

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15116

研究課題名(和文) 遺伝子非コード領域ORFから翻訳される機能性タンパク質の探索

研究課題名(英文) Screening for functional protein-encoding ORFs located outside coding regions in the human genome

研究代表者

相澤 康則 (Aizawa, Yasunori)

東京工業大学・バイオ研究基盤支援総合センター・講師

研究者番号：90418674

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトゲノムは解読されてから15年以上経っているが、未だその中に幾つの遺伝子があり、ヒトゲノムに何種類のタンパク質がコードされているのか未解明のままである。当研究室では、これまでの通説ではタンパク質をコードしていないと考えられていたヒトゲノム領域(非コード領域)から、タンパク質が産生される例を1つ発見している。本研究では、この発見の経緯で得られた経験をもとに、2つめの事例を探索した結果、ミトコンドリア機能に関わる可能性の高いタンパク質が、ヒトゲノムの非コード領域から産生されることを発見した。本研究は、ヒトゲノムの新しい機能的側面を示唆する価値のある研究だといえる。

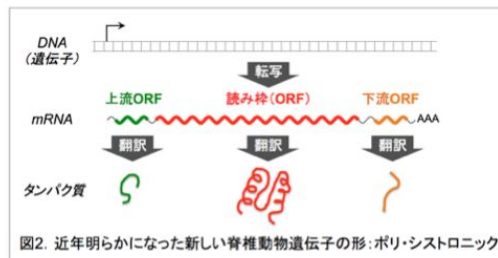
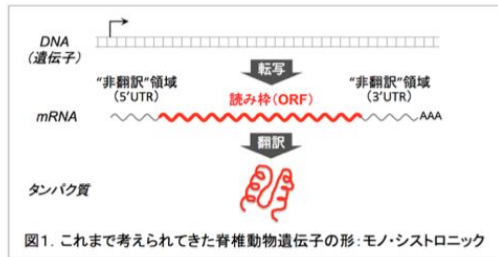
研究成果の概要(英文)：This study identified a novel candidate of small ORFs (uORF13) that is located within untranslated regions of human messenger RNAs and encodes functional proteins. The uORF13-encoding protein (uORF13p) is localized at mitochondria and seems to be involved in regulation of the membrane potential. Alanine-scanning mutagenesis allowed us to find two different peptide motifs, which can have opposite roles in the membrane potential control. In addition to our first example of functional protein-encoding small ORF located in noncoding regions, this finding also supports that the human genome encodes more functional proteins which we have yet to discover.

研究分野：ゲノム科学

キーワード：非コードゲノム ORF ミトコンドリア 膜電位 ペプチドモチーフ

1. 研究開始当初の背景

(1) 遺伝子学では「ヒトやマウスを含む行動生物の遺伝子の5'非翻訳領域にある ORF (上流 ORF) は、その下流にあるメインの ORF からの翻訳量を調節するシス配列である」というのが通説であり、「上流 ORF に生理活性タンパク質がコードされている」という事例はヒトを含む哺乳類では報告されていない。
 (2) しかし申請者は、マウスの高次行動を支配する脳タンパク質をコードする上流 ORF (uORF44) を発見していた (参照、図1および2; 未発表)。



(3) uORF44 が唯一の例外なのか、これ以外にも、機能性タンパク質を発現する上流 ORF (Functional Protein-encoding upstream ORF、略して FP-uORF) が存在するのかが、次の大きな課題であると、本研究開始当初に申請者は考えていた。

2. 研究の目的

FP-uORF を同定すること。またその過程で、FP-uORF を効率良く同定するための実験スキームの構築にも努め、今後の FP-uORF 研究の基盤を構築すること。

3. 研究の方法

(1) 同義置換率をもとに、FP-uORF 候補を生物情報学的に選別・クローニングする

(2) 機能性タンパク質候補が細胞内で結合する相手タンパク質を免疫沈降法で同定する

(3) 機能性タンパク質候補と結合相手の細胞内共局在性を免疫染色法で同定する

(4) ゲノム編集技術でマウス細胞内在性の機能性タンパク質候補を欠失させ、その機能的影響を調べる

(5) 全長が 100 アミノ酸以下の FP-uORF タンパク質の特徴を活かし、全長にわたるアラニンスキャニング変異を実施し、それらの細胞内過剰発現によって、機能欠損変異体および機能増強変異体 (ドミナントネガティブ変異体) の探索を進める

4. 研究成果

(1) NCBI の RefSeq に登録されているヒトとマウスの mRNA 配列から、30 アミノ酸以上の FP-uORF をコードする全 uORF を抽出したのち、両生物種の間でアミノ酸配列の相同性 (Homology) が 60%以上であり、かつ同義 DNA 置換率の高い (ds/dn が 1.5 以上) ものを配列情報解析により選別し、FP-uORF 候補を 128 個得た。

これら 128 個の FP-uORF に対して、公共のデータベースにある様々な情報を取り込み、FP-uORF データベース (FP-uORF_db) を構築した。取り込んだ情報の中には、各 FP-uORF を含む mRNA のヒト臓器別転写発現レベルや、FP-uORF にコードされているアミノ酸配列内の既知ペプチドモチーフについての情報も盛り込まれている (FP-uORF_db は未公開)。

(2) FP-uORF_db の中で「神経系臓器のみで転写レベルで高発現しており、かつ1つ以上の膜貫通領域をもつ」を3つ選別し、それらの欠損マウスの作製を、CRISPR/Cas9 法を用いて実施した。富山大学の高雄教授らとの共同研究である。

これまでに2つの FP-uORF のヘテロ変異マウスの作製に成功しており、本研究期間終了後も交配を重ね、行動解析を実施する予定である。

(3) 128 個の FP-uORF のクローニングを、様々なヒト臓器由来の cDNA ライブラリーを用いて実施し、これまでに 115 個のクローニングに成功している。これらはすべて、C 末端に FLAG タグあるいは GFP が融合した形で翻訳発現できるプラスミドに組み込まれている。

(4) 申請書で予定していたように、免疫沈降による「FP-uORF 由来タンパク質への結合相手タンパク質の同定」を複数種類の FP-uORF に対して試みた。FLAG 融合体を HeLa 細胞に発現したのち、抗 FLAG 抗体ビーズによる沈降物を SDS-PAGE 展開したところ、ネガティブコントロールには見えないバンドが見えた。それらバンドを切り出し、質量分析にかけた。しかしこれまでのところ、各種熱ショックタンパク質のみが結合タンパク質として同定され、機能解明につながりそうな結合相手タンパク質の同定には至らなかった。東京工業大学の田口教授との共同研究である。

一方、GFP 融合体を HeLa 細胞内で強制発現させたのち、蛍光共焦点顕微鏡で細胞内局在

の有無を検証した。半数近くが細胞全体に発現される一方で、ミトコンドリアに局在するものが全体の 25%ほど存在していることがマイトラッカー染色で明らかになった。

以下は、これらミトコンドリア局在 FP-uORF タンパク質（以下、mtFP-uORFp）にフォーカスして機能解析を進めることにした。

(5) mtFP-uORFp を HeLa 細胞および 293T 細胞内でひとつずつ過剰発現させたのち、JC-1 試薬を用いてミトコンドリア膜電位への影響を調べた。その結果、過剰発現によって優位に膜電位が低下する mtFP-uORFp を 2 つ同定した。

(6) 上流 ORF にコードされている 100 アミノ酸長以下のタンパク質は一般に、天然変性タンパク質であるものが多く、構造ドメインを持っている可能性のあるものは我々のモチーフ検索の結果からも極めて少ないことが推測されることから、FP-uORF タンパク質の多くは、機能性を発揮するために、他のタンパク質分子との相互作用の場となるペプチドモチーフをもつものが多いはずである。

そのような機能性モチーフの存在を検証するために、mtFP-uORFp の 1 つ（以下、uORF13p と呼ぶ）に対して、アラニンスキヤニング変異体解析を実施した。全長 70 アミノ酸の uORF13p の、N 末端から 2 番目のアミノ酸から 2 残基ずつをアラニンに置換した uORF13p 変異体を C 末端 FLAG 融合体として全て作製した。合計 35 種類ある。

(7) これら変異体をひとつずつ HeLa 細胞内で発現し、抗 FLAG 抗体を用いて免疫染色を実施し、細胞内局在を検証した。その結果、検証したアラニン変異体は全て、ミトコンドリアに局在することが判明した。この結果から、uORF13p の細胞内輸送先は、局所的なアミノ酸モチーフで決まっていなかったことが強く示唆された。

(8) 次に、uORF13p アラニン変異体を同様に HeLa 内で発現し、(5) と同様に JC-1 試薬でミトコンドリア膜電位への影響を調べた。その結果、N 末端付近をアラニンに置換した変異体では、野生型 uORF13p を過剰発現した際に観察されていた膜電位の減少が解消されていた。

一方、C 末端付近のある 2 アミノ酸のアラニン変異体で、野生型 uORF13p の時よりもより大きくミトコンドリア膜電位の減少を誘発していた。この変異体はいわゆる、ドミナントネガティブである。

以上のアラニン変異体の結果から、uORF13 の 70 アミノ酸配列には、少なくとも 2 つの機能性ペプチド部位が存在し、それらの機能的役割が異なることが示唆された。

(9) uORF13 の研究は、他の FP-uORF の機能解析を進める上で有用な一つの研究方針を提示している。全長は短いながらも、そのなかに機能性ペプチドモチーフが存在することを前提に、アラニンスキヤニング変異を実施し、野生型 FP-uORF 過剰発現によって引き起こされる細胞表現型の正負のいずれかへの変化を引き起こす変異体を探索するアプローチは効果的である。

しかしその前提としては、野生型 FP-uORF タンパク質の過剰発現によって誘発する細胞表現型を見つける必要があり、そのための一つの戦略として、細胞局在性が有用であることを本研究は示している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Kitano, S., Kurasawa, H., Aizawa, Y. Transposable elements shape the human proteome landscape via formation of cis-acting upstream open reading frames. *Genes to Cells* 23(4) 274-284 (2018) doi: 10.1111/gtc.12567. (査読あり)

[学会発表](計 8 件)

相澤康則、"GP-write passions from Japan." (招待講演：ゲノム合成国際コンソーシアム GP-write 年次会議「GP-write Scientific Working Meeting」; 2018年5月、米国・ボストン)

相澤康則、「ゲノム革命が作り出す未来」(招待講演：研究・イノベーション学会、第50回ブレイクスルー研究会; 2018年3月、日本・渋谷)

相澤康則、"Genome Engineering in Tokyo Tech." (招待講演：Taiwan-Japan International Engineering Forum2018; 2018年3月、台湾・台北)

相澤康則、"Coding potential of "noncoding" regions in mammalian genomes." (招待講演：GP-write China Kickoff Meeting; 2018年1月、中国・深圳)

相澤康則、"Genome architecture for the Dark Matter right under genic nose - UTR and intron." (ConBio2017; 2017年12月、神戸・日本)

相澤康則、"Key factors special for designing human genes and genomes." (招待講演：The 12th International Conference on Genomics; 2017年10月、中国・深圳)

相澤康則、"Speculative Design of Genome Dark Matter." (招待講演：細胞を創る研究会10.0; 2017年10月、日本・京都)

相澤康則、"Synthetic screening for essential introns and retroelements in

human and animal cells." (招待講演：ゲノム合成国際コンソーシアムGP-writeキックオフ会議「GP-write Meeting」; 2017年5月、米国・ニューヨーク)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：生理活性タンパク質の同定方法及びその方法によって得られた生理活性タンパク質
発明者：相澤康則、北野翔平、喜田裕一郎
権利者：国立大学・東京工業大学
種類：特許
番号：PCT/JP2016/077198
出願年月日：2016 (H28) 年 09 月 14 日
国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ:

<http://www.bio.titech.ac.jp/laboratory/aizawa/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

相澤 康則 (YASUNORI AIZAWA)
東京工業大学・バイオ研究基盤支援総合センター・講師
研究者番号：90418674

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

高雄 啓三 (KEIZO TAKAO)
富山大学・研究推進機構研究推進総合支援センター・教授
研究者番号：80420397

田口 秀樹 (HIDEKI TAGUCHI)
東京工業大学・生命理工学院・教授
研究者番号：40272710

(4) 研究協力者

山下 仁義 (HITOYOSHI YAMASHITA)
佐々木 皓崇 (HIROTAKA SASAKI)
倉澤 光 (HIKARU KURASAWA)