

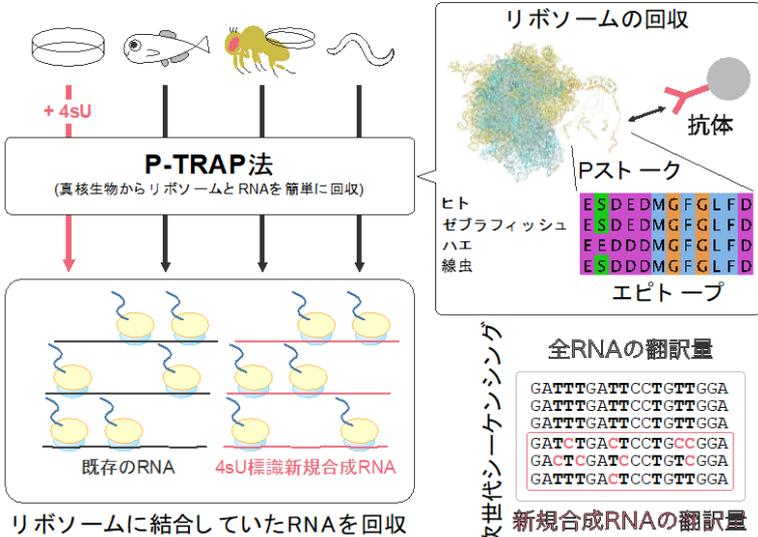
PRESS RELEASE

令和5年7月13日
琉球大学

RNAの新規合成量とその翻訳量を同時に測定できる手法を考案

～リボソーム免疫沈降法と新規合成 RNA 標識法を組み合わせた遺伝子発現解析法の確立～

琉球大学大学院医学研究科 先進医療創成科学講座 山下暁朗教授、今井大達助教、皮膚科学講座 高橋健造教授、内海大介助教、生化学講座 黒柳秀人教授、鳥原英嗣助教らの研究グループは、新規リボソーム回収法と新生 RNA 標識法を組み合わせ、RNA の転写量と翻訳量を同時に解析できる手法 (nP-TRAP 法*) を開発しました。実際にこの手法を用い、ヒト胎児腎細胞においてストレス時に合成される mRNA のうち特定の mRNA が積極的に翻訳されることを見いだしました。



リボソームの回収

抗体

ヒト
ゼブラフィッシュ
ハエ
線虫

エピトープ

全RNAの翻訳量

次世代シーケンシング

新規合成RNAの翻訳量

既存のRNA 4sU標識新規合成RNA

リボソームに結合していたRNAを回収

P-TRAP法
(真核生物からリボソームとRNAを簡単に回収)

+4sU

研究成果のポイント

- 既製の抗体を用いたリボソーム免疫沈降法により、ほとんどの真核生物から翻訳中のリボソームを回収する新しい手法 (P-TRAP 法) を確立しました。
- P-TRAP 法と新生 RNA 標識法を組み合わせることで、培養細胞において転写量と翻訳量を同時に測定する新しい手法 (nP-TRAP-seq 法) を開発しました。
- nP-TRAP-seq 法を用いることで、小胞体ストレス応答^(注1)時に、細胞がストレス関連遺伝子の新規合成 mRNA を積極的に翻訳することを見いだしました。
- 本手法は様々な真核生物・細胞において転写量と翻訳量を測定する、また、臨床検体における翻訳量を測定するツールとして普及することが期待されます。

記

日時：随時連絡可

内容等：別紙参照ください



PRESS RELEASE

<発表概要>

【研究の背景】

生物は環境の変化やストレスに対応するため、遺伝子発現パターンを変化させます。遺伝子発現の最終産物であるタンパク質の存在量は、(1) 成熟 mRNA の量 (転写量) と (2) タンパク質合成量 (翻訳量) に大きく影響されます。このうち、(1) 成熟 mRNA の合成量と分解量を詳細に調べるために、ヌクレオチドアナログを用いた RNA 代謝標識法が有効です。例えば、ヌクレオチドアナログの一つである 4-チオウリジン (4sU) を細胞培地に添加すると、その後合成された RNA にはウリジンの代わりに 4sU が取り込まれます。次世代シーケンサーにより 4sU の取り込み部位に生じる T>C 変換^(注2)を検出することで、4sU 添加後に合成された新生 RNA を調べることができます。一方、(2) 成熟 mRNA の翻訳量もタンパク質の存在量に大きな影響を与えます。翻訳量の推定には、タンパク質合成装置であるリボソームに結合した成熟 RNA (≒実際に翻訳されている RNA) を調べることが有効です。

転写と翻訳は相互に影響し合うことから、転写量と翻訳量を同時に測定することで遺伝子発現パターンの変化をより詳細に理解できるようになると期待されます。しかしながら、RNA の転写量と翻訳量を同時に測定できる簡便な方法はありませんでした。

【研究の成果】

本研究では、タンパク質合成装置であるリボソームの P ストック領域のエピトープを認識する抗体により、様々な真核生物から翻訳中のリボソームを簡易に回収できる P-stalk mediated Translational ribosome affinity purification (P-TRAP) 法を新たに確立しました。また、P-TRAP 法と 4sU-RNA 標識法、次世代シーケンス法を組み合わせることで、RNA の転写量と翻訳量を簡便に測定できる手法 nascent P-TRAP-seq (nP-TRAP-seq) 法を新たに樹立しました。開発した nP-TRAP-seq 法を用いて、ヒト胎児腎細胞の小胞体ストレス応答での遺伝子発現パターンの変化 (RNA の転写量と翻訳量の変化) を調べ、小胞体ストレス応答時に新たに合成された新生 RNA の中でストレス緩和などに関わるものが積極的に翻訳される一方で、それ以外のものの翻訳が抑制されることを発見しました。

【本研究成果の意義と今後の展開】

RNA の転写量と翻訳量を同時に解析できる nP-TRAP-seq 法を用いることで、ウイルス感染や炎症を始めとした、RNA の転写とその翻訳により制御される様々な生命現象の制御メカニズムの解明が期待されます。また P-TRAP 法を用いることで、超遠心機など的高額な機器や手間のかかる操作を必要とせず、ほとんどの真核生物からリボソームとその結合 mRNA を短時間で回収できます。これまで研究が難しかった非モデル生物やヒトの臨床検体における翻訳を本手法で調べることが可能となり、新たな生命現象の発見・理解や治療標的・診断マーカーの発見や、疾患の超早期の予測・予防への貢献が期待されます。



PRESS RELEASE

【用語解説】

注 1) 小胞体ストレス応答

小胞体は、リボソームが合成したポリペプチド鎖の一部を取り込み、それらを適切な形へ折りたたんだり修飾したりすることで生理活性を持つタンパク質を生成する細胞内小器官の一種。何らかの理由で正しく折り畳まれなかったタンパク質や正常な修飾を受けていないタンパク質が小胞体内腔に蓄積する状況を小胞体ストレスと呼ぶ。生物は小胞体ストレスに対処するためのシステム（小胞体ストレス応答）を備えている。

注 2) T>C 変換

一般的な次世代シーケンサーを用いて RNA の塩基配列を解読するためには、RNA を鋳型とした cDNA ライブラリを作製する必要がある。cDNA ライブラリ作製の過程で、RNA 中のウリジンはアデニン (A) に、アルキル化された 4sU はグアニン (G) に変換される。そのため、解読された塩基配列中でチミジン (T) からシトシン (C) への変換 (T>C 変換) を検出することで、元から存在している RNA と新規に合成された (4sU が取り込まれた) RNA を識別できる。

<研究費>

日本学術振興会科学研究費, 国立研究開発法人科学技術振興機構ムーンショット, 沖縄県ものづくり振興課からの研究助成を受けて行われました。

<論文情報>

- (1) 論文タイトル: Simultaneous measurement of nascent transcriptome and translome using 4-thiouridine metabolic RNA labeling and translating ribosome affinity purification
- (2) 雑誌名: Nucleic Acids Research
- (3) 著者: Hirotsu Imai, Daisuke Utsumi, Hidetsugu Torihara, Kenzo Takahashi, Hidehito Kuroyanagi, Akio Yamashita
- (4) DOI 番号: 10.1093/nar/gkad545
- (5) アブストラクト URL (https://academic.oup.com/nar/advance-article/doi/10.1093/nar/gkad545/7209333?utm_source=advanceaccess&utm_campaign=nar&utm_medium=email)