

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15719

研究課題名(和文)mRNAポリA鎖の長さとの翻訳活性の相関性解析

研究課題名(英文)Correlation between mRNA poly(A) tail length and translational activity

研究代表者

尾上 耕一(Ogami, Koichi)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70796523

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): mRNAのポリA鎖の長さとの翻訳活性は正に相関すると考えられてきた。一方で近年、その相関性は発生の初期段階に限定され、その他では消失することが報告され、議論を呼んでいる。本研究では、その議論に新しい見解を与えることを目的にdirect RNA-seqとポリソーム分画を併用したポリA鎖長-翻訳の相関解析を行った。本研究では、明確に正の相関を示す335遺伝子を同定でき、それらの大多数はリソームおよびミトコンドリア機能と関連する遺伝子であることを明らかにした。さらに、5'TOP配列が大多数のmRNAにおける相関性を説明づける配列であり、RNA結合タンパク質LARP1の関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子発現の転写後における調節は、しばしばポリA鎖の分解や伸長を介してなされる。それらの分子メカニズムを理解するにあたって、ポリA鎖の長さとの相関関係の有無は最も根幹的な問いであり、慎重な検討が必要である。本研究では、相関関係の存在に否定的な最近の研究結果に概ね一致する見解が得られたが、その一方で、例外的に強い相関性を示す遺伝子群を複数同定することに成功した。本研究の結果、翻訳におけるポリA鎖の役割について、新たな問いを投げかける重要な知見が得られた。

研究成果の概要(英文): Poly(A) tail length has long been believed to correlate positively with translation efficiency. In fact, multiple studies have reported the correlation in various types of cells. However, the concept is being challenged by recent studies utilizing the next generation sequencing, all agreeing that the correlation was observed only in the early embryonic cells but absent in the later developmental stages. To address the controversy, we employed direct RNA-sequencing in the combination with polysome fraction. We have identified 335 genes in which positive correlation is evident and found that large majority of them consist of ribosome protein genes and mitochondrial function-related genes. We further found that this exceptional correlation can be explained by the presence of 5'TOP or 5'TOP-like sequences at the 5' most end of these genes and that the RNA-binding protein LARP1, which directly binds to 5'TOP sequences, is correlated with the coupling of polyA-tail length and translation.

研究分野：分子生物学

キーワード：翻訳 ポリA鎖 ナノポアシーケンサー directRNA sequencing TOP mRNA

1. 研究開始当初の背景

一部の例外を除く全ての mRNA の 3'末端には、アデニンの連続配列であるポリ A 鎖が付加されている。mRNA のポリ A 鎖の長さや翻訳活性には正の相関があると古くから考えられてきた。実際に、古典的な解析手法で個別の mRNA を対象に行われた研究では、種々の RNA 結合タンパク質がポリ A 鎖の分解や伸長を介して遺伝子発現を調節する例が多く示されてきた。しかしながら、近年の次世代シーケンサーを用いた研究では、ポリ A 鎖の長さや翻訳活性との相関関係は発生の初期のみに限定され、その後では消失することが報告された。このような結論は、これまで積み重ねられてきた転写後の遺伝子発現調節機構の解釈の根幹を揺るがすものであるが、古典的手法で得られた結果と相容れない見解が得られた理由については十分な議論がされていない。そこで本研究では、先行研究よりもバイアスの少ない方法によって最近の研究報告の蓋然性と一般性を検証することとした。

2. 研究の目的

本研究では、最近否定的な見解が発表されたポリ A 鎖の長さや翻訳活性との相関性を、ポリソーム分画とナノポアシーケンサーによる direct RNA-seq(dRNA-seq)を組み合わせる方法により再検証することを目的に開始した。

3. 研究の方法

mRNA の翻訳活性は、その結合するリボソームの数に反映される。そこで、HEK293T 細胞の細胞質抽出液をショ糖密度勾配遠心にかけ、mRNA をリボソーム非結合画分 (free)、リボソームが 1 つ結合したモノソーム画分(mono)、2~4 個結合した軽ポリソーム画分(light-poly)、5 個以上結合した重ポリソーム画分(heavy-poly)の 4 つのフラクションプールに分離した (図 1)。各プールから RNA を抽出した後、5'cap 構造に高い親和性を示す変異型 eIF4E タンパク質(eIF4E_{K119A})を用いて cap 構造をもつ RNA のみを精製した。Oxford Nanopore 社製 direct RNA-sequencing kit を用いて RNA の 3'ポリ A 鎖にアダプターを付加し、ナノポアシーケンサー MinION を用いて dRNA-seq を実施した。この方法では、5'cap による精製と 3'ポリ A 鎖へのアダプター付加を組み合わせるため、完全長の RNA のみが解析の対象となり、また、PCR による増幅を必要としないため、先行研究で用いられた方法よりも正確に翻訳-ポリ A 鎖長相関の解析ができる。得られたリードをマッピングした後、各 mRNA リードのポリ A 鎖長を推定した。一部の mRNA については、ノーザンブロッティングによるバリデーションを行った。

4. 研究成果

mRNA 種ごとのポリ A 鎖長分布の変化を表すメトリックとして、PASS(PolyA Shift Score)を定義した (図 2A)。典型的なポリ A 鎖長分布パターンから無作為に任意の数のリード抽出をそれぞれ複数回行い、PASS およびポリ A 鎖の平均長のばらつきをシミュレーションしたところ、50 リードカウント程度あれば信頼性のある結果が得られることが確認された。そこで、全てのフラクションプールにおいて 50 リードカウント以上得られた mRNA 260 種のみを対象に、free 画分との比較による PASS 計算を行った。この 260 種を、リボソームの結合数とポリ A 鎖長に正の相関が見られる "Positive linear group" と、それ以外の "Non linear group" に分類した (図 2A)。Positive linear group の遺伝子において Gene Ontology(GO)解析を実施したところ、リボソームサブユニットの遺伝子が有意に多く見出された (図 2B)。リボソームサブユニットの mRNA の 5'末端には TOP (terminal oligopyrimidine) と呼ばれる配列が存在することが知られるが、実際に Positive linear group の 5'末端配列のモチーフ解析では TOP 配列が同定され (図 2C)、TOP 遺伝子らしさをスコア化した TOP score (Phillippe et al., PNAS 2020)による判別の結果、リボソームサブユニット以外の TOP mRNA も複数含まれていることが明らかとなった。TOP 配列には RNA 結合タンパク質 LARP1 が結合することが報告されている。そこで、HEK293T 細胞における既報の LARP1 PAR-CLIP(Hong et al., eLife 2017)を再解析したところ、Positive linear group の TOP mRNA のほとんどが LARP1 の結合標的であることが判明した (図 2D)。また、興味深いことに、LARP1 は TOP mRNA のポリ A 鎖長制御に関与することをノックダウン実験により明らかにした。

図 1

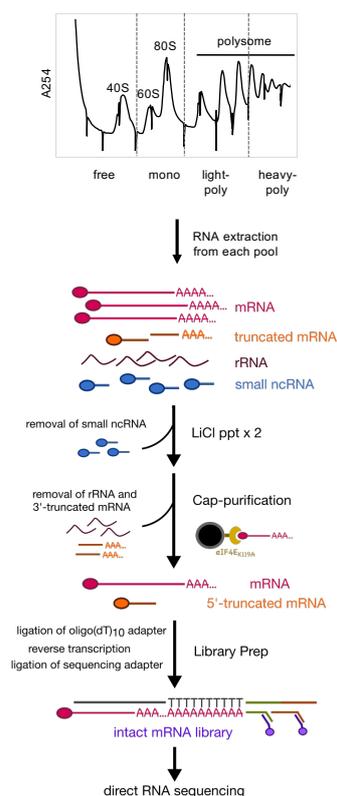
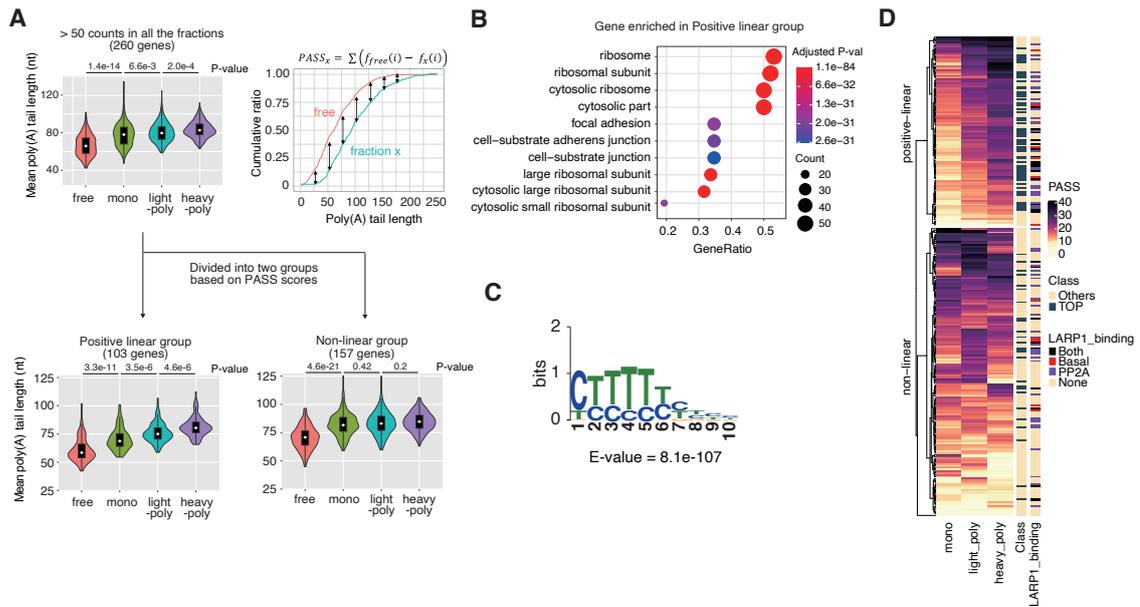
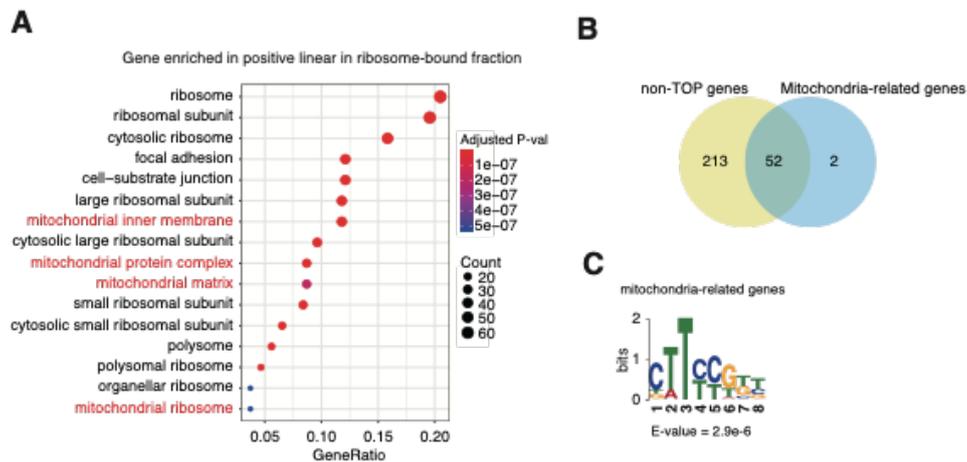


図 2



多くの mRNA 種において、free 画分におけるリード存在比率は非常に少なかった。そこで、リボソーム結合画分(mono, light-poly, heavy-poly)において>50 カウント を満たす mRNA 1,418 種を対象に、free 画分を除外して同様の解析を行った。この場合、リボソーム結合画分においてリボソームの結合数とポリ A 鎖長に正の相関を示す遺伝子は 335 種得られ、全体の 24%未満に過ぎないことが判明した。この 335 種について GO 解析を行った結果、リボソームサブユニットに加え、ミトコンドリア機能と関連する遺伝子が多く含まれていることが明らかとなった (図 3A)。TOP score による判定を行ったところ、この 335 種のうち TOP 遺伝子は 70 程度に過ぎず、ミトコンドリア機能と関連する遺伝子も TOP 遺伝子には分類されなかった (図 3B)。一方でミトコンドリア機能と関連する遺伝子の mRNA 5'末端配列のモチーフ解析を行ったところ、TOP 様の配列が有意に見出された。

図 3



以上の結果から、最近の報告と同様に、大半の遺伝子転写産物において、ポリ A 鎖長と翻訳活性との相関は認められないことが確認された。しかし一方で、TOP、あるいは TOP 様の配列をもつ mRNA では例外的に相関関係が認められることが判明した。先行研究の PAL-seq データ (Subtelny et al., Nature 2014)を再解析したところ、TOP mRNA における相関性はマウス NIH3T3 細胞においても確認できたことから、マウス細胞においても TOP mRNA のポリ A 鎖と翻訳活性相関が存在するようである。しかしながら、TOP mRNA でなぜそのような相関性が見られるのか、その理由は不明のままである。今回の解析では、LARP1 が TOP mRNA とそれ以外の挙動の違いを説明するファクターである可能性を示唆しており、さらなる研究が期待される。さらに、本研究では正の相関を示す nonTOP 遺伝子も複数得ることができた。それら nonTOP 遺伝子の間に何らかの共通した特徴があるか、今後の詳細な検討が求められる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Cheng Larry C., Zheng Dinghai, Baljinnyam Erdene, Sun Fangzheng, Ogami Koichi, Yeung Percy Luk, Hoque Mainul, Lu Chi-Wei, Manley James L., Tian Bin	4. 巻 11
2. 論文標題 Widespread transcript shortening through alternative polyadenylation in secretory cell differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-16959-2	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 Ogami Koichi, Suzuki Hiroshi I.	4. 巻 22
2. 論文標題 Nuclear RNA Exosome and Pervasive Transcription: Dual Sculptors of Genome Function	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 13401 ~ 13401
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms222413401	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10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Koichi Ogami, Yuka Oishi, Natsumi Yamaguchi, Shin-ichi Hoshino
2. 発表標題 Poly(A) tail length positively correlates with the extent of mRNA ribosome loading
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Laboratory meeting: Translational Control（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 尾上耕一、野木森拓人、大石結香、合田凌也、細田直、喜多村徳昭、北出幸夫、星 野真一
2. 発表標題 リボソームリサイクル因子ABCE1は外来性RNA分解を正に制御する
3. 学会等名 第 84 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中北侑希、尾上耕一、山岸良多、細田直、星野真一
2. 発表標題 癌抑制遺伝子産物 BTG3 による標的mRNAのポリ A 鎖制御
3. 学会等名 第 84 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石川裕之、尾上耕一、野木森拓人、星野真一
2. 発表標題 ウイルス感染時の細胞内翻訳シャットダウン機構の解明
3. 学会等名 第 84 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口奈都美、尾上耕一、細田直、星野真一
2. 発表標題 インターロイキンエンハンサー結合因子ILF3は細胞質において標的mRNAのポリA鎖を伸長する
3. 学会等名 第 84 回日本生 化学会中部支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮原彰太、尾上耕一、細田直、星野真一
2. 発表標題 翻訳終結因子eRF3によるmRNAポリA鎖分解開始のメカニズム
3. 学会等名 第 84 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村亮太、中島朋香、小林純果、志水良亮、尾上耕一、星野真一
2. 発表標題 LARP4は呼吸鎖複合体構成因子のmRNAポリA鎖伸長を制御する
3. 学会等名 第 84 回日本生化学会中部 支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中島朋香、志水良亮、尾上耕一、星野真一
2. 発表標題 RNA結合タンパク質LARP4はミトコンドリア周辺に局在する
3. 学会等名 第 84 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大石結香、尾上耕一、山口奈津美、星野真一
2. 発表標題 mRNA3'末端ポリA鎖の長さは翻訳活性と正に相関する
3. 学会等名 第 84 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 都島大知、隠岐興一、寺山七夢、中村亮太、尾上耕一、星野真一
2. 発表標題 RNA3'ポリアデニル化を制御するRNA結合タンパク質の標的 miRNAの網羅的探索
3. 学会等名 第 84 回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2020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
---------	---------