

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23710263

研究課題名（和文） 核小体低分子RNAを基盤とした遺伝子発現制御方法の開発

研究課題名（英文） Development of the method for constructing artificial snoRNA regulating for target-gene expression.

研究代表者

福田 将虎（FUKUDA MASATORA）

福岡大学・理学部・助教

研究者番号：90526691

研究成果の概要（和文）：

標的メッセンジャーRNA (mRNA) の各ヌクレオチドを化学修飾する核小体低分子 RNA (snoRNA) ライブラリーと細胞スクリーニングを用いて、「生体内で標的タンパク質発現を抑制する人工 snoRNA」を構築する方法論の開発を行った。結果、本方法論により得られた snoRNA は、標的タンパク質発現をわずかに抑制した。また、開始コドンを標的とする snoRNA がタンパク質発現抑制効果も持つという興味深い結果を得た。

研究成果の概要（英文）：

The research aim of this study is to develop the strategy for constructing an artificial snoRNA regulating the target-gene expression in the cell. snoRNAs targeting 2'-O-methylation to A or G at the start codon of target-mRNA were obtained by the cell-based screening with the snoRNA library. As the results of characterization for selected snoRNAs, these snoRNAs slightly reduced the target-protein expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：生体分子の化学修飾

1. 研究開始当初の背景

生体内の機能性 RNA は、転写後にスプライシングや化学修飾などのプロセッシングを経て成熟し、本来の機能を発揮している。現在までに 100 種類以上の RNA 修飾が報告されており、タンパク質の発現、細胞内局在などの重要な生命現象を制御していると考えられている。しかしながら、RNA 修飾が持つ生理学的意義の全貌は未だ明らかになっておらず、RNA の転写後プロセッシングの意義と機能を理解することは、学術的にはもちろん、診断や医療技術の進歩に大きく貢献できる。

核小体低分子 RNA (snoRNA) は、特定のタンパク質と複合体を形成し、リボソーム

RNA (rRNA) や核内低分子 RNA (snRNA) を始めとする生体内非翻訳 RNA (ncRNA) の化学修飾を担っている。一方で、mRNA を修飾する snoRNA の存在も報告されており、①snoRNA による mRNA 前駆体のリボース 2'-O-メチル化修飾が、スプライシング反応を制御している (Kishore S, et. al., *Science*, **311**, 230-232 (2006))、②人工 snoRNA による mRNA 修飾が標的タンパク質発現を抑制する (Ono M, et. al., *Mol Biol Cell*, **21**, 1569-1584 (2010)) ことが既に報告されている。これら一連の報告は、「生体内 snoRNA の mRNA 修飾が遺伝子発現を制御している」可能性を示唆しているが、「タンパク質発現を抑制する mRNA 上の修飾部位」を詳

細に調べた例はない。

snoRNA による mRNA 修飾がタンパク質発現に与える影響を詳細に解析するためには、①人工的に構築した snoRNA を用いて、前駆体を含む標的 mRNA の各ヌクレオチドを生体内で化学修飾する方法論及び、②標的タンパク質発現を抑制する snoRNA をハイスループットに同定する方法論を開発する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、細胞内で標的タンパク質発現を抑制する snoRNA 構築方法の開発を目指した。生体内で特定 RNA 配列上のリボース 2'-O-メチル化修飾を担う snoRNA は、boxCD 型 snoRNA であり、メチル基転移酵素を始めとするタンパク質因子との複合体形成に必要な「box 配列」と、標的 RNA 配列と相補的な「標的認識配列」を有する。そこで本研究では、boxCD 型 snoRNA の標的認識配列を多様化し、細胞内で標的タンパク質発現を抑制する snoRNA を同定する方法論を開発することを目的とし、①snoRNA を用いて細胞内標的 mRNA の各ヌクレオチドを 2'-O-メチル化修飾する方法及び、②チミジンキナーゼ融合タンパク質を用いた細胞スクリーニング方法を開発し、③選択した snoRNA の機能評価を行い、snoRNA を基盤とした遺伝子発現制御が可能であるかを評価する。

3. 研究の方法

(1) 細胞内で標的 mRNA の各ヌクレオチドを 2'-O-メチル化修飾する方法の開発

boxCD 型 snoRNA の細胞内発現ベクターを複製し、標的 mRNA の各ヌクレオチドを 2'-O-メチル化修飾できるように、標的認識配列を多様化する方法を開発した。構築した snoRNA 発現ベクターライブラリーを細胞に遺伝子導入し、発現条件を検討した。

(2) チミジンキナーゼ融合タンパク質を恒常的に発現する細胞の構築

snoRNA により標的タンパク質発現が抑制された細胞をスクリーニングするため、標的タンパク質とチミジンキナーゼを同一 mRNA 上にコードする融合タンパク質を設計した。融合タンパク質を恒常的に発現する細胞株を構築し、細胞が死滅するガンシクロビル濃度を決定した。

(3) 標的タンパク質発現を抑制する snoRNA 同定方法の開発

snoRNA 発現ベクターライブラリーを (2) で構築した細胞に導入し、ガンシクロビル存在下で培養後、生存細胞から発現プラスミドを

回収し、標的タンパク質発現を抑制する snoRNA 配列を同定した。

4. 研究成果

基盤となる snoRNA として U20 (SNORD20) RNA を用いた。U20 RNA 発現プラスミドを構築した後、標的認識配列を GFP DNA 配列を断片化した GFP DNA ライブラリーに置換した。この方法により、細胞内で GFP mRNA あらゆるヌクレオチドをメチル化可能な snoRNA 発現プラスミドライブラリーを構築した。一方で、細胞スクリーニングは、チミジンキナーゼ (TK) 発現細胞がガンシクロビル (GCV) 存在下では、DNA 合成が阻害され死滅することを利用する。そのため、同一 mRNA にコードされる GFP-TK 融合タンパク質 (GFP-TK) を恒常的に発現する細胞株を樹立した。その後、得られた複数の GFP-TK 細胞株において、各細胞が死滅する GCV 濃度をそれぞれ決定した。上記研究により、「細胞内で GFP mRNA 上のあらゆるヌクレオチドを 2'-O-メチル化修飾可能な snoRNA 発現プラスミドライブラリー」と「GFP-TK 融合タンパク質を恒常的に発現する細胞」を構築することに成功した。続いて、細胞スクリーニングは、①snoRNA 発現プラスミドライブラリーの細胞導入、②GCV 存在下での培養、③生存細胞からのプラスミド回収、④獲得プラスミドの増幅によるプラスミドライブラリーの再構築、の課程を繰り返し行った。3 回選択後のプラスミドライブラリーの DNA 塩基配列解析を行った結果、GFP mRNA 上の開始コドン (AUG) の A または G を標的とする snoRNA (snoST1、snoST3) が得られた。上記 snoRNA をスクリーニングに用いた細胞に形質導入し、GCV 存在下で生存細胞数を算出した結果、コントロールと比較して snoST1 発現細胞は、わずかに生存割合が上昇した。また、snoST1、snoST3 の GFP-TK タンパク質発現抑制効果をウェスタンブロッティングにより確認した。以上の結果より、本研究で開発した細胞スクリーニングにより、細胞内で標的タンパク質発現を抑制する人工 snoRNA が構築できることを明らかにした。また、タンパク質発現抑制が 2'-O-メチル化修飾によるものかどうかは不明であるが、本研究により、開始コドンを標的とする snoRNA がタンパク質発現抑制効果も持つという興味深い結果が得られた。

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 2 件、全て査読あり)

- (1) Liew, F.F., Hasegawa, T., Fukuda, M., Nakata, E., Morii, T.
“Construction of dopamine sensors by using fluorescent ribonucleopeptide complexes”
Bioorganic and Medicinal Chemistry, **19**, 4473-4481 (2011)
- (2) Fukuda, M., Kurihara, K., Tanaka, Y., Deshimaru, M.
“A strategy for developing a hammerhead ribozyme for selective RNA cleavage depending on substitutional RNA editing”
RNA, **18**, 1735-1744 (2012)

[学会発表] (計 11 件)

- ① 川本崇仁、弟子丸正伸、福田将虎
「標的遺伝子発現を抑制する核小体低分子 RNA の構築」
第 35 回日本分子生物学会年会
2012 年 12 月 11 日～2012 年 12 月 14 日(福岡国際会議場・マリンメッセ福岡)
- ② 川本崇仁、弟子丸正伸、福田将虎
「標的遺伝子の発現を抑制する核小体低分子 RNA の構築」
第 14 回 RNA 学会
2012 年 07 月 18 日～2012 年 07 月 20 日(東北大学百周年記念会館)
- ③ 栗原圭、弟子丸正伸、福田将虎
「RNA 編集を特異的に識別するリボザイムの構築」
第 34 回日本分子生物学会年会
2011 年 12 月 13 日 (パシフィコ横浜)
- ④ 田中泰圭、加藤卓、福田将虎、弟子丸正伸
「セロトニン 2C 型受容体 mRNA の編集における ADAR1 と ADAR2 の共働的な作用」
第 34 回日本分子生物学会年会
2011 年 12 月 13 日 (パシフィコ横浜)
- ⑤ 山口彰太、福田将虎、弟子丸正伸
「マウス脳内における 2'-O-メチル化が RNA 編集に及ぼす影響の解析」
第 34 回日本分子生物学会年会
平成 23 年 12 月 13 日 (パシフィコ横浜)
- ⑥ 栗原圭、弟子丸正伸、福田将虎
「ハンマーヘッド型リボザイムを基盤とした RNA 修飾を識別するリボザイムの構築」
第 84 回日本生化学会大会
2011 年 9 月 24 日 (京都国際会議場)
- ⑦ Masatora Fukuda, Kei Kurihara, Masanobu Deshimaru “Construction of

ribozymes recognizing specific RNA modifications in HTR2C mRNA” The 16th Annual Meeting of the RNA Society, The RNA Society of Japan 13th Annual Meeting, 16th of June, **2011** (Kyoto, Japan)

- ⑧ Yasuyoshi Tanaka, Suguru Kato, Masatora Fukuda, Masanobu Deshimaru
“Editing pattern of serotonin 2C receptor mRNA depends on the expression level of ADARs” The 16th Annual Meeting of the RNA Society, The RNA Society of Japan 13th Annual Meeting, 16th of June, **2011** (Kyoto, Japan)
- ⑨ 栗原圭、山本諭司、福田将虎、弟子丸正伸
「RNA 配列上の修飾を識別するリボザイムの構築」
平成 23 年度日本生化学会九州支部例会
2011 年 5 月 21 日 (久留米大学)
- ⑩ 田中泰圭、加藤卓、福田将虎、弟子丸正伸
「ADAR1 の発現量に依存したセロトニン 2C 型受容体 mRNA の編集パターンの変動」
平成 23 年度日本生化学会九州支部例会
2011 年 5 月 21 日 (久留米大学)
- ⑪ 加藤卓、田中泰圭、福田将虎、弟子丸正伸
「ADAR2 の発現量に依存したセロトニン 2C 型受容体 mRNA の編集パターンの変動」
平成 23 年度日本生化学会九州支部例会
2011 年 5 月 21 日 (久留米大学)

[図書] (計 0 件)

なし

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 将虎 (FUKUDA MASATORA)
福岡大学・理学部・助教
研究者番号：90526691

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし