

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：37111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14466

研究課題名(和文)mRNA配列中のシュードウリジンの生理的意義の解明

研究課題名(英文)Biological significance of pseudouridylation in mRNAs

研究代表者

弟子丸 正伸 (Deshimaru, Masanobu)

福岡大学・理学部・准教授

研究者番号：70309889

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：生体内の一部のmRNAにおけるウリジン(U)からシュードウリジン(Ψ)への修飾の生理的作用を明らかにするため、人為的にΨを導入したアミロイド前駆体タンパク質(APP)mRNAの翻訳産物におけるアミノ酸置換を調査した。APPのE2領域をコードするmRNA断片のコードン435(UUC)の第2塩基にΨ修飾を導入し、小麦胚抽出物を用いて翻訳反応を行い、生じたタンパク質産物を免疫沈降により精製した。得られたタンパク質試料は未修飾mRNAの翻訳産物と同じ分子質量を示し、APP mRNAのコードン435がUUCからUΨCに変化しても、コードされるアミノ酸はフェニルアラニンのまま変化しないことが示された。

研究成果の概要(英文)：To estimate the biological significance of uridine-to-pseudouridine (U-to-Psi) modification found in natural mRNAs, possible amino acid substitution was investigated in the protein produced from a Psi-containing mRNA for amyloid precursor protein (APP). A Psi was introduced at the second site of codon 435 in the APP mRNA partial fragment, and it was used as template for in vitro translation using wheat germ extract. As the resultant protein product was analyzed, its molecular mass was quite identical to that observed in the case that a relevant mRNA fragment without Psi modification was used as template. This result indicates that the amino acid code remains unchanged even when Psi is introduced in the codon UUC for phenylalanine, at least in the case of codon 435 in APP mRNA.

研究分野：生化学

キーワード：転写後修飾 シュードウリジン mRNAリコーディング

1. 研究開始当初の背景

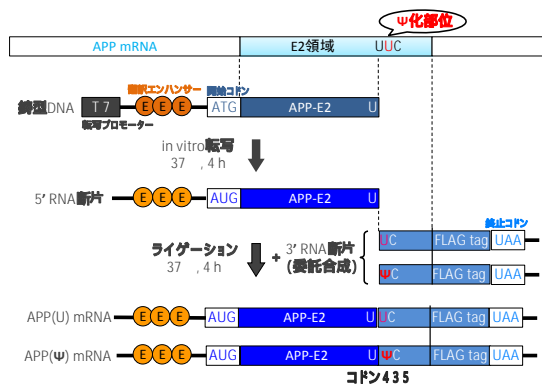
mRNA 配列中に天然に存在するシュドウリジン (Ψ) の生理的役割は知られていないが、終止コドン内のウリジン (U) を人為的に Ψ に置換するとアミノ酸コドンに変化することが報告されている (1)。例えば、終止コドン UAA および UAG を UAA および UAG に置換するとセリンおよびトレオニン、UGA を UGA に置換するとチロシンおよびフェニルアラニンを、それぞれコードするコドンに変化することが示された。一方、酵母およびヒト培養細胞において、細胞内の一部の mRNA の特定部位における Ψ 化が報告され (2, 3)、それらにおける Ψ 化率が栄養状態によりアミノ酸コドン中に生じた Ψ が翻訳産物のアミノ酸配列に及ぼす作用は知られていなかった。

2. 研究の目的

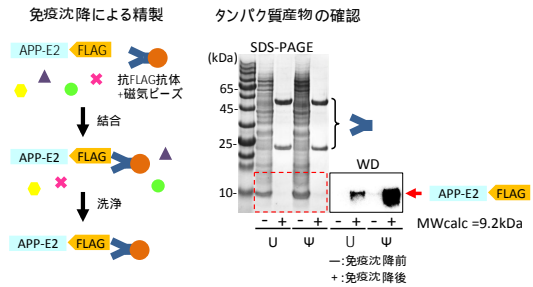
Ψ 化修飾が報告されている mRNA について、アミノ酸コドンにおける Ψ 化がその翻訳過程においてアミノ酸コードを変化させる可能性について、調査した。

3. 研究の方法

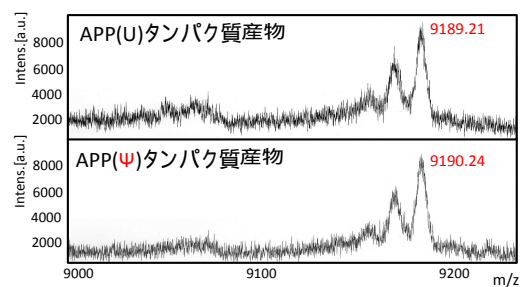
Ψ 化の影響を調査するモデルとして、配列中に Ψ 化部位が報告されているアミロイド前駆体タンパク質 (APP) mRNA を選んだ。APP mRNA の塩基配列中で、コドン 435 (UUC) の第 2 塩基が Ψ 化を受けると報告されている。本来フェニルアラニンをコードする UUC が Ψ 化により UΨC になるとアミノ酸コードが変化するのではないかと考え、以降の実験を計画した。人工 mRNA の 3' 側断片は、コドン 435 の Ψ 化部位から始まり FLAG タグコード配列・終止コドンと続くよう設計し、依頼合成した。これと、in vitro 転写により調製した APP の E2 領域のみをコードする 5' 側断片を連結し、モデル mRNA とした。



調製した mRNA から、コムギ胚抽出物無細胞翻訳系を用いて 24 時間、24 時間の翻訳反応を行い、生じたタンパク質産物を免疫沈降により精製した。



得られたタンパク質試料について MALDI-TOF による質量分析を行った結果、未修飾 mRNA の翻訳産物と同じ位置にピークを示し、分子質量は Ψ 化部位を含むコドン 435 がフェニルアラニンをコードした場合の計算分子量 9193.04 とほぼ一致した。



4. 研究成果

APP mRNA のコドン 435 が UUC から UΨC に変化しても、コードされるアミノ酸はフェニルアラニンのまま変化せず、この場合の Ψ 化修飾はアミノ酸コードに変化を引き起こさないことが示された。今後は、他のアミノ酸コドンに関しても同様の実験を行い、Ψ 化がアミノ酸コードを変化させる可能性についてさらに調査する必要がある。

参考文献

1. Converting nonsense codons into sense codons by targeted pseudouridylation. Karijovich, J., Yu, Y. T. Nature 474, 395-398 (2011).
2. Pseudouridine profiling reveals regulated mRNA pseudouridylation in yeast and human cells. Carlile, T. M., Rojas-Duran, M. F., Zinshteyn, B., Shin, H., Bartoli, K. M., Gilbert, W. V. Nature 515, 143-146 (2014).
3. Transcriptome-wide mapping reveals widespread dynamic-regulated pseudouridylation of ncRNA and mRNA. Schwartz, S., Bernstein, D. A., Mumbach, M. R., Jovanovic, M., Herbst, R. H., León-Ricardo, B. X., Engreitz, J. M., Guttman, M., Satija, R., Lander, E. S., Fink, G., Regev, A. Cell 159, 148-162 (2014).

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3件)

内田 琢, Christoph Lossin, 井原 由紀子, 弟子丸 正伸, 柳川 右千夫, 小山 進, 廣瀬 伸一. Abnormal γ -aminobutyric acid neurotransmission in a Kcnq2 model of early onset epilepsy.

Epilepsia. 2017年6月2日受理 (in press).

doi: 10.1111/epi.13807, 査読あり.

井原 由紀子, 友納 優子, 弟子丸 正伸, Zhang Bo, 内田 琢, 石井 敦士, 廣瀬 伸一. Retigabine, a Kv7.2/Kv7.3-Channel Opener, Attenuates Drug-Induced Seizures in Knock-In Mice Harboring Kcnq2 Mutations.

PLoS One 11 巻 2 号, e0150095 (2016).

doi: 10.1371/journal.pone.0150095. 査読あり.

福田 将虎, 小山 唯, 西垂水 梓, 尾村 美樹, 野瀬 可那子, 弟子丸 正伸.

Identification of an RNA element for specific coordination of A-to-I RNA editing on HTR2C pre-mRNA.

Genes Cells 20 巻 10 号, p. 834-846 (2015).

doi: 10.1111/gtc.12272. 査読あり.

〔学会発表〕(計12件)

永井 佑樹, 塩井 成留実, 弟子丸 正伸, 寺田 成之. ヒヤシンス球根ゲノム DNA 配列解析よりヒヤシンストリプシンインヒビター前駆体遺伝子の決定. 平成 29 年度日本生化学会九州支部例会, 2017年5月14日, 宮崎大学清武キャンパス(宮城県宮崎市)

永井 佑樹, 塩井 成留実, 寺田 成之, 弟子丸 正伸. ヒヤシンストリプシンインヒビター(LHTI)前駆体を限定分解する酵素の切断の基質認識の特異性.

第 89 回日本生化学会大会, 2016年9月27日, 仙台国際センター他(宮城県仙台市)

西垂水 梓, 小山 唯, 弟子丸 正伸, 福田 将虎. HTR2C pre-mRNA の A-to-I RNA 編集における ADAR2 の二本鎖 RNA 結合ドメインの役割. 第 89 回日本生化学会大会, 2016年9月25日, 仙台国際センター他(宮城県仙台市).

永井 佑樹, 塩井-青木 成留実, 寺田 成之, 弟子丸 正伸. ヒヤシンストリプシンインヒビター前駆体の遺伝子構造解析. 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会, 2015年12月2日, 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

西垂水 梓, 小山 唯, 弟子丸 正伸, 福田 将虎. HTR2C pre-mRNA の編集における編集酵素 ADAR2 の dsRBD の役割. 第 38 回日本

分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会, 2015年12月2日, 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

犬塚 美和, 野本 有華, 友池 真紀, 藍 浩之, 弟子丸 正伸. ミツバチの羽化後成熟過程における RNA 編集の変動. 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会, 2015年12月1日, 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

大蔵 一聡, 山口 彰太, 福田 将虎, 弟子丸 正伸. セロトニン 2C 型受容体 mRNA における 2'-O-メチル化と A-to-I 編集の相互作用. 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会, 2015年12月1日, 神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

内田 琢, 弟子丸 正伸, 小山 進, 柳川 右千夫, 廣瀬 伸一. Kcnq2 遺伝子変異マウスに見られる発達期海馬の GABA ネットワーク異常. 第 42 回 日本脳科学会, 2015年11月12日, ANA ホリディンリゾート宮崎(宮城県宮崎市)

野瀬 可那子, 西垂水 梓, 中川 裕之, 弟子丸 正伸, 福田 将虎. 細胞内 A-to-I RNA 編集における基質 RNA 発現量と編集効率の相関性. 第 17 回日本 RNA 学会年会, 2015年7月16日, ホテルライフオーポート札幌(北海道・札幌市)

梅野 紘充, 西垂水 梓, 弟子丸 正伸, 福田 将虎. ADAR2 による A-to-I RNA 編集を標的的部位特異的に誘導する機能性 RNA の構築. 第 17 回日本 RNA 学会年会, 2015年7月15日, ホテルライフオーポート札幌(北海道・札幌市)

西垂水 梓, 小山 唯, 弟子丸 正伸, 福田 将虎. セロトニン 2C 型受容体 pre-mRNA の RNA 編集における編集酵素 ADAR の標的部位選択性と dsRBD の関係. 第 17 回日本 RNA 学会年会, 2015年7月15日, ホテルライフオーポート札幌(北海道・札幌市)

犬塚 美和, 野本 有華, 友池 真紀, 藍 浩之, 弟子丸 正伸. ミツバチの羽化後成熟過程における RNA 編集の変動. 平成 27 年度日本生化学会九州支部例会, 2015年5月17日, 九州大学箱崎キャンパス(福岡県福岡市)

〔図書〕(計1件)

安藤 祥司, 熊本 栄一, 坂本 寛, 弟子丸 正伸. 化学同人, ライフサイエンスの科学, 2016, 216. ISBN 9784759818277.

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

なし

6．研究組織

(1)研究代表者

弟子丸 正伸 (DESHIMARU, Masanobu)

福岡大学・理学部・准教授

研究者番号：70309889

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

岩城 めぐみ (IWAKI, Megumi)