

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：平成 19 年～平成 22 年
課題番号：19592157
研究課題名（和文）GTPシクロヒドロラーゼの内在性アンチセンスRNA：発現機構と生理的機能の解明
研究課題名（英文）Naturally occurring antisense RNA of GTP cyclohydrolase 1: a physiological role and expression mechanisms of the antisense RNA
研究代表者
中西信夫（NAKANISHI NOBUO）
明海大学・歯学部・講師
研究者番号：20118574

研究代表者の専門分野：神経科学，生化学
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，テトラヒドロビオプテリン，GTPシクロヒドロラーゼ，RNA干渉，一酸化窒素，遺伝子発現調節，トランスクリプトーム，転写

1. 研究計画の概要

テトラヒドロビオプテリン(BH4)は一酸化窒素やモノアミン性神経伝達物質の生合成を制御する因子で，生体内の BH4 濃度は神経機能，血管機能に重大な作用を及ぼす。筆者らは BH4 生合成の律速酵素である GTPシクロヒドロラーゼ 1 (GCH)に内在性アンチセンス RNA (GCH naRNA) が存在することを見いだした。本研究はこの GCH naRNA の発現機構と生理的機能を解明することを目的とする。

このため，おもに PC12 細胞を用いて，(1) GCH mRNA (GCH センス RNA) と GCH naRNA の発現がどのような因子 (情報伝達分子，薬剤など) によりどのような影響を受けるか；(2) GCH naRNA は GCH 蛋白質，および GCH 酵素系の最終産物である BH4 レベルにどのような影響を与えるか；(3) GCH naRNA はどのような構造をしているか；を明らかにしようとした。

2. 研究の進捗状況

(1) 内在性アンチセンス RNA (naRNA) の検定・定量方法の確立，開発について：標的遺伝子のプロモーター領域塩基配列(mRNA のための転写開始点より上流)のフォーワードプライマーを用いた RT-PCR によって，総 RNA 中の naRNA を検定する方法を確立した。

この方法は GCH 遺伝子だけでなく他の酵素遺伝子にも適用され，マウス耳下腺では Na⁺,K⁺-ATPase の naRNA の存在が確認されたことから，内在性アンチセンス RNA は GCH のような調節性の酵素だけではなく，比

較的恒常的に存在している酵素の発現にも関係することを示唆する結果を得ている (Arch. Oral. Biol. 2008)。

(2) PC12 細胞の BH4 量および GCH mRNA レベルは神経成長因子によって増加するが，このとき同時に GCH naRNA も増加した。また，PC12 細胞の GCH mRNA を増加させる他の因子 (リポ多糖/TNF α ，膜透過性サイクリック AMP アナログ，フォルボールエステルなど) によっても GCH naRNA は増加した。

GCH naRNA は GCH mRNA からの GCH 蛋白質合成を抑制する方向に作用するとの推定で研究を進めてきたが，生体の状況によっては GCH mRNA を分解から保護しテトラヒドロビオプテリン(BH4)レベルを上昇させる方向に作用する可能性が示唆された。

(3) 5' RACE 法による GCH naRNA の 5' 末端分析の結果，， mRNA のヌクレオチド位置 2710, 2558, 2467, 2326 に相当する 4 種の末端が得られた。短いものが長い RNA 鎖から分解されたものかどうか検討中である。

3. 現在までの達成度

③やや遅れている。

(1) GCH naRNA の生理的機能の解析のためにさらに高精度の定量方法が必要であり，リアルタイム PCR の適応を検討しているが，センス RNA とアンチセンス RNA の混在する試料に適応できるようにする方法がまだ完成していない。

(2) 生理的意義を明らかにするためセンス RNA あるいはアンチセンス RNA の一方のみを発現誘導 (あるいは発現抑制) する試薬/

条件を検索しているが達成できていない。

4. 今後の研究の推進方策

(1) 生理的機能の検討には発現レベルの比較的小さな変化も正確に迅速に測定すること、センス RNA とアンチセンス RNA を厳密に区別して測定することが重要である。このため RNA 標品中の GCH mRNA あるいは GCH naRNA の片方だけを特異的に分解する処理を行った後にリアルタイム RT-PCR 法でそれぞれの発現レベルを定量する方法を確立する。

(2) GCH アンチセンス RNA の 3' 末端側の構造 (配列) を明らかにする。

(3) GCH mRNA は終止コドンが 851-853 の位置にあり異様に長い 3'UTR を有する。この 3'UTR 部分に結合する miRNA が存在すること、また GCH naRNA もこの部分に対応する配列を持つので、それら miRNA の GCH アンチセンス RNA に対する作用を検討する。

5. 代表的な研究成果

(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 4 件)

Kurihara K, Nakanishi N, Amano O, Tonosaki K: Expression of Na⁺/K⁺-ATPase α 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)

Suzuki K, Uchida K, Nakanishi N, Hattori Y: Cilostazol activates AMP-activated protein kinase and restores endothelial function in diabetes. Am. J. Hypertens. 21: 451-457, 2008. (査読有)

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. Arterioscler. Thromb Vasc. Biol. 27, 865-870, 2007. (査読有)

Iwata C, Wang X, Uchida K, Nakanishi N, Hattori Y: Buthionine sulfoximine causes endothelium dependent hyper-relaxation and hypoadiponectinemia. Life Sci. 80, 873-878, 2007. (査読有)

[学会発表] (計 6 件)

Kurihara K, Nakanishi N, Tonosaki K: Regulation of kallikrein 1b26 (klk1b26) expression in mouse submandibular gland by post-transcriptional modification of its mRNA. 36th International Congress of Physiological Science (IUPS 2009), 2009.5.30, Kyoto, Japan.

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ンな修飾. 第 53 回日本唾液腺学会, 2008 年 12 月, 東京.

栗原琴二, 中西信夫, 天野修, 外崎肇一: 栗原琴二, 中西信夫, 天野修, 外崎肇一: Na⁺/K⁺-ATPase の内在性アンチセンス RNA の発現. 第 3 回トランスポーター研究年会, 2008 年 6 月, 京都.

栗原琴二, 外崎肇一, 長谷川宏幸, 服部良之, 中西信夫: 神経成長因子は LPS/TNF α による PC12 細胞 iNOS 発現誘導を抑制する. 第 3 回 JPC/JCNRA 合同プテリジン研究会, 東京, 2007 年 7 月

中西信夫, 栗原琴二, 外崎肇一, 服部良之, 長谷川宏幸: PC12 細胞の BH4 レベルに対する LPS/TNF α と神経成長因子の作用. 第 3 回 JPC/JCNRA 合同プテリジン研究会, 東京, 2007 年 7 月

鈴木木弘, 服部良之, 岡安寿江, 中西信夫, 笠井貴久男: テトラヒドロピオプテリンは動脈硬化を抑制する. 第 3 回 JPC/JCNRA 合同プテリジン研究会, 東京, 2007 年 7 月

[図書] (計 1 件)

Hasegawa H, Sawabe K, Sugawara Y, Maruyama S, Matsuoka H, Nakanishi N, Wakasugi K O: Recent studies on sepiapterin and biopterin transport in mammalian cells: Chemistry and Biology of Pteridines and Folates, Blau, N. and Thöny, B. eds., SPS Verlagsgesellschaft mbH, Heibronn, Germany, pp. 254-268, 2007. (査読有)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]