

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14319

研究課題名(和文) シナプスにおけるタンパク質合成を高精度で捉える革新的技術の開発

研究課題名(英文) Development of real-time imaging of local translation at neuronal synapse by using molecular interaction between translation termination factors

研究代表者

森 泰丈 (Mori, Yasutake)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：00343252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の局所におけるタンパク質合成をリアルタイムに検出する目的で、タンパク質合成を翻訳停止時における分子間反応に置き換えて捉える新たな系を開発した。翻訳停止時に会合する2つの因子に着目し、この2つのタンパク質に蛍光タンパク質であるCFPとYFPを融合した分子プローブを作製し、これらを特定のmRNAの停止コドン周辺に結合させた。翻訳反応が終了すると、翻訳停止に関わる因子間の近接によりCFPとYFPの距離が縮まり、CFPの励起によりYFPの蛍光を検出することができる。この反応を検出することでタンパク質合成の動きを細胞の構造を破壊することなく経時的に検出することに成功した。

研究成果の概要(英文)：To develop a novel detection method of protein synthesis on time at restricted region of the cells, we focused on molecular interaction between two translation factors at the last phase of ribosomal scanning on specific mRNA. Two different fluorophores CFP and YFP were fused with the interacting translation termination factors to produce a pair of molecular probe. We expressed these probed in the cells and anchored them around the stop codon of specific mRNA. In this preparation, the end of the mRNA scanning induced proximity of two fluorophores by interaction of the molecular probes, so that excitation of CFP emitted YFP fluorescence. We detected the fluorescence energy transfer in the cells that are activated by serum and growth factors. In conclusion, this energy transfer from CFP to YFP well related to translation state of the cells. We successfully detected protein synthesis rate in living cells without destroying cell structure.

研究分野：解剖学、神経解剖学

キーワード：局所翻訳 翻訳停止因子 シナプス 分子イメージング

1. 研究開始当初の背景

ニューロンは樹状突起に局在する mRNA からタンパク質を合成し(局所タンパク質合成; local protein synthesis) 個々のシナプスにおいて独立した翻訳を行うことができる。このようなシナプスにおける自律的なタンパク質合成系は、脳の機能全体に重要な役割を果たしていると考えられている。しかし、シナプスにおけるタンパク質合成がニューロンの活動によりどのように制御され、また逆にニューロン全体の活動にいかなる影響を与えるのかについては十分な解析が成されているとは言い難い。その理由として翻訳の動きをリアルタイムにトレースし、さらにそれを操作する方法論が存在しないことが挙げられる。これまで、翻訳の最終産物であるタンパク質量が翻訳の活動性の指標とされてきたが、タンパク質量の変化は分解を含め翻訳以外の様々な不確定要因による影響を受けるため、翻訳の動きを解析するための指標としては適切ではない。

2. 研究の目的

ニューロンでは特定の mRNA が樹状突起に局在し、個々のシナプスにおいて活動の強度に応じた翻訳を受ける。しかし、シナプスにおける翻訳がニューロンの活動によりどのように制御され、またニューロン全体の活動にいかなる影響を与えるのかについては十分な解析が成されているとは言い難い。本研究では、シナプスにおけるタンパク質合成の動きを、翻訳を受けている mRNA 上で起きる翻訳因子間の相互作用を指標として解析する新たな手法の開発を行う。この手法は、タンパク質量の変化を翻訳速度の指標とする従来の手法よりも、より高い時間的・空間的解像度で捉えることが期待され、LTP や LTD の成立時にシナプスのようなミクロな領域で起きるタンパク質合成の動きをこれまでにない正確さで解析することを目的とする。

3. 研究の方法

翻訳をタンパク質量の変化として解析するのではなく、mRNA 上で起きる分子間相互作用として解析するシステムの開発を目指すため、目的の mRNA 上で起きる翻訳停止因子間の近接を FRET により検出する系を確立することを考えた。具体的には mRNA をプラットフォームとして翻訳停止時に起きる eRF3 と Upf1 との間の相互作用を再現し、eRF3 と Upf1 それぞれに付加した CFP から YFP へのエネルギー遷移を検出する。このシステムにより細胞の形態を破壊することなく、翻訳の動きを解析した。先において起きる活動電位や翻訳レベルをどのように変化させるのかを解析することが予想された。

解析の対象とする mRNA を外因性に発現

させておき、tethering は N ペプチドと BoxB 配列との人工的な相互作用を利用する。この強制発現した mRNA は翻訳領域、終止コドン直後に BoxB、その下流に 13' UTR を連結した構造となるように設計する (BoxB-CaM3')。FRET プローブとして用いる翻訳停止因子の組み合わせは、リボゾームの機能を阻害することのないように配慮する。eRF1 はリボゾームの P サイトに入り込むと考えられるため、蛍光タンパクを付加することによりリボゾームに取り込まれない可能性がある。そこで、リボゾームのより外側に結合する eRF3 を利用し、それに結合する Upf1 タンパク質との分子間相互作用を CFP と YFP をそれぞれに付加することで FRET として解析する。Upf1 には N 末端側に N ペプチド配列を付加し、この配列を介して BoxB-CaM3' mRNA に tethering する。つまり、N-BoxB を介した人工的な RNA-タンパク質複合体をリボゾームがスキャンすることにより、停止コドン認識時に eRF3 が導入され、eRF3-Upf1-BoxB-CaM3' mRNA の ternary complex が形成される。このように mRNA の終止コドン周囲で生じる人工的な分子間反応を CFP の励起波長で見ると FRET が起きて翻訳停止を検出することができ、YFP の励起波長で見ると mRNA の細胞内局在を検出することができる。ネガティブコントロールとして BoxB-CaM3' mRNA の終始コドンをセンスコドンに変えた read-through 型の mRNA を使用した。この mRNA では BoxB がリボゾームによる翻訳を受け BoxB で結合している Upf1 が mRNA から排除されるため、eRF3-Upf1 の間の相互作用が起きない。したがってコントロール mRNA で FRET が検出できないことが確認できれば、2 者のプローブ間の相互作用が翻訳停止時に特異的に起きることを示せる。

4. 研究成果

リボゾームが停止コドンを認識したときに起きる分子間反応を利用することにより、特定の mRNA 上で起きる翻訳を可視化する新たな翻訳検出系を構築する目的で、reporter mRNA と FRET プローブの作製をおこなった。reporter mRNA は線維芽細胞の伸長端に局在する beta-actin mRNA を利用し、beta-actin の終止コドンの 3' 側に box B 配列を挿入した beta-actin-BoxB mRNA を発現するベクターを作製した。また、FRET 反応を観察するための蛍光タンパク質である CFP、YFP を Upf1 と翻訳停止因子 eRF3 にそれぞれ付加したベクターを作製した。Upf1-YFP にはさらに BoxB 領域に結合する N 配列を付加することにより、reporter mRNA と BoxB- N 間の RNA-タンパク質相互作用を介して Upf1-YFP が結合できるように設計した。以上、reporter mRNA を発現するベクターである beta-actin、FRET プローブを発現する CFP-eRF3、N-Upf1-YFP の 3 種類のベクターを作製した。ベクターは

培養細胞発現用としてアデノウイルスベクターを基にクローニングを行った。さらに神経細胞に発現させる目的でアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターへのクローニングをおこない、ウイルス粒子を得ることができた。beta-actin-BoxB mRNA、CFP-eRF3 タンパク質、N-Upf1-YFP タンパク質を発現するアデノウイルス線維芽細胞に感染させて、ライゼートを回収し分光蛍光光度計により吸収波長の YFP/CFP 比率を解析した。

各 FRET 解析用の蛍光プローブを発現させるベクター、また reporter mRNA を発現するためのベクターのコンストラクションは終了し、アデノウイルスにより線維芽細胞に発現させることが可能である。さらに高い力価を有するウイルス粒子を得る目的で、継代し、濃縮することにより、感染から 12 時間で可視化レベルにまで FRET プローブを発現させることが可能となっている。また、分光蛍光光度計により吸収スペクトルを測定したところ、430nm の CFP 励起波長により、530nm 付近の YFP の吸収波長のピークを検出することができた。これは CFP-eRF3、N-Upf1-YFP 間の FRET が起きていることを示しており、reporter mRNA 非存在下ではこのようなピークは確認できないことから、これら 2 つのプローブのランダムな相互作用を検出していないと考えられた。以上より reporter mRNA 上でおきる翻訳を検出する系の基盤が確立できたと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 6 件)

第 39 回日本神経科学学会大会

「PRMT1 による hnRNP K のアルギニンメチル化が mRNA の樹状突起への輸送を制御する」森泰文、猪口徳一、宮田信吾、遠山正彌、佐藤真(平成 28 年 7 月 21 日 パシフィコ横浜、神奈川県横浜市)

第 121 回日本解剖学会総会 全国学術総会

「RNA 結合タンパク質 hnRNP K のアルギニンメチル化修飾を介した mRNA 輸送機構の解明」森泰文、猪口徳一、遠山正彌、佐藤真(平成 28 年 3 月 30 日 ビッグパレット福島、福島県郡山市)

第 91 回日本解剖学会 近畿支部学術集会

(招待講演)「RNA 結合タンパク質 hnRNP K のアルギニンメチル化修飾が樹状突起への mRNA 輸送を制御する」森泰文、猪口徳一、遠山正彌、佐藤真(平成 27 年 11 月 28 日 京都工業繊維大学、京都府京都市)

Neuroscience 2015, SfN 's Annual Meeting (国

際学会) Arginine methylated form of hnRNP K variant mediates a dendritic localization of α CaMKII mRNA. Y Oka, Y Mori, T Iguchi, M Tohyama, M Sato(平成 27 年 10 月 20 日 Chicago McCormick Place, USA)

第 58 回神経化学学会大会

Functional analysis of protein arginine N-Methyltransferase 8 (PRMT8) in activated microglia that are induced by spinal cord injury. 森泰文、小山佳久、猪口徳一、宮田信吾、遠山正彌、佐藤真(平成 27 年 9 月 12 日 大宮ソニックシティ、埼玉県大宮市)

第 38 回神経科学学会大会

「hnRNP K のサブタイプ特異的なアルギニンメチル化が mRNA の樹状突起への輸送を制御する」森泰文、遠山正彌、佐藤真(平成 27 年 7 月 31 日 神戸国際会議場・展示場、兵庫県神戸市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)N

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

森 泰文(MORI Yasutake)
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：00343252

(2)研究分担者

岡 雄一郎(OKA Yuichiro)
大阪大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：30614432

猪口 徳一(IGUCHI Tokuichi)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号： 6 0 5 0 9 3 0 5

(3)連携研究者

佐藤 真 (SATO Makoto)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号： 1 0 2 2 2 0 1 9

(4)研究協力者