

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：83902

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590483

研究課題名(和文) microRNA-143/145 低発現と癌、疾患発症の分子機構の解析

研究課題名(英文) Molecular mechanism of miR-143/145 down-regulation in cancer and disease

研究代表者

飯尾 明生 (Iio, Akio)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・発生障害学部・リサーチレジデント

研究者番号：80344349

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、miR-143/145ホスト遺伝子NCR143/145プロモーターはSRF/ELK1によってフィードバック制御されており、癌ではそのしくみが破綻していること、NCR143/145 RNAがDDX6/AGO2により核外にリクルートされ、脱キャップ化を介してP-bodyで積極的に分解されることでmiR-143/145の産生が低下することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we found that NCR143/145 promoter was feed-back regulated by SRF/ELK1 and its regulatory mechanisms were disrupted in cancers. Furthermore, we showed that DDX6 and AGO2 promoted the nuclear export and degradation of NCR143/145 RNA through decapping followed by miR-143/145 down-regulation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：microRNA 癌 プロモーター DDX6 P-body

1. 研究開始当初の背景

miR-143/145 の発現が多く、癌及び癌細胞株で低下していることは報告されているが、Dicer の発現異常や p53 変異を介した Dicer によるプロセッシング異常以外、発現低下の根本的な原因は解明されていない。申請者は、様々な組織、細胞株で miR-143 と miR-145 の発現プロファイルが酷似していること、両遺伝子間の距離が約 1.7kb と短いことから、同一プロモーターから転写されていると予想し、miR-143/145 をコードするホスト遺伝子 NCR143/145 を同定し、この発現異常が miR-143/145 の発現低下の主要な原因であることを突き止めた。(Mol Cancer. 2010) NCR143/145 の機能は miR-143/145 を生み出す以外は不明であるが、タンパク質をコードせず、Alu リピートを持ち、核に多く存在する典型的な長鎖 **non-coding RNA (ncRNA)** である点でユニークである。また、昨今の miRNA を中心としたポストゲノム機能性 RNA 研究の進展から考えると、この ncRNA の制御系の解析は、その異常、破綻に伴う癌、疾患の発症の分子機序の解明に寄与するのみならず、多種多様な遺伝子発現制御能を有する miR-143/145 のオーガナイザーとして、高次生命現象に果たす役割を理解することにつながるかと期待される。

2. 研究の目的

本研究は、microRNA-143 及び -145 (miR-143/145) について、多くの癌及び疾患でなぜ発現低下しているのか、その発現低下が癌や疾患の発症の原因なのか結果なのか、正常組織における役割は何なのか明らかにし、外来性 miR-143/145 の癌や疾患に対する核酸医薬としての臨床応用や、バイオマーカーとしてのエビデンスの蓄積、ならびに内在性 miR-143/145 の発現調節を標的とした医薬品の開発を目的としている。

3. 研究の方法

(1) NCR143/145 プロモーターの解析

正常ヒトゲノム DNA を用いて PCR により上流約 2 kb のプロモーター領域を単離し、バイオインフォマティクスにより転写調節領域を推定した。動物種間で保存される CarG box や CAAT box に変異や欠失を導入し、ルシフェラーゼアッセイにより解析した。また、転写因子 SRF や ELK1 の強制発現や siRNA によるノックダウンによる転写活性の調節について検討した。

(2) NCR143/145 及び miR-143/145 の発現上昇を伴う siRNA スクリーニング

NCR143/145 及び miR-143/145 の発現制御に関わる RNA 結合タンパク質を、siRNA を用いたノックダウンによりスクリーニングした。

(3) P-body との関連性の解析

LPS や Cycloheximide(CHX) 処理による P-body の増減と NCR143/145 及び miR-143/145 発現変化との関連性について検

討した。

(4) RIP 法による解析

NCR143/145 と DDX6 及び AGO2 が直接結合しているかどうか、RIP 法により解析した。

(5) NCR143/145 分解活性の解析

DDX6 のノックダウンによる NCR143/145 の分解活性について、アクチノマイシン D(ActD)処理により解析した。また、XRN1 及び EXOSC10 のノックダウンによる NCR143/145 RNA 量の変化について解析した。

(6) 核-細胞質移行の解析

Leptomycin B(LMB)及び Importazole(IPZ) 処理により核-細胞質移行を阻害した時の DDX6 及び AGO2 の局在、NCR143/145 RNA 量の変化を解析した。

(7) キャップ依存的発現制御の解析

DCP1A のノックダウン及び抗 m7G-CAP 抗体を用いた RIP 法により、NCR143/145 の DDX6 を介した発現制御がキャップ依存的かどうか検討した。

(8) NCR143/145 発現増加に関わる機能性成分のスクリーニング

NCR143/145 の発現を増加する植物由来の機能性成分をプロモーターアッセイ及び qPCR によりスクリーニングした。

(9) 核に滞留する NCR143/145 の解析

RNA editing 酵素 ADAR1 活性を阻害した時の NCR143/145 RNA の核内・細胞質内の局在性について解析した。

4. 研究成果

(1) SRF/ELK1 による NCR143/145 発現制御

NCR143/145 プロモーター (2kb) には動物種で保存された CarG box 及び CAAT box が存在した。そこで CarG box に変異を導入したところ、プロモーター活性は有意に低下し、CarG box, CAAT box 両方を欠失すると完全に消失することがわかった (図 1)。

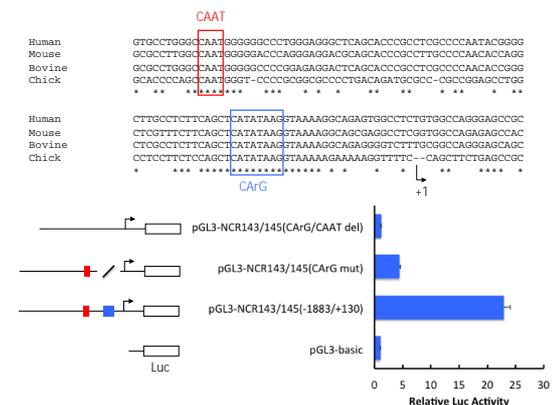


図1 NCR143/145プロモーターの解析

そこで SRF 発現ベクター及び活性化型 RhoA(V14) 発現ベクターを共発現させたところ、プロモーター活性が上昇し、逆にドミナントネガティブ型 SRF(SRFN) を共発現させたところ活性が低下した (図 2A)。また、RhoA-SRF 経路阻害剤 CCG-1423 で細胞を処理すると NCR143/145 の発現は有意に低下した

(図2B)。さらに siRNA により SRF をノックダウンするとプロモーター活性は低下し、逆に ELK1 をノックダウンすると活性が上昇した(図2C)。SRF のノックダウンにより miR-143/145 の発現も低下することから(図2D)、SRF による転写調節を介して NCR143/145 の発現が調節され、その結果、miR-143/145 の発現が変化することがわかった。また、ELK1 は miR-143/145 の標的分子であることから、発現のフィードバック制御の可能性が示唆された。

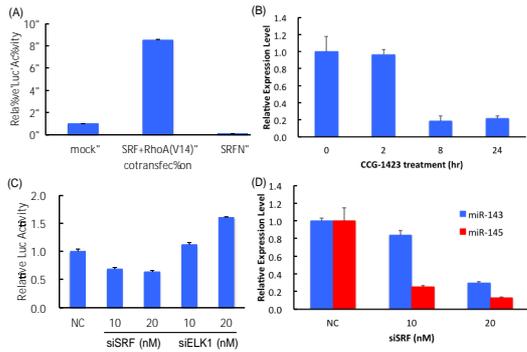


図2 SRF/ELK1による発現制御

(2) DDX6 による P-body を介した発現制御

各種 RNA 結合タンパク質の siRNA によるノックダウンスクリーニングにより DDX6 が同定された(図3A)。DDX6 は P-body のマーカーであることから、LPS 処理により P-body を増加させたところ、NCR143/145 発現量は低下した(図3B)。逆に CHX 処理により P-body を減少させたところ、NCR143/145 発現量は増加し、miR-143/145 発現量も増加した(図3C)。

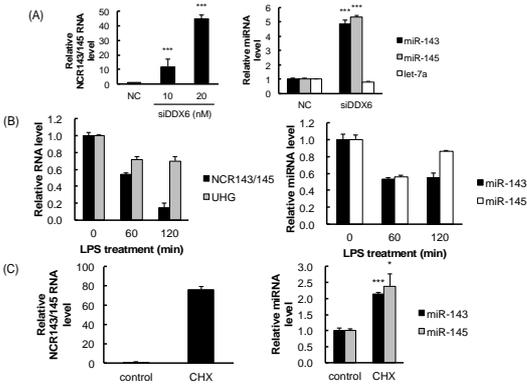


図3 DDX6とP-bodyを介した発現制御

P-body は RNA の分解に関与していることから、ActD 処理により RNA 分解活性を調べたところ、NCR143/145 RNA は分解が早く、DDX6 のノックダウンにより分解が抑制されることがわかった(図4)。

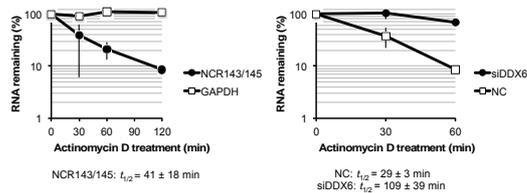


図4 NCR143/145 RNAの分解活性

細胞質の RNA 分解酵素 XRN1 や核内 RNA 分解酵素因子 EXOSC10 をノックダウンすると NCR143/145 RNA 量が増加することから、核内、核外両方で分解されていることが示唆された(図5)。

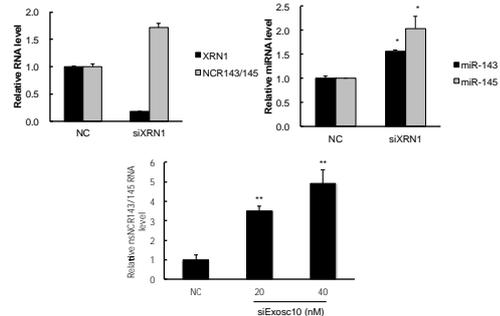


図5 RNA分解酵素複合体の関与

次に、DDX6 が直接 NCR143/145 に結合して分解に関与しているかどうか確かめるため、RIP 法を行ったところ、有意に結合していることがわかった(図6A)。また、NCR143/145 には AGO2 も直接結合しており、三者が複合体を形成していることがわかった(図6B)。

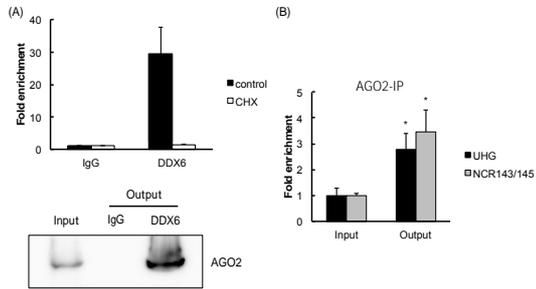


図6 DDX6, AGO2とNCR143/145の結合

DDX6 及び AGO2 は核-細胞質移行していることがわかっていて。そこで、LMB 処理により核から細胞質への移行を阻害したところ、プロセシング前の NCR143/145 RNA (nsNCR143/145) が増加することがわかった(図7A,B)。一方、IPZ 処理により細胞質から核への移行を阻害したところ、核では増加したが、細胞質では低下することがわかった(図7C,D)。

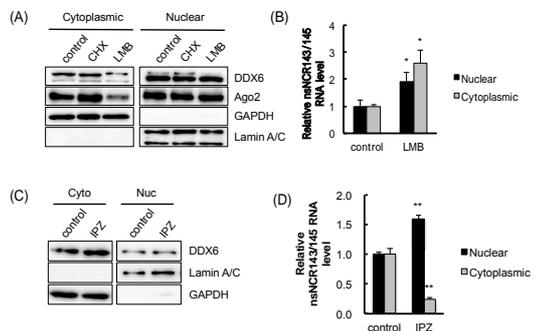


図7 核-細胞質移行による制御

DDX6 はデキャッピングを介した翻訳抑制に関与している。そこで NCR143/145 RNA の発現制御がキャップ構造に依存したものが

どうか検証するため、デキャッピングに関わる DCP1A をノックダウンしたところ、NCR143/145 RNA が増加することがわかった(図 8A)。そこで、抗 m7G-CAP 抗体を用いた RIP 法を行なったところ、CHX 処理や DDX6 ノックダウンにより m7G-CAP 構造を有した nsNCR143/145 RNA が増加することがわかった(図 8B)。

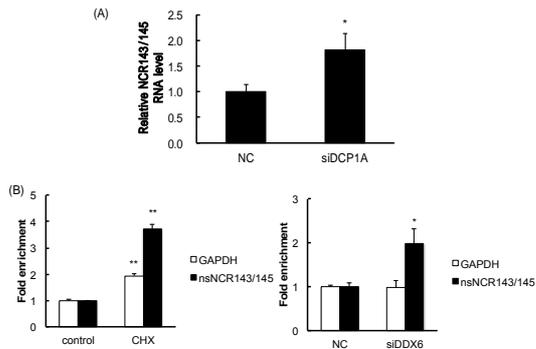


図8 m7Gキャップ依存的な発現制御

以上の結果から、DDX6 の発現の多い癌では分解されずに残ったプロセシング前の nsNCR143/145 が、DDX6/AGO2 を介して核外にリクルートされ、P-body においてデキャッピングを介して分解が促進され、その結果、miR-143/145 の発現が低下することが示唆された。

(3)miR-143/145 発現増加活性を有する機能性成分の同定

各種植物(果物)抽出物及び単離された成分の中から NCR143/145 プロモーター活性の上昇を指標にしたスクリーニングを行い、ブラジル産レッドプロポリス抽出物及びマンゴスチンに増加活性があることがわかり、miR-143/145 が増加することが確認できた(図 9)。

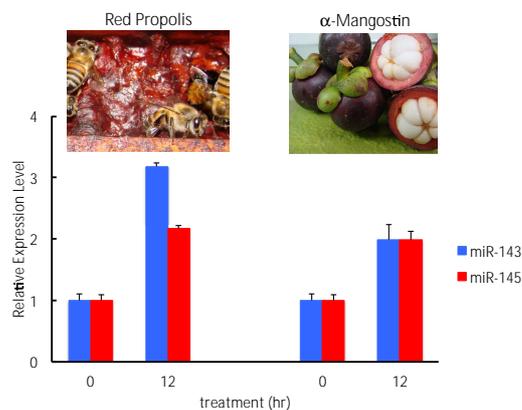


図9 機能性成分によるmiR-143/145発現調節

(4)核滞留 NCR143/145 の性状

miR-143/145 へのプロセシング及び分解を免れた NCR143/145 が、わずかに核内に滞留していることがわかってきた(図 10A)。NCR143/145 には Alu 配列が多数存在し、RNA 編集を受けている可能性が示唆された。そこで ADAR1 阻害剤である pentostatin で処理し

たところ、核内の NCR143/145 が減少し、細胞質 NCR143/145 の増加が確認できた(図 10B)。胃癌において ADAR1 の高発現が確認されており(図 10C)、以上の結果は、ADAR1 により Alu 配列を標的にした NCR143/145 RNA の RNA 編集が起こり、プロセシングを受けずに核内に滞留していることを示唆している。

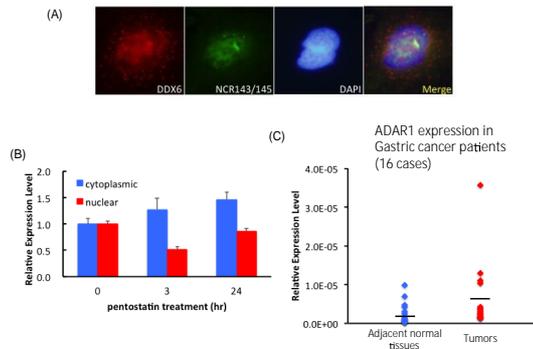


図10 ADAR1によるNCR143/145 RNAの核滞留

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1件)

Akio Iio, Takeshi Takagi, Kohei Miki, Tomoki Naoe, Atsuo Nakayama, Yukihiro Akao.

DDX6 post-transcriptionally down-regulates miR-143/145 expression through host gene NCR143/145 in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1829, 1102-1110 (2013) 査読有

DOI:10.1016/j.bbagr.2013.07.010

[学会発表](計1件)

Akio Iio and Yukihiro Akao.

DDX6 posttranscriptionally downregulates miR-143/145 expression through host gene, NCR143/145, in cancer cells.

第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月4日, 横浜

6. 研究組織

(1)研究代表者

飯尾 明生 (IIO AKIO)

愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所・発生障害学部・リサーチレジデント

研究者番号: 80344349

(2) 連携研究者

赤尾 幸博 (AKAO YUKIHIRO)

岐阜大学・院・連合創薬・教授

研究者番号: 00222505