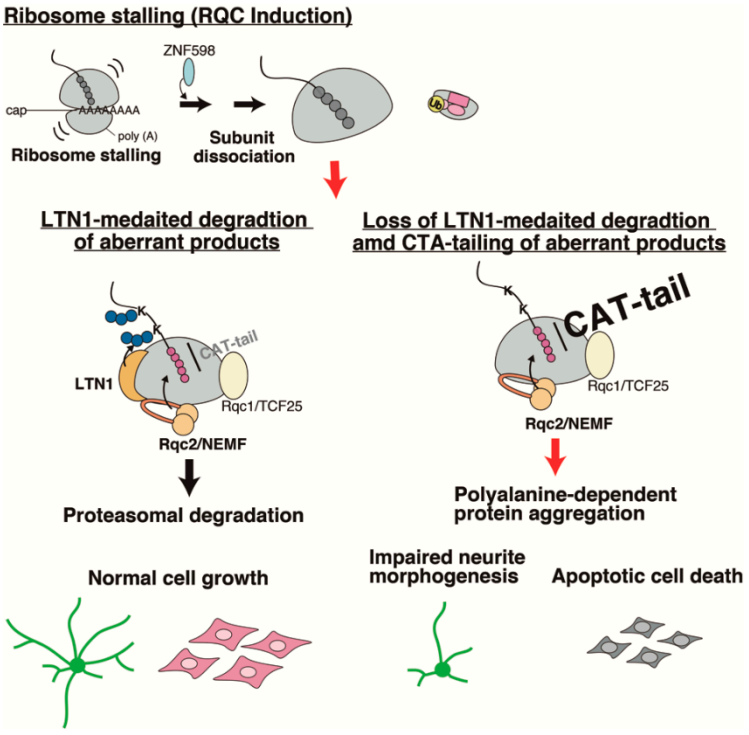
20　翻訳品質管理機構RQCの神経細胞での生理機能の解明	稲田　利文

【目的】RQC 関連因子の欠損による翻訳異常の実体や、記憶学習における RQC の機能はほとんど不明のままである。リボソーム機能の異常を認識し排除する分子機構の全体像が解明されつつある現状を踏まえ、本研究では RQC の神経細胞における機能解析を目的とした。

【方法】RQC により新生タンパク質が分解される過程では、新生タンパク質の末端に CAT テイルとよばれる、アラニンとスレオニンからなるペプチドが付加され、この配列の付加により異常新生タンパク質が効率良く分解される。一方で、RQC が破綻した際には CAT テイル化タンパク質が凝集体の蓄積を誘導することも報告されている。一方、異常新生タンパク質に CAT テイルを付加する反応は、ヒトを含む哺乳類細胞では確認されていない。本研究では、品質管理機構の破綻により神経変性が発症する原因の解明を目的に、神経初期培養細胞での神経突起伸長の阻害効果や神経細胞死とその分子基盤を解明することで、RQC の生理機能の解明を進めた。

【結果】異常タンパク質をユビキチン化し分解する E3 ライゲースである LTN1 と CAT テイル付加に必須な NMEF の発現低下条件における異常タンパク質の発現と神経細胞機能への影響を解析した。①哺乳細胞における CAT テイルの確認とアミノ酸組成解析：RQC の標的となる異常タンパク質を精製し、質量分析を行った。その結果、哺乳細胞において RQC 因子である NMEF 依存に CAT テイルが付加されること、またその特徴的なアミノ酸組成が明らかとなった。②哺乳細胞における異常タンパク質への CAT テイルによる細胞死誘導：哺乳細胞における異常タンパク質への CAT テイルの付加によって、アポトーシスが誘導されることが確認された。③マウス神経初代培養細胞の神経突起伸長における RQC の機能解析：shRNA を用いてマウス神経初代培養細胞で RQC 因子をノックダウンし、神経突起伸長を Sholl 解析によって解析した結果、RQC 因子である LTN1 による異常タンパクの分解が欠損すると CAT テイルが付加され、神経突起伸長が阻害されることが明らかとなった。以上の実験結果により、RQC の破綻による異常タンパク質への CAT テイル化が、細胞死や神経突起伸長阻害を誘導することが明らかとなった（Udagawa, Seki, Okuyama *et al.*, *Cell Rep.* 2021）。本研究成果は、タンパク質恒常性の破綻に繋がる異常翻訳の実体解明に貢献するものである。

RQC の破綻による異常タンパク質への CAT テイル化が、細胞死や神経突起伸長阻害を誘導する



20. 翻訳品質管理機構 RQC の神経細胞での生理機能の解明

稲田　利文

東北大学 大学院薬学研究科 遺伝子制御薬学分野

Key words：翻訳品質管理 RQC，衝突リボソーム，タンパク質恒常性，CAT テイル，ユビキチン化

緒　言

正確な遺伝子発現は生命現象の根幹であり、その破綻や異常は様々な疾患の原因となる。細胞の保持する品質管理機構は、異常な遺伝子産物を認識し排除することで遺伝子発現の正確性を保証している。翻訳伸長段階での異常は遺伝子産物の機能に重大な欠損を示すため、品質管理機構によって認識され排除される必要がある。我々は、終止コドンを持たない異常 mRNA のポリ（A）鎖をリボソームが翻訳した場合に、翻訳伸長反応が停止する結果、新生鎖のユビキチン化とプロテアソームによる迅速な分解が起こることを報告した［1］。その後の国内外の多数の研究室によって解析が進んだ結果、合成途中のタンパク質を分解する品質管理機構の概要が解明され、現在 RQC（Ribosome-associated Quality Control）と呼ばれている［2］。特に、RQC の初期段階である翻訳伸長中に停滞したリボソームを認識し解離させる分子機構を解明し E3 ユビキチンライゲース ZNF598（酵母では Hel2）が翻訳伸長中に停滞したリボソームの特異的な構造を認識し、リボソームタンパク質 uS10 をユビキチン化することが RQC に必須であることを発見し、また停滞した 80S リボソームを各サブユニットに解離する新規 RQC-Trigger（RQT）複合体を世界で初めて同定し報告した［3, 4］。さらにクライオ電子顕微鏡による単粒子解析を行い、E3 ユビキチンライゲース ZNF598 の酵母相同因子 Hel2 が衝突したリボソームの特異的構造を認識することを見出した［5，6］。以上より、ZNF598 がリボソームタンパク質の特異的残基をユビキチン化し、RQT 複合体がユビキチン化リボソームを特異的に認識してサブユニットに解離する分子機構が明らかになった。

RQC の分子機構の理解は急速に進んでいるが、その生理機能の理解は十分進んでいない。これまでに、合成途上の異常タンパク質がリボソームから解離する因子である ANKZF1 の機能欠損により、ミトコンドリアにおいて異常タンパク質の顕著な凝集が観察されミトコンドリアの機能が破綻することを共同研究により報告した［7］。一方で、RQC が神経において重要な生理的機能を持つことも明確になっている。RQC 品質管理において、翻訳途中で合成を停止した異常タンパク質を分解する E3 ユビキチンライゲースである LISTERIN（LTN1）の変異は、神経細胞死と行動異常を引き起こす［8］。また、自閉症と ZNF598 遺伝子内変異との関連が示唆されている［9］。しかしながら、RQC 関連因子の欠損による翻訳異常の実体や、記憶学習における RQC の機能はほとんど不明のままである。リボソーム機能の異常を認識し排除するシステムの実体を解明しつつある現状を踏まえ、本研究では RQC の神経細胞における機能解析を目的とした。神経初期培養細胞での神経突起伸長の阻害効果や神経細胞死とその分子基盤を解明することで、RQC の生理機能の解明を進めた。その結果、RQC の破綻による異常タンパク質への CAT テイル化が、細胞死や神経突起伸長阻害を誘導することが明らかとなった［10］。本研究成果は、タンパク質恒常性の破綻に繋がる異常翻訳の実体解明に貢献するものである。

方法および結果

RQC により新生タンパク質が分解される過程では、新生タンパク質の末端に CAT テイルとよばれる、アラニンとスレオニンからなるペプチドが付加され、この配列の付加により異常新生タンパク質が効率良く分解される。一方で、異常タンパク質を分解する E3 ユビキチンライゲースである LTN1 が機能欠損した際には、CAT テイル化した異常

タンパク質が凝集体の蓄積を誘導することも、出芽酵母で報告されている。また異常新生タンパク質に CAT テイルを付加する反応は出芽酵母で発見されたが、ヒトを含む哺乳類細胞では確認されていない。したがって、品質管理機構の破綻により神経変性が発症する原因の解明を目的に、RQC 関連因子、特に異常タンパク質をユビキチン化し分解する E3 ライゲースである LTN1 と CAT テイル付加に必須な因子である NEMF の発現低下条件における異常タンパク質の発現と神経細胞機能への影響を、以下の方法で解析した。

1. 哺乳細胞における CAT テイルの確認とアミノ酸組成解析

哺乳細胞における CAT テイルの確認とアミノ酸組成解析：終止コドンを含まない mRNA 由来の異常タンパク質は RQC の標的となる。LTN1 ノックダウン条件下で異常タンパク質を精製し、質量分析を行った（図 1a）。その結果、哺乳細胞において RQC 因子である NMEF 依存に CAT テイルが付加されること、またその特徴的なアミノ酸組成が明らかとなった（図 1b）。また、V5-TEV-NEMF と結合する 60S サブユニット中に存在する tRNA を RT-qPCR で定量した結果、アミノ酸組成とほぼ一致する tRNA が同定された（図 1c）。

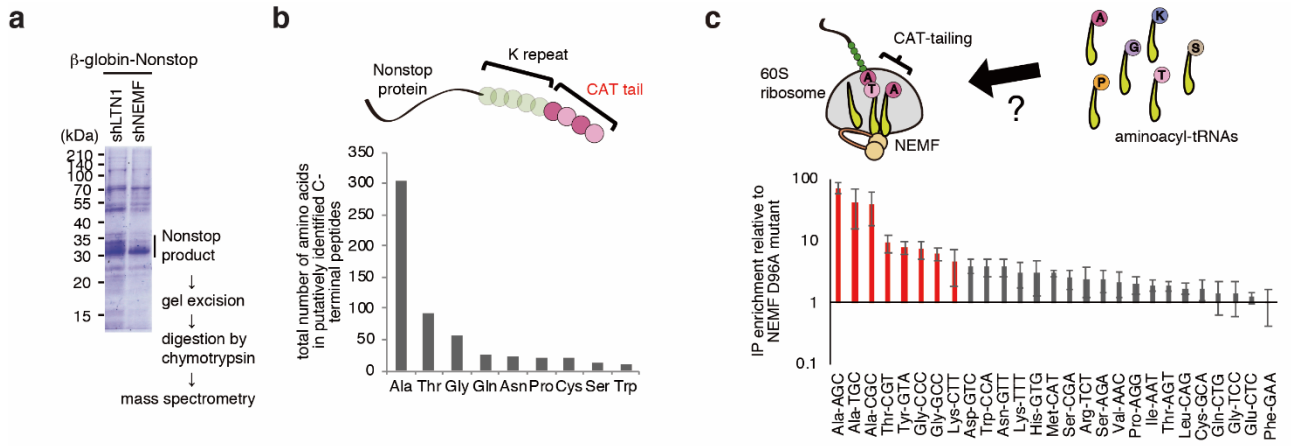


図1. 哺乳細胞における異常タンパク質へCATテイルが付加される

a) LTN1 もしくは NEMF をノックダウンした HEK293 細胞に終止コドンを含まない β-globin mRNA（β-globin-Nonstop）の reporter を transfection し、CCB 染色後ゲル抽出後、質量分析を行った。

b) 哺乳細胞における CAT テイルのアミノ酸組成。RQC の基質となる異常タンパク質である β-globin-Nonstop へ付加された質量分析により明らかとなった CAT テイルのアミノ酸組成。

c) V5-TEV-NEMF 結合 60S サブユニット中に存在する tRNA の定量。HEK293 細胞に V5-TEV-NEMF を発現させ、ショ糖密度勾配遠心により 60S サブユニットを分画後、V5-TEV-NEMF 結合 60S サブユニットを精製し、共精製された tRNA を RT-PCR により定量した。

2. 哺乳細胞における異常タンパク質への CAT テイル付加による細胞死誘導の確認

CAT テイル化した異常タンパク質が凝集体の蓄積を誘導することが、出芽酵母で報告されている。従って我々は、哺乳細胞における異常タンパク質への CAT テイル化による細胞毒性効果を検証する実験の 1 つとして、細胞死について解析した。HeLa 細胞に 3xFLAG-EGFP-Ctrl またはノンストップレポーターをトランスフェクションし、1 日後に死細胞と生細胞をカウントした。その結果、ノンストップレポーターの発現に依存して死細胞の割合が増加した（n＝5、平均±SEM）（図 2a）。

次に、アポトーシス阻害剤 Z-VAD-FMK もしくは DMSO 存在下での 3xFLAG-EGFP-Ctrl またはノンストップ

レポーターをランスフェクションした HeLa 細胞の死細胞と生細胞の比を測定した。その結果、Z-VAD-FMK 存在下で、ノンストップレポーターの発現に依存した細胞死が有意に抑制された（n＝10、平均±SEM）（図 2b）。またウエスタン解析により、ノンストップレポーターを発現する HeLa 細胞においてカスパーゼ-3 の切断が確認された（図 2c）。以上の結果により、哺乳細胞における異常タンパク質への CAT テイル化によって、アポトーシスが誘導されることが確認された。

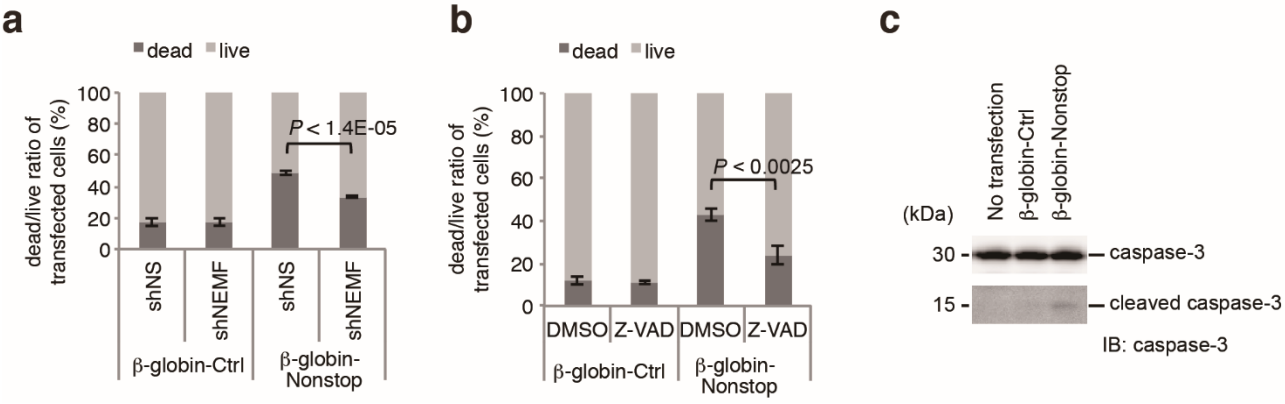


図2. 異常タンパク質へのCATテイル付加によって細胞死が誘導される

a) HeLa 細胞での 3xFLAG-EGFP-Ctrl またはノンストップレポーターをトランスフェクションし、1 日後に死細胞と生細胞をカウントした（n＝5、平均±SEM、Student's t test、P＜1.4E-05）。

b) 3xFLAG-EGFP-Ctrl またはノンストップレポーターをトランスフェクションした HeLa 細胞のアポトーシス阻害剤Z-VAD-FMK（20μM）もしくはDMSO存在下での死細胞と生細胞の比（n＝10、平均±SEM、Student's t test、P＜0.0025）。

c) ノンストップを含む各種レポーターを発現する HeLa 細胞の粗抽出液をもちいたカスパーゼ-3 のウエスタン解析。全長（上）および切断されたカスパーゼ-3（下）が抗カスパーゼ-3 抗体で検出された。

3. 異常タンパク質への CAT テイルの付加により神経突起伸長が阻害される

次に我々は、マウス神経初代培養細胞の神経突起伸長における RQC の機能解析を行った。shRNA を用いてマウス神経初代培養細胞で RQC 因子をノックダウンし、神経突起伸長を Sholl 解析によって解析した（図 3a）。その結果、LTN ノックダウンにより神経突起伸長が阻害されるが、NMEF をさらにノックダウンすると阻害効果が抑制された（図 3b、c）。RQC 因子である LTN1 による異常タンパクの分解が欠損すると CAT テイルが付加され、神経突起伸長が阻害されることが明らかとなった。

考　察

タンパク質恒常性の破綻は、不良タンパク質の蓄積やオルガネラの損傷、シグナル伝達経路撹乱など、広範な細胞機能障害を引き起こすため、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患の原因になると考えられる。タンパク質合成途中のエラーによる翻訳停止はタンパク質の機能の重大な欠陥を引き起こすため、品質管理機構によって認識され排除される必要がある。RQC は合成途上の異常タンパク質の凝集を抑制して分解へと導き、タンパク質恒常性を維持し細胞の機能を守る極めて重要な品質管理機構であり、出芽酵母、線虫、ショウジョウバエ等の様々な生物種で保存された普遍的な品質管理機構である。我々は、タンパク質恒常性維持に極めて重要な RQC を世界に先駆けて発見し、RQC 関連因子の同定と分子機構の解明を進めて来た。本研究で我々は、RQC の破綻による異常タンパク質への CAT テイル化が、細胞死や神経突起伸長阻害を誘導することを明らかにした。

今後は、神経変性疾患の発症機構の理解には RQC の生理機能解明が重要になることは間違いない。異常翻訳を識別

する E3 ライゲースである ZNF598 変異と自閉症との関連が示唆されているが、その分子基盤は全く解明されてない。翻訳伸長段階での異常とストレス応答との関連も次第に明らかになっており、神経における異常翻訳を解消する RQC の生理機能解明を今後さらに進めていきたい。また我々は、ANKZF1 が合成途上の異常タンパク質をリボソームから解離させることを構造機能相関解析により明らかにした。ANKZF1 の機能欠損は、エネルギー産生をはじめ老化や疾患とも密接に関わるミトコンドリアでの異常タンパク質の顕著な凝集を引き起こし、その機能破綻を引き起こすため、ANKZF1 の神経細胞における機能解明はミトコンドリア機能維持における RQC の生理機能解明に大きく貢献するものと期待される。今後の RQC 機能解析によって、神経細胞における翻訳異常の実体とマウス個体での生理機能の欠損の関連が解明され、神経細胞における異常翻訳の実体解明と異常タンパク質の産生を抑制する技術開発の分子基盤になると期待される。

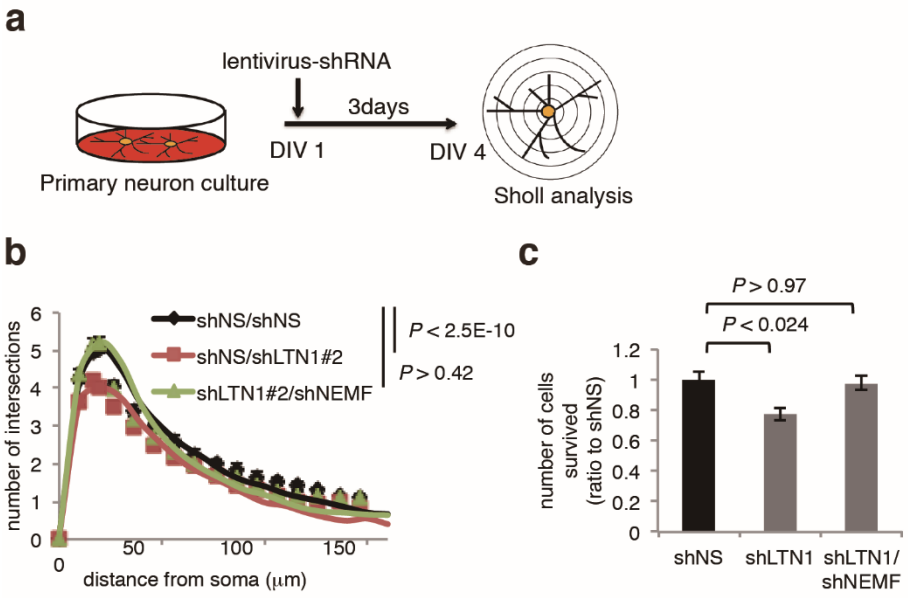


図3. 異常タンパク質へのCATテイルの付加により神経突起伸長が阻害される

a) 神経初期培養細胞の Sholl 分析による突起伸長の評価方法の手順。DIV1 の培養神経細胞に *shLTN1* を発現するレンチウイルスを感染させ、DIV4 に Sholl 解析を行った。縦軸が神経突起と同心円との交点の数、横軸は細胞体からの距離を表す。

b) LTN1/NEMF ダブルノックダウンニューロンのショル分析（shNS/shNS、n＝176、shNS/shLTN1、n＝180、shLTN1/shNEMF、n＝189、平均±SEM）。

c) LTN1 ノックダウンおよび LTN1/NEMF ダブルノックダウン時のニューロン生存率（shNS/shNS、n＝80、shNS/shLTN1、n＝80、shLTN1/shNEMF、n＝79、平均±SEM、Student's t test、P＜0.024、P＞0.97）。

共同研究者・謝辞

本研究成果は、東北大学大学院薬学研究科遺伝子制御薬学分野において、宇田川剛助教、修士課程大学院生の奥山卓さん、関萌香さんの不断の努力により得られたものである。また、協力してくれた研究室メンバーに感謝したい。質量分析を担当していただいた産業技術総合研究所の夏目徹主席研究員と足達俊吾研究員、また貴重なご助言をいただいた薬学研究科衛生化学分野の松沢厚教授と野口拓也准教授に、心より感謝申し上げる。

文　献

1) Ito-Harashima S, Kuroha K, Tatematsu T, Inada T. Translation of poly(A) tail plays crucial roles in nonstop mRNA surveillance via translation repression and protein destabilization by proteasome in yeast. Genes Dev. 2007 Mar 1;21(5):519-24. doi: 10.1101/gad.1490207. PMID: 17344413

2) Inada T. Quality controls induced by aberrant translation. Nucleic Acids Res. 2020 Feb 20;48(3):1084-1096. doi:10.1093/nar/gkz1201. PMID: 31950154

3) Matsuo Y, Ikeuchi K, Saeki Y, Iwasaki S, Schmidt C, Udagawa T, Sato F, Tsuchiya H, Becker T, Tanaka K, Ingolia NT, Beckmann R, Inada T. Ubiquitination of Stalled Ribosome Triggers Ribosome-associated Quality Control. Nat Commun. 2017 Jul 31;8(1):159. doi: 10.1038/s41467-017-00188-1. PMID: 28757607

4) Hashimoto S, Sugiyama T, Yamazaki R, Nobuta R, Inada T. Identification of a novel trigger complex that facilitates ribosome-associated quality control in mammalian cells. Sci Rep. 2020 Feb 25;10(1):3422. doi: 10.1038/s41598-020-60241-w. PMID: 32099016

5) Ikeuchi K, Tesina P, Matsuo Y, Sugiyama T, Cheng J, Saeki Y, Tanaka K, Becker T, Beckmann R, Inada T. Collided ribosomes form a unique structural interface to induce Hel2-driven quality control pathways. EMBO J. 2019 Mar 1;38(5):e100276. doi: 10.15252/embj.2018100276. Epub 2019 Jan 4. PMID: 30609991

6) Matsuo Y, Tesina P, Nakajima S, Mizuno M, Endo A, Buschauer R, Cheng J, Shounai O, Ikeuchi K, Saeki Y, Becker T, Beckmann R, Inada T. RQT complex dissociates ribosomes collided on endogenous RQC substrate SDD1 Nat Struct Mol Biol. 2020 Apr;27(4):323-332. doi: 10.1038/s41594-020-0393-9. Epub 2020 Mar 23. PMID: 32203490

7) Su T, Izawa T, Thoms M, Yamashita Y, Cheng J, Berninghausen O, Hartl FU, Inada T, Neupert W, Beckmann R. Structure and function of Vms1 and Arb1 in RQC and mitochondrial proteome homeostasis. Nature. 2019 Jun;570(7762):538-542. doi: 10.1038/s41586-019-1307-z. Epub 2019 Jun 12. PMID: 31189955

8) Chu J, Hong NA, Masuda CA, Jenkins BV, Nelms KA, Goodnow CC, Glynne RJ, Wu H, Masliah E, Joazeiro CA, Kay SA. A mouse forward genetics screen identifies LISTERIN as an E3 ubiquitin ligase involved in neurodegeneration. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Feb 17;106(7):2097-103. doi: 10.1073/pnas.0812819106. Epub 2009 Feb 5. PMID: 19196968

9) Krumm N, Turner TN, Baker C, Vives L, Mohajeri K, Witherspoon K, Raja A, Coe BP, Stessman HA, He ZX, Leal SM, Bernier R, Eichler EE. Excess of rare, inherited truncating mutations in autism. Nat Genet. 2015 Jun;47(6):582-8. doi: 10.1038/ng.3303. Epub 2015 May 11. PMID: 25961944

10) Udagawa T, Seki M, Okuyama T, Adachi S, Natsume T, Noguchi T, Matsuzawa A, Inada T. Failure to degrade CAT-Tailed proteins disrupts neuronal morphogenesis and cell survival. Cell Rep. 2021 Jan 5;34(1):108599. doi:10.1016/j.celrep.2020.108599. PMID: 33406423