

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11770

研究課題名(和文)新規noncoding RNA-L-ISTによるSeP翻訳制御メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of SeP translational regulation mechanism by novel noncoding RNA-L-IST-

研究代表者

三田 雄一郎 (Mita, Yuichiro)

同志社大学・生命医科学部・助教

研究者番号：70609122

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)：Se含有タンパク質Selenoprotein P(SeP)には内在性antisense RNAであるL-ISTが存在する。SePを発現しているHepG2細胞にL-ISTを過剰発現させると、mRNA量非依存的にSePタンパク質が減少した。そのメカニズムとして、L-ISTがSeP mRNAとSBP2との結合を阻害し、その結果、mRNAに結合しているリボソーム量が減少することによって、翻訳段階を特異的に阻害していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SePは糖尿病や肺高血圧症を悪化させる因子であることが明らかにされている。そのため、SePを減少させることは、これらの疾患の新たな治療標的になりうると考えられる。L-ISTは、SeP mRNA量非依存的にSePタンパク質量を減少させることができる。そのため、SePの翻訳制御が新たな治療標的として有望であると考えられる。また、Se含有タンパク質の翻訳制御メカニズムは現在でも詳細が明らかになっていない。今回新たに同定したL-ISTによるSeP翻訳抑制メカニズムは、Se含有タンパク質の翻訳制御メカニズムに新たな視点を提示できたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Se-containing protein Selenoprotein P (SeP) has an endogenous antisense RNA, L-IST. overexpression of L-IST in HepG2 cells, which cells express of SeP, decreased SeP protein independent of an mRNA expression level. It is clear that L-IST inhibits the binding of SeP mRNA to SBP2, resulting in a specific inhibition of the translation step by reducing the amount of ribosomes bound to the mRNA.

研究分野：糖尿病

キーワード：Selenoprotein P SECIS noncoding RNA 翻訳

1. 研究開始当初の背景

微量元素の1つである Se は人間の体内に約 13 mg しか含まれていないが、Se が欠乏すると重篤な心筋症を引き起こすことや、免疫の異常、がんの発症リスクが増加することが知られている。一方で、Se を過剰に摂取することで糖尿病の発症リスクの増加や神経障害などの過剰症が起こる。生体内における Se の至適濃度の範囲は非常に狭く、Se のホメオスタシスの維持は生体機能・生命の維持に重要な役割を担っている。

25 種類存在する Se 含有タンパク質の 3'非翻訳領域(3'UTR)には、ヘアピン構造をとる Sec 挿入配列(SECIS)と呼ばれるヘアピン構造を形成する配列が存在し、SECIS に SECIS Binding Protein 2 (SBP2)が結合することによって、通常は終止コドンとして用いられている UGA に Sec を挿入することができる。SECIS と SBP2 の結合力の強さは SECIS の立体構造に依存していることが知られている。そのため、SECIS による Sec 挿入効率、つまり、Se 含有タンパク質の翻訳効率は SECIS の配列依存的ではなく、SECIS の立体構造依存的だということが示唆されている。

2. 研究の目的

我々は、Se 含有タンパク質の一つ、Selenoprotein P (SeP)には内在性の antisense long noncoding RNA L-IST が存在することを見出した。SeP を発現している HepG2 細胞に L-IST を過剰発現させると、SeP mRNA 量非依存的に SeP タンパク質量を減少させた。本研究課題では、L-IST による SeP タンパク質減少メカニズムの解析を行った。

3. 研究の方法

ヒト肝細胞癌由来 HepG2 細胞に *in vitro* RNA 合成法によって合成した L-IST を transfection した。リボソームと mRNA の結合の変化は、スクロース濃度勾配法をもいたポリソーム解析で解析した。*in vivo* の実験は同志社大学の動物実験審査を受けた後、動物実験倫理規定を順守して行った。

4. 研究成果

(1). L-IST による SeP タンパク質減少メカニズムの解析

L-IST を過剰発現した HepG2 細胞では、SeP タンパク質の減少が起こったが、GPx4 等の他の Se 含有タンパク質の減少は見られなかった。L-IST が転写以降の段階で SeP タンパク質を減少させているデータが得られたため、mRNA とリボソームの結合をポリソーム解析で評価を行った。その結果、L-IST を過剰発現した細胞では、リボソームが豊富に結合している領域の SeP mRNA が減少していた。一方で、Se 含有タンパク質の1つ、GPx4 は L-IST の過剰発現を行っても mRNA に結合するリボソーム量に変化は見られなかった。このことから、L-IST はリボソームと SeP mRNA の結合を阻害していることが示唆された。次に、SECIS を利用した Sec 挿入に必須の因子である SBP2 と SeP mRNA との結合を確認したところ、L-IST の過剰発現によって SBP2 と SECIS の結合が阻害された。そのため、L-IST は SeP mRNA の翻訳段階、特に SECIS と SBP2 との結合を阻害していると考えられる。

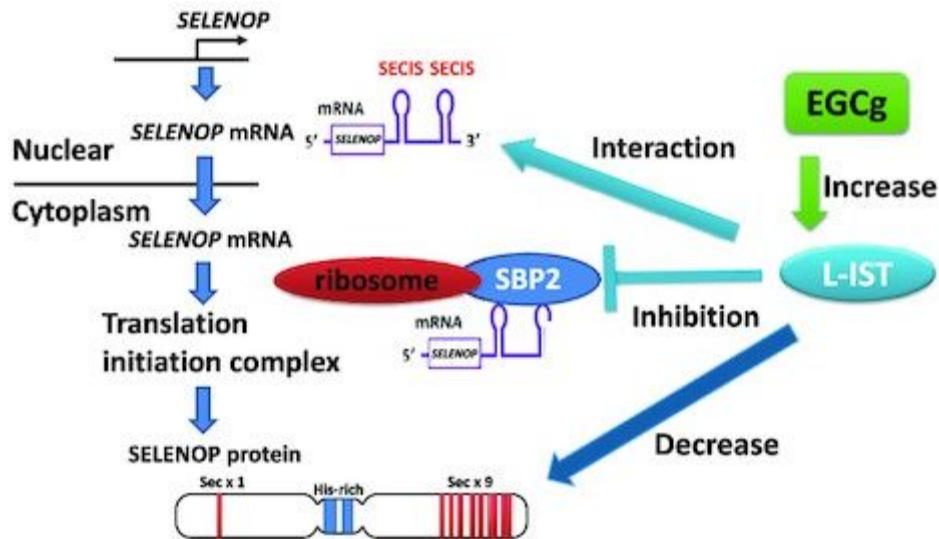
(2). L-IST の必要配列の同定

L-IST の必要配列を同定するため、SeP mRNA と相補的な領域の 5'末端側、3'末端側の欠損変異体を作製した。その結果、どちらの欠損変異体でも SeP タンパク質を減少させることができなかった。そこで、5'末端側に着目し、必要領域の同定を行った。その結果、5'側から 501-600 塩基を欠損させた L-IST には SeP タンパク質を減少させる能力がないことが明らかになり、こ

の領域に機能配列があることが分かった。

(3). L-IST の発現を増加させる物質の探索

SeP は糖尿病で増加する物質として知られている。そのため、SeP タンパク質を減少させる L-IST を増加させる物質は、糖尿病の治療薬候補として有望である。L-IST の増加を促す物質を探索した結果、エピガロカテキンガレート(EGCG)が同定された。100mg/kg の EGCG をマウスに投与したところ、血中 SeP の減少及び血糖値の減少が確認された。その際、肝臓での SeP mRNA の発現量に変化は認められず、L-IST は増加していた。そのため、血中 SeP の減少は、L-IST の増加による SeP mRNA の翻訳抑制に起因するものであることが示唆された。



図：L-IST による SeP mRNA 翻訳制御メカニズム

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Islam Md Nurul, Mita Yuichiro, Maruyama Keisuke, Tanida Ryota, Zhang Weidong, Sakoda Hideyuki, Nakazato Masamitsu | 4. 巻 244 |
| 2. 論文標題 Liver-expressed antimicrobial peptide 2 antagonizes the effect of ghrelin in rodents | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Endocrinology | 6. 最初と最後の頁 13~23 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1530/JOE-19-0102 | 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 Mita Yuichiro, Uchida Risa, Yasuhara Sayuri, Kishi Kohei, Hoshi Takayuki, Matsuo Yoshitaka, Yokooji Tadashi, Shirakawa Yoshino, Toyama Takashi, Urano Yasuomi, Inada Toshifumi, Noguchi Noriko, Saito Yoshiro | 4. 巻 49 |
| 2. 論文標題 Identification of a novel endogenous long non-coding RNA that inhibits selenoprotein P translation | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Nucleic Acids Research | 6. 最初と最後の頁 6893~6907 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkab498 | 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 Kitabayashi Nanako, Nakao Shohei, Mita Yuichiro, Arisawa Kotoko, Hoshi Takayuki, Toyama Takashi, Ishii Kiyoko, Takamura Toshinari, Noguchi Noriko, Saito Yoshiro | 4. 巻 183 |
| 2. 論文標題 Role of selenoprotein P expression in the function of pancreatic cells: Prevention of ferroptosis-like cell death and stress-induced nascent granule degradation | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine | 6. 最初と最後の頁 89~103 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.freeradbiomed.2022.03.009 | 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16件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kohei Kishi, Yuichiro Mita, Risa Uchida, Sayuri Yasuhara, Yoshiro Saito, Noriko Noguchi, |
| 2. 発表標題 Search for functional regions of L-IST necessary for suppressing SeP translation |
| 3. 学会等名 The 43th Annual meeting of the Molecular Biology Society of Japan |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 小槻 悠介, 三田 雄一郎, 野口 範子, 斎藤 芳郎 |
| 2. 発表標題 内在性L-ISTが Selenoprotein Pの発現に与える影響 |
| 3. 学会等名 生命金属に関する合同年会 (ConMetal 2020) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 三田 雄一郎, 小槻 悠介, 譚 仕強, 斎藤 芳郎, 野口 範子 |
| 2. 発表標題 過酸化水素は ATP 合成を阻害することによって Selenoprotein P の発現を減少させる |
| 3. 学会等名 生命金属に関する合同年会 (ConMetal 2020) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 北林 奈々子, 三田 雄一郎, 中尾 昌平, 斎藤 芳郎, 野口 範子 |
| 2. 発表標題 膵 細胞モデル MIN6 における Selenoprotein P 欠乏に伴う Insulin の低下メカニズム |
| 3. 学会等名 生命金属に関する合同年会 (ConMetal 2020) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 三田 雄一郎, 斎藤 芳郎, 小槻 悠介, 譚 仕強, 野口 範子 |
| 2. 発表標題 過酸化水素は ATP を減少を介して Selenoprotein P の発現量を抑制する |
| 3. 学会等名 第73回 日本酸化ストレス学会学術集会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 下村 加誉子、三田 雄一郎、野口 範子 |
| 2. 発表標題 SH-SY5Y細胞が分泌する肝細胞のSelenoprotein P発現を抑制する因子に関する研究 |
| 3. 学会等名 第74回 日本酸化ストレス学会学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kohei Matsuda, Yuichiro Mita, Takuma Kashi, Yuto Kataoka, Yoshiro Saito, Noriko Noguchi |
| 2. 発表標題 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) does not increase the unknown modification of DJ-1 in neurons |
| 3. 学会等名 The 43th Annual meeting of the Molecular Biology Society of Japan |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 三田雄一郎、斎藤芳郎、内田理沙、安原小百合、横大路将、野口範子 |
| 2. 発表標題 Selenoprotein Pの翻訳を抑制する新規noncoding RNAの同定と機能解析 |
| 3. 学会等名 第72回 日本酸化ストレス学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 三田雄一郎 |
| 2. 発表標題 Selenoprotein P を標的 と した 糖尿病 治療 |
| 3. 学会等名 Free Radical Summer School 2019 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yuichiro Mita, Nurul Islam MD, Ryota Tanida, Hideyuki Sakoda, Masamitsu Nakazato. |
| 2. 発表標題 Liver-expressed antimicrobial peptide 2 antagonizes the effects of ghrelin in rats |
| 3. 学会等名 GUTS FORUM 2019 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 三田雄一郎、斎藤芳郎、小槻悠介、横大路将、白川静乃、野口範子 |
| 2. 発表標題 糖尿病関連蛋白質Selenoprotein Pは新電子性物質によって減少する |
| 3. 学会等名 第92回日本生化学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 三田雄一郎、斎藤芳郎、中山華穂、曾谷奏、坂口理沙子、野口範子 |
| 2. 発表標題 Selenoprotein Pが引き起こすインスリン抵抗性はセレン運搬能だけでは説明できない |
| 3. 学会等名 第5回セレン研究会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 坂口理沙子、三田雄一郎、曾谷奏、斎藤芳郎、野口範子 |
| 2. 発表標題 過剰Selenoprotein PのC2C12筋管細胞におけるインスリン抵抗性増加メカニズムの解明 |
| 3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 北林奈々子、中尾昌平、三田雄一郎、野口範子、斎藤、芳郎 |
| 2. 発表標題 Selenoprotein P発現を低下した膵臓b細胞モデルMIN6の 機能障害メカニズムに関する研究 |
| 3. 学会等名 第72回 日本酸化ストレス学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 小槻悠介、三田雄一郎、野口 範子、斎藤 芳郎 |
| 2. 発表標題 Selenoprotein Pの発現に対する親電子性物質の効果 |
| 3. 学会等名 第72回 日本酸化ストレス学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 斎藤 芳郎、三田 雄一郎、堤良平 |
| 2. 発表標題 血漿セレノプロテインPによるセレン運搬機構の解析 細胞・組織移行性の違いについて |
| 3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2019 |
| 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 |
|-------------------|--|---|----|
| 研究 分 担 者 | 田所 弘子 (Tadokoro Hiroko) (10770133) | 国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・研究員 (82606) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|