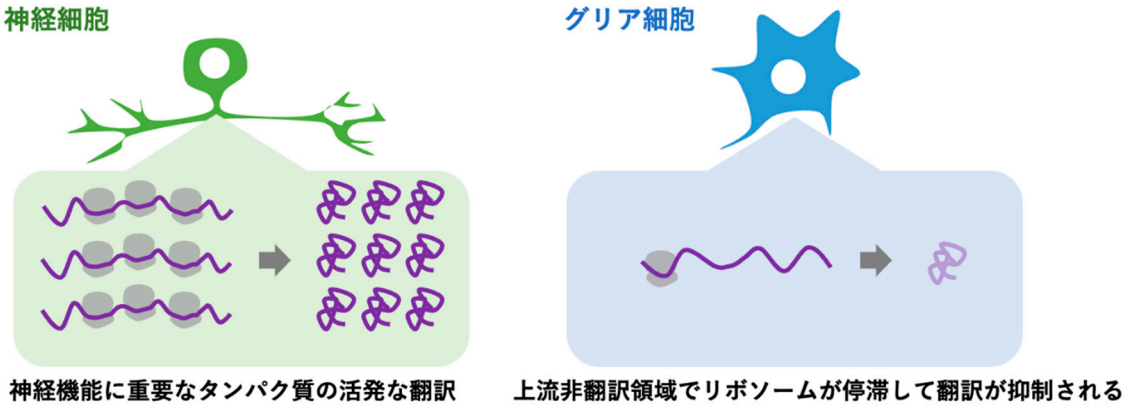
101　神経系におけるトランスラトームアトラス	市之瀬　敏晴

【目的】遺伝子発現は、転写と翻訳の両方の段階で制御を受ける。多様な細胞種から構成される神経系において、転写産物の量は単一細胞レベルで明らかにされている一方、翻訳レベルでの制御は未解明の点が多い。そこで本研究では　ショウジョウバエの神経系をモデルに、神経細胞とグリア細胞という大きく異なる二つの細胞種について、どういった翻訳レベルの違いが細胞種間で生じているのか、また、どのようなメカニズムでその違いが生じているのか、明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】神経細胞とグリア細胞の間でタンパク質翻訳を比較するため、細胞種特異的なリボソームプロファイリングを行った。この方法では、特定細胞由来のリボソームを遺伝学的にタグし、リボソームと mRNA の複合体を RNase 処理することで、リボソームに保護された 30 塩基程度の RNA 断片（フットプリント）の配列を次世代シーケンサーによって解読する。同時にトランスクリプトーム解析も行い、mRNA あたりのリボソームの数（翻訳効率）を算出した。翻訳効率は遺伝子によって最大で 100 倍程度異なり、神経細胞とグリア細胞の間で比較すると、同じ遺伝子でも mRNA あたりのリボソームの結合数は細胞種によって数十倍程度異なるものがあることが判明した。特にイオンチャネルや G タンパク質共役受容体、神経ペプチドなど神経機能に関わる遺伝子において、神経細胞ではグリア細胞に比べて翻訳効率が 10 倍程度高かった。これらの遺伝子の配列を調べると、上流非翻訳領域（5' UTR）に開始コドンと終止コドンから構成される短い上流 ORF（Upstream-ORF：uORF）が多数存在していた。興味深いことに、グリア細胞ではこれらの uORF にリボソームが多数集積していた。この配列の翻訳制御における役割を解明するため著者らは、uORF を含む 5' UTR 配列を蛍光タンパク質につないだトランスジェニックレポーターを作製し、神経細胞とグリア細胞で発現させた。その結果、uORF 配列によってグリア細胞特異的な翻訳抑制が生じることを示した。以上本研究により、上流非翻訳領域、特に uORF 配列によって翻訳レベルで細胞種特異的なタンパク質発現が生じることを発見した。

概念図：神経機能に重要な遺伝子は、神経細胞では活発に翻訳される一方、
グリア細胞では上流非翻訳領域でリボソームが停滞し、翻訳が抑制される



101. 神経系におけるトランスラトームアトラス

市之瀬　敏晴

東北大学 学際科学フロンティア研究所

Key words：神経細胞，グリア細胞，翻訳制御，Ribo-seq，ショウジョウバエ

緒　言

多細胞生物は、機能や性質の異なる多種類の細胞種から構成される。その多様な性質発現は、遺伝子発現の違いによる。ゲノムにコードされる遺伝子は、mRNA にまず転写されたのち、タンパク質に翻訳される。当然ながら、タンパク質発現は転写と翻訳の両方のステップで制御を受ける。過去 10 年間の分子生物学では、転写レベルでの発現調節に対する理解が飛躍的に進んだ。これは、次世代シークエンス技術を用いた網羅的な転写の解析（トランスクリプトーム解析）の登場によるところが大きい。特に最近では、一細胞トランスクリプトーム解析と呼ばれる、個別細胞のトランスクリプトーム解析が行われ、ゲノムワイドな転写パターンが細胞レベルでマップされた［1，2］。

一方で、実際の細胞機能を担うのは mRNA ではなくタンパク質であり、そのタンパク質を合成する翻訳の重要性は言わずもがなである。実際、マウスの線維芽細胞に含まれるタンパク質量は、mRNA との相関係数が 0.35 程度であるのに対して翻訳量との相関係数は 0.85 と高い数値を示し、翻訳調節の役割の大きさを示している［3］。しかし、タンパク質は核酸よりも実験的に扱うことが困難であり、特に多種の細胞が入り混じる生体組織において、翻訳調節に関する理解は相対的に乏しい状況にある。

そこで本研究ではショウジョウバエの神経系をモデルに、ゲノムワイドな翻訳パターン（トランスラトーム）の解析を神経細胞とグリア細胞という異なる細胞種において行い、比較した。また、トランスジェニックレポーターを作製し、異なる細胞種で発現誘導することにより、上流 UTR 配列によって細胞種特異的な翻訳の制御が起こっていることを示すことに成功した。

方法および結果

1. 神経細胞とグリア細胞からの翻訳プロファイリングの比較

リボソームプロファイリングとは、リボソームと mRNA の複合体を RNase 処理することで、リボソームに保護された 30 塩基程度の RNA 断片（フットプリント）の配列を次世代シーケンサーによって解読する方法である［4］。これを mRNA 上にマップすることで、リボソームがどの mRNA の、どの部位に存在しているか、コドン単位で明らかにすることができる。また、トランスクリプトーム解析と比較することで、翻訳効率（mRNA 分子あたりのリボソーム結合数）を計算することができる。著者は、リボソームプロファイリングとトランスクリプトーム解析を脳の特定の細胞種で行うための技術開発を行った［5］。この細胞種特異的リボソームプロファイリングでは、遺伝学的に標的細胞のリボソームを FLAG タグし、免疫沈降法で精製したのち、リボソームプロファイリングとトランスクリプトーム解析を行う（図 1A）。この二つの解析から翻訳効率を計算すると、先行研究と同様に、遺伝子によって翻訳効率は最大で 100 倍程度異なっていた（図 1B）。興味深いことに、神経細胞とグリア細胞の間で比較すると、同じ遺伝子でも細胞種によって翻訳効率は大きく異なることが判明した。特にイオンチャネルや G タンパク質共役受容体、神経ペプチドなど神経機能に関わる遺伝子において、神経細胞ではグリア細胞に比べて翻訳効率が 10 倍近く高かった（図 1C）。このことは、転写だけでなく翻訳レベルでも細胞

種間に違いがあり、転写と翻訳の両方の段階でタンパク質発現における細胞種の違いが表現されていると理解することができる。

著者らはさらにそのメカニズムを探るため、神経細胞とグリア細胞の間で翻訳効率が大きく異なる遺伝子について、mRNA 上のリボソームの分布を解析した。その結果、これらの遺伝子上では、グリア細胞特異的に、上流非翻訳領域（5' UTR）とされてきた領域にもリボソームが集積していることが明らかになった（図 1D）。リボソームプロファイリングでは 40S 小サブユニットはほとんど検出しないため、これらの領域では 80S リボソームによるタンパク質翻訳が起きていることがわかる。実際、これらの領域には、開始コドンと終止コドンから構成される短い ORF（Upstream ORF : uORF）が多数存在し、グリア細胞で特にリボソームが集積していた。この結果は、特定細胞種においてリボソームは uORF によって‘トラップ’され、下流のタンパク質コード領域の翻訳が抑制されていることを強く示唆する。

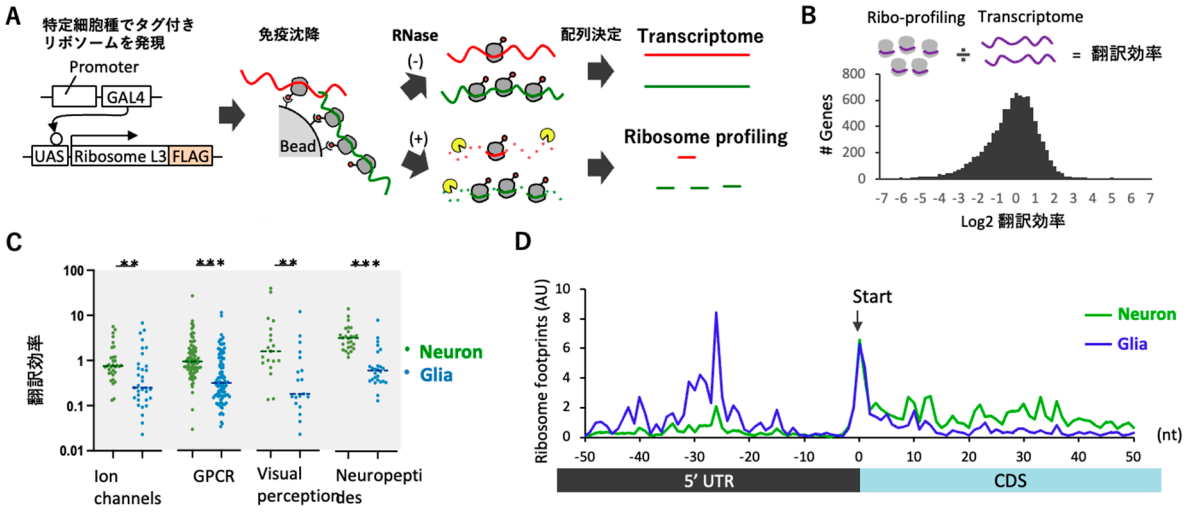


図 1. 細胞種特異的なリボソームプロファイリングとトランスクリプトーム解析

A） 特定細胞由来のリボソームと mRNA を免疫沈降し、リボソームプロファイリング（RNase 処理あり）とトランスクリプトーム解析（RNase 処理なし）を行う。

B） 各遺伝子について、リボソームの結合数を mRNA の量で割ることで mRNA あたりの翻訳量（翻訳効率）を算出した。

C） それぞれの遺伝子群について、神経細胞（緑）とグリア細胞（青）における翻訳効率を比較した。神経機能を担う多くの遺伝子について、グリアで翻訳抑制が見られる。**P＜0.01、***P＜0.001（Dunn's multiple comparisons test）。

D） グリアで翻訳抑制が起きている 161 個の遺伝子について、そのリボソームの分布平均を開始コドンの前後 50 塩基において、神経細胞とグリア細胞の間で比較した。グリア細胞において 5′UTR でのリボソームの集積が見られる。

2. 遺伝学レポーターを使用した因果関係の証明

「uORF が細胞種特異的な翻訳抑制を担う」という仮説を検証するための実験を行った。この目的のため、*Rh1* という遺伝子に着目した。この遺伝子は光受容体をコードし、神経で強く翻訳されている（図 2A）。興味深いことに、この遺伝子の上流非翻訳領域には開始コドンと終止コドンのみから構成される最小単位の ORF が三つ存在し、グリア細胞ではリボソームの分布が極端にこの上流領域に偏っていた（図 2B、C）。この配列が細胞種特異的な翻訳に与える影響を解明するため、この配列を蛍光タンパク質 Venus につないだトランスジェニックレポーターショウジョウバエを作製し（図 2D）、脳内でのタンパク質発現を観察した。その結果、興味深いことに、グリア細胞では mRNA の発現は見られるものの、タンパク質発現が抑制されることが観察された（図 2E、F）。

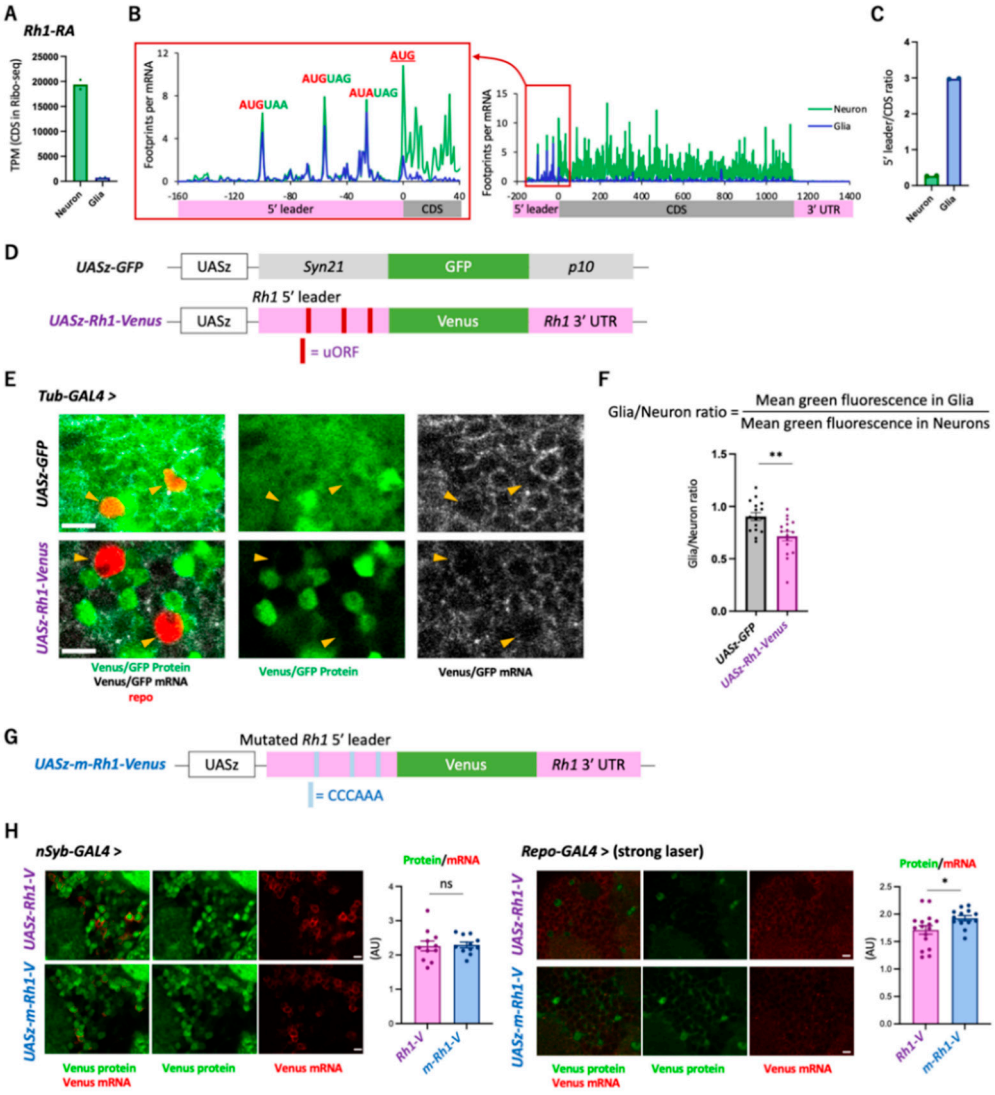


図 2. トランスジェニックレポーターによる uORF 配列の機能の解明

A) Rh1 のタンパク質コード領域におけるリボソームフットプリントを神経細胞とグリア細胞の間で比較した。

B) Rh1 上のリボソームの分布を神経とグリアの間で比較した。グリア細胞において、開始コドンと終止コドンのみで構成される uORF 上に多数のリボソームが集積している。

C) Rh1 における 5'UTR と CDS のリボソームの密度比を神経細胞とグリア細胞で比較した。

D) トランスジェニックレポーター配列。緑色蛍光タンパク質（GFP、Venus）に uORF を含む 5'UTR をつないだ。コントロールとして、過剰発現に広く使われる Syn21 を使用した。

E) Tubulin-GAL4 を用い、ショウジョウバエ脳において神経細胞とグリア細胞両方で発現を誘導した。緑：蛍光タンパク質シグナル、赤：グリアマーカー（repo）、白：レポーターmRNA シグナル。スケールバー：5μm。

F) 神経細胞とグリア細胞の蛍光タンパク質の発現比を定量した。**P＜0.01（Mann-Whitney test of ranks）。

G) uORF を変異させたレポーターを作製した。

H) 神経細胞（左）とグリア細胞（右）で Rh1 レポーター（UAS-Rh1-V）と Rh1 変異レポーター（UASz-m-Rh1-V）を発現させ、その mRNA とタンパク質の蛍光シグナル比を算出した。スケールバー：5μm。Ns：P＞0.05、*P＜0.05（Mann-Whitney test of ranks）。

コントロールのレポーターではグリア細胞・神経細胞ともに強い発現が見られている（図 2E、F）。この結果は、Rh1 の非翻訳領域配列により、グリア細胞特異的な翻訳抑制が生じたことを示唆する。さらに著者らは、uORF の機能を探るため、uORF のみを CCCAAA という配列に改変したレポーターを作製した（図 2G）。その結果、この改変型レポーターではグリア細胞での蛍光タンパク質発現が亢進すること、神経細胞ではそのような亢進は見られないことが判明した（図 2H）。この結果から、Rh1 の上流非翻訳領域に存在する小さな uORF が細胞種特異的な翻訳調節を行うことが明らかとなった。

考　察

本研究では脳内の標的細胞種から転写と翻訳を同時に解析する手法の開発を行い、神経細胞とグリア細胞の間で翻訳効率を比較した［5］。この新しいアプローチにより、同じ遺伝子であっても翻訳レベルで細胞種間の差が生じること、上流非翻訳領域に存在する小さなORFがその役割の一端を担っていることが明らかになった。上流非翻訳領域の ORF による翻訳制御は貧栄養や細胞ストレスといった細胞応答に重要な役割を持つことが先行研究によって報告されているが、本研究は細胞種間のタンパク質発現の違いを生み出すメカニズムにスポットを当てたものといえる。

神経系は、機能や形態が非常に多様な細胞から構成される。ショウジョウバエの神経系は哺乳類の脳と比べると比較的単純といえるが、それでも 5,000 を超える多様な細胞種から構成される［6］。これら多様な細胞種は、わずか 100 個程度の神経幹細胞から生み出されることがわかっている［7］。この細胞多様性は、おそらく転写による調節のみでは実現することが難しく、転写と翻訳の二重の制御をかけることによって生み出されると考えられる。以上、本研究により、生体脳における翻訳制御の細胞種間の多様性と、そのメカニズムの一端を明らかにすることができた。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東北大学大学院生命研究科の谷本拓、東北大学学際科学フロンティア研究所の菅野舞、東京理科大学先進工学部の近藤周、理化学研究所開拓研究本部の岩崎信太郎、七野悠一、水戸麻理である。

文　献

1） Macosko EZ, Basu A, Satija R, Nemesh J, et al., Highly Parallel Genome-wide Expression Profiling of Individual Cells Using Nanoliter Droplets. Cell. 2015 May 21;161(5):1202-1214. doi: 10.1016/j.cell.2015.05.002. PMID: 26000488; PMCID: PMC4481139.

2） Li H, Janssens J, De Waegeneer M, Kolluru SS et al., Fly Cell Atlas: A single-nucleus transcriptomic atlas of the adult fruit fly. Science. 2022 Mar 4;375(6584):eabk2432. doi: 10.1126/science.abk2432. Epub 2022 Mar 4. PMID: 35239393; PMCID: PMC8944923.

3） Schwanhäusser B, Busse D, Li N, Dittmar G, Schuchhardt J, Wolf J, Chen W, Selbach M. Global quantification of mammalian gene expression control. Nature. 2011 May 19;473(7347):337-42. doi: 10.1038/nature10098. Erratum in: Nature. 2013 Mar 7;495(7439):126-7. doi: 10.1038/nature11848. PMID: 21593866.

4） Ingolia NT, Ghaemmaghami S, Newman JR, Weissman JS. Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. Science. 2009 Apr 10;324(5924):218-23. doi: 10.1126/science.1168978. Epub 2009 Feb 12. PMID: 19213877; PMCID: PMC2746483.

5) Ichinose T, Kondo S, Kanno M, Shichino Y, Mito M, Iwasaki S, Tanimoto H. Translational regulation enhances distinction of cell types in the nervous system. eLife. In Press. doi.org/10.1101/2023.06.15.545207.

6) Scheffer LK, Xu CS, Januszewski M, Lu Z, Takemura SY, Hayworth KJ, Huang GB, Shinomiya K, Maitlin-Shepard J, Berg S, Clements J, Hubbard PM, Katz WT, Umayam L, Zhao T, Ackerman D, Blakely T, Bogovic J, Dolafi T, Kainmueller D, Kawase T, Khairy KA, Leavitt L, Li PH, Lindsey L, Neubarth N, Olbris DJ, Otsuna H, Trautman ET, Ito M, Bates AS, Goldammer J, Wolff T, Svirskas R, Schlegel P, Neace E, Knecht CJ, Alvarado CX, Bailey DA, Ballinger S, Borycz JA, Canino BS, Cheatham N, Cook M, Dreher M, Duclos O, Eubanks B, Fairbanks K, Finley S, Forknall N, Francis A, Hopkins GP, Joyce EM, Kim S, Kirk NA, Kovalyak J, Lauchie SA, Lohff A, Maldonado C, Manley EA, McLin S, Mooney C, Ndama M, Ogundeyi O, Okeoma N, Ordish C, Padilla N, Patrick CM, Paterson T, Phillips EE, Phillips EM, Rampally N, Ribeiro C, Robertson MK, Rymer JT, Ryan SM, Sammons M, Scott AK, Scott AL, Shinomiya A, Smith C, Smith K, Smith NL, Sobeski MA, Suleiman A, Swift J, Takemura S, Talebi I, Tarnogorska D, Tenshaw E, Tokhi T, Walsh JJ, Yang T, Horne JA, Li F, Parekh R, Rivlin PK, Jayaraman V, Costa M, Jefferis GS, Ito K, Saalfeld S, George R, Meinertzhagen IA, Rubin GM, Hess HF, Jain V, Plaza SM. A connectome and analysis of the adult Drosophila central brain. Elife. 2020 Sep 7;9:e57443. doi: 10.7554/eLife.57443. PMID: 32880371; PMCID: PMC7546738.

7) Ito M, Masuda N, Shinomiya K, Endo K, Ito K. Systematic analysis of neural projections reveals clonal composition of the Drosophila brain. Curr Biol. 2013 Apr 22;23(8):644-55. doi: 10.1016/j.cub.2013.03.015. Epub 2013 Mar 28. PMID: 23541729.