

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650029

研究課題名(和文) 栄養応答性miRNA発現制御に介在する新規シグナル伝達経路の解析

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism that couples the microRNA biogenesis with the nutritional state

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトを含めた動物は、食後や空腹時など栄養状態の変化に応じて、幹細胞や前駆細胞の分裂や分化といった活動を調節することが知られている。本研究では線虫という実験動物を用い、nhl-2とnos-1という遺伝子が、飢餓時に神経の前駆細胞の活動を一時停止するのに必須であること、飢餓時にmiR-235というマイクロRNAの生合成調節を促進する可能性を見出した。今後、栄養状態の変化に伴いmiR-235やnhl-2、nos-1がどのように相互作用するか調べることで、動物がどのように栄養状態の変化に応答するか、遺伝子や細胞レベルでの理解が進むことが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Stem and progenitor cells in animals have been known to change the frequency of cellular behaviors such as cell divisions and differentiation. Using the nematode, *C. elegans*, our studies suggest that two genes, called nhl-2 and nos-1, play an essential role in temporally arresting cell divisions and subsequent differentiation of neural progenitor cells during starvation, and that they regulate the biogenesis of a microRNA, called miR-235. Further elucidation of the mechanism that underlies the genetic and molecular interactions among these molecules under the nutritionally poor and replete conditions would help to understand how animals coordinate the cellular activity with the change in the nutritional state.

研究分野：生化学

キーワード：マイクロRNA RNA結合蛋白質 線虫 栄養

1. 研究開始当初の背景

miRNA は 20-24 ヌクレオチド残基からなる小さな RNA であり、部分的に相補的な配列をもつ標的 RNA の分解や翻訳抑制を促進する。miRNA は前駆体である pri-miRNA として転写され、中間体の pre-miRNA を経て、mature miRNA として成熟し機能する。これまでの研究から、miRNA の生合成過程に関わる重要な酵素群の多くは同定されたものの、個々の miRNA の発現制御に介在するシグナル伝達経路については不明な点が多い。我々は、線虫を用いて insulin/insulin-like growth factor (IGF) シグナリング (IIS) 経路の負の制御因子である pten (線虫では *daf-18*) や foxo (*daf-16*) の null 変異体と同様の表現型を示す欠失変異体として、先に miR-235 を同定した (Kasuga et al., Nature 497, 503-506. 2013)。

これまでの発現解析により、miR-235 の発現は飢餓条件下で亢進し摂食により抑制されること、摂食による発現抑制に、摂食によって活性化される IIS 経路が関与していることを見出している。しかしながら、飢餓条件下における *mir-235* の転写促進には foxo の寄与が比較的少なく、miR-235 の栄養条件に応答した発現の制御機構は未解明である。

2. 研究の目的

外界からのシグナルによるマイクロ RNA (miRNA) の発現制御の機構には不明な点が多い。先に申請者らは、線虫を用いて神経前駆細胞の飢餓応答に必須である miRNA として miR-235 を同定した (Kasuga et al., Nature 497, 503-506. 2013)。これまでに IIS 経路が miR-235 の発現を抑制すること、foxo 非依存的な miR-235 発現促進機構が存在する可能性を見出している。そこで本研究では、外界からの栄養に応答して miR-235 の発現が制御される機構を解明する。miR-235 は広く動物界で保存されており、他の動物でも foxo 以外の IIS 経路応答性転写因子などによる miRNA の発現調節機構などは不明なことから、本研究により高等動物でも保存されている新規の栄養応答性 miRNA 発現制御とシグナル経路の発見が期待できる。

3. 研究の方法

これまでの研究により、pre-miR-235 の 5' 末端より 2.3 kb 上流領域を含む 3 kb のゲノム断片が *mir-235* 変異体の表現系を完全に救助すること (Kasuga et al., Nature 497, 503-506. 2013)。そのゲノム断片から生合成された pri-miR-235 と mature miR-235 の発現および pre-miR-235 の 5' 末端より 2.3 kb 上流領域を *gfp* cDNA の上流に融合させた GFP レポーター遺伝子の発現が、内在性 mature miR-235 と同様に摂食によって顕著に抑制 (飢餓時の約 20%) されることを見出している。これらの知見は、pre-miR-235 の 5' 末端より 2.3 kb 上流領域に飢餓時に発現を亢

進させる (あるいは摂食時に発現を抑制する) シスエレメントが存在することを示唆する。そこで、前述した miR-235 GFP レポーター遺伝子を用いて、いわゆる 'promoter bashing' をおこない栄養応答性シスエレメント領域を同定する。具体的には 5' 側から複数の異なる長さを欠失したコンストラクトを作成し、*mir-235* 欠失変異体に形質転換して、表皮幹細胞や神経前駆細胞の発現に必須である領域を同定する。

上記の栄養応答性シスエレメントの絞り込みで数百ヌクレオチド残基まで絞り込んだ時点で、Clontech 社の Matchmaker Gold Yeast One-Hybrid Library Screening System を用いて酵母 1 ハイブリッド法にて結合蛋白質を単離する。次に、2 次スクリーニングとして、1 次スクリーニングで陽性クローンとして同定された遺伝子の欠失変異体が、本国のナショナルバイオリソースセンターおよび米国の線虫ストックセンターから入手できる場合はそれらを取り寄せ、また、欠失変異体が存在しなければ RNAi にて機能阻害をおこなった際の miR-235 の発現量を TaqMAN プローブを用いた qRT-PCR にて同定する。miR-235 の転写を促進する遺伝子に関しては *mir-235* 変異体と同様の表現型 (Kasuga et al., Nature 497, 503-506. 2013) を示すはずである。

4. 研究成果

pre-miR-235 の 5' 末端より 2.3 kb 上流領域に *gfp* を融合させたレポーター遺伝子を作製し、*gfp* の転写産物の発現を調べたところ、内在性 mature miR-235 と同様に摂食によって顕著に抑制 (飢餓時の約 20%) されることを見出した (図 1)。そこで、この GFP レポーター遺伝子のプロモーター領域を 5' 側から約 100 塩基対ごとに欠失したコンストラクトを作製し、GFP の発現パターンを調べた。その結果、約 2 kb 上流の領域をもつレポーター遺伝子は、2.3 kb 上流領域をもつものと同様に、表皮、表皮幹細胞、神経前駆細胞で GFP の発現を示すのに対し、1.9 kb 上流の領域しかもたないレポーター遺伝子は、表皮幹細胞でのみ GFP の発現を示した (図 2)。また、

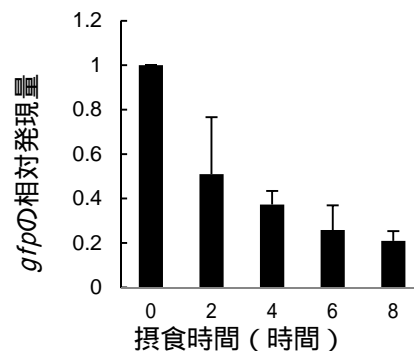


図 1 *gfp* レポーター遺伝子の発現は摂食によって抑制される

さらに 1.6 kb 上流領域までプロモーターを削り込んだコンストラクトは表皮幹細胞での GFP 発現も失うことを見出した(図2)。そこで 2.3 kb のプロモーター領域のうち、1.9-2.0 kb および 1.6-1.7 kb 上流領域をそれぞれ欠失した GFP レポーター遺伝子の発現パターンを調べたところ、1.9-2.0 kb 領域は表皮と神経前駆細胞における GFP 発現に必須

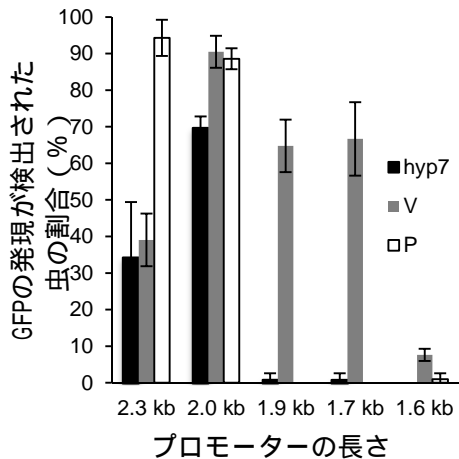


図2 *gfp* 発現に必要なシスエレメントの同定
hyp7:表皮細胞、V:表皮幹細胞、P:神経前駆細胞を示す。

であるのに対し、1.6-1.7 kb 領域は表皮幹細胞における GFP 発現に必須でないことを見出した。さらに、1.9 kb のプロモーター領域しか含まない *mir-235* ゲノム断片は、*mir-235* null 変異体における神経前駆細胞の表現型を救助できないことから、表皮と神経前駆細胞における *mir-235* の発現が神経前駆細胞の静止期維持に重要であることが示唆された。上述の 1.9-2.0 kb 領域をベイトに酵母 1 ハイブリッド法を用いて結合因子を探索したところ、DNA 結合タンパク質を 1 つ同定することができたが、そのタンパク質をコードする遺伝子の欠失変異体では *mir-235* の発現に影響は見られなかった。また、入手可能な転写因子をコードする遺伝子群の変異体を取り寄せ、*mir-235* 変異体と同様に、飢餓条件下で神経前駆細胞の静止期が維持できない変異体を探索し、そのような転写因子変異体を一系統同定した。そこで、その転写因子変異体と野生型における *mir-235* の発現量を、TaqMAN probe を用いた qRT-PCR 解析により比較したが、両者に有意な差は検出されなかった。

上に述べたアプローチにより、*mir-235* の発現に重要なシス領域を決定することはできなかったものの、その結合因子は同定することができなかった。そこで microRNA の生合成や活性調節に関与することがこれまでに示唆されたことのある因子群のなかで、機能阻害すると、*mir-235* 遺伝子の欠失変異体と同様に飢餓条件下で神経前駆細胞の静止期から

の異常活性化を示すものを探索した。その結果、TRIM-NHL タンパク質をコードする *nhl-2*

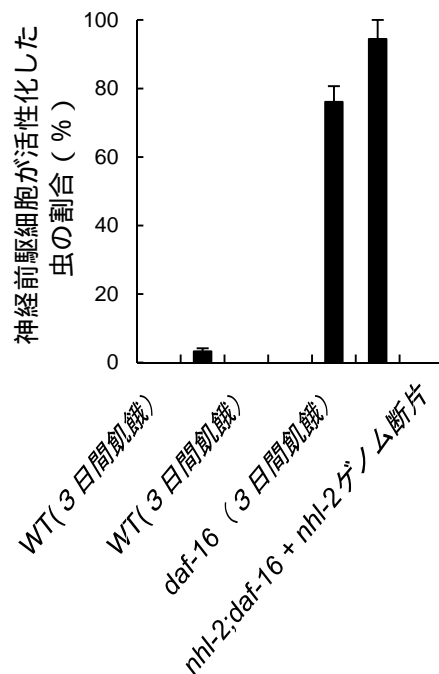


図3 *nhl-2* の欠失変異は *daf-16/foxo* null 変異体の表現型を増強する

遺伝子の欠失変異体が、ペネトランスは低いものの *mir-235* 変異体と同様の表現型を示すことを見出した(図3)。飢餓条件下の *nhl-2* 変異体における *mir-235* の発現量をノザン解析にて調べると、*daf-16/foxo* 変異体と同様に発現量の低下が見られた(図4)。そこで *nhl-2; daf-16/foxo* 二重変異体を作成したところ、*nhl-2* の欠失変異は *daf-16/foxo* null 変異体の神経前駆細胞の表現型を増強したものの、*mir-235* の発現に顕著な影響を与えなかった(図3、4)。よって、*nhl-2* は *daf-16/foxo* と並行する遺伝学的経路を介して神経前駆細胞の静止期を制御するものの、*mir-235* の発現制御に関しては、同じ遺伝学的経路で機能する可能性が示唆された。*nhl-2; daf-16* 二重変異体で認められる表現型は、約 6 kb の *nhl-2* ゲノム領域を形質転換することでほぼ完全に抑制された。よって、ノザン解析の結果も含めて考えると、*nhl-2* と *daf-16* は遺伝学的になんらかのクロストークがあると考えられた(図3)。

上述したように *nhl-2* 欠失変異体の表現型のペネトランスは比較的低いことから、*nhl-2* とリダグダントに機能する因子が存在すると考え、酵母 2 ハイブリッド法を用いて、*nhl-2* の相互作用因子を探索した。その結果、ヒトやショウジョウバエの NANOS オルソログである *nos-1* と、CCR4-NOT 複合体やデキャッピング複合体といった翻訳抑制や mRNA の分解に関与する因子群が単離された。*nos-1* の単独変異体は、野生型や *nhl-2* 欠失変異体と同様、飢餓条件下においては神経前駆細胞が

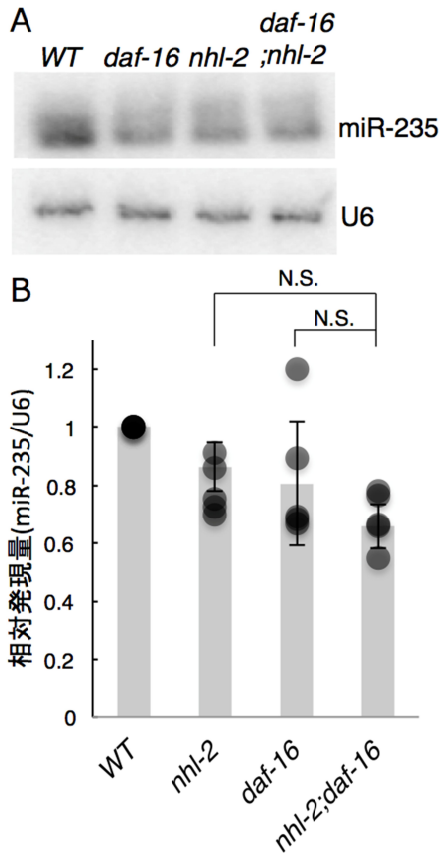


図4 *nhl-2* や *daf-16* 変異体における miR-235 の発現量
miR-235 と U6 のノザンプロット(A)と U6 を内部標準として相対定量したもの(B)を示す。N.S.は有意差なしを示す。

静止期に維持されていた。しかしながら、*nhl-2* および *nos-1* 欠失変異体と比較すると、*nhl-2;nos-1* 二重変異体では、神経前駆細胞

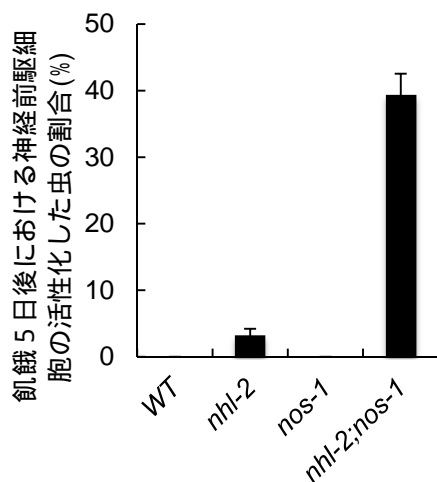


図5 *nhl-2* と *nos-1* はリダンダントに神経前駆細胞の活性化を抑制する
が活性化した虫の割合が著しく上昇した(図5)

以上の結果より、TRIM-NHL や NANOS といった蛋白質が、miR-235、並びに CCR4-NOT 複合体やデキャッピング複合体を介して、神経前駆細胞の栄養応答に参与する可能性が示唆された。しかしながら、*nhl-2* や *nos-1* が miR-235 を介して神経前駆細胞を制御するか、また、神経前駆細胞の静止期制御における *nhl-2* と *nos-1*、CCR4-NOT 複合体やデキャッピング複合体との相互作用の意義を今後検討する必要がある。TRIM-NHL と NANOS が複合体を形成する例は、ショウジョウバエの BRAT と NANOS で前例がある (Sonoda, J., & Wharton, R.P. *Genes Dev.* 15, 762-773. 2001)。しかしながら、TRIM-NHL および NANOS のいずれにおいても、本研究で示唆されたような栄養応答への関与は報告がない。今後、NHL-2 と NOS-1、翻訳制御因子群などとの生体内での相互作用を確認し、食餌環境や IIS 経路の影響を検証してゆけば、栄養応答性の新規翻訳制御メカニズムを明らかにできることが期待できる。

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4件)

Nagata Y, et al. Katada T (36人中33番目), Ogawa S. Variegated RHOA mutations in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* 127 (5): 596-604 (2016) [doi: 10.1182/blood-2015-06-644948]. 査読有

Ogita Y, Egami S, Ebihara A, Ueda N, Katada T, Kontani K. Di-Ras2 Protein Forms a Complex with SmgGDS Protein in Brain Cytosol in Order to Be in a Low Affinity State for Guanine Nucleotides. *J. Biol. Chem.* 290 (33): 20245-20256 (2015) [doi: 10.1074/jbc.M115.637769]. 査読有

Saito K, Katada T. Mechanisms for exporting large-sized cargoes from the endoplasmic reticulum. *Cell Mol. Life Sci.* 72 (19): 3709-3720 (2015) [doi: 10.1007/s00018-015-1952-9]. 査読有

Fukuyama M, Kontani K, Katada T, Rougvie AE. The *C. elegans* Hypodermis Couples Progenitor Cell Quiescence to the Dietary State. *Curr. Biol.* 25 (9): 1241-1248 (2015) [doi: 10.1016/j.cub.2015.03.016]. 査読有

[学会発表](計15件)

堅田 利明. 細胞のシグナル伝達系に介在する諸種の G 蛋白質-Gi の発見から G 蛋白質が果たす役割の拡大に向けて - [第183回 横浜市立大学医学学会 講演

会] 2015年2月19日 横浜市立大学(神奈川県・横浜市)
Masamitsu Fukuyama. Hedgehog and PTCHD genes couple reactivation of neural progenitors to the nutritional state in *C. elegans*. [第48回日本発生生物学会大会] 2015年6月3日 つくば国際会議場(茨城県・つくば市)
齋藤 康太、篠原 健太郎、前田 深春、佐々木 紀人、友石 章太郎、堅田 利明. 小胞体からのコラーゲン分泌機構の機能解析 [第14回生命科学研究会] 2015年6月26日三浦市民ホール(神奈川県・三浦市)
Masamitsu Fukuyama, Masahiko Kume, Kenji Kontani, Toshiaki Katada. Hedgehog and PTCHD genes couple reactivation of quiescent neural progenitors to the dietary environment. [20th International *C. elegans* Meeting] 2015年6月27日 Los Angeles(米国)
齋藤 康太、田辺 共哉、篠原 健太郎、前田 深春、佐々木 紀人、堅田 利明. コラーゲン分泌に対しcTAGE5は2種の異なる機能を有する [第67回日本細胞生物学会] 2015年6月30日 タワーホール船堀(東京都・江戸川区)
Kota Saito, Tomoya Tanabe, Toshiaki Katada. Dual function of cTAGE5 in collagen export from the ER. [Gordon Research Conference, Molecular membrane biology] 2015年7月15日 Andover(米国)
前田 深春、齋藤 康太、堅田 利明. 小胞体上のVII型コラーゲン積み荷受容体の性状解析.[第14回次世代を担うファーマ・バイオフィォーラム2015] 2015年9月12日 千葉大学(千葉県・千葉市)
岡 実穂、橋本 圭介、山口 良文、齋藤 伸一郎、三浦 正幸、三宅 健介、紺谷 圏二、堅田 利明. マウス初期胚発生過程において低分子量Gタンパク質Ar18bはリソソームによる母体由来タンパク質の分解に必要である.[第14回次世代を担うファーマ・バイオフィォーラム2015] 2015年9月12日 千葉大学(千葉県・千葉市)
坂井田 京、北澤 文、春日 秀文、糸 優彦、福山 征光、紺谷 圏二、堅田 利明. TRIM-NHL NHL-2を介した神経前駆細胞の栄養応答機構の解析.[第14回次世代を担うファーマ・バイオフィォーラム2015] 2015年9月13日 千葉大学(千葉県・千葉市)
篠原 健太郎、齋藤 康太、堅田 利明. 細胞外環境pHによるER exit siteの局在制御機構の解析 [BMB2015 第38回日本分子生物学会年会第88回日本生化学

会大会合同年会] 2015年12月1日 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)
前田 深春、齋藤 康太、堅田 利明. 小胞体上のVII型コラーゲン積み荷受容体の性状解析[BMB2015 第38回日本分子生物学会年会第88回日本生化学会大会合同年会] 2015年12月3日 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)
福山 征光. 線虫における神経前駆細胞の栄養応答を司る組織間ネットワーク [BMB2015 第38回日本分子生物学会年会第88回日本生化学会大会合同年会] 2015年12月3日 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)
齋藤 康太、前田 深春、篠原 健太郎、堅田 利明. 生理的および肝線維化時におけるコラーゲン分泌機構の解析 [BMB2015 第38回日本分子生物学会年会第88回日本生化学会大会合同年会] 2015年12月3日 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)
橋本 圭介、岡 実穂、山口 良文、岸 雄介、後藤 由季子、三浦 正幸、紺谷 圏二、堅田 利明. 低分子量Gタンパク質Ar18bはマウス胚発生における正常な脳形成に必要である[BMB2015 第38回日本分子生物学会年会第88回日本生化学会大会合同年会] 2015年12月3日 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)
岡 実穂、橋本 圭介、山口 良文、齋藤 伸一郎、三浦 正幸、三宅 健介、紺谷 圏二、堅田 利明. マウス初期胚発生過程において低分子量Gタンパク質Ar18bは母体由来タンパク質のリソソーム分解に必要である[BMB2015 第38回日本分子生物学会年会第88回日本生化学会大会合同年会] 2015年12月4日 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

[その他]

東京大学大学院薬学系研究科生理化学教室
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・講師
研究者番号：20422389