

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560370

研究課題名(和文)運動誘発性炎症作用における翻訳動態変化の網羅的解析

研究課題名(英文)Global analyses of translational dynamics in exercise-induced inflammation

研究代表者

鈴木 克彦 (Suzuki, Katsuhiko)

早稲田大学・スポーツ科学大学院・教授

研究者番号：80344597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：これまで多くの研究がなされてきた転写動態変化に関連する作用機序に加え、翻訳動態変化も生体システムに重要な影響を及ぼしている。また近年、これまでは技術的に困難であった翻訳動態変化を網羅的に解析可能な技術(Ribosome profiling)が開発され、次世代シーケンサーにより解析することで、それぞれのmRNAが実際はどの程度翻訳されていたのかを網羅的かつ1塩基単位の高精度で解析することができるようになった。同技術を用いて運動が翻訳動態に与える影響を網羅的に解析し、未知であった作用機序の解明に加え、急性炎症・抗炎症応答時においても新たなシス配列因子を発見することができた。

研究成果の概要(英文)：Not only the dynamic changes in transcription, but also those in translation in relation with mechanisms of action have great impacts on biological systems. In addition, recently, technological advancement due to ribosome profiling using the next-generation sequencer enables us to analyze translational dynamics globally and with a high degree of accuracy for one nucleotide unit. Using this technology, we investigated the effect of exercise on translational dynamics with a genome-wide, and revealed new mechanisms of action together with novel cis-elements in response to acute pro- and anti-inflammatory responses.

研究分野：スポーツ科学

キーワード：運動 翻訳動態 Ribosome profiling 次世代シーケンサー マウス 骨格筋 遺伝子 タンパク質

1. 研究開始当初の背景

これまで多くの研究がなされてきた転写動態変化に関連する作用機序に加え、翻訳動態変化も生体システムに重要な影響を及ぼしていることがわかってきた。また近年、これまでは技術的に困難であった翻訳動態変化を網羅的に解析可能な技術 (Ribosome profiling; Ribo-Seq) が開発された。Ribo-Seq では、翻訳阻害剤等で翻訳中のリボソームをメッセンジャーRNA (mRNA) 上に固定し、リボソームに包含されておらず翻訳されていない mRNA 領域を酵素分解し、残されたリボソームに包含され翻訳されていた領域を特異的に抽出・精製し次世代シーケンサーにより解析することで、それぞれの mRNA が実際はどの程度翻訳されていたのかを網羅的かつ 1 塩基単位の高精度で解析することができる。同技術を用いて酵母やマウス胚細胞などの翻訳ダイナミクスが検証され始めたが、運動が個々の遺伝子の翻訳動態にどのような影響を与えるのかはわかっていなかった。

2. 研究の目的

運動時においても、翻訳動態が劇的に変化していることが強く考えられる。理由の一つとして、運動によって大きな影響を受けるシグナル経路の一つである mammalian Target of Rapamycin (mTOR) 経路があり、一過性持久性運動によって mTOR 経路が活性化され、翻訳開始複合体タンパク質の産生と全体のタンパク質産生効率が増加すると報告されていることや、一方で、持久性運動様刺激に起因する mTOR 経路の阻害や翻訳調整機構の不活性化、さらに mTOR の抑制と運動トレーニングによる筋肥大との間に強い相関が認められるなど矛盾点も多く、運動が翻訳動態へ及ぼす影響が大きいことは共通しているが、未解明な部分が多い。

そこで本研究では、マウスの生体リボソームプロファイリングを確立し、一過性の持久性運動によって骨格筋の個々の遺伝子の翻訳動態がどのように変化するのかを世界で初めて網羅的かつ 1 塩基単位の高精度で検証することを目的とした。また、研究状況の進捗が当初の予定を上回るものであったため、上記目的に加え、新たに網羅的翻訳動態変化のデータを多角的に解析することで、翻訳動態変化を誘導する新規作用機序因子の発見も目的とした。

3. 研究の方法

まず、生体リボソームプロファイリングを確立するために、C57BL/6J 雄マウスから採取した骨格筋を用いてリボソームプロファイリングの最適化を行った。翻訳に関する情報

が適切に得られているか確認するために、リボソームプロファイリングの特徴である、(1) 翻訳領域特異的に現れるシグナル、(2) それぞれの遺伝子に 3 つ存在するコーディングフレームのうち一つに鋭いピークが現れる 3 塩基周期性の 2 点を確認した。

マウスの生体リボソームプロファイリングを確立した後、マウスの一過性持久性運動モデルを用いて、一過性運動が翻訳動態に与える影響を網羅的に検討した。9~10 週齢の C57BL/6J 雄マウス (各群 n = 6) に持久性運動 (20 m/分) を 1 時間実施し、骨格筋を採取する直前に 50mg/ml の翻訳阻害剤であるシクロヘキサミドを骨格筋に注射した。網羅的転写動態解析 (mRNA-Seq) と Ribo-Seq のサンプル調整に際し、個体間差の影響を最小化するために、非運動群と運動直後群それぞれ 3 個体分の骨格筋を混合し n=1 とし (各群 n = 2)、次世代シーケンサー用のサンプルを調整した。mRNA-Seq に関しては、IonTorrent 次世代シーケンサー用のサンプル調整キットに準じて行った。Ribo-Seq においては、翻訳中であつたリボソームを固定した後、RNaseI で翻訳されていない (リボソームに包含されていない) mRNA 部分を酵素分解し、スクロースクッション法にてモノソームを単離・精製し、RNaseI により脱リン酸化された 5' とリン酸化された 5' をそれぞれリン酸化・脱リン酸化処理し、シーケンサー用のアダプターを付加した後、IonTorrent 次世代シーケンサー用のサンプル調整キットに準じてシーケンスライブラリーを調整し、IonPGM にてシーケンスを行った。

得られたシーケンスリードを IonTorrent サーバーのアライナーを用いて Ensembl より取得したマウス遺伝子のコーディング領域 (CDS) にマッピングを行った。その際、リード長が 24 塩基以下のものは排除し、複数領域にマップされたリードに関しては最もマッピングスコアの良いものを採用した。ある程度の発現量 (> 125 Read Per Million; RPM) が認められた遺伝子 (n = 1011) に対して主成分分析を行うとともに、得られた発現量/翻訳量データに対し edgeR を用いることで Trimmed Mean of M (TMM) 法にて標準化し、統計モデルに負の二項分布を用いて誤差を推定し、変動遺伝子を検出した。そのなかで、転写動態変化非依存的かつ翻訳動態が有意に変動している遺伝子に着目し、リアルタイム PCR やウエスタンブロットを用いて確認した。

リボソームプロファイリングを立ち上げる際に用いた RAW264 マクロファージ様細胞株の急性炎症・抗炎症モデルにおける mRNA-Seq と Ribo-Seq のデータを用いて新規作用機序因子を探索した。具体的には、リポ多糖 (LPS) (100ng/ml) と LPS (100ng/ml) + デキサメサゾン (10 μM) によって 30 分の急性炎症・抗炎症を誘導した RAW264 細胞を、上記の方法で mRNA-Seq と Ribo-Seq 用のシーケ

ンスライブラリーを調整し、IonPGM 次世代シーケンサーを用いてシーケンスを行った。同様に、IonTorrent サーバーのアライナーを用いて Ensembl より取得したマウス遺伝子のコーディング領域(CDS)にマッピングを行い、リード長が 24 塩基以下のものは排除した。変動遺伝子解析に際し、9620 遺伝子 (> 15 RPM) に対して edgeR を用いて解析し、転写動態変動遺伝子と翻訳動態変動遺伝子を得た。それぞれの変動遺伝子群に対し、遺伝子オントロジー解析や、Multiple Em for Motif Elicitation を用いていずれかの群に有意に存在しているシス配列因子を探索した。

4. 研究成果

RAW264 細胞株を用いて立ち上げたリボソームプロファイリングを生体モデルに適用し、マウスの運動モデルにした。生体リボソームプロファイリングにおいても、RAW264 細胞と同じように、(1) 翻訳領域特異的に現れるシグナル、(2) それぞれの遺伝子に 3 つ存在するコーディングフレームのうち一つに鋭いピークが現れる 3 塩基周期性の 2 点を確認することができた。これは、生体モデルにおいても、翻訳プロファイルを 1 塩基精度で捉えることができたことを示している。

マウスの一過性持久性運動モデルに対して網羅的転写動態・翻訳動態解析を行った結果、従来の手法では発見が難しかった事象や因子が発見できた。非運動群と運動直後の群それぞれの mRNA-Seq と Ribo-Seq のデータに対して主成分分析を行ったところ、運動の有無の差よりも転写動態と翻訳動態プロファイルとの間の差が大きいことが認められた。これにより、転写動態と翻訳動態の違いは、一過性運動がもたらす影響よりも大きいということが示唆できる。これは、これまで示されてきた、転写動態プロファイルではそれぞれのタンパク質のプロファイルを反映するには乏しいとの知見と一致し、転写とタンパク質との間に位置する翻訳調節の重要性を改めて示すものと考えられる。

さらに、一過性運動によって転写動態非依存的に翻訳動態が変化している遺伝子とその意義を示唆することができた。一過性運動依存的に転写動態もしくは翻訳動態が有意に変動する遺伝子を edgeR により解析したところ、転写レベルでは有意な差が認められず翻訳動態のみが有意に増加している遺伝子が見つかった。この遺伝子に関しては、これまでは運動によって変動することが知られていなかったが、本研究によって初めてこの遺伝子が翻訳調節優位に運動の影響を受けていることが示された。また、過去に報告されている当該遺伝子のノックアウトマウスの表現型を考慮すると、この遺伝子の翻訳調節優位な増加が運動時の持久力やパフォーマンスの維持に関与していることが示唆された。これらの結果は論文としてまとめ、国

際誌に発表済みである。

本研究では、当初の予定を上回る進捗があったため、網羅的なデータをより多角的に解析し、新たな作用機序因子を探索することも行った。具体的には、リポ多糖 (LPS) (100ng/ml)のみと LPS(100ng/ml) + デキサメサゾン (10 μM) によって 30 分の急性炎症・抗炎症を誘導した RAW264 細胞の mRNA-Seq と Ribo-Seq のデータを、edgeR により解析し、それぞれに対応する変動遺伝子を探索した。その中でも、LPS のみによって翻訳動態が有意に変動する遺伝子群と LPS と DEX により翻訳動態が有意に変動する遺伝子群に着目し、それぞれの 5' 非コーディング領域 (Untranslated Region; UTR)、CDS、3' UTR の配列を比較し、いずれかの群に特異的に存在する配列を探索した。その結果、3' UTR においてのみ特異的に存在し、その他の群 (転写動態変化群など) では有意な存在を見せないシス配列因子が見つかった。加えて、これらのシス配列因子に対し、それぞれの群 (LPS 依存的な転写動態変動群、LPS 依存的な翻訳動態変動群、LPS+DEX 依存的な転写動態変動群、LPS+DEX 依存的な翻訳動態変動群) において、フィッシャーの正確確率検定で確認したところ、これらのシス配列因子は LPS+DEX 依存的な翻訳動態変動群においてのみ有意な値を示した。これは、これら新規シス配列因子が、LPS+DEX 依存的な翻訳動態変動遺伝子の 3' UTR 特異的に存在し、急性抗炎症応答時の翻訳動態変化の作用機序に関与している可能性を示唆している。上記同様に、これらの新しい知見を論文としてまとめ、国際誌に報告した。

以上のように、本研究は運動が翻訳動態に与える影響を網羅的に解析し、未知であった作用機序を発見するという当初予定していた目的に加え、急性炎症・抗炎症応答時においても新たなシス配列因子を発見することができた。今後は、翻訳動態変化の経時変化を検討するなど、本研究をより発展させ、運動や急性炎症・抗炎症時における作用機序のさらなる解明をめざす。

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 2 件)

Hiroaki Sako, Koichi Yada, and Katsuhiko Suzuki, Genome-Wide Analysis of Acute Endurance-Induced Translational Regulation in Mouse Skeletal Muscle, PLoS One, 2016; 11(2): e0148311. (査読有)

Hiroaki Sako and Katsuhiko Suzuki, Genome-wide Analysis of Acute Inflammatory and Anti-Inflammatory

Responses in RAW264 Cells Suggests cis-Elements Associated with Translational Regulation, Journal of Data Mining in Genomics & Proteomics, 2016; 7(2). (査読有)

〔学会発表〕(計 1 件)

佐古博皓, 鈴木克彦, 一過性運動や急性炎症刺激にともなう翻訳速度変化の解析, 第70回日本体力医学会大会, ポスター発表, 2015年9月18日 - 2015年9月20日 和歌山市.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

早稲田大学予防医学・応用免疫学研究室

<http://www.f.waseda.jp/katsu.suzu/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 克彦 (SUZUKI, Katsuhiko)

早稲田大学・スポーツ科学学術院・教授

研究者番号: 80344597

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

佐古 博皓 (Sako, Hiroaki)

早稲田大学大学院・スポーツ科学研究科

博士課程