

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462923

研究課題名(和文) ストレス応答マイクロRNAが制御するMUC1の役割について

研究課題名(英文) Role of MUC1 regulated by stress-responded micro RNA

研究代表者

田代 茂樹 (TASHIRO, Shigeki)

長崎大学・病院(歯学系)・助教

研究者番号：20300882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)： 本来は膜結合型糖タンパク質であるMUC1の多機能性、特に電離放射線、低酸素分圧、紫外線などの環境ストレス下における機能に注目した。特にマイクロRNAを介したMUC1発現制御がストレス対応に重要な役割を担っているのではないかと考えている。

MUC1の低酸素分圧に対する応答について検証した結果、HeLa S3細胞を低酸素分圧条件下で培養すると、MUC1の発現レベルが培養開始後2時間以内に低下し、6時間後ではMUC1の発現が検知できないレベルにまで低下していた。その原因タンパク質と考えた α -NACと γ -タキシリンのsiRNAを導入したところMUC1の発現が減少しポジティブを示唆するデータが得られた。

研究成果の概要(英文)： MUC1 is a transmembrane glycoprotein that modulates transcription via its cytoplasmic domain. We originally paid attention to the MUC1 function under the environmental stresses such as ionizing radiation, UV, heat-shock, Hypoxia. Particularly we think that MUC1 expression control through the micro RNA may take the role that is important to stress correspondence.

As a result of having inspected it about a reply to hypoxia about the MUC1 protein, in HeLa S3 cell cultured under a hypoxia, an expression of MUC1 level decreased within 2 hours after a culture start and decreased in the level that expression of MUC1 could not detect in 6 hours later. After transfecting siRNA of the cause protein candidate α -NAC and γ taxilin, MUC1 expression level decreased, the data which suggested positively were provided.

研究分野：分子生物学

キーワード：MUC1 マイクロRNA ストレス応答 cPLA2 GAP結合

1. 研究開始当初の背景

MUC1 は腺上皮細胞に特異的に発現する膜結合型糖タンパク質である。消化管や生殖腺などの内腔上皮表面を覆う粘液の主要な糖タンパクであるムチン (Mucin) の1つである。ムチンには現在 20 種類ほどが確認されており、大きく分泌型と膜結合型とに分けることができる。膜結合型ムチンのうちでも MUC1 は特徴的で、細胞ががん化する際にその発現量が増加するため、腺組織におけるがん化マーカーとして使われている。そのタンパク質のカルボキシル末端断片 (MUC1-C) はミトコンドリアと核内で別の働き細胞の増殖やアポトーシスに深く関与していると考えられている。一方、このタンパク質は小胞体にて糖鎖付加などの様々な修飾を受けることが知られている。さらに興味深いことに、MUC1-C が膜結合部位から離れ、ミトコンドリアや核内に移動して、種々の遺伝子発現調節をするというユニークなタンパク質でもある。例えば、MUC1-C は核内にて、転写促進因子として働き、細胞増殖に関与する遺伝子発現を調節してがん化を促進させているのではないかと考えられている (図1)

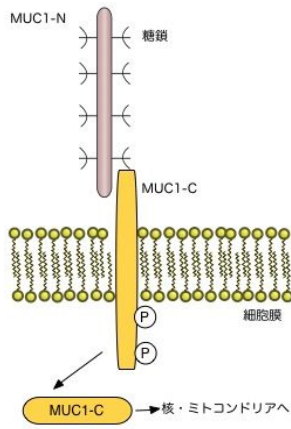


図1 MUC1の分子構造

microRNA (miRNA)は21-25塩基からなる1本鎖の非コードRNAで、遺伝子発現を抑制する働きを持っている。最近の研究で、MUC1タンパク質の発現がmiRNAによって制御されている可能性が報告された。miRNAによるタンパク質発現の制御の特徴は、大雑把に言えば、きめ細かな、その場の状況により即応した制御が可能なことであろう。こうした点が、転写や翻訳後の制御と異なる点である。むしろ、細胞内の様々な場所で働く必要があるMUC1にとって、miRNAを介した発現制御は理にかなったメカニズムであるといわねばならない。では、MUC1はどんな条件でこうした制御を受けるのか？ これまでの予備実験の結果、HeLa S3細胞を低酸素分圧(Hypoxia)条件下で培養すると、MUC1の発現レベルが培養開



図2 Western blotting

始後2時間以内に低下し、6時間後ではMUC1の発現が検知できないレベルにまで低下していた (図2)。

こうした結果を踏まえて、われわれは、MUC1は細胞が細胞外から受ける様々なストレス因子、例えば放射線、紫外線、温熱、あるいは成長あるいは固形がんの発育に際して生じる低酸素分圧環境からの刺激にきめ細やかに対応していると考えている。こうした考えを支持するいくつかの証拠がある。例えば、小胞体ストレス応答にmiRNAが関与していることである (Mol Cell 48:1-12, 2012)。おそらく、小胞体ストレスに際しては、放置しておけばMUC1が小胞体内で蓄積されてしまうのかもしれない。これを防ぐため、細胞は小胞体ストレスの原因となった刺激に対応したmiRNAを使って、MUC1の発現を抑制しようとしているのではないだろうか。MUC1と同一目的のために強調して働く異なるタンパク質 (Galectin-3) が、同一のmiRNAによって発現制御されるという報告がある一方 (Mol Cell 27: 992-1004, 2007)、異なるmiRNAがMUC1 mRNAの3'末端非翻訳領域に結合することでタンパク質翻訳を制御しているという報告もある (Genes Cancer 1: 62-68, 2010; Cancer Res 70: 378-381, 2010)。従って、異なる外的ストレスに対応するため、細胞は予め様々な種類のmiRNAを用意していると思われる。本研究では上で述べた仮説を検証する目的にて、異なる外的ストレスそれぞれに対応できるmiRNAを同定し、MUC1が様々な外的ストレスに対応できる multipurpose stress-response protein であることを実証しようとした。

本研究計画を遂行する上でわれわれが立てた仮説をまとめて図3に示す。この仮説の要諦は以下のごとくである。すなわち、異なる外的ストレスは異なるmiRNAがそれぞれに対応し、その処理はそれぞれのmiRNAに決められた場所にて行われる、というものである。図3に示すA~DはMUC1と相互

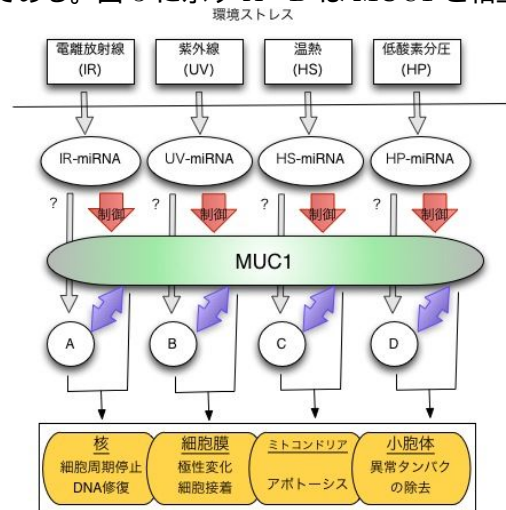


図3 様々な環境ストレスに反応するMUC1の役割

作用するタンパク質であり、異なる環境ストレスに異なるタンパク質が関与することを示している。ストレス応答はそれぞれの miRNA や相互作用するタンパク質によって、核、細胞膜、ミトコンドリア、および小胞体などの場所にてそれぞれの応答が行われるのではないかと考えている。

2. 研究の目的

本研究では、本来は膜結合型糖タンパク質である MUC1 の多機能性、特に電離放射線、低酸素分圧(Hypoxia)、紫外線など様々な環境ストレス下における働きに注目した。MUC1 あるいはそのカルボキシル末端断片(MUC1-C)は、膜、ミトコンドリア、小胞体、核など細胞内の様々な場所で働いていることが最近明らかになった。従って、細胞が受ける異なる外因ストレスに対して、こうした様々な細胞内器官において、異なるストレスによる刺激に様々なメカニズムで対応している可能性がある。特に、われわれは micro RNA (miRNA) を介した MUC1 発現制御がこうしたストレス対応に極めて重要な役割を担っていると考えている。よって、本研究の目的は、外的ストレスに細胞が対応する際、それぞれのストレスに対応した異なる miRNA が産生され、刺激の種類と程度に応じて MUC1 の発現ないしは糖鎖などのタンパク修飾がなされているという仮説のもとに研究を進め、MUC1 が有する多様性がいかに重要であるかを検証した。

3. 研究の方法

環境ストレス(電離放射線、紫外線、温熱、Hypoxia) に対する細胞応答に際しての MUC1 および miRNA の役割を知るために、実験計画の前半には主に環境ストレス応答し、且つ MUC1 に関与する miRNA のスクリーニングと同定を行う。そして後半に同定された miRNA を使った機能解析や MUC1 と相互作用するタンパク質について詳細に解析する予定である。さらに、ライン化された培養細胞だけでなく、より正常細胞に近い初代培養細胞においても環境ストレス応答が MUC1 と特異的 miRNA によって制御されていることを解析していきたい。

(1) ストレス特異性 miRNA のスクリーニング

目的の項でも述べたように miRNA には特異性が有り、異なるストレスには異なる miRNA が対応していると想定している(図3)。本研究では環境ストレスとして電離放射線、紫外線、温熱、Hypoxia を選んだ。これまでのわれわれの研究から HeLa S3 細胞がこれら4つの異なる環境ストレス全般に亘って広範囲にストレス応答することがわかっている。しかも HeLa S3 は内在性の MUC1 を比較的多く発現していることもわかっている(図2参

照)。従って、スクリーニングおよび MUC1-ストレスタンパク相互作用解析においてはすべて HeLa S3 を使うことにする。スクリーニングにはリアルタイム PCR マイクロアレイ法を用いる。解析により主に増加傾向の miRNA を選択し、解析に用いる。減少傾向を示すものは基本的に本研究の対象ではないが、特徴的な kinetics を示すものがあれば解析の対象にしたい。環境ストレスに応答し、かつ MUC1 を制御する miRNA をスクリーニングする。

(2) In vivo における MUC1 と miRNA の解析

スクリーニングされた miRNA が実際にストレスを与えた細胞内でストレス応答経路においてどのような働きをしているかを検討した。その手順を図4にまとめて示す。ある特定のストレス制御、例えばここでは X 線(電離放射線)によるストレスを考えてみたい。X 線を照射していない細胞においては、おそらく X 線照射に対応する miRNA は産生されないか、あるいは極めてその発現レベルは低いであろう。この時、内在する細胞中の MUC1 は X 線照射に特異的に対応するストレス対応タンパク質 A と結合した状態であると考えられる。この状態ではストレス対応タンパク質 A は不活性のままであり、ストレス応答は生じない(a)。一方、X 線を照射するとその刺激特異的に対応した miRNA が産生され、その結果、MUC1 の産生は翻訳段階で抑制される。この場合には、ストレス対応タンパク質 A との結合が起こらず、ストレス対応タンパク質 A の働きにより、ストレス応答が開始される(b)。従って、刺激がなくても合成 miRNA を導入すれば(b)の場合と同様のストレス応答が生じるはずである(c)。一方、X 線によるストレス刺激があっても、アンチ miRNA で miRNA の活性を抑えれば、(a)の場合と同様にストレス応答は生じない(d)。こうした方法によって miRNA によるストレス応答調節が特異的かつ直接的なものであることを証明しようと試みた。

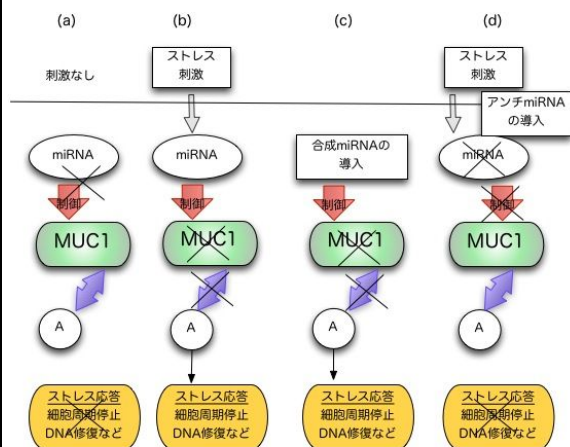


図4 ストレス応答とmiRNA同定の流れ

(3) 同定された miRNA、MUC1 と相互作用するタンパク質の細胞応答解析

様々な環境ストレス特異的に対応する miRNA と協調して働く未知のストレス対応タンパク質 A (図 4) を MUC1 と結合させて見つけようと考えた。そのためには図 4(d) のように、miRNA を働かせず、結果的に MUC1 を抑制させないようにして、MUC1 と A が結合した状態を保つことが必要となる。その細胞を得るため、同定した miRNA に対するアンチ miRNA を遺伝子導入する。本来の細胞とアンチ miRNA 導入細胞における MUC1 による比較免疫沈降実験、特異的バンドのアミノ酸解析を行うことにより、遺伝子導入した細胞からタンパク質 A が得られると期待した。ストレス対応タンパク質 A が同定されれば、

ストレス刺激の有無による MUC1 との相互作用の違い、

ストレス刺激の有無による MUC1 との細胞内局在変化、

同定した miRNA によって制御されるか

以上について解析して、ストレス対応タンパク質 A の重要性を見つけ出そうと試みた。

また、アンチ miRNA は、同定した miRNA の応答をストップさせているので、特定のストレス刺激に応答できない。この細胞に別のストレスを与えてストレス応答を観察すれば次のことを見極めることが可能である。すなわち、応答できなければ共通であり、別のストレス応答が起これば、1つのストレス応答に特異的な可能性が高くなる。こうした方法によって同定した miRNA の共通性、特異性について証明しようとして試みた。

(4) cPLA₂ ノックアウトマウスの作製

以前からわれわれの研究室で研究しているストレス応答に関与する cPLA₂ との関連も解析するため、cPLA₂ のノックアウトマウスを完成させ、cPLA₂ と MUC1 との関連を検証しようとして試みた。

前回の科研(基盤研究(c)22592087)によって cPLA₂ のコンディショナル ノックアウトマウスは完成したが、このマウスに Cre 発現マウスを交配して、ともにヘテロとなるマウスを作製、トランスポゾン飛ばすことによって目的のノックアウトマウスを作製した。

4. 研究成果

(1) ストレス特異性 miRNA のスクリーニングと In vivo における MUC1 と miRNA の解析

miRNA には特異性が有り、異なるストレスには異なる miRNA が対応していると想定している。本研究では環境ストレスとして電離放射線、紫外線、温熱、Hypoxia を選んだ。現在まで同定されているものとして、以下の miRNA が存在している。

電離放射線 : miR-152, -410, -431, -493 (up-regulated), miR-155, -20a, -25, -15a (down-regulated) (Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. 81: 839-848; 2011)

紫外線 : miR-125b (JBC 280: 16635- 16641; 2005, JBC 287:33036- 33047; 2012), miR-22 (BBRC 417: 546- 551; 2012)

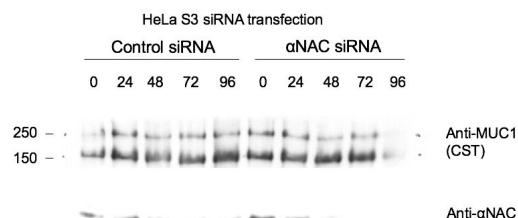
温熱 : miR-3120 (JBC 287: 14726- 14733; 2012), miR-21, miR-24 (FEBS Lett. 582: 4137- 4142; 2008)

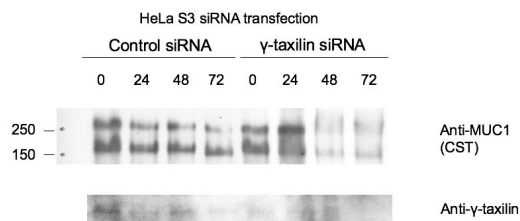
Hypoxia : miR-23, -24, -26, -27, -103, -107, -181, -210, -213 (MCB 27: 1859 -1867; 2007)

しかし、これらの miRNA とは MUC-1 の発現にはほとんど関連性を見出せなかった。一方、MUC-1 の発現をコントロールする miRNA として、miR-200c, -141, -192, -33, -135b (down-regulated)、miR-1224-3p, -218, -146a, -27b, -130a (up-regulated) が発表されてしまった (PLoS One 15: e73306; 2013)。MUC1 は、直接の miR-200C / 141、およびさらに低減転写産物の生産のプロモーターで、ZEB1 の miR-200C / 141 クラスターの既知の転写リプレッサーと相互作用することなどが述べられており、MUC1 を介したシグナル伝達は、転移のプロセスに関連付けられているマイクロ RNA の転写を調節することにより、癌の進行に影響を与えるとされていた。

(2) miRNA、MUC1 と相互作用するタンパク質の細胞応答解析

環境ストレスである低酸素分圧(Hypoxia) に対する細胞応答に際しての MUC1 および miRNA の役割を知るために、MUC1 の低酸素分圧に対する応答について検証した。実験の結果では、HeLa S3 細胞を低酸素分圧条件下で培養すると、MUC1 の発現レベルが培養開始後 2 時間以内に低下し、6 時間後では MUC1 の発現が検知できないレベルにまで低下していたが、その原因タンパク質候補の siRNA を導入して試してみたところ、ポジティブを示唆するデータが得られた。





上記の結果に示すように、NAC、-taxilin の siRNA は MUC1 の発現を抑制する方向へ関与していることが明らかとなった。

NAC は ER(小胞)ストレスに応答する因子であり、-taxilin は細胞内小胞輸送調節因子である。膜タンパク質である MUC1 と相互作用する可能性は十分に考えられる。今後は膜の近辺に局在する cPLA₂ とともに関連性を調査していく予定である。

(3)cPLA₂ ノックアウトマウスの作製

以前からわれわれの研究室で研究しているストレス応答に関与する cPLA₂ との関連も解析するため、cPLA₂ のノックアウトマウスを完成させ、cPLA₂ と MUC1 との関連を検証した。現時点では明らかかなポジティブなデータは得られていない。

ノックアウトマウスに関しては MEF 細胞、肺由来の繊維芽細胞なども作製し、ウエスタンブロットにより、cPLA₂ タンパク質の発現について野生型細胞と比較し、間違いのないことを確認した(データは示さない)。

(4)細胞間の相互作用

われわれは今までの研究から、ギャップ結合を通して細胞間が相互作用する際に miRNA もやりとりをしているのではないかと考えていたが、近年になってそのような事象を示唆する論文が発表された(Cellular Signalling 27: 2506-2514; 2015, Oncotarget. 8583; 2016)。特に細胞外マトリックスである MUC1 は外部ストレス応答に対するターゲットになり得ると考え、隣の細胞からやってきた miRNA が MUC1 制御を司ると考えるのは矛盾がない。

ギャップ結合が関与しないとしても、エクソソームが細胞間連携に関与していることが明らかとなっており、エクソソームに miRNA を内包させれば、バイスタンダー効果は容易に説明可能である。

以上のことから miRNA が情報伝達に関与し、細胞内だけに留まらず、近接する細胞にも情報を伝えているのは明白である。本研究では詳細までは明らかにできなかったが、ストレス応答に対する MUC1 制御の的確な miRNA を見つけ出し解析していかなければならないと考えている。

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 0 件)

[学会発表](計 1 件)

田代茂樹, 中村 卓: cPLA₂ コンディショナル・ノックアウトマウスの作成
日本歯科放射線学会 第 54 回総会・学術大会 プログラム P13(演題番号 1-3-2), 2013 年 6 月 1 日, 福岡県立ももち文化センター ももちパレス, 福岡県福岡市早良区百道 2 丁目 3 番 15 号

6. 研究組織

(1)研究代表者

田代 茂樹 (TASHIRO, Shigeki)
長崎大学・病院(歯学系)・助教
研究者番号: 20300882

(2)研究分担者

佛坂 由可 (HOTOKEZAKA, Yuka)
長崎大学・病院(歯学系)・講師
研究者番号: 10244089

片山 郁夫 (KATAYAMA, Ikuo)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教
研究者番号: 80295089

市川 陽子 (ICHIKAWA, Yoko)
長崎大学・病院(歯学系)・助教
研究者番号: 90380857

中村 卓 (NAKAMURA, Takashi)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授
研究者番号: 30172406