

—— 研究助成報告 ——

新規な翻訳解析技術を用いたてんかんに関わる 神経細胞異常興奮メカニズムの解明

田 中 元 雅

要旨：てんかんは罹患率の高い脳神経系疾患の一つであり、その病態解明は急務である。てんかんは脳内における神経細胞の過剰な興奮によって生じると考えられているものの、その発症分子機序には不明な点が多い。これまでの研究から、異常な神経興奮には翻訳異常が関わりと示唆されているが、神経細胞だけの翻訳を調べることは技術的に難しいため、てんかんをもたらし翻訳異常には不明な点が多い。本研究では、神経細胞選択的に翻訳を調べることできるリボソームプロファイリング技術を構築し、てんかんの症状を示す脆弱X症候群の原因遺伝子FMR1の遺伝子欠損マウスを用いた翻訳解析を行った。その結果、海馬における神経細胞特異的な翻訳解析から、小胞体シグナル配列を含む遺伝子のアミノ末端領域で翻訳が顕著に速くなることを見出した。本研究の成果は、てんかんにおける新たなバイオマーカーや治療法の開発につながると期待される。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2023；34：41-46

Key Words：翻訳, リボソーム, FMR1, 脆弱X症候群

【序論】

てんかんは頻度の高い脳疾患の一つであり、脳内における神経細胞の過剰な興奮によって生じるものの、分子レベルにおいて、てんかんの発症機序はいぜんとして不明な点が多い。本研究では、てんかんの要因と考えられる神経細胞の異常な過剰興奮に着目する。なかでも、その発端となりうるmRNA翻訳の異常な亢進メカニズムに焦点を当てる。つまり、神経細胞の過剰興奮の一つの原因として、mRNA翻訳つまりタンパク質合成の異常な亢進によるシナプス関連タンパク質の増加が示唆されるが、その詳細は不明である。

本研究では、てんかんのモデルとして、てんかん症状および神経細胞の過剰興奮を示すことが知られているFMR1遺伝子(患者の20%以上でてんかんが見られる脆弱X症候群の原因遺伝子)の欠損(KO)マウスを用いる^{1, 2)}。FMR1遺

伝子によってコードされるRNA結合タンパク質FMRPは、mRNAやリボソームに結合し、翻訳最中にあるリボソームの動き、つまり翻訳を抑制すると示唆されている¹⁾。実際に、FMR1遺伝子を欠損させた細胞はタンパク質の全体的な合成が促進することが示唆されている¹⁾。しかし、その翻訳の亢進量はわずかであるという報告や野生型とはあまり変化がないという報告もあり、現在、議論が分かれている。また、FMRPの標的mRNAとなる遺伝子が網羅的な解析によって840個ほど同定されているものの、どの標的mRNAに対するFMRPの翻訳制御が生理学的により重要であるかはほとんど分かっていない。つまり、FMRPが全ての標的mRNAに対して一様に作用し、同程度の影響を及ぼすとは考えにくく、ある一群の標的mRNAに対する翻訳制御が生理学的により重要であることが示唆されるものの、その詳細は不明である。

本研究では、それらの問いに答えるべく、網羅

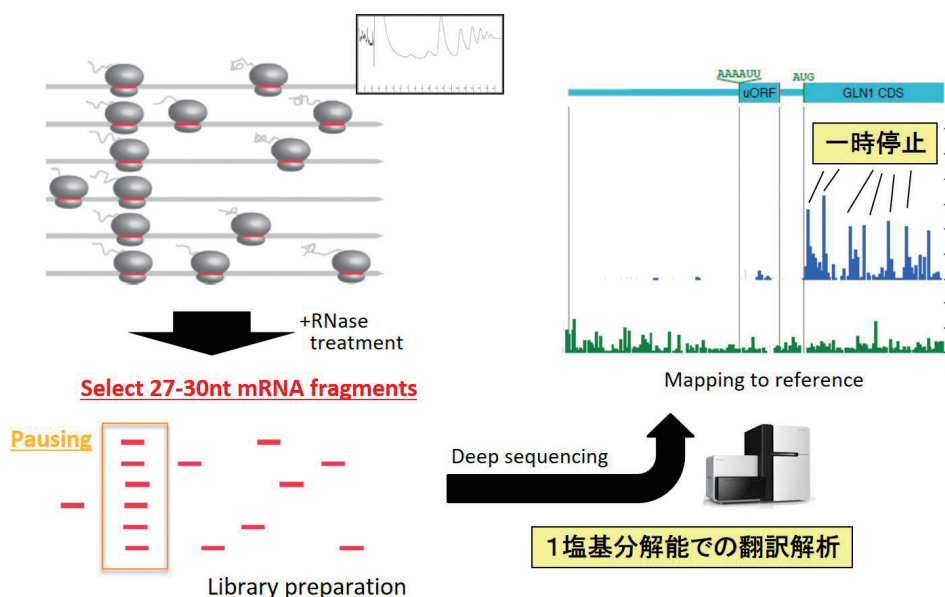


Fig. 1 翻訳リズムを調べるための網羅的な配列解析の概要

細胞懸濁液をRNA分解酵素で処理し、スクロース密度勾配遠心実験によってモノソーム（単量体のリボソーム）を単離する。その後、モノソーム内に存在する27-30塩基程度のmRNAを回収し、そのライブラリーを作成して、次世代シーケンサーを用いて網羅的な配列解析を行う。そのリード（リボソームフットプリント）をリファレンス配列にマッピングし、どのmRNA領域が実際に翻訳されているかを解析する。図は文献3）を一部改変。

的かつ一塩基レベルの分解能をもつ翻訳解析（リボソームプロファイリング（Ribo-Seq））技術³⁻⁶⁾を個体マウスに応用する。さらに、Ribo-Seq技術を細胞種選択的に行うことができるように改変し、それをてんかんの症状を示すFmr1 KOマウスに応用し、神経細胞が異常に興奮する分子メカニズムをmRNA翻訳異常の観点から、その網羅的解析によって解明することを目的とする（Fig. 1）。

本研究によって、神経細胞において異常な翻訳を示す遺伝子を同定し、てんかんの新たな治療および予防戦略の開発につなげることを目指す。

【方法】

翻訳抑制に関わると示唆されているRNA結合タンパク質FMRP⁷⁻⁸⁾を欠損させたFmr1 KOマウスと、タグの付いたリボソーム構成タンパク質を興奮性神経細胞だけで発現できるマウスを交配させた。約8週齢の野生型またはFmr1

KOマウスから海馬を取り出し、そこから細胞抽出液を調製し、RNase処理後にスクロース勾配実験を行った。単離したモノソーム分画に対して特異的なタグに対する抗体によって免疫沈降を行うことで、興奮性神経細胞だけに対して、翻訳中リボソームを選択的に精製した（Fig. 2A）。そのリボソーム内に存在している27-30塩基程度のmRNA断片をゲルから切り出し、そのRNA断片から逆転写反応などを経てシーケンスライブラリーを作成し、次世代シーケンサーで網羅的なRibo-Seq解析を行った。

さらには、遺伝子欠損を付与した場合だけでなく、外界からの刺激によっても、野生型マウスやFmr1 KOマウスの海馬での翻訳リズムが変化するか明らかにすることを目指した。野生型およびFmr1 KOマウスの足へ電気刺激を与え、恐怖条件付けを行った。野生型マウスではその恐怖記憶が24時間後も持続しているが、Fmr1 KOマウスでは恐怖記憶が低下していることをマウスの行動試験より確認した⁹⁾。恐怖

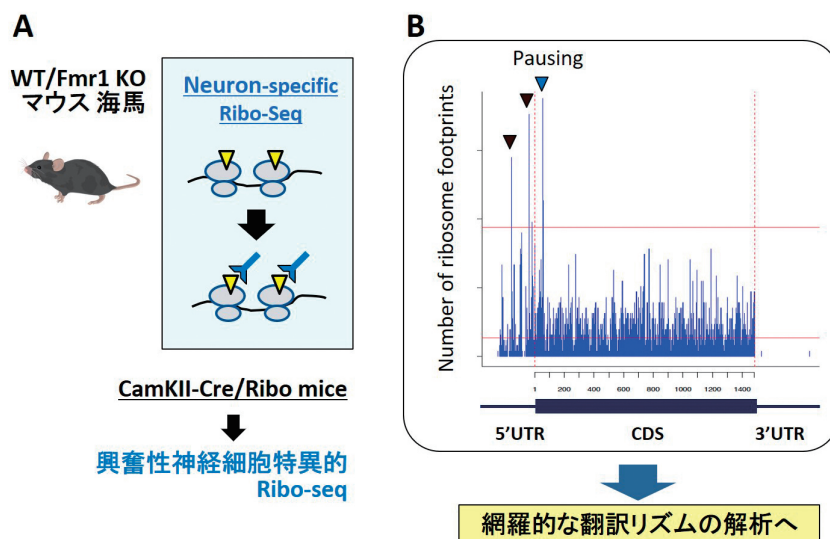


Fig. 2 神経細胞選択的な翻訳の一時停止に関する定量的な解析

A：海馬興奮性神経細胞に選択的なリボソームプロファイリング法のワークフロー

B：約28塩基のmRNAをリファレンスへマッピングした後のリボソームフットプリントのピークの高さは、リボソームがそのコドンに滞在している頻度をあらわしている。したがって、高いピークを示す位置では、リボソームが高頻度に一時停止していることを示しており、結果として、遺伝子の全体にわたってリボソームの動きが遅い領域や、逆に速い領域を知ることができる。

記憶の形成には翻訳(新規なタンパク質合成)が関与しているため、Fmr1 KOマウスの海馬でどのような翻訳異常が生じているかを調べるために足電気刺激後に海馬を採取した。そこで上記と同様に、海馬内の興奮性神経細胞内の翻訳中リボソームを選択的に単離し、翻訳最中にあるmRNAに対して次世代シーケンサーで網羅的なRibo-Seq解析を行った。

一方で、これまでの研究によって、Fmr1 KOマウスの認知機能の低下は、塩化リチウムの投与によって低減されることが報告されている¹⁰⁻¹²⁾。そこで、塩化リチウムの翻訳リズム変容への影響を調べるため、塩化リチウム含有餌および比較対照として通常の塩化ナトリウム含有餌を野生型およびFmr1 KOマウスへ与えた。次に、それらの海馬における興奮性神経細胞内において、Fmr1 KOマウスの異常な翻訳が回復するか調べるため、Ribo-Seq解析を行った。

これらのシーケンスデータを取得したあと、翻訳リズムに関するデータ解析を行った。特に、リボソームの一時停止頻度などのmRNA上の

動きを詳細に調べるため様々なスクリプトを新規に開発し、一時停止の頻度や一時停止した際の停止強度を各遺伝子の各コドンごとについて定量を行った(Fig. 2B)。このように、リボソームの一時停止の頻度や強度を指標に、翻訳最中にあるリボソームの動きの速さ、つまり翻訳のリズムについて、マウスの全ての遺伝子に対して検討を行った。

【結果】

野生型とFmr1 KOマウスの間で、リボソームの一時停止部位におけるアミノ酸配列に大きな変化は認められなかった。また、一時停止を引き起こす原因となり得るmRNAの二次構造や新生ポリペプチド鎖のドメイン構造との相関も明らかではなかった。

そこで、一時停止の頻度や情報を各遺伝子ごとにまとめるのではなく、各遺伝子を領域ごとに細かく分け、各遺伝子(コーディング領域)の前半(開始コドン下流)、真ん中、後半(終始コドン上流)に分けて一時停止の解析を行った。

その結果、驚いたことに、Fmr1 KOマウスでは翻訳において、アミノ末端を含む前半のコーディング領域でリボソームの一時停止の頻度が低いことが明らかになった。そこで、どのような遺伝子群がそのような翻訳リズムの変調を示したか調べたところ、小胞体シグナル配列を持つ遺伝子、なかでも、シナプス関連膜タンパク質の遺伝子が顕著にその特徴を示した。一方で、そのリボソームの一時停止の頻度は、過去に報告されているFMRPの標的mRNA⁷⁾と非標的mRNAとの間で比較しても、明確な違いがなかった。ところが興味深いことに、FMRPの標的遺伝子かつシナプス関連の膜タンパク質遺伝子という遺伝子グループでは、標的遺伝子全体のグループに比べて顕著に一時停止の頻度が低下し、両者で有意な差異が認められた。この結果は、FMRPの標的遺伝子の中に、顕著な翻訳リズムの変調を示す遺伝子群(シナプス関連膜タンパク質遺伝子)が存在することを意味している。

また、Fmr1 KOマウスに足電気刺激を行ったところ、意外なことに、Fmr1 KOマウスにおいて翻訳異常が見られた小胞体シグナル配列を持つ遺伝子において、翻訳中リボソームの一時停止の頻度が増加した。逆に、野生型マウスではリボソームの一時停止の頻度が減少することが明らかになった。

さらに、翻訳リズムの変調を回復させることができるか検討するため、塩化リチウム餌を8週齢のマウスへ3か月間投与したところ、Fmr1 KOマウスにおけるリボソーム一時停止の低頻度が優位に回復することが明らかになった。また、その回復度合いは、シナプス関連膜タンパク質遺伝子において有意であることが明らかになった。

【考察】

これまでに、RNA結合タンパク質であるFMRPの標的mRNAとして840個程度の遺伝子が同定されていた⁷⁾。しかし、FMRPがすべての標的mRNAへ同じように作用し、神経細胞へ同じ影響をもたらすとは考えにくく、FMRPの欠損や機能阻害によって、標的

mRNAのなかでどのmRNAの翻訳異常が顕著に認められ、また、認知機能やてんかん症状に深く関わるのかは不明であり、それは重要な問いであった。本研究によって、シナプス膜タンパク質遺伝子が翻訳される際、遺伝子の前半領域における翻訳リズムの異常が、Fmr1 KOマウスのシナプス可塑性や認知行動の異常に関わることが示唆された。また、小胞体シグナルを持つ遺伝子のコーディング前半領域における翻訳リズムの異常は、シグナル認識粒子受容体タンパク質との相互作用に変化をもたらし、それによって細胞膜への輸送やタンパク質の発現量に影響を与えることが考えられた。その詳細な解析は今後の課題である。

以上から、本結果は、シナプス膜タンパク質遺伝子の翻訳リズムの異常が、てんかんに対する新たなバイオマーカーおよび治療標的になり得ることを示唆しており、正常な翻訳リズムに回復させることが新たな治療戦略になる可能性を示唆している。

【謝辞】

本研究を行うにあたり研究助成を頂きました公益財団法人てんかん治療研究振興財団に厚く御礼申し上げます。また、本研究を主導的に行いました当研究チームのYikai Chen 博士、Nayan Suryawanshi 氏、佐藤 海 博士、高嶋 記子 氏に感謝いたします。

【参考文献】

- 1) Richter JD, Zhao X. The molecular biology of FMRP: new insights into fragile X syndrome. *Nat Rev Neurosci* 2021 ; **22** : 209-222.
- 2) Liu X., Kumar V., Tsai N.P. Auerbach BD. Hyperexcitability and Homeostasis in Fragile X Syndrome. *Front Mol Neurosci* 2022 ; **14** : 805929.
- 3) Ingolia NT, Ghaemmaghami S, Newman JR, Weissman JS. Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science* 2009 ; **324** : 218-223.
- 4) Chen C.W., Tanaka M. Genome-Wide Translation Profiling by Ribosome-Bound tRNA

- Capture. *Cell Rep* 2018 ; **23** : 608-621.
- 5) Endo R, Chen YK, Burke J, Takashima N, Suryawanshi N, Hui KK, et al. Dysregulation of ribosome-associated quality control elicits cognitive disorders via overaccumulation of TTC3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2023 ; **120** : e2211522120.
 - 6) Aryal S, Longo F, Klann E. Genetic removal of p70 S6K1 corrects coding sequence length-dependent alterations in mRNA translation in fragile X syndrome mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2021 ; **118** : e2001681118.
 - 7) Darnell JC, Jensen KB, Jin P, Brown V, Warren ST, Darnell RB. Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function. *Cell* 2021 ; **16** : 489-499.
 - 8) Sawicka K, Hale CR, Park CY, Fak JJ, Gresack JE, Van Driesche SJ et al. FMRP has a cell-type-specific role in CA1 pyramidal neurons to regulate autism-related transcripts and circadian memory. *Elife* 2019 ; **8** : e46919.
 - 9) Osterweil EK, Krueger DD, Reinhold K, Bear MF. Hypersensitivity to mGluR5 and ERK1/2 leads to excessive protein synthesis in the hippocampus of a mouse model of fragile X syndrome. *J Neurosci* 2010 ; **30** : 15616-15627.
 - 10) Liu Z-H, Chuang D-M, and Smith CB. Lithium ameliorates phenotypic deficits in a mouse model of fragile X syndrome. *Int J Neuropsychopharmacol* 2011 ; **14** : 618-630.
 - 11) Liu Z-H., Huang T, and Smith CB. Lithium reverses increased rates of cerebral protein synthesis in a mouse model of fragile X syndrome. *Neurobiol Dis* 2012 ; **45** : 1145-1152.
 - 12) King MK, Jope RS. Lithium treatment alleviates impaired cognition in a mouse model of fragile X syndrome. *Genes Brain Behav* 2013 ; **12** : 723-731.

