

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011 ~ 2012

課題番号：23770240

研究課題名（和文） 機械刺激依存的なマイクロ RNA の発現制御機構と生体内での機能の解析

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

研究代表者

宮坂 恒太 (Miyasaka Kota)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：20590300

研究成果の概要（和文）：

研究代表者の解析により、microRNA の機械刺激依存的なプロモーターを同定し、蛍光タンパクを繋げてゼブラフィッシュに導入することで、拍動依存的に心臓に蛍光を発するゼブラフィッシュを作出することに成功した。さらに、microRNA の下流の因子を網羅的に解析することにより、下流因子を同定し、そのノックアウトマウスを作成して解析を行った。すると、脂質代謝の亢進、および運動耐性の上昇が観察された。

研究成果の概要（英文）：

I identified mechanical-stress dependent promoter of microRNA. The promoter was ignited by heart beating and shear stress of zebrafish hearts and the activation of this promoter could detect by fluorescence microscopy in real time. I knocked out the specific gene that is downstream target of stress-dependent miRNA. The knockout mice showed the enhancement of lipid metabolism and endurance exercise capacity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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： 機械的刺激、マイクロ RNA

1. 研究開始当初の背景

発生期の心臓は身体の全ての器官の中で最も早く形成され、かつ機能する、非常に重要な器官であり、その発生過程は多くの生物において高度に保存されている。しかし、心臓予定中胚葉の側方から正中への移動の制御機構と、中胚葉の融合後に生じる心房・心

室の領域決定に関しては、機能する因子も全くわかっておらず、心臓形成のブラックボックスともいえる分野であった。心臓中胚葉の正中への移動機構は、申請者の以前の研究から明らかとなったが、心臓の心房・心室や房室弁の領域形成機構は不明であった。

このテーマは、ヒトの胎生致死の原因として最も多い重篤な心奇形の発生機構の解明

につながることから、分子生物学の創世期から研究されてきたが(Srivastava ら、2000)、その機構を説明するには不十分である。そこで申請者は胚発生中に心拍動を停止させると、心臓発生が正常に進行しなくなるという報告に着目した(Hove ら、2003)。このことは心臓発生には生化学的シグナル伝達による遺伝子の発現制御だけではなく、拍動や血流などの機械的刺激(メカニカルストレス)をきっかけとする遺伝子の発現制御機構が存在することを示唆している。申請者はメカニカルストレスと心臓発生を架橋する因子の候補として microRNA に着目し、**Dre-miR-143 (miR-143)** を同定した。ゼブラフィッシュを用いた解析から、miR-143 は拍動依存的に心室のみに発現し、レチノイン酸(RA)シグナルを制御することで、心房と心室の境界を決定していることが明らかとなった。

これまでの研究で、拍動依存的な miRNA の発現制御という現象は同定できたが、メカニカルストレスにตอบสนองして miRNA の発現が上昇するための機構は未解明のままである。miR-143 に関しては、転写がどこから開始され、どんな因子によって誘導されるのかも不明であり、miRNA のプロモーターや発現制御の解析はほとんど行われていないのが現状である。申請者はこのプロモーター領域を詳細に解析することによって、これまで想定されていなかった、メカニカルストレス依存的な転写の制御機構の解明と、ストレスに応じた生体反応の機構が解明できるものと考えた。

2. 研究の目的

本申請研究の目的は、メカニカルストレスによる microRNA の発現制御機構(メカノトランスダクション)を解明し、ストレスに応じた microRNA の機能を解析することである。近年の報告により、拍動や血流などのメカニカルストレスが心臓や血管形成に必須であることが明らかとなってきたが、実際にメカニカルストレスと器官形成を架橋する因子の同定には至っていない。そこで申請者は酸化ストレスや熱ストレスなど、生体に負荷される様々なストレスにตอบสนองして発現することが報告されている microRNA に着目し、メカニカルストレスと生命現象を架橋する因子と想定した。

3. 研究の方法

本申請研究の実施予定期間は 2 年間とする。この間に、現在までに実施した予備実験の結果を元に、(1)メカニカルストレスによる miR-143 の発現制御機構の解明と、(2)脂

肪分化制御における miR-143/145 の機能解析、の 2 つの課題に関して研究を遂行する。

研究目的(1)に関する研究内容

予備的な実験により予想されたプロモーター領域をレポーター遺伝子につなぎ、種々の転写因子を用いたプロモーターアッセイを行う。検証に使用する因子は、ストレス応答性が報告されている、MAPKシグナルの転写因子やPPARをはじめとする核内受容体を検討している。さらにメカニカルストレスが転写因子を介さず、直接、miR-143 の発現を亢進する可能性を考慮して、miR-143 を含むBACクローンを入手し、miR-143 を luciferase と置換して組み換え細胞を作出し、その細胞に伸展刺激やせん断応力をかけることで、刺激に応じた miR-143 の変化を検出する。その際には発光を検出可能な高感度CCDカメラを使用し、『力』の可視化を試みる。使用する培養細胞は、ストレスに恒常的に曝される細胞が妥当であり、ヒト臍帯血管内皮細胞、マウス筋芽細胞、線維芽細胞、ラット心筋細胞を考えている。

また、shRNA を用いて LINC 複合体の構成因子の機能阻害を誘導した際にメカニカルストレスに対する反応性が変化するかを確認する。さらに、ゲノム上の miR-143 の近傍に LacO 配列を挿入し LacI-GFP と結合させることで、メカニカルストレスによる miR-143 を含むゲノム領域の核内での位置の変化を可視化する。これにより、世界初のメカニカルストレス反応性を有する転写制御領域の同定を試みる。

研究目的(2)に関する研究内容

初年度中の早い時期に KO ベクターを用いて、miR-143 KO マウスの作出に取り掛かる miR-143/145 の KO マウスを維持・管理する傍ら、RA シグナルと miR-143/miR145、それぞれが脂肪分化を制御することを確認する。その際には、メカニカルストレスとの関係も考慮し、細胞伸展や miR-143 の過剰発現/機能阻害、RA シグナルの活性化/抑制による分化効率の違いを検討する。

平成 24 年度(最終年度)

研究目的(1)に関する研究内容

メカニカルストレス反応性を有するプロモーターの解析を継続し、いくつかの候補を、ライブイメージングが容易なゼブラフィッシュに導入し、心拍動や血液循環の停止、血圧の上昇を強制的に誘導した際に、内在性の miR-143 の発現変動を模倣できるかを確認

する。結果をまとめて機械刺激に応じた miRNA の発現制御機構を解明したという趣旨で論文を投稿する。

研究目的(2)に関する研究内容

細胞での解析に続いて、代謝における miR-143 の機能解析は、メタボリズムの解析が容易なマウスを用いて行う。miR-143/145 ノックアウトマウスは心室の低形成や、脂肪代謝の異常など、発生期だけでなく成体における表現形が予想される。そこで発生初期では、心臓の形態に特に着目して表現型解析を行う。その際にはゼブラフィッシュにおける miR-143 のノックダウン胚の表現型との比較も十分に行う。加えて成体では、大動脈窄縮術（成体の大動脈弓を結紮することで左心室へのメカニカルストレスを増大させ肥大型心筋症のモデルマウスを作出するための施術）への反応性を観察し、マラソン耐久テスト（強制的な連続運動をマウスが疲れ果てるまで繰り返す実験）により骨格筋のリモデリング状態や代謝活性を観察する。さらに、代謝異常マウスの解析に多用される、高脂肪食飼育、寒冷暴露など、多様な解析を行い、全身性の代謝における miR-143 の機能を考察する。

以上の結果をまとめて、miR-143/RA シグナルを介したメカニカルストレスによるメタボリズムの制御機構として論文を投稿する。

4. 研究成果

本研究の目的は、メカニカルストレスによる microRNA の発現制御機構（メカノトランスダクション）を解明し、ストレスに応じた microRNA の機能を解析することである。

近年の報告により、拍動や血流などのメカニカルストレスが心臓や血管形成に必須であることが明らかとなってきたが、実際にメカニカルストレスと器官形成を架橋する因子の同定には至っていない。そこで申請者は酸化ストレスや熱ストレスなど、生体に負荷される様々なストレスに応答して発現することが報告されている microRNA に着目し、メカニカルストレスと生命現象を架橋する因子と想定した。さらに予備的な実験により、幾つかの miRNA は脂肪分化・代謝に関与していることが明らかとなった。このことから、運動すなわち、メカニカルストレスによる脂肪代謝の制御にも miRNA が関与している可能性が考えられる。これらに着想された本研究では、(1)メカニカルストレスによる miRNA の発現制御機構の解明、(2)脂肪分化

制御における miRNA の機能を生体レベルの解析を目的とした。

初年度の解析により、microRNA の機械刺激依存的なプロモーターを同定し、蛍光タンパクを繋げてゼブラフィッシュに導入することで、拍動依存的に心臓に蛍光を発するゼブラフィッシュを作出することに成功した。最終年度にはその microRNA の機能解析を進め、論文を投稿した(投稿中)。

しかし、機械刺激依存的な miRNA のプロモーターは種間で高度に保存されながらも、マウスやニワトリのプロモーターを用いた蛍光発現解析やルシフェラーゼアッセイでは、機械刺激依存的な蛍光や発光が起こらなかった。この miRNA の発現自体はマウスでもニワトリでも機械刺激依存的であることが確かめられているため、ゼブラフィッシュで見られたような機械刺激依存的な発現には他のエンハンサーの存在が必要である可能性が示唆される。したがって今後は、機械刺激依存的に発現することが分かっている、他の miRNA のプロモーター等を比較解析することで、よりゲノム上の領域を限定していくことで、機械刺激依存的なプロモーターの同定を継続していきたい。だが、すくなくともゼブラフィッシュにおいては機械刺激依存性を示すレポーターが完成したので、全身に発現させることで、胚発生期に細胞同士がどれほどの『力』がかかっているのか、細胞移動の際には、どの程度の『力』を発生させているのかななどを可視化することができるようになった。また、心血管系に発現させることで、高負荷のせん断応力のかかる部位を特定することができるため、さらに研究を進めることで、負荷の増大に伴って引き起こされる心血管疾患等の発症や予防に関する新たな知見を得ることができると期待される。

また、LINC 複合体は細胞質の Plectin と Nesprin、核膜上の Sun / KASH protein と LaminA によって構成されているが、培養細胞を用いたノックダウンでは高い効率で細胞が細胞死を起こしてしまうため、研究を遂行するのが極めて難しかった。特に LINC 複合体において、重要な役割を示すことが想定される Sun1 および Sun2 のノックダウンでの細胞死の割合が高かった。しかし、このことは LINC 複合体がなくなったことにより、細胞が基質との接着ストレスや培養液からの静水圧などのメカニカルストレス、常時変化する周囲の環境に適応できなくなった結果とも考えられる。今後はタモキシフェン誘導型の Cre リコンビナーゼを用いた、LINC 複合体の条件的ノックダウンの系を培養細胞において確立し、メカニカルストレス負荷前にノックダウンすることで、純粋にメカニ

カルストレスに対する LINC 複合体の機能を解析する予定である。今回の研究では実験系を立ち上げるまでに至らず、細胞死と他のストレスとの関係性の解析はできなかったが、実験系が構築でき次第、研究を進めていく。

microRNA による代謝制御に関しては、miR-143 および miR-145 のノックアウトでは発生期に大きな表現型が出るうえに、条件的ノックアウトも用いても、下流の様々な因子の発現に影響が出てしまうため、代謝に絞った解析が困難であった。そこで、microRNA の下流で代謝に関与する因子を網羅的に解析し、筋芽細胞である C2C12 での筋分化制御や、脂肪芽細胞の 3T3-L1 用いた脂肪分化および脂肪分解等の予備的な実験を行った結果、ある特定の因子を同定し、そのノックアウトマウスを作成して解析を行った。すると、脂質代謝の亢進、および運動耐性の上昇が観察された。このマウスでは耐久トレーニング（トレッドミルテスト）依存的に、白色脂肪および肝臓で発現が上昇し、野生型マウスに比べて脂質代謝関連マーカーの発現が上昇した。さらに血中の脂肪酸量の増加、ATP 産生の増大を示した。運動後には乳酸値の減少と糖消費の減少が観察され、糖代謝の抑制が示唆された。同時に脂肪酸β酸化律速酵素の活性上昇がおこっており、運動継続可能時間および走行距離が増大した。このマウスはいわばマラソンマウスであり、この因子の機能を解析し、創薬のターゲットとすれば、経口摂取するのみで運動したものと同等の効果をもたらすいわゆる、エクササイズピルの開発にもつながりうる成果である。

しかし、この因子は転写因子ではなく、特徴的な酵素活性を有するようなモチーフも含まない。モチーフ解析の結果からは、DNA とタンパク、またはタンパクとタンパクの相互作用に関与することが推測されるため、現在、標的を探索中である。標的の探索は磁性ビーズにこの因子を固定しての、アフィニティ精製により行っており、いくつかの新規標的候補が同定されている。中でも運動などの刺激依存的に脂肪や筋肉で発現が誘導され、脂肪分解および脂肪酸β酸化に関与する因子も同定されており、ノックアウトマウスではこの新規標的因子の活性が増加していることも確かめられた。この因子は核内受容体の一種であり、リガンドが不明のオーファン受容体である。すなわち申請者が同定した、miRNA の下流に存在するこの因子が子の核内受容体に直接結合し、下流の代謝関連因子の発現を網羅的に抑制している可能性も考えられる。今後は標的因子の探索及び機能解析に焦点を当てて解析を進める予定であり、本解析は論文投稿へ向け、鋭意継続中である。

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)

[学会発表] (計 4 件)

1. 宮坂恒太, 褐色脂肪研究の新展開 — 新規定量法の開発とマウスの表現型解析 — 第 66 回日本栄養・食糧学会(招待講演), 2012 年 05 月 20 日, 宮城県

2. 宮坂恒太, 細胞へのミクロな力学作用が microRNA を介してマクロな心臓の形態を生み出すロジック, 第 5 回 Evo-Devo 青年の会 epigenetics から進化を理解する(招待講演), 2012 年 06 月 16 日, 愛知県

3. 宮坂恒太, メカニカルストレスは細胞内の代謝変化を誘導し細胞分化を制御する, 第 35 回日本分子生物学会, 2012 年 12 月 11 日, 福岡

4. 宮坂恒太, Mechanical stress induces muscle cell differentiation and adapts lipid metabolism to energy demand, 第 45 回日本発生物学会, 2012 年 05 月 28 日, 兵庫

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮坂 恒太 (Miyasaka Kota)
東北大学・加齢医学研究所・助教
研究者番号: 20590300

(2)研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3)連携研究者

なし ()

研究者番号: