

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：34304

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02370

研究課題名(和文) コドンによる遺伝子発現制御のダイナミズム

研究課題名(英文) Dynamism of codon-mediated regulation of gene expression

研究代表者

三嶋 雄一郎 (Mishima, Yuichiro)

京都産業大学・生命科学部・准教授

研究者番号：00557069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、分化が進行するゼブラフィッシュ初期胚において、コドンがmRNA安定性に与える影響(コドン効果)を定量的に解析するPACE法を開発した。この方法を用い、コドン効果がコドンに対応するtRNAの量とリボソームによる翻訳速度と相関することを明らかにした。またtRNAの量の変化がコドン効果の変化につながることを実験的に証明した。さらに、コドン効果によるmRNA分解機構が、リボソームによる翻訳の品質管理機構No-go decayとは独立の経路で働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

本研究により、タンパク質読み枠のコドンの組み合わせが細胞内においてmRNAの安定性に影響を及ぼす際の原理の一端が明らかとなった。また、コドンがmRNAの安定性に与える効果が、tRNAの量的な変化によって変動することが示された。この成果により、細胞内においてmRNAの安定性がどのように決まっているのかという本質的な疑問の解明が進んだ。この成果は、生命の基礎原理の理解のみならず、将来的にはmRNAワクチンに代表されるmRNA医薬品の開発にも大きく貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a method named PACE to quantitatively analyze the effect of codons on mRNA stability (codon effect) in early zebrafish embryos. Using the PACE method, we revealed that the codon effect correlates with the amount of tRNA corresponding to the codons and the translation rate by the ribosome. We also experimentally demonstrated that changes in the amount of tRNA lead to changes in the corresponding codon effect. Furthermore, we demonstrated that the mRNA degradation mechanism by the codon effect acts independently of the no-go decay pathway, which is a translational quality control mechanism by the ribosome.

研究分野：分子生物学

キーワード：ゼブラフィッシュ コドン tRNA mRNA分解 リボソーム

1. 研究開始当初の背景

生体を構成するタンパク質のアミノ酸配列は、塩基のトリプレットからなるコドンの並びによって指定される。通常20種類のアミノ酸は61種類のコドンによって指定されるが、これらのコドンは決して一様に翻訳されるわけではなく、対応する tRNA とのバランスによって、タンパク質の量や質に大きな影響を与えている。例えば大腸菌や酵母では、ゲノムのコドン使用頻度と対応する tRNA の量は良く相関しており、コドンの選択は翻訳伸長反応の効率や正確性に影響を及ぼすことが知られている。高等真核生物においても、リボソームタンパクなど発現が高い遺伝子は使用頻度の高いコドンを多く含む傾向にある。このようなコドンと tRNA の関係は、これまで主として転写レベルで決定されていると考えられてきた。

我々は、小型淡水魚ゼブラフィッシュをモデルとした研究から、受精直後の mRNA 安定性がコドン組成によって規定されており、コドンには mRNA を安定化するものと不安定化するものが存在することを見出した①。この現象はリボソームによる翻訳に依存していることから、コドンが tRNA によって読み取られる際の動態が mRNA の安定性に影響を及ぼしていると考えられる。このようなコドン機能の新知見に加え、mRNA 安定性コードに影響を及ぼしうる tRNA の量や修飾の状態も、細胞の状態や種類に応じて変化していることが明らかとなってきた。しかし、コドンを介した mRNA の安定性変化の簡便かつ定量的な解析方法は存在しておらず、各コドンの効果が tRNA の状態に応じて実際にどの程度変動するのかについても、ほとんど明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、分化が進行するゼブラフィッシュ初期胚においてコドンが mRNA 安定性に与える影響を定量的に解析し、コドン効果が生じる原因や、翻訳動態との関係について検証する。また、実験的に tRNA を操作することによって、コドン効果の可変性についての検証を行う。以上のアプローチにより、コドンによる遺伝子発現制御のダイナミズムを脊椎動物の個体において明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

検証するコドンとスペーサーコドンを20回繰り返すコドンタグ配列を GFP の3'末端に挿入したレポーター mRNA (コドンレポーター) を構築し、これをゼブラフィッシュ受精卵に顕微注入することで、単一コドンが mRNA の安定性に与える影響を検出した。このコドンレポーターをライブラリ化し、RNA-seq によってタグ部分の配列を解析することで、61 センスコドンが mRNA の安定性に及ぼす影響を一括して定量できる実験系を開発した (以下 Parallel Analysis of Codon Effects ; PACE 法と呼ぶ)。この PACE 法を、発生過程の胚において実施し、コドンが mRNA の安定性に及ぼす影響と、その際のリボソームの挙動の検証を行った。50 匹程度の受精後 2 時間と 6 時間の胚から RNA を回収し、RNA-seq と ribosome footprint profiling によりタグ部分の量と翻訳効率を定量化した。この時、GFP mRNA の翻訳を特異的に阻害できるアンチセンスモルフォリノオリゴ (MO) を導入した実験を平行して行い、翻訳の有無による差分を、コドンが翻訳されることで生じた mRNA 安定性の変化として算出した。利用可能な tRNA の量を人為的に変化させるために、アスパラギン分解酵素の過剰発現を行い、アミノ酸がチャージされた Asp-tRNA の量を減少させて PACE 法を実施した。コドンによる mRNA 分解と関連する可能性がある Znf598 のゼブラフィッシュ変異体においても PACE 法を実施し、コドン効果に影響が生じるか検討した。

4. 研究成果

コドンが mRNA 安定性に及ぼす効果を純粋に検出できる独自の実験系として開発した PACE 法を、条件の最適化を行いながら実施した。コドンタグライブラリ DNA を混合し、in vitro 転写によりコドンタグライブラリ mRNA を作成したのち、ゼブラフィッシュ受精卵に顕微注入した。注入後一定時間において RNA を回収し、RNA-seq による解析を行い、各コドンが mRNA 安定性に与える影響を測定した。その結果、各コドンが翻訳依存的に mRNA の安定性に与える影響を厳密に数値化することに成功した (図1)。次に、PACE 法の測定結果をゼブラフィッシュ初期胚における tRNA-seq の結果②と比較したところ、コドンが mRNA 安定性に与える影響は、対応するアンチコドンを持つ tRNA の量と一部相関することが明らかとなった。さらに、リボソームの

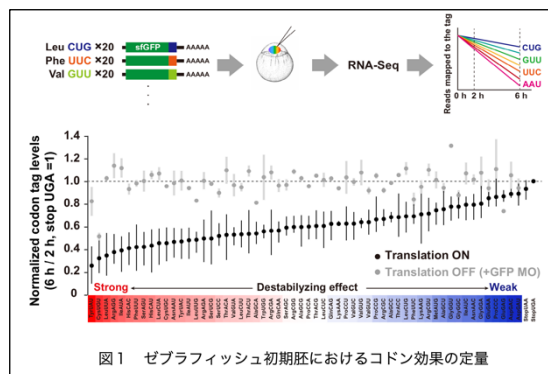


図1 ゼブラフィッシュ初期胚におけるコドン効果の定量

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 0件）

1. 著者名 三嶋 雄一郎	4. 巻 70
2. 論文標題 遺伝暗号による遺伝子発現制御	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 162 ~ 167
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11477/mf.2425200976	査読の有無 無
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 Mishima Yuichiro	4. 巻 14
2. 論文標題 PAINTing translation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 832 ~ 833
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41589-018-0102-8	査読の有無 無
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 Mishima Yuichiro, Han Peixun, Ishibashi Kota, Kimura Seisuke, Iwasaki Shintaro	4. 巻 41
2. 論文標題 Ribosome slowdown triggers codon mediated mRNA decay independently of ribosome quality?control	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e109256
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2021109256	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yuichiro Mishima, Seisuke Kimura, Shintaro Iwasaki
2. 発表標題 Defining codon-mediated mRNA decay and No-go decay in zebrafish embryos
3. 学会等名 EMBL meeting Protein synthesis and Translational Control（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuichiro Mishima
2. 発表標題 Codon-mediated mRNA decay in zebrafish embryos
3. 学会等名 The 20th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ウェブサイト https://www.mishima-lab.com/
--

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	稲田 利文 (Inada Toshifumi) (40242812)	東北大学・薬学研究科・教授 (11301)	

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