

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：32625

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2015

課題番号：24650505

研究課題名(和文) 離乳期におけるラクターゼ発現低下への非コードRNAの関与

研究課題名(英文) Relations of the micro RNA to the lactase gene expression in the weaning period.

研究代表者

福島 亜紀子 (Fukushima, Akiko)

女子栄養大学・栄養学部・教授

研究者番号：50327962

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ラクターゼは哺乳動物の小腸に発現し、母乳中の唯一の糖質である乳糖を加水分解する酵素である。この活性は哺乳期には高く離乳期に至るまで著明に発現低下するが、その低下機構は未だ明らかにされていない。本研究では低分子RNA(microRNA; miRNA)がラクターゼ遺伝子の転写レベルの抑制にはたらいているという仮説に基づき検証を行った。miRNAを3D-Gene® miRNA Oligo chipを用い網羅的に解析すると哺乳期より離乳期以後で発現の高い複数の低分子RNAが存在した。しかし、候補miRNAとラクターゼmRNA、ラクターゼの転写活性化因子mRNAと比較しても相補性ではなかった。

研究成果の概要(英文)：Lactase is an enzyme that is expressed in the small intestine of mammals. It hydrolyzes lactose, the only sugar present in maternal milk. There is high lactase activity during the lactation period, followed by a notable downregulation until the weaning period, but the mechanism behind this downregulation has yet to be clarified. The present study aimed to verify the hypothesis that a low molecular weight RNA (microRNA; miRNA) inhibits the transcription of the lactase gene. miRNAs were comprehensively analyzed using a 3D-Gene® miRNA Oligo chip, and the results showed the presence of multiple types of miRNAs that were expressed at a higher level from the weaning period onward than during the lactation period. However, it was not possible to confirm any complementarity between the candidate miRNAs and mRNAs for lactase or for transcription activating factors.

研究分野：栄養学

キーワード：ラクターゼ microRNA 転写抑制

1. 研究開始当初の背景

(1) ラクターゼの成長過程における特異的な発現パターンの変化

ラクターゼ-フロリジン加水分解酵素(ラクターゼ)は、哺乳動物の小腸粘膜細胞に存在し、母乳中に含まれる唯一の炭水化物源であるラクトースを加水分解する。ラクターゼは出生時を頂点として離乳期に至るまで著明に発現低下することが知られているがその低下機構は未だ明らかにされていない。

(2) b)ラクターゼ遺伝子発現解析の現状

ヒトラクターゼは1991年には遺伝子構造が明らかにされ、その後、発現に関わるシス配列の同定と結合因子の解析が進められた。小腸細胞様の培養細胞であるCaco-2細胞が解析に用いられたが、未分化のCaco-2細胞はラクターゼを発現しておらず、増殖、分化させることにより発現量が上昇してくる。Caco-2細胞を用いた転写因子が複数報告されたが、個体に戻って解析を進めると成長の過程のラクターゼ発現変動と合わないなど原因転写因子は同定に至っていない。また、培養細胞系では、成長に伴うラクターゼ発現低下は再現できないため、ラクターゼ遺伝子の5'上流領域を導入したトランスジェニックマウスを用いた解析が進められ、シス配列の位置は報告されたが、関与する因子の同定には至っていない。

(3) 乳糖不耐症遺伝子多型からの解析

ヒトは哺乳動物の中でも例外的に離乳後も乳糖を摂取する機会があり、ラクターゼ発現が哺乳時期よりも低いがある程度維持されている。このラクターゼ発現には個体差(人種差)があり、遺伝子多型解析の結果より個人差には5'上流-13910 C>Tの関与が報告されている。今年、ヒト乳幼児の腸管生検細胞を用いて多型によるラクターゼ mRNA 量、酵素活性に関する報告があり、多型により有意な mRNA 量、酵素活性の低下を示し、乳糖不耐症の原因多型であることは明らかになったが、どの多型でもラクターゼ発現の低下は確認され、発現低下機構の解明には至っていない。

(4) これまでの研究成果を踏まえ着想に至った経緯

我々は1987年よりラクターゼの離乳期における発現低下機構を解明するためにタンパク質精製、cDNA 決定の研究に関わっていた。また、ラット離乳期に離乳延長させることによる影響を解析し、離乳期に起きるラクターゼ発現低下は強固に規定されており、餌の操作では変化しないこと、また、発現低下は転写レベルで調節されていることを報告した(Motohashi Y, Fukushima A, et al. Lactase decline in weaning rats is regulated at the transcriptional level and not caused by termination of milk ingestion., J Nutr.

1997,127, 1737-43.)。また、他の課題にも着手し、培養細胞を用いたレポーターアッセイを始め、分子生物学的な様々な手法を自由に扱えるようになった(Fukushima A, et al. Short-chain fatty acids induce intestinal transient receptor potential vanilloid type 6 expression in rats and Caco-2 cells. J Nutr. 2009 ;139:20-5.)。

2. 研究の目的

ラクターゼ-フロリジン加水分解酵素(ラクターゼ)は、哺乳動物の小腸粘膜細胞に存在し、母乳中に含まれる唯一の炭水化物源であるラクトースを加水分解する。ラクターゼは胎生期後半より発現し、出生時を頂点として離乳期に至るまで著明に発現低下することが知られているがその低下機構は未だ明らかにされていない。従来の発現機構解析は、主に遺伝子配列とその結合タンパク質の解析から進められてきたが、現在までにラクターゼの発現低下機構を解明した報告はない。近年、細胞内で発現している RNA の中にタンパク質をコードしていないが、低分子 RNA 自身が遺伝子発現を mRNA レベルで抑制することが示されてきている。また、クロマチン構造変化も視野に入れた解析方法によりラクターゼ発現低下の機構の解析を進める。

3. 研究の方法

Sprague-Dawley系ラット10日齢と10週齢の小腸上部1/4の部位よりmicroRNA(miRNA)画分を含む総RNAを抽出し、mRNA解析は3D-Gene®全遺伝子型DNA chip、miRNA解析は3D-Gene® miRNA Oligo chipを用いた解析を東レ株式会社に依頼しおこなった。

また、発現上昇が確認できたmiRNAについては、Sprague-Dawley系ラット2日、10日、5週、10週齢の小腸上部1/4の部位よりmicroRNA(miRNA)画分を含む総RNAを抽出し、定量的RT-PCR法により経日変化を調べた。

遺伝子配列情報の解析を「Target-ScanHuman」というソフトを用いて行い、ラクターゼやラクターゼの転写因子として報告されているCdx-2、Oct1、HNF-1αとのmiRNAの結合の可能性を解析した。

4. 研究成果

(1) 3D-Gene®全遺伝子型 DNA chip を用い、2 万個の遺伝子の解析を行った (図 1)。

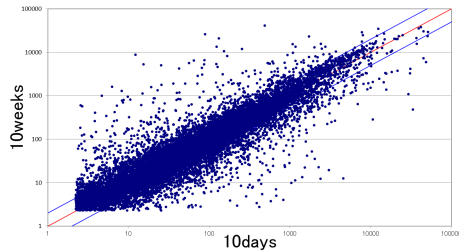


図 1. 3D-Gene®全遺伝子型 DNA chip

発現量が 10 日齢、10 週齢ともに 100 と比較的高く、10 日齢の方が 10 週齢より 8 倍以上発現が高かったものを表 1 に示す。この中には、ラクターゼ遺伝子 (Lct) も含まれ、9.7 倍の発現上昇であった。

表 1. 3D-Gene®全遺伝子型 DNA chip

	10days	10weeks	10days 10weeks
Cxcl11	1085	116	9.4
NP_001101662.1	1298	121	10.7
Slc17a5	1307	153	8.5
Lct	1594	165	9.7
Dpp7	1622	138	11.8
G6pc	1990	207	9.6
NP_001099836.1	2904	221	13.1
Ccdc151	3280	249	13.2
Naga	3622	264	13.7
Fbp1	6934	635	10.9
Pck1	10650	281	37.9
Lgmn	15605	1375	11.3
Hmgcs2	29476	1076	27.4
Apoc2	30854	3231	9.6
Fcgrt	33394	480	69.6

(2) 3D-Gene® miRNA Oligo chip を用い、680 個の miRNA の解析を行った (図 2)。

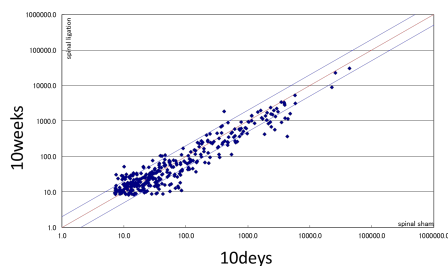


図 2. 3D-Gene® miRNA Oligo chip

10 日齢の方が 10 週齢より有意に発現量が高いものが 11 種類、10 週齢の方が 10 日齢よ

り有意に発現量が高いものが 25 種類 (表 2) あった。

この 25 種類のうちのいくつかの miRNA について、2 日、10 日、5 週、10 週齢での発現の変化をみると rno-miR-29a、rno-miR-142-3p は、5 週から 10 週にかけ急激な増加が確認された。

表 2. 3D-Gene® miRNA Oligo chip

	10days	10weeks	10weeks/10da ys
rno-miR-29a	415.1	1863.1	4.5
rno-miR-483	7.5	30.1	4.0
rno-miR-147	10.1	51.3	5.1
rno-miR-328a	13.9	28.7	2.1
rno-miR-34b	9.4	22.2	2.4
rno-miR-132	10.8	26.1	2.4
rno-miR-142-5p	46.4	108.1	2.3
rno-miR-142-3p	29.0	76.2	2.6
rno-miR-187	10.9	31.2	2.9
rno-miR-216a	20.5	51.2	2.5
rno-miR-222	9.9	24.5	2.5
rno-miR-290	9.6	28.2	2.9
rno-miR-23a*	12.1	26.2	2.2
rno-miR-672	10.5	22.8	2.2
rno-miR-146b	41.0	102.5	2.5
rno-miR-665	16.0	33.3	2.1
rno-miR-191*	8.1	23.8	3.0
rno-miR-200a*	20.9	48.3	2.3
rno-miR-210*	14.3	31.7	2.2
rno-miR-196c*	9.2	28.7	3.1
rno-miR-425*	14.2	33.5	2.4
rno-miR-770*	13.1	28.3	2.2
rno-miR-3547	13.0	28.9	2.2
rno-miR-3572	9.8	24.4	2.5
rno-miR-3593-3p	38.8	103.4	2.7

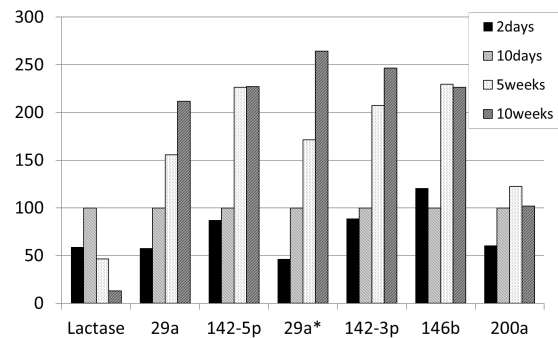


図 3. 発現上昇した miRNA の経日変化

(3) TargetScanHuman による解析

ラクターゼ

ラクターゼ mRNA の 3' 非翻訳領域に結合の可能性のある miRNA を抽出し、3D-Gene® miRNA Oligo chip で得られた発現量を比較した。3' 非翻訳領域に完全に相補的な配列を

もつ miRNA は、3D-Gene® miRNA Oligo chip には搭載されておらず、部分的に一致するものは7つあった。rno-miR-203 は、10 日齢と10 週齢では発現量は半分に減少しており、ラクターゼ発現低下には関与しないと示唆された。その他の日齢による変化がなかった(表3)。

表3.ラクターゼ遺伝子の3'非翻訳領域に部分的に結合するmiRNA

	10days	10weeks	
rno-miR-203	4450.9	1153.9	down*
rno-miR-664	59.5	49.9	
rno-miR-139-5p	36.7	39.1	
rno-miR-186	29.5	22.6	
rno-miR-883		9.3	
rno-miR-376c*			
rno-miR-299			

cdx-2

cdx-2 の3'非翻訳領域に完全に相補的な配列をもつ rno-miR-24 は3D-Gene® miRNA Oligo chip に搭載されていたが、その発現量は10日齢の方が10週齢より高く候補にはならなかった。また、部分的に一致するものはなかった。

Oct1

3'非翻訳領域に完全に相補的な配列をもつ mi 低分子 RNA は搭載されておらず、部分的に一致するものは5つあった。また、測定可能なものは4つで rno-miR-381 のみが10週齢が高くなっていますが発現量が低く、再検討が必要であった(表4)。

表4. Oct1 遺伝子の3'非翻訳領域に部分的に結合するmiRNA

	10days	10weeks
rno-miR-31	2402.0	679.6
rno-miR-324-5p	111.1	44.2
rno-miR-337	13.3	13.8
rno-miR-381	13.3	16.3
rno-miR-448*		

HNF-1α

3'非翻訳領域に完全に相補的な配列をもつ miRNA は搭載されておらず、部分的に一致するものは多く存在した。rno-miR-34b は2倍以上上昇していたが発現量が低く、再検討が必要であった(表5)。

表5. HNF-1α 遺伝子の3'非翻訳領域に部分的に結合するmiRNA

	10days	10weeks		10days	10weeks	
rno-miR-34b	9.4	22.2	up*	rno-miR-760-3p	28.8	32.2
rno-miR-150	4330.7	365.0	down***	rno-miR-484	25.3	23.4
rno-miR-31	2402.0	679.6	down*	rno-miR-188	22.0	17.6
rno-miR-301a	235.1	63.8	down*	rno-miR-382	21.2	12.1
rno-miR-22	976.0	440.3	down*	rno-miR-674-5p	20.3	25.0
rno-miR-103	2314.5	934.6	down*	rno-miR-328b-3p	19.6	
rno-miR-107	2141.2	827.8	down*	rno-miR-122	15.2	
rno-miR-130a	678.7	259.7	down*	rno-miR-328a	13.9	28.7
rno-miR-204	23.9	10.6	down*	rno-miR-330	12.9	
rno-miR-205	87.1	42.6	down*	rno-miR-344a-5p	10.6	14.1
rno-miR-328a*	385.6	721.0		rno-miR-349	7.3	
rno-miR-146a	342.9	318.1		rno-miR-485		15.5
rno-miR-7a	120.3	132.2		rno-miR-760-5p		15.0
rno-miR-214	120.0	78.6		rno-miR-326		14.4
rno-miR-130b	109.6	103.6		rno-miR-383		12.3
rno-miR-193	106.1	61.4		rno-miR-20b-3p		8.6
rno-miR-342-3p	70.3	63.7		rno-miR-211		
rno-miR-17-1-3p	63.5	78.1		rno-miR-879		
rno-miR-138	45.7	81.0		rno-miR-344a-3p		
rno-miR-146b	41.0	102.5		rno-miR-17-2-3p		
rno-miR-329	33.8	18.0		rno-miR-344b-5p		
rno-miR-301b	32.0	18.3		rno-miR-344b-2p		
rno-miR-327	30.4	33.2		rno-miR-344a		
				rno-miR-344b-1a		

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

福島亜紀子、山田和彦, ラット小腸粘膜上皮細胞の離乳期における遺伝子発現の網羅的解析, 68 回日本栄養・食糧学会大会講演要旨集 P.255(2014)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福島亜紀子 (FUKUSHIMA, Akiko)

女子栄養大学・栄養学部・教授

研究者番号: 5 0 3 2 7 9 6 2