

41. 免疫リボソームが生み出す翻訳動態の分子機構の解明

名古屋大学大学院 理学研究科 理学専攻 生命理学講座
分子発現制御学グループ 教授

松本 有樹修

概要

免疫細胞の初期活性化における翻訳制御機構を解明するため、本課題では免疫細胞の活性化に伴うリボソーム構成の変化（Ribosome heterogeneity）に着目して研究を行った。われわれの予備的解析により、ナイーブ B 細胞にリボポリサッカライド（LPS）刺激を 3 時間与えると翻訳動態が急激に変容することが分かっており、この大きな翻訳パターン変化はリボソーム構成因子の変化、すなわち免疫細胞特有のリボソーム「免疫リボソーム（イムノリボソーム）」の形成による可能性が示唆された。そこで本研究では、マウス由来の免疫細胞の初期活性化に焦点を当て、TCP-seq や Ribo-seq をはじめとする新規翻訳解析技術を駆使して免疫リボソームの包括的解析を行った。その結果、LPS 刺激によってマクロファージにおける翻訳活性が著しく上昇し、併せてリボソーム構成因子も動的に変化することを見出した。特に、翻訳開始抑制因子 PDCD4 のリボソーム結合減少を確認し、これが休眠状態の免疫細胞で翻訳を抑制する機構に関与することが示唆された。これらの成果により、免疫細胞の活性化に特有な翻訳制御メカニズムの一端を解明することができた。なお、本研究の遂行にあたり三菱財団からの研究助成により多大な支援を受けた。

背景および目的

免疫細胞の分化や活性化に際しては、エピジェネティクス変化や転写レベルでの制御、さらにリン酸化など翻訳後修飾による調節が重要であることがよく知られている。一方で、mRNA からの新生タンパク質産生といったタンパク質翻訳レベルでの制御についての理解は、他の階層に比べてまだ十分に進んでいない。近年になり実験技術の発達に伴って翻訳制御の重要性が徐々に明らかとなり、動的な細胞応答において翻訳段階での制御が遺伝子発現調節の主役となる場合もあることが示されている。実際、翻訳制御により細胞はタンパク質合成量を直接調節することで刺激に迅速に応答でき、幹細胞の分化過程などで翻訳制御が決定的な役割を果たす例が報告されている。

真核生物における翻訳開始の過程では、まず 40S リボソーム小サブユニットが翻訳開始因子とともに 43S 開始前複合体を形成して mRNA 上を走査し、開始コドンに到達すると 60S リボソーム大サブユニットが結合して翻訳を開始する（80S リボソーム形成）という段階的機構を取る。細胞内リボソーム構成は長らく全て同一であると考えられてきたが、近年の研究によりリボソーム構成要素や修飾状態の違いによって特定の mRNA 翻訳活性が変化しうることが示唆され、「リボソームの不均一性（Ribosome heterogeneity）」という概念が提唱されている。この仮説によれば、リボソーム構成の違い（例えば特定のリボソームタンパク質のパラログやリボソーム RNA 修飾の差異）が選択的な翻訳制御を生み出し、転写制御に加えて新たな遺伝子発現調節層を提供していると考えられる。われわれはリボソームの不均一性が組織間でも存在するのではないかと着目し、実際に横紋筋特異的なリボソームとして RPL3L を含有する「Myo-ribosome」を同定した。RPL3L 含有リボソームは心臓および骨格筋に特異的に発現するリボソームタンパク質パラログであり、従来型 RPL3 含有リボソームとは機能的に異なり心筋における翻訳伸長動態を変化させ、心臓収縮機能の維持に寄与することが明らかとなった。この発見は、組織

特異的なリボソーム構成の変化が生理機能に与える影響を示す一例であり、リボソーム不均一性の生物学的意義を支持する成果である。

一方、免疫細胞においても刺激応答に伴うリボソーム不均一性が存在する可能性が考えられる。我々は予備的実験において、ナイーブ B 細胞に LPS 刺激を与えると数時間以内という短時間で翻訳動態が大きく変化することを見出した。この急激な翻訳パターン変化はリボソーム構成因子の変化、すなわちリボソーム不均一性による可能性があり、免疫細胞に特徴的な構成を持つリボソームを「免疫リボソーム」と称することとした。以上を踏まえ、本研究課題では免疫細胞の初期活性化に着目し、我々のグループがこれまでに開発・改良してきた複数の新規手法を活用して免疫リボソームの包括的解析を行い、免疫細胞活性化時の翻訳制御機構を解明することを目的とした。

方法

マウス由来のマクロファージ細胞を用い、LPS 刺激による初期活性化に伴う翻訳動態変化の包括的解析を実施した。マクロファージは、生体内から単離した腹腔マクロファージと、骨髓由来マクロファージ (BMDM) の 2 種類を用いた。これらの細胞に対し LPS 刺激を行い、以下の解析手法を組み合わせることで細胞内翻訳の包括的な解析を行った。まずポリソームプロファイリングによってポリソーム (複数リボソームが結合した mRNA) とモノソーム (単一リボソームが結合した mRNA) の比率変化を調べ、刺激に伴う細胞全体の翻訳活性変動を評価した。次に、RNA-seq 法により mRNA の発現変動を網羅的に解析し、翻訳変動との関連を解析した。また、リボソーム動態解析手法として TCP-seq および Ribo-seq を導入した。Ribo-seq (リボソームプロファイリング) は細胞内の翻訳リボソーム (80S リボソーム) が担持する mRNA 断片を網羅的にシーケンスすることで各遺伝子上のリボソーム占有位置を解析する手法であり、翻訳中のリボソーム位置 (コドン単位の解像度) を明らかにする。一方、TCP-seq (翻訳複合体プロファイリング) はホルムアルデヒド固定により翻訳前複合体を含むリボソーム位置を保存し、40S 小サブユニット及び 80S リボソームそれぞれの担持断片を分画・シーケンスすることで、走査中の 40S リボソームと伸長中の 80S リボソームそれぞれの位置を同時に可視化する手法である。以上の手法を組み合わせることで、刺激応答における各遺伝子の転写変動と翻訳変動、および翻訳開始から伸長に至る動的变化を包括的に解析した。

さらに我々は、リボソーム不均一性の解析を目的として Sel-TCP-MS 法を新たに開発している。Sel-TCP-MS は上記 TCP-seq と同様の原理で 40S 走査リボソームと 80S 翻訳リボソームを分画し、それぞれを質量分析 (Mass Spectrometry, MS) によって構成因子を同定する手法である。本研究ではこの Sel-TCP-MS 法を免疫細胞に適用し、LPS 刺激前後における 40S および 80S リボソームそれぞれの構成タンパク質や結合因子の変化を網羅的に解析した。これにより、免疫細胞活性化に伴い量的変動または結合状態の変化を示すリボソーム関連因子 (免疫リボソームの構成因子) の同定を試みた。最後に、以上の網羅的解析で候補として得られた免疫リボソーム特異的因子について、その機能を検証するためノックアウト (遺伝子欠損) マウスの作製や細胞レベルでのノックアウト実験に着手した。具体的には、標的因子遺伝子を欠失させた遺伝子改変マウスの作製に加え、野生型マクロファージへ CRISPR/Cas9 システムをエレクトロポレーション導入することで当該因子を急速に欠失させる実験系も構築し、急性および恒常的な欠失条件下で免疫応答に与える影響を調べた。

結果および考察

まず、LPS 刺激に伴うマクロファージのグローバルな翻訳活性変化をポリソームプロファイリングにより評価した。LPS 刺激 3 時間後の細胞から抽出したポリソーム画分をモニタリングした結果、未刺激状態では多くのリボソームがモノソーム画分として検出されたのに対し、LPS 刺激後にはポリソーム画分のピークが顕著に上昇し、ポリソーム/モノソーム比の劇的な増加が確認された。これは、免疫刺激のない安静時のマクロファージでは翻訳開始率が低く全体的な翻訳活性が抑制された休眠状態であるのに対し、LPS 刺激によって翻訳が一斉に活性化され多数のリボソームが同時に mRNA に結合していることを示す。この知見は、刺激応答における免疫細胞の機能変化に翻訳制御が深く関与する可能性を示唆するものであり、従来注目されてきた転写レベルでのリプロ

グラミングに加えて、翻訳レベルでのリプログラミングが生じていることを示す。実際、TCP-seq や Ribo-seq 解析でも多く遺伝子でリボソーム占有量の有意な変化が検出された。刺激による翻訳選択性の大規模な書き換えが起こっていることが明らかになった。これは、免疫細胞応答において転写制御にとどまらず翻訳制御が広範囲に機能していることを示す新たな知見である。

リボソーム構成因子の変化（リボソーム不均一性）については、Sel-TCP-MS 法により 40S リボソームと 80S リボソームに結合するタンパク質群の比較解析を行った。LPS 刺激によって結合量に顕著な変化を示す因子が複数同定され、その中でも PDCD4 (Programmed Cell Death 4) タンパク質に注目した。PDCD4 は 40S リボソーム小サブユニットに結合して翻訳開始複合体の機能を抑制することが知られており、N 末端ドメインを介して 40S サブユニットの mRNA エントリーチャンネルに直接結合し、C 末端ドメインで翻訳開始因子 eIF4A のヘリカーゼ活性を阻害することで翻訳開始を抑制する役割を持つ。免疫刺激のない安静状態のマクロファージでは PDCD4 が 40S リボソームに結合することで翻訳開始を阻害し、全体的な翻訳活性を低く抑えた休眠状態を維持していると考えられる。一方、LPS 刺激 3 時間後には 40S リボソームに結合する PDCD4 量が顕著に減少しており、PDCD4 による翻訳抑制が解除されて多数の mRNA で翻訳が開始されたと考えられる。

PDCD4 の機能的意義をさらに検証するため、我々は PDCD4 ノックアウトマウスを樹立し解析を進めている。また、野生型マウス由来マクロファージに CRISPR/Cas9 システムのガイド RNA と Cas9 タンパク質をエレクトロポレーション法で導入し、一過的に PDCD4 を欠損させる実験系も確立した。加えて、Pdc4 遺伝子座に 3xFLAG タグ配列をノックインしたレポーターマウスも作製済みであり、生体内および細胞内で PDCD4 の動態や相互作用を追跡する研究基盤を整えた。今後、これら PDCD4 欠損・標識系の解析を通じて、免疫細胞の休眠維持や活性化における PDCD4 の役割を明らかにしていく予定である。ひいては、本研究で提唱する「免疫リボソーム」の概念を発展させ、免疫細胞特異的なリボソーム構成と翻訳制御機構を明確にすることで、免疫応答の新たな制御基盤の解明につながるものと考えられる。

(完)

発表論文

- 1) Shiraishi T., Matsumoto A. From non-coding to coding: The importance of long non-coding RNA translation in de novo gene birth. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1869(2): 130747, 2025.
- 2) Świrski MI., Tierney JAS., (incl. Matsumoto A.), Valen E., Baranov PV. Translon: a single term for translated regions. *Nat. Methods.*, 22(10): 2002-2006, 2025.
- 3) Tsukamoto Y., Kawamura A., Yurtsever A., Suzuki H., Rojas-Chverra NM., Sato H., Ino D., Ichikawa T., Wei W., Haji S., Voon DCC., Matsumoto A., Matsumoto K., Takahashi H., Kodera N., Fukuma T., Ogawa Y., Nishiyama M., Sakai K. Condensation-dependent interactome of a chromatin remodeler underlies tumor suppressor activities. *Nat. Commun.*, 16(1): 9599, 2025.
- 4) Ichihara K., Shiraishi T., Chadani Y., Kito Y., Shiraishi C., Hirata M., Takahashi Y., Kobo A., Hatano A., Matsumoto M., Machida K., Imataka H., Toyoda A., Mishiro-Sato E., Nojima T., Ito T., Taguchi H., Nakayama KI., Matsumoto A. eIF2D promotes 40S ribosomal subunit recycling during intrinsic ribosome destabilization. *Nucleic Acids Res.*, 53(22): gkaf1322, 2025.