

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：27103

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12347

研究課題名(和文) 新手法によるビタミン機能の解明：補酵素結合RNAの探索と機能解析

研究課題名(英文) Exploration of coenzyme-binding RNA to find novel functions of vitamins

研究代表者

濱田 俊 (Hamada, Shun)

福岡女子大学・国際文理学部・教授

研究者番号：60282349

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：水溶性ビタミンは主に補酵素として働いており、補酵素は酵素反応において、中心的役割を果たしている。酵素のほとんどはタンパク質であるが、リボ核酸(RNA)も特定の立体構造をとり、酵素、リボザイムとして働くことが知られている。ビタミンを補酵素とする未知のリボザイムが発見できれば、ビタミンの未発見の機能を解明することにつながる。本研究では、ビタミンB2(フラビヌクレオチド)、ビタミンB12(シアノコバラミン)を固相化する方法、ビタミン固相化カラムからの精製方法について検討を行い、2つのビタミンと結合するマウスRNAの探索を行った。しかし、これらのビタミンに結合するRNAの取得には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：Most of hydrophilic vitamins function as coenzymes and play central roles in the catalytic reaction of enzymes. Several ribonucleic acids also function as catalysts, ribozymes. To find ribozymes collaborated with vitamins would lead to revealing unknown functions of vitamins. In the present project, we used flavin adenine dinucleotide (FAD) and cyanocobalamin as baits to identify vitamin-binding ribozymes. Total RNA prepared from the whole mouse body were incubated with FAD- or cyanocobalamin-immobilized beads. After removing unbound RNA by washing, the binding RNA was eluted and amplified. The amplified RNA was again incubated with the vitamin-immobilized beads, the binding RNA was eluted and amplified. This process was repeated four to five times. The final amplified RNA was examined whether it binds to the vitamins, or the sequences of the corresponding cDNA clones were determined. However, we could not find the vitamin-binding RNA in the present study.

研究分野：神経栄養学

キーワード：リボザイム ビタミン 補酵素 RNA

1. 研究開始当初の背景

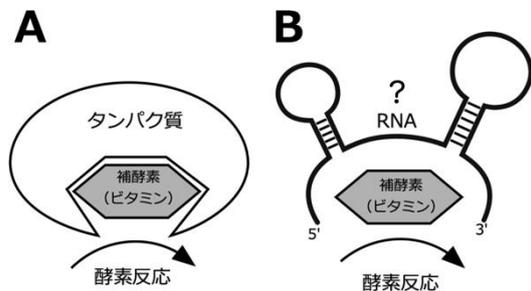
私達はこれまで、ビタミンが神経系に及ぼす影響について興味をもち、研究を進めてきた(文献1)。その過程で、ビタミンの生理機能には未だに不明な点が残されていることを知り、新しい方法論によるビタミンの生理機能探索の必要性を考えるようになった。

水溶性ビタミンの多くは補酵素として働いている。これらの補酵素はタンパク質と複合体を形成し、触媒反応において活性中心としての役割を果たしている。一方で、ある種のリボ核酸(RNA)も分子内で相補的な塩基対形成により特定の立体構造をとり、酵素のような働きをすることが知られている。このようなRNAはリボザイムと呼ばれている。タンパク質の合成装置であるリボソームのRNA(リボソームRNA)や、RNAスプライシングを行う低分子核内RNA(small nuclear RNA, snRNA)などは代表的なリボザイムである。

分子進化の視点からみると、原始生命は代謝反応をリボザイムによって触媒していたと考えられている。現生生物の持つ補酵素にヌクレオチド構造を持つものがあるのは、その名残であると考えられている。もしそうであるなら、現存するリボザイムの中に補酵素と一緒に働くものがあったとしても不思議ではない。人工的に合成されたリボザイムの中にはニコチンアミドジヌクレオチド(NAD)やチアミンピロリン酸(ビタミンB1)を補酵素として要求するものが既に作成されている(文献2, 3)。また、原核生物に存在するリボザイムの中には、低分子化合物と結合するものが一例同定されている(文献4)。しかし、これまでのところ、補酵素と結合して触媒反応を発揮するような真核生物のリボザイムは発見されていない。ビタミンを補酵素とする新しいリボザイムが同定できれば、そのリボザイムの機能を解明することにより、ビタミンの未知の生理活性を解明できる可能性があると考えた。

2. 研究の目的

ビタミンの新たな機能の見出すため、ビタミンを補酵素とするリボザイムを同定する。本研究では、検出の容易さや市販の抗体が利用できるなどの理由により、ビタミンB2(フラビンアデニンジヌクレオチド FAD、フラビンモノヌクレオチド FMN)、ビタミンB12(シアノコバラミン)に着目し、これらに結合するRNAを探索することにした(下図B)。



3. 研究の方法

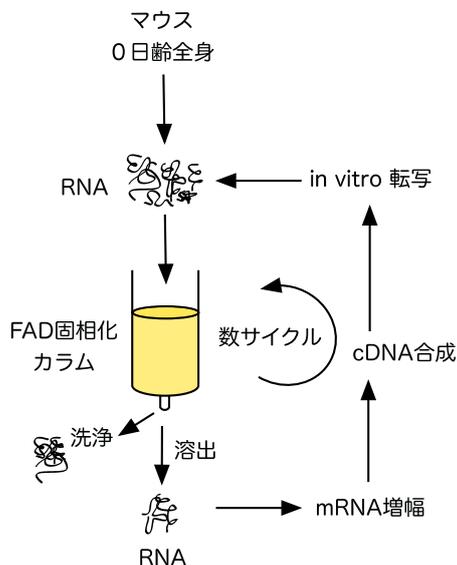
1) ビタミンB2 (FAD, FMN) に結合するマウス RNA の探索

ビタミンB2の補酵素型であるFAD及びFMNを実験に用いた。まず、FADをNHS活性化セファロース・ビーズに固相化し、FADカラムの作成を行った。FADがビーズに結合すると、ビーズが黄色に着色することを利用し、FADを効率よく結合できるカラム作成条件を決定した。

作成したFADカラムが機能するかどうか検討するため、陽性コントロールRNAの調製を行った。枯草菌リボフラビン・オペロンから転写されるRNAのleader配列(rib-leader RNA)は、リボフラビン、FAD、FMNのいずれとも結合することが報告されている。そこで、リボフラビン・オペロンのleader配列をクローニングし、rib-leader cDNAを鋳型とし、RNAポリメラーゼとヌクレオチドを加えて試験管内でrib-leader RNAを合成した。

合成したrib-leader RNAが、作成したFADカラムと結合するかどうか検討した。rib-leader RNAと生後0日齢マウス全身組織から抽出したtotal RNAと混合し、ペリスタルポンプを使ってカラムに循環させ、RNAを結合させた。洗浄後、カラムに結合したRNAを過剰量のFMNにより溶出させた。溶出液中にrib-leader RNAが含まれているかどうかRT-PCR法により確認した。

リアルタイムPCR法を用い、rib-leader RNAの回収率が高くなるようにRNA結合緩衝液、RNA溶出条件等を検討した。また非特異的にカラムへ結合するRNAを低減させるカラムの洗浄条件を検討した。これらの条件検討の後に、マウスRNAのみをFADカラムに反応させ、結合したRNAを溶出・回収した。RNA増幅キット(Clontech)を用いて、この溶出されたRNAの増幅を行い、再びFAD固相化カラムへと結合・洗浄・溶出させた(下図)。



このサイクルを数回繰り返したところ、数100塩基対付近にRNAの増幅が認められた。

この RNA が FMN に結合するかどうか検討するため、得られた RNA と FMN を液相中で反応させ、ゲルろ過カラムを用いて RNA 分画を分離し、その中に含まれる FMN を逆相高速液体クロマトグラフィー蛍光検出法により定量した。

2) ビタミン B12 (シアノコバラミン) と結合するマウス RNA の探索

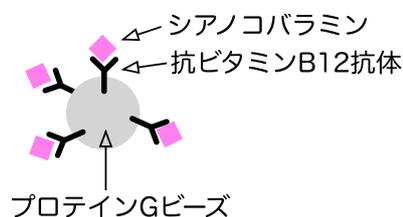
まず、シアノコバラミンと結合する生体内 RNA を探索するための実験系の作成を行った。シアノコバラミンは、大腸菌コバラミン・オペロンの leader 配列に由来する RNA に結合することが知られている。PCR 法でコバラミン・オペロンの leader 配列を増幅し pBluescriptII ベクターにクローニングした。塩基配列を確認後、クローニングした DNA を鋳型とし、試験管内転写反応によりセンス鎖 RNA を陽性コントロール、アンチセンス鎖 RNA を陰性コントロールとして合成した。また、NHS 活性化セファロース・ビーズにシアノコバラミンを結合させたビーズを作成した。次に、このシアノコバラミンを結合させたビーズに陽性コントロール RNA に結合するかどうか確かめるため、生後 0 日齢マウス全身由来の総 RNA に陽性コントロール RNA もしくは陰性コントロール RNA を加えた RNA を用いて結合実験を行った。

当初は 1) と同様に 1 ml の NHS 活性化セファロース・ビーズにシアノコバラミンを固相化したカラムを用いて、シアノコバラミンカラムを作成したが、非特異的にビーズに結合する RNA が多かったため、試験管内選択法 (SELEX 法) を参考にし、比較的少量のシアノコバラミン結合ビーズ (10 μ l) を実験に使用した。また、非特異的な RNA の吸着を減らすため、セファロース・ビーズ (前処理ビーズ) と RNA をあらかじめ反応させた後の RNA を結合実験に用いることにした。

RNA を熱変性後、急冷させてから、前処理ビーズ、続いてシアノコバラミン・ビーズと反応させ、洗浄後、結合した RNA をシアノコバラミン溶液で競合溶出した。RNA をアルコール沈殿により回収し、逆転写反応により cDNA を合成した。この cDNA を鋳型にして PCR を行い、陽性および陰性コントロール RNA が含まれるかどうか検討した。

3) ビタミン B12 (シアノコバラミン) と結合するマウス RNA の免疫沈降法による探索

生後 0 日齢マウス全身組織から total RNA を抽出した。プロテイン G ビーズに抗ビタミン B12 抗体 (Cloud-Clone) を結合させ、そこにシアノコバラミンを加え、ビーズ-抗体-シアノコバラミンの複合体を作成した。



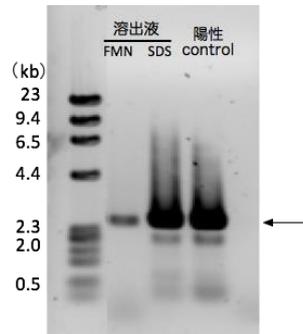
次にその複合体に、プロテイン G ビーズのみで前処理したマウス総 RNA を加え、シアノコバラミンへ RNA を結合させた。その後、数回洗浄し、フェノールクロロホルム処理、エタノール沈殿を行い結合 RNA を回収した。次に RNA 増幅キットを用いて増幅し、逆転写を行い cDNA を得た。次にこの cDNA を鋳型として、RNA 合成を行った。この RNA を用いて、再びビーズ-抗体-シアノコバラミン複合体への結合、RNA の抽出、増幅を行った。このサイクルを 5 回繰り返して行い、シアノコバラミンへ結合する RNA の選別・濃縮を行った。最終的に得られた RNA を逆転写し、PCR 法による増幅を行い、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によりバンドを確認した。ゲルより cDNA 断片を抽出し、pBluescriptII ベクターへクローニングした。DNA シーケンサを用い、挿入 cDNA 断片の塩基配列を解析した。

4. 研究成果

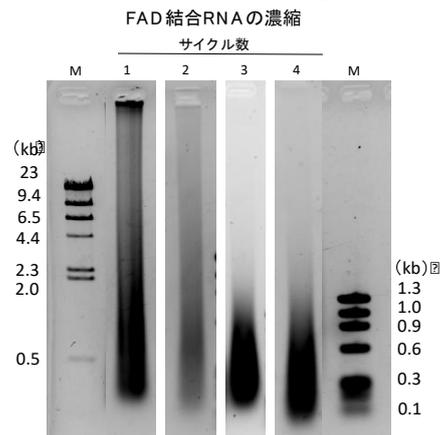
1) リボフラビン (ビタミン B2) に結合するマウス RNA の探索

この実験系において、コントロール RNA である rib-leader RNA は FAD 固相化カラムへ結合することが確認された (上図)。

次に、FAD カラムを用いて、マウス全身組織由来の RNA に対し、結合・洗浄・溶出・増



幅の過程を 4 サイクル行った。その結果、約 100bp~900bp の RNA が濃縮された (下図)。濃縮された RNA が FMN と結合するかどうか高速液体クロマトグラフィー蛍光検出法により定量した。その結果、陰性コントロール RNA (rib-leader 配列の相補鎖 RNA) と相互作用する FMN 量よりも少ない FMN しか検出できず、非特異的な RNA が増幅されてきた可能性が高

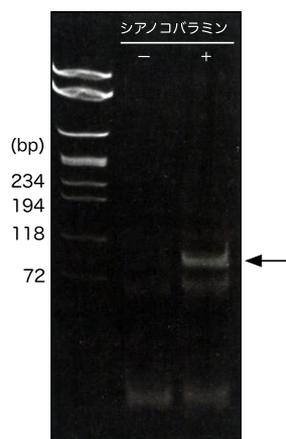


いことがわかった。

2) ビタミン B12 (シアノコバラミン) と結合するマウス RNA の探索

シアノコバラミンを結合させたセファロース・ビーズを用いた実験では、コバラミンオペロンの leader 配列由来の陽性コントロール RNA を検出できなかった。原因として、シアノコバラミンが十分 NHS 活性化セファロースに結合しない可能性が考えられた。そこで、コバラミンに対する抗体を利用した免疫沈降法を用いる 3) の実験を行った。

3) ビタミン B12 (シアノコバラミン) と結合するマウス RNA の免疫沈降法による探索



上図は免疫沈降法を用いた、RNA の結合・洗浄・溶出・増幅の過程を 5 回繰り返した後得られた RNA を逆転写し、PCR 法により増幅された cDNA の電気泳動写真である。シアノコバラミンがある場合とない場合（陰性対照）で、濃縮されてきた RNA 断片のサイズ分布パターンが異なっていることがわかった（矢印）。矢印から上の部分のゲルより（約 100 bp~200 bp の部分）cDNA を精製しベクターにクローニングした。最終的に得られた cDNA 断片の塩基配列の解析では、ゲノム上の配列や増幅に用いたプライマーのみの配列などであり、シアノコバラミンと結合する可能性のある RNA とは考えられなかった。

<引用文献>

① Hamada et al., Thiamine deficiency induces massive cell death in the olfactory bulbs of mice., J. Neuropathol. Exp. Neurol., 72, 2013, 1193-1202

② Tsukiji et al., An alcohol dehydrogenase ribozyme., Nature Struct. Biol., 10, 2003, 713-717

③ Cernak & Sen, A thiamin-utilizing ribozyme decarboxylates a pyruvate-like substrate., Nature Chem., 5, 2013, 971-977

④ Winkler et al., Control of gene expression by a natural metabolite-responsive ribozyme., Nature, 428, 2004, 281-286

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 0 件）

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔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〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱田 俊 (HAMADA, Shun)
福岡女子大学・国際文理学部・教授
研究者番号：60282349

(2) 研究分担者

濱田 香世子 (HAMADA, Kayoko)
福岡女子大学・国際文理学部・学術研究員
研究者番号：20448814

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()