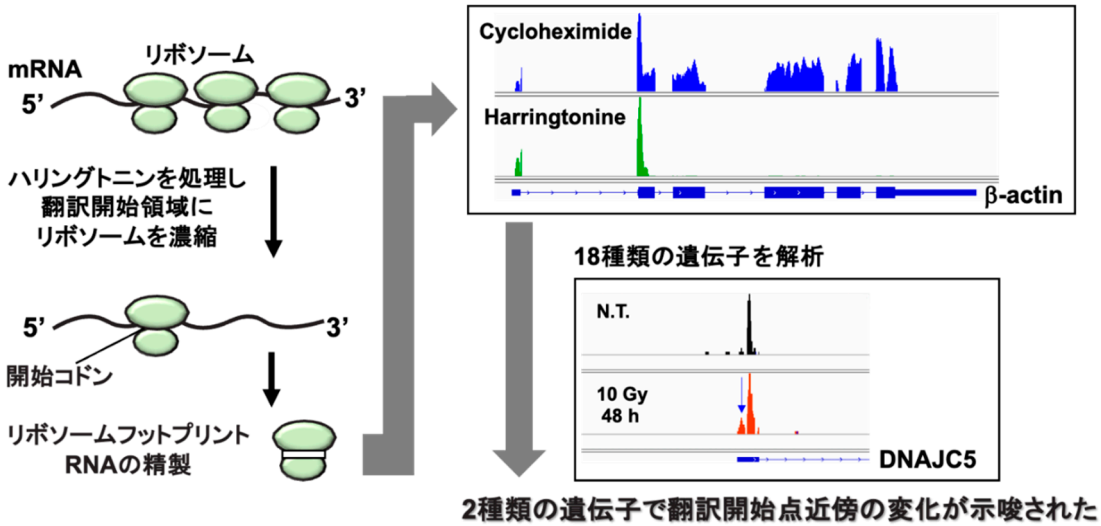
105　ゲノムストレス依存的な非典型的翻訳機構の解明	内原　脩貴

【目的】免疫チェックポイント阻害剤（ICI：Immune-checkpoint inhibitor）は様々ながん種に適応されるが、単剤では十分な効果を発揮できないケースが多く存在するため、治療効果を高める方法が模索されている。DNA 損傷を誘導する化学療法剤や放射線治療は免疫応答を促進すると考えられていることから、ICI と化学放射線療法を併用する臨床試験が世界中で行われている。しかしながら、DNA 損傷を誘発してがん細胞を殺傷するはずの放射線治療や化学療法剤が、いかにして抗腫瘍免疫を活性化しているのか、その分子メカニズムはほとんど明らかになっていない。著者の所属する研究グループでは、化学放射線治療が DNA 損傷シグナル依存的に、免疫抑制分子 PD-L1 の発現誘導を引き起こすことを見出し報告している。さらに著者は、放射線や化学療法剤などによって誘発された DNA 損傷が HLA クラス I の提示を促進すること、すなわち腫瘍環境内で免疫活性が高まることを明らかにしている。特に著者は、DNA 損傷後に発生する抗原は、パイオニアラウンド翻訳を介して産生されるという独自の抗原産生モデルを提案している。さらに DNA 損傷依存的にパイオニアラウンド翻訳が促進される mRNA アイソフォームを 20 種類（18 種類の遺伝子）同定している。これらの属するパスウェイの遺伝子は、5'UTR から翻訳され得ることが示唆されており、開始コドン AUG に依存しない翻訳が生じている可能性が考えられた。そこで本研究では、DNA 損傷依存的に生じる翻訳開始変化とその分子機構の解明を目指した。

【方法】X 線非照射および 10 Gy X 線照射 48 時間後のヒト正常網膜色素上皮（RPE：Retinal Pigment Epithelium）を用いてリボソームプロファイリングを行った。シーケンス生データに対してトリミングや UMI 抽出、マッピング等の処理を行い、ゲノムにマップされたデータを用いて Metagene 解析および IGV による可視化を行った。18 種類の遺伝子について、翻訳開始点近傍を可視化することでマッピングパターンの変化を解析した。

【結果】Metagene 解析により、フットプリントがコーディング領域（CDS）内に存在していること、3 塩基周期性を持つことが確認されたため、リボソームプロファイリングが適切に実施できたと考えられた。また、ハリングトニン処理により翻訳開始点近傍にフットプリントが濃縮されることが確認できた。これら結果は X 線非照射群および照射群で認められた。そこで次に、パイオニアラウンド翻訳が促進された 18 種の遺伝子について、翻訳開始点近傍を解析した。その結果、2 種類の遺伝子（*CDC73*、*DNAJC5*）でリードの分布パターンが変化することが示唆された。

X 線が翻訳開始点近傍のリボソーム局在に及ぼす影響



105. ゲノムストレス依存的な非典型的翻訳機構の解明

内原　脩貴

*群馬大学 未来先端研究機構 シグナル伝達研究プログラム

Key words：X 線，DNA 損傷，翻訳開始領域，リボソームプロファイリング

緒　言

免疫チェックポイント阻害剤（ICI：Immune-checkpoint inhibitor）は様々ながん種に適応されるが、単剤では十分な効果を発揮できないケースが多く存在し、その治療効果を改善するための基礎研究が求められている。DNA 損傷を誘導する化学療法剤や放射線治療は免疫応答を促進すると考えられていることから、ICI と化学放射線療法を併用する臨床試験が世界中で行われている。これらの臨床試験において概ね良好な結果が得られているが、大きな個人差があることが明らかになりつつある。実際に、DNA 損傷を誘発してがん細胞を殺傷するはずの放射線治療や化学療法剤が、いかにして抗腫瘍免疫を活性化しているのか、その分子メカニズムはほとんど明らかになっていない。

著者の所属する研究グループでは、化学放射線治療が DNA 損傷シグナル依存的に、免疫抑制分子 PD-L1 の発現誘導を引き起こすことを見出し報告している［1，2］。免疫チェックポイント阻害剤は PD-L1 発現による免疫抑制機構を解除することから、これらの成果は化学放射線治療と合わせて抗 PD-1/PD-L1 阻害剤を投与することは有用であるエビデンスを示すことができている。このような研究背景において、著者は放射線や化学療法剤などによって誘発された DNA 損傷が HLA クラス I の提示を促進すること、すなわち腫瘍環境内で免疫活性が高まることを明らかにした［3］。特に著者は、DNA 損傷後に発生する抗原は、mRNA に対する品質管理であるパイオニアラウンド翻訳を介して産生されるという独自の抗原産生モデルを提案している。また DNA 損傷依存的にパイオニアラウンド翻訳が促進される mRNA アイソフォームを 20 種類（18 種類の遺伝子）同定している。これらの属するパスウェイの遺伝子は、5'UTR から翻訳され得ることが示唆されており［4］、開始コドン AUG に依存しない『非典型的な翻訳』が生じている可能性が考えられた。そこで本研究では、DNA 損傷依存的に生じる翻訳開始変化とその分子機構の解明を目指した。

方　法

1. 細胞培養

ヒト正常網膜色素上皮（RPE：Retinal Pigment Epithelium）をダルベッコ改変イーグル培地:栄養混合物 F-12（DMEM/F-12）で培養した。培地には、10%ウシ胎児血清（FBS）、1×ペニシリン-ストレプトマイシン-L-グルタミン溶液、および重炭酸ナトリウムを添加し使用した。細胞は 37℃、5% CO_2 の条件下で培養を行った。X 線照射は MX-160Labo（160 kVp、1.07 Gy/min、3.00 mA、mediXtec）を使用して実験を行った。

2. リボソームプロファイリング

RPE 細胞に 10 Gy X 線を照射した 48 時間後に、シクロヘキシミドまたはハリングトニンを含む細胞溶解バッファーで細胞を溶解した。DNase で溶解液を 10 分間処理し、遠心後に上清を分取した。細胞溶解液に含まれる RNA 量は Qubit RNA BR Assay Kit により測定した。RNA 量 10 μg 分に相当する細胞溶解液を分取し、20 U の RNase I を加え、25℃で 45 分間処理した。この反応は SUPERase·In を加えることで停止させた。

*現在の所属：慶應義塾大学 薬学部・分子腫瘍薬学講座

その後、超遠心機を用いてショ糖密度勾配遠心によりリボソームを単離し、TRIzol と Direct-zol MicroPrep kit を用いて RNA を抽出した。変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、モノソームのリボソームフットプリント長である 17～34 bp の RNA を抽出した。リボソームフットプリントに対して脱リン酸化処理およびリンカーライゲーションを行い、変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により精製した。その後、リボソーム RNA を取り除き、逆転写反応を行った。変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により精製した cDNA を環状化し、ハイフィデリティーPCR 酵素により増幅し、バーコードを付加した。PCR 産物は非ポリアクリルアミドゲル電気泳動により精製し、MultiNA を用いてライブラリーの品質を確認した。ライブラリーシーケンスはマクロジェンに委託した。

3. データ解析

データ解析は、和光理研のスーパーコンピュータ HOKUSAI 内に構築された共同研究先（理化学研究所岩崎 RNA システム生化学研究室）のサーバー内で行った。まず、fastp を用いてアダプターのトリミングと低クオリティーリードの除去を行い、cutadapt および UMI-tools を用いてバーコード毎にサンプルの分配および UMI の抽出を行った。STAR を用いて rRNA や tRNA などの ncRNA に由来するリードを取り除き、ゲノムにマッピングした。また、PCR duplicate は UMI-tools により取り除いた。その後、Metagene 解析および IGV による可視化を行った。

結果および考察

1. リボソームプロファイリング結果のクオリティチェック

RPE 細胞に 10 Gy X 線を照射した 48 時間後または非照射の条件でリボソームプロファイリングを行い、Metagene 解析によるクオリティチェックの後、緒言に示した 18 種類の遺伝子について翻訳開始点変化を解析した。シクロヘキシミドはタンパク質合成途中のリボソームに作用し mRNA 上で停止させるため、その処理より翻訳途中のリボソーム結合部位を同定することができる。一方で、ハリングトニンは開始コドンに存在するリボソームを阻害するため、翻訳開始点に位置するリボソームを濃縮することができる。Metagene 解析により、フットプリントがコーディング領域（CDS）内に存在しているか、また 3 塩基周期性（3 つ存在するコーディングフレームのうち、1 つにピークが現れる）があるかどうかを検討した結果、CDS 内に 3 塩基周期毎のピークが認められた（図 1A、B）。また、フットプリント長として、30 nt および 20 nt 付近にピークが認められた（図 1C）。この結果は、X 線照射および非照射、シクロヘキシミド処理およびハリングトニン処理のいずれでも同様であったことから、リボソームプロファイリングが適切に実施できたと考えられた。

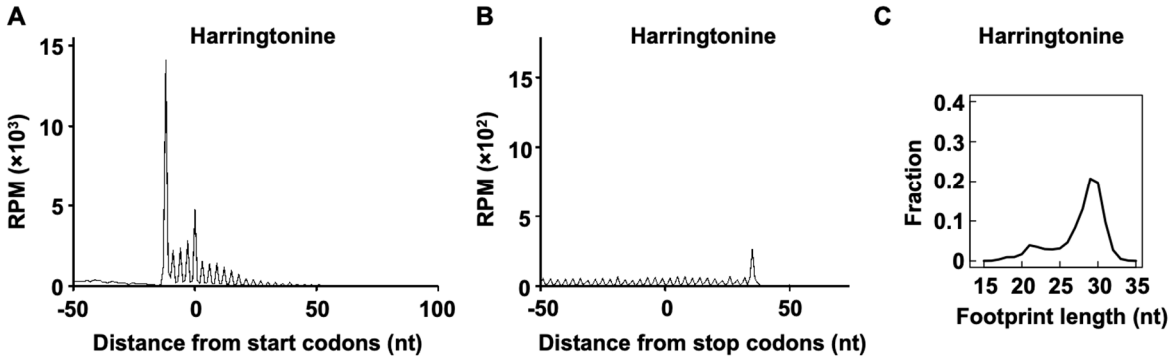


図 1. リボソームプロファイリングの Metagene 解析

A、B）全フットプリントの 5'末端について、開始コドンまたは終止コドンからの相対位置をプロットした。

C）マッピングされたフットプリントのリード長をプロットした。

さらにゲノムにマッピングしたリードを IGV で可視化することで、イントロン領域にピークが検出されないこと、ハリングトニン処理により翻訳開始点近傍にピークが濃縮されていることを確認した（図 2）。

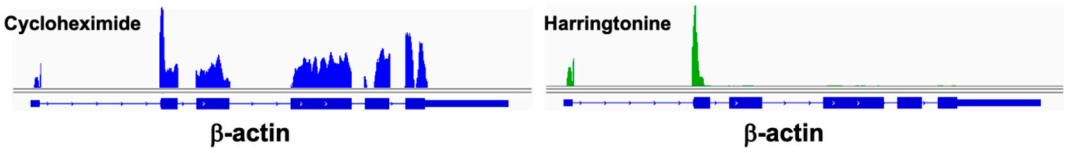


図 2. ハリングトニン処理によるリボソームの翻訳開始点における濃縮

シクロヘキシミドまたはハリングトニンを処理した RPE 細胞のリボソームプロファイリング結果について、*β-actin* 遺伝子領域を IGV で可視化した。

2. X 線依存的に生じる翻訳開始領域の変化

緒言で示した 18 種類の遺伝子について、X 線非照射 RPE 細胞および 10 Gy X 線照射 48 時間後の RPE 細胞のリボソームプロファイリングの結果を比較した。ハリングトニン処理したデータを IGV で可視化し、翻訳開始点付近を比較した結果、16 種類の遺伝子について翻訳開始領域近傍の顕著なパターンの変化は認められなかった（図 3A）。一方で、*CDC73* と *DNAJC5* の 2 種類の遺伝子については微細な変化が観察された（図 3B）。今回、HLA クラス I により提示される候補ペプチドの由来となる 18 種類の遺伝子について個別に解析を行い、2 種類の遺伝子で翻訳開始点が変化している可能性が示された。この 2 種類の遺伝子については、マッピングされたリード数が少なく、偶然パターン変化が観察された可能性が否定できないため、今後、シーケンスを深く読む必要がある。

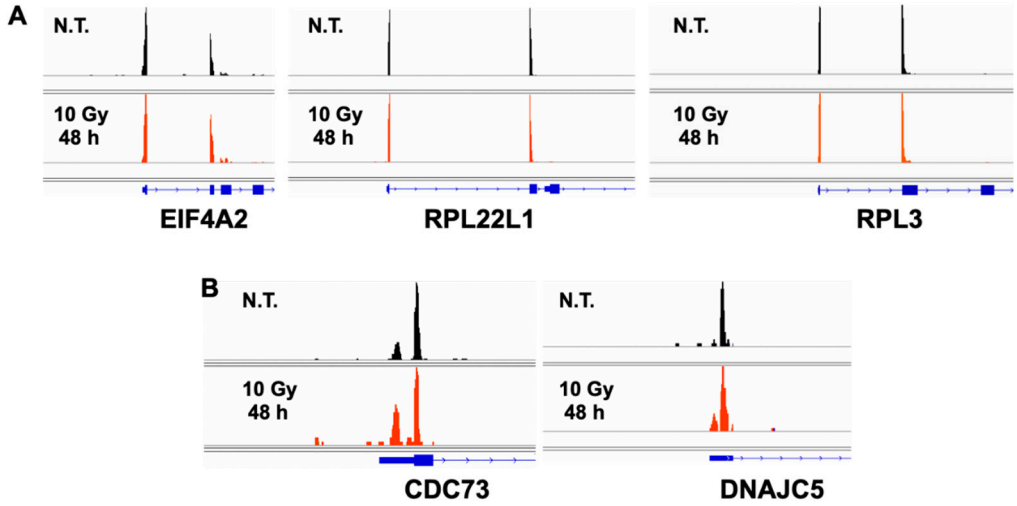


図 3. X 線依存的な翻訳開始領域の変化

X 線非照射および 10 Gy 照射 48 時間後の RPE 細胞のリボソームプロファイリング結果を IGV で可視化した。A. 翻訳開始領域の変化が認められなかった 16 種類の遺伝子の中で、3 種類を代表的なデータとして示した。B. 翻訳開始領域の変化が示唆された 2 種類の遺伝子のデータを示した。

これまでに AUG 開始コドンから開始される翻訳は翻訳因子 eIF2α により制御されること、AUG 類似開始コドンから生じる翻訳は eIF2A や eIF5 により制御されることが報告されている［5，6］。また、DNA 損傷により eIF2α の活性が低下すること、GUG 開始コドンからの翻訳が促進することが示唆されている［7，8］。したがって、DNA 損傷による翻訳開始領域の変化は、今回検討した遺伝子以外にも様々な遺伝子で生じている可能性が考えられる。そのため、MACS3 によるピークコール解析等を用いて網羅的に翻訳開始領域の変化を探索していく必要がある。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、理化学研究所岩崎 RNA システム生化学研究室の七野悠一である。

文　献

1） Sato H, Niimi A, Yasuhara T, Permata TBM, Hagiwara Y, Isono M, Nuryadi E, Sekine R, Oike T, Kakoti S, Yoshimoto Y, Held KD, Suzuki Y, Kono K, Miyagawa K, Nakano T, Shibata A. DNA double-strand break repair pathway regulates PD-L1 expression in cancer cells. Nat Commun. 2017 Nov 24;8(1):1751. doi: 10.1038/s41467-017-01883-9. PMID: 29170499; PMCID: PMC5701012.

2） Permata TBM, Hagiwara Y, Sato H, Yasuhara T, Oike T, Gondhowiardjo S, Held KD, Nakano T, Shibata A. Base excision repair regulates PD-L1 expression in cancer cells. Oncogene. 2019 Jun;38(23):4452-4466. doi: 10.1038/s41388-019-0733-6. Epub 2019 Feb 12. PMID: 30755733.

3） Uchihara Y, Permata TBM, Sato H, Kawabata-Iwakawa R, Katada S, Gu W, Kakoti S, Yamauchi M, Kato R, Gondhowiardjo S, Hosen N, Yasuhara T, Shibata A. DNA damage promotes HLA class I presentation by stimulating a pioneer round of translation-associated antigen production. Mol Cell. 2022 Jul 21;82(14):2557-2570.e7. doi: 10.1016/j.molcel.2022.04.030. Epub 2022 May 19. PMID: 35594857.

4) Ruiz Cuevas MV, Hardy MP, Hollý J, Bonneil É, Durette C, Courcelles M, Lanoix J, Côté C, Staudt LM, Lemieux S, Thibault P, Perreault C, Yewdell JW. Most non-canonical proteins uniquely populate the proteome or immunopeptidome. Cell Rep. 2021 Mar 9;34(10):108815. doi: 10.1016/j.celrep.2021.108815. PMID: 33691108; PMCID: PMC8040094.
5) Starck SR, Jiang V, Pavon-Eternod M, Prasad S, McCarthy B, Pan T, Shastri N. Leucine-tRNA initiates at CUG start codons for protein synthesis and presentation by MHC class I. Science. 2012 Jun 29;336(6089):1719-23. doi: 10.1126/science.1220270. PMID: 22745432.
6) Tang L, Morris J, Wan J, Moore C, Fujita Y, Gillaspie S, Aube E, Nanda J, Marques M, Jangal M, Anderson A, Cox C, Hiraishi H, Dong L, Saito H, Singh CR, Witcher M, Topisirovic I, Qian SB, Asano K. Competition between translation initiation factor eIF5 and its mimic protein 5MP determines non-AUG initiation rate genome-wide. Nucleic Acids Res. 2017 Nov 16;45(20):11941-11953. doi: 10.1093/nar/gkx808. PMID: 28981728; PMCID: PMC5714202.
7) Kim EJ, Lee YJ, Kang S, Lim YB. Ionizing radiation activates PERK/eIF2α/ATF4 signaling via ER stress-independent pathway in human vascular endothelial cells. Int J Radiat Biol. 2014 Apr;90(4):306-12. doi: 10.3109/09553002.2014.886793. Epub 2014 Mar 19. PMID: 24456547.
8) Datta C, Truesdell SS, Wu KQ, Bukhari SIA, Ngue H, Buchanan B, Le Tonqueze O, Lee S, Kollu S, Granovetter MA, Boukhali M, Kreuzer J, Batool MS, Balaj L, Haas W, Vasudevan S. Ribosome changes reprogram translation for chemosurvival in G0 leukemic cells. Sci Adv. 2022 Oct 28;8(43):eabo1304. doi: 10.1126/sciadv.abo1304. Epub 2022 Oct 28. PMID: 36306353; PMCID: PMC9616492.