

令和 5 年 5 月 18 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19206

研究課題名(和文) 遺伝情報を拡大する翻訳時のタンパク質多様性産生のメカニズムと生理機能

研究課題名(英文) Mechanisms and physiological functions of protein diversity production during translation that expand genetic information

研究代表者

三浦 正幸 (Miura, Masayuki)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・教授

研究者番号：50202338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：ジフタミド化は全ての真核細胞翻訳伸長因子eEF2のみになされる特殊な化学修飾である。酵母のジフタミド酵素変異体では翻訳の忠実度が下がり、-1フレームシフト翻訳の頻度が上昇するが、多細胞生物での調節機構や生理的な意味に関しては不明な点が多い。生体内の-1フレームシフトを検出するための手法として、SARS-Cov-2から取られた-1フレームシフトを起こす配列 Frame Shift Element (FSE)を2つの異なる蛍光タンパク質で挟んだレポーターを作出した。このレポーターを用いてショウジョウバエ組織における-1フレームシフトの組織や性差による違いが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

翻訳の多様性を示す現象に、一つのmRNAからポリプロテインを産生する現象がある。様々なウイルスはフレームシフトによって読み枠を変えることで産生するタンパク質の種類を増やすことが知られているが、コロナウイルスゲノムRNAはその塩基配列に-1フレームシフトを可能にする情報が含まれている。-1フレームシフト翻訳に関わるeEF2ジフタミド化の多細胞生物における生理機能とその調節が明らかになることで、翻訳による遺伝子多様性発現や、翻訳の正確性を決める新たな仕組みが明らかになることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Diphthamide modification is a unique chemical modification made only to all eukaryotic translation elongation factor eEF2. Yeast diphthamide-modification mutants show reduced translation fidelity and increased frequency of -1 frameshift translation, but the regulatory mechanism and physiological significance in multicellular organisms remain unclear. As a method for detecting -1 frameshifts in vivo, we generated a reporter in which a -1 frameshift sequence (FSE) taken from SARS-Cov-2 is flanked by two different fluorescent proteins. This reporter revealed tissue- and sex-dependent differences in -1 frameshifts in *Drosophila*.

研究分野：発生遺伝学

キーワード：翻訳 コロナウイルス フレームシフト eEF2 ジフタミド修飾 ショウジョウバエ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

ゲノム情報の最終的な読み取りは mRNA の翻訳にあるが、この翻訳機構に関してかつてないほど注目が集まっている。これまでは翻訳開始、伸長の調節による翻訳効率の研究が精力的に行われ、ゲノムに書かれた遺伝情報がいかに効率よく一つのタンパク質に翻訳されるかに研究の主眼がおかれた。しかし近年の翻訳研究から、翻訳伸長過程で作られる新生鎖自体が新たな機能を発揮することがわかり、タンパク質の機能発現は多段階になされることが示された。さらに翻訳の多様性を示す現象に、一つの mRNA からポリプロテインを産生する現象がある。

様々なウイルスはフレームシフトによって読み枠を変えることで産生するタンパク質の種類を増やす。なかでもよく知られているのが -1 frameshift の現象で、5' キャップ構造を有する mRNA でもあるコロナウイルスゲノム RNA はその配列に -1 frameshift を可能にする情報が含まれる。SARS-CoV-2 は感染後 14 の ORF から 29 のタンパク質が産生される。感染初期に翻訳されるのは ORF1a/b で、ここで作られるポリプロテインからは、ウイルスのゲノム RNA 複製や、ホストの mRNA スプライシング、翻訳、Signal Recognition Particle の機能阻害を行う 16 個の non-structural protein (NSP1-16) が作られる。初めは ORF1a が作られるが、-1 frameshift をおこすことによって ORF1b が作られる。これにはフレームシフトをおこす場所の近傍にあるリボソームが滑りやすい配列 (slippery sequence) とそれに続く mRNA の 2 次構造が関係する。しかし、ホストの細胞の翻訳伸長マシナリーがこの現象を調節する仕組みは殆ど明らかにされていない。ホスト側の -1 frameshift 機構に関わる仕組みの研究は、コロナウイルス増殖の解明や感染予防の観点からも非常に重要度が高い。さらに、-1 frameshift が動物細胞 mRNA 翻訳でもタンパク質の多様性をもたらす可能性や、その異常がプロテオスタシス一般に関わるのかにも大きな興味もたれる。

真核細胞の翻訳伸長因子 eEF2 には、このタンパク質のみにおこる特殊な化学修飾であるジフタミド化がおこるが、未だにその翻訳への関わりは不明な点が多い (review in Tsuda-Sakurai & Miura, JB 165, 1-8, 2019)。酵母でジフタミド化がおきないジフタミド酵素変異体は、通常の条件で増殖に変化はないが、高温などのストレス条件化では増殖低下を示す。興味深いことに、酵母のジフタミド酵素変異体では翻訳の忠実度が下がり、-1 frameshift の頻度が上昇する。よって、本研究ではショウジョウバエをモデルとして eEF2 ジフタミド化の生理機能解析をすることにより、未だ不明な点が多い -1 frameshift の制御機構と生理機能を解明する。

## 2. 研究の目的

本研究では、ジフタミド化 eEF2 の -1 frameshift 翻訳機構への関わりを明らかにし、ジフタミド化 eEF2 を介した -1 frameshift が多細胞動物において機能する生理的な役割を明らかにする。本研究の知見はセントラルドグマにおいてこれまで見過ごされてきた翻訳時のタンパク質多様性産生や翻訳精度調節のメカニズムと生理機能を解明するものである。また -1 frameshift がコロナウイルス増殖の最初のステップに関わることから、本研究の成果はコロナウイルスを含むウイルス増殖の宿主組織選択性、環境変化や細胞間相互作用による増殖への影響に関する理解を進めるものである。

## 3. 研究の方法

### A) -1 frameshift を細胞で検出するレポーターの作成

SARS-CoV-2 の ORF1a と ORF1b の間にある FrameShift Element (FSE) として機能すると予想される配列を用いて ORF1a として mRuby3 を、ORF1b として mNeonGreen を繋いだレポーターを作成する (FSE レポーター)。FSE レポーターの機能を哺乳類及びショウジョウバエ培養細胞にて検討する。

## B) FSE レポータートランスジェニックショウジョウバエの作成と-1 frameshift の生体解析

Gal4/UAS binary gene expression system を用いて FSE レポーターを任意の組織、細胞で発現させることが可能なトランスジェニックショウジョウバエを作成する。-1 frameshift のおきやすさに、1)組織特異性があるのか、2)性差や加齢に伴う変化はあるのか、3)様々な環境ストレスで-1 frameshift が影響されるのか、といった生体での-1 frameshift を詳細に観察する。

### 4 . 研究成果

#### A)細胞における FSE レポーターの検討

FSE レポーターが細胞内で発現すると V5 タグが結合した蛍光タンパク質 mRuby3 が翻訳され、-1 frameshift が起こると myc タグが結合した蛍光タンパク質 mNeonGreen と mRuby3 が融合したタンパク質が翻訳される。コントロールレポーターとして-1 frameshift が起こらないレポーター及び mRuby3 と mNeonGreen の融合タンパク質のみ発現するレポーターを作出した。ショウジョウバエ胚由来の S2 細胞を用いて作製したレポーターを発現させた結果、ウエスタンブロットにおいて FSE レポーターでは期待通り mRuby3 及び融合タンパク質のバンドが検出された。

HeLa 細胞にレポーターを発現させ FACS により-1 フレームシフトを起こしている細胞集団の定量をおこなったところ全体の約 35%の割合で-1 フレームシフトを起こしていることが判った。ジフタミド化には7つの酵素(Dph1-7 遺伝子)が関わるが細胞種ごとに Dph 遺伝子の発現は異なり、Dph1 発現量と-1 フレームシフトの起こりやすさは逆相関の傾向にあることが示唆された。

#### B)ショウジョウバエにおける FSE レポーターの検討

ショウジョウバエにおいて組織における-1 フレームシフトの観察を行った。-1 frameshift を起こさない変異を導入した FSE レポーターショウジョウバエでは、幼虫・蛹・成虫全ての段階で mRuby3 は発現していたものの、mNeonGreen の発現は見られなかった。その一方で FSE レポーターを発現させ、組織ごとに-1 フレームシフトを検出した結果、組織、雌雄間において-1 フレームシフト効率に違いが見られた。組織ごとの-1 フレームシフト効率をウエスタンブロットで検出される mRuby3 のバンドに対する、mRuby3 と mNeonGreen の融合タンパク質のバンド比を指標として定量した結果、頭部と胸部で高い効率を示しており、生殖組織と腸では効率が低かった。また、雌雄を比較すると、組織全体で雄の方が雌よりも-1 フレームシフト効率が高い傾向が見られた。

eEF2 ジフタミド修飾と-1 frameshift の関係性を生体内で検証するために、細胞が大きく解剖と観察に適しているショウジョウバエ唾液腺を用いて解析を行った。まず、Dph1 の eEF2 ジフタミド修飾への寄与をジフタミド修飾をピオチンラベルする DT assay により検証した。ストレプトアビジンによって検出されたジフタミド修飾を受けた eEF2 のバンドは Dph1 knock down (KD)によって消失した。次に Dph1 KD 時の-1 frameshift を FSE レポーターにより観察した結果、Dph1 KD によって-1 frameshift は増加傾向を示した。ジフタミド修飾は重金属ストレスによって影響を受けるが、実際に CuSO<sub>4</sub> を含む餌で幼虫を飼育すると-1 frameshift は増加した。重金属ストレス以外にも、ジフタミド修飾にはメチル化基質である S-adenosyl methionine (SAM) が必要であることから、-1 frameshift が生体内のメチオニン代謝状態の影響を受けることも想定される。今後、組織ごとの-1 frameshift 効率、ストレス応答や栄養応答、さらには影響を受ける mRNA を解析することによって、生体内における-1 frameshift の生理学的な意義を明らかにできることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shinoda Natsuki, Horikoshi Misuzu, Taira Yusuke, Muramoto Masaya, Hirayama Shoshiro, Murata Shigeo, Miura Masayuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Caspase cleaves <i>Drosophila</i> <sup>&lt;sc&gt;BubR1&lt;/sc&gt;</sup> to modulate spindle assembly checkpoint function and lifespan of the organism	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/febs.16811	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kosakamoto Hina, Okamoto Naoki, Aikawa Hide, Sugiura Yuki, Suematsu Makoto, Niwa Ryusuke, Miura Masayuki, Obata Fumiaki	4. 巻 4
2. 論文標題 Sensing of the non-essential amino acid tyrosine governs the response to protein restriction in <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Metabolism	6. 最初と最後の頁 944 ~ 959
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42255-022-00608-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三浦正幸
2. 発表標題 個体老化を制御する栄養感受性臨界期の存在
3. 学会等名 第41回日本認知症学術集会、第37回日本老年精神医学会合同開催（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masayuki Miura
2. 発表標題 Genetic control of animal aging by amino acids metabolism
3. 学会等名 第44回日本基礎老化学会大会国際シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三浦正幸
2. 発表標題 代謝による個体老化の臨界期制御
3. 学会等名 第64回日本神経化学会大会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------