

研究報告書

「Long non-coding RNA から翻訳されるスモールプロテインの同定と機能解析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成26年11月～平成30年3月

研究者: 松本 有樹修

1. 研究のねらい

2000年代から始まった勢力的なトランスクリプトーム解析により、ゲノムの非常に多くの領域が転写されているということが明らかとなった。これらの転写産物には、long non-coding RNA (lncRNA) という200塩基以上でタンパク質をコードしない mRNA 様の RNA が膨大に存在していた。近年の解析結果から、核内に存在する lncRNA がクロマチン修飾酵素群を特定の遺伝子領域に輸送しているなどといった、新たな機能が明らかになってきた。しかし、これらの機能は膨大に存在する lncRNA のごく一部にしか当てはまらず、多くの lncRNA の機能はいまだ不明である。

一般的に lncRNA は、タンパク質をコードせず RNA そのものが機能に関与していると考えられている。しかしわれわれは、lncRNA は本当にタンパク質をコードしていないのだろうか、という疑問を抱いた。なぜなら、膨大に存在する lncRNA の多くは、計算式によって「non-coding」として分類されただけであり、これら lncRNA は100アミノ酸以下のタンパク質をコードする可能性がある小さな Open Reading Frame (ORF) を持っている。これら小さな ORF が本当に翻訳されていないのかどうかは、計算式からだけでは非常に判断が難しい。そこでわれわれは、一部の lncRNA はスモールプロテインを翻訳しており、それらは生命に重要な機能を持っているのではないかという作業仮説を立て、これらの検証を行った。

2. 研究成果

(1) 概要

近年のトランスクリプトーム解析により、lncRNA が大量に存在することが明らかとなった。lncRNA はタンパク質をコードしないと考えられているが、その RNA 配列からは100アミノ酸残基以下の小さな ORFs が大量に推測される。しかし、これらは非常に小さいため、おそらく翻訳されていないと判断された。しかし、これら小さな ORFs が本当に翻訳されていないかどうかは、詳細に検討する必要がある。

今回われわれは質量分析計を用いた新たな手法を確立し、lncRNA に存在する小さな ORFs から翻訳される、新規スモールプロテイン群を同定した。進化的に保存されたスモールプロテインも多数存在し、細胞質やミトコンドリア、リソソームといった多様な細胞内局在を示した。さらに、これらスモールプロテインに対する結合タンパク質を同定して、それら結合タンパク質から予想される様々な表現型のスクリーニング解析を行った。その結果、新規スモールプロテインの一つがアミノ酸依存的な mTORC1 の活性化を制御していることを見だし、われわれはこの新規スモールプロテインを SPAR (Small regulatory Polypeptide of Amino acid Response) と名付けた。さらに Spar ノックアウトマウスを作製し、Spar が筋再生の調節に重要な因子であることを明らかにした。

われわれの解析の結果、一部の lncRNA はノンコーディング RNA では無く、コーディン

グ RNA であることが分かった。これら新規スモールプロテイン群はこれまで見逃されてきた新たな因子であり、今後様々な疾患への関与が明らかになると期待される。

(2) 詳細

研究テーマ A, スモールプロテインの詳細な分子機構の解析

われわれはまず質量分析計を用いて、lncRNA から翻訳されるスモールプロテインを同定する手法の確立を行った。この解析によって新規スモールプロテイン群の同定に成功し、それらのうちから LINC00961 RNA から翻訳される 90 アミノ酸のスモールプロテインに焦点を当てて解析を進めていくことにした。

このスモールプロテインは N 末端領域に膜貫通ドメインを持っており、リソソームに局在していた。LINC00961 から翻訳されるスモールプロテインの機能を明らかにするために、免疫沈降により結合タンパク質の同定を行った。その結果、このスモールプロテインは v-ATPase 複合体を構成する多くのサブユニット (ATP6V0A1, ATP6V0A2, ATP6V0D1, ATP6AP2) と結合していることがわかった。

v-ATPase 複合体はリソソーム上で Ragulator 複合体などと結合することによって、アミノ酸依存的な mTORC1 の活性化に寄与していることが知られている。そこでわれわれは、LINC00961 から翻訳されるスモールプロテインが、アミノ酸依存的な mTORC1 の活性化に寄与をしているのではないかと仮定した。

非常に興味深いことに、LINC00961 を過剰発現すると、アミノ酸依存的な mTORC1 の活性化が劇的に抑制された。しかし、LINC00961 に Δ ATG 変異を導入してスモールプロテインを産生できなくした変異体を過剰発現しても、同様の表現型は観察されなかった。このことから、LINC00961 の RNA 自身の機能ではなく、スモールプロテインがこの表現型に寄与していることが分かった。また LINC00961 をノックダウンすると、過剰発現とは逆にアミノ酸依存的な mTORC1 の活性化をより亢進した。以上のことよりわれわれは、LINC00961 から翻訳されるスモールプロテインを Small regulatory Polypeptide of Amino acids Response (SPAR) と名付けた。

アミノ酸が枯渇した条件下では、v-ATPase 複合体と Ragulator 複合体がタイトなスーパーコンプレックスを形成しているが、アミノ酸の添加によって、このタイトな構造が緩み、ルーズな構造へと変化することが知られている。この構造の変化が引き金となり Ragulator 複合体が活性化し、mTORC1 が活性化される。そこで SPAR がこのスーパーコンプレックスの制御に関与しているかどうかを検討してみたところ、SPAR を過剰発現する細胞では、このアミノ酸依存的なスーパーコンプレックスの結合の変化が抑制されていることを見出した。このことよりわれわれは、SPAR は v-ATPase 複合体と結合することによって、アミノ酸依存的なスーパーコンプレックスの構造変化を制御し、mTORC1 の活性化を抑制していると考えている。

研究テーマ B, ノックアウトマウスの解析

Spar の個体における役割を解析するために、CRISPR/Cas9 システムを用いて Spar ノックアウトマウスを作製した。また、遺伝子全体を欠損させるのではなく、開始コドンである ATG のみを欠損させることによって、RNA の発現はそのまま、スモールプロテインの発現のみを

除去した。Spar ノックアウトマウスはメンデル比にそって生まれ、明らかな異常を示さなかったことから、Spar は発生には重要でないということが分かった。

Spar は骨格筋において特に高発現していた。骨格筋において mTORC1 の活性は通常抑制されているが、筋障害後の筋再生の過程において急激に活性化されることが知られている。興味深いことに、われわれは筋障害直後に Spar の発現が劇的に低下することを見出した。この発現の低下は筋再生に伴い回復していった。そこでわれわれは、Spar は筋障害後の mTORC1 の活性化を負に制御し、筋再生の過程を調節しているのではないかと考えた。

まず始めに、筋障害後の mTORC1 の活性化にアミノ酸が必須であるかどうかを検討するために、筋障害を誘導すると同時に、コントロールの餌、もしくはロイシンを欠損した餌の投与を行った。ロイシンを欠損した餌を投与した群では、筋障害後の mTORC1 の活性化が抑制され、筋再生も遅延していた。このことは筋障害後の mTORC1 の活性化、及び筋再生はアミノ酸依存的であることを示している。次に野生型マウスと Spar ノックアウトマウスを用いて同様の解析を行ってみたところ、Spar ノックアウトマウスにおいて、筋障害後の mTORC1 の活性化がより増強されており、筋再生も有意に亢進していた。また、Spar ノックアウトマウスでは、筋障害後の幹細胞の増殖、分化、及び筋繊維への成熟などが亢進していた。以上の結果より、Spar は筋再生の過程で発現が低下することにより、mTORC1 の活性化を増強して筋再生を促進しているということが分かった。

研究テーマ C, circRNA の翻訳能の検討

LncRNA が翻訳されているという発見は、さらなる疑問を生み出した。近年、circular RNA (circRNA)という新種の環状 non-coding RNA が細胞内に高発現していることが明らかになり注目を浴びているが、circRNA もまた翻訳されているのだろうか。これは通常の mRNA などがスプライシング機構によって環状化された RNA であると考えられている。circRNA は全ての遺伝子からスプライシングエラーによってランダムに出来ているわけではなく、遺伝子特異性や、エキソン嗜好性があるため、選択的かつ能動的に産生されるようである。

circRNA は細胞質に局在しているが、環状構造になる際に 5' cap 構造を失うため、リボソームにリクルートされず、non-coding RNA であることが知られている。しかし Internal Ribosome Entry Site (IRES) 配列を含む人工 circular RNA は翻訳されることが報告されており、一部の IRES を含んだ内在性 circRNA は翻訳される可能性が示唆される。IRES 配列を計算により同定することは現在でも困難であるため、次世代シーケンサーを用いてポリソームに結合する circRNA の同定や(ポリソームプロファイリング法)、質量分析計を用いて同定を試みた。

しかし残念なことに、ポリソームプロファイリング法、質量分析法のどちらの方法を用いても、circRNA から翻訳されるタンパク質を同定することは出来なかった。

3. 今後の展開

今回のわれわれの解析により、LncRNA と考えられていた RNA から翻訳されるスモールプロテイン群を同定した。これらのうち、われわれが同定した新規スモールプロテインである SPAR はヒトやマウスなどの哺乳類で保存されており、アミノ酸依存的な mTORC1 の活性化を抑制し、筋再生

の過程を調節していることを明らかにした。この発見は、SPAR 以外にも重要なスモールプロテインが多数存在することを示唆しており、これらスモールプロテインが様々な生命現象を調節することにより疾患に関与している可能性がある。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

(A) スモールプロテインの詳細な分子機構の解析

(B) ノックアウトマウスの解析

上記の研究に関しては、目標を達成することが出来た。また、これらの研究によって得られた成果は Nature 誌に報告した。質量分析計により同定したスモールプロテインに対して、様々な機能スクリーニングを行い、最終的にその一つの分子機構を明らかにすることが出来た。われわれが SPAR と名付けた新規スモールプロテインは v-ATPase 複合体の構造変換を制御することにより、アミノ酸依存的な mTORC1 の活性化を抑制していた(研究テーマ A における成果)。また、SPAR ノックアウトマウスなどの解析を行うことにより、筋障害後の再生にはアミノ酸依存的な mTORC1 の活性化が重要であり、SPAR はこの過程を調節していることを明らかにした(研究テーマ B における成果)。この結果は、SPAR に限らず、このような機能性のスモールプロテインがまだ多く埋もれている可能性を示唆している。現在疾患との関連があるようなスモールプロテインのスクリーニングを開始しており、最終的には創薬まで繋がることを期待している。

(C) circRNA の翻訳能の検討

circRNA からタンパク質が翻訳されているかどうかに関して検討した。非常に挑戦的なプロジェクトであるため、上記プロジェクトのサブプロジェクトとした。上記のプロジェクトにより習得した技術を応用して、リボソームプロファイリング法や質量分析法などを用いて、circRNA から翻訳されるタンパク質が存在するかどうか検討したが、残念ながら同定することは出来なかった。しかし、このような挑戦的なプロジェクトを挑むことが出来たのも、上記のプロジェクトが上手くいっており、さらにさきがけの大きな支援があったからであり、成否に関わらず満足している。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

一般的に lncRNA は、タンパク質をコードせず RNA そのものが機能に関与していると考えられていた。しかし、膨大に存在する lncRNA の多くは、計算式によって「non-coding」として分類されただけであり、lncRNA が本当にタンパク質をコードしていないのだろうかという素朴な疑問を松本有樹修研究者は持ち、一部の lncRNA はスモールプロテインを翻訳しており、それらは生命に重要な機能を持っているのではないかという作業仮説を立て、これらの検証を行った。解析の結果、一部の lncRNA はノンコーディング RNA では無く、コーディング RNA であり、翻訳されてスモールプロテインが産生され、その発現を中止したマウスでは表現系

が認められることから、生理作用を持つ一部の lncRNA はスモールプロテインをコードしているという予想外の新しい概念を確立することに成功した。このような視点からの lncRNA の研究は、全く新しい分野であり、その発展性は計り知れないものがあると期待している。

実際、松本有樹修研究者はその招待講演の多さからわかるように、各方面から非常に注目されている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1) Matsumoto A., Pasut A., Matsumoto M., Yamashita R., Fung J., Monteleone E. Saghatelian A., Nakayama KI., Clohessy JG, Pandolfi PP.: mTORC1 and muscle regeneration are regulated by the LINC00961 encoded SPAR polypeptide. *Nature*, 12;541(7636):228-232 (2017).

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

[招待講演]

- 1 松本 有樹修: Long non-coding RNAから翻訳される機能性スモールプロテイン群の同定: SPARはmTORC1と筋再生を制御する, 東北大学. 2017年6月13日, 仙台
- 2 松本 有樹修: Long non-coding RNAから翻訳される機能性スモールプロテイン群の同定: SPARはmTORC1と筋再生を制御する, 東京大学. 2016年12月19日, 東京
- 3 松本 有樹修: Long non-coding RNAから翻訳される機能性スモールプロテイン群の同定: SPARはmTORC1と筋再生を制御する, 北海道大学. 2016年6月23日, 札幌
- 4 松本 有樹修: Long non-coding RNAから翻訳される機能性スモールプロテイン群の同定: SPARはmTORC1とオートファジーを制御する, 京都大学. 2015年12月21日, 京都
- 5 松本 有樹修: Long non-coding RNAから翻訳される機能性スモールプロテイン群の同定: SPARはmTORC1とオートファジーを制御する, 九州大学. 2015年6月17日, 福岡
- 6 松本 有樹修: Long non-coding RNAから翻訳される機能性スモールプロテイン群の同定: SPARはmTORC1とオートファジーを制御する, 浜松医科大学. 2015年6月15日, 浜松

[受賞]

第69回日本細胞生物学会大会、若手最優秀発表賞、2017年6月