

機関番号：32404

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2010

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）Natural antisense of GTP cyclohydrolase 1: physiological functions 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

研究成果の概要（和文）：

テトラヒドロビオプテリン(BH4)は神経伝達物質や一酸化窒素を合成に必須であり神経機能、血管機能に重大な影響を持つ物質である。BH4の生合成を調節する酵素、GTPシクロヒドロラーゼ1(GCH)には内在性アンチセンスRNA(GCH naRNA)が存在することを見出しその機能について研究した。GCHタンパク質をつくるためのメッセンジャーRNA(GCH mRNA)が増加するように細胞を刺激するとGCH naRNAもGCH mRNAと同調して増加する。GCH naRNAはGCH mRNAを安定化しBH4生産を増加させる方向に働くと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Tetrahydrobiopterin (BH4) is an essential cofactor for the enzymes which synthesize monoamine neurotransmitters and nitric oxide, thus influencing neuronal and vascular functions. We found in PC12 cells and in rat and mouse livers natural antisense RNA (naRNA) of GTP cyclohydrolase 1 (GCH), a rate-limiting enzyme in BH4 de novo synthesis. When the PC12 cells were stimulated by various agents which increased the cellular BH4 level, GCH naRNA was increased in parallel with GCH mRNA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,450,000

研究分野：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：内在性アンチセンスRNA, GTPシクロヒドロラーゼ, 遺伝子発現調節, テトラヒドロビオプテリン, 一酸化窒素, 神経伝達物質, トランスクリプトーム

## 1. 研究開始当初の背景

テトラヒドロビオプテリン(BH4)は一酸化窒素合成酵素(NOS)や芳香族アミノ酸水酸化酵素の必須の補酵素であり、生体内で一酸化窒素(NO)生成量やモノアミン性神経伝達物

質生合成を調節している重要な物質である。このため、BH4の欠損・不足は様々な神経疾患や血管機能障害の原因となる。また逆に過剰のBH4はNOの過剰生成を介して血圧低下を引き起こすこともある。このように生体内で

BH4レベルを生体の環境や健康状態に合わせて適正に制御することは極めて重要である。

最近のヒト、マウスなどのゲノムDNA解析とRNA生合成についての研究の発展によって、RNA転写産物の種類(マウスで18万以上)は遺伝子の種類(マウスで2万2千と推定)よりも10倍近く多いことが明らかにされた。これらの膨大な種類のRNA転写産物の機能の解明が、これからの生命科学の最も重要な課題の1つとなることは間違いない。それらRNA転写産物の1種として内在性アンチセンスRNAの存在がScience誌で明らかにされ、それが遺伝子発現調節において重要な働きをすると予想されている。

筆者らは、遺伝子のプロモーター部域配列に特異的なフォワードプライマーを用いた逆転写反応(RT)でcDNAの合成を行い、これを鋳型としてPCRを行うことにより任意の遺伝子について内在性アンチセンスRNAの存在を検出する方法を確立した。この方法により、BH4生合成量を制御する酵素、GTPシクロヒドロラーゼ(GCH)の内在性アンチセンスRNAを発見し、国際学会で発表した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、培養細胞系(PC12細胞、血管内皮細胞、好塩基球系細胞)やモデル実験動物(ラット、マウス)において、分子生物学的手法を用いてGCHアンチセンスRNAが細胞内外のBH4濃度に及ぼす作用、GCHアンチセンスRNA分子そのものの性質、細胞内のGCHアンチセンスRNAの動態を検討し、(1)内在性GCHアンチセンスRNAの生理的機能、(2)GCHの内在性アンチセンスRNAの構造、(3)GCHアンチセンスRNAの発現機構、を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

### (1) GCHの内在性アンチセンスRNAの生理的機能

BH4レベルの変化(増加および減少)を誘導し、GCHセンスRNA(mRNA)とGCHアンチセンスRNAの挙動およびBH4産生とGCH蛋白質に対するアンチセンスRNAの影響を検討する。GCHアンチセンスRNAの検定・定量はGCH遺伝子プロモーター部域配列のフォワードプライマーを用いたRT-PCR、ノーザンブロットによって行う。培養細胞系では、神経成長因子(NGF)投与、細菌内毒素(LPS)/インターロイキン1投与、細胞内Ca<sup>2+</sup>上昇刺激によりGCH発現誘導を起こす。モデル実験動物(マウス)では、LPS投与により、血管、心臓、腎、唾液腺などでGCH mRNA転写を誘導する。またGCHセンスRNA(GCH mRNA)発現抑制はGCH siRNAの導

入によって行う。

### (2) GCHの内在性アンチセンスRNAの構造

GCH naRNAの5'末端を5' RACE法によって検討する。3'末端については、mRNAの3'末端分析に用いられるポリA配列を利用する通常の3' RACE法は適用できないので(GCH naRNA 3'末端のポリA構造の存在が確認されない) RT反応で用いるフォワードプライマー配列のGCHゲノム上の位置を検討することで分析する。またヒトおよびマウスのGCHゲノム配列をを参考にGCHアンチセンスRNAの全長の塩基配列を検討する。

### (3) GCHアンチセンスRNAの発現機構

GCHセンスRNA(GCH mRNA)発現に何らかの影響を与える薬剤のなかからGCHアンチセンスRNA発現を誘導/促進する薬剤、あるいは発現を抑制/阻害する薬剤の検索を行う。

## 4. 研究成果

### (1) タンパク質をコードする遺伝子に対する内在性アンチセンスRNAの検出方法の確立

蛋白質をコードしている遺伝子のmRNAレベルを測定するためのRT-PCRにおいて、最初の逆転写反応(RT)ではリバースプライマーを用いて相補的DNA(cDNA)を作成しなければ、次いで行われるPCR反応でmRNA由来のPCR産物は理論的に得られないはずである。しかし、このことは逆に、遺伝子特異的(GS)フォワードプライマーを用いてRT反応を行い続いて行ったPCR反応において予測されるサイズと配列を持ったPCR産物が産生されれば、その遺伝子の内在性アンチセンスRNAが作られていることを示唆するものである。また、耐熱性逆転写酵素(RT)を用いてRT反応における非特異的なcDNAの生成を抑えること、さらには遺伝子のプロモーター部域配列のフォワードプライマーを用いてRT反応を行うことを追加して内在性アンチセンスRNAの存在を検定する方法を確立した。この方法によって、テトラヒドロビオプテリン(BH4)生合成系の律速酵素であるGTPシクロヒドロラーゼ1(GCH)に内在性アンチセンスRNAが存在することを検証した。また、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<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-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(Kurihara K, Nakanishi N, et al., Arch Oral Biol 53, 593-604, 2008)。

(2) GTPシクロヒドラーゼ 1 (GCH) に対する内在性アンチセンスRNA (GCH naRNA) の存在

ラット褐色腫細胞PC12より抽出した総RNA標品から、GCH mRNA 配列 (Accession No. NM\_024356) 特異性フォワードプライマー F8 あるいは F422 を用いて RT 反応を行い、次いで PCR 反応を行うと GCH と相同の塩基配列を持つ PCR 産物が生産された (図 1)。

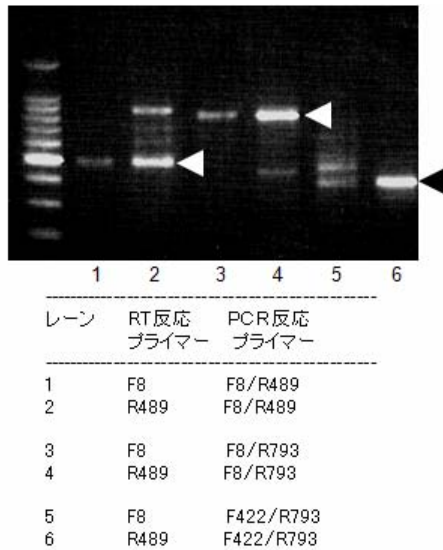


図1: 逆転写反応にフォワードプライマー (F8) あるいはリバースプライマー (R489) を用いた RT-PCR

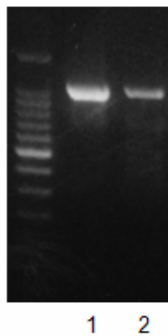


図2: 逆転写反応に mRNA 転写開始部より上流にある配列のフォワードプライマー (F-549) を用いた RT-PCR

また、GCH ゲノムの 5' 調節領域に相当する配列 (GCH mRNA への転写開始部位より 549 ヌクレオチド上流: Accession No. AF131210) をもつフォワードプライマー、F[-549] による RT 反応で cDNA を作成した場合にも GCH 配列に相同の PCR 産物が生産された (図 2)。これらの結果は PC12 細胞において内在性 GCH アンチセンス RNA (GCH naRNA) が発現していることを示している。ラット肝より抽出した総 RNA 標品においても同様の結果が得られた (図 3)。さらには、マウス肝よりの総 RNA 標品においてもラット肝と同様の結果が得られた (図 3)。GCH naRNA は腫瘍由来の培養細胞にだけ見られるものではなく、ラット、マスにおいて GCH タンパク質、したがって GCH センス RNA (GCH mRNA) が発現している正常な肝組織においても発現していることを示すものであり、ヒトにおいても GCH naRNA が発現しており何らかの機能を果たしていることを示唆するものである。

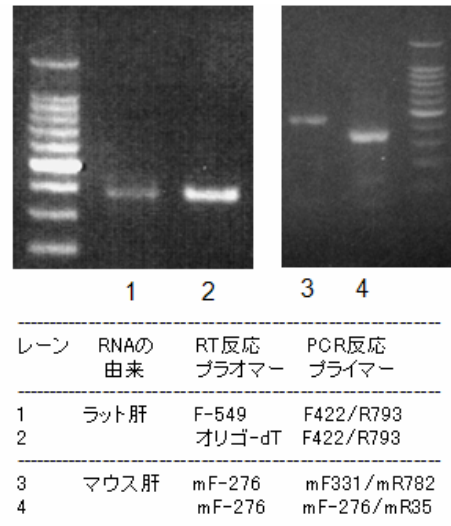


図3: ラット肝およびマウス肝より調製した RNA 中に検出された内在性 GCH アンチセンス RNA

(3) ラット GTPシクロヒドラーゼ 1 (GCH) の全長 mRNA の推定構造

GCH naRNA の構造を調べるために GCH mRNA の配列を参考にしようとしたが、GenBank に登録されているラット GCH mRNA (Accession No. NM\_024356) の配列は mRNA の全長を記載したものではない (終止コドンより下流の約 120 ヌクレオチドまでしか記載されていない)。そこで全長 mRNA 配列が決定されているマウス GCH mRNA 塩基配列 (Accession No. NM\_008102) とラット GCH 遺伝子近傍の配列 (GenBank Accession No. NC\_005114) との間で塩基配列の比較を行った結果、ラット GCH 遺伝子の配列は Accession No. NC\_005114 のヌクレオチド番号 nt#23139794-nt#2302254 の部分に相当する。この結果ラット GCH mRNA

の完全長は 2758 ヌクレオチドと推定される (NM\_024356 として登録されているのは 1016 ヌクレオチドまでである)。

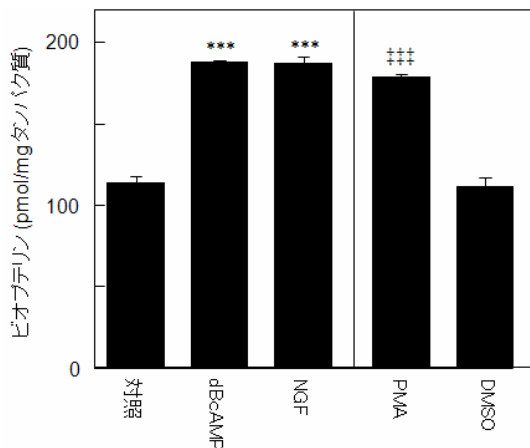


図4: PC12細胞のBH4レベルに対するジブチリルcAMP(dBcAMP), 神経成長因子(NGF), フォルボールエステル(PMA)の作用(DMSO: PMAの溶剤)

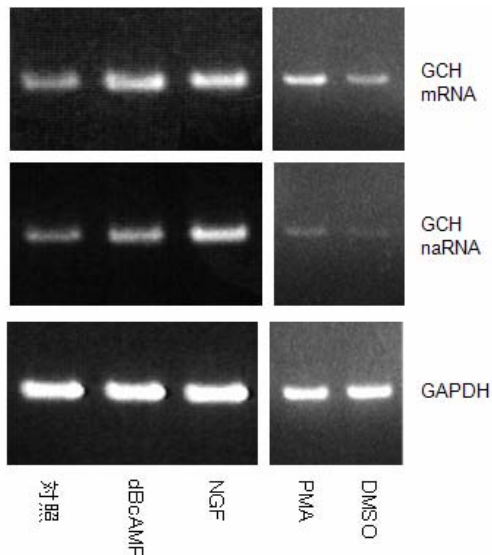


図5: PC12細胞のGCH mRNAと内在性GCHアンチセンスRNA(GCH naRNA)に対するジブチリルcAMP(dBcAMP), 神経成長因子(NGF), フォルボールエステル(PMA)の作用(GAPDH: グリセルアルデヒドリン酸脱水素酵素のmRNA; DMSO: ジメチルスルフォキシド, PMAの溶剤)

(4) ラットGTPシクロヒドラーゼ 1 (GCH) の内在性アンチセンスRNA (GCH naRNA) の構造

上記のようにラットGCH mRNAの完全長は 2758ヌクレオチドと推定される。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。アンチセンスRNAにおいてもRNAスプライシングが起きていることも考えられるので, これらの位置がGCH naRNAの転写開始部位を意味するものか, あるいは短いものが長いRNA鎖から分解されたものかどうかはまだ不

明である。

GCH naRNAの3' 末端については, RT反応で用いるフォワードプライマーの分析の結果から, 少なくともmRNA転写開始部位より549ヌクレオチド以上の上流に相当する位置にあることがわかったが, ゲノムの非転写領域の塩基配列からは特異性が高いプライマー設計が困難であり3' 末端の位置は同定できていない。

(5) GTPシクロヒドラーゼ 1 mRNA発現に作用する薬剤と内在性アンチセンスRNA (GCH naRNA) の動態

PC12細胞のBH4量は神経成長因子(NGF), サイクリックAMP (膜透過性サイクリックAMP類似体), フォルボールエステル(フォルボール 12-ミリスチル 13-アセテート, PMA) の投与や(図4), リポ多糖(LPS)と腫瘍壊死因子 $\alpha$  (TNF $\alpha$ )の併用投与によって増加する。それはGCH mRNA発現がこれらの促進されるためである。これらの薬剤がGCH mRNA発現を促進的に調節調節する時, GCH naRNA発現にどのような影響をあたえるか検討した。いずれの場合もGCH naRNA発現はGCH mRNAと同様に促進的調節を受けた(図5)。一方, PC12細胞をBH4サルベージ経路の前駆物質であるセピアプテリン(SP)存在下で長期間(4~5日間)培養するとGCH mRNAレベルが低下するが, それと同時にGCH naRNAレベルも低下した。また, in vivoにおいても, 唾液腺を含め腎, 心臓, 血管などのGCH mRNAレベルはマウスへのリポ多糖投与により発現が促進され, 細胞・組織中のBH4濃度が上昇するが, このときにもGCH naRNAレベルは増加した。これらの結果から, 筆者らの当初の予想とは反対に, GCH naRNAはGCHタンパク質合成とBH4合成に対し抑制的というよりはむしろ促進的に作用していることが示唆された。

(6) 今後の課題

GCH naRNAはGCHタンパク質発現に促進的に作用することが示唆された。その機構としてGCH mRNAの安定化を高める効果が考えられるが, 今後検証すべき課題である。また, GCH mRNAは長大(翻訳領域の2.5倍の長さ)な3'非翻訳領域(3' UTR)を有するという特徴があり, これはマイクロRNA(miRNA)によって抑制的発現調節をうけるmRNAに多く見られる性質である。このようなmiRNAの検討, GCH naRNAとの機能的関係も本研究から現れてきた新たな課題である。

## 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5件)

- ①Iwata C, Wang X, Uchida K, Nakanishi N, Hattori Y, Buthionine sulfoximine causes endothelium dependent hyper-relaxation and hypo-adiponectinemia. *Life Sciences*, 査読有, 80, 873-878, 2007.
- ②Hattori 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*, 査読有, 27, 865-870, 2007.
- ③Suzuki K, Uchida K, Nakanishi N, Hattori Y: Cilostazol activates AMP-activated protein kinase and restores endothelial function in diabetes. *Am. J. Hypertens.* 査読有, 21: 451-457, 2008.
- ④Kurihara K, Nakanishi N, Amano O, Tonosaki K, Expression of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase · subunit isoforms in rat salivary glands: occurrence of sense and antisense RNAs of the α3 isoform in the sublingual gland. *Archives of Oral Biology*, 査読有, 53, 593-604, 2008.
- ⑤Ohta S, Hattori Y, Nakanishi N, Sugimoto H, Kasai K, Differential modulation of immunostimulant-triggered NO production by endoplasmic reticulum stress inducers in vascular smooth muscle cells. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 査読有, 57, 434-438, 2011.

[学会発表] (計8件)

- ①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/NF $\alpha$ 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, 2007年7月, 東京(帝京大学医学部)
- ②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/NF $\alpha$ 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, 2007年7月, 東京(帝京大学医学部)
- ③鈴木國弘, 服部良之, 岡安寿江, 中西信夫, 笠井貴久男, テトラヒドロピオブ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, 2007年7月, 東京(帝京大学医学部)
- ④栗原琴二, 中西信夫, 天野修, 外崎肇一,

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-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(京都大学)

- ⑤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, 2008年12月, 東京(文京学院大学)
- ⑥Kurihara K, Nakanishi N, Tonosaki K, Regulation of kallikrein 1b26 (klk1b26) expression in mouse submandibular gland and by post-transcriptional modification of its mRNA. 36th International Congress of Physiological Science (IUPS 2009), 2009年5月, Kyoto, Japan.
- ⑦栗原琴二, 中西信夫, 友村明人, 外崎肇一: 雄マウスの顎下腺に多く発現しているカリクレイン(KLK1b26)蛋白質を翻訳するmRNAの5'末端部分に特異的に相互作用する雌マウス顎下腺のmiRNA, 第87回日本生理学大会, 2010年5月, 岩手
- ⑧栗原琴二, 中西信夫, 友村明人, 外崎肇一: 雄マウスの顎下腺に多く発現しているカリクレイン蛋白質を翻訳しているmRNAに特異的に相互作用する雌マウス顎下腺のmiRNA, 第52回歯科基礎医学会総会, 2010年9月, 東京

[図書] (計1件)

- ①Hasegawa 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, 査読有, pp. 254-268, 2007.

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

栗原 琴二 (KURIHARA KINJI)  
明海大学・歯学部・講師  
研究者番号: 10170096  
渡部 省二 (WATABE SHOJI)  
山口大学・医学系研究科・教授  
研究者番号: 30113020  
長谷川 宏幸 (HASEGAWA HIROYUKI)  
帝京科学大学・理工学部・教授  
研究者番号: 10092983  
(H17→H18; H19 退職)