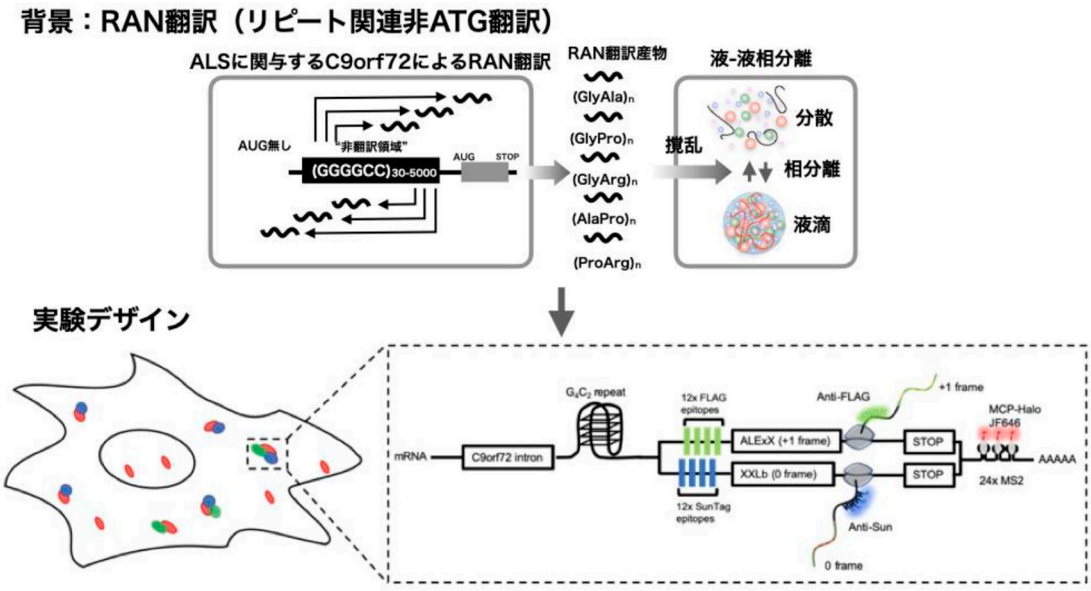
219　神経変性疾患に関わる翻訳現象の細胞内イメージング	田口　英樹

【目的】生命のセントラルドグマの終端である翻訳過程に大きな未開のバイオロジーがあることがわかってきた。翻訳は、遺伝子読み枠（ORF）内の開始コドンから始まって最後に終止コドンにて終わるだけではない。非典型的な翻訳に関して近年、神経変性疾患に関与する塩基リピート配列内から、開始コドン ATG に依らない翻訳開始が起こり、細胞毒性を有する翻訳産物が合成されることがわかってきた。この非典型的な翻訳開始は「RAN (Repeat-Associated Non-ATG)翻訳」と呼ばれ、これまでのアミロイド研究の枠を超えて神経変性疾患の分子機構解明の鍵を握っていると目されているが、その分子機構や細胞内でどのように RAN 翻訳が起こるのかなどよくわかっていない。そこで、本研究では、最近、開発された生細胞内で mRNA と複数の翻訳フレームの新生ポリペプチド鎖を可視化する系を応用して、細胞内での RAN 翻訳の分子機構に迫ることを目的とした。

【方法】生細胞内で RAN 翻訳イメージングを行うためには 1 本の mRNA と各翻訳フレームの新生ポリペプチド鎖を可視化する必要がある。そのために 1 本の mRNA で複数の翻訳フレームを別々の蛍光で可視化できる実験系を用いて RAN 翻訳の可視化を試みることとした。具体的には、RAN 翻訳のターゲットとして、ALS の原因遺伝子 *C9orf72* が持つ（GGGGCC）n リピート配列を選択し、RAN 翻訳の可視化を行なった。本研究では、上原記念生命科学財団のサポートによって観察用のプラスミドを作製後、予備的な観察を東京工業大学で行ったのちに、共同研究先である米国コロラド州立大学の Tim Stasevich ラボで詳細な観察、解析を行う予定とした。

【結果と考察】（GGGGCC）80 リピートを含む *C9orf72* 遺伝子を複数の翻訳フレームを検出できるプラスミドに組込んだ。作製したプラスミドを新生ポリペプチド鎖可視化のための抗体、mRNA の可視化に使う MCP とともに細胞に導入しライブセルイメージングを行なった．その結果、RAN 翻訳（0 フレーム）と見られる輝点が確認されたが、他のフレームは観察できなかった。予備研究が終了したところで渡米する予定であったが、新型コロナウイルスの感染拡大により、渡米が不可能となった。そこで、生細胞観察にも必要となる RAN 翻訳の分子機構解析を再構築型無細胞翻訳系で実施する系を立ち上げた。以上、上原記念生命科学財団の多大な支援を賜ることで、RAN 翻訳研究において世界的にも非常にユニークな実験系を確立することができた。最終的には、RAN 翻訳が関わる神経変性疾患の治療戦略や創薬にも結びつくことが期待される。

本研究の概念図



219. 神経変性疾患に関わる翻訳現象の細胞内イメージング

田口　英樹

東京工業大学 科学技術創成研究院 細胞制御工学研究センター

Key words：神経変性疾患，非典型的翻訳，塩基リピート関連非 ATG 翻訳（RAN 翻訳），生細胞内イメージング

緒　言

生命のセントラルドグマの終端である翻訳過程に大きな未開のバイオロジーがあることがわかってきた。翻訳は、遺伝子読み枠（ORF）内の開始コドンから始まって、淡々とコドンを読んでいき、最後に終止コドンにて終わるだけではない。以前からよく知られているフレームシフト、リードスルー以外にも、これまで認識されていなかった非典型的な翻訳現象が次々と明らかになってきている。私たちの最近の結果でも、翻訳伸長時の一時停止が ORF の 7〜8 割にのぼるほど頻繁に起こっていること[1]、特定のアミノ酸配列を翻訳している際にリボソームが不安定化して途中終了し、生理機能を有する現象などがわかってきた［2，3］。さらに、10 年ほど前には、非典型的な翻訳が疾患に関わるリピート関連非 ATG（Repeat-Associated Non-ATG：RAN）翻訳が見つかった（図 1）［4］。RAN 翻訳では神経変性疾患に関与する異常に伸長した塩基リピート配列内から、開始コドン ATG に依らない翻訳開始が起こる。さらに、奇妙なのはセンス鎖、アンチセンス鎖の全てのフレームで翻訳が起こることである。例えば、筋萎縮性側索硬化症（ALS）での GGGGCC という異常伸長リピートにおいては、Gly-Ala、Gly-Pro、Gly-Arg、Pro-Ala、Pro-Arg の 5 種類のジペプチドリピート（DPR）の翻訳が確認されている。これらの RAN 翻訳産物の一部が細胞内のタンパク質や RNA の液 - 液相分離を撹乱して細胞毒性を発揮するらしい［5］。RAN 翻訳は、これまでのアミロイド研究の枠を超えて神経変性疾患の分子機構解明の鍵を握っていると目されているが、その分子機構や細胞内でどのように RAN 翻訳が起こるのかなどよくわかっていない。

これまでの RAN 翻訳研究では、細胞を破砕した上でウエスタンブロッティング（DPR 翻訳産物もしくは人為的に導入したタグへの抗体）で行うのが常であるが、細胞破砕に伴い、細胞内での情報が失われる。例えば、1 つの mRNA から特定の読み枠だけが翻訳されるのか、それとも複数の読み枠が混合して翻訳されるのか、というようなことは RAN 翻訳の分子機構の理解にとって重要であるが、細胞を破砕するとその情報は失われてしまう。理想的には、生細胞内で個別の mRNA から読み枠毎の翻訳産物を区別して観察できれば明らかとなる。そこで本研究では、最近、開発された生細胞内で一つ一つの mRNA での翻訳産物を観察する系と、その応用であるフレームシフトの個別観察の系を RAN 翻訳に適用し、生細胞内での RAN 翻訳の分子機構を解析する系を確立する。この系の確立により、神経変性疾患における RAN 翻訳の生理的意義の一端を解明することを目的とした。

具体的には、生細胞内で個別の mRNA からの翻訳産物を可視化する方法を開発した Stasevich 博士（米国コロラド州立大学、東京工業大学兼任）が、その発展系として確立したフレームシフトの可視化系［6，7］に、RAN 翻訳を起こす GGGGCC リピートを組み込み、生細胞内での RAN 翻訳の可視化を行うことを目標とした。上原記念生命科学財団のサポートによって、RAN 翻訳イメージング用のプラスミドの作製が終了し、予備的なイメージングを行った。その結果、RAN 翻訳の一部のイメージングが観察できた。より高感度、かつ詳細な解析のため、当初は共同研究先の Stasevich ラボで長期滞在する予定だったが、新型コロナ感染拡大により頓挫してしまった。そのために、イメージング研究の際に活かせるための分子機構解析として、ヒト因子由来の再構成型無細胞翻訳系（ヒト因子由来 PURE システム［8，9］）にて RAN 翻訳を再現する実験にも着手し、十分な結果を得ている。

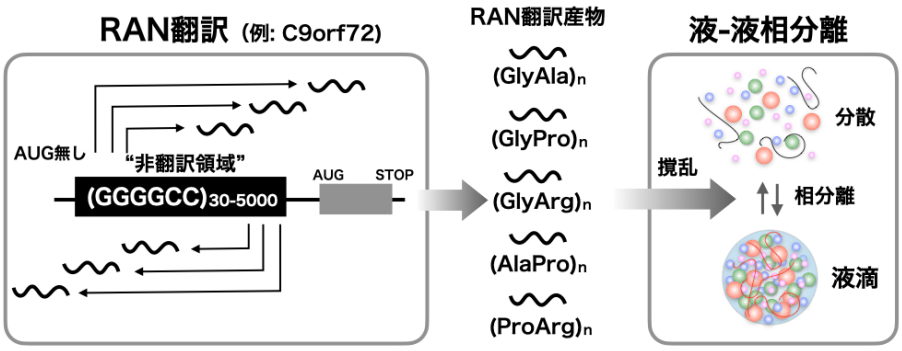


図 1. リピート関連非 ATG（Repeat-Associated Non-ATG: RAN）翻訳の概要

10 年ほど前に、異常な塩基リピートが関わる神経変性疾患において、非翻訳領域、かつ開始コドンがない領域から全てのフレームで翻訳が起こる非典型的な翻訳現象が見つかり、Repeat-Associated Non-ATG（RAN）と呼ばれるようになった。筋萎縮性側索硬化症（ALS）の *C9orf72* 遺伝子内の GGGGCC リピートからは Gly-Ala など 5 種類の翻訳産物ができ、その一部は細胞内の液 - 液相分離を撹乱することで毒性を発揮すると言われているが、詳細は不明である。

方　法

1. 生細胞での RAN 翻訳イメージング用プラスミドの作製

生細胞内で RAN 翻訳イメージングを行うためには 1 本の mRNA と各翻訳フレームの新生ポリペプチド鎖（新生鎖）を可視化する必要がある。そのために図 2 に示したような 1 本の mRNA で複数の翻訳フレームを別々の蛍光で可視化できる実験系［7］を応用して RAN 翻訳の可視化を試みることとした。この実験系の基本は、Stasevich らが確立した生細胞内での新生鎖トラッキング（Nascent chain tracking：NCT）法を用いる［6］。NCT 法で使う mRNA には mRNA のイメージング用の 3’側非翻訳領域に組込まれた複数の MS2 ステムループ、新生鎖の N 末端を認識するためのエピトープタグ（FLAG など）が組込まれている。イメージングは、mRNA の MS2 ステムループに特異的に結合する MCP タンパク質、抗エピトープタグ抗体の Fab 領域にそれぞれ異なった蛍光色素を結合させて、細胞内にビーズローディング法で導入し、mRNA、新生鎖をそれぞれイメージングする。翻訳中の mRNA とその翻訳産物である新生鎖は生細胞内の細胞質において共局在するスポットとして可視化できる。RAN 翻訳の可視化のためには異なったフレームを別々のエピトープタグで区別できる系を用いた。RAN 翻訳のターゲットとして ALS 関連遺伝子 *C9orf72* が持つ（GGGGCC）n リピート配列を選択し、RAN 翻訳の可視化を行うこととした。

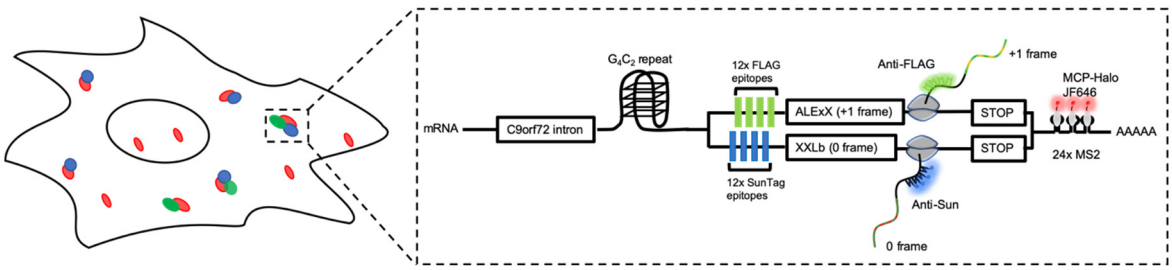


図 2. 生細胞での RAN 翻訳可視化系の概要

RAN 翻訳では複数のフレームが翻訳されることが特徴の一つである。個別の mRNA からの翻訳産物、およびフレームシフト観察系は共同研究者の Stasevich 博士が作製した実験系を用いる。フレームシフト観察系の上流に *C9orf72* 由来の GGGGCC リピートを組込むことで RAN 翻訳におけるセンス鎖の 0 と+1 の二つのフレームの可視化を行う。

2. 生細胞内イメージング

上記で作製した RAN 翻訳イメージング用プラスミド、新生ポリペプチド鎖可視化のための蛍光標識抗体（anti-FLAG）、mRNA の可視化に使う蛍光標識 MCP-Halo（JF646 標識）を U-2OS 細胞にビーズローディング法で導入し、ライブセルイメージングを行った。

結果および考察

1. RAN 翻訳をしている mRNA と RAN 翻訳産物のイメージング

RAN 翻訳観察用プラスミドが完成したので、U-2OS 細胞に観察に必要な蛍光標識抗体、mRNA 観察用 MCP-JF646 を導入し、イメージングを行った。その結果、再現性よく、0 フレームからの新生鎖（SunTag）と mRNA が共局在するようすがわかった（図 3）。その一方で、+1 フレームからの新生鎖は観察できなかった。

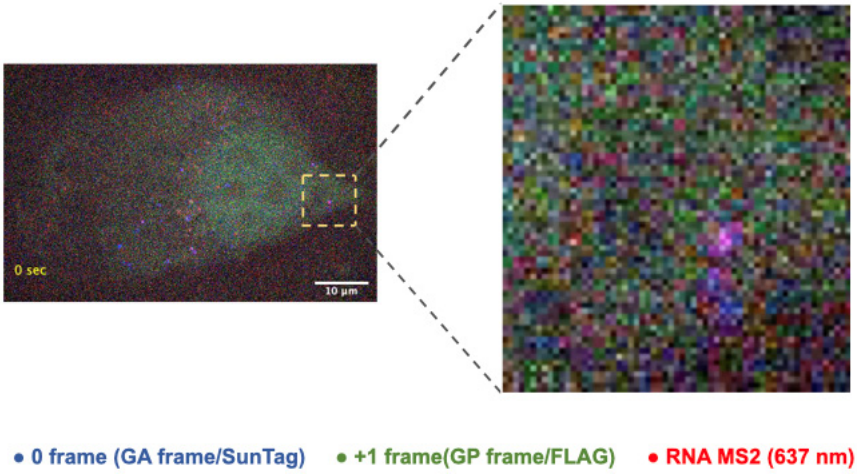


図 3. U-2OS 細胞における生細胞での RAN 翻訳の観察結果
作製したベクターを細胞内に導入し、観察したところ、0 フレームからの翻訳産物の起点が mRNA と一致する細胞があった。スケールバー：10 μm。

この観察では、通常の共焦点蛍光顕微鏡を用いたが、Stasevich ラボでは自作の斜光照明によって、S／N 比がよい環境で細胞内イメージングができること、NCT 法をベースとしたフレームシフト翻訳の観察のノウハウがあるため、この研究を担当していたメンバーを Stasevich ラボに 2020 年 4 月より派遣して、詳細なイメージングを行う予定であったが、新型コロナウイルスの感染拡大により、門戸が閉ざされ、詳細なイメージングは保留となっている。

2. 再構築型無細胞翻訳系による RAN 翻訳の再構成

RAN 翻訳は不明点が多いが、中でも分子機構についてほぼわかっていない。細胞抽出液系（ウサギ網状赤血球抽出液系など）で RAN 翻訳が起こるという報告があるが、どのような翻訳因子が必要なのかわかっていないので、兵庫県立大学の今高寛晃博士のグループらによって開発されている精製されたヒト因子由来の再構築型翻訳系（Human PURE）[8, 9] を用いて RAN 翻訳を行うこととした。その結果、図 4 に示すように IRES 系にて *C9orf72* の GGGGCC リピートの翻訳（図では 0 フレームのみ示したが、+1、+2 フレームも検出）が確認された。これによって RAN 翻訳は翻訳に必須の因子だけで翻訳伸長が起こることが証明された。

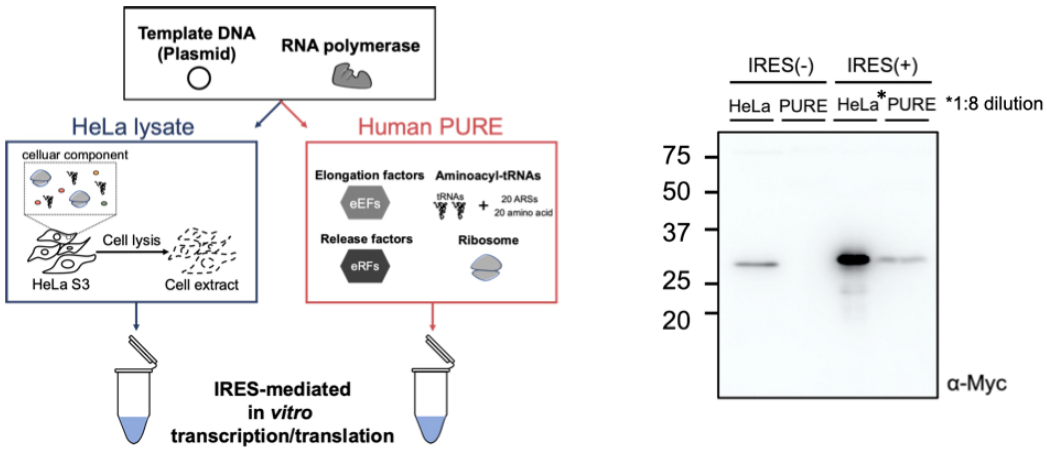


図 4. ヒト因子由来の再構築型無細胞翻訳系による RAN 翻訳の再構成
ヒト因子由来の再構築型翻訳系（Human PURE）と HeLa 細胞抽出液での翻訳系にて、GGGGCC リピートの翻訳を翻訳開始因子がない状況でも翻訳開始可能な IRES 系を用いて実施した。

3. 今後の展望

以上、上原記念生命科学財団の多大な支援を賜ることで、RAN 翻訳の生細胞内イメージング、精製したヒト翻訳因子で再構成した翻訳系（Human PURE）での RAN 翻訳という世界的にも非常にユニークな実験系を確立することができた。今後、どちらの手法も、通常の細胞生物学、生化学ではアプローチできない研究を推進し、当該分野の進展に大きく貢献できる。最終的には、RAN 翻訳が関わる神経変性疾患の治療戦略や創薬にも結びつくことが期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、近畿大学医学部の永井義隆博士、上山盛夫博士、コロラド州立大学の Timothy Stasevic 博士、兵庫県立大学の今高寛晃博士、町田幸大博士である。

文　献

1） Chadani Y, Niwa T, Chiba S, Taguchi H, Ito K. Integrated in vivo and in vitro nascent chain profiling reveals widespread translational pausing. Proc Natl Acad Sci U S A 113, E829-E838 (2016). PMID: 26831095, DOI: 10.1073/pnas.1520560113

2） Chadani Y, Niwa T, Izumi T, Sugata N, Nagao A, Suzuki T, Chiba S, Ito K, Taguchi H. Intrinsic Ribosome Destabilization Underlies Translation and Provides an Organism with a Strategy of Environmental Sensing. Molecular Cell 68, 528-539.e5 (2017). PMID: 29100053, DOI: 10.1016/j.molcel.2017.10.020

3） Chadani Y, Sugata N, Niwa T, Ito Y, Iwasaki S, Taguchi H. Nascent polypeptide within the exit tunnel stabilizes the ribosome to counteract risky translation. EMBO J 40 (2021). PMID: 34672004, DOI: 10.15252/EMBJ.2021108299

4） Zu T, Gibbens B, Doty NS, Gomes-Pereira M, Huguet A, Stone MD, Margolis J, Peterson M, Markowski TW, Ingram MA, Nan Z, Forster C, Low WC, Schoser B, Somia NV, Clark HB, Schmechel S, Bitterman PB, Gourdon G, Swanson MS, Moseley M, Ranum LP. Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions. Proc Natl Acad Sci U S A 108, 260-265 (2011). PMID: 21173221, DOI: 10.1073/pnas.1013343108

5) Nanaura H, Kawamukai H, Fujiwara A, Uehara T, Aiba Y, Nakanishi M, Shiota T, Hibino M, Wiriyasermkul P, Kikuchi S, Nagata R, Matsubayashi M, Shinkai Y, Niwa T, Mannen T, Morikawa N, Iguchi N, Kiriyama T, Morishima K, Inoue R, Sugiyama M, Oda T, Kodera N, Toma-Fukai S, Sato M, Taguchi H, Nagamori S, Shoji O, Ishimori K, Matsumura H, Sugie K, Saio T, Yoshizawa T, Mori E., C9orf72-derived arginine-rich poly-dipeptides impede phase modifiers. Nat Commun 12 (2021). PMID: 34489423, DOI: 10.1038/S41467-021-25560-0

6) Morisaki T, Lyon K, DeLuca KF, DeLuca JG, English BP, Zhang Z, Lavis LD, Grimm JB, Viswanathan S, Looger LL, Lionnet T, Stasevich TJ. Real-time quantification of single RNA translation dynamics in living cells. Science (1979) 352, 1425-1429 (2016). PMID: 27313040, DOI: 10.1126/science.aaf0899

7) Lyon K, Aguilera LU, Morisaki T, Munsky B, Stasevich TJ. Live-Cell Single RNA Imaging Reveals Bursts of Translational Frameshifting. Molecular Cell 75, 172-183.e9 (2019). PMID: 31178355, DOI: 10.1016/j.molcel.2019.05.002

8) Machida K, Mikami S, Masutani M, Mishima K, Kobayashi T, Imataka H. A translation system reconstituted with human factors proves that processing of encephalomyocarditis virus proteins 2A and 2B occurs in the elongation phase of translation without eukaryotic release factors. Journal of Biological Chemistry 289, 31960–31971 (2014). PMID: 25258322, DOI: 10.1074/jbc.M114.593343

9) Machida K, Shigeta T, Yamamoto Y, Ito T, Svitkin Y, Sonenberg N, Imataka H. Dynamic interaction of poly(A)-binding protein with the ribosome. Scientific Reports 8 (2018). PMID: 30487538, DOI: 10.1038/s41598-018-35753-1