

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14631

研究課題名(和文) タンパク質の翻訳を促進するレトロトランスポゾンSINEの作用機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanism of action on retrotransposon SINEs that upregulate protein translation

研究代表者

高橋 葉月 (Takahashi, Hazuki)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・特別任期制研究員

研究者番号：20726012

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：SINEUPsは、アンチセンス非コードRNAであり、そこに含まれるレトロトランスポゾン遺伝子のSINEが、標的mRNAの翻訳機能を促進UPすることから名付けられた。

本研究ではこれまで未知であったSINEUPsの作用機序を解明するために、翻訳機能促進を有する20個のSINE RNAを選択し、配列や2次構造を比較した。その結果、10塩基程度の比較的短い配列や構造に類似点があることを見出した。さらに標的mRNAの翻訳機能向上に携わっている蛋白質 HNRNPKおよびPTBP1の同定を行い、それらがSINEUPの核細胞質間輸送およびSINEUPs・標的mRNAsの共局在に関与してい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

本研究では、SINEが生細胞内でSINEUPsの機能因子として働く際の作用機序を一部解明することができた。古代の外来生物から残留したガラクタ遺伝子だと認識されてきたレトロトランスポゾンが、哺乳類生物内で高度に保存された翻訳に関わる因子と複合体を形成し、蛋白質合成を向上しているという発見は、未知の翻訳機能のさらなる全容を明らかにするための重要な手がかりになると考える。SINEUPsは、蛋白質が正常の量発現しないことが原因で発症する希少疾患やハプロ不全型病の治療を目指した開発が進められている。そのため、本研究から得られた結果は、今後の基礎研究のみならず、応用研究の礎になる成果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：SINEUPs are antisense long noncoding RNAs contain retrotransposon SINE that UP regulate translation of target mRNAs.

In order to understand the mechanisms of action on SINEUPs, I selected 20 kinds of SINE RNAs and compare the sequences and secondary structures. As a result, I found that there are around 10 nucleotides similarities in the sequences and structures. Furthermore, I identified the proteins HNRNPK and PTBP1 that are involved in upregulating the translational function of target mRNAs and clarified that they are involved in nucleocytoplasmic transport of SINEUPs and colocalization of SINEUPs and target mRNAs.

研究分野：細胞分子生物学

キーワード：SINEの作用機序の特定 SINEと相互作用している蛋白質の同定 SINEの核細胞質輸送経路の特定

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年まで、レトロトランスポゾン遺伝子は、ウィルスから宿主遺伝子に寄生された「機能を持たない、または機能を失ったガラクタ遺伝子」だと思われていた。しかし、我々の研究グループは、パーキンソン発症原因遺伝子である、PARK5のアンチセンスロングノンコーディングRNA (AS-1ncRNA)内のレトロトランスポゾンSINEが、PARK5の蛋白質合成を促進するという事を、2012年に発見した[1]。そのAS-1ncRNAはストレス時に発現することが確認され、宿主が自らのゲノム内でレトロトランスポズンを発現させ、ストレス応答として機能させているという、新たな知見につながった。その後の研究の過程において、そのストレス応答はPARK5のAS-1ncRNAに限ったことではなく、他のAS-1ncRNAでも行われていることが確認された。SINEが標的mRNAの蛋白質合成をUPすることから、そのAS-1ncRNAをSINEUPsと名付けた。

我々は、合成したmRNAや他の内在mRNA蛋白質に対してもSINEUPはその翻訳を促進するかという疑問を持ち、アンチセンス領域をいくつかのmRNAに対してデザインし、その効果を調べた。その結果、ヒト細胞、ハムスター細胞、ハエ細胞、メダカの胚の実験系で、SINEUPはターゲットmRNAの蛋白質翻訳を促進した[2、3]。その結果を受け、引き続き、多くのターゲットに対してアンチセンス配列をデザインし、SINEUPを遺伝子治療や抗体産生の効率化のツールとした研究をおこなっている[4]。

以上の研究から、SINEUPが様々な蛋白質の翻訳を促進するという現象は明らかになっているが、“SINEUPがどのようにターゲット遺伝子の蛋白質翻訳を促進するのか”という大きな問いは、まだ明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、下記2つを目的とし、問いに対する答えを明らかにした。

目的1「SINEUPが蛋白質翻訳を促進するために必要な、SINEの重要部位の特定」

目的2「SINEUPと一緒に翻訳に関わっている因子の特定」

3. 研究の方法

目的1の方法として、まずSINEデータベース (<http://sines.eimb.ru/>) から、シロイヌナズナ、キャベツ、サーモン、馬、げっ歯類、ヒトから発見されたSINE配列を20個選定した。SINEは①tRNAを起源に持つもの。②7SLRNAを起源に持つもの。と、大きく2つの進化的起源に分類され、AS-PARK5に含まれるSINEB2は①に相当する。データベースにはどちらの起源かが明記されているため、今回はSINEB2と同じ①のtRNA由来のものに絞って選定した。選定したSINEをSINEUPの機能領域に、アンチセンスをGFPに対してデザインした結合領域に組み換え、それらをヒト胎児腎細胞(HEK-293T)に導入した。検出方法は、以前当研究室で開発した高スループット解析方法を応用した。さらに、翻訳促進に必要な重要部位の特定を、相同性をもつ配列の比較や、RNAの2次構造の比較を公開されているバイオインフォマティクス的手法を用いて行った。

目的2の方法として、目的1で得たSINEUPに結合する蛋白質をヒト細胞(HEK-293T)で同定した。結合する蛋白質の同定方法は、既存の方法を応用し、SINEUPに特化した方法に改良を加えた。まず、SINEUPと蛋白質の結合をUVでクロスリンクし、細胞核、細胞質をスクロースで分けた。次に、SINEUPをビオチン化したタイリングプローブに結合させ、ストレプトアビジンで捕えた。最後に結合蛋白質(RBP)のみを抽出し、理化学研究所脳科学総合研究センターが提供している、質量分析(MASS spec)解析サービスを用い、結合蛋白質の同定を行った。その後、SINEUPと蛋白質が実際に結合しているかを、結合蛋白質に対する特異抗体にて免疫沈降を行い、結合するRNAがSINEUPかを解析した。同定したSINEUP結合蛋白質が翻訳促進機能にかかわっているかを調べるため、同定した蛋白質の遺伝子に対するshRNAをデザインし、SINEUPの効果を比較した。最終的に、同定した結合蛋白質が、マウスとヒトでどのくらい保存されているかを比較した。

4. 研究成果

(1) 目的1では、シロイヌナズナ(SB4およびpSINE1)、キャベツ(SB1およびSB8)、サーモン(SmaIおよびHpAI)、馬(ERE-2)、げっ歯類(B2)、ヒト(Ther-1およびID)から発見されたSINEのセンス鎖とアンチセンス鎖の20個をSINEUP-GFPの機能領域に組み換え、以前に報告した高スループットな測定方法[5]を用い、SINEB2と比較した結果、SmaI、SB4、B2、ERE-2およびTher-1がSINEB2よりもEGFPの発現を顕著に促進した(図1)。そこで、これらのSINEの配列を、他のSINEと比較した結果、SINEUPの効果とSINEの全長配列の間に相関性を見出せなかった(図2)。さらに全長の2次構造予測にも相関性がみられなかった。これらの結果から、SINEの全長配列がSINEUPの機能に関与しているのではなく、SINEに相互作用

する他の因子が S I N E の短い配列や別の特徴（例えば短いRNA構造）を認識し、標的mRNAの翻訳を向上しているという仮説を証明するために、当初計画通り、結合因子の特定を行った。

(2) 目的2の結果として、S I N E U P に結合する蛋白質を M A S S s p e c で解析し、機能に関する因子を細胞内でノックダウン (K D) し、S I N E U P s の効果に影響を与えるかを解析した。P T B P 1 と H N R N P K の2つのノックダウン細胞では、S I N E U P - G F P の効果が、ネガティブコントロール (S C R) まで減少した (図3) [6]。また、K D の細胞では、S I N E U P が核内で発現する量が上昇し、核から細胞質に移動する量が減少した (図4) [6]。S I N E を削除した変異体でも同様な結果がみられたため、これらの結果から、S I N E U P が、P T B P 1 と H N R N P K の両方に結合することで、S I N E U P の局在を決定し、標的mRNAの翻訳を向上しているという作用機序の一部が明らかになった。さらに、S I N E U P、標的mRNA、P T B P 1 および H N R N P K が翻訳の機能に関与している因子と相互作用しているかをポリゾーム解析法で確認したところ、そのすべてがポリゾームのフラクションに共沈した [6]。

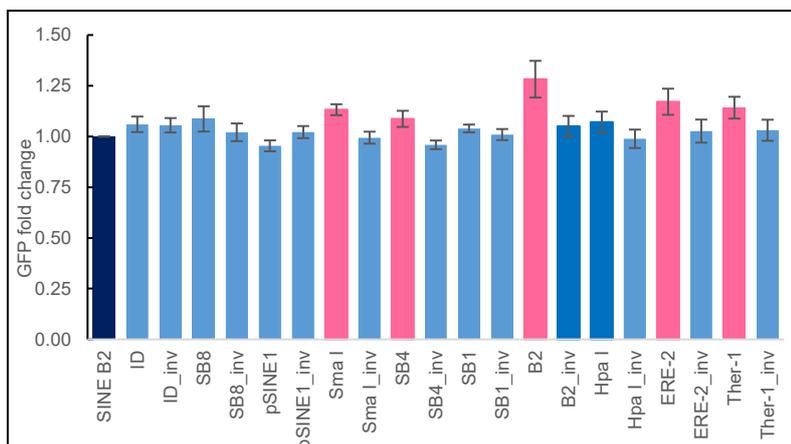


図1. S I N E の解析結果

G F P f o l d i n d u c t i o n は G F P の蛍光を全細胞数で積分した強度で算出した。n 数=3~5、inv はアンチセンス鎖を示す。

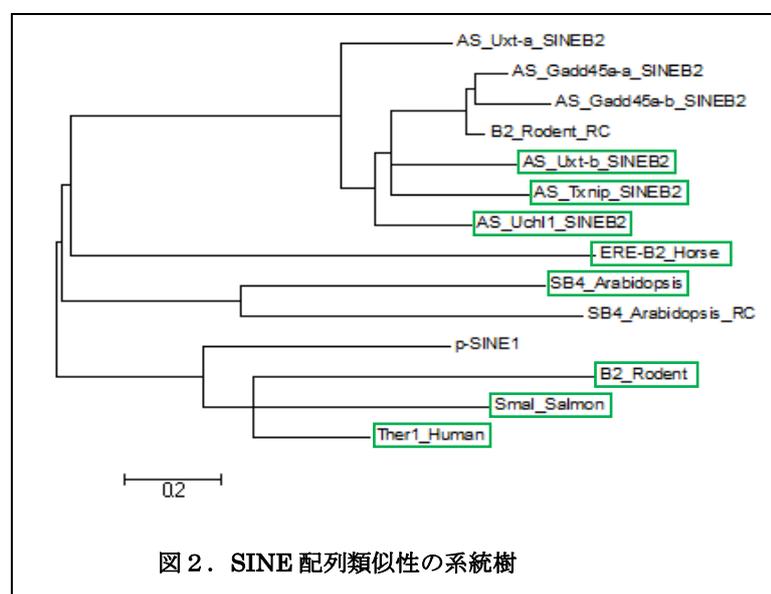


図2. S I N E 配列類似性の系統樹

P T B P 1 は以前から細胞局在に関与する蛋白質だということが知られており、ヒト、マウスで共通に発現している。さらにリボゾームに結合して、通常の翻訳ではなく I R E S の翻訳に関与することが知られている。また、H N R N P K は以前から核内でRNAのスプライシングを担っていること、細胞局在に関与する蛋白質であるということが知られている。こちらもヒト、マウスで共通に発現していることが知られている。本研究では、それらの既知の蛋白質が、ヒトの細胞内でmRNAのみならずマウス由来の非コード長鎖RNAに結合し、細胞内移動を担っているという新しい知見を生み出した。さらには、その結合はRNAの全長配列を認識しているのではなく、その中でも短い配列 (10塩基以下) を認識していることが解明された。今後は、これらの知見を基に、短い配列で形成されている S I N E の立体構造を解明し、複合体との結合を構造解析することが求められる。また、リボソームとの結合や他の翻訳因子との結合の解明も同様に求められる。

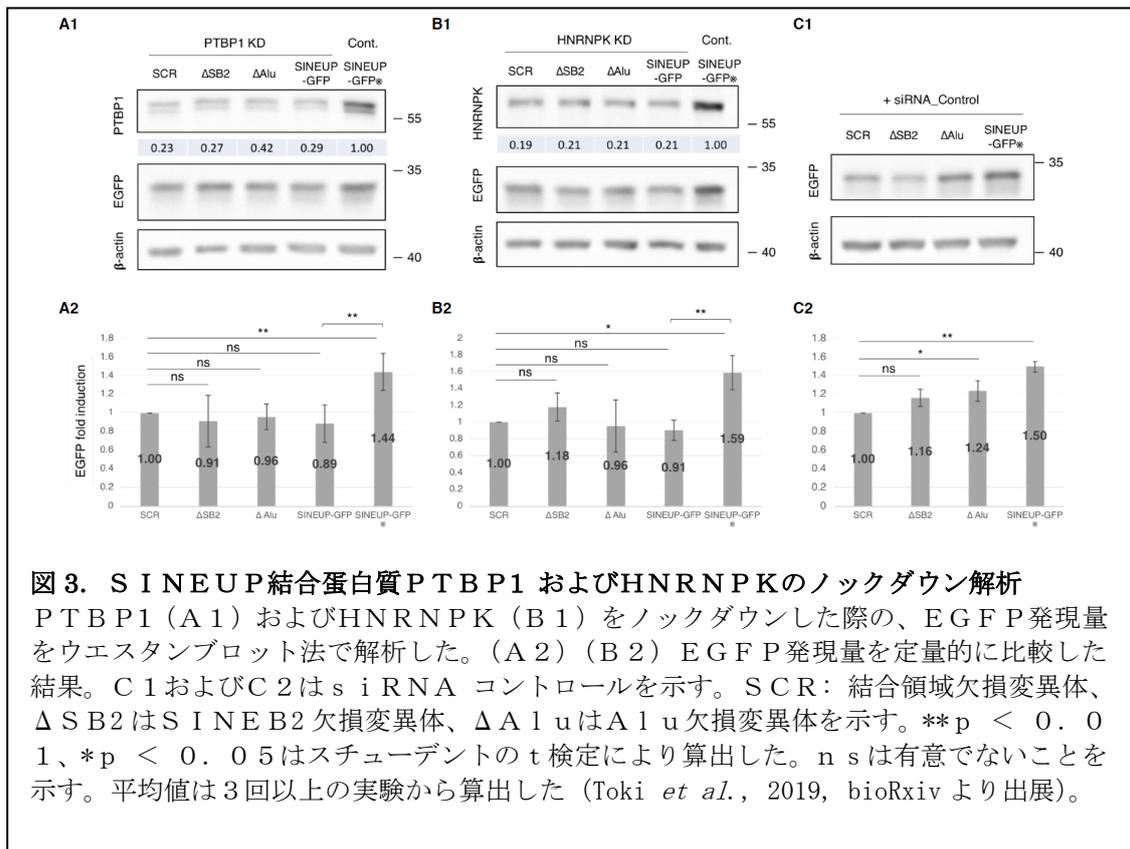


図3. SINEUP結合蛋白質PTBP1 およびHNRNP Kのノックダウン解析

PTBP1 (A1) およびHNRNP K (B1) をノックダウンした際の、EGFP発現量をウエスタンブロット法で解析した。(A2) (B2) EGFP発現量を定量的に比較した結果。C1およびC2はsiRNAコントロールを示す。SCR: 結合領域欠損変異体、ΔSB2はSINEB2欠損変異体、ΔAluはAlu欠損変異体を示す。** $p < 0.01$ 、* $p < 0.05$ はスチューデントのt検定により算出した。nsは有意でないことを示す。平均値は3回以上の実験から算出した (Toki *et al.*, 2019, bioRxiv より出展)。

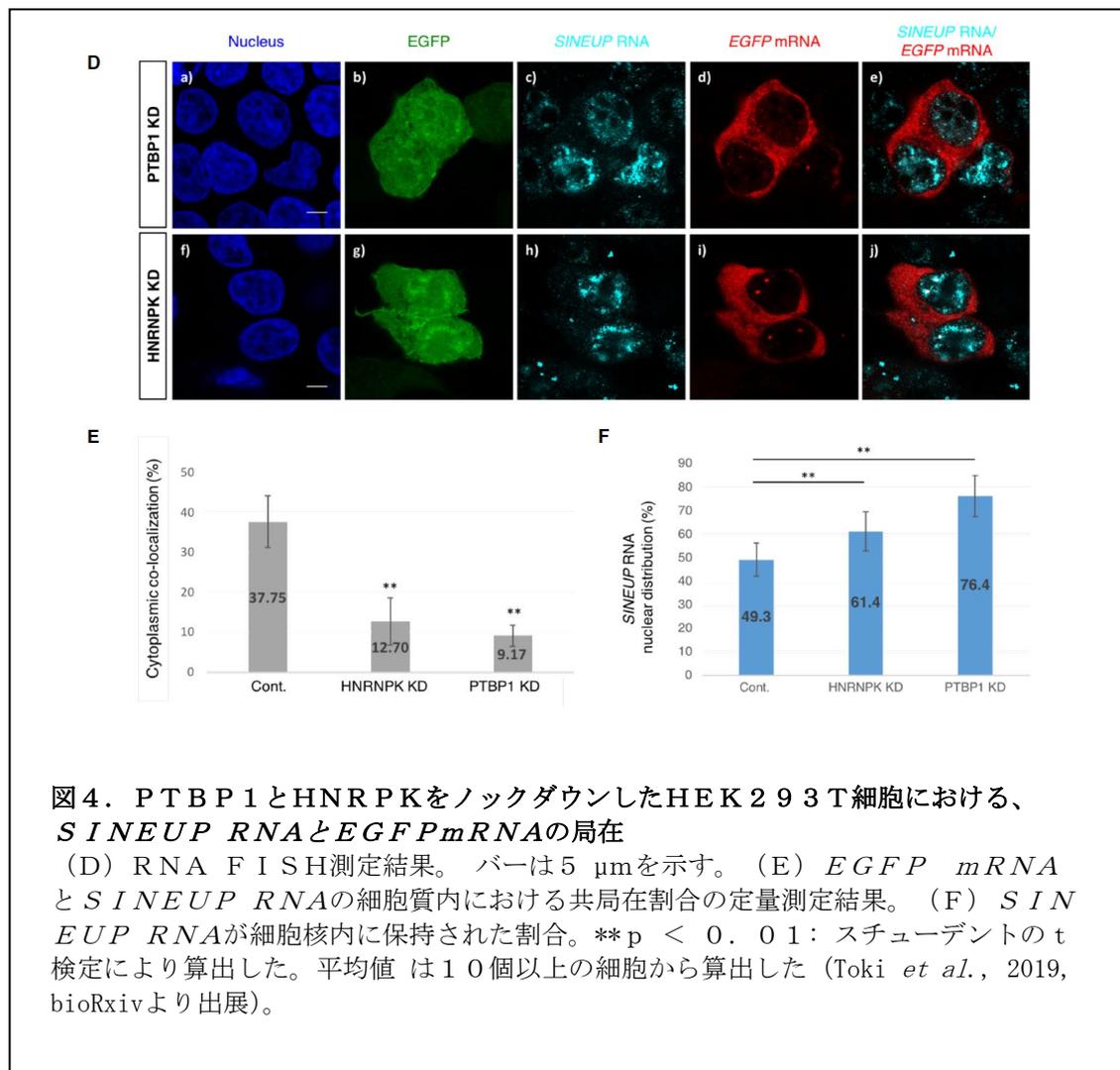


図4. PTBP1とHNRNP KをノックダウンしたHEK293T細胞における、SINEUP RNAとEGFP mRNAの局在

(D) RNA FISH測定結果。バーは5 μmを示す。(E) EGFP mRNAとSINEUP RNAの細胞質内における共局在割合の定量測定結果。(F) SINEUP RNAが細胞核内に保持された割合。** $p < 0.01$: スチューデントのt検定により算出した。平均値は10個以上の細胞から算出した (Toki *et al.*, 2019, bioRxivより出展)。

引用文献

1. Carrieri C, Cimatti L, Biagioli M, Beugnet A, Zucchelli S, Fedele S, et al. Long non-coding antisense RNA controls Uchl1 translation through an embedded SINEB2 repeat. *Nature*. 2012;491(7424):454-7. Epub 2012/10/16. doi: 10.1038/nature11508.
2. Zucchelli S, Fasolo F, Russo R, Cimatti L, Patrucco L, Takahashi H, et al. SINEUPs are modular antisense long non-coding RNAs that increase synthesis of target proteins in cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2015;9:174. Epub 2015/06/02. doi: 10.3389/fncel.2015.00174.
3. Indrieri A, Grimaldi C, Zucchelli S, Tamaro R, Gustincich S, Franco B. Synthetic long non-coding RNAs [SINEUPs] rescue defective gene expression in vivo. *Sci Rep*. 2016;6:27315. Epub 2016/06/07. doi: 10.1038/srep27315.
4. Patrucco L, Chiesa A, Soluri MF, Fasolo F, Takahashi H, Carninci P, et al. Engineering mammalian cell factories with SINEUP noncoding RNAs to improve translation of secreted proteins. *Gene*. 2015. Epub 2015/06/06. doi: 10.1016/j.gene.2015.05.070.
5. Takahashi H, Kozhuharova A, Sharma H, Hirose M, Ohyama T, Fasolo F, et al. Identification of functional features of synthetic SINEUPs, antisense lncRNAs that specifically enhance protein translation. *PLoS One*. 2018;13(2):e0183229. Epub 2018/02/07. doi: 10.1371/journal.pone.0183229.
6. Toki N, Takahashi H, Zucchelli S, Gustincich S, Carninci P. SINEUP long non-coding RNA acts via PTBP1 and HNRNPK to promote translational initiation assemblies. *bioRxiv*. 2019. doi: <https://doi.org/10.1101/664029>.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Toki Naoko, Takahashi Hazuki, Zucchelli Silvia, Gustincich Stefano, Carninci Piero	4. 巻 -
2. 論文標題 SINEUP long non-coding RNA acts via PTBP1 and HNRNPK to promote translational initiation assemblies	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 bioRxiv	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） https://doi.org/10.1101/664029	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

〔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 Hazuki Takahashi, Harshita Sharma, Silvia Zucchelli, Stefano Gustincich, Piero Carninci
2. 発表標題 Noncoding RNA “SINEs” up-regulate protein translation of target protein coding mRNA
3. 学会等名 Keystone: Long Noncoding RNAs: From Molecular Mechanism to Functional Genetics (X2) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hazuki Takahashi, Naoko Toki, Harshita Sharma, Piero Carninci
2. 発表標題 Noncoding RNA “SINEs” up-regulate protein translation of target protein coding mRNA
3. 学会等名 RNA2019 (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----