

令和元年6月6日現在

機関番号：82401

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2014～2018

課題番号：26116004

研究課題名（和文）tRNAリボソームプロファイリングの開発と応用

研究課題名（英文）Development and application of tRNA ribosome profiling technology

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） 129,800,000円

研究成果の概要（和文）：mRNAの翻訳はすべての生命現象の根幹をなし、その異常は精神・神経変性疾患を含む様々なヒト疾患に関連している。本研究では、翻訳過程を詳細に明らかにするために、翻訳中のリボソームの中に存在するmRNAだけでなくtRNAも含めて解析できる新規なリボソームプロファイリング技術を開発した。その結果、tRNAの異常に伴う新たな翻訳抑制メカニズムを発見した。また、認知症や自閉症のモデルマウスを用いて、それらのマウスが翻訳異常を示すことを見出し、それが社会性の欠如などの精神障害を導くことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

翻訳解析を行うための新たな技術を開発したことで、細胞に対して、環境ストレスなどの変化がmRNAの翻訳過程、ひいてはタンパク質の恒常性維持にどのように影響を与えているかを詳細に解析することが可能になった。また、精神・神経変性疾患モデルマウスを用いて、その脳内や神経細胞内での翻訳異常が社会性の欠如などの精神障害を導くことを見出した本研究によって、翻訳因子や翻訳制御に基づいた、精神障害に対する新たな治療戦略の開発に道を拓くと期待できる。したがって、本研究の成果は、生命科学の広い分野において波及効果を与えたと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Translation of mRNA is a fundamental biological process in living organisms.

We developed a simultaneous mRNA/tRNA ribosome profiling technique that allowed us to capture both mRNA and tRNA inside ribosomes and analyze mRNA translation in details. Using this technology, we found a novel translation inhibitory mechanism in which altered tRNA is involved. In addition, we have developed mouse models of FTLD (frontotemporal lobar degeneration) and autism and found that dysregulated mRNA translation in neurons is responsible for mental disorders including impaired anxiety and social behaviors. In particular, we found that altered local translation in dendrites is closely involved in mental disorders.

研究分野：構造神経科学

キーワード：翻訳 tRNA リボソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

tRNAにはコードするアミノ酸が同じtRNAが存在しているが、その生理的意義には不明な点が多い。近年、翻訳時にどのtRNAが選択されるかで翻訳速度、それによって新生鎖の構造、機能に変化をもたらすことが見出されてきた。しかし、技術的な難しさから、翻訳時に実際にどのtRNAがどのように選択されているかは不明であった。また、精神・神経変性疾患や自閉症などの発達障害では、mRNAの翻訳異常が指摘されていた。しかし、これまで技術的な制約もあり、具体的に神経細胞のどのような翻訳異常が精神障害を導くのかは十分に理解されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、翻訳最中のmRNAに加え、tRNAの配列を次世代シーケンサーで解析し、実際の翻訳に使われているtRNAを網羅的かつ定量的に明らかにするtRNAリボソームプロファイリング (tRNA-Rbs-P)の技術開発を行う。さらに、同一試料からtRNAとmRNAのRbs-Pを同時に行う手法を確立させる(図1)。以上から、tRNA使用率の決定、tRNAの修飾と断片化などの網羅的解析を行い、さらに、野生型および精神・神経変性疾患モデルマウスの脳や神経細胞を用いて、樹状突起における局所翻訳の実態解明の解明と精神障害発現との相関解明を目指した。

3. 研究の方法

出芽酵母の同一試料から、ポリソームに結合したmRNAとtRNAをスクロース勾配実験によって単離、精製し、それらにタグをつけ逆転写反応を行う。その後、PCRでそのDNA断片を増幅し、ライブラリーを作成した。比較として、全く同じ酵母抽出液から、リボソームに結合していない(細胞質全体から)mRNAとtRNAも用いた。それらの配列を次世代シーケンサーで網羅的に読み、膨大な配列データのゲノム配列へのマッピングを行った。各配列のリード数によって翻訳最中のmRNA断片やtRNAを定量し、翻訳速度の遅い(より多くのmRNAがリボソームに結合した)遺伝子領域において、mRNAコドンの最適さやtRNA修飾との相関を調べた。また、tRNAの修飾を検出し、そのtRNA修飾の翻訳過程への関与をtRNA修飾酵素の遺伝子欠損株を用いて検討した。

また、栄養枯渇や酸化ストレスなどのストレス存在下での翻訳抑制の分子機序を一塩基、コドンレベルで明らかにするため、これらのRbs-P技術を応用した。特に、翻訳に使われるtRNAの選択率の変化、tRNAの修飾や断片化の翻訳抑制への関与について、網羅的な検討を加えた。

さらに、マウス脳や神経細胞の樹状突起での局所翻訳の解明を目指し、精神・神経変性疾患モデルマウス個体や初代培養ニューロンを用いて、Rbs-Pを含む翻訳解析を行った。特に、各種翻訳解析から、精神障害につながる翻訳異常の原因を調べた。

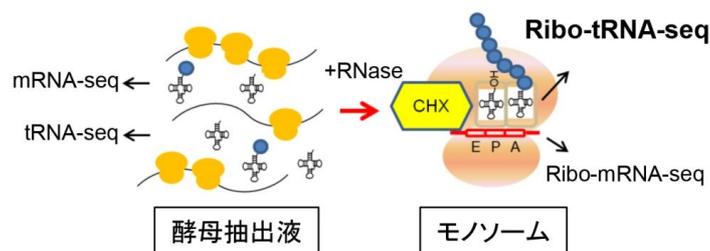


図1 tRNA/mRNA同時リボソームプロファイリング法の開発

同一酵母から四つのライブラリーを作成した。酵母抽出液から tRNA-seq、mRNA-seq 用のライブラリー、RNA 分解酵素 (RNase) 処理後のモノソームから Ribo-tRNA-seq、Ribo-mRNA-seq 用を作成した。

4. 研究成果

出芽酵母細胞の同一試料から、翻訳最中のリボソームに結合したRNAをスクロース勾配実験などによって単離、精製し、それらを増幅してライブラリーを作成するためのプラットフォームを確立させた。比較として、全く同じ酵母抽出液から、細胞質全体からのRNAも同じ試料から調製した。それらの配列を次世代シーケンサーで網羅的に読み、膨大な配列データのゲノム配列へのマッピングを行った。これら一連の実験手順を確立させ、再現性の高いデータを取ることに成

功した。

mRNA翻訳の阻害は様々な細胞の状態の変化や疾患とも関連しているが、その詳細はいまだ不明な点が多い。そこで、翻訳阻害を起こすことが知られている酸化ストレスなどの様々なストレス条件下において本手法を用いて解析を行った。その結果、翻訳阻害のメカニズムを明らかにできる分子バイオマーカーを見出した。また、様々な環境ストレス存在下での出芽酵母の翻訳阻害メカニズムの解明を目指した研究をさらに進めた。特に、tRNAの修飾に関わると考えられるオルガネラや遺伝子に関する欠損酵母株などを用いた解析を行い、それによって翻訳阻害の表現型や翻訳モードがどのように変化するかをリボソームプロファイリング法などから検討した。その結果、tRNA修飾がmRNA翻訳に与える影響に関して、翻訳阻害に関して、tRNAが関わる新たな分子メカニズムに関する知見を得た。

精神・神経変性疾患モデルの神経細胞の翻訳について翻訳解析を行った。その結果、精神障害に広く関わる DISC1 が神経細胞の樹状突起における局所翻訳に関わることを見出した。また、その関与が、神経刺激に伴う神経活動に依存したことから、DISC1 が神経活動に依存した（特に樹状突起での）翻訳を制御することを新たに見出した。また、その翻訳制御のメカニズムを調べたところ、40S リボソームサブユニットに DISC1 が比較的多く存在し、各種翻訳開始因子とも結合すること、翻訳開始を促進させる役割を持つことをリコンビナントタンパク質で再構成した *in vitro* 翻訳実験などから明らかにした。

また、認知症や社会性の欠如などの表現型を示す前頭側頭葉変性症(FTLD)のモデルマウスを新たに構築し、そのマウスの翻訳解析を行った。その結果、FTLD 原因タンパク質の TDP-43 と DISC1 が共凝集することによって局所翻訳の機能が低下し、社会性の欠如や過活動などの精神障害をもたらすことを明らかにした。

さらにタンパク質の凝集化と精神障害の関係を調べる目的で、オートファジー機能を興奮性または抑制性の神経細胞のみで選択的に欠損させた二種類のマウスを構築した。その結果、両方のマウスが、社会性の欠如や巣作り行動の異常などを含む自閉症様の表現型を示すことを見出した。その分子メカニズムを新規に開発したプロテオミクス手法で調べたところ、翻訳レベルが低下すること、GABA 受容体の輸送に関わる GABARAP タンパク質群が p62 依存的に凝集することで、細胞表面の GABA 受容体が減少し、興奮性・抑制性のバランスが崩れることを分子生物学実験、電気生理実験から見出した。以上から、タンパク質の凝集化は他のタンパク質との共凝集を通して幅広く、精神障害をもたらすことを明らかにした。

以上から、翻訳解析を行うための Rbs-P を含む新たな技術を開発したことで今後、細胞に対して、環境ストレスなどの変化が mRNA の翻訳過程、ひいてはタンパク質の恒常性維持にどのように影響を与えているかを詳細に解析することが可能になった。また、精神・神経変性疾患モデルマウスを用いて、その脳内や神経細胞内での翻訳異常が社会性の欠如などの精神障害を導くことを見出した本研究によって、翻訳因子や翻訳制御に基づいた、精神障害に対する新たな治療戦略の開発に道を拓いた。

したがって、本研究の成果は、生命科学の広い分野において波及効果を与えるものと考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Sugiyama S., Tanaka M. Distinct segregation patterns of yeast cell-peripheral proteins uncovered by a method for protein segregatome analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 116, 8909-8918 (2019). doi: 10.1073/pnas.1819715116. 査読あり
2. Hui K.K., Takashima N., Watanabe A., Chater T.E., Matsukawa H., Nekooki-Machida Y., Nilsson P., Endo R., Goda Y., Saido T.C., Yoshikawa T., Tanaka M. GABARAPs dysfunction by autophagy deficiency in adolescent brain impairs GABA_A receptor trafficking and social behavior. *Sci Adv.*, 5(4), eaau8237 (2019). doi: 10.1126/sciadv.aau8237. 査読あり

3. Endo R., Takashima N., Nekooki-Machida Y., Komi Y., Hui K.K., Takao M., Akatsu H., Murayama S., Sawa A., Tanaka M. TDP-43 and DISC1 Co-Aggregation Disrupts Dendritic Local Translation and Mental Function in FTLD. *Biol. Psychiatry*, 84, 509-521 (2018). doi: 10.1016/j.biopsych.2018.03.008. 査読あり
4. Chen C.W., Tanaka M. Genome-Wide Translation Profiling by Ribosome-Bound tRNA Capture. *Cell Rep.*, 23, 608-621 (2018). doi: 10.1016/j.celrep.2018.03.035. 査読あり
5. Ohhashi Y., Yamaguchi Y., Kurahashi H., Kamatari Y.O., Sugiyama S., Uluca B., Piechatek T., Komi Y., Shida T., Müller H., Hanashima S., Heise H., Kuwata K, Tanaka M. Molecular basis for diversification of yeast prion strain conformation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 115, 2389-2394 (2018). doi: 10.1073/pnas.1715483115. 査読あり

〔学会発表〕(計13件)

1. Motomasa Tanaka, TDP-43 and DISC1 Co-Aggregation Disrupts Dendritic Local Translation and Mental Function in FTLD, Post ICN Neuroscience meeting (招待講演)(国際学会)、2018年9月27日、Keio Plaza Hotel, 東京都
2. Motomasa Tanaka, TDP-43 and DISC1 Co-Aggregation Disrupts Dendritic Local Translation and Mental Function in FTLD, International Symposium on “Proteins; from the Cradle to the Grave”(招待講演)(国際学会)、2018年8月26日～2018年8月29日、比叡山延暦寺、滋賀県
3. Motomasa Tanaka, Protein Co-Aggregation Disrupts Local Translation in Dendrites and Mental Function in FTLD, The 41st Annual Meeting of the Japanese Neuroscience Society (招待講演)、2018年7月26日～2018年7月29日、神戸コンベンションセンター、神戸市
4. Motomasa Tanaka, Abnormal local translation in dendrites impairs cognitive functions in neuropsychiatric disorders, The 12th Uehara international symposium (招待講演)(国際学会)、2017年6月12日～2017年6月14日、ハイアットリージェンシー、東京都
5. Motomasa Tanaka, Genome-wide translation profiling by ribosome-bound tRNA capture, International Symposium on Protein Quality Control (国際学会)、2017年6月4日、東大寺総合文化センター、奈良市
6. Motomasa Tanaka, Genome-Wide Translation Profiling by Ribosome-Bound RNA Capture, 第39回日本分子生物学会(招待講演)、2016年11月30日～2016年12月02日、パシフィコ横浜・横浜市
7. 田中元雅、リボソーム内tRNAの解析による環境ストレス細胞プロファイリング、第89回日本生化学大会(招待講演)、2016年09月25日～2016年09月27日、東北大学・仙台市
8. Motomasa Tanaka, TDP-43/DISC1 Aggregation Impairs Local Dendrite Translation and Mental Function in FTLD, Nascent Chain Biology Meeting (招待講演)(国際学会)、2016年09月01日～2016年09月03日、富士レークホテル、山梨県
9. Motomasa Tanaka, Ribosome-bound RNA Profiling for Translation Control Studies in Yeast, RNA2016 satellite-symposium(招待講演)(国際学会)、2016年06月27日～2016年06月27日、京都大学・京都市
10. Motomasa Tanaka, Molecular mechanism of impaired dendritic local translation in neuropsychiatric disorders, RNA regulation and neuroscience (招待講演)(国際学会)、2015年10月29日～2015年10月29日、東北大学、仙台市
11. Motomasa Tanaka, Global analysis of translation inhibition caused by environmental stressors in

yeast、Nascent-chain Biology Meeting 2015 in Tokyo (招待講演)(国際学会)、2015年10月01日～2015年10月01日、東京大学、東京都

12. Motomasa Tanaka、A novel translational analysis focusing on tRNA、第37回日本分子生物学会(招待講演)、2014年11月25日～2014年11月25日、パシフィコ横浜、横浜市
13. 田中元雅、tRNAリボソームプロファイリングの技術開発と翻訳解析への応用、第14回日本蛋白質科学会(招待講演)、2014年06月27日～2014年06月27日、ワークピア横浜、横浜市

〔図書〕(計 4件)

1. 遠藤良、田中元雅、注目の遺伝子 TDP-43、分子精神医学、先端医学社、19、42-45、(2019).
2. 中川幸姫、田中元雅、シャペロンによるプリオン凝集体の形成と伝播の制御、蛋白質代謝医学—構造・機能の研究から臨床応用まで、田中啓二企画、医学のあゆみ、医歯薬出版、1111-1115 (2018).
3. 田中元雅、プリオン様タンパク質の感染性の本体とその生成分子機構の解明、NEUROINFECTION、日本神経感染症学会、22、6-9 (2017).
4. 遠藤良、田中元雅、脳内に異常タンパク質が広がる!?!—プリオン病から認知症へ、ここまでわかった!脳とこころ(こころの科学増刊)、加藤忠史編、日本評論社、125-130 (2016).

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称: タンパク質合成を解析する方法、及びその利用

発明者: 田中元雅、Chein-Wen Chen

権利者:

種類:

番号: 2017-236458

出願年: 2018

国内外の別: 国内

取得状況(計 0件)

〔その他〕

所属機関でのプレスリリース:

- (1) 翻訳中 tRNA の網羅的解析手法を開発

http://www.riken.jp/pr/press/2018/20180411_1/

- (2) アミロイド構造の多様性の原因解明

http://www.riken.jp/pr/press/2018/20180322_1/

- (3) タンパク質の共凝集化による精神障害の発現

http://www.riken.jp/pr/press/2018/20180614_1/

- (4) オートファジー機能の欠損が自閉症様行動を誘導

http://www.riken.jp/pr/press/2019/20190411_1/

- (5) 細胞分裂時のタンパク質分配の偏りを網羅的に解析

http://www.riken.jp/pr/press/2019/20190426_3/

6. 研究組織

- (1) 研究分担者 なし

- (2) 研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。