

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03418

研究課題名(和文) 多能性幹細胞におけるRNAレギュローム

研究課題名(英文) RNA regulome in pluripotent stem cells

研究代表者

山本 拓也 (Yamamoto, Takuya)

京都大学・iPS細胞研究所・准教授

研究者番号：60546993

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、ヒト体細胞とヒト多能性幹細胞を用いてRNA2次構造に着目した解析を行い、特定の遺伝子の5'UTR領域が多能性幹細胞特異的な翻訳制御に寄与していることを明らかにした。また、個々のRNAのスプライシングバリエーションごとにRNA2次構造を高精度で解析する手法を開発し、独自に構築したレポーターシステムを組み合わせて解析することによって、多能性幹細胞特異的に高い翻訳効率を示すスプライシングバリエーションを同定しそれらのRNA2次構造を決定した。また、多能性特異的なRNA 2次構造に結合しうる候補制御因子も抽出した。本研究は、転写後RNA制御ネットワーク機構と多能性維持機構の関連性を示すものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多能性幹細胞では、転写制御に関する多くの知見が得られており、転写ネットワークモデルが確立されている。しかしながら、転写後修飾、タンパク質翻訳制御までを含めたRNAの多面的制御機構に関する知見はまだ限られている。本研究では、体細胞初期化モデルを用いてRNA2次構造のプロファイルを構築することにより、タンパク質翻訳を制御するRNAの二次構造の機能解明を行い、多能性維持機構に寄与する転写後修飾および翻訳制御機構の関連性を明らかにした。つまり、細胞運命変換過程における制御機構を階層的なRNA制御機構という観点から考察するという新しい視点をもたらすことができた。

研究成果の概要(英文)：This study focused on RNA secondary structure using human somatic cells and human pluripotent stem cells and found that the 5' UTR regions of a specific gene contribute to pluripotent stem cell-specific translational regulation. Furthermore, we also developed a method to analyze the RNA secondary structure of individual RNA splicing variants with high precision. Using this method combined with our original reporter system, we identified splicing variants that show high translation efficiency only in pluripotent stem cells and determined their RNA secondary structures. We also extracted candidate regulators that could bind to the pluripotency-specific RNA secondary structures. This study demonstrates a link between the post-transcriptional RNA regulatory network and the maintenance of pluripotency.

研究分野：分子生物学

キーワード：RNA 2次構造 多能性幹細胞 翻訳制御

1. 研究開始当初の背景

生命の設計図である DNA を鋳型として合成された mRNA は、細胞内において DNA がもつ遺伝暗号を伝達する役目を果たす。mRNA の第一義的な役割は、DNA 配列情報に埋め込まれた暗号をもとに、細胞の機能や性質を司る多種多様なタンパク質を合成することである。次世代シーケンサー等を用いた網羅的解析技術の進歩により、細胞や組織で発現している mRNA の「量」を容易に測定することが可能になった。さらに、エピジェネティック制御や転写因子に関する研究により、様々な細胞での転写ネットワークが明らかになり、mRNA の発現量を規定する分子メカニズムの解明は進んでいる。また、近年では、単一細胞における mRNA の発現量もある程度正確に測定することが可能となり、mRNA の「量」という観点からは、多くの知見が得られるようになった。しかしながら、最近の研究により、細胞の初期化過程や分化過程のように細胞の状態が大きく変化する時、mRNA 自身の量の変化と mRNA を元に合成されるはずのタンパク質量の変化との相関がそこまで高くないことがわかってきた。つまり、あらゆる生命現象の根幹をなすタンパク質の発現制御を理解するためには、mRNA の「量」の変化だけでなく、mRNA の「質」の変化も理解することが必要である。細胞核内で転写された mRNA は、多くのプロセッシングを受け、機能する mRNA へと成熟する。その中でも特に mRNA の 2 次構造は、タンパク質の翻訳に大きな影響を与えることが知られている。例えば、*in silico* での RNA の 2 次構造シミュレーション解析とポリソームプロファイリングを組み合わせた研究により、スタートコドン近辺で 2 次構造をとりにくい mRNA の方が、翻訳効率が高いことが示唆されている。また、mRNA の 2 次構造によって翻訳途中のリボソームの進行が阻害され、リボソームポージングという現象が生じることも示されている。さらに、RNA の 2 次構造は、スプライシングや RNA 編集といった転写後修飾と密接に関連し、タンパク質の翻訳へ影響を与える。このように、遺伝情報をタンパク質へとつなげる発現制御機構を理解するためには、mRNA の量だけでなく mRNA がどのような立体構造で存在するのか、また、それら立体構造はどのように制御されているのかを解明する必要がある。本研究課題では、mRNA の 2 次構造といった mRNA の「質」が、どのように制御され、どのような生物学的役割を果たすのか、を明らかにすることを目指す。

2. 研究の目的

本研究の目的は、多能性幹細胞特異的な mRNA の 2 次構造を同定し、その構造がどのように制御され、どのようにタンパク質の発現制御に関連するのかを統合的に解析し(RNA レギュローム)、mRNA の「質」的制御が細胞機能に及ぼす影響を解明することである。

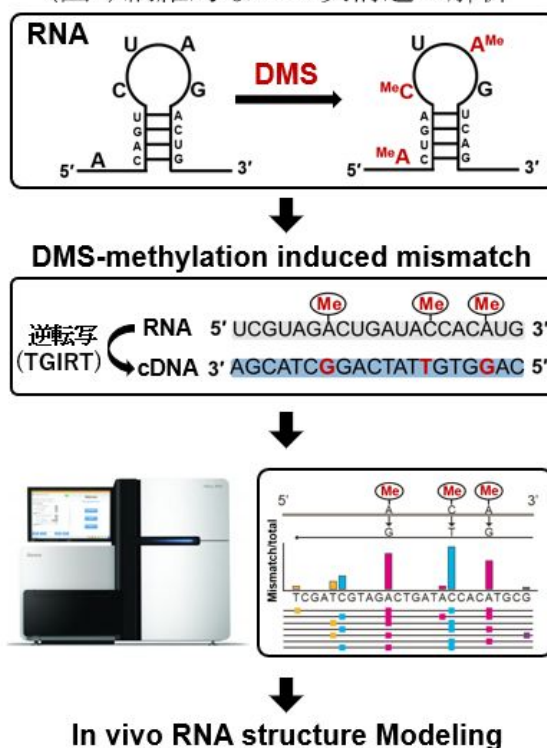
3. 研究の方法

(1) Genome wide DMS-MaPseq

化学プローブ DMS (dimethyl sulfate) は、1 本鎖のアデニン(A)およびシトシン(C)の RNA 塩基をメチル化するが、2 本鎖となっている領域の塩基に対してはメチル化を起こさない。それら 1 本鎖領域の A、C がメチル化された RNA を鋳型にして特別な逆転写酵素 (TGIRT: Thermostable Group II intron reverse transcriptase) を用いて逆転写反応を行なうと、メチル化された塩基に変異が導入され反応が続く。その後、これらの変異箇所を次世代シーケンサーで決定するこ

とによって、in vivo の細胞において RNA の 1 本鎖部分と 2 本鎖部分を同定できる (DMS-maPseq; Nat Methods 14, 75-82, 2017)。さらに、統計学的手法を駆使し、高精度な RNA 構造解析が可能となる (図 1)。

(図1) 網羅的なRNA2次構造の解析



(2) Target specific DMS-MaPseq

(1) で述べたゲノムワイドな mRNA の二次構造の解析では、mRNA のスプライシングバリエーションごとについて、mRNA の二次構造を決定するのが難しい。なぜなら、ショートリードによる配列決定では、決定されたリードがどのスプライシングバリエーション由来であるのかを同定するのが困難な場合が多いからである。そこでタンパク質翻訳へ影響を与える RNA の 2 次構造をより精度高く解析するため、分子バーコード (UMI: Unique Molecular Identifier) とターゲットシーケンシングを用いた改良版 DMS-MaPseq 法を確立した。この手法により、ランダムに切断したショートリードを用いた解析では不可能であった細胞内の RNA の数百 bp にわたる非翻訳領域の RNA 二次構造に関して、スプライシングバリエーションを区別しながら高精度で決定でき、体細胞と多能性幹細胞で翻訳効率変わる遺伝子の RNA の二次構造の違いを見出すことが可能となる (図 2)。

(3) 非翻訳領域の機能実験

a. Reporter assay

GFP 遺伝子上流に特定のスプライシングバリエーションの 5' 非翻訳領域をつなげ、多能性幹細胞特異的なタンパク質の翻訳に重要である 5' 非翻訳領域を明らかにする。

b. shRNA (small hairpin RNA)

各スプライシングバリエーション特異的な機能阻害実験により、どのスプライシングバリエーションの 5' UTR が多能性幹細胞特異的なタンパク質の翻訳に必須であるのかを調べることができる。

4. 研究成果

(1) 網羅的な二次構造の解析

研究の方法(1)で述べたゲノムワイドな DMS-MaPseq を含め、細胞内で mRNA の 2 次構造を同定する手法の確立を目指した。まず、DMS だけでなくさまざまな化学プローブを用いて検討した。その結果、DMS (dimethyl sulfate) 処理により、A および C の塩基で高い変異率を示すこと、既知の RNA2 次構造が再現よく同定できることが明らかとなり、DMS が体細胞初期化前後の細胞内における 2 次構造を同定するのに最適であることを示した。また、次世代シーケンサーを用いた網羅的解析手法を確立し、複数の多能性幹細胞株 (iPS 細胞、ES 細胞) での RNA2 次構造の同定を行った。結果、複数の遺伝子の非翻訳領域に、多能性幹細胞特異的な RNA2 次構造が存在し、その 2 次構造がタンパク質翻訳へ影響を与える可能性があるこ

とが示唆された。また、それらの多能性幹細胞特異的な RNA2 次構造はスプライシング制御とも密接に関連することも明らかとなった。

(2) RNA methylation と RNA 二次構造との相関関係の検討

N6-methyladenosine (m6A) は最も豊富に存在する RNA 修飾で、RNA 二次構造をほどくことで RNA 結合タンパク質が RNA の結合を制御することが報告されている (Nature 518, 560-564, 2015)。そこで、m6A の修飾がつく RNA の箇所と二次構造の相関性を網羅的に調べるために、既に公開されているヒト多能性幹細胞の m6A と RNA の二次構造の関連性を調べた。その結果、m6A の周辺部位および全体の DMS による変異率にはほとんど差が見られなかった。このことは、m6A と RNA2 次構造には、大きな関連性がないことを意味する。

(3) 転写後修飾を受ける遺伝子群の同定

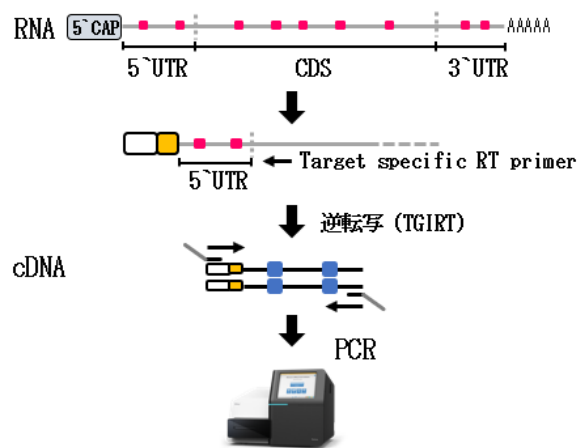
転写後修飾によって発現が制御されていると予想される遺伝子を同定するために、ヒト体細胞と多能性幹細胞において、RNAseq および質量分析を用いて mRNA とタンパク質の発現プロファイリングを取得し、RNA の発現変動率よりタンパク質の発現変動率が高い遺伝子群を調べた。特に、多能性幹細胞でタンパク質の発現レベルが高いが、RNA の発現は体細胞と比べてほとんど変化しない遺伝子らに着目した。候補遺伝子群を用いてエンリッチメント解析を行った結果、transcription and export (TREX) complex の構成因子である、TH0 complex の関連遺伝子が濃縮されていることを見出した。

(4) 非翻訳領域の二次構造の解析

(3)で見出した TH0 complex の中で、特に THOC5 がもっとも著しい変化を見せたため、THOC5 に着目して研究を行った。まず、THOC5 は、どのようなメカニズムで多能性幹細胞において、タンパク質のみの発現量を増加させるのかを検討した。タンパク質分解、mRNA の局在、polyA の長さ、等さまざまな観点から調べた結果、THOC5 の 5' 非翻訳領域が、多能性幹細胞で高い発現を示す原因となっていることが明らかとなった。さらに、THOC5 には 4 種類のスプライシングバリエントが報告されており、どのスプライシングバリエントが翻訳に重要であるのかを調べた。shRNA (small hairpin RNA) を用いた発現抑制実験および GFP レポーター

アッセイを行った結果、2 つのスプライシングバリエント (v2 と v4) の 5' 非翻訳領域が翻訳に重要であることを見出した (図 3、左)。次に、研究の方法の(3)で述べた Target specific DMS-MaPseq を用いて体細胞と多能性幹細胞における THOC5 のスプライシングバリエントの 5' 非翻訳領域の二次構造の解析を行い (図 2)、2 次構造が変化することを見出した。次に、バイオインフォマティクス的手法を駆使して、RNA 結合タンパク質 (RBP) の結合モチーフの同定を試

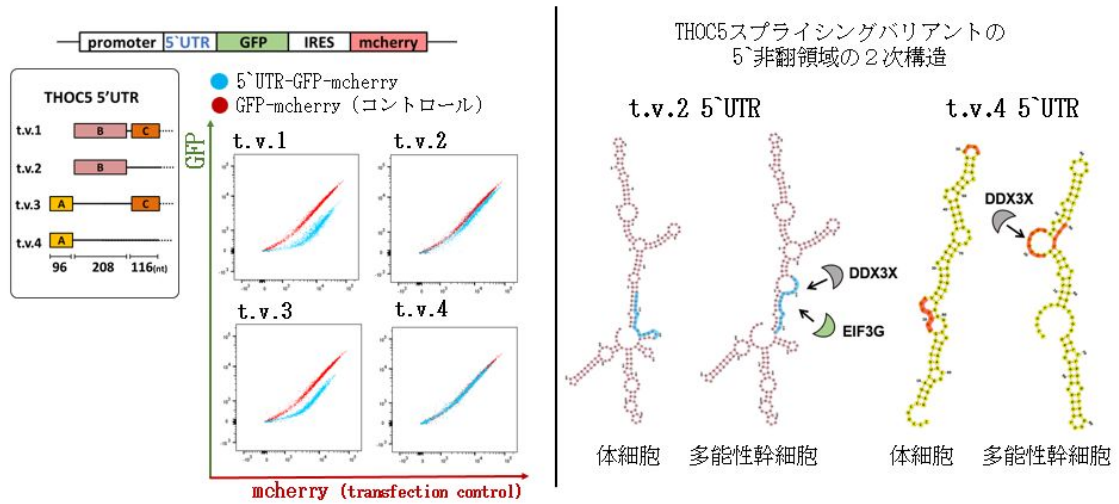
(図2) ターゲットシーケンシを用いた 5' 非翻訳領域の RNA 二次構造の解析



- DMSによりメチル化された塩基(A又はC)
- メチル化された塩基によって導入された変異
- 分子バーコード

み、多能性幹細胞特異的にタンパク質翻訳に影響を及ぼす制御候補因子を同定した(図3、右)。この結果は、多能性幹細胞特有のRNA2次構造により、多能性幹細胞特異的なタンパク質翻訳制御が存在することを示唆する。以上より、本研究は、転写後RNA制御ネットワーク機構と多能性維持機構の関連性を示すものである。

(図3)5'非翻訳領域のレポーターアッセイと二次構造の解析



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山本拓也
2. 発表標題 多能性幹細胞における転写後制御機構
3. 学会等名 第41回 日本炎症・再生医学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takuya Yamamoto
2. 発表標題 RNA secondary structure dynamics during somatic cell reprogramming
3. 学会等名 The 43rd Annual Meeting of the MBSJ（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本拓也
2. 発表標題 RNA secondary structures and translational regulation in pluripotent stem cells
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021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
---------	---------