

奨励金No.1588

環状 RNA とその翻訳産物を網羅的に同定する手法の開発

大久保 周子

京都大学 iPS 細胞研究所 未来生命科学開拓部門 助教

Comprehensive identification of circular RNA and their translated products

Chikako Okubo

Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University, Assistant Professor



本研究は iPS 細胞特異的な環状 RNA を数多く同定し、その中で翻訳されタンパク質を生成する環状 RNA に着目すべく「環状 RNA とその翻訳産物を網羅的に同定手法の開発」を当初目的とした。しかし、iPS 細胞特異的な翻訳制御機構の存在が明らかとなり、翻訳される環状 RNA の同定に先立って iPS 細胞特異的な翻訳因子の同定が必要と考え、「iPS 細胞特異的な翻訳制御に関する研究」へと方向転換し、EIF3D という翻訳開始因子が iPS 細胞の特性である多能性と自己複製能の維持に重要であることを示した。

Our initial research aimed to develop a comprehensive identification method for circular RNAs and their translational products, based on our prior identification of iPS cell-specific circular RNAs. However, our findings revealed the existence of an iPS cell-specific translational regulatory mechanism. Consequently, we determined that identifying iPS cell-specific translation factors was a necessary step before identifying translated circular RNAs. Therefore, we shifted our research focus to the study of iPS cell-specific translational regulation and demonstrated that the translation initiation factor EIF3D plays a crucial role in maintaining the pluripotency and self-renewal capacity of iPS cells.

1. 研究内容

【背景】

多能性幹細胞（Pluripotent Stem Cell: PSC）が分化多能性を保持したまま自己複製を維持するために、複数のシグナル伝達経路がバランスよく協調して働くことが重要である。このバランスが崩れると、PSC は自己複製のサイクルから逸脱し、分化細胞へと変化してしまう。したがって、自己複製と分化誘導のバランスを最適に保つためには、これらのシグナル経路を精密に制御する必要がある、その恒常性を保つメカニズムは完全には解明されていない。そこで、分化多能性のメカニズムを解明する鍵として、RNA をタンパク質に変換する「翻訳」過程が細胞の恒常性における重要な因

子として着目してきた。これまで、PSC の特性は転写因子ネットワークやエピゲノム、シグナル伝達を通じて研究されてきましたが、全体像は明らかにされておらず、これらの事象を橋渡しする翻訳制御に注目することで、未知のメカニズムが明らかになることが期待される。

【結果】

（1）多能性維持に必須の翻訳因子 EIF3D の同定

まず CRISPRi 法を用いて全遺伝子を対象とした機能スクリーニングを実施し、ヒト PSC の自己複製能に必須な約 150 の翻訳因子を同定した（図 1A）。翻訳因子の中でも特に EIF3D に着目し、発現抑制株を作製した（図 1B）。EIF3D の発現を抑

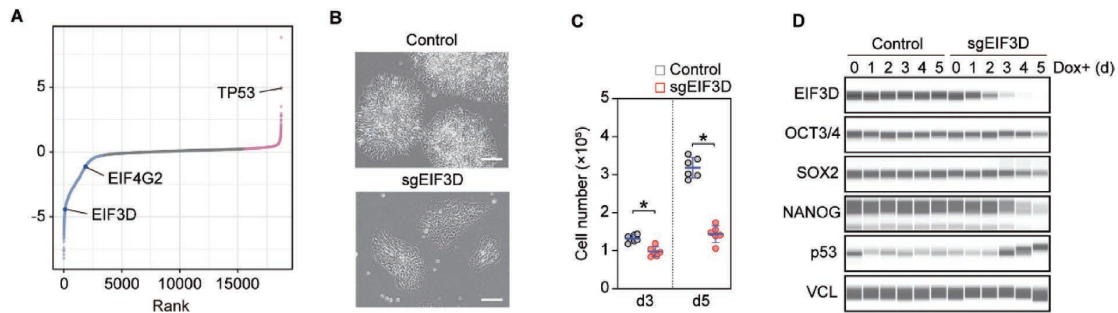


図1. A) CRISPRi法を用いた機能スクリーニング結果。青色が増殖を抑制した遺伝子、赤色が増殖を促進した遺伝子を示す。B) EIF3D発現抑制株、発現抑制3日目の顕微鏡像。C) EIF3D発現抑制下での細胞数の推移。D) EIF3D発現抑制0-5日目における多能性マーカー遺伝子（OCT3/4、SOX2、NANOG）とp53。VCLはコントロール

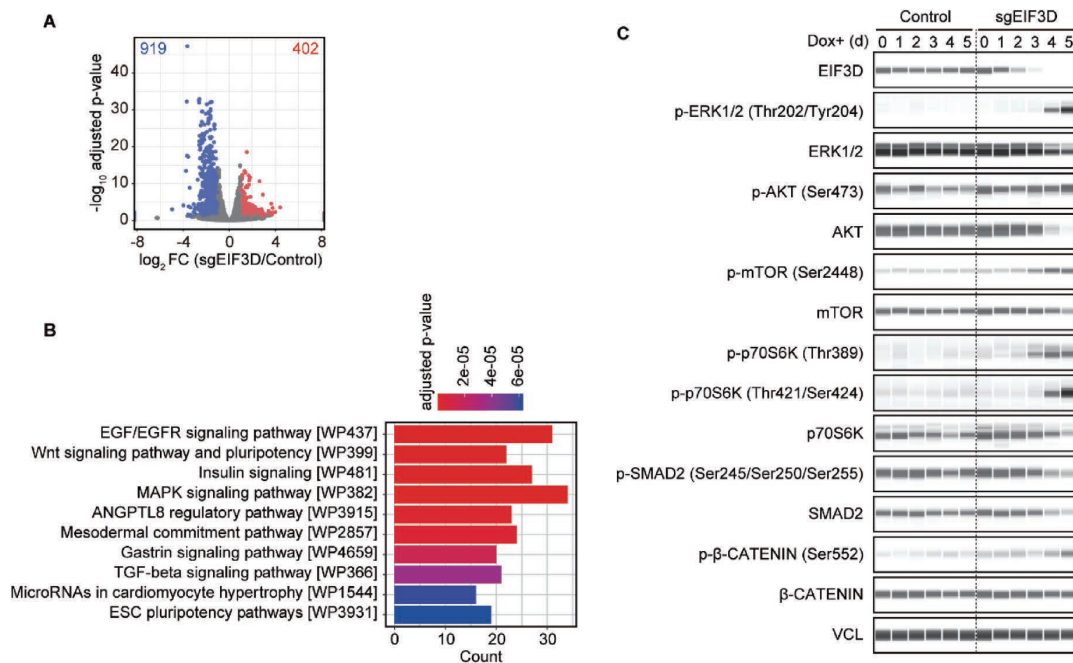


図2. A) 翻訳効率の変化結果。青色と赤色がそれぞれ Fold change 2 倍以上で翻訳効率が低下、もしくは上昇した遺伝子。B) EIF3D発現抑制下で翻訳効率が低下した遺伝子の Gene Ontology 解析結果。C) EIF3D発現抑制下での MAPK 因子（ERK1/2、p-ERK1/2）、Insulin 因子（AKT、p-AKT、mTOR、p-mTOR、p70S6K、p-70S6K）、WNT シグナル因子（β-CATENIN、p-β-CATENIN）、TGFβ 因子（SMAD2、p-SMAD2）の変化。VCL はコントロール

制したヒトPSCは、特定の細胞系譜への分化を伴わない分化多能性の喪失と著しい増殖能の低下という表現型を示した（図1B-D）。次に、これら二つの顕著な表現型の仕組みに迫ることで、EIF3Dの役割を理解することを目指す。

(2) EIF3Dは分化多能性維持に関わるシグナル伝達経路の翻訳を選択的に制御する

翻訳制御因子であるEIF3Dがどのような仕組みでヒトPSCの性質維持に関わっているのかを明らかにするために、EIF3D発現抑制下における遺伝子発現および翻訳効率の変化を調べた（図2A）。その結果、EIF3Dは翻訳制御を介して、ヒトPSCの自己複製に関わることが知られている複数のシ

グナル伝達経路（MAPK、Insulin、WNT、TGF β など）の活性を調節していることが明らかとなった（図 2B、C）。以上より、EIF3D による翻訳制御は、主要なシグナル伝達経路のバランスを調整することで、分化多能性を維持していることが明らかになった。

(3) EIF3D は p53 の活性を抑制しヒト PSC の高い増殖能を維持する

ヒト PSC において EIF3D の発現を抑制すると p53 タンパク質の発現が上昇しており（図 1C）、機能スクリーニングにおいて、p53 はヒト PSC の

自己複製を強力に阻害することがわかった。そこで、EIF3D が p53 の発現を制御する仕組みを調べた。その結果、EIF3D は p53 タンパク質の発現や安定性を制御する因子群の翻訳を調節することで、p53 タンパク質の発現を低く抑えていることが明らかとなった（図 1A、B）。このように、EIF3D は翻訳制御を介して p53 の活性を抑制し、ヒト PSC の高い増殖能を支えていることが明らかになった。

まとめ

本研究は、EIF3D の翻訳制御によって複数のシグナル伝達経路の恒常性を維持していることを示

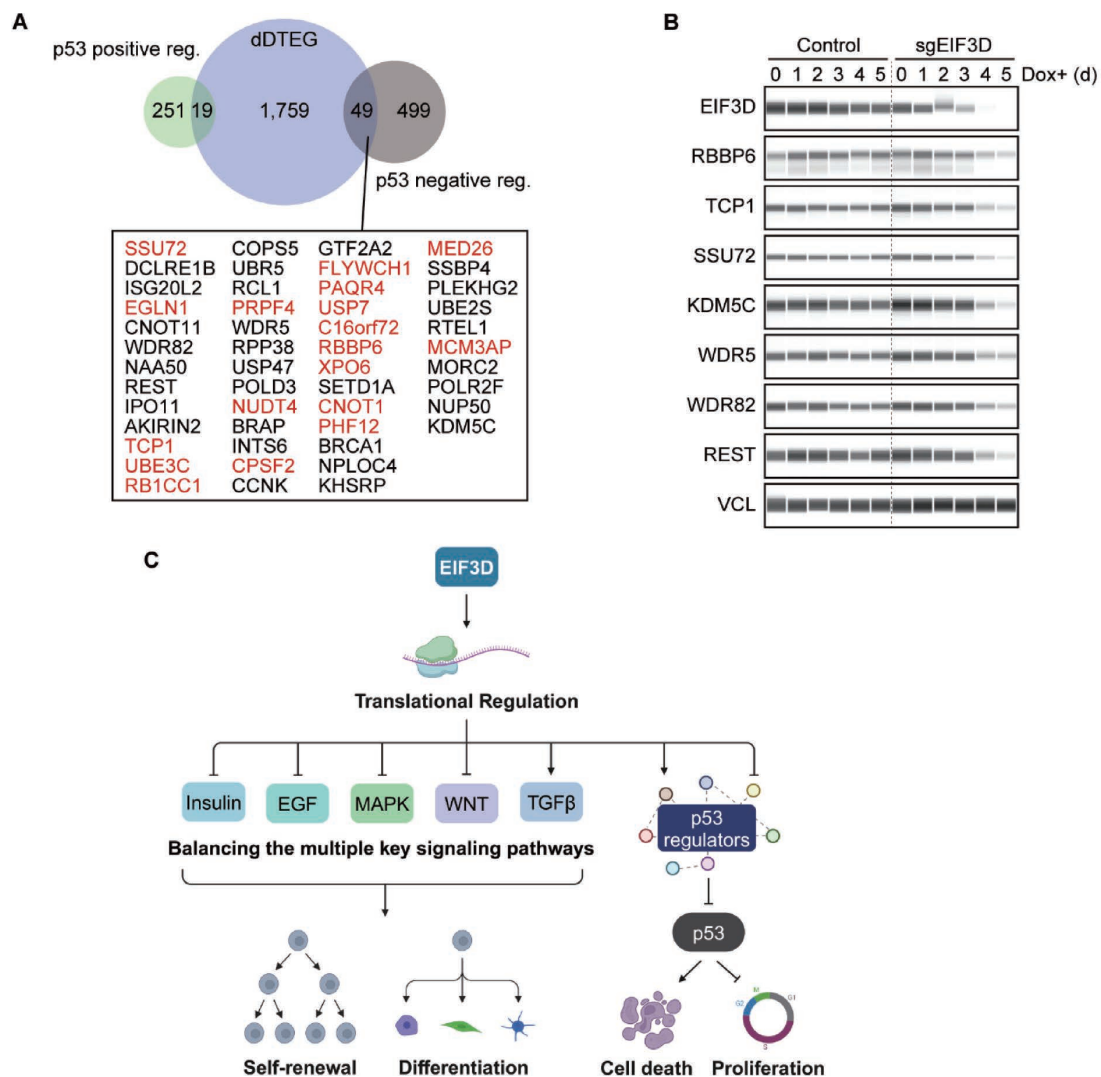


図 3. A) EIF3D 発現抑制で翻訳効率が低下した遺伝子と p53 タンパク質の制御因子の弁図。B) A で重複した遺伝子の一部遺伝子の発現変化。C) 本研究のスキーマ（Created in BioRender. Takahashi, K. (2025) <https://BioRender.com/e03i977>）

した（図 3C）。EIF3D の機能は、多能性幹細胞にとって重要な 2 つの特徴、すなわち自己複製・分化、そして強力な増殖能を解明する手がかりとなる。

2. 発表（研究成果の発表）

2.1 発表学会

Okubo C., Takahashi K., Selective Transplantation Orchestrates Key Signaling Pathways in Primed Pluripotency. ISSCR 2024 Annual Meeting, Hamburg, Germany, July 12, 2024 (Poster presentation)

2.2 発表論文

Okubo C.*, Nakamura M., Sato M., Shichino Y., Mito M., Takashima Y., Iwasaki S., Takahashi K.*. EIF3D Safeguards the Homeostasis of Key Signaling Pathways in Human Primed Pluripotency. Science Advances. 2025, eadq5484 (*corresponding author)