

令和 2 年 5 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19549

研究課題名(和文) ノンコーディングRNAから明らかとなる新規ユビキチン様タンパク質と皮膚疾患

研究課題名(英文) Novel ubiquitin-like protein encoded by long non-coding RNAs

研究代表者

松本 有樹修 (Akinobu, Matsumoto)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号：60741519

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：われわれは、long non-coding RNAとして報告されていたRNAから翻訳される新規タンパク質を同定した。このタンパク質は哺乳類から鳥類まで幅広く保存され、皮膚特異的に発現しており、ユビキチン様ドメインを持っていた。この新規ユビキチン様タンパク質がケラチノサイトにおいてどのような役割を担っているのかを明らかにするために、このタンパク質を過剰発現した細胞、及びノックアウトマウスの表皮を用いて様々な解析を行ったところ、このタンパク質は細胞周期を制御していることが明らかとなった。さらに、このタンパク質を欠損マウスでは皮膚の再生が有意に遅延することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

われわれが同定した新規ユビキチン様タンパク質は、これまでlong non-coding RNAと思われていたRNAから翻訳されていた。long non-coding RNAがタンパク質を翻訳しているということも含め、まだ未知のユビキチン様タンパク質が存在していたという発見は学術的にも意義が高い。またこの新規ユビキチン様タンパク質は皮膚の再生に重要であることが明らかとなり、臨床的な意義も高い知見である。

研究成果の概要(英文)：We have identified a novel protein that is translated from an RNA that has been reported as a long non-coding RNA. The protein is widely conserved from birds to mammals, is expressed in a skin-specific manner, and has a ubiquitin-like domain. To elucidate the role of this novel ubiquitin-like protein in keratinocytes, we analyzed the human primary keratinocytes overexpressing this protein and epidermis derived from knockout mice, and found that this protein regulates the cell cycle. Furthermore, we found that skin regeneration was significantly delayed in mice deficient in this protein.

研究分野：分子生物学

キーワード：Long non-coding RNA ユビキチン様タンパク質 皮膚

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、lncRNA と呼ばれる「200 塩基以上でタンパク質をコードしない mRNA 様の長鎖 RNA」がゲノム上に膨大に存在することが明らかとなった。しかし、lncRNA は本当にタンパク質をコードしていないのだろうか。実際には、膨大に存在する lncRNA の多くは計算式によって「non-coding」として分類されただけであり、多くの lncRNA からは 100 アミノ酸以下の小さな ORF が大量に予測される。そこで申請者らは質量分析計を用いて、lncRNA から翻訳されるポリペプチドを同定する新しい手法を確立した。さらに、質量分析計により同定された新規ポリペプチドの一つが、アミノ酸依存的な mTORC1 の活性化を制御し、筋再生を調節していることを明らかにした [Matsumoto et al., Nature 541: 228-232 (2017)]。

これら lncRNA から翻訳される新規ポリペプチド群はこれまで見逃されてきた新たな機能性の因子であり、原因不明の様々な疾患に関与している可能性が考えられる。そこでわれわれは、様々な lncRNA に関してポリペプチドを翻訳している可能性を検討したところ、ある lncRNA がユビキチン様ドメインを持つタンパク質が翻訳されることを見いだした。

まず、本当にこの lncRNA が翻訳されているのか検討を行った。新規タンパク質の同定の際には、FLAG ノックイン法が有用である。lncRNA の全長 RNA をクローニングし、推測される ORF の C 末端に FLAG 配列を挿入した発現ベクターを HEK293T 細胞に導入すると FLAG シグナルが観察されたことから、間違いなくこの lncRNA から新規タンパク質が翻訳されていることが分かった。また、ATG 配列を欠損した変異体では FLAG シグナルが完全に消失したことから、その ATG が開始コドンであることが判明した。

得られたアミノ酸配列情報をもとに、SMART アルゴリズムを用いてドメイン予測を行ってみたところ、この新規タンパク質はユビキチン様ドメインを持っていることが分かった。ユビキチンは C 末端の GG 配列を使って共有結合によりポリユビキチン化されることが知られているが、新規ユビキチン様タンパク質は GG 配列を持たないため、共有結合はできないと考えられる。そのため、分子間相互作用などによって何らかの機能を持つことなどが予測される。

さらに、何らかの疾患において新規ユビキチン様タンパク質に変異が起こってないか検討した。genomAD という 16000 人の疾患患者（様々な疾患を含む）の whole genome sequence を行ったデータベースがあるため、この情報を使い新規ユビキチン様タンパク質の ORF に変異がないか検討した。その結果、新規ユビキチン様タンパク質の 4 番のアミノ酸がある箇所に、1 塩基欠損によりフレームシフトを起こす変異があることが分かった。すなわち、この変異を持つ染色体からユビキチン様タンパク質は翻訳されない。16000 人の患者の 2 本の染色体、32000 カウントのうち、97 カウントがこの変異を持っていたため、比較的多い変異であることが分かる。genomAD のデータはどの疾患かを特定することができないため、今後どの疾患患者にこの変異が存在するか明らかにしていく必要がある。

分子機構を明らかにするために、抗 FLAG 抗体による免疫沈降とプロテオーム解析により、結合タンパク質を同定した。新規ユビキチン様タンパク質は非常に多くのタンパク質と結合していたが、そのうち最も強い結合を示したのが Filaggrin であった。Filaggrin は表皮のマーカーとしても使われる分子であり、ヒトのアレルギー性皮膚炎や魚鱗癬などの疾患に関与していることが知られている。今後、新規ユビキチン様タンパク質が、Filaggrin になんらかの影響を与えていないかを検討していく必要がある。

2. 研究の目的

新規ユビキチン様タンパク質は皮膚の表皮に高発現していることから、この新規ユビキチン様タンパク質が表皮分化に重要なのではないかと仮説を立て、この仮説を検証することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

CRISPR/Cas9 システムを用いてノックアウトマウスの作製を行う。上記のヒトで見つかった変異と同様の 1 塩基の欠損を導入することにより、RNA の発現には影響を与えず、ユビキチン様タンパク質の発現のみを欠損させる。ノックアウトマウスの表現型を解析することより、新規ユビキチン様タンパク質が表皮分化に重要なのであるか検討する。

4. 研究成果

ノックアウトマウスの作製を行ったが、残念ながらこのマウスは表皮の分化異常などの劇的な表現型は示さなかった。そこで、この新規ユビキチン様タンパク質がケラチノサイトにおいてどのような役割を担っているのかを明らかにするために、ヒト正常ケラチノサイトの初代培養細胞にこのタンパク質を過剰発現した細胞、及びノックアウトマウスから採取した表皮を用いて、それぞれ RNA-seq 解析を行ったところ、細胞周期が変化している可能性が示唆された。そこで、ノックアウトマウスからケラチノサイトの初代培養細胞を作製し、BrdU アッセイにより新規ユビキチン様タンパク質の細胞周期への影響を評価した。その結果、過剰発現細胞では細胞周期の亢進、ノックアウト細胞では細胞周期の遅延が認められた。また、RNA の二次構造などによる RNA としての機能の影響を除外するために、RNA の二次構造は変化するが翻訳されるタンパク質のアミノ酸配列は変わらない配列を *in silico* で予測し、ケラチノサイトの初代培養細胞にその人工配列を過剰発現したところ、RNA の二次構造とは関係なく、タンパク質のア

ミノ酸配列依存的に細胞周期の亢進が認められた。次に、ノックアウトマウスに皮膚傷害を誘導して、その後の再生を経過観察してみたところ、新規ユビキチン様タンパク質を欠損した皮膚では皮膚の再生が有意に遅延していることが明らかとなった。この再生の遅延はケラチノサイトの増殖の低下に起因するものであると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsumoto A, Nakayama KI.	4. 巻 18;43(1)
2. 論文標題 Hidden Peptides Encoded by Putative Noncoding RNAs.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Struct. Funct.	6. 最初と最後の頁 75-83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1247/csf.18005	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 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松本 有樹修
2. 発表標題 Long non-coding RNAから翻訳される機能性ポリペプチド群の同定
3. 学会等名 日本筋学会第4回学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本 有樹修
2. 発表標題 Functional polypeptides encoded by putative long non-coding RNAs
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
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
---------------------------	-----------------------	----