

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658118

研究課題名(和文) 栄養応答におけるマイクロRNAの役割を探る

研究課題名(英文) Exploration of the role of microRNAs in nutrition response

研究代表者

加藤 久典 (Kato, Hisanori)

東京大学・総括プロジェクト機構・特任教授

研究者番号：40211164

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロRNA(miRNA)は、タンパク質に翻訳されない小さなRNAであり、様々なmRNAに作用して遺伝子の発現を制御する。栄養条件の変化により量が変わるmiRNAを探索する目的で、アミノ酸のひとつロイシン欠乏に応答するmiRNAをDNAマイクロアレイにより調べたところ、miR-149*の増加に着目した。また、低タンパク質食に反応するmiR-203の量を培養細胞において人工的に増減させたところ、その標的遺伝子としてNaa50というガンや細胞増殖に関わる因子を見出した。

研究成果の概要(英文)：Micro-RNAs(miRNA) are small RNAs that do not encode proteins and regulate the expression of a variety of genes by interacting with their mRNAs. Aiming at finding miRNAs that respond to nutritional conditions, we performed DNA microarray analysis. An interesting finding was the up-regulation of miR-149* in response to the deficiency of leucine, an essential amino acid. In addition, we manipulated the amount of miR-203, a miRNA which respond to low protein diet, in cultured cells. As miR-203 target, we identified Naa50, a factor involved in cancer and cell growth.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品化学

キーワード：マイクロRNA アミノ酸 タンパク質栄養 遺伝子発現 ロイシン

1. 研究開始当初の背景

マイクロ RNA (miRNA) は、タンパク質に翻訳されない小さな RNA であり、ヒトの場合 1000 種類ほどが見つかっている。miRNA は、様々な mRNA の分解を促進したり翻訳を抑制することで、多様な生命現象を調節していることが明らかとなってきた。栄養条件によって量が増減する miRNA が存在するかどうかについては不明であったが、申請者らの以前のラットを用いた実験において、絶食や低タンパク質摂取などによって肝臓中の量が変動する miRNA が存在することが見出された。しかし、これらの miRNA が栄養条件に対する成体応答に実際に関与しているのか、そしてどのような mRNA を標的としているのかについては明らかとなっていなかった。また、タンパク質栄養と miRNA の関係をより掘り下げる目的において、血中のアミノ酸濃度の変化に応答する miRNA の情報を得るために、培養細胞において利用できるアミノ酸を制限することも有効と考えられた。

2. 研究の目的

(1) アミノ酸欠乏と miRNA

アミノ酸栄養に応答する miRNA を同定してその機能を明らかにするため、まず培養細胞において、アミノ酸の欠乏により量の変動を示す miRNA を miRNA 解析用 DNA マイクロアレイにより見出す。見出された miRNA について、それらの miRNA をノックダウン、または過剰発現させ、栄養素に対する応答の変化を解析する。

(2) タンパク質栄養と miRNA

ラットに低タンパク質食を 2 週間摂取させることにより HepG2 細胞において、miR-203 を過剰発現させ、それにより mRNA レベルが変化する遺伝子を DNA マイクロアレイ解析により同定することを目指す。これらにより、miRNA が各栄養素への応答にどの程度関与しているかを明らかにし、さらに栄養素の未知の機能についての情報を得ることと目的とする。

3. 研究の方法

(1) アミノ酸欠乏と miRNA

ヒト肝臓癌由来 HepG2 細胞 (Human Hepatocellular Carcinoma Cells) を 10% FBS、100U/m penicillin、100 μ g/mL streptomycin を含む DMEM (5796, SIGMA) を用い 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 存在下で培養した。2 日に 1 度培地交換を行い、80-90%サブコンフルエントになったところで 6 well-plate に細胞が 5.0×10^5 cell/well となるように播種した。48 時間培養したところで培地を MEM (Minimum Essential Medium Eagle) に変更した。この際、通常の MEM 培地で培養した群をコントロール群 (Con) とし、ロイシンを欠乏させた MEM 培地をロイシン欠乏群 (Leu-) とした。培養開始 48 時間後に TRIzol

法により total RNA を回収し、以後の実験に利用した。

各群 6 サンプルからプールして得られた Total RNA 1000 ng を、GeneChip® miRNA Array 3.0 (Affymetrix) に供した。方法は Affymetrix 社の標準プロトコールに従った。正規化を含むデータの解析は Affymetrix miRNA QC Tool software (version 1.0.33.0) を用いて行った。

miRNA Array の欠点として、得られる結果の偽陽性が高いことが懸念されている。そのため今回はロイシンの欠乏に応答する miRNAs をより正確に抽出するため、同様の実験を独立して 3 度行い、3 度とも Log ratio が 0.6 以上であったものを抽出した。

RT-qPCR を利用して、miRNA Array の結果の再現性を確認した。miRNA の cDNA への逆転写は Universal cDNA Synthesis Kit (Exiqon) を使用し、qPCR でのプライマーには individual miCURY LNA PCR primer set (Exiqon) を、標識試薬には ExiLENT SYBR Green master mix (Exiqon) を使用した。また内部標準には U6 snRNA を採用し、併せて発現量を定量した。

ロイシン欠乏時に発現が上昇することが確認された miR-149* の生体内での機能を詳細に明らかにすることを、続く目的とした。そこで細胞内での同 miRNA 量を人為的に変動させ、その変化に応答して発現を変動させる mRNA を DNA マイクロアレイ解析で同定した。

96 well-plate に翌日 8~9 割コンフルエントになるように HepG2 細胞を播種し、トランスフェクションを実施した。合成 miR-149* とそのインヒビター、さらに同 miRNA の結合配列をルシフェラーゼ遺伝子に連結させた Plasmid vector (全て Active Motif) を共トランスフェクションし 24 時間培養した後、ルシフェラーゼアッセイに供した。合成 miR-149* が正しく導入されていれば、発光が抑制され、またインヒビターによる抑制の回復が期待される。

(2) タンパク質栄養と miRNA

既にラット肝臓において栄養の変化、特に低タンパク質食の摂取に応答することを見出している miR-203 を標的として用いた。過剰発現、および過剰発現にノックダウンを組み合わせることを同様に HepG2 細胞で行った。それぞれ、miCENCURY OX と miRCURY LNA を用いた。miR-203 の過剰発現により発現が低下し、そこにノックダウンを組み合わせることで発現が上昇する遺伝子を DNA マイクロアレイにより探索した。それらの遺伝子のうち、miR-203 の標的配列を有し、代謝上重要と考えられる遺伝子を抽出した。さらにそれらの発現変動を qPCR にて確認した。

4. 研究成果

ロイシン欠乏で 12 時間処理を行い、RNA

を調製し、バイオアナライザーによって正しく miRNA が得られていることを確認した。これを miRNA アレイで解析した結果、ロイシン欠乏時にその発現が上昇する 12 種の miRNAs(miR-149*、miR-638、miR-663、miR-762、miR-1228*、miR-1908、miR-1915、miR-3178、miR-3196、miR-4497、miR-4508、miR-4530、各 miRNA の発現変動挙動は表に示す)が抽出された。また同一の total RNA サンプルを、GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix)に供して得られた遺伝子発現プロファイルと、これら miRNAs の結果の比較解析を IPA(Ingenuity Pathway Analysis)上にて行ったところ、miR-149*が up-stream regulator のカテゴリー最上位にランクインしたことから、以後この miR-149*の機能に特に注目して解析を進めることにした。

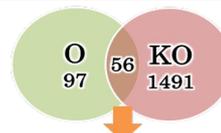
まずは合成 miR-149*のみを導入し、導入濃度の検討を行った。その結果 100 nM の導入によって、約 50%の発光抑制が認められ、miR-149*が正しく導入されていることを確認した。さらにルシフェラーゼ遺伝子の発現量を RT-qPCR によって測定したところ、約 80%の発現抑制が認められ、標的 mRNA の分解あるいはタンパク質への翻訳の抑制がされていると予想された。

これらの成果より、アミノ酸欠乏というシグナルを仲介する miRNA として miR-149*が機能していることが強く示唆された。

(2)タンパク質栄養と miRNA

過剰発現とノックダウンは効率よく行われた。同じサンプルを用いた DNA マイクロアレイ解析において、過剰発現により発現が低下した遺伝子 97 個、過剰発現したものをノックダウンで抑制した場合に発現が上昇した遺伝子が 1491 個見出された(図 1)。それらに共通した遺伝子 56 個のうち、miR-203 の直接の標的と考えられる遺伝子として Naa50 が見出された。Naa50 は低タンパク質食給餌ラット肝臓でも発現増加が確認され、miR-203 の標的遺伝子である可能性が強く示された。miR-203 は癌抑制遺伝子であるとの報告もあり、低タンパク質食給餌は miR-203 の発現減少を介して Naa50 の発現を増加し、細胞増殖抑制を防ぐ方向の機能をする可能性が示唆された。Naa50 および低タンパク質食の実験から見出された標的候補である HADHB (脂肪酸 α 酸化酵素の一つヒドロキシアシル CoA 脱水素酵素)の発現低下は、qPCR によっても確認できた。このように栄養条件の制御下にある miRNA を操作することで、miRNA を介した標的遺伝子の制御を確認することが可能となった。

	O vs. C	K-O vs. O
Detectable	291	2691
Increase (signal \geq 100)	60	1491
Decrease (signal \geq 100)	97	1048



56個の遺伝子から標的遺伝子の探索

図 1 miR-203 の過剰発現とそのノックダウンにより発現が変動した mRNA 数

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

K Takahashi, K Saito, S Takahashi, H Kato, A study on the effects of low protein diet on hepatic miRNA and its target genes by microarray analysis、The 20th International Congress of Nutrition、2013 年 9 月 15 日~2013 年 9 月 20 日、グラナダ (スペイン)

Hisanori Kato、Integration of multiple omics for the study of food functionality 2013 International symposium for the Cheonan Food Expo 2013 年 9 月 6 日、天安市 (韓国)

高橋薫、高橋祥子、斉藤憲司、加藤久典、低タンパク質食摂取の影響を受ける miRNA である miR-203 の標的遺伝子の探索、第 67 回日本栄養・食糧学会大会、2013 年 5 月 25 日、名古屋大学 (愛知県)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 久典 (KATO, Hisanori)
東京大学・総括プロジェクト機構・特任教授
研究者番号：40211164

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：