

「筋ジストロフィー関連マイクロ RNA の魚類モデルにおける機能」

神戸大学大学院理学研究科

日下部 りえ

1 研究の背景と目的

骨格に連結し伸縮することで運動や呼吸、嚥下を可能にする骨格筋は、生命維持に不可欠な器官である。骨格筋は常時損傷と再生を繰り返しており、非常に再生能力の高い組織であるが、治療法の確立していない遺伝性疾患が多数存在する。また、筋肉ごとに異なる形態や機能と、遺伝子調節との関連は未解明な部分が多い。

昨今のゲノム情報の蓄積により、骨格筋の再生過程やタンパク質をコードしない機能性 RNA の重要な関わりが示されつつある。機能性 RNA の一グループである microRNA はわずか 22 塩基の短い RNA 分子で、標的 messenger RNA の非翻訳領域への結合により、翻訳抑制や分解促進を引き起こす。microRNA の多くは時間・空間特異的に発現し、転写因子、分泌タンパク質、各種構造タンパク質や酵素の遺伝子の発現調節を担う。例として、筋ジストロフィーのうちジストロフィンタンパク質を欠くデュシェンヌ型(DMD)と肢帯型ジストロフィー (LGMD) では、複数の microRNA の発現レベルが異なることが知られている。しかし、さまざまな形態と機能をもつ骨格筋の発生過程においてこれらの microRNA の発現パターンや、標的 mRNA との相互作用がどのように変化するかは未解明な部分が多い。

本研究では筋ジストロフィーをはじめとする遺伝性筋疾患に関わる miR について、骨格筋組織間での分子機能比較を行う。生きた胚内での筋肉の観察が容易なメダカを材料に、遺伝子調節システムを実験的に調べる基盤を立ち上げ、骨格筋の発生過程における miR の機能に迫る。

2 研究方法・研究内容

本研究では主として以下の方法により、メダカの microRNA の配列およびゲノム上の位置の同定、発現パターンの解析、および抑制機能の解析を行った。

(1) メダカ *Oryzias latipes* の小分子 RNA ライブラリーの作成と大規模解読

小分子 RNA に最適化された抽出キット (Ambion 社) を用い、日本産ヒメダカから、22 塩基前後の長さの RNA 分子を抽出する。得られた RNA にアダプターオリゴを連結し、PCR 反応を用いて DNA ライブラリーへと変換した。次世代シーケンサーを用いて配列を解読した。さらに、メダカゲノム配列データベース (ナショナルバイオリソースプロジェクト・基礎生物学研究所) を用いて、microRNA のゲノム上の位置を同定した。

(2) 筋肉関連 microRNA の発現パターンの解析

(1) で同定された microRNA のうち、筋肉の発生過程に機能していると予想されるものを選び、1) ノザンハイブリダイゼーションによる発生段階特異的な発現の検出、2) in situ ハイブリダイゼーションによる組織特異的な発現の検出、という 2 種類の方法で発現パターンの解析を行った。プローブとして LNA (locked-nucleic acid-modified oligonucleotide) 修飾オリゴプローブを使用した。

(3) microRNA の機能阻害実験

筋肉特異的な microRNA が生体内でどのように機能しているか調べるため、モルフォリノアンチセンスオリゴ（カスタム合成）を用いた機能阻害実験を行った。メダカ受精卵の卵殻は非常に硬く、顕微注入法（マイクロインジェクション）による導入は困難を伴う。そこで、還元型グルタチオン溶液処理を行って卵殻を軟化させ、手製のホールディングピペットを用いた顕微注入を行った。

3 研究成果

(1) メダカ筋肉特異的 microRNA の同定

メダカ胚から抽出した小分子 RNA より遺伝子ライブラリーを作製し、800 万クローン以上の塩基配列を解読した。その結果、約 560 種類の新規メダカ microRNA を同定することができた。

次にメダカゲノム上における microRNA 遺伝子の位置を同定した。筋肉に発現する代表的な microRNA である miR-1, miR-133, miR-206 は近傍に位置し、特徴的なクラスター構造をもっていた。miR-1 遺伝子（第 7 染色体と第 17 染色体）、miR-206（第 24 染色体）、miR-133 遺伝子（第 7 染色体、第 17 染色体、第 24 染色体）は、「miR-1 と miR-133」「miR-206 と miR-133」という組合せで同じ染色体上の近傍に位置し、遺伝子対を形成していた。

(2) 発生過程におけるメダカ miR-1, miR-133, miR-206 の発現パターンの解析

成魚から数種類の組織を取り出し、各組織から抽出した total RNA に対してノザンブロットを行ったところ、主に心臓と体幹部筋肉において約 22 塩基鎖長の miR-1 と miR-133 の発現が見られた。一方、miR-206 は体幹部筋肉のみで発現しており、心臓由来の total RNA では発現が見られなかった。また、各発生段階を追ったノザンブロットでは、い

ずれの microRNA も体節が形成され始める受精後 2 日から発現が始まり、発生が進むにつれてその発現量は増加していた。また、成熟型 microRNA の発現だけでなく miR-206 と miR-133 の前駆体（約 80 塩基）に対応するバンドも検出することができた。

次に胚に対するホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。発現の検出にはノザンブロットで使用したのと同じ配列の LNA プローブを用いた。これらの microRNA は受精後 3 日において体節由来の骨格筋細胞での発現が確認された。しかし哺乳類での場合と異なり、心臓での発現は見られなかった。さらに、これらの miRNA は、体幹部と胸鰭原基内の筋肉で異なる発現様式を示していた。受精後 5 日胚では体



図 1. メダカ胚での前駆体 miR の *in situ* ハイブリダイゼーション法による発現検出。上段: miR-1-2/133a-1 前駆体。下段: miR-206/miR-133b 前駆体。どちらの前駆体も一つの RNA 分子として、筋肉細胞のみに産生される。

幹部の筋肉に加え、胸鰭原基内でも筋細胞の分化が起こる。この発生段階の胚において miR-206 は体幹部と胸鰭原基内の両方の筋肉で発現が検出された。一方、miR-1 の発現は体幹部の筋肉のみで、胸鰭原基内では見られなかった。

上記のような発現様式の違いが microRNA 生成過程のどの段階で起こっているか調べるため、一次転写産物の前駆体 miRNA を含む領域をクローニングし、発現様式を調べた。遺伝子間領域が 800bp とコンパクトな miR-206 と miR-133b について、RT-PCR を行ったところ、この領域に対応するひとつながりの遺伝子断片を増幅することができた。さらにこの産物に対する RNA プローブを用いてホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションを行ったところ、miR-206/133b の発現は体幹部や胸びれ原基、さらに頭部の骨格筋でも miR-206/133b の転写産物が見られた。一方、心臓での発現は見られなかった。

同様の解析を、miR-1-1/miR-1-2 及び miR-133a-1/miR-133a-2 遺伝子対についても行った。その結果、miR-1-1 と miR-133a-2 は体節由来の筋肉と胸びれ原基内の筋肉で発現しており、心臓では発現が見られなかった。成熟型 miRNA と前駆体 miRNA の発現様式を比較すると成熟型 miR-1 は胸鰭原基内での筋肉細胞に発現が見られなかったのに対し、前駆体 miR-1-1 にはその発現が見られた。microRNA は一次転写産物の産生調節と細胞質内でのプロセッシング調節の両方により、筋肉器官ごとに異なる遺伝子調節機構を担っていることが示唆された。

(3) microRNA 遺伝子の上流転写調節領域の予測

これらの miRNA ファミリー遺伝子の上流領域に結合する転写因子の予測を行った。転写因子結合モチーフの予測解析ソフト (TFsearch) を用いてこれら miRNA 遺伝子の上流領域の配列に対して筋肉関連転写因子の結合モチーフの探索を行った。その結果、これらの microRNA 遺伝子対は複数種の心筋や骨格筋形成関連転写因子群により転写制御を受け、一続きあるいは個別の転写産物として生成されると予想される。一方、miR-206/miR-133 遺伝子については前述の miR-206/133b の転写産物の検出実験結果と一致して、miR-206 上流の E-box と MyoD ファミリーによる骨格筋特異的な転写制御によって、一続きの転写産物が生成され、その後 miR-206 と miR-133 の個別の miRNA へとプロセッシングを受けると考えられる。

(4) microRNA の機能阻害による機能解析

まず成熟型 miR-206 の配列に完全に相補なモルフォリノオリゴ (MO) をメダカの 1 細胞期の細胞質に顕微注入した。ネガティブコントロールとして、miR-206MO の 5 塩基に塩基置換を挿入した MO も使用した。実験胚を体幹部と胸びれの筋肉が完全に形成される受精後 5 日まで発生させ、totalRNA を抽出し、ノザンブロットを行った。コントロール MO 注入胚や正常胚では miR-206 の発現が検出されたのに対し、miR-206MO を顕微注入した胚では miR-206 の発現はほとんど見られず、この miR-206MO が miR-206 の発現を特異的に抑制できることが確認できた

続いて、この miR-206 機能阻害胚を受精後 5 日で固定し、さまざまな筋肉マーカーによる発現検出を行い、筋肉形成に与える影響を調べた。miR-206 機能阻害胚では骨格筋アクチン *OLMA1* の発現が体幹部の筋肉で減少していた。*MyoD* の発現は正常胚のものと同様であった。以上の結果から miR-206 は筋分化決定因子の下流に位置する収縮

タンパク質遺伝子の転写を亢進する機能を持ち、そこには未知の抑制的な因子が介在していると考えられる。

発表論文

1. **Rie Kusakabe**, Saori Tani, Koki Nishitsuji, Miyuki Shindo, Kohji Okamura, Yuki Miyamoto, Kenta Nakai, Yutaka Suzuki, Takehiro G. Kusakabe, and Kunio Inoue. (2013) Characterization of the compact bicistronic microRNA precursor, miR-1/miR-133, expressed specifically in *Ciona* muscle tissues. *Gene Exp. Patterns* 13(1), 43-50.
2. Saori Tani, Shigehiro Kuraku, Hiroshi Sakamoto, Kunio Inoue and **Rie Kusakabe**. (2013) Developmental expression and evolution of muscle-specific microRNAs conserved in vertebrates *Evol. Dev.* 15 (4), 293–304.
3. Yumiko Kato, **Rie Kusakabe**, Kunio Inoue and Shin Tochinai. (2013) miR-124 is involved in post-transcriptional regulation of polypyrimidine tract binding protein 1 (PTBP1) during neural development in the medaka, *Oryzias latipes*. *Zool. Sci.* 30 (11), 891-900.

4 生活や産業への貢献および波及効果

メダカは日本でゲノム解読が完了し、魚類のなかでも、他系統との比較に適したゲノム形質を持っていることが知られる。本研究の成果により、機能性 RNA 研究でのメダカの利用基盤が整い、マイクロインジェクション技術を応用した miR 機能阻害や過剰発現の実験が可能な段階に達した。今後、疾患により筋障害と再生のバランスが失われる際の miR の挙動を解明し、病理診断や機能阻害を応用した治療法の開発へつなげることを目指している。将来的には、遺伝性筋疾患の変異体メダカを用いて、通常状態と運動を制限した状態での相互作用の比較を行い、筋分化と再生における機能性 RNA の役割を明らかにしていきたい。