

令和元年6月17日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18707

研究課題名(和文) 内在性antisense RNAによるセレノプロテインP翻訳制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of selenoprotein P translational regulation by endogenous antisense RNA

研究代表者

三田 雄一郎(Mita, Yuichiro)

宮崎大学・医学部・研究員

研究者番号：70609122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Sec含有タンパク質のmRNAには、Sec挿入配列(SECIS)が存在する。SECISにSBP2が結合することによってSecがタンパク質に挿入される。Sec含有タンパク質の一つであるセレノプロテイン P (SeP)には関連する long ncRNA (L-IST)が存在する。そこでL-ISTがSePに与える影響を検証した。HepG2細胞にL-ISTを発現させたところ、SeP mRNA非依存的にタンパク質量が減少した。そのメカニズムはSeP mRNAとSBP2の結合阻害による翻訳抑制だった。以上の結果からL-ISTはSECISの機能を阻害し、SePの翻訳を抑制する新規ncRNAと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病で増加し、糖尿病を増悪させる因子として知られているSelenoprotein P(SeP)のタンパク質レベルを抑制する新規のnoncoding RNAであるL-ISTを発見し、メカニズムの解析を行った。その結果、L-ISTはSeP mRNAの翻訳段階を特異的に抑制することが分かった。SePはSECISを利用するという特殊な翻訳様式を示しており、L-ISTを標的にすることにより血中SeP高値の糖尿病患者への副作用の少ない糖尿病治療法を開発できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The Sec insertion sequence (SECIS) is present in the mRNA of the Sec-containing protein. The binding of SBP2 to SECIS induce Sec insert into the protein. A related long ncRNA (L-IST) exists in selenoprotein P (SeP) which is one of the Sec-containing proteins. Therefore, we examined the influence of L-IST on SeP. When L-IST was expressed in HepG2 cells, the expression level of protein decreased in a SeP mRNA-independent manner. The mechanism was translational repression by the binding inhibition of SeP mRNA and SBP2. From the above results, L-IST is a novel ncRNA and L-IST can inhibit the function of SECIS and suppresses the translation of SeP mRNA.

研究分野：noncoding RNA

キーワード：noncoding RNA セレノプロテインP 翻訳 SECIS

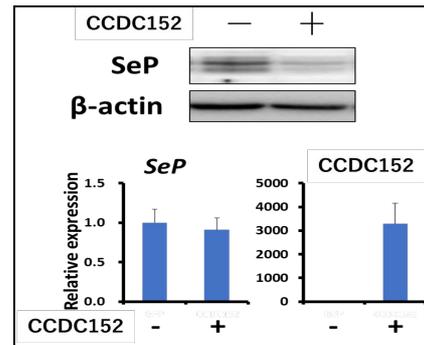
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

食べ物に含まれる必須微量元素の1つであるセレン(Se)はシステインの硫黄が Se に置き換わったセレノシステイン(Sec)という形でタンパク質中に含まれている。Sec を含むタンパク質には GPx4, TR1 のような抗酸化タンパク質や DIO1 のような甲状腺ホルモンの合成に重要な働きをするものも多く、Se の欠乏は様々な疾患の危険因子とされている。Sec を含むタンパク質の mRNA の 3' 非翻訳領域(3'UTR)には Sec 挿入配列(SECIS)という特殊なヘアピン構造を形成する配列が存在する。この SECIS に SECIS Binding Protein 2 (SBP2)が結合することにより、通常は終始コドンとして認識される UGA に Sec が挿入される。実際に、SBP2 遺伝子に変異を有する患者では、Sec 含有タンパク質の翻訳が阻害され、甲状腺機能障害をはじめとする様々な疾患が引き起こされることが報告されている。

SECIS を介した Sec 挿入メカニズムは古くから解析されており、SECIS の配列や位置、SBP2 を含む RNA 結合複合体の構成など、多くの情報が得られている。しかし、SECIS の配列に依存しない立体構造の変化の可能性は解析されておらず、未だに情報を得られていない。そこで、SECIS の立体構造に影響を与える noncoding RNA(ncRNA)の存在を仮定し、BLAST 解析を用いて SECIS 類似配列のスクリーニングを行った。その結果、血漿 Se 含有タンパク質の Selenoprotein P (SeP)の SECIS に対する antisense RNA である CCDC152 が同定された。SeP を発現している HepG2 細胞に CCDC152 を過剰発現させたところ、mRNA 量非依存的に SeP のタンパク質量を減少させる効果が見られた。

本研究では CCDC152 による SeP タンパク質量減少のメカニズムの解明を行う事とした。



## 2. 研究の目的

上記の背景及びこれまでの研究成果を元に、本研究では SeP SECIS 配列に対する内在性 antisense RNA の役割を明らかにし、SeP の発現制御メカニズム及び個体全体への影響の解明を目的とし以下の実験を行う。

- 1). CCDC152 による SeP 発現量抑制メカニズムの解明
  - 2). SeP 発現量に対する CCDC152 RNA の必要配列の同定
  - 3). CCDC152 を介した SeP 翻訳調整による糖尿病治療法の開発
- これらの研究を通して ncRNA による新規の SECIS 制御メカニズムの解明を行うとともに CCDC152 を標的とした新たな糖尿病治療法の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

### 1). CCDC152 による SeP 発現量抑制メカニズムの解明

SeP を発現している HepG2 細胞に CCDC152 を過剰発現させ、SeP mRNA の転写から翻訳までのどの段階が阻害されているのかを確認する。具体的には mRNA の核外移行、mRNA へのリボソームの結合、SeP mRNA の SECIS への SBP2 の結合の検討を行う。

### 2). SeP 発現量に対する CCDC152 RNA の必要配列の同定

CCDC152 は SeP のコードされている遺伝子領域の antisense 鎖にコードされている。特に SECIS のコードされている領域全体の antisense 配列が CCDC152 の一部として転写されている。そこで、CCDC152 を相補的な領域全長、SeP mRNA 3'UTR 相当領域、SECIS 相当領域に分割し、SeP タンパク質量、mRNA の変動を調べる

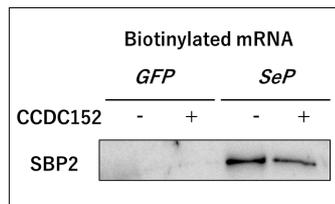
### 3). CCDC152 を介した SeP 翻訳調整による糖尿病治療法の開発

CCDC152 の標的になっている SeP は糖尿病患者で増加し、糖尿病を悪化させる因子であることが知られている。CCDC152 の増加によって SeP の増加を抑制する物質は SeP を標的とする新たな糖尿病治療薬として期待できる。そこで、抗糖尿病作用が知られている食品由来成分やポリフェノールなどの物質を HepG2 細胞に添加し、CCDC152 を増加させ SeP タンパク質量の減少を引き起こす物質のスクリーニングを行った。In vitro で良好な結果が得られた物質はマウスに投与し、in vivo の効果を検討した。

## 4. 研究成果

### 1). CCDC152 RNA による SeP 発現量抑制メカニズムの解明

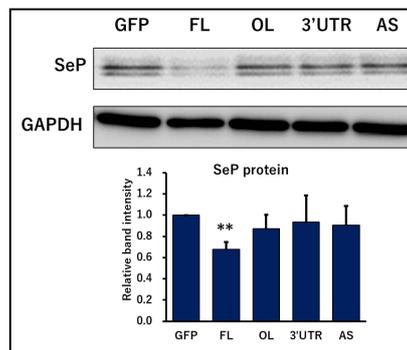
SeP と CCDC152 を発現していない HEK293 細胞に Plasmid を用いて SeP と CCDC152 を CMV Promoter を利用して遺伝子発現を行う Plasmid を共発現させた場合でも mRNA 量非依存的に SeP のタンパク質量の減少が見られる。それに対し、HepG2 細胞では内在性の SeP Promoter を利用して転写が行われている。異なる 2 種類の Promoter で同じ結果が得られていることから、CCDC152 は転写段階には影響していないことが分かる。次に、SeP mRNA の核外移行への影響を調べるために、CCDC152 を過剰発現させた HepG2 細胞の核内と細胞質の SeP mRNA の存在比率を測定したが、CCDC152 の有無でその比率に変化は見られなかった。翻訳段階への影響を調べるため SeP mRNA に結合しているリボソーム量をポリソーム解析を用いて調べた。その結果、SeP mRNA に結合しているリボソーム量は CCDC152 を過剰発現することによって減少していた。過去の報告から、SECIS に結合する SBP2 が減少すると mRNA に結合するリボソームが減少することが報告されているため、ビオチン化した SeP mRNA を用いて SBP2 が SeP mRNA とどれくらい結合しているのかを調べた。コントロールとして用いた GFP 発現細胞に比べ CCDC152 発現細胞では SeP mRNA に結合する SBP2 量の減少が確認された。



これらの結果から CCDC152 によって引き起こされる mRNA 量非依存的な SeP 多量タンパク質の減少は SeP mRNA の SECIS に対する SBP2 の阻害が原因であることが示唆された。CCDC152 によるタンパク質量の減少は他の SECIS を持つ mRNA にコードされているタンパク質では起こらないため、SeP 特異的であることがわかった。

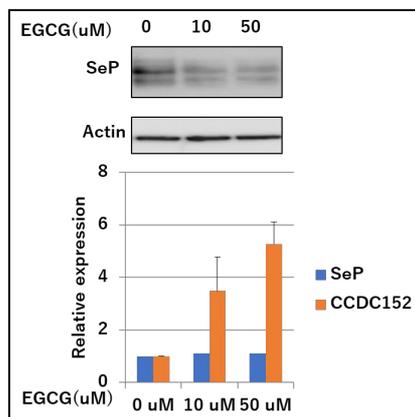
### 2). SeP 発現量に対する CCDC152 RNA の必要配列の同定

Carrieri らの報告(C. Carrieri et al. Nature. 2012)で示されているように、内在性 Long antisense RNA によって行われる翻訳制御には、対象となる mRNA との重複した配列だけでなく、非重複部分の配列の存在が重要な場合がある。そこで、CCDC152 の必要配列が重複領域内に存在しているかを調べるために、CCDC152 の配列を SeP mRNA との重複領域 (OL)、5' 非重複領域、3' 非重複領域、SECIS antisense(AS) 配列など複数の部位に分け、各領域欠損変異体等を作成し、SECIS 配列への影響や SeP タンパク質の発現量の変化を調べた。しかし、断片化した重複配列では SeP のタンパク質量を減少させる効果は認められず、Carrieri らの報告の場合と同様にその他の相動性領域以外が必要であることが分かった。そこで CCDC152 の 3' 領域、5' 領域を欠損した断片化 RNA を作成し過剰発現を行った。しかし、SeP mRNA の発現自体に変動が見られる断片化 RNA が存在し、必要領域の絞り込みを終えることができなかった。



### 3). CCDC152 を介した SeP 翻訳調整による糖尿病治療法の開発

CCDC152 の発現量を増加させ、SeP のタンパク質量を減少させる物質のスクリーニングを行った。スクリーニングの条件として、1. CCDC152 を増加させる、2. SeP の mRNA を増加させない 3. SeP タンパク質を減少させる物質とした。初めに、予備検討ですでに CCDC152 を増加させる物質として同定していた EGCG の類縁体であるカテキンファミリーについて検討を行った。その結果、EGCG、EGC、EC でも同様に CCDC152 の増加を認めた。EGCG 以外のカテキンファミリー分子は SeP mRNA の減少作用も見られた。他の物質として、ポリフェノールのクルクミン、レスペラトロール、スルフォラファンを追加も行い、クルクミンとスルフォラファンで CCDC152 の増加及び SeP タンパク質の減少効果が確認できた。



最後に、マウスに EGCG の投与を行った。100mg/kg の EGCG を投与したマウスでは投与後 24 時間で血糖値の低下が見られた。血糖値が減少した濃度では血中 SeP 濃度の減少が認められた。肝臓での CCDC152 及び L-IST の発現量を調べた結果、SeP mRNA は変化しなかったが、CCDC152 の発現量の減少が確認された。そのため、血中 SeP 濃度の減少は肝臓における CCDC152 が発現した結果、肝臓から分泌される SeP が減少したためだと考えられる。

これらの研究結果から、CCDC152 は SeP の翻訳段階を特異的に阻害する ncRNA だとわかり、Long ncRNA - Inhibitor of SeP Translation (L-IST) と名付けた。L-IST は SeP mRNA の SECIS と SBP2 の結合を阻害することによって SeP のタンパク質量を減少させることができる。この作用は SECIS に対する呼応下ではなく SeP mRNA 特異的な効果である。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計9件)

### 【学術論文】

#### 英文

Okada T, Mita Y, Sakoda H, et al. Impaired adaptation of energy intake induces severe obesity in aged mice on a high fat diet. *Physiol Rep.* (2019) 7(3):e13989 doi: 10.14814/phy2.13989 (査読あり)

Mita Y, Kataoka Y, Saito Y, et al. Distribution of oxidized DJ-1 in Parkinson's disease-related sites in the brain and in the peripheral tissues: effects of aging and a neurotoxin. *Sci Rep.* (2018) 8(1):12056. doi: 10.1038/s41598-018-30561-z. (査読あり)

Okada T, T.M. Zaved Waisea, Mita Y, et al. Analysis of peripheral ghrelin signaling via the vagus nerve in ghrelin receptor–restored GHSR-null mice. *Neurosci Letters* (2018) 681(10) 50-55. doi:10.1016/j.neulet.2018.05.035 (査読あり)

Mita Y, Nakayama K, Inari S, et al. Selenoprotein P-neutralizing antibody improves insulin secretion and glucose intolerance in mouse models for type 2 diabetes. *Nat Commun.* (2017) 8(1):1658. doi: 10.1038/s41467-017-01863-z. (査読あり)

Ariyoshi M, Katane M, , Mita Y, et al. D-Glutamate is metabolized in the heart mitochondria. *Sci Rep.* (2017), 7:43911. doi: 10.1038/srep43911. (査読あり)

Misu H, Takayama H, Mita Y, et al. Deficiency of the hepatokine selenoprotein P increases responsiveness to exercise in mice through upregulation of ROS and AMPK in muscle. *Nature Med* (2017) 23(4):508-516. doi: 10.1038/nm.4295 (査読あり)

Saito Y, Akazawa-Ogawa Y, Mita Y, et al. Oxidation and interaction of DJ-1 with 20S proteasome in the erythrocytes of early stage Parkinson's disease patients. *Sci Rep.* (2016) 6:30793. doi: 10.1038/srep30793. (査読あり)

Yasuda Y, Sakai A, Mita Y, et al. Genetic polymorphism at codon 546 of the human RAD17 contributes to the risk for esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Mol Epidemiol Genet.* (2016) 7(1):58-66. eCollection 2016. (査読あり)

#### 和文

御簾 博文, 三田 雄一郎, 斎藤 芳郎, 篁 俊成. インスリン抵抗性の病態から治療への展開へパトカインセレノプロテインPを標的とするインスリン抵抗性治療薬の開発を目指して. *糖尿病* (2018) 61(Suppl.1) S-29 (査読あり)

[学会発表](計24件)

三田雄一郎、斎藤芳郎、内田理沙 et al. 内在性 long non-coding RNA による新規 Selenoprotein P 翻訳制御メカニズム, 第4回日セレン研究会, 2018年7月, 滋賀 (口頭発表)

三田雄一郎、中山華穂、稲荷尚吾 et al. Selenoprotein P 中和抗体を用いた糖尿病治療の開発 第91回日本内分泌学会学術総会 2018年4月 宮崎 (ポスター発表)

三田雄一郎 Selenoprotein P に対する中和抗体は糖尿病モデルマウスの病態を改善する. 第6回南九州糖尿病シンポジウム 2018年3月 鹿児島 (基調講演)

三田雄一郎、斎藤芳郎、内田理沙 et al. non-coding RNA による Selenoprotein P 翻訳抑制メカニズムの解. Conbio 2017 2017年12月 神戸 (ポスター発表)

内田理沙、三田雄一郎、斎藤芳郎 et al. 糖尿病関連タンパク質 Selenoprotein P の翻訳を抑制する内在性 long non-coding RNA の発現変化. Conbio 2017 2017年12月 神戸 (ポ

スター発表)

三田雄一郎、齋藤芳郎、内田理沙 et al. 内在性 long non-coding RNA による新規 Selenoprotein P 翻訳制御メカニズム, 第 39 回日本分子生物学会, 2016 年 12 月, 横浜 (シンポジウム)

三田雄一郎、中山華穂、稲荷尚吾 et al. Selenoprotein P の中和抗体による耐糖能異常及びインスリン分泌能の改善. 第 69 回日本酸化ストレス学会学術集会 2016 年 8 月, 仙台(口頭発表)

三田雄一郎、中山華穂、稲荷尚吾 et al. セレノプロテイン P の阻害抗体による糖尿病治療効果の解析-インスリン抵抗性及び分泌能を改善する抗体医薬の開発. 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会 2016 年 5 月 京都 (口頭発表)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称: セレノプロテイン P の発現抑制剤およびその利用

発明者: 齋藤芳郎、三田雄一郎、野口範子、内田理沙、安原小百合、横大路将

番号: 特願 2017-123077

出願年: 2017

国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

ホームページ等

<https://systemlifescience.wixsite.com/system-life-science>

## 6. 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。