

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

平成30年4月27日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 熊本大学 大学院生命科学研究部
職 名 准教授
研究代表者 魏 范研

下記のとおり平成29年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号: 17005)

1. 共同研究課題名	修飾 tRNA の可視化による膵β細胞タンパク質翻訳制御機構の解明		
2. 共同研究目的	膵β細胞におけるタンパク質翻訳は主にインスリンを産生し、糖代謝の維持に必須である。本研究は、タンパク質翻訳の中心的な分子である tRNA に焦点をあて、tRNA に存在する化学修飾がどのように翻訳を制御するかを可視化することで、膵β細胞の翻訳制御メカニズムの解明を目的とする。		
3. 共同研究期間	平成29年4月1日 ~ 平成30年3月31日		
4. 共同研究組織			
氏 名	所属部局等	職名等	役割分担
(研究代表者) 魏 范研	大学院生命科学研究部 分子生理学	准教授	研究代表(tRNA 精製、ラベリング)
(分担研究者) 富澤 一仁	大学院生命科学研究部 分子生理学	教授	研究全般に対する助言
5. 群馬大学生体調節研究所 の共同研究担当教員	分野名	脳病態制御分野	氏 名
			林(高木)朗子 教授

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に變更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

(課題番号: 17005)

6. 共同研究計画

申請者はこれまでに2型糖尿病危険遺伝子 CDKAL1 の機能解析を行い、tRNA 修飾の生理機能を明らかにした。CDKAL1 はリジンコドンに対応する tRNA のアンチコドン近辺のアデノシンをチオメチル化修飾する酵素であった。Cdkal1 欠損マウスや CDKAL1 遺伝子異常を有するヒトでは、プロインスリンのリジンコドンで誤翻訳が多発し、プロインスリンのプロセッシングが障害されていた。その結果、 β 細胞で成熟インスリンのレベルが低下し、また小胞体ストレスが惹起され、最終的に耐糖能異常を呈した。

このように、チオメチル化修飾はタンパク質翻訳制御を介して膵 β 細胞の機能に重要であるが、その詳細な分子機構が不明である。そこで、本共同研究では、チオメチル化修飾を欠損するリジン tRNA をまず蛍光ラベルし、当該 tRNA を β 細胞の株細胞や膵島に導入する。次に、2光子顕微鏡を用いてリジン tRNA の局在やブドウ糖など刺激に誘発される翻訳時の tRNA の挙動を可視化することで、tRNA 修飾による膵 β 細胞の翻訳制御機構を明らかにする。

7. 共同研究の成果

①マウス tRNALys の単離精製:

野生型マウス及び Cdkal1 欠損マウスの肝臓を用いてチオメチル化修飾を含む tRNALys と含まない tRNALys を精製した。具体的には、tRNALys の配列に相補的な配列を有するビオチン結合型オリゴ DNA を作製し、マウス肝臓から精製した Total RNA と同オリゴをハイブリダイズさせた後、ストレプトアビジンビーズで tRNALys を特異的に単離精製した。精製した tRNA は質量分析機でチオメチル化修飾の有無を確認した。

②蛍光ラベル tRNALys の作製:

精製した tRNA に水素化ホウ素ナトリウムを加え、D-loop に存在するジヒドロリジンを還元したのち、酸性条件下で蛍光色素である Cy3-hydrazide と混合し、蛍光ラベルを加えた。

③蛍光ラベル tRNALys の動作確認

成果②で作製した Cy3-tRNALys の動態を確認するために、Cy3-tRNA と RNAiMax を混合し、HeLa 細胞にトランスフェクションし、蛍光顕微鏡で観察した。Cy3-tRNA がタンパク質翻訳に参加していることを実証するために、翻訳に必要なリボソームタンパク質を同時に抗体で免疫染色した。その結果、Cy3-tRNA がリボソームと共局在することが確認された。

④Cdkal1 欠損膵 β 細胞株の作製

β 細胞におけるチオメチル化修飾を含まない tRNA の動態を明らかにするために、Cdkal1 遺伝子欠損の膵 β 細胞を作製する必要がある。申請者は Cdkal1 ノックアウトマウスと膵 β 細胞特異的に SV40T 抗原を発現するトランスジェニックマウスを交配させた。その結果、Cdkal1 ノックアウトマウスの膵臓に β 細胞由来の腫瘍が確認された。腫瘍を摘出し、分散培養を続けたところ、Cdkal1 遺伝子欠損を有する不死化膵 β 細胞株を得た。

本共同研究により、インスリン翻訳に重要である tRNALys の蛍光ラベル化に成功した。また、Cdkal1 遺伝子欠損不死化 β 細胞株の作製にも成功した。今後は同 β 細胞株に Cy3-tRNALys を導入し、tRNA 動態を明らかにしたい。

8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

①本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文
該当しない。

②この共同研究に基づくとの記載のある論文
該当しない。