

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18995

研究課題名(和文)概日リズムを呈するmicroRNAによる神経変性防御機構の解明

研究課題名(英文)Unraveling the neuroprotective mechanism of rhythmic microRNA

研究代表者

木下 千智(Kinoshita, Chisato)

帝京大学・医学部・助教

研究者番号：10567085

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：神経変性疾患の惹起要因である酸化ストレスに対する内因性抗酸化物質グルタチオン量の決定には、膜輸送体EAAC1とその負調節因子GTRAP3-18が不可欠である。これらのタンパク質は同一のmicroRNAにより調節されるが、GTRAP3-18に対する調節様式は変則的であり、RNA結合タンパク質介在の可能性が示唆された。そこでGTRAP3-18の3'非翻訳領域RNA配列を固定化した分離精製磁気ビーズを用いて、RNA結合タンパク質を分離精製し質量分析を行った。質量分析及び標的配列予測スコアより6個の候補を得たため、現在3'非翻訳領域解析及び遺伝子導入法を用いてRNA結合タンパク質の同定を行っている。

研究成果の概要(英文)：Glutathione is an important endogenous antioxidant against oxidative stress which is one of the cause of neurodegenerative diseases. Glutathione level has been reported to be regulated by membrane transporter EAAC1 and its negative regulator GTRAP3-18. We have shown that they are regulated by same microRNA although regulatory mechanism for GTRAP3-18 by microRNA is speculated to be mediated by RNA-binding protein. So, we have tried to purify the RNA binding proteins of GTRAP3-18 by magnetic beads bound to RNA sequence of its 3'-UTR. Then we have analyzed the purified proteins by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Method. Combined with the prediction scores from microRNA database, we have obtained six RNA-binding protein candidates of GTRAP3-18. At present, we are trying to identify the RNA-binding protein of GTRAP3-18 using 3'-UTR reporter gene assay and gene knockdown assay.

研究分野：分子生物学

キーワード：GTRAP3-18 RNA結合タンパク質

1. 研究開始当初の背景

(1) グルタチオンによる神経保護作用

パーキンソン病を始めとする神経変性疾患は、酸化ストレス原因説が有力である。中枢神経系では末梢組織と異なりSuperoxide dismutaseが少ないため、抗酸化物質グルタチオンの役割が特に大きい。パーキンソン病患者の死後脳の研究では、脳におけるグルタチオン濃度の異常な低下が示されている他、発症以前からのグルタチオン低下が見られるとの画像診断による研究結果も報告されている。

脳におけるグルタチオン量の決定には、膜輸送体EAAC1とその負調節タンパク質GTRAP3-18が不可欠である(Aoyama K, Kinoshita C et al. *Neurobiology of Disease*, 2012)。最近、申請者は概日リズムを有するmicroRNAのmiR-96-5p(以下miR96)がEAAC1の発現量を直接制御することにより、グルタチオンリズム及び神経保護作用の調節に関与していることを発見した(Kinoshita C et al. *Nature Communications*, 2014)。同時期に、miR96の発現異常が神経変性疾患のひとつである多系統萎縮症の要因となり得ると欧州の研究室より報告され、神経保護作用や概日リズムに言及していないものの申請者の結論は間接的に支持されている。

(2) microRNAによる神経保護作用の制御

microRNAは、20数塩基のノンコーディングRNAで、複合体RISCを形成し機能する小分子である。哺乳類におけるmicroRNAの主要な機能は、主に遺伝子の3'非翻訳領域に結合して遺伝子発現に対し転写後抑制を行うことである。近年、種々の疾患がmicroRNAの異常を原因とする可能性が示唆されており、microRNAが治療の標的として重要であることを示唆する。

(3) 中脳ドパミン神経細胞保護における概日

リズムを呈するmicroRNAの重要性

概日リズムは、生体が有する自律性時計が刻む約24時間周期のリズムである。多くの生命現象が概日リズムを呈し、グルタチオン及び神経保護作用も例外ではない。生体に概日リズムを備えることの意義のひとつに、進化の過程における光合成による酸素産生の副産物 - 活性酸素障害への防御システムであるという考えがある。面白いことに光合成能をもたない哺乳類においても活性酸素が概日リズムを呈する傾向にある。中脳黒質緻密部においては、概日リズム中枢である視交叉上核とは独立した時計があるとの報告があり、miR96による独自の概日リズム機構によってグルタチオンリズムを形成している可能性が高い。miR96の概日リズム調節機構の全容を解明することが酸化ストレス抵抗性の理解、ひいては治療への応用を考える上で極めて重要であることが推定される。

2. 研究の目的

申請者は中脳ドパミン神経細胞において概日リズムを呈するmiR96がEAAC1の発現量を直接リズム的に制御することで、グルタチオン量及び神経保護作用の調節を行っていることをすでに報告している(Kinoshita C et al. *Nature Communications*, 2014)。面白いことに、miR96がEAAC1の負調節因子であるGTRAP3-18の発現量を異なる機序で調節していることが明らかになった。哺乳類においてmicroRNAは通常、標的タンパク質を負に直接制御する。GTRAP3-18においては正の制御が見られるばかりでなく、miR96の標的配列も検出できないため、申請者は他の因子 - おそらくはRNA結合タンパク質 - の介在を予想した。これまでの研究成果を基に研究計画をたて、以下の項目を明らかにすることを目的とした。

(1) GTRAP3-18の非翻訳領域に結合するRNA結合タンパク質を同定する。

(2) miR96に直接的制御をうけるRNA結合タンパク質を見つけ出す。

(3) そのRNA結合タンパク質の発現量を操作することによりGTRAP3-18発現量やグルタチオン量、さらに神経保護作用への影響を調べる。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

SH-SY5Y細胞は10%ウシ胎児血清と1%抗生物質入りのDMEM(Life Technologies)で37℃、5%CO₂の条件で培養した。

(2) 遺伝子導入

miR96 mimic及びmiR96 inhibitor、siRNA (Thermo Fisher Scientific)は、Lipofectamine RNAi MAX (Life Technologies)を用いて細胞に遺伝子導入した。

(3) ウェスタンブロッティング

タンパク質の量はBCA protein assay (Thermo Fisher Scientific)により測定し、同量をサンプルとして用いた。サンプルはRIPA Buffer (20mM Tris-HCl(pH7.5), 150mM NaCl, 1% NP-40, 1%デオキシコール酸, 0.1% SDS, プロテアーゼ阻害剤)に溶解してありSDS-PAGEで分離した後、PVDF膜 (Bio-Rad)に転写した。非特異的バンドはスキムミルクによりブロッキングし、GTRAP3-18抗体 (Abnova)は1,000倍希釈して用いた。

(4) 分離精製磁気ビーズ

マウス黒質緻密部からTrizol (Life Technologies)を用いてRNAを抽出し、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Life Technologies)にて逆転写を行

い、cDNAを作成した。そこからGTRAP3-18の3'非翻訳領域をクローニングし、それを鋳型にT7RNAポリメラーゼ (Takara)でRNAを合成した。合成RNAはさらにPierce RNA 3' End Desthiobiotinylation Kit (Thermo scientific)を用いてビオチン化し、アビジンを結合した分離精製磁気ビーズ

(DynaBeads)に固定化した。このビーズを用いてマウス黒質緻密部抽出液と反応させ、結合したタンパク質をSDS-PAGEにて分離した。

(3) 液体クロマトグラフィー質量分析

ゲル片を1mm角に細切りし、ジチオスレイトールによる還元、ヨードアセトミドによるアルキル化の後、トリプシンにて酵素消化を行った。酵素消化液は回収後減圧乾固し、0.1%ギ酸溶液に再溶解後遠心して上清を分析に用いた。

(4) 3'非翻訳領域リポーターアッセイ

GTRAP3-18の3'非翻訳領域のDNA配列は、PrimeSTAR HS (Takara)を用いて増幅し、pMD20-TベクターにMighty TA-Cloning Kit (Takara)を用いてクローニングした。配列はDNAシーケンサーによる解析を受託サービス (FASMAC)に委託した。インサートは制限酵素による切断によりウミホタルルシフェラーゼリポーターベクター pMIR-REPORT (Promega)にサブクローニングした。SH-SY5Y細胞にGTRAP3-18配列を挿入したリポーター遺伝子ベクター及び適切な組み合わせのmiR96 mimic及びmiR96 inhibitor、RNA結合タンパク質siRNAを共に遺伝子導入した後、48時間後にサンプリングした。ウミホタルルシフェラーゼ活性は、内部補正ウミシイタケルシフェラーゼと共にDual-luciferase Reporter Assay System

(Promega)によりLuminometer (Turner Biosystems)を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) miR96によるGTRAP3-18発現量への影響

申請者の未公開データより、GTRAP3-18タンパク質を制御するmicroRNAとしてmiR96が浮上した。そこでSH-SY5Y細胞にmiR96を遺伝子導入し、GTRAP3-18タンパク質の発現量に影響を及ぼすかウェスタンブロッティング法を用いて調べた。結果は、miR96の導入によりGTRAP3-18は、コントロールと比べて4倍程度発現量が増加することが分かった(図1; *P<0.05)。

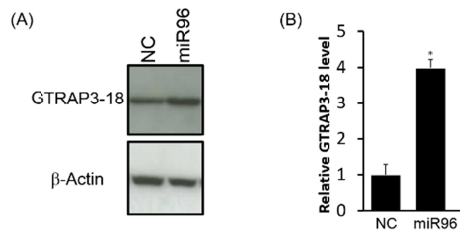


図1

次に3'非翻訳領域リポーター遺伝子アッセイを用いてmiR96がGTRAP3-18の転写後から翻訳に至るまでの過程に何らかの影響を及ぼす

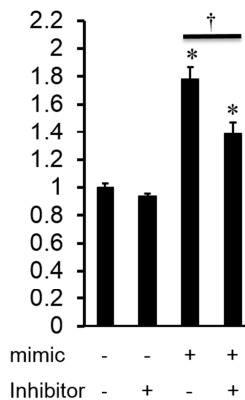


図2

か調べた。その結果、miR96によってルシフェラーゼ活性は有意に増加し、またinhibitor

により増加が有意に抑制されることが分かった(図2; *P<0.05,コントロールとの比較。†P<0.05, 阻害剤の影響)。

(2) RNA結合タンパク質の分離精製

マウス黒質緻密部から抽出したRNAより作成したcDNAを基にクローニングしたGTRAP3-18の3'非翻訳領域を鋳型にT7RNAポリメラーゼでRNAを合成し、分離精製磁気ビーズに固定化した。このビーズを用いてマウス黒質緻密部抽出液と反応させ、結合したタンパク質をSDS-PAGEにて分離した。結果、コントロールと比較してGTRAP3-18の3'非翻訳領域RNA配列に特異的に結合していると考えられるタンパク質のバンドが5つ得られた(図3)。

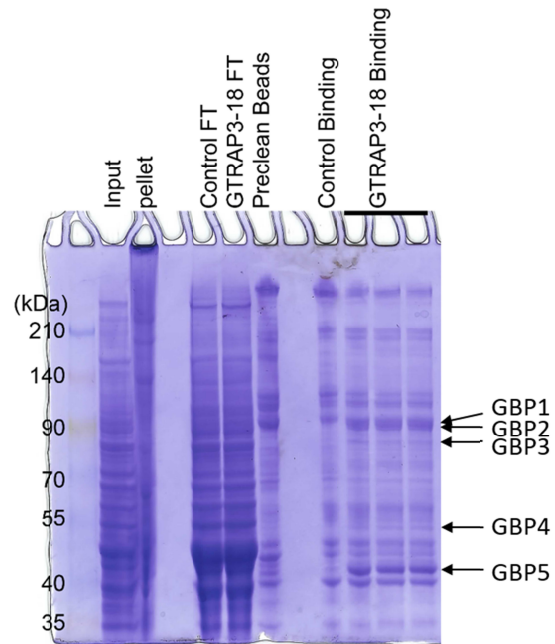


図3

この5つのバンドをゲル片として切り出し、液体クロマトグラフィー質量分析を受託業者に依頼した。

(3) RNA結合タンパク質候補の絞り込み

