

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659033

研究課題名(和文)新規マイクロRNA分子mirtronから明らかにする哺乳類の神経構築制御機構

研究課題名(英文)Regulation of mammalian neuronal system by a novel microRNA "mirtron".

研究代表者

水口 裕之 (Mizuguchi, Hiroyuki)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：50311387

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本課題により、ほ乳類特異的mirtronであるmir-877が、セロトニン神経発生の運命決定およびアドレナリン/ノルアドレナリン作動性神経の分化と機能制御に関わる遺伝子Xを標的として、個体の脳内セロトニン神経の調節に関わることを、および、ストレス反応の中枢性制御に関わる遺伝子Yを標的として、全身性ストレス反応に重要な糖質コルチコイドの放出の調節に関わることを、ノックアウトマウスを用いた解析からそれぞれ示唆する知見を得た。これにより、ほ乳類特異的mirtronがほ乳類の脳機能を多機能的に制御する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we revealed using knockout mice that mir-877, a mammalian-specific mirtron, regulated the functions of serotonergic neurons through suppression of gene X which is involved in serotonergic and adrenergic neural development, and also regulated the serum glucocorticoid level, which is a mediator of stress responses, through suppression of gene Y. Our findings suggested that mammalian-specific mirtrons could regulate varieties of central nervous functions.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学

キーワード：microRNA mirtron セロトニン神経 ストレス

1. 研究開始当初の背景

生命現象の制御における small RNA の役割は、想像を超えた広がりを見せつつあるが、中でも、miRNA は、mRNA の分解や翻訳抑制を介して中心的な役割を果たす。一般に miRNA は、まず核内で Drosha 複合体によるプロセッシングを受け前駆体 pre-miRNA を形成した後に、細胞質において Dicer 複合体による切断を受け、成熟体となるが、近年、短いイントロンとして切り出される RNA 配列そのものが既に前駆体である、すなわち Drosha 複合体によるプロセッシングをバイパスする例が、ショウジョウバエなどで報告され mirtron と名付けられた (Ruby J.G. et.al, 2007 Nature) 哺乳類で広く保存が確認されているものは、mir-877、mir1224、mir-1225 の3種のみであり (Berezikov E et.al., 2007 Mol. Cell)、いずれも脳組織より同定されたことから、脳神経系における機能が推測されるが、明らかではない。Mirtron は、霊長類特異的 mirtron、哺乳類特異的 mirtron、ショウジョウバエ特異的 mirtron など、生物系統固有に同定される傾向にある。近年、ゲノム解読の結果、生物種間で遺伝子数が大きくは変わらないことが明らかとなって以来、むしろ固有の遺伝子発現調節システムこそが、生物種を規定する源であるとの考え方が示されている。mirtron に生理的機能が本当にあるとすれば、これこそが固有の調節システムの一翼である可能性は十分にある。固有の調節システムが働く場として典型的な組織を挙げるとすれば、哺乳類において他の種とは際立った違いをみせるのは、その発達した脳神経機能であるといえる。これまで、神経組織特異的な転写ネットワークと、それによりもたらされる神経発生経路については、大きな研究成果が挙げられている。しかしながら、そのネットワークを構築する重要な要因である転写後調節システムについては、ほとんど明らかとなっておらず、種に固有の調節システムについてはさらに謎のままである。我々は、高等生物種固有の mirtron が高次脳神経機能構築において重要な役割を担うのではないかという仮説を提示し、これを証明するために、まず、哺乳類特異的 mirtron である mir-877 が、脳神経組織の高度な機能に関与するかどうかについてノックアウトマウスを用いた検証を試みる。

2. 研究の目的

“mirtron” は、イントロンに存在するマイクロ RNA (miRNA) の一種であるが、切り出され

た短いイントロンそのものが前駆体として成熟化するユニークな分子である。哺乳類特異的 mirtron は主に脳から単離されたものの、生理機能を持つかどうか明らかではない。本研究では、哺乳類で広く保存されている mirtron である mir-877 に注目し、ノックアウトマウスを用いてその脳神経機能における役割を解明することにより、哺乳類が高次脳神経機能を獲得する上で、生物種固有の mirtron をどのように利用してきたか、その精緻な戦略を明らかにする。我々は、これまでに mir-877 の標的遺伝子の絞り込みを in silico で行い、さらにレポーターアッセイ等による検証を行った結果、交感神経分化に関わる転写因子群を同定した。さらに、その中の 1 遺伝子は、情動など様々な生理現象を支配する中枢性セロトニン神経の運命決定に直接関わる遺伝子であった。このことから、mir-877 が自律神経システムならびに中枢神経の構築に関わる可能性が考えられた。また、同様の絞り込みの結果、ストレス中枢である H P A (Hypothalamus-Pituitary-Adrenal) 軸に対して抑制的に働く遺伝子を標的として同定した。このことから、mir-877 は、中枢性のストレス反応を制御することが考えられた。この仮説を検証するために、我々は mir-877 欠損マウスを樹立し、神経における表現型解析に着手することとした。

3. 研究の方法

(1) セロトニン神経に関わる遺伝子の mir-877 による制御を個体で確かめるために、mir-877 欠損成体マウス脳幹における発現を western blot により解析した。

(2) Mir-877 ノックアウトマウスにおける交感神経機能を検討するために、個体における主要な交感神経組織である副腎髄質におけるアドレナリン・ノルアドレナリン・ドーパミン合成酵素であるチロシン水酸化酵素、ドーパミン水酸化酵素、および、交感神経を特徴づける各種マーカー遺伝子の発現を、免疫染色および定量的 RT-PCR により解析した。

(3) Mir-877 ノックアウトマウスにおけるセロトニン神経形成について検討するために、成体でのセロトニン神経分布を、抗セロトニン抗体を用いた免疫染色により解析した。また、mir-877 欠損による標的遺伝子の調節異常がもたらす胎児期のセロトニン神経発生への影響について検討するために、

E10.5-E11.5の脳幹について、抗セロトニン抗体を用いた免疫染色によりセロトニン神経の分布を観察した。

(4)レポーターアッセイで抑制が確認されたストレス関連遺伝子が、個体でもmir-877により制御されることを確認するために、mir-877欠損マウスの視床下部における発現をwestern blotにより検討した。

(5)mir-877の発現がストレス性に制御される可能性について検討するために、野生型成体マウスに、絶食、拘束のストレス負荷をかけ、脳内各組織における発現変動をnorthern blotにより検討した。

(6)mir-877のストレス応答制御について検討するために、定常時およびストレス負荷直後、およびストレス解除後一定時間後の。血中糖質コルチコイド濃度を測定し、野生型と比較した。

4. 研究成果

(1) 遺伝子Xの脳幹における蛋白発現レベルがmir-877欠損個体で増加していたことから、mir-877による抑制が個体でも起きることが明らかとなった。

(2) 副腎髄質におけるチロシン水酸化酵素の発現がmir-877欠損個体で増加していたことから、副腎髄質における遺伝子Xの機能が亢進していることが示唆され、交感神経機能制御におけるmir-877の抑制的機能が示唆された。しかしながら、適切な免疫染色用の抗体が入手できないために、副腎髄質における遺伝子Xの発現が増加しているかどうかについては検討できなかった。

(3) 成体脳幹部におけるセロトニン陽性細胞の分布については大きな変動は観察されなかったが、陽性領域の若干の減少が観察された。引き続き各縫線核における細胞分布について詳細な検討が必要と考えられる。一方、胎児の脳幹部セロトニン陽性神経細胞については、mir-877欠損個体で減少している様子が観察されたことから、mir-877は、セロトニン神経発生に関わる遺伝子Xの制御を介して、促進的に作用することが示唆された。

(4)

mir-877欠損により、ストレス中枢である視床下部、扁桃核における遺伝子Yの発現が、ノックアウト個体で上昇していることを蛋

白レベルで観察した。

(5)野生型マウスを様々なストレス環境に暴露し、ストレス中枢組織である前頭葉、扁桃核、室傍核のmir-877発現量をnorthern blottingにより検討した結果、ストレス負荷によりmir-877の発現量は低下し、続くストレス解除によって低下から回復しており、mir-877がストレス反応性マイクロRNAであることが明らかとなった。

(6)全身のストレス反応を引き起こす糖質コルチコイドの血中濃度を、定常状態で測定し、野生型マウスとmir-877ノックアウトマウス間で比較したところ、ノックアウトではおよそ1/2に低下しており、mir-877の欠損が平常時のストレスレベルの維持に関わることが明らかとなった。また、ストレス負荷時についても解析した結果、負荷がかけられている時点での血中濃度の上昇にはあまり影響しないが、ストレス解除後の低下速度に違いが観察されたことから、mir-877がストレス状態からの回復過程に関わることが示唆された。

mir-877がセロトニン神経の機能に関わることを示唆する知見が得られており、中枢神経におけるセロトニン機能は、ストレス状態を緩和する方向に働くと考えられていることから、ストレス制御遺伝子Yの制御にmir-877が関わることを示す解析結果と考え併せると、mir-877には中枢性のストレス調節機能のあることが強く示唆されると結論付けられる。今後は、行動面への影響について、詳細な解析を進め、mir-877とストレス関連疾患との関係性について明らかにすることが求められる。

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 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 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 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

水口 裕之 (MIZUGUCHI Hiroyuki)
大阪大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：50311387

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：