

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：74408

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06776

研究課題名（和文）新規アンチセンスRNAにコードされる翻訳産物の同定と生物学的役割の解明

研究課題名（英文）Isolation and characterization of novel peptides derived from antisense RNA

研究代表者

酒井 翼（SAKAI, Tsubasa）

公益財団法人サントリー生命科学財団・生物有機科学研究所・統合生体分子機能研究部・研究員

研究者番号：40414122

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、尾索動物ホヤのアンチセンスRNA翻訳産物の同定および機能解明を目的としており、酸性プロテアーゼ遺伝子アンチセンスRNAにコードが予測された51アミノ酸残基ペプチド(PEP51)をカタウレイボヤ卵巣抽出液から多種HPLCと質量分析計を用いて単離同定し、さらに卵巣中の卵巣テスト細胞において卵黄形成終了期特異的に発現すること明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アンチセンスRNAの翻訳産物の同定にあたり、生化学的手法と質量分析を駆使して、実験・解析において取り扱いが困難かつ存在量が極微量の約6kDaペプチドを迅速に同定する方法が確立され、PEP51の存在を示すと共に、その解析基盤の学術的な意義は大きい。また、組織学的解析によって、PEP51の卵巣成長における機能を示す結果が得られ、アンチセンスRNAの種特異的な機能の意義と生物学的役割を明らかにする道が拓かれた。

研究成果の概要（英文）： In this study, 51-amino-acid peptide coded in antisense RNA of a protease gene was identified using various HPLC and MALDI-TOF MS from the ovary of the ascidian, *Ciona intestinalis* type A. Immunohistochemistry and immunoelectron microscopy using specific antibody against the peptide revealed specific expression in test cells of the post-vitellogenic stage follicles.

研究分野：進化細胞機能学

キーワード：テスト細胞 卵巣 ペプチド 進化 脊索動物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

カテプシン (以後 CTS と記す) は主に細胞内小器官リソソームに局在する酸性プロテアーゼで、CTS ファミリー遺伝子は単細胞生物から植物、高等動物に至るまで生物界に広く保存されるが、脊索動物の出現前後において高保存性 CTS-L 遺伝子から分岐した CTS-H 遺伝子 (*Ctsh*) は、脊索動物門においてのみ見出される (Zhou J et al. *Int J Biol Sci* 2015)。申請者らはこれまでの研究で、脊索動物モデルの一つ、尾索動物カタユレイボヤ *Ciona intestinalis* (以後ホヤ、*Ci*)を用いて、脊椎動物では未解明の初期卵胞成長の制御に CTSD の活性化が必須であることを発見した (Aoyama M et al. *Endocrinology* 2008)。次いで、ホヤ卵巣における CTS ファミリーの遺伝子発現を *in situ* hybridization (ISH) によって解析した所、卵胞の test 細胞(脊椎動物の顆粒膜細胞に相当すると考えられる)特異的に *CiCtsh* の mRNA と共に相補的な塩基配列を持つアンチセンス (as) RNA の共発現を発見した(挑戦的萌芽 16K14772)。さらに驚くべきことに、同 asRNA が機能未知の 51 アミノ酸残基ペプチド(PEP51)をコードしていることを見出した。相同性検索でいかなる動物にも一致する配列は見当たらず、細胞内局在予測では細胞外分泌の可能性、3つの Cys が分子内もしくは分子間のジスルフィド結合を示唆する等、PEP51 が実際に卵巣で新規ペプチドとして、卵胞制御に関与するのではないかと考えられた。

2. 研究の目的

asRNA は mRNA の相補的塩基配列を持つ 1 本鎖 RNA で、mRNA や DNA と重なり合う領域での相互作用を介して、転写促進や mRNA の安定性の向上、翻訳制御、miRNA 機能の阻害を行うことが知られている (Wanowska E et al. *WIREs RNA* 2018)。ところが、近年のゲノム・トランスクリプトーム解析によって、マウスやヒトにおいて、ある遺伝子領域のアンチセンス鎖に他の遺伝子が存在する箇所が数千あり、その翻訳可能性が指摘されている (Okada H et al. *Clin Neurol* 2013)。しかし、それらの発現と生理機能調節の相関性や、遺伝子領域が重なることの生物学的意義は明らかにされていない。したがって、本研究では、asRNA の翻訳産物の卵胞発育という具体的な生理現象における機能を明らかにすることで、asRNA の生理的役割、センス-アンチセンス鎖の遺伝子領域重複の意義解明というポストゲノムの重要課題において、asRNA 発現と機能の種特異性とその生物学的役割を解明する突破口を開くことを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) *CiCtsh* の asRNA 翻訳産物 PEP51 に対する特異的抗体を用いた発現解析
- (2)ホヤ卵胞破碎液の各種精製および質量分析による PEP51 の同定

(3)卵胞以外の組織（神経複合体や内柱等）における *CiPep51* RNA の発現解析（定量 PCR） および翻訳産物の定量解析（ウエスタンブロッティング）

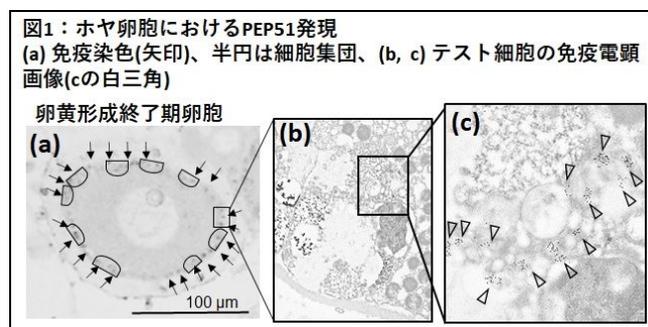
(4)*CiPep51* RNA 全長塩基配列の RACE 法による決定、*CiPep51* の転写・翻訳機構解明

4 . 研究成果

1 . *CiCtsh* asRNA 翻訳産物に対する特異的抗体を用いた発現解析

A: *CiCtsh* asRNA にコードされるペプチド (PEP51)に対する特異的抗体を作製し、抗原ペプチドカラムで精製後、合成 PEP51 を用いたウエスタンブロッティング、および COS7 細胞を用いた PEP51 強制発現系に対する免疫染色で抗体特異性を実証した。そして、この抗体を用いた卵巣切片に対する免疫染色で、卵黄形成終了期卵胞で細胞集団を形成する test 細胞の一部でのみ PEP51 が発現することが示された（図 1a）

B: 抗 PEP51 抗体を用いた免疫電顕解析で、崩壊する test 細胞の細胞質における PEP51 局在を突き止めた（図 1 b,c）



この細胞内局在から、PEP51 はペプチドホルモンなどとは異なり、細胞内部で作用する因子と考えられ、その生理機能解明にあたり非常に大きな指針を得た。また、崩壊する細胞における局在から、PEP51 の存在量が少ないことが推測された。

2 . 各種精製および質量分析による PEP51 の同定

50 匹分ホヤ卵巣抽出液から、細胞質・膜画分の分離、ゲルろ過 HPLC、SepPak 精製、免疫沈降、逆相 HPLC の精製過程を経て、合成 PEP51 と一致する m/z 5898 のピーク、更にトリプシン処理断片の理論分子量と一致する m/z 1440 のピークを MALDI-TOF MS で検出し、*CiCtsh* asRNA 翻訳産物 PEP51 の存在を確実なものとした。

3 . 卵胞以外の組織における *CiPep51* RNA の発現解析、翻訳産物の定量解析

神経複合体、エラカゴ、内柱、腸における *CiPep51* RNA 発現を RT-PCR で確認、そしてこれら組織における翻訳産物 PEP51 の発現を免疫染色で確認した。

4 . *CiPep51* RNA の全長塩基配列決定

RACE 法により *CiPep51* の 5'末端配列を決定した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 酒井十, 松原, 白石, 川田, 高橋, 佐竹
2. 発表標題 カタウレイボヤ卵胞のカテプシンHアンチセンス RNA由来ペプチドの同定
3. 学会等名 日本動物学会第90回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 酒井十, 松原, 白石, 川田, 高橋, 佐竹
2. 発表標題 尾索動物ホヤ卵胞で発現するカテプシンHアンチセンスRNA由来ペプチドの同定
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------