

平成 22 年 5 月 10 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20700364
 研究課題名 (和文) 遺伝子ノックアウトから見えてきたマイクロ RNA が寄与する生命現象の解明
 研究課題名 (英文) Analysis of miRNA functions from miRNA knockout mouse
 研究代表者
 蓮輪 英毅 (HASUWA HIDETOSHI)
 大阪大学・微生物病研究所・助教
 研究者番号：50343249

研究成果の概要 (和文) : タンパク質をコードしない機能性 RNA であるマイクロ RNA についてノックアウトマウスを作製し解析したことによって、任意の miRNA が生物の種を保存し繁殖させるための生命機能である生殖機能を司っていることを見出した。さらに、表現型を示す組織に絞り込んでマイクロ RNA の標的遺伝子を解析したことによって、数百あると言われている標的遺伝子の中から生命現象に直結した標的遺伝子を明らかにすることができた。

研究成果の概要 (英文) : MicroRNAs (miRNAs) are endogenous small non-coding RNAs. In mammals, the role of miRNAs is indicated in a few miRNAs, but the understanding of a relationship between the impairment of miRNA and diseases in animals is not clearly demonstrated. I tried to establish the miRNA knockout mouse and revealed that reproductive function was regulated by miRNA. Furthermore, I have clarified a real target gene related with phenotype using the miRNA knockout mouse.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：分子生物学・実験動物学

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：マイクロ RNA、遺伝子改変動物

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

(1) ゲノムプロジェクトおよび塩基配列解析技術の発展により、生物を司るゲノムDNAには遺伝情報としてタンパク質をコードする遺伝子以外にRNAとして機能する遺伝子が多く存在していることが明らかになった。

(2) タンパク質をコードしないRNA (non-coding RNA) は多種多様であり、メッセンジャーRNA (mRNA) 様のもの、百キロ塩基以上の大きなもの、核内で機能すると考えられているsnRNA、20塩基程度のマイクロRNA (miRNA) などの存在がわかってきた。

(3) miRNAは低分子RNA群に属するnon-coding RNAで、RNAを標的としてその翻訳を阻害することで、標的遺伝子の発現を制御していることが明らかとなった。これまで遺伝子の発現の制御は染色体DNAからRNAに転写される際の調節が主であると考えられてきたが、機能性RNAによる遺伝子発現制御という新しい概念が生まれた。

(4) miRNAは8塩基の配列 (seed配列) の相同性をもとに標的遺伝子の3'-UTRに干渉することで、遺伝子の発現を調節することが提唱された。ただし、seed配列のみでmiRNAが作用するmRNAを検索すると、数百もの標的遺伝子が候補となり、実際に生体で機能する標的遺伝子についてはほとんど未知である。

2. 研究の目的

(1) miRNAの機能およびmiRNAが寄与する生命現象を明らかにするためには、動物個体を用いて解析することが必要である。そのために、遺伝子改変動物作製技術を用いmiRNAノックアウトマウス、miRNAトランスジェニックマウスを作製することを目的とする。

(2) 作製したmiRNA遺伝子改変動物の表現型を解析することで、miRNAが寄与する生命現象を浮き彫りにすると共に、miRNAにより制御される標的遺伝子について、miRNA機能組織から同定を目指す。

3. 研究の方法

(1) miRNAノックアウトマウスの作製
任意のmiRNAを欠損させたターゲティングベクターを作製し、ES細胞を用いた相同組換え法によりmiRNAを欠損させたES細胞を樹立する。樹立した組換えESクローンからキメラマウスを作製し、交配させることでノックアウトマウスを作製した。PCR法、サザン

ロットティング法、ノザンロットティング法、リアルタイムPCR法を用いて、目的miRNAの欠損を検定した。

(2) 表現型の解析
分子生物学・生化学・組織解剖学的手法を用いmiRNAノックアウトと野生型あるいはヘテロノックアウトマウスを比較解析した。

(3) 標的遺伝子の同定
miRNA標的遺伝子を同定するために、コンピューター検索解析を行い、標的遺伝子をリストした。その中から、標的配列を複数もつ遺伝子についてレポーター遺伝子を構築し、miRNA発現ベクターと一緒に培養細胞に導入することで、miRNAの標的解析を行った。さらに、ノックアウトマウスを用い、標的候補となる遺伝子の挙動をRNA・タンパク質レベル (転写・翻訳レベル) で解析した。

4. 研究成果

1) miRNAノックアウトマウスの作製
任意のmiRNAを欠損させたES細胞を2ライン樹立し、PCR法およびサザンロット法により目的の欠損が生じていることを確認した。
それぞれの組換えES細胞から複数ラインのキメラマウスの作製に成功し、野生型マウス (C57B/L6) と交配させ、miRNA欠損染色体が伝わったヘテロノックアウトマウスの作出に成功した。
ヘテロノックアウトマウスを交配させノックアウトマウスを作製することができた。このとき、メンデルの法則に従い野生型、ヘテロノックアウト、ホモノックアウトマウスが生まれたことより、このmiRNA欠損では胎生致死は起こらず、健康に生まれ成長することがわかった。

2) 表現型の解析-1
腎臓、肺、胸腺で強く発現していることからそれらの組織切片を作製し観察したが、野生型と変わらず異常がなかった。また、1年以上健康に飼育できた。

(3) 表現型の解析-2
生殖組織である精巣および卵巣でも発現していることから、ノックアウトマウスの生殖能力を調べたところ、雄は正常であったが雌が強い不妊傾向を示すことがわかった。
不妊の原因を調べるために、交尾行動と妊娠について調べたところ、ノックアウトマウスは交尾をするにもかかわらず、妊娠しないことがわかった。さらに、妊娠しない原因は排卵不全によるものであった。(図1)

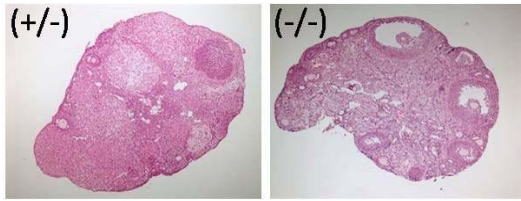


図1 miRNA ヘテロノックアウト(+/-)とノックアウト(-/-)マウスの卵巣切片
(-/-)は排卵不全のために排卵後の黄体形成が見られない

(4) 表現型の解析-3

排卵は視床下部—下垂体—卵巣系により厳密に制御されている。これらのどの組織に不妊の表現型が起因するか調べた。まず、卵巣が支障が部からの刺激により下垂体から分泌される排卵ホルモン注射に反応し排卵するか確認したところ、ノックアウトマウスでも野生型・ヘテロノックアウトマウスと同等に排卵することが確認できた。このことから、不妊の表現型がみられたmiRNA ノックアウトマウスの卵巣は正常に排卵できる能力があることがわかった。

視床下部および下垂体はこれまで、ノックアウトしたmiRNAの発現を確認していなかった組織であったことから、ノザンプロッティング法によりmiRNAの発現を確認した。その結果、視床下部では発現しておらず、下垂体で強く発現していることを確認した。このことから、不妊の原因は下垂体の機能不全である可能性が示唆された。

これまでにいくつかのmiRNA欠損マウスの解析が国内外で報告されているが、生殖機能に表現型が観察された最初の研究成果である。

(5) 標的遺伝子の解析-1

miRNAの標的候補遺伝子をseed配列の相同性をもとに検索したところ、約1,000の遺伝子が候補となりえることがわかった。すべての遺伝子について調べることはできないので、ヒトとマウスで共通し且つ複数の標的配列を3'-UTR内にもつ遺伝子に絞り込んで、DsRed2を指標としたレポーター遺伝子を作製し、培養細胞にmiRNA発現ベクターと一緒に導入することで標的遺伝子を検定した。その結果、約8割の遺伝子が優位にmiRNA存在下でDsRed2の蛍光が減弱することがわかり、多くの遺伝子が1つのmiRNAにより制御されていることが示唆された。

(6) 標的遺伝子の解析-2

培養細胞を用いた実験で見出した標的遺伝子がmiRNAノックアウトマウスの不妊の表現型に関係しているのかどうか調べるために、下垂体での発現をRT-PCRおよびウエスタン

ブロッティング法を用い、RNAおよびタンパク質量を調べた。その結果、miRNAノックアウトマウスでmiRNAが欠損しても、タンパク質量が変化しないものが大半であり、コンピューターによる解析やin vitroの培養細胞を用いた解析系では標的遺伝子と考えられるものが多く存在するが、生命現象を正常に維持・機能させるための真の標的遺伝子はほんの一握りしかないことが示唆された。

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)

[学会発表] (計2件)

平成20年

① 蓮輪英毅, Disruption of miR-200b Leads to Female Infertility, 41st Annual SSR Meeting, 20年5月27-30日, Kailua-Kona, Hawaii

② 蓮輪英毅, miR-200b 欠損マウスの解析, 日本実験動物科学技術2008, 20年5月15-17日, 仙台

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蓮輪 英毅 (HIDETOSHI HASUWA)
大阪大学・微生物病研究所・助教
研究者番号：50343249

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：