

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32689
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2019～2020
課題番号：19K24293
研究課題名(和文) 生体骨格筋におけるマイクロRNAの代謝動態の解析

研究課題名(英文) Analysis of miRNA turnover in muscle in vivo

研究代表者

及川 哲志(Oikawa, Satoshi)

早稲田大学・スポーツ科学学術院・助教

研究者番号：20844997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体骨格筋におけるマイクロRNA(miRNA)の生物学的半減期を明らかにすることを目的とした。新生されたmiRNAを標識・単離し、PCRによる発現解析を行った結果、骨格筋に発現するmiRNAは72時間以内に代謝されたことが明らかとなった。さらに、薬剤誘導性miRNA欠損マウスを用いた解析ではmiRNAの急速な発現低下が観察された。以上の検討から、生体骨格筋のmiRNAの生物学的半減期は数時間から長くとも数日である可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々を含むいくつかの研究グループは、骨格筋のmiRNAが非常に高い安定性を持ち、細胞内で4週間以上も維持されている可能性を示した。しかし、本研究によって骨格筋miRNAの生物学的半減期は30時間程度であることが初めて明らかとなり、生体骨格筋におけるmiRNAは当初期待されたほど安定でないことが示唆された。miRNAは基本的に細胞内で機能するが、これらの一部は血液中でも存在し骨格筋の状態(サルコペニアなど)を反映するバイオマーカーの候補としても注目されている。本研究成果は、miRNAの骨格筋における機能や、筋の状態を示すバイオマーカーの有用性などに関する研究を進める上で基礎的な知見となる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to determine the metabolic dynamics of miRNAs in skeletal muscle in vivo. Newly synthesized miRNAs, which were labeled with 5-ethynyl uridine and isolated by "Click-Reaction", were analyzed by real-time PCR analysis. The data showed that muscle-enriched miRNAs were metabolized within 72 hours. Furthermore, a rapid reduction of miRNAs were observed in muscle of tamoxifen-inducible miRNAs deficient mice. Taken together, we demonstrated that biological half-life of miRNAs in skeletal muscle in vivo was approximately 10 to 30 hours.

研究分野：スポーツ科学、応用健康科学

キーワード：マイクロRNA RNA代謝 骨格筋 ノンコーディングRNA 生物学的半減期

1. 研究開始当初の背景

マイクロ RNA (miRNA) は、タンパク質に翻訳されない小分子ノンコーディング RNA であり、転写後調節を介してタンパク発現を負に調節することで、個体の発生やがんをはじめとする疾患など、さまざまな生命現象に関与している (Bartel. *Cell*. 2004). ヒトを対象とした検討において、血液中に安定して存在する miRNA が最大酸素摂取量と相関関係を示すことや (Mooren et al. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 2014), 短期間の持久性運動トレーニングにより骨格筋の miRNA の発現量に変動が認められるなど (Russell et al. *J Physiol*. 2013), 持久性運動能力を推定するバイオマーカーとなり得ることや骨格筋の運動適応へ関与することなどが報告されている。

これまでに miRNA の生合成に関しては精力的に研究が行われており、miRNA の生合成を制御する中心的な分子が同定され、その制御機構が体系化されつつある一方、miRNA の分解や代謝動態に関してはほとんど研究が行われておらず、現在も不明な点が多い。

これまでに我々は、成熟 miRNA へのプロセッシングに必須の酵素である Dicer を薬剤誘導性に欠損するマウス (iDicer KO マウス) において、Dicer を欠損した 4 週間後であっても、骨格筋に発現する複数の miRNA が最大でも 60% しか低下しないことを報告した (Oikawa et al. *Am J Physiol-Cell Physiol*. 2019). 同様に Vechetti らは、タモキシフェン誘導性に骨格筋のみで Dicer を欠損するマウスにおいても、miRNA の減少が僅かであったことを報告した (Vechetti et al. *Sci Rep*. 2019). このことは、生体骨格筋に発現する miRNA が極めて高い安定性を持つ可能性を示唆する。筋や血管に豊富に発現する miR-23a は、iDicer KO マウスにおいて発現が変化しなかったため、特に高い安定性をもつことが期待された。miRNA の代謝動態や生物学的半減期に関しては、培養細胞を用いた *in vitro* における結果がいくつか報告されており、miRNA の半減期は数時間から 48 時間程度であった (Duffy et al. *Mol Cell*. 2015; Marzi et al. *Genome Res*. 2016). しかしながら、*in vivo* において miRNA の代謝動態および生物学的半減期を直接的に評価した報告はない。

2. 研究の目的

本研究では生体骨格筋における miRNA の代謝動態および生物学的半減期を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

miRNA の標識にはウリジンの同位体である 5-Ethynyl Uridine (5-EU) を用いた。野生型マウスの腹腔内へ 5-EU (5 mg) を投与し、5, 8, 11, 29, 77 時間後に摘出した骨格筋から Isogen II (ニッポンジーン) を用いて total RNA を精製した。Click-iT Nascent RNA Capture Kit (Invitrogen) を用いて 5-EU でラベリングされた RNA をビオチン化した後、ストレプトアビジンビーズを用いてそれらを単離した。次に TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いた逆転写反応により cDNA を合成した。リアルタイム PCR による miRNA の発現解析には、TaqMan MicroRNA Assay (Thermo Fisher Scientific) および TaqMan Universal PCR Master Mix, no AmpErase UNG (Thermo Fisher Scientific) を用いた。小分子ノンコーディング RNA である Rnu6 を用いて miRNA の発現量を標準化した。データは 5-EU 投与の 5 時間後における miRNA の発現に対する相対変化で示した。

タモキシフェン誘導性 miR-23a/b cluster 欠損マウスは、全身性かつタモキシフェン誘導性に Cre^{ERT2} 酵素を発現する CAG-Cre^{ERT2} マウス (Hayashi and McMahon. *Dev Biol*. 2002) と miR-23a/b cluster-floxed マウス (Oikawa et al. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. 2018) の交配により得た。miR-23a/b cluster を欠損させるため、8-10 週齢の成熟したマウスに 5 日間連続でタモキシフェンを腹腔内投与した。コントロールマウスとして Cre を発現しないマウスを用いた。5 日目の投与の翌日および 3 週間後に骨格筋を採取した。前述した方法で total RNA の抽出および逆転写反応を行い、リアルタイム PCR 法を用いて miR-23a の発現を定量した。

4. 研究成果

野生型マウスの筋より単離した 5-EU を含む RNA を用いて骨格筋に豊富な miR-1, miR-133a, miR-206, miR-23a の発現を定量した結果、いずれの miRNA も 72 時間後には顕著な減少が認められ (図 1), これらの生物学的半減期は約 10-30 時間であった。したがって生体骨格筋における miRNA の安定性は、当初期待されたほど高くない可能性が示された。

タモキシフェン誘導性 miR-23 cluster 欠損マウスにおいては、タモキシフェン投与の直後に miR-23a の発現は約 70% 減少し、投与 3 週間後においては 90% 以上の減少が認められた。

以上の結果より、当初の本研究の仮説に反し、骨格筋に発現する miRNA の生物学的半減期は長くととも数日であることが明らかとなった。

miRNAs turnover in muscles

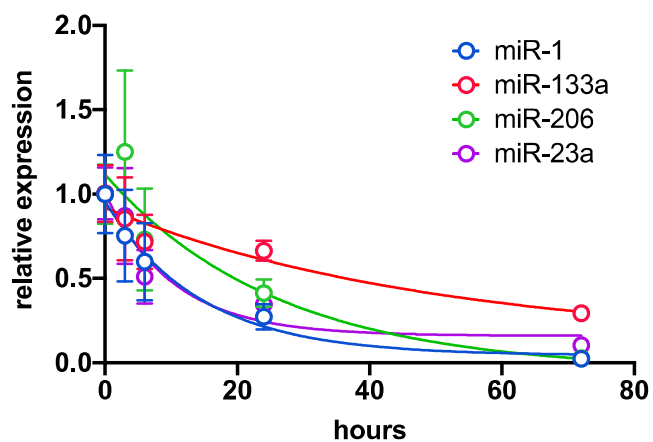


図1, 生体骨格筋におけるmiRNAの代謝動態
筋に豊富なmiR-1, miR-133a, miR-206, miR-23aの発現を
リアルタイムPCRによって定量した.
データは投与5時間後を0時間として発現量の変化を示した.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------