

研究報告書
令和3年度：A課題

2023年 4月 6日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田 知光 殿

研究施設 同志社大学

住 所 京都府京田辺市多々羅都谷 1-3

研究者氏名 三田雄一郎

(研究課題)

Se含有タンパク質の翻訳制御を標的とした新たながん治療法の確立

令和4年 4月 1日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

【目的】

必須微量元素の一つ、セレンはシステインの硫黄がセレンに置き換わったセレノシステイン (Sec) の形でタンパク質中に存在している。Sec は、通常では終止コドンとして利用される UGA にコードされており、UGA の下流にヘアピン構造をとる Sec 挿入配列 (SECIS) が存在するときのみ、終止コドンではなく Sec を挿入するためのコドンとして認識される。

我々は、セレン含有タンパク質の一つ、セレノプロテイン P (SeP) の SECIS 領域をコードするゲノム領域に存在する新規の noncoding RNA である Long noncoding RNA-Inhibitor of Selenoprotein P translation (L-IST) を同定した。L-IST を SeP を発現している HepG2 細胞に過剰発現させたところ、SeP の mRNA 量に変化は起こらなかったが、タンパク質の減少が起こった。そのメカニズムを解析したところ、SECIS を利用した SeP の翻訳に必須の因子である SECIS 結合タンパク質である SBP2 と SECIS の結合を阻害することによって、SeP の翻訳を配列依存的に抑制していることが明らかになった。

Long-noncoding RNA による mRNA からタンパク質への翻訳制御には、相補的な配列だけでなく、非相補的な配列が重要になることが報告されているが、L-IST 中の必要領域は現在のところ同定されていない。

そこで、本研究課題では、L-IST による SeP 翻訳抑制に必要な機能性配列を同定することによって、セレン含有タンパク質の翻訳制御メカニズムを明らかにし、がん治療への応用を目指すことを目的とする。

【実験方法】

pcDNA3.1(-)のBamH IサイトにL-ISTの5'非相動性領域、3'非相動性領域の欠損変異体、および、5'領域、3'領域の部分欠損変異体を挿入したPlasmidを作成した。in vitro RNA合成によって全長及び各種変異体RNAを合成し、SePを発現しているHepG2細胞にトランスフェクションし、SePのタンパク質量をウエスタンブロッティング法で、mRNAをreal time PCR法で解析した。Control RNAとして、GFPを用いた。トランスフェクションを行うすべての条件でトランスフェクションするRNAのmol数をそろえて解析を行った。

【結果と考察】

全長のL-ISTをトランスフェクションしたHepG2細胞では、mRNA量非依存的にSePのタンパク質量が減少したのに対し、5'非相補的領域、3'非相補的領域を欠損させたL-ISTをトランスフェクションした場合は、SePのmRNA量、タンパク質量ともに変化が認められなかった。また、相補的領域の一部配列だけを用いた場合も、タンパク質量に変化が起らなかった。このため、L-ISTの3'非相補的配列、5'相補的配列のどちらにも機能性領域があると推測された。

はじめに、5'領域の必要量基の同定を試みた。5'末端から100塩基ずつ短くしたL-IST変異体を作成してトランスフェクションした結果、500塩基欠損変異体ではSePタンパク質量の減少が認められたのに対し、600塩基欠損変異体ではSePタンパク質の減少が起らなかった。さらに、501塩基から600塩基のみを欠損させた変異L-ISTでもSePタンパク質量が減少しなかったことから、5'非翻訳領域の機能性配列は501塩基から600塩基の間であることが明らかになった。

次に、3'領域の必要量基の同定を試みた。5'領域の場合と同様に3'末端から100塩基ずつ短くしたL-IST変異体を作成してトランスフェクションした結果、3'末端から500塩基まで欠損させた変異体ではL-ISTの活性は保たれていたが、600塩基まで欠損させると、L-ISTによるSePタンパク質の減少効果が焼失した。このため、3'非相動性配列に含まれる機能性配列は3'末端から501塩基から600塩基に含まれていることが示唆された。しかし、この領域だけを欠損させた欠損変異体による解析を行うことができず、より詳細な検証を行う必要がある。

Long noncoding RNAによる配列依存的なタンパク質の翻訳制御には、SIN3配列やAlu反復配列のような、特定の配列が繰り返される反復配列が必要になることが多い。L-IST中に既知の機能性配列や、反復配列が存在しないか検索を行ったところ、相補的領域に近接する3'非翻訳領域に繰り返し配列が存在することが明らかになった。しかし、この領域は、L-ISTの機能領域が含まれていると考えられる3'側から501塩基から600塩基の間ではなく、より相補的な配列に近い位置に存在している。そのため、L-ISTの機能が焼失する3'側から600塩基を欠損させた変異体は繰り返し配列を含有している。このことから、L-ISTの機能には、典型的な繰り返し配列や、既知の機能性配列は関与しておらず、新規の機能性配列が関与していると考えられる。

【発表論文】

該当なし

【謝辞】

本研究はがん研究振興財団令和3年度研究助成をうけて行いました。この場を借りて感謝申し上げます。