

令和 6 年 5 月 25 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19363

研究課題名（和文）揺らぎ仮説の実態解明

研究課題名（英文）Deciphering the Wobble Hypothesis

研究代表者

田中 元雅（TANAKA, Motomasa）

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：40321781

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：翻訳過程における「揺らぎ仮説」の実態解明を目指して、これまでに申請者が開発してきたmRNA/tRNA同時リボソームプロファイリング法をさらに発展させ、より精度の高い網羅的解析シーケンス技術をほぼ確立させた。その手法を、リボソーム関連品質管理が障害されたマウスの脳試料へ応用したところ、未完成の翻訳産物（新生ポリペプチド鎖）の蓄積を防ぐために翻訳開始過程に阻害が生じること、逆にその阻害のために神経細胞の突起伸長が遅れ、発達障害がもたらされることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNAの遺伝情報がmRNAに転写されたあとに、どのようにしてリボソームがその遺伝情報をデコードし、タンパク質の合成に変換しているかを理解することは、あらゆる生命現象の根源に関わる。本研究で新たに開発する翻訳解析技術とバイオインフォマティクス解析手法は、疾患モデルの動物や細胞における翻訳解析に応用が可能であり、その疾患の病態解明や新たな治療法の開発につながる可能性がある。特に、どのような頻度、量の揺らぎ塩基が翻訳中のリボソームに取り込まれるかを明らかにすることは、翻訳過程の深い理解につながる。

研究成果の概要（英文）：In order to gain insights into wobble bases in mRNA translation, we have developed a novel simultaneous mRNA/tRNA ribosome profiling technique. This analytical method has allowed us to precisely analyze mRNA translation at single nucleotide resolution. We have applied this technique to a model mouse for neurodevelopmental diseases in which ribosome-associated quality control is dysregulated by lack of Ltn1, an E3 ligase. We found that in the Ltn1-deficient brains the process of translation initiation is significantly compromised, which in turn impaired dendritic outgrowth and thereby led to manifestation of neurodevelopmental phenotypes.

研究分野：構造神経科学

キーワード：翻訳 リボソーム tRNA コドン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、同義置換により翻訳速度が変わることによって、合成最中のタンパク質のフォールディング構造や機能まで変化しうることが示唆されてきた。つまり、ある mRNA コドンに対して「どの tRNA がリボソーム内に取り込まれ、実際の翻訳に使われるか」は、細胞機能の根本に関わるものの十分に理解されていない。それを明らかにするため、翻訳最中にあるリボソーム内に取り込まれた mRNA と tRNA を網羅的かつ精度高く解析する手法にはまだいくつかの問題点があった。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに申請者が開発してきた新たな mRNA/tRNA 同時リボソームプロファイリング法(Chen et al., Cell Reports, 2018)をさらに発展させ、新たな mRNA/tRNA 同時リボソームプロファイリング法を確立させ、「揺らぎ仮説」の実態解明を目指す。特に、揺らぎ塩基の使用頻度を調べるための実験系とパイオインフォマティクス解析のための基盤技術を確立する。特に、P部位の mRNA コドンと tRNA アンチコドンを高精度に同定するための試料調製やライブラリー作成の条件を最適化し、各アミノ酸における mRNA コドンと tRNA アンチコドンの相関を明らかにする。

3. 研究の方法

アンチコドンを含む tRNA の配列を網羅的に明らかにするため、ライブラリー条件をこれまでの手法からの高度化および最適化を進め、tRNA に関する RNA シーケンシングとリボソームプロファイリング実験を行った。特に、tRNA の配列や修飾を、より少ない試料から高い精度で調べることができる条件を探索した。また、mRNA の解析についても、ノンコーディング RNA における翻訳など、通常の CDS に由来する翻訳以外の翻訳過程を詳しく調べるためのデータ解析技術の開発を行った。さらに、mRNA/tRNA 同時リボソームプロファイリング法を用いてリボソーム関連品質管理機構の解明を試みた。リボソーム関連品質管理機構に関わり(1)、新生ポリペプチド鎖をユビキチン化するユビキチンリガーゼである Ltn1 を欠損させたマウス的大脑へ応用し、網羅的な mRNA および tRNA の翻訳解析を行った。

4. 研究成果

培養細胞およびマウス脳細胞抽出液を用いて、リボソームの P 部位の mRNA コドンと tRNA アンチコドンを高精度に同定するための試料調製やライブラリー作成の条件の最適化を進めた。その結果、より高い精度で、各種 tRNA 配列を分類し、かつ様々な tRNA 修飾のより正確な定量を行うことができるように、これまでの研究で用いてきたパイオインフォマティクス解析手法を変更し、既存のスク립トの改変を行った(2-4)。それによって、より少量の試料を用いて、より正確に mRNA コドンと tRNA アンチコドンの相関を調べることができる実験およびデータ解析のシステムをほぼ確立させた。

また、tRNA の解析に加えて mRNA の解析も進め、特にリボソーム関連品質管理に関わり、不完全な新生ポリペプチド鎖を分解させるユビキチン化する E3 リガーゼである Ltn1 を欠損させたマウス的大脑を用いた mRNA の翻訳解析を進めた(5)。その結果、Ltn1 欠損マウスが発達障害を示す理由として、以下に記すように翻訳開始過程の抑制が明らかになった。

Ltn1 KO マウス脳における翻訳抑制のメカニズムを明らかにするため、Ltn1 欠損マウスにおい

て10倍以上の異常な発現上昇を認めているTTC3が、翻訳制御にどのように関わっているか調べた。本研究で開発を行ってきた翻訳プロファイリングによる定量的な解析を進めたところ、Ltn1欠損マウスでは翻訳開始の段階が顕著に抑制されていることを、翻訳開始の阻害剤であるハリントニンを用いたリボソームプロファイリング実験から明らかにした(5)。つまり、TTC3の発現上昇のため翻訳開始の阻害を生じさせて全体の翻訳活性を低下させることで、不完全な新生ポリペプチド鎖のさらなる蓄積を防いでいることを明らかにした。逆に、神経細胞において、TTC3の発現上昇のために翻訳の阻害が起こることによって神経突起の成長が遅れること、それによって神経発達が遅れて認知障害が生じたことを、TTC3のノックダウンによるレスキュー実験から明らかにした。さらに、このようなmRNAの網羅的な翻訳解析によって、リボソーム内における特異的なtRNAの変化が示唆された。

また、これらの研究を通して、リボソームによって翻訳される通常のコーディング配列(CDS)だけでなく、非翻訳領域に存在するupstream ORF(uORF)やノンコーディングRNAについても、実際に翻訳されているかどうかを判断するためのデータ解析手法を確立させた。それによって、通常のCDSにおける翻訳だけでなく、より幅広いIRNAに対して、mRNAおよびtRNAのパイオインフォマティクス解析から翻訳の詳細を明らかにできた。さらに、細胞内ストレスによって、リボソーム内に取り込まれたtRNAの種類や揺らぎ塩基が、どのような影響を受けるかを解析する実験系をほぼ確立させることができた。

<引用文献>

- (1) Brandman, O. Hedge, R.S., *Nat. Struct. Mol. Biol.* **23**, 7-15 (2016).
- (2) Chen, C.W., Tanaka, M. Genome-Wide Translation Profiling by Ribosome-Bound tRNA Capture. *Cell Reports*, **23**, 608-621 (2018).
- (3) Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. NT Ingolia, S Ghaemmaghami, JRS Newman, JS Weissman, *Science* **324**, 218-223 (2009).
- (4) Behrens A, Rodschinka G, Nedialkova DD. High-resolution quantitative profiling of tRNA abundance and modification status in eukaryotes by mim-tRNAseq. *Mol Cell*. **81**, 1802-1815 (2021).
- (5) Endo R., Chen Y.K., Burke J., Takashima N., Suryawanshi N., Hui K.K., Miyazaki T., Tanaka M. Dysregulation of ribosome-associated quality control elicits cognitive disorders via overaccumulation of TTC3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **120**, e2211522120 (2023).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Endo R., Chen Y.K., Burke J., Takashima N., Suryawanshi N., Hui K.K., Miyazaki T., Tanaka M.	4. 巻 120
2. 論文標題 Dysregulation of ribosome-associated quality control elicits cognitive disorders via overaccumulation of TTC3	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.	6. 最初と最後の頁 e2211522120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.221152212	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 5件／うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Motomasa Tanaka
2. 発表標題 Dysregulated Translation Rhythms of Synaptic Genes in Neuropsychiatric Disorders
3. 学会等名 GRC Translation Machinery in Health and Disease（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Motomasa Tanaka
2. 発表標題 Deciphering neurodevelopmental disorders by profiling mRNA translation in neurons
3. 学会等名 CMHA International Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Motomasa Tanaka
2. 発表標題 Deciphering mental disorders by profiling mRNA translation in neurons
3. 学会等名 The 44th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, The 1st CJK International Meeting（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Motomasa Tanaka
2. 発表標題 Dysregulation of ribosome-associated quality control elicits neurodevelopmental disorders
3. 学会等名 GRC Mini Symposium, Academia Sinica (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nayan Suryawanshi, Takayasu Mikuni, Motomasa Tanaka
2. 発表標題 Activity-dependent Translatome Analysis Reveals Novel Protein Synthesis
3. 学会等名 A*STAR-RIKEN Joint Workshop, Singapore (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>神経疾患の鍵を握る細胞の“品質管理” https://www.riken.jp/pr/closeup/2023/20230524_1/index.html Making a bad situation worse https://www.riken.jp/medialibrary/riken/pr/publications/riken_research/2023/rr202309.pdf タンパク質の品質管理 https://cbs2.riken.jp/magazine/06/#page=9</p>
--

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
---------	---------