

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：17601

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2017～2020

課題番号：16KK0185

研究課題名（和文）mRNA選択的な翻訳制御機構の解明（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Selected mRNA translation and ribosomopathies(Fostering Joint International Research)

研究代表者

上地 珠代 (Uechi, Tamayo)

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：10381104

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,200,000円

渡航期間： 16ヶ月

研究成果の概要（和文）：リボソームは細胞内でタンパク質を合成する装置で、翻訳の異常と細胞のがん化との関連が示唆されている。私たちは、肝細胞がんの患者においてリボソームRNAの修飾をガイドするSNORA24遺伝子の発現が特異的に低下していることを見出した。SNORA24の発現抑制によってリボソームRNAの修飾が2箇所欠損することにより、がんの悪性化を招くこと、細胞内への脂質の蓄積が起こること、リボソームへのtRNAの取り込みに変化が生じることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトのリボソームは79種類のタンパク質と4種類のRNAで構成され、RNAは約200箇所化学修飾を受ける複雑な構造体である。タンパク質や修飾の翻訳における役割は未解明であるが、様々な先天性疾患やがんとの関連が示唆されている。しかし、ほぼすべての細胞に存在するリボソームの異常がなぜ特定の疾患を引き起こすのか不明である。本研究では、RNA修飾の翻訳における役割を初めて示した。また、リボソームにmRNA特異的な翻訳調節機構が備わっていることを示唆し、疾患発症の分子メカニズムを解明する手がかりとなる。

研究成果の概要（英文）：Ribosomes are macromolecular complexes that are composed of ribosomal proteins and RNAs. H/ACA small nucleolar RNAs (snoRNAs) are responsible for converting hundreds of specific uridine residues to pseudouridine within the RNAs and are found altered expression in numerous cancers. We found that loss of SNORA24 gene in mice expressing RASG12V promoted the development of liver cancer resembling human steatohepatic hepatocellular carcinoma, and are associated with poor survival. These findings suggest that snoRNA-guided chemical modifications may play important roles in safeguarding against oncogenic insult. At the molecular level, using single-molecule FRET analysis, we find that such ribosomes exhibit perturbations in aminoacyl-transfer RNA selection and altered dynamics within the pre-translocation ribosome complex. These data should provide a fundamental clue to molecular mechanisms of the mRNA-specific translation controls and pathogenesis of the diseases with mutated ribosomes.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：snoRNA リボソーム 翻訳 RNA修飾 肝細胞がん

1. 研究開始当初の背景

真核生物のリボソームは、4種類のRNA (rRNA) と約80種類のタンパク質 (RP) で構成される複雑な構造体である。これら因子の異常は個体の死を招き疾患の原因にはならないと考えられてきた。しかし、リボソームの生合成因子をコードする遺伝子の変異がいくつかの先天性疾患で同定され「リボソーム病」という概念が確立した。しかし、すべての細胞に存在する翻訳装置の異常がなぜ特定の疾患を引き起こすのかは解明されていなかった。rRNA は約200箇所化学修飾を受ける。その反応をガイドする核小体低分子RNA (snoRNA) の発現が、細胞の老化やがん化に伴って変動することが示唆されたが分子メカニズムは不明であった。

私は、rRNAの修飾やRPが翻訳過程において特定の役割を担うため、それぞれの異常が特定の疾患とリンクすると推測した。リボソーム病のひとつであるダイヤモンド・ブラックファン貧血の患者では複数のRP遺伝子の変異が報告されていた。特にRPS19遺伝子に着目してゼブラフィッシュを用いて解析を進めていたが、メカニズムの核心に迫るには新たな研究手法が必要であると考えていた。国際的なDBA研究会においても大きな進展は報告されていなかった。

そこで「Cancer ribosome」を提唱し、細胞の老化やがん化とRNA修飾との関連について研究実績のあるRuggiero博士の協力を得て、新規の翻訳制御機構の解明に向けた研究を加速させたいと考えた。

2. 研究の目的

肝細胞がん患者の病変組織では、いくつかのsnoRNA遺伝子の発現が低下していることを見出した。特にSNORA24遺伝子(18S rRNAの2箇所の修飾をガイドするRNA)の発現低下は患者の予後の悪さに関連するデータが得られた。また、繊維芽細胞で変異型Rasを発現させる細胞老化が誘導され、特定のsnoRNA遺伝子の発現が上昇した。このような細胞でSNORA24を欠損させると、細胞は老化を回避しコロニー形成能を上昇させた。つまり、この遺伝子のがん抑制遺伝子としての機能が示唆された。そこで、SNORA24遺伝子が関与する細胞がん化の機序を明らかにしたいと考えた。本研究では、マウスを用いてrRNA修飾の欠損ががんの悪性化に関与することを個体レベルで確認し、細胞のがん化を招く翻訳異常を分子レベルで明らかにすることを目的とした。

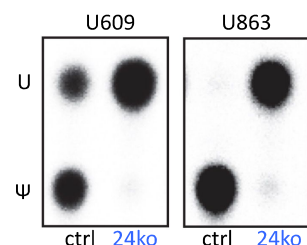
3. 研究の方法

- (1) 変異RASを安定して発現するマウスの肝がん細胞において、ゲノム編集技術によりSNORA24遺伝子をノックアウトした。この細胞をマウス肝臓に移植し腫瘍を形成させた。腫瘍組織切片を作製しORO染色により脂肪滴を観察した。
- (2) ヒトおよびマウス肝がん細胞におけるSNORA24がガイドするRNA修飾(18S rRNAの2箇所のシュードウリジル化)の欠損はSCARLET (site-specific cleavage and radioactive-labeling followed by ligation-assisted extraction and thin-layer chromatography)法により確認した。
- (3) グローバルな新規タンパク質の合成には影響が及ばないことを、OP-ピューロマイシンを用いた解析、およびポリソーム解析により確認した。
- (4) 修飾を欠損したリボソームとmRNAおよびtRNA間で起こる分子動態を捉えるために、ヒトおよびマウス肝がん細胞を用いて一分子FRET(蛍光共鳴エネルギー)解析を行った。さらに、ヒト肝がん細胞を用いて、終止コドンのリードスルーや間違ったtRNAの取り込みを測定するためにレポーターアッセイを実施した。

4. 研究成果

本研究の成果は、rRNAの欠損がタンパク質を合成する際の分子動態に変化をもたらす、リボソームの翻訳機能の正確さが低下する可能性を初めて示したことである。

- (1) Snora24遺伝子をノックアウトしたマウス肝細胞および肝細胞がんマウスモデルを用いた解析

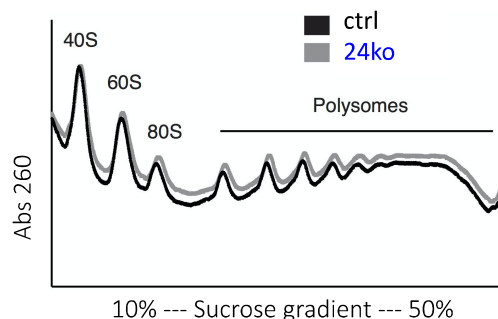


18S rRNA上の2箇所 (U609、U863) のウリジンをSCARLET法により検出した。SNORA24欠損によりシュードウリジル化 (Ψ) が行われないことを確認した。

変異型 Ras を発現するマウスの肝細胞において *Snora24* 遺伝子をノックアウトし、マウスの肝臓に移植すると3週間程度で肝がんにより死亡した。このことから、*Snora24* の発現は変異 Ras による細胞のがん化を抑制することが示唆された。SNORA24 がガイドするシュドウリジル化が欠損してもグローバルな翻訳活性に変化がみられなかったことから、特定の遺伝子の翻訳だけが影響を受ける可能性があるかと推測した。

(2) 修飾を欠損したリボソームの翻訳機能解析

修飾を欠損したマウスの肝細胞には脂肪が蓄積する傾向がみられたことから、脂質代謝に関連する因子の翻訳量変動の検出を試みた。ポリソームを形成する mRNA (リボソームが結合し翻訳過程にある mRNA) を回収し脂質代謝関連の因子の発現量を解析したが有意な差はなかった。さらにプロテオーム解析も試みたが、修飾の有無によるタンパク質量の差は検出されなかった。

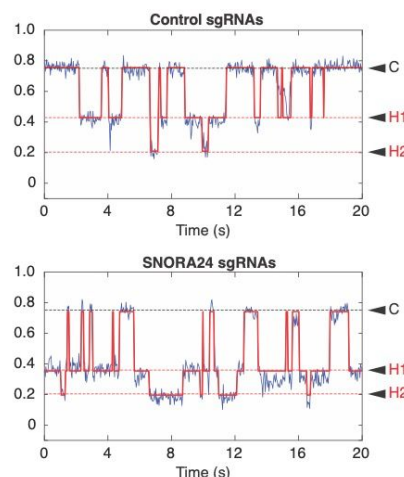
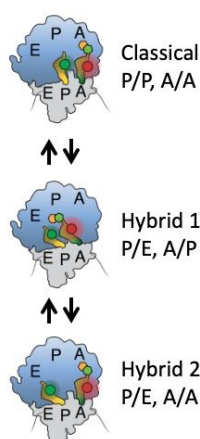


修飾の欠損によるグローバルな翻訳活性 (ポリソーム形成) に変化はなかった。

(3) 修飾を欠損したリボソームと tRNA との分子動態の変化を捉える解析

様々な代謝経路の阻害剤や翻訳阻害剤に対して、細胞の増殖能が変化するかどうか解析を試みた。その結果、タンパク質合成阻害剤であるアニソマイシンで処理した場合、修飾を欠損した細胞が高い増殖能を示した。これは、リボソームに何らかの構造的な変化が起きていることを示唆した。その変化を分子レベルで捉えるために一分子 FRET 解析をとルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイを行った。修飾を欠損しているリボソームでは、特定のアミノアシル tRNA の選択効率が高くなり、間違っ た tRNA の取り込みも起きやすくなることを示唆するデータが得られた。

研究を開始した当初は、rRNA 修飾が欠損することで特定の mRNA の翻訳効率が変化することを予測していたが、本研究ではそのような遺伝子の同定には至らなかった。しかし、リボソーム内の分子動態という切り口からの解析を試み、rRNA 修飾が tRNA のリボソームへの取り込みに影響を与えることを示すことができた。このような分子動態の変化は、mRNA の翻訳速度やアミノ酸配列を変化させ、がんの悪性化や様々な疾患を発症させる可能性があると考えた。



リボソームに取り込まれた tRNA の動態は、rRNA 修飾の有無により差が生じた。

rRNA は約 200 箇所化学修飾を受けることが知られている。修飾部位は生物種間でも保存性が高いため、翻訳において重要な役割を担っていると推測する。今後は、ゼブラフィッシュを用いて網羅的に snoRNA 遺伝子のノックアウトモデルを作製し、解析を進める予定である。また、悪性末梢神経鞘腫を発症するゼブラフィッシュのスクリーニング解析において複数の RP 遺伝子の変異が同定されている。RP もがん抑制遺伝子としての機能をもつことが示唆されるため、rRNA 修飾と組み合わせた解析を行うことにより、さらに詳細な翻訳のダイナミクスを明らかにできると期待している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tamayo Uechi, Naoya Kenmochi	4. 巻 12
2. 論文標題 Zebrafish Models of Diamond-Blackfan Anemia: A Tool for Understanding the Disease Pathogenesis and Drug Discovery	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 pharmaceuticals	6. 最初と最後の頁 151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ph12040151	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Mary McMahon, Adrian Contreras, Mikael Holm, Tamayo Uechi, Craig M Forester, Xiaming Pang, Cody Jackson, Meredith E Calvert, Bin Chen, David A Quigley, John M Luk, R Kate Kelley, John D Gordan, Ryan M Gill, Scott C Blanchard Is a corresponding author, Davide Ruggero	4. 巻 8
2. 論文標題 A single H/ACA small nucleolar RNA mediates tumor suppression downstream of oncogenic RAS	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e48847
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.48847	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Tsutomu Toki, Kenichi Yoshida, Ru NanWang, Sou Nakamura, Takanobu Maekawa, Kumiko Goi, Megumi C. Kato, Seiya Mizuno, Fumihiro Sugiyama, Rika Kanazaki, Tamayo Uechi, Yukari Nakajima, Yusuke Sato, Yusuke Okuno, et al.	4. 巻 103
2. 論文標題 De Novo Mutations Activating Germline TP53 in an Inherited Bone-Marrow-Failure Syndrome	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 American Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 440-447
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajhg.2018.07.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Chakraborty A, Uechi T, Nakajima Y, Gazda HT, O'Donohue MF, Gleizes PE, Kenmochi N	4. 巻 495
2. 論文標題 Cross talk between TP53 and c-Myc in the pathophysiology of Diamond-Blackfan anemia: Evidence from RPL11-deficient in vivo and in vitro models	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1839-1845
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.12.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Tamayo Uechi, Maki Yoshihama, Yukari Nakajima, Mariko Nagatomo, Yutaka Suzuki, Naoya Kenmochi
2. 発表標題 Translational efficiency of mRNAs required for hematopoiesis were decreased in a zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上地球代, Mary McMahon, Davide Ruggero
2. 発表標題 リボソームRNAの修飾欠損によるtRNA結合の変化
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tamayo Uechi, Maki Yoshihama, Yukari Nakajima, Yutaka Suzuki, Naoya Kenmochi
2. 発表標題 Translational efficiency of mRNAs required for hematopoiesis were decreased in a zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia
3. 学会等名 Translational Control（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mary McMahon, Adrian Contreras, Tamayo Uechi, Craig Forester, Bin Chen, David Quigley, Kate Kelley, John Gordan, Ryan Gill, Davide Ruggero
2. 発表標題 Tumor suppressive role of small nucleolar RNAs in the control of lipid metabolism
3. 学会等名 Translational Control（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上地球代, 吉浜麻生, 中島由香里, 鈴木穰, 伊藤悦朗, 剣持直哉
2. 発表標題 リボソーム病モデルにおけるmRNAの翻訳制御と疾患発症の分子機構
3. 学会等名 第19回日本RNA学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tamayo Uechi, Maki Yoshihama, Yukari Nakajima, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Etsuro Ito, Naoya Kenmochi
2. 発表標題 Ribosomal dysfunction and defective erythropoiesis in a zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia
3. 学会等名 The 22nd Annual Meeting of the RNA Society (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 上地球代, 中島由香里, 澤田尚史, 石田詩織, 土岐力, 伊藤悦朗, 剣持直哉
2. 発表標題 ゼブラフィッシュを用いた先天性貧血の新規原因遺伝子の同定
3. 学会等名 平成29年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ルジェーロ ダビデ (Ruggero Davide)	カリフォルニア大学サンフランシスコ校・泌尿器科/HDFCがんセンター・教授	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	カリフォルニア大学サンフランシスコ校		