

令和 6 年 9 月 12 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02404

研究課題名(和文) Coding/Non-coding RNAの網羅的かつ精密な分類と性質の解析

研究課題名(英文) Comprehensive and precise classification and characterization of Coding/Non-coding RNA

研究代表者

松本 有樹修 (Matsumoto, Akinobu)

名古屋大学・理学研究科・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)：われわれは、Long non-coding RNA (lncRNA)の一部がポリペプチドを翻訳することを明らかにしてきた経緯から、次に真のlncRNAを同定することを目標とした。種々の翻訳プロファイリング法を用いて正確なcoding/non-coding RNAの分類が可能となり、5' capを持たないRNA群を同定した。5' cap構造を持たないが、予想に反してリボソームと相互作用が観察されたことから翻訳される可能性が示唆された。このようなRNAを人工的に発現させるレポーター系の構築を行ない、これらRNAの性質の詳細な検討が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新種のRNAを同定したことはRNAの研究領域において非常に意義が高い。またそれら新種のRNAを解析するための実験系を構築したことから、今後これらRNAの意義がさらに明らかになることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Having shown that a fraction of long non-coding RNAs (lncRNAs) translate polypeptides, we next set out to identify the true lncRNAs. Using various translation profiling methods, we were able to accurately classify coding/non-coding RNAs and identified a group of RNAs without 5' caps. Although these RNAs do not have a 5' cap structure, they were unexpectedly observed to interact with the ribosome, suggesting that they may be translated. We have constructed a reporter system to artificially express these RNAs and will be able to study the properties of these RNAs in detail.

研究分野：Long non-coding RNA

キーワード：Long non-coding RNA Coding RNA 翻訳プロファイリング

## **1. 研究開始当初の背景**

Long non-coding RNA (lncRNA) の定義は「タンパク質をコードしない 200 塩基以上の RNA」とされているが、われわれはこれまでに、lncRNA に存在する小さな ORF から翻訳される新規ポリペプチド群を同定し、それらが重要な機能を持つことを明らかにしてきた。

## **2. 研究の目的**

lncRNA から翻訳されるポリペプチドの発見により、翻訳研究の根本的な問題点が浮き彫りになった。一部の lncRNA は実際は“coding RNA”であったが、これはどのような RNA が翻訳され、どのような RNA が翻訳されないのかということの規定する原理が不明であるために、coding RNA を non-coding RNA と誤分類していたということを意味する。そこで本課題では、翻訳プロファイリング法という新技術を駆使して coding RNA/non-coding RNA の正確な分類を行い、それらの性質を解明することを目標とした。

## **3. 研究の方法**

### **翻訳プロファイリング法は翻訳の全ての段階を可視化する**

翻訳のモニターには“Ribo-seq”という手法が用いられている。リボソームが結合している部分の mRNA が RNase I によって消化されない原理に基づき、RNase I 処理後に密度勾配遠心法によりリボソームを精製して配列解析を行う。これによりリボソームが結合している mRNA (= Open Reading Frame, ORF) を定量的に測定できるようになった。しかし、Ribo-seq は ORF 領域のみの検出であり、得られる情報量は限られていた。そこで、翻訳に関わる様々なサブユニットにタグ配列をノックインした細胞を作製し、RNase I 処理後にタグ抗体で免疫沈降し、次世代シーケンサーで配列解析をすることによって翻訳の全ての過程を可視化した。本法は translation だけでなく、cap-binding や scanning も観察可能である。

実際に、HEK293T 細胞を用いて、EIF4E (cap-binding) に FLAG、EIF3D (scanning) に V5 タグをノックインして翻訳プロファイリング法を行い、translation は Ribo-seq で検出した。メタジーン解析を行ったところ、予想通り scanning は 5'UTR、translation は ORF に集積していた。

### **翻訳プロファイリング法により coding /non-coding RNA の正確な分類を行う**

既存の Ribo-seq は lncRNA が翻訳されているかの検討に有用な手法ではあるが、ノイズによる偽陽性 (non-coding RNA を coding RNA と誤同定する) が問題であった。そこでわれわれは、翻訳プロファイリング法を用いて Ribo-seq の偽陽性を劇的に減少させる手法を開発した。既知の coding 遺伝子を用いた予備解析により、scanning の波形は開始コドンの 26 nt 後ろで減少し、translation の波形は開始コドンの 12 nt 前に立ち上がるという法則が明らかとなった。また、lncRNA である Gas5 でも同様の波形が

得られたことから、Gas5 は 50 アミノ酸のポリペプチドを翻訳することが分かった。一方 lncRNA である AC011467.2 では、translation (Ribo-seq) の結果からはポリペプチドを翻訳する可能性が示唆されたが、scanning の波形はノイズのような形状を示しており、開始コドンの 26 nt 後ろで減少するという法則も観察されなかった。また、cap-binding の波形は、Gas5 と AC011467.2 の両方とも scanning と同様のパターンを示した。そこで、それぞれの予測される ORF の C 末端にタグ配列をノックインし、それらが翻訳されているかをウエスタンブロットにより確認してみたところ、予想通り Gas5 の ORF は翻訳されていたが、AC011467.2 の ORF は翻訳されていなかった。

このように翻訳プロファイリング法により精密に coding RNA と non-coding RNA の分類が可能となったことから、網羅的に coding RNA/non-coding RNA の正確な分類を行い、それらの性質を解明していく。

#### **4. 研究成果**

種々の培養細胞やマウス組織などを用いて翻訳プロファイリングを行い、それら得られた結果を元に long non-coding RNA の性質の解析を行った。この解析の結果、多くの long non-coding RNA は翻訳開始因子と相互作用しており、翻訳されている可能性が示唆された。一方で、一部の long non-coding RNA は翻訳開始因子と相互作用していなかったため、これらは真の long non-coding RNA である可能性が高いことがわかった。

それら真の long non-coding RNA 候補の様々な性質を解析する過程において、5'cap を持たない RNA 群を同定した。5'cap 構造を持たないため、当初は翻訳されていない可能性が予想されたが、予想に反してリボソームとの相互作用が観察された。一方で、翻訳開始因子との相互作用は観察されなかった。

翻訳開始因子とは相互作用しないが、リボソームとの相互作用は観察されたことから、これら RNA が本当に翻訳されないのかどうかをより正確に検討していく必要が生じたため、このような RNA を人工的に発現させるレポーター系の構築を行なった。これにより今後どのような因子がこのような特殊な RNA の産生を引き起こすのか、またこれら RNA が本当に翻訳されるのかなどの検討が可能となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ichihara Kazuya, Nakayama Keiichi I, Matsumoto Akinobu	4. 巻 173
2. 論文標題 Identification of unannotated coding sequences and their physiological functions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 237 ~ 242
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvac064	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 -

1. 著者名 Ichihara Kazuya, Matsumoto Akinobu, Nishida Hiroshi, Kito Yuki, Shimizu Hideyuki, Shichino Yuichi, Iwasaki Shintaro, Imami Koshi, Ishihama Yasushi, Nakayama Keiichi I	4. 巻 49
2. 論文標題 Combinatorial analysis of translation dynamics reveals eIF2 dependence of translation initiation at near-cognate codons	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 7298 ~ 7317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkab549	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松本 有樹修
2. 発表標題 Hidden ORFの同定と機能解析およびその発現制御機構の解明
3. 学会等名 タンパク質研究シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 市原知哉、平田実奈、野島孝之、中山敬一、松本有樹修
2. 発表標題 5' キャップを持たず安定的に存在するmRNAの機能解析
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023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
---------	---------