

研究終了報告書

「タンパク質合成の時空間制御から見た多細胞システムの理解」

研究期間：2020 年 10 月～2024 年 3 月

研究者：藤井 耕太郎

1. 研究のねらい

数十年に渡り、遺伝子発現の転写段階での時空間制御の解析が行われ、どのような細胞間相互作用を受け、下流の細胞増殖、移動、分化が制御されているか理解が深められてきた。近年になり、Ribosome Profiling (Ribo-seq)の技術が開発され、生体内のすべてのタンパク質合成をゲノムワイドに解析できる様になり、その理解は一層深められた。一方で、機能しないタンパク質はプロテアソームによって分解されるため、タンパク質合成の『質』の制御は今まで注目されてこなかった。しかし翻訳のエラー頻度は驚くほど高く、新生タンパク質のおよそ 15%がエラーを含み、新生タンパク質の 20%以上が合成後すぐに分解される。そのようにエラーの多いタンパク質合成で、生物がどのように機能するプロテオームを構築しているのか、翻訳の正確性の理解は驚くほど進んでいない。申請者は単細胞生物や培養細胞を用いて翻訳の正確性を制御する機構の一旦を明らかにしてきた(Fujii et al *Mol Cell*. 2018)。本研究提案では申請者が培ってきたリボソームを生化学的に扱う技術と、ポストドクターの研究過程で身につけたマウスを扱う技術を融合し、翻訳のエラーをモニターする技術を多細胞生物へと応用し、翻訳の正確性を多細胞個体で観察するシステムを世界に先駆けて構築する。さらには翻訳のエラーを誘導する分子機構を明らかにすることで、翻訳の正確性が時空間的に制御される機構に迫ることを目標とした。そして、今まで顧みられなかった翻訳の正確性という新たな視点から発生、疾患、老化といった生命現象を観察することで今まで隠されていた新たな概念、機構を明らかにしていくことを目標とした。

2. 研究成果

(1) 概要

2020 年 12 月にアメリカのフロリダ大学でコロナ禍の中、研究室を立ち上げ、テニユアを獲得するための新たな研究テーマとしてさがし研究に着手した。翻訳の正確性を *in vivo* で観察する手法はなく、レポーターモデルマウスを作成することは一つの武器になると考えた。そこで、翻訳エラーの一つである UGA の Stop codon readthrough (SCR)をモニターできるレポーターのトランスジェニックマウスを作成し、SCR 率の時空間ダイナミクスを観察した。興味深いことに、発生胚ではどの組織でも同様の SCR 率を示したのに対し、2 ヶ月、10 ヶ月、18 ヶ月のマウスでは組織ごとに異なる SCR 率を示した。さらに時系列に沿って筋肉では SCR が上がったのに対し、心臓では下がった。つまり組織ごとに時系列での SCR の制御が異なることを示唆している。このマウスは様々な文脈で測定をすることでその真価を発揮する。現在、ドイツやアメリカ国内、UF を中心に共同研究の輪が広まってきている。

翻訳の正確性を制御する分子機構に関しても研究を進めている。申請者の以前の研究からタンパク質合成の開始アミノ酸であるメチオニン (iMet)を翻訳と協調して切り落とすことが翻訳の正確性に必要であることを発見していた。iMet のプロセッシングがどのように翻訳の正確性を

制御しているか研究を進め、リボソームに含まれるリボソームタンパク質(RP)に iMet が残っていると翻訳のエラーを誘導することが分かった。iMet プロセッシングは新生タンパク質の7割が受けるプロセスであるが、プロセスの意義はあまり分かっていない。RP の iMet プロセッシングが組織間や時系列で変化するか、翻訳の正確性のダイナミクスへ関与するかも興味深い。どの RP に iMet が残ると正確性に影響を与えるか同定し、論文としてまとめる。

以上の結果はアメリカの R01 グラントに応募するための十分な予備データの蓄積であり、テニユアを獲得のための良い下準備になったと考えている。

(2) 詳細

1. 多細胞生物において、翻訳の正確性が時系列、組織間でダイナミックに変化する

これまで多細胞個体で翻訳の正確性を観察する手法はなく、培養細胞や単細胞生物での観察が主であり、組織間や時系列での翻訳の正確性の観察はされてこなかった。本研究で翻訳のエラーの一つである UGA の Stop Codon Readthrough (SCR) をモニターするレポーターのトランスジェニックマウスを作成した。そのマウスを用いて、2ヶ月、10ヶ月、18ヶ月のマウスにおけるそれぞれの組織での SCR 率を観察した。その結果、翻訳の正確性の驚くべき時空間ダイナミクスを観察した。筋肉や肺組織では10ヶ月、18ヶ月で SCR が増えたが、心臓や脾臓では逆に10ヶ月、18ヶ月で SCR が下がった。さらに、腎臓や肝臓は常に SCR 頻度が高かったが、脳は常に低かった(Fig.1A)。逆に胚発生中の E13.5 日胚から、頭、肺、心臓、肝臓、腸での SCR 率を測定すると常に一定であった(Fig.1B)。これらの結果は分化した細胞がそれぞれに異なる翻訳の正確性を持つことを示唆している。

このマウスを用いた共同研究が始まりつつあり、ドイツのグループとは老化したマイクログリア細胞におけるエラーの変化を、UF のグループとは筋ジストロフィーのモデルマウスにおけるエラーの変化を見ていく。また、このコンストラクトを用いての共同研究も行なった(論文 1)。このマウスのレポーターは Renilla (Rluc) と Firefly (Fluc) luciferase のタンデムレポーターの真ん中に Stop Codon を入れ、SCR を Fluc で検出している。Fluc の活性は Rluc や nano luciferase (Nluc) と比較すると低い、より検出効率を高めた Fluc-Nluc の系も作成し(Fig.1C)、より検出効率の高いマウスをさがし三期生である徳島大学の高岡さんと作成している。

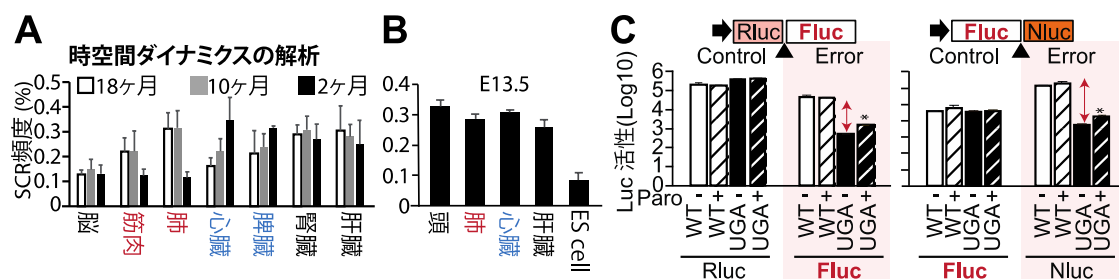


Fig1: A. 18ヶ月、10ヶ月、2ヶ月齢の SCR レポーターのトランスジェニックマウスを灌流し、血液を PBS に置き換えたのちにそれぞれの臓器を取り出し、ルシフェーゼアッセイを行った。B. トランスジェニックマウスの E13.5 日胚から組織を取り出し、ルシフェーゼアッセイを行った。C. 今まで使われてきた Rluc-Fluc のレポーターと新しく作成した Fluc-Nluc のレポーター。Fluc で SCR を検出していたのをより感度の良い Nluc で検出できるようになった。

2. 開始 methionine (iMet) がリボソームに残っていると翻訳のエラーが増える

多くのタンパク質合成は Met から開始するが、約 7 割の新生タンパク質から Methionine Aminopeptidase (MetAP)によって翻訳と協調して iMet は切り落とされる。以前の我々の研究から iMet のプロセッシングが翻訳の正確性に重要であることが出芽酵母、及びマウスの培養細胞で示されていた(Fujii et al., 2018)。しかし、iMet プロセッシングが翻訳の正確性を担保している分子機構は分かっていなかった。iMet のプロセッシングが MetAP の基質ではないタンパク質合成の正確性にも寄与することが、MetAP の基質ではないレポーターを用いたアッセイから分かった (Fig.2A)。このことは iMet のプロセッシングがそのタンパク質合成の正確性に直接働いているのではなく、翻訳の正確性を制御する特定の基質が存在し、その因子に iMet が残ることで翻訳の正確性に影響が出ていることを示唆している。興味深いことに、80%以上のリボソームタンパク質 (RP)が MetAP の基質である(Fig.2B)。このことから、RP に iMet が残っているとリボソームの構造が少しだけ歪み、翻訳の正確性に影響を与えていると仮説を立てた(Fig.2B)。この仮説を検証するために、MetAP の活性が低い株(*ES27Δ*)で iMet が RP に残るか確かめた。そのために Met をアナログである HPG で標識すると、*ES27Δ*ではいくつかの RP の HPG シグナルが増えた。逆に、HPG のシグナルが変異株で消えている RP も存在した(Fig.2C)。iMet が残ることで RP のリボソームへの取り込みに影響が出て、その RP を含まないリボソームが合成される可能性がある。以上から MetAP の活性が変化することで RP の iMet プロセッシングに影響が出ることが分かった。次に、実際にそれらのリボソームでエラーの頻度が増えるか確認するために、*ES27Δ*株からリボソームを精製し、野生株の翻訳因子と in vitro で混ぜ、翻訳の正確性が低下することを確認した(Fig.2D)。これらのことから iMet の残った RP を含むリボソームが翻訳の正確性を下げることがわかった。現在どの RP に iMet が残ると翻訳の正確性が低下するか同定し、論文としてまとめようと考えている。

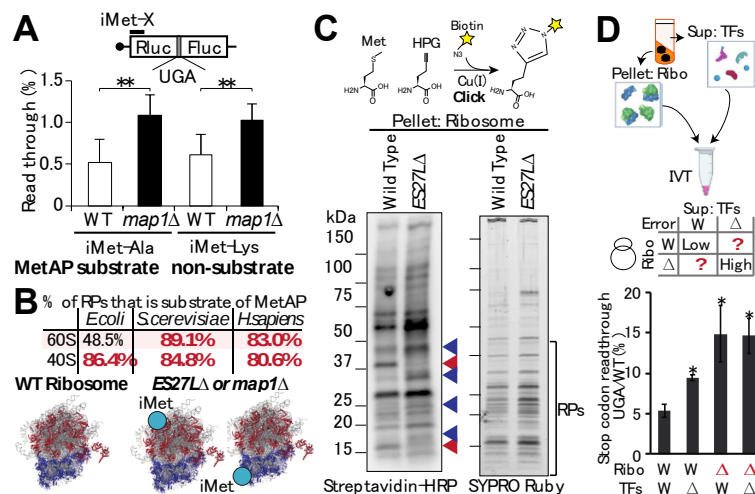


Fig2: A. MetAP の基質となる SCR のレポーターと基質ではないレポーターを作成した。基質のレポーターは無電荷の小さいアミノ酸が2番目にあり、基質ではないレポーターは正電荷のリシンを2番目のアミノ酸に持つ。MetAP の欠損株である *map1Δ* 株で MetAP の基質であるなしに関わらず SCR が増えた。B. 真核生物では 80% 以上のリボソームタンパク質 (RP) が MetAP の基質である。MetAP の活性が低い株 (*ES27Δ*) や *map1Δ* 株でのリボソームのモデル。iMet が RP に残ったままのリボソームが増えていると考えられる。C. Methionine (Met) のアナログである HPG を用いて Met を標識し、精製したリボソーム中に含まれる HPG をクリックケミストリーを用いて観察した。*ES27Δ* のリボソームで iMet が残った RP が増えた (青三角)。逆にシグナルが消えた RP もあった (赤三角)。D. 細胞抽出液をリボソームと上澄 (他の翻訳因子: TFs を含む) に分画し、混ぜることで翻訳を in vitro で再構成する系を用いて、WT と *ES27Δ* 由来のリボソームと TFs の組み合わせで SCR を計測した。WT-WT の組み合わせは Δ-Δ の組み合わせよりも SCR が低かった。Δ 由来のリボソームと WT 由来の TFs でも高い SCR 率を示したことから、iMet の残ったリボソームが翻訳のエラーを誘導することが示された。

3. まとめ

さがけの面接に呼んでいただいたおかげで、コロナの hiring freeze の中、フロリダ大学からオファーレターをいただき、研究室を立ち上げることができた。研究室を立ち上げて一年目に、さがけで購入した機械を用いて、ポスドク時の最後の研究を責任著者として出すことができた(論文2)。新たな研究室を立ち上げ、新しい研究テーマとして取り組んだ本研究課題では、翻訳の正確性が生体内で組織間、時系列でダイナミックに変化することを示した。また、正確性を制御する分子機構の一つも明らかにすることができた。さらに、トランスジェニックマウスを通じ、国際的な共同研究の輪を広げている。

3. 今後の展開

研究期間中に研究室の立ち上げから、多くのことを明らかにしつつあるが、未だ論文にできていない。最も論文に近いのが iMet プロセッシングによる翻訳の正確性の制御機構である。論文化するために、現在どの RP に iMet が残ると翻訳のエラーが増えるか、同定を試みている。また、iMet プロセッシングを行う MetAP の遺伝子は重複しており、iMet プロセッシング活性の時空間ダイナミクスは測定されたことがない。組織間、時系列で MetAP の活性が変化し、本研究で明らかにした正確性の時空間ダイナミクスを制御していれば、非常に興味深い、新たな機構となる。

本研究課題で作成したトランスジェニックマウスは非常に有用であり、すでにいくつかの国際的な共同研究の輪が広がっている。ドイツのグループとはマイクログリアの翻訳の正確性を老化や炎症と関連して解析していく。UF 内でも神経変性疾患のモデルマウスと掛け合わせ、疾患と関連して脳や筋肉組織における翻訳の正確性がどのように変化するか、疾患へどの様に影響するか明らかにしていく。また、現在のレポーターマウスはまだ改良の余地がある。また、SCR だけでなく、リボソームのフレームシフトやアミノ酸のミスインコーポレーションを解析できるマウスも本さがけ 3 期生である高岡さんとの共同研究で作成して行きたいと考えている。

4. 自己評価

2020 年の 12 月というアメリカではコロナ禍の真っ只中に研究室を立ち上げ、不慣れな学生、技術官、ポスドクの指導、英語での科研費申請、授業、カリフォルニアからフロリダへの引越に伴う第二次カルチャーショック(政治、食べ物)、第二子出産など多くのことを経験、挑戦してきた、非常に濃い三年間であった。PI からの重圧から放たれ、PI として自由に研究ができる環境は素晴らしく、逆に PI としての責任、ストレスを感じつつ、研究に邁進できた。現在最もチャレンジなのがアメリカのグラント R01 を獲得することで、まだ成功していない。その中でさがけを取れたことは金銭的にももちろんであるが、精神的に非常に大きく、選んでくださった領域代表、アドバイザー、JST の方々にはいくら感謝をしてもしきれない。

さがけの本研究課題は新しい研究室で、完全に新しいプロジェクトとして開始した。ポスドク時代に培ったマウスを扱う技術と、Ph.D からリボソームを研究することで培ったリボソームを生化学的に扱う技術を融合し、タンパク質合成の正確性を個体レベルで解析するという挑戦的なテーマに取り組ませていただいた。トランスジェニックマウスの作成から始まったため、個体レベルでのダイナミクスの解析結果を得るまでに長い時間がかかった。発生段階での解析をした際にはどのステージでも組織でも変化がなく、落胆しつつも諦めず、2ヶ月、10ヶ月、18ヶ月とサンプル

を貯め続け、組織間、時系列でのダイナミクスを観察することができた。これから分子機構や生理学的意義に迫っていくことで新たな分野を開拓していきたい。このマウスは様々なコンテキストで解析していくことでその真価を発揮する。実際にドイツの **Bonn** 大学での講演を通じて新たなネットワーク、共同研究が始まっている。これからもこのマウスを通じて、新たな研究者との交流が広がり、科学者としての成長を助けてくれることを期待している。

翻訳の正確性を制御する分子機構を解明するプロジェクトは当初期待していた方向ではうまくいかなかったが、以前の研究で未解明の問いを追求していく形で興味深い方向に進展することができたと考えている。特に **iMet** プロセシングの特定の基質が与える生理的意義はほぼ未解明であったが、本研究課題でリボソームタンパク質の **iMet** プロセシングが与える翻訳の正確性への貢献は新しく、**MetAP** の活性の時空間ダイナミクスも含めてこれからの研究への広がりも十分あると考えている。

サイエンスを自由に行うことで翻訳の正確性の多細胞におけるダイナミクスから、その制御と、この三年間で多くのことが分かってきており、同時にアメリカの **R01** グラントに応募するのに十分な予備データを蓄積することができた。先日 2023 年の 10 月のサイクルに初めての **R01** グラントを提出し、現在レビューを待っている。それと同時に別のグラントを描き始める準備をしている。テニユアを取るためにはグラントと論文の二つが大きな課題となるが、この三年間でその下準備をうまく積むことができたと考えている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 件

1. Silver nanoparticles enhance the efficacy of aminoglycosides against antibiotic-resistant bacteria
本研究課題で開発したレポーターを用いた共同研究による研究成果。翻訳のエラーを引き起こす抗生物質のアミノグリコサイドのバクテリアに対する効果が Silver nanoparticle によって増強される。その際に宿主である哺乳類細胞に対する影響を翻訳エラーを指標に評価した。
2. Controlling tissue patterning by translational regulation of signaling transcripts through the core translation factor eIF3c
責任著者となった研究成果。グローバルな翻訳開始因子である eIF3 複合体の変異マウスが発生を制御する重要な細胞シグナルの一つである Shh シグナル様の表現型を示した。 eIF3 複合体が通常の翻訳形式とは異なり、 Ptch1 mRNA の 5'UTR に直接結合し、リボソームをリクルートしていることを示した。翻訳段階での制御の正確なシグナリング、形態形成への重要性を示した。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件(特許公開前のものは件数にのみ含む)

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- 藤井耕太郎、アメリカでの就職活動、2021 年 4 月 19 日、RNA 学会報、第 43 号
- 藤井耕太郎、Controlling tissue patterning by translational regulation of signaling transcripts、2021 年6月 19 日、日本プロテオーム学会(招待講演)
- 藤井耕太郎、Controlling tissue patterning by translational regulation of signaling transcripts through the core translation factor eIF3c、2022 年7月21日、RNA Japan(招待講演)
- Kotaro Fujii, Translation fidelity regulation by ribosome, Jan 18, 2023, RNA: From biology to drug discovery(招待講演)
- Kotaro Fujii, Translation fidelity regulation by ribosome, Jan 27, 2023, UF International Brainstorm Symposium(オーガナイズ、講演)
- Kotaro Fujii, Controlling the fidelity of protein synthesis and its impact on diseases, Sep 5, 2023, University Clinic Bonn(招待講演)