

## 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 $\alpha$ 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

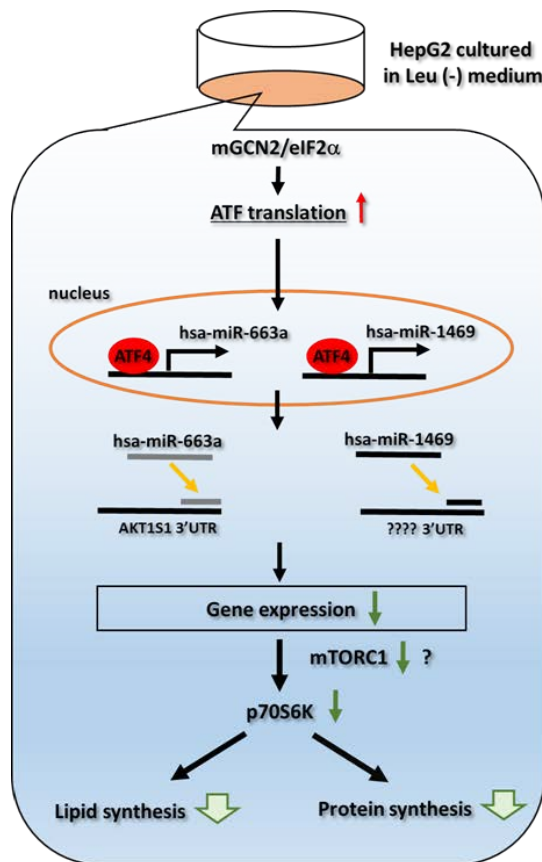
本章では動物モデルでの miRNAs の栄養伝達因子としての役割の検討を目的とした。ロイシン欠乏食を一週間給餌した C57BL/6J マウス肝臓において発現上昇する miRNAs をマイクロアレイ解析によって探索したところ、mmu-miR-182-5p、mmu-miR-193a-3p、mmu-miR-193b-3p が見出された。マウス肝臓のプロテーム解析結果をもとにこれら miRNAs の標的遺伝子候補を探索したところ、*CD2AP* および *YWHAZ* が見出された。各 miRNAs の機能解析として、マウス肝臓 AML12 細胞においてこれら miRNAs を過剰発現させたところ、*CD2AP* 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

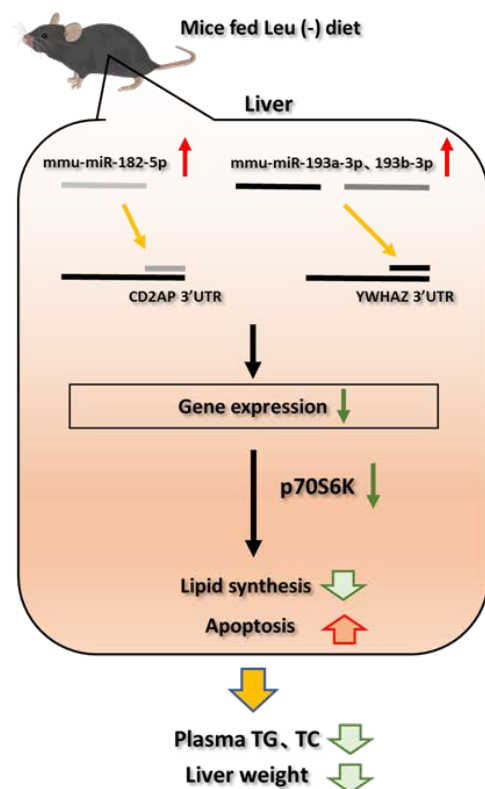
本研究では、必須アミノ酸であるロイシンの欠乏に応答して発現上昇する miRNAs の探索またその機能解析を培養細胞および実験動物を利用して検討した。その結果、どちらの実験モデルにおいても複数の miRNAs が応答し、標的遺伝子の発現を抑制することで mTOR シグナル系の抑制を誘導し、その結果脂質合成やタンパク合成の抑制、アポトーシスの活性化を引き起こしていることが明らかになった。またヒト培養細胞モデル (HepG2 細胞) での検討においては、転写因子 ATF4 を介したこれ miRNAs の発現制御機構も併せて明らかにすることが出来た。

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