

令和 2 年 4 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14674

研究課題名(和文)ミトリボソームインタラクトーム解析法の開発と生合成・翻訳制御因子の同定

研究課題名(英文)A method for identifying the mitoribosome interactome

研究代表者

今見 考志 (Imami, Koshi)

京都大学・薬学研究科・特定研究員(特任講師)

研究者番号：30528344

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアに存在するリボソーム(以下ミトリボソーム)は、エネルギー生産に必須の呼吸鎖複合体を構成するタンパク質を翻訳することに特化している。ミトリボソームによるタンパク質合成は生命の維持に関わる本質的なプロセスであり、ミトコンドリア翻訳装置の異常は様々な疾病にも関与している。しかし、細胞質リボソームと比較して、ミトリボソームの生合成過程や翻訳制御の詳細はわかっていなかった。本研究では、新規プロテオミクス手法を開発し、ミトリボソームの生合成と翻訳に関わる因子を系統的に同定しその全体像を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアは細胞内のエネルギー生産に必須のオルガネラであり、その機能障害はパーキンソン病などの疾病の原因となる。さらに、ミトコンドリア病に関連する遺伝子変異はミトコンドリア内の翻訳装置に異常をもたらすことが知られている。本研究で明らかにしたミトコンドリア翻訳系に関わるタンパク質の系統的な同定は、ミトコンドリア病や基本的なミトコンドリア機能の理解に貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The mitoribosome is specialized for producing proteins composed of the OXIPHOS complex in mitochondria. Protein production by mitoribosomes is an essential process in all living organisms and involves the mitochondria disease. However, our understanding about mitoribosomes is still limited. In this study, we devised a method to systematically capture the mitoribosome interactome, and reveal an overview of proteins involved in the translation and biogenesis for mitoribosomes.

研究分野：プロテオミクス

キーワード：プロテオミクス ミトコンドリア リボソーム 翻訳 質量分析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリア内でのエネルギー生産は呼吸鎖複合体によって行われている。ミトコンドリアリボソーム (以下ミトリボソーム) はその複合体のサブユニットを構成する 13 種の膜タンパク質を翻訳することに特化している。それゆえ、ミトコンドリアは細胞内のエネルギー生産に必須のオルガネラであり、その機能障害はパーキンソン病などの疾病の原因となる。重要なことに、ミトコンドリア病に関連する遺伝子変異はミトコンドリア内の翻訳装置に異常をもたらすことが知られている (Rooijers et al. Nat. Commu. 2013)。

このようにミトコンドリア病と翻訳装置の異常は密接な関係があるにも関わらず、ミトリボソームの構成タンパク質や生合成過程、翻訳制御の機構は、細胞質リボソームと比較してほとんどわかっていない (総説 Pearce et al. Trends in Biochem. Sci 2017 参照)。ミトリボソームがどのようなタンパク質で構成され、どのようなタンパク質の力を借りて生合成され、最終的にどのようなタンパク質が翻訳制御に関わっているか、その一連のステップを理解することは不可欠である。その一方で、技術的な側面に着目すると、次世代シーケンサーの発展により転写レベルでのミトコンドリア遺伝子発現制御の理解は進んでいるものの (例えば Mercer et al. Cell 2011)、ミトリボソームの構成タンパク質や結合タンパク質を同定する技術はこれまで報告されていない。

2. 研究の目的

上述の問題点を踏まえ本研究では、ミトリボソームを解析するための新規プロテオミクス手法を開発し、ミトリボソームの合成と翻訳に関わる因子の全体像を明らかにすることを目的とする。具体的には、**Aim 1)** ミトリボソームの構成タンパク質と結合タンパク質を系統的に同定するためのプロテオミクス手法の開発と **Aim 2)** 同定した結合タンパク質の生合成または翻訳への影響を定量的かつプロテオームワイドに評価するための手法の開発をおこなう。

3. 研究の方法

Aim 1) ミトリボソームの構成タンパク質と結合タンパク質を系統的に同定するためのプロテオミクス手法の開発

申請者らが開発したポリソームプロテオームプロファイリング法 (Imami et al. Mol. Cell 2018) と質量分析を組み合わせ、ミトリボソームの各サブユニットと複合体に結合するタンパク質を系統的に同定する。

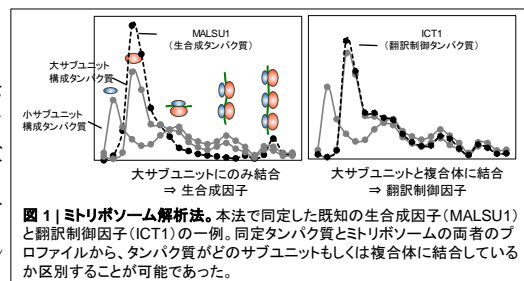
Aim 2) 同定した結合タンパク質の生合成または翻訳への影響を定量的かつプロテオームワイドに評価するための手法の開発

新生タンパク質を標識するための安定同位体アミノ酸パルス標識法 (Selbach et al. Nature 2009)、ミトコンドリア生化学的精製法、質量分析を組み合わせ、ミトリボソームによって翻訳されるタンパク質を同定・定量する。

4. 研究成果

Aim 1) ミトリボソームの構成タンパク質と結合タンパク質を系統的に同定するためのプロテオミクス手法の開発

まずショ糖密度勾配遠心法を用いてミトリボソームの各々のサブユニット・モノソーム・ポリソームを生化学的に分離した。安定同位体アミノ酸標識法 (SILAC 法: Ong et al. MCP 2002) と質量分析法を組み合わせることで、分離したミトリボソームの量的プロファイル密度勾配に沿って正確に定量することが可能であった (図 1)。ここで鍵となるアイデアは、1) リボソームの構成 (結合) タンパク質であれば、ミトリボソームタンパク質のプロファイルと同様のプロファイルを示す点、2) プロファイルからタンパク質がどのサブユニットや複合体に結合しているかを同定できる点である。従って、生合成もしくは翻訳に関わる因子かを区別することができる。



申請者が開発した以前の手法では細胞質リボソームしか分離できなかったが、ミトリボソームを分離できるように最適化した密度勾配とバッファ条件を採用し、ヒト HEK293 細胞を用いて実験を行った。その結果、サブユニットと結合する既知の生合成因子 (例 MALSU1) や複合体に結合する翻訳制御因子 (例 ICT1) を同定することができ、本法のコンセプトが実現可能であることがわかった (図 1)。また、これまでミトリボソームと結合することが知られていなかった数 10 種のタンパク質を同定することに成功した。

Aim 2) 同定した結合タンパク質の生合成または翻訳への影響を定量的かつプロテオームワイドに評価するための手法の開発

実際に同定したミトリボソーム結合タンパク質が生合成や翻訳に関与するのかをバリデーションするシステムを確立した。予備実験として、ミトリボソーム翻訳阻害剤であるクロラムフェニコールで処理した HEK293T 細胞と未処理のコントロール細胞を用意し、各々の培地に異なる安定同位体標識アミノ酸を加え、その新生タンパク質への取り込みを質量分析法でモニターした。その結果、ミトリボソームによって翻訳される 13 種の膜タンパク質のうち 12 種が定量可能であること、また阻害剤処理した細胞ではタンパク質の合成が阻害されていることを確認した (図 2)。

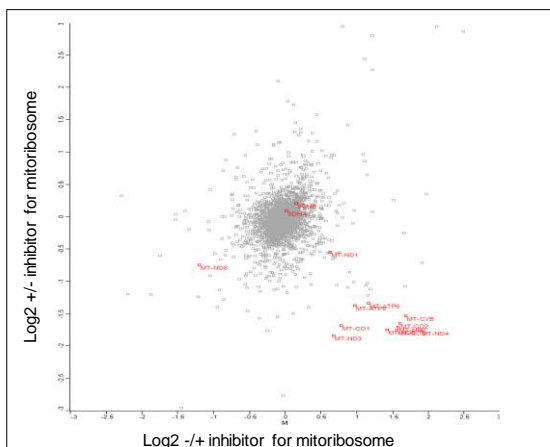


図 2 | ミトリボソーム翻訳産物の定量法。 翻訳阻害剤処理した細胞と対照細胞間における新生タンパク質の合成量を比較したところ、12種のミトリボソーム合成タンパク質(赤字)の翻訳阻害を本法で捉えることができた。

以上の結果は、本法は既存手法 (表 1) よりも多くのミトリボソーム合成タンパク質を定量可能であること、タンパク質合成量の変化を定量的に評価できることを示している。

表 1: 既存方法におけるミトリボソーム翻訳産物の同定数

pSILAC approaches	Selbach et al Nature 2008	Ebner et al Plos one 2014	Hunten et al, MCP 2015	PUNCHP Avier et al Gene Dev. 2015
# total mito proteins quantified (%) in all exp.	2 (15%)	6 (46%)	4 (31%)	3 (23%)
# total quantified proteins	4039	5435	5126	2535

今後の展開としては、同定した候補タンパク質を欠損した細胞と対照となる細胞間の新生タンパク質の合成量比から候補タンパク質の生合成や翻訳への影響を定量的に評価する予定である。仮にミトリボソームの生合成が制御されていればミトリボソーム構成タンパク質の合成に影響を与え、翻訳制御に関与していれば呼吸鎖複合体タンパク質の合成に影響を与えることが本手法を用いることで明らかにすることができる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Imami Koshi, Milek Miha, Bogdanow Boris, Yasuda Tomoharu, Kastelic Nicolai, Zauber Henrik, Ishihama Yasushi, Landthaler Markus, Selbach Matthias	4. 巻 72
2. 論文標題 Phosphorylation of the Ribosomal Protein RPL12/uL11 Affects Translation during Mitosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 84 ~ 98.e9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2018.08.019	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 該当する
1. 著者名 Imami Koshi, Yasuda Tomoharu	4. 巻 9
2. 論文標題 Measuring Protein Synthesis during Cell Cycle by Azidohomoalanine (AHA) Labeling and Flow Cytometric Analysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BIO-PROTOCOL	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21769/BioProtoc.3215	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 -
1. 著者名 Theil Kathrin, Imami Koshi, Rajewsky Nikolaus	4. 巻 10
2. 論文標題 Identification of proteins and miRNAs that specifically bind an mRNA in vivo	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-12050-7	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 該当する
1. 著者名 今見 考志	4. 巻 4
2. 論文標題 転写後・翻訳制御の解明に向けたプロテオミクス基盤技術の開発	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本プロテオーム学会誌	6. 最初と最後の頁 61 ~ 69
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14889/jpros.4.2_61	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 -

1. 著者名 今見考志	4. 巻 27
2. 論文標題 質量分析法に基づくプロテオミクス解析	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本病態生理学会雑誌	6. 最初と最後の頁 25-27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) x	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 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 今見考志, 石濱泰
2. 発表標題 "Functionality" を有するリン酸化部位を相関解析から同定する
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今見考志
2. 発表標題 転写後・翻訳制御機構の解明に向けたプロテオミクス基盤技術の開発
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2019年大 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今見考志
2. 発表標題 「翻訳」からみる遺伝子発現制御の理解: シグナル伝達制御とのクロストーク
3. 学会等名 第16回北里疾患プロテオーム研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今見考志
2. 発表標題 転写後・翻訳制御のプロテオミクス
3. 学会等名 RNAフロンティアミーティング2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今見考志・Miha Milek・Boris Bogdanow・保田朋波流・石濱泰・Markus Landthaler・Matthias Selbach
2. 発表標題 “Ribosomics” reveals a novel mechanism for translational regulation
3. 学会等名 国際シンポジウム Proteins: From the Cradle to the Grave (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Imami K, Mielk M, Yasuda T, Bogdnow B, Yasuda T, Kastelic N, Zauber N, Ishihama Y, Landthaler M, Selbach M
2. 発表標題 “Ribosomics” reveals a novel mechanism for translational regulation
3. 学会等名 第20回武田科学振興財団生命科学シンポジウム RNAネオバイオロジー (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今見考志・Miha Milek・Boris Bogdanow・保田朋波流・石濱泰・Markus Landthaler・Matthias Selbach
2. 発表標題 リボソミクス解析からみえてきた新たな翻訳制御機構
3. 学会等名 Mass Spectrometry and Proteomics 2018 (MSP2018) (日本質量分析学会・日本プロテオーム学会 2018年合同大会) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今見考志
2. 発表標題 質量分析法に基づくプロテオミクス解析
3. 学会等名 第28回日本病態生理学会大会（招待講演）
4. 発表年 2018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