

セレノプロテインPの翻訳を抑制する新規 noncoding RNA の同定および その病態生理学的意義

三田 雄一郎¹, 斎藤 芳郎²

1. はじめに

血漿中に存在するセレノプロテインP (SELENOP) は、必須微量元素セレン (Se) を含むタンパク質であり、Seをセレノシステイン (Sec; システインの硫黄がSeに置き換わったアミノ酸) の形で持つ。SELENOPは、Seを全身に運ぶ役割を担っている。近年、血中SELENOPの増加が、2型糖尿病を増悪させることが明らかになり、糖尿病治療標的として注目されている^{1,2)}。SELENOPをはじめとするSe含有タンパク質は、ユニークな翻訳機構により合成される。Se含有タンパク質をコードするmRNAの3'非翻訳領域 (3'UTR) には、Sec挿入配列 (SECIS) と呼ばれる安定なループ構造を持つ配列が存在し、通常では終止コドンとして認識されるUGAにSecが挿入される。SECISには、UGAのアンチコドンを持つSec-tRNA^{Sec}や特異的な伸長因子eEFSec、SECIS結合タンパク質SBP2が複合体を形成している。Se含有タンパク質の翻訳においてポリペプチドがUGAまで合成されると、複合体からSecが供給され、UGA以外の終止コドンで翻訳が止まる。

我々は、SECIS配列を解析する過程で、SELENOP mRNAのSECISを含む3'UTRと相補的な配列を持つ機能不明の遺伝子 *coiled coil domain-containing protein 152* (*CCDC152*) を同定した。SELENOPを発現しているヒト肝がん由来HepG2細胞に*CCDC152*を過剰発現させたところ、

SELENOP mRNA量を変化させることなく、タンパク質量を減少させた。*CCDC152* RNAは核内に多く存在すること、*CCDC152*を発現していないHEK293細胞に過剰発現させてもタンパク質を検出できないこと、*CCDC152* RNAとSELENOP mRNAが結合することなどから、RNAとして機能する可能性が考えられた。*CCDC152*を過剰発現させたHepG2細胞では、SELENOP mRNAとリボソームの結合や、SECIS結合タンパク質SBP2の結合が減少した。我々はこれらの機能から*CCDC152*を *long noncoding RNA inhibitor of selenoprotein P translation* (*L-IST*) と命名した³⁾。*L-IST*を増加させる化合物として、緑茶の主成分として知られるエピガロカテキンガレート (EGCg) を同定し、EGCgがマウス肝臓の*L-IST*増加および血中SELENOP量の減少を引き起こすことを見いだした。SELENOPの発現増加が2型糖尿病の発症進展に関わることから、*L-IST*の増加は、糖尿病の予防と治療に有効となる可能性がある。以上、本稿ではSe含有タンパク質の翻訳機構について解説し、我々が見いだした*L-IST*の作用を解説する。また、2型糖尿病の新たな治療戦略となる*L-IST*の増加について記す。

2. セレノシステインの翻訳機構

必須微量元素であるSeは欠乏すると重篤な心筋症を生じることやがんの発症率が増加することが知られる^{4,5)}。Seの生理機能を担うタンパク質は、SeをSecの形で含み、ヒトゲノム中には25種類見つかっている。その中には、glutathione peroxidase (GPx) や thioredoxin reductase (TrxR) などの抗酸化タンパク質、iodothyronine deiodinase (IDO) などの甲状腺ホルモン合成に関連するタンパク質が含まれ、酸化ストレス防御やエネルギー代謝に重要な役割を担う。Secのタンパク質中への挿入は翻訳段階で行われており、Secは“翻訳されうる21番目のアミノ酸”とも呼ばれる⁶⁾。Secの翻訳に必須なSECISと呼ばれるヘアピン構造にSBP2やSec-tRNA^{Sec}が結合し、通常は終止コドンとして機能しているUGAコドンにSecが挿入される⁷⁾。SECISとSBP2の結合力の強さはSECISの立体構造に依存している。25種類存在するSe含有タンパク質のSECIS塩基配列は、2個のステムループを含むヘアピン構造をとること以外、共

¹同志社大学生命医科学部医生命システム学科システム生命科学研究室 (〒610-0394 京都府京田辺市多々羅都谷1-3)

²東北大学大学院薬学研究科代謝制御薬学分野 (〒980-8578 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6-3 C301)

Identification of novel noncoding RNA that suppress translation of selenoprotein P and its pathophysiological implication

Yuichiro Mita¹ and Yoshiro Saito² (¹The Systems Life Sciences laboratory, Department of Medical Life Systems, Faculty of Life and Medical Sciences, Doshisha University, 1-3 Miyakodani, Tatara, Kyotanabe, Kyoto 610-0394, Japan, ²Laboratory of Molecular Biology and Metabolism, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University, C301, 6-3 Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8578, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940386

© 2022 公益社団法人日本生化学会

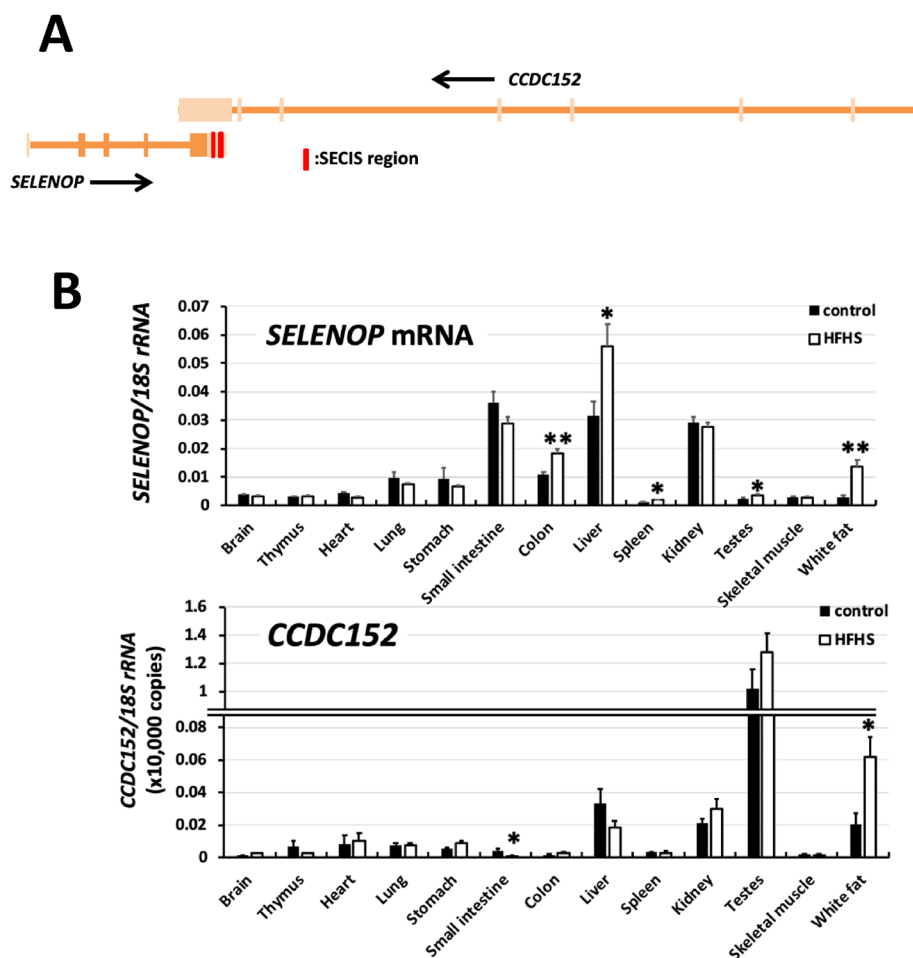


図1 *CCDC152* 遺伝子の模式図と発現 (文献3より一部転載)

(A) *CCDC152* と *SELENOP* 遺伝子の配列。各遺伝子のエクソンを太く示した。SECIS 領域を赤で示した。*CCDC152* は *SELENOP* のコードされているゲノム領域のアンチセンス鎖にコードされている。(B) 正常および高脂肪高スクロース食 (HFHS) で飼育したマウスの各組織における *CCDC152* と *SELENOP* の mRNA 発現量 ($n=5$, mean \pm S.E.M.). ** $P<0.01$, * $P<0.05$ vs Control, Student's t test.

通性はほとんど存在しない。そのため、SECIS による Sec 挿入効率、つまり Se 含有タンパク質の翻訳効率は SECIS の配列依存的ではなく、SECIS の立体構造依存的であることが示唆されている⁸⁾。それを裏づけるように、それぞれの SECIS と SBP2 の結合力には違いがあることが報告されており、SECIS の立体構造を変化させる因子は Se 含有タンパク質の量を決める因子となりうると考えられる⁷⁾。

3. *CCDC152* の同定と機能解析

SelenoDB (<http://selenodb.crg.eu>) にある SECIS 配列の BLAST 解析を行った結果、Se 運搬タンパク質である *SELENOP* の SECIS 配列に対してアンチセンス配列を持つ遺伝子 *CCDC152* が見つかった (図1A)。*CCDC152* は、*SELENOP* の一部 coding 領域および SECIS 配列を含む 3'UTR 領域に対するアンチセンス配列を含み、両者は一

部完全に相補的な配列を有していた。各種培養細胞における *CCDC152* 発現量を解析したところ、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞やグリオーマ U087MG、ヒト T リンパ球腫 Jurkat 細胞で発現が認められたが、*SELENOP* を発現分泌する肝がん由来 HepG2 細胞での発現はわずかであった。マウスの各組織における発現量を比較したところ、*SELENOP* は主に肝臓、小腸、腎臓で発現がみられるのに対し、*CCDC152* は精巣で最も発現が高く、肝臓や腎臓、白色脂肪組織でも発現が認められた (図1B)。高脂肪高スクロース食 (HFHS) で飼育した糖尿病モデルマウスでは、肝臓における *SELENOP* 発現の増加がみられるが、肝臓の *CCDC152* は低下する傾向が認められた。これらの結果から、*CCDC152* 遺伝子が糖代謝とも関連する可能性が考えられた。

機能未知であった *CCDC152* について、*SELENOP* を発現している HepG2 細胞に過剰発現させ、*SELENOP* 発現に

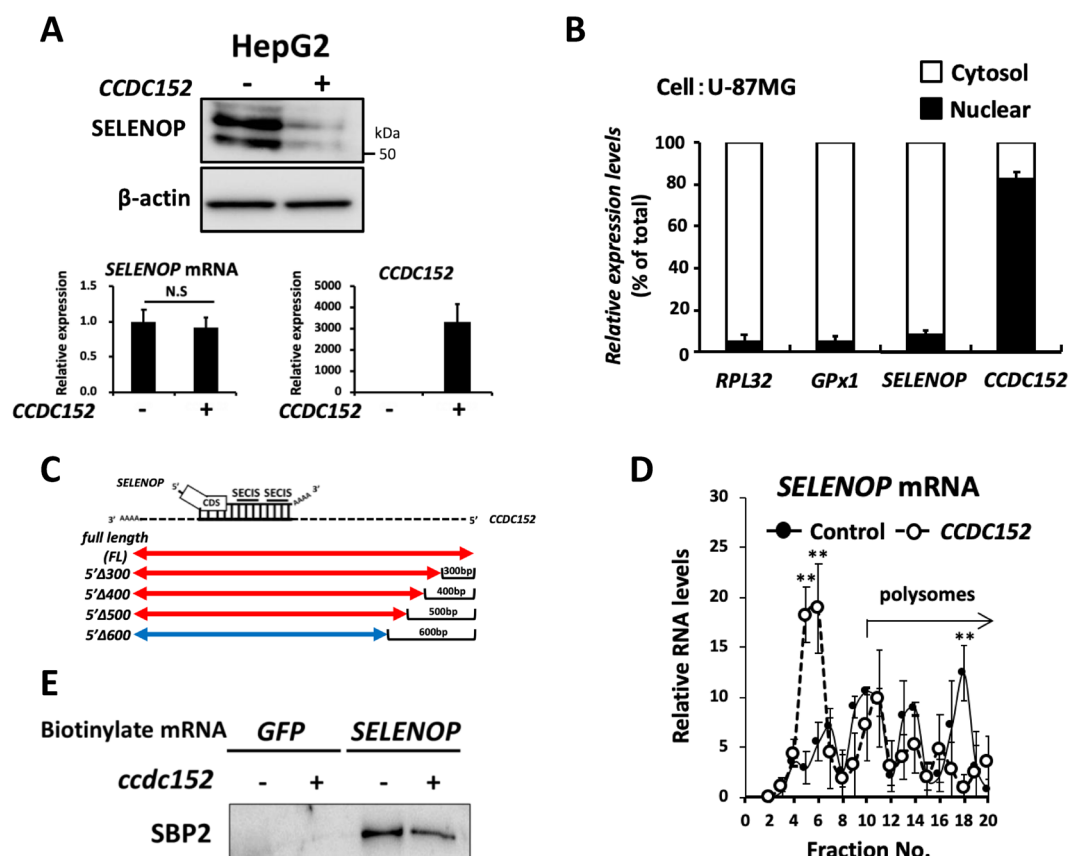


図2 *CCDC152*はlong noncoding RNAの特徴を持ち、SELENOPの翻訳段階を阻害する（文献3より一部転載）
 (A) HepG2細胞に*CCDC152*を過剰発現すると、SELENOPタンパク質がmRNA量非依存的に減少した。(B) *CCDC152* RNAは、他の遺伝子と異なり核画分に多く検出された。内在的に*CCDC152*を発現するアストロサイトーマU-87MG細胞の結果を示した。RPL32：ribosomal protein L32。(C) *CCDC152*を500bp削除（5' Δ 500）してもSELENOP発現量を低下させたが、600bp削除（5' Δ 600）すると発現量低下活性が消失した。(D)ポリソーム解析により、*CCDC152*の過剰発現に伴うSELENOP mRNAへのリボソーム結合の低下が観察された（ $n=3$, mean \pm S.D.）。** $P<0.01$ vs Control, student's t test。(E)ビオチン化mRNAを用いたプルダウンアッセイから、*CCDC152*はSELENOP mRNAとSBP2の結合を阻害すると考えられた。GFP：green fluorescent protein。

及ぼす効果を検討した。その結果、SELENOPのタンパク質量の減少が起こったが、SELENOP mRNA量に変化は認められなかった（図2A）。SELENOPを発現していないHEK293細胞に*CCDC152*とSELENOP mRNAを過剰発現した際にも、HepG2細胞と同様に、mRNA量の減少を伴わずにSELENOPタンパク質の減少が起こり、細胞特異性はみられなかった。その他、SELENOP以外のSe含有タンパク質（GPxやTrxR）のタンパク質量、mRNA量には変化がみられず、*CCDC152*はSe含有タンパク質のSECIS全般に影響を与えるわけではなく、特異的にSELENOPタンパク質量を減少させていると考えられた。また、プロテアーゼ阻害剤を用いた検討から*CCDC152*はSELENOPの分解を促進していないことから、転写以降の段階でSELENOPタンパク質を減少させている可能性が考えられた。

次に、*CCDC152*遺伝子の特徴について解析を行った結果、*CCDC152*はpoly-A tail構造を持つこと、細胞内の局在

は主に核内であることがわかった（図2B）。*CCDC152*にはオープンリーディングフレーム（ORF）が存在するが、*CCDC152*を発現していないHEK293細胞に、ORFのC末端にHA-Tagをつけた*CCDC152*を遺伝子導入してもタンパク質が検出されなかった。*CCDC152*の機能領域について、想定される開始メチオニンが削除される5'末端から500塩基まで欠損（5' Δ 500）させてもSELENOPタンパク質の低下作用は維持されたが、600塩基まで欠損（5' Δ 600）させると作用が消失した（図2C）。以上のことから、*CCDC152*がlong noncoding RNAとして機能する可能性が考えられた。

*CCDC152*が転写以降の段階でSELENOPタンパク質を減少させている可能性が示されたため、SELENOP mRNAとリボソームの結合についてポリソーム解析で評価を行った。その結果、*CCDC152*を過剰発現したHepG2細胞では、リボソームが豊富に結合している領域（フラクショ

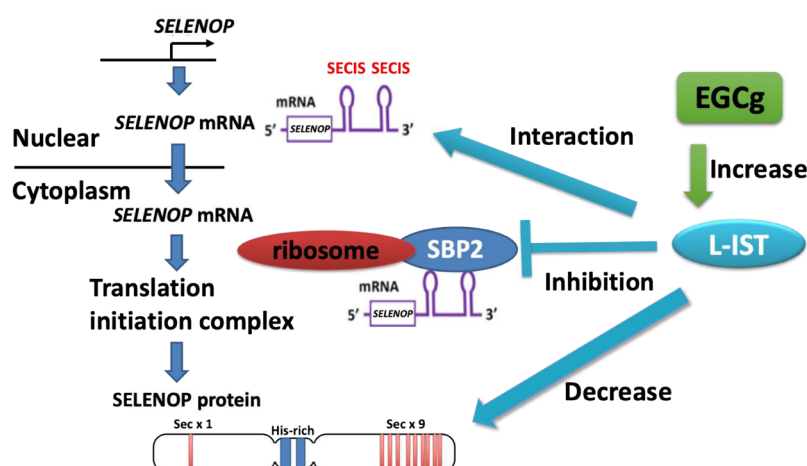


図3 エピガロカテキンガレート (EGCg) による *L-IST* (*CCDC152*) 増加を介した *SELENOP* 低下作用 (文献3より一部転載)

ン番号の大きい方)の *SELENOP* mRNA が有意に減少した (図2D)。一方で、Se含有タンパク質である GPx4 は、*CCDC152* の過剰発現を行っても mRNA の分布に大きな変化は認められなかった (データは示さず)。このことから、*CCDC152* は *SELENOP* の翻訳段階、特にリボソームとの結合を阻害していることが示唆された。SECIS を介した Sec 挿入に必須の因子である SBP2 と *SELENOP* mRNA との結合を確認したところ、*CCDC152* の過剰発現によって *SELENOP* mRNA と SBP2 との結合が减弱した (図2E)。以上より、*CCDC152* は *SELENOP* の翻訳段階、特に SECIS と SBP2 との結合を阻害していると考えられる。我々は以上の機能から *CCDC152* を *long noncoding RNA inhibitor of selenoprotein P translation* (*L-IST*)⁹⁾ と命名した (図3)。

4. EGCg は *L-IST* の発現を増加させ、*SELENOP* タンパク質を減少させる

血中 *SELENOP* の増加は、糖尿病^{7,8)}・肺高血圧⁹⁾を増悪させることがすでに明らかにされており、*SELENOP* を低下させる方法の確立は、関連疾患の新たな治療戦略となる。そこで、*L-IST* を増加させる物質の探索を行った。その結果、緑茶の主成分であり糖尿病予防効果が知られている EGCg が、*SELENOP* mRNA 量を変化させることなく、*L-IST* を増加させることが明らかになった。EGCg で刺激した HepG2 細胞では、*L-IST* の増加に伴い *SELENOP* タンパク質の減少も確認された。そこで、マウスに EGCg を投与する実験を行った結果、EGCg 投与マウスの肝臓では、*L-IST* の増加が起こり、血中 *SELENOP* の減少がみられた (図3)。

5. noncoding RNA による翻訳制御メカニズム

ゲノムの中に存在する遺伝子間領域の多くは、機能を持たない“ジャンク領域”と考えられた時期があったが、近年そのジャンク領域から多くの noncoding RNA が見いだされ、その機能が明らかになっている。タンパク質の「量」の調整に関与する noncoding RNA の解析は精力的に行われており、siRNA による RNA 干渉は2006年にノーベル医学・生理学賞の受賞対象となった。siRNA/miRNA のような 20 mer 前後の短い RNA によるタンパク質の減少は、RISC 複合体を介し、mRNA の分解などを介してタンパク質を減少させる。それに対し、long noncoding RNA による翻訳制御メカニズムは、RNA の種類によって異なるメカニズムが報告されている。アンチセンス *BASE-1* は mRNA の安定化を引き起こすことで *BASE-1* タンパク質量を増加させる¹⁰⁾。SINEB2 配列を持つ RNA はリボソームをリクルートすることで、ターゲットとなる mRNA の翻訳を促進する¹¹⁾。mRNA に直接作用しない long noncoding RNA として、competing endogenous RNA (ceRNA) と呼ばれる RNA 群が存在する。ceRNA は miRNA をトラップすることによって miRNA の作用を弱め、標的になっている mRNA のコードするタンパク質量を増加させる¹²⁾。今回同定された *L-IST* は、*SELENOP* mRNA の SECIS 配列の相補的な配列を有し、*SELENOP* mRNA と直接結合することによって、SECIS と SBP2 との結合を阻害し、*SELENOP* mRNA とリボソームの結合を阻害すると思われる。SECIS の立体構造と翻訳効率との関連性は研究が進んでいるが、立体構造に影響を与える因子の探索は進んでおらず、*L-IST* の発見は新たな視点を提供すると思われる。

6. おわりに

我々は、SELENOP mRNAの持つSECIS配列と相補的な配列を持つ新規noncoding RNA, *L-IST*を同定した。*L-IST*はSELENOPの翻訳段階を特異的に阻害することによって、SELENOPタンパク質量を減少させた(図3)。SELENOPはもともとSe運搬タンパク質として研究が進められてきたが、近年の研究で過剰なSELENOPが糖尿病をはじめとした多くの疾患に関連することが明らかとなってきた^{1,2,9)}。*L-IST*はSELENOPのタンパク質量を特異的に下げることができるため、*L-IST*を増加させる治療法の確立は、SELENOP高値の患者に対する個別化医療として有効であると考えられる。

謝辞

本稿で紹介したCCDC152/*L-IST*に関する研究は、野口範子 同志社大学教授、稲田利文 東京大学教授の協力のもと行いました。この場を借りて感謝申し上げます。

文 献

- Mita, Y., Nakayama, K., Inari, S., Nishito, Y., Yoshioka, Y., Sakai, N., Sotani, K., Nagamura, T., Kuzuhara, Y., Inagaki, K., et al. (2017) Selenoprotein P-neutralizing antibodies improve insulin secretion and glucose sensitivity in type 2 diabetes mouse models. *Nat. Commun.*, **8**, 1658.
- Misu, H., Takamura, T., Takayama, H., Hayashi, H., Matsuzawa-Nagata, N., Kurita, S., Ishikura, K., Ando, H., Takeshita, Y., Ota, T., et al. (2010) A liver-derived secretory protein, selenoprotein P, causes insulin resistance. *Cell Metab.*, **12**, 483–495.
- Mita, Y., Uchida, R., Yasuhara, S., Kishi, K., Hoshi, T., Matsuo, Y., Yokooji, T., Shirakawa, Y., Toyama, T., Urano, Y., et al. (2021) Identification of a novel endogenous long non-coding RNA that inhibits selenoprotein P translation. *Nucleic Acids Res.*, **49**, 6893–6907.
- Duntas, L.H. & Benvenga, S. (2015) Selenium: an element for life. *Endocrine*, **48**, 756–775.
- Rayman, M.P. (2012) Selenium and human health. *Lancet*, **379**, 1256–1268.
- Vindry, C., Ohlmann, T., & Chavatte, L. (2018) Translation regulation of mammalian selenoproteins. *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.*, **1862**, 2480–2492.
- Low, S.C., Grundner-Culemann, E., Harney, J.W., & Berry, M.J. (2000) SECIS-SBP2 interactions dictate selenocysteine incorporation efficiency and selenoprotein hierarchy. *EMBO J.*, **19**, 6882–6890.
- Donovan, J. & Copeland, P.R. (2012) Selenocysteine insertion sequence binding protein 2L is implicated as a novel post-transcriptional regulator of selenoprotein expression. *PLoS One*, **7**, e35581.
- Kikuchi, N., Satoh, K., Kurosawa, R., Yaoita, N., Elias-Al-Mamun, M., Siddique, M.A.H., Omura, J., Satoh, T., Nogi, M., Sunamura, S., et al. (2018) Selenoprotein P promotes the development of pulmonary arterial hypertension. *Circulation*, **138**, 600–623.
- Faghihi, M., Modarresi, F., Khalil, A., Wood, D.E., Sahagan, B.G., Morgan, T.E., Finch, C.E., St Laurent, G. 3rd, Kenny, P.J., & Wahlestedt, C. (2008) Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of beta-secretase. *Nat. Med.*, **14**, 723–730.
- Carrieri, C., Cimatti, L., Biagioli, M., Beugnet, A., Zucchelli, S., Fedele, S., Pesce, E., Ferrer, I., Collavin, L., Santoro, C., et al. (2012) Long non-coding antisense RNA controls Uchl1 translation through an embedded SINEB2 repeat. *Nature*, **491**, 454–457.
- Tay, Y., Kats, L., Salmena, L., Weiss, D., Tan, S.M., Ala, U., Karreth, F., Poliseno, L., Provero, P., Di Cunto, F., et al. (2011) Coding-independent regulation of the tumor suppressor PTEN by competing endogenous mRNAs. *Cell*, **147**, 344–357.

著者寸描

●三田 雄一郎 (みた ゆういちろう)

同志社大学生命医科学部医生命システム学科助教。博士(医学)。

■略歴 2003年群馬大学工学部卒業、05年京都府立大学大学院農学研究科博士前期課程修了、10年岡山大学大学院医歯薬学総合研究科博士課程修了。京都府立医科大学博士研究員、同志社大学特別研究員、宮崎大学特任助教を経て18年より現職。

■研究テーマと抱負 noncoding RNAによるSe代謝制御メカニズムの解析。Se含有タンパク質は生命維持に必須のタンパク質だが、その翻訳調整メカニズムは詳しくわかっておらず、その解明を目指している。

■ウェブサイト <https://systemlifescience.wixsite.com/system-life-science/welcome-message>

■趣味 サイクリング。

●斎藤 芳郎 (さいとう よしろう)



東北大学大学院薬学研究科教授。博士(薬学)。

■略歴 1996年北海道大学薬学部卒業、2001年同大学院薬学研究科博士課程修了。2000年よりJSPS特別研究員DC2、02年産業技術総合研究所研究員、08年同志社大学生命医科学部講師、12年同大准教授、18年同大教授。18年9月より現職。

■研究テーマと抱負 セレンや超硫黄分子など微量元素や活性種の代謝を分子レベルで理解し、その生理的意義を明らかにするとともに、関連する疾患の治療に役立てることを目指しています。生体内の絶妙なバランスを分子レベルで明らかにしていきたい。

■ウェブサイト <http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~taisya/index.html>

■趣味 スポーツ観戦、日本酒とコーヒー。