

博士論文

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。

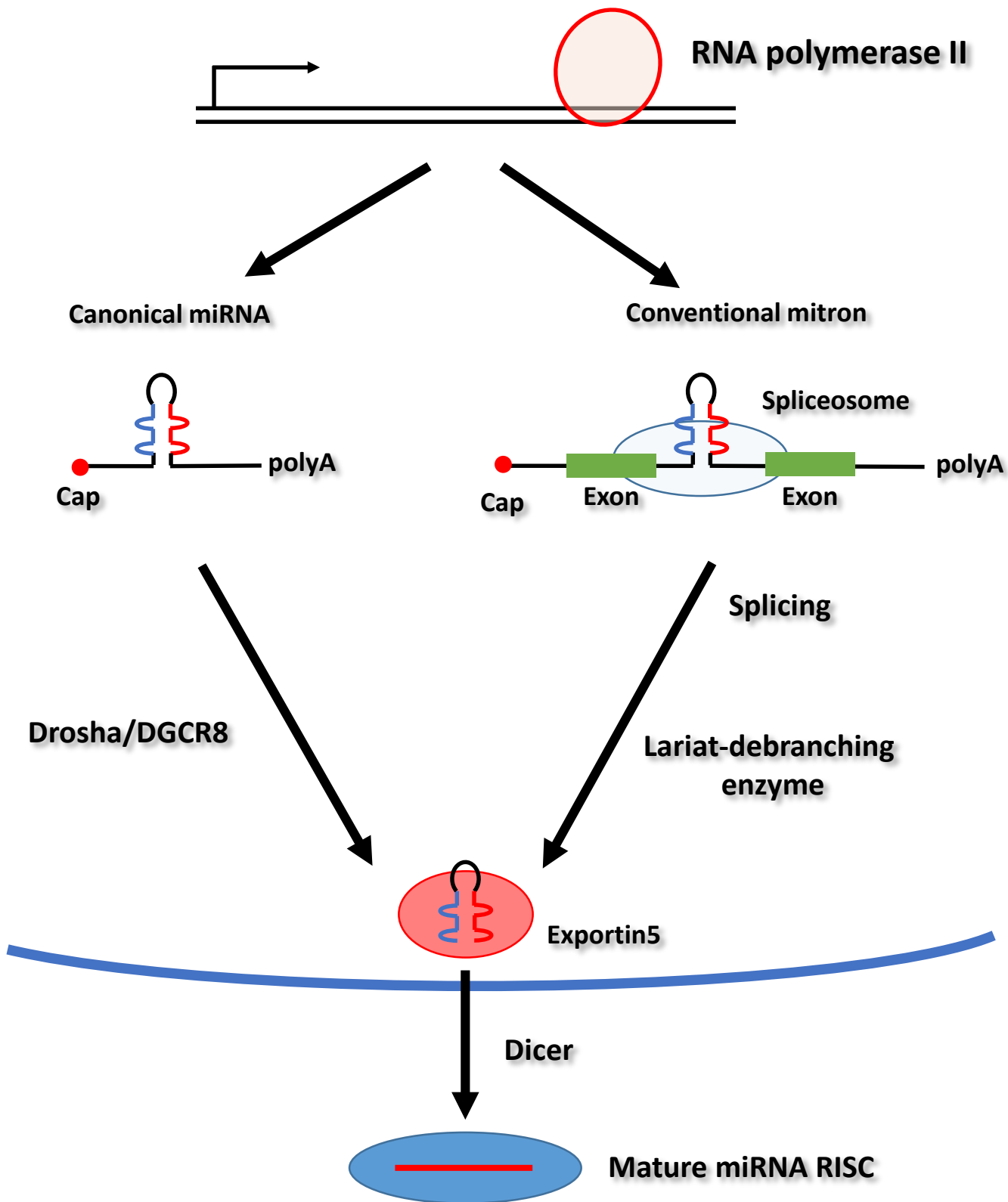


Fig. 0-1. miRNAs生合成経路

代表的な2パターンを示した。核内で転写により生成したpri-miRNAは、Drosha/DGCR8の作用もしくはLariat-debranching enzymeによって切断され、pre-miRNAとなる。その後核外以降し、Dicerによって処理され、mature miRNAが生成する。

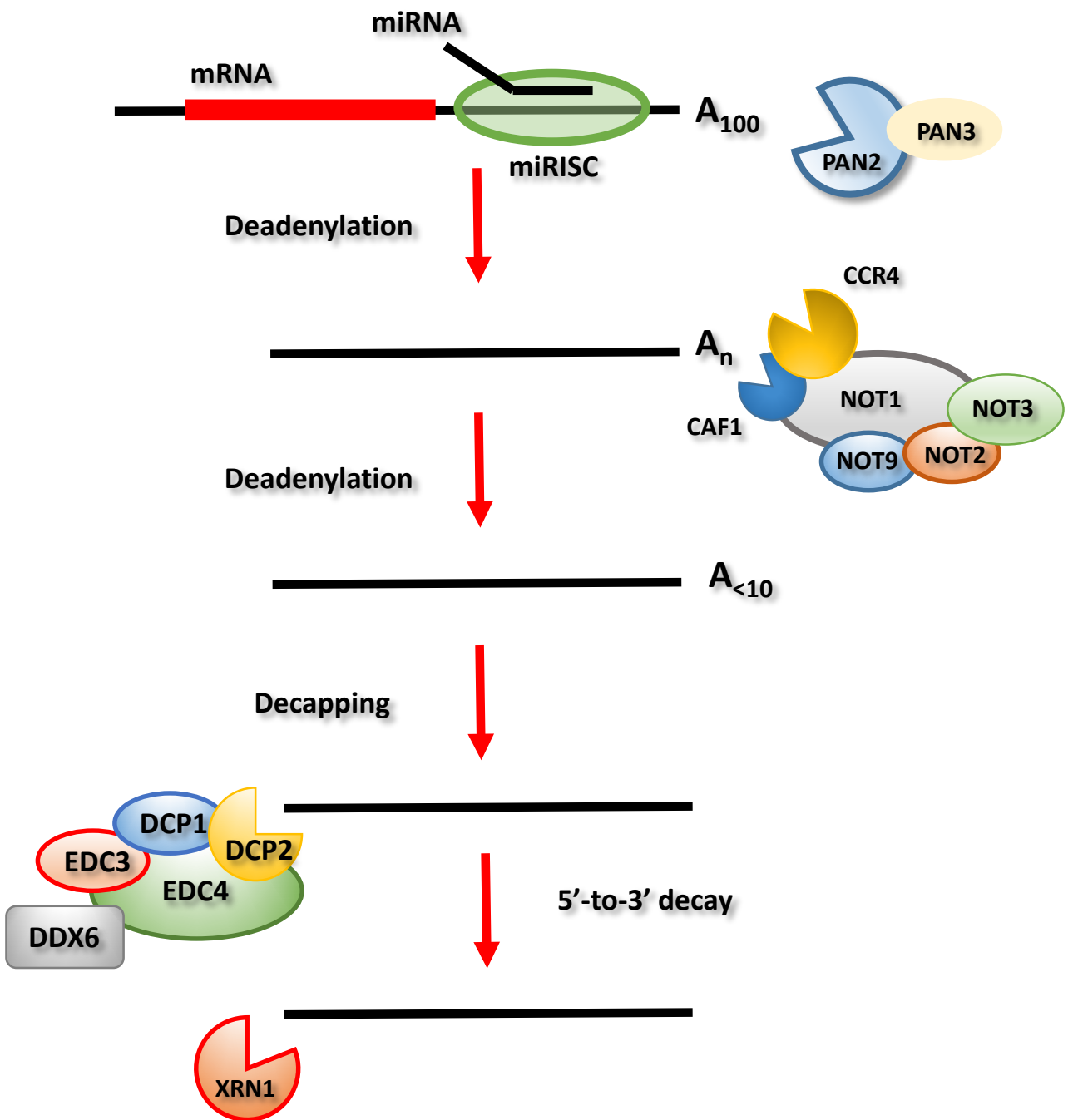


Fig. 0-2. miRISCsによる標的遺伝子mRNAの認識とその分解
 miRISCが標的遺伝子3'UTRに結合すると種々の酵素タンパク質が誘導され、脱アデニル化、脱キャップ化が順に起こり、最終的にmRNAが分解される。

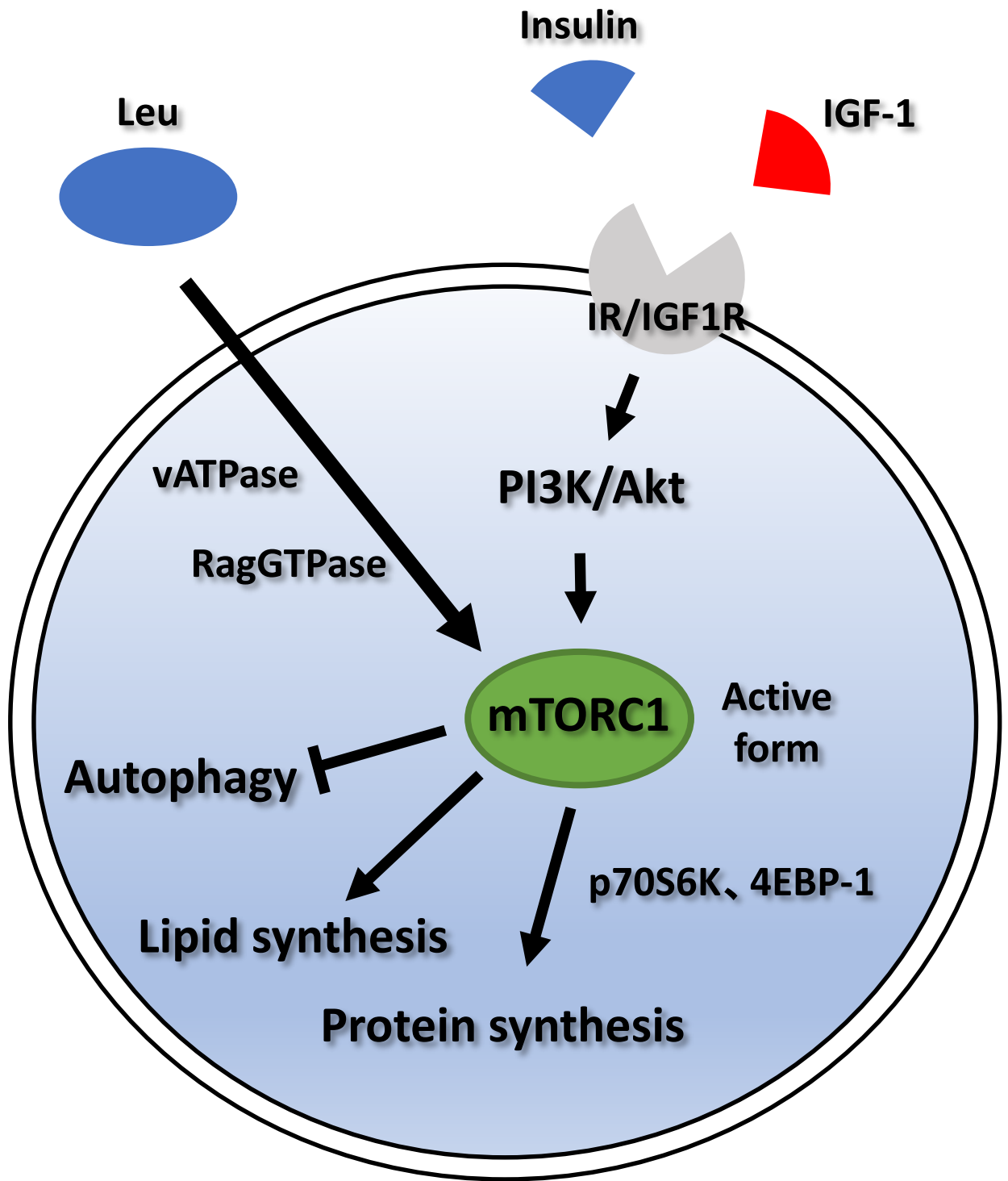
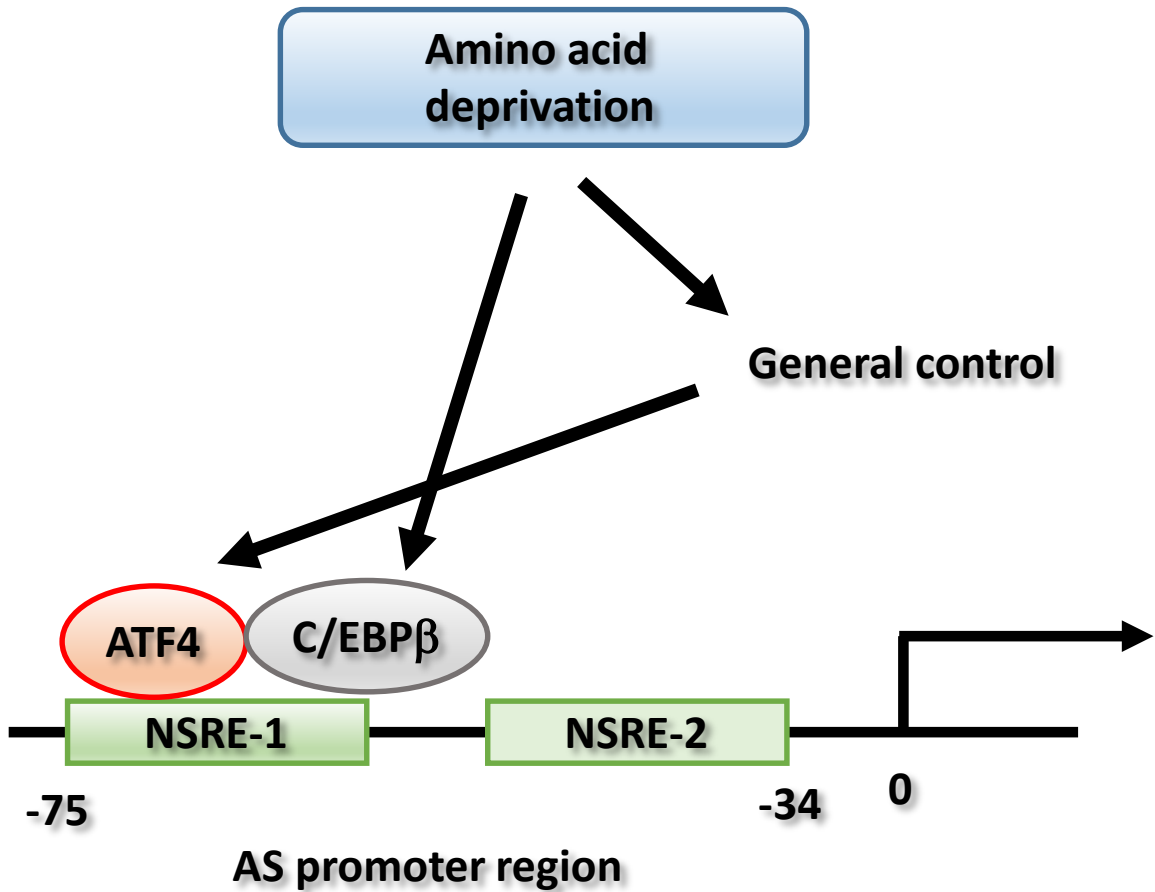


Fig. 0-3. 成長因子あるいはロイシンによるmTORC1活性化とその下流経路の制御
 mTORC1は成長因子によりPI3K/Akt経路を介してもしくロイシンによって直接的に活性化され、タンパク合成や脂質合成、オートファジーの抑制を誘導する。

A



B

NSRE-1 -57 GAAGTTT**CATCAT**GCCTGC -75

Fig. 0-4. ATF4によるアスパラギン酸合成酵素 (AS)の転写調節

A : アミノ酸欠乏に反応して、ATF4およびC/EBPβが特異的に翻訳が活性化し、NSRE-1と呼ばれる領域に結合し、ASの転写を活性化する。

B : ATF4結合の結合コア配列 (赤字)

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

緒言

序論で述べたように miRNAs は標的遺伝子の発現を抑制する事で遺伝子発現を調節する因子であるが、アミノ酸栄養の変化に応答する miRNAs に関する報告は未だない。そこで本章では、アミノ酸栄養と miRNAs の関連を明らかにする第一歩として、培養細胞を利用した簡便なモデルによって、必須アミノ酸の1つであるロイシンの欠乏に応答する miRNAs が存在するかを、マイクロアレイ技術を利用した解析で探索することにした。また miRNAs の標的遺伝子の多様性から、標的候補となる遺伝子数は極めて多い。そこで本章では DNA マイクロアレイを利用したトランスクリプトーム解析と iTRAQ (Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation)法を利用したプロテオーム解析を併用し、結果を比較解析する事で、より効果的な標的遺伝子候補の探索方法を検討した。

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

1-1-1-a. 細胞培養

ヒト肝臓癌由来 HepG2 細胞 (Human Hepatocellular Carcinoma Cells, ATCC より購入) を 10% FBS、100U/m penicillin、100 µg/mL streptomycin を含む DMEM (5796, Sigma Aldrich) を用い 37°C、5% CO₂ 存在下で培養した。2 日に 1 度培地交換を行い、80-90%サブコンフルエントになったところで 6 well-plate に細胞が 5.0×10⁵ cell/well となるように播種した。24 時間培養したところで培地を MEM (Minimum Essential Medium Eagle) に変更し、以後 12 時間培養した。この際、通常の MEM 培地で培養した群をコントロール群 (Control) とし、ロイシンを欠乏させた MEM 培地をロイシン欠乏群 ([Leu(-)]) とした。使用した培地の組成は Table. 1-1-1.に示した。

1-1-1-b. 細胞からの total RNA 抽出

培養終了後の細胞プレートを各ウェル PBS で 2 回洗浄した後、1 mL TRIzol 試薬 (Invitrogen ThermoFisher Scientific) を加え、ピペッティングによってよく混合した。これを一時、-80°C 条件で冷凍保存した。氷上で解凍した後、200 µL クロロホルムを加えて強く攪拌した。室温で 2~3 分間静置した後、4°C、16,000×g で 15 分間遠心して上層を得た。これに 500 µL のイソプロパノールを加えて軽く転倒混合し、4°C、16,000

×g で 10 分間遠心し、上清を取り除いた。これに 80%エタノールを 1 mL 加えて軽く転倒混合し、4°C、16,000×g、10 分間遠心し、再び上清を取り除き蒸発乾固させた後、RNase Free Water を加えて室温でインキュベーションした。抽出した RNA サンプルはアガロースゲル電気泳動※によって分解が無いことを確認した後、-80°C で保存した。

※ 電気泳動

25 mL D.D.W に 0.75 g アガロース S (ニッポン・ジーン) を入れ加熱して透明になるまで溶解させた。そこに 65°C で加温した 8.5 mL ホルムアルデヒド、11.5 mL D.D.W、5 mL 10×MOPS (Sigma Aldrich) 溶液を加えた。混合溶液を 65°C で 10 分間加温した後、型に流し込んで約 1 時間静置しゲルを作製した。抽出した RNA サンプル 1.0 µg に 8.0 µL 変性 buffer を加え 65°C で 10 分間加温後、氷上で保管しゲルに全量をアプライして電気泳動を行った。泳動開始 20 分後にゲルを回収し UV 照射を行い、28S リボソーム RNA の輝度が 18S リボソーム RNA の輝度の 2 倍以上であることを確認した。

1-1-1-c. mRNA の定量 PCR

1-1-1-b. で得た total RNA から cDNA を合成し、これを使用して定量 PCR を行った。Total RNA 500 ng を含む RNase free 水 8 µL に対し、PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time、タカラバイオ)内の 5×PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time)を 2 µL 加えてよく混合し、TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Standard を利用し以下の様に温度変化させ、cDNA を合成した。

37°C	15 min
85°C	5 sec
4°C	∞

こうして得られた cDNA を使用して定量リアルタイム PCR を行った。SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus、タカラバイオ)に含まれる SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) 6.3 µL に対し、0.5 µL のプライマー (F、R それぞれ 0.5 µM)、RNase free 水 4.3 µL を混合したものに、cDNA テンプレートを 1 µL 加え、Thermal Cycler Dice Real Time System TP800 および real-time PCR detection system (共にタカラバイオ)により cDNA の増幅および蛍光の検出を行った。内部標準として glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*)の mRNA 発現を補正に利用し、目的の mRNA の相対値を算出した。PCR 反応時の温度変化、また使用したプライマーを以下に示す。

95°C	10 sec
------	--------

95°C	5 sec	}	40 cycle
60°C	30 sec		
95°C	15 sec		
60°C	30 sec		
95°C	15 sec		

使用したプライマー

ATF4

F : GGCCAAGCACTTCAAACCTC

R : TTTCTCCAACATCCAATCTGTCC

IGFBP-1

F : AAGGCTCTCCATGTCACCAAC

R : TTTCTTCTCCTGATGTCTCCTGTG

GAPDH

F : CGACCACTTTGTCAAGCTCA

R : GCTGGTCCAGGGGTCTTACT

1-1-1-d. miRNA マイクロアレイ

1-1-1-b.で抽出した total RNA を解析に供した。各群 n=3 から当量の totalRNA をプールし、計 1000 ng/8 μL になるように濃度を調整した。この total RNA サンプルに対して、Flashtag™ RNA Labeling Kit (Genisphere) を用いて miRNA に polyA およびビオチン標識された 3DNA®をライゲーションした。方法は Genisphere 社の標準プロトコルに従った。こうして得られた標識済み miRNA を GeneChip® miRNA Array 3.0 (Affymetrix) に 48°C、16 時間ハイブリダイズさせた後、Fluidics Station 450 装置 (Affymetrix) と試薬 GeneChip® Hybridization (Affymetrix) を用いて wash and stain を行った。Scanning は装置 Affymetrix Gene Array Scanner 3000 を用いて行った。方法は Affymetrix 社の標準プロトコルに従って行った。データの読み取りは AGCC (Affymetrix® GeneChip® Command Console® Software) を、正規化を含むデータの解析は Affymetrix miRNA QC Tool software (version 1.0.33.0) を用いて行った。得られたデータセットのうち、発現変動倍率が Log ratio > 0.6 であったものを発現上昇したものとした。なお、本研究では同様の試験を 3 回行った。

1-1-1-e. miRNA の定量 PCR

1-1-1-b. で得た total RNA から cDNA を合成し、これを使用して定量 PCR を行った。Total RNA 2000 ng を含む RNase free 水 12 μ L に対し、miScript II RT kit (QIAGEN) 内の 5 \times miScript HiSpec Buffer を 4 μ L、10 \times miScript Nucleics Mix を 2 μ L、miScript Reverse Transcriptase Mix を 2 μ L を加え良く混合した。その後 TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice[®] Standard を利用し以下の様に温度変化させ、cDNA を合成した。

37°C 60 min
94°C 5 min
4°C ∞

こうして得られた cDNA を使用して定量リアルタイム PCR を行った。miScript SYBR Green PCR Kit (QIAGEN) 内の QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix 12.5 μ L に対し、miScript Universal Primer を 2.5 μ L、測定遺伝子のプライマーを 2.5 μ L、RNase free 水を 6.5 μ L 加えて混合した後、cDNA テンプレートを 1 μ L 加え、Thermal Cycler Dice Real Time System TP800 および real-time PCR detection system (共にタカラバイオ) により cDNA の増幅および蛍光の検出を行った。内部標準として U6 spliceosomal RNA (U6snRNA) の miRNA 発現を補正に利用し、目的の miRNA の相対値を算出した。PCR 反応時の温度変化、また使用したプライマーを以下に示す。

95°C	15 min	} 40 cycle
94°C	15 sec	
55°C	30 sec	
70°C	30 sec	

使用したプライマー

Hs_miR-1228*_2 miScript Primer Assay (MS00016387、QIAGEN)

Hs_RNU6-2_11 miScript Primer Assay (MS00033740、QIAGEN)

1-1-2. 結果

1-1-2-a. アミノ酸欠乏に応答するマーカー遺伝子の発現変動

12時間のロイシン欠乏を施した HepG2 細胞での ATF4 および IGFBP-1 の mRNA 発現量は、Control 群と比較して有意な増加を示し、それぞれ 1.71 倍、9.53 倍であった (Fig. 1-1-2-1.)。

1-1-2-a. マイクロアレイ解析

HepG2 細胞の培養からマイクロアレイ試験までを独立して 3 回行ってデータを得た。その結果、発現変動倍率が $\text{Log ratio} > 0.6$ を示した miRNAs は 1 回目、2 回目、3 回目でそれぞれ 20、35、20 種であった (Data not shown)。これら 3 回のマイクロアレイ結果で共通して $\text{Log ratio} > 0.6$ を示したものを抽出したところ、12 種の miRNAs が見出された (Table. 1-1-2.)。

1-1-2-b. hsa-miR-1228-5p の定量 PCR

マイクロアレイ解析での平均発現上昇倍率の最も高かった hsa-miR-1228-5p の発現量を定量 PCR によって測定したところ、ロイシン欠乏処理によって有意な発現上昇が認められ、Control 群に対して 3.24 倍であった (Fig. 1-1-2-2.)。

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

1-2-1-a. 細胞培養

1-1-1-a.と同様にして行った。

1-2-1-b. 細胞へのロイシン欠乏処理と total RNA 抽出

1-1-1-b.と同様にして行った。

1-2-1-c. 細胞へのロイシン欠乏処理とタンパク質抽出

細胞培養は基本的には 1-2-1-b.と同様にして行ったが、処理時間を 48 時間とした。培養終了後のプレートの各ウェルを PBS で 2 回洗浄した後、液体窒素に接触させることで凍結させた。凍結した細胞プレートを氷上で融解し、セルスクレイパーにより細胞を回収した。ここに 200 μ L/well の RIPA buffer を加えよく懸濁し細胞を溶解、チューブに回収した。Microson ultrasonic cell disruptor XL-2000 (Misonix)の出力を 25%に設定し、氷水中で 30 秒間ソニケーションすることで、溶出したゲノム DNA を剪断した。その後 4°C で 1 時間ローテート処理を施し、4°C、16,000 \times g で 30 分間遠心、上清を回収してタンパク質抽出サンプルとした。タンパク質濃度の測定は BSA (Bovine Serum Albumin)を基準物質とした Bradford 法によって行い、595 nm の吸光度を測定した。

1-2-1-d. miRNA のトランスフェクション

miRNA のトランスフェクションは以下の様にして行った。アッセイ開始時に 70-80% コンフルエントになるように、6 well-plate に HepG2 細胞を播種し 10%FBS を含む DMEM 培地で一晩培養した。翌日、hsa-miR-1228-5p もしくは標的遺伝子を持たない Control miRNA を終濃度が 80 nM になるようにトランスフェクション[※]させた。トランスフェクション開始 6 時間後に一度培地交換を行い、以後 16 時間培養した。培養開始 24 時間後に細胞から total RNA を、48 時間後にタンパク質を回収して以後の解析に使用した。

※ miRNA のトランスフェクションは以下の様に行った。まず 2.5 $\mu\text{L}/\text{well}$ Lipofectamine® RNAiMAX Reagent を、147.5 $\mu\text{L}/\text{well}$ Opti-MEM I Reduced-Serum Medium (共に Invitrogen Invitrogen ThermoFisher Scientific)で希釈し、室温で 5 分間静置した。他方 20 μM となるように RNase free 水に溶解した miRNA 溶液 2 μL を 148 μL の Opti-MEM I Reduced-Serum Medium に溶解し終量 150 μL とした。次いで両者を混合後 vortex、スピンドウンした後、室温で 20 分間静置した。予め 37°C に加温しておいた 10%FBS を含む DMEM 培地を 700 μL 加え計 1000 μL とし各 well に分注した。使用した試薬を以下に示す。

Non-targeting miRNA Mimic v1 (MIM9001、Active Motif)

hsa-miR-1228-5p Mimic (MIM0749、Active Motif)

1-2-1-c. DNA マイクロアレイ解析

1-2-1-b.で得た total RNA 200 ng を使用した。3'IVT Express Kit (Affymetrix) を用いて RNA からの cDNA 合成、cDNA を鋳型としたビオチン標識 cDNA を合成した。洗浄及び断片化をした後に GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix) に 45°C、16 時間ハイブリダイズさせた。方法は Affymetrix 社の標準プロトコールに従った。Wash and stain、scanning は miRNA アレイと同様の方法で行った。データの読み取りおよび正規化を含むデータの解析は AGCC を利用して行った。

1-2-1-d. iTRAQ 法によるプロテオーム解析

i アセトン沈殿およびバッファー交換

あらかじめ-20°C に冷やしておいたアセトンをタンパク質抽出液に対して 6 倍量加え、転倒混和した。その後-20°C で 1~3 時間静置し、沈殿を生成させた。その後遠心分離 (12,000 \times g、4°C、15 min)し、上清のアセトンを除去した。得られたタンパク質ペレットを 250 mM TEAB で溶解した。溶解液中のタンパク質濃度を再び Bradford 法で測定し、各サンプルの濃度が 100 $\mu\text{g}/20 \mu\text{L}$ になるように希釈し、各群のサンプルをプールした。

ii 還元、システイン残基のブロック処理

プール後のサンプル溶液 20 μL に対して iTRAQ キット(iTRAQ® Reagent Multiplex Kit、SCIEX)の Denaturant を 1 μL 加えた。次に Reducing reagent を 2 μL 加えて攪拌、スピンドウンし、60°C で 1 時間インキュベートした。更に Cystein blocking Reagent を 1 μL 加えて攪拌、スピンドウンし室温で 10 分間インキュベートした。

iii トリプシン消化

各サンプルにトリプシン溶液を 10 μ L 加えて攪拌、スピンドウンした後 pH 試験紙を使用して溶液 pH が 7~8 になっていることを確認した。その後 37°C で 16 時間インキュベートした。

iv iTRAQ ラベリング

キット内の iTRAQ 試薬 114、115 にそれぞれ 70 μ L のエタノールを加えて攪拌、スピンドウンした。これをトリプシン消化後の各サンプルに対して全量加えた (Control 群: 114, [Leu(-)群]: 115)。pH 試験紙で溶液 pH が 7~8 であることを確認した後、室温で 1 時間インキュベートし、その後両サンプルを 1 つに混合した。

v Cation Exchange Column による精製

ラベル後のサンプルに、10 倍量の Loading buffer (ICAT® Cation Exchange Buffer Pack、SCIEX)を加えた。pH 試験紙で溶液 pH を確認しながら、10%ギ酸を加えて pH を 3 程度に調整した。平衡化したカラムにサンプルをアプライしカラムに吸着させ、Loading buffer で洗浄し、調整した Elute buffer (ICAT® Cation Exchange Buffer Pack、SCIEX)でサンプルを溶出させた。

vi 有機溶媒の除去

溶出させたサンプルフラクション (6 フラクション、それぞれ 1 mL)をバキュームドライで 100 μ L 程度に濃縮し、buffer に含まれるアセトニトリルを除去した。ここに終量が 1.5 mL になるように 0.1%ギ酸を加え、溶解させた。

vii 脱塩処理

Sep-Pak (Waters)を用いた。ディスポーザルシリンジで 1.5 mL の 70%アセトニトリル、0.1%ギ酸/Milli-Q 水を送液し、次に 1.5 mL の 0.1%ギ酸/Milli-Q 水を送液した後、サンプルを全量送液し、Sep-Pak にタンパク質を吸着させた。次に 1.5 mL の 1.5 mL の 0.1%ギ酸/Milli-Q 水を送液した後に 1.5 mL の 70%アセトニトリル、0.1%ギ酸/Milli-Q 水を送液し、溶出画分を回収した。

viii 有機溶媒の除去

脱塩処理後のサンプルをバキュームドライで濃縮乾固した後、0.1%ギ酸 50 μ L に溶解した。

ix LC-MS/MS による分析

10 μ L のサンプルを LC-MS/MS (TripleTOFTM 5600 + System with Eksigent nanoLC)で分析した後、ProteinPilotTMSoftware、Mascot® server を用いた定性解析及び MultiQuantTMSoftware を用いた定量解析を行った。

1-2-1-e. TargetScanHuman を利用した hsa-miR-1228-5p の標的遺伝子候補の探索

hsa-miR-1228-5p の標的遺伝子候補の探索には TargetScanHuman (Release 7.0, http://www.targetscan.org/vert_70/)を使用した。得られたトランスクリプトームおよびプロテオームデータのうち、変動倍率が Log ratio < -0.1 であったものの中で各 miRNAs の標的部位を有するものを探索した。

1-2-2. 結果

1-2-2-a. トランスクリプトーム解析

マイクロアレイで発現解析された 21118 種の遺伝子のうち、ロイシン欠乏処理によって発現が $\text{Log ratio} < -0.1$ であった遺伝子は 11774 種あり、そのうちで hsa-miR-1228-5p の標的部位を有するものは 676 種であった。一方、hsa-miR-1228-5p の過剰発現によって発現が $\text{Log ratio} < -0.1$ と変化した遺伝子は 2724 種あり、そのうちで hsa-miR-1228-5p の標的部位を有するものは 154 種であった。更にこれら 2 つの試験の共通項、すなわちどちらの試験でも $\text{Log ratio} < -0.1$ を示しかつ hsa-miR-1228-5p の標的部位を有する遺伝子は 98 種であった (Fig. 1-2-2-1)。

1-2-2-b. プロテオーム解析

今回 iTRAQ 試験によって同定されたタンパク質 4016 種のうち、定量に成功したものは 3361 種であった。このうちロイシン欠乏処理によって発現が $\text{Log ratio} < -0.1$ であったものは 593 種あり、そのうちで hsa-miR-1228-5p の標的部位を有するものは 42 種であった。一方、hsa-miR-1228-5p の過剰発現によって発現が $\text{Log ratio} < -0.1$ と変化した遺伝子は 3425 種あり、そのうちで hsa-miR-1228-5p の標的部位を有するものは 241 種であった。更にこれら 2 つの試験の共通項、すなわちどちらの試験でも $\text{Log ratio} < -0.1$ を示しかつ hsa-miR-1228-5p の標的部位を有する遺伝子は 35 種であった (Fig. 1-2-2-2)。

第三節 考察

本章では HepG2 細胞を利用し、必須アミノ酸の1つであるロイシンの欠乏に応答して発現変動する miRNAs の網羅的探索を行った。また抽出された miRNAs の標的遺伝子候補の探索方法として、mRNA 発現に着目しマイクロアレイ解析を利用する方法、またタンパク質発現に着目しプロテオーム解析を利用する方法を比較検討することで、以後の研究基盤を作ることに着手した。

3度の独立したマイクロアレイ解析によって抽出された12種の miRNAs

本章では miRNAs の網羅的探索にあたり、false positive な結果を可能な限り除去する目的で、3度の独立したマイクロアレイ解析を行った。解析に供した total RNA については、必須アミノ酸欠乏に応答するマーカー遺伝子として ATF4 およびこの転写因子によって発現調節を受けている IGFBP-1 の発現上昇を確認し、正確にアミノ酸欠乏に応答しているサンプルを供することが出来たと考えている。

3度のマイクロアレイデータを比較すると、Log ratio にして 0.1~0.2 程度の値のばらつきはあるものの、miRNAs の発現変動傾向は安定しており (Data not shown)、ロイシン欠乏時に発現上昇する miRNA 群の探索としては成功したと言える。今回はこのうち平均変動倍率が Log ratio > 0.6 であったもののうち、特に発現上昇が大きかった 12種の miRNAs を抽出した。このうち最も平均変動倍率が大きかった hsa-miR-1228-5p は、hsa-miR-1228-3p と共にヘアピンループ状で核外に輸送され、互いに対をなす miRNAs である。5p 側はそのうちの star 配列側であるが、序論で述べたように、近年では star 配列の機能性にも注目が集まっていることから (Ghildiyal et al., 2010)、今回は hsa-miR-1228-5p に着目して研究を進めることにした。

hsa-miR-1228-5p の標的遺伝子候補の探索方法の検討に関して

本章ではトランスクリプトーム解析およびプロテオーム解析の 2 つの解析を利用して、ロイシン欠乏時および hsa-miR-1228-5p の過剰発現時の両者の変化を比較することでそれぞれの有用性を評価することにした。網羅性の点でトランスクリプトーム解析が大きく優れているのは言うまでもないが、ここでは網羅性 (測定出来る全遺伝子数) に対する実験条件の影響 (ロイシン欠乏や miRNA トランスフェクションにより変動した遺伝子数) の割合という視点も含めて考察する。

ロイシン欠乏下での両オミクスの結果に関して

ロイシン欠乏下では mRNA については、マイクロアレイで評価できる全 21118 遺伝子のうち 11774 遺伝子が発現減少していた。一方 21118 遺伝子のうちで hsa-miR-1228-5p の標的部位を有する 1235 遺伝子のうち、発現減少していたのは 676 遺伝子であった。全体に対する割合を計算すると、順に 55.7%、54.7%とほぼ同程度であった。一方タンパク質については、定量できた全 3361 遺伝子中 593 遺伝子が発現減少していることが確認できた。3361 遺伝子のうちで hsa-miR-1228-5p の標的部位を有する 243 遺伝子のうち、発現減少していたのは 42 遺伝子であった。全体に対する割合を計算すると、順に 17.6%、17.3%となり、こちらもほぼ同程度であった。

miRNA 過剰発現下での両オミクスの結果に関して

他方、hsa-miR-1228-5p 過剰発現時では、mRNA についてはマイクロアレイで評価できる全 21118 遺伝子のうち 2724 遺伝子が発現減少していた。一方 21118 遺伝子のうちで hsa-miR-1228-5p の標的部位を有する 1235 遺伝子のうち、発現減少していたのは 154 遺伝子であった。全体に対する割合を計算すると、順に 12.9%、12.4%とほぼ同程度であった。一方タンパク質については、定量できた全 3361 遺伝子中 3328 遺伝子が発現減少していることが確認できた。3361 遺伝子のうちで hsa-miR-1228-5p の標的部位を有する 243 遺伝子のうち、発現減少していたのは 241 遺伝子であった。全体に対する割合を計算すると、順に 99.0%、99.2%となり、こちらもほぼ同程度であった。

両条件に共通して発現減少していた遺伝子に関して

トランスクリプトームについては 98 種、プロテオームについては 35 種の遺伝子が hsa-miR-1228-5p の標的部位を有し、かつ両条件で発現減少していた遺伝子として抽出された。この 2 群の共通因子は 5 遺伝子 (*CTSD*、*EZR*、*LRPAP1*、*QKI*、*RAB8A*) のみであり、極めて少なかった。従って本章においてはトランスクリプトームとプロテオーム結果の相関は非常に低いものとなった。

栄養条件とトランスフェクション条件の影響の比較

上記の結果より、トランスクリプトームは栄養状態の変化の影響を強く反映し、一方でプロテオームは miRNA 過剰発現の影響を強く反映することが分かった。また発現変動している遺伝子の割合に関する結果から、種々の条件の影響の強さは miRNA の標的部位を持つものと持たないもので同程度であることも分かった。序論で紹介したように、近年の研究では miRNAs による遺伝子発現制御の大半は標的遺伝子の mRNA 分解に起因するという報告も多い (Guo et al., 2010)が、本章の結果はこうした報告とは異なるものであった。しかし、こうした既報もあらゆる miRNAs に対しての普遍的な結果

ではなく、miRNAs 導入後の培養時間等によっても大きく影響を受ける可能性が高い。また hsa-miR-1228-5p の標的部位を有する遺伝子に関しては、トランスクリプトームとプロテオームデータに相関があまり認められなかったこと、タンパク質情報がより表現型に近いものであることから、本研究の範囲内ではプロテオーム解析がより有用であると結論付けることにした。

本章まとめ

3 度の miRNA アレイの施行によって、擬陽性の低い結果としてロイシン欠乏に応答して発現上昇する 12 種の miRNAs を見出すことに成功した。またそのうちの 1 つである hsa-miR-1228-5p に着目し、その標的遺伝子探索方法の検討として、トランスクリプトームとプロテオーム解析をそれぞれ利用する方法を比較したところ、本章の試験条件ではプロテオーム解析結果が miRNA の作用をより強く反映すると考えられ、現段階では以後の解析に有用であると考えられた。しかし時間検討などを引き続き行い、トランスクリプトームデータとの併用など、より正確に標的遺伝子を見出す方法などの検討も必要であろう。

Table. 1-1-1. アッセイに使用した培地組成

試薬	/L
10 × Earle's Balanced Salt Solution	100 mL
100 × MEM Vitamin Solution	10 mL
NaHCO ₃	2200 mg
HEPES	5958 mg
L-グルタミン	292.2 mg
L-アルギニン塩酸塩	126 mg
L-システイン塩酸塩 (一水塩)	31.4 mg
L-チロシン	36 mg
L-ヒスチジン塩酸塩 (一水塩)	42 mg
L-リジン塩酸塩	73 mg
L-メチオニン	15 mg
L-フェニルアラニン	32 mg
L-スレオニン	48 mg
L-トリプトファン	10 mg
L-イソロイシン	52 mg
L-ロイシン	52 mg
L-バリン	52 mg

上記はControl培地の組成を示している。Leu (-)群については、上記培地組成から、L-ロイシンを除いたものを調製した。

Table. 1-1-2. ロイシン欠乏下で発現上昇したmiRNAs

miRNA	Log ratio (Ave.)
hsa-miR-149-3p	0.87
hsa-miR-638	0.71
hsa-miR-663a	0.80
hsa-miR-762	0.88
hsa-miR-1228-5p	1.03
hsa-miR-1469	0.95
hsa-miR-1915	0.71
hsa-miR-3178	0.91
hsa-miR-3196	0.78
hsa-miR-4497	0.82
hsa-miR-4508	1.02
hsa-miR-4530	0.87

3回のマイクロアレイの試験で得られたLog ratioの平均値を示した。

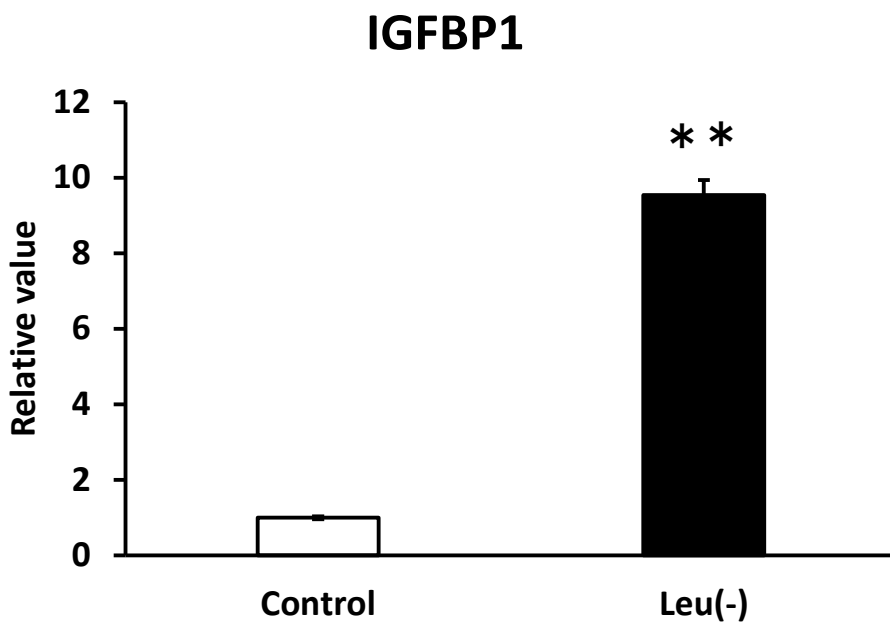
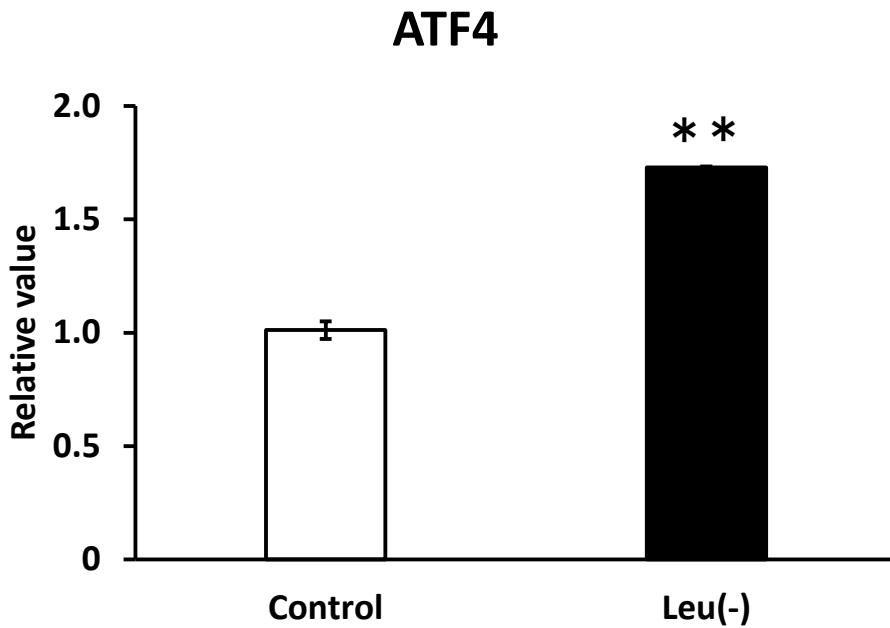


Fig. 1-1-2-1. ロイシン欠乏下のHepG2細胞におけるATF4およびIGFBP-1のmRNA発現

グラフの値は平均値±S.E.を示す。n=3, **:p<0.01 (vs.Control)

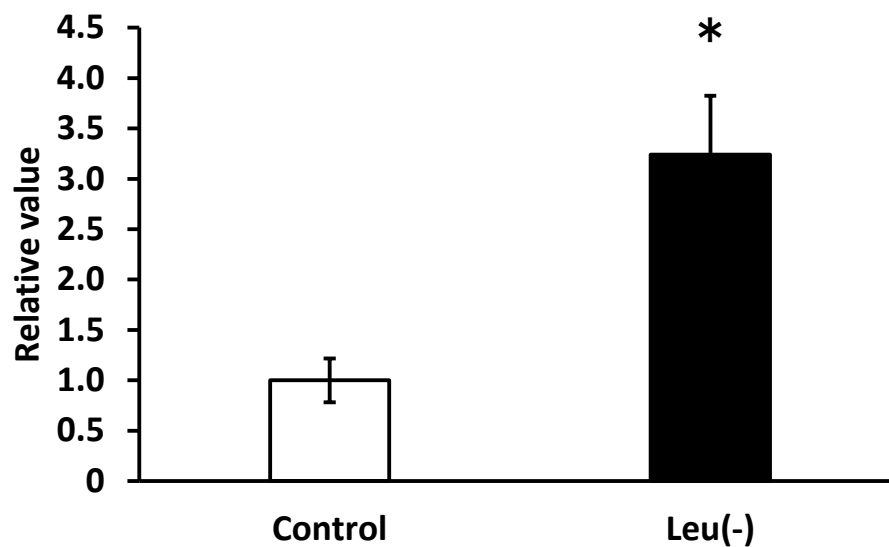


Fig. 1-1-2-2. ロイシン欠乏下のHepG2細胞におけるhsa-miR-1228-5pの発現

グラフの値は平均値±S.E.を示す。n=6, *:p<0.05 (vs.Control)

ロイシン欠乏

Log ratio < -0.1
(11774)

hsa-miR-1228-5p OX

Log ratio < -0.1
(2724)

hsa-miR-1228-5p
標的候補
(676)

hsa-miR-1228-5p
標的候補
(154)

98候補遺伝子

Fig. 1-2-2-1. トランスクリプトーム解析によるmiRNA標的遺伝子候補の探索

ロイシン欠乏時にhsa-miR-1228-5pの作用を介して発現減少する98種の遺伝子リストを2つのマイクロアレイ試験の統合解析によって抽出した。()内には減少した遺伝子数を示した。

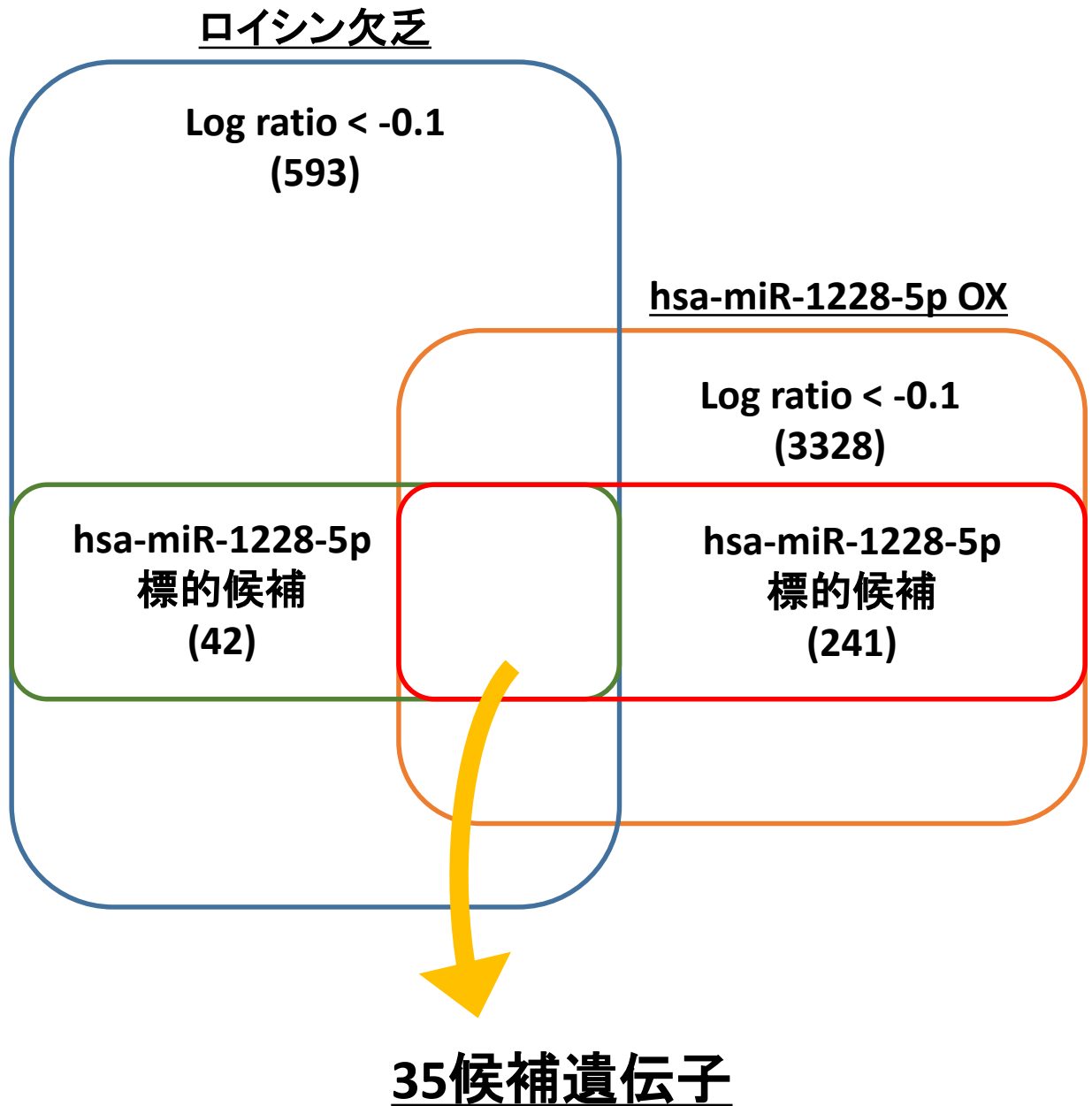


Fig. 1-2-2-2. プロテオーム解析によるmiRNA標的遺伝子候補の探索
 ロイシン欠乏時にhsa-miR-1228-5pの作用を介して発現減少する遺伝子を2つのプロテオーム試験の統合解析によって抽出した。
 ()内には減少した遺伝子数を示した。

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

緒言

第一章では、網羅的解析手法を利用して必須アミノ酸の1つであるロイシンの欠乏に
応答する12種のmiRNAsを見出した。また併せて、トランスクリプトームやプロテオ
ーム解析の結果との統合解析によって、miRNAsの標的遺伝子候補を推定する
ための有効な方法を探索した。本章ではそれら12種のmiRNAsがどのような機構を介してロ
イシン欠乏に応答しているのか、その機序の解析を試みた。

必須アミノ酸欠乏下では、その状況に適応するために遺伝子発現の変化を始めとした
様々な応答が生じることが広く知られている (Bruhat et al., 1999)。そのうちの1つと
して、mGCN2/eIF2 α 経路を介した、転写因子 ATF4 (Activating Transcription Factor
4)の特異的な翻訳活性化が挙げられる (De Sousa-Coelho et al., 2013)。ATF4はbZIP
スーパーファミリーに属する転写因子であり、他のATFファミリーのタンパク質や
C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein)ファミリーと共に働くことにより、アスパ
ラギン合成酵素やCHOP (C/EBP homology protein)の発現を誘導する (Ohoka et al.,
2005)。序論で述べたように、microRNAの発現は通常は通常の遺伝子と同様に行われる
(Canonical pathway)か、タンパク質コード遺伝子の転写時にイントロンから切り出さ
れる形 (Mitron pathway)で行われる (Ha and Kim, 2014; Kim et al., 2009)。従って
このATF4によって発現が制御されるmicroRNAも存在することが予想されるが、こ
うした報告は未だなされていなかった。そこで本研究では、ロイシン欠乏時のmiRNAs
の発現制御機構解明の一步として、このATF4によって発現制御されるmiRNAsの探
索を行うこととした。また併せて、第一章で検討した標的遺伝子候補推定の結果を踏ま
え、主にプロテオーム解析を活用してこうしたmiRNAsの標的探索を行い、この現象
の生理学的な意義を見出すことを目的とした。

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

2-1-1-a. 細胞培養

ヒト肝臓ガン由来 HepG2 細胞の培養は、1-1-1-a.と同様にして行った。

2-1-1-b. 細胞からの total RNA の抽出

1-1-1-b.と同様にして行った。

2-1-1-c. ATF4 ORF 領域の増幅

細胞から抽出した total RNA から cDNA を合成しこれを鋳型として使用した。cDNA の合成は、1-1-1-c.と同様にして行った。得られた cDNA 200 ng を含む DNA 溶液と下記のプライマー (それぞれ 0.2 μ M に希釈したものを 1 μ L ずつ)、dNTP mixture を 4 μ L、5 \times PrimeSTAR buffer (Mg²⁺ plus)を 10 μ L、PrimeSTAR HS DNA polymerase を 0.5 μ L を加え計 50 μ L とし混合した後に TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Standard を利用し以下の様に温度変化させ、ATF4 の ORF 領域を増幅させた。

94°C	2 min	}	30 cycle
98°C	10 sec		
55°C	5 sec		
72°C	70 sec		
4°C	∞		

使用したプライマー

F : ACAGGATCCATTCCAGCAAAGCA (BamH1 の認識配列を含む)

R : CTAGAATTCTCTATGTACAAGCACA (EcoR1 の認識配列を含む)

プライマーの合成は、Invitrogen ThermoFisher Scientific に依頼した。

得られた PCR 産物のうち、18 μL に対して 2 μL の 10 \times Loading buffer (Takara)を混合した後、全量をアプライして電気泳動^{※1}によって PCR 増幅産物が得られていることを確認した。さらにゲルのその部分をカミソリで切り取り、-20 $^{\circ}\text{C}$ で凍結した後、Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)を利用してゲル片から DNA を回収、精製した。

※1 PCR 産物の電気泳動は以下の方法で行った。TAE buffer 100 mL に対して 1 g の Agarose S (ナカライテスク)を混合し、電子レンジで加熱して溶解したものを型に流し込んで 60 分間静置しゲルを作製した。ここに Loading buffer と混合した PCR 産物をアプライし、50 mV で 45 分間泳動した。泳動後のゲルを EtBr 溶液中で 15 分間振盪後 UV を照射し、ヒト ATF ORF の塩基長である 1088 bp 付近にバンドがあることを確認した。

2-1-1-d. ATF4 過剰発現プラスミドの作製

pcDNATM3.1⁽⁺⁾ (Invitrogen ThermoFisher Scientific) 2 μg と 2-2-1-c.で得られた精製後 PCR 産物 50 μg を、BamH1 および EcoR1 を加え 37 $^{\circ}\text{C}$ で一晩処理した後、両者のモル比が pcDNA : PCR 産物 = 1 : 5 になるように濃度を調整し、ここに T4 DNA ligase を混合し 4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩処理し、PCR 断片をプラスミドに導入した。ライゲーション後のプラスミドは 2-1-1-c.と同様に TAE ゲルでの泳動を行い分子量が約 6500 bp 付近にバンドが生じる事を確認、切り取った後、ゲル片からの精製を経て適切にインサートが導入されたと考えられるものを回収した。このプラスミド DNA 3 ng を *E. coli*. DH5a Competent Cells (Takara) 50 μL と混合し、氷上で 30-40 分間静置した後、ヒートブロックにて 42 $^{\circ}\text{C}$ で 45 秒間処理し、氷上で 2 分間急冷した。ここに SOC 培地を 950 μL 加え、転倒混和した後、同じくヒートブロックにて 37 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間培養した。培養後の大腸菌溶液を、LB 寒天培地 (2.5 g/100 mL LB、1.5 g/100 mL Agar、それぞれ Sigma Aldrich、ナカライテスク)プレート上に塗布し、37 $^{\circ}\text{C}$ で一晩培養した。プレート上に生じたコロニーを回収し、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアンピシリンナトリウムを含む 3 mL の LB 液体培地中で一晩振盪培養した。培養後の培地を室温で 3,000 rpm、1 分間遠心した後、大腸菌ペレットを回収し、GenEluteTM Plasmid Miniprep Kit (Sigma Aldrich) を使用してプラスミド DNA を回収した。プラスミド DNA 2 μg に対して再度制限酵素処理を施し、電気泳動を行い、5428 bp および 1088 bp 位置付近にバンドが生じることを確認した後、シーケンスを Eurofins Genomics 社に依頼して解析し、正確に ATF4 ORF が導入されていることを確認し、過剰発現プラスミドの完成とした。

2-1-1-e. HepG2 細胞への ATF 過剰発現プラスミドの導入

6well-plate (Falcon)で 70-80%コンフルエントになるように HepG2 細胞を播種し、10%FBS を含む DMEM 培地で一晚培養した。翌日、2-2-1-d.で作製した ATF4 過剰発現プラスミドまたはインサートを含まない pcDNATM3.1 (+) をトランスフェクション^{※2}させた。トランスフェクション開始 6 時間後に一度培地交換を行い、更にその 18 時間後にも培地を交換した。トランスフェクション開始後 24、48 時間後に各 well を PBS で 2 回洗浄し、プレートに液体窒素に接触させることで凍結させた。プレートは以後解析に利用するまでは-80°C にて保存した。

※2 プラスミドのトランスフェクションは以下のように行った。まず 10 μ L/well Lipofectamine 2000 Reagent を、140 μ L/well Opti-MEM I Reduced-Serum Medium (共に Invitrogen Invitrogen ThermoFisher Scientific)で希釈し、室温で 5 分間静置した。他方、両プラスミド 1 μ g を同じく終量 150 μ L となるように Opti-MEM I Reduced-Serum Medium に溶解した。次いで両者を混合後 vortex、スピンドウンした後、室温で 20 分間静置した。予め 37°C に加温しておいた 10%FBS を含む DMEM 培地を 1700 μ L 加え、計 2000 μ L とし各 well に分注した。

2-1-1-f. 定量 RT-PCR による ATF4 mRNA 量の測定

培養後の HepG2 細胞から得た total RNA から cDNA を合成し、これを使用して定量 PCR を行った。方法は 1-1-1-c.と同様に行った。内部標準として glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*)の mRNA 発現を補正に利用し、目的の mRNA の相対値を算出した。使用したプライマーは以下に示した。

使用したプライマー

ATF4

F : ACAGGATCCATTCCAGCAAAGCA

R : CTAGAATTCTCTATGTACAAGCACA

GAPDH

F : CGACCACTTTGTCAAGCTCA

R : GCTGGTCCAGGGGTCTTACT

プライマーの合成は、Invitrogen ThermoFisher Scientific に依頼した。

2-1-1-g. HepG2 細胞からのタンパク質の抽出

1-2-1-c.と同様にして行った。

2-1-1-h. イムノブロットニングによる ATF4 タンパク質発現量の測定

SDS-PAGE に供する際、8%ポリアクリルアミドゲルを使用した。タンパク質 20 μg の抽出溶液に対して 3×Laemmli's buffer を加えて 5 分間煮沸したサンプルを SDS-PAGE に供した。泳動槽は Mini-PROTEAN 3 cell (Bio-Rad)を使用した。泳動終了後、PVDF 膜 (Immobilon-P, Millipore)へのブロットニングを、セミドライブロッター (アナテック)を使用したセミドライ式で行った (定電流 1 mA/1 cm²、45-60 分間)。なお用いた泳動 buffer および blotting buffer の組成に関しては後述する。ブロットニング終了後、PVDF 膜を PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal® (TOYOBO)に浸し、室温で 1 時間もしくは 4°C で一晩ブロッキングした。抗体による検出は以下のように行った。一次抗体は後述する濃度に Can Get Signal Solution 1 で希釈して用い、4°C で一晩インキュベートした。続いて TBS-T で 5 回洗浄後、二次抗体として horseradish peroxidase (HRP)標識抗体 (GE Healthcare)を Can Get Signal Solution 2 で 1:2500-10000 に希釈して用い、室温で 1 時間インキュベートした。最後に TBS-T で 5 回洗浄した後に ECL Western Blotting Detection System (GE Healthcare)で化学発光させた。化学発光は Ez-Capture MG (ATTO)で検出し、CS Analyzer 3.0 (ATTO)を用いてデンシトリー解析により定量を行った。

泳動 buffer 組成

25 mM Tris (ナカライテスク)
192 mM Glycine (関東化学)
0.1% SDS (ナカライテスク)

Blotting buffer 組成

25 mM Tris (ナカライテスク)
192 mM Glycine (関東化学)
0.1% SDS (ナカライテスク)
15% (v/v) メタノール (関東化学)

TBS-T (pH 7.4)組成

25 mM Tris (ナカライテスク)
135 mM NaCl (関東化学)
2.5 mM KCl (関東化学)
0.1% (v/v) Tween20 (関東化学)

用いた一次抗体

#11815 ATF-4 (D4B8) Rabbit mAb (Cell Signaling Technology)

希釈倍率 1 : 1000

GAPDH antibody (V-18): sc-20357 (Santa Cruz Biotechnology)

希釈倍率 1 : 250

2-1-1-i. 統計処理

結果は平均値±標準誤差で示した。統計解析はスチューデントの *t*-test を用いて有意性の検定を行った。

2-1-2. 結果

ATF 過剰発現プラスミドを導入した HepG2 細胞における ATF4 mRNA および ATF タンパク質の発現量をそれぞれ測定したところ、過剰発現処理によって mRNA レベルでは約 18.6 倍の、タンパク質レベルでは約 6.27 倍の上昇が認められた (Fig. 2-1.)。

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

2-2-1-a. マイクロアレイ解析

Total RNA は 2-1-1-f. で抽出したものを使用した。またマイクロアレイ解析には GeneChip® miRNA 3.0 Array (Affymetrix) を使用し、実験条件については 1-1-1-d. と同様にして行った。得られたデータセットのうちで、Mock 群に対する ATF4 OX 群の発現上昇倍率が Log ratio > 0.6 であったものを発現上昇したものと判定した。

2-2-1-b. ロイシン欠乏下での miR-663a および miR-1469 の発現挙動解析

アッセイ開始時に 70-80%コンフルエントになるように、12 well-plate に HepG2 細胞を播種し 10%FBS を含む DMEM 培地で一晚培養した。培地を MEM (Control 群) もしくはロイシンを含まない MEM [Leu(-)群] に交換し、0-48 時間培養した。培養開始後 0、12、24、48 時間後に細胞を洗浄し、total RNA を抽出した。total RNA の抽出は 1-1-1-b. と同様に行った。Total RNA からの cDNA 合成、およびその後の定量 PCR は下記に示すプライマーを使用し、1-1-1-c. と同様にして行った。内部標準として U6 spliceosomal RNA (U6snRNA) の miRNA 発現を補正に利用し、目的の miRNA の相対値を算出した。

使用したプライマー

Hs_miR-663_3 miScript Primer Assay (MS00037247, QIAGEN)

Hs_miR-1469_2 miScript Primer Assay (MS00037800, QIAGEN)

Hs_RNU6-2_11 miScript Primer Assay (MS00033740, QIAGEN)

2-2-1-c. ATF4 ノックダウン HepG2 細胞での ATF4 タンパク量の経時的変化の解析

ATF4 のノックダウンは以下の様に行った。アッセイ開始時に 70-80%コンフルエントになるように、6 well-plate に HepG2 細胞を播種し 10%FBS を含む DMEM 培地で一晚培養した。翌日、ATF4 を標的とする siRNA または標的遺伝子を持たない siRNA (後述) を終濃度が 40 nM になるようにトランスフェクション^{*3}させた。トランスフェクション開始後 6 時間で一度培地交換を行い、更にその 18 時間後にも培地を交換した。トランスフェクション開始後 0、12、24、48 時間後に各 well を PBS で 2 回洗浄し、プレートを液体窒素に接触させることで凍結させた。プレートは以後解析に利用するまでは -80°C にて保存した。

※3 siRNA のトランスフェクションは以下の様に行った。まず 2.5 $\mu\text{L}/\text{well}$ Lipofectamine® RNAiMAX Reagent を、147.5 $\mu\text{L}/\text{well}$ Opti-MEM I Reduced-Serum Medium (共に Invitrogen Invitrogen ThermoFisher Scientific)で希釈し、室温で 5 分間静置した。他方 20 μM となるように RNase free 水に溶解した siRNA (後述) 2 μL を 148 μL の Opti-MEM I Reduced-Serum Medium に溶解し終量 150 μL とした。次いで両者を混合後 vortex、スピンドウンした後、室温で 20 分間静置した。予め 37°C に加温しておいた 10%FBS を含む DMEM 培地を 700 μL 加え計 1000 μL とし各 well に分注した

使用した siRNA

Hs_ATF4_5 FlexiTube siRNA (SI03019345, QIAGEN)

AllStars Negative Control siRNA (SI03650318, QIAGEN)

その後のイムノブロットに関しては、2-1-1-h.と同様に行った。

2-2-1-d. ATF4 ノックダウン、ロイシン欠乏時の HepG2 細胞での ATF4 の発現解析

アッセイ開始時に 70-80%コンフルエントになるように、6 well-plate に HepG2 細胞を播種し 10%FBS を含む DMEM 培地で一晩培養した。翌日、ATF4 を標的とする siRNA または標的遺伝子を持たない siRNA を終濃度が 40 nM になるようにトランスフェクションさせた。トランスフェクション開始 6 時間後に一度培地交換を行い、さらにその 6 時間後に培地を MEM (Control 群)もしくはロイシンを含まない MEM [Leu(-)群]に交換し、12 時間培養した。細胞から total RNA、タンパク質を抽出し、定量 PCR およびイムノブロットにより ATF4 mRNA、ATF4 タンパク質の発現を測定した。Total RNA の抽出および定量 PCR、イムノブロットについては 1-1-1-c.および 2-1-1-h.と同様にして行った。

2-2-1-e. ATF4 ノックダウン、ロイシン欠乏時の HepG2 細胞での両 miRNAs の発現挙動解析

2-2-1-d.で抽出した total RNA を使用して cDNA を合成し、定量 PCR によって hsa-miR-663a および hsa-miR-1469 の発現量を測定した。cDNA の合成およびその後の定量 PCR については、2-2-1-b.と同様にして行った。

2-1-1-i. 統計処理

結果は平均値±標準誤差で示した。統計解析は2群比較の場合はスチューデントの t test を、4群比較の場合は二元配置分散分析後、Tukeyの方法を利用して有意性の判定を行った。

2-2-2. 結果

2-2-2-a. マイクロアレイ解析

マイクロアレイ解析の結果、ATF4 過剰発現時に発現上昇した miRNAs は 702 種あり、そのうち Mock 群に対する発現上昇倍率が Log ratio > 0.6 の条件を満たしていたものは 203 種であった。この 203 種と第一章で抽出されたロイシン欠乏下で発現上昇する 12 種の miRNAs を比較すると、hsa-miR-663a および hsa-miR-1469 が共通して発現上昇を示していた (Fig. 2-2-2-1)。

2-2-2-b. ロイシン欠乏下での hsa-miR-663a および hsa-miR-1469 の発現挙動解析

ロイシン欠乏下における両 miRNAs の発現挙動を調べるため、一定時間ごとに total RNA を回収し、発現量を測定したところ、hsa-miR-663a の発現量はロイシン欠乏開始から以後 48 時間後まで上昇し続け、Control 群と比較して最大 3.14 倍の上昇を示した (Fig. 2-2-2-2A)。一方 hsa-miR-1469 の発現量はロイシン欠乏開始後 24 時間でピークを示し、以後 48 時間まで Control 群に対して高値を示し続けたが、最大 3.9 倍の上昇を示した (Fig. 2-2-2-2B)。

2-2-2-c. ATF4 ノックダウン HepG2 細胞での ATF4 タンパク量の経時変化

HepG2 細胞内の ATF4 タンパク発現量は、siRNA トランスフェクション開始 12 時間以降、全ての時間において siRNA による有意なノックダウン効果が認められた。一方で ATF4 を標的としない control siRNA 群では、トランスフェクション開始 24 時間以降、顕著な ATF4 発現の上昇が認められた (Fig. 2-2-2-3A、B)。

2-2-2-d. ATF4 ノックダウン、ロイシン欠乏時の HepG2 細胞での ATF4 の発現解析

HepG2 細胞内の ATF4 タンパク発現量および mRNA の発現量は、control siRNA のトランスフェクション条件下では、ロイシン欠乏処理によって有意な増加を示した (Control 群に対してタンパクレベルでは 2.16 倍、mRNA レベルでは 1.92 倍)が、ATF4 を標的とする siRNA のトランスフェクションを施した群においては、この有意な発現増加が認められなかった (Fig. 2-2-2-4A-C)。

2-2-2-e. ATF4 ノックダウン、ロイシン欠乏時の HepG2 細胞での各 miRNAs の発現挙動解析

12 時間のロイシン欠乏処理を施した HepG2 細胞中の両 miRNAs の発現は有意に増加し、hsa-miR-663a で 1.81 倍、hsa-miR-1469 で 1.70 倍の上昇を示した。しかし、ATF4 を標的とする siRNA の処理によってこの上昇は Control レベルにまで完全にキャンセルされた (Fig. 2-2-2-5A、B)。

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

2-3-1-a. TargetScanHuman を利用した miRNA 標的遺伝子候補の探索

hsa-miR-663a および hsa-miR-1469 の標的遺伝子候補の探索には、TargetScanHuman (Release 7.0, http://www.targetscan.org/vert_70/)を使用した。第一章で得たロイシン欠乏下の HepG2 細胞内のプロテオームデータセットのうち、発現変動が Log ratio < -0.1 を満たす遺伝子に絞り、hsa-miR-663a および hsa-miR-1469 の標的部位を有するものを探索した。

2-3-1-b. miRNA のトランスフェクション

各 miRNAs の過剰発現は 1-2-1-d.と同様にして行った。使用した試薬は以下に示した。

Non-targeting miRNA Mimic v1 (MIM9001、Active Motif)

hsa-miR-663a Mimic (MIM0663、Active Motif)

hsa-miR-1469 Mimic (MIM0829、Active Motif)

2-3-1-c. 細胞からの total RNA の回収

1-1-1-b.と同様に行った。

2-3-1-d. 細胞からのタンパク質の回収

1-2-1-c.と同様に行った。

2-3-1-e. イムノブロットイング

2-1-1-h.と同様にして行った。使用した抗体を以下に示す。

使用した抗体

#2691 PRAS40 (D23C7) XP® Rabbit mAb

希釈倍率 1 : 1000

#3339 Ras (27H5) Rabbit mAb

希釈倍率 1 : 500

#3787 Phospho-Akt (Ser473) (736E11) Rabbit mAb

希釈倍率 1 : 1000
#2938 Akt1 (C73H10) Rabbit mAb
希釈倍率 1 : 500
#9205 Phospho-p70 S6 Kinase (Thr389) Antibody
希釈倍率 1 : 1000
#2708 p70 S6 Kinase (49D7) Rabbit mAb
希釈倍率 1 : 500
#3700 β -Actin (8H10D10) Mouse mAb
希釈倍率 1 : 1000
(全て Cell Signaling Technology)

2-3-1-f. 定量 PCR

得られた total RNA から、cDNA を合成しこれを鋳型として使用した。cDNA の合成およびその後の PCR 増幅反応は 1-1-1-c.と同様にして行った。用いたプライマーの配列、は以下に示した。尚、内部標準として **glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*)** の mRNA 発現を補正に利用し、目的の mRNA の相対値を算出した。

使用したプライマー

SREBP1c

F : GGCCCGGGAAGTCACTGT

R : GGAGCCATGGATTGCACATT

FASN

F : TGATTCAAATTGCTGCTTGG

R : CACATGCGGTTTAATTGTGG

ACC1

F : GCCACAGTTCTGAGCCTTAACC

R : CGCTCCATACCCAGCCATAC

SCD1

F : CCTGGGCATAACAGCAGGA

R : TCACGAGCCCATTCATAGACA

LDLR

F : CAAGTGCCAGTGTGAGGAAGG

R : GGTGAAGAAGAGGTAGGCGATG

HMGCR

F : CTTGTTGAATGTCTTGTGATTGGAG

R : AGGACACACAAGCTGGGAAGA

LC3a

F : CGCTACAAGGGTGAGAAGCA

R : GGTTCAACCAGCAGGAAGAAGG

LC3b

F : ACCATGCCGTCGGAGAA

R : CACCGGGATTTTGGTTGG

BCL2

F : TGTGGATGACTGAGTACCTGAACC

R : ACAGCCAGGAGAAATCAAACAGA

β -actin

F : AGCACAGAGCCTCGCCTTT

R : GCGCGGCGATATCATCA

2-3-1-g. 統計解析

結果は平均値±標準誤差で示した。統計解析は 2 群比較の場合はスチューデントの *t* test を、3 群比較の場合は Dunnett の方法を用いて有意性の検定を行った。

2-3-2. 結果

2-3-2-a. TargetScan を利用した miRNAs 標的遺伝子候補の探索

TargetScan 上で hsa-miR-663a および hsa-miR-1469 の標的遺伝子候補を探索したところ、それぞれ 97 種、62 種の遺伝子が見出された。得られた結果を TargetScan 上で標的候補の確からしさの指標の 1 つとして利用されている Cumulative weighted context++ score を参考にして順位付けし、上位 5 種の遺伝子を抽出したところ、hsa-miR-663a については *AKT1S1*、*FASN*、*SLC25A1*、*HRAS*、*GLO1* が、hsa-miR-1469 については *AKT1S1*、*E2F7*、*NDRG1*、*SDF4*、*TMSB10* が抽出された (Table. 2-3-2.)。なお、この後着目した *AKT1S1* および *HRAS* について、各 miRNAs の標的部位の位置や配列を Fig. 2-3-2-1~3. に示した。

2-3-2-b. miRNA トランスフェクションによる標的候補タンパク質量の変化

トランスフェクション開始 48 時間後の HepG2 細胞中の *AKT1S1* (*PRAS40*)、*HRAS* のタンパク発現をイムノブロットで確認したところ、hsa-miR-663a の過剰発現によって *AKT1S1* (*PRAS40*) のタンパク発現量は有意な減少を示し、0.69 倍となった (Fig. 2-3-2-4)。また *HRAS* のタンパク発現量は有意な上昇を示し、1.26 倍となった (Fig. 2-3-2-5)。一方 hsa-miR-1469 の過剰発現によって *AKT1S1* (*PRAS40*) のタンパク発現量は変化しなかった (Fig. 2-3-2-4)。

2-3-2-c. miRNA トランスフェクションが Akt および p70S6K のリン酸化に及ぼす影響

トランスフェクション開始 48 時間後の HepG2 細胞中の Akt、p70S6K およびそのリン酸化タンパク発現を定量し、リン酸化レベルを測定した。その結果 hsa-miR-663a および hsa-miR-1469 の過剰発現によって Akt のリン酸化レベルには変化は無かったが、p70S6K のリン酸化レベルは有意に減少し、それぞれ 0.65 倍、0.60 倍となった (Fig. 2-3-2-6、7)。

2-3-2-d. miRNA トランスフェクションが脂質代謝関連遺伝子の発現に及ぼす影響

トランスフェクション開始 48 時間後の HepG2 細胞中の脂質代謝関連遺伝子の mRNA 発現を測定したところ、*SREBP1c*、*FASN*、*LDLR*、*HMGCR* はどちらの miRNA のトランスフェクションによっても有意な発現上昇を示し、それぞれ hsa-miR-663a で 1.43、4.00、1.18、1.46 倍、hsa-miR-1469 で 1.41、4.73、1.30、1.53 倍となった。一方 *LDLR* の発現はどちらの miRNA のトランスフェクションによっても有意な発現減少を示し、それぞれ 0.90、0.78 倍となった。また、*ACCI* は hsa-miR-663a のトラン

スフェクションでのみ有意な減少を示し、0.83 倍となった (Fig. 2-3-2-8)。

2-3-2-e. miRNA トランスフェクションがオートファジーおよびアポトーシス関連遺伝子の発現に及ぼす影響

トランスフェクション開始 48 時間後の HepG2 細胞中のオートファジーおよびアポトーシス関連遺伝子の mRNA 発現を測定したところ、*BCL2* はどちらの miRNA のトランスフェクションによっても有意な発現減少を示し、それぞれ hsa-miR-663a で 0.39 倍、hsa-miR-1469 で 0.60 倍となった。他方、*LC3a*、*LC3b* は hsa-miR-663a のトランスフェクションのみによって有意な発現減少を示し、それぞれ 0.78、0.81 倍となった (Fig. 2-3-2-9)。

第四節

考察

本章では、第一章でマイクロアレイ解析によって抽出されたロイシン欠乏に応答して発現変動した 12 種の miRNAs の発現調節機構の解明の第一歩として、転写因子 ATF4 によって制御される miRNAs のスクリーニングを行い、これと先の 12 種の miRNAs を比較することで、ロイシン欠乏下で ATF4 を介して応答する miRNAs の探索を行った。第一節にて作製した ATF4 過剰発現ベクターの導入により、HepG2 細胞内では大幅な ATF4 の発現上昇が確認され、miRNAs のスクリーニングを行う上で適切なサンプルを入手することが出来たと考えている。第二節ではこうして得られた total RNA を供した miRNA アレイ、またこの結果と第一章で抽出した 12 種の結果の共通項として、hsa-miR-663a および hsa-miR-1469 を見出すことが出来た。

2 つの miRNAs は、ATF4 による転写活性化により発現上昇している

microRNA の発現の変動要因として、大きく分けて転写活性の変動およびその後の安定性の変動の 2 つが考えられる。本章二節で得られた結果により、ATF4 のノックダウンによってロイシン欠乏によって誘導される hsa-miR-663a および hsa-miR-1469 の発現上昇が対照群と同程度にまで完全にキャンセルされる事が明らかとなった。ATF4 の転写因子としての働きに関する様々な報告、また両 miRNAs の host 遺伝子の転写開始点上流には、ATF4 のコア配列の 1 種である AARE (Amino acid response element) および CRE (cAMP response element) の類似配列が保存されていたこと (Fig. 2-4-1) から、両 miRNAs はロイシン欠乏下において ATF4 による転写活性化を経て発現上昇していたと考えることが出来る。

両 miRNAs の標的候補探索の結果に関して

本章では TargetScanHuman7.0 を利用して、両 miRNAs の標的候補を 5 つずつ抽出した。ロイシン欠乏時にはタンパク質代謝、および脂質代謝に大きな変動が生じるが、この変動に大きく寄与しているのが mTOR であると考えられている (Ricoult and Manning, 2013)。mTOR はロイシンによって直接的に活性化されるほか、インスリンや IGF-1 といった成長因子の作用により、PI3K/Akt 経路を経て活性化されることが報告されている (Loewith and Hall, 2011)。そこで本章では、mTOR 経路の不活性化を誘導する因子としての miRNAs の可能性を探るため、この経路に関連する因子を主な解析対象とした。

標的候補遺伝子タンパク量への hsa-miR-663a 過剰発現の影響

今回標的候補とした *AKT1S1* および *HRAS* のうち、48 時間後の miRNAs 過剰発現によってタンパク量の有意な減少が認められたのは *AKT1S1* のみであった。両者の 3'UTR を比較すると、hsa-miR-663a の標的部位は 2 か所あり、また seed sequence の相同性は共に 7mer-m8 である点では共通している。しかしその 2 か所の 3'末端からの距離 (*AKT1S1* では 52-28、146-152 の 2 か所、*HRAS* では 195-201、243-249 の 2 か所)については *AKT1S1* において、極めて近い位置に標的部位が存在している点が大きな違いであると言える。序論でも述べた様に、miRNAs の作用の強さの指標 (Cumulative weighted context++ score、本論文で標的候補抽出に使用した指標でもある)の計算項目には、相同 seed sequence の長さ、その GC 含有率、標的位置の数、標的位置の 3'末端からの距離などがあり、この距離は非常に重要なファクターである。従って今回の結果はこうした作用の強さの結果が現れたものだと考えている。

標的候補遺伝子タンパク質量への hsa-miR-1469 過剰発現の影響

今回標的候補とした *AKT1S1* のタンパク質発現量は、48 時間の miRNA 過剰発現を施しても影響を受けなかった。しかし miRNA 過剰発現によって p70S6K のリン酸化レベルの減少が認められていたことから、この miRNA が何らかの遺伝子の mRNA に作用していることが予想される。標的遺伝子の決定に至らなかった原因として、プロテオーム解析の網羅性の低さが挙げられる。網羅性の向上を期待すると共に、マイクロアレイなどを利用し、mRNA の発現変動を参考にすることで、標的遺伝子探索を行うことが今後の課題といえる。

miRNAs 過剰発現による mTOR 経路周辺因子の活性の変化に関して

今回周辺因子として Akt および p70S6K の活性を評価した。両者は共にリン酸化されることによって活性化される因子であり、Akt は mTOR を含む下流因子のリン酸化をすることで最終的にタンパク質合成、脂質合成、細胞分裂などを誘導する (Martini et al., 2014)。一方 p70S6K は mTOR の下流に位置し、mTORC1 によってリン酸化され活性化し、自身の下流因子である S6 Ribosomal タンパク質のリン酸化を介してタンパク質合成の活性化を誘導する (Martini et al., 2014)。今回 48 時間の 2 種類の miRNAs の過剰発現によって、Akt のリン酸化レベルに変化は認められなかったものの、p70S6K のリン酸化レベルは大幅な減少が認められた。従って miRNAs は Akt より下流の因子への関与を介して、p70S6K の活性調節に寄与していると考えられる。

hsa-miR-663a は *AKT1S1* を標的としてそのタンパク質発現の抑制に関与していることが今回明らかになった。*AKT1S1* は mTORC1 の構成因子 (mTOR、mLST8/GβL、Raptor、AKT1S1)の 1 つである (Sancak et al., 2007)。一般には活性型 Akt によって

リン酸化を受けると、それによって AKT1S1 は mTORC1 から解離し核内に移行し、それにより mTORC1 が活性化されるため、mTORC1 の活性に対して抑制的な作用を有する因子であると考えられている (Vander Haar et al., 2007)。しかし一方で Hong-Brown らは AKT1S1 の KD を施したマウス筋管細胞 C2C12 では、mTORC1 の活性の低下とそれに伴う p70S6K のリン酸化レベルの低下を報告している (Hong-Brown et al., 2010)。本章においても hsa-miR-663a の作用によって AKT1S1 のタンパク質発現がノックダウンされ、同様の結果が得られたものと考えている。

また興味深い事として、第一章で抽出された 12 種の miRNAs のうち、hsa-miR-149-3p、hsa-miR-762、hsa-miR-3196 も AKT1S1 mRNA の 3'UTR に標的部位を持つ事が、TargetScanHuman により明らかにされている。hsa-miR-1469 の様に実際に標的部位を持ちながらも発現を制御しないものもあるため、今後検討が必要であるが、ロイシン欠乏下で種々の miRNAs が AKT1S1 の発現を制御している可能性がある。

miRNAs 過剰発現による脂質代謝関連遺伝子発現の変化に関して

生存のためのエネルギー産生や、細胞増殖を行うための膜形成のために、脂肪酸合成経路およびコレステロール合成経路は重要な役割を演じている。生体内の状況を察知し、こうした代謝を調節する転写因子として SREBPs が広く知られている。SREBPs は bHLH-Zip ファミリーの 1 つであるが、特徴として、まず前駆体として合成され、十分なステロール存在下では小胞体もしくは核膜上に存在している。ステロール欠乏下ではこの前駆体が 2 段階のプロセッシングを受け、成熟型となり、コレステロールもしくは脂肪酸合成関連遺伝子のプロモーター領域に存在する SREs (Sterol regulatory elements)あるいは E-box に結合する事で、これら遺伝子の発現を誘導する (Brown et al., 2000; Kim et al., 1995; Sakai et al., 1996)。なかでも SREBP1c は肝臓や脂肪組織を含む様々な組織で主に発現し、脂肪酸合成関連遺伝子の発現を制御し、コレステロール生合成関連遺伝子の発現を制御する SREBP2 との機能分担が行われている (Horton et al., 1998)。

両 miRNAs の過剰発現によって、SREBP1c の mRNA 発現増加、またその下流に位置する脂肪酸合成経路の酵素である FASN、SCD1 の mRNA 発現の増加が認められた。また、LDLR およびコレステロール合成経路の律速酵素である HMGCR の mRNA 発現が上昇していたことから、過剰発現下においては脂肪酸およびコレステロールの積極的な合成が行われる方向に遺伝子発現が変動していたと考えられる。HepG2 細胞をロイシン欠乏条件で一定時間培養すると、SREBP1c およびその下流の脂肪酸合成系、コレステロール合成系の mRNA 発現量は大幅に減少することが報告されており (Guo and Cavener, 2007)、本研究においても同様の結果を得ている (Data not shown)。また、SREBP1c の活性は mTORC1 によっても調節を受けていることが知られている (Jo et al., 2014)。今回 miRNAs の過剰発現により mTORC1 の活性低下を確認していたこ

とから、ロイシン欠乏時と同様に **SREBP1c** ならびにその下流遺伝子の発現の減少を予想していたため、今回の結果は想定していたものとは逆の傾向を示していた。

考えられる原因として、利用した細胞株の性質とトランスフェクション時の培地条件が考えられる。今回の試験においては、ガン細胞である **HepG2** 細胞を使用した。一般にガン細胞はエネルギー要求性が非常に高く、今回のように **mTORC1** 活性が低下していても、エネルギーを作り出す方向に代謝が動いていた可能性もある。また導入した **miRNAs** が細胞内で正確に作用し、標的遺伝子の発現抑制を適切に誘導することを優先し、培地中に 10% **FBS** を含む **DMEM** 培地での培養を施していた。そのため **mTORC1** 活性の抑制は誘導されたものの、他の経路がそれを補う制御が誘導され、結果として脂質代謝の亢進が誘導されたものと考えている。**miRNAs** の脂質代謝関連遺伝子群へのより直接的な影響を明らかにするために、今後 **miRNAs** の **inhibitor** を使用した機能解析による検討が必要である。

miRNAs 過剰発現によるオートファジー、アポトーシス関連遺伝子発現の変化に関して

アミノ酸や脂質、糖質など生存に必須な栄養素が欠乏している条件下では、細胞ではアポトーシスやオートファジーが誘導されるなど、生存の維持の為に応答が生じる。必須アミノ酸であるロイシン欠乏条件下においても、こうした応答が誘導されることは広く知られている (Wu et al., 2012)。本章ではアポトーシス関連遺伝子として **BCL2** を、オートファジー関連遺伝子として **LC3a**、**LC3b** に注目した。**BCL2** は **Bcl2** ファミリーの 1 種であり、ミトコンドリアの膜透過性を調節することでアポトーシスの制御を担う因子の 1 つとして、ミトコンドリアからのシトクロム **C** の放出を阻害することで、アポトーシスを阻害することが報告されている (Ohsumi, 2001)。一方 **LC3** は、転写後 **LC3I** として翻訳された後に **LC3II** へとプロセッシングされ、オートファゴソームの構成タンパク質となり、オートファジーのマーカー因子として広く知られている (Ohsumi, 2001)。これら遺伝子の mRNA 発現が、**miRNAs** 過剰発現下でどのような振る舞いを見せるかを検討したところ、両 **miRNAs** の過剰発現によって **BCL2** の大幅な発現減少が認められ、アポトーシスの誘導が行われていると考えられた。一方オートファジーマーカーである **LC3** の発現は、**miRNAs** の過剰発現によって上昇することはなかった (**hsa-miR-663a** の過剰発現で減少、**hsa-miR-1469** の過剰発現では変わらず)。オートファジーの誘導は、**mTORC1** の活性抑制によって惹起されることが知られており (Yu et al., 2010)、今回の結果は予想に反していたが、脂質代謝系と同様に使用した細胞株や培養条件の影響があったと考えている。

本章まとめ

ロイシン欠乏下の HepG2 細胞で発現上昇した 12 種の miRNAs のうち、hsa-miR-663a および hsa-miR-1469 は転写因子 ATF4 を介して発現上昇していることが明らかになった。またその後の機能解析により、hsa-miR-663a は *AKT1S1* を標的としその発現を抑制する事で、mTORC1 の活性を低下させていることが示唆された。mTORC1 は脂質合成やタンパク質合成、アポトーシスなどを制御していることから、ロイシン欠乏下のこうした経路の制御に miRNAs の関与があることが示唆された。一方で hsa-miR-1469 も mTORC1 の活性を抑制したものの、今回の解析の網羅性ではそれに寄与する標的因子を見出すことは出来なかったため、引き続き検討が必要である。

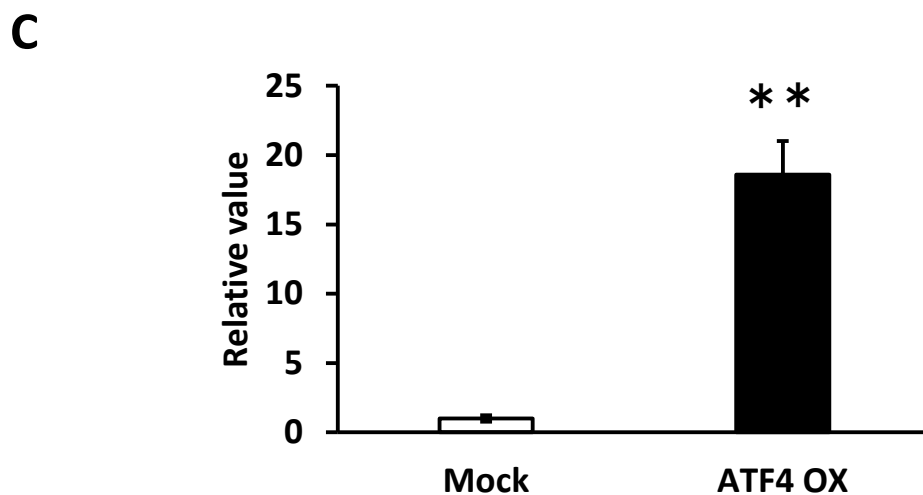
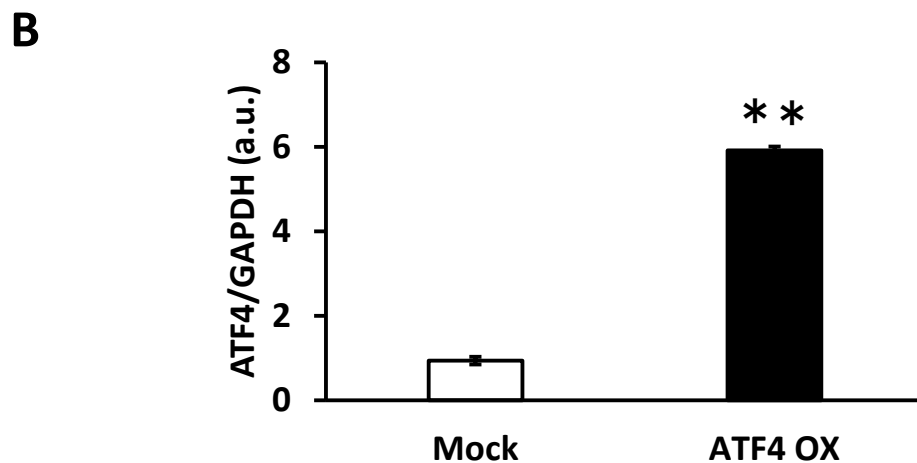
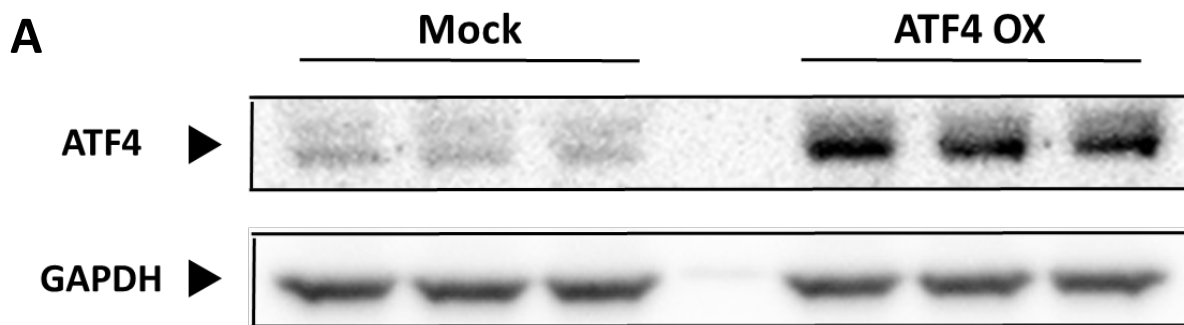


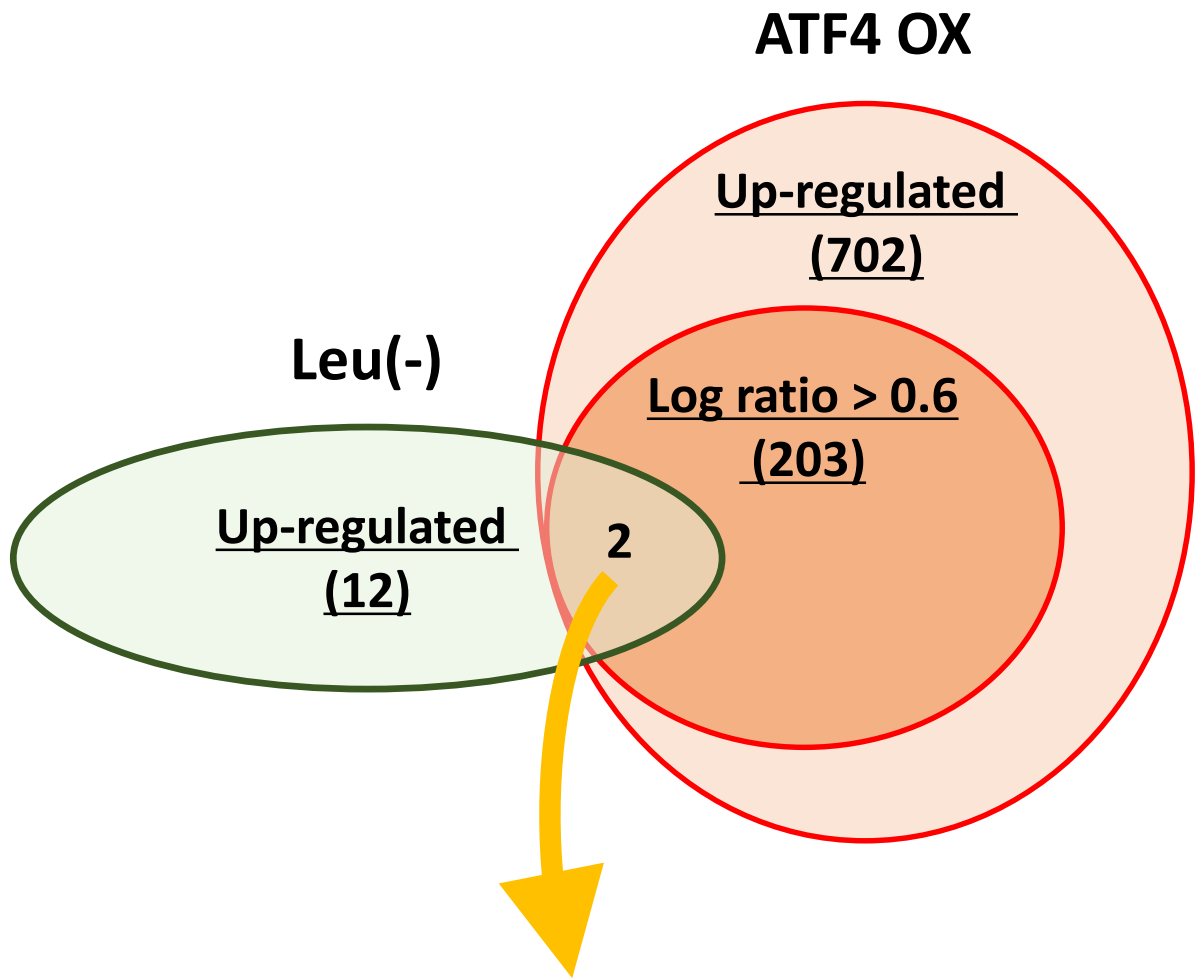
Fig. 2-1. ATF4過剰発現プラスミド導入時のHepG2細胞内でのATF4発現

A : イムノブロットの結果

B : ATF4タンパク質発現量

C : ATF4 mRNA発現量

グラフの値は平均値±S.E.を示す。n=3, **:p<0.01(vs.Control)



- [**hsa-miR-663a (Log ratio : 0.80、1.01)**
- [**hsa-miR-1469 (Log ratio : 0.95、0.73)**

Fig. 2-2-2-1 2つのマイクロアレイデータの統合解析
 ロイシン欠乏下で発現上昇したmiRNAsを左 (ベン図緑)に、ATF4過剰
 発現時に発現上昇したmiRNAsを右 (ベン図赤)に示している。抽出され
 た2つのmiRNAsの変動倍率を()内に示した (緑 : Leu(-)の3回のアレイ
 結果の平均値、赤 : ATF4 OX時のアレイ結果)。

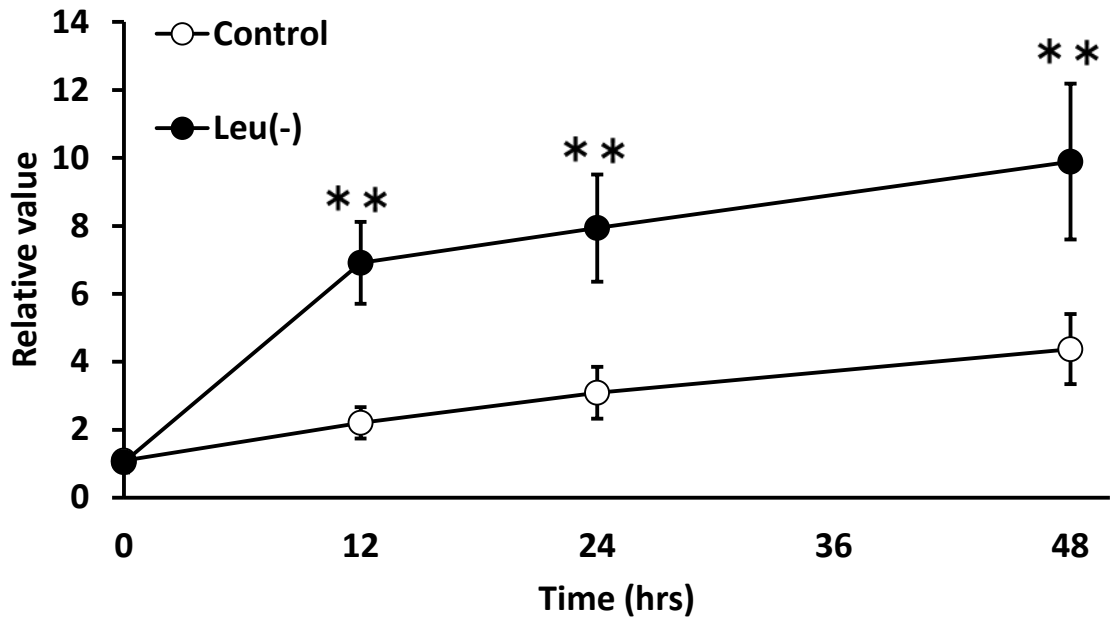
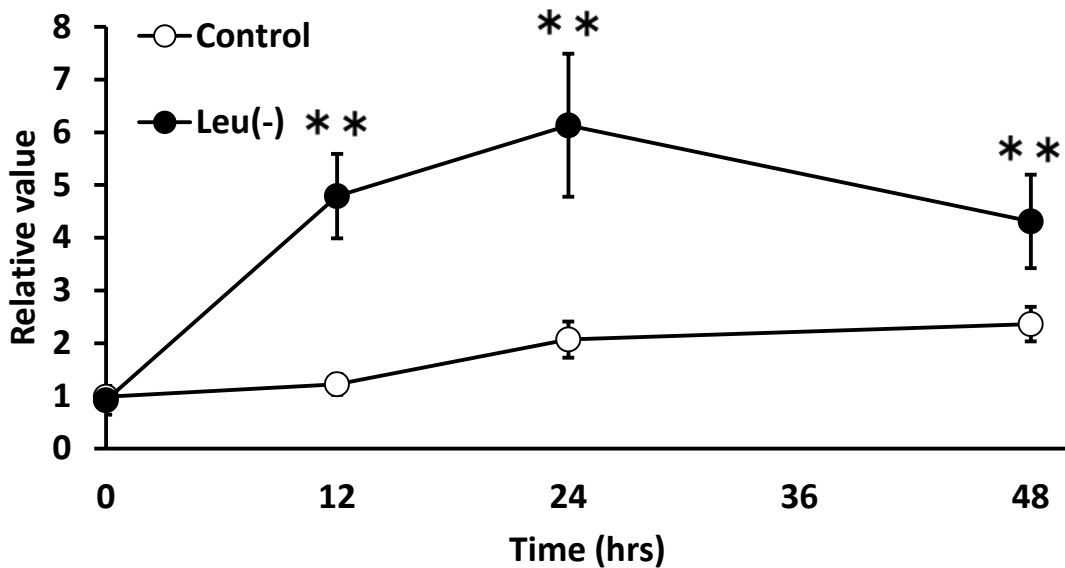
A**B**

Fig. 2-2-2-2. ロイシン欠乏下におけるhsa-miR-663aおよびhsa-miR-1469の経時変化

A : hsa-miR-663a

B : hsa-miR-1469

グラフの値は平均値±S.E.を示す。n=6, **:p<0.01(vs.Control)

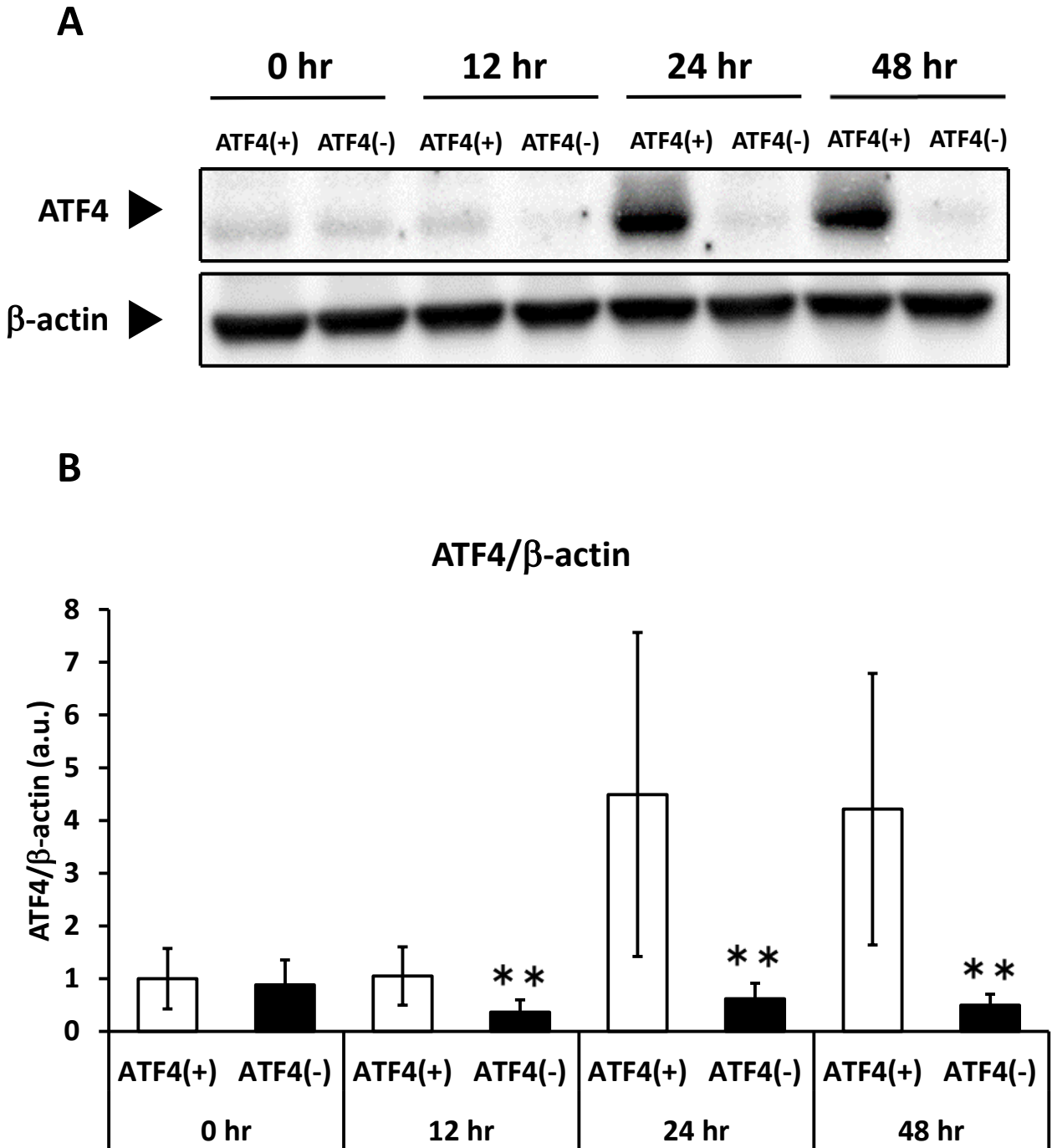


Fig. 2-2-2-3. ATF4ノックダウンHepG2細胞でのATF4タンパク量の経時変化

A: 代表的なイムノブロットの結果

B: ATF4タンパクの発現量

グラフの値は平均値 \pm S.E.を示す。n=3, **:p<0.01(vs.Control)

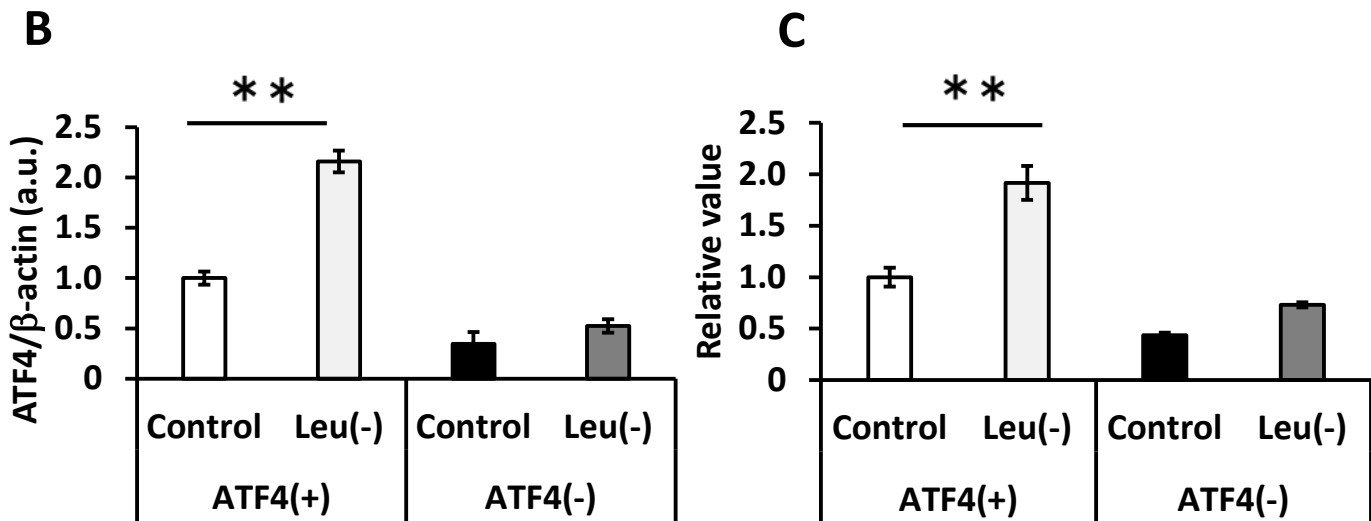
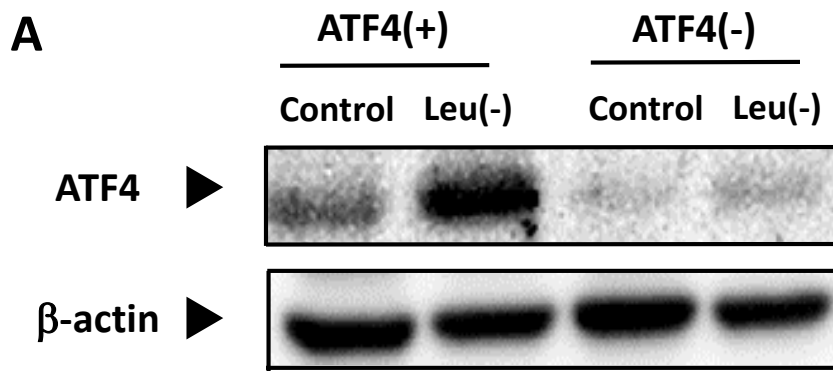


Fig. 2-2-2-4. ATF4ノックダウン、ロイシン欠乏時のHepG2細胞でのATF4の発現解析

A : 代表的なイムノブロットの結果

B : ATF4タンパクの発現量

C : ATF4 mRNAの発現量

グラフの値は平均値 \pm S.E.を示す。n=3, ** : p<0.01(vs.Control)

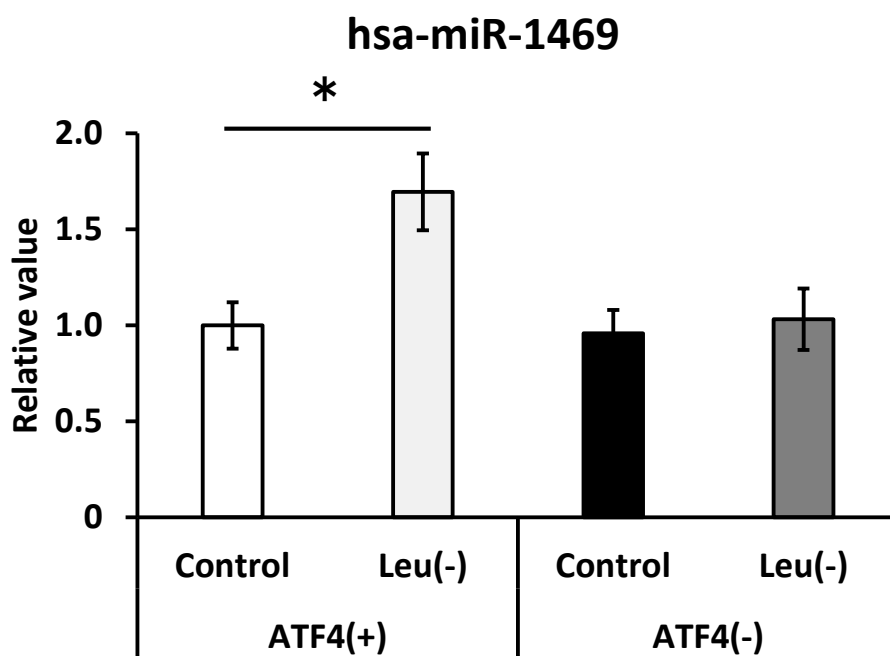
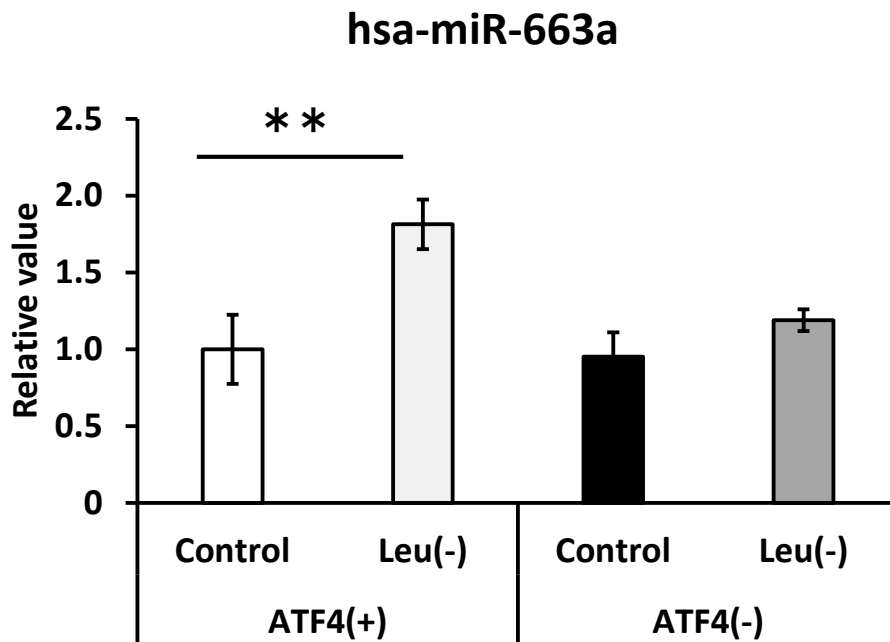


Fig. 2-2-2-5. ATF4ノックダウン、ロイシン欠乏時のHepG2細胞でのmiRNAsの発現解析
 グラフの値は平均値±S.E.を示す。n=3, *: p<0.05、*: p<0.01(vs.Control)

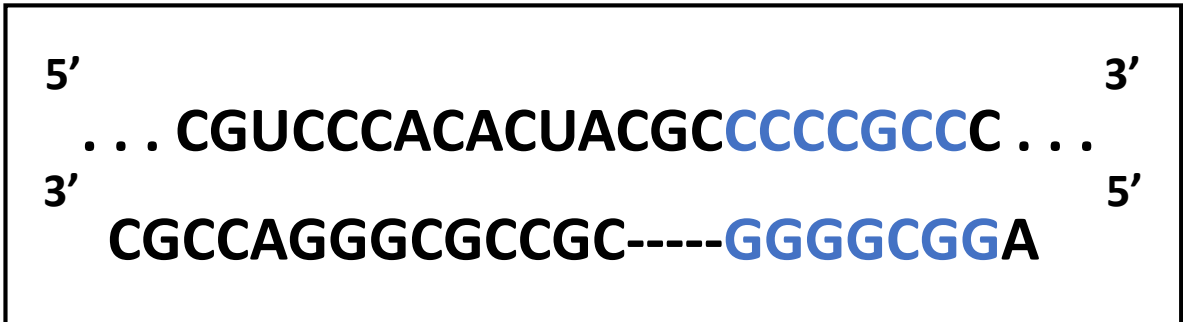
Table. 2-3-2 各miRNAsの標的遺伝子候補と標的スコア

miRNA	標的遺伝子候補	Score
hsa-miR-663a	<i>AKT1S1</i>	-0.89
	<i>FASN</i>	-0.80
	<i>SLC25A1</i>	-0.60
	<i>HRAS</i>	-0.60
	<i>GLO1</i>	-0.54
hsa-miR-1469	<i>TMSB10</i>	-0.61
	<i>E2F7</i>	-0.45
	<i>AKT1S1</i>	-0.41
	<i>NDRG1</i>	-0.35
	<i>SDF4</i>	-0.15

TargetScan上での解析における、Cumulative weighted context++ scoreの上位5位までを示した。また本論文中でその後着目した遺伝子は赤字で示した。

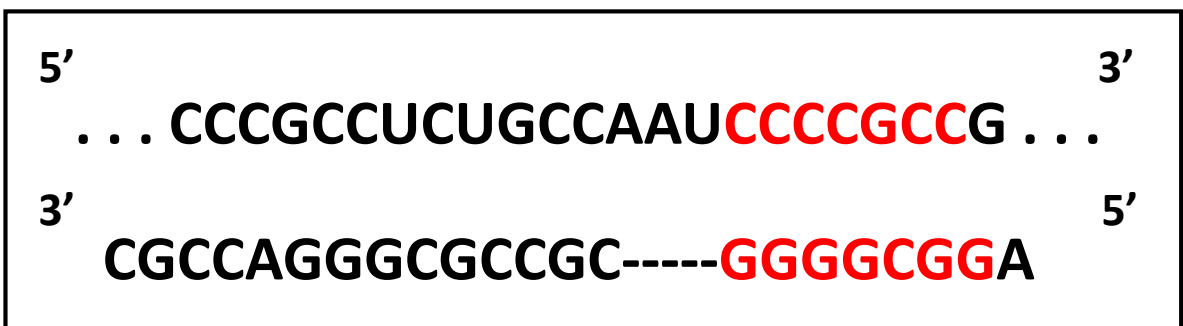
Human AKT1S1 3'UTR (length : 884 bp)

Position of 52-58 of AKT1S1 3'UTR



hsa-miR-663a

Position of 146-152 of AKT1S1 3'UTR

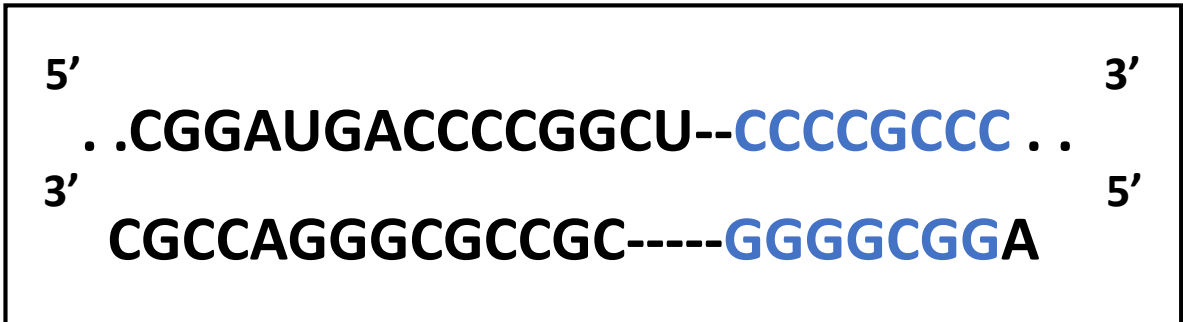


hsa-miR-663a

Fig. 2-3-2-1. hsa-miR-663aの配列とAKT1S1の結合予想部位
TargetScanHumanにより抽出した2ヶ所の結合予想部位を示した。
青または赤で示した配列が、miRNAのseed sequenceまたはその
予想結合配列である。

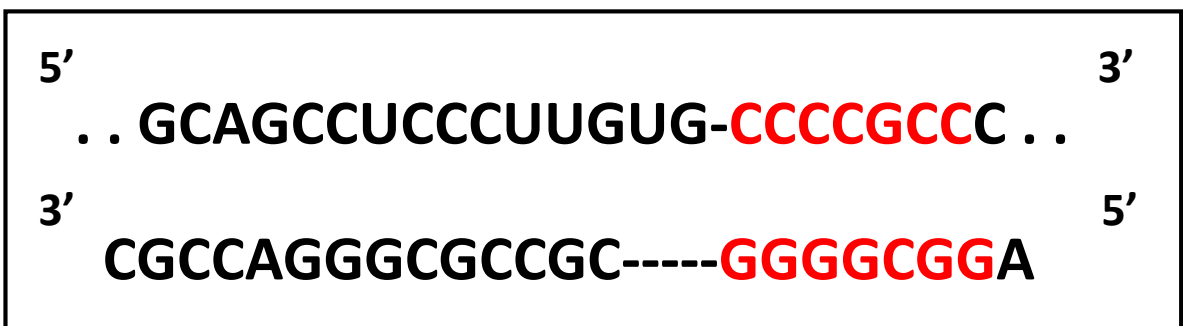
Human *HRAS* 3'UTR (length : 533 bp)

Position of 195-201 of *HRAS* 3'UTR



hsa-miR-663a

Position of 243-249 of *HRAS* 3'UTR

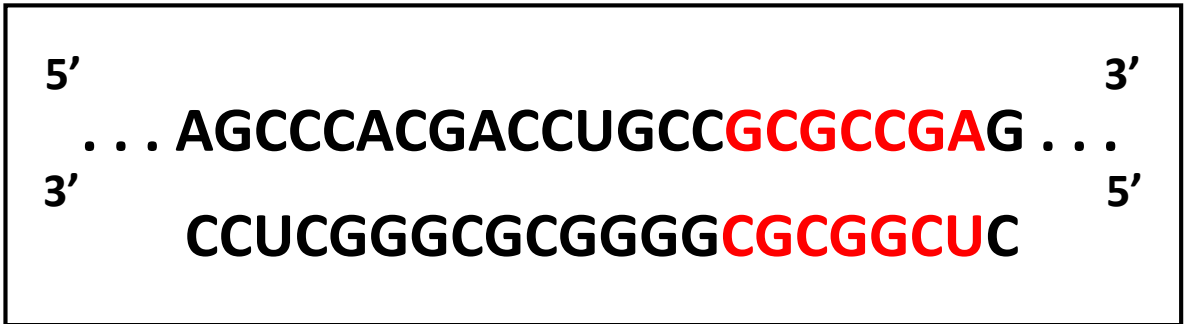


hsa-miR-663a

Fig. 2-3-2-2. hsa-miR-663aの配列と*HRAS*の結合予想部位
TargetScanHumanにより抽出した2ヶ所の結合予想部位を示した。
青または赤で示した配列が、miRNAのseed sequenceまたはその
予想結合配列である。

Human AKT1S1 3'UTR (length : 884 bp)

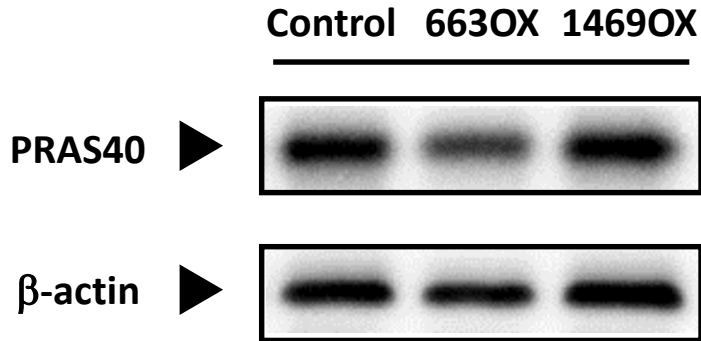
Position of 176-182 of AKT1S1 3'UTR



hsa-miR-1469

Fig. 2-3-2-3. hsa-miR-1469の配列とAKT1S1の結合予想部位
TargetScanHumanにより抽出した結合予想部位を示した。
赤で示した配列が、miRNAのseed sequenceまたはその予想結合配列
である。

A



B

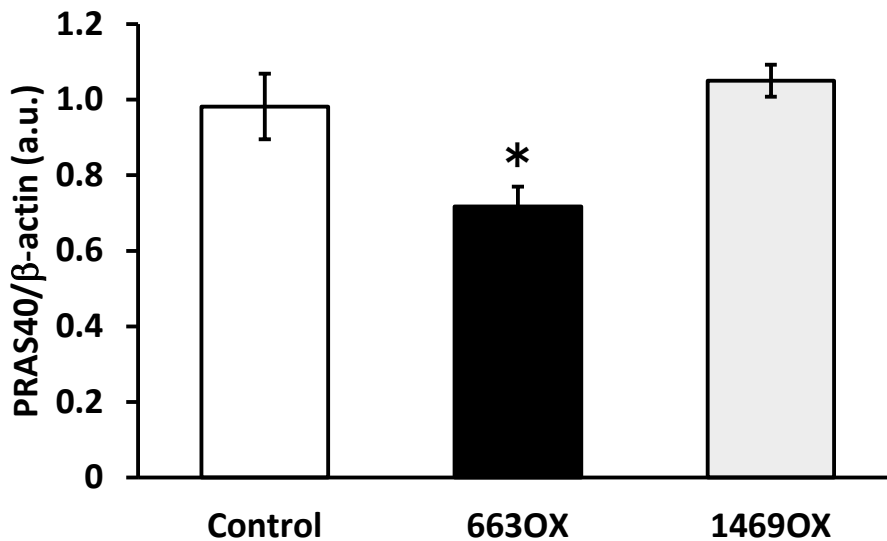


Fig. 2-3-2-4. hsa-mR-663a、hsa-miR-1469過剰発現が Δ AKT1S1 (PRAS40)に及ぼす影響

A: 代表的なイムノプロットの結果

B: PRAS40タンパク発現量

グラフの値は平均値 \pm S.E.を示す。n=3, *:p<0.05(vs.Control)

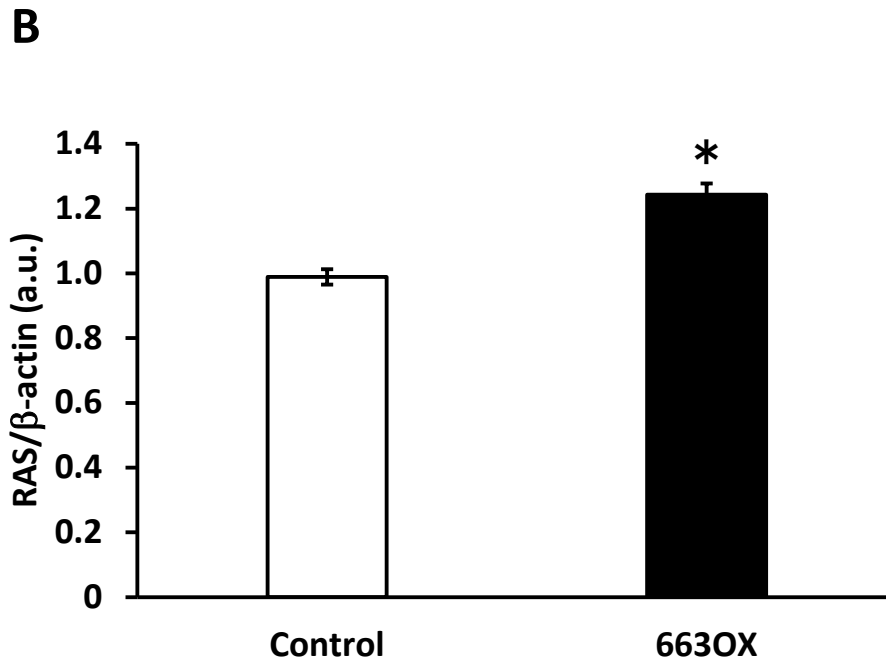
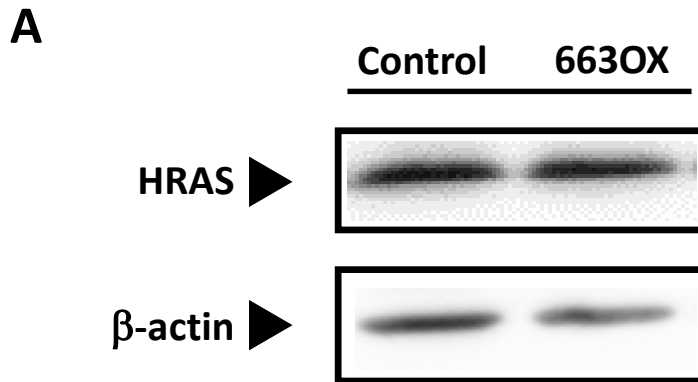


Fig. 2-3-2-5. hsa-mR-663a過剰発現がHRASに及ぼす影響

A: 代表的なイムノプロットの結果

B: HRASタンパク発現量

グラフの値は平均値 \pm S.E.を示す。n=3, *:p<0.05(vs.Control)

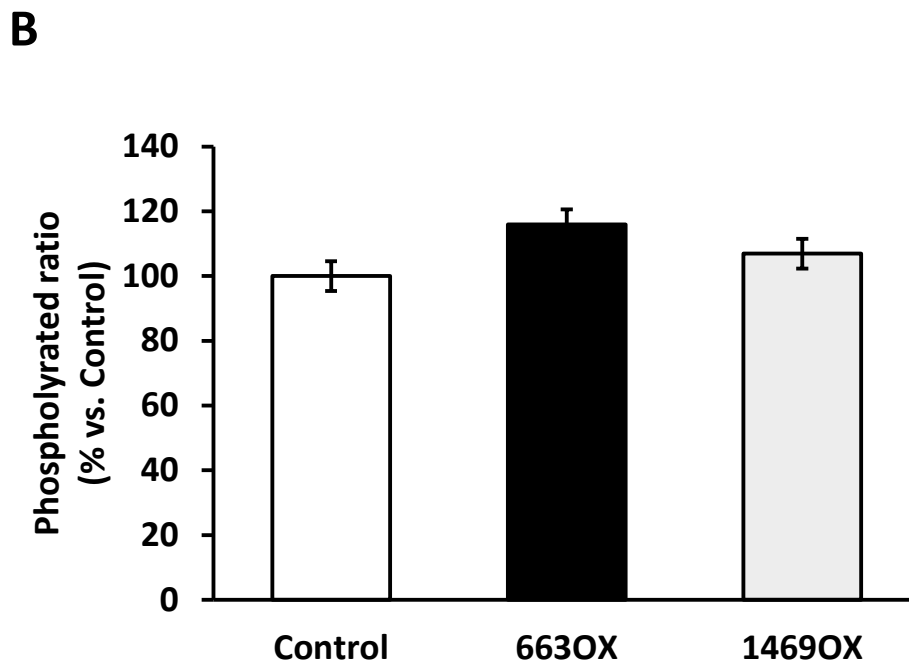
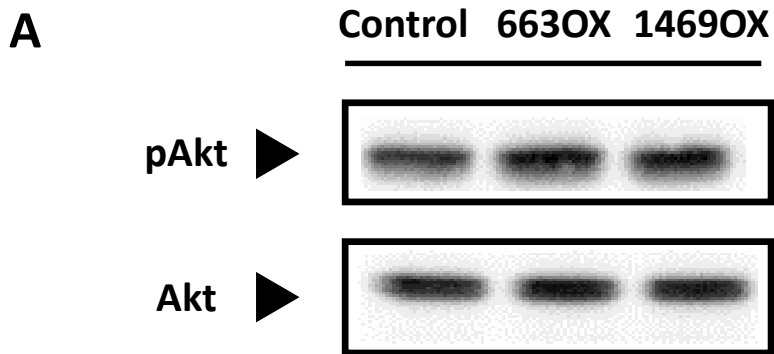


Fig. 2-3-2-6. hsa-mR-663a、hsa-miR-1469 過剰発現がAktのリン酸化に及ぼす影響

A: 代表的なイムノブロットの結果

B: Aktのリン酸化レベル

グラフの値は平均値±S.E.を示す。n=3, *:p<0.05(vs.Control)

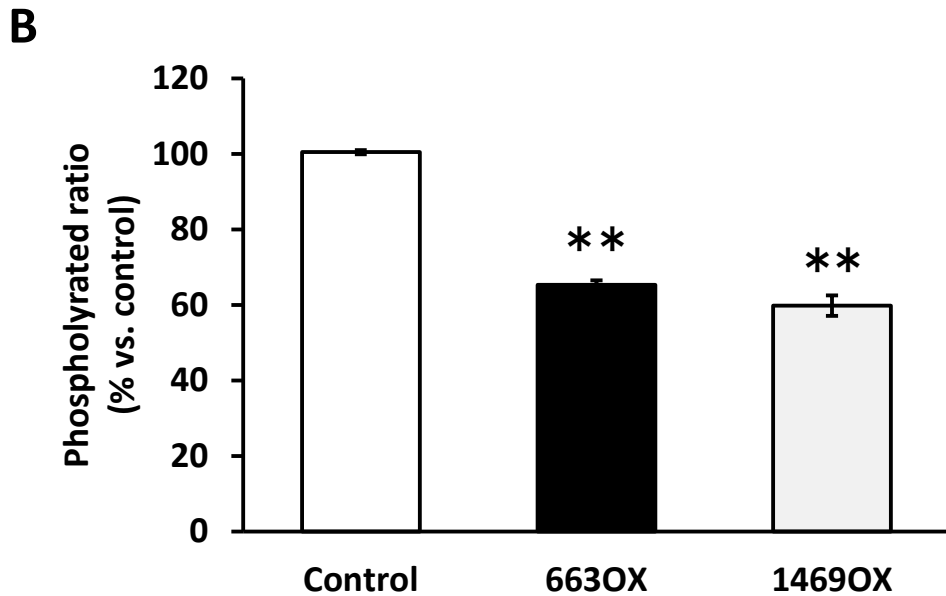
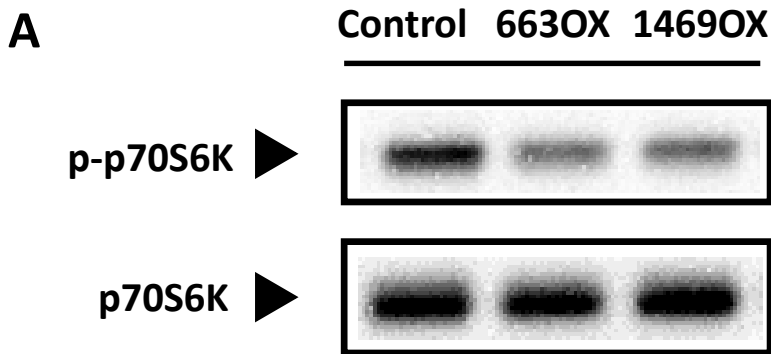


Fig. 2-3-2-7. hsa-mR-663a、hsa-miR-1469過剰発現がp70S6Kのリン酸化に及ぼす影響

A: 代表的なイムノブロットの結果

B: p70S6Kのリン酸化レベル

グラフの値は平均値±S.E.を示す。n=3, *:p<0.05(vs.Control)

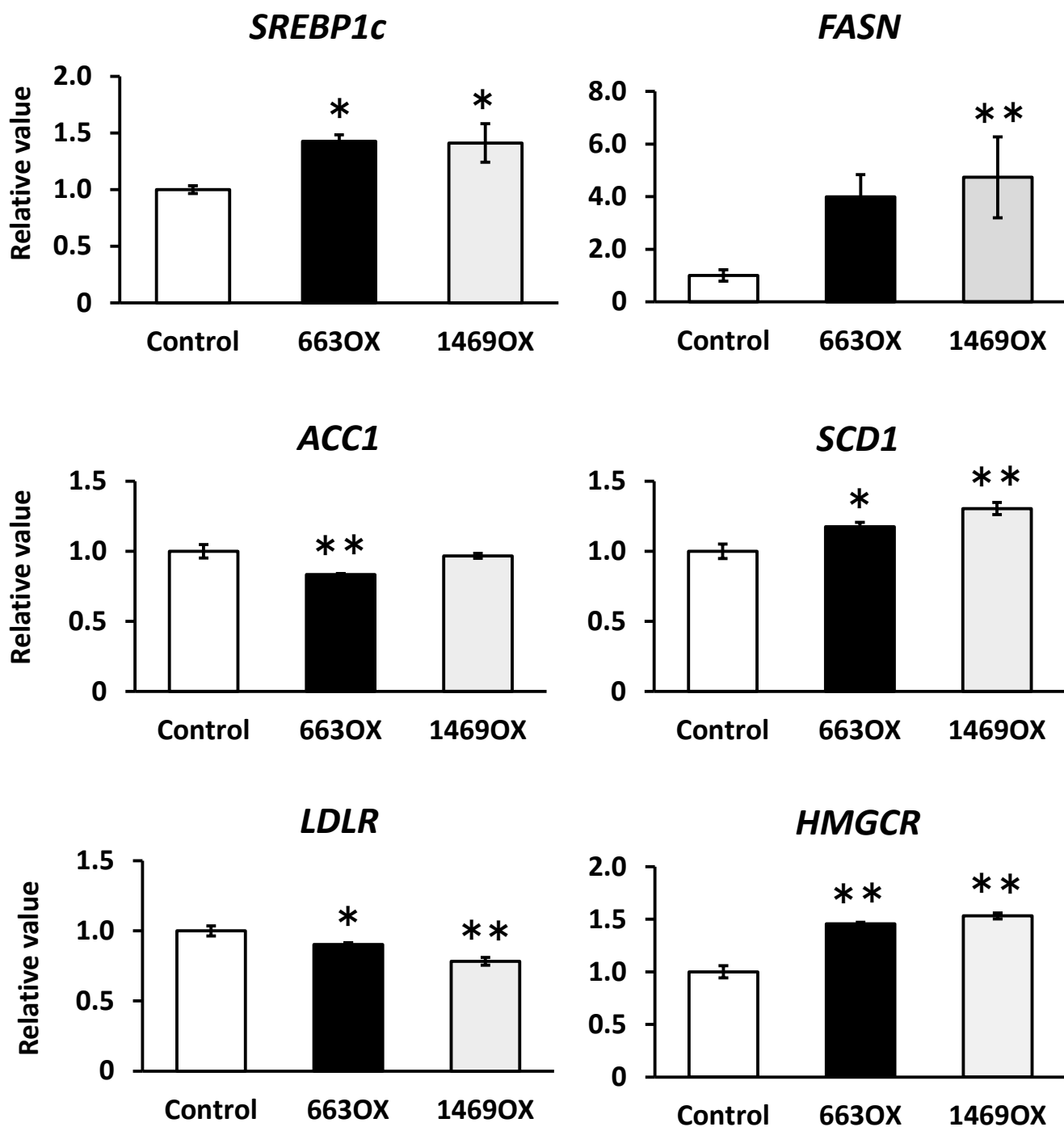


Fig. 2-3-2-8. 脂質代謝関連遺伝子発現の変化

グラフの値は平均値±S.E.を示す。n=3, ** :p<0.01, * :p<0.05(vs.Control)

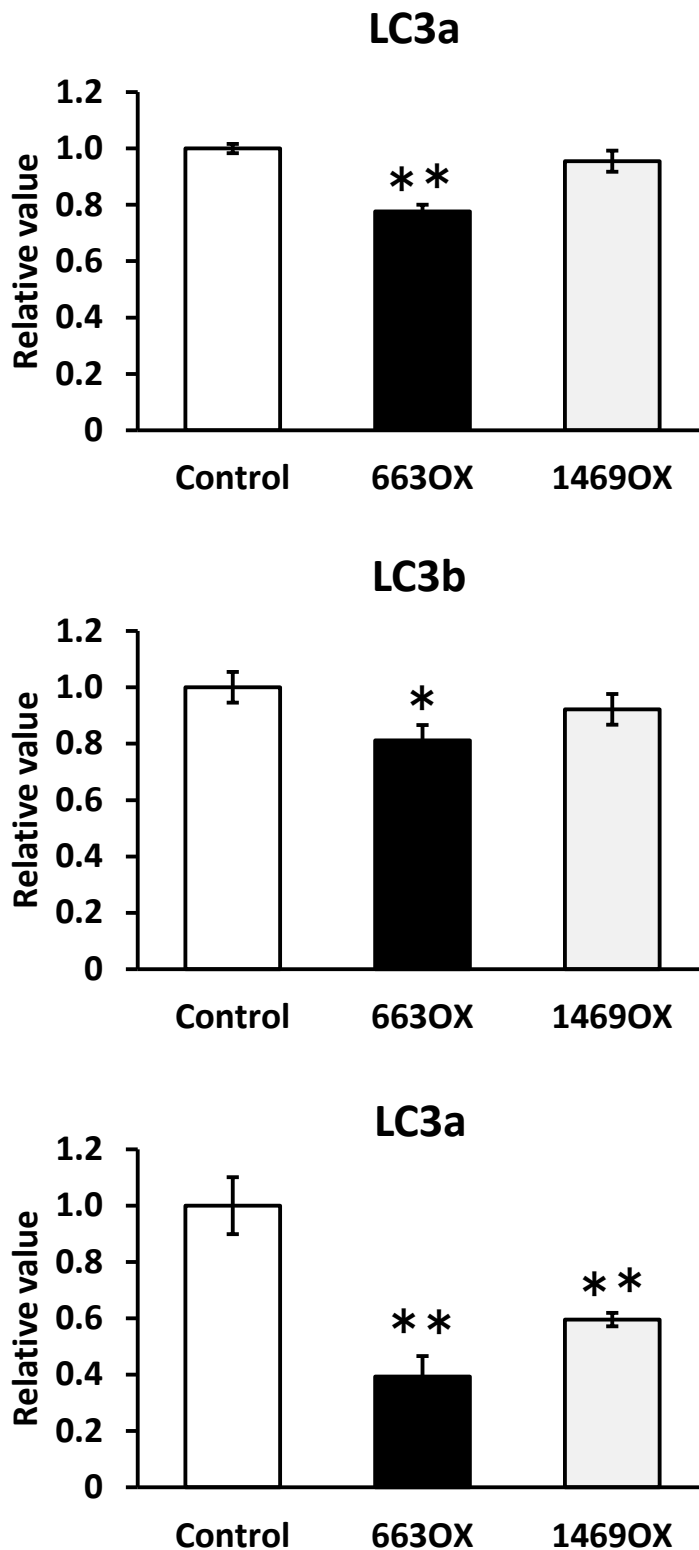


Fig. 2-3-2-9. オートファジー、アポトーシス関連遺伝子発現の変化
 グラフの値は平均値±S.E.を示す。n=3, ** :p<0.01, * :p<0.05(vs.Control)

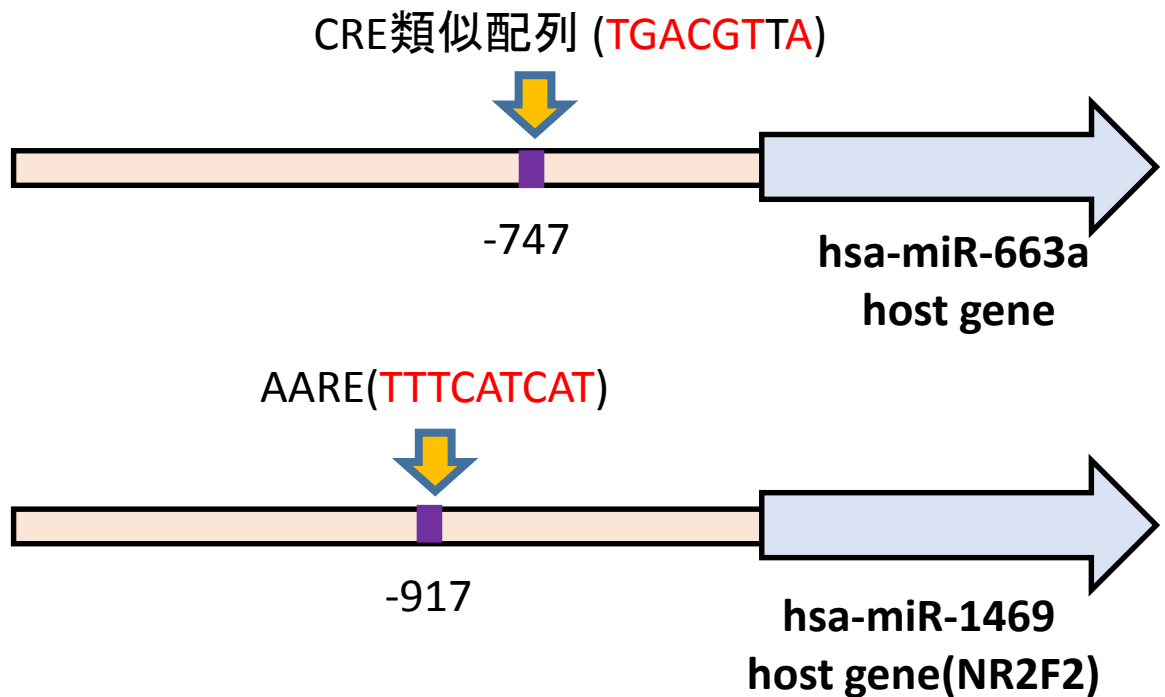


Fig. 2-4-1. hsa-miR-663aおよびhsa-miR-1469のhost遺伝子の転写開始点上流

両遺伝子上流にはATF4の結合コア配列 (AARE)、あるいはCRE類似配列が保存されている。

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

緒言

第一章、第二章ではヒト肝臓ガン細胞である **HepG2** 細胞を用いて、必須アミノ酸の欠乏に応答する **miRNAs** の探索およびその機能解析を行ってきた。培養細胞モデルは、細胞周辺の栄養状態を変化させることや遺伝子導入を簡便に行うことができる非常に強力なツールであるものの、組織間のネットワークや全身を介したフィードバックなど実際の生体で生じるイベントを反映することは出来ない。そこで本章では、実験スケールを動物モデルにまで拡張し、より実際の生体情報が反映される状況下でアミノ酸栄養状態と **miRNAs** との関係性を見出すことを目的とした。

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

3-1-1-a. 飼育条件

6 週齢の雄性 **C57BL/6J** マウス (日本チャールズリバー) を 2 週間予備飼育した。飼育期間中の食餌と水は自由摂取とし、飼育室は明期 (8:00~20:00)、暗期 (20:00~8:00) の 12 時間サイクルで管理した。予備飼育に用いた餌は後述する **Control** 群の食餌を使用した。予備飼育後、マウスを標準食 (**Control**) 群、ロイシン欠乏食 [**Leu(-)**] 群の 2 群に分け (各飼料組成は **Table. 3-1-1-1**、**3-1-1-2** に示す)、以後 7 日間飼育した。マウスは個別飼育とし、体重及び摂食量については 2 日に 1 度測定を行った。全ての動物実験は、東京大学動物実験施設規則に従って動物実験委員会の承認を得て行った。本飼育開始後 7 日目に解剖を行った。マウスにイソフロラン (**MERCK Animal Health**) で麻酔後、頸動脈より採血を行い、肝臓および骨格筋 (腓腹筋、ヒラメ筋) を摘出した。摘出した臓器は直ちに液体窒素中で凍結し、後の分析に供するまで **-80°C** で保存した。血液はヘパリン処理後、遠心分離し (**3,000×g**、**4°C**、**10 分間**)、血漿を得た。得られた血漿は分析に供するまでは **-80°C** で保存した。

3-1-1-b. 血中の生化学パラメーター解析

血漿中のグルコース、トリグリセライド、総コレステロール、インスリンの濃度の測定を行った。測定にはグルコース **CII**-テストワコー、トリグリセライド **E**-テストワコー、コレステロール **E**-テストワコー (全て和光純薬工業)、マウスインスリン測定キッ

ト (森永)を使用した。測定は添付のプロトコルに従って行った。

3-1-1-c. 肝臓中脂質の解析

肝臓中の脂質抽出は *Folch et al.*の方法 (*Floch et al., 1957*)をもとにして行った。肝臓に対して 20 倍容のホルチ液 [クロロホルム (関東化学) : メタノール (関東化学) = 2 : 1] 中でポリトロン型ホモジナイザーを用いて可溶化し、4°C で一晩静置した。翌日、ホモジナイズに用いたホルチ液の 1/5 倍容の 0.8%塩化カリウム溶液を加え激しく攪拌した後、氷上で 1 時間静置した。その後油層を注意深く分取し、減圧下で乾固した後、再びホルチ液に溶解させた。この溶解液の一部を分取し、再び減圧下で乾固した後、イソプロパノールに溶解させ、測定に供した。試料中のトリグリセライドおよび総コレステロール濃度は、トリグリセライド E-テストワコー、コレステロール E-テストワコー (ともに和光純薬工業)を用い、添付のプロトコルに従いそれぞれ測定した。

3-1-1-d. 肝臓組織からの total RNA の抽出

肝臓組織 (約 50 mg)を 1 mL TRIzol 試薬 (Invitrogen ThermoFisher Scientific)に入れ、ポリトロン型ホモジナイザー (Kinematica)でホモジナイズし、室温で 5 分間静置した。その後の抽出処理、および純度の確認は 1-1-1-b.と同様にして行った。

3-1-1-e. 定量 RT-PCR

得られた total RNA から、cDNA を合成しこれを鋳型として使用した。cDNA の合成およびその後の PCR 増幅反応は 1-1-1-c.と同様にして行った。用いたプライマーの配列は以下に示した。尚、内部標準として β -actin の mRNA 発現を補正に利用し、目的の mRNA の相対値を算出した。

プライマー

SREBP1c

F : ATCGGCGCGGAAGCTGTCGGGGTAGCGTC

R : ACTGTCTTGTTGTTGATGAGCTGGAGCAT

FASN

F : TTGTCGTCTGCCTCCAGAGC

R : GACCATGTCCACACCACCAA

ACC1

F : CAATCCGATTTGTTGTCATGGT

R : CGTAATTGTTGTTGTTGGGTCCT

SCD1

F : GCAAGCTCTACACCTGCCTCTT

R : AGCCGTGCCTTGTAAGTTCTGT

LDLR

F : GCAAGGACAAGTCAGATGAGGA

R : GGCTACCGTGAATGCAGGA

HMGCR

F : CAGTACAGTCGTCATTCATTTCTC

R : AACTTTGCTAATGCACTCGCTCT

β -actin

F : TTCGTTGCCGGTCCACA

R : CCACGATGGAGGGGAATACA

3-1-1-f. 統計解析

結果は平均値±標準誤差で示した。統計解析はスチューデントの *t*-test を用いて有意性の検定を行った。

3-1-2. 結果

3-1-2-a. 体重及び摂食量

飼育期間中の体重は、ロイシン欠乏食給餌群 [Leu(-)群] では、飼育日数を重ねるに連れて Control 群と比べて著しく減少し、飼育最終日には Control 群の約 0.82 倍となった (Fig. 3-1-2-1A)。また飼育期間中の総摂食量には、両群で有意な差は認められなかった (Fig. 3-1-2-1B)。

3-1-2-b. 臓器重量

解剖時の臓器重量を Fig. 3-1-2-2. に示した。肝臓重量は Control 群と比較してロイシン欠乏食給餌群 [Leu(-)群] で有意に低値を示し、Control 群の約 0.79 倍となった (Fig. 3-1-2-2A)。また骨格筋重量に関しても、腓腹筋、ヒラメ筋共に有意に低値を示し、共に Control 群の約 0.88 倍となった (Fig. 3-1-2-2B、C)。

3-1-2-c. 各種血液パラメーター

i 血糖値および血漿中インスリン濃度

血糖値は Control 群と比較してロイシン欠乏食給餌群 [Leu(-)群] で有意に低値を示し Control 群の約 0.85 倍となった (Fig. 3-1-2-3A)、一方血漿中インスリン濃度は両群で有意な差は認められなかった (Fig. 3-1-2-3B)。

ii 血中トリグリセライド、総コレステロール濃度

血中トリグリセライド、総コレステロール濃度は Control 群と比較してロイシン欠乏食給餌群 [Leu(-)群] で有意に低値を示しそれぞれ Control 群の約 0.77 倍、0.87 倍となった (Fig. 3-1-2-4A、B)。

3-1-2-d. 肝臓中脂質量

肝臓中トリグリセライド量、総コレステロール量ともに両群間で有意な差は認められなかった (Fig. 3-1-2-5A、B)。

3-1-2-e. 肝臓中脂質代謝関連遺伝子の mRNA 発現

SREBP1c、*HMGCR*、*LDLR* は Control 群と比較してロイシン欠乏食給餌群 [Leu(-)群] において有意な増加が認められ、それぞれ Control の約 1.33 倍、2.33 倍、1.75 倍であった。他方 *SCD1* はロイシン欠乏食給餌群 [Leu(-)群] において顕著な減少が認められ、Control の約 0.39 倍となった。*FASN* および *ACCI* の発現量には有意な差は認められなかった (Fig. 3-1-2-6A-F)。

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

3-2-1-a. マイクロアレイ解析

本章 3-1-1-d. で抽出した total RNA を使用した。各群、終量が 1 μ g となるように total RNA をプールした。以後の miRNAs に対するビオチンラベル化処理からマイクロアレイチップへのハイブリダイズ、データの読み取りおよび解析に関しては 1-1-1-d. と同様に行った。ただし、本試験ではマイクロアレイチップとして GeneChip[®] miRNA 4.0 Array (Affymetrix) を使用した。まず得られたデータセットのうち、ロイシン欠乏食給餌群 [Leu(-)群] での Signal 値が 20 以上であったもののうち、変動倍率が log ratio で 1.0 以上であったものを抽出した。さらにこうした miRNAs のうち、マウス及びヒトでも保存されているものを抽出した。

3-2-1-b. mmu-miR-182-5p、mmu-miR-193a-3p、mmu-miR-193b-3p の発現解析

定量 PCR を利用して解析を行った。3-1-1-d. で抽出した total RNA を使用して cDNA を合成し、定量 PCR に供した。cDNA の合成及びその後の PCR 反応に関しては、1-1-1-e. と同様に行った。PCR に使用したプライマーを以下に示す。

使用したプライマー

Mm_miR-182_2 miScript Primer Assay (MS00011291、QIAGEN)

Mm_miR-193_1 miScript Primer Assay (MS00001785、QIAGEN)

Mm_miR-193b_1 miScript Primer Assay (MS00011368、QIAGEN)

Mm_miR-335_1 miScript Primer Assay (MS00002142、QIAGEN)

Hs_RNU6-2_11 miScript Primer Assay (MS00033740、QIAGEN)

3-2-1-c. マウス肝臓からのタンパク質抽出

肝臓組織を約 50 mg 秤り取り、1000 μ L の RIPA buffer (組成は後述)に入れ、ポリトロン型ホモジナイザー (Kinematica) でホモジナイズした。1 時間ローテーターで攪拌した後、遠心分離 (14,000 \times g、4 $^{\circ}$ C、30 分間)し、上清をタンパク質抽出液とした。抽出液のタンパク質濃度は BSA を基準とした Bradford 法によって測定した。得られた抽出液は測定に供するまでは -80 $^{\circ}$ C で保存した。

RIPA buffer 組成

50 mM Tris pH 7.6

150 mM NaCl

1 mM EDTA

1% TritonX-100

1% Sodium Deoxycholate

0.1% SDS

3-2-1-d. iTRAQ 法によるプロテオーム解析

1-2-1-d.と同様にして行った。

3-2-1-e. TargetScan を利用した miRNA 標的遺伝子候補の探索

mmu-miR-182-5p、mmu-miR-193a、mmu-miR-193b の標的遺伝子候補の探索には TargetScanHuman (Release 7.0, http://www.targetscan.org/vert_70/)を使用した。得られたプロテオームデータのうち、変動倍率が $\text{Log ratio} < -0.1$ であったものの中で各 miRNAs の標的部位を有するものを探索した。

3-2-1-f. 統計解析

結果は平均値±標準誤差で示した。統計解析はスチューデントの t -test を用いて有意性の検定を行った。

3-2-2. 結果

3-2-2-a. マイクロアレイ解析

今回同定された 3165 種のマウス miRNAs のうち、1300 種の miRNAs が発現上昇、1504 種の miRNAs が発現減少した。また発現上昇した 1300 種の miRNAs のうち、ロイシン欠乏食給餌群 [Leu(-)群] で Signal 値が 20 以上、かつ変動倍率が Log ratio で 1.0 以上であった miRNAs は、15 個であった。この 15 個の miRNAs のうち、マウスとヒトの両方で保存されていたのは、mmu-miR-335-5p、mmu-miR-193b-3p、mmu-miR-182-5p、mmu-miR-193b-3p の 4 種であった (Table. 3-2-2.)。

3-2-2-b. 定量 PCR による各 miRNAs の発現確認

定量 PCR でこれら 4 種の miRNAs の発現を確認したところ、mmu-miR-182-5p、mmu-miR-193a-3p、mmu-miR-193b-3p の発現は有意な上昇を示し、それぞれ 2.15 倍、2.07 倍、2.40 倍であった。mmu-miR-335-5p については有意な上昇は認められず、マイクロアレイ解析の再現性を得ることは出来なかった (Fig. 3-2-2-1)。

3-2-2-c. iTRAQ 法によるプロテオーム解析

プロテオミクスの結果、2477 種のタンパク質が同定され、そのうち 1734 種のタンパク質の定量に成功した。このうち発現の減少が認められたものは 823 種であった (Fig. 3-2-2-2)。

3-2-2-d. TargetScan を利用した miRNAs 標的遺伝子候補の探索

TargetScan 上で mmu-miR-182-5p および mmu-miR-193a-3p、mmu-miR-193b-3p の標的遺伝子候補を探索したところ、それぞれ 97 種、62 種の遺伝子が見出された。得られた結果を TargetScan 上で標的候補の確からしさの指標の 1 つとして利用されている Cumulative weighted context++ score を参考にして順位付けし、上位 5 種の遺伝子を抽出したところ、mmu-miR-182-5p については *RAC1*、*MSN*、*CD2AP*、*NUS1*、*CORO1C* が、mmu-miR-193a-3p、mmu-miR-193b-3p^{*}については *AP2M1*、*RPS21*、*SPRYD4*、*HYOU1*、*YWHAZ* が抽出された (Table. 3-2-2-2.)。なお、その後着目した *RAC1*、*CD2AP*、*YWHAZ* について、各 miRNAs の標的部位の位置や配列を Fig. 3-2-2-3~5. に示した。

※ mmu-miR-193a-3p と mmu-miR-193b-3p は同一の seed sequence を有するファミリーを形成しており、従って標的候補となる遺伝子も同一とされているため、Table. 3-2-2-2. では mmu-miR-193a、b とまとめて表記する事にした。

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

3-3-1-a. 細胞培養

マウス肝臓 AML12 細胞 (alpha mouse liver 12、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 佐藤隆一郎教授より御供与頂いたもの) を 10%FBS (ニチレイバイオサイエンス)、1% 100 U/ml penicillin streptomycin (Sigma Aldrich)、40 ng/mL DEX、1% ITS (insulin、transferrin、selenium、41400-045、Gibco)を含む DMEM-F12 培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium and Ham's F12 medium、D8437、Sigma Aldrich) で培養した。培養中は 2 日に一度培地交換を行い、80-90%コンフルエントになったところで継代を行った。継代は細胞プレートに対して PBS で一度洗浄を施し、Trypsin-EDTA 溶液 (Sigma Aldrich)を加えて 3 分間処理することで細胞を剥離させることで行った。以後全ての培養は 37°C、5% CO₂ の条件下で行った。

3-3-1-b. miRNAs のトランスフェクション

6 well-plate または 12 well-plate に対してアッセイ開始時 40~50% confluent になるように AML12 細胞を播種した。mmu-miR-182-5p、mmu-miR-193a、mmu-miR-193b の過剰発現条件およびその後の培養条件に関しては、1-2-1-d.と同様に行った。トランスフェクション時に使用した試薬は以下に示す。

Syn_mmu-miR-182-5p (MSY0000211、QIAGEN)

Syn_mmu-miR-193a-3p (MSY0000223、QIAGEN)

Syn_mmu-miR-193b (MSY0004859、QIAGEN)

AllStars Negative Control siRNA (SI03650318、QIAGEN)

3-3-1-c. 細胞からの total RNA の回収

1-1-1-b.と同様に行った。

3-3-1-d. 細胞からのタンパク質の回収

1-2-1-c.と同様に行った。

3-3-1-e. イムノブロッティング

2-2-1-h.と同様にして行った。使用した抗体を以下に示す。

使用した抗体

#5478 CD2AP (A599) Antibody

希釈倍率 1 : 1000

#2465 Rac1/2/3 Antibody

希釈倍率 1 : 1000

#5521 14-3-3 ζ (D23B7) Rabbit mAb

希釈倍率 1 : 500

#9205 Phospho-p70 S6 Kinase (Thr389) Antibody

希釈倍率 1 : 1000

#2708 p70 S6 Kinase (49D7) Rabbit mAb

希釈倍率 1 : 500

#3787 Phospho-Akt (Ser473) (736E11) Rabbit mAb

希釈倍率 1 : 1000

#2938 Akt1 (C73H10) Rabbit mAb

希釈倍率 1 : 500

#4376 Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (20G11) Rabbit mAb

希釈倍率 1 : 1000

#4696 p44/42 MAPK (Erk1/2) (L34F12) Mouse mAb

希釈倍率 1 : 500

#3700 β-Actin (8H10D10) Mouse mAb

希釈倍率 1 : 1000

(全て Cell Signaling Technology)

3-3-1-f. 定量 PCR

得られた total RNA から、cDNA を合成しこれを鋳型として使用した。cDNA の合成およびその後の PCR 増幅反応は 1-1-1-c.と同様にして行った。用いたプライマーの配列、は以下に示した。尚、内部標準として β -actin の mRNA 発現を補正に利用し、目的の mRNA の相対値を算出した。

使用したプライマー

SREBP1c

F : ATCGGCGCGGAAGCTGTCGGGGTAGCGTC

R : ACTGTCTTGGTTGTTGATGAGCTGGAGCAT

FASN

F : TTGTCGTCTGCCTCCAGAGC

R : GACCATGTCCACACCACCAA

ACC1

F : CAATCCGATTTGTTGTCATGGT

R : CGTAATTGTTGTTGTTGGGTCCT

SCD1

F : GCAAGCTCTACACCTGCCTCTT

R : AGCCGTGCCTTGTAAGTTCTGT

LDLR

F : GCAAGGACAAGTCAGATGAGGA

R : GGCTACCGTGAATGCAGGA

HMGCR

F : CAGTACAGTCGTCATTCATTTCTC

R : AACTTTGCTAATGCACTCGCTCT

β -actin

F : TTCGTTGCCGGTCCACA

R : CCACGATGGAGGGGAATACA

LC3a

F : CGCTACAAGGGTGAGAAGCA

R : TGGTTGACCAGCAGGAAGAA

LC3b

F : CCAAGTTCCTGGTGCCTGA

R : ACTTCGGAGATGGGAGTGGA

BCL2

F : GAGAGCGTCAACAGGGAGATG

R : GGGCCATATAGTTCCACAAAGG

3-3-1-g. 統計解析

結果は平均値±標準誤差で示した。統計解析は2群比較の場合はスチューデントの *t* test を、3群以上の比較の場合は Dunnett の方法を用いて有意性の検定を行った。

3-3-2. 結果

3-3-2-a. miRNA トランスフェクションによる標的遺伝子候補タンパク質の発現変化

トランスフェクション開始 48 時間後の AML12 細胞中の *Rac1*、*CD2AP*、*YWHAZ* のタンパク発現をイムノブロットで確認したところ、*mmu-miR-182-5p* の過剰発現によって *Rac1* のタンパク発現量には変化は認められなかったが、*CD2AP* のタンパク発現量は有意な減少を示し、0.64 倍となった (Fig. 3-3-2-1、2)。また *mmu-miR-193a-3p* および *mmu-miR-193b-3p* の過剰発現によって *YWHAZ* のタンパク発現量は有意な減少を示し、それぞれ 0.50 倍、0.43 倍となった (Fig. 3-3-2-3)。

3-3-2-b. miRNA トランスフェクションが Akt、p70S6K および Erk1/2 のリン酸化に及ぼす影響

トランスフェクション開始 48 時間後の AML12 細胞中の Akt、p70S6K および Erk1/2 のリン酸化タンパク発現を定量し、リン酸化レベルを測定した。その結果 *mmu-miR-182-5p* および *mmu-miR-193a-3p*、*mmu-miR-193b-3p* の過剰発現によって Akt のリン酸化レベルには変化は無かったが、p70S6K のリン酸化レベルは有意に減少し、それぞれ 0.63 倍、0.60 倍、0.43 倍となった (Fig. 3-3-2-4、5)。一方、Erk1/2 のリン酸化レベルは miRNA 過剰発現による影響を受けなかった (Fig. 3-3-2-6)。

3-3-2-c. miRNA トランスフェクションが脂質代謝関連遺伝子の発現に及ぼす影響

トランスフェクション開始 48 時間後の AML12 細胞中の脂質代謝関連遺伝子の mRNA 発現を測定したところ、*SREBP1c*、*FASN*、*SCD1*、*HMGCR* は全ての miRNA のトランスフェクションによって有意な発現減少を示し、それぞれ *mmu-miR-182-5p* で 0.83、0.81、0.66、0.82 倍、*mmu-miR-193a-3p* で 0.77、0.76、0.69、0.51 倍、*mmu-miR-193b-3p* で 0.60、0.50、0.63、0.30 倍となった。一方 *FASN* の発現は *mmu-miR-193a* および *mmu-miR-193b* の過剰発現によって有意な発現減少を示し、それぞれ 0.66、0.41 倍となった。また、*SCD1* は *mmu-miR-182-5p* のトランスフェクションでのみ有意な発現上昇を示し、1.96 倍となった (Fig. 3-3-2-7)。

3-3-2-d. miRNA トランスフェクションがオートファジーおよびアポトーシス関連遺伝子の発現に及ぼす影響

トランスフェクション開始 48 時間後の AML12 細胞中のオートファジーおよびアポトーシス関連遺伝子の mRNA 発現を測定したところ、*LC3a* はすべての miRNA のトランスフェクションによっても有意な発現減少を示し、*mmu-miR-182-5p* で 0.79 倍、*mmu-miR-193a-3p* で 0.67 倍、*mmu-miR-193b-3p* で 0.56 倍を示した。他方、*BCL2*

の発現は mmu-miR-182-5p のトランスフェクションのみによって有意な発現減少を示し、0.49 倍となった。LC3b の発現は miRNA トランスフェクションの影響を受けなかった (Fig. 3-3-2-8.)。

第四節

考察

本章では必須アミノ酸の 1 つであるロイシンを欠乏した食餌を 1 週間給餌した C57/BL6J マウスの肝臓において発現変動する miRNAs を網羅的に探索し、mmu-miR-182-5p および mmu-miR-193a-3p、mmu-miR-193b-3p を見出した。さらに肝臓プロテオームデータとの比較により標的遺伝子候補の探索を行い、マウス肝臓細胞 AML12 を利用した機能解析を試みた。

動物実験で得られた表現型、肝臓での遺伝子発現に関して

必須アミノ酸を欠乏させたラットやマウスでは、摂食量の低下や窒素源の不足によるタンパク質分解を介した大幅な体重減少が観察されることは古くから知られている。また摂取エネルギー不足によって、全身の脂質の分解、さらに全身のタンパク質（主に骨格筋や肝臓）の分解が引き起こされ、生じた遊離アミノ酸がエネルギー合成に利用されている状態になるとされている (Beverly et al., 1990; Kamata et al., 2014)。

本章で行った動物試験でも、体重の低下や骨格筋、肝臓の重量低下が認められた。また血中パラメーターに関しても、血糖値、TG、TC 濃度の低下が認められ、タンパク源不足や摂取エネルギー不足の影響があったとみられる。一方で肝臓中脂質量 (TG、TC) には変化は無く、また肝臓中脂質合成関連遺伝子の発現については *SREBP1c*、*LDLR*、*HMGCR* といったコレステロール生合成関連遺伝子の発現増加が認められ、*FASN* や *ACCI* などの脂肪酸合成関連遺伝子には変化は認められなかった。

Guo らは、ロイシン欠乏食給餌により肝臓での脂質生合成が低下することを報告しており、これには肝臓中 *SREBP1c* タンパク量の低下とそれに伴う脂質合成関連遺伝子群の発現減少が関与しているとしている。またその結果として、血中 TG 濃度の低下が生じていると論じている (TC には変化なし)。また、この時血糖値に変化は認められなかったとしている (Guo and Cavener, 2007)。

マウスの週齢や飼育期間などについては同様の試験系で飼育を行ったにも関わらず、得られた結果には相違が認められているが、他にも Xiao らは同様の飼育を行い、血糖値の低下を確認している (Xiao et al., 2011) ことや、Kamata らも血中 TG、TC 濃度の低下を確認しており (Kamata et al., 2014)、今回得た結果と同様の傾向を示している実験報告もある。

本章の動物試験は、飼育環境等なんらかの違いにより Guo らと比較して、栄養制限による影響がより強く反映されたものだと考えている。Guo らの報告では肝臓重量および血糖値の低下が認められていないこともこの考えを支持している。今回飼育したマウス体内では、骨格筋などの分解によって生じた遊離アミノ酸が肝臓で糖新生あるいは

コレステロール生合成に利用されていたと考えている。より確かな議論をするために、今後より短い日数での飼育を施し、結果を先行研究と比較するなど、さらなる検討が必要であるが、全身のタンパク質代謝、エネルギー代謝に大きな変動がもたらされていることは確認できた。

肝臓で発現上昇した miRNAs とその標的遺伝子の探索結果に関して

本章の実験で肝臓での発現上昇が認められた *mmu-miR-182-5p* および *miR-mmu-miR-193a-3p*、*mmu-miR-193b-3p* の標的候補を、TargetScanHuman を利用して探索した。第二章と同様に本章でも Cumulative weighted context++ score の上位 5 つまでを抽出し、その中で mTORC1 をはじめとした細胞増殖に関わりのある因子に着目してその後の機能解析を行った。

標的候補遺伝子タンパク量への *mmu-miR-182-5p* 過剰発現の影響

今回標的候補とした *RAC1* および *CD2AP* のうち、48 時間後の miRNAs 過剰発現によってタンパク量の有意な減少が認められたのは *CD2AP* のみであった。両者の 3'UTR を比較すると、*RAC1* の 3'UTR には *mmu-miR-182-5p* の標的部位は 1 つあり、その seed sequence の相同性は 8mer であり、他方 *CD2AP* の 3'UTR には標的部位は 3 か所ありそれぞれ seed sequence の相同性は 7mer-8m、8mer、7mer-A1 であった。また 3'末端から標的位置までの距離に関しては、*RAC1* の 1 か所は 308-315、*CD2AP* の 3ヶ所は 7mer-8m、8mer の順に 174-180、2275-2282 であった。標的部位の数、また 3'末端からの距離などを総合して、*CD2AP* が miRNAs の作用を受けやすい状態にあったことが、今回の結果に影響していたものと考えられる。

標的候補遺伝子タンパク量への *mmu-miR-193a-3p*、*mmu-miR-193b-3p* 過剰発現の影響

今回標的候補とした *YWHAZ* のタンパク発現量は、48 時間の miRNA 過剰発現によって、どちらの miRNA においても有意な減少を示した。両 miRNAs の有する seed sequence や *YWHAZ* 3'UTR 内の標的部位は同一であるものの、*mmu-miR-193b-3p* の過剰発現の方がより影響が強いことが、本章で得られた種々の結果から示唆されている。これには AML12 細胞における内在性 miRNAs の発現量の違いが起因していると考えられている。定量 PCR による発現量測定時には、*mmu-miR-193a-3p* が *mmu-miR-193b-3p* と比較して Ct 値が 1~2 程度小さく発現が高い傾向にあった (Data not shown)。従って今回の miRNA 導入時の影響が *mmu-miR-193b-3p* の方がより強く影響したものと考えられる。

miRNAs 過剰発現による細胞増殖関連因子の活性の変化に関して

今回周辺因子として Akt および p70S6K、さらに Erk1/2 の活性を評価した。Akt/p70S6K に関しては第二章で述べた通りであるが、今回は PI3K/Akt 経路に並ぶ主要な細胞増殖シグナル経路の分子である Erk1/2 も評価対象にした。今回 48 時間の miRNAs の過剰発現によって、Akt、Erk1/2 のリン酸化レベルに変化は認められなかったものの、p70S6K のリン酸化レベルは大幅な減少が認められた。

CD2AP はその全身ノックアウトマウスはネフローゼ症候群および腎不全を発症することから、糸球体足細胞を利用した研究が盛んに行われている (Shih et al., 1999)。CD2AP は 3 つの SH3 ドメインを有するアダプタータンパク質であり、この SH3 ドメインを介して様々なタンパク質と結合し、その局在化やシグナル伝達の足場として働くことが知られている (Panni et al., 2015; van Duijn et al., 2010)。また近年では PI3K の p85 に結合し、PI3K の細胞膜移行を誘導する事で、PI3K/Akt 経路の活性化を引き起こし、アポトーシスの阻害に働いていることも報告されているほか、こうしたアポトーシスの阻害に、Ras-Erk1/2 シグナル経路の活性化が関与している可能性も示唆されている (Ren and You Yu, 2015; Yu and Li, 2013)。今回 mmu-miR-182-5p の過剰発現によりこの CD2AP の発現減少が認められたことから、PI3K/Akt シグナルや Erk1/2 シグナルの活性低下を予想したが、Akt のリン酸化状態に変化は認められず、また Erk シグナルについても活性の変化は認められなかった。本章で得た結果を説明するためには、CD2AP を介して制御される他の経路が存在し、直接的に p70S6K のリン酸化を制御している可能性や、今回着目しなかったタンパク質をコードする遺伝子を mmu-miR-182-5p が標的として発現抑制した可能性などを今後検討していく必要がある。

一方 YWHAZ は別名 14-3-3 ζとも呼ばれ、14-3-3 ファミリー (β、γ、ε、δ、ζ、τ、η) の 1 種である (Aitken, 1995, 2006)。14-3-3 ファミリーは標的とするタンパク質のセリン/スレオニンモチーフに結合し、その局在や活性を調節する因子とされており、生体内の様々な機能調節に関わっている (Benzinger et al., 2005; Jin et al., 2004)。今回着目した ζ アイソフォームは、その過剰発現によりヒト上皮ガン細胞の増殖が促進されることや、この時 PI3K の p85 サブユニット (セリンモチーフを持つ) に結合し、PI3K の細胞膜への移行を促進しこれを活性化させ、下流因子である Akt のリン酸化を誘導していることが報告されている (Neal et al., 2012; Neal et al., 2009)。またリン酸化された AKT1S1 は mTORC1 から乖離した後、14-3-3 ζ と結合することで安定化し、mTORC1 の活性低下が誘導されること、AKT1S1 のリン酸化サイトに変異を導入すると、14-3-3 ζ との結合が出来なくなり、結果 mTORC1 活性阻害能が減少する事が報告されている (Fonseca et al., 2007; Vander Haar et al., 2007)。こうした報告を踏まえると、今回 miRNAs の過剰発現によって Akt のリン酸化レベルに変化は認められなかったものの、p70S6K のリン酸化レベルに変化が認められたことは、14-3-3 ζ タンパク質

発現量の低下によって AKT1S1 と 14-3-3 ζ の相互作用が阻害されたことに起因していると考えられた。

miRNAs 過剰発現による脂質代謝関連遺伝子発現の変化に関して

3種の miRNAs の過剰発現によって、*SREBP1c*、*FASN*、*LDLR*、*HMGCR* の有意な発現減少が、また *ACC1* に関しては mmu-miR-193a-3p、mmu-miR-193b-3p の過剰発現によって有意な発現減少が認められた。すなわち脂質生合成が抑制されていることが考えられた。第二章で利用した HepG2 細胞における結果では、p70S6K のリン酸化レベルが低下していたにも関わらず、こうした脂質生合成経路が亢進しており、予想に反した結果となったが、本章で使用した AML12 細胞においては、種々の報告と矛盾しない結果が得られた。第二章第四節では、こうした結果が得られた理由として、細胞種の違いや培地の組成を考察事項として述べた。本章においてもトランスフェクション時の培地条件は 10%FBS を含む DMEM であり、第二章と基本的には同一条件であった。こうした事実を総合すると、ガン細胞と通常細胞との代謝活性の違いが結果の違いに影響していたものと解釈する事が出来た。

miRNAs 過剰発現によるオートファジー、アポトーシス関連遺伝子発現の変化に関して

アポトーシス抑制遺伝子である *BCL2* の発現は mmu-miR-182-5p の過剰発現により有意に減少し、mmu-miR-193a-3p および mmu-miR-193b-3p の過剰発現では有意ではないものの減少傾向が認められた。従ってアポトーシスが誘導されている事が示唆され、中でも mmu-miR-182-5p は強く影響することが明らかとなった。一方オートファジーマーカー遺伝子である *LC3* に関しては、第二章同様、各 miRNAs の過剰発現により *LC3a* の減少が認められることが分かったものの発現上昇はなく、オートファジーの誘導は示唆されなかった。mmu-miR-193a-3p、mmu-miR-193b-3p の過剰発現時には、広範な細胞死が確認されていたが、mmu-miR-182-5p においてはこうした所見は認められなかった (Fig. 3-3-2-9)。本章では 48 時間の培養を行ったが、脂質生合成経路の抑制の影響がより強く反映された結果となった。培養時間を延長するなど、検討を続けることによって、mmu-miR-182-5p の作用も表現型として顕在化する可能性がある。

本章まとめ

ロイシン欠乏食給餌マウスの肝臓において、mmu-miR-182-5p および mmu-miR-193a-3p、mmu-miR-193b-3p が発現上昇する事が明らかとなった。AML12 細胞を利用した機能解析によって、*CD2AP* や *YWHAZ* が標的となり、細胞増殖経路が抑制されることが示唆された。しかし *CD2AP* については既報にある働きのみでは今回の現象を説明す

る事は不十分であり、今後別の経路についての検討が必要である。

Table. 3-1-1-1. 給餌した餌の組成

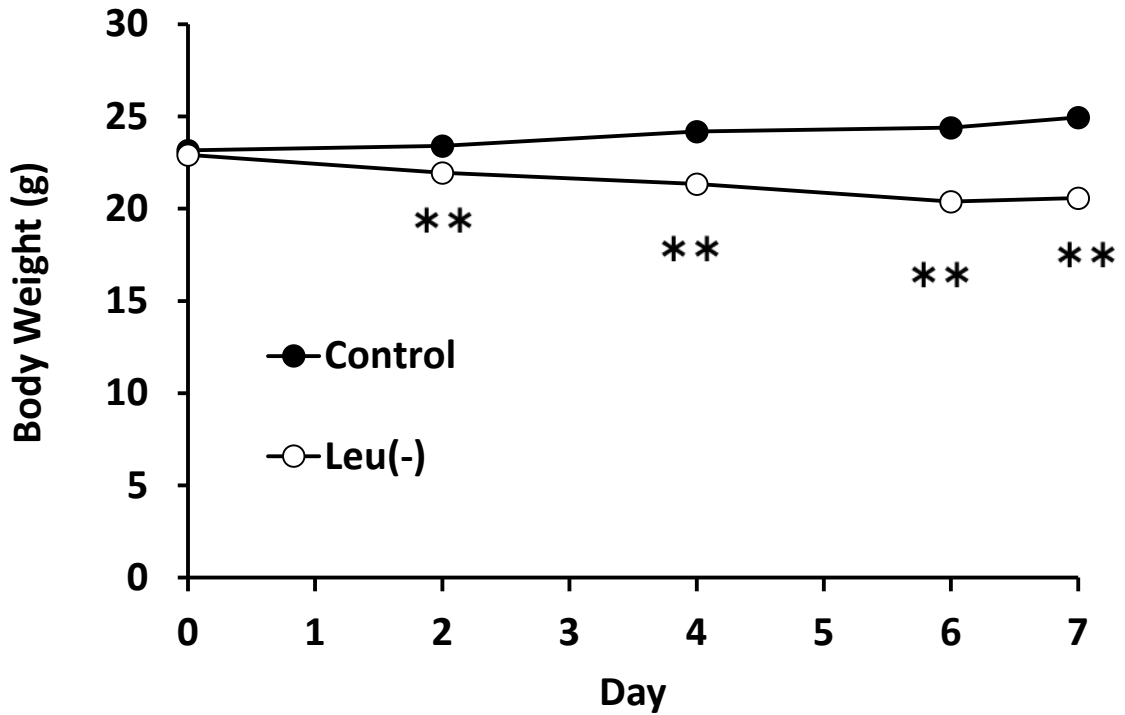
成分	Control	Leu (-)
	g/kg	g/kg
アミノ酸混合物	150	137
コーンスターチ	647.5	660.5
メチオニン	2.5	2.5
大豆油	50	50
ビタミン混合物 (AIN76組成)	10	10
ミネラル混合物 (AIN76組成)	40	40
セルロース	100	100
計	1000	1000

※ アミノ酸混合物の組成はTable. 3-1-1-2に示す。

Table. 3-1-1-2. アミノ酸混合物の組成

	Control	Leu (-)
アミノ酸	g/kg	g/kg
イソロイシン	7.1	7.1
ロイシン	13.0	0.0
リジン塩酸塩	14.1	14.1
メチオニン	3.9	3.9
シスチン	0.8	0.8
フェニルアラニン	7.2	7.2
チロシン	7.8	7.8
トレオニン	6.1	6.1
トリプトファン	1.7	1.7
バリン	9.2	9.2
ヒスチジン	4.1	4.1
アルギニン	5.2	5.2
アラニン	4.1	4.1
アスパラギン酸	5.1	5.1
アスパラギン1水和物	5.8	5.8
グルタミン酸	14.6	14.6
グリシン	2.6	2.6
プロリン	15.0	15.0
セリン	8.1	8.1
グルタミン	14.6	14.6
計	150	137

体重



総摂食量

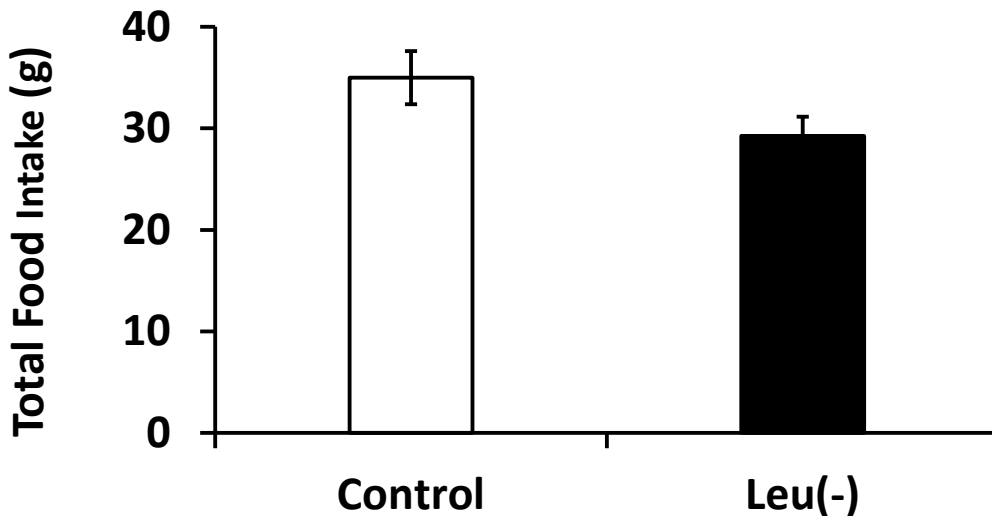


Fig. 3-1-2-1. 飼育期間中の体重推移と、総摂食量
グラフの値は平均値±S.E.を示す。n=9, **:p<0.01(vs.Control)

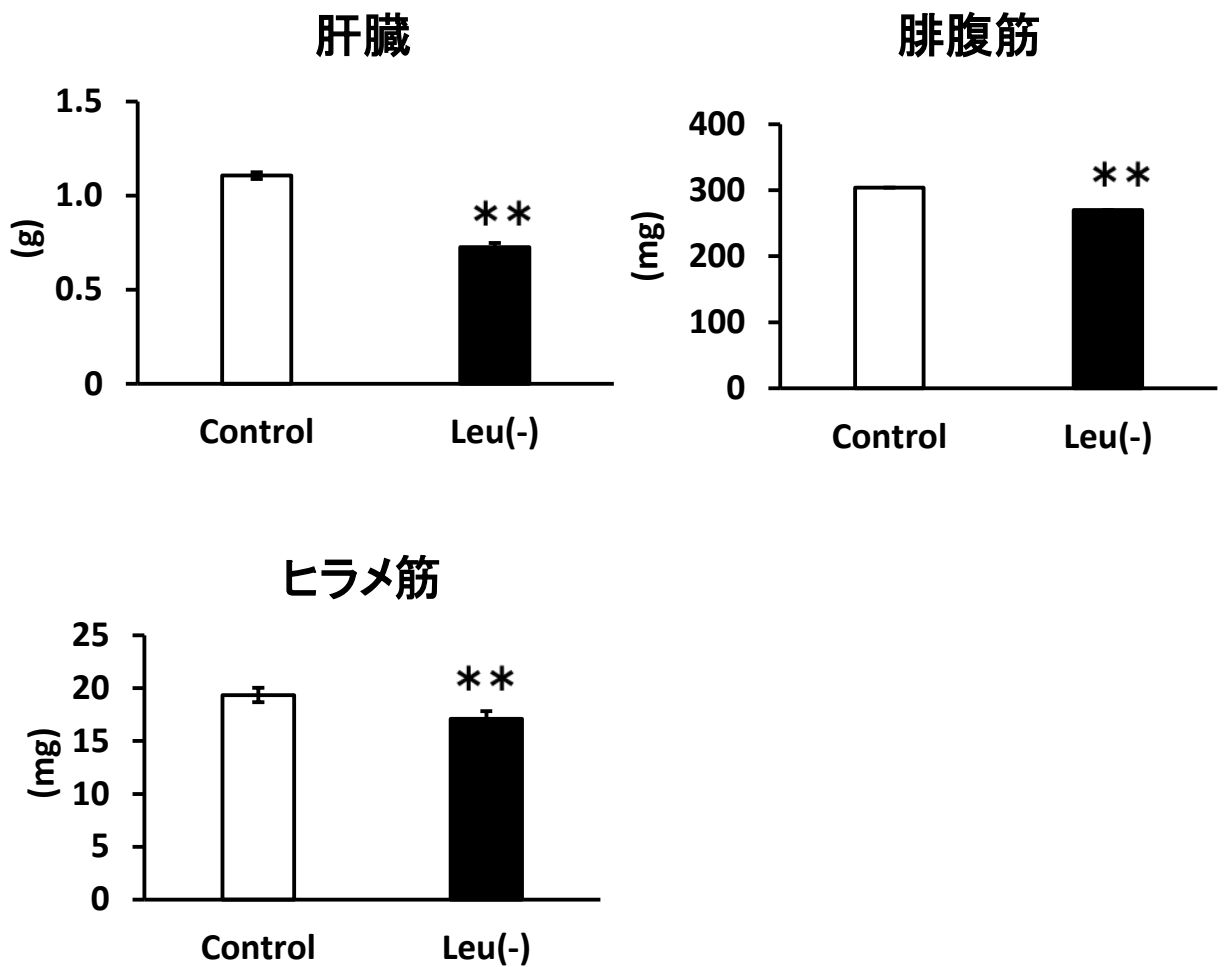
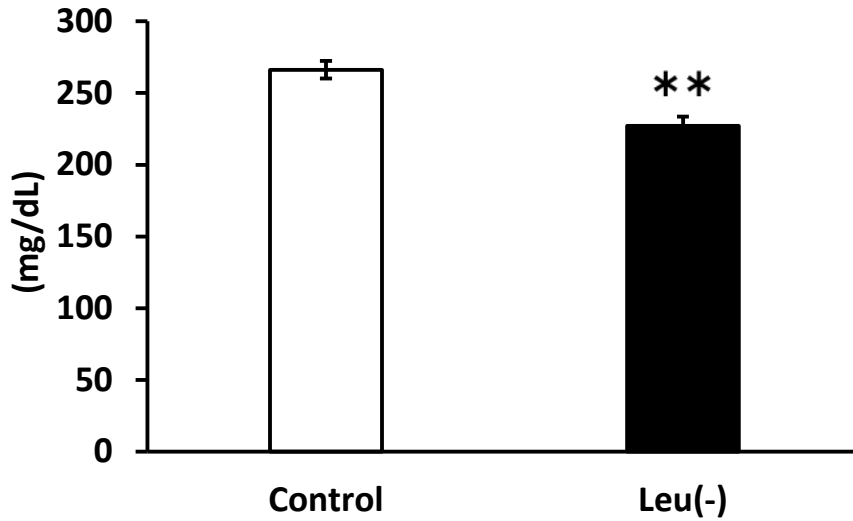


Fig. 3-1-2-2. 解剖時の臓器重量
 グラフの値は平均値±S.E.を示す。n=9, **:p<0.01(vs.Control)

血糖値



血漿インスリン濃度

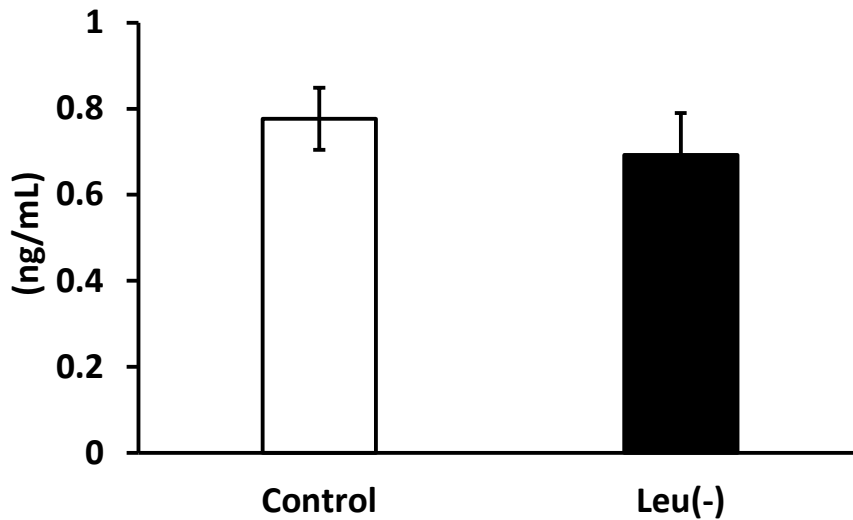


Fig. 3-1-2-3. 解剖時の血糖値と血漿インスリン濃度
グラフの値は平均値±S.E.を示す。n=9, ** :p<0.01(vs.Control)

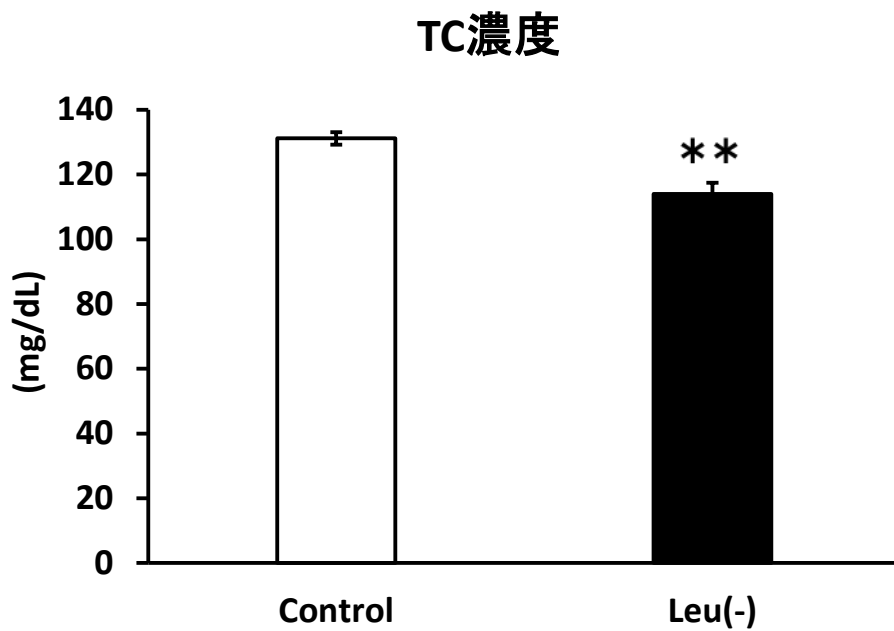
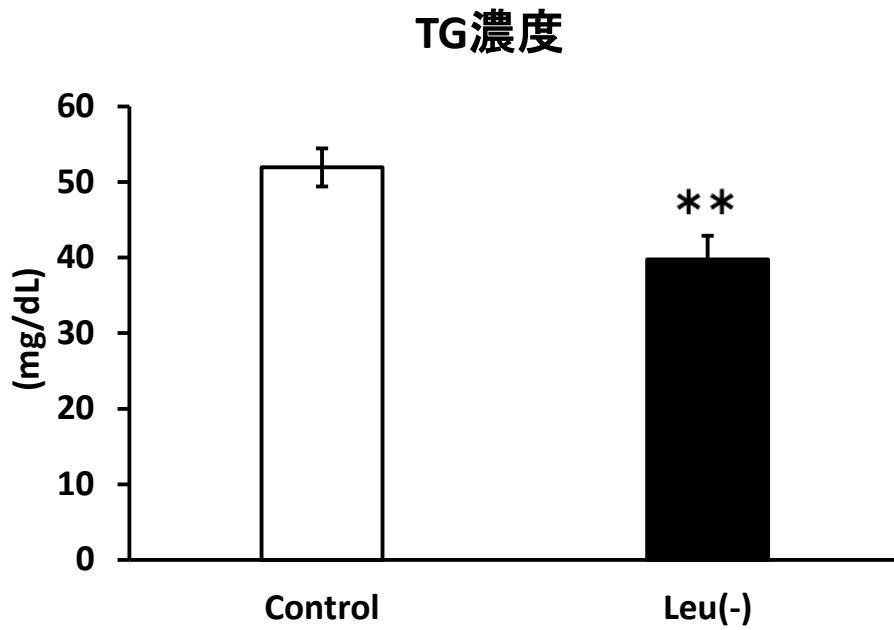


Fig. 3-1-2-4. 解剖時の血漿中TG濃度およびTC濃度
グラフの値は平均値±S.E.を示す。n=7-9, ** :p<0.01(vs.Control)

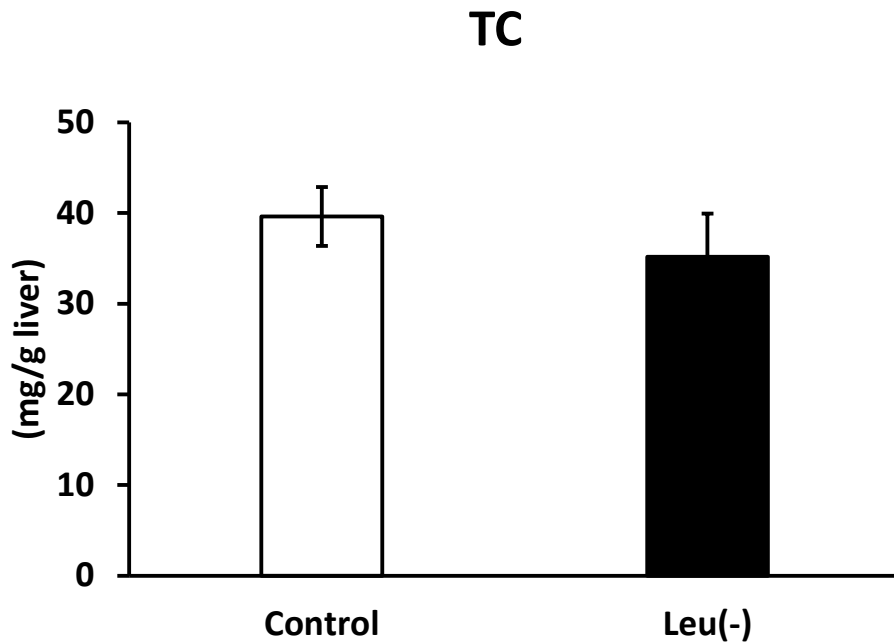
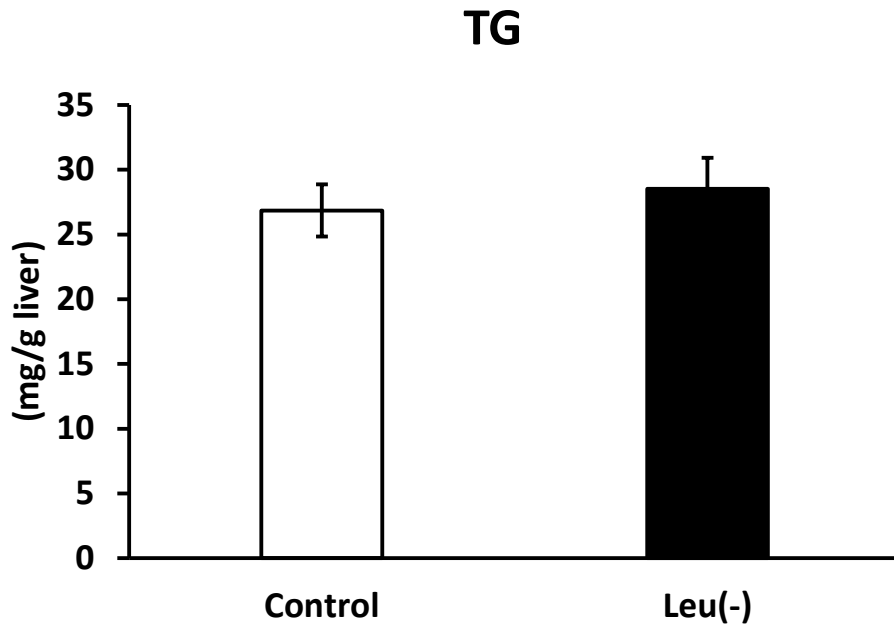


Fig. 3-1-2-5. 解剖時の肝臓中脂質量
グラフの値は平均値±S.E.を示す。n=9

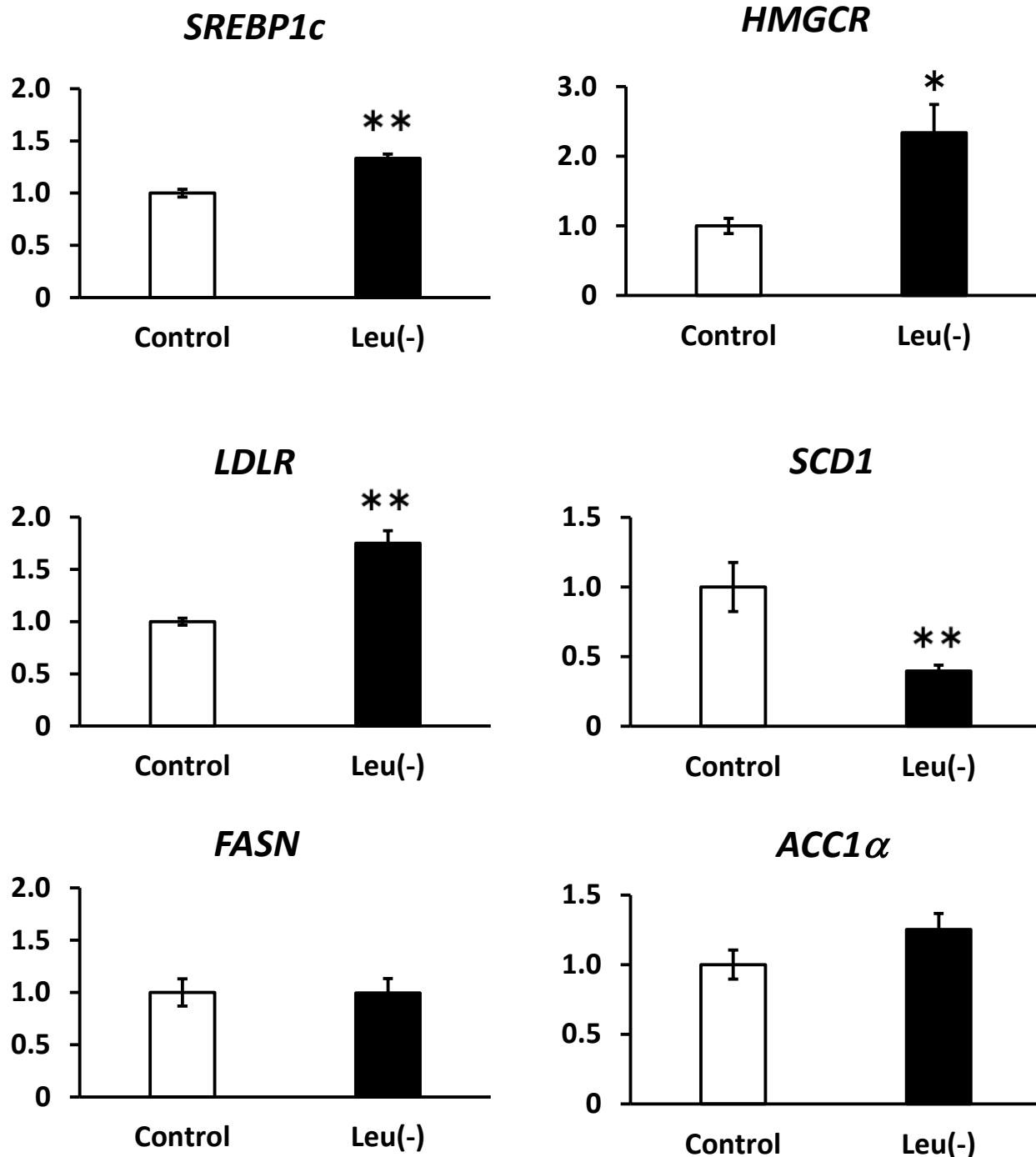


Fig. 3-1-2-6. 肝臓脂質代謝関連遺伝子発現の変化
 グラフの値は平均値±S.E.を示す。n=9, ** :p<0.01, * :p<0.05(vs.Control)

Table. 3-2-2-1. ロイシン欠乏食給餌マウス肝臓で発現上昇したmiRNAs

miRNA	Log ratio [Leu(-)/Control]
mmu-miR-706	2.52
mmu-miR-335-5p	2.30
mmu-miR-3068-3p	1.86
mmu-miR-324-3p	1.53
mmu-miR-193b-3p	1.44
mmu-miR-322-5p	1.41
mmu-miR-30b-3p	1.36
mmu-miR-182-5p	1.31
mmu-miR-362-5p	1.14
mmu-miR-210-3p	1.13
mmu-miR-345-3p	1.11
mmu-miR-92b-3p	1.07
mmu-miR-187-3p	1.06
mmu-miR-193b-3p	1.06
mmu-miR-29b-2-5p	1.01

Log ratioが1.0以上のもののうち、Singal値が20以上であったものを示した。またマウスとヒトに共通して保存され、本論文で特に注目したものを赤字で表記している。

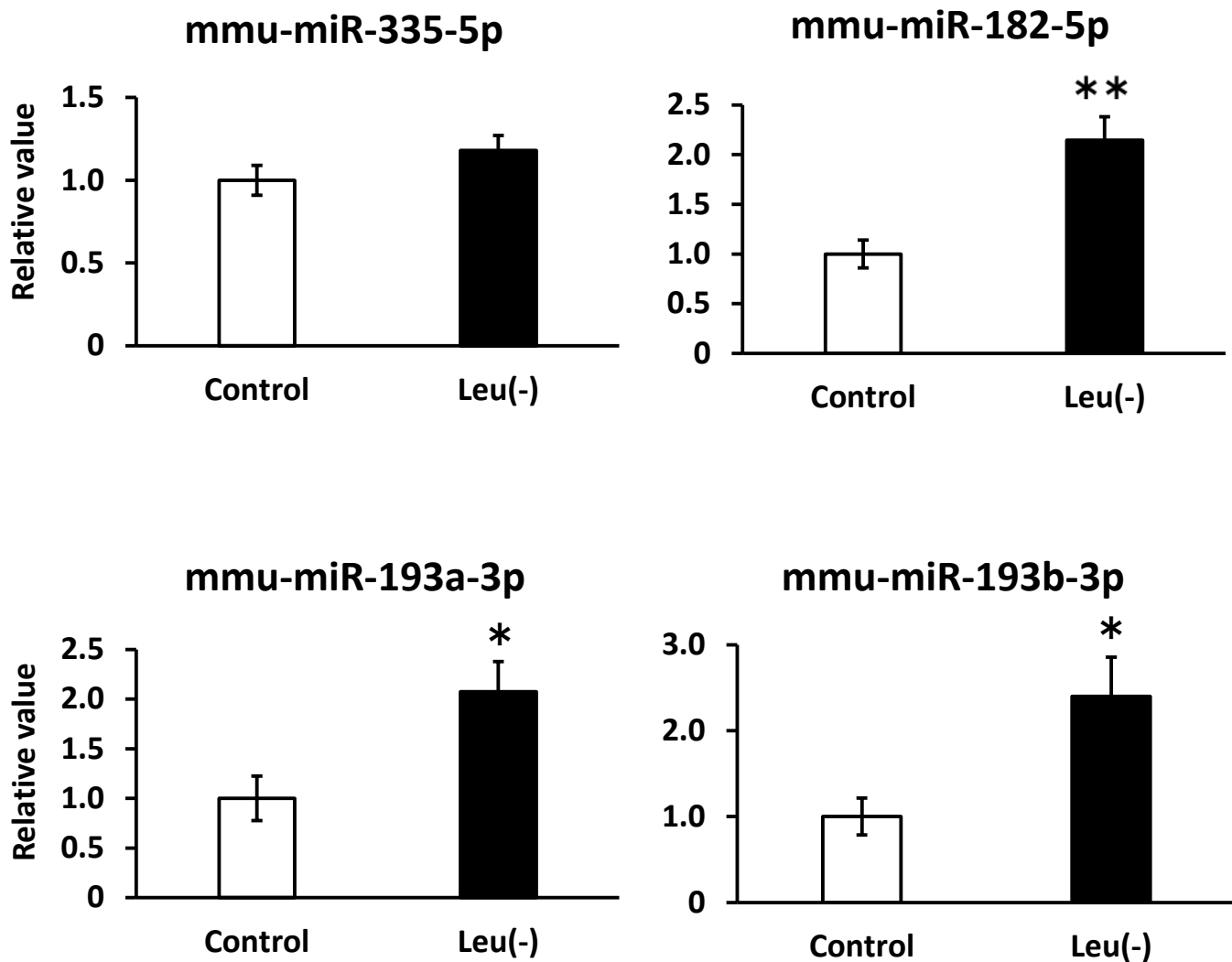


Fig. 3-2-2-1. 各種miRNAsの発現

グラフの値は平均値±S.E.を示す。n=9, ** :p<0.01, * :p<0.05(vs.Control)

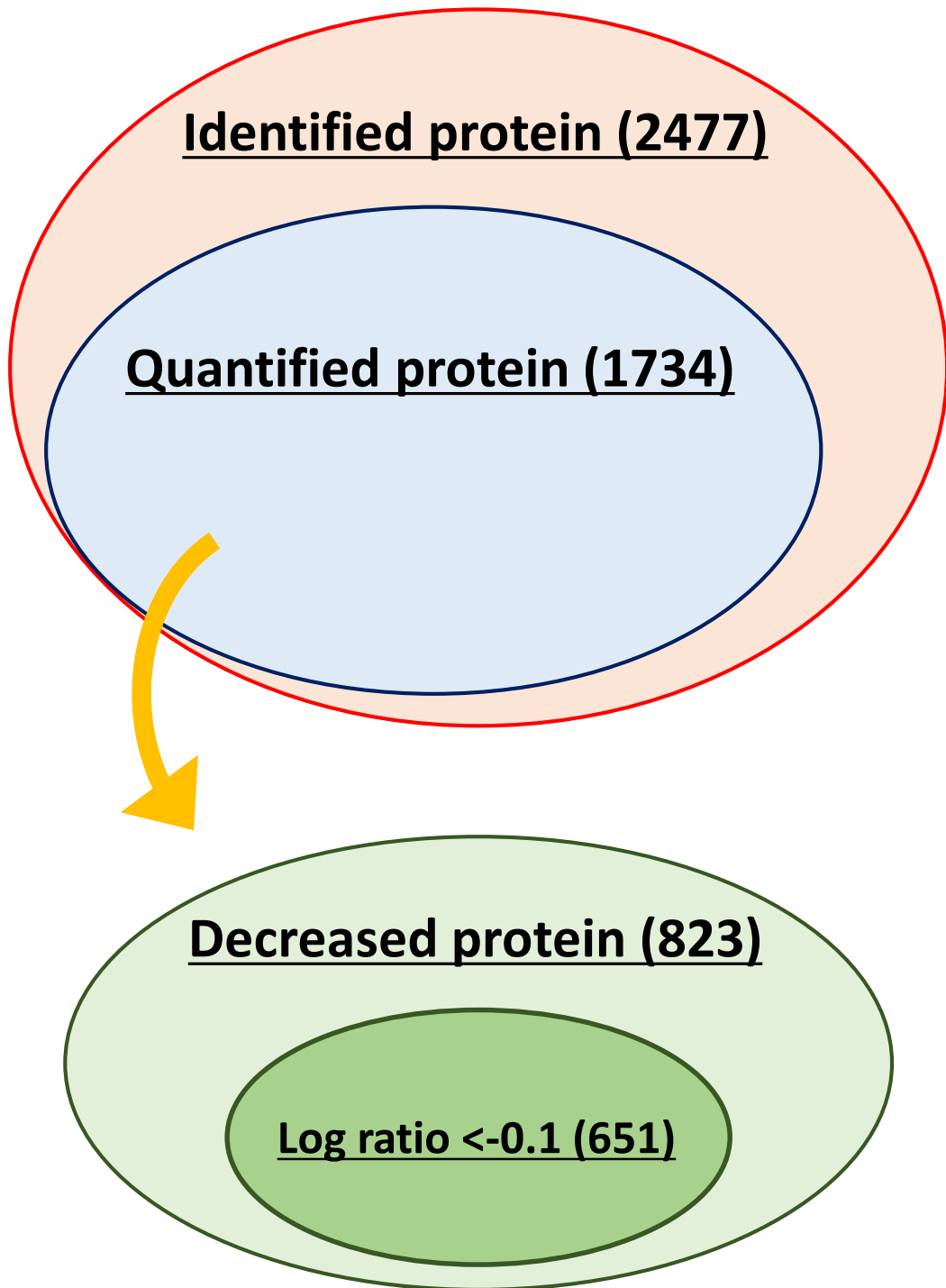


Fig. 3-2-2-2. ロイシン欠乏食給餌マウス肝臓におけるプロテオーム結果 iTRAQ法により行われたプロテオームの結果を示した。()内は対象のタンパク質数を示す。

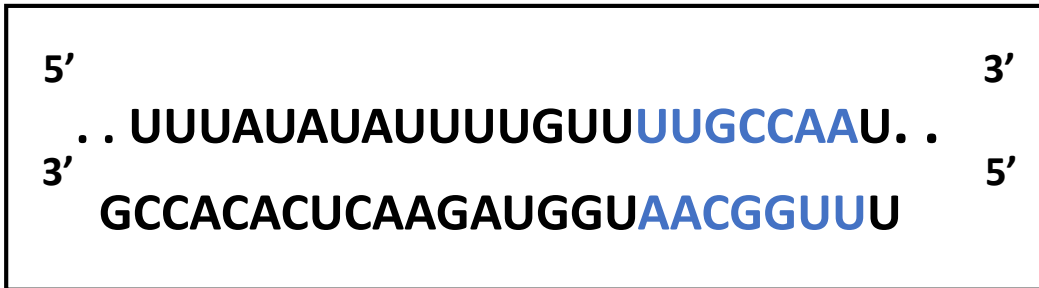
Table. 3-2-2-2. 各miRNAsの標的遺伝子候補と変動倍率

miRNA	標的遺伝子候補	Score
mmu-miR-182-5p	<i>RAC1</i>	-0.62
	<i>MSN</i>	-0.62
	<i>CD2AP</i>	-0.53
	<i>NUS1</i>	-0.48
	<i>CORO1C</i>	-0.39
mmu-miR-193a, b	<i>AP2M1</i>	-0.75
	<i>RPS21</i>	-0.53
	<i>SPRYD4</i>	-0.50
	<i>HYOU1</i>	-0.45
	<i>YWHAZ</i>	-0.41

TargetScan上での解析における、Cumulative weighted context++ scoreの上位5位までを示した。また本論文中でその後着目した遺伝子は赤字で示した。

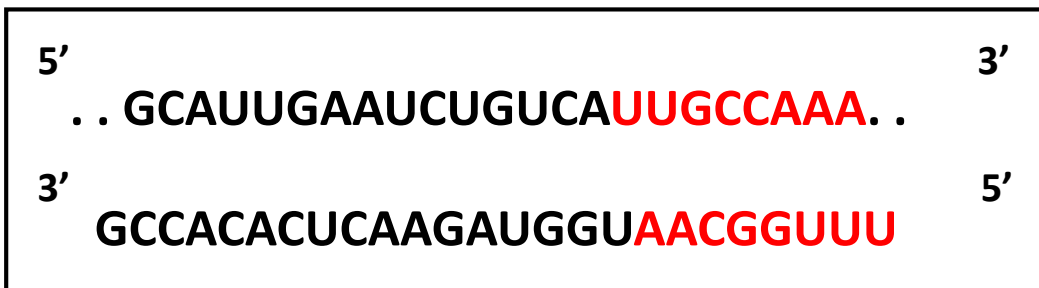
Human CD2AP 3'UTR (length : 2593 bp)

Position of 149-155 of CD2AP 3'UTR



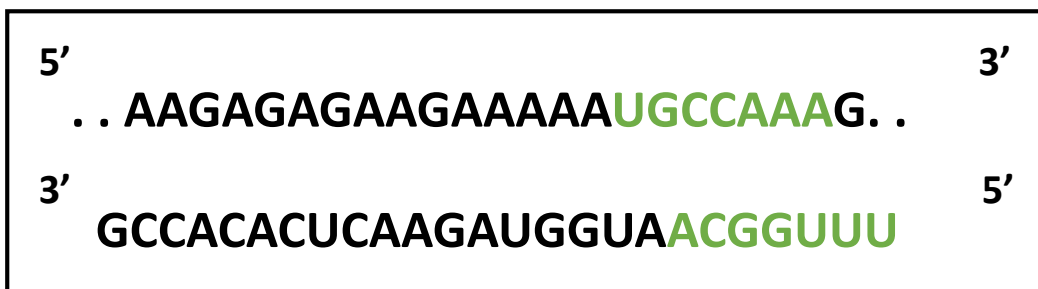
mmu-miR-182-5p

Position of 1812-1819 of CD2AP 3'UTR



mmu-miR-182-5p

Position of 2570-2576 of CD2AP 3'UTR

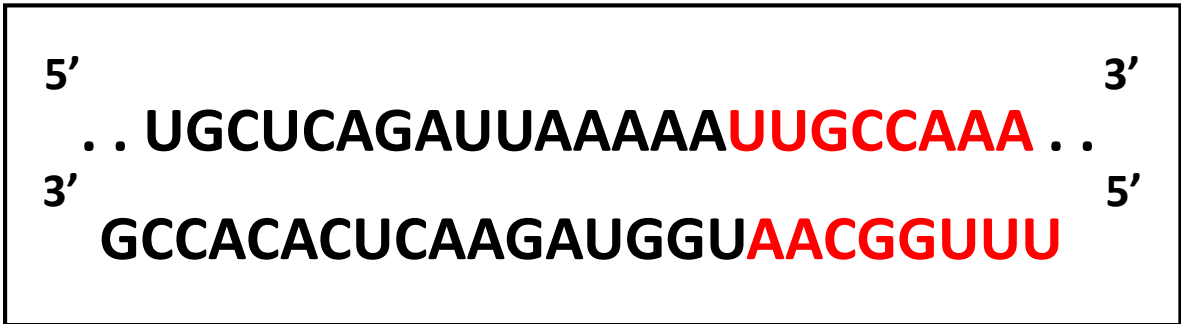


mmu-miR-182-5p

Fig. 3-2-2-3. mmu-miR-182-5pの配列とCD2APの結合予想部位 TargetScanHumanにより抽出した2ヶ所の結合予想部位を示した。青または赤、緑で示した配列が、miRNAのseed sequenceまたはその予想結合配列である。

Human *RAC1* 3'UTR (length : 1528 bp)

Position of 269-276 of *RAC1* 3'UTR

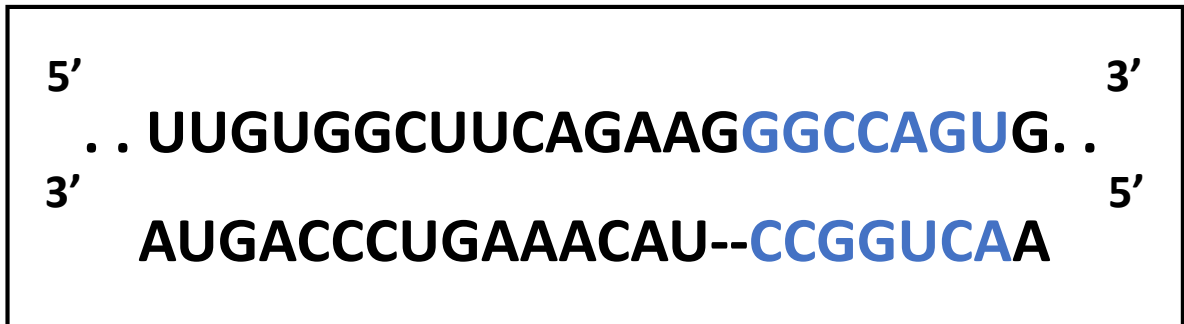


mmu-miR-182-5p

Fig. 3-2-2-4. mmu-miR-182-5pの配列と*RAC1*の結合予想部位
TargetScanHumanにより抽出した結合予想部位を示した。
赤で示した配列が、miRNAのseed sequenceまたはその予想結合配列
である。

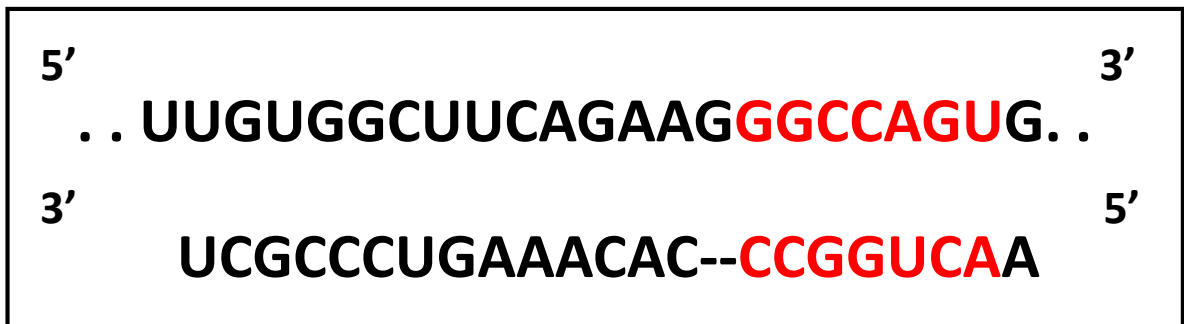
Human YWHAZ 3'UTR (length : 2143 bp)

Position of 296-302 of YWHAZ 3'UTR



mmu-miR-193a-3p

Position of 296-302 of YWHAZ 3'UTR



mmu-miR-193b-3p

Fig. 3-2-2-5. mmu-miR-193a、mmu-miR-193b-3pの配列とYWHAZの結合予想部位TargetScanHumanにより抽出した2ヶ所の結合予想部位を示した。青または赤で示した配列が、miRNAのseed sequenceまたはその予想結合配列である。

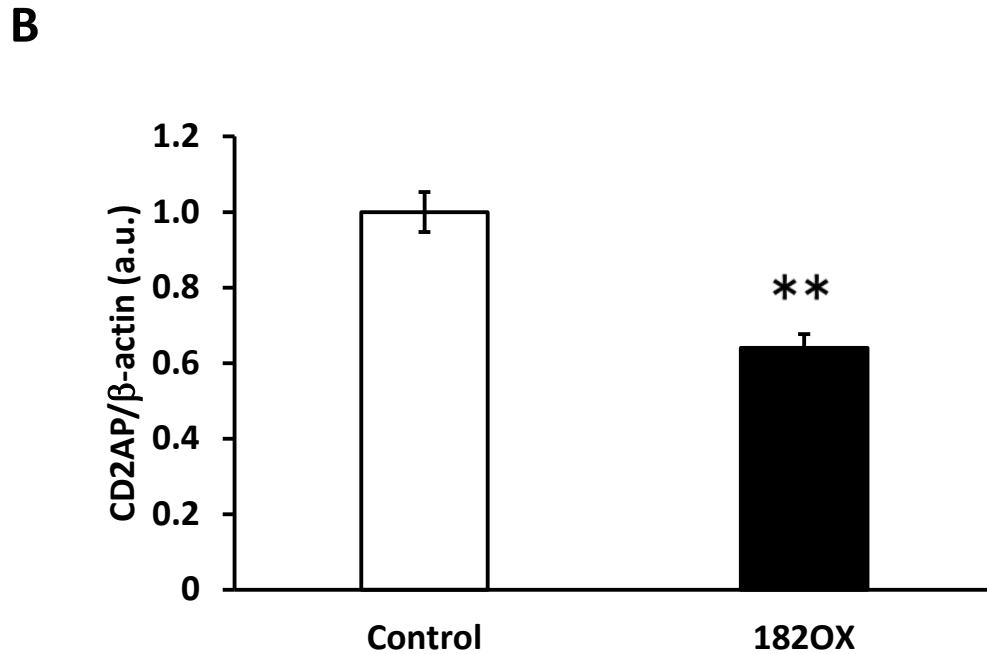
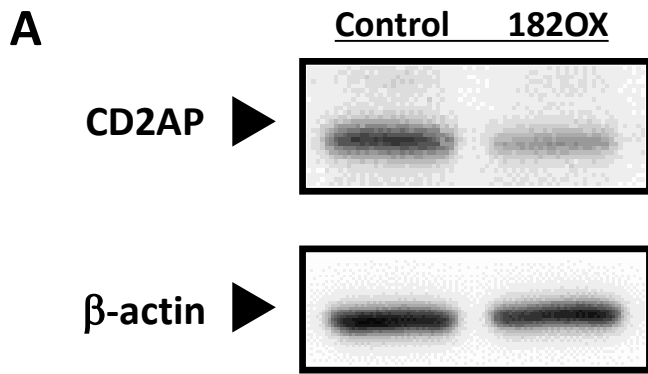


Fig. 3-3-2-1. mmu-miR-182-5pの過剰発現がCD2AP発現に及ぼす影響

A: イムノブロットの結果

B: CD2APタンパク発現量

グラフの値は平均値 \pm S.E.を示す。n=3, **:p<0.01(vs.Control)

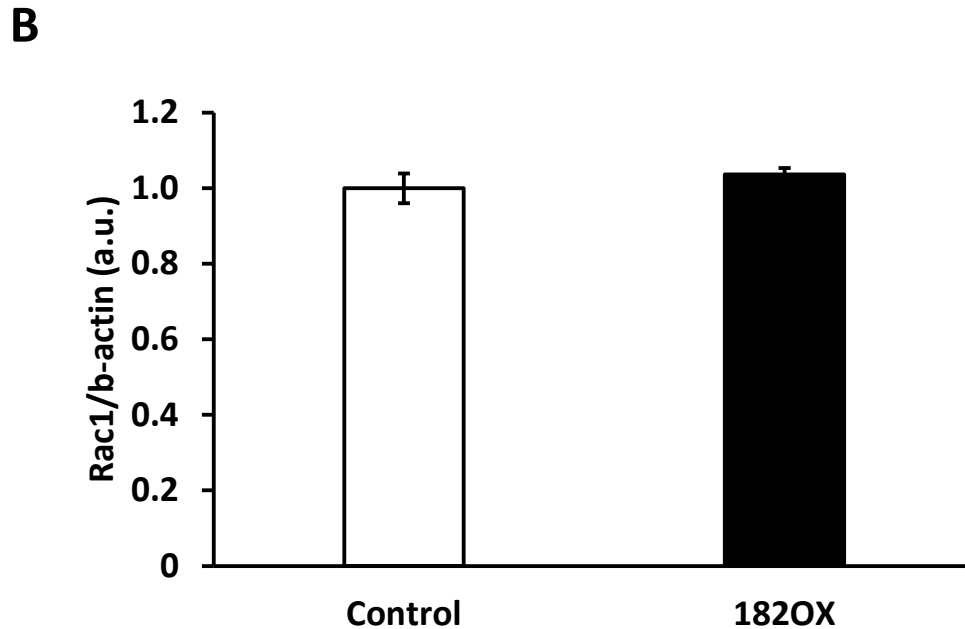
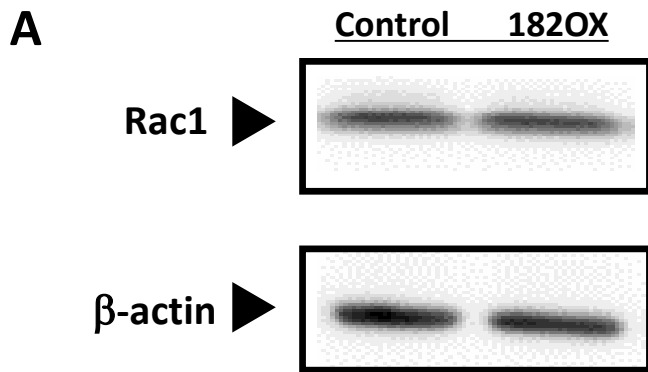


Fig. 3-3-2-2. mmu-miR-182-5pの過剰発現がRac1発現に及ぼす影響

A: イムノブロットの結果

B: Rac1タンパク発現量

グラフの値は平均値 \pm S.E.を示す。n=3

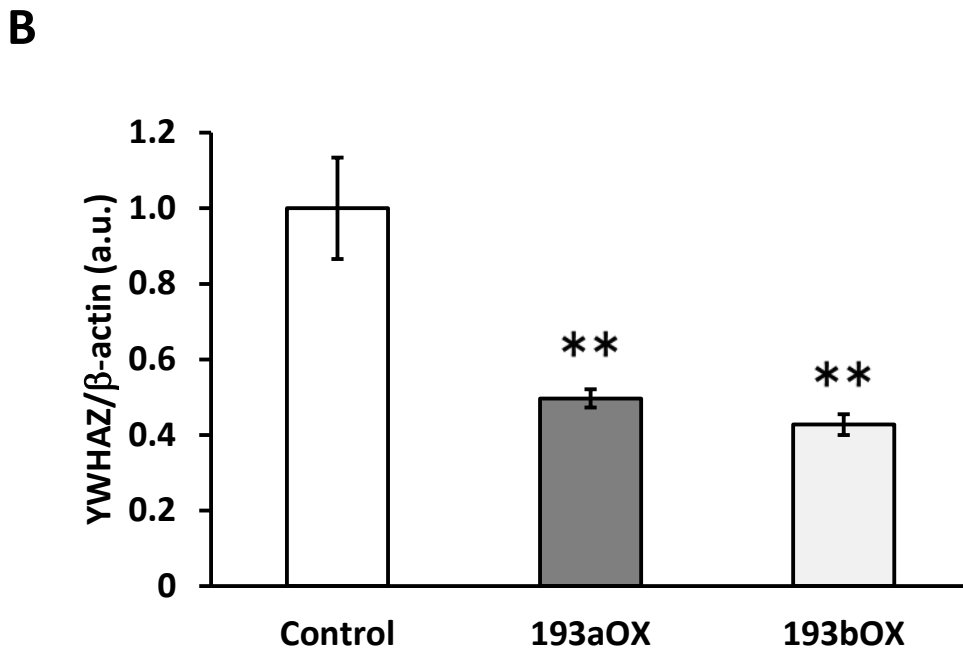
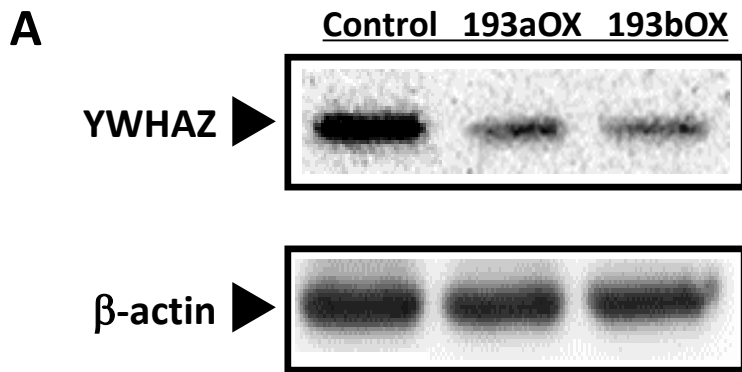


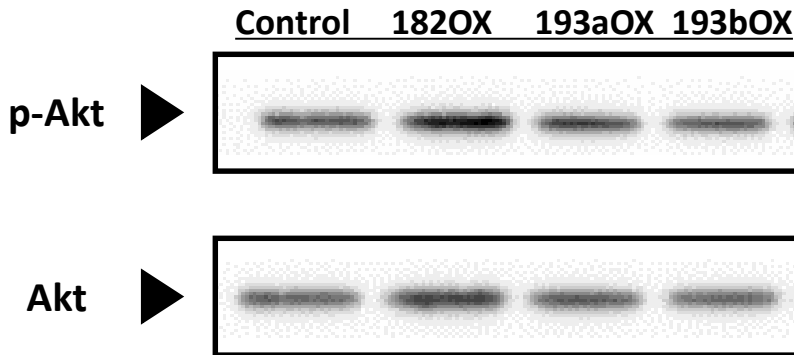
Fig. 3-3-2-3. mmu-miR-193a-3p、mmu-miR-193b-3pの 過剰発現が YWHAZ発現に及ぼす影響

A: 代表的なイムノブロットの結果

B: YWHAZタンパク発現量

グラフの値は平均値 \pm S.E.を示す。n=3, **:p<0.01(vs.Control)

A



B

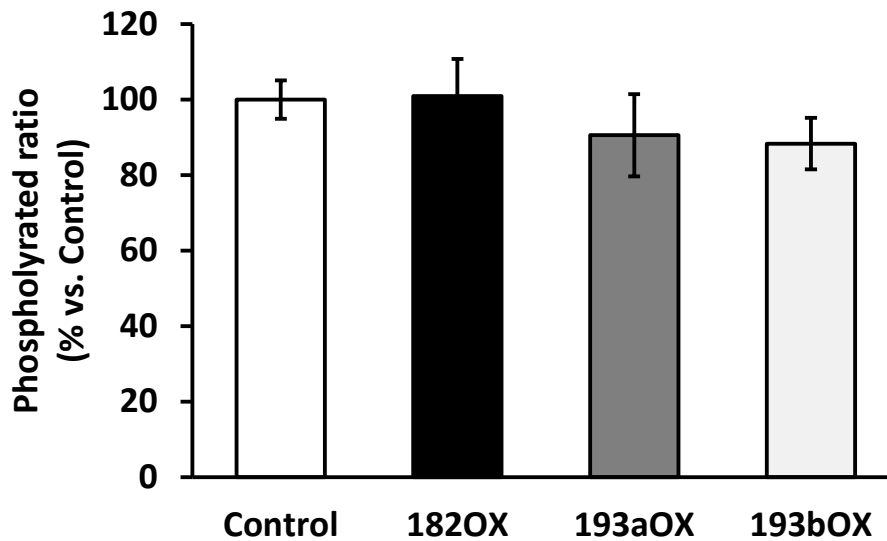


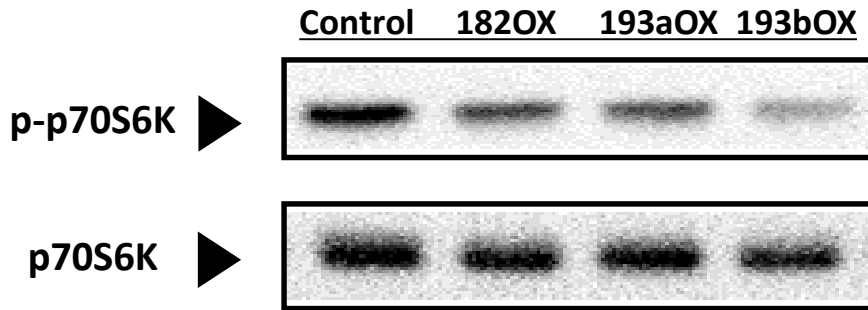
Fig. 3-3-2-4. mmu-miR-182-5p、mmu-miR-193a-3p、mmu-miR-193b-3pの過剰発現がAktのリン酸化に及ぼす影響

A: 代表的なイムノブロットの結果

B: Aktのリン酸化レベル

グラフの値は平均値±S.E.を示す。n=3

A



B

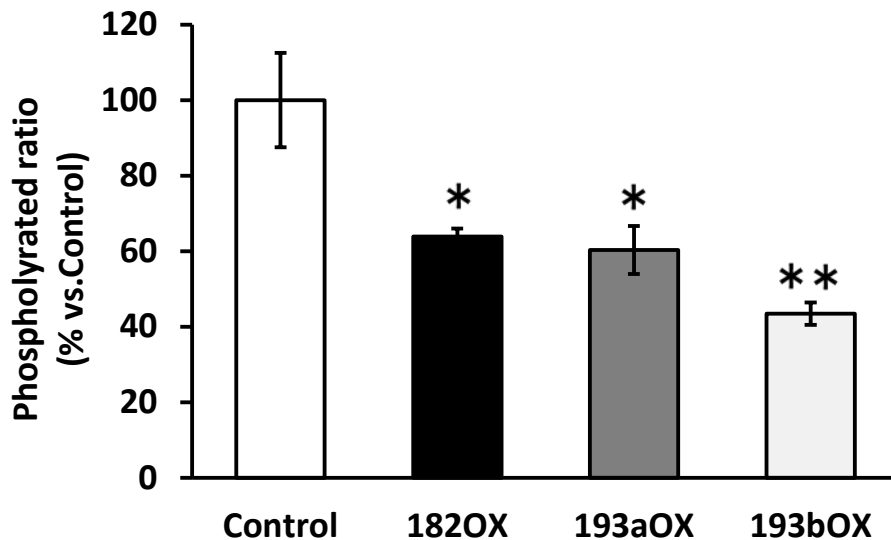


Fig. 3-3-2-5. mmu-miR-182-5p、mmu-miR-193a-3p、mmu-miR-193b-3pの過剰発現がp70S6Kのリン酸化に及ぼす影響
A：代表的なイムノブロットの結果
B：p70S6Kのリン酸化レベル

グラフの値は平均値±S.E.を示す。
n=3, **:p<0.01, *:p<0.05(vs.Control)

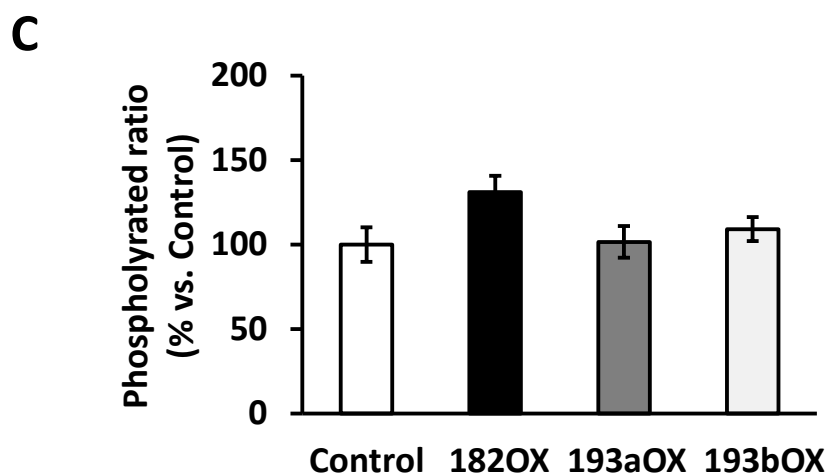
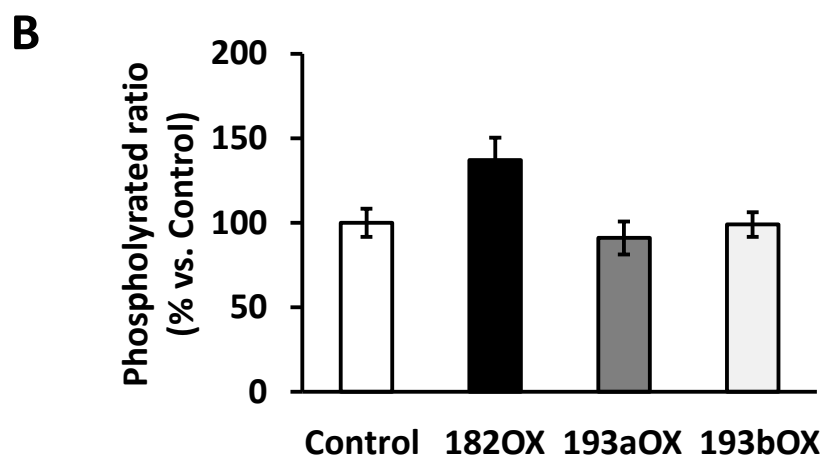
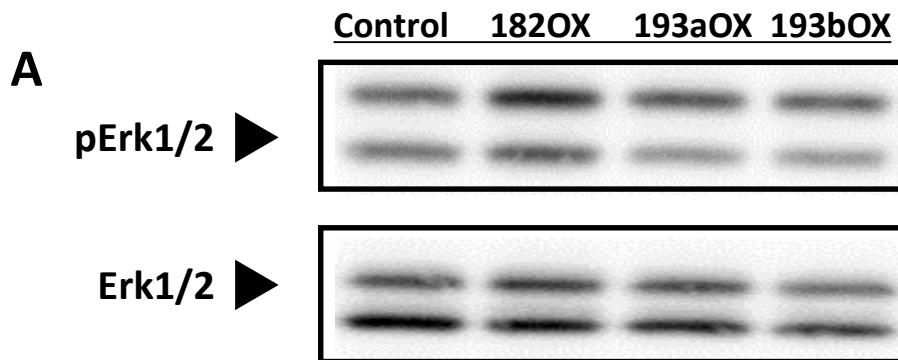


Fig. 3-3-2-6. mmu-miR-182-5p、mmu-miR-193a-3p、mmu-miR-193b-3pの過剰発現がErk1/2のリン酸化に及ぼす影響

A: 代表的なイムノブロットの結果

B: Erk1のリン酸化レベル C: Erk2のリン酸化レベル

グラフの値は平均値±S.E.を示す。n=3

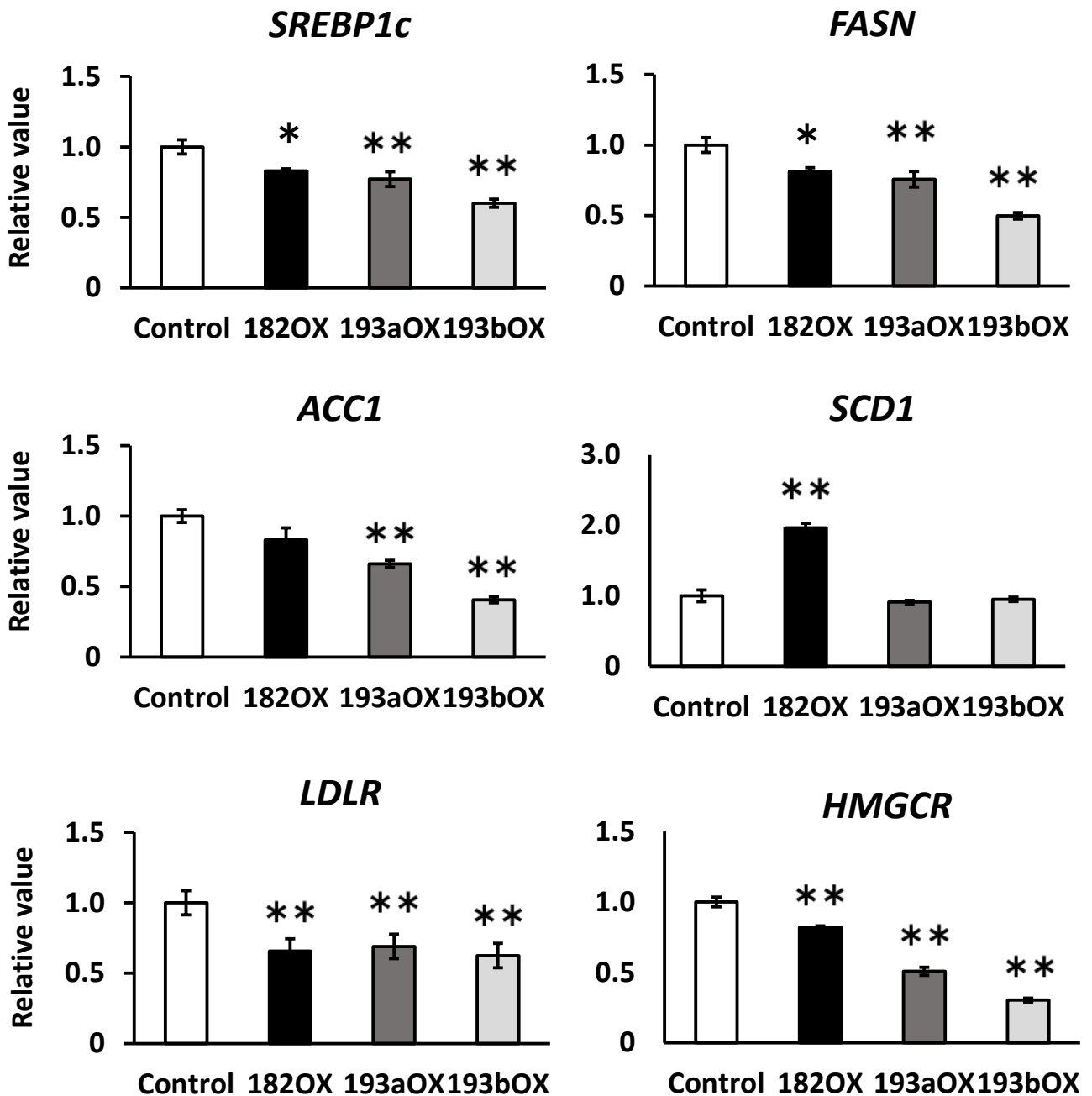


Fig. 3-3-2-7. 脂質代謝関連遺伝子発現の変化
 グラフの値は平均値±S.E.を示す。n=3, **:p<0.01(vs.Control)

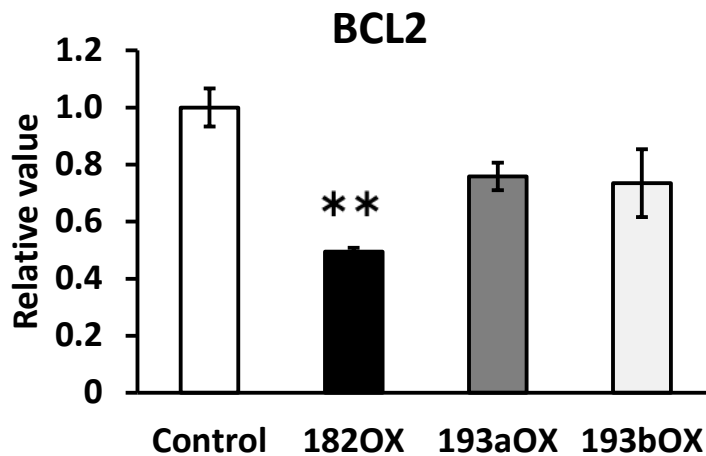
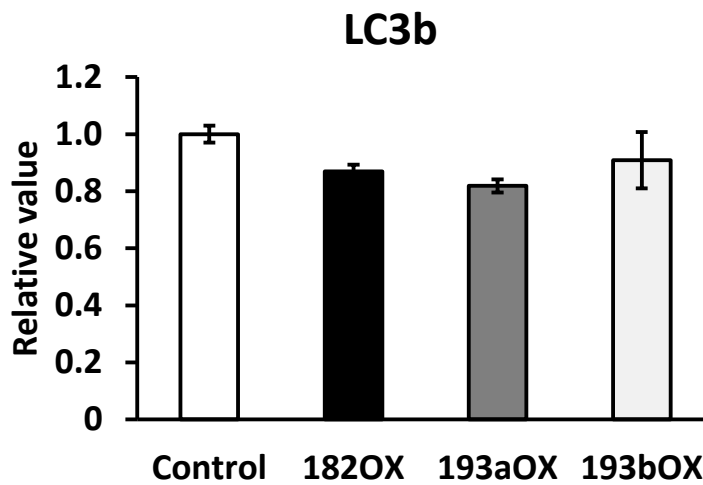
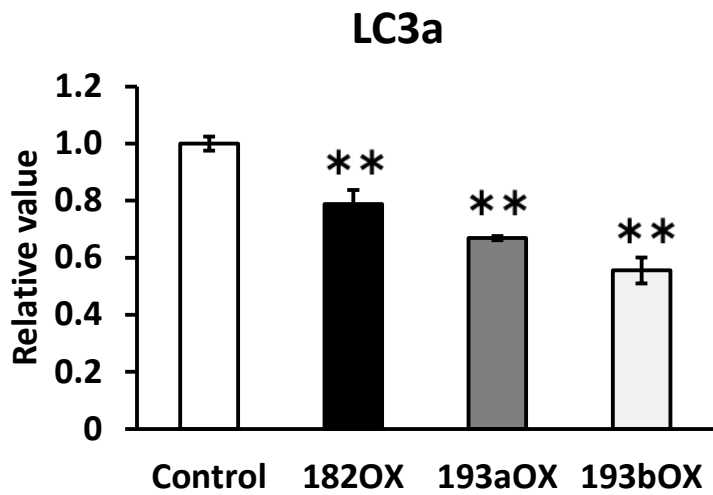
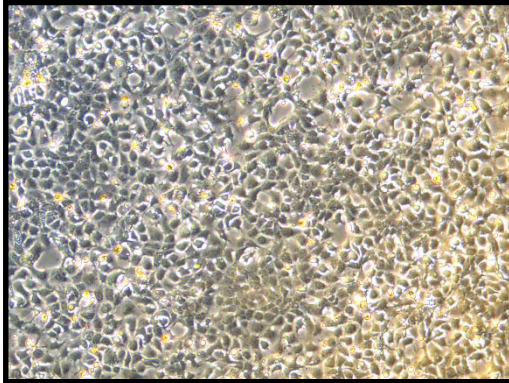
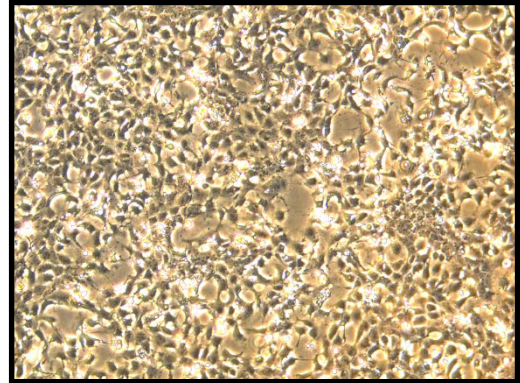


Fig. 3-3-2-8. オートファジー、アポトーシス関連遺伝子発現の変化
 グラフの値は平均値±S.E.を示す。n=3, **:p<0.01 (vs.Control)

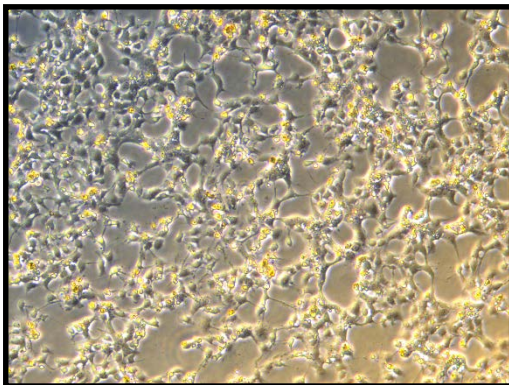
Control



mmu-miR-182-5p



mmu-miR-193a-3p



mmu-miR-193b-3p

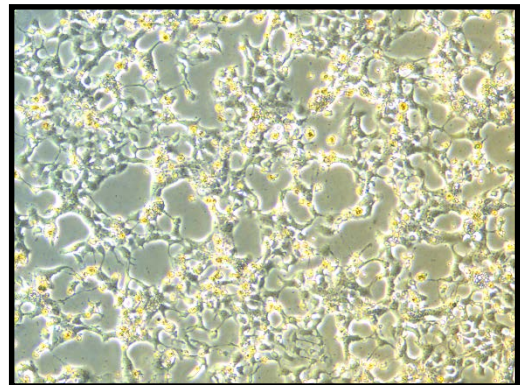


Fig. 3-3-2-9. miRNAs過剰発現がAML12細胞の増殖に及ぼす影響

総合討論

総合討論

本研究では近年研究が盛んに進められている miRNAs に着目し、細胞培養モデルや実験動物においてアミノ酸栄養状態の変化に応答し、下流遺伝子発現の調節を引き起こす miRNAs の探索とその作用機序の解明を行った。また必須アミノ酸欠乏下で活性化される転写因子 ATF4 に着目し、一部の miRNAs についてはその発現調節機構の解明も試みた。ここでは総合討論として、各章で得た結果を振り返りつつ、本研究を総括していく。また今後の分子栄養学における miRNA 研究の展望についても述べたい。

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

本章ではマイクロアレイ技術を利用した解析により、HepG2 細胞においてロイシン欠乏に応答して発現上昇する 12 種の miRNAs を見出した。同時にロイシン欠乏に応答して発現減少する miRNAs も見出されており、こちらも重要な事実であると考えられる。しかし序論で述べた通り、必須アミノ酸欠乏下では General control 経路により一部の遺伝子を除く大部分の mRNAs の翻訳が抑制されることから、遺伝子発現の抑制の為に発現上昇する miRNAs が多く存在し、重要な役割を担うと予想した（実際、マイクロアレイの結果において 3 度の結果に共通して Log ratio < -0.6 であったものは存在しなかった。Data not shown）。このような理由から、本研究ではまず発現上昇する miRNAs に着目し解析を進めた。

またこの 12 種のうち、最も発現上昇倍率の大きかった hsa-miR-1228-5p に着目し、その細胞内発現を変動させた際のトランスクリプトームやプロテオームの変化を俯瞰する事で、この miRNA の標的遺伝子の探索における有用な手法の検討を行った。その結果、特に hsa-miR-1228-5p の過剰発現時の細胞内プロテオームに極めて大きな変動があり、miRNA トランスフェクションの影響をプロテオームが強く受ける事、またロイシン欠乏時の細胞内オミクス結果との比較により、標的候補遺伝子の中には mRNA の変動とタンパク質の変動結果に相関の認められないものも多かった。トランスクリプトームと比較してプロテオームがより表現型に近いことなども考慮し、本研究ではプロテオーム結果を利用する方が標的遺伝子候補を見出しやすいとの結論を得た。この結論を受けて、以後の章ではプロテオーム解析結果との比較により標的遺伝子候補の探索を行っている。

しかし miRNAs による遺伝子発現調節の機構の大半は mRNA の脱アデニル化に始まる mRNA 分解であることも数多く報告されている。本研究では miRNAs の作用が mRNA やタンパク質発現に反映される時間にはラグがあることを想定し、最初の miRNAs のスクリーニングおよび DNA マイクロアレイ解析には 12 時間のロイシン欠

乏下または 24 時間の miRNA 過剰発現での培養を施した細胞の total RNA を、後半のプロテオーム解析には 48 時間のロイシン欠乏あるいは miRNA 過剰発現での培養を施した細胞のタンパク質を供したが、こうした設定時間が最も適切であったかには疑問が残る。特に mRNA 発現はフィードバック調節などを鋭敏に受けやすく、培養 48 時間時点では既にこうした調節を受けていた可能性がある。従ってより適切な時間設定の為には、タイムコース試験などを行い、複数の培養時間サンプルから得た結果を俯瞰して考察する必要がある。本研究では議論を一貫させるために、以後の章での miRNA トランスフェクションでも処理時間を 48 時間として進めている。

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

本章は 1) ロイシン欠乏下での miRNAs の発現応答機序の解明、および 2) こうした miRNAs の機能解析の 2 つに大きく分けることが出来る。

1) 発現応答機序の解明

本章ではまず、ロイシン欠乏下で発現上昇した 12 種の miRNAs の発現調節機構を探る一歩として、過剰発現モデルを作製する事で転写因子 ATF4 によって制御を受ける miRNAs のスクリーニングを行った。その後ノックダウン技術を利用した解析により、ロイシン欠乏下の HepG2 細胞では、hsa-miR-663a および hsa-miR-1469 が ATF4 によって発現亢進されていることが明らかになった。miRNAs のスクリーニングにあたり、24 時間の過剰発現処理後の miRNA 発現プロファイルを取得したが、その結果 hsa-miR-663a および hsa-miR-1469 の発現上昇倍率は Log ratio でそれぞれ 1.01、0.73 であった。しかしロイシン欠乏時のこれら miRNAs の継時的発現変化を確認した実験では、対照群に対して 3~4 倍の発現上昇を示していた。miRNA スクリーニング用サンプルとして、敢えて過激な実験条件を採用したため、予想に反する結果ではあったものの ATF4 は C/EBP β など種々のタンパク質と共に働くことも知られており、ATF4 のみの過剰発現では実際の生体状態を反映した正確なスクリーニングが出来なかった可能性がある。

また各 miRNAs の host 遺伝子転写開始点上流には ATF4 の結合コア配列である AARE や CRE に類似した配列が保存されていることがゲノムデータベース上での解析により明らかになり、本章ではこの部位に ATF4 が作用する事で転写を活性化していると考察したが、実際の結合状態を確認するまでには至らなかった。今後レポーターアッセイを利用した転写活性の評価や、ChIP アッセイによる結合状態の確認などによって、miRNAs の発現に対する ATF4 の作用の詳細を明らかにしていきたい。

2) miRNAs の機能解析

本章後半では第一章で得たプロテオーム解析結果をもとにして、両 miRNAs の標的遺伝子候補を抽出した。その結果 hsa-miR-663a の標的遺伝子として *AKT1S1 (PRAS40)* が抽出された。PRAS40 が mTORC1 の構成因子の 1 つとして重要な役割を果たしていることは種々の報告から明白であり、さらに hsa-miR-663a の過剰発現によって p70S6K のリン酸化レベルの低下が確認されたことから、今回の結果によって miRNAs による mTORC1 の活性調節経路の存在の可能性を提示する事が出来た。一方 hsa-miR-1469 の標的遺伝子は、今回得たプロテオームデータとの比較では同定する事が出来なかった。しかしこの miRNA の過剰発現によっても hsa-miR-663a と同様に p70S6K のリン酸化レベルの低下や、その下流遺伝子発現に変化が認められていた為、何かしらの遺伝子を標的として、こうした経路の活性調節に寄与していた可能性は高い。miRNAs 過剰発現時のプロテオームデータを取得し、標的遺伝子候補を探るなど、引き続き検討をしていきたい。

また mTORC1 の下流遺伝子発現に関しては、miRNAs 過剰発現時の脂質生合成経路、アポトーシス経路、オートファジー経路の代表的な遺伝子の発現を評価したが、ロイシン欠乏下の HepG2 細胞で認められる遺伝子発現変動や、mTORC1 の活性低下によって期待される遺伝子発現変動とは異なる結果が得られた。今後はロイシン欠乏下でこれら miRNAs をノックダウンすることで、その詳細な機能を明らかにしていきたい。

本章で得た結果のまとめを Fig. 4-1 に示した。

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

本章も第二章同様、1) 動物実験による検討、2) AML12 細胞を利用した機能解析と大きく分けることができる。

1) ロイシン欠乏食給餌マウスの飼育と肝臓 miRNA 発現変動

本章前半では 1 週間のロイシン欠乏食給餌を C57BL/6J マウスに施した。1 週間の飼育によってマウスの体重や各種臓器重量、血中パラメーターに大きな変化が生じた。一部の既報に比べて栄養制限による影響を強く受けていたと考察していることは本章で述べた通りだが、今回はこの条件下での肝臓 miRNA 発現プロファイルを取得し、発現上昇していた miRNAs として mmu-miR-182-5p、mmu-miR-193a-3p、mmu-miR-193b-3p を見出した。マイクロアレイ、およびその後の定量 PCR での評価によって、これら miRNAs は 2.0~2.5 倍程度の発現上昇をしていたことが確認できたが、これが発現ピークであったのかは判定できず、今回得られた表現型（重度の影響があったと思われる）を踏まえると、飼育初期でのこれら miRNAs の発現挙動が気になるところである。今

後短い日数での飼育を行い、こうした miRNAs が栄養制限初期で鋭敏に応答するのか、あるいは日数の経過と共にさらに上昇していくのかを評価したい。

本研究室では以前に低タンパク質食を給餌したラットの肝臓における miRNAs 発現プロファイルを取得しており、非常に興味深いことに *rno-miR-182* および *rno-miR-193* は減少した miRNAs の上位 4 つに含まれていた (高橋ら)。この 3 つの miRNAs はヒト、マウス、ラットで *seed sequence* が共通したファミリーを形成しており、ラットとマウスでは 3'UTR 上の配列が保存された遺伝子も多いことから、類似した働きを有している可能性が高いと考えている。一般に低タンパク質食を給餌したラットは脂肪肝を発症し、肝臓中での脂質生合成も活発に行われることが報告されている (Flores et al., 1970; Kato and Kimura, 2003; Toyoshima et al., 2010)。本章後半で示されるように、こうした miRNAs の過剰発現により脂質生合成遺伝子の発現は大幅に抑制されている。これらの結果よりこの 3 種の miRNAs はアミノ酸栄養状態の変化に何らかの機構で応答し、mTORC1 などの活性調節を介して、脂質代謝やタンパク質代謝に寄与していることが考えられた。今後ラットの結果についても解析を進めることで、応答機序解明の手掛かりが掴める可能性もある。

2) AML12 細胞を利用した機能解析

本章後半ではマウス肝臓のプロテオーム結果をもとにして、*mmu-miR-182-5p* の標的遺伝子として *CD2AP* を、*mmu-miR-193a-3p*、*mmu-miR-193b-3p* の標的遺伝子として *YWHAZ* を見出した。*CD2AP* は腎臓での働きが広く報告されているアダプター因子であり、肝臓でのその働きに関する報告はされていないが、腎細胞では PI3K/Akt シグナルの制御に関与することから着目した。miRNAs の過剰発現により *CD2AP* の発現が低下し、p70S6K のリン酸化レベルの低下が認められたものの、上流因子である Akt や Erk1/2 のリン酸化レベルには変化が認められず、どのような経路を介して p70S6K のリン酸化の制御が行われているのかは明らかにできなかった。今後は肝臓での *CD2AP* の新たな働きの可能性を探ると共に、*CD2AP* 以外の標的候補も含めて検討を続けていきたい。一方 *YWHAZ* は様々なリン酸化タンパク質と結合する足場タンパク質として働きシグナル伝達を制御する因子であり、今回 *mmu-miR-193a-3p*、*mmu-miR-193b-3p* の過剰発現によって発現が抑制されることで、mTORC1 の活性調節に関わるリン酸化シグナルが阻害され、p70S6K のリン酸化レベルの低下が誘導されたものと考えている。また *mmu-miR-182-5p* の過剰発現時には認められなかった広範なアポトーシスが認められたことから、様々な経路に関わる重要な因子であることが分かる。

こうした miRNAs がどのようにロイシン欠乏に応答しているのかは非常に興味深く、第二章でも示したように、培養細胞モデルはこうした検討を簡便に行うことができる。本章においても同様に考えて応答機序解析に着手した。しかし、AML12 細胞をロイシン欠乏培地で 48 時間 (0、12、24、48 時間) まで培養したところ、細胞内のこれら miRNAs

の発現上昇は認められず(Data not shown)、続く解析を行うことができなかった。原因として AML12 細胞のロイシン欠乏に対する応答性が低い可能性や、単純なロイシン欠乏に反応しているわけではない可能性もある。すなわちロイシン欠乏食を給餌すると全身でタンパク質分解が生じ、遊離アミノ酸の形でロイシンが供給されるが、同時にその他の余剰なアミノ酸の血中濃度が上昇する事になる (Kamata et al., 2014)。こうした外界アミノ酸バランスの変化に肝臓が反応している可能性もある。今後異なるマウスの細胞株を利用した評価や、培地中の全体的なアミノ酸バランスを考慮した検討が必要であろう。また近年では miRNAs は exosome という形で血中で安定に存在し、各組織の細胞においてエンドサイトーシスによって取り込まれることで、臓器間輸送が行われる可能性も指摘されている (Sun et al., 2015; Zavesky et al., 2015; Zhang et al., 2015)。従って他の臓器で発現上昇し、こうした機構によって肝臓に運ばれてきた可能性も考えられる。血中の miRNAs を解析する事は困難とされてきたが、近年では安定に抽出する事が出来るキットも開発されており、今後アミノ酸栄養の変化に対する血中 miRNAs の挙動を測定する事も重要であると考えられる。

本章で得た結果を Fig. 4-2 に示した。

総括と今後の展望

本研究では、培養細胞もしくは実験動物においてアミノ酸栄養状態の変化に反応して発現上昇する miRNAs を探索し、さらにプロテオーム解析を主に利用してその標的遺伝子の探索を行うことで生体内での機能を明らかにした。また培養細胞モデルにおいてはその発現制御機構についても明らかにすることができた。

私たちの健康寿命を延長する上で、ガンや生活習慣病、運動器疾患の予防は重要な課題である。こうした疾患の発症には miRNAs が深く関与していること、また食生活の乱れによる栄養不良も同時に関与していることは知られていた。本研究の成果によって、栄養状態の変化に反応して miRNAs の発現が変動する事、またこうした miRNAs が mTORC1 を始めとした、疾患発症にも重要な因子の活性を調節することが明らかになり、この 2 つの要素に miRNAs が栄養伝達因子として介在している可能性を提示できた。

今後単一アミノ酸欠乏にとどまらず、様々な栄養状態における miRNAs の発現変動やその生理学意義を蓄積していくことで、miRNAs を標的とした機能性食品の開発や創薬など、様々な領域での応用が可能であり、分子栄養学における miRNAs 研究の発展がますます期待される。

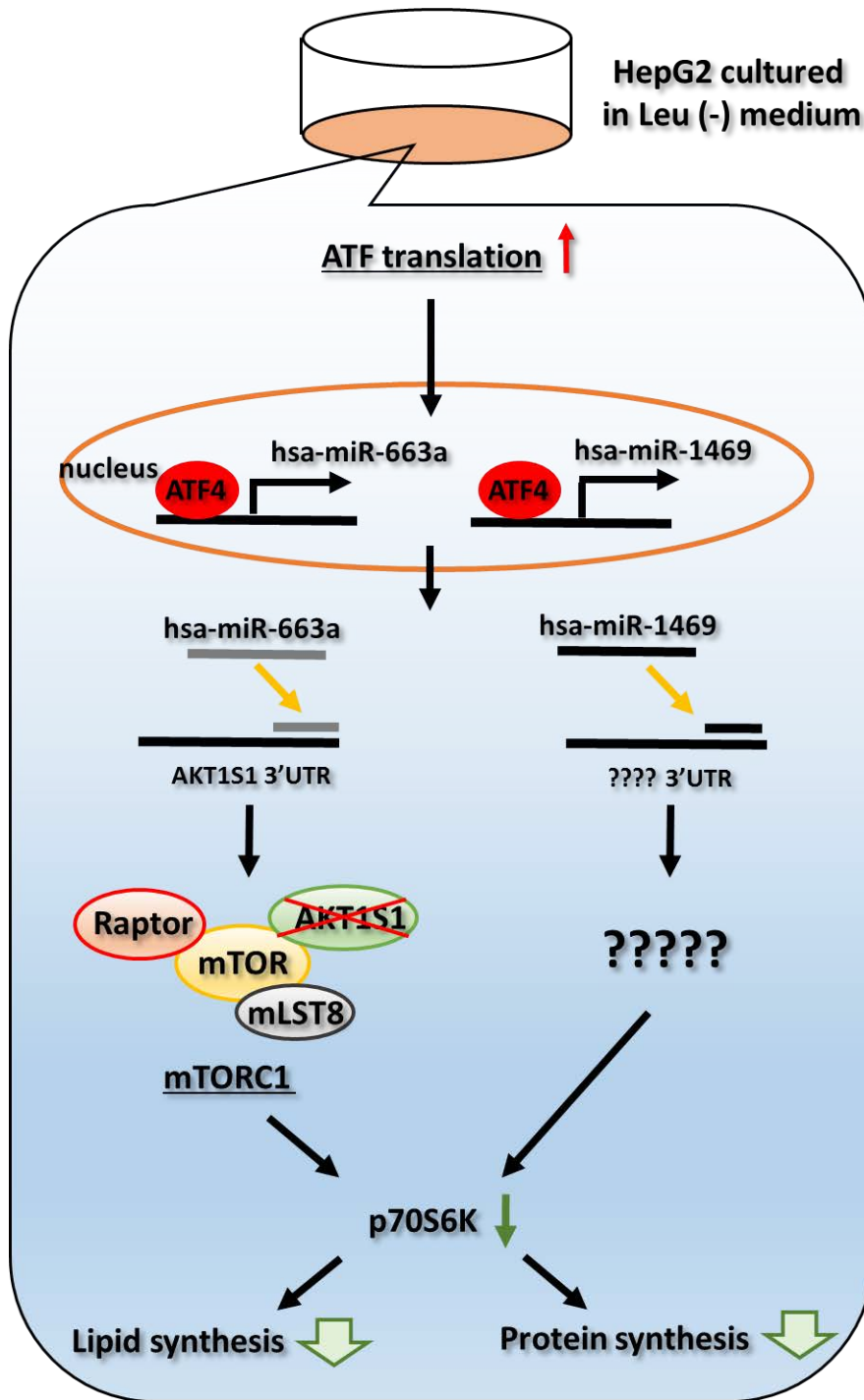


Fig. 4-1. 第二章で予想されたhsa-miR-663aとhsa-miR-1469の作用機序
 hsa-miR-663aとhsa-miR-1469はロイシン欠乏下で転写因子ATF4を介して発現上昇し、
 そのうちhsa-miR-663aはAKT1S1 (PRAS40)を標的としてmTORC1の活性低下を誘導する。
 hsa-miR-1469の標的は今回同定することができず、今後さらなる検討が必要である。

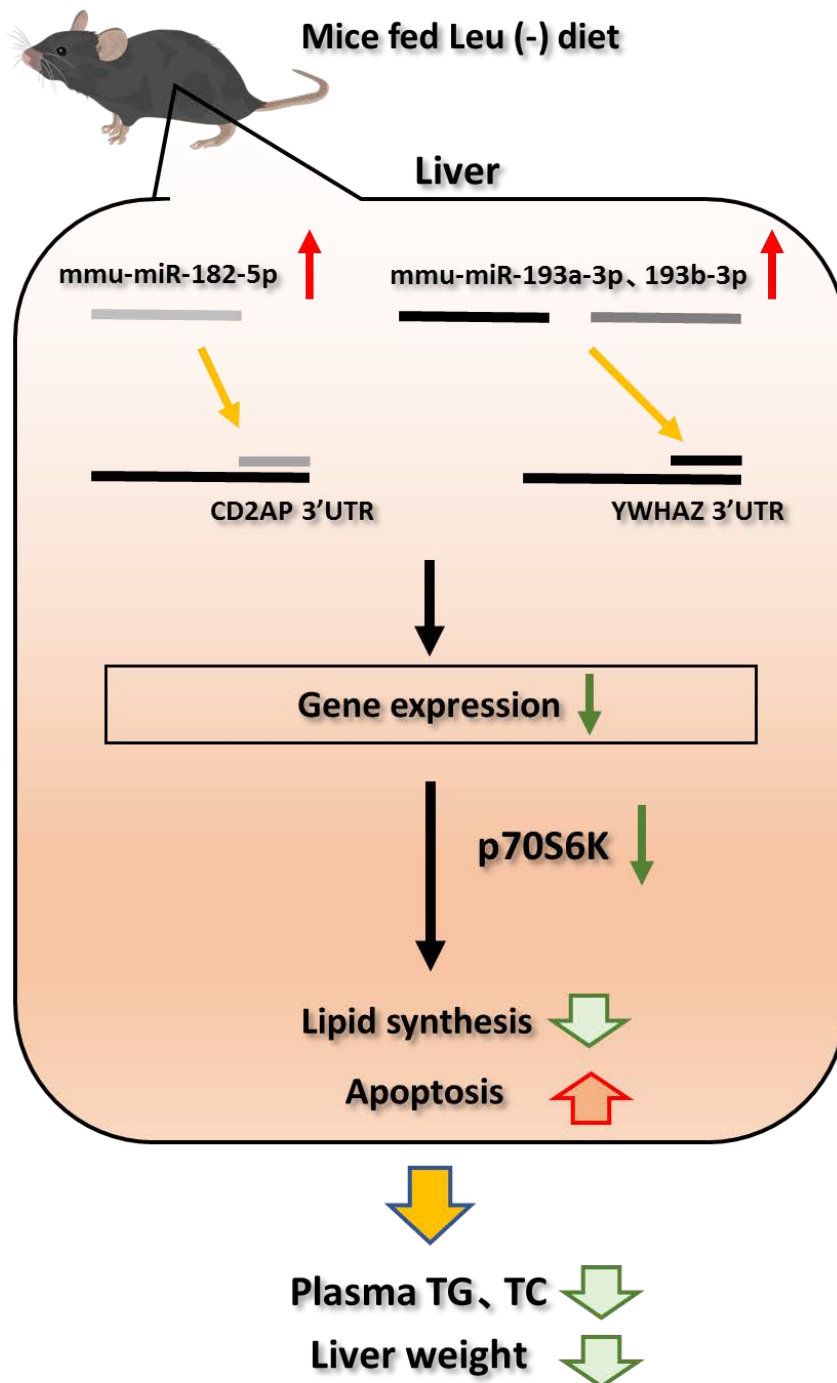


Fig. 4-2. 第三章で予想されたmmu-miR-182-5pとmmu-miR-193a-3p、mmu-miR-193b-3pの作用機序
 ロイシン欠乏食を給餌したマウス肝臓で発現上昇するmmu-miR-182-5pはCD2APを、
 mmu-miR-193a-3pおよびmmu-miR-193b-3pはYWHAZ (14-3-3ζ)を標的とすることで、最終的に
 p70S6Kリン酸化レベルの低下、その下流での脂質合成の低下や細胞死の活性化を誘導
 していると考えられる。しかしCD2APの作用機序の詳細など、今後さらなる検討が必要である。

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 micro-RNA 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., Zanasi, 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., McGeary, 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

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成 25 年度博士課程 進学
氏 名 山村 淳貴
指導教員名 加藤 久典

論文題目

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

背景と目的

microRNA (miRNAs)は、23-25 塩基長の小分子 non-coding RNA の 1 種であり、その 5'末端に位置する 6-8 塩基長の seed sequence と呼ばれる配列が標的遺伝子の mRNA の 3'非翻訳領域に作用することで、その分解や翻訳の抑制を誘導する事が知られている。

miRNAs は、現在では全遺伝子の半数以上の発現調節に関わると考えられており、注目を浴びている因子であるが、近年の研究によって癌や糖尿病、サルコペニアといった種々の病態において骨格筋や肝臓などの主要な臓器での発現が大きく変化することも見出されている。他方こうした疾患の発症機序の一因には、日々の食生活の乱れによる栄養不良があるとされているため、栄養状態によって発現変動する miRNAs が存在し、生体内で重要な役割を演じている可能性が高いが、分子栄養学研究における miRNAs の果たす役割を明らかにした研究事例は少ない。そこで本研究では、培養細胞および実験動物を利用して、肝臓において必須アミノ酸欠乏に応答して発現変動する miRNAs の網羅的探索およびその機能解析を行うことで、miRNAs の栄養情報伝達

因子としての新たな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

本章ではまず、3度の独立したマイクロアレイ解析によって、ヒト肝臓ガン細胞である HepG2 細胞において必須アミノ酸の1つであるロイシンの欠乏に応答する 12種の miRNAs を見出した。さらにこのうち最も発現変動が大きかった hsa-miR-1228-5p に着目し、標的遺伝子の探索手法の検討を行った。すなわち HepG2 細胞におけるロイシン欠乏下のトランスクリプトームの変化と hsa-miR-1228-5p の過剰発現時のトランスクリプトームの変化を比較し標的遺伝子候補を抽出する方法と、同条件におけるプロテオームの変化を比較し標的遺伝子候補を抽出する方法を比較検討した。プロテオーム解析には iTRAQ (Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation)法を用いた。しかしながら両者によって抽出された遺伝子を比較したところ、共通して発現減少を示していたものは極めて少なかった。また mRNA とタンパクの発現量に相関認められないものも比較的多かったことや、より表現型に近い因子で評価すべきという点から、マイクロアレイと比較して網羅性に劣るものの、現段階ではプロテオーム解析を中心に利用することが有効であると考えられた。

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

第一章ではロイシン欠乏に応答して発現上昇する 12種の miRNAs が見出された。こうした miRNAs がどのような機構を介して応答しているのかを明らかにすることを本章の目的とした。ATF4 は必須アミノ酸欠乏時に mGCN2 および eIF2 α の活性化により特異的に翻訳が活性化される転写因子であり、種々の遺伝子の発現を亢進することでこうした栄養飢餓への応答を誘導するが、この ATF4 によって制御を受ける miRNAs については今まで報告が無かった。そこで HepG2 細胞に対して ATF4 の過剰発現を施し、マイクロアレイ解析によって ATF4 によって制御される 203種の miRNAs を見出した。これと第一章で抽出した 12種の miRNAs を比較し、ロイシン欠乏下で ATF4 を介して発現上昇する miRNAs の候補として hsa-miR-663a および hsa-miR-1469 を見出した。両 miRNAs はロイシン欠乏下で時間依存的な発現上昇を示したほか、ATF4 をノックダウンするとこの発現上昇がキャンセルされること、両 miRNAs の host 遺伝子の転写開始点上流には、ATF4 の結合コア配列である AARE もしくは CRE 類似配列が保存されていたことから、両 miRNAs は ATF4 を介してロイシン欠乏に応答していると考えられた。第一章で得たプロテオーム解析結果を元にこれら miRNAs の標的遺伝子の探索を行ったところ、複数の標的候補遺伝子が抽出された。HepG2 細胞に対してこれら miRNAs の過剰発現を施し、標的タンパク発現量を評価したところ、hsa-miR-

663a が *AKT1S1* を標的としていることが明らかになった。また、両 miRNAs の過剰発現により、mTORC1 の下流因子の 1 つである p70S6K1 のリン酸化レベルの大幅な減少が認められた。ロイシン欠乏下の細胞では mTORC1 の活性が低下し、それに伴った脂質生合成活性、タンパク質生合成活性の低下やアポトーシス誘導が観察されることは広く知られているが、本章で得られた結果により、こうした現象に関する新たな経路を見出すことができた。しかし一方で今回の実験からは hsa-miR-1469 の標的遺伝子を見出すことが出来ず、網羅性の向上という課題が残る結果となった。

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

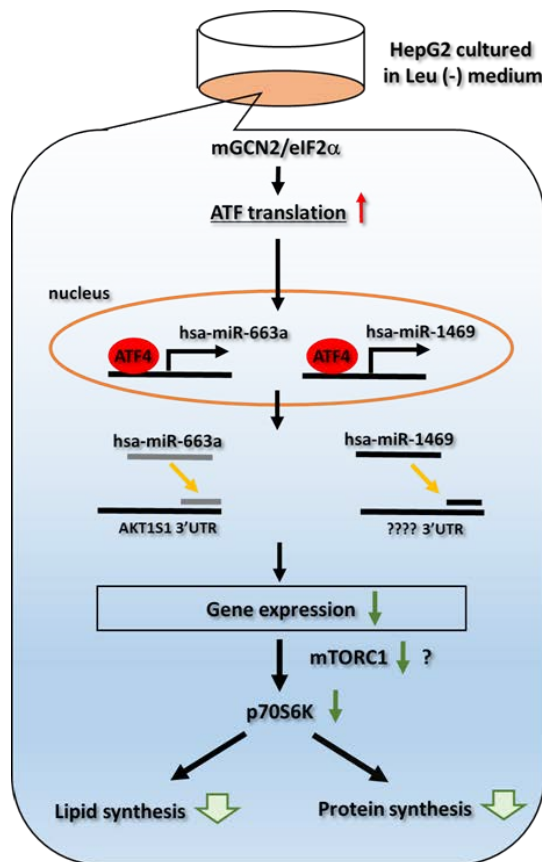
本章では動物モデルでの miRNAs の栄養伝達因子としての役割の検討を目的とした。ロイシン欠乏食を一週間給餌した C57BL/6J マウス肝臓において発現上昇する miRNAs をマイクロアレイ解析によって探索したところ、mmu-miR-182-5p、mmu-miR-193a-3p、mmu-miR-193b-3p が見出された。マウス肝臓のプロテーム解析結果をもとにこれら miRNAs の標的遺伝子候補を探索したところ、*CD2AP* および *YWHAZ* が見出された。各 miRNAs の機能解析として、マウス肝臓 AML12 細胞においてこれら miRNAs を過剰発現させたところ、*CD2AP* および *YWHAZ* のタンパク発現量の低下が認められ、実際に標的とされていることが確認できた。また p70S6K1 のリン酸化レベルの大幅な減少、さらに *SREBP1c* を始めとした脂質生合成関連遺伝子群の発現減少、アポトーシス関連遺伝子 *BCL2* の発現上昇が認められたほか、mmu-miR-193a-3p、mmu-miR-193b-3p の過剰発現時には広範な細胞死が観察された。ロイシン欠乏食給餌マウスにおいては血中トリグリセライド、コレステロール濃度の低下や肝臓重量の減少が観察されており、細胞分裂や脂質生合成の抑制が予想されていたが、本章の結果によりこうした表現型にこれら miRNAs の働きが関与していることが示唆された。

総括

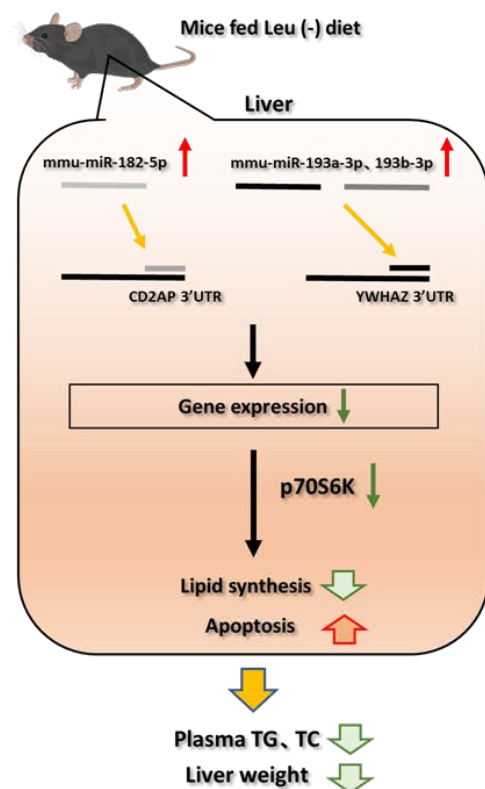
本研究では、必須アミノ酸であるロイシンの欠乏に応答して発現上昇する miRNAs の探索またその機能解析を培養細胞および実験動物を利用して検討した。その結果、どちらの実験モデルにおいても複数の miRNAs が応答し、標的遺伝子の発現を抑制することで mTOR シグナル系の抑制を誘導し、その結果脂質合成やタンパク合成の抑制、アポトーシスの活性化を引き起こしていることが明らかになった。またヒト培養細胞モデル (HepG2 細胞) での検討においては、転写因子 ATF4 を介したこれ miRNAs の発現制御機構も併せて明らかにすることが出来た。

本研究の成果により、アミノ酸栄養伝達機構の新たな経路として、miRNAs による遺伝子発現機構を提示することに成功した。今後様々な栄養条件に関してこうした知見を蓄積することで、分子栄養学における miRNA 研究領域の発展、また将来的には miRNAs を標的とした創薬や機能性食品開発に貢献出来ると考えている。

本研究で明らかにされたこと



第二章のまとめ



第三章のまとめ

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」の皆様のおかげによって、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