

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2006～2009  
 課題番号：18592046  
 研究課題名 (和文) 内在性アンチセンス RNA によるイオン輸送担体アイソフォームの発現および機能調節  
 研究課題名 (英文) Regulations of expression and physiological function on ion transporter isoforms by natural antisense RNA

研究代表者  
 栗原 琴二 (KURIHARA KINJI)  
 明海大学・歯学部・講師  
 研究者番号：10170086

研究成果の概要 (和文)：神経組織にのみ存在すると考えられていた  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase  $\alpha$  アイソフォームの  $\alpha 3$  アイソフォームが RT-PCR 法でラット舌下腺に検出された。また、舌下腺には  $\alpha 3$  の mRNA に相補的な配列を持つアンチセンス RNA も存在した。同時にアンチセンス RNAs を簡便に検出する方法を確立できた。 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase  $\alpha 3$  アイソフォームのアンチセンス RNA 量は高週齢ラットに顕著に発現していた。

研究成果の概要 (英文)： $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase  $\alpha$ -subunit isoform  $\alpha 3$  was detected in the SLG of rats by RT-PCR. We also found the presence of natural antisense RNA of the isoform. The level of  $\alpha 3$  antisense RNA was higher in aged rats.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,200,000	0	1,200,000
2007 年度	900,000	270,000	1,170,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,400,000	660,000	4,060,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：アンチセンス, RNA, イオン輸送担体, Na-ポンプ, アイソフォーム, 唾液腺

## 1. 研究開始当初の背景

アンチセンス RNA が存在する事実が 2005 年の 9 月に Science 誌 (Katayama S,

Science 309, 1564-1566, 2005) に掲載された。したがって、アンチセンス RNA による発現調節および機能調節は急速に発展す

るホットなテーマであり、当時手がけられつつある領域であった。

1985年 Sweadner はハウスキーピングに存在する Na/K-ATPase  $\alpha$  サブユニットの  $\alpha 1$  アイソフォームに加え、脳、網膜、筋肉、脂肪組織に  $\alpha 2$  の存在を蛋白質レベルで発見した (Sweadner KJ, Gilkeson RC, J Biol Chem 260, 9016-9022, 1985)。次いで 1986年 Shull は脳から新たに  $\alpha 3$  をクローニングした (Shull GE et al, Biochemistry 25, 8125-8132, 1986)。RT-PCR 法が開発されてから、mRNA レベルでそれぞれのアイソフォームの局在が調べられた。例外的な発現報告例として、腎臓に  $\alpha 2$  が存在するかどうか (Lucking K et al, Am J Physiol 271 F253-F260, 1996)、肺に  $\alpha 3$  (Choi Y et al, Arch Biochem Biophys 344, 165-175, 1997) が存在するかどうか議論されていた。我々の予備実験の結果では議論されている臓器の他に、3大唾液腺の舌下腺に  $\alpha 3$  が存在することを確認していた。また、ヒト大腸では癌化によって  $\alpha 3$  が発現する報告 (Sakai H et al, FEBS Lett 563, 151-154, 2004) があった。それまで  $\alpha 1$  以外は特定の組織にのみ特異的に存在すると考えられてきたが、調節による発現量の違い、または調節異常による発現と考え直すべきと考えていた。それまで発現の調節に関する詳細な報告は無く、アンチセンス RNA も含め、発現調節の解明は今後開拓されるべき研究分野であった。

一方、Na/K/2Cl 共輸送体は Cl<sup>-</sup> イオンの重要な供給経路であり、耳下腺の Na/K/2Cl 共輸送体 (NKCC1) は米国国立衛生研究所 (NIH) の RJ Turner 博士によって势力的に分子構造学的手法で機能解析されていた (Oh YS, Turner RJ, Biochemistry 44, 11821-8, 2005)。国内では唾液腺を用いて

柴芳樹教授 (広島大・歯) らのグループによって電気生理学的に機能解析されていた (Sugita M et al: J Gen Physiol 124, 59-69, 2004)。一方、腎臓型の Na/K/2Cl 共輸送体 (NKCC2) については Johns Hopkins 大学の Forbush 博士によって、分子生物学的手法でリン酸化部位を変異させ機能調節の研究が行われていた (Gimenez I, Forbush B, Am J Physiol (Renal Physiol), 2005)。Na/K/2Cl 共輸送体の研究の重要性は国際的に認識されており、世界から著名な研究者が出席するゴードン・リサーチ・カンファレンスにも「唾液腺および唾液」部門が設けられており、Na/K/2Cl 共輸送体について活発に議論されていた。1999年のこのカンファレンスで、筆者の「NKCC1 蛋白質のリン酸化によってブメタナイドの結合が増加する」という研究は高い評価を受け、受賞口演を得ており、申請者はこの分野で国際的に先端の研究レベルに位置していた。第78回日本生理学大会「腎尿細管のイオンチャネルおよび輸送担体の発現と機能調節」のシンポジウムでも Na/K/2Cl 共輸送体について活発的に議論され、筆者もシンポジストとして招聘された。しかしながら、当時の研究は国内外に問わず蛋白質の機能変化に留まっており、発現量を調節する研究は無かった。アンチセンス RNA によって、腎臓の NKCC2 と唾液腺の NKCC1 を選択的に発現調節する研究を今後展開すべきと考えていた。

## 2. 研究の目的

### (1) 研究の全体構想

腎臓での体液量調節や唾液分泌に関与する「イオン輸送担体が如何に発現調節され、如何に機能調節されるのか」を解明する。Na/K-ATPase (Na-ポンプ) および Na/K/2Cl

共輸送体は腎臓や唾液腺でイオンの輸送に関与する重要なシステムである。周知のとおり、これらの蛋白質は DNA のセンス鎖から作られた mRNA を鋳型にして作られる。一方、生体では“アンチセンス RNA” が実在することが本年9月に明らかにされ(Katayama S et al, Antisense transcription in the mammalian transcriptome. *Science* 309, 1564-1566, 2005), 蛋白質の発現調節に関与している可能性が示唆された。イオン輸送担体の発現調節, 機能調節を明らかにするために、イオン輸送担体アイソフォームの内在性アンチセンス RNA が存在するか、アンチセンス RNA がイオン輸送担体の発現にどのように関与しているのかを分子生物学的手法で明らかにする。

#### (2) 明らかにする具体的な目的

- ①イオン輸送担体には一次構造を異にするアイソフォームが存在する。これらのイオン輸送担体アイソフォームのアンチセンス RNA の存在を調べるために、アンチセンス RNA を鋳型にする逆転写反応法と PCR 法を確立し、アンチセンス RNA の存在を明らかにする。また、mRNA 量とアンチセンス RNA 量を比較し、相関関係を明らかにする。
- ②イオン輸送担体のアイソフォームが発現していない培養細胞に、特定のアイソフォームをトランスフェクトして mRNA を発現させた場合、対応するアンチセンス RNA の発現誘導が起きるかを明らかにする。
- ③特定のアイソフォームは特定の組織に特異的に存在する。特定のイオン輸送担体アイソフォームが発現している細胞に、そのアンチセンス RNA をトランスフェクトし過剰発現させた場合、mRNA の量がど

のように調節されるかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1)各種臓器のイオン輸送担体アイソフォームのアンチセンス RNA の発現を調べるために、アンチセンス RNA からの逆転写反応法と PCR 法を確立し、アンチセンス RNA の発現量を定量した。また、mRNA 発現量とアンチセンス RNA 発現量を比較し、両者の相関関係を明らかにした。

#### ①アンチセンス RNAs の逆転写反応

アンチセンス RNA の逆転写反応には種々の問題を想定し3種の可能性を試みた。

- ① 通法に従い oligo(dT)を用いて試みた。
- ② テイル部分は未知であるため、6-mer程度のランダムプライマーを用いて、アンチセンス RNA の非特定の部分から逆転写反応を試みた。
- ③ アンチセンス RNA 特異的なフォワードプライマーを用いた。

#### (2)PCRによるアンチセンス RNA の増幅

##### ①各イオン輸送担体アイソフォームのプライマー設計

Query Gene Bank Database, National Center for Biotechnology から cDNA 配列を読み出した。しかし、これらの配列はセンス側の配列に当たるため、これに相補的なアンチセンスの配列(3'側と5'側を逆にし、相補的塩基に置換)に書き換えた。これを鋳型にしてプライマーを設計した。プライマー合成は専門の業者に委託した。

##### ②PCRによる目的配列の増幅

逆転写したアンチセンス DNA に設計した

プライマーを添加して PCR で増幅した。アンチセンス RNA から逆転写したアンチセンス DNA の量が少ない場合、効率が悪いことが考えられたので、経費がかかるが高活性のポリメラーゼを用いる必要があった。また、問題点として設計したプライマーがセンス DNA (cDNA) に結合する可能性が考えられるので①の逆転写反応で mRNA からの逆転写を阻止する対策を組み込んだ。

### ③ PCR プロダクトの確認

設計したプライマーに対し理論的に推定される大きさであること、およびプロダクトの塩基配列を確認した。当大学分子生物学研究室に DNA シークエンサーが設置されており、容易に確認できた。

## (3) アンチセンス RNA の発現量を定量し、mRNA 発現量と比較し、両者の因果関係を検討

① mRNA とアンチセンス RNA から逆転写した後、Real-time PCR 様にサイクル数を変え、PCR プロダクトを定量した。

② ①の方法で、各種臓器のイオン輸送担体アイソフォームの mRNA 量とアンチセンス RNA 量と比較し、両者の関係を明らかにした。

## 4. 研究成果

研究成果の概要 (和文) :  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase  $\alpha$  アイソフォームを RT-PCR で調べると、 $\alpha 1$  および  $\alpha 2$  は 3 大唾液腺すべてに検出され、 $\alpha 3$  は舌下腺にのみ検出された。3 大唾液腺の各アイソフォームをウエスタンブロットで検出すると、mRNA の発現量に応じた蛋白質が検出された。また、舌下腺の  $\alpha 3$  を免疫染色すると漿液細胞と肥満細胞の膜に陽性で

あった。しかし、顎下腺では陰性であった。一般に、 $\alpha 2$  および  $\alpha 3$  は脳、神経組織に存在すると考えられていたが、3 大唾液腺で、舌下腺の肥満細胞に  $\alpha 3$  が強く発現していたことから、ヒスタミン分泌と  $\alpha 3$  との関係が考えられた。一方、ラット舌下腺の tRNAs を鋳型にして  $\alpha 3$  に特異的なフォワードプライマーで逆転写反応後、PCR を行うと、期待される PCR 産物が得られ、その配列は  $\alpha 3$  と一致した。この結果から舌下腺に

$\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase  $\alpha 3$  の mRNA のみならず、そのアンチセンス RNA も存在することを明らかにすることができた。同時にフォワードプライマーを利用して antisense RNAs を簡便に検出する方法も確立できた。この方法で舌下腺の  $\alpha 3$  のアンチセンス RNA の発現量を比較すると、雄に比べ雌に顕著であった。

$\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase  $\alpha 3$  アイソフォーム蛋白質の発現をウエスタンブロットで分析すると、脳の場合、10 週齢と 60 週齢とで同様な発現であったが、舌下腺では高週齢ラットに顕著であった。舌下腺の GAPDH の mRNA 量は 10 および 60 週齢ラットで違いは認められなかったが、 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase  $\alpha 3$  アイソフォームの mRNA およびアンチセンス RNA 量は蛋白質と同様に高週齢ラットに顕著に発現していた。加齢によって antisense RNAs が増加することからアンチセンス RNA はサイレンシング的作用があると考えられた。

## 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 6 件)

① Kinji Kurihara, Nobuo Nakanishi, Osamu

- Amano and Keiichi: Tonosaki Expression of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$  subunit isoforms in rat salivary glands: occurrence of sense and antisense RNAs of the  $\alpha 3$  isoform in the sublingual gland, Arch. Oral Biol., 53, 593~604, 2008 (査読有)
- ② Suzuki K, Uchida K, Nakanishi N, Hattori Y: Cilostazol activates AMP-activated protein kinase and restores endothelial function in diabetes. American Journal of Hypertension 21, 451-457, 2008 (査読有)
- ③ Hasegawa H, Sawabe K, Sugawara Y, Maruyama M, Matsuoka H, Nakanishi N, Wakasugi OK: Recent Studies on Sepsin and Biotin Transport in Mammalian Cells. Chemistry and Biology of Pteridines and Foliates, Blau, N. and Thöny, B. eds., SPS Verlagsgesellschaft mbH, Heibronn, Germany, pp. 254-268, 2007 (査読有)
- ④ Hattori Y, Hattori S, Wang X, Satoh H, Nakanishi N, Kasai K: Oral administration of tetrahydrobiopterin slows the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 27, 865-870, 2007 (査読有)
- ⑤ Iwata, C., Wang, X., Uchida, K., Nakanishi, N., Hattori, Y.: Buthionine sulfoximine causes endothelium dependent hyper-relaxation and hypoadiponectinemia. Life Sciences 80, 873-878, 2007 (査読有)
- ⑥ Hattori Y, Nakanishi N: Statin increases GTP cyclohydrolase I RNA and 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin in vascular endothelial cell. Pteridines 17, 65-68, 2006 (査読有)
- [学会発表] (計 8 件)
- ① Kinji Kurihara, Nobuo Nakanishi, Keiichi Tonosaki: Regulation of kallikrein 1b26 (klk1b26) expression in mouse submandibular gland by post-transcriptional modification of its mRNA. XXXVI International Congress of Physiological Sciences (IUPS2009), Kyoto, Japan, July27-August1, 2009
- ② 栗原琴二, 中西信夫, 外崎肇一: アンドロジェンによるマウスカリクレイン遺伝子のポストトランスクリプショナルな修飾, 第53回日本唾液腺学会, 東京, 2008年12月6日
- ③ 栗原琴二: 内在性アンチセンスRNAによる唾液腺イオン輸送担体の発現調節機構の分子生物学的手法による解析, 明海歯科医学会第5回学術大会, 埼玉, 2008年 6月 4日
- ④ 栗原琴二, 外崎肇一: 加齢によるイオン輸送担体アイソフォームRNAsの発現について, 第49回歯科基礎医学会総会, 北海道, 2007年 8月30-31日

⑤ 栗原琴二，中西信夫，外崎肇一：  
Na/K-ATPase  $\alpha$ 3アイソフォームのRNA s。  
第84回日本生理学大会 大阪 2007年3  
月20-23日

⑥ 栗原琴二，中西信夫，天野修，友村明人，  
外崎肇一：唾液腺のイオン輸送担体アイ  
ソフォームのアンチセンスRNAの発現に  
ついて。第51回日本唾液腺学会，東京，  
2006年12月9日

⑦ 栗原琴二，中西信夫，天野修，友村明人，  
外崎肇一：唾液腺のイオン輸送担体アイ  
ソフォームのRNA s の発現について，第48  
回歯科基礎医学会総会，横浜，2006年 9  
月22-23日

⑧ 丸山七朗，中貴弘，長尾隆英，坂上宏，  
大川周治，栗原琴二，外崎肇一，柏俣正  
典，E. W. Gresik：ホルモンによるマウス  
胎仔顎下腺の分枝形態形成とレチノイン  
酸受容体の発現調節機構，第79回日本薬  
理学会，シンポジウム性差医療とくすり  
<研究推進委員会企画>，横浜，2006年3  
月横浜，2006年3月8-10日

〔図書〕（計1件）

① 栗原琴二：（著書分担）口腔生物学各論—  
唾液腺— 7章 唾液腺実験入門 3.唾  
液腺培養細胞株 a 培養細胞の樹立 b唾  
液腺由来の細胞株 c 唾液腺の培養細胞  
を用いた研究例 d 唾液腺の遊離細胞を  
用いた研究例，学建書院 128-132，2006

栗原 琴二 (KURIHARA KINJI)  
明海大学・歯学部・講師  
研究者番号：10170086

(2)研究分担者

中西 信夫 (NAKANISHI NOBUO)  
明海大学・歯学部・講師  
研究者番号：20118574

## 6. 研究組織

(1)研究代表者