

ヒト骨格筋の分化過程における新たな遺伝子発現制御機構の発見 ～mRNA 修飾と特殊翻訳の制御がセレン含有タンパク質の発現を制御する～

1. 発表者：

野田 悠太 (研究当時：東京大学 大学院工学系研究科 化学生命工学専攻 博士課程 3 年)
岡田 俊平 (研究当時：東京大学 大学院工学系研究科 化学生命工学専攻 特任研究員)
鈴木 勉 (東京大学 大学院工学系研究科 化学生命工学専攻 教授)

2. 発表のポイント：

- ◆ セレン含有タンパク質(注 1)であるセレノプロテイン N (SELENON)は、セレンの高い還元作用を用いて、酸化ストレスから細胞を保護する役割がある。SELENON の発現制御は骨格筋の形成や機能に重要な役割を担っている。本研究は、筋分化の過程において、SELENON 遺伝子が以下に示す 2 つの機構で発現制御されることを明らかにした。
- ◆ 筋分化の前期から中期にかけて、SELENON の前駆体 mRNA の二次構造が変化し、RNA 編集(注 2)が導入されることで、異常な mRNA スプライシング(注 3)が抑制され、SELENON タンパク質の発現が維持されることが判明した。
- ◆ SELENON は 21 番目のアミノ酸として知られるセレノシステイン(Sec)を含んでおり、Sec はリコーディング(注 4)と呼ばれる特殊翻訳によって取り込まれる。筋分化の中期以降はリコーディング活性が低下し、SELENON の発現が低下することが明らかになった。リコーディング制御はこれまで報告されていない新規の現象であり、遺伝子発現制御の概念を大きく拡張させるものである。
- ◆ 本研究成果は、ヒト骨格筋形成のさらなる理解に加え、将来的には SELENON 関連疾患(注 5)の治療法の開発や、加齢などによる筋力低下の改善につながることを期待される。

3. 発表概要：

セレノプロテイン N (SELENON)は活性中心に重金属であるセレンを含むセレン含有タンパク質である。骨格筋が分化する過程において、細胞が一時的な酸化ストレスに曝されるが、SELENON はセレンの高い還元作用を用いて、酸化ストレスから細胞を保護する役割がある。SELENON 遺伝子の変異は SELENON 関連疾患と総称される重篤な筋疾患を引き起こすことから、SELENON 遺伝子の正確な発現制御が骨格筋の形成や機能に不可欠である。骨格筋が分化する初期段階では SELENON の発現が高く保たれ、分化が進むにつれて SELENON の発現が下がることが知られていたが、そのしくみはよくわかっていなかった。

東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻の野田悠太大学院生(研究当時)、岡田俊平特任研究員(研究当時)、鈴木勉教授のグループは、ヒトの筋芽細胞が骨格筋へと分化する前期と中期において、SELENON の発現が高く保たれ、後期において、発現量が徐々に低下するしくみを明らかにした(図 1)。そのしくみから、新規の遺伝子発現制御機構が見つかった。

SELENON の mRNA 前駆体には Alu 反復配列(注 6)が含まれており(図 2)、mRNA スプライシングの過程でこの一部がエキソンとして取り込まれるとナンセンス変異依存 mRNA 分解機構(nonsense mediated mRNA decay, NMD)(注 7)により発現が抑制される(図 2)。筋分化の前期から中期にかけて、RNA 結合タンパク質と RNA 修飾が、系列的に作用することで、Alu 反復配列のエキソン化が抑制され(図 1)、SELENON タンパク質の発現が維持されるこ

とが判明した(図 3)。

2 つ目の制御機構は、特殊翻訳の制御である(図 1)。**SELENON** はセレン含有タンパク質であり、活性中心にセレノシステイン (**Sec**)残基を有している(図 4A)。**Sec** は終止コドンの 1 つである **UGA** コドンによりコードされ、リコーディングと呼ばれる特殊なタンパク質合成によって取り込まれる。研究グループは、筋分化の中期から後期にかけて、多くのリコーディングに関与する因子の発現が低下することを見出した(図 4BC)。特に **Sec** を受容した **tRNA^{Sec}** が顕著に減少する(図 4D)ことで、**UGA/Sec** コドンのリコーディングの効率が低下していることを明らかにした。この結果、筋分化の後期では、活性のある **SELENON** が合成されず、また **UGA/Sec** コドンが未成熟終止コドンとして認識されることで、**SELENON mRNA** は **NMD** の機構により分解され、発現量が低下することが明らかとなった。

本研究により明らかとなった段階的な転写後制御機構により、筋分化の過程で **SELENON** の発現が精密に制御されることが示された。今後は、これらの制御機構の生理的意義を明らかにすることで、骨格筋形成のさらなる理解に加え、将来的には **SELENON** 関連疾患の治療法の開発や、加齢などによる筋力低下の改善につながることを期待される。また本研究で示されたリコーディングの制御はこれまで報告されていない新規の現象であり、遺伝子発現制御機構の理解において大きな概念的進歩をもたらすものである。本研究成果は 5 月 6 日(英国夏時間)に科学誌「*Nature Communications*」に掲載された。

4. 発表内容：

骨格筋は多核化した筋繊維の束で構成されており、損傷を受けると再生能力を持つ筋衛星細胞が活性化して増殖し、筋芽細胞に分化する。筋芽細胞は互いに融合して多核の筋管細胞を形成し、最終的に成熟した筋繊維を形成する(図 1)。この過程では小胞体ストレスが誘起されることにより活性酸素 (**ROS**)が大量に発生し、分化のための重要なシグナル伝達に用いられる。しかし過剰な **ROS** は酸化ストレスを引き起こし、細胞を損傷させるため、筋芽細胞はセレン含有タンパク質などによる抗酸化システムを発動させ、酸化還元状態のバランスを保つことで骨格筋の正常な分化を保証することが知られている。

セレン含有タンパク質は、システインの硫黄が微量な金属元素であるセレン(原子番号 34)に置き換わったセレノシステイン(**Sec**)残基を有したタンパク質の総称である。ヒトではこれまでに 25 種類のセレン含有タンパク質が同定されており、そのほとんどが **Sec** の高い求核性による酸化還元特性を利用して、抗酸化作用や酸化還元シグナル伝達に関与している。その中でも、**SELENON** は骨格筋との重要な関係性が明らかになっている。**SELENON** は酵素活性部位に **Sec** 残基を持つ糖タンパク質であり、小胞体の膜上に局在し、その高い還元作用で酸化ストレスに対して細胞を保護する役割を担っている。また **SELENON** は小胞体内の **Ca²⁺**濃度が低い時に、**Ca²⁺**ポンプである **SERCA** を還元し、その活性を維持することで、細胞内 **Ca²⁺**濃度の調節に重要な役割を担っている。**SELENON** は骨格筋の形成や構造の維持に必須であることが知られており、**SELENON** 遺伝子の変異により **SELENON** 関連ミオパシーと呼ばれる進行性で重篤な筋疾患を引き起こす。しかしこの疾患が生じる詳細な分子機構は未だ不明であり、根治的な治療法が存在しないのが現状である。骨格筋が分化する過程で、筋芽細胞が互いに融合し多核の筋管細胞を形成する際に、**SELENON** の発現量が減少する(図 1)ことが知られている。したがって **SELENON** の発現調節は骨格筋形成に重要な役割を持つと考えられているが、その詳細な機構や生理的意義は不明である。

本研究グループは、骨格筋が分化する過程において、**SELENON** の発現がどのように調節

されているかを明らかにすることを目標とし、特に転写後過程における制御機構に着目して研究を行った。実験材料として、ヒト由来の不死化した筋芽細胞株である Hu5/KD3 細胞を用い、*in vitro* での筋分化過程における遺伝子発現の解析および生化学を駆使した解析により、転写後における 2 つの機構を明らかにした(図 1)。

1 つ目の機構は、mRNA の成熟化過程において、Alu 反復配列の一部がエキソンとして取り込まれる Alu エキソン化の制御である(図 2)。SELENON mRNA の第 2 イントロン内に存在するアンチセンス鎖の Alu 配列はスプライシングに必要なシグナルを有するため、その一部がしばしばエキソンとして取り込まれる現象(Alu エキソン化)が知られていた(図 2AB)。この異常な mRNA には未成熟終止コドン(PTC)が出現し、NMD と呼ばれる mRNA の品質管理機構により分解される(図 2BC)。ヒト組織間で比較すると、SELENON mRNA の Alu エキソン化は骨格筋で顕著に亢進している。したがって骨格筋では分化の過程で Alu エキソン化による mRNA の分解を介して SELENON の発現量を低下する機構が考えられた。そこで、Hu5/KD3 細胞の分化の過程でこの機構を詳細に解析した。ウェスタンブロッティングでタンパク質の発現変動を調べると、確かに分化に伴い SELENON の発現が減少する様子が観察された(図 3A)。また、SELENON mRNA の Alu エキソン化は筋分化の中期から後期にかけて促進されていることがわかった(図 3B)。そこで、Alu エキソン化を制御する因子として報告があり、分化の過程で発現量が低下する hnRNP C と ADAR1(図 3A)に着目した。RNA 結合タンパク質である hnRNP C はアンチセンス鎖の Alu 配列が持つ連続したウリジン残基に結合することが知られている。実際に RNA 干渉法により hnRNP C の発現を抑制すると、Alu エキソン化が増加した(図 2C)ことから、hnRNP C は SELENON mRNA の Alu のエキソン化を抑制する働きが明らかとなった。

次に、分化中期にかけて、hnRNP C の定常状態量が減少すると(図 3A)、ADAR1 による Alu エキシソンの 5'スプライス部位 (5'ss)周辺へのイノシン (I)修飾が増加することが判明した(図 3C)。この部位は U1 snRNA が 5'ss を認識するコンセンサス配列であり(図 3D)、I 修飾が U1 snRNA のシュードウリジン(Ψ)との塩基対形成を妨げると予想された。そこで、SELENON mRNA の第 2 イントロン全長を含むレポーター遺伝子を作成し、細胞内でスプライシングの効率を調べた。5'ss 周辺の I 修飾部位を、I と化学構造の類似したグアノシン (G)に置換したレポーターを作成したところ、エキソン化が顕著に抑制されていた。以上の結果から、ADAR1 による 5'ss 周辺への I 修飾が U1 snRNA の認識を弱めることで、Alu エキソン化を抑制するという、新規のエピトランスクリプトミクス(注 8)的な遺伝子発現制御モデルが提唱された。以上の解析結果から、SELENON の発現が筋分化の前期と中期で維持される(図 3A)のは、hnRNP C による Alu 配列への結合と、ADAR1 による Alu エキソン 5'ss への I 修飾という、2 つの異なる機構が序率的に働くことで Alu エキソン化が抑制される(図 1)からであると結論付けた。そして分化後期には、ADAR1 の発現が低下する(図 3A)ことで I 修飾も低下し(図 3C)、Alu エキソン化が促進される(図 3B)ことで、正常な mRNA が減少し SELENON タンパク質の定常状態量が減少すると考えられる。また、Alu エキソンを含む異常な mRNA は NMD で分解される。

2 つ目の機構は、翻訳過程における制御である(図 1)。Hu5/KD3 細胞の筋分化の中期から後期にかけて、完全長 SELENON タンパク質の発現低下に伴い、Sec のリコーディング部位である UGA コドンで終結した短い翻訳産物が増加していることが判明した(図 3A, 4A)。そこで、Hu5/KD3 細胞の筋分化過程での継時的な RNA-seq 解析を行った結果、多くの UGA/Sec リコーディング因子が分化に伴い発現が低下していることがわかった(図 4B)。さらに、セレ

ニウム転移酵素 SEPSECS については RNA-seq では有意な減少は見られなかったものの、Day3 以降にタンパク質の定常状態量が大きく減少することが明らかになった (図 4C)。そこで、Hu5/KD3 細胞分化の Day0 (分化前) と Day5 (分化後) の total RNA から tRNA^{Sec} を単離精製し、RNase T₁ で消化した後に、高感度なキャピラリー液体クロマトグラフィー質量分析法を用いて 3'末端に結合しているアミノ酸を詳細に解析した。この結果、Day0 では Sec-tRNA^{Sec} の割合は全体の 33.5% を占めていたが、Day5 では、その割合が 14.4% と大きく減少しており、代わりに pSer-tRNA^{Sec} が蓄積している様子が観測された (図 4D)。したがって筋分化の後期においては pSer から Sec の変換過程が律速となり、Sec-tRNA^{Sec} が枯渇するために、UGA/Sec コドンのリコーディング効率が低下し、活性のある SELENON が合成されないと結論付けた。また UGA/Sec コドンは未成熟終止コドンとして認識され SELENON mRNA が NMD により分解されることで、更なる SELENON タンパク質の発現低下が導かれる。

以上より、本研究では段階的な転写後発現制御機構により、筋分化の過程で SELENON の発現が精密に制御されていることが示された。近年、RNA 修飾によるエピトランスクリプトミクス制御が生命科学に大きな潮流を生み出しているが、I 修飾はヒトの転写産物中に最も豊富に存在する RNA 修飾の 1 つである。I 修飾の 90% 以上が Alu 反復配列上に存在することが知られているが、その機能は十分に理解されていない。本研究は、SELENON mRNA の I 修飾が U1 snRNA の認識を妨げることで、mRNA スプライシングを制御することを示した最初の例であり、I 修飾の機能を理解する上での新たな視点を提供している。さらに、セレン含有タンパク質の発現に必須な UGA/Sec のリコーディングに関しては、そのしくみは詳しく調べられてきたものの、その制御がどのような生命現象と関連しているかは知られていなかった。本研究は、細胞が分化する過程で UGA/Sec リコーディングが制御されることを示した初めての成果である。今後これらの制御機構の生理的意義を明らかにすることで、将来的には SELENON 関連疾患の治療法の開発や、加齢などによる筋力低下の改善につながることを期待される。

本研究は、日本学術振興会 (JSPS) の基盤研究 (S) 「RNA エピジェネティクスと高次生命現象」 (代表: 鈴木 勉、26220205)、基盤研究 (S) 「RNA 修飾の変動と生命現象」 (代表: 鈴木 勉、18H05272)、新学術領域研究 (研究領域提案型) 「ncRNA のケミカルタクソノミ」 (代表: 鈴木 勉、26113003)、および科学技術振興機構 (JST) の戦略的創造研究推進事業 (ERATO) 「鈴木 RNA 修飾生命機能プロジェクト」 (研究総括: 鈴木 勉、JPMJER2002) の支援を受けて実施された。

5. 発表雑誌:

雑誌名: 「*Nature Communications*」

論文タイトル: Regulation of A-to-I RNA editing and stop codon recoding to control selenoprotein expression during skeletal myogenesis

著者: Yuta Noda, Shunpei Okada and Tsutomu Suzuki

DOI 番号: 10.1038/s41467-022-30181-2

アブストラクト URL: <https://www.nature.com/articles/s41467-022-30181-2>

6. 問い合わせ先:

<研究に関すること>

東京大学 大学院工学系研究科 化学生命工学専攻
教授 鈴木 勉 (すずき つとむ)
E-mail: ts[at]chembio.t.u-tokyo.ac.jp

<報道に関すること>
東京大学 大学院工学系研究科 広報室
Tel: 03-5841-0235
E-mail: kouhou[at]pr.t.u-tokyo.ac.jp

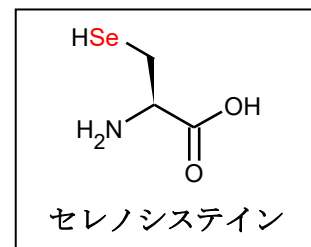
科学技術振興機構 広報課
Tel: 03-5214-8404
E-mail: jstkoho[at]jst.go.jp

<JST 事業に関すること>
科学技術振興機構 研究プロジェクト推進部 グリーンイノベーショングループ
加藤 豪 (かとう ごう)
Tel: 03-3512-3528
E-mail: eratowww[at]jst.go.jp

7. 用語解説：

(注 1) セレン含有タンパク質

システインの硫黄がセレン (Se)に置き換わったセレノシステイン (Sec) 残基を有するタンパク質。Sec は 21 番目のアミノ酸と呼ばれている。ヒトではこれまでに 25 種類のセレン含有タンパク質が同定されており、そのほとんどが Sec の高い求核性による酸化還元特性を利用して、抗酸化作用や酸化還元シグナル伝達に関与していると考えられている。しかし機能が明らかになっているセレン含有タンパク質は少ない。



(注 2) RNA 編集

RNA 修飾の一種であり、アデノシン(A)を脱アミノ化してイノシン(I)へと変換する機構。A-to-I RNA 編集(エディティング)と呼ばれる。核内で ADAR1 および ADAR2 と呼ばれる酵素が触媒し、RNA が二本鎖を形成した場所に導入される。I 修飾はグアノシン(G)と化学構造が類似しているため、シトシン(C)と塩基対形成が可能であり、mRNA 上の塩基情報が A から G へと変換されて認識されることから、RNA 編集と呼ばれる。タンパク質の翻訳領域内においてはアミノ酸の変化、イントロンにおいては選択的スプライシングの変化など様々な機能を持ち、遺伝子発現の制御に関与していることが知られている。

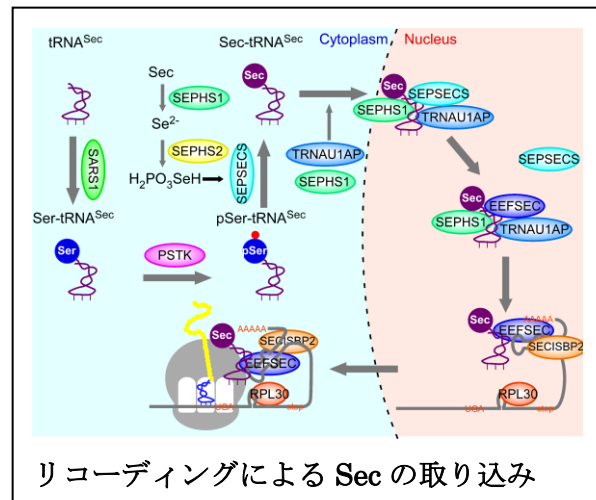
(注 3) mRNA スプライシング

転写により合成された mRNA 前駆体には、翻訳されて最終的にアミノ酸配列へと変換される領域 (エキソン)と、スプライシングの過程で取り除かれる部分 (イントロン)が交互に並んで構成されている。mRNA 前駆体から、イントロンが除去された後にエキソン同士がつながる一連の反応を mRNA スプライシングと呼ぶ。この反応は、U1, U2, U4, U5, U6 snRNA と

呼ばれる 5 種の核内低分子 RNA と多数の関連タンパク質からなるスプライソソームと呼ばれる複合体群が、序列的に働くことで触媒される。

(注 4) リコーディング

Sec は終止コドンの 1 つである UGA コドンによりコードされ、リコーディングと呼ばれる特殊なタンパク質合成によってタンパク質へと取り込まれる。Sec には専用のアミノアシル tRNA 合成酵素がなく、tRNA^{Sec} には、まずセリル tRNA 合成酵素 (Seryl-tRNA synthetase, SARS) の作用により、セリン (Ser) が付加し、O-ホスホセリル tRNA キナーゼ (phosphoseryl-tRNA kinase, PSTK) の作用により、リン酸化セリン (pSer) に変換される。続いて、セレノリン酸合成酵素である SEPHS1 や SEPHS2 がセレノリン酸を合成する。さらにセレニウム転移酵素(SEPSECS)がこのセレノリン酸を用いて、pSer-tRNA^{Sec} 上の pSer の水酸基をセレノールに変換することで、Sec が合成される。Sec のペプチド鎖への取り込みは、mRNA 上のリコーディング部位である UGA コドンの下流に SECIS と呼ばれる特徴的なステムループ構造が必要である。また、Sec-tRNA^{Sec} 特異的な翻訳伸長因子 EEFSEC などの複数の因子を必要とする。



さらにセレニウム転移酵素(SEPSECS)がこのセレノリン酸を用いて、pSer-tRNA^{Sec} 上の pSer の水酸基をセレノールに変換することで、Sec が合成される。Sec のペプチド鎖への取り込みは、mRNA 上のリコーディング部位である UGA コドンの下流に SECIS と呼ばれる特徴的なステムループ構造が必要である。また、Sec-tRNA^{Sec} 特異的な翻訳伸長因子 EEFSEC などの複数の因子を必要とする。

(注 5) SELENON 関連疾患

SELENON 遺伝子に変異があることで生じる先天性の筋疾患(ミオパチー)。生まれながらあるいは幼少期から、筋力低下に関わる様々な症状を呈する。全身の筋緊張の低下に加え、高口蓋、呼吸障害、哺乳・嚥下障害、発育・発達の遅れ、関節拘縮、脊柱異常などを示す。筋疾患は様々な原因遺伝子が知られているが、SELENON 遺伝子の変異は重篤な症状を示すことが知られている。

(注 6) Alu 反復配列

霊長類ゲノムに含まれる約 300 塩基長の SINE (short interspersed element) として分類されるレトロトランスポゾン(逆転写酵素の作用で増幅する因子)の一種である。その数は 100 万コピーにもおよび、ヒトゲノムの約 11%を占める。主にゲノムの非コード領域に存在するが、遺伝子内の非翻訳領域やイントロンにも大量に存在する。遺伝子内に存在する Alu 配列が転写されると、しばしばセンス鎖の Alu 配列とアンチセンス鎖の Alu 配列が相補鎖を形成し、長い二本鎖 RNA 構造が生じる。二本鎖 RNA はしばしば細胞内ウイルスセンサーである MDA5 に認識され、自然免疫応答を誘導するため、Alu 配列は ADAR1 によるイノシン(I)修飾によって被覆されている。実際に、I 修飾の約 90%は Alu 配列上に生じていることが知られている。また、アンチセンス鎖の Alu 配列は U の連続した配列を持っており、この配列が mRNA スプライシングに必要なポリピリミジントラクトとして認識され、しばしば Alu 配列の一部がエクソンとして成熟 mRNA に取り込まれることが知られている。この現象を Alu のエクソン化と呼ぶ。タンパク質のコーディング領域内に生じた Alu エキシソのうち、80%

以上に、翻訳領域の途中で生じた異常な終止コドン、すなわち未成熟終止コドン(pre-mature termination codon, PTC)を持つため、これらは異常な mRNA として NMD の機構によって分解される。一方で、Alu エキソンは有益なエキソンとして獲得される場合もあり、ヒトの多様性や病気に対する抵抗性を獲得するなどゲノムの進化にも貢献していると考えられている。ヒトの選択的スプライシングの生じるエキソンのうち 5%以上が Alu 配列由来である。

(注 7) ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構(nonsense mediated mRNA decay, NMD)

成熟 mRNA には、開始コドンから終止コドンの間にタンパク質のアミノ酸配列がコードされているが、しばしば mRNA スプライシングの不具合で読み枠がずれたり、遺伝子のナンセンス変異によって、途中で終止コドンが生じたりすることがある。これを未成熟終止コドン(Pre-mature termination codon, PTC)と呼ぶ。核から細胞質に移行した mRNA が最初に翻訳される際に、未成熟終止コドンを見つけてこの mRNA を速やかに分解する機構が NMD と呼ばれ、mRNA の品質管理機構の 1 つである。UPF1 は NMD に必須の因子の 1 つである。

(注 8) エピトランスクリプトミクス

RNA の構造や機能が RNA の転写後修飾によってダイナミックに制御されることで、遺伝子発現の調節を介して、さまざまな生命現象に関与するという概念。

8. 添付資料：

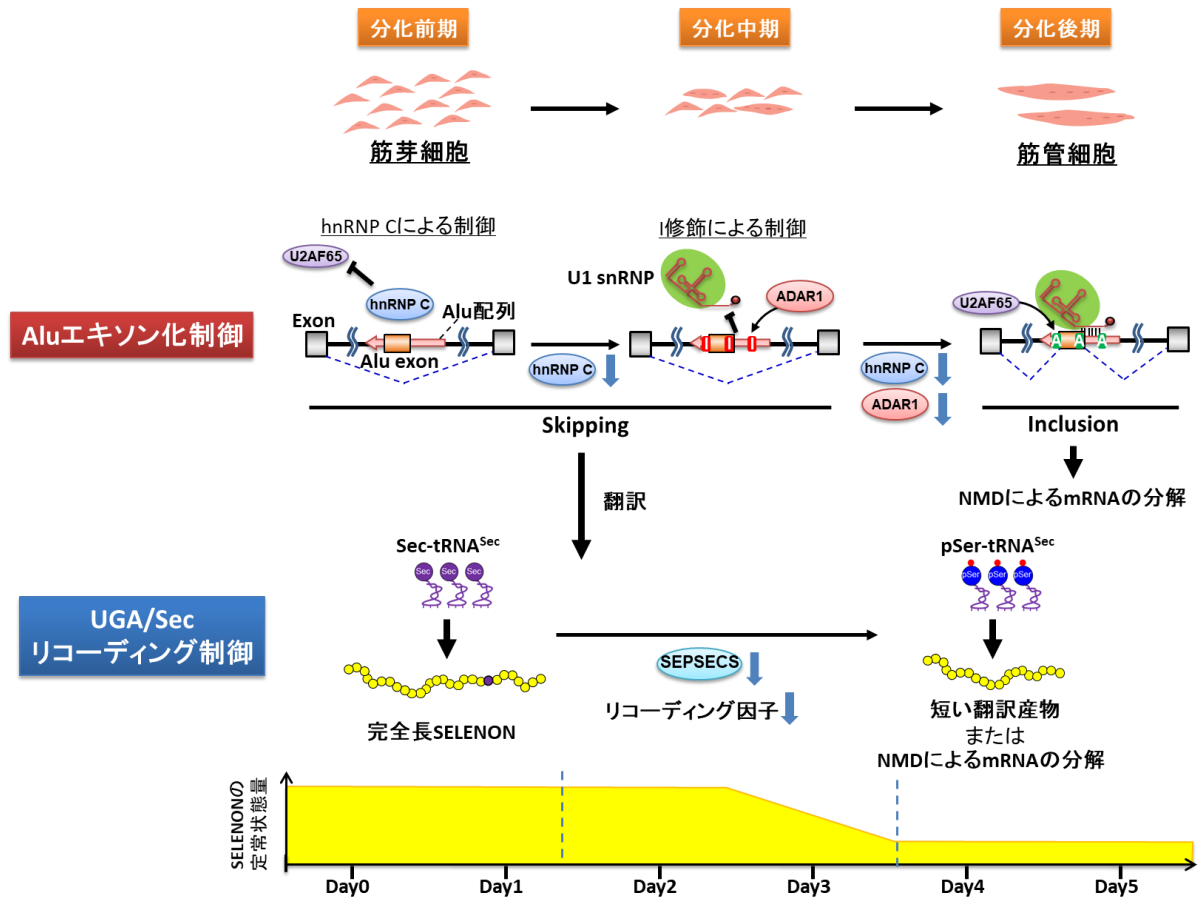


図 1. 筋分化過程で *SELENON* は 2 つの転写後制御機構により発現量が調節される

分化前期から中期にかけては、Alu のエクソン化を抑制することで *SELENON* の発現量が維持される。分化前期では主に、hnRNP C が Alu 配列に結合することで Alu のエクソン化が抑制される。中期にかけて hnRNP C が減少すると、RNA の二次構造が変化し、Alu 配列は ADAR1 に認識されるようになる。ADAR1 は、Alu エキシンの 5'スプライス部位周辺へ I 修飾を導入し、U1 snRNA の認識を阻害することで、Alu のエクソン化を抑制する。これらの 2 つの機構が順番に作用することで、分化前期から中期にかけて *SELENON* タンパク質の発現量が維持される。中期から後期にかけては、ADAR1 も低下し、Alu エクソン化が促進され、正常な mRNA が減少することで *SELENON* の発現量が低下する。また、Alu エクソン化によって生じた異常な mRNA は NMD により分解される。さらに後期では、SEPSECS などのリコーディング因子が低下することで、Sec を受容した tRNA^{Sec} が減少し、活性のある *SELENON* は合成されず、また UGA/Sec コドンが未成熟終止コドンとして認識され *SELENON* mRNA が NMD により分解されることで、完全長の *SELENON* タンパク質の発現低下が導かれる。

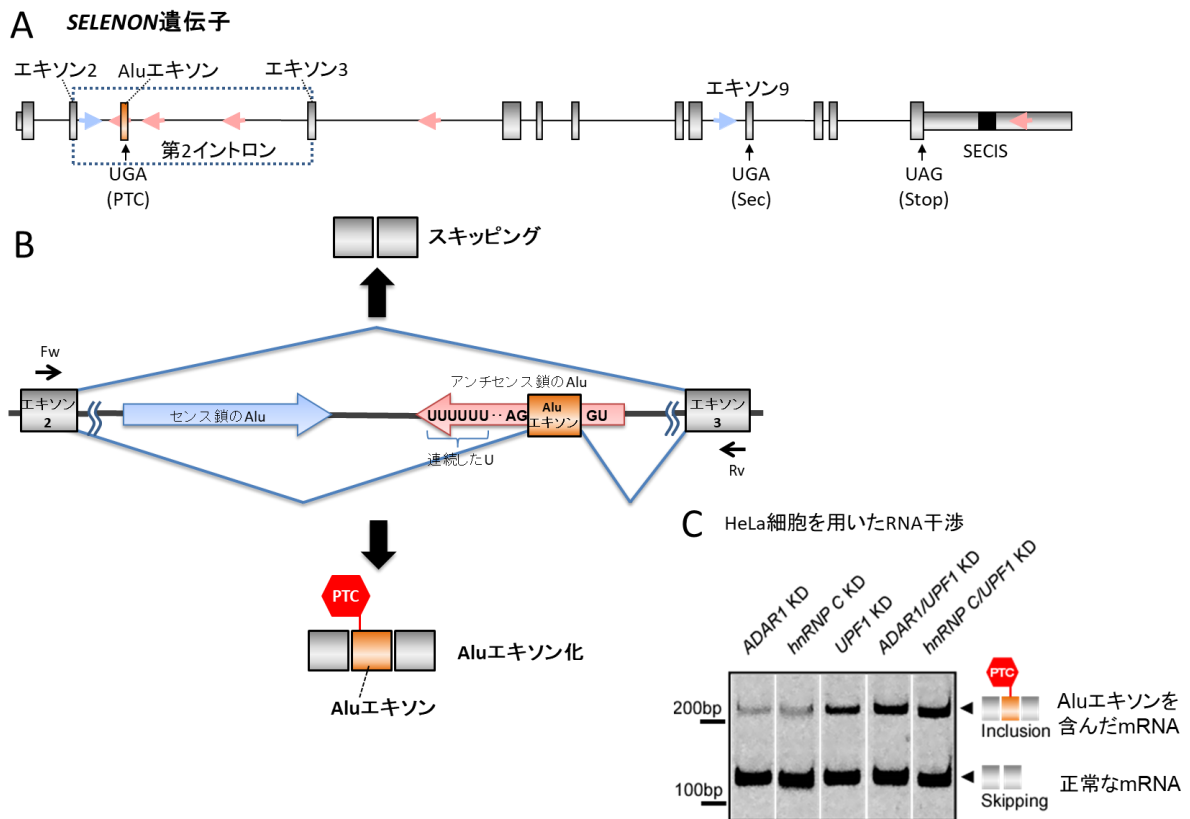


図 2. *SELENON* 遺伝子の構成と Alu エキソン化のしくみ

(A) *SELENON* 遺伝子の全体の構成を示す。エキソン 2 と 3 の間の第 2 イントロンを点線枠で示した。センス鎖およびアンチセンス鎖の Alu 配列をそれぞれ青とピンクの矢印で示す。Sec をコードする UGA コドン(リコーディング部位)はエキソン 9 に、SECIS エlement は 3'非翻訳領域にある。

(B)エキソン 2 と 3 の間を拡大した領域を示す。アンチセンス鎖の Alu 配列には Alu エキソンおよびスプライシングに必要なコンセンサス配列を含む。スプライシングにより Alu エキソンがスキッピングされると正常な mRNA が生じ、Alu エキソンが取り込まれると、異常な mRNA が生じる。Alu エキソンには未成熟終止コドン (PTC)が生じる。逆転写 PCR のプライマーの位置を黒の矢印 (Fw, Rv)で示す。

(C) 逆転写 PCR による Alu エキソン化の解析。Alu エキソンを含む異常な mRNA(上のバンド)と Alu エキソンがスキッピングされた正常な mRNA(下のバンド)の比率から Alu エキソン化を定量した。NMD に必須の因子である UPF1 を RNA 干渉によってノックダウンしたところ Alu エキソンを含む異常な mRNA が増加したことから、NMD の機構で分解されていることがわかる。また、UPF1 をノックダウンした状態で ADAR1 および hnRNP C をノックダウンするとさらに異常な mRNA が蓄積したことから、これら 2 つの因子は Alu エキソン化を抑制する役割がある。

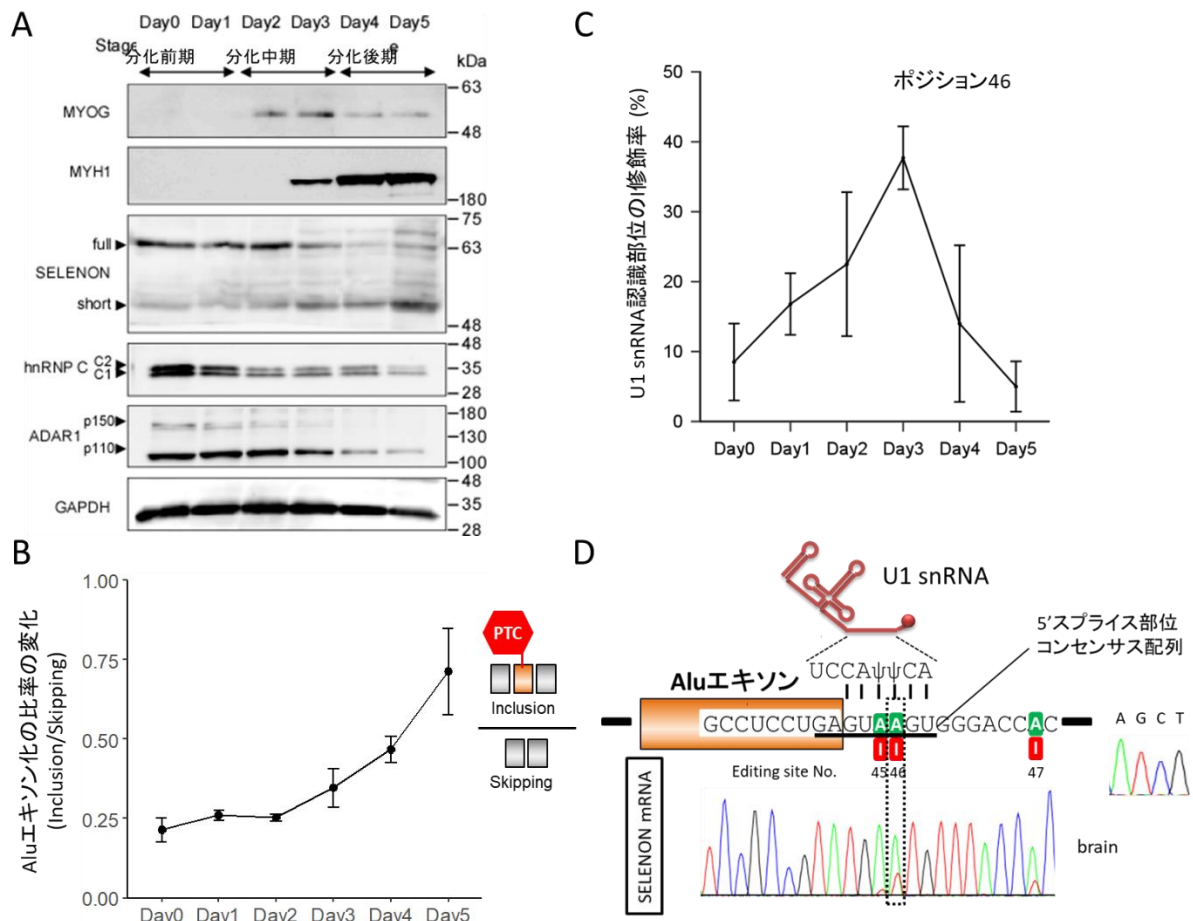


図 3. 分化中期には Alu エキシソンの 5'スプライス部位周辺の I 修飾が増加し Alu エキシソニ化を抑制する

(A) ウェスタンブロッティングによる Hu5/KD3 細胞の分化過程におけるタンパク質定常状態量の解析。筋分化のマーカー遺伝子である MYOG、MYH1 の発現より、筋分化誘導からの日数で、Day0 と Day1 を分化前期、Day2 と Day3 を分化中期、Day4 と Day5 を分化後期とした。SELENON の完全長と短い翻訳産物、hnRNP C2 と hnRNP C1、ADAR1 の p150 と p110 のアイソフォームを矢頭で示した。GAPDH はコントロールとして用いた。

(B) 筋分化過程における *SELENON* のスキッピングされた正常な mRNA と Alu エキシソンを含む異常な mRNA 量を逆転写 qPCR により定量した。3 回測定した値の平均値と標準偏差を示した。

(C) 筋分化過程における *SELENON* mRNA の Alu エキシソン 5'スプライス部位(U1 snRNA 認識部位、position 46)における I 修飾率。3 回測定した値の平均値と標準偏差を示した。

(D) *SELENON* mRNA の Alu エキシソン 5'スプライス部位周辺の I 修飾と U1 snRNA の認識。波形はサンガーシーケンシングにより得られたクロマト図であり、I は化学構造が G に類似していることから、I 修飾部位では緑の A と赤の G の波形の混在が見られる。このデータはヒト脳由来の RNA を用いた。

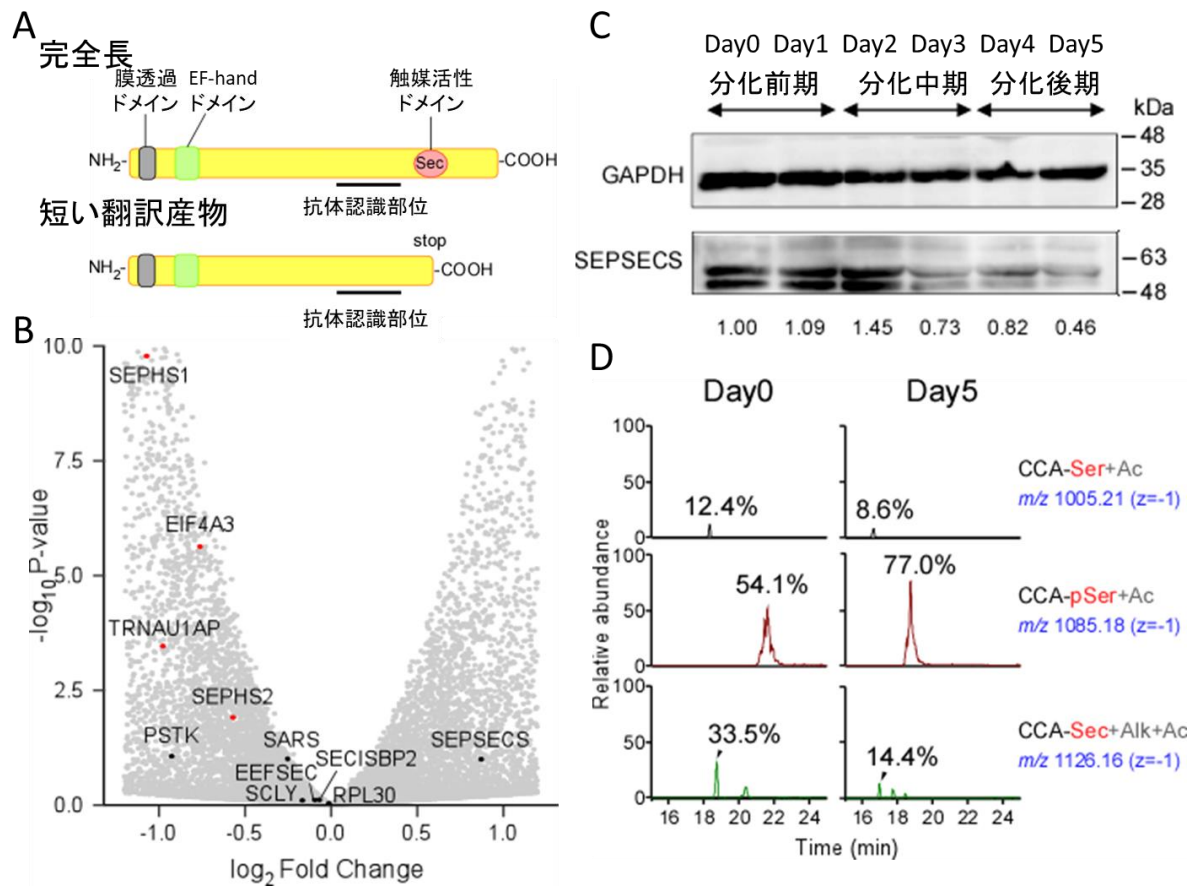


図 4. 筋分化の後期に UGA/Sec コドンのリコーディングが抑制される

(A) SELENON タンパク質の完全長と短い翻訳産物のドメイン構造の模式図。灰色が膜貫通ドメイン、緑が EF-hand ドメイン、赤が触媒活性ドメインを表す。また下線は図 3A で用いられた抗 SELENON 抗体のエピトープ部位を示す。

(B) Hu5/KD3 細胞の分化過程における RNA-seq での Day0 に対する Day5 の発現の volcano plot。横軸が \log_2 fold change、縦軸が $-\log_{10}$ P-value を示す。赤の点は P-value < 0.05 (t 検定) で有意に変動している UGA/Sec リコーディング因子を示す。

(C) ウェスタンブロッティングによる Hu5/KD3 細胞の分化過程における SEPSECS 発現量の解析。バンドの濃さから SEPSECS の発現量を定量し、コントロールである GAPDH でノーマライズし、Day0 を 1 とした相対値を下部に示した。

(D) Hu5/KD3 細胞分化の Day0 (分化前) と Day5 (分化後) における tRNA^{Sec} 末端にアミノ酸が付加した RNase T₁ 消化断片のマスキングクロマトグラム。配列、m/z および価数は右に示した。縦軸はこれら 3 つの強度の合計を 100 として表している。