

令和 3 年 8 月 16 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02707

研究課題名(和文) 脳・神経疾患に関与する新規ポリペプチド群の解析

研究課題名(英文) Analysis of novel polypeptides involved in brain and neurological diseases

研究代表者

松本 有樹修 (Matsumoto, Akinobu)

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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：Long non-coding RNA(lncRNA)はその定義によるとタンパク質をコードしないRNAであるが、われわれはこれまでにlncRNAから翻訳される新規ポリペプチドを同定し、それらが重要な機能を持つことを明らかにした。本研究課題では、脳特異的に発現して、自閉症や鬱病などで発現が変化しているポリペプチドの焦点を当てて解析を行なった。本研究期間中に、これら新規ポリペプチドのタグノックインマウスを作製して、内在性の発現の証明や結合タンパク質の同定などを行い、さらにノックアウトマウスを作製して様々な行動異常を示すことなどを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Long non-coding RNA(lncRNA)はその定義によるとタンパク質をコードしないRNAであるが、われわれはこれまでにlncRNAから翻訳される新規ポリペプチドを同定し、それらが重要な機能を持つことを明らかにした。本研究課題では、脳特異的に発現して、自閉症や鬱病などで発現が変化しているポリペプチドの焦点を当てて解析を行ない、マウスにおいてそれらを欠損すると社会行動の変化などを引き起こすことなどを明らかにした。これらlncRNA由来の新規ポリペプチドという全く新しい因子の解析により、新たな治療法の開拓へとつながる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Long non-coding RNAs (lncRNAs) are RNAs that do not encode proteins by definition, but we have identified novel polypeptides translated from lncRNAs and shown that they have important functions. In this project, we focused on polypeptides that are expressed specifically in the brain and whose expression is altered in diseases such as autism and depression. During this research period, we generated tag knock-in mice of these novel polypeptides to prove their endogenous expression and to identify their binding proteins, and also generated knock-out mice to show various behavioral abnormalities.

研究分野：分子生物学

キーワード：Long non-coding RNA ポリペプチド 脳・神経疾患

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

近年、long non-coding RNA (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。そこでわれわれ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、質量分析解析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 にコードされるポリペプチド群は、これまで未開拓であった新しい機能因子であり、なんらかの原因不明の疾患に寄与している可能性が考えられる。これらポリペプチドの重要性をさらに示すためには、疾患との関連を見つけることが重要であり、疾患に特化したスクリーニングなどを行う必要がある。

## 2. 研究の目的

lncRNA が発見されて以来、RNA そのものが機能性を持つという仮説の元に研究が行われてきた。しかし、われわれを含むいくつかのグループにより、一部の lncRNA から機能性のポリペプチドが翻訳されていることが明らかになり、新たな研究領域が開拓された。

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。lncRNA は特に脳・神経系において多く発現していることから、本課題では脳・神経系の疾患を対象を絞り研究を進めていく。予備研究により、lncRNA にコードされる 8 個の候補ポリペプチドを同定しており、これら候補の機能解析を進めることにより、疾患との関連を明らかにしていくこととする。

## 3. 研究の方法

すでに同定していた 8 個の候補ポリペプチドは脳特異的に発現しており、自閉症や鬱病、グリオーマなどといった様々な疾患において、RNA の発現量の変化や遺伝子の欠損などが見られた。培養細胞を用いた実験により、これらポリペプチドが細胞質や小胞体、リソソーム、核などといった非常に多様な細胞内局在を示すことを明らかにしていた。

本課題ではさらにそれらの解析を進めるために、モノクローナル抗体の作製やタグノックインマウスの作製による内在性の発現の確認や、質量分析計を用いた結合タンパク質の同定、さらにノックアウトマウスを作製して、RNA-seq 解析や網羅的行動解析などの様々な表現型解析を行なった。

## 4. 研究成果

### 内在性の発現の確認

われわれはまず、それぞれのポリペプチドに対する抗体の作製を行なった。腸骨リンパ法を用いてモノクローナル抗体の作製を行ったが、残念ながら良いクローンを得ることができなかった。そこで次にわれわれは、CRISPR/Cas9 システムを用いて、それぞれのポリペプチドの C 末端に FLAG タグ配列をノックインしたマウスの作製を行った。本研究期間において、計 4 種

のタグノックインマウスを作製し、全てにおいて内在性の発現が見られたことから、これら新規ポリペプチドが脳内でも間違い無く翻訳されていることを証明した。

### **結合タンパク質の同定**

これらポリペプチドの分子機構を解明するために、FLAG タグノックインマウスの脳組織や、ポリペプチドを過剰発現した HEK293T 細胞などを用いて結合タンパク質の同定を行なった。抗 FLAG 抗体による免疫沈降とプロテオーム解析により、8 種全てのポリペプチドに対して結合タンパク質の同定を行った。

多くのポリペプチドはタンパク質と弱く相互作用しており、明確な結合タンパク質を同定することができなかった。しかし、一部のポリペプチドは HDAC3 複合体などと強く相互作用しているものがあり、このようなポリペプチドはこれら結合タンパク質の機能を制御している可能性が考えられる。

### **ノックアウトマウスの作製**

CRISPR/Cas9 システムを用いてノックアウトマウスの作製を行った。ORF の翻訳開始付近に 1 塩基の欠損を導入することによりポリペプチドを欠損させ、RNA 自身に与える影響は最小限に抑えるようにし、ポリペプチドの機能特異的な解析を行なった。計 8 種の候補ポリペプチドのうち、本研究期間では 6 種のノックアウトマウスを作製した。

作製したノックアウトマウスは、全て生存可能であったことから、脳発生に著しい異常は生じていないことが考えられた。またこれらポリペプチドは脳特異的に発現しているため、他の臓器に影響が出る可能性は低い。そこで、これら全てのマウスにおいて、脳組織を取り出して RNA-seq 解析を行なった。一部のノックアウトマウスでは、様々な遺伝子の発現変化や GSEA 解析により様々なシグナルに異常が生じていることなどが分かった。

### **ヒトの自閉症患者で発言が低下するポリペプチドの解析**

ヒトの自閉症患者で発言が低下していることが分かっているポリペプチドに関して、ノックアウトマウスの網羅的な行動解析スクリーニングを実施した。残念ながら自閉症様の症状は観察されなかったが、いくつかのテストにおいて異常を示すことが分かった。RNA-seq 解析を行ったところ、有意差を持って発言が変化する遺伝子はなかったが、GSEA 解析によりシグナル経路などに変化が生じていることが分かった。

### **HDAC3 と結合するポリペプチドの解析**

これらポリペプチドのうちのひとは核移行シグナルを持ち核内に局在しており、HDAC3 複合体を形成するサブユニットの全てと非常に強く結合していた。HDAC3 はエピジェネティックな制御に関わる因子であり RNA の発現に影響するが、ポリペプチド KO マウスの脳で RNA-seq 解析を行なったところ、様々な遺伝子の RNA 発現が変化していることが分かった。また、これら発現変化が見られた遺伝子を用いて GO term 解析を行うと、synapse 形成や adult behavior などに関わる遺伝子群であることが分かった。

次に KO マウスの網羅的な行動解析を行ったところ、KO マウスは前肢の軽度な筋力低下、活動量の増加、社会性の異常、恐怖刺激に対する記憶想起の低下など、様々な異常を示すことが明らかとなった。これらの結果より、新規ポリペプチドの欠損により HDAC3 複合体の活性に障害が生じ、ヒストンアセチル化状態の変化に起因する脳内のトランスクリプトームの変化により、様々な行動異常を示すということが考えられた。新規ポリペプチドは非常に小さな分子であるにも関わらず、生理的にも重要な機能を持つことが示された。今後、ChIP-seq などを行い、より詳細な分子機構などを明らかにしていく。

## 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 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nita Akihiro, Muto Yoshiharu, Katayama Yuta, Matsumoto Akinobu, Nishiyama Masaaki, Nakayama Keiichi I.	4. 巻 34
2. 論文標題 The autism-related protein CHD8 contributes to the stemness and differentiation of mouse hematopoietic stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108688 ~ 108688
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.108688	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 Guarnerio J, Zhang Y, Cheloni G, Panella R, Katon JM, Simpson M, Matsumoto A, Papa A, Loretelli C, Petri A, Kauppinen S, Garbutt C, Nielsen GP, Deshpande V, Castillo-Martin M, Cordon-Cardo C, Spentzos D, Clohessy JG, Batish M, Pandolfi PP.	4. 巻 29
2. 論文標題 Intragenic antagonistic roles of protein and circRNA in tumorigenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Research	6. 最初と最後の頁 628 ~ 640
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41422-019-0192-1	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 Kito Yuki, Matsumoto Masaki, Hatano Atsushi, Takami Tomoyo, Oshikawa Kiyotaka, Matsumoto Akinobu, Nakayama Keiichi I.	4. 巻 10
2. 論文標題 Cell cycle-dependent localization of the proteasome to chromatin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5801
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-62697-2	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 Matsumoto Akinobu, Nakayama Keiichi I.	4. 巻 43
2. 論文標題 Hidden Peptides Encoded by Putative Noncoding RNAs	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	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5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 松本 有樹修
2. 発表標題 新規ポリペプチドによる恒常性維持機構
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本 有樹修
2. 発表標題 Long non-coding RNAの解析から明らかとなった新規ポリペプチドワールド
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本 有樹修
2. 発表標題 Polypeptides world revealed by analyses of long non-coding RNAs
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（国際学会）
4. 発表年 2019年

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

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