

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：26402

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25290066

研究課題名(和文) Sox転写因子とmicroRNAが構成する遺伝子制御ネットワークの解明

研究課題名(英文) Regulation of microRNA genes by Sox transcription factors

研究代表者

蒲池 雄介 (Kamachi, Yusuke)

高知工科大学・環境理工学部・教授

研究者番号：90263334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：microRNAは機能性小分子RNAで、細胞の分化や増殖に重要な役割を持つが、この遺伝子群の発現が胚発生過程でどのように制御されているのかは多くの場合不明である。本研究では、脊椎動物の胚発生に必須であるとともに、がんmicroRNAとしても注目されているmir-17-92クラスター遺伝子を中心にしてmicroRNA遺伝子群の発現制御機構を調べ、複数のmicroRNA遺伝子の発現制御にSox転写因子群が関係していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：A microRNA is a small non-coding RNA molecule that plays an important role in cell differentiation and cell proliferation. However, it remains largely unknown how expression of the microRNA gene family is controlled during embryonic development. In this study, we investigated regulation of the microRNA genes including the mir-17-92 cluster gene, which is indispensable for vertebrate embryogenesis and also known as cancer microRNA. We found that Sox transcription factors are involved in the regulation of several microRNA genes.

研究分野：分子発生生物学

キーワード：転写因子 microRNA

1. 研究開始当初の背景

microRNA (miRNA) は、約 22 塩基鎖長の機能性小分子 RNA であり、多くの場合標的 mRNA の 3' UTR に作用して、翻訳の抑制と mRNA の不安定化を行うことで標的遺伝子の発現を抑える。近年の研究により miRNA は、胚発生、細胞分化、細胞増殖、細胞死などの正常な生理機能ばかりでなく、がんを中心とするヒトの疾患の発症や進行とも大きくかかわることが明らかにされつつある。しかし、miRNA が遺伝子制御ネットワーク全体の中で、どのような位置づけにあるのかについての理解はいまだに不十分である。その理由として、miRNA が受ける発現制御のメカニズムについては解析が全般的に遅れていること、また miRNA が標的とする mRNA の同定が過度にバイオインフォマティクスに頼りすぎており、*in vivo* での本来の標的の同定が不十分なままであること、などがあげられる。したがって、これらの問題点を克服することが、miRNA が関わるゲノム機能の理解には必要とされている。

本課題の研究対象のもう一方の中心となる Sox (Sry-related HMG box) 転写因子は、幹細胞性と密接に関連した転写因子であるが、胚発生の過程では細胞の分化状態の制御と胚の形態形成を結びつける、中核的な役割を果たす因子であることが、申請者らを含めたさまざまなグループの研究により分かりつつある。メンバーの一員である Sox11 (SoxC グループ) は、胚発生の過程において中枢神経系をはじめとした様々な組織で発現される。ノックアウト (KO) マウスの解析から、Sox11 は中枢神経系、眼、心臓、肺など様々な組織・器官の発生に必要であることが分かっているが、どのようなメカニズムでこれらの発生プロセスの制御を行っているのかは十分には分かっていない。最近、我々はゼブラフィッシュを用いた Sox11 の機能喪失解析から、sox11 ノックダウン (KD) 胚が KO マウス胚と類似した表現型を示すことを確認した。さらに重要なこととして、Sox11 は *mir-17~92* クラスター遺伝子の発現レベルを調節することにより、胚発生の制御に重要な役割を果たしている可能性があることを見いだした。

2. 研究の目的

mir-17~92 クラスターがコードする microRNA 群は、脊椎動物の胚発生に必須であるとともに、がん microRNA としても非常に注目されている。しかし、*mir-17~92* クラスター遺伝子の発現制御機構、またそれぞれの miRNA の生理機能の理解はいまだに不十分である。申請者は、ゼブラフィッシュを用いた Sox11 転写因子の機能喪失解析から、Sox11 が *mir-17~92* クラスターの発現を直接に制御している可能性があることを見いだした。本研究では、ゼブラフィッシュのモデル生物としての利点を生かして、*mir-17~92* が受け

る転写調節機構を Sox 転写因子と Myc などの他の転写因子との協調作用に注目して明らかにするとともに、*mir-17~92* に由来する miRNA 群の標的 mRNA の解析を行う。最終的には、Sox11 を含めた Sox 転写因子ファミリーと *mir-17~92* を含めた miRNA 遺伝子群からなる遺伝子制御ネットワークとその胚発生過程における役割を明らかにする。

3. 研究の方法

以下の研究を関連づけて研究することで Sox11/SoxB1 因子と miRNA が構成する遺伝子制御ネットワークとその胚発生過程における役割を明らかにする。

(1) ゼブラフィッシュの胚発生過程において *mir-17~92* クラスター遺伝子が受ける転写調節機構を、Sox 転写因子と Myc などの他の転写因子の協調作用に注目して調べる。

(2) *sox11* ノックダウン胚および *soxB1* ノックダウン胚で発現が変動している miRNA を網羅的に探索し、Sox11/SoxB1 の発現制御ネットワークに関わる miRNA を明らかにする。

4. 研究成果

(1) *sox11* ノックダウン胚における *mir-17~92* ファミリーの発現低下

ゼブラフィッシュでは、アンチセンスモルフオリノオリゴ (MO) を 1 細胞期の胚に顕微注入することで、容易に遺伝子機能のノックダウンが行える。ゼブラフィッシュは、*sox11* 遺伝子として *sox11a* および *sox11b* をもつ。アンチセンス MO を用いて、これらの遺伝子のノックダウンを行ったところ、いずれか一方のノックダウンが胚発生に与える影響は軽微であるが、両方をノックダウンすると中枢神経系をはじめとして胚組織全体の低形成、また心臓の形成不全など *Sox11* KO マウスと共通する表現型が観察された (図 1 参照)。この *sox11a/11b* ダブルノックダウン (以降 *sox11* ノックダウンと呼ぶ) 胚における遺伝子発現のプロファイルを詳細に調べたところ、TGF- β シグナル経路の遺伝子群やさまざまな細胞外マトリックス遺伝子群の発現の上昇がみられた。Sox11 は、多くの場合転写活性化因子として働くことから、なんらかの抑制因子の転写制御を介してこれらの遺伝子群の発現レベルを間接的に制御している可能性が考えられた。miRNA はこのような抑制因子の候補となり得るが、実際に *sox11* ノックダウン胚では、*mir-17~92* ファミリーのクラスター群の発現が低下していることを見いだした (図 2 参照)。

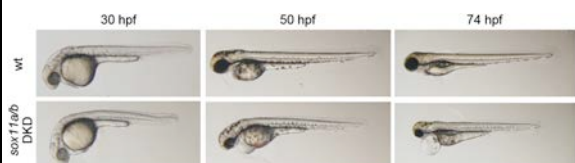


図 1. *sox11* KD 胚が示す中枢神経系をはじめとした胚組織全体の低形成

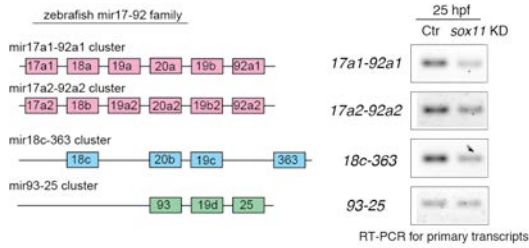


図2. ゼブラフィッシュ mir-17~92 ファミリーと sox11 KD 胚での発現低下

胚における *mir-17a1~92a1* 遺伝子の一次転写産物の発現を *in situ* ハイブリダイゼーションで調べたところ、*sox11* ノックダウン胚では実際に発現が低下していることが確認された(図3参照)。



図3

(2) *mir-17~92* クラスター遺伝子が受ける転写調節機構

mir-17~92 ファミリーとして、ゼブラフィッシュには4つのクラスターが存在するが、発現レベルが高く、また *sox11* ノックダウンの影響を最も受ける *mir-17a1~92a1* クラスターについてまず転写調節機構を調べた。主要な転写開始点と思われる部位の上流-622塩基から miRNA コード領域のすぐ上流+1609塩基までのゲノム DNA 配列(-622/+1609)を、mCherry-ルシフェラーゼ融合レポーターに連結した。このコンストラクトをゼブラフィッシュ 1 細胞期の胚に顕微注入すると、24 時間胚では mCherry ならびにルシフェラーゼの高い活性が見られた。一方、転写開始部位の下流側を欠失させたコンストラクト(-622/+169)では、両者の活性は著しく低下した(図4参照)。したがって、転写開始点から下流側の領域に、エンハンサー的な活性を持つ領域があることがわかった。

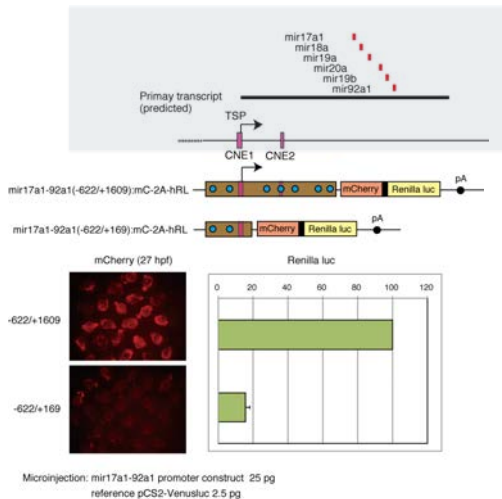


図4

次に、これらのコンストラクトを *sox11a* および *sox11b* に対するアンチセンス MO と共に顕微注入したところ、転写開始点から下流側の領域を含むコンストラクト(-622/+1609)のルシフェラーゼ活性は *sox11* ノックダウン胚では著しく低下したが、下流側を欠失させたコンストラクト(-622/+169)ではノックダウンの影響は軽微であった(図5参照)。この結果は、転写開始点から下流側配列がもつエンハンサー様の活性は Sox11 転写因子に依存していることを示す。この配列中には、Sox 転写因子の結合コンセンサス配列に近い配列(図中に青丸で示す)が複数含まれている。

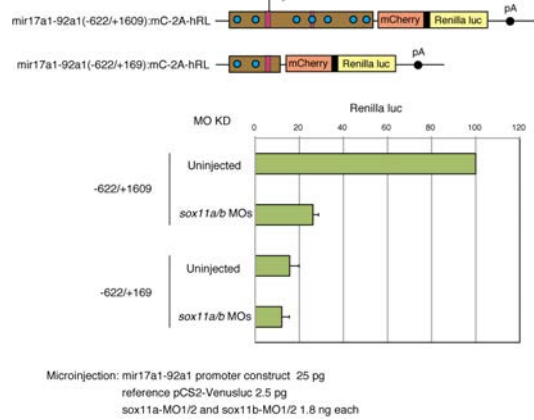


図5

転写開始点から下流域の配列が実際にエンハンサーとして働くかどうかを調べるため、3つの領域に分割してそれぞれの DNA 断片を TK プロモーターに連結した。この中で中央部に位置する断片は、ゼブラフィッシュ胚で高いエンハンサー活性を示すとともに、その活性は *sox11* ノックダウンにより低下することがわかった(図6参照)。この配列中には、脊椎動物間で保存されている Sox 結合配列が存在する。

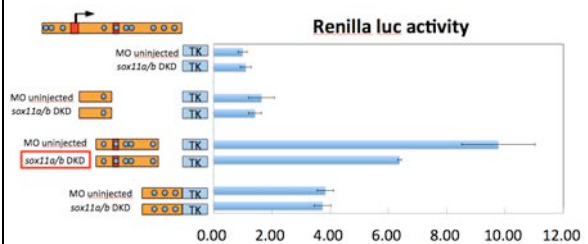


図6

(3) Sox 転写因子のノックダウン胚にける miRNA 遺伝子群の発現変動

この研究では *sox11* ノックダウン胚ならびに *soxB1* の4重ノックダウン胚(*sox2/sox3/sox19a/sox19b*)における miRNA 遺伝子群の発現変動を調べた。*sox11* ノックダウン胚においては、*mir-17~92* ファミリー遺伝子に加えて、*mir-126* や *let-7* などに発現レベルの変化が見られた(図7参照)。*soxB1* の4重ノックダウン胚においては、発生ステ

ージによっていくつかの miRNA 遺伝子に発現変動が見られた (図 8 参照)。mir-17~92 ファミリー遺伝子に関しては、発生の初期段階では *sox11* ノックダウン胚の場合とは異なり発現が上昇していた。mir-430 クラスターに関しても、6 体節期で発現の上昇が観察された。このことは、Sox 転写因子群が miRNA 遺伝子群の発現制御に広く関わることで、さまざまな胚発生プロセスを制御している可能性を示している。

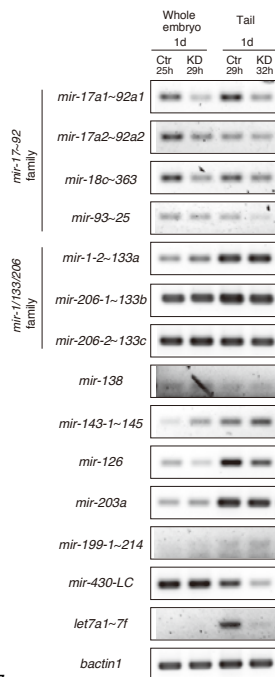


図 7

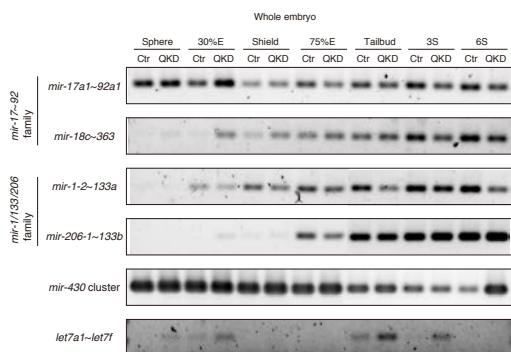


図 8

(4) miRNA 遺伝子のフィードバック制御機構 *mir-17-92* ファミリーのうち、主要な *mir-17a1-92a1* クラスターなどについて一次転写産物ならびに個々の miRNA の発現を定量 PCR 法ならびに in situ ハイブリダイゼーション法により測定し、*sox11* ノックダウンがこれらの発現に与える影響を調べた。この結果、*sox11* ノックダウンにより一次転写産物の発現量が減少しているにもかかわらず、成熟 miRNA の発現量の変化が予想外に小さいことが判明した。このことは、成熟 miRNA の発現量は一次転写産物の発現量とは必ずしも比例せず、フィードバック制御機構などによる複雑なメカニズムにより制御されている

可能性を示唆するものである。

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)

[雑誌論文] (計 3 件)

(1) Yasumi, T., Inoue, M., Maruhashi, M., Kamachi, Y., Higashi, Y., Kondoh, H., Uchikawa, M. Regulation of trunk neural crest delamination by δ EF1 and Sipl1 in the chicken embryo. (2016) Dev. Growth. Differ. , Vol. 58, 205-214, DOI: 10.1111/dgd.12256 (査読有り)

(2) Kamachi, Y. and Kondoh, H. Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation. (2013) Development 140, 4129-4144. DOI: 10.1242/dev.091793. (査読有り)

(3) Morimura H., Tanaka S. I., Ishitobi H., Mikami T., Kamachi Y., Kondoh H., Inouye Y. (2013) Nano-Analysis of DNA Conformation Changes Induced by Transcription Factor Complex Binding Using Plasmonic Nanodimers. ACS Nano. 7, 10733-40. DOI: 10.1021/nn403625s. (査読有り)

[学会発表] (計 4 件)

(1) 川合 杏奈, 近藤 寿人, 蒲池 雄介 Sox11 に依存した miRNA-17-92 クラスター発現の制御機構 第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 3 日 神戸ポートアイランド (兵庫県)

(2) Kamachi, Y. Molecular functions of Sox11 in zebrafish development: focus on retina and fin development. 4th International SOX Research Conference 2014 年 9 月 9 日-12 日 Cleveland (USA)

(3) 蒲池 雄介 ゼブラフィッシュの眼とヒレの発生における Sox11 転写因子の役割 第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 25-27 日 パシフィコ横浜 (神奈川県)

[図書] (計 2 件)

(1) Kondoh, H. and Kamachi, Y. (2015) SOX2-Partner Factor Interactions and Enhancer Regulation. Sox2: Biology and Role in Development and Disease, pp. 131-144 発表年 :

(2) Kamachi, Y. (2015) Evolution of Sox2 and Functional Redundancy in Relation to Other SoxB1 Genes. Sox2: Biology and Role in Development and Disease, pp. 89-106

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蒲池 雄介 (Kamachi, Yusuke)
高知工科大学・環境理工学群・教授
研究者番号：90263334