

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17834

研究課題名（和文）iPS細胞特異的なRNA修飾を介した転写後制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of stem cell-specific post-transcriptional regulation

研究代表者

余越 萌（Yokoshi, Moe）

東京大学・定量生命科学研究所・助教

研究者番号：80791938

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、幹細胞特異的なRNAのメチル化制御機構の分子基盤を確立することを目的とした。ヒトiPS細胞とES細胞、ヒト線維芽（HDF）細胞を用いて、Ribosome Profiling法を行った結果、幹細胞で特異的に翻訳活性の高い遺伝子は、主にRNA代謝に関わる遺伝子であることを明らかにした。さらに、RNAi screeningの結果、RNA修飾に関わる遺伝子が幹細胞の機能に重要である可能性が示唆された。よって、同定したRNA修飾関連タンパク質が結合すると予想されるsmall RNAの発現量を確認したところ、HDF細胞と比較して幹細胞で5倍以上高発現していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、翻訳活性型リボソーム結合mRNAとRNAメチル化修飾の解析という新しい二方向のアプローチから統合的に幹細胞特異的な転写後制御機構を明らかにすることを目指しており学術的意義の高い研究内容であると考えられる。本研究を通じて、幹細胞での転写後制御機構の役割を解明し、将来的に神経難病における幹細胞レベルでの転写後制御機構の異常が同定されれば、mRNA代謝異常で引き起こされる疾患の研究分野全体に大きく貢献でき、社会的にも高い意義を持つものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to establish a molecular basis for the regulation of stem cell-specific RNA methylation. Ribosome Profiling in human iPS and ES cells and human fibroblast (HDF) cells revealed that the genes that are specifically translationally active in stem cells are mainly those involved in RNA metabolism. Furthermore, the results of RNAi screening suggest that genes involved in RNA modification may be important for stem cell function. Therefore, we confirmed the expression level of small RNA, which is expected to be bound by the identified RNA modification-related proteins, was more than 5-fold higher in stem cells than in HDF cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：転写後制御 幹細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト iPS 細胞を用いる再生医療は、実用化に向け iPS 細胞の大量生産、及び標的細胞への分化誘導効率の向上が急務である。しかしながら、現在でもヒト iPS 細胞の樹立効率は 1% 程度と低く、分化誘導効率も神経系の運動ニューロンなどでは 20~30% に留まっているのが実情である。その大きな要因として、iPS 細胞への初期化機構や多能性維持、分化誘導機構の全容が未だ不明瞭である点が挙げられる。これまでの幹細胞研究においては、iPS 細胞への初期化が 4 つの転写因子によって誘導されることから、主に転写制御の研究に焦点が当たっていた。特に、DNA のメチル化は高い幹細胞特異性を示し、未分化細胞と分化細胞では修飾パターンが全く異なることが報告されている。しかしながら、mRNA 代謝制御などの転写後制御機構と細胞分化の関わりについては、明らかにされていない。

近年の網羅的な全転写産物解析とタンパク質発現解析の研究から、RNA の転写量とタンパク質の発現量が相関しないケースが多々報告されており、転写後の翻訳制御システムの重要性が認識されつつある (Schwanhäusser B. et al., Nature, 2013)。さらに、網羅的シーケンス技術の向上により、mRNA のメチル化修飾が次々と発見され、新しい転写後制御機構として世界中で研究が加速している (Dominissini D. et al., Nature, 2012)。例えば、N6-methyladenosine (m6A) と呼ばれるアデノシンのメチル化が mRNA に高頻度存在し、m6A が mRNA の安定性や翻訳効率を制御していることが報告されている (Meyer KD et al., Cell, 2015, 図 1)。また、マウスの ES 細胞においては、m6A-RNA メチル化酵素を欠損させた場合、超多能性を獲得することが報告され、m6A が幹細胞の多能性に関与していることが強く示唆されている (Shay Geula et al., Science, 2015)。しかしながら、どんな遺伝子の、どこ mRNA メチル化部位が幹細胞機能において重要であるかといった詳細は未だ明らかにされていない。そこで、申請者は、mRNA のメチル化を介した転写後制御機構がヒト iPS 細胞で特異的に存在し、幹細胞維持に寄与しているのではないかと考え、本提案研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、転写後制御、特に新しい転写後修飾として近年発見された mRNA のメチル化に着目する。mRNA のメチル化は、翻訳効率を精密に制御しているが、幹細胞での役割はほとんど未解明である。そのため、翻訳活性型及びメチル化 mRNA を網羅的にシーケンスすることによって、iPS 細胞特異的な mRNA のメチル化制御機構の分子基盤情報を確立することを目的とする。本研究の結果は、幹細胞維持の基礎生物学的な理解にとどまらず、iPS 細胞及び幹細胞特異的な転写後 RNA 修飾機構という新たな研究分野の開拓に繋がることも期待できる。

3. 研究の方法

本研究計画は、ヒト iPS 細胞において mRNA のメチル化修飾を介して翻訳が活性化している遺伝子を網羅的に同定する。その後、幹細胞の未分化維持に関わる可能性がある候補遺伝子の mRNA メチル化における、iPS 細胞への初期化や分化制御機構への寄与を明らかにする。

- (1) リボソームプロファイリング法による iPS 細胞特異的な翻訳活性型 mRNA の回収
- (2) メチル化 RNA 認識抗体を用いた iPS 細胞特異的なメチル化 mRNA の回収
- (3) 次世代シーケンサーを用いた網羅的シーケンスと幹細胞機能に関わる候補遺伝子の選定
- (4) 候補遺伝子の発現変動や人工メチル化 mRNA の作製・導入による iPS 細胞への影響の検討
- (5) iPS 細胞から運動ニューロンへの分化過程における mRNA 修飾変化の実験的検証

4. 研究成果

mRNA に結合するリボソームの密度を定量することで、翻訳活性型 mRNA を網羅的に同定できるリボソームプロファイリング法をヒト iPS 細胞で確立した。まず、培地中にタンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドを加えてリボソームを mRNA 上に固定させた。そして、細胞溶解後、RNA 分解酵素 (RNase) 処理で RNA を断片化した。その後、リボソームに結合する RNA を抽出・精製して、RT-PCR を行い、網羅的シーケンス可能な cDNA ライブラリーを作製した。同様の操作を iPS 細胞への初期化前の HDF 細胞においても遂行した。

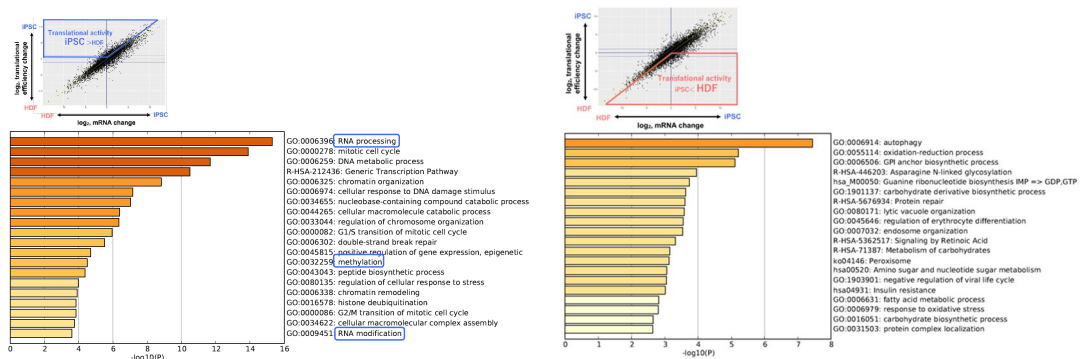


図 1 iPS 細胞で特異的に翻訳活性の高い遺伝子は、主に RNA 代謝に関わる遺伝子である

その結果、iPS 細胞で特異的に翻訳活性の高い遺伝子は、主に RNA 代謝に関わる遺伝子であることを明らかにした(図 1 左)。一方で、HDF 細胞では全く異なる遺伝子群が翻訳活性化していることが分かった(図 1 右)。

次に、候補遺伝子を絞るために RNAi screening を行ったところ、146 つの候補遺伝子のうち、42 つが iPS 細胞で有意に細胞死を引き起こすことが明らかになった。その中には、tRNA や rRNA のメチル化酵素が多く含まれており、RNA 修飾に関わる遺伝子が iPS 細胞の機能に重要である可能性が示唆された。今回は、最も iPS 細胞特異的に細胞死を引き起こした 2 つのタンパク質 FBL と NOP56 に着目した(図 2)。両者とも C/D box snoRNA 結合タンパク質として知られている。snoRNA は、主に核内に局在する小型のノンコーディング RNA の一種で、C/D box 型と H/ACA 型の 2 種類が存在する。哺乳類のほとんどの snoRNA は転写物のイントロン内にコードされており、遺伝子発現に重要な役割を果たしている。また、RNA 修飾にも重要な役割を果たしており、最近では mRNA の選択的スプライシングを制御していることが報告されている。そこで、次に候補遺伝子 146 つのイントロン領域に snoRNA がコードされているか調べたところ、7 つの snoRNA を発見した。意外なことに、これらの snoRNA は全て C/D box 型であり、発現量を qPCR で確認したところ、HDF 細胞と比較して iPS 細胞で 5 倍以上高発現していることが分かった。さらに、FBL と NOP56 タンパク質も発現量が全て iPS 細胞で有意に高発現していることも確認された。

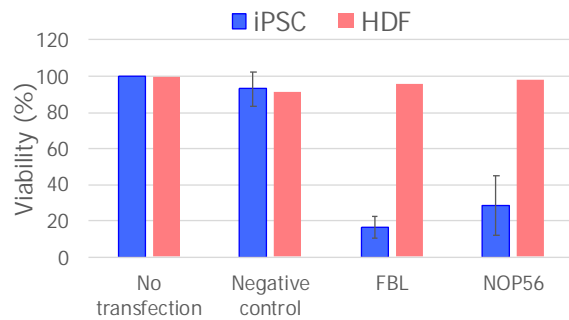


図 2 FBL と NOP56 は iPS 細胞特異的な細胞死を引き起こす

本研究を通して、幹細胞を用いたリボソームプロファイリング、RNAi screening、qPCR、ウエスタンブロットングなどの実験により、RNA 修飾に関わるタンパク質が iPS 細胞特異的に翻訳活性が上昇し、かつそのタンパク質が結合する snoRNA も発現が有意に上昇していることが明らかとなった。したがって、将来的には、RNA-seq のデータから、iPS 細胞特異的に高発現する snoRNA を網羅的に解析する。さらに、今回同定された RNA 修飾関連タンパク質と結合する snoRNA が実際にどのような種類の RNA をターゲットにして修飾を施すのかについては現在まで明確にされていない。よって、RNA 修飾の種類及び修飾部位を明らかにし、幹細胞特異的な RNA 修飾が存在するのか検討するために、メチル化 RNA の網羅的シーケンス解析を行う予定である。幹細胞特異的なメチル化部位が特定された場合、そのメチル化を欠損させた状態では、幹細胞の生存や機能にどのような影響をもたらすのか、そして、iPS 細胞の翻訳活性に変化をもたらすのかどうかを解析していく。本研究の結果は、幹細胞維持の基礎生物学的な理解にとどまらず、iPS 細胞及び幹細胞特異的な転写後 RNA 修飾機構という新たな研究分野の開拓に繋がるのが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 余越 萌, 河原行郎, 齊藤博英
2. 発表標題 mRNAの網羅的解析からアプローチする転写後調節機構
3. 学会等名 第19回 日本RNA学会年会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 余越 萌
2. 発表標題 幹細胞特異的な転写後制御機構の解明を目指して
3. 学会等名 東京大学先端科学技術研究センター システム生物学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 神経前駆細胞の選別方法	発明者 高橋淳, 森実飛鳥, 春原匡, 齊藤博英, パーカラム, 余越萌	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2017 156213	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----