

必須アミノ酸欠乏に応答するmiRNAsの探索とその作用機序に関する研究

| | |
|---------|---|
| 著者 | 山村 淳貴 |
| 学位授与年月日 | 2016-03-24 |
| URL | http://doi.org/10.15083/00073596 |

博士論文（要約）

必須アミノ酸欠乏に応答する miRNAs の 探索とその作用機序に関する研究

東京大学大学院 農学生命科学研究科

応用生命化学専攻 平成 25 年入学

氏名 山村 淳貴

指導教官 加藤 久典

目次

| | |
|--|----|
| 序論 | 1 |
| 第一章 HepG2 細胞においてロイシン欠乏に応答して発現変動する miRNAs の探索 とオミクス手法を利用した標的遺伝子解析手法の検討 | 12 |
| 緒言 | |
| 第一節 HepG2 細胞においてロイシン欠乏下で発現上昇する miRNAs の網羅的探索 | |
| 1-1-1. 材料と方法 | 13 |
| 1-1-2. 結果 | 17 |
| 第二節 各種オミクス手法を利用した、hsa-miR-1228-5p の標的遺伝子候補の探索 | |
| 1-2-1. 材料と方法 | 18 |
| 1-2-2. 結果 | 22 |
| 第三節 考察 | 23 |
| 図表 | 26 |
| 第二章 ロイシン欠乏下の HepG2 細胞で転写因子 ATF4 によって制御される miRNAs の機能とその応答機序の解析 | 32 |
| 緒言 | |
| 第一節 ATF 過剰発現プラスミドの構築と HepG2 細胞導入時の発現確認 | |
| 2-1-1. 材料と方法 | 34 |
| 2-1-2. 結果 | 39 |
| 第二節 ATF4 過剰発現時に発現上昇する miRNAs の探索とその発現挙動解析 | |
| 2-2-1. 材料と方法 | 40 |
| 2-2-2. 結果 | 43 |
| 第三節 トランスフェクション技術を利用した hsa-miR-663a および hsa-miR-1469 の機能解析 | |
| 2-3-1. 材料と方法 | 45 |
| 2-3-2. 結果 | 48 |
| 第四節 考察 | 50 |
| 図表 | 55 |

| | | |
|-----|--|--|
| 第三章 | ロイシン欠乏食給餌マウス肝臓において発現上昇する miRNAs の探索と AML12 細胞を利用したその機能解析 | 72 |
| | 緒言 | |
| | 第一節 | ロイシン欠乏食給餌マウスの表現型と脂質代謝関連遺伝子の発現解析 |
| | 3-1-1. | 材料と方法 73 |
| | 3-1-2. | 結果 76 |
| | 第二節 | ロイシン欠乏食給餌マウス肝臓において発現応答する miRNAs の網羅的探索と標的遺伝子候補の探索 |
| | 3-2-1. | 材料と方法 77 |
| | 3-2-2. | 結果 79 |
| | 第三節 | マウス肝臓 AML12 細胞を利用した mmu-miR-182-5p および mmu-miR-193a-3p、mmu-miR-193b-3p の機能解析 |
| | 3-3-1. | 材料と方法 80 |
| | 3-3-2. | 結果 84 |
| | 第四節 | 考察 86 |
| | 図表 | 91 |
| | 総合討論 | 115 |
| | 参考文献一覧 | 123 |
| | 論文要旨 | |
| | 謝辞 | |

序論

序論

長い間、タンパク質をコードしない ncRNA (non-coding RNA) は機能を持たないものとされてきたが、近年ではこの ncRNA が生物の多様性を生み出す基盤となると考えられている (Mattick, 2004)。ncRNA は 20-30 塩基長の小分子 RNA (snRNA) と、タンパク質をコードする mRNA と同様の構造を有する長鎖 ncRNA (LncRNA) に大別される (Amaral and Mattick, 2008)。ここでは近年急速に研究が進んでおり、本研究でも研究対象とした小分子 RNA に焦点を当てて紹介する。

0-1. 小分子 non-coding RNA

タンパク質をコードしない non-coding RNA のうち、20-30 塩基長の小分子 RNA には miRNAs (microRNAs)、siRNA (small interfering RNA)、piRNA (PIWI-interacting RNA) の 3 種がある (Kim et al., 2009)。これらは後述する様々な修飾過程を経て、mature small RNA となるが、その後標的遺伝子へのリクルートをする因子によって 2 種類に分けられる。すなわち Argonaute ファミリーに属する AGO によってリクルートされる miRNAs および siRNA、同じく Argonaute ファミリーに属する PIWI によってリクルートされる piRNA である (Czech and Hannon, 2011)。Argonaute によって標的にリクルートされる小分子 ncRNA のうち、特に研究が進められているのが miRNAs である (Kozomara and Griffiths-Jones, 2011)。

0-1-1. miRNAs (microRNAs)

miRNA の研究は lin-4 の発見に始まる。1993 年に lin-14 と呼ばれる転写因子の mRNA 発現が小分子 ncRNA によって制御されていることが線虫において発見され、この小分子 ncRNA は lin-4 と命名され、これが miRNA の最初の発見となった (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993)。実際に miRNAs という呼び名が使用され始めたのは 2001 年からで、そこから miRNAs 研究は急速に進んでいった (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee and Ambros, 2001; Ruvkun, 2001)。線虫からヒトに至るまで 223 種において保存されていると言われている miRNAs であるが、種によって特徴がある。代表的なものとして植物と動物に関して紹介すると、植物の miRNAs は標的遺伝子の mRNA に対して完全相補性を持つ (Rhoades et al., 2002)。従って 1 種の miRNAs に対する標的遺伝子の数は、多くても数遺伝子となる。一方動物の miRNAs は、5'末端のわずか 7-8 塩基の相補性によって標的遺伝子の発現を制御できるという特徴を持ち、これにより 1 種の miRNAs に対する標的遺伝子の数が数百に上ることもある (Bartel, 2009; Doench and Sharp, 2004; Lai, 2002)。本研究においても動物の miRNAs に注目して研究を進め、以降 miRNAs は動物のものを指すことにする。

0-1-2. miRNA の生合成経路

標準的な miRNA の生合成は pri-miRNA (primary-miRNA) と呼ばれる長い転写産物が段階的に切断を受けることで行われる。この pri-miRNA は通常 RNA polymerase II によって転写される。その後のプロセッシング過程には大きく分けて 2 つあり、canonical なプロセッシング、mitrion と呼ばれるプロセッシング方法があり、それぞれ全 miRNAs 発現様式の約 2/3、1/3 を占めると言われている (Ha and Kim, 2014; Kim et al., 2009)。生成した pre-miRNAs は、canonical なプロセッシングでは、核内で Drosha RNase III および DGCR8 と呼ばれる酵素タンパク質によって切断を受け、~55-70 塩基長の pre-miRNAs となる。一方、mitrion プロセッシング過程では、スプライシング後、Lariat-debranching enzyme と呼ばれる酵素タンパク質によって切断を受け、pre-miRNAs が生成する。その後、Exportin-5 により核外に輸送された pre-miRNAs は Dicer RNase III および TRBP に認識されさらに切断され、~22 塩基長の 2 本鎖 RNA になる (Czech and Hannon, 2011)。この 2 本鎖 RNA のうち細胞内に高濃度で存在するものは mature-miRNAs、低濃度で存在するものは miRNAs もしくは star 配列と呼ばれ、以前は mature-miRNA が主に AGO 複合体に取り込まれ、機能を発揮し、star 配列は分解されるものと考えられていた (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003) が、近年の研究によって、star 配列側も AGO 複合体に取り込まれ、機能を発揮する例が発見され始め、こちらも無視できない存在となっている (Ghildiyal et al., 2010; Okamura et al., 2008)。miRNAs 生合成の過程の様子を Fig. 0-1 に示した。

0-1-3. miRNAs による標的遺伝子の発現調節機構

AGO 複合体に取り込まれ、miRISCs (miRNA-induced silencing complexes) となった miRNAs は標的となる遺伝子の mRNA の 3'UTR にリクルートされる。miRNAs は自身の 5'末端の 6-8 塩基長の seed sequence と呼ばれる領域によって、標的遺伝子の 3'UTR に存在する相補的配列を認識する。標的遺伝子の発現抑制は、まず mRNA の脱アデニル化から始まる。複数の酵素タンパク質複合体により、脱アデニル化が繰り返され、最終的には脱キャップ反応が誘導される。その後、5'末端から mRNA の分解が始まり、発現が抑制される (Fabian and Sonenberg, 2012; Huntzinger and Izaurralde, 2011)、Fig. 0-2)。一方、翻訳の抑制は miRISCs が eIF4F 複合体に作用し、不安定化することで誘導されていると考えられているが、その詳細な機構は明らかにされていない (Ricci et al., 2013)。こうした複数の機構によって標的遺伝子の調節が行われているが、近年の研究成果によれば、miRNAs による制御はまず mRNA の緩やかな翻訳抑制に始まり、その後強力な mRNA 分解が引き起こされることや、制御機構の 70-80% を mRNA 分解が占め、mRNA 翻訳抑制は 20-30% 程度であることなども報告されている (Eichhorn et al., 2014; Guo et al., 2010; Meijer et al., 2013)。

0-1-4. miRNAsによる標的遺伝子抑制能

miRNAsが5'末端のseed sequenceをもとに標的遺伝子の3'UTRに結合して働くことは既に述べたが、その結合力あるいは作用力の評価も行われている。seed sequenceの相同性が高いほど結合力が強く、抑制作用が強くなることは言うまでもない。また標的mRNAの5'末端から1塩基目がAであることや、8塩基目がmiRNAsのseed sequenceと相補的であることなども重要な要素であり、標的部位のうちでこれら両条件を満たすものを8mer site、8塩基目の相補性に欠けるものを7mer-A1 site、1塩基目がAでないものを7mer-m8 siteと呼び、この順に発現抑制作用が強いことが提唱されている(Lewis et al., 2005)。また標的遺伝子3'UTR内に複数の標的部位がある場合や、3'末端により近い部分に標的部位が存在する場合には抑制作用を有しやすいなどの報告もされている(Agarwal et al., 2015)。こうした知見を元に、様々なmiRNAsの標的遺伝子探索ツールが構築されており、そのうちの1つが本研究でも利用したTargetScan (Release 7.0, http://www.targetscan.org/vert_70/)である。このサイトではヒト、線虫、ショウジョウバエ、魚について種々のmiRNAsとその標的部位を検索することが出来る。様々なツールの中でもTargetScanHuman 7.0は2015年8月に更新され、最新のゲノム情報を元に標的部位を探索することが出来る。

0-2. 種々の疾患の発症とmiRNAsの関わり

標的遺伝子の発現を調節するというその特性から、miRNAsは様々な疾患発症のメカニズムに関わるとされている。例としてここではガン、肥満とインスリン抵抗性、サルコペニアとmiRNAsとの関わりについて述べる。

0-2-1. ガンとmiRNAs

慢性リンパ球性白血病患者のリンパ球において、しばしばmiR-15/16クラスターが欠損していることから(Calin et al., 2002)、ガン抑制遺伝子としてのmiRNAsの側面が明らかにされたことがきっかけになり、ガンとmiRNAsの関連性は急速に研究されている。核外でのmiRNAsの最終的な修飾に働くDicer (Fig. 0-1)をノックアウトし、全体的なmiRNAsの産生を抑制すると、細胞のガン化が促進されるなどの報告もあり、こうした見解を支持している(Kumar et al., 2009; Lambertz et al., 2010)。miR-15/16の他にもmiR-26aはCCND2やCCNE2を標的とすることで、細胞増殖の抑制を誘導する性質を持ち、肝臓ガン細胞において発現が低下していること、let-7はRasを標的とすることで同じく細胞増殖の抑制を誘導する性質を持ち、肺ガン細胞において発現が低下しているなど、様々な報告がなされている(Kota et al., 2009; Trang et al., 2010)。

一方、逆にガン化を誘導するmiRNAsに関する報告も数多くなされており、OncomiRsと称される。例えばmiR-155はその過剰発現によってB細胞のガン化を誘導することや、miR-21の過剰発現によってB細胞リンパ腫が誘導されるなどの報告が

ある (Costinean et al., 2006; Medina et al., 2010)。

さらに一部の miRNAs は組織によってはガン抑制遺伝子であったり OncomiRs でもあったりする例も報告されており (Felli et al., 2005; Garofalo et al., 2012)、研究の余地は残されているが、ガン治療の創薬などへの応用が大きく期待されている。

0-2-2. 肥満、インスリン抵抗性と miRNAs

インスリンはグルコース代謝を司る非常に重要なホルモンであり、膵β細胞から分泌され、全身の様々な組織に作用し、グルコース取り込みを促進する (Mayer et al., 2007)。肥満によって誘導される種々の炎症性サイトカインは、組織のインスリン抵抗性を惹起する一因とされている (Osborn and Olefsky, 2012)。肥満患者の脂肪細胞では miR-126 および miR-193b の発現が低下していること、このうち miR-126 が炎症性サイトカインの 1 種である *CCL2* を標的としていることが報告されている (Arner et al., 2012)。また miR-221 は肥満患者の脂肪細胞における発現が上昇しており、アディポネクチンのレセプターである *ADIPOR1* を標的とし、アディポネクチンの作用を抑制することでインスリン抵抗性の発症に寄与していると考えられている (Lustig et al., 2014; Yamauchi and Kadowaki, 2013)。他にも肥満患者の肝臓において miR-802 の発現が上昇し、*HNF1β* を標的とし発現抑制することで耐糖能異常やインスリン抵抗性を誘導している可能性なども報告されている (Kornfeld et al., 2013)。

0-2-3. サルコペニア骨格筋萎縮病態と miRNAs

近年、骨格筋萎縮病態の 1 つとして、Sarcopenia (サルコペニア、加齢に伴う骨格筋萎縮) が注目されており、今後超高齢化社会を迎える我が国では特に対策が急務であるとも言われている (Cruz-Jentoft et al., 2010)。骨格筋萎縮病態が引き起こされる機構の 1 つに 2 つの E3 ユビキチンリガーゼの発現調節がある。"Atrogenes" とも称される *MAFbx* および *MuRF1* は標的タンパク質をユビキチン化し、その後のユビキチン・プロテアソーム系による分解を誘導することで骨格筋タンパク質量を減少させる (Bodine et al., 2001)。これら両遺伝子は miR-23a および miR-23b の標的配列を有していることがマウスやラット、ヒトにおいて確認されており、細胞実験や動物実験において、こうした miRNAs の過剰発現によって Dexamethasone 誘導性の骨格筋萎縮の程度を軽減することが報告されている (Wada et al., 2011)。

0-3. タンパク質・アミノ酸栄養不良との関わりと、アミノ酸栄養シグナル

前述した癌やインスリン抵抗性とそれに伴う 2 型糖尿病、サルコペニアの発症およびその症状悪化において、日々の食事環境の悪化に伴う栄養不良がその一因であるとされている (Anker and Morley, 2015; Turner-McGrievy et al., 2008; Vetter et al., 2014)。本研究では代表的な栄養素として、タンパク質を構成する分子であるアミノ酸に着目し

た。アミノ酸栄養状態が悪化すると、生体内では様々なシグナルを介してその状況への応答が生ずる。中でもアミノ酸による翻訳活性調節機構および遺伝子発現調節機構は盛んに研究が進められている。以下に代表的な例を2つ挙げる。

0-3-1. mTOR 依存的な翻訳調節機構

mTOR (mammalian target of rapamycin) と呼ばれるキナーゼは、下流の 4E-BP1 や p70S6K1 をリン酸化することで eIF4E 複合体形成を介したキャップ依存的翻訳の促進、または Top mRNA と呼ばれる一部の mRNA の翻訳を活性化させることが知られている。mTOR はインスリンや IGF-1 等の成長因子によって活性化されるほか、アミノ酸、特にロイシンによって活性化されることが報告されている [(Loewith and Hall, 2011), Fig. 0-3.]。その機構には不明な点も多いものの、vATPase および RagGTPase を介した、リソソーム膜上での活性化に関与すると言われている (Bar-Peled and Sabatini, 2014)。

0-3-2. mTORC1 非依存的な経路 (General control 経路)

種々のアミノ酸欠乏状態において、非アミノアシル tRNA 濃度が低下しこれが mGCN2 (mammalian general control non-derepressing 2) と呼ばれる eIF2 α キナーゼに結合することで、mGCN2 の活性化および eIF2 α のリン酸化が引き起こされる。これにより大部分の mRNA の翻訳が抑制されるが一部の mRNA の翻訳活性は上昇する (Bar-Peled and Sabatini, 2014)。ここではその 1 つとして ATF4 (Activating Transcription Factor 4) による遺伝子発現調節を紹介する。ATF4 は転写因子として様々な遺伝子の発現を調節しており、例えばアスパラギン合成酵素 (AS) のプロモーターに存在する NSRE -1 (Nutrient sensing response element-1) と呼ばれる領域に同じくアミノ酸欠乏時に翻訳が誘導される C/EBP β と共に結合することで、AS の転写を促進する [(Kilberg et al., 2009), Fig. 0-4.]。

0-4. 本研究の目的

ここまで述べてきたように、miRNAs は標的遺伝子の発現抑制を介して、栄養不良に起因する種々の疾患発症、あるいはその進行に大きく寄与しているものと考えられる。また栄養不良時には翻訳活性や mRNA 転写活性の変化が迅速に生じ、生体機能が維持されている。miRNAs も大部分の mRNA 同様に生合成されるため、その例外ではなく、こうした栄養状態の変化に応答して発現が変動する miRNAs が存在し、重要な役割を演じている可能性が高い。しかしながら、分子栄養学研究において miRNAs に着目した研究事例は未だ少ない。そこで本研究ではアミノ酸栄養不良に応答して発現変動する miRNAs を網羅的に探索し、その機能解析を行うことで、アミノ酸栄養情報伝達因子としての miRNAs の側面を明らかにすることを目的とした。

第一章

HepG2 細胞においてロイシン欠乏に応答して
発現変動する miRNAs の探索とオミクス手法
を利用した標的遺伝子解析手法の検討

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内
に出版予定。

第二章

ロイシン欠乏下の HepG2 細胞で転写因子
ATF4 によって制御される miRNAs の機能と
その応答機序の解析

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内
に出版予定。

第三章

ロイシン欠乏食給餌マウス肝臓において
発現上昇する miRNAs の探索と AML12 細胞
を利用したその機能解析

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内
に出版予定。

総合討論

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。5年以内
に出版予定。

参考文献一覽

1. Agarwal, V., Bell, G.W., Nam, J.W., and Bartel, D.P. (2015). Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife* *4*.
2. Aitken, A. (1995). 14-3-3 proteins on the MAP. *Trends in biochemical sciences* *20*, 95-97.
3. Aitken, A. (2006). 14-3-3 proteins: a historic overview. *Seminars in cancer biology* *16*, 162-172.
4. Amaral, P.P., and Mattick, J.S. (2008). Noncoding RNA in development. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* *19*, 454-492.
5. Anker, S.D., and Morley, J.E. (2015). Cachexia: a nutritional syndrome? *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* *6*, 269-271.
6. Arner, E., Mejhert, N., Kulyte, A., Balwiercz, P.J., Pachkov, M., Cormont, M., Lorente-Cebrian, S., Ehrlund, A., Laurencikiene, J., Heden, P., *et al.* (2012). Adipose tissue microRNAs as regulators of CCL2 production in human obesity. *Diabetes* *61*, 1986-1993.
7. Bar-Peled, L., and Sabatini, D.M. (2014). Regulation of mTORC1 by amino acids. *Trends in cell biology* *24*, 400-406.
8. Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* *136*, 215-233.
9. Benzinger, A., Muster, N., Koch, H.B., Yates, J.R., 3rd, and Hermeking, H. (2005). Targeted proteomic analysis of 14-3-3 sigma, a p53 effector commonly silenced in cancer. *Molecular & cellular proteomics : MCP* *4*, 785-795.
10. Beverly, J.L., Gietzen, D.W., and Rogers, Q.R. (1990). Effect of dietary limiting amino acid in prepyriform cortex on food intake. *The American journal of physiology* *259*, R709-715.
11. Bodine, S.C., Stitt, T.N., Gonzalez, M., Kline, W.O., Stover, G.L., Bauerlein, R., Zlotchenko, E., Scrimgeour, A., Lawrence, J.C., Glass, D.J., *et al.* (2001). Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nature cell biology* *3*, 1014-1019.
12. Brown, M.S., Ye, J., Rawson, R.B., and Goldstein, J.L. (2000). Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* *100*, 391-398.
13. Bruhat, A., Jousse, C., and Fafournoux, P. (1999). Amino acid limitation regulates gene expression. *The Proceedings of the Nutrition Society* *58*, 625-632.
14. Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., *et al.* (2002). Frequent deletions and down-regulation of microRNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *99*, 15524-15529.

15. Costinean, S., Zanesi, N., Pekarsky, Y., Tili, E., Volinia, S., Heerema, N., and Croce, C.M. (2006). Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 7024-7029.
16. Cruz-Jentoft, A.J., Baeyens, J.P., Bauer, J.M., Boirie, Y., Cederholm, T., Landi, F., Martin, F.C., Michel, J.P., Rolland, Y., Schneider, S.M., *et al.* (2010). Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age and ageing* *39*, 412-423.
17. Czech, B., and Hannon, G.J. (2011). Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nature reviews Genetics* *12*, 19-31.
18. De Sousa-Coelho, A.L., Relat, J., Hondares, E., Perez-Marti, A., Ribas, F., Villarroya, F., Marrero, P.F., and Haro, D. (2013). FGF21 mediates the lipid metabolism response to amino acid starvation. *Journal of lipid research* *54*, 1786-1797.
19. Doench, J.G., and Sharp, P.A. (2004). Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes & development* *18*, 504-511.
20. Eichhorn, S.W., Guo, H., McGearry, S.E., Rodriguez-Mias, R.A., Shin, C., Baek, D., Hsu, S.H., Ghoshal, K., Villen, J., and Bartel, D.P. (2014). mRNA destabilization is the dominant effect of mammalian microRNAs by the time substantial repression ensues. *Molecular cell* *56*, 104-115.
21. Fabian, M.R., and Sonenberg, N. (2012). The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nature structural & molecular biology* *19*, 586-593.
22. Felli, N., Fontana, L., Pelosi, E., Botta, R., Bonci, D., Facchiano, F., Liuzzi, F., Lulli, V., Morsilli, O., Santoro, S., *et al.* (2005). MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 18081-18086.
23. Flores, H., Sierralta, W., and Monckeberg, F. (1970). Triglyceride transport in protein-depleted rats. *The Journal of nutrition* *100*, 375-379.
24. Fonseca, B.D., Smith, E.M., Lee, V.H., MacKintosh, C., and Proud, C.G. (2007). PRAS40 is a target for mammalian target of rapamycin complex 1 and is required for signaling downstream of this complex. *The Journal of biological chemistry* *282*, 24514-24524.
25. Garofalo, M., Quintavalle, C., Romano, G., Croce, C.M., and Condorelli, G. (2012). miR221/222 in cancer: their role in tumor progression and response to therapy. *Current molecular medicine* *12*, 27-33.

26. Ghildiyal, M., Xu, J., Seitz, H., Weng, Z., and Zamore, P.D. (2010). Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs partitions microRNA* strands into the RNA interference pathway. *RNA (New York, NY)* *16*, 43-56.
27. Guo, F., and Cavener, D.R. (2007). The GCN2 eIF2alpha kinase regulates fatty-acid homeostasis in the liver during deprivation of an essential amino acid. *Cell metabolism* *5*, 103-114.
28. Guo, H., Ingolia, N.T., Weissman, J.S., and Bartel, D.P. (2010). Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* *466*, 835-840.
29. Ha, M., and Kim, V.N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology* *15*, 509-524.
30. Hong-Brown, L.Q., Brown, C.R., Kazi, A.A., Huber, D.S., Pruznak, A.M., and Lang, C.H. (2010). Alcohol and PRAS40 knockdown decrease mTOR activity and protein synthesis via AMPK signaling and changes in mTORC1 interaction. *Journal of cellular biochemistry* *109*, 1172-1184.
31. Horton, J.D., Shimomura, I., Brown, M.S., Hammer, R.E., Goldstein, J.L., and Shimano, H. (1998). Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. *The Journal of clinical investigation* *101*, 2331-2339.
32. Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2011). Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature reviews Genetics* *12*, 99-110.
33. Jin, J., Smith, F.D., Stark, C., Wells, C.D., Fawcett, J.P., Kulkarni, S., Metalnikov, P., O'Donnell, P., Taylor, P., Taylor, L., *et al.* (2004). Proteomic, functional, and domain-based analysis of in vivo 14-3-3 binding proteins involved in cytoskeletal regulation and cellular organization. *Current biology : CB* *14*, 1436-1450.
34. Jo, H.K., Kim, G.W., Jeong, K.J., Kim do, Y., and Chung, S.H. (2014). Eugenol ameliorates hepatic steatosis and fibrosis by down-regulating SREBP1 gene expression via AMPK-mTOR-p70S6K signaling pathway. *Biological & pharmaceutical bulletin* *37*, 1341-1351.
35. Kamata, S., Yamamoto, J., Kamijo, K., Ochiai, T., Morita, T., Yoshitomi, Y., Hagiya, Y., Kubota, M., Ohkubo, R., Kawaguchi, M., *et al.* (2014). Dietary deprivation of each essential amino acid induces differential systemic adaptive responses in mice. *Molecular nutrition & food research* *58*, 1309-1321.
36. Kato, H., and Kimura, T. (2003). Evaluation of the effects of the dietary intake of proteins and amino acids by DNA microarray technology. *The Journal of nutrition* *133*, 2073s-2077s.

37. Khvorova, A., Reynolds, A., and Jayasena, S.D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* *115*, 209-216.
38. Kilberg, M.S., Shan, J., and Su, N. (2009). ATF4-dependent transcription mediates signaling of amino acid limitation. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* *20*, 436-443.
39. Kim, J.B., Spotts, G.D., Halvorsen, Y.D., Shih, H.M., Ellenberger, T., Towle, H.C., and Spiegelman, B.M. (1995). Dual DNA binding specificity of ADD1/SREBP1 controlled by a single amino acid in the basic helix-loop-helix domain. *Molecular and cellular biology* *15*, 2582-2588.
40. Kim, V.N., Han, J., and Siomi, M.C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature reviews Molecular cell biology* *10*, 126-139.
41. Kornfeld, J.W., Baitzel, C., Konner, A.C., Nicholls, H.T., Vogt, M.C., Herrmanns, K., Scheja, L., Haumaitre, C., Wolf, A.M., Knippschild, U., *et al.* (2013). Obesity-induced overexpression of miR-802 impairs glucose metabolism through silencing of Hnf1b. *Nature* *494*, 111-115.
42. Kota, J., Chivukula, R.R., O'Donnell, K.A., Wentzel, E.A., Montgomery, C.L., Hwang, H.W., Chang, T.C., Vivekanandan, P., Torbenson, M., Clark, K.R., *et al.* (2009). Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell* *137*, 1005-1017.
43. Kozomara, A., and Griffiths-Jones, S. (2011). miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic acids research* *39*, D152-157.
44. Kumar, M.S., Pester, R.E., Chen, C.Y., Lane, K., Chin, C., Lu, J., Kirsch, D.G., Golub, T.R., and Jacks, T. (2009). Dicer1 functions as a haploinsufficient tumor suppressor. *Genes & development* *23*, 2700-2704.
45. Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science (New York, NY)* *294*, 853-858.
46. Lai, E.C. (2002). Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nature genetics* *30*, 363-364.
47. Lambertz, I., Nittner, D., Mestdagh, P., Denecker, G., Vandesompele, J., Dyer, M.A., and Marine, J.C. (2010). Monoallelic but not biallelic loss of Dicer1 promotes tumorigenesis in vivo. *Cell death and differentiation* *17*, 633-641.
48. Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G., and Bartel, D.P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science (New York, NY)* *294*, 858-862.

49. Lee, R.C., and Ambros, V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science (New York, NY)* *294*, 862-864.
50. Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* *75*, 843-854.
51. Lewis, B.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* *120*, 15-20.
52. Loewith, R., and Hall, M.N. (2011). Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. *Genetics* *189*, 1177-1201.
53. Lustig, Y., Barhod, E., Ashwal-Fluss, R., Gordin, R., Shomron, N., Baruch-Umansky, K., Hemi, R., Karasik, A., and Kanety, H. (2014). RNA-binding protein PTB and microRNA-221 coregulate AdipoR1 translation and adiponectin signaling. *Diabetes* *63*, 433-445.
54. Martini, M., De Santis, M.C., Braccini, L., Gulluni, F., and Hirsch, E. (2014). PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review. *Annals of medicine* *46*, 372-383.
55. Mattick, J.S. (2004). RNA regulation: a new genetics? *Nature reviews Genetics* *5*, 316-323.
56. Mayer, J.P., Zhang, F., and DiMarchi, R.D. (2007). Insulin structure and function. *Biopolymers* *88*, 687-713.
57. Medina, P.P., Nolde, M., and Slack, F.J. (2010). OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma. *Nature* *467*, 86-90.
58. Meijer, H.A., Kong, Y.W., Lu, W.T., Wilczynska, A., Spriggs, R.V., Robinson, S.W., Godfrey, J.D., Willis, A.E., and Bushell, M. (2013). Translational repression and eIF4A2 activity are critical for microRNA-mediated gene regulation. *Science (New York, NY)* *340*, 82-85.
59. Neal, C.L., Xu, J., Li, P., Mori, S., Yang, J., Neal, N.N., Zhou, X., Wyszomierski, S.L., and Yu, D. (2012). Overexpression of 14-3-3zeta in cancer cells activates PI3K via binding the p85 regulatory subunit. *Oncogene* *31*, 897-906.
60. Neal, C.L., Yao, J., Yang, W., Zhou, X., Nguyen, N.T., Lu, J., Danes, C.G., Guo, H., Lan, K.H., Ensor, J., *et al.* (2009). 14-3-3zeta overexpression defines high risk for breast cancer recurrence and promotes cancer cell survival. *Cancer research* *69*, 3425-3432.
61. Ohoka, N., Yoshii, S., Hattori, T., Onozaki, K., and Hayashi, H. (2005). TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *The EMBO journal* *24*, 1243-1255.
62. Ohsumi, Y. (2001). Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nature reviews Molecular cell biology* *2*, 211-216.

63. Okamura, K., Phillips, M.D., Tyler, D.M., Duan, H., Chou, Y.T., and Lai, E.C. (2008). The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution. *Nature structural & molecular biology* *15*, 354-363.
64. Osborn, O., and Olefsky, J.M. (2012). The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nature medicine* *18*, 363-374.
65. Panni, S., Salvioli, S., Santonico, E., Langone, F., Storino, F., Altilia, S., Franceschi, C., Cesareni, G., and Castagnoli, L. (2015). The adapter protein CD2AP binds to p53 protein in the cytoplasm and can discriminate its polymorphic variants P72R. *Journal of biochemistry* *157*, 101-111.
66. Ren, Q., and You Yu, S. (2015). CD2-associated protein participates in podocyte apoptosis via PI3K/Akt signaling pathway. *Journal of receptor and signal transduction research*, 1-4.
67. Rhoades, M.W., Reinhart, B.J., Lim, L.P., Burge, C.B., Bartel, B., and Bartel, D.P. (2002). Prediction of plant microRNA targets. *Cell* *110*, 513-520.
68. Ricci, E.P., Limousin, T., Soto-Rifo, R., Rubilar, P.S., Decimo, D., and Ohlmann, T. (2013). miRNA repression of translation in vitro takes place during 43S ribosomal scanning. *Nucleic acids research* *41*, 586-598.
69. Ricoult, S.J., and Manning, B.D. (2013). The multifaceted role of mTORC1 in the control of lipid metabolism. *EMBO reports* *14*, 242-251.
70. Ruvkun, G. (2001). Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science (New York, NY)* *294*, 797-799.
71. Sakai, J., Duncan, E.A., Rawson, R.B., Hua, X., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1996). Sterol-regulated release of SREBP-2 from cell membranes requires two sequential cleavages, one within a transmembrane segment. *Cell* *85*, 1037-1046.
72. Sancak, Y., Thoreen, C.C., Peterson, T.R., Lindquist, R.A., Kang, S.A., Spooner, E., Carr, S.A., and Sabatini, D.M. (2007). PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Molecular cell* *25*, 903-915.
73. Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P.D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* *115*, 199-208.
74. Shih, N.Y., Li, J., Karpitskii, V., Nguyen, A., Dustin, M.L., Kanagawa, O., Miner, J.H., and Shaw, A.S. (1999). Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science (New York, NY)* *286*, 312-315.
75. Sun, T., Kalionis, B., Lv, G., Xia, S., and Gao, W. (2015). Role of Exosomal Noncoding RNAs in Lung Carcinogenesis. *BioMed research international* *2015*, 125807.

76. Toyoshima, Y., Tokita, R., Ohne, Y., Hakuno, F., Noguchi, T., Minami, S., Kato, H., and Takahashi, S. (2010). Dietary protein deprivation upregulates insulin signaling and inhibits gluconeogenesis in rat liver. *Journal of molecular endocrinology* *45*, 329-340.
77. Trang, P., Medina, P.P., Wiggins, J.F., Ruffino, L., Kelnar, K., Omotola, M., Homer, R., Brown, D., Bader, A.G., Weidhaas, J.B., *et al.* (2010). Regression of murine lung tumors by the let-7 microRNA. *Oncogene* *29*, 1580-1587.
78. Turner-McGrievy, G.M., Barnard, N.D., Cohen, J., Jenkins, D.J., Gloede, L., and Green, A.A. (2008). Changes in nutrient intake and dietary quality among participants with type 2 diabetes following a low-fat vegan diet or a conventional diabetes diet for 22 weeks. *Journal of the American Dietetic Association* *108*, 1636-1645.
79. van Duijn, T.J., Anthony, E.C., Hensbergen, P.J., Deelder, A.M., and Hordijk, P.L. (2010). Rac1 recruits the adapter protein CMS/CD2AP to cell-cell contacts. *The Journal of biological chemistry* *285*, 20137-20146.
80. Vander Haar, E., Lee, S.I., Bandhakavi, S., Griffin, T.J., and Kim, D.H. (2007). Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nature cell biology* *9*, 316-323.
81. Vetter, M.L., Amaro, A., and Volger, S. (2014). Nutritional management of type 2 diabetes mellitus and obesity and pharmacologic therapies to facilitate weight loss. *Postgraduate medicine* *126*, 139-152.
82. Wada, S., Kato, Y., Okutsu, M., Miyaki, S., Suzuki, K., Yan, Z., Schiaffino, S., Asahara, H., Ushida, T., and Akimoto, T. (2011). Translational suppression of atrophic regulators by microRNA-23a integrates resistance to skeletal muscle atrophy. *The Journal of biological chemistry* *286*, 38456-38465.
83. Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* *75*, 855-862.
84. Wu, H., Wang, F., Hu, S., Yin, C., Li, X., Zhao, S., Wang, J., and Yan, X. (2012). MiR-20a and miR-106b negatively regulate autophagy induced by leucine deprivation via suppression of ULK1 expression in C2C12 myoblasts. *Cellular signalling* *24*, 2179-2186.
85. Xiao, F., Huang, Z., Li, H., Yu, J., Wang, C., Chen, S., Meng, Q., Cheng, Y., Gao, X., Li, J., *et al.* (2011). Leucine deprivation increases hepatic insulin sensitivity via GCN2/mTOR/S6K1 and AMPK pathways. *Diabetes* *60*, 746-756.
86. Yamauchi, T., and Kadowaki, T. (2013). Adiponectin receptor as a key player in healthy longevity and obesity-related diseases. *Cell metabolism* *17*, 185-196.

87. Yu, L., McPhee, C.K., Zheng, L., Mardones, G.A., Rong, Y., Peng, J., Mi, N., Zhao, Y., Liu, Z., Wan, F., *et al.* (2010). Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature* *465*, 942-946.
88. Yu, S., and Li, Y. (2013). Dexamethasone inhibits podocyte apoptosis by stabilizing the PI3K/Akt signal pathway. *BioMed research international* *2013*, 326986.
89. Zavesky, L., Jandakova, E., Turyna, R., Langmeierova, L., Weinberger, V., and Minar, L. (2015). Supernatant versus exosomal urinary microRNAs. Two fractions with different outcomes in gynaecological cancers. *Neoplasma*.
90. Zhang, J., Li, S., Li, L., Li, M., Guo, C., Yao, J., and Mi, S. (2015). Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function. *Genomics, proteomics & bioinformatics* *13*, 17-24.
91. 高橋薫 (2013). 栄養状態の変化に応答する miRNA の網羅的解析と関連する生体制御機構の探索. 平成 24 年度 修士論文

謝辞

本研究は東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学研究科、総括寄付講座「食と生命」で行われました。

当研究室特任教授である加藤久典先生には、修士課程入学以来5年間にわたり懇切丁寧な御指導を賜りました。本研究の遂行においては勿論のこと、日々の研究室での生活姿勢など、時には厳しく、研究者としての正しい姿勢を御指導頂きました。こうして加藤先生の下で学べたことを誇りに思うと共に、心から御礼申し上げます。

またマウス肝臓細胞を利用した試験におきまして、東京大学農学生命科学応用生命化学専攻 食品生化学研究室 佐藤隆一郎先生からAML12細胞を御供与頂き、詳細な解析を遂行することが出来ました。深く御礼申し上げます。質量分析計に関しては、相談に乗って下さり懇切丁寧に指導頂きました潮秀樹先生と水産化学研究室の皆様にも深く御礼申し上げます。

修士時代から実験操作や網羅的解析手法の丁寧な指導を賜りました、本研究室の賈慧娟博士、中澤京子氏、斎藤憲司氏、大谷りら博士には心から御礼申し上げます。また当研究室秘書であります斉藤君江氏には研究室での生活面、精神面共に支えて頂きました。心から御礼申し上げます。当研究室の卒業生である数多くの先輩や後輩、また現在の学生メンバーである山下貴仙氏、西東恵梨氏、赤坂優太氏、三好萌氏、高杉紗英氏、呂偉達 (Leo)氏、内田絵理子氏、谷脇香氏には、博士論文執筆中にも多くの励ましを頂き、大きな支えになりました。こうした「食と生命」の皆様のお協力によって、5年間にわたる研究室生活を非常に密度の濃いものにすることが出来ました。心から御礼申し上げます。また学会や勉強会などでも、数多くの先生方に御指導を頂き、より豊かな視点で研究を遂行することが出来ました。心から御礼申し上げます。

最後にどんな時も私を温かく見守り、支えて下さった家族や多くの友人に深く感謝申し上げます。

2015年12月 山村淳貴