
翻訳速度調節機構を基盤としたパラメトリック生物学の創成

領域番号: 20B307

令和2年度～令和4年度

科学研究費助成事業(科学研究費補助金)

(学術変革領域(B))

研究成果報告書

令和6年6月

領域代表者 土居 雅夫

京都大学・薬学研究科・教授

はじめ

本研究領域は、翻訳速度調節機構を基盤としたパラメトリック生物学の創成を目指し、令和2年10月より科学研究費助成事業 学術変革領域(B)の課題領域として研究を開始した。生物はゆるやかな変化に対応する能力として「パラメトリック型」分子機構を備えている。これは0か1のON/OFF制御ではなく、連続的な反応の「velocityの変化」が担う繊細な制御であり、これまでは往々にして見逃されてきた。本研究はパラメトリック生物学という新分野の中核として、現在刷新されつつある「翻訳速度の可変性」という概念に着目して翻訳パラメトリック生物学の創出を目指した。物理化学から生理学まで大きな階層多様性を持つ4研究班がそれぞれ翻訳速度の定量化・可視化を実現する新規技術を開発し、相互に活用することで翻訳速度を制御する未だ謎の分子機構を多面的な視点から明らかにすることに挑んだ。その結果、生命の柔軟な機能制御において翻訳が担う様々な役割を示す多くの研究成果が生まれた。本報告書は学術変革領域(B)「パラメトリック翻訳」の研究成果をまとめる。

研究組織

領域代表者 土居雅夫 京都大学薬学研究科・教授

総括班

研究代表者 土居雅夫 京都大学薬学研究科・教授

研究協力者 岩崎信太郎 国立研究開発法人理化学研究所開拓研究本部・主任研究員

研究協力者 原田慶恵 大阪大学蛋白質研究所・教授

研究協力者 岡部弘基 東京大学大学院薬学系研究科・特定准教授

研究協力者 池内与志 東京大学生産技術研究所・准教授

研究協力者 三宅崇仁 京都大学薬学研究科・助教

計画研究

(A01 班)

研究代表者 土居雅夫 京都大学薬学研究科・教授

研究協力者 三宅崇仁 京都大学薬学研究科・助教

(A02 班)

研究代表者 岩崎信太郎 国立研究開発法人理化学研究所開拓研究本部・主任研究員

(A03 班)

研究代表者 原田慶恵 大阪大学蛋白質研究所・教授

研究分担者 岡部弘基 東京大学大学院薬学系研究科・特定准教授

(A04 班)

研究代表者 池内与志穂 東京大学生産技術研究所・准教授

交付決定額(配分額)

	合計	直接経費	間接経費
令和2年度	56,940,000 円	43,800,000 円	13,140,000 円
令和3年度	51,350,000 円	39,500,000 円	11,850,000 円
令和4年度	50,310,000 円	38,700,000 円	11,610,000 円
総計	158,600,000 円	122,000,000 円	36,600,000 円

研究発表

雑誌論文(著者名、論文標題、雑誌名、査読の有無、巻、発行年(西暦)、最初と最後の頁)

1. Shao X, Miyake T, Inoue Y, Hasegawa E, Doi M: Temperature-Dependent Upregulation of Per2 Protein Expression is Mediated by eIF2 α Kinases PERK and PKR through PI3K Activation. *Biol Pharm Bull*, 査読有, 47, 2024, 600-605.
2. Sakai S, Tanaka Y, Tsukamoto Y, Kimura-Ohba S, Hesaka A, Hamase K, Hsieh C, Kawakami E, Ono H, Yokote K, Yoshino M, Okuzaki D, Matsumura H, Fukushima A, Mita M, Nakane M, Doi M, Isaka Y, Kimura T: d-Alanine affects the circadian clock to regulate glucose metabolism in kidney. *Kidney360*, 査読有, 5, 2024, 237-251.
3. Shichino Y, Yamaguchi T, Kashiwagi K, Mito M, Takahashi M, Ito T, Ingolia NT, Kuba K, Iwasaki S: eIF4A1 enhances LARP1-mediated translational repression during mTORC1 inhibition. *Nat Struct Mol Biol*, 査読有, 2024 (Online ahead of print.)
4. Apostolopoulos A, Kawamoto N, Chow SYA, Tsuiji H, Ikeuchi Y, Shichino Y, Iwasaki S: dCas13-mediated translational repression for accurate gene silencing in mammalian cells. *Nat Commun*, 査読有, 15, 2024, 2205
5. Kumakura N, Singkaravanit-Ogawa S, Gan P, Tsushima A, Ishihama N, Watanabe S, Seo M, Iwasaki S, Narusaka M, Narusaka Y, Takano Y, Shirasu K: Guanosine-specific single-stranded ribonuclease effectors of a phytopathogenic fungus potentiate host immune responses. *New Phytol*, 査読有, 242, 2024, 170-191
6. Tanaka M, Yokoyama T, Saito H, Nishimoto M, Tsuda K, Sotta N, Shigematsu H, Shirouzu M, Iwasaki S, Ito T, Fujiwara T: Boric acid intercepts 80S ribosome migration from AUG-stop by stabilizing eRF1. *Nat Chem Biol*, 査読有, 20, 2024, 605-614
7. Teyssonniere EM, Shichino Y, Mito M, Friedrich A, Iwasaki S, Schacherer J: Translation variation across genetic backgrounds reveals a post-transcriptional buffering signature in yeast. *Nucleic Acids Res*, 査読有, 52, 2024, 2434-2445
8. Chuma S, Kiyosue K, Akiyama T, Kinoshita M, Shimazaki Y, Uchiyama S, Sotoma S, Okabe K, Harada Y: Implication of thermal signaling in neuronal differentiation revealed by manipulation and measurement of intracellular temperature. *Nat Commun*, 査読有, 15, 2024, 3473
9. Osaki T, Duenki T, Chow SYA, Ikegami Y, Beaubois R, Levi T, Tamagawa-Nakagawa N, Hirano Y, Ikeuchi Y: Complex activity and short-term plasticity of human cerebral organoids reciprocally connected with axons. *Nat Commun*, 査読有, 15, 2024, 2945
10. Ikegami Y, Duenki T, Arakaki I, Sakai R, Osaki T, Ashihara S, Furushima T, Ikeuchi Y: A simple and inexpensive laser dissection of fasciculated axons from motor nerve organoids. *Front Bioeng Biotechnol*, 査読有, 12, 2024, 1259138, eCollection
11. Yamaguchi Y, Maekawa Y, Kabashima K, Mizuno T, Tainaka M, Suzuki T, Dojo K, Tominaga T, Kuroiwa S, Masubuchi S, Doi M, Tominaga K, Kobayashi K, Yamagata S,

- Itoi K, Abe M, Schwartz WJ, Sakimura K, Okamura H: An intact pituitary vasopressin system is critical for building a robust circadian clock in the suprachiasmatic nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 査読有, 120, 2023, e2308489120
12. Uehara H, Doi M: Reactivation of circadian clock-regulated intracrine activity ameliorates meibomian gland dysfunction and its associated dry eye disease. *Sapporo Symposium on Biological Rhythm Proceedings* pp, 査読有, 2023, 345-35
 13. Yoshimoto R, Nakayama Y, Nomura I, Yamamoto I, Nakagawa Y, Tanaka S, Kurihara M, Suzuki Y, Kobayashi T, Kozuka-Hata H, Oyama M, Mito M, Iwasaki S, Yamazaki T, Hirose T, Araki K, Nakagawa S: 4.5SH RNA counteracts deleterious exonization of SINE B1 in mice. *Mol Cell*, 査読有, S1097-2765, 2023, 00964-4
 14. Zhao X, Ma D, Ishiguro K, Saito H, Akichika S, Matsuzawa I, Mito M, Irie T, Ishibashi K, Wakabayashi K, Sakaguchi Y, Yokoyama T, Mishima Y, Shirouzu M, Iwasaki S, Suzuki Ta, Suzuki T: Glycosylated queuosines in tRNAs optimize translational rate and post-embryonic growth. *Cell*, 査読有, 2023186, 5517-5535, e24
 15. Matsuura-Suzuki E, Toh H, Iwasaki S: Human-rabbit hybrid translation system to explore the function of modified ribosomes. *Bio Protoc*, 査読有, 13, 2023, e4714
 16. Nagao A, Nakanishi Y, Yamaguchi Y, Mishina Y, Karoji M, Toya T, Fujita T, Iwasaki S, Miyauchi K, Sakaguchi Y, Suzuki T: Quality control of protein synthesis in the early elongation stage. *Nat Commun*, 査読有, 2023, 14, 2704
 17. Kito Y, Matsumoto A, Ichihara K, Shiraishi C, Tang R, Hatano A, Matsumoto M, Han P, Iwasaki S, Nakayama KI: The ASC-1 complex promotes translation initiation by scanning ribosomes. *EMBO J*, 査読有, 42, 2023, e112869
 18. Shiraishi C, Matsumoto A, Ichihara K, Yamamoto T, Yokoyama T, Mizoo T, Hatano A, Matsumoto M, Tanaka Y, Matsuura-Suzuki E, Iwasaki S, Matsushima S, Tsutsui H, Nakayama KI: RPL3L-containing ribosomes determine translation elongation dynamics required for cardiac function. *Nat Commun*, 査読有, 14, 2023, 2131
 19. Sotoma S, Abe H, Miyanoiri Y, Ohshima T, Harada Y: Highly Dispersed 3C Silicon Carbide Nanoparticles with a Polydopamine/Polyglycerol Shell for Versatile Functionalization. *ACS Appl. Materials & Interfaces*, 査読有, 15, 2023, 21413--21424
 20. Fukumoto K, Miyazono Y, Ueda T, Harada Y, Tadakuma H: Evaluating the two-dimensional molecular layout effect on the DNA origami-based transporter. *Nanoscale Advances*, 査読有, 5, 2023, 2590-2601
 21. Ishikawa T, Sugawara K, Zhang J, Funatsu T, Okabe K: Direct observation of cytoskeleton-dependent trafficking of miRNA visualized by the introduction of pre-miRNA. *iScience*, 査読有, 27, 2023, 108811
 22. Inomata N, Miyamoto T, Okabe K, Ono T: Measurement of cellular thermal properties and their temperature dependence based on frequency spectra via an on-chip-integrated microthermistor. *Lab on a Chip*, 査読有, 23, 2023, 2411-2420

23. Nettles SA, Ikeuchi Y, Lefton KB, Abbasi L, Erickson A, Agwu C, Papouin T, Bonni A, Gabel HW: MeCP2 represses the activity of topoisomerase II β in long neuronal genes. *Cell Rep*, 査読有, 42, 2023, 113538
24. Soma A, Kubota A, Tomoe D, Ikeuchi Y, Kawamura F, Arimoto H, Shiwa Y, Kanesaki Y, Nanamiya H, Yoshikawa H, Suzuki T, Sekine Y: yaaJ, the tRNA-Specific Adenosine Deaminase, Is Dispensable in *Bacillus subtilis*. *Genes (Basel)*, 査読有, 14, 2023, 1515
25. Miyake T, Inoue Y, Shao X, Seta T, Aoki Y, Nguyen Pham KT, Shichino Y, Sasaki J, Sasaki T, Ikawa M, Yamaguchi Y, Okamura H, Iwasaki S, Doi M: Minimal upstream reading frame of Per2 mediates phase fitness of the circadian clock to day/night physiological body temperature rhythm. *Cell Rep*, 査読有, 42, 2023, 112157
26. Chen M, Kumakura N, Saito H, Muller R, Nishimoto M, Mito M, Gan P, Ingolia NT, Shirasu K, Ito T, Shichino Y, Iwasaki S: A parasitic fungus employs mutated eIF4A to survive on rocaglate-synthesizing *Aglaia* plants. *eLife*, 査読有, 12, 2023, e81302
27. Yamashita A, Shichino Y, Fujii K, Koshidaka Y, Adachi M, Sasagawa E, Mito M, Nakagawa S, Iwasaki S, Takao K, Shiina N: ILF3 prion-like domain regulates gene expression and fear memory under chronic stress. *iScience*, 査読有, 26, 2023, 106229
28. Saito H, Osaki T, Ikeuchi Y, Iwasaki S: High-throughput assessment of mitochondrial protein synthesis in mammalian cells using mito-FUNCAT FACS. *Bio Protoc*, 査読有, 13, 2023, e4602
29. Hamada Y, Sasaki L, Uehara H, Suzuki T, Kinoshita S, Otsuka K, Kihara A, Yamaguchi Y, Miyake T, Doi M: Optimising the method for visualising mouse meibomian gland using eyelid whole-mount lipid staining. *Ocul Surf*, 査読有, 26, 2022, 268-270
30. Yamamoto A, Takahashi Y, Inuki S, Nakagawa S, Nakao K, Ohno H, Doi M, Takakura Y: The identification of novel small extracellular vesicle (sEV) production modulators using luciferase-based sEV quantification method. *J Extracell Biol*, 査読有, 1, 2022, e62
31. Yamaguchi Y, Murai I, Takeda M, Doi S, Seta T, Hanada R, Kangawa K, Okamura H, Miyake T, Doi M: Nmu/Nms/Gpr176 triple-deficient mice show enhanced light-resetting of circadian locomotor activity. *Biol Pharm Bull*, 査読有, 45, 2022, 1172-1179
32. Tsujihana K, Tanegashima K, Santo Y, Yamada H, Akazawa S, Nakao R, Tominaga K, Saito R, Nishito Y, Hata R, Nakamura T, Murai I, Kono Y, Sugawa M, Tanioka M, Egawa G, Doi M, Isa T, Kabashima K, Hara T, Okamura H: Circadian protection against bacterial skin infection by epidermal CXCL14-mediated innate immunity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 査読有, 119, 2022, e2116027119
33. Matsuo M, Seo K, Taruno A, Mizoro Y, Yamaguchi Y, Doi M, Nakao R, Kori H, Abe T, Ohmori H, Tominaga K, Okamura H: A light-induced small G-protein gem limits the circadian clock phase-shift magnitude by inhibiting voltage-dependent calcium channels. *Cell Rep*, 査読有, 39, 2022, 110844

34. Zhao T, Chida A, Shichino Y, Choi D, Mizunuma M, Iwasaki S, Ohya Y: Multifarious translational regulation during replicative aging in yeast. *J Fungi (Basel)*, 査読有, 8, 2022, 938
35. Chhipi-Shrestha JK, Yoshida M, Iwasaki S: Filter trapping protocol to detect aggregated proteins in human cell lines. *STAR Protoc*, 査読有, 3, 2022, 101571
36. Matsuura-Suzuki E, Shimazu T, Takahashi M, Kotoshiba K, Suzuki T, Kashiwagi K, Sohtome Y, Akakabe M, Sodeoka M, Dohmae N, Ito T, Shinkai Y, Iwasaki S: METTL18-mediated histidine methylation of RPL3 modulates translation elongation for proteostasis maintenance. *eLife*, 査読有, 11, 2022, e72780
37. Yamada A, Toya H, Tanahashi M, Kurihara M, Mito M, Iwasaki S, Kurosaka S, Takumi T, Fox A, Kawamura Y, Miura K, and Nakagawa S: Species-specific formation of paraspeckles in intestinal epithelium revealed by characterization of NEAT1 in naked mole-rat. *RNA*, 査読有, 28, 2022, 1128-1143
38. Shichino Y, Iwasaki S: Compounds for selective translational inhibition. *Curr Opin Chem Biol*, 査読有, 69, 2022, 102158
39. Ferdinandus, Suzuki M, Vu Cong Quang, Harada Y, Sarker Satya Ranjan, Ishiwata S, Kitaguchi T, Arai S: Modulation of Local Cellular Activities using a Photothermal Dye-Based Subcellular-Sized Heat Spot. *ACS Nano*, 査読有, 16, 2022, 9004-9018
40. Oyama K, Zeeb Vadim, Yamazawa T, Kurebayashi N, Kobirumaki-Shimozawa F, Murayama T, Oyamada H, Noguchi S, Inoue T, Inoue Y U, Nishino I, Harada Y, Fukuda N, Ishiwata S, Suzuki M: Heat-hypersensitive mutants of ryanodine receptor type 1 revealed by microscopic heating. *Proc Natl Acad Sci USA*, 査読有, 119, 2022, e2201286119
41. Matsui Y, Takemura N, Shirasaki Y, Takahama M, Noguchi Y, Ikoma K, Pan Yixi, Nishida S, Taura M, Nakayama A, Funatsu T, Misawa T, Harada Y, Sunazuka T, Saitoh T: Nanaomycin E inhibits NLRP3 inflammasome activation by preventing mitochondrial dysfunction. *Int Immunol*, 査読有, 34, 2022, 505-518
42. Sotoma S, Okita H, Chuma S, Harada Y: Quantum nanodiamonds for sensing of biological quantities: Angle, temperature, and thermal conductivity. *Biophys Physicobiol*, 査読有, 19, 2022
43. Nakamura T, Sakamoto J, Okabe K, Taniguchi A, Yamada T G, Nonaka S, Kamei Y, Funahashi A, Tominaga M, Hiroi N F: Temperature elevation detection in migrating cells. *Optics Continuum*, 査読有, 1, 2022, 1085-1085
44. Chow Siu Yu A, Nakayama K, Osaki T, Sugiyama M, Yamada M, Takeuchi H, Ikeuchi Y: Human sensory neurons modulate melanocytes through secretion of RGMB. *Cell Rep*, 査読有, 40, 2022, 111366-111366

45. Murata K, Saibe Y, Uchida M, Aono M, Misawa R, Ikeuchi Y, Ishii K: Two-photon, red light uncaging of alkyl radicals from organorhodium(iii) phthalocyanine complexes. *Chem Commun*, 査読有, 58, 2022, 11280-11283
46. Chow Siu Yu A, Hu Huaruo, Osaki T, Levi Timothée, Ikeuchi Y: Advances in construction and modeling of functional neural circuits in vitro. *Neurochem Res*, 査読有, 47, 2022, 2529-2544
47. Chow Siu Yu A, Nakanishi Y, Kaneda S, Ikeuchi Y: Modeling Axonal Degeneration Using Motor Nerve Organoids. *Methods Mol Biol.*, 査読有, 2515, 2022, 89-97
48. Wu Xiaobin, Park Jongho, Chow Siu Yu A, Kasuya Maria Carmelita Z, Ikeuchi Y, Kim Beomjoon: Mammalian HEMK1 methylates glutamine residue of the GGQ motif of mitochondrial release factors. *Sci Rep*, 査読有, 12, 2022, 4104
49. Yamaguchi T, Usami N, Misumi K, Toyokura A, Higo A, Ono S, Hwang Gilgueng, Larrieu Guilhem, Ikeuchi Y, Tixier-Mita Agnes, Saito K, Levi Timothee, Mita Y: Self-Deformable Flexible MEMS Tweezer Composed of Poly(Vinylidene Fluoride)/Ionic Liquid Gel for Electrical Measurements and Soft Gripping. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 査読有, 31, 2022, 802-812
50. Sasaki L, Hamada Y, Daisuke Yarimizu D, Suzuki T, Nakamura H, Shimada A, Nguyen Pham KT, Shao X, Yamamura K, Inatomi T, Morinaga H, Nishimura EK, Kudo F, Manabe I, Haraguchi S, Sugiura Y, Suematsu M, Kinoshita S, Machida M, Nakajima T, Hiroshi Kiyonari H, Okamura H, Yamaguchi Y, Miyake T, Doi M: Intracrine activity involving NAD-dependent circadian steroidogenic activity governs age-associated meibomian gland dysfunction *Nat Aging*, 査読有, 2, 2022, 105–114
51. Fang Q, Kimura Y, Shimazu T, Suzuki T, Dohmae N, Iwasaki S, Shinkai Y: Mammalian HEMK1 methylates glutamine residue of the GGQ motif of mitochondrial release factors. *Sci Rep*, 査読有, 12, 2022, 4104,
52. Kimura Y, Saito H, Osaki T, Ikegami Y, Wakigawa T, Ikeuchi Y, Iwasaki S: Mito-FUNCAT-FACS reveals cellular heterogeneity in mitochondrial translation. *RNA*, 査読有, 28, 2022, 895-904
53. Apostolopoulos A and Iwasaki S: Into the matrix: current methods for mitochondrial translation studies. *J Biochem*, 査読有, 171, 2022, 379-387
54. Wu Q, Shichino Y, Abe T, Suetsugu T, Omori A, Kiyonari H, Iwasaki S, Matsuzaki F: Selective translation of epigenetic modifiers affects the temporal pattern and differentiation of neural stem cells. *Nat Commun*, 査読有, 13, 2022, 470
55. Mishima Y, Han P, Ishibashi K, Kimura S, Iwasaki S: Ribosome slowdown triggers codon-mediated mRNA decay independently of ribosome quality control. *EMBO J*, 査読有, 41, 2022, e109256

56. Fujita T, Yokoyama T, Shirouzu M, Taguchi H, Ito T, Iwasaki S: The landscape of translational stall sites in bacteria revealed by monosome and disome profiling. *RNA*, 査読有, 28, 2022, 290-302
57. Chhipi Shrestha JK, Schneider-Poetsch T, Suzuki T, Mito M, Khan K, Dohmae N, Iwasaki S, Yoshida M: Splicing modulators elicit global translational repression by condensate-prone proteins translated from introns. *Cell Chem Biol*, 査読有, 29, 2022, 259-275, e10
58. Murakami A, Nagao K, Sakaguchi R, Kida K, Hara Y, Mori Y, Okabe K, Harada Y, Umeda M: Cell-autonomous control of intracellular temperature by unsaturation of phospholipid acyl chains. *Cell Rep*, 査読有, 38, 2022, 110487
59. Wu X, Park J, Chow Siu Yu A, Kasuya Maria Carmelita Z, Ikeuchi Y, Kim B: Localised light delivery on melanoma cells using optical microneedles. *Biomed Opt Express*, 査読有, 13, 2022, 1045-1045
60. Yamaguchi Y, Murai I, Goto K, Doi S, Zhou H, Setsu G, Shimatani H, Okamura H, Miyake T, Doi M: Gpr19 is a circadian clock-controlled orphan GPCR with a role in modulating free-running period and light resetting capacity of the circadian clock. *Sci Rep*, 査読有, 11, 2021, 22406
61. Kashiwagi K, Shichino Y, Osaki T, Sakamoto A, Nishimoto M, Takahashi M, Mito M, Weber F, Ikeuchi Y, Iwasaki S, Ito T: eIF2B-capturing viral protein NSs suppresses the integrated stress response. *Nat Commun*, 査読有, 12, 2021, 7102
62. Chadani Y, Sugata N, Niwa T, Ito Y, Iwasaki S, Taguchi H: Nascent polypeptide within the exit tunnel stabilizes the ribosome to counteract risky translation. *EMBO J*, 査読有, 40, 2021, e108299
63. Ichihara K, Matsumoto A, Nishida H, Kito Y, Shimizu H, Shichino Y, Iwasaki S, Imami K, Ishihama Y, Nakayama KI: Combinatorial analysis of translation dynamics reveals eIF2 dependence of translation initiation at near-cognate codons. *Nucleic Acids Res*, 査読有, 49, 2021, 7298-7317
64. Iwakawa HO, Lam YWA, Mine A, Fujita T, Kiyokawa K, Yoshikawa M, Takeda A, Iwasaki S, Tomari Y: Ribosome stalling caused by the Argonaute-miRNA-SGS3 complex regulates production of secondary siRNA biogenesis in plants. *Cell Rep*, 査読有, 35, 2021, 109300
65. Makino S, Kawamata T, Iwasaki S, Ohsumi Y: Selectivity of mRNA degradation by autophagy. *Nat Commun*, 査読有, 12, 2021, 2316
66. Sotoma S, Harada Y: Composite Quantum Sensors Based on Fluorescent Nanodiamonds for Intracellular Controlled Heating in Living Cells. *ACS Applied Nano Materials*, 査読有, 4, 2021, 3969-3976

67. Okamoto K, Watanabe M T, Horie M, Nishiyama M, Harada Y, Fujita H: Pressure-induced changes on the morphology and gene expression in mammalian cells. *Biol Open*, 査読有, 10, 2021, bio058544
68. Okabe K, Uchiyama S: Intracellular thermometry uncovers spontaneous thermogenesis and associated thermal signaling. *Commun Biol*, 査読有, 4, 2021, 1377
69. Misawa R, Ikeuchi Y: Light-Induced Differentiation of Forebrain Organoids by NVOC-SAG. *Methods Mol Biol*, 査読有, 2374, 2021, 185-194
70. Mitsuzawa S, Suzuki N, Akiyama T, Ishikawa M, Sone T, Kawada J, Funayama R, Shirota M, Mitsuhashi H, Morimoto S, Ikeda K, Shijo T, Ohno A, Nakamura N, Ono H, Ono R, Osana S, Nakagawa T, Nishiyama A, Izumi R, Kaneda S, Ikeuchi Y, Nakayama K, Fujii T, Warita H, Okano H, Aoki M: Reduced PHOX2B stability causes axonal growth impairment in motor neurons with TARDBP mutations. *Stem Cell Rep*, 査読有, 16, 2021, 1527-1541
71. Hiroyuki Shimatani, Yuichi Inoue, Yota Maekawa, Takahito Miyake, Yoshiaki Yamaguchi, Masao Doi: Thermographic imaging of mouse across circadian time reveals body surface temperature elevation associated with non-locomotor body movements. *PLoS One*, 査読有, 16, 2021, e0252447
72. Matsuo M, Seo K, Mizuguchi N, Yamazaki F, Urabe S, Yamada N, Doi M, Tominaga K, Okamura H: Role of $\alpha 2\delta 3$ in Cellular Synchronization of the Suprachiasmatic Nucleus Under Constant Light Conditions. *Neuroscience*, 査読有, 461, 2021, 1-10
73. Lin Heng, Huang Yen-Sung, Fustin Jean-Michel, Doi M, Chen Huatao, Lai Hui-Huang, Lin Shu-Hui, Lee Yen-Lurk, King Pei-Chih, Hou Hsien-San, Chen Hao-Wen, Young Pei-Yun, Chao Hsu-Wen: Hyperpolyploidization of hepatocyte initiates preneoplastic lesion formation in the liver. *Nat Commun*, 査読有, 12, 2021, 645
74. Makino S, Kawamata T, Iwasaki S, Ohsumi Y: Selectivity of mRNA degradation by autophagy. *Nat Commun*, 査読有, 12, 2021, 2316
75. Yoshimoto R, Chhipi-Shrestha JK, Schneider-Poetsch T, Furuno M, Burroughs AM, Noma S, Suzuki H, Hayashizaki Y, Mayeda A, Nakagawa S, Kaida D, Iwasaki S, Yoshida M: Spliceostatin A interaction with SF3B1 limits U1 snRNP availability and causes premature cleavage and polyadenylation. *Cell Chem Biol*, 査読有, S2451-9456, 2021, 00111-00112
76. Higashi H, Kato Y, Fujita T, Iwasaki S, Nakamura M, Nishimura Y, Takenaka M, Shikanai T: The pentatricopeptide repeat protein PGR3 is required for the translation of petL and ndhG by binding their 5'UTRs. *Plant Cell Physiol* pcaa180, 査読有, 62, 2021, 1146-1155
77. Chen M, Asanuma M, Takahashi M, Shichino Y, Mito M, Fujiwara K, Saito H, Floor SN, Ingolia NT, Sodeoka M, Dodo K, Ito T, Iwasaki S: Dual targeting of DDX3 and eIF4A by the translation inhibitor rocaglamide A. *Cell Chem Biol*, 査読有, 28, 2021, 475-486

78. Sotoma S, Chongxia Zhong, James Chen Yong Kah, Yamashita H, Taras Plakhotnik, Harada Y*, Suzuki M*: In situ measurement of intracellular thermal conductivity using heater-thermometer hybrid diamond nanosensor. *Sci Adv*, 査読有, 7, 2021, eabd7888 (*corresponding authors)
79. Nakayama K, Sassa S, Sugiyama M, Kurosumi M, Nishikori S, Chow Siu Yu A, Suzuki T, Ikeuchi Y: Three-dimensional imaging of the hyperpigmented skin of senile lentigo reveals underlying higher density intracutaneous nerve fibers. *J Dermatol Sci*, 査読有, 102, 2021, 72-75
80. Nagayoshi Y, Chujo T, Hirata S, Nakatsuka H, Chen CW, Takakura M, Miyauchi K, Ikeuchi Y, Carlyle BC, Kitchen RR, Suzuki T, Katsuoka F, Yamamoto M, Goto Y, Tanaka M, Natsume K, Nairn AC, Suzuki T, Tomizawa K, Wei FY: Loss of *Ftsj1* perturbs codon-specific translation efficiency in the brain and is associated with X-linked intellectual disability. *Sci Adv*, 査読有, 7, 2021, eabf3072
81. Misawa R, Minami T, Okamoto A, Ikeuchi Y: Light-inducible control of cellular proliferation and differentiation by a Hedgehog signaling inhibitor. *Bioorg Med Chem*, 査読有, 38, 2021, 116144
82. Nakagawa S, Nguyen Pham Khanh Tien, Shao Xinyan, Doi M: Time-Restricted G-Protein Signaling Pathways via GPR176, Gz, and RGS16 Set the Pace of the Master Circadian Clock in the Suprachiasmatic Nucleus. *Int J Mol Sci*, 査読有, 21, 2020, 5055
83. Mito M, Mishima Y, and Iwasaki S: Protocol for Disome Profiling to Survey Ribosome Collision in Humans and Zebrafish. *STAR Protoc*, 査読有, 1, 2020, 100168
84. Wakamori M, Okabe K, Ura K, Funatsu T, Takinoue M, Umehara T: Quantification of the effect of site-specific histone acetylation on chromatin transcription rate. *Nucleic Acids Res*, 査読有, 48, 2020, 12648-12659
85. Ivana Duic, Tadakuma H, Harada Y, Yamaue R, Deguchi K, Suzuki Y, Yoshimura S, Kato H, Takeyasu K, Fujita T: Viral RNA recognition by LGP2 and MDA5, and activation of signaling through step-by-step conformational changes. *Nucleic Acids Res*, 査読有, 48, 2020, 11664-11674
86. Osaki T, Chow SYA, Nakanishi Y, Hernandez Joel, Kawada J, Fujii T, Ikeuchi Y: Three-Dimensional Motor Nerve Organoid Generation. *J Vis Exp*, 査読有, 163, 2020
87. Shaik FA, Ihida S, Ikeuchi Y, Tixier-Mita A, Toshiyoshi H: TFT sensor array for real-time cellular characterization, stimulation, impedance measurement and optical imaging of in-vitro neural cells. *Biosens Bioelectron*, 査読有, 169, 2020, 112546
88. 三宅崇仁, 土居雅夫: 最小単位 uORF 翻訳を介した体内時計調律: ゆるやかな体温変動にしなやかに調和する時計の仕組み. *生化学*, 査読無, 95, 2023, 837-841
89. 蕭穂文, 土居雅夫: マイボーム腺のアンチエイジング. *Monthly Book OCULISTA*, 査読無, 126, 2023, 16-20

90. 濱田悠貴, 土居雅夫: 体内時計とドライアイ. *Precision Medicine*, 査読無, 6, 2023, 30-33
91. 蕭穂文, 土居雅夫: Nicotinamide mononucleotide for the potential treatment of age-associated dry eye disease. *MEDCHEM NEWS*, 査読無, 33, 2023, 16-20
92. 上原日佳梨, 土居雅夫: イントラクライン機構の再活性化による加齢性ドライアイ軽減—NAD⁺とサーカディアンリズムが鍵—. *Geriatric Medicine*, 査読無, 61, 2023, 35-38
93. 土居雅夫, 佐々木玲奈, 濱田悠貴, 鎗水大介: NAD⁺によるイントラクラインを介した加齢性ドライアイ軽減法. *実験医学*, 査読無, 40, 2022, 2168-2171
94. 三宅崇仁, 土居雅夫: Roles of the circadian clock mechanism in the regulation of daily rhythms of body temperature. *BRAIN and NERVE*, 査読無, 74, 2022, 159-166
95. 濱田悠貴, 山口賀章, 土居雅夫: 老化と体内時計: 加齢による脳内中枢時計の機能低下を中心に. *Geriatric Medicine*, 査読無, 59, 2021, 683-687
96. 土居雅夫: 時間生物学と医療の融合—現状と将来—. *Medical Science Digest*, 査読無, 47, 2021, 6-8
97. Nguyen Pham Khanh Tien, 土居雅夫: 時計遺伝子の転写のシス制御エレメントに点変異を入れると体内時計はどうなるのか. *生化学*, 査読無, 92, 2020, 735-739
98. 戸室幸太郎, 藤博貴, 岩崎信太郎: リボソームプロファイリング法の拡張によるトランスクリプトームの多面的理解. *実験医学*, 査読無, 41, 2023, 2369-2375
99. 岩崎信太郎, 吉田稔: スプライシング阻害と翻訳制御. *生化学*, 査読無, 94, 2022, 819-828
100. 松浦絵里子, 岩崎信太郎: リボソームタンパク質の修飾と翻訳制御. *細胞*, 査読無, 54, 2022, 684-687
101. 市原知哉, 岩崎信太郎, 松本有樹修: 未注釈 ORF の同定とその生理機能. *実験医学*, 査読無, 40, 2022, 2003-2010
102. 岩崎信太郎: ダイソームプロファイリング法によるリボソーム衝突の網羅探索. *生化学*, 査読無, 94, 2022, 87-91
103. 七野悠一, 岩崎信太郎: RNP 顆粒研究を加速するトランスクリプトーム解析技術. 相分離生物学の全貌 現代化学増刊, 査読無, 2020, 368-372
104. 外間進悟, 原田慶恵: 量子センサーを用いた生細胞観察. *光学*, 査読無, 49, 2020, 311-316
105. 外間進悟, 鈴木団, 原田慶恵: 細胞の熱伝導率を定量する—量子センサーによるナノバイオセンシング—. *化学*, 査読無, 76, 2021, 32-36

学会発表（発表者名、発表標題、学会等名、発表年）

1. Masao Doi: The role of the minimal upstream open reading frame of Per2. China-Japan Chronobiology Summit Forum, 2023
2. Masao Doi: Intracrine activity in the meibomian gland: A nexus between circadian clock and MGD. The 29th Annual Meeting of Kyoto Cornea Club, 2023
3. Masao Doi: A new regulatory RNA sequence: the minimal upstream open reading frame of Per2 has a role in temperature entrainment. Gordon Research Conference, Chronobiology, 2023
4. Masao Doi: Circadian intracrine activity governs age-associated meibomian gland dysfunction and evaporative dry eye disease. Sapporo Symposium on BIOLOGICAL RHYTHM 2022, 2022
5. Masao Doi: Circadian steroidogenesis and ageing-associated disease. XVII EUROPEAN BIOLOGICAL RHYTHMS SOCIETY CONGRESS, 2022
6. Masao Doi: Time as medicine — Impact of rejuvenating circadian transcriptional and metabolic activity. International Symposium Metabolic Medicine: Decoding Cellular Plasticity, In Memory of Paolo Sassone-Corsi, University of California, 2022
7. Masao Doi: Circadian clock: disease etiology and drug target exploration. The 5th Asian Forum on Chronobiology , 2021
8. Masao Doi: Time as medicine and disease etiology. The CFBT Summer Showcase, 2021
9. Masao Doi: Reactivation of circadian clock-regulated intracrine activity ameliorates meibomian gland dysfunction and its associated dry eye disease. 第 100 回日本生理学会大会, 2023
10. 土居雅夫: 体内時計プログラムに基づく健康長寿・良質睡眠への新アプローチ. 京都銀行×京都大学特別共同セミナー「健康長寿と未来に繋ぐ社会貢献」, 2022
11. 土居雅夫: 新奇のイントラクライン機構を介した加齢性眼疾患・ドライアイ症治療法の開発—NAD⁺要求性ステロイド合成のサーカディアンリズムが鍵—. 第 10 回 AAA (Academy of Aging and Cardiovascular-Diabetes Research), 2022
12. 土居雅夫: 生体リズムを基盤とした時間医薬科学の展開. 日本薬学会東海支部主催特別講演会, 2021
13. 土居雅夫: 高血圧症の病理・薬理における時間生物学視点. Premium Hypertension Conference, 2021
14. Masao Doi: Research for drug discovery aimed at circadian rhythm regulation by time-restricted gating of G-protein signaling. 第 85 回日本循環器学会学術集会, 2021
15. 土居雅夫: 時計遺伝子のシス制御エレメントが個体の活動や生理リズムの維持に与える影響の範囲・限界. 第 43 回日本分子生物学会年会, 2020

16. 土居雅夫: 脳内サーカディアンリズム中枢を制御する時間選択的 G タンパク質シグナル伝達経路 GPR176-Gz-RGS16 の役割. 第 93 回日本生化学会大会, 2020
17. Iwasaki S: Advanced tricks in ribosome profiling. Hong Kong RNA Club, 2024
18. Iwasaki S: Survey of aggregation-prone proteins and Hero protein clients. RIKEN Pioneering project “Biology of Intracellular Environments” International Symposium 2024, 2024
19. Iwasaki S: HT-Thor-Ribo-Seq: high-throughput ribosome profiling platform with RNA-dependent RNA amplification. EMBO Workshop, RNA MEETS PROTEIN DECAY, 2023
20. Iwasaki S: Gravitational and mechanical forces drive mitochondrial translation through cell adhesion-FAK axis. The 33rd Tokyo RNA Club, 2022
21. Iwasaki S: Biology of RocA, a sequence-selective translation inhibitor. The 30th Tokyo RNA Club, 2022
22. Iwasaki S: Gravity activates mitochondrial translation through cell adhesion-FAK axis. The 44th Annual Meeting of The Molecular Biology Society of Japan (MBSJ2021), 2021
23. Iwasaki S: Genome-wide survey of ribosome traverse. RIKEN-KFU 3rd Joint Symposium, 2021
24. Iwasaki S: A specific eIF4A paralog facilitates LARP1-mediated translation repression during mTORC1 inhibition. Mini-symposium on RNA Biology and Therapeutics [Basic Science (IBS) and Seoul National University (SNU), Korea], 2021
25. 岩崎信太郎: HT-Thor-Ribo-Seq: ribosome profiling tailored for ultra-low inputs and massive parallel samples. 第 2 回タンパク質シンポジウム (JST/AMED), 2024
26. Iwasaki S: HT-Thor-Ribo-Seq: high-throughput ribosome profiling platform with RNA-dependent RNA amplification. 1st OIST-RIKEN meeting, 2023
27. 岩崎信太郎: 翻訳の網羅的理解/ Genome-wide understanding of translation. 第 96 回日本生化学会大会 (日本生化学会奨励賞受賞講演), 2023
28. 岩崎信太郎: HT-Thor-Ribo-Seq: 超微量試料かつ大量検体からの翻訳網羅解析/ HT-Thor-Ribo-Seq: ribosome profiling tailored for ultra-low inputs and massive parallel samples. 第 44 回日本炎症・再生医学会、大阪、2023
29. 岩崎信太郎: Genome-wide survey of ribosome traversal/翻訳網羅解析. 日本人類遺伝学会第 67 回大会, 2022
30. 岩崎信太郎: Genome-wide survey of ribosome traversal/翻訳の網羅的理解. 第 45 回日本分子生物学会年会, 2022
31. 岩崎信太郎: Genomic, biochemical, and structural bases of an mRNA-selective natural translation inhibitor/天然翻訳阻害剤 rocaglate の生物学. 第 51 回日本環境変異原ゲノム学会, 2022

32. 岩崎信太郎:翻訳阻害剤の隠れた mRNA 配列特異性. 日本計算法学生物学会 (The Chem-Bio informatics Society [CBI]学会) 2022 年大会, 2022
33. 岩崎信太郎: Isolation and dissection of cellular environments. RIKEN Pioneering project “Biology of Intracellular Environments” workshop 2022, 2022
34. 岩崎信太郎: A specific eIF4A paralog facilitates LARP1-mediated translation repression during mTORC1 inhibition. 第 59 回日本生物物理学学会年会, 2021
35. 岩崎信太郎: METTL18-mediated histidine methylation on RPL3 modulates translation elongation for proteostasis maintenance. 第 15 回日本臨床ストレス応答学会「マルチファセット・プロテインズ」, 2021
36. 岩崎信太郎: eIF2B 結合性ウイルスタンパク質 NSs による統合的ストレス応答抑制. 第 94 回日本生化学大会, 2021 年
37. 岩崎信太郎: 葉緑体翻訳と細胞質 mRNA 調節のシンクロナイゼーション. 第 62 回日本植物生理学会年会, 2021
38. 岩崎信太郎: 抗がん作用をもつ小分子 Rocaglamide A による DDX3 と eIF4A を介した二重翻訳阻害. 第 93 回日本生化学大会, 2020
39. Shunsuke Chuma, Kohki Okabe, Yoshie Harada: Involvement of intracellular temperature in neuronal differentiation. 第 15 回生命医科学研究所ネットワーク国際シンポジウム, 2020
40. 福本紘大, 宮菌侑也, 多田隈尚史, 原田慶恵: DNA オリガミを用いたキネシン-1 の空間配置が輸送複合体の協調運動に与える影響の解析. 日本分子生物学会第 43 回年会, 2020
41. 外間進悟, 仲崇霞, 鈴木団, 張煥正, 原田慶恵: 高度に機能制御されたダイヤモンド量子センサによる細胞内センシングの実績. 量子生命科学会第 2 回大会, 2020
42. 岡部弘基: 細胞内温度イメージングによる温度シグナリング研究. 東京理科大学ニューロ・ナノ懇談会, 2020
43. 外間進悟, 鈴木団, 原田慶恵: 細胞内熱伝導率の計測. 光・量子デバイス研究会 超スマート社会の構築に繋がる革新的材料創出に向けた光・量子ビーム応用技術調査専門委員会, 2021
44. Shingo Sotoma, Madoka Suzuki and Yoshie Harada: Measurements of intracellular thermal conductivity using heater-thermometer hybrid diamond nanosensors. 17th International Conference of Computational Methods in Sciences and Engineering, 2021
45. 原田慶恵: ナノダイヤモンドを用いた細胞内イメージング. 第 38 回医用高分子研究会 講座～生体イメージングの最前線～, 2021
46. Shingo Sotoma, Shunsuke Chuma, Koki Okabe and Yoshie Harada: Intracellular thermometry with fluorescent polymer sensor and nanodiamond. Pacifichem, 2021

47. 中馬俊祐, 岡部弘基, 原田慶恵: 細胞内温度イメージングを用いた神経分化機構の解明. 2022 年生体運動研究合同班会議, 2022
48. 岡部弘基, 寶田雅治, 船津高志: 細胞内温度イメージングによる細胞内伝熱工学. 日本生物工学会大会, 2021
49. 岡部弘基: Intracellular thermal signaling facilitates translation control. 第 59 回日本生物物理学会年会, 2021
50. 原田慶恵: 蛍光高分子温度センサーと蛍光ナノダイヤモンドを使用した細胞内温度計測. 第 10 回 Organelle zone seminar, 2022
51. 原田慶恵: 神経細胞の分化における細胞内温度の関与. 第 22 回日本蛋白質科学会年会, 2022
52. Yoshie Harada: Intracellular thermometry with fluorescent polymer sensor and nanodiamond. The 15th Asia Pacific Physics Conference (APPC15) Biological Physics, 2022
53. 原田慶恵: 細胞内温度イメージング. 第 62 回生物物理若手の会 夏の学校 2022, 2022
54. Masato Kaya, Hideki Itoh, Yoshie Harada, Birgitte E. Lane, Madoka Suzuki: Time-course analysis of mutant keratin filament dynamics in cultured epidermal cells under thermal stress using a local heating method. 第 60 回生物物理学会年会, 2022
55. Chujie Liu, Takashi Murayama, Toshiko Yamazawa, Kotaro Oyama, Yoshie Harada, Madoka Suzuki: Malignant hyperthermia-implicated heat hypersensitive mutations in the central region of RyR1 channel studied by a local heat pulse method. 第 60 回生物物理学会年会, 2022
56. 福本紘大, 村山祐子, Liu Yuxiang, Wang Bingxun, 伊藤耕一, 原田慶恵, 関根俊一, 多田隈尚史: DNA origami-based supermolecule purification from bacterial lysate. 第 23 回日本 RNA 学会年会, 2022
57. 中馬俊祐, 大喜多弘隆, 外間進悟, 岡部弘基, 原田慶恵: 蛍光性ナノダイヤモンドを用いた神経分化における細胞内温度計測. 量子生命科学会第 4 回大会, 2022
58. Shunsuke Chuma, Hirotaka Okita, Shingo Sotoma, Kohki Okabe Yoshie Harada: Contribution of intracellular thermogenesis to neural differentiation. 第 60 回生物物理学会年会, 2022
59. 大喜多弘隆, 外間進悟, 中馬俊祐, 鈴木団, 原田慶恵: 高分散化表面修飾ナノダイヤモンドの細胞移行と細胞内標的部位への局在化の試み. 量子生命科学会第 4 回大会, 2022
60. 大喜多弘隆, 外間進悟, 中馬俊祐, 鈴木団, 原田慶恵: Reserach on the development of localizsd highly dispered surface modified nanodiamond and their cellular uptake. 第 60 回生物物理学会年会, 2022

61. 神谷奈央子, 岡部弘基, 船津高志: Thermal signaling mechanisms of translational control in eukaryotic cells. 第 60 回日本生物物理学会年, 2022
62. Kohki Okabe: Temperature Mapping in a Single Living Biological Cell. The 13th Asian Thermophysical Properties Conference (ATPC 2022), 2022
63. 岡部弘基: 細胞内局所温度変動の機構と意義. 第二回バイオソフトマターメディカル研究会, 2023
64. 池内与志穂: Organoids-on-a-chip models for understanding neuronal circuits and underlying protein synthesis regulations. 第 59 回日本生物物理学学会年会, 2021
65. 池内与志穂: An Organoids-on-a-chip Approach for Modeling Macroscopic Neural Circuits in vitro. 第 44 回神経科学学会大会, 2021
66. 池内与志穂: Organoids-on-a-chip models for understanding neuronal circuits and underlying protein synthesis regulations. 第 43 回日本分子生物学会年会, 2021
67. 池内与志穂: Advanced Complexity and Plasticity of Neural Activity in Reciprocally Connected Human Cerebral Organoids. Neuro2022, 2022
68. 池内与志穂: Organoids-on-a-chip models for understanding neuronal circuits and underlying protein synthesis regulations. The 29th Tokyo RNA Club, 2022
69. 池内与志穂: 大脳オルガノイドをつなげて神経回路を創る. 細胞を作る研究会, 2022
70. 池内与志穂: 神経オルガノイドを用いた神経のしなやかな翻訳調節とその機能の探索. 日本生化学学会, 2022
71. 池内与志穂: 末梢神経オルガノイドチップの開発と応用. 第 33 回日本末梢神経学会学術集会, 2022

図書 (著者名、出版社名、書名、発行年(西暦)、総ページ数)

1. 嶋谷寛之, 土居雅夫: エヌ・ティー・エス出版, 膜タンパク質工学ハンドブック, 体内時計の中樞を調節する G 蛋白質共役型受容体, 2020, 5

産業財産権

出願

1. Mito M, Shichino Y, Wakigawa T, and **Iwasaki S**. RIKEN, Method for generating DNA Library using RNA templated RNA amplification, PCT/JP2024/009605, filed March 12, 2024, Patent Pending
2. Ito T, Kashiwagi K, **Iwasaki S**, Shichino Y, Ikeuchi Y, and Osaki T. RIKEN/The University of Tokyo, INTEGRATED STRESS RESPONSE INHIBITOR, PCT63/191332, PCT/JP2022/020964, US 63/191,332, filed May 20, 2022, Patent pending

その他

本研究に関する HP

学術変革領域(B) パラメトリク翻訳

<http://parametric-translation.pharm.kyoto-u.ac.jp/>

各計画研究班に関する HP

<https://systems-biology.pharm.kyoto-u.ac.jp/>

https://www.riken.jp/research/labs/chief/rna_sys_biochem/

<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/nanobiology/research/>

<https://www.bmce.iis.u-tokyo.ac.jp/>

新聞雑誌報道など

1. 2023 年 1 月 14 日 朝日新聞(朝刊 5 面): ののちゃんのDO科学「体内時計」って何なの?
2. 2023 年 3 月 17 日 科学新聞(3 面): 体内リズムの時刻合わせ役 新たなRNA配列発見
3. 2023 年 4 月 26 日 Science Japan: Newly discovered RNA sequence plays a role in temporal adaptation of circadian rhythm: A group from Kyoto University finds that changes in body temperature fine-tune translational speed
4. 2024 年 1 月 29 日 日刊工業新聞(電子版): 植物の栄養吸収制御、東大など仕組み解明 低肥料作物の開発期待
5. 2024 年 5 月 9 日 日本経済新聞(電子版): 東大と阪大、細胞内局所における自発的な発熱が神経細胞が分化する際の突起伸長の駆動力として働くことを発見
6. 2024 年 5 月 10 日 日刊工業新聞(電子版): 細胞内の熱、神経分化のカギ 東大・阪大などがメカニズム特定
7. 2024 年 1 月 29 日 日刊工業新聞(電子版): 植物の栄養吸収制御、東大など仕組み解明 低肥料作物の開発期待
8. 2021 年 10 月 19 日 ITmediaNEWS: 「機械の脳」が現実に? 現実味を帯びてきた脳の人工再現——東大研究者たちが講演
9. 2022 年 6 月 12 日 読売新聞 [サイエンス Report]オルガノイド 試験管内に「臓器」

研究成果

生物はゆるやかな変化に対応する能力として「パラメトリック型」分子機構を備えている。これは0か1の ON/OFF 制御ではなく、連続的な反応の「velocity の変化」が担う制御であり、我々はこれをパラメトリック制御と定義した。またさらに、本研究では、パラメトリック生物学の中核となる生命化学反応として「翻訳」に注目した。というのも、分子生物学の黎明期から翻訳はベルトコンベヤーのような定常的の化学反応であるという思い込みが世界的にも支配的であったが、次世代シーケンサーをはじめとする新しい解析技術の登場/向上により、翻訳はむしろ細胞内外の状況に応じ速度を変える柔軟性をもった可変装置であるという可能性があらわれてきたためである。

我々は翻訳を柔軟な可変装置として捉え、翻訳の速度に着目した研究を行うことで、いまだ謎に満ちたパラメトリック生命機構の理解に貢献することを目指し、以下の研究を行った。

具体的には、A01 班(土居、京大、翻訳速度制御を介した睡眠・代謝・体内時計のパラメトリック制御)、A02 班(岩崎、理研、新規 Disome-Seq 法:パラメトリックなリボソーム渋滞の網羅的探索)、A03 班(原田、阪大・細胞内局所パラメトリック翻訳における物理化学的調節機構)、A04 班(池内、東大、柔軟な神経らしさを作り出すパラメトリック翻訳制御)の4研究班とそれを束ねる総括班を設置し、全班がそれぞれに連携して研究を進めることで、共通の目標である「翻訳パラメトリック生物学の創成」を目指した。

A01 班の研究では体内時計に着目した。昼夜でおおきく変化する環境下において恒常的に健康を維持するためには全身の細胞がそれぞれバラバラではなくテンポを揃えてリズムを刻む必要がある。これまでに、体内でおこる数°Cレベルの基礎体温の変化が全身のリズムの調和に寄与すると示されてきたが分子機構が不明であった。このような中、我々は、時計遺伝子 *Per2* の 5'UTR に最小単位 uORF という新しい RNA エlement を同定し、これが体温に応じた細胞のリズム位相合わせに必須であることを示した (Cell Rep 2023)。uORF を介した *Per2* の翻訳制御は効率的な傷の治癒に寄与するため医学的にも重要と考えられる (科学新聞 2023/3/17)。

A01 班の研究の背景を補足すると、我々ヒトを含め哺乳動物は恒温動物である(内温動物ともいう)ため、体温は一定であると誤解されることがあるが、四六時中常に固定の値を示すわけではない。哺乳類の体温は 1-3°C という微小な幅で変動するサーカディアンリズムを示すと知られており、活動期に高く、休眠期に低くなることが知られている。このサーカディアンリズムの形成は、脳視床下部にある視交叉上核 (SCN) が行っており、SCN はこの体温の概日リズムやホルモン・神経活動の概日リズムを利用して、全身 37 兆個の細胞ひとつひとつが有する細胞時計の時刻を調律すると考えられている。これまで、概日体温変動レベルの微細な温度変化は、ヒートショックタンパク質や低温誘導性 RNA 結合タンパク質を介して生物時計の位相を調節するとされてきたが、これら因子の機能を薬理的・遺伝学的阻害しても温度による生物時計調律を阻害することができないため、未だ解明されていない謎の分子機序が存在するのではないかと考えられていた。

そのような中、A01 班においては、哺乳類の体内時計遺伝子の中でも最も重要な振動子である *Per2* に着目し、*Per2* の発現が微細な温度変化にどのように応答するのか、その分子メカニズムの解析を通じて細胞時計の温度同調機構の謎に迫ることを目的とした。

用いた方法については、*Per2* m-uORF 欠損変異マウス(C57BL/6J 系統)は CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子編集により作出し、サンガー法による DNA シーケンス解析により変異導入を確認した。本研究におけるすべての動物使用に関しては、京都大学動物実験委員会の審査・承認を受け実施した。また、*Per2::LucTS knock-in* 細胞は、CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子編集により、*Per2* CDS の終止コドンの直前にルシフェラーゼ遺伝子 CDS を挿入することで作出し、DNA シーケンス解析により当該遺伝子の挿入を確認した。In vitro 温度制御・ウェスタンブロット・qRT-PCR においては、35°C および 38.5°C にあらかじめ設定した培養インキュベーターを用意し、定めた時刻に細胞培養皿を迅速に移動させることによって実施した。ルシフェラーゼレポーターアッセイにおいては、ペルチェ素子内蔵の改変発光測定装置(最小温度変化幅:0.1°C)を用いて実施した。温度のルシフェラーゼに対する直接的な作用が測定結果に与える影響を排除するために、本研究においてはルシフェラーゼ温度耐性変異体 LucTS5 を用いた。ウェスタンブロットによる *Per2* タンパク質の検出には自作の抗 *Per2* 抗体を用いた。Cry2 抗体(MBL, PM082)、 α -Tubulin 抗体(Sigma, T6199)、 β -actin 抗体(Sigma, A5441)は市販の製品を用いた。アジドホモアラニン AHA を取り込んだ新規合成タンパク質へのビオチン標識は、biotin-PEG4-alkyne(Sigma)および Click-iT Protein Reaction Buffer Kit(Thermo Fisher)を用いて実施した。mRNA の発現定量は qRT-PCR により Rplp0 の発現量を内在性コントロールとした。Polysome profiling において用いた 15–50%の連続スクロース密度勾配は、BioComp Gradient Master(Biocomp Instruments)を用いて作製した。次世代シーケンサー解析は Hiseq X・HiSeq 4000 を用いて実施し、各リードを STAR (v 2.7.0)によりマウスゲノム(GRCm38/mm10)にマッピングした後、samtools(v 1.10)でソーティング・インデックス作製を行った。

上記の背景・目的・方法により A01 班では次の具体的結果を得た。すなわち、細胞時計の位相を同調させたマウス胚線維芽細胞を 4 時間毎にサンプリングし、ウェスタンブロット法を用いて *Per2* を可視化すると、*Per2* タンパク質のサーカディアン発現振動が観察された。この細胞に対して各時刻に生理的微小温度変化(WTS, 35°C to 38.5°C)を与えると、*Per2* タンパク質が増加するタイミングにさらに WTS を与えた場合に、*Per2* タンパク質が有意に増大することがわかった。興味深いことに、同じ条件下において *Per2* の mRNA 量は変化せず、アジドホモアラニン-Click chemistry を用いた新規合成タンパク質発現解析や polysome profiling 法では *Per2* 新規合成量の温度依存的な変化が見られたことから、生理的な微小温度変化は、*Per2* の転写ではなく翻訳量を調節することが明らかになった。

Per2 の翻訳制御機構を確かめるため、mRNA 上でのリボソームの位置を可視化するリボソームプロファイリングを行い、WTS によるリボソーム動態変化を調べたところ、*Per2* mRNA の 5' 非翻訳領域(5' UTR)に WTS に伴うリボソーム集積を観察し、この集積は *Per2* 5' UTR の最小単位上流翻訳フレーム(m-uORF)にあることがわかった。最小単位 uORF とは、開始コドンと終止コドンから構成されるたった 6 塩基の配列である。この *Per2* m-uORF の機能を調べるため、遺伝学的に *Per2* m-uORF を欠損させたマウスを新規に作成し、そのマウスより線維芽細胞を作製してイムノブロットを行ったところ、欠損マウス由来の細胞では

WTS に伴う *Per2* タンパク質増加が観察されなかった。ヒト・マウスの *Per2* 5' UTR を用いた翻訳レポーターアッセイにおいても、m-uORF 依存的なレポーター温度応答が観察され、m-uORF を非最小単位 uORF に変異するだけで この応答は消失したことから、*Per2* m-uORF は *Per2* 翻訳温度応答の制御エレメントであるとわかった。

Per2 m-uORF を介した翻訳制御の上流制御因子を確かめるため、LucTS5 を用いて *Per2* レポーター細胞を作製し、約 150 種類のキナーゼ阻害薬をスクリーニングしたところ、複数の PI3K 阻害薬が *Per2* 発現温度応答を抑制することがわかった。PI3K 由来のリン脂質が WTS に伴い増加したため、PI3K は WTS に応答して活性化したと考えられる。重要なことにこの考えに一致して、PI3K 阻害薬存在下では細胞時計は環境の微小温度サイクルに全く同調することができなかった。つまり、PI3K-*Per2* m-uORF カスケードは生物時計温度応答に必須であることがわかった。

では温度サイクルにうまく位相合わせができなくなると、どのようなことが生物の機能上、問題になるのだろうか。マウス体表面温度は規則正しい概日リズムを示すことから (Shimatani *et al.* PLoS One 16, e0252447, 2021) 皮膚機能の恒常性維持には体温リズムと体内時計が関与するのではないかという発想のもと、我々は、マウスの活動期と休息期における皮膚の傷の治り具合を評価した。その結果、野生型マウスでは活動期 (8PM) に与えた傷の方が休息期 (8AM) に与えた傷よりも治りが早く、皮膚修復能に概日リズムがあることが示された一方、変異マウスではその皮膚の修復効率に概日リズムを認めることができないことがわかった。つまり、今回見いだした *Per2* m-uORF パスウェイは生体内でも組織の正常な恒常維持に重要であることが示唆された。

以上にまとめた今回の研究成果は、哺乳類において最小単位 uORF の生理的役割を具体的に示した最初の例となった (Miyake *et al.* Cell Rep 42, 112157, 2023)。創傷治癒を例に今回は解析したが、全身の体内リズムの不調和は多くの病気の原因になることが知られている。今回の生理的体温変動への体内時計の調和を司る RNA エLEMENTの発見は、全身の細胞リズムの調和に基づいた新しい治療薬の開発につながる可能性を秘めており、今後の研究の発展が期待される。

次に A02 班では翻訳の動態に着目した。A02 班ではかねてよりリボソーム渋滞を網羅的に解析する手法 Disome-Seq を開発してきた (Han *et al.* Cell Rep 2020)。この手法をヒト、ゼブラフィッシュ (Han *et al.* Cell Rep 2020) のみならず、大腸菌にまで展開させ (Fujita *et al.* RNA 2022)、さらに、パラメトリックな翻訳の動態を人工的に制御する新技術として dCas13 を用いた CRISPR δ (クリスパー・デルタ) 法の開発に成功した (Apostolopoulos *et al.* Nat Commun 2024)。

A02 班の研究 (翻訳動態) 背景を補足すると、分子生物学のセントラルドグマは遺伝情報の核となる核酸の情報をアミノ酸という性質の異なる分子配列へ変換する仕組みであるが、その変換速度の鍵を握るのがリボソームが行う翻訳である。リボソームによるコドンの読み取り速度は一般に一定であると誤解されることがある。しかし、多様な原因 (レアコドン、mRNA の二次構造、特定のアミノ酸配列など) によって一時停止するというパラメトリックな動態を示す。さらに、一時停止パラメトリック制御の破綻が疾患につながるなどといったことが報告され

始めておりその生理学的な機能の解明が喫緊の課題となっている。つまり、大きな問題として、「翻訳速度の一時停止を支配する共通の原理・ルールは存在するのだろうか？またそれは生理学的にどう制御されるのだろうか？」という課題が残る。この問題に答えるためにはそもそも「細胞中に存在する 8 万種もある mRNA のどの mRNA 上のどのコドン上でリボソームが一時停止しているのか」という根本的な問いに答える必要がある。しかしながら、リボソーム停止という現象がはじめに見つかってから約半世紀経った現在でもほとんど明らかになっていない。これはこの問題に挑戦するために必要な網羅的・定量的・高感度の翻訳一時停止検出技術が存在しなかったことによる。つまり、このボトルネックとなる技術的欠損が翻訳一時停止の生理学的意義の探究研究の歯止めとなっていた。

そのような中、A02 班においては、上記のボトルネック解消技術として新手法『Disome-Seq 法』を開発し、リボソーム位置停止に由来するリボソーム渋滞というパラメトリックな挙動を網羅的かつ 1 コドン分解能で捉えることを目的とした。またこれを他班との共同研究に応用することにより、細胞内の物理化学的な環境(細胞内温度)ならびに高次生命現象下(脳の記憶学習や体内時計)におけるリボソーム渋滞の役割の解明につなげることを目標とした。

用いた方法については、mRNA 上のリボソームの位置を網羅的に同定する手法として確立された Ribo-Seq 技術を応用した。リボソームは非常に大きな複合体であるので、RNase 処理を施してもリボソームが直接結合する mRNA の一部分は分解から免れる。この性質を利用し、Ribo-Seq 法ではリボソーム一つ分によって保護された約 30 塩基長の RNA 断片(リボソームフットプリント)を回収し、次世代シーケンサーにより配列を読み解くと、ゲノム中のどの mRNA がどの程度翻訳されていたかを網羅的に知ることができる。しかし、従来の手法では一時停止しているリボソームと通常の翻訳を行うリボソームを見分けることが難しく、リボソーム停滞位置を高感度に見分けることができない。一方、リボソームが十分な時間、mRNA 上で停滞していた場合、次のリボソームが先頭のリボソームに衝突してリボソーム 2 つが連なり、渋滞した複合体 Disome (di-ribosome) が形成されると考えられる。そこで本研究で新たに開発した Disome-Seq 法では、「渋滞した 2 つのリボソームからはリボソーム 2 つ分の長さのフットプリントが生じる」ことを利用し、そのような長さのリボソームフットプリントのみを回収し、次世代シーケンサーによって読み取る方法を取った。この改変により、一時停止中のリボソームのみを抽出し、その停滞一をコドン分解能かつ高い網羅性で解析できると考えた。さらに、本研究では新規の翻訳ロックダウン法の開発にも取り組んだ。これまでの研究から、翻訳の動態を人工的に制御することができれば、本学術領域の目指す翻訳のパラメトリック制御の理解に貢献できると考えた。そこで、mRNA の量は変化させず、そこからの翻訳だけを特異的に抑えることのできる手法の開発を目指した。近年、CRISPR-Cas と呼ばれる細菌の免疫に関わるシステムが注目を浴びている。Cas13 と呼ばれるタンパク質は短いガイド RNA と相補的な配列をもつ RNA を認識し、分解することのできる RNase である。この Cas13 を利用し、翻訳を特異的に抑える技術が確立できるのではないかと考えた。Cas13 の RNase 活性中心に点変異を導入した dead Cas13 (dCas13) を用いることで、標的 RNA には結合するが分解を誘導しない実験系として利用した。これにより、リボソームの立体障害として翻訳を抑えるというシステムになる。

上記の背景・目的・方法により A02 班では次の具体的結果を得た。すなわち、リボソーム渋滞位置の網羅的探索を可能にする Disome-Seq 法を確立し、それを多様な試料に応用した

(Han et al. Cell Rep 2020; Fujita et al. RNA 2022)。ヒト培養細胞(HEK293)に応用すると、2000 箇所ほどのリボソーム停滞位置が検出された。大まかに概算すると 11%の mRNA が少なくとも1箇所のリボソーム停滞を誘導する配列を持っていた。その一部はストップコドン上にあたり、翻訳終結およびリボソームリサイクリングが律速になっていることがわかった。また、disome の上流にまた disome が形成され、さらにその上流に disome が形成されるという、リボソームの数珠繋ぎ状態が形成されることもわかった。このような、disome を形成させやすいモチーフを探索すると P-G-X あるいは R-X-K のようなモチーフが見つかった。これらは元来、ペプチド転移反応が起きにくいとされている配列であり、そのようなコンテキストでリボソーム衝突が生じていることが初めて明らかとなった。

同様のことを、ゼブラフィッシュの胚で行うと、ヒトで観察されたような数珠繋ぎ状態と特異的なモチーフが同様に観察された。さらに、ゼブラフィッシュとヒトで共通に disome が観察される mRNA に着目すると、全く同じ位置で disome が形成されていることがわかった。つまりこのことは、リボソーム衝突が進化的に保存されていること、プログラムされた機構であることを示唆している。

特にヒト細胞で最も長いリボソーム数珠繋ぎを誘導する mRNA が *XBPlu* である。一般にリボソームの衝突は ribosome-associated quality control (RQC) という品質管理機構を誘導し、新生ペプチド鎖の分解を誘導する。実際に *XBPlu* の disome 形成配列をレポーター系に導入すると、RQC が生じ、disome 形成配列以降からのタンパク質の合成が減少した。一方、RQC の必須因子である ZNF598 をノックダウンすると、その減少が回復した。これは *XBPlu* が RQC の標的であることを示している。当時、内在の RQC 標的配列は見つかっておらず、この我々の報告がその最初の例と言える。これらの成果は Cell Reports 誌に発表するとともに (Han et al. Cell Rep 2020) その詳細な protocol も公開した (Mito et al. STAR Protoc 2020)。

さらに研究を展開し、同様の Disome-Seq を大腸菌にも適用した (Fujita et al. RNA 2022)。大腸菌の場合は、ヒトやゼブラフィッシュと明確に異なり、ストップコドン上でリボソーム停滞が起きにくいこと、さらには、リボソーム数珠繋ぎが生じない、明確なモチーフが取得できないといった違いがあることがわかった (Fujita et al. RNA 2022)。

翻訳ノックダウン法の開発においては、まず、翻訳抑制が誘導可能か、複数の Cas13 種で実験をしたところ、*Prevotella* sp. P5-125 Cas13b (PspCas13b) が最も効率高くタンパク質合成を阻害した。このとき dPspCas13b にしておくこと mRNA の分解を誘導しない。さらにまた、ガイド RNA を開始コドン上に配置する、あるいは 5'UTR 上に配置すると翻訳抑制を誘導できるが、ORF やストップコドン上では誘導できないことがわかった。これは翻訳がすでに始まっている elongating ribosome は非常に processive で阻害できないが、5' UTR 上を滑り運動している scanning ribosome に対しては立体障害として機能することを示している。

また、同様の手法は非典型翻訳にも応用が可能であることを示すことができた。ウイルスは internal ribosome-entry site (IRES) という配列を利用して、mRNA の末端ではなく途中から翻訳を開始することができるが、dCas13 はこの場合であっても翻訳を抑制することができた。また、repeat-associated non-AUG (RAN) translation と呼ばれる様式では繰り返し配列

によって駆動される翻訳で、読み枠 3 つからすべて翻訳してしまい、神経変性疾患の原因となるタンパク質を合成することが知られているが、このような様式にも dCas13 は奏功した。

重要なのが、この dCas13 による翻訳抑制を介したノックダウンが、非常に特異的であることである。RNASeq と Ribo-Seq を使って、dCas13 による mRNA に対する影響と、翻訳に対する影響を網羅的かつ定量的に解析すると、mRNA に関しては標的、非標的の mRNA 関わらず全く影響を与えなかった。これに対して翻訳は、標的になっているものだけがノックダウン効果を受けることが判明した。

以上のように新規に開発した方法を dCas13 を用いた翻訳ノックダウン系として CRISPR δ [delta (δ): DEpLetionof Translation by blockAde] と名付け、Nature Communications 誌に発表した (Apostolopoulos et al. Nat Commun 2024)。

A03 班では翻訳速度の物理化学的側面に着目した。細胞内局所において翻訳速度を制御する機構は不明である。翻訳は最大の細胞内エネルギー消費反応であることから、A03 班では、翻訳速度に与える物理化学的機構として細胞内温度に着目し、細胞内局所のパラメトリックな翻訳速度調節の駆動力として細胞内局所での発熱および温度不均一性の関与を検証した。その結果、蛍光性ポリマー温度センサーを用いた細胞内温度計測法を用いて翻訳が細胞内温度に与える影響を詳細に調査し、細胞内温度が翻訳に密接に関与することを見出した。また、遺伝子発現の大きな変化を伴う神経分化において転写や翻訳が発熱を示すこと、また加熱により分化が促進されることを発見した (Chuma et al. Nat Commun, 2024)。

A03 班の研究の背景を補足すると、A03 班ではこれまでに、細胞内における温度計測を初めて達成し、細胞内局所における時空間的な温度の変動を見出していた。さらに、細胞内局所温度変化が生体分子の状態変化を介して細胞機能に貢献する現象である「温度シグナリング」を検出していた。この細胞内局所の「温度シグナリング」は、細胞内局所発熱と細胞機能をつなぐ興味深い現象であり、生物学における斬新なメカニズムを提起しうるものである。しかし、このような細胞内局所温度変化の実体とその生物学的意義については完全に謎であった。一方、Ribo-seq をはじめとする生化学研究から、細胞内で最大の化学反応である翻訳が一過的な停止や再開により連続的かつダイナミックに制御されること、また翻訳因子が熱力学状態である液液相分離であるとの報告がされつつある。これを「温度シグナリング」と合わせることで、パラメトリックな翻訳の駆動力として温度変化が担う分子機構の存在を仮説立てた。つまり、もし細胞内局所温度変動と翻訳調節の関連を証明しその分子機構が解明できれば、パラメトリックな細胞反応の原理の解明につながると考えられた。

そのような中、A03 班においては、細胞内局所温度変化を切り口に、細胞内翻訳速度変化の物理化学メカニズムを解明することを目的とした。翻訳速度変化は注目を集めているにも関わらず、その物理化学機構は一切不明である。これに対し、本研究では細胞内温度変化という独自の技術と発見に基づいた視点でその謎に挑戦した。翻訳速度と細胞内温度変動の関連を解明することは、細胞微小空間における温度変化が細胞機能に貢献する「温度シグナリング」の作用点を明らかにすることにもつながり、細胞内における適応的遺伝子発現調節に関する新機軸となる可能性がある。従来知られている化学シグナリングや mRNA の配列による翻訳速度調節原理とは異なり、細胞内物理化学環境の変化による緩やかかつ

イナミックな翻訳制御機構が、遍く難解な生命現象を紐解く新たな鍵となるという考えのもと、細胞内翻訳速度変化の物理化学メカニズムの解明を目指した。

用いた方法については、蛍光性ポリマー温度センサーによる細胞内温度分布イメージング法と蛍光ナノダイヤモンドによる局所温度計測法を用いて、薬剤等により翻訳活性を変調した細胞内温度測定から翻訳反応の熱特性を解析する方法をとった。予備的検討で翻訳が発熱反応であることを見出したので、細胞内の局所温度を人工操作した際の翻訳活性・速度の変化を観察した。細胞内局所温度操作法としては、いずれも独自の IR レーザー照射や金修飾蛍光ナノダイヤモンドへの可視レーザー照射に加えて、高熱容量の熱スポンジ分子による温度勾配抑制法を用いた。翻訳活性の評価は、従来の翻訳因子の可視化やレポーターの観察に加えて、本領域の他班の翻訳測定法を組み入れた。細胞内局所における翻訳一分子イメージングによる分子動態解析においては、細胞内局所で mRNA-リボソーム複合体を一分子レベルで直接観察し、温度変化が与える状態変化を記述する。蛍光性 RNA ロープに光安定性に優れた蛍光ナノダイヤモンドないし明減色素 2MeSiR を連結し、蛍光プローブの光子分布から重心位置を解析することで mRNA 1 粒子を追跡する方法を開発した。温度シグナリングによる翻訳速度調節の分子機構の解明に向けては、翻訳速度調節のメカニズムを調べるため、上述の技術群を組み合わせ発熱性オルガネラや人工熱源と関連した翻訳状態の変化やリボソーム渋滞時の mRNA の振る舞いを一分子レベルで観察した。特に、翻訳中 mRNA の拡散定数の変化、会合状態の解析から温度応答の実体を捉え、その温度依存機構を解析するという方法をとった。

上記の背景・目的・方法により A03 班では次の具体的結果を得た。すなわち、細胞内局所のパラメトリックな翻訳速度調節の駆動力として細胞内局所での発熱および温度不均一性の関与を検証するため、当該研究に必要となる蛍光性ポリマー温度センサーによる細胞内温度マッピング法および蛍光ナノダイヤモンドによる細胞内局所温度計測法に改良を加えその応用により、細胞内局所の温度変化を高速かつ高精度に計測する方法を構築した。

まず、翻訳が細胞内温度に与える影響を詳細に検討した。その結果、一定温度環境において培養した細胞内の定常的温度とそれぞれの細胞内における翻訳活性に正の相関があることを発見した。さらに、神経分化の進行に伴って細胞内の定常的温度が上昇することを見出した。これらの結果は、翻訳阻害が定常的細胞内温度の低下や神経分化に起因する温度上昇を抑制する結果と良好に合致し、細胞内温度が翻訳と密接に関与することを示している。

次に、細胞内発熱が翻訳に与える役割を解明するために、細胞内の選択的加熱法の開発に取り組んだ。細胞内局所の加熱法として、金ナノ粒子への可視光レーザー照射を選択し、金ナノ粒子の細胞内への導入法の検討および加熱時の細胞内温度変化の定量的評価を行った。続いて、構築した金ナノ粒子による細胞内加熱法を用いて翻訳の操作を検討した。細胞内の mRNA を可視化した細胞において、金ナノ粒子による局所加熱を行ったところ、mRNA が顆粒状に集合する様子を観察した。免疫染色によりこれらの RNA 顆粒は翻訳調節能が知られているストレス顆粒であることを示したことから、細胞内局所加熱により、翻訳が制御可能であることを発見した。さらに、細胞内発熱が翻訳反応に直接影響を与えるかどうかを検討するために、細胞内の温度勾配を阻害する方法の開発と細胞内の特定 mRNA の加熱法の開発にも取り組んだ。その結果、生理的温度領域において吸熱的構造

変化を示すポリマーを細胞内に導入することで、濃度依存的に細胞内温度分布を攪乱することを発見した。温度勾配を阻害した細胞内において翻訳活性を評価したところ、細胞内温度勾配阻害時に翻訳活性が著しく低下した。一方、赤外レーザーによる細胞内局所加熱時の翻訳活性の変化は検出できなかった。現状の加熱法である数マイクロメートルサイズの細胞質加熱では翻訳速度の変化は誘導できないと考えられる。さらに、温度シグナリングによる翻訳制御の生理的意義を解明するため、神経組織・細胞を用いて機能発現に伴う翻訳活性と細胞内温度の関係を調査した。特に、遺伝子発現の大きな変化を伴う神経分化において転写や翻訳が発熱を示すこと、また加熱により分化が促進されることを発見した。以上の結果は、翻訳活性が温度シグナリングによる正の制御を受けること、さらにそれが神経分化等の生理的意義を有することを示している(Chuma *et al.* Nat Commun 2024)。

最後に A04 班では脳オルガノイドに着目した。翻訳のパラメトリック機構の解明に向け、大脳オルガノイドを2つ軸索束を介して接続した大脳コネクタイトの回路構造が、どのように神経活動を変化させるのかを知るために、タンパク質合成に着目して細胞の内部状態の変化を調べた。その結果、大脳オルガノイドを2つ直接密着させたアSEMBロイドに比べてコネクタイトでは軸索の状態を制御する膜タンパク質の量が増えていることが明らかになった。このタンパク質がコネクタイトの内部ネットワーク状態を制御する鍵になると考え、アゴニストとアンタゴニストで活性を調節したところ、オルガノイド間の神経活動のやりとりを制御できる手法として活用できることがわかった(Osaki *et al.* Nat Commun 2024)。

A04 班の研究(脳オルガノイドを用いた翻訳)の背景を補足すると、神経回路構造は、脳の高次機能の根源である。回路構造が変われば、神経ネットワークの活動がダイナミックに変化し、それにともなって細胞内での遺伝子発現も変化すると考えられが、神経の回路構造、活動、内部状態の詳しい関係は明らかになっていない。これらの関係性を定量的に理解し、鍵となる分子を知ることによって、神経回路の活動パターンを変化させられれば、神経ネットワークを自在に操れるようになると考えられる。一方で近年、ヒト iPS 細胞の三次元培養によって神経系的一部分を自発的に模倣した神経(あるいは脳)オルガノイドと呼ばれる培養組織の研究が進んでいる。二つ以上の神経オルガノイドを融合させることで神経系内部の機能的領域間のつながりを模倣した研究も盛んに行われている(アSEMBロイド)。しかし、大脳の左右半球の繋がり(脳梁)のような、離れた脳部位のつながりは模倣できなかった。A04 班の先行研究(Kawada *et al.* Stem Cell Reports 2017, Kirihara *et al.* iScience 2019 他)において開発した培養マイクロデバイスを用いて神経オルガノイドの間を軸索でついだところ(ここではコネクタイトと呼ぶ)、神経活動が全体的に増加し、複雑かつ特徴的な低周波オシレーション活動を示すことが観察されていた。またコネクタイトの *in silico* モデルを作成すると、実際のコネクタイトのような特徴的な神経活動パターンが生成されたことからオルガノイド間の結合の仕方で神経活動を制御できる可能性があることを得ていた。そこでアSEMBロイドとコネクタイトを用いることで、神経回路構造の違いによって引き起こされる細胞内部のタンパク質合成の状態を明らかにできるのではないかと考えられた。

そのような中、A04 班においては、柔軟な神経らしさを作り出すパラメトリック翻訳制御の解明を目指し、A04 班が自家開発したマイクロデバイスを用いてヒト iPS 細胞から生出させた

神経組織「コネクトイド」を用いることによって、神経組織の回路構造に依存して引き起こされるネットワークの活動パターンの変化とそれに伴う神経細胞内の翻訳速度の局所的变化を解析し、神経機能の基盤となる翻訳制御の実態と機構を明らかにすることを旨とした。コネクトイドによって初めてわかる神経細胞の局所翻訳制御の本質を、領域内で開発される新技術を活用することによって生体脳機能へ演繹することにより、記憶の強弱などの柔軟な脳機能を支えるパラメトリックな翻訳制御機構を解明することを目的とした。また、コネクトイドを各班に提供し、睡眠覚醒・リボソーム渋滞・温度による局所翻訳制御の解析に貢献することを目的とした。

用いた方法については、神経回路の構造の変化に伴う神経活動の変化と、その背後にあるタンパク質量の変化を調べるために、オルガノイドとコネクトイドを、mRNA シーケンス、リボソームプロファイリング、プロテオミクス解析のそれぞれで比較する方法をとった。神経組織の回路構造のちがいで引き起こされる細胞内の変化を調べ、神経活動と照合した。これらの解析によって得られた知見をもとに、神経ネットワーク活動を制御する鍵となるタンパク質を同定し、そのタンパク質を利用してネットワーク全体の挙動を変化させられるかどうかの検証を行う実験を行った。

上記の背景・目的・方法により A04 班では次の具体的結果を得た。すなわち、回路構造による遺伝子発現変化を調べるため、コネクトイドおよびアセンブロイドの RNA 発現量とタンパク質翻訳効率を RNA-seq とリボソームプロファイリングにより比較解析した結果、アセンブロイドに比してコネクトイドでは細胞外基質、軸索誘導、神経幹細胞増殖関係の遺伝子の翻訳が促進されていることが判明した。この結果から、神経の回路構造や結合の仕方による神経活動の変化に伴い、転写や翻訳も変動することが示唆された。変化した遺伝子群の中から特に、シナプス結合の強度を制御するシナプス制御因子に着目した。コネクトイドとアセンブロイドにおけるシナプス制御因子の発現量をウェスタンブロットティングにより比較したところ、コネクトイドにおいてシナプス制御因子の発現量が増加していた。そこで、シナプス制御因子がコネクトイドにおける特徴的な神経活動を制御しているのではないかと我々は考えた。実際、シナプス制御因子を制御すると長期抑制 (LTD) を引き起こすことが知られている。コネクトイドの特徴的な神経活動は連続的に低周波神経活動を示す期間とあまり活動しない期間を交互に繰り返すという特徴があることから、シナプス制御因子が神経伝達物質の放出を制御することで複雑な活動パターンを生み出す要因になっているという仮説を立てた。シナプス制御因子のアゴニスト、アンタゴニストをオルガノイドに添加し神経活動の変化を計測したところ、アゴニストを添加してもスパイクの頻度は変化しなかったが、アンタゴニストを添加したところスパイクの頻度が上昇した。この結果から大脳オルガノイドではシナプス制御因子が定常的に活性化していて、神経活動を強く抑制していることが示された。

今回の研究から、神経回路構造を変化させるだけで神経活動が変化するだけではなく遺伝子発現も変化することがわかった。実際の大脳内でも当該シナプス制御因子が神経回路の結合を調整して、機能的な神経活動を創り出している可能性がある (Osaki *et al.* Nat Commun 2024)。

以上の A01, A02, A03, A04 の研究成果を得るための支援として、総括班では、領域会議・総括班会議の開催を通じて、各班員の研究活動を大きく後押ししてきた。関連学会においては当領域に関するシンポジウムを企画した他、本領域内のみならず、領域外の研究者への情報・技術共有を目的とした Parametric Translation Club を組織し、分野発展に向けた領域形成に貢献した。領域ホームページを開設・運営し、研究活動の広報にあたるとともに、高校生向けの授業・市民公開講座の開催を通じて研究成果の発信を行った他、次世代シーケンサー Ribo-Seq 技術習得のためのブートキャンプを開催するとともに、領域融合型若手育成支援の一環として、世界をリードする海外研究者などを積極的に招聘・交流する国際シンポジウムなどの機会を設けた。

これにより、各班から、「翻訳パラメトリック生物学の創成」に貢献する成果が生み出された。

本領域研究は、生命現象のパラメトリック機能制御における「翻訳」の重要性を見出すことを目指したが、その成果は「生命における翻訳調節の本質的な意義とは何か?」という疑問を数多くの研究者へ投げかけ、生物学のパラダイムシフトをおこし、幅広い学問領域の発展のきっかけとなったと考えている。数多くの研究領域において、翻訳は転写後におきる付随的なものであるとの認識が未だに強く、翻訳速度という観点に立った生命現象の理解はまだまだ立ち遅れているのが現状である。今回は体内時計と脳オルガノイドを検証のためのプロトタイプとしたが、翻訳自体は進化的に保存された高度システムであることから、本領域で得られた新知見および新技術は他の生命機構の理解にも活用できる可能性が高い。特に、老化、がん領域、免疫、組織再生、エネルギー代謝、さらには植物、菌類、細菌にまで広がる生物種を超えた生命機構の理解に貢献できると考えられる。

本研究の成果は、上述の新たな生理機能の理解だけでなく、生物物理学的にも新たな観点をもたらす可能性がある。細胞内にはパラメトリックな翻訳制御を担う物理化学シグナルとして未知の化学シグナル(局所温度/pH 勾配) や相分離シグナル(高分子溶解度変化) 等がある。このような未開の細胞内反応場の理解においても本領域で開発した翻訳反応解析ツールが重要になる可能性がある。今後の研究の発展が期待される。

領域アドバイザーとして本領域を支えて下さった、本間さと先生(札幌花園病院睡眠医療センターセンター長)ならびに梅田眞郷先生(京都大学名誉教授)に感謝申し上げます。