

小胞体における新生鎖の品質管理機構の解析

曾川 愛守榮

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 動物細胞工学研究室

(河野 憲二 教授)

平成28年12月19日提出

目次

略語	4
1. 序論	5
2. 材料と方法	8
2-1. プラスミド	
2-2. 抗体	
2-3. <i>in vitro</i> 転写と <i>in vitro</i> 翻訳	
2-4. Nu-PAGE 電気泳動	
2-5. 新生鎖の二次元電気泳動	
2-6. 細胞とトランスフェクション	
2-7. FACS による蛍光強度解析	
2-8. siRNA によるノックダウンとトランスフェクション	
2-9. タンパク質精製とウェスタンブロット解析	
2-10. ショ糖密度勾配遠心法によるポリソーム解析	
2-11. ジキトニン分画法	
2-12. 共免疫沈降法	
2-13. ユビキチンアッセイ法	
2-14. ³⁵ S Met, Cys ラベルによる A1AT の膜透過解析	
2-15. Dual luciferase reporter assay	
2-16. RT-PCR による <i>XBPlu</i> mRNA スプライシング解析	
2-17. Real-time PCR 解析	
3. 結果	17
3-1. 哺乳動物において発現抑制をもたらす翻訳停止配列の探索	
3-2. 哺乳動物細胞において R30 による翻訳停止は発現抑制をもたらす	
3-3. 哺乳動物細胞において小胞体膜上で翻訳停止する遺伝子の探索	
3-4. Fluc-ER[R30] は共翻訳状態でトランスロコン上に分布する	
3-5. Fluc-ER[R30] は RQC の標的になる	
3-6. Listerin ノックダウン時に Fluc-ER[R30] とトランスロコンは共に 60S リボソーム画分に増加する.	

- 3-7. RQC 不全は分泌・膜タンパク質の小胞体への膜透過を阻害する.
- 3-8. Listerin ノックダウン時に Fluc-ER[R30] は核やサイトゾルにも局在する
- 3-9. Listerin ノックダウン時に小胞体タンパク質は分解促進される
- 3-10. Listerin ノックダウン時に UPR の活性が低下する
- 3-11. Listerin は UPR によって発現量が上昇する

4. 考察 27

- 4-1. 停滞したリボソームを解離する因子について
- 4-2. mRNA の途中で停滞するリボソームの RQC における NEMF の必要性
- 4-3. トランスロコンを閉塞した新生鎖の解離機構について
- 4-4. RQC 不全時の分泌・膜タンパク質の膜透過阻害について
- 4-5. トランスロコン閉塞時における Fluc-ER[R30] の核局在について
- 4-6. Listerin が UPR の制御下にある生理的意義について
- 4-7. RQC の生理的な基質について
- 4-8. RQC 不全時の分泌・膜タンパク質および RQC 標的小胞体タンパク質の挙動について

結論

5. 図表 34

6. 謝辞 72

7. 参考文献 73

略語

4E-BP: eIF4E-binding proteins
A1AT: α -1 antitrypsin
ATF4: activating transcription factor-4
ATF6: activating transcription factor-6
BiP: Binding immunoglobulin protein
CHOP: CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein
CNX: Calnexin
CTABr: Cetrimonium bromide
EAC: EGFP-Arrest sequence-mCherry
eIF-: Eukaryotic initiation factor-
ERAD: Endoplasmic reticulum-associated degradation
Fluc: Firefly luciferase
Hsp40: Heat Shock Protein of 40 kDa
IRE1 α : Inositol-requiring enzyme-1
Lep: Leptin
NEMF: Nuclear export mediator factor
PERK: Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase
RING: Really Interesting New Gene
Prp: Prion protein
Rluc: Renilla luciferase
RNC: Ribosome-Nascent Chain
RQC: Ribosome-associated protein Quality Control
RRL: Rabbit reticulocyte lysate
S1P: The site-1 protease
S2P: The site-2 protease
SS: Signal Sequence
UPR: Unfolded protein response
VCP: Valosin-containing protein
XBP1: X-Box-binding protein1

1. 序論

ゲノム DNA に書き込まれた遺伝情報は mRNA に転写され、その mRNA がリボソームによって翻訳され、タンパク質になることでその機能を発現する。ほぼすべての生命現象はそれぞれの遺伝子の発現量と発現場所が制御されることで維持されていると言っても過言ではない。これまで、遺伝子発現制御については主に転写調節因子による転写制御について研究されてきた。一方、タンパク質の翻訳時にも様々な状況や環境に応じて発現制御されることが報告されている。翻訳は翻訳開始、ペプチド鎖伸長、翻訳終結の3つの過程に分けられ(図1A)、これまで遺伝子の発現制御は特に翻訳開始の過程において研究が進められてきた。翻訳開始の過程において、通常、mRNAの5'末端のキャップ構造に結合する翻訳開始因子 eIF4E は足場タンパク質の eIF4G や RNA ヘリカーゼである eIF4A とともに eIF4F と呼ばれる複合体を形成している。しかし、栄養欠乏時や低酸素時には eIF4F を構成する eIF4E に 4E-BPs (eIF4E-binding proteins) が強固に結合し、不活性化され、キャップ依存的な翻訳が抑制される(Sachs AB *et al.*, 1997, Jackson RJ *et al.*, 1997, Sonenberg N *et al.*, 1998)。このように翻訳開始における発現制御は関わる因子やメカニズム、発現制御が起こる条件など、詳細な研究が行われてきた。

一方、近年では興味深いことにペプチド鎖伸長反応においても遺伝子発現が起きることが明らかとなってきた。一般的にペプチド鎖伸長反応ではリボソームが mRNA 上を一定の速度で移動しながら遺伝情報に対応したアミノ酸を1つずつ選び付加していく。しかし、突然変異によって mRNA 上の終止コドンが欠損した場合や open-reading frame (ORF) の内部に非常に高度な mRNA の高次構造が形成される場合、特定のアミノアシル tRNA が不足した場合、リジンやアルギニンといった正電荷アミノ酸のクラスターが出現した場合には、リボソームがその部位で捉えられ、mRNA 上で停滞する「翻訳停止」が起こること報告されている (Doma *et al.*, 2006; Shoemaker *et al.*, 2012) (図1B)。これらの要因以外に、マウスの ES 細胞を用いたリボソームプロファイリングによる解析では、発現量の高い遺伝子の約22%で翻訳停止が起きることが報告されており、正常に発現する遺伝子についても、ある一定の割合で翻訳停止が起こることが示唆されている(Ingolia *et al.*, 2011)。しかしながら、哺乳動物における翻訳停止の生理的意義については当研究室

で解明した XBP1u の翻訳停止でのみ解明されており、その他の遺伝子については現時点では未解明のままである (Yanagitani *et al.*, 2009, Yanagitani *et al.*, 2011). また、翻訳停止メカニズムについては XBP1u も含め、そのほとんどは明らかになっていない.

高等生物では、多くの翻訳停止は細胞内で異常な現象として感知され、その mRNA は分解促進され、発現が制御される (Frischmeyer PA *et al.*, 2002; van Hoof A *et al.*, 2002). さらに、合成途中の新生ポリペプチド鎖 (新生鎖) は新生鎖の品質管理機構 **R**ibosome-associated protein **Q**uality **C**ontrol (RQC) に従ってプロテアソームによって分解される. RQC では、mRNA 上で停滞した 80S リボソームは解離因子によって mRNA から解離され、40S リボソームが脱離し、60S リボソーム-新生鎖 (60S RNC) 複合体が生じる. 次に、60S RNC 複合体の基底部から露出した tRNA を認識して Nuclear export mediator factor (NEMF) が結合し、60S RNC-NEMF 複合体が形成される. NEMF は新生鎖のユビキチン化を行う E3 ligase Listerin の 60S RNC 複合体への結合を促進する. その後、60S RNC-NEMF 複合体に結合した Listerin は新生鎖のユビキチン化を促進し、ユビキチン化された新生鎖は ATPase である P97 (VCP) によってプロテアソームに運ばれ、分解される (Bengtson *et al.*, 2010; Brandman *et al.*, 2012; Shao *et al.*, 2013, 2014, 2015). (図 1 C).

先行研究において Listerin 欠損マウスは胎生致死の表現型を示し、順遺伝学的解析から、Listerin の変異マウスは神経変性疾患様の表現型を示すことが報告されている (Chu J *et al.*, 2009). Listerin は主に RQC で生じた 60S RNC 複合体に対して特異的にはたらく E3 ligase であることが報告されているため、RQC は生命維持に必要不可欠な現象であることが示唆される. また、RQC の生理的意義に関しても近年明らかにされつつあり、Listerin が欠損した細胞では翻訳停止によって生じた 60S RNC 複合体の新生鎖が凝集体を形成し、サイトゾルに蓄積することで細胞毒性をもたらすことが報告されている (Theodoraki *et al.*, 2012; Choe *et al.*, 2016; Yonashiro *et al.*, 2016; Defenouillere *et al.*, 2016). このように RQC はサイトゾルにおいて、翻訳停止に起因する新生鎖の凝集体形成を防ぐための役割を持つことが明らかにされている. さらに、RQC 機構を回避して凝集体が形成された場合には別の分解機構がはたらくことも明らかとなっている. 新生鎖によって形成された凝集体の分解機構はハンチントン病の原因とされるポリグルタミン凝集体と

同様の分解機構がはたらき、Hsp40 ファミリーの DNAJB1 (酵母のオーソログは Sis1p) によって新生鎖が形成する凝集体をリフォールディングしながら核へと隔離し、核に存在するプロテアソームによって新生鎖が分解されることが報告されている (Park *et al.*, 2013, Choe *et al.*, 2016; Yonashiro *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2016). この報告とマウスの順遺伝学解析とを合わせると、新生鎖が形成する凝集体と神経変性疾患に密接な関わりがあることが示唆され、RQC が病理学的にも興味深い機構であることが考えられる。

一方、近年の研究では、分泌・膜タンパク質の翻訳中に翻訳停止が起きた場合、RQC によってその新生鎖の分解が促進されることが報告されている (von der Malsburg *et al.*, 2015; Crowder *et al.*, 2015; Arakawa *et al.*, 2016). 真核生物において分泌・膜タンパク質は翻訳と共役し、トランスロコンを通じて膜輸送されることで小胞体に送り込まれる (図 1 D). つまり、分泌・膜タンパク質で翻訳停止が起きた場合、小胞体に膜輸送される新生鎖はトランスロコンに透過した状態で Listerin によってユビキチン化され、プロテアソーム系で分解される (図 1 E). このように、小胞体膜上で翻訳停止したリボソームの新生鎖はトランスロコンによって個別に仕分けられているため、サイトゾルのように新生鎖が凝集体を形成するとは考えられない。そこで、著者は小胞体膜上ではたらく RQC には新生鎖の凝集体形成を防ぐ以外の生理的意義があると考えた。つまり、当研究では小胞体膜透過中の新生鎖にはたらく RQC の新たな生理的意義の解明を目指した。RQC の新たな生理的意義として、RQC 不全時に翻訳停止したリボソームがトランスロコン上に長期的に停滞することで、トランスロコンの閉塞が起き、本来小胞体に膜輸送されるべき分泌・膜タンパク質の膜透過効率が低下することが考えられる。結果的にこのトランスロコンの閉塞が分泌・膜タンパク質の減少をもたらし、小胞体の恒常性が破綻することが考えられる (図 1 F). この仮説から、RQC は分泌・膜タンパク質の膜透過維持に貢献しているというモデルを立てた。このモデルを検証するため、当研究ではまず、RQC 標的小胞体タンパク質の設計とその人工遺伝子の作製を行った。次に、作製した RQC 標的小胞体タンパク質を用いて、RQC 不全時に実際にトランスロコンの閉塞が起きるのかどうかについて検証を行った。さらに、RQC 不全が与える小胞体の恒常性への影響を調べ、RQC が小胞体膜上で新たな生理的意義をも持つのかどうかについて検証した。

2. 材料と方法

2.1. プラスミド

EAC[R30] / pcDNA3.1 と EAC[R15] / pcDNA3.1, EAC[A30] / pcDNA3.1 を作製するために、インサートとして当研究室で既に作製されていた、RPAP [R30] / pcDNA3.1 と RPAP[R15] / pcDNA3.1, RPAP[A30] / pcDNA3.1 をそれぞれ BamHI と EcoRI で消化して R30, A15R15, A30 配列を得た。また、先行研究で使われていた EAC [XBP1u (WT)] / pcDNA3.1 を BamHI と EcoRI で消化して、翻訳停止配列が除去された EAC / pcDNA3.1 の DNA 切片を得た。これらの DNA 断片をライゲーションし、目的のプラスミドを得た。

Fluc-ER[R30] / pcDNA3.1 を作製するために、プライマー F1 5'-AGGAGAAGA AGAAGGAGAAGAAGAAGAAGGAGAAGAAGAAGAAGGAAGGACGAGCTGT GATCTAGAGG-3' と R1 5'- AGGAGAAGAAGAAGGAGAAGAAGAAGAAGGA GAAGAAGAAGAAGGAAGGACGAGCTGTGATCTAGAGG-3' (下線部は Fluc-ER ORF とアニーリングする塩基を示す) を用いて、Fluc-ER / pcDNA3.1 を鋳型として PCR を行い、30 個のアルギニンを Fluc-ER ORF の下流および小胞体残留シグナル (KDEL) の上流に挿入した。

Listerin レスキュー用のプラスミド DNA である Listerin [WT] (rescue) / pFN21A を作製するために、プライマー F2 5'- CGAGACCCTGacgtatatctcaaaggaa cagctattgag -3' と R2 5'- TAGGCTTCAAcattgcattctgaaaggatgtttcag- 3' (下線部は Listerin ORF とアニーリングする塩基を示す) を用いて、pFN21AA0714 (Kazusa) を鋳型として PCR を行い、サイレント変異を挿入した。

Listerin レスキュー用の不活性型 Listerin である Listerin [W1749A] (rescue) / pFN21A および Listerin [W1749E] (rescue) / pFN21A のプラスミド DNA を作製するために、W1749A 用のプライマーとして F3 5'- cagcctgctgtacaaagcctttacatctag caacaaatcc -3' と R3 5'- ggatttgtgctagatgtaaaggctttgtacaagcaggctg -3' を用い、W1749E 用のプライマーとして F4 5'- cagcctgctgtacaaagagttacatctagcaacaaatcc -3' と R4 5'- ggatttgtgctagatgtaaactctttgtacaagcaggctg -3' を用い、Listerin [WT] (rescue) / pFN21A を鋳型として PCR を行い、点変異を挿入した。

その他に、以下のプラスミドを用いた。(全て当研究室で作製されたプラスミド DNA)

α -1-antitrypsin (A1AT)/ pcDNA3.1, Fluc-ER / pcDNA3.1, Rluc-Cyt / pcDNA3.1, Flag-Ubiquitin / pcDNA3.1

で 2 時間反応させた. 次にDNase (Promega) を 37 °C で 30分間反応させ, Isogen-LS (ニッポンジーン) を用いてmRNA を精製し, 5' Cap 化EAC mRNA を得た. 300 ng の EAC mRNA を20 nM Amino Acid Mixture Minus Methionine, 40 μM MG-132, 4 μL Eeasy Tag EXPRE^{35S}^{35S} protein labeling mix (Promega) を含むウサギの網状赤血球抽出液 (RRL) (Promega) に加え, 30°C で *in vitro* 翻訳した. 0分のサンプルは mRNA を添加する前に回収した. 反応開始 5 分後に翻訳開始阻害剤 (8 μg / mL Harringtonine⁽¹⁾ (sc-204771A, Santa Cruz Biotechnology)) を添加し, 翻訳開始から10, 20, 30, 60. 90 分後にサンプルを回収した. RNaseA 処理のため, 翻訳産物の半量を 400 mg / mL の RNaseA (Nacalai) を含む buffer [2% SDS, 0.25 M Bis-Tris, pH6.5, 20 mM MG-132, 1 mM PMSF, 10 μg / mL pepstatinA, 1 μM Benzamide, 10 μg / mL Leupeptin] に加え, 半量は RNase A を含まない buffer を加え, 37°Cで 30 分間反応させた. 次にサンプルバッファー [1% SDS, 0.625 M Bis-Tris, pH6.5, 5% Glycerol] を等量加え, 30分間室温においた.

(1) Harringtonine は遊離の 60S サブユニットと結合し, この複合体が形成する 80S サブユニットは開始コドンから移動できず, 翻訳開始を阻害する.

2.4. Nu-PAGE 電気泳動

翻訳停止産物である peptidyl-tRNA のアミノアシル結合はアルカリ性溶液下で不安定となる. 解析にはアミノアシル結合を保持するために, 中性ゲルの Nu-PAGE ゲル (ThermoFisher) を用いた. 泳動バッファーとして MOPs バッファー (50 mM MOPs (pH 7.7), 50 mM Tris Base, 0.1% SDS, 1 mM EDTA) を用いて 55 mA で電気泳動を行った. 泳動後のゲルはオートラジオグラフィーにて検出した.

2.5. 新生鎖の二次元電気泳動

まず, 上記と同様の Nu-PAGE 電気泳動を行う. 次に, レーンごとにゲルを切り出し, tRNA 脱離用の強塩基バッファー (1 M Tris (pH 未調整), 0.1% SDS, 10% Glycerol) を加え, 80°Cで 30 分間反応させた. 次に 2D 用 Nu-PAGE ゲル(ThermoFisher) に切り出したゲルをのせ, MOPs バッファー (50 mM MOPs (pH 7.7), 50 mM Tris Base, 0.1% SDS, 1 mM EDTA) を用いて 55 mA で電気泳動を行った. 泳動後のゲルはオートラジオグラフィーにて検出した.

2.6. 細胞とトランスフェクション

HeLa 細胞と HEK293T 細胞はウシ血清（終濃度 10%）を加えた Dulbecco's Modified Eagle Medium (Nacalai) 中で 37°C, 5% CO₂ 条件下で培養した。トランスフェクションは PEI-Max (24765, Polysciences, Inc) を用いて行った。トランスフェクションの方法は以下に述べる。

HeLa 細胞では 6well プレートに 5.0×10^4 cells / well となるように細胞を播種した。24 時間後、PEI-Max-plasmid DNA 複合液（200 μ L DMEM 中に 9 μ L の 0.323 g / L PEI-Max (pH8.0) と 1 μ g plasmid DNA を含む）を滴下し、24 時間培養した。HEK293T 細胞では 6well プレートに 5.0×10^5 cells / well となるように細胞を播種した。24 時間後、PEI-Max-plasmid DNA 複合液（250 μ L DMEM 中に 12.5 μ L の 0.323 g / L PEI-Max (pH8.0) と 1.25 μ g plasmid DNA を含む）を滴下し、24 時間培養した。

また、10 cm² の系で行った場合は、全て 6 well プレートの 6 倍のスケールで行った。

2.7. FACS による蛍光強度解析

(2.6) で述べた方法で HeLa 細胞にそれぞれの蛍光タンパク質遺伝子をトランスフェクションし、24 時間後に細胞回収を行った。回収した後、細胞を 500 μ L の 1xPBS に懸濁し、FACS ARIA SORP (BD) を用いて蛍光強度を測定した。

2.8. siRNA によるノックダウンとトランスフェクション

Lipofectamine RNAiMax Reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いてノックダウンを行った。Listerin ノックダウン用の siRNA として、siListerin #1 (stealth 4164) 5'-gctgaaacc atgtgaaacatta -3' と siListerin #7 (NM015565 stealth1500) 5'-gattgcaacatgggcagctattta a -3' を用いた。またコントロール用の siRNA として、siLuc を用いた。

HEK293T 細胞を 6well プレートに 2.5×10^5 cells / well となるように細胞を播種し、ノックダウン溶液（500 μ L Opti-mem 中に 30 pmol siRNA と 3.8 μ L Lipofectamine RNAi Max (13778150, Thermo Fisher Scientific) を含む）を滴下する。トランスフェクションをしない場合は 72 時間培養した。トランスフェクションをする場合は 48 時間後に PEI-Max-plasmid DNA 複合液（250 μ L DMEM 中に 12.5 μ L の 0.323 g / L PEI-Max (pH8.0) と 1.25 μ g plasmid DNA を含む）を滴

下し、24 時間培養した。

また、10 cm² の系で行った場合は、全て 6 well プレートの 6 倍のスケールで行った。小胞体ストレスを誘導する場合は、ノックダウンを行って 64 時間後に小胞体ストレス誘導剤の 2 µg / mL Tunicamycin および 0.5 µg / mL Thapsigargin を添加し、0, 2, 4, 6, 8 時間後にそれぞれ細胞回収を行った。

2.9. タンパク質精製とウェスタンブロット解析

Nu-PAGE の場合、(2.6) や (2.8) で回収した細胞から Lysis buffer [0.35 M Bis-Tris (pH6.5), 2% SDS, 10% Glycerol, 20 mM MG-132, 1 mM PMSF, 10 µg / mL pepstatinA, 1 µM Benzamide, 10 µg / mL Leupeptin] によりタンパク質を抽出した。RNaseA 処理をする場合は、400 mg / mL の RNaseA を加え、37°C, 30 分間反応させた。Endo H 処理する場合は 500 Unit の EndoH (BioLabs) を加え、37°C, 30 分間反応させた。次にサンプルバッファー [0.5% SDS, 87.5 M Bis-Tris, pH6.5, 2.5% Glycerol] を加え、30 分間室温においた。これらのサンプルを中性のゲル (0.35 M Bis-Tris (pH6.5)) を用いてタンパク質の電気泳動を行った。

SDS-PAGE の場合、(2.6) や (2.8) で回収した細胞から Lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH8.0), 150 mM NaCl, 1% Triton-X, 0.5% SDS, 20 mM MG-132, 1 mM PMSF, 10 µg / mL pepstatinA, 1 µM Benzamide, 10 µg / mL Leupeptin] によりタンパク質を抽出した。ただし、リン酸化を検出する PERK や IRE1α の場合は Lysis buffer に Phos stop (Roche) を 1 錠加えた。また、Endo H 処理する場合は 500 Unit の EndoH (BioLabs) を加え、37°C, 30 分間反応させた。次にサンプルバッファー [2% SDS, 0.05 M Tris-HCl (pH 6.8), pH6.5, 10% Glycerol] を加え、98°C で 5 分間処理した。これらのサンプルを SDS-PAGE ゲル [0.375 M Tris-HCl (pH8.8), 0.1% SDS] を用いて 20 mA で電気泳動した。ただし、IRE1 のリン酸化を検出する場合は、Phos-tag ゲル [0.375 M Tris-HCl (pH8.8), 0.1% SDS, 0.1 mM MnCl₂, 12.5 µM phos-tag (Wako)] を用いた。

電気泳動後のブロッティングは PVDF 膜 (0.45 µm, Merk Millipore) とブロッティングバッファーの Cathode buffer [25 mM Tris-HCL, 40 mM Amino-hexanoic acid, pH9.4], AnodeI buffer [300 mM Tris-HCL, pH10.4], AnodeII [25 mM Tris-HCL, pH10.4] を用いて行った。ブロッティング後、(2.2) で示したそれぞれの 1 次抗体のプロトコルに従ってブロッティング、1 次抗体反応、2 次抗体反応を行い、Amersham ECL (GE ヘルスケア) によって検出を行った。

2.10. ショ糖密度勾配遠心法によるポリソーム解析

10 cm² dish で培養した細胞を 10 mL の 1xPBS で1回 Wash し, Lysis buffer [20 mM HEPES-KOH, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 2% Digitonin (Wako), 20 mM MG-132, 1 mM PMSF, protease inhibitor cocktail (Nacalai)] を 500 μL 加え, スクレイパーで回収する. この抽出液をシリンジで懸濁し, 氷上で 30 分間静置した後に, 遠心分離 (1000 rpm, 10 分, 4°C) を行った. このサンプルを Gradient station ip (Bio Comp) で作製した SW-40Ti 用の 10-50 % のスクロース溶液 [20 mM HEPES-KOH, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.1% Digitonin (Wako)] にのせ, 超遠心 (35000 rpm, 190 分, 4°C) を行った. このチューブに入ったサンプルを Gradient station ip を用いて 254 nm の吸光度を測定しながら, フラクションを回収した. 回収したサンプルは TCA 沈殿法によってタンパク質を精製し, ペレットを 100 μL の Sample buffer によってサンプル化した.

2.11. ジキトニン分画法

6 well dish で培養した HEK293T 細胞に, 25 μg / mL Digitonin (Wako) を含む緩衝液 A [50 mM HEPES-KOH, 150 mM KOAc, 0.1 M Mg (OAc)₂, 20 mM MG-132, 1 mM PMSF, 10 μg / mL pepstatinA, 1 μM Benzamide, 10 μg / mL Leupeptin] を 400 μL 加え, スクレイパーで回収した. この抽出液をシリンジで懸濁し, 氷上で 5 分間静置した後に, 遠心分離 (3000 g, 3 分, 4°C) を行った. 上清は “サイトゾル画分” として回収した. 続いて, 沈殿を 1 % TritonX-100 を含む緩衝液 A で再懸濁し, 氷上で 5 分間静置した. この懸濁液を遠心分離 (8000 g, 3 分, 4°C) し, 得られた上清を “膜画分” とした. さらに沈殿を Sample buffer によってサンプル化し, 核画分とした.

2.12. 共免疫沈降法

10 cm² dish の HEK293T 細胞に Fluc-ER または Fluc-ER[R30] を一過的に発現させ, IP Buffer [20 mM HEPES-KOH, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 2% Digitonin, 20 mM MG-132, 1 mM PMSF, 10 μg / mL pepstatinA, 1 μM Benzamide, 10 μg / mL Leupeptin] で懸濁した. 氷上で 5 分間静置した後に, 遠心分離 (17700 g, 20 分, 4°C) を行い, 上清を回収した. 上清に IP Buffer で平衡化した protein G Sepharose 4 Fast Flow (pharmacia Biotech) を 20 μL 加え, 4°C で 30 分間攪拌した. その後, 遠心 (2000 g, 30 秒, 4°C) し, 上清を新しいチューブに移した. これに

抗 Fluc 抗体を 5 μ L 加え, 4°C で 1 時間攪拌した後に, protein G Sepharose 4 Fast Flow を 20 μ L を加え, 4°C で 30 分間攪拌した. 次いで, 遠心 (2000 g, 30 秒, 4°C) し, 上清を除き, IP Buffer で 4 回洗浄した. これを 4xSample Buffer (+100 mM DTT) を 35 μ L 加えて 37°C, 30 分間処理し, DEPC 処理水を 65 μ L 加え, 免疫沈降サンプルとしてウェスタンブロット解析を行った.

2.13. ユビキチンアッセイ法

Listerin のノックダウンを 48 時間行った 15 cm² dish の HEK293T 細胞に, Listerin と Fluc-ER[R30] と Flag-Ub を一過的に発現させ, 24 時間後に細胞を回収した. この細胞を IP Buffer [20 mM HEPES-KOH, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 2% Digitonin, 10 mM NEM, 20 mM MG-132, 1 mM PMSF, 10 μ g / mL pepstatinA, 1 μ M Benzamide, 10 μ g / mL Leupeptin] で懸濁した. 氷上で 5 分間静置した後に, 遠心分離 (17,700 g, 20 分, 4°C) を行い, 上清を回収した. 上清に IP Buffer で平衡化した protein G Sepharose 4 Fast Flow (pharmacia Biotech) を 20 μ L 加え, 4°C で 30 分間攪拌した. その後, 遠心 (2000 g, 30 秒, 4°C) し, 上清を新しいチューブに移した. これに抗 Fluc 抗体を 5 μ L 加え, 4°C で 1 時間攪拌した後に, protein G Sepharose 4 Fast Flow を 20 μ L を加え, 4°C で 30 分間攪拌した. 次いで, 遠心 (2000 g, 30 秒, 4°C) し, 上清を除き, IP Buffer で 4 回洗浄した. これを 4xSample Buffer (+100 mM DTT) を 50 μ L 加えて 37°C, 30 分間処理した. このサンプルの上清を新しいチューブに移し, 陽イオン性の界面活性剤である臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTAB) を 1.67 % となるように加えた. ボルテックスして 5 分間室温に静置し, peptidyl-tRNA の共沈剤である 0.1 mg / mL yeast tRNA を含む 0.25 M NaOAc と懸濁する. 30°C, 10 分間処理し, 遠心分離 (17700 g, 10 分, 25°C) を行い, 上清を完全に取り除く. ペレットに 4xSample Buffer (+100 mM DTT) を 35 μ L 加えて 37°C, 30 分間処理した. DEPC 処理水を 65 μ L 加え, Fluc-R30 新生鎖のサンプルとして FLAG 抗体によるウェスタンブロット解析を行った.

2.14. ³⁵S Met, Cys ラベルによる A1AT の膜透過解析

Listerin のノックダウンを 48 時間行った 6 well dish の HEK293T 細胞に, 各濃度の Fluc-ER[R30] とそれぞれの A1AT を一過的に発現させ, 24 時間後に Met, Cys を除いた培地に交換して培養して飢餓状態にし, 30 分後に 10 μ L の

³⁵S Met, Cys を含む培地に交換し、ラベルを 30 分行った。その後、dish に 500 μL の 50% TCA を加え、セルスクレイパーでサンプルを回収した。その後、TCA 沈殿したサンプルを 1 mL の IP buffer [50 mM HEPES-KOH (pH7.4), 150 mM NaCl, 1% TritonX-100, 0.5% SDS, 20 mM MG-132, 1 mM PMSF, 10 μg / mL pepstatinA, 1 μM Benzamide, 10 μg / mL Leupeptin] を加えた。次に、IP Buffer で平衡化した protein G Sepharose 4 Fast Flow (pharmacia Biotech) を 20 μL 加え、4°C で 30 分間攪拌した。その後、遠心 (2000 g, 30 秒, 4°C) し、上清を新しいチューブに移した。これに抗 A1AT 抗体を 5 μL 加え、4°C で 1 時間攪拌した後に、protein G Sepharose 4 Fast Flow を 20 μL を加え、4°C で 30 分間攪拌した。次いで、遠心 (2000 g, 30 秒, 4°C) し、上清を除き、IP Buffer で 4 回洗浄した。これを 4xSample Buffer (+100 mM DTT) を 35 μL 加えて 98°C, 5 分間処理した。このサンプルに 65 μL の滅菌水を加え、SDS-PAGE ゲル[0.375 M Tris-HCl (pH8.8), 0.1% SDS]を用いて 20 mA で電気泳動した。泳動後のゲルはオートラジオグラフィーにて検出した。

2.15. Dual luciferase reporter assay

Listerin のノックダウンを 48 時間行った 12 well の HEK293T 細胞に、DNA 量比が Fluc-ER : Rluc-Cyt = 19:1 となるようにトランスフェクションし、24 時間後に Dual-luciferase reporter system (Promega) を用いて発光レベルをルミノメーターで検出した。

2.16. RT-PCR による *XBPlu* mRNA スプライシング解析

細胞から Isogen-LS (ニッポンジーン)によって RNA を抽出した。その後、イソプロパノール沈殿法で RNA を精製し、80%エタノールで洗い、DEPC 処理水に溶解した。得られた RNA を RNase free DNase I (TaKaRa) で処理し、Isogen-LS で RNA を再抽出した。RNA 1.0 μg に 2.5 mM dNTPmix (TaKaRa #R019A) 2 μL と 50 ng / μL Random Hexamer (Thermo Fisher Scientific) 1 μL 加え、65°C で 5 分間 反応させた。この溶液に逆転写反応液[M-MLV 1xReaction buf, 40U M-MLV, 2.5U RNasin (Promega)] を加えて逆転写反応 (25°C, 10 分間; 42°C, 50 分間; 70°C, 15 分間)を行った。その後、反応液に 4U Ribonuclease H (RNaseH) (TaKaRa) を加えて 37°C で 20 分間反応させ一本鎖 cDNA を得た。

XBPlu mRNA スプライシングを確認するために、ヒト *XBP1* 特異的プライマ

— F6 5x (5' –GAACCAGGAGTTAAGACAGC-3') と R6 3x (5' –AGTCAATACCG CCAGAATCC-3') を用いて *XBPIu* cDNA を増幅した。方法として, rTaq DNA Polymerase (TaKaRa#R001A) を用いて 25 サイクル (98°C, 30 秒; 55°C, 30 秒; 72°C, 30 秒) PCR を行った。PCR 産物は, 6% アクリルアミドゲルによる電気泳動とエリジウムブロマイド染色により検出した。

2.17. Real-time PCR 解析

(2.16.) で作製した cDNA サンプルをテンプレートとし, 0.5 μM 5' プライマー, 0.5 μM 3' プライマー, SYBR premix Taq TM (TaKaRa #RR0419) を含む反応液に加えた。このサンプルは Multiwell Plate384 にアプライし, LightCycler 480 (Roche) を用いて Real Time-PCR を行った。GAPDH プライマーとして F7 5'-AGCCACAATCGCTCAGACAC-3' と R7 5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3' を用いた。Listerin プライマーとして, F8 5'-GGAGTAGCTGTTCAGCAGTGG-3' と R8 5'-AAGCCTTCCATAATACTTCCATTCT-3' を用いた。

3. 結果

3.1. 哺乳動物において発現抑制をもたらす翻訳停止配列の探索

酵母における RQC の研究では、連続した 12 個の正電荷アミノ酸による翻訳停止が RQC の標的になることを報告している (Dimitrova *et al.*, 2009, Bengtson *et al.*, 2010, Tsuboi *et al.*, 2012, Brandman O *et al.*, 2012, Matsuda *et al.*, 2014) . 一方、哺乳動物細胞において RQC の標的となる翻訳停止配列は不明である。これまで著者は、哺乳動物細胞において RQC の標的となる翻訳停止配列の探索を行ってきた。先行研究ではウサギの網状赤血球ライセート (RRL) を用いた *in vitro* 解析で、15 個の連続したアルギニン (R15) では、翻訳停止後にポリペプチド鎖伸長反応が再開して全長へと成熟することが明らかとなった。この結果は R15 では発現抑制が起きないことを示しており、RQC の標的になるためには、より翻訳停止の強い正電荷クラスターが必要なことが示唆された (曾川修士論文, 2013) . そのため当研究では引き続き、RQC の標的となる翻訳停止配列の探索を行った。

当研究では、翻訳停止を検証するためのコンストラクトとして、翻訳停止配列の上流に EGFP, 下流に mCherry を連結させた EAC (**E**GFP-**A**rrest-**m**Cherry) を用いた。翻訳停止配列として 30 個のアルギニンを連結させた EAC[R30] を作製した (図 2) . 翻訳停止産物 (新生鎖) は、中性のアクリルアミドゲル (Nu-PAGE) を用いた電気泳動によって peptidyl-tRNA として検出可能である (図 3) .

この方法を用いて、EAC[R30] で発現抑制がおこるかを解析した (図 4) . RRL による ³⁵S Met, Cys を用いた *in vitro* 翻訳の結果、EAC[R15] では、翻訳開始から 10 分において、弱い翻訳停止産物が検出され、それ以降は観察することができなかった。EAC[R15] では、翻訳停止配列を持たない EAC [A30] より全長量が低下していたが、翻訳停止産物の多くは全長へと翻訳再開しており、発現抑制が十分でないことが示唆された。一方、連続したアルギニンを 30 個持つ EAC[R30] では、翻訳開始から 90 分後にも翻訳停止産物が検出され、全長はほとんど検出されなかった。この結果は EAC[R30] の翻訳停止では発現抑制が起きることを示している。

また、別の翻訳停止産物検出法である「新生鎖の二次元電気泳動」によっても EAC[R30] の翻訳停止を検証した。Ito *et al.*, (2011) によって確立された新生鎖の二次元電気泳動は peptidyl-tRNA を形成する新生鎖と tRNA をもたないタンパ

ク質を分離する方法であり, RNaseA 処理と同様に, 翻訳停止産物の検証に有効な方法である (図 5). この方法により, 図 4 の EAC[R30] のサンプルを用いて解析した (図 6).

その結果, 新生鎖のラインにドット状のシグナルが検出された. このシグナルが翻訳停止産物であり, 時間とともに減少していた. 翻訳抑制が起きているのであれば, 翻訳停止後にそのまま翻訳が終結する「翻訳放棄」が起きることが考えられる. しかし, 今回の実験において翻訳放棄産物は * で示した RRL 由来のシグナルと重なってしまい, 定量することができなかった. 一方, 全長は翻訳停止産物の減少に匹敵するほどの増加はしておらず, EAC[R30] では翻訳再開がほとんど起きないことが示唆された. この結果から, R30 による翻訳停止では全長への翻訳再開よりも翻訳放棄が起きることが示唆される. 以上の結果から, R30 による翻訳停止では発現抑制が引き起こされることが示唆された.

3.2. 哺乳動物細胞において R30 による翻訳停止は発現抑制をもたらす

(3.1.) の *in vitro* 翻訳では, R30 の翻訳停止で発現抑制がおきることが示唆された. 次に, 哺乳動物細胞において R30 による翻訳停止が発現抑制をもたらすのかを検証した. 方法として, 当研究室で確立された翻訳停止検証システムである「EAC システム」を用いた (大古殿修論, 2015) (図 7). EAC システムは FACS 解析によって細胞内の蛍光強度を解析する方法であり, 細胞内の緑色蛍光と赤色蛍光のパラメーターを分けて定量的に測定できる (図 8). 当研究では, R30 の翻訳停止で発現抑制が起きるのかを解析するために, HeLa 細胞に発現させたそれぞれの EAC の緑色蛍光 (EGFP) および赤色蛍光 (mCherry) の強度を測定し, 両者の蛍光強度を発現量として換算し, 細胞内の発現量を解析した.

まず, それぞれの EAC において, 緑色および赤色蛍光の蛍光強度別の細胞数を解析した (図 9 左側カラムと中央カラム). 最も細胞の多い蛍光強度を赤のラインで示し, この位置をそれぞれの EAC における蛍光強度の平均値とした. その結果, 緑色蛍光の蛍光強度は EAC[R15] > EAC[A30] > EAC[R30] の順になっていた. 次に, 赤色蛍光の蛍光強度は EAC[A30] > EAC[R15] > EAC[R30] の順になっていた. これらの結果から, 緑色蛍光も赤色蛍光のどちらも EAC[R30] が最も蛍光強度が低下していることが明らかとなった.

次に緑色蛍光と赤色蛍光がともに 10^4 以上の強度を示す細胞集団 (P9) について解析した (図 9 右側カラム). その結果, 緑色および赤色蛍光ともに 10^4

以上を示す細胞集団 (P9) の割合は, EAC[R15] で 31.8%, EAC[A30] で 34.4% とほとんど差がなく, それに対して EAC[R30] は 14.8%と, 大きく低下していることが明らかとなった. この結果は, R30 による翻訳停止は哺乳動物細胞においても発現抑制を引き起こすことを示している.

以上の結果と (3.1.) の結果から, R30 の翻訳停止は発現抑制をもたらすことが明らかとなった.

3.3. 哺乳動物細胞において小胞体膜上で翻訳停止する遺伝子の探索

高等生物において RQC の標的となる小胞体タンパク質はまだ同定されていない. 一方, 酵母では正電荷アミノ酸クラスターが RQC の標的になることが報告されており, 当研究では哺乳動物細胞において R30 による翻訳停止が発現抑制をもたらすことを明らかにした. これらの点から, 哺乳動物細胞において R30 による翻訳停止は RQC の標的になることが示唆される. 当研究では, 小胞体膜上で RQC の標的となる人工タンパク質を用いて, 小胞体膜上における RQC の生理的意義を明らかにすることを目的としている. そのため, まず小胞体膜上で RQC の標的となる人工タンパク質を作製する必要があると考えた. よって, R30 の翻訳停止配列を小胞体タンパク質に挿入し, 哺乳動物細胞の小胞体膜上で RQC の標的となる小胞体タンパク質の作製を行った.

R30 の翻訳停止を引き起こす小胞体タンパク質として, Firefly luciferase (Fluc) の上流に小胞体移行シグナル, 下流に R30 と小胞体残留シグナル (KDEL) を付加し, 共翻訳的に小胞体へと膜透過される小胞体局在型の Fluc-ER[R30] を作製した (図 10). まず, 図 3. で示した方法によって, 哺乳動物細胞における Fluc-ER[R30] の翻訳停止を検証した. HEK293T 細胞に Fluc-ER[R30] 発現ベクターをトランスフェクションし, Fluc-ER[R30] を一過的に発現させた. この細胞からタンパク質を抽出し, 半量を RNaseA 処理し, Nu-PAGE ゲルを用いたウェスタンブロットにより翻訳停止を検証した. その結果, RNaseA 処理によって消失し, 全長の位置にシフトするバンドが検出された. このバンドは R30 によって生じた翻訳停止産物であり, Fluc-ER[R30] の翻訳停止を検証することができた. また, 小胞体の内部で起こる糖鎖修飾は主に全長および新生鎖から tRNA が脱離した Fluc-ER[R30] で観察され, 翻訳停止産物では観察されなかった. この結果は, Fluc-ER[R30] は主に翻訳後に N-グリコシド型糖鎖修飾を受けることを示唆している.

3.4. Fluc-ER[R30] は共翻訳状態でトランスロコン上に分布する

Fluc-ER[R30] 新生鎖が RQC の標的になるためには、新生鎖が共翻訳状態、すなわち 60S または 80S リボソームの中に存在する必要がある。これを検証するために、ショ糖密度勾配遠心法によるポリソーム解析 (図 11) を行い、Fluc-ER[R30] 新生鎖が 60S または 80S リボソームに存在するかを解析した。その結果、Fluc-ER[R30] 新生鎖は 60S リボソームおよび 80S リボソームを含むモノソームとポリソームの画分のみで観察された (図 12)。この結果は、ほぼ全ての Fluc-ER[R30] 新生鎖が共翻訳状態で存在することを示している。

リボソームは巨大分子複合体であり、小胞体内部へと膜透過できない。そのため小胞体に局在し、リボソームに包まれている Fluc-ER[R30] 新生鎖は小胞体膜上で停滞していることが考えられる。よって、ジギトニンを用いた細胞分画 (ジギトニン分画法) を行い、Fluc-ER[R30] 新生鎖 が小胞体に局在するのかを検証した。ジギトニンはコレステロールと結合する界面活性剤であり、細胞膜の透過性を上げ、サイトゾルの可溶性分子を選択的に溶出できる。続いて非イオン性界面活性剤の Triton-X で膜成分を可溶化する (図 13)。この方法によって Fluc-ER[R30] を一過的に発現させた HEK293T 細胞をサイトゾルと膜フラクションに分画し、ウェスタンブロットを行った (図 14)。その結果、Fluc-ER[R30] は小胞体膜タンパク質の Calnexin と同様の局在を示し、ほぼ全てが小胞体に局在していた。この結果から、ほぼ全ての共翻訳状態の Fluc-ER[R30] 新生鎖は小胞体膜上に局在していることが示唆された。

次に、この翻訳停止した Fluc-ER[R30] 新生鎖がトランスロコンに透過中であるのかを解析した。方法として抗 Fluc 抗体による Fluc-ER[R30] の共免疫沈降を行い、トランスロコンの構成因子である Sec61 α および Sec61 β との相互作用を解析した (図 15)。解析の結果、Fluc-ER[R30] は翻訳停止しない Fluc-ER に比べて Sec61 α および Sec61 β と強く相互作用していた。この結果から、Fluc-ER[R30] の翻訳停止は新生鎖がトランスロコンに膜透過した状態で起きることが示唆される。

3.5. Fluc-ER[R30] は RQC の標的になる

前述の解析で Fluc-ER[R30] 新生鎖を含むリボソームはトランスロコン上で停滞することが示唆された。この結果から Fluc-ER[R30] 新生鎖が RQC の標的となる必要条件を満たしているため、次の実験では Fluc-ER[R30] 新生鎖が

RQC の標的になるのかを検証した. 序論で述べたように, Listerin はリボソーム結合型の E3 ligase であり, 翻訳停止したリボソームの新生鎖を選択的にユビキチン化する. そのため, Listerin は RQC 特異的にはたらく E3 ligase といえる. よって, Listerin ノックダウンと Listerin レスキュー実験により, Fluc-ER[R30] が RQC の標的になるのかを検証した.

まず Listerin ノックダウン用の siRNA として, 図 16. に示す siListerin#1 と siListerin #7 を用いた. Listerin の発現量は siListerin #1 では約 15%, siListerin#7 では約 35% まで低下していた. Listerin レスキュー実験では siListerin #1 に認識されない, 図 17. 上 に示すようなサイレント変異を挿入した Listerin 発現ベクターを作製した. また, 酵母を用いた先行研究ではネガティブコントロールとして, Listerin の RING 活性を不活性化する変異体が得られている (Bengtson *et al.*, 2010). Listerin の RING ドメインは高等生物で高度に保存されているため, 同様の変異を入れ, RING 活性を不活性化させた, 不活性型 Listerin 発現プラスミドベクターを作製した (図 17. 下) .

これらの材料を用いて Listerin ノックダウンおよび Listerin レスキュー実験を行い, Listerin が Fluc-ER[R30] の発現量を低下させるのかを検証した (図 18). 解析の結果, siListerin #1 によるノックダウンにより, Fluc-ER[R30] 新生鎖と全長の量が増加した (lane 2,3). また, ノックダウン効率の低い siListerin #7 では全長のみ増加していた (lane 2,7). 次に, Listerin をレスキューすることで, Fluc-ER[R30] 新生鎖と全長が減少していた (lane 4). さらに, 不活性型 Listerin 発現ベクターではレスキューできず, Listerin の RING 活性が Fluc-ER[R30] の発現抑制に必要であることが明らかとなった (lane 5,6). これらの結果は, Listerin の発現量に応じて Fluc-ER[R30] が発現抑制されることを示しており, RQC の標的となることを示している.

次に, Fluc-ER[R30] 新生鎖が RQC の標的となるのであれば, Listerin によって新生鎖のユビキチン化が促進されるはずである. よって, Listerin の活性に従って Fluc-ER[R30] 新生鎖のユビキチン化が起きるのかを Listerin レスキュー実験により検証した. 抗 Fluc 抗体による免疫沈降と陽イオン性の界面活性剤である 臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム (CTABr) による peptidyl-tRNA の精製により, Fluc-ER[R30] 新生鎖のみを精製した. このサンプルをウェスタンブロットし, ユビキチンの検出を行った (図 19) . その結果, Listerin レスキュー時にユビキチンのスメアなバンドが観察され, Listerin が

Fluc-ER[R30] 新生鎖のユビキチン化を促進することが明らかとなった。以上の結果から、トランスロコン上で翻訳停止したリボソームに含まれる Fluc-ER[R30] 新生鎖は Listerin の標的となってユビキチン化され、発現抑制されることが明らかとなった。

以上の結果から、哺乳動物細胞の RQC の標的となる翻訳停止配列として初めて、R30 を同定した。さらに、哺乳動物細胞において、RQC の標的となる小胞体タンパク質の初めての例として、Fluc-ER[R30] が得られた。

3.6. Listerin ノックダウン時に Fluc-ER[R30] とトランスロコンは共に 60S リボソーム画分に増加する

Listerin が不活性化した条件では、翻訳停止によって生じる 60S RNC 複合体の新生鎖はユビキチン化されないため、60S RNC 複合体が蓄積することが考えられる。すなわち、Listerin ノックダウン時に Fluc-ER[R30] 新生鎖が 80S リボソーム画分から 60S リボソーム画分に増加し、さらにトランスロコンも同様の挙動を示すのであれば、トランスロコンは Fluc-ER[R30] 新生鎖と強く結合していることがわかる。この仮説を証明するために、Listerin knockdown 時の Fluc-ER[R30] とトランスロコンの挙動をショ糖密度勾配遠心法によって解析した (図 20)。その結果、Listerin knockdown 時に Fluc-ER[R30] はポリソーム画分から 60S リボソーム付近の画分に増加していた。この結果は Listerin knockdown 時に Fluc-ER[R30] は主に 60S RNC 複合体を形成していることを示唆している。また、トランスロコンの構成因子である Sec61 β も Fluc-ER[R30] と同様にポリソーム画分から 60S リボソーム画分に増加していた。この結果から、Fluc-ER[R30] と Sec61 β の間に強い相互作用があることが示唆される。また、Fluc-ER[R30] を発現させていない場合も Listerin ノックダウンによって Sec61 β がポリソーム画分から 60S リボソーム画分に増加するため、トランスロコンは内在性の RQC 標的小胞体タンパク質とも相互作用していることが示唆される (図 21)。

以上の結果は、Listerin ノックダウン時に 60S RNC 複合体がトランスロコンに蓄積することを示唆しており、当研究の「RQC 不全時にトランスロコンの閉塞がおこる」という仮説を支持している。

3.7. RQC 不全は分泌・膜タンパク質の小胞体への膜透過を阻害する

これまでの結果から、リボソームに包まれた Fluc-ER[R30] 新生鎖がトランスロコンに膜透過した状態で停滞していることが示唆された。これをもとに、当研究では“RQC 不全によって長期的に停滞したリボソームはトランスロコンを閉塞する”という仮説の検証を行った。トランスロコンの閉塞は分泌・膜タンパク質の膜透過を妨げることが考えられる。よって、RQC 不全時に分泌・膜タンパク質の小胞体への膜透過効率が低下すれば、トランスロコンが閉塞している可能性が高いため、分泌・膜タンパク質の膜透過効率を解析した。

方法として、分泌型の糖タンパク質である α -1 antitrypsin (A1AT) の小胞体内での糖鎖付加を指標とし、膜透過効率を検証した (図 22. 上)。また、Kim et al., (2002) はペプチドホルモンである Leptin (Lep) や細胞膜タンパク質の Prion protein (PrP) の小胞体への膜透過は一般的な分泌・膜タンパク質に比べて効率が悪いことを報告している。このような膜透過効率の低い小胞体移行タンパク質の Signal sequence (SS) は、トランスロコンの孔に挿入する力が弱いため、トランスロコンの閉塞の影響を受けやすいことが考えられる。そのため、A1AT の SS を膜透過効率の低い PrP や Lep の SS に置換した A1AT[Lep] と A1AT[PrP] を作製した (図 22. 下)。

次に、RQC 不全を再現するために、HEK293T 細胞において Listerin をノックダウンし、RQC 標的小胞体タンパク質である Fluc-ER[R30] の一過的発現を行った。この細胞を、 ^{35}S Met, Cys によるラベルを行い、RQC 不全時におけるそれぞれの A1AT の膜透過効率を解析した (図 23)。

まず、A1AT において、脱糖鎖酵素の EndoH を用いて糖鎖型と非糖鎖型 A1AT のバンドを同定した。その結果、小胞体に膜透過された糖鎖型 A1AT (Gly-A1AT) と膜透過されていない非糖鎖型 A1AT (A1AT) を明瞭に区別することができた (lane 1, 2), (lane 14, 15), (lane 27, 28)。この Gly-A1AT と A1AT を定量することで膜透過効率を算出した。

解析の結果、A1AT[WT] の膜透過効率は約 80%、A1AT[Lep] は約 70%、A1AT[PrP] は 65% となっており、先行研究と同様に Lep や PrP の SS による膜透過効率は低いことが確認された (lane 2, 15, 28)。次に、Listerin をノックダウンした細胞では、どの A1AT でも膜透過効率に変化が見られなかった (lane 2, 8), (lane 15, 21), (lane 28, 34)。また、Fluc-ER[R30] を一過的に発現させた細胞では、Fluc-ER[R30] の発現量に従った膜透過効率の低下が観察されるが、

A1AT[WT] ではほとんど差がなく、膜透過効率の低い A1AT[Lep] と A1AT[PrP] においても、625 ng の Fluc-ER[R30] 発現ベクターのトランスフェクションでは、約 10 ポイント程度の低下に留まっていた (lane 2-7), (lane 15-20), (lane 28-33).

一方、Listerin をノックダウンし、Fluc-ER[R30] を一過的に発現させた細胞では、全ての A1AT で Fluc-ER[R30] の発現量に従った膜透過効率の著しい低下が観察された (lane 8-13), (lane 21-26), (lane 34-39). 625 ng の Fluc-ER[R30] 発現ベクターのトランスフェクションにより、A1AT[WT] では約 80%から約 60%へ、A1AT[Lep] では約 70%から約 25%へ、A1AT[PrP] では約 65%から約 20% へと減少していた(lane 2, 13), (lane 15, 26), (lane 28, 39).

以上の結果から、RQC 不全によって分泌・膜タンパク質の膜透過効率が低下することが明らかとなった。特に膜透過効率の低い SS では膜透過の障害が著しく大きく、トランスロコンの孔に非常に挿入しにくい環境になっていることがうかがえる。この結果は“RQC 不全時には長期的に停滞したリボソームがトランスロコンを閉塞する”という仮説を支持している。

3.8. Listerin ノックダウン時に Fluc-ER[R30] は核やサイトゾルにも局在する

RQC 不全時にトランスロコンの閉塞が起こるのであれば、トランスロコンの閉塞後に翻訳され始めた Fluc-ER[R30] は膜透過できない。そのため、Listerin ノックダウン時に一部の Fluc-ER[R30] は膜透過できず、小胞体以外の画分に局在するのではないかと考え、ジギトニン分画法により検証した (図 24)。

その結果、Listerin ノックダウン時には Fluc-ER[R30] は小胞体だけでなく、サイトゾルや核にも局在することが明らかとなった (lane1-8). この結果は Listerin ノックダウンによって Fluc-ER[R30] 自身も小胞体に膜透過できなくなり、サイトゾルや核に局在するようになったことを示唆している。また、プロテアソーム阻害剤である MG-132 を添加した場合、Listerin 存在下においても、核に Fluc-ER[R30] が局在していた (lane1-4, 9-12). この結果は、プロテアソーム阻害が Listerin ノックダウンと同様の現象を引き起こすことを示唆している。そのため Listerin ノックダウンでは、プロテアソーム阻害剤の有無にかかわらず Fluc-ER[R30] は核やサイトゾルに局在していたことが考えられる (lane 9-12, 13-16).

以上の結果から RQC が働かなければトランスロコンが閉塞し、やがて RQC 標的小胞体タンパク質は小胞体に局在できなくなるため、核やサイトゾルに局

在するようになることが示唆される。この結果も RQC 不全時にはトランスロコンが閉塞されるという仮説を支持している。また、このような RQC 不全における局在の変化は細胞にとって何らかの悪影響をもたらす可能性がある。

3.9. Listerin ノックダウン時に小胞体タンパク質は分解促進される。

(3.7.) と (3.8.) の結果より, RQC 不全時に分泌・膜タンパク質の一部は小胞体内に膜透過できなくなることが示された。小胞体に膜透過できなかった分泌・膜タンパク質は, 小胞体移行シグナルや膜貫通ドメインなどの疎水領域が原因となって構造異常タンパク質を形成し, プロテアソーム系で分解促進されることが考えられる。よって, Listerin ノックダウン時に分泌・膜タンパク質は分解促進をされるのかを検証した。

方法として, HEK293T 細胞に小胞体局在型の Firefly luciferase (Fluc-ER) およびサイトゾル局在型の Renilla luciferase (Rluc-Cyt) を共発現させた (図 25 上)。この細胞抽出液を Dual-luciferase assay によって Listerin ノックダウン時の Fluc-ER の活性を検証した (図 25 下)。解析の結果, Listerin ノックダウン時には Fluc-ER の活性が低下していた。一方, MG-132 によりプロテアソームを阻害すると, Listerin ノックダウン時においても Fluc-ER の活性が通常条件と同程度まで増加していた。この結果は, Listerin ノックダウン時には 分泌・膜タンパク質のプロテアソーム分解が促進され, 小胞体タンパク質が減少することを示している。

3.10. Listerin ノックダウン時に UPR の活性が低下する

Listerin ノックダウンにより, 小胞体タンパク質が低下することが示唆された。RQC の小胞体における生理的意義を明らかにするために, Listerin ノックダウンによる小胞体タンパク質の低下が, 小胞体の恒常性を破綻させるのかを検証した。小胞体の恒常性を知る上で, 小胞体ストレス応答 (unfolded protein response : UPR) に注目した (図 26)。UPR は小胞体内で構造異常タンパク質が蓄積することで誘導されるシグナル伝達経路であり, 小胞体ストレスを緩和させる。このように, UPR は小胞体の恒常性維持に重要であり, Listerin ノックダウン時に UPR の活性に影響が見られれば小胞体の恒常性が脅かされていることが考えられる。

よって, Listerin ノックダウン時に小胞体ストレス誘導剤である Tunicamycin

(Tm) または Thapsigargin (Tg) を添加し、小胞体ストレスセンサーの活性を解析した(図 27, 28). まず, Tm によって小胞体ストレスを誘導した場合, siControl において PERK は約 50 %まで活性化するのにに対し, siListerin #1 では約 30%, siListerin#7 では約 40% までしか活性化していなかった. さらに IRE1 α -XBP1 経路についても, Listerin ノックダウンでは IRE1 α と XBP1u mRNA splicing はともに十分な活性化が見られなかった. 次に, Tg によって小胞体ストレスを誘導した場合, 特に siListerin#1 において PERK, IRE1 α -XBP1 経路の活性が低下していた.

Tm と Tg のどちらの場合も Listerin の発現量が少ないほど UPR の活性が低下しており, Listerin の活性と UPR に相関性があることが示唆された. これらの結果から, RQC 不全は UPR を誘導できないほど, 小胞体内のタンパク質の低下を引き起こすことが明らかとなった. つまり, RQC 不全時には分泌・膜タンパク質が十分に合成されておらず, 小胞体の恒常性が破綻していることが示唆される. よって, RQC は小胞体の恒常性を維持する上で重要な機構であることが考えられる.

3.11. Listerin は UPR によって発現量が上昇する.

今回の結果から Listerin が小胞体の恒常性に密接に関わることが明らかとなった. 一方, 現在 Listerin の発現制御や活性制御は不明であり, 著者は何らかの方法で Listerin が小胞体の恒常性をモニターし, 自身の発現・活性を制御しているのではないかと考えた. そのためまず可能性の1つとして, 小胞体の恒常性維持に重要な役割を持つ UPR が Listerin の発現制御に関わるのかを解析した. (3.10) で使用した siControl のタンパク質サンプルを用いて Listerin のタンパク量をウェスタンブロットで解析した(図 29). その結果, Tm および Tg の両方で Listerin のタンパク質の増加が観察された. また, Listerin タンパク質は UPR で誘導される BiP や CHOP タンパク質と同様のタイミングで増加しており, Listerin が UPR の下流遺伝子であることが示唆された.

次に, UPR によって Listerin の発現量が上がるのであれば, mRNA 量も増加するはずである. よって, (3.10) で使用した Tm 処理したサンプルの cDNA を用いて Real-time PCR により mRNA を定量した(図 30). その結果, Listerin mRNA はタンパク質と同様に UPR によって増加していた. これらの結果から, Listerin の発現量は UPR によって制御されていることが示唆された.

4. 考察

本研究では、哺乳動物において小胞体膜上で RQC の標的となる翻訳停止配列として、連続した 30 個のアルギニン配列 (R30) を同定した。このような正電荷アミノ酸クラスターは、終止コドンが欠損した mRNA やキャップ非依存的な翻訳によって mRNA の 3' 末端にある poly (A) 鎖が翻訳された場合に出現することが考えられる。また、Listerin ノックダウンと小胞体局在型 RQC の基質の一過的発現を組み合わせると RQC 不全にした結果、膜・分泌タンパク質の膜透過が低下していた。さらに、Listerin ノックダウンによって膜・分泌タンパク質はプロテアソーム系で分解促進されていることが明らかとなった。これらの結果は RQC 不全によって、トランスロコン上で長期的なリボソームの停滞を引き起こされ、停滞したリボソームによってトランスロコンが閉塞されることを示唆している。さらに、Listerin ノックダウン時の UPR 活性の検証により、RQC 不全時には十分量の分泌・膜タンパク質が合成できないことが示唆された。

以上の結果から、小胞体では、RQC 不全時に長期的なリボソームの停滞によってトランスロコンが閉塞され、膜透過が阻害されることで分泌・膜タンパク質量が減少し、小胞体の恒常性が破綻することが示唆される。

これまで、RQC はサイトゾルでの新生鎖の凝集体形成を防ぐために必要と考えられてきた。今回の結果はこれに加え、RQC は分泌・膜タンパク質の膜透過制御を担うことを示している。

4.1. 停滞したリボソームを解離する因子について

図 20. より、Listerin ノックダウンが 60S RNC 複合体の蓄積をもたらすことが明らかとなった。しかしながら、より直接的にリボソームの停滞による影響を観察するためには、mRNA 上で停滞した 80S リボソームを解離する因子を欠損させる必要がある。

図 1B で示したように、リボソームの停滞には mRNA の 3' 末端で停滞する場合と、mRNA の途中で停滞する場合がある。現在の知見では、mRNA の 3' 末端で停滞したリボソームを解離する因子として、eRF1 / eRF3 のホモログである Pel0 / Hbs1L が同定されている (図 1C. の説明を参照)。しかしながら、この複合体は空の A サイトに挿入するため、今回用いた Fluc-ER [R30] のような mRNA の途中で停滞したリボソームに対しては働かないことが示唆される。その

ため近年、mRNA の途中で停滞したリボソームの解離には eRF1 / eRF3 のホモログではなく、リボソームの外部から解離を促進する因子が想定されているが、まだ詳細は明らかとなっていない。今後、新たな解離因子が同定され、その因子の欠損株を用いれば、より直接的な長期に渡るリボソームの停滞による影響が観察できることが考えられる。

4.2. mRNA の途中で停滞するリボソームの RQC における NEMF の必要性

今後の研究では、Lisrein 以外の RQC に関わる因子を阻害し、Listerin と同様の影響が再現されるかを検証する必要がある。その候補として Listerin の 60S RNC 複合体への局在に必須とされる NEMF のような 60S RNC の tRNA に結合する因子が挙げられる。

しかし近年の酵母の研究では、mRNA の途中で停滞したリボソームは mRNA から解離する過程で tRNA が脱離し、Rqc2 (NEMF のアナログ) が 60S RNC 複合体に結合できなくなることが報告されている。さらに、Rqc2 が結合しなくとも Listerin は新生鎖をユビキチン化するため、Rqc2 や NEMF は RQC に必須ではない可能性がある (Shcherbik *et al.*, 2016)。この報告に関してはまだ知見が少ないため、今後さらなる検証が必要となる。

この報告を踏まえ、当研究において 図 20. の結果を検証すると、Fluc-ER[R30] においてもリボソームフラクションに tRNA が結合していないペプチドが多く観察されていた。この結果は、Fluc-ER[R30] の翻訳停止も mRNA の途中で起こるため、Fluc-ER[R30] の RQC において、NEMF が関与しないことを示している可能性がある。

以上と 4.1. の考察を合わせて、RQC に必ず関わる因子は現在のところ Listerin のみであると考えられる。そのため、今回の研究結果を他の因子によって再現性を検証するためには、複数の因子を欠損するかまたは RQC に必ず関わる因子を新たに同定し、欠損させる必要がある。

4.3. トランスロコンを閉塞した新生鎖の解離機構について

本来、Fluc-ER[R30] 新生鎖はトランスロコンで停滞した場合、小胞体内で糖鎖修飾を受ける。しかし、図 10. の結果では、糖鎖修飾を受けた新生鎖は観察されなかった。また、図 18. の結果では Listerin ノックダウンにおいても糖鎖型の Fluc-ER[R30] 新生鎖は観察されず、Listerin が糖鎖型新生鎖を分解して

いる可能性は低い。しかし、実際に Fluc-ER[R30] 新生鎖がトランスロコンに透過して停滞するのであれば、糖鎖修飾を受けた新生鎖が検出されるはずである。

そこで、糖鎖修飾を受けた新生鎖が検出されなかった理由の一つとして、小胞体膜貫通型のプロテアーゼ Ste24 が関わっている可能性が考えられる。Ste24 はトランスロコンを透過した状態で孔に停滞したタンパク質のサイトゾル側を切断するプロテアーゼである。この切断により、タンパク質を小胞体内とサイトゾルに分断し、トランスロコンの閉塞を解除している (Ast *et al.*, 2016)。Fluc-ER[R30] 新生鎖も同様にトランスロコンで停滞するため、この Ste24 の標的になる可能性が高い。

よって、Ste24 を欠損した細胞で糖鎖型 Fluc-ER[R30] 新生鎖が検出されるのであれば、RQC 機構だけでなく Ste24 も Fluc-ER[R30] によるトランスロコンの閉塞の解除に関わることが考えられる。

4.4. RQC 不全時の分泌・膜タンパク質の膜透過阻害について

(3.7.) の結果では、小胞体移行シグナル (SS) の違いによって、RQC 不全時の膜透過の阻害効率が異なっていた。このような差異が生じた理由として、Kim *et al.*, (2002) の報告をもとに次のように考えた。トランスロコンに挿入されにくい Lep や Prp の SS はトランスロコンに挿入されやすい SS と普段から競合しているが、トランスロコンが閉塞され、フリーのトランスロコンが減少した場合に、競合が激しくなり、トランスロコンに挿入されにくい SS がフリーのトランスロコンまでたどり着かず、結果的に、膜透過できない確率が高くなることが考えられる。

次に、分泌・膜タンパク質における膜透過の優劣にどのような生理的意義があるのかを考えた。1つの可能性として、生命維持に重要な分泌・膜タンパク質は膜透過効率の高い SS が選ばれているのではないかと考えた。例えば、小胞体ストレス時にはなるべく小胞体への膜透過を防ぐ必要があるが、小胞体ストレスを緩和する分子シャペロンや ERAD 関連因子は膜透過する必要がある。こういった場合に SS に膜透過の優劣があれば、小胞体ストレス時に必要最低限のタンパク質のみを膜透過することができ、小胞体の許容量を超えるタンパク質の流入を防ぐことができる。この仮説は今後、分子シャペロンや ERAD 関連因子の SS を (3.7.) と同様に、A1AT の SS と置換することで明らかにすることができる。

4.5. トランスロコン閉塞時における Fluc-ER[R30] の核局在について

(3.8.)の結果では、Fluc-ER[R30]が Listerin ノックダウンおよびプロテアソーム阻害によって、小胞体だけでなくサイトゾルや核にも局在していた。サイトゾルについては、トランスロコンが閉塞されることで小胞体に膜透過されなかった Fluc-ER[R30]が蓄積することが考えられる。核については理由を明確にできないため、まず著者は Fluc-ER[R30]が核に局在する原因が RQC 不全と翻訳停止のどちらにあるのかを検証した。

この疑問を解決するために、Listerin ノックダウンおよびプロテアソーム阻害時に翻訳停止能をもたない Fluc-ER が核に局在するのかによって解析した (図 31)。その結果、Fluc-ER は Listerin ノックダウンによって核に局在することが明らかとなった。翻訳停止しない場合でも Listerin ノックダウンによって核に局在することから、小胞体タンパク質は RQC 不全時に核へと局在することが示唆された。

この理由は、今回の当研究で明らかにした「RQC 不全時にトランスロコンが閉塞する」という新しい知見により説明ができる。RQC 不全時にトランスロコンが閉塞されることで、RQC 標的タンパク質だけでなく小胞体タンパク質もサイトゾルで凝集体を形成し、Hsp40 ファミリーの分子シャペロンである DnaJB1 によって凝集体がほどこれながら核に運ばれることが考えられる。

また、Listerin ノックダウン時に全体的に Fluc-ER のタンパク質量が増加しているのに対して、(3.9.)では、Fluc-ER の活性化が低下していた。この理由として1つ目に、ミスローカライズした Fluc-ER タンパク質は凝集体を形成し、活性を失った状態で安定化していることが考えられる。2つ目に Dual luciferase reporter assay では核画分が抽出できないため、核に移行した分の Fluc-ER 活性が測定できていないことが考えられる。

4.6. Listerin が UPR の制御下にある生理的意義について

(3.11)の結果から、Listerin の発現量が UPR によって2~4倍ほど増加することが明らかとなった。この現象の生理的意義は RQC が分泌・膜タンパク質の膜透過を制御する点から、小胞体ストレス後に分泌・膜タンパク質の膜透過を促進させることにあると考えられる。では、Listerin の発現量をたった2~4倍ほど増加させるだけで膜透過効率を十分に上昇させることができるのか、この疑問について考察を行った。

(3.10) では、Listerin の発現量を野生型の約 15 % に抑える siListerin #1 と約 35 % に抑える siListerin#7 で IRE1 α -XBP1 経路の活性化に大きな差が生じていた。この結果は Listerin のわずかな発現量の違いで RQC の活性に差が生じることを示している。つまり分泌・膜タンパク質の膜透過効率はこの Listerin のわずかな発現量の差で制御されることが示唆される。そのため、Listerin の発現量が 2～4 倍ほどに増加することは、分泌・膜タンパク質の膜透過を促進する上で、十分な差であることが考えられる。

また、小胞体ストレス時には eIF2 α のリン酸化などが起きることで、分泌・膜タンパク質は翻訳抑制される。つまり小胞体ストレス時には分泌・膜タンパク質量が低下することが考えられる。しかし、UPR が RQC を通して分泌・膜タンパク質の膜透過を促進し、一早く分泌・膜タンパク質を正常な量まで亢進させることで小胞体の恒常性を維持していることが考えられる。

4.7. RQC の生理的な基質について

これまで RQC の基質として、図 1B で示したような突然変異や人工的な翻訳停止が用いられてきた。一方、生理的に RQC の基質となるタンパク質は同定されておらず、生理的な RQC の基質や RQC の基質が増加する状況や生命現象は全く明らかとなっていない。つまり、Listerin が欠損したマウスは致死となるため RQC が生命維持に必須であることはわかるが、実際にどのような状況で、RQC の基質が存在するのかわかっておらず、今後、RQC の研究を詳細に行うために、生理的な RQC の基質を明らかにすることは必須となる。

(4.6) で少し触れたが、小胞体ストレス時には分泌・膜タンパク質の膜透過は極力避けられるべきである。また、(3.7) では、小胞体局在型の RQC の基質量にしたがって膜透過効率が低下する。これらから、小胞体ストレス時に RQC の基質を増加させることで、生理的なトランスロコンの閉塞をもたらし、分泌・膜タンパク質の小胞体への膜透過を最小限に抑えているのではないかと考えた。

この仮説をもとに、私は小胞体ストレス時に小胞体局在型の RQC の基質が増加する要因として、以下のことを考えた。

「小胞体ストレス時に IRE1 α が活性化し、regulated IRE1-dependent decay of mRNA (RIDD) が働くことで、小胞体膜に局在した mRNA が切断され、nonstop mRNA が大量に生じる。」

この要因によって、小胞体ストレス時には小胞体局在型の RQC の基質が増加

することが考えられる。そのため、(3.10) では Fluc-ER[R30] を発現させなくとも小胞体ストレスによって小胞体局在型の RQC の基質が増加し、効率よくトランスロコンの閉塞がもたらされていることが考えられる。

つまり、IRE1 α の RIDD 活性は分泌・膜タンパク質の発現量を低下させるだけでなく、トランスロコンの閉塞を促進し、分泌・膜タンパク質の膜透過を阻害している可能性が考えられる。

4.8. RQC 不全時の分泌・膜タンパク質および RQC 標的小胞体タンパク質の挙動について

当研究の結果と先行研究をもとに、RQC 不全時の分泌・膜タンパク質の挙動を以下のようにまとめた (図 32)。

1. 小胞体局在型の RQC の基質がトランスロコン上で長期的なリボソームの停滞を引き起こし、トランスロコンが閉塞される。
 2. トランスロコンの閉塞により、分泌・膜タンパク質の小胞体への膜透過が阻害される。
 3. 小胞体内部ではタンパク質量が低下する。(分泌・膜タンパク質が低下する)
 4. サイトゾルでは膜透過できなかった分泌・膜タンパク質や RQC の基質が凝集体を形成し、蓄積する。
 5. 凝集体は Hsp40 ファミリーの分子シャペロンである DnaJB1 によってほどかれながらサイトゾルから核に運ばれ、分解促進される。
4. と 5. については、当研究で Listerin ノックダウン時に小胞体タンパク質や RQC の基質の核への蓄積を観察したのみであり、詳しい解析はまだ行っていない。しかし、先行研究によって 4. と 5. の現象は報告されているため、上記のような一連のメカニズムが起きている可能性は高い。今後の研究ではこのメカニズムが正しいかどうかを証明する必要がある。

結論

当研究の結論として、図 33 に示すように、RQC は分泌・膜タンパク質の膜透過を制御することで小胞体の恒常性を維持するというモデルを提唱する。これまでに RQC の生理的意義は、サイトゾルにおける新生鎖の凝集体形成を防ぐことにあることが知られている。これに加え、当研究では RQC の生理的意義として小胞体膜上でトランスロコンの閉塞を防ぐという新たな知見を見出すことができた。この知見により、RQC を病気と関わりの深い小胞体と関連付けることができ、今後 RQC 不全が原因となった疾患が見つかる可能性がある。また、分泌・膜タンパク質の膜透過を制御する機構は、筆者の知る限りではこれまでに記述されておらず、この RQC が初めての例であると考えている。今後、この RQC は、「分泌・膜タンパク質の膜透過制御」という観点から小胞体関連の分野においても注目され、発展することが期待される。

最後に、RQC という現象は発見されてから 4 年程度しか経っておらず、RQC に関わる因子や RQC の基質、RQC が生理的に働く状況など、まだ明らかになっていないことが多い。そのため、現段階では議論できない部分も多く、今後の研究が期待される。特に RQC の基質については一刻も早く明らかにし、RQC が生理的にはたらく生命現象を見出す必要がある。

5. 図表

A

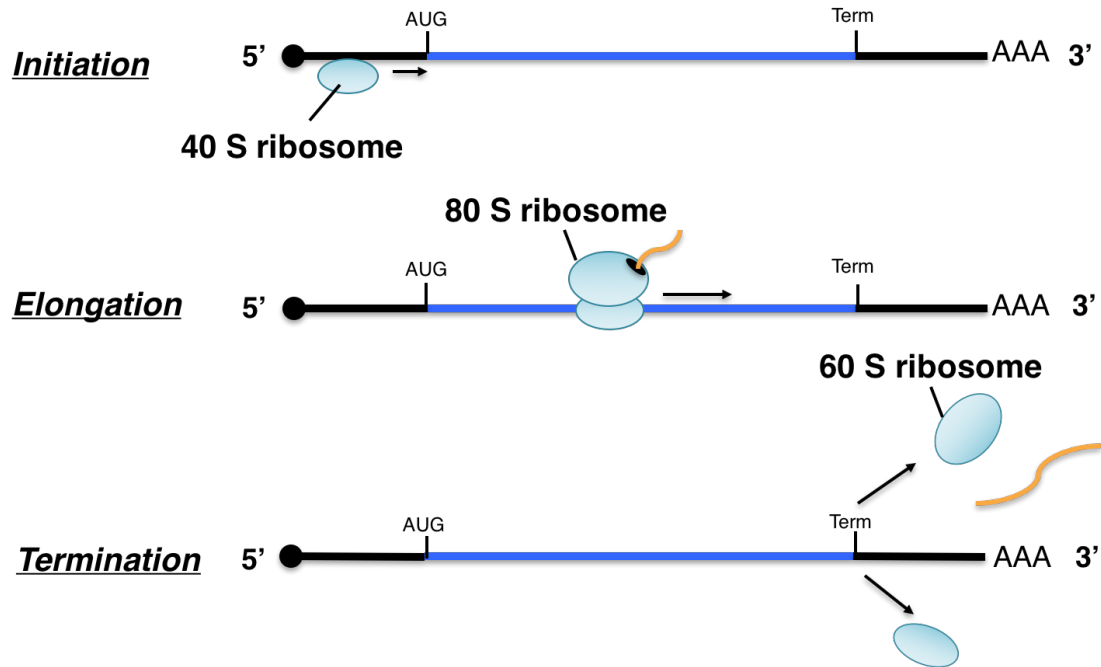
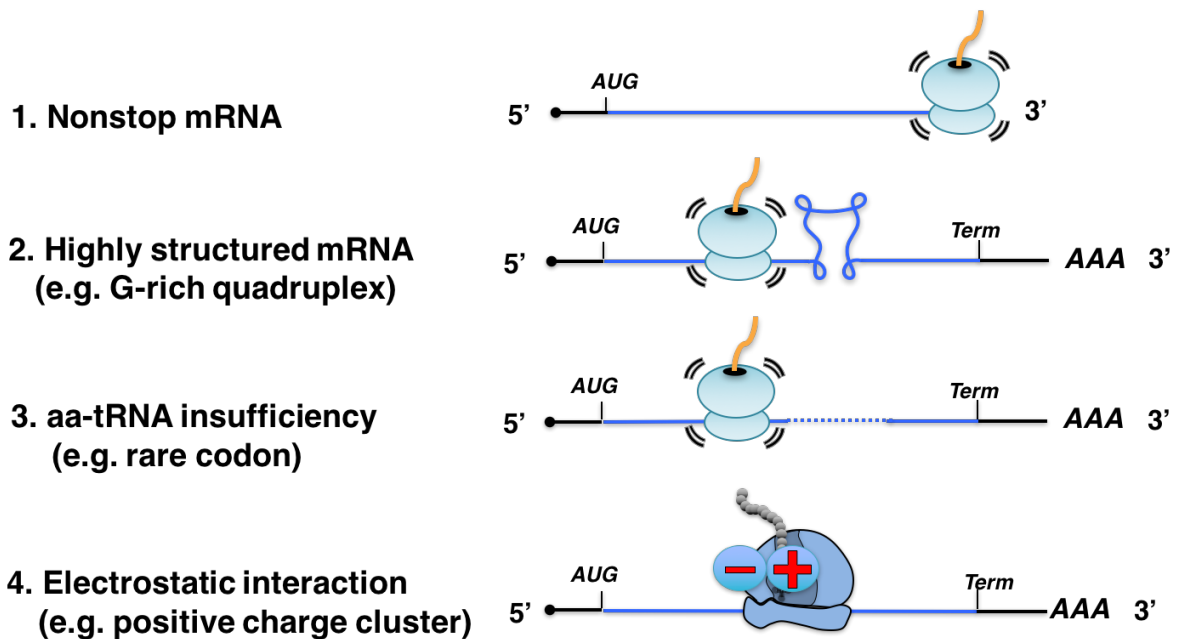


図 1 序論補足図

(A) リボソームによる翻訳の概要図.

翻訳過程は大きく3つに分けられる。翻訳開始では、40S リボソームが mRNA の 5' キャップに結合し、3' 側に向かって開始コドン（AUG）をスキャンする。最初に開始コドンにたどり着いた 40S リボソームは 60S リボソームと結合して 80S リボソームを形成する。既知の翻訳制御は主にこの段階に作用する。ペプチド鎖伸長反応では 80S リボソームが開始コドンから終止コドンまで遺伝暗号を解読し、アミノ酸を連結させてペプチド鎖を伸長する。この段階はリボソームが mRNA 上を一定の速度で進行しながらアミノ酸を連結すると考えられている。翻訳終結では 80S リボソームが終止コドンにたどり着き、終結因子により mRNA 上から解離し、ポリペプチド鎖の合成が完了する。

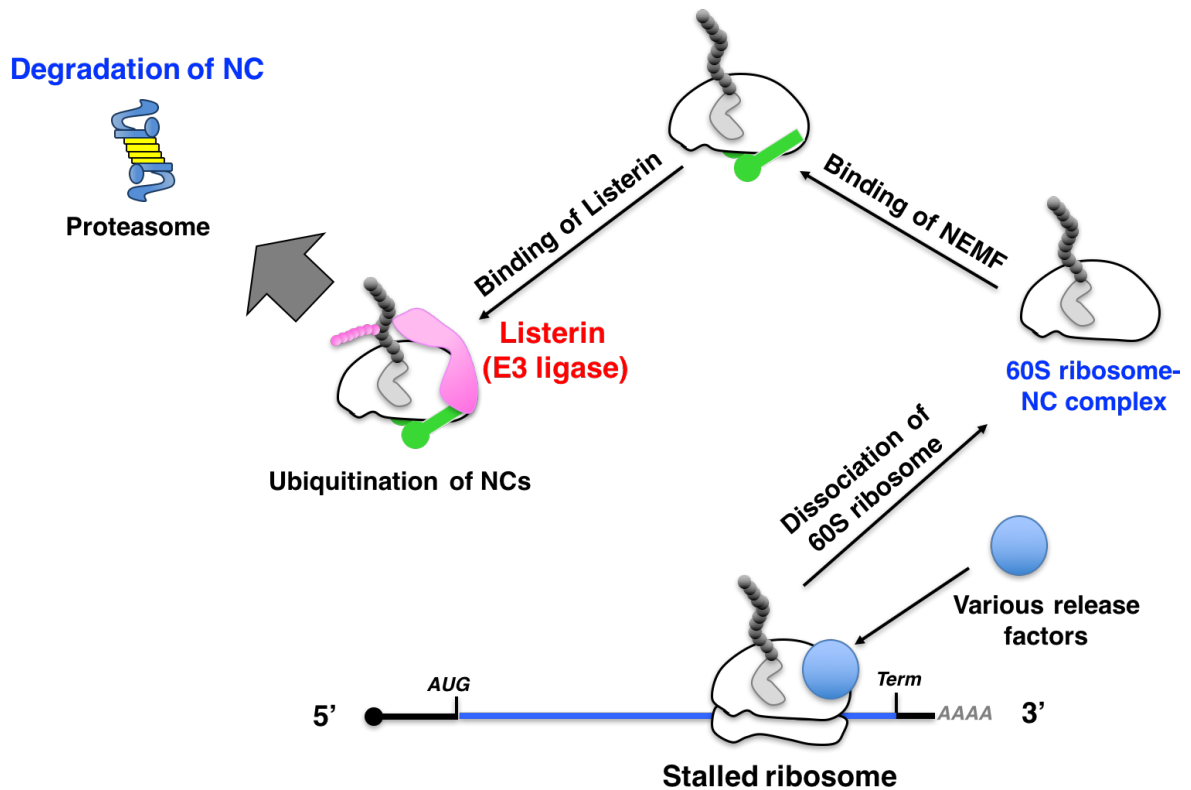
B



(B) 様々な要因で引き起こされる翻訳停止.

ここでは終止コドンにたどり着く前に引き起こされる、4つの異なる翻訳停止について述べる。突然変異やキャップ非依存的な翻訳を含めたフレームシフトによって終止コドンが欠損した場合や mRNA が傷害を受けて 3' 末端が切断されて終止コドンが欠損した場合には mRNA の 3' 末端でリボソームが停滞する (1)。mRNA が連続したグアニン塩基を持つ場合に G-rich quadruplex と呼ばれる高次構造を形成し、リボソームが物理的に進めなくなり停滞する (2)。mRNA がレアコドンを含んだ場合や特定のアミノアシル tRNA が不足している場合に、それぞれのアミノアシル tRNA がリボソームの A サイトにたどり着くまでの間、リボソームが停滞する (3)。リボソームがリジンやアルギニンといった正電荷アミノ酸を連続して翻訳した場合や mRNA の 3' 末端にある polyA 鎖を翻訳した場合に、正電荷アミノ酸クラスターとリボソームトンネルにある rRNA の負電荷によって強い静電的相互作用が引き起こされ、リボソームが停滞する (4)。(Shoemaker *et al.*, 2012; Brandman *et al.*, 2016)

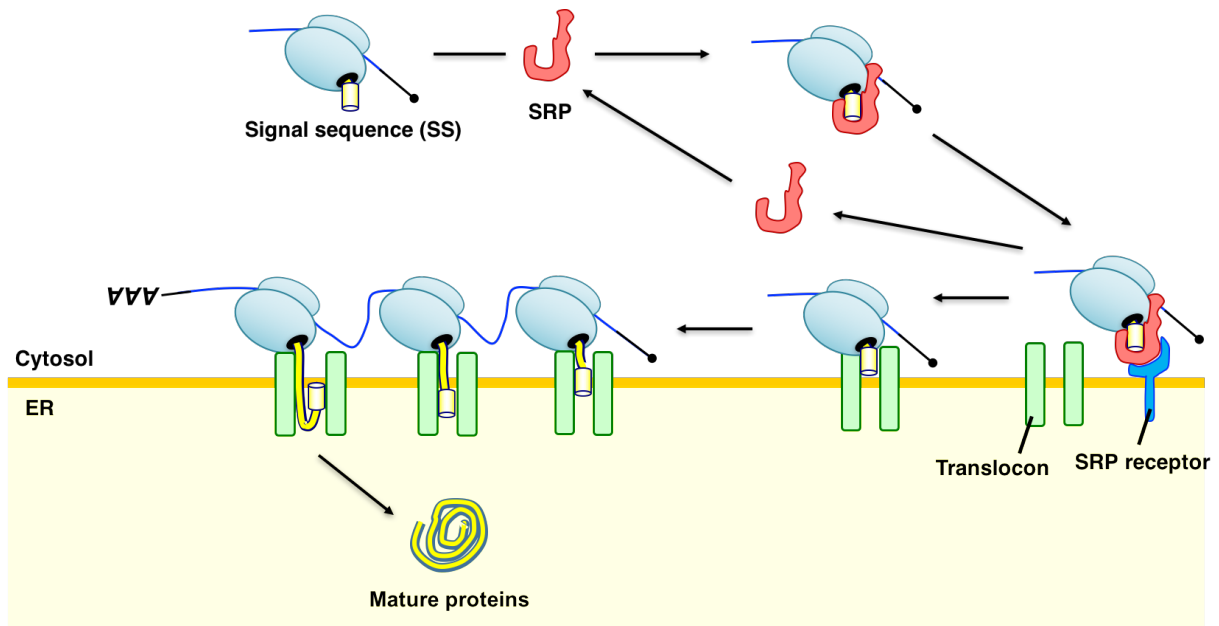
C



(C) Ribosome-associated protein Quality Control (RQC) による新生鎖の分解.

まず、(B) で示した様々な要因によって停滞した 80S リボソームは解離因子によって mRNA から解離され 60S リボソーム-新生鎖 (60S RNC) 複合体と 40S リボソームとなる。40S リボソームは他の遺伝子の翻訳にリサイクルされる。mRNA の 3' 末端で停滞したリボソームの解離は空の A サイトに eRF1/eRF3 のホモログである Pello/Hbs1L が挿入することで促進される。一方、mRNA の途中で翻訳停止したリボソームの解離はリボソームトンネルには入らない別の解離因子が示唆されているが、詳細はまだ明らかとなっていない。次に、60S RNC 複合体の tRNA が露出した基底部に NEMF が結合し、60S RNC-NEMF 複合体が形成される。次に、E3 ligase の Listerin が N 末端側を NEMF と相互作用する形で結合する。Listerin によって 60S RNC 複合体の新生鎖のユビキチン化が進み、ATPase である P97 (VCP) によってプロテアソームに運ばれ、分解が促進される。現在の知見では Listerin は 60S RNC-NEMF 複合体にのみ相互作用する RQC 専用の E3 ligase と考えられている。また、この RQC はサイトゾルでの新生鎖による凝集体形成を防ぐ役割があることが報告されている。

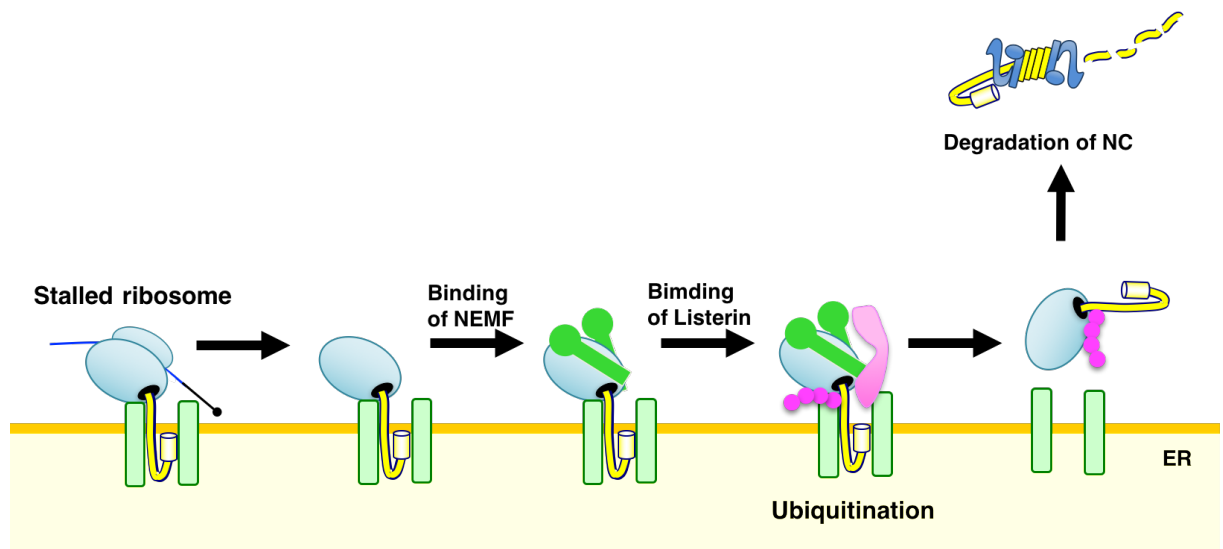
D



(D) 分泌・膜タンパク質の小胞体への膜透過機構 (SRP 経路) .

N 末端に疎水性に富んだシグナルペプチドをもつ分泌・膜タンパク質では SRP を介して小胞体へと膜輸送される. リボソームが mRNA から N 末端にあるシグナルペプチドを翻訳し, シグナルペプチドがリボソームトンネルから露出すると小胞体シグナル認識粒子 (signal recognition particle : SRP) が結合し, 翻訳が一時的に停止する. その後, 小胞体膜上の SRP 受容体を介して, リボソームが小胞体膜透過チャンネルであるトランスロコンと結合すると翻訳が再開される. その後, 翻訳と共役して新生鎖が小胞体内へと送り込まれる. 小胞体内に送り込まれたポリペプチド鎖は小胞体分子シャペロンの BiP やフォールディング酵素などによって正しく折りたたまれ, 機能的なタンパク質へと成熟する.

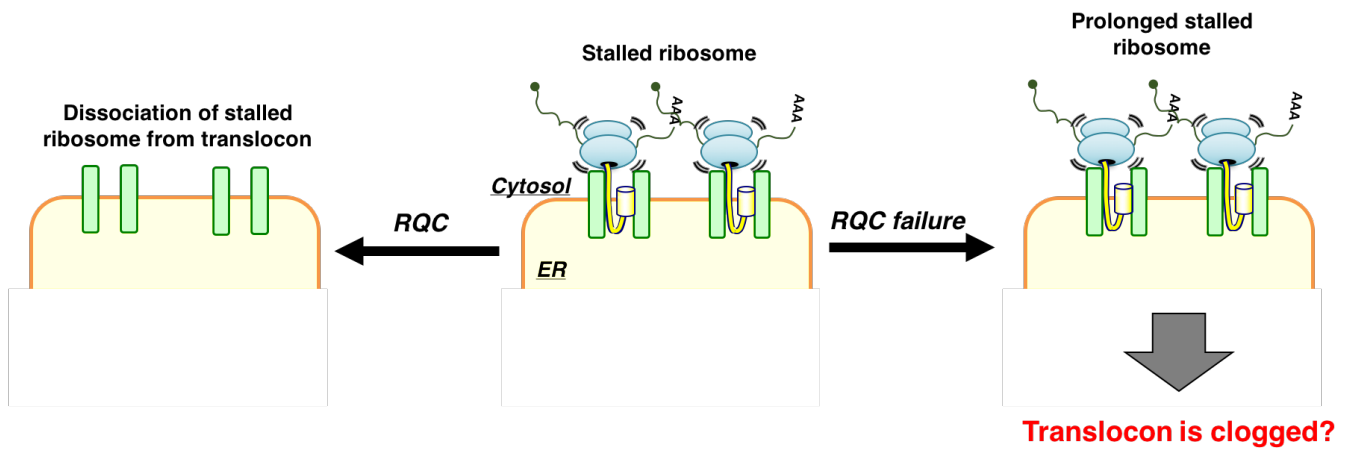
E



(E) 小胞体膜上で起こる RQC 機構.

(D) で述べたように、N 末端にシグナルペプチドをもつ分泌・膜タンパク質は小胞体に共翻訳的に膜透過されるため、翻訳停止を引き起こした場合、リボソームは小胞体膜上で停滞する。この場合にも RQC がはたらき、サイトゾルと同様の流れで新生鎖の分解が起こる。

F



(F) RQC 不全時に起こるトランスロコンの閉塞モデル.

通常、トランスロコン上で停滞したリボソームは RQC に従って速やかに除去される (右). 一方、RQC が機能しない場合はトランスロコン上でリボソームが長期的に停滞し、トランスロコンの閉塞が起きることが考えられる (左). このモデルをもとに、当研究では小胞体膜上で起こる RQC は分泌・膜タンパク質の小胞体への膜透過維持に重要であるという仮説を立てた.

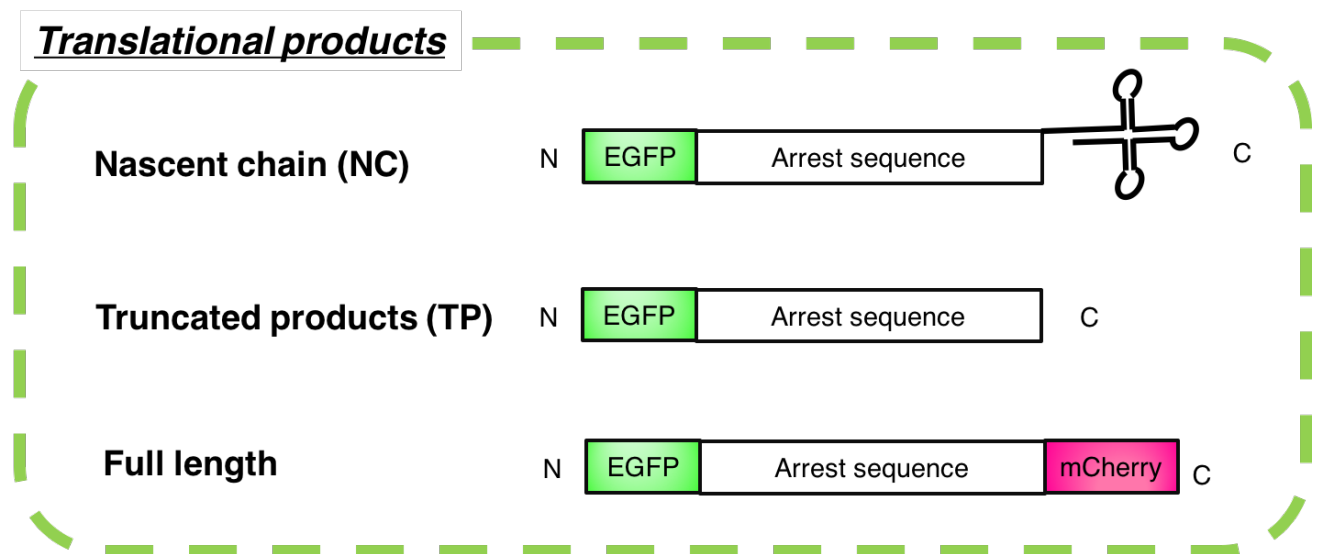
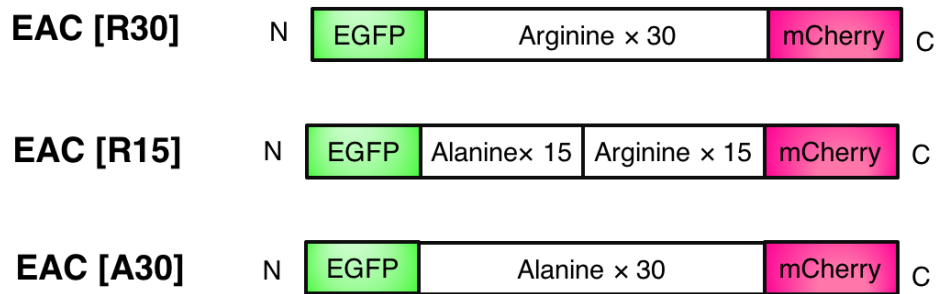


図 2. 翻訳停止検証用人工タンパク質 –EAC システム–

翻訳停止を検証するコンストラクトとして、翻訳停止配列の R30 および A15R15、ネガティブコントロールの A30 の上流に EGFP、下流に mCherry を連結した EGFP-Arrest sequence- mCherry (EAC) を作製し、pcDNA3.1 ベクターに組み込んだ。このコンストラクトで翻訳停止が起きた場合、EGFP を合成した状態でリボソームは停滞する (Arrest products)。その後、翻訳が放棄されれば EGFP と翻訳停止配列からなる翻訳中途産物 (TP) ができ、翻訳が再開すれば mCherry も合成され、全長 (Full) となる。

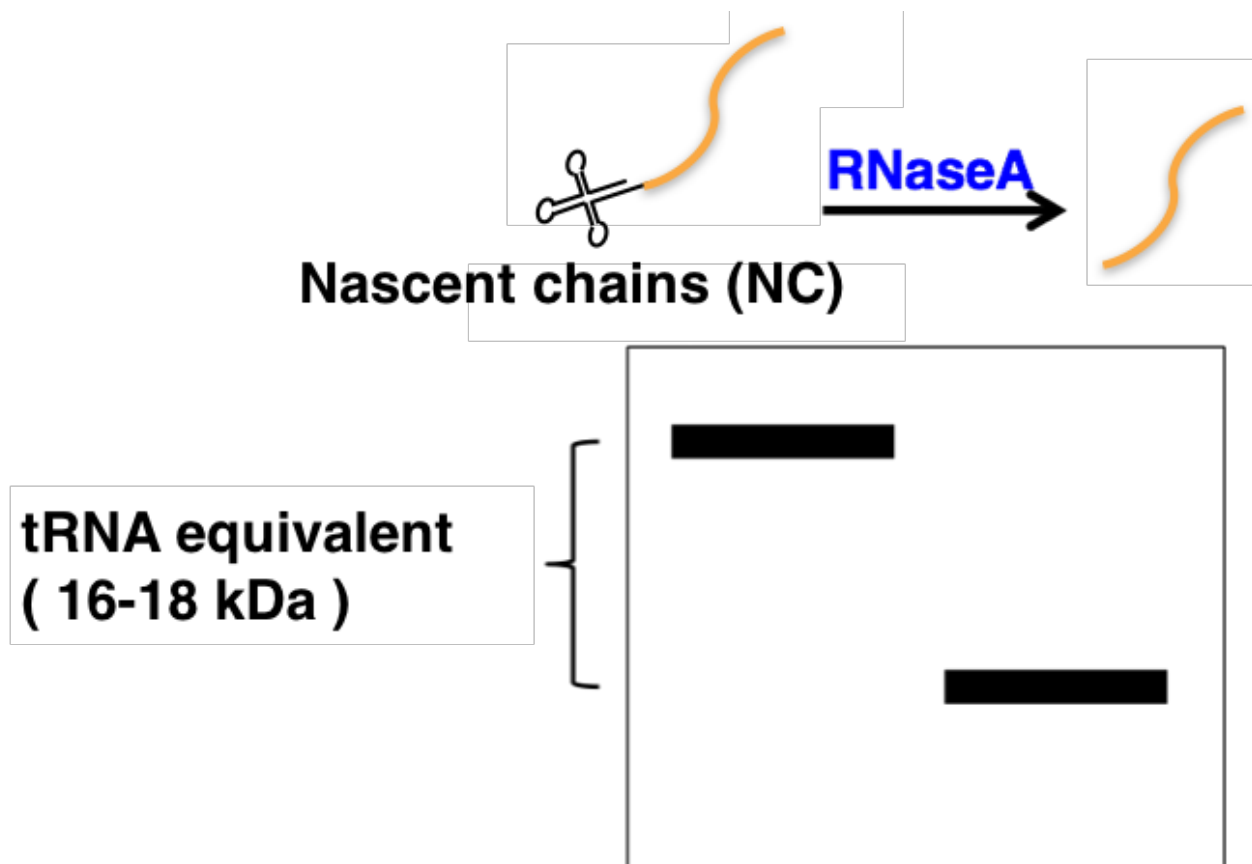


図 3. RNaseA 処理による翻訳停止産物の同定

翻訳停止産物の peptidyl-tRNA は RNaseA 処理によって tRNA が分解される。tRNA は 16-18 kDa 当量であるため、RNaseA 処理したサンプルとともに中性のアクリルアミドゲル (Nu-PAGE) によるタンパク質電気泳動を行うことで、翻訳停止産物を同定することができる。

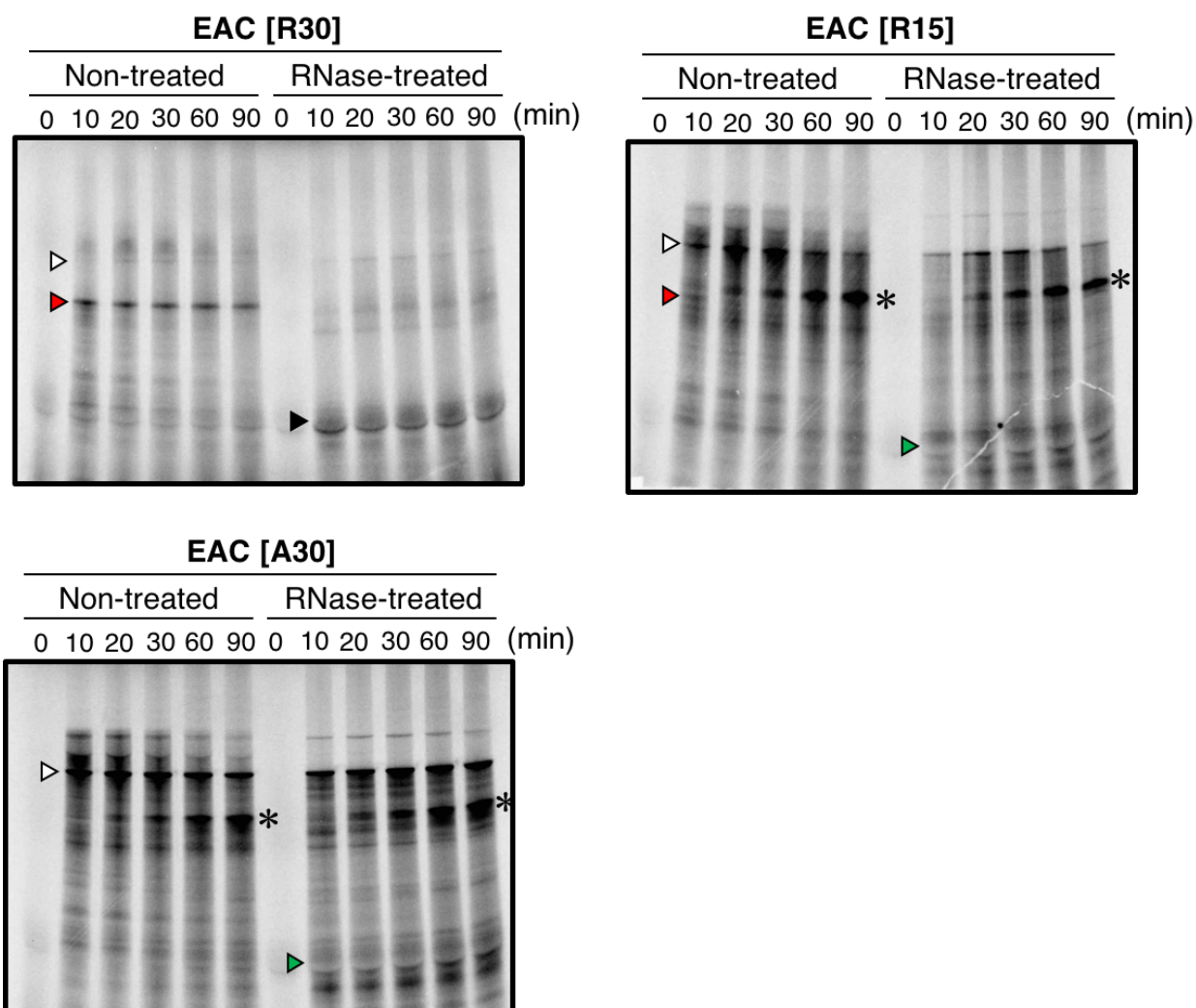


図 4. EAC [R30], EAC[R15], EAC[A30] における *in vitro* 翻訳 (RNaseA 処理)

in vitro 転写で合成した EAC [R30], EAC [R15], EAC [A30] の mRNA をそれぞれ ^{35}S Met, Cys を含むウサギの網状赤血球ライセート (RRL) によって *in vitro* 翻訳した. タイムコースをとり, それぞれの翻訳停止持続時間を検証した. タンパク質全長を 白, 翻訳停止産物を 赤, 翻訳停止産物から tRNA が脱離した産物を黒の矢頭で表記した. また, 緑色の矢頭は EAC[R30] の黒の矢頭と同じ位置を示しており, EAC[R15] や EAC[A30] ではこの位置にバンドが検出されないことを示している.

また, EAC[R15] や EAC[A30] で検出される * で示したバンドは RNaseA 感受性でなく, 時間とともに全長が減少するのに対してこのバンドが増加することから, 全長に由来した産物であることが考えられる. 低い位置に全長が増加する理由として, EGFP および mCherry が翻訳後にフォールディングしてバレル構造をとることで, Nu-PAGE 電気泳動において移動度が高くなっていることが考えられる. その他に, EAC[R15] や EAC[A30] で多くのバンドが検出されたが, ほとんどが同定できていない. しかし, R30 に非依存的に検出されることから, R30 の翻訳停止に無関係のバンドであることが考えられる.

First electrophoresis

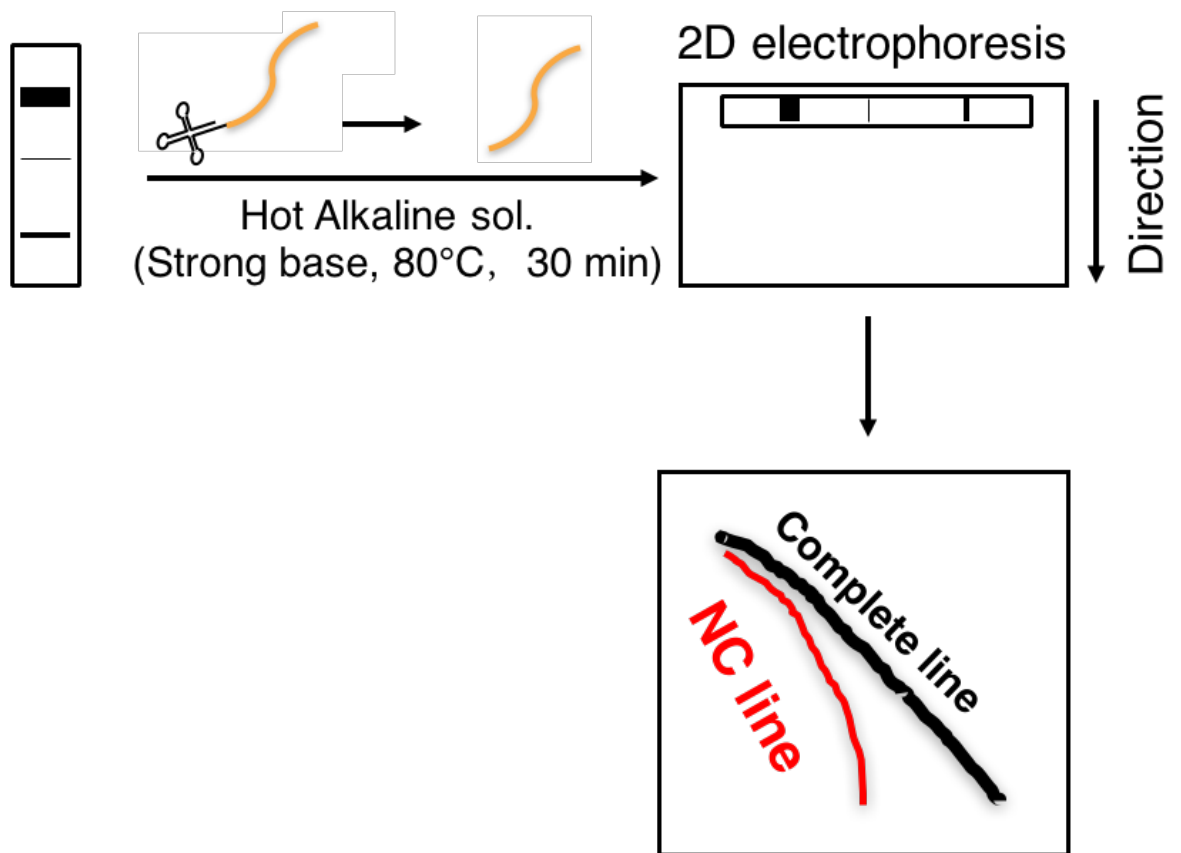


図 5. 新生鎖の二次元電気泳動による翻訳停止産物の同定

1回目の Nu-PAGE 電気泳動後、ゲルをレーンごとに切り出し、高温かつ強塩基処理により peptidyl-tRNA を加水分解させ、tRNA を脱離させる。tRNA が脱離すると 16-18 kDa ほど分子量が低下するため、二次元目の電気泳動では peptidyl-tRNA は NC line として検出され、ペプチドのみの Complete line より低い位置に検出される。

EAC [R30]

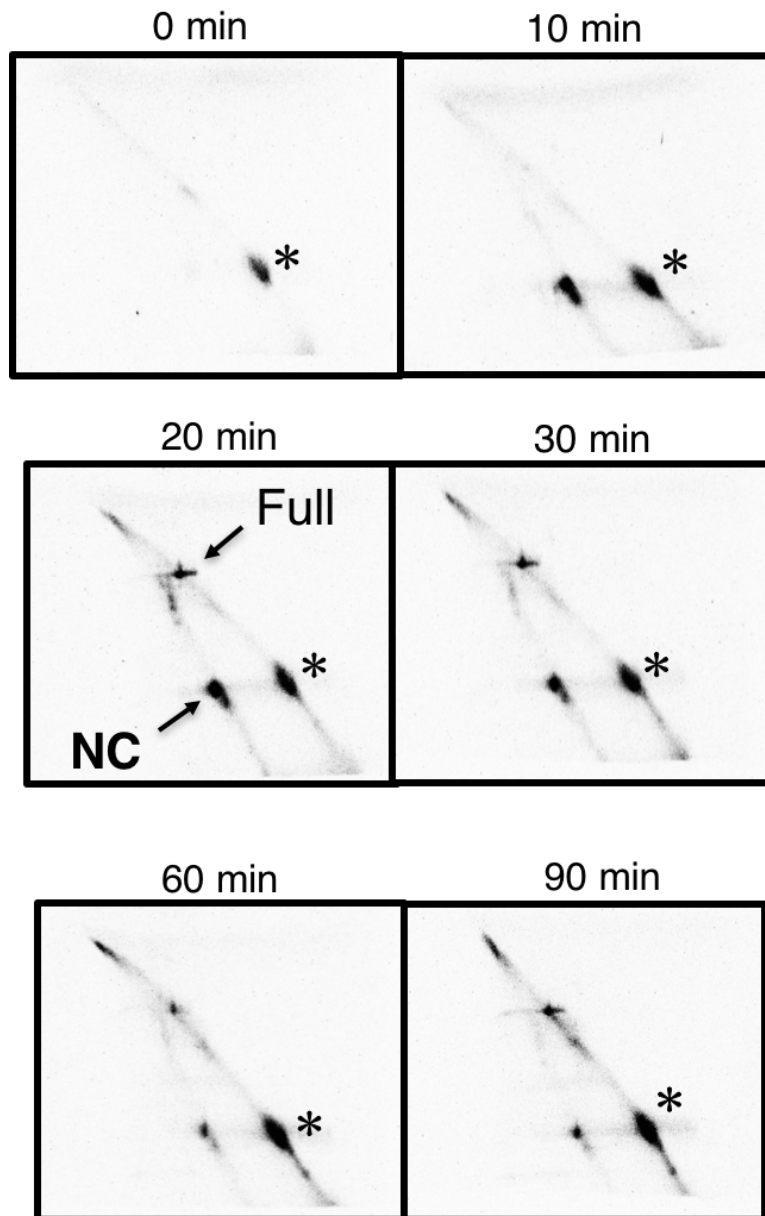


図 6. EAC [R30] における *in vitro* 翻訳 (新生鎖の二次元電気泳動)

図 3. で用いた EAC [R30] のサンプルを二次元電気泳動に用いた. 全長 (Full) と翻訳停止産物 (NC) のシグナル位置を矢印で示した.

翻訳開始 0 分では mRNA を添加していないため, 0 分で観察される * は EAC[R30] に無関係のバンドである. このバンドは RRL 内のタンパク質と ^{35}S Met, Cys が相互作用したものであることが考えられる. また, 翻訳停止産物から tRNA が脱離した産物は * とシグナルが重なっているため, 翻訳停止後にどれだけ翻訳が終結しているかを観察するのは難しくなっている.

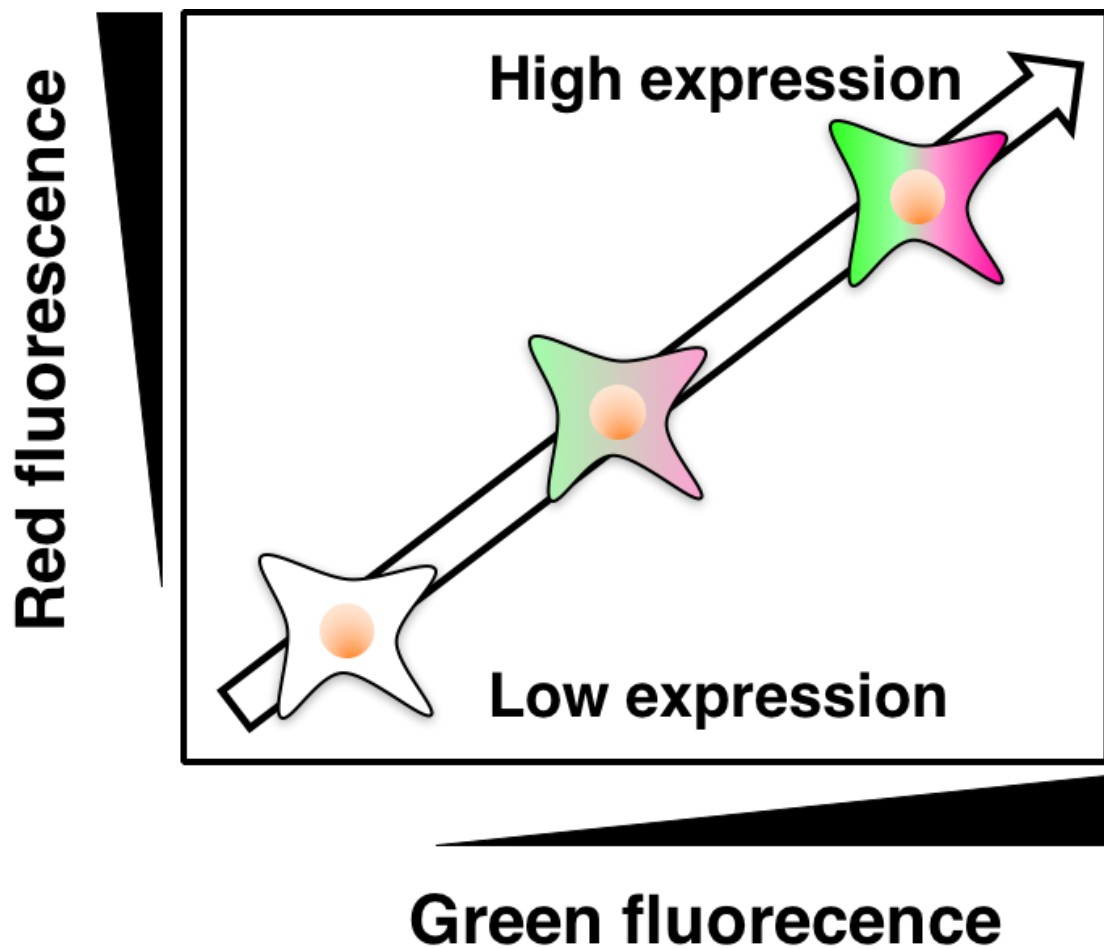
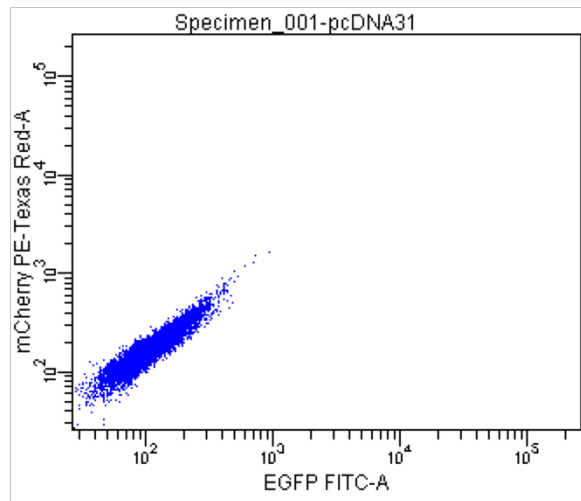


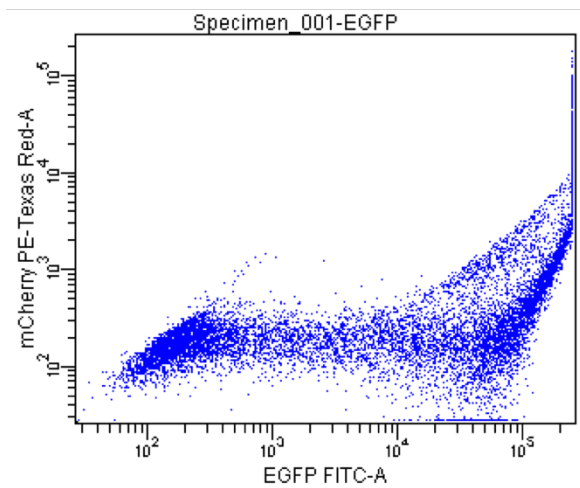
図 7. 哺乳動物細胞を用いた EAC システムによる FACS 解析

図 2. で示した EAC システムを細胞内に一過的に発現させた FACS 解析では、細胞内の蛍光強度を定量的に測定できる。今回の実験では EAC を発現させた HeLa 細胞を測定するため、EGFP による緑色蛍光と mCherry による赤色蛍光の強度を測定することで、発現量を解析することができる。

Control



EGFP



mCherry

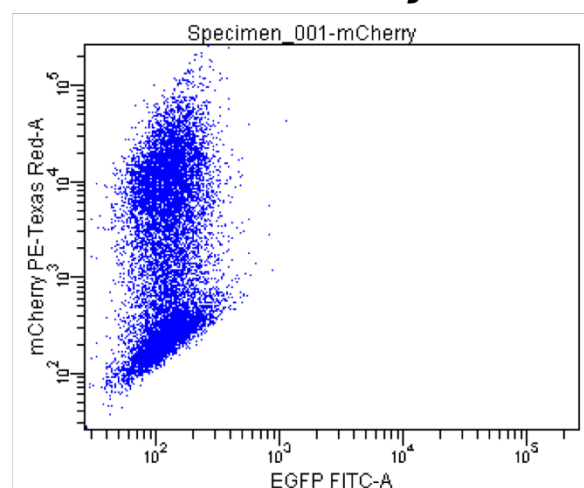


図 8. HeLa 細胞に一過的発現させた蛍光タンパク質の FACS 解析

HeLa 細胞に空ベクター (Control) または EGFP, mCherry の発現ベクターをトランスフェクションし, EGFP の蛍光パラメーターは横軸に, mCherry の蛍光パラメーターは縦軸に表示するように設定した。

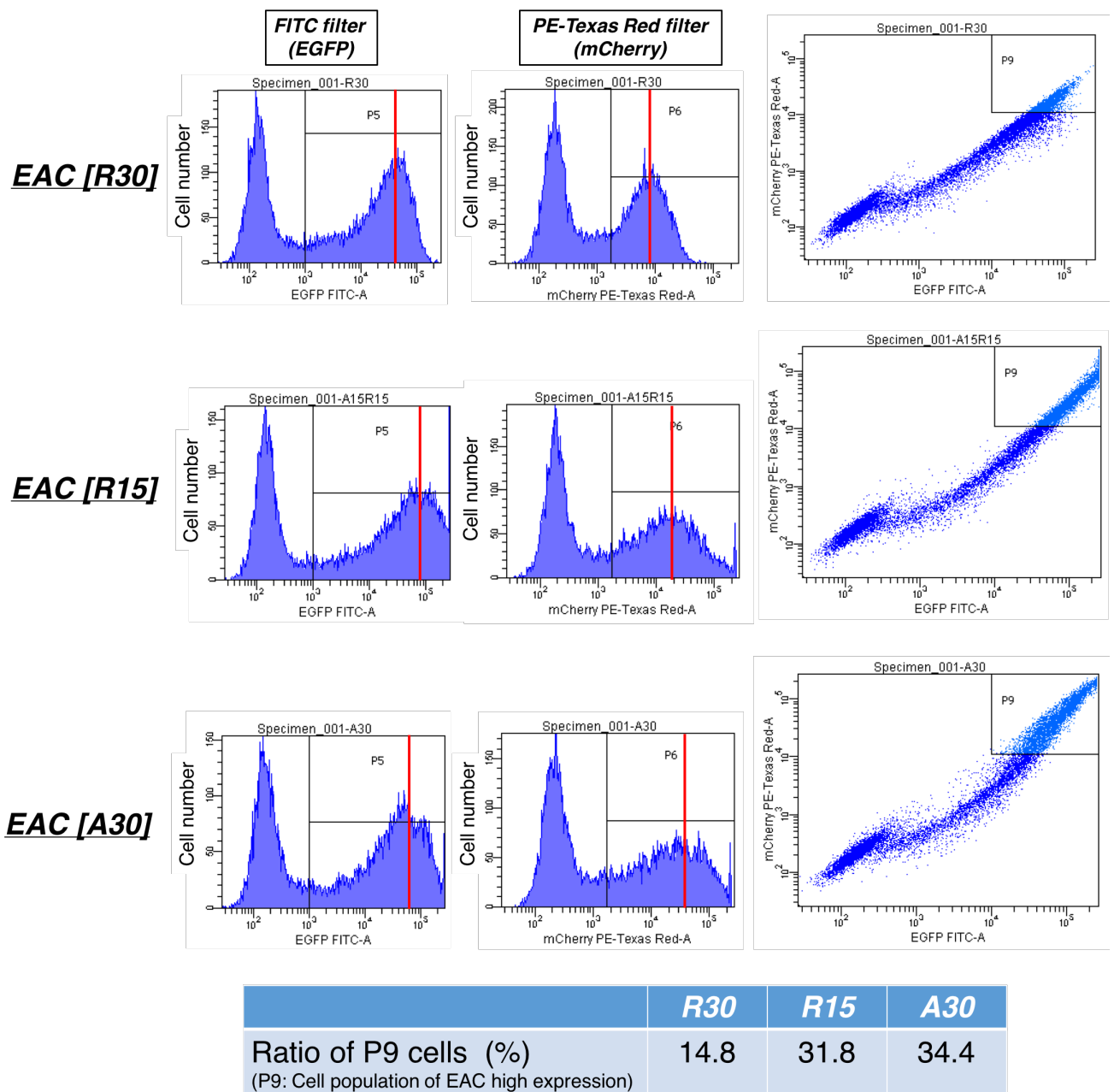


図 9. HeLa 細胞に一過的発現させた EAC の FACS 解析

HeLa 細胞に EAC [R30] または EAC [R15], EAC [A30] 発現ベクターをそれぞれトランスフェクションし, 24 時間後に FACS 解析を行った. 左側のカラムは緑色蛍光, 中央のカラムは赤色蛍光におけるそれぞれの蛍光強度を示す細胞の数を示している. 赤色の線は, 最も細胞数の多い蛍光強度を示している. 右側のカラムは緑色・赤色蛍光両方の蛍光強度を示している. P9 は緑色・赤色蛍光の蛍光強度がともに 10^4 以上を示す細胞集団を示している. また下の表は全細胞に対する P9 の割合を示した.

Fluc-ER [R30]

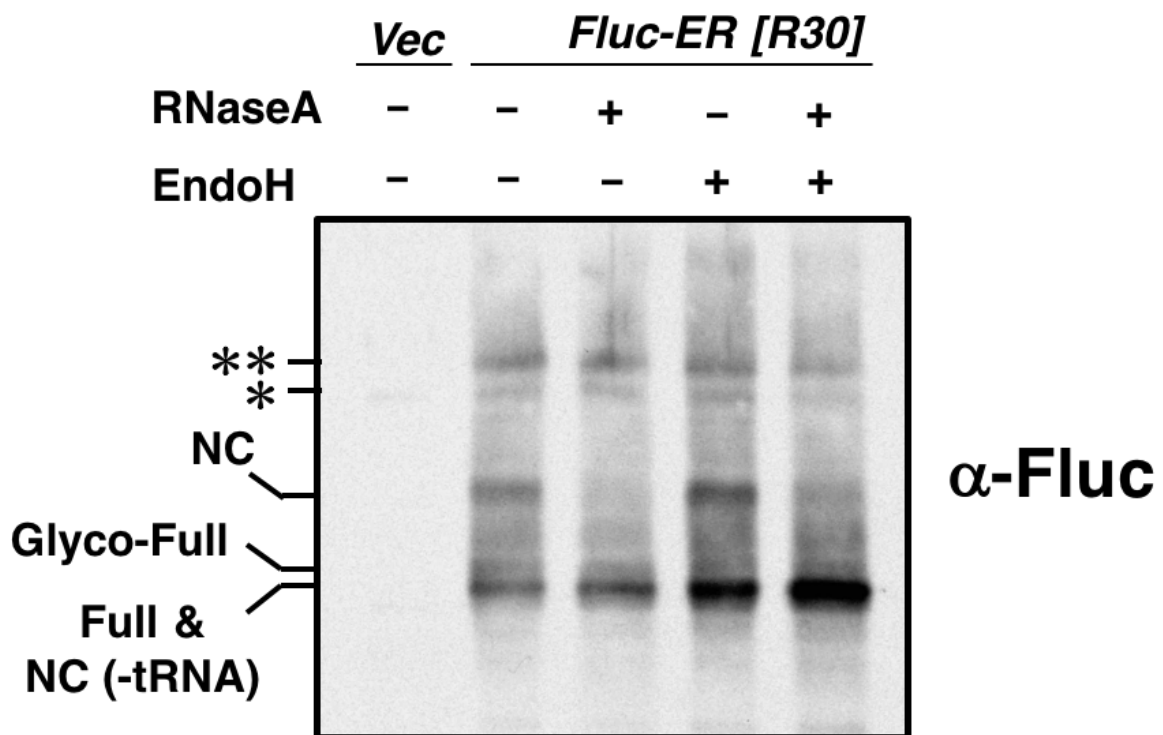


図 10. Fluc-ER[R30] における翻訳停止の検証とバンドの同定

Fluc-ER[R30] は Firefly luciferase (Fluc) の N 末端に Calreticulin 由来の signal sequence を付加し, C 末端に翻訳停止配列として R30 と小胞体係留シグナルである KDEL 配列を付加した. Firefly luciferase は, 小胞体に膜透過した際に N 型糖鎖修飾を受けると予測される -N-X-S-配列が 1 ヶ所存在する. (Firefly luciferase の 197 番目のアスパラギン酸残基) (上図)

HEK293T 細胞に Fluc-ER[R30] を発現させたサンプルを 翻訳停止産物 (peptidyl-tRNA) の tRNA を分解する RNase A (40 µg / mL) および N 型糖鎖の分解酵素である Endo H を反応させ, ウェスタンブロッティングを行った. 全長は Full, 翻訳停止産物は NC, 糖鎖型は Glyco- と表記した. (下図) * は vector control においても検出されるノンスペシフィックバンドである. ** は Vector control では検出されない Fluc-ER[R30] の未同定のバンドである.

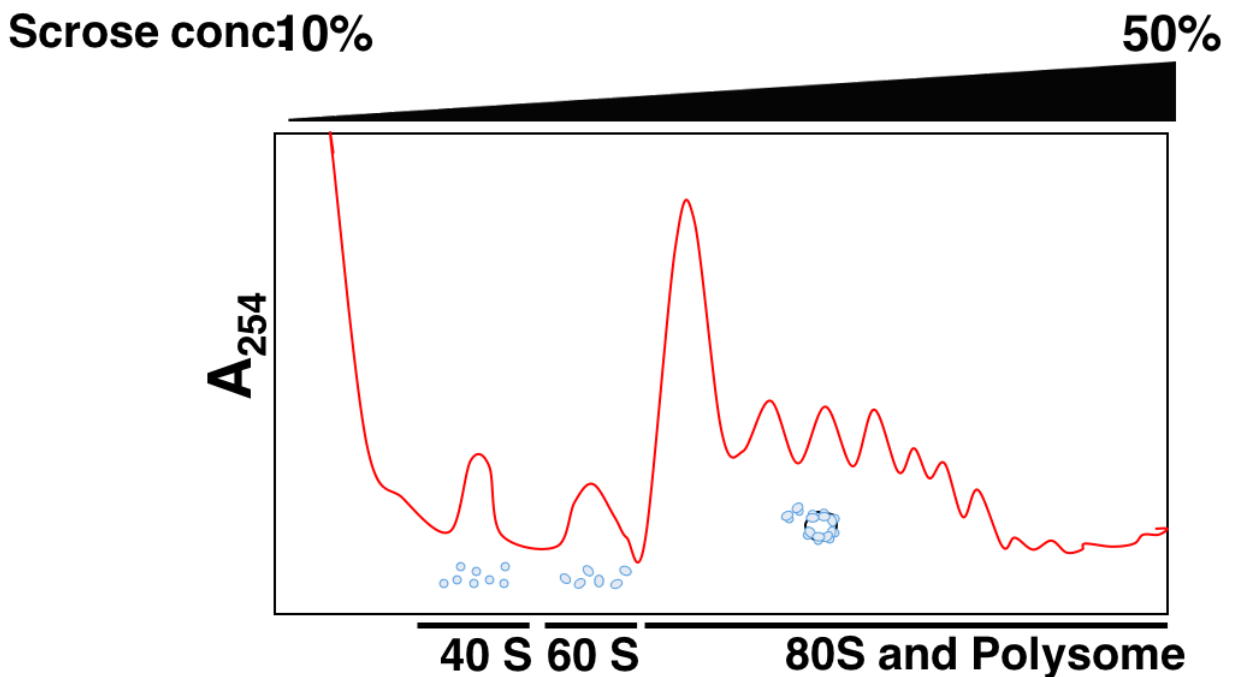
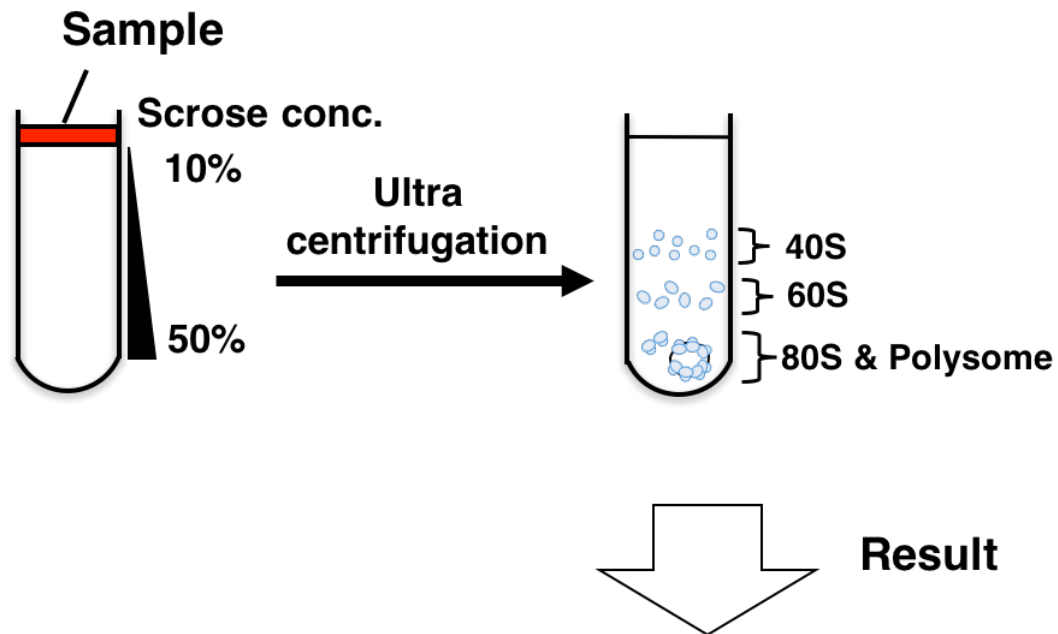


図 11. ショ糖密度勾配遠心法によるポリソーム解析

ショ糖密度勾配遠心法によるポリソーム解析では、上層が 10%、下層が 50% のスクロースグラデーションにサンプルをのせ、超遠心を行う。沈降係数に従って分画された 40S, 60S, 80S リボソームを rRNA の吸光度 (254 nm) によって解析し、フラクションを分画する。

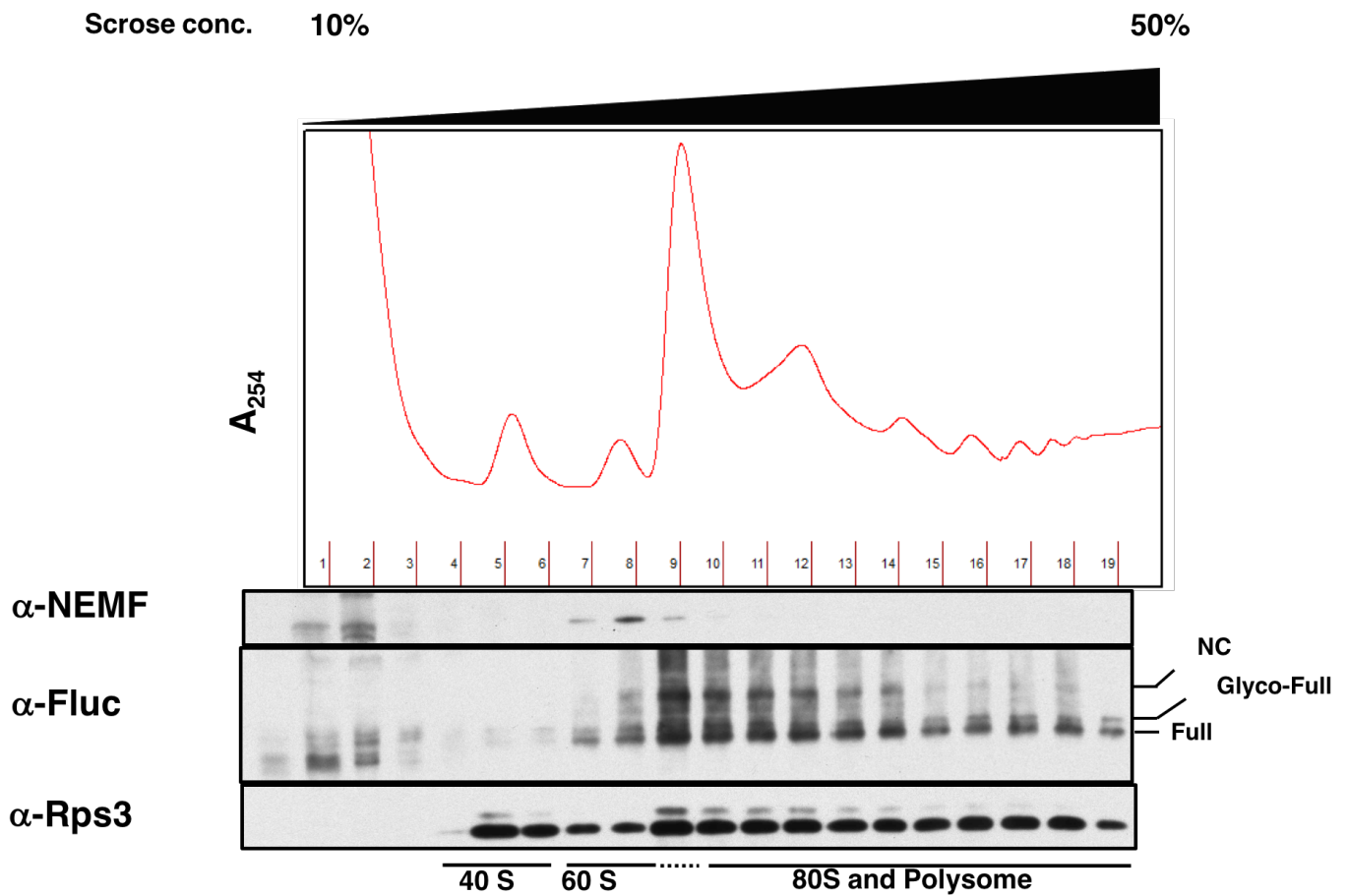


図 12. Fluc-ER[R30] におけるシヨ糖密度勾配遠心法によるポリソーム解析

HEK293T 細胞に Fluc-ER[R30] の発現ベクターをトランスフェクションした。24 時間後に細胞回収し、シヨ糖密度勾配遠心法によってサンプルを沈降係数によって分画した。分画したサンプルを Nu-PAGE 電気泳動し、ウェスタンブロットで解析した。Rps3 は小サブユニットのリボソームを構成するタンパク質であり、40S リボソームと 80S リボソームを示す。今回の実験では Rps3 の減少が観察される画分を 60S 画分とした。

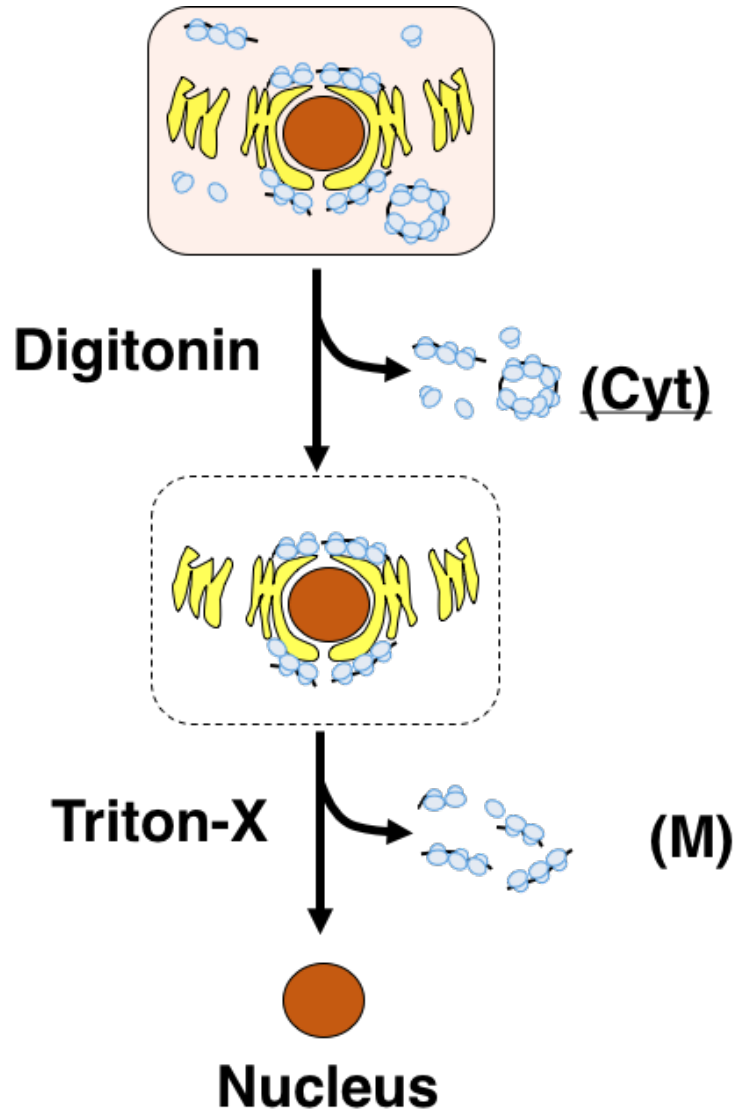


図 13. Fluc-ER[R30] を一過的に発現させた HEK293T 細胞におけるジギトニン分画

ジギトニン分画法の概略図. ジギトニン抽出 (サイトゾル) 画分を “Cyt”, Triton-X 抽出 (膜) 画分を “M” と表した.

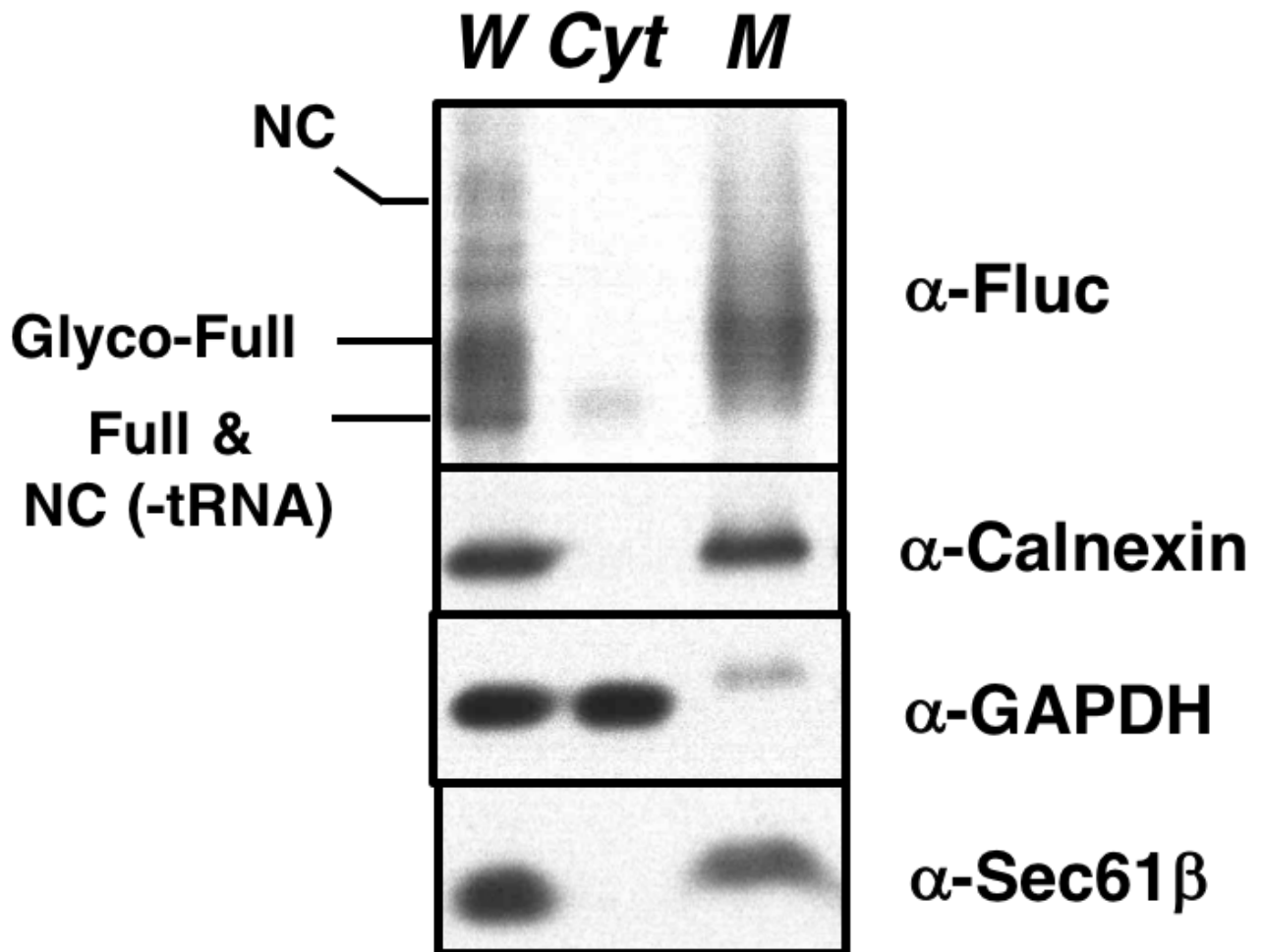


図 14. Fluc-ER[R30] を一過的に発現させた HEK293T 細胞におけるジギトニン分画

HEK293T 細胞に Fluc-ER[R30] の発現ベクターをトランスフェクションした. 24 時間後に細胞回収し, (C) で示したジギトニン分画を行った. それぞれの抽出液から調製したタンパク質を Nu-PAGE による電気泳動を行い, ウェスタンブロットで解析した.

また, W および Cyt に比べて M は全体的にバンド位置が高くなっている. さらに, NC のバンドは W では観察されるが, M と Cyt でははっきりと検出されなかった.

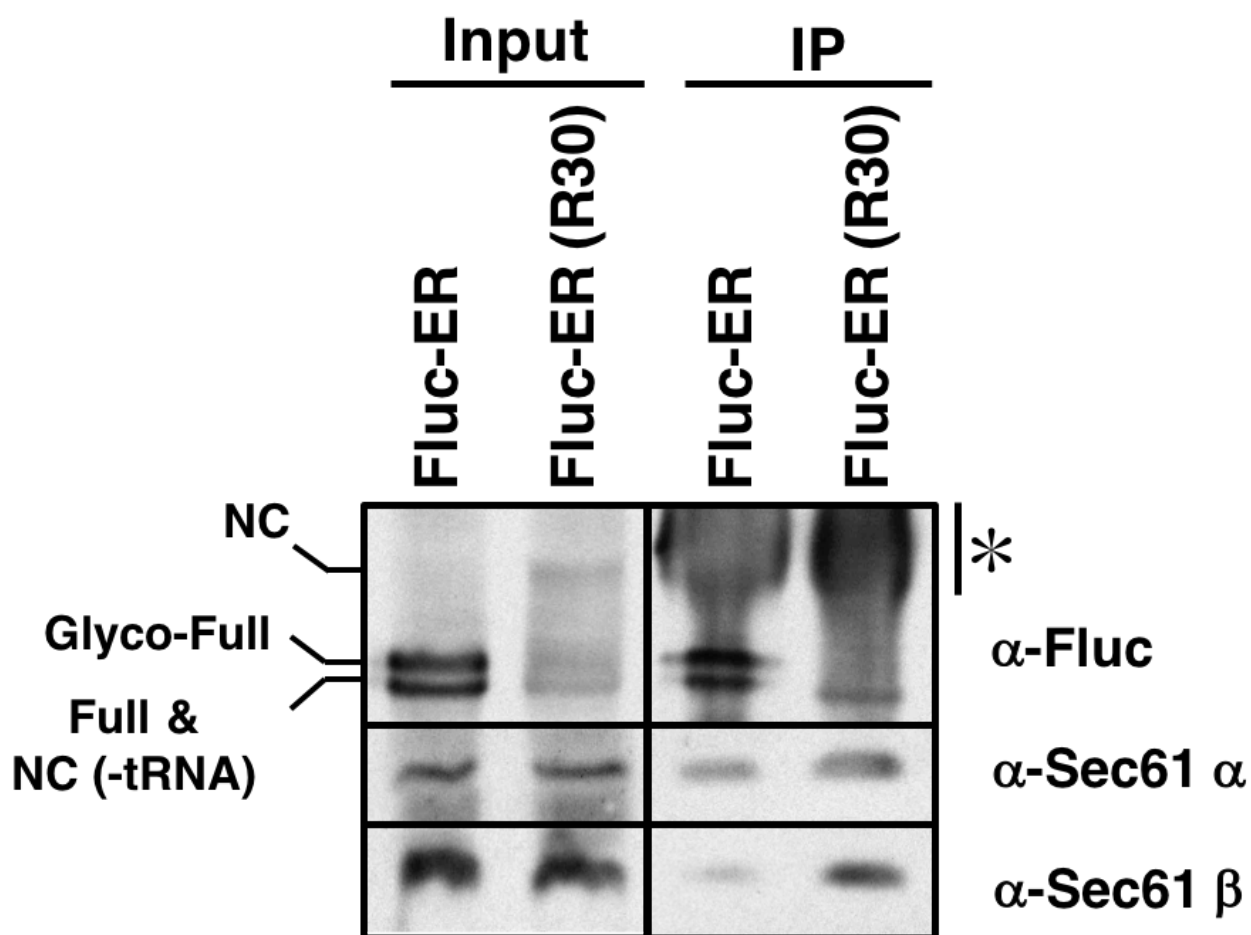


図 15. 共免疫沈降法による Fluc-ER および Fluc-ER[R30] とトランスロコンとの相互作用の確認

HEK293T 細胞に Fluc-ER または Fluc-ER[R30] の発現ベクターをトランスフェクションした。24 時間後に細胞回収し、 α -Fluc により免疫沈降を行った。サンプルを、Nu-PAGE 電気泳動し、 α -Sec61 α または α -Sec61 β によるウェスタンブロットで解析した。*は非特異的なバンドを表す。

Listerin mRNA

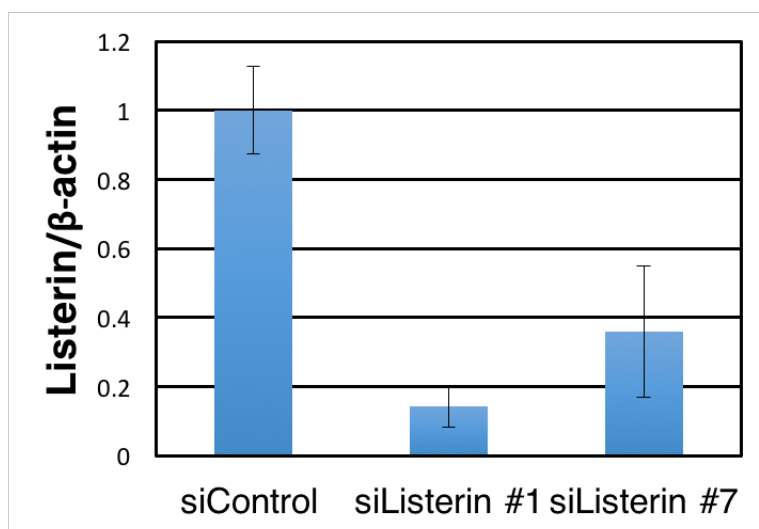
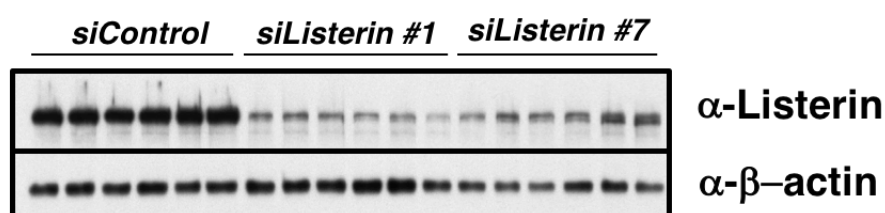


図 16. Listerin ノックダウンに用いた siRNA (siListerin #1, siListerin #7)

Listerin ノックダウン用の siRNA として siListerin #1 と siListerin#7 を用いた。HEK293T 細胞にそれぞれの siRNA を導入し、72 時間後に細胞回収した。Lysis buffer によってタンパク質を抽出し、タンパク質電気泳動を行い、ウェスタンブロットを行った。右のグラフは Listerin ノックダウン効率を算出し、5 回の実験から平均と標準偏差で表した。

Silent mutation for Listerin rescue in siListerin #1

<u>siListerin #1</u>	GCTGAAACCCATGTGTGAAACATTA
<u>Silent mutation</u>	GTTGAAGCCTATGTGCGAGACCCTG
	* * * * * * * * * * * * *
<u>Amino acids</u>	M L K P M C E T L

Sequence of RING domain in Listerin

<u>Homo sapiens</u>	C M I C F S V I H G F N Y S - L P K K A C R T C K K K F H S A C L Y K W F - T S S N K S T C P L C R
<u>S. cerevisiae</u>	C A I C Y S I L H A V D - R K L P S K T C P T C K N K F H G A C L Y K W F R S S G N N - T C P L C R

↓

図 17. si Listerin #1 による Listerin ノックダウンにおける Listerin レスキュー用発現ベクターの設計および高等生物における Listerin の RING ドメインの保存性と不活性化点変異

Listerin のレスキュー実験を行うために, siListerin #1 に認識されない Listerin 発現ベクターを作製した. *のない位置の塩基に変異を入れた. 全てサイレント変異であり, コードされるアミノ酸は変わらない. (上図)

Listerin の RING ドメインは *S. cerevisiae* と *Homo sapiens* において赤枠のアミノ酸が保存されている. *S. cerevisiae* において Listerin の RING ドメインにあたる 1542 番目のトリプトファン (W, 矢印) をアラニン (A) またはグルタミン酸 (E) に置換すると RING 活性が失われることが報告されている. *Homo sapiens* においても, この位置の W は保存されており, 酵母と同様の 1749 番目の W を A または E に置換した Listerin 発現ベクターを作製した. (下図)

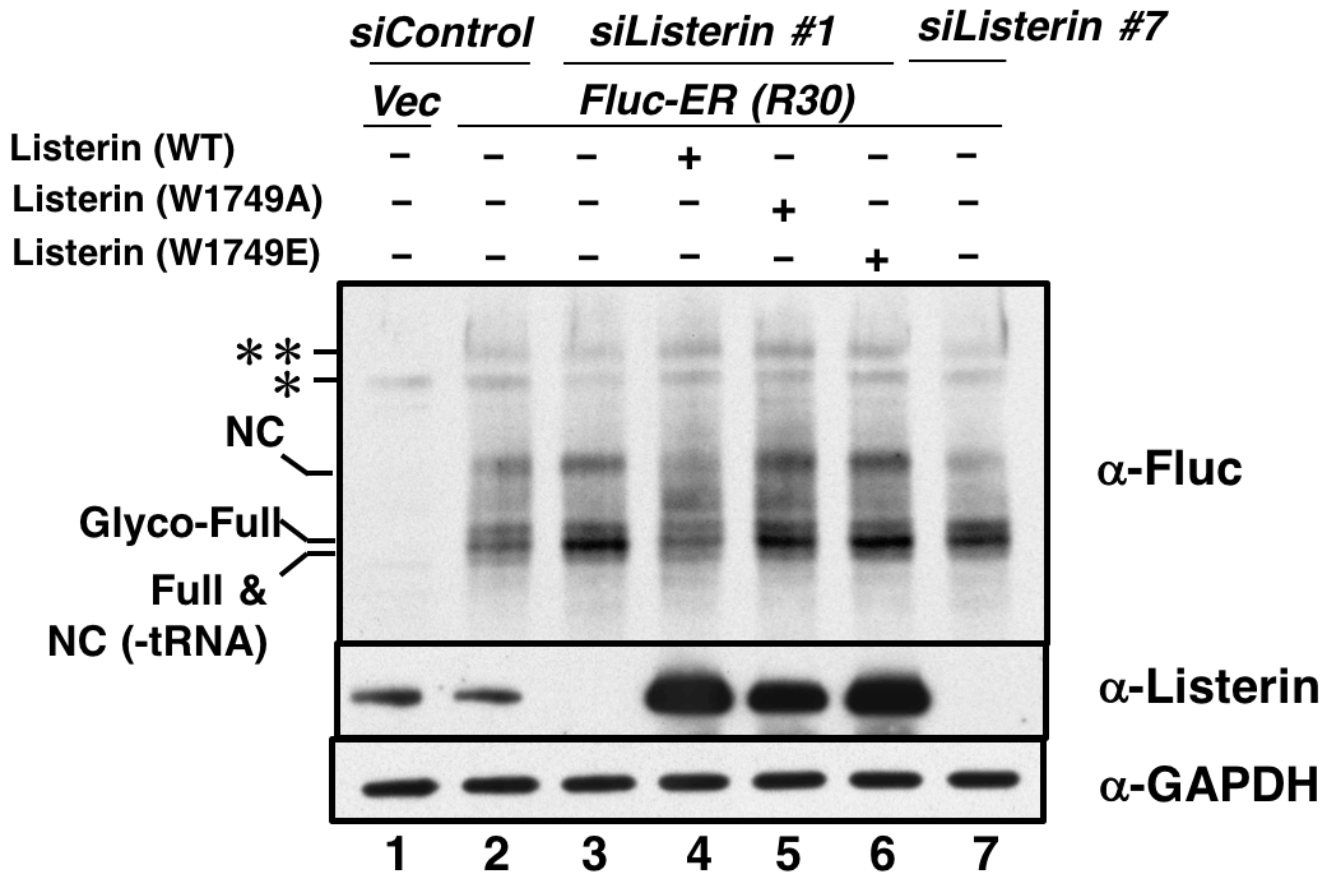


図 18. Listerin ノックダウンおよび Listerin レスキューによる Fluc-ER[R30] の発現

HEK293T 細胞をそれぞれの siRNA を用いてノックダウンし、48 時間後に Fluc-ER[R30] 発現ベクターおよび Listerin 発現ベクターをトランスフェクションした。24 時間後に細胞回収し、Lysis buffer によってタンパク質を抽出した。Nu-PAGE によるタンパク質電気泳動を行い、ウェスタンブロットにより解析した。全長は Full, 翻訳停止産物は NC, 糖鎖型は Glyco- と表記した。(下図) * は vector control で検出されるノンスペシフィックバンドである。** は Vector control では検出されない Fluc-ER[R30] の未同定のバンドである。

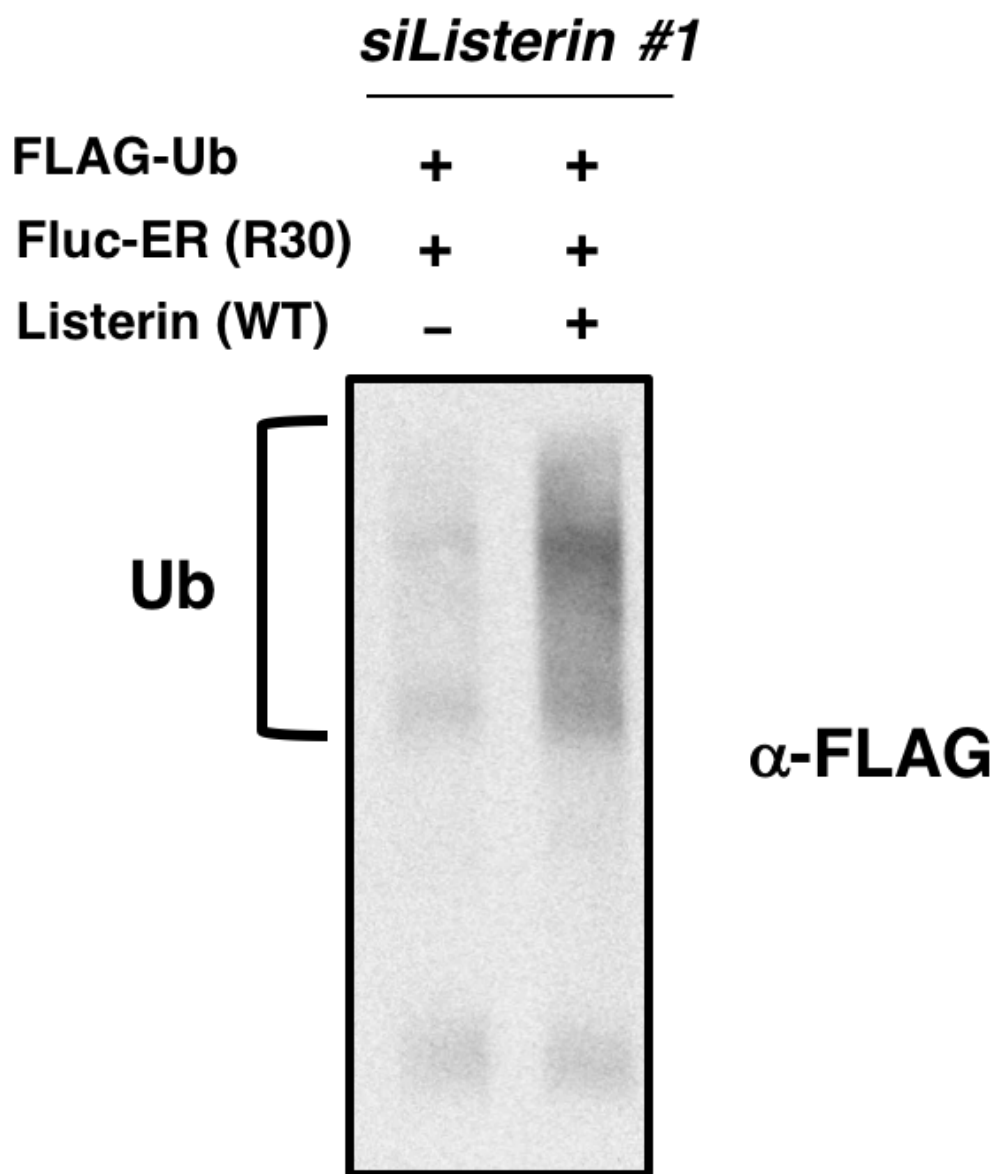


図 19. Listerin による Fluc-ER[R30] 新生鎖のユビキチン化の確認

HEK293T 細胞をそれぞれの siRNA を用いてノックダウンし、48 時間後に FLAG-Ub および Fluc-ER[R30] 発現ベクターおよび Listerin 発現ベクターをトランスフェクションした。24 時間後に細胞回収し、Lysis buffer によってタンパク質を抽出した。抗 Fluc 抗体による免疫沈降を行い、続いて CTAB を用いて新生鎖を精製した。Nu-PAGE によるタンパク質電気泳動を行い、ウェスタンブロットにより解析した。

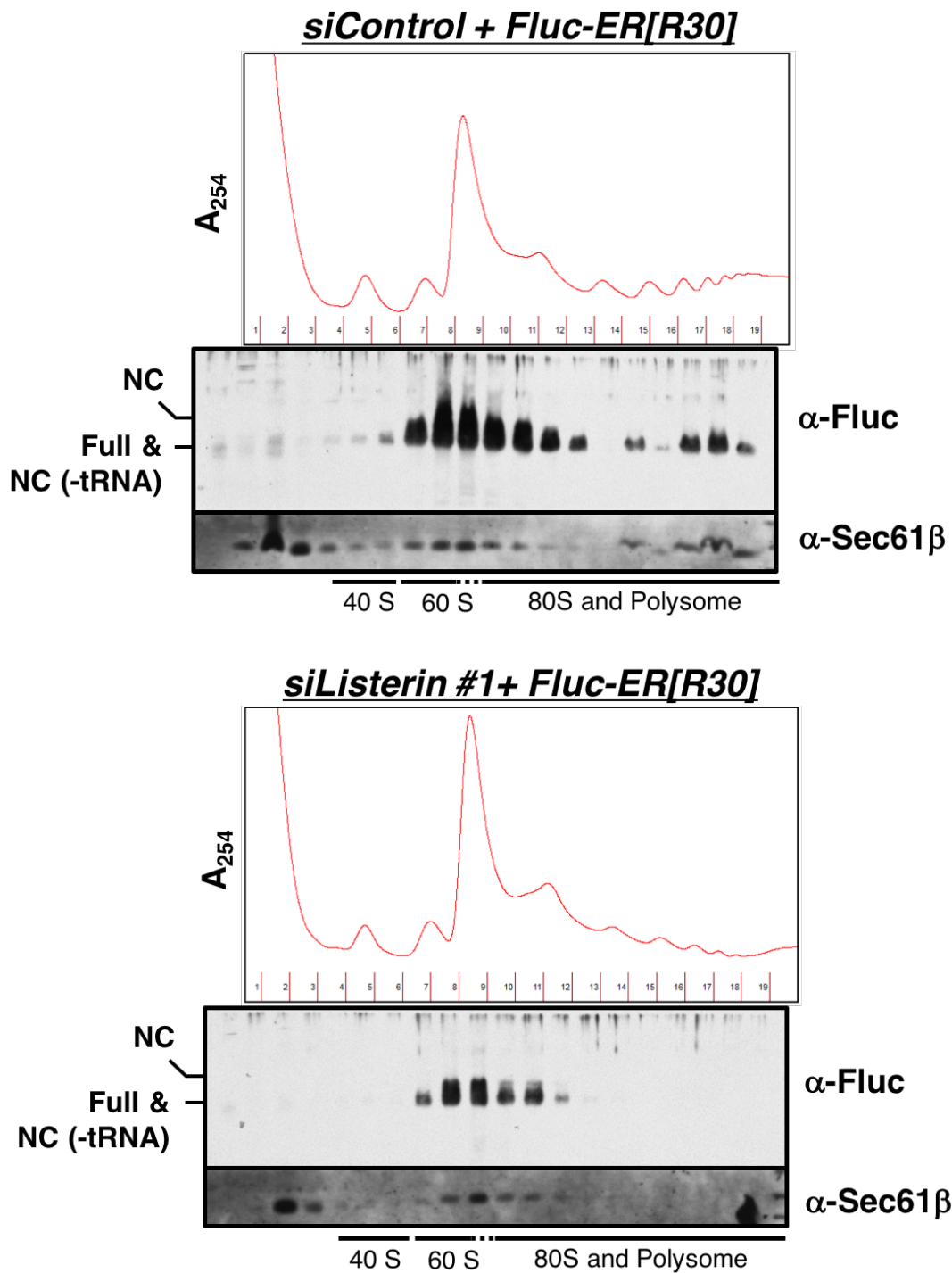


図 20. *Listerin* ノックダウンにおける *Fluc-ER[R30]* 発現時のトランスロコンのポリソーム解析

HEK293T 細胞をそれぞれの siRNA を用いてノックダウンし、48 時間後に *Fluc-ER[R30]* 発現ベクターをトランスフェクションした。24 時間後に細胞回収し、ショ糖密度勾配遠心法によってサンプルを沈降係数によって分画した。分画したサンプルを Nu-PAGE 電気泳動し、ウェスタンブロットで解析した。

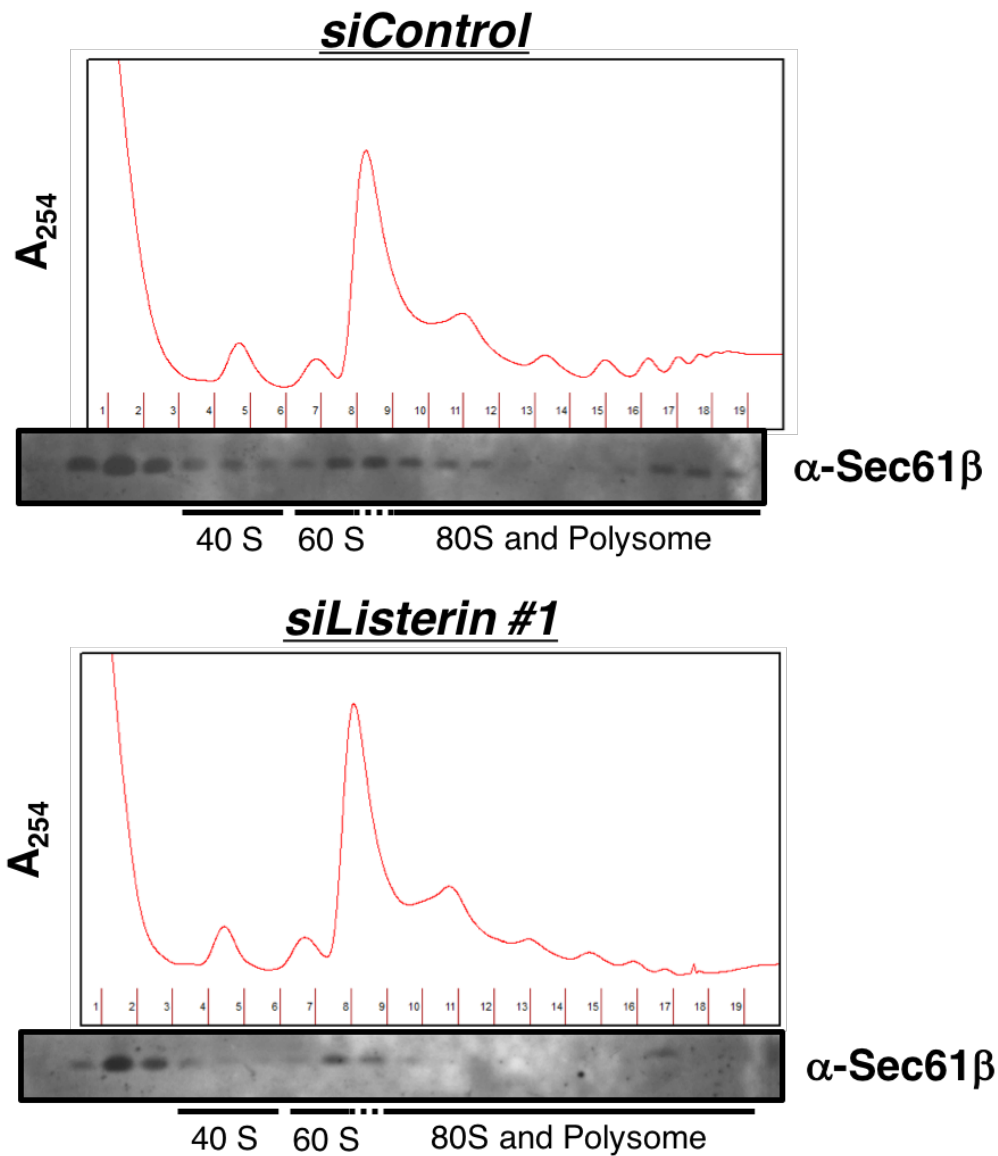


図 21. Listerin ノックダウンにおけるトランスロコンのポリソーム解析
 HEK293T 細胞をそれぞれの siRNA を用いてノックダウンし、72 時間後に細胞回収し、ショ糖密度勾配遠心法によってサンプルを沈降係数によって分画した。分画したサンプルを Nu-PAGE 電気泳動し、ウェスタンブロットで解析した。

α -1-antitrypsin (A1AT)

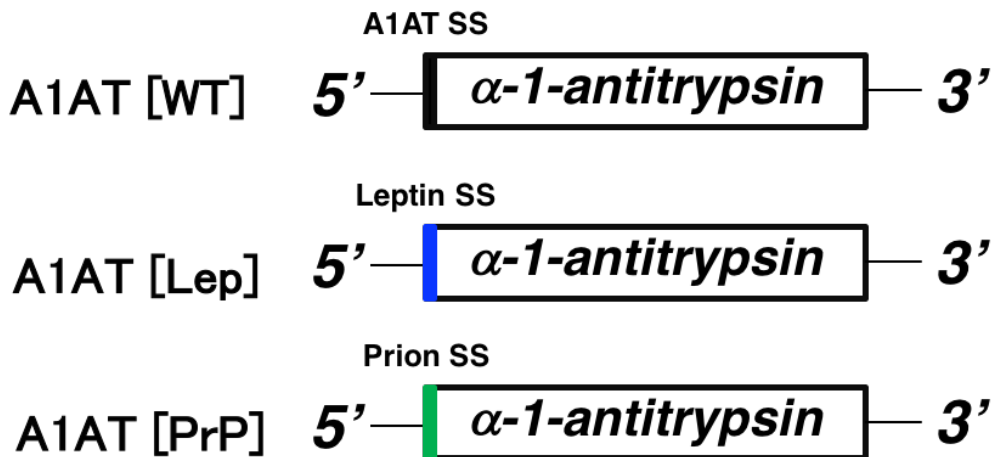
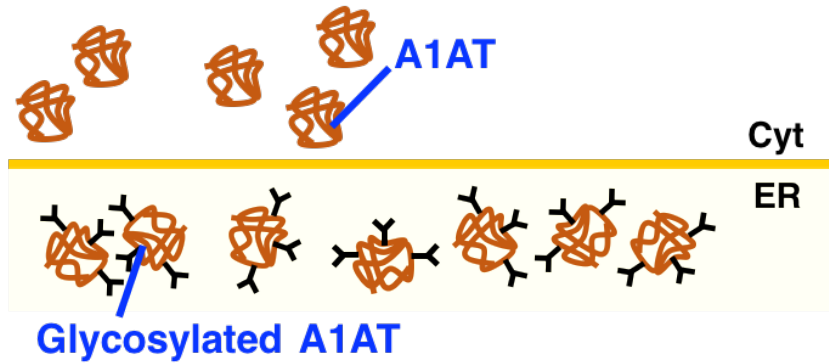


図 22. A1AT を用いた膜透過効率の解析と小胞体移行シグナル置換型 A1AT の作製

α -1-antitrypsin (A1AT) は小胞体に膜透過した際に N 型糖鎖修飾を受けると予測されるアスパラギン酸残基が 3 ヶ所存在する。(70 番目と 107 番目と 271 番目のアスパラギン酸残基) 糖鎖付加は小胞体内で起こるため、糖鎖付加型 A1AT と非糖鎖型 A1AT の割合を調べることで膜透過効率を検証できる。SDS PAGE 電気泳動で糖鎖型および非糖鎖型 A1AT を容易に同定できるため、A1AT 全量に対する糖鎖型 A1AT の割合を算出することで A1AT の膜透過効率を算出した。(上図)

ペプチドホルモンの Leptin (Lep) および細胞質タンパク質の Prion protein (PrP) の小胞体移行シグナル (SS) は小胞体への膜透過効率が低い。これらの SS と A1AT の SS を置換した SS 置換型の A1AT [Lep] および A1AT[PrP] を作製した。(下図)

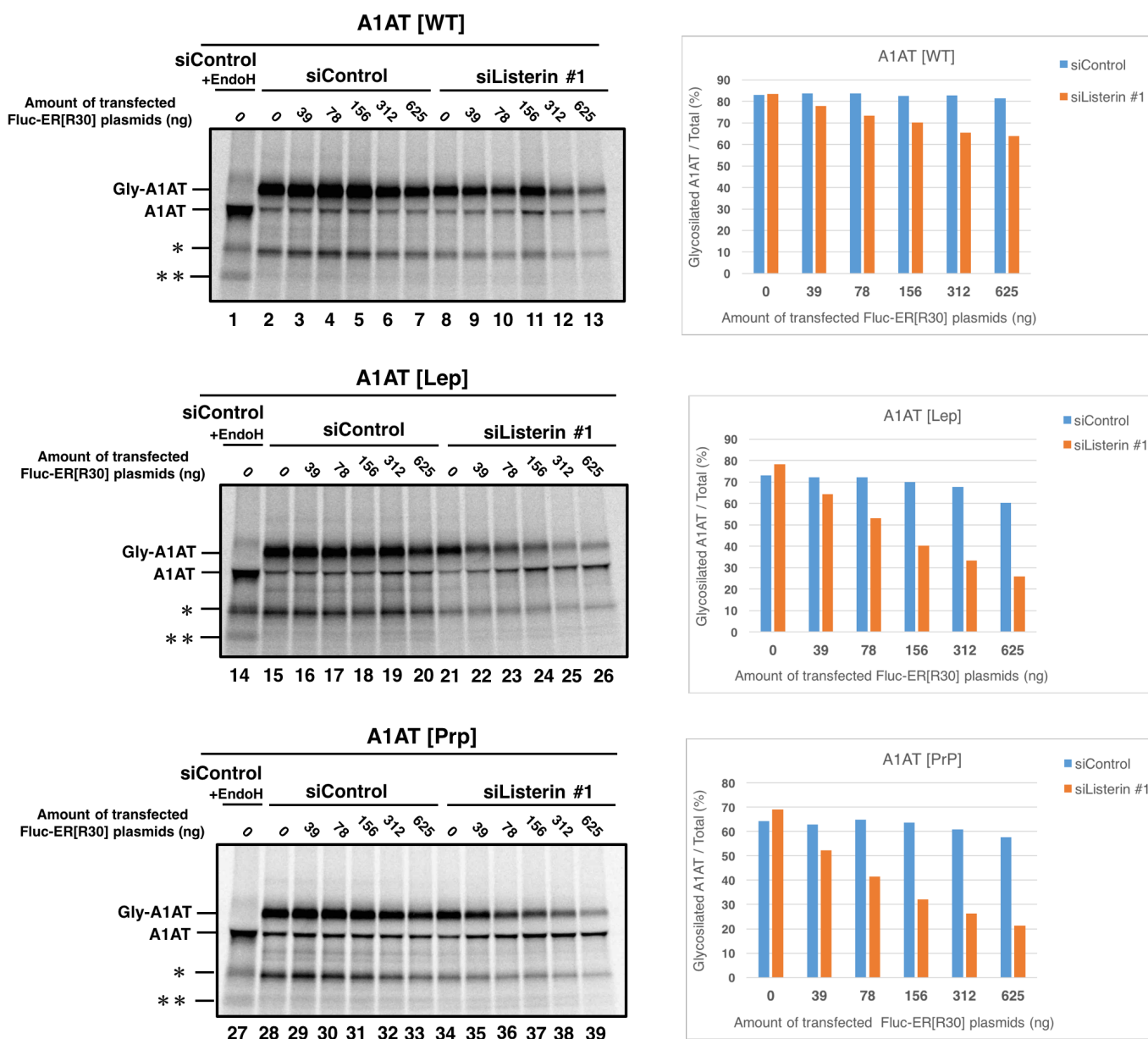


図 23. Listerin ノックダウンと Fluc-ER[R30] の一過的発現による RQC 不全時の A1AT の膜透過効率の確認

HEK293T 細胞をそれぞれの siRNA を用いてノックダウンし、48 時間後に、A1AT および Fluc-ER[R30] の発現ベクターをトランスフェクションした。24 時間後に ^{35}S Met, Cys を 30 分間ラベルした。Fluc-ER[R30] のトランスフェクション量を 2 倍、4 倍...と増加させ、膜透過効率を検証した。非糖鎖型 A1AT は A1AT、糖鎖型 A1AT は Gly-A1AT と表記した。グラフはそれぞれのサンプルの A1AT の膜透過効率を、A1AT 全量に対する糖鎖型 A1AT の割合で算出した。

* は Endo H 感受性のバンドであり、糖鎖型 A1AT の量と相関性がある。そのため、糖鎖型 A1AT 由来のバンドであることが示唆される。** は EndoH 処理後に増加することから、* の脱糖鎖型であることが示唆される。

Dual luciferase reporter assay

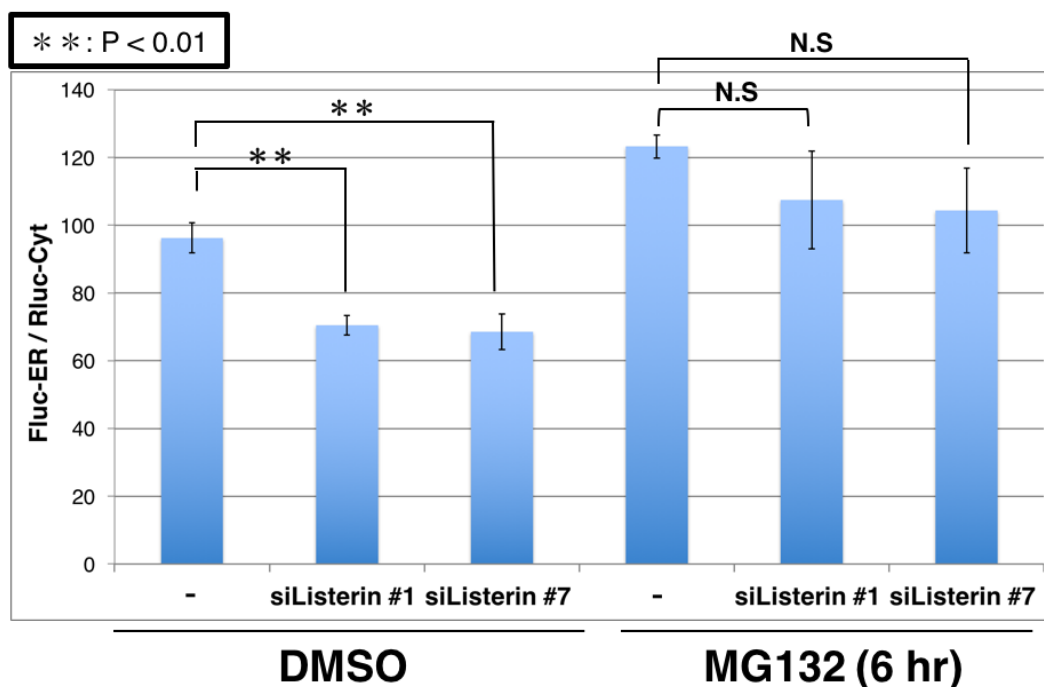
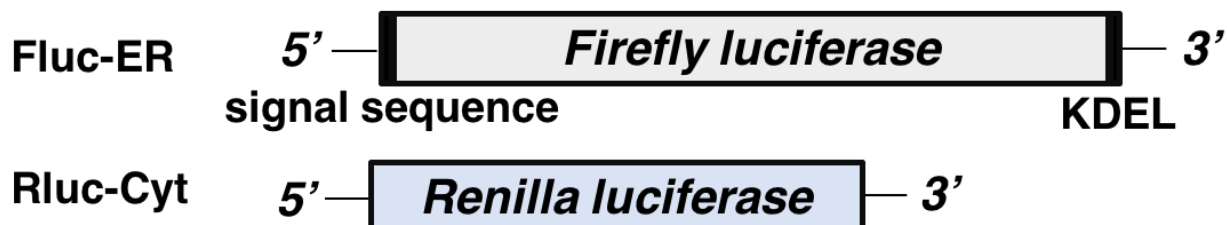


図 25. Dual luciferase assay による Listerin ノックダウン時の小胞体タンパク質のプロテアソーム分解の検証。

小胞体局在型 Firefly Luciferase (Fluc-ER) は, Firefly luciferase の N 末端に Calreticulin 由来の signal sequence を, C 末端に小胞体残留シグナルである KDEL 配列を付加した. 細胞局在型 Renilla luciferase (Rluc-Cyt) は特に手は加えていない. (下図)

HEK293T 細胞をそれぞれの siRNA を用いてノックダウンし, 48 時間後に Fluc-ER と Rluc-Cyt の発現ベクターをトランスフェクションした. 18 時間後に MG-132 (10 μ M) で 6 時間処理し, ルシフェラーゼ活性を測定した. グラフは, Rluc-Cyt の活性に対する Fluc-ER の活性を算出した. 3 回の実験を行い, 3 回の実験の平均と標準偏差で表した. (上図)

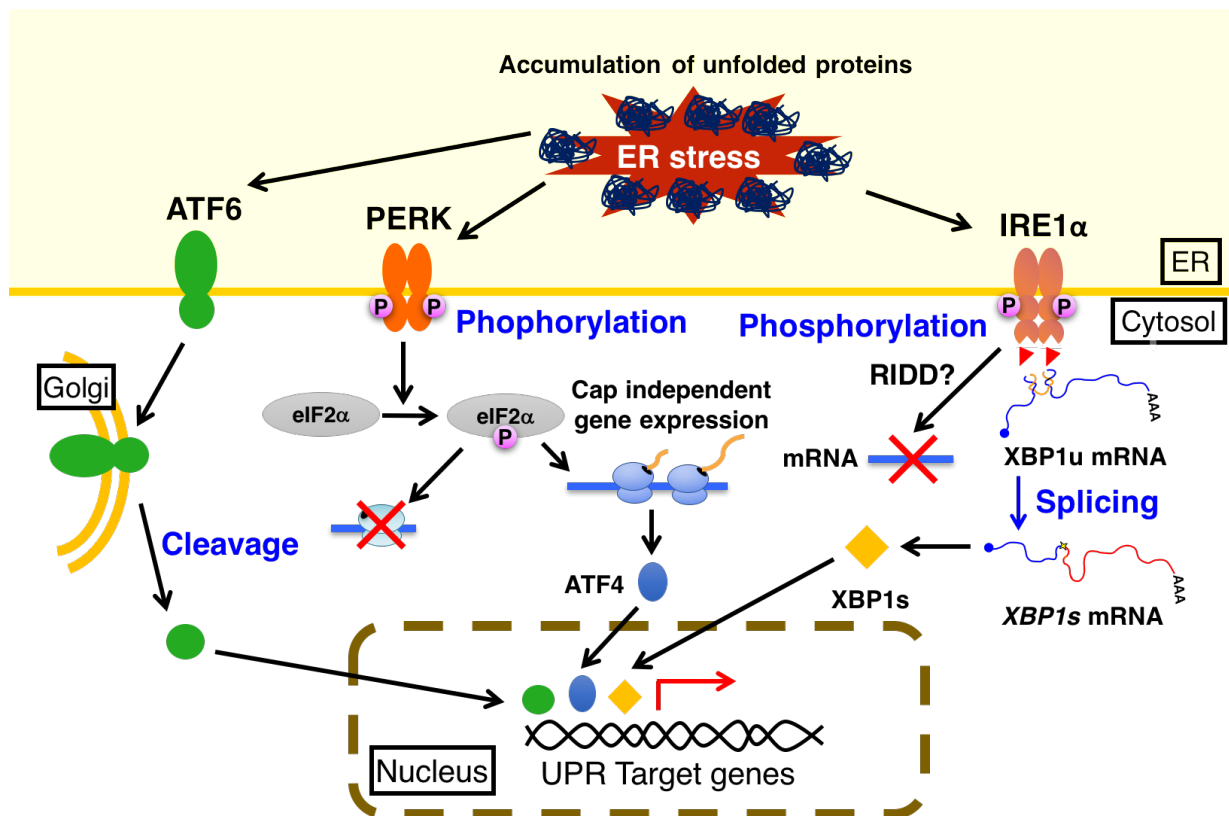


図 26. 小胞体ストレス時に働く小胞体ストレス応答 (UPR) のメカニズム

細胞は小胞体に構造異常タンパク質が蓄積すると小胞体ストレス応答 (UPR) を活性化させて、変性タンパク質の蓄積による毒性から自身を守っている (Ron and Walter, 2007; Travers *et al.*, 2000). 哺乳動物細胞では主に 3 種類の小胞体ストレスセンサー PERK, ATF6, IRE1 α が活性化する. PERK は小胞体ストレスを感知してサイトゾル側のキナーゼドメインが活性化し、翻訳開始因子 eIF2 α をリン酸化する (Harding *et al.*, 1999). eIF2 α のリン酸化により、5' Cap 非依存的な翻訳が行われるようになり、転写活性因子である ATF4 を誘導する. ATF6 はサイトゾル側に bZIP 型転写因子ドメインをもつ膜貫通タンパク質で、小胞体ストレスを感知することで小胞体からゴルジ体へ輸送される. S1P プロテアーゼや S2P プロテアーゼによってその膜貫通ドメインが切断され、核へ移行して転写完成因子としてはたらく (Haza *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 2000; Adachi *et al.*, 2008). IRE1 α は小胞体ストレスを感知することで、サイトゾル側のリボヌクレアーゼドメインが活性化し (Tirasophon *et al.*, 1998), 共翻訳的に小胞体膜上に局在した XBP1 前駆体 (unspliced form; XBP1u) の mRNA をスプライシングする (Yoshida *et al.*, 2001; Shen *et al.*, 2001; Calton *et al.*, 2002). XBP1 mRNA (spliced form; XBP1s) から転写活性を持った XBP1 が合成される. 3つのストレスセンサーから誘導された転写因子は、小胞体分子シャペロンやフォールディング酵素、小胞体に蓄積した構造異常タンパク質を分解する ERAD 経路に関わる因子の発現誘導を行い、小胞体ストレスを緩和する (Yoshida *et al.*, 2003; Sriburi *et al.*, 2007).

Tunicamycin

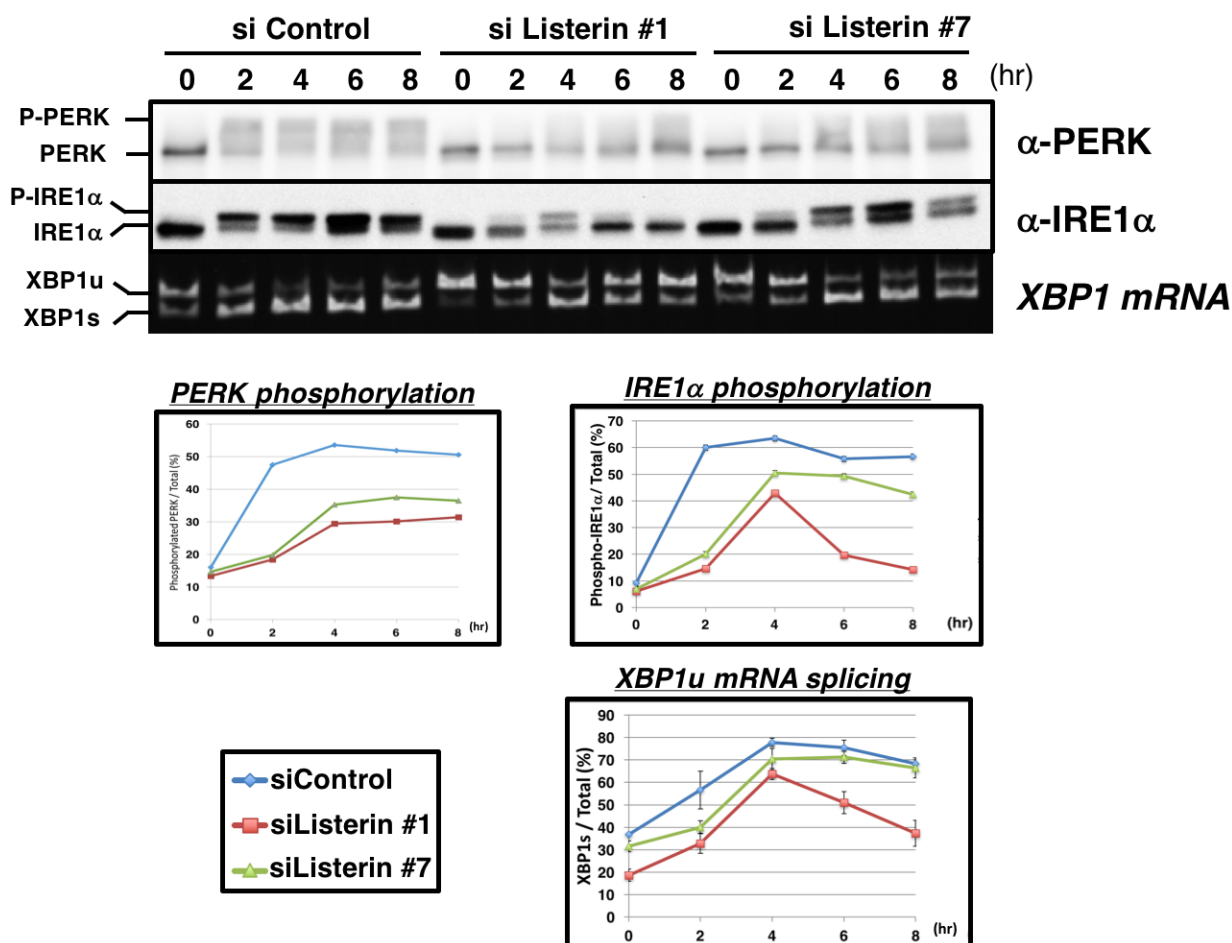


図 27. Listerin ノックダウンがもたらす Tm による小胞体ストレス時における小胞体ストレスセンサーの活性への影響

HEK293T 細胞を Listerin ノックダウンして 64 時間後に小胞体ストレス誘導剤である Tm (2 $\mu\text{g} / \text{mL}$) を添加し, 0, 2, 4, 6, 8 時間のタイムコースをとった. タンパク質および mRNA を細胞から抽出し, PERK と IRE1 α の活性はウェスタンブロットにより解析した. XBP1u mRNA のスプライシングは mRNA から合成した cDNA を RT-PCR によって解析した. それぞれの活性は, それぞれの因子の総量に対する活性化した割合によって算出した. XBP1u mRNA のスプライシングに関しては 3 回行い, 3 回の実験の平均と標準偏差で表した.

Thapsigargin

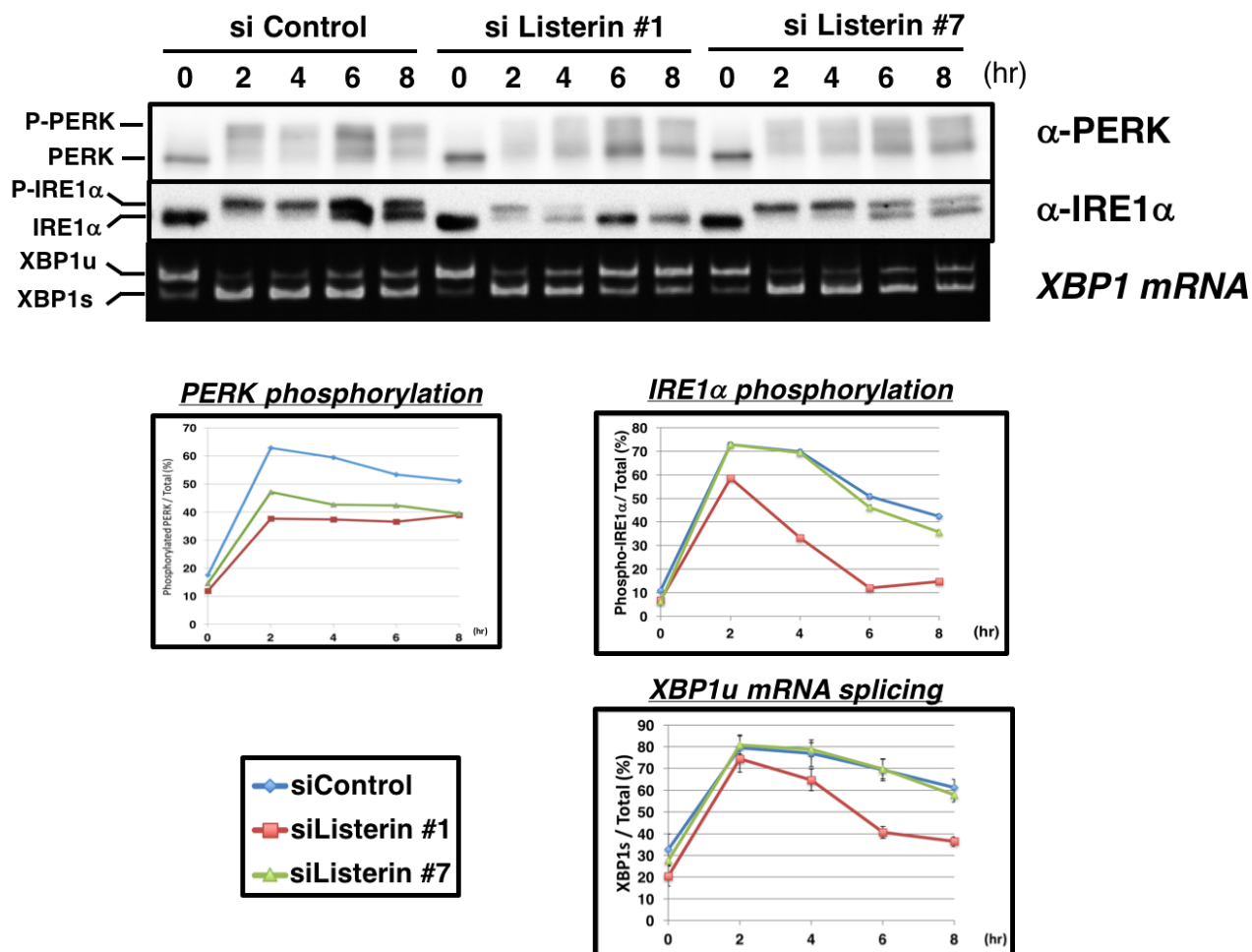
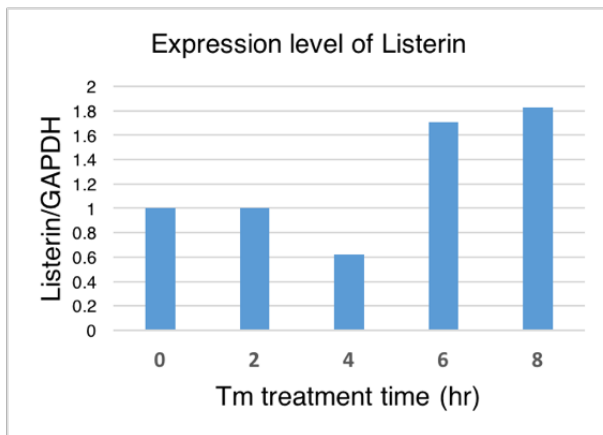
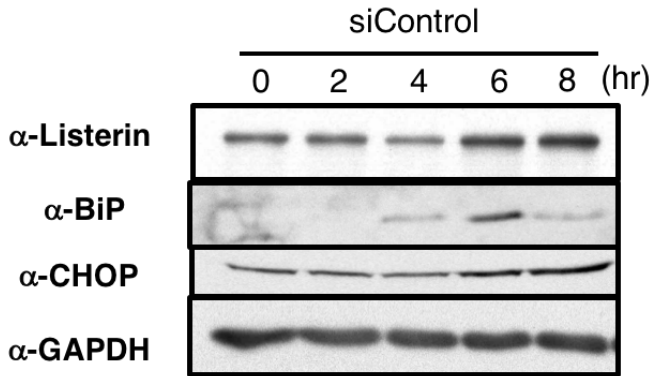


図 28. Listerin ノックダウンがもたらす Tg による小胞体ストレス時における小胞体ストレスセンサーの活性への影響

HEK293T 細胞を Listerin ノックダウンして 64 時間後に小胞体ストレス誘導剤である Tg (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加し、0, 2, 4, 6, 8 時間のタイムコースをとった。タンパク質および mRNA を細胞から抽出し、PERK と IRE1 α の活性はウェスタンブロットにより解析した。XBP1u mRNA のスプライシングは mRNA から合成した cDNA を RT-PCR によって解析した。それぞれの活性は、それぞれの因子の総量に対する活性化した割合によって算出した。XBP1u mRNA のスプライシングに関しては 3 回行い、3 回の実験の平均と標準偏差で表した。

Tunicamycin



Thapsigargin

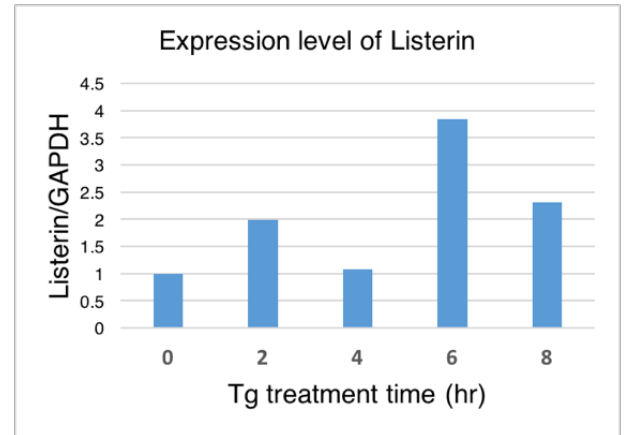
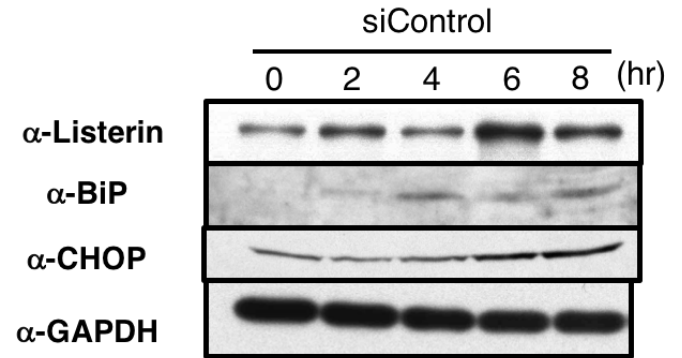


図 29. UPR によって **Listerin** タンパク質の量が上昇する

図 22. と 図 28. で使用した siControl のタンパク質のサンプルを, 抗 Listerin 抗体と, 抗 BiP, 抗体, 抗 CHOP 抗体, 抗 GAPDH 抗体を用いてウェスタンブロットで解析した.

	Listerin (Cp)	GAPDH (Cp)	$2^{-(\text{Listerin Cp} - \text{GAPDH Cp})}$	Each value / Tm 0hr value
Tm1 0 hr	24.76	16.71	265.0278205	1
Tm1 2 hr	25.08	16.84	302.3341213	1.140763716
Tm1 4 hr	25.76	17.47	312.9959111	1.180992661
Tm1 6 hr	26.51	17.08	689.7835914	2.602683711
Tm1 8 hr	26.84	17.58	613.1090968	2.313376368

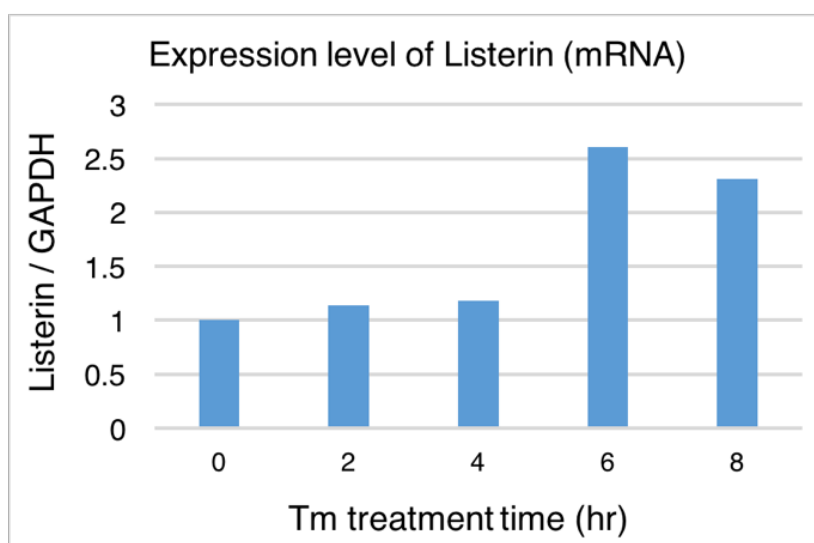


図 30. UPR によって **Listerin mRNA** の量が上昇する

図 22. で使用した siControl の mRNA から合成した cDNA サンプルを Real-time PCR により Listerin mRNA および GAPDH mRNA 量を測定した. グラフは, 0 hr の Listerin / GAPDH を 1.0 として示している.

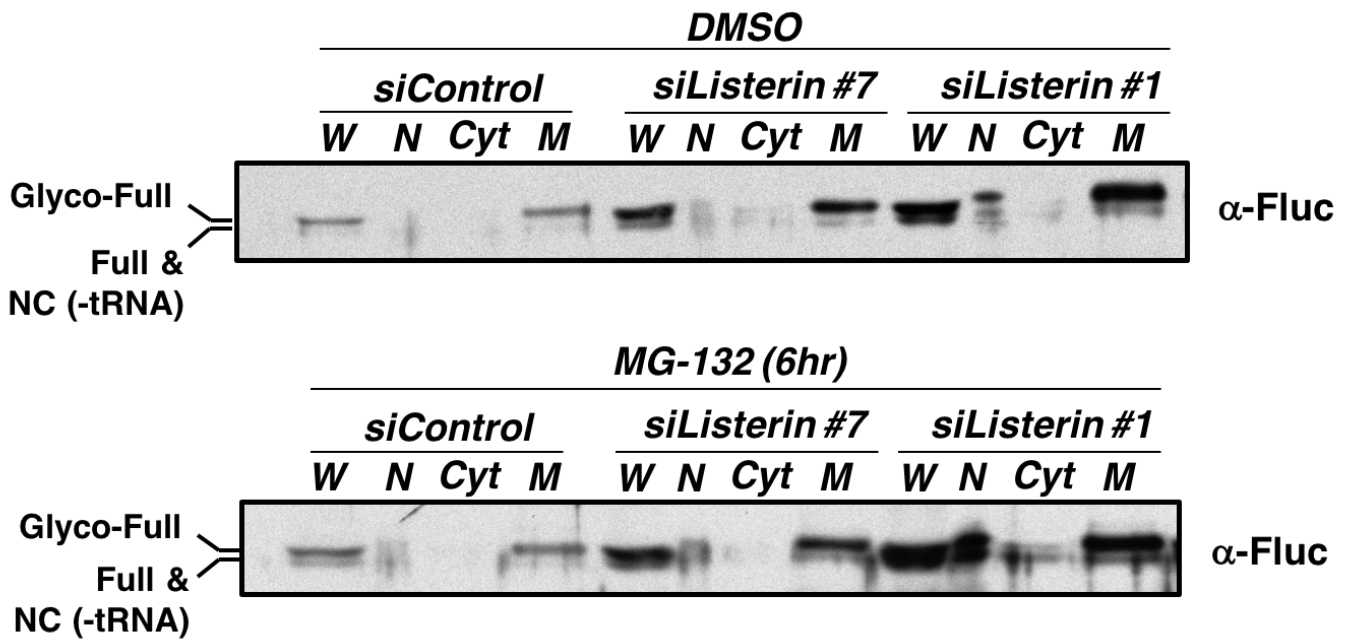


図31. ジギトニン分画法による *Listerin* ノックダウン時の *Fluc-ER* の局在の確認

HEK293T 細胞をそれぞれの siRNA を用いてノックダウンし、48 時間後に *Fluc-ER* の発現ベクターをトランスフェクションした。18 時間後に MG-132 (10 μM) で 6 時間処理し、細胞回収した。このサンプルをジギトニン分画した。それぞれの抽出液から調製したタンパク質を Nu-PAGE による電気泳動を行い、ウェスタンブロットで解析した。それぞれの画分は全量 (W), 核 (N), サイトゾル (Cyt), 膜 (M) と表記した。

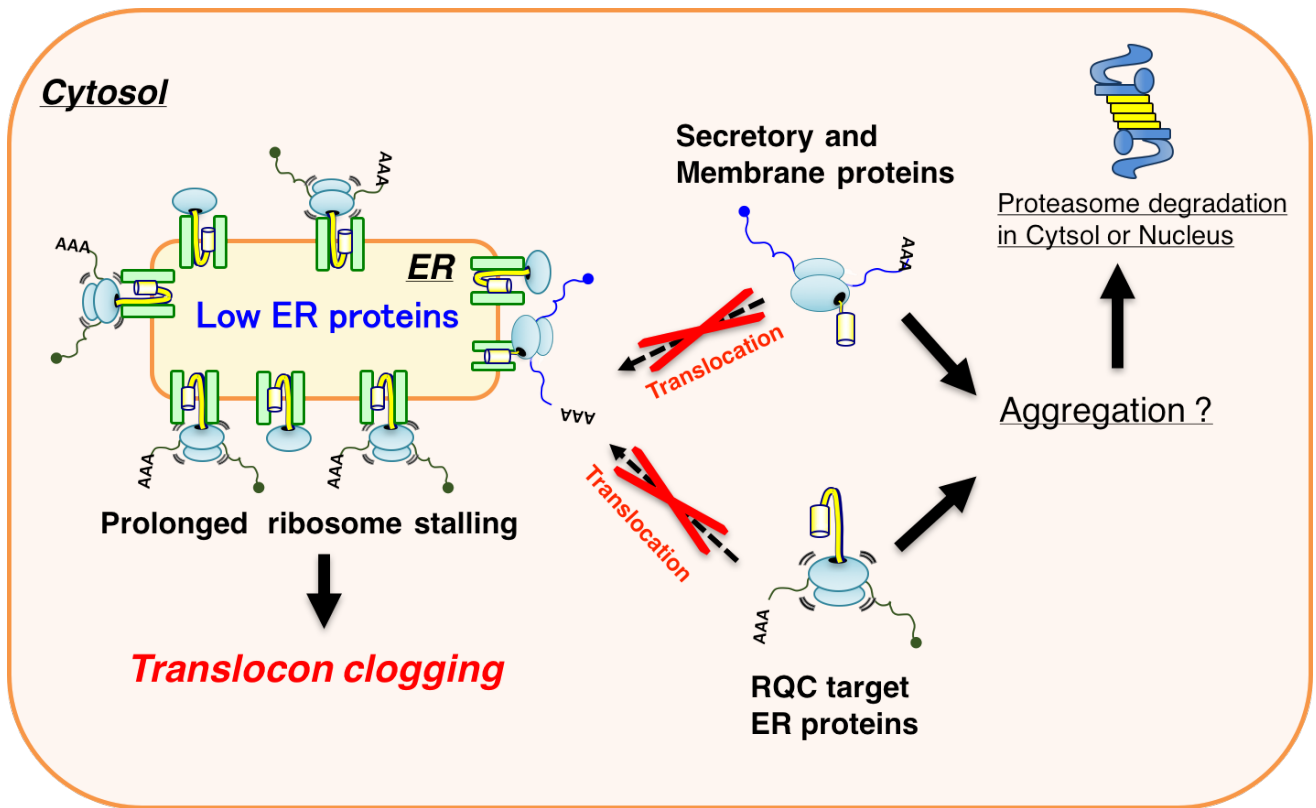


図 32. RQC 不全時における分泌・膜タンパク質および RQC 標的小胞体タンパク質の挙動のモデル

当研究では RQC 不全時に RQC 標的小胞体タンパク質がトランスロコン上で長期にわたる翻訳停止を引き起こし、トランスロコンの閉塞がおきることを明らかにした。さらに、トランスロコンの閉塞により、小胞体内のタンパク質量が低下する。

新規合成された分泌・膜タンパク質や RQC 標的小胞体タンパク質はプロテアソーム系で分解促進されることが予想される。また、膜透過できなかった分泌・膜タンパク質や RQC 標的小胞体タンパク質は核に局在しているため、凝集体を形成したのちに核でプロテアソーム分解されていることが予想される。

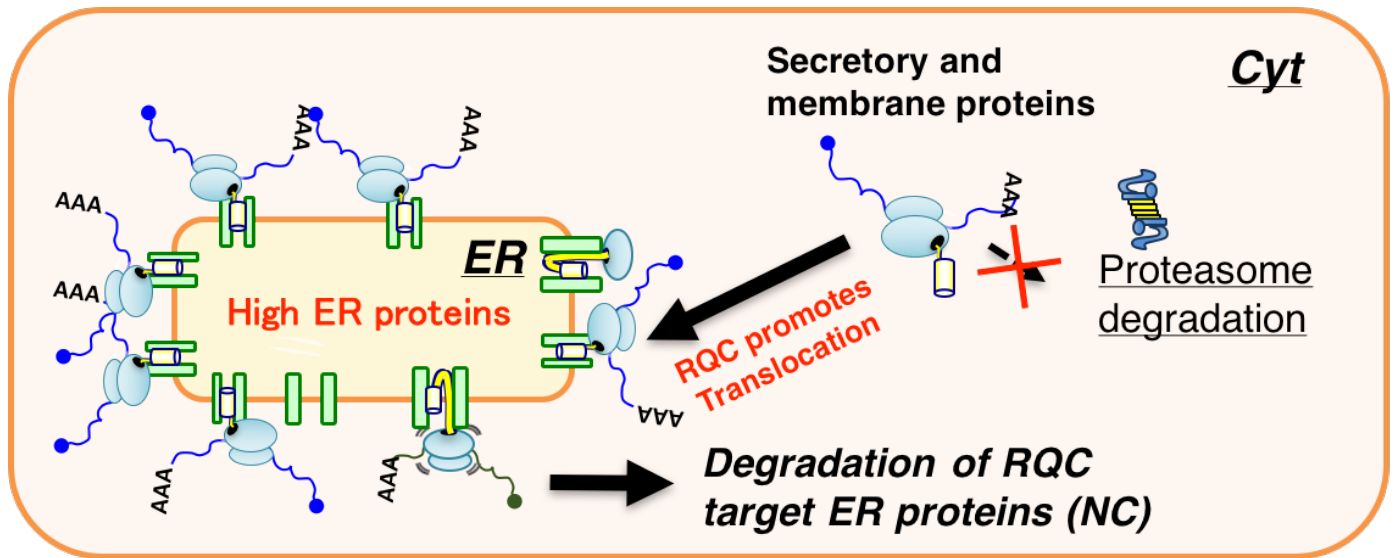


図 33. 当研究で見出された小胞体膜上における RQC の生理的意義のモデル

小胞体膜上における RQC は、トランスロコン上に停滞したリボソームを速やかに解離し、新生鎖を分解促進する役割を担う。その結果、分泌・膜タンパク質の膜透過は効率良く行われ、小胞体内のタンパク質量は維持される。RQC は分泌・膜タンパク質の膜透過を亢進することで、小胞体の恒常性維持に貢献している。

6. 謝辞

はじめに、このような研究の機会を与えてくださった河野憲二教授に深く感謝致します。アドバイザーの河合太郎教授、石田靖雅准教授には本研究を進める上での確かなアドバイスをいただくことができました。深く感謝致します。さらに木俣行雄准教授、都留秋雄助教、小池雅昭助教には日頃からディスカッションをしていただき、着実に研究を進めることができました。感謝致します。また、河野研で新生鎖の実験系を確立してくださり、日頃からディスカッションをして頂いた 現・ATR の柳谷耕太博士には研究を進める上で非常にお世話になりました。最後に河野研の皆様には研究だけでなく、日々の生活も支えていただき、非常に快適な研究生生活を送らせていただいたことを深く感謝致します。

7. 参考文献

- Adachi Y, Yamamoto K, Okada T, Yoshida H, Harada A, Mori K. (2008)
ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum.
Cell Struct Funct. 33(1):75-89.
- Arakawa S, Yunoki K, Izawa T, Tamura Y, Nishikawa S, Endo T. (2016)
Quality control of nonstop membrane proteins at the ER membrane and in the cytosol.
Sci Rep. 6:30795.
- Ast T, Michaelis S, Schuldiner M (2016)
The Protease Ste24 Clears Clogged Translocons.
Cell. 164(1-2):103-14.
- Bengtson MH, Joazeiro CA. (2010)
Role of a ribosome-associated E3 ubiquitin ligase in protein quality control.
Nature. 467(7314):470-3.
- Brandman O, Stewart-Ornstein J, Wong D, Larson A, Williams CC, Li GW, Zhou S, King D, Shen PS, Weibezahn J, Dunn JG, Rouskin S, Inada T, Frost A, Weissman JS. (2012)
A ribosome-bound quality control complex triggers degradation of nascent peptides and signals translation stress.
Cell. 151(5):1042-54.
- Brandman O, Hegde RS. (2016)
Ribosome-associated protein quality control.
Nat Struct Mol Biol. 23(1):7-15.

Calfon M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, Clark SG, Ron D. (2002)

IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA.

Nature. 415(6867):92-6.

Choe YJ, Park SH, Hassemer T, Körner R, Vincenz-Donnelly L, Hayer-Hartl M, Hartl FU. (2016)

Failure of RQC machinery causes protein aggregation and proteotoxic stress.

Nature. 531(7593):191-5.

Crowder JJ, Geigges M, Gibson RT, Fults ES, Buchanan BW, Sachs N, Schink A, Kreft SG, Rubenstein EM. (2015)

Rkr1/Ltn1 Ubiquitin Ligase-mediated Degradation of Translationally Stalled Endoplasmic Reticulum Proteins.

J Biol Chem. 290(30):18454-66.

Chu J, Hong NA, Masuda CA, Jenkins BV, Nelms KA, Goodnow CC, Glynne RJ, Wu H, Masliah E, Joazeiro CA, Kay SA. (2009)

A mouse forward genetics screen identifies LISTERIN as an E3 ubiquitin ligase involved in neurodegeneration.

PNAS. 106(7):2097-103.

Defenouillère Q, Zhang E, Namane A, Mouaikel J, Jacquier A, Fromont-Racine M. (2016)

Rqc1 and Ltn1 Prevent C-terminal Alanine-Threonine Tail (CAT-tail)-induced Protein Aggregation by Efficient Recruitment of Cdc48 on Stalled 60S Subunits.

J Biol Chem. 291(23):12245-53.

Dimitrova LN, Kuroha K, Tatematsu T, Inada T. (2009)

Nascent peptide-dependent translation arrest leads to Not4p-mediated protein degradation by the proteasome.

J Biol Chem. 284(16):10343-52.

Doma MK, Parker R. (2006)

Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation.
Nature. 440(7083):561-4.

Frischmeyer PA, van Hoof A, O'Donnell K, Guerrierio AL, Parker R, Dietz HC . (2002)

An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons.

Science. 295(5563):2258-61.

Harding HP, Zhang Y, Ron D. (1999)

Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase.

Nature. 397(6716):271-4.

Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K. (1999)

Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress.

Mol Biol Cell. 10(11):3787-99.

Jackson RJ, Wickens M. (1997)

Translational controls impinging on the 5'-untranslated region and initiation factor proteins.

Curr Opin Genet Dev. 7(2):233-41.

Ingolia NT, Lareau LF, Weissman JS. (2011)

Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes.

Cell. 147(4):789-802.

Kim SJ, Mitra D, Salerno JR, Hegde RS. (2002)

Signal sequences control gating of the protein translocation channel in a substrate-specific manner.

Genes Cells. 2(2):207-17.

Matsuda R, Ikeuchi K, Nomura S, Inada T. (2014)
Protein quality control systems associated with no-go and nonstop mRNA surveillance in yeast.
Genes Cells. 19(1):1-12.

Park SH, Kukushkin Y, Gupta R, Chen T, Konagai A, Hipp MS, Hayer-Hartl M, Hartl FU. (2013)
PolyQ proteins interfere with nuclear degradation of cytosolic proteins by sequestering the Sis1p chaperone.
Cell. 154(1):134-45.

Ron D and Walter P. (2007)
Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response.
Nat Rev Mol Cell Biol. 8, 519-529.

Sachs AB, Sarnow P, Hentze MW. (1997)
Starting at the beginning, middle, and end: translation initiation in eukaryotes.
Cell. 89(6):831-8.

Shao S, von der Malsburg K, Hegde RS. (2013)
Listerin-dependent nascent protein ubiquitination relies on ribosome subunit dissociation.
Mol Cell. 50(5):637-48.

Shao S, Hegde RS. (2014)
Reconstitution of a minimal ribosome-associated ubiquitination pathway with purified factors.
Mol Cell. 55(6):880-90.

Shao S, Brown A, Santhanam B, Hegde RS. (2015)
Structure and assembly pathway of the ribosome quality control complex.
Mol Cell. 57(3):433-44.

Shcherbik N, Chernova TA, Chernoff YO, Pestov DG. (2016)
Distinct types of translation termination generate substrates for ribosome-associated quality control.
Nucleic Acids Res. 44(14):6840-52.

Shen X, Ellis RE, Lee K, Liu CY, Yang K, Solomon A, Yoshida H, Morimoto R, Kurnit DM, Mori K, Kaufman RJ. (2001)
Complementary signaling pathways regulate the unfolded protein response and are required for *C. elegans* development.
Cell. 107(7):893-903.

Shoemaker CJ, Green R. (2012)
Translation drives mRNA quality control.
Nat Struct Mol Biol. 19(6):594-601.

Sonenberg N, Gingras AC. (1998)
The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth.
Curr Opin Cell Biol. 10(2):268-75.

Sriburi R, Bommiasamy H, Buldak GL, Robbins GR, Frank M, Jackowski S, Brewer JW. (2007)
Coordinate regulation of phospholipid biosynthesis and secretory pathway gene expression in XBP-1(S)-induced endoplasmic reticulum biogenesis.
J Biol Chem. 282(10):7024-34.

Theodoraki MA, Nillegoda NB, Saini J, Caplan AJ. (2012)
A network of ubiquitin ligases is important for the dynamics of misfolded protein aggregates in yeast.
J Biol Chem. 287(28):23911-22.

Tirasophon W1, Welihinda AA, Kaufman RJ. (1998)

A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells.

Genes Dev. 12(12):1812-24.

Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissman JS, Walter P. (2001)

Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation.

Cell. 101(3):249-58.

Tsuboi T, Kuroha K, Kudo K, Makino S, Inoue E, Kashima I, 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(4):518-29.

van Hoof A, Frischmeyer PA, Dietz HC, Parker R. (2002)

Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon.

Science. 295(5563):2262-4

von der Malsburg K, Shao S, Hegde RS. (2015)

The ribosome quality control pathway can access nascent polypeptides stalled at the Sec61 translocon.

Mol Biol Cell. 26(12):2168-80.

Yanagitani K, Imagawa Y, Iwawaki T, Hosoda A, Saito M, Kimata Y, Kohno K.

Cotranslational targeting of XBP1 protein to the membrane promotes cytoplasmic splicing of its own mRNA.

Mol Cell. 34(2):191-200.

Yanagitani K, Kimata Y, Kadokura H, Kohno K. (2011)
Translational pausing ensures membrane targeting and cytoplasmic splicing of XBP1u mRNA.
Science. 331(6017):586-9.

Yang J, Hao X, Cao X, Liu B, Nyström T. (2016)
Spatial sequestration and detoxification of Huntingtin by the ribosome quality control complex.
Elife. 5. pii: e11792.

Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Davé UP, Prywes R, Brown MS, Goldstein JL. (2000)
ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs.
Mol Cell. 6(6):1355-64.

Yonashiro R, Tahara EB, Bengtson MH, Khokhrina M, Lorenz H, Chen KC, Kigoshi-Tansho Y, Savas JN, Yates JR, Kay SA, Craig EA, Mogk A, Bukau B, Joazeiro CA. (2016)
The Rqc2/Tae2 subunit of the ribosome-associated quality control (RQC) complex marks ribosome-stalled nascent polypeptide chains for aggregation.
Elife, 5:e11794.

Yoshida H, Matsui T, Hosokawa N, Kaufman RJ, Nagata K, Mori K. (2003)
A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response.
Dev Cell. 4(2):265-71.

Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. (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):881-91.