

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500458

研究課題名(和文)マイクロRNAによる神経細胞の発達制御機構の解析

研究課題名(英文)Regulation of neuronal development by microRNAs

研究代表者

安東 英明(Ando, Hideaki)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号：50373262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロRNA(miRNA)は、タンパク質をコードしない小さなRNAである。細胞内カルシウムチャネルであるIP3受容体の欠損マウスの脳の異常には、カルシウムより発現誘導されるmiRNAが関与している可能性が考えられる。本研究では、カルシウムシグナルの下流で神経細胞の発達・成熟を制御しているmiRNAの探索とその解析を行った。また、miRNAの活性や機能を解析するための新規技術の開発を行った。

研究成果の概要(英文)：MicroRNAs(miRNAs) are small non-coding RNAs. Abnormal brain development due to knockout of IP3 receptor, an intracellular calcium channel, may be attributable to aberrant expression of miRNAs. In this study, we searched and analyzed miRNAs regulated by calcium signaling. Additionally, we developed new technologies to analyze miRNA functions.

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：脳神経科学、神経化学・神経薬理学

キーワード：マイクロRNA

## 1. 研究開始当初の背景

マイクロ RNA (miRNA) は、タンパク質をコードしない約 20-25 塩基の小さな RNA である。miRNA は primary transcript として転写された後、RNA 切断酵素によるプロセッシングを受け、成熟 miRNA となる。成熟 miRNA は、標的遺伝子の mRNA に相補的に結合してタンパク質翻訳を抑制し、発生・分化など多様な生理現象を制御する。

一方、細胞内カルシウムチャネル  $IP_3$  受容体は、脳機能発現に重要な役割を果たす。 $IP_3$  受容体 I 型の部位特異的欠損マウスは、神経細胞の発達異常、樹状突起スパインの増加といった表現型を示す。miRNA は神経細胞の発達や、シナプス形成を制御することが報告されているため、これらの  $IP_3$  受容体 I 型欠損マウスの表現型にカルシウムにより発現誘導される miRNA が関与している可能性が考えられる。

また、我々はこれまでに、マウス脳や ES 細胞を用いた deep sequencing 解析により、前駆体 miRNA のループ部分に相当する低分子 RNA (miRNA-loop) を同定している。これらの miRNA-loop が生理的機能を持つのか、あるいは単なる miRNA プロセッシングの副産物であるのかは不明であった。

さらに、miRNA の生合成や機能を解析するためには、新たな実験技術の開発が不可欠と考えられる。例えば、従来では、miRNA の活性を任意のタイミングで局所的に制御することはできない。また、従来 miRNA の発現や活性を解析する方法の多くは細胞・組織の溶解や固定が必要であり、生きた細胞内の miRNA 活性をイメージングする技術は一般的には普及していない。そのため、生細胞内の miRNA のプロセッシングの kinetics や、in vivo での miRNA 活性の時空間的变化に関しては不明な点が多かった。

## 2. 研究の目的

### (1) $IP_3$ 受容体 I 型欠損マウスの表現型における miRNA の役割の解明

神経活動によるカルシウム濃度上昇により発現が誘導される miRNA や、 $IP_3$  受容体 I 型欠損マウスにおいて発現が変動している miRNA を同定する。これらの miRNA のマウス脳における発現領域、発現細胞を明らかにする。またこれらの miRNA による、神経細胞の樹状突起の発達・成熟、樹状突起スパインの形成、シナプス形成などの制御機構を解明する。さらに、miRNA の発現異常が、部位特異的  $IP_3$  受容体 I 型欠損マウスの表現型の原因である可能性を解明する。

### (2) miRNA-loop の発現・機能解析

マウス脳や ES 細胞を用いた deep sequencing で同定した miRNA-loop の発現お

よび機能を解析する。

### (3) 光活性型 miRNA の開発

任意のタイミングで局所的に miRNA を活性化する技術を開発する。すなわち、miRNA に光分解性の保護基を付加して miRNA 活性を一時的に抑え、照射により miRNA 活性を回復することが可能なケージ化 miRNA を開発する。このケージ化 miRNA を用いることにより、時空間的に制御された miRNA の活性化が可能になると期待される。

### (4) miRNA のイメージング技術の開発

生きた細胞内での miRNA 活性の経時的イメージングを可能とする新規 miRNA センサーを開発する。

## 3. 研究の方法

### (1) $IP_3$ 受容体 I 型欠損マウスにおける miRNA の発現解析

野生型マウス、および小脳中脳特異的  $IP_3$  受容体 I 型欠損マウスの小脳から total RNA を精製し、miRNA マイクロアレイで発現が減少している miRNA を探索した。また、初代培養神経細胞を高濃度 KCl などで刺激し、発現が上昇する miRNA を miRNA マイクロアレイで探索した。

これらのスクリーニングで同定された miRNA について、マウス脳における発現領域および発現細胞を、locked nucleic acid 修飾したプローブを用いた in situ ハイブリダイゼーション法で解析した。さらに部位特異的  $IP_3$  受容体 I 型欠損マウスの脳切片を用いた in situ ハイブリダイゼーションを行い、野生型との発現を比較した。

### (2) miRNA-loop の発現・機能解析

マウス脳や ES 細胞における miRNA-loop の発現を定量的 PCR やノザンプロットングで解析した。また、miRNA-loop と Ago タンパク質との結合を免疫沈降と定量的 PCR により解析した。さらに、miRNA-loop の活性を培養細胞を用いたルシフェレースアッセイにより解析した。

### (3) 光活性型 miRNA の開発

miRNA の合成 2 本鎖 RNA のリン酸基に、光分解性のケージング試薬を反応させ、ケージド miRNA の合成及び精製を行った。

次に、培養細胞を用いてケージド miRNA の活性の確認を行った。3' UTR に miRNA のターゲット配列をもつレポーター遺伝子とともにケージド miRNA を培養細胞に導入し、ケージ化により miRNA の活性が抑制されていることを確認した。

さらに、細胞に紫外光を照射することにより、miRNA の活性が回復するかどうかを評価した。

### (4) miRNA のイメージング技術の開発

miRNA 活性をモニターする新規 miRNA センサーを作製した。このセンサーを発現する培養細胞に miRNA を導入し、miRNA センサーの蛍光量の経時的变化を解析した。

次に、培養器一体型蛍光量を用いて、miRNA センサーのシグナルの経時的变化の kinetics を、長時間タイムラプスイメージングで解析した。

また、マウス ES 細胞を神経系へ分化誘導する際に発現量が変動する miRNA を miRNA マイクロアレイで探索した。同定された miRNA に対する miRNA センサーを作製し、ES 細胞分化時の miRNA 活性の変化を測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) IP<sub>3</sub> 受容体 I 型欠損マウスにおける miRNA の発現解析

miRNA マイクロアレイによるスクリーニングにより、小脳中脳特異的 IP<sub>3</sub> 受容体 I 型欠損マウスの小脳で発現が低下している miRNA を同定した。また定量的 PCR により、この miRNA の発現が小脳中脳特異的 IP<sub>3</sub> 受容体 I 型欠損マウスの小脳で低下していることを確認した。次に、in situ ハイブリダイゼーションによりマウス脳でのこの miRNA の発現解析を行った。しかし、発現量が低いためか、これまでのところ十分なシグナルが得られていない。

一方、神経細胞の高濃度 KCl 刺激で発現が上昇する miRNA を miRNA マイクロアレイによるスクリーニングで同定した。in situ ハイブリダイゼーションでこの miRNA のマウス脳の発現を解析したところ、小脳プルキンエ細胞および海馬での発現が高いことが明らかになった。小脳中脳特異的 IP<sub>3</sub> 受容体 I 型欠損マウスでの発現を解析したところ、プルキンエ細胞での発現が低下している傾向が見られたものの、更なる確認が必要である。

今後は、これらの miRNA の発現をさらに解析するとともに、神経細胞における機能を解析する予定である。

##### (2) miRNA-loop の発現・機能解析

Deep sequencing で同定された miRNA-loop の発現を定量的 PCR で解析した。その結果、ES 細胞での miRNA-loop の発現が確認された。さらに、ES 細胞の分化により、miRNA-loop の発現が変動することを見いだした。また、HeLa 細胞に miRNA 遺伝子を導入すると、プロセッシングされて miRNA-loop が産生されることを確認した。また Ago タンパク質を免疫沈降したサンプルから RNA を精製し、定量的 PCR を行った結果、miRNA-loop が検出されたことから、miRNA-loop が Ago タンパク質と結合していることが明らかになった。

現在、HeLa 細胞を用いたルシフェーラスアッセイにより miRNA-loop の活性を測定して

いる。

##### (3) 光活性型 miRNA の開発

miRNA の合成 2 本鎖 RNA に、ケージ化試薬を反応させることにより、ケージド miRNA の合成を行った。HeLa 細胞に、レポーター遺伝子 (miRNA 標的配列を持つ GFP) とともにケージド miRNA を導入し、その活性を評価したところ、ケージ化することにより miRNA の活性が部分的に抑制されることが確認された。

さらに、光照射による miRNA 活性の回復を解析した。ケージド miRNA とレポーター遺伝子を HeLa 細胞に導入後、紫外光を照射し、GFP 蛍光を評価した。その結果、紫外光照射によりわずかながら miRNA の活性が回復していることを見いだした。しかしながら、その効率は実用にはまだ不十分で、今後のさらなるケージ化効率、光による活性化効率の改良が必要と考えられる。

##### (4) miRNA のイメージング技術の開発

生細胞内での miRNA 活性をリアルタイムで測定するための新規蛍光センサーの開発を行った。この蛍光センサーを用いて、HeLa 細胞内で miRNA の発現が誘導されてからプロセッシングをうけて活性化するまでの kinetics をタイムラプスイメージングで観察することに成功した。

また、マウス ES 細胞が神経系へ分化する際の miRNA 活性の経時的变化の測定を行った。さらに蛍光波長の異なる 2 種類の蛍光センサーを開発し、2 種類の miRNA の活性化の kinetics を同時に測定することに成功した。

この新規 miRNA センサーを用いることにより、従来解析が難しかった in vivo での miRNA 活性の時空間的变化の解析が可能になることが期待される。

#### 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4件)

1. Ando H, Kawaai K, Mikoshiba K. IRBIT: A regulator of ion channels and ion transporters. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* (査読有り) doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.01.031, 2014.
2. Park S, Shcheynikov N, Hong JH, Zheng C, Suh SH, Kawaai K, Ando H, Mizutani A, Abe T, Kiyonari H, Seki G, Yule D, Mikoshiba K, Muallem S. Irbit mediates synergy between ca(2+) and cAMP signaling pathways during epithelial transport in mice. *Gastroenterology* (査

読有り) 145(1):232-241, 2013.

3. Lesiak A, Pelz C, Ando H, Zhu M, Davare M, Lambert TJ, Hansen KF, Obrietan K, Appleyard SM, Impey S, Wayman GA. A genome-wide screen of CREB occupancy identifies the RhoA inhibitors Par6C and Rnd3 as regulators of BDNF-induced synaptogenesis. *PLoS One* (査読有り) 8(6):e64658, 2013.
4. Yang D, Li Q, So I, Huang CL, Ando H, Mizutani A, Seki G, Mikoshiba K, Thomas PJ, Muallem S. IRBIT governs epithelial secretion in mice by antagonizing the WNK/SPAK kinase pathway. *J. Clin. Invest.* (査読有り) 121(3):956-965, 2011.

[学会発表](計1件)

1. Multiple functions of an IP3 receptor binding protein, IRBIT. Ando H, Shirakabe K, Kiefer H, Mizutani A, Yamada H, Seki G, Yang D, Muallem S, Mikoshiba K. The 10th JBS Biofrontier Symposium: New Aspects of Phospholipid Biology and Medicine 2011. 2011年11月15日、ルイガンスホテル(福岡)

[産業財産権]

取得状況(計1件)

1. 名称: Control of intercellular target molecule by IP3 receptor-binding protein  
発明者: Mikoshiba K, Ando H, Mizutani A  
権利者: 科学技術振興機構  
種類:  
番号: 第2014297号  
取得年月日: 2013年3月13日  
国内外の別: ヨーロッパ

[その他]

ホームページ等

<http://mikoshiba-lab.brain.riken.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安東 英明 (Ando, Hideaki)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号: 50373262

(3) 連携研究者

久恒 智博 (Hisatsune, Chihiro)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号: 10321803

菅原 健之 (Sugawara, Takeyuki)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

研究者番号: 70584522

古田 寿昭 (Furuta, Toshiaki)

東邦大学・理学部・教授

研究者番号: 90231571