

機関番号：12601

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2010

課題番号：21680049

研究課題名（和文） メカニカルストレス誘導性マイクロRNAの統合的解析

研究課題名（英文） Functional analysis of mechanical stress-induced microRNAs

研究代表者

秋本 崇之（AKIMOTO TAKAYUKI）

東京大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：00323460

研究成果の概要（和文）：

本研究では身体運動に関連する遺伝子発現制御のうち、とくに身体運動に起因するメカニカルストレス誘導性マイクロRNA（miRNA）による転写後制御について解析した。マイクロアレイによる網羅的解析により、メカニカルストレス誘導性miRNAとして複数のmiRNAを同定した。このうちmiR-23aに関して、培養細胞および動物個体を用いてその機能を解析した結果、miR-23aは2つのユビキチンリガーゼの翻訳を抑制することで骨格筋の萎縮を抑制することを見いだした。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study is to determine gene regulation related to physical exercise, especially focusing on post-transcriptional control due to mechanical stress-induced microRNA (miRNA)s. We first identified several mechanical stress-induced miRNAs by a comprehensive microarray analysis. Among them, we chose miR-23a to analyze with respect to its function in skeletal muscle by using cultured cells and experimental animals. We found that miR-23a inhibits skeletal muscle atrophy by suppressing the translation of two ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1 in their 3' UTR dependent manner.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	13,900,000	4,170,000	18,070,000
2010年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
年度			
年度			
年度			
総計	21,500,000	6,450,000	27,950,000

研究分野：スポーツ・健康科学

科研費の分科・細目：スポーツ科学

キーワード：筋肉,運動,細胞内シグナル伝達,物理的ストレス,転写調節,スモール RNA

1. 研究開始当初の背景

身体運動は肥満,がん,糖尿病,冠動脈疾患,骨粗鬆症など,現在問題となっている主要な疾患の多くを予防あるいは改善し,生活習慣病予防の切り札の1つであると認識されている. このため現在までに,「健康に対する運動の効用」,「運動による代謝性疾患の予防・治療」のメカニズムを明らかにすべく,身体運動による転写調節メカニズムに関する多くの研究がなされてきた.

一方,転写後の遺伝子発現制御についてはほぼ研究がなされていないに等しい.

近年,ゲノム遺伝子の転写後発現調節にタンパク質をコードしない RNA (non-coding RNA/ncRNA) が関与することが新たに示され,特に ncRNA の一種であるマイクロ RNA (miRNA) は,標的 mRNA の発現を制御することが報告されている. miRNA は,標的遺伝子の 3' 非翻訳領域に結合し,翻訳阻害もしくは標的遺伝子を直接分解することで,その標的遺伝子の発現を制御する(1). バイオインフォマティクスを用いた解析によると,驚くべきことに全遺伝子の約 1/3 が miRNA によって制御されていると推測されている.

一方,生体には重力,身体運動,拍動,血流などにより様々なメカニカルストレスが負荷されており,それらのストレスに応答して生体機能が調節されていることや,長期的な生体組織の再構築(リモデリング)が行われていることが明らかになってきた. 例えば血管内腔面を覆う血管内皮細胞には血流によるせん断応力が負荷され,その外周に位置する血管平滑筋細胞には拍動による伸展応力が負荷されている. また,関節軟骨では歩行による生じる静水圧負荷によってコラーゲンなどの細胞外マトリクス産生が影響を受けていると報告されている. 逆に物理的ストレスが負荷されない,あるいは激減する微重力環境,無動,不活動などでは骨格筋への力学的負荷の低下により廃用性萎縮が惹

起され,骨量の減少が起こる. これら物理的ストレスに対する生体機能の調節や生体組織の再構築といった現象は,微視的には組織内の細胞が力学的環境の変化に応答して,細胞機能の変化や組織の再構築を行った結果,組織の機能や構造を変化させることによって起こっていると考えられる. したがって,細胞のメカニカルストレスへの応答のメカニズムや,応答の結果が生体組織のリモデリングにどのように関連しているのかを解明することは非常に重要である.

しかし,メカニカルストレス適応における転写後調節を議論した研究は現在のところ全くない.

2. 研究の目的

研究目的は以下の3つである:1) 網羅的解析によるメカニカルストレス誘導性 miRNA の同定, 2) メカニカルストレス誘導性 miRNA の機能解析, 3) メカニカルストレスが miRNA 発現を誘導するメカニズムの解明.

3. 研究の方法

本研究では,マイクロアレイを用いた網羅的解析により,メカニカルストレス誘導性 miRNA を同定する. 同定されたメカニカルストレス誘導性 miRNA に関して,培養細胞および動物個体を用いてその機能を解析する. すなわち,同定された miRNA の強制発現ベクター, miRNA をノックダウンする LNA 化アンチセンスオリゴ, miRNA の標的遺伝子のレポーター等を組み合わせて遺伝子導入し,その表現系を解析することで miRNA の機能を明らかにする. 動物個体における miR-23a の機能を詳細に解析するため, miR-23a を発現するトランスジェニックマウスおよび miR-23 を欠損する遺伝子改変マウスを作出する. また,メカニカルストレスが miRNA 発現を誘導するメカニズムに関して,メカニカルストレスにより誘導される細胞内シグナル(メカノトラ

ンスダクション) に連なる転写制御の解析を行う。

4. 研究成果

マイクロアレイを用いた網羅的解析により、メカニカルストレス誘導性 miRNA を複数同定した。同定されたメカニカルストレス誘導性 miRNA に関して、培養細胞および動物個体を用いてその機能を解析した。すなわち、同定された miRNA の強制発現ベクター、miRNA をノックダウンする LNA 化アンチセンスオリゴ、miRNA の標的遺伝子のレポーター等を組み合わせて遺伝子導入し、その表現系を解析することでいくつかの miRNA の機能を明らかにした。

具体的には、マイクロアレイによる網羅的解析により、メカニカルストレス誘導性 miRNA として同定した miR-23a に関して、培養細胞を用いた実験の結果、miR-23a によるユビキチンリガーゼの転写後調節を介した骨格筋萎縮抑制が認められた。また、miR-23a を強発現するトランスジェニックマウスを作製し、その表現系を解析した。この結果、miR-23a によるユビキチンリガーゼの転写後調節を介した骨格筋萎縮抑制が、動物個体においても認められ、マイクロ RNA による骨格筋萎縮抑制が in vivo でも機能していることが明らかになった (現在論文 revise 中)。

また、骨格筋における miR-23 の機能をさらに詳細に検討するため、miR-23a/b をターゲットしたキメラマウスの作製を試みた。miR-23a に関してはすでにキメラマウスが得られた。miR-23b に関して、ベクターコンストラクションは完了したものの、研究期間内にキメラマウスを得ることができなかった。

次に、メカニカルストレスが miRNA 発現を誘導するメカニズムを解析するために miR-23 の 5' 上流ゲノム配列を取得しレポーターアッセイを行った。このレポーターは、いくつかの条件で miR-23 発現と同期したが、in vitro でのメカニカルストレスには応答しないため、メカニカルストレス反応性エレメントを欠いていると考えられた。

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 4 件)

1. K. Aizawa, M. Iemitsu, S. Maeda, N. Mesaki, T. Ushida, T. Akimoto#. Endurance exercise training enhances local sex steroidogenesis in skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc*, 掲載確定 (印刷中) (査読有)
2. K. Aizawa, M. Iemitsu, S. Maeda, T. Otsuki, K. Sato, T. Ushida, N. Mesaki, T. Akimoto#. Acute exercise activates local bioactive androgen metabolism in skeletal muscle. *Steroid*, 75(3): 219-223, 2010 (査読有)
3. Y. Ito, N. Toriuchi, T. Yoshitaka, H. Ueno-Kudoh, T. Sato, S. Yokoyama, K. Nishida, T. Akimoto, M. Takahashi, S. Miyaki, H. Asahara. The Mohawk homeobox gene plays a critical role in tendon differentiation by regulating type I collagen production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(23), 10538-10542, 2010 (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

1. 秋本崇之, 和田正吾, 相澤勝治, 牛田多加志. メカニカルストレスによる PGC-1 α アイソフォームの発現. 第 64 回日本体力医学会学術総会, 朱鷺メッセ (新潟), 2009. 9. 18
2. 秋本崇之, 和田正吾, 加藤義雄, 浅原弘嗣, 牛田多加志. マイクロ RNA による骨格筋の制御. シンポジウム 10「The Myogenesis - 遺伝子・細胞・組織から検討した骨格筋細胞の発生・分化・再生 -」, 第 64 回日本体力医学会学術総会, 朱鷺メッセ (新潟), 2009. 9. 18
3. 相澤勝治, 和田正吾, 目崎登, 牛田多加志, 秋本崇之. 骨格筋における活性型ア

ンドロゲン産生の調節機序, 第 65 回日本体力医学会学術総会, 千葉商科大学 (千葉), 2010.9.17

4. S. Wada, Y. Kato, M. Okutsu, S. Miyaki, K. Suzuki, Z. Yan, S. Schiaffino, H. Asahara, T. Ushida, T. Akimoto. Translational suppression of atrophic regulators by miR-23a integrates resistance to skeletal muscle atrophy. European Muscle Conference, Abano-Terme (Padova), Italy, 2010.9.14

[図書] (計 1 件)

1. 秋本崇之, 牛田多加志. 物理的刺激と軟骨細胞. 運動器慢性疾患に対する運動療法 (分担執筆: 黒澤尚編), 金原出版, 東京, 6-11, 2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋本 崇之 (AKIMOTO TAKAYUKI)
東京大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 00323460

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし