

ダイソームプロファイリング法によるリボソーム衝突の網羅探索

岩崎 信太郎

1. はじめに

分子生物学のセントラルドグマは遺伝情報の核となる核酸の情報をアミノ酸という性質の異なる分子配列へ変換する仕組みである。その変換速度の鍵を握るのがリボソームによる翻訳である。リボソームのmRNA上の移動速度は一般に一定であると考えられがちである。しかし、実は多様な原因によってリボソームがopen reading frame (ORF) 上で一時停止することが知られている。このリボソームの一時停止の破綻が疾患につながる例¹⁾や、逆に一時停止の過剰な形成が細胞死を誘導する²⁾例が知られており、細胞の中でリボソームの一時停止は綿密に制御される必要があると考えられている。そのため、リボソームの一時停止がどのmRNAのどのコドンで生じているかを網羅的に把握することが、リボソーム一時停止を介する生命現象を理解する上で喫緊の課題となっている。しかしながら、これまで適切な技術が存在しなかったことから、この問題は長年解決されてこなかった。

2. リボソーム (モノソーム) プロファイリング法

リボソームプロファイリング法はまさにこの問題を解決することのできる技術として登場した³⁾。リボソームは非常に大きい複合体であり、mRNAの一部を内部に取り込む形で結合する。そのために、RNase処理を施してもリボソーム内部に含まれるmRNA領域は分解から免れる。この残った約30塩基程度のRNA断片 (リボソームフットプリントと呼ぶ) の配列を次世代シーケンサーによって網羅的に決定することがリボソームプロファイリング法の骨子である (図1A左)。解析された核酸配列はmRNA上におけるリボソームの位置情報を反映する。リボソームプロファイリング法は細胞の中で、1) どのmRNAの、2)

mRNA上のどの領域で、3) どのコドンが、4) どの程度、翻訳されていたかという情報を得ることのできる非常に強力な手法である (図1B)。

mRNAのORF中の特定のコドン上でリボソームが一時停止していた場合、リボソームプロファイリングでは該当するコドンからより多くのフットプリントが出現することになり、ピークとして算出されるはずである (図1B)。しかしながら、リボソームプロファイリング法では通常に翻訳伸長しているリボソームと一時停止しているリボソームを見分けることができないため、感度高く翻訳停止位置を決定することが難しかった。

3. ダイソームプロファイリング法

それに対して近年開発されたダイソームプロファイリング法はこれまで不明瞭だったリボソーム停止位置を高感度、高分解能かつ網羅的に解析することができるよう⁴⁻¹⁴⁾。ある特定のコドン上でリボソームが十分な時間一時停止すると、さらに次のリボソームが追いつき一時停止していたリボソームに衝突することになり、二つのリボソームが連なった複合体がmRNA上で形成されることになる (図1A右)。この複合体をダイソーム (di-ribosome : disome) と呼ぶ。通常のリボソームプロファイリング法 [ダイソームプロファイリング法と特に区別し、モノソーム (mono-ribosome : monosome) プロファイリング法と呼ぶ] では、リボソーム一つ分が残すフットプリントとして約20~30塩基長のRNA断片を回収し解析するのに対し、ダイソームプロファイリング法ではそのおよそ倍の長さである約50~60塩基長のRNA断片を回収し実験に用いる (図1A)。ダイソームプロファイリング法では一時停止したリボソーム由来のフットプリントがより濃縮されることになる (図1B)。実際にこの手法がこれまでに、ヒト培養細胞⁸⁾、マウス肝臓⁷⁾、マウスES細胞¹⁰⁾、ゼブラフィッシュ胚⁸⁾、シロイヌナズナ¹²⁾、酵母^{4, 6, 9, 13)}、大腸菌^{5, 14)}、SARS-CoV-2ウイルス¹¹⁾に応用されている。

4. ダイソームフットプリント長とリボソーム構造

予想されるとおり、ダイソームフットプリントの長さはおよそモノソームプリント長の2倍程度、約50~60塩基

理化学研究所開拓研究本部 (〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1 生物科学研究棟 S205)

Comprehensive identification of ribosomal collision by disome profiling

Shintaro Iwasaki (RIKEN Cluster for Pioneering Research, S205 Bioscience Bldg., 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940087

© 2022 公益社団法人日本生化学会

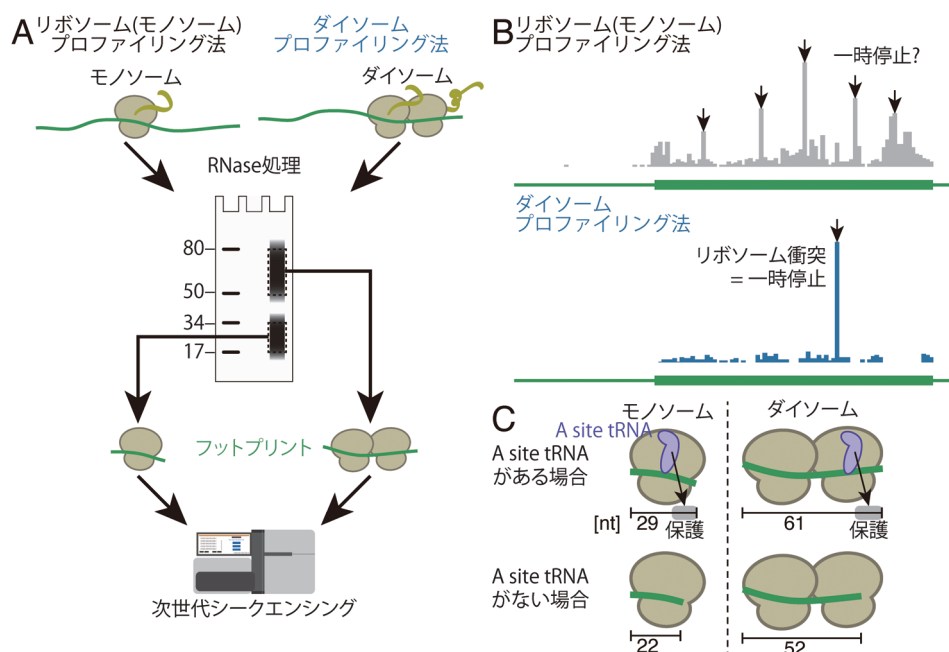


図1 モノソームプロファイリング法とダイソームプロファイリング法の概要

(A) リボソーム (モノソーム) プロファイリング法およびダイソームプロファイリング法の実験方法の模式図。分取するフットプリントの長さが異なる。(B) モノソームプロファイリング法とダイソームプロファイリング法によって得られるリードの分布の模式図。ダイソームプロファイリング法では一時停止に依存したリボソーム渋滞のみに着目する。(C) リボソームフットプリントの長さの特徴。A siteにtRNAがリクルートされることにより、3'側がよりRNaseから保護される。

長程度になる (図1C)。特に51~54塩基長、58~61塩基長の2種類の長さのフットプリントが得られる^{8,9)}。これらは前方の一時停止位置しているリボソームの状態を反映することがわかっている。

通常のモノソームプロファイリングではリボソームのA site上のtRNAの有無に従って長いフットプリント (28~30塩基長、A siteにtRNAがある場合) と短いフットプリント (21~22塩基長、A siteにtRNAがない場合) が生じる (図1C)¹⁵⁾。これはA siteのtRNAによって、mRNAがRNaseによって3'末端側から刈り込まれるのを防ぐためである。ダイソームの前方のリボソームがA siteにtRNAを保持しているかによって2種類の長さのダイソームフットプリントが生じると考えられる (図1C)。

5. リボソーム衝突位置の特徴

リボソームの衝突が生じる過程として、二つのシナリオが考えられる。たとえば、mRNAの翻訳の効率が高く、より多くのリボソームが結合するため、確率的に衝突するリボソームが多い、ということが考えられる (stochasticモデル)。この場合、リボソーム衝突が生じるmRNA上の位置はランダムである。実際にマウスの肝臓などではこの傾向が高い⁷⁾。

その一方で、特定のmRNA上でリボソームの一時停止が生じやすい配列がある場合、決まったコドン上に特にダイソームが形成されやすいことが考えられる (deterministicモデル)。特にダイソームフットプリントが蓄積しやすいコドン位置には以下で挙げるような特徴があることがわかっている。注目すべきはこれらの特徴は必ずしもすべての生物種や組織に共通するわけではなく、それぞれの生物種や組織、細胞種によって異なる点である。これは翻訳伸長、翻訳終結、リボソームのリサイクルの速度がダイナミックに変化しうることを示している。

1) ストップコドン

ストップコドンでは非常に多くダイソームが形成されることが報告されている (図2A)^{8,9,13)}。このような傾向はヒト培養細胞、ゼブラフィッシュ胚、酵母でみられる。ストップコドンはeRF1と呼ばれる因子によって認識されるが、eRF1によるストップコドンの認識は、ストップコドンのさらに下流1塩基目の配列によっても影響されることがわかっており、ピリミジン塩基 (U/C) よりもプリン塩基 (A/G) が好まれることが知られている¹⁶⁾。ヒト培養細胞ではストップコドン下流にC塩基が存在するとよりダイソームが形成されやすいことがわかっており、翻訳終結反応の効率が悪いストップコドンでリボソームの衝突が生じ

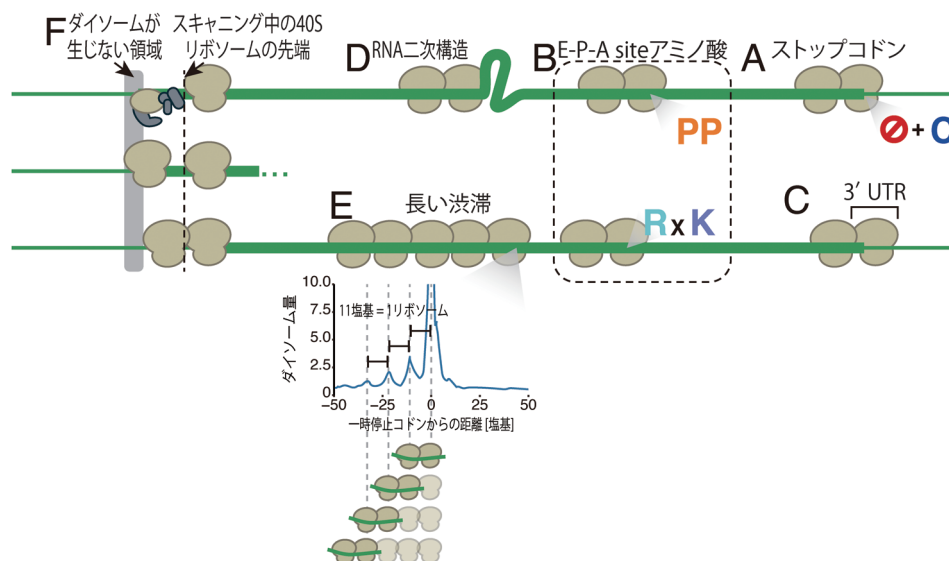


図2 ダイソームプロファイリング法によって明らかになったリボソーム衝突位置の特徴 (A~F) リボソーム衝突が顕著にみられる位置の特徴としてストップコドン(A), プロリン連続 (PP) やアルギニン-X-リシン配列 (RxK) 等のE, P, A site (B), 3' UTR (C), RNAの二次構造(D)があげられる。また、細胞内ではより長いリボソームの渋滞が生じることもある(E)。それに対し、開始コドンの直下ではリボソーム衝突は生じない(F)。

ることが示唆されている⁸⁾。それに対して、マウス肝臓ではストップコドン上でダイソームが特段蓄積する様子はみられていない⁷⁾。

2) E, P, A siteのコドンおよびアミノ酸配列

ダイソームはストップコドンだけでなくORF中にも多数生じる。ダイソーム中の二つリボソームのうち、先端で一時停止しているリボソームが読み取っているコドンやアミノ酸、特に三つのtRNA結合サイト (E site, P site, A site) に強い傾向が現れる (図2B)。たとえば、プロリンの連続配列やアルギニン-X-リシン配列はリボソームによるペプチジル転移反応が非効率な配列として知られており^{17, 18)}、実際にそのような配列でダイソームが形成される^{8, 9, 13)}。特にプロリンはペプチジル転移反応の供与体としても受容体としても、活性が低いことが知られている。また、アミノ酸ではなくコドンの配列による効果も観察されることから、tRNAの読み取り段階での制御も示唆されている⁷⁾。

3) 3' UTR

通常リボソームはストップコドン上で翻訳を終結した後にmRNAから解離するが、ダイソームが3' UTR上で形成される場合がある。特にORF中のリボソームがストップコドン上で停滞していたリボソームを3' UTRに押し出すような形でダイソームフットプリントが取得される (図2C)^{8, 9)}。ダイソームの前方のリボソームはもともとストップコドン上で翻訳終結反応が完了し、tRNAと新生ペプチ

ドが切断された後、80Sリボソーム自体がリサイクルされず依然としてmRNAに結合した状態の分子種であることが示唆されている。これはリボソームリサイクルの速度が、翻訳の伸長や終結よりも遅いことを示している。

4) 二次構造

非常に強いRNAの二次構造がORF中に形成されると翻訳伸長反応の立体障害となることが知られている。酵母ではRNAの二次構造の上流にダイソームが観測される (図2D)¹³⁾。その一方でヒト培養細胞ではそのような傾向は高くない⁸⁾が、これは特殊な因子 (AVEN) によって二次構造が巻き戻されているためである可能性が示唆されている¹⁰⁾。

また、特殊なRNAの二次構造によるダイソームの形成が報告されている。SARS-CoV-2ウイルスのORF1aとORF1bの間にはフレームシフト位置が存在し、下流のシュードノット (pseudoknot) 構造によってリボソームを停滞させ、フレームシフトを促進することが知られている。ダイソームプロファイリングによってまさにこのフレームシフト直前にリボソームの衝突が生じることが明らかになっている¹¹⁾。

5) 長いリボソーム渋滞

ダイソームプロファイリング法では衝突した二つのリボソームを観測しているが、そのデータ解析から実際の細胞ではさらに長い3個以上のリボソームの渋滞が生じることがわかる。ダイソームの上流にはさらにリボソーム

一つ分 (33塩基=11コドン) 程度の間隔でダイソームが蓄積するのが観察される (図2E)⁸⁾。特に, *XBPlu* と呼ばれる遺伝子上にあるリボソーム一時停止位置では最大六つのリボソームが連続して渋滞を起こしていることが観察される⁸⁾。また, 酵母では三つのリボソームの衝突 (tri-ribosome: trisome) によるフットプリントも観測することができる⁹⁾。

6) ダイソームが生じない領域

逆にリボソーム渋滞が生じにくい位置も存在する。たとえば, 後方のリボソームは開始コドンから4コドンほどは先端のリボソームと衝突できない (図2F)^{4, 7-9)}。これは, スキャニング中の40Sリボソームに開始因子等が結合しており, 開始コドン上に80Sを形成するための余分なスペース (4コドン程度) が必要だからではないかと考察されている。

7) モノソームプロファイリングとの比較

リボソームの衝突が生じるためには前方のリボソームの一時停止が必要であることから, ダイソームプロファイリングで観察される衝突位置にはモノソームが常に蓄積すると考えられる。しかしながらこの直感的な予想と相反して, ダイソームが生じていてもモノソームが蓄積しない位置というのが多く観察される^{7-9, 13)}。これは上記のタイプに加えて, リボソームの停滞が強固すぎ, 多くのリボソームがダイソームになってしまった結果, モノソームプロファイリングではリードが得られない, という状況を反映していると考えられる。今後分子動力学等を利用した解析により, ダイソーム形成のダイナミクスに対する理解がさらに進むことが期待される。

6. 有益か有害か

以上のように多くのmRNA, 多くのコドン位置でリボソームが一時停止し, ダイソームが形成されることが明らかになってきた。リボソームの一時停止に関しては1) タンパク質フォールディング促進と2) 翻訳異常センサーとしての役割の2通りが報告されている。

1) タンパク質フォールディング促進

複数の生物種間 (酵母-ヒト, ヒト-ゼブラフィッシュ) におけるホモログで, 全く同じ遺伝子の同じコドン上でダイソームが形成されることが示されており, 進化的な重要な機能の存在を示している^{8, 13)}。また, ダイソームプロファイリングから見つかるリボソーム一時停止位置は α ヘリックスをコードするmRNA配列間に多く見つかることから⁷⁾, リボソームが一時停止することで, 合成中のアミ

ノ酸鎖がフォールディングする時間的猶予を与えるのではないかと推察されている。実際に, ダイソーム上にはフォールディングを助ける分子シャペロンがより多くリクルートされるということが報告されている¹³⁾。

2) 翻訳異常センサー

その一方でダイソームの形成が細胞にとって有害なmRNAやタンパク質の産生を示すシグナルとして利用されることもわかってきている。たとえば, ribosome-associated quality control (RQC), ribosome stress response (RSR)²⁾, アミノ酸飢餓応答のようなストレス応答のシグナルがあげられる。このような経路はダイソームに特異的な構造・分子インターフェイスを認識する因子が重要な役割を果たす。たとえばRQCでは, Hel2と呼ばれる因子がダイソームを認識するが, この因子を酵母においてノックアウトすると, RQCの標的となることがわかっている配列 (リシンやアルギニンの連続配列) 上のダイソームが不安定化し減少する⁹⁾。また, ヒトにおいてもダイソームを多く蓄積させる*XBPlu* mRNAから産生されるタンパク質がRQCのシステムによって分解されていることがわかってきた⁸⁾。

以上のような, 細胞にとって許容してもよいダイソームと翻訳異常時に形成されるダイソームがどのように見分けられているか, その分子機構の理解が今後期待される。

7. おわりに

ダイソームプロファイリングは非常に汎用性・応用性の高い技術であり今後多くの応用が進むだろうと予想される。上記のように, ダイソームの形成は静的なものではなく非常に動的であることから, 発生時期や細胞種の違い, ストレス・環境応答などでそれらがどのように変化し, 生命現象を制御しているのか, 今後理解されていくことを大いに期待する。

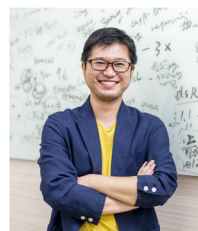
文 献

- 1) Kimchi-Sarfaty, C., Oh, J.M., Kim, I.W., Sauna, Z.E., Calcagno, A.M., Ambudkar, S.V., & Gottesman, M.M. (2007) A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science*, **315**, 525-528.
- 2) Meydan, S. & Guydosh, N.R. (2020) A cellular handbook for collided ribosomes: Surveillance pathways and collision types. *Curr. Genet.*, **67**, 19-26.
- 3) Ingolia, N.T., Ghaemmaghami, S., Newman, J.R.S., & Weissman, J.S. (2009) Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science*, **324**, 218-223.
- 4) Guydosh, N.R. & Green, R. (2014) Dom34 rescues ribosomes in 3' untranslated regions. *Cell*, **156**, 950-962.

- 5) Subramaniam, A.R., Zid, B.M., & O'Shea, E.K. (2014) An integrated approach reveals regulatory controls on bacterial translation elongation. *Cell*, **159**, 1200–1211.
- 6) Diamant, A., Feldman, A., Schochet, E., Kupiec, M., Arava, Y., & Tuller, T. (2018) The extent of ribosome queuing in budding yeast. *PLOS Comput. Biol.*, **14**, e1005951.
- 7) Arpat, A.B., Liechti, A., De Matos, M., Dreos, R., Janich, P., & Gatfield, D. (2020) Transcriptome-wide sites of collided ribosomes reveal principles of translational pausing. *Genome Res.*, **30**, 985–999.
- 8) Han, P., Shichino, Y., Schneider-Poetsch, T., Mito, M., Hashimoto, S., Udagawa, T., Kohno, K., Yoshida, M., Mishima, Y., Inada, T., et al. (2020) Genome-wide survey of ribosome collision. *Cell Rep.*, **31**, 107610.
- 9) Meydan, S. & Guydosh, N.R. (2020) Disome and trisome profiling reveal genome-wide targets of ribosome quality control. *Mol. Cell*, **79**, 588–602.e6.
- 10) Tuck, A.C., Rankova, A., Arpat, A.B., Liechti, L.A., Hess, D., Iesmantavicius, V., Castelo-Szekely, V., Gatfield, D., & Bühler, M. (2020) Mammalian RNA decay pathways are highly specialized and widely linked to translation. *Mol. Cell*, **77**, 1222–1236.e13.
- 11) Bhatt, P.R., Scaiola, A., Loughran, G., Leibundgut, M., Kratzel, A., Meurs, R., Dreos, R., O'Connor, K.M., McMillan, A., Bode, J.W., et al. (2021) Structural basis of ribosomal frameshifting during translation of the SARS-CoV-2 RNA genome. *Science*, **372**, 1306–1313.
- 12) Kim, E.Y., Wang, L., Lei, Z., Li, H., Fan, W., & Cho, J. (2021) Ribosome stalling and SGS3 phase separation prime the epigenetic silencing of transposons. *Nat. Plants*, **7**, 303–309.
- 13) Zhao, T., Chen, Y.M., Li, Y., Wang, J., Chen, S., Gao, N., & Qian, W. (2021) Disome-seq reveals widespread ribosome collisions that promote cotranslational protein folding. *Genome Biol.*, **22**, 16.
- 14) Fujita, T., Yokoyama, T., Shirouzu, M., Taguchi, H., Ito, T., & Iwasaki, S. (2022) The landscape of translational stall sites in bacteria revealed by monosome and disome profiling. *RNA*, **078188.120**.
- 15) Wu, C.C., Zinshteyn, B., Wehner, K.A., & Green, R. (2019) High-resolution ribosome profiling defines discrete ribosome elongation states and translational regulation during cellular stress. *Mol. Cell*, **73**, 959–970.e5.
- 16) Brown, A., Shao, S., Murray, J., Hegde, R.S., & Ramakrishnan, V. (2015) Structural basis for stop codon recognition in eukaryotes. *Nature*, **524**, 493–496.
- 17) Doerfel, L.K., Wohlgemuth, I., Kubyskhin, V., Starosta, A.L., Wilson, D.N., Budisa, N., & Rodnina, M.V. (2015) Entropic contribution of elongation factor P to proline positioning at the catalytic center of the ribosome. *J. Am. Chem. Soc.*, **137**, 12997–13006.
- 18) Sothilvelam, S., Neuner, S., Rigger, L., Klepacki, D., Micura, R., Vázquez-Laslop, N., & Mankin, A.S. (2016) Binding of macrocyclic antibiotics leads to ribosomal selection against specific substrates based on their charge and size. *Cell Rep.*, **16**, 1789–1799.

著者寸描

●岩崎 信太郎 (いわさき しんたろう)



理化学研究所開拓研究本部主任研究員、東京大学新領域創成科学研究科メディカル情報生命専攻客員准教授。博士（生命科学）。

■略歴 1983年栃木県に生る。2006年東京大学教養学部卒業。11年同大学院新領域創成科学研究科博士課程修了。同年東京大学分子細胞生物學研究所助教。13年より米国Carnegie Institution for Scienceを

経て、米国California大学Berkeley校ポスドクフェロー。16年より理化学研究所RNAシステム生化学研究室准主任研究員。17年改組により主任研究員。また17年より東京大学新領域創成科学研究科メディカル情報生命専攻客員准教授。

■研究テーマと抱負 RNAと翻訳が関わる現象を網羅のかつ生化学的な手法により理解する。

■ウェブサイト http://www.riken.jp/research/labs/chief/rna_sys_biochem/
<http://iwasakirna.com/ja/>

■趣味 無い時間を縫ってみるお笑い番組。