

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（フロリダ大学 Center for NeuroGenetics）

共同研究者：竹本龍也（徳島大学先端酵素学研究所）

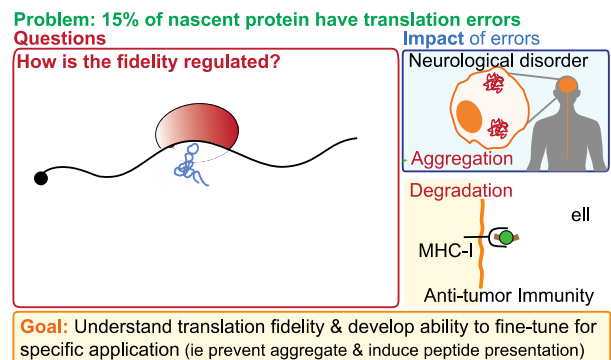
研究分担者：高岡勝吉（徳島大学先端酵素学研究所）

【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。

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。本研究提案では mRNA の翻訳段階でのエラー頻度を定量するレポーターコンストラクトの遺伝子組み換えマウスを樹立する。昨年度の共同利用研究により、マウス作製経験の豊富な共同研究者（竹本・高岡）による技術支援により、研究を飛躍的に加速することができる。



[1-2] 研究の方法・経過

申請者の作製したレポーターの遺伝子組み換えマウス（図 1 A）を用いて 2 ヶ月齢のマウスから器官を採取し、stop codon readthrough (SCR) 翻訳エラーの効率を測定した（図 1 A-C）。レポーターで観察された SCR rate が細胞内のタンパク質合成エラー率を反映しているか確認するため、発表されている ribosome profiling (Ribo-seq) のデータを解析し、SCR によって 3' UTR にいるリボソームの量をゲノムワイドに器官ごとに比較した（図 1 D）。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

作成したレポーターを用いて世界で初めて生物個体における翻訳のエラー効率を観察した。それによって予想していなかったレベルでの器官ごとの SCR レートの違いを観察できた。脳が最も SCR が低く、ついで骨格筋、心臓が続く、肺、腎臓、肝臓がマウスの ES 細胞と同程度に SCR 効率が高かった（図 1 B）。この結果はルシフェラーズアッセイだけでなく、レポータータンパク質を精製し、ウエスタンブロットで確認しても同様であった（図 1 C）。さらに、レポーターだけではなく、内在性の mRNA における SCR をゲノムワイドに観察するために、すで

に報告されたマウスの7週目の様々な器官におけるRibo-seqのデータを解析すると、CDSの後の3' UTRにあるリボソームの量が脳では心臓、腎臓、肝臓と比べて少ないことが示され(図1D)、作成したレポーターマウスが効率よく生体内のSCR率のダイナミクスを捉えることができることを示した。

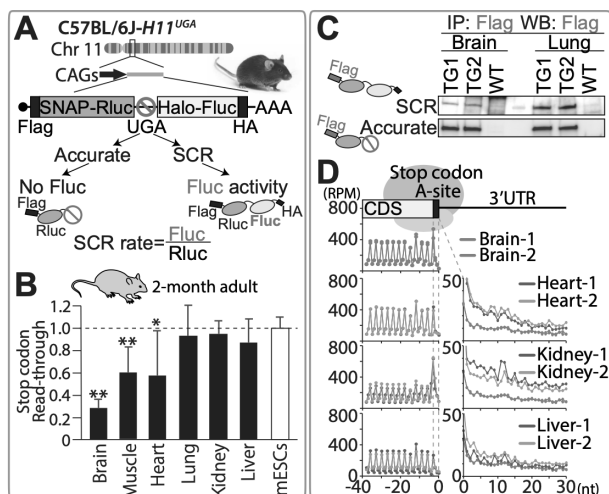


図1: (A) トランスジェニックマウスのデザイン。(B) 2ヶ月齢のマウスのそれぞれの器官におけるルシフェラーゼアッセイによって検出されたSCR rate。(C) 免疫沈降 (IP) によって精製されたレポータータンパク質に対してウエスタンブロット (WB)。(D) Ribo-seq のデータを用いたゲノムワイドでのSCRの解析。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

遺伝疾患のおよそ10%がCDS途中にstop codon (premature termination codon (PTC)) が現れることで遺伝子発現に以上が起ることによって発症する。それを防ぐ戦略としてSCRを引き起こす薬剤の研究が世界中で行われている。そのような薬剤は長い期間投与されなくてはならず、SCRをPTCに選択的に引き起こす必要がある。薬剤の選択制やクリプティックなSCRの誘導を生体内でモニターするシステムは存在しない。我々のマウスは薬剤の安全性を長期にわたって観察することのできる優れたモデルとなり、さまざまな疾患の安全な治療の確立に貢献できる可能性がある。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

今年中に論文をまとめ投稿したい。

[3-2]学会発表

Kotaro Fujii, Controlling the fidelity of

protein synthesis and its impact on diseases, Invited talk, SickKids Research Institute, 10月7日, 2024

Kotaro Fujii, Controlling the fidelity of protein synthesis and its impact on diseases, Invited talk, UF: Physiology & Aging Seminar, 10月28日, 2024

Kotaro Fujii, Controlling the fidelity of protein synthesis and its impact on diseases, Invited talk, 京都大学医学生物学研究所, 2月14日, 2025

【4】今後の課題等

今年中に論文をまとめ成果を報告したい。