

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 1日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570182

研究課題名（和文）甲状腺ホルモン受容体 α mRNA の uORF による翻訳抑制機構研究課題名（英文）Mechanism of translational repression by uORF of thyroid hormone receptor α mRNA

研究代表者

矢尾板 芳郎 (Yaoita Yoshio)

広島大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：00166472

研究成果の概要（和文）：

両生類の変態において、甲状腺ホルモンは一連の形態変化を誘導する。私たちは、甲状腺ホルモン受容体 TR α の mRNA の翻訳が、それ自身の 5' 非翻訳領域(5' UTR)によって約 1/20 に抑制されることを示した。15 塩基から 24 塩基の配列からなる、5' UTR にある 5 カ所の領域が翻訳抑制活性を示し、他の遺伝子の 5' UTR の中にもあっても下流にある遺伝子の翻訳を抑制した。この領域の中には Sp1 結合配列と類似の新規の翻訳抑制配列も存在していた。

研究成果の概要（英文）：

During amphibian metamorphosis, thyroid hormone induces a series of dynamic morphological changes. We showed that the 5'-untranslated region (5'-UTR) reduces the translation of the thyroid hormone receptor (TR) α mRNA to one-twentieth. Five elements in TR α 5'-UTR, which are composed of 15 to 24 nucleotides, possess translational repressive activity, and inhibit the translation of the downstream open reading frame in the 5'-UTRs of other mRNAs. There is a novel translational repressive sequence similar to the Sp1-binding site among elements.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：分子発生生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：翻訳、翻訳抑制、甲状腺ホルモン α 、5'-UTR, uORF

1. 研究開始当初の背景

無尾両生類の変態は、後期発生において甲

甲状腺ホルモンで引き起こされる、幼生型から成体型への体の作り替えである。ほぼ全ての器官が関係し、甲状腺ホルモンの血中増加とともに後肢・前肢の発達、鰓や尾の退縮などが、予め決まった順番で協調してダイナミックに変化する。

甲状腺ホルモン受容体は、発生過程において血中で増加していく甲状腺ホルモンに結合することにより遺伝子発現を調節し、両生類の変態の中で重要な役割を果たしている。甲状腺ホルモン受容体には α 、 β がある。頭部と尾では受精後3週間からクライマックス後期まで甲状腺ホルモン受容体 α mRNA は増加し続けるにもかかわらず、細胞当たりの甲状腺ホルモン受容体 α 蛋白質分子数が、各々、6000 と 2000 と一定であることが知られている。このことから、甲状腺ホルモン受容体 α の発現は転写後、強力な翻訳調節を受けていると想像されている。

一般的に変態初期に変化する器官では甲状腺ホルモン受容体 α が高く発現している。幼生頭部は尾よりも10分1の濃度の甲状腺ホルモンに反応できる。つまり、頭部は尾よりも高い甲状腺ホルモン受容体 α 蛋白質を発現するように設定されているために、より低い濃度の甲状腺ホルモンに反応できる可能性を示している。したがって、甲状腺ホルモン受容体 α mRNA の翻訳調節を明らかにして、その細胞内蛋白質の設定機構を知ることは甲状腺ホルモンへの感受性の決定機構を理解することになり、変態における器官変化の順番がどのように決められているかを解明することになる。

2. 研究の目的

甲状腺ホルモンはヒトの生理・病理病態と関係しているだけでなく様々な生命現象とも関わっている。例えば、脊索動物の変態、特に両生類の変態を引き起こす。その時、甲状腺ホルモン受容体 α の発現量は各々の器官で各々の一定量へ転写後調節により制御されており、その器官のホルモン感受性と関連していると考えられている。本研究は、甲状腺ホルモン受容体 α mRNA の5'非翻訳部位に存在する upstream open reading frame (uORF) が脊椎動物でほぼ保存されており、しかも翻訳抑制活性を示すことに着目して、それが受容体の発現量を調節していると考え、その分子機構を解明することを目的としている。

3. 研究の方法

以下のやり方で研究を推進した。

(1) 様々な両生類の甲状腺ホルモン受容体 α mRNA の5'非翻訳部位をクローニングし、塩基配列を決定して比較する。

(2) 甲状腺ホルモン受容体 (TR) α mRNA の5'非翻訳部位 (5' UTR) の翻訳抑制活性を培養細胞内の TR 蛋白質量と mRNA 量を比較して確認する。

(3) TR α 5' UTR が他の構造遺伝子に対しても、また、他の培養細胞でも翻訳抑制活性を持つかを調べる。

(4) TR α 5' UTR が生体内で翻訳抑制活性を示すかを幼生を用いて解析する。

(5) TR α 5' UTR の翻訳抑制活性をどの塩基配列が担っているか、欠損変異を用いて示す。

(6) 翻訳抑制活性を有する領域 (uORF も含む) に様々な点変異を導入してその影響を調べる。

(7) 翻訳抑制活性を有する領域が無細胞系翻訳システムでも機能するかを調べる。

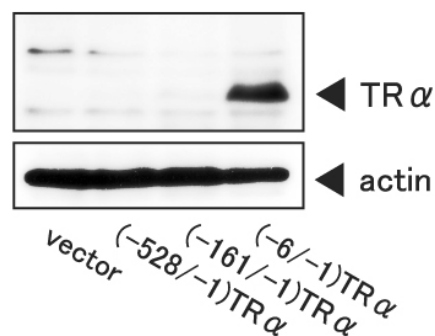
4. 研究成果

研究の方法に従って成果を示す。

(1) 両生類 (無足類、有尾類、無尾類) では開始コドンの100塩基上流まで、無尾類では130塩基上流まで、ツメガエル類では160塩基上流まで保存されていた。無尾類の TR α 3' UTR では構造遺伝子から30塩基下流までしか保存されていないことを考慮すると保存されている TR α 5' UTR には何らかの機能があることが推測される。

(2) 528塩基の TR α 5' UTR の全塩基配列と TR α 構造遺伝子を含む発現コンストラクト ((-528/-1)TR α)、ツメガエル類で保存されている160塩基と構造遺伝子を含むもの ((-161/-1)TR α)、6塩基上流しか含まないもの ((-6/-1)TR α) をアフリカツメガエル培養細胞にトランスフェクションさせて、細胞抽出液に含まれる TR α 蛋白質量を Western blots で定量した。

Western blots (A6 cells)

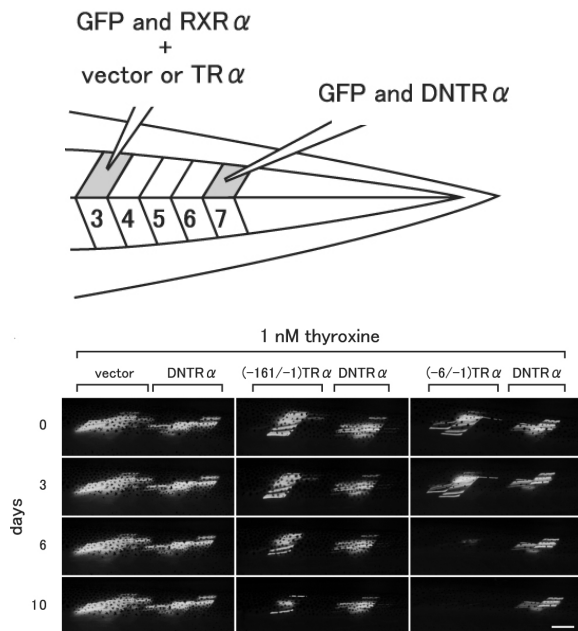


また、同じ細胞から RNA を抽出し、RT-PCR で TR α mRNA の量も定量し、TR α mRNA 当たりの TR α 蛋白質量を比較した。TR α 5' UTR (-528/-1) や (-161/-1) を持つコンストラクトでトランスフェクションした細胞では TR α 5' UTR を持たない (-6/-1) より TR α mRNA 当たりの TR α

蛋白量が20分の1に減少していた。このことは進化的に両生類で保存されているTR α 5' UTR(-161/-1)の存在によりTR α mRNAの翻訳抑制が起きたことを意味している。

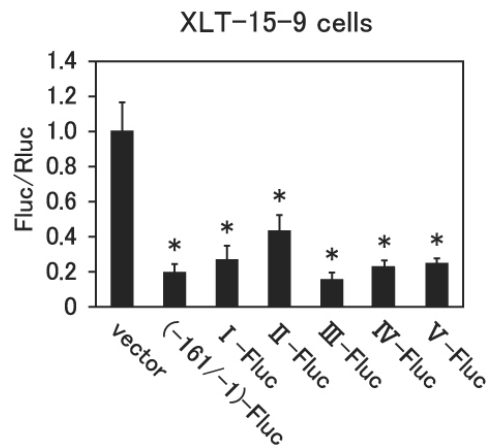
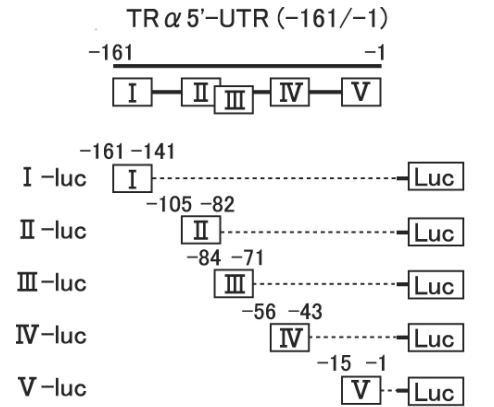
(3)TR α 5' UTR(-161/-1)の翻訳抑制活性は構造遺伝子を蛍光ルシフェラーゼ遺伝子に代えても、ウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子に代えても観察された。また、トランスフェクションする細胞をA6細胞にしてもXLT-15-9細胞にしても確認できた。ヒト由来の細胞株でも翻訳抑制活性があった。TR β 5' UTRを代わりに用いると翻訳抑制活性が見られなかったため、この現象は塩基配列依存的な抑制効果であると言える。

(4)変態前の尾の筋細胞でTRの発現量を増やすと、低濃度の甲状腺ホルモン(T4)にも反応して筋細胞死が起きる(主な発表論文 2. Genes to Cell in press)。(161/-1)TR α か、(-6/-1)TR α か、どちらかを緑色蛍光蛋白質(GFP)遺伝子と共に尾の筋細胞にトランスフェクションさせてTR α 蛋白質を過剰発現させ、幼生を1 nM T4で処理した。(-6/-1)TR α を導入した筋細胞では早く細胞死が起きて、共発現しているGFPによる緑色蛍光が6日目には著しく減少していたが、(161/-1)TR α を導入した筋細胞では緑色蛍光発現がゆっくり減っていった。下記の図の様に尾の右側に dominant negative TR と GFP 発現型遺伝子を注入しているので、甲状腺ホルモン存在下で



も細胞死が起きず、GFPの蛍光減少も生じない。これを基準として考えることができる。したがって、生体内においてもTR α 5' UTR(-161/-1)が翻訳抑制活性を示していることが強く示唆された。

(5)翻訳抑制活性を持つ塩基配列を同定するために5'側から、または3'側からTR α 5' UTR(-161/-1)欠損変異を作り、ルシフェラーゼ遺伝子の前に配置した。その遺伝子コンストラクトを培養細胞にトランスフェクションして翻訳抑制活性を定量した。TR α 5' UTR(-161/-1)内では5つの領域が翻訳抑制活性を持っていた。それらはルシフェラーゼ遺伝子の5'側に置かれても単独で翻訳抑制活性を示した。



(6)5つの翻訳抑制領域のうち、5'側から4番目と5番目の塩基配列は両生類全体で保存されているので、点変異を入れて、より詳細に解析した。

①5番目の領域は15塩基から構成され、uORFの構造をとっていた。開始コドンや終止コドンに変異を導入すると翻訳抑制活性は完全に消失した。それ以外のコドンも両生類では保存されていたが、少しアミノ酸配列を変化させる変異を入れても翻訳抑制活性は抑制されなかった。8-9個の塩基を変えると若干、抑制活性が弱くなった。本研究条件下において開始コドンと終止コドン以外では抑制活性の塩基配列依存性もしくはアミノ酸配列依存性は共に弱かった。

②4番目の領域は14塩基であり、GCリッチ

な配列であった。Centroid fold program では stem-loop 構造をとっていることになっていた。loop は 3 塩基からなり、一番 3' 側の塩基配列だけを、他の塩基に変換しても抑制活性は維持された。しかし、それ以外の塩基を変化させると、抑制活性が失われた。stem の部分を立体構造に影響を与えないように変異を加えても、活性が無くなった。この領域の翻訳抑制活性は非常に塩基配列特異的であると言える。この塩基配列特異性は転写因子である Sp-1 の結合配列とほぼ同じである。しかし、この領域があるからと言って、転写量は増加しないし、Sp-1 を過剰発現させても翻訳抑制活性は影響を受けなかった。

(7) 無細胞系翻訳システム（麦芽抽出液）で TR α 5' UTR (-161/-1) を 5' 側に含む mRNA を翻訳させると蛋白の産生量が極めて低くなり、5 つ翻訳抑制領域も同様に抑制活性を示した。

したがって、私たちは 161 塩基からなる TR α の 5' UTR に翻訳抑制活性を見出し、それが他の遺伝子の上流でも、ヒト由来細胞でも、生体内でも機能を有することを示した。TR α 5' UTR には 14-24 塩基により構成される、5 つの翻訳抑制領域があり、これらは単独で活性を示し、無細胞系翻訳システムでも活性を持つ。5 つの中には Sp-1 の結合配列とほぼ同様のものがあり、塩基配列特異性が類似していたが、この領域には転写活性がなかった。

「国内外における位置付けとインパクト」

5' UTR の翻訳制御配列には、uORF、internal ribosome entry sites (IRES)、stem-loop 構造等が知られている。TR α 5' UTR の 5 番目の領域は uORF である。4 番目の領域はエネルギー的に不安定であるが stem-loop 構造に分類されると思われる。5 番目の uORF は基本的には今まで発表されてきた uORF と同じであると考えられるが、コードされているアミノ酸配列が魚類からヒトまでほぼ保存されていることから、何らかの特別な機能があると思われる。今回の実験条件では、明確なアミノ酸配列依存性が観察されなかったため、残念ながらその意義を解析できなかった。

4 番目の領域は両生類で保存されており、しかも、Sp-1 の結合配列と類似した塩基配列特異性を有する翻訳抑制活性を持っていた。転写活性は確認できなかったが、新規の翻訳抑制配列である。しかも、ヒトのみならず、麦芽抽出液を用いた実験から植物でも活性があると思える。翻訳制御は転写調節以上に蛋白発現に関与しているとの報告があり、この発見は今後の翻訳制御の研究に大きな影

響を与えるものである。

両生類とヒトの TR α 遺伝子には保存されている uORF があるが、その他にヒトでは 5' UTR にある G-quadruplex により翻訳抑制が起きていると考えられている。両生類の TR α 遺伝子にはそのような配列は確認できず、Sp-1 結合配列類似の領域で翻訳抑制が起きている。同じ翻訳抑制が違う分子機構を仲介されながら生じていることは TR α mRNA の翻訳抑制が生理的に重要であるということを示しており、TR α の機能を解析する上で重大な示唆を与えている。

「今後の展望」

Sp-1 結合配列類似の領域による翻訳抑制に関与する蛋白質は興味深い。この翻訳抑制の分子機構の解析を進めていきたい。

TR α 遺伝子発現が後肢で高く、尾で低いため、甲状腺ホルモンへの感受性に差が生じ、後肢が発達してから尾が退縮する（主な発表論文 2. Genes to Cell in press）。転写レベルの発現ではこの差を説明できないので、TR α 5' UTR が後肢では翻訳抑制に効いていないのではないかと考えている。そのため、幼生の後肢と尾での TR α 5' UTR の翻訳抑制活性を定量する計画である。

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 6 件）

1. Morihiko Okada, Keisuke Nakajima, Yoshio Yaoita

Translational regulation by the 5'-UTR of thyroid hormone receptor α (TR α) mRNA.

The Journal of Biochemistry 査読有 151, 2012, 519-531

2. Keisuke Nakajima, Kenta Fujimoto and Yoshio Yaoita

Regulation of thyroid hormone sensitivity by differential expression of the thyroid hormone receptor during *Xenopus* metamorphosis

Genes to Cells 査読有 2012 (in press)

3. 矢尾板芳郎

蛙や昆虫の変態について、日本医事新報、査読無、No. 4584、2012年、62-64

4. Keiko Kashiwagi, Akihiko Kashiwagi, Atsushi Kurabayashi, Hideki Hanada, Keisuke Nakajima, Morihiko Okada, Minoru Takase, and Yoshio Yaoita.

Xenopus tropicalis: an ideal experimental animal in amphibia.

Exp Anim. 査読有, 59(4), 2010, 395-405

5. Yukiko Yamazaki, Ryo Akashi, Yutaka Banno, Takashi Endo, Hiroshi Ezura, Kaoru Fukami-Kobayashi, Kazuo Inaba, Tadashi Isa, Katsuhiko Kamei, Fumie Kasai, Masatomo Kobayashi, Nori Kurata, Makoto Kusaba, Tetsuro Matuzawa, Shohei Mitani, Taro Nakamura, Yukio Nakamura, Norio Nakatsuji, Kiyoshi Naruse, Hironori Niki, Eiji Nitasaka, Yuichi Obata, Hitoshi Okamoto, Moriya Okuma, Kazuhiro Sato, Tadao Serikawa, Toshihiko Shiroishi, Hideaki Sugawara, Hideko Urushibara, Masatoshi Yamamoto, Yoshio Yaoita, Atsushi Yoshiki, and Yuji Kohara

NBRP databases: databases of biological resources in Japan

Nucleic Acids Research, 査読有, 38, 2010, D26-D32

6. 矢尾板芳郎、伊藤弓弦、浅島 誠
両生類実験動物 *Xenopus tropicalis* を中心として、細胞工学別冊「バイオリソース&データベース活用術 web でキャッチ!! 実験材料・インフォマティクス」、査読無、巻無し、2009年、158-160

[学会発表] (計14件)

1. 田澤一朗、石田雄二、吉里勝利、矢尾板芳郎

無尾両生類の尾域消失期に於ける Hox 遺伝子ファミリーの発現プロファイル

2012年度日本動物学会中国四国支部広島県例会、2012年3月3日、東広島市、広島大学東広島キャンパス

2. 岡田守弘、中島圭介、矢尾板芳郎

甲状腺ホルモン受容体 α mRNA の5' 非翻訳領域に存在する翻訳制御配列に関する解析、第34回日本分子生物学会年会、2011年12月16日、横浜市

3. 岡田守弘、中島圭介、矢尾板芳郎

甲状腺ホルモン受容体 α mRNA の5' 非翻訳領域に存在する翻訳制御配列に関する解析
第5回日本ツメガエル研究集会、2011年10月6日、静岡市

4. 岡田守弘、中島圭介、矢尾板芳郎

甲状腺ホルモン受容体 α (TR α) mRNA の翻訳抑制の分子機構の解析
第84回日本生化学会大会、2011年9月24日、京都市

5. 中島圭介、藤本健太、矢尾板芳郎

両生類変態における組織感受性は甲状腺ホルモン受容体 α の発現量によって決められる
日本動物学会第82回大会、2011年9月22日、旭川市、大雪クリスタルホールなど

6. 田澤一朗、石田雄二、吉里勝利、矢尾板芳郎

無尾両生類の尾域消失期に於ける Hox 遺伝子の発現プロファイル
日本動物学会第82回大会、2011年9月21日、旭川市、大雪クリスタルホールなど

7. Morihiko Okada, Keisuke Nakajima, Yoshio Yaoyita

Molecular analysis of translational regulation of thyroid hormone receptor alpha mRNA.

Experimental Biology 2011 (ASBMB), (2011.4.13), Walter E Washington Convention Center, Washington, D. C. USA

8. 岡田守弘、中島圭介、矢尾板芳郎

甲状腺ホルモン受容体 α (TR α) mRNA の翻訳抑制の分子機構

第 33 回日本分子生物学会年会、2010年12月8日、神戸、神戸ポートアイランド

9. 中島圭介、藤本健太、矢尾板芳郎

無尾両生類の変態における甲状腺ホルモンに対する組織感受性の決定機構

第 33 回日本分子生物学会年会、2010年12月8日、神戸、神戸ポートアイランド

10. 田澤一朗、石田雄二、吉里勝利、矢尾板芳郎

無尾両生類の変態期における Hox 遺伝子の発現

社団法人日本動物学会第81回大会、2010年9月23日、東京都、東京大学駒場キャンパス

11. 中島圭介、藤本健太、矢尾板芳郎

Low levels of Thyroid Hormone can Induce the Death of Thyroid Hormone Receptor-Overexpressing Muscle Cells in *Xenopus* Tadpole Tail

第 32 回日本分子生物学会年会、2009年12月12日、横浜市

12. 中島圭介、藤本健太、矢尾板芳郎

変態期における無尾両生類幼生の甲状腺ホルモン感受性の決定要因

第3回日本ツメガエル研究集会、2009年10月7日、広島県、宮島杜の宿

13. 中島圭介、藤本健太、矢尾板芳郎

無尾両生類の変態における形態変化のタイミングの決定要因

社団法人日本動物学会第80回大会、2009年9月19日、静岡市、静岡県コンベンションアーツセンターグランシップ

14. 岡田守弘、田澤一朗、矢尾板芳郎

無尾両生類真皮のカルシウム沈着の解析

社団法人日本動物学会第80回大会、2009年9月19日、静岡市、静岡県コンベンションアーツセンターグランシップ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢尾板 芳郎 (YAOITA YOSHIO)
広島大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：00166472

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

中島 圭介 (NAKAJIMA KEISUKE)
広島大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：60260311

田澤 一朗 (TAZAWA ICHIROU)
広島大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：10304388

(4) 研究協力者

岡田 守弘 (OKADA MORIHIRO)
広島大学・大学院理学研究科・博士課程