

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 4 月 18 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02155

研究課題名(和文) 環状RNAの翻訳機構を理解しその生理的意義を解明する

研究課題名(英文) Understanding the biological roles of circular RNAs through the analysis of their translation mechanisms

研究代表者

高橋 和利 (Takahashi, Kazutoshi)

京都大学・iPS細胞研究所・准教授

研究者番号：80432326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、これまで見過ごされてきた環状RNAとその翻訳産物を同定することを目的に、環状RNAのマッピングと解析パイプラインの構築を行った。ヒト多能性幹細胞株で発現する環状RNAは約6700種類であった。これらの環状RNAが翻訳されているかを調べるために、ヒト多能性幹細胞で翻訳されている領域の同定を行った。その結果、約28000か所の翻訳領域を同定し、既知のCDSが約60%、既知CDSのパリアントが約20%で、残りの約20%が新規の翻訳領域であることを明らかにした。以上のように本研究では、多能性幹細胞で発現する環状RNAのマッピングと翻訳解析への足掛かりとなる基盤データを得ることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

真核生物における環状RNAはこれまで存在は示されているが、翻訳に関する報告は少ない。多くが環状RNAを癌や疾患などのバイオマーカーまたは機能性RNAとして報告しているのみであった。近年になり、環状RNAが翻訳されていることを報告した論文が出始めている状況である。本研究は多能性幹細胞で発現する環状RNAを網羅的に同定した。さらに多能性幹細胞における翻訳領域を決定した。今後この基盤データを利用することで、既存のプロテオミクスデータは大幅に拡張され、生命現象を理解するうえで必要な新規分子が同定できると期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to map circular RNAs (circRNAs) and establish an analysis pipeline to elucidate the translation mechanism of circRNAs and the physiological significance of their translation products, which have been overlooked to date. We identified approximately 6700 circRNAs expressed in human pluripotent stem cell lines. To determine whether these circRNAs are translated, we identified the regions where they are translated in human pluripotent stem cells using a ribosome profiling strategy. We found that approximately 28,000 regions were translated in human pluripotent stem cells, of which approximately 60% were known coding sequences (CDSs), 20% were variants of known CDSs, and the remaining 20% were novel translated regions. As described above, this study succeeded in obtaining baseline data that will serve as a stepping stone for mapping and translational analysis of circRNAs expressed in pluripotent stem cells.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：環状RNA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

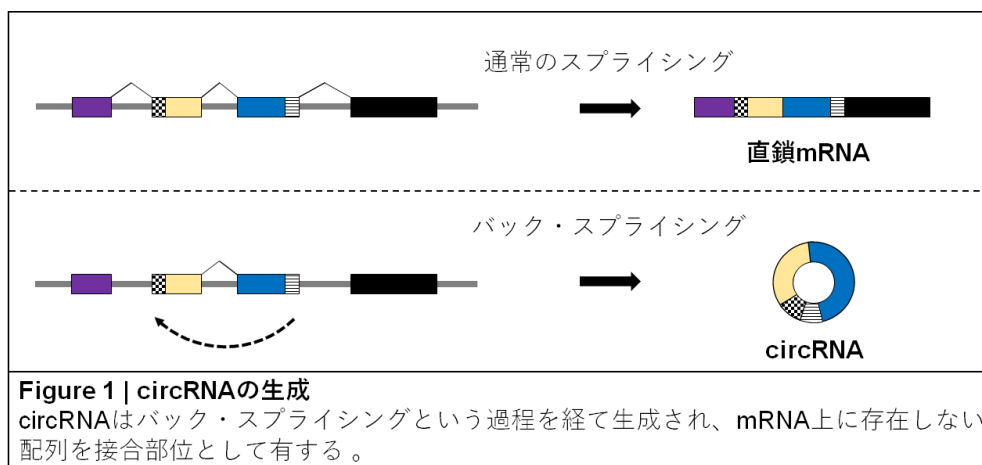
### 1. 研究開始当初の背景

教科書にはいわゆる「標準的な」タンパク質翻訳機構が説明されてきたが、近年の技術発展により、タンパク質翻訳はこれまで認識されていたより複雑で未知な部分が多いと考えられるようになってきた。従来、真核生物において、mRNA 中の一番長い open reading frame (ORF) 配列である coding sequence (CDS) のみがタンパク質として翻訳されるとされてきた。しかし、リボソームプロファイリング法を用いてリボソームが結合し実際に翻訳されている領域を調べると、CDS 以外の「非翻訳 (翻訳されない)」とされている領域においても翻訳されている配列があることがわかってきた (Chen et al., 2020)。その中には、一般的に非翻訳 RNA とされる long non-coding RNA (lncRNA) や mRNA スプライシング時に副産物として生成される circular RNA (circRNA) も含まれる。申請者はこれら「非標準的」な翻訳機構に幅広く興味を持ち研究を行っている。その中でも本課題は、従来のゲノミクスをベースとしたアプローチでは見過ごされてきた circRNA とその翻訳に焦点を当てる。

circRNA は、直鎖 pre-mRNA が成熟する過程において、通常のスプライシングの逆方向で起こる バック・スプライシングによって生成される (Chen et al., 2015) (Fig. 1)。直鎖 RNA である mRNA は 5'末端に Cap 構造、3'末端に poly A 鎖を有し、これらが eukaryotic translation initiation factor gamma (eIF4G) を中心とした翻訳開始因子複合体の標的となり翻訳が開始される。一方で、circRNA は末端を持たないため eIF4G による標準的な翻訳機構では説明がつかず、未知の「非標準的な」機構による制御を受けていると考えられる。申請者はこれまで Cap 構造に依存しない翻訳機構に関する研究を行っており、circRNA の翻訳機構について本課題で迫りたいと考える (Takahashi et al., 2005; Sugiyama et al., 2017; Takahashi et al., 2020)。

circRNA は環状化により発生した接合部位配列を持ち、これはゲノム DNA 上に存在しないものである (Fig. 1)。この接合部位配列を含む領域が翻訳された場合、ゲノム DNA や mRNA 配列を眺めていても見つからないタンパク質が生成されることとなる。事実、筋組織で発現する ZNF609 遺伝子から生成される circRNA が翻訳されこれまで同定されていなかったタンパク質をコードしていることが示されている (Pamudurti et al., 2017)。

このような背景から、circRNA がコードするタンパク質は現時点でほとんどが未同定・未解析であるが、生理的に意義を持つ大きな可能性を秘めている。これらに着目すれば、今まで考えられてきたよりも遥かに多くの新規翻訳産物が同定されると期待される。事実、質量分析により細胞で発現するタンパク質の解析を行うと、CDS 由来の既知タンパク質とアノテーションされる割合は約 40%程度である。従来、残りはデータとして高品質で信頼性が高いものであっても既知タンパク質とマッチしないという理由で無視されていたが、これらは circRNA がコードする新規タンパク質を含む可能性が高い。このように未同定・未解析の circRNA に着目すれば、今まで考えられてきたよりも遥かに多くの翻訳産物が新規に同定され、細胞機能の実行役を担うプレイヤーが出そろおうだろう。



## 2. 研究の目的

これまで見過ごされてきた circRNA の翻訳機構と翻訳産物の生理的意義を解明する

長らく生命科学の教科書では、「転写因子による制御で DNA より転写された mRNA のみが細胞機能を担い手であるタンパク質として翻訳される」とされてきた。そして、従来研究のほとんどが、mRNA によりコードされるタンパク質の機能を解析することで当該遺伝子の理解を目指してきた。これにより多くの知見が得られたが、我々はいまだに細胞の設計図を手にはしていない。つまり、現時点で生命現象を理解するには「足りないもの」が存在することは明らかであり (Armengaud, 2010)、おそらく我々がこれまで見過ごしてきたものの中に答えがあるだろうという発想が本課題のスタート地点である。本研究では、教科書に示されてきたドグマに縛られることなく、これまで我々が見過ごしていたものについて考えてみたい。このようなコンセプトのもとに、「mRNA のみがタンパク質をコードする」という考え方の下に従来あまり研究されてこなかった circRNA とその翻訳産物に着目し、タンパク質データベースの大幅な拡張を達成する。circRNA がコードするタンパク質により、新規メカニズムの発見や既存パスウェイのミッシングピースを埋めることができると期待される。申請者の得意分野を活かし円滑に研究を進める目的でヒト多能性幹細胞をモデルとして用いるが、本研究において circRNA バイオロジーの重要性を示すことで、将来的には、個体発生、老化、癌や様々な疾患など分野の垣根を超えた大きな波及効果が期待できる。

## 3. 研究の方法

### (1) circRNA マッピング

circRNA の性質上、circRNA 本体のほとんどの部分の塩基配列は同遺伝子座にある mRNA の配列と重複するため通常の RNA-seq では区別が困難である (Fig. 1)。この問題点については、精製したトータル RNA に対して直鎖 RNA を特異的に消化する RNase R を用いて 37 °C で 45 分間処理し、大部分の直鎖状 RNA を除去した。一部の特殊な構造をとる RNA は RNase R では効果的に分解できないため、RNase R で消化しきれない RNA の末端に poly A を人工的に付加しオリゴdT ピーズを用いて除去した。これにより純度の高い環状 RNA サンプルの調製に成功した。得られたデータについてライブラリーを作製し、次世代シーケンサーによりデータを得た。得られたデータを用いて、circExplorer (Hansen et al., 2016) などの公開プログラムを利用し、ヒト多能性幹細胞における信頼性の高い circRNA マップを作成した。

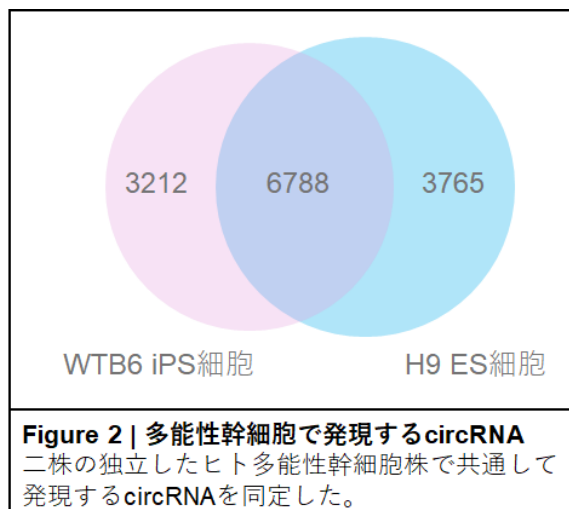
### (2) リボソームプロファイリングによる翻訳領域の決定

リボソームのプロファイリングは、以下の条件で実施した (Mito et al., 2020)。細胞を 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl、5 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM DTT、1% Triton X-100、100 µg/mL chloramphenicol、100 µg/mL CHX を含むバッファーで溶解し、氷上で 15 分間の DNase 処理を行った。10 µg の RNA を RNase I を用いて 25 °C で 45 分間処理し、スクロースクッション (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 20 U/mL SUPERase-In, 1 M Sucrose, 100 µg/mL chloramphenicol, and 100 µg/mL CHX) を用いた超遠心によって濃縮した。得られたペレットを 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 300 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1% Triton X-100, 20 U/mL SUPERase-In に再懸濁し、Direct-zol RNA Microprep kit を用いて精製した。RNA サンプルを電気泳動で分離し、17-34 nt の断片を切り出し精製した。これらの精製リボソームフットプリント RNA を、インナーインデックス配列とユニーク分子識別子 (UMI) を含むリンカーオリゴヌクレオチドでライゲーションし、その後、riboPOOLS for Riboseq を用いて rRNA を除去した。残存した RNA を ProtoScript II による逆転写反応に用い、circLigase2 で環状化した。cDNA 鋳型は、Phusion ポリメラーゼを用い、インデックス配列を含むプライマーを用いて増幅した。

#### 4. 研究成果

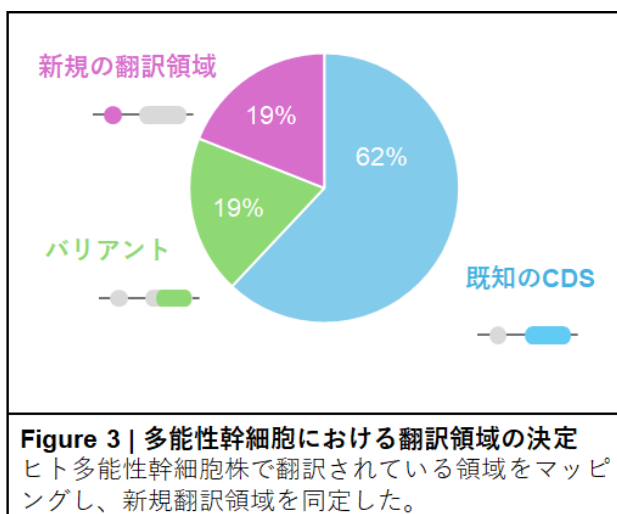
##### (1) circRNA マッピング

二株の独立したヒト多能性幹細胞株 (H9 ヒト ES 細胞と WTB6 ヒト iPS 細胞) から抽出した RNA を用いて、環状 RNA を濃縮し次世代シーケンスにより配列を決定した。環状 RNA はゲノム配列とアノテーションすることができないため、得られた結果を専用のプログラムで解析し、直鎖状 RNA と区別し、バック・スプライシングにより形成されたジャンクション配列をもとにゲノムへのマッピングを行った。その結果、ヒト多能性幹細胞株は約 10,000 種の環状 RNA を発現しており、両株で共通して発現する環状 RNA は約 6,700 種類であった (Fig. 2)。



##### (2) リボソームプロファイリングによる翻訳領域の決定

多能性幹細胞で発現する環状 RNA が翻訳されているかを調べるために、リボソームプロファイリング法を用いてヒト多能性幹細胞で翻訳されている領域の同定を行った。その結果、WTB6 iPS 細胞では約 28000 か所の領域がヒト多能性幹細胞において翻訳されていることがわかった。マッピングの結果をもとにこれらを分類すると、既知の Coding Sequence (CDS) が約 60%、既知 CDS のバリエント (翻訳開始点や終結点異なるもの) が約 20%で、残りの約 20%が新規の翻訳領域であった。以上のように本研究では、多能性幹細胞で発現する環状 RNA のマッピングと翻訳解析への足掛かりとなる基盤データを得ることに成功した。



#### < 引用文献 >

- Chen, J., Brunner, AD., J Cogan, Z., Nuñez, JK., Fields, AP., Adamson, B., Itzhak, DN., Li, JY., Mann, M., Leonetti, MD., Weissman, JS. "Pervasive functional translation of noncanonical human open reading frames" *Science* 367, 1140-1146 (2020).
- Chen, LL., Yang, L. "Regulation of circRNA biogenesis" *RNA Biology* 12, 381-388 (2015).
- Takahashi, K., Maruyama, M., Tokuzawa, Y., Murakami, M., Oda, Y., Yoshikane, N., Makabe, KW., Ichisaka, T., Yamanaka, S. "Evolutionarily Conserved Non-AUG Translation Initiation in NAT1/p97/DAP5 (EIF4G2)" *Genomics* 85, 360-367 (2005).
- Sugiyama, H., Takahashi, K., Yamamoto, T., Iwasaki, M., Narita, M., Nakamura, M., Rand, TA., Nakagawa, M., Watanabe, A., Yamanaka, S. "Nat1 promotes translation of specific proteins that induce differentiation of mouse embryonic stem cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.* 114, 340-345 (2017).
- Takahashi, K., Jeong, D., Wang, S., Narita, M., Jin, X., Iwasaki, M., Perli, SD., Conklin, BR., Yamanaka, S. "Critical roles of translation initiation and RNA uridylation in endogenous

retroviral expression and neural differentiation in pluripotent stem cells.” *Cell Reports* **31**, 107715 (2020).

Pamudurti, NR., Bartok, O., Jens, M., Ashwal-Fluss, R., Stottmeister, C., Ruhe, L., Hanan, M., Wyler, E., Perez-Hernandez, D., Ramberger, E., Shenzis, S., Samson, M., Dittmar, G., Landthaler, M., Chekulaeva, M., Rajewsky, N., Kadener, M. “Translation of CircRNAs” *Molecular Cell* **66**, 9-21 (2017).

Armengaud, J. “Proteogenomics and systems biology: quest for the ultimate missing parts” *Expert Review of Proteomics* **7**, 65-77 (2010).

Hansen, TB., Venø, MT., Damgaard, CK., Kjems, J. “Comparison of circular RNA prediction tools” *Nucleic Acids Research* **44**, e58 (2016).

Mito, M., Mishima, Y. & Iwasaki, S. “Protocol for Disome Profiling to Survey Ribosome Collision in Humans and Zebrafish” *STAR Protocols* **1**, 100168 (2020).

•

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Iwasaki Mio, Kawahara Yuka, Okubo Chikako, Yamakawa Tatsuya, Nakamura Michiko, Tabata Tsuyoshi, Nishi Yohei, Narita Megumi, Ohta Akira, Saito Hirohide, Yamamoto Takuya, Nakagawa Masato, Yamanaka Shinya, Takahashi Kazutoshi	4. 巻 25
2. 論文標題 Multi-omics approach reveals posttranscriptionally regulated genes are essential for human pluripotent stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 104289 ~ 104289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.104289	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 Takahashi, K., Nakamura, M., Okubo, C., Kliesmete, Z., Ohnuki, M., Narita, M., Watanabe, A., Ueda, M., Takashima, Y., Hellmann, I., Yamanaka, S.	4. 巻 17
2. 論文標題 The pluripotent stem cell-specific transcript ESRG is dispensable for human pluripotency.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1009587
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1009587	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 Hashimoto, R., Sakamoto, A., Deguchi, S., Yi, R., Sano, E., Hotta, A., Takahashi, K., Yamanaka, S., Takayama, K.	4. 巻 26
2. 論文標題 Dual inhibition of TMPRSS2 and Cathepsin B prevents SARS-CoV-2 infection in iPS cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Therapy Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 1107-1114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtn.2021.10.016	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 Takahashi, K., Okubo, C., Nakamura, M., Iwasaki, M., Kawahara, Y., Tabata, T., Miyamoto, Y., Woltjen, K., Yamanaka, S.	4. 巻 2
2. 論文標題 A stress-reduced passaging technique improves the viability of human pluripotent cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports Methods	6. 最初と最後の頁 100155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.crmeth.2021.100155	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 Okubo Chikako, Nakamura Michiko, Sato Masae, Shichino Yuichi, Mito Mari, Takashima Yasuhiro, Iwasaki Shintaro, Takahashi Kazutoshi	4. 巻 2024.02.09
2. 論文標題 Selective Translation Orchestrates Key Signaling Pathways in Primed Pluripotency	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 579580
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2024.02.09.579580	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 -

〔学会発表〕 計6件(うち招待講演 6件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 高橋 和利
2. 発表標題 Non-canonical mode of translation in pluripotency.
3. 学会等名 シングルセルゲノミクス研究会2022(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋 和利
2. 発表標題 分化多能性を規定する翻訳制御機構
3. 学会等名 日本再生医療学会第3回科学シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高橋 和利
2. 発表標題 非標準的翻訳の解読から細胞運命決定機構に迫る
3. 学会等名 第185回長浜バイオ大学バイオセミナー(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋 和利
2. 発表標題 Non-canonical mode of translation in cell fate decision.
3. 学会等名 The RIKEN BDR Stem Cell Seminar Series (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋 和利
2. 発表標題 Context-dependent roles of NAT1 in stem cells.
3. 学会等名 The 18th Stem Cell Research Symposium (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋 和利
2. 発表標題 多能性幹細胞を規定する分子機構
3. 学会等名 医学研究の最先端セミナー (招待講演)
4. 発表年 2023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
研究 分担者	岩崎 未央  (Iwasaki Mio)  (10722811)	京都大学・iPS細胞研究所・講師    (14301)	

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
---------	---------