

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (特設分野研究)

研究期間：2016～2019

課題番号：16KT0191

研究課題名(和文) 非開始コドンから翻訳されたタンパク質バリエーション中のストレスバイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of non-AUG translation products induced by stress for the investigation of new biomarkers

研究代表者

小川 哲弘 (Ogawa, Tetsuhiro)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・助教

研究者番号：40323480

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：疾患の早期発見を可能とする新規バイオマーカーの候補として、AUG以外のコドン(非AUGコドン)を開始コドンとする翻訳産物に注目した。これら非AUGコドンからの翻訳産物には、ストレスに反応して特定の翻訳開始因子依存的に発現するものが存在する。本研究では、このうち正規翻訳産物と共通のC末端領域を持ち、N末端長が異なるタンパク質バリエーションを探索した。リボソームプロファイリングと呼ばれる網羅的手法により解析を行った結果、熱ストレスに反応して発現すると推定される複数のタンパク質バリエーションを得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、様々なバイオマーカーが開発されてきたが、疾患の早期発見を可能とするものは限定的であった。このことから、これまでとは一線を画する、新たな視点に基づいたバイオマーカー探索が求められていた。本研究で注目した非AUGコドンからの翻訳産物は、これまでは例外、あるいは実験上のアーティファクトとして見過ごされてきた。今回、これら非AUGコドンからの翻訳産物の中に、ストレスの指標となり得る因子を見出すことに成功した。また、本研究を通して、有用なバイオマーカー取得の方法論を提案することが出来た。

研究成果の概要(英文)：To investigate new biomarkers for detection of early stage of diseases, we focused on proteins whose translation is initiated at non-AUG codons. It is known that part of non-AUG translation is induced by stress, which requires a specific translation initiation factor. In this study, we screened protein variants, which share the same C-terminal region with their canonical products and the N-terminal region is extended or truncated. Ribosome profiling analysis suggested protein variants, expressed by heat stress and the specific translation initiation factor, as a candidate of the new biomarker.

研究分野：細胞生物学

キーワード：バイオマーカー ストレス 非AUGコドン

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体を取り巻く環境には様々なストレスが存在し、これらはしばしば疾患誘導の原因となる。そこで、バイオマーカーと呼ばれる、特定の疾病の指標となる因子を測定することで、疾患の早期発見や進行度の評価が試みられている。例えば、がんや動脈硬化、血管の炎症などを誘導する酸化ストレスでは、「抗酸化作用因子の活性測定」や「蓄積した酸化物質そのものの定量」などが指標となる。しかし、前者は技術的な限界があり、後者においては、検出感度の上昇はすなわちストレスの進行を意味し、早期発見の観点からは相反する。このように、適切なバイオマーカーの設定には未だ議論の余地がある。仮に、ストレス特異的に発現するタンパク質そのものをバイオマーカーとして利用出来るならば、こうした問題点が克服されると考えられる。また、これまで注目されてこなかったものに目を向けることで、画期的な新規バイオマーカーの取得が期待される。

さて、これまでは、全てのタンパク質は AUG を開始コドンとして合成されることが常識であり、AUG 以外のコドン (非 AUG コドン) からの翻訳開始は例外とされていた。ところが近年、ストレスに応答した「非 AUG コドンからの翻訳開始」が想像以上に頻繁に起こっていることが、「リボソームプロファイリング」による解析から分かってきた。リボソームプロファイリングとは、翻訳途上にある mRNA 上の配列を網羅的に解析する手法である。これにより、飢餓状態にある出芽酵母やマウス胚性幹細胞において、AUG 以外のコドンを開始コドンとした翻訳が頻繁に起こることが示された。また、この非 AUG コドンからの翻訳開始は、ストレスや分化など、細胞の状態変化に誘導されることも分かった。このことから、これらストレスに応答して発現する非 AUG コドンからの翻訳産物は、バイオマーカー探索における宝庫であると期待された。

### 2. 研究の目的

本研究は、ストレス特異的に発現する非 AUG コドンからの翻訳産物を網羅的に探索し、これを通して、疾患原因となるストレスの早期発見に向けた新規バイオマーカーの取得を目指した。非 AUG からの翻訳産物としては、uORF (upstream open reading frame) にみられるものなど、様々な形態が知られている。これらのうち、ここでは「タンパク質バリエーション」に注目した。このタンパク質バリエーションとは、mRNA の 5' 非翻訳領域あるいは ORF 内に存在する、正規開始コドンと同一フレームにあり、AUG 以外のコドンから翻訳が開始されたものを指す。これにより、共通の C 末端領域を持ちながら、正規翻訳産物とは N 末端長が異なるタンパク質となる。このタンパク質バリエーションの機能については大部分が明らかにされていないが、正規翻訳産物に対するアンタゴニストとして働く例が知られている。また、N 末端シグナル配列やドメイン構造などの欠失・付加により局在性や機能が変化することで、ストレス応答性因子として機能することも報告されている。非 AUG コドンからの翻訳開始メカニズムについても、ほとんど分かっていない。しかしながら、近年、翻訳開始因子 eIF2A (eIF2 $\alpha$ とは異なる分子) がこれに関わることが示された。そこで、タンパク質バリエーション取得の効率性を上げるため、この eIF2A にも注目した。

### 3. 研究の方法

#### (1) タンパク質バリエーション解析に用いる細胞の作製

マウス tRNA 遺伝子の可変ループコード領域を標的とする gRNA を 2 種類作製した。この gRNA を用いた CRISPR/Cas9 法により、マウス線維芽細胞(Neuro2a)に存在する開始 tRNA 遺伝子の 6~7 割程度を破壊することを試みた。また、マウス C57BL/6 受精卵において、非 AUG コドンからの翻訳開始に関わる eIF2A の遺伝子のうちエキソン 2 および エキソン 4 を標的とし、CRISPR/Cas9 法により遺伝子破壊を行った。ここから胎児に発生させた後、これを取り出してマウス線維芽細胞 (MEF) を調製することで、eIF2A ノックアウト MEF を得た。破壊領域近傍の配列解析および抗 eIF2A 抗体を用いたウエスタンブロッティングを行うことで、適切に遺伝子破壊が出来た MEF を決定した。また、eIF2A ノックアウト受精卵を用いて、eIF2A ノックアウトマウスの作製を試みた。

#### (2) ストレスに応答して発現するタンパク質バリエーションの解析

野生株および eIF2A ノックアウト MEF に対して熱ストレスを作用させた。その後、Harringtonine (翻訳開始の特異的阻害剤) および Cycloheximide を添加することで、mRNA 上の翻訳開始点にリボソームを固定した。ここから調製した細胞ライゼートを Micrococcal Nuclease と反応させることで、リボソームと結合していない mRNA 領域を分解した。RNA を調製した後、アダプターが結合出来るように末端形状を修飾した。ポリアクリルアミドゲルを用いて低分子 RNA を精製した後、RNAseq を行った。得られた配列に基づいて、eIF2A の翻訳開始に利用されたコドンを決定した。このうち、正規開始コドン以外であり、かつ正規翻訳産物のオープンリーディングフレームと同一フレーム上にあるものを抽出した。以上の結果から、熱ストレスに応答して eIF2A 依存的に発現したと考えられるタンパク質バリエーションを推定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) タンパク質バリエント解析に用いる細胞の作製

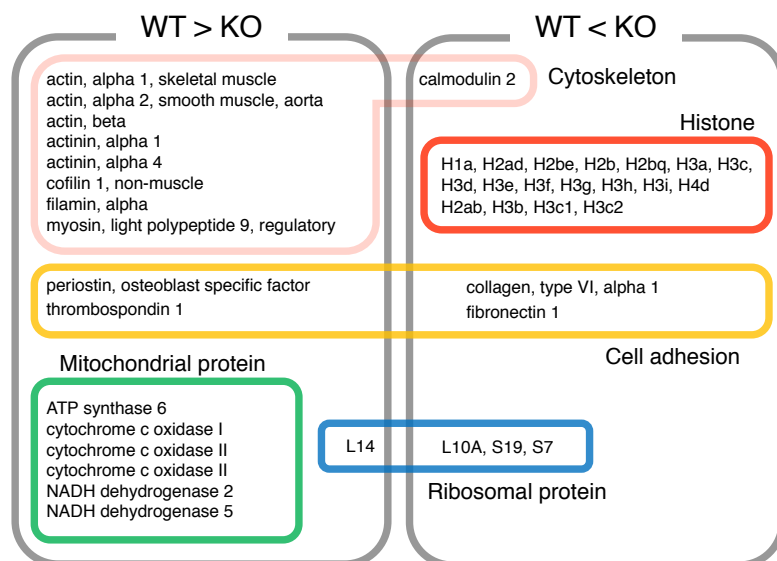
非 AUG コドンからの翻訳開始に際しては、伸長 tRNA が利用されると考えられる。大腸菌では、開始コドンからの厳密な翻訳開始は開始 tRNA 量に依存しており、これが不足すると、相対的に増加した伸長 tRNA による翻訳開始が活性化される。また、自然界の細菌や出芽酵母、HeLa 細胞などでは、開始 tRNA 量を積極的に調節することで、ストレス環境への適応化が図られることが示唆されていた。そこで、人為的に開始 tRNA 量を減少させることで、恒常的にタンパク質バリエントを発現する細胞の作出を試みた。2 種類の gRNA を用いた CRISPR/Cas9 法により、Neuro2a における一部の開始 tRNA 遺伝子の破壊を行った。条件を種々に検討し、gRNA1、および gRNA2 から最終的にそれぞれ 22, 36 クローン of 細胞を得た。しかし、ほぼ全ての株において、生育速度が大幅に低下していた。また、大部分の破壊株で細胞形状に異常がみられた。これらのことから、ここで作製した細胞株を実験に供することは困難と判断した。

最近、翻訳開始因子 eIF2A が、ストレスにตอบสนองした非 AUG コドンからの翻訳開始に関与することが報告された。eIF2A を発現しない細胞を作製し、ストレス下でのタンパク質発現を野生株と比較することで、eIF2A に依存したタンパク質バリエントが取得出来ると考えた。そこで、マウス C57BL/6 受精卵において、eIF2A 遺伝子のエキソン 2 および エキソン 4 を標的として遺伝子破壊を行った。このうち、エキソン 2 を標的とした場合、13.5dpc で全ての胚に退行がみられた。一方、エキソン 4 を標的とした際には、同 13.5dpc で 1 腹から 10 匹の胎児を取得することに成功した。ここからマウス胎児線維芽細胞 (MEF) を調製した。また、ノックアウトマウスの作製を並行して行ったが、個体を得ることは出来なかった。eIF2A がストレス応答性因子の発現に関与するのであれば、eIF2A ノックアウトマウスはストレスに高感受性を示し、パイオマーカ-の性能評価における重要なツールとなると期待される。今後は、gRNA の再設計など更に条件検討を行うことで、作製を目指すことが重要と考える。

##### (2) ストレスにตอบสนองして発現するタンパク質バリエントの解析

eIF2A は、正規翻訳開始因子 eIF2 $\alpha$  がストレスにより不活性化した際に、そのバックアップとして機能する。そこで、eIF2 $\alpha$  を不活性化し、かつメカニズムの解析が進んでいる熱ストレスに注目した。野生型 MEF および eIF2A ノックアウト MEF に対して熱ストレスを作用させた後、リボソームプロファイリングを行うことで、ストレスにตอบสนองして eIF2A 依存的に発現したと考えられるタンパク質バリエントを網羅的に解析した。得られたバリエントでは、開始コドンとして CUG, GUG が多く用いられていたが、これは過去の報告と一致していた。次に、得られた因子について機能ごとにグループ化した (下図参照)。eIF2A のノックアウトにより発現が減少したもの (「WT > KO」と表示) として、細胞骨格、細胞接着に関与する因子が複数同定された。これらは、熱ストレスにตอบสนองして eIF2A 依存的に発現するタンパク質バリエントと考えられる。一方、当初予想していなかったが、eIF2A ノックアウトにより発現が上昇したタンパク質バリエント (「WT < KO」と表示) も得られた。これには、特にヒストンタンパク質やリボソームタンパク質などが含まれていた。これらは、ストレスにตอบสนองして eIF2A により発現が抑制されるものと考えられる。

ヒト塩基性線維芽細胞増殖因子 (Fibroblast Growth factor-2 (FGF-2)) には、正規開始コドンの上流に、同一フレーム上に 3 つの CUG コドンが存在する。そして、HeLa 細胞において、これら CUG コドンからの翻訳開始が促進されることが示されていた。そこで、これに eIF2A が関与する可能性について検証した。内在性 FGF-2 は、ウエスタンブロッティングによる検出が困難であった。そこで、エピゾーマルベクターを用いて、HeLa 細胞において FGF-2 を強制発現させた。この株において eIF2A をノックダウンし、FGF-2 の CUG コドンからの翻訳開始が抑制されるか調べたが、eIF2A の明確な関与はみ



タンパク質バリエントの内訳

とめられなかった。

eIF2A は、開始 tRNA に加えてロイシン tRNA とも結合し、これを用いて CUG コドン（ロイシン tRNA が認識）からの翻訳を開始すると考えられるが、分子レベルでの機能解析は進んでいなかった。また、マウスにて臓器ごとの eIF2A の mRNA およびタンパク質量が定量されていたが、mRNA 量が少ないにも関わらず、タンパク質量が多い臓器もみられた。そこで、まずマウス各臓器における eIF2A 量を再度測定することで、過去の報告の再現性を検討した。その結果、膵臓および肝臓で eIF2A のタンパク質量が多いとする過去の報告が確認された。膵臓では、細胞が小胞体ストレスによる負荷を恒常的に受けている。この小胞体ストレス緩和に関わる因子 (BiP) の発現は eIF2A に依存するが、これが膵臓において eIF2A 量が多い理由のひとつと考えられる。また、今回の結果から、新たに精巣でも eIF2A の蓄積が観察された。eIF2A に依存した非 AUG コドンからの翻訳産物が、精巣において重要な役割を担うと考えられる。出芽酵母では、ストレスに応答して eIF2A の安定性が変化すること、またリン酸化による翻訳後修飾を受けることが報告されている。本研究においても、細胞株の種類によって eIF2A の安定性が異なることが示された。このことから、哺乳動物において eIF2A の安定性が翻訳後修飾で変化する可能性を考えた。データベースを検索したところ、ヒトおよびマウス eIF2A において、リン酸化を受ける部位が多数予想されていた。そこで、eIF2A におけるストレスに応答した翻訳後修飾について調べているが、明確な結果は得られていない。eIF2 $\alpha$  と eIF2A とは機能的に競合するため、両者が同時に存在するのは細胞に不都合と考えられる。この視点からすると、ストレス条件下で eIF2 $\alpha$  が不活性化し、eIF2A が安定化することは合目的である。今後、eIF2A の安定性を中心に機能を検証することで、eIF2A による非 AUG コドンからの翻訳メカニズムが明らかにされ、有用な新規バイオマーカーの発見につながると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西 晃平、山田陸翠、赤川博文、陣内 凱、島日佳理、日高真誠、葛山智久、小川哲弘
2. 発表標題 栄養飢餓に誘導される出芽酵母リボソーム分解機構の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西晃平、山田陸翠、赤川博文、陣内凱、島日佳理、日高真誠、葛山智久、小川哲弘
2. 発表標題 ストレスに応答したリボソーム分解機構の解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田陸翠、西晃平、赤川博文、陣内凱、島日佳理、日高真誠、葛山智久、小川哲弘
2. 発表標題 リボソーム分解に関わる普遍的リボヌクレアーゼの機能解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム
4. 発表年 2019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
研究分担者	角田 茂  (Kakuta Shigeru)  (80345032)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授    (12601)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小川 智子 (Ogawa Tomoko)  (90466011)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・チーム長  (82111)	
研究分担者	藤井 渉 (Fujii Wataru)  (40708161)	東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・助教  (12601)	