

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：34428
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2018～2021
課題番号：18K05563
研究課題名(和文) 環状RNAの細胞内局在機構を明らかにし脳内環状RNAの謎に迫る

研究課題名(英文) Elucidation of circRNA transport pathway

研究代表者

芳本 玲 (Yoshimoto, Rei)

摂南大学・農学部・講師

研究者番号：70595652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：機能性circRNAの一つであるciRS-7を発現するヒト神経芽細胞腫(SH-SY5Y)細胞を用いたASO阻害実験から、ciRS-7イントロン内に環状化に必要な相補的配列の存在が示された。バイオインフォマティクス解析とレポーター実験により、MIR(Mammalian Interspersed Repeats)と呼ばれる繰り返し配列(SINE)が環状化に必要なことを世界に先駆けて解明した。さらにRNA-Seqデータ解析からMIR依存的に産生されるcircRNAを多数発見し、MIR依存的な環状化には普遍性があり、マウスからヒトまで高度に保存された新しいカテゴリーのcircRNAの存在を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

circRNAのほとんどは細胞質に局在し、主な機能としてはマイクロRNA(miRNA)を吸着することによりmiRNAの転写後発現調節を制御するもの、RNA結合タンパク質(RBP)の機能を制御するもの、そしてmRNA由来の翻訳枠(ORF)を持ち翻訳を受けるものが存在する(図1)。したがってcircRNAはマイクロRNA(miRNA)や長鎖ノンコーディングRNA(lncRNA)に並ぶ新たな機能性RNA群であり、circRNAの機能解明は、重要な疾患の治療に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：ASO inhibition experiments using human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells expressing ciRS-7 have revealed the presence of a complementary sequence in the ciRS-7 intron that is required for cyclization. Bioinformatics analysis and reporter experiments revealed that a repeat sequence called MIR (Mammalian Interspersed Repeats) (SINE) is required for circularization. Furthermore, we discovered many circRNAs produced in an MIR-dependent manner by analyzing RNA-Seq data, and established that MIR-dependent circularization that is highly conserved from mouse to human.

研究分野：応用分子細胞生物学

キーワード：RNA

1. 研究開始当初の背景

(1) ciRS-7 は MIR という哺乳類に保存された繰り返し配列依存的に産生される

ciRS-7 を発現するヒト神経芽細胞腫(SH-SY5Y)細胞を用いた ASO 阻害実験から、ciRS-7 イントロン内に環状化に必要な相補的配列の存在が示された。バイオインフォマティクス解析とレポーター実験により、MIR(Mammalian Interspersed Repeats)と呼ばれる繰り返し配列(SINE)が環状化に必要なことを世界に先駆けて解明した。さらに RNA-Seq データ解析から MIR 依存的に産生される circRNA を多数発見し、MIR 依存的な環状化には普遍性があり、新しいカテゴリーの circRNA の存在を確立した(論文投稿中)。

(2) circRNA は核から細胞質へ能動的に輸送される

核と細胞質の分画で RNA-Seq を行い、circRNA の多くが細胞質に局在することを見出した。アフリカツメガエル卵母細胞へのプラスミド DNA 注入実験を用いて、転写後にスプライシング反応によって環状化された circRNA が核から細胞質へ能動的に輸送されることを明らかにした(京都大学・大野陸人研究室との共同研究)。さらに circRNA の輸送は mRNA 核外輸送因子 TAP に依存していることが競合阻害実験および siRNA によるノックダウン実験により示された。circRNA には末端構造がないため、未知の circRNA 側の TAP のアダプター因子の存在が予想される。

2. 研究の目的

コーディング RNA を産生するはずの mRNA 前駆体から機能のあるノンコーディング RNA が作られている、しかもその構造は完全なる環状である。次世代高速シーケンサーによるトランスクリプトーム解析によって、ヒトで数千種の環状 RNA(circRNA)が組織・発生段階特異的に発現している事が明らかになった。さらにアルツハイマー病、ALS といった神経変性疾患、癌、アテローム性動脈硬化症において circRNA とこれら疾患との関係が相次いで報告されており、転写、スプライシング、翻訳レベルでの遺伝子発現を制御する新たなノンコーディング RNA 群として世界的に注目されている(図 1)。私たちはこれまで、小脳特異的に発現する circRNA である ciRS-7 に注目し、その環状化機構を示し、新奇の生合成メカニズムを明らかにした(論文投稿中)。さらに、circRNA が核外輸送される事実を確認した(詳細は本研究の着想に至った経緯に述べる)。circRNA と mRNA の構造を比べると、幾何学的に多くの違いがある(図 2、詳細は本研究の目的に述べる)。それにも関わらず、核で生成された circRNA は細胞質へと核外輸送され、その一部は細胞質に局在するのはなぜか？この基本的な問題を解決することは、circRNA の機能の全貌を知るための前提条件である。

3. 研究の方法

ほとんどの circRNA がコーディング RNA のエキソンから構成されていることから、スプライシング依存的に作られていると予想されるが、mRNA と異なりその成熟機構には不明な点が多い。そこで私は circRNA と mRNA の相違に注目して、以下の2つのテーマを提案したい。

(1) circRNA の核外輸送機構の解明：

予備実験から私は circRNA が核から細胞質へ積極的に輸送されることを明らかにしている。一般に、mRNA の核外輸送経路は末端構造や転写物の長さ (>250 塩基長)に依存する(図 2)。それに対し、circRNA には mRNA と違いキャップ、ポリ A といった末端構造がなく、長さの分布も mRNA と異なるため、mRNA とは異なる未知の輸送複合体によって核外輸送されると仮説を提起した。その未知の輸送複合体の分子実態の解明を目指す。

(2) 脳内に過剰発現する circRNA 存在意義の探求：

circRNA は脳や神経系細胞で他の細胞に比べ多様であり、一部は圧倒的な発現量を示すがその意義は未だ謎である。さらに軸索輸送される circRNA や、エキソソームと呼ばれる細胞外分泌小胞に含まれる circRNA も報告されている。これらの circRNA の局在は遺伝子発現のどの段階で決まるのだろうか。mRNA においては 3'非翻訳領域(3'UTR)が RNA の挙動を制御するが、circRNA は 3'UTR を持たないため環状 RNA の生合成過程が circRNA の局在を決めている可能性がある(図 2)。テーマ A)の遂行と並行して、神経系で特異的に発現する circRNA 発現レポーターを用いて circRNA の輸送に注目することで、この重要な疑問に答えたい。

4. 研究成果

(1) 機能性 circRNA の一つである ciRS-7 の生合成メカニズムの解明

機能性 circRNA の一つである ciRS-7 を発現するヒト神経芽細胞腫(SH-SY5Y)細胞を用いた ASO 阻害実験から、ciRS-7 イントロン内に環状化に必要な相補的配列の存在が示された。バイオインフォマティクス解析とレポーター実験により、MIR(Mammalian Interspersed Repeats)と呼ばれる繰り返し配列(SINE)が環状化に必要なことを世界に先駆けて解明した。さらに RNA-Seq データ解析から MIR 依存的に産生される circRNA を多数発見し、MIR 依存的な環状化には普遍性があり、マウスからヒトまで高度に保存された新しいカテゴリーの circRNA の存在を確立した(図 1)[iScience.23,101345(2020)]。

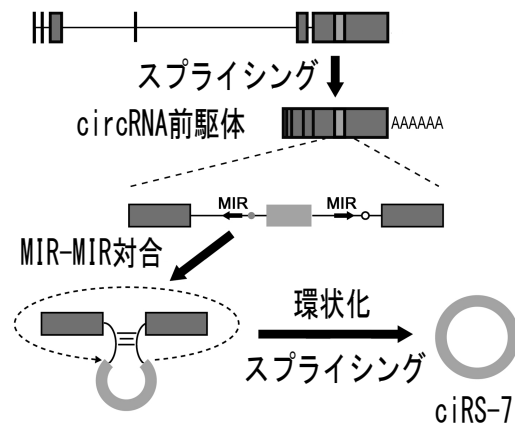


図 1. ciRS-7 の生合成メカニズム

ciRS-7 は長大なノンコーディング遺伝子から転写され、イントロン内の MIR-MIR 対合により環状化スプライシングが促進される。

(2) 新生 circRNA の簡便な検出方法の開発

circRNA の半減期は非常に長く、通常のノックダウン実験 (48~72 時間) では輸送阻害効果を見出すことが極めて難しいことが予備実験からわかっている。したがって circRNA の核外輸送を評価するには、新生転写物を検出する必要がある。ただし、従来の新規転写物の検出法は新生 RNA の精製・定量性の確保が煩雑で siRNA スクリーニングには適していない。

そこで、私はこの問題を解決すべく新たな新生転写物の検出方法を開発した(図 2)。RNA アナログの一つである 4-チオウリジン(4SU)で細胞中の RNA をパルスラベルした後全 RNA を精製する。4SU をヨードアセトアミド (IAA)にてアルキル化(4S*U)した後逆転写を行う。通常 RNA 上の U 塩基は DNA の A 塩基として逆転写されるが 4S*U 塩基は G 塩基として逆転写される。アリル特異的 PCR で A→G 塩基を検出することで新生転写物の定量 PCR が可能となる。実際に IAA 処理により A→G 置換を起こすと PCR 増幅産物が約 10 倍増えることから特異性は十分に担保されている。

スクリーニング手順としては、HEK293 細胞に siRNA を導入し、十分にノックダウンされたタイミングを待って 4SU で RNA をパルスラベルする。その後、核・細胞質を生化学的に分画し、上に述べた手法を用いて新たに転写された circRNA の核・細胞質の割合を RT-PCR で定量する。

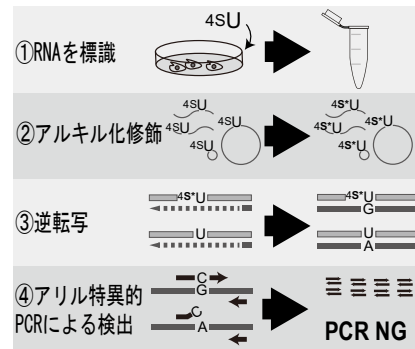


図 2. 新生 circRNA の簡便な検出方法

核酸アナログの一つである 4SU で細胞の RNA を標識したのち、アルキル化・逆転写により一塩基置換を引き起こし、それを PCR で検出する原理

(3) circRNA の核外輸送経路の解明

ciRS-7 は細胞質で機能することから核外輸送をうけるはずである。実際にアフリカツメガエルの卵母細胞への微量注入系を用いた ciRS-7 発現プラスミドの注入実験から核内で生合成された ciRS-7 は能動的に細胞質へと核外輸送されることを証明した。そしてヒト HEK293 細胞において、ciRS-7 には mRNA 輸送アダプター因子である TAP/NXF1 が結合しており、siRNA を用いた TAP/NXF1 ノックダウンでは ciRS-7 の核外輸送が阻害された。したがって ciRS-7 の核外輸送は mRNA 型であることが示唆された[投稿準備中]。

次に circRNA の核外輸送は長さ・配列に関わらず mRNA 型であろうと仮定し、いくつかの長さの circRNA を発現するレポータープラスミドをもちいて TAP/NXF1 ノックダウンの効果を調べた。ところが予想に反して 1000 塩基未満の短い circRNA の輸送は TAP/NXF1 ノックダウンで阻害されなかった。また短い circRNA を人工的に長くし 1000 塩基以上にすると TAP/NXF1 ノックダウンにより核外輸送が阻害された。これらの結果は、細胞には circRNA の長さを認識する分子機構があることを意味するが、その詳細は謎である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Yoshimoto Rei, Rahimi Karim, Hansen Thomas B., Kjems Jorgen, Mayeda Akila | 4. 巻 23 |
| 2. 論文標題 Biosynthesis of Circular RNA ciRS-7/CDR1as Is Mediated by Mammalian-wide Interspersed Repeats | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 iScience | 6. 最初と最後の頁 101345 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101345 | 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 Kawamoto Takahito, Yoshimoto Rei, Taniguchi Ichiro, Kitabatake Makoto, Ohno Mutsuhito | 4. 巻 26 |
| 2. 論文標題 ISG20 and nuclear exosome promote destabilization of nascent transcripts for spliceosomal U snRNAs and U1 variants | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Genes to Cells | 6. 最初と最後の頁 18 ~ 30 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12817 | 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 Yoshimoto Rei, Chhipi-Shrestha Jagat K., Schneider-Poetsch Tilman, Furuno Masaaki, Burroughs A. Maxwell, Noma Shohei, Suzuki Harukazu, Hayashizaki Yoshihide, Mayeda Akila, Nakagawa Shinichi, Kaida Daisuke, Iwasaki Shintaro, Yoshida Minoru | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Spliceostatin A interaction with SF3B limits U1 snRNP availability and causes premature cleavage and polyadenylation | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cell Chemical Biology | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chembiol.2021.03.002 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Ueno Tomonori, Taga Yuki, Yoshimoto Rei, Mayeda Akila, Hattori Shunji, Ogawa-Goto Kiyoko | 4. 巻 116 |
| 2. 論文標題 Component of splicing factor SF3b plays a key role in translational control of polyribosomes on the endoplasmic reticulum | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences | 6. 最初と最後の頁 9340 ~ 9349 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1901742116 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|----------------------|
| 1. 著者名 Yoshimoto Rei, Rahimi Karim, Ebbesen Karoline K, Hansen Thomas, Kjems Jorgen, Mayeda Akila | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 The functional circular RNA, ciRS-7 (CDR1as), is biosynthesized using back-splicing promoted by inverted mammalian-wide MIRs but not primate-specific Alus | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 biorxiv | 6. 最初と最後の頁 411231 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/411231 | 査読の有無 無 |
| 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 Ueno Tomonori, Taga Yuki, Yoshimoto Rei, Mayeda Akila, Hattori Shunji, Ogawa-Goto Kiyoko | 4. 巻 116 |
| 2. 論文標題 Component of splicing factor SF3b plays a key role in translational control of polyribosomes on the endoplasmic reticulum | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences | 6. 最初と最後の頁 9340-9349 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1901742116 | 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 - |

[学会発表] 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 Rei Yoshimoto, Ichiro Taniguchi, Karim Rahimi, Jorgen Kjems, Thomas B. Hansen, Mutsuhito Ohno, Akila Mayeda. |
| 2. 発表標題 A subset of human circRNAs are biosynthesized using mammalian-wide interspersed repeats (MIRs) and exported to cytoplasm via TAP/p15 pathway |
| 3. 学会等名 Eukaryotic mRNA Processing, CSHL (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Rei Yoshimoto, Ichiro Taniguchi, Ohno Mutsuhito and Akila Mayeda |
| 2. 発表標題 ciRS-7 Is Biosynthesized Using Back-Splicing Promoted by Inverted MIR Elements And Is Exported to Cytoplasm via Tap/p15 pathway |
| 3. 学会等名 RNA Biology, Cold Spring Harbor Asia (国際学会) |
| 4. 発表年 2018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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

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 | | | |
|---------|-------------------|--|--|--|
| デンマーク | Aarhus University | | | |