

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700360

研究課題名(和文) 中枢神経系に高発現するマイクロRNA - 124a の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of microRNA-124a which is highly expressed in the CNS

研究代表者

佐貫 理佳子 (Sanuki, Rikako)

大阪大学・たんぱく質研究所・助教

研究者番号：50607471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロRNA-124a (miR-124a) は中枢神経系で最も高発現するマイクロRNAのひとつである。研究代表者は成熟した中枢神経系におけるmiR-124aの機能を明らかにするため、miR-124aコンディショナルノックアウトマウスの作製を行っている。また、Creリコンビナーゼを網膜や脳に発現させるためのアデノ随伴ウイルスによる遺伝子導入系を確立した。また、脳におけるmiR-124aの標的候補遺伝子を多数同定した。本研究結果によって中枢神経系における新たなmiR-124a機能の一端が解明された。

研究成果の概要(英文)：MicroRNA-124a (miR-124a) is one of the most abundant microRNAs in the central nervous system (CNS). In order to clarify roles of miR-124a in the mature CNS, we are generating floxed miR-124a mice. We established the conditional gene deletion method upon Cre-recombinase expression in the retina and the brain using adeno-associated virus (AAV). Moreover, we identified candidate miR-124a target genes in the brain. The results in the current study contributed to progress of understanding on the miR-124a function in the CNS.

研究分野：神経解剖学

科研費の分科・細目：神経病理学

キーワード：マイクロRNA 中枢神経系 網膜 アデノ随伴ウイルス

1. 研究開始当初の背景

マイクロRNAはゲノムDNAにコードされ、転写とその後のプロセッシングによって誕生する18~25塩基程度の短いRNAである。作用機序はsiRNA (small interfering RNA)と似ており、マイクロRNAは他の蛋白質と共に複合体RISC (RNA-induced silencing complex)を形成して、マイクロRNAと相補な配列を持つmRNAを標的として結合し、そのmRNAの翻訳阻害あるいは分解を行う(図1)。近年マイクロRNAが中枢神経系の発生や機能で重要な役割を担う分子として注目を集めている。ヒト脳では500-600種類ものマイクロRNAが発現していると示唆されているが、それらマイクロRNAの中で、miR-124aは脳では最も高発現しているマイクロRNAである(Curr. Biol. 12; 735-739, 2002)。

生体におけるmiR-124aの機能を明らかにするために、申請者らはゲノム中に3か所コードされているmiR-124a-1~3のうち、生体におけるmiR-124a発現にとって最も重要な領域であるmiR-124a-1の欠損マウスを作製して解析を行ってきた。このマウスを用いたmiR-124aの機能解析から、miR-124aは標的遺伝子Lhx2の抑制を介して神経細胞の成熟と維持に寄与することが分かり、神経系の発達段階にmiR-124aは本質的な機能を持つことが明らかとなった(Sanuki et al. Nature Neuroscience, 14; 1125-1134, 2011)。

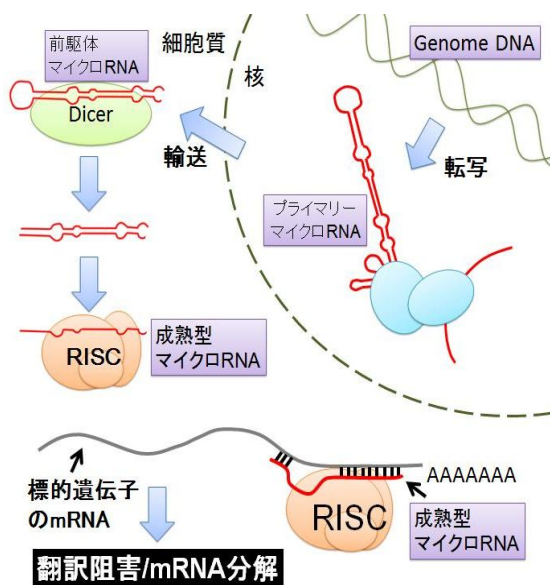


図1. マイクロRNAの生合成と機能

2. 研究の目的

研究代表者らは神経細胞分化から成熟期におけるmiR-124aの機能を明らかにしたが、成熟後の神経細胞におけるmiR-124aの機能は未解明のままである。研究代表者らはゲノム中にコードされる3つのmiR-124aのうち、最も重要と考えられるmiR-124a-1欠損マウスの解析を行ってきた。さらなるmiR-124a

の機能解析のために、miR-124aのトリプル欠損マウス、およびコンディショナル欠損マウスの作製を進め、成熟神経細胞におけるmiR-124aの機能を明らかにし、また最終的にはmiR-124aの標的遺伝子を同定することを目的とする(図2)。

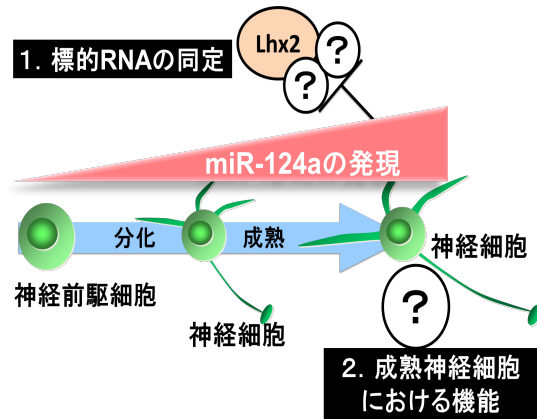


図2 本研究提案の概要

3. 研究の方法

I. miR-124aのコンディショナル欠損マウスの作製とAAVによるCre発現系の構築

miR-124aコンディショナルノックアウトマウスを作製するために、適切なCreリコンビナーゼの発現調整システムの構築が必須である。アデノ随伴ウイルス(AAV)はパルボウイルス科に属する約4.7kbの一本鎖DNAウイルスであり、現在までに病原性は知られておらず、それゆえに非常に弱い免疫反応しか引き起こさない。またAAVはキャプシドで覆われており、このキャプシド蛋白質を決定する血清型の種類によって感染細胞種が異なる。そこで本研究では神経細胞への感染が期待できる血清型7種類を用いて、網膜細胞への感染傾向およびその効果と脳への感染傾向について各細胞マーカーと供染色して調べた。さらに、AAVの感染効果を調べるために、ヒト遺伝性網膜色素変性症のモデルマウスのレスキュー実験を行った。Crx (Cone-rod homeobox)は網膜視細胞の分化と成熟をつかさどる転写因子である。Crx欠損マウスはヒト遺伝性網膜色素変性症のモデルマウスとなる。研究代表者らはCrxを発現するAAV5をCrx欠損マウスの網膜下に注入し、Crx遺伝子を補った。Crx欠損マウスへ施した治療効果を検討するために、アポトーシスのマーカーとなる活性型カスパーゼ3で免疫染色を行った。また、Crxの下流遺伝子の発現も調べた。さらに外節形成の有無を調べるため、電子顕微鏡で網膜の視細胞のディスクの形成がレスキューされているか調べた。電気生理学的にも網膜に治療効果があるかを調べるため、網膜電図を記録した。

## II . miR-124a 標的 RNA の同定

miR-124a 標的遺伝子を網羅的に同定するため、CLIP 法に使用する抗体を作成している。研究代表者らは RISC 複合体の中心蛋白質 Ago2 に対する抗体を作製するため、Ago2 のリコンビナント蛋白質を精製した。さらに、miR-124a-1 欠損マウスの脳をサンプルとして、次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析を行った。

## III .miR-124a-2 および miR-124a-3 欠損マウスの作製

miR-124a-2 はマウスの 3 番染色体に、miR-124a-3 は 2 番染色体にそれぞれコードされている。これまでに、miR-124a-2 は蛋白質非コード RNA のイントロンにコードされていること、miR-124a-3 領域には明確な転写ユニットが存在しないことが知られている。miR-124a-2 と miR-124a-3 欠損マウスを作製するために、各 miR-124a 前駆体配列を loxP 配列で挟んだ floxed-PGK-neo カセットに置き換えるためのターゲティングベクターを作製し、ES 細胞にエレクトロポレーションした。ES 細胞のスクリーニング後、キメラマウスを作製するために、胚盤胞期の受精卵に ES 細胞をインジェクションした。得られたキメラマウスから生殖系列に移行した個体を得、ユビキタスプロモーター下で Cre リコンビナーゼを発現する CAG-Cre トランスジェニックマウスと掛け合わせ、ゲノムに挿入されていた PGK-neo カセットを取り除いた( 図 3 と 4 )。

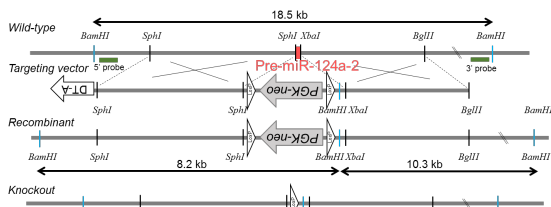


図 3 . miR-124a-2 欠損マウスの作製

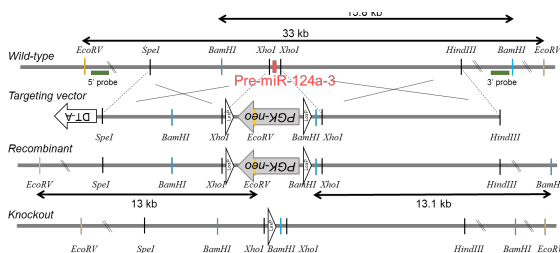


図 4 . miR-124a-3 欠損マウスの作製

## 4 . 研究成果

網膜細胞への感染傾向を調べた結果、血清型 5 が網膜視細胞に高効率に感染することが明らかとなった。Crx を発現する AAV5 を Crx 欠損マウスの網膜下に注入し、Crx 遺伝子を補った。その結果、網膜視細胞の脱落が

抑えられ、Crx 欠損マウスにおいて外節の形成が見られた。また、Crx 下流遺伝子であるロドプシンや錐体オプシンの発現が亢進した。これらの細胞が生理学的に機能するか調べるために、網膜電位図を測定した。その結果、遺伝子治療を施した Crx 欠損マウスにおいて、ERG による応答が認められた。Crx は網膜視細胞の発生や機能に必要な遺伝子群を“オン”にする役割を持つ司令塔遺伝子である。Crx 下流遺伝子の多くは他の遺伝性網膜変性症の原因遺伝子である。したがって Crx 欠損状態は他の遺伝性網膜疾患よりも治療が難しい、重篤な網膜変性を導くことが知られている。網膜色素変性症は治療法が確立されていない難病である。Crx 欠損マウスの遺伝子治療が有効であることを示した本研究の意義は大きい。さらに、miR-124a の機能解析するために適切な AAV の血清型も選択された。AAV が網膜をはじめとした中枢神経系への遺伝子導入に有効な手段であることが確認できた。また、miR-124a 標的候補遺伝子を多数同定することができた。加えて、miR-124a-2 および miR-124a-3 それぞれの遺伝子欠損マウスの作製に成功した。

## 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 2 件 )

1. Watanabe S, Sanuki R, Ueno S, Koyasu T, Hasegawa T, Furukawa T (2013) Tropisms of AAV for subretinal delivery to the neonatal mouse retina and its application for in vivo rescue of developmental photoreceptor disorders. PLoS One 8(1):e54146. (doi: 10.1371/journal.pone.0054146)
2. Katoh K, Yamazaki R, Onishi A, Sanuki R, Furukawa T (2012) G9a histone methyltransferase activity in retinal progenitors is essential for proper differentiation and survival of mouse retinal cells. J Neurosci 32(49): 17658-17670. (doi: 10.1523/JNEUROSCI.1869-12.2012)

[ 学会発表 ] ( 計 12 件 )

1. 佐貴理佳子, 杉田祐子, 渡邊哲史, 入江章一, 島田真理子, 古川貴久, 網膜神経回路におけるシナプス位置制御による層構造形成メカニズム - Analysis of molecular mechanisms underlying layered neural network formation in the mouse retina, 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
2. 渡邊哲史, 佐貴理佳子, 上野真治, 古川貴久,

- アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの血清型による網膜標的細胞の特異性の比較と網膜変性症モデルマウスのレスキューへの応用 - Tropisms of AAV for Subretinal Delivery to the Neonatal Mouse Retina and Its Application for In Vivo Rescue of Developmental Photoreceptor Disorders, 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
3. 佐貫理佳子, 渡邊哲史, 入江彰一, 古川貴久, 網膜シナプス層の位置決定の分子メカニズム, 平成 25 年度 包括脳ネットワーク 夏のワークショップ, 2013 年 8 月 29 日, 名古屋国際会議場 (名古屋市熱田区)
  4. 小塚孝司, 三浦隆義, 佐貫理佳子, 古川貴久, 単一細胞ラベリング法によるマウス網膜層構造形成の観察, 第 17 回視覚科学フォーラム, 2013 年 8 月 5 日, 立命館大学びわこ・くさつキャンパス ローム記念館 5 階大会議室 (草津市)
  5. 南卓矢, 佐貫理佳子, 古川貴久, 網膜視細胞で発現する SAM ドメイン蛋白質の発現と機能の解析, 第 17 回視覚科学フォーラム, 2013 年 8 月 5 日, 立命館大学びわこ・くさつキャンパス ローム記念館 5 階大会議室 (草津市)
  6. 佐貫理佳子, 渡邊哲史, 入江彰一, 古川貴久, 第 15 回日本 RNA 学会年会, miR-124a は神経細胞の成熟と維持に関与する, 2013 年 7 月 24 日, 愛媛県民文化会館・ひめぎんホール (愛媛県・松山市)
  7. 入江彰一, 佐貫理佳子, 古川貴久, Micro RNA-124a is required for hippocampal axogenesis and retinal cone survival through Lhx2 suppression, 第 8 回研究所ネットワーク国際シンポジウム 再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点シンポジウム 合同シンポジウム, 2013 年 6 月 27 日, 芝蘭会館 稲盛ホール (京都市)
  8. Ryoji Yamazaki, Kimiko Katoh, Rikako Sanuki, Takahisa Furukawa, G9a Histone Methyltransferase Activity in Retinal Progenitors is Essential for Proper Differentiation and Survival of Mouse Retinal Cells, ARVO2013, May 7, 2013, Convention Center, Fort Lauderdale, Florida, USA
  9. Satoshi Watanabe, Rikako Sanuki, Shinji Ueno, Takahisa Furukawa, Tropisms of AAV for Subretinal Delivery to the Neonatal Mouse Retina and Its Application for In Vivo Rescue of the Crx Knockout Retina, ARVO2013, May 7, 2013, Convention Center, Fort Lauderdale, Florida, USA
  10. 山崎竜史, 加藤君子, 大西暁士, 佐貫理佳子, 古川貴久, G9a ヒストンメチルトランスフェラーゼによるエピジェネティック制御のマウス網膜発生における役割 (An important role of epigenetic gene regulation by G9a histone methyltransferase in mouse

retinal development), 2012 年 12 月 11 日, 第 35 回日本分子生物学会, 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡市),

11. 佐貫理佳子, 渡邊哲史, 古川貴久, マイクロ RNA-124a の海馬神経細胞軸索形成と網膜錐体視細胞における機能 (MicroRNA-124a regulates hippocampal axogenesis and retinal cone photoreceptor survival), 第 35 回日本神経科学学会, 2012 年 9 月 19 日, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)
12. Takahisa Furukawa, Yuki Muranishi, Koji Terada, Tatsuya Inoue, Kimiko Katoh, Toshinori Tsujii, Rikako Sanuki, Yasuhiro Tamaki, RAX Homeoprotein and NOTCH-HES Signaling Regulate Otx2 Expression in Embryonic Retinal Photoreceptor Cell Fate Determination, ARVO2012, May 8, 2012, Convention Center, Fort Lauderdale, Florida, USA

〔図書〕(計 1 件)

1. (分担執筆) Sanuki R, Furukawa T, Nova Science Publishers, MicroRNA let-7: Role in Human Diseases and Drug Discovery, Chapter 9 "Roles of let-7 family miRNAs in development and differentiation", 2012, 125-144.

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.protein.osaka-u.ac.jp/furukawa\\_lab/](http://www.protein.osaka-u.ac.jp/furukawa_lab/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐貫 理佳子 (SANUKI, Rikako)

大阪大学・蛋白質研究所・助教

研究者番号: 50607471