

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657081

研究課題名(和文) 栄養状態に应答するmiRNAと時計遺伝子の発現振動相互作用の解析

研究課題名(英文) Molecular mechanism that links a nutrient-responsive miRNA with clock genes

研究代表者

堅田 利明 (KATADA, TOSHIAKI)

東京大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：10088859

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：miR-92は腫瘍形成に関与することが知られているマイクロRNA(miRNA)であるが、その生理機能や介在するシグナル伝達経路は不明な点が多い。我々は、線虫と哺乳動物の培養細胞を用いてmiR-92と時計遺伝子群との機能的相互作用の可能性を検証した。

線虫を用いた解析では、線虫のmiR-92とヒト時計遺伝子Per2のオルソログであるlin-42がお互いの発現を抑制することで、神経や下皮の前駆細胞の分化タイミングを適切に制御することを示唆する知見を得た。また、NIH3T3細胞でマウスmiR-92やそのパラログの発現パターンを調べたが、発現振動を示さなかった。

研究成果の概要(英文)：Although the microRNA(miRNA) miR-92 and its paralogues have been known to be associated with tumorigenesis, their physiological role and the signaling pathway in which they function remain to be delineated. In this study, we explored the relationship between the miR-92 family of miRNAs and the clock genes, using the nematode *C. elegans* and mammalian cultured cells.

We found several lines of evidence suggesting that *C. elegans* miR-92 orthologue, miR-235 and the clock gene *Period2* ortholog *lin-42* negatively regulate each other to determine the timing of differentiation in progenitor cells. On the other hand, miR-92 and one of its paralogues did not show oscillatory expression pattern in cultured rodent fibroblasts.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：microRNA 時計遺伝子 栄養感知 線虫

1. 研究開始当初の背景

miR-17-92 クラスターは、ポリシストロニックに転写される6つの microRNA (miRNA) からなり、腫瘍形成に関与することが知られている。しかしながら、マウスなどの哺乳動物は、miR-17-92 クラスターのパラログが複数存在し、遺伝学的な冗長性が予測されることもあって、クラスター内の個々の miRNA の詳細な生理機能や介在するシグナル伝達経路などに関しては不明な点が多い。我々は、miR-17-92 クラスターを構成する miRNA のうち、多細胞動物間で保存されている miR-92 に着目し、マウスやショウジョウバエなどとは異なり miR-92 オルソログを一つしか持たない線虫を用いてその機能解析を行ってきた。これまでに我々は、線虫の miR-92 オルソログ miR-235 は、飢餓条件下における神経前駆細胞の休眠（ここでは分裂や分化といった細胞挙動を停止した状態のことを指す）の維持に必須であることを見いだしていた。また、miR-235 の発現は、飢餓条件下で比較的高いレベルで維持され、摂食開始と共に一時的に低下し、摂食が停止する脱皮中に再び増加する振動パターンを示すことを認めていた。先行研究により、哺乳動物の概日リズムを制御する時計遺伝子 *Period* のオルソログをコードする *lin-42* も摂食開始と共に発現振動を示すことが報告されていたが、興味深いことに、その位相は miR-235 のそれとほぼ逆である。miRNA は、相補的な配列をもつ「標的遺伝子」の mRNA と相互作用し、その発現を抑制することが知られている。我々は Targetscan などのアルゴリズムを用いて、ヒト miR-92 および線虫 miR-235 の標的遺伝子候補群を比較したところ、時計遺伝子 *Period2* と TEF (Thyrotroph Embryonic Factor)、および、それらの線虫オルソログである *lin-42* と *atf-2* が、それぞれ標的遺伝子であると予測されていることを見出した。以上の知見より、我々は miR-92 および miR-235 が *Period2/lin-42* あるいは TEF/*atf-2* 時計遺伝子群の発現を負に制御し、そのような相互作用が発現振動に寄与していると考えた。

2. 研究の目的

本挑戦的萌芽研究では、線虫と哺乳動物培養細胞をもちい、miR-92 ファミリーと時計遺伝子群との相互作用を検証する。はじめに、すでに miR-235 が発現振動を示すことが確認されている線虫をもちい、miR-235 が *lin-42* および *atf-2* の発現を負に制御するかを検討した。*mir-235* の発現への寄与が認められる時計遺伝子に関しては、変異体を用いた表現形解析をおこない、*mir-235* の生理機能における時計遺伝子の寄与、および時計遺伝子の既知の生理機能における *mir-235* の寄与を遺伝学的相互作用を調べることにより評価した。哺乳動物培養細胞に関しては、時計遺伝

子の発現を同期させ、線虫 miR-235 と同様に miR-92 ファミリー群のいずれかが発現振動を示すか検討した。

3. 研究の方法

実験で使用した線虫株は、米国の CGC (Caenorhabditis Genetics Center) より購入した。表現形観察は微分干渉顕微鏡下で定法に従って行った。miR-92 ファミリーの発現解析はライフテクノロジーズ社の TaqMan プローブを用いた qRT-PCR 法によりおこなった。

4. 研究成果

(1) *mir-235* 遺伝子は飢餓条件下で *lin-42* の発現を抑制する

miR-235 の発現は飢餓条件下で亢進し、摂食開始後数時間で飢餓時の 20%以下に低下することから、miR-235 の標的遺伝子の発現は、飢餓条件下で *mir-235* 依存的に抑制され、摂食によって亢進すると予測される。実際に、miR-235 の標的遺伝子の一つである *nhr-91* は上記のような発現パターンを示すことを先に確認している。そこで、*lin-42* と *atf-2* の転写産物の発現量を、飢餓条件下における野生型と *mir-235* 欠失変異体 (*mir-235 (n4504)*)、および飢餓条件下と摂食条件下の野生型同士で比較した。その結果、*lin-42* は、飢餓条件下における野生型と比較して、飢餓条件下の *mir-235 (n4504)* 変異体および摂食条件下の野生型で再現性よく 2 倍以上高い発現量を示した (図 1)。以上の観察結果は、miR-235 が *lin-42* の発現を負に制御することを示唆する。

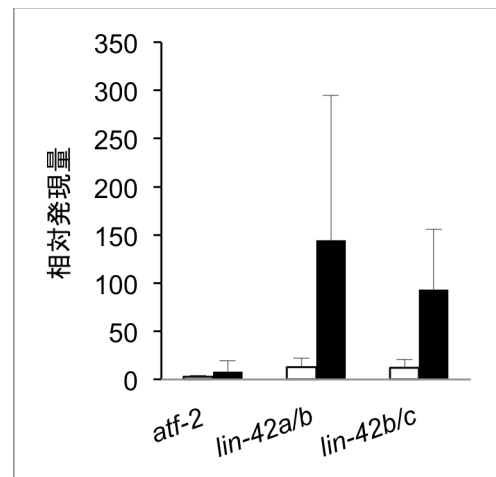


図1 時計遺伝子オルソログ *atf-2* と *lin-42* の相対発現量。

白いバーは飢餓条件下における *mir-235* 変異体/野生型の発現量比を、黒いバーは野生型における摂食開始後 8 時間/0 時間の発現量比を示す。エラーバーは標準偏差を示す (n ≥ 3)。

(2) *lin-42* は、*mir-235* 欠失変異体で見ら

れる神経前駆細胞の異常活性化に關与する

孵化直後の線虫を飢餓条件に曝露すると、確認できる全ての幹細胞や前駆細胞が分裂や分化といった細胞活動を可逆的に停止した状態で維持される。この一時的な休眠状態は、豊富な餌を摂食させることによって解除される。我々の先行研究によって、*mir-235* (*n4504*) 変異体では、飢餓条件下にもかかわらず神経前駆細胞群が休眠から離脱（活性化）し、分裂や分化をおこなうことが知られている。上述の研究で、*lin-42* は飢餓条件下の *mir-235* 変異体で顕著に発現が亢進されていることから、*lin-42* が *mir-235* 変異体での神経前駆細胞の休眠離脱に關与している可能性が考えられる。そこで *mir-235* (*n4504*) と *lin-42* 欠失変異体 (*lin-42* (*ok2385*)) をかけあわせて二重変異体を作製し、*mir-235* (*n4504*) 変異体における神経前駆細胞の活性化に対する *lin-42* の寄与を評価した。*mir-235* (*n4504*); *lin-42* (*ok2385*) 二重変異体では、飢餓条件下における神経前駆細胞の異常活性化が全く見られなかった (図 2)。よって、*lin-42* の発現亢進が神経前駆細胞の活性化を誘発する可能性が示唆された。

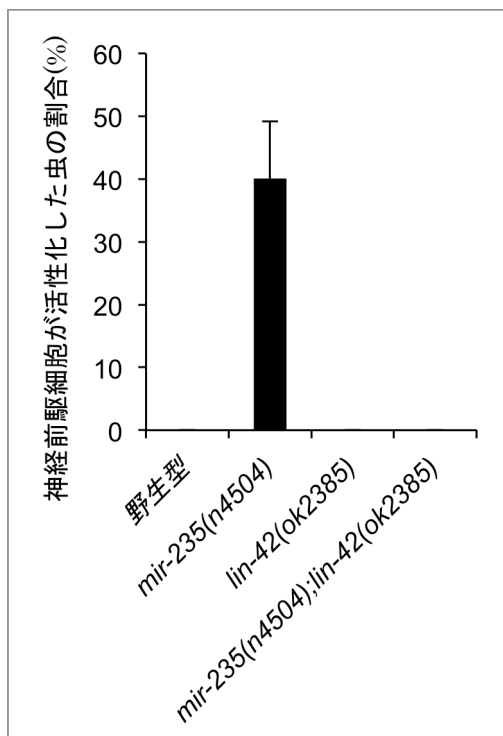


図 2 *lin-42* の機能障害は *mir-235* 変異体における神経前駆細胞の異常活性化を抑制する。

各遺伝子型を持つ線虫を 5 日間飢餓条件に曝露し、神経前駆細胞の活性化した虫の割合を測定した。エラーバーは標準偏差を示す ($n \geq 3$)。

(3) *mir-235* は *lin-42* 欠失変異体における早熟の表現形に關与する

先行研究により *lin-42* は、下皮幹細胞の分化のタイミングを制御することが明らかとなっている。*lin-42* の機能障害は、野生型と比較してライフステージの早い段階で下皮幹細胞が分化し成虫で見られるような構造を形成し、いわば早熟の表現形を示す。そこで、上述の (2) の実験とは逆に、*mir-235* の活性が *lin-42* 変異体における早熟の表現形に寄与するか否かを評価するため *lin-42* (*ok2385*) 変異体と *mir-235* (*n4504*); *lin-42* (*ok2385*) 二重変異体に置ける早熟の表現形を比較した。興味深いことに二重変異体では、*lin-42* 単独変異体と比較して顕著に早熟の表現形が抑制されていた。同様の結果は *ok2385* と異なる *lin-42* 領域を欠失した *lin-42* (*n1089*) 変異体と *mir-235* (*n4504*) 変異体を持ちいても得られた。よって、*lin-42* 変異体では miR-235 の機能あるいは発現が亢進し、早熟の表現形を誘発する可能性が示唆された。

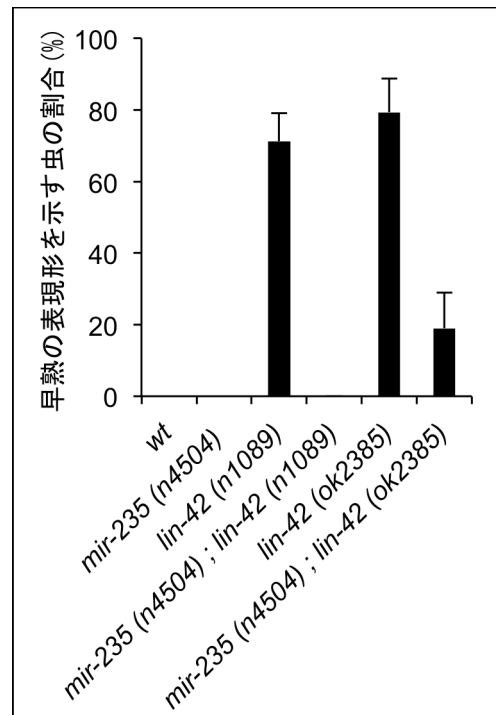


図 3 *lin-42* 変異体で見られる早熟の表現形は *mir-235* に依存する。

lin-42 変異体の早熟の表現形は、4 齢幼虫期に alae を持つ個体を数えることで評価した。エラーバーは標準偏差を示す ($n \geq 3$)。

(4) *lin-42* は miR-235 の発現を負に制御する

上記 (3) の結果より *lin-42* は miR-235 の発現あるいは活性を負に制御する可能性が考えられる。そこで、*lin-42* (*n1089*) 変異体と *lin-42* (*ok2385*) 変異体における pri-miR-235 の発現量を野生型と比較したところ、*lin-42* の両変異体で顕著に増加していることが認められた。よって、*lin-42* は miR-235 の発現を負に制御し、下皮幹細胞の

最終分化のタイミングを調節することが示唆された。

(5) miR-25 や miR-92 は繊維芽細胞では発現振動を示さない

高等動物および線虫において Period2 やその線虫オルソログである *lin-42* の発現が振動パターンを示すことは既に知られているが、高等動物において miR-92 ファミリーのいずれかが、線虫 miR-235 のように発現振動を示すのか不明である。そこで、NIH3T3 細胞を dexamethasone 処理して Period2 を含む時計遺伝子群の発現を細胞間で同期させ、同期処理後の miR-25, miR-92, miR-363, miR-367 の発現量の経時変化を、TaqMan プローブを用いた qRT-PCR によって解析した。miR-363 と miR-367 の発現は検出できず、NIH3T3 細胞ではほとんど発現していないと考えられた。また、miR-25 と miR-92 の発現は検出できたが顕著な発現振動を認めることはできなかった。今後、NIH3T3 以外の細胞、とりわけ miR-363 や miR-367 を発現する細胞において発現パターンを精査する必要がある。

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 1 件)

1. 福山 征光. 幹・前駆細胞の栄養応答とその分子機構の最前線 インスリン経路とマイクロRNAの関与. *ファルマシア* **50**: 512-516 (2014) <http://farumashia.pharm.or.jp/mokuji/2014/50-06.html> 査読無
2. Kasuga, H., Fukuyama, M., Kitazawa, A., Kontani, K., Katada, T. The microRNA miR-235 couples blast cell quiescence to the nutritional state. *Nature* **497** (7450): 503-506 (2013) [doi: 10.1038/nature12117]、査読有

[学会発表] (計 5 件)

1. 福山 征光、春日 秀文、北澤 文、小川 拓也、糸 優彦、紺谷 圏二、堅田 利明. 線虫のマイクロ RNA miR-235 は幼生発生開始の栄養チェックポイントとして機能する [第 36 回日本分子生物学会年会 ; 2013 年 12 月 4 日 / 神戸]
2. 福山 征光、春日 秀文、北澤 文、紺谷 圏二、堅田 利明. microRNA である miR-235 は前駆細胞の休眠と栄養状態を結びつける [日本動物学会第 84 回大会 ; 2013 年 9 月 28 日 / 岡山]
3. Fukuyama, M., Kasuga, H., Kitazawa, A.,

Kume, M., Ogawa, T., Kontani, K., Katada, T. The microRNA miR-235 suspends growth and development during starvation [第 46 回日本発生生物学会 ; 2013 年 5 月 31 日 / 松江]

4. 春日 秀文、福山 征光、北澤 文、紺谷 圏二、堅田 利明. インスリン経路を介した芽細胞休眠制御に関与する microRNA *mir-235* の同定と解析 [第 35 回日本分子生物学会年会 ; 2012 年 12 月 11 日 / 福岡]
5. 福山 征光、春日 秀文、北澤 文、紺谷 圏二、堅田 利明. 休眠時に高発現して発生停止を維持する microRNA [日本動物学会第 83 回大会 ; 2012 年 9 月 13 日 / 大阪]

[その他]

1. 春日秀文・福山征光. ライフサイエンス新着論文レビュー "First Author's" <http://first.lifesciencedb.jp/archives/7163>
2. 福山 征光. 日本学術振興会ウェブページ「事業の成果」 https://www.jsps.go.jp/seika/2013/vol3_003.html
3. 福山 征光. 科研費 NEWS 2013 年度 VOL. 3 P. 17. 「マイクロ RNA による前駆細胞の栄養応答性調節機構の研究」 http://www.jsps.go.jp/j-grantsinaid/22_letter/data/news_2013_vol3/news_2013_vol3.pdf
4. 福山 征光、春日 秀文、北澤 文、小川 拓也、糸 優彦、紺谷 圏二、堅田 利明. 東京大学プレスリリース (平成 25 年 5 月 8 日) 「栄養不足が発育をさまたげるしくみ —低栄養状態に応答し前駆細胞の活性化を阻害する遺伝子を発見—」 http://www.u-tokyo.ac.jp/public/public01_250508_02_j.html
5. 研究室ホームページ <http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~seiri>
6. 研究組織
 - (1) 研究代表者
堅田 利明 (KATADA, Toshiaki)
東京大学・大学院薬学系研究科・教授
研究者番号 : 10088859
 - (2) 研究分担者
福山 征光 (FUKUYAMA, Masamitsu)
東京大学・大学院薬学系研究科・助教
研究者番号 : 20422389