

平成 21 年 5 月 27 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007-2008

課題番号：19770171

研究課題名 (和文) 骨分化・筋分化に関わるマイクロ RNA の同定とその機能解析

研究課題名 (英文) Identification and characterization of microRNAs involved in osteogenesis and myogenesis

研究代表者

寺澤 和哉 (TERASAWA KAZUYA)

京都大学・薬学研究科・特定助教

研究者番号：00361569

研究成果の概要：マイクロ RNA (miRNA) はタンパク質をコードしない 22 塩基程度のスモール RNA で遺伝子発現を翻訳レベルで制御する機能を持つ。本研究では新規に骨分化で発現が亢進する miRNA を同定した。これら骨分化研究において重要な知見である。また骨・筋分化に伴って共通して減少する一群の miRNA を同定した。細胞の増殖制御機構に広く関与すること考えられ、今後の展開が期待される。また筋分化に関与する miRNA に関しては、筋管細胞、休止細胞に着目することで新たな知見を見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	480,000	3,880,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞分化、マイクロ RNA

## 1. 研究開始当初の背景

従来、遺伝子の機能発現は DNA→RNA→タンパク質への遺伝情報の伝達、いわゆるセントラルドグマを中心に考えられてきた。しかしながら近年、tRNA や rRNA 以外のタンパク質をコードしない (ノンコーディング) RNA も重要な役割を果たすことが明らかになってきた。マイクロ RNA (miRNA) もノンコーディング RNA の一種で、植物から動物まで広く保存した 22 塩基程度のスモール RNA である。遺伝子発現を翻訳レベルで制御する機能を持ち、近年、発生や分化、癌、アポトーシスと

いった生命現象に広く関与することが明らかにされつつある。miRNA は標的遺伝子の mRNA の 3'UTR に相補的に結合し、その翻訳の抑制や mRNA 自体の分解を促進することで遺伝子発現を調節することが知られている。これまで多くの研究がタンパク質をコードする遺伝子に着目したものであり、さらにひとつの miRNA で多数の遺伝子発現を制御できることから、miRNA の機能解明は複雑な生命現象への理解に必須のものであると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、細胞分化に關与する miRNA の同定および機能の解析を目的とし、その為骨分化、筋分化に着目した。分化の際には多くの遺伝子の発現変化が生じる。miRNA が遺伝子発現を制御する機能を持つことから、これらの分化に miRNA が關与していることが考えられる。マウス C2C12 細胞は培養条件により骨分化・筋分化を誘導できる性質を持ち、筋分化のモデルとしてよく利用されている。一種類の細胞から二つの分化を誘導できることから、単純に分化で発現が変動する miRNA だけでなく、両分化を比較することで分化一般に共通制御される miRNA を同定できることが期待できる。そこで C2C12 細胞を用いて骨分化・筋分化に伴ってその発現が変動する miRNA をアレイ法により同定し、その機能を解析することを目指した。

## 3. 研究の方法

C2C12 細胞をコンフルエントまで培養した後、低血清培地に交換しその後 4 日間培養し筋分化を誘導した。骨分化誘導は、低血清培地に骨形成因子 BMP を添加することで行った。分化前後の細胞よりトータル RNA を回収し、バイオアナライザー (Agilent 社) を用いて RNA の質を確認した後、miRNA マイクロアレイ解析 (LC Sciences 社) を行った。miRNA の定量は TaqMan リアルタイム PCR 法を用いた。

遺伝子発現は RT-PCR 法およびリアルタイム PCR 法を用いて調べた。

筋管細胞、休止細胞の分離は、文献に基づいた方法を用いた。具体的には、筋管細胞の接着が弱いことを利用したもので、トリプシン処理濃度と時間を調節することで行った。分離の程度は既知のマーカー遺伝子の発現で確認した。

miRNA の標的遺伝子予測は web 上のプログラム TargetScan を使用した。次に標的候補遺伝子の 3'UTR をレポーター遺伝子の下流にクローニングしレポーターアッセイを行い検討を行った。

## 4. 研究成果

### (1) マイクロアレイ実験

C2C12 細胞を骨分化・筋分化誘導し RNA を回収し、miRNA マイクロアレイ解析を行った。筋分化は筋管形成を、骨分化はアルカリフォスファターゼ活性を指標にそれぞれ分化を確認した。各々を誘導前 0day と誘導後 4day の比較を行った。図 1 に散布図を示す。筋分化に伴って発現が亢進する miRNA はすでに複数報告されているが、それらの発現の増加は全て確認できた。このことからア

レイ解析は信頼できるものと考えられる。

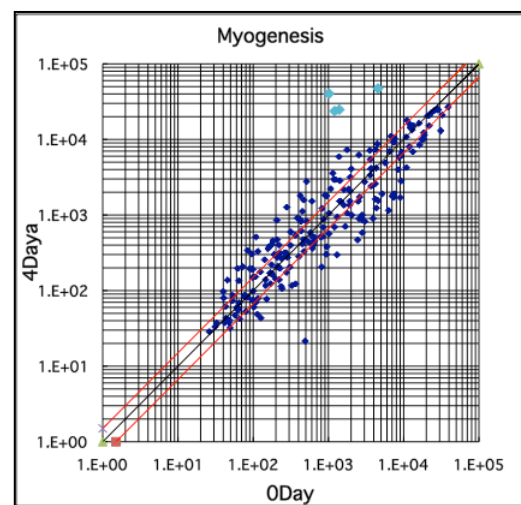
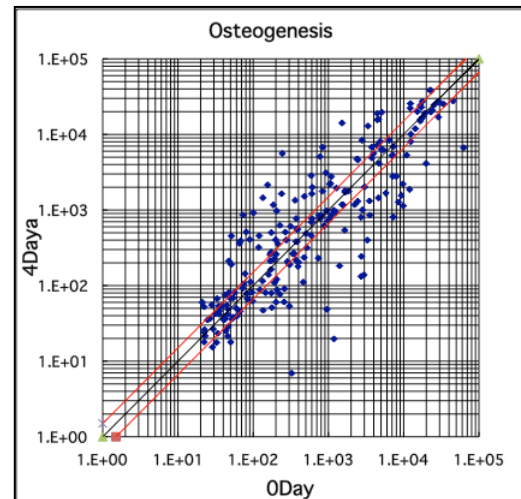


図 1. 骨分化 (上)・筋分化 (下) アレイデータの散布図。軸は常用対数、赤線は二倍変動を示す。左上に行く程分化で発現が亢進する、左下に行く程分化で発現が減少することを示す。水色の点は既に筋分化で発現が亢進することが知られている miRNA を示す (下)。

### (2) マイクロアレイ解析

骨分化、筋分化に伴って減少する miRNA (2 倍変動) はそれぞれ 33、41 種類同定できたが、興味深いことにその内 27 種もの miRNA が共通のものであった (図 3)。

これら miRNA の標的遺伝子を予測プログラムを用いて調べたところ、細胞の増殖に関わるものが多数見られた。実際、本研究中に細胞の増殖に関わることが示されたものもあった。そこでこの miRNA に関して C2C12 細胞でも増殖への影響を検討したところ抑制効果を確認した。分化に伴って細胞は増殖を停

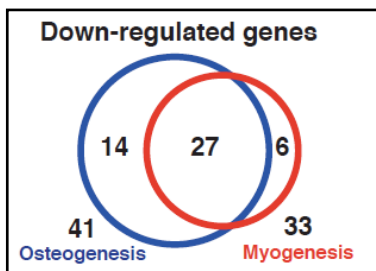


図 3.

止する必要があることとこの結果はよく合致する。これら共通して減少した miRNA が一般に細胞の増殖を正に制御しているとする、他の分化の系でも分化に伴いこれら miRNA の発現が減少することが考えられる。また発現が亢進した場合は異常増殖を引き起こし癌化に関与することも考えられる。実際これら miRNA のいくつか癌に関与することが報告されている。これらは今後の検討すべき課題である。

骨分化、筋分化に伴って増加する miRNA (2 倍変動) はそれぞれ 43、37 種類同定できたが、その内 17 種が共通のものであった(図 4)。

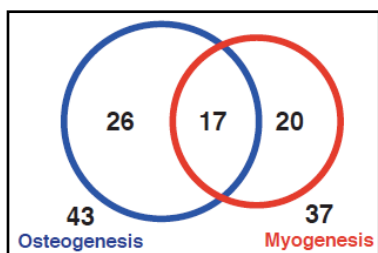


図 4.

骨分化で発現が亢進する miRNA に関しては変化が著しいものをリアルタイム PCR 法で確認した。まだ標的遺伝子同定を初めとした骨分化における役割を解明できていないが、骨分化に伴って発現が亢進する miRNA はまだほとんど報告されておらず、今回同定した miRNA の解析は骨形成に新たな知見をもたらすものと考えられる。これらの内の一つはコーディング遺伝子のイントロン中にコードされていた。これを親遺伝子と呼ぶが、興味深いことにこの親遺伝子も骨分化に際して発現が亢進することを RT-PCR 法で確認した。この遺伝子と骨形成の関わりは知られてなくこの miRNA と合わせて骨分化における機能の解析を続けている。

### (3) 筋特異的 miRNA の解析

アレイ解析により筋特異的 miRNA を複数同定したが、既知の特異的 miRNA の発現変動が著しく大きかったので既知の miRNA を中心に解析を進めた。

筋分化では、細胞融合をして多核の筋管形成をせず、細胞分裂を停止し休止する細胞が存在することが知られている(サテライト細

胞と呼ばれる)。休止細胞は筋肉の再生の際には再び増殖し、融合し筋管を形成する筋幹細胞である。分化誘導後の C2C12 細胞から筋管細胞と休止細胞を分離し、各々の RNA を回収し、リアルタイム PCR 法で筋特異的 miRNA の発現を調べたところ、休止細胞ではその発現が有為に少ないことが分かった。筋管細胞・休止細胞に着目した miRNA の解析はまだされていないことや、幹細胞の研究の点からも興味深い結果が得られた。

miRNA は翻訳抑制だけでなく mRNA の分解も引き起こすことが知られている。また組織特異的 miRNA を培養細胞に発現させると、遺伝子発現がその組織様に変化することが報告されている。このことは筋分化に伴い発現が減少する遺伝子は筋特異的 miRNA の標的遺伝子である可能性が高いことを意味する。そこで miRNA の標的遺伝子を同定する為に NCBI のマイクロアレイデータベースよりアレイデータベースよりアレイデータベースを入手し筋分化に伴い発現が減少する遺伝子のリストを作成した(骨分化においてはアレイデータベースが入手できず行っていない)。さらにこれら遺伝子のうち筋特異的 miRNA 標的予測されているものを絞り込んだ。これまでの筋分化の研究を踏まえ、特にその内の一つに関して解析を進めた。リアルタイム PCR 法でまず発現を確認したところ、分化に伴い減少した。次に 3' UTR をクローニングしレポーターアッセイを行ったところ、miRNA 存在化で有意にレポーター活性が減少した(図 5)。この miRNA がこの遺伝子を標的とすることが示唆された。

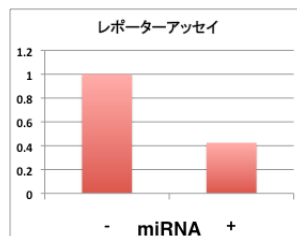


図 5. レポーターアッセイ。  
-、+は miRNA の発現を有無を示す。

この遺伝子の筋管・休止細胞で発現も調べたところ、興味深いことに休止細胞で強い発現が見られた。miRNA は休止細胞で発現していないことから、筋管形成の際に、この miRNA が発現しこの標的遺伝子の発現を抑えるモデルが考えられる。筋分化、筋再生の観点から重要な発見であると思われ、引き続き解析を行っている。

### 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)

無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺澤 和哉 (TERASAWA KAZUYA)  
京都大学・薬学研究科・特定助教  
研究者番号：00361569

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし