

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月16日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770216

研究課題名（和文）microRNAによる骨格筋 - 血管クロストークの制御

研究課題名（英文）microRNA-mediated regulation of the crosstalk between muscle and vasculature.

研究代表者

三嶋 雄一郎（MISHIMA YUICHIRO）

神戸大学・理学研究科・学術研究員

研究者番号：00557069

研究成果の概要（和文）：microRNA（以下miRNA）は、mRNAに結合して転写後レベルの抑制を引き起こす新たな階層の遺伝子発現制御因子である。本研究では、小型淡水魚ゼブラフィッシュを用い、骨格筋で発現するmiRNAであるmiR-1が細胞非自律的に血管形成を制御するメカニズムを解析した。その結果、miR-1が分泌因子VEGFを負に制御することで血管形成を調節していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：MicroRNAs are a novel layer of gene regulatory mechanism that induce post-transcriptional silencing. In this study, we analyzed the non-cell autonomous regulation of vasculogenesis by a muscle-specific miRNA, miR-1, in zebrafish. Our results indicated that miR-1 modulates vasculogenesis via the negative regulation of secreted factor VEGF.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：microRNA、ゼブラフィッシュ、血管形成

1. 研究開始当初の背景

microRNA（以下miRNA）は、mRNAに結合して翻訳の抑制・mRNAの不安定化を引き起こす約22塩基の内在性RNAである。これまで数百種類のmiRNA遺伝子が脊椎動物のゲノム中に存在することが明らかにされており、その多くは時期・組織特異的な発現様式を示す。さらに各々のmiRNAは数十から数百もの異なったmRNAを標的としており、ゲノム配列の解析からはヒト遺伝子のうち

30～50%がmiRNAによる制御を受けていると試算されている。すなわち、miRNAは転写後段階で機能する新たな階層の遺伝子発現制御機構であるといえる。しかしながら、非常に多岐にわたることが予想されるmiRNAの生理機能のうち、明らかになっているものは未だ氷山の一角である。

体内の血液の循環には、精密かつ巧妙に構築された血管網が必要不可欠である。また血管新生・再生の異常は血流障害や腫瘍形成促

進の要因となりうる。そのため個体発生・組織再生過程では、皮下組織や筋肉など血管と隣接する組織からの誘導シグナルにより、血管形成パターンが厳密に制御されている。しかしながら、このような血管—非血管組織間のクロストークを支えるメカニズムの詳細は明らかになっていない。

2. 研究の目的

申請者はゼブラフィッシュ胚において骨格筋 miRNA の欠損が周辺組織に細胞非自律的に及ぼす影響を解析し、ゼブラフィッシュ胚発生過程において骨格筋における miR-1 の欠損が体節間血管の形成を増進することを見いだしていた。この予備的な研究結果は、miR-1 によって血管—骨格筋のクロストークが制御されていることを強く示唆している。しかしながら、miR-1 がどの標的遺伝子の制御を介して、どのようにして血管形成に貢献しているのかは不明である。そこで本研究では、ゼブラフィッシュを用い miR-1 による血管—骨格筋のクロストーク制御機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) miR-1 機能阻害時における血管形成亢進の表現型を詳細に解析するために、血管細胞の核を GFP で可視化した fli1-GFP トランスジェニックゼブラフィッシュ系統を用いて miR-1 の機能阻害実験を行った。

(2) 血管細胞増殖の表現型を引き起こす原因となる miR-1 標的遺伝子の探索を行った。我々が以前に網羅的に同定した miR-1 標的遺伝子群のうち、血管細胞の増殖を引き起こす可能性のある遺伝子として、血管内皮細胞増殖因子 VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) に着目し、レポーターアッセイにより miR-1 による制御を受けるか検証した。

(3) miR-1 機能阻害時の血管増殖の表現型が VEGF の過剰発現によって引き起こされているかを検証するため、miR-1 機能阻害胚において VEGFAa の発現を抑制した。

4. 研究成果

(1) 血管細胞の核を GFP で可視化した fli1-GFP トランスジェニックゼブラフィッシュ系統を用いて miR-1 の機能阻害実験を行った結果、モルフォリノアンチセンスオリゴ (以下、MO) を用いて miR-1 の機能を阻害した場合には、コントロールの非特異的 MO を導入した場合と比較して、体節間の血管細胞の数が増殖していることが明らかとなった (図 1 A および B)。この結果より、miR-1 の標的となっている遺伝子は血管細胞の増殖を促す因子であることが示唆された。

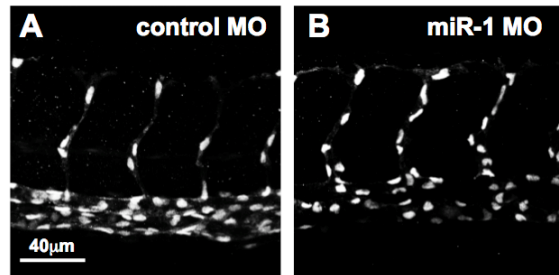


図 1 miR-1 および VEGFAa の機能阻害時における血管細胞数の変化

(2) ゼブラフィッシュのゲノム中には二種類の VEGFA 遺伝子 (vegfaa, vegfab) が存在する。配列解析の結果、2つの遺伝子とも mRNA の 3' 非翻訳領域 (3' untranslated region; 3' UTR) 中に miR-1 の標的配列がそれぞれ 3 個と 2 個存在していることが明らかとなった (図 2 A)。これらの標的部位はマウス、ヒトにおいても保存されていた。そこで、これら遺伝子の 3' UTR を介して実際に miR-1 による抑制が行われるかを検証するために、ホタルルシフェラーゼの ORF 下流に 3' UTR を結合させたレポーター mRNA を作製した。ゼブラフィッシュ胚内にレポーターと miR-1 を導入した結果、vegfaa, ab の 3' UTR ともに miR-1 によって抑制されることが明らかとなった (図 2 B)。以上の結果より、miR-1 は vegfa 遺伝子を直接的に抑制する可能性が強く示唆された。

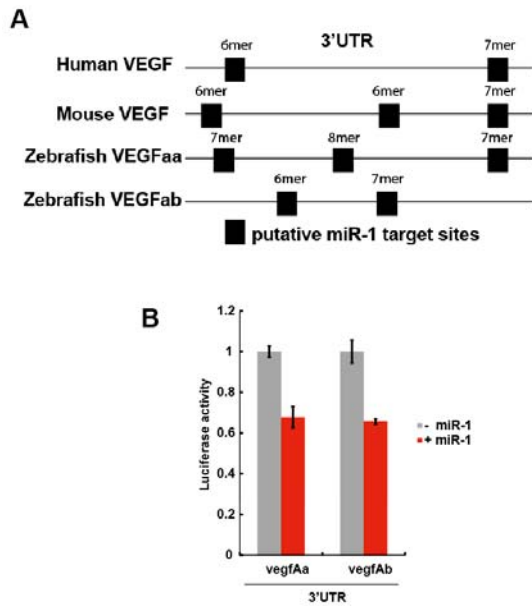


図2 miR-1によるVEGF遺伝子の3'UTRを介した制御の検証

(3) miR-1によってVEGFAが抑制されているならば、miR-1機能阻害胚においてはVEGFが過剰に産生されていることが原因で、血管形成が亢進していると考えられる。そこで、miR-1機能阻害胚においてVEGFAaまたはVEGFAbの発現を段階的に抑制し、血管細胞増殖の表現型が抑制され得るか検証した。その結果、導入したVEGFAa MOの濃度依存的に血管細胞増殖の表現型が抑制された(図1AからD)。一方、VEGFAbを抑制した場合は細胞数の増殖は抑制されなかった。この結果より、miR-1が生体内でVEGFAaの活性レベルを負に制御し、至適な血管細胞数を規定していることが明らかとなった。

以上の結果から、ゼブラフィッシュをモデルとして、血管を取り巻く周辺組織(=骨格筋)から分泌されるVEGFの発現レベルが骨格筋特異的なmicroRNAであるmiR-1による負の調節を受けていることが明らかになった。VEGF遺伝子中のmiR-1標的配列は哺乳類においても保存されているため、本研究によって得られた知見はヒトにおいて受傷後や血流障害時の血管再生治療にも大きく貢献できると考える。また腫瘍治療においては、細胞周期やDNA修復機構などの根本的な原因の修復よりも、腫瘍の成長や転移を抑制することの方が即効性があり重要である。今後、腫瘍細胞による血管誘起過程におけるmiR-1の関与が明らかにされれば、miRNAをターゲットとした創薬・治療法の開発への波及効果が期待される。

これまでの成果は論文としてまとめ、現在査読付き国際誌に投稿中である。

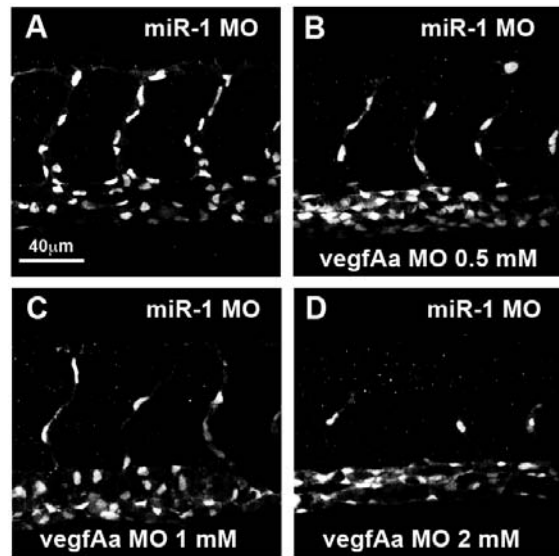


図3 miR-1の阻害によって生じる血管細胞数の増加はVEGFAaの発現阻害によって回復する

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)

① Mishima Y

Widespread roles of microRNAs during zebrafish development and beyond
Development Growth and Differentiation 誌
査読有、2012、54 (1):55-65

② Cifuentes D、Xue H、Taylor D.W.、Patnode H、Mishima Y、Cheloufi S、Ma E、Mane S、Hannon G. J.、Lawson N、Wolfe S、Giraldez AJ

A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity
Science 誌
査読有、2010、328(5986): 1694-8

[学会発表] (計 7 件)

① 三嶋 雄一郎、井上邦夫

Molecular mechanisms and regulations of microRNA-mediated gene silencing in zebrafish、第 34 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2011

② Mishima Y、Fukao A、Kishimoto T、Sakamoto H、Fujiwara T、Inoue K. Molecular mechanisms of miRNA-mediated repression during zebrafish embryogenesis The 16th Annual Meeting of the RNA Society 京都国際会議場、2011

③ Mishima Y

Interactions between microRNA pathway and translation machineries
Tokyo RNA Club the Fifth Meeting
東京大学 弥生講堂、2011

④ Mishima Y、Fukao A、Kishimoto T、Sakamoto H、Fujiwara T、Inoue K Molecular mechanisms of miRNA-mediated repression during zebrafish embryogenesis Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology "Mechanisms and Biology of RNA silencing" Portola Plaza Hotel & Spa, Monterey, California, USA、2011

⑤ 三嶋 雄一郎、岸本 友良、深尾 亜喜良、武田 耕哲、坂本 博、藤原 俊伸、井上 邦夫 microRNA 経路の中核因子 TNRC6A は複数のメ

カニズムを介して標的 mRNA を抑制する
第 33 回日本分子生物学会年会
神戸ポートアイランド、2010

⑥ 三嶋 雄一郎、岸本 友良、深尾 亜喜良、武田 耕哲、坂本 博、藤原 俊伸、井上 邦夫 microRNA 経路の中核因子 TNRC6A は複数のメカニズムを介して標的 mRNA を抑制する 第 2 回 RNAi 研究会 グランドプリンスホテル広島、2010

⑦ Mishima Y、Fukao A、Kishimoto T、Sakamoto H、Fujiwara T、Inoue K The Molecular Mechanisms of TNRC6 to Induce Translational Repression and Deadenylation in Zebrafish The 19th CDB Meeting - RNA Sciences in Cell and Developmental Biology 理化学研究所 CDB、2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三嶋 雄一郎 (MISHIMA YUICHIRO)
神戸大学・理学研究科・学術研究員
研究者番号：00557069