肝臓において翻訳調節因子 YB-1 と相互作用する新奇 lncRNA の解析

田中　融
日本大学薬学部

遺伝子発現は主に転写レベルと翻訳レベルで調節されるが、YB-1 は DNA と RNA の双方に対する結合性を持ち、細胞状態に応じて転写因子や翻訳調節因子として機能する多機能タンパク質である[1, 2]。正常な細胞では主に細胞質に分布し、mRNA と相互作用してポリソームの形成に影響を与え、翻訳を調節している。ところが、がん細胞では抗がん剤などの genotoxic stress によって核へ移行し、多剤耐性遺伝子 MDR1 や上皮成長因子受容体 EGFR などの転写を促進することによって、がんを増悪させることが知られている[3, 4]。

我々はこれまでに、YB-1 がマウスの一生において組織ごとに異なる時期に発現することを報告している[5]。そして、脳や骨格筋では生後間もない発達期に多く発現し、GluR2 や CaM1、ニコチン性アセチルコリン受容体など、神経伝達に関わるタンパク質の mRNA と相互作用して、神経刺激に応じた迅速な翻訳活性化を行うことを明らかにした[6-8]。その一方、肺や腎臓、精巣、肝臓では生まれてから大人にいたるまで一定レベルで発現している。特に肝臓では、興味深いことに老化による発現レベルの低下も見られず、一生を通じて高度に発現しているのが観察された。肝臓は様々な代謝反応を担う臓器であることから、YB-1 による翻訳調節が、幼齢期からアダルトまで全てのライフステージで重要な代謝反応に関与していることが予想された。そのため、本研究では、まず肝臓における YB-1 のポリソーム結合性を調べ、どのような mRNA の翻訳調節を行っているのか解析した。

結果・考察

1. 幼齢期とアダルトの肝臓における YB-1 のポリソーム結合性

我々はこれまでに、脳や骨格筋において YB-1 がポリソームと相互作用し、神経刺激に応じて翻訳が活発な高分子量のポリソーム画分にシフトすることを報告している[6-8]。脳や骨格筋では生後間もない時期にしか YB-1 は豊富に発現していないのに対し、肝臓では一生を通じて高度に発現しており、また大人と子供では肝臓の代謝に違いがあることから、まず、YB-1 のポリソーム結合性を幼齢期とアダルトの両方について解析を行った。幼齢期およびアダルトのマウス肝臓をホモジナイズし、15~45%のショ糖勾配遠心を行った(Fig. 1)。予想に反し、YB-1 はアダルトでは脳や骨格筋においてポリソーム画分に含まれていたが、一方幼齢期ではポリソームフリーの画分にのみ分布していた。この結果は、幼齢期では YB-1 が翻訳活性のある mRNA の翻訳調節に関与していないことを示している。そこで、次に幼齢期の肝臓とアダルトの肝臓それぞれにおいて、どのような mRNA が YB-1 と相互作用しているのかを調べた。

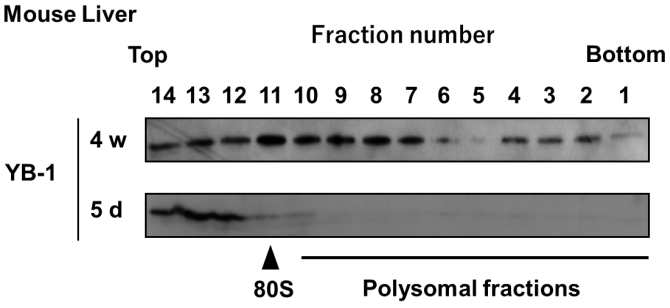

Fig. 1 肝臓におけるYB-1のポリソーム結合性
4週齢および5日齢のマウス肝臓から細胞質を調製し、15~45%のショ糖勾配遠心を行った。各画分の一定量を用いてwestern blotを行い、抗YB-1抗体を用いてYB-1の分布を解析した。

2. 肝臓において YB-1 と相互作用する mRNA の解析

4 週齢および 5 日齢のマウス肝臓から細胞質を調製し、抗 YB-1 抗体を用いて免疫沈殿を行った。得られた複合体から RNA を抽出し、Oligo (dT)を使った RT-PCR により cDNA クローニングを行った。4 週齢では Glucokinase や Pyruvate kinase、Galactokinase 1 といった糖代謝に関わるものや、また脂質代謝に関わる Acetyl CoA carboxylase など代謝系酵素の mRNA と相互作用していた。一方、5 日齢のマウスでは非常に興味深いこと

に mRNA ではなくポリ A を持ついくつかの新奇 lncRNA が得られた。この結果は、幼齢期の肝臓では代謝を盛んに行う必要があるため、lncRNA が YB-1 と相互作用することによって、YB-1 による翻訳調節が起こらないようにしていることを示唆している。本研究ではその中で出現頻度の最も高かった 803 塩基の RNA を lncRNA-L と呼ぶことにし、これが YB-1 のポリソーム結合性に与える影響について解析を進めていくことにした。

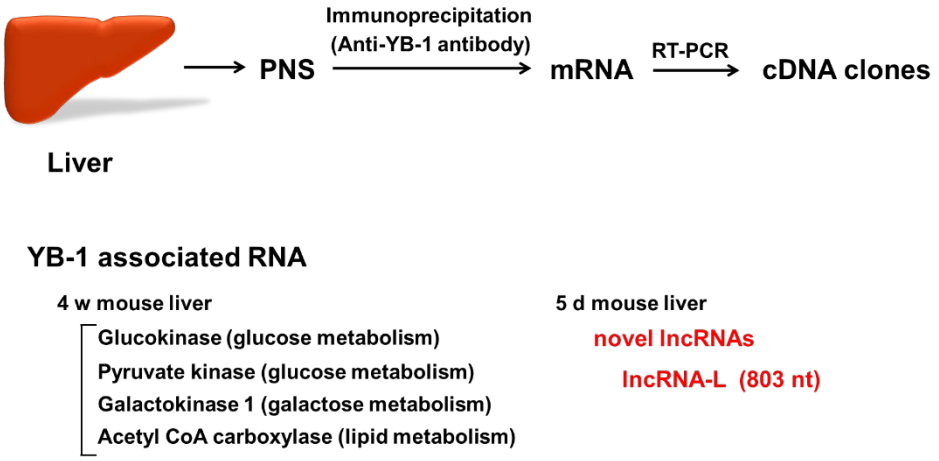

Fig. 2 肝臓でYB-1と相互作用するRNA
4週齢および5日齢のマウス肝臓から細胞質を調製し、抗YB-1抗体を用いて免疫沈殿を行った。RNAを抽出し、Oligo (dT)を用いて逆転写後cDNAクローニングを行った。

3. YB-1 のポリソーム結合性に対する lncRNA-L の影響

YB-1 のポリソーム結合性に与える lncRNA-L の影響を調べるために、ヒト肝由来細胞の HepG2 細胞に、lncRNA-L 発現プラスミドをトランスフェクションした。コントロールには EGFP を発現するプラスミドを用いた。細胞質を調製し、15~45%のショ糖勾配遠心を行ったところ、コントロールでは YB-1 が高分子量のポリソーム画分にまで分布していた一方、lncRNA-L を過剰発現させた方では、興味深いことに高分子量のポリソーム画分における YB-1 の量が大きく減少していた。この結果は、lncRNA-L が高分子量のポリソームから YB-1 を解離させる機能をもつことを意味している。そこで、次に YB-1 が解離した結果、YB-1 のターゲット mRNA の翻訳がどのように変化するのか解析した。

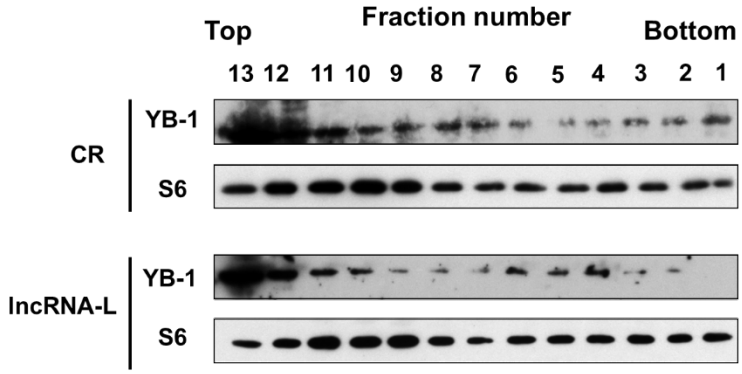

Fig. 3 YB-1のポリソーム結合性に与えるlncRNA-Lの影響
ヒト肝由来HepG2細胞にlncRNA-L発現ベクターをトランスフェクションして、lncRNA-Lを過剰発現させた。細胞質を調製して15~45%のショ糖勾配遠心を行い、各画分の一定量をwestern blot後、抗YB-1抗体を用いてYB-1の分布の変化を調べた。

4. GALK1 mRNA の翻訳に対する lncRNA-L の影響

ターゲットには 4 週齢のマウス肝臓において YB-1 が相互作用していた mRNA のうち、幼齢期の主要なエネルギー源であるガラクトースの代謝に関わる Galactokinase 1 (GALK1)の mRNA を用いた。lncRNA-L を過剰発現させると、YB-1 と lncRNA-L との相互作用は大きく増加し、反対に GALK1 mRNA との相互作用は減少した(Fig. 4A)。さらに GALK1 mRNA 量の変化を伴わずに GALK1 タンパク質量の増加が起こった(Fig. 4B)。このとき YB-1 タンパク質量に変化は見られなかった。これらの結果は、lncRNA-L が GALK1 mRNA から YB-1 を解離させた結果、GALK1 mRNA の翻訳を活性化させたことを示している。

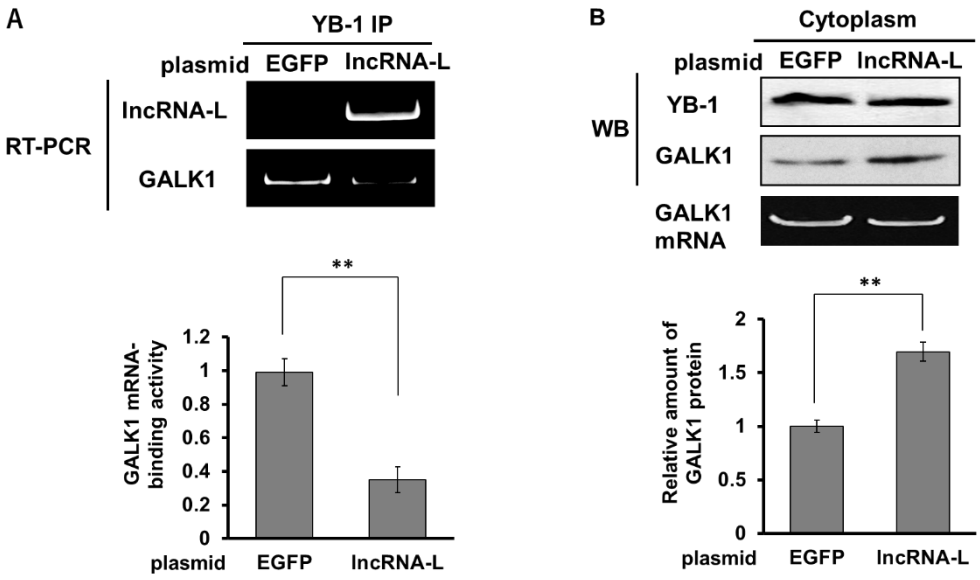

Fig. 4 GALK1 mRNAの翻訳に与えるlncRNA-Lの影響
HepG2細胞にlncRNA-L発現ベクターをトランスフェクションし、lncRNA-Lを過剰発現させた。(A) 細胞質を調製し、抗YB-1抗体を用いて免疫沈殿後、RT-PCRを行いlncRNA-LおよびGALK1 mRNAに対するYB-1の結合性の変化を調べた(**$p < 0.01$: Student's *t*-test)。(B) YB-1タンパク質量およびGALK1タンパク質量の変化はwestern blotで、GALK1 mRNA量の変化はRT-PCRで解析した(**$p < 0.01$: Student's *t*-test)。

まとめ

肝臓において YB-1 は一生を通じて高度に発現が見られるが、幼齢期とアダルトでポリソームに対する結合性が異なっていた。アダルトでは他の組織と同様にポリソームと相互作用していたが、幼齢期ではポリソームとは相互作用せず、非ポリソーム画分にのみ検出された(Fig. 1)。そして、ターゲットの RNA もアダルトでは GALK1 など代謝系酵素の mRNA などが得られた一方、興味深いことに幼齢期では本研究で解析を行った lncRNA-L をはじめとして、ポリ A 配列を持つ複数の新奇 lncRNA が得られた(Fig. 2)。lncRNA-L を過剰発現させると、YB-1 と lncRNA-L との相互作用が大きく増加するのに対して GALK1 mRNA との相互作用は大きく減少し、それに伴い高分子量のポリソームに結合する YB-1 の量が減少していた(Fig. 3, 4)。このとき GALK1 mRNA の翻訳が活性化していた。これらの結果から、幼齢期の肝臓では lncRNA-L などの lncRNA が YB-1 と相互作用することによって、YB-1 が mRNA の翻訳調節に参加できないように制御していることが示唆される。そして、lncRNA-L による YB-1 の制御が、幼齢期からアダルトに成長する過程で変化する、肝臓の代謝系遺伝子の発現パターンに影響を与えている可能性がある。また、データは示していないが、アダルトでもわずかに lncRNA-L が発現しており、食事などによって変化する遺伝子発現パターンにどのような影響を与えるのか興味深い。

謝辞
本研究は令和元年度日本大学薬学部研究奨励助成金の支援により行われた。このような興味深い結果が得られ、さらに研究を発展させられる機会を頂いたこと、心より感謝の意を表する。

参考文献

[1] K. Matsumoto, AP. Wolffe, Gene regulation by Y-box proteins: coupling control of transcription and translation, Trends Cell Biol., 8 (1998) 318-323.
[2] K. Kohno, H. Izumi, T. Uchiumi, M. Ashizuka, M. Kuwano, The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1, Bioessays, 25 (2003) 691-698.
[3] R.C. Bargou, K. Jürchott, C. Wagener, S. Bergmann, S. Metzner, K. Bommert, M.Y. Mapara, K.J. Winzer, M.

Dietel, B. Dörken, H.D. Royer, Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression, Nat. Med. 3 (1997) 447-450.

[4] A.L. Stratford, G. Habibi, A. Astanehe, H. Jiang, K. Hu, E. Park, A. Shadeo, T.P. Buys, W. Lam, T. Pugh, M. Marra, T.O. Nielsen, U. Klinge, P.R. Mertens, S. Aparicio, S.E. Dunn, Epidermal growth factor receptor (EGFR) is transcriptionally induced by the Y-box binding protein-1 (YB-1) and can be inhibited with Iressa in basal-like breast cancer, providing a potential target for therapy, Breast Cancer Res., 9 (2007) R61.

[5] A. Miwa, T. Higuchi, S. Kobayashi, Expression and polysome association of YB-1 in various tissues at different stages in the lifespan of mice, Biochem. Biophys. Acta, 1760 (2006) 1675-1681.

[6] T. Tanaka, S. Ohashi S, T. Funakoshi, S. Kobayashi, YB-1 binds to GluR2 mRNA and CaM1 mRNA in the brain and regulates their translational levels in an activity-dependent manner, Cell Mol. Neurobiol., 30 (2010) 1089-1100.

[7] T. Tanaka, S. Ohashi, M. Moue, S. Kobayashi, (2012) Mechanism of YB-1-mediated translational induction of GluR2 mRNA in response to neural activity through nAChR, Biochim. Biophys. Acta, 1820 (2012) 1035-1042.

[8] S. Ohashi, M. Moue, T. Tanaka, S. Kobayashi, Translational level of acetylcholine receptor α mRNA in mouse skeletal muscle is regulated by YB-1 in response to neural activity. Biochem. Biophys. Res. Commun., 414 (2011) 647-652.