

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790761
 研究課題名（和文） 発生過程における miRNA の役割と DiGeorge 症候群の発症機構
 研究課題名（英文） Analysis of the developmental process under miRNA and pathogenesis of DiGeorge syndrome
 研究代表者
 塩濱 愛子（SHIOHAMA AIKO）
 慶應義塾大学・医学部・助教
 研究者番号：40383731

研究成果の概要：

DiGeorge 症候群（DGS）/ 円錐動脈幹異常顔貌症候群（CAFS）は 22q11.2 領域微小欠失に起因した胎生期の臓器形成に異常が生じる症候群である。同一領域の欠失を有する患者間でも症状に大きな差があるなど、作用機序の解明は進んでいない。*DGCR8* は DGS/CAFS 欠失領域に存在しており、さらに最近 miRNA 成熟化因子であることが判明した。本研究では、発生初期の観察に適したモデル生物“メダカ”と *DGCR8* ノックアウトマウスを用い、発生過程にて *DGCR8* が果たす役割を検証した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード：発生、miRNA、DiGeorge 症候群、モデル生物

1. 研究開始当初の背景

DGS/CAFSは、心臓疾患、顔貌異常（口蓋裂、咽頭の異常）、胸腺過小形成、精神発達遅延などを特徴とする先天性疾患である。これまでDGS/CAFS領域で報告されてきた原因候補遺伝子として*TBX1*を筆頭に*UFD1L*、*CRKL*、*HIRA*があるが、それらのノックアウトマウスの表現型は一部の症状しか示さず、全ての症状を

説明できる単独の遺伝子が存在するかどうかは不明の状態であった。研究代表者は22q11.2領域に存在する遺伝子の網羅的な探索と機能の解析から、新規遺伝子*DGCR8*を単離・同定した。マウスを用いた*in situ*ハイブリダイゼーション解析の結果、マウス*Dgcr8*は発生期に発現し、その部位はDGS/CAFSの症状が現れる組織と一致して

いた (図 1、Shiohama, A. *et al.*, *BBRC*2003)。

また、DGCR8タンパクはmiRNAの前駆体である pri miRNA を pre miRNA へとプロセシングを行う miRNA 成熟化因子であることから、発生過程における遺伝子発現の制御に関わることが推測された。miRNA は、非コーディング領域から 70 ~ 100塩基程度の長さであり、植物から動物にわたる広範囲の生物において遺伝子発現の制御に関わることが示されている。

線虫では *let-7/lin-4* などの miRNA 欠損は成虫へ成長できないことや、さらに下流の miRNA 成熟化因子である DICER のノックアウトマウスは早期胎仔期で発生異常を起こすことが判明した。ヒトゲノム解読により miRNA が数多くゲノム上に存在していることが明らかとなったが、ほ乳類における miRNA の発現・成熟化から実際の遺伝子発現抑制に至る経路の詳細は未だに不明であり、各 miRNA と特異的な mRNA の組み合わせも明確になっていない。このように miRNA の機能に関する研究が精力的に進められているが、先天性疾患と miRNA の作用機序に関する研究は始まったばかりである。

2 . 研究の目的

DGS/CAFS は 22q11.2 領域微小欠失に起因した胎生期の臓器形成に異常が生じる症候群である。同一領域の欠失を有する患者間でも症状に大きな差があるなど、作用機序の解明は進んでいない。miRNA は近年その存在が明らかにされ、多くの生物種の初期発生において重要な役割を担っていることが判ってきた。これまで DGS/CAFS と miRNA の関連は示されておらず、本研究では発生初期の観察に適したモデル生物 “メダカ” と、作製した *DGCR8* ノックアウトマウスを用いて、発生過程における *DGCR8* が果たす役割と DGS/CAFS

発症機構の関連を検証した。哺乳動物 (マウス) の他にメダカを用いる意義は、純系種が確立されており、多産の上、卵のサイズも大きいことから、発生期を観察するためのモデルに適している。また、既にヒト相同遺伝子の変異が、先天性及び後天性の心臓疾患に非常に良く似た表現型を示すことが報告されている。ヒトでは致死になってしまう重篤な障害を、生きたままその経過を観察できるという利点もあるため、DGS/CAFS における遺伝子発現と臓器形成の関連解析には非常に有効である。

3 . 研究の方法

ゲノムシーケンス情報を用いてヒト DGS/CAFS 欠失領域に存在する 37 遺伝子に対して、マウス・フグ・メダカにおける相同遺伝子の同定およびシンテニーマップを作成し、発現解析を行うための各種の遺伝子配列の同定を行った。遺伝子発現解析は発生段階におけるマウス・メダカ胚から mRNA を採取・調製し、RT-PCR 法を用いて DGS/CAFS 欠失領域に存在する遺伝子の発現量及び発現時期を同定した。メダカでは、各遺伝子の 5' 非翻訳領域のクローニングを行い、GFP 遺伝子を結合したキメラ DNA を作製し、メダカ受精卵に注入後、発生過程における各遺伝子の発現部位を蛍光顕微鏡を用いて観察した。*LacZ* 遺伝子を *DGCR8* 遺伝子の開始コドンより下流に挿入することで作製した *DGCR8* ノックアウトマウスのヘテロ及びホモ欠失個体に対して、各発生段階の胚から mRNA を採取・調製し、RT-PCR 法を用いて解析した。



図1：DGCR8のマウス胎生期における発現部位

4. 研究成果

ゲノムシーケンス情報を用いてヒト

DGS/CAFS 欠失領域に存在する 37 遺伝子に対して、マウス・フグ・メダカにおける相同遺伝子の同定（マウス 35 個、フグ 34 個、メダカ 34 個）およびシンテニーマップを作成した結果、この領域は魚類にもシンテニーが保たれていることが明らかとなり、発現解析を行うための各種の遺伝子配列を同定した。続いて遺伝子発現解析を行い、メダカにおいて、発生初期から発現している遺伝子は 7 個、臓器形成期から発現している遺伝子は 17 個あり、また、発現がほとんど見られなかった遺伝子は 3 個存在した。マウス・メダカで結果を比較したところ、ほとんどの遺伝子について発現時期が共通していた。DGCR8 ノックアウトマウスにおいてホモ欠失個体における出生が認められなかったため、ヘテロ欠失個体同士の交配後、各発生段階における胚を採取し、LacZ 染色後ジェノタイプングを行うことで、ホモ欠失個体について胎生 5.5~6 日齢前後での致死が認められた。早期初期胚の *in vitro* 培養を試み、DGCR8 の発現を LacZ 染色にて観察した。各発生段階の胚および新生仔から mRNA を採取・調製し、リアルタイム PCR 法を用いた DGCR8 欠損による遺伝子発現量を検討した。メダカ DGCR8 遺伝子の

5' 非翻訳領域のクローニングを行い、GFP 遺伝子を結合したキメラ DNA を作製し、メダカ受精卵に注入後、発生過程における遺伝子の発現部位の観察をした。DGCR8 メダカの相同遺伝子をモルフォリノオリゴ DNA (MO) を用いてノックダウン実験を行い、遺伝子発現量低下時の発生過程における表現型に及ぼす影響を検討したところ、頭部形成および循環器形成の異常が認められた。即ち、mRNA が成熟する際のエキソン間のスプライシングを阻止する箇所に作成した MO を注入した胚より RNA を初期ステージから順次採取し RT-PCR 法により抑制効果を確認した（図 2）。8 細胞期に示されるバンドは卵由来 mRNA であると考えられ後期原腸胚期から発現抑制による mRNA の減少が確認された。続いて、開始コドン周辺に設計した MO を注入した胚では、翻訳抑制されるため、目的タンパクに対する抗体を用いてウェスタンブロット法により抑制効果を確認することができた（図 3）。初期胚では卵由来のタンパク質として発現が認められるが、MO の注入により 4 体節期でのタンパク発現は抑制されていることが確認された。

モルフォリノをバックボーンとした合成 DNA 類似体は配列特異的に遺伝子発現を抑制・減少させることが可能である。このことから複数種のモルフォリノオリゴ DNA を用いて同時にいくつもの遺伝子をノックダウンすることや、導入するモルフォリノオリゴ DNA の濃度で発現量をコントロールすることで、メダカを用いてヒト染色体部分モノソミーを模した解析手段を今後試みることで、画期的な成果が期待できる。また、マウスおよびメダカといった 2 種の生物を解析に併用することにより、信頼性の高い結果をより早く得ることが可能になることが期待される。

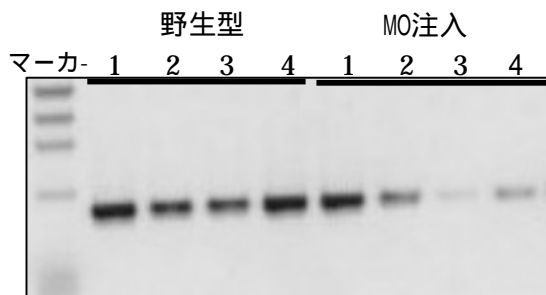


図2：RT-PCR法によるMO抑制効果確認実験

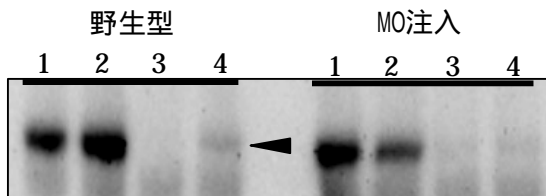


図3：ウェスタンブロット法によるMO抑制効果確認実験

(図2および3とも、1：8細胞期(2時間後)
2：初期桑実胚期(5時間後) 3：後期原腸胚期(21時間後) 4：4体節期(31時間後))

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩濱 愛子 (SHIOHAMA AIKO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：40383731

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし