

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570265

研究課題名(和文)生殖腺特異的microRNAの機能解析と分子ネットワークの解明

研究課題名(英文)Molecular network and functional analysis of gonad specific microRNA

研究代表者

高田 修治(TAKADA, Shuji)

独立行政法人国立成育医療研究センター・システム発生・再生医学研究部・部長

研究者番号：20382856

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：生殖腺でのmicroRNAの機能を解析するため、生殖腺で特異的に発現しているmicroRNA-202の機能解析を行った。microRNAは標的となるmRNAを介して機能するため、microRNA-202の標的をルシフェラーゼレポーターを用いた方法により同定した。また、microRNA-202のin vivoでの機能を解析するため、TALENを用いたゲノム編集により実行した。巨視的解析では異常は観察されていない。

研究成果の概要(英文)：In order to analyze functions of microRNA in gonadogenesis, functions of microRNA-202, which is expressed specifically in gonads, were studied. Since microRNA functions through target mRNA, a target of microRNA-202 was screened by luciferase reporter assay. Also microRNA-202 KO mouse was established by genome editing utilizing TALEN system. The microRNA-202 KO mouse did not show abnormality by macroscopic specification.

研究分野：発生生物学

科研費の分科・細目：遺伝子発現調節

キーワード：microRNA セルトリ細胞 フォリキュラー細胞 性分化

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究代表者はマウスを用いた microRNA の大規模プロファイリング実験により、microRNA-202 が生殖腺特異的 microRNA であるデータを得ていた。その発現は生殖腺の形成時から成獣になるまで生殖腺で続くため、生殖腺での microRNA の機能解析によりモデル遺伝子であると考えられた。

(2) microRNA-202 はヒトにおいては 10 番染色体長腕の末端 (10qter) に存在し、この座位は性分化疾患に関与することが知られている (Ogata et al., *Kidney International* 58:2281-2290 (2000))。microRNA-202 の発現時期、染色体上の位置から microRNA-202 は性分化疾患の責任遺伝子の可能性が考えられる。

2. 研究の目的

生殖腺の発生と分化をモデルにノックアウトマウスの作製や転写調節、標的遺伝子の同定により組織特異的 microRNA の分子ネットワーク (転写→microRNA-202→標的遺伝子→機能) を解明することを目標とする。また、microRNA-202 はヒトゲノムにおいては性分化疾患座位 (10qter) に存在するため、microRNA-202 が生殖腺形成に関与している可能性をノックアウトマウスの作製により検討する。

3. 研究の方法

(1) microRNA-202 ノックアウトマウスの作製。成熟型の microRNA-202 を認識する transcription activator-like effector nucleases (TALEN) の RNA をマウスの前核期受精卵に顕微注入により導入し、マウス個体を作製した。得られたヘテロ変異マウスを野生型マウスにかけ合わせることで、雄と雌の F1 ヘテロマウスを作製した。F1 ヘテロマウス同士をかけ合わせ、F2 のノックアウトマウスを作製した。ノックアウトマウスに性分化疾患が起こっていないか外生殖器を観察した。

(2) microRNA-202 の標的遺伝子の同定。強制発現用のプロモーター下に配したルシフェラーゼレポーター遺伝子の 3' UTR 部分にヒト cDNA ライブラリーを挿入したライブラリー (約 5,000 クローンからなる) を 384 プレートに分注したセットを用いた。このセットにリバーストランスフェクション法を用いて、microRNA-202 発現ベクターまたはコントロールとして microRNA の存在しない発現ベクターと共に HEK-293T 細胞にそれぞれトランスフェクションし、ルシフェラーゼアッセイによりスクリーニングを行った。一次、二次、三次スクリーニングを行い、標的を同定した。

(3) microRNA-202 の強制発現による効果の検討。microRNA-202 のゲノム領域をインサートとして含有する大腸菌人工染色体 (BAC) を購入し、精製後マウスの前核期受精卵に顕微注入することによりマウス個体を作製した。得られたトランスジェニックマウスを野生型マウスにかけ合わせた。

(4) microRNA-202 の標的の強制発現による表現型の解析。(2) により同定した microRNA-202 の標的候補の open reading frame と internal ribosome entry site (IRES)-DsRed をゲノム上の microRNA-202 の上流配列に連結した配列をマウスの前核期受精卵に顕微注入により導入し、マウス個体を作製した。

4. 研究成果

(1) マウス胚性幹細胞 (ES) 細胞を用いることにより microRNA-202 のノックアウトマウスの作製を試みたが、ノックアウトマウス作製には至らなかった。しかし、ゲノム編集によるノックアウトマウスの作製法が研究室内で完成したため、TALEN によるゲノム編集により microRNA-202 のヘテロ変異を持つマウスを作製した。このマウスをかけ合わせることで変異をホモに持つノックアウトマウスを得た。外生殖器の観察からは一見正常であった。胎仔期の生殖腺の形態や組織像、成獣での精巣と卵巣の大きさや形態、組織像解析が待たれる。

(2) microRNA は標的となる mRNA の翻訳抑制や分解により機能するため、microRNA の機能を解析するには標的 mRNA の同定は重要である。そのため、方法 (2) の一次スクリーニングを実行することにより、66 の mRNA が候補としてリストアップした。その 66 の候補をそれぞれスケールアップして詳細に標的である可能性を検討したところ、Activin receptor type 1A (Acvr1a) が標的となることが明らかとなった。通常 microRNA の標的を探索する場合、インターネットで利用可能な塩基配列情報から推測する Target Scan などのソフトウェアを用いることが多いが、経験的にこれらのソフトウェアでは同定が難しかったため、本研究では生化学的な方法を用いた。今回同定した Acvr1a はインターネットで利用可能な塩基配列情報から推測するソフトウェアでは標的候補としてはリストアップされていない。そのため、まだソフトウェアのアルゴリズムには組み込まれていない、または未知の microRNA の認識機構が存在する可能性がある。本研究では microRNA-202 が認識している Acvr1a の配列の同定を試みた。そのために、Acvr1a の nested deletion clones を作製し、それぞれを強制発現用プロモーター下に配したルシフェラーゼレポーター遺伝子の 3' UTR として組み込んだレポーターベクターを構築し

た。それぞれを microRNA-202 強制発現ベクターと共に培養細胞へトランスフェクション後、ルシフェラーゼアッセイを行った。しかし、明瞭に標的である配列を検出することはできなかった。実験系に問題があった可能性もまだいまのところ否定できないが、複数箇所認識部位が存在するためにこの方法では検出できなかったのかもしれない。今後これらの可能性を考え、microRNA-202 が認識する Acvrla の配列を同定しなければならない。

(3) microRNA-202 の機能解析をノックアウトマウスの作製による loss-of-function の実験と共に、トランスジェニックマウスの作製による gain-of-function により計画した。microRNA-202 は生殖腺内の支持細胞特異的に発現しているため、胎仔期支持細胞特異的プロモーター下に microRNA-202 を結合したトランス遺伝子を用いてトランスジェニックマウスを作製する必要がある。しかし、そのようなプロモーターは知られていないため、BAC をトランス遺伝子としたトランスジェニックマウスの作製を行った。トランスジェニックマウスを 1 頭得る事ができたため、野生型マウスとかけ合わせ F1 を得る事により解析に必要なトランスジェニックマウスの頭数を得る事を計画した。しかし、得られた F1 マウスはすべて野生型であったため、解析ができなかった。

(4) (2) の実験により、microRNA-202 は Acvrla を介して機能していることが推測された。生殖腺の支持細胞の正常な発生、分化、あるいは機能に Acvrla が抑制されていることが必要であると考えられる。そのため、microRNA-202 の発現量の減少が性分化疾患に関与しているならば、Acvrla の翻訳が正常より高くなっているためであると考えられる。このことを検討するため、Acvrla の強制発現による機能解析を計画した。ただ、上記(3)に記したように適切なプロモーターは知られておらず、BAC での作製も難しい可能性がある。そのため、microRNA-202 のプロモーターに相当すると考えられるマウスゲノムの microRNA-202 の上流配列をプロモーターとして用いて Acvrla のトランスジェニックマウスの作製を試みた。マウス受精卵への顕微注入により行ったが、トランスジェニックマウスを得ることができなかった。今後、トランスジェニックマウスを作製し直し、表現型の解析が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

- ① Kato T, Miyata K, Sonobe M, Yamashita S, Tamano M, Miura K, Kanai Y, Miyamoto S, Sakuma T, Yamamoto T, Inui M, Kikusui T, Asahara H, Takada S. Production of Sry knockout mouse using

TALEN via oocyte injection. *Sci Rep*. 2013; 3: 3136. 査読有
doi: 10.1038/srep03136.

- ② Takada S, Sato T, Ito Y, Yamashita S, Kato T, Kawasumi M, Kanai-Azuma M, Igarashi A, Kato T, Tamano M, Asahara H. Targeted gene deletion of miRNAs in mice by TALEN system. *PLoS One*. 2013; 8(10): e76004. 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0076004.

〔学会発表〕(計6件)

- ① 加藤朋子, 宮田康平, 園部未来, 山下聡, 玉野萌恵, 宮本新吾, 佐久間哲史, 山本卓, 乾雅史, 菊水健史, 浅原弘嗣, 高田修治, TALEN 技術を用いた Sry KO マウスの作出、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 5 日、神戸ポートアイランド(兵庫)
- ② 山下聡, 加藤朋子, 山口勝司, 重信秀治, 乾雅史, 高田修治, 浅原弘嗣, SOX9 はオス生殖腺において Dhh の発現を直接制御する、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 5 日 1、神戸ポートアイランド(兵庫)
- ③ 乾雅史, 加藤朋子, 五十嵐ありさ, 浅原弘嗣, 高田修治, ハイスループット・スクリーニング系を用いた卵巣形成関連候補因子の制御因子の探索、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 5 日、神戸ポートアイランド(兵庫)
- ④ Shuji Takada, MicroRNA-202 is specifically expressed in the gonads through early to terminal differentiation stages in the mouse. Sixth International Symposium on The Biology of Vertebrate Sex Determination, 2012 年 4 月 25 日、King Kamehameha's Kona Beach Hotel (Hawaii, USA)
- ⑤ 高田修治, 生殖腺特異的マイクロ RNA の同定と機能解析 (Identification and characterisation of gonad-specific microRNA). 第 35 回日本分子生物学会年会: ワークショップ「哺乳類の性分化・性成熟の新知見: 性腺機能を制御する遺伝子ネットワークとその破綻による疾患」、2012 年 12 月 13 日、福岡国際会議場(福岡)
- ⑥ 高田修治, 渡辺義隆, 久貝朋子, 玉野萌恵, 五十嵐ありさ, 浅原弘嗣, microRNA-202 は生殖腺特異的に生殖腺の分化初期から発現する、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、パシフィコ横浜(神奈川)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 修治 (TAKADA, Shuji)

独立行政法人国立成育医療研究センター・システム発生・再生医学研究部・部長

研究者番号：20382856