

研 究 報 告 書(公開)

「紫外線によって生じる RNA 損傷の修復機構の研究」

研究期間：平成19年9月～平成23年3月

研究者：北島 真

1. 研究のねらい

真核生物のリボソームは4本のRNAと80個のたんぱく質で構成されています。この巨大な複合体に対してどのような品質管理の機構が存在するのかは、明確ではありませんでした。本研究では真核生物のリボソームに対して紫外線などによる損傷を与え、ストレスによってダメージを受けたリボソームが細胞の中でどのような運命をたどるかについて詳しく追跡することで、真核生物のリボソームがどのような品質管理機構によってその品質を確保しているのか、これまでに知られていない新しい機構を発見し解明することを目指しました。

2. 研究成果

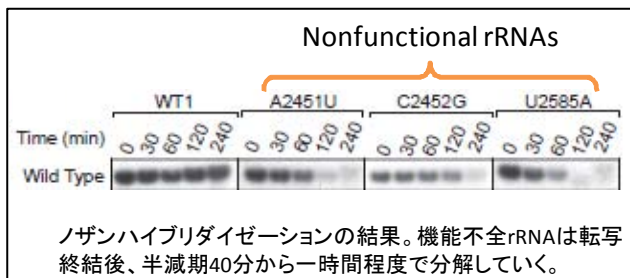
紫外線の照射や塩基置換によってリボソームがダメージを受けた場合、ダメージの内容によっては細胞の中で損傷リボソームが選択的に消失していくという現象を明らかにした。このことは真核生物にはリボソームの異常を認識し、これを取り除くことでリボソームの機能を保っている「品質管理機構」が存在していることを示している。本研究ではこの「品質管理機構」について、損傷の「修復」とみられる現象と、「選択的分解」とみられる現象の2つに焦点を絞り、それぞれの現象の分子機構解明を目標とした。

このうち、「修復」の現象については、新しい知見がみいだされてきているが、公表の段階になく準備中の論文にその詳細を譲りたい。以下には、「選択的分解」現象についてのみ記載した。

(1) 機能不全リボソーム RNA は選択的に分解される

リボソーム RNA (rRNA) の品質管理機構を研究するにあたり、一方の実験系では出芽酵母を材料として選択した。これは出芽酵母には遺伝学的な手法や、さまざまな道具が豊富に存在するために、分子機構の解明に非常に有効であるためである。出芽酵母は紫外線に対して非常に抵抗性を示す(おそらく細胞壁の存在によると思われる)ことが文献的に分かっていたので、この場合には紫外線を照射することを断念し、rRNA の活性中心に点変異を導入することでリボソームを不活性化することを試みた。

RNA ポリメラーゼ I の温度感受性株を用いた実験より、点変異を導入した rRNA のうち3種類について、リボソームの機能が失われることが示された。これらの機能不全 rRNA を発現する細胞で、機能不全 rRNA の転写を停止させ、これらの RNA が細胞内でどの程度安定であるかをノザンハイブリダイゼーションで確認した。すると、機能を持った正常型の rRNA の場合にはほとんど分解が観察されないほど安定であるのと対照的に、

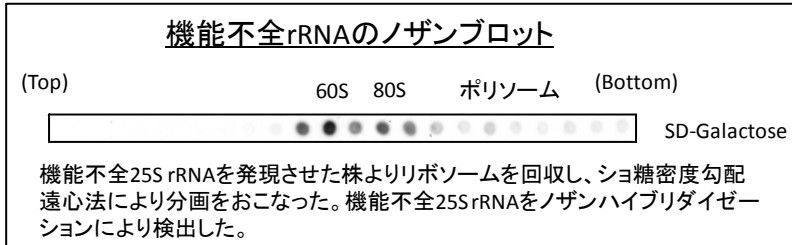


点変異により機能不全となった変異 rRNA の場合には、どの場合も半減期40分から一時間程度の短い時間で分解が起こることが明らかになった(図)。これは真核生物の rRNA に対して何らかの品質管理機構が存在していることを示す結果である。

ある。

(2)機能不全 rRNA はリボソーム粒子中に入ってから分解される

上記の機能不全 rRNA を発現させた酵母からリボソームを調製し、シヨ糖密度勾配遠心法とノザンハイブリダイゼーションを組み合わせた方法により、機能不全 rRNA がどの分画に現れるかを検証した。すると機能不全 rRNA の多くは 60S と 80S のピークに現れており、一部は



ポリソーム画分にも含まれていた(図)。このことは機能不全 25S rRNA はいったん 60S 粒子までアッセンブルされてから一度は 80S を形成し、その後分解されることを

示している。つまり細胞は rRNA に正常な機能が備わっているかどうかの判定を、一旦 80S 粒子の形にしてから行っていることを意味している。

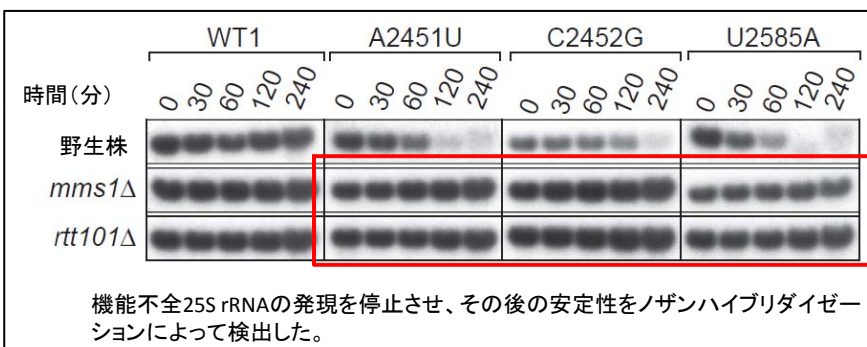
機能不全 rRNA を発現させた酵母を、in situ ハイブリダイゼーションを使って観察すると、機能不全 rRNA は細胞質の画分に主に存在することが明らかになった。このことは上記の観察と一致し、このような点変異を持つ rRNA も 60S 粒子となって核から細胞質へと移行し、80S 粒子を形成しようということを示している。

以上の実験から、細胞はなんらかの形でリボソーム 80S 粒子の機能が正しいかどうかを診断する方法を持っている、ということが結論された。

(3)機能不全リボソームの選択的分解に関与する因子の同定

この現象に関わる因子を同定するために、出芽酵母の遺伝子ノックアウトコレクションを利用した。これは出芽酵母の持つ 6000 個の遺伝子のうち、約 5000 個の非必須遺伝子を順番にノックアウトした変異株のコレクションである。これら 5000 株に対して、機能不全 25S rRNA を発現するプラスミドを順次導入した。

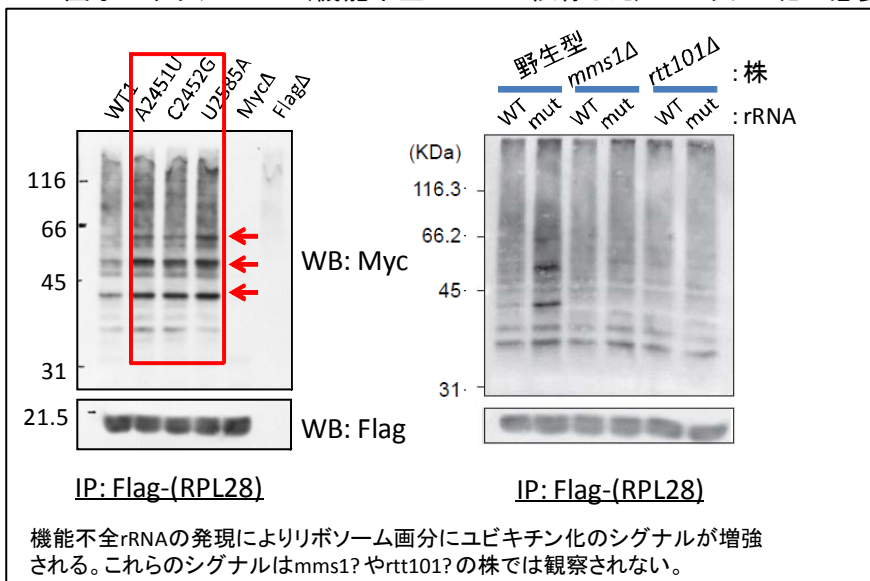
得られた 5000 株を使って、コロニーノザン法を用いて、機能不全 25S rRNA の分解が停止したような株をスクリーニングした。陽性だった株についてはリアルタイム PCR を用いて二次スクリーニングを行った。最終的に、*mms1* Δ 株と *rtt101* Δ 株について、これらの株が機能不全 25S rRNA を分解する能力がほぼ完全に失われていることが明らかになった(図)。これらの株に対して、それぞれ野生型の *Mms1* あるいは *Rtt101* を発現するプラスミドを導入すること



ことで、機能不全 25S rRNA の分解は完全に復活することから、これら二つの因子がどちらもこのリボソームの品質管理に必要な因子であることが明らかになった。

(4) 分解に先立ち機能不全リボソームが選択的にユビキチン化される

Mms1 と Rtt101 が、これまでにユビキチンリガーゼ複合体の構成因子であることが知られていた因子であることから、これらを含む複合体が機能不全リボソームを、分解に先だつてユビキチン化している、という仮説をたてた。このことを検証するために、機能不全 rRNA を発現した細胞からリボソームを精製し、その中に含まれるユビキチン化たんぱくのパターンを、Myc-Ubiquitin の系を用いて解析した。すると予想通り、機能不全 rRNA の発現に依存して、リボソーム画分にユビキチン化が増強して現れることが明らかになった。これらのユビキチン化のシグナルは、mms1 Δ 株や rtt101 Δ 株においては全く観察されなくなるから、これら 2 つの因子がリボソームの(機能不全 rRNA に依存した)ユビキチン化に必要な因子であること



は明らかである(図)。おそらくこれら 2 つを含むユビキチンリガーゼ複合体が、機能不全リボソームを何らかの方法で検出し、特異的なユビキチン化を行うことで、その中に含まれる機能不全 rRNA の分解を誘導するのだろう。

(5) 機能不全 rRNA が分解されることの厳密な証明

ここまでの実験では、点変異を持った rRNA が分解されること、その時にユビキチン化が誘導されることを示しているが、この変異 rRNA が本当に機能不全かどうかは厳密には示されていない。RNA ポリメラーゼ I の温度感受性株を用いたアッセイで、これらの rRNA が相補活性を持たないことを示していたが、これは直接には機能不全であることを示してはいない。点変異による rRNA の分解が誘導されるために、これらの rRNA は相補活性がないだけなのかもしれない。もともと機能不全のものが細胞の品質管理機構で認識される、ということを示すためには、さらに厳密な実験が必要だった。

mms1 Δ 株においては、点変異を持つ rRNA が安定化する。このことを利用して、これらの点変異を持つ rRNA が分解しない状況を作り、その上で相補活性を回復するかどうかの実験を行った。その結果、「機能不全」として用いてきたどの点変異を含む rRNA の場合でも、分解が停止している場合にも相補活性を回復することはできなかった。これらの観察から、細胞には機能の異常な rRNA を見分けて認識し、そのリボソームをユビキチン化して分解へと導く、品質管理機構が存在するということが最終的に明らかになった。

3. 今後の展開

これまでに、真核生物のリボソームには品質管理機構が存在すること、そのうちの一部にはユビキチン-プロテアソームの機構が関与していることが分かってきた。さらに、リボソームに与える損傷によっては、リボソーム画分に導入されるユビキチン化たんぱく質のパターンが異なるなどの現象が最近になって明らかになっており、リボソームのユビキチン化パターンはその後のリボソームの運命を決める暗号としての意味があることが分かってきている。今後さまざまな損傷を持つリボソームの細胞内での運命を解析し、その品質管理機構を明らか

にすることを計画している。

リボソームの合成過程に関与する因子の欠陥で起こる、さまざまな遺伝病が報告されている。今回明らかになったリボソームの品質管理機構を基礎として、細胞内でリボソームが正しい性能を果たすためにどのような監視がなされ、リボソームの品質が維持されているかを明らかにすることで、さまざまな遺伝病などの治療に道を拓く可能性があるかと期待できる。

4. 自己評価

当初の目標とした、損傷をおったリボソームの品質管理機構について、一部については深く追究することができた。特に出芽酵母を用いた系により、品質管理機構の重要なポイントにユビキチン化が関与していることが明らかになり、さらにそのことを基礎として、細胞内で機能不全リボソームがどのような仕組みで検出されるのかについても少しずつ状況が明らかになりつつある。しかしこれまでに明らかになったことは、紫外線により導入されたリボソーム RNA の損傷の一部のものの運命についてと、点変異を活性中心(ペプチジルトランスフェラーゼセンター)に導入された 25S rRNA のその後の運命に関することのみであり、細胞内で起こりうるさまざまな rRNA 損傷のごく一部分だけを拡大して深く追究したにすぎない。リボソームの品質管理がどのようになされているのか、その全体像については不明な点が多く残された。紫外線のみならず多様なストレスの影響や、ペプチジルトランスフェラーゼ以外の重要な塩基に点変異を導入した場合の効果など、その全体像を明らかにするためには今後さらに、多くの実験がなされる必要があると考えている。

5. 研究総括の見解

リボソームの活性を失わせる変異を持つ rRNA の運命を研究した結果である。このような変異 RNA もリボソームに取り込まれること、リボソームとなってから不活性なものは、ユビキチン化され分解されることを明らかにした。不活性リボソームの品質管理機構を解明したものと高く評価できる。もう一つの「修復系」については重要な研究成果が得られているものの、論文等公表準備との関係から公表の段階でないとして成果が示されていない。早急な論文発表が望まれる。

6. 主要な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1	Fujii K, <u>Kitabatake M</u> , Sakata T, Miyata A, Ohno M. "A role for ubiquitin in the clearance of nonfunctional rRNAs." Genes Dev. 2009 23(8):963-974.
2	Kodama K, Nakayama H, Sakamoto K, Fukuzawa S, Kigawa T, Yabuki T, <u>Kitabatake M</u> , Takio K, Yokoyama S. "Site-specific incorporation of 4-iodo-L-phenylalanine through opal suppression." J Biochem. (2010) 148(2):179-187.
3	Wu J, Bu W, Sheppard K, <u>Kitabatake M</u> , Kwon ST, Soll D, Smith JL "Insights into tRNA-dependent amidotransferase evolution and catalysis from the structure of the Aquifex aeolicus enzyme" J Mol Biol (2009) 391(4):703-716.
4	Fujii K, <u>Kitabatake M</u> , Ohno M. "Proteasome dependent degradation of nonfunctional rRNAs dectated by selective ubiquitination" (2011 年、投稿準備中)

(2)特許出願 なし

(3)その他(主要な学会発表、受賞、著作物等)

国際学会口頭発表

- 1 "Selective degradation of nonfunctional ribosomal RNAs mediated by the



ubiquitin-proteasome system”

Kitabatake M, Fujii K, Sakata T, Miyata A, Ohno M.

The 19th CDB Meeting “RNA Sciences in Cell and Developmental Biology”(Kobe)2010年5月

2 “A role for ubiquitin in the clearance of nonfunctional rRNAs”

Kitabatake M, Fujii K, Sakata T, Miyata A, Ohno M.

RNA meeting, Madison (Wisconsin, USA) 2009年5月

3 “A role for ubiquitin in the clearance of nonfunctional rRNAs”

Kitabatake M, Fujii K, Sakata T, Miyata A, Ohno M.

International conference on Ribosome Biogenesis, Regensburg (Germany) 2009年8月

国内学会口頭発表

1. 「機能不全リボソーム RNA の品質管理におけるユビキチンの新しい機能」

北嶋真、藤井耕太郎、坂田知子、宮田淳美、大野睦人

日本生化学会年会シンポジウム「多様性と非多様性を獲得する RNA プログラム」

神戸、2009年10月

2. 「機能不全リボソームが分解される仕組み」

北嶋真、藤井耕太郎、酒井朗恵、大野睦人

日本 RNA 学会年会 東京、2010年7月

3. 「リボソーム RNA の品質管理におけるユビキチンの役割～DNA 修復との接点～」

北嶋真、藤井耕太郎、坂田知子、酒井朗恵、大野睦人

第39回日本環境変異原学会年会 筑波、2010年11月

4. 「真核生物における機能不全リボソームの選択的分解」

北嶋真、藤井耕太郎、酒井朗恵、坂田知子、大野睦人

日本分子生物学会年会 神戸、2010年12月