

令和元年6月7日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18122

研究課題名(和文)新規神経保護タンパク質群のエピジェネティック制御

研究課題名(英文) Epigenetic regulation of novel neuroprotective proteins

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：神経変性疾患の惹起要因とされる酸化ストレスに対し、抗酸化作用持つグルタチオンの量的決定には、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により調節されることが明らかになっている。しかしながら、その調節様式は通常とは異なり、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に結合するタンパク質群を複数同定し解析を行った。その結果、GTRAP3-18はRNA結合タンパク質にある負に制御されており、このタンパク質を介してGTRAP3-18がmicroRNAに調節されていることを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経変性疾患の治療は投薬により一時的に症状を改善させることは可能であるが、病気の進行を抑制することはできない。種々の神経変性疾患に共通して見られるのが酸化ストレスの亢進と抗酸化機構の破綻である。本研究では、miR96による脳グルタチオン量調節機構が新規エピジェネティック制御機構によるものと明らかにした学術的意義と、この制御機構の解明が分子標的薬や遺伝子治療の開発に繋がり得るという臨床的意義を併せ持つ。今後の更なる研究が未だ根治が不可能な神経変性疾患における根本治療開発の一助になり得ると考えている。

研究成果の概要(英文)：Glutathione is an important endogenous antioxidant against oxidative stress which causes neurodegenerative diseases. Glutathione level is regulated by membrane transporter EAAC1 and its negative regulator GTRAP3-18. They are regulated by same microRNA, however, regulatory mechanism of GTRAP3-18 by microRNA is suggested to be different from that of EAAC1 and other proteins, which is speculated to be mediated by RNA-binding protein. So, we have tried to identify the RNA binding proteins of GTRAP3-18 and analyzed its regulatory mechanism. As a result, we found GTRAP3-18 is negatively regulated by one of its RNA binding proteins. Furthermore, GTRAP3-18 is suggested to be regulated by microRNA through this RNA binding protein.

研究分野：分子神経科学

キーワード：グルタチオン microRNA RNA結合タンパク質 神経変性疾患 酸化ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 中枢神経系における神経保護物質

パーキンソン病を始めとする神経変性疾患の惹起要因として最有力候補に酸化ストレスがあげられる。末梢組織では SOD(Superoxide dismutase)による抗酸化作用が大きい、中枢神経系では SOD の発現量が非常に少ないため、抗酸化物質グルタチオンが神経保護作用に特に重要な役割を持つ。死後脳研究によるとパーキンソン病患者の脳におけるグルタチオン濃度には異常な低下が示されている他、画像診断の研究からも発症以前よりグルタチオン量低下が観察されたとの報告がある。

これまでに膜輸送体 EAAC1 とその負調節タンパク質 GTRAP3-18 が脳グルタチオン量の決定に不可欠であることを示している(Aoyama K, Kinoshita C et al. *Neurobiology of Disease*, 2012)。さらに miR96-5p(以下 miR96)と呼ばれる microRNA が EAAC1 発現量の直接制御により、グルタチオン量及び神経保護作用を調節していることを発見した(Kinoshita C et al. *Nature Communications*, 2014)。この報告は神経変性疾患のひとつ多系統萎縮症の要因に miR96 発現異常が関与するとの欧州の研究室による報告と一致し、神経保護作用等に言及してはいないが我々の結論を間接的に支持する。

(2) ゲノム編集による遺伝子治療

近年のポストゲノム解析によると、これまでの予想を反してゲノムの大半は転写されており mRNA 以外にも種々の RNA が産生されていることが明らかになった。その多くは機能未知のノンコーディング RNA であり、遺伝子の非翻訳領域に結合し遺伝子発現に対し転写後抑制を行う microRNA もそのひとつである。最近ではノンコーディング RNA が種々の疾患に関与することが示唆されており、治療標的としての重要性は論を俟たない。近年 CRISPR-Cas9 システム等により遺伝子自体に変異を与えるゲノム編集が可能になり、最近の研究では *in vivo* においても局所的なゲノム編集が可能な SLENDR 法が開発された。これにより機能性 RNA への脳部位特異的な遺伝子改変が可能になるため根治が不可能とされてきた神経変性疾患の根本治療に繋がると考えられる。

(3) RNA 結合タンパク質の多様性

予備の結果より GTRAP3-18 は miR96 によって制御されるが、この制御は microRNA の主機能である転写後抑制とは異なるため、RNA 結合タンパク質等を介する間接的なものであることが示唆された。実際、GTRAP3-18 の非翻訳領域には複数の RNA 結合タンパク質が結合することが明らかになっている。

主に転写後調節を担う RNA 結合タンパク質はヒトゲノム中の遺伝子の約 7.5% を占めると言われる。その多様性は、進化と共に増大したノンコーディング RNA 機能との密接な関与が示唆されているが、詳細は未知である。

近年では、神経変性疾患の原因遺伝子として RNA 結合タンパク質が同定されるなど、新規創薬標的として期待される。これまで miR96 による EAAC1 発現量に対する負の調節と EAAC1 の負調節因子 GTRAP3-18 発現量に対する正の制御を明らかにしたが、機構は未知である。しかしながら哺乳類における microRNA の機能は負の直接制御であること、さらに GTRAP3-18 上に miR96 標的配列がないことを鑑みると、RNA 結合タンパク質等の介在が予想された。そこで質量分析の上 microRNA データベース解析を行ったところ GTRAP3-18 非翻訳領域に結合し、且つ miR96 に制御すると予測される RNA 結合タンパク質を複数同定した。これらのタンパク質群は GTRAP3-18 発現量を直接負に調節することがその後の実験により示唆されている。

2. 研究の目的

神経変性疾患の惹起要因として最有力視されている酸化ストレスに対する防御機構にとって必須の内因性抗酸化物質グルタチオンの調節機構を明らかにすることは、神経変性疾患の新しい着眼による治療の理論的基盤となる。グルタチオン量調節には神経保護タンパク質に対する負調節因子 GTRAP3-18 が不可欠である。これまでの研究より GTRAP3-18 は microRNA によって RNA 結合タンパク質を介した間接的制御を受ける可能性を明らかにした。本研究における主目的は RNA 結合タンパク質による神経保護機構の詳細なメカニズムを明らかにし、遺伝子治療への応用を目指すことである。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

SH-SY5Y 細胞及び HEK29 細胞は 10% ウシ胎児血清と 1% 抗生物質入りの DMEM または MEM (Life Technologies) で 37 °C、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) 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 シークエ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) GTRAP3-18 非翻訳領域 RNA と RNA 結合タンパク質群の相互作用

GTRAP3-18 に対する 3'非翻訳領域リポーター遺伝子アッセイを用いて miR96 及び RNA 結合タンパク質 NOVA1 に対する siRNA 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か調べた。その結果、miR96 及び NOVA1siRNA によってルシフェラーゼ活性は有意に増加し、また miR96 の影響に対しては inhibitor により増加が有意に抑制されることが分かった (図 1; *P<0.05, コントロールとの比較。 †P<0.05, 阻害剤の影響)。

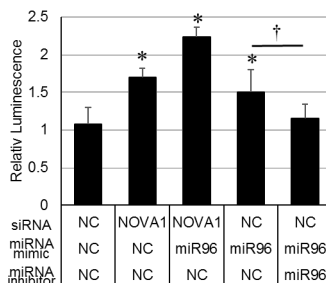


図 1

(2) RNA 結合タンパク質群による GTRAP3-18 発現量の制御機構の解析

NOVA1 のノックダウンが GTRAP3-18 発現にどのような影響を与えるか調べた。SH-SY5Y 細胞を用いた実験系では遺伝子導入効率の問題によって有意な結果が得られなかったため、HEK293 細胞を用いた。NOVA 1 の siRNA 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。NOVA1siRNA によってタンパク質は有意に増加した。(図 2)。

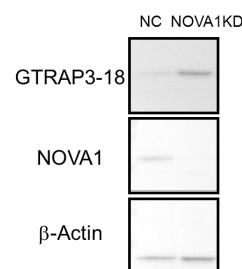


図 2

(3) RNA 結合タンパク質群による miR96 に直接制御と miR96 結合部位の同定

NOVA1 に対する 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か調べた。その結果、miR96 及び NOVA1siRNA によってルシフェラーゼ活性は有意に増加し、また miR96 の影響に対しては inhibitor により増加が有意に抑制されることが分かった (図 3; *P<0.05, コントロールとの比較)。

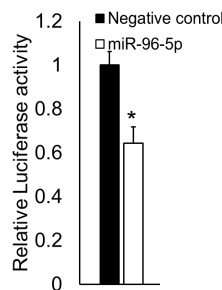


図 3

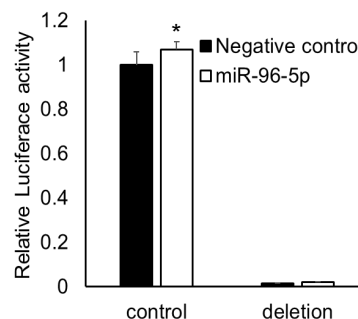


図 4

さらに、GTRAP3-18 の 3'非翻訳領域上における RNA 結合タンパク質結合サイト欠損させた時の miR96 及び RNA 結合タンパク質 siRNA を調べたが、欠損により GTRAP3-18 の翻訳活性が著しく減少したため、影響を見ることが出来なかった (図 4; *P<0.05, コントロールとの比較)。欠損ではなく点変異による影響を現在検討中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

1. Kinoshita C, Aoyama K, Nakaki T.

Neuroprotection afforded by circadian regulation of intracellular glutathione levels: A key role for miRNAs. *Free Radic Biol Med.* 119:17-33. 2018

2. 青山 晃治, 木下 千智, 中木敏夫

グルタチオン *Clinical Neuroscience.* 36(6): 739-741. 2018

[学会発表](計 3 件)

1. Kinoshita C, Nakaki T, Aoyama K. 「miR-96-5p modulates RNA-binding proteins that down-regulate GTRAP3-18」 The 92th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society (平成 31 年 3 月、大阪)

2. Kinoshita C, Aoyama K, Nakaki T. 「Dual Control of Glutathione Regulation in Neuroprotection」 2nd Innovations and State of the Art In Alzheimer's & Dementia Research (平成 30 年 7 月、スペイン)

3. Kinoshita C, Nakaki T. 「GTRAP3-18 regulated by RNA-binding proteins under the control of microRNA」 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (平成 30 年 7 月、京都)

〔図書〕(計1件)

Rosenbergs Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease Sixth Edition Vols 1 and 2. 「Disorders of Glutathione Metabolism」 Aoyama K, Kinoshita C and Nakaki T.

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称:「miR-96-5p 阻害剤とそのスクリーニング方法」

発明者:中木敏夫、木下千智

権利者:学校法人帝京大学

種類:特許

番号:特願 2014-207297

出願年:2014年

国内外の別:国内

名称:「miR-96-5pinhibitor and a screening method for the inhibitor」

発明者:中木敏夫、木下千智

権利者:学校法人帝京大学

種類:特許

番号:15/486.648

出願年:2017年

国内外の別:米国

取得状況(計1件)

名称:「miR-96-5p 阻害剤とそのスクリーニング方法」

発明者:中木敏夫、木下千智

権利者:学校法人帝京大学

種類:特許

番号:特許第 6342288 号

取得年:2018年

国内外の別:国内

〔その他〕

ホームページ等:なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:なし

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名:なし

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。