

研究題目 遺伝子発現の正確性を in vivo で定量する技術の確立

研究組織

研究代表者：藤井 耕太郎 (Florida 大学)

共同研究者：竹本龍也 (徳島大学先端酵素学研究所)

研究分担者：高岡勝吉 (徳島大学先端酵素学研究所)

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

遺伝子発現の正確性の時空間制御はエラー産物の検出の困難さから観察されていない。本共同研究において、タンパク質合成の正確性を定量するレポーターの遺伝子組み換えマウスを樹立します。マウス作製経験の豊富な共同研究者(竹本・高岡)により研究を飛躍的に加速することができます。

[1-2]研究の方法・経過

タンパク質合成のエラーを検出するコンストラクトは、エラーがあった時にのみ検出できる Gain-of-activity のレポーターコンストラクトを用いる。基本的には 1st ORF に Renilla luciferase (Rluc) を、2nd ORF に Firefly luciferase (Fluc) を用いて、1st と 2nd ORF の間に STOP codon を挿入することで、リボソームが STOP codon を読み飛ばした時にのみ、2nd ORF の Fluc が合成され、エラーを検出することが出来る。

代表者が遺伝子組み換えマウスを作成した際には luciferase だけでなく、レポーターを可視化するため、SNAP-tag と Halo-tag をそれぞれの ORF に挿入し、CAGs プロモーターから発現させるコンストラクトを ROSA locus に挿入した。この組み替えマウスは残念ながらレポーター mRNA の発現が非常に低く (Actin mRNA の 100 倍は低かった)、3 世代後にマウスの毛が早期に落ちる、出生率が若干低い、死亡率が少し高いという表現系が出てきた。それらの現象を総合的に考え、レポーターコンストラクトに若干ではあるが、細胞毒性が存在していると結論付けた。レポーターの細胞毒性は重要な問題である。このレポーターはマウス個体における翻

訳エラーの時空間的ダイナミクスを観察することを目的としている。もし、エラー産物である 1st ORF と 2nd ORF の融合タンパク質が毒性を持った場合、高いエラー頻度を持つ細胞が優先的に死んでしまう。

本共同研究では最初に STOP codon を入れない WT の融合タンパク質をマウスに発現させ、mRNA の発現量および表現系に問題がないコンストラクトを同定し、エラーを検出するレポーターマウスを作成しようと考えた。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

本年度の共同利用の結果、細胞毒性を持たないレポーターを同定することができた。また、単に細胞毒性を減らすだけでなく、STOP codon の後に検出効率の良いレポーターを置くことにより、エラーの検出効率を従来のレポーターより 10 倍程度引き上げることに成功した。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

生物の恒常性を保ち、正常な胚発生を保証するために、遺伝子の発現は正確に行われる必要がある。遺伝子発現の最終段階である mRNA からタンパク質への翻訳段階はエラーの頻度が高く、新生タンパク質のおよそ 15%に少なくとも一つのエラーが含まれると言われている。エラーにはアミノ酸の置換、ストップコドンのリードスルー、リボソームのフレームシフトが含まれる。がん細胞ではエラー頻度を増やし、エラーを含む自己ペプチドを免疫細胞に提示することで、がん免疫を活性化させることが、近年報告されている。逆にエラーが増えることで、タンパク質凝集、神経変性を引き起こし、老化

が加速することが示されている。しかし、哺乳類個体において、エラーの頻度を直接測る技術は今まで確立されていない。胚発生や老化の過程でいつ、どこでタンパク質合成のエラーが起こるのか、どのようにエラーが起こるのかを理解することは正確な遺伝子発現を保証し、恒常性を維持するためにも重要である。mRNA の翻訳は生命現象の根幹の 1 つであり、特に正確性を個体レベルで観察できるモデルはいまだにない。本プロジェクトだけでなく、広い学問分野に波及効果が見込まれる。

【3】 主な発表論文等

[3-1] 論文発表

なし

[3-2] 学会発表

Kotaro Fujii, Controlling the fidelity of protein synthesis and its impact on diseases, Invited talk, University Clinic Bonn, 9 月 5 日, 2023

Kotaro Fujii, Controlling the fidelity of protein synthesis and its impact on diseases, Invited talk, 京都産業大学, 10 月 26 日, 2023

Kotaro Fujii, Controlling the fidelity of protein synthesis and its impact on diseases, Invited talk, 東京大学, 3 月 7 日, 2024

【4】 今後の課題等

引き続き徳島大学との共同研究により、次年度は細胞毒性を持たないレポーターマウスを作成する。