

背景

DNA に書かれた遺伝情報は、mRNA、タンパク質と形を変え、実際に生体としての機能を果たします。中でも mRNA からタンパク質がつくられる過程は「翻訳」と呼ばれ、リボソームという分子によって実際にタンパク質が組み立てられていく重要なステップです。しかし、それぞれの mRNA が何個のリボソームによって同時に翻訳されているのか、翻訳を開始する頻度や速度はどれくらいなのかといった基本的なパラメータを測定することは困難でした。翻訳の脱制御はがんや神経変性疾患を含む疾患を誘導することが知られており、病態の理解につなげる上でも、これらのパラメータを知ることは重要な意味があります。

近年、mRNA 上のリボソームの状態や翻訳動態を網羅的に解析する手法として「リボソームプロファイリング法^[4]」が広く用いられています。リボソームプロファイリング法では、リボソームフットプリントと呼ばれる短い RNA 断片を生成・回収し、次世代シーケンサー^[5]を用いてその配列を読み解くことで、mRNA 上の「どこに」、「どのくらい」リボソームが存在しているのかといった情報を網羅的に得ることができます。しかし、既存のリボソームプロファイリング法から得られる情報は翻訳の相対的な情報のみであり、絶対的な数値であるリボソームの数や翻訳開始^[6]速度を知ることはできませんでした（図 1）。

そこで共同研究グループは新規の手法を開発し、以上の問いにアプローチすることを試みました。

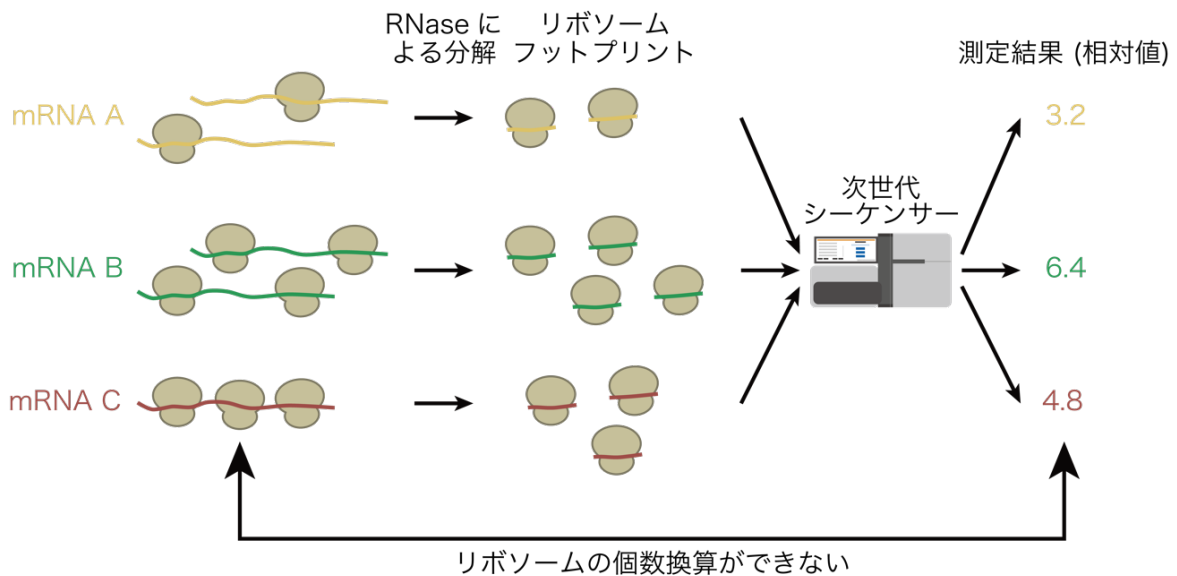


図 1 リボソームプロファイリング法の特徴とその課題

既存のリボソームプロファイリング法では mRNA 上のリボソームの数について相対的な量しか知ることができなかった。

研究手法と成果

共同研究グループは既存のリボソームプロファイリング法を改変して「Ribo-Calibration 法」を開発しました。Ribo-Calibration 法では、既知のリボソーム数（モル比）から成る「mRNA・リボソーム複合体」を細胞に添加し、外部標準^[7]として用います。すなわち、細胞由来の mRNA から得られたリード^[8]をその外部標準由来のリードを用いて補正することで、それらを絶対的なリボソーム数に読み替えることが可能になりました。

まず、共同研究グループは、試験管内翻訳系を用いて、レポーター mRNA^[9]を試験管内で翻訳した後、反応溶液を密度勾配遠心によって分画し、特定の個数のリボソームを含む分画のみを精製し、外部標準として準備しました（図 2 左）。これと細胞抽出液と混合しリボソームプロファイリング法と RNA-Seq 法^[10]を行いました（図 2 右）。

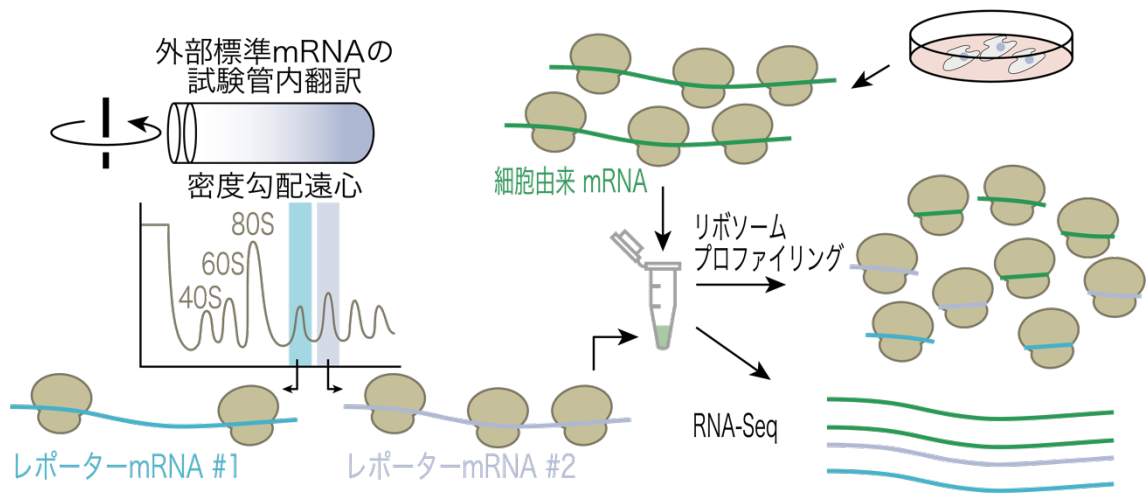


図 2 Ribo-Calibration 法の模式図

- (左) 二つのレポーター mRNA を試験管内で翻訳し、密度勾配遠心によって特定の個数のリボソームが結合した mRNA を含む分画を精製した。
- (右) 作成した外部標準と細胞抽出液（細胞由来 mRNA）と混合し、リボソームプロファイリング法と RNA-Seq 法を行った。

解析の結果、実験から得られたデータに基づいて計算されたリボソーム数が、理論的なリボソーム数とよく一致し、Ribo-Calibration 法の正確性が確認されました（図 3A）。そこで、計算を細胞内の全遺伝子に拡張したところ、ヒト細胞において約 5 個のリボソームが mRNA 上で翻訳を行っていることが分かりました（図 3B）。平均的に mRNA の長さが長いほど、翻訳を行っているリボソームの数も多く（図 3C）、それぞれのリボソーム間の距離は 270 塩基程度でした（図 3D）。さらに興味深いことに、一部の mRNA は非常に短いリボソーム間距離（およそ 30 塩基）を持っていました（図 3E）。これはおよそリボソーム一つ分に相当する長さであることから、このような mRNA ではリボソーム同士が非常に近接しながらうまく翻訳を行っていると考えられます。

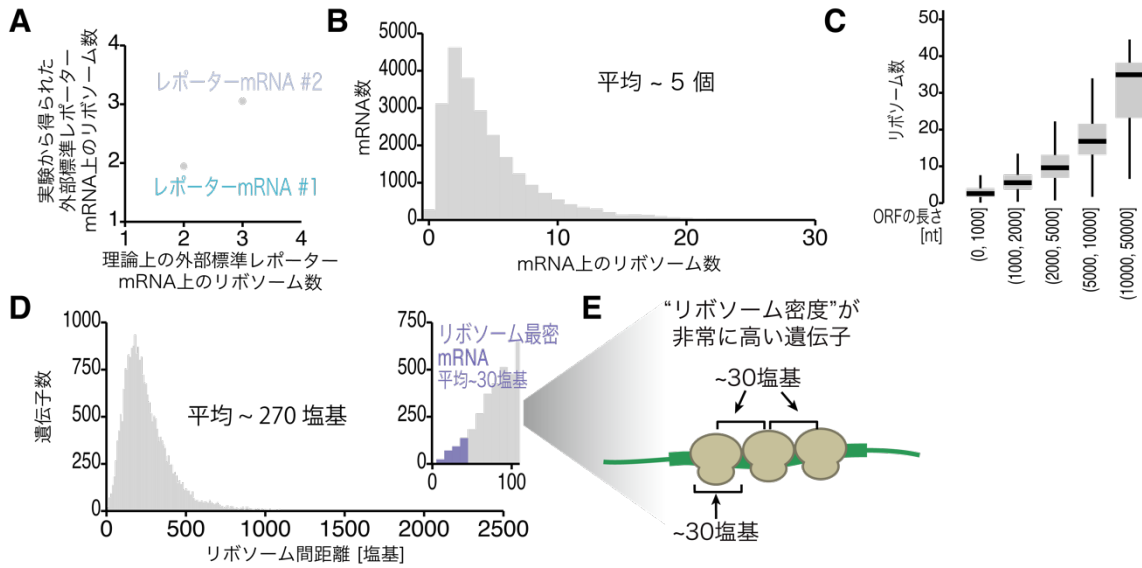


図 3 Ribo-Calibration 法によるリボソーム数の網羅的測定

- (A) Ribo-Calibration 法によって実験的に決定されたリボソーム数（縦軸）と理論的なリボソーム数（横軸）。
- (B) 細胞内のリボソーム数の分布。平均五つのリボソームが翻訳を行っていることが示された。
- (C) 細胞内のリボソーム数と遺伝子長（ORF (Open Reading Frame) 長）の関係。ORF 長が長い mRNA ほど、多くのリボソームによって翻訳されている。
- (D) 細胞内の mRNA 上のリボソーム同士の平均距離（塩基）。最も密度が高いものではおよそ 30 塩基ごとにリボソームが点在して翻訳していることが示唆された。
- (E) 非常に高い密度のリボソームによる翻訳の概念図。

次に共同研究グループは、Ribo-Calibration 法とリボソームの伸長速度を測定することができる「リボソームランオフアッセイ法^[11]」を組み合わせることで、翻訳開始速度を計算することを試みました。まず、mRNA 上のリボソームの数は、1 回の翻訳にかかる時間（翻訳開始速度）と一つのリボソームの滞留時間によって規定されるという数理モデルを作成しました。これを基に実験と解析を行った結果、ヒト細胞においては、翻訳伸長^[12]速度が平均 4 コドン/秒であることが測定され（図 4A）、平均すると 22 秒に 1 回の頻度で翻訳が起こっていました（図 4B）。

また、mRNA の半減期を測定する手法である RNA-Seq 法と Ribo-Calibration 法から計算された翻訳の開始速度を組み合わせることで、1 分子の mRNA が転写されてから分解されるまでに翻訳される回数が平均およそ 1,800 回であることを、明らかにしました（図 4C）。

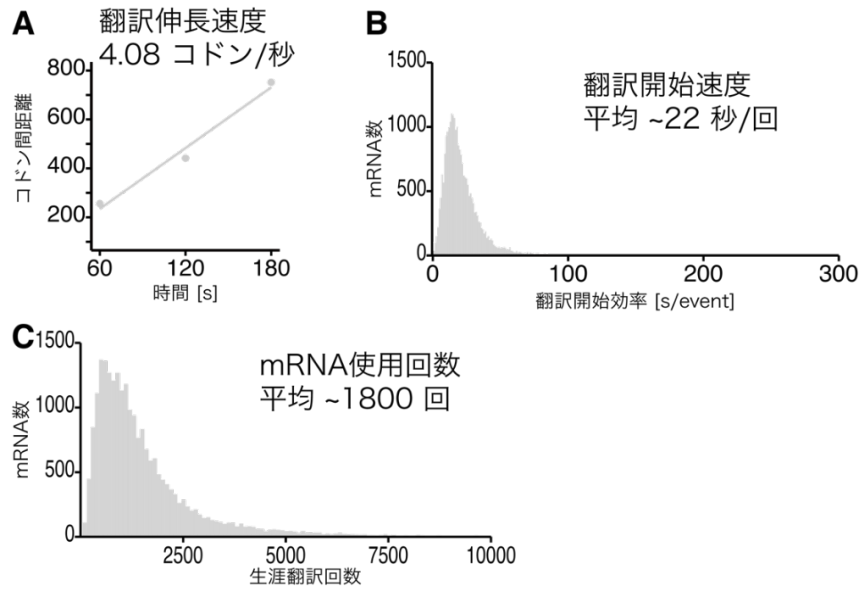


図4 Ribo-Calibration 法による翻訳速度の網羅的測定

- (A) リボソームランオフアッセイ法によって計測された翻訳伸長速度。
- (B) 翻訳開始効率の分布。平均およそ 22 秒に 1 度翻訳が開始されることが示された。
- (C) 生涯翻訳回数の分布。mRNA は分解されるまでにおよそ 1,800 回翻訳される。

さらに、共同研究グループは解析対象を iPS 細胞、ケラチノサイト（表皮を形成する細胞）などの皮膚細胞、若年・老化マウスの脳組織まで拡張し、それぞれの細胞、組織におけるリボソーム数を網羅的に測定しました（図5）。これらの結果から、細胞種ごとにリボソーム数の多様性や、老化時における翻訳量の低下は、翻訳の効率よりも mRNA の転写量に起因していることなどが明らかになりました。

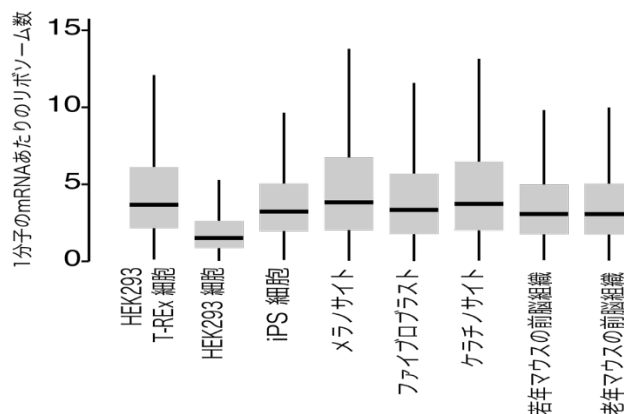


図5 さまざまな細胞種間におけるリボソーム数の多様性

Ribo-Calibration 法によって計測されたさまざまな細胞種や組織間におけるリボソーム数。HEK293 はヒト胎児腎由来細胞。T-Rex はその垂種の一つを指す。メラノサイトはメラニン合成細胞。ファイブプロラストは線維芽細胞。

今後の期待

本研究では、細胞内の翻訳パラメータを網羅的に決定することができる Ribo-Calibration 法を開発しました。Ribo-Calibration 法は細胞種、組織を問わず、広く応用が可能です。今後、翻訳異常と深い関連のあるがんや神経変性疾患に対して適用することで疾患病態の理解へつながるほか、高効率な mRNA ワクチンの設計・評価などに活用できる可能性も期待されます。

論文情報

<タイトル>

Calibrated ribosome profiling assesses the dynamics of ribosomal flux on transcripts

<著者名>

Kotaro Tomuro, Mari Mito, Hirotaka Toh, Naohiro Kawamoto, Takahito Miyake, Siu Yu A. Chow, Masao Doi, Yoshiho Ikeuchi, Yuichi Shichino, and Shintaro Iwasaki

<雑誌>

Nature Communications

<DOI>

10.1038/s41467-024-51258-0

補足説明

[1] 翻訳

mRNA ヘコピーされた塩基配列をアミノ酸配列へ変換して、リボソームでアミノ酸を順番につなげてタンパク質を合成すること。

[2] リボソーム

リボソーム RNA (rRNA) とリボソームタンパク質から構成される超巨大複合体。リボソームはメッセンジャーRNA (mRNA) にコードされているコドンを読み取り、タンパク質を合成する。

[3] メッセンジャーRNA (mRNA)

タンパク質のアミノ酸の並び方の情報 (コドン) を持つ RNA のこと。リボソームによってそのコドンが読み取られ、タンパク質が合成される。

[4] リボソームプロファイリング法

組織から翻訳装置であるリボソームを抽出し、リボソームと結合している RNA 配列を同定することで、どの遺伝子がどの程度の効率で翻訳されているかを知る解析法。リボソームは大きな複合体であるため、一定の mRNA 領域を覆うように結合する。これらのリボソームと mRNA の複合体を RNA 分解酵素で処理すると、リボソームが保護する mRNA 断片だけが分解されずに回収される。

[5] 次世代シーケンサー

DNA の塩基配列を決定するための装置。複数の DNA 断片の塩基配列を同時並行で、高速・高精度に決定できる。

[6] 翻訳開始

リボソームが mRNA 上の開始コドン上に結合するまでの一連の素過程を指す。

[7] 外部標準

既に濃度などの量があらかじめ分かっている標準物質のことを指す。外部標準に照らし合わせ解析することでサンプル間のデータのばらつきを標準化することができる。

[8] リード

次世代シーケンサーで決定された DNA 断片の個数のこと。リードの個数の増減で、それに相当する DNA あるいは RNA がどれくらいの量であったかを相対的に定量することができる。

[9] レポーター mRNA

遺伝子の発現を簡便に確認するために用いられる、外来性の mRNA。代表例としてはルシフェラーゼや緑色蛍光タンパク質（GFP）が挙げられる。

[10] RNA-Seq 法

次世代シーケンサーを使って RNA の量を網羅的に計測する手法。RNA を逆転写により DNA に変換し解析する。

[11] リボソームランオフアッセイ法

時間を置き mRNA 上で翻訳反応（ラン/run）しているリボソームに、翻訳を終結させ、乖離（かいり）（オフ/off）させる実験手法。翻訳開始を阻害することで実験が可能になる。

[12] 翻訳伸長

mRNA 上にリクルートされたリボソームが、コドンを認識し、ペプチドを伸長させる反応を指す。

共同研究グループ

理化学研究所 開拓研究本部 岩崎 RNA システム生化学研究室

主任研究員	岩崎信太郎	（イワサキ・シンタロウ）
研究員	七野悠一	（シチノ・ユウイチ）
大学院生リサーチ・アソシエイト	戸室幸太郎	（トムロ・コウタロウ）
テクニカルスタッフ I	水戸麻理	（ミト・マリ）
学振特別研究員 PD	藤 博貴	（トウ・ヒロタカ）
基礎科学特別研究員	河本尚大	（カワモト・ナオヒロ）

東京大学 生産技術研究所

准教授	池内与志穂	（イケウチ・ヨシホ）
特任助教	周 小余	（チャウ・シウユ）

京都大学大学院薬学研究科

教授	土居雅夫	(ドイ・マサオ)
助教	三宅崇仁	(ミヤケ・タカヒト)

研究支援

本研究は、RIKEN Pioneering Projects「Biology of Intracellular Environments（研究分担者：岩崎信太郎、七野悠一）」で実施し、日本学術振興会（JSPS）科学研究費助成事業基盤研究（B）「ミトコンドリア特異的リボソームプロファイリング法によるオルガネラ翻訳網羅解析（研究代表者：岩崎信太郎）」、同基盤研究（A）「細胞内構造を支えるヘテロポリマー間相互作用の網羅的解析（研究分担者：岩崎信太郎）」、同基盤研究（C）「細胞内顆粒 P-body による mRNA の空間的制御を介した細胞周期調節機構（研究代表者：七野悠一）」、同若手研究「翻訳開始因子 eIF4A1 とグルタミン代謝による協調的な発現制御機構（研究代表者：七野悠一）」「リボソームプロファイリングを応用したリボソーム構造動態の解明（研究代表者：藤博貴）」、同研究活動スタート支援「溶連菌毒素による宿主翻訳ハイジャック機構の解明（研究代表者：藤博貴）」、同特別研究員奨励費「細胞侵入型病原細菌による宿主翻訳の攪乱（研究代表者：藤博貴）」「青色光適応メカニズムから概日的遺伝子発現制御の意義を理解する（研究代表者：河本尚大）」、同学術変革領域研究（B）「新規 Disome-Seq 法：パラメトリックなりボソーム渋滞の網羅的探索（研究代表者：岩崎信太郎）」「柔軟な神経らしさを作り出すパラメトリック翻訳制御の解明（研究代表者：池内与志穂）」、同学術変革領域研究（A）「時間タンパク質学：翻訳速度の大規模並列網羅解析（研究代表者：岩崎信太郎、研究分担者：池内与志穂）」「APEX-Ribo-Seq：近傍標識による非典型局所翻訳の網羅解析（研究代表者：七野悠一）」「非典型局所翻訳を包括的に解明する APEX-Ribo-Seq 法の確立（研究代表者：七野悠一）」、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）革新的先端研究開発支援事業ユニットタイプ（CREST）「プロテオスタシスの理解と革新的医療の創出」研究開発領域「神経変性疾患におけるアグリゲーションと翻訳の陰陽（研究代表者：岩崎信太郎、研究分担者：池内与志穂）」による助成を受けて行われました。

発表者・機関窓口

<発表者> ※研究内容については発表者にお問い合わせください。

理化学研究所 開拓研究本部 岩崎 RNA システム生化学研究室

主任研究員	岩崎信太郎	(イワサキ・シントロウ)
研究員	七野悠一	(シチノ・ユウイチ)
大学院生リサーチ・アソシエイト	戸室幸太郎	(トムロ・コウタロウ)
テクニカルスタッフ I	水戸麻理	(ミト・マリ)
学振特別研究員 PD	藤 博貴	(トウ・ヒロタカ)
基礎科学特別研究員	河本尚大	(カワモト・ナオヒロ)

Tel: 048-467-3613 (岩崎)、050-3502-4540 (岩崎)

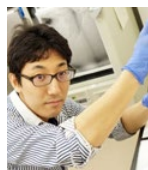
Email: shintaro.iwasaki [at] riken.jp (岩崎)

東京大学 生産技術研究所

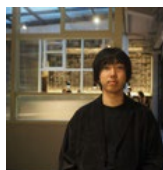
准教授	池内与志穂	(イケウチ・ヨシホ)
特任助教	周 小余	(チャウ・シウユ)



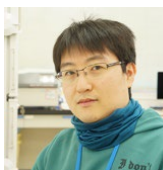
岩崎信太郎



七野悠一



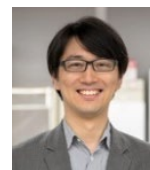
戸室幸太郎



藤 博貴



河本尚大



池内与志穂



周 小余

<機関窓口>

理化学研究所 広報室 報道担当

Tel: 050-3495-0247

Email: ex-press [at] ml.riken.jp

東京大学 生産技術研究所 広報室

Tel: 03-5452-6738

Email: pro [at] iis.u-tokyo.ac.jp

※上記の[at]は@に置き換えてください。