

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19303

研究課題名(和文)独自の進化を遂げた動物ミトコンドリアmRNAポリ(A)鎖の機能解析

研究課題名(英文) The length of the polyadenylation tails of human mitochondrial transcripts alters their stability

研究代表者

松島 雄一 (Matsushima, Yuichi)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：20571342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：RNAに付加されるポリ(A)鎖の機能は多様である。ポリ(A)鎖が付加されたRNAは分解が促進される場合もあれば、逆に分解が抑制され安定化する場合もあることが知られている。ヒトのミトコンドリアDNAには11のメッセンジャーRNA(mRNA)がコードされているが、その大半は成熟化に伴いポリ(A)鎖が付加される。ミトコンドリアDNAにコードされているmRNAはポリ(A)鎖短縮の結果分解が促進されるもの、逆に分解が抑制されるもの、また全く影響を受けないものが存在した。これらのことはミトコンドリアmRNAのポリ(A)鎖は個々のmRNAごとに全く異なる機能を持つことを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

真核生物の核DNAから転写されたmRNAは成熟化に伴いポリ(A)鎖が付加されその分解抑制に寄与するが、原核生物の核様体DNAから転写されたRNAでは分解時にポリ(A)鎖が一時的に付加され、それはRNAの分解促進に寄与する。興味深いことにミトコンドリアmRNAには50塩基程のポリ(A)鎖が付加されるが、このポリ(A)鎖は個々のmRNA毎に分解抑制と分解促進あるいは影響なしと全く異なる効果を持つことを示した。ヒトのミトコンドリアでは真核生物型と現各区分生物型のポリ(A)鎖の機能が共存している可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The functions of RNA polyadenylation are diverse. In prokaryotes, polyadenylation promotes the degradation of the RNA, whereas in eukaryotes, polyadenylation inhibits the degradation of the RNA. Human mitochondrial DNA encodes 11 mRNAs and most of which are polyadenylated during maturation. We investigated the effect of polyadenyl tail shortening on mitochondrial mRNAs. Interestingly, the shortening of polyadenyl tails produced different effects on stabilization and destabilization for each mitochondrial mRNA. These results suggest that polyadenyl-tail of mitochondrial mRNAs exhibits both prokaryotic and eukaryotic polyadenyl-tail effects in each mRNA. Further studies are needed to understand the mechanism of altered stability of the mitochondrial mRNAs by polyadenyl tails.

研究分野：分子生物学

キーワード：ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

RNAに付加されるポリ(A)鎖の機能は多様である。ポリ(A)鎖が付加されたRNAは分解が促進される場合もあれば、逆に分解が抑制され安定化する場合もあることが知られている(図1)。真核生物の核DNAから転写されたmRNAは成熟化に伴いポリ(A)鎖が付加されるが、それはmRNAの安定化に寄与するが、一方、原核生物の核様体DNAから転写されたRNAでは分解時にポリ(A)鎖が一時的に付加され、それはRNAの分解促進に寄与する(表1)。酵母のミトコンドリアDNAから転写されたRNAにはポリ(A)鎖は付加されないが、植物のミトコンドリアDNAやクロロプラストDNAから転写されたRNAにはポリ(A)鎖が付加されそれらは共に分解促進に寄与することが知られている。

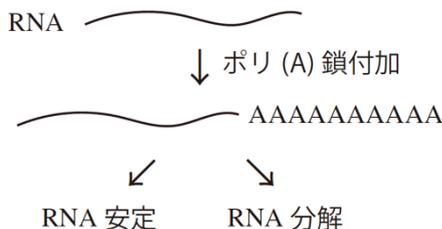


図1 RNAに対するポリ(A)鎖付加の効果

	コードされているDNA	mRNAに対する効果
原核生物	核様体DNA	分解促進
真核生物	核DNA	安定化
	酵母ミトコンドリアDNA	ポリ(A)鎖付加なし
	植物ミトコンドリアDNA	分解促進
	植物クロロプラストDNA	分解促進

表1 各種mRNAに対するポリ(A)鎖付加の効果

ヒトのミトコンドリアDNAには11のメッセンジャーRNA(mt-mRNA)、2つのリボソームRNA(mt-rRNA)、22のトランスファーRNA(mt-tRNA)がコードされている(図2)。ミトコンドリアポリ(A)ポリメラーゼがmt-mRNAにポリ(A)鎖を付加する酵素として知られている。ヒトミトコンドリアDNAから転写されたmt-mRNAの多くは成熟化に伴いポリ(A)鎖が付加されるがその機能は明らかでない。

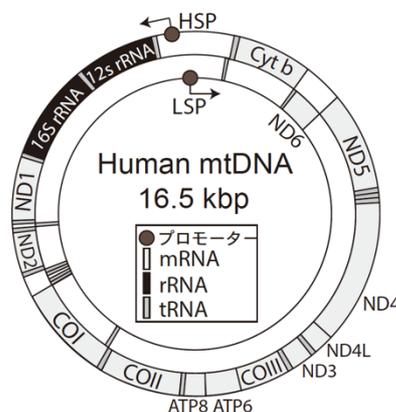


図2 ヒトミトコンドリアDNAの構造
ヒトのミトコンドリアDNA(mtDNA)には11のmRNA、2つのrRNA、22のtRNAがコードされている。11のmRNAから13のポリペプチドが合成される。ATP6とATP8、ND4とND4Lは各々1つのmRNAにコードされている。これらのRNAはHSPとLSPの2つのプロモーターからそれぞれ一続きに転写され、その後個々のRNAに分割される。

2. 研究の目的

本研究はポリ(A)鎖が動物ミトコンドリアDNAから転写されたRNAに与える影響を調べるとともに、そのメカニズムについて明らかにすることを目的とする。具体的にはRNAに付加されるポリ(A)鎖が短縮に伴う影響及び、ポリ(A)鎖がより長く伸長した場合の影響について解析を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

本研究ではヒト培養細胞を用いて研究を行った。主に、siRNAを用いた遺伝子ノックダウン法によりミトコンドリアポリ(A)ポリメラーゼを枯渇させた細胞と野生型ミトコンドリアポリ(A)ポリメラーゼ遺伝子を誘導発現した細胞を用いて各種解析を行った。

4. 研究成果

HeLa細胞に対しミトコンドリアポリ(A)ポリメラーゼをターゲットにsiRNA法による遺伝子ノックダウンを3日おきに行った。ミトコンドリアポリ(A)ポリメラーゼタンパク質の枯渇に遅れて、mtDNAにコードされているCOX2タンパク質も減少することが明らかになった(図3)。また、これ以降の実験は2回のノックダウン処理した細胞(6日後)を用いて行った。

ミトコンドリアポリ(A)ポリメラーゼをノックダウンした細胞から、RNAを抽

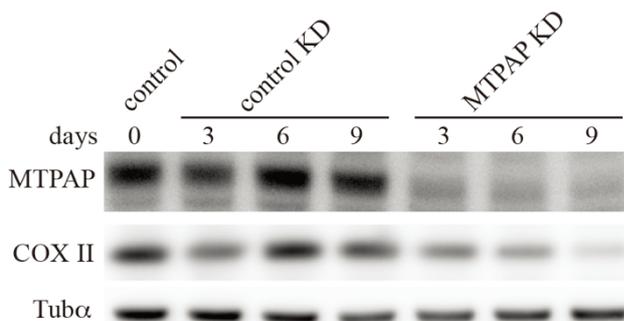


図3 ミトコンドリアポリ(A)ポリメラーゼのノックダウン
HeLa細胞に対し3日おきにsiRNA法によるノックダウンを行った。2回目のノックダウン(6日後)でミトコンドリアポリ(A)ポリメラーゼ(MTPAP)が十分に減少していたため、以降の実験は2回目のノックダウン(6日後)の細胞を用いて行っている。

出して、COX1 の mt-mRNA に付加されたポリ(A)鎖長を計測したところ、通常の HeLa 細胞では、50 塩基前後のポリ(A)鎖が付加されているところ、ミトコンドリアポリ(A)ポリメラーゼノックダウン細胞では、0-10 塩基程度に短縮されていることが確認された(図4)。また、他の複数の mt-mRNA についても同程度のポリ(A)鎖長の短縮が確認された。

次に、RT-qPCR 法を用いてミトコンドリア DNA にコードされている RNA 量を測定した。通常の HeLa 細胞に比べ、ミトコンドリアポリ(A)ポリメラーゼノックダウン細胞では mt-rRNA には大きな変化は見られなかったものの、mt-mRNA では COXI、COXII が減少、ND1、ND2 は増加、ND4/4L や CYB は変化しなかった(図5)。このように個々の mt-mRNA ごとに全く異なる変動を示した。一方、ミトコンドリア DNA にコードされている mt-tRNA は mt-mRNA や mt-rRNA と比べて半減期が短いことが知られており、そのため mt-tRNA の量はミトコンドリア DNA の転写活性を反映するとされている。そこで、コントロール細胞とミトコンドリアポリ(A)ポリメラーゼノックダウン細胞の複数の mt-tRNA 量を比較してみたところ、両者の間に違いは見られなかった。このことから、ミトコンドリアポリ(A)ポリメラーゼノックダウン細胞でもコントロール細胞と同じ程度のミトコンドリア DNA からの転写が行われていると考えられた。また前述した通り mtDNA からの転写は一続きに行われるため各 mt-mRNA は均等に合成されていると考えられるため、ミトコンドリアポリ(A)ポリメラーゼノックダウン細胞で観察された一部の mt-mRNA の増減は、ポリ(A)鎖長の短縮に伴う安定性変化を示すものと考えられ、その効果は個別の mt-mRNA 毎に異なると考えられた。

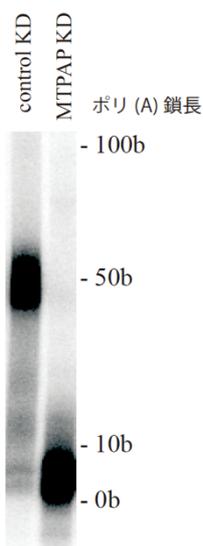


図4 ミトコンドリアポリ(A)鎖の測定
ミトコンドリアポリ(A)ポリメラーゼを枯渇させた HeLa細胞から得られたCOX1のmRNAに付加されているポリ(A)鎖の長さを測定した。

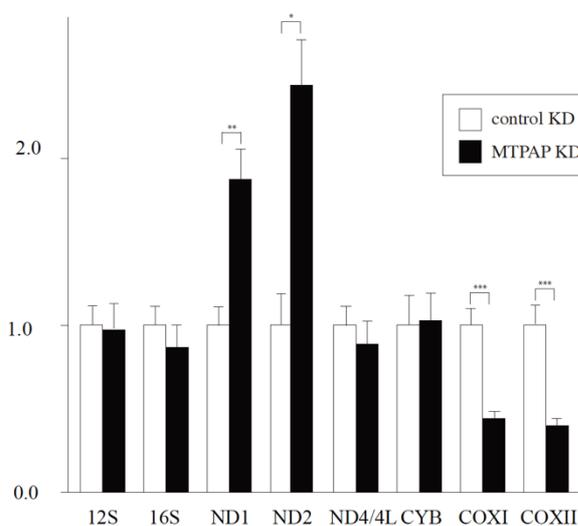


図5 ミトコンドリアDNAにコードされている各種RNAの定量
ミトコンドリアポリ(A)ポリメラーゼを枯渇させた細胞に含まれるミトコンドリアDNAにコードされている各種RNAをRT-qPCR法を用いて定量した。

これらの結果を合わせて考えると、ポリ(A)鎖短縮により減少する mt-mRNA ではポリ(A)鎖の機能は真核生物の核 DNA にコードされている mRNA と同様のポリ(A)鎖の機能(安定化)に類似し、ポリ(A)鎖短縮で増加する mt-mRNA ではミトコンドリアの起源に近い原核生物のポリ(A)鎖の機能(分解促進)に似ている(図6)。またポリ(A)鎖短縮でも変化しない mt-mRNA ではポリ(A)鎖がその安定性に関与しないことを示している。また、ポリ(A)鎖長をさらに延長した場合の効果について調べるためにミトコンドリアポリ(A)ポリメラーゼを過剰に発現させる細胞を樹立し、ポリ(A)鎖の延長を確認した。現在ポリ(A)鎖の延長が mt-rRNA に与える影響について詳細に解析を行っている。

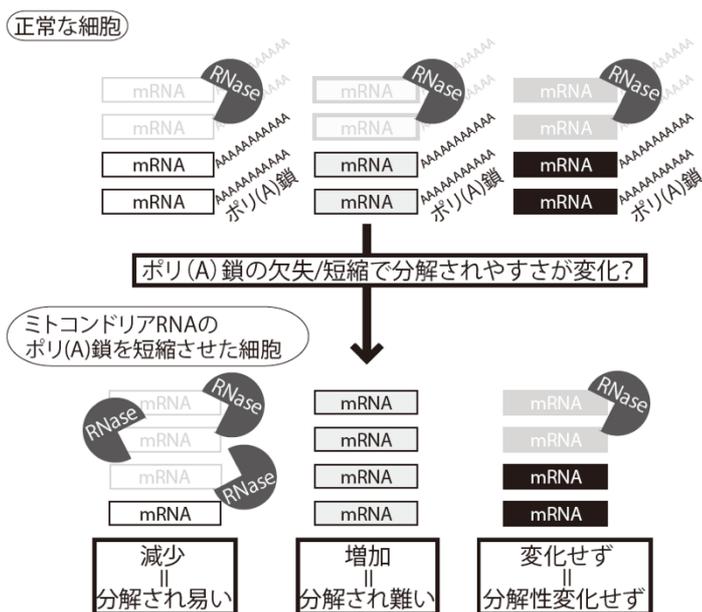


図6 ポリ(A)鎖欠失/短縮に伴うmt-mRNA安定性変化
mt-mRNAは一定数が新たに合成され、またRNaseにより分解されることで定常状態を保っている(上)。ポリ(A)鎖の欠失/短縮に伴いRNaseによる【分解されやすさ】が変化すれば(下)、mt-mRNA量の変化につながる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------