造を持つ。eEF1A は、翻訳伸長過程においてリボソームの A-site にセンスコドンが存在している状態を、eRF3 は、翻訳終結過程において A-site に終止コドンが存在している状態を認識し、結合する。また、Ski7 との相互作用が欠損したエキソソーム変異体は、NSD の惹起に欠損を示すことが報告されていることから(Hoof *et al.*, 2002)、Ski7 の C 末端ドメインは、ノンストップ mRNA 上で停滞したリボソーム中の空の A-site を認識し、eEF1A や eRF3 と同様に A-site に結合することで、SKI-エキソソーム複合体をリクルートしノンストップ mRNA の分解を誘導すると考えられていた。

しかしながら、SKI-エキソソーム複合体は、3'末端から 5'末端方向への mRNA 分解を促進するが、mRNA の 3'末端には停滞したリボソームが存在し、ヌクレアーゼのアクセスを阻害していることが考えられる。つまり、ノンストップ

mRNA の迅速な分解を可能にするためには、5'末端からの分解を行うか、停滞したリボソームを解離するか、ノンストップ mRNA を分子内切断することで mRNA の末端を露出させることが必要であると考えられる。先行研究により、NSD は、SKI-エキソソーム複合体による 3'-5'側の分解だけでなく、5'末端に付加されている Cap 構造の除去(デキャッピング)を介した 5'-3'側の分解も同時に行うことにより、mRNA の両末端からの迅速な分解を確立していることが報告されている(Inada and Aiba, 2005)。特に、前述した Ski7 を介した mRNA 分解を阻害した際に、デキャッピングを介した 5'-3'側の分解が強く活性化されており、両方向からの分解活性が、効率的かつ迅速なノンストップ mRNA の除去を可能にしていることが示唆された。

また、先行研究により、Ski7 の C 末端領域が mRNA の 3'末端で停滞したリボソームを認識し解離させる、というモデルが提唱されていたが、一方で、これを支持する結果は報告されていなかった。通常の翻訳終結反応においては、翻訳終結因子である eRF1-eRF3 複合体が終止コドンを認識してリボソームの A-site に結合し、ペプチド鎖解離反応を行うことで翻訳終結が起こる。このため、ノンストップ mRNA の分解過程において、mRNA の末端で停滞したリボソームを解離させる因子群の同定を目的とし、当研究室において、自己切断活性をもつハンマーヘッドリボザイムを用いて細胞内にノンストップ mRNA を効率よく発現させる系が構築され、eRF1-eRF3 複合体と構造相同性を示す Dom34-Hbs1 複合体の NSD における機能解析が行われた。この結果、翻訳終結因子 eRF1 と類似した構造を含む Dom34 と GTPase 活性をもつ Hbs1 の複合体は、GTP をチャージした状態で mRNA の 3'末端で停滞したリボソームにリクルートされ、NSD の惹起に必須であることが明らかになった。その後、Hbs1 による GTP の加水分解に依存して、Hbs1 が Dom34 から脱離することで、Dom34 は空の A-site に結合する。それに伴い、ATP 依存性ヘリカーゼである Rli1/ABCE1 をリボソ-

ムにリクルートし、Rli1により停滞したリボソームは mRNA から解離することが報告された(Inagaki and Ford Doolittle, 2000; Carr-Schmid *et al.*, 2002; Inge-Vechtomov, Zhouravleva and Philippe, 2003; Kong *et al.*, 2004; Doma and Parker, 2006; Jackson, 2007; Lee *et al.*, 2007; Passos *et al.*, 2009; Kobayashi *et al.*, 2010; Becker *et al.*, 2011, 2012; Tsuboi *et al.*, 2012; Matsuda *et al.*, 2014; Preis *et al.*, 2014; Young *et al.*, 2015)。この結果、ノンストップ mRNA の3'末端は露出し、3'末端へのSKI-エキソソーム複合体のアクセスやノンストップ mRNA の迅速な分解が可能になることが明らかになっている(Tsuboi *et al.*, 2012)。この一連の Dom34-Hbs1-Rli1 を介した解離反応は *in vitro* においても再現され、報告されている(Shoemaker, Eyler and Green, 2010; Pisareva *et al.*, 2011; Shoemaker and Green, 2011)。前述した Dom34-Hbs1 複合体によるノンストップ mRNA の分解誘導は、NGDの結果として生じる5'側断片上においても作用しており、mRNA の末端で停滞したリボソームが空の A-site を形成することが、Ski7 の C 末端領域非依存の Dom34-Hbs1 を介したリボソームの異常停滞の解消に必須であることが明らかになった(Tsuboi *et al.*, 2012)。さらに、解離後の新生ペプチド鎖-60S 複合体は、Ltn1 等により認識され、前述した RQC 経路によって新生ペプチド鎖の分解が促進されることも明らかになっており、停滞したリボソームは解離されると同時に、ノンストップ mRNA 及び合成された新生ペプチド鎖はともに迅速に分解を受けることが示されている。

このようにして、Dom34-Hbs1 複合体は、mRNA の末端で停滞したリボソームを解離するために必須である一方で、mRNA の内部切断を促進することも報告されている(Passos *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010b; Kuroha *et al.*, 2010; Tsuboi *et al.*, 2012)。DOM34 欠損株を含め、特に、停滞したリボソームの解離が阻害された条件下では、mRNA 末端で停滞したリボソームの近傍において、停滞位置の上流側におけるノンストップ mRNA の内部切断が促進されることも示されており、

この切断にはリボソームタンパク質 Asc1 が関与することが報告されている (Tsuboi *et al.*, 2012; Ikeuchi and Inada, 2016)。

また、ノンストップ mRNA の産生が発症要因となる疾患も報告されている。ムコ多糖症における *mucopolysaccharidosis II*, ダイヤモンドブラックファン貧血における *RPS19* 遺伝子、無精子症における *GPR54* 遺伝子などにおいて、終止コドン周辺の変異によりノンストップ mRNA が産生されることが報告されており (Chatr-aryamontri *et al.*, 2004; Lualdi *et al.*, 2006)、ノンストップ mRNA の発現制御は生体内で不可欠であることが示唆されている。

このように、Dom34-Hbs1 複合体や Ski7 の C 末端領域を介したリボソームの解離や、リボソームタンパク質 Asc1 が必須である mRNA 内部切断によって、停滞したリボソームにより保護されている mRNA の末端が露出し、SKI-エキソソーム複合体や Xrn1 エキソヌクレアーゼを介した両方向からの mRNA 分解が促進されている。また、ノンストップ mRNA 由来の合成された新生ペプチド鎖は、RQC 経路により分解されることで、細胞は異常翻訳の解除を行なっている。

1-6 参考文献

- Alexieva, Z. *et al.* (1988) ‘Chloramphenicol induction of cat-86 requires ribosome stalling at a specific site in the leader’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(9), pp. 3057–3061. doi: 10.1073/pnas.85.9.3057.
- Amrani, N. *et al.* (2004) ‘A faux 3'-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-mediated mRNA decay’, *Nature*, 432(7013), pp. 112–118. doi: 10.1038/nature03060.
- Amrani, N., Sachs, M. S. and Jacobson, A. (2006) ‘Early nonsense: mRNA decay solves a translational problem’, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(6), pp. 415–425. doi: 10.1038/nrm1942.
- Atkinson, J. and Martin, R. (1994) ‘Mutations to nonsense codons in human genetic disease: implications for gene therapy by nonsense suppressor tRNAs’, *Nucleic Acids Research*, 22(8), pp. 1327–1334. doi: 10.1093/nar/22.8.1327.
- Becker, T. *et al.* (2011) ‘Structure of the no-go mRNA decay complex Dom34-Hbs1 bound to a stalled 80S ribosome’, *Nature Structural & Molecular Biology*, 18(6), pp. 715–720. doi: 10.1038/nsmb.2057.
- Becker, T. *et al.* (2012) ‘Structural basis of highly conserved ribosome recycling in eukaryotes and archaea’, *Nature*, 482(7386), pp. 501–506. doi: 10.1038/nature10829.
- Bessho, Y. *et al.* (2007) ‘Structural basis for functional mimicry of long-variable-arm tRNA by transfer-messenger RNA’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(20), pp. 8293–8298. doi: 10.1073/pnas.0700402104.
- Bhushan, S. *et al.* (2011) ‘SecM-Stalled Ribosomes Adopt an Altered Geometry at the Peptidyl Transferase Center’, *PLOS Biology*, 9(1), p. e1000581. doi: 10.1371/journal.pbio.1000581.
- Brandman, O. *et al.* (2012) ‘A Ribosome-Bound Quality Control Complex Triggers

- Degradation of Nascent Peptides and Signals Translation Stress', *Cell*, 151(5), pp. 1042–1054. doi: 10.1016/j.cell.2012.10.044.
- Brandman, O. and Hegde, R. S. (2016) 'Ribosome-associated protein quality control', *Nature Structural & Molecular Biology*, 23(1), pp. 7–15. doi: 10.1038/nsmb.3147.
- Bresson, S. and Tollervey, D. (2018) 'Tailing Off: PABP and CNOT Generate Cycles of mRNA Deadenylation', *Molecular Cell*, 70(6), pp. 987–988. doi: 10.1016/j.molcel.2018.06.009.
- Carr-Schmid, A. *et al.* (2002) 'Novel G-Protein Complex Whose Requirement Is Linked to the Translational Status of the Cell', *Molecular and Cellular Biology*, 22(8), pp. 2564–2574. doi: 10.1128/MCB.22.8.2564-2574.2002.
- Chadani, Y. *et al.* (2010) 'Ribosome rescue by Escherichia coli ArfA (YhdL) in the absence of trans-translation system', *Molecular Microbiology*, 78(4), pp. 796–808. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07375.x.
- Chadani, Y. *et al.* (2011) 'Escherichia coli YaeJ protein mediates a novel ribosome-rescue pathway distinct from SsrA- and ArfA-mediated pathways', *Molecular Microbiology*, 80(3), pp. 772–785. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07607.x.
- Chadani, Y. *et al.* (2016) 'Integrated in vivo and in vitro nascent chain profiling reveals widespread translational pausing', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(7), pp. E829–E838. doi: 10.1073/pnas.1520560113.
- Chandrasekaran, V. *et al.* (2019) 'Mechanism of ribosome stalling during translation of a poly(A) tail', *Nature Structural & Molecular Biology*, 26(12), pp. 1132–1140. doi: 10.1038/s41594-019-0331-x.
- Chang, J. H. *et al.* (2012) 'Dxo1 is a new type of eukaryotic enzyme with both decapping and 5'-3' exoribonuclease activity', *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(10), pp. 1011–1017. doi: 10.1038/nsmb.2381.

- Chatr-aryamontri, A. *et al.* (2004) ‘Nonsense-mediated and nonstop decay of ribosomal protein S19 mRNA in Diamond-Blackfan anemia’, *Human Mutation*, 24(6), pp. 526–533. doi: 10.1002/humu.20117.
- Chen, L. *et al.* (2010a) ‘Structure of the Dom34–Hbs1 complex and implications for no-go decay’, *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(10), pp. 1233–1240. doi: 10.1038/nsmb.1922.
- Chen, L. *et al.* (2010b) ‘Structure of the Dom34–Hbs1 complex and implications for no-go decay’, *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(10), pp. 1233–1240. doi: 10.1038/nsmb.1922.
- Chiba S. (2018) ‘調節性翻訳アレストペプチドによる細胞機能の制御’, *Journal of Japanese Biochemical Society*, 90(2), pp. 147–157. doi: 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900147.
- Chiba, S. and Ito, K. (2015) ‘MifM Monitors Total YidC Activities of *Bacillus subtilis*, Including That of YidC2, the Target of Regulation’, *Journal of Bacteriology*, 197(1), pp. 99–107. doi: 10.1128/JB.02074-14.
- Chiba, S., Lamsa, A. and Pogliano, K. (2009) ‘A ribosome–nascent chain sensor of membrane protein biogenesis in *Bacillus subtilis*’, *The EMBO Journal*, 28(22), pp. 3461–3475. doi: 10.1038/emboj.2009.280.
- Chu, J. *et al.* (2009) ‘A mouse forward genetics screen identifies LISTERIN as an E3 ubiquitin ligase involved in neurodegeneration’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(7), pp. 2097–2103. doi: 10.1073/pnas.0812819106.
- Collart, M. A. (2003) ‘Global control of gene expression in yeast by the Ccr4–Not complex’, *Gene*, 313, pp. 1–16. doi: 10.1016/S0378-1119(03)00672-3.
- Collart, M. A. (2016) ‘The Ccr4–Not complex is a key regulator of eukaryotic gene expression’, *WIREs RNA*, 7(4), pp. 438–454. doi: 10.1002/wrna.1332.

Collart, M. A. and Panasenko, O. O. (2012) ‘The Ccr4–Not complex’, *Gene*, 492(1), pp. 42–53. doi: 10.1016/j.gene.2011.09.033.

Collart, M. A. and Timmers, H. Th. M. (2004) ‘The Eukaryotic Ccr4-Not Complex: A Regulatory Platform Integrating mRNA Metabolism with Cellular Signaling Pathways?’, in *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. Academic Press, pp. 289–322. doi: 10.1016/S0079-6603(04)77008-7.

Coyle, S. M., Gilbert, W. V. and Doudna, J. A. (2009) ‘Direct Link between RACK1 Function and Localization at the Ribosome In Vivo’, *Molecular and Cellular Biology*, 29(6), pp. 1626–1634. doi: 10.1128/MCB.01718-08.

Crowe-McAuliffe, C. *et al.* (2020) ‘Structural basis for bacterial ribosome quality control’, *bioRxiv*, p. 2020.09.03.281279. doi: 10.1101/2020.09.03.281279.

Defenouillère, Q. *et al.* (2013) ‘Cdc48-associated complex bound to 60S particles is required for the clearance of aberrant translation products’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(13), pp. 5046–5051. doi: 10.1073/pnas.1221724110.

Defenouillère, Q. *et al.* (2017) ‘The ribosome-bound quality control complex remains associated to aberrant peptides during their proteasomal targeting and interacts with Tom1 to limit protein aggregation’, *Molecular Biology of the Cell*, 28(9), pp. 1165–1176. doi: 10.1091/mbc.e16-10-0746.

Denis, C. L. and Chen, J. (2003) ‘The CCR4–NOT Complex Plays Diverse Roles in mRNA Metabolism’, in *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. Academic Press, pp. 221–250. doi: 10.1016/S0079-6603(03)01007-9.

Dimitrova, L. N. *et al.* (2009) ‘Nascent Peptide-dependent Translation Arrest Leads to Not4p-mediated Protein Degradation by the Proteasome’, *Journal of Biological Chemistry*, 284(16), pp. 10343–10352. doi: 10.1074/jbc.M808840200.

Doamekpor, S. K. *et al.* (2020) ‘A novel 5'-hydroxyl dinucleotide hydrolase activity for

the DXO/Rai1 family of enzymes', *Nucleic Acids Research*, 48(1), pp. 349–358. doi: 10.1093/nar/gkz1107.

Doma, M. K. and Parker, R. (2006) 'Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation', *Nature*, 440(7083), pp. 561–564. doi: 10.1038/nature04530.

D'Orazio, K. N. *et al.* (2019) 'The endonuclease Cue2 cleaves mRNAs at stalled ribosomes during No Go Decay', *eLife*. Edited by N. Sonenberg and J. L. Manley, 8, p. e49117. doi: 10.7554/eLife.49117.

van den Elzen, A. M. G. *et al.* (2014) 'Dom34-Hbs1 mediated dissociation of inactive 80S ribosomes promotes restart of translation after stress', *The EMBO Journal*, 33(3), pp. 265–276. doi: 10.1002/emj.201386123.

Filbeck, S. *et al.* (2021) 'Mimicry of Canonical Translation Elongation Underlies Alanine Tail Synthesis in RQC', *Molecular Cell*, 81(1), pp. 104-114.e6. doi: 10.1016/j.molcel.2020.11.001.

Frischmeyer, P. A. *et al.* (2002) 'An mRNA Surveillance Mechanism That Eliminates Transcripts Lacking Termination Codons', *Science*, 295(5563), pp. 2258–2261. doi: 10.1126/science.1067338.

Fukui, K. and Kuramitsu, S. (2011) *Structure and Function of the Small MutS-Related Domain*, *Molecular Biology International*. Hindawi. doi: <https://doi.org/10.4061/2011/691735>.

Funakoshi, Y. *et al.* (2007) 'Mechanism of mRNA deadenylation: evidence for a molecular interplay between translation termination factor eRF3 and mRNA deadenylases', *Genes & Development*, 21(23), pp. 3135–3148. doi: 10.1101/gad.1597707.

Gaba, A., Jacobson, A. and S. Sachs, M. (2005) 'Ribosome Occupancy of the Yeast

CPA1 Upstream Open Reading Frame Termination Codon Modulates

Nonsense-Mediated mRNA Decay', *Molecular Cell*, 20(3), pp. 449–460. doi:

10.1016/j.molcel.2005.09.019.

Galluzzi, L., Giordanetto, F. and Kroemer, G. (2009) 'Targeting HSP70 for Cancer Therapy', *Molecular Cell*, 36(2), pp. 176–177. doi: 10.1016/j.molcel.2009.10.003.

Gamble, C. E. *et al.* (2016) 'Adjacent Codons Act in Concert to Modulate Translation Efficiency in Yeast', *Cell*, 166(3), pp. 679–690. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.070.

Glover, M. L. *et al.* (2020) 'NONU-1 Encodes a Conserved Endonuclease Required for mRNA Translation Surveillance', *Cell Reports*, 30(13), pp. 4321–4331.e4. doi:

10.1016/j.celrep.2020.03.023.

Goldstrohm, A. C. and Wickens, M. (2008) 'Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(4), pp. 337–344.

doi: 10.1038/nrm2370.

Gong, F. *et al.* (2001) 'The mechanism of tryptophan induction of tryptophanase operon expression: Tryptophan inhibits release factor-mediated cleavage of

TnaC-peptidyl-tRNA^{Pro}', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(16), pp. 8997–9001. doi: 10.1073/pnas.171299298.

Gonzales, B. *et al.* (2005) 'The Treacher Collins syndrome (TCOF1) gene product is involved in pre-rRNA methylation', *Human Molecular Genetics*, 14(14), pp. 2035–

2043. doi: 10.1093/hmg/ddi208.

Goralski, T. D. P., Kirimanjeswara, G. S. and Keiler, K. C. (2018) 'A New Mechanism for Ribosome Rescue Can Recruit RF1 or RF2 to Nonstop Ribosomes', *mBio*, 9(6). doi:

10.1128/mBio.02436-18.

Goyenvalle, A. *et al.* (2004) 'Rescue of Dystrophic Muscle Through U7

snRNA-Mediated Exon Skipping', *Science*, 306(5702), pp. 1796–1799. doi:

10.1126/science.1104297.

Gu, Z. *et al.* (1994) ‘Anti-peptidyl transferase leader peptides of attenuation-regulated chloramphenicol-resistance genes’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(12), pp. 5612–5616. doi: 10.1073/pnas.91.12.5612.

Guydosh, N. R. *et al.* (2017) ‘Regulated Ire1-dependent mRNA decay requires no-go mRNA degradation to maintain endoplasmic reticulum homeostasis in *S. pombe*’, *eLife*. Edited by N. Sonenberg, 6, p. e29216. doi: 10.7554/eLife.29216.

Guydosh, N. R. and Green, R. (2014) ‘Dom34 Rescues Ribosomes in 3’ Untranslated Regions’, *Cell*, 156(5), pp. 950–962. doi: 10.1016/j.cell.2014.02.006.

Halbach, F. *et al.* (2013) ‘The Yeast Ski Complex: Crystal Structure and RNA Channeling to the Exosome Complex’, *Cell*, 154(4), pp. 814–826. doi: 10.1016/j.cell.2013.07.017.

Han, P. *et al.* (2020) ‘Genome-wide Survey of Ribosome Collision’, *Cell Reports*, 31(5), p. 107610. doi: 10.1016/j.celrep.2020.107610.

Hanawa-Suetsugu, K. *et al.* (2002) ‘SmpB functions in various steps of trans-translation’, *Nucleic Acids Research*, 30(7), pp. 1620–1629. doi: 10.1093/nar/30.7.1620.

Handa, Y., Inaho, N. and Nameki, N. (2011) ‘YaeJ is a novel ribosome-associated protein in *Escherichia coli* that can hydrolyze peptidyl-tRNA on stalled ribosomes’, *Nucleic Acids Research*, 39(5), pp. 1739–1748. doi: 10.1093/nar/gkq1097.

Haraguchi, Y. *et al.* (2008) ‘Ribosome Stacking Defines CGS1 mRNA Degradation Sites During Nascent Peptide-Mediated Translation Arrest’, *Plant and Cell Physiology*, 49(3), pp. 314–323. doi: 10.1093/pcp/pcn005.

Harrison, C. J. *et al.* (1997) ‘Crystal Structure of the Nucleotide Exchange Factor GrpE Bound to the ATPase Domain of the Molecular Chaperone DnaK’, *Science*, 276(5311),

pp. 431–435. doi: 10.1126/science.276.5311.431.

Himeno, H. *et al.* (1997) ‘In vitro Trans Translation mediated by alanine-charged 10sa RNA11 Edited by D.E. Draper’, *Journal of Molecular Biology*, 268(5), pp. 803–808. doi: 10.1006/jmbi.1997.1011.

Himeno, H., Kurita, D. and Muto, A. (2014) ‘Mechanism of trans-translation revealed by in vitro studies’, *Frontiers in Microbiology*, 5. doi: 10.3389/fmicb.2014.00065.

Hogg, J. R. and Goff, S. P. (2010) ‘Upf1 Senses 3’UTR Length to Potentiate mRNA Decay’, *Cell*, 143(3), pp. 379–389. doi: 10.1016/j.cell.2010.10.005.

Hoof, A. van *et al.* (2002) ‘Exosome-Mediated Recognition and Degradation of mRNAs Lacking a Termination Codon’, *Science*, 295(5563), pp. 2262–2264. doi: 10.1126/science.1067272.

Houseley, J., LaCava, J. and Tollervey, D. (2006) ‘RNA-quality control by the exosome’, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(7), pp. 529–539. doi: 10.1038/nrm1964.

Huang, C. *et al.* (2000) ‘Charged tmRNA but not tmRNA-mediated proteolysis is essential for *Neisseria gonorrhoeae* viability’, *The EMBO Journal*, 19(5), pp. 1098–1107. doi: 10.1093/emboj/19.5.1098.

Huter, P. *et al.* (2017) ‘Structural Basis for Ribosome Rescue in Bacteria’, *Trends in Biochemical Sciences*, 42(8), pp. 669–680. doi: 10.1016/j.tibs.2017.05.009.

Ibrahim, F. *et al.* (2018) ‘Ribothrypsis, a novel process of canonical mRNA decay, mediates ribosome-phased mRNA endonucleolysis’, *Nature Structural & Molecular Biology*, 25(4), pp. 302–310. doi: 10.1038/s41594-018-0042-8.

Ikeuchi, K. *et al.* (2019) ‘Collided ribosomes form a unique structural interface to induce Hel2-driven quality control pathways’, *The EMBO Journal*, 38(5), p. e100276. doi: 10.15252/emj.2018100276.

- Ikeuchi, K. and Inada, T. (2016) 'Ribosome-associated Asc1/RACK1 is required for endonucleolytic cleavage induced by stalled ribosome at the 3' end of nonstop mRNA', *Scientific Reports*, 6(1), p. 28234. doi: 10.1038/srep28234.
- Ikeuchi, K., Izawa, T. and Inada, T. (2019) 'Recent Progress on the Molecular Mechanism of Quality Controls Induced by Ribosome Stalling', *Frontiers in Genetics*, 9. doi: 10.3389/fgene.2018.00743.
- Inada, T. (2020) 'Quality controls induced by aberrant translation', *Nucleic Acids Research*, 48(3), pp. 1084–1096. doi: 10.1093/nar/gkz1201.
- Inada, T. and Aiba, H. (2005) 'Translation of aberrant mRNAs lacking a termination codon or with a shortened 3'-UTR is repressed after initiation in yeast', *The EMBO Journal*, 24(8), pp. 1584–1595. doi: 10.1038/sj.emboj.7600636.
- Inagaki, Y. and Ford Doolittle, W. (2000) 'Evolution of the Eukaryotic Translation Termination System: Origins of Release Factors', *Molecular Biology and Evolution*, 17(6), pp. 882–889. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026368.
- Inge-Vechtomov, S., Zhouravleva, G. and Philippe, M. (2003) 'Eukaryotic release factors (eRFs) history', *Biology of the Cell*, 95(3–4), pp. 195–209. doi: 10.1016/S0248-4900(03)00035-2.
- Ishii, E. *et al.* (2015) 'Nascent chain-monitored remodeling of the Sec machinery for salinity adaptation of marine bacteria', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(40), pp. E5513–E5522. doi: 10.1073/pnas.1513001112.
- Ishimura, R. *et al.* (2014) 'Ribosome stalling induced by mutation of a CNS-specific tRNA causes neurodegeneration', *Science*, 345(6195), pp. 455–459. doi: 10.1126/science.1249749.
- Isken, O. and Maquat, L. E. (2007) 'Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function', *Genes & Development*, 21(15), pp. 1833–3856.

doi: 10.1101/gad.1566807.

Ito, K. and Chiba, S. (2013) ‘Arrest Peptides: Cis-Acting Modulators of Translation’, *Annual Review of Biochemistry*, 82(1), pp. 171–202. doi: 10.1146/annurev-biochem-080211-105026.

Ito, K., Chiba, S. and Pogliano, K. (2010) ‘Divergent stalling sequences sense and control cellular physiology’, *Biochemical and biophysical research communications*, 393(1), pp. 1–5. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.01.073.

Ito-Harashima, S. *et al.* (2007) ‘Translation of the poly(A) tail plays crucial roles in nonstop mRNA surveillance via translation repression and protein destabilization by proteasome in yeast’, *Genes & Development*, 21(5), pp. 519–524. doi: 10.1101/gad.1490207.

Izawa, T. *et al.* (2012) ‘Roles of Dom34:Hbs1 in Nonstop Protein Clearance from Translocators for Normal Organelle Protein Influx’, *Cell Reports*, 2(3), pp. 447–453. doi: 10.1016/j.celrep.2012.08.010.

Jackson, R. J. (2007) ‘The Missing Link in the Eukaryotic Ribosome Cycle’, *Molecular Cell*, 28(3), pp. 356–358. doi: 10.1016/j.molcel.2007.10.014.

Karzai, A. W., Susskind, M. M. and Sauer, R. T. (1999) ‘SmpB, a unique RNA-binding protein essential for the peptide-tagging activity of SsrA (tmRNA)’, *The EMBO Journal*, 18(13), pp. 3793–3799. doi: 10.1093/emboj/18.13.3793.

Kashima, I. *et al.* (2006) ‘Binding of a novel SMG-1–Upf1–eRF1–eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay’, *Genes & Development*, 20(3), pp. 355–367. doi: 10.1101/gad.1389006.

Keiler, K. C., Waller, P. R. H. and Sauer, R. T. (1996) ‘Role of a Peptide Tagging System in Degradation of Proteins Synthesized from Damaged Messenger RNA’,

- Science*, 271(5251), pp. 990–993. doi: 10.1126/science.271.5251.990.
- Kelley, W. L. (1998) ‘The J-domain family and the recruitment of chaperone power’, *Trends in Biochemical Sciences*, 23(6), pp. 222–227. doi: 10.1016/S0968-0004(98)01215-8.
- Kobayashi, K. *et al.* (2010) ‘Structural basis for mRNA surveillance by archaeal Pelota and GTP-bound EF1 α complex’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(41), pp. 17575–17579. doi: 10.1073/pnas.1009598107.
- Kong, C. *et al.* (2004) ‘Crystal Structure and Functional Analysis of the Eukaryotic Class II Release Factor eRF3 from *S. pombe*’, *Molecular Cell*, 14(2), pp. 233–245. doi: 10.1016/S1097-2765(04)00206-0.
- Kostova, K. K. *et al.* (2017) ‘CAT-tailing as a fail-safe mechanism for efficient degradation of stalled nascent polypeptides’, *Science (New York, N.Y.)*, 357(6349), pp. 414–417. doi: 10.1126/science.aam7787.
- Kuhn, A., Koch, H.-G. and Dalbey, R. E. (2017) ‘Targeting and Insertion of Membrane Proteins’, *EcoSal Plus*, 7(2). doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0012-2016.
- Kurita, D. *et al.* (2007) ‘Interaction of SmpB with ribosome from directed hydroxyl radical probing’, *Nucleic Acids Research*, 35(21), pp. 7248–7255. doi: 10.1093/nar/gkm677.
- Kuroha, K. *et al.* (2010) ‘Receptor for activated C kinase 1 stimulates nascent polypeptide-dependent translation arrest’, *EMBO reports*, 11(12), pp. 956–961. doi: 10.1038/embor.2010.169.
- Kuroha, K. *et al.* (2013) ‘The Upf Factor Complex Interacts with Aberrant Products Derived from mRNAs Containing a Premature Termination Codon and Facilitates Their Proteasomal Degradation’, *Journal of Biological Chemistry*, 288(40), pp. 28630–28640. doi: 10.1074/jbc.M113.460691.

- Kuroha, K. *et al.* (2018) ‘Release of Ubiquitinated and Non-ubiquitinated Nascent Chains from Stalled Mammalian Ribosomal Complexes by ANKZF1 and Ptrh1’, *Molecular Cell*, 72(2), pp. 286-302.e8. doi: 10.1016/j.molcel.2018.08.022.
- Kuroha, K., Tatematsu, T. and Inada, T. (2009) ‘Upf1 stimulates degradation of the product derived from aberrant messenger RNA containing a specific nonsense mutation by the proteasome’, *EMBO reports*, 10(11), pp. 1265–1271. doi: 10.1038/embor.2009.200.
- Łabno, A., Tomecki, R. and Dziembowski, A. (2016) ‘Cytoplasmic RNA decay pathways - Enzymes and mechanisms’, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(12), pp. 3125–3147. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.09.023.
- LaRiviere, F. J. *et al.* (2006) ‘A Late-Acting Quality Control Process for Mature Eukaryotic rRNAs’, *Molecular Cell*, 24(4), pp. 619–626. doi: 10.1016/j.molcel.2006.10.008.
- Lee, H. H. *et al.* (2007) ‘Structural and Functional Insights into Dom34, a Key Component of No-Go mRNA Decay’, *Molecular Cell*, 27(6), pp. 938–950. doi: 10.1016/j.molcel.2007.07.019.
- Letzring, D. P. *et al.* (2013) ‘Translation of CGA codon repeats in yeast involves quality control components and ribosomal protein L1’, *RNA*, 19(9), pp. 1208–1217. doi: 10.1261/rna.039446.113.
- Leu, J. I.-J. *et al.* (2009) ‘A Small Molecule Inhibitor of Inducible Heat Shock Protein 70’, *Molecular Cell*, 36(1), pp. 15–27. doi: 10.1016/j.molcel.2009.09.023.
- Linde, L. *et al.* (2007) ‘Nonsense-mediated mRNA decay affects nonsense transcript levels and governs response of cystic fibrosis patients to gentamicin’, *The Journal of Clinical Investigation*, 117(3), pp. 683–692. doi: 10.1172/JCI28523.

- Lintner, N. G. *et al.* (2017) 'Selective stalling of human translation through small-molecule engagement of the ribosome nascent chain', *PLOS Biology*, 15(3), p. e2001882. doi: 10.1371/journal.pbio.2001882.
- Liu, B., Han, Y. and Qian, S.-B. (2013) 'Cotranslational Response to Proteotoxic Stress by Elongation Pausing of Ribosomes', *Molecular Cell*, 49(3), pp. 453–463. doi: 10.1016/j.molcel.2012.12.001.
- Lu, J. and Deutsch, C. (2008) 'Electrostatics in the Ribosomal Tunnel Modulate Chain Elongation Rates', *Journal of molecular biology*, 384(1), pp. 73–86. doi: 10.1016/j.jmb.2008.08.089.
- Lu, J., R.Kobertz, W. and Deutsch, C. (2007) 'Mapping the Electrostatic Potential within the Ribosomal Exit Tunnel', *Journal of Molecular Biology*, 371(5), pp. 1378–1391. doi: 10.1016/j.jmb.2007.06.038.
- Lualdi, S. *et al.* (2006) 'Identification of nine new IDS alleles in mucopolysaccharidosis II. Quantitative evaluation by real-time RT-PCR of mRNAs sensitive to nonsense-mediated and nonstop decay mechanisms', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1762(4), pp. 478–484. doi: 10.1016/j.bbadis.2006.01.003.
- Lytvynenko, I. *et al.* (2019) 'Alanine Tails Signal Proteolysis in Bacterial Ribosome-Associated Quality Control', *Cell*, 178(1), pp. 76-90.e22. doi: 10.1016/j.cell.2019.05.002.
- Lyumkis, D. *et al.* (2014) 'Structural basis for translational surveillance by the large ribosomal subunit-associated protein quality control complex', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(45), pp. 15981–15986. doi: 10.1073/pnas.1413882111.
- Matsuda, R. *et al.* (2014) 'Protein quality control systems associated with no-go and

- nonstop mRNA surveillance in yeast', *Genes to Cells*, 19(1), pp. 1–12. doi: 10.1111/gtc.12106.
- Matsuki, Y. *et al.* (2020) 'Ribosomal protein S7 ubiquitination during ER stress in yeast is associated with selective mRNA translation and stress outcome', *bioRxiv*, p. 2020.09.24.311365. doi: 10.1101/2020.09.24.311365.
- Matsuo, Y. *et al.* (2017) 'Ubiquitination of stalled ribosome triggers ribosome-associated quality control', *Nature Communications*, 8(1), p. 159. doi: 10.1038/s41467-017-00188-1.
- Matsuo, Y. *et al.* (2020) 'RQT complex dissociates ribosomes collided on endogenous RQC substrate SDD1', *Nature Structural & Molecular Biology*, 27(4), pp. 323–332. doi: 10.1038/s41594-020-0393-9.
- Mendell, J. T. and Dietz, H. C. (2001) 'When the Message Goes Awry: Disease-Producing Mutations that Influence mRNA Content and Performance', *Cell*, 107(4), pp. 411–414. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00583-9.
- Miller, J. E. and Reese, J. C. (2012) 'Ccr4-Not complex: the control freak of eukaryotic cells', *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 47(4), pp. 315–333. doi: 10.3109/10409238.2012.667214.
- Moore, S. D. and Sauer, R. T. (2007) 'The tmRNA System for Translational Surveillance and Ribosome Rescue', *Annual Review of Biochemistry*, 76(1), pp. 101–124. doi: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142733.
- Mordret, E. *et al.* (2019) 'Systematic Detection of Amino Acid Substitutions in Proteomes Reveals Mechanistic Basis of Ribosome Errors and Selection for Translation Fidelity', *Molecular Cell*, 75(3), pp. 427–441.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2019.06.041.
- Muhlrad, D. and Parker, R. (1999) 'Recognition of Yeast mRNAs as "Nonsense Containing" Leads to Both Inhibition of mRNA Translation and mRNA Degradation:

- Implications for the Control of mRNA Decapping', *Molecular Biology of the Cell*, 10(11), pp. 3971–3978. doi: 10.1091/mbc.10.11.3971.
- Nakatogawa, H. and Ito, K. (2001) 'Secretion Monitor, SecM, Undergoes Self-Translation Arrest in the Cytosol', *Molecular Cell*, 7(1), pp. 185–192. doi: 10.1016/S1097-2765(01)00166-6.
- Nakatogawa, H. and Ito, K. (2002) 'The Ribosomal Exit Tunnel Functions as a Discriminating Gate', *Cell*, 108(5), pp. 629–636. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00649-9.
- Navickas, A. *et al.* (2020) 'No-Go Decay mRNA cleavage in the ribosome exit tunnel produces 5'-OH ends phosphorylated by Trl1', *Nature Communications*, 11(1), p. 122. doi: 10.1038/s41467-019-13991-9.
- Nilsson, J. *et al.* (2004) 'Regulation of eukaryotic translation by the RACK1 protein: a platform for signalling molecules on the ribosome', *EMBO reports*, 5(12), pp. 1137–1141. doi: 10.1038/sj.embor.7400291.
- Nora, V.-L., Celine, T. and Alexander, S. M. (2008) 'Molecular Mechanism of Drug-Dependent Ribosome Stalling', *Molecular Cell*, 30(2), pp. 190–202. doi: 10.1016/j.molcel.2008.02.026.
- Norbury, C. J. (2013) 'Cytoplasmic RNA: a case of the tail wagging the dog', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(10), pp. 643–653. doi: 10.1038/nrm3645.
- Osuna, B. A. *et al.* (2017) 'In vitro analysis of RQC activities provides insights into the mechanism and function of CAT tailing', *eLife*. Edited by A. G. Hinnebusch, 6, p. e27949. doi: 10.7554/eLife.27949.
- Panasenko, O. O. *et al.* (2019) 'Co-translational assembly of proteasome subunits in NOT1-containing assembliesomes', *Nature Structural & Molecular Biology*, 26(2), pp. 110–120. doi: 10.1038/s41594-018-0179-5.
- Panasenko, O. O. and Collart, M. A. (2012) 'Presence of Not5 and ubiquitinated Rps7A

- in polysome fractions depends upon the Not4 E3 ligase', *Molecular Microbiology*, 83(3), pp. 640–653. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07957.x.
- Park, E. and Rapoport, T. A. (2012) 'Mechanisms of Sec61/SecY-Mediated Protein Translocation Across Membranes', *Annual Review of Biophysics*, 41(1), pp. 21–40. doi: 10.1146/annurev-biophys-050511-102312.
- Park, J. *et al.* (2019) 'UPF1/SMG7-dependent microRNA-mediated gene regulation', *Nature Communications*, 10(1), p. 4181. doi: 10.1038/s41467-019-12123-7.
- Passos, D. O. *et al.* (2009) 'Analysis of Dom34 and its function in No-Go decay', *Molecular biology of the cell*, 20(13), pp. 3025–3032. doi: 10.1091/mbc.E09-01-0028.
- Peach, S. E., York, K. and Hesselberth, J. R. (2015) 'Global analysis of RNA cleavage by 5'-hydroxyl RNA sequencing', *Nucleic Acids Research*, 43(17), pp. e108–e108. doi: 10.1093/nar/gkv536.
- Pisareva, V. P. *et al.* (2011) 'Dissociation by Pelota, Hbs1 and ABCE1 of mammalian vacant 80S ribosomes and stalled elongation complexes', *The EMBO Journal*, 30(9), pp. 1804–1817. doi: 10.1038/emboj.2011.93.
- Polier, S. *et al.* (2008) 'Structural Basis for the Cooperation of Hsp70 and Hsp110 Chaperones in Protein Folding', *Cell*, 133(6), pp. 1068–1079. doi: 10.1016/j.cell.2008.05.022.
- Preis, A. *et al.* (2014) 'Cryo-electron Microscopic Structures of Eukaryotic Translation Termination Complexes Containing eRF1-eRF3 or eRF1-ABCE1', *Cell Reports*, 8(1), pp. 59–65. doi: 10.1016/j.celrep.2014.04.058.
- Preissler, S. *et al.* (2015) 'Not4-dependent translational repression is important for cellular protein homeostasis in yeast', *The EMBO Journal*, 34(14), pp. 1905–1924. doi: 10.15252/embj.201490194.
- Ramu, H., Mankin, A. and Vazquez-Laslop, N. (2009) 'Programmed drug-dependent

- ribosome stalling', *Molecular Microbiology*, 71(4), pp. 811–824. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06576.x.
- Rogers, E. J. *et al.* (1990) 'Four codons in the cat-86 leader define a chloramphenicol-sensitive ribosome stall sequence.', *Journal of Bacteriology*, 172(1), pp. 110–115. doi: 10.1128/jb.172.1.110-115.1990.
- Rubio, A., Jiang, X. and Pogliano, K. (2005) 'Localization of Translocation Complex Components in *Bacillus subtilis*: Enrichment of the Signal Recognition Particle Receptor at Early Sporulation Septa', *Journal of Bacteriology*, 187(14), pp. 5000–5002. doi: 10.1128/JB.187.14.5000-5002.2005.
- Saibil, H. (2013) 'Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(10), pp. 630–642. doi: 10.1038/nrm3658.
- Saito, K., Horikawa, W. and Ito, K. (2015) 'Inhibiting K63 Polyubiquitination Abolishes No-Go Type Stalled Translation Surveillance in *Saccharomyces cerevisiae*', *PLOS Genetics*. Edited by G. Copenhaver, 11(4), p. e1005197. doi: 10.1371/journal.pgen.1005197.
- Schuermann, J. P. *et al.* (2008) 'Structure of the Hsp110:Hsc70 Nucleotide Exchange Machine', *Molecular Cell*, 31(2), pp. 232–243. doi: 10.1016/j.molcel.2008.05.006.
- Sengupta, J. *et al.* (2004) 'Identification of the versatile scaffold protein RACK1 on the eukaryotic ribosome by cryo-EM', *Nature Structural & Molecular Biology*, 11(10), pp. 957–962. doi: 10.1038/nsmb822.
- Shalgi, R. *et al.* (2013) 'Widespread Regulation of Translation by Elongation Pausing in Heat Shock', *Molecular Cell*, 49(3), pp. 439–452. doi: 10.1016/j.molcel.2012.11.028.
- Shao, S. *et al.* (2015) 'Structure and Assembly Pathway of the Ribosome Quality Control Complex', *Molecular Cell*, 57(3), pp. 433–444. doi:

10.1016/j.molcel.2014.12.015.

Shao, S. and Hegde, R. S. (2014) ‘Reconstitution of a Minimal Ribosome-Associated Ubiquitination Pathway with Purified Factors’, *Molecular Cell*, 55(6), pp. 880–890. doi: 10.1016/j.molcel.2014.07.006.

Shao, S., von der Malsburg, K. and Hegde, R. S. (2013) ‘Listerin-Dependent Nascent Protein Ubiquitination Relies on Ribosome Subunit Dissociation’, *Molecular Cell*, 50(5), pp. 637–648. doi: 10.1016/j.molcel.2013.04.015.

Shen, P. S. *et al.* (2015) ‘Rqc2p and 60S ribosomal subunits mediate mRNA-independent elongation of nascent chains’, *Science*, 347(6217), pp. 75–78. doi: 10.1126/science.1259724.

Shirai, Y.-T. *et al.* (2014) ‘Multifunctional roles of the mammalian CCR4–NOT complex in physiological phenomena’, *Frontiers in Genetics*, 5. doi: 10.3389/fgene.2014.00286.

Shoemaker, C. J., Eyler, D. E. and Green, R. (2010) ‘Dom34:Hbs1 Promotes Subunit Dissociation and Peptidyl-tRNA Drop-Off to Initiate No-Go Decay’, *Science*, 330(6002), pp. 369–372. doi: 10.1126/science.1192430.

Shoemaker, C. J. and Green, R. (2011) ‘Kinetic analysis reveals the ordered coupling of translation termination and ribosome recycling in yeast’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(51), pp. E1392–E1398. doi: 10.1073/pnas.1113956108.

Silva, G. M., Finley, D. and Vogel, C. (2015) ‘K63 polyubiquitination is a new modulator of the oxidative stress response’, *Nature Structural & Molecular Biology*, 22(2), pp. 116–123. doi: 10.1038/nsmb.2955.

Simms, C. L. *et al.* (2014) ‘An Active Role for the Ribosome in Determining the Fate of Oxidized mRNA’, *Cell Reports*, 9(4), pp. 1256–1264. doi: 10.1016/j.celrep.2014.10.042.

- Simms, C. L., Yan, L. L. and Zaher, H. S. (2017) ‘Ribosome Collision Is Critical for Quality Control during No-Go Decay’, *Molecular Cell*, 68(2), pp. 361-373.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2017.08.019.
- Singh, R. K. *et al.* (2012) ‘Novel E3 Ubiquitin Ligases That Regulate Histone Protein Levels in the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*’, *PLoS ONE*, 7(5). doi: 10.1371/journal.pone.0036295.
- Sitron, C. S., Park, J. H. and Brandman, O. (2017) ‘Asc1, Hel2, and Slh1 couple translation arrest to nascent chain degradation’, *RNA*, 23(5), pp. 798–810. doi: 10.1261/rna.060897.117.
- Sohmen, D. *et al.* (2015) ‘Structure of the *Bacillus subtilis* 70S ribosome reveals the basis for species-specific stalling’, *Nature Communications*, 6(1), p. 6941. doi: 10.1038/ncomms7941.
- Song, M.-G., Li, Y. and Kiledjian, M. (2010) ‘Multiple mRNA Decapping Enzymes in Mammalian Cells’, *Molecular Cell*, 40(3), pp. 423–432. doi: 10.1016/j.molcel.2010.10.010.
- Su, T. *et al.* (2019) ‘Structure and function of Vms1 and Arb1 in RQC and mitochondrial proteome homeostasis’, *Nature*, 570(7762), pp. 538–542. doi: 10.1038/s41586-019-1307-z.
- Sugiyama, T. *et al.* (2017) ‘Crucial role of ATP-bound Sse1 in Upf1-dependent degradation of the truncated product’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 488(1), pp. 122–128. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.05.020.
- Szádeczky-Kardoss, I. *et al.* (2018) ‘The No-go decay system degrades plant mRNAs that contain a long A-stretch in the coding region’, *Plant Science*, 275, pp. 19–27. doi: 10.1016/j.plantsci.2018.07.008.
- Takahashi, S. *et al.* (2008) ‘Upf1 potentially serves as a RING-related E3 ubiquitin

- ligase via its association with Upf3 in yeast', *RNA*, 14(9), pp. 1950–1958. doi: 10.1261/rna.536308.
- Tenson, T. and Ehrenberg, M. (2002) 'Regulatory Nascent Peptides in the Ribosomal Tunnel', *Cell*, 108(5), pp. 591–594. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00669-4.
- Tesina, P. *et al.* (2020) 'Molecular mechanism of translational stalling by inhibitory codon combinations and poly(A) tracts', *The EMBO Journal*, 39(3), p. e103365. doi: 10.15252/embj.2019103365.
- Traverse, C. C. and Ochman, H. (2016) 'Conserved rates and patterns of transcription errors across bacterial growth states and lifestyles', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(12), pp. 3311–3316. doi: 10.1073/pnas.1525329113.
- Tsuboi, T. *et al.* (2012) 'Dom34:Hbs1 Plays a General Role in Quality-Control Systems by Dissociation of a Stalled Ribosome at the 3' End of Aberrant mRNA', *Molecular Cell*, 46(4), pp. 518–529. doi: 10.1016/j.molcel.2012.03.013.
- Verma, R. *et al.* (2013) 'Cdc48/p97 promotes degradation of aberrant nascent polypeptides bound to the ribosome', *eLife*. Edited by I. Dikic, 2, p. e00308. doi: 10.7554/eLife.00308.
- Verma, R. *et al.* (2018) 'Vms1 and ANKZF1 peptidyl-tRNA hydrolases release nascent chains from stalled ribosomes', *Nature*, 557(7705), pp. 446–451. doi: 10.1038/s41586-018-0022-5.
- Wang, Z. and Sachs, M. S. (1997) 'Ribosome stalling is responsible for arginine-specific translational attenuation in *Neurospora crassa*.', *Molecular and Cellular Biology*, 17(9), pp. 4904–4913. doi: 10.1128/MCB.17.9.4904.
- Welch, E. M. *et al.* (2007) 'PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations', *Nature*, 447(7140), pp. 87–91. doi: 10.1038/nature05756.
- Willmund, F. *et al.* (2013) 'The Cotranslational Function of Ribosome-Associated

- Hsp70 in Eukaryotic Protein Homeostasis', *Cell*, 152(1), pp. 196–209. doi: 10.1016/j.cell.2012.12.001.
- Wilson, D. N. and Beckmann, R. (2011) 'The ribosomal tunnel as a functional environment for nascent polypeptide folding and translational stalling', *Current Opinion in Structural Biology*, 21(2), pp. 274–282. doi: 10.1016/j.sbi.2011.01.007.
- Winz, M.-L. *et al.* (2019) 'Molecular interactions between Hel2 and RNA supporting ribosome-associated quality control', *Nature Communications*, 10(1), p. 563. doi: 10.1038/s41467-019-08382-z.
- Wolf, A. S. and Grayhack, E. J. (2015) 'Asc1, homolog of human RACK1, prevents frameshifting in yeast by ribosomes stalled at CGA codon repeats', *RNA*, 21(5), pp. 935–945. doi: 10.1261/rna.049080.114.
- Yamashita, A. *et al.* (2001) 'Human SMG-1, a novel phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase, associates with components of the mRNA surveillance complex and is involved in the regulation of nonsense-mediated mRNA decay', *Genes & Development*, 15(17), pp. 2215–2228. doi: 10.1101/gad.913001.
- Yamashita, A. *et al.* (2005) 'Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover', *Nature Structural & Molecular Biology*, 12(12), pp. 1054–1063. doi: 10.1038/nsmb1016.
- Yan, L. L. and Zaher, H. S. (2019) 'Ubiquitin—a beacon for all during quality control on the ribosome', *The EMBO Journal*, 38(5), p. e101633. doi: 10.15252/embj.2019101633.
- Yanagitani, K. *et al.* (2009) 'Cotranslational Targeting of XBP1 Protein to the Membrane Promotes Cytoplasmic Splicing of Its Own mRNA', *Molecular Cell*, 34(2), pp. 191–200. doi: 10.1016/j.molcel.2009.02.033.
- Yanagitani, K. *et al.* (2011) 'Translational Pausing Ensures Membrane Targeting and

- Cytoplasmic Splicing of XBP1u mRNA', *Science*, 331(6017), pp. 586–589. doi: 10.1126/science.1197142.
- Yi, H. *et al.* (2018) 'PABP Cooperates with the CCR4-NOT Complex to Promote mRNA Deadenylation and Block Precocious Decay', *Molecular Cell*, 70(6), pp. 1081-1088.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2018.05.009.
- Yip, M. C. J. *et al.* (2019) 'Mechanism for recycling tRNAs on stalled ribosomes', *Nature Structural & Molecular Biology*, 26(5), pp. 343–349. doi: 10.1038/s41594-019-0211-4.
- Yip, M. C. J. *et al.* (2020) 'ELAC1 Repairs tRNAs Cleaved during Ribosome-Associated Quality Control', *Cell Reports*, 30(7), pp. 2106-2114.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2020.01.082.
- Yoshida, H. *et al.* (2001) 'XBP1 mRNA Is Induced by ATF6 and Spliced by IRE1 in Response to ER Stress to Produce a Highly Active Transcription Factor', *Cell*, 107(7), pp. 881–891. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00611-0.
- Young, D. J. *et al.* (2015) 'Rli1/ABCE1 Recycles Terminating Ribosomes and Controls Translation Reinitiation in 3'UTRs In Vivo', *Cell*, 162(4), pp. 872–884. doi: 10.1016/j.cell.2015.07.041.
- Zhou, W. *et al.* (2017) 'PPR-SMR protein SOT1 has RNA endonuclease activity', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(8), pp. E1554–E1563. doi: 10.1073/pnas.1612460114.
- Zurita Rendón, O. *et al.* (2018) 'Vms1p is a release factor for the ribosome-associated quality control complex', *Nature Communications*, 9(1), p. 2197. doi: 10.1038/s41467-018-04564-3.

第 2 章

リボソームタンパク質 uS3 のユビキチン化を介した
機能不全リボソームの分解系

18S Nonfunctional Ribosomal RNA Decay (18S NRD)の解析

2-1. 序論

2-1-1. リボソームの活性と翻訳における重要性

リボソームは、mRNA にコードされた遺伝暗号を解読し、タンパク質を合成する場であり、大小2つのサブユニットから構成される。これらはリボソームタンパク質(Ribosomal protein: r-protein)とリボソーマル RNA(Ribosomal RNA: rRNA)の複合体であり、分子量としては大腸菌では 2.7MDa、哺乳類では 4.6MDa にも及ぶ。真核生物(出芽酵母/哺乳類細胞)においては、小サブユニットである 40S サブユニットは1種の 18S rRNA と 33 種のリボソームタンパク質 (Asc1/RACK1 を含む)、大サブユニットである 60S サブユニットは3種の 25S/28S、5.8S、5S rRNA と 46/47 種のリボソームタンパク質から構成される(図 2-1A)。

真正細菌や古細菌には、細胞核が存在せず、転写と翻訳は共役して行われることから、転写された mRNA は速やかに翻訳され、毎秒 20 アミノ酸という非常に素早くペプチド鎖が合成されていく。一方で、真核生物においては、核と細胞質が核膜で隔てられており、核内で転写された mRNA が修飾を受けながら細胞質へと輸送され、リボソームのある細胞質中で翻訳が行われるため、毎秒 2-4 アミノ酸という原核生物と比較してゆっくりした速度でペプチドが合成される。

リボソームは、コドンに対応したアミノ酸をチャージしている tRNA を選択したのち、その結合を許容することでコドン情報を解読し、運搬されてきたアミノ酸をペプチド鎖として連結させてタンパク質を合成する、一連の反応を触媒する。活性部位としては、小サブユニットにコドンを認識し mRNA と tRNA のコドン-アンチコドン形成を行うコドン解読中心(Decoding Center: DC)、大サブユニットにアミノアシル tRNA からペプチジル tRNA へのアミノ酸の転移を触媒し、ペプチド結合の形成を行うペプチジル転移酵素中心(Peptidyl Transference Center: PTC)が存在する。これらの活性発揮には、リボソームタンパク質ではなく、厳

密に折りたたまれた rRNA が中心的な役割を担い、実際に、DC では 18S rRNA、PTC では 25S rRNA の特定の塩基が活性中心として知られている(図 2-1B)。このように rRNA が活性を発揮している一方で、リボソームタンパク質はそれらの構造安定化等の補助的な役割を担っている。

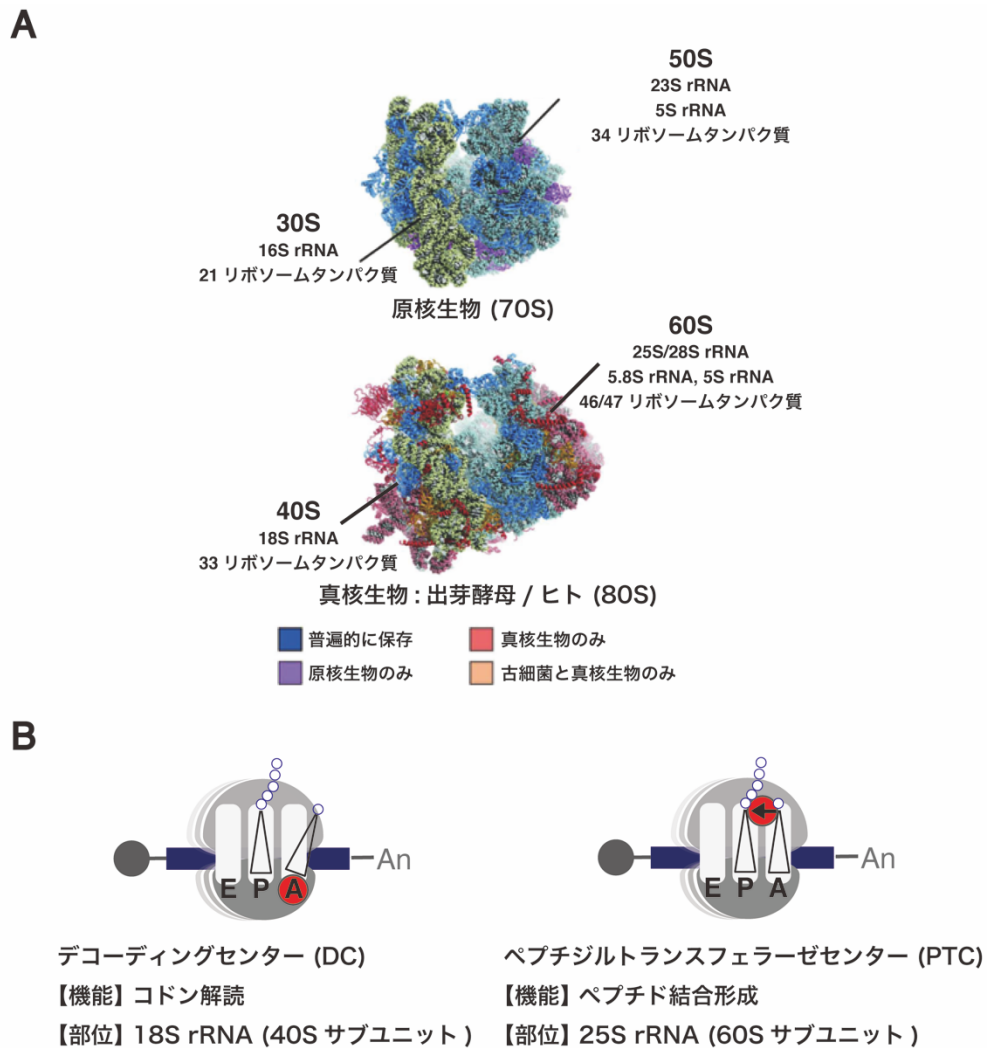


図 2-1. 翻訳装置リボソームの構造と活性

A) 原核生物および真核生物におけるリボソームの構造組成 (Ban 研究室 HP より引用、
改変)。

B) リボソームの翻訳活性部位。活性残基は rRNA 上に存在し翻訳伸長に必須な役割を
担う。

2-1-2. 翻訳サイクルとリボソーム

タンパク質を合成する翻訳サイクルは、(1)tRNA のアミノアシル化、(2)翻訳開始、(3)翻訳伸長、(4)翻訳終結の 4 段階からなるが、本項では翻訳伸長反応について概説する。リボソームは、A-site、P-site、E-site の 3 つの tRNA 結合部位を有しており、A-site にはアミノアシル tRNA、P-site にはペプチジル tRNA、E-site にはデアシル tRNA が結合する(図 2-2A)。

まず、アミノ酸をチャージしたアミノアシル tRNA が GTP 結合型翻訳伸長因子 EF-Tu によって A-site に運ばれ、tRNA アンチコドンが A-site に位置する mRNA コドンと可逆的に対合する。この際、コドン-アンチコドンの塩基対合が正しければ、リボソームの小サブユニットの構造変化が起き、EF-Tu に結合した GTP は GDP へと加水分解され、アミノアシル tRNA を A-site に残して EF-Tu はリボソームから解離する。しかしながら、この対合が正しくない場合、EF-Tu に結合した GTP は加水分解を受けず、tRNA とともに EF-Tu はリボソームから遊離する。ここでの小サブユニットの構造変化については、2-1-3 で述べる。

コドン-アンチコドンの塩基対合だけでは、翻訳の正確性を十分に保証できないため、このように EF-Tu は翻訳の精度を高める役割を担っている。前述したように、塩基対合が正確な場合には、リボソームは自身の構造を変化させることで、EF-Tu の GTPase ドメインを活性化し、結合した GTP を加水分解することで EF-Tu のコンフォメーションを劇的に変化させてアミノアシル tRNA との結合を脱離させ、EF-Tu-GDP 複合体はリボソームから解離する。EF-Tu の解離後、アミノアシル tRNA は A-site の深くに入り込み、アミノアシル tRNA にチャージされたアミノ酸は P-site に近接する。しかしながら、塩基対合が不正確な場合には、EF-Tu の GTPase 活性が活性化されず、結合した GTP が加水分解されないだけでなく、EF-Tu がアミノアシル tRNA から脱離しないことで、アミノアシル tRNA が A-site に完全に収まる順応反応(accommodation)の過程をも阻害する。こ

の結果、EF-Tu-GTP-アミノアシル tRNA 複合体は tRNA を結合したままリボソーム上から解離する。以上のように、コドン-アンチコドンの塩基対形成の正確性は、リボソーム小サブユニット中の DC の構造変化のみならず、EF-Tu を介した A-site におけるアミノアシル tRNA の安定化によっても保証されている。

正しいコドン-アンチコドンの塩基対形成が行われると、PTC において、P-site 上のペプチジル tRNA に結合したポリペプチド鎖の C 末端のカルボキシル基が tRNA から外れ、A-site 上のアミノアシル tRNA に結合したアミノ酸の N 末端のアミノ基と新たに共有結合を形成する。ペプチド転移反応がおこると、小サブユニットが保持する mRNA に対し大サブユニットが回転し移動することで、小サブユニットの P-site と A-site に存在する 2 つの受容ステム部位が、アンチコドンステム部位をそのままに、それぞれ大サブユニット E-site と P-site へと移動する。最後に、GTP 結合型翻訳伸長因子 EF-G が、A-site に結合すると、EF-G-GTP は tRNA の移動を促し、転座反応(translocation)がおこる。このようにして、tRNA のアンチコドン部分と mRNA に対して、小サブユニットが元の状態に回転することで 3 ヌクレオチド(1 コドン)分移動し、デアシル化された E-site に存在する tRNA はリボソームから解離する。このサイクルが繰り返されることで、ペプチド鎖が伸長していく。

以上では、翻訳伸長因子を原核生物の名称で述べたが、真核生物においても EF-Tu は eEF1A として、EF-G は eEF2 として保存されている。

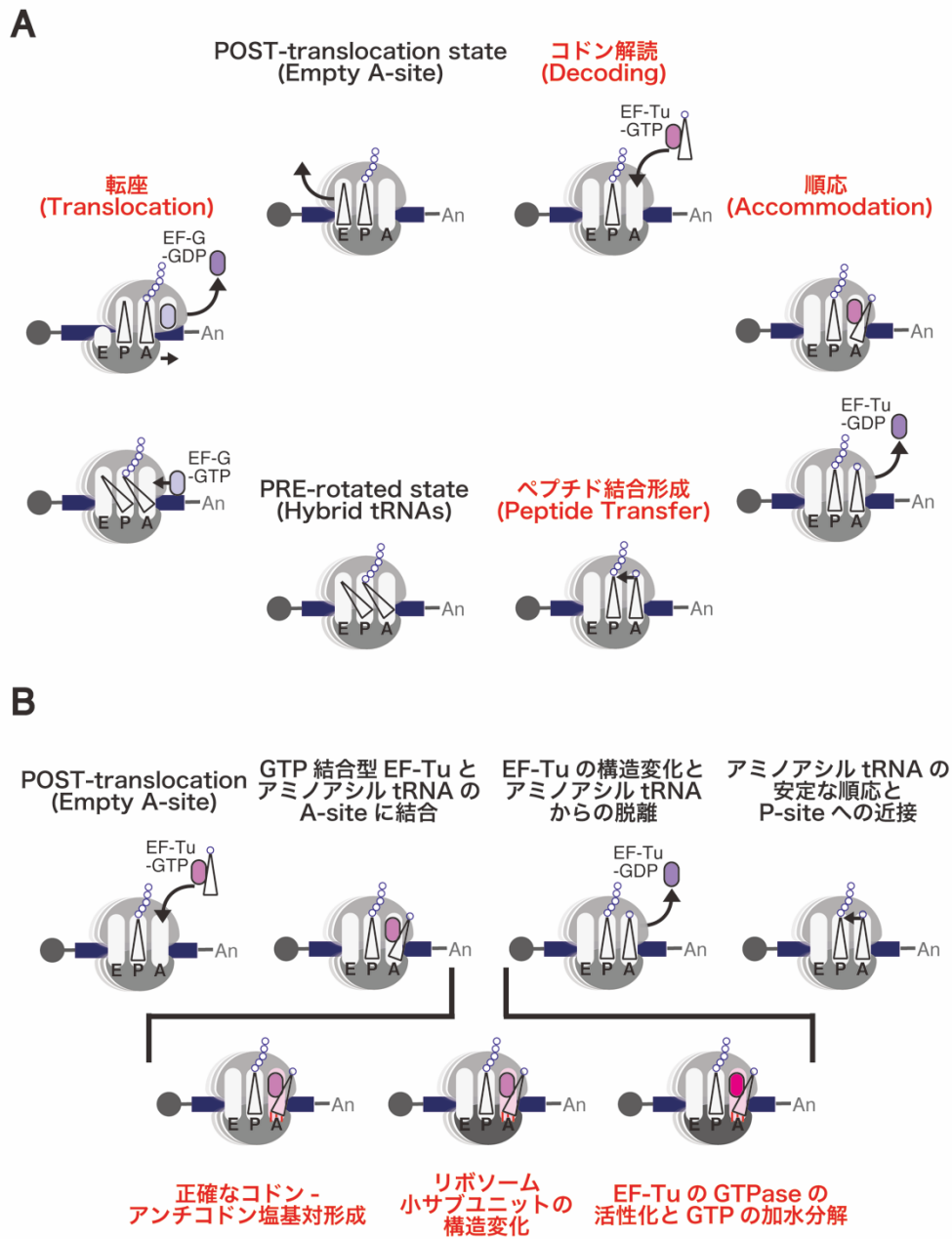


図 2-2. 翻訳伸長反応サイクル

A) 原核生物における翻訳伸長サイクル。大きく 4 つの反応を繰り返すことで翻訳伸長反応を正確に、かつ円滑に進めている。

B) コドン解読の正確性を保証する機構。リボソームの小サブユニットの構造変化がアミノアシル tRNA の A-site への順応を促進する。

2-1-3. リボソーム A-site における分子スイッチとしての Decoding Center

翻訳過程における誤読率は $1/10^4$ とされており、EF-Tu によりアミノアシル tRNA の選別のみならず、リボソームも自身の構造を変化を介して、正確な塩基対形成を保証している(図 2-2B)。コドン-アンチコドンの塩基対合は、コドン 1 文字目-アンチコドン 3 文字目とコドン 2 文字目-アンチコドン 2 文字目はワトソン-クリック型の正確な塩基対を形成する一方で、コドン 3 文字目-アンチコドン 1 文字目は Wobble 位と呼ばれ、ミスマッチ塩基対を許容することが知られている(詳細は第 3 章で述べる)。

以下では、コドン解読の正確性を保証する機構について、原核生物の 16S rRNA(真核生物における 18S rRNA)を例に述べる。この正確なコドン解読を可能にしているのが、A-site 近傍の小サブユニットを構成する 16S rRNA である。これは、RNA 分子スイッチとして働き、アミノアシル tRNA が A-site に運ばれてくると、16S rRNA の活性残基である A1492 および A1493 が内側を向いた不活性状態から、外側を向いた活性状態へと劇的なコンフォメーション変化を引き起こし、コドン-アンチコドンシステムを認識する(Ogle *et al.*, 2001, 2002) (図 2-3A)。このコンフォメーション変化の連続によって、外側を向いたアデニン残基はコドン-アンチコドンの 1 番目と 2 番目の塩基対合がワトソン-クリック型の塩基対であることを立体的形状から確認し、翻訳の正確性を維持している(Ogle *et al.*, 2001, 2002)。活性状態においては、分子スイッチが外側へと裏返るようにしてコンフォメーションが変化し、16S rRNA の A1493 残基はコドン 1 文字目-アンチコドン 3 文字目と、A1492 残基はコドン 2 文字目-アンチコドン 2 文字目に対し、コドン及びアンチコドンの両方のヌクレオシド中の糖の 2'ヒドロキシ基と水素結合を形成し、コドン-アンチコドン間の安定化に寄与している。また、16S rRNA 中の G530 残基も、コドン 2 文字目-アンチコドン 2 文字目中の両ヌクレオシド中の糖の 2'ヒドロキシ基と相互作用しており、また、コドン 3 文字目-

アンチコドン 1 文字目は Wobble 位として知られてはいるものの、この G530 残基やリボソームタンパク質 eS12 を含むリボソームエレメントによって安定化されている。このように、コドン-アンチコドンの塩基対合の正確性を、小サブユニットの構造変化を伴いながら、16S rRNA の保存塩基(A1492、A1493、G530) が副溝側から認識することで維持している(A マイナー相互作用と呼ばれる)(Ogle *et al.*, 2001, 2002) (図 2-3B,C)。

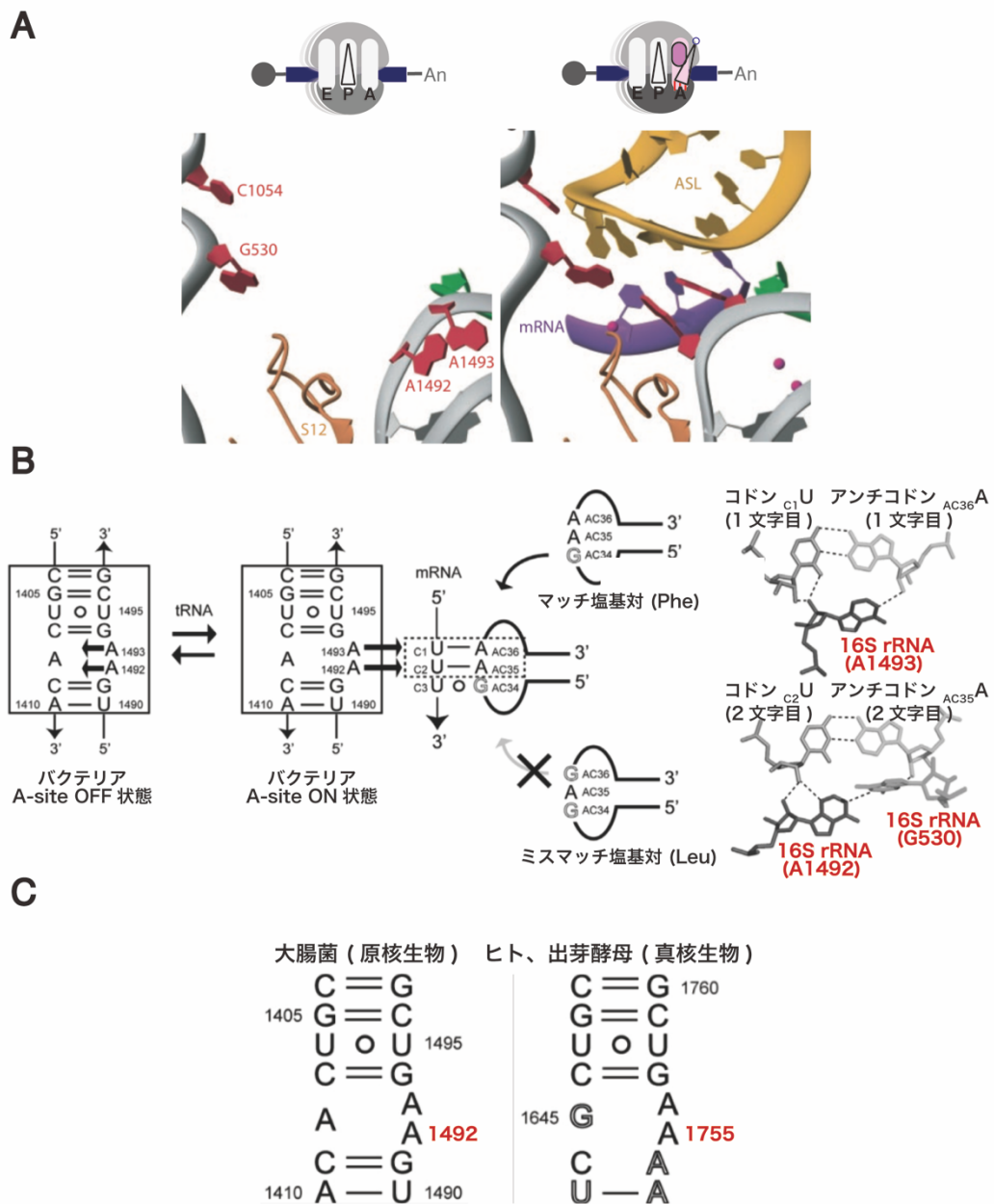


図 2-3. デコーディングセンターの活性残基を介したコドン解読の正確性の保証

- A) デコーディングセンターの活性残基である 18S rRNA-A1492/A1493 残基のコンフォメーション変化 ((Ogle *et al.*, 2001)を引用)。
- B) デコーディングセンターの活性残基とコドン-アンチコドンとの相互作用 (日本結晶学会誌 51, 145-521, 2009 から引用、改変)。
- C) 原核生物と真核生物のデコーディングセンターの配列比較 (日本結晶学会誌 51, 145-521, 2009 から引用、改変)。

実際に、バクテリア感染症の治療に用いられるアミノグリコシド系抗生物質は、原核生物のリボソームの A-site の分子スイッチに作用し、高い殺菌効果を示すことで知られる。これらの抗生物質は、A-site の分子スイッチの内部ループを認識して結合し、押し出すようにして活性部位を外側に向けて固定し、スイッチを活性状態に限定することで、完全に適合しない誤った tRNA をも受け入れ、校正を行えず、tRNA の選別を出来なくさせるために、タンパク質の誤読が促進される。さらに、結晶構造解析や断熱モーフイング解析の結果、原核生物の A-site のスイッチングはデコーディングに関わる 2 つのアデニン残基の構造変化のみでおこるのに対し、真核生物の A-site のスイッチングには大きな構造変化が必要であり、より多くのエネルギーを必要とすることが明らかになった。したがって、原核生物では、比較的緩いスイッチングを生かして迅速なタンパク質合成を実現する一方で、真核生物では、比較的硬いスイッチングを生かして正確性の高いタンパク質合成を実現していることが示唆されている。アミノグリコシド系抗生物質は、原核生物の A-site 分子スイッチを活性状態に固定し、翻訳の正確性を顕著に低下させる一方で、真核生物の A-site 分子スイッチには、原核生物とは異なり、選択的に不活性状態に結合するか、結合しないとされている。A-site 分子スイッチを不活性状態に固定すると、翻訳反応は過度に正確になるが、A-site へのアミノアシル tRNA の結合効率が困難になり、翻訳の効率が顕著に低下することが知られている。このために、真核生物の A-site 分子スイッチに対して、殺菌効果が高く人体への毒性が低い抗生物質バロモマイシンは結合せず、殺菌効果がほぼなく人体への毒性が非常に高い化合物 NB33 は不活性状態に固定することが明らかになっている。このような抗生物質によりもたらされる副作用は、A-site の分子スイッチを不活性状態に固定させ、活性状態への切り替えを阻害するとともに、不活性型 A-site 分子スイッチがリボソームの転座反応に関与するリボソームタンパク質 eS12 の活性構造を乱すことで、転座を阻

害しタンパク質合成を完全に停止させることで引き起こると考えられている。

2-1-4. Nonfunctional Ribosomal RNA Decay: NRD

リボソームの合成には、非常に多くのエネルギーが必要となるため、細胞は完成されたリボソームを長期間使用する。増殖中の酵母においては、あまりにリボソームの安定性が高いために、その分解を実験的に観察することはほとんど不可能である。しかしながら、このように安定なリボソームも、必要な場合には効率的に分解される経路を細胞は備えている。一例としては、合成時のエラーや成熟化等における損傷や変異によって、リボソーム自身が活性を失い、機能不全となった場合である。このようなリボソームは、十分な活性を持ち合わせていないために、翻訳反応を遂行できないだけでなく、mRNA 上で停止してしまったり、他のリボソームの進行を阻害したり、場合によっては有害な封入体を形成してしまう可能性が考えられる。このような機能不全リボソームは、Nonfunctional Ribosomal RNA Decay (NRD)によって生体内から迅速に除去される。次項の 2-1-5、2-1-6 では、2 種類の NRD 機構について概説する。

正常な活性を持つリボソームも分解される場合があり、この代表的な例は栄養飢餓の場合である。栄養源が枯渇した場合、細胞はリボソーム量を減少させることで余剰のタンパク質合成を抑制するとともに、分解したリボソームから栄養素を抽出し、生存に最低限必須な分子の合成に転用すると考えられている。栄養飢餓以外にも、酸化ストレスや小胞体ストレスの場合にもリボソームの分解を促進することで、タンパク質合成を抑制しているとされている。次項の 2-1-7 では、このようなストレス条件等におけるリボソームの分解系について簡単に述べる。

Melissa Moore 研究室では、出芽酵母を用いて、活性を失った機能不全リボソームが細胞内で選択的に分解されることを報告し、Nonfunctional Ribosomal RNA

Decay (NRD)と名付けた(LaRiviere *et al.*, 2006)。前述したように、本来、正常な機能を持つ 18S rRNA や 25S rRNA はそれぞれのサブユニットに取り込まれ、極めて安定に存在し、翻訳を行う。しかしながら、18S rRNA や 25S rRNA の重要な活性部位において変異を持つ rRNA は、合成され、プロセッシングを受け、それぞれのサブユニットに取り込まれるにも関わらず、正常な翻訳ができないために細胞内で迅速に分解されることが示されている(LaRiviere *et al.*, 2006) (図 2-4A)。この際に、アセンブリされ、80S リボソームになった状態であったとしても、変異型ではないサブユニットは分解を受けず、変異型であるサブユニットのみが選択的に分解を受けることが報告されている(LaRiviere *et al.*, 2006; Cole and LaRiviere, 2008)。従って、このように細胞は機能を損なったりリボソームを認識し、分解する品質管理機構を備えており、この品質管理では選択的なサブユニット中の rRNA の分解を可能にするために、サブユニットの解離反応が必須であると考えられる。以下では、25S rRNA 上の PTC に変異を持つ 60S サブユニットの分解系である 25S NRD と、18S rRNA 上の DC に変異を持つ 40S サブユニットの分解系である 18S NRD について述べる。

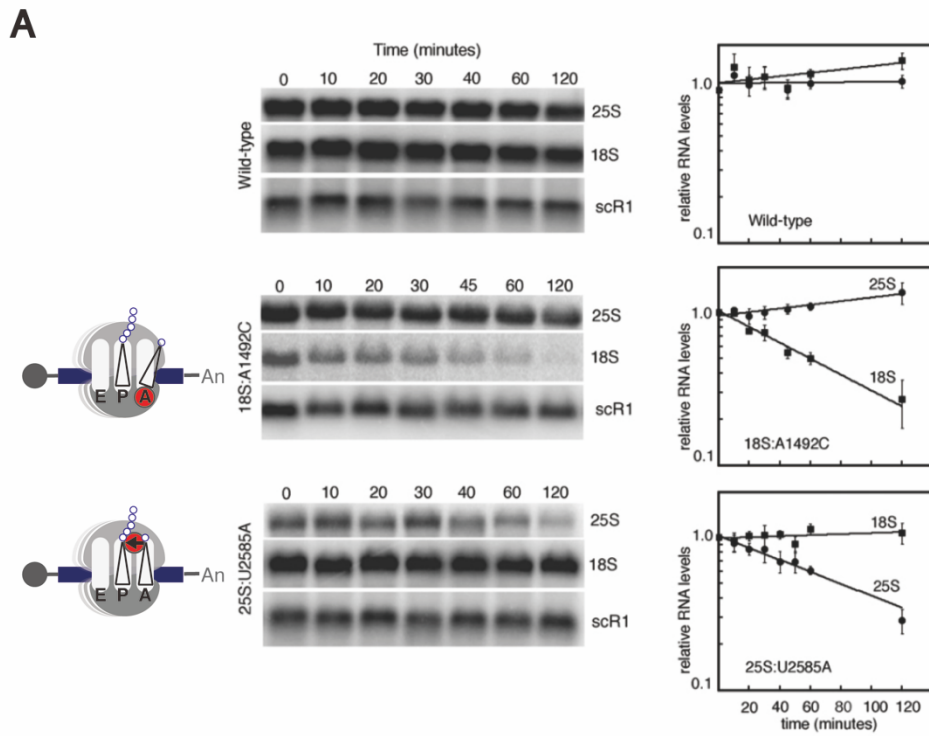


図 2-4. 機能不全リボソームの分解系 NRD の発見

A) 変異型 rRNA を含むリボソームサブユニットの半減期測定 ((LaRiviere *et al.*, 2006) から引用)。

2-1-5. 25S Nonfunctional Ribosomal RNA Decay: 25S NRD

25S NRD は、25S rRNA の活性部位であるペプチジル転移酵素中心(PTC)に変異を持つ rRNA/リボソームの分解系である(LaRiviere *et al.*, 2006)。これまで、25S NRD の解析には、PTC として機能する 25S rRNA の活性部位 A2451 や U2585(大腸菌におけるナンバーリングを採用)の変異体が使用されてきた。25S rRNA:A2451 や U2585 は、PTC において種間で広く保存された残基であり、ペプチド結合形成に直接関与することが報告されている(Nissen *et al.*, 2000; Cannone *et al.*, 2002; Hansen *et al.*, 2002)。また、*in vitro* において、25S rRNA:A2451 や U2585 の変異型 rRNA では、アセンブリされるにも関わらず、翻訳活性が損なわれることが示唆されていた(Youngman *et al.*, 2004)。さらに、これらの変異を持つ大腸菌は致死であり、PTC における活性維持は生命にとって必須であることが明らかになっていた(Green, Samaha and Noller, 1997; Muth, Ortoleva-Donnelly and Strobel, 2000)。Melissa Moore 研究室では、A2451G 変異型 25S rRNA は、正常に合成、アセンブルしたのち、細胞内で迅速に分解を受けることを報告した(LaRiviere *et al.*, 2006)。また、野生型 25S rRNA は細胞質に拡散していたのに対し、変異型 25S rRNA:A2451G や U2585A は、細胞質中において核周辺の foci に局在することが示されている(Cole *et al.*, 2009)。変異型 25S rRNA を含むリボソームは、PTC に変異を持ち、ペプチジル転移反応に異常が生じると想定されるため、2 番目のコドンに対するアミノアシル tRNA が A-site に位置し、ペプチド結合を形成する際に、リボソームの停止が惹起される可能性が高いと考えられる。

25S NRD では、PTC 変異型 25S rRNA を含む機能不全リボソームが、Rtt101-Mms1-Cdc34 Culin 型 E3 リガーゼによってユビキチン化を受ける(Fujii *et al.*, 2009)。この際には、アクセサリ分子として Crt10 が Rtt101-Mms1-Cdc34 複合体に結合して、基質認識を行うと示唆されている(Sakata *et al.*, 2015)。ユビキ

チン化された 60S サブユニットは Cdc48-Npl4-Ufd1 依存に解離し、60S サブユニットを構成するリボソームタンパク質がユビキチン-プロテアソーム系によって分解されることで、露出した変異型 25S rRNA が細胞内の RNase により迅速に分解を受ける、というモデルが提唱されている(Fujii *et al.*, 2012) (図 2-5A)。実際にプロテアソーム阻害条件では、機能不全 60S サブユニットが蓄積することから、25S NRD において、プロテアソームが rRNA の分解に必須な因子であることは明らかである(Fujii *et al.*, 2012)。しかしながら、25S NRD におけるリボソームのユビキチン化の詳細な部位、基質選択機構、サブユニット解離との関連性については明らかになっていない。

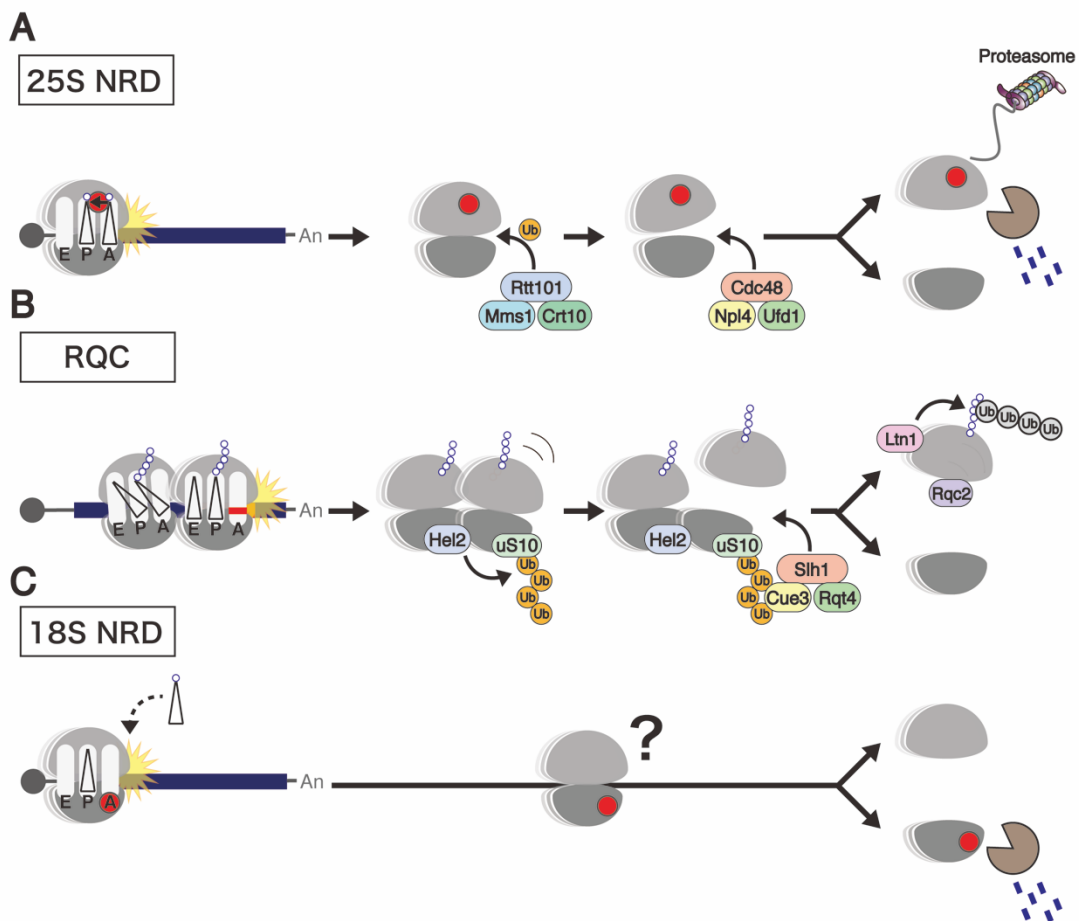


図 2-5. NRD と RQC の比較

A) 25S NRD、B) RQC、C) 18S NRD の分子機構について比較を行った。

2-1-6. 18S Nonfunctional Ribosomal RNA Decay: 18S NRD

18S NRD は、18S rRNA の活性部位であるコドン解読中心(DC)に変異を持つ rRNA/リボソームの分解系である(LaRiviere *et al.*, 2006)。これまで、18S NRD の解析には、DC として機能する 18S rRNA の活性部位 A1492 や A1493、G530(大腸菌におけるナンバーリングを採用)の変異体で使用されてきた。18S rRNA: A1492 や A1493、G530 は、DC において種間で広く保存された残基であり、コドン解読における正確性の保証に関与することが報告されていた(Ogle *et al.*, 2001, 2002; Cannone *et al.*, 2002)。また、*in vitro* において、18S rRNA:A1492 や G530 の変異型 rRNA では、アセンブリされるにも関わらず、アミノアシル tRNA の A-site への結合が損なわれることが示唆されていた。さらに、これらの変異を持つ大腸菌は致死であり、DC における活性維持は生命にとって必須であることが明らかになっていた(Powers and Noller, 1990, 1993; Yoshizawa, Fourmy and Puglisi, 1999)。Melissa Moore 研究室では、A1492C 変異型 18S rRNA は、正常に合成、アセンブルしたのち、細胞内で迅速に分解を受けることを報告した(LaRiviere *et al.*, 2006)。通常リボソームは非常に安定な複合体であるが、A1492C 変異型 18S rRNA を含む機能不全リボソームのうち、変異を有する 18S rRNA は迅速に分解を受けるが、その会合パートナーである 25S rRNA は非常に安定であることが明らかになっている。そのために、変異型 18S rRNA は、80S リボソームにまでアセンブリしたのちに、何らかの形でサブユニット解離を受け、解離後の 40S サブユニットに対してのみ RNase がアクセスすると予想される(図 2-5C)。変異型 18S rRNA は、エキソヌクレアーゼである Rrp6 や Xtn1、エキソソームリクルート因子である Ski7 の欠損下やコアエキソソームである Rrp44 の発現抑制下で安定化したことから、これらの因子により分解を受けていることが示されている(Cole *et al.*, 2009; Limoncelli, Merrikh and Moore, 2017)。一方で、プロテアソーム阻害剤である MG132 処理時にも、変異型 18S rRNA は依然として分解を受けて

いたことから、25S NRD とは異なり、18S NRD はプロテアソーム非依存な分解系であることが明らかになっている(Fujii *et al.*, 2012)。さらに *XRN1* 欠損下では、野生型 18S rRNA は細胞質中に拡散していたのに対し、変異型 18S rRNA は細胞質に foci を形成して蓄積する(Cole *et al.*, 2009)。また、18S NRD の基質は、同様に *Xrn1* に依存した分解系である NGD(第 1 章を参照)の基質や、P-body に高濃度で局在するデキャッピング酵素 *Dcp2* と共局在したことから、変異型 18S rRNA は RNA の代謝の場として知られる P-body に局在し、*Xrn1* により分解を受けることが明らかになっていた(Parker and Sheth, 2007; Cole *et al.*, 2009)。また、変異型 18S rRNA を含むリボソームは、コドン解読反応に異常が生じると想定されるため、開始コドンが P-site、2 番目のコドンが A-site に位置した時に、A-site におけるデコーディングが出来ずに、リボソームの停止が惹起される可能性が高いと考えられる。18S NRD の基質は NGD の基質と同様に P-body で分解されることに加えて、RQC/NGD において必須なリボソームタンパク質 *Asc1* やリボソームの解離を担う *Dom34* や *Hbs1* についても、変異型 18S rRNA の分解に関与することが報告されている(Cole *et al.*, 2009; Limoncelli, Merrikh and Moore, 2017)。さらに、翻訳伸長阻害剤である Cycloheximide の処理時では、変異型 18S rRNA の分解が顕著に阻害されることから、18S NRD には翻訳伸長反応が必須である可能性が示唆されている。以上のことから、18S NRD には共翻訳的な mRNA 品質管理と同様の因子群が関与しており、翻訳伸長阻害に起因するリボソームの異常停滞に起因する RQC/NGD と 18S NRD の関連性が示唆されている(Cole *et al.*, 2009) (図 2-5B,C)。

2-1-7. その他のリボソームの分解経路

リボソームは、転写後に核内において、アセンブリ以前の 40S や 60S サブユニットの成熟過程には細胞質において、正常なプロセスを経なかった異常リボ

ソームは厳密な品質管理により分解されることが知られている。本項では、アセンブリが完了し 80S リボソームにまで組み立てられたにも関わらず分解を受ける例に限定するため、アセンブリ以前の品質管理については割愛する(図 2-6A)。

オートファジーは、細胞が飢餓状態を生存するために自己消化することで栄養源を確保する機構である。この過程では、細胞は、標的とする細胞質内の分子をオートファゴソームと呼ばれる膜によって隔離し、リソソームや液胞に運び、分解する。自食作用とも呼ばれ、細胞が自らのタンパク質をアミノ酸に分解することで、エネルギー源やタンパク質合成の新たな材料として変換する、生体材料のリサイクル経路として知られている。その一種として、リボソームのオートファジーであるリボファジー(Ribophagy)が報告されている(Kraft *et al.*, 2008) (図 2-6A)。実際に、窒素源飢餓下では、リボソームが液胞に運ばれており、脱ユビキチン化酵素である Ubp3 や Bre5 がそれに関与することも報告されている(Kraft *et al.*, 2008)。さらに、窒素源飢餓下では、リボソームはタンパク質のみならず、RNA 成分も分解を受けることが明らかになっている。液胞内に存在する RNase である Rny1 は、オートファジー経路によって液胞に運ばれた rRNA を切断し、ヌクレオシドや塩基の形で細胞外へ漏出させていることが示唆されている(Huang *et al.*, 2015)。しかしながら、この RNA 分解は Ubp3 や Bre5 には依存せず、リボファジーの分子機構には未だ様々な課題が残されている。

現在も、リボファジーについては多数の研究がなされており、RQC において新生ペプチド鎖のユビキチン化を行う E3 リガーゼ Ltn1 によるリボソームタンパク質 uL23 のユビキチン化が、リボファジーからリボソームを保護していることや、Ubp3 と Bre5 はこのユビキチン鎖を除去することでリボファジーを誘導していることも報告されている(Ossareh-Nazari *et al.*, 2014)。リボソームは多くのタンパク質成分と RNA 成分を含む栄養価の高い構造体であることから、飢餓時に新規タンパク質合成を抑制したり、生体材料をリサイクルしたりする点で、

細胞にとってリボソームは好都合の分解対象であると考えられる。

また、TOR を阻害することで栄養飢餓シグナルを発動するラパマイシンの処理は、翻訳開始の阻害やオートファジーの誘導、リボソームの合成阻害などを誘導する。ラパマイシンの処理によっても、rRNA は急速に分解を受けるが、これまでに述べた因子群は関与せず、リボファジーとは別経路であることが示されている(Pestov and Shcherbik, 2012)。さらに、過酸化水素処理等の酸化ストレス時には、前述の RNase である Rny1 は液胞から細胞質中に移動し、オートファジー非依存に rRNA や tRNA を切断する(Thompson and Parker, 2009)。このように、栄養飢餓やストレス時には、オートファジー依存にも非依存にもリボソームが分解される。加えて、抗ウイルス応答時には RNaseL が(Wreschner *et al.*, 1981; Hamajima *et al.*, 2013)、小胞体ストレス応答時には Ire1 が(Iwawaki *et al.*, 2001)、rRNA を切断することが知られており、リボソームは様々な局面に応じて分解を受け、細胞内のタンパク質合成の阻害に寄与すると考えられているが、今後も詳細な解析が必要とされている。

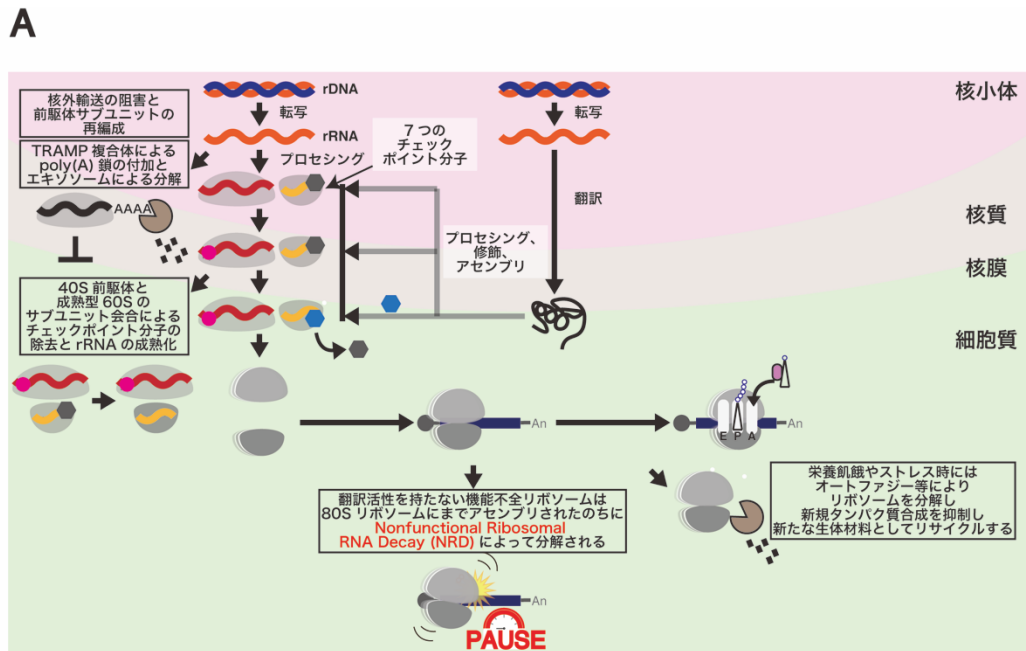


図 2-6. リボソーム品質管理、分解経路の一例

A) リボソームは多岐にわたる品質管理を受け細胞質へと移行する(考察を参照)。

2-1-8. リボソームタンパク質の欠失や変異に起因する疾患: リボソーム病

リボソーム病は、リボソームを構成する因子や生合成に関わる因子の変異に起因する疾患である(Draptchinskaia *et al.*, 1999; Narla and Ebert, 2010)。代表例としては、以下に挙げるダイヤモンドブラックファン貧血、先天性角化不全症候群、トリーチャー・コリンズ症候群がある。いずれもリボソームの生合成に関与する遺伝子が原因遺伝子として同定されているが、未解明な点が多く残されている(図 2-7A)。

ダイヤモンドブラックファン貧血(Diamond-Blackfan Anemia; DBA)は *RPS19*, *RPL5* を始めとしたリボソームタンパク質の変異によって発症する。主に造血組織の異常が生じ、赤血球の成熟過程の阻害による再生不良性貧血を呈する先天性疾患であり、リボソームの生合成が疾患の原因になることが明らかになった最初の例である(Draptchinskaia *et al.*, 1999)。DBA は、骨髄での赤芽球系の細胞がほとんど見られず、発癌リスクも高いことで知られているが、それは代表的な癌抑制因子である p53 とリボソームタンパク質との関連性が原因であることが示唆されている。p53 は、多様な生体ストレスや細胞環境の変化に応答して様々なシグナルを発することで細胞の運命決定を行う役割を担っており、p53 自身は E3 リガーゼである MDM2 を介して分解されることが報告されていた。これまでに MDM2 に結合するリボソームタンパク質として RpL5 や RpL11 等の 8 種類のタンパク質が報告されていることから、一部のリボソームタンパク質の異常によってリボソーム生合成量が低下し、余剰のリボソームタンパク質が産生されると、このうち RpL5、RpL11 等が MDM2 に結合し、その E3 リガーゼ活性を阻害することによって、p53 が MDM2 による制御系から解放され、安定化された p53 がアポトーシスを介した細胞死誘導を誘導することが示された(Lohrum *et al.*, 2003; Dai and Lu, 2004; Chakraborty, Uechi and Kenmochi, 2011) (図 2-7B)。また DBA モデルゼブラフィッシュ胚においてロイシン添加による翻訳活性化によつ

て症状が緩和した報告から、リボソーム生合成異常による翻訳活性の低下が疾患発症に関与する可能性が示唆されている(Payne *et al.*, 2012)。

先天性角化不全症候群(Dyskeratosis Congenita; DKC)は、爪の萎縮や皮膚の色素沈着、粘膜の異常などの外的症状の他、骨髄不全や腫瘍化などの重篤な症状も呈する疾患である。主な原因遺伝子としては、核小体タンパク質である *DKC1* が同定されている(Heiss *et al.*, 1998)。*DKC1* は核小体低分子 RNA である snoRNA に結合し、主に rRNA のシュドウリジン化と呼ばれるウリジン残基の異性化に関わる因子である(Knight *et al.*, 2001)。rRNA のウリジン化修飾は IRES(Internal Ribosome Entry Site)依存の mRNA の翻訳に必要であり、これらの mRNA の翻訳効率の低下が原因であると考えられている(Yoon *et al.*, 2006)。

トリーチャー・コリンズ症候群(TreacherCollins Syndrome; TCS)は、頬骨や下顎の形成不全や口蓋裂など骨格形成の異常や奇形をきたす病であり、*TCOF1* が原因遺伝子として同定されている(The Treacher Collins Syndrome Collaborative Group *et al.*, 1996)。*TCOF1* は rRNA の転写(Hayano *et al.*, 2003)や 18S rRNA のメチル化を介した成熟化(Valdez *et al.*, 2004; Gonzales *et al.*, 2005)に関与する。*TCOF1* 遺伝子をハプロ不全にしたマウスモデルでは、リボソームの合成量が減少するとともに、神経外胚葉や神経堤細胞の増殖が抑制されることが知られている(Dixon *et al.*, 2006)。

以上の例を皮切りに、リボソーム病の発症例は多数報告されており、リボソームタンパク質の変異や rRNA の成熟異常によって、造血、がん、皮膚から骨格に至るまで様々な組織で、多様な疾患を呈することが明らかになってきた。つまり、一見均一に存在しているように見えるリボソームも、それぞれが mRNA に対し選択性を持っており、その特異性が多種多様な症状をもたらすという可能性が示唆されている。近年では、このように、均一に見えるものの、本来組み込まれているはずのリボソームタンパク質の欠失や、本来組み込まれていな

いリボソームタンパク質の結合、またリボソームタンパク質のパラログの存在等により、微細な差を持ったリボソームが、特定の翻訳反応を制御することが示されており、このように特徴的なリボソームはまとめて **Specialized Ribosomes** と呼ばれている(Xue and Barna, 2012; Dinman, 2016; Guo, 2018)。

Specialized Ribosomes の一例として、DBA を誘発するリボソームが挙げられる。前述したように、DBA は赤血球細胞の産生障害を特徴とする遺伝性再生不良性貧血であり、現在では、DBA の原因変異として 11 種類のリボソームタンパク質のヘテロ変異もしくは染色体の欠失が報告されている。これは、全患者の 55%にも相当し、その分子基盤の解明が期待されているが、このようなりボソーム構成成分の変異や欠失が、なぜ赤血球細胞特異的に影響するのかは明らかになっていなかった。近年、リボソームとは無関係な *GATA1* 遺伝子が原因遺伝子として同定され、議論を呼んでいる(Sankaran *et al.*, 2012)。*GATA1* は主に血球前駆細胞で発現する転写因子であり、赤血球、巨核球、好酸球の前駆細胞の生存とその分化に必須であるが、リボソームタンパク質のハプロ不全は、40S もしくは 60S サブユニットの合成量を低下させ生合成異常を引き起こすだけではなく、そのようなハプロ不全リボソームは、*GATA1* mRNA の翻訳活性を顕著に低下させることが明らかになった。これまでの報告から、*GATA1* mRNA の 5'UTR は非常に短く、かつ特殊な RNA 二次構造を含んでいることから、このような特徴を持つ mRNA がハプロ不全リボソームに対して選択的に影響を受けやすいことが明らかになっている。このようにして DBA の原因変異として知られるハプロ不全リボソームは、単にグローバルに翻訳活性を低下させる訳ではなく、選択的に、かつ顕著に *GATA1* mRNA 等の翻訳活性を低下させる。このために、転写因子 *GATA1* の産生量が極端に減少し、その下流の赤血球前駆細胞、赤血球細胞の産生に必須な mRNA の転写やそれ由来のタンパク質の発現が損なわれる。このように、多様なリボソームタンパク質の変異や欠失の影響が最終的に同様の

GATA1 mRNA の翻訳活性の低下を導き、赤血球細胞特異的に異常が生じると考えられている(Cmejlova *et al.*, 2006; Boulwood and Pellagatti, 2014; Ludwig *et al.*, 2014; Lahtvee *et al.*, 2017; Khajuria *et al.*, 2018) (図 2-7B)。

A

疾患	原因遺伝子	異常反応	造血 がん 皮膚 骨格			
非症候性難聴	ミトコンドリアリボソーム <i>18S rRNA A1555</i>	デコーディング活性				
ダイヤモンド・ブラックファン貧血	<i>RPS19</i> をはじめとする リボソームタンパク質他 10 遺伝子、 <i>GATA1</i>	リボソームタンパク質	◎	○		○
先天性角化不全症	<i>DKC1</i>	rRNA の修飾	◎	○	◎	
5q 症候群	<i>RPS14</i>	リボソームタンパク質、 rRNA のプロセシング	◎	○		
軟骨毛髪低形成	<i>RMBP</i>	5.6S rRNA の成熟	◎	○	◎	◎
シュバツハマン・ダイヤモンド症候群	<i>SBDS</i>	リボソームの生合成、 rRNA のプロセシング	◎	○		◎
T 細胞急性リンパ性白血病	<i>RPL5, RPL10, RPL22</i>	リボソームタンパク質	◎	◎		◎
トリーチャー・コリンズ症候群	<i>TCOF1</i>	リボソームの生合成				◎

B

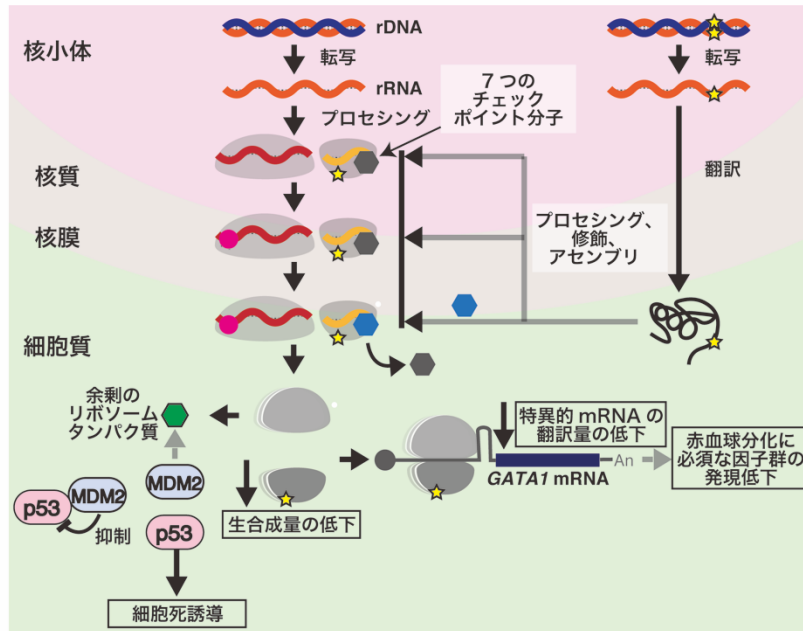


図 2-7. ダイヤモンドブラックファン貧血に着目したリボソーム病の発症メカニズム

A) リボソーム病の例。ダイヤモンドブラックファン貧血はリボソーム病のモデル疾患として盛んに研究されている。

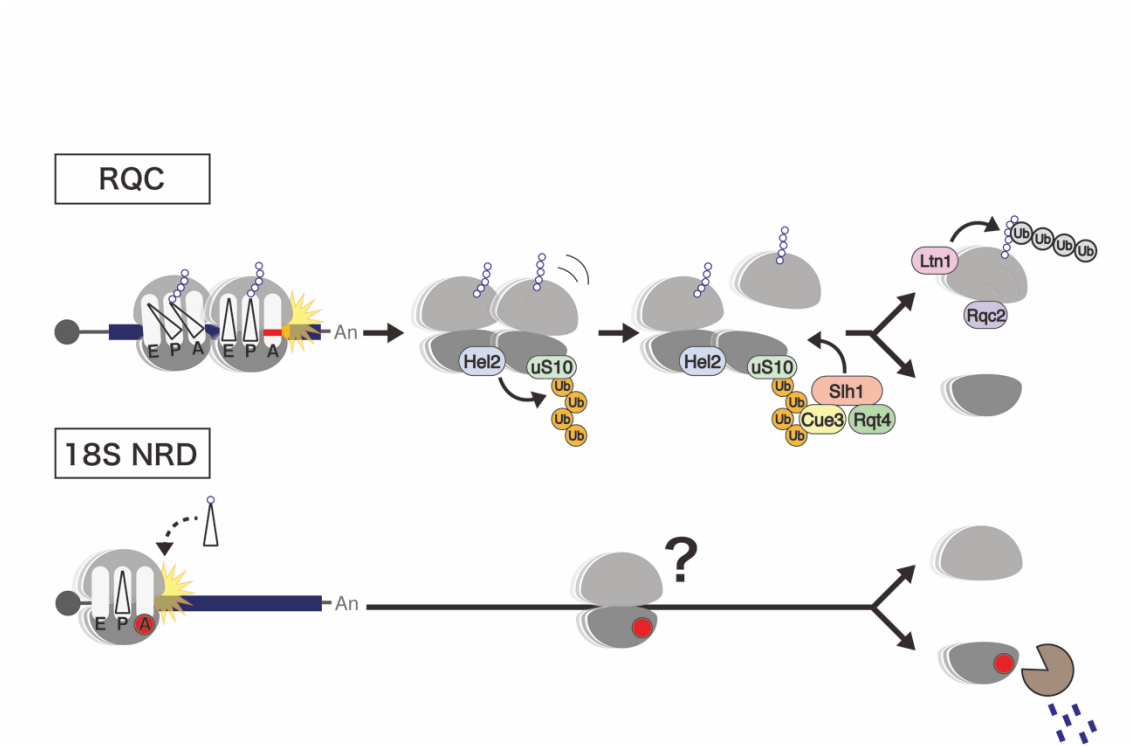
B) ダイヤモンドブラックファン貧血の発症メカニズム。リボソームの生合成量の低下のみならず、特異的な mRNA の翻訳活性の変化が発症原因として知られている。

2-2. 目的

本研究では、デコーディング活性を持たない機能不全リボソームの運命決定機構について解析を行った。前述したように、A1492C 変異型リボソームは、デコーディングの際にリボソーム A-site の分子スイッチによる翻訳の校正機能が完全に失われるだけではなく、小サブユニットのコンフォメーション変化が起こらなくなるために、EF-Tu がアミノアシル tRNA から脱離せずに、翻訳反応自体が進行しなくなることが考えられる。先行研究により、変異型 A1492C-18S rRNA を含む機能不全リボソームは、80S リボソームにまでアセンブリされ、翻訳反応に参加したのち、変異を有する 40S サブユニット中の 18S rRNA のみが選択的に分解されることが報告されている。この選択的な分解のためには、mRNA 上にリクルートされた機能不全リボソームが特異的に解離し、40S サブユニットは分解経路に、60S サブユニットはリサイクル経路に取り込まれる必要があると考えられる。

以上のことから、A1492C 変異型リボソームは、翻訳活性を持たないために mRNA 上で停滞し、これを異常と感知されることで、特異的なリボソームの解離反応を受けることが想定できる。そのため、18S NRD は、第 1 章で概説した RQC 経路と酷似した反応である可能性が考えられることから、リボソームのユビキチン化に着目し、解析を行った(Sugiyama *et al.*, 2019) (図 2-8)。

また、京都大学 ウイルス・再生医科学研究所の大野睦人教授、北島真助教に、本研究で使用したプラスミドを、東京都医学総合研究所の田中啓二理事長、佐伯泰参事研究員には、本研究で使用したプラスミドおよび出芽酵母株を分与して頂いた。



機能不全リボソームの分解はリボソームのユビキチン化に依存するのか
機能不全リボソームはどのように解離されるのか

図 2-8. 本研究の目的

2-3. 結果

2-3-1. リボソームタンパク質 uS3 の K212 残基におけるユビキチン化は 18S

NRD の惹起に必須である

RQC は、mRNA や新生ペプチド鎖の異常に伴うリボソームの異常停止、衝突に起因する合成途上の新生ペプチド鎖の分解系である。リボソームの異常停止、衝突は、そのセンサーである E3 リガーゼ Hel2 によって認識され、Hel2 は衝突リボソームを構成するリボソームタンパク質 uS10 の K6/8 残基に K63 型のポリユビキチン鎖を形成することで、異常翻訳中のリボソームに対し目印をつける。RQC 経路においては、リボソームのユビキチン化は、その下流の RQT 複合体を介したリボソームのサブユニット解離に必須であり、解離後の 60S サブユニット上では新生ペプチド鎖の分解が誘導される。

18S NRD においても、リボソームの翻訳活性不全により、mRNA 上で異常停止し、80S リボソームのサブユニット解離が誘導されると想定されることから、RQC と同様にリボソームのユビキチン化が引き金となるのではないかと考え、変異型 rDNA をコードするレポーター遺伝子の過剰発現系を用いたスクリーニングを行った。

本研究では、18S NRD をモニターするためのレポーター遺伝子として、ガラクトース存在下で転写誘導される *GAL7* プロモーターの下流に、*18S rDNA* *WT/A1492C-5.8S rDNA-25S rDNA* をコードするプラスミドを用いた(図 2-9A)。

また、18S NRD の誘導に必須なユビキチン化標的の同定を目的とした検出感度の高いスクリーニングを行うために、相同組替えを用いたゲノム編集技術を用いて、リボソーム小サブユニットを構成する各リボソームタンパク質の C 末端に 3HA タグを付加した出芽酵母株ライブラリーを構築した。これらの 3HA タグ出芽酵母株に対し、*18S rDNA-WT* もしくは *18S rDNA-A1492C* をコードするレ

ポーター遺伝子を形質転換し、ガラクトース培地で培養、転写誘導後に集菌した。TCA 沈殿によって濃縮、調整したサンプルをアプライし、抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロッティングを行うことで、細胞内で相対的に変異型 18S rRNA-A1492C の発現量を上昇させた際に、ユビキチン化が亢進するリボソームタンパク質の同定を目指した。その結果、リボソームタンパク質 uS3 の C 末端に 3HA タグを付加した *uS3-3HA* 株において、プラスミドによる外因性 18S rRNA-A1492C の過剰発現により、uS3 のユビキチン化レベルが若干ながら増加することが明らかになった(図 2-9B)。本解析は、*GAL7* プロモーターによる過剰発現系であるが、細胞内の *18S rDNA* のコピー数とこれに由来する 18S rRNA の発現量は非常に多いために、プラスミド由来の 18S rRNA-A1492C の発現により検出された差は小さいと考えられる。一方で、18S rRNA-A1492C の過剰発現によっても、他のリボソームタンパク質のユビキチン化レベルは変化しなかった。したがって、変異型 18S rRNA を含む機能不全リボソームでは、uS3 のユビキチン化が亢進している可能性が示唆された。

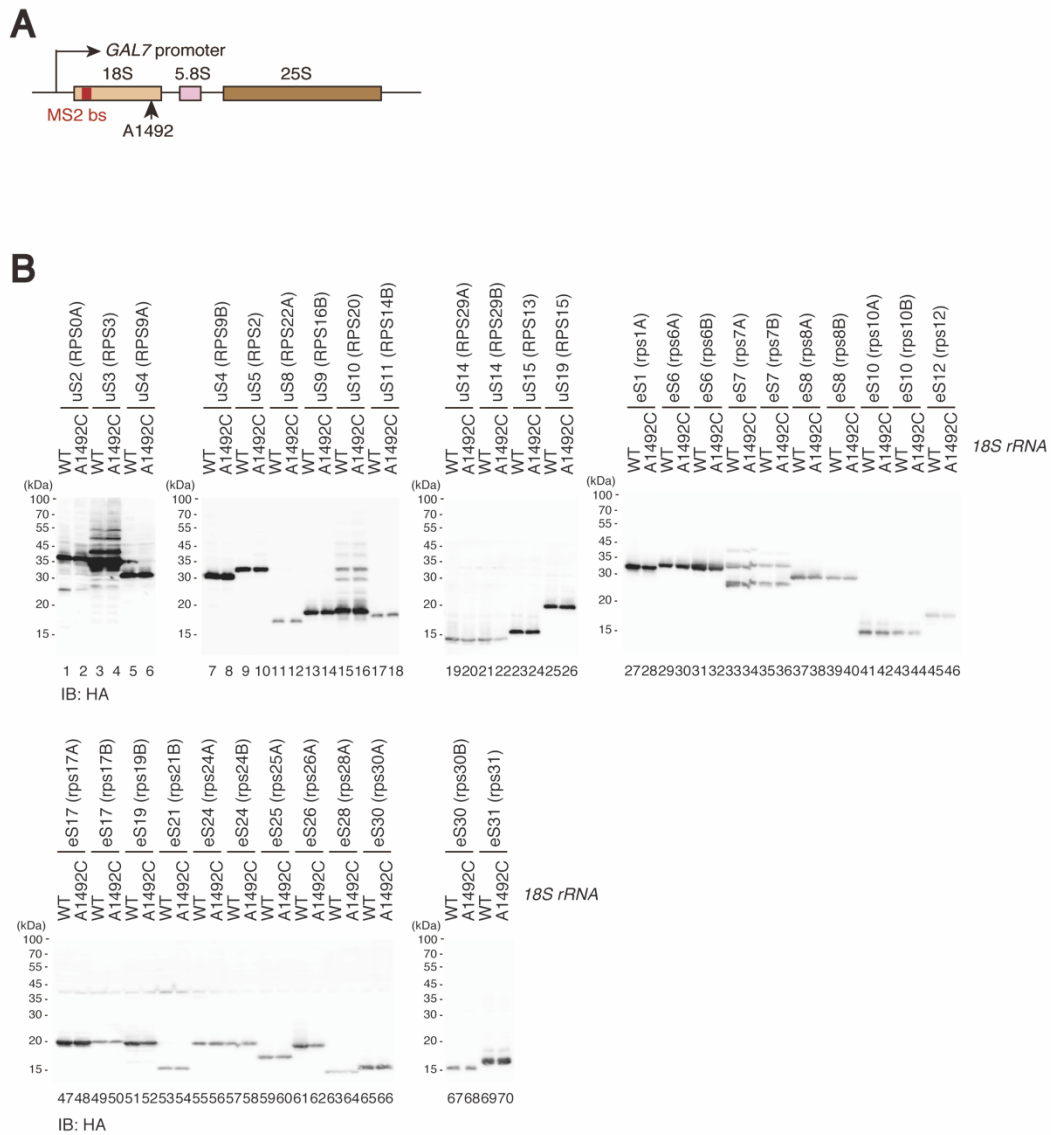


図 2-9. 機能不全リボソームのリボソームタンパク質 uS3 ではユビキチン化が亢進する

A) 本研究で用いた rDNA プラスミド。GAL7 プロモーターの下流に 18S rDNA を導入し、ノーザンブロットによる検出用の特異的タグ配列や特異的精製用の MS2 配列を挿入した。

B) 変異型 A1492C-18S rRNA の過剰発現による機能不全リボソームのユビキチン化標的スクリーニング。野生型 18S rRNA の過剰誘導時と比較して、変異型 18S rRNA の発現誘導時には uS3 のユビキチン化が亢進した。

リボソームタンパク質 uS3 の C 末端テイルは、リボソームの表面に露出しており、翻訳後修飾を受けるとされている (図 2-10A)。uS3 のユビキチン化における C 末端テイルの重要性を明らかにするため、変異型 18S rRNA を過剰生産した酵母株から uL23-FLAG を介して 80S リボソームを精製後、ウエスタンブロットを行った。uS3 の C 末端テイルには 212 番目と 223 番目に 2 つのリジン残基が存在するが、uS3 の 212 番目のリジン残基をアルギニン残基に置換しユビキチン化が起こらないようにさせた *uS3-K212R* 変異株においては uS3 のユビキチン化がほぼ完全に消失した。このことから、uS3 の K212 残基は K223 残基と比較して主要なユビキチン化部位であることが明らかになった (図 2-10B)。また抗 K63 型ポリユビキチン抗体もしくは抗 K48 型ポリユビキチン抗体を用いた解析により、uS3 の主要なポリユビキチン鎖は K63 型である可能性が示唆された(図 2-10C)。

実際に、uS3 の K212 残基におけるユビキチン化が変異型 18S rRNA の分解に必須であるかを検討するため、rRNA の半減期測定を行った。18S rRNA の半減期を測定する際には、レポーター遺伝子を形質転換した酵母株をガラクトース培地で培養、転写誘導したのち、グルコース培地へと培地交換を行うことで転写遮断を行った。その後、経時的にサンプリングを行い、RNA 抽出後、ノーザンブロットを行った。内在性の rRNA と区別して、プラスミド由来の rRNA のみを特異的に評価するため、レポーター遺伝子中にタグ配列を挿入し、これに対応するようなプローブを用いて検出を行った。

野生株においては、野生型 18S rRNA は非常に安定であった($t_{1/2}>4\text{hrs}$)一方で、変異型 A1492C-18S rRNA は非常に不安定であり迅速に分解された($t_{1/2}=0.7\text{hrs}$)。しかしながら、uS3 がユビキチン化を受けない *uS3-K212R* 変異株においては、野生型 18S rRNA が非常に安定であった($t_{1/2}>4\text{hrs}$)ことに加え、変異型 A1492C-18S rRNA も分解を受けず、非常に安定であった($t_{1/2}>4\text{hrs}$)。したがって、

uS3 の K212 残基のユビキチン化依存に変異型 18S rRNA の分解が惹起されていることが明らかになった(図 2-10D)。

以上の結果から、RQC の惹起は、E3 リガーゼ Hel2 による衝突リボソームの uS10-K6/8 残基のユビキチン化に依存する一方で、18S NRD の惹起は、機能不全リボソームの uS3-K212 残基のユビキチン化に依存することが示された。Hel2 によるユビキチン化標的として uS10 のほか、uS3 も報告されていたが、uS3 のユビキチン化は RQC の惹起に関与しないことから、その機能については未解明であった(Matsuo *et al.*, 2017; Simms, Yan and Zaher, 2017)。そこで、RQC の誘導に必須な E2 酵素 Ubc4、E3 酵素 Hel2 の 18S NRD への関与について検討を行うため、変異型 18S rRNA の半減期測定を行った。野生株($t_{1/2}=1.3\text{hrs}$)と比較して *hel2* Δ においては弱いながらも表現型を示し($t_{1/2}=1.3\text{hrs}$)、部分的に寄与することが示唆された。また、*ubc4* Δ において、変異型 18S rRNA は分解が完全に抑えられ劇的に安定化しており($t_{1/2}>4\text{hrs}$)、Ubc4 は 18S NRD に必須な E2 酵素であることが明らかになった(図 2-10E)。したがって、Hel2 を含めた複数の E3 酵素が 18S NRD における uS3 のユビキチン化に関与していることが考えられた。

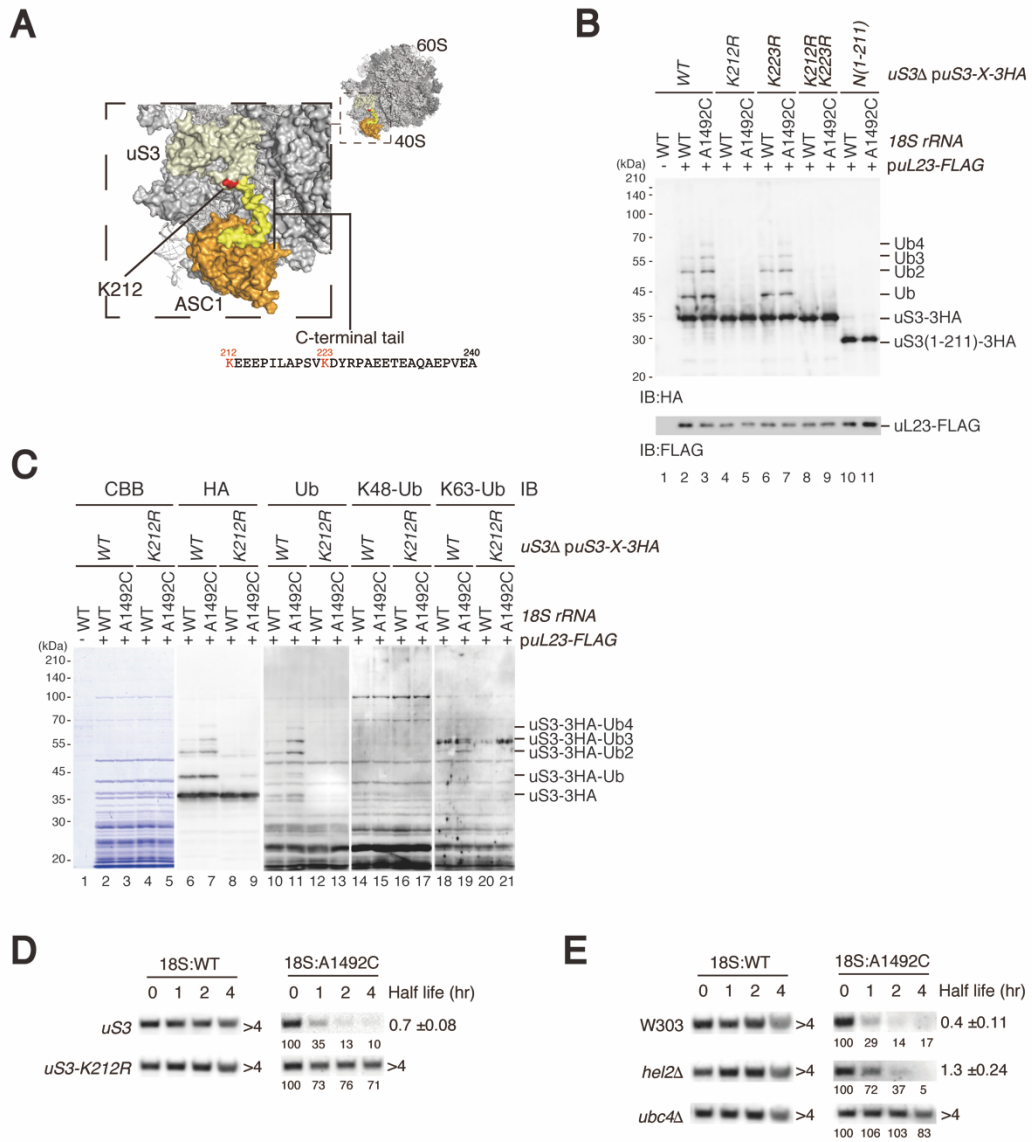


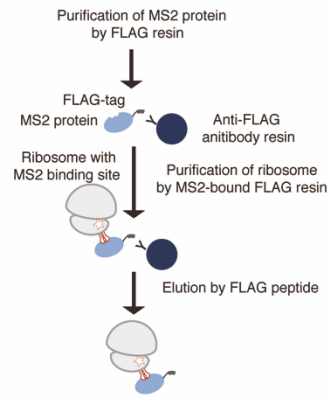
図 2-10. 機能不全リボソームのリボソームタンパク質 uS3 の K212 残基ではユビキチン化が亢進する

- A) リボソームタンパク質 uS3 のリボソーム上における位置。図は PDB: 4V88 を参照し PyMol によって作成した。uS3 は薄黄色、uS3 のうち C 末端テイルを黄色、K212 残基を赤色、リボソームタンパク質 Asc1 はオレンジ色で示した。
- B) リボソームタンパク質 uL23-FLAG を介した 80S リボソームの精製による uS3 のユビキチン化レベルの比較。uS3-K212R 変異株においては uS3 がユビキチン化をほとんど受けないことが示唆された。
- C) リボソームタンパク質 uL23-FLAG を介した 80S リボソームの精製による uS3 のユビキチン化レベルの比較。精製産物を抗 K63 型ポリユビキチン抗体を用いたウエスタンブロットにより解析すると、uS3 が受けるポリユビキチン化は K63 型であることが示唆された。(当研究室 池内 実験データ)
- D) uS3-K212R 変異株における変異型 A1492C-18S rRNA の半減期測定。uS3 の K212 残基がユビキチン化を受けない uS3-K212R 変異株においては、18S NRD が完全に阻害された。
- E) RQC 関連因子 *hel2Δ* や *ubc4Δ* における変異型 A1492C-18S rRNA の半減期測定。*ubc4Δ* においては、18S NRD が完全に阻害された一方で、*hel2Δ* においては、部分的な表現型を示した(当研究室 市村 卒業論文、修士論文、池内 実験データ)。

当研究室 李は、機能不全リボソームにおける uS3 のユビキチン化の亢進について、詳細に解析を行うため、レポーター遺伝子の 18S rRNA 中の 9es3b region にタンデムに繋いだ MS2 binding site を挿入することで、機能不全リボソームの特異的精製系を構築した。MS2 binding site を挿入したレポーター遺伝子由来の MS2-18S rRNA を組み込んだ 80S リボソームは、FLAG タグを付加した MS2 タンパク質を結合させた Anti-FLAG Agarose Resin を介して特異的に精製することができる(図 2-11A)。

実際に、機能不全リボソームの特異的精製を介して uS3 のユビキチン化レベルを検討したところ、野生株では野生型リボソームと比較して変異型リボソームにおいて uS3 のユビキチン化が顕著に亢進していた一方で、*uS3-K212R* 変異株においては野生型リボソーム、変異型リボソームの双方において uS3 のユビキチン化はほぼ完全に消失していた。また、9es3b region を増幅する RT-PCR 法により、精製産物が MS2 binding site を含む MS2-18S rRNA のみであることを確認している。したがって、機能不全リボソームにおいて、特異的に uS3 のユビキチン化が亢進することが明らかになった(図 2-11B)。特に、機能不全リボソームにおけるポリユビキチン化の亢進は顕著であった。

A



B

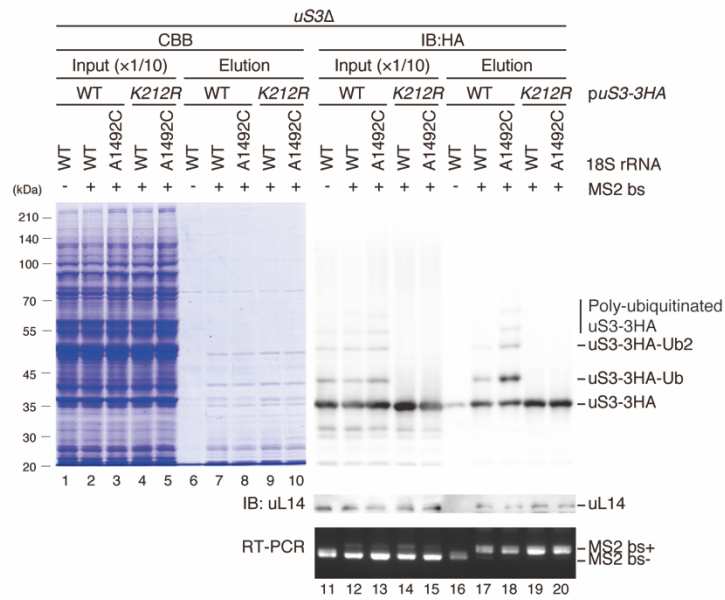


図 2-11. 機能不全リボソームのリボソームタンパク質 uS3 の K212 残基では特異的にユビキチン化が亢進する (当研究室 李 修士論文)

A) MS2-bs を介した機能不全リボソームの特異的精製系: MS2-Tagged RNA Affinity Purification (MS2-TRAP)。FLAG タグを付加した MS2 タンパク質を抗 FLAG 抗体アガロースレジンに結合させ、これを介して MS2-18S rRNA を含む 80S リボソームを特異的に精製した。

B) MS2-TRAP により精製された 80S リボソーム中の uS3 のユビキチン化レベルの比較。変異型 A1492C-18S rRNA を含む機能不全リボソームの uS3 の K212 残基では野生型リボソームと比較してユビキチン化が亢進しポリユビキチン化されていた。

2-3-2. E3 ユビキチンリガーゼ Mag2 は uS3 をモノユビキチン化することで 18S NRD を誘導する

ユビキチン化は、E1 活性化酵素、E2 転移酵素、E3 リガーゼからなる複数の酵素群による連続した反応である。これまでの結果から、18S NRD の惹起には、uS3 の K212 残基のユビキチン化が必須であることが明らかになった一方で、前項の結果により、RQC の惹起に必須な E3 リガーゼ Hel2 が 18S NRD に対し部分的に関与することは示されていたものの、ユビキチン化反応の基質特異性を決定づける E3 リガーゼの同定には至っていなかった。

当研究室では、E3 リガーゼ活性を有するドメインをコードした 75 の非必須遺伝子の KO ライブラリを用いた遺伝学的スクリーニングを行うことで、18S NRD の惹起に必須な E3 リガーゼとして Mag2 を同定している。実際に、rRNA の半減期測定を行った結果、変異型 A1492C-18S rRNA が野生株において迅速に分解されていた($t_{1/2}=0.4\text{hrs}$)一方で、*mag2Δ*においては *ubc4Δ*と同様に分解が完全に抑えられ顕著に安定化する($t_{1/2}>4\text{hrs}$)ことが明らかになっている(図 2-12A)。また、野生型 18S rRNA についてはいずれの変異株においても安定であった($t_{1/2}>4\text{hrs}$)。したがって、E3 リガーゼ Mag2 は、E2 酵素 Ubc4 と同様に 18S NRD に必須であることが明らかになった。しかしながら、18S NRD における Mag2 の作用点は明らかになっていなかった。

さらに、当研究室 加藤は、機能不全リボソームの特異的精製を介して uS3 のユビキチン化における Mag2 の機能を解析した。その結果、野生株で生じていた機能不全リボソームにおける uS3 のユビキチン化の亢進は、*mag2Δ*において完全に消失していた。*mag2Δ*における表現型は *uS3-K212R* 変異株と非常に類似しており、Mag2 による uS3 の K212 残基のユビキチン化の亢進が、機能不全リボソームの分解に必須であることが明らかになった(図 2-12B)。

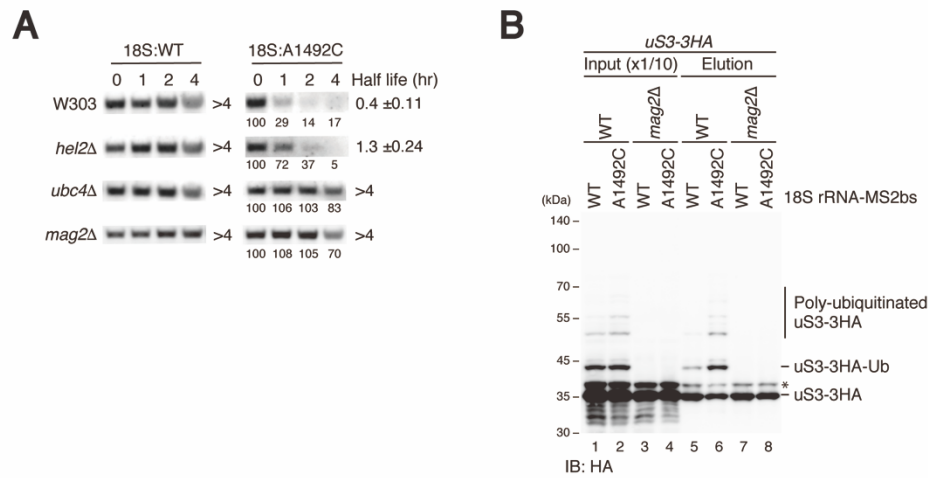


図 2-12. E3 リガーゼ Mag2 は 18S NRD における uS3 のユビキチン化に必須である (当研究室 加藤 修士論文)

A) *mag2Δ* における変異型 A1492C-18S rRNA の半減期測定。*mag2Δ* においては、18S NRD が完全に阻害された。

B) *mag2Δ* における MS2-TRAP により精製された 80S リボソーム中の uS3 のユビキチン化レベルの比較。変異型 A1492C-18S rRNA を含む機能不全リボソームの uS3 におけるユビキチン化の亢進が *mag2Δ* により阻害された。

本研究において 18S NRD の誘導に必須な因子として同定された Mag2 は RING-Finger 型の E3 リガーゼである(図 2-13A)。そこで、18S NRD や uS3 のユビキチン化における Mag2 の E3 活性の重要性について検討を行った。rRNA の半減期測定を行ったところ、*mag2Δ*において変異型 18S rRNA は分解を受けず顕著に安定化されていた($t_{1/2}>4\text{hrs}$)一方で、野生型 Mag2 を相補させることで変異型 18S rRNA は迅速に分解された($t_{1/2}=0.46\text{hrs}$)。しかしながら、Mag2 の RING ドメインの欠失変異体($\Delta RING$)や活性中心の点変異体(*C195/198S*)を発現させても相補せず、変異型 18S rRNA は分解を受けなかった($t_{1/2}>4\text{hrs}$) (図 2-13B)。これと一致するように、uS3 のユビキチン化レベルについても、野生型 Mag2 はその表現型を相補した一方で、変異型 $\Delta RING$ や *C195/198S* では相補できなかった(図 2-13C)。したがって、Mag2 は自身の RING 型の E3 活性を生かし、リボソームタンパク質 uS3 をユビキチン化することにより、18S NRD を惹起することが明らかになった。

最後に、uS3 のユビキチン化における Mag2 の粗活性について、*in vitro* ユビキチン化反応を用いて解析を行った。内在性の uS3 ユビキチン化が入らない *ubc4ΔuS3-3HA* 株から 80S リボソームを精製して反応基質を、リコンビナントタンパク質として大腸菌から Mag2 や Ubc4 等を精製し、酵素群を調整した(図 2-13D)。ユビキチン化反応に必須な ATP、ユビキチン、E1、E2 として Ubc4、E3 として Mag2、基質として精製した 80S リボソームを反応させたのち、抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロットを行うことで uS3 のユビキチン化を検出した。その結果、反応に必須な全ての成分を反応させた際にのみ、Mag2 は uS3 にユビキチン分子を 1 つ付加した(図 2-13E)。また、内在性の uS3 ユビキチン化が入らない *mag2ΔuS3ΔpuS3-3HA* 株から 80S リボソームを精製して基質とし、同様の反応を行ったところ、野生型 Mag2 は uS3 をモノユビキチン化した一方で、 $\Delta RING$ や *C195/198S* のような E3 活性を失った変異型 Mag2 は反応できなかった(図

2-13F)。したがって、Mag2 は自身の RING ドメインを介し、uS3 に対してモノユビキチン化を行う活性を有することが明らかになった。一方で、Mag2 は uS3 をポリユビキチン化する活性は有さなかった。

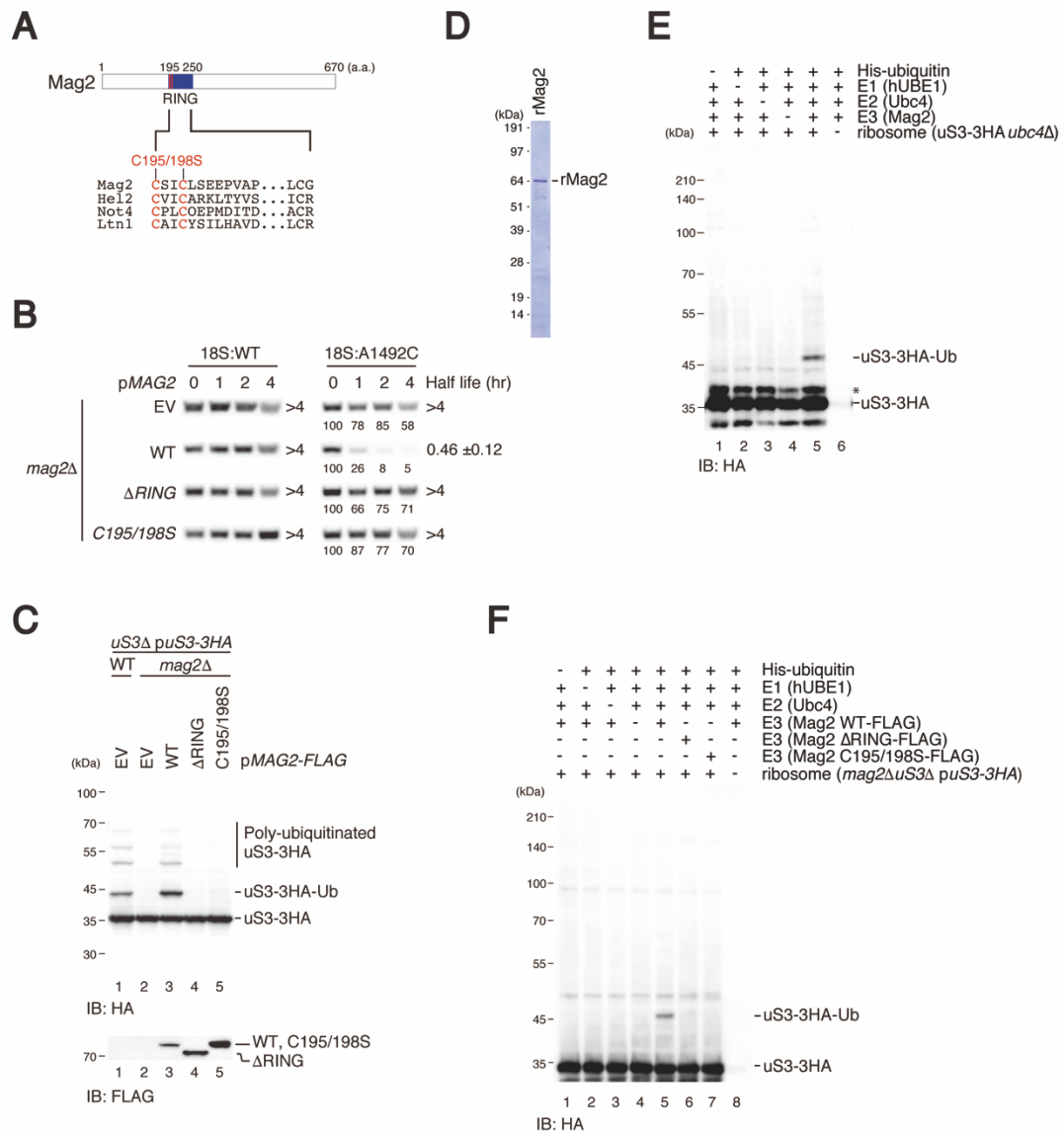


図 2-13. E3 リガーゼ Mag2 は自身の RING ドメインを介して uS3 をモノユビキチン化する

A) Mag2 のドメイン構成。RING ドメインを青色、RING-Finger 型 E3 リガーゼで保存されたモチーフを赤色で示した。

B) *MAG2* 変異株における変異型 A1492C-18S rRNA の半減期測定。Mag2 の RING ドメインの活性依存に 18S NRD が惹起されることが示された。(当研究室 加藤 修士論文)

C) *MAG2* 変異株における uS3 のユビキチン化レベルの比較。Mag2 の RING ドメインの活性依存に uS3 がユビキチン化されることが示された。(当研究室 加藤 修士論文)

D) リコンビナント Mag2 タンパク質の精製。大腸菌株 Rosetta-gami2(DE3)において発現誘導した Mag2 を精製し、CBB 染色により検出した。

E) Mag2 を用いた *In vitro* ユビキチン化反応。*ubc4ΔuS3-3HA* 酵母株から精製した 80S リボソームを基質とし、ユビキチン化反応に必須な ATP、ユビキチン、E1、E2(Ubc4)、E3(Mag2)を反応させた。反応産物を抗 HA 抗体によるウエスタンブロットにより検出し、uS3 のユビキチン化レベルを評価した。Mag2 は uS3 に対しモノユビキチン化を行うことを示した。

F) Mag2 を用いた *In vitro* ユビキチン化反応。*mag2ΔuS3ΔpuS3-3HA* 酵母株から精製した 80S リボソームを基質とし、ユビキチン化反応に必須な ATP、ユビキチン、E1、E2(Ubc4)、E3(野生型もしくは変異型 Mag2)を反応させた。反応産物を抗 HA 抗体によるウエスタンブロットにより検出し、uS3 のユビキチン化レベルを評価した。Mag2 は uS3 に対し RING ドメインに由来する E3 活性依存的にモノユビキチン化を行うことを示した。

2-3-3. Mag2 による uS3 のモノユビキチン化は K63 型ポリユビキチン鎖の形成を促進する

前項の結果から、Mag2 は uS3 をモノユビキチン化する活性を有することが明らかになっていたが、機能不全リボソームの特異的精製の結果から、機能不全リボソームの uS3 にはポリユビキチン鎖が伸長すること、また、抗 K63 型ポリユビキチン抗体を用いたウエスタンブロットの結果から、uS3 には K63 型ポリユビキチン鎖が伸長する可能性が示唆されていた。

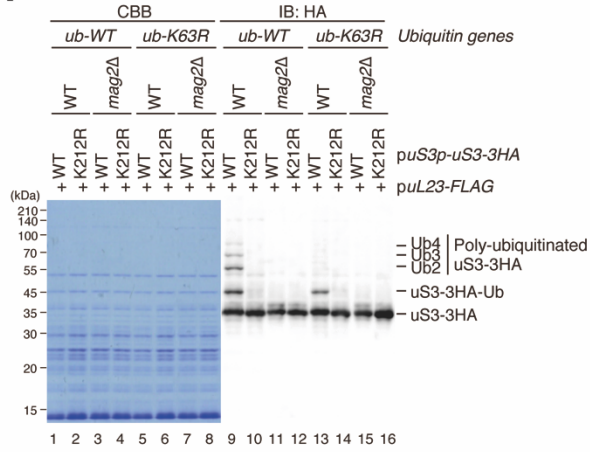
まず、K63 型ポリユビキチン鎖を特異的に形成できない *Ubi-K63R* 変異酵母株を用いて、実際に uS3 上に K63 型ポリユビキチン鎖が形成されるのか、を検討した。*Ubi-K63R* 変異酵母株では、細胞内のユビキチン遺伝子を、全て K63 型ポリユビキチン鎖を伸長できない *Ubi-K63R* に置換しているため、K63 型ポリユビキチン鎖の形成が阻害される。その結果、*Ubi-WT* 野生酵母株において、uS3 には複数のユビキチン分子が付加されたポリユビキチン鎖が形成されることが明らかになった。また、uS3 のポリユビキチン鎖の形成は、Mag2 や K212 残基に依存していた。さらに、*Ubi-K63R* 変異酵母株においては、コントロールである *Ubi-WT* 野生酵母株と比較して、ポリユビキチン鎖が消失し、モノユビキチン分子が残存していたことから、uS3 に形成されたポリユビキチン鎖は K63 型ポリユビキチン鎖であることを示している。したがって、Mag2 は uS3 の K212 残基に K63 型ポリユビキチン鎖が形成されるために必須であることが示唆された(図 2-14A)。

次に、uS3 の K212 残基のポリユビキチン化に対する Mag2 の詳細な関与を明らかにするために、FLAG タグを付加した uL23 を介した 80S リボソームのアフィニティー精製と His6 タグを付加したユビキチンを介したユビキチン化タンパク質のプルダウンを連続的に組み合わせ、ユビキチン化されたりリボソームを精製し、uS3 のユビキチン化の検出を試みた(図 2-14B)。その結果、uS3 のユビキ

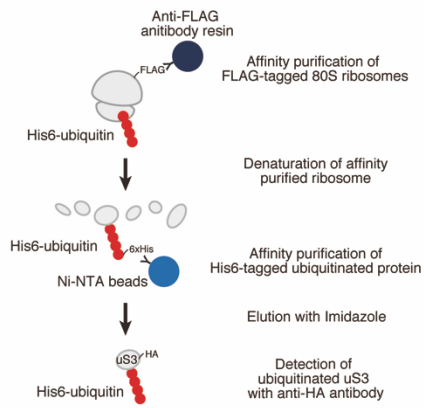
チン化は、野生株と比較して、uS3 にユビキチン化が入らない *uS3-K212R* やモノユビキチン化が入らない *mag2Δ* において劇的に減少することが示された(図 2-14C)。さらに、コントロールと比較して、Mag2 の過剰発現時には、モノユビキチン化型 uS3 のみならず、ポリユビキチン化型 uS3 が顕著に増加した。また、K212 残基や Mag2 に非依存のユビキチン化型 uS3 も、非常に少ないながらも検出された。

以上の結果をあわせ、機能不全リボソームの uS3 の K212 残基には K63 型ポリユビキチン鎖が形成され、このポリユビキチン鎖の形成には Mag2 による uS3 のモノユビキチン化が必須である可能性が強く示唆されている。

A



B



C

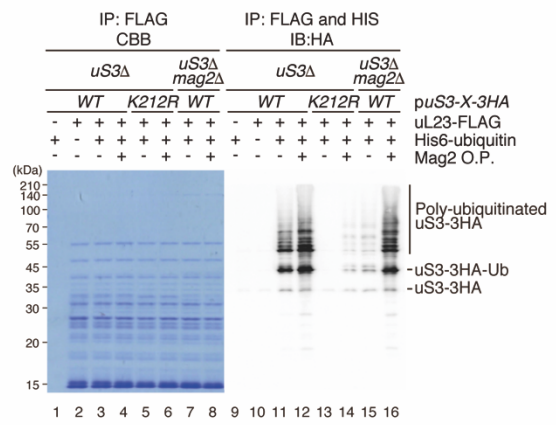


図 2-14. リボソームタンパク質 uS3 の K212 残基は Mag2 依存に K63 型ポリユビキチン化を受ける

A) リボソームタンパク質 uL23-FLAG を介した 80S リボソームの精製による uS3 のユビキチン化レベルの比較。K63 型ポリユビキチン鎖を形成できない *Ubi-K63R* 変異株を用いて解析を行うことで、Mag2 は K212 残基における K63 型ポリユビキチン鎖の形成に必須であることを示した。

B) Serial Affinity Purification。リボソームタンパク質 uL23-FLAG を介した 80S リボソームの精製後、RNase やグアニジン塩酸塩を用いて精製リボソームを変性させ、過剰発現したユビキチンの His6 タグを介して Ni-NTA ビーズによりユビキチン化リボソームタンパク質を精製した。

C) Serial Affinity Purification による uS3 のユビキチン化レベルの評価。uS3 の K212 残基には Mag2 依存にポリユビキチン化が行われることが示された。

2-3-4. 18S NRD における Mag2 による uS3 のモノユビキチン化は Hel2 による K63 型ポリユビキチン鎖の形成に必須である

これまでに、18S NRD に関与する E3 リガーゼとして Mag2 と Hel2 が同定された。18S NRD の惹起においては、uS3 が K63 型ポリユビキチン化される可能性が示唆されていた一方で、Mag2 は uS3 のモノユビキチン化活性のみを有することから、uS3 のユビキチン化における Hel2 の機能について評価した。

まず、Mag2 や Hel2 を過剰発現することにより uS3 のユビキチン化への影響を検討した。その結果、Mag2 の過剰発現によっては主にモノユビキチン化が亢進した一方で、Hel2 の過剰発現によっては主にポリユビキチン化が亢進した。さらに、この Hel2 の過剰発現による uS3 のポリユビキチン化の亢進は、モノユビキチン化が起こらない *mag2Δ* やユビキチン化部位の変異株である *uS3-K212R* では生じなかったことから、Hel2 による uS3 のポリユビキチン化は Mag2 による K212 残基のモノユビキチン化に依存することが示唆された(図 2-15A,B)。

Mag2 によるモノユビキチン化に依存した Hel2 によるポリユビキチン化という連続した多段階反応を再構成するため、*in vitro* ユビキチン化反応を行った。出芽酵母に過剰生産させたのちにアフィニティー精製した Hel2 や大腸菌を用いて発現誘導させた Mag2 を用いて、精製した 80S リボソームと反応させた(図 2-15C)。前述した結果と一致し、Mag2 の単独反応により uS3 はモノユビキチン化された一方で、Hel2 を単独で混合した際には uS3 のユビキチン化反応は起こらなかった。しかしながら、Mag2 と Hel2 を共反応させることで uS3 が効率よくポリユビキチン化された(図 2-15D)。さらに、これらの反応は、基質とする 80S リボソームとして、uS3 の 212 番目のリジン残基をアルギニン残基に置換した *uS3-K212R* リボソームを用いた際には起こらなかった。したがって、Mag2 によりモノユビキチン化された uS3 を基質にして、Hel2 は uS3 の K212 残基にポリユビキチン鎖を伸長することが明らかになった。

さらに、Hel2 が uS3 に伸長するポリユビキチン鎖の連結様式について検討を行うため、反応系に添加するユビキチンとして変異型ユビキチンを用いた。その結果、Mag2 と Hel2 の共反応時に、野生型ユビキチンを用いた反応と比較して K63 型ポリユビキチン鎖を伸長できない K63R ユビキチンを用いると反応効率が顕著に低下した(図 2-15E)。したがって、Hel2 は、Mag2 によりモノユビキチン化された uS3 に対し、K63 型ポリユビキチン鎖を伸長する E4 酵素として機能することが明らかになった。

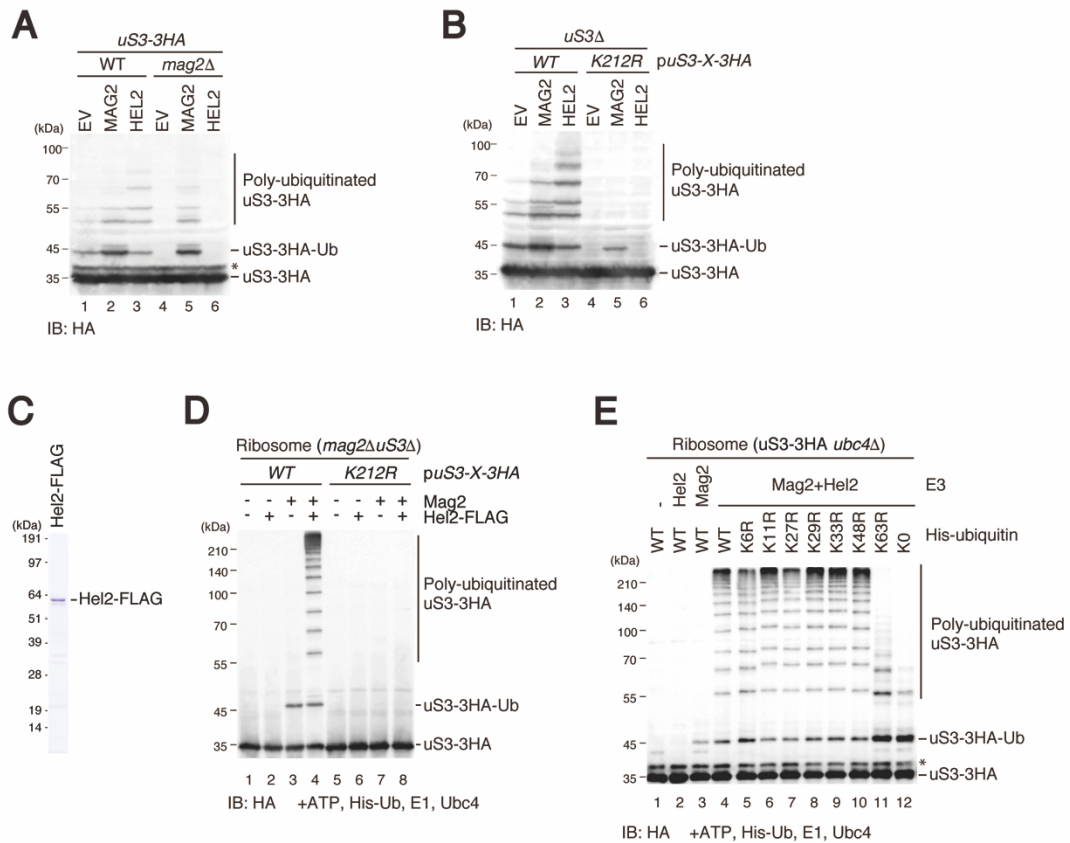


図 2-15. E3 リガーゼ Hel2 は Mag2 によりモノユビキチン化された uS3 を基質にして K63 型ポリユビキチン鎖を形成する

A,B) 各種変異株における Mag2 や Hel2 の過剰発現解析。Hel2 は Mag2 存在下において uS3 の K212 残基にポリユビキチン化を行うことが示唆された。

C) リコンビナント Hel2 タンパク質の精製。Hel2-FLAG を過剰発現させた出芽酵母株から FLAG タグを介して Hel2-FLAG を精製し、CBB 染色により検出した。

D) Mag2 と Hel2 を用いた *In vitro* ユビキチン化反応。*mag2ΔuS3ΔpuS3-3HA* もしくは *puS3-K212R-3HA* 酵母株から精製した 80S リボソームを基質とし、ユビキチン化反応に必須な ATP、ユビキチン、E1、E2(Ubc4)、E3(Mag2、Hel2)を反応させた。反応産物を抗 HA 抗体によるウエスタンブロットにより検出し、uS3 のユビキチン化レベルを評価した。Hel2 は Mag2 によりモノユビキチン化された uS3 の K212 残基に対しポリユビキチン鎖を伸長することを示した。

E) Mag2 と Hel2 を用いた *In vitro* ユビキチン化反応。*ubc4ΔuS3-3HA* 酵母株から精製した 80S リボソームを基質とし、ユビキチン化反応に必須な ATP、ユビキチン変異体、E1、E2(Ubc4)、E3(Mag2、Hel2)を反応させた。反応産物を抗 HA 抗体によるウエスタンブロットにより検出し、uS3 のユビキチン化レベルを評価した。Hel2 は Mag2 によりモノユビキチン化された uS3 の K212 残基に対し K63型ポリユビキチン鎖を伸長することを示した。

2-3-5. E3 ユビキチンリガーゼ Rsp5 は Hel2 と同様にかつ相加的に 18S NRD に 関与する

以上の結果から、uS3 は Mag2 によるモノユビキチン化、それに依存した Hel2 によるポリユビキチン化を受けることが明らかになった。しかしながら、変異型 A1492C-18S rRNA の分解系である 18S NRD において、Mag2 は必須である一方で、Hel2 はその欠損により非常に弱い表現型を示すことから部分的に関与すると考えられていた。そのため、Hel2 と相加的に機能する未同定の E3 リガーゼが存在すると想定し、必須遺伝子に焦点を当て、解析を進めた。

その結果、先行研究において、リボソームに作用し、多様なタンパク質に K63 型ポリユビキチン鎖を形成する報告例のある Rsp5 に着目した(Kwapisz *et al.*, 2005; Kraft and Peter, 2008; Shcherbik and Pestov, 2011)。必須遺伝子の発現抑制酵母株の構築のため、DAmP (Decreased Abundance by mRNA Perturbation) 法と呼ばれるゲノム編集技術を用いた。DAmP 法では、標的遺伝子の終止コドンの直後に薬剤耐性遺伝子を相同組換えによって挿入し、相対的に 3'UTR の長さを延長させることで、NMD を介した標的 mRNA の分解を誘導し、必須遺伝子の発現量を低下させる。

18S NRD の惹起に E3 リガーゼ Rsp5 が関与するのか、を検討するため、rRNA の半減期測定を行った。変異型 A1492C-18S rRNA は、野生株において迅速に分解を受けていた($t_{1/2}=0.6\text{hrs}$)一方で、発現抑制株である *rsp5-DAmP* においては著しく安定化した($t_{1/2}=2.8\text{hrs}$)。さらに、前述した結果より、*hel2Δ*において変異型 A1492C-18S rRNA が若干安定化していた($t_{1/2}=1.3\text{hrs}$)が、二重変異株である *hel2Δrsp5-DAmP* においては劇的に安定化しており ($t_{1/2}>4\text{hrs}$)、*mag2Δ*や *uS3-K212R* 変異株と同様にその分解が完全に抑えられた(図 2-16A)。したがって、Hel2 と Rsp5 は 18S NRD において独立に関与し、相加的に機能することが明らかになった。

次に、uS3 のユビキチン化に対する Rsp5 の関与について検討を行うため、それぞれの因子の過剰発現下における uS3 のユビキチン化レベルについて解析した。その結果、Rsp5 の過剰発現によって uS3 のポリユビキチン化が亢進しており、これは *mag2Δ* において起こらなかったことから、Rsp5 は Mag2 依存に uS3 をポリユビキチン化することが示唆された(図 2-16B)。この表現型は、uS3 のユビキチン化における Hel2 の機能と酷似しており、18S NRD の惹起において Rsp5 が Hel2 と相加的に機能することと一致する。

最後に、これまでに 18S NRD に関与することで同定した 3 つの E3 リガーゼについて、各変異株において MS2 配列を介した機能不全リボソームの特異的精製を行うことで、18S NRD における uS3 のユビキチン化との関連性を検討した。野生株において、機能不全リボソーム中の uS3 は非常に効率よくユビキチン化を受けていたが、*mag2Δ* においては、uS3 のモノユビキチン化のみならずポリユビキチン化も完全に消失した。この結果は、Mag2 による uS3 のモノユビキチン化が、ポリユビキチン鎖の形成にも必須であることを示している。一方で、*hel2Δ* においては、uS3 のユビキチン化レベルにほぼ変化がなかったが、Rsp5 の発現抑制株である *rsp5-DAmP* においては、uS3 のポリユビキチン化が顕著に減少しており、Rsp5 が機能不全リボソーム中の uS3 に対しポリユビキチン化を行うことが明らかになった(図 2-16C)。

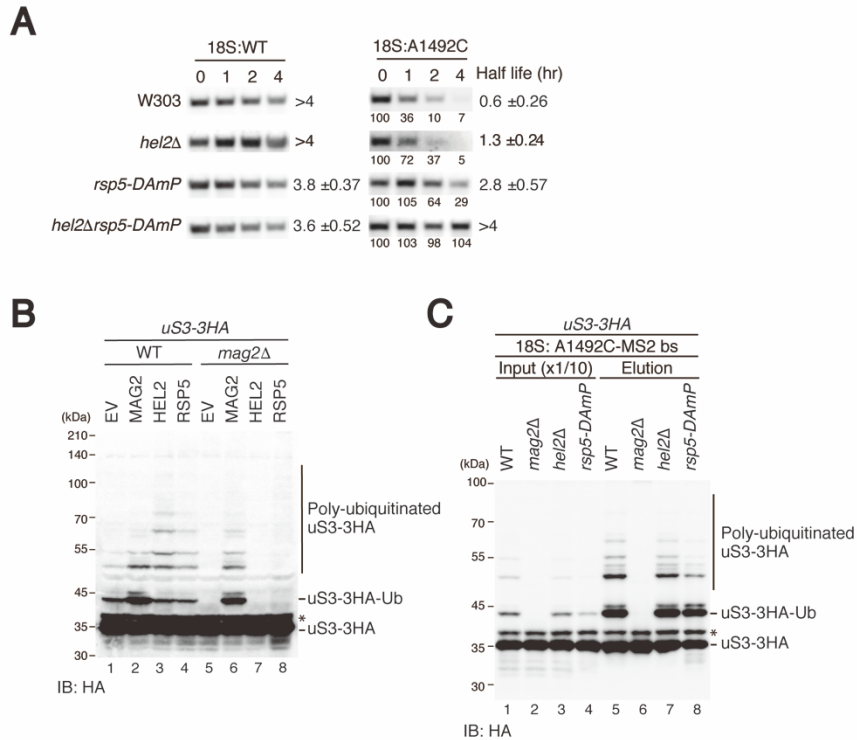


図 2-16. E3 リガーゼ Rsp5 は 18S NRD において Hel2 と独立に、かつ相加的に機能する

A) *rsp5-DAmP* における変異型 A1492C-18S rRNA の半減期測定。

hel2Δrsp5-DAmP においては、18S NRD が完全に阻害された。

B) 各種変異株における Mag2 や Hel2、Rsp5 の過剰発現解析。Rsp5 は Hel2 と同様に Mag2 存在下において uS3 にポリユビキチン化を行うことが示唆された。

C) *rsp5-DAmP* における MS2-TRAP により精製された 80S リボソーム中の uS3 のユビキチン化レベルの比較。変異型 A1492C-18S rRNA を含む機能不全リボソームの uS3 におけるポリユビキチン化の亢進が *rsp5-DAmP* により阻害された。

2-3-6. E3 ユビキチンリガーゼ Hel2 と Rsp5 は、Mag2 によるモノユビキチン化された uS3 を基質として、多段階のポリユビキチン化反応を行う

これまでに、E3 リガーゼ Hel2 は、Mag2 によりモノユビキチン化された uS3 を基質にして、K63 型ポリユビキチン鎖を形成することを明らかにしている。そこで、18S NRD に対して Hel2 と独立かつ相加的に機能することで同定した E3 リガーゼ Rsp5 が、Hel2 と同様の多段階反応により uS3 にポリユビキチン鎖を形成するのか、*in vitro* ユビキチン化反応を用いて解析を行った。

基質として精製した 80S リボソームと、ユビキチン化反応に必須な ATP、ユビキチン、E1 酵素、E2 酵素として Ubc4、E3 リガーゼとして Mag2 や Hel2、Rsp5 を様々な組み合わせで反応させた。Hel2 は、出芽酵母に過剰生産させた後にアフニティー精製を行うことで、Mag2 や Rsp5 は、大腸菌で発現誘導させた後にプルダウンを行うことで調整を行った(図 2-17A)。

これまでの結果と一致して、Mag2 の単独反応では uS3 がモノユビキチン化され、Hel2 は Mag2 と共反応させることで uS3 をポリユビキチン化した。また、Hel2 の単独反応では uS3 にユビキチン化が起こらなかった一方で、Rsp5 の単独反応では uS3 がポリユビキチン化された。そこで、Rsp5 と Mag2 を共反応させたところ、Rsp5 の単独反応時と比較して、新たな uS3 のポリユビキチン化が検出できたため、ウェスタンブロットにおける反応産物の泳動度の違いから、ユビキチン鎖の帰属を行なった(図 2-17B)。Mag2 と Rsp5 の共反応時に検出できた 2 つのユビキチン鎖のうち、相対的に大きなバンドである Upper-Ub は、Mag2 と Hel2 の共反応時に形成されたユビキチン鎖と同じパターンである一方で、相対的に小さなバンドである Lower-Ub は、Rsp5 の単独反応時に形成されたユビキチン鎖と同じ泳動パターンを示した。したがって、Upper-Ub は Mag2 によるモノユビキチン化に依存したポリユビキチン鎖、Lower-Ub は Mag2 に非依存のポリユビキチン鎖であることが明らかになった。

Hel2 は uS3 の K212 残基に対して、Mag2 によるモノユビキチン化依存にポリユビキチン鎖を形成する。前述したポリユビキチン鎖の泳動度の違いが、ユビキチン化部位の差異により生じていると想定し、反応の基質として uS3 の K212 残基にユビキチン化が入らない *uS3-K212R* リボソームを用いて検討を行った。その結果、*uS3-K212R* リボソームを基質とした反応では、Rsp5 の単独反応時に形成される Mag2 に非依存の Lower Ub のみが検出できた一方で、Mag2 の単独反応時に形成される uS3 のモノユビキチン化や Mag2 と Hel2 もしくは Rsp5 の共反応時に形成される Mag2 に依存の Upper Ub は検出できなかった(図 2-17C)。したがって、Mag2 による uS3 のモノユビキチン化、Upper Ub として帰属される Mag2 によるモノユビキチン化に依存した Hel2 や Rsp5 による uS3 のポリユビキチン化は uS3 の K212 残基に生じていることが明らかになった。さらに、Lower Ub として帰属される Mag2 に非依存の Rsp5 による uS3 のポリユビキチン化は uS3 の K212 残基以外の部位に生じていることが明らかになった。

これまでの解析結果から、uS3 の K212 残基における Mag2 によるモノユビキチン化に依存した Hel2 や Rsp5 によるポリユビキチン化 (Upper Ub) は、18S NRD に必須であることは明らかである。そこで、uS3 の K212 残基以外に生じる Mag2 に非依存の Rsp5 によるポリユビキチン化 (Lower Ub) が、18S NRD に関与するのか、検討を行った。まず、Lower Ub が生じるユビキチン化部位を同定するため、翻訳後修飾を受けると報告のある uS3 の C 末端テイルに着目した。Rsp5 の単独反応の結果、野生型リボソームや *uS3-K212R* リボソームではポリユビキチン鎖が形成された一方で、C 末端テイル(212-240 アミノ酸)を欠損させた *uS3-N(1-211)* リボソームを基質にした場合には反応が起こらなかった(図 2-17D)。したがって、Mag2 に非依存の Rsp5 によるポリユビキチン化 (Lower Ub) は、uS3 の C 末端テイルのうち、K212 残基以外の部位に生じていることが示唆された。C 末端テイルに含まれ、ユビキチン化の標的となりうるリジン残基は、K212 残

基と K223 残基のみであることから、uS3 の K223 残基に着目して解析を進めた。Rsp5 の単独反応の結果、野生型リボソームや *uS3-K212R* リボソームではポリユビキチン鎖が形成された一方で、uS3 の K223 残基にユビキチン化が入らない *uS3-K223R* リボソームや *uS3-K212/223R* リボソームを基質にした場合には反応が起こらなかった(図 2-17E)。したがって、Lower Ub として帰属された Mag2 に非依存の Rsp5 によるポリユビキチン化は、K223 残基に生じていることが明らかになった。さらに、野生型リボソームに対する Mag2 と Rsp5 の共反応時に形成されていた Upper Ub および Lower Ub の 2 パターンのポリユビキチン鎖のうち、*uS3-K212R* リボソームでは Mag2 に依存した Upper Ub が消失、*uS3-K223R* リボソームでは Mag2 に非依存の Lower Ub が消失、*uS3-K212/223R* リボソームでは Upper Ub および Lower Ub の両方が消失した。

以上の結果から、少なくとも本研究で行った *in vitro* ユビキチン化反応中では、uS3 の K212 残基における Mag2 によるモノユビキチン化に依存した Hel2 や Rsp5 によるポリユビキチン化 (Upper Ub) と K223 残基における Mag2 に非依存の Rsp5 によるポリユビキチン化 (Lower Ub) が生じていることが明らかになった。

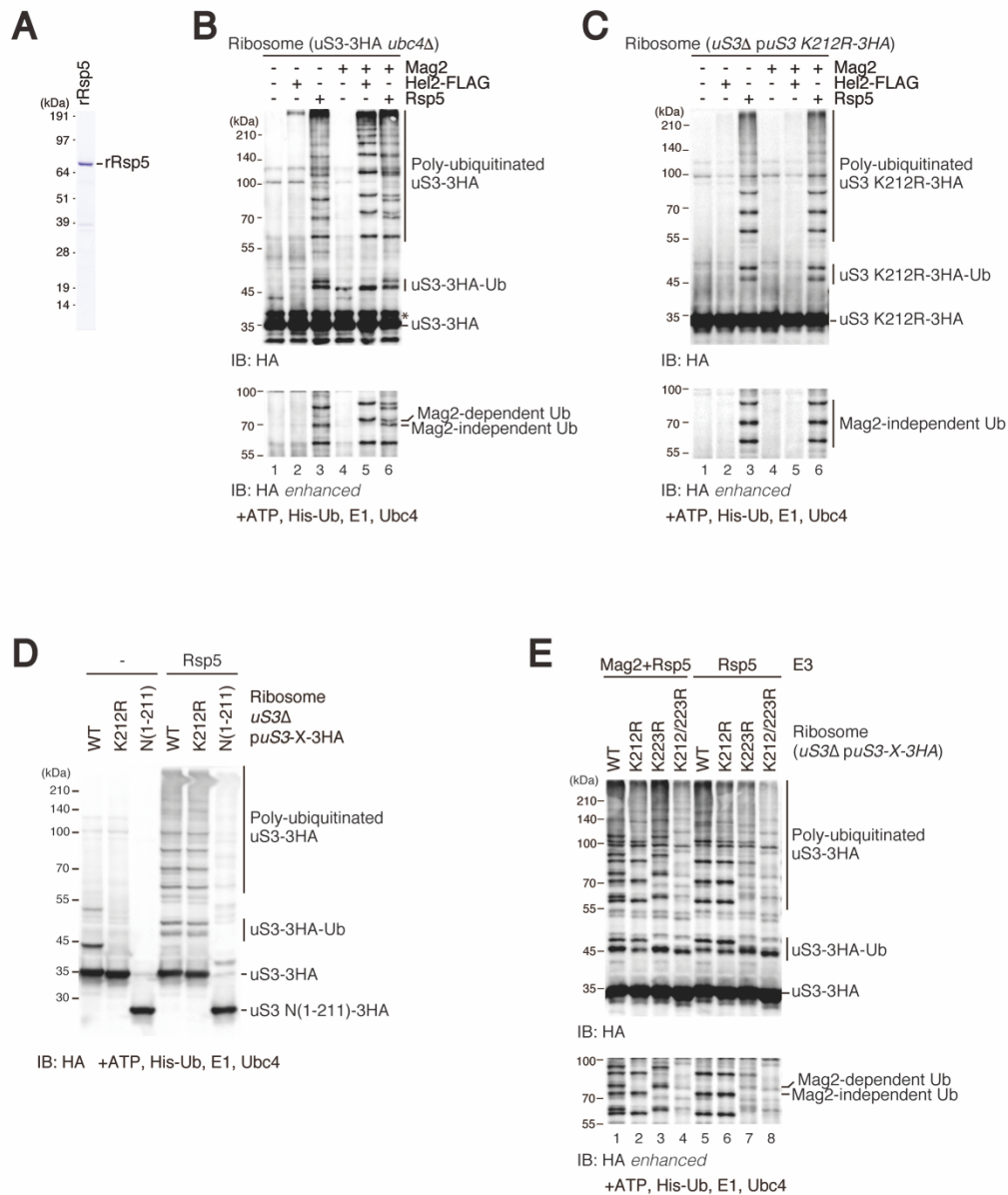


図 2-17. E3 リガーゼ Hel2、Rsp5 は Mag2 によりモノユビキチン化された uS3 を基質にしてポリユビキチン鎖を形成する

A) リコンビナント Rsp5 タンパク質の精製。大腸菌株 Rosetta-gami2(DE3)において発現誘導した Rsp5 を精製し、CBB 染色により検出した。

B) Mag2 と Hel2、Rsp5 を用いた *In vitro* ユビキチン化反応。*ubc4ΔuS3-3HA* 酵母株から精製した 80S リボソームを基質とし、ユビキチン化反応に必須な ATP、ユビキチン、E1、

E2(Ubc4)、E3(Mag2、Hel2、Rsp5)を反応させた。反応産物を抗 HA 抗体によるウエスタンブロットにより検出し、uS3 のユビキチン化レベルを評価した。Hel2、Rsp5 は Mag2 によりモノユビキチン化された uS3 に対しポリユビキチン鎖を伸長することを示した一方で、Rsp5 は Mag2 非依存にもポリユビキチン鎖を伸長した。

C) Mag2 と Hel2、Rsp5 を用いた *In vitro* ユビキチン化反応。uS3 Δ uS3-K212R-3HA 酵母株から精製した 80S リボソームを基質とし、ユビキチン化反応に必須な ATP、ユビキチン、E1、E2(Ubc4)、E3(Mag2、Hel2、Rsp5)を反応させた。反応産物を抗 HA 抗体によるウエスタンブロットにより検出し、uS3 のユビキチン化レベルを評価した。Hel2 や Rsp5 による Mag2 依存のポリユビキチン化は uS3 の K212 残基に生じていた一方で、Rsp5 による Mag2 非依存のポリユビキチン化は K212 残基以外の部位に生じていることが明らかになった。

D) Rsp5 を用いた *In vitro* ユビキチン化反応。uS3 Δ uS3-WT-3HA、uS3 Δ uS3-K212R-3HA、uS3 Δ uS3-N(1-211)-3HA 酵母株から精製した 80S リボソームを基質とし、ユビキチン化反応に必須な ATP、ユビキチン、E1、E2(Ubc4)、E3(Rsp5)を反応させた。反応産物を抗 HA 抗体によるウエスタンブロットにより検出し、uS3 のユビキチン化レベルを評価した。Rsp5 による Mag2 非依存のポリユビキチン化は K212 残基以外の C 末端テイルに生じていることが明らかになった。

E) Mag2 と Rsp5 を用いた *In vitro* ユビキチン化反応。uS3 Δ uS3-WT-3HA、uS3 Δ uS3-K212R-3HA、uS3 Δ uS3-K223R-HA、uS3 Δ uS3-K212/223R-3HA 酵母株から精製した 80S リボソームを基質とし、ユビキチン化反応に必須な ATP、ユビキチン、E1、E2(Ubc4)、E3(Mag2、Rsp5)を反応させた。反応産物を抗 HA 抗体によるウエスタンブロットにより検出し、uS3 のユビキチン化レベルを評価した。Rsp5 による Mag2 非依存のポリユビキチン化は K223 残基に生じていることが明らかになった。

次に、Lower Ub として帰属した uS3 の K223 残基における Mag2 に非依存の Rsp5 によるポリユビキチン化が、18S NRD に関与するのか、を検討するため rRNA の半減期測定を行った。その結果、uS3 の K223 残基にユビキチン化が入らない *uS3-K223R* 変異株においても、変異型 A1492C-18S rRNA は迅速に分解されていた(図 2-18A)。したがって、uS3 の K223 残基におけるユビキチン化は、18S NRD に関与しないことが明らかになった。以上の結果から、uS3 の K212 残基における Mag2 によるモノユビキチン化に依存した Hel2 や Rsp5 によるポリユビキチン化が、18S NRD に必須であることを明らかにした。

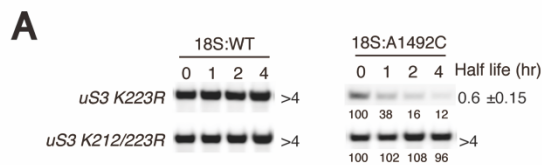


図 2-18. Rsp5 が Mag2 非依存に行う uS3-K223 残基におけるポリユビキチン化は 18S NRD に関与しない

A) *uS3-K223R* もしくは *uS3-K212/223R* における変異型 A1492C-18S rRNA の半減期測定。*uS3-K223R* 変異株においては、変異型 18S rRNA は迅速に分解された。

最後に、18S NRD の惹起に必須なユビキチン鎖の連結様式の同定を試みた。これまでの複数の解析結果により、uS3 に入るポリユビキチン鎖は K63 型であることが示唆されていたため、*In vitro* ユビキチン化反応に添加するユビキチンとして、K63 型ポリユビキチン鎖のみを伸長できる K63(1)ユビキチン変異体を用いて解析を進めた。その結果、uS3 の K212 残基における Mag2 によるモノユビキチン化に依存した Hel2 や Rsp5 によるポリユビキチン化 (Upper Ub) や、K223 残基における Mag2 に非依存の Rsp5 によるポリユビキチン化 (Lower Ub) のいずれについても、野生型ユビキチンを用いた反応と同様に、K63(1)ユビキチン変異体を用いても伸長していたことから、いずれのユビキチン鎖も K63 型ポリユビキチン鎖であることが示唆された(図 2-19A)。

次に、解析の解像度を上げるために、uS3 の K223 残基にユビキチン化が生じない *uS3-K223R* リボソームを基質として用い、18S NRD の惹起に必須である uS3 の K212 残基におけるユビキチン化反応のみをモニターした。その結果、前述した結果と一致して、Mag2 によるモノユビキチン化に依存したポリユビキチン鎖は、野生型ユビキチンを用いた反応と同様に、K63(1)ユビキチン変異体を用いても伸長していたことから、Hel2 や Rsp5 はモノユビキチン化された uS3 に対し、K63 型ポリユビキチン鎖を伸長する E4 酵素として機能することが示された(図 2-19B)。

したがって、18S NRD の惹起では、Mag2 によりモノユビキチン化された uS3 の K212 残基を基質にして、Hel2 や Rsp5 が K63 型ポリユビキチン鎖を形成することが、必須であることを明らかにした(図 2-19C)。

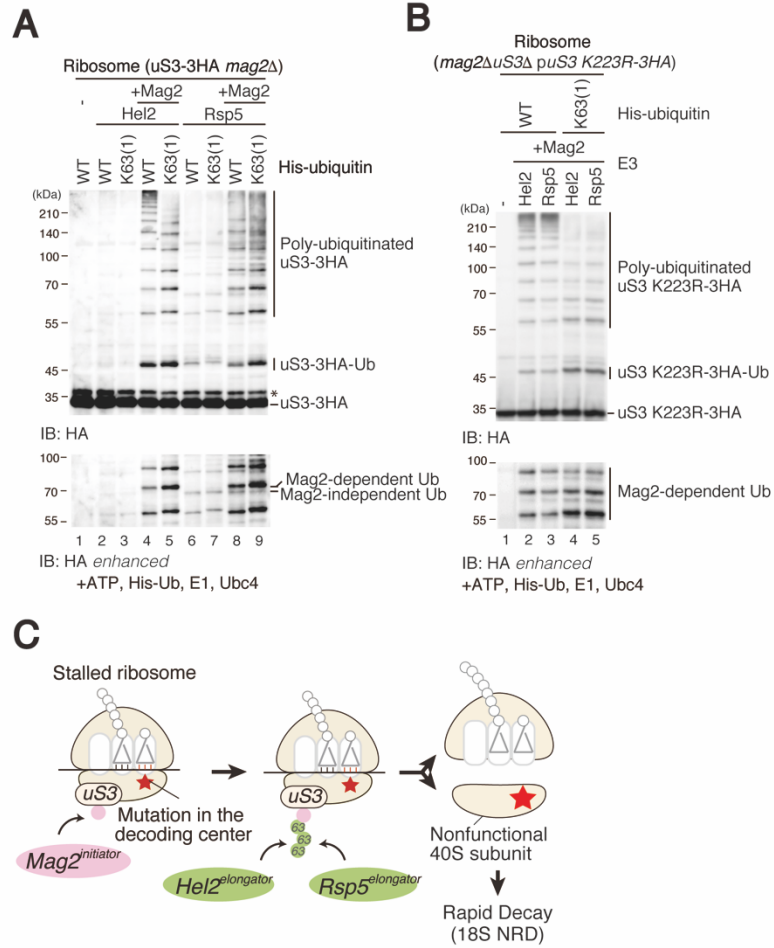


図 2-19. E3 リガーゼ Hel2、Rsp5 は Mag2 によりモノユビキチン化された uS3 を基質にして K63 型ポリユビキチン鎖を形成する

A) Mag2 と Hel2、Rsp5 を用いた *In vitro* ユビキチン化反応。*mag2ΔuS3-3HA* 酵母株から精製した 80S リボソームを基質とし、ユビキチン化反応に必須な ATP、ユビキチン変異体、E1、E2(Ubc4)、E3(Mag2、Hel2、Rsp5)を反応させた。反応産物を抗 HA 抗体によるウエスタンブロットにより検出し、uS3 のユビキチン化レベルを評価した。Hel2、Rsp5 は Mag2 によりモノユビキチン化された uS3 に対し K63 型ポリユビキチン鎖を伸長することを示した。

B) Mag2 と Hel2、Rsp5 を用いた *In vitro* ユビキチン化反応。

mag2ΔuS3ΔuS3-K223R-3HA 酵母株から精製した 80S リボソームを基質とし、ユビキチン化反応に必須な ATP、ユビキチン変異体、E1、E2(Ubc4)、E3(Mag2、Hel2、Rsp5)を反応させた。反応産物を抗 HA 抗体によるウエスタンブロットにより検出し、uS3 のユビキチン化レベルを評価した。Hel2、Rsp5 は Mag2 によりモノユビキチン化された uS3 の K212 残基に対し K63 型ポリユビキチン鎖を伸長することを示した。

C) 提唱された多段階ユビキチン化反応モデル。翻訳不全を引き起こした機能不全リボソームは、Mag2 によるモノユビキチン化を受けたのち、Hel2 や Rsp5 により K63 型ポリユビキチン化を受ける。翻訳に必要な不可欠なリボソームの選択的な分解は、厳密な制御下で惹起されることを示している。

2-3-7. リボソームタンパク質 Asc1 は uS3 の効率的なユビキチン化に関与する

先行研究において、18S NRD に関与することで報告されているリボソームタンパク質 Asc1 や mRNA 品質管理因子 Dom34 について、18S NRD における uS3 のユビキチン化やサブユニット解離への影響を検討した(Cole *et al.*, 2009; Limoncelli, Merrih and Moore, 2017)。実際に、当研究室 市村や池内が行った変異型 A1492C-18S rRNA の半減期測定の結果、野生株 ($t_{1/2}=0.5\text{hrs}$) と比較して、*asc1* Δ ($t_{1/2}=2.44\text{hrs}$) や *dom34* Δ ($t_{1/2}=2.96\text{hrs}$) において半減期が延長し、安定化していたことから、18S NRD の誘導には、Asc1 や Dom34 が関与することが示された(図 2-20A)。

まず、uS3 のユビキチン化における Asc1 や Dom34 の関与を検討するため、当研究室 李は、それぞれの変異株において、MS2 配列を用いた機能不全リボソームの特異的精製を行うことで、uS3 のユビキチン化レベルを検出した。その結果、野生株と比較して *dom34* Δ では変化がなかったが、*asc1* Δ においては顕著に uS3 のユビキチン化レベルが低下していた(図 2-20B)。リボソームタンパク質 Asc1 はリボソーム上で 18S NRD におけるユビキチン化標的である uS3 に近接しており、様々な反応の足場タンパク質として機能することが報告されていることから、Asc1 は E3 リガーゼ等がリクルートされる足場として関与し、uS3 のユビキチン化の効率に影響するのではないかと考えた。そのため、ASC1 の存在下もしくは非存在下から 80S リボソームを調整し、これらを基質とした *in vitro* ユビキチン化反応を行うことで、Mag2 によるユビキチン化の濃度依存性を検討した。その結果、Asc1 を含む 80S リボソームと比較し、Asc1 を含まない 80S リボソームを反応の基質とした際には、Mag2 による uS3 のモノユビキチン化の効率が顕著に低下していた(図 2-20C)。

以上の結果から、Asc1 は、効率的な Mag2 による uS3 のモノユビキチン化に関与することが明らかになった。効率的なモノユビキチン化は、モノユビキチ

ン化に依存した Hel2 や Rsp5 によるポリユビキチン鎖の形成の効率にも影響し
うることから、Asc1 は 18S NRD において効率的なユビキチン鎖の形成を支持す
ることで、18S NRD に寄与していると考えられる。

一方で、元来、Dom34 はノンストップ mRNA の 3'末端で停滞したリボソーム
の解離に必須な因子であり、その解離反応を介して異常ノンストップ mRNA の
分解系である NSD を促進することが報告されている(Tsuboi *et al.*, 2012; Hilal *et*
al., 2016)。そのため、機能不全リボソームの uS3 のユビキチン化レベルに関与
しなかった Dom34 は、uS3 のユビキチン化の下流で、もしくは uS3 のユビキチ
ン化とは独立に、機能不全リボソームの機能する可能性が考えられる。

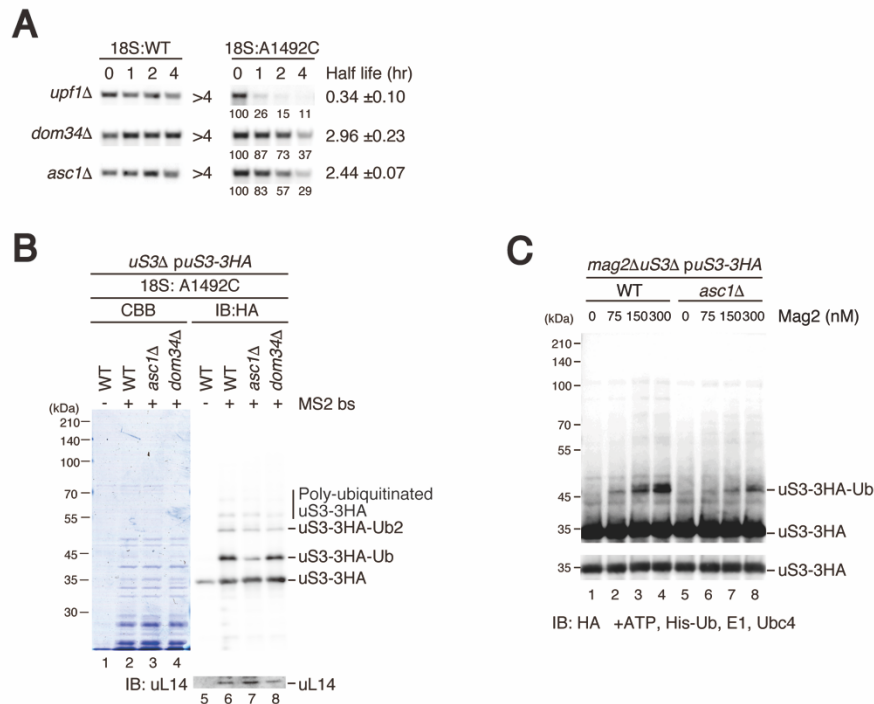


図 2-20. リボソームタンパク質 Asc1 は効率的な uS3 のユビキチン化に関与する

A) *asc1Δ*や *dom34Δ*における変異型 A1492C-18S rRNA の半減期測定。*asc1Δ*や *dom34Δ*においては、18S NRD が抑制された。(当研究室 市村 卒業論文、修士論文、池内 実験データ)

B) *asc1Δ*や *dom34Δ*における MS2-TRAP により精製された 80S リボソーム中の uS3 のユビキチン化レベルの比較。変異型 A1492C-18S rRNA を含む機能不全リボソームの uS3 におけるポリユビキチン化の亢進が *asc1Δ*では抑制された。(当研究室 李 実験データ)

C) Mag2 を用いた *In vitro* ユビキチン化反応。*mag2Δ uS3Δ puS3-WT-3HA* もしくは *mag2Δ asc1Δ uS3Δ puS3-WT-3HA* 酵母株から精製した 80S リボソームを基質とし、ユビキチン化反応に必須な ATP、ユビキチン変異体、E1、E2(Ubc4)、E3(Mag2)を反応させ、uS3 のユビキチン化における Mag2 の濃度依存性を検討した。反応産物を抗 HA 抗体によるウエスタンブロットにより検出し、uS3 のユビキチン化レベルを評価した。

2-4. 考察

2-4-1. 機能不全リボソームはリボソームタンパク質 uS3 の K212 残基においてユビキチン化され、18S NRD により分解誘導される

本研究では、コドン解読を行うリボソームの活性部位である 18S rRNA 上のデコーディングセンターに変異を持つ機能不全リボソームの運命決定機構について解析を行った。デコーディングセンターの活性残基である 18S rRNA の A1492 残基は、コドン-アンチコドンの双方と水素結合を形成することで、正確な塩基対形成をモニターし、自身の構造変化を伴いながら翻訳伸長反応を進める。つまり、活性残基に変異を有する 18S rRNA-A1492C 機能不全リボソームは、デコーディング活性を失い、翻訳伸長不全に陥ると考えられ、また、その変異によって翻訳の正確性が欠損するのみならず、翻訳活性自体が失われ、初めてデコーディング活性を要する翻訳開始時に mRNA 上で停止する、もしくは劇的にその翻訳効率が低下すると想定される。

翻訳伸長阻害を受けたリボソームをハブとする翻訳品質管理機構として RQC が知られる。RQC は、mRNA や合成された新生ペプチド鎖の異常に依存してリボソームが mRNA 上で停止した際に、先頭で停止したリボソームに対し後続のリボソームが衝突することで惹起される。リボソームの衝突センサーとして E3 ユビキチンリガーゼ Hel2 が同定されており、Hel2 は衝突リボソーム中のリボソームタンパク質 uS10 に対し K63 型ポリユビキチン鎖を伸長することで、異常翻訳状態に陥ったリボソームに目印をつけ、RQC を惹起する。ユビキチン化されたリボソームには、その解離を担う RQT 複合体がリクルートされ、リボソームを解離することによって、合成途上のペプチド鎖の分解を誘導する。このように、異常翻訳を引き起こしたリボソームに対し、ユビキチン鎖という目印をつけることで、細胞内に品質管理の必要性を伝達していると考えられる。

変異型 18S rRNA を含む機能不全リボソームについても、前述したように翻訳不全に陥り、mRNA 上で停止する可能性が高いと考えられることから、本研究により、デコーディング活性を失った機能不全リボソームの分解系である 18S NRD には、リボソームタンパク質 uS3 の K212 残基におけるユビキチン化が必須であることを明らかにした。

RQC では、mRNA のコーディング領域において異常停止、衝突したリボソームに目印をつけるため、uS10 をユビキチン化するが、18S NRD においては、翻訳開始時に翻訳活性不全が判明すると想定されることから、開始コドン上で停滞したリボソームに目印をつけるため、uS10 ではなく異なるリボソームタンパク質である uS3 にユビキチン化を行うと考えられる。さらに、RQC の惹起時は、mRNA や新生ペプチド鎖の異常により翻訳停止が起こるため、リボソーム自身は正常であると考えられる。このため、新生ペプチド鎖は RQC により、mRNA は NGD により分解する一方で、リボソームは分解せずにリサイクルすると想定される。一方で、18S NRD の惹起時には、mRNA は正常である一方で、リボソーム自身の活性に異常がある。そのため、mRNA は分解せずに、活性不全に陥ったリボソームのサブユニットを特異的に分解する必要がある。以上のように、同じようなリボソームの停止であっても、品質管理の対象となるリボソームの mRNA 上での存在位置を、リボソームのコンフォメーションや新生ペプチド鎖の有無、P-site tRNA の組成により検知することで、ユビキチン化する標的部位を変化させ、RQC を誘導すべきか、18S NRD を惹起すべきかを細胞は選択していると考えられる。

2-4-2. 18S NRD における uS3 のユビキチン化は複数の E3 リガーゼによる多段階反応であり、それによる K63 型ポリユビキチン鎖の形成が 18S NRD の惹起に必須である

本研究の結果、18S NRD における uS3 のユビキチン化は複数の E3 リガーゼによる特徴的な多段階反応であることが明らかになった(図 2-21)。18S NRD の惹起に必須である uS3 の K212 残基におけるユビキチン化については、Mag2、Hel2、Rsp5 により行われる。rRNA の安定性測定の結果から、変異型 A1492C-18S rRNA の半減期は、野生株で $t_{1/2}=0.4\text{hrs}$ と非常に不安定であった一方で、*mag2Δ* では $t_{1/2}>4\text{hrs}$ と分解が完全に抑えられ非常に安定であった。また、*hel2Δ* では $t_{1/2}=1.3\text{hrs}$ 、*rsp5-DAmP* では $t_{1/2}=2.8\text{hrs}$ と単独変異株では弱い表現型であったが、*hel2Δrsp5-DAmP* では $t_{1/2}>4\text{hrs}$ と著しく安定化した。したがって、Hel2 と Rsp5 は独立に、かつ相加的に機能していると考えられる。また、*in vitro* ユビキチン化反応の結果から、Hel2 と Rsp5 は Mag2 によりモノユビキチン化された uS3 を基質にして、K63 型ポリユビキチン鎖を伸長する E4 酵素であることを示した。以上の結果から、18S NRD における uS3 のユビキチン化反応は 2 段階であり、1 段階目の Mag2 によるモノユビキチン化によって活性異常を示す機能不全リボソームに対し目星をつけ分解対象の候補として選別したのち、2 段階目の Hel2 や Rsp5 による K63 型ポリユビキチン化によって分解対象としての正式な目印がつけられ、18S NRD を介して分解誘導されると考えられる。このモデルは、MS2 配列を用いた機能不全リボソームの特異的精製の結果とも一致しており、野生型リボソームと比較して、機能不全リボソームにおいてはモノユビキチン化のみならず、特にポリユビキチン化が顕著に亢進していた。

先行研究において、Rsp5 は栄養飢餓時に正常なリボソームを分解する Ribophagy に関与することが示唆されているほか(Kraft and Peter, 2008)、豊富な栄養培地中でもオートファジー非依存にリボソームを分解誘導する(Shcherbik and Pestov, 2011)ことが報告されている。豊富な栄養条件における細胞は、代謝活性も高く、細胞内の RNase により無差別に損傷を受けた rRNA や noncoding RNA を迅速に分解する活性を有しているために(Deutscher, 2003)、このように僅かで

も損傷を受けたリボソームを除去し、無傷のリボソームのみを選択的に細胞内に維持する。このプロセスに Rsp5 が関与すると示唆されている。この分子メカニズムについては、不明な点が多数残されているが、実際に *RSP5* の温度感受性変異株においては、無差別に rRNA が断片化し、特に翻訳伸長中のリボソームを示す polysome 量が減少していることから、Rsp5 は翻訳伸長段階に移行した後のリボソームを崩壊させることが報告されている(Shcherbik and Pestov, 2011)。本研究においても、コントロールと比較して *rsp5-DAmP* 変異株では、野生型 18S rRNA の半減期が若干不安定化していることが検出されている。このようにして、Rsp5 は正常なりボソームであったとしても、細胞内の RNase 等により何らかの損傷を受けた rRNA を迅速に除去し、細胞内のリボソームの品質を高く維持する機能を有すると考えられ、翻訳活性不全を有する変異型 A1492C-18S rRNA の分解に関与することとも一致する。Rsp5 は先行研究において polysome 中のリボソームを崩壊させ、それぞれのサブユニット中の rRNA を断片化させていることから、翻訳伸長中に異常を生じたリボソームに対しアクセスし、分解誘導していると考えられる。また、Hel2 は、翻訳伸長阻害により異常停止、衝突したリボソームに対しリクルートされ、RQC を惹起することから、翻訳伸長中のリボソームに対してアクセスすることは明らかである。以上のことから、Hel2 や Rsp5 は何らかの形で翻訳開始過程から翻訳伸長過程に移行してしまった機能不全リボソームに対して作用し、uS3 のポリユビキチン化を介してリボソームの品質管理を行う最後の砦として機能すると考えられる。

以上の結果をあわせ、開始コドン上で翻訳不全に陥った機能不全リボソームは、Mag2 によりその uS3 がモノユビキチン化され、翻訳異常を示すリボソームの候補として選別された後、何らかの要因で、翻訳伸長過程に移行した機能不全リボソームに対して、Hel2 や Rsp5 がそれらを認識し、uS3 を K63 型ポリユビキチン化することで、18S NRD を促進すると考えられる。しかしながら、これ

らの基質特異性の詳細については未解明な点が多く残されており、今後の研究が期待されている。

さらに、前述したように、Rsp5 は野生型リボソームの僅かな損傷等を検知して分解へと導くことが報告されている。本研究で検出された uS3 のユビキチン化は、野生型 18S rRNA を含むリボソームにおいても僅かながら生じていることから、これにも何らかの意義があると考えられる。哺乳類細胞では、UV 照射やアミノ酸飢餓等のストレス条件において、uS3 のモノユビキチン化が細胞生存率に関与することが報告されており (Higgins *et al.*, 2015; Jung *et al.*, 2017)、野生型リボソームであっても何らかの損傷やストレスを受けた際には、uS3 のユビキチン化がその下流の反応に重要であると考えられる。これらを踏まえると、18S NRD のように迅速な反応が必須な場合に、uS3 はポリユビキチン化され、細胞は即座に応答すると想定される。

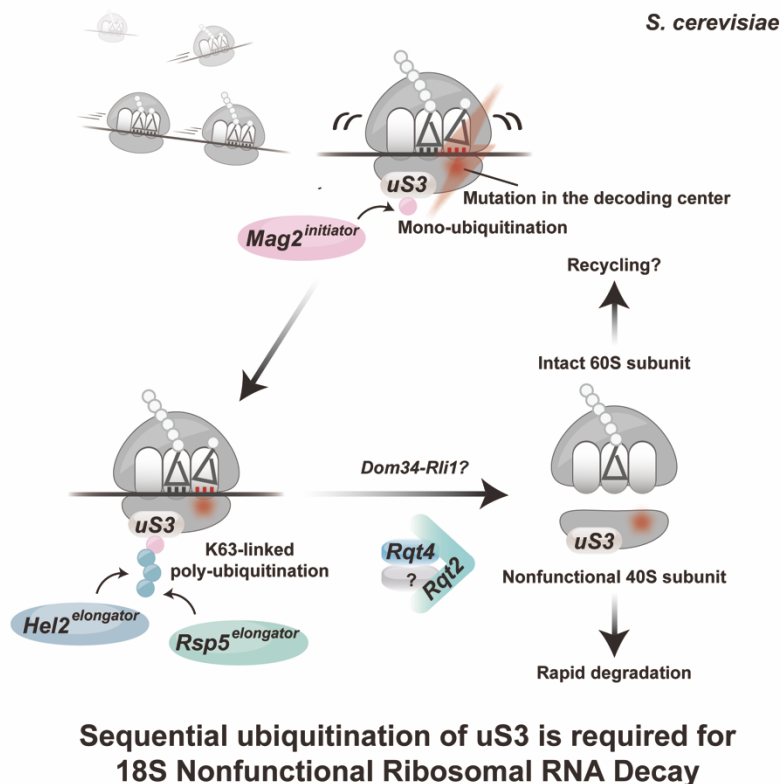


図 2-21. 本研究により提唱された機能不全リボソームの分解系 18S NRD のモデル
デコーディングセンターに変異を有し、翻訳活性不全に陥った機能不全リボソームは、リボソームタンパク質 uS3 の K212 残基において複数の E3 リガーゼによる多段階ユビキチン化反応を受け、K63 型ポリユビキチン鎖を形成する。これを引き金にして、機能不全リボソームがサブユニット解離されることで、変異を有する 40S サブユニット中の 18S rRNA の選択的な分解が可能になっている。

2-4-3. 機能不全リボソームはuS3のユビキチン化依存的にサブユニット解離し、40S サブユニット中の変異型 18S rRNA の選択的な分解を可能にする

18S NRD では、変異を持つ 40S サブユニット中の 18S rRNA のみが分解を受け、その会合パートナーであり正常な 60S サブユニット中の 25S rRNA は非常に安定である(LaRiviere *et al.*, 2006)。翻訳活性不全を示す機能不全リボソームは、80S リボソームにまでアセンブリされた後に分解を受けることから、そのサブユニット解離が必須であると考えられる。

当研究室では、ショ糖密度勾配遠心法とノーザンブロット法を用いて機能不全リボソームのチェイス実験を行うことで、uS3 の K212 残基におけるユビキチン化が機能不全リボソームのサブユニット解離に必須であることを明らかにしている(Sugiyama *et al.*, 2019)。したがって、uS3 のユビキチン化に依存して機能不全リボソームが解離するためには、ユビキチン化を認識して何らかのリボソーム解離因子がリクルートされると考えられる。

RQC の誘導過程においては、衝突リボソーム中のリボソームタンパク質 uS10 が Hel2 によって K63 型ポリユビキチン化を受ける。このリボソーム上のユビキチン鎖を目印として、リボソームの解離を担う RQT 複合体がリクルートされ、衝突リボソームが解離し、新生ペプチド鎖の分解の舞台となる 60S RNCs が産生される(Matsuo *et al.*, 2017, 2020; Sitron, Park and Brandman, 2017)。RQT 複合体は、RNA ヘリカーゼ活性を有する Slh1、ユビキチン結合能を有する Cue3、機能未知の Rqt4/Ykr023w から構成される。当研究室では、18S NRD においても、RQC と同様に翻訳不全に陥ったリボソームが、自身の K63 型ポリユビキチン化依存に解離を受けることから、機能不全リボソームの解離反応における RQT 複合体の機能解析を行っている。

18S NRD における RQT 複合体の関与を検討するため、当研究室 市村は、各変異株における変異型 A1492C-18S rRNA の半減期測定を行なった。その結果、

*slh1Δ*において、変異型 rRNA は分解を受けず劇的に安定化していた($t_{1/2}>4\text{hrs}$)。Slh1 は、ATPase 活性を有する RecA ドメインと機能未知の Sec63 ドメインを 2 度繰り返す非常に特徴的なアミノ酸配列により構成されるが、そのうち N 末端側の RecA1 ドメインの K316 残基が、RQC における衝突リボソームの解離活性に必須であることが報告されている(Matsuo *et al.*, 2017, 2020) (図 2-22A)。そこで、*slh1Δ*酵母株に対し、野生型 *SLHI* をプラスミドにより発現させると、*slh1Δ*の表現型は完全に相補され、変異型 18S rRNA は迅速に分解された($t_{1/2}=0.58\text{hrs}$)。その一方で、ATPase 活性に欠損を示す変異型 *SLHI-K316R* をプラスミドにより発現させても、*slh1Δ*の表現型は相補されず、変異型 18S rRNA は分解されず非常に安定であった($t_{1/2}>4\text{hrs}$)。以上の結果から、RQC において衝突リボソームのサブユニット解離を行う RQT 複合体中の Slh1 の ATPase 活性が、18S NRD の誘導に必須であることが明らかになった(図 2-25B)。

また、RQC における RQT 複合体の構成成分である Cue3、Rqt4/Ykr023w についても、同様に解析を行ったところ、*cue3Δ*においては、変異型 rRNA は分解を受けていた($t_{1/2}=0.72\text{hrs}$)が、*rqt4/ykr023wΔ*においては、弱いながらも変異型 rRNA が安定化していた($t_{1/2}=1.73\text{hrs}$) (図 2-22B)。RQC においても、Cue3 や Ykr023w は Slh1 と比較してその欠損株は非常に弱い表現型を示すことを鑑みると、18S NRD に対し Rqt4/Ykr023w は関与しており、Cue3 は関与しない、と考えられる。したがって、18S NRD においては、Slh1 と Rqt4/Ykr023w が関与しており、それらが Cue3 以外のユビキチン結合能を持つ未同定のタンパク質 X と複合体を形成し、機能不全リボソームの解離に機能すると考えられる。RQC においてはリボソームタンパク質 uS10 のユビキチン化、18S NRD においてはリボソームタンパク質 uS3 のユビキチン化が引き金となることから、それぞれのユビキチン鎖に特化した認識分子(ユビキチンデコーダー)が存在し、その違いによって下流に伝達されるシグナルが異なっていると想定される。さらに、当研究室では、ショ

糖密度勾配遠心法を用いた機能不全リボソームのチェイス実験を行うことで、Slh1 の ATPase 活性が機能不全リボソームの解離に必須であることを明らかにしている(図 2-22C) (Sugiyama *et al.*, 2019)。したがって、RQC と 18S NRD においては、ともに RQT 複合体中の Slh1 が有する ATPase 活性によりリボソームのサブユニット解離が誘導されるが、ユビキチン化を受ける標的タンパク質が異なることで、その基質を認識してリクルートされる RQT 複合体中のユビキチン結合タンパク質が異なると推察される。

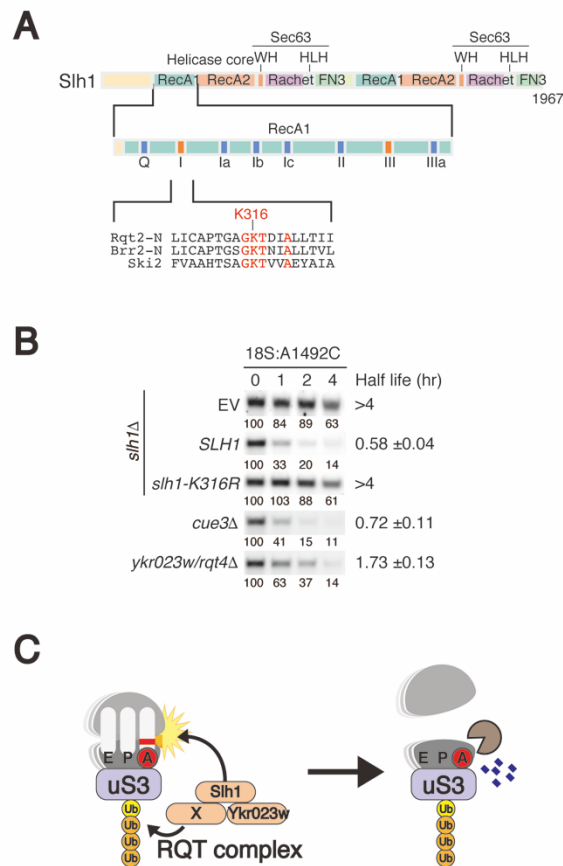


図 2-22. Slh1 の ATPase 活性は 18S NRD の誘導に必須である

A) Slh1 のドメイン構造。Ski2-like RNA helicase ドメインの保存されたモチーフを赤色で示した。

B) RQT 複合体構成因子の変異株における変異型 A1492C-18S rRNA の半減期測定。Slh1 の ATPase 活性の欠損により 18S NRD が完全に阻害された(当研究室 市村 修士論文)。

C) uS3 のユビキチン化と Slh1 の ATPase 活性は機能不全リボソームの解離に必須である。

哺乳類細胞においては、脱ユビキチン化酵素 USP10-RNA 結合タンパク質 G3BP1 複合体が、ユビキチン化された 40S サブユニットのリボソームタンパク質からユビキチン鎖を除去することで、解離後の 40S サブユニットのリソソームによる分解を防ぎ、それを正常な翻訳サイクルへと再利用させることが報告されている(Meyer *et al.*, 2020)。したがって、RQC と 18S NRD の双方の経路において、K63 型ポリユビキチン鎖はリボソームのサブユニット解離に必須である一方で、細胞は、解離後の 40S サブユニットに残された uS10 もしくは uS3 上のユビキチン鎖の除去の有無あるいはそのタイミングに依存して、リボソームサブユニットをリサイクルするか、分解するか、を決定している可能性もある。

さらに、ノンストップ mRNA 等の 3'末端で停滞したリボソームの解離に関与し、NSD に必須である Dom34 についても、18S NRD に関与することを明らかにした。Dom34 は、ノンストップ mRNA の 3'末端で停滞したリボソームの空の A-site に対し結合することが報告されており(Tsuboi *et al.*, 2012; Hilal *et al.*, 2016)、デコーディングセンターの変異により翻訳不全に陥った機能不全リボソームにおいても、リボソームの A-site にアミノアシル tRNA が安定に結合せず、空の A-site が生じる可能性があることから、これに対し選択的に結合すると考えられる。しかしながら、リボソームの解離に関与すると報告のある Slh1 と Dom34 が、18S NRD においてどのように反応基質を選択しているのか、は未解明である。

2-4-4. 多様なリボソーム品質管理とリボソーム病の原因としての翻訳活性不全

翻訳反応を行う巨大 RNA-タンパク質複合体であるリボソームは、遺伝子発現において必須な因子である。その精密さや緻密さを維持するため、リボソームの品質管理は多岐にわたり、厳密にその品質を保証している。

リボソームは、転写後に核内において、アセンブリ以前の 40S や 60S サブユニットの成熟過程には細胞質において、正常なプロセスを経なかった異常リボソームは厳密な品質管理により分解されることが知られている。詳細は割愛するが、核小体から細胞質へ輸送されるまでの間、rRNA は様々なプロセッシングを受けたり、修飾を受けたりすることで成熟型 rRNA が産生される。その後、リボソームサブユニットとしてアセンブルされるために、rRNA を基盤として多数のリボソームタンパク質が組み込まれ、正確なリボソームサブユニットが産生される。もし、核内において異常が生じた場合には、その核外輸送を阻害し、前駆体サブユニットを再編成することで、細胞質への移行を阻害したり、rRNA に対して TRAMP 複合体により poly(A)鎖を付加し、エキソソームによる分解を行ったりすることで、異常産物を除去する。また、リボソームタンパク質が組み込まれるアセンブリ過程では、7つのチェックポイント分子が適宜着脱することで、その成熟過程が正常に行われているかを確認している。このようにして、正常にプロセッシングおよびアセンブリされたリボソームのみが細胞質で機能している。

しかしながら、本研究で着目したデコーディングセンターに変異を有し翻訳活性不全を示す機能不全リボソームは、その成熟過程が正常であるために、80S リボソームにアセンブルされ、mRNA に結合し翻訳を開始するまで、その異常が検知されない。序論で概説したように、デコーディングセンターに変異を有する機能不全リボソームは 18S NRD により、ペプチジルトランスフェラーゼセンターに変異を有する機能不全リボソームは 25S NRD により分解を受ける。ま

た、近年、真核生物のリボソームにのみ拡張された Expansion Segment の変異による翻訳異常についても報告されている。25S rRNA 中の Expansion Segment 7 (ES7L) に変異を持つ変異型リボソームは、翻訳活性こそ有するものの、それによる翻訳によってタンパク質毒性が誘発され、細胞生存率を低下させることが明らかになっている。この変異型 ES7L リボソームは 25S NRD を回避し、TRAP(Translational Relocalization with Aberrant Polypeptides) と呼ばれる経路によって、細胞質中に Foci を形成する。TRAP は、このようにして変異型リボソームを翻訳反応に使用しないように隔離することで、リボソームの品質を維持していると報告されている(Ghosh *et al.*, 2020)。

これらの翻訳活性不全をきたす rRNA の活性残基の変異は、大腸菌や出芽酵母において致死であり、生体の生存にとって必須であることは明らかである(Powers and Noller, 1990, 1993; Yoshizawa, Fourmy and Puglisi, 1999)。一方で、致死にはならないが細胞内に重篤な影響を及ぼすデコーディングセンターの変異が知られている。序論で概説したように、デコーディング活性の厳密さは、A-site の分子スイッチの「かたさ」に依存する。その「かたさ」は、ヒトでは質を重視した正確なタンパク質合成が必要であるために、非常に「かたい」スイッチである一方で、バクテリアでは量を重視した大量のタンパク質合成が必要であるために、「ゆるい」スイッチになっている。ヒト・ミトコンドリア A-site の A1555G 変異は、そのスイッチの「かたさ」を「ゆるく」させ、翻訳の正確性を低下させることで非症候性難聴を発症することが報告されている(Prezant *et al.*, 1993; Hobbie *et al.*, 2008)。この変異は、ミトコンドリアで合成される 13 種類のタンパク質群が全て電子伝達系に関与するために、これらの翻訳の正確性が低下すると、細胞内の ATP 合成に異常をもたらす。これによってスーパーオキシドが大量に産生され、ミトコンドリアが酸化的損傷を受けることで、非症候性難聴を発症するとされている。この他にも、リボソームの成熟過程やそれを構

成するリボソームタンパク質の欠失や変異によってもたらされる疾患は数多く知られており、リボソーム病と呼ばれているが、これらについても特定の mRNA の翻訳不全が直接的な原因となっていることが明らかになっている。今後、多様なリボソームの運命決定機構や特定の mRNA の翻訳抑制機構の詳細が明らかになれば、それらを結びつけることで、リボソームにまつわる疾患の新たな分子基盤が構築されると期待できる。

2-5. 参考文献

- Boultonwood, J. and Pellagatti, A. (2014) 'Reduced translation of GATA1 in Diamond-Blackfan anemia', *Nature Medicine*, 20(7), pp. 703–704. doi: 10.1038/nm.3630.
- Cannone, J. J. *et al.* (2002) 'The Comparative RNA Web (CRW) Site: an online database of comparative sequence and structure information for ribosomal, intron, and other RNAs', *BMC Bioinformatics*, 3(1), p. 2. doi: 10.1186/1471-2105-3-2.
- Chakraborty, A., Uechi, T. and Kenmochi, N. (2011) 'Guarding the "translation apparatus": defective ribosome biogenesis and the p53 signaling pathway', *WIREs RNA*, 2(4), pp. 507–522. doi: 10.1002/wrna.73.
- Cmejlova, J. *et al.* (2006) 'Translational efficiency in patients with Diamond-Blackfan anemia', *Haematologica*, 91(11), pp. 1456–1464.
- Cole, S. E. *et al.* (2009) 'A Convergence of rRNA and mRNA Quality Control Pathways Revealed by Mechanistic Analysis of Nonfunctional rRNA Decay', *Molecular Cell*, 34(4), pp. 440–450. doi: 10.1016/j.molcel.2009.04.017.
- Cole, S. E. and LaRiviere, F. J. (2008) 'Chapter 12 - Analysis of Nonfunctional Ribosomal RNA Decay in *Saccharomyces cerevisiae*', in Maquat, L. E. and Kiledjian, M. (eds) *Methods in Enzymology*. Academic Press (RNA Turnover in Eukaryotes: Analysis of Specialized and Quality Control RNA Decay Pathways), pp. 239–259. doi: 10.1016/S0076-6879(08)02412-9.
- Dai, M.-S. and Lu, H. (2004) 'Inhibition of MDM2-mediated p53 Ubiquitination and Degradation by Ribosomal Protein L5', *Journal of Biological Chemistry*, 279(43), pp. 44475–44482. doi: 10.1074/jbc.M403722200.
- Deutscher, M. P. (2003) 'Degradation of Stable RNA in Bacteria', *Journal of Biological*

Chemistry, 278(46), pp. 45041–45044. doi: 10.1074/jbc.R300031200.

Dinman, J. D. (2016) ‘Pathways to Specialized Ribosomes: The Brussels Lecture’, *Journal of Molecular Biology*, 428(10, Part B), pp. 2186–2194. doi: 10.1016/j.jmb.2015.12.021.

Dixon, J. *et al.* (2006) ‘Tcof1/Treacle is required for neural crest cell formation and proliferation deficiencies that cause craniofacial abnormalities’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(36), pp. 13403–13408. doi: 10.1073/pnas.0603730103.

Draptchinskaia, N. *et al.* (1999) ‘The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia’, *Nature Genetics*, 21(2), pp. 169–175. doi: 10.1038/5951.

Fujii, K. *et al.* (2009) ‘A role for ubiquitin in the clearance of nonfunctional rRNAs’, *Genes & Development*, 23(8), pp. 963–974. doi: 10.1101/gad.1775609.

Fujii, K. *et al.* (2012) ‘40S subunit dissociation and proteasome-dependent RNA degradation in nonfunctional 25S rRNA decay’, *The EMBO Journal*, 31(11), pp. 2579–2589. doi: 10.1038/emboj.2012.85.

Ghosh, A. *et al.* (2020) ‘Proteotoxic stress promotes entrapment of ribosomes and misfolded proteins in a shared cytosolic compartment’, *Nucleic Acids Research*, 48(7), pp. 3888–3905. doi: 10.1093/nar/gkaa068.

Gonzales, B. *et al.* (2005) ‘The Treacher Collins syndrome (TCOF1) gene product is involved in pre-rRNA methylation’, *Human Molecular Genetics*, 14(14), pp. 2035–2043. doi: 10.1093/hmg/ddi208.

Green, R., Samaha, R. R. and Noller, H. F. (1997) ‘Mutations at nucleotides G2251 and U2585 of 23 S rRNA perturb the peptidyl transferase center of the ribosome 1 1 Edited by P. E. Wright’, *Journal of Molecular Biology*, 266(1), pp. 40–50. doi:

10.1006/jmbi.1996.0780.

Guo, H. (2018) ‘Specialized ribosomes and the control of translation’, *Biochemical Society Transactions*, 46(4), pp. 855–869. doi: 10.1042/BST20160426.

Hamajima, R. *et al.* (2013) ‘Degradation of rRNA in BM-N cells from the silkworm *Bombyx mori* during abortive infection with heterologous nucleopolyhedroviruses.’, *The Journal of general virology*. doi: 10.1099/vir.0.053645-0.

Hansen, J. L. *et al.* (2002) ‘Structural insights into peptide bond formation’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(18), pp. 11670–11675. doi: 10.1073/pnas.172404099.

Hayano, T. *et al.* (2003) ‘Proteomic Analysis of Human Nop56p-associated Pre-ribosomal Ribonucleoprotein Complexes POSSIBLE LINK BETWEEN Nop56p AND THE NUCLEOLAR PROTEIN TREACLE RESPONSIBLE FOR TREACHER COLLINS SYNDROME’, *Journal of Biological Chemistry*, 278(36), pp. 34309–34319. doi: 10.1074/jbc.M304304200.

Heiss, N. S. *et al.* (1998) ‘X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions’, *Nature Genetics*, 19(1), pp. 32–38. doi: 10.1038/ng0598-32.

Higgins, R. *et al.* (2015) ‘The Unfolded Protein Response Triggers Site-Specific Regulatory Ubiquitylation of 40S Ribosomal Proteins’, *Molecular Cell*, 59(1), pp. 35–49. doi: 10.1016/j.molcel.2015.04.026.

Hilal, T. *et al.* (2016) ‘Structural insights into ribosomal rescue by Dom34 and Hbs1 at near-atomic resolution’, *Nature Communications*, 7(1), p. 13521. doi: 10.1038/ncomms13521.

Hobbie, S. N. *et al.* (2008) ‘Mitochondrial deafness alleles confer misreading of the genetic code’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(9), pp. 3244–3249.

doi: 10.1073/pnas.0707265105.

Huang, H. *et al.* (2015) 'Bulk RNA degradation by nitrogen starvation-induced autophagy in yeast', *The EMBO Journal*, 34(2), pp. 154–168. doi: 10.15252/embj.201489083.

Iwawaki, T. *et al.* (2001) 'Translational control by the ER transmembrane kinase/ribonuclease IRE1 under ER stress', *Nature Cell Biology*, 3(2), pp. 158–164. doi: 10.1038/35055065.

Jung, Y. *et al.* (2017) 'Modulating cellular balance of Rps3 mono-ubiquitination by both Hel2 E3 ligase and Ubp3 deubiquitinase regulates protein quality control', *Experimental & Molecular Medicine*, 49(11), pp. e390–e390. doi: 10.1038/emm.2017.128.

Khajuria, R. K. *et al.* (2018) 'Ribosome Levels Selectively Regulate Translation and Lineage Commitment in Human Hematopoiesis', *Cell*, 173(1), pp. 90-103.e19. doi: 10.1016/j.cell.2018.02.036.

Knight, S. *et al.* (2001) 'Identification of novel DKC1 mutations in patients with dyskeratosis congenita: implications for pathophysiology and diagnosis', *Human Genetics*, 108(4), pp. 299–303. doi: 10.1007/s004390100494.

Kraft, C. *et al.* (2008) 'Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease', *Nature Cell Biology*, 10(5), pp. 602–610. doi: 10.1038/ncb1723.

Kraft, C. and Peter, M. (2008) 'Is the Rsp5 ubiquitin ligase involved in the regulation of ribophagy?', *Autophagy*, 4(6), pp. 838–840. doi: 10.4161/auto.6603.

Kwapisz, M. *et al.* (2005) 'Rsp5 ubiquitin ligase modulates translation accuracy in yeast *Saccharomyces cerevisiae*', *RNA*, 11(11), pp. 1710–1718. doi: 10.1261/rna.2131605.

Lahtvee, P.-J. *et al.* (2017) 'Absolute Quantification of Protein and mRNA Abundances

Demonstrate Variability in Gene-Specific Translation Efficiency in Yeast', *Cell Systems*, 4(5), pp. 495-504.e5. doi: 10.1016/j.cels.2017.03.003.

LaRiviere, F. J. *et al.* (2006) 'A Late-Acting Quality Control Process for Mature Eukaryotic rRNAs', *Molecular Cell*, 24(4), pp. 619–626. doi: 10.1016/j.molcel.2006.10.008.

Limoncelli, K. A., Merrih, C. N. and Moore, M. J. (2017) 'ASC1 and RPS3: new actors in 18S nonfunctional rRNA decay', *RNA*, 23(12), pp. 1946–1960. doi: 10.1261/rna.061671.117.

Lohrum, M. A. E. *et al.* (2003) 'Regulation of HDM2 activity by the ribosomal protein L11', *Cancer Cell*, 3(6), pp. 577–587. doi: 10.1016/S1535-6108(03)00134-X.

Ludwig, L. S. *et al.* (2014) 'Altered translation of GATA1 in Diamond-Blackfan anemia', *Nature Medicine*, 20(7), pp. 748–753. doi: 10.1038/nm.3557.

Matsuo, Y. *et al.* (2017) 'Ubiquitination of stalled ribosome triggers ribosome-associated quality control', *Nature Communications*, 8(1), p. 159. doi: 10.1038/s41467-017-00188-1.

Matsuo, Y. *et al.* (2020) 'RQT complex dissociates ribosomes collided on endogenous RQC substrate SDD1', *Nature Structural & Molecular Biology*, 27(4), pp. 323–332. doi: 10.1038/s41594-020-0393-9.

Meyer, C. *et al.* (2020) 'The G3BP1-Family-USP10 Deubiquitinase Complex Rescues Ubiquitinated 40S Subunits of Ribosomes Stalled in Translation from Lysosomal Degradation', *Molecular Cell*, 77(6), pp. 1193-1205.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2019.12.024.

Muth, G. W., Ortoleva-Donnelly, L. and Strobel, S. A. (2000) 'A Single Adenosine with a Neutral pKa in the Ribosomal Peptidyl Transferase Center', *Science*, 289(5481), pp. 947–950. doi: 10.1126/science.289.5481.947.

- Narla, A. and Ebert, B. L. (2010) 'Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction', *Blood*, 115(16), pp. 3196–3205. doi: 10.1182/blood-2009-10-178129.
- Nissen, P. *et al.* (2000) 'The Structural Basis of Ribosome Activity in Peptide Bond Synthesis', *Science*, 289(5481), pp. 920–930. doi: 10.1126/science.289.5481.920.
- Ogle, J. M. *et al.* (2001) 'Recognition of Cognate Transfer RNA by the 30S Ribosomal Subunit', *Science*, 292(5518), pp. 897–902. doi: 10.1126/science.1060612.
- Ogle, J. M. (2001) 'Recognition of Cognate Transfer RNA by the 30S Ribosomal Subunit', *Science*, 292(5518), pp. 897–902. doi: 10.1126/science.1060612.
- Ogle, J. M. *et al.* (2002) 'Selection of tRNA by the Ribosome Requires a Transition from an Open to a Closed Form', *Cell*, 111(5), pp. 721–732. doi: 10.1016/S0092-8674(02)01086-3.
- Ossareh-Nazari, B. *et al.* (2014) 'Ubiquitylation by the Ltn1 E3 ligase protects 60S ribosomes from starvation-induced selective autophagy', *The Journal of Cell Biology*, 204(6), pp. 909–917. doi: 10.1083/jcb.201308139.
- Parker, R. and Sheth, U. (2007) 'P Bodies and the Control of mRNA Translation and Degradation', *Molecular Cell*, 25(5), pp. 635–646. doi: 10.1016/j.molcel.2007.02.011.
- Payne, E. M. *et al.* (2012) 'L-leucine improves the anemia and developmental defects associated with Diamond-Blackfan anemia and del(5q) MDS by activating the mTOR pathway', *Blood*, 120(11), pp. 2214–2224. doi: 10.1182/blood-2011-10-382986.
- Pestov, D. G. and Shcherbik, N. (2012) 'Rapid Cytoplasmic Turnover of Yeast Ribosomes in Response to Rapamycin Inhibition of TOR', *Molecular and Cellular Biology*, 32(11), pp. 2135–2144. doi: 10.1128/MCB.06763-11.
- Powers, T. and Noller, H. F. (1990) 'Dominant lethal mutations in a conserved loop in 16S rRNA.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(3), pp. 1042–1046.

Powers, T. and Noller, H. F. (1993) 'Evidence for functional interaction between elongation factor Tu and 16S ribosomal RNA.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(4), pp. 1364–1368.

Prezant, T. R. *et al.* (1993) 'Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic- induced and non-syndromic deafness', *Nature Genetics*, 4(3), pp. 289–294. doi: 10.1038/ng0793-289.

Sakata, T. *et al.* (2015) 'Crt10 directs the cullin-E3 ligase Rtt101 to nonfunctional 25S rRNA decay', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 457(1), pp. 90–94. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.12.072.

Sankaran, V. G. *et al.* (2012) 'Exome sequencing identifies *GATA1* mutations resulting in Diamond-Blackfan anemia', *The Journal of Clinical Investigation*, 122(7), pp. 2439–2443. doi: 10.1172/JCI63597.

Shcherbik, N. and Pestov, D. G. (2011) 'The ubiquitin ligase Rsp5 is required for ribosome stability in *Saccharomyces cerevisiae*', *RNA*, 17(8), pp. 1422–1428. doi: 10.1261/rna.2615311.

Simms, C. L., Yan, L. L. and Zaher, H. S. (2017) 'Ribosome Collision Is Critical for Quality Control during No-Go Decay', *Molecular Cell*, 68(2), pp. 361-373.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2017.08.019.

Sitron, C. S., Park, J. H. and Brandman, O. (2017) 'Asc1, Hel2, and Slh1 couple translation arrest to nascent chain degradation', *RNA*, 23(5), pp. 798–810. doi: 10.1261/rna.060897.117.

Sugiyama, T. *et al.* (2019) 'Sequential Ubiquitination of Ribosomal Protein uS3 Triggers the Degradation of Non-functional 18S rRNA', *Cell Reports*, 26(12), pp. 3400-3415.e7. doi: 10.1016/j.celrep.2019.02.067.

The Treacher Collins Syndrome Collaborative Group *et al.* (1996) 'Positional cloning

of a gene involved in the pathogenesis of Treacher Collins syndrome', *Nature Genetics*, 12(2), pp. 130–136. doi: 10.1038/ng0296-130.

Thompson, D. M. and Parker, R. (2009) 'The RNase Rny1p cleaves tRNAs and promotes cell death during oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*', *Journal of Cell Biology*, 185(1), pp. 43–50. doi: 10.1083/jcb.200811119.

Tsuboi, T. *et al.* (2012) 'Dom34:Hbs1 Plays a General Role in Quality-Control Systems by Dissociation of a Stalled Ribosome at the 3' End of Aberrant mRNA', *Molecular Cell*, 46(4), pp. 518–529. doi: 10.1016/j.molcel.2012.03.013.

Valdez, B. C. *et al.* (2004) 'The Treacher Collins syndrome (TCOF1) gene product is involved in ribosomal DNA gene transcription by interacting with upstream binding factor', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(29), pp. 10709–10714. doi: 10.1073/pnas.0402492101.

Wreschner, D. H. *et al.* (1981) 'Ribosomal RNA cleavage, nuclease activation and 2-5A (ppp(A2'p)nA) in interferon-treated cells', *Nucleic Acids Research*, 9(7), pp. 1571–1581. doi: 10.1093/nar/9.7.1571.

Xue, S. and Barna, M. (2012) 'Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(6), pp. 355–369. doi: 10.1038/nrm3359.

Yoon, A. *et al.* (2006) 'Impaired Control of IRES-Mediated Translation in X-Linked Dyskeratosis Congenita', *Science*, 312(5775), pp. 902–906. doi: 10.1126/science.1123835.

Yoshizawa, S., Fourmy, D. and Puglisi, J. D. (1999) 'Recognition of the Codon-Anticodon Helix by Ribosomal RNA', *Science*, 285(5434), pp. 1722–1725. doi: 10.1126/science.285.5434.1722.

Youngman, E. M. *et al.* (2004) 'The Active Site of the Ribosome Is Composed of Two

Layers of Conserved Nucleotides with Distinct Roles in Peptide Bond Formation and Peptide Release', *Cell*, 117(5), pp. 589–599. doi: 10.1016/S0092-8674(04)00411-8.

市村 淳 卒業論文

市村 淳 修士論文

李 思涵 卒業論文

李 思涵 修士論文

加藤 海輝 卒業論文

加藤 海輝 修士論文

第3章

リボソームタンパク質 eS7 のユビキチン化を介した
コドン至適度依存 mRNA 分解系 **Codon
optimality-dependent mRNA Decay** の解析

3-1. 序論

3-1-1. コドン至適度(Codon optimality)、偏り(Codon bias)、使用頻度(Codon usage)

mRNA は、各アミノ酸をコードするコドンごとに3塩基ずつ翻訳される。コドンは、A(アデニン)、U(ウラシル)、C(シトシン)、G(グアニン)の4つの塩基の並びから構成されているため、 4^3 通りの組み合わせにより、64種のコドンが存在する。この多様なコドンに、20種のアミノ酸と翻訳終結シグナルがコードされている。同じアミノ酸をコードする同義コドンは、一見同じように考えられるが、全く異なる性質を持つことが報告されている。

コドン至適度(Codon optimality)は、「コドン解読のしやすさ」の指標であり、コドンは、それらが同義コドンであっても、「翻訳されるコドンが A-site に存在する際に、細胞がどのくらい効率的に適切なアミノアシル tRNA を、細胞質中の tRNA から選択し運搬できるか」に基づいて、至適コドン(optimal codon)と非至適コドン(non-optimal codon)に分類される(図 3-1A)。このため、コドン至適度は、翻訳反応の効率に直接的に影響を与えうる指標であることから、それぞれの細胞種のゲノムには固有のコドンの偏り(Codon bias)が存在するとされている。大腸菌や出芽酵母、線虫、ショウジョウバエや真核生物に至るまで、コドンの偏りは tRNA の発現量と相関することが報告されており(Ikemura, 1981; Moriyama and Powell, 1997; Duret, 2000; Reis, Savva and Wernisch, 2004; Sabi and Tuller, 2014)、特に、対応する tRNA 量の多いコドンは、その翻訳効率やそれに由来するタンパク質合成量が高いと想定され、実際に高発現の遺伝子に豊富にコードされていることも明らかになっている(Sharp and Li, 1986; Roth, 2012)。このように、コドン至適度は、様々な生物において、翻訳反応に関与する決定的な因子の一つであり、これらの生理学的意義については、現在も様々な議論がある(Gingold and

Pilpel, 2011; Plotkin and Kudla, 2011; Novoa and Ribas de Pouplana, 2012; Quax *et al.*, 2015)。

40 年程前から、タンパク質合成における個々のコドンと翻訳効率の関連性を示す指標として、至適コドンの使用頻度(The frequency of use of optimal codons: (Ikemura, 1981))や同義コドン間での使用頻度の偏り(Codon Bias Index: (Bennetzen and Hall, 1982))、高発現遺伝子におけるコドンの選択性(The codon adaptive index: (Sharp and Li, 1987))やそれぞれのコドンに対する tRNA の使用可能量(tRNA adaptive index: (Reis, Savva and Wernisch, 2004))、といった様々な形で単純化された解析値が提唱されてきた。しかしながら、いずれの場合にも、tRNA 存在量やアミノ酸組成、個々のコドンの翻訳効率等について網羅的かつ正確に評価できた指標は存在していなかった。そして、2013 年に Judith Frydman 研究室から、Normalized Translational Efficiency として、現在も用いられているコドン至適度(Codon optimality)が再定義された(Pechmann and Frydman, 2013)。実際に、至適コドンの翻訳効率は高いこと、その翻訳速度は速いこと、さらに、その翻訳の正確性が高いことが報告されており、一方で、非至適コドンはゆっくりと翻訳されることが示されている(Akashi, 1994; Drummond and Wilke, 2008)。

翻訳反応では、mRNA 上のコドンに対応する特異的な tRNA が、リボソームの A-site にアミノ酸をチャージして運搬し、結合することが必要になる(Petrov *et al.*, 2011)。細胞質中の tRNA の存在量は、tRNA 遺伝子のコピー数に相関しており、細胞ごとに著しく異なるため(Tuller *et al.*, 2010)、tRNA の使用可能量(tRNA adaptive index)は、それぞれの細胞種において翻訳効率を反映する重要な指標として報告されていた(Reis, Savva and Wernisch, 2004)。一方で、2013 年以前に報告されていたコドンに対する翻訳効率の指標は、高発現遺伝子に特化した解析の結果得られた値であることから、全てのゲノムに渡る網羅性は満たしておらず、さらに高発現の遺伝子には至適コドンが豊富に含まれていることから(Zhou,

Weems and Wilke, 2009)、至適コドンに対しバイアスがかかっている可能性があった(Zhou, Weems and Wilke, 2009)。また、翻訳伸長効率は、アミノ酸がチャージされた tRNA の需要量と供給量のバランスによって定義されると考えられるが、使用頻度の高いコドンに対応する tRNA については、翻訳反応においてその需要が増えるために、その供給が追いつかなくなる可能性もあり、tRNA の存在量のみならず、細胞内での mRNA の発現量やそれらを構成するコドンの使用頻度についても併せて検討する必要がある。そのため、Frydman らは、tRNA の需要と供給のバランスについて、ゲノムやそれを構成するコドンの発現プロファイルを含めて再検討したコドン至適度を新たに定義した。そこで、彼らは、mRNA の存在量からコドンの使用頻度(Codon usage)を再算出し、tRNA の使用可能量の指標である tRNA adaptive index(Reis, Savva and Wernisch, 2004)と組み合わせることで、細胞内のコドンと tRNA の相互作用を正規化した。つまり、この定義では、Codon usage により算出されたアミノアシル tRNA の需要量に対し、使用可能な tRNA の供給量が相対的に上回った際に、至適コドンとして定義される(図 3-1B)。

以下では、コドン至適度が関与することで報告のある、翻訳伸長効率や翻訳正確性、タンパク質のフォールディングや mRNA 分解等との関連性について述べる(Hanson and Collier, 2018; Nieuwkoop *et al.*, 2020) (図 3-2A)。

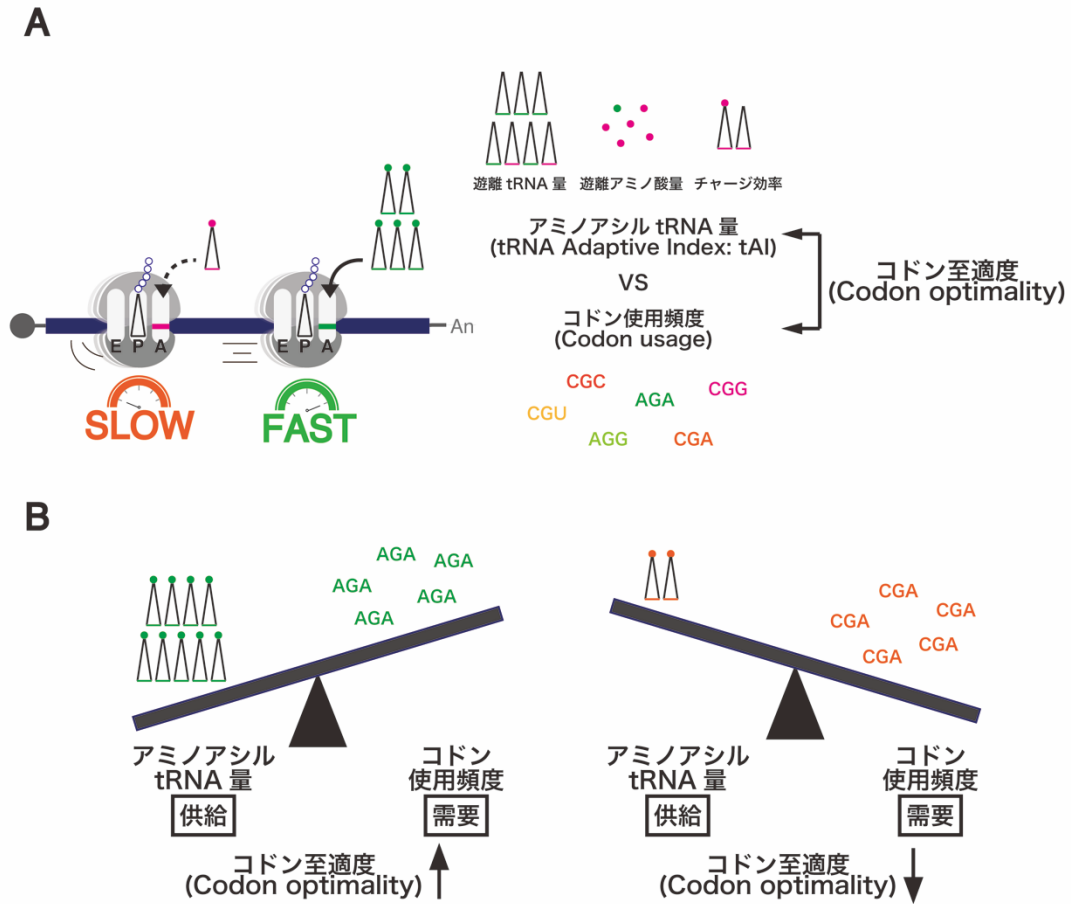


図 3-1. コドン至適度の定義

A) コドン至適度は、細胞質プール中に存在するアミノアシル tRNA の使用可能量と mRNA 上のコドン使用頻度のバランスにより定義される。

B) コドン至適度の定義におけるアミノアシル tRNA の需要と供給の関係。

3-1-2. コドン効果と翻訳伸長反応

前述したように、コドンは翻訳伸長効率に重大な影響を与えることが明らかになっている。1991年に、放射性ラベルをしたアミノ酸の取り込み実験により、コドンが翻訳速度に影響を与えることが報告された(Sørensen and Pedersen, 1991)。また、1コドンあたりの翻訳速度は、対応する tRNA の存在量に依存しており、非至適コドンにおける翻訳速度の遅延は、リボソームの A-site に対応する tRNA が運搬されてくる効率が低下するためであることが示されていた(Koutmou, Radhakrishnan and Green, 2015) (図 3-2A)。現在では、mRNA の翻訳動態を網羅的に検出する手法である Ribosome profiling 法の確立により、トランスクリプトームワイドに、個々の mRNA、さらには個々のコドンレベルにおけるリボソームの占有率を評価することで、mRNA の翻訳効率を定量することが可能になった (Ingolia, 2014)。Ribosome profiling 法では、細胞内のある時点でのスナップショットを撮影するようにして翻訳動態を検出するため、至適コドンの翻訳速度は速く、非至適コドンの翻訳速度は遅いことに基づくと、至適コドンと比較して、非至適コドン上を占有するリボソーム量は相対的に多いことが想定される。これと一致するように、リボソームの A-site に位置する特定のコドンに対するリボソームの相対占有率を算出した複数の報告によると、tRNA の存在量とリボソームの占有率には見事な逆相関が得られている。この結果は、A-site に至適コドンが位置する相対的な時間は短く、逆に非至適コドンが位置する時間は相対的に長いことを示唆しており、それぞれのコドン至適度と翻訳効率の関係を反映していた(Gardin *et al.*, 2014; Lareau *et al.*, 2014; Hussmann *et al.*, 2015; Weinberg *et al.*, 2016) (図 3-2A)。近年では、*in vitro* translation system や real time single molecule imaging 等の新手法の発展によって、コドン至適度と翻訳伸長効率との関連性が明らかにされており、一分子解析の結果によると、至適コドンは1秒間に4.9コドン翻訳される一方で、非至適コドンでは3.1コドンしか翻訳されず、コドンに

よって翻訳速度が異なることを示している(Chekulaeva and Landthaler, 2016; Iwasaki and Ingolia, 2016; Yan *et al.*, 2016) (図 3-2B)。

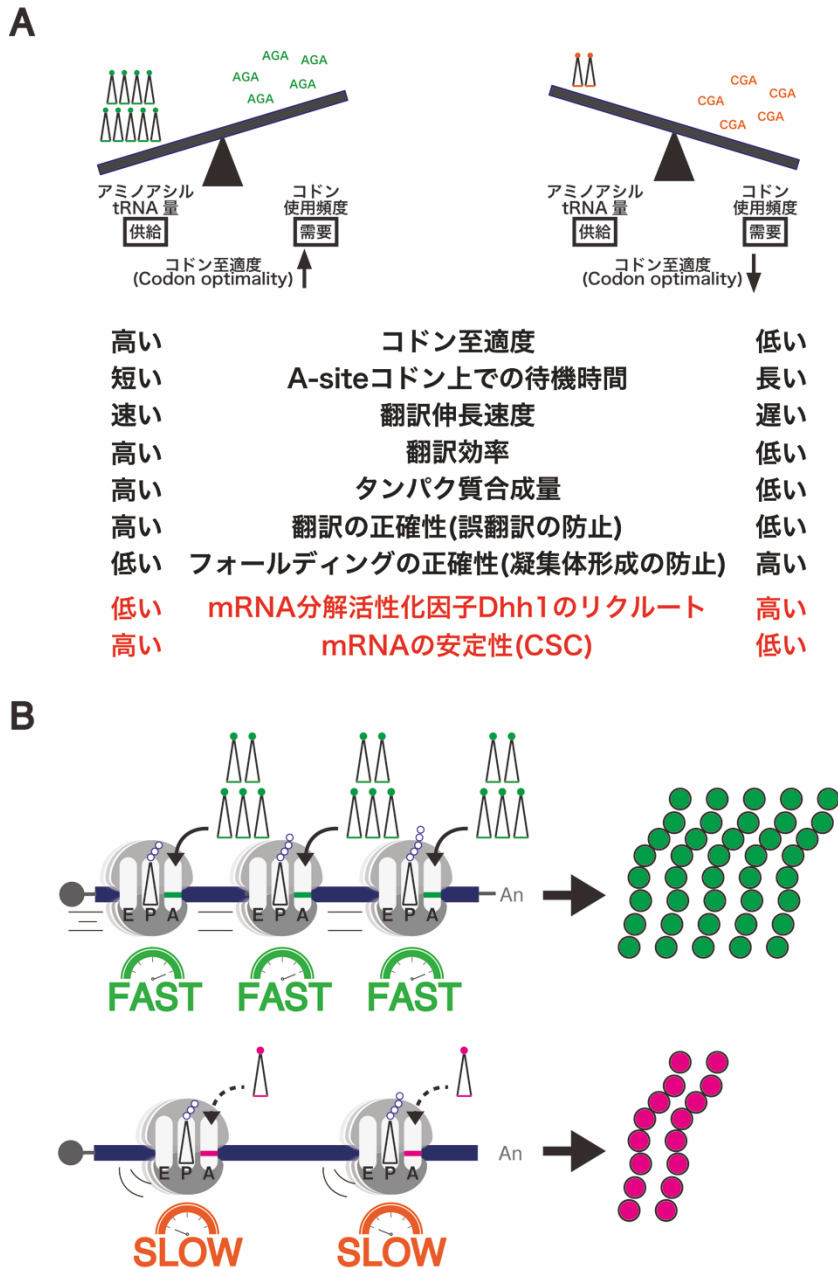


図 3-2. コドン至適度と翻訳伸長効率

- A) コドン至適度は翻訳効率と mRNA の安定性における重要な決定因子である。
- B) コドン至適度は高発現遺伝子の発現量維持や細胞種、組織に依存した遺伝子発現の維持に関与する。

3-1-3. コドン効果と mRNA の翻訳効率

mRNA の翻訳伸長反応におけるコドン効果について、前項で述べたが、単なる読み枠であるコドンが生体に与える意義については、現在も様々な議論がある。実際に、コドンの偏りは高発現遺伝子で多く検出されており、さらに進化的に広く保存されていることが報告されている(Akashi, 1994; Dong, Nilsson and Kurland, 1996; Urrutia and Hurst, 2001; Yang and Nielsen, 2008)。しかしながら、ハイスループットプロテオミクスや遺伝学的解析の結果では、mRNA の発現量とそれ由来のタンパク質の発現量は完全には相関せず、むしろコドンの偏りと翻訳効率の直接的な関連性は弱いことから、転写後制御がタンパク質量のアウトプットに重要であることが示唆されていた(Lu *et al.*, 2007; Kudla *et al.*, 2009; Vogel *et al.*, 2010; Goodman, Church and Kosuri, 2013; Li *et al.*, 2014)。これらは、翻訳開始効率の制御や、翻訳後のタンパク質自身が適切な構造をとるためのフォールディング速度の違いや、翻訳と共役した mRNA 分解等に起因することが明らかになっており、詳細は次項以降で述べる。特に、開始コドンの周辺に強固で安定な mRNA の二次構造が存在する場合には、翻訳を開始するために高いエネルギーが必要であったり(Kudla *et al.*, 2009; Gu, Zhou and Wilke, 2010; Tsao *et al.*, 2011)、非至適コドン上においてリボソームの進行速度が遅延する場合には、開始コドン領域からコーディング領域にリボソームが移動する速度も遅延する可能性があることから、様々な要因がそれぞれの翻訳開始効率に影響を与えることが知られている(Mitarai, Sneppen and Pedersen, 2008; Potapov *et al.*, 2012)。これらの結果は、翻訳効率を最大にするためには、コドンを最適化することと同様に、翻訳開始領域近傍の mRNA の二次構造を緩める必要があることを示唆している。先行研究では、上述した多岐にわたる要因を無視して翻訳効率が算出されていたために、コドン至適度とタンパク質合成量に強い相関が得られていないと考えられる(Tuller *et al.*, 2010)。

一方で、前述したように、tRNA の存在量は翻訳効率に対し重大な影響を与える因子である。一般的に、翻訳反応では、mRNA のコドンと tRNA のアンチコドンは Watson-Crick 型塩基対合に基づいて、正確な組み合わせで塩基対形成を行う。しかしながら、64 通りのコドンは、20 種のアミノ酸をコードするためには過剰であり、終止コドンを除く 61 通りのコドンに対応する tRNA を合成するためには莫大なエネルギーを必要とすると考えられることから、Crick は Wobble (ゆらぎ) 仮説を提唱している。実際に、1 種のアミノ酸をコードするコドンは複数存在しており、加えて、これらの 1、2 番目のコドンは共通で、3 番目では異なる塩基が使われる。これは、遺伝暗号の縮重と呼ばれ、1 種のアミノ酸に対応する tRNA 分子を複数有し、2 種類以上のコドンと対合できる tRNA 分子種が存在することで成り立っている。このため、実際にヒトゲノム中には完全に正確なペアリングをできる tRNA 分子が存在しない場合もある。このようにして、生体は、より効率的なタンパク質産生を可能にしている。前述したゆらぎ仮説では、コドンの 3' 塩基と対合するアンチコドンの 5' 塩基は他の 2 つの塩基対ほど空間的な制限がなく、ある程度の自由度を持たせている、という仮説である。この際に重要な修飾塩基として、イノシン(I)が知られており、ウラシル(U)、アデニン(A)、シトシン(C)と対合できることが報告されている。ゆらぎ塩基対形成は、Watson-Crick 型塩基対合と比較して効率が悪く (Curran, 1995)、これと一致するように、Ribosome profiling の結果では、これらのゆらぎ塩基対形成をするコドンによる A-site の占有率は高いことが明らかになっている (Weinberg *et al.*, 2016)。以上の結果から、単純な tRNA の使用可能量に加え、塩基対形成の仕方やこれを踏まえたリボソームによる正しい tRNA の選択効率が、翻訳効率の差異に関わると考えられる。

第 1 章で述べたが、Elizabeth J. Grayhack 研究室は、連続するコドンの組み合わせ (Codon pair) のうち 17 種がリボソームの進行速度を遅延させることを報告し、

これらを Inhibitory di-codon と呼んだ(Gamble *et al.*, 2016)。Inhibitory di-codon は、連続する di-codon のうち、少なくとも 1 つのコドンはゆらぎ塩基対形成をし、それと連続して非至適コドンが存在する場合に生じ、翻訳効率を低下させることが示唆されている(Coleman *et al.*, 2008; Gamble *et al.*, 2016; Tesina *et al.*, 2020)。つまり、コドンの組成のみならず、コドンの並びも、翻訳効率を決定づける重要な因子である。

3-1-4. コドン効果とタンパク質のフォールディング

これまで、構造学的モチーフをコードする mRNA 領域における、至適度の低いコドンの翻訳によるリボソームの進行速度の低下は、適切なタンパク質のフォールディングを促進する、とされてきた(Thanaraj and Argos, 1996)。大腸菌を用いた報告では、コドンの最適化は、タンパク質の合成量を亢進させるものの、産生されたタンパク質にはフォールディング異常が生じ、ミスフォールディング体として可溶性等が著しく低下することが知られている(Komar, Lesnik and Reiss, 1999; Zhang, Hubalewska and Ignatova, 2009)。さらに、非至適コドンに対応する tRNA 分子の増加によっても、合成されたタンパク質のミスフォールディングを誘発することや(Zhang, Hubalewska and Ignatova, 2009)、タンパク質の機能に必要な構造を形成するドメイン上のみのコドンの最適化によっても機能不全タンパク質が産生されることから(Yu *et al.*, 2015)、同義コドンであってもコドン至適度の変化は、産生されるタンパク質のコンフォメーションに影響することが報告されている。これは、コドンの最適化によって、リボソームの進行速度の遅延が阻害されると、フォールディングに必要な時間が不足するために、そのミスフォールディングが誘発されることを示唆している(図 3-3A)。さらに、バイオインフォマティクスや遺伝学的解析を駆使した報告によっても、タンパク質が二次もしくは三次構造を形成する領域の下流には、非至適コドンが存在す

る傾向が高く、そのようなコドン配置が共翻訳的なフォールディングに関与することが示唆されている(Pechmann and Frydman, 2013; Yu *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2015)。したがって、リボソームは、構造ドメインの下流のリンカーをコードする領域をゆっくりと進むことで、合成途中のペプチド鎖の適切なフォールディングを可能にしている(図 3-3A)。

このように、構造ドメインのリンカー領域には非至適コドンが豊富に含まれる傾向がある一方で、種間で高く保存され、構造形成や機能発揮に必須な残基は至適コドンが含まれる傾向がある。これは、至適コドンの誤翻訳率が低いことを示唆しており(Thomas, Dix and Thompson, 1988; Dix and Thompson, 1989; Kramer and Farabaugh, 2007; Drummond and Wilke, 2008; Huang *et al.*, 2009; Kramer *et al.*, 2010)、細胞は適切なコドン至適度やコドン配置を獲得することで、シャペロン群に依存しない共翻訳的なフォールディングを可能にし、かつ、誤翻訳を防ぎ、機能不全タンパク質の産生から回避していると考えられる(図 3-3A)。

さらに、Judith Frydman 研究室では、コドン至適度とタンパク質の二次構造との関連性について報告しており(Pechmann and Frydman, 2013)、種間で高く保存された α ヘリックス構造を形成する領域では、それをコードするコドンについても、至適コドン、非至適コドンの両方が高く保存されていた。また、 β シート構造を形成する領域では非至適コドンが保存されていないのに対し、至適コドンの保存性は顕著に高くなっていた。 α ヘリックス構造はリボソームトンネル内腔で共翻訳的にフォールディングされるが(Rocha, 2004; Chamary, Parmley and Hurst, 2006)、 β シート構造はトポロジー的に一貫性がなく、合成後にフォールディングされる(Dong, Nilsson and Kurland, 1996)。また、 β シート構造には疎水性残基が富むことが一般的に知られており、このようなアミノ酸組成は、タンパク質の凝集を促進しやすい。以上の結果から、 β シート構造をコードする、もしくは、疎水性度の高い領域をコードする mRNA には、種間で保存された至

適度の高いコドンが富んでおり、翻訳効率やリボソームの進行速度を高く維持することで、正確な翻訳反応を促進し、かつ、ミスセンス変異が生じたとしてもタンパク質の凝集を防ぐようなコドン組成になっている(Pechmann and Frydman, 2013)。加えて、前述したように、 α ヘリックス構造は、リボソームトンネル内腔でも共翻訳的にフォールディングされることで知られており、この領域では、至適コドンと非至適コドンの両方が高く保存されていた。このようなコドン至適度の高い保存性は、合成されたペプチドがリボソームトンネルに侵入する初期段階において、翻訳とフォールディングの速度を厳密に調節するために、コドンの至適度が進化的に選択されてきた、と考えられる(Kim *et al.*, 2015; Buhr *et al.*, 2016)。

上述したように、誤翻訳が最も影響する部位では至適コドンが、合成されたペプチドのミスフォールディングが最も影響する部位では非至適コドンが、進化的に保存され、選択されている。したがって、至適コドンの翻訳は、正確で、かつ合成されたタンパク質の凝集を防ぎ、非至適コドンの翻訳は、翻訳反応と共役したフォールディングを巧妙に調節する、といったように、コドンの選択性は、単にリボソームの速度に依存した翻訳効率に影響を与えるだけでなく、それぞれがコードするタンパク質の構造維持においても機能的な一面を持ち合わせていることが明らかになっている(Kim *et al.*, 2015) (図 3-2A)。

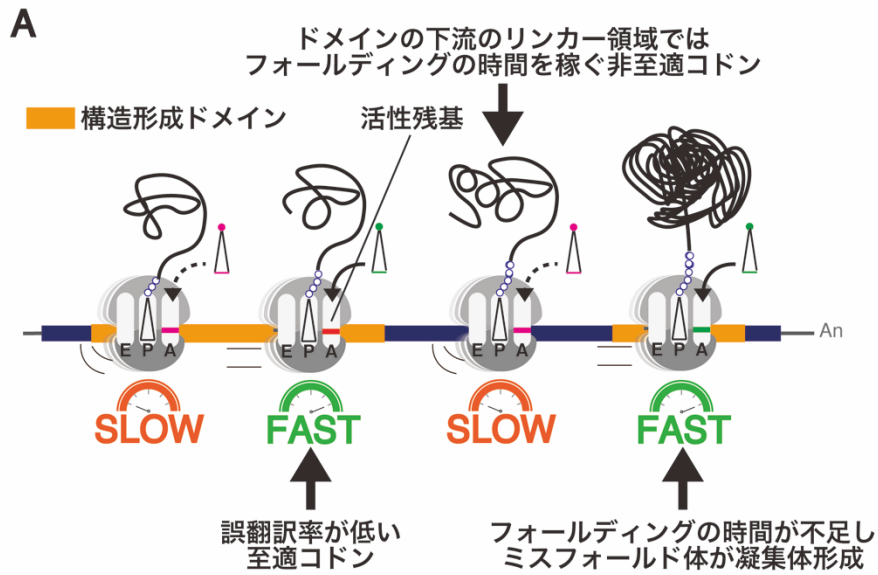


図 3-3. コドン至適度とタンパク質フォールディング

A) コドン至適度は翻訳の正確性やフォールディングの精度に関与しており、翻訳されたタンパク質の活性維持や構造維持においても重要である。

3-1-5. コドン効果と mRNA の安定性

mRNA の転写と分解の間の動的制御は、mRNA の安定性に大きく影響し、タンパク質合成量の決定要因となることは明らかである(Presnyak *et al.*, 2015; Boël *et al.*, 2016; Lahtvee *et al.*, 2017)。出芽酵母において、mRNA の半減期は数分から数時間と多様である(Carlini, 2005; Presnyak *et al.*, 2015; Tesina *et al.*, 2019)が、対応する tRNA 量が極端に少ないレアコドンの遺伝子内挿入により mRNA の安定性が顕著に低下するという遺伝学的解析から、mRNA の安定性と翻訳反応の関連性が示唆されていた(Hoekema *et al.*, 1987; Caponigro, Muhlrad and Parker, 1993; W. Hu *et al.*, 2009; Sweet, Kovalak and Collier, 2012)。Jeff Collier 研究室では、RNA ポリメラーゼ II の温度感受性出芽酵母株を用いて、転写遮断後の mRNA の安定性を RNA-seq により網羅的に定量した(Presnyak *et al.*, 2015)。その結果、安定な mRNA に富むコドンと不安定な mRNA に富むコドンが存在することが明らかになり、ある mRNA に含まれるそれぞれのコドンの頻度(Codon frequency)とその mRNA の安定性(Transcript stability)の相関を、Codon stability Coefficient(CSC)として定義した(図 3-4A)。CSC は、tRNA の使用可能量を示す tRNA adaptive index(tAI)と強く相関し、これに基づくコドン至適度とも顕著に相関したことから、至適コドンを富む mRNA は安定で、非至適コドンを富む mRNA は不安定な傾向にあることが明らかになった(Presnyak *et al.*, 2015) (図 3-4A)。実際に、レポーター遺伝子のコドン至適度を変動させることで、mRNA の安定性を含め、リボソームの進行速度、翻訳効率が変化しており、コドンの至適度は、それにより構成される mRNA の安定性の決定にも関与することが報告されている(Presnyak *et al.*, 2015; Harigaya and Parker, 2016b, 2016a) (図 3-4B)。

出芽酵母では、コドン至適度に依存した mRNA 安定性制御に対して、DEAD-box 型ヘリカーゼの DDX6 ファミリーであり、mRNA の 5'末端におけるデキャッピングを促進する機能を有する Dhh1 の関与が示唆された。Dhh1 は非

至適コドンに富む mRNA 上で翻訳速度が遅くなったりリボソームを好んで結合することが報告されている(Sweet, Kovalak and Collier, 2012; Radhakrishnan *et al.*, 2016) (図 3-4C)。これにより mRNA のデキャッピングを介した分解が惹起されると考えられるが、詳細な分子機構は明らかになっていない。

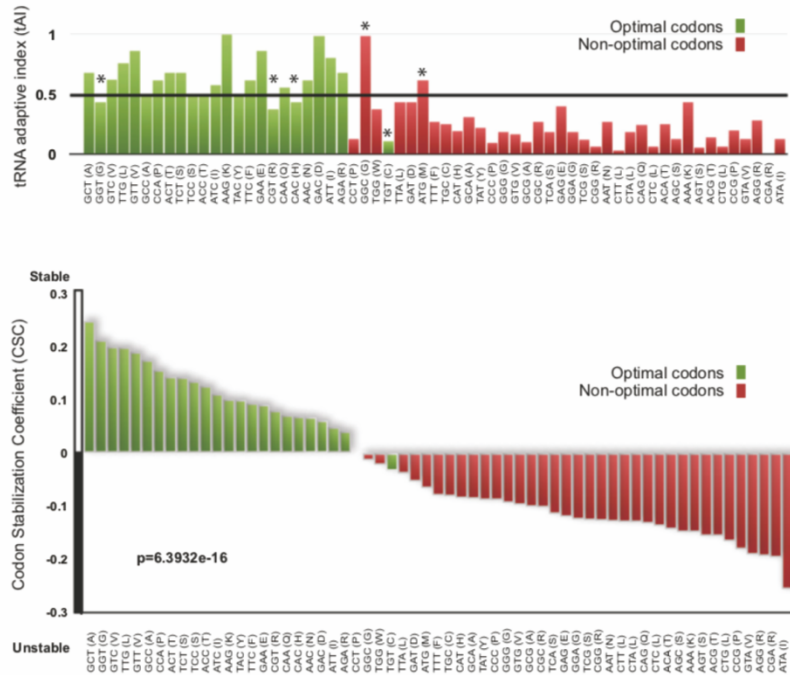
また、哺乳類細胞においても、HEK293 細胞、HeLa 細胞や CHO 細胞等を用いて、CSC が算出されており、tAI と強く相関することが報告されている(Narula *et al.*, 2019; Q. Wu *et al.*, 2019; Forrest *et al.*, 2020)。さらに、哺乳類細胞において、mRNA の安定性はコドンのみならず、コードされるアミノ酸組成にも相関があり、tRNA 量のみならず遊離アミノ酸の存在量にも依存することが明らかになっている(Forrest *et al.*, 2020)。加えて、コドン内の塩基の偏り(Codon bias)も重要な制御因子であり、mRNA を構成する塩基の GC 含量をはじめとして、コドンを形成する 3 番目の塩基が G もしくは C であればその mRNA は相対的に安定、A もしくは T であれば相対的に不安定な傾向がある、といったように、コドン形成する塩基についても mRNA の安定性に影響することが示唆されている(Hia *et al.*, 2019)。このようなコドンの偏りを認識する分子として RNA 結合タンパク質 ILF2/3 が同定されているが、詳細な分子機構については不明なままである(Hia *et al.*, 2019)。アミノ酸組成については、この他にも複数の報告があり、特定の非常に短いアミノ酸モチーフや、ポリプロリン等の特定のアミノ酸配列が翻訳されることで、そのペプチドがリボソームの出口トンネル内との相互作用を引き起こし、リボソームの停滞や翻訳の中断を惹起しうることが知られている(Navon *et al.*, 2016; Wilson, Arenz and Beckmann, 2016; Huter *et al.*, 2017; Verma *et al.*, 2019)。

以上のようにして、至適コドンによる遺伝子発現は、タンパク質合成量と正確性を最大に維持でき、また、誤翻訳によるエネルギー消費やタンパク質毒性を最小限にし、かつ、mRNA を安定化することでそのターンオーバーを抑える

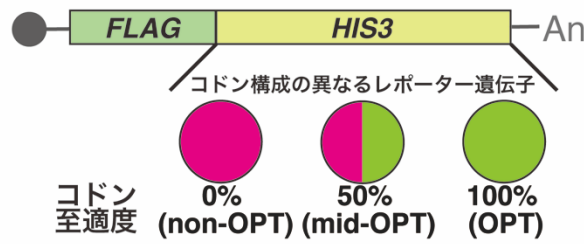
ことができる。近年では、mRNA の修飾も、翻訳伸長効率や mRNA 分解に関与することが報告されており、*N*⁶-メチルアデノシンや *N*⁴-アセチルシチジン等が知られている(Choi *et al.*, 2016; Zhao, Roundtree and He, 2017; Arango *et al.*, 2018)。

最後に、コドンが mRNA の安定性や翻訳効率等を変化させ、遺伝子発現に影響を与えることは明らかではあるが、これが完全な決定要因ではない。コドン至適度のみならず、ORF の上流や下流に存在する非翻訳領域の配列や構造、microRNA 等の機能性核酸を介した mRNA 分解、RNA 結合タンパク質をはじめとしてトランスに作用する因子群等、mRNA は多数の影響を受け、最終的な遺伝子発現の量的、質的な調節を受けていると考えられる(Mohanty and Kushner, 2016; Zhao *et al.*, 2018; Menendez-Gil *et al.*, 2020)。この一例として、ショウジョウバエの神経系では、コドン至適度と mRNA の安定性の相関が非常に低いことが報告されており、主に、神経系特異的なトランスに作用する因子によって mRNA の安定性やその制御が担われていると考えられる(Burow *et al.*, 2018)。

A



B



C

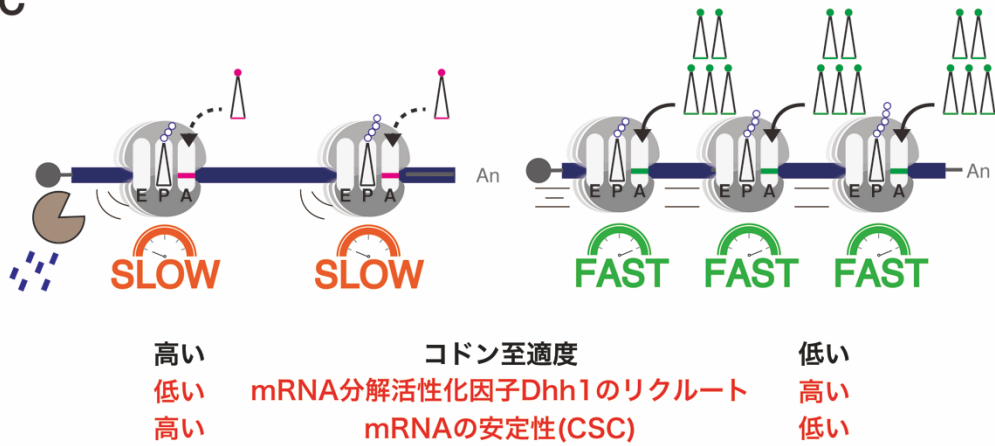


図 3-4. コドン至適度と mRNA 安定性

- A) コドン至適度は mRNA 安定性と強く相関する。mRNA のコドン組成とその安定性を定義する指標として CSC が報告されている(Presnyak *et al.*, 2015)。
- B) 本研究においても使用したコドン至適度の異なる mRNA レポーター遺伝子。Jeff Collier 研究室において構築され、多数の報告で用いられている。
- C) コドン至適度に依存した mRNA 分解の誘導には、デキャッピング活性化因子 Dhh1 の関与が示唆されていた。

3-1-6. コドン効果の生理学的意義

これまで述べたように、コドン至適度は、その mRNA の安定性、リボソームの進行速度の調整を介した翻訳効率、さらには合成されたタンパク質のフォールディング等に広く影響し、遺伝子発現を微調節していると考えられる。実際に、機能的に類似した mRNA のコドン至適度は似通っており、同じような速度で分解を受けることが知られている(Wang *et al.*, 2002; Akashi, 2003; Presnyak *et al.*, 2015)。出芽酵母において解糖系に関与する酵素群をコードする mRNA は、いずれも至適コドンに富んでおり、mRNA を安定化し、さらにタンパク質量を最大限合成することで、細胞は、解糖系酵素をはじめとする代謝経路に重要な酵素の発現を高く維持している。一方で、フェロモン応答等、刺激に対する一過性応答に関与するタンパク質群をコードする mRNA は非至適コドンに富んでいる。これは、このような細胞内調節や微細な制御系に関与する因子群の発現を低く保つために関与し、これにより、mRNA が不安定化し、一過性応答を迅速に解除するために必須である(Presnyak *et al.*, 2015) (図 3-5A)。

このように、細胞は、それぞれの mRNA がコードするタンパク質の機能に基づき、タンパク質の必要量に応じたコドン至適度を獲得してきた、と考えられる。一方で、組織の発達や分化によって細胞が要求するタンパク質とその量は時事刻々と変化している。以下では、環境ストレス応答や細胞の発達、分化等におけるコドン至適度の調節を介した制御やその生理学的意義について述べる。

大腸菌では、ロイシンは 6 つの異なる tRNA によって解読され、これらのコドン至適度には顕著な差がある。ロイシンの飢餓時には、至適コドンに対応する tRNA に対するアミノ酸のチャージ率が顕著に低下する一方で、非至適 tRNA に対するアミノ酸のチャージ率は相対的に変化しないことが報告されている(Elf *et al.*, 2003)。この変化はそれぞれのロイシンコドンにおけるコドン至適度を切り替え、特にアミノ酸の生合成やタンパク質のリサイクルに関与するタンパク質

をコードする mRNA について、通常時では非至適コドンにより構成されていたにも関わらず、アミノ酸飢餓により mRNA が至適化され、それらの翻訳量が相対的に上昇することが知られている。したがって、アミノ酸飢餓時には、tRNA プール中のアミノ酸チャージ率の内訳が動的に変化し、環境ストレスに応答して必要な mRNA の翻訳を促進することが報告されている(Wohlgemuth, Gorochowski and Roubos, 2013)。ヒト胎児腎臓細胞においても、チャージされた tRNA プールがアミノ酸飢餓時に変化し、この変化がユビキチン-プロテアソーム経路に関与するタンパク質のリサイクル因子群の翻訳を上昇させる(Saikia *et al.*, 2016)。また、tRNA の転写後修飾は、特にアンチコドン領域で生じ、多くの mRNA における翻訳の正確性や効率に強く関与することが明らかになっている(Nedialkova and Leidel, 2015; Chou *et al.*, 2017; Kimura, Srisuknimit and Waldor, 2020)。実際に、細胞は Wobble 位での特定の tRNA に対する修飾を動的に変化させることで、酸化ストレス等に対する細胞応答に必要な mRNA の翻訳を優先的に促進する例も知られている(Chan *et al.*, 2010, 2012; Fernández-Vázquez *et al.*, 2013; Endres, Dedon and Begley, 2015)。このようにして、細胞は tRNA プール内のアミノ酸のチャージ率や転写後修飾を動的に操ることで、mRNA のコドンそのままに、その至適度を変化させ、細胞が必要とする mRNA の翻訳を選択的に優先させることで、環境ストレスに応答し、細胞内恒常性を維持している。

コドン至適度による制御は、ストレス応答を介した恒常性維持の他にも、生物の発達や細胞の変化にも関与する。受精卵は、母体由来の mRNA 等の母性因子により発生が誘導されるが、その後、接合体の転写開始後には母性因子は迅速に分解され、接合体由来の mRNA やタンパク質の合成が活性化する。この母性-胚性転移(Maternal-to-Zygotic transition : MZT)は、初期胚発生に重要な過程であり、この過程における母性 mRNA の分解は、コドン至適度に依存した制御を受けていることが知られている。ゼブラフィッシュ胚やアフリカツメガエル胚

において、分解を受ける母性 mRNA は非至適コドンの相対濃縮率と強い正の相関を示すことが報告されており、これは、生物の発達過程において、コドン至適度に依存した mRNA 分解系が大きく寄与していることを示している(Bazzini *et al.*, 2016; Mishima and Tomari, 2016) (図 3-5B)。

また、細胞は、tRNA 遺伝子近傍のクロマチン構造を制御することで、細胞内 tRNA 存在量を変化させることが示唆されている(Wohlgemuth, Goroehowski and Roubos, 2013)。がん細胞を含む増殖細胞では、細胞周期や細胞増殖等に関与する細胞自律遺伝子の要求する tRNA 量が上昇し、最終分化細胞では細胞集団の配置に関与する細胞接着遺伝子の要求する tRNA 量が上昇することが報告されている(Gingold and Pilpel, 2011)。このように、腫瘍細胞で大きく変化する翻訳の動的変化は、細胞内 tRNA プールの調節によって行われている。がん細胞は、通常の細胞と異なるコドン至適度を採用しており、これは tRNA 量やコドン至適度の調節による臨床展開の可能性を示唆している(Grewal, 2015)。

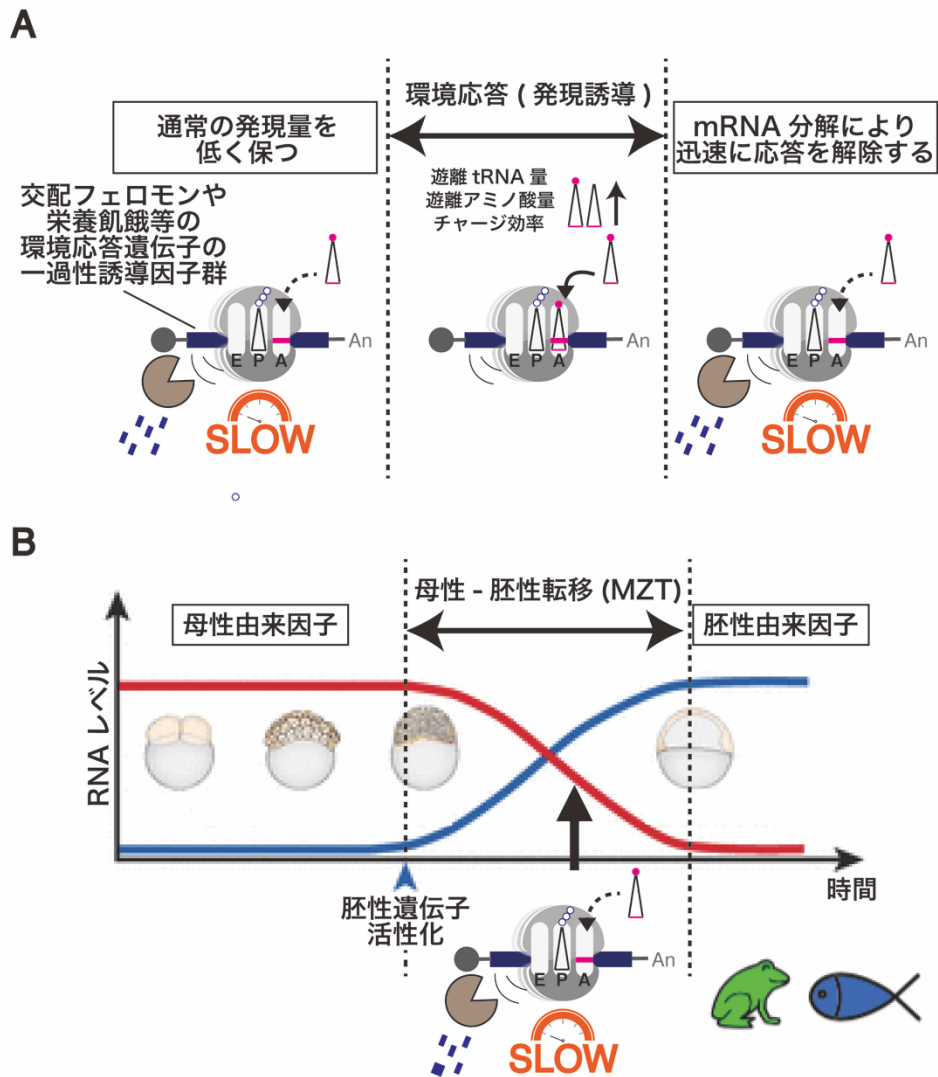


図 3-5. コドン至適度の生理学的意義

- A) 非至適コドンは、一過性応答遺伝子群に富んでおり、その発現制御に関与する。
- B) 生物の発生段階における遺伝子発現変動に、コドン至適度に依存した mRNA 分解が関与する(Bazzini *et al.*, 2016; Mishima and Tomari, 2016)。

3-1-7. 遺伝子発現を広く制御する Ccr4-Not 複合体

Ccr4-Not 複合体は、種間で広く保存された多機能複合体であり、遺伝子発現を広く制御することで知られる(Collart, 2003, 2016; Denis and Chen, 2003; Collart and Timmers, 2004; Collart and Panasenko, 2012; Miller and Reese, 2012; Inada and Makino, 2014; Panasenko, 2014; Shirai *et al.*, 2014) (図 3-6A)。細胞質中では主要な脱アデニル化酵素(Deadenylase)として poly(A)鎖の短鎖化を介した mRNA 分解や翻訳抑制に重要であるのみならず(Wahle and Winkler, 2013)、poly(A)鎖の短鎖化に依存しない転写後制御や共翻訳的な品質管理等にも関与することが報告されている(Cooke, Prigge and Wickens, 2010)。さらに、核内ではクロマチン修飾や転写制御、RNA 輸送や DNA 修復等にも関与する。Ccr4-Not 複合体は、出芽酵母において 1-2MDa にも及ぶ巨大なタンパク質複合体で、Ccr4、Caf1、Caf40、Caf130、Not1、Not2、Not3、Not4、Not5 の 9 つのコアサブユニットにより構成されており、ヒトにおいても、コアサブユニットの相同因子として CNOT1-CNOT10 が同定されている(Liu *et al.*, 1998; Bai *et al.*, 1999; Gavin *et al.*, 2002; Morel *et al.*, 2003) (図 3-6A)。コアサブユニットのうち、最も大きい分子量を持つ Not1 を足場タンパク質として複合体を形成し、様々な相互作用因子と結合することで、多彩な機能を発揮するが、これらのうち、出芽酵母 Not4 はヒト CNOT4 を相同因子とし、ユビキチン化反応に必須な RING 型 E3 リガーゼ活性を有する(図 3-6B)。出芽酵母において、NOT4 欠損株やそのユビキチン化標的であるリボソームタンパク質 eS7 の変異株 eS7-4KR 変異株は、顕著な生育阻害を示すことから、その生体内における重要性が示唆されている(Ikeuchi *et al.*, 2019)(図 3-6C)。また、出芽酵母における Not4 は、自身の C 末端領域を介して Not1 と結合し安定に複合体中に存在するとされているが、ヒト CNOT4 は、その C 末端領域が欠損しており、コアサブユニットの中で唯一、複合体中に安定に存在しない因子であることが報告されている(Albert *et al.*, 2002; Temme *et al.*, 2010; Panasenko and Collart, 2011)。

また、種間の保存性は一部重複もしくは分岐しており、ヒト CNOT3 は、出芽酵母における Not3 と Not5 の機能的ホモログとして知られるが、これらは完全な冗長性を持つわけではなく、*NOT3* と比較して *NOT5* の欠損はより強い表現型を示すことが報告されている(Oberholzer and Collart, 1998)。

さらに、第 1 章で述べたように、出芽酵母における Ccr4 は、EEP(Endonuclease-Exonuclease-Phosphatase)ファミリーに属す RNase であり、ヒトでは CNOT6/CCR4a 及び CNOT6L/CCR4b として保存されている。さらに、Caf1 は、DEDD スーパーファミリーに属しており、RNaseD ドメインを有し、ヒト CNOT7/CAF1 及び CNOT8/POP2 として保存されている。両者ともに poly(A)鎖を除去するデアデニレースとしてのエキソヌクレアーゼ活性を持つ(Wang *et al.*, 2010)。Caf1 は Ccr4 と Not 複合体とを繋留させる役割も持ち合わせており、この結合がデアデニレーションに重要であることも報告されている(Tucker *et al.*, 2002)。これらの因子群の欠損マウスは様々な表現型を示すことから、Ccr4-Not 複合体は生理学的にも重要であることは明らかである(Shirai *et al.*, 2014)。

Ccr4-Not 複合体は、これまで核内、細胞質内の両方に存在することが検出されており、この幅広い局在は機能的側面とも一致する(Tucker *et al.*, 2001; Temme *et al.*, 2010)。ある報告では、この局在制御は細胞周期に依存し、G0 もしくは G1 期では Ccr4-Not 複合体は核内に存在するのに対し、DNA の複製が始まる S 期に移行する前に細胞質中に局在するとされている(Morel *et al.*, 2003)。細胞質中では、翻訳が活発な polysome 上や RNA 代謝の場である P-body(Processing body)に局在することが知られている(Teixeira and Parker, 2007; Dimitrova *et al.*, 2009; Panasenko and Collart, 2012)。このように多数の構成成分を介して、Ccr4-Not 複合体は様々な場所で多彩な機能を発揮するが、次項では、まず、核内におけるクロマチンリモデリング、転写制御、核内品質管理と mRNA 輸送、について簡単に概説する。

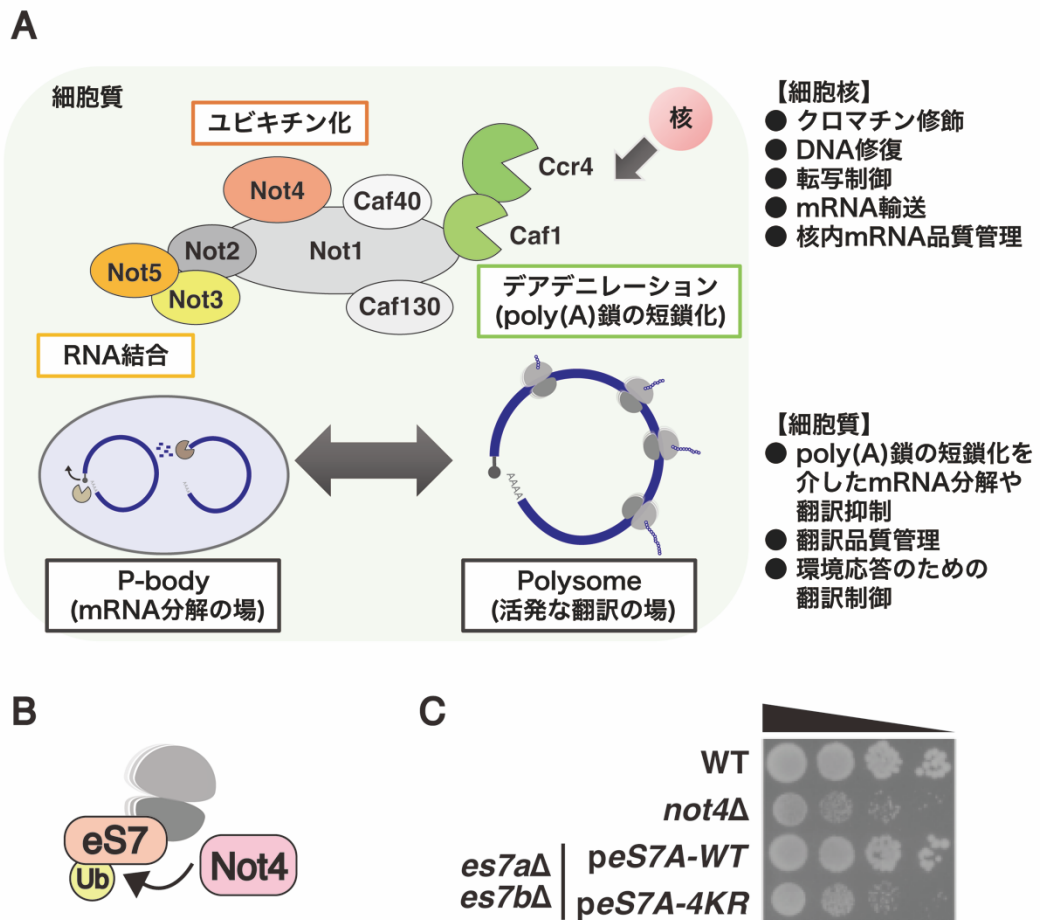


図 3-6. Ccr4-Not 複合体の多機能性と Not4 による eS7 ユビキチン化の重要性

A) 遺伝子発現を広範に制御する多機能複合体 Ccr4-Not は、細胞質において翻訳が活発な polysome に結合する。

B) E3 ユビキチンリガーゼ Not4 はリボソームタンパク質 eS7 のモノユビキチン化を行う。

C) *NOT4* 欠損出芽酵母株や eS7 がユビキチン化を受けない *eS7-4KR* 変異出芽酵母株は顕著な生育阻害を示す (Ikeuchi *et al.*, 2019)。

3-1-8. 核内における Ccr4-Not 複合体の機能

核内 DNA は、ヒストンタンパク質の助けを借りて、ヌクレオソームにパッケージングされ、これがさらに束ねられたクロマチン構造を形成している。クロマチンリモデリングは、アセチル化やメチル化、リン酸化を介した特異的酵素によるヒストン修飾や、ATP 依存的なヌクレオソームの動的変化によって、濃縮したゲノム DNA に対する RNA ポリメラーゼのアクセスを可能にする、という転写量の調節を介した遺伝子発現制御である。*NOT4* や *NOT5* の欠損下では酵素群の発現量や活性に変化が生じ、ヒストン H3 及び H4 のアセチル化や H3 のトリメチル化が顕著に低下するために、RNA ポリメラーゼ II のアクセス及び転写活性に影響を与えることが知られている(Laribee *et al.*, 2007; Mulder *et al.*, 2007; Peng *et al.*, 2008; Mersman *et al.*, 2009)。

また、Ccr4-Not 複合体は、転写開始点であるプロモーター領域に結合することが報告されており、これは転写の活性化や抑制といった制御に関与する(Benson *et al.*, 1998; Deluen *et al.*, 2002; Swanson *et al.*, 2003; Zwartjes *et al.*, 2004; G. Hu *et al.*, 2009; Kruk *et al.*, 2011; Venters *et al.*, 2011; Venturini *et al.*, 2012)。一例として、Not1 はレチノイン酸 X 受容体(RXR α)にリガンド依存的に相互作用する(Winkler *et al.*, 2006)。また、転写活性化因子である出芽酵母 Yap1(Gulshan, Thommandru and Moye-Rowley, 2012)やヒトにおける PAF1(Sun *et al.*, 2015)は Not4/CNOT4 によるユビキチン化標的であることが示されている。このようなプロモーター領域上での転写開始の制御のみならず、Ccr4-Not 複合体は RNA ポリメラーゼ II の進行による転写伸長にも関与する。転写伸長の過程において、ある種の DNA 配列上では RNA ポリメラーゼ II の進行が阻害され、後方へ後戻りし一時停止することがある(Backtracking と呼ばれる)。この際に、RNA ポリメラーゼ II の Rpb4 モジュールが Ccr4-Not 複合体の構成成分である Not3 及び Not5 と相互作用することで、Ccr4-Not 複合体は転写伸長中の RNA ポリメラーゼ II に

結合し、この一時停止を回避し前方へ押し進める機能を持つ(Wind and Reines, 2000; Reese, 2013; Villanyi *et al.*, 2014)。

核内で転写された mRNA は、細胞質へと輸送される。この過程では、機能的な mRNA のみを輸送するために、核内 mRNA の品質管理が存在する。Ccr4-Not 複合体は、THO 複合体中の核内 poly(A)結合タンパク質である Nab2 や Hrp1、核膜孔複合体(NPC: Nuclear Pore Complex)の構成因子である Mlp1 と結合することで、品質管理の対象となった mRNA と核内エキソソームである Rrp6 やそのコファクターである RNA ヘリカーゼ Mtr4 との相互作用を可能にしている(Libri *et al.*, 2002; Kerr *et al.*, 2011)。このように、Ccr4-Not 複合体は、mRNA の転写制御だけではなく、mRNA の細胞質への輸送とその過程における品質管理に関与することが示されている。

3-1-9. 細胞質内における Ccr4-Not 複合体の機能

細胞質へと輸送された mRNA は、活発に mRNA が翻訳されている polysome と翻訳されていない mRNA を貯蔵する RNA 顆粒を循環することが知られている(Decker and Parker, 2012)。特に神経細胞では、細胞体のみならず、樹状突起や軸索でも翻訳が行われるが、このように細胞体から離れた場所でのタンパク質合成である局所翻訳には、mRNA を含んだ RNA 顆粒による特定の場所への mRNA 輸送が必須である。RNA 顆粒に含まれる mRNA は翻訳されることなく輸送され、細胞外からの刺激等によって翻訳抑制が解除されることで、mRNA の翻訳が開始され局所翻訳が可能になる。翻訳を終了した mRNA は最初に P-body と呼ばれる mRNA 分解因子を豊富に含む RNA 顆粒に移動し、リモデリングのち、翻訳開始因子とともに Stress granule と呼ばれる翻訳開始因子を豊富に含む RNA 顆粒に移動する。そして、翻訳を再開する準備ができた後、mRNA は再放出され翻訳の再開が可能になる、とされている。これらの RNA 顆粒は、mRNA

分解や翻訳の再開に適したタンパク質群の局所濃度や、mRNA プールに対する翻訳の許容量についての緩衝作用を提供するために、mRNA の貯蔵庫として機能する(Decker and Parker, 2012)。

実際に、Ccr4-Not 複合体の全ての構成因子は polysome 上に存在しており、さらに *NOT2*、*NOT4*、*NOT5* の欠損下において新生タンパク質は大量に凝集することが知られている(Panasenko and Collart, 2012)。また、野生株と比較して *NOT4* や *NOT5* の欠損下では polysome 中に含まれる mRNA の割合が変化しており、個々の mRNA 毎に Not4 や Not5 依存的に翻訳効率が上がる mRNA と下がる mRNA が知られている(Villanyi *et al.*, 2014; Matsuki *et al.*, 2020)。つまり、少なくとも Ccr4-Not 複合体は、Not4 や Not5 を介して翻訳効率やタンパク質のフォールディングに何らかの影響を与えている可能性がある。また、Ccr4-Not 複合体が特定の mRNA についての RNA 顆粒と polysome の間の循環や、フォールディングを補助する分子シャペロンとの相互作用に関与する可能性も考えられるが(Panasenko and Collart, 2011; Boulon, Bertrand and Pradet-Balade, 2012)、これらの詳細な分子機構については明らかになっていない。

Not4 は、前述した通り、ユビキチン化に必須な E3 活性を有し、リボソームタンパク質 eS7 やリボソーム結合型シャペロンである NAC (Nascent polypeptide Associated Complex)を標的とする(Panasenko *et al.*, 2006; Panasenko and Collart, 2012; Matsuda *et al.*, 2014; Ikeuchi *et al.*, 2019; Matsuki *et al.*, 2020)。当研究室における先行研究により、Not4 による eS7 のユビキチン化は、リボソームの異常停滞に起因し mRNA の切断を伴う品質管理機構 NGD や小胞体ストレス応答時の翻訳制御に関与することが報告されている(Ikeuchi *et al.*, 2019; Matsuki *et al.*, 2020) (図 3-7A)。また、リボソームの異常停滞に起因した新生ペプチド鎖の品質管理機構 RQC や、栄養飢餓時のグローバルな翻訳抑制に Not4 が関与することも報告されているが、この際のユビキチン化標的については明らかになっていない

(Dimitrova *et al.*, 2009; Bengtson and Joazeiro, 2010; Halter, Collart and Panasenko, 2014; Matsuda *et al.*, 2014; Preissler *et al.*, 2015)。特に、栄養飢餓時にはアミノアシル化された tRNA が顕著に減少し、様々な mRNA 上でリボソームの一時停止が惹起される可能性が考えられるが、この際には、Ccr4-Not 複合体は新生ペプチド鎖の分解に関与するのみならず、デキャッピング活性化因子である Dhh1 をリクルートし、mRNA の 5'末端の Cap 構造を除去することで、翻訳開始の阻害を誘導することが示唆されている(Preissler *et al.*, 2015)。以上の報告から、Not4 は、リボソームの異常停滞を含め、多彩な翻訳状態の検知やそれに対する共翻訳的な応答に必須であると考えられる。加えて、Ccr4-Not 複合体の足場タンパク質である Not1 は、自身の MIF4G ドメインを介して、デキャッピング活性化因子である Dhh1 と直接相互作用し、mRNA 分解や翻訳抑制を促進する機能を持つことから、これらの応答において Not4 は単独ではなく複合体として機能していると考えられる(Coller and Parker, 2005; Chen *et al.*, 2014; Mathys *et al.*, 2014; Rouya *et al.*, 2014)。

このように、Ccr4-Not 複合体は多彩な機能を発揮するが、特筆すべき活性はデアデニレースとしての poly(A)の短鎖化である。第 1 章で前述した通り、Ccr4-Not 複合体中の Caf1 や Ccr4 がこの活性を担っており、Caf1 は poly(A)鎖の PABP が結合していない領域を、Ccr4 は PABP が結合している領域を削り込むことで、翻訳終結後の普遍的な mRNA 分解を促進する(Webster *et al.*, 2018)。また、Ccr4-Not 複合体は、正常な翻訳終結時には poly(A)鎖上の PABP により Caf1/CNOT7 を介してリクルートされるが、ナンセンス変異に起因する早期異常翻訳終結時には NMD 因子である SMG7 により Pop2/CNOT8 を介してリクルートされることで、デアデニレーションを開始する(Funakoshi *et al.*, 2007)。さらに、Ccr4-Not 複合体は、特異的な配列に相互作用するような種々の RNA 結合タンパ

ク質や小分子 RNA である microRNA を介して、mRNA の非翻訳領域である 3'UTR にリクルートされることも多く知られている。

第 1 章では、デアデニレーションが mRNA 分解経路の律速段階であり、デキャッピングはその下流で起こる、と述べたが、必ずしもそうとは限らない。出芽酵母におけるデキャッピング活性化因子である Dhh1 は Not1 の MIF4G ドメインと直接結合しており、mRNA 上にリクルートされた Ccr4-Not-Dhh1 複合体はデアデニレーションを介さずにデキャッピングを促進することが可能である。この一例として、*EDC1* mRNA は自身の 3'UTR に含む poly(U) tract によってデアデニレーションから保護されており、Not2 や Not4、Not5 に依存したデキャッピングのみによって mRNA 分解を受ける基質として報告されている(Muhlrad and Parker, 2005)。

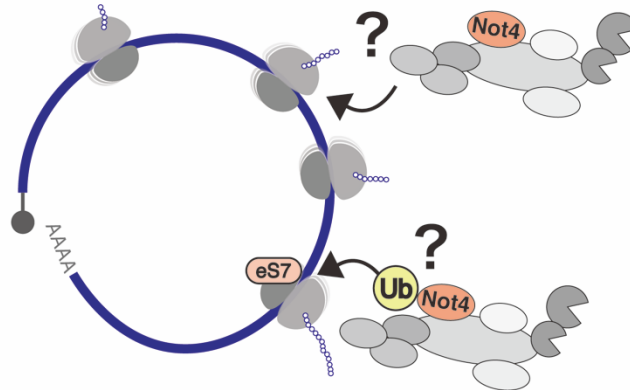
3-2. 目的

前述したように、Ccr4-Not 複合体は遺伝子発現を広く制御する多機能複合体である。細胞質中において翻訳が活発な polysome に結合することが報告されている一方で、リボソームに結合した Ccr4-Not 複合体の詳細な機能、結合の特異性、及びそれを担うサブユニットは解明されていない。

また、当研究室では、Ccr4-Not 複合体がリボソームタンパク質 eS7 をユビキチン化することで共翻訳的な品質管理を惹起することを報告しているが (Panasenکو and Collart, 2012; Ikeuchi *et al.*, 2019)、NOT4 欠損株や eS7 がユビキチン化を受けない eS7-4KR 株では、顕著な生育阻害が起こる(図 3-6C)ことから、リボソームタンパク質 eS7 のユビキチン化には更に広範でかつ普遍的な翻訳制御機能が存在すると考えられる。

そこで、本研究では、クライオ電子顕微鏡を用いた構造学的解析や Ribosome profiling 法を用いた翻訳動態の網羅的解析、mRNA の安定性試験をはじめとする遺伝学的解析を組み合わせることで、翻訳反応における Ccr4-Not 複合体の普遍的な機能の解明を試みた(Buschauer *et al.*, 2020) (図 3-7)。

また、本研究はミュンヘン大学(ドイツ)の Roland Beckmann 研究室、ケースウエスタンリザーブ大学(アメリカ)の Jeff Collier 研究室との共同研究である。



Ccr4-Not 複合体は翻訳中のリボソーム上でどのように機能するのか
Ccr4-Not 複合体はどのようにリボソームに対し結合するのか
Not4 による eS7 のユビキチン化はどのような普遍的な反応に関与するのか

図 3-7. 本研究の目的

3-3. 結果

3-3-1. Ccr4-Not 複合体は至適度が低いコドン上のリボソームを認識し結合する

当研究室 松尾講師により、Ccr4-Not 複合体がどのような mRNA を翻訳中のリボソームに対し結合するのか、翻訳状態を網羅的に検出する Ribosome profiling 法を用いて解析された。Ribosome profiling 法は mRNA 上のリボソームの結合状態を評価する解析手法である。80S リボソームによって覆われている mRNA 配列は RNase 処理から保護されることを応用し、Ribosome profiling 法では次世代シーケンサーを用いてその配列を網羅的かつ定量的にシーケンスすることで、個々の mRNA の翻訳レベルをゲノムワイドに解析できる。本研究では、通常の Ribosome profiling 法と Not4 を bait とした免疫沈降法を組み合わせた Selective ribosome profiling が行われた。内在性の NOT4 に FTP (FLAG-TEV-ProteinA) タグを付加した出芽酵母株を培養し、翻訳伸長阻害剤でありリボソーム A-site に結合する Tigecycline を処置した菌体から Ccr4-Not 複合体結合型リボソームを精製した(図 3-8A)。Not4 によって精製された polysome 中に、Not4 が結合していないリボソームが含まれている可能性を避けるため、Not4 による免疫沈降の間にインキュベーションのステップを加えることにより、内在性の RNase による polysome の解離を誘発させ、バックグラウンドを低下させた(図 3-8B)。これにより得た精製産物を SDS-PAGE によって泳動後、CBB 染色を行うと、Ccr4-Not 複合体の構成成分や Not4 により共精製されたリボソームを構成するリボソームタンパク質が検出された(図 3-12A 参照)。また、精製産物をシヨ糖密度勾配遠心法により分画した結果、内在性の RNase により polysome が解離し、monosome の状態で精製されていることが確認できた。以上のようにして、内在性の Not4 を bait とし、Ccr4-Not-リボソーム複合体が精製された。

次世代シーケンサーを用いた解析の結果、Not4 により免疫沈降されたリボ

ソームが翻訳中の mRNA には、CSC が低くコドン至適度が低い mRNA が多く含まれることが明らかになった(図 3-8C,D)。また、mRNA レベルではなくコドンレベルで評価することで、Not4 に結合したリボソームの A-site に含まれるコドンのカウントのエンリッチメントと、CSC 及び tAI は、非常に強い逆相関を示すことが明らかになった(図 3-8E)。したがって、Not4 が結合したリボソームの A-site に存在するコドンには、CSC が低く、かつ tAI が低い非至適コドンが多く含まれていることが明らかになった。以上の結果から、Ccr4-Not 複合体は、コドン至適度の低い mRNA を翻訳中のリボソームを好んで結合しており、特に A-site に非至適コドンが位置するリボソームに対し強く結合することが明らかになった(図 3-9)。つまり、Ccr4-Not 複合体は、A-site コドンの至適度が低いことで、翻訳速度が遅延したリボソームを検知して結合する可能性が示唆された。

さらに、Ribosome profiling において、80S リボソームによって保護される通常の mRNA 断片は 29mer 程度(Classical footprint)であることに比べて、空の A-site を持つリボソーム由来の mRNA 断片は、21mer 程度(Short footprint)と短いことが知られている(C. C.-C. Wu *et al.*, 2019)。コントロールとしたリボソームタンパク質 uL30 で精製し RNase 処理を行った mRNA 断片(図 3-10A,B)や、Input として調整した Total lysate に対し RNase 処理を行った mRNA 断片(図 3-10C)には 29mer 程度の Classical footprint が多く含まれたのに対し、これらと比較して、Not4 により精製した Selective ribosome profiling の結果では 21mer 程度の short footprint が多く検出された。したがって、Not4 が結合したリボソームは、通常と比較して、空の A-site を含むリボソームが富んでおり、Ccr4-Not 複合体は、コドン至適度が低いために、A-site へのアミノアシル tRNA の結合速度が遅延し、空の A-site を含むリボソームに対し多く結合することが示唆された。

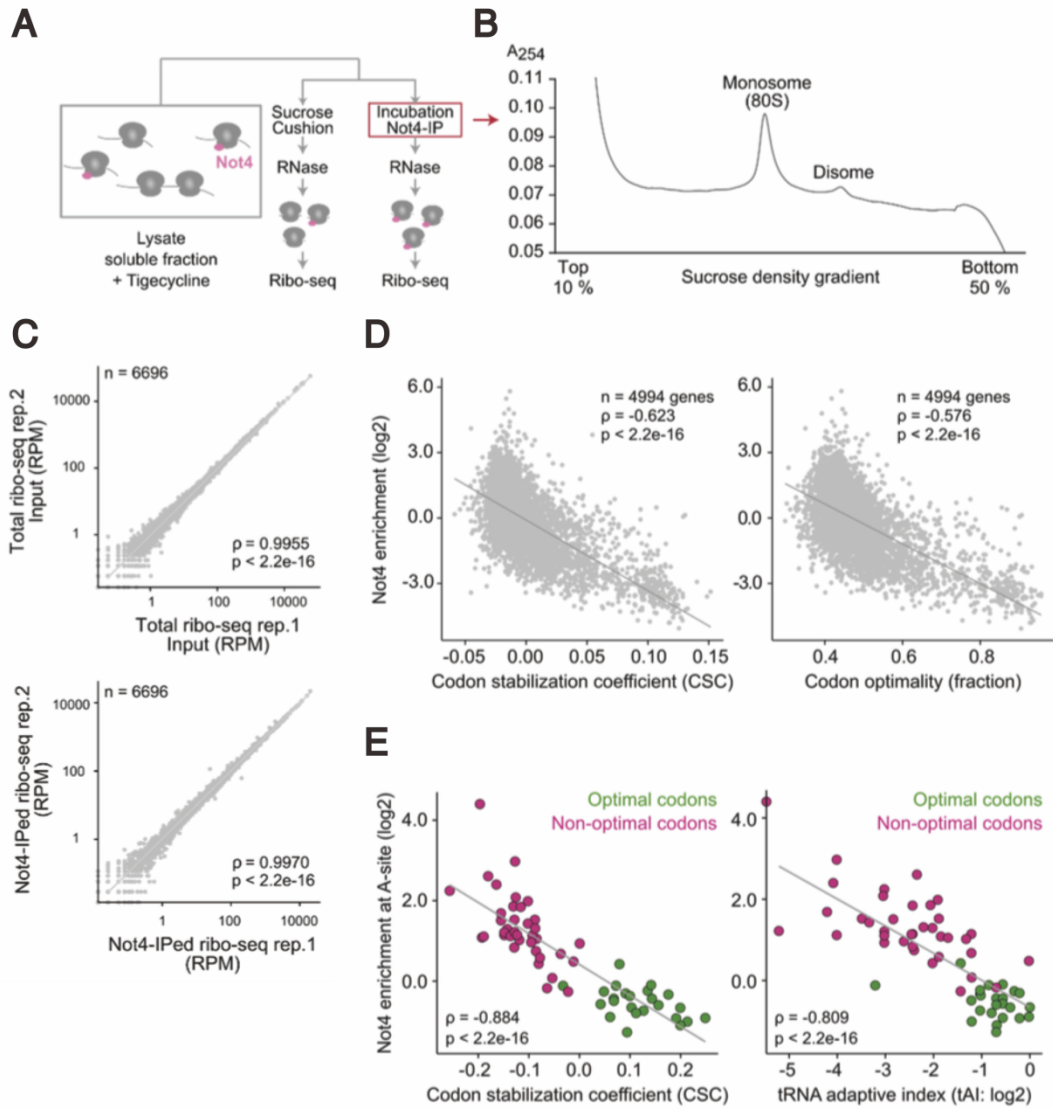


図 3-8. Ccr4-Not 複合体は至適度が低いコドンを含むリボソームを認識し結合する。(当研究室 松尾講師)

A) Monosome-enriched selective ribosome profiling。A-site に結合する翻訳伸長阻害剤 Tigecycline を処理した細胞抽出液から、Not4 と共精製されるリボソームが翻訳中の mRNA について次世代シーケンサーにより解析した。精製過程に、Incubation のステップを加えることで、内在性の RNase によって polysome を monosome 化し、Not4 と直接結合したリボソームのみを特異的に精製した。共精製されたリボソームに対し、RNase 処理をし、リボソームにより保護されている mRNA 領域のみをフラグメント化し、網羅的な Ribo-Seq を行った。

B) ショ糖密度勾配遠心法による Monosome-enriched サンプルの確認。内在性の RNase により Not4-Monosome 複合体が精製されたことを確認した。

C) クオリティチェック。Not4 により共精製された Not4-IPed ribosome fraction とコントロールとした Total ribosome fraction について、精度および再現性が高いサンプル調整ができていることが確認された。

D) Not4 により共精製された Not4-IPed ribosome が翻訳中の mRNA と、コドン至適度の指標となる Codon Stabilization Coefficient (CSC) と tRNA Adaptive Index (tAI) の比較。Not4 による共精製における mRNA の enrichment とその mRNA についての CSC もしくは tAI は逆相関することが示された。

E) Not4 により共精製された Not4-IPed ribosome の A-site に含まれるコドンと、コドン至適度の指標となる Codon Stabilization Coefficient (CSC) と tRNA Adaptive Index (tAI) の比較。Not4 による共精製における A-site に位置するコドンの enrichment と CSC もしくは tAI は逆相関することが示された。

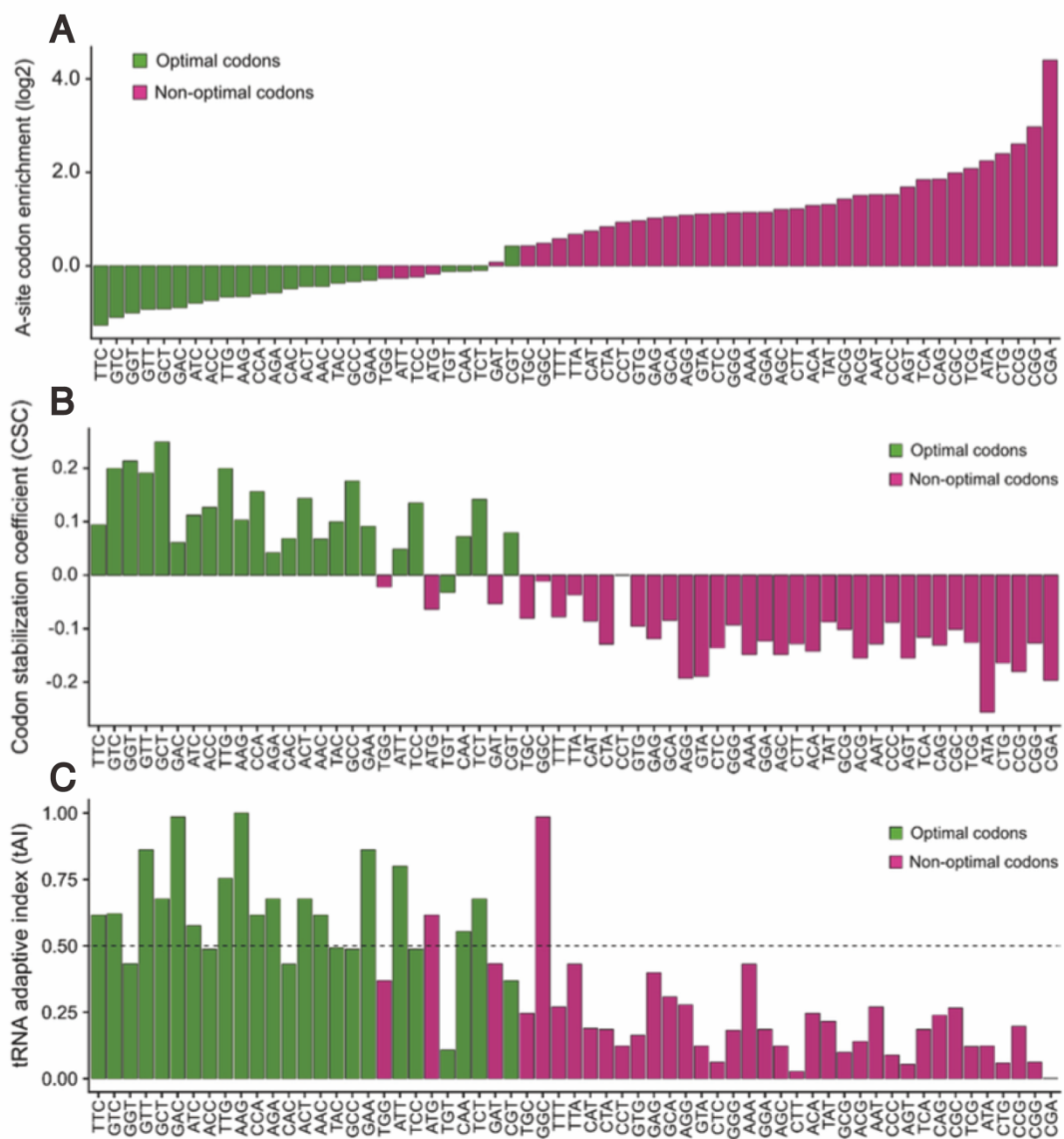


図 3-9. Ccr4-Not 複合体が結合したリボソームの A-site コドンの enrichment とコドン至適度の指標となる CSC、tAI は強く逆相関する。(当研究室 松尾講師)

- A) Monosome-enriched selective ribosome profiling により明らかになった、Not4-IPed ribosome の A-site に含まれるコドンの enrichment。至適コドンは緑色、非至適コドンは赤色で示しており、コドン至適度と Not4-IPed ribosome の A-site に含まれるコドンの enrichment は強く逆相関することが示された。
- B) CSC と Not4-IPed ribosome の A-site に含まれるコドンの enrichment の比較。
- C) tAI と Not4-IPed ribosome の A-site に含まれるコドンの enrichment の比較。

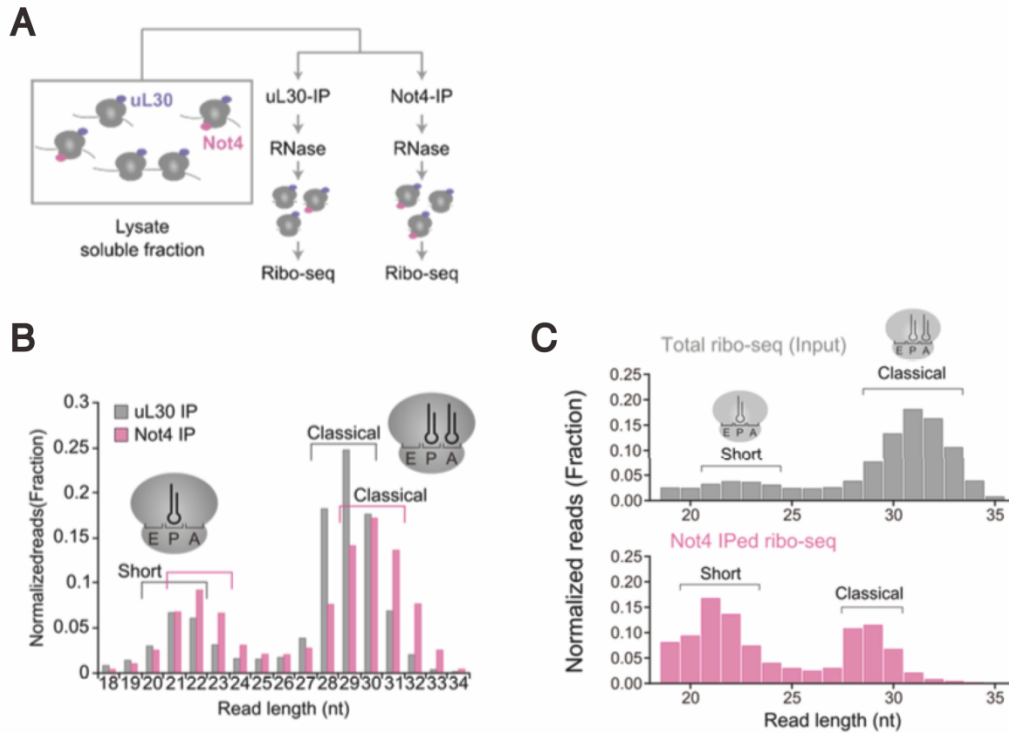


図 3-10. Ccr4-Not 複合体は空の A-site を含むリボソームと効率よく結合する。(当研究室 松尾講師)

A) Fast selective ribosome profiling. リボソームタンパク質 uL30 による精製をコントロールとし、Not4 と共精製されるリボソーム中の mRNA を Ribo-Seq により解析した。

B) Fast selective ribosome profiling で得られたリード長の比較。コントロールと比較して、Ccr4-Not 複合体が結合したリボソームが保護する fragment 長は 21-23nt の short length であり、空の A-site を含むことが示唆された。

C) Monosome-enriched selective ribosome profiling で得られたリード長の比較。インプットと比較して、Ccr4-Not 複合体が結合したリボソームが保護する fragment 長は 21-23nt の short length であり、空の A-site を含むことが示唆された。

3-3-2. Not4 を介したリボソームタンパク質 eS7 のユビキチン化は、コドン至適度に依存した mRNA 分解系に必要である

前述したように、Ccr4-Not 複合体は、コドン至適度が低い mRNA を翻訳中のリボソームに対し、優先的に結合することが明らかになった。コドン至適度は、mRNA 自身の安定性やその翻訳効率、それに由来するタンパク質合成量を決定する主要な指標として知られている。多くの場合、コドン至適度は細胞質中の tRNA 量と強く相関しており、A-site に非至適コドンが存在するときに、対応するアミノアシル tRNA の結合時間が相対的に遅延し、翻訳中のリボソームは空の A-site を生じる。したがって、Ribosome profiling の結果は、非至適コドン上で空の A-site の時間が相対的に延長すると、Not4 を含む Ccr4-Not 複合体がそれを翻訳中のリボソームに対し結合する、ということを示唆している。

それでは、コドン至適度に由来するリボソームの速度変化を検知して結合した Ccr4-Not 複合体は、リボソーム上でどのような機能を持つのか。本研究では、コドン至適度に依存した mRNA 分解に着目して解析を行った。mRNA の半減期測定では、ガラクトース存在下で転写誘導される GAL7 プロモーターの下流に、コドン至適度の異なる HIS3 遺伝子をコードするレポーター遺伝子を用いた。ノーザンブロットによる検出を行うため、HIS3 遺伝子上流に FLAG-Tag 配列を挿入し、FLAG-Tag mRNA 配列に対応するプローブを用いて mRNA の安定性を検出、定量した。このようなレポーター遺伝子をコードするプラスミドを出芽酵母株に形質転換し、ラフィノース培地で前培養を行った後、ガラクトース培地で転写誘導を行った。一定の濁度まで培養した後、グルコース培地に培地交換することで転写を遮断し、経時的にサンプリングを行った。その結果、先行研究と一致して、野生株においては、非至適コドンにより構成される *non-optimal* HIS3 mRNA(以下、*non-OPT-0%*レポーター)の半減期は 2.43 ± 0.55 min、中間的な至適度の *middle-optimal* HIS3 mRNA(以下、*mid-OPT-50%*レポーター)の半減期は

6.27±0.54 min、至適コドンにより構成される *optimal HIS3* mRNA(以下、*OPT-100%* レポーター)の半減期は 17.20±2.08 min であり、同じアミノ酸をコードする *HIS3* mRNA にも関わらず、それぞれの mRNA 安定性はコドン至適度に相関し、コドン至適度に依存した mRNA 分解が検出された(図 3-11)。

次に、Ribosome profiling 時に bait として使用した Not4 が、コドン至適度に依存した mRNA 分解に関与するか、検討するため、*not4Δ*株におけるそれぞれの mRNA の半減期を測定した。その結果、*not4Δ*株においては、*non-OPT-0%*レポーターの半減期は 7.17±0.76 min (野生株では 2.43±0.55 min)、*mid-OPT-50%*レポーターの半減期は 14.17±0.56 min (野生株では 6.27±0.56 min)、*OPT-100%*レポーターの半減期は 15.63±1.47 min (野生株では 17.20±2.08 min)であった。*non-OPT-0%*レポーターと *OPT-100%*レポーターの半減期の差は、野生株では 14.77min であったのに対し、*not4Δ*株においては 8.46min となり、コドン至適度に依存した mRNA 分解が著しく阻害された。特に、野生株に比べ、*not4Δ*株では *non-OPT-0%*レポーターの半減期が 4.74min 延長し、非至適 mRNA が顕著に安定化していたことから、Not4 はコドン至適度に依存した mRNA 分解に必須であることが明らかになった(図 3-11)。

さらに、Not4 は RING 型の E3 ユビキチンリガーゼであり、リボソームタンパク質 eS7 をモノユビキチン化することが報告されている。次に、コドン至適度に依存した mRNA 分解系における eS7 のユビキチン化の関与について検討した。Not4 による eS7 のユビキチン化部位は、eS7-K83/84 残基であるが、本研究では、これらを含む eS7-K72/76/83/84 の 4 つのリジン残基をアルギニン残基に置換した eS7a-4KR 変異体を用いた。出芽酵母の eS7 には、eS7A と eS7B のパラログが存在しているため、eS7A 及び eS7B を欠失させ、プラスミドで野生型 eS7A-WT を相補させた *es7aΔes7bΔpeS7A-WT* 株、もしくは変異型 eS7a-4KR を発現させた *es7aΔes7bΔpeS7a-4KR* 株を用いて、レポーター mRNA の半減期測定を行った。そ

の結果、*es7aΔes7bΔpeS7a-4KR* 株では、*non-OPT-0%*レポーターの半減期は 8.07 ± 0.90 min (*es7aΔes7bΔpeS7A-WT* 株では 2.80 ± 0.43 min)、*mid-OPT-50%*レポーターの半減期は 13.53 ± 0.60 min (*es7aΔes7bΔpeS7A-WT* 株では 8.13 ± 1.81 min)、*OPT-100%*レポーターの半減期は 18.33 ± 5.00 min (*es7aΔes7bΔpeS7A-WT* 株では 21.17 ± 2.29 min)であった。これらは、前述した *not4Δ*株における表現型と著しく類似しており、*non-OPT-0%*レポーターと *OPT-100%*レポーターの半減期の差は、*es7aΔes7bΔpeS7A-WT* 株では 18.37min であったのに対し、*es7aΔes7bΔpeS7a-4KR* 株においては 10.26min であった。特に、*es7aΔes7bΔpeS7A-WT* 株に比べ、*es7aΔes7bΔpeS7a-4KR* 株では *non-OPT-0%*レポーターの半減期は 5.27min 延長し、eS7 のユビキチン化の欠損により非至適 mRNA が顕著に安定化していた。以上のことから、Not4 を介したリボソームタンパク質 eS7 のユビキチン化はコドン至適度に依存した mRNA 分解に必須であることが明らかになった(図 3-11)。

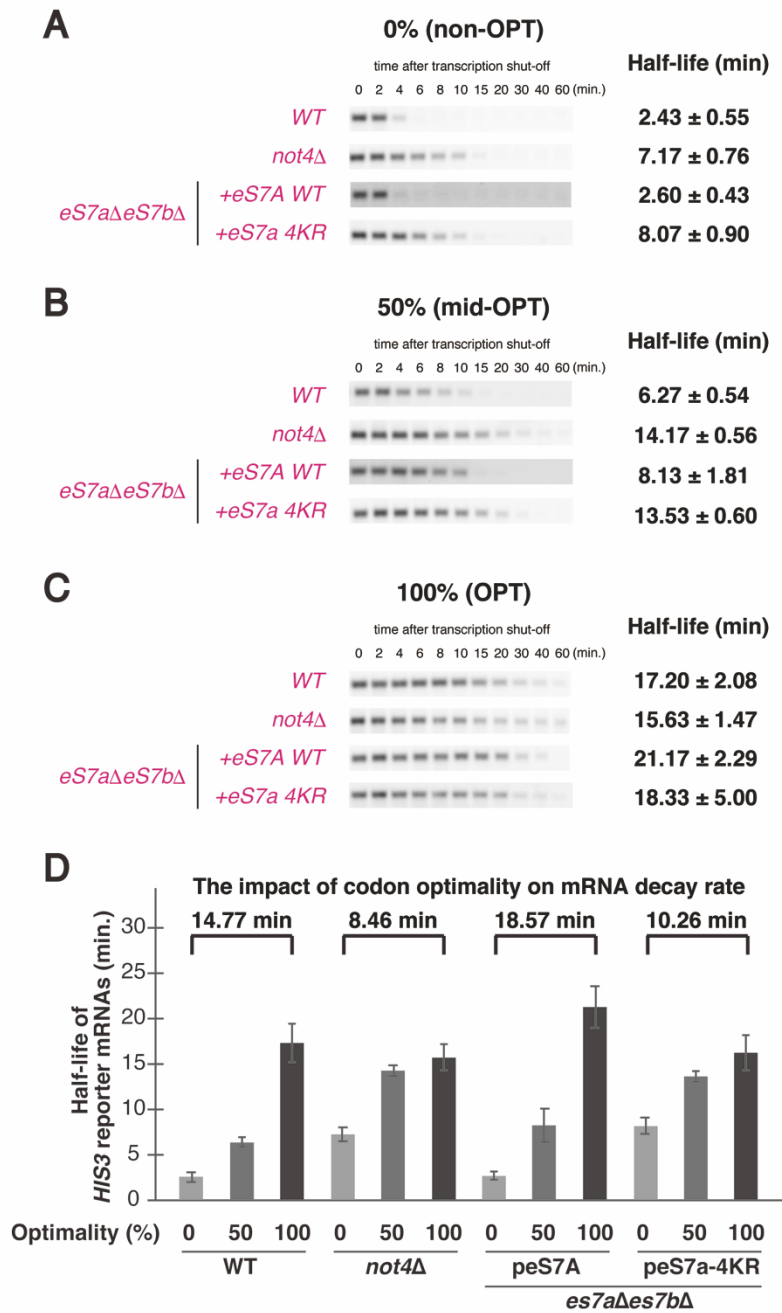


図 3-11. Not4 によるリボソームタンパク質 eS7 のユビキチン化は、コドン至適度に依存した mRNA 分解に関与する。

A) Non-OPT mRNA 半減期測定。転写遮断後の Non-OPT *FLAG-HIS3* mRNA の安定性をノーザンブロットングにより *FLAG* 配列に対応するプローブを用いて検出した。

B) Mid-OPT mRNA 半減期測定。転写遮断後の Mid-OPT *FLAG-HIS3* mRNA の安定性をノーザンブロットングにより *FLAG* 配列に対応するプローブを用いて検出した。

C) OPT mRNA 半減期測定。転写遮断後の OPT *FLAG-HIS3* mRNA の安定性をノーザンブロットングにより *FLAG* 配列に対応するプローブを用いて検出した。

D) A-C の定量結果。コドン至適度に依存した mRNA 分解は Not4 による eS7 のユビキチン化に依存することが明らかになった。

3-3-3. Ccr4-Not 複合体は Not5 の N 末端領域を介してリボソームの E-site に結合する

リボソームと Ccr4-Not 複合体の結合様式について明らかにするため、ミュンヘン大学 Roland Beckmann 研究室との共同研究により、Ccr4-Not 複合体が結合した翻訳伸長中のリボソームについて、クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析を行った。Selective ribosome profiling の際と同様に、内在性の *NOT4* に FTP (FLAG-TEV-ProteinA) タグを付加した出芽酵母株を培養し、翻訳伸長阻害剤である Tigecycline を処置した菌体から Ccr4-Not 複合体結合型リボソームを精製した(図 3-12A)。その後、精製産物をショ糖密度勾配遠心法によって monosome 画分と polysome 画分に分画し、構造解析が行われた。その結果、Not4 により精製された Ccr4-Not-リボソーム複合体は、80S リボソームであり、さらに驚くべきことに、tRNA は P-site のみに存在し、A-site は空であった(図 3-12B)。この結果は、Selective ribosome profiling の結果とも一致し、Ccr4-Not 複合体は、mRNA のコドン至適度が低く相対的にデコーディング速度が遅延したために、空の A-site を含んだ 80S リボソームを好んで結合することが明らかになった。E-site tRNA は A-site の順応に必要では無いことから、非至適コドンが A-site に位置し、相対的に空の A-site の時間が延長することで、結果的に生じた P-site tRNA のみを持つ (--/PP/--)80S リボソームを Ccr4-Not 複合体が認識すると考えられる。

さらに、2.8Å の解像度で解析することで、E-site には、Ccr4-Not 複合体の構成成分である Not5 の N 末端領域(2-113 残基 :N-Terminal Domain: NTD)が結合していることが明らかになった。Not5 の N 末端領域以外の部分や、Ccr4-Not 複合体の他の構成成分については、結合様式がフレキシブルであるために、検出されなかったと考えられる(図 3-12B)。Not5 の N 末端領域は、3つの α ヘリックスの束と 4 つ目の短い α ヘリックスを、短いリンカーが直接繋いだ構造を形成しており、このうち 3 つの α ヘリックスの束が安定な疎水性コアを形成し、60S サブ

ユニットと 40S サブユニットの間に正確に相互作用することで、Not5 の N 末端領域は E-site に安定に結合する。Not5 の N 末端領域は、P-site tRNA、25S rRNA、18S rRNA、リボソームタンパク質 eS25 の N 末端テイルと直接相互作用していたことから、P-site に tRNA を持つアSEMBルされた 80S リボソームが、Ccr4-Not 複合体の結合に必要であることが示唆された(図 3-12C,D)。以上の構造は、ショ糖密度勾配遠心後の monosome 画分、polysome 画分のいずれでも検出された。

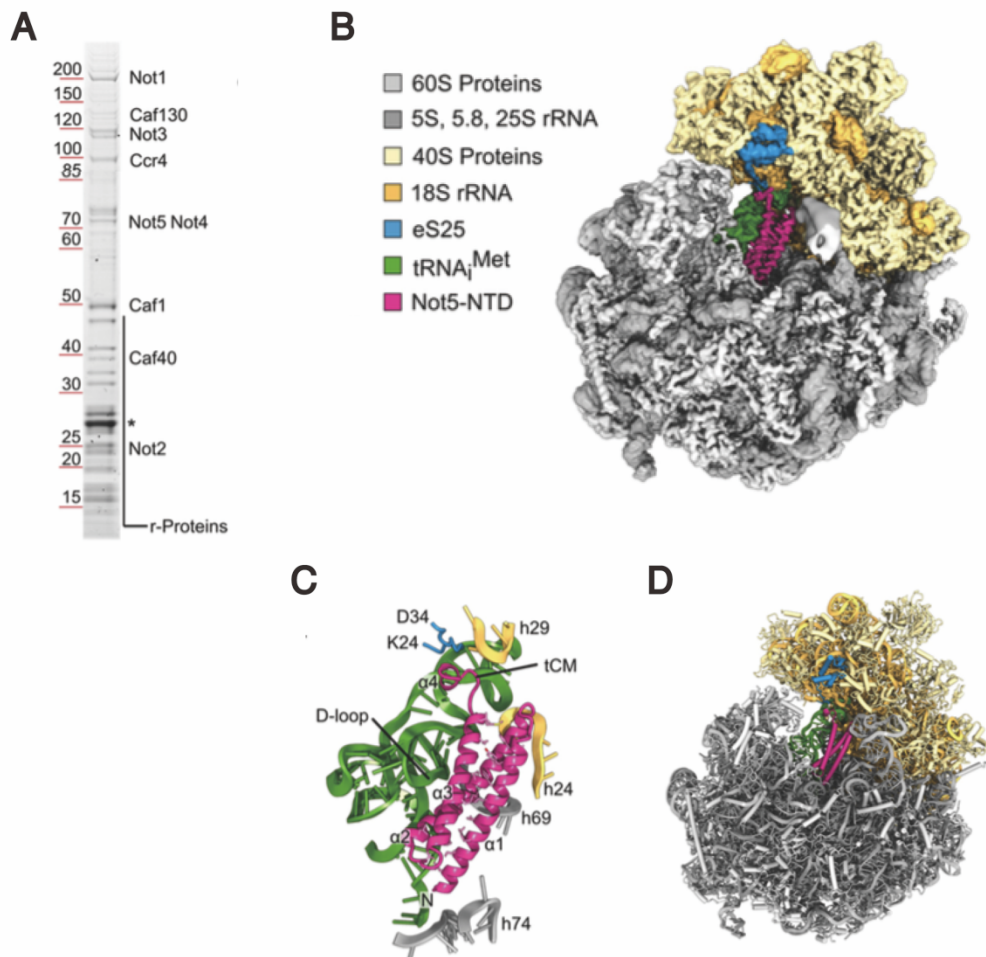


図 3-12. Ccr4-Not 複合体は、Not5 の N 末端領域を介して、空の A-site を含む 80S リボソームの E-site に結合する。(Roland Beckmann 研究室 Robert Buschauer ら)

A) Not4 で共精製される 80S リボソーム-Ccr4-Not 複合体。ゲノム編集によって Not4 に FLAG-TEV protease site-ProteinA (FTP) タグを付加した出芽酵母の細胞抽出液から、Ccr4-Not 複合体とそれに共精製されるタンパク質群を SDS-PAGE で泳動、検出した。クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析に進める前に、質量分析によってタンパク質群の帰属を行った。*は溶出の際に用いた TEV protease。

B) クライオ電子顕微鏡で得られたデンシティマップ。Ccr4-Not 複合体の構成成分である Not5 の N 末端ドメインがリボソームの E-site に結合していることが明らかになった。

C) Not5 の N 末端領域とリボソーム成分($\text{tRNA}_{i}^{\text{Met}}$ 、18S rRNA、25S rRNA、リボソームタンパク質 eS25)の相互作用の概要。tCM は tRNA-clamp motif を示す。

D) Not5-80S リボソーム複合体の原子モデル。

実際に、Not5 の N 末端領域が、Ccr4-Not 複合体とリボソームの結合に必要なか、を明らかにするため、*not5Δ*に *NOT5-HA* もしくは *Not5-ΔNTD-HA* を発現するプラスミドを形質転換した出芽酵母を培養及び集菌後、調整した細胞抽出液をシヨ糖密度勾配遠心法により分画した。その後、TCA 沈殿によりタンパク質サンプルとし、抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロッティングを行うことで、Not5 タンパク質の局在を検出した。その結果、野生型の Not5 は monosome 画分から polysome 画分にかけて広く局在したのに対し、N 末端領域を欠損した変異型の Not5-ΔNTD はリボソームに結合せず、free 画分に局在した(図 3-13A)。したがって、Not5 の N 末端領域は Ccr4-Not 複合体とリボソームの結合に必須であることが明らかになった。一方で、Ccr4-Not 複合体とリボソームが結合しない *not5ΔpNot5-ΔNTD* 株においても、Not4 を介した eS7 のユビキチン化は依然として起こっており、Not4 による eS7 のユビキチン化には、Not5 の N 末端領域を介した Ccr4-Not とリボソームの結合は必要ではないことが示された(図 3-13B)。

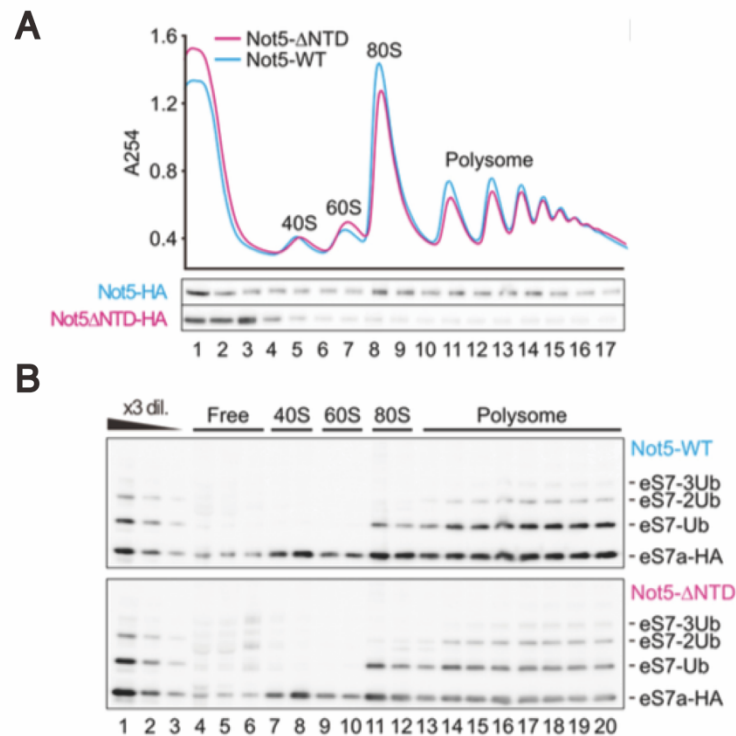


図 3-13. Not5 の N 末端領域を介した Ccr4-Not 複合体とリボソームの結合活性は、リボソームタンパク質 eS7 のユビキチン化に関与しない。(当研究室 松木)

A) ショ糖密度勾配遠心法を用いた Not5 の局在評価。出芽酵母細胞抽出液を 10%-50%のショ糖密度勾配にアプライし遠心後、分画したサンプルを TCA 沈殿により濃縮し、抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロットングにより Not5 のリボソームへの結合活性を検出した。これにより Not5 の N 末端領域はリボソームとの結合に必須であることが明らかになった。

B) ショ糖密度勾配遠心法を用いた eS7 のユビキチン化レベルの評価。A)と同様の解析時の eS7 のユビキチン化レベルを検出することで、Not5 を介したリボソームの結合活性は、eS7 のユビキチン化に影響しないことが示された。

3-3-4. Ccr4-Not 複合体は、翻訳開始過程後期及び翻訳伸長反応中のリボソームに結合する

Roland Beckmann 研究室において行われたクライオ電子顕微鏡による構造解析は、Not4 により共精製される Ccr4-Not-リボソーム複合体をショ糖密度勾配遠心法により分画したサンプルを用いて行われた。その結果、monosome 及び polysome のフラクションから分取したいずれの電子顕微鏡像においても、Not5 の N 末端領域はリボソームの E-site に結合していた。この際に、リボソーム上に存在する mRNA 及び tRNA はランダムであることが想定されたが、驚くべきことに monosome 画分由来の電子顕微鏡像においては、P-site に開始メチオニン tRNA が存在した(図 3-14A)。したがって、Ccr4-Not 複合体は翻訳伸長過程のみならず、翻訳開始過程の後期にもリボソームに結合することが明らかになった。また、薬剤処理なし、リボソーム A-site に結合する翻訳伸長阻害剤 Tigecycline、リボソーム E-site に結合する翻訳伸長阻害剤 Cycloheximide を処置した出芽酵母の細胞抽出液から、Not4 で精製する前の 80S フラクション(total)と精製した後の 80S フラクション(Pull)を調整し、tRNA ノーザンブロッティングが行われた。開始 tRNA である $\text{tRNA}_i^{\text{Met}}$ と伸長 tRNA の一種である tRNA^{Ala} に対するプローブを用いて検出した結果、精製前の 80S リボソームと比較して、Ccr4-Not 複合体が結合した精製リボソームにおいては、コントロールとして用いた伸長 tRNA の一種である tRNA^{Ala} の結合効率に差が見られなかった一方で、開始 tRNA である $\text{tRNA}_i^{\text{Met}}$ は顕著に多く含まれていることが示された(図 3-14B)。このような開始 tRNA の結合効率の上昇は Tigecycline の処理に依存しなかった一方で、Cycloheximide の処置サンプルでは顕著に低下していることが明らかになった。これは Ccr4-Not 複合体が 80S リボソームの E-site を介して結合することと一致しており、Cycloheximide と Not5 の N 末端領域が E-site において競合したために、結合効率が低下した可能性が考えられる。

さらに、当研究室 松尾講師により行われた Not4 を介した Selective ribosome profiling の結果において、Not4 と共精製されたりボソーム由来のピークが ORF に広く分布していたことに加え、コントロールとしたりボソームタンパク質 uL30 に共精製されたりボソーム由来のピークと比較して、Not4 に共精製されたりボソーム由来のピークは、開始コドン上に著しく蓄積していた(図 3-14C,D)。したがって、翻訳開始反応の後期課程において、スキヤニングを終えて開始コドン上に位置し、開始メチオニン tRNA がリクルートされた後の 80S リボソームに対し、Ccr4-Not 複合体、少なくとも Not4 がリクルートされることが示唆された。Not5 の N 末端領域が結合する E-site と Not4 がユビキチン化するリボソームタンパク質 eS7 は、リボソーム上において非常に遠位な位置に存在するため、E-site に結合した Not5 を含む Ccr4-Not 複合体と eS7 をユビキチン化する Not4 を含む Ccr4-Not 複合体は同一分子である可能性は低いと考えられる。さらに、Not4 によるリボソームタンパク質 eS7 のユビキチン化は、Not5 を介した Ccr4-Not 複合体とリボソームとの安定な結合には依存しないことから、翻訳開始反応の後期において、Not4 は単独で、もしくは Ccr4-Not 複合体として、Not5 の N 末端領域非依存にリボソームにリクルートされ、リボソームタンパク質 eS7 をユビキチン化することが示唆された。しかしながら、Not5 の N 末端領域の翻訳開始反応における機能については明らかになっていない。

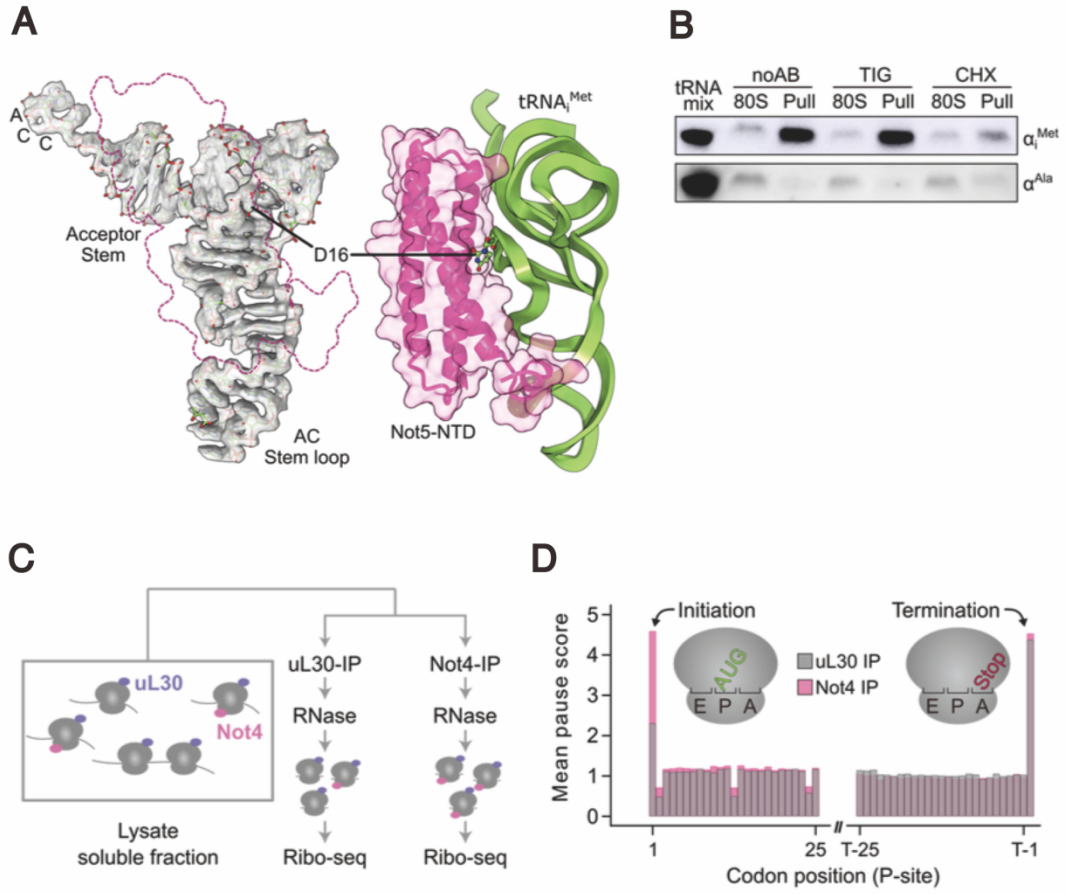


図 3-14. Not5 の N 末端領域を介した Ccr4-Not 複合体とリボソームの結合活性は、リボソームタンパク質 eS7 のユビキチン化に関与しない。(A,B: Roland Beckmann 研究室 Robert Buschauer ら、C,D: 当研究室 松尾講師)

A) クライオ電子顕微鏡で得られたデンシティマップと原子モデル。Ccr4-Not 複合体の構成成分である Not5 の N 末端ドメインが開始 tRNA である tRNA^{Met} の D-loop と相互作用していることが明らかになった。

B) tRNA ノーザンプロットング。薬剤処理なし、リボソーム A-site に結合する翻訳伸長阻害剤 Tigecycline、リボソーム E-site に結合する翻訳伸長阻害剤 Cycloheximide を処置した出芽酵母の細胞抽出液から、Not4 で精製する前の 80S フラクシオン(total)と精製した後の 80S フラクシオン(Pull)を調整し、等量のリボソームをアプライした。開始 tRNA である tRNA^{Met} と伸長 tRNA の一種である tRNA^{Ala} に対するプローブを用いて検出した結果、Ccr4-Not 複合体が結合したリボソームには開始 tRNA が多く含まれていることが示された。

C) Fast selective ribosome profiling。リボソームタンパク質 uL30 による精製をコントロールとし、Not4 と共精製されるリボソーム中の mRNA を Ribo-Seq により解析した。

D) Fast selective ribosome profiling で得られたリード位置の比較。コントロールと比較して、Ccr4-Not 複合体が結合したリボソームが保護する fragment は開始コドンで顕著に増加しており、Ccr4-Not 複合体は翻訳開始段階で 80S リボソームに結合することが示唆された。

以上のように、ショ糖密度勾配遠心法により分画した monosome 画分における Ccr4-Not-リボソーム複合体は、翻訳開始反応過程の後期であることが示されたため、次に、polysome 画分における Ccr4-Not-リボソーム複合体の構造解析が行われた。その結果、polysome 画分においても、A-site が空であり、tRNA は P-site のみに存在し、E-site に Not5 が結合した電子顕微鏡像が得られた(図 3-15A,B)。polysome 画分で得られた構造は、monosome 画分で得られた構造と非常に類似していたが、tRNA 領域の解像度が低く、得られた像は多種の tRNA 分子の混合物であると考えられることから、polysome 画分に含まれる Ccr4-Not 複合体が結合した翻訳伸長反応中のリボソームには様々な tRNA が含まれることが示唆された(図 3-15A,B)。

実際に、monosome 画分由来のリボソームのペプチジルトランスフェラーゼセンター近傍では、P-site tRNA の CCA 末端にメチオニン残基がひとつ付加されているのに対し、polysome 画分では、新生ペプチド鎖がペプチジルトランスフェラーゼセンターからリボソーム出口トンネルに向けて伸長しており、それぞれが翻訳開始過程後期、翻訳伸長過程であることが確認されている(図 3-15C,D)。

本項の結果から、Ccr4-Not 複合体は、翻訳開始後期と翻訳伸長中にリボソームへと結合しており、かつ Not5 を介した E-site への結合は Not4 による eS7 のユビキチン化に関与しないことから、Ccr4-Not 複合体は、翻訳開始後期に Not4 を介して eS7 をユビキチン化したのち、翻訳伸長中には Not5 を介してリボソームの E-site に結合する可能性が示唆された。

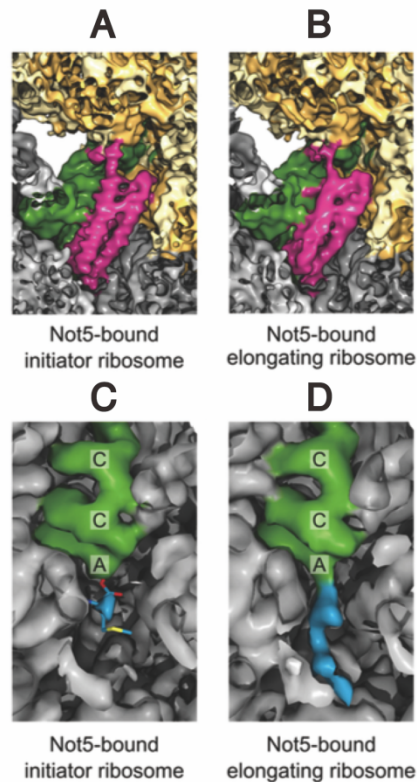


図 3-15. Ccr4-Not 複合体は、翻訳開始および翻訳伸長中の 80S リボソームと Not5 の N 末端領域を介して結合する。(Roland Beckmann 研究室 Robert Buschauer ら)

A,B) Not5 の結合部位についてクライオ電子顕微鏡で得られたデンシティマップ。A)では翻訳開始段階、B)では翻訳伸長段階のリボソームに対して、Ccr4-Not 複合体は Not5 の N 末端領域を介して結合することが明らかになった。緑色は P-site tRNA、赤色は Not5 の N 末端ドメインを示す。

C,D) リボソームの活性中心であるペプチジルトランスフェラーゼセンター(PTC)についてクライオ電子顕微鏡で得られたデンシティマップ。Not5-80S リボソーム複合体中の P-site tRNA の CCA 末端は、C)では青色で示されたメチオニンとエステル結合を形成しており、翻訳開始段階であること、D)では青色で示された新生ペプチド鎖を形成しており、翻訳伸長段階であることが明らかになった。

3-3-5. Not5 の N 末端領域はリボソームタンパク質 eS25 との相互作用により、安定に E-site に結合する

Roland Beckmann 研究室において行われた Ccr4-Not 複合体結合型リボソームの構造解析の結果より、Not5 の N 末端領域は、P-site tRNA と相互作用することが明らかになった。Not5 の N 末端領域のうち、ヘリックス $\alpha 2$ が tRNA の D-loop のバックボーンとの間に、ヘリックス $\alpha 2$ と $\alpha 3$ は D-arm との間に複数の水素結合を形成していた。さらに、Not5 の K103-L110 残基は、tRNA のアンチコドンステムループのリン酸バックボーンと相互作用することで、Not5 と P-site tRNA の結合を安定化させるため、tRNA clamp-motif (tCM) と名付けた(図 3-16A)。

このうち、Not5 の F105/A109 残基はリボソームタンパク質 eS25 の K25/K29 残基と水素結合を形成しており、これによって、リボソームタンパク質 eS25 の N 末端テイルは、Not5 の tCM を所定の位置に保持し、tCM と tRNA の相互作用をさらに安定化していることが示唆された(図 3-16B)。通常、eS25 のテイルは構造学的にフレキシブルであるにも関わらず、Not5 の存在下においては、eS25 の N 末端テイルが P-site 方向へと伸長することで、eS25 が 18S rRNA と新たに安定な構造を形成していた。その結果、Not5 の N 末端領域と 18S rRNA との相互作用を誘発し、Not5 の tCM と tRNA バックボーンとの結合を安定化すると考えられる。

したがって、Not5 の N 末端領域は、リボソームタンパク質 eS25 の構造安定化、相互作用パートナーの変化をはじめとする、非常に特異的で複雑な結合様式により、P-site に位置する tRNA と複数の相互作用を形成し、E-site に安定に結合することが明らかになった(図 3-16C)。

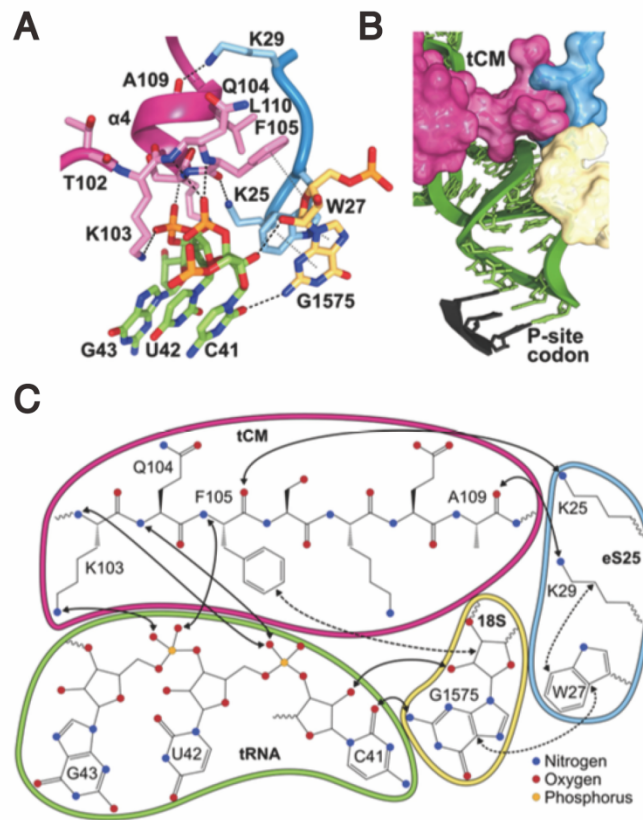


図 3-16. Not5 の N 末端領域は、P-site tRNA、18S rRNA、25S rRNA、リボソームタンパク質 eS25 と相互作用し、リボソーム E-site に安定に結合する。(Roland Beckmann 研究室 Robert Buschauer ら)

A) Not5 の tRNA clamp motif (tCM) と開始 tRNA である $tRNA_i^{Met}$ 、リボソームタンパク質 eS25、18S rRNA の間の相互作用部位の概略。赤色は Not5 の tCM、緑色は開始 tRNA、青色はリボソームタンパク質 eS25、黄色は 18S rRNA を示す。

B) A) で示した相互作用部位のうち、アンチコドンステムループ近傍の原子モデル。

C) A) で示した相互作用パートナー分子の概略。実線矢印は極性相互作用、破線矢印は疎水性相互作用を示す。

3-3-6. リボソームタンパク質 eS25 により安定化される Not5 の N 末端領域の E-site への結合は、コドン至適度に依存した mRNA 分解系に参与する

クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析の結果、Ccr4-Not 複合体は、その構成因子である Not5 の N 末端領域を介して、リボソームの E-site に結合することが明らかになった。Not5 は種間で広く保存されており、ヒトでは CNOT3 として mRNA の安定性制御に参与することが知られている(Muhlrad and Parker, 2005; Suzuki *et al.*, 2015; Alhusaini and Collier, 2016)。このため、Not5 の N 末端領域を介した Ccr4-Not 複合体とリボソームへの結合が、コドン至適度に依存した mRNA 分解に参与するか、*not5Δ* に空ベクター、野生型 *NOT5-HA*、N 末端領域を欠失した変異型 *Not5-ΔNTD-HA* を発現するプラスミドを形質転換した出芽酵母を培養し、mRNA の半減期測定を行った。その結果、*non-OPT-0%* レポーターの半減期は、*not5Δ* 欠損株では 6.43 ± 0.21 min であり、野生型 *not5ΔpNOT5* 株では 2.20 ± 0.16 min と相補したのに対し、変異型 *not5ΔpNot5-ΔNTD* 株では 5.83 ± 0.12 min と相補しなかった。したがって、Not5 の N 末端領域は、非至適 mRNA の分解に必須であることが明らかになった。また、*mid-OPT-50%* レポーターの半減期は、*not5Δ* では 8.70 ± 1.58 min であり、野生型 *not5ΔpNOT5* 株では 7.56 ± 0.56 min と相補したのに対し、変異型 *not5ΔpNot5-ΔNTD* 株では 8.57 ± 0.88 min と相補しなかった。さらに、*OPT-100%* レポーターの半減期は、*not5Δ* では 23.90 ± 3.49 min、野生型 *not5ΔpNOT5* 株では 29.03 ± 4.36 min、変異型 *not5ΔpNot5-ΔNTD* 株では 25.43 ± 4.20 min であった。*non-OPT-0%* レポーターと *OPT-100%* レポーターの半減期の差は、野生型 *not5ΔpNOT5* 株では 26.83 min であったのに対し、*not5Δ* では 17.47 min、変異型 *not5ΔpNot5-ΔNTD* 株では 19.60 min であり、Not5 の N 末端領域を欠失させると、mRNA 分解におけるコドン至適度依存性が抑制された。したがって、Not5 の N 末端領域は、コドン至適度に依存した mRNA 分解に参与することが明らかになった(図 3-17)。

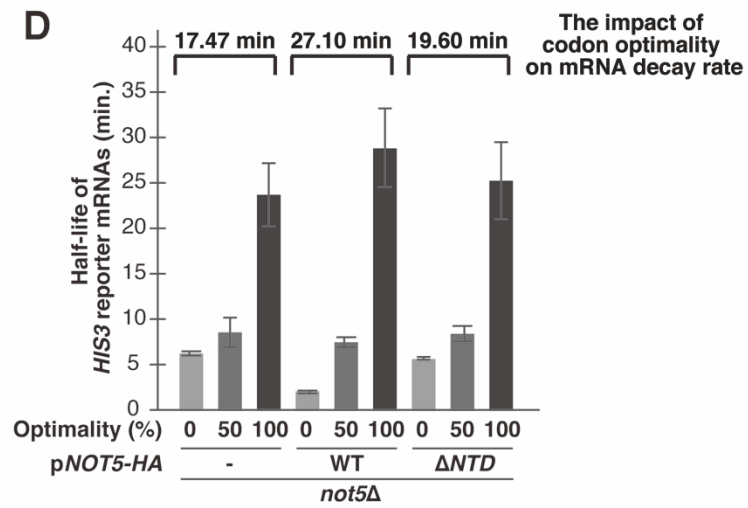
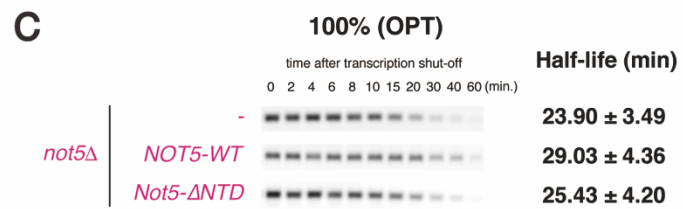
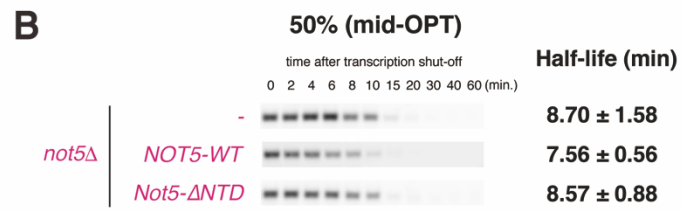
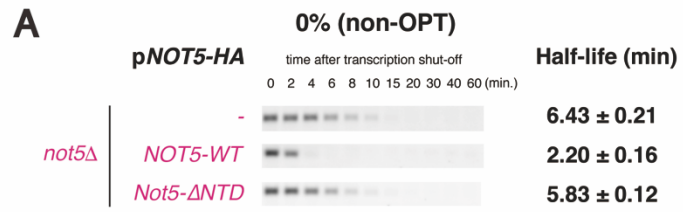


図 3-17. Not5 の N 末端領域を介したリボソームへの結合活性は、コドン至適度に依存した mRNA 分解に関与する。

A) Non-OPT mRNA 半減期測定。転写遮断後の Non-OPT *FLAG-HIS3* mRNA の安定性をノーザンブロットングにより *FLAG* 配列に対応するプローブを用いて検出した。

B) Mid-OPT mRNA 半減期測定。転写遮断後の Mid-OPT *FLAG-HIS3* mRNA の安定性をノーザンブロットングにより *FLAG* 配列に対応するプローブを用いて検出した。

C) OPT mRNA 半減期測定。転写遮断後の OPT *FLAG-HIS3* mRNA の安定性をノーザンブロットングにより *FLAG* 配列に対応するプローブを用いて検出した。

D) A-C の定量結果。コドン至適度に依存した mRNA 分解は Not5 の N 末端領域を介したリボソームへの結合活性に依存することが明らかになった。

前述したクライオ電子顕微鏡を用いた構造解析により、リボソームの E-site に結合した Not5 は、リボソームタンパク質 eS25 と直接相互作用しており、これにより Not5 と P-site tRNA の相互作用が安定化されることが示唆されている。Jeff Coller 研究室において行われた mRNA 半減期測定の結果、eS25 は非至適コドンにより構成される *non-OPT-0%* レポーターの分解に必須であることが明らかになった(図 3-18)。したがって、リボソームタンパク質 eS25、および、これにより安定化される Not5 の N 末端領域とリボソーム E-site との結合は、コドン至適度に依存した mRNA 分解を促進することが示唆された。

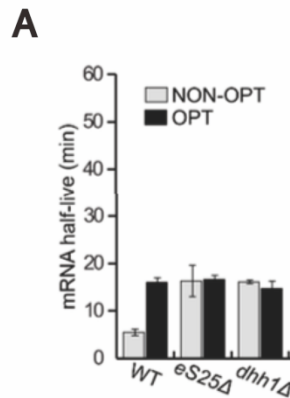


図 3-18. リボソームタンパク質 eS25 は、コドン至適度に依存した mRNA 分解に必須である。(Jeff Coller 研究室 Ying-Hsin Chen ら)

A) Non-OPT および OPT mRNA 半減期測定。転写遮断後の Non-OPT もしくは OPT *PGK1 5'UTR-Synthetic ORF-PGK1 3'UTR* mRNA の安定性を、³²P ラベルしたアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いたノーザンブロッティングにより検出した。その結果、コドン至適度に依存した mRNA 分解に不可欠である Dhh1 と同程度に eS25 も必須であることが示された。

3-3-7. Not4 による eS7 のユビキチン化は、Not5 の N 末端領域の E-site への結合に必須である

これまでの結果から、Ccr4-Not 複合体は、(1) Not4 を介したリボソームタンパク質 eS7 のユビキチン化、(2) Not5 の N 末端領域を介したリボソーム E-site への結合、を行うことで、コドン至適度に依存した mRNA の分解を誘導することが明らかになった。前述したショ糖密度勾配遠心法の結果から、Not5 の N 末端領域は、Not4 による eS7 のユビキチン化に必須ではないことが明らかになっている。このため、Not4 によるユビキチン化が行われる際に、Ccr4-Not 複合体が Not5 を介してリボソームに結合しているわけではなく、これらは別のタイミングであることが示唆されている。

Not4 による eS7 のユビキチン化と Not5 を介したリボソーム E-site への結合の関連性を検討するため、多重欠損株を用いて mRNA の半減期測定を行った。前述したように、*non-OPT-0%*レポーターの半減期は、野生型 *not5ΔpNOT5* 株では 2.20 ± 0.16 min、変異型 *not5ΔpNot5-ΔNTD* 株では 5.83 ± 0.12 min であり、その差は 3.63min だった。これに対し、*not4Δnot5Δ* の二重欠損株に野生型 *NOT5-HA* もしくは変異型 *Not5-ΔNTD-HA* をプラスミドで発現させ、半減期測定を行うと、*not4Δnot5ΔpNOT5-WT* 株では 9.10 ± 0.72 min、*not4Δnot5ΔpNot5-ΔNTD* 株では 8.97 ± 0.63 min であり、その差は 0.13min となった。したがって、*NOT4* の欠失によりほぼ完全に Not5 の N 末端領域の効果が抑制されることが明らかになった。同様に、*mid-OPT-50%*レポーターの半減期は、野生型 *not5ΔpNOT5* 株では 7.56 ± 0.56 min、変異型 *not5ΔpNot5-ΔNTD* 株では 8.57 ± 0.88 min であり、その差は 1.01min だったのに対し、*not4Δnot5ΔpNOT5-WT* 株では 18.77 ± 1.02 min、*not4Δnot5ΔpNot5-ΔNTD* 株では 19.17 ± 2.69 min であり、その差は 0.40min となり、同様に *NOT4* の欠失によりほぼ完全に Not5 の N 末端領域の効果が抑制された。また、*OPT-100%*レポーターの半減期は、野生型 *not5ΔpNOT5* 株では 29.03 ± 4.36

min、変異型 *not5ΔpNot5-ΔNTD* 株では 25.43 ± 4.20 min であり、その差は 3.60 min だったのに対し、*not4Δnot5ΔpNOT5-WT* 株では 18.30 ± 1.47 min、*not4Δnot5ΔpNot5-ΔNTD* 株では 18.87 ± 0.93 min となり、その差は 0.57 min であった。これらの結果から、コドン至適度の異なるレポーター mRNA の半減期において、*NOT4* の欠失により完全に Not5 の N 末端領域の効果が抑制されることが示唆された。さらに、*non-OPT-0%*レポーターと *OPT-100%*レポーターの半減期の差は、*not5ΔpNOT5-WT* 株では 26.80 min、*not5ΔpNot5-ΔNTD* 株では 19.60 min であり、Not5 の N 末端領域の効果が 7.20 min であったのに対し、*not4Δnot5ΔpNOT5-WT* 株では 9.20 min、*not4Δnot5ΔpNot5-ΔNTD* 株では 9.90 min であったことから、*NOT4* の欠失により Not5 の N 末端領域の効果が 0.70 min とほぼ完全に阻害された。したがって、コドン至適度に依存した mRNA 分解における Not5 の N 末端領域の活性は、Not4 に依存することが示された(図 3-19)。

さらに本研究では、Not4 と同様に eS7 のユビキチン化も Not5 の N 末端領域の活性に必須であることが明らかにした。*es7aΔes7bΔnot5Δ* の三重欠損株に eS7 がユビキチン化を受けない *eS7a-4KR* を発現するプラスミドと、野生型 *NOT5-HA* もしくは変異型 *Not5-ΔNTD-HA* をプラスミドで発現させ、*non-OPT-0%*レポーターの半減期測定を行うと、*es7aΔes7bΔnot5ΔpeS7a-4KRpNOT5-HA* 株では 9.83 ± 1.72 min、*es7aΔes7bΔnot5ΔpeS7a-4KRpNOT5ΔNTD-HA* 株では 9.10 ± 0.22 min であり、その差は 0.73 min となり、eS7 のユビキチン化の欠損によっても、*NOT4* 欠失下と同様に、ほぼ完全に Not5 の N 末端領域の効果が抑制された。同様に、*mid-OPT-50%*レポーターの半減期は、*es7aΔes7bΔnot5ΔpeS7a-4KRpNOT5-HA* 株では 17.43 ± 0.78 min、*es7aΔes7bΔnot5ΔpeS7a-4KRpNOT5ΔNTD-HA* 株では 16.27 ± 2.16 min であり、その差は 1.16 min であった。さらに、*OPT-100%*レポーターの半減期は、*es7aΔes7bΔnot5ΔpeS7a-4KRpNOT5-HA* 株では 16.30 ± 0.88 min、*es7aΔes7bΔnot5ΔpeS7a-4KRpNOT5ΔNTD-HA* 株では 16.40 ± 2.11 min であり、その

差は 0.10min であったことから、コドン至適度の異なるレポーターの mRNA の半減期において、eS7 のユビキチン化の欠損によっても完全に Not5 の N 末端領域の効果が抑制された。また、*non-OPT-0%*レポーターと *OPT-100%*レポーターの半減期の差は、*not5ΔpNOT5-WT* 株では 26.80min、*not5ΔpNot5-ΔNTD* 株では 19.60min であり、Not5 の N 末端領域の効果が 7.20min であった一方で、*es7aΔes7bΔnot5ΔpeS7a-4KRpNOT5-HA* 株では 6.47min、*es7aΔes7bΔnot5ΔpeS7a-4KRpNOT5ΔNTD-HA* 株では 7.30min であったことから、eS7 のユビキチン化の欠損下では Not5 の N 末端領域の効果が 0.83min とほぼ完全に阻害された。したがって、以上の結果から、コドン至適度に依存した mRNA 分解における Not5 の N 末端領域の活性は、Not4 を介した eS7 のユビキチン化に依存し、また、Not4 による eS7 のユビキチン化と Not5 を介した Ccr4-Not 複合体とリボソームの結合が同一経路であることが示された(図 3-19)。

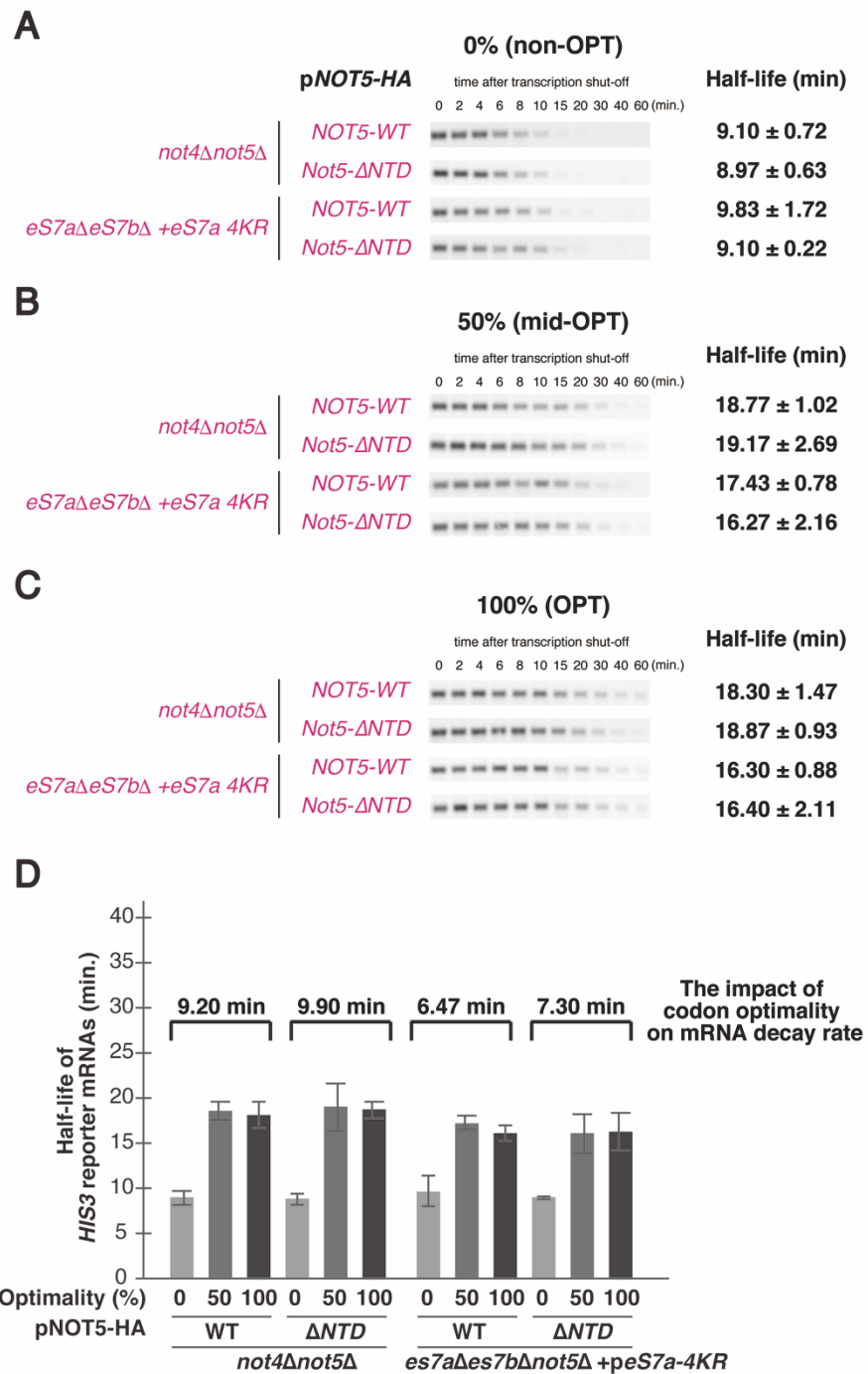


図 3-19. Not4 による eS7 のユビキチン化と Not5 の N 末端領域を介したリボソームへの結合は、同一経路である。

A) Non-OPT mRNA 半減期測定。転写遮断後の Non-OPT *FLAG-HIS3* mRNA の安定性をノーザンブロットングにより *FLAG* 配列に対応するプローブを用いて検出した。

B) Mid-OPT mRNA 半減期測定。転写遮断後の Mid-OPT *FLAG-HIS3* mRNA の安定性をノーザンブロットングにより *FLAG* 配列に対応するプローブを用いて検出した。

C) OPT mRNA 半減期測定。転写遮断後の OPT *FLAG-HIS3* mRNA の安定性をノーザンブロットングにより *FLAG* 配列に対応するプローブを用いて検出した。

D) A-C の定量結果。Not4 による eS7 のユビキチン化と Not5 の N 末端領域を介したリボソームへの結合は、同一経路であることが明らかになった。

次に、Not5 を介した Ccr4-Not 複合体とリボソームの結合が、Not4 を介した eS7 のユビキチン化に依存するのかを検討した。NOT5 が欠失した各種変異株として、*not5*Δ株、*not4*Δ*not5*Δ株、*es7a*Δ*es7b*Δ*not5*Δ*peS7A-WT* 株、*es7a*Δ*es7b*Δ*not5*Δ*peS7a-4KR* 株に、NOT5-HA を発現するプラスミドを形質転換した出芽酵母を培養及び集菌後、調整した細胞抽出液をショ糖密度勾配遠心法により分画した。その後、TCA 沈殿によりタンパク質サンプルとし、抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロッティングを行うことで、Not5 タンパク質の局在を検出した。その結果、*not5*Δ株に相補させた Not5 は monosome および polysome 画分に局在したのに対し、*not4*Δ*not5*Δ株に相補させた Not5 はリボソームに結合せず、free 画分に局在した(図 3-20A)。さらに、*es7a*Δ*es7b*Δ*not5*Δ*peS7A-WT* 株に相補させた Not5 は、*not5*Δ株と同様に翻訳中のリボソームに結合したのに対し、*es7a*Δ*es7b*Δ*not5*Δ*peS7a-4KR* 株に相補させた Not5 は、*not4*Δ*not5*Δ株と同様に翻訳中のリボソームに結合しなかった(図 3-20A)。したがって、Not4 を介したリボソームタンパク質 eS7 のユビキチン化反応は、Not5 の N 末端領域を介した Ccr4-Not 複合体とリボソームの結合に必須であり、Not5 とリボソームの E-site の結合反応の上流で起こることが明らかになった。以上の結果とクライオ電子顕微鏡を用いた構造解析の結果と合わせると、翻訳開始過程後期において、Not4 はリボソームタンパク質 eS7 をユビキチン化し、翻訳伸長反応時に、Ccr4-Not 複合体はリボソームの翻訳伸長速度の低下を検知し、Not5 の N 末端領域を介してリボソームの E-site に結合することで、コドン至適度に依存した mRNA 分解を誘導することが明らかになった。

また、NOT4 と NOT5 の二重欠損株は致死であることから、これらが関与するコドン至適度に依存した mRNA 分解の生体における重要性が示唆されている(図 3-20B)。

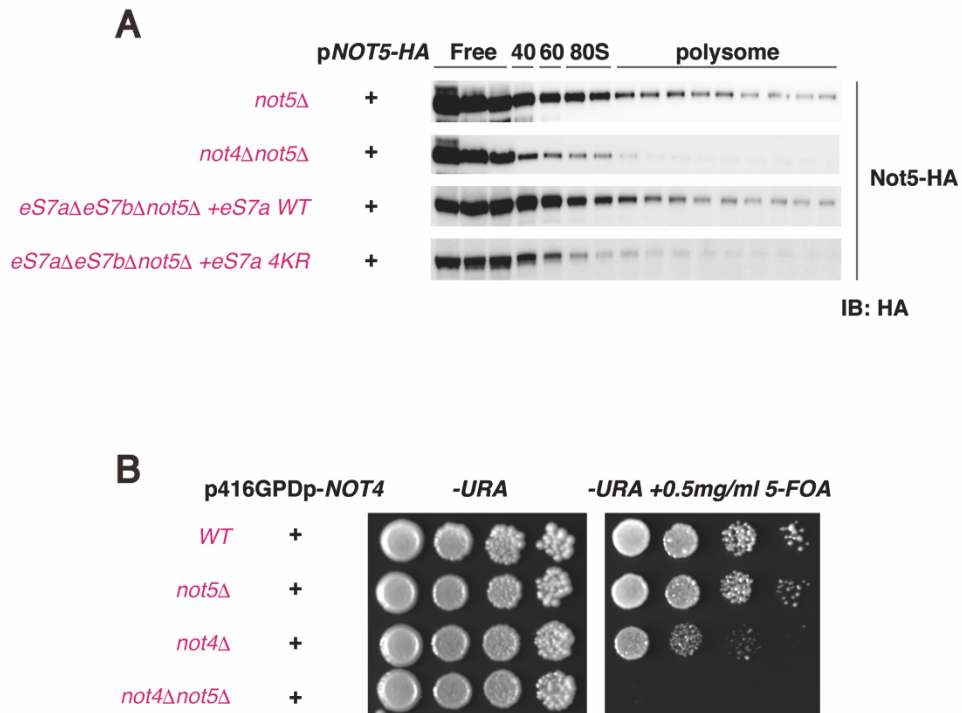


図 3-20. Not4 による eS7 のユビキチン化は Not5 とリボソームの結合に必須である。

A) ショ糖密度勾配遠心法を用いた Not5 の局在評価。HA タグを付加した Not5 を発現するプラスミドを形質転換した出芽酵母由来の細胞抽出液を 10%-50%のショ糖密度勾配にアプライし遠心後、分画したサンプルを TCA 沈殿により濃縮し、抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロットティングにより Not5 のリボソームへの結合活性を検出した。これにより Not5 の N 末端領域とリボソームの結合には Not4 による eS7 のユビキチン化が必須であることが明らかになった。

B) 出芽酵母の Spot assay。Not4 を過剰発現し、アミノ酸選択マーカーとして Uracil 合成酵素遺伝子である *URA3* をコードする p416*GPDp*-*NOT4* を出芽酵母株に形質転換し培養後、10 倍の希釈系列を調整した。*URA3* がコードするオロチジン酸デカルボキシラーゼはピリミジンアナログである 5-FOA を代謝し毒性物質に変換するために、*URA3* を含む酵母細胞は、5-FOA 存在下では生育不能になる。Uracil を含まない SDC-Ura プレートと、Uracil を含まず 5-FOA を含む SDC-Ura+5-FOA プレートに対し、形質転換後の出芽酵母液を滴下することで、*NOT4* と *NOT5* の二重欠損株は致死であることが示された。

3-3-8. Not4 による eS7 のモノユビキチン化が、コドン至適度に依存した mRNA 分解に必須である

先行研究において、Not4 による eS7 のモノユビキチン化は、リボソームの停滞、衝突のセンサータンパク質である E3 ユビキチンリガーゼ Hel2 による K63 型ポリユビキチン鎖の形成を可能にし、mRNA 品質管理機構 NGD を惹起することが報告されている(Ikeuchi *et al.*, 2019)。このため、Not5 の N 末端領域を介した Ccr4-Not 複合体とリボソームの結合に必須である eS7 のユビキチン化が、モノユビキチン化であるのか、K63 型ポリユビキチン化であるのか、検討を行なった。

内在性のユビキチンをコードする遺伝子を全て欠失させ、野生型ユビキチン (*Ubi-WT*) もしくは K63 型ポリユビキチン鎖を形成できない変異型ユビキチン (*Ubi-K63R*) を発現させた出芽酵母株に、*NOT5-HA* 及び *eS7A-HA* を発現するプラスミドを形質転換し、培養及び集菌後、調整した細胞抽出液をショ糖密度勾配遠心法により分画した。その後、TCA 沈殿によりタンパク質サンプルとし、抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロッティングを行うことで、Not5 タンパク質の局在と eS7A のユビキチン化レベルを検出した。その結果、eS7A のポリユビキチン鎖は、*Ubi-WT* 株と比較して *Ubi-K63R* 株において完全に消失したことから、eS7A 上に形成されるポリユビキチン鎖は、主に K63 型ポリユビキチン鎖であることが明らかになった。その一方で、Not5 は *Ubi-K63R* 株においても polysome 画分に局在したことから、Not5 を介した Ccr4-Not 複合体とリボソームとの結合は、eS7 の K63 型ポリユビキチン化には依存せず、モノユビキチン化に依存する可能性が示唆された(図 3-21)。

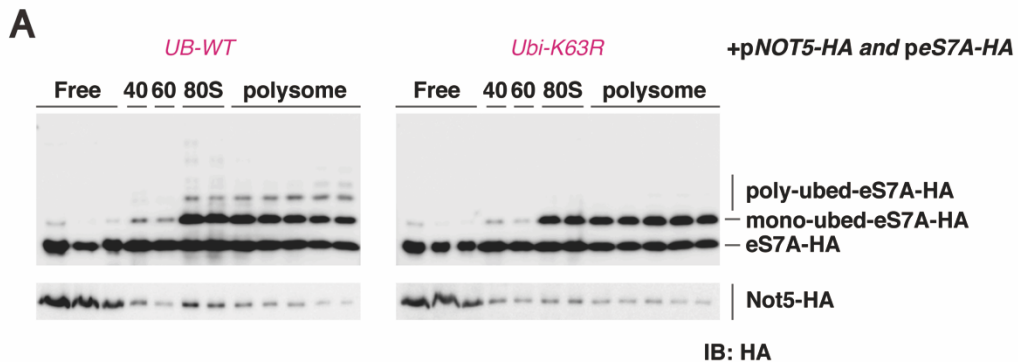


図 3-21. Not4 による eS7 のモノユビキチン化は Not5 とリボソームの結合に必須である。

A) ショ糖密度勾配遠心法を用いた Not5 の局在と eS7 のユビキチン化レベルの評価。HA タグを付加した Not5 と HA タグを付加した eS7 を発現する各プラスミドを形質転換した出芽酵母由来の細胞抽出液を 10%-50%のショ糖密度勾配にアプライし遠心後、分画したサンプルを TCA 沈殿により濃縮し、抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロットングにより Not5 のリボソームへの結合活性を検出した。これにより、Not5 の N 末端領域とリボソームの結合には eS7 のポリユビキチン化は関与せず、モノユビキチン化が必須であることが明らかになった。本実験では、出芽酵母内のユビキチンをコードする全遺伝子を欠損させ、プラスミドにより野生型ユビキチンを相補させた *UB-WT* 株と K63 型ポリユビキチン鎖を形成できない K63R ユビキチンを相補させた *Ubi-K63R* 株を用いた。

3-3-9. Not4によるeS7のユビキチン化とNot5のN末端領域のE-siteへの結合は、Dhh1のリボソームへの結合に必須である

これまでに、非至適 mRNA 上で進行速度が遅延したリボソームを認識し、その mRNA の分解を惹起する因子として、デキャッピング活性化因子である Dhh1 が同定されている。しかしながら、本研究により、デアデニレーションに関与する Ccr4-Not 複合体中の Not4 及び Not5 がコドン至適度依存の mRNA 分解系を制御することを明らかにした。そこで、この分解系における Ccr4-Not 複合体と Dhh1 の関係性について解析を行った。

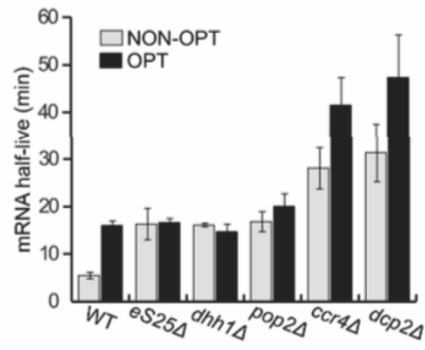
Jeff Coller 研究室における mRNA の半減期測定の結果、野生株では、至適 mRNA と非至適 mRNA の安定性に顕著な差が検出された一方で、先行研究と一致して、デキャッピング活性化因子である *dhh1*Δ株においては、至適 mRNA と非至適 mRNA の安定性がほぼ同じであり、mRNA の安定性におけるコドン至適度依存性が完全に阻害された。また、デキャッピング酵素である *dcp2*Δ株や、Ccr4-Not 複合体中に含まれるデアデニレーズである *pop2/caf1*Δ株や *ccr4*Δ株においても、野生株と比較して、mRNA の安定性におけるコドン至適度依存性が強く抑制された。したがって、コドン至適度依存の mRNA 分解には、Dhh1 により促進されるデキャッピングのみならず、Ccr4-Not 複合体を介したデアデニレーションも関与することが示唆された(図 3-22A)。

次に、Dhh1 のリボソームへのリクルートと Ccr4-Not 複合体の関連性を明らかにするため、野生株もしくは *not4*Δ株、*es7a*Δ*es7b*Δ*peS7-WT* 株もしくは *es7a*Δ*es7b*Δ*peS7-4KR* 株に *Dhh1-HA* を発現するプラスミドを形質転換した出芽酵母を培養及び集菌後、調整した細胞抽出液をショ糖密度勾配遠心法により分画した。その後、TCA 沈殿によりタンパク質サンプルとし、抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロッティングを行うことで、Dhh1 タンパク質の局在を検出した。その結果、野生株において Dhh1 は monosome および polysome 画分に局在した

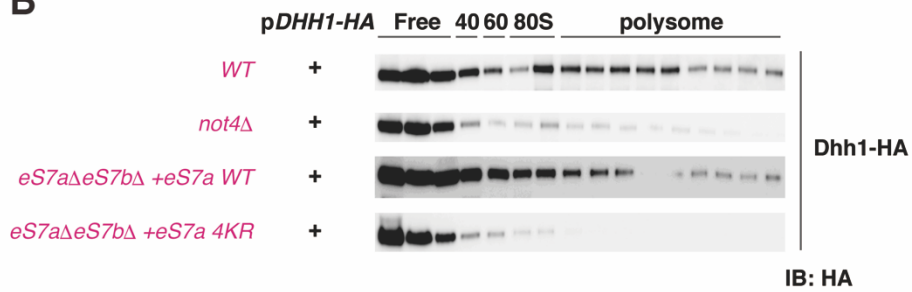
のに対し、*not4*Δ株においてはリボソームに結合せず、free 画分に局在した(図 3-22B)。さらに、*es7a*Δ*es7b*Δ*peS7-WT* 株では Dhh1 が翻訳中のリボソームと結合したのに対し、リボソームタンパク質 eS7 がユビキチン化を受けない *es7a*Δ*es7b*Δ*peS7-4KR* 変異株においては、*not4*Δ株と同様に、翻訳中のリボソームに結合しなかった(図 3-22B)。以上の結果から、Dhh1 とリボソームの結合には、Not4 による eS7 のユビキチン化が必須であることが明らかになった。また、野生型 *not5*Δ*pNOT5-WT* 株と比較して、Ccr4-Not 複合体とリボソームが結合しない変異型 *not5*Δ*pNot5-ΔNTD* 株においても、Dhh1 は翻訳中のリボソームに結合しなかったことから、Not4 を介した eS7 のユビキチン化に依存した Not5 の N 末端領域を介したリボソーム E-site との結合は、Dhh1 のリボソームへの結合に必須であることが示された(図 3-22C)。

Dhh1 は、Ccr4-Not 複合体中の足場タンパク質である Not1 に直接結合することが報告されているため、進行速度が遅延したリボソームを Ccr4-Not 複合体が認識し、Not5 がリボソーム E-site に結合することで、Dhh1 がその複合体中の Not1 にリクルートされ、デキャッピングを介した mRNA 分解を誘導する可能性が示唆された。さらに、一般的な mRNA 分解においては、デアデニレーションが律速反応であり、デキャッピングの上流で起こる。また、この mRNA 分解系には、デアデニレーションも関与することを踏まえると、デアデニレーションの下流で Dhh1 を介したデキャッピングの活性化が促進されている可能性も考えられる。

A



B



C

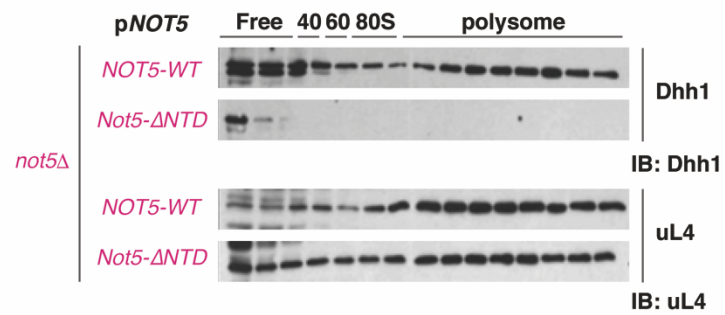


図 3-22. リボソームタンパク質 eS25 は、コドン至適度に依存した mRNA 分解に必須である。(A,C: Jeff Collier 研究室 Ying-Hsin Chen ら)

A) Non-OPT および OPT mRNA 半減期測定。転写遮断後の Non-OPT もしくは OPT *PGK1 5'UTR-Synthetic ORF-PGK1 3'UTR* mRNA の安定性を、³²P ラベルしたアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いたノーザンブロットティングにより検出した。

B) ショ糖密度勾配遠心法を用いた Dhh1 の局在評価。HA タグを付加した Dhh1 を発現するプラスミドを形質転換した出芽酵母由来の細胞抽出液を 10%-50%のショ糖密度勾配にアプライし遠心後、分画したサンプルを TCA 沈殿により濃縮し、抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロットティングにより Not5 のリボソームへの結合活性を検出した。これにより Dhh1 とリボソームの相互作用には Not4 による eS7 のユビキチン化が必須であることが明らかになった。

C) ショ糖密度勾配遠心法を用いた Dhh1 の局在評価。出芽酵母由来の細胞抽出液を 10%-50%のショ糖密度勾配にアプライし遠心後、分画したサンプルを TCA 沈殿により濃縮し、抗 Dhh1 抗体、抗 uL4 抗体を用いたウエスタンブロットティングにより Dhh1 のリボソームへの結合活性を検出した。これにより Not5 の N 末端領域とリボソームの結合は Dhh1 のリボソームへのリクルートに必須であることが明らかになった。

3-3-10. Not4 による eS7 のユビキチン化と Not5 の N 末端領域の E-site への結合の阻害は、デキャッピング反応を介した mRNA 分解を抑制する

最後に、Not4 による eS7 のユビキチン化と Not5 の N 末端領域を介したリボソーム E-site への結合が、直接デキャッピング反応に必須であるかを確認するために、*EDC1* mRNA を用いて解析を行った。一般的には、デアデニレーションが mRNA 分解経路の律速段階であり、デキャッピングはその下流で起こる、とされているが、3-1-9 で前述したように、出芽酵母においてはデキャッピング活性化因子である Dhh1 は Not1 と直接相互作用し、mRNA 上にリクルートされた Ccr4-Not-Dhh1 複合体はデアデニレーションを介さずに直接デキャッピングを促進することが可能である。*EDC1* mRNA はデアデニレーションを受けず、Not4 や Not5 等に依存したデキャッピングのみを介して mRNA 分解を受ける基質として報告されている。そこで、各種酵母株を培養し、集菌、RNA を抽出後、ノーザンブロットィングを行い、*EDC1* mRNA に対応するプローブを用いて検出を行った。その結果、野生株と比較して *not4Δ* や *not5Δ*、*dhh1Δ* 欠損株では、*EDC1* mRNA が安定化し、その発現量が上昇した(図 3-23A,B)。また、eS7 がユビキチン化を受けない *es7aΔes7bΔpeS7-4KR* 株においても、コントロールである *es7aΔes7bΔpeS7-WT* 株と比較して *EDC1* mRNA の発現量が上昇した(図 3-23A,B)。さらに、Not5 がリボソームの E-site に結合できない変異型 *not5ΔpNot5-ΔNTD* 株においても、コントロールである野生型 *not5ΔpNOT5-WT* 株と比較して *EDC1* mRNA の発現量が上昇した(図 3-23A,B)。加えて、*NOT4* の欠失下や eS7 のユビキチン化の欠損下においては、Not5 の N 末端領域に依存した表現型が観察されなかった(図 3-23C,D)。以上のような、*EDC1* mRNA のデキャッピングを介した mRNA 分解についての表現型は、これまでに示したコドン至適度依存の mRNA 分解における表現型と非常によく一致していた。したがって、Not4 を介した eS7 のユビキチン化に依存した Not5 のリボソーム E-site への結合は、デキャッピングに依存

した mRNA 分解に必須であることが明らかになった。

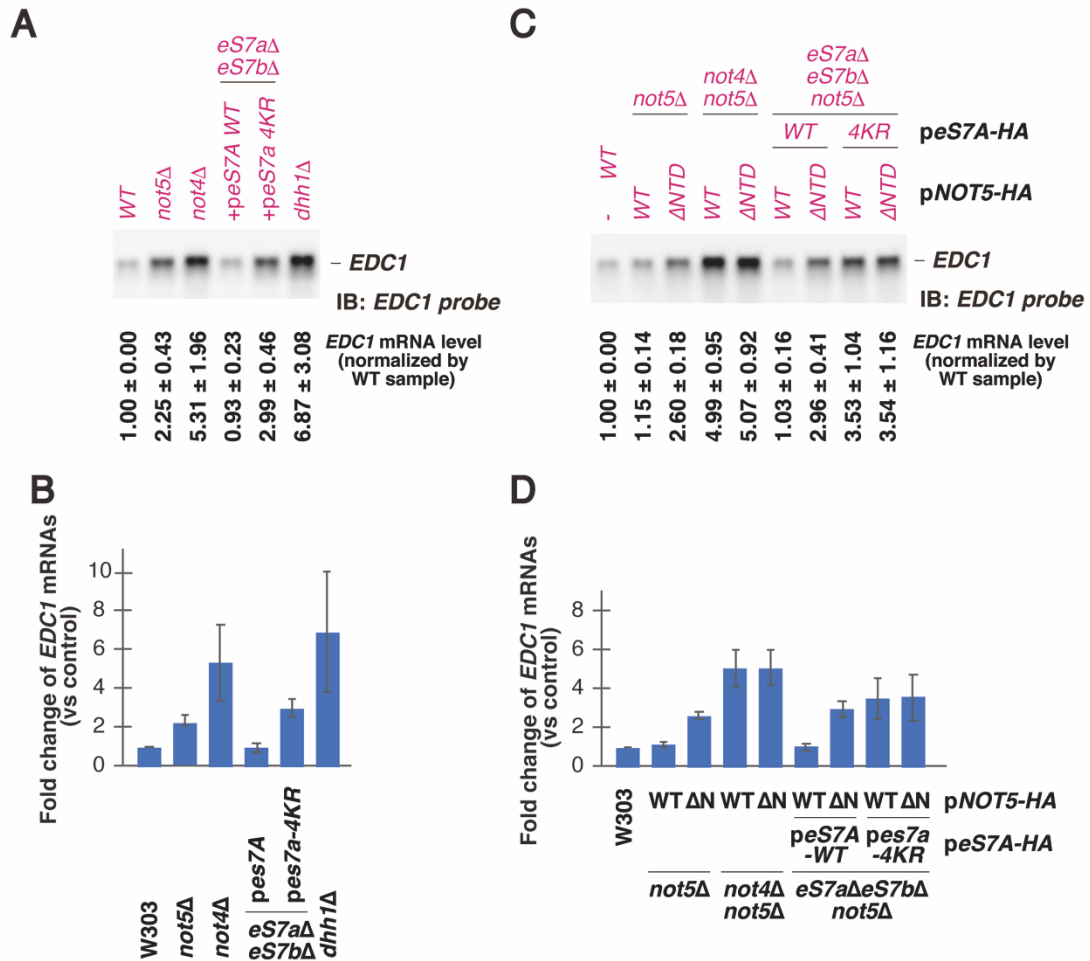


図 3-23. Not4 による eS7 のユビキチン化と Not5 の N 末端領域を介したリボソームとの結合は、デキャッピングを介した mRNA 分解を促進する。

A,C) *EDC1* mRNA の発現量の定量。各種出芽酵母を培養、集菌後、RNA 抽出を行った。調整した RNA サンプルをアプライし、ノーザンブロットングを行なった。内在性の *EDC1* mRNA に対応するプローブを用いて検出した。

B,D) A,C の定量結果。Not4 による eS7 のユビキチン化と Not5 の N 末端領域を介したリボソームへの結合は、デキャッピングを介した *EDC1* mRNA の分解を促進することが明らかになった。

3-4. 考察

3-4-1. Ccr4-Not 複合体は、コドン至適度に依存したリボソームの動的速度変化をモニターする重要なセンサーである

本研究では、Ccr4-Not 複合体が、コドン至適度に依存したリボソームの速度変化をモニターし、それに依存した mRNA 分解を誘導することを明らかにした。さらに、この過程には、Ccr4-Not 複合体中の構成成分である E3 リガーゼ Not4 によるリボソームタンパク質 eS7 のユビキチン化と、RNA 結合タンパク質 Not5 による 80S リボソームの E-site への結合が関与することを示した(図 3-24)。

クライオ電子顕微鏡を用いた構造解析の結果から、Not5 は自身の N 末端領域を介して、空の A-site を含む Post-translocation state と呼ばれる(--/PP/--)状態の 80S リボソームの E-site に特異的に結合しており、また、Ribosome profiling を用いた網羅的翻訳動態解析の結果により、Ccr4-Not 複合体は A-site に非至適コドンが位置した 80S リボソームを好んで結合することを明らかにした。したがって、Ccr4-Not 複合体は、tRNA 量の相対的不足等によるデコーディング速度の遅延を感知し、相対的に空の A-site を形成する時間が長くなったリボソームを認識して結合していると考えられる。

生体内で機能発揮するタンパク質の発現量は、多数の決定要因により定義されるが、mRNA の安定性に基づいた発現量の変化は、それに由来するタンパク質の合成量に最も大きな影響を及ぼす。コドン至適度は、mRNA 安定性と顕著に逆相関しており、翻訳されにくい非至適 mRNA は、翻訳されやすい至適 mRNA と比較して、迅速に分解される(Presnyak *et al.*, 2015)。本研究では、コドン至適度に依存した mRNA 分解に、Not4 による eS7 のユビキチン化に依存した Not5 の N 末端領域を介したリボソームへの結合が関与することを明らかにした。この特徴的な結合様式は、下流のデアデニレーションやデキャッピングを促進す

ることで mRNA 分解を促進する。これまで、デキャッピング活性化因子である Dhh1 が、コドン至適度に依存したリボソームの動的变化をモニターし、mRNA 分解を誘導していると考えられていたが (Sweet, Kovalak and Coller, 2012; Radhakrishnan *et al.*, 2016)、本研究により、Ccr4-Not 複合体がリボソームの動きを感知していることが明らかになった(図 3-24)。Dhh1 は、Ccr4-Not 複合体の構成成分であり、それらの足場タンパク質である Not1 と直接相互作用することが報告されており (Coller and Parker, 2005; Chen *et al.*, 2014; Mathys *et al.*, 2014; Rouya *et al.*, 2014)、Ccr4-Not 複合体とリボソームの結合頻度に応じてリクルートされていることが示唆された。また、デキャッピングのみならず、非至適 mRNA は Caf1/CNOT7 を介したデアデニレーションを受けることも報告されており (Webster *et al.*, 2018)、これらによって mRNA の両末端が露出することで迅速な mRNA 分解が可能になっていると考えられる(図 3-24)。

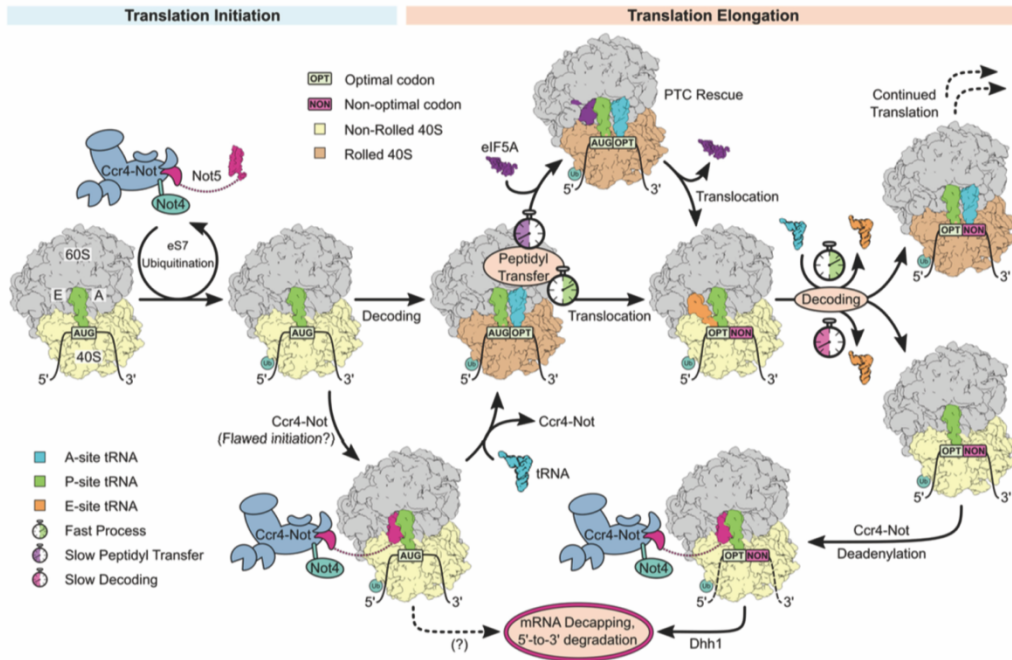


図 3-24. 本研究により提唱されたモデル。

非至適コドンに富む mRNA は、そのコドン至適度に依存して分解を受けることが報告されており、この惹起には Ccr4-Not 複合体が関与することを明らかにした。デコーディング速度が著しく低下する非至適コドン上では、リボソームの A-site にアミノアシル tRNA が結合するまでに相対的に長い時間を要するため、その間、リボソームは空の A-site を形成し、アミノアシル tRNA の結合を待機する。Ccr4-Not 複合体の構成因子である Not5 の N 末端領域は、A-site が空である 80S リボソームの E-site に結合し、Dhh1 により活性化されるデキャッピングを介した mRNA 分解を促進する。さらに、Not5 とリボソームの相互作用には、その上流で Not4 によりリボソームタンパク質 eS7 がユビキチン化されることが必須であり、これらの一連の反応を介して、Ccr4-Not 複合体はリボソームの速度変化を感知し、コドン至適度に依存した迅速な mRNA 分解を可能にしている。

3-4-2. Not4 によるリボソームタンパク質 eS7 のユビキチン化は、様々な応答を即座に指令するための、前処置のような反応である可能性がある

本研究では、翻訳伸長段階におけるリボソームの動的な速度変化に着目したが、構造解析の結果から、Ccr4-Not 複合体は翻訳伸長過程のみならず、翻訳開始過程後期にも 80S リボソームに結合することが示唆されている。翻訳開始過程後期にも、P-site に開始 Met-tRNA を含み、A-site と E-site が空である、Ccr4-Not 複合体の結合標的となる Post-translocation state の状況が起こりうる。Not5 が結合するリボソーム E-site と Not4 がユビキチン化する eS7 は、リボソーム表面上で近接しておらず、これらの反応を行う Ccr4-Not 複合体は別分子である可能性が推測されるため、翻訳開始過程後期に Ccr4-Not 複合体が Not4 による eS7 ユビキチン化を担う可能性が十分に考えられる(図 3-25)。Not4 による eS7 のユビキチン化は、異常翻訳に起因する品質管理やストレス応答における翻訳制御等に必須であり、多様な状況で機能を発揮することから、コドン至適度に依存する遺伝子発現制御を含め、様々な応答に備えた前処置反応である可能性が考えられる(Dimitrova *et al.*, 2009; Ikeuchi *et al.*, 2019; Matsuki *et al.*, 2020) (図 3-25)。つまり、ある一定頻度、もしくは特定の翻訳開始時に eS7 がユビキチン化されることで、細胞内の翻訳動態に異常事態が生じた場合に、eS7 のモノユビキチン化は即座に必要な応じた反応や結合を可能にし、それらを促進する前処理のような機能を持つ可能性がある(図 3-25)。実際に、コドン至適度に依存した mRNA 分解は、一過性の応答や細胞が晒された条件に依存して特異的な反応等を誘導する(Presnyak *et al.*, 2015)。出芽酵母においてフェロモン応答等、刺激に対する一過性応答に関与するタンパク質群をコードする mRNA は非至適コドンに富み、不安定化されている。これは、このような細胞内調節や微細な制御系に関与する因子群の発現を低く保つために重要であり、さらに一過性応答を迅速に解除するために必須な遺伝子発現制御である。そのほかにも、本章の序論で述べた

ように、リボソームの異常停滞や小胞体ストレス応答等をはじめとする特異的な一過性応答に対応するために、Not4 によるリボソームユビキチン化が必須であることが報告されている。さらに、本研究の結果、コドン至適度に依存した制御においては、翻訳開始段階で Not4 は eS7 をユビキチン化という前処理をすることで、翻訳伸長途上であっても即座に Not5 がリボソームに直接結合できるように誘導している可能性が示唆された(図 3-25)。しかしながら、*in vivo* での解析結果によると、polysome 中の eS7 のユビキチン化はその効率こそ高いものの全てがユビキチン化を受けているわけではなく、ある頻度でユビキチン化されている(図 3-13A)。今後、eS7 がユビキチン化された、もしくはされていないリボソームの違いについて、標的とする mRNA 成分やその細胞内局在、リボソームに結合した翻訳促進因子群等を検出することで、eS7 のユビキチン化がもたらす下流のシグナル経路の全容の解明が期待される。

一方で、翻訳開始過程後期における Ccr4-Not 複合体とリボソームの結合は、コドン至適度に依存した遺伝子発現制御には依存しない全く異なる機能を持つ可能性も考えられる。例えば、翻訳開始反応から翻訳伸長反応への移行がスムーズに進まず、リボソームが一時停止しまった場合に、その翻訳反応を解除しようと Ccr4-Not 複合体が開始コドン上にリクルートされることで mRNA 分解を惹起する可能性がある。また、一般的に mRNA は closed-loop と呼ばれる環状化構造を形成していることから、mRNA の 3'末端においてデアデニレーションを終えた Ccr4-Not 複合体が、5'末端を介して橋渡しされ、開始コドン上へとリクルートされることで、分解途上の mRNA に対し、さらなる翻訳開始反応が起こらないように、立体構造的に新たなリボソームの結合を阻害し、かつ、5'末端におけるデキャッピング酵素のアセンブリやその活性を促進している可能性も考えられる。

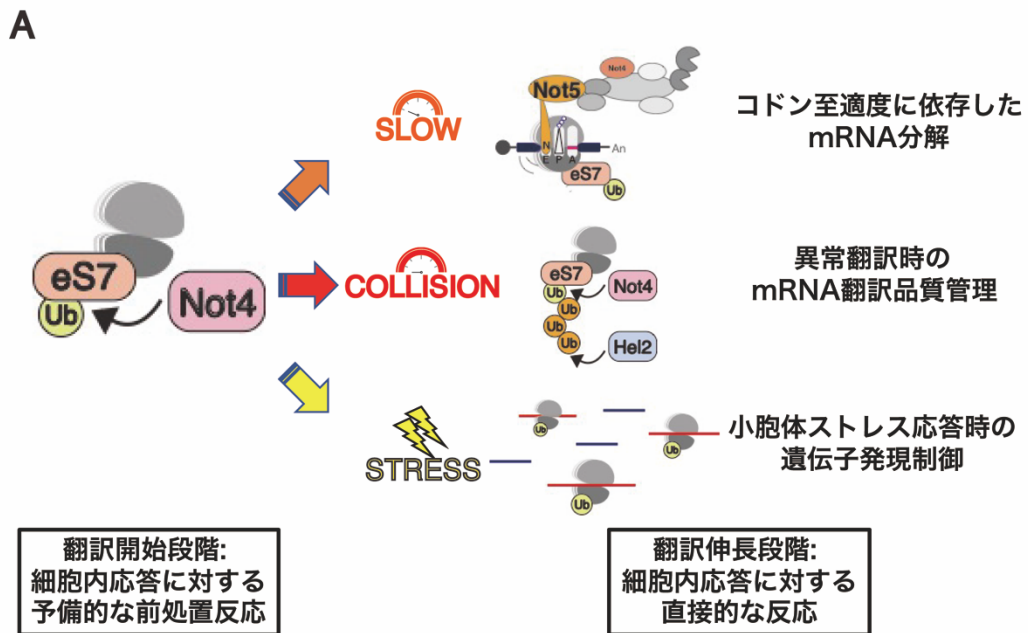


図 3-25. Not4 による eS7 ヲビキチン化は多彩な翻訳制御に関与する

A) 本研究の結果を受けて提唱する Not4 による eS7 のユビキチン化を介した翻訳制御モデル。Not4 による eS7 のユビキチン化は、翻訳動態や細胞内環境の変化に応じた多様な遺伝子発現制御における前処置反応として広く関与すると考えられる。

3-4-3. Not5 と eIF5A は微細な基質の違いを見極めてリボソームの E-site に結合する

構造解析の結果、Not5 が結合したリボソームは、A-site が空であり、P-site のみに tRNA を含む(--PP/--)ことが明らかになった。これは、翻訳伸長反応のうちトランスロケーション後の、E-site に脱アシル化された tRNA、P-site にペプチジル tRNA を含み、A-site は空である(--PP/EE) POST-translocation state と呼ばれる状態から、脱アシル化 tRNA が E-site から解離した状態のときに形成される(--PP/--)。翻訳伸長反応の過程では、アミノアシル tRNA が A-site に結合した(AA/PP/--)、ペプチド転移反応が起き、トランスロケーションが完了した(--PP/EE)、脱アシル化 tRNA が E-site から解離し、次のコドン解読を行う(--PP/--)の3つのプロセスを繰り返すことで、mRNA のコドン暗号を解読し、ペプチド鎖を合成していく(Budkevich *et al.*, 2014)。この間、リボソーム上では、単に tRNA が移動するのみならず、リボソーム 40S サブユニットや L1 ストークと呼ばれるタンパク質部位がコンフォメーション変化を行うことが報告されている(Subunit rolling)。(--PP/--)の状態では、リボソーム 40S サブユニットは E-site の方向に回転するために、L1 ストークが 40S サブユニットとの衝突を避けるようにして、リボソームの内部へと入り込まず外側に露出する一方で、A-site にアミノアシル tRNA が結合した(AA/PP/--)の状態では、40S サブユニットは逆方向へと回転し L1 ストークがリボソームの内部へと入り込み、E-site に移動してきた脱アシル化 tRNA を放出する(図 3-26A)。このように、tRNA の移動と連動して、リボソーム自身のコンフォメーション変化が正常な翻訳伸長反応に重要である。

eIF5A は真核生物から古細菌まで広く保存されている多機能分子であり、ハイプシン修飾部位を持つ唯一のタンパク質である。これまで、eIF5A は連続したプロリン配列等による翻訳伸長阻害の解消に必須であることが報告されていることに加え、翻訳伸長段階のみならず、翻訳終結におけるペプチド鎖の解離を促

進することでも知られている。さらに、eIF5A はリボソームの E-site に結合し、ペプチジル tRNA の CCA 末端を安定化することで、ペプチジルトランスフェラーゼセンターにおけるペプチド転移反応を促進することが明らかになっている (Schmidt *et al.*, 2016)。したがって、本研究の結果とあわせると、Not5 はデコーディングセンターにおけるコドン解読の遅延を感知して、(--/PP/--)リボソームの E-site へと結合する一方で、eIF5A はペプチジルトランスフェラーゼセンターにおけるペプチド転移反応の遅延を感知して、(AA/PP/--)リボソームの E-site へと結合することが明らかになっている(図 3-27B)。

Not5 は空の A-site を持つリボソームを認識する一方で、eIF5A はアミノアシル tRNA が A-site に結合したリボソームの E-site に結合することから、これらの構造基盤を比較することで、Not5 が認識するリボソームの基質特異性について検討した(Schmidt *et al.*, 2016) (図 3-27A-C)。その結果、Not5 の基質となる空の A-site を持つリボソームでは、A-site に tRNA を取り込んだ eIF5A の基質と比較して、P-site tRNA のアンチコドンステムループが E-site の方向へと 1.6Å 移動しており、この微細なコンフォメーション変化が Not5 の tCM との相互作用を可能にしていることが明らかになった(図 3-27C)。一方で、eIF5A の基質である(AA/PP/--)リボソームにおいては、P-site のアンチコドンステムループは、Not5 の tCM と衝突してしまい、効率的かつ安定に相互作用を形成できないことが示唆された(図 3-27D-E)。さらに、前述した Subunit rolling によるリボソーム小サブユニットや L1 ストークの構造変化も Not5 と eIF5A の基質の違いとして考えられるために、(--/PP/--)の状態、L1 ストークが 40S サブユニットとの衝突を避けるようにして、リボソームの内部へと入り込まず、外側に向けたような構造を相対的に長時間維持することが、Ccr4-Not 複合体による基質認識に必要な可能性もある(図 3-26A)。しかしながら、これがリボソームと Not5 との結合に関与するのか、その下流の Dhh1 を介した mRNA 分解のシグナルとなるのかは、明らかになって

いない。

以上の結果から、Not5 の N 末端領域は非常に微細なリボソームのコンフォメーション変化を検知し、空の A-site を持つリボソームに特異的に結合することが明らかになっている(Hanson *et al.*, 2018)。また、Not5 はコドン解読の遅延を検知して POST-translocation state (--/PP/--)を認識する一方で、eIF5A はペプチド転移反応の遅延を検知して PRE-translocation state (AA/PP/--)を認識し、E-site に結合することが示された。

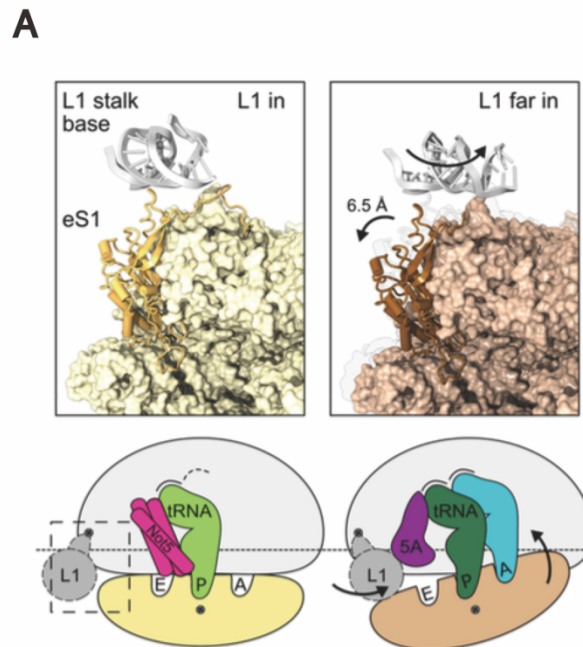


図 3-26. A-site tRNA に依存してサブユニットが回転しリボソームのコンフォメーションが変化する。(Roland Beckmann 研究室 Robert Buschauer ら)

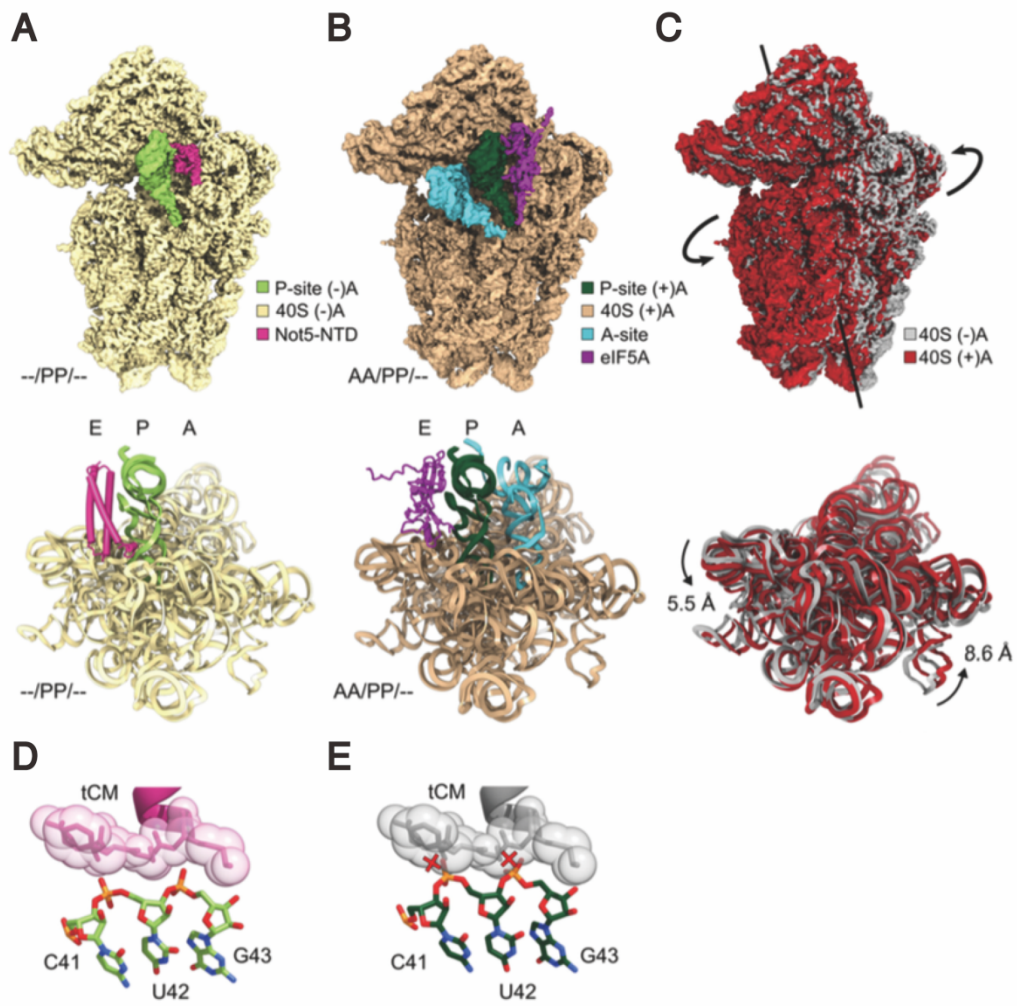


図 3-27. Not5 の N 末端領域は空の A-site を持つリボソームに対し選択的に結合する。

(Roland Beckmann 研究室 Robert Buschauer ら)

(A) Not5 が結合した(--/PP/--)の 80S リボソームのうち、40S サブユニットのクライオ電子顕微鏡で得られたデンシティマップとモデル。Ccr4-Not 複合体の構成成分である Not5 の N 末端ドメインがリボソームの E-site に結合していることが明らかになった。

(B) eIF5A が結合した(AA/PP/--)の 80S リボソームのうち、40S サブユニットのクライオ電子顕微鏡で得られたデンシティマップとモデル。Ccr4-Not 複合体の構成成分である Not5 の N 末端ドメインがリボソームの E-site に結合していることが明らかになった。

(C) (A)と(B)の重ね合わせ。60S サブユニットは完全に重なる一方で、40S サブユニットが回転していることが示されている。

(D) Not5 が結合した(--/PP/--)の 80S リボソームのうち、Not5 の tCM とアンチコドンシステムの相互作用。(--/PP/--)の 80S リボソームでは、Not5 の tCM は P-site tRNA のアンチコドンシステムと安定に相互作用することが明らかになった。

(E) eIF5A が結合した(AA/PP/--)の 80S リボソームのうち、Not5 の tCM とアンチコドンシステムの相互作用。(AA/PP/--)の 80S リボソームでは、A-site の順応の際に Not5 の tCM は P-site tRNA のアンチコドンシステムと衝突し、正常で安定な相互作用ができないことが示された。

3-4-4. Not5 の N 末端領域を介したリボソームへの結合は、哺乳類細胞においても保存され、この結合活性の欠損が様々な疾患発症に関与している可能性がある

リボソームとの結合において、その結合活性を担う Not5 は、CNOT3 として哺乳類細胞でも保存されており、ホモログである CNOT3 も mRNA 安定性を制御することで知られている(Muhlrad and Parker, 2005; Alhusaini and Collier, 2016)。実際に、CNOT3 が枯渇した MEF においては、細胞死誘導に関与するタンパク質の mRNA が安定化し、ネクロトーシスを介した細胞死が促進されることから、いくつかの特定の mRNA の分解に CNOT3 が関与しており、CNOT3 がそれらを制御することで、細胞がネクロトーシス死に至るのを防いでいると報告されている(Suzuki *et al.*, 2015)。

また、本研究で明らかになった Not5 とリボソームの詳細な結合様式は、Ccr4-Not とリボソームの結合活性の欠損が癌の発症に関与する可能性があることを示唆している。Not5-(F105-A109)と水素結合を形成する eS25-(K25-K29)や、18S rRNA-G1575 と相互作用する eS25-W27 を含む、eS25 の KKKWSK モチーフは種間で高く保存されており、このうち、出芽酵母における eS25-K25 に対応するヒトにおける eS25-K33E 変異は甲状腺癌細胞において報告されている(Tate *et al.*, 2019)。また、Not5 の N 末端領域は CNOT3 にも高く保存されており、CNOT3 においてもリボソームの結合活性が保存されている可能性がある。CNOT3 の N 末端領域には多数の癌変異が報告されており、出芽酵母における Not5-K58 に対応するヒトにおける CNOT3-R57W/E 変異が代表例である(De Keersmaecker *et al.*, 2013; Tate *et al.*, 2019)。Not5-K58 残基は、25S rRNA のリン酸バックボーンと直接相互作用しており、CNOT3-R57 残基においても同様の活性が期待される。Not5-R57/CNOT3-K58 残基のトリプトファンやグルタミン酸への変異は、この水素結合の形成ができず、25S rRNA との相互作用を顕著に不安定化させる可能性

がある。先行研究により、腫瘍細胞で大きく影響する翻訳の動的変化は、細胞内 tRNA プールの調節によって行われ、がん細胞は、通常の細胞と異なるコドン至適度を採用していることが示唆されていることから(Gingold and Pilpel, 2011; Grewal, 2015)、このような遺伝子産物の合成だけではなく、本研究によって明らかになった Ccr4-Not 複合体を介したコドン至適度に依存した mRNA 分解についての理解と応用は、疾患の発症やその進行機序の解明、それに対する臨床基盤の確立に対し大きく寄与できる可能性がある。

3-5. 参考文献

- Akashi, H. (1994) ‘Synonymous codon usage in *Drosophila melanogaster*: natural selection and translational accuracy.’, *Genetics*, 136(3), pp. 927–935.
- Akashi, H. (2003) ‘Translational Selection and Yeast Proteome Evolution’, *Genetics*, 164(4), pp. 1291–1303.
- Albert, T. K. *et al.* (2002) ‘Identification of a ubiquitin–protein ligase subunit within the CCR4–NOT transcription repressor complex’, *The EMBO Journal*, 21(3), pp. 355–364. doi: 10.1093/emboj/21.3.355.
- Alhusaini, N. and Coller, J. (2016) ‘The deadenylase components Not2p, Not3p, and Not5p promote mRNA decapping’, *RNA*, 22(5), pp. 709–721. doi: 10.1261/rna.054742.115.
- Arango, D. *et al.* (2018) ‘Acetylation of Cytidine in mRNA Promotes Translation Efficiency’, *Cell*, 175(7), pp. 1872–1886.e24. doi: 10.1016/j.cell.2018.10.030.
- Bai, Y. *et al.* (1999) ‘The CCR4 and CAF1 Proteins of the CCR4–NOT Complex Are Physically and Functionally Separated from NOT2, NOT4, and NOT5’, *Molecular and Cellular Biology*, 19(10), pp. 6642–6651. doi: 10.1128/MCB.19.10.6642.
- Bazzini, A. A. *et al.* (2016) ‘Codon identity regulates mRNA stability and translation efficiency during the maternal-to-zygotic transition’, *The EMBO Journal*, 35(19), pp. 2087–2103. doi: 10.15252/emboj.201694699.
- Bengtson, M. H. and Joazeiro, C. A. P. (2010) ‘Role of a ribosome-associated E3 ubiquitin ligase in protein quality control’, *Nature*, 467(7314), pp. 470–473. doi: 10.1038/nature09371.
- Bennetzen, J. L. and Hall, B. D. (1982) ‘Codon selection in yeast.’, *Journal of Biological Chemistry*, 257(6), pp. 3026–3031.
- Benson, J. D. *et al.* (1998) ‘Association of distinct yeast Not2 functional domains with

components of Gcn5 histone acetylase and Ccr4 transcriptional regulatory complexes.’, *The EMBO Journal*, 17(22), pp. 6714–6722. doi: 10.1093/emboj/17.22.6714.

Boël, G. *et al.* (2016) ‘Codon influence on protein expression in *E. coli* correlates with mRNA levels’, *Nature*, 529(7586), pp. 358–363. doi: 10.1038/nature16509.

Boulon, S., Bertrand, E. and Pradet-Balade, B. (2012) ‘HSP90 and the R2TP co-chaperone complex: Building multi-protein machineries essential for cell growth and gene expression’, *RNA Biology*, 9(2), pp. 148–154. doi: 10.4161/rna.18494.

Budkevich, T. V. *et al.* (2014) ‘Regulation of the Mammalian Elongation Cycle by Subunit Rolling: A Eukaryotic-Specific Ribosome Rearrangement’, *Cell*, 158(1), pp. 121–131. doi: 10.1016/j.cell.2014.04.044.

Buhr, F. *et al.* (2016) ‘Synonymous Codons Direct Cotranslational Folding toward Different Protein Conformations’, *Molecular Cell*, 61(3), pp. 341–351. doi: 10.1016/j.molcel.2016.01.008.

Burow, D. A. *et al.* (2018) ‘Attenuated Codon Optimality Contributes to Neural-Specific mRNA Decay in *Drosophila*’, *Cell Reports*, 24(7), pp. 1704–1712. doi: 10.1016/j.celrep.2018.07.039.

Buschauer, R. *et al.* (2020) ‘The Ccr4-Not complex monitors the translating ribosome for codon optimality’, *Science*, 368(6488). doi: 10.1126/science.aay6912.

Caponigro, G., Muhlrads, D. and Parker, R. (1993) ‘A small segment of the MAT alpha 1 transcript promotes mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*: a stimulatory role for rare codons.’, *Molecular and Cellular Biology*, 13(9), pp. 5141–5148. doi: 10.1128/MCB.13.9.5141.

Carlini, D. B. (2005) ‘Context-Dependent Codon Bias and Messenger RNA Longevity in the Yeast Transcriptome’, *Molecular Biology and Evolution*, 22(6), pp. 1403–1411. doi: 10.1093/molbev/msi135.

- Chamary, J. V., Parmley, J. L. and Hurst, L. D. (2006) 'Hearing silence: non-neutral evolution at synonymous sites in mammals', *Nature Reviews Genetics*, 7(2), pp. 98–108. doi: 10.1038/nrg1770.
- Chan, C. T. Y. *et al.* (2010) 'A Quantitative Systems Approach Reveals Dynamic Control of tRNA Modifications during Cellular Stress', *PLoS*. Available at: <https://dspace.mit.edu/handle/1721.1/64964> (Accessed: 21 October 2020).
- Chan, C. T. Y. *et al.* (2012) 'Reprogramming of tRNA modifications controls the oxidative stress response by codon-biased translation of proteins', *Nature Communications*, 3(1), p. 937. doi: 10.1038/ncomms1938.
- Chekulaeva, M. and Landthaler, M. (2016) 'Eyes on Translation', *Molecular Cell*, 63(6), pp. 918–925. doi: 10.1016/j.molcel.2016.08.031.
- Chen, Y. *et al.* (2014) 'A DDX6-CNOT1 Complex and W-Binding Pockets in CNOT9 Reveal Direct Links between miRNA Target Recognition and Silencing', *Molecular Cell*, 54(5), pp. 737–750. doi: 10.1016/j.molcel.2014.03.034.
- Choi, J. *et al.* (2016) 'N⁶-methyladenosine in mRNA disrupts tRNA selection and translation-elongation dynamics', *Nature Structural & Molecular Biology*, 23(2), pp. 110–115. doi: 10.1038/nsmb.3148.
- Chou, H.-J. *et al.* (2017) 'Transcriptome-wide Analysis of Roles for tRNA Modifications in Translational Regulation', *Molecular Cell*, 68(5), pp. 978-992.e4. doi: 10.1016/j.molcel.2017.11.002.
- Coleman, J. R. *et al.* (2008) 'Virus Attenuation by Genome-Scale Changes in Codon Pair Bias', *Science*, 320(5884), pp. 1784–1787. doi: 10.1126/science.1155761.
- Collart, M. A. (2003) 'Global control of gene expression in yeast by the Ccr4-Not complex', *Gene*, 313, pp. 1–16. doi: 10.1016/S0378-1119(03)00672-3.
- Collart, M. A. (2016) 'The Ccr4-Not complex is a key regulator of eukaryotic gene

- expression', *WIREs RNA*, 7(4), pp. 438–454. doi: 10.1002/wrna.1332.
- Collart, M. A. and Panasenko, O. O. (2012) 'The Ccr4–Not complex', *Gene*, 492(1), pp. 42–53. doi: 10.1016/j.gene.2011.09.033.
- Collart, M. A. and Timmers, H. Th. M. (2004) 'The Eukaryotic Ccr4-Not Complex: A Regulatory Platform Integrating mRNA Metabolism with Cellular Signaling Pathways?', in *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. Academic Press, pp. 289–322. doi: 10.1016/S0079-6603(04)77008-7.
- Coller, J. and Parker, R. (2005) 'General Translational Repression by Activators of mRNA Decapping', *Cell*, 122(6), pp. 875–886. doi: 10.1016/j.cell.2005.07.012.
- Cooke, A., Prigge, A. and Wickens, M. (2010) 'Translational Repression by Deadenylases', *Journal of Biological Chemistry*, 285(37), pp. 28506–28513. doi: 10.1074/jbc.M110.150763.
- Curran, J. F. (1995) 'Decoding with the A:I wobble pair is inefficient', *Nucleic Acids Research*, 23(4), pp. 683–688. doi: 10.1093/nar/23.4.683.
- De Keersmaecker, K. *et al.* (2013) 'Exome sequencing identifies mutation in CNOT3 and ribosomal genes RPL5 and RPL10 in T-cell acute lymphoblastic leukemia', *Nature Genetics*, 45(2), pp. 186–190. doi: 10.1038/ng.2508.
- Decker, C. J. and Parker, R. (2012) 'P-Bodies and Stress Granules: Possible Roles in the Control of Translation and mRNA Degradation', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(9), p. a012286. doi: 10.1101/cshperspect.a012286.
- Deluen, C. *et al.* (2002) 'The Ccr4-Not Complex and yTAF1 (yTafII130p/yTafII145p) Show Physical and Functional Interactions', *Molecular and Cellular Biology*, 22(19), pp. 6735–6749. doi: 10.1128/MCB.22.19.6735-6749.2002.
- Denis, C. L. and Chen, J. (2003) 'The CCR4–NOT Complex Plays Diverse Roles in mRNA Metabolism', in *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*.

- Academic Press, pp. 221–250. doi: 10.1016/S0079-6603(03)01007-9.
- Dimitrova, L. N. *et al.* (2009) ‘Nascent Peptide-dependent Translation Arrest Leads to Not4p-mediated Protein Degradation by the Proteasome’, *Journal of Biological Chemistry*, 284(16), pp. 10343–10352. doi: 10.1074/jbc.M808840200.
- Dix, D. B. and Thompson, R. C. (1989) ‘Codon choice and gene expression: synonymous codons differ in translational accuracy’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(18), pp. 6888–6892. doi: 10.1073/pnas.86.18.6888.
- Dong, H., Nilsson, L. and Kurland, C. G. (1996) ‘Co-variation of tRNA Abundance and Codon Usage in *Escherichia coli* at Different Growth Rates’, *Journal of Molecular Biology*, 260(5), pp. 649–663. doi: 10.1006/jmbi.1996.0428.
- Drummond, D. A. and Wilke, C. O. (2008) ‘Mistranslation-Induced Protein Misfolding as a Dominant Constraint on Coding-Sequence Evolution’, *Cell*, 134(2), pp. 341–352. doi: 10.1016/j.cell.2008.05.042.
- Duret, L. (2000) ‘tRNA gene number and codon usage in the *C. elegans* genome are co-adapted for optimal translation of highly expressed genes’, *Trends in Genetics*, 16(7), pp. 287–289. doi: 10.1016/S0168-9525(00)02041-2.
- Elf, J. *et al.* (2003) ‘Selective Charging of tRNA Isoacceptors Explains Patterns of Codon Usage’, *Science*, 300(5626), pp. 1718–1722. doi: 10.1126/science.1083811.
- Endres, L., Dedon, P. C. and Begley, T. J. (2015) ‘Codon-biased translation can be regulated by wobble-base tRNA modification systems during cellular stress responses’, *RNA Biology*, 12(6), pp. 603–614. doi: 10.1080/15476286.2015.1031947.
- Fernández-Vázquez, J. *et al.* (2013) ‘Modification of tRNA^{Lys}UUU by Elongator Is Essential for Efficient Translation of Stress mRNAs’, *PLOS Genetics*, 9(7), p. e1003647. doi: 10.1371/journal.pgen.1003647.
- Forrest, M. E. *et al.* (2020) ‘Codon and amino acid content are associated with mRNA

- stability in mammalian cells', *PLOS ONE*, 15(2), p. e0228730. doi: 10.1371/journal.pone.0228730.
- Funakoshi, Y. *et al.* (2007) 'Mechanism of mRNA deadenylation: evidence for a molecular interplay between translation termination factor eRF3 and mRNA deadenylases', *Genes & Development*, 21(23), pp. 3135–3148. doi: 10.1101/gad.1597707.
- Gamble, C. E. *et al.* (2016) 'Adjacent Codons Act in Concert to Modulate Translation Efficiency in Yeast', *Cell*, 166(3), pp. 679–690. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.070.
- Gardin, J. *et al.* (2014) 'Measurement of average decoding rates of the 61 sense codons in vivo', *eLife*. Edited by N. Sonenberg, 3, p. e03735. doi: 10.7554/eLife.03735.
- Gavin, A.-C. *et al.* (2002) 'Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes', *Nature*, 415(6868), pp. 141–147. doi: 10.1038/415141a.
- Gingold, H. and Pilpel, Y. (2011) 'Determinants of translation efficiency and accuracy', *Molecular Systems Biology*, 7(1), p. 481. doi: 10.1038/msb.2011.14.
- Goodman, D. B., Church, G. M. and Kosuri, S. (2013) 'Causes and Effects of N-Terminal Codon Bias in Bacterial Genes', *Science*, 342(6157), pp. 475–479. doi: 10.1126/science.1241934.
- Grewal, S. S. (2015) 'Why should cancer biologists care about tRNAs? tRNA synthesis, mRNA translation and the control of growth', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(7), pp. 898–907. doi: 10.1016/j.bbagr.2014.12.005.
- Gu, W., Zhou, T. and Wilke, C. O. (2010) 'A Universal Trend of Reduced mRNA Stability near the Translation-Initiation Site in Prokaryotes and Eukaryotes', *PLOS Computational Biology*, 6(2), p. e1000664. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000664.
- Gulshan, K., Thommandru, B. and Moye-Rowley, W. S. (2012) 'Proteolytic

Degradation of the Yap1 Transcription Factor Is Regulated by Subcellular Localization and the E3 Ubiquitin Ligase Not4', *Journal of Biological Chemistry*, 287(32), pp.

26796–26805. doi: 10.1074/jbc.M112.384719.

Halter, D., Collart, M. and Panasenko, O. O. (2014) 'The Not4 E3 Ligase and CCR4 Deadenyase Play Distinct Roles in Protein Quality Control', *PloS one*. doi:

10.1371/journal.pone.0086218.

Hanson, G. *et al.* (2018) 'Translation elongation and mRNA stability are coupled through the ribosomal A-site', *RNA*, 24(10), pp. 1377–1389. doi:

10.1261/rna.066787.118.

Hanson, G. and Coller, J. (2018) 'Codon optimality, bias and usage in translation and mRNA decay', *Nature reviews. Molecular cell biology*, 19(1), pp. 20–30. doi:

10.1038/nrm.2017.91.

Harigaya, Y. and Parker, R. (2016a) 'Analysis of the association between codon optimality and mRNA stability in *Schizosaccharomyces pombe*', *BMC Genomics*, 17(1), p. 895. doi: 10.1186/s12864-016-3237-6.

Harigaya, Y. and Parker, R. (2016b) 'Codon optimality and mRNA decay', *Cell Research*, 26(12), pp. 1269–1270. doi: 10.1038/cr.2016.127.

Hia, F. *et al.* (2019) 'Codon bias confers stability to human mRNAs', *EMBO reports*, 20(11), p. e48220. doi: 10.15252/embr.201948220.

Hoekema, A. *et al.* (1987) 'Codon replacement in the PGK1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: experimental approach to study the role of biased codon usage in gene expression.', *Molecular and Cellular Biology*, 7(8), pp. 2914–2924. doi:

10.1128/MCB.7.8.2914.

Hu, G. *et al.* (2009) 'A genome-wide RNAi screen identifies a new transcriptional module required for self-renewal', *Genes & Development*, 23(7), pp. 837–848. doi:

10.1101/gad.1769609.

Hu, W. *et al.* (2009) ‘Co-translational mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*’, *Nature*, 461(7261), pp. 225–229. doi: 10.1038/nature08265.

Huang, Y. *et al.* (2009) ‘Selection for minimization of translational frameshifting errors as a factor in the evolution of codon usage’, *Nucleic Acids Research*, 37(20), pp. 6799–6810. doi: 10.1093/nar/gkp712.

Hussmann, J. A. *et al.* (2015) ‘Understanding Biases in Ribosome Profiling Experiments Reveals Signatures of Translation Dynamics in Yeast’, *PLOS Genetics*, 11(12), p. e1005732. doi: 10.1371/journal.pgen.1005732.

Huter, P. *et al.* (2017) ‘Structural Basis for Polyproline-Mediated Ribosome Stalling and Rescue by the Translation Elongation Factor EF-P’, *Molecular Cell*, 68(3), pp. 515–527.e6. doi: 10.1016/j.molcel.2017.10.014.

Ikemura, T. (1981) ‘Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes: A proposal for a synonymous codon choice that is optimal for the *E. coli* translational system’, *Journal of Molecular Biology*, 151(3), pp. 389–409. doi: 10.1016/0022-2836(81)90003-6.

Ikeuchi, K. *et al.* (2019) ‘Collided ribosomes form a unique structural interface to induce Hel2-driven quality control pathways’, *The EMBO Journal*, 38(5), p. e100276. doi: 10.15252/emj.2018100276.

Inada, T. and Makino, S. (2014) ‘Novel roles of the multi-functional CCR4-NOT complex in post-transcriptional regulation’, *Frontiers in Genetics*, 5. doi: 10.3389/fgene.2014.00135.

Ingolia, N. T. (2014) ‘Ribosome profiling: new views of translation, from single codons to genome scale’, *Nature Reviews Genetics*, 15(3), pp. 205–213. doi: 10.1038/nrg3645.

Iwasaki, S. and Ingolia, N. T. (2016) ‘Seeing translation’, *Science*, 352(6292), pp.

1391–1392. doi: 10.1126/science.aag1039.

Kerr, S. C. *et al.* (2011) ‘The Ccr4-Not Complex Interacts with the mRNA Export Machinery’, *PLOS ONE*, 6(3), p. e18302. doi: 10.1371/journal.pone.0018302.

Kim, S. J. *et al.* (2015) ‘Translational tuning optimizes nascent protein folding in cells’, *Science*, 348(6233), pp. 444–448. doi: 10.1126/science.aaa3974.

Kimura, S., Srisuknimit, V. and Waldor, M. K. (2020) ‘Probing the diversity and regulation of tRNA modifications’, *Current Opinion in Microbiology*, 57, pp. 41–48. doi: 10.1016/j.mib.2020.06.005.

Komar, A. A., Lesnik, T. and Reiss, C. (1999) ‘Synonymous codon substitutions affect ribosome traffic and protein folding during in vitro translation’, *FEBS Letters*, 462(3), pp. 387–391. doi: 10.1016/S0014-5793(99)01566-5.

Koutmou, K. S., Radhakrishnan, A. and Green, R. (2015) ‘Synthesis at the Speed of Codons’, *Trends in Biochemical Sciences*, 40(12), pp. 717–718. doi: 10.1016/j.tibs.2015.10.005.

Kramer, E. B. *et al.* (2010) ‘A comprehensive analysis of translational missense errors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*’, *RNA*, 16(9), pp. 1797–1808. doi: 10.1261/rna.2201210.

Kramer, E. B. and Farabaugh, P. J. (2007) ‘The frequency of translational misreading errors in *E. coli* is largely determined by tRNA competition’, *RNA*, 13(1), pp. 87–96. doi: 10.1261/rna.294907.

Kruk, J. A. *et al.* (2011) ‘The multifunctional Ccr4–Not complex directly promotes transcription elongation’, *Genes & Development*, 25(6), pp. 581–593. doi: 10.1101/gad.2020911.

Kudla, G. *et al.* (2009) ‘Coding-Sequence Determinants of Gene Expression in *Escherichia coli*’, *Science*, 324(5924), pp. 255–258. doi: 10.1126/science.1170160.

- Lahtvee, P.-J. *et al.* (2017) ‘Absolute Quantification of Protein and mRNA Abundances Demonstrate Variability in Gene-Specific Translation Efficiency in Yeast’, *Cell Systems*, 4(5), pp. 495-504.e5. doi: 10.1016/j.cels.2017.03.003.
- Lareau, L. F. *et al.* (2014) ‘Distinct stages of the translation elongation cycle revealed by sequencing ribosome-protected mRNA fragments’, *eLife*. Edited by R. Parker, 3, p. e01257. doi: 10.7554/eLife.01257.
- Laribee, R. N. *et al.* (2007) ‘CCR4/NOT complex associates with the proteasome and regulates histone methylation’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(14), pp. 5836–5841. doi: 10.1073/pnas.0607996104.
- Li, G.-W. *et al.* (2014) ‘Quantifying Absolute Protein Synthesis Rates Reveals Principles Underlying Allocation of Cellular Resources’, *Cell*, 157(3), pp. 624–635. doi: 10.1016/j.cell.2014.02.033.
- Libri, D. *et al.* (2002) ‘Interactions between mRNA Export Commitment, 3'-End Quality Control, and Nuclear Degradation’, *Molecular and Cellular Biology*, 22(23), pp. 8254–8266. doi: 10.1128/MCB.22.23.8254-8266.2002.
- Liu, H. Y. *et al.* (1998) ‘The NOT proteins are part of the CCR4 transcriptional complex and affect gene expression both positively and negatively.’, *The EMBO Journal*, 17(4), pp. 1096–1106. doi: 10.1093/emboj/17.4.1096.
- Lu, P. *et al.* (2007) ‘Absolute protein expression profiling estimates the relative contributions of transcriptional and translational regulation’, *Nature Biotechnology*, 25(1), pp. 117–124. doi: 10.1038/nbt1270.
- Mathys, H. *et al.* (2014) ‘Structural and Biochemical Insights to the Role of the CCR4-NOT Complex and DDX6 ATPase in MicroRNA Repression’, *Molecular Cell*, 54(5), pp. 751–765. doi: 10.1016/j.molcel.2014.03.036.
- Matsuda, R. *et al.* (2014) ‘Protein quality control systems associated with no-go and

- nonstop mRNA surveillance in yeast', *Genes to Cells*, 19(1), pp. 1–12. doi: 10.1111/gtc.12106.
- Matsuki, Y. *et al.* (2020) 'Ribosomal protein S7 ubiquitination during ER stress in yeast is associated with selective mRNA translation and stress outcome', *bioRxiv*, p. 2020.09.24.311365. doi: 10.1101/2020.09.24.311365.
- Menendez-Gil, P. *et al.* (2020) 'Differential evolution in 3'UTRs leads to specific gene expression in *Staphylococcus*', *Nucleic Acids Research*, 48(5), pp. 2544–2563. doi: 10.1093/nar/gkaa047.
- Mersman, D. P. *et al.* (2009) 'Polyubiquitination of the demethylase Jhd2 controls histone methylation and gene expression', *Genes & Development*, 23(8), pp. 951–962. doi: 10.1101/gad.1769209.
- Miller, J. E. and Reese, J. C. (2012) 'Ccr4-Not complex: the control freak of eukaryotic cells', *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 47(4), pp. 315–333. doi: 10.3109/10409238.2012.667214.
- Mishima, Y. and Tomari, Y. (2016) 'Codon Usage and 3' UTR Length Determine Maternal mRNA Stability in Zebrafish', *Molecular Cell*, 61(6), pp. 874–885. doi: 10.1016/j.molcel.2016.02.027.
- Mitarai, N., Sneppen, K. and Pedersen, S. (2008) 'Ribosome Collisions and Translation Efficiency: Optimization by Codon Usage and mRNA Destabilization', *Journal of Molecular Biology*, 382(1), pp. 236–245. doi: 10.1016/j.jmb.2008.06.068.
- Mohanty, B. K. and Kushner, S. R. (2016) 'Regulation of mRNA Decay in Bacteria', *Annual Review of Microbiology*, 70(1), pp. 25–44. doi: 10.1146/annurev-micro-091014-104515.
- Morel, A.-P. *et al.* (2003) 'BTG2 antiproliferative protein interacts with the human CCR4 complex existing in vivo in three cell-cycle-regulated forms', *Journal of Cell*

Science, 116(14), pp. 2929–2936. doi: 10.1242/jcs.00480.

Moriyama, E. N. and Powell, J. R. (1997) ‘Codon Usage Bias and tRNA Abundance in *Drosophila*’, *Journal of Molecular Evolution*, 45(5), pp. 514–523. doi: 10.1007/PL00006256.

Muhlrad, D. and Parker, R. (2005) ‘The yeast EDC1 mRNA undergoes deadenylation-independent decapping stimulated by Not2p, Not4p, and Not5p’, *The EMBO Journal*, 24(5), pp. 1033–1045. doi: 10.1038/sj.emboj.7600560.

Mulder, K. W. *et al.* (2007) ‘Regulation of histone H3K4 tri-methylation and PAF complex recruitment by the Ccr4-Not complex’, *Nucleic Acids Research*, 35(7), pp. 2428–2439. doi: 10.1093/nar/gkm175.

Narula, A. *et al.* (2019) ‘Coding regions affect mRNA stability in human cells’, *RNA*, p. rna.073239.119. doi: 10.1261/rna.073239.119.

Navon, S. P. *et al.* (2016) ‘Amino acid sequence repertoire of the bacterial proteome and the occurrence of untranslatable sequences’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(26), pp. 7166–7170. doi: 10.1073/pnas.1606518113.

Nedialkova, D. D. and Leidel, S. A. (2015) ‘Optimization of Codon Translation Rates via tRNA Modifications Maintains Proteome Integrity’, *Cell*, 161(7), pp. 1606–1618. doi: 10.1016/j.cell.2015.05.022.

Nieuwkoop, T. *et al.* (2020) ‘The Ongoing Quest to Crack the Genetic Code for Protein Production’, *Molecular Cell*, 80(2), pp. 193–209. doi: 10.1016/j.molcel.2020.09.014.

Novoa, E. M. and Ribas de Pouplana, L. (2012) ‘Speeding with control: codon usage, tRNAs, and ribosomes’, *Trends in Genetics*, 28(11), pp. 574–581. doi: 10.1016/j.tig.2012.07.006.

Oberholzer, U. and Collart, M. A. (1998) ‘Characterization of NOT5 that encodes a new component of the Not protein complex’, *Gene*, 207(1), pp. 61–69. doi:

10.1016/S0378-1119(97)00605-7.

Panasenko, O. *et al.* (2006) ‘The Yeast Ccr4-Not Complex Controls Ubiquitination of the Nascent-associated Polypeptide (NAC-EGD) Complex’, *Journal of Biological Chemistry*, 281(42), pp. 31389–31398. doi: 10.1074/jbc.M604986200.

Panasenko, O. O. (2014) ‘The role of the E3 ligase Not4 in cotranslational quality control’, *Frontiers in Genetics*, 5. doi: 10.3389/fgene.2014.00141.

Panasenko, O. O. and Collart, M. A. (2011) ‘Not4 E3 Ligase Contributes to Proteasome Assembly and Functional Integrity in Part through Ecm29’, *Molecular and Cellular Biology*, 31(8), pp. 1610–1623. doi: 10.1128/MCB.01210-10.

Panasenko, O. O. and Collart, M. A. (2012) ‘Presence of Not5 and ubiquitinated Rps7A in polysome fractions depends upon the Not4 E3 ligase’, *Molecular Microbiology*, 83(3), pp. 640–653. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07957.x.

Pechmann, S. and Frydman, J. (2013) ‘Evolutionary conservation of codon optimality reveals hidden signatures of cotranslational folding’, *Nature Structural & Molecular Biology*, 20(2), pp. 237–243. doi: 10.1038/nsmb.2466.

Peng, W. *et al.* (2008) ‘Regulators of Cellular Levels of Histone Acetylation in *Saccharomyces cerevisiae*’, *Genetics*, 179(1), pp. 277–289. doi: 10.1534/genetics.107.085068.

Petrov, A. *et al.* (2011) ‘Dynamics of the translational machinery’, *Current Opinion in Structural Biology*, 21(1), pp. 137–145. doi: 10.1016/j.sbi.2010.11.007.

Plotkin, J. B. and Kudla, G. (2011) ‘Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias’, *Nature Reviews Genetics*, 12(1), pp. 32–42. doi: 10.1038/nrg2899.

Potapov, I. *et al.* (2012) ‘Effects of codon sequence on the dynamics of genetic networks’, *Journal of Theoretical Biology*, 315, pp. 17–25. doi:

10.1016/j.jtbi.2012.08.029.

Preissler, S. *et al.* (2015) ‘Not4-dependent translational repression is important for cellular protein homeostasis in yeast’, *The EMBO Journal*, 34(14), pp. 1905–1924. doi: 10.15252/embj.201490194.

Presnyak, V. *et al.* (2015) ‘Codon Optimality Is a Major Determinant of mRNA Stability’, *Cell*, 160(6), pp. 1111–1124. doi: 10.1016/j.cell.2015.02.029.

Quax, T. E. F. *et al.* (2015) ‘Codon Bias as a Means to Fine-Tune Gene Expression’, *Molecular Cell*, 59(2), pp. 149–161. doi: 10.1016/j.molcel.2015.05.035.

Radhakrishnan, A. *et al.* (2016) ‘The DEAD-Box Protein Dhh1p Couples mRNA Decay and Translation by Monitoring Codon Optimality’, *Cell*, 167(1), pp. 122–132.e9. doi: 10.1016/j.cell.2016.08.053.

Reese, J. C. (2013) ‘The control of elongation by the yeast Ccr4-Not complex’, *Biochimica et biophysica acta*, 1829(1), pp. 127–133. doi: 10.1016/j.bbagr.2012.09.001.

Reis, M. dos, Savva, R. and Wernisch, L. (2004) ‘Solving the riddle of codon usage preferences: a test for translational selection’, *Nucleic Acids Research*, 32(17), pp. 5036–5044. doi: 10.1093/nar/gkh834.

Rocha, E. P. C. (2004) ‘Codon usage bias from tRNA’s point of view: Redundancy, specialization, and efficient decoding for translation optimization’, *Genome Research*, 14(11), pp. 2279–2286. doi: 10.1101/gr.2896904.

Roth, A. C. (2012) ‘Decoding properties of tRNA leave a detectable signal in codon usage bias’, *Bioinformatics*, 28(18), pp. i340–i348. doi: 10.1093/bioinformatics/bts403.

Rouya, C. *et al.* (2014) ‘Human DDX6 effects miRNA-mediated gene silencing via direct binding to CNOT1’, *RNA*, 20(9), pp. 1398–1409. doi: 10.1261/rna.045302.114.

Sabi, R. and Tuller, T. (2014) ‘Modelling the Efficiency of Codon–tRNA Interactions

- Based on Codon Usage Bias', *DNA Research*, 21(5), pp. 511–526. doi: 10.1093/dnares/dsu017.
- Saikia, M. *et al.* (2016) 'Codon optimality controls differential mRNA translation during amino acid starvation', *RNA*, 22(11), pp. 1719–1727. doi: 10.1261/rna.058180.116.
- Schmidt, C. *et al.* (2016) 'Structure of the hypusinylated eukaryotic translation factor eIF-5A bound to the ribosome', *Nucleic Acids Research*, 44(4), pp. 1944–1951. doi: 10.1093/nar/gkv1517.
- Sharp, P. M. and Li, W. H. (1987) 'The codon Adaptation Index--a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications.', *Nucleic Acids Research*, 15(3), pp. 1281–1295.
- Sharp, P. M. and Li, W.-H. (1986) 'An evolutionary perspective on synonymous codon usage in unicellular organisms', *Journal of Molecular Evolution*, 24(1), pp. 28–38. doi: 10.1007/BF02099948.
- Shirai, Y.-T. *et al.* (2014) 'Multifunctional roles of the mammalian CCR4–NOT complex in physiological phenomena', *Frontiers in Genetics*, 5. doi: 10.3389/fgene.2014.00286.
- Sørensen, M. A. and Pedersen, S. (1991) 'Absolute in vivo translation rates of individual codons in *Escherichia coli*: The two glutamic acid codons GAA and GAG are translated with a threefold difference in rate', *Journal of Molecular Biology*, 222(2), pp. 265–280. doi: 10.1016/0022-2836(91)90211-N.
- Sun, H.-Y. *et al.* (2015) 'Protein Degradation of RNA Polymerase II-Association Factor 1(PAF1) Is Controlled by CNOT4 and 26S Proteasome', *PLOS ONE*, 10(5), p. e0125599. doi: 10.1371/journal.pone.0125599.
- Suzuki, T. *et al.* (2015) 'CNOT3 suppression promotes necroptosis by stabilizing

- mRNAs for cell death-inducing proteins’, *Scientific Reports*, 5(1), p. 14779. doi: 10.1038/srep14779.
- Swanson, M. J. *et al.* (2003) ‘A Multiplicity of Coactivators Is Required by Gcn4p at Individual Promoters In Vivo’, *Molecular and Cellular Biology*, 23(8), pp. 2800–2820. doi: 10.1128/MCB.23.8.2800-2820.2003.
- Sweet, T., Kovalak, C. and Collier, J. (2012) ‘The DEAD-Box Protein Dhh1 Promotes Decapping by Slowing Ribosome Movement’, *PLOS Biology*, 10(6), p. e1001342. doi: 10.1371/journal.pbio.1001342.
- Tate, J. G. *et al.* (2019) ‘COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer’, *Nucleic Acids Research*, 47(D1), pp. D941–D947. doi: 10.1093/nar/gky1015.
- Teixeira, D. and Parker, R. (2007) ‘Analysis of P-Body Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*’, *Molecular Biology of the Cell*, 18(6), pp. 2274–2287. doi: 10.1091/mbc.E07-03-0199.
- Temme, C. *et al.* (2010) ‘Subunits of the *Drosophila* CCR4-NOT complex and their roles in mRNA deadenylation’, *RNA*, 16(7), pp. 1356–1370. doi: 10.1261/rna.2145110.
- Tesina, P. *et al.* (2019) ‘Structure of the 80S ribosome–Xrn1 nuclease complex’, *Nature Structural & Molecular Biology*, 26(4), pp. 275–280. doi: 10.1038/s41594-019-0202-5.
- Tesina, P. *et al.* (2020) ‘Molecular mechanism of translational stalling by inhibitory codon combinations and poly(A) tracts’, *The EMBO Journal*, 39(3), p. e103365. doi: 10.15252/embj.2019103365.
- Thanaraj, T. A. and Argos, P. (1996) ‘Protein secondary structural types are differentially coded on messenger RNA.’, *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 5(10), pp. 1973–1983.
- Thomas, L. K., Dix, D. B. and Thompson, R. C. (1988) ‘Codon choice and gene expression: synonymous codons differ in their ability to direct aminoacylated-transfer

RNA binding to ribosomes in vitro.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(12), pp. 4242–4246.

Tsao, D. *et al.* (2011) ‘Disruptive mRNA folding increases translational efficiency of catechol-O-methyltransferase variant’, *Nucleic Acids Research*, 39(14), pp. 6201–6212. doi: 10.1093/nar/gkr165.

Tucker, M. *et al.* (2001) ‘The Transcription Factor Associated Ccr4 and Caf1 Proteins Are Components of the Major Cytoplasmic mRNA Deadenylation Complex in *Saccharomyces cerevisiae*’, *Cell*, 104(3), pp. 377–386. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00225-2.

Tucker, M. *et al.* (2002) ‘Ccr4p is the catalytic subunit of a Ccr4p/Pop2p/Notp mRNA deadenylation complex in *Saccharomyces cerevisiae*’, *The EMBO Journal*, 21(6), pp. 1427–1436. doi: 10.1093/emboj/21.6.1427.

Tuller, T. *et al.* (2010) ‘An Evolutionarily Conserved Mechanism for Controlling the Efficiency of Protein Translation’, *Cell*, 141(2), pp. 344–354. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.031.

Urrutia, A. O. and Hurst, L. D. (2001) ‘Codon Usage Bias Covaries With Expression Breadth and the Rate of Synonymous Evolution in Humans, but This Is Not Evidence for Selection’, *Genetics*, 159(3), pp. 1191–1199.

Venters, B. J. *et al.* (2011) ‘A Comprehensive Genomic Binding Map of Gene and Chromatin Regulatory Proteins in *Saccharomyces*’, *Molecular Cell*, 41(4), pp. 480–492. doi: 10.1016/j.molcel.2011.01.015.

Venturini, G. *et al.* (2012) ‘CNOT3 Is a Modifier of PRPF31 Mutations in Retinitis Pigmentosa with Incomplete Penetrance’, *PLOS Genetics*, 8(11), p. e1003040. doi: 10.1371/journal.pgen.1003040.

Verma, M. *et al.* (2019) ‘A short translational ramp determines the efficiency of protein synthesis’, *Nature Communications*, 10(1), p. 5774. doi: 10.1038/s41467-019-13810-1.

- Villanyi, Z. *et al.* (2014) 'The Not5 Subunit of the Ccr4-Not Complex Connects Transcription and Translation', *PLOS Genetics*, 10(10), p. e1004569. doi: 10.1371/journal.pgen.1004569.
- Vogel, C. *et al.* (2010) 'Sequence signatures and mRNA concentration can explain two-thirds of protein abundance variation in a human cell line', *Molecular Systems Biology*, 6(1), p. 400. doi: 10.1038/msb.2010.59.
- Wahle, E. and Winkler, G. S. (2013) 'RNA decay machines: Deadenylation by the Ccr4-Not and Pan2-Pan3 complexes', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1829(6), pp. 561–570. doi: 10.1016/j.bbagr.2013.01.003.
- Wang, H. *et al.* (2010) 'Crystal structure of the human CNOT6L nuclease domain reveals strict poly(A) substrate specificity', *The EMBO Journal*, 29(15), pp. 2566–2576. doi: 10.1038/emboj.2010.152.
- Wang, Y. *et al.* (2002) 'Precision and functional specificity in mRNA decay', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(9), pp. 5860–5865. doi: 10.1073/pnas.092538799.
- Webster, M. W. *et al.* (2018) 'mRNA Deadenylation Is Coupled to Translation Rates by the Differential Activities of Ccr4-Not Nucleases', *Molecular Cell*, 70(6), pp. 1089–1100.e8. doi: 10.1016/j.molcel.2018.05.033.
- Weinberg, D. E. *et al.* (2016) 'Improved Ribosome-Footprint and mRNA Measurements Provide Insights into Dynamics and Regulation of Yeast Translation', *Cell Reports*, 14(7), pp. 1787–1799. doi: 10.1016/j.celrep.2016.01.043.
- Wilson, D. N., Arenz, S. and Beckmann, R. (2016) 'Translation regulation via nascent polypeptide-mediated ribosome stalling', *Current Opinion in Structural Biology*, 37, pp. 123–133. doi: 10.1016/j.sbi.2016.01.008.
- Wind, M. and Reines, D. (2000) 'Transcription elongation factor SII', *BioEssays*, 22(4),

pp. 327–336. doi:

10.1002/(SICI)1521-1878(200004)22:4<327::AID-BIES3>3.0.CO;2-4.

Winkler, G. S. *et al.* (2006) ‘Human Ccr4-Not complex is a ligand-dependent repressor of nuclear receptor-mediated transcription’, *The EMBO Journal*, 25(13), pp. 3089–3099.

doi: 10.1038/sj.emboj.7601194.

Wohlgemuth, S. E., Gorochofski, T. E. and Roubos, J. A. (2013) ‘Translational sensitivity of the Escherichia coli genome to fluctuating tRNA availability’, *Nucleic Acids Research*, 41(17), pp. 8021–8033. doi: 10.1093/nar/gkt602.

Wu, C. C.-C. *et al.* (2019) ‘High-Resolution Ribosome Profiling Defines Discrete Ribosome Elongation States and Translational Regulation during Cellular Stress’, *Molecular Cell*, 73(5), pp. 959-970.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2018.12.009.

Wu, Q. *et al.* (2019) ‘Translation affects mRNA stability in a codon-dependent manner in human cells’, *eLife*. Edited by N. Sonenberg, K. Struhl, and J. S. Weissman, 8, p. e45396. doi: 10.7554/eLife.45396.

Yan, X. *et al.* (2016) ‘Dynamics of Translation of Single mRNA Molecules In Vivo’, *Cell*, 165(4), pp. 976–989. doi: 10.1016/j.cell.2016.04.034.

Yang, Z. and Nielsen, R. (2008) ‘Mutation-Selection Models of Codon Substitution and Their Use to Estimate Selective Strengths on Codon Usage’, *Molecular Biology and Evolution*, 25(3), pp. 568–579. doi: 10.1093/molbev/msm284.

Yu, C.-H. *et al.* (2015) ‘Codon Usage Influences the Local Rate of Translation Elongation to Regulate Co-translational Protein Folding’, *Molecular Cell*, 59(5), pp. 744–754. doi: 10.1016/j.molcel.2015.07.018.

Zhang, G., Hubalewska, M. and Ignatova, Z. (2009) ‘Transient ribosomal attenuation coordinates protein synthesis and co-translational folding’, *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(3), pp. 274–280. doi: 10.1038/nsmb.1554.

Zhao, B. S., Roundtree, I. A. and He, C. (2017) 'Post-transcriptional gene regulation by mRNA modifications', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(1), pp. 31–42. doi: 10.1038/nrm.2016.132.

Zhao, J.-P. *et al.* (2018) 'AU-Rich Long 3' Untranslated Region Regulates Gene Expression in Bacteria', *Frontiers in Microbiology*, 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.03080.

Zhou, M. *et al.* (2015) 'Nonoptimal codon usage influences protein structure in intrinsically disordered regions', *Molecular Microbiology*, 97(5), pp. 974–987. doi: 10.1111/mmi.13079.

Zhou, T., Weems, M. and Wilke, C. O. (2009) 'Translationally Optimal Codons Associate with Structurally Sensitive Sites in Proteins', *Molecular Biology and Evolution*, 26(7), pp. 1571–1580. doi: 10.1093/molbev/msp070.

Zwartjes, C. G. M. *et al.* (2004) 'Repression of Promoter Activity by CNOT2, a Subunit of the Transcription Regulatory Ccr4-Not Complex', *Journal of Biological Chemistry*, 279(12), pp. 10848–10854. doi: 10.1074/jbc.M311747200.

第 4 章

リボソームタンパク質 **uS10** のユビキチン化を介した
リボソームの異常停止に起因する新生ペプチド鎖の分解系
Ribosome-associated Quality Control (RQC)の解析

4-1. 序論

4-1-1. 哺乳類細胞におけるリボソームの停止、衝突

第1章で述べたように、出芽酵母においては、対応する tRNA 量が極端に少ない CGA レアコドンクラスターや内在性標的配列 *SDD1* mRNA が RQC の標的 mRNA 配列として知られている。このような配列を挿入したレポーター遺伝子を用いて、RQC 関連因子の機能評価が行われてきた。しかしながら、哺乳類細胞においては、内在性標的配列が同定されておらず、テスト配列として AAA コドンを繰り返す poly(A)鎖が用いられてきた。Poly(A)鎖は、プロセシングの一種として mRNA の 3'末端に付加されるため、通常翻訳されることはない。しかし、mRNA コーディング領域における poly(A)鎖の異常付加はある頻度で起きており、この際に産生されるノンストップ mRNA 上ではリボソームが停止し、RQC の標的となる。

Poly(A)鎖は、翻訳を受けると(AAA)コドンによりコードされるポリリジンを産生する。連続した塩基性アミノ酸クラスターであるポリリジン配列は、その側鎖が正電荷を帯びており、リボソームトンネル内腔が帯びる負電荷と静電相互作用を生じることで、リボソームによる翻訳伸長速度を低下させると考えられてきた。しかしながら、(AAA)コドンクラスターと比較して、同様にポリリジンをコードする(AAG)コドンクラスターによっては顕著な翻訳効率の低下が検出されない。Ramanujan S. Hegde 研究室や V. Ramakrishnan 研究室は、クライオ電子顕微鏡を用い、poly(A)鎖上で停滞したリボソームの構造解析を行ったところ、poly(A) mRNA 上のリボソームではその活性部位の異常なコンフォメーション変化が起きていることを見出している(Chandrasekaran *et al.*, 2019)。

コドンの解読を担うデコーディングセンターにおいては、mRNA 中の+1 位から+4 位の4つのアデノシン塩基がスタックし、single-stranded helix 構造を形成

する(図 4-1A)。この poly(A) mRNA 特異的な mRNA 構造の形成は、18S rRNA のうち保存性の高い A1825 および C1698 残基によって安定化されていることが示唆されている。特に、18S rRNA A1825 残基は、通常の翻訳時には内側へと入り込んでいるが、poly(A) mRNA 特異的に mRNA に近づくようにして外側へとずれ、異常なコンフォメーション変化を引き起こしている。この構造変化により A1825 残基が突き出ることによって、翻訳伸長因子 eEF1A-GTP によるアミノアシル tRNA のリクルートを阻害し、翻訳伸長停滞が誘発されていると考えられる(図 4-1B)。さらに、特に Lys-tRNA には、空間的な大きな障壁となる 2-methylthio-N6-(aminocarbonyl-L-theronyl) 修飾が A37 に付加されており、18S rRNA のコンフォメーション変化の影響を大きく受けるとも考えられている(図 4-1C)。A1825 残基は、poly(A) mRNA による single-stranded helix 構造との相互作用のみならず、28S rRNA 中の A3760 残基の構造変化によっても外側にずれた状態から内側を向いた本来の構造に戻ることができなくなっており、poly(A) mRNA 上では、複数の構造変化が要因となり、外側を向いた異常コンフォメーションに固定されている(図 4-1B)。

デコーディングセンターにおける異常コンフォメーションのみならず、ペプチド転位反応を行うペプチジルトランスフェラーゼセンターにおいても、P-site tRNA に最も近位のリジン残基の側鎖が A-site 方向を向き、そのカルボニル基が反対方向へと異常配向することが示されている。このような異常コンフォメーションは、通常の翻訳伸長反応では見られない。この poly(A) mRNA 特異的な異常配向は、P-site tRNA にチャージされた近位のリジン残基と A-site tRNA にチャージされたリジン残基が反発的な静電相互作用を生じるために、A-site tRNA の順応が阻害されるためであると考えられる。そのために、通常の翻訳伸長時には 4Å 以下であるアミノアシル tRNA のアミノ基とペプチジル tRNA のカルボニル基のエステル結合に要する物理的距離が、poly(A) mRNA 上では 5.4Å にも及

び、ペプチド結合形成の効率を低下させているとも考えられる。以上のような、新生ペプチド鎖とリボソームトンネル内腔の静電相互作用によるペプチド伸長阻害のみならず、poly(A) mRNA 特異的にリボソームの活性部位における異常コンフォメーション変化が生じることで、リボソームは poly(A) mRNA 上で強く停止することが明らかになっている(Chandrasekaran *et al.*, 2019)。

このようにして、poly(A)鎖をテスト配列とした *in vivo* における解析によって、RQC 関連因子群が同定されてきたが、*in vivo* で停止リボソーム上における特異的な反応をモニターすることは容易ではなく、近年では *in vitro* における生化学的な手法を用いて、その酵素活性や機能評価が進められている。先行研究においては、ウサギ網状赤血球由来ライセートを用いた試験管内翻訳系に対し、翻訳終結時にリボソームの解離を担う翻訳終結因子 eRF1 のドミナントネガティブ変異体(eRF1-AAQ)を共反応させることで、終止コドン上でリボソームを強制停止させて得られる停止リボソームが RQC 反応の基質として用いられている(Juszkiewicz *et al.*, 2018; Juszkiewicz, Speldewinde, *et al.*, 2020)。この eRF1-AAQ を介した人工的な停止リボソームは、出芽酵母と同様に後続のリボソームと衝突することで、哺乳類細胞においても 2 つのリボソームが衝突した Di-some を形成することが報告されている(Juszkiewicz *et al.*, 2018) (図 4-1D)。

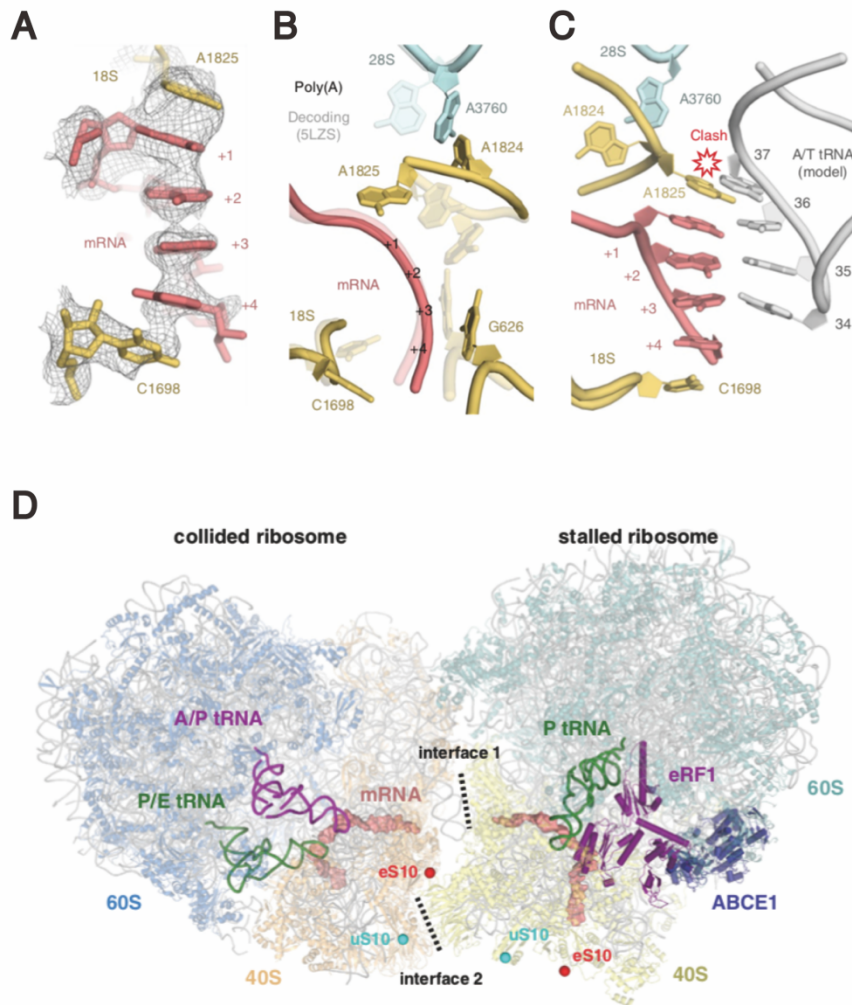


図 4-1. 哺乳類細胞における衝突リボソームのクライオ電子顕微鏡像。

A-C) poly(A) mRNA 上ではデコーディングセンターに特異的なコンフォメーション変化が生じ、翻訳伸長阻害がおこる。(Chandrasekaran *et al.*, 2019)

D) eRF1-AAQ 変異体を用いて強制停止させることで合成した Disome。(Juszkiewicz *et al.*, 2018)

4-1-2. 衝突リボソームに目印をつける E3 ユビキチンリガーゼ ZNF598

出芽酵母においては、E3 ユビキチンリガーゼ Hel2 がリボソームの衝突を検知し、目印としてリボソームタンパク質 uS10 の K6/8 残基に対し K63 型ポリユビキチン鎖を伸長する。哺乳類細胞においては、出芽酵母 Hel2 のホモログとして、RING 型 E3 ユビキチンリガーゼ ZNF598 が同定されている(Garzia *et al.*, 2017; Matsuo *et al.*, 2017; Sundaramoorthy *et al.*, 2017; Juskiewicz *et al.*, 2018; Hashimoto *et al.*, 2020)。ZNF598 は、N 末端領域に GC-rich region を含み、それに隣接するようにして RING ドメインを有する。中央領域には 3 つの核酸結合活性を有する C2H2 型 Zinc Finger ドメインを持ち、C 末端側には Proline-rich region が存在する。ZNF598 は細胞質に局在し、翻訳中のポリソームにも結合しており、その E3 活性は E2 酵素 UBE2D3 と協調して機能することで、リボソームの異常停止に起因する品質管理 RQC に必須であることが報告されている。また、変異体解析によって、C2H2 型 Zinc Finger ドメインや Proline-rich region についても、RQC の誘導に必須であることを報告している(Garzia *et al.*, 2017; Hashimoto *et al.*, 2020)。4-thiouridine(4-SU) PhotoActivatable Ribonucleoside enhanced Cross-Linking and ImmunoPrecipitation (PAR-CLIP)を用いた報告によると、ZNF598 は tRNA に対し高い親和性を示し、mRNA や rRNA にもクロスリンクされることが明らかになっている(Garzia *et al.*, 2017)。ZNF598 は tRNA の D-loop 領域にクロスリンクされ、特に(AAA)コドンに対応する tRNA-Lys(UUU)との結合効率が顕著に高いことが示されている。また、rRNA についても、5S(pos.96-121)、18S rRNA(pos.686-707、745-778)に対して ZNF598 が顕著にクロスリンクされていたことから、ZNF598 は 40S サブユニットを足場にして結合することが考えられる。以上のことから、poly(A)鎖上で停滞し tRNA-Lys(UUU)がリクルートされたリボソームの 40S サブユニットに対し、ZNF598 がリクルートされることが示唆されていた(Garzia *et al.*, 2017) (図 4-2A)。

また、複数の報告により、ZNF598 の E3 活性によりユビキチン化を受ける標的タンパク質の同定が進められている。トリプシン消化によって得られるユビキチンのダイグリン残基を介した精製法である Remnant Immuno-Affinity Profiling が行われた結果、ZNF598 によるユビキチン化標的としてリボソームタンパク質 eS1-K249 残基、eS10-K138/139 残基、uS10-K4/8 残基や Heat-Shock protein HSPH1-K234 残基が同定された。Poly(A)鎖をテスト配列とするレポーター遺伝子を用いた解析により、このうち、eS10、uS10 についてはリボソームの停止に関与する一方で、eS1 は関与しなかったことからその下流で何らかの関与があると考えられる(Garzia *et al.*, 2017)。さらに、翻訳伸長阻害剤 Anisomycin の処理条件でユビキチン化が亢進する uS5-K58/K275 残基、eS10-K138/139 残基、uS10-K4/8 残基に着目した解析によると(Higgins *et al.*, 2015)、eS10、uS10 についてはリボソームの停止に関与する一方で、uS5 は関与しないことが報告されている(Sundaramoorthy *et al.*, 2017)。しかしながら、これらの報告は、野生型リボソームタンパク質、もしくはユビキチン化部位の変異型リボソームタンパク質を過剰発現もしくは安定発現させた解析系によって行われており、内在性の野生型リボソームタンパク質におけるユビキチン化修飾を無視したものであるため、さらなる解析が必要である。さらに、*in vitro* で精製した 80S リボソームとリコンビナントタンパク質 ZNF598 を反応させた後、質量分析を行うことで、ユビキチン化標的として uS3-K214 残基、eS10-K138/139 残基、uS10-K4/8 残基が同定されている(Juszkiewicz and Hegde, 2017)。また、安定同位体標識を用いた SILAC-based proteome approach により網羅的な解析が行われた結果、ZNF598 の標的タンパク質として、uS5-K58 残基、uS3-K62/K90/K214 残基、eS10-K138/139 残基、uS10-K8/K20 残基、RACK1-K106/K271 残基が同定されているが、実際にこれらの ZNF598 によるユビキチン化修飾が、衝突リボソーム上で起こるか、RQC に対し影響を及ぼすか、については検討されておらず、今後の課題となっ

ている(Sundaramoorthy *et al.*, 2017)。

このようにして、いくつかのリボソームタンパク質が ZNF598 依存にユビキチン化を受けることが明らかにされてきたが、上述した基質特異性についての課題を解決するために、ウサギ網状赤血球由来ライセートを用いた *in vitro* 翻訳系を用いた解析が進められた(Juszkiewicz *et al.*, 2018)。その結果、ZNF598 は2つのリボソームが衝突した Di-some に対し効率よく結合し、かつ eRF1-AAQ 変異体を用いた試験管内翻訳系によりリボソームを強制停止させることで合成した衝突リボソーム中のリボソームタンパク質 eS10 に対し、モノユビキチン化を行うことが示されている(Juszkiewicz *et al.*, 2018) (図 4-2A)。

以上の報告を併せ、これまで E3 ユビキチンリガーゼ ZNF598 は、出芽酵母 Hel2 と同様に、リボソームの衝突によって合成される Di-some に対し結合し、リボソームタンパク質 eS10 をモノユビキチン化することが示されていた。しかしながら、ZNF598 依存にユビキチン化されるリボソームタンパク質は eS10 以外にも複数同定されており、これまでの報告で用いられてきた基質は人工的な配列や反応を駆使して合成されていることから、細胞内でどのようにリボソームが停止、衝突し、どの標的タンパク質にユビキチン鎖という目印を付けられているかについては、さらなる問題として残ったままである。また、ユビキチン鎖の長さや連結様式は、それを認識するデコーダー分子や下流に伝達するシグナルを決定づけることから、生体内において非常に重要な指標となる。出芽酵母において Hel2 は衝突リボソーム上の uS10 の K63 型のポリユビキチン鎖を形成する一方で、哺乳類細胞においては eS10 がモノユビキチン化を受けるとしか検出されていない。したがって、出芽酵母と哺乳類細胞の間で、ユビキチン鎖の形成に差異が生じることで、その下流のシグナル伝達経路が変化するのか、分解様式が同じなのか、異なるのか、についても検討が必要である。

4-1-3. 出芽酵母 RQT 複合体と高いホモロジーを有する 3 者複合体

出芽酵母においては、Hel2 によって K63 型ポリユビキチン化された衝突リソームは、RQT 複合体によって解離を受ける。RQT 複合体は、当研究室において同定され、ATP 依存性 RNA ヘリカーゼである Slh1、ユビキチン結合能を持つ Cue3、機能未知の Ykr023w からなる三者複合体である。我々は、出芽酵母 RQT 複合体と非常に高い配列相同性を持つ因子群により構成される Activating Signal Cointegrator-1 (ASC-1) complex に着目し、RQC への関与を検討した(Hashimoto *et al.*, 2020)。元来、ASC-1 complex は、ASCC3、ASCC2、ASCC 1、TRIP4/ASC-1 の四者複合体であり、Serum Response Factor(SRF)、c-Jun、p50 や p60 に対し直接結合することで、SRF や Activating Protein 1(AP-1)や Nuclear Factor κ B(NF- κ B) の活性化を促進する因子群として同定されている(Kim *et al.*, 1999; Jung *et al.*, 2002)。TRIP4 は、Zinc Finger ドメインを含むトランス活性化モチーフを有し、これを介して TATA-binding protein(TBP)や TFIIA、SRC-1、CBP/p300、核内受容体と結合することによって、核内において転写活性化活性を持ち、核内受容体や AP-1、NF- κ B の発現制御に関与する(Lee *et al.*, 1995; Jung *et al.*, 2002)。一方で、ASCC3、ASCC2、ASCC1 は三者で ASCC complex をも形成していることで知られる。ASCC3 は脱メチル化酵素である ALKBH3 と結合し、様々な腫瘍細胞におけるアルキル化損傷耐性の獲得に必須であることが報告されている。DNA 修復過程においては、ASCC3 は 3'-5' DNA ヘリカーゼ活性を有していることから、ALKBH3 が基質とする一本鎖 DNA の生成のために、二本鎖 DNA を解くことで、DNA のメチル化修飾を脱離させることで機能する。実際に、ASCC3 の発現抑制下においては、3-メチルシトシンが増加し、細胞増殖を抑制することから、ASCC3 はそのヘリカーゼ活性を介して細胞型特有のゲノム維持に関与することで知られている(Dango *et al.*, 2011)。この過程においては、ASCC2 に含まれユビキチン結合活性を持つ CUE ドメインを介した K63 型ポリユビキチン鎖の認識が、

DNA 損傷部位への ASCC complex の適切なリクルートに必須であることが報告されており、ASCC2 は K63 型ポリユビキチン鎖を特異的に認識することが示唆されている(Brickner *et al.*, 2017)。さらに、ASCC1 についても、病巣部位への ASCC complex のリクルートを制御している(Soll *et al.*, 2018)。

以上のように、核内において、転写活性化に関与する ASC-1 complex や DNA 修復に関与する ASCC complex のうち、その構成因子である ASCC3 は、出芽酵母 Slh1 と非常に類似したドメイン構成であり、RecA 型 ATP 依存性ヘリカーゼ活性を有する DEAD ドメイン、HELICc ドメイン、機能未知の Sec63 ドメインを 2 度繰り返す構造を形成する。ASCC3 は、細胞質中にも存在しており、Poly(A) 鎖をテスト配列としたレポーター遺伝子を用いた解析によって、ASCC3 は ZNF598 と同様に RQC の誘導に必須であることが明らかになっている(Matsuo *et al.*, 2017)。さらに、同様の解析から、ASCC2 や TRIP4 についても RQC の惹起に関与した一方で、ASCC1 は RQC に関与しなかった(Hashimoto *et al.*, 2020)。さらに、RQC の誘導に関与することで同定した ASCC3、ASCC2、TRIP4 は、ASCC1 の非存在下においても複合体を形成していたことから、我々は、出芽酵母 RQT complex (Slh1-Cue3-Ykr023w)の哺乳類細胞における機能的ホモログとして、ASCC3-ASCC2-TRIP4 からなる三者複合体を同定した(Hashimoto *et al.*, 2020)。実際に、RQC においては、ASCC3 の RNA ヘリカーゼ活性や ASCC2 のユビキチン結合活性が重要であったことから、出芽酵母と同様に哺乳類細胞においても、ZNF598 によりユビキチン化された衝突リボソームに対し、RQT 複合体はリクルートされ、その解離を担うと想定されている(Juszkiewicz, Speldewinde, *et al.*, 2020) (図 4-2A)。

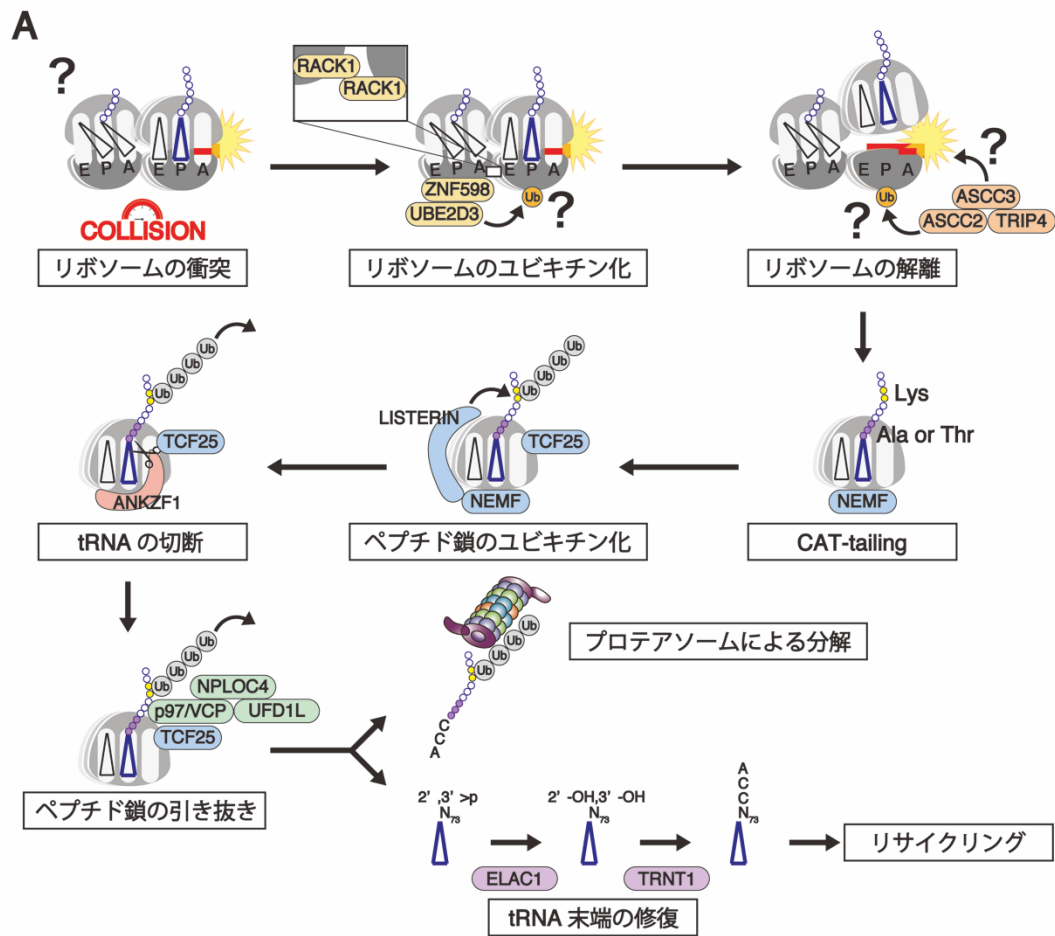


図 4-2. 哺乳類細胞における RQC の分子機構。

4-1-4. 哺乳類細胞における RQC 複合体上での合成途上の新生ペプチド鎖の分解

解離後の 60S サブユニット(60S-RNCs)上には、合成途上のペプチド鎖-ペプチジル tRNA が残存する(Shoemaker, Eyler and Green, 2010; Pisareva *et al.*, 2011)。これらを生体内から排除するため、哺乳類細胞においても出芽酵母と同様に RQC 複合体が形成され、ユビキチン-プロテアソーム経路を介して合成途上のペプチド鎖が分解される。RQC 複合体は、出芽酵母において 60S-RNCs に対し、Rqc1、Rqc2、Ltn1 が結合して構成される一方で、哺乳類細胞においても、そのホモログである RQC1/TCF25、RQC2/NEMF、LISTERIN が結合して形成される。以下では、哺乳類細胞において RQC 複合体を構成する 3 つの因子を含め、解離後の 60S RNCs に作用する因子群について、RQC 複合体上における機能を概説する(Ikeuchi, Izawa and Inada, 2019; Joazeiro, 2019; Inada, 2020; Sitron and Brandman, 2020)。

LISTERIN は、RING 型 E3 ユビキチンリガーゼであり、新生ペプチド鎖を K48 型ポリユビキチン化することにより、プロテアソームを介した分解を促進する。出芽酵母 Ltn1 と同様に、LISTERIN は自身の N 末端領域を介して 60S サブユニットのリボソーム会合面に位置し負電荷を帯びた rRNA のリン酸骨格に結合する。このような特徴的な結合様式により、40S サブユニットを含む 80S リボソームには相互作用できず、解離後の 60S サブユニットに対し特異的な結合が可能になっている。LISTERIN の N 末端領域がリボソーム会合面に位置する一方で、C 末端領域は反対側のリボソーム表面へと相互作用し、C 末端に位置する RING ドメインがリボソームトンネル出口付近にアンカーされることで、新生ペプチド鎖のユビキチン化を行う(Lyumkis *et al.*, 2014; Shao and Hegde, 2014; Shao *et al.*, 2015; Shen *et al.*, 2015; Doamekpor *et al.*, 2016; Kostova *et al.*, 2017; Osuna *et al.*, 2017) (図 4-3)。

以上のように、LISTERIN による新生ペプチド鎖へのユビキチン鎖の形成については、上述した構造学的基盤によって基質特異性が担保されているだけでなく、その効率的な反応や活性の発揮に、RQC2/NEMF や RQC1/TCF25 が関与している。

出芽酵母 Rqc2 のホモログである NEMF は、60S サブユニットの会合面に結合し、その N ドメイン、C ドメインは P-site tRNA と直接結合する。さらに、その M ドメインは LISTERIN の N 末端領域と相互作用することで、Ltn1 と 60S サブユニットの新たなアンカーポイントとして機能し、それらの結合安定性を高めている。このような P-site tRNA-NEMF-LISTERIN の特徴的な相互作用によって、NEMF は、LISTERIN とペプチジル tRNA を含む解離後の 60S サブユニットとの結合特異性を担保する機能を持つ。さらに、NEMF は 60S サブユニットの 40S サブユニットとの会合面に結合することで、解離後のリボソームサブユニットの再会合を防ぐとされている (Brandman *et al.*, 2012; Defenouillère *et al.*, 2013; Lyumkis *et al.*, 2014; Shao and Hegde, 2014; Shao *et al.*, 2015; Shen *et al.*, 2015) (図 4-3)。

一方で、LISTERIN は、新生ペプチド鎖のリジン残基に対し K48 型ポリユビキチン鎖を伸長することで、その分解を促進するが、リボソーム出口トンネルの外側にリジン残基が露出していない場合にはユビキチン鎖を伸長できない。このような事態を回避するために、NEMF は CAT-tailing と呼ばれる特別な反応を RQC 基質に対し行う。CAT-tailing は、mRNA 配列や 40S サブユニット非依存的に、解離後の 60S サブユニット上の合成途上の新生ペプチド鎖の C 末端にアラニン残基やスレオニン残基を付加する反応であり、RQC 経路特有の現象である。CAT-tailing には、新生ペプチド鎖のリジン残基をリボソームトンネル内腔から細胞質へと物理的に押し出すことで、Ltn1 による新生ペプチド鎖のユビキチン化の効率を高める役割があり、近年出芽酵母のみならず哺乳類細胞におい

でも保存されていることが報告されている。また、CAT-tailing は Ltn1 に依存したユビキチン化を促進するのみならず、Ltn1 の不足時には、付加されたアラニン残基やスレオニン残基から構成されるペプチド鎖の C 末端のアミノ酸配列が分解のデグロンとして機能し、Ltn1 に非依存かつプロテアソームに依存のリカバリー経路の活性化にも必須であることが報告されている(Defenouillère *et al.*, 2013; Shen *et al.*, 2015; Choe *et al.*, 2016; Kostova *et al.*, 2017; Osuna *et al.*, 2017; Sitron and Brandman, 2019; Wu *et al.*, 2019)。

最も機能未知の RQC 複合体構成因子として TCF25 が挙げられる。過去の報告では、TCF25 は、ユビキチン化されたペプチド鎖をリボソームトンネルから引き抜く AAA+ ATPase である Cdc48/p97/VCP のリクルートに関与する、とされていた。これに加え、近年の *in vitro* における解析により、TCF25 は、LISTERIN によるペプチド鎖のユビキチン化効率を上昇させ、かつ形成するユビキチン鎖を K48 型ポリユビキチン鎖に限定し、ユビキチン鎖の選択性を高めることで、LISTERIN による新生ペプチド鎖の分解誘導を促進することが示唆されている (Brandman *et al.*, 2012; Defenouillère *et al.*, 2013; Shao *et al.*, 2015; Osuna *et al.*, 2017; Kuroha *et al.*, 2018)。しかしながら、その作用機序は未解明な点が多い。

以上のようにしてユビキチン化された新生ペプチド鎖に、Cdc48/p97/VCP がコファクターである Ufd1/UFDL1 や Npl4/NPLOC4 を伴う形でリクルートされ、ペプチド鎖をリボソームトンネルから引き抜き、プロテアソーム依存的な分解へと導く。

しかしながら、ユビキチン化された合成途上の新生ペプチド鎖は、リボソーム内とペプチジル tRNA を介して結合していることから、プロテアソームに運ばれるためにはペプチジル tRNA と新生ペプチド鎖を切り離す必要がある。出芽酵母 Vms1 は、翻訳終結における解離因子 eRF1 と類似した Vms1-Like Release Factor 1 (VLR1) ドメインを有し、RQC において新生ペプチド鎖を 60S RNCs から切り

離すことが報告されている。Vms1 は、哺乳類細胞において ANKZF1 として保存されており、当初はペプチジル tRNA 加水分解酵素であることで同定されたが、のちに tRNA エンドヌクレアーゼであることが報告された。Vms1/ANKZF1 の VLR1 ドメインはリボソームの A-site に結合し、酵素活性ループをペプチド鎖とペプチジル tRNA の繋ぎ目である tRNA の 3'CCA 末端へと配向することで、Vms1/ANKZF1 は tRNA の CCA 末端を切断し、CCA が付加されたペプチド鎖と tRNA を産生する(Verma *et al.*, 2013, 2018; Kuroha *et al.*, 2018; Zurita Rendón *et al.*, 2018; Su *et al.*, 2019; Yip *et al.*, 2019)。このようにして、新生ペプチド鎖をリボソームトンネルから細胞質へと遊離し、プロテアソームによる分解を可能にしている。

このようにして、解離後の 60S-RNCs においても、適切なユビキチン化や CAT-tailing を新生ペプチド鎖に施すことで、厳密な分解対象の選別、迅速な分解が行われている。

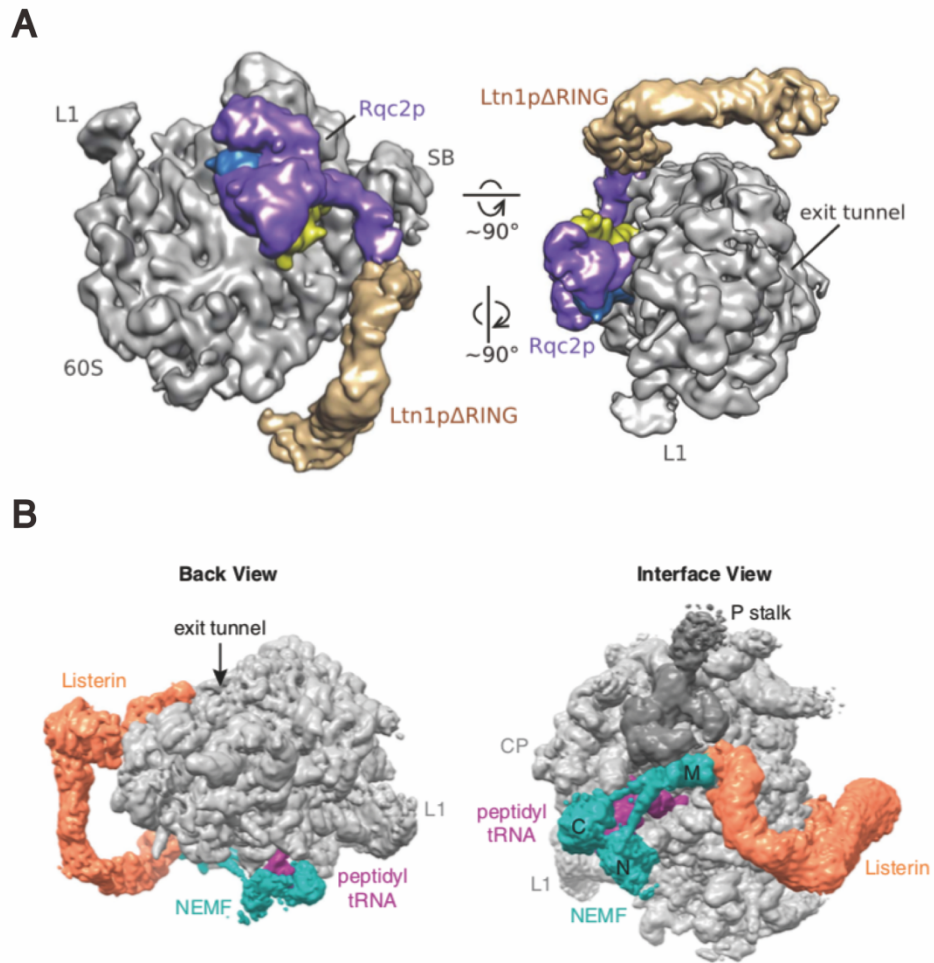


図 4-3. クライオ電子顕微鏡を用いた RQC 複合体の検出。

A) 出芽酵母における Rqc2 と Ltn1 が結合した 60S RNCs。(Shen *et al.*, 2015)より引用。

B) 哺乳類細胞における NEMF と LISTERIN が結合した 60S RNCs。(Shao *et al.*, 2015)より引用。

4-1-5. Disome profiling による内在性 RQC 標的配列 *Xbp1u* mRNA の同定

Ribosome profiling 法は、リボソームによる mRNA の翻訳動態を網羅的かつ定量的に解析する手法である。この手法では、細胞内の mRNA のうち、翻訳中のリボソームにより保護されている領域のみが RNase に耐性を持つことを利用し、細胞抽出液に対し RNase を処理して得られた mRNA フラグメント(フットプリント)をシーケンスする。これにより、細胞内においてリボソームが実際に「どの mRNA の、どの領域を」翻訳中かを解析することができる。理化学研究所 岩崎研究室では、当研究室を含めた共同研究により、ヒト細胞における mRNA 上でのリボソームの交通渋滞、衝突位置を網羅的に明らかにするため、典型的な Monosome profiling を改変した Disome profiling が行われた。Monosome profiling では、1つのリボソーム(Monosome)によって保護された 17-34nt 長の mRNA フラグメントを RNase 処理によって単離しシーケンスを行うが、Disome profiling では、2つのリボソームが衝突し Disome が形成された際にのみ産生される 40-65nt 長の mRNA フラグメントを RNase 処理によって単離しシーケンスを行う(図 4-5A)。この Disome profiling の結果、リボソームを停止させる多様な mRNA モチーフが明らかになり、このうち RQC の内在性標的配列として *Xbp1u* mRNA が同定された(図 4-5B)。

熱ストレス等によってミスフォールディングを引き起こしたタンパク質が小胞体に蓄積し、小胞体ストレスが生じた場合、シャペロンや異常タンパク質の分解因子の発現を誘導し、ストレスを緩和する機構である小胞体ストレス応答(Unfolded Protein Response : UPR)が惹起される。この UPR により発現誘導される転写活性化因子の一つが XBP1 である(Yoshida *et al.*, 2001) (図 4-4A)。

小胞体ストレス応答時には、未成熟型 *Xbp1u* mRNA がスプライシングを受け、26塩基からなるイントロンが除去されることで、活性を有する成熟型 *Xbp1s* mRNA が産生される(図 4-4A)。この際、スプライシングを受けることで、開始

コドンのコドンフレームと転写活性化ドメインのコドンフレームが一致し、転写活性化因子としての活性を発揮できるようになる(図 4-4A)。Xbp1u mRNA のスプライシングは、小胞体ストレス応答時に活性化される小胞体タンパク質 IRE1 α により行われるため、Xbp1u mRNA が効率の良いスプライシングを受けるためには、IRE1 α が位置する小胞体膜上に局在化される必要がある(Yanagitani *et al.*, 2009) (図 4-4B)。

Xbp1u mRNA は、イントロンの下流にアレストペプチド(AP)をコードしており、それによる翻訳の一時停止を巧妙に利用し、自身の mRNA を小胞体膜上へと局在化させている(図 4-4B)。

Xbp1u mRNA 由来の AP は、ペプチジルトランスフェラーゼセンターの近傍で顕著なターンを形成することで独特なコンフォメーションを生じ(図 4-5D)、28S rRNA やリボソームトンネル内部の狭窄部位を構成するリボソームタンパク質 uL4 や uL22 と直接相互作用したり(図 4-5E)、ペプチジルトランスフェラーゼセンターを歪め、活性を阻害したりすることにより、翻訳を停止させる(Yanagitani *et al.*, 2011; Shanmuganathan *et al.*, 2019) (図 4-5F)。

Xbp1u mRNA の AP 上でリボソームが一時停止すると、その上流にコードされており既に合成された疎水性アミノ酸領域(HR2)がリボソーム出口トンネルの外側に露出し、シグナル認識粒子(SRP)依存に認識、輸送されることで小胞体膜上のトランスロコン Sec61 へと係留される。このようにして、スプライシングを行う IRE1 α が局在する小胞体膜上に、Xbp1u mRNA が翻訳停止したままアンカーされることで、効率のよいスプライシングを受けることができるようになる。したがって、Xbp1u mRNA における翻訳停止は、効率的な SRP の動員、小胞体膜上への局在化、IRE1 α によるスプライシングを可能にしている(Yanagitani *et al.*, 2011; Shanmuganathan *et al.*, 2019) (図 4-4B)。

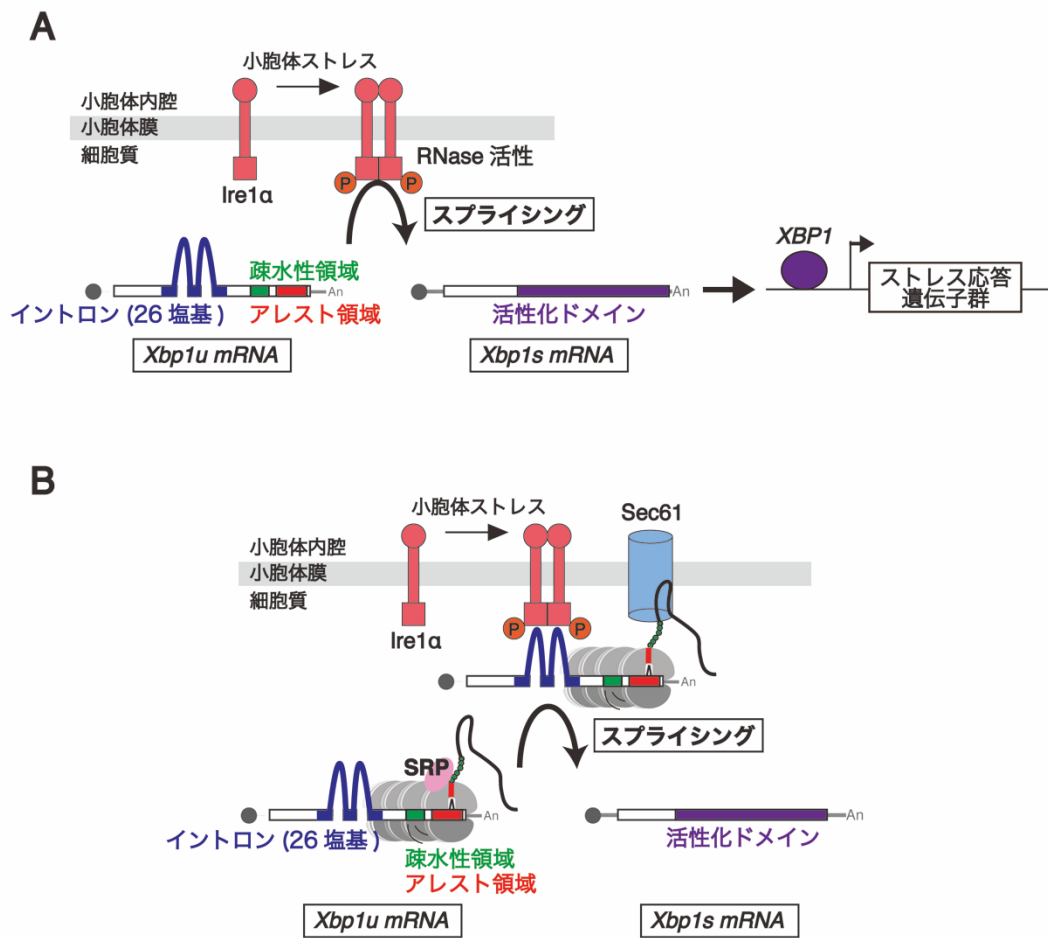


図 4-4. *Xbp1u* mRNA における翻訳停止は、効率的な小胞体膜上への局在化、IRE1 α によるスプライシングを可能にしている。

A) 小胞体ストレス応答時の XBP1 タンパク質発現機構。

B) *Xbp1u* mRNA における翻訳停止と効率的な小胞体膜上への局在化の関連性。

実際に、Disome profiling によって、既知の翻訳停止位置上に Disome footprint のピークが検出されたことから、*Xbp1u* mRNA 上ではリボソームの衝突が生じていることが明らかになった(図 4-5B)。さらに、その上流側に 11 コドンの間隔で 5 つの Disome footprint のピークが並んでいたことから、少なくとも 6 つのリボソームが連続して衝突していると考えられる(Han *et al.*, 2020) (図 4-5B)。

また、レポーター遺伝子を用いた解析により、*Xbp1u* mRNA 由来のペプチド鎖は、RQC に必須な LISTERIN や ZNF598 に依存して発現制御を受けていた(図 4-5C)。このことから、*Xbp1u* mRNA 上で停止したリボソームは、後続のリボソームと衝突し、停止リボソーム上に係留された合成途上の未成熟型 XBP1u ペプチド鎖は RQC による分解を受けることが明らかになった。このようにして、出芽酵母 *SDD1* mRNA のような、哺乳類細胞における内在性 RQC 標的配列として *Xbp1u* mRNA が同定された(Han *et al.*, 2020) (図 4-5C)。

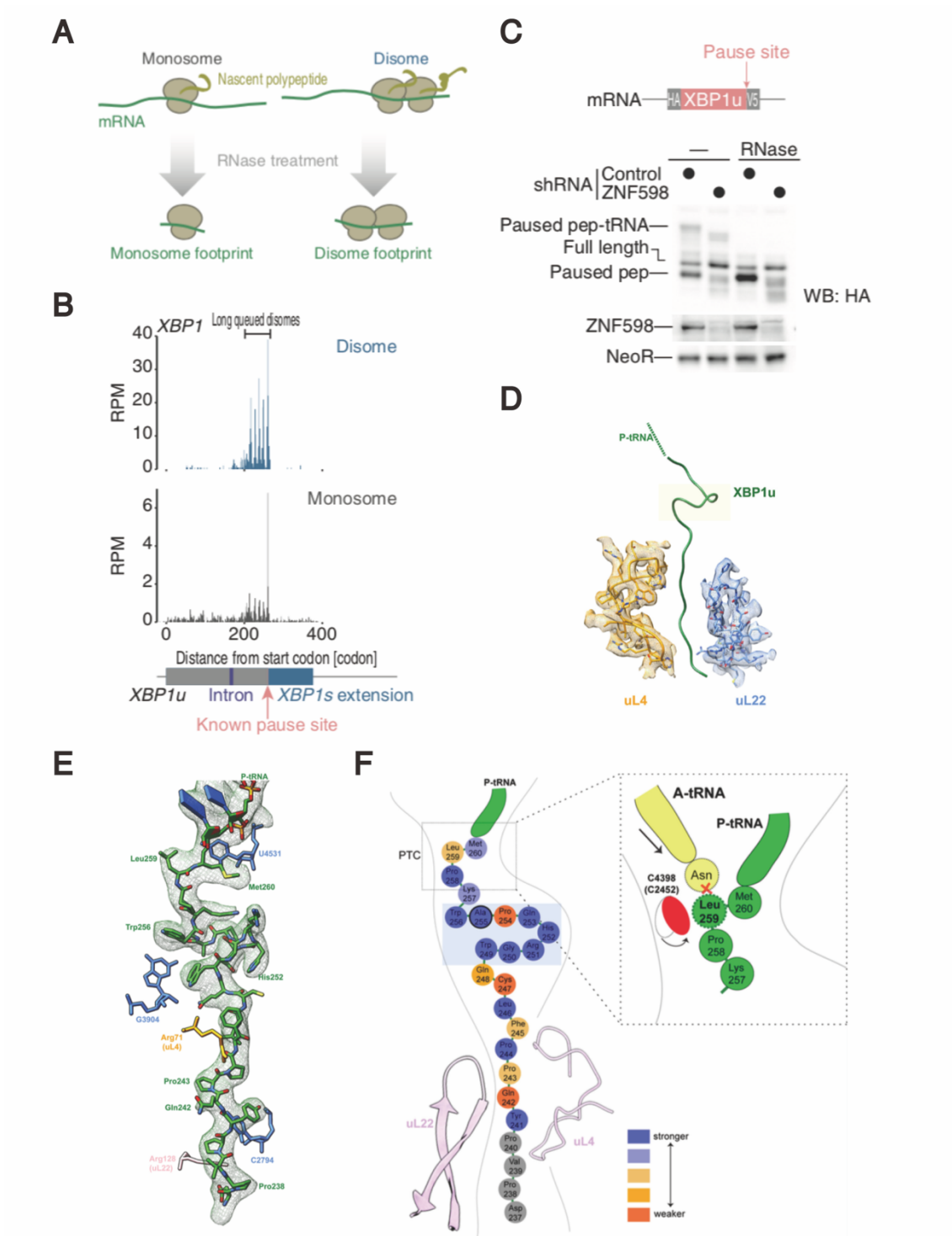


図 4-5. 内在性 RQC 標的配列 *Xbp1u* mRNA。

A-C) Disome profiling に基づいた RQC 標的配列としての *Xbp1u* mRNA の同定。

D-F) クライオ電子顕微鏡を用いた *Xbp1u* mRNA 上での停滞様式の検出。

4-1-6. リボソームの衝突と細胞内応答

リボソームの衝突は、合成途上の新生ペプチド鎖の分解系である RQC のみならず、多彩なイベントを惹起する(Meydan and Guydosh, 2020b, 2020a)。第 1 章で前述したように、出芽酵母においては、mRNA の切断を伴う NGD により異常 mRNA が分解されるが、哺乳類細胞においてその保存性が報告された例はない。

哺乳類細胞において、リボソームの衝突センサーである E3 リガーゼ ZNF598 は、m4EHP (mammalian eIF4E homologous protein)複合体の構成成分として同定された(Amaya Ramirez *et al.*, 2018; Tollenaere *et al.*, 2019)。m4EHP は、翻訳開始因子 eIF4E と競合的に mRNA の 5' Cap 構造に結合することで翻訳抑制を行うとされていた。近年、衝突リボソーム上の ZNF598 は、GIGYF2 と 4EHP と共に複合体を形成しており、このうち、GIGYF2 と 4EHP は、翻訳停滞配列を含む mRNA の新規の使用を防ぐため、その異常 mRNA の翻訳開始を阻害する機能を持つことが報告されている(Hickey *et al.*, 2020)。さらに、GIGYF2 と 4EHP は、翻訳開始の阻害のみならず、共翻訳的な異常 mRNA の分解にも関与することが明らかになっている(Weber *et al.*, 2020)。このように、ZNF598 が RQC を介して合成途上の新生ペプチド鎖の分解促進を行う一方で、細胞は、GIGYF2 依存に翻訳反応の鋳型となる mRNA を分解し、かつ、4EHP 依存に翻訳開始阻害をすることで、異常 mRNA にロードするリボソーム量を抑え、異常翻訳の蓄積を最小限に抑えている(図 4-6)。

さらに、複数の報告により、ZNF598 とは独立の衝突センサーとして、EDF1 や ZAK α が報告されている。

EDF1 は、出芽酵母においても Mbf1 として保存されており、リボソーム同士の衝突界面近傍において、後続のリボソームの 40S サブユニット内の mRNA エントリーチャンネルに特異的に結合することが示されている(Sinha *et al.*, 2020)。Mbf1/EDF1 は、停滞リボソームのフレームシフトを阻害し、mRNA 上にリボソ

ームを固定することでその読み枠の維持に関わるのみならず(Wang *et al.*, 2018)、ZNF598 に非依存、RACK1 に依存して衝突リボソームにリクルートされ、GIGYF2 や 4EHP を介した翻訳制御を誘導することが示唆されている(Juszkiewicz, Slodkiewicz, *et al.*, 2020; Sinha *et al.*, 2020)。さらに、これらの報告においては、EDF1 や GIGYF2、4EHP は ZNF598 非依存に衝突リボソームにリクルートされることから、EDF1 は GIGYF2 や 4EHP を衝突リボソーム上にリクルートすることで比較的マイルドに翻訳停滞を抑える一方で、ZNF598 が衝突リボソームにリクルートされた際には比較的強行的に RQC によって新生ペプチド鎖を分解誘導する可能性が考えられる(図 4-6)。

リボソームの異常停止は、異常 mRNA や合成された新生ペプチド鎖による翻訳伸長阻害に起因する例のみならず、環境ストレス時にも生じうると想定される(Liu, Han and Qian, 2013; Shalgi *et al.*, 2013; Darnell, Subramaniam and O'Shea, 2018; Pochopien *et al.*, 2020)。分子シャペロンの絶対量不足や、熱ストレス、小胞体ストレス、酸化ストレス等の Proteotoxic stress 時には、細胞内のミスフォールドタンパク質の存在量が増えることから、分子シャペロンである Hsc70 や Hsp70 が遊離のミスフォールドタンパク質に奪われるために、共翻訳的なタンパク質フォールディングが追いつかず、ストレス下においては、翻訳伸長速度が低下、停止する可能性がある。また、栄養飢餓や UV 照射、翻訳伸長阻害剤の処置等の Ribotoxic stress 時には、アミノ酸不足や RNA 修飾、リボソームの強制停滞の誘導が起こるために、リボソームが停止すると考えられる。このうち一例として、アミノ酸飢餓時に、アミノ酸をチャージしていないデアシル化 tRNA がリボソームに対し結合すると、ペプチド結合形成が出来ずに翻訳が停止しリボソームが衝突する。その後、Gcn1 がリボソームの衝突によって形成された disome にまたがるようにして結合することが示されている(Pochopien *et al.*, 2020)。Gcn1 が結合した disome には、リン酸化酵素 Gcn2 がリクルートされ、それによって

eIF2 α がリン酸化されることで、グローバルな翻訳抑制や転写因子 Gcn4/ATF4 を介した特異的遺伝子の発現誘導といったストレス応答が起こる。このような eIF2 α のリン酸化を介した一連の翻訳制御は、eIF2 α キナーゼを活性化する様々なストレスによって共通して惹起されることから、統合的ストレス応答 (Integrated Stress Response :ISR) と呼ばれている。このように、Proteotoxic stress や Ribotoxic stress をはじめとする環境ストレス時にも、リボソームの停止やその衝突が生じると想定されるが、細胞は、これによって形成された disome を特徴的なハブとして、ISR を惹起する可能性が示唆されてきた。

それでは、ISR 時にはどのようなセンサーが衝突リボソームを検知するのか。RQC の惹起時には ZNF598 がセンサーとして衝突リボソーム上にリクルートされるが、ISR の惹起時には MAPKKK である ZAK α /MLK7 が細胞内ストレスセンサーとして衝突リボソームに結合することが示唆されている (Wu *et al.*, 2020)。リン酸化型 ZAK α は、衝突リボソームに対し特異的に結合することで、GCN1-GCN2-GCN20 をリクルートし、リボソームの衝突に応じて eIF2 α のリン酸化を促進する。これにより、ISR が惹起され、ストレスが軽減されるために細胞は生存する。一方で、ストレスのレベルに応じて、リン酸化型 ZAK α は MAPKKs をリン酸化し、p38 や JNK のリン酸化をも活性化することで、アポトーシスを介した細胞死の誘導にも関与することが示唆されている (Wu *et al.*, 2020) (図 4-6)。

以上のように、細胞内では、リボソームの衝突によって、①EDF1 をセンサーとする翻訳開始阻害や mRNA 分解を介した停滞リボソームの蓄積の抑制、② ZNF598 をセンサーとする合成途上の新生ペプチド鎖の RQC を介した強制分解、③ZAK α をセンサーとする eIF2 α のリン酸化を介した ISR による細胞生存、④ ZAK α をセンサーとする MAP キナーゼ経路を介したアポトーシスによる細胞死、という複数の経路が応答でき、細胞内の状況に応じて反応経路が選択され

ると考えられている。RQC と ISR は互いに活性化レベルを制御しており、一方の経路の不活化はもう一方の経路の過剰活性化をもたらす可能性が示唆されていることから(Yan and Zaher, 2020)、細胞のダメージレベルが低いとき(例えば、単一の mRNA 上でのみリボソームの停止が生じているとき)には RQC によってそれぞれの衝突ユニットで処理し、ダメージレベルが高いとき(例えば、細胞内全体で広くリボソームの停止が生じているとき)には ISR によって細胞内全体の制御系を動かすことによって翻訳の異常事態を処理している可能性もある(図 4-6)。

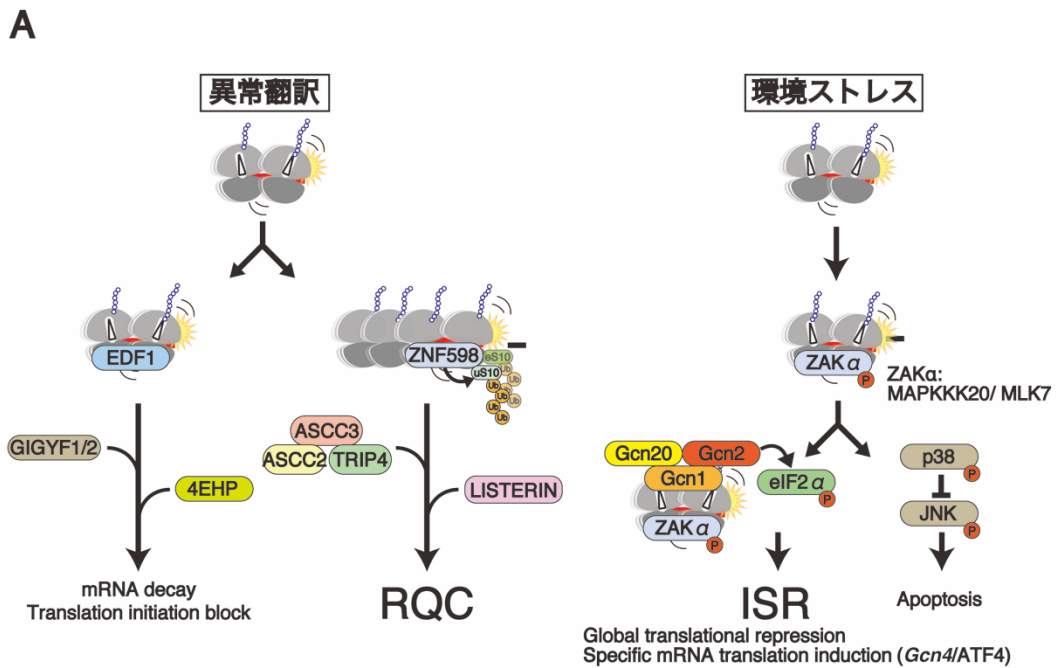


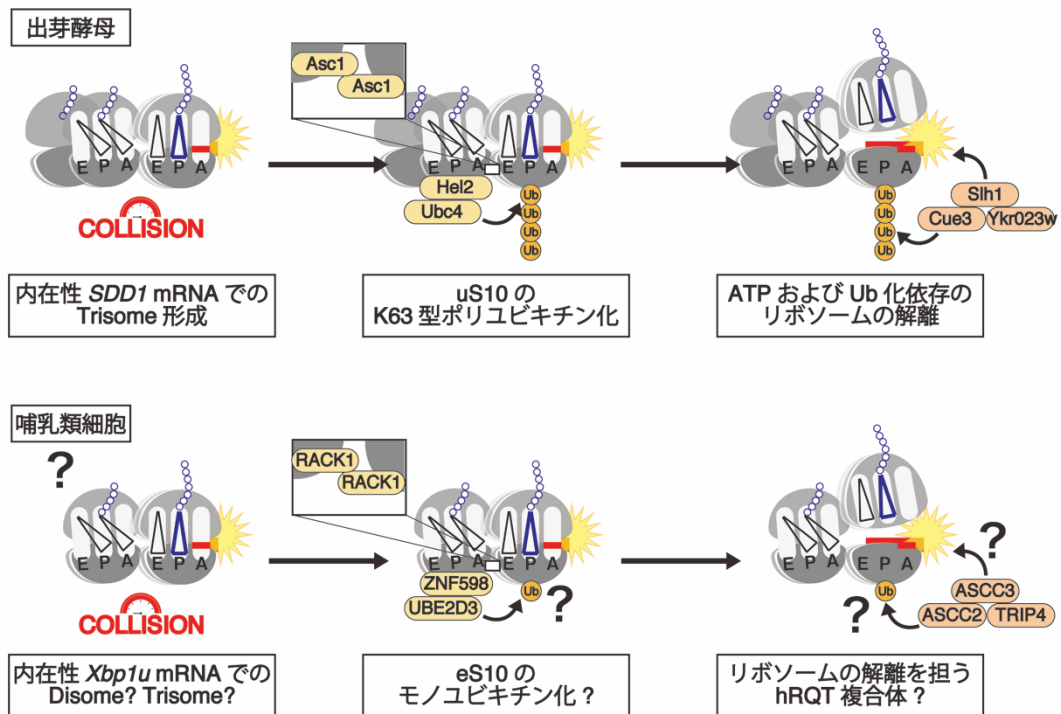
図 4-6. リボソームの衝突による RQC と ISR。

4-2. 目的

これまで、RQC の分子基盤は、主に出芽酵母を用いた研究によって確立されてきた。その結果、出芽酵母においては、RQC の惹起に、①リボソームの衝突による特異的な構造の形成、②リボソームの衝突センサーである E3 ユビキチンリガーゼ Hel2 によるリボソームタンパク質 uS10 の K63 型ポリユビキチン化、③RQT 複合体によるリボソームユビキチン化依存的な衝突リボソームの解離、が誘導されることが必須であることが明らかになっている。特に、出芽酵母における内在性の RQC 標的配列 *SDD1* mRNA 上においては、3 つのリボソームの衝突により形成される Trisome が Hel2 によるユビキチン化における 1 ユニットとして認識される。

一方で、哺乳類細胞においては、前述したような人工的な配列や反応を駆使することにより、RQC に関与する因子として E3 ユビキチンリガーゼ ZNF598 や出芽酵母 RQT 複合体と非常に高いホモロジーを有する ASCC3-ASCC2-TRIP4 複合体が同定されてきた。しかしながら、細胞内においてリボソームがどのようにして停滞、衝突し、それが解除されるのか、については明らかになっていなかった。また、ユビキチン鎖の連結様式は、その下流シグナルを決定づける非常に重要な因子であるが、Hel2 は uS10 に対し K63 型ポリユビキチン化を行う一方で、ZNF598 は eS10 に対しモノユビキチン化を行うことで報告されていた。さらに、ASCC3-ASCC2-TRIP4 複合体についても出芽酵母 RQT 複合体と同様にリボソームの解離に関与するのかは明らかになっていない。

そのため、本研究では試験管内翻訳系において RQC 反応の再構築を行うことで、それぞれの RQC 因子の活性評価を行い、その分子実態や反応の詳細を明らかにすることを目的とした(図 4-7)。



内在性 RQC 標的配列上でリボソームはどのように停滞、衝突し、解除されるのか
 ZNF598 は出芽酵母と同様に K63 型ポリユビキチン鎖を形成するのか
 hRQT 複合体はユビキチン化依存的にリボソームを解離させるのか

図 4-7. 本研究の目的。

4-3. 結果

4-3-1. *Xbp1u* mRNA 上でリボソームは停止し衝突する。

先行研究において、Disome profiling が行われた結果、哺乳類細胞における RQC の内在性標的配列として *Xbp1u* mRNA が同定されている(Han *et al.*, 2020)。*Xbp1u* mRNA は、それによりコードされるペプチド鎖の C 末端側にアレストペプチド (AP)領域を含み、この領域においてリボソームが一時停止することが知られている。このリボソームの一時停止は、小胞体ストレス時に、*Xbp1u* mRNA-リボソーム-新生ペプチド鎖複合体を効率的に小胞体膜上にターゲティングさせ、小胞体膜上の RNase である IRE1 α によって *Xbp1u* mRNA が効率よくスプライシングを受けるために必須である(Yanagitani *et al.*, 2009, 2011)。詳細については、4.1.5 で前述した。しかし、驚くべきことに、*Xbp1u* mRNA 上ではリボソームが衝突し、その合成途上の新生 XBP1u ペプチド鎖は RQC によって分解を受けていることが明らかにされている(Han *et al.*, 2020)。

このため、本研究においては、哺乳類細胞における RQC の内在性標的配列として初めて同定された *Xbp1u* mRNA をテンプレートとした試験管内翻訳反応を行い、RQC の惹起反応の再構築を行なった。

まず、T7 プロモーターの下流に、*Xbp1u* mRNA のコーディング領域を挿入したテンプレート mRNA を、ウサギ網状赤血球由来ライセート(Rabbit Reticulocyte Lysate: RRL)中で翻訳させることで、試験管内で *Xbp1u* mRNA 上でのリボソームの停止、衝突を再現しようと試みた(図 4-8A)。実際には、*Xbp1u* mRNA の開始コドンの直下に、リボソーム-新生ペプチド鎖複合体 (Ribosome-Nascent chain Complex: RNC)の精製用に His6 タグ、その下流にウエスタンブロットによる検出用に PA タグを付加したテンプレート mRNA を用いた。これにより、もし、反応中で *Xbp1u* mRNA を翻訳中のリボソームが停止すれば、N 末端の His6 タグ

を介して停止リボソームを精製することが可能になる(図 4-8B)。実際に、*His6-PA-Xbp1u* mRNA を RRL 中で翻訳させ、N 末端の His6 タグを介して RNC を精製した後、抗 PA 抗体を用いたウエスタンブロットを行うと、リボソームの停止の指標となるペプチジル tRNA 結合型の新生ペプチド鎖(peptRNA-AP)が検出された(図 4-8C)。実際に、ペプチジル tRNA 結合型の新生ペプチド鎖に対し、RNaseA を処理すると、ペプチジル tRNA が消化されることを確認している。また、精製された RNC がリボソームの停止に由来するかを検討するため、先行研究においてリボソームの停止に欠損を示すことで同定されている W256A 変異を用いた(Yanagitani *et al.*, 2011)。リボソームの停止を阻害する点変異体 *Xbp1u-W256A* mRNA やアレストペプチド領域を欠損させた *Xbp1u-ΔAR* mRNA を用いた反応では、ペプチジル tRNA 結合型の新生ペプチド鎖が検出されなかった。したがって、*in vitro* において *Xbp1u* mRNA 上でのリボソームの停止が再現でき、その結果生じる RNC を精製することに成功した。

次に、RNC 精製によって得た停止リボソームをショ糖密度勾配遠心法によって分画した。その結果、アレストペプチド領域を欠損させた *Xbp1u-ΔAR* mRNA を用いた反応では、リボソームが *Xbp1u-ΔAR* mRNA 上で停止しないためにリボソーム由来の吸光が検出されなかった。一方で、野生型 *Xbp1u* mRNA を用いた反応では、80S リボソームのみならず、停止リボソームに対し後続のリボソームが衝突することで形成された Disome(2 つのリボソームの衝突)、Trisome(3 つのリボソームの衝突)、Tetrasome(4 つのリボソームの衝突)、Pentosome(5 つのリボソームの衝突)、Hexasome(6 つのリボソームの衝突)も精製された(図 4-8D)。さらに、RNC に含まれる新生ペプチド鎖について、分画後のサンプルを抗 PA 抗体によるウエスタンブロットによって検出したところ、野生型 *Xbp1u* mRNA 由来の精製 RNC においてのみ、衝突リボソーム上にシグナルが検出された(図 4-8E)。したがって、本研究における RNC 精製によって得られる産物は、リボ

ソームの停止に由来しており、*Xbp1u* mRNA 上では2つ以上のリボソームが衝突することが明らかになった。この結果は、Disome profiling を用いた先行研究において、*Xbp1u* mRNA 上で複数の Disome footprint が検出されていることと一致する(Han *et al.*, 2020)。また、*Xbp1u* mRNA 上では3つ以上のリボソームが衝突することから、哺乳類細胞における RQC の基質としては、2つのリボソームが衝突した Disome では不十分であり、さらなるリボソームの衝突が必要である可能性も考えられる。

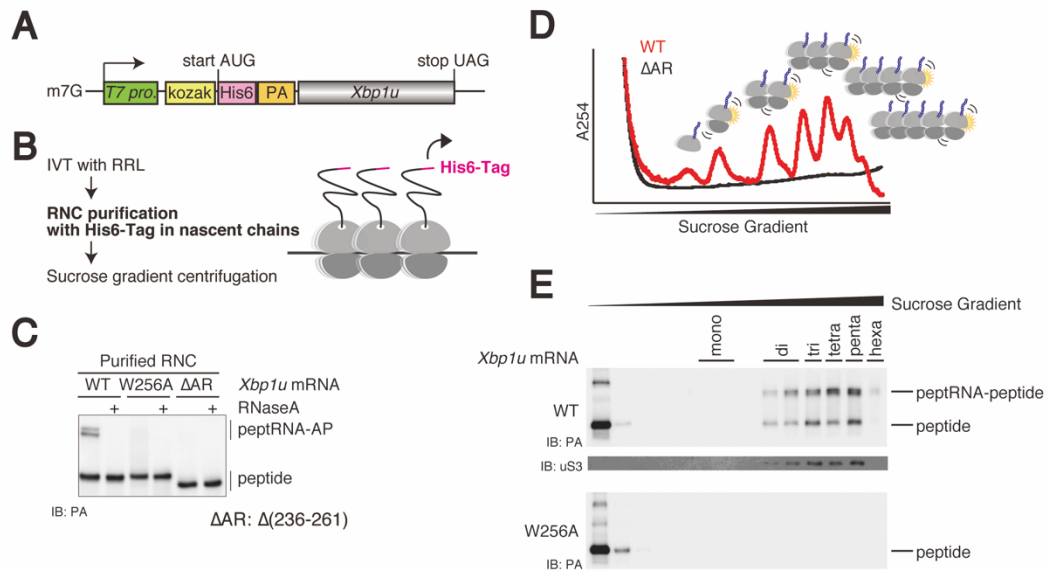


図 4-8. *Xbp1u* mRNA 上でリボソームは停止し衝突する。

A) テンプレート mRNA の構造。T7 プロモーターの下流に His6 タグ、PA タグ、*Xbp1u* mRNA 配列を挿入した。

B) 本実験の流れ。新生ペプチド鎖の N 末端の His6 タグを介して RNC を精製した。

C) RNC 精製。*Xbp1u* mRNA 由来の RNC を検出すると、ペプチジル tRNA 結合型新生ペプチド鎖が検出できた。

D,E) RNC 精製後にシヨ糖密度勾配遠心法により分画した際の吸光と抗 PA 抗体を用いたウエスタンブロット。

4-3-2. E3 リガーゼ ZNF598 は衝突リボソーム上のリボソームタンパク質 uS10 および eS10 をポリユビキチン化する。

出芽酵母においては、E3 リガーゼ Hel2 が衝突リボソーム中のリボソームタンパク質 uS10 を K63 型ポリユビキチン化することで RQC を惹起する。出芽酵母 Hel2 の哺乳類ホモログとして、E3 リガーゼ ZNF598 が同定されている(Garzia *et al.*, 2017; Matsuo *et al.*, 2017; Sundaramoorthy *et al.*, 2017; Juszkiwicz *et al.*, 2018; Hashimoto *et al.*, 2020)。一方で、これまで複数のアプローチによって、ZNF598 によるユビキチン化標的の探索が行われてきた(Garzia *et al.*, 2017; Juszkiwicz and Hegde, 2017; Sundaramoorthy *et al.*, 2017)が、これらの結果は ZNF598 の潜在活性を評価したものであり、リボソームの衝突依存性という基質特異性については議論されていない。また、翻訳終結因子 eRF1 の変異体を過剰量反応させた試験管内翻訳系を用いた解析によって、リボソームタンパク質 eS10 のモノユビキチン化が衝突リボソーム上で起こることが示されている(Juszkiwicz *et al.*, 2018)ものの、RQC の正確な基質を用いて評価した例はない。

そのため、本研究では、正確な RQC 基質として、*Xbplu* mRNA 上で衝突リボソームを用いて解析を行った。まず、RRL を用いた試験管内翻訳系によって合成された衝突リボソームを、その新生ペプチド鎖の N 末端に含まれる His6 タグを介して magnetic beads に繫留させた。Beads に繫留させた RNC に対し、ユビキチン化反応に必須な ATP、ユビキチン、E1、E2 として UBE2D3 (Garzia *et al.*, 2017)、E3 として ZNF598 を反応させた(図 4-9A)。ZNF598 タンパク質は、HEK293T 細胞に 3FLAG タグを付加した ZNF598 をプラスミドによって過剰発現させた後、抗 FLAG 抗体ビーズを用いて精製した(図 4-9B)。Beads 上で RNC をユビキチン化させた後、溶出することで試料とした。先行研究において、基質特異性については担保されていないものの ZNF598 のユビキチン化標的候補として示唆されていた、リボソームタンパク質 uS5、uS3、eS10、uS10 に対する抗体を用いて

ウエスタンブロットを行うことで、リボソームの衝突に依存した ZNF598 のユビキチン化標的の同定を行なった。その結果、uS5 および uS3 は、ZNF598 を反応系に添加しても変化がなかった一方で、eS10、uS10 は、ZNF598 依存的にユビキチン化された(図 4-9C)。さらに、これらは、これまでに検出されていなかったポリユビキチン鎖であった。したがって、E3 リガーゼ ZNF598 は、衝突リボソーム中のリボソームタンパク質 eS10、uS10 に対し、ポリユビキチン鎖を形成することが明らかになった。

一方で、RRL による翻訳中に精製 ZNF598 タンパク質を共反応させることで、共翻訳的なユビキチン化反応を行った結果(図 4-9D)、Beads 上におけるユビキチン化反応と一致して、eS10、uS10 はポリユビキチン化を受けた。一方で、uS3、uS5 についてもモノユビキチン化効率が亢進することが明らかになった(図 4-9E)。この結果は、uS3、uS5 のモノユビキチン化について、RRL 中に含まれる未知の因子が ZNF598 依存の反応を促進していることを示唆している。以上の結果から、ZNF598 は eS10、uS10 をポリユビキチン化すること、また未知の因子と協調することで uS3、uS5 のモノユビキチン化を促進することが示された。

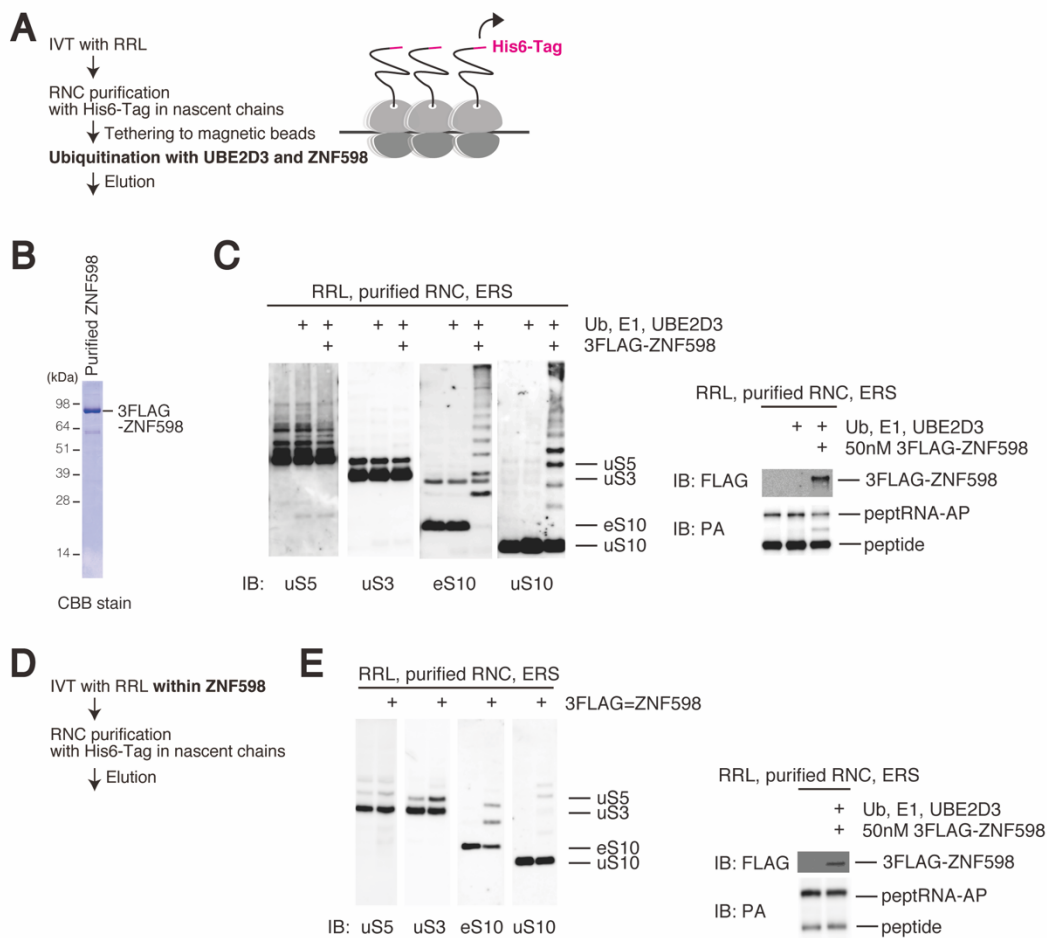


図 4-9. E3 リガーゼ ZNF598 は衝突リボソーム上のリボソームタンパク質 uS10 および eS10 をポリユビキチン化する。

A) 本実験の流れ。Magnetic beads に繫留した RNC に対し、ZNF598 によりユビキチン化反応を行なった。

B) ZNF598 タンパク質の精製。HEK293T 細胞に 3FLAG-ZNF598 を過剰発現し、FLAG タグを介して精製した。

C) 精製 RNC に対する Beads 上でのユビキチン化反応。

D) 本実験の流れ。RRL による翻訳中に ZNF598 を共反応させ、ユビキチン化反応を行なった。

E) RNC に対する Lysate 中でのユビキチン化反応。

4-3-3. E3 リガーゼ ZNF598 は、衝突したリボソームを認識しリボソームタンパク質 uS10 をポリユビキチン化する。

出芽酵母における RQC の内在性標的配列 *SDD1* mRNA 上において、E3 リガーゼ Hel2 は 3 つのリボソームが衝突した Trisome を 1 ユニットとして認識し、特異的にユビキチン化を行う。このため、哺乳類細胞における RQC の内在性標的配列 *Xbplu* mRNA 上において、E3 リガーゼ ZNF598 がどのような衝突リボソームを基質にするのか、検討を行った。

本実験では、まず、翻訳中の RRL に対し精製 ZNF598 タンパク質を共反応させることで、リボソームタンパク質 uS10 のユビキチン化効率を比較するため、翻訳と共役してユビキチン化を行ったのち、RNC を精製後、ショ糖密度勾配遠心法によって分画した(図 4-10A)。その結果、精製された Monosome-RNC 上のユビキチン化効率と比較して、2 つのリボソームが衝突した Disome-RNC 上におけるユビキチン化効率は亢進しており、さらに 3 つ、4 つのリボソームが衝突した Trisome-RNC、Tetrasome-RNC 上におけるその効率はさらに顕著であった、したがって、リボソームの衝突の数が多く、その程度が強いほど、ZNF598 による反応基質になりやすいことが明らかになった(図 4-10B)。

これをさらに検証するため、精製 RNC をショ糖密度勾配遠心法によって分画したのち、ユビキチン化反応に必須な ATP、E1、E2 として UBE2D3、E3 として ZNF598 を反応させ、経時的にサンプリングを行うことで反応効率について詳細に検討した(図 4-10C)。その結果、リボソームタンパク質 uS10、eS10 のいずれにおいても、Monosome-RNC と比較して、Disome-RNC、Trisome-RNC、Tetrasome-RNC においてユビキチン化効率が高かったことから、リボソームの衝突の数が多く、その程度が強いほど、ZNF598 が好むことを明らかにした(図 4-10D)。

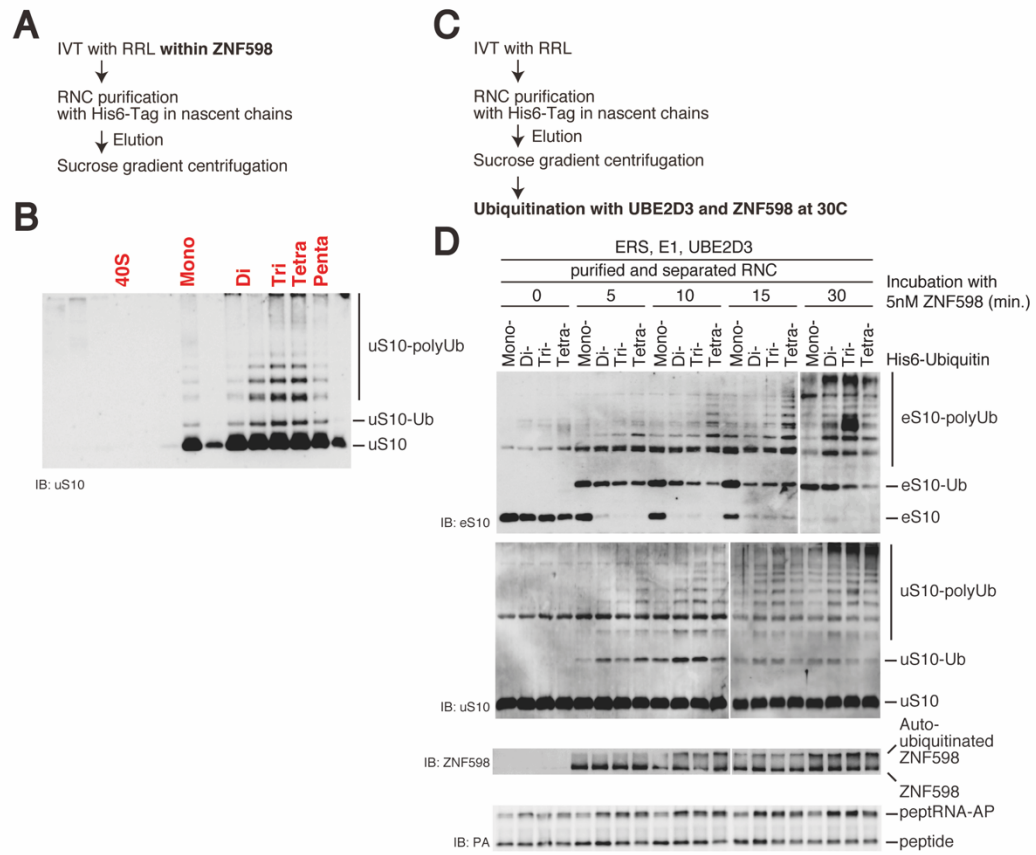


図 4-10. E3 リガーゼ ZNF598 は強いリボソームの衝突を反応基質として好む。

- A) 本実験の流れ。RRLによる翻訳中にZNF598を共反応させ、ユビキチン化反応を行なった。
- B) RNC に対する Lysate 中でのユビキチン化反応。
- C) 本実験の流れ。精製 RNC をショ糖密度勾配遠心法により分画後、ユビキチン化反応を行なった。
- B) 分画後の RNC に対するユビキチン化反応の kinetics の比較。

再穂に、Beads 上に繫留した RNC に対して、ユビキチン化反応を行った後、溶出し、その精製産物をショ糖密度勾配遠心法によって分画した。その結果、ZNF598 非存在下において uS10 はユビキチン化を受けていない一方で、ZNF598 存在下においては、uS10 はポリユビキチン化されていた。さらに、このポリユビキチン化は、複数のリボソームが衝突した画分において顕著であった。また、3FLAG タグが付加された ZNF598 についても、同様の画分に効率よく結合していた。したがって、ZNF598 は、少なくとも *Xbplu* mRNA 上において、複数のリボソームが衝突を認識し、その uS10 をポリユビキチン化することが明らかになった(図 4-11A,B)。

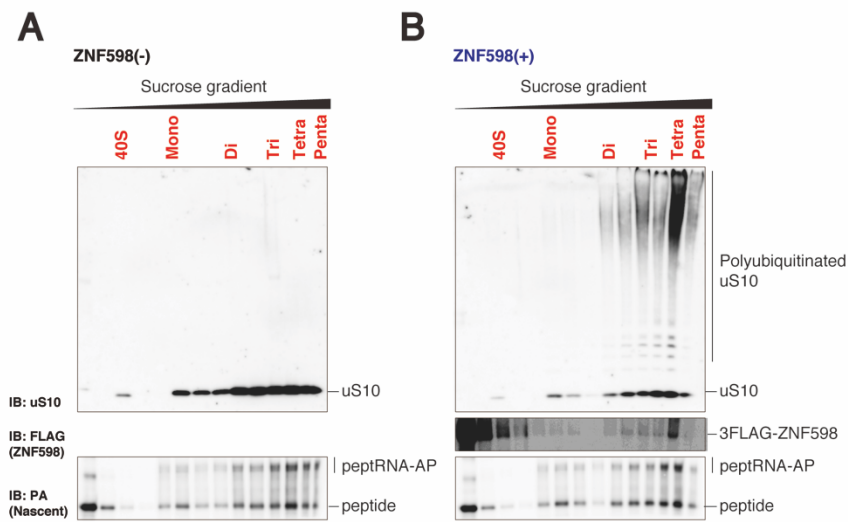


図 4-11. E3 リガーゼ ZNF598 は Tri-, Tetra-some 等の衝突リボソームに対しユビキチン化を行う。

A、B) ユビキチン化した RNC をショ糖密度勾配遠心法により分画した。

これまでの遺伝学的解析の結果から、出芽酵母において Hel2 や RQT 複合体を介したリボソームの解離反応を惹起する配列として、内在性 *SDD1* mRNA や poly(A)配列をはじめとする連続した塩基性アミノ酸配列、レアコドンクラスターやステムループを含む RNA 二次構造等、が知られている。これらには、「コーディング領域中に翻訳伸長阻害配列が存在し、A-site に mRNA が存在する状態で、リボソームの衝突が生じる」という共通項が存在し、この場合に、「Hel2 によるリボソームのユビキチン化-RQT 複合体によるリボソームの解離」が誘導され、RQC や NGD が起こると考えられる。

一方で、mRNA の切断等によって生じる poly(A)鎖を含まないノンストップ mRNA を翻訳するリボソームは、「mRNA の末端まで移動し、A-site に mRNA が存在しない状態で停滞する」と考えられる。このような場合には、「空の A-site を認識して結合する Dom34-Hbs1 複合体-Rli1 によるリボソームの解離」が誘導され、RQC や NSD が起こると考えられる。

また、終止コドンの欠失等により、mRNA の 3'末端に存在する poly(A)鎖上でリボソームが停止する際には、多くの場合、リボソームは poly(A)鎖の末端まで移動できず途中で停止するために、「空の A-site-Rli1 経路」ではなく「Hel2 によるユビキチン化-RQT 複合体経路」を介して処理されることが考えられる。これまで、「空の A-site-Rli1 経路」についての解析は、自己切断活性を持つハンマーヘッドリボザイム配列をレポーター遺伝子中に挿入することで、強制的に mRNA を切断し、その末端でリボソームを停止させることで行われてきた。哺乳類細胞においても、出芽酵母 Hel2-Slh1 は ZNF598-ASCC3 として、出芽酵母 Dom34-Hbs1-Rli1 は PELO-HBS1L-ABCE1 として保存されていることから、哺乳類細胞において「ZNF598 によるユビキチン化-hRQT 複合体経路」を介したリボソームの解離反応の対象となるのは、「コーディング領域中に翻訳伸長阻害配列が存在し、A-site に mRNA が存在する状態で、リボソームの衝突が生じる」場

合であると考えられる。

これを踏まえ、次に、以上の 2 経路を惹起する基質の違いや ZNF598 によるポリユビキチン化の基質特異性について詳細に検討を行うため、これまでと同様に、*T7* プロモーターの下流に、*AUG-His6-PA-Xbp1u(1-V193)* mRNA を挿入し、その下流に複数のテスト配列を導入した。コントロールとして、*V193* の直後に終止コドン配置させた *Xbp1u(1-V193)-stop* mRNA を用いた(図 4-12A)。*Xbp1u(1-V193)* はアレストペプチド(AP)領域を含まないため、*Xbp1u(1-V193)-stop* mRNA の翻訳ではリボソームは停止しない(図 4-12A)。

また、解析にあたり、出芽酵母において ZNF598 のホモログである Hel2 の基質として知られている 3 つのテンプレート mRNA を作成した。一つ目は、*Xbp1u* mRNA のうちアレストペプチド領域の *Xbp1u(194-261)* で、二つ目は、*A*(アデニン)を 60 回繰り返し 20 回連続したリジン残基を翻訳する *poly(A)* である。三つ目は、非常に強固な二次構造を形成するステムループを導入した *Stem-loop* である(図 4-12A)。

さらに、出芽酵母において Hel2 ではなく Dom34-Hbs1 複合体-Rli1 経路の対象となることで知られている 2 つのテンプレート mRNA を作成した。一つ目は、終止コドン挿入しない *Truncate* で、二つ目は、自己切断活性を持つ *Rz-ribozyme* である。これらの mRNA では、*Xbp1u-V193* が mRNA の末端となるため、ここでリボソームが停止する(図 4-12A)。

本実験では、以上のような計 6 種のテスト配列を挿入したテンプレート mRNA を作成した。まず、それぞれの配列がリボソームを停止させ、翻訳伸長効率が低下するか、検討を行った。前述したテンプレート mRNA の *Xbp1u(1-V193)* 領域を *Nluc* に置換した mRNA をそれぞれ作成し、RRL 中での反応後に *Nluc* の活性を測定することでタンパク質合成量を検討した。その結果、本実験で用いる 6 種のテスト配列によって翻訳伸長効率が低下することが確認できた(図 4-12B)。

次に、作成した *AUG-His6-PA-Xbp1u(1-V193)-X* mRNA ($X=stop, Xbp1u(194-261), poly(A), Truncate, Rz-ribozyme, Stem-loop$) を RRL 中で翻訳させ、RNC 精製後に抗 PA 抗体を用いたウエスタンブロットを行なった。その結果、テスト配列を挿入した *Xbp1u(194-261), poly(A), Truncate, Rz-ribozyme, Stem-loop* mRNA 由来の RNC では、ペプチジル tRNA 結合型新生ペプチド鎖が検出された一方で、コントロールとした *stop* mRNA では、それが検出されなかった(図 4-12C)。したがって、コントロール以外のいずれのテスト配列の翻訳によっても、リボソームは mRNA 上で停止しており、RNC として精製されていることが明らかになった。

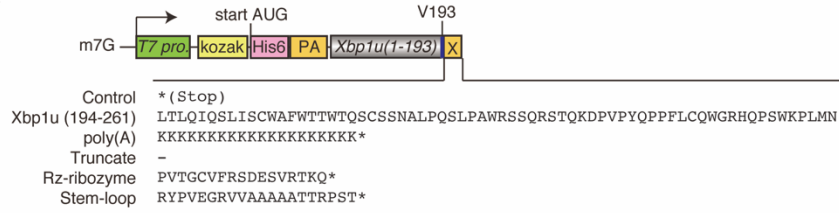
次に、これらの反応基質としての違いについて明らかにするため、それぞれの精製 RNC をショ糖密度勾配遠心法により分画後、新生ペプチド鎖に相当する抗 PA 抗体を用いたウエスタンブロットを行うことで、RNC がどのような状態で精製されているか検証を行った(図 4-12D)。その結果、*Xbp1u(194-261), poly(A), Stem-loop* mRNA 由来の RNC においては、主に Disome 以上の重いフラクションにシグナルが検出されたことから、*Xbp1u(194-261), poly(A), Stem-loop* mRNA 上においてはリボソームが衝突することが示された。一方で、*Truncate, Rz-ribozyme* mRNA 上においてはリボソームの衝突は検出されず、Monosome-RNC として停止していることが明らかになった(図 4-12D)。

以上の結果を踏まえ、*Xbp1u(194-261), poly(A), Stem-loop* mRNA 由来の衝突した Multisome-RNC と、*Truncate, Rz-ribozyme* mRNA 由来の Monosome-RNC を調整後、それぞれの RNC に対し、ZNF598 によるユビキチン化反応を行なった(図 4-12E,F)。その結果、これまでの *Xbp1u* mRNA を用いた解析と一致して、衝突リボソームである *poly(A), Stem-loop* mRNA 由来の RNC において、uS10、eS10 はともにポリユビキチン化されることが明らかになった。一方で、リボソームが衝突していない *Truncate, Rz-ribozyme* mRNA 由来の Monosome-RNC においては、ZNF598 により uS10 がユビキチン化を受けないものの、eS10 はモノユビキ

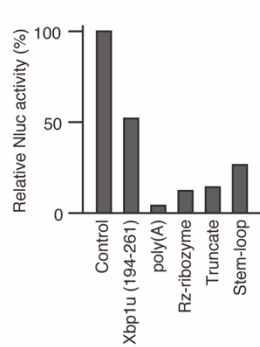
チン化されることが明らかになった(図 4-12E,F)。

以上の結果は、前述したそれぞれの mRNA における異常翻訳の特徴と一致しており、「コーディング領域中に翻訳伸長阻害配列が存在し、A-site に mRNA が存在する状態で、リボソームの衝突が生じる」*Xbp1u(194-261)*, *poly(A)*, *Stem-loop* mRNA 由来の RNC 中の uS10、eS10 に対し、ZNF598 は K63 型ポリユビキチン化を行うことを示している。一方で、リボソームの衝突を伴うことなく「mRNA の末端まで移動し、A-site に mRNA が存在しない状態で停滞する」ために「空の A-site-ABCE1 経路」の対象となる *Truncate*, *Rz-ribozyme* mRNA 由来の RNC に対して、ZNF598 は uS10 に反応せず、eS10 にモノユビキチン化を行った。以上の結果からも、RQC の惹起における ZNF598 を介したリボソームのポリユビキチン化の重要性が明らかになった。つまり、「停止したリボソームが ZNF598 の認識標的となりうるリボソームの衝突界面を形成するか否か」が、「ZNF598 によるユビキチン化-hRQT 複合体経路」を介した RQC の惹起における必要条件である可能性が示唆される。

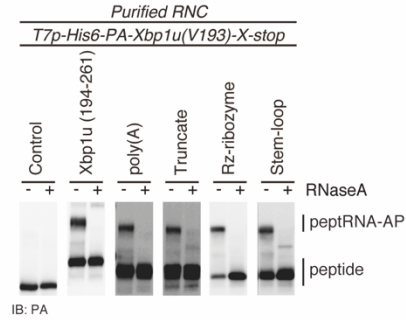
A



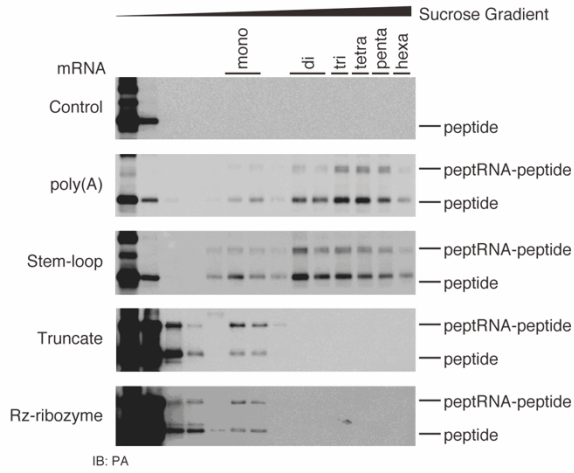
B



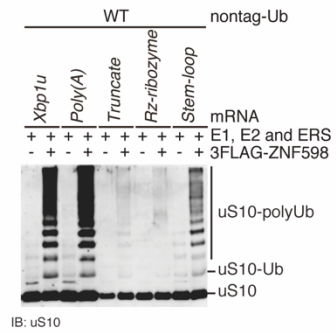
C



D



E



F

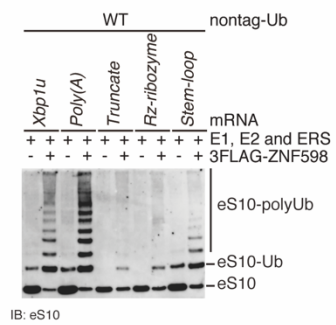


図 4-12. E3 リガーゼ ZNF598 は RQC の標的となる衝突リボソーム上のリボソームタンパク質 uS10 および eS10 を K63 型ポリユビキチン化する。

A) 本実験で用いたテンプレート mRNA。T アプロモーターの下流に、His6 タグ、PA タグ、*Xbp1u(1-V193)* mRNA、テスト配列を挿入した。

B) T アプロモーターの下流に、His6 タグ、PA タグ、*Nluc mRNA*、テスト配列を挿入したテンプレート mRNA を RRL 中で翻訳させた後、*Nluc* の活性を測定した。

C,D) RNC 精製。それぞれのテスト配列を含む mRNA 由来の RNC を検出すると、ペプチジル tRNA 結合型新生ペプチド鎖が検出できた。

E,F) *Truncate*, *Rz-ribozyme*, *Stem-loop* mRNA 由来の RNC に対し、ユビキチン化反応を行なった。

4-3-4. E3 リガーゼ ZNF598 は RQC の標的となる衝突リボソーム上のリボソームタンパク質 uS10 および eS10 を K63 型ポリユビキチン化する。

これまでの解析から、E3 リガーゼ ZNF598 は衝突リボソーム上の uS10 および eS10 に対し、ポリユビキチン鎖を形成することを明らかにした。ポリユビキチン鎖を形成するユビキチン分子の連結様式は、それを認識し結合するデコーダー分子を決定し、その下流に伝達するシグナルを左右する、非常に重要な指標である。出芽酵母 Hel2 は uS10 に対し、ユビキチン分子の 63 番目のリジン残基を介して連結した K63 型ポリユビキチン鎖を形成することから、ZNF598 が K63 型ポリユビキチン鎖を伸長するのか、検討した。本実験では、beads 上に繫留した RNC に対して行うユビキチン化反応の際に、野生型ユビキチンをコントロールとして、K63 鎖のみを形成できる K63only ユビキチンや K63 鎖を形成できない K63R ユビキチンを反応させることで、その反応効率を比較した(図 4-13A)。その結果、uS10、eS10 とともに、野生型ユビキチンを用いた反応と同様に K63only ユビキチンを用いた反応においても、ポリユビキチン鎖が形成されていた(図 4-13B,C)。一方で、K63 鎖を形成できない K63R ユビキチンを用いた反応時には、顕著に反応効率が低下していた(図 4-10B,C)。このことから、E3 リガーゼ ZNF598 は RQC の標的となる衝突リボソーム上のリボソームタンパク質 uS10 および eS10 を K63 型ポリユビキチン化することが明らかになった。また、RQC の基質として既に報告されている *poly(A)* mRNA の翻訳によって、*Xbplu* mRNA と同様に、衝突リボソームの uS10、eS10 が K63 型ポリユビキチン化を受けるか、検討を行った。その結果、*poly(A)* mRNA 上で停止したリボソームにおいても、uS10、eS10 とともに K63 型ポリユビキチン化を受けることが明らかになった(図 4-13D,E)

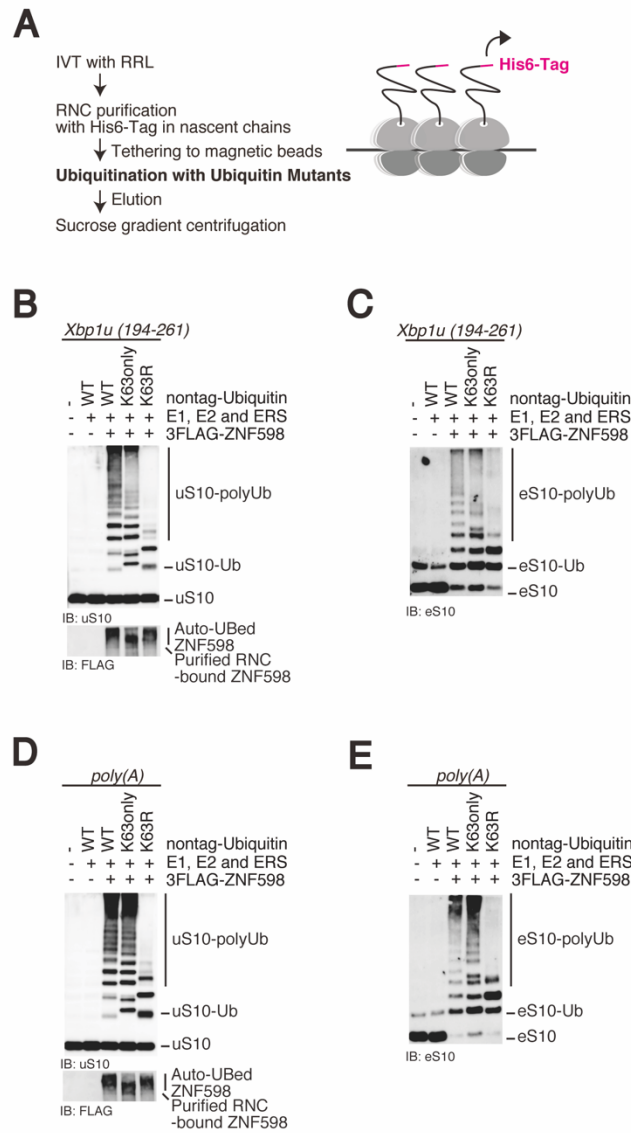


図 4-13. E3 リガーゼ ZNF598 は RQC の標的となる衝突リボソーム上のリボソームタンパク質 uS10 および eS10 を K63 型ポリユビキチン化する。

A) 本実験の流れ。Magnetic beads に繫留した RNC に対し、ユビキチン変異体を用いて ZNF598 によりユビキチン化反応を行なった。

B,C) *Xbp1u* mRNA 由来の RNC に対し、ユビキチン変異体を用いて反応を行なった。

D,E) *poly(A)* mRNA 由来の RNC に対し、ユビキチン変異体を用いて反応を行なった。

4-3-5. ASCC3-ASCC2-TRIP4 により構成される hRQT 複合体は衝突リボソームの解離に関与する。

出芽酵母では、RQT 複合体は、Hel2 による uS10 のユビキチン化依存に、衝突リボソームを解離する。RQT 複合体は、RNA ヘリカーゼ活性を有する Slh1、ユビキチン結合能を有する Cue3、機能未知の Ykr023w により構成される。このため、Cue3 のユビキチン結合ドメインがユビキチン化された uS10 に対し結合することで、RQT 複合体が衝突リボソームにリクルートされると考えられる。当研究室では、出芽酵母 RQT 複合体の構成成分と非常に高いホモロジーを有する哺乳類細胞 ASCC3-ASCC2-TRIP4 を同定し、RQC の誘導に関与することを報告している(Hashimoto *et al.*, 2020)。

そこで、哺乳類細胞 ASCC3-ASCC2-TRIP4 複合体(以後、hRQT 複合体)が、出芽酵母 RQT 複合体と同様に、衝突リボソームの解離を行うか、検討を行った。

まず、精製 hRQT 複合体を調整するため、HEK293T 細胞にプラスミドによって 3 つの因子を過剰発現させ精製を試みたが、精製された産物量が少なく、反応に不十分であったことから、出芽酵母を用いた複合体精製を行った。出芽酵母野生株に、3FLAG-ASCC3、ASCC2、TRIP4 を発現するプラスミドを形質転換し、培養後、抗 FLAG 抗体ビーズを用いて精製し、CBB 染色によって検出した(図 4-14A)。

本実験では、野生型ユビキチンを用いて ZNF598 によりユビキチン化させた RNC を magnetic beads から溶出後、ATP と精製 hRQT 複合体と反応させた。その後、シヨ糖密度勾配遠心法を用いて分画後、抗 uS10 抗体を用いてウエスタンブロットを行うことで、ユビキチン化された uS10 の局在を評価した(図 4-14B)。その結果、hRQT 複合体非存在下では、ZNF598 によりユビキチン化された uS10 は、主に Trisome や Tetrasome の画分に局在した一方で、hRQT 複合体を反応させることでユビキチン化された uS10 は 40S サブユニット画分に移行した(図

4-14C,D)。この結果から、hRQT 複合体は、衝突リボソームの解離を行うことが明らかになった。

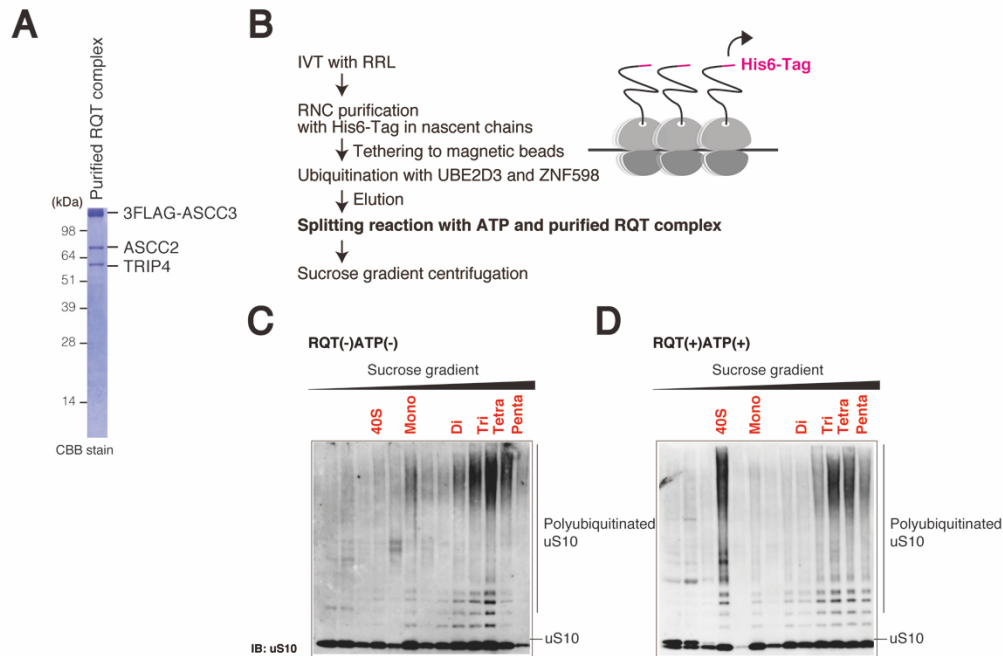


図 4-14. ASCC3-ASCC2-TRIP4 により構成される hRQT 複合体は衝突リボソームの解離に関与する。

A) hRQT 複合体の精製。出芽酵母野生株に 3FLAG-ASCC3、ASCC2、TRIP4 を過剰発現し、FLAG タグを介して精製した。

B) 本実験の流れ。Magnetic beads に繫留した RNC に対し、ZNF598 によりユビキチン化を行なった後、溶出した。ユビキチン化された RNC と ATP、hRQT 複合体を反応させた後、シヨ糖密度勾配遠心法により分画した。

C,D) 衝突リボソームの解離実験。Xbp1u mRNA 由来の RNC に対し、野生型ユビキチンを用いてユビキチン化、hRQT 複合体を用いて解離させた。hRQT 複合体により uS10 がユビキチン化された衝突リボソームは解離した。

4-3-6. hRQT 複合体は K63 型ポリユビキチン鎖に高い親和性を持つ。

次に、衝突リボソームの解離を担う hRQT 複合体が、K63 型ポリユビキチン鎖に親和性を持つか、試験管内結合解析によって検討を行った。

E2 酵素 Ubc13/Mms2 は K63 型ポリユビキチン鎖を形成することで知られている。そのため、GST タグを付加したユビキチンに対し、大腸菌において発現誘導したのち精製した(図 4-15B)これらの酵素群を反応させることで、人工的に K63 型ポリユビキチン鎖を調整した(図 4-15C)。調整したモノユビキチン分子、K63 型ポリユビキチン鎖を、それぞれに付加された GST タグによってビーズ上に繫留させ、そこに精製 hRQT 複合体を混合することで、これらが結合するか、解析を行った(図 4-15A)。その結果、hRQT 複合体の構成成分である ASCC3 や ASCC2 は、K63 型ポリユビキチン鎖に結合した(図 4-15D)。さらに、モノユビキチン分子を用いた反応と比較しても、hRQT 複合体と K63 型ポリユビキチン鎖の親和性は、非常に高いことが明らかになった(図 4-15D)。

また、hRQT 複合体とユビキチン分子の結合が、ユビキチン鎖の長さではなく、連結様式に依存することを検討するため、hRQT 複合体に対するモノユビキチン分子、人工合成され 4 分子が連結した Tetra-K48 型ポリユビキチン鎖、Tetra-K63 型ポリユビキチン鎖の結合実験を行った(図 4-15E)。その結果、モノユビキチン分子、Tetra-K48 型ポリユビキチン鎖と比較して、Tetra-K63 型ポリユビキチン鎖と hRQT 複合体の親和性が顕著に高かったことから、hRQT 複合体は、その連結様式に依存して K63 型ポリユビキチン鎖に対し、特異的に結合することが示された(図 4-15F)。

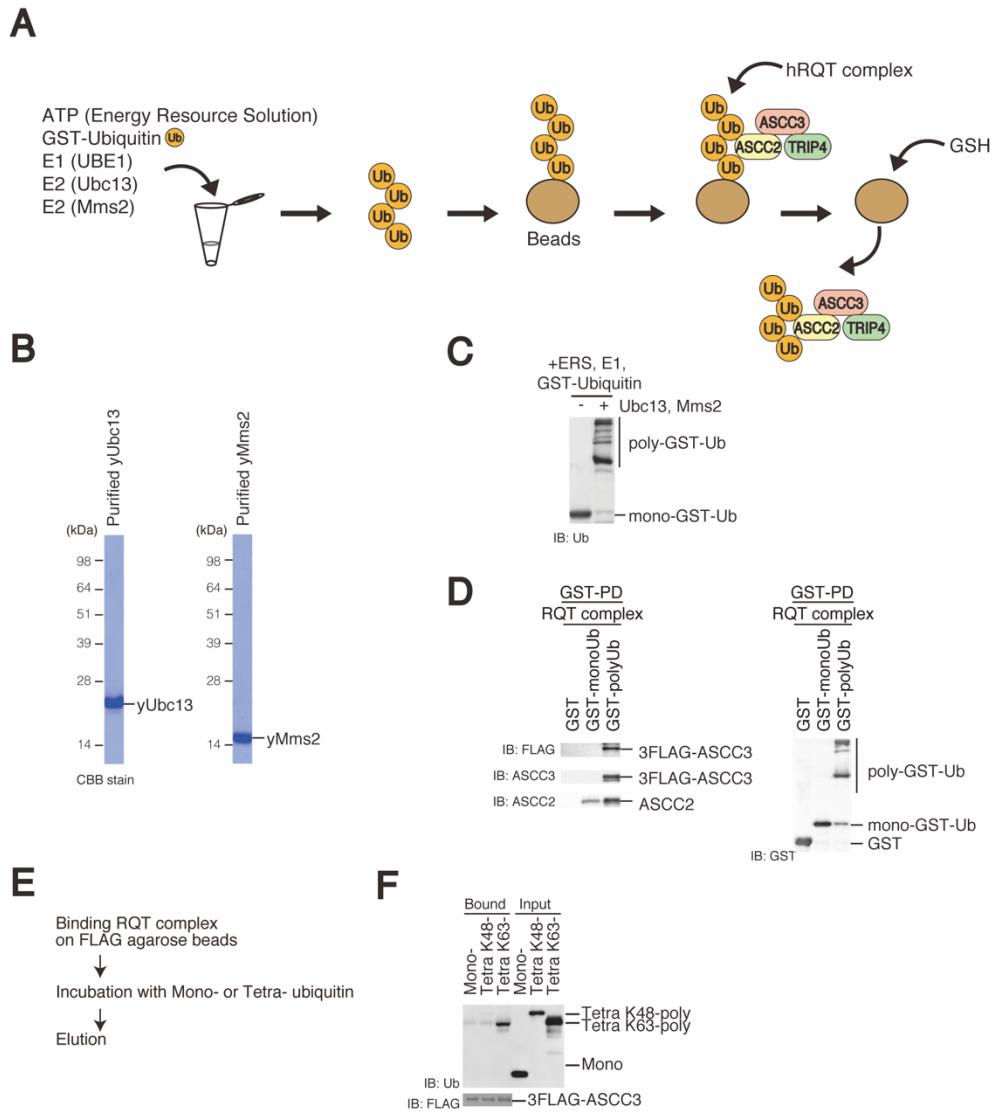


図 4-15. hRQT 複合体は、K63 型ポリユビキチン鎖に高い親和性を持つ。

A) 本実験の流れ。試験管内合成した K63 型ポリユビキチン鎖とモノユビキチン分子をビーズに繫留させ、精製 hRQT 複合体と混合することで、結合解析を行った。

B) yUbc13、yMms2 の精製。大腸菌に出芽酵母の Ubc13 もしくは Mms2 を発現誘導させ、精製した。

C) 試験管内ユビキチン化反応。GST タグを付加したユビキチンに対し、Ubc13 や Mms2 等を反応させることで、人工的に K63 型ポリユビキチン鎖を合成した。

D) 試験管内結合解析。モノユビキチン分子を用いた反応と比較し、hRQT 複合体と K63 型ポリユビキチン鎖の親和性は、非常に高かった。

E) 本実験の流れ。精製 hRQT 複合体をビーズに繫留させたのち、人工合成した Tetra-K63 型ポリユビキチン鎖、Tetra-K48 型ポリユビキチン鎖とモノユビキチン分子を混合することで、結合解析を行った。

F) 試験管内結合解析。モノユビキチン分子、Tetra-K48 型ポリユビキチン鎖を用いた反応と比較し、hRQT 複合体と K63 型ポリユビキチン鎖の親和性は、非常に高かった。

4-3-7. hRQT 複合体は K63 型ポリユビキチン鎖依存に衝突リボソームの解離に関与する。

前述した結果から、衝突リボソームの解離を担う hRQT 複合体は、K63 型ポリユビキチン鎖に対し高い親和性を持つことが示された。また、RQC の惹起段階において、ZNF598 は衝突リボソーム中の uS10、eS10 を K63 型ポリユビキチン化することで、その異常翻訳中のリボソームに目印をつける。これらを踏まえ、ZNF598 によるリボソームの K63 型ポリユビキチン化が、hRQT 複合体を介した衝突リボソームの解離に必須であるか、検討を行った。

本実験では、beads 上に繫留した RNC に対して行う ZNF598 によるユビキチン化を、K63 鎖のみを形成できる K63only ユビキチンもしくは K63 鎖を形成できない K63R ユビキチンによって行うことで、その後のリボソームの解離における K63 型ポリユビキチン鎖の重要性を評価した(図 4-16A)。ユビキチン化した RNC を溶出し、ATP や hRQT 複合体と反応させた後、ショ糖密度勾配遠心法によって分画した。

その結果、K63 鎖のみを形成できる K63only ユビキチンを用いた反応系において、hRQT 複体の非存在下で、ZNF598 によりユビキチン化された uS10 は、主に Trisome や Tetrasome の画分にエンリッチしていた一方で、hRQT 複合体を反応させることで、ユビキチン化された uS10 は 40S サブユニット画分と 80S サブユニット画分に移行し、衝突リボソームが解離されたことがわかる(図 4-16B,C)。一方で、K63 鎖を形成できない K63R ユビキチンを用いた反応系においては、uS10 は ZNF598 によって、おそらく複数のリジン残基でモノユビキチン化を受けるマルチプルモノユビキチン化を受けており、その反応効率は 80S 画分や Trisome 画分、Tetrasome 画分ではほぼ変わらず、そのユビキチン化基質の特異性が失われていた(図 4-16D,E)。また、hRQT 複体の有無によって、ユビキチン化された uS10 の局在に大きな変化がなかった。以上の結果から、hRQT

複合体による衝突リボソームの解離には、uS10 の K63 型ポリユビキチン化が必須であることが明らかになった。この結果を支持するように、抗 FLAG 抗体によって検出された ASCC3 は、K63 型ポリユビキチン化された Trisome、Tetrasome に顕著に結合していた(図 4-16B,C)一方で、モノユビキチン化された Trisome、Tetrasome には結合していなかった(図 4-16D,E)。さらに、抗 PA 抗体によって検出されたペプチジル tRNA 結合型新生ペプチド鎖(peptRNA-AP)は、K63only ユビキチンを用いた反応系においてのみ、hRQT 複合体依存に解離を受け、60S サブユニットに検出された(図 4-16B,C)。

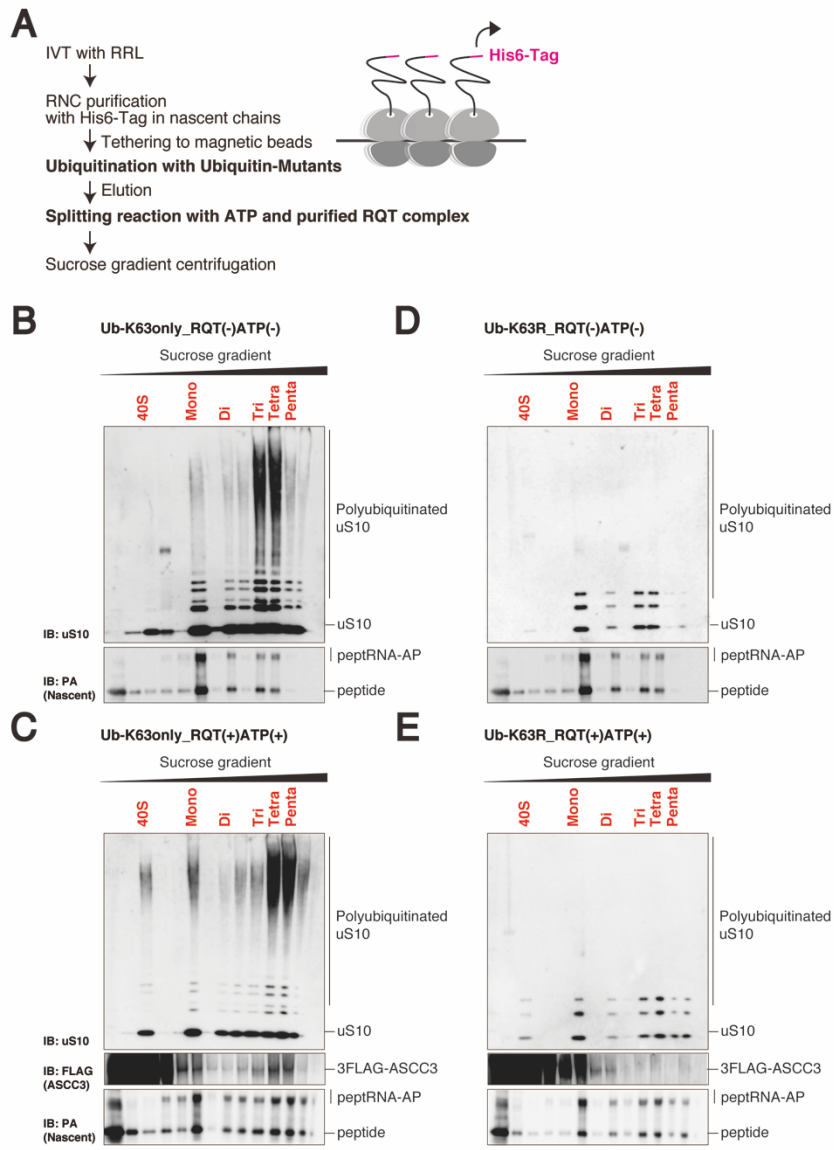


図 4-16. hRQT 複合体は K63 型ポリユビキチン鎖依存に衝突リボソームの解離に関与する。

A) 本実験の流れ。Magnetic beads に繫留した RNC に対し、ZNF598 によりユビキチン化を行なった後、溶出した。ユビキチン化された RNC と ATP、hRQT 複合体を反応させた後、シヨ糖密度勾配遠心法により分画した。

C,D) 衝突リボソームの解離実験。Xbp1u mRNA 由来の RNC に対し、K63only ユビキチンを用いてユビキチン化、hRQT 複合体を用いて解離させた。hRQT 複合体により uS10 が K63 型ポリユビキチン化された衝突リボソームは解離した。

C,D) 衝突リボソームの解離実験。Xbp1u mRNA 由来の RNC に対し、K63R ユビキチンを用いてユビキチン化、hRQT 複合体を用いて解離させた。hRQT 複合体により uS10 がマルチプルモノユビキチン化された衝突リボソームは解離しなかった。

4-4. 考察

4-4-1. 哺乳類細胞における RQC の惹起において、衝突リボソームは ZNF598 により K63 型ポリユビキチン化を受け、hRQT 複合体依存に解離される。

RQC は、リボソームの異常停止、衝突によって惹起される合成途上の新生ペプチド鎖の分解系である。これまで RQC の分子基盤は、主に出芽酵母を使用した研究から明らかになってきた。

出芽酵母における RQC の内在性標的配列 *SDD1* mRNA 上で停止したリボソームは、後続のリボソームと衝突することで、3 つのリボソームが衝突した Trisome を形成する。これを 1 ユニットとして、リボソームの衝突センサーである E3 リガーゼ Hel2 が認識し、衝突リボソーム上のリボソームタンパク質 uS10 を K63 型ポリユビキチン化する。このようにユビキチン鎖という目印をつけることで、リボソームは、細胞内に自身の異常停止を知らせる。その後、RQT 複合体が uS10 のユビキチン化依存にリクルートされ、その構成因子である Slh1 の ATPase 活性により衝突リボソームを解離させる。このようにして、新生ペプチド鎖の分解の舞台である 60S RNCs が形成される。

一方で、哺乳類細胞においては、これまで人工的な配列や反応を駆使して RQC 関連因子が同定されてきた一方で、その活性や機能については未解明な点が多くあった。本研究では、哺乳類細胞における内在性の RQC 標的配列として報告された *Xbplu* mRNA をモデル配列として用いることで、実際に細胞内でリボソームがどのように停滞し、衝突するのか、またどのようにそれが解消されるのかを明らかにした。*In vitro* 翻訳系を用いた生化学実験の結果、出芽酵母 Hel2 のホモログである E3 リガーゼ ZNF598 は、*Xbplu* mRNA 上で衝突したリボソームに対し、非常に効率よくポリユビキチン化を行うことが明らかになった(図 4-17)。また、ユビキチン変異体を用いた解析や様々なテスト配列を使用した解析の結

果、ZNF598 は、衝突リボソーム上のリボソームタンパク質 uS10、eS10 に対し、K63 型のポリユビキチン化を行うことが明らかになった(図 4-17)。

一方で、先行研究において、eRF1-AAQ 変異体を用いて強制的に合成された Disome では、ZNF598 により eS10 がモノユビキチン化を受けることが報告されている(Juszkiewicz *et al.*, 2018)。本研究においても、eS10 のモノユビキチン化は、*Truncate, Rz-ribozyme* mRNA を翻訳することで、リボソームの衝突を伴うことなくその mRNA 末端で停滞したリボソームを基質にした反応において検出された。しかしながら、*Truncate, Rz-ribozyme* mRNA 由来の RNC は、*in vivo* において、Dom34/PELO-Hbs1/HBS1L-Rli1/ABCE1 により解離されることが示されており、Hel2/ZNF598 によるユビキチン化を必須とする RQT 複合体の基質ではない。

これを支持するように、本研究の結果、ZNF598 は、より強く衝突し、その衝突界面がより多く存在するリボソームを好むことが明らかになった。このことから、*Xbplu* や *poly(A)* mRNA 由来等、「ZNF598 によるユビキチン化-hRQT 複合体経路」を介した RQC の対象となる RNC は、Disome のみならず、Trisome、Tetrasome 等、より強いリボソームの衝突を形成し、uS10 や eS10 においてポリユビキチン化を受けたと考えられる。一方で、*Truncate, Rz-ribozyme* mRNA 由来の RNC や、先行研究において使用されていた eRF1-AAQ 変異体により強制的に合成された RNC は、Trisome、Tetrasome 等の強いリボソームの衝突を形成せず、Monosome の状態で停止するために、ZNF598 によるポリユビキチン化を受けない、という可能性が想定される。したがって、「停止したリボソームが ZNF598 の標的となるより強いリボソームの衝突を形成するか否か」が、「ZNF598 によるユビキチン化-hRQT 複合体経路」を介した RQC の惹起における必要条件である可能性が示唆される。そのため、上述した反応で検出された eS10 のモノユビキチン化は、RQT 複合体の活性発揮に直接的に必要な機能不明の反応であると考えられる。

さらに、本研究の結果、少なくともリボソームタンパク質 uS10 の ZNF598 による K63 型ポリユビキチン化が、hRQT 複合体を介した衝突リボソームの解離反応に関与することが明らかになった(図 4-17)。先行研究において、hRQT 複合体の構成成分でありユビキチン結合能を有する ASCC2 は、K63 型ポリユビキチン鎖に対し相互作用することが示唆されている(Brickner *et al.*, 2017)。また本研究の結果から、ASCC2 を含む hRQT 複合体は、モノユビキチン分子と比較して K63 型ポリユビキチン鎖に対し非常に高い親和性を持つことが示された。したがって、ZNF598 は hRQT 複合体の効率的なリクルートのために、リボソームに K63 型ポリユビキチン鎖を形成していると考えられる(図 4-17)。

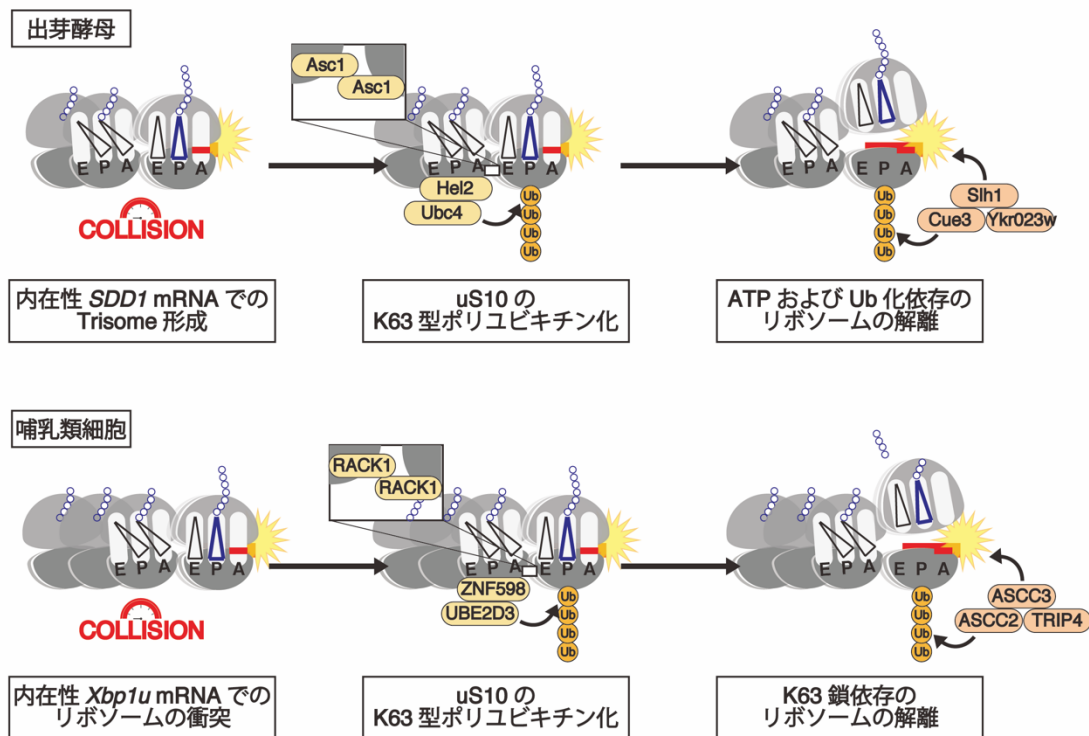


図 4-17. hRQT 複合体は ZNF598 による K63 型ポリユビキチン鎖依存に衝突リボソームの解離を行う。

4-4-2. Tri-, Tetra-some: 哺乳類細胞における RQC を介した分解ユニット

本研究の結果、リボソームの衝突センサー ZNF598 は、Tri-, Tetra-some 等により強いリボソームの衝突を 1 ユニットとして認識し、ユビキチン化することが示唆された。また、出芽酵母における Hel2 についても、*SDD1* mRNA 上でリボソームが 3 つ衝突した Trisome を 1 ユニットとして認識する (Matsuo *et al.*, 2020)。リボソームの衝突は、特異的なリボソーム同士の相互作用を生じ、これによるリボソームの衝突界面は、Disome では 1 つ、Trisome では 2 つ、Tetrasome では 3 つ生じると考えられるため、単にこの数が Hel2/ZNF598 のリクルートに起因する RQC の誘導に関与している可能性がある。しかしながら、例えば Trisome における先頭と 2 つ目のリボソームの間の相互作用と、2 つ目と 3 つ目のリボソームの間の相互作用は完全に同じではないことが知られている (Matsuo *et al.*, 2020)。その代表例がリボソームタンパク質 Asc1/RACK1 同士の相互作用である。Asc1/RACK1 は、RQC の惹起に必須であることから (Sitron, Park and Brandman, 2017; Sundaramoorthy *et al.*, 2017)、その表現型には、それらの特徴的な相互作用が関与している可能性がある。Trisome においては、Asc1 同士の直接相互作用は 2 つ目と 3 つ目のリボソームの間でのみ生じていた。したがって、単に衝突界面の数ではなく、Asc1 同士の直接相互作用の場所やそのリボソームの状態、tRNA の組成との関係、先頭のリボソームとの空間的距離等が Hel2/ZNF598 のリクルートに関与している可能性も考えられる。

4-1-6 で前述したが、衝突リボソームのセンサーとして ZNF598 のほか、EDF1 や ZAK α が報告されている。EDF1 は、その結合によって GIGYF2 や 4EHP を衝突リボソームにリクルートし、その mRNA の分解や新規の翻訳開始を阻害することで、比較的マイルドにリボソームの停止を抑制する。一方で、ZAK α は、その結合により細胞内ストレスに対して ISR を誘導することで細胞生存を導いたり、MAPK 経路を活性化することで細胞死を誘導したりする。これらの違い

から、細胞のダメージレベルが低いとき(例えば、単一の mRNA 上でのみリボソームの衝突が生じているとき)には、EDF1 がリクルートされマイルドに新規の異常停止を抑え、細胞のダメージレベルが中程度のとき(例えば、単一の mRNA 上でのみリボソームの強い衝突が生じているとき)には、ZNF598 がリクルートされ RQC によってそれぞれの衝突ユニットで処理し、ダメージレベルが高いとき(例えば、細胞内全体で広くリボソームの衝突が生じているとき)には、ISR によって細胞内全体の制御系を動かすことによって翻訳の異常事態を処理している可能性もある。

本研究により、少なくとも *Xbp1u* mRNA 上において、ZNF598 は Disome のみならず、Trisome、Tetrasome に対しても作用し RQC を惹起することが明らかになった。先行研究において、EDF1 が Disome に結合したクライオ電子顕微鏡像が示されている(Sinha *et al.*, 2020)ことから、EDF1 は 2 つのリボソームが衝突した Disome に対し高い親和性を持つと考えられる。したがって、EDF1 は Disome 形成時にリクルートされ、新規の異常翻訳を mRNA 分解や翻訳開始阻害によって防ぐと考えられるが、この反応を行うことによっても細胞内のダメージが軽減されない場合には、後続のリボソームが衝突し続けてしまう。この場合には、ZNF598 が Tri-, Tetrasome に対してリクルートされ強制的に RQC を介して分解するという、異常翻訳解消の最後の砦として機能しているかもしれない。

また、出芽酵母において *HEL2* 欠損株では eIF2 α のリン酸化が亢進することから、ZAK α を介した ISR は、報告されている通り環境ストレスに応答して誘導される可能性も考えられるが、Hel2/ZNF598 を介した RQC 経路が破綻もしくは追いつかない場合に、そのバックアップ経路として存在している可能性も考えられる(Meydan and Guydosh, 2020b; Yan and Zaher, 2020)。

4-4-3. RQC による新生ペプチド鎖 XBP1u の分解の生理学的意義

本研究では、RQC の内在性標的配列として *Xbp1u* mRNA を用いた。*Xbp1u* mRNA は、イントロンの下流にアレストペプチド(AP)をコードしており、それによる翻訳の一時停止を巧妙に利用し、自身の mRNA を小胞体膜上へと局在化させることで、効率のよいスプライシングを受け、その活性を発揮している (Yanagitani *et al.*, 2011; Shanmuganathan *et al.*, 2019)。それでは、なぜ *Xbp1u* mRNA に由来する XBP1u ペプチドが RQC により分解される必要があるのか。

一つは、スプライシング後の *Xbp1s* mRNA を細胞質中に遊離するためであると考えられる。小胞体膜上にアンカーされた *Xbp1u* mRNA-リボソーム-XBP1u ペプチド複合体は、IRE1 α によりスプライシングを受けると、*Xbp1s* mRNA-リボソーム-XBP1u ペプチド複合体に変換される。しかしながら、スプライシング後の *Xbp1s* mRNA-リボソーム-XBP1u ペプチド複合体は、XBP1u ペプチドを介して小胞体膜上のトランスロコン Sec61 に繫留されている。したがって、*Xbp1s* mRNA を細胞質に遊離するためには、この複合体を解消する必要がある。そのため、RQC を介してリボソームを解離し、かつ XBP1u ペプチドを分解することで、*Xbp1s* mRNA の細胞質への遊離を可能にしているかもしれない。また、これが解消されず蓄積すると、トランスロコンが繫留された XBP1u ペプチドによって閉塞され、小胞体内の恒常性が乱れる可能性も考えられる。

もう一つは、小胞体膜以外にミスターゲッティングされてしまった *Xbp1u* mRNA-リボソーム-XBP1u ペプチド複合体の解消のためである可能性がある。出芽酵母において、RQC も NGD も誘導できない *not4 Δ hel2 Δ* や *not4 Δ slh1 Δ* の変異株は、*not4 Δ* と比較して顕著な生育阻害を示す (Ikeuchi *et al.*, 2019)。したがって、細胞内における RQC/NGD の欠損、それによって起こると想定される衝突リボソームの細胞内異常蓄積は、強い細胞毒性を誘導すると考えられる。

先行研究で行われた Disome profiling やレポーター遺伝子を用いた解析は、小胞体ストレス非存在下で行われているため、*Xbp1u* mRNA における RQC の生理

学的意義としては、後者の方が有力かもしれない。今後、新たな内在性標的配列の同定が進むことによって、RQCを含め、さらなる翻訳品質管理の生理学的重要性が明らかになると期待される。

4-5. 参考文献

- Amaya Ramirez, C. C. *et al.* (2018) '4EHP-independent repression of endogenous mRNAs by the RNA-binding protein GIGYF2', *Nucleic Acids Research*, 46(11), pp. 5792–5808. doi: 10.1093/nar/gky198.
- Brandman, O. *et al.* (2012) 'A Ribosome-Bound Quality Control Complex Triggers Degradation of Nascent Peptides and Signals Translation Stress', *Cell*, 151(5), pp. 1042–1054. doi: 10.1016/j.cell.2012.10.044.
- Brickner, J. R. *et al.* (2017) 'A ubiquitin-dependent signalling axis specific for ALKBH-mediated DNA dealkylation repair', *Nature*, 551(7680), pp. 389–393. doi: 10.1038/nature24484.
- Chandrasekaran, V. *et al.* (2019) 'Mechanism of ribosome stalling during translation of a poly(A) tail', *Nature Structural & Molecular Biology*, 26(12), pp. 1132–1140. doi: 10.1038/s41594-019-0331-x.
- Choe, Y.-J. *et al.* (2016) 'Failure of RQC machinery causes protein aggregation and proteotoxic stress', *Nature*, 531(7593), pp. 191–195. doi: 10.1038/nature16973.
- Dango, S. *et al.* (2011) 'DNA Unwinding by ASCC3 Helicase Is Coupled to ALKBH3-Dependent DNA Alkylation Repair and Cancer Cell Proliferation', *Molecular Cell*, 44(3), pp. 373–384. doi: 10.1016/j.molcel.2011.08.039.
- Darnell, A. M., Subramaniam, A. R. and O'Shea, E. K. (2018) 'Translational Control through Differential Ribosome Pausing during Amino Acid Limitation in Mammalian Cells', *Molecular Cell*, 71(2), pp. 229-243.e11. doi: 10.1016/j.molcel.2018.06.041.
- Defenouillère, Q. *et al.* (2013) 'Cdc48-associated complex bound to 60S particles is required for the clearance of aberrant translation products', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(13), pp. 5046–5051. doi: 10.1073/pnas.1221724110.

- Doamekpor, S. K. *et al.* (2016) ‘Structure and function of the yeast listerin (Ltn1) conserved N-terminal domain in binding to stalled 60S ribosomal subunits’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(29), pp. E4151–E4160. doi: 10.1073/pnas.1605951113.
- Garzia, A. *et al.* (2017) ‘The E3 ubiquitin ligase and RNA-binding protein ZNF598 orchestrates ribosome quality control of premature polyadenylated mRNAs’, *Nature Communications*, 8(1), p. 16056. doi: 10.1038/ncomms16056.
- Han, P. *et al.* (2020) ‘Genome-wide Survey of Ribosome Collision’, *Cell Reports*, 31(5), p. 107610. doi: 10.1016/j.celrep.2020.107610.
- Hashimoto, S. *et al.* (2020) ‘Identification of a novel trigger complex that facilitates ribosome-associated quality control in mammalian cells’, *Scientific Reports*, 10(1), p. 3422. doi: 10.1038/s41598-020-60241-w.
- Hickey, K. L. *et al.* (2020) ‘GIGYF2 and 4EHP Inhibit Translation Initiation of Defective Messenger RNAs to Assist Ribosome-Associated Quality Control’, *Molecular Cell*, 79(6), pp. 950-962.e6. doi: 10.1016/j.molcel.2020.07.007.
- Higgins, R. *et al.* (2015) ‘The Unfolded Protein Response Triggers Site-Specific Regulatory Ubiquitylation of 40S Ribosomal Proteins’, *Molecular Cell*, 59(1), pp. 35–49. doi: 10.1016/j.molcel.2015.04.026.
- Ikeuchi, K. *et al.* (2019) ‘Collided ribosomes form a unique structural interface to induce Hel2-driven quality control pathways’, *The EMBO Journal*, 38(5), p. e100276. doi: 10.15252/emj.2018100276.
- Ikeuchi, K., Izawa, T. and Inada, T. (2019) ‘Recent Progress on the Molecular Mechanism of Quality Controls Induced by Ribosome Stalling’, *Frontiers in Genetics*, 9. doi: 10.3389/fgene.2018.00743.
- Inada, T. (2020) ‘Quality controls induced by aberrant translation’, *Nucleic Acids*

Research, 48(3), pp. 1084–1096. doi: 10.1093/nar/gkz1201.

Joazeiro, C. A. P. (2019) ‘Mechanisms and functions of ribosome-associated protein quality control’, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(6), pp. 368–383. doi: 10.1038/s41580-019-0118-2.

Jung, D.-J. *et al.* (2002) ‘Novel transcription coactivator complex containing activating signal cointegrator 1’, *Molecular and Cellular Biology*, 22(14), pp. 5203–5211. doi: 10.1128/mcb.22.14.5203-5211.2002.

Juszkiewicz, S. *et al.* (2018) ‘ZNF598 Is a Quality Control Sensor of Collided Ribosomes’, *Molecular Cell*, 72(3), pp. 469–481.e7. doi: 10.1016/j.molcel.2018.08.037.

Juszkiewicz, S., Slodkowicz, G., *et al.* (2020) ‘Ribosome collisions trigger cis-acting feedback inhibition of translation initiation’, *eLife*. Edited by I. Topisirovic, S. R. Pfeffer, and I. Topisirovic, 9, p. e60038. doi: 10.7554/eLife.60038.

Juszkiewicz, S., Speldewinde, S. H., *et al.* (2020) ‘The ASC-1 Complex Disassembles Collided Ribosomes’, *Molecular Cell*, 79(4), pp. 603–614.e8. doi: 10.1016/j.molcel.2020.06.006.

Juszkiewicz, S. and Hegde, R. S. (2017) ‘Initiation of Quality Control during Poly(A) Translation Requires Site-Specific Ribosome Ubiquitination’, *Molecular Cell*, 65(4), pp. 743–750.e4. doi: 10.1016/j.molcel.2016.11.039.

Kim, H.-J. *et al.* (1999) ‘Activating Signal Cointegrator 1, a Novel Transcription Coactivator of Nuclear Receptors, and Its Cytosolic Localization under Conditions of Serum Deprivation’, *Molecular and Cellular Biology*, 19(9), pp. 6323–6332.

Kostova, K. K. *et al.* (2017) ‘CAT-tailing as a fail-safe mechanism for efficient degradation of stalled nascent polypeptides’, *Science (New York, N.Y.)*, 357(6349), pp. 414–417. doi: 10.1126/science.aam7787.

Kuroha, K. *et al.* (2018) ‘Release of Ubiquitinated and Non-ubiquitinated Nascent

- Chains from Stalled Mammalian Ribosomal Complexes by ANKZF1 and Ptrh1', *Molecular Cell*, 72(2), pp. 286-302.e8. doi: 10.1016/j.molcel.2018.08.022.
- Lee, J. W. *et al.* (1995) 'Two classes of proteins dependent on either the presence or absence of thyroid hormone for interaction with the thyroid hormone receptor.', *Molecular Endocrinology*, 9(2), pp. 243–254. doi: 10.1210/mend.9.2.7776974.
- Liu, B., Han, Y. and Qian, S.-B. (2013) 'Cotranslational Response to Proteotoxic Stress by Elongation Pausing of Ribosomes', *Molecular Cell*, 49(3), pp. 453–463. doi: 10.1016/j.molcel.2012.12.001.
- Lyumkis, D. *et al.* (2014) 'Structural basis for translational surveillance by the large ribosomal subunit-associated protein quality control complex', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(45), pp. 15981–15986. doi: 10.1073/pnas.1413882111.
- Matsuo, Y. *et al.* (2017) 'Ubiquitination of stalled ribosome triggers ribosome-associated quality control', *Nature Communications*, 8(1), p. 159. doi: 10.1038/s41467-017-00188-1.
- Matsuo, Y. *et al.* (2020) 'RQT complex dissociates ribosomes collided on endogenous RQC substrate SDD1', *Nature Structural & Molecular Biology*, 27(4), pp. 323–332. doi: 10.1038/s41594-020-0393-9.
- Meydan, S. and Guydosh, N. R. (2020a) 'A cellular handbook for collided ribosomes: surveillance pathways and collision types', *Current Genetics*. doi: 10.1007/s00294-020-01111-w.
- Meydan, S. and Guydosh, N. R. (2020b) 'Disome and Trisome Profiling Reveal Genome-wide Targets of Ribosome Quality Control', *Molecular Cell*, 79(4), pp. 588-602.e6. doi: 10.1016/j.molcel.2020.06.010.
- Osuna, B. A. *et al.* (2017) 'In vitro analysis of RQC activities provides insights into the

- mechanism and function of CAT tailing', *eLife*. Edited by A. G. Hinnebusch, 6, p. e27949. doi: 10.7554/eLife.27949.
- Pisareva, V. P. *et al.* (2011) 'Dissociation by Pelota, Hbs1 and ABCE1 of mammalian vacant 80S ribosomes and stalled elongation complexes', *The EMBO Journal*, 30(9), pp. 1804–1817. doi: 10.1038/emboj.2011.93.
- Pochopien, A. A. *et al.* (2020) 'Structure of Gen1 bound to stalled and colliding 80S ribosomes', *bioRxiv*, p. 2020.10.31.363135. doi: 10.1101/2020.10.31.363135.
- Shalgi, R. *et al.* (2013) 'Widespread Regulation of Translation by Elongation Pausing in Heat Shock', *Molecular Cell*, 49(3), pp. 439–452. doi: 10.1016/j.molcel.2012.11.028.
- Shanmuganathan, V. *et al.* (2019) 'Structural and mutational analysis of the ribosome-arresting human XBP1u', *eLife*. Edited by R. S. Hegde, D. Ron, and A. Mankin, 8, p. e46267. doi: 10.7554/eLife.46267.
- Shao, S. *et al.* (2015) 'Structure and Assembly Pathway of the Ribosome Quality Control Complex', *Molecular Cell*, 57(3), pp. 433–444. doi: 10.1016/j.molcel.2014.12.015.
- Shao, S. and Hegde, R. S. (2014) 'Reconstitution of a Minimal Ribosome-Associated Ubiquitination Pathway with Purified Factors', *Molecular Cell*, 55(6), pp. 880–890. doi: 10.1016/j.molcel.2014.07.006.
- Shen, P. S. *et al.* (2015) 'Rqc2p and 60S ribosomal subunits mediate mRNA-independent elongation of nascent chains', *Science*, 347(6217), pp. 75–78. doi: 10.1126/science.1259724.
- Shoemaker, C. J., Eyler, D. E. and Green, R. (2010) 'Dom34:Hbs1 Promotes Subunit Dissociation and Peptidyl-tRNA Drop-Off to Initiate No-Go Decay', *Science*, 330(6002), pp. 369–372. doi: 10.1126/science.1192430.
- Sinha, N. K. *et al.* (2020) 'EDF1 coordinates cellular responses to ribosome collisions',

- eLife*. Edited by N. Sonenberg, J. L. Manley, and N. Sonenberg, 9, p. e58828. doi: 10.7554/eLife.58828.
- Sitron, C. S. and Brandman, O. (2019) ‘CAT tails drive degradation of stalled polypeptides on and off the ribosome’, *Nature Structural & Molecular Biology*, 26(6), pp. 450–459. doi: 10.1038/s41594-019-0230-1.
- Sitron, C. S. and Brandman, O. (2020) ‘Detection and Degradation of Stalled Nascent Chains via Ribosome-Associated Quality Control’, *Annual Review of Biochemistry*, 89(1), pp. 417–442. doi: 10.1146/annurev-biochem-013118-110729.
- Sitron, C. S., Park, J. H. and Brandman, O. (2017) ‘Asc1, Hel2, and Slh1 couple translation arrest to nascent chain degradation’, *RNA*, 23(5), pp. 798–810. doi: 10.1261/rna.060897.117.
- Soll, J. M. *et al.* (2018) ‘RNA ligase-like domain in activating signal cointegrator 1 complex subunit 1 (ASCC1) regulates ASCC complex function during alkylation damage’, *Journal of Biological Chemistry*, 293(35), pp. 13524–13533. doi: 10.1074/jbc.RA117.000114.
- Su, T. *et al.* (2019) ‘Structure and function of Vms1 and Arb1 in RQC and mitochondrial proteome homeostasis’, *Nature*, 570(7762), pp. 538–542. doi: 10.1038/s41586-019-1307-z.
- Sundaramoorthy, E. *et al.* (2017) ‘ZNF598 and RACK1 Regulate Mammalian Ribosome-Associated Quality Control Function by Mediating Regulatory 40S Ribosomal Ubiquitylation’, *Molecular Cell*, 65(4), pp. 751-760.e4. doi: 10.1016/j.molcel.2016.12.026.
- Tollenaere, M. A. X. *et al.* (2019) ‘GIGYF1/2-Driven Cooperation between ZNF598 and TTP in Posttranscriptional Regulation of Inflammatory Signaling’, *Cell Reports*, 26(13), pp. 3511-3521.e4. doi: 10.1016/j.celrep.2019.03.006.

- Verma, R. *et al.* (2013) ‘Cdc48/p97 promotes degradation of aberrant nascent polypeptides bound to the ribosome’, *eLife*. Edited by I. Dikic, 2, p. e00308. doi: 10.7554/eLife.00308.
- Verma, R. *et al.* (2018) ‘Vms1 and ANKZF1 peptidyl-tRNA hydrolases release nascent chains from stalled ribosomes’, *Nature*, 557(7705), pp. 446–451. doi: 10.1038/s41586-018-0022-5.
- Wang, J. *et al.* (2018) ‘Multi-protein bridging factor 1(Mbf1), Rps3 and Asc1 prevent stalled ribosomes from frameshifting’, *eLife*. Edited by R. Green and J. L. Manley, 7, p. e39637. doi: 10.7554/eLife.39637.
- Weber, R. *et al.* (2020) ‘4EHP and GIGYF1/2 Mediate Translation-Coupled Messenger RNA Decay’, *Cell Reports*, 33(2), p. 108262. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108262.
- Wu, C. C.-C. *et al.* (2020) ‘Ribosome Collisions Trigger General Stress Responses to Regulate Cell Fate’, *Cell*, 182(2), pp. 404-416.e14. doi: 10.1016/j.cell.2020.06.006.
- Wu, Z. *et al.* (2019) ‘MISTERMINATE Mechanistically Links Mitochondrial Dysfunction with Proteostasis Failure’, *Molecular Cell*, 75(4), pp. 835-848.e8. doi: 10.1016/j.molcel.2019.06.031.
- Yan, L. L. and Zaher, H. S. (2020) ‘Ribosome quality control antagonizes the activation of the integrated stress response on colliding ribosomes’, *Molecular Cell*. doi: 10.1016/j.molcel.2020.11.033.
- Yanagitani, K. *et al.* (2009) ‘Cotranslational Targeting of XBP1 Protein to the Membrane Promotes Cytoplasmic Splicing of Its Own mRNA’, *Molecular Cell*, 34(2), pp. 191–200. doi: 10.1016/j.molcel.2009.02.033.
- Yanagitani, K. *et al.* (2011) ‘Translational Pausing Ensures Membrane Targeting and Cytoplasmic Splicing of XBP1u mRNA’, *Science*, 331(6017), pp. 586–589. doi: 10.1126/science.1197142.

Yip, M. C. J. *et al.* (2019) 'Mechanism for recycling tRNAs on stalled ribosomes', *Nature Structural & Molecular Biology*, 26(5), pp. 343–349. doi: 10.1038/s41594-019-0211-4.

Yoshida, H. *et al.* (2001) 'XBP1 mRNA Is Induced by ATF6 and Spliced by IRE1 in Response to ER Stress to Produce a Highly Active Transcription Factor', *Cell*, 107(7), pp. 881–891. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00611-0.

Zurita Rendón, O. *et al.* (2018) 'Vms1p is a release factor for the ribosome-associated quality control complex', *Nature Communications*, 9(1), p. 2197. doi: 10.1038/s41467-018-04564-3.

第 5 章
総括

本博士論文では、翻訳装置リボソームをハブとした 3 つの反応に着目して論じた。これらはいずれも、リボソームの速度変化に依存して惹起されるイベントであり、細胞内の翻訳恒常性を保つ上で必須の経路である。

第 2 章では、機能不全リボソームの分解系 18S NRD について論じた。リボソームの活性部位であるデコーディングセンターはコドン解読を行う場である。デコーディングセンターの活性残基である 18S rRNA の A1492 残基の変異は、翻訳活性不全を誘発し、それを含む 80S リボソームは mRNA 上で停止すると考えられる。このような機能不全リボソームは 18S NRD と呼ばれる経路により細胞内から迅速に排除されるが、この惹起にリボソームタンパク質 uS3 の K212 残基における K63 型ポリユビキチン化が必須であることを見出した。18S NRD における uS3 のユビキチン化は非常に特殊な多段階反応であり、E3 リガーゼ Mag2 によってモノユビキチン化された uS3 を基質にして、E3 リガーゼ Hel2 や Rsp5 が K63 型ポリユビキチン化を行うことを明らかにした。このようにして生じた uS3 のユビキチン化は、機能不全リボソームの解離反応に必須であり、この解離反応は RNA ヘリカーゼ Slh1 の ATPase 活性に依存して誘導されることを明らかにした。以上のようにして、uS3 のユビキチン化依存に機能不全リボソームが解離することで、変異を有する 40S サブユニット中の 18S rRNA に対し特異的に RNase がアクセスし、選択的な分解が可能になる、と考えられる。

第 3 章では、コドン至適度に依存した mRNA の分解系 Codon optimality-dependent mRNA decay について論じた。コドン至適度は、細胞質プールに存在する翻訳反応に使用可能なアミノアシル tRNA 量と mRNA 上のコドン使用頻度のバランスによって定義される翻訳伸長速度の指標である。コドン至適度は、mRNA の翻訳効率に強く関与することから、結果としてタンパク質の合成効率と直接リンクする。さらに、先行研究により、コドン至適度が低く翻訳速度が遅延した mRNA の安定性は相対的に低いことが知られており、その分

解系は Codon optimality-dependent mRNA decay と呼ばれていた。本研究では、共同研究によりクライオ電子顕微鏡を用いた構造解析、リボソームによる翻訳動態を網羅的に解析する Ribosome profiling 法、mRNA 安定性試験をはじめとする遺伝学的解析を組み合わせることで、遺伝子発現を広範に制御する多機能複合体 Ccr4-Not がコドン至適度に依存したリボソームの速度変化をモニターし、速度遅延を生じたリボソームに対して効率よく結合することを見出した。Ccr4-Not 複合体は、自身の構成成分である Not5 の N 末端領域を介して、速度遅延した 80S リボソームの E-site に結合し、デキャッピング活性化因子 Dhh1 を遅延リボソームに対しリクルートすることで、mRNA 分解を誘導していた。また、Not5 の N 末端領域を介したリボソームとの安定な結合には、Not4 による eS7 のユビキチン化が必須であり、これらがコドン至適度に依存した mRNA 分解に関与することを明らかにした。様々な知見を併せると、Not4 による eS7 のユビキチン化は翻訳開始時に起き、細胞内の多様なイベントに対し即座にレスポンスするための予備的な反応であると想定される。

第 4 章では、翻訳伸長停滞に起因する新生ペプチド鎖の分解系 RQC について論じた。RQC は、mRNA や合成された新生ペプチド鎖の異常による翻訳伸長阻害によって、リボソームが停滞、衝突することで惹起され、最終的に合成途上の新生ペプチド鎖を分解する機構である。これまで RQC の分子基盤は出芽酵母を用いた研究により確立されてきたが、本研究では哺乳類細胞における RQC 反応の保存性の解明と再構成系を用いた活性評価を行った。内在性の RQC 標的配列として *Xbplu* mRNA を用いた試験管内翻訳系によって、*Xbplu* mRNA 上で停止したリボソームは、後続のリボソームと衝突することを明らかにした。さらに、出芽酵母 Hel2 と同様に、リボソームの衝突センサーである ZNF598 は衝突リボソームに対し、ユビキチン鎖という目印をつけること、その標的はリボソームタンパク質 uS10 および eS10 であること、さらに ZNF598 は 3 つのリボソ

ームが衝突した Trisome や 4 つのリボソームが衝突した Tetrasome 等のより強く衝突したリボソームを標的とし、uS10 に K63 型ポリユビキチン鎖を伸長することを見出した。出芽酵母においては、ユビキチン化された衝突リボソームは RQT 複合体によって解離されるが、哺乳類細胞において出芽酵母 RQT 複合体と非常に高いホモロジーを持つ ASCC3-ASCC2-TRIP4 からなる三者複合体が RQC に関与することを報告し、これが ZNF598 により形成された K63 型ポリユビキチン鎖に依存したリボソームのサブユニット解離を行うことを明らかにした。

以上のように、本研究では、リボソームの翻訳不全、速度遅延、異常衝突といった特徴的な反応に依存して誘導される rRNA 分解、mRNA 分解、新生ペプチド鎖分解が、リボソームのユビキチン化により惹起されることを明らかにした。それぞれの反応に応じて、リボソームは、①異なるリボソームタンパク質に、②異なる E3 ユビキチンリガーゼ群によって修飾を受け、③異なるもしくは未知のユビキチン結合タンパク質群により認識され、④異なる下流シグナルを伝達する、ことが明らかになっており、以上のような差異によって分解系惹起の特異性が保証されている。このように、本研究では、これまで遺伝子発現の過程における翻訳マシンとして知られていたリボソームが、細胞内で生じた緊急事態に応答するために、自身にユビキチン鎖という目印をつけることで、異常翻訳に陥った mRNA-リボソーム-新生ペプチド鎖複合体の存在を細胞内に知らせ、それらの選択的かつ迅速な分解を惹起することを明らかにした。

各章の考察で論じたように、特に、リボソーム中の変異やそれに伴う翻訳機能不全はリボソーム病、Ccr4-Not 複合体とリボソームの結合活性不全は腫瘍形成や細胞死、RQC の不全はタンパク質毒性やそれに伴う神経変性に対して関与することが示唆されており、今後さらなる生理学的な意義について議論されることが期待される。さらに、多くの遺伝性疾患の発症は、変異型タンパク質の異常蓄積や発現抑制により生じると考えられているため、これらの発現制御に

対し翻訳過程におけるリボソームの速度変化が関与する可能性も考えられる。

リボソームのユビキチン化標的部位は、本研究において解析対象となった出芽酵母における uS3-K212 残基、eS7-K83/84 残基、哺乳類細胞における uS10-K4/8 残基、eS10-K138/139 残基以外にも多数同定されている。さらにリボソームは、ユビキチン化のみならず、リン酸化、アセチル化等、多彩な翻訳後修飾を受けることから、これらによる緻密かつ厳密な制御が、多様な翻訳品質管理に関与する可能性もある。したがって、リボソームをハブとした反応のさらなる詳細な理解が、これまで未知であった翻訳動態を解明する上で重要であることは間違いない。

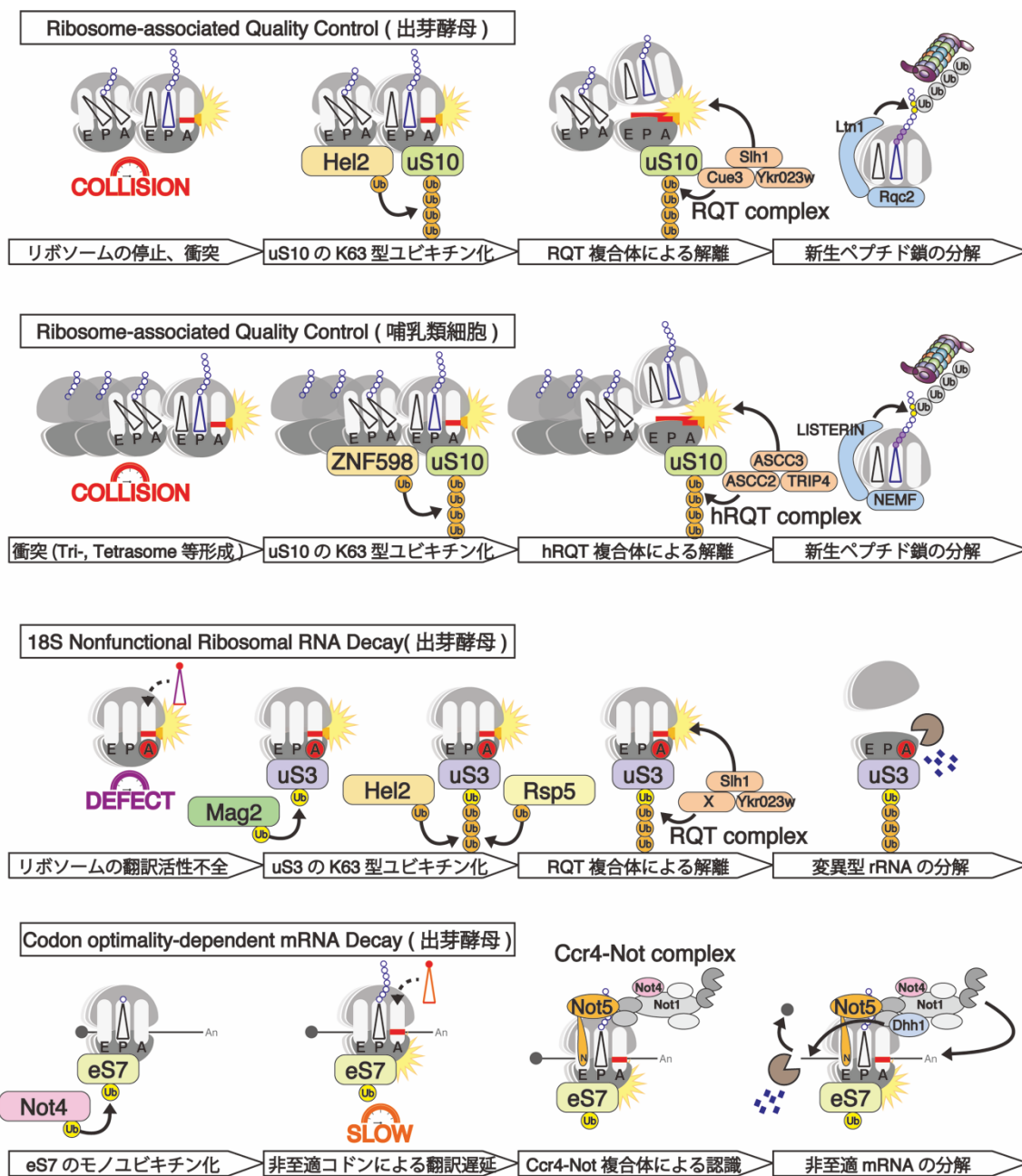


図 5-1. 本博士論文の総括

第 6 章
材料と実験方法

6-1 出芽酵母株

Table 1. 本研究で使用した出芽酵母株

本研究では、出芽酵母 W303-1a 株とそれを親株とする遺伝子変異株を用いた。また、第 2 章における遺伝学的スクリーニングでは、BY4741 株由来の Yeast KnockOut library strain (Open Biosystems)を使用した。

Strains	Genotype/plasmid	Source	Section
W303-1a	<i>MATa ade2 his3 leu2 trp1 ura3 can1</i>	Lab stock	2,3,4
YKI969	W303-1a <i>us3delta::natMX4 p416GPDp-uS3</i>	This study	2
YKI110	W303-1a <i>hel2delta::natMX4</i>	Matsuo <i>et al.</i> , 2017	2
YKI339	W303-1a <i>ubc4delta::natMX4</i>	Matsuo <i>et al.</i> , 2017	2
YMK7	W303-1a <i>rpa190-3 ts</i>	Nogi <i>et al.</i> , 1991	2
YMY47	W303-1a <i>uS3-3HA::hisMX6</i>	This study	2
YSG058	W303-1a <i>uS3-3HA::hisMX6</i> <i>ubc4delta::natMX4</i>	This study	2
YMY88	W303-1a <i>uS3-3HA::hisMX6</i> <i>hel2delta::natMX4</i>	This study	2
YMK285	W303-1a <i>mag2delta::kanMX4</i>	This study	2
YSG105	W303-1a <i>uS3-3HA::hisMX6</i> <i>mag2delta::kanMX4</i>	This study	2
YSG114	W303-1a <i>mag2delta::kanMX4</i>	This study	2

	<i>us3delta::natMX4 p416GPDp-uS3</i>		
YMY46	W303-1a <i>uS10-3HA::hisMX6</i>	Matsuo <i>et al.</i> , 2017	2
YMY87	W303-1a <i>uS10-3HA::hisMX6</i> <i>hel2delta::natMX4</i>	Matsuo <i>et al.</i> , 2017	2
YSG012	W303-1a <i>eS10A-3HA::hisMX6</i>	This study	2
YSG013	W303-1a <i>eS10B-3HA::hisMX6</i>	This study	2
YSS2191 (UB-WT)	<i>MATa lys2-801 leu2-3,2-112 ura3-52</i> <i>his3-Δ200 trp1-1 ubi1-Δ1::TRP1</i> <i>ubi2-Δ2::ura3 ubi3-Δub-2 ubi4-Δ2::LEU2</i> (<i>YEpKan-TEF1p-kozak-yUb-CYC1t</i>) (<i>pUB100</i>)	This study, parental strain is SUB328 (DF5, Finley Lab.)	2,3
YSS2192 (UB-K63R)	<i>MATa lys2-801 leu2-3,2-112 ura3-52</i> <i>his3-Δ200 trp1-1 ubi1-Δ1::TRP1</i> <i>ubi2-Δ2::ura3 ubi3-Δub-2 ubi4-Δ2::LEU2</i> (<i>YepKan-TEF1p-kozak-yUbK63R-CYC1t</i>) (<i>pUB100</i>)	This study, parental strain is SUB328 (DF5, Finley Lab.)	2,3
YSG117	YSS2191 <i>mag2delta::natMX4</i>	This study	2
YSG118	YSS2192 <i>mag2delta::natMX4</i>	This study	2
YSG102	W303-1a <i>uS3-3HA::hisMX6</i> <i>rsp5DAmp::kanMX4</i>	This study	2
YSG103	W303-1a <i>uS3-3HA::hisMX6</i> <i>hel2delta::natMX4 rsp5DAmp::kanMX4</i>	This study	2
YLD159	W303-1a <i>xrn1delta::kanMX4</i>	Kuroha <i>et al.</i> ,	2

		2010	
YKI1455	W303-1a <i>xrn1delta::kanMX4</i> <i>us3delta::natMX4 p416GPDp-uS3</i>	This study	2
YMK326	W303-1a <i>xrn1delta::kanMX4</i> <i>mag2delta::natMX4</i>	This study	2
YIT2004	W303-1a <i>upf1delta::kanMX4</i>	Kuroha <i>et al.</i> , 2009	2
YSA033	W303-1a <i>dom34delta::hphMX4</i>	Kuroha <i>et al.</i> , 2010	2
YKK542	W303-1a <i>asc1delta::kanMX4</i>	Kuroha <i>et al.</i> , 2010	2
YAI583	W303-1a <i>asc1delta::kanMX4</i> <i>us3delta::natMX4 p416GPDp-uS3</i>	This study	2
YLS157	W303-1a <i>dom34delta::hphMX4</i> <i>us3delta::natMX4 p416GPDp-uS3</i>	This study	2
YLS158	W303-1a <i>mag2delta::hphMX4</i> <i>asc1delta::kanMX4 us3delta::natMX4</i> <i>p416GPDp-uS3</i>	This study	2
YKI1720	W303-1a <i>rqt2delta::natMX4</i>	Matsuo <i>et al.</i> , 2017	2
YKI1722	W303-1a <i>rqt3delta::natMX4</i>	Matsuo <i>et al.</i> , 2017	2
YKI1721	W303-1a <i>rqt4delta::natMX4</i>	Matsuo <i>et al.</i> , 2017	2

YAI575	W303-1a <i>xrn1delta::kanMX4</i> <i>rqt2delta::natMX4</i>	This study	2
YAI590	W303-1a <i>uS3-3HA::hisMX6</i> <i>rqt2delta::natMX4</i>	This study	2
YSG002	W303-1a <i>eS1A-3HA::hisMX6</i>	This study	2
YSG006	W303-1a <i>eS6A-3HA::hisMX6</i>	This study	2
YSG007	W303-1a <i>eS6B-3HA::hisMX6</i>	This study	2
YMY48	W303-1a <i>eS7A-3HA::hisMX6</i>	This study	2
YSG009	W303-1a <i>eS7B-3HA::hisMX6</i>	This study	2
YSG010	W303-1a <i>eS8A-3HA::hisMX6</i>	This study	2
YSG011	W303-1a <i>eS8B-3HA::hisMX6</i>	This study	2
YSG014	W303-1a <i>eS12-3HA::hisMX6</i>	This study	2
YSG015	W303-1a <i>eS17A-3HA::hisMX6</i>	This study	2
YSG016	W303-1a <i>eS17B-3HA::hisMX6</i>	This study	2
YSG017	W303-1a <i>eS19A-3HA::hisMX6</i>	This study	2
YSG018	W303-1a <i>eS19B-3HA::hisMX6</i>	This study	2
YSG020	W303-1a <i>eS21B-3HA::hisMX6</i>	This study	2
YSG021	W303-1a <i>eS24A-3HA::hisMX6</i>	This study	2
YSG022	W303-1a <i>eS24B-3HA::hisMX6</i>	This study	2
YSG023	W303-1a <i>eS25A-3HA::hisMX6</i>	This study	2
YSG025	W303-1a <i>eS26A-3HA::hisMX6</i>	This study	2
YSG029	W303-1a <i>eS28A-3HA::hisMX6</i>	This study	2
YSG031	W303-1a <i>eS30A-3HA::hisMX6</i>	This study	2
YSG032	W303-1a <i>eS30B-3HA::hisMX6</i>	This study	2

YSG033	W303-1a <i>eS31-3HA::hisMX6</i>	This study	2
YSG034	W303-1a <i>uS2-3HA::hisMX6</i>	This study	2
YSG037	W303-1a <i>uS4A-3HA::hisMX6</i>	This study	2
YSG038	W303-1a <i>uS4B-3HA::hisMX6</i>	This study	2
YSG039	W303-1a <i>uS5-3HA::hisMX6</i>	This study	2
YSG041	W303-1a <i>uS8A-3HA::hisMX6</i>	This study	2
YSG044	W303-1a <i>uS9B-3HA::hisMX6</i>	This study	2
YSG047	W303-1a <i>uS11B-3HA::hisMX6</i>	This study	2
YSG052	W303-1a <i>uS14A-3HA::hisMX6</i>	This study	2
YSG053	W303-1a <i>uS14B-3HA::hisMX6</i>	This study	2
YSG054	W303-1a <i>uS15-3HA::hisMX6</i>	This study	2
YSG057	W303-1a <i>uS19-3HA::hisMX6</i>	This study	2
yJC151	MATa, <i>ura3, leu2, his3, met15</i>	Hu <i>et al.</i> , 2009	3
yJC1708	<i>ura3, leu2, his3, met15</i> or MET15, LYS2, <i>not5::LEU2</i>	This study	3
yJC1892 or 93	MATa, <i>ura3, leu2, his3, met15</i> [pGAL- <i>PGK1-SYNOP</i> or <i>SYNNONOP</i> -pG, URA3]	Presnyak <i>et al.</i> , 2015	3
yJC1913 or 14	MATa, <i>ura3, leu2, his3, met15 dhh1::NEO</i> [pGAL- <i>PGK1-SYNOP</i> or <i>SYNNONOP</i> -pG, URA3]	Presnyak <i>et al.</i> , 2015	3
yJC1917 or 18	MATa, <i>ura3, leu2, his3, met15 dcp2::NEO</i> [pGAL- <i>PGK1-SYNOP</i> or <i>SYNNONOP</i> -pG, <i>al.</i> , 2015	Presnyak <i>et al.</i> , 2015	3

	URA3]		
yJC1961 or 62	MATa, ura3, leu2, his3, met15 <i>ccr4::NEO</i> [pGAL-PGK1-SYNOP or SYNNONOP-pG, URA3]	Presnyak <i>et al.</i> , 2015	3
yJC2364 or 65	MATa, ura3, leu2, his3, met15 <i>pop2::NEO</i> [pGAL-PGK1-SYNOP or SYNNONOP-pG, URA3]	Presnyak <i>et al.</i> , 2015	3
yJC2587 or 88	ura3, leu2, his3, met15 or MET15, LYS2, <i>not5::LEU2</i> [pGAL-PGK1-SYNOP or SYNNONOP-pG, URA3]	This study	3
yJC2809 or 10	MATa, ura3, leu2, his3, lys2, <i>rps25a::KANMX</i> , <i>rps25b::KANMX</i> [pGAL-PGK1-SYNOP or SYNNONOP-pG, URA3]	This study	3
yJC2708	MATa, ura3, leu2, his3, met15, <i>NOT5-HA::HIS</i>	This study	3
Not4- FTP A	MATa ade2 his3 leu2 trp1 ura3 can1 <i>NOT4-FTP A::natNT2</i>	Matsuo <i>et al.</i> , 2017	3
uL30-TAP	MATa ade2 his3 leu2 trp1 ura3 can1 <i>uL30-TAP::TRP1</i>	Matsuo <i>et al.</i> , 2017	3
YLD258	MATa ade2 his3 leu2 trp1 ura3 can1 <i>not4Δ::kanMX6</i>	Ikeuchi <i>et al.</i> , 2019	3
Y124	MATa ade2 his3 leu2 trp1 ura3 can1 <i>eS7aΔ::HIS3MX6 eS7bΔ::natNT2</i>	Ikeuchi <i>et al.</i> , 2019	3

	<i>p416-eS7A-HA</i>		
YSG125	MATa <i>ade2 his3 leu2 trp1 ura3 can1</i> <i>not5Δ::natNT2 p416-NOT5-HA</i>	This study	3
YSG131	MATa <i>ade2 his3 leu2 trp1 ura3 can1</i> <i>not5Δ::HIS3MX6 not4Δ::kanMX6</i> <i>p416-NOT5-HA</i>	This study	3
YSG132	MATa <i>ade2 his3 leu2 trp1 ura3 can1</i> <i>not5Δ::kanMX4 eS7aΔ::HIS3MX6</i> <i>eS7bΔ::natNT2 p416-eS7A-HA</i>	This study	3
YSA024	MATa <i>ade2 his3 leu2 trp1 ura3 can1</i> <i>dhh1Δ::kanMX4</i>	This study	3

6-2 プラスミド

Table 2. 本研究で使したプラスミド

Plasmids	Features	Source	Section
p414GPDp	<i>TRP1 CEN6</i>	Lab stock	2
p415GPDp	<i>LEU2 CEN6</i>	Lab stock	2
p416GPDp	<i>URA3 CEN6</i>	Lab stock	2
pWT4	<i>URA3 2μ GAL7p-rDNA 25S-tag</i> <i>18S-tag</i>	Fujii <i>et al.</i> , 2009	2
pA1492C	<i>URA3 2μ GAL7p-rDNA 25S-tag</i> <i>18S A1755C-tag</i>	Fujii <i>et al.</i> , 2009	2
pKI123	p414 <i>uS3p-uS3</i>	Matsuo <i>et al.</i> , 2017	2
pKI139	p414 <i>uS3p-us3-K212R</i>	Matsuo <i>et al.</i> , 2017	2
pSM16	p415 <i>TEFp-FLAG-MS2</i>	This study	2
pLS9	<i>URA3 2μ GAL7p-rDNA 25S-tag</i> <i>18S-MS2 bs</i>	This study	2
pLS10	<i>URA3 2μ GAL7p-rDNA 25S-tag</i> <i>18S A1755C-MS2 bs</i>	This study	2
pKI269	p414 <i>uS3p-uS3-3HA</i>	This study	2
pKI270	p414 <i>uS3p-us3-K212R-3HA</i>	This study	2
pMK26	p415GPDp- <i>MAG2-FLAG</i>	This study	2
pMK38	p415GPDp- <i>MAG2</i> <i>deltaRING-FLAG</i>	This study	2
pMK39	p415GPDp- <i>MAG2</i>	This study	2

	<i>C195/198S-FLAG</i>		
pMK33	p416GPDp-MAG2-FLAG	This study	2
pSG185	p414uS3p-us3-K223R-3HA	This study	2
pSG186	p414uS3p-us3-K212/223R-3HA	This study	2
pSG187	p414uS3p-us3-N(1-211)-3HA	This study	2
pFS3	p415GPDp-uL23-FLAG	Matsuo <i>et al.</i> ,2017	2
pGEX-UBC4	pGEX6P1-UBC4	Matsuo <i>et al.</i> ,2017	2
pSG171	pGEX6P1-MAG2	This study	2
pMK53	pGEX6P1-MAG2-FLAG	This study	2
pMK54	pGEX6P1-MAG2 <i>deltaRING-FLAG</i>	This study	2
pMK55	pGEX6P1-MAG2 <i>C195/198S-FLAG</i>	This study	2
pMK28	p415GPDp-MAG2	This study	2
pKI82	p413GPDp-uL23-FLAG	Matsuo <i>et al.</i> ,2017	2
YEplac195	<i>URA3 2μ</i>	Lab stock	2
pKI214	<i>YEplac195CUP1p-6HIS-Ubiquiti</i> <i>n</i>	This study	2
pKI191	p416GPDp-uL23-FLAG	Matsuo <i>et al.</i> ,2017	2
pSG188	<i>pRS317-uS3p-uS3-3HA</i>	This study	2
pSG189	<i>pRS317-uS3p-us3-K212R-3HA</i>	This study	2
pKK19	p415GPDp-HEL2-FLAG	Matsuo <i>et al.</i> ,2017	2
pSG170	p415GPDp-FLAG-RSP5	This study	2
pGEX-RSP5	pGEX6P1-RSP5	Saeki <i>et al.</i> , 2005	2

pKI200	p415RQT2p-RQT2	Lab stock	2
pMY601	p415RQT2p-rqt2 K316R	Lab stock	2
pKI201	p415RQT2p-RQT2-3HA	Matsuo <i>et al.</i> , 2017	2
pMY529	p415RQT2p-rqt2 K316R-3HA	Matsuo <i>et al.</i> , 2017	2
pMK58	p414uS3p-us3-K45R-3HA	This study	2
pMK59	p414uS3p-us3-K75R-3HA	This study	2
pMK60	p414uS3p-us3-K106R-3HA	This study	2
pMK61	p414uS3p-us3-K108R-3HA	This study	2
pMK62	p414uS3p-us3-K132R-3HA	This study	2
pMK63	p414uS3p-us3-K141R-3HA	This study	2
pMK64	p414uS3p-us3-K151R-3HA	This study	2
pMK65	p414uS3p-us3-K185R-3HA	This study	2
pMK66	p414uS3p-us3-K200R-3HA	This study	2
pJC296	<i>PGK1pG reporter</i> (under control of GAL1 UAS)	Hu <i>et al.</i> , 2009	3
pJC672	<i>PGK1pG reporter with SYNOP ORF</i> (under control of GAL1 UAS)	Presnyak <i>et al.</i> , 2015	3
pJC673	<i>PGK1pG reporter with SYNNONOP ORF</i> (under control of GAL1 UAS)	Presnyak <i>et al.</i> , 2015	3
pJC857	<i>0% optimal HIS3 with N-terminal FLAG tag</i> (GAL1 promoter)	Radhakrishnan <i>et al.</i> , 2016	3
pJC862	<i>50% optimal HIS3 with</i>	Radhakrishnan <i>et al.</i>	3

	<i>N-terminal FLAG tag (GAL1 promoter)</i>	<i>al.</i> , 2016	
pJC867	<i>100% optimal HIS3 with N-terminal FLAG tag (GAL1 promoter)</i>	Radhakrishnan <i>et al.</i> , 2016	3
pRS416-Not5-HA	CEN, URA3, <i>Not5-HA (NOT5 promoter)</i>	This study	3
pRS415	CEN, LEU2	Lab stock	3
pRS415-Not5-HA	CEN, LEU2, <i>Not5-HA (NOT5 promoter)</i>	This study	3
pRS415-Not5 Δ NTD-HA	CEN, LEU2, <i>Not5ΔNTD-HA (NOT5 promoter)</i> , the region from 2 to 113 A.A. is deleted	This study	3
pRS416-eS7-HA	CEN, URA3, <i>eS7a-HA (eS7A promoter)</i>	Ikeuchi <i>et al.</i> , 2019	3
pRS315-eS7-HA	CEN, LEU2, <i>eS7a-HA (eS7A promoter)</i>	Ikeuchi <i>et al.</i> , 2019	3
pRS315-eS7-4KR-HA	CEN, LEU2, <i>eS7a-4KR-HA (eS7A promoter)</i>	Ikeuchi <i>et al.</i> , 2019	3
pYM032	CEN, ADE2, <i>eS7a-WT-HA (eS7A promoter)</i> in pASZ11	Lab stock	3
pYM033	CEN, ADE2, <i>eS7a-4KR-HA (eS7A promoter)</i> in pASZ11	Lab stock	3
pSM037	CEN, URA3, <i>DHH1-HA (GPD</i>	Lab stock	3

	promoter)		
pKI346	CEN, URA3, <i>FLAG-NOT4</i> (<i>GPD</i> promoter)	Ikeuchi <i>et al.</i> , 2019	3
pTX573	pcDNA3.1(+)- <i>HA-Xbplu</i>	Lab stock	4
pRY224	pcDNA3.1(+)- <i>3FLAG-ZNF598</i>	Lab stock	4
pNM11	p425 <i>GPDp-3FLAG-ASCC3</i>	This study	4
pNM14	p416 <i>GPDp-ASCC2</i>	This study	4
pNM16	p414 <i>GPDp-TRIP4</i>	This study	4
pNM18	p413 <i>GPDp-ASCC1</i>	This study	4
pKI111	p416 <i>GPDp-UBA1-FLAG</i>	Ikeuchi <i>et al.</i> , 2019	4
pOKA111	pGEX6P1- <i>UBC13</i>	Saeki <i>et al.</i> , 2004	4
pOKA112	pGEX6P1- <i>MMS2</i>	Saeki <i>et al.</i> , 2004	4
pGEX6P1	pGEX6P1	Matsuo <i>et al.</i> , 2017	4
pGEX6P1-Ub	pGEX6P1- <i>Ubiquitin</i>	Matsuo <i>et al.</i> , 2017	4

6-3 抗体

Table 3. 本研究で使用した抗体

Antibodies	Source	Catalog Number	Section
Anti-HA-Peroxidase	Roche	Cat# 12013819001, RRID:AB_390917	2,3,4
Anti-uL14 antibody	Abcam Bacterial and Virus Strains	Cat# ab112587, RRID:AB_10866400	2
Anti-FLAG M2 antibody	Sigma	Cat# F1804-1MG	2,3,4
Anti-Ubiquitin (P4D1) HRP	Santa Cruz Biotechnology	Cat# sc-8017	2,4
Anti-K48 Ubiquitin antibody	EMD Millipore	Cat# 05-1308	2
Anti-K63 Ubiquitin antibody	Cell Signaling Technology	Cat# 8081	2
Anti-eEF2	(Inada and Aiba, 2005)	N/A	2
Anti-PA-Peroxidase	Wako	Cat# 015-25951	4
Anti-uS5 antibody	Bethyl Labs	Cat# A303-794A; RRID: AB_11218192	4
Anti-uS3 antibody	Bethyl Labs	Cat# A303-840A; RRID: AB_2615588	4
Anti-eS10 antibody	Abcam	Cat# ab151550; RRID: AB_2714147	4

Anti-uS10 antibody	Abcam	Cat# ab133776	4
Anti-ZNF598 antibody	Novus Biological	Cat# NBP1-84658	4
Anti-ASCC3 antibody	Proteintech	Cat# 17627-1-AP-150	4
Anti-ASCC2 antibody	Bethyl Labs	Cat# A304-020A	4
Anti-ASCC1 antibody	Bethyl Labs	Cat# A303-871A	4
Anti-TRIP4 antibody	Bethyl Labs	Cat# A300-843A	4
Anti-GST antibody	コスモバイオ	Cat# 66001-2-IG	4
ECL Anti-mouse IgG, horseradish Peroxidase	GE Healthcare	Cat# NA931V	2,3,4
ECL Anti-rabbit IgG, horseradish Peroxidase	GE Healthcare	Cat# NA934V	2,3,4

6-4 プローブ

Table 4. 本研究で使したプローブ

Probe	Forward primer	Reverse primer	Section
5' DIG-labelled <i>18S rDNA-Tag</i>	5'-CGAGGATTCAGGCT TTGG-3'		2
5' DIG-labelled LNA <i>18S</i> <i>rDNA-Tag</i>	5'-AGcGAGGATTcAGG CTTTGGtC-3'		2
5' DIG-labelled <i>FLAG-Tag</i>	5'-CTTGTCGTCGTCGT CCTTGTAGTC-3'		3
5' DIG-labelled <i>EDCI</i>	5'-ATGTCGACGGATAC CATGTATTTCAACAG-3'	5'- TTAGCCTCCCTTGGAC CATTAGTG-3'.	3

6-5 プライマー

Table 5. 本研究で使用したプライマー

● RT-PCR for insertion of MS2 bs

5'-CATCAAAGAGTCCGACTCGAACTTGGGTGATCCTCAAGTTTTCTTGAGTC
GACCTGCAGACAAGGGTGATCCTCTTGTTATCAGACATTGATTTTTTATCTAAT
AAATAC-3',

5'-AAAAAATCAATGTCTGATAACAAGAGGATCACCCCTTGTCTGCAGGTCGAC
TCAAGAAAACCTGAGGATCACCCAAGTTCGAGTCGGACTCTTTGATGATTCA
TAATAAC-3'

● Template DNA for T7-kozak-His6-PA-Xbp1u

Fw:

5'-ggccagtGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGACACTTGCTTTTGACACAAC
AGCCACCATGCATCATCATCATCATggtgttgcctatgccaggtgctgaagatgatgttggGAg
tggtggtggcagcc-3'

Xbp1u_WT_Xho1_Rev:

5'-GGGATAGGCTTACCTCTAGACTCGAGggtcattaatggcttcagcttg-3'

Xbp1u_W256A_Xho1_Rev:

5'-GGGATAGGCTTACCTCTAGACTCGAGggtcattaatggctttgcgcttg-3'

Xbp1u_ΔAP(236-261)_Xho1_Rev:

5'-GGGATAGGCTTACCTCTAGACTCGAGctggtagacctctgggagc-3'

Xbp1u_V193-Stop_Rev:

5'-tacgccCTCGAGACGTGCGCAGCTGGCCACGTACGTATCGCTATCTAGCTAtac
cgccagaatccat ggg-3'

Xbp1u_V193-(194-261)_Rev:

5'-tacgccCTCGAGACGTGCGCAGCTGGCCACGTACGTATCGCTATCTAGCTAgtt
cattaatggcttcc agcttg-3'

Xbp1u_V193-polyA60_Rev:

5'-tacgccCTCGAGACGTGCGCAGCTGGCCACGTACGTATCGCTATCTAGCTAttttt
ttaccgccagaatccatgggga-3'

Xbp1u_V193-HHRz_Rev:

5'-tacgccCTCGAGCGTGCGCAGCTGGCCACGTACGTATCGCTATCTAGCTACCT
GTTTCGTCCTCACGGACTCATCAGACCGGAAAACACATCCGGTGACAGGtacc
gccagaatccatgggga-3'

Xbp1u_V193-nonstop_Rev:

5'-taccgccagaatccatggg-3'

Xbp1u_V193-stemloop_Rev:

5'-tacgccCTCGAGAACGTGCGCAGCTGGCCACGTACGTATCGCTATCTAGCTA
CGATATCCCGTGGAGGGGCGCGTGGTGGCGGCTGCAGCCGCCACCACGCGC
CCCTCCACGGGATATCGtaccgccagaatccatgggga-3'

● Template DNA for *T7-kozak-His6-PA-Nluc*

Fw:

5'-gccagtGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGGAACTTGCTTTTGACACAACA
GCCACCATGCATCATCATCATCATCATggtgttgctatgccagtgctgaagatgatgtgttATGGT
CTTCACACTCGAAGATTT-3'

Nluc-Stop_Rev:

5'-tacgccAAGCTTCACGTGCGCAGCTGGCCACGTACGTATCGCTATCTAGCTAC
GCCAGAA TGC GTTTCGC-3'

6-6 出芽酵母を用いた実験方法

6-4-1 培地

出芽酵母の培養には以下の培地を用いた。

YPD 培地: 1% Yeast extract, 2% polypeptone, 2% glucose

SC 培地: yeast nitrogen base without amino acids 6.7g/L, アミノ酸混合物 1.3g/L, 2% glucose

適宜、2% galactose、2% raffinose 培地を用いた。

6-4-2 遺伝子変異株の作製法

PCR を用いた遺伝子欠損株作製法により、遺伝子変異出芽酵母株を作成した (Baudin *et al.*, 1993)。ゲノム中の変異標的遺伝子の 5'末端/3'末端配列と薬剤耐性マーカーを持つ *kanMX4*, *hphMX4*, *natMX4*, *natNT2* あるいは *HIS3MX6* カセットの 5'末端/3'末端配列をそれぞれつなげたプライマーを作成し、カセット内の配列を増幅させた。PCR 産物を親株に対し、相同組み替えを利用して導入し、薬剤を添加した、もしくはアミノ酸を欠乏させた培地で選別することで、遺伝子欠損株を作成した。

6-4-3 出芽酵母の培養

YPD 培地またはマーカーとなるアミノ酸を除いた SC 培地を用いて、酵母細胞を 30°C で培養した。タンパク抽出/RNA 抽出に用いる菌体は、培養液を遠心分離 (3500rpm, 1min, RT) によって集菌し、液体窒素を用いて凍結させた。

6-4-4 タンパク質の抽出

凍結させた菌体を TCA buffer 500 μ L に懸濁し、20% TCA 500 μ L と 0.5mm

Zirconia/Slica Beads 500 μ L を含む 1.5mL tube に添加した。vortex(30sec \times 3)によって菌体を破碎後、その上清を遠心分離(13000rpm、4 $^{\circ}$ C、10min)した。上清を捨て、ペレットを SDS sample buffer(150 μ L/OD=0.6)に溶解し、100 $^{\circ}$ Cで 5min 加熱した。これを SDS-PAGE のサンプルとした。ユビキチン化を検出する際には、77 $^{\circ}$ Cで 5min 加熱した。

TCA buffer: 20mM Tris-HCl (pH6.8), 50mM NH₄OAC, 200mM EDTA, 1mM pmsf

1x SDS Sample Buffer: 0.125M Tris-HCl pH6.8, 4% SDS, 20% Glycerol, 0.01% Bromophenol Blue

6-4-5 CBB 染色

調製したタンパク質サンプル 5 μ L を 10% SDS-PAGE で電気泳動した。泳動後、ゲルを CBB 染色液に浸し、1.5 時間常温振盪した後、CBB 脱色液で 2 時間脱色した。

10% SDS-polyacrylamide running gel: 9.67% acrylamide, 0.33% N,N'-methylene bis acrylamide, 375mM Tris-HCl pH8.8, 0.1% SDS, 0.05% TEMED, 0.1% APS

SDS-polyacrylamide stacking gel: 4.843% acrylamide, 0.167% N,N'-methylene bis acrylamide, 125mM Tris-HCl pH6.8, 0.1% SDS, 0.12% TEMED, 0.1% APS

CBB 染色液: 45% Methanol, 10.4% Acetic acid, 1g/L CBBR250

CBB 脱色液: 25% 2-propanol, 10.45% Acetic acid

6-4-6 Western Blotting

上記で作製したタンパク質試料 5-10 μ L を 10%または 12% SDS-PAGE もしくは 10%または 12% Nu-PAGE で電気泳動した。泳動後、ゲルを Cathord buffer で平衡化した。PVDF 膜をメタノールで洗浄し、Anode2 buffer で平衡化後、メンブレンに先程のゲル中のタンパク質を electro-blotting により転写させた。転写後、

メンブレンのブロッキングを PBS/0.1% Tween-20 に溶かしたスキムミルクで行い、一次抗体反応を行った。メンブレンを PBS/0.1% Tween-20 で洗浄後、さらに二次抗体反応を行った。その後、検出試薬でメンブレンを反応させた後、LAS-3000 mini または LAS-4000 mini (FUJIFILM)を用いて検出を行った。

SDS buffer : 250mM Tris, 2M Glycine, 1% SDS

Anode1 buffer : 300mM Tris-HCl pH10.4, 25% Methanol

Anode2 buffer : 25mM Tris-HCl pH10.4, 25% Methanol

Cathode buffer : 25mM Tris-HCl pH9.4, 25% Methanol, 0.3% Glycin

PVDF 膜 : Millipore

抗 mouse IgG 抗体 : Anti-mouse IgG Horseradish peroxidase linked whole antibody (from sheep) (GE healthcare)

抗 rabbit IgG 抗体 : anti rabbit IgG horseradish peroxidase linked-whole antibody(from donkey) (GE Healthcare)

PBS/0.1% Tween-20: 10mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ (pH 7.5), 0.9% NaCl, 0.1%

Tween-20

Immunostar LD : WAKO

6-4-7 RNA の抽出

凍結させた菌体を RNA buffer 300 μ L に懸濁し、RNA 用フェノール 250 μ L を加え vortex(10sec)でよく混合し、65 $^{\circ}$ Cで 5 分間静置した後、5 分氷冷した。遠心分離(13,000rpm, 5min, RT)し、上清に対して再度 250 μ L の RNA 用フェノールを加え同様の操作を行った。上清を取り、200 μ L の RNA 用フェノール/クロロホルムを加え、vortex(10sec)でよく混合し、遠心分離(13,000rpm, 5min, RT)した。上清に 200 μ L の RNA 用 PCI を加え、vortex(10sec)でよく混合し、遠心分離(13,000rpm, 5min, RT)した。上清を分取し、エタノール沈殿を行い、RNA ペレットを DEPC

処理水 30 μ L に溶解した。

RNA buffer: 30mM NaCl, 20mM Tris-HCl (pH9.5), 10mM EDTA, 1% SDS

PCI: フェノール、クロロホルム、イソアミルアルコール、量比 25:24:1 の混合物

6-4-8 RNA 半減期測定における RNA の抽出

目的の株に導入したプラスミドのマーカーに対応したアミノ酸または塩基を除いたラフィノース含有 SC 液体培地に植菌後、ガラクトース含有 SC 液体培地に置換し、転写誘導をかけた。30°C で OD₆₀₀=0.30(第 2 章の rRNA 半減期の場合)、もしくは 0.50(第 3 章の mRNA 半減期の場合)まで培養後、培養液 10mL を遠心分離(2,330g×2min RT)し、培地をデカントで取り除いた後、グルコース含有 SC 液体培地 15mL を加えよく懸濁した。同時にカウントアップを開始し、培養液 1.5mL を分注後、遠心(7,740g×15sec)し、0h の菌体として集菌した。残りの培養液は 30°C で引き続き振盪培養し、指定した時間が経過するごとに培養液 1.5mL を分注し、同様に集菌した。得られた菌体を氷上で 200 μ L の RNA buffer に懸濁した。懸濁液に水飽和フェノール 200 μ L を加え Vortex で混合し、65°C で 5 分間静置した後、再び Vortex でよく混合し、5 分間氷上に静置後、遠心分離(16,200g×5min RT)し、水層 200 μ L を新しいチューブに移し替えた。得られた水層にフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール 25:24:1 を 200 μ L 加え、Vortex で混合後、遠心分離(16,200g×5min RT)し、水層 180 μ L を新しいチューブに移し替えた。得られた水層に対し 18 μ L の 3M NaOAc と 450 μ L の 100% EtOH を加え、ボルテックス後、-80°C で 10 分以上静置した。その後、4°C で遠心(17,000gx15min)後、上清を除き、300 μ L の 75% EtOH を加えてさらに 4°C で遠心(17,000gx15min)後、上清を除き、Vacuum で乾燥後、30 μ L の DEPC 処理水で溶解した。得られた RNA 溶液 3 μ L と DEPC 処理した水 3 μ L とを混合し、RNA 試料とした。ノーザンブロッティング

の際には、RNA 溶液を 6 μ L アプライした。

6-4-9 Northern Blotting (Glyoxal method)

上記で作成した RNA 試料の濃度を nanodrop で測定後、RNA 1.2 μ g を DEPC 処理水と混合し 6 μ L とし、RNA sample buffer 27 μ L に加え、74 $^{\circ}$ C で 10min 加熱し、氷上で急冷した。これを MOPS 1.2%アガロースゲルにアプライし電気泳動を行った。泳動後、20x SSC を用いたキャピラリーブロッティング法により RNA をメンブレンに転写させ、UV crosslinker (GE ヘルスケア)により RNA を固定した。Digoxigenin(DIG)-11-dUTP で標識した目的の RNA のプローブを用いて 50 $^{\circ}$ C で一晩、ハイブリダイゼーションを行った。メンブレンを wash buffer 1, 2 で洗浄した後、マレイン酸 Buffer に希釈した Blocking reagent でブロッキングし、抗 DIG-AP 抗体と反応させた。wash buffer 3 でメンブレンを洗浄し、wash buffer 4 でメンブレンを平衡化させた。CDP-Star detection kit (Roche)でメンブレンを 10 分間反応させた後、LAS-4000 mini (FUJIFILM)を用いて検出を行った。

Glyoxal Mix: 60% DMSO, 20% Glyoxal (Deionized), 1.2xMOPS buffer, 5% RNA loading dye, 5% Glycerol

RNA Loadind dye: 50% Glycerol, 10mM EDTA(pH8.0), 0.05% BPB, 0.05% Xylen cyanol

Agarose gel: 1xMOPS, 1.2% agarose

10xMOPS buffer (pH7.0): 0.2M MOPS, 50mM NaOAc, 10mM EDTA, pH7.0

20xSSC: 3M NaCl, 0.3M Trisodium citrate dihydrate

wash buffer 1: 2xSSC, 0.1% SDS

wash buffer 2: 0.1xSSC, 0.1% SDS

マレイン酸 Buffer : 100mM maleic acid, 150mM NaCl, pH7.0, adjusted by NaOH

wash buffer 3: 100mM maleic acid, 0.3% Tween-20

wash buffer 4: 100mM Tris-HCl, 100mM NaCl, pH9.5

メンブレン : Hybond-N⁺ membrane (Amersham)

Anti-digoxigenin-AP : (Roche)

DIG-DNA labeling Kit : (Roche)

CDP-Star detection Kit : (Roche)

6-4-10 Northern Blotting (Formaldehyde method)

上記で作成した RNA 試料の濃度を nanodrop で測定後、RNA 1.2ug を DEPC 処理水と混合し 6 μ L とし、RNA sample buffer 21.5 μ L に加え、65°C で 5min 加熱し、氷上で急冷した。これを Formaldehyde-MOPS 1.2% アガロースゲルにアプライし電気泳動を行った。以降は Glyoxal method と同様。

Glyoxal Mix: 60% Formamide (deionized), 20% Formaldehyde, 1.2xMOPS buffer, 5% Glycerol, BPB

Agarose gel: 1xMOPS, 1.2% agarose, 17% Formaldehyde(37%)

6-4-11 RT-qPCR (SuperScript method)

上記で作成した RNA 試料の濃度を、SuperScript® Reverse Transcriptase キット (invitrogen) を用いて逆転写反応を行った。RNA 濃度を nanodrop で測定後、RNA 500ng と MiliQ を混合し 4 μ L とした。PCR チューブに Oligo dT15 プライマー (500ng)、dNTP mix (10mM each) を 4 μ L 加えた後、RNA 溶液 3.6 μ L を加えて混合した。インキュベート(65°C, 5min)後、氷上で急冷した。12 μ L のプレミックス(5x first-strand buffer 4 μ L, 0.1M DTT 1 μ L, RNasin 1 μ L, SuperScript III Reverse Transcriptase 0.5 μ L, MiliQ 5.5 μ L)を加え、ピペッティングにより混合した。インキュベート(50°C 60min, 80°C 5min)後、TE buffer 40 μ L を加え、cDNA サンプルとして用いた。

上記の操作で作製した cDNA を、CFX Connect™ Real-Time System (BIO-RAD)

を用いて定量した。反応には KAPA SYBR® FAST qPCR キット (KAPA BIOSYSTEMS)を用いた。テンプレート cDNA 1 μ L に、2x qPCR Master Mix 7.5 μ L、10 μ M Primer Fw&Rev Mix 0.2 μ L、MiliQ 6.3 μ L を加え、15 μ L とした。反応温度は、95°C 3 分間を 1 サイクル、95°C10 秒間、55°C30 秒間を 40 サイクル、95°C10 秒間を 1 サイクルで行った。

RNasin : RNasin® Plus RNase Inhibitor (Promega)

TE Buffer : 10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0

6-4-12 RT-qPCR (ReverTra Ace method)

上記で作成した RNA 試料の濃度を、ReverTra Ace キット(TOYOBO)を用いて逆転写反応を行った。RNA 濃度を nanodrop で測定後、RNA 500ng と MiliQ を混合し 6.5 μ L とした。PCR チューブに調整した RNA 溶液と Oligo dT15 プライマー (500ng)を加えて混合した。インキュベート(65°C, 5min)後、氷上で急冷した。4 μ L の 5xRT buffer、8 μ L の 2.5mM dNTPs、0.5 μ L の ReverTra Ace を加え、ピペッティングにより混合した。インキュベート(30°C 10min, 42°C 60min, 99°C 5min)後、TE buffer 40 μ L を加え、cDNA サンプルとして用いた。以降は SuperScript method と同様。

6-4-14 ポリソーム解析

目的の株におけるマーカーのアミノ酸を除いた SC 液体培地に植菌し、30°Cで OD₆₀₀=0.5-0.7 まで培養した後、翻訳伸長阻害剤である Cycloheximide もしくは Tigecycline を処理し(第 3 章においてタンパク質の局在を検出する場合は、Cycloheximide と Not5 がリボソーム E-site への結合において競合してしまうため、処理しない)、培養液 200ml を遠心分離(6000rpm, 3min RT)により集菌し、液体窒素を用いて凍結した。凍結した菌体を乳棒と乳鉢を用いて液体窒素下で破碎し、

lysis buffer 3ml/1L に溶解後、遠心分離(40000g, 30min 4°C)で不溶性画分を沈殿させ、その上清を細胞粗抽出液とした。抽出した細胞粗抽出液 800 μ l を Gradient master(BIO COMP)により作成した 10-50%スクロース溶液に重層した。これを SW41Ti rotor (Beckman Coulter)を用いた 10-50%スクロース密度勾配遠心(40000rpm, 80min, 4°C)により分離し、BIO-MINI UV MONITOR(ATTO)で A260 の測定並びに Position Gradient Fractionator(TOWA LABO)でポリソームの分画を行った。ショ糖密度勾配遠心法後に分画した各サンプルを Northern Blotting 用に調製する際は、226 μ L の各画分のサンプルに 500 μ L の 8M グアニジン塩酸と 750 μ L の 100%エタノールを加え、遠心分離(1300rpm、15 分、4°C)を行った。上清の除去後エタノール沈殿を行い、沈殿物を 30 μ L の DEPC 処理水に懸濁し、RNA 試料としてノーザンブロットに使用した。ショ糖密度勾配遠心法後に分画した各サンプルを Western Blotting 用に調製する際は、TCA 沈殿により濃縮することで、タンパク質試料としてウエスタンブロットに使用した。

Lysis buffer: 20mM HEPES pH7.4, 2mM Mg(OAc)₂, 100mM KOAC, 1mM DTT, 1mM PMSF, 0.01% NP-40, Complete mini EDTA-free 1tablet/10 ml

10% sucrose solution: 10% sucrose, 10mM Tris, 70mM NH₄OAC, 4mM Mg(OAC)₂

50% sucrose solution: 50% sucrose, 10mM Tris, 70mM NH₄OAC, 4mM Mg(OAC)₂

6-7 培養細胞を用いた実験方法

6-7-1 継代

ディッシュに接着した培養細胞は、1xPBS を用いて洗浄した後、37°Cで 5 分間トリプシン処理にて剥離した。その後、DMEM-FBS 培地でトリプシンを不活化し、細胞を懸濁し、適量に希釈してディッシュに播き、37°C、5% CO₂ の CO₂ インキュベーター内で培養した。

DMEM-FBS: DMEM (nacalai tesque) 500ml, FBS(gibco) 50ml

2.5%トリプシン+EDTA: (nacalai tesque)

1xPBS: ダルベッコ PBS(-)粉末「ニッスイ」(日水) 9.6g/L

6-7-2 レンチウイルス作製及び感染

トランスフェクションの際に接着した HEK293T 細胞が、70-80%程度となるように細胞を 6well プレートもしくは 6cm ディッシュに播種した。Transfection の際、mixA と mixB を 1.5ml チューブ内でそれぞれ調整し、mixB を mixA に加えピペッティングにより混合し、室温で 30 分間静置した。この間に、DMEM-FBS 培地を無血清培地である Opti-MEM に半量交換し、37°C、5% CO₂ の CO₂ インキュベーター内で静置した。30 分後に、混合液を滴下し、37°C、5% CO₂ の CO₂ インキュベーター内で培養した。一晚培養後、DMEM-FBS 培地で培地交換を行い、その後 2 日間 37°C、5% CO₂ の CO₂ インキュベーター内で培養した。

蛍光顕微鏡で GFP の発現と、細胞の融合度合を確認後、10ml シリンジ (TERUMO)、及び滅菌フィルター(Millipore)で回収した。回収したレンチウイルスは-80°Cで保存した。

培養細胞に感染させる際は、6well プレート(6cm ディッシュ)に DMEM-FBS 培地 1ml と細胞懸濁液 500µl(1000µl)、レンチウイルス 800ul(1600ul)を加え、37°C、

5% CO₂ の CO₂ インキュベーター内で 3 日間培養した。

mixA: pll3.7 shRNA 1.7 μ g (3.3 μ g), pSPAX2 1.25 μ g (2.5 μ g), pMD2.G 0.85 μ g (1.7 μ g), Opti-MEM(gibco) 150 μ l (500 μ l)

mixB: PEI-Max(コスモバイオ) 12 μ l (17 μ l), Opti-MEM 150 μ l (500 μ l)

()内は 6cm ディッシュの使用量を示す。

6-7-3 トランスフェクション

レポータージーンアッセイを行う際は、shRNA を発現するレンチウイルスを感染させた後に、レポーターを導入することで解析を行った。2-2-3 で 6cm ディッシュ上で感染させた細胞を、1xPBS で洗浄した後トリプシン 400 μ l を加え 37°C で 5 分間処理することで剥離した。ここに DMEM-FBS 培地を 3.6ml 加え、ピペティングにより懸濁した。この細胞懸濁液を 6well プレートに 600 μ l ずつ分注し、37°C、5% CO₂ の CO₂ インキュベーター内で一晩培養した。翌日、2-2-3 のトランスフェクションと同様の手法でレポーターを発現するプラスミドをトランスフェクションし、一晩培養後、後述する 6-5-4 の手法で回収した。

mixA: reporter plasmid 4 μ g, transfection control(pLacZ-V5) 0.2 μ g, Opti-MEM 150 μ l

mixB: PEI-Max 12 μ l, Opti-MEM 150 μ l

6-7-4 タンパク抽出及び Bio-Rad assay 法によるタンパク定量

回収する細胞を 1xPBS で洗浄し、用事調製した Protease inhibitor (Roche)を含む Passive lysis buffer(Promega)を 200 μ l 加え、氷上で細胞を剥離した。これを 1.5ml チューブに移し、10 分間氷上で静置後、4°C、15000rpm で 10 分間遠心し、上清を新たな 1.5ml チューブに回収し氷上に置いた。

Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad Laboratories Inc.)を用い

タンパク質定量を行った。BSA 10mg/mL (NEB)を最終濃度 0、1.25、2.5、5、7.5、10、12.5、25、37.5、50mg/mL になるように水で希釈した。この BSA サンプルを各 100 μ L、もしくは回収した細胞試料 2 μ L に水を 98 μ L 加え 100 μ L としたものを、それぞれ 96well プレートに移した。5 分の 1 に希釈した Bio-Rad Reagent を、全 well に 100 μ L ずつ加え、5 分間インキュベートした。その後、吸光度を波長 595nm で測定した。得られた数値から検量線を作製し、各細胞由来のタンパク質量を計算し求めた。

6-7-5 Luciferase assay

タンパク質 5 μ g を 96well プレートに移した。ルミノメーターで蛍光を測定した。基質として、Luciferase Assay Reagent II と、50 分の 1 に希釈した Stop & Glo[®] Reagent を用いた。

Luciferase Assay Substrate (lyophilized) (Promega)

Luciferase Assay Buffer II (Promega)

Stop & Glo[®] Reagent Substrate (Promega)

Stop & Glo[®] Reagent Buffer (Promega)

Nano-Glo[®] Luciferase Assay (Promega)

6-7-6 RNA 抽出

回収する細胞から培地を取り除き、Isogen II (和光)を 1ml 加え、粘性がなくなるまでピペッティングすることで細胞を剥離した。これを 2ml チューブに移し、400 μ l の水を加え、激しく振盪した。室温で 15 分間静置後、室温、12000g で 15 分間遠心した。上清 1ml を RNase-free の 1.5ml チューブに移した後、p-bromoanisole(WAKO)を 5 μ l 加え、激しく振盪した。室温で 5 分間静置後、室温、12000g で 10 分間遠心した。上清 900 μ l を RNase-free の 1.5ml チューブに移した

後、p-bromoanisol を 4.5 μ l 加え、激しく振盪した。室温で 5 分間室温で静置後、室温、12000g で 10 分間遠心した。上清 750ul を RNase-free の 1.5ml チューブに移した後、イソプロパノールを 750ul 加え激しく振盪し、室温で 10 分間静置した。室温、12000g で 10 分間遠心し、RNA ペレットを吸わないように上清を取り除いた。75%エタノールで 2 回洗浄を行い、30 μ l の MilliQ に溶解した。

6-7-7 ウェスタンブロッティング、ノーザンブロッティング、RT-qPCR

ヒト培養細胞由来のタンパク質サンプル、RNA サンプルについては、出芽酵母を用いた解析と同様の手法で解析した。

6-8 タンパク質精製法

6-8-1 Ccr4-Not 複合体精製

ゲノム編集により内在性の NOT4 に FTP タグを付加した出芽酵母株を YPD 液体培地に植菌し、30°C で OD₆₀₀=0.5-0.6 まで培養した後、遠心分離(6000rpm, 3min RT)により集菌し、液体窒素を用いて凍結した。凍結した菌体を乳棒と乳鉢を用いて液体窒素下で破碎し、purification buffer 1 に溶解後、遠心分離(40,000g, 30min 4°C)で不溶性画分を沈殿させ、その上清を細胞粗抽出液とした。抽出した細胞粗抽出液を magnetic IgG-coupled Dynabeads M-270 Epoxy (Life Technologies) と 4°C で 1 時間 incubation した後、Purification buffer 1 によって 5 回洗浄を行った。Homemade His-TEV protease と 4°C で 2 時間反応させることで溶出を行った。

Purification buffer 1: 50mM Tris-HCl pH7.5, 10mM MgCl₂, 100mM NaCl, 1mM DTT, 0.5mM PMSF, 0.01% NP-40, Complete mini EDTA-free 1tablet/10 ml

6-8-2 80S ribosome の精製 (Ribosome-IP)

目的の株に導入したプラスミドのマーカーに対応したアミノ酸または塩基を除いた SC 液体培地に植菌し、OD₆₀₀=0.7 まで培養後、菌体を回収した。菌体は 250mL ボトルを用いて遠心分離(3,500rpm, 5min, RT)により回収し液体窒素を用いて凍結した。凍結した菌を乳棒と乳鉢を用いて液体窒素下で破碎し、Purification buffer 2 3ml/L を加え、攪拌しながら 4°C で溶解させた。遠心分離(40,000g, 30min, 4°C)で不溶性画分を沈殿させ、その上清を細胞粗抽出液とした。抽出した細胞粗抽出液を anti-DYKDDDDK tag antibody beads (Wako) と 4°C で 1 時間 incubation した後、Purification buffer 2 によって 7 回洗浄を行った。250µg/mL FLAG peptide (GenScript) と 4°C で 2 時間反応させることで溶出を行った。

Purification buffer 2: 50mM Tris-HCl pH7.5, 150mM KCl, 10mM Mg(OAc)₂,

0.05% NP-40, 1mM DTT, 1mM PMSF, Complete mini EDTA-free 1tablet/10 ml

6-8-3 ユビキチン化リボソームタンパク質の精製 (Serial Affinity Purification)

目的の株に *pCUP1p-His6-Ubiquitin* と *puL23-FLAG* を導入後、プラスミドのマーカーに対応したアミノ酸または塩基を除いた SC 液体培地に植菌し、OD₆₀₀=0.7 まで培養後、菌体を回収した。*CUP1 promoter* からの転写誘導のため、集菌の 2 時間前に最終濃度が 0.1mM となるように Cu^{2+} を処置した。菌体は 250mL ボトルを用いて遠心分離(3,500rpm, 5min, RT)により回収し液体窒素を用いて凍結した。凍結した菌を乳棒と乳鉢を用いて液体窒素下で破碎し、Purification buffer 3 3ml/L を加え、攪拌しながら 4°C で溶解させた。遠心分離(40,000g, 30min, 4°C)で不溶性画分を沈殿させ、その上清を細胞粗抽出液とした。抽出した細胞粗抽出液を anti-DYKDDDDK tag antibody beads (Wako) と 4°C で 1 時間 incubation した後、Purification buffer 2 によって 7 回洗浄を行った。250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FLAG peptide (GenScript) と 4°C で 2 時間反応させることで溶出を行った。溶出した 80S リボソームに対し、RNase-It (mixture of 5U/ μl of Rnase T1 and 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of RNase A, Agilent) を処置し、最終濃度が 6M となるように Guanidine-HCl を混合し、変性条件とした。変性させたリボソームタンパク質群に対し、Ni-NTA agarose (QIAGEN) を加え、4°C で 12 時間反応させた後、Purification buffer 4 で 2 回、Purification buffer 5 で 2 回洗浄を行った。その後、最終濃度 300mM の Imidazole によってユビキチン化されたリボソームタンパク質群を溶出した。

Purification buffer 3: 50mM Tris-HCl pH7.5, 150mM KCl, 10mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$, 0.05% NP-40, 2mM 2-mercaptoethanol, 1mM PMSF, Complete mini EDTA-free 1tablet/10 ml

Denaturation condition: 50mM Tris-HCl pH7.5, 300mM NaCl, 6M Guanidine-HCl, 10mM Imidazole, 0.05% NP-40, 2mM 2-mercaptoethanol

Purification buffer 4: 50mM Tris-HCl pH7.5, 300mM NaCl, 6M Guanidine-HCl, 10mM Imidazole, 0.05% NP-40, 5mM 2-mercaptoethanol

Purification buffer 5: 50mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl, 10mM MgCl₂, 10mM Imidazole, 0.01% NP-40, 5mM 2-mercaptoethanol

6-8-4 MS2配列を用いた機能不全リボソームの精製 (MS2-TRAP)

pTEFp-FLAG-MS2を導入した出芽酵母株をグルコース含有 SC 液体培地に植菌し、OD600=0.7 まで培養後、菌体を回収した。菌体は 250mL ボトルを用いて遠心分離(3,500rpm, 5min, RT)により回収し液体窒素を用いて凍結した。凍結した菌を乳棒と乳鉢を用いて液体窒素下で破砕し、Purification buffer 6 3ml/L を加え、攪拌しながら 4°C で溶解させた。遠心分離(40,000g, 30min, 4°C)で不溶性画分を沈殿させ、その上清を *FLAG-MS2 lysate* とした。抽出した細胞粗抽出液を anti-DYKDDDDK tag antibody beads (Wako) と 4°C で 1 時間 incubation した後、Purification buffer 6 から Purification buffer 7 へと段階的に塩濃度を低下させながら 7 回洗浄を行った。

FLAG-MS2 lysate を anti-DYKDDDDK tag antibody beads に結合させる間に、*18S-MS2 lysate* の調整を行なった。pGAL7p-18S-MS2 *bs WT or A1492C* を導入した出芽酵母株をガラクトース含有 SC 液体培地に植菌し、OD600=0.7 まで培養後、菌体を回収した。菌体は 250mL ボトルを用いて遠心分離(3,500rpm, 5min, RT)により回収し液体窒素を用いて凍結した。凍結した菌を乳棒と乳鉢を用いて液体窒素下で破砕し、Purification buffer 7 3ml/L を加え、攪拌しながら 4°C で溶解させた。遠心分離(40,000g, 30min, 4°C)で不溶性画分を沈殿させ、その上清を 18S-MS2 lysate とした。18S-MS2 lysate を *FLAG-MS2 lysate-bound anti-DYKDDDDK tag antibody beads* と 4°C で 1.5 時間 incubation した後、Purification buffer 7 によって 7 回洗浄を行った。250µg/mL FLAG peptide (GenScript)を含む Purification buffer 7

と 4°C で 1 時間反応させることで溶出を行った。

Purification buffer 6: 50mM Tris-HCl pH7.5, 300mM KCl, 12mM Mg(OAc)₂, 0.01% NP-40, 1mM DTT, 1mM PMSF, Complete mini EDTA-free 1tablet/10 ml

Purification buffer 7: 50mM Tris-HCl pH7.5, 100mM KCl, 12mM Mg(OAc)₂, 0.01% NP-40, 1mM DTT, 1mM PMSF, Complete mini EDTA-free 1tablet/10 ml

6-8-5 *In vitro* reaction 用の 80S リボソームの精製 (出芽酵母 W303-1a)

目的の株に導入したプラスミドのマーカーに対応したアミノ酸または塩基を除いた SC 液体培地に植菌し、OD₆₀₀=0.7 まで培養後、菌体を回収した。菌体は遠心分離(3,500rpm, 5min, RT)により回収し液体窒素を用いて凍結した。凍結した菌を乳棒と乳鉢を用いて液体窒素下で破碎し、Purification buffer 8 10ml/L を加え、攪拌しながら 4°C で溶解させた。遠心分離(40,000g, 30min, 4°C)で不溶性画分を沈殿させ、その上清を細胞粗抽出液とした。抽出した細胞粗抽出液を anti-DYKDDDDK tag antibody beads (Wako) と 4°C で 1 時間 incubation した後、Purification buffer 8 から Purification buffer 9 へと段階的に界面活性剤濃度を低下させながら 7 回洗浄を行った。250µg/mL FLAG peptide (GenScript) を含む Purification buffer 9 と 4°C で 2 時間反応させることで溶出を行った。

Purification buffer 8: 50mM Tris-HCl pH7.5, 100mM NaCl, 10mM MgCl₂, 0.01% NP-40, 1mM DTT, 1mM PMSF, Complete mini EDTA-free 1tablet/10 ml

Purification buffer 9: 50mM Tris-HCl pH7.5, 100mM NaCl, 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 1mM PMSF, Complete mini EDTA-free 1tablet/10 ml

6-8-6 *In vitro* reaction 用の Hel2-FLAG もしくは Uba1-FLAG の精製 (出芽酵母 W303-1a)

目的の株に導入したプラスミドのマーカーに対応したアミノ酸または塩基を

除いた SC 液体培地に植菌し、OD600=0.7 まで培養後、菌体を回収した。菌体は遠心分離(3,500rpm, 5min, RT)により回収し液体窒素を用いて凍結した。凍結した菌を乳棒と乳鉢を用いて液体窒素下で破砕し、Purification buffer 10 10ml/L を加え、攪拌しながら 4°C で溶解させた。遠心分離(40,000g, 30min, 4°C)で不溶性画分を沈殿させ、その上清を細胞粗抽出液とした。抽出した細胞粗抽出液を anti-DYKDDDDK tag antibody beads (Wako) と 4°C で 1 時間 incubation した後、Purification buffer 10 から Purification buffer 9 へと段階的に塩濃度および界面活性剤濃度を低下させながら 7 回洗浄を行った。250µg/mL FLAG peptide (GenScript) を含む Purification buffer 9 と 4°C で 2 時間反応させることで溶出を行った。

Purification buffer 10: 50mM Tris-HCl pH7.5, 500mM NaCl, 10mM MgCl₂, 0.01% NP-40, 1mM DTT, 1mM PMSF, Complete mini EDTA-free 1tablet/10 ml

6-8-7 *In vitro* reaction 用の hRQT 複合体の精製 (出芽酵母 W303-1a)

目的の株に導入したプラスミドのマーカーに対応したアミノ酸または塩基を除いた SC 液体培地に植菌し、OD600=0.7 まで培養後、菌体を回収した。菌体は遠心分離(3,500rpm, 5min, RT)により回収し液体窒素を用いて凍結した。凍結した菌を乳棒と乳鉢を用いて液体窒素下で破砕し、Purification buffer 11 3ml/L を加え、攪拌しながら 4°C で溶解させた。遠心分離(40,000g, 30min, 4°C)で不溶性画分を沈殿させ、その上清を細胞粗抽出液とした。抽出した細胞粗抽出液を anti-DYKDDDDK tag antibody beads (Wako) と 4°C で 2 時間 incubation した後、Purification buffer 11 によって 7 回洗浄を行った。250µg/mL FLAG peptide (GenScript) を含む Purification buffer 11 と 4°C で 2 時間反応させることで溶出を行った。

Purification buffer 11: 50mM Tris-HCl pH7.5, 100mM NaCl, 10mM MgCl₂, 0.1% NP-40, 10% Glycerol, 5mM 2-mercaptoethanol, 10µM ZnCl₂, 100mM L-Arginine,

1mM PMSF, Complete mini EDTA-free 1tablet/10 ml

6-8-8 *In vitro* reaction 用の rGST-Ub, rUbc4, rUbc13, rMms2 および rMag2, rRsp5 の精製 (大腸菌 Rosseta-gami 2 (DE3))

目的のプラスミドを形質転換した大腸菌株を、50 μ g/ml ampicillin と 24 μ g/ml chloramphenicol を含む LB 液体培地に植菌し、37 $^{\circ}$ C で OD600=0.5 まで培養した。その後、最終濃度 0.2mM となるように IPTG を加え、rGST-Ub、rUbc4、rUbc13、rMms2 の場合には 30 $^{\circ}$ C で 6 時間、rMag2、rRsp5 の場合には 20 $^{\circ}$ C で 16 時間発現誘導行なった。菌体は遠心分離(3,500rpm, 10min, RT)により回収し液体窒素を用いて凍結した。凍結した菌を乳棒と乳鉢を用いて液体窒素下で破碎し、Purification buffer 12 10ml/L を加え、攪拌しながら 4 $^{\circ}$ C で溶解させた。この際に、DNase1 を 10 μ l/10ml 加えることで、核酸を溶解した。溶解後、遠心分離(40,000g, 30min, 4 $^{\circ}$ C)で不溶性画分を沈殿させ、その上清を細胞粗抽出液とした。抽出した細胞粗抽出液を Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare) と 4 $^{\circ}$ C で 1 時間 incubation した後、Purification buffer 12 から Purification buffer13 へと段階的に塩濃度および界面活性剤濃度を低下させながら 5 回洗浄を行った。PreScission protease (GE Healthcare)を含む Purification buffer 13 と 4 $^{\circ}$ C で 16 時間反応させることで溶出を行った。また、protease による切断ではなく、精製タンパク質に GST タグを残したまま溶出する場合には、最終濃度 10mM の還元型グルタチオン (GSH)を含む Purification buffer 13 と 4 $^{\circ}$ C で 16 時間反応させることで溶出を行った。

Purification buffer 12: 50mM Tris-HCl pH7.5, 500mM NaCl, 10% Glycerol, 0.2% Triton X-100, 1mM DTT, 1mM PMSF, Complete mini EDTA-free 1tablet/10 ml

Purification buffer 13: 50mM Tris-HCl pH7.5, 100mM NaCl, 10% Glycerol, 1mM DTT, 1mM PMSF, Complete mini EDTA-free 1tablet/10 ml

6-8-9 *In vitro* reaction 用の 3FLAG-ZNF598 の精製 (ヒト培養細胞 HEK293T)

目的のプラスミドを形質導入した培養細胞を回収し PBS で 3 回洗浄後、Purification buffer 14 を加え、25G syringe を用いて溶解させた。遠心分離(7,300g, 10min, 4°C)で不溶性画分を沈殿させ、その上清を細胞粗抽出液とした。抽出した細胞粗抽出液を anti-DYKDDDDK tag antibody beads (Wako)と 4°Cで 2 時間 incubation した後、Purification buffer 14 から Purification buffer15 へと段階的に塩濃度および界面活性剤濃度を低下させながら 7 回洗浄を行った。250µg/mL FLAG peptide (GenScript)を含む Purification buffer 15 と 4°Cで 2 時間反応させることで溶出を行った。

Purification buffer 14: 10mM HEPES pH7.4, 500mM NaCl, 10% Glycerol, 5mM 2-mercaptoethanol, 2% NP-40, 1mM PMSF, Complete mini EDTA-free 1tablet/10 ml

Purification buffer 15: 10mM HEPES pH7.4, 100mM NaCl, 10% Glycerol, 5mM 2-mercaptoethanol, 1mM PMSF, Complete mini EDTA-free 1tablet/10 ml

6-9 試験管内反応法

6-9-1 *In vitro* 80S ribosome ubiquitination assay

ユビキチン化反応は、以下の精製産物を反応させることで行った。uS3 のユビキチン化を検出する場合には、25°Cで 1-3 時間反応させた後、4x SDS sample buffer を加えることで反応を停止させ、77°Cで 10 分間加熱することで反応試料とした。

Reaction Buffer: 50mM Tris-HCl pH7.5, 100mM NaCl, 10mM MgCl₂, 1mM DTT

50μM His6-Ubiquitin (UBPBio)

100nM UBE1 (UBPBio) or Uba1-FLAG

300nM Ubc4

150nM Mag2, Hel2-FLAG and/or Rsp5

2A₂₆₀ units of purified 80S ribosomes

Energy Regenerating Source (ERS) (1mM ATP (Roche), 10mM Creatine Phosphate (Wako), 20μg/ml Creatine kinase (Roche))

6-9-2 *In vitro* transcription and template mRNA preparation

T7 promoter 下流に目的の DNA 配列を挿入した DNA 断片を PCR により増幅した。mMESSAGE mMACHINE™ T7 Transcription Kit (Thermo Fisher)を用いた *In vitro* transcription により、調整した PCR 断片を鋳型として、5'末端に Cap 構造を付加させた mRNA テンプレートを作成した。その後、転写産物に対し TURBO DNase を処理することで PCR 断片を消化後、RNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いて mRNA を精製した。

6-9-3 *In vitro* translation and RNC purification

In vitro translation は、TnT[®] T7 Quick for PCR DNA (Promega)を用いて行った。まず、ウサギ網状赤血球由来ライセート(Rabbit Reticulocyte Lysate: RRL)に対し、最終濃度 0.8mM となるように CaCl₂を加え、Micrococcal Nuclease (MNase: Takara)を反応させ、23°Cで 15 分間静置した。これにより、RRL 中の内在の mRNA を完全に消化することで、後に加える mRNA テンプレート由来の翻訳効率を上昇させる。反応後、最終濃度 2mM となるように、EGTA を加え、mRNA の消化反応を停止させた。その後、MNase-treated RRL に対し、5μg/200μl RRL reaction となるように調整した mRNA を加え、30°Cで 15 分間静置した。反応時間については、mRNA テンプレートに応じて、15-60 分間と変化させた。翻訳反応後、最終濃度 750mM KOAc、25mM Mg(OAc)₂、250mM Sucrose、2mM Spermidine となるように、それぞれを加え、氷上に移した。次に、反応後の RRL と 600μl/200μl RRL reaction の Dynabeads His-Tag Isolation and Pulldown (Thermo Fisher)を混合し、RNC Purification buffer により 1ml までメスアップした後、4°Cで 10 分間 incubation した。その後、RNC purification buffer により 5 回洗浄し、最終濃度 300mM の Imidazole を含む RNC Purification buffer において 20°Cで 15 分間反応させ溶出した。

RNC Purification buffer: 50mM HEPES pH7.4, 750mM KOAc, 25mM Mg(OAc)₂, 0.05% NP-40,, 250mM Sucrose, 2mM Spermidine, 5mM 2-mercaptoethanol, RNase inhibitor (Promega), Complete mini EDTA-free (Roche) 1tablet/10 ml

6-9-4 *In vitro* RNC ubiquitination assay

6-9-3 と同様にして、反応後の RRL と 300μl/200μl RRL reaction の Dynabeads His-Tag Isolation and Pulldown (Thermo Fisher)を混合し、RNC purification buffer により 1ml までメスアップした後、4°Cで 10 分間 incubation することで beads に binding させた。その間に、E2 酵素にユビキチン分子をチャージ

させるため、200 μ l RRL reaction あたり、500 μ M Tag-Free Ubiquitin (UBPBio)を 10 μ l、15 μ M UBE1 (UBPBio)を 1 μ l、5 μ M UBE2D3 (Funakoshi)を 6 μ l、10xERS を 15 μ l、500mM Mg(OAc)₂を 1 μ l 混合し、33 μ l の溶液を 23°Cで 15 分間静置することで、Ubiquitin Preincubation reaction を行った。

Dynabeads への binding が終了した後、beads を RNC Purification buffer で 2 回、RNC Ubiquitination buffer で 2 回洗浄し、最終的に beads を 100 μ l の RNC Ubiquitination buffer に懸濁した。その後、100 μ l の RNC-conjugated beads に対し、Ubiquitin Preincubation reaction を 33 μ l、RNase inhibitor を 1 μ l、最終濃度が 5-25nM となるように 3FLAG-ZNF598 を混合し、RNC Ubiquitination buffer により 150 μ l までメスアップした。この際、反応液中の Sucrose 濃度が 250mM になるように再調整した。このようにして、20°Cで 30 分間反応させることで、RNC を beads に繫留させた状態でユビキチン化反応を行なった。

ユビキチン化反応後、beads を RNC Ubiquitination buffer により 3 回洗浄し、最終濃度 300mM の Imidazole を含む RNC Ubiquitination buffer において 20°C で 15 分間反応させ溶出した。

RNC Ubiquitination buffer: 50mM HEPES pH7.4, 100mM KOAc, 25mM Mg(OAc)₂, 0.05% NP-40, 250mM Sucrose, 2mM Spermidine, 5mM 2-mercaptoethanol, RNase inhibitor (Promega), Complete mini EDTA-free (Roche) 1tablet/10 ml

RNC Ubiquitination condition: 30 μ M Tag-Free Ubiquitin, 100nM UBE1, 200nM UBE2D3, 1mM ATP, 10mM Creatine Phosphate, 20 μ g/ml Creatine kinase, 5-25nM 3FLAG-ZNF598, 200 μ l RRL 由来の RNC, RNC Ubiquitination buffer (250mM Sucrose は混合後に要調整)、RNase inhibitor

6-9-5 *In vitro* RNC splitting assay

6-9-4 と同様にして、RNC を beads に繫留させた状態でユビキチン化反応を行なった後、beads を RNC Purification buffer により 2 回、RNC Ubiquitination buffer により 2 回、RNC Splitting buffer により 2 回洗浄し、最終濃度 300mM の Imidazole を含む RNC Splitting buffer において 20°C で 15 分間反応させ溶出した。

溶出後のユビキチン化された RNC に対し、最終濃度 1mM ATP、10-25nM hRQT complex、RNase inhibitor を混合し、20°C で 60 分間反応させた。

反応後の RNC を、SW41Ti rotor (Beckman Coulter) を用いた 15-50% スクロース密度勾配遠心 (40000rpm, 120min, 4°C) により分離し、BIO-MINI UV MONITOR(ATTO) で A260 の測定並びに Position Gradient Fractionator(TOWA LABO) でポリソームの分画を行った。

RNC Splitting buffer: 50mM HEPES pH7.4, 300mM KOAc, 5mM Mg(OAc)₂,

0.05% NP-40, 250mM Sucrose, 2mM Spermidine, 5mM 2-mercaptoethanol,

RNase inhibitor (Promega), Complete mini EDTA-free (Roche) 1tablet/10 ml

15% sucrose solution: 15% sucrose, 50mM HEPES pH7.4, 100mM KOAc, 5mM Mg(OAc)₂, 2mM Spermidine

50% sucrose solution: 50% sucrose, 50mM HEPES pH7.4, 100mM KOAc, 5mM Mg(OAc)₂, 2mM Spermidine

第 7 章
謝辭

本研究を遂行するにあたり、ご指導ご鞭撻を賜りました稲田 利文 教授に心より感謝申し上げます。稲田教授とデータを挟んで議論する中で、1つの生データから多くの可能性を見出すことの重要さを学びました。稲田教授は「妄想」と仰いますが、その「妄想」によって数々のモデルが立てられ、そこから科学の新たなページが切り開かれている様を、大学院生の今、目の前にできたことで、研究の楽しさや難しさを学べたと感じています。実験データがなかなか出ない停滞時期にも、多彩なアプローチから一つの事象を追い求める稲田教授の姿勢を見習うことで、一步一步ではありましたが前に進めたと実感しています。

本博士論文の審査をご快諾いただき、数々のご指導とご助言を下さいました、東北大学大学院薬学研究科 衛生化学分野 松沢 厚 教授、東北大学大学院薬学研究科 分子細胞生化学分野 井上 飛鳥 准教授に深く感謝申し上げます。著者の研究に真剣に耳を傾けて下さり、事前説明会や予備審査の際には的確なコメントやアドバイスを頂けたからこそ、このような博士論文を書き上げることができたと実感しています。予備審査の際には、発表を通して「伝えること」の大切さやその難しさを、学ぶことができました。この経験は、今後の研究者人生においても生かしていきたいと思えます。

本博士論文 第3章の Codon optimality-dependent mRNA decay についての研究は、ドイツ・ミュンヘン大学 Roland Beckmann 研究室、アメリカ・ケースウェスタンリザーブ大学 Jeff Coller 研究室との共同研究によって行われました。世界の最先端で研究を進めるグループとの共同研究に加わり、その進め方を目の当たりに出来たことを深謝いたします。また、コロナ禍の2020年9月にオンラインで行われた国際学会において口頭発表をさせて頂いた際、その発表直後に

Roland Beckmann 教授から頂いた「Great Job!」というメールは今でも忘れられません。貴重な機会をいただき、ありがとうございました。

本博士論文 第2章の 18S Nonfunctional Ribosomal RNA Decay についての研究においては、京都大学 ウイルス・再生医科学研究所 大野 陸人 教授、北島 真助教から貴重なプラスミドを分与して頂きました。さらに、東京都医学総合研究所 田中 啓二 理事長、佐伯 泰 参事研究員には貴重なプラスミドや出芽酵母株を分与して頂きました。この場をお借りして、感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、多大なるご指導やご助言を賜りました研究室の皆様にご心より感謝申し上げます。松尾 芳隆 講師には、考え方から手法、モチベーションの保ち方まで、研究者として生きていく上で必要な様々なエッセンスを頂きました。著者が辛かった時期に、松尾先生の PC を見ながら、あまりのデータの綺麗さに驚きつつも、思わず目を見合わせ、喜んだ時間を鮮明に覚えています。また、著者が不慣れな生化学実験に行き詰まった時期にも、相談に乗って頂きました。心より感謝申し上げます。また、宇田川 剛 助教には、学部生時代に培養細胞やマウスを用いた実験を教えて頂きました。研究はおろか学生として不十分だった著者を厳しくも時に温かくご指導いただいたことを、深く感謝いたします。井澤 俊明 助教には、その温厚な雰囲気のおかげで、著者が実験で行き詰まった時期に、軽く談笑させて頂くことで前向きになれたような気がしています。信田 理沙 学術研究員には、配属当初からいままで、細かな実験手法をご教示いただき、さらにその研究室中に響き渡る笑い声に励まされたのは著者だけではなく皆同じかと思えます。池内 健 元特任助教 (現 ミュンヘン大学 Roland Beckmann 研究室) には、出芽酵母を用いた実験の数々をご教示頂き、博士課程の間、その遠く大きな背中を身近な目標としていました。

プライベートでも何度か飲み連れて行って頂き、特に、*EMBO J*に論文が受理された日には、外が明るくなるまで飲み明かしたことを鮮明に覚えています。ありがとうございました。また、皆が充実した研究生生活を送れるよう、いつも細かなケアをしてくださった秘書の稲田 敦子 様には心より感謝申し上げます。

松木 泰子さんには、1 学年上の先輩として、いや良き友人として、研究室配属当初から励まして頂きました。博士課程の間、身近な先輩としていてくれて、お互いに励まし合いながら研究を続けられたことは、本当に幸せだったと思っています。

橋本 怜史さんとは、*Scientific reports* の論文を共著で出させて頂きました。その知識量は著者自身見習わなければならないほどで、博士課程と一緒に卒業できることを幸せに思います。

研究室に配属された当初の先輩方や、修士課程まで同期として研究室活動を共にした仲間たち、学部時代の同期の皆様についても、卒業後であってもこまめに連絡をくれたり、飲み連れて行ってくれたりと、心の支えになりました。感謝申し上げます。

市村 淳さん、李 思涵さん、加藤 海輝さんには、18S NRD の解析にあたり、大変お世話になりました。特に、李さん、加藤さんとは、論文受理までの険しい道のりを一緒に支え合いながら進められたこと、深謝いたします。成田 桃子さんとも、RQC の解析において、一緒に研究が出来て嬉しかったです。また、実験台やデスクが近く、毎日お互いに励ましあいながら過ごせた奥山 卓 さん、関 萌香 さん、友松 翔太 さん、斎藤 大志 さんに御礼申し上げます。

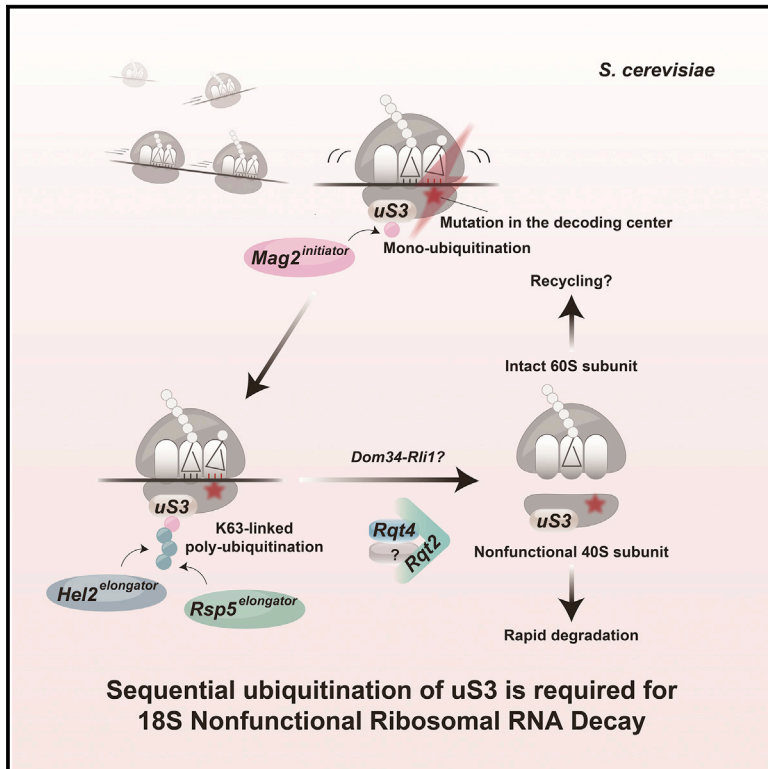
この章には収まり切らないほど、たくさんの方々に大変お世話になりました。誠にありがとうございました。

最後になりましたが、遠方からいつも温かな愛情を持って見守ってくれた故郷静岡の家族に深く感謝いたします。

第 8 章
副論文

Sequential Ubiquitination of Ribosomal Protein uS3 Triggers the Degradation of Non-functional 18S rRNA

Graphical Abstract



Authors

Takato Sugiyama, Sihan Li, Misaki Kato, Ken Ikeuchi, Atsushi Ichimura, Yoshitaka Matsuo, Toshifumi Inada

Correspondence

tinada@m.tohoku.ac.jp

In Brief

18S non-functional rRNA decay (NRD) eliminates non-functional 18S rRNA with deleterious mutations in the decoding center. Sugiyama et al. show that 18S NRD requires Mag2-mediated monoubiquitination followed by Hel2- and Rsp5-mediated K63-linked polyubiquitination of uS3. Subunit dissociation requires Asc1, Dom34, sequential ubiquitination of uS3, and ATPase activity of Slh1 (Rqt2).

Highlights

- 18S non-functional rRNA decay requires sequential uS3 ubiquitination
- Hel2 and Rsp5 form a K63-linked polyubiquitin chain on uS3 monoubiquitinated by Mag2
- uS3 ubiquitination induces subunit dissociation of non-functional 80S by Slh1 (Rqt2)



Sequential Ubiquitination of Ribosomal Protein uS3 Triggers the Degradation of Non-functional 18S rRNA

Takato Sugiyama,^{1,2} Sihan Li,^{1,2} Misaki Kato,^{1,2} Ken Ikeuchi,¹ Atsushi Ichimura,¹ Yoshitaka Matsuo,¹ and Toshifumi Inada^{1,3,*}

¹Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Sendai 980-8578, Japan

²These authors contributed equally

³Lead Contact

*Correspondence: tinada@m.tohoku.ac.jp

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.067>

SUMMARY

18S non-functional rRNA decay (NRD) eliminates non-functional 18S rRNA with deleterious mutations in the decoding center. Dissociation of the non-functional 80S ribosome into 40S and 60S subunits is a prerequisite step for degradation of the non-functional 18S rRNA. However, the mechanisms by which the non-functional ribosome is recognized and dissociated into subunits remain elusive. Here, we report that the sequential ubiquitination of non-functional ribosomes is crucial for subunit dissociation. 18S NRD requires Mag2-mediated monoubiquitination followed by Hel2- and Rsp5-mediated K63-linked polyubiquitination of uS3 at the 212th lysine residue. Determination of the aberrant 18S rRNA levels in sucrose gradient fractions revealed that the subunit dissociation of stalled ribosomes requires sequential ubiquitination of uS3 by E3 ligases and ATPase activity of Slh1 (Rqt2), as well as Asc1 and Dom34. We propose that sequential uS3 ubiquitination of the non-functional 80S ribosome induces subunit dissociation by Slh1, leading to degradation of the non-functional 18S rRNA.

INTRODUCTION

The ribosome is a crucial platform for precise gene expression, including translation, protein folding, and targeting. It has been demonstrated that the non-functional ribosome itself is subjected to quality control systems to avoid production of potentially harmful products by abnormal translation. In yeast, Cole et al. (2009) and LaRiviere et al. (2006) showed that non-functional rRNA decay (NRD) quality controls detect and eliminate mature rRNA containing individual point mutations that adversely affect ribosome function possessed by fully assembled ribosomes and ribosomal subunits. With the fundamental but differential functions of the 40S and 60S subunits in translation, NRD quality controls eliminate non-functional subunits in distinct pathways. 25S NRD quality control eliminates 25S rRNA with mutations in the peptidyl transferase center, and

18S NRD eliminates mutated 18S rRNA containing deleterious point mutations in the decoding center (Cole et al., 2009; LaRiviere et al., 2006).

In NRD, subunit dissociation of the non-functional 80S ribosome is a prerequisite step for degradation of the non-functional subunit. 25S NRD requires an E3 ubiquitin ligase complex, and proteins associated with a non-functional ribosome are ubiquitinated in an Rtt101-Mms1-dependent manner (Fujii et al., 2009), with Crt10 responsible for substrate recognition of the Rtt101-Mms1-containing E3 ligase complex (Sakata et al., 2015). The non-functional and ubiquitinated 60S subunit is dissociated from the 40S subunit in a Cdc48-Npl4-Ufd1 complex (Cdc48 complex)-dependent manner before it is attacked by the proteasome (Fujii et al., 2012). The non-functional 60S subunits accumulate under proteasome-depleted conditions, and the majority of mutant 25S rRNAs retain their full length, indicating that the proteasome is an essential factor triggering rRNA degradation. However, the mechanism whereby the E3 ubiquitin ligase complex recognizes the substrate and ubiquitinates the ribosome and the precise role of ribosome ubiquitination in subunit dissociation remain to be elucidated.

The mechanism of 18S NRD is mostly unknown. However, several lines of evidence have suggested a connection between 18S NRD and the ribosome-associated quality control (RQC) system. Asc1 has been reported to be involved in 18S NRD (Cole et al., 2009; Limoncelli et al., 2017) and is required for RQC as well (Juszkiewicz and Hegde, 2017; Kuroha et al., 2010; Sundaramoorthy et al., 2017). RQC is a translation arrest-induced quality control system leading to degradation of the arrest products (Bengtson and Joazeiro, 2010; Brandman et al., 2012; Defenouillère et al., 2013). In the first step, RQC recognizes the abnormal stalling ribosome and ubiquitinates the specific residue(s) in the stalled ribosome. In yeast, an E3 ubiquitin ligase, Hel2, ubiquitinates uS10 at K6 and/or K8 and plays a crucial role in RQC (Matsuo et al., 2017). ZNF598, a mammalian homolog of Hel2, ubiquitinates the ribosomal protein eS10 at K138 and/or K139 and uS10 at K4 and/or K8, stimulating the translational arrest and RQC triggered by poly-lysine mRNA sequences (Juszkiewicz and Hegde, 2017; Sundaramoorthy et al., 2017). In the second step of RQC, ribosome ubiquitination induces subunit dissociation, which is a crucial event for Ltn1-dependent ubiquitination of the arrest products on the 60S large ribosomal subunit (Becker et al., 2012; Bengtson and Joazeiro,



2010; Pisareva et al., 2011; Shao et al., 2013; Shoemaker et al., 2010; Shoemaker and Green, 2011), leading to subsequent proteasomal degradation (Bengtson and Joazeiro, 2010; Brandman et al., 2012; Hilal and Spahn, 2015; Lyumkis et al., 2014; Shao and Hegde, 2014; Shen et al., 2015). The RQC-triggering (RQT) complex is required for RQC and has been proposed to recognize the ubiquitinated stalled ribosome and induce subunit dissociation. The RQT complex is composed of three factors: the RNA helicase family protein Slh1 (Rqt2), the ubiquitin-binding protein Cue3 (Rqt3), and Rqt4 (Matsuo et al., 2017; Sitron et al., 2017). The ATPase activity of Slh1 and the ubiquitin-binding activity of Rqt3 are crucial for RQC (Matsuo et al., 2017).

An important question regarding RQC is how Hel2 and its mammalian homolog ZNF598 recognizes and ubiquitinates the specific substrate. The first observation for the substrate specificity of Hel2 is that ribosomes co-purified with the tagged Hel2 are mainly in the rotated state with the hybrid tRNAs (Matsuo et al., 2017). More recently, Juszkiwicz et al. (2018) demonstrated that the di-ribosome (disome) is a preferential substrate for ZNF598-dependent ubiquitination with the *in vitro* translation system. The disome is formed by using mutant eRF1 that is defective in peptide-releasing activity, and cryoelectron microscopy (cryo-EM) analysis of the disome revealed that the colliding ribosome is in a rotated form (Juszkiwicz et al., 2018). Further, other recent studies demonstrated that not only RQC but also another quality control system, no-go decay (NGD), responds to ribosome collision (Ikeuchi et al., 2019; Simms et al., 2017). In yeast, NGD and RQC require common factors and biochemical events, suggesting a coupling of these two quality control pathways (Shoemaker and Green, 2012). A disome unit consists of the leading stalled ribosome and the following colliding ribosome. Endonucleolytic cleavage of an NGD reporter mRNA occurs at sites within this disome unit and is dependent on Hel2-mediated K63-linked polyubiquitination of uS10 as well as the activity of the RQT component Slh1 (Ikeuchi et al., 2019). These results suggest that NGD and RQC are coupled via this ubiquitination event. Taken together, Hel2 and its mammal homolog ZNF598 recognize the disome containing the colliding ribosome in the rotated state (Juszkiwicz et al., 2018; Ikeuchi et al., 2019), leading to ubiquitination of uS10 in yeast and uS10, eS10, and uS3 in mammals. Subsequently, the RQT complex targets the ubiquitinated ribosomes in the hybrid state specifically, allowing dissociation of the stalled ribosome into subunits (Matsuo et al., 2017). These findings strongly indicate involvement of the ubiquitination of ribosomal protein(s) in subunit dissociation and subsequent events in quality control induced by ribosome stalling. However, there is no experimental evidence to demonstrate involvement of the RQT complex in the dissociation of the stalled ribosome into subunits.

A recent study showed that the C-terminal 212–240 region of uS3 is essential for 18S NRD (Limoncelli et al., 2017). The 212th lysine residue (K212) of uS3 was also identified as a target of Hel2-dependent ubiquitination (Matsuo et al., 2017) but was dispensable for RQC, leading to the possibility that the non-functional 80S ribosome with inactive 18S rRNA could be recognized and ubiquitinated by a specific E3 ligase and dissociated into subunits, followed by degradation of the non-functional 18S rRNA in the 40S subunit without affecting the 60S subunit. There-

fore, it should be determined whether uS3 ubiquitination assumes a role in 18S NRD. Here we report that sequential ubiquitination of uS3 triggers subunit dissociation in 18S NRD. 18S NRD requires Hel2- and Rsp5-mediated K63-linked polyubiquitination of uS3 at K212 with the premise of Mag2-mediated monoubiquitination. The decay of aberrant 40S was partially impaired in the *xm1Δ* mutant background, and the defect in subunit dissociation was monitored by accumulation of the mutated 40S. Ubiquitination of uS3 at K212 and ATPase activity of Slh1 were required for subunit dissociation. The reported 18S NRD factor Asc1 is involved in uS3 ubiquitination and, thus, is required for subunit dissociation. We propose that the non-functional 80S ribosomes stall because of decoding failure and are ubiquitinated sequentially at the K212 residue of uS3. Mag2 mediates monoubiquitination of uS3 at K212, followed by Hel2- or Rsp5-mediated polyubiquitination. Subsequently, Slh1 stimulates the subunit dissociation that leads to Xrn1-dependent degradation of the non-functional 18S rRNA in the 40S subunit. Taken together with the mechanism of RQC, we propose that the crucial roles of ribosome ubiquitination and Slh1 are conserved in quality control induced by ribosome stalling.

RESULTS

Ubiquitination of uS3 at K212 Is Essential for 18S NRD

The non-functional 40S ribosomal subunit composed of the 18S rRNA containing the A1492C mutation could initiate translation but may stall at the elongation step because of a defect in the fidelity of decoding. Given that RQC requires ubiquitination of uS10 at K6 and/or K8 residues on the stalled ribosome (Matsuo et al., 2017), we suspected that ubiquitination of ribosomal proteins is also involved in 18S NRD. We reported previously that uS3 is ubiquitinated at K212 in a Hel2-dependent manner and that substitution of the K212 residue of uS3 with arginine (K212R) disrupted its ubiquitination but without affecting RQC (Matsuo et al., 2017). Therefore, we hypothesized that ubiquitination of uS3 at K212 may participate in 18S NRD. To test this, we determined the ubiquitination levels of ribosomal proteins when expression of the mutated 18S:A1492C rRNAs under control of the *GAL7* promoter was induced by galactose in the medium (Cole et al., 2009; LaRiviere et al., 2006) in a series of strains expressing 3 consecutive epitope tag sequences derived from human influenza hemagglutinin (3HA)-tagged ribosomal 40S subunit proteins (Figure 1A). Western blot analysis with anti-HA antibody revealed that the exogenous expression of 18S:A1492C increased the levels of di-, tri-, and tetra-ubiquitinated forms of uS3 but not that of other ribosomal proteins (Figure S1A and S1B, lanes 6 and 7). We also confirmed that ubiquitination of uS3 was strongly diminished in *uS3-K212R* mutant cells, the lysine-to-arginine substitution mutant of uS3 (Figure S1B, lanes 6–9). Moreover, western blotting with antibodies against K63- or K48-linked polyubiquitin revealed that the polyubiquitination of uS3 was mainly K63-linked (Figure S1B, lanes 18 and 19).

We next verified whether K212 of uS3 is necessary for 18S NRD by half-life measurement of the mutated 18S:A1492C rRNA in *uS3-K212R* mutant cells. The 18S:A1492C rRNA was drastically stabilized in *uS3-K212R* mutant cells (half-life

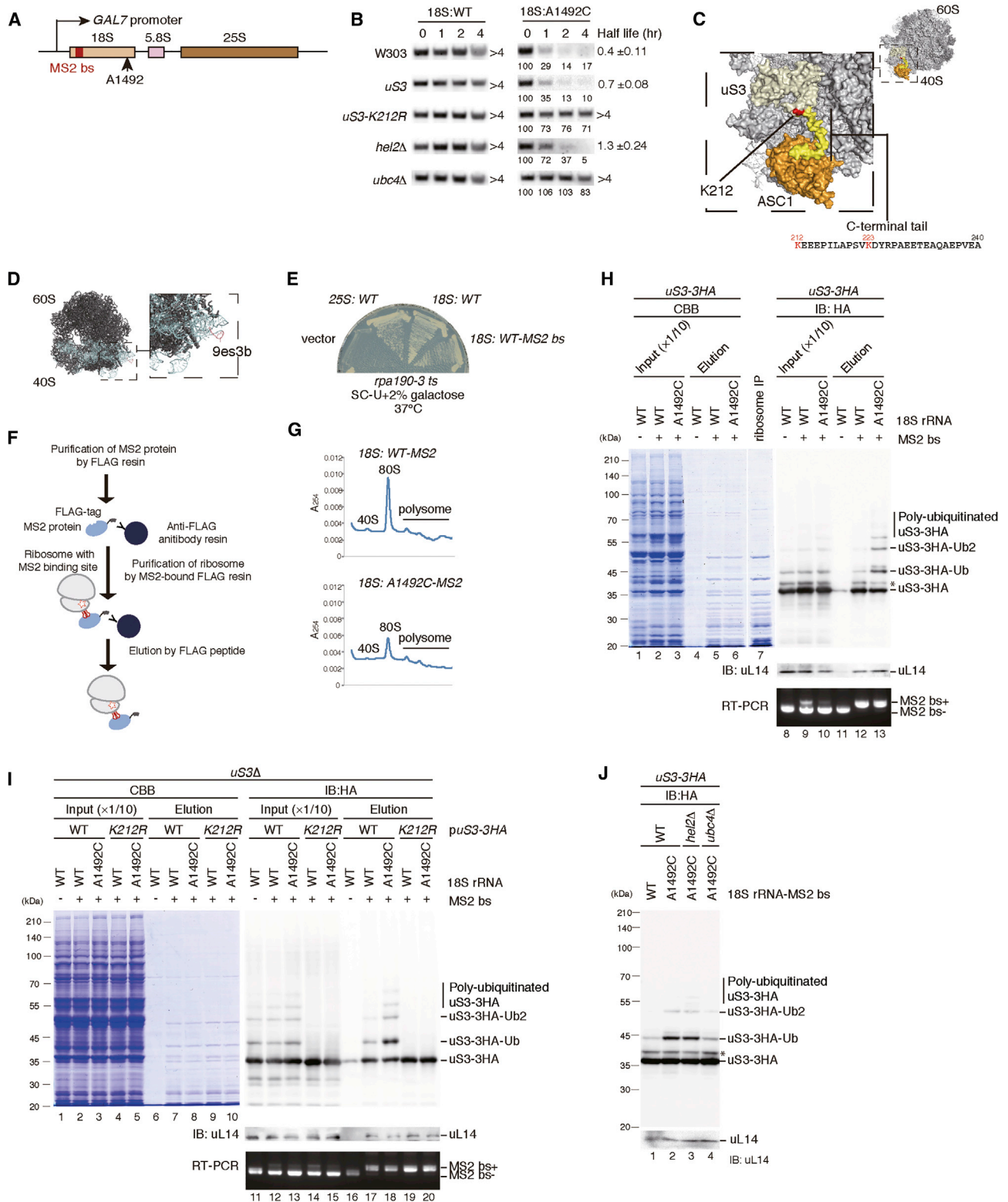


Figure 1. Ubiquitination of uS3 Is Essential for 18S NRD

(A) Construction of the rDNA plasmid with the A1492C mutation and MS2 site.

(B) Ubiquitination of uS3 at K212 and the E2-conjugating enzyme Ubc4 are required for 18S NRD. The stability of 18S:WT or 18S:A1492C rRNA in the indicated mutant cells was determined as described in the STAR Methods.

(legend continued on next page)

[$t_{1/2}$] > 4 h) (Figure 1B), indicating that ubiquitination at the K212 residue of uS3 is essential for 18S NRD. In addition, the increase in the ubiquitination level of uS3 by exogenous expression of mutated 18S:A1492C was completely diminished in *uS3-K212R* mutant or C-terminal tail deletion cells (Figure S1C, lanes 4, 5, 10, and 11). These results are consistent with a recent study showing that the C-terminal 212–240 region of uS3, which is known to be subject to post-translational modification, is crucial for the decay pathway of the mutated 18S rRNA (Limoncelli et al., 2017; Figure 1C). To assess the role of ubiquitination of other lysine residues of uS3 in 18S NRD, we also constructed a series of uS3 mutants in which each lysine residue that is reported to be ubiquitinated was substituted with arginine (Swaney et al., 2013; Figure S1D). We determined the stability of the mutated 18S:A1492C in these uS3 mutants and found that the 18S:A1492C rRNA was drastically stabilized only in the *uS3-K212R* mutant but not in the other mutants (Figure S1D). These strongly suggest that the ubiquitination of uS3 at K212 plays a crucial role in 18S NRD, although we cannot exclude the possibility that the ubiquitination of other lysine residues plays minor or additional roles in this decay pathway.

A critical question regarding 18S NRD is how the quality control system recognizes the aberrant ribosome with the deleterious mutation in the decoding center. It is known that an E3 ligase, Hel2, and an E2 ubiquitin-conjugating enzyme, Ubc4, play essential roles in RQC via ubiquitination of uS10 at the K6 or K8 residue (Matsuo et al., 2017). Because Hel2 is also involved in ubiquitination of uS3 (Matsuo et al., 2017; Simms et al., 2017), we examined the role of *HEL2* in 18S NRD. 18S:A1492C was modestly but significantly stabilized but still degraded in *hel2Δ* mutant cells ($t_{1/2}$ = 1.3 h versus wild-type [WT] $t_{1/2}$ = 0.4; Figure 1B), indicating that Hel2 partially contributes to 18S NRD, possibly via ubiquitination of uS3. On the other hand, the mutated 18S:A1492C rRNA was drastically stabilized in *ubc4Δ* mutant cells (Figure 1B; $t_{1/2}$ > 4 h versus WT $t_{1/2}$ = 0.4), indicating that Ubc4 is essential for 18S NRD.

We then established a method to purify the non-functional ribosome with the insertion of MS2 coat protein binding sites into the mutated 18S rRNA. Tandem MS2 binding sites were inserted into the 9es3b region, which is a non-conserved expansion segment in yeast 18S rRNA that barely interacts with ribosomal proteins and rRNA residues around it (Figure 1D).

The insertion did not affect cell growth (Figure 1E). MS2-tagged ribosomes were affinity-purified with MS2-FLAG protein and eluted by FLAG peptide (Figure 1F). Sucrose density gradient centrifugation revealed that the affinity-purified MS2-tagged 80S ribosomes were mainly monosomes (Figure 1G). Negligible contamination of the non-tagged endogenous ribosome in purified samples was detected with RT-PCR to amplify the 9es3b region (Figures 1H, bottom, lanes 8–13, and 1I, bottom, lanes 11–20). The level of ubiquitination of uS3 in the MS2-tagged 80S ribosome with the 18S:A1492C mutation was drastically increased (Figure 1H, lanes 12 and 13), and K212 was the only lysine residue for ubiquitination of uS3 (Figure 1I, lanes 18 and 20). Because Hel2 and Ubc4 are involved in 18S NRD (Figure 1B), we determined the level of polyubiquitinated uS3 of affinity-purified non-functional 80S ribosomes in *hel2Δ* and *ubc4Δ* mutant cells. The polyubiquitinated uS3 was strongly reduced in *ubc4Δ* but negligibly affected in *hel2Δ* mutant cells (Figure 1J, lanes 3 and 4). These results strongly suggest that a putative E3 ligase, in concert with the E2 enzyme Ubc4, is involved in polyubiquitination of uS3 on the non-functional 80S ribosome to induce 18S NRD.

18S NRD Requires Mag2-Mediated Monoubiquitination

To identify the putative E3 ligase that is responsible for K63-linked polyubiquitination of uS3 in the non-functional 80S ribosome, we screened 75 non-essential genes encoding E3 ligases. We introduced a plasmid expressing the aberrant 18S:A1492C under control of the *GAL7* promoter. Transformants were cultured in the presence of galactose and harvested 3 h after transcription shutoff by addition of glucose. We identified a *mag2Δ* mutant in which the level of the mutated 18S:A1492C rRNAs was not reduced even 3 h after transcription inhibition (Figure S2A). We determined the stability of the 18S:A1492C rRNA in the *mag2Δ* mutant and confirmed the drastic stabilization of the 18S:A1492C rRNA (Figure 2A). Indeed, the level of polyubiquitinated uS3 in the affinity-purified non-functional MS2-tagged 80S ribosome was strongly diminished in *mag2Δ* mutant cells (Figure 2B, lanes 7 and 8). Mag2 is a RING-finger type E3 ubiquitin ligase (Figure 2C) predicted to be involved in repair of alkylated DNA because of interaction with Mag1 (Samanta and Liang, 2003). The WT MAG2 complemented the defect of *mag2Δ* mutant cells in 18S NRD but the RING domain deletion

(C) The structure diagram was generated in PyMOL using PDB: 4V88. The ribosomal proteins uS3 and Asc1 are shown in pale yellow and orange, respectively. The C-terminal tail of uS3 subject to post-translational modification is shown in yellow, and the 212th Lys residue is shown in red.

(D) Predicted position of the MS2 binding site on the ribosome. A tandem MS2 binding site (MS2-bs) was inserted into 9es3b on 18S rRNA, located at the tip of the left foot of the 40S subunit (dark gray, 18S rRNA; red, bases 229–234 of 9es3b). The image was generated by PyMol using PDB: 4V88.

(E) The insertion of MS2-bs into 9es3b did not affect cell growth. *rpa190-3* mutant cells were transformed with the indicated rRNA genes, and cells were streaked on synthetic complete (SC) medium containing 2% galactose.

(F) The experimental procedure for purification of non-functional ribosomes with insertion of MS2-bs into the mutated 18S rRNA (MS2-tagged RNA affinity purification [TRAP] method).

(G) The affinity-purified MS2-tagged 80S ribosomes with MS2-FLAG protein were mostly monosomes.

(H) uS3 of the non-functional 80S ribosomes was polyubiquitinated. MS2-tagged 80S ribosomes were affinity-purified with MS2-FLAG protein as described in (F) and subjected to SDS-PAGE. The levels of endogenous 80S and MS2-tagged 80S were determined by RT-PCR with the specific primers. An asterisk indicates the band derived from the endogenously 3HA-tagged uS3 allele but not from the plasmid-derived uS3-3HA allele.

(I) K212 of uS3 is responsible for polyubiquitination of the non-functional 80S ribosomes. The non-functional 80S ribosomes were purified from the indicated strains as described in (F).

(J) The E2 enzyme Ubc4 is required for uS3 polyubiquitination of the non-functional 80S ribosomes. The non-functional 80S ribosomes were purified as described in (F). An asterisk indicates the band derived from the endogenously 3HA-tagged uS3 allele but not from the plasmid-derived uS3-3HA allele.

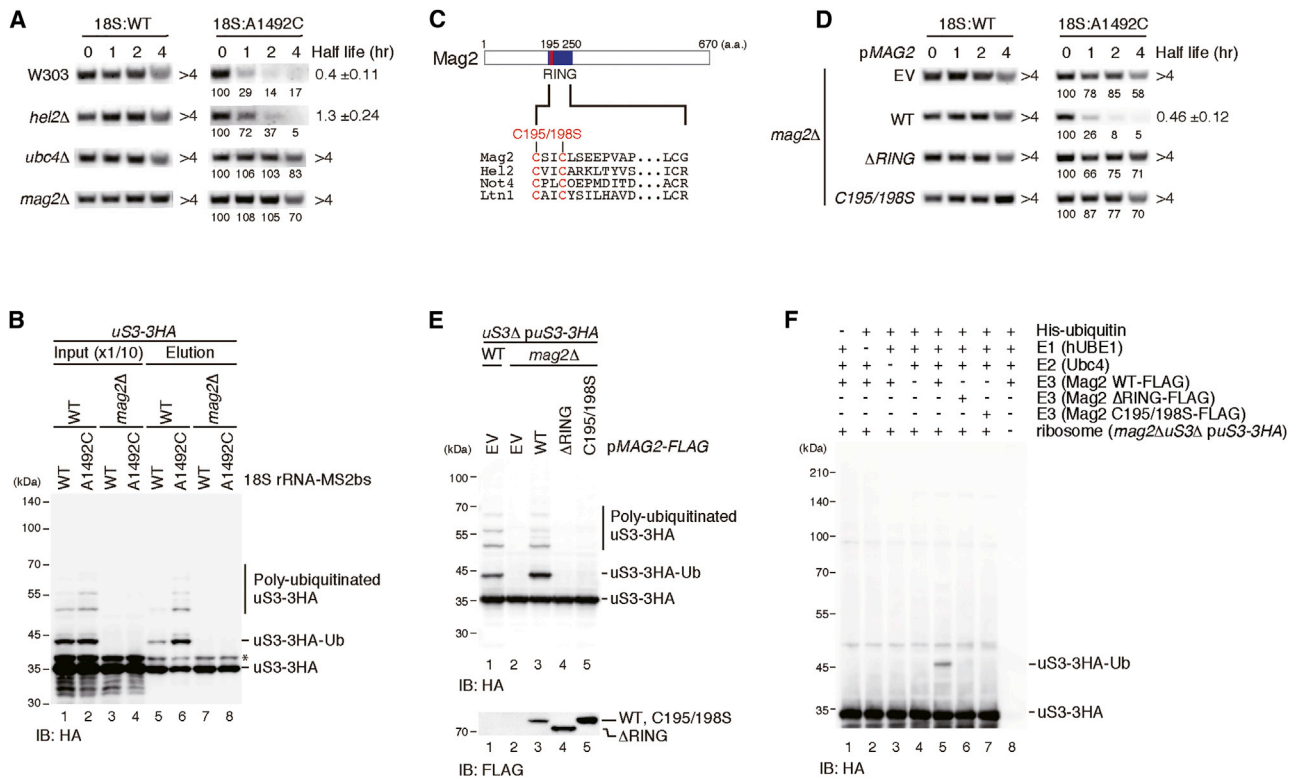


Figure 2. 18S NRD Requires Mag2-Mediated Monoubiquitination of uS3

(A) The E3 ligase Mag2 and the E2 enzyme Ubc4 are essential for 18S NRD. The stability of 18S:WT or 18S:A1492C rRNA in the indicated mutant cells was determined as described in Figure 1B. (B) Mag2 is required for ubiquitination of uS3 on the non-functional 80S ribosome with 18S:A1492C rRNA. The non-functional 80S ribosomes were purified as shown in Figure 1F. (C) Schematic drawing of the Mag2 domain structure. The conserved motif of the RING-finger type E3 ligase is indicated in red. (D) The mutations in the RING-finger domain of Mag2 strongly diminished 18S NRD. (E) Ubiquitination of uS3 was defective in the Mag2 RING domain mutants. (F) The recapitulation of Mag2-mediated monoubiquitination on uS3 using an *in vitro* ubiquitination reaction.

mutant and C195SC198S (C195 and 198S) double substitution mutant did not (Figure 2D). Western blot analysis revealed that the ubiquitinated uS3 was strongly diminished in the *mag2Δ* mutant cells (Figure 2E, lanes 1 and 2), indicating that Mag2 is required for the ubiquitination of uS3. We next investigated whether overproduction of Mag2 facilitates polyubiquitination of uS3. Overproduction of WT Mag2 significantly increased the ubiquitinated form of uS3 but the RING domain mutants did not (Figure 2E, lanes 3–5). These results indicate that K212 is a primary site of the Mag2-dependent ubiquitination of uS3. We also investigated the substrate specificity of Mag2-dependent ubiquitination of ribosomal proteins and found that Mag2 increased the level of the ubiquitinated uS3-3HA but not uS10-3HA or eS10-3HA (Figure S2B).

We next performed an *in vitro* ubiquitination assay with purified Mag2 (Figure S2C), Ubc4, and purified ribosome from *mag2ΔuS3Δ* mutant cells expressing uS3-3HA from the plasmid (Figure 2F). The monoubiquitinated form of uS3, but not the polyubiquitinated one, was observed in the reaction with WT Mag2 protein (Figure 2F, lane 5), whereas it was not observed in the RING domain mutants (Figure 2F, lanes 6 and 7), strongly

suggesting that Mag2 is an E3 ubiquitin ligase responsible for monoubiquitination of uS3. We also performed an *in vitro* ubiquitination assay with ribosomes purified from *ubc4ΔuS3-3HA* mutant cells and observed Mag2-dependent monoubiquitination of uS3 (Figures S2D). We concluded that the Mag2-dependent monoubiquitination of uS3 was recapitulated with the *in vitro* ubiquitination reaction. Taken together, we propose that Mag2, in concert with Ubc4, is required for 18S NRD via ubiquitination of the ribosomal protein uS3 at K212.

K63-Linked Polyubiquitination of uS3 by Hel2 Requires Mag2-Mediated Monoubiquitination

The results shown above indicate that Mag2-dependent monoubiquitination is required for polyubiquitination of uS3 at K212. To confirm the involvement of Mag2 in polyubiquitination of uS3 at K212, we purified the ubiquitinated ribosomal proteins using serial affinity purification from cells expressing FLAG-tagged uL23 and His6-tagged-ubiquitin (Figure S3A). The ubiquitinated uS3 was drastically decreased in *mag2Δ* or *uS3-K212R* mutant cells (Figure S3B, lanes 13 and 15) compared with WT cells (Figure S3B, lane 11). Further,

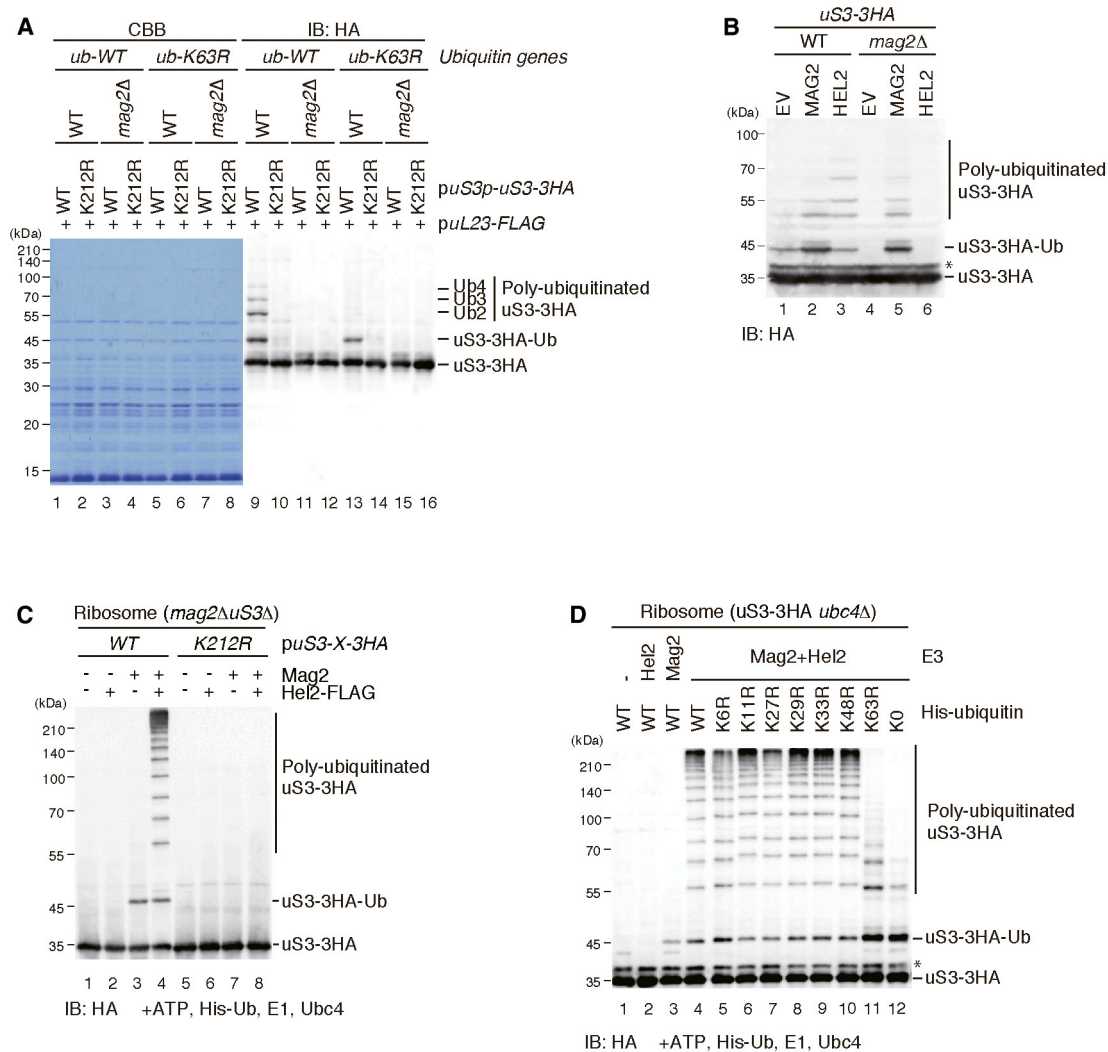
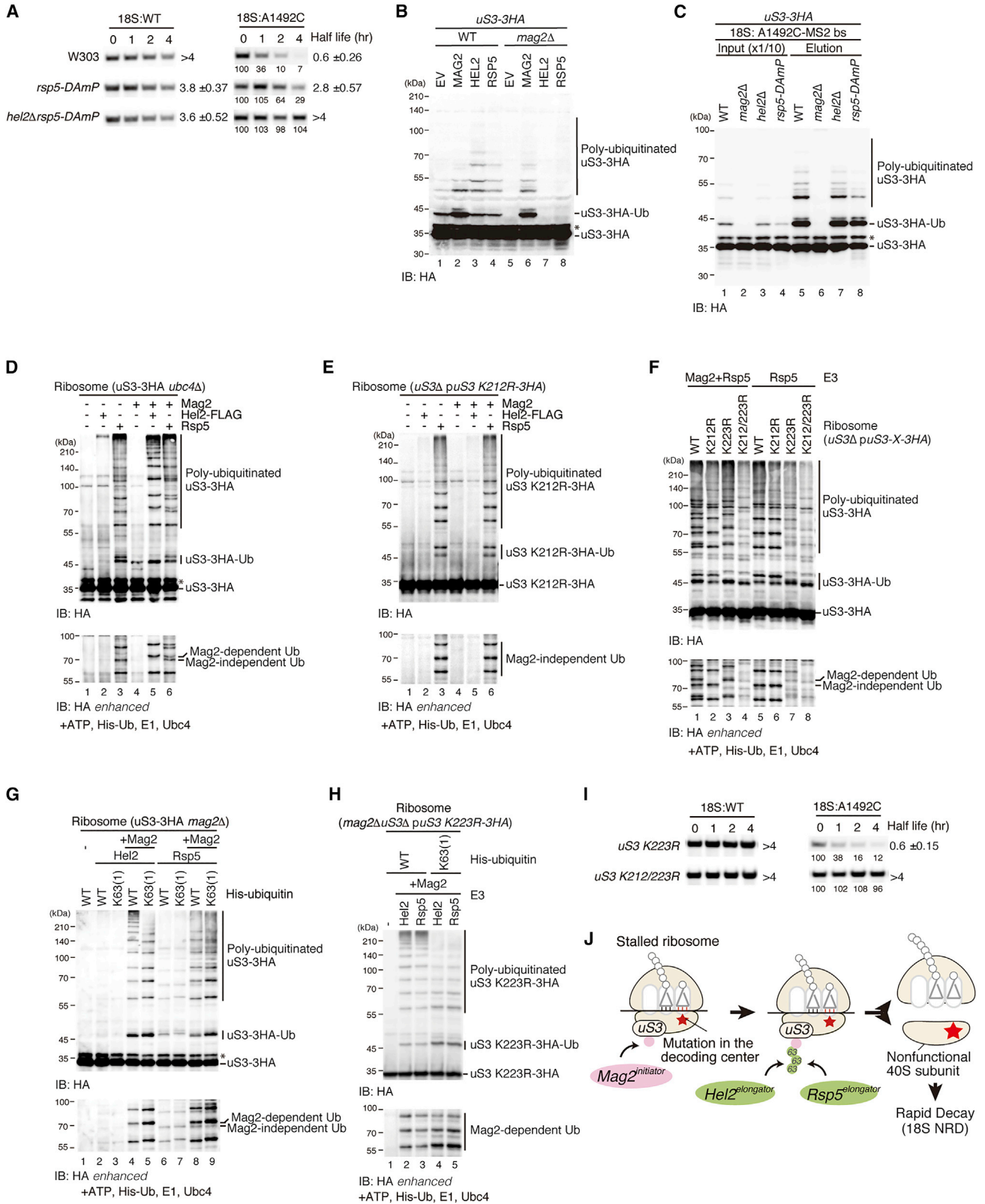


Figure 3. K63-Linked Polyubiquitination by Hel2 Is Multi-step and Requires Mag2-Mediated Monoubiquitination

(A) Mag2 and the K212 residue of uS3-dependent ubiquitination are K63 linked.
 (B) Hel2 forms a polyubiquitin chain on uS3 in a Mag2-dependent manner *in vivo*. Shown is a western blot analysis of the polyubiquitinated levels of uS3 in the indicated strains with overproduction of Mag2 or Hel2.
 (C) The K212 residue of uS3 is responsible for polyubiquitination by Hel2. The *in vitro* ubiquitination reaction recapitulated Mag2-mediated monoubiquitination, and Hel2-mediated polyubiquitination of monoubiquitinated uS3 depends on K212.
 (D) The recapitulation of K63-linked and Hel2-mediated polyubiquitination of Mag2-mediated monoubiquitinated uS3 in the *in vitro* ubiquitination reaction.

overproduction of Mag2 increased the mono- and poly-ubiquitination of WT uS3-3HA (Figure S3B, lanes 11 and 12) but not uS3-K212R-3HA (Figure S3B, lanes 13 and 14). We hypothesized that the polyubiquitination of uS3 was mainly K63-linked based on several lines of results. First, western blotting with antibodies against K63- or K48-linked polyubiquitin revealed that the polyubiquitination of uS3 was mainly K63-linked (Figure S1B). Second, Hel2-mediated K63-linked polyubiquitination of uS10 at K6 or K8 is crucial for RQC (Ikeuchi et al., 2019). To identify the linkage of the polyubiquitin chain on uS3, we used the *Ub-K63R* mutant strain in which all endogenous ubiquitin-encoding genes are modified. Polyubiquitinated forms of uS3 were significantly decreased in *Ub-K63R* mutant

cells, indicating that the polyubiquitination of uS3 is mainly K63-linked (Figure 3A, lanes 9 and 13). It has been confirmed that this reduction in *Ub-K63R* mutant cells was not due to the decreased expression level of Hel2 in the mutant cells (Ikeuchi et al., 2019). Furthermore, K63-linked polyubiquitination was detected only in the presence of Mag2 and the lysine 212 residue of uS3 (Figure 3A, lanes 9–11). To further verify the K63-linked ubiquitination, affinity-purified MS2-tagged functional or non-functional 80S ribosomes were incubated with a K63-specific tandem ubiquitin binding entity (TUBE) that recognizes the K63-linked polyubiquitin chain. K63-TUBE was specifically associated with the non-functional 80S ribosomes but not the functional 80S ribosomes (Figure S3C, lanes 7 and 8).



(legend on next page)

Mag2 directly monoubiquitinated, but not polyubiquitinated, uS3 *in vitro* (Figure 2F; Figure S2D), whereas Mag2 is required for the polyubiquitination of uS3 (Figure 2B, 2E, and 3A). Thus, we suspected that another E3 ligase, Hel2, which partially participates in 18S NRD (Figure 2A), might be involved in the polyubiquitination of uS3 that depends on the monoubiquitination by Mag2. We then investigated whether overproduction of Hel2 facilitates the polyubiquitination of uS3. The overproduction of Hel2 significantly increased the polyubiquitinated but not the monoubiquitinated form of uS3 at K212 in WT cells (Figure 3B, lane 3) but not in *mag2Δ* or *uS3-K212R* mutant cells (Figure 3B, lane 6; Figure S3D, lane 6). This strongly suggests that Hel2 is involved in the polyubiquitination of uS3 in 18S NRD and that the Hel2-mediated polyubiquitination of uS3 depends on Mag2-mediated monoubiquitination *in vivo*. We noticed that overproduction of Mag2 also increased the level of monoubiquitinated uS3, even in *uS3-K212R* mutant cells, slightly but significantly (Figure S3D, lane 5). This monoubiquitination by overproduction of Mag2 was also observed in *uS3-N(1-211)* mutant cells (Figure S3E, lanes 6 and 12), which indicates that target(s) other than K212 and the C-terminal tail of uS3 might be monoubiquitinated when overproducing Mag2. Because none of the substitution mutants of the reported ubiquitination substrates but K212 stabilized the mutated 18S rRNA (Figure S1D), we conclude that lysine residues other than K212 are dispensable for 18S NRD, even when they might be ubiquitinated under specific conditions.

Finally, we performed an *in vitro* ubiquitination assay with purified Mag2, Hel2-FLAG, and Ubc4 and recapitulated the Hel2-dependent polyubiquitination on the monoubiquitinated uS3 by Mag2. Hel2 failed to ubiquitinate uS3 on ribosomes purified from *mag2ΔuS3-3HA* mutant cells (Figure 3C, lane 2) but polyubiquitinated uS3 in the presence of Mag2 (Figure 3C, lanes 1–4). The *in vitro* ubiquitination reaction with the *mag2ΔuS3-3HA* or *mag2ΔuS3-K212R-3HA* mutant ribosomes also revealed that Hel2 forms a polyubiquitin chain on uS3 at K212, depending on Mag2-mediated monoubiquitination (Figure 3C, lanes 4 and 8). We also confirmed that the polyubiquitin chain formed by Hel2 was K63-linked (Figure 3D, lanes 4–12). These results indicate

that Hel2 serves as an E4 ubiquitin chain elongation factor for K63-linked ubiquitination of uS3 and that the Mag2-mediated monoubiquitination of uS3 is prerequisite for Hel2-mediated K63-linked polyubiquitination.

Rsp5- and Hel2-Mediated K63-Linked Polyubiquitination Requires Mag2-Mediated Monoubiquitination

The 18S:A1492C rRNA in *hel2Δ* mutant cells was less stable than in *ubc4Δ* mutant cells (Figure 1B, *hel2Δ*, $t_{1/2} = 1.3$ h versus *ubc4Δ* $t_{1/2} > 4$ h), suggesting that other E3 ligases are involved in K63-linked polyubiquitination of uS3. An essential E3 ligase, Rsp5, is involved in K63-linked polyubiquitination of various proteins (Kraft and Peter, 2008; Kwapisz et al., 2005; Shcherbik and Pestov, 2011). Therefore, we examined the role of Rsp5 in K63-linked polyubiquitination of uS3 and 18S NRD. To investigate the role of *RSP5* in uS3 polyubiquitination and 18S NRD, we utilized *rsp5-DAmP* cells in which the *RSP5* mRNA level was significantly reduced because of insertion of the drug-resistant open reading frame in the 3' UTR (Schuldiner et al., 2005). The 18S:A1492C rRNA was significantly stabilized in *rsp5-DAmP* mutant cells and completely stabilized in *hel2Δrsp5-DAmP* double-mutant cells (Figure 4A; *hel2Δ* $t_{1/2} = 1.3$ h versus *rsp5-DAmP* $t_{1/2} = 2.8$ h versus *hel2Δrsp5-DAmP* $t_{1/2} > 4$ h). This suggests that two E3 ligases, Rsp5 and Hel2, are involved in 18S NRD in distinct pathways. Overproduction of Hel2 or Rsp5 significantly increased the polyubiquitinated form of uS3 at K212 in WT cells (Figure 4B, lanes 3 and 4) but not in *mag2Δ* mutant cells (Figure 4B, lanes 7 and 8), confirming that Rsp5 is also involved in the polyubiquitination of uS3 and that Rsp5-mediated polyubiquitination depends on Mag2-mediated monoubiquitination. We next determined the level of polyubiquitinated uS3 of the affinity-purified non-functional 80S ribosomes in the mutant cells. The mono- and polyubiquitinated forms of uS3 were eliminated in *mag2Δ* mutant cells (Figure 4C, lanes 2 and 6), indicating that Mag2-mediated monoubiquitination is required for the polyubiquitination of uS3 in 18S NRD. The polyubiquitinated form of uS3 was strongly reduced in *rsp5-DAmP* mutant cells (Figure 4C, lane 8), indicating that Rsp5 plays a

Figure 4. Both Hel2 and Rsp5 Form a K63-Linked Polyubiquitin Chain on the Monoubiquitinated uS3 by Mag2 *In Vitro*

(A) The E3 ligases Hel2 and Rsp5 are involved in 18S NRD in distinct pathways. The stability of 18S:A1492C rRNA in the indicated mutant cells was determined as described in Figure 1B.

(B) Overproduction of Rsp5 increases the levels of Mag2-dependent polyubiquitination of uS3 *in vivo*.

(C) Rsp5 and Hel2 are involved in polyubiquitination of monoubiquitinated uS3 of the non-functional 80S ribosome with 18S:A1492C rRNA. The non-functional 80S ribosomes were purified as described in Figure 1F.

(D–H) *In vitro* ubiquitination assay.

(D) The *in vitro* ubiquitination reaction recapitulates Hel2- or Rsp5-mediated polyubiquitination of the monoubiquitinated uS3. The reaction samples contained the indicated purified E3 ligase Mag2, Hel2-FLAG, Rsp5, the E2 enzyme Ubc4, E1, Ubiquitin (Ub), and substrate uS3-3HA ribosome purified from *ubc4ΔuS3-3HA* cells.

(E) Hel2 and Rsp5 polyubiquitinates monoubiquitinated uS3 at the K212 residue.

(F) The K212 and K223 residues of uS3 are polyubiquitination sites for Rsp5-mediated Mag2-dependent or -independent polyubiquitination.

(G and H) Hel2 and Rsp5 form a K63-linked polyubiquitin chain on Mag2-mediated monoubiquitinated uS3 at K212. The K63(1) ubiquitin mutant with a single Lys 63rd residue was used to determine the polyubiquitin linkage specificity with the substrate uS3-3HA ribosomes (G) or uS3-K223R-3HA ribosome (H).

(I) Rsp5-mediated uS3 ubiquitination at the K223 residue is dispensable for 18S NRD. The stability of 18S:A1492C rRNA in the indicated mutant cells was determined as described in Figure 1B.

(J) Sequential ubiquitination of uS3 at K212 is required for 18S NRD. The ribosome with the non-functional 40S subunit with mutation in the decoding center is subjected to Mag2-mediated monoubiquitination of uS3 at the Lys 212 residue, followed by Hel2- and Rsp5-dependent K63-linked polyubiquitin chain formation on the monoubiquitinated uS3.

crucial role in polyubiquitination of uS3 on the non-functional 80S ribosome.

To reveal the mechanism of sequential ubiquitination of uS3 in the non-functional 80S ribosome by the E3 ligase Mag2 and the E4 enzymes Hel2 and Rsp5, we reconstituted Mag2-mediated polyubiquitination of uS3 with an *in vitro* ubiquitination assay with Mag2, Hel2-FLAG, Rsp5, Ubc4, uS3-3HA-tagged ribosomes, E1, and ATP (Figure 4D). Hel2 polyubiquitinated uS3 in a Mag2-mediated monoubiquitination-dependent manner (Figure 4D, lanes 2 and 5). In contrast, Rsp5 still ubiquitinated uS3 on ribosomes purified from *uS3-3HAubc4Δ* mutant cells *in vitro* even in the absence of Mag2 (Figure 4D, lane 3). Noticeably, in the presence of Mag2, additional ubiquitinated products were detected in comparison with the absence of Mag2 (Figure 4D, lanes 3 and 6), and those are almost the same as the polyubiquitinated products in the presence of Mag2 and Hel2 (Figure 4D, lanes 5 and 6). Given that Hel2 forms a polyubiquitin chain on uS3 at K212 dependent on Mag2-mediated monoubiquitination (Figure 3C), one possibility is that Rsp5 forms a polyubiquitin chain on uS3 at K212 dependent on Mag2-mediated monoubiquitination and a polyubiquitin chain on uS3 at other lysine residues in the absence of Mag2. Indeed, the *in vitro* ubiquitination reaction with *uS3-K212R-3HA* mutant ribosomes revealed that Rsp5 forms a polyubiquitin chain on uS3 at lysine residues other than K212 in a Mag2-independent manner (Figure 4E, lanes 3 and 6). We revealed that the carboxyl-terminal 212–240 amino acid region of uS3 is required for Mag2-independent polyubiquitination of uS3 by Rsp5 (Figure S4A) and that K223 is the only lysine residue other than K212 in this region (Figure 1C). The mutational analysis of lysine residues in the region revealed that K223 of uS3 is the Rsp5-mediated polyubiquitination site in the absence of Mag2 (Figure 4F, lanes 5–7). Moreover, the polyubiquitinated uS3 products by Mag2 and Rsp5 with *uS3-K212R* mutant ribosomes (Figure 4F, lane 2) were the same as Mag2-independent Rsp5-mediated polyubiquitinated uS3 products with the uS3-WT or *uS3-K212R* mutant ribosomes (Figure 4F, lanes 5 and 6). Taken together, these results indicate that K223 of uS3 is responsible for Rsp5-mediated polyubiquitination without Mag2. We then performed an assay with the uS3-3HA ribosome purified from *uS3-3HAMag2Δ* (Figure 4G) or *uS3-K223R-3HA* (Figure 4H) and the WT ubiquitin or the ubiquitin mutants bearing a single 63rd lysine residue (K63(1)) for restriction of ubiquitin chain formation. The assay revealed that Hel2 or Rsp5-mediated polyubiquitination of the monoubiquitinated uS3 is mainly K63-linked (Figure 4G, lanes 4, 5, 8, and 9). The K63-linked polyubiquitinated uS3 products by Mag2 and Hel2 ligases with *uS3-K223R* mutant ribosomes (Figure 4H, lanes 2 and 4), were the same as the products by Mag2 and Rsp5 ligases (Figure 4H, lanes 3 and 5) in both the WT (Figure 4H, lanes 2 and 3) or K63(1) ubiquitin (Figure 4H, lanes 4 and 5). Taken together, we concluded that both Hel2 and Rsp5 form a K63-linked polyubiquitin chain on the monoubiquitinated uS3 at K212. Given that 18S NRD was not affected in *uS3-K223R* mutant cells (Figure 4I), we propose that 18S NRD requires Mag2-dependent monoubiquitination of uS3 at K212, followed by K63-linked polyubiquitination by Hel2 and Rsp5 (Figure 4J).

Polyubiquitination of uS3 at K212 Is Required for Subunit Dissociation in 18S NRD

To avoid the uneconomic decay of an intact 60S subunit in the stalled ribosome, subunit dissociation should be a prerequisite for the decay of a non-functional 40S subunit but not the 60S in 18S NRD. We next examined whether ubiquitination of uS3 is involved in dissociation of the stalled ribosome into the mutated 40S and the normal 60S subunits. 18S:A1492C rRNA was rapidly degraded in WT cells but stabilized in *xrn1Δ* mutant cells (Cole et al., 2009; Fujii et al., 2012). The level of 18S:A1492C rRNA was drastically decreased 2 h after inhibition of transcription in WT cells but only moderately in *xrn1Δ* mutant cells (Figure 5A), making the mutated 18S:A1492C detectable at a late stage of 18S NRD. We determined the distribution of 18S:WT or 18S:A1492C rRNAs in sucrose gradient fractions with cell extracts of WT or *xrn1Δ* mutant cells. Northern blot analysis of 18S:A1492C rRNA in the fractions revealed that 18S:A1492C rRNA was distributed mainly in the 80S fractions in WT cells (Figures S5A and 5B, left). In *xrn1Δ* cells, the level of 18S:A1492C rRNA in 40S fractions was increased 2 h after inhibition of transcription (Figure 5B, bottom right). In contrast, the 18S:WT rRNA mainly remained in 80S fractions in WT and *xrn1Δ* mutant cells even 2 h after inhibition of transcription (Figure S5B). This strongly suggests that the non-functional 80S ribosome is dissociated into 40S and 60S subunits and that Xrn1 rapidly degrades the 18S:A1492C rRNA of the 40S subunit in WT cells. We also assumed that the 18S:A1492C rRNA might be accumulated in the 80S fraction when the dissociation of the non-functional 80S ribosome into subunits of the mutation or deletion of specific 18S NRD factors is impaired.

To address the role of ubiquitination of uS3 in subunit dissociation, we examined whether 18S:A1492C rRNA remains in the 80S fractions in *uS3-K212Rxrn1Δ* mutant cells. 18S:A1492C rRNA was mainly distributed in 80S fractions in the *uS3-K212Rxrn1Δ* mutant (Figure 5C, bottom right) but in 40S fractions in the *uS3-WTxrn1Δ* mutant 2 h after the inhibition of transcription (Figure 5C, bottom left). We also confirmed that 18S:A1492C rRNA was mainly distributed in 80S fractions 2 h after inhibition of transcription in *mag2Δxrn1Δ* mutant cells, leading to the conclusion that subunit dissociation of the non-functional 80S ribosome depends on the ubiquitination of uS3 at K212 by Mag2 (Figure 5D, bottom). Based on these results, we propose that the non-functional 80S ribosome is stalled by the decoding failure and ubiquitinated at K212 of uS3. Subsequently, the aberrant 80S ribosome with the ubiquitinated uS3 is dissociated into subunits, and the mutated 40S subunit is degraded in an Xrn1-dependent manner.

Asc1 and Dom34 Are Required for Subunit Dissociation in 18S NRD

We next investigated the precise roles of Dom34 and Asc1 in 18S NRD. 18S:A1492C rRNA was significantly more stable in *dom34Δ* ($t_{1/2} = 2.96$ h; Figure 6A) or *asc1Δ* ($t_{1/2} = 2.44$ h; Figure 6A) cells than in WT cells ($t_{1/2} = 0.5$ h; Figure 1A). We investigated the role of Dom34 and Asc1 in the ubiquitination of uS3 at K212. Mainly, uS3 monoubiquitination of the non-functional 80S ribosome was strongly diminished in *asc1Δ* mutant cells (Figure 6B, lane 7), indicating that ASC1 facilitates

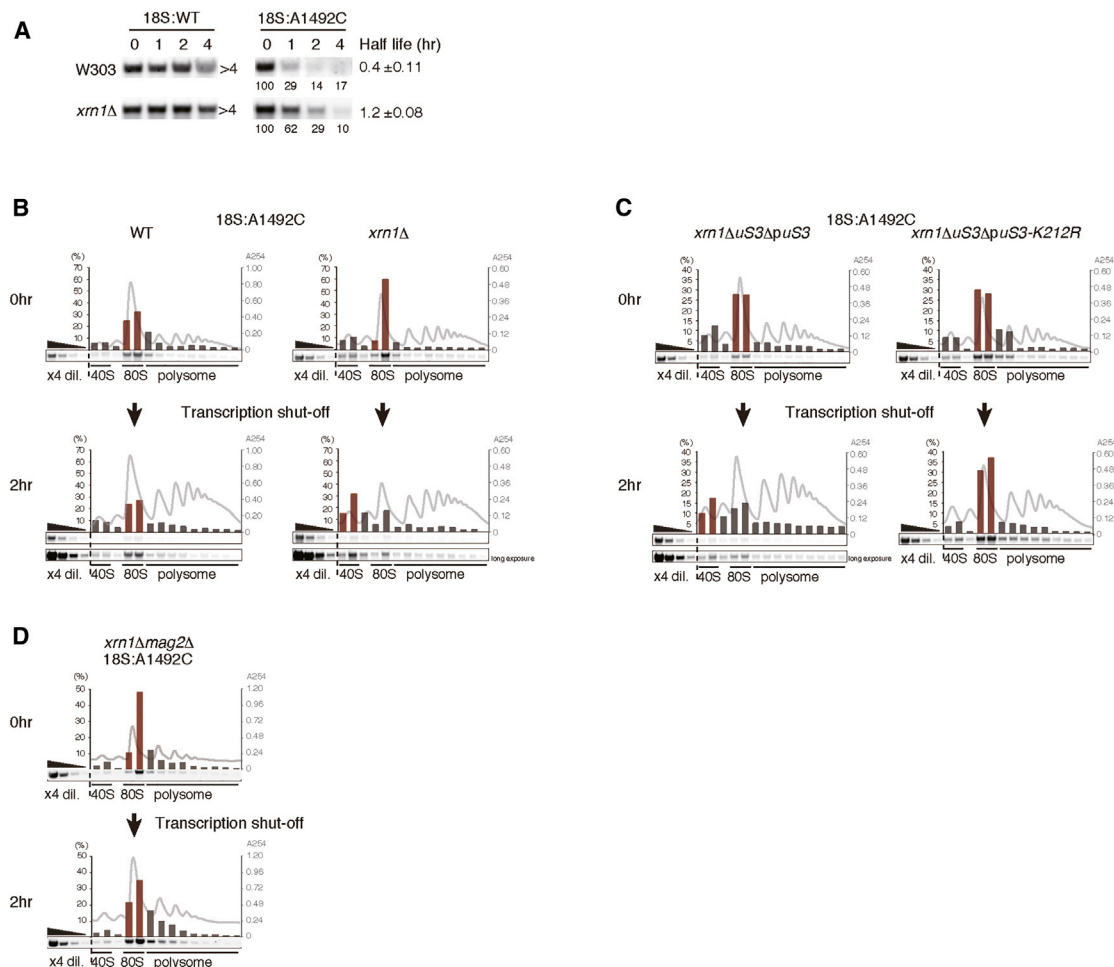


Figure 5. Ubiquitination of uS3 Is Required for Dissociation of Non-functional 80S Ribosomes into Subunits

(A) Xrn1 is involved in 18S NRD. The stability of 18S:WT or 18S:A1492C rRNA in the indicated strains was determined as described in Figure 1B. (B) W303 or *xrn1Δ* cells harboring a plasmid expressing 18S:A1492C rRNAs by the *GAL7* promoter were grown to optical density 600 (OD_{600}) = 0.3 and resuspended in medium containing 2% glucose to inhibit transcription from the *GAL7* promoter. Cells were harvested 2 h after addition of glucose, and cell extracts were subjected to centrifugation in sucrose density gradients. The levels of 18S:A1492C rRNAs in fractions were quantified by northern blot analysis with a digoxigenin (DIG)-labeled probe for the tag sequence. (C) Ubiquitination of uS3 at K212 is required for subunit dissociation of the non-functional 80S ribosome. The lysates of the indicated cells expressing 18S:A1492C rRNAs were analyzed as described in (B). (D) Mag2 is required for subunit dissociation of the non-functional 80S ribosome. The lysates of *mag2Δxrn1Δ* cells expressing 18S:A1492C rRNAs were analyzed as described in (B).

monoubiquitination on uS3. To further clarify the function of Asc1 in uS3 ubiquitination, we performed an *in vitro* ubiquitination assay with ribosomes purified from *mag2Δ* or *mag2Δasc1Δ* mutant cells. The efficiency of monoubiquitination on uS3 in the *mag2Δasc1Δ* ribosome by Mag2 was decreased compared with that of *mag2Δ* ribosomes (Figure 6C). These results indicate that Asc1 is required for efficient monoubiquitination on uS3 of the non-functional 80S ribosome and, hence, may contribute to monoubiquitination-dependent polyubiquitination by Hel2 and Rsp5. 18S:A1492C rRNA was stabilized and distributed in 80S fractions but not accumulated in 40S fractions in *asc1Δxrn1Δ* mutant cells 2 h after inhibition of transcription (Figure 6D, bottom left). This is consistent with results showing that

subunit dissociation was impaired in the *uS3-K212Rxn1Δ* mutant and strongly supports that Mag2-dependent ubiquitination of uS3 is required for dissociation of the non-functional 80S ribosome into the 40S and 60S subunits.

We then examined the role of Dom34 in the ubiquitination of uS3 and subunit dissociation. The level of the ubiquitinated uS3 of the affinity-purified mutant 80S ribosome with 18S:A1492C rRNA was almost the same as that of the *dom34Δ* mutant cells (Figure 6B, lanes 6 and 8). 18S:A1492C rRNA was stabilized and mainly distributed in 80S fractions but not accumulated in 40S fractions in the *dom34Δxrn1Δ* mutant cells 2 h after inhibition of transcription (Figure 6D, bottom right). These results imply that Dom34 is required for subunit

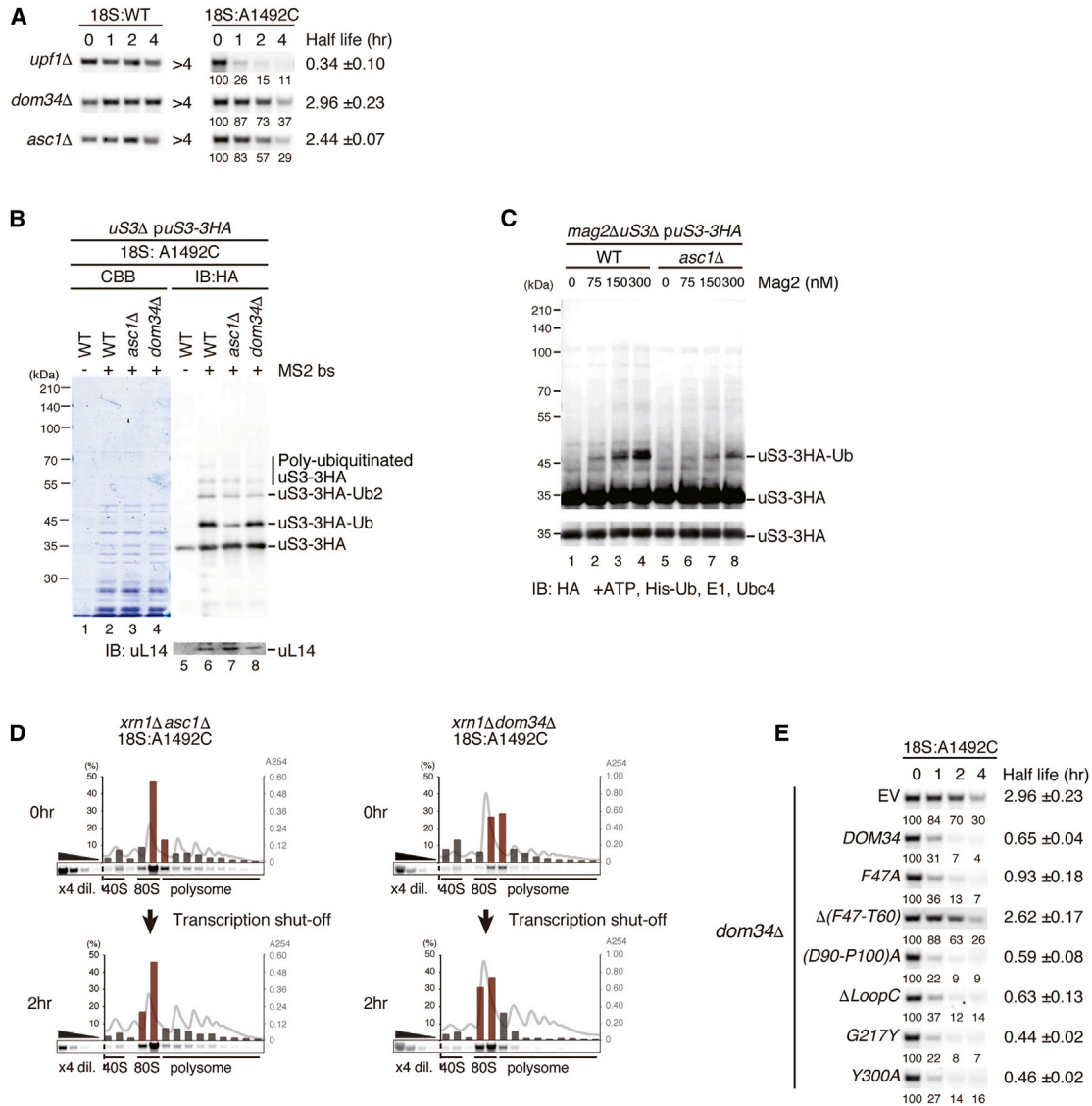


Figure 6. Distinct Roles of Asc1 and Dom34 in Ubiquitination of uS3 and Dissociation of Non-functional 80S Ribosomes into Subunits

(A) Asc1 and Dom34 are involved in 18S NRD. The stability of 18S:A1492C rRNA in the indicated mutants was determined as described in Figure 1B.

(B) Asc1, but not Dom34, is required for uS3 monoubiquitination of non-functional ribosomes. The levels of ubiquitinated uS3 in affinity-purified ribosomes from the indicated strains were determined as described in Figure 1F.

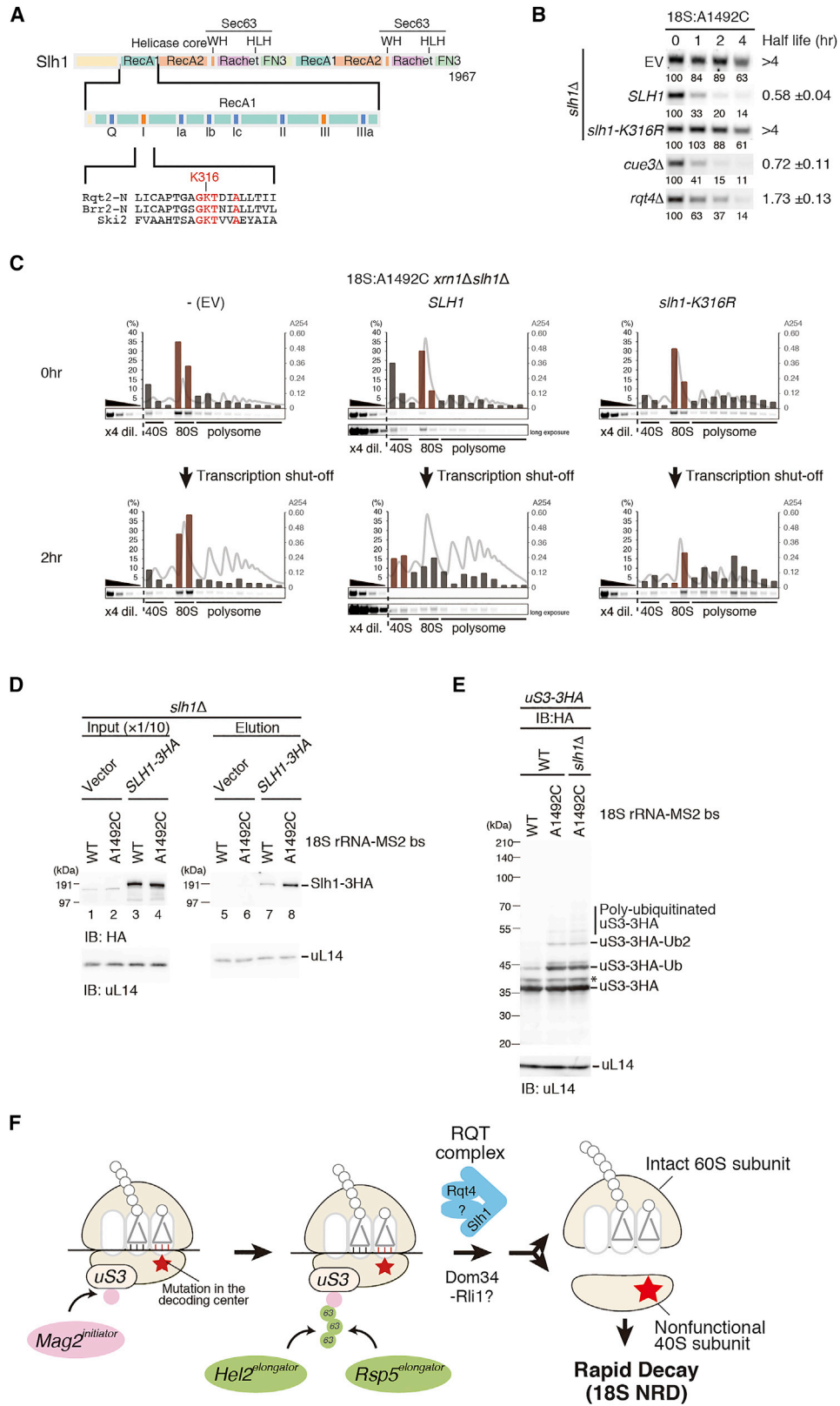
(C) Asc1 is required for efficient Mag2-mediated monoubiquitination of uS3 in the *in vitro* ubiquitination reaction.

(D) The levels of 18S:A1492C rRNAs in sucrose gradient fractions in *asc1Δxrn1Δ* or *dom34Δxrn1Δ* mutant cells were determined as described in Figure 5B.

(E) The stability of 18S:A1492C rRNA in the indicated Dom34 mutants was determined as described in Figure 1B.

dissociation in 18S NRD without playing a role in uS3 ubiquitination. We suspect that Dom34 contributes to dissociation of the stalled 80S ribosomes into subunits after ubiquitination of uS3, or it could play a role independent of ubiquitination. It has been reported that Dom34 is also required for dissociation of the stalled ribosome at the 3' end of nonstop mRNA and that it plays a crucial role in NSD (Chen et al., 2010; Tsuboi et al., 2012). Both the Dom34-F47A and Dom34-Δ(F47-T60) mutants were defective in dissociation of the stalled ribosome at the 3' end of nonstop mRNA that is required for NSD (Tsuboi et al., 2012). To see whether the activity of Dom34 that is essential for subunit

dissociation at the 3' end of mRNA is also required for 18S NRD, we determined the stability of the 18S:A1492C rRNA in these *dom34* mutants. The 18S:A1492C rRNA was drastically stabilized in Dom34-Δ(F47-T60) mutant cells ($t_{1/2} = 2.62$ h) but only moderately stabilized in Dom34-F47A mutant cells ($t_{1/2} = 0.93$ h; Figure 6E), indicating that the defect of 18S NRD in *dom34* mutants is not due to the defect in NSD. Moreover, although NSD was completely abolished in the absence of Dom34, 18S NRD seems to be less sensitive to this factor. We propose that Dom34-Hbs1 is involved in dissociation of stalled non-functional ribosomes during translation elongation in a



(legend on next page)

manner distinct from its roles in releasing ribosomes stalled at the 3' end of nonstop mRNA.

ATPase Activity of Slh1 Is Required for Subunit Dissociation in 18S NRD

Because it is unnecessary to eliminate the 60S subunit of the non-functional ribosome with a mutation in the 40S subunit, subunit dissociation is proposed to be an essential step for 18S NRD. Subunit dissociation is also required for RQC, where the RQT complex, especially the ATPase activity of Slh1, is crucial for the subsequent events. (Figure 7A). We proposed that the RQT complex targets the ribosomes, which are ubiquitinated at uS10, and facilitates dissociation of the stalled ribosome into subunits (Matsuo et al., 2017). Because ubiquitination of ribosomal protein is also essential in 18S NRD, we investigated the roles of the components of the RQT complex in 18S NRD. We determined the stability of 18S:A1492C rRNA in *rqt* mutant cells (Figure 7B). 18S:A1492C rRNA was drastically stabilized in *slh1/rqt2Δ* ($t_{1/2} > 4$ h) and *slh1/rqt2-K316R* mutant cells ($t_{1/2} > 4$ h), indicating that ATPase activity of Slh1 is essential for 18S NRD. 18S:A1492C rRNA was also significantly stabilized in *rqt4Δ* mutant cells ($t_{1/2} = 1.73$ h) and only moderately stabilized in *rqt3Δ* mutant cells ($t_{1/2} = 0.72$ h), suggesting that Slh1–Rqt4 also play a crucial role in 18S NRD. We then investigated the role of Slh1 in dissociation of the stalled ribosome in 18S NRD. 18S:A1492C rRNA was mainly distributed in the 80S fractions but not the 40S fractions in *slh1/rqt2Δxrn1Δ* mutant cells 2 h after inhibition of transcription (Figure 7C, bottom left). This phenotype was complemented by WT *SLH1/RQT2* (Figure 7C, bottom center) but not by *slh1/rqt2-K316R* (Figure 7C, bottom right). These results indicate that the ATPase activity of Slh1 is required for dissociation of the non-functional 80S ribosome into 40S and 60S subunits.

In RQC, the RQT complex is associated with the stalled ribosome bound to the E3 ligase Hel2 which is crucial for RQC (Matsuo et al., 2017). Therefore, we examined whether Slh1 is also associated with the non-functional MS2-tagged 80S ribosomes that are affinity-purified with FLAG-tagged MS2 coat protein (Figure 7D). Slh1 was co-purified with MS2-tagged 80S ribosomes containing 18S:A1492C rRNA more efficiently than with ribosomes containing 18S:WT rRNA (Figure 7D, lanes 7 and 8), indicating that Slh1 is recruited to the non-functional 80S ribosome with the mutation in the decoding center. Because the results in this study demonstrate that ubiquitination of uS3 at K212 is required for subunit dissociation, one possibility is that Slh1 is involved in uS3 ubiquitination and, therefore, crucial for 18S NRD. To address this possibility, we investigated the role

of Slh1 in the ubiquitination of uS3. The level of ubiquitinated uS3 of the non-functional 80S ribosomes was not affected in *slh1/rqt2Δ* mutant cells (Figure 7E), indicating that Slh1 is not required for the ubiquitination of uS3. Taken together, we propose that the ATPase activity of Slh1 is required for the dissociation of stalled 80S ribosomes into subunits after ubiquitination of uS3 (Figure 7F).

DISCUSSION

Quality controls for aberrant mRNAs prevent the production of potentially harmful protein products by repressing translation and promoting protein and mRNA degradation (Brandman and Hegde, 2016; Lykke-Andersen and Bennett, 2014; Pechmann et al., 2013; Schoenberg and Maquat, 2012; Shao and Hegde, 2016). Recent studies have demonstrated that the ubiquitination of specific ribosomal proteins plays a crucial role in RQC (Juzkiewicz and Hegde, 2017; Matsuo et al., 2017; Sundaramoorthy et al., 2017). In yeast, the ubiquitination of uS10 at the K6 and/or K8 residues is essential for RQC (Matsuo et al., 2017). Cells also specifically recognize ribosomes that are functionally deficient and target them for clearance. In this study, we demonstrated the essential function of ribosome ubiquitination in 18S NRD, the decay pathway of non-functional 18S rRNA. uS3 ubiquitination at K212 is critical for 18S NRD, indicating conserved roles of ribosome ubiquitination in the two quality controls induced by ribosome stalling. In RQC, an E3 ligase, Hel2, in concert with an E2 enzyme, Ubc4, is solely responsible for the ubiquitination of uS10 in yeast (Ikeuchi et al., 2019; Matsuo et al., 2017). On the other hand, in 18S NRD, Mag2-dependent monoubiquitination of uS3 at K212 is required for 18S NRD (Figures 1 and 2). We also identified the Hel2 and Rsp5 ligases, which are involved in K63-linked polyubiquitination of monoubiquitinated uS3 at K212 and revealed essential roles of Hel2 and Rsp5 in 18S NRD (Figures 3 and 4). Although Rsp5 potentially polyubiquitinates K223 of uS3 in a Mag2-independent manner (Figures 4D–4F), 18S NRD was not disturbed in *uS3-K223R* mutant cells (Figure 4I). We conclude that Rsp5 facilitates degradation of non-functional 18S:A1492C via formation of a K63-linked polyubiquitin chain of monoubiquitinated uS3 at K212 in a Mag2-dependent manner. Further, although the polyubiquitinated form of uS3 was significantly diminished in *rsp5-DAmP* mutant cells (Figure 4C), polyubiquitination was not completely abolished. Because uS3 ubiquitination is a complicated multi-step event, we could not exclude the possibility that an additional E3 ligase may be involved in polyubiquitination of uS3 for degradation of the non-functional 18S rRNA, and further study

Figure 7. ATPase Activity of Slh1 Is Required for Subunit Dissociation in 18S NRD

- (A) Schematic drawing of the domain structure of Slh1 (Rqt2). The conserved motif of the Ski2-like RNA helicase is indicated in red.
 (B) Slh1 and Rqt4 are involved in 18S NRD. The stability of 18S:A1492C rRNAs in the indicated *rqt* mutants was determined as in Figure 1B.
 (C) Slh1 is required for subunit dissociation of the non-functional 80S ribosome. The levels of 18S:A1492C rRNAs in sucrose gradient fractions in the indicated cells were determined as described in Figure 5B.
 (D) The efficient association of Slh1 with the non-functional 80S ribosome. The levels of Slh1-3HA co-purified with MS2-tagged 80S ribosomes were determined by western blot analysis.
 (E) Slh1 is dispensable for uS3 ubiquitination of non-functional 80S ribosomes. The levels of ubiquitinated uS3 of affinity-purified 80S ribosomes from the indicated strains were determined by western blot analysis as described in Figure 1F.
 (F) The proposed model for 18S NRD.

would be necessary to investigate whether the two E4 enzymes, Hel2 and Rsp5, are sufficient for polyubiquitination of monoubiquitinated uS3 in 18S NRD. We also noticed that the WT uS3 ribosome is substantially ubiquitinated (Figures S1A, 1H, and 1I). Several studies have reported that monoubiquitination of mammalian uS3 is required for cell viability under stress conditions such as UV exposure and amino acid starvation (Higgins et al., 2015; Jung et al., 2017). In yeast, uS3 has been reported to be ubiquitinated in response to ribosome stalling with cycloheximide treatment (Simms et al., 2017). Therefore, we reasoned that substantial uS3 ubiquitination might be crucial for a rapid stress response under various conditions. How Mag2, the master regulator of uS3 monoubiquitination, as well as Hel2 and Rsp5 participate in this natural ubiquitination event remains to be elucidated.

It has been proposed that subunit dissociation is a prerequisite for decay of the non-functional 40S subunit in 18S NRD to avoid uneconomic decay of the 60S subunit in the stalled ribosome (Cole et al., 2009; LaRiviere et al., 2006; Limoncelli et al., 2017). To monitor dissociation of the aberrant 80S ribosome into subunits, we determined the distribution of 18S:A1492C rRNA before degradation in *xrn1Δ* mutant cells. 18S:A1492C rRNA was accumulated in 40S fractions after inhibition of transcription in *xrn1Δ* mutant cells (Figure 5A), implying that aberrant 80S ribosomes are dissociated into subunits and that Xrn1 rapidly degrades the 18S:A1492C rRNA of the 40S subunit. Ubiquitination of uS3 at K212 is required for subunit dissociation in 18S NRD (Figure 5C), indicating that ribosome ubiquitination plays an essential role in the early stage of this quality control pathway. Moreover, we have proposed that the RQT complex is responsible for subunit dissociation of the stalled ribosome in RQC (Matsuo et al., 2017). In this study, our results demonstrate that the ATPase activity of Slh1 is required for subunit dissociation of the stalled 80S ribosomes after ubiquitination of uS3 but dispensable for Mag2-dependent ubiquitination of uS3 (Figure 7). Based on these results, we propose that the ATPase activity of Slh1 is commonly required for subunit dissociation of stalled 80S ribosomes after ubiquitination of specific ribosomal proteins in quality control pathways. However, the ubiquitin-binding activity of Rqt3, which is involved in RQC (Matsuo et al., 2017), did not appear to be required for 18S NRD, suggesting that a putative ubiquitin-binding protein may be involved in 18S NRD in concert with Slh1.

18S NRD also requires Dom34 and a 40S subunit-associated protein, Asc1 (Cole et al., 2009; LaRiviere et al., 2006; Limoncelli et al., 2017), which also participate in NGD, an mRNA quality control system induced by stalled ribosomes (Chen et al., 2010; Doma and Parker, 2006; Ikeuchi and Inada, 2016; Kuroha et al., 2010; Tsuboi et al., 2012). In this study, we demonstrate that Asc1, but not Dom34, contributes to the ubiquitination of uS3 (Figure 6B). We propose that Asc1 facilitates stalling of the mutated 80S ribosome or recognition of the stalled ribosome by the E3 ligase(s). Interestingly, in the *asc1Δ* mutant, two quality controls, RQC and NGD, induced by the R(CGN)12 sequence, were severely impaired (Ikeuchi and Inada, 2016; Matsuda et al., 2012). It has also been reported that RACK1, the human homolog of Asc1, is involved in RQC via ribosome ubiquitination (Juszkiewicz and Hegde, 2017; Sundaramoorthy et al., 2017).

Moreover, our results indicate that Asc1 is involved in efficient monoubiquitination by Mag2 on uS3 and may contribute to monoubiquitin-dependent polyubiquitination by Hel2 and Rsp5. Notably, Asc1 directly interacts with uS3 via an antiparallel β sheet structure and clamps the C-terminal tail of uS3 (Figure 1C), suggesting that Asc1 seems to be required for efficient ubiquitination on the K212 residue located in the base of the C-terminal tail of uS3. This suggests that Asc1 may play a role in facilitating the recognition and ubiquitination of the stalled ribosome, possibly via interactions with the ubiquitination target(s) in quality controls, including 18S NRD.

Biochemical analyses have demonstrated that yeast Dom34-Hbs1 and its human homologs promote dissociation of the translation elongation complex into subunits, release of mRNA, and drop-off of peptidyl tRNA (Becker et al., 2012; Pisareva et al., 2011; Shao et al., 2013; Shoemaker et al., 2010; Shoemaker and Green, 2011). Dom34-Hbs1 promotes the degradation of nonstop mRNAs from their 3' ends by exosomes, and the 47th Phe in the domain N is crucial for dissociation of the stalled ribosome (Tsuboi et al., 2012). Cryo-EM analysis of the structure of Dom34 and Hbs1 bound to a yeast ribosome programmed with nonstop mRNA has demonstrated that the domain N of Dom34 is inserted into the upstream mRNA-binding groove via direct interactions with conserved nucleotides of 18S rRNA (Hilal et al., 2016), indicating that it senses the absence of mRNA at the A-site and part of the mRNA entry channel by direct competition. Our results show that Dom34 is required for rapid degradation of 18S:A1492C rRNA (Figure 6A) and subunit dissociation of the non-functional ribosome (Figure 6D) but not necessary for ubiquitination of uS3 (Figures 6B and 6C). We propose that Dom34 is required for 18S NRD in step(s) after or independent of uS3 ubiquitination. The mutations in the F47 residue of Dom34 eliminated NSD (Tsuboi et al., 2012) but not 18S NRD (Figure 6E), whereas the β -loop region was required for 18S NRD (Figure 6E). It has been reported that the β -loop region profoundly penetrates into the mRNA channel and mimics mRNA from the second nucleotide of the A-site codon to position +9 (Hilal et al., 2016). We propose that the β -loop acts as a mechanical sensor that competes with mRNA more efficiently in aberrant stalling ribosomes than in intact ribosomes, triggering 18S NRD. Knowing that, in NSD, Dom34 recruits Rli1 to dissociate the 80S ribosome into subunits, further experiments are required to investigate whether Dom34 binds to the A-site of the stalled non-functional 80S ribosomes and recruits Rli1 to dissociate them into subunits in 18S NRD. It also remains unclear how both Dom34 and Slh1 are involved in subunit dissociation. With the similarity of Slh1 to the spliceosomal RNA helicase Brr2 (Plaschka et al., 2017; Absmeier et al., 2016), it is possible that Slh1 modulates the structure of the stalled ribosome to be a substrate for Rli1-dependent subunit dissociation.

A question that remains is how the aberrant 18S rRNA is eventually degraded after subunit dissociation. In 25S NRD, a ribosome with a mutation in the peptidyl transferase center is ubiquitinated by Mms1-Rtt101, an E3 ligase complex. The Cdc48-Ufd1-Npl4 complex recognizes the ubiquitinated ribosome, dissociates it into the normal 40S and the aberrant 60S using the ATPase activity of the Cdc48 complex, and recruits the aberrant 60S to the proteasome. The proteasome removes the ribosomal proteins and the ribosome-associated proteins from

the aberrant 60S, allowing the specific RNase to access the mutated 25S rRNA. However, the degradation of mutant 18S rRNA in 18S NRD appears to be independent of the proteasome (Fuji et al., 2012). This could mean that the RNases, Xrn1, and the exosome could access the non-functional 18S rRNA without degradation of the protein components around it or that the ribosomal proteins in the dissociated 40S subunit could be degraded in a proteasome-independent manner; for example, via the vacuole degradation pathway. An intermediate of the mutant 18S rRNA was observed in the absence of Xrn1 (Cole et al., 2009), implying that the eventual degradation of 18S:A1492C might be a multi-step event where disassembly of the 40S subunit might be the rate-limiting step. Further study will reveal the fate of the protein components of the 40S subunit and whether they are degraded or disassembled for recycling.

Based on the results of this study, we propose a model for 18S NRD in comparison with RQC (Figure 7F). In RQC, Hel2 recognizes the rotated ribosomes, leading to ubiquitination of uS10 (Matsuo et al., 2017). Subsequently, the RQT complex targets the ubiquitinated ribosomes and dissociates them into subunits depending on the ATPase activity of Slh1 and the ubiquitin-binding activity of Rqt3. In 18S NRD, the E3 ligase(s) Mag2, Hel2, and Rsp5 may recognize the ribosome that is stalled by decoding failure and ubiquitinate uS3 at K212 in concert with the E2 enzyme Ubc4. The Slh1-Rqt4 complex facilitates subunit dissociation of the uS3-ubiquitinated ribosomes in an ATPase activity-dependent manner. Subsequently, the non-functional 40S subunit is subjected to Xrn1-dependent degradation. It remains to be determined whether the two quality controls are coupled, including whether Ltn1-dependent ubiquitination of peptidyl tRNA occurs on the dissociated 60S subunit in 18S NRD. Our study demonstrates conserved roles of ribosome ubiquitination and the ATPase activity of Slh1 in two quality controls induced by ribosome stalling. Ribosomes are stalled during translation elongation because of the translation of specific codon pairs or deleterious mutation in the rRNAs. The E3 ubiquitin ligase recognizes the ribosome that stalled in a specific state and ubiquitinates specific residues of ribosomal proteins. Slh1 and its associated factors dissociate the ubiquitinated ribosome into subunits depending on the ATPase activity of Slh1. Given that the unfolded protein response triggers site-specific ubiquitination of 40S ribosomal proteins (Higgins et al., 2015), further experiments will uncover the roles of ribosome ubiquitination in the determination of the fates of translating ribosomes and translational control in response to stresses and environmental changes.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
- METHOD DETAILS
 - Yeast Strains
 - Plasmids
 - Yeast Culture and Media

- RNA Isolation for determination of rRNA stability
- RNA Electrophoresis and Northern Blotting for determination of rRNA stability
- Total Protein Sample Preparation for SDS-PAGE and Western Blotting
- MS2-tagged RNA affinity purification (MS2-TRAP)
- Protein Purification

● QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information can be found with this article online at <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.067>.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Y. Saeki and Dr. K. Tanaka for critical strains. This study was supported by a grant-in-aid for scientific research (KAKENHI) from the Japan Society for the Promotion of Science (grants 26116003 and 18H03977 to T.I.) and by research grants from the Kato Memorial Bioscience Foundation (to Y.M.).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Genetic and biochemical experiments were performed by T.S., S.L., M.K., A.I., K.I., and Y.M. under the supervision of T.I. T.I. primarily conceived the idea, designed the experiments, and wrote the manuscript.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

Received: September 10, 2018

Revised: January 13, 2019

Accepted: February 18, 2019

Published: March 19, 2019

REFERENCES

- Absmeier, E., Santos, K.F., and Wahl, M.C. (2016). Functions and regulation of the Brr2 RNA helicase during splicing. *Cell Cycle* 15, 3362–3377.
- Becker, T., Franckenberg, S., Wickles, S., Shoemaker, C.J., Anger, A.M., Armache, J.P., Sieber, H., Ungewickell, C., Berninghausen, O., Daberkow, I., et al. (2012). Structural basis of highly conserved ribosome recycling in eukaryotes and archaea. *Nature* 482, 501–506.
- Bengtson, M.H., and Joazeiro, C.A. (2010). Role of a ribosome-associated E3 ubiquitin ligase in protein quality control. *Nature* 467, 470–473.
- Brandman, O., and Hegde, R.S. (2016). Ribosome-associated protein quality control. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23, 7–15.
- Brandman, O., Stewart-Ornstein, J., Wong, D., Larson, A., Williams, C.C., Li, G.W., Zhou, S., King, D., Shen, P.S., Weibezahn, J., et al. (2012). A ribosome-bound quality control complex triggers degradation of nascent peptides and signals translation stress. *Cell* 151, 1042–1054.
- Chen, L., Muhrad, D., Hauryliuk, V., Cheng, Z., Lim, M.K., Shyp, V., Parker, R., and Song, H. (2010). Structure of the Dom34-Hbs1 complex and implications for no-go decay. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 1233–1240.
- Cole, S.E., LaRiviere, F.J., Merrikh, C.N., and Moore, M.J. (2009). A convergence of rRNA and mRNA quality control pathways revealed by mechanistic analysis of nonfunctional rRNA decay. *Mol. Cell* 34, 440–450.
- Defenouillere, Q., Yao, Y., Mouaikel, J., Namane, A., Galopier, A., Decourty, L., Doyen, A., Malabat, C., Saveanu, C., Jacquier, A., and Fromont-Racine, M. (2013). Cdc48-associated complex bound to 60S particles is required for the clearance of aberrant translation products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 5046–5051.

- Doma, M.K., and Parker, R. (2006). Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature* **440**, 561–564.
- Fujii, K., Kitabatake, M., Sakata, T., Miyata, A., and Ohno, M. (2009). A role for ubiquitin in the clearance of nonfunctional rRNAs. *Genes Dev.* **23**, 963–974.
- Fujii, K., Kitabatake, M., Sakata, T., and Ohno, M. (2012). 40S subunit dissociation and proteasome-dependent RNA degradation in nonfunctional 25S rRNA decay. *EMBO J.* **31**, 2579–2589.
- Higgins, R., Gendron, J.M., Rising, L., Mak, R., Webb, K., Kaiser, S.E., Zuzow, N., Riviere, P., Yang, B., Fenech, E., et al. (2015). The Unfolded Protein Response Triggers Site-Specific Regulatory Ubiquitylation of 40S Ribosomal Proteins. *Mol. Cell* **59**, 35–49.
- Hilal, T., and Spahn, C.M. (2015). Ribosome rescue and protein quality control in concert. *Mol. Cell* **57**, 389–390.
- Hilal, T., Yamamoto, H., Loerke, J., Bürger, J., Mielke, T., and Spahn, C.M. (2016). Structural insights into ribosomal rescue by Dom34 and Hbs1 at near-atomic resolution. *Nat. Commun.* **7**, 13521.
- Ikeuchi, K., and Inada, T. (2016). Ribosome-associated Asc1/RACK1 is required for endonucleolytic cleavage induced by stalled ribosome at the 3' end of nonstop mRNA. *Sci. Rep.* **6**, 28234.
- Ikeuchi, K., Tesina, P., Matsuo, Y., Sugiyama, T., Cheng, J., Saeki, Y., Tanaka, K., Becker, T., Beckmann, R., and Inada, T. (2019). Collided ribosomes form a unique structural interface to induce Hel2-driven quality control pathways. *EMBO J.* Published online January 4, 2019. <https://doi.org/10.15252/emboj.2018100276>.
- Inada, T., Winstall, E., Tarun, S.Z., Yates, J.R., 3rd, Schieltz, D., and Sachs, A.B. (2002). One-step affinity purification of the yeast ribosome and its associated proteins and mRNAs. *RNA* **8**, 948–958.
- Janke, C., Magiera, M.M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E., et al. (2004). A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* **21**, 947–962.
- Jung, Y., Kim, H.D., Yang, H.W., Kim, H.J., Jang, C.Y., and Kim, J. (2017). Modulating cellular balance of Rps3 mono-ubiquitination by both Hel2 E3 ligase and Ubp3 deubiquitinase regulates protein quality control. *Exp. Mol. Med.* **49**, e390.
- Juszkiewicz, S., and Hegde, R.S. (2017). Initiation of Quality Control during Poly(A) Translation Requires Site-Specific Ribosome Ubiquitination. *Mol. Cell* **65**, 743–750.e4.
- Juszkiewicz, S., Chandrasekaran, V., Lin, Z., Kraatz, S., Ramakrishnan, V., and Hegde, R.S. (2018). ZNF598 Is a Quality Control Sensor of Collided Ribosomes. *Mol. Cell* **72**, 469–481.e467.
- Kraft, C., and Peter, M. (2008). Is the Rsp5 ubiquitin ligase involved in the regulation of ribophagy? *Autophagy* **4**, 838–840.
- Kuroha, K., Akamatsu, M., Dimitrova, L., Ito, T., Kato, Y., Shirahige, K., and Inada, T. (2010). Receptor for activated C kinase 1 stimulates nascent polypeptide-dependent translation arrest. *EMBO Rep.* **11**, 956–961.
- Kwapisz, M., Cholbinski, P., Hopper, A.K., Rousset, J.P., and Zoladek, T. (2005). Rsp5 ubiquitin ligase modulates translation accuracy in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* **11**, 1710–1718.
- LaRiviere, F.J., Cole, S.E., Ferullo, D.J., and Moore, M.J. (2006). A late-acting quality control process for mature eukaryotic rRNAs. *Mol. Cell* **24**, 619–626.
- Limocelli, K.A., Merrih, C.N., and Moore, M.J. (2017). ASC1 and RPS3: new actors in 18S nonfunctional rRNA decay. *RNA* **23**, 1946–1960.
- Longtine, M.S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D.J., Shah, N.G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., and Pringle, J.R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 953–961.
- Lykke-Andersen, J., and Bennett, E.J. (2014). Protecting the proteome: Eukaryotic cotranslational quality control pathways. *J. Cell Biol.* **204**, 467–476.
- Lyumkis, D., Oliveira dos Passos, D., Tahara, E.B., Webb, K., Bennett, E.J., Vinterbo, S., Potter, C.S., Carragher, B., and Joazeiro, C.A. (2014). Structural basis for translational surveillance by the large ribosomal subunit-associated protein quality control complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 15981–15986.
- Matsuda, R., Ikeuchi, K., Nomura, S., and Inada, T. (2012). Protein quality control systems associated with No-Go and Non-Stop mRNA surveillance in yeast. *Genes Cells* **19**, 1–12.
- Matsuo, Y., Ikeuchi, K., Saeki, Y., Iwasaki, S., Schmidt, C., Udagawa, T., Sato, F., Tsuchiya, H., Becker, T., Tanaka, K., et al. (2017). Ubiquitination of stalled ribosome triggers ribosome-associated quality control. *Nat. Commun.* **8**, 159.
- Pechmann, S., Willmund, F., and Frydman, J. (2013). The ribosome as a hub for protein quality control. *Mol. Cell* **49**, 411–421.
- Pisareva, V.P., Skabkin, M.A., Hellen, C.U., Pestova, T.V., and Pisarev, A.V. (2011). Dissociation by Pelota, Hbs1 and ABCE1 of mammalian vacant 80S ribosomes and stalled elongation complexes. *EMBO J.* **30**, 1804–1817.
- Plaschka, C., Lin, P.C., and Nagai, K. (2017). Structure of a pre-catalytic spliceosome. *Nature* **546**, 617–621.
- Sakata, T., Fujii, K., Ohno, M., and Kitabatake, M. (2015). Crt10 directs the cullin-E3 ligase Rtt101 to nonfunctional 25S rRNA decay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **457**, 90–94.
- Samanta, M.P., and Liang, S. (2003). Predicting protein functions from redundancies in large-scale protein interaction networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 12579–12583.
- Schoenberg, D.R., and Maquat, L.E. (2012). Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 246–259.
- Schuldiner, M., Collins, S.R., Thompson, N.J., Denic, V., Bhamidipati, A., Punna, T., Ihmels, J., Andrews, B., Boone, C., Greenblatt, J.F., et al. (2005). Exploration of the function and organization of the yeast early secretory pathway through an epistatic miniarray profile. *Cell* **123**, 507–519.
- Shao, S., and Hegde, R.S. (2014). Reconstitution of a minimal ribosome-associated ubiquitination pathway with purified factors. *Mol. Cell* **55**, 880–890.
- Shao, S., and Hegde, R.S. (2016). Target Selection during Protein Quality Control. *Trends Biochem. Sci.* **41**, 124–137.
- Shao, S., von der Malsburg, K., and Hegde, R.S. (2013). Listerin-dependent nascent protein ubiquitination relies on ribosome subunit dissociation. *Mol. Cell* **50**, 637–648.
- Shcherbik, N., and Pestov, D.G. (2011). The ubiquitin ligase Rsp5 is required for ribosome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* **17**, 1422–1428.
- Shen, P.S., Park, J., Qin, Y., Li, X., Parsawar, K., Larson, M.H., Cox, J., Cheng, Y., Lambowitz, A.M., Weissman, J.S., et al. (2015). Protein synthesis. Rqc2p and 60S ribosomal subunits mediate mRNA-independent elongation of nascent chains. *Science* **347**, 75–78.
- Shoemaker, C.J., and Green, R. (2011). Kinetic analysis reveals the ordered coupling of translation termination and ribosome recycling in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, E1392–E1398.
- Shoemaker, C.J., and Green, R. (2012). Translation drives mRNA quality control. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 594–601.
- Shoemaker, C.J., Eylar, D.E., and Green, R. (2010). Dom34:Hbs1 promotes subunit dissociation and peptidyl-tRNA drop-off to initiate no-go decay. *Science* **330**, 369–372.
- Simms, C.L., Yan, L.L., and Zaher, H.S. (2017). Ribosome Collision Is Critical for Quality Control during No-Go Decay. *Mol. Cell* **68**, 361–373.e5.
- Sitron, C.S., Park, J.H., and Brandman, O. (2017). Asc1, Hel2, and Slh1 couple translation arrest to nascent chain degradation. *RNA* **23**, 798–810.
- Sundaramoorthy, E., Leonard, M., Mak, R., Liao, J., Fulzele, A., and Bennett, E.J. (2017). ZNF598 and RACK1 Regulate Mammalian Ribosome-Associated Quality Control Function by Mediating Regulatory 40S Ribosomal Ubiquitylation. *Mol. Cell* **65**, 751–760.e4.
- Swaney, D.L., Beltrao, P., Starita, L., Guo, A., Rush, J., Fields, S., Krogan, N.J., and Villén, J. (2013). Global analysis of phosphorylation and ubiquitylation cross-talk in protein degradation. *Nat. Methods* **10**, 676–682.
- Tsuboi, T., Kuroha, K., Kudo, K., Makino, S., Inoue, E., Kashima, I., and Inada, T. (2012). Dom34:hbs1 plays a general role in quality-control systems by dissociation of a stalled ribosome at the 3' end of aberrant mRNA. *Mol. Cell* **46**, 518–529.

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Anti-HA-Peroxidase	Roche	Cat# 12013819001, RRID:AB_390917
Anti-RpL23 (uL14) antibody	Abcam Bacterial and Virus Strains	Cat# ab112587, RRID:AB_10866400
Anti-FLAG M2 antibody	Sigma	Cat# F1804-1MG; RRID:AB_262044
Anti-Ubiquitin (P4D1) HRP	Santa Cruz Biotechnology	Cat# sc-8017; RRID:AB_628423
Anti-K48 Ubiquitin antibody	EMD Millipore	Cat# 05-1308; RRID:AB_10859893
Anti-K63 Ubiquitin antibody	Cell Signaling Technology	Cat# 8081; RRID:AB_1587580
ECL Anti-mouse IgG, horseradish Peroxidase	GE Healthcare	Cat# NA931V; RRID:AB_772210
ECL Anti-rabbit IgG, horseradish Peroxidase	GE Healthcare	Cat# NA934V; RRID:AB_772206
Anti-eEF2		N/A
Bacterial and Virus Strains		
<i>E. coli</i> . Rosetta-gami 2(DE3)	Novagen	Cat# 71351
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
G-418 Sulfate	Wako	Cat# 074-05963
Hygromycin B	Wako	Cat# 085-06153
LEXSY-NTC, Nourseothricin	JenaBioScience	Cat# AB-101S
cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Roche	Cat# 11836170001
Anti DYKDDDDK tag, Antibody Beads	Wako	Cat# 016-22784
DYKDDDDK peptide	GenScript	N/A
Glutathione Sepharose™ 4B	GE Healthcare	Cat# 17-1756-05
PreScission Protease	GE Healthcare	Cat# 27084301
Ni-NTA agarose	QIAGEN	Cat# 1018240
RNase-It	Agilent	Cat# 400720-81
Creatine kinase	Roche	Cat# 10127566001
Creatine phosphate	Wako	Cat# 030-04584
His-ubiquitin	UBPBio	Cat# E1300
His-ubiquitin (K6R)	UBPBio	Cat# E1720
His-ubiquitin (K11R)	UBPBio	Cat# E1730
His-ubiquitin (K27R)	UBPBio	Cat# E1740
His-ubiquitin (K29R)	UBPBio	Cat# E1750
His-ubiquitin (K33R)	UBPBio	Cat# E1760
His-ubiquitin (K48R)	UBPBio	Cat# E1770
His-ubiquitin (K63R)	UBPBio	Cat# E1780
His-ubiquitin (K0)	UBPBio	Cat# E1710
His-ubiquitin (K63(1))	UBPBio	Cat# E1880
Human UBE1	UBPBio	Cat# B1100
Ubc4	This study	N/A
Mag2	This study	See Figure S2
HeI2-FLAG	This study	See Figure S2
Rsp5	This study	See Figure S2
Mag2-FLAG	This study	N/A
Mag2 ΔRING-FLAG	This study	N/A
Mag2 C195 and 198S-FLAG	This study	N/A

(Continued on next page)

Continued		
REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Critical Commercial Assays		
DIG Easy Hyb Granules	Roche	Cat# 11796895001
Blocking Reagent	Roche	Cat# 11096176001
Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments	Roche	Cat# 11093274910
PCR DIG Probe Synthesis Kit	Roche	Cat# 11636090910
CDP-Star	Roche	Cat# 11759051001
Experimental Models: Organisms/Strains		
<i>S. cerevisiae</i> : W303-1a (parental strain)	Lab stock	See Table S1
<i>S. cerevisiae</i> : BY4741 (Yeast KnockOut strain)		
<i>S. cerevisiae</i> : other strains	Lab stock and This study	See Table S1
Oligonucleotides		
PCR forward primer for insertion of <i>MS2</i> bs: 5'-CACTA TCGACTACGCGATCATGGCG-3'	This study	N/A
PCR reverse primer for insertion of <i>MS2</i> bs: 5'-TGATTT CTCGTAAGGTGCCGAGTGG-3'	This study	N/A
Forward oligonucleotide for <i>MS2</i> bs: 5'-CATCAAAGA GTCCGACTCGAACTTGGGTGATCCTCAAGTTTTCTT GAGTCGACCTGCAGACAAGGGTGATCCTCTTGTTA TCAGACATTGATTTTTATCTAATAAATAC-3'	This study	N/A
Reverse oligonucleotide for <i>MS2</i> bs: 5'-AAAAAATCAAT GTCTGATAACAAGAGGATCACCCCTTGTCTGCAGGTC GACTCAAGAAAAGTGGAGGATCACCCAAGTTCGAGT CGGACTCTTTGATGATTCATAATAAC-3'	This study	N/A
5' DIG-labeled <i>18S rDNA</i> -tag probe: 5'-CGAGGATTCA GGCTTTGG-3'	This study	N/A
5' DIG-labeled LNA <i>18S rDNA</i> -tag probe (LNA in lower cases): 5'-AGcGAGGATTcAGGCTTTGGtC-3'	This study	N/A
Recombinant DNA		
Yeast expression plasmids	Lab stock and This study	See Table S2
<i>E. coli</i> . expression plasmids for recombinant protein	Lab stock and This study	See Table S2
Software and Algorithms		
Multi Gauge version 3.0	Fujifilm	Fujifilm

CONTACT FOR REAGENT AND RESOURCE SHARING

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Prof. Toshifumi Inada (tinada@m.tohoku.ac.jp).

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

Saccharomyces cerevisiae strains used in this study were W303-1a (ATCC stock number, 208352; genotype: MATa ade2-1 ura3-1 his3-11 trp1-1 leu2-3 leu2-112 can1-100) and BY4741 (ATCC stock number, 201388; genotype: MATa his3delta1 leu2delta0 met15delta0 ura3delta0). The genotypes of the strains and their mutant derivatives are listed in [Table S1](#). Cells were grown in YP or synthetic complete (SC) medium at 30°C. The respective media contained either 2% glucose or 2% galactose.

METHOD DETAILS

Yeast Strains

Yeast strains W303-1a and its derivatives used in this study are listed in [Table S1](#). Yeast knock out library strains (BY4741) (Open Biosystems) used in E3 ligase screening are indicated in [Figure S2](#). Gene disruption strains and C-terminally 3xHA tagged strains were constructed by established homologous recombination strategies using PCR-amplified selection marker genes with cassette sequences (*kanMX4*, *hphMX4*, *natMX4*, *natNT2* or *HIS3MX6*) (Janke et al., 2004; Longtine et al., 1998). Used antibiotics for selection are G-418 Sulfate (# 074-05963, Wako), Hygromycin B (# 085-06153, Wako) and LEXSY-NTC, Nourseothricin (# AB-101S,

JenaBioScience). For analysis of essential ribosomal protein gene *uS3*, *uS3* mutant strains were constructed by plasmid shuffle. *uS3* gene in parent strain harboring a *uS3*-expressing plasmid with *URA3* selection marker gene, was disrupted by the PCR-based method using *kanMX4* cassette. Plasmids encoding *uS3* or *uS3* K212R mutant with *TRP1* selection marker gene were transformed into the *uS3Δ::kanMX4; URA3+* strain. *uS3Δ::kanMX4; uS3/TRP1+* and *uS3Δ::kanMX4; uS3 K212R/ TRP1+* strains that had lost the *URA3+* plasmid were selected on synthetic complete (SC) plates containing 0.5 mg/mL of 5-fluoroorotic acid (5-FOA) (#F9001-8, Zymo Research).

Plasmids

Plasmids used in this study are listed in [Table S2](#). DNA cloning was performed with PCR amplification by using gene specific primers and PrimeSTAR HS DNA polymerase (# BIO-21040/DM5, Takara-bio), and by using T4 DNA ligase (# M0202L, NEB). Plasmid encoding *uS3* point mutant and plasmids encoding 18S rRNA with MS2 binding site were constructed by site-directed mutagenesis by PCR using primer sets harboring the point mutation or the MS2 binding site sequence, respectively. All cloned DNAs amplified by PCR were verified by sequencing.

Yeast Culture and Media

All yeast cells were grown in YPD or synthetic complete (SC) medium with 2% glucose at 30°C, and harvested at log phase (OD600 of 0.5 ~0.8) by centrifugation and discarding medium, unless otherwise noted. For expression of plasmid-derived 18S rRNA in polysome analysis, half-life determination and MS2-TRAP, cells were grown in SC medium containing 2% galactose to introduce transcription from the *GAL7* promoter. For polysome analysis ([Figure 5H](#)), yeast cells harboring *pGAL7p-rDNA 18S-tag WT4* or *A1492C* were cultured in SC medium containing 2% galactose exponentially at 30°C until OD600 reaches 0.3, and 200 mL of the cell culture was harvested as 0 h sample. Another 200 mL of the culture was re-suspended in 200 mL pre-warmed SC medium containing 2% glucose to inhibit transcription from *GAL7* promoter, and continuously cultured at 30°C for 2 h. Cells were then harvested as 2 h sample. For half-life determination, cells harboring *pGAL7p-rDNA 18S-tag WT4* or *A1492C* were grown in SC medium containing 2% galactose until OD600 reaches 0.3. 10 mL of the culture was re-suspended in 15 mL of pre-warmed SC medium containing 2% glucose for inhibition of transcription from *GAL7* promoter. Cells were continuously cultured at 30°C, and 1.5 mL of the yeast cell culture was harvested at time points (0, 1, 2, 4 h) after transcription inhibition. For MS2-TRAP, cells harboring *pGAL7p-rDNA 18S-MS2 bs WT* or *A1492C* were cultured at 30°C in SC medium containing 2% galactose, and 300 mL of the culture was harvested at log phase (OD600 of 0.5 ~0.8) by centrifugation and discarding medium. All cell pellets were frozen in liquid nitrogen immediately after harvest and stored at -80°C until used.

RNA Isolation for determination of rRNA stability

Total RNA samples were used for Northern blotting shown in [Figures 1B, 2A, 2D, 4A, 4I, 5A, 6A, 6E, 7B, S1D, and S2A](#). Yeast cells expressing 18S-tag rRNA were harvested at time points (0, 1, 2, 4 h) after transcription shut-off. Total RNA solutions were prepared by acidic phenol RNA extraction method as follow. The cell pellet was re-suspended with 200 μL of RNA buffer (Tris-HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% SDS with DEPC-treated MilliQ water, room temperature) on ice, followed by immediate addition of 200 μL of water-saturated phenol and a 10 s vortex. The mixture was incubated at 65°C for 5 min, mixed by vortex for 10 s and chilled on ice for 5 min. After centrifugation at 16,000 x *g* for 5 min, room temperature, 200 μL of the water layer was transferred to a new 1.5 mL RNase free tube. 200 μL of water-saturated phenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1) was then added, followed by a 10 s vortex and a centrifugation at 16,000 x *g* for 5 min, room temperature. 180 μL of the water layer was pipetted into a new 1.5 mL RNase free tube and subjected to ethanol precipitation. The RNA pellet was finally dissolved with 30 μL of DEPC-treated water to gain total RNA solution.

RNA Electrophoresis and Northern Blotting for determination of rRNA stability

6 μL of total RNA solution was mixed with 24 μL of glyoxal mix (600 μL of DMSO, 200 μL of deionized 40% glyoxal, 120 μL of 10x MOPS buffer (200 mM MOPS, 50 mM NaOAc, 10 mM EDTA, pH 7.0), 62.5 μL of 80% glycerol and 17.5 μL of DEPC-treated water in 1 mL) and 3 μL of RNA loading buffer (50% glycerol, 10 mM EDTA pH 8.0, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol). The mixture was incubated at 74°C for 10 min and left to stand on ice for 10 min to obtain RNA samples. 25 μL of each sample was electrophoresed at 200 V for 40 min on a 1.2% agarose gel in 1 x MOPS buffer (20 mM MOPS, 5 mM NaOAc, 1 mM EDTA, pH 7.0), followed by transfer of RNA to Hybond-N⁺ membrane (GE healthcare) with 20 x SSC (3 M NaCl, 300 mM Trisodium citrate dihydrate) for 20 h using capillary system. RNA was cross-linked on the membrane by CL-1000 ultraviolet crosslinker (UVP) at 120 mJ/cm². The membrane was incubated with DIG Easy Hyb Granules (# 11796895001, Roche) for 1 h in a hybridization oven at 50°C. 5' end DIG-labeled 18S rDNA oligonucleotide (5'-CGAGGATTCAGGCTTTGG-3', in [Figures 1B, 2A, 6A, and 6E](#)) or DIG-labeled LNA 18S rDNA oligonucleotide (5'-AGcGAGGATTCAGGCTTTGtC-3', in [Figures 2D, 4A, 4I, 5A, 7B, S1D, and S2A](#)) for the Tag sequence (5'-AAAGCCT GAATCCTCG-3') was added and incubated for over 18 h. The membrane was washed with wash buffer I (2x SSC, 0.1% SDS) for 15 min, 2 times, in a hybridization oven at 50°C, followed by an additional wash with wash buffer II (0.1x SSC, 0.1% SDS) for 15 min at 50°C. The membrane was then washed with 1x maleic acid buffer (100 mM maleic acid, 150 mM NaCl, pH 7.0, adjusted by NaOH) for 10 min at room temperature and incubated with Blocking Reagent (# 11096176001, Roche) for 30 min. Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments (# 11093274910, Roche) was added to Blocking Reagent and membrane was further incubated for 1 h. After

that, the membrane was washed with wash buffer III (1x maleic acid buffer, 0.3% tween 20) for 10 min, 3 times, and equilibrated by equilibration buffer (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 9.5). To detect 18S-tag rRNA, the membrane was reacted with CDP-star (# 11759051001, Roche) for 10 min, and chemiluminescence was detected by ImageQuant LAS 4000 (GE healthcare). Relative RNA levels were determined using Multi Gauge v3.0 (Fujifilm, Japan) by comparison to a standard curve using a series of dilutions of samples from time point 0 h (just after transcription shut off).

Total Protein Sample Preparation for SDS-PAGE and Western Blotting

Trichloroacetic acid (TCA) precipitation

10 mL of exponentially grown yeast culture was harvested at OD600 of 0.5~0.8. Cell pellet was allowed to stand on ice, re-suspended with 500 μ L of ice-cold TCA buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM NH_4OAc , 2 mM EDTA, 1 mM PMSF) and added 500 μ L of 0.5 mm dia. ZIRCONIA/SILICA beads (BioSpec) as well as 500 μ L of ice-cold 20% TCA. After thorough vortex for 30 s each, 3 times at 4°C, supernatant was collected into a new 1.5 mL tube, and beads were further washed with 500 μ L of ice-cold TCA buffer followed by collection of supernatant to the 1.5 mL tube. After centrifugation at 18,000 $\times g$, 4°C for 10 min, supernatant was removed completely and pellet was dissolved with SDS sample buffer (120 mM Tris, 3.5% SDS, 14% glycerol, 8 mM EDTA, 120 mM DTT and 0.01% BPB; added 150 μ L/10 mL culture at OD600 of 0.6). For SDS-PAGE followed by western blotting except for detection of ubiquitylated proteins, total protein samples were incubated at 100°C for 10 min followed by centrifugation at 16,000 $\times g$ for 10 min, room temperature. For ubiquitylated proteins, total protein samples were incubated at 77°C for 10 min before centrifugation.

Electrophoresis and Western Blotting

Protein samples were separated by SDS-PAGE, and were analyzed by CBB staining or were transferred onto PVDF membrane (Immobilon-P, Millipore). After blocking with 5% skim milk in PBST (10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7.5, 0.9% NaCl, 0.1% Tween-20), membrane was incubated with primary antibodies for 1 h at room temperature followed by wash with PBST for 3 times and further incubation with ECL Anti-mouse or Anti-rabbit IgG, horseradish Peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies purchased from GE healthcare (# NA931V, # NA934V) for 1 h at room temperature. In the case of HA-tagged protein detection, membrane was incubated with HRP-conjugated antibodies. After washing with PBST for 3 times, chemiluminescence was detected by LAS4000 (GE Healthcare). Primary antibodies for western blotting are shown below. Anti-HA-Peroxidase was purchased from Roche (# 12013819001, RRID: AB 390917). Anti-uL14 (RpL23) was purchased from Abcam Bacterial and Virus Strains (# ab112587, RRID: AB 10866400). Anti-Ubiquitin antibody was purchased from Santa Cruz Biotechnology (# sc-8017). Anti-K48 Ubiquitin antibody was purchased from EMD Millipore (# 05-1308). Anti-K63 Ubiquitin antibody was purchased from Cell Signaling Technology (# 8081).

MS2-tagged RNA affinity purification (MS2-TRAP)

Preparation of FLAG-MS2 lysate

Yeast cells expressing pTEFp-FLAG-MS2 were cultured in 1 L of SC medium containing 2% glucose at 30°C until OD600 reaches 0.7. Cells were harvested by centrifugation and discarding medium. After grinding the cell pellets in liquid nitrogen with a mortar and a pestle, 3 mL of ice-cold LB300 (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM KCl, 12 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$, 0.01% NP-40, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, cOmplete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (#11836170001, Roche)(1 tablet/10 mL) was added to the cell powder. The suspension was centrifuged at 10,000 $\times g$, 4°C for 10 min in 50 mL tubes followed by thorough centrifugation of supernatant at 15,000 $\times g$, 4°C for 15 min in 1.5 mL tubes. The supernatant was collected into new 1.5 mL tubes, centrifuged at 15,000 $\times g$, 4°C for 15 min to obtain clear supernatant as FLAG-MS2 lysate. For each sample, FLAG-MS2 lysate (equivalent to 100 A260 units) was incubated at 4°C with 50 μ L of pre-equilibrated anti-DYKDDDDK tag antibody beads (# 016-22784, Wako) for 1 h (FLAG-binding). After binding, beads were washed with LB300 for 3 times, LB200 for 1 time, LB150 for 1 time and LB100 for 1 time before used for the following MS2-rRNA binding step.

Purification of ribosomes expressing 18S-MS2 bs rRNA

During FLAG-binding, pellets of cells expressing pGAL7p-rDNA 18S-MS2 bs WT or A1492C (equivalent to 300 mL of yeast cell culture) were ground in liquid nitrogen and lysed in 1 mL of ice-cold LB100 (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM KCl, 12 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$, 0.01% NP-40, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, cOmplete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (#11836170001, Roche)(1 tablet/10 mL)). The rRNA-expressing cell lysates were prepared as described in preparation of FLAG-MS2 lysate. The rRNA-expressing lysate (equivalent to 75 A260 units) was added to beads after FLAG-binding and washes and incubated for 1.5 h at 4°C for MS2-rRNA binding. At the same time, 5 μ L of each rRNA-expressing cell lysate was pipetted to a new tube and 45 μ L of 1 \times Laemmli Sample Buffer (2% SDS, 10% glycerol, 50 mM Tris-HCl pH 6.8, 25 mM DTT, 0.1% Bromophenol Blue) was added to prepare input protein samples. After MS2-rRNA binding, beads were washed with LB100 7 times. FLAG-MS2-rRNA was then eluted from beads by 400 μ L of LB100 containing 250 μ g/mL FLAG peptide (GenScript) at 4°C for 1 h. Beads were removed using a Mobicol with a filter (MoBiTec), and the individual elution fractions were concentrated to 25-35 μ L using 100K MWCO centrifugal filter units (Millipore). 4 \times Laemmli Sample Buffer (200 mM Tris-HCl pH 6.8, 8% SDS, 40% glycerol, 100 mM DTT, 0.04% BPB) was then added based on the volumes of the concentrated elution fractions to prepare elution protein samples. Protein samples for observation of ubiquitination were heated at 77°C, otherwise at 95°C for 10 min, centrifuged at 16,000 $\times g$ for 10 min, room temperature, and subjected to 10% SDS-PAGE

followed by CBB staining or western blotting. PCR primers for site directed mutagenesis for insertion of *MS2* bs are 5'-CATCAAAGAGTCCGACTCGAACTTGGGTGATCCTCAAGTTTTCTTGAGTCGACCTGCAGACAAGGGTGATCCTCTTGTATCAGACATTGATTTTATCTAATAAATAC-3' and 5'-AAAAATCAATGTCTGATAACAAGAGGATCACCCCTTGTCTGCAGGTCGACTCAA

GAAACTTGAGGATCACCCAAGTTCGAGTCGGACTCTTTGATGATTCATAATAAC-3'

Sucrose density gradient centrifugation (SDG)

Frozen cell pellets (equivalent to 200 mL of yeast cell culture) were ground in liquid nitrogen using a mortar and a pestle. Cell powder was suspended in SDG lysis buffer (20 mM HEPES-KOH pH 7.4, 100 mM KOAc, 2 mM Mg(OAc)₂, 0.1 mg/mL Cycloheximide, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, cOmplete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (#11836170001, Roche) (1 tablet/10 mL)). The suspension was centrifuged for 10 min at 5,600 × *g*, 4°C. The supernatant was pipetted into a new tube and centrifuged for 15 min at 20,080 × *g*, 4°C. The supernatant was again pipetted into a new tube and centrifuged at 20,080 × *g*, 4°C for 15 min. The clean supernatant was collected as cell lysate. The total quantity of individual cell lysates was layered onto sucrose gradients (10%–50% sucrose in 10 mM Tris-acetate pH 7.4, 70 mM NH₄OAc, and 4 mM Mg(OAc)₂) prepared in 25 × 89 mm poly-allomer tubes (Beckman Coulter) with a Gradient Master (Biocomp Instruments). After centrifugation at 131,000 × *g* in a SW28 rotor (Beckman Coulter) for 170 min at 4°C, the gradients were fractionated by fractionator (TOWA lab, Tsukuba), and the polysome profiles were generated by continuous absorbance measurement at 254 nm using a single path UV-1 optical unit (ATTO Biomini UV-monitor) connected to a chart recorder (ATTO digital mini-recorder). 226 μL of each fraction was collected and processed for RNA isolation.

RNA isolation followed by SDG

500 mL of 8 M Guanidine-HCl was immediately added to each sucrose fraction on ice. After vortexing for 10 s, 750 μL of 100% EtOH was added and the mixed well by vortexing for another 10 s. The mixtures were then left to stand at –30°C for at least 1 h. Following a centrifugation for 15 min at 20,080 × *g*, 4°C, the supernatants were discarded and 300 μL of 75% EtOH was added to each tube. After centrifuging at 20,080 × *g*, 4°C for 15 min and removal of supernatants, pellets were suspended in 200 μL of RNA buffer (0.3 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA pH 8.0, 1% SDS). 20 μL of 3 M NaOAc and 600 μL of 100% EtOH were subsequently added. After vortexing for 10 s, the mixtures were allowed to stand still at –30°C for 1 h, and then centrifuged at 20,080 × *g*, 4°C for 15 min. The supernatants were discarded and 300 μL of 75% EtOH were added to each tube, followed by a centrifugation at 20,080 × *g*, 4°C for 15 min. The supernatants were well removed and pellets were dried using a centrifugal vacuum concentrator. 30 μL of DEPC-treated water was added to each tube to dissolve the pellets and obtain RNA solutions. 27 μL of RNA sample buffer (60% DMSO, 20% glyoxal, 5 mM NaOAc, 1 mM EDTA, 20 mM MOPS, 5% glycerol, 0.1 mg/mL Bormophenol Blue, 0.1 mg/mL xylene cyanol) was added to 6 μL of each RNA solution to obtain RNA samples. The RNA samples were subjected to Northern blotting which was performed the same as that for rRNA stability determination.

Ribosome Immuno-Precipitation

C-terminally 3xHA tagged strains were used for purification. Ribosome was purified from 50ml of yeast cell culture in SC containing 2% glucose by one-step affinity purification method using uL23-FLAG expressing plasmid, as described previously (Inada et al., 2002). Ground yeast pellet was re-suspended in ice-cold LB150 (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM KCl, 10 mM Mg(OAc)₂, 0.05% NP-40, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) containing cOmplete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (#11836170001, Roche)(1 tablet/10 mL), centrifuged at 10,000 × *g*, 4°C for 10 min followed by thorough centrifugation of supernatant at 20,000 × *g*, 4°C for 30 min to obtain clear lysate. To purify ribosome with FLAG-tagged ribo-protein, the lysate was incubated at 4°C with 30 μL of pre-equilibrated anti-DYKDDDDK tag antibody beads (# 016-22784, Wako) for 1 h. After wash steps by batch with LB150 for 7 times, ribosomes were eluted from beads by incubation with 400 μL of LB150 containing 250 μg/mL FLAG peptide (GenScript) at 4°C for 1 h. Eluted ribosomes were concentrated by TCA precipitation method and dissolved with SDS sample buffer. The ubiquitylated ribosomal proteins were detected by PAGE followed by western blotting.

Serial-Affinity Purification by uL23-FLAG containing ribosome and 6HIS-tagged ubiquitin

The ubiquitylated ribosomal proteins were purified by two-step affinity purification method using uL23-FLAG and 6HIS-tagged ubiquitin expressing plasmid. 1L of yeast cells harboring pCUP1p-6HIS-Ubiquitin and puL23-FLAG were cultured in SC containing 2% glucose. To induce the expression of 6HIS-Ubiquitin, the cells were cultured in the presence of 0.1 mM Cu²⁺ for 2 h. Ground yeast pellet was re-suspended in ice-cold LB150 (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM KCl, 10 mM Mg(OAc)₂, 0.05% NP-40, 2 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM PMSF) containing cOmplete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (#11836170001, Roche)(1 tablet/10 mL), centrifuged at 10,000 × *g*, 4°C for 10 min followed by thorough centrifugation of supernatant at 40,000 × *g*, 4°C for 30 min to obtain clear lysate. To purify the FLAG-tagged ribosomes, the lysate was incubated at 4°C with 200 μL of pre-equilibrated anti-DYKDDDDK tag antibody beads (# 016-22784, Wako) for 1 h. After wash steps by batch with LB150 for 7 times, ribosomes were eluted from beads by incubation with 600 μL of LB150 containing 250 μg/mL FLAG peptide (GenScript) at 4°C for 1 h. The eluted ribosomes were then treated with RNase-It (mixture of 5U/μl of RNase T1 and 2μg/μl of RNase A)(#400720-81, Agilent) and incubated at denaturation condition (50mM Tris-HCl (pH7.5), 300mM NaCl, 10mM Imidazole, 6M Guanidine-HCl, 2 mM 2-mercaptoethanol, 0.01% NP-40). To purify ribo-protein-bound ubiquitin, the denatured ribosomes were incubated at 4°C with 50 μL of pre-equilibrated Ni-NTA agarose (# 1018240, QIAGEN) for 12 h. After wash steps by batch with WB1 (50mM Tris-HCl (pH7.5), 300mM NaCl, 10mM Imidazole, 6M Guanidine-HCl, 5mM 2-mercaptoethanol, 0.05% NP-40) for 2 times and WB2 (50mM Tris-HCl (pH7.5), 150mM NaCl, 10mM MgCl₂, 10mM Imidazole, 2mM 2-mercaptoethanol, 0.01% NP-40) for 2 times, ribo-protein-bound ubiquitin was eluted from beads by incubation with 300 μL of EB150 containing 300mM Imidazole (50mM Tris-HCl (pH7.5), 150mM NaCl, 10mM MgCl₂, 300mM Imidazole, 2mM 2-mercaptoethanol, 0.01% NP-40) at 4°C for 1 h. Eluted ubiquitylated ribo-proteins were concentrated by TCA

precipitation method and dissolved with SDS sample buffer. The ubiquitylated ribosomal proteins were detected by PAGE followed by western blotting.

Protein Purification

Ribosome for *In Vitro* Ubiquitylation Assay

Ribosome was purified from 1 L of yeast cell culture of SC 2% glucose by one-step affinity purification method using uL23-FLAG expressing plasmid, as described previously (Inada et al., 2002). To detect ubiquitylated ribosomal proteins by PAGE followed by western blotting after *in vitro* ubiquitylation reaction, C-terminally 3xHA tagged strains were used for purification. It is notable that, to be free of ubiquitylated ribosomal proteins in purified ribosome, ribosome was purified from indicated mutant background. Ground yeast pellet was re-suspended in ice-cold LB100 (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.01% NP-40, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) containing cOmplete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (#11836170001, Roche)(1 tablet/10 mL), centrifuged at 10,000 x g, 4°C for 10 min followed by thorough centrifugation of supernatant at 40,000 x g, 4°C for 30 min to obtain clear lysate. To purify ribosome with FLAG-tagged ribo-protein, lysate was incubated at 4°C with 100 μL of pre-equilibrated anti-DYKDDDDK tag antibody beads (# 016-22784, Wako) for 1 h. After wash steps by batch with LB100 for 7 times and LB100 w/o detergent for 3 times, ribosomes were eluted from beads by 150 μL of Elution Buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.01% NP-40, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 250 μg/mL FLAG peptide (GenScript)) at 4°C for 1 h. Eluted ribosomes were confirmed by PAGE and CBB stain, and were used for *in vitro* ubiquitylation assay.

Hel2-FLAG

Hel2-FLAG was purified from 1 L of SC 2% glucose culture of yeast cell harboring pGPDp-HEL2-FLAG-CYC1t. Ground yeast pellet was re-suspended in ice-cold LB500 (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.01% NP-40, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) containing cOmplete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (#11836170001, Roche)(1 tablet/10 mL), centrifuged at 10,000 x g, 4°C for 10 min followed by thorough centrifuge of supernatant at 40,000 x g, 4°C for 30 min to obtain clear lysate. To purify Hel2-FLAG, lysate was incubated at 4°C with 100 μL of pre-equilibrated anti-DYKDDDDK tag antibody beads (# 016-22784, Wako) for 1 h. After wash steps by batch with LB500 for 5 times, LB400 for 1 time, LB300 for 1 time, LB200 for 1 time and LB100 w/o detergent for 3 times, Hel2-FLAG was eluted from beads by 150 μL of Elution Buffer at 4°C for 1 h.

Recombinant proteins of Ubc4

Recombinant Ubc4 was purified as GST-Ubc4 from *E. coli* Rossetta-gami 2 (DE3) (#71351, Novagen) harboring pGEX6P1-Ubc4, and was eluted as no tagged Ubc4 by PreScission Protease (# 27084301, GE Healthcare).

E. coli cells were grown in 1 L of LB medium supplemented with 50 μg/mL ampicillin and 35 μg/mL chloramphenicol at 37°C to OD₆₀₀ = 0.3, cooled to 16°C, and induce with 0.1 mM isopropyl thio-β-galactopyranoside (IPTG) for 16 h before harvested. *E. coli* cells were lysed by ultrasonic wave with 10 mL of ice-cold PBS(-) KCl(-) (137 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF) containing cOmplete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (#11836170001, Roche)(1 tablet/10 mL). The lysate was centrifuged at 10,000 x g, 4°C for 10 min followed by thorough centrifuge of supernatant at 35,000 x g, 4°C for 1 h to obtain clear lysate. The clear lysate was incubated with 1 mL of Glutathione Sepharose 4B (# 17-1756-05, GE Healthcare) pre-equilibrated with PBS(-) KCl(-), followed by wash with PBS(-) KCl(-) for 5 times. Ubc4 moiety was eluted from beads using 1 mL of elution buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) with 80 μL of PreScission protease (# 27084301, GE Healthcare) at 4°C for 16 hr. Finally, 50% glycerol was added to the eluate.

Recombinant proteins of Mag2, Rsp5

Recombinant Mag2 and Rsp5 were purified as GST-tagged forms from *E. coli* Rossetta-gami 2 (DE3) as described above section.

E. coli cells were grown in 200 mL of LB medium supplemented with 50 μg/mL ampicillin and 24 μg/mL chloramphenicol at 37°C to OD₆₀₀ = 0.5, cooled to 20°C, and induce with 0.2 mM IPTG for 16 h at 20°C before harvested. Particularly, *E. coli* cells were ground by a mortar and a pestle in liquid nitrogen and resulting powder was collected in a 50 mL tube. The powder was re-suspended by ice-cold LGB100 (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 10% glycerol, 0.2% Triton X-100, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) containing cOmplete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (#11836170001, Roche)(1 tablet/10 mL), added 10 μL of DNase1 and centrifuged at 10,000 x g, 4°C for 10 min followed by thorough centrifuge of supernatant at 40,000 x g, 4°C for 30 min to obtain clear lysate. Lysate of *E. coli* cells was incubated with 200 μL of Glutathione Sepharose 4B (# 17-1756-05, GE Healthcare) pre-equilibrated with LGB100, followed by wash with LGB100 for 5 times and LGB100 w/o detergent for 3 times. Ubc4 moiety was eluted from beads using 200 μL of protease buffer (8 μL of PreScission protease (# 27084301, GE Healthcare) in LGB100 w/o detergent) at 4°C for 16 h.

In vitro Ubiquitylation Assay

In vitro ubiquitylation assays of ribosome were performed in Figures 2F, 3C, 3D, 4D–4H, S2D, and S4A. Ubiquitylation reactions in reaction buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT) contained 50 μM His-ubiquitin (as described below), 100 nM UBE1 (# B1100, UBPBio), 300 nM Ubc4, 150 nM Mag2, 150 nM Hel2-FLAG and/or 150 nM Rsp5 (See Figure S2), 2 A₂₆₀ units of ribosome and energy regenerating source (1 mM ATP, 10 mM creatine phosphate (# 030-04584, Wako) and 20 μg/mL creatine kinase (# 10127566001, Roche)). Initially, reaction was mixed at room temperature without E3 ligase and ribosome. Then, ribosome and E3 was added and incubated at 25°C for 3 h. To stop ubiquitylation reaction, 4x Laemmli sample buffer was added to the reaction tube. Samples were incubated at 77°C for 10 min to proceed to SDS-PAGE followed by western blotting. The following ubiquitin mutants were purchased from UBPBio: WT (#E1300), K6R (#E1720), K11R (#E1730), K27R (#E1740), K29R (#E1750), K33R (#E1760), K48R (#E1770), K63R (#E1780), K0 (#E1710) and K63(1) (#E1880).

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

For half-life determination in [Figures 1B, 2A, 2D, 4A, 4I, 5A, 6A, 6E, and 7B](#), the intensity of each 18S rRNA-derived band in Northern blotting was quantified using Multi Gauge (v3.0, Fujifilm) to determine the 18S rRNA level at each time point. The average half-lives and SD were calculated in Microsoft Excel based on the results of three independent experiments. A representative result of 18S rRNA levels was also shown. For data of sucrose density gradient centrifugation in [Figures 5B–5D, 6D, 7C, and S5B](#), the intensity of each 18S rRNA-derived band in Northern blotting was quantified using Multi Gauge (v3.0, Fujifilm) to determine the 18S rRNA level in each sucrose fraction. The percentage of 18S: A1492C rRNA level in each gradient fraction among the total 18S: A1492C rRNA level was calculated in Microsoft Excel. Each experiment was repeated at least twice, and a representative result was shown.

RESEARCH ARTICLE SUMMARY

BIOCHEMISTRY

The Ccr4-Not complex monitors the translating ribosome for codon optimality

Robert Buschauer*, Yoshitaka Matsuo*, Takato Sugiyama, Ying-Hsin Chen, Najwa Alhusaini, Thomas Sweet, Ken Ikeuchi, Jingdong Cheng, Yasuko Matsuki, Risa Nobuta, Andrea Gilmozzi, Otto Berninghausen, Petr Tesina, Thomas Becker, Jeff Collier†, Toshifumi Inada†, Roland Beckmann†

INTRODUCTION: The tightly controlled process of gene expression requires messenger RNAs (mRNAs), which represent DNA-derived blueprints for polypeptides, to be translated by the protein-producing machinery of the cell, the ribosomes. Therefore, protein levels depend largely on cellular mRNA levels, and the control of mRNA decay is one of the most critical processes for setting the overall level of gene expression. Half-lives of mRNAs vary greatly between different transcripts, and regulation of the mRNA decay rate is intimately connected to the elongation phase of mRNA translation. To that end, codon optimality has been established as a key parameter for determining mRNA half-life in multiple eukaryotic organisms. It has also been established that the timely decay of short-lived mRNAs enriched with nonoptimal codons requires the Ccr4-Not complex. Ccr4-Not is an essential protein complex, with its best understood role in mRNA degradation, where it serves as the major cytoplasmic 3'-poly(A)-tail deadenylase that initiates decay of most mRNAs. By deadenylation and subsequent activation of the mRNA decapping machinery, the Ccr4-Not complex renders

mRNAs accessible to the major degrading exonucleases, such as Xrn1 on the 5' end and the exosome on the 3' end. The molecular mechanism underlying codon optimality monitoring and coordination with mRNA decay by the Ccr4-Not complex has remained elusive.

RATIONALE: Because nonoptimal codons affect decoding kinetics of the ribosome and mRNA degradation occurs largely cotranslationally, it is highly plausible that codon optimality is directly monitored on the ribosome. In addition, a direct physical link between the participating Ccr4-Not complex and the ribosome has been suggested previously, and the Not4 subunit of the complex, an E3 ligase, ubiquitinates the eS7 protein of the 40S ribosomal subunit in yeast. Therefore, we set out to gain insights into the connection between the Ccr4-Not complex and the translation machinery in the context of mRNA homeostasis by combining cryo-electron microscopy (cryo-EM), ribosome profiling, and biochemical analysis.

RESULTS: We used affinity-purified native Ccr4-Not-ribosome complexes from *Saccharomyces*

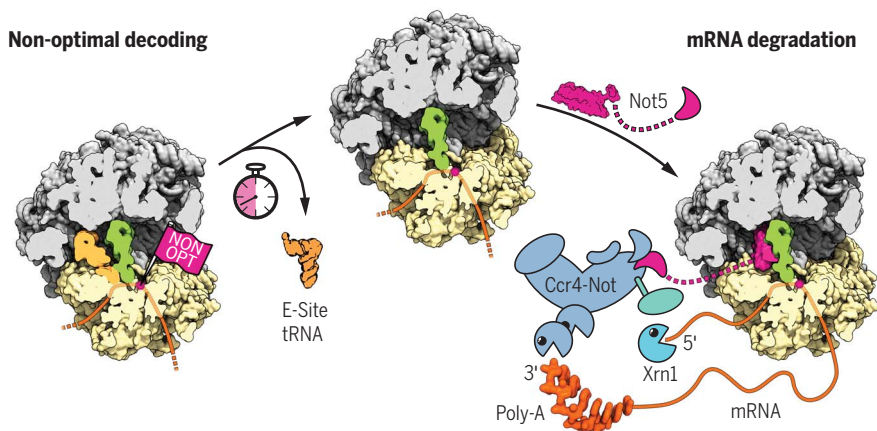
cerevisiae for analysis by cryo-EM and found that recruitment of Ccr4-Not to the ribosome occurs via the Not5 subunit. The N terminus of Not5—in particular, a three α -helix bundle—interacted specifically with the ribosomal E-site, and deletion of the Not5 N-terminus resulted in the loss of stable ribosome association of the Ccr4-Not complex. However, ubiquitination of the small ribosomal subunit protein eS7 through the Not4 subunit still occurred. The

ON OUR WEBSITE

Read the full article at <http://dx.doi.org/10.1126/science.aay6912>

Not5 interaction involved the ribosomal protein eS25 of the small subunit, in addition to transfer RNA (tRNA) and ribosomal RNAs (rRNAs). We found that Ccr4-Not interacts with both initiating and elongating ribosomes. In either case, Not5 engaged the E-site only when the ribosome adopted a distinct conformation lacking accommodated tRNA in the A-site, indicative of impaired decoding kinetics. Ribosome profiling revealed that low-optimality codons were enriched in the A-site in the Ccr4-Not-bound elongating ribosomes. This observation explained the low A-site tRNA occupancy observed with cryo-EM and suggested a link to codon optimality monitoring. Consistently, using mRNA stability assays, we found that loss of Not5 resulted in the inability of the mRNA degradation machinery to sense codon optimality. The observed dysregulation of mRNA half-life was detected upon Not5 deletion, Not5 N-terminal deletion, eS25 deletion, and loss of eS7 ubiquitination by Not4, which apparently serves as an upstream prerequisite for further Ccr4-Not activity on the ribosome. In addition, mRNA decapping was found to be impaired in these mutants, which confirmed that, in this pathway, Ccr4-Not triggers decapping downstream of optimality monitoring.

CONCLUSION: Our analysis elucidates a direct physical link between the mRNA decay-mediating Ccr4-Not complex and the ribosome. Dependent on preceding ubiquitination of eS7 by the Not4 subunit, the Ccr4-Not complex binds (via the Not5 subunit) specifically to the ribosomal E-site when the A-site lacks tRNA because of slow decoding kinetics. This state of the ribosome occurs in the presence of nonoptimal codons in the A-site, which explains the shorter half-lives of transcripts enriched in nonoptimal codons. Thus, our findings provide mechanistic insights into the coordination of translation efficiency with mRNA stability through the Ccr4-Not complex. ■



Ccr4-Not couples translation efficiency to mRNA degradation. When ribosomes encounter nonoptimal codons, low decoding efficiency leads to an increased likelihood of dissociation of the E-site tRNA before the cognate tRNA is accommodated in the A-site. As a result, the ribosomal E-site adopts a specific conformation, which is recognized by the Ccr4-Not complex through the N-terminus of its Not5 subunit, eventually triggering mRNA degradation by Xrn1.

The list of author affiliations is available in the full article online.
*These authors contributed equally to this work.
†Corresponding author. Email: beckmann@genzentrum.lmu.de (R.B.); toshifumi.inada.a3@tohoku.ac.jp (T.I.); jmc71@case.edu (J.C.)
Cite this article as R. Buschauer et al., *Science* 368, eaay6912 (2020). DOI: 10.1126/science.aay6912

RESEARCH ARTICLE

BIOCHEMISTRY

The Ccr4-Not complex monitors the translating ribosome for codon optimality

Robert Buschauer^{1*}, Yoshitaka Matsuo^{2*}, Takato Sugiyama², Ying-Hsin Chen³, Najwa Alhusaini³, Thomas Sweet³, Ken Ikeuchi^{1,2}, Jingdong Cheng¹, Yasuko Matsuki², Risa Nobuta², Andrea Gilmozzi¹, Otto Berninghausen¹, Petr Tesina¹, Thomas Becker¹, Jeff Collier^{3,†}, Toshifumi Inada^{2,†}, Roland Beckmann^{1,†}

Control of messenger RNA (mRNA) decay rate is intimately connected to translation elongation, but the spatial coordination of these events is poorly understood. The Ccr4-Not complex initiates mRNA decay through deadenylation and activation of decapping. We used a combination of cryo-electron microscopy, ribosome profiling, and mRNA stability assays to examine the recruitment of Ccr4-Not to the ribosome via specific interaction of the Not5 subunit with the ribosomal E-site in *Saccharomyces cerevisiae*. This interaction occurred when the ribosome lacked accommodated A-site transfer RNA, indicative of low codon optimality. Loss of the interaction resulted in the inability of the mRNA degradation machinery to sense codon optimality. Our findings elucidate a physical link between the Ccr4-Not complex and the ribosome and provide mechanistic insight into the coupling of decoding efficiency with mRNA stability.

The Ccr4-Not (carbon catabolite repressor 4-negative on TATA) complex is an essential and conserved protein complex comprising at least six core subunits arranged in a modular architecture. Although Ccr4-Not has roles in many aspects of regulating gene expression (e.g., chromatin remodeling, transcription, mRNA export, and RNA interference), its most defined and best understood role is in mRNA degradation, serving as the major cytoplasmic deadenylase other than Pan2-Pan3 (1, 2). Two subunits of Ccr4-Not (Caf1 and Ccr4) are poly(A)-specific nucleases that initiate decay of most mRNAs. Their activity in shortening the 3'-poly(A) tail is typically followed by removal of the 7-methylguanylate cap at the 5' end by the Dcp2-Dcp1 holoenzyme and then subsequent 5'-to-3' degradation by Xrn1 (3). For most transcripts, decapping is strictly dependent on prior deadenylation. However, little is known about the spatial organization that allows the coordination of deadenylation with decapping by Ccr4-Not.

The control of mRNA decay is one of the most critical processes for setting the overall level of gene expression. Half-lives of mRNAs vary greatly between transcripts, and codon optimality has been established as a major parameter for determining mRNA half-life

in eukaryotes (4–6). The timely decay of short-lived mRNAs enriched with nonoptimal codons involves the Ccr4-Not complex (7) and the activator of decapping Dhh1 (8), but the molecular principles underlying codon optimality reading have remained enigmatic. Because nonoptimal codons affect decoding kinetics and mRNA degradation occurs cotranslationally (9), it can be reasoned that codon optimality is directly monitored on the ribosome. A physical link of the Ccr4-Not complex to the ribosome has been suggested previously (10, 11). The Not4 subunit of the complex, an E3 ligase, ubiquitinates proteins of the 40S ribosomal subunit (12, 13), and the Not5 subunit appears to be important for mRNA translatability and polyribosome levels in yeast (14). In this study, we set out to gain mechanistic insights into the connection between Ccr4-Not and the translation machinery in the context of mRNA homeostasis.

The Not5 subunit anchors Ccr4-Not to the ribosome

To look for a physical link between the ribosome and Ccr4-Not, we copurified endogenous ribosome-bound Ccr4-Not complexes from *Saccharomyces cerevisiae*, using tagged Not4 as bait. We performed sucrose density gradient centrifugation and isolated a monosome 80S and a polysome fraction, both stabilized by the antibiotic tigecycline to prevent ribosomal runoff. Single-particle cryo-electron microscopy (cryo-EM) analysis (table S1) of the monosome fraction resulted in a structure of an 80S ribosome with a vacant A-site; a transfer RNA (tRNA) in the P-site; and additional, mostly α -helical, density in the E-site (Fig. 1A). The

overall resolution of 2.8 Å (fig. S1, A to C) allowed us to identify the extra density as the N-terminal domain (NTD) of Not5 (residues 2 to 113). Not5 is a highly conserved component of Ccr4-Not (CNOT3 in humans) with known roles in controlling mRNA stability (15, 16). We were able to build an atomic model of the previously structurally uncharacterized Not5-NTD (Fig. 1B and fig. S1D). The remaining part of Not5 and also the entire Ccr4-Not complex were apparently flexibly linked to the NTD and therefore not resolved, with the exception of a small helical bundle extending from the NTD near the 40S head, which we could visualize but not model in a chemically cross-linked cryo-EM sample (fig. S1, E and F). Nevertheless, the presence of the entire Ccr4-Not complex in the cryo-EM sample was confirmed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and mass spectrometry (Fig. 1C). The NTD of Not5 was composed of a three- α -helix bundle and a short linker, followed by a β turn directly leading into a short fourth α helix (Fig. 1, D and E). The three-helix bundle established a stable hydrophobic core, and the entire NTD bound to the ribosome in the E-site by precisely spanning the distance between the 60S and the 40S ribosomal subunits. The domain directly interacted with the P-site tRNA, the 25S ribosomal RNA (rRNA), 18S rRNA, and the N-terminal tail of the ribosomal protein eS25, suggesting that binding requires a fully assembled 80S ribosome with tRNA in the P-site (Fig. 1, E to G). To rule out the possibility of an artifact induced by tigecycline, we repeated the structure determination in absence of antibiotics and confirmed the presence of the NTD in the same position and conformation (fig. S1, G to I). Moreover, the same overall architecture was also observed for the complexes after chemical cross-linking or when isolated from the polysome fraction (see below). To test whether the NTD is required for ribosome association of the Ccr4-Not complex in vivo, we generated a yeast strain carrying a Not5 construct lacking the NTD. Analysis of this mutant strain using sucrose density gradient centrifugation revealed that association of the Ccr4-Not complex with ribosomes was decreased, as evident from the signal for the Not5 subunit (Fig. 1H and fig. S2, A and B). Most of the mutant complex was observed in the top fraction of the gradient, with low signal remaining throughout the gradient. Thus, the NTD of Not5 makes a key contribution to the association of the Ccr4-Not complex with the ribosome. The remaining association with the translation machinery is likely to reflect a second binding mode of Ccr4-Not that could involve the interaction of the Not4 subunit with ribosomal proteins for ubiquitylation. Consistent with this idea, ubiquitination of eS7 still occurred in the Not5- Δ NTD strain (Fig. 1I and fig. S2, A and B).

¹Gene Center and Department of Biochemistry, University of Munich, 81377 Munich, Germany. ²Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, Sendai 980-8578, Japan. ³Center for RNA Science and Therapeutics, School of Medicine, Case Western Reserve University, Cleveland, OH 44106, USA.

*These authors contributed equally to this work.

†Corresponding author. Email: beckmann@genzentrum.lmu.de (R.B.); toshifumi.inada.a3@tohoku.ac.jp (T.I.); jmc71@case.edu (J.C.)

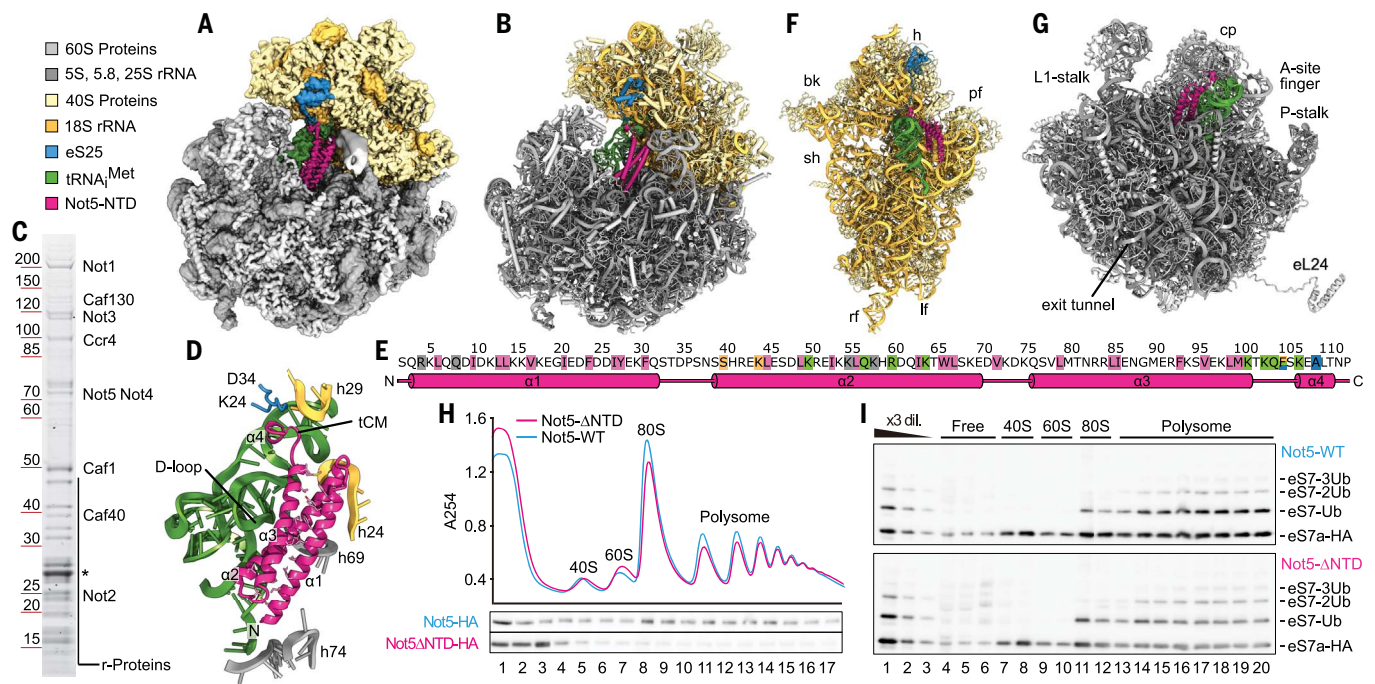


Fig. 1. The N terminus of Not5 binds to the ribosomal E-site. (A) Cryo-EM density map and (B) atomic model of the Not5-80S complex. (C) SDS-PAGE analysis and mass spectrometry of the cryo-EM sample (asterisk: TEV-protease). (D) Overview of Not5-NTD, interacting ribosomal features, and tRNA^{Met} (tCM: tRNA clamp-motif). Residues that establish the hydrophobic core of the three-helix bundle are shown as sticks. (E) Topology of the Not5-NTD. Key residues are highlighted (pink: hydrophobic core, green: interaction with tRNA, blue: interaction with eS25, beige: interaction with 18S rRNA, gray: interaction with 25S rRNA). Single-letter abbreviations for the amino acid residues are as follows: A, Ala; C, Cys; D, Asp; E, Glu; F, Phe; G, Gly; H, His; I, Ile;

K, Lys; L, Leu; M, Met; N, Asn; P, Pro; Q, Gln; R, Arg; S, Ser; T, Thr; V, Val; W, Trp; and Y, Tyr. (F) Atomic model of the 40S subunit, P-site tRNA, and Not5-NTD, as seen from the ribosomal intersubunit space. Locations of head (h), beak (bk), platform (pf), shoulder (sh), left foot (lf), and right foot (rf) of the 40S subunit are indicated. (G) Atomic model of the 60S subunit, P-site tRNA, and Not5²⁻¹¹³, as seen from the ribosomal intersubunit space. Locations of the central protuberance (cp) and other characteristic features are indicated. (H) Density gradient profiles of Not5-HA and Not5-ANTD-HA strains and corresponding Western blot. (I) Western blot of eS7-HA in the fractions of the sucrose density gradients from (H).

Not5 targets initiating and elongating ribosomes

We initially used the native Ccr4-Not:80S complexes from the monosome fraction of the sucrose gradient and expected to find a mixture of different mRNAs and tRNAs. To our surprise, the codon present within the P-site was well resolved and identified as AUG (Fig. 2A). Moreover, the tRNA could be unambiguously identified as the initiator tRNA^{Met}, not the elongator tRNA^{Met} (Fig. 2B and fig. S2C). These data suggest an association of the Ccr4-Not complex with late-initiation complexes. To confirm this, we probed by Northern blotting for individual tRNAs in 80S fractions before and after Not4 pull-down assay and in the presence or absence of tigecycline or cycloheximide (CHX) (Fig. 2C). As expected, we observed a strong enrichment of tRNA^{Met} and not tRNA^{Ala} (as control) in the ribosomal samples upon pull-down assay independent of tigecycline, whereas copurifications in presence of CHX yielded significantly fewer ribosomes. A structural feature of tRNA^{Met} that is also shared by other tRNAs is a short D-loop (17) (fig. S2D), which in our structure directly interacted with the three-helix bundle

of Not5 (Fig. 2, B and D). This may suggest some degree of specificity of Not5 conferred by proximity and probing of the tRNA D-loop. Finally, interaction with late-initiation complexes was also consistent with the results of selective ribosome profiling after coimmunoprecipitation using Not4 as bait (Not4-IP) or the ribosomal protein uL30 as control (Fig. 2E): We observed a broad association of Not4 over the entire open reading frame (ORF), yet with a twofold enrichment of ribosomes on the initiation codon compared with the control (Fig. 2F).

We next asked whether the Ccr4-Not complex also binds to elongating ribosomes and determined cryo-EM structures from heavy fractions of a sucrose gradient (between three and six ribosomes). We also observed a population of ribosomes with Not5 bound in the E-site, tRNA present in the P-site, and a vacant A-site. This structure resembled our observations with Not5 bound to the late-initiation complex (Fig. 2, G and H). However, the local resolution of the tRNA was not high enough to identify the tRNA unambiguously, suggesting the presence of a mix of different tRNAs

species. In contrast to the initiation structure, there was clear density for a nascent chain extending from the peptidyl transferase center into the ribosomal exit tunnel, confirming the elongating state of the ribosomes (Fig. 2, I and J). Thus, Not5 links the Ccr4-Not complex to both late-initiating and elongating ribosomes within the ORF.

Molecular interactions of the Not5-NTD

One interaction of the NTD with the ribosome is established through the P-site tRNA. It involves multiple hydrogen bonds between the backbone of the tRNA D-loop and helix $\alpha 2$ of Not5 (Fig. 3A and fig. S3A), whereas the backbone of the D-arm hydrogen bonds with helices $\alpha 2$ and $\alpha 3$ of Not5 (Fig. 3, B and C, and fig. S3B). Another interaction involves residues K103 to L110 of Not5, which we termed the tRNA clamp-motif (tCM) (Fig. 3D and fig. S3, C to E) because it locks the phosphate backbone of the tRNA anticodon stem loop. This interaction is further stabilized by the N-terminal tail of the ribosomal protein eS25 (Fig. 3, D and E). This tail of eS25 is usually flexible; however, in the presence of Not5 it is stabilized and can be

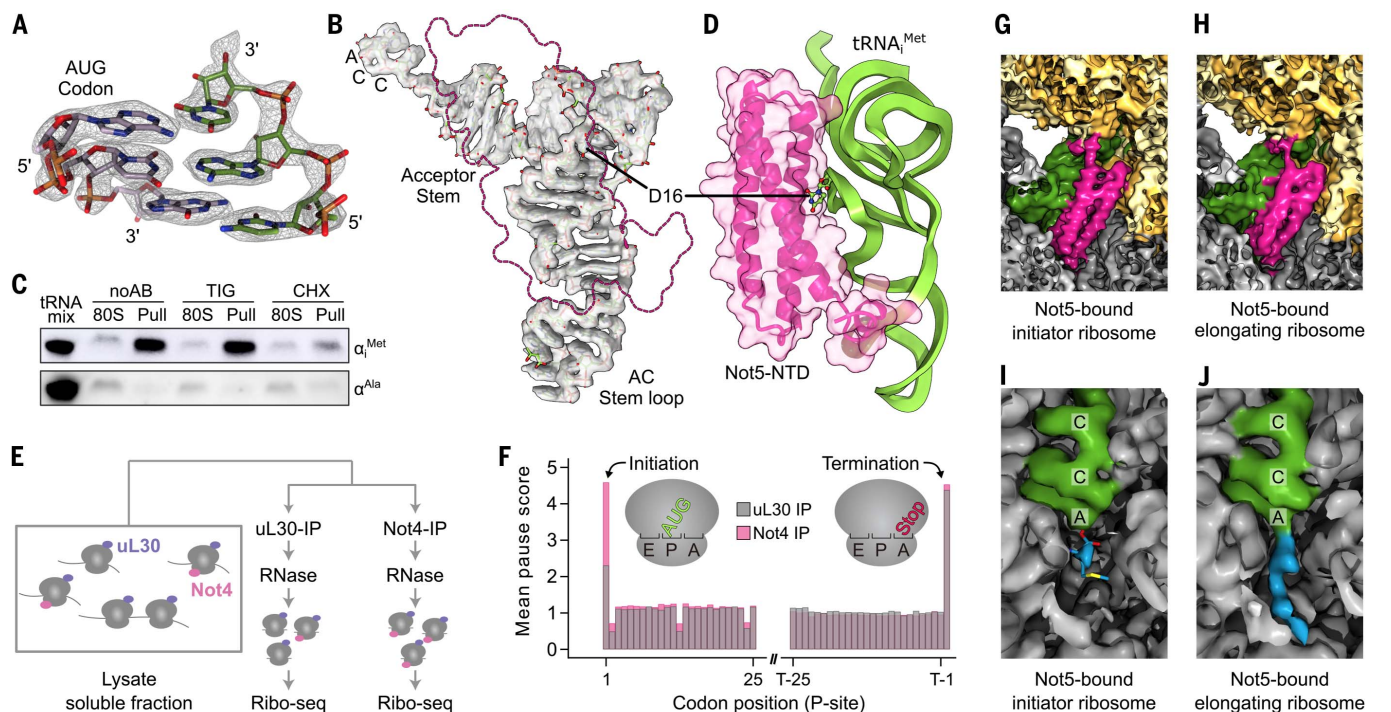


Fig. 2. Not5 interacts with initiating and elongating ribosomes. (A) Cryo-EM density and atomic model of the codon-anticodon interaction. (B) Cryo-EM density and atomic model of tRNA^{Met}. The position of Not5-NTD is outlined in pink. AC, anticodon. (C) Northern blot against tRNA^{Met} (top) and tRNA^{Ala} (bottom). The same amount of ribosomes was loaded before (80S) and after (Pull) affinity purification. The samples were prepared without antibiotics (noAB), in the presence of tigeicycline

(TIG), or in the presence of cycloheximide (CHX). (D) D-loop recognition through Not5. (E and F) Selective ribosome profiling of Ccr4-Not associated ribosomes (Not4 IP) and total ribosomes (uL30 IP). (G and H) Cryo-EM densities of the Not5 binding site in the initiator and elongating ribosome (low-pass filtered to 5 Å). (I) Peptidyl transferase center (PTC) of the Not5-80S complex with ester bonded methionine (blue). (J) PTC of the elongating Not5-bound ribosome (nascent chain: blue).

observed extending from the globular part of eS25 at the head of the small ribosomal subunit to the ribosomal P-site (Figs. 1F and 3C). There, residues K25 and K29 of eS25 form hydrogen bonds with the carbonyl groups of F105 and A109 of Not5, respectively. Thereby, eS25 holds the tCM of Not5 in place, and together the tCM, eS25, and 18S rRNA form a groove that accommodates the tRNA backbone (Fig. 3E). W27 of eS25 pins the flexible N-terminal tail to this location through a stacking interaction with G1575 of the 18S rRNA between rRNA helices h29 and h42. G1575 also stabilizes the β turn of Not5 through a stacking interaction between the ribose and F105 of Not5 (Fig. 3D). Residues K25, W27, and K29 of eS25 belong to the highly conserved KKKWSK motif, and a human K33E mutation (corresponding to yeast K25E) has been found in thyroid carcinoma cells (18). The central residue F105 of Not5 is coordinated simultaneously by 18S rRNA through the side chain, by eS25 through the carbonyl oxygen, and by the tRNA through the backbone nitrogen. Furthermore, interactions of the Not5-NTD with the 18S rRNA involve rRNA helices h23 and h24 (Fig. 3F and fig. S3F). Interaction with the 25S rRNA involves helix $\alpha 2$ of Not5 and the extension of rRNA helix H69 (Fig. 3G and fig. S3G) as well as helix $\alpha 1$ of Not5 and rRNA helix

H74 (Fig. 3H and fig. S3H). The human homolog of Not5, CNOT3, contains a highly conserved NTD (fig. S3I), suggesting a conserved function of CNOT3 as an anchor to the human ribosome. Multiple cancer mutations cluster in the NTD of CNOT3 (18), with one of the most frequent mutations being R57W/E (K58 in yeast) (19). K58 directly interacts with the phosphate backbone of 25S rRNA in our structure (Fig. 3G), and analogous interaction can be predicted for R57 of the human homolog. Mutation of K58 (or R57 in human) to tryptophan or glutamate would not allow hydrogen bond formation and would therefore destabilize the interaction. Thus, the Not5-NTD engages in a highly specific and complex binding mode in the ribosomal E-site involving 40S and 60S ribosomal rRNA as well as eS25 and a P-site tRNA with a small D-loop.

A-site occupation determines E-site preference for either Not5 or eIF5A

We observed Not5 binding to ribosomes in the posttranslocation state, in which ribosomes usually carry a deacylated tRNA in the E-site and a peptidyl-tRNA in the P-site but no A-site tRNA (-/PP/EE). Not5 can apparently bind to this posttranslocation-state conformation as soon as also the E-site is vacant (-/PP/-) (Fig. 4A). In this state, the small ribosomal

subunit is rotated toward the E-site and the L1-stalk cannot adopt the far inside conformation, which is necessary to accommodate eIF5A because of a potential clash with the 40S subunit (fig. S3J). By contrast, upon accommodation of the A-site tRNA (AA/PP/-) (fig. S3, K to N), the 40S ribosomal subunit undergoes a conformational change in the opposite direction, known as subunit rolling (20) (Fig. 4, B and C). Together, these movements result in characteristic remodeling of the E-site. In the presence of CHX, we observed enrichment of the (AA/PP/-) state and found eIF5A bound to the E-site, as previously described (21).

Not5 and eIF5A binding to a vacant E-site appear to be mutually exclusive, not only because of a direct steric clash between the two factors, but also as a result of different conformational requirements for E-site binding. Comparison of the Not5-bound (-/PP/-) ribosome with the eIF5A-bound (AA/PP/-) ribosome shows that, upon A-site accommodation, the anticodon stem loop of the P-site tRNA has moved toward the E-site. This involves nucleotides 41 to 43, which are clamped by the tCM of Not5, and this subtle movement of the tRNA backbone (~1.6 Å) would cause clashes with the tCM upon A-site accommodation (Fig. 4, D and E). This explains how Not5 can probe the shape of the E-site and stably and specifically bind

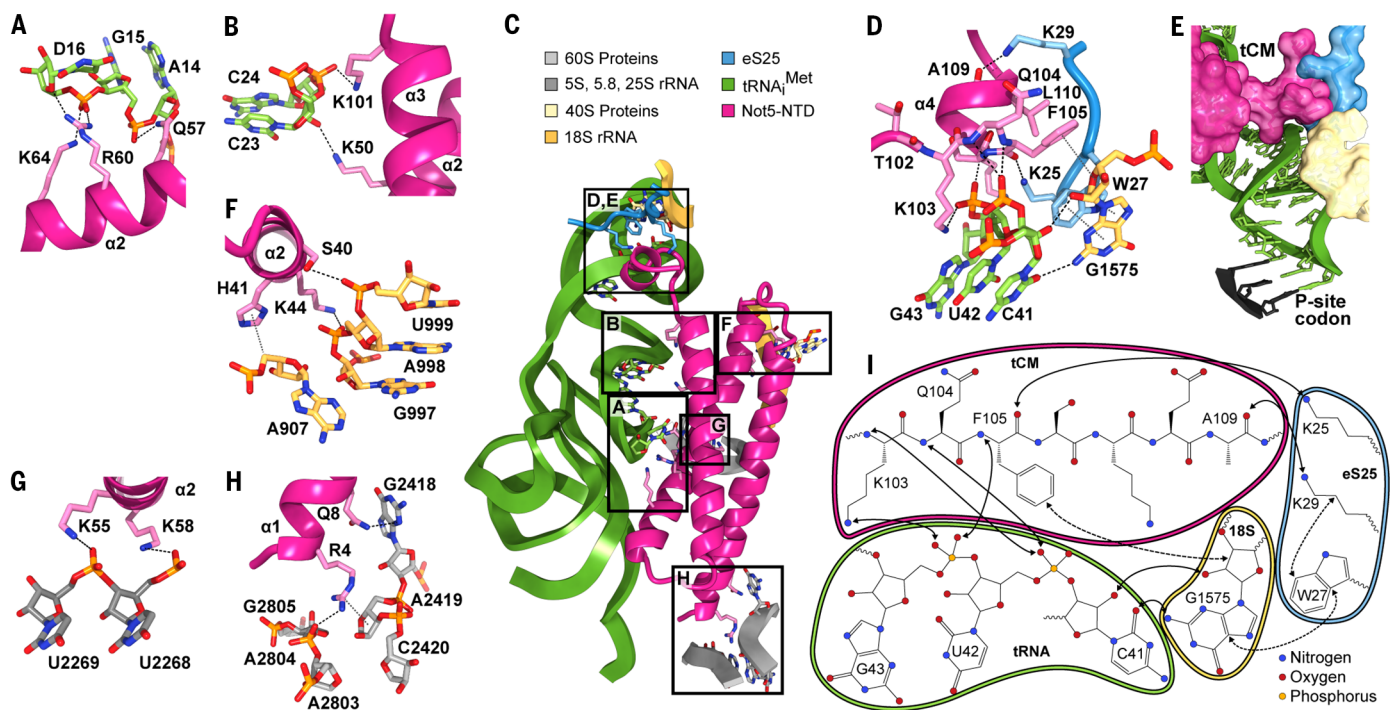


Fig. 3. Not5-80S complex interface. (A) Interactions of the Not5-NTD with the D-loop of tRNA^{Met}. Hydrogen bonds and ion bridges are shown as black dashed lines. (B) Interactions of Not5 with the D-stem of tRNA^{Met}. (C) Overview of the interaction sites of the Not5-NTD and the initiator-80S ribosome. (D) Interactions between the tCM of Not5, tRNA^{Met}, eS25, and 18S rRNA. Hydrogen bonds and ion bridges are shown as black dashed lines. Hydrophobic interactions are

shown as gray dotted lines. (E) Surface representation of the interface shown in (D) and atomic model of the anticodon stem loop of tRNA^{Met}. (F) Interactions of Not5-NTD with 18S rRNA. (G and H) Interactions of Not5 with 25S rRNA. (I) Schematic summary of the binding interface of the tCM of Not5 with the initiator 80S (solid arrows: polar interactions; dashed arrows: hydrophobic interactions).

to the E-site in the absence of an accommodated A-site tRNA. In agreement with this observation, we found ribosomes simultaneously interacting with A-site tRNA and Not5-NTD only when in a nonrolled and non-accommodated conformation, resembling a tRNA sampling situation (fig. S4C). Also, we generally observed only small populations of Ccr4-Not:80S complexes in the presence of CHX, which stabilizes the unfavored, A-site tRNA-accommodated pretranslocation state.

Preferential association of Ccr4-Not to ribosomes with empty A-sites was further confirmed by ribosome profiling, which has previously been shown to yield shorter (~21-nucleotide oligomer) fragments from ribosomes with an empty A-site (22). Using Not4 as bait for selective profiling, we indeed observed enrichment of these short mRNA fragments (Fig. 4F). Despite slight variations of the exact fragment length distribution in different experiments, the effect of enrichment of short reads in Ccr4-Not-bound ribosomes was consistent (fig. S30). The allosteric coupling between the A- and E-sites of the 80S ribosome was illustrated by quantified trajectories of ribosomal proteins (C α atoms) and RNA (P atoms) that describe a transition between the Not5-bound posttranslocation state and the A-site tRNA accommodated pretranslocation state (Fig. 4G).

Thus, the NTD of Not5 can probe the ribosomal E-site in a highly selective way, resulting in the Ccr4-Not complex most efficiently interacting with ribosomes with a vacant A-site, as schematically summarized in Fig. 4H. Consequently, the Ccr4-Not complex and eIF5a may facilitate a differential readout of the translational state of the ribosome via E-site probing: The Ccr4-Not complex would be recruited with preference to ribosomes displaying low decoding efficiency and thereby would increase the likelihood of mRNA deadenylation, decapping, and degradation (23). By contrast, the competing eIF5A would preferentially interact with ribosomes that remain longer in the pretranslocation state because of slow peptidyl transferase kinetics, thereby allowing for stabilization of a productive peptidyl transferase center geometry and effectively counteracting Ccr4-Not recruitment.

Not5 senses codon optimality for mRNA decay dependent on Not4

Codon optimality is a major determinant of mRNA degradation, with the proportion of nonoptimal codons within the transcript determining its half-life (4). In essence, a non-optimal codon is one whose functional tRNA concentration is low, resulting in prolonged vacancy of the ribosomal A-site. Because evic-

tion of the E-site tRNA does not require A-site accommodation (24), prolonged vacancy of the A-site results in an increased probability of a ribosome adopting the (-/PP/-) state, which can be recognized by Not5. Thus, a ribosome with an empty E-site in the posttranslocation-state conformation could be specifically sensed by Not5 as a proxy for the presence of a non-optimal codon in the A-site. To test this hypothesis, we performed selective ribosome profiling upon coimmunoprecipitation of Ccr4-Not:ribosome complexes, again using Not4 as bait. We aimed at reducing the background of ribosomes, which are copurified merely because of association with a Not4-bound ribosome within the same polysome. To that end, we included an incubation step during the Not4-IP, resulting in polysome dissociation [most likely through endogenous ribonucleases (RNases)] after adding tigecycline to prevent runoff (fig. S5, A to D). The data revealed a significant inverse correlation between enrichment of messages upon Not4-IP and their associated codon stabilization coefficient (CSC) or degree of codon optimality, respectively (Fig. 5A). An even stronger correlation was observed at the codon level: Enrichment of specific codons at the A-site position upon Not4-IP was inversely correlated with CSC and tRNA adaptation index (tAI) (Fig. 5B). Listing the A-site codons

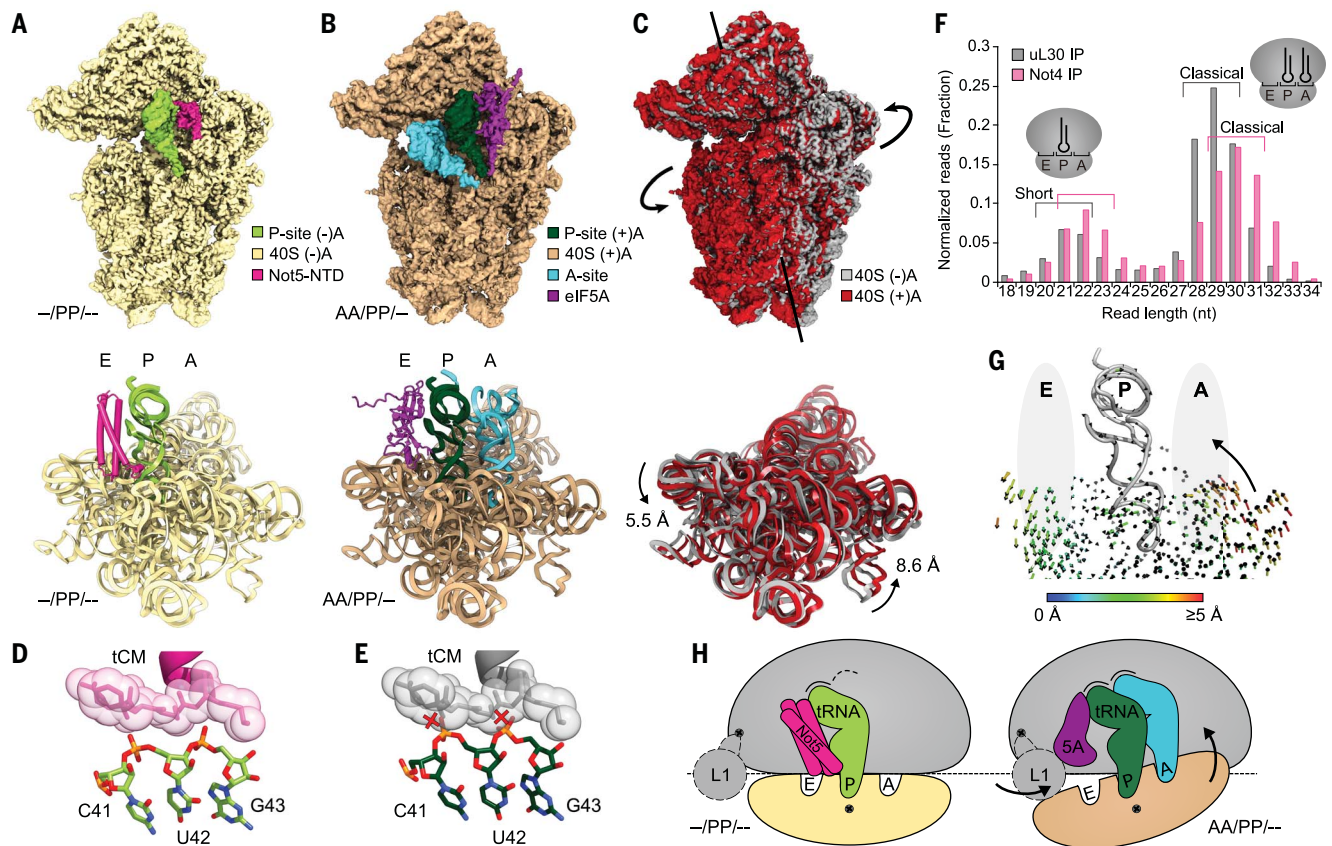


Fig. 4. eIF5A and Not5 compete for the E-site in an A-site-dependent manner. (A) Density (top) and model (bottom) of the Not5-bound 40S subunit of the (-/PP/-) 80S ribosome (only 18S rRNA model shown). (B) Density (top) and model (bottom) of the eIF5A-bound 40S subunit of the (AA/PP/-) 80S ribosome (only 18S rRNA model shown). (C) Superposition of the densities (top) and the models (bottom) from (A) and (B). Subunit rolling is indicated. Structures in (A) to (C) were aligned with respect to the 60S subunits. (D) The tCM of Not5 is contacted by the anticodon stem of the P-site tRNA in the

according to their enrichment through Not4-IP resulted in an almost perfect separation into optimal and nonoptimal codons (Fig. 5C and fig. S5E). Thus, the presence of Ccr4-Not on the ribosome correlates strongly with low codon optimality of the associated mRNAs and in particular with the presence of nonoptimal codons in the ribosomal A-site. This strongly supports our hypothesis that the Ccr4-Not complex is recruited by ribosomes during slowed decoding of nonoptimal codons in the A-site.

We next tested whether the Not5 subunit of the Ccr4-Not complex affects optimality-dependent mRNA degradation and evaluated the decay rates of reporters previously developed to monitor effects of codon optimality on mRNA half-life. Loss of Not5 indeed stabilized nonoptimal mRNAs and, to a lesser extent, also destabilized optimal mRNAs, whereas the semi-optimal mRNAs were stabilized (Fig. 5D and fig. S5F). Thus, loss of the entire Not5 largely disables a cell's ability to degrade mRNAs according to codon usage. Because our

structures suggest a central role for the NTD of Not5, we tested whether codon optimality-dependent mRNA degradation could be maintained in the absence of this domain. We performed mRNA half-life measurements in Not5 deletion cells that expressed nothing, full-length Not5, or Not5 lacking the NTD from plasmids. The N-terminally truncated Not5 failed to rescue the deletion phenotype of global dysregulation of mRNA decay, in contrast to full-length Not5 (Fig. 5E and fig. S6A). Moreover, deletion of eS25, the central ribosomal interaction partner of Not5, also stabilized nonoptimal mRNAs (fig. S5G). Thus, the interaction of the Not5-NTD with the ribosomal E-site is required for communicating codon optimality to the mRNA degradation machinery. Consistent results have also been reported for the mammalian system, in which deletion of the NTD of CNOT3 led to a stabilizing effect for several mRNAs (25).

In addition to the interaction of Not5-NTD with the E-site, the Ccr4-Not complex estab-

lishes a second interaction with the ribosome, which is mediated through the Not4 E3 ligase by ubiquitination of the small subunit protein eS7. As presented earlier (Fig. II), the activity of the Not5-NTD is not required for efficient eS7 ubiquitination. However, we wondered whether eS7 ubiquitination by Not4 affects the function of Not5 in sensing codon optimality. Deletion of Not4 strongly stabilized nonoptimal and semi-optimal reporters, similar to the deletion of the Not5-NTD (Fig. 5E and fig. S6B). This effect could be clearly ascribed to a loss of eS7 ubiquitination, because mutation of the four lysine residues targeted by Not4 (eS7-4KR) resulted in the same phenotype, with respect to codon optimality, as that produced by Not4 deletion. The phenotypes of neither the Not4 deletion nor the eS7a-4KR mutation were additive with the Not5-NTD deletion (Fig. 5E and fig. S6, B and C). Thus, eS7-ubiquitination by Not4 is part of the same pathway as Not5 but occurs upstream of E-site probing. Consistent with this finding, Not5

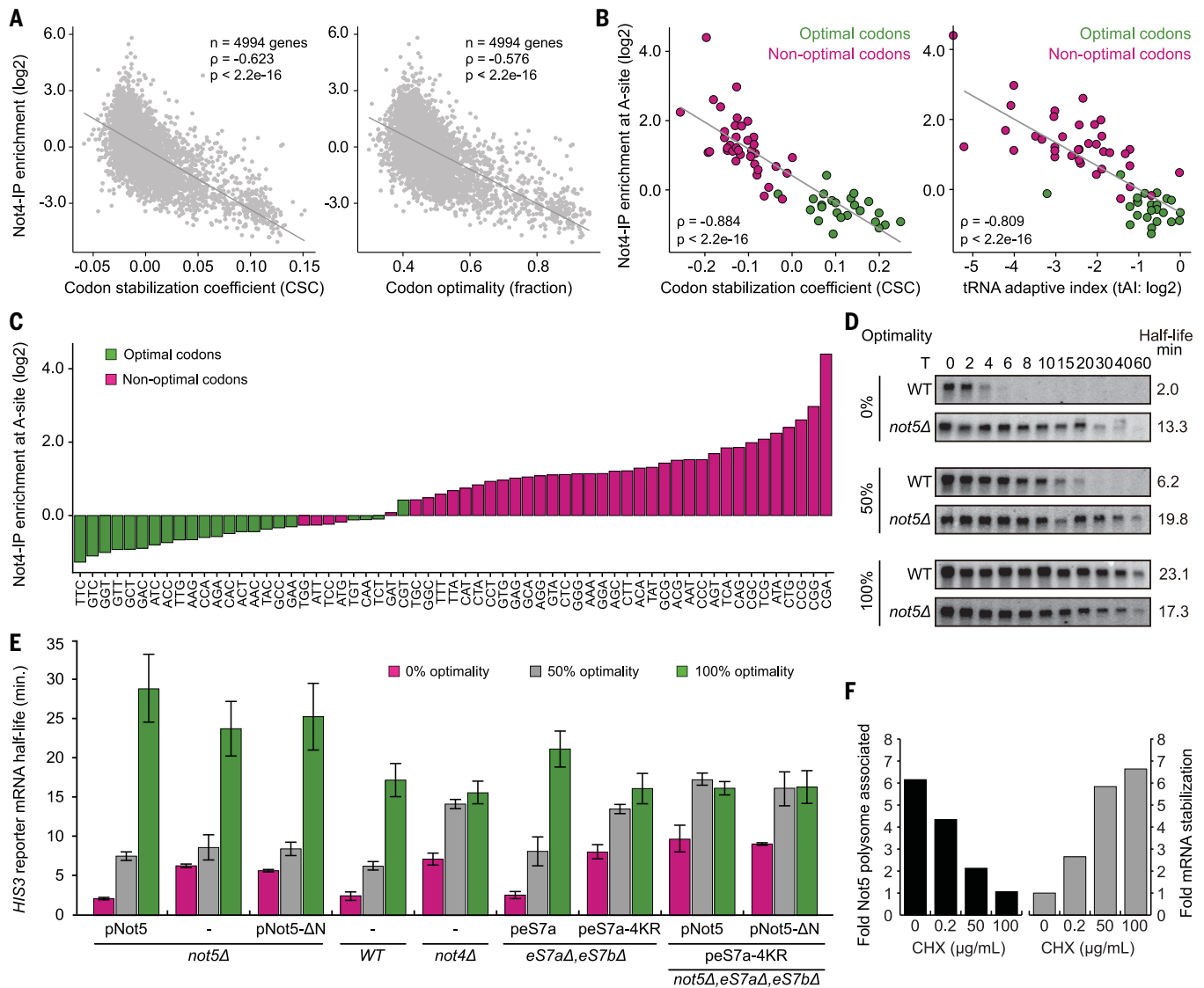


Fig. 5. Not5-NTD and eS7 ubiquitination by Not4 are involved in degradation of nonoptimal mRNAs. (A) Monosome-enriched selective ribosome profiling of Ccr4-Not associated ribosomes and total ribosomes. Enrichment of messages through Not4-IP is inversely correlated with codon stabilization coefficient (CSC) and codon optimality of the messages. (B) Enrichment of specific codons present in the A-site through Not4-IP is inversely correlated with their CSC and the corresponding tAI. (C) Individual codons present in the A-site listed according to their enrichment through Not4-IP. (D) Half-life determination of optimal and

nonoptimal PGK1pG reporter mRNAs through Northern blotting at various time points after transcriptional shutoff (T) in either wild-type or *not5Δ* strains. (E) *HIS3* reporter mRNA half-life measurements in different cell lines (*not5Δ*, WT, *not4Δ*, *eS7a/bΔ*, and *not5ΔeS7a/bΔ*) in combination with expression of different constructs from plasmids (pNot5, pNot5-ΔN, peS7a, and peS7a-4KR) on the basis of Northern blotting (fig. S6; data are means \pm SDs, $N = 3$ replicates). (F) Quantification of the association of Not5 with the translation machinery and stabilization of a nonoptimal PGK1pG reporter mRNA in relation to CHX concentration.

binding to ribosomes was dependent on prior eS7 ubiquitination, because deletion of Not4 or eS7a-4KR mutation substantially reduced Not5 association with (poly)-ribosomes (fig. S5H).

The codon optimality-dependent mRNA degradation pathway has previously been demonstrated to strictly depend on Dhh1 (8), which activates mRNA decapping downstream of Ccr4-Not action (7). We determined whether the Not5:E-site interaction or eS7 ubiquitination also affects the presence of Dhh1 on the translation machinery. Either deletion of the

Not5-NTD or disabling of eS7 ubiquitination was indeed sufficient to prevent Dhh1 association with ribosomes (fig. S5, H and I) and also to cause a decapping defect (fig. S7). This observation confirmed the previously determined sequence of events during codon optimality-dependent mRNA decay (7).

Stabilization of mRNA can also be triggered by CHX treatment, which was ascribed to a steric protection of the mRNAs through accumulation of stalled ribosomes (26). According to our results, CHX should indeed have

a stabilizing effect on mRNAs, but rather through a mechanism of stalling ribosomes with an altered E-site conformation that disfavors Not5 binding, effectively impairing codon optimality sensing. To test this, we employed increasing concentrations of CHX and analyzed polysome association of Not5, as well as the half-life of a nonoptimal mRNA reporter in vivo. In agreement with our hypothesis, treatment of cells with CHX resulted in a dose-dependent depletion of Ccr4-Not from ribosomes (fig. S5J) and in a dose-dependent

stabilization of mRNA (Fig. 5F). Together, these in vivo data support a model in which E-site probing by the Not5-NTD represents the key event for sensing codon optimality in the A-site and for coupling it to mRNA degradation. On the basis of our results, we propose a general model for codon optimality-dependent mRNA degradation (Fig. 6).

Discussion

We discovered a physical link between the Ccr4-Not complex and the ribosome mediated by the Not5 subunit, which specifically binds to ribosomes in the posttranslocation state with simultaneous vacancy of E- and A-sites. Along with the observed strong correlation of Ccr4-Not association to the ribosome with the presence of nonoptimal codons in the A-site, this finding demonstrates that the Ccr4-Not complex is specifically recruited to the translation machinery, when decoding is slowed. In vivo analysis of mRNA half-life showed

that recruitment of Ccr4-Not to the ribosome through Not5 is crucial for the discriminative degradation of mRNAs with different codon optimality. Moreover, the interaction of Ccr4-Not and the ribosome is necessary for the presence of Dhh1 on the translation machinery. Decapping of nonoptimal messages was previously reported to depend strictly on Dhh1 and to occur downstream of deadenylation (7). We also discovered that ubiquitination of eS7 by Not4 is an upstream prerequisite for Not5 binding and the downstream events.

In addition to elongating ribosomes, we also found that a large fraction of the Ccr4-Not complex bound to late-initiation 80S complexes. From a structural perspective, these complexes are ideal targets for Ccr4-Not because they are fully assembled 80S ribosomes in the posttranslocation state with tRNA in the P-site and empty A- and E-sites. With respect to codon optimality sensing, however, the location seems puzzling. One possibility is that, independent of

codon optimality, mRNA decay could also be triggered in this situation, owing to a flawed transition from translation initiation to elongation. This is supported by our finding that these initiation complexes were mainly present in the 80S monosome and not in the polysome fractions. Another possibility is that we were observing a later stage in the mRNA degradation pathway: Considering the closed-loop mRNA model, one could speculate that Ccr4-Not is handed over from the 3' end to the 5' end of the mRNA after deadenylation. Such a handover could be beneficial, because anchoring the complex to the E-site of an 80S ribosome located on the start codon would be an ideal way to assemble and activate the decapping machinery within spatial proximity to the 5' cap while probably inhibiting further initiation. This idea is further supported by recent RNA-binding studies of deadenylation and decapping factors, showing a distributed allocation on the 5' and 3' ends of the transcripts

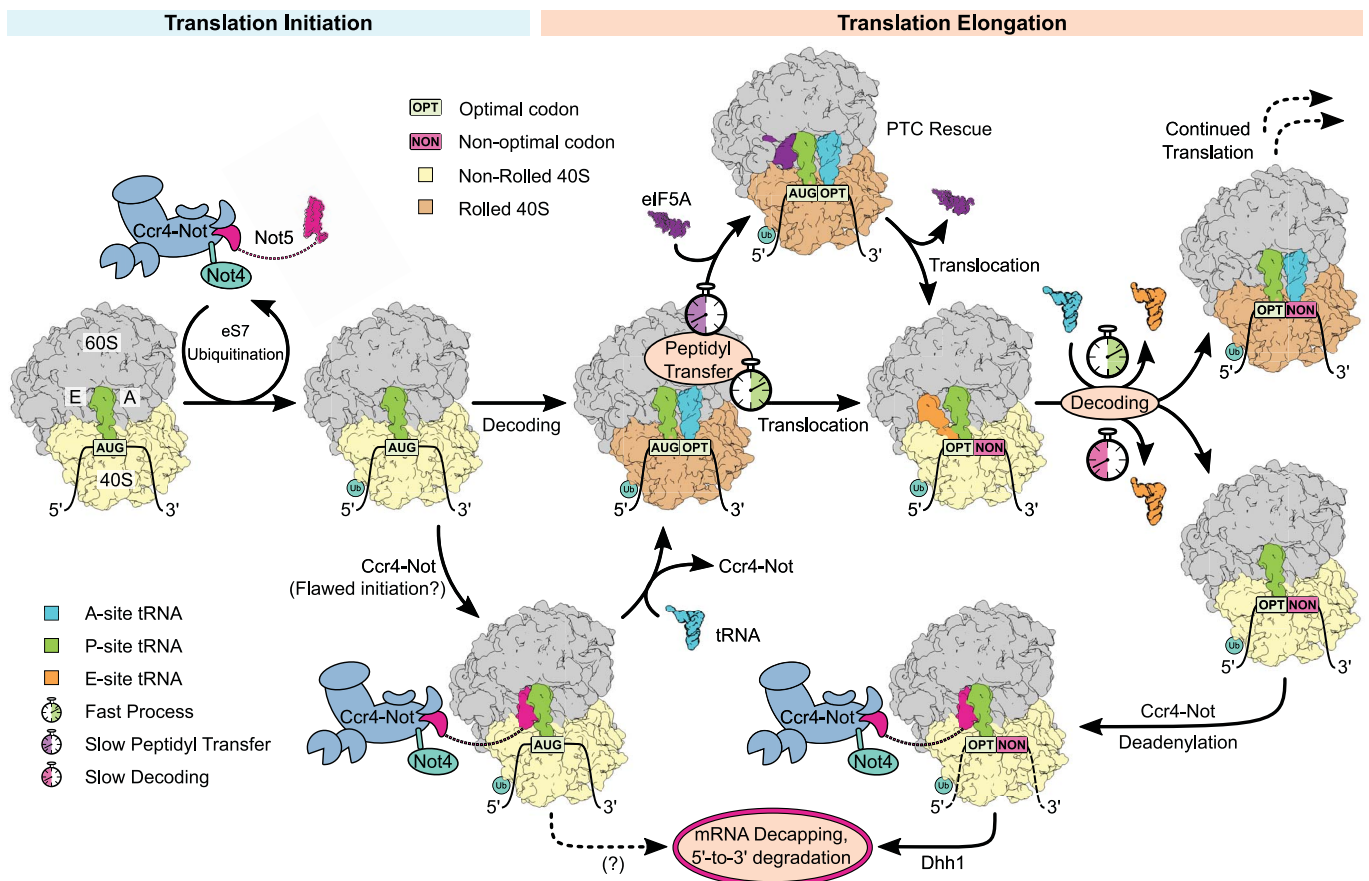


Fig. 6. Model of cotranslational mRNA degradation. Upon subunit association, eS7 is ubiquitinated by Not4. Ccr4-Not can then be anchored to the ubiquitinated (–/PP/–) ribosome through the Not5-NTD. In the case of successful decoding, the ribosome adopts the rolled (AA/PP/–) conformation, disfavoring Ccr4-Not association. Efficient peptidyl transfer leads to translocation, resulting in a classical posttranslocation state (–/PP/EE). If peptidyl transfer is slow, eIF5A binds to the E-site, promoting PTC activity and rescuing translation. When decoding

efficiency is low because of a nonoptimal codon in the A-site, there is an increased probability that the E-site tRNA dissociates before the correct tRNA is accommodated in the A-site, resulting in a (–/PP/–) posttranslocation-state ribosome. This complex is recognized by the Not5-NTD, leading to deadenylation and Dhh1-dependent mRNA degradation. It is unclear whether the mRNA also enters the degradation pathway in the case of the Ccr4-Not-bound initiator ribosome.

(27). Nonetheless, Ccr4-Not function during initiation is likely to extend beyond mRNA decay (28).

Fundamentally, our study demonstrates that the ribosomal conformation, and specifically the E-site, is used as an allosteric indicator of both slow peptidyl transfer kinetics and slow decoding kinetics (movie S1). In either case, translation elongation slows, resulting in transient stabilization of a distinct ribosomal conformation with an accessible E-site. In the case of slow peptidyl transfer, this can be recognized by eIF5A, which promotes peptidyl transfer activity and hence rescues translation. In the case of slow decoding kinetics, this can be recognized by Ccr4-Not, thereby leading to an increased probability of mRNA degradation. This may represent a universal mechanism that can explain how mRNA decay is coupled to translation efficiency in eukaryotes.

Materials and methods

Yeast strains and genetic methods

Gene disruption and C-terminal tagging were performed by established recombination techniques as previously described (29, 30). The *S. cerevisiae* strains used in this study are listed in table S2.

Plasmids

All recombinant DNA techniques were performed according to standard procedures using *Escherichia coli* DH5a for cloning and plasmid propagation. All cloned DNA fragments generated by polymerase chain reaction (PCR) amplification were verified by sequencing. Plasmids used in this study are listed in table S3.

Native complex purification

A *S. cerevisiae* strain with genomically Flag-TEV-ProteinA-tagged Not4 (Not4-FTPA) was cultured in 10 l YPD medium supplemented with 5 µg/ml ampicillin and 10 µg/ml tetracycline and harvested by centrifugation at OD₆₀₀ of 0.9. The pellet was washed in water and lysis buffer [20 mM HEPES pH 7.4, 100 mM KOAc, 10 mM Mg(OAc)₂, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 100 µg/ml tigecycline, protease inhibitor cocktail tablet (Roche)] and frozen in liquid nitrogen. Lysis was performed by grinding the frozen cell pellet in a Freezer Mill (6970 EFM). The ground powder was thawed in 15 ml of lysis buffer, and the lysate was cleared by centrifugation at 12,000g for 15 min at 4°C. Cleared lysate was distributed and layered on top of six sucrose density gradients [10 to 50% sucrose in 20 mM HEPES pH 7.4, 100 mM KOAc, 10 mM Mg(OAc)₂, 1 mM DTT, 10 µg/ml tigecycline in 25-mm-by-89-mm polyallomer tubes, SW32, Beckman Coulter] and centrifuged at 125,755g for 3 hours at 4°C. The gradients were subsequently fractionated from top to bottom using a Gradient Master

(BioComp). The fractions corresponding to the 80S peak (monosome sample) or corresponding to polysomes in the range of 2 to 5 ribosomes (polysome sample) were pooled and treated equally for the remaining purification. The pooled samples were incubated with 100 µl of pre-equilibrated magnetic IgG-coupled Dynabeads M-270 Epoxy (Life Technologies) for 1 hour at 4°C. Beads were washed with 3 × 1 ml wash buffer [20 mM HEPES pH 7.4, 100 mM KOAc, 10 mM Mg(OAc)₂, 1 mM DTT, 10 µg/ml tigecycline]. The Ccr4-Not:ribosome complexes were eluted from IgG beads by incubation with 70 U AcTEV protease (Thermo Fisher) in 50 µl of elution buffer [20 mM HEPES pH 7.4, 100 mM KOAc, 10 mM Mg(OAc)₂, 1 mM DTT, 10 µg/ml tigecycline] for 1.5 hours at 4°C. For the cross-linked sample, chemical cross-linking was performed using 0.5 mM BS3 (Thermo Fisher) for 30 min on ice before the reaction was quenched with 20 mM Tris. All samples were kept on ice until cryo-EM grid preparation or were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. For Northern blotting in the presence of CHX, the purification was performed following the same protocol, but instead of tigecycline, 100 µg/ml CHX were used in the lysis buffer and 10 µg/ml CHX were used during sucrose density centrifugation and affinity purification.

The sample leading to the eIF5A-bound (AA/PP/-) ribosome was prepared by culturing the Not4-FTPA strain in 10 l YPD medium supplemented with 5 µg/ml ampicillin and 10 µg/ml tetracycline and harvesting by centrifugation at OD₆₀₀ of 0.9. The pellet was washed in water and lysis buffer [20 mM HEPES pH 7.4, 100 mM KOAc, 10 mM Mg(OAc)₂, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 100 µg/ml CHX, protease inhibitor cocktail tablet (Roche)] and frozen in liquid nitrogen. Lysis was performed by grinding the frozen cell pellet in a Freezer Mill (6970 EFM). The ground powder was thawed in 15 ml of lysis buffer, and the lysate was cleared by centrifugation at 12,000g for 15 min at 4°C. Cleared lysate was incubated with 100 µl of pre-equilibrated magnetic IgG-coupled Dynabeads M-270 Epoxy (Life Technologies) for 1 hour at 4°C. Beads were washed with 3 × 2 ml wash buffer [20 mM HEPES pH 7.4, 100 mM KOAc, 10 mM Mg(OAc)₂, 1 mM DTT, 10 µg/ml CHX]. Elution was performed by incubation with 200 U AcTEV protease (Thermo Fisher) in 300 µl of elution buffer [20 mM HEPES pH 7.4, 100 mM KOAc, 10 mM Mg(OAc)₂, 1 mM DTT] for 1.5 hours at 4°C. The eluate was layered on top of a sucrose density gradient [10 to 50% sucrose in 20 mM HEPES pH 7.4, 100 mM KOAc, 10 mM Mg(OAc)₂, 1 mM DTT, 10 µg/ml CHX in 14-mm-by-95-mm polyallomer tubes, SW40, Beckman Coulter] and centrifuged at 192,072g for 2.5 hours at 4°C. The gradient was subsequently fractionated from top to bottom using a Gradient Master (BioComp). The 80S fraction was pelleted for

1 hour at 436,000g at 4°C (TLA-100, Beckman Coulter); resuspended in 20 mM HEPES pH 7.4, 100 mM KOAc, 10 mM Mg(OAc)₂, 1 mM DTT, and 10 µg/ml CHX; and kept on ice until cryo-EM grid preparation.

Electron microscopy and image processing

For all samples, 0.05% β-octylglucoside was added shortly before grid preparation. The final concentration of the ribosomal samples was 4 to 5 OD₂₆₀ units per ml. Before sample application, grids were glow-discharged for 20 s at 2.2 × 10⁻¹ torr using a PDC-32G plasma cleaner (Harrick). Cryo-EM grids were prepared by application of 3.5 µl of the sample containing purified Ccr4-Not:ribosome complexes onto R3/3 copper grids with 3-nm continuous carbon support (Quantifoil) and vitrification in liquid ethane using a Vitrobot Mark IV (Thermo Fisher) (45 s of wait time, 2.5 s of blotting time, blot force 0, 95% humidity, 4°C, Whatman 595 blotting paper). Data collection was performed on a Titan Krios TEM (Thermo Fisher) equipped with a Falcon II direct electron detector. Data were collected at 300 kV with a total dose of 28 e⁻/Å² fractionated over 10 frames with a pixel size of 1.084 Å per pixel and a target defocus range of -1.3 to -2.8 µm using software EPU (Thermo Fisher). The raw movie frames were aligned using MotionCor2 (31) and contrast transfer function (CTF) estimation was performed using Gctf (32). See table S1 for cryo-EM data, refinement statistics, and validation statistics.

For the tigecycline monosome dataset, 9945 micrographs were used for automated particle picking with Gautomatch, resulting in 557,059 initial particles, of which 359,890 were selected for further processing upon 2D classification in RELION-2.1 (33). After an initial round of 3D refinement, 3D classification with a mask on the ribosomal intersubunit space was performed. The dataset featured two major classes: a ribosome lacking tRNAs but containing eIF5A (~31% of the data) and a ribosome containing P-site tRNA and additional density in the E-site, which was later identified as the NTD of Not5 (~48% of the data). The 176,111 particles belonging to the Not5-containing class were refined to a final resolution of 2.8 Å using 3D refinement, CTF refinement, and postprocessing in RELION-3.0 (34). The final volume was filtered according to local resolution using RELION-3.0. A classification scheme is provided in fig. S4A.

For the polysome dataset, 9611 micrographs were used for automated particle picking with Gautomatch, resulting in 828,516 initial particles, of which 435,002 were selected for further processing upon 2D classification in RELION-3.0. After an initial round of 3D refinement, 3D classification was performed with a mask on the ribosomal intersubunit space, yielding three major classes: a ribosome lacking tRNAs

but containing eIF5A (~31% of the data), an AP/EE hybrid (~39% of the data), and a ribosome containing P-site tRNA and Not5 (~21% of the data). The Not5-containing class was further classified using a mask on Not5 and, finally, without a mask to further enrich particles containing Not5 and to remove bad particles. The final class containing P-site tRNA, Not5, and density for a nascent chain was refined to a resolution of 3.2 Å using 3D refinement, CTF refinement, and postprocessing in RELION-3.0. The final volume was filtered according to local resolution using RELION-3.0. A classification scheme is provided in fig. S4B.

For the CHX monosome dataset, 12,697 micrographs were used for automated particle picking, with Gautomatch resulting in 1,378,230 initial particles, of which 1,194,480 were selected for further processing upon 2D classification in RELION-3.0. After an initial round of 3D refinement and 3D classification, bad particles and empty ribosomes were discarded, resulting in 274,817 particles (100%) featuring A- and/or P-site tRNA, which were used for extensive 3D classification. This resulted in a class of (AA/PP/-) ribosomes containing eIF5A (~19%), a class of (-/PP/-) ribosomes containing Not5 (~18%), a class of ribosomes containing P-site tRNA and eRF1 in the A-site (~19%), a class of (AA/PP/-) ribosomes in a nonrolled state containing Not5 (~11%), a class of (AA/PP/-) ribosomes (~3%), a class of (-/PP/-) ribosomes (~16%), and a class of empty ribosomes bound to a hibernation factor (~14%). The 50,989 particles belonging to the eIF5A containing (AA/PP/-) class were refined to a final resolution of 3.1 Å using 3D refinement, CTF refinement, and postprocessing in RELION-3.0. The final volume was filtered according to local resolution using RELION-3.0. A classification scheme is provided in fig. S4C.

For the cross-linked monosome dataset, 10,654 micrographs were used for automated particle picking with Gautomatch, resulting in 589,191 initial particles, of which 337,215 were selected for further processing upon 2D classification in RELION-3.0. After an initial round of 3D refinement, 3D classification was performed using a mask comprising the ribosomal P- and E-sites, yielding a major class containing P-site tRNA and Not5 (~37% of the data). The class was further subclassified without a mask to remove low-quality particles. The final volume was refined to 2.9 Å using 3D refinement, CTF refinement, and postprocessing in RELION-3.0. A classification scheme is provided in fig. S4D.

Model building and refinement

A full model was built for the Not5-bound (-/PP/-) ribosome. The model was based on the crystal structure of the yeast 80S ribosome (PDB ID 4V88). Ribosomal proteins and RNA were modeled and refined using COOT (35)

and PHENIX (36). A second copy of the ribosomal protein eL41 was identified adjacent to helix 54 and was then modeled and refined. Initiator-tRNA was modeled on the basis of the crystal structure of yeast tRNA_i^{Met} (PDB ID 1YFG) and subsequently refined. For identification of the additional density in the ribosomal E-site, we placed three helices of poly-Ala into the helical density and assigned individual, highly resolved side chains close to the D-loop of the tRNA as one specific amino acid (e.g., W), as belonging to a group of possible amino acids (e.g., [FYH]), or as any amino acid (X). The resulting pattern [VIL]-[NQ]-X-[FYH]-R-X(2)-[VIL]-[KRQ]-X-W was compared to the UniProt databank (restricted to *S. cerevisiae*) using the motif search function on prosite.expasy.org, yielding two hits: residues 56 to 66 of the Not5 subunit of Ccr4-Not and residues 834 to 844 of the SEH-associated protein 4. The SEH-associated protein could be excluded because the pattern had to be located within the first 100 residues of the unknown protein (N terminus clearly identifiable). Because the N termini of Not3 and Not5 are highly similar, we compared the density of distinctive residues such as I27 (Not5) versus Y27 (Not3), H59 (Not5) versus L58 (Not3), or L67 (Not5) versus Q66 (Not3). The density could be unambiguously assigned to Not5. Not5²⁻¹¹³ was de novo modeled and refined.

The model of the eIF5A-bound (AA/PP/-) ribosome was derived from the Not5-bound ribosome. The model of eIF5A and the A-site tRNA were derived from a previously solved cryo-EM structure (PDB ID 5GAK). The models were refined to fit the (AA/PP/-) density map using COOT and PHENIX.

Cryo-EM densities and molecular models were visualized using ChimeraX (37).

Probe generation for tRNA Northern blotting

Specific digoxigenin (DIG)-labeled antisense probes for tRNA Northern blotting were generated by amplifying an unrelated DNA sequence of 230 nucleotides (nt) from a pcDNA5/FRT/TO-derived plasmid by PCR in the presence of 1 mM DIG-dUTP. The reverse primer used in the PCR reaction had a 3' overhang of 30 nt, which were the reverse complement to the initial 30 bases at the 5' end of the respective tRNAs.

Hybridizing sequence for tRNA_i^{Met}: 5'-CCC-TGCGCGCTTCCACTGCGCCACGGCGCT-3'

Hybridizing sequence for tRNA^{Ala}: 5'-GGA-GCGCGCTACCGACTACGCCACACGCC-3'

tRNA Northern blotting

The samples for tRNA Northern blotting were prepared as described above. In essence, cells were lysed in the presence of no antibiotic, 100 µg/ml tigecycline, or 100 µg/ml CHX. For sucrose density gradient centrifugation, the concentrations of antibiotics were reduced

to 10 µg/ml. After fractionation, samples of the total 80S fractions of all preparations were taken, and the remaining 80S fractions were subjected to affinity purification as described above. Upon elution of the complexes through tag cleavage using AcTEV protease (Thermo Fisher), the ribosome concentrations were measured according to A254.

The Northern blots were performed according to Roche DIG Northern Starter Kit protocol. Equal amounts of ribosomes (~160 pmol) of each sample and 100 ng of yeast tRNA mix as control were separated on NOVEX TBE-Urea Gels 10% (Invitrogen), transferred to Nylon Hybond N+ membranes (Amersham), and probed against tRNAs with DIG-labeled antisense probes. Chemoluminescence was detected on an Amersham 600 imager (GE Healthcare).

Preparation of ribosome protected mRNA fragments for selective ribosome profiling (Not4- and L7-lped-based approach)

The yeast strains with genomically tagged Not4 (Not4-FTPA) or uL30 (uL30-TAP) were cultured in YPD medium and harvested by centrifugation at OD₆₀₀ of 0.5 to 0.6. The harvested cell pellet was frozen in liquid nitrogen and then ground in liquid nitrogen using a mortar. The cell powder was resuspended with the no-drag lysis buffer (50 mM Tris pH7.5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 0.01% NP-40, 1 mM DTT) to prepare the whole-cell lysate. The whole cell lysate was centrifuged at 39,000g for 30 min at 4°C, and the supernatant fraction was used for the purification step. The supernatant fraction was incubated with magnetic IgG-coupled Dynabeads M-270 Epoxy (Life Technologies) for 1 hour at 4°C, and then beads were washed with lysis buffer five times. Elution was performed by incubation with homemade His-TEV protease for 2 hours at 4°C. The elution containing 10 µg of total RNA was treated with 12.5 units of RNase I (Epicentre) at 23°C for 45 min. The ribosome protected mRNA fragments were extracted by TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific) and used for the library preparation.

Preparation of ribosome protected mRNA fragments for monosome-enriched selective ribosome profiling

The yeast strain expressing genomically tagged Not4 (Not4-FTPA) was cultured in YPD medium until mid-log phase (OD₆₀₀ = 0.5 to 0.6), and then the cell pellet was rapidly harvested by centrifugation. The harvested cell pellet was immediately frozen in liquid nitrogen and then ground in liquid nitrogen using a mortar. The cell powder was resuspended with lysis buffer containing 100 µg/ml tigecycline. The whole-cell lysate was centrifuged at 39,000g for 30 min at 4°C, and the supernatant fraction was used for the following step. For total

ribo-seq (input), the supernatant fraction containing 10 μg of total RNA was treated with 12.5 units of RNase I (Epicentre) at 23°C for 45 min, and then ribosome fraction was sedimented through 1 M sucrose cushion. The ribosome protected mRNA fragments were extracted by TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific) and used for the library preparation. For Not4-IPed ribo-seq, the supernatant fraction was incubated with magnetic IgG-coupled Dynabeads M-270 Epoxy (Life Technologies) for 3 hours at 4°C to ensure binding of Not4 to IgG and to partially digest mRNAs by endogenous nuclease. The Not4-bound IgG beads were washed with lysis buffer containing 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tigecycline. Elution was performed by incubation with homemade His-TEV protease for 2 hours at 4°C. The elution containing 10 μg of total RNA was treated with 12.5 units of RNase I (Epicentre) at 23°C for 45 min. The ribosome-protected mRNA fragments were extracted by TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific) and used for the library preparation.

Library preparation for ribosome profiling

Library preparation was performed according to the method previously described with the following modifications (38). As linker DNA, 5'-(Phos)NNNNNIIIIITGATCGGAAGAGCACACGTCTGAA(ddC)-3' [where (Phos) indicates 5' phosphorylation and (ddC) indicates a terminal 2',3'-dideoxycytidine] was used. The Ns and Is indicate a random barcode for eliminating PCR duplication and multiplexing barcode, respectively. The linkers were preadenylated with a 5' DNA Adenylation kit (NEB) and then used for the ligation reaction. Unreacted linkers were digested by 5' deadenylase (NEB) and RecJ exonuclease (epicentre) at 30°C for 45 min. An oligo 5'-(Phos)NNAGATCGGAAGAGCGTCGTGTAGGAAAGAG(iSp18)GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTC-3' [where (Phos) indicated 5' phosphorylation and Ns indicate a random barcode] was used for reverse transcription. PCR was performed with oligos 5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTC-3' and 5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATJJJJJGTGACTGGAGTTCAGACGTGTG-3' [where Js indicate the reverse complement of the index sequence discovered during Illumina sequencing]. The libraries were sequenced on a HiSeq 4000 (Illumina).

Data analysis for selective ribosome profiling

Sequencing reads were demultiplexed and stripped of 3' linker sequence using FASTX-toolkit v0.0.14. The unique molecular identifiers (UMIs), which can serve to remove PCR duplications generated during library preparation, were extracted by UMI-tools v1.0.1 (39). The datasets after these steps are deposited at Gene Expression Omnibus (GEO): GSE131408 and GSE144250. The reads were first filtered

by mapping to Bowtie Index composed of non-coding RNA genes using Bowtie2 v2.2.5. Reads were then mapped to the genome using Tophat v2.1.1. Only uniquely mapping reads from the final genomic alignment were used for subsequent analysis. We estimated the position of the A-site from the 5' end of the reads at the initiation codon on the basis of the length of each footprint using plastids v0.4.7 (40). The mapped read counts were calculated by plastids v0.4.7.

For the analysis of ribosome pause score (Fig. 2F), all footprints containing short form (21 to 22 nt for Not4-IPed and 21 to 23 nt for L7-IPed ribo-seq) and classical form (28 to 30 nt for Not4-IPed and 29 to 31 nt for L7-IPed ribo-seq) were used. The offsets were 17 for 23-nt reads; 16 for 22-, 29-, 30-, and 31-nt reads; and 15 for 21- and 28-nt reads. As previously published (41), we basically took the footprints accumulation over the average of the footprint density in the given ORFs. Analyses were restricted to the mRNAs with 0.5 footprints per codon and more. The averaged pause scores on given codons were computed by R v3.3.2.

For calculating Not4-enrichment (Fig. 5), we employed the monosome-enriched ribosome profiling dataset. All footprints containing short form (21 to 24 nt for input and 20 to 23 nt for Not4-IPed ribo-seq) and classical form (29 to 33 nt for input and 28 to 30 nt for Not4-IPed ribo-seq) were used for analysis. The offsets used in this analysis were 17 for 33-nt reads; 16 for 21- to 24- and 29- to 32-nt reads; and 15 for 20- and 28-nt reads. Transcript-level Not4-enrichment analysis was computed by R package "DESeq" (42). Transcripts that mapped less than 25 reads were omitted from transcript-level enrichment analysis. Codon stabilization coefficient (CSC, fraction of optimality (codon optimality), and TAI were referred for (4, 43, 44). For meta-gene assay of Not4-enrichment at individual codons within the ORF, we first calculated reads per million (RPM) for each codon from overall ORFs ($n = 6696$ genes), excluding initiation and termination codons, and then mean RPM at each codon ($n = 61$ amino acid-coding codons) from Not4-IPed ribo-seq dataset were divided by input one.

Analytical sucrose density gradient centrifugation

Yeast cells were grown exponentially at 30°C, treated with 0.1 mg/ml of CHX for 5 min before harvesting, and then harvested by centrifugation. The harvested cell pellet was frozen and ground in liquid nitrogen using a mortar. The cell powder was resuspended with lysis buffer [20 mM HEPES-KOH, pH 7.4, 100 mM potassium acetate, 2 mM magnesium acetate, 0.5 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 tablet/10 ml Complete mini EDTA-free (11836170001, Roche)] to prepare the lysate. The lysate (the equivalent of 50 A260 units) was layered on top of the 10 to

50% sucrose gradients and then centrifuged at 150,000g in a P28S rotor (Hitachi Koki, Japan) for 2.5 hours at 4°C. The polysome profiles were generated by continuous absorbance measurement at 254 nm using a single-path UV-1 optical unit (ATTO Biomini UV-monitor) connected to a chart recorder (ATTO digital mini-recorder). Proteins in each fraction were separated by 10% Nu-PAGE and transferred to PVDF membranes (Millipore; IPVH00010). After blocking with 5% skim milk, the blots were incubated with the Anti-HA-Peroxidase (12013819001, Roche), and detected by ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare).

In the sucrose density gradient centrifugation analysis of fig. S5H, yeast cells were grown exponentially at 30°C and then harvested by centrifugation without CHX treatment. The lysate (the equivalent of 50 A260 units) were layered on top of the 10 to 50% sucrose gradients and then centrifuged at 270,700g in a SW41Ti rotor (Beckman Coulter) for 80 min at 4°C. Other experimental handling was similar to that described above.

Transcriptional shutoff and RNA Northern blot analysis

For the *GALI* UAS transcriptional shutoff analysis, cells expressing the appropriate plasmids were grown at 24°C in synthetic media with 2% galactose/1% sucrose to allow for expression of the reporter mRNA. Cells were shifted to synthetic media without sugar at an $\text{OD}_{600} = 0.4$, and then transcription was repressed by adding glucose to a final concentration of 4%. Cells were collected at the time points indicated in the figures. For the CHX-treated experiments, different concentrations of CHX (0, 0.2, 50, or 100 mg/ml) were added to cells ($\text{OD}_{600} = 0.4$) for 40 min, followed by the transcriptional shutoff analysis.

Total RNA was extracted by phenol/chloroform and precipitated with 95% EtOH overnight. RNA (30 μg) was separated on 1.4% agarose-formaldehyde gels at 100 V for 1.5 hours, transferred to nylon membranes, and probed with ^{32}P -labeled antisense oligonucleotides to detect poly (G) (oJC168), *HIS3* (oJC2564), or *SCR1* (oJC306) (table S3). Blots were exposed to PhosphorImager screens, scanned by Typhoon 9400, and quantified by ImageQuant.

Half-life measurement and RNA Northern blot for *HIS3* mRNA stability analysis

For the *HIS3* mRNA stability analysis, cells expressing the respective plasmids were grown at 30°C in synthetic media with 2% galactose after preculture in synthetic media with 2% raffinose to allow for expression of the reporter mRNA. At an $\text{OD}_{600} = 0.5$, galactose-containing media was removed and then transcription was repressed by adding glucose to a final concentration of 2%. Cells were collected at the time points indicated in the figures. See Fig. 5E for

HIS3 reporter mRNA half-life measurements and fig. S6 for Northern blots of *HIS3* reporter mRNA.

Total RNA was extracted by phenol/chloroform and refined with ethanol precipitation. RNA (500 or 1000 ng) was mixed with 27 μ l of glyoxal mix [600 μ l of DMSO, 200 μ l of deionized 40% glyoxal, 120 μ l of 10x MOPS buffer (200 mM MOPS, 50 mM NaOAc, 10 mM EDTA, pH 7.0), 62.5 μ l of 80% glycerol, and 17.5 μ l of DEPC-treated water in 1 ml] and 3 μ l of RNA loading buffer (50% glycerol, 10 mM EDTA pH 8.0, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol) and separated on 1.2% agarose-MOPS gels at 200 V for 40 min, then transferred to Hybond-N+ membrane (GE healthcare) with 20xSSC (3M NaCl, 300 mM Trisodium citrate dihydrate) for 20 hours using a capillary system. After cross-linking on a membrane by CL-1000 ultraviolet cross-linker (UVP) at 120 mJ/cm², the membrane was incubated with DIG Easy Hyb Granules (Roche) for 1 hour in a hybridization oven at 50°C. 5' end DIG-labeled oligonucleotide for the FLAG-Tag sequence (5'-CTTGTCGTCGTCGTCCTTGTAGTC-3') was added and incubated for more than 18 hours, followed by an additional wash with wash buffer I (2.0x SSC, 0.1% SDS) and wash buffer II (0.1x SSC, 0.1% SDS) for 15 min at 50°C. The membrane was then incubated with 1x maleic acid buffer (100 mM maleic acid, 150 mM NaCl, pH 7.0, adjusted by NaOH) containing Blocking Reagent (Roche) for 60 min at room temperature. Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments (Roche), was added to Blocking Reagent and further incubated for 1 hour. For washing, membrane was incubated with wash buffer III (1x maleic acid buffer, 0.3% tween 20) for 10 min, three times, and equilibrated by equilibration buffer (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, pH 9.5). For detection, membrane was reacted with CDP-star (Roche) for 10 min, and chemiluminescence was detected by LAS-4000 (GE healthcare). Relative RNA levels were determined using Multi Gauge v3.0 (Fujifilm, Japan) by comparison to a standard curve using a series of dilutions of samples from time point 0 hours (just after transcription shutoff). The displayed values represent the averages of biological triplicates ($N = 3$) and their standard deviations.

Polyribosome analysis and Western blotting

CHX (100 μ g/ml) was added when cells reach to OD₆₀₀ = 0.4 before harvesting. For detecting Dhh1p by Western blotting, cells were cross-linked at a final concentration of 0.25% formaldehyde for 5 min, then treated with 125 mM glycine for 10 min to quench cross-linking before adding CHX. Cells were then lysed into lysis buffer (10 mM Tris pH 7.4, 100 mM NaCl, 30 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 100 μ g/ml CHX) by vortexing with glass beads, and cleared using the hot needle puncture method. 1% Triton X-100 was added into the supernatant.

7.5 OD₂₆₀ units were loaded on 15 to 45% (w/w) sucrose gradients prepared on a Biocomp Gradient Master in gradient buffer (50 mM Tris-acetate pH 7.0, 50 mM NH₄Cl, 12 mM MgCl₂, 1 mM DTT) and centrifuged in a SW-41Ti rotor at 41,000 revolutions per minute for 2 hours and 26 min (to detect Dhh1p signal, the centrifugation step is optimized to 1 hour 13 min for all groups in fig. S5I (45) at 4°C]. Gradients were fractionated by using a Brandel Fractionation System and an ISCO UA-6 ultraviolet detector. Fractions were precipitated at -20°C with 10% TCA (final concentration) overnight. Pellets were washed with 80% acetone, resuspended in 50 μ l of SDS-PAGE loading buffer, and boiled at 95°C for 5 min, then separated by 10% SDS polyacrylamide gels, followed by Western blotting with primary antibodies (anti-HA [BioLegend, PRB-101C], anti-Rpl4 [Proteintech, 11302-1-AP], anti-Dhh1p at 4°C overnight and incubated with secondary antibodies (goat-anti-Mouse [Santa Cruz sc-2005] and goat-anti-Rabbit [Pierce 31460]) at room temperature for 1 hour. Signal was detected by chemiluminescence using Blue Ultra Autorad film.

Endogenous mRNA Northern blot for *EDC1* mRNAs

For the endogenous mRNA Northern blot, the indicated cells were grown at 30°C in synthetic media with 2% glucose. Cells were harvested at an OD₆₀₀ = 0.7. Total RNA was extracted by phenol/chloroform and ethanol precipitation. RNA (5 μ g) was separated on 1.2% agarose-formaldehyde gels at 200 V for 60 min, and then transferred to nylon membranes. After the RNA-transfer step, experimental handling was similar to that described for the *HIS3* half-life measurements. Relative RNA levels were determined using Multi Gauge v3.0 (Fujifilm, Japan). The displayed values represent the averages of biological triplicates ($N = 3$) and their standard deviations.

DIG-labeled *EDC1* probes were prepared by PCR-based nucleic acid labeling using PCR DIG Probe Synthesis kit (Roche, NJ, USA) according to the procedure specified by the manufacturer and primers 5'-ATGTCGACG-GATACCATGTATTTCAACAG-3' and 5'-TTA-GCCTCCCTTGGACCATTAGTG-3'.

REFERENCES AND NOTES

- M. A. Collart. The Ccr4-Not complex is a key regulator of eukaryotic gene expression. *WIREs RNA* 7, 438–454 (2016). doi: 10.1002/wrna.1332; PMID: 26821858
- I. B. Schäfer et al., Molecular Basis for poly(A) RNP Architecture and Recognition by the Pan2-Pan3 Deadenylase. *Cell* 177, 1619–1631.e21 (2019). doi: 10.1016/j.cell.2019.04.013; PMID: 31104843
- R. Parker. RNA degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 191, 671–702 (2012). doi: 10.1534/genetics.113.137265; PMID: 22785621
- V. Presnyak et al., Codon optimality is a major determinant of mRNA stability. *Cell* 160, 1111–1124 (2015). doi: 10.1016/j.cell.2015.02.029; PMID: 25768907

- A. A. Bazzini et al., Codon identity regulates mRNA stability and translation efficiency during the maternal-to-zygotic transition. *EMBO J.* 35, 2087–2103 (2016). doi: 10.15252/embj.201694699; PMID: 27436874
- Q. Wu et al., Translation affects mRNA stability in a codon-dependent manner in human cells. *eLife* 8, e45396 (2019). doi: 10.7554/eLife.45396; PMID: 31012849
- M. W. Webster et al., mRNA Deadenylation Is Coupled to Translation Rates by the Differential Activities of Ccr4-Not Nucleases. *Mol. Cell* 70, 1089–1100.e8 (2018). doi: 10.1016/j.molcel.2018.05.033; PMID: 29932902
- A. Radhakrishnan et al., The DEAD-Box Protein Dhh1p Couples mRNA Decay and Translation by Monitoring Codon Optimality. *Cell* 167, 122–132.e9 (2016). doi: 10.1016/j.cell.2016.08.053; PMID: 27641505
- P. Tesina et al., Structure of the 80S ribosome-Xrn1 nuclease complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 26, 275–280 (2019). doi: 10.1038/s41594-019-0202-5; PMID: 30911188
- L. N. Dimitrova, K. Kuroha, T. Tatematsu, T. Inada, Nascent peptide-dependent translation arrest leads to Not4p-mediated protein degradation by the proteasome. *J. Biol. Chem.* 284, 10343–10352 (2009). doi: 10.1074/jbc.M808842020; PMID: 19204001
- S. Preissler et al., Not4-dependent translational repression is important for cellular protein homeostasis in yeast. *EMBO J.* 34, 1905–1924 (2015). doi: 10.15252/embj.201490194; PMID: 25971775
- K. Ikeuchi et al., Collided ribosomes form a unique structural interface to induce Hel2-driven quality control pathways. *EMBO J.* 38, e100276 (2019). doi: 10.15252/embj.2018100276; PMID: 30609991
- O. O. Panasenko, M. A. Collart, Presence of Not5 and ubiquitinated Rps7A in polysome fractions depends upon the Not4 E3 ligase. *Mol. Microbiol.* 83, 640–653 (2012). doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07957.x; PMID: 22243599
- Z. Villanyi et al., The Not5 subunit of the ccr4-not complex connects transcription and translation. *PLoS Genet.* 10, e1004569 (2014). doi: 10.1371/journal.pgen.1004569; PMID: 25340856
- N. Alhusaini, J. Coller, The deadenylase components Not2p, Not3p, and Not5p promote mRNA decapping. *RNA* 22, 709–721 (2016). doi: 10.1261/ma.054742.115; PMID: 26952104
- D. Muhlrud, R. Parker, The yeast *EDC1* mRNA undergoes deadenylation-independent decapping stimulated by Not2p, Not4p, and Not5p. *EMBO J.* 24, 1033–1045 (2005). doi: 10.1038/sj.emboj.7600560; PMID: 15706350
- R. Basavappa, P. B. Sigler, The 3 A crystal structure of yeast initiator tRNA: Functional implications in initiator/elongator discrimination. *EMBO J.* 10, 3105–3111 (1991). doi: 10.1002/j.1460-2075.1991.tb07864.x; PMID: 1915284
- J. G. Tate et al., COSMIC: The Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Res.* 47, D941–D947 (2019). doi: 10.1093/nar/gky1015; PMID: 30371878
- K. De Keersmaecker et al., Exome sequencing identifies mutation in *CNOT3* and ribosomal genes *RPL5* and *RPL10* in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Genet.* 45, 186–190 (2013). doi: 10.1038/ng.2508; PMID: 23263491
- T. V. Budkevich et al., Regulation of the mammalian elongation cycle by subunit rolling: A eukaryotic-specific ribosome rearrangement. *Cell* 158, 121–131 (2014). doi: 10.1016/j.cell.2014.04.044; PMID: 24995983
- C. Schmidt et al., Structure of the hypusinated eukaryotic translation factor eIF-5A bound to the ribosome. *Nucleic Acids Res.* 44, 1944–1951 (2016). doi: 10.1093/nar/gkv1517; PMID: 26715760
- C. C. Wu, B. Zinshteyn, K. A. Wehner, R. Green, High-Resolution Ribosome Profiling Defines Discrete Ribosome Elongation States and Translational Regulation during Cellular Stress. *Mol. Cell* 73, 959–970.e5 (2019). doi: 10.1016/j.molcel.2018.12.009; PMID: 30686592
- G. Hanson, N. Alhusaini, N. Morris, T. Sweet, J. Coller, Translation elongation and mRNA stability are coupled through the ribosomal A-site. *RNA* 24, 1377–1389 (2018). doi: 10.1261/rna.066787.118; PMID: 29997263
- A. D. Petropoulos, R. Green, Further in vitro exploration fails to support the allosteric three-site model. *J. Biol. Chem.* 287, 11642–11648 (2012). doi: 10.1074/jbc.C111.330068; PMID: 22378789
- T. Suzuki et al., *CNOT3* suppression promotes necroptosis by stabilizing mRNAs for cell death-inducing proteins. *Sci. Rep.* 5, 14779 (2015). doi: 10.1038/srep14779; PMID: 26437789
- L. Y. Chan, C. F. Mugler, S. Heinrich, P. Vallotton, K. Weis, Non-invasive measurement of mRNA decay reveals translation

- initiation as the major determinant of mRNA stability. *eLife* **7**, e32536 (2018). doi: [10.7554/eLife.32536](https://doi.org/10.7554/eLife.32536); pmid: [30192227](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30192227/)
27. S. Sohrabi-Jahromi *et al.*, Transcriptome maps of general eukaryotic RNA degradation factors. *eLife* **8**, e47040 (2019). doi: [10.7554/eLife.47040](https://doi.org/10.7554/eLife.47040); pmid: [31135339](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31135339/)
 28. O. O. Panasenko *et al.*, Co-translational assembly of proteasome subunits in NOT1-containing assemblyosomes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **26**, 110–120 (2019). doi: [10.1038/s41594-018-0179-5](https://doi.org/10.1038/s41594-018-0179-5); pmid: [30692646](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30692646/)
 29. M. S. Longtine *et al.*, Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 953–961 (1998). doi: [10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199807\)14:10<953::AID-YEA293>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199807)14:10<953::AID-YEA293>3.0.CO;2-U); pmid: [9717241](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9717241/)
 30. C. Janke *et al.*, A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: New fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* **21**, 947–962 (2004). doi: [10.1002/yea.1142](https://doi.org/10.1002/yea.1142); pmid: [15334558](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15334558/)
 31. S. Q. Zheng *et al.*, MotionCor2: Anisotropic correction of beam-induced motion for improved cryo-electron microscopy. *Nat. Methods* **14**, 331–332 (2017). doi: [10.1038/nmeth.4193](https://doi.org/10.1038/nmeth.4193); pmid: [28250466](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28250466/)
 32. K. Zhang, Gctf: Real-time CTF determination and correction. *J. Struct. Biol.* **193**, 1–12 (2016). doi: [10.1016/j.jsb.2015.11.003](https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.11.003); pmid: [26592709](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26592709/)
 33. D. Kimanius, B. O. Forsberg, S. H. Scheres, E. Lindahl, Accelerated cryo-EM structure determination with parallelisation using GPUs in RELION-2. *eLife* **5**, e18722 (2016). doi: [10.7554/eLife.18722](https://doi.org/10.7554/eLife.18722); pmid: [27845625](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27845625/)
 34. J. Zivanov *et al.*, New tools for automated high-resolution cryo-EM structure determination in RELION-3. *eLife* **7**, e42166 (2018). doi: [10.7554/eLife.42166](https://doi.org/10.7554/eLife.42166); pmid: [30412051](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30412051/)
 35. P. Emsley, K. Cowtan, Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D* **60**, 2126–2132 (2004). doi: [10.1107/S0907444904019158](https://doi.org/10.1107/S0907444904019158); pmid: [15572765](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15572765/)
 36. P. V. Afonine *et al.*, Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr. D* **68**, 352–367 (2012). doi: [10.1107/S0907444912001308](https://doi.org/10.1107/S0907444912001308); pmid: [22505256](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22505256/)
 37. T. D. Goddard *et al.*, UCSF ChimeraX: Meeting modern challenges in visualization and analysis. *Protein Sci.* **27**, 14–25 (2018). doi: [10.1002/pro.3235](https://doi.org/10.1002/pro.3235); pmid: [28710774](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28710774/)
 38. N. T. Ingolia, G. A. Brar, S. Rouskin, A. M. McGeachy, J. S. Weissman, The ribosome profiling strategy for monitoring translation in vivo by deep sequencing of ribosome-protected mRNA fragments. *Nat. Protoc.* **7**, 1534–1550 (2012). doi: [10.1038/nprot.2012.086](https://doi.org/10.1038/nprot.2012.086); pmid: [22836135](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22836135/)
 39. T. Smith, A. Heger, I. Sudbery, UMI-tools: Modeling sequencing errors in Unique Molecular Identifiers to improve quantification accuracy. *Genome Res.* **27**, 491–499 (2017). doi: [10.1101/gr.209601.116](https://doi.org/10.1101/gr.209601.116); pmid: [28100584](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28100584/)
 40. J. G. Dunn, J. S. Weissman, Plastid: Nucleotide-resolution analysis of next-generation sequencing and genomics data. *BMC Genomics* **17**, 958 (2016). doi: [10.1186/s12864-016-3278-x](https://doi.org/10.1186/s12864-016-3278-x); pmid: [27875984](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27875984/)
 41. C. J. Woolstenhulme, N. R. Guydosh, R. Green, A. R. Buskirk, High-precision analysis of translational pausing by ribosome profiling in bacteria lacking EFP. *Cell Rep.* **11**, 13–21 (2015). doi: [10.1016/j.celrep.2015.03.014](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.014); pmid: [25843707](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25843707/)
 42. S. Anders, W. Huber, Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* **11**, R106 (2010). doi: [10.1186/gb-2010-11-10-r106](https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-10-r106); pmid: [20979621](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20979621/)
 43. S. Pechmann, J. Frydman, Evolutionary conservation of codon optimality reveals hidden signatures of cotranslational folding. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 237–243 (2013). doi: [10.1038/nsmb.2466](https://doi.org/10.1038/nsmb.2466); pmid: [23262490](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23262490/)
 44. D. A. Drummond, A. Raval, C. O. Wilke, A single determinant dominates the rate of yeast protein evolution. *Mol. Biol. Evol.* **23**, 327–337 (2006). doi: [10.1093/molbev/msj038](https://doi.org/10.1093/molbev/msj038); pmid: [16237209](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16237209/)
 45. T. Sweet, C. Kovalak, J. Collier, The DEAD-box protein Dhh1 promotes decapping by slowing ribosome movement. *PLoS Biol.* **10**, e1001342 (2012). doi: [10.1371/journal.pbio.1001342](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001342); pmid: [22719226](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22719226/)

ACKNOWLEDGMENTS

Computations were partially performed on the NIG supercomputer at ROIS National Institute of Genetics. We thank H. Sieber, C. Ungewickell, S. Rieder, L. Kater, and J. Schneider for technical support. This work used the Vincent J. Coates Genomics Sequencing Laboratory at UC Berkeley, supported by NIH S10 Instrumentation Grant ODD18174. We also thank T. Fröhlich and LAFUGA for mass spectrometry analysis. **Funding:** This study was

supported by a Ph.D. fellowship by Boehringer Ingelheim Fonds to R.Bu., a Deutsche Forschungsgemeinschaft grant (BE1814/15-1) to J.Ch., Grants-in-Aid for Scientific Research (KAKENHI) from the Japan Society for the Promotion of Science (26116003 and 18H03977 to T.I.; 19K06481 to Y.Matsuo), Research Grants in the Natural Sciences from the Takeda Foundation (to T.I.), Research Grants in the Medical Sciences from Kato Memorial Bioscience Foundation (to Y.Matsuo), and NIH grants (GM118018 and GM115086 to J.Co.). **Author contributions:** R.Bu., R.Be., T.I., and J.Co. designed experiments; O.B. collected cryo-EM data; R.Bu. prepared cryo-EM samples and processed the cryo-EM data; R.Bu. and J.Ch. built molecular models; R.Bu. and P.T. refined molecular models; R.Bu. and T.B. analyzed structures; Y.Matsuo performed and analyzed selective ribosome profiling; Y.-H.C., Y.Matsuki, and T.Su. performed analytical ultracentrifugation; A.G. and R.Bu. performed tRNA Northern blotting; T.Su., Y.-H.C., N.A., T.Sw., R.N., and K.I. performed mRNA stability measurements; and R.Bu., R.Be., and J.Co. wrote the manuscript, with comments from all authors. **Competing interests:** The authors declare no competing interests. **Data and materials availability:** The sequencing data for ribosome profiling experiments have been deposited in the National Center for Biotechnology Information's Gene Expression Omnibus (GEO) and are accessible through GEO series accession numbers GSE131408 and GSE144250. Cryo-EM maps and molecular models have been deposited with in the Electron Microscopy Data Bank with accession codes EMD-10431 (Not5-80S) and EMD-10537 (eIF5A-80S) and in the Protein Data Bank (PDB) with IDs 6TB3 (Not5-80S) and 6TNU (eIF5A-80S).

SUPPLEMENTARY MATERIALS

science.sciencemag.org/content/368/6488/eaay6912/suppl/DC1
Figs. S1 to S7
Tables S1 to S3
MDAR Reproducibility Checklist
References (46, 47)
Movie S1

[View/request a protocol for this paper from Bio-protocol.](#)

10 July 2019; resubmitted 30 January 2020
Accepted 5 March 2020
[10.1126/science.aay6912](https://doi.org/10.1126/science.aay6912)

The Ccr4-Not complex monitors the translating ribosome for codon optimality

Robert Buschauer, Yoshitaka Matsuo, Takato Sugiyama, Ying-Hsin Chen, Najwa Alhusaini, Thomas Sweet, Ken Ikeuchi, Jingdong Cheng, Yasuko Matsuki, Risa Nobuta, Andrea Gilmozzi, Otto Berninghausen, Petr Tesina, Thomas Becker, Jeff Collier, Toshifumi Inada and Roland Beckmann

Science **368** (6488), eaay6912.
DOI: 10.1126/science.aay6912

Coupling translation and mRNA decay

Gene expression requires messenger RNAs (mRNAs)—DNA-derived blueprints of genes—to be translated by protein-producing ribosomes. The levels of mRNAs are tightly regulated, in part by controlling their half-lives. In eukaryotic cells, mRNA half-life is largely linked to translational efficiency, but the mechanism underlying this link has remained elusive. Buschauer *et al.* used cryo-electron microscopy and RNA sequencing to show how a key regulator of mRNA degradation, the Ccr4-Not complex, monitors the ribosome during mRNA translation. They found that the Not5 subunit directly binds to a ribosomal site exposed specifically during inefficient decoding, thereby triggering mRNA degradation. Analysis of mutants revealed the importance of this sensing mechanism for mRNA homeostasis.

Science, this issue p. eaay6912

ARTICLE TOOLS

<http://science.sciencemag.org/content/368/6488/eaay6912>

SUPPLEMENTARY MATERIALS

<http://science.sciencemag.org/content/suppl/2020/04/15/368.6488.eaay6912.DC1>

REFERENCES

This article cites 47 articles, 10 of which you can access for free
<http://science.sciencemag.org/content/368/6488/eaay6912#BIBL>

PERMISSIONS

<http://www.sciencemag.org/help/reprints-and-permissions>

Use of this article is subject to the [Terms of Service](#)

Science (print ISSN 0036-8075; online ISSN 1095-9203) is published by the American Association for the Advancement of Science, 1200 New York Avenue NW, Washington, DC 20005. The title *Science* is a registered trademark of AAAS.

Copyright © 2020 The Authors, some rights reserved; exclusive licensee American Association for the Advancement of Science. No claim to original U.S. Government Works