

令和 6 年 4 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19531

研究課題名（和文）横紋筋リボソームの破綻が引き起こす心機能不全の分子機構の解明

研究課題名（英文）Molecular Mechanisms of Cardiac Dysfunction Caused by the Loss of Myo-ribosomes

研究代表者

松本 有樹修（Matsumoto, Akinobu）

名古屋大学・理学研究科・教授

研究者番号：60741519

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：タンパク質の翻訳にはリボソームが主要な役割を担うが、われわれは横紋筋には独自の横紋筋リボソームが存在することを見出した。横紋筋リボソームを欠損したマウスは心臓の収縮能の低下を示した。横紋筋リボソームは心臓特異的な翻訳スピードを生み出すために重要であり、横紋筋リボソームの欠損により心臓の機能に重要なタンパク質の適切な産生が損なわれた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

われわれは横紋筋リボソームという特殊なリボソームが存在することを見出し、その欠損は心臓の機能異常につながることを明らかにした。近年、横紋筋リボソームを構成する遺伝子の変異が小児の拡張型心筋症の患者などで同定されていることから、この特殊化リボソームの破綻が疾患に繋がることが示唆されている。横紋筋リボソームの理解は、将来的にはこれら疾患の治療に繋がることなどが期待される。

研究成果の概要（英文）：Ribosomes play a central role in protein translation, and we have found that striated muscle has its specialized ribosomes, called Myo-ribosomes. Mice lacking the Myo-ribosomes showed reduced contractility of the heart. Myo-ribosomes are important for generating cardiac-specific translation speed, and loss of Myo-ribosomes impairs proper production of proteins important for cardiac function.

研究分野：翻訳

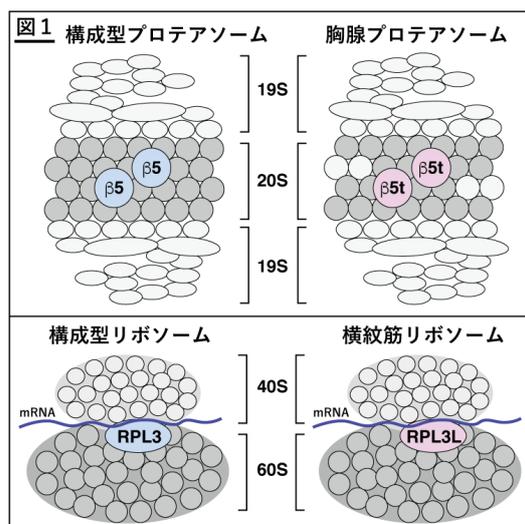
キーワード：横紋筋リボソーム 拡張型心筋症 Ribo-seq

1. 研究開始当初の背景、2. 研究の目的

● 胸腺プロテアソームを参考にして、横紋筋に特異的なリボソームを発見した

プロテアソームはタンパク質複合体からなるプロテアーゼであり、ポリユビキチン化されたタンパク質を分解する。プロテアソームを形成するサブユニットの一つであるβ5にはβ5tというバリエントがあり、胸腺皮質上皮細胞特異的に発現している。β5がβ5tに入れ替わったプロテアソームは「胸腺プロテアソーム」と呼ばれ(図1上)、β5tノックアウト(KO)マウス(=胸腺プロテアソームを欠損)は、胸腺のCD8 single positive(SP)T細胞の顕著な減少を示す[Murata S et al., Science (2007)]。

タンパク質の分解に関わるプロテアソームと同じように、タンパク質の翻訳に関わるリボソームも多くのタンパク質から構成される巨大複合体であることから、リボソームにも組織特異的に発現するサブユニットが存在するのではないかと考えた。そこでIn silicoスクリーニングを行ったところ、リボソームサブユニットの一つであるRPL3のバリエントであるRPL3Lが横紋筋(心筋と骨格筋)特異的に発現していることを見出した(図1下)。RPL3は横紋筋を含む全身の組織に発現していることから、横紋筋にはRPL3を含む「構成型リボソーム」とRPL3Lを含む「横紋筋リボソーム」の両方が存在することが分かった。



● 横紋筋リボソームの欠損は、翻訳活性の異常と心臓の収縮能の低下に繋がる

さらに近年、ヒトの拡張型心筋症の患者でRPL3Lの変異が報告された[Ganapathi M et al., Hum. Genet. (2020)]。しかし、RPL3Lノックアウト(KO)マウスの報告は無かった。そこで予備的研究としてRPL3L KOマウス(=横紋筋リボソームを欠損)を作製した。RPL3L KOマウスは生存可能であり、少なくとも8週齢において外観的な異常は観察されなかったが、心臓のエコー解析を行ったところ、心臓の収縮能[LVEF (left ventricular ejection fraction)とFS (fractional shortening)]の低下が認められた。

また、RPL3とRPL3Lは心臓では同程度発現しているが、RPL3L KOマウスではRPL3の発現が2倍程度に増加していたことから、心臓におけるリボソーム複合体の総数は低下していないと思われる。すなわち、観察された表現型はリボソーム複合体の数の減少によるものではなく、「構成型リボソーム」と「横紋筋リボソーム」の質的な違いに起因するものであると考えられる。

そこで、本課題では「構成型リボソーム」と「横紋筋リボソーム」にどのような質的な違いがあるかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

[1] RPL3L KOマウスの心臓の経時的観察と病理学的解析

これまでに12週齢のRPL3L KOマウスにおいて、有意に心臓の収縮能の低下が観察されているため、老化によりさらに症状が悪化するか、拡張型心筋症様の症状を呈するかなど検討

する。さらに病理学的解析により繊維化などが見られないかの検討も行う。

【2】 タグノックインマウスを作製して標的 mRNA に違いがないかを検討する

近年、リボソームサブユニットのリン酸化状態などの違いによって、mRNA への結合性が異なる（翻訳活性が異なる）という『リボソーム不均質性（Ribosome heterogeneity）』が示され [Genuth N et al., Mol. Cell (2018)]、大いに注目されている。**RPL3 や RPL3L は、リボソーム複合体において mRNA と接触する領域に位置しているため（図 1 下）**、「構成型リボソーム」と「横紋筋リボソーム」では mRNA に対する結合する親和性が異なる可能性がある。そこで、RPL3 もしくは RPL3L に HA タグ配列をノックインしたマウスを作製し、ノックインマウスの心臓のサンプルを用いて HA タグ抗体の免疫沈降で精製し、それぞれのリボソームに含まれる mRNA を次世代シーケンサーによって解析することにより、「構成型リボソーム」と「横紋筋リボソーム」が翻訳する mRNA の種類と割合を定量的に解析する。例えば、RPL3L の欠損により翻訳活性が低下していた mRNA は（上述）、「横紋筋リボソーム」がより多く結合している可能性が高い。

【3】 クライオ電子顕微鏡解析により構造基盤を明らかにする

横紋筋リボソームの構造をクライオ電子顕微鏡で解析することにより、mRNA や周辺のリボソームサブユニット、アミノアシル tRNA、rRNA との相互作用領域が、RPL3（構成型リボソーム）と RPL3L（横紋筋リボソーム）でどのように異なるかを解析する。

4. 研究成果

これまでに 12 週齢の RPL3L KO マウスにおいて、有意に心臓の収縮能の低下が観察されているため、老化によりさらに症状が悪化するかを検討するために、10 ヶ月齢のマウスなども用いて解析を行ったが、さらなる症状の悪化は観察されなかった。また心臓の圧負荷などを行っても、さらなる悪化は見られなかった。

RPL3 もしくは RPL3L に HA タグ配列をノックインしたマウスを作製した。さらに、ノックインマウスの心臓のサンプルを用いて HA タグ抗体の免疫沈降で精製し、IP-Ribo-seq などを行なった。RPL3L-HA の IP-Ribo-seq では心臓の収縮にかかわる遺伝子などが、RPL3-HA と比較してより濃縮されていた。

Ribo-seq を行ったところ、RPL3L KO マウスの心臓では特に Ala や Pro コドンでの翻訳スピードの遅延が観察されたため、これらコドンで Disome の形成が亢進している可能性が示唆された。そこで Disome-seq を行ったところ、実際に Disome の形成亢進が確認された。プロテオーム解析を行うことにより、これら Disome の形成亢進が確認されたタンパク質の発現量が低下していることを確認した。分子基盤を明らかにするために、クライオ電子顕微鏡による解析を行っていたが、その解析が困難であったために AlphaFold による予測を行った。RPL3 と RPL3L は共にリボソームにおける peptidyl transferase center の近傍に位置しており、その領域のアミノ酸配列が RPL3 と RPL3L で異なっていたため、このアミノ酸の違いが翻訳スピードに影響していることが示唆された。以上の結果を Nature Communications 誌に論文として報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 1件）

1. 著者名 Shiraishi Chisa, Matsumoto Akinobu, Ichihara Kazuya, Yamamoto Taishi, Yokoyama Takeshi, Mizoo Taisuke, Hatano Atsushi, Matsumoto Masaki, Tanaka Yoshikazu, Matsuura-Suzuki Eriko, Iwasaki Shintaro, Matsushima Shouji, Tsutsui Hiroyuki, Nakayama Keiichi I.	4. 巻 14
2. 論文標題 RPL3L-containing ribosomes determine translation elongation dynamics required for cardiac function	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2131
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-023-37838-6	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 松本有樹修
2. 発表標題 Myo-ribosomes determine translation elongation dynamics required for cardiac function
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会（国際学会）
4. 発表年 2023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
---------	---------