

平成 21 年 7 月 14 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2006～2009
課題番号：18592046
研究課題名 (和文) 内在性アンチセンス RNA によるイオン輸送担体アイソフォームの発現
および機能調節
研究課題名 (英文) Regulations of expression and function for ion transporter isoforms
by natural antisense RNAs
研究代表者
栗原 琴二 (KURIHARA KINJI)
明海大学・歯学部・講師
研究者番号：10170086

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：アンチセンス, RNA, サイレンシング, イオン輸送担体, アイソフォーム,
NA-ポンプ, Na/K/2Cl 共輸送体, 唾液腺

1. 研究計画の概要

腎臓での体液量調節や唾液分泌に関与する「イオン輸送担体が如何に発現調節され、如何に機能調節されるのか」を解明する。周知の通り、イオン輸送担体の蛋白質は DNA のセンス鎖から作られた mRNA を鋳型にして作られる。一方、生体では“アンチセンス RNA”が実在すること、また、これらは蛋白質の発現調節に関与している可能性がある。イオン輸送担体の発現調節、機能調節を明らかにするために、イオン輸送担体アイソフォームの内在性アンチセンス RNA の実体およびアンチセンス RNA がイオン輸送担体の発現にどのように関与しているのかを分子生物学的手法で明らかにする。

2. 研究の進捗状況

(1) 3大唾液腺に発現している Na⁺/K⁺-ATPase α アイソフォームを RT-PCR で調べると、α 1 は 3大唾液腺すべてに検出され、α 3 は舌下腺にのみ検出された。3大唾液腺のアイソフォームをウエスタンブロットで検出すると、mRNA の発現量に応じた蛋白質が検出された。また、舌下腺の α 3 を免疫染色すると漿液細胞と肥満細胞の膜に陽性であった。一般に、α 3 は脳、神経組織にのみ存在すると考

えられていたが、舌下腺に α 3 が強く発現していることを明らかにできた。

(2) ラット舌下腺の Total RNA を鋳型にして α 3 に特異的なフォワードプライマーで逆転写反応後、PCR を行うと、予想されるサイズの PCR 産物が得られ、その配列は α 3 と一致した。この結果から舌下腺に Na⁺/K⁺-ATPase α 3 のアンチセンス RNA が存在することを明らかにできた。同時にアンチセンス RNAs を簡便に検出する方法も確立できた。

(3) Na⁺/K⁺-ATPase α 3 アイソフォーム蛋白質の発現をウエスタンブロットで分析すると、脳の場合、10 週齢と 60 週齢で同様な発現であったが、舌下腺では高週齢ラットに顕著であった。また、mRNA およびアンチセンス RNA 量は蛋白質と同様に高週齢ラットに顕著に発現していることを明らかにできた。

(4) ゲノム DNA の配列から mRNA に転写されない数百塩基上流部分に相当する種々のフォワードプライマーで逆転写反応を行い、PCR を行うと理論的な増幅物ができた。よって、アンチセンス RNA には mRNA に転写されない部分が含まれる可能性が考えられた。

(5) 内在性アンチセンス RNA のサイズを検討するためにノーザンブロット分析を行った。理論的にアンチセンス RNA に相補的な配列のプローブを多数作製し、ハイブリダイゼーションを試みたが、単一の強いシグナルは検出されなかった。アンチセンス RNA は単一の大きさを持っていないことが考えられる。

3. 現在までの達成度

③やや遅れている。

(理由)

(1) Na^+/K^+ -ATPase α アイソフォームの $\alpha 3$ のアンチセンス RNA の実体を明らかにし、アンチセンス RNA の簡便な検出方法の確立は順調であった。しかし、内在性アンチセンス RNA のノーザンブロットの確立に時間を要した。アンチセンス RNA のサイズについて明確な結果を得られなかったが、本来、アンチセンス RNA が単一の大きさを持っていない可能性もある。

(2) 研究期間中、当教室では2年もの間准教授不在であり、当時、助教であった筆者が通常の講義や大学業務に加え、欠員となっている准教授に代わりさらに多くの業務を科せられたため、研究のための時間が予想以上に制限された。

(3) 動物実験の制限が強くなり、学内の規則が整えられるまで、実際的に動物を使用できない状態が生じ、研究の遂行に支障をきたした。

4. 今後の研究の推進方策

唾液腺にイオン輸送担体アイソフォームの mRNA のみならず内在性アンチセンス RNA が存在することを明らかにし、アンチセンス RNA が加齢によって変化する知見を得てきた。鍋島陽一博士等によって Klotho 遺伝子の欠損が“早老症”になること (Nature 390, 45, 1997), さらに Klotho 蛋白質は Na^+/K^+ -ATPase を細胞膜に移送させる機能を持つこと (Science 329, 1615, 2007) が報告されている。今後、高週齢で増加するアンチセンス RNA と Klotho 遺伝子との関連性

について検討していきたい。

5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計1件)

① Kinji Kurihara, Nobuo Nakanishi, Osamu Amano and Keiichi: Tonosaki Expression of Na^+/K^+ -ATPase α subunit isoforms in rat salivary glands: occurrence of sense and antisense RNAs of the $\alpha 3$ isoform in the sublingual gland, Arch. Oral Biol., 53, 593~604, 2008 (査読有)

[学会発表] (計3件)

① 栗原琴二, 中西信夫, 天野修, 外崎肇一: Na^+/K^+ -ATPase の内在性アンチセンス RNA の発現, 第3回トランスポーター研究会年会, 京都, 2008年 6月7~8日

② 栗原琴二, 外崎肇一: 加齢によるイオン輸送担体アイソフォーム RNAs の発現について, 第49回歯科基礎医学会総会, 北海道, 2007年 8月30~31日

③ Nakanishi, N., Kurihara, K., Tonosaki, K., Hattori, Y., Hasegawa, H.: Naturally occurring antisense RNA of GTP cyclohydrolase I in PC12 cells: stimulation of both sense and antisense RNAs of the enzyme by nerve growth factor, dibutyryl cAMP and phorbol ester, PMA. Tetrahydrobiopterin and Alternative Treatment in PKU, Cardiovascular Diseases, and Diabetes, Sendai, Japan, September 10-11, 2006.

[図書] (計1件)

① 栗原琴二: (著書分担) 口腔生物学各論—唾液腺— 7章 唾液腺実験入門 3.唾液腺培養細胞株 a培養細胞の樹立 b唾液腺由来の細胞株 c唾液腺の培養細胞を用いた研究例 d唾液腺の遊離細胞を用いた研究例, 学建書院 128-132, 2006