

氏 名 中沢 香織

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2205 号

学位授与の日付 2020 年 9 月 28 日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻  
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 RNG140(caprin2)-mediated translational regulation  
implicated in mouse eye lens differentiation

論文審査委員 主 査 教授 上野 直人  
教授 中山 潤一  
准教授 渡辺 英治  
准教授 飯島 崇利  
東海大学 医学部 医学研究科

## 博士論文の要旨

氏 名 Nakazawa, Kaori

論文題目 **RNG140 (caprin2)-mediated translational regulation implicated in mouse eye lens differentiation**

(マウスのレンズ分化における RNG140 (caprin2) による翻訳制御機構の解析)

Regulation of gene expression at the translational level is key to determining cell fate and function. Like many other developmental processes, gene expression during eye lens development is highly controlled. An RNA-binding protein RNG140 (also known as caprin2) is a candidate for such a translational regulator in lens development because RNG140 conditional knockout in mice has been reported to cause lens compaction defects and features of Peters anomaly. Although RNG140 is known to inhibit translation in rabbit reticulocyte lysates, it is unknown how RNG140 blocks translation and how such translational regulation is relevant to the *in vivo* function of RNG140 in lens development.

To elucidate the effect of RNG140 on translation in cells, I generated Chinese hamster ovary (CHO) cells that overexpress RNG140. Ribopuromycylation analysis of the cells showed that RNG140 overexpression significantly reduced nascent polypeptides, suggesting that global translation was suppressed by RNG140. Polysome profiling of the cells using sucrose density gradient centrifugation showed that RNG140 overexpression increased inactive 80S ribosomes that are not engaged on mRNAs. This was confirmed by an increased association of eukaryotic elongation factor 2 (eEF2) on ribosomes, which is a hallmark of inactive 80S. These results indicated that RNG140 increases inactive 80S ribosomes and suppresses global translation in CHO cells.

Next, RNG140-associated proteins were identified by mass spectrometry of RNG140 immunoprecipitates from RNG140 overexpressing cells. As a result, eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF3) subunit proteins were identified as major RNG140-associated proteins.

To test the effect of RNG140 on eIF3-mediated translation initiation, I performed translation assays using a luciferase mRNA reporter fused to 5'UTRs that cause eIF3-dependent and independent translation. RNG140 overexpression did not affect eIF3-independent translation, but did suppress eIF3-dependent translation. These data indicated that RNG140 suppresses eIF3-dependent translation initiation.

To determine which mRNAs are affected by RNG140 in cells, I performed ribosome profiling upon RNG140 overexpression in CHO cells. Overexpression of RNG140 identified transcripts with reduced translation efficiency (more-T: more likely target transcripts) and increased translation efficiency (less-T: less likely target transcripts). Furthermore, I compared the length and the number of coding exons of the transcripts between the more-T and less-T groups. The length of the coding sequence (CDS) and the number of coding exons in the more-T group were markedly larger than those in the less-T group, suggesting that RNG140 preferentially targets transcripts with longer CDS and more coding exons to repress translation.

Gene ontology (GO) enrichment analysis found that the more-T group included a number of factors involved in cell proliferation, for example, ubiquitin ligases, phosphoinositide 3-kinase (PI3K), PIK-related kinases such as TRRAP, DNA replication initiators, and mitotic regulatory proteins. Consistently, the rate of cell growth was decreased by RNG140 overexpression in CHO cells. These results suggested that RNG140-mediated translational repression of cell proliferation-associated mRNAs slows cell growth.

To investigate whether the RNG140-mediated translational regulation operates *in vivo*, I generated RNG140 knockout mice by CRISPR/Cas9-mediated genome editing. RNG140 knockout (*Rng140<sup>-/-</sup>*) mice had a 5-bp deletion in the exon 6 sequence, which caused a frame-shift and generated a downstream premature stop codon in the exon 7 sequence. Quantitative RT-PCR and western blotting confirmed that RNG140 transcript and protein were decreased in the eye lens of these mice. Moreover, *Rng140<sup>-/-</sup>* mice had a significantly reduced size of the lens nucleus compared with *Rng140<sup>+/+</sup>* mice.

Finally, I conducted ribosome profiling of *Rng140*<sup>-/-</sup> mouse eyes at postnatal day 0.5 (P0.5) and compared with that of *Rng140*<sup>+/+</sup> mice. RNG140 deficiency increased the translation efficiency of transcripts corresponding to the more-T group in the CHO ribosome profiling, but in contrast, decreased that of the less-T group. Notably, mRNAs involved in lens differentiation, such as crystallin mRNAs, were short, and their translation efficiency was reduced by RNG140 knockout. These results suggested that RNG140-mediated translational repression operates in mouse eyes *in vivo*, which reduces the translation of a set of mRNAs, whereas it allows other mRNAs, including those associated with lens differentiation, to escape repression and be translated during lens differentiation.

In summary, I characterized RNG140-mediated translational regulation. Several lines of evidence have shown that RNG140 binds to eIF3 and inhibits translation initiation. RNG140 preferentially inhibited translation of long mRNAs, which can be a way to differentially regulate mRNA translation for proliferation and differentiation. Thus, this study provides insights into the mechanistic basis of lens cell transition from proliferation to differentiation via RNG140-mediated translational regulation.

## 博士論文審査結果

Name in Full  
氏 名 中 沢 香 織

論文題目 RNG140 (caprin2)-mediated translational regulation implicated in mouse eye lens differentiation

RNA 結合タンパク質は遺伝子の転写後調節や RNA の局在制御などさまざまな機能を有している。申請者の中沢さんは、培養細胞及びマウスを用い、脳や眼に強く発現する RNA 結合タンパク質 RNG140 (caprin2) による翻訳制御機構及びその翻訳制御と眼のレンズ分化との関連性を解析した。まず、Chinese hamster ovary (CHO) 細胞において RNG140-GFP の強制発現が翻訳に与える影響を、リボピューロマイシレーション染色法、ショ糖密度勾配遠心法、ポリソーム画分の eEF2 イムノプロット法によって解析した。その結果、全体的な翻訳が低下し、mRNA に結合していない翻訳不活性型の 80S リボソームが増加することを見出した。次に RNG140-GFP 発現 CHO 細胞からの免疫沈降及び質量分析により、RNG140 は翻訳開始因子 eIF3 とタンパク質-タンパク質相互作用で結合していることを見出した。そこで eIF3 依存的及び非依存的な翻訳のレポーター解析を行い、RNG140 の強制発現は eIF3 依存的な翻訳を特異的に抑制することを示した。さらに RNG140-GFP 発現細胞のリボソームプロファイリングを行い、RNG140 発現による mRNA の翻訳効率の変化を網羅的に解析した。その結果、長さの短い mRNA は RNG140 による翻訳抑制を免れ、逆に長い mRNA の翻訳が有意に抑制されていることを見出した。長い mRNA の中には HECT, PI3K/PI4K などの細胞増殖に関わるグループに分類される mRNA が多く含まれていることが遺伝子オントロジー解析によって示唆された。実際に CHO 細胞の増殖速度は RNG140-GFP の強制発現によって低下した。

次に申請者は、CRISPR/Cas9 法によって RNG140 ノックアウトマウスを作製した。RNG140 は眼のレンズで高い発現を示すが、ノックアウトによりその発現が顕著に低下したことを定量的 RT-PCR、イムノプロット、免疫組織染色により確認した。このマウスから眼球を単離し、リボソームプロファイリングを行った結果、RNG140 ノックアウトの翻訳効率への影響は CHO 細胞における RNG140 の強制発現とは逆相関があることを見出した。すなわち、HECT, PI3K/PI4K などに分類される長い mRNA の翻訳は上昇し、逆に短い mRNA の翻訳効率は相対的に低下した。クリスタリン mRNA などレンズの分化に関与する mRNA の長さは総じて短く、それらのノックアウトマウスにおける翻訳効率は低下した。この結果は、RNG140 がレンズ分化に関与するクリスタリンなどの mRNA を翻訳抑制のターゲットにしないことを示唆した。

以上の研究は、レンズ分化時に発現上昇する RNG140 による mRNA 選択的翻訳抑制が、如何に細胞増殖を抑制しつつ分化は抑制しないように機能するかという新たなモデルを提唱するとともに、mRNA の選択性とその長さに関連するという新たな現象を見出した研究である。よって審査委員会は、本研究が学位の授与にふさわしいと判断した。