

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 10 月 1 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25540129

研究課題名(和文) RNA配列に潜む翻訳制御情報の抽出

研究課題名(英文) Detection of translational signal in RNAs

研究代表者

山下 理宇 (Yamashita, Riu)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・准教授

研究者番号：10401259

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年Non-coding RNA という翻訳されないRNA の存在が明らかになってきた。しかしながら、これらのRNA は、長いORF を持つか持たないかによって定義されているだけであり、実際にはsmall peptide が翻訳されている可能性もある。本研究課題では、まず、ribosome profiling 等のデータを利用して翻訳されているRNA と翻訳されていないRNA の分類を行った。その結果、non-coding RNAと考えられていたものの中には小ペプチドをコードする場合もあり、質量分析計からもその存在を確認した。さらに、これらの中には生物学的な意味があるものも発見した。

研究成果の概要(英文)：There is not clear definition of non-coding RNAs so far. Here I detected potential coding RNA from non-coding RNAs. Some of them were detected as short peptides by Mass spectrometry analysis. Moreover, one of them shows cell-cycle accelation by overexpression of the small peptide. I made the database for potetial small peptide, and it is available on web site.

研究分野：分子生物学

キーワード：翻訳制御 non-coding RNA データベース

1. 研究開始当初の背景

近年 Non-coding RNA という翻訳されない RNA の存在が明らかになってきた。しかしながら、これらがどのような役割をしているのかに関しては不明な点が多い。ここで、再び考えてみると、これらの lincRNA は、長い ORF を持つか持たないかによって定義されているだけであり、実際には small peptide が翻訳されている可能性もある。一方、RNA が転写されて以降の制御情報、すなわち翻訳制御情報に関しては、現在でも乏しい。例えば、現在までに知られている翻訳制御に関わる配列は、開始コドンのやや上流にある Kozak、mRNA の開始部分の二次構造、コドン使用頻度等が知られている。しかしながら、どの遺伝子がこれらの構造を持つか、それらが時期・空間的に発現制御を受けているのか、といったことを網羅的に解析した報告はない。以上のように、翻訳に関する網羅的解析の報告は少なく、翻訳される RNA やその制御機構については不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究課題では、まず、ribosome profiling 等のデータを利用して翻訳されている RNA と翻訳されていない RNA の分類を行う。さらに、細胞ごとに翻訳状態が異なる、すなわち細胞特異的な翻訳制御を受けている RNA を同定する。続いて、翻訳制御が細胞間で違いがあるのかを検討する。その一方で、ゲノム配列上(主に転写される部分)に存在する翻訳制御情報の抽出し、その制御要因となり得る配列情報を推定する。さらに、そのモデル化を行い、実験的な検証を行う。また、それらと SNP 情報を照らし合わせ、発現制御を考慮に入れた疾患・発現メカニズムについても考察する。最終的に、得られた情報は、構築したデータベースに格納し、翻訳制御の総合的なデータベースとして web 経由での公

開を目指す。

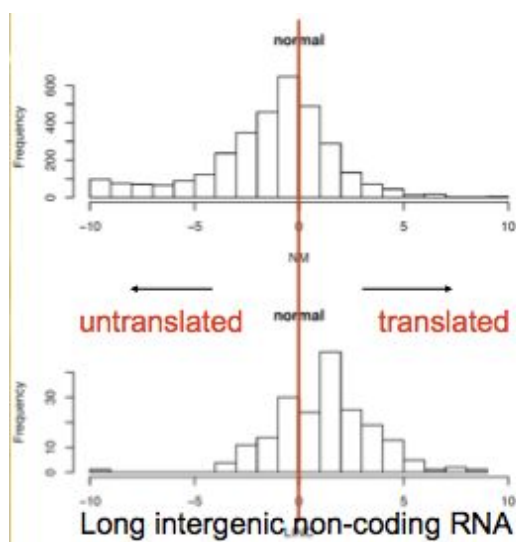
3. 研究の方法

平成 25 年度は、基礎データの収集とデータベースの構築に努める。まず、ribosome profile 等の mRNA が ribosome に存在することがわかる次世代シーケンサー由来のデータを収集し、ゲノム上にマッピングしてコード領域・非コード領域での比較を行う。また、RNA のどの部分に ribosome が付いているのか推定を行う。得られた情報は、データベースとして蓄積する。平成 26 年度は、データベースに得られた情報を利用しての翻訳制御情報の抽出を行う。具体的には、二次構造予測、de novo のモチーフ抽出、Kozak や IRES 等の既知の翻訳情報との比較を行う。また、これらの組み合わせを通して RNA の翻訳制御モデルを構築し一部に関しては検証実験を行う。さらに、実験的な検証を行い生物学区的な機能を考察する。

4. 研究成果

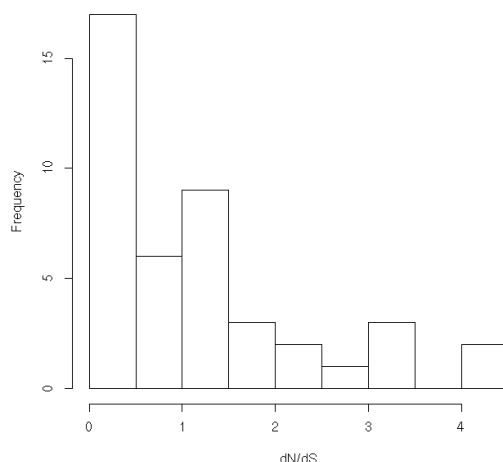
平成 25 年度は、PC3 細胞を用いて ribosomal profiling の実験を行い、翻訳されている RNA と翻訳されていない RNA の同定を行った。この結果、mRNA でありながら翻訳されていない可能性の RNA と non-coding でありながら翻訳されている可能性のある linc-RNA を抽出できた。意外にも linc-RNA の半分程度が ribosome 分画での存在が確認され、翻訳されている可能性が示唆された(下図参照)。さらに、翻訳されていない mRNA では、phosphoprotein, zinc-finger といった Gene ontology が有意に観察され、生物学的に意味を持つ可能性が示唆された。また、non-coding と考えられていた linc-RNA の一つは、over-expression させると細胞周期の亢進が観察された。現在、これが本当に翻訳されているのかについて質量分析計と

の結果と照合中である。これ以外にも、既存の non-coding RNA の配列から潜在的な ORF のデータベースを作り、質量分析計の結果に対して検索を行った。これにより、まず 80 種類程度の候補を得ることができ、tblastx によりマウスのデータベースを検索した結果、1/3 程度にホモログがあることがわかった。なお、一部のこの結果は転写開始点データベース DBTSS に投入されている。



平成 26 年度は、前年得られた系をさらに拡張し、16 種類の細胞から 131 個の潜在的に翻訳されるペプチド配列を同定した。これらの中から、既存のツールを用いて翻訳モデル構築を試みるため、Melina2 等を使い、モチーフ抽出を試みたが、特徴的なモチーフは抽出できなかった。さらに、これらを、マウスとマウス以外の脊椎動物の EST データベースに保存配列が存在するかを確認したところ、マカクだけの霊長類だけではなく、ウシ、ラット、ゼブラフィッシュといった脊椎動物での存在が認められ、潜在的に生物学的な意味を持つ可能性が示唆された。また、マウスとアライメントの取れた 47 ペプチドに関して dN/dS を計算したところ、 <1.0 を示すものが 23 ペプチド (48.9%) 認められ、これらは進化的に負の選択圧がかかっている可能性が示

唆された。(下図参照)



さらにこの中の一つは、細胞内のエンドソーム/リソソームに局在し、v-ATPase と作用することで mTORC1 を抑制的に制御することに働くことが示唆された。加えて、この現象はアミノ酸刺激を行ったときだけ観察され、mTOR のパスウェイに強く関わっている可能性が示唆された。これは、今回予測した小ペプチドが生物学的に意味を持っていることを示唆し、潜在的な小ペプチドがより多くの生命現象に関わっている可能性を示唆している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

1. Nagasaki M, Yasuda J, Katsuoka F, Nariai N, Kojima K, Kawai Y, Yamaguchi-Kabata Y, Yokozawa J, Danjoh I, Saito S, Sato Y, Mimori T, Tsuda K, Saito R, Pan X, Nishikawa S, Ito S, Kuroki Y, Tanabe O, Fuse N, Kuriyama S, Kiyomoto H, Hozawa A, Minegishi N, Douglas Engel J, Kinoshita K, Kure S, Yaegashi N; ToMMo Japanese Reference Panel Project (Yamashita R. を含む), Yamamoto M. Rare variant discovery by deep whole-genome sequencing of 1,070 Japanese individuals. Nat Commun. 2015 Aug 21;6 査読あり
2. Sato Y, Yamagishi J, Yamashita R, Shinozaki N, Ye B, Yamada T, Yamamoto M, Nagasaki M, Tsuboi A. Inter-Individual Differences in the Oral Bacteriome Are Greater than

- Intra-Day Fluctuations in Individuals. PLoS One. 2015 Jun 29;10(6) 査読あり
3. Suzuki A, Wakaguri H, Yamashita R, Kawano S, Tsuchihara K, Sugano S, Suzuki Y, Nakai K. DBTSS as an integrative platform for transcriptome, epigenome and genome sequence variation data. Nucleic Acids Res. 2014 Nov 5. 43(Database issue):D87-91 査読あり
 4. Yamagishi J, Wakaguri H, Yokoyama N, Yamashita R, Suzuki Y, Xuan X, Igarashi I. The Babesia bovis gene and promoter model: an update from full-length EST analysis. BMC Genomics. 2014 Aug 13;15:678. 査読あり
 5. Katayama T, Wilkinson MD, Aoki-Kinoshita KF, Kawashima S, Yamamoto Y, Yamaguchi A, Okamoto S, Kawano S, Kim JD, Wang Y, Wu H, Kano Y, Ono H, Bono H, Kocbek S, Aerts J, Akune Y, Antezana E, Arakawa K, Aranda B, Baran J, Bolleman J, Bonnafant-Rouyer J, Buttigieg PL, Campbell MP, Chen YA, Chiba H, Cock PJ, Cohen KB, Constantin A, Duck G, Dumontier M, Fujisawa T, Fujiwara T, Goto N, Hoehndorf R, Igarashi Y, Itaya H, Ito M, Iwasaki W, Kala M, Katoda T, Kim T, Kokubu A, Komiyama Y, Kotera M, Laibe C, Lapp H, Lantieri T, Marshall MS, Mori T, Mori H, Morita M, Murakami K, Nakao M, Narimatsu H, Nishide H, Nishimura Y, Nystrom-Persson J, Ogishima S, Okamura Y, Okuda S, Oshita K, Packer NH, Prins P, Ranzinger R, Rocca-Serra P, Sansone S, Sawaki H, Shin SH, Splendiani A, Strozzi F, Tadaka S, Toukach P, Uchiyama I, Umezaki M, Vos R, Whetzel PL, Yamada I, Yamasaki C, Yamashita R, York WS, Zmasek CM, Kawamoto S, Takagi T. BioHackathon series in 2011 and 2012: penetration of ontology and linked data in life science domains. J Biomed Semantics. 2014 Feb 5;5(1):5. 査読あり
 6. Okuyama K, Ikawa T, Gentner B, Hozumi K, Harnprasopwat R, Lu J, Yamashita R, Ha D, Toyoshima T, Chanda B, Kawamata T, Yokoyama K, Wang S, Ando K, Lodish HF, Tojo A, Kawamoto H, Kotani A. MicroRNA-126-mediated control of cell fate in B-cell myeloid progenitors as a potential alternative to transcriptional factors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Aug 13;110(33):13410-5. 査読あり

〔学会発表〕(計 3 件)

- 1 山下理宇他, "潜在的に翻訳される RNA と

そのデータベース", SIG-BIO 研究会, 石川、北陸先端大, 2014 年 3 月 1-2 日

- 2 山下理宇他, "RNA の翻訳制御機構", 生命情報若手の会, 千葉, 東京大学検見川セミナーハウス, 2014 年 2 月 17-19 日
3. Riu Yamashita et al, "Potential translation in RNA sequences", JSBI meeting, Tower Hall Funabori, Tokyo Japan, Oct.29-31, 2013.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://dbtss.hgc.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 理宇 (Yamashita, Riu)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・准教授

研究者番号：10401259