

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08244

研究課題名(和文)酸化ストレス防御機能マスタースイッチとしてのmicroRNAに関する研究

研究課題名(英文)micro RNA as the master key for protection of oxidative stress

研究代表者

中木 敏夫(Nakaki, Toshio)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：30164148

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：RNA結合タンパク質Xは機能がこれまで未知であった既知タンパク質と同定した。このタンパク質の機能の一つが解明された。したがって、酸化ストレスのマスタースイッチとして働くmiR96は2つの経路によってEAAC1の発現を制御することが明らかになった。一つはEAAC1を直接抑制する経路、他の一つはRNA結合タンパク質Xを抑制する経路である。RNA結合タンパク質XはGTRAPを抑制し、その結果EAAC1が抑制されることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Our preliminary studies indicated GTRAP and EAAC1 are inversely regulated by miR96, but there is no miR96-binding site on GTRAP messenger RNA. We speculated the inhibition by miR96 is not achieved by a direct binding to GTRAP but is mediated through another unidentified protein. This protein has been identified by this project.

研究分野：神経薬理学

キーワード：グルタチオン EAAC1 GTRAP3-18 microRNA タウリン システイン

1. 研究開始当初の背景

GTRAP3-18 (以下 GTRAP) は EAAC1 の調節因子として同定された膜タンパク質である。EAAC1 は中枢神経系では神経細胞に特異的に発現しており、細胞質から PI3 キナーゼの作用によって形質膜へ移行し、形質膜においてグルタミン酸やシステインの細胞内への輸送を行う。しかし、神経細胞内グルタミン酸の供給源としては、グルタミンからグルタミン酸を合成する機構が主たる役割をしていることが知られており、神経細胞における EAAC1 の役割はむしろシステイン輸送機構として重要であると認識されるようになった。実際に EAAC1 のノックアウトマウスの神経細胞内グルタミン酸量は全く変化しなかったのに対して、システイン含有量は著明に減少した。それと同時に神経細胞内グルタチオン量も著明に減少した。一方、グリア細胞内のシステイン及びグルタチオン量は変化しなかった。これらの事実より、EAAC1 は神経細胞内グルタチオン量の維持にとって必須であることが示された。グルタチオン(GSH)はグルタミン酸、システイン、グリシンからなるトリペプチドであり、末梢組織に比べて superoxide dismutase が比較的少ない中枢神経系においては主要な抗酸化物質である。神経変性疾患では神経細胞グルタチオンの減少がみられる。膜タンパク質の EAAC1 は中枢神経系では神経細胞特異的に発現しており、形質膜においてグルタミン酸やシステインの細胞内への輸送を行う。さらに、EAAC1 ノックアウトマウスは酸化ストレスに対して脆弱になっていることも判明した。その後、EAAC1 の機能調節を研究する過程で、文献調査により、米国のグループが Yeast two hybrid method を用いて EAAC1 と物理的に結合するタンパク質として GTRAP を数年前に報告していることを知った。そこで、申請者らは GTRAP が EAAC1 のシステイン輸送能力を変化させ、さらに神経細胞内グルタチオン量を変化させるのではないかと推測し、細胞レベル及びマウス個体レベルで GTRAP 発現量を増加させるか、もしくは oligonucleotide や siRNA により GTRAP を減少させることにより EAAC1 の機能を調べたところ、GTRAP は EAAC1 機能の抑制因子であることを見出した。この事実は GTRAP<sup>-/-</sup>マウスによって確定した。

< microRNA による EAAC1 調節 >

申請者は神経 microRNA-96-5p (以下 miR96) の概日リズムによって中脳 EAAC1 発現量が調節されており、その結果として神経保護作用に概日リズム

があることを報告した (Kinoshita.C et al.,2014)。microRNA は、20 数塩基のノンコーディング RNA で、複合体 RISC を形成し機能する小分子である。哺乳類における microRNA の主要な機能は、主に遺伝子の非翻訳領域に結合して遺伝子発現に対し転写後抑制を行うことである。実際に miR96 は EAAC1 の messenger RNA と結合することにより EAAC1 の翻訳を抑制することが明らかになった。さらに興味深いことに GTRAP も miR96 によって制御されること、および EAAC1 とは逆に正の制御を受けていることが予備の結果より判明していた。miR96 により GTRAP の発現が増加することが判明した。しかし GTRAP の mRNA には miR96 の結合部位が存在しないことが予備的な実験結果から明らかになった。すなわち、miR96 による GTRAP の蛋白合成阻害は GTRAP の messenger RNA に結合することによるのではなく、間接的に、おそらくは別のタンパク質(図では X と表示)の発現の抑制を介して行われている可能性が濃厚である。

2. 研究の目的

本研究は、未知タンパク質 X を同定することが目的である。

3. 研究の方法

グルタチオン量決定に関与する EAAC1 及び GTRAP における miR96 による異なる制御は、GTRAP の RNA 結合タンパク質の介在による可能性が示唆された。本研究計画では、この RNA 結合タンパク質を同定し、さらに miR96 結合阻害剤のスクリーニングをする。具体的には miR96 に制御される GTRAP の 3' 非翻訳領域に結合する RNA 結合タンパク質 X を同定し、機能解析を行う。さらに RNA 結合タンパク質に対する miR96 結合阻害剤のスクリーニングを行い、in vivo において阻害剤がグルタチオン量及び神経保護作用にたいしていかなる効果があるかを調べる。

(1) GTRAP3-18 の RNA 結合タンパク質 X の同定

RNA 結合タンパク質 X の介在が最も有力な仮説と考えられたため、その同定を以下の手順で行う。

GTRAP の 3' 非翻訳領域 RNA 配列を固定化した分離精製磁気ビーズを用いて、マウス中脳抽出液より RNA 結合タンパク質 X を分離精製し質量およびアミノ酸一次構造分析を行った。

データベース解析により候補タン

パク質から miR96 直接標的分子の絞り込みを行い、RNA 結合タンパク質 X が既知タンパク質であればアミノ酸一次構造及び塩基配列をデータベースにより確認し、未知タンパク質であればアミノ酸一次構造を決定する。結果的には前者であった。

- (2) miR96 による RNA 結合タンパク質 X の直接的制御

RNA 結合タンパク質 X が miR96 により直接的制御を受けるか調べるため、以下の実験を行った。

リポータージーンアッセイによる 3' 非翻訳領域解析後、RNA 結合タンパク質 X の発現調節を調べた。

- (3) RNA 結合タンパク質 X の発言を抑制する効果を検証した。

RNA 結合タンパク質 X の発現を siRNA によって阻害することにより、GTRAP 量が増加するかどうかを検証した。

#### (4) 研究成果

RNA 結合タンパク質 X は機能がこれまで未知であった既知タンパク質と同定した。このタンパク質の機能の一つが解明された。したがって、酸化ストレスのマスタースイッチとして働く miR96 は 2 つの経路によって EAAC1 の発現を制御することが明らかになった。一つは EAAC1 を直接抑制する経路、他の一つは RNA 結合タンパク質 X を抑制する経路である。RNA 結合タンパク質 X は GTRAP を抑制し、その結果 EAAC1 が抑制されることが明らかとなった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 件)

- (ア) Facilitation of yeast-lethal membrane protein production by detoxifying with GFP tagging.

Oshikane H, Watabe M, Nakaki T.  
Protein Expr Purif. 2018 ;148:40-45.  
(査読有)

- (イ) A simple and effective method for detecting precipitated proteins in MALDI-TOF MS.

Oshikane H, Watabe M, Nakaki T.  
Anal Biochem. 2018 ;1;546:1-4.  
(査読有)

- (ウ) Neuroprotection afforded by circadian regulation of intracellular glutathione levels: A key role for miRNAs.

Kinoshita C, Aoyama K, Nakaki T.  
Free Radic Biol Med.

2018 ;1;119:17-33. (査読有)

- (エ) GTRAP3-18 regulates food intake and body weight by interacting with pro-opiomelanocortin.

Aoyama K, Bhadhprasit W, Watabe M, Wang F, Matsumura N, Nakaki T.  
FASEB J. 2018 ;32:330-341 (査読有)

- (オ) Glutathione in Cellular Redox Homeostasis: Association with the Excitatory Amino Acid Carrier 1 (EAAC1).

Aoyama K, Nakaki T.  
Molecules. 2015 ;14;20:8742-58.  
(査読有)

[学会発表](計 3 件)

木下千智、押鐘浩之、渡部正彦、内海 計、中木敏夫 microRNA 制御を受ける RNA タンパク質群による GTRAP3-18 の調節。第 90 回日本薬理学会年会。2017 年 3 月 16 日、長崎。

松村暢子、青山晃治、中木敏夫 細胞内システイン取り込み促進作用におけるカフェイン誘導体の構造-活性相関。第 90 回日本薬理学会年会。2017 年 3 月 15 日、長崎。

青山晃治、角田ワッタナボン、中木敏夫 視床下部における AMPK 活性化と GTRAP3-18 の関係。第 90 回日本薬理学会年会。2017 年 3 月 15 日、長崎。

青山晃治、角田ワッタナボン、中木敏夫 AMPK と神経グルタチオン産生。第 89 回日本薬理学会年会。2016 年 3 月 9 日、横浜。

押鐘浩之、渡部正彦、青山晃治、中木敏夫 薬理的に有用性の高いリコンビナント膜タンパク質の生産に向けた汎用性ある新規的方法。第 89 回日本薬理学会年会。2016 年 3 月 9 日、横浜。

松村暢子、青山晃治、中木敏夫 カフェイン代謝物の細胞内システイン取り込み促進作用。第 89 回日本薬理学会年会。2016 年 3 月 9 日、横浜。

木下千智、内海 計、渡部正彦、青山晃治、

中木敏夫 miR-96-5p に制御される GTRAP3-18 負調節因子の同定 第 89 回日本薬理学会年会。2016 年 3 月 9 日、横浜。  
木下千智、青山晃治、松村暢子、内海計、渡部正彦、中木敏夫 日内リズムを呈する miR-96-5p によるグルタミン酸量調節と神経保護作用 第 88 回日本薬理学会年会。2015 年 3 月 19 日、名古屋。

青山晃治、角田ワッタナボン、中木敏夫 AM PK 活性化が神経グルタミン酸産生に及ぼす影響 第 88 回日本薬理学会年会。2015 年 3 月 19 日、名古屋。

押鐘浩之、渡部正彦、青山晃治、中木敏夫 神経変性疾患に於けるタンパク質間相互作用 (PPI) を基礎とした薬剤スクリーニング系の構築の試み 第 88 回日本薬理学会年会。2015 年 3 月 19 日、名古屋。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中木 敏夫 (NAKAKI, Toshio)  
帝京大学・医学部・教授

研究者番号：3 0 1 6 4 1 4 8

### (2) 研究分担者

青山 晃治 (AOYAMA, Koji)  
帝京大学・医学部・准教授

研究者番号：0 0 4 2 0 9 4 3

### (3) 研究分担者

松村 暢子 (MATSUMURA, Nobuko)  
帝京大学・医学部・助教

研究者番号：3 0 3 1 7 6 9 8