

令和元年6月3日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06152

研究課題名(和文) リボソームに翻訳履歴を付加してmRNA配列非依存的な翻訳制御機構を検証する

研究課題名(英文) Verification of translational control independent on mRNA sequence

研究代表者

遠藤 慧 (ENDO, Kei)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・助教

研究者番号：40626074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,100,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物のもっとも基本的なモデル生物である出芽酵母を用いて、タンパク質合成装置であるリボソームを細胞内で標識し、標識されたリボソームを生理条件下で抽出するための技術基盤を構築した。また、細胞内で同じ配列の違う分子を見分けるための方法や、間接的あるいは一過的なmRNAとタンパク質の相互作用を解析するための方法につながるシード技術を開発した。さらに、予期せずして新奇な翻訳開始現象を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生命現象の根源とも言える「タンパク質合成反応」に従来とは異なる視点から挑むことを通じて生命の不思議に対してより深い理解をもたらすと期待される。長期的には、「転写量からタンパク質合成量の精密な予測」を実現し、発生・分化の仕組みや病因・病態の解明など生命科学のあらゆる分野において、生命現象を動的なシステムとして理解すること、さらにその挙動を計算機上で再現することに貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：We developed a technology platform for intracellular labeling of ribosomes, the protein synthesis apparatus, and for extracting the labeled ribosomes under physiological conditions, using *Saccharomyces cerevisiae*, the most basic model organism for eukaryotes. We also developed seed techniques that lead to methods for distinguishing different molecules of the same sequence in cells, and for analyzing indirect or transient mRNA-protein interactions. In addition, we unexpectedly found a novel phenomenon of translation initiation.

研究分野：分子生物学

キーワード：翻訳 リボソーム 履歴 選択的スプライシング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の技術革新によって、タンパク質に比べて mRNA のゲノムワイドな同定、定量はますます簡便になっており、mRNA 量からタンパク質量を推定できれば多岐にわたる分野において生命システムの理解がより深まることは想像に難くない。しかし、細胞内のタンパク質量は mRNA 量だけでは十分に説明できず(文献) タンパク質を合成する翻訳段階の制御の総体に対する理解が依然として不足していた。タンパク質量を決める主要なパラメータとして mRNA 量の他にはタンパク質の合成速度と分解速度がある。このうちタンパク質合成速度については、mRNA の二次構造やコドン出現頻度など配列依存的な影響が歴史的に示されているが、未だ完全な予測は実現しておらず(文献) 単純な配列解析からは予測できない制御機構の存在が示唆される。そこで本研究課題では、未知の「配列非依存的な翻訳制御機構」が存在することを作業仮説として、その検証を試みることにした。

研究代表者は本研究課題以前に、合成生物学(構成的生物学)および再生医療の分野で、特に応用を目的として mRNA に付加機能を埋め込む mRNA 設計技術の研究に取り組み、様々な機能を人工的に付加した mRNA を開発してきた(文献)。このような機能的 mRNA の設計技術は世界的にみてもユニークであり、かつ研究成果も高い評価を受けていた。研究代表者はこれら mRNA の応用研究に取り組む中、mRNA 設計のアプローチが生細胞内の翻訳動態の解明に貢献できると考え、本研究課題の着想に至った。特に最近、合成生物学的なアプローチが注目されているが、単純にバイオテクノロジーの一分野としての発展が目立ち、「生物学」として生命現象のより深い理解への踏み込みが十分ではなかった。本研究課題では、構成的に設計した mRNA を起点に翻訳装置の細胞内動態を追跡することを通じて、最近の網羅的解析を含めた従来型の還元的な研究アプローチを補完しながら、生命現象の根幹をなす翻訳装置の挙動解明を目指す基礎生物学の重要な一側面としての合成生成物学研究に取り組むことを目指した。

2. 研究の目的

旧来の翻訳研究のアプローチでは、生細胞内にせよ *in vitro* 再構築系にせよ、翻訳関連因子の改変(存在量や性質)や阻害剤の添加などの実験操作によって翻訳因子の機能が検証されてきた。この場合、実験系の翻訳活性は均質であり、mRNA 上の制御モチーフや二次構造、コドン頻度など、各 mRNA の配列に依存した翻訳制御のみが想定されていることになる。そのため翻訳装置や mRNA の個々の分子の挙動は全く追跡できておらず、ある翻訳反応が次の翻訳反応に与える影響は未解明のままであった。近年のシーケンス解析技術の発展によって、リボソームと相互作用している mRNA をゲノムワイドに定量するリボソームプロファイリング法が開発され、mRNA ごとの翻訳効率を網羅的に評価できるようになってきた(文献)。このようなゲノムワイドな解析は細胞のある瞬間の状態を切り取る静的な解析には極めて高い威力を発揮するが、やはり動的な変化の前後関係を追跡することができない。そこで本研究課題では、機能的 mRNA の設計によって翻訳反応依存的に翻訳装置に履歴を残す技術を開発し、これまでの研究アプローチでは決定的に欠けていた「翻訳反応の前後関係で決定される配列非依存的な翻訳制御機構」の存在を検証することに挑んだ。

3. 研究の方法

(1) タンパク質修飾タグ化リボソームを発現する細胞株の構築

リボソームタンパク質に特異的なタグを付加し、このタグを細胞内で修飾することにより、翻訳反応の履歴をリボソーム上に残す方法の構築を目指した。まず、リボソームの立体構造に基づいて、リボソーム粒子の表面に末端が露出しているリボソームタンパク質を探索した。次に、これらのリボソームタンパク質遺伝子をクローニングし、末端にタグを付加したプラスミドベクターを構築した。これらを出芽酵母に導入して、出芽酵母染色体中の当該リボソームタンパク質遺伝子をタグ付加リボソームタンパク質遺伝子へと置換した出芽酵母株を構築した。

(2) リボソームタンパク質に付加したタグの細胞内修飾の検出

リボソームタンパク質に付加したタグを細胞内で修飾する酵素の発現ベクターを構築し、このベクターを用いて前項で構築した出芽酵母株を形質転換した。形質転換体を液体培地で培養したのち、細胞を破砕して全タンパク質をウエスタンブロット法で解析した。

(3) 修飾酵素を用いたレポーター mRNA の構築と検出

前項の修飾酵素を様々なタイプの発現ベクターに移した。特に、出芽酵母内で選択的スプライシングの再構築に挑んだ。出芽酵母の近縁種において mRNA の品質管理に関わる HBS1 と SKI7 とが選択的スプライシングによって合成されることが報告されていた(文献)ことから、この異種由来遺伝子を骨格として用いて、選択的スプライシングによって修飾酵素の発現が切り替わる発現ベクターを構築した。

(4) レポーター mRNA の検出

前項で構築した発現ベクターを用いて項(1)で構築した出芽酵母株を形質転換した。形質転換体を液体培地で培養したのち、細胞を破砕して全 RNA を抽出した。全 RNA をオリゴ dT プライマーを用いて逆転写し、定量的 PCR 法によってレポーター mRNA の発現を検出した。特に

選択的スプライシングを用いたレポーター mRNA の発現系においては、スプライシングバリエーション特異的なプライマーを設計して定量検出を実施した。

(5) 細胞内で特定の mRNA を修飾する方法の開発

本研究で主に取り組んでいたレポーター mRNA によってリボソームタンパク質を修飾する方法とは逆の研究アプローチとして、タンパク質により特定の mRNA を修飾する研究方法の開発にも取り組んだ。まず、特定の mRNA に結合する RNA 結合タンパク質と、RNA の塩基修飾酵素との融合タンパク質の発現ベクターを構築した。この発現ベクターを用いて出芽酵母株を形質転換し、得られた形質転換体を液体培地で培養したのち、細胞を破碎して全 RNA を抽出した。全 RNA をオリゴ dT プライマーを用いて逆転写したのち、特異的なプライマーを用いて特定の mRNA の一部を増幅して、次世代配列解析装置を用いたアンプリコン配列解析に供した。

4. 研究成果

(1) リボソームタンパク質の細胞内修飾

本研究では、修飾後リボソームを生理的な条件下で特異的に抽出することを目指して、細胞内でリボソームタンパク質をビオチン化する系の構築に取り組んだ。タンパク質のビオチン化酵素として大腸菌 BirA を採用し、BirA の基質ペプチドをタグとしてリボソームタンパク質と融合させた。融合させるリボソームタンパク質としては、リボソーム大サブユニットのなかでもリボソームトンネル近傍に位置し、かつ、C 末端がリボソーム表面に露出している RPL25 および RPL32 を採用した。RPL25 および RPL32 の遺伝子をクローニングし、これらの C 末端にビオチン化タグを融合させ、これを出芽酵母の染色体中の遺伝子と置換することにより、ビオチン化タグを保持したリボソームを発現する出芽酵母株の構築に成功した。

これらの出芽酵母株を BirA 発現ベクターで形質転換したのち、形質転換体を液体培養して細胞を破碎し全タンパク質を抽出した。全タンパク質を SDS-PAGE で分離後に PVDF 膜に転写し、ストレプトアビジン-HRP を用いて発光検出することにより、実際にリボソームタンパク質がビオチン化されることが確認された。さらに、ビオチン化リボソームを生理的な条件下で特異的に抽出する条件の検討も実施した。

本研究で構築した出芽酵母株とリボソームの抽出法は、本研究で目指す翻訳反応の前後関係の解明にとどまらず、生理的条件下でリボソームの特異的な構成や構成の違いに依存した機能性の検証するための実験手法として、リボソームの役割を中心とした遺伝子発現制御機構の全貌解明に貢献すると期待される。

(2) 選択的スプライシングの再構築

一般的な mRNA の解析方法では、配列自体の同一性を検証可能であっても、同一の配列を持つ別 mRNA 分子を識別することができない。そのため、翻訳反応の前後関係を解析するために、リボソームが翻訳する mRNA 分子の同一性を検証する必要があった。そこで同じ遺伝子座から転写された後に配列に多様性を生じる選択的スプライシングを出芽酵母内で再構築することとした。出芽酵母は、真核生物でありながら、多くの遺伝子がイントロンを含まない。ところが類縁の酵母で比較的大きな遺伝子が選択的スプライシングするとの報告があった（文献）ため、その遺伝子をもとに選択的スプライシングを再構築することに挑んだ。選択的スプライシングによって mRNA 上の配列が変更される領域を前項で用いた BirA に置換することにより、スプライスバリエーションの一方は BirA を含みリボソームを修飾するタンパク質を翻訳するが、もう一方は BirA を含まないためリボソームを修飾しないタンパク質を合成する構成とした。この再構築系の発現ベクターで出芽酵母を形質転換し、全 RNA を抽出して cDNA を合成した。定量的 PCR 法で解析すると期待どおりのスプライシングバリエーションの合成が確認された。ところが、cDNA に含まれる再構築系 mRNA の大多数は、期待とは異なり全くスプライシングされていなかった。スプライシング効率の向上を検討したが、劇的な効率の向上は達成できなかった。依然として反応効率に改善の余地が残ってはいるが、一定の選択的スプライシング再構築には成功していることから、本研究で取り組んだ再構築系により、今後、出芽酵母の *in vivo* におけるスプライシング研究が展開する可能性があると期待される。

(3) 当初の計画とは逆の研究アプローチの開発

一定の選択的スプライシングの再構築には成功したものの、スプライシングの効率が低く、本研究の目的である翻訳反応の前後関係を評価するには至らなかった。そのため、スプライシング効率をさらに向上させる研究と並行して、異なる研究アプローチの実験系の構築にも取り組んだ。本研究で主に取り組んでいた研究アプローチはレポーター mRNA によってリボソームタンパク質を修飾する方法だったことから、これとは逆の研究アプローチとして、タンパク質により特定の mRNA を修飾する研究方法の開発に取り組むこととした。特定の mRNA の修飾を検出するためのアプローチとしては、mRNA の塩基を修飾する酵素を用い、対象 mRNA 上の塩基修飾を次世代配列解析によって検出することとした。

レポーター mRNA の cDNA から、mRNA 上で融合タンパク質が結合する領域を含む約 450 塩基の領域を PCR 増幅したのち、反応産物を精製して次世代配列解析装置 MiSeq によるアンプリコン配列解析を実施した。得られた配列データから正確性が極めて高い 2~3 万配列を抽出

して塩基置換の頻度を解析したところ、レポーター mRNA の 9.5% で塩基置換が検出された。また、配列解析した領域内では 1 残基あたり最大 2% の塩基置換が検出され、塩基置換によって mRNA とタンパク質間の特異的な相互作用を検出することに成功した。本方法は、未だ開発の途上にあるが、これまでに解析が難しかった、リボソームを介した間接的な mRNA-タンパク質間の相互作用や、安定した mRNA-タンパク質複合体が維持されない一過的な mRNA-タンパク質間の相互作用の解析の道を開拓すると期待できる。さらに、この一連の研究アプローチの開拓の過程において、mRNA にトランスに作用するタンパク質因子依存的に非 AUG コドンから翻訳開始する予期せぬ現象を見出した。この新奇現象の成立要件の検討を通じて、翻訳開始反応の分子機構に新たな知見が得られることも期待される。

< 引用文献 >

- Schwahnhaüsser B. et al., *Nature* **473**:337–342 (2011).
Csárdi G. et al., *PLoS Genet.* **11**:e1005206 (2015).
Stapleton J.A. et al., *ACS Synth. Biol.* **1**:83–88 (2012); Endo K. et al., *Nucleic Acids Res.* **41**:e135 (2013); Endo K. et al., *Nat. Commun.* **4**:2393 (2013); Miki K. et al., *Cell Stem Cell* **16**:699–711 (2015); Wroblewska L. et al., *Nat. Biotech.* **33**:839–841 (2015); Endo K. et al., *Sci. Rep.* **6**:21991 (2016).
Ingolia N.T. et al., *Science* **324**:218–223 (2009).
Marshall A.N. et al., *PLoS Genet.* **9**:e1003376 (2013).

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計 3 件)

- 堀江 史博、遠藤 慧、伊藤 耕一：
「RNA 結合タンパク質の mRNA 結合に依存する新奇な翻訳開始反応の分子メカニズム解明」
日本分子生物学会第 41 回年会，2018 年 11 月，パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）
堀江 史博、遠藤 慧、伊藤 耕一：
「タンパク質と mRNA の結合に依存する新奇な翻訳開始反応の成立要件検証と一般化」，
2017 年度生命科学系学会合同年次大会，2017 年 12 月，神戸ポートアイランド（兵庫県神戸市）
堀江 史博、遠藤 慧、伊藤 耕一：
「非 AUG コドン翻訳開始を誘起するタンパク質応答性リボスイッチの開発」，「細胞を創る」
研究会 10.0，2017 年 10 月，京都教育文化センター（京都府京都市）

[図書](計 1 件)

- Endo, K., and Saito, H.:
“mRNA Engineering for the Control of Mammalian Cells in Medical Applications.”
In: Masuda S., Izawa S (eds.), *Applied RNA Bioscience*, Springer Singapore, pp 95-114
(2018).

[その他]

ホームページ等

<https://sites.google.com/edu.k.u-tokyo.ac.jp/keiindo>

<http://blog2014endou.japanprize.jp>

6 . 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：堀江 史博

ローマ字氏名：(HORIE, humihiro)

研究協力者氏名：本山 志織

ローマ字氏名：(MOTOYAMA, shiori)

研究協力者氏名：都竹 亜紀子

ローマ字氏名：(TSUZUKU, akiko)

研究協力者氏名：中田 絵理子

ローマ字氏名：(NAKATA, eriko)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。