

令和 6 年 4 月 25 日現在

機関番号：38005

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K15709

研究課題名（和文）翻訳速度変化を介した新生タンパク質の折り畳み機構の解明とその応用

研究課題名（英文）microRNAs slow translating ribosomes to prevent protein misfolding

研究代表者

佐古 博皓（Sako, Hiroaki）

沖縄科学技術大学院大学・細胞シグナルユニット・ポストドクトラルスカラー

研究者番号：80793570

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：リボソームプロファイリングとmiRNA結合領域データの解析により、mRNAのCDSに結合するmiRNAは、標的の分解や翻訳を抑制することなく、リボソームの速度を一時的に遅くさせる機能を持つ可能性を示した。この概念を実験的に検証するために、新生鎖のミスフォールディングに脆弱なレポーターを作成し、グローバルもしくは標的特異的なmiRNAの減少が翻訳速度を局所的に加速させ、新生鎖の折り畳みを負に制御することを示した。また、内在性のタンパク質においてもnon-cleaving shRNAによって翻訳速度を調節することで標的タンパク質の変性を抑制することが可能かどうか検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

miRNAは標的mRNAに結合し、mRNAの分解や翻訳抑制を亢進することが広く知られている。miRNAはmRNAのCDSへも3' UTRと同程度結合するが、CDSに結合するmiRNAの発現量への影響は小さく、なぜ多くのmiRNAがCDSにも結合するのかは分かっていなかった。本研究では、一部のmiRNAは、標的のmRNA分解や翻訳抑制ではなく、リボソームの翻訳速度を局所的に遅くすることで、新たに生まれたタンパク質の折り畳みを促進していることを示すととも、様々な疾患と関連するタンパク質変性の抑止策の一つとして新たな可能性を示すことができた。

研究成果の概要（英文）：A combined analysis of ribosome profiling and miRNA-binding sites revealed that CDS-targeting miRNAs can slow translating ribosomes without suppressing translational elongation. To further understand the notion in an experimentally, a reporter was designed to examine the folding status of nascent proteins which may be mediated by CDS-targeting miRNAs.

研究分野：分子生物学

キーワード：翻訳速度 リボソームプロファイリング 新生鎖 タンパク質変性 糖尿病

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

miRNA は標的 mRNA に結合し、mRNA の分解や翻訳抑制を亢進することが広く知られている。miRNA は mRNA の CDS へも 3'UTR と同程度結合するが、CDS に結合する miRNA の発現量への影響は小さく、なぜ多くの miRNA が CDS にも結合するのかが分かっていなかった。リボソームが mRNA を翻訳する速度は、局所的に変化している。mRNA の高次構造やコドンの最適化具合など様々な要因により速度は変化する。適度かつ局所的な翻訳速度の低下は、変性に脆弱なタンパク質領域の適切な折り畳みに寄与していると分かってきた。しかし、タンパク質の適切な折り畳みを促進するために、翻訳速度の特異的かつダイナミックな制御機構は未だ分かっていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、一部の miRNA は、標的の mRNA 分解や翻訳抑制ではなく、リボソームの翻訳速度を局所的に遅くすることで、新たに生まれたタンパク質の折り畳みを促進しているという概念を検証することを目的としている。

### 3. 研究の方法

リボソームプロファイリングと miRNA 結合箇所の網羅的データを解析することで、miRNA が翻訳速度を局所的に制御し、タンパク質の変性を制御している可能性を検討する。実験的に当該概念を検討するために、新生鎖のミスフォールディングに脆弱なレポーターを作成し、miRNA のレポータータンパク質の折り畳みに対する影響をグローバルな miRNA の減少、レポーターに結合する miRNA の阻害、miRNA mimic によるレスキュー、の3ステップにおいて生化学的に検討し、最終的に内在性のタンパク質における同様の機序の有無を検討する。

miRNA の減少が新生鎖の変性に与える影響を生化学的に検証する。具体的には、miRNA 生成酵素の一つである DROSHA や AGO を 293T 細胞においてノックアウトしグローバルに miRNA を減少させることでレポーターの凝集の変化を検討する。

内在性のタンパク質においても miRNA/shRNA によって翻訳速度を調節することで標的タンパク質の変性を抑制することが可能かどうか検証するために、どのような性質を持った内在性タンパク質が翻訳速度の低下により変性・凝集を抑制できるのかを検証する。そのために、低濃度の翻訳阻害剤により細胞内の翻訳速度を低下させ、不溶性分画(凝集タンパク質)を LC/MS/MS により解析し、対照群に対して相対量が減少しているタンパク質を同定する。

また、miRNA/non-cleaving shRNA が翻訳速度を一時的に低下させることを検証するために、miRNA の減少によるレポーターの局所的な翻訳速度変化を、リボソームプロファイリングを用いて検証する。また、蛍光レポーターを作成し、フローサイトメトリー解析により、non-cleaving shRNA が標的タンパク質産生を阻害することなく、翻訳速度を一時的に低下させることを確認する。

### 4. 研究成果

リボソームプロファイリングと miRNA 結合箇所のデータの解析により、mRNA の CDS に結合する miRNA は、標的の分解や翻訳を抑制することなく、リボソームの速度を一時的に遅くさせる機能を持つことを示唆することができた。レポーターを用いた実験では、グローバルな miRNA の減少、もしくはレポーターの一部に結合する miRNA の特異的な抑制により、レポータータンパク質の凝集が増加し、半減期も短くなるという結果を得た。さらに、レポーターの一部に特異的に結合する非切断型 shRNA により、レポータータンパク質の凝集が減少するという結果も得られた。また、miRNA/non-

cleaving shRNA が翻訳速度を一時的に低下させることを検証するために、蛍光レポーターを作成し、フローサイトメトリー解析により、non-cleaving shRNA が標的タンパク質産生を阻害することなく、翻訳速度を一時的に低下させることを確認した。さらに、内在性のタンパク質においても non-cleaving shRNA によって翻訳速度を調節することで標的タンパク質の変性を抑制することが可能かどうか検証するために、変性が2型糖尿病とも関連があるとされるインスリンに着目し、non-cleaving shRNA を設計し、インスリンの変性指標であるプロインスリンの dimer・trimer への影響を検討したところ、non-cleaving shRNA により、monomer プロインスリンに対する dimer・trimer を減少させることができた。

これらのことから、一部の miRNA は標的の発現量を負に制御することなく、翻訳中のリボソームの速度を局所的に調節することで新生鎖の折り畳みを補助しているという可能性を明らかにすることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 2件）

1. 著者名 Sako Hiroaki, Akimoto Takayuki, Suzuki Katsuhiko, Ushida Takashi, Yamamoto Tadashi	4. 巻 -
2. 論文標題 microRNAs slow translating ribosomes to prevent protein misfolding	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 biRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2020.12.08.417139	査読の有無 無
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 Sako Hiroaki, Youssef Mohieldin, Elisseeva Olga, Akimoto Takayuki, Suzuki Katsuhiko, Ushida Takashi, Yamamoto Tadashi	4. 巻 42
2. 論文標題 microRNAs slow translating ribosomes to prevent protein misfolding in eukaryotes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e112469
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2022112469	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐古博皓
2. 発表標題 miRNAs slow translating ribosomes to prevent protein misfolding
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐古博皓
2. 発表標題 miRNAs slow translating ribosomes to prevent protein misfolding in a CCR4-NOT-dependent manner
3. 学会等名 CCR4-NOT研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐古博皓
2. 発表標題 miRNAs slow translating ribosomes to prevent protein misfolding
3. 学会等名 RNAフロンティアミーティング
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroaki Sako, Tadashi Yamamoto
2. 発表標題 microRNAs slow translating ribosomes to prevent protein misfolding
3. 学会等名 System Biology seminar
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiroaki Sako, Tadashi Yamamoto
2. 発表標題 microRNAs slow translating ribosomes to prevent protein misfolding
3. 学会等名 OIST-RIKEN meeting
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiroaki Sako, Tadashi Yamamoto
2. 発表標題 microRNAs slow translating ribosomes to prevent protein misfolding
3. 学会等名 Signal Network Meeting
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiroaki Sako, Tadashi Yamamoto
2. 発表標題 microRNAs slow translating ribosomes to prevent protein misfolding
3. 学会等名 OIST-Kyudai Joint Symposium Series 1: Bio-Inspired Wonders and Energy Innovations
4. 発表年 2024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

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