

様式 C - 7 - 1

平成28年度科学研究費助成事業（科学研究費補助金）実績報告書（研究実績報告書）

1. 機関番号	1 4 6 0 3	2. 研究機関名	奈良先端科学技術大学院大学																												
3. 研究種目名	新学術領域研究（研究領域提案型） 4. 研究期間 平成26年度～平成30年度																														
5. 課題番号	2 6 1 1 6 0 0 6																														
6. 研究課題名	mRNAの局在化に働く新生鎖の機能解析																														
7. 研究代表者	<table border="1"> <tr> <th>研究者番号</th> <th>研究代表者名</th> <th>所属部局名</th> <th>職名</th> </tr> <tr> <td>5 0 1 4 2 0 0 5</td> <td>コウノ ケンジ 河野 憲二</td> <td>バイオサイエンス研究科</td> <td>教授</td> </tr> </table>			研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名	5 0 1 4 2 0 0 5	コウノ ケンジ 河野 憲二	バイオサイエンス研究科	教授																				
研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名																												
5 0 1 4 2 0 0 5	コウノ ケンジ 河野 憲二	バイオサイエンス研究科	教授																												
8. 研究分担者	<table border="1"> <tr> <th>研究者番号</th> <th>研究分担者名</th> <th>所属研究機関名・部局名</th> <th>職名</th> </tr> <tr> <td>6 0 2 6 3 4 4 8</td> <td>キマタ ユキオ 木俣 行雄</td> <td>バイオサイエンス研究科</td> <td>准教授</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </table>			研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名	6 0 2 6 3 4 4 8	キマタ ユキオ 木俣 行雄	バイオサイエンス研究科	准教授																				
研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名																												
6 0 2 6 3 4 4 8	キマタ ユキオ 木俣 行雄	バイオサイエンス研究科	准教授																												
9. 研究実績の概要	<p>本研究は、翻訳休止（ポージング）により起こる、翻訳途上蛋白質とリボソームの品質管理機構、また翻訳レベルでの新生鎖とリボソームの生理機能について明らかにすることを目的とする。モデル蛋白質として、哺乳動物細胞の小胞体ストレス応答に重要なXBP1uの翻訳休止によるXBP1u mRNAの小胞体膜への輸送機構を解明する。小胞体膜への輸送のためには、「疎水性領域(HR2)と翻訳休止配列(PS)の2つが必要であり、翻訳休止時にHR2にシグナル識別粒子(SRP)が結合することが重要であること」が今までの研究で明らかになっている。今回の実験で、PSのC末側1つ目のアミノ酸Asnを削除しても良いが、2つ目のアミノ酸Metを削除すると翻訳休止を起こさないことが明らかとなった。このことは翻訳休止時にMetがリボソーム上のP siteに位置していることが翻訳休止に必要であるという今までのデータを支持している。また合成途上のXBP1uを小胞体膜上へ特異的に運ぶためには、HR2とPSとの適正な距離（アミノ酸残基数）が重要であることを示唆する結果を得た。XBP1uは小胞体膜上に運ばれるが、膜内に挿入されないことがその機能に必要であることを考えると、現在のようにより出口から少し離れた距離にあることにもらかの重要な意味があると考えている。このことは逆に、分泌蛋白質の効率よい小胞体膜通過を解析するための良いモデルとなる可能性を秘めている。また翻訳休止時に新生鎖とリボソーム蛋白質とが相互作用していることが考えられていたが、光架橋法によりRPL3, 4, 7がその後補蛋白質として上がって来た。これらの蛋白質はリボソームトンネル内に露出することが報告されているので、翻訳休止に必要なアミノ酸がこれらのリボソーム蛋白質と相互作用していると考えられる。</p>																														

10. キーワード

(1) 蛋白質	(2) 翻訳休止	(3) 小胞体ストレス応答	(4) 新生鎖
(5)	(6)	(7)	(8)

11. 現在までの進捗状況

(区分)(2) おおむね順調に進展している。

(理由)

(1) 翻訳休止によるXBP1u mRNAの小胞体膜への標的化機構の解明 XBP1u新生鎖の翻訳休止に必要なC末端側26アミノ酸残基(PS)をC末端から1アミノ酸ずつ削除したmRNAを作製し *in vitro*で翻訳した結果、C末端側から2番目のMetまで削ると翻訳休止がほとんど起きないことが分かり、翻訳休止が起きるためにはMetがPサイトに位置していることが重要であることが支持された。HR2-PS間のアミノ酸を5, 10, 15, 27残基削除した変異型XBP1uを発現させ、その翻訳休止や膜への挿入効率を調べた所、膜への挿入効率は5-15アミノ酸を削除するに従い上昇する傾向が観察された。これは、新生鎖のHR2がリボソームから丁度出現した位置にあることが膜への挿入効率を挙げていることを示唆している。しかし翻訳休止効率も落ちているため、より詳細な検討が必要である。

(2) 翻訳休止の分子機構の解析 光架橋の実験から、翻訳休止配列のアミノ酸がリボソーム蛋白質のRPL3, RPL4, RPL7と相互作用していることを支持する結果を得た。これらのリボソーム蛋白質は、ペプチド鎖合成のリボソームトンネルに露出していることが報告されており、翻訳休止配列との相互作用を支持する結果である。

12. 今後の研究の推進方策

(今後の推進方策)

(1) XBP1uの小胞体膜へのリクルートには、翻訳休止とHR2にSRPが結合することが重要であることが明らかとなっている。今回の研究からHR2とPSとの間の距離が小胞体膜への挿入効率に影響することが分かった。短くすると効率が上がることが示されたが、その理由としては2つの可能性が考えられる。1つはHR2がリボソームトンネル外に丁度露出する位置にあることがSRPの結合に重要である可能性、もう1つは翻訳休止が膜への挿入を抑制している可能性である。今後はそれらのdeletion mutantsとSRP54との結合量、また膜への挿入効率や翻訳休止効率の変化をより詳細に調べどちらの可能性が正しいのかを明らかにする。

(2) リボソーム蛋白質のRPL3, 4, 7とXBP1uのPSとの相互作用が示唆されたので、これらのRPLの発現をノックダウンした時に、XBP1uの翻訳休止が減少するかどうかを調べる。翻訳休止が減少するという実験結果が得られたならば、これらのRPL蛋白質を過剰発現させ翻訳休止のrescue実験を行なう。この系が動くことが確認されれば、RPLのアミノ酸部位に変異を入れたRPLを発現させ、相互作用するアミノ酸部位を同定したい。また共免疫沈降の実験から、翻訳休止を起こす時にリボソーム上での相互作用を起こす蛋白質の1つとしてeEF2が候補に上がって来た。eEF2に関しては、ジフタマイドと呼ばれる特殊な修飾アミノ酸の生理的役割に着目し、翻訳休止との関連を調べたい。

13.研究発表(平成28年度の研究成果)

〔雑誌論文〕計(6)件/うち査読付論文 計(6)件/うち国際共著論文 計(2)件/うちオープンアクセス 計(2)件

著者名	論文標題【掲載確定】				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著
Sato, H., Shiba, Y., Tsuchiya, Y., Saito, M., Kohno, K.			2 0 1 7	印刷中	-
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1247/csf.17002					
オープンアクセス					
オープンアクセスとしている(また、その予定である)					

著者名	論文標題【掲載確定】				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著
Schmitner, N., Kohno, K., Meyer, D.			2 0 1 7	307-321	該当する
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1242/dmm.026633.					
オープンアクセス					
オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難					

著者名	論文標題【掲載確定】				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著
Tschurtschenthaler, M., Adolph, T.E., Ashcroft, J.W., Niederreiter, L., Bharti, R., Saveljeva, S., Bhattacharyya, J., Flak, M.B., Shih, D.Q., Fuhrer, G.M., Parkes, M., Kohno, K., Iwawaki, T., van der Woude, C.J., Harding, H., Smith, Peppelenbosch, M.P., Targan, S.R., Ron, D., Rosenstiel, P., Blumberg, R.S., Kaser, A.			2 0 1 7	401-422	該当する
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1084/jem.20160791.					
オープンアクセス					
オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難					

著者名		論文標題【掲載確定】					
Kanda, S., Yanagitani, K., Yokota, Y., Esaki, Y., Kohno, K.		Autonomous translational pausing is required for XBP1u mRNA recruitment to the ER via the SRP pathway.					
雑誌名		査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著	
Proc. Natl. Acad. Sci. USA		有	113	2 0 1 6	E5885-E5895	-	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)							
10.1073/pnas.1604435113							
オープンアクセス							
オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難							

著者名		論文標題【掲載確定】					
Le, Q.G., Ishiwata-Kimata, Y., Kohno, K. Kimata, Y.		Cadmium impairs protein folding in the endoplasmic reticulum and induces the unfolded protein response.					
雑誌名		査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著	
FEMS Yeast Research		有	pii: fow049	2 0 1 6	1-8	-	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)							
10.1093/femsyr/fow049							
オープンアクセス							
オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難							

著者名		論文標題【掲載確定】					
Tsuru, A., Imai, Y., Saito, M., Kohno, K.		Novel mechanism of enhancing IRE1-XBP1 signalling via the PERK-ATF4 pathway.					
雑誌名		査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著	
Sci. Rep.		有	6	2 0 1 6	24217(1-8)	-	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)							
10.1038/srep24217							
オープンアクセス							
オープンアクセスとしている(また、その予定である)							

〔学会発表〕 計(20)件 / うち招待講演 計(2)件 / うち国際学会 計(2)件

発表者名	発表標題【発表確定】	
小池雅昭	ペプチド鎖伸長因子eEF2におけるジフタミド修飾の生理的意義の解明	
学会等名	発表年月日	発表場所
「新生鎖の生物学」第3回若手ワークショップ	2016年05月23日～ 2016年05月25日	淡路夢舞台国際会議場(兵庫県淡路市)

発表者名	発表標題【発表確定】	
曾川愛守榮	新生鎖の品質管理機構RQCの小胞体に対する生理的役割	
学会等名	発表年月日	発表場所
「新生鎖の生物学」第3回若手ワークショップ	2016年05月23日～ 2016年05月25日	淡路夢舞台国際会議場(兵庫県淡路市)

発表者名	発表標題【発表確定】	
苅田聰	A novel role of SRP pathway on XBP1u localization and ER homeostasis	
学会等名	発表年月日	発表場所
「新生鎖の生物学」第3回若手ワークショップ	2016年05月23日～ 2016年05月25日	淡路夢舞台国際会議場(兵庫県淡路市)

発表者名	発表標題【発表確定】	
大古殿美加	XBP1u タンパク質の翻訳停止機構の解明	
学会等名	発表年月日	発表場所
「新生鎖の生物学」第3回若手ワークショップ	2016年05月23日～ 2016年05月25日	淡路夢舞台国際会議場(兵庫県淡路市)

発表者名	発表標題【発表確定】	
Tran Minh Duc	The Unfolded Protein Response in Yeast Cells under Stationary Phase	
学会等名	発表年月日	発表場所
第68回日本細胞生物学会大会	2016年06月15日～ 2016年06月17日	京都テルサ(京都府・京都市)

発表者名	発表標題【発表確定】	
土屋雄一	Hanging Drop法による脾臓 細胞株を用いたpseudoisletの作製	
学会等名	発表年月日	発表場所
第68回日本細胞生物学会大会	2016年06月15日～ 2016年06月17日	京都テルサ(京都府・京都市)

発表者名	発表標題【発表確定】	
小池雅昭	ペプチド鎖伸長因子2に形成されるジフタミドの生理的意義の解明	
学会等名	発表年月日	発表場所
第68回日本細胞生物学会大会	2016年06月15日～ 2016年06月17日	京都テルサ(京都府・京都市)

発表者名	発表標題	
Kenji Kohno	Autonomous translational pausing is required for XBP1u mRNA recruitment to the ER via the SRP pathway	
学会等名	発表年月日	発表場所
Nascent Chain Biology International Symposium(招待講演)	2016年09月01日～ 2016年09月03日	Fuji Lake Hotel(山梨県・南都留郡)

発表者名	発表標題【発表確定】	
Satoshi Kanda	Autonomous translational pausing is required for XBP1u mRNA recruitment to the ER via the SRP pathway	
学会等名	発表年月日	発表場所
Nascent Chain Biology International Symposium	2016年09月01日～ 2016年09月03日	Fuji Lake Hotel(山梨県・南都留郡)

発表者名	発表標題【発表確定】	
Masaaki Koike	Studies on physiological meanings of diphthamide in eEF2	
学会等名	発表年月日	発表場所
Nascent Chain Biology International Symposium	2016年09月01日～ 2016年09月03日	Fuji Lake Hotel(山梨県・南都留郡)

発表者名	発表標題【発表確定】	
Niku Ohfurudono	Molecular mechanism of XBP1u translational pausing	
学会等名	発表年月日	発表場所
Nascent Chain Biology International Symposium	2016年09月01日～ 2016年09月03日	Fuji Lake Hotel(山梨県・南都留郡)

発表者名	発表標題【発表確定】	
Ash-way Sogawa	Novel physiological roles of RQC in the ER of mammalian cells	
学会等名	発表年月日	発表場所
Nascent Chain Biology International Symposium	2016年09月01日～ 2016年09月03日	Fuji Lake Hotel(山梨県・南都留郡)

発表者名	発表標題【発表確定】	
藤本拓志	瞬特異的に発現するPDIファミリータンパク質(PDIp)の生理的な機能の解析	
学会等名	発表年月日	発表場所
第89回日本生化学会大会	2016年09月25日～ 2016年09月27日	東北大学川内北キャンパス(宮城県・仙台市)

発表者名	発表標題【発表確定】	
Kenji Kohno	The role of translational pausing in the delivery of XBP1u mRNA to the ER via the SRP pathway	
学会等名	発表年月日	発表場所
EMBO conferences "Structure and function of the endoplasmic reticulum" (招待講演) (国際学会)	2016年10月23日～ 2016年10月27日	PGA Cataluna Resort (Girona, Spain)

発表者名	発表標題【発表確定】	
Ash-way Sogawa	Novel physiological roles of RQC in the ER of mammalian cells.	
学会等名	発表年月日	発表場所
EMBO conferences "Structure and function of the endoplasmic reticulum" (国際学会)	2016年10月23日～ 2016年10月27日	PGA Cataluna Resort (Girona, Spain)

発表者名	発表標題【発表確定】	
小池雅昭	ペプチド鎖伸長因子2に形成されるシフタミドの生理的意義の解明	
学会等名	発表年月日	発表場所
第39回日本分子生物学会	2016年11月30日～ 2016年12月02日	パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

発表者名	発表標題【発表確定】	
山田麗奈	ジフタミド修飾酵素欠損細胞を用いたジフタミドの生理的意義の解明	
学会等名	発表年月日	発表場所
第39回日本分子生物学会	2016年11月30日～ 2016年12月02日	パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

発表者名	発表標題【発表確定】	
土屋雄一	脾臓 細胞におけるIRE1 -XBP1 経路の生理的活性化はプロインスリン折り畳み酵素の発現維持に働く	
学会等名	発表年月日	発表場所
第39回日本分子生物学会	2016年11月30日～ 2016年12月02日	パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

発表者名	発表標題【発表確定】	
佐藤仁美	脾島 細胞における阻害剤をもちいたIRE1 の機能解析	
学会等名	発表年月日	発表場所
日本農芸化学会2017年度大会	2017年03月17日～ 2017年03月20日	京都女子大(京都府・京都市)

発表者名	発表標題【発表確定】	
桶谷真希	小胞体ストレス応答に関与するXBP1uがSRP経路にはいるための条件解析	
学会等名	発表年月日	発表場所
日本農芸化学会2017年度大会	2017年03月17日～ 2017年03月20日	京都女子大(京都府・京都市)

〔図書〕 計(0)件

著者名	出版社		
書名		発行年	総ページ数

14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

〔出願〕 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

〔取得〕 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別
				出願年月日	

15. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計(0)件

国際研究集会名	開催年月日	開催場所

16. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

(1) 国際共同研究：国際共同研究である

共同研究相手国	相手方研究機関			
USA	UCSF	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-
-	-	-	-	-

17. 備考

動物細胞工学研究室（河野研）

<http://bsw3.naist.jp/kouno/>

動物細胞工学研究室（河野研）

<https://www.facebook.com/naist.kohnolab/>