

## 平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究終了報告書

◆記入に当たっては、「平成18年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究終了報告書記入要領」を参照してください。

ローマ字		KATADA TOSHIAKI					
①研究代表者氏名		堅田 利明			②所属研究機関・部局・職		東京大学・大学院薬学系研究科・教授
③研究課題名	和文	真核細胞の mRNA 動態を制御する新規G蛋白質ファミリーの構造と機能					
	英文	The structure and function of a novel G protein family regulating eukaryotic mRNA dynamics					
④研究経費 金額単位：千円	平成13年度	平成14年度	平成15年度	平成16年度	平成17年度	総合計	
	22,600	20,900	19,000	17,100	15,200	94,800	
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者） *平成18年3月31日現在							
氏名	所属研究機関・部局・職		現在の専門	役割分担（研究実施計画に対する分担事項）			
堅田 利明	東京大学・大学院薬学系研究科・教授		生物化学	新規G蛋白質ファミリーの生化学的性状解析、及び研究の総括			
紺谷 圏二	東京大学・大学院薬学系研究科・助教授		細胞生物学	新規G蛋白質の遺伝子破壊及び変異体導入による mRNA 動態の解析			
梶保 博昭	東京大学・大学院薬学系研究科・助手		分子生物学	G蛋白質-mRNA 結合蛋白質間の相互作用部位の解析			
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）							
<p>申請者らは、<math>\alpha\beta\gamma</math>サブユニットからなる三量体G蛋白質の機能解明に関わる研究過程で、これらとは別種のファミリーに属する新規のG蛋白質GSPT1 (G1 to S phase transition of the cell cycle) を先に単離した。GSPTはそのC末端側に真核細胞の翻訳伸長因子EF1<math>\alpha</math>と相同性な領域を有し、その存在が先に推定されていた翻訳終結を仲介するG蛋白質eRF3であることを証明した。一方、eRF3にはEF1<math>\alpha</math>にないユニークなN末端側付加ドメインが存在することから、その結合因子の解析を続け、新たにmRNAの3'-末端ポリ(A)鎖領域と結合するポリ(A)結合蛋白質(PABP)を同定した。PABPはmRNAのポリ(A)鎖を覆ってmRNAの安定性に寄与するが、さらに翻訳開始因子eIF4Gとも結合し、mRNAを環状化して翻訳開始をも制御する可能性が指摘されている。これらの知見は、eRF3が翻訳の終結に加えてmRNAの安定性や翻訳開始にも影響を与え、広義の遺伝子発現の調節に重要な役割を果たすことを意味している。さらに申請者らは、このeRF3ファミリーG蛋白質に属する他のメンバーについても検討を加え、それらが共通に、固有のN末端側ドメインを介して真核細胞のmRNA安定性の制御に関わる可能性を見出した。</p> <p>本研究では、このようなN末端側にユニークな機能ドメインを有する新規のG蛋白質eRF3ファミリーについて、翻訳と共役したmRNAの動態制御という全く新しい視点で、それらの機能を解明することを目的とした。こうした視点での広義の遺伝子発現調節に関しては全く未開拓な分野であり、さらに原核細胞のRF3とは異なり、真核細胞において独自の進化を遂げたと考えられるeRF3ファミリーの構造と機能に関わる解析は、真核細胞に特徴的なmRNAの翻訳後修飾(5' cap構造と3'ポリ(A)鎖付加)との関連においても、極めて興味深い研究課題と考えられる。</p>							

⑦ 研究成果の概要 (研究目的に対する研究成果を必要に応じて図表等を用いながら、簡潔に記入してください。)

1. 翻訳終結から mRNA 分解を仲介する G 蛋白質 eRF3 の機能解析

これまでに、eRF3 は 2 つの機能ドメイン (N と C ドメイン) からなり、C ドメインは終止コドンを認識する終結因子 eRF1 と結合し、一方の N ドメインは poly(A) 付加領域を覆って mRNA の分解を保護する PABP と結合することを明らかにした。1) これらの結合の生理的役割を解明する目的で、出芽酵母の eRF3/N ドメインを欠失させて mRNA 分解の動態を解析した結果、調べた全ての mRNA の poly(A) 鎖分解が阻害され、mRNA が安定化された。また、こうした mRNA の分解は翻訳の進行と共役した。すなわち、eRF1 との結合を介して翻訳終結を終えた

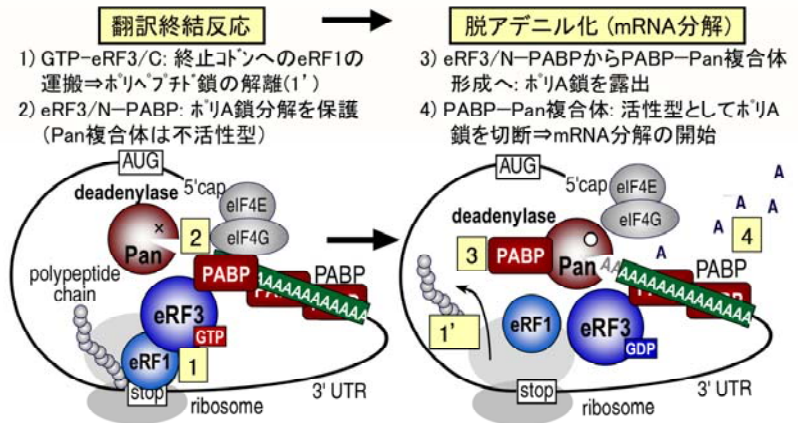


図1. 翻訳終結から mRNA 分解を仲介する [eRF1-eRF3-PABP-PAN] 間相互作用

eRF3 は、その後 N ドメインを介して PABP と結合し、poly(A) 鎖分解へと導く機構が示された。2) PABP に結合する eRF3-N ドメイン上の部位を特定し、eRF1-eRF3 と PABP 間の相互作用が、翻訳開始因子を介する mRNA の環状化を補強し、翻訳を終えたリボソームを開始反応に向けて効率良くリサイクリングさせる機能も有することを明らかにした。3) さらに、ポリ A 鎖分解に介在するヒト poly(A) nuclease 複合体 (Pan2/Pan3) を同定した。Pan2 は 3' → 5' 方向に RNA を分解するエキソリボヌクラーゼで、PABP が PAN3 に結合すると、Pan2 の poly(A) に対する基質特異性とヌクラーゼ活性が上昇した。4) Pan3 と eRF3 は、PABP に対して競合的に結合するので、翻訳終結とポリ A 鎖分解の共役は [eRF1-eRF3-PABP-Pan] 間の相互作用によって制御することを見出した (図 1 参照)。5) 一方、eRF3/C と eRF1 との結合は GTP を要求したが、これは相同性のある EF1 $\alpha$  が GTP 結合型でアミノアシル tRNA と会合するという特性と共通しており、eRF3 の C ドメインは GTP/GDP 型でそのコンホメーションを大きく転換することを明らかにした。

2. G 蛋白質 eRF3 ファミリーに属する他のメンバーの機能解析

2-1) 3' から 5' 方向への mRNA 分解に介在する G 蛋白質 Ski7

eRF3 に類似の Ski7p は、その N 末端領域を介して、3' → 5' 方向の mRNA 分解経路に介在するマシーナリーの exosome 及び Ski 複合体と相互作用することを見出した。真核生物では、ナンセンス変異を含む mRNA が積極的に分解される NMD (nonsense-mediated mRNA decay) 経路が存在するが、Ski7 破壊株において、ナンセンス変異を含む mRNA の蓄積が観察され、これまで NMD 経路に介在しないとされていた 3' → 5' mRNA 分解経路の寄与を明らかにした。また、Upf 因子群と Ski7p が相互作用すること、相互作用部位の過剰発現によって NMD 経路が抑制されることを示し、Ski7p と Upf 因子群の相互作用が NMD 特異的な 3' → 5' 方向の分解促進に必要であることを解明した (図 2 参照)。

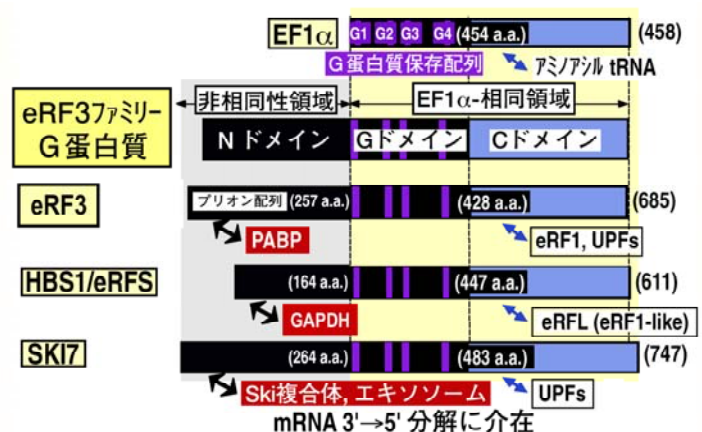


図2. C末端側にEF1 $\alpha$ 様領域を有する新規G蛋白質eRF3ファミリー

2-2) 1次構造上 eRF3 に最も類縁の G 蛋白質 eRFS

eRFS (eRF3-similar protein) は eRF3 に相同であるが、翻訳終結には関与しない。そこで相互作用因子を検索し、eRFS は eRF1 と構造が類似の新規分子 eRFL (eRF1-like protein) と結合することを見出した。eRFS と eRFL はともに翻訳中のリボソームに存在することから、eRF3-eRF1 と類似の様式で翻訳のある過程において機能すると考えられる。また eRFS は N ドメインを介して解糖系の酵素である GAPDH と相互作用することを見出した。GAPDH は、mRNA の不安定化をもたらすシス配列である AU-rich element (ARE) 結合蛋白質としても同定されている。酵母 eRFS 破壊株において ARE をもつ mRNA が安定化していることから、eRFS は GAPDH との相互作用を介して ARE をもつ mRNA の分解を制御することが示された。

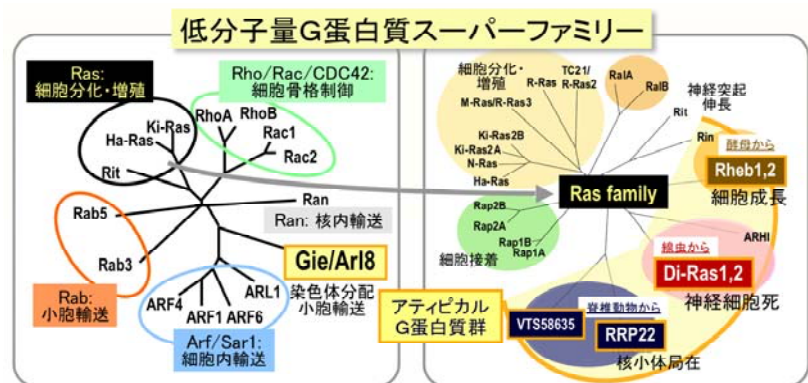
⑧特記事項 (この研究において得られた独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、当該研究分野及び関連研究分野への影響等、特記すべき事項があれば記入してください。)

G蛋白質eRF3ファミリーは、翻訳伸長因子EF1 $\alpha$ にはないユニークなN末端側ドメインの存在から、非典型(アティピカル)なG蛋白質群と考えられる。今後のポストゲノム研究においては、こうしたユニークな特性を有するG蛋白質の網羅的解析から、興味深いシグナル伝達経路が明らかにされ、G蛋白質の役割がさらに拡大する可能性が非常に高い。このような視点から申請者らは、G蛋白質eRF3ファミリーの機能解明を目指した本研究をさらに発展させるため、平成15年度の間評価に際して提出した研究状況報告書で述べたように、その一部で別種の新奇低分子量G蛋白質サブファミリーについても解析を進めた。

これまでに、Rasグループに属しながらGTP結合型のコンホメーションを好む生化学的性状の新規のDi-Ras (Distinct subgroup of Ras-family GTPases) メンバー、また系統樹上全く別種の低分子量G蛋白質サブファミリーを形成する新たな分子群(Gie)など、複数種のG蛋白質を単離・同定している(図3参照)。なおGieは、機能未知な低分子量G蛋白質の中で進化的に最もよく保存されている分子の1つであり、その機能を抑制すると染色体の分離に異常が起こることから、novel GTPases indispensable for equal segregation of chromosomesの頭文字をとって名付けた。

ここで同定されたDi-RasやGie/Ar18などの低分子量G蛋白質は、細胞内でその多くがGTP結合型のコンホメーションを保って存在しており、翻訳及びmRNA動態の制御に介在する多くの因子群のG蛋白質と類似した特性を有する。Di-Rasは、低分子量G蛋白質としては珍しく線虫以上の神経細胞に極めて限局的に発現しており、神経細胞死や神経ペプチドの分泌制御への介在が期待されている。また、同じく線虫以上の多細胞生物にお

いて広範な組織に発現するGie/Ar18は、低分子量G蛋白質ファミリーの中では最も種を超えて一次構造上での保存性が高く(アミノ酸レベルでヒトとショウジョウバエ、線虫間で、それぞれ87.1%, 84.4%の同一性をもつ)、物質輸送や細胞質分裂・染色体分離への関与が見出されている。これらアティピカルなG蛋白質サブファミリーの機能解析から、G蛋白質の果たす生理的役割がさらに拡大し、創薬研究を含めた細胞機能の新しい制御技術の開発に関わる研究の展開も十分期待できる。



1. ユニークな一次構造と生化学的性状: GTP結合型を好む
2. 多細胞生物の限局した組織に分布(Gie, Rhebを除く)

図3. 本研究で同定したアティピカル低分子量G蛋白質ファミリー

⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

### 【発表論文】

- 1) Wada T, Nakagawa K, Nishitai G, Seo J, Kishimoto H, Watanabe T, Kitagawa D, Sasaki T, Penninger JM, Nishina H, Katada T. Impaired synergistic activation of stress-activated protein kinase SAPK/JNK in ES cells lacking SEK1/MKK4. *J. Biol. Chem.* **276**: 30892-30897 (2001).
- 2) Kurosu H, Katada T. Association of phosphatidylinositol 3-kinase composed of p110b-catalytic and p85-regulatory subunits with the small GTPase Rab5. *J. Biochem.* **130**: 73-78 (2001).
- ③ Araki Y, Takahashi S, Kobayashi T, Kajiho H, Hoshino S, Katada T. Ski7p G protein interacts with the exosome and the Ski complex for 3'-to-5' mRNA decay in yeast. *EMBO J.* **20**: 4684-4693 (2001).
- 4) Sasaki T, Wada T, Kishimoto H, Irie-Sasaki J, Matsumoto G, Goto T, Yao Z, Wakeham A, Mak TW, Suzuki A, Katada T, Nishina H, Penninger JM. The stress kinase MKK7 is a negative regulator of antigen receptor and growth factor receptor induced proliferation in hematopoietic cells. *J. Exp. Med.* **17**: 757-768 (2001).
- 5) Kitagawa D, Tanemura S, Ohata S, Shimizu N, Seo J, Nishitai G, Watanabe T, Nakagawa K, Kishimoto H, Wada T, Tezuka T, Yamamoto T, Nishina H, Katada T. Activation of extracellular signal-regulated kinase by ultraviolet is mediated through *Src*-dependent epidermal growth factor receptor phosphorylation. Its implication in an anti-apoptotic function. *J. Biol. Chem.* **277**: 366-371 (2002).
- 6) Saito K, Murai J, Kajiho H, Kontani K, Kurosu H, Katada T. A novel binding protein composed of homophilic tetramer exhibits unique properties for the small GTPase Rab5. *J. Biol. Chem.* **277**: 3412-3418 (2002).
- 7) Kontani K, Tada M, Ogawa T, Okai T, Saito K, Araki Y, Katada T. Di-Ras: A distinct subgroup of Ras-family GTPases with unique biochemical properties. *J. Biol. Chem.* **277**: 41070-41078 (2002).
- 8) Watanabe T, Nakagawa K, Ohata S, Kitagawa D, Nishitai J, Seo J, Tanemura S, Shimizu N, Kishimoto H, Wada T, Aoki J, Arai H, Iwatsubo T, Mochita M, Watanabe T, Satake M, Ito Y, Matsuyama T, Mak TW, Penninger JM, Nishina H, Katada T. SEK1/MKK4-mediated SAPK/JNK signaling participates in embryonic hepatoblast proliferation via a pathway different from NF-kappaB-induced anti-apoptosis. *Dev Biol.* **15**: 332-347 (2002).
- 9) Uchida N, Hoshino S, Imataka H, Sonenberg N, Katada T. A novel role of the mammalian GSPT/eRF3 associating with poly(A)-binding protein in cap/poly(A)-dependent translation. *J. Biol. Chem.* **277**: 50286-50292 (2002).
- 10) Nishida M, Schey KL, Takagahara S, Kontani K, Katada T, Urano Y, Nagano T, Nagao T, Kurose H. Activation mechanism of G<sub>i</sub> and G<sub>o</sub> by reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* **277**: 9036-9042 (2002).
- 11) Ito N, Yokomizo T, Sasaki T, Kurosu H, Penninger J, Kanaho Y, Katada T, Hanaoka K, Shimizu T. Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase activation and calcium influx for leukotriene B<sub>4</sub>-induced enzyme release. *J. Biol. Chem.* **277**: 44898-44904 (2002).
- 12) Kishimoto H, Nakagawa K, Watanabe T, Kitagawa D, Momose H, Seo J, Nishitai G, Shimizu N, Ohata S, Tanemura S, Asaka S, Goto T, Fukushi H, Yoshida H, Suzuki A, Sasaki T, Wada T, Penninger JM, Nishina H, Katada T. Different properties of SEK1 and MKK7 in dual phosphorylation of stress-induced activated protein kinase SAPK/JNK in embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* **278**: 16595-16601 (2003).
- 13) Takahashi S, Araki Y, Sakuno T, Katada T. Interaction between Ski7p and Upf1p is required for nonsense-mediated 3'-to-5' mRNA decay in yeast. *EMBO J.* **22**: 3951-3959 (2003).
- ⑭ Hosoda N, Kobayashi T, Uchida N, Funakoshi Y, Kikuchi Y, Hoshino S, Katada T. Translation termination factor eRF3 mediates mRNA decay through the regulation of deadenylation. *J. Biol. Chem.* **278**: 38287-38291 (2003).

⑨研究成果の発表状況(続き) (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)

- 15) Kajiho H, Saito K, Tsujita K, Kontani K, Araki Y, Kurosu H, Katada T. RIN3: a novel Rab5 GEF interacting with amphiphysin II involved in the early endocytic pathway. *J. Cell Sci.* **116**: 4159–4168 (2003).
- 16) Momose H, Kurosu H, Tsujimoto N, Kontani K, Tsujita K, Nishina H, Katada T. Dual phosphorylation of phosphoinositide 3-kinase adaptor Grb2-associated binder 2 is responsible for superoxide formation synergistically stimulated by Fcγ and formyl-Met-Leu-Phe receptors in differentiated THP-1 cells. *J. Immunol.* **171**: 4227–4234 (2003).
- 17) Nishina H, Nakagawa K, Azuma N, Katada T. Activation Mechanism and Physiological Roles of Stress-Activated Protein Kinase/c-Jun NH<sub>2</sub>-Terminal Kinase in Mammalian Cells. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* **17**: 295–302 (2003).
- 18) Uchida N, Hoshino S, Katada T. Identification of a human cytoplasmic poly(A) nuclease complex stimulated by poly(A)-binding protein. *J. Biol. Chem.* **279**: 1383–1391 (2004).
- 19) Nishitai G, Shimizu N, Negishi T, Kishimoto H, Nakagawa K, Kitagawa D, Watanabe T, Momose M, Ohata S, Tanemura S, Asaka S, Kubota J, Saito R, Yoshida H, Mak TW, Wada T, Penninger JM, Azuma N, Hiroshi N, Katada T. Stress induces mitochondria-mediated apoptosis independent of SAPK/JNK activation in embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* **279**: 1621–1626 (2004).
- 20) Wada T, Joza N, Cheng HY, Sasaki T, Kozieradzki I, Bachmaier K, Katada T, Schreiber M, Wagner EF, Nishina H, Penninger JM. MKK7 couples stress signalling to G2/M cell-cycle progression and cellular senescence. *Nat. Cell Biol.* **6**: 215–226 (2004).
- 21) Okai T, Araki Y, Tada M, Tateno T, Kontani K, Katada T. Novel small GTPase subfamily capable of associating with tubulin is required for chromosome segregation. *J. Cell Sci.* **117**: 4705–4715 (2004).
- ② Kobayashi T, Funakoshi Y, Hoshino S, Katada T. The GTP-binding release factor eRF3 as a key mediator coupling translation termination to mRNA decay. *J. Biol. Chem.* **279**: 45693–45700 (2004).
- 23) Sakuno T, Araki Y, Ohya Y, Kofuji S, Takahashi S, Hoshino S, Katada T. Decapping reaction of mRNA requires Dcp1 in fission yeast: Its characterization in different species from yeast to human. *J. Biochem.* **136**: 805–812 (2004).
- 24) Nishina H, Wada T, Katada T. Physiological roles of SAPK/JNK signaling pathway. *J. Biochem.* **136**: 123–126 (2004).
- 25) Matsuoka M, Igisu H, Nakagawa K, Katada T, Nishina H. Requirement of MKK4 and MKK7 for CdCl<sub>2</sub>- or HgCl<sub>2</sub>-induced activation of c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase in mouse embryonic stem cells. *Toxicol. Lett.* **152**: 175–181 (2004).
- 26) Saito K, Araki Y, Kontani K, Nishina H, Katada T. Novel role of the small GTPase Rheb: Its implication in endocytic pathway independent of the activation of mammalian target of rapamycin. *J. Biochem.* **137**: 423–430 (2005).
- 27) Saito K, Kajiho H, Araki Y, Kurosu H, Kontani K, Nishina H, Katada T. Purification and analysis of RIN family – novel Rab5 GEFs. *Methods Enzymol.* **403**: 276–283 (2005).
- 28) Im YJ, Im DS, Lee YK, Lee EH, Sato K, Tomura H, Katada T, Ui M, Okajima F. Study on action mode of sphingosine 1-phosphate in rat hepatocytes. *J. Pharmacol. Sci.* **97**: 443–446 (2005).
- 29) Kofuji S, Sakuno T, Takahashi S, Araki Y, Doi Y, Hoshino S, Katada T. The decapping enzyme Dcp1 participates in translation termination through its interaction with the release factor eRF3 in budding yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* in press (2006).



⑨研究成果の発表状況(続き) (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会、特許等の発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付けてください。)

【総説・著書等】

荒木保弘、星野真一、堅田利明：真核細胞のmRNA動態を制御する新規Gタンパク質ファミリー。 **実験医学** 20: 150-157 (2002)。

星野真一：GSPTファミリーによる遺伝子発現制御。 **生化学** 74: 1343-1348 (2002)。

打田直行、星野真一、堅田利明、Ann-Bin Shyu：真核細胞におけるmRNA動態の制御。 **蛋白質核酸酵素** 48: 1488-1495 (2003)。

梶保博昭、齋藤康太、荒木保弘、堅田利明：極性細胞での小胞輸送-Rabファミリーによる制御機構。特集「上皮組織ベクトル輸送の分子基盤と機能制御」。 **蛋白質核酸酵素** 48: 133-139 (2003)。

堅田利明：翻訳終結とmRNA分解を結ぶGタンパク質。 **学術月報** 56: 1258-1262 (2003)。

星野真一：真核生物mRNAの分解制御。 **蛋白質核酸酵素** 48: 1229-1240 (2003)。

仁科博史、中川健太郎、堅田利明：SAPK/JNK系の活性化機構と生理的役割。 **実験医学** 22: 1551-1556 (2004)。

堅田利明：細胞内情報伝達。スタンダード薬学シリーズ4 生物系薬学 II。細胞をミクロに理解する(日本薬学会編) pp. 316-335 東京化学同人(2005)。

Nishina H, Watanabe T, Nakagawa K, Ohata S, Asaka S, Katada T. SAPK/JNK signaling participates in embryonic hepatoblast proliferation via a pathway different from NF-kappaB-induced anti-apoptosis. *Stem Cell and Liver Regeneration*: (Okita K. eds.) pp. 1-14, Springer-Verlag, Tokyo (2004)。

Nishina H, Katada T. The biological function of JNKs (MKK4/MKK7 knockout mice). *The JNK signaling pathway* (Lin A, ed.) pp. 41-49, Landes Bioscience, Texas (2005)。

【国際会議・国内学会での主な発表】

Araki Y, Hoshino S, Katada T: The N-terminal domain of Ski7 G protein interacts with the exosome and Ski2/Ski3/Ski8 complex for 3' to-5' messenger RNA decay in yeast. The 2001 Cold Spring Harbor meeting on "Eukaryotic mRNA Processing" Cold Spring Harbor 米国、ニューヨーク(2001年8月)。

Katada T: Small GTPases in protein targeting and sorting. International Symposium on Cell Signaling -From Diseases to Drug Discovery- 香港、Shatin(2001年10月)。

Uchida N, Hoshino S, Imataka H, Sonenberg N, Katada T: A novel role of the interaction between GSPT/eRF3 and PABP in eukaryotic translation. FASEB Summer Research Conference, Post-Transcriptional Control of Gene Expression: Effectors of mRNA decay. 米国、ツーソン(2002年7月) "Best Presentation Award" 受賞。

堅田利明、荒木保弘、星野真一；翻訳とmRNA動態を制御する新規のGタンパク質ファミリー。日本薬学会第123年会 シンポジウム「Gタンパク質を介在するシグナル伝達経路と創薬への展開」長崎(2003年3月)。

Katada T: Novel family of G proteins involving in translation termination and mRNA degradation. US-Japan Conference on Drug Development and Rational Drug Design, 米国、ロスアンゼルス(2005年8月)。

堅田利明：細胞のシグナル伝達系に介在する諸種のGTP結合性制御蛋白質の機能解析[持田記念学術賞受賞講演] 東京(2005年10月)。