

ゴルジ体を舞台とする新規局所翻訳メカニズムの解明

東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカル情報生命専攻
博士後期課程2年（助成時）
博士後期課程3年（現在）
戸室 幸太郎

【研究の背景】

RNA からタンパク質が合成される過程である翻訳は、原核生物から真核生物に至るまで普遍的にみられる生命現象である。翻訳は細胞内で一様に起こると思われがちであるが、実際には、ER やミトコンドリアなど特定の細胞内領域において、必要なタンパク質をその場で合成する「局所翻訳」が存在することが知られている (Das et al., 2021)。これまで、ER やミトコンドリアが細胞内の主な「翻訳場」と考えられてきたが、核膜 (Lautier et al., 2021)、RNA 顆粒 (Fernandopulle et al., 2021) やペルオキシソーム (Dahan et al., 2022) など、多様なオルガネラにおける局所翻訳の存在も報告されている。これらの知見は、翻訳が従来考えられていた以上に高度に区画化され、精緻に制御されている可能性を示している。しかしながら、これまでの局所翻訳研究は個別遺伝子の観察が中心であり、適切な網羅的解析手法が乏しかったことから、その全貌は十分には解明されていなかった。

申請者は、リボソームプロファイリング法 (Ribo-Seq) と改変型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APEX2) による近接標識法を統合した APEX-Ribo-Seq 法を開発してきた (Tomuro et al., 2025)。Ribo-Seq は細胞内の翻訳状態を網羅的かつ定量的に解析することができる手法である (Ingolia et al., 2009)。一方、APEX2 はその近傍 (~20 nm) のみに存在する RNA やタンパク質にビオチンを付加することができる酵素である (Rhee et al., 2013, Lam et al., 2016)。これらを組み合わせた APEX-Ribo-Seq では、任意の細胞内領域に APEX2 を局在化させ、近傍に存在するビオチン化リボソームおよび mRNA を精製することで、局所的な翻訳を網羅的に解析することができる (図 1)。

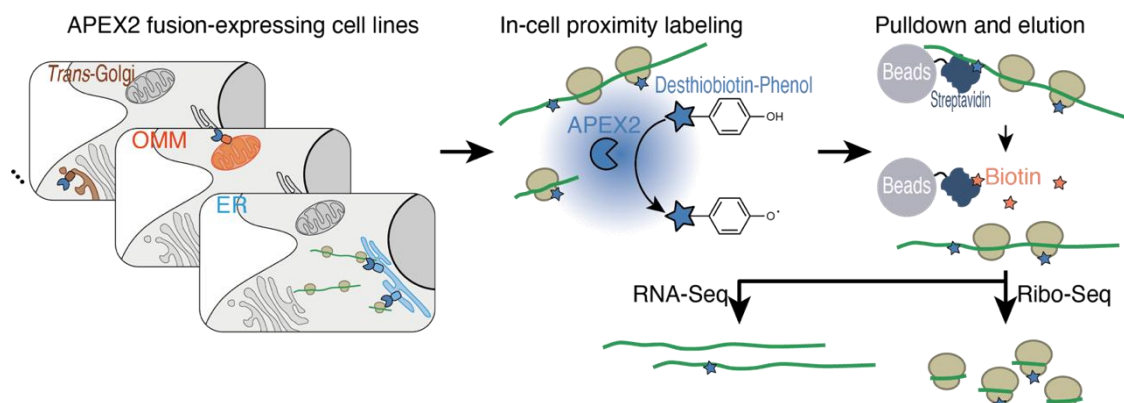


図 1 APEX-Ribo-Seq 法の概要

【研究実施項目とその内容】

APEX-Ribo-Seq を用いて、シスゴルジ体およびトランスゴルジ体における局所翻訳の網羅的解析を行った(A)。さらに、翻訳制御因子のノックダウン実験を通じて、翻訳変動を担う因子の同定を試みた(B)。加えて、イメージング解析により、ゴルジ体近傍における局所翻訳を可視化し、その動態を詳細に解析した(C)。

(A) ゴルジ体翻訳の網羅的計測

これまでの先行研究では、ゴルジ体あるいはその近傍において特定の遺伝子が翻訳されている可能性が示唆されてきたものの、その報告はきわめて限定的であった。そこで、申請者が独自に確立した APEX-Ribo-Seq 法 (図 1) を用いて、シスゴルジ体およびトランスゴルジ体における翻訳状態を網羅的に計測した。その結果、各領域で選択的に翻訳される遺伝子群を包括的にリスト化することに成功した。

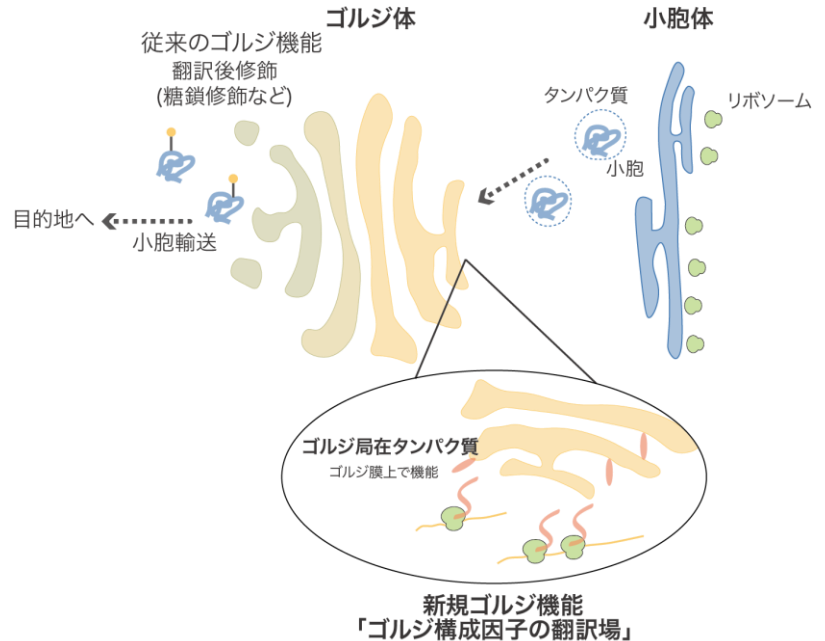


図 2 申請者の想定するゴルジ体における翻訳像

(B) ゴルジ体翻訳制御因子の同定

局所翻訳においては、mRNA の局在化を担う RNA 結合タンパク質や、新生鎖と相互作用するタンパク質が重要な役割を果たすことが知られている (Gasparski et al., 2022)。また先行研究から、ゴルジ体には翻訳制御に関与する RNA 結合タンパク質である FXR1 や G3BP1 などが局在することが報告されている (Zhang et al., 2024)。申請者は、ゴルジ体の構築および維持に必要なゴルジ局在タンパク質が、その場で選択的に翻訳されている可能性を想定している (図 2)。そこで、これらの知見や既知の RNA 局在データベースをもとに候補因子を選定し、それらのノックダウンが、実施項目 A で同定された遺伝子群の翻訳に与える影響を Ribo-Seq により検証した。

(C) ゴルジ体翻訳のイメージング解析

実施項目 A で同定された遺伝子群が、実際にゴルジ体近傍へ局在し、その場で翻訳されているかを明らかにするためには、その動態を一分子レベルで可視化する必要がある。また、それらの遺伝子由来 RNA のうち、どの程度の割合が実際に局所翻訳に関与しているのかを評価することも重要である。そこで、APEX-Ribo-Seq により同定した候補遺伝子を対象として、Puro-PLA 法および smiFISH 法を用いた翻訳スポットと RNA スポットのイメージング解析を行い、ゴルジ体との共局在率を検証した。