

No.	22-2018	
研究課題名	RNAグアニン四重鎖による翻訳異常停止に対する品質管理機構の解明	
研究代表者	塩田 倫史（熊本大学発生医学研究所・教授）	
研究組織	受入教員	稲田 利文（東京大学医科学研究所・教授）
	分担者	矢吹 梯（熊本大学発生医学研究所・助教）
	分担者	松尾 和哉（熊本大学発生医学研究所・研究員）
	分担者	稲田 利文（基礎医科学部門 RNA制御学分野・教授）
	分担者	松尾 芳隆（基礎医科学部門 RNA制御学分野・准教授）
	分担者	鈴木 亨（基礎医科学部門 RNA制御学分野・助教）

東京大学医科学研究所国際共同利用・共同研究拠点事業
共同研究報告書 (年次終了・研究完了)【国内】

共同研究報告 (年次終了)

本研究では、異常翻訳の感知応答システムの分子機構とその生理機能の解明を目指して、グアニン四重鎖によるタンパク質翻訳抑制に注目し、トリプレットリピート病である「ARX ポリアラニン伸長病 (West 症候群)」における翻訳品質管理機構 (RQC) の機能を解明する。

グアニン四重鎖 (G-quadruplex; G4) 構造 (下図) は、グアニンが豊富な配列領域で形成される。ヒトゲノム中の DNA グアニン四重鎖 (G4DNA) は、ゲノムの複製や遺伝子の転写に関与し、RNA グアニン四重鎖 (G4RNA) は、タンパク質翻訳制御や RNA スプライシングに関与することが予想されている。しかしながら、G4 構造の生物学的な役割や病態との関与は未解明である。本疾患の原因遺伝子である ARX 遺伝子内には、アラニンコドンが連続した GCG 反復配列が存在する。この GCG 反復配列の伸長変異は、抑制性神経細胞における ARX タンパク質の異常により知的障害を伴う難治性てんかんを呈することが知られている。本共同研究により、G4RNA の形成による ARX タンパク質の翻訳異常停止に対する RQC の生理意義を解明し、昨年度に以下の成果を得た。

1) RNA 高次構造解析

疾患型でのみ G4RNA の G カルテット二次構造が形成されることを円二色性解析・RNase T1 フットプリントアッセイで明らかにした。

2) G4RNA 形成による遺伝子転写・タンパク質翻訳解析

健常人型、疾患型、塩基置換型の 3 種のリピート配列を持つ NanoLuc タグを付加した ARX 遺伝子を用いてマウス神経芽細胞腫 Neuro2a 安定発現細胞株を作製した。ARX 遺伝子の転写と翻訳を解析するために、RT-qPCR とルシフェラーゼアッセイを行い、疾患型細胞のみで翻訳の有意な低下が見られた。

3) G4RNA 形成による異常翻訳停止の実体解明

翻訳の異常停止により形成される衝突リボソームを中心として、G4RNA 形成により誘導される異常翻訳をリボソームプロファイリング法で解析する。これらの安定発現細胞について、RQC 因子である ZNF4598, ASCC3, LTN1 の KO 細胞を構築し、ARX mRNA における翻訳アレストの有無とそれを解消する品質管理機構 RQC の機能を検証した。また mRNA の品質管理 NGD が誘導されるか検証を進めた。さらに、衝突リボソームが小胞体ストレスなどのストレス応答を誘導するか検討を進めた。

グアニン四重鎖構造
(G-quadruplex; G4)

