理化学研究所　九州大学

PRESS RELEASE（2021/07/06）

非典型的開始コドンからの翻訳開始機構を解明
ー　がん等の治療法開発に期待　ー

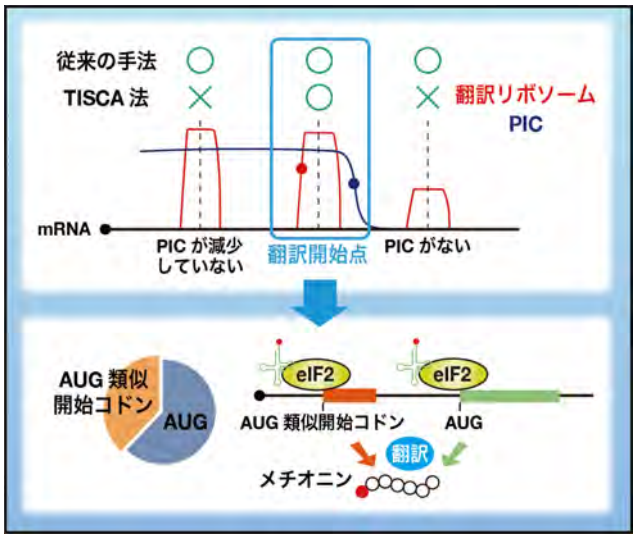
九州大学生体防御医学研究所の中山 敬一 主幹教授、医学系学府博士課程 3 年の市原 知哉 大学院生、松本 有樹修 准教授、理化学研究所開拓研究本部の岩崎 信太郎 主任研究員らの研究グループは、翻訳開始点を正確に同定する新規手法『TISCA(TIS detection by translation Complex Analysis)法』を開発し、通常の AUG 開始コドンとは異なる AUG 類似開始コドンからの翻訳開始機構の一部を解明しました。

タンパク質の翻訳は通常、mRNA（※1）の AUG 開始コドンから始まりますが、近年、AUG とは異なるコドンから翻訳が開始する非典型的翻訳が起こることが報告されています。しかし、このような AUG 以外の開始コドンからの翻訳開始機構は不明でした。

本研究グループは、リボソームプロファイリング法（※2）を用いた翻訳開始点同定手法を改良した TISCA 法を開発し、非典型的翻訳が起こる場所を網羅的に同定しました。その結果、ヒト細胞の全ての翻訳のうち、4 割程度は AUG 以外の開始コドンから翻訳が起こると予測されました。プロテオミクス解析により、非典型的翻訳により生じたタンパク質を検出し、また非典型的翻訳から生じるタンパク質の最初のアミノ酸は典型的翻訳と同様にメチオニンであることが分かりました。非典型的翻訳の開始には、eIF2、eIF2A、eIF2D といった翻訳開始因子が関与することが報告されていましたが、これらの因子がどの程度関与しているかは不明でした。これらの機能を抑制した細胞の解析から、非典型的翻訳は主に eIF2 に依存しているということが分かりました。

近年、非典型的翻訳はがんや精神疾患等の病気に関与することが報告されています。今後さらに非典型的翻訳の仕組みが解明されることで、がん等の病気の新規治療法確立が期待されます。

本研究成果は、2021 年 7 月 6 日(火)午前 0 時 5 分(UTC)に英国科学雑誌「Nucleic Acids Research」で公開されます。なお、研究の詳細や用語解説は別紙を参照。



（参考図）翻訳開始点同定法 TISCA による翻訳開始機構の解明

研究者からひとこと：

タンパク質の翻訳は生命の根本的な現象ですが、非典型的な翻訳がかなりの割合で起こっていることが分かりました。TISCA 法の開発によって、これまで知られていなかった非典型的な翻訳制御メカニズムの解明とがん等の疾患の治療法開発に繋がることが期待されます。

九州大学
中山主幹教授

【お問い合わせ】 九州大学生体防御医学研究所　主幹教授　中山 敬一（なかやま けいいち）
TEL：092-642-6815　　FAX：092-642-6819
Mail：nakayak1@bioreg.kyushu-u.ac.jp

別　紙

非典型的開始コドンからの翻訳開始機構を解明
ー　がん等の治療法開発に期待　ー

＜研究の背景と経緯＞

ヒトを含む真核生物では通常、タンパク質の翻訳はAUG開始コドンから始まりますが、近年AUGとは異なる開始コドン（AUG類似開始コドン）から始まる非典型的翻訳が起こることが報告されています。非典型的翻訳の解析は、ゲノム中のどの配列が翻訳されているかを網羅的に解析する手法であるリボソームプロファイリング法によって飛躍的に進歩しました。リボソームプロファイリング法は、リボソームとmRNAの複合体をRNA分解酵素で処理した後、リボソームによって保護されるmRNA断片（フットプリント）を次世代シークエンサーで読み取ることで、翻訳中のリボソームの位置を特定する手法です。さらに、開始コドン以降の翻訳を停止させる薬剤で処理することで、開始コドン周辺のリボソームフットプリントのみを検出する手法も開発されています（翻訳開始シークエンス法）。しかし、リボソームプロファイリング法や翻訳開始シークエンス法には解析上のノイズが多数含まれており、生体内で非典型的翻訳がどの程度起こっているかは不明でした。

＜研究の内容＞

本研究グループは、翻訳開始に重要な翻訳前開始複合体(PIC)に着目しました。PICはリボソーム小サブユニットと翻訳開始因子（※3）群の集合体で、まずmRNAの5’キャップ（※4）に結合して、mRNAの5’UTR（※5）上を進みながら開始コドンを探索します（図1）。開始コドンを見つけるとリボソーム大サブユニットが結合して翻訳リボソームとなり翻訳が開始します。リボソームプロファイリング法は翻訳リボソームがmRNA上のどこに結合しているのかしか観察できませんが、近年PICの動態を解析するための翻訳複合体プロファイリング法（Sel-TCP-seq）が開発されました（図2）。翻訳リボソームとPICは性質が異なるために、開始コドンでリボソームフットプリントは増加するのに対し、PICフットプリントは逆に減少します（図3）。リボソームフットプリントが増加する点とPICフットプリントが減少する点を網羅的に同定し、これらで挟まれる場所を開始コドンとすることで、正確な翻訳開始点の同定が可能になりました。この新たな翻訳開始点同定手法をTISCA（TIS identification by translation Complex Analysis）法と名付けました（図4）。TISCA法によってHEK293T細胞の翻訳開始点を同定したところ、全ての翻訳のうち4割程度はAUG以外の開始コドンから開始することが分かりました。

翻訳を開始するには、開始コドンに対応したtRNA（※6）が必要になります。AUG開始コドンに対応したtRNAはeIF2、AUG類似開始コドンに対応したtRNAはeIF2A、eIF2Dといった翻訳開始因子が運ぶと言われていましたが、実際にeIF2AやeIF2Dが非典型的翻訳に関与しているかは不明でした。AUG類似開始コドンから翻訳されたタンパク質をプロテオミクス解析した結果、これらの最初のアミノ酸はほとんどの場合AUG類似開始コドンに対応したアミノ酸ではなく、AUG開始コドンに対応したメチオニンであることが分かりました。このことから、AUG類似開始コドンから翻訳が開始する時、AUG開始コドンと同様にeIF2によってtRNAが運ばれる可能性が考えられました。実際にeIF2、eIF2A、eIF2Dの機能をそれぞれ抑制したHEK293T細胞を解析したところ、eIF2AとeIF2Dの機能を抑制しても非典型的翻訳にはほとんど影響はなく、eIF2の機能を抑制すると顕著に非典型的翻訳の活性が低下することが分かりました（図5）。以上の結果から、AUG類似開始コドンからの翻訳開始は主にeIF2に依存していることが明らかになりました。

＜今後の展開と治療応用への期待＞

本研究では、AUG類似開始コドンからの非典型的翻訳がどの程度起こっているか、またその制御機構が明らかになりました。翻訳の異常はがんや精神疾患等の病気と密接に関係しています。非典型的翻訳が生体内でかなりの割合で起こっていることを考えると、非典型的翻訳ががん等の悪性化の大きな要因となっている可能性があります。今後は非典型的翻訳とがんや精神疾患等の関連を詳細に調べ、これらの疾患の治療標的の探索を進めたいと考えています。

＜参考図＞

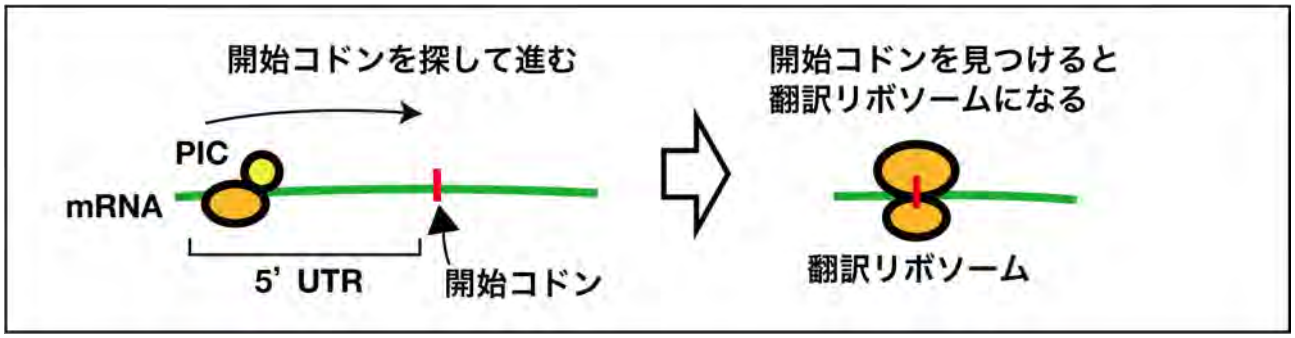


図１　真核生物における翻訳開始

リボソーム小サブユニットと翻訳開始因子群の集合体である翻訳前開始複合体(PIC)はmRNAの5' UTR上を進んで開始コドンを探します。開始コドンが見つかったら、リボソーム大サブユニットが結合して翻訳リボソームとなり、翻訳を開始します。

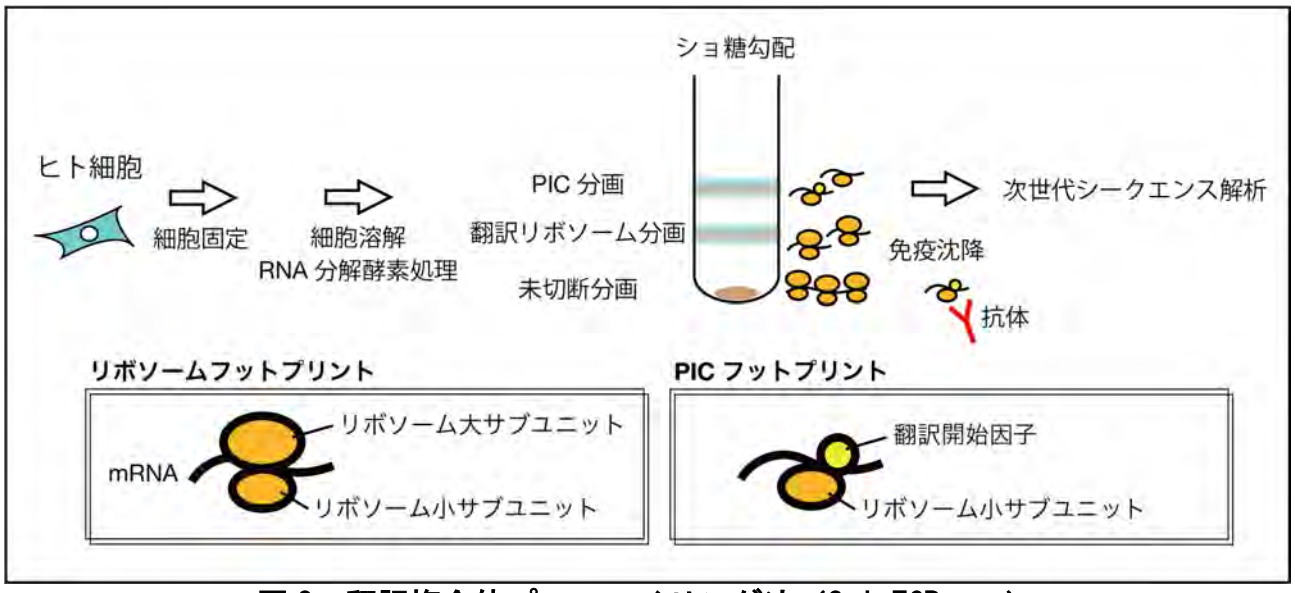


図２　翻訳複合体プロファイリング法（Sel-TCP-seq）

培養しているヒト細胞をホルマリンにより固定した後、細胞を溶解して RNA 分解酵素で処理します。この時、リボソームや PIC が結合している mRNA はそれらに保護されて分解を免れ、一定の長さに保たれます。次に、ショ糖勾配分画を行い、密度の違いによってリボソームと PIC を分離します。最後に翻訳開始因子に対する抗体で免疫沈降を行い、次世代シークエンサーを用いて PIC が保護していた mRNA 配列（PIC フットプリント）を解析します。

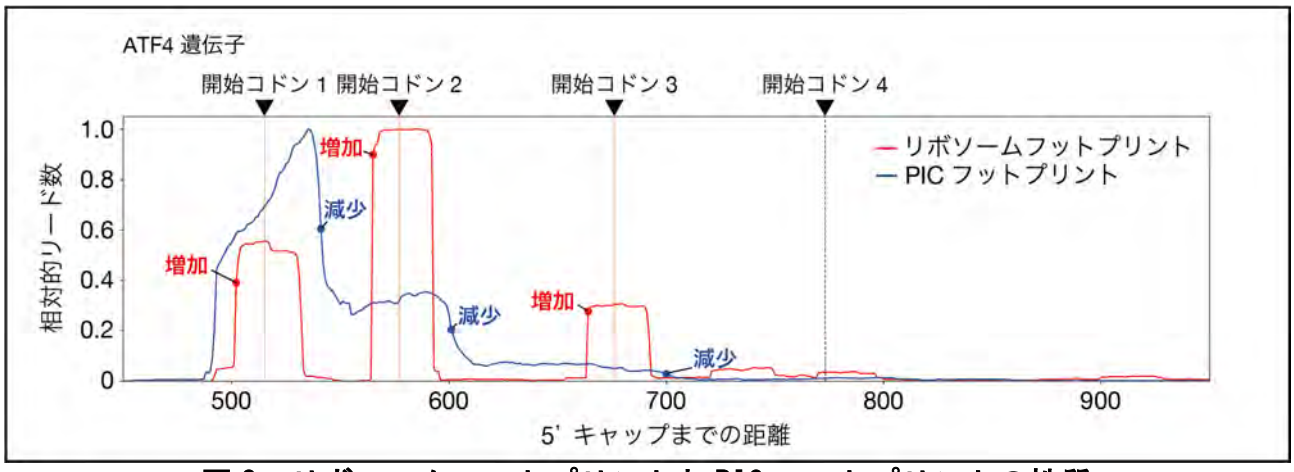


図 3　リボソームフットプリントと PIC フットプリントの性質

リボソームフットプリントは開始コドンの前で増加する一方で、PIC フットプリントは開始コドンの後で減少します。例えば ATF4 という遺伝子は 4 つの開始コドンを持ち、そのうち 3 つの開始コドンで翻訳開始シークエンス法のピークと PIC フットプリントの減少が見られます。

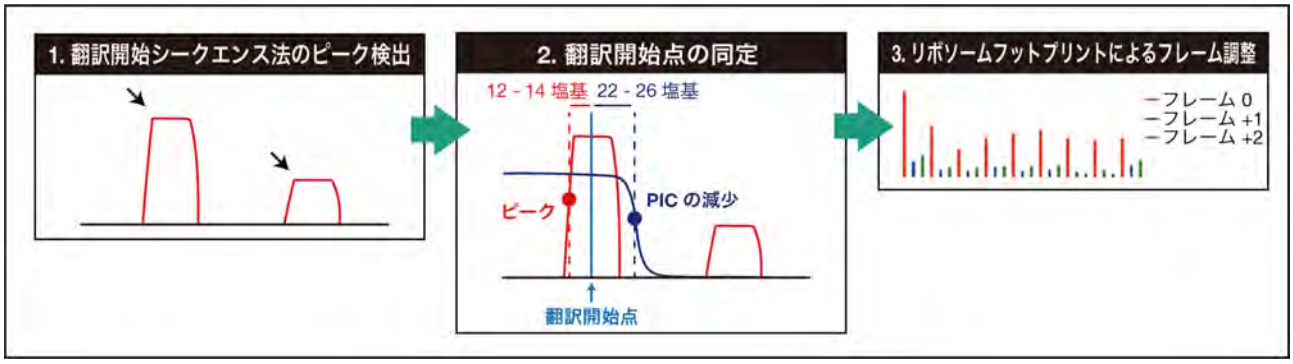


図 4　TISCA 法の概要

従来の翻訳開始シークエンス法では、リボソームフットプリントが増加するピークを全て検出します（左図）。TISCA 法ではさらに、PIC フットプリントの減少がそれらの点の近くで起こっているかを調べます（中図）。最後に、リボソームフットプリントの周期的な性質を利用して正確な開始コドンの位置を決定します（右図）。

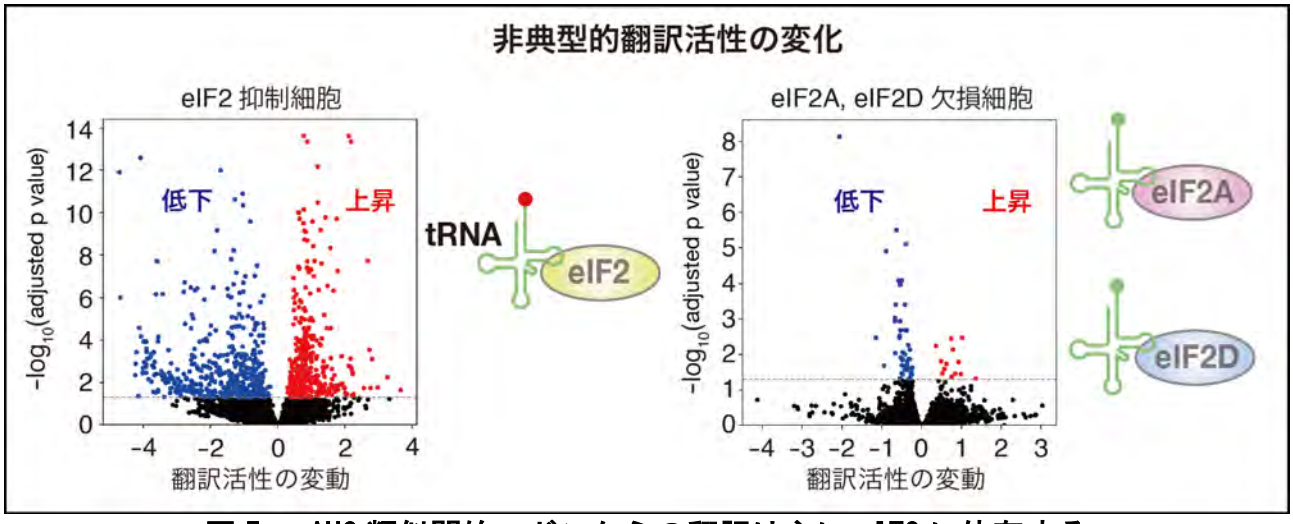


図 5　AUG 類似開始コドンからの翻訳は主に eIF2 に依存する

eIF2 の機能を抑制した細胞と、eIF2A と eIF2D の両方を欠損した細胞を用いて、非典型的翻訳活性が正常状態と比べてどれくらい変化しているかを解析しました。eIF2 の機能を抑制した細胞では大きく非典型的翻訳活性が変化している一方で、eIF2A と eIF2D の両方を欠損した細胞ではほとんど影響がありませんでした。

＜用語解説＞

（※1）mRNA：messenger RNA の略で、タンパク質を合成するための塩基配列情報を持った RNA です。その遺伝情報は特定のアミノ酸に対応するコドンと呼ばれる 3 塩基配列という形になっていて、リボソームが mRNA の情報からタンパク質を合成する反応を翻訳と呼びます。

（※2）リボソームプロファイリング法：翻訳中のリボソームの mRNA 上の位置を網羅的に特定する手法で、リボソームによって保護される mRNA 断片（リボソームフットプリント）を次世代シークエンサーで読み取ります。リボソームフットプリントはリボソームの大きさに応じた特定の長さを持ち、リボソームがコドンを読み取る際の 3 塩基ごとの周期性を示します。

（※3）翻訳開始因子：リボソームが開始コドンを見つけ、翻訳を開始するまでの過程を補助する因子で、真核生物では eIF(eukaryotic initiation factor)と呼ばれます。

（※4）5’キャップ：mRNA の 5’末端に見られる修飾構造で、翻訳開始の最初の段階で翻訳開始因子によって認識されます。

（※5）5’UTR：5’ untranslated region の略で、mRNA 配列の中で開始コドンより前の非翻訳領域を指します。

（※6）tRNA：transfer RNA の略で、リボソームが翻訳を行う際に対応するアミノ酸を合成中のポリペプチド鎖に転移させるためのアダプター分子です。

＜論文情報＞

タイトル：“Combinatorial analysis of translation dynamics reveals eIF2 dependence of translation initiation at near-cognate codons”
（翻訳動態の複合的解析は AUG 類似開始コドンにおける翻訳開始の eIF2 依存性を明らかにする）

掲載誌：Nucleic Acids Research, 2021

著者名：Kazuya Ichihara, Akinobu Matsumoto, Hiroshi Nishida, Yuki Kito, Hideyuki Shimizu, Yuichi Shichino, Shintaro Iwasaki, Koshi Imami, Yasushi Ishihama and Keiichi I. Nakayama

DOI：10.1093/nar/gkab549

本成果は、以下の事業・研究領域・研究課題によって得られました。

科学研究費補助金・特別推進研究
研究課題名：「幹細胞における細胞周期の制御と代謝系との連関に関する総合的研究」
研究代表者：中山 敬一（九州大学 生体防御医学研究所　主幹教授）
研究期間：平成 30 年 4 月～令和 5 年 3 月

科学研究費補助金・学術変革領域研究(A)・マルチファセット・プロテインズ：拡大し変容するタンパク質の世界
研究課題名：「ノンコーディング RNA から産生されるタンパク質の生理機能」
研究代表者：松本 有樹修（九州大学 生体防御医学研究所　准教授）
研究期間：令和 2 年 11 月～令和 7 年 3 月

＜お問い合わせ先＞

【研究内容に関すること】
九州大学 生体防御医学研究所　主幹教授　中山 敬一（なかやま けいいち）
TEL：092-642-6815　FAX：092-642-6819
Mail：nakayak1@bioreg.kyushu-u.ac.jp

【報道に関すること】
九州大学　広報室
TEL：092-802-2130　FAX：092-802-2139
Mail：koho@jimu.kyushu-u.ac.jp

理化学研究所　広報室　報道担当
Mail:ex-press@riken.jp