

論文題目 腸管分化に関わる microRNA の探索とその発現制御解析

氏 名 日野 公洋

1.序論

microRNA (miRNA) とは細胞内在性の 21 塩基程度の機能性 RNA のことであり、部分的相補的な塩基認識を介して標的 RNA の翻訳抑制や不安定化を引き起こすことが知られている。miRNA は細胞分化や増殖、ガン化やアポトーシスなどに関与していることが報告されており、これら以外にも様々な細胞諸現象に関与していると考えられている。

miRNA は細胞内のゲノムにコードされており、primary-miRNA (pri-miRNA) と呼ばれる長い初期転写産物として転写される。この初期転写産物は mRNA と同様に 5'末端に cap 構造、3'末端に poly A 配列が付加されている。その後、種々のプロセッシングステップを経て 21 塩基程度の mature miRNA となり、miRNP と呼ばれる effector complex 内で標的 RNA 認識の guide RNA として機能する(Fig.1)。

現在、miRNA は human で 541 種類、mouse で 443 種類見つかっており (miRBase ver10.2 に登録されている miRNA 数)、それらは全遺伝子の 30%を制御しているとの予測もある。しかし、現状では未知の部分が多く、今後の解析が期待されている。

腸管上皮細胞は腸管の底部から絨毛先端に到達するまで 5 日程度と細胞の寿命が短いため、細胞増殖や分化に関する研究が非常に活発に行われている。miRNA 研究においても、腸管由来細胞株や腸管組織を用いた大規模 miRNA クローニングが行われており、腸管は多くの miRNA が報告されている組織の 1 つとなっている。しかし、それらのデータは組織としての発現プロファイルを与える一方、組織内のどの細胞で発現しているかという部位的な情報や、どういう時期に発現変化が起こるかという時期的な情報を示してはいない。そのため、miRNA が発現している細胞の同定、分化やガン化などの細胞形質の変化に伴う miRNA の発現解析を行うことは miRNA の機能解析に重要な示唆を与えるものと考えられる。

ヒト大腸ガン由来細胞株である Caco-2 細胞は、分化誘導によって小腸吸収上皮細胞の形質を獲得することが知られており、in vitro での吸収上皮細胞分化メカニズムの解析や、薬物吸収テストなどに用いられている。腸管上皮細胞は組織からの精製、培養が困難であるため、Caco-2 細胞を用いた in vitro 分化誘導系は腸管分化のメカニズムを解明する上で非常に重要な系となっている。

我々は、Caco-2 細胞を用いた in vitro 分化誘導系を用いて、腸管上皮細胞分化に関わる miRNA の探索とその発現制御解析を行った。腸管分化に関与する miRNA の報告は未だに無く、腸管分化時に発現量の変化する miRNA を探索、同定することは腸管分化のメカニズムに新たな視点を導入することになると考えている。

2.方法・結果

Caco-2 分化誘導系による吸収上皮細胞分化を確認するため、吸収上皮細胞の分化マーカーとして知られている Lactase phlorizin hydrolase(LPH)、Sucrase-Isomaltase(SI)の発現量変化を RT-PCR を用いて検出した (Fig.2A)。分化誘導が確認された試料を用いて、吸収上皮分化誘導前後の Caco-2 細胞間での miRNA の発現量変化を TaqMan miRNA assay kit を用いて定量した。Caco-2 分化誘導系において、多くの miRNA がその発現量を変化させることが分かったが、我々はそれらの中から、分化後 Caco-2 細胞内で特に高い intensity を示し、分化誘導において高い発現誘導性を示す miR-194 に注目した (Fig.2B)。

腸管上皮細胞は crypt 底部から絨毛の先端に向かって細胞分化が階層的に進むことが知られている (Fig.3A)。Caco-2 細胞分化誘導系において発現上昇を示す miR-194 が、in vivo において発現上昇を示すかどうかを検討するため、miR-194 の発現分布を in situ hybridization (ISH) を用いて観察した (Fig.3B) その結果、miR-194 は分化した上皮細胞特異的に発現を示すことが明らかになった。以上から培養細胞系、in vivo の両解析において分化した腸管上皮細胞特異的発現が観察されることから、miR-194 は腸管上皮細胞の分化、成熟に何らかの関わりを持っているのではないかと考えた。

miR-194 はヒトゲノムでは 1 番染色体上に miR-194-1 が、11 番染色体上に miR-194-2 がコードされている (Fig.4A. mature miRNA は全く同一の塩基配列)。Caco-2 細胞分化誘導系において、どちらが分化誘導による mature miR-194 の発現誘導に寄与しているのかを検討するため、RT-PCR を用いて pri-miRNA の定量を行った (Fig.4B)。その結果、miR-194-1、miR-194-2 共に分化誘導により発現上昇が起こることが明らかになった。しかし、miR-194-2 の方がより強い発現誘導を受けていることから、ゲノム上に 2 カ所ある miR-194 gene のうち、miR-194-2 に注目することにした。

初めに、miR-194-2 がどのような機構で発現が制御されているかを解析するために、RACE 法を用いて pri-miR-194-2 の遺伝子構造を決定した (Fig.5)。我々が決定した遺伝子構造から、miR-194-2、miR-192 は intron 上にコードされた intronic miRNA であり、その host RNA はタンパクをコードしていない non-coding RNA であることを示した。

続いて、pri-miR-194-2 の転写制御機構を解析するため、転写開始点近傍領域を Luciferase 遺伝子上流に組み込み、dual luciferase reporter assay を用いて promoter 領域の同定を行った (Fig.6)。組み込んだ転写開始点近傍領域の deletion analysis から、部分的に保存された領域を含む -162~+21 の領域に十分な promoter 活性があることを確認し、その領域中の -70~-52 領域に特に重要な配列を含むことが mutation analysis により明らかになった。この -70~-52 領域に結合する転写因子を motif search を用いて探索したところ、この領域に腸管特異的遺伝子の発現を制御している Hepatocyte nuclear factor-1 alpha (HNF-1 α) の結合配列が含まれていることが分かった。HNF-1 α はホメオボックスを持つ転写因子であり、腸管においては Caco-2 の分化誘導の際に分化マーカーとして使用した LPH や SI などの小腸特異的遺伝子群の発現を制御していることが知られている。

HNF-1 α が pri-miR-194-2 の転写制御を行っているかどうかを検討するために、pri-miR-194-2 promoter reporter と HNF-1 α を co-transfection することで、pri-miR-194-2 promoter の転写活性が上昇することを確認した (Fig.7A)。また、HNF-1 α の推定結合領域である-70~-52 領域を欠失、もしくは変異させた pri-miR-194-2 promoter 変異体では HNF-1 α の過剰発現による転写活性の上昇が観察されなくなることを確認した。以上から、pri-miR-194-2 promoter の-70~-52 領域に過剰発現させた HNF-1 α が結合し、その転写を制御しているのではないかと考えられる。

さらに内在性の HNF-1 α が miR-194-2 promoter に結合しているかどうかを検討するため、Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) assay を行い、抗 HNF-1 α 抗体で特異的に免疫沈降されたクロマチンに pri-miR-194-2 promoter 領域が濃縮されていることを確認した (Fig.7B)。以上から、腸管特異的遺伝子群を制御していることで知られる HNF-1 α が、腸管上皮細胞で発現している miR-194 の発現も制御していると考えられる。

最後に腸管上皮細胞分化において発現誘導の起こる miR-194 がどのような機能をもっているのかを検討するため、luciferase reporter を用いた miR-194 の標的遺伝子評価実験を行った。その結果、検討を行った 10 種の遺伝子のうち 4 種の遺伝子の 3'UTR が、miR-194 の標的となり得ることを明らかにした。

3.結論

我々は腸管上皮細胞の分化に関わる miRNA の探索を行い、興味深い miRNA として miR-194 を同定し、その発現制御メカニズムについて解析を行った。さらに miR-194 が標的として発現制御し得る候補遺伝子を 4 種同定した。

我々の成果は腸管上皮細胞分化における miRNA による発現制御機構の存在を示唆すると共に、腸管上皮細胞分化における miRNA の役割の一端を明らかにした重要な知見であると考えている。

Figure.1

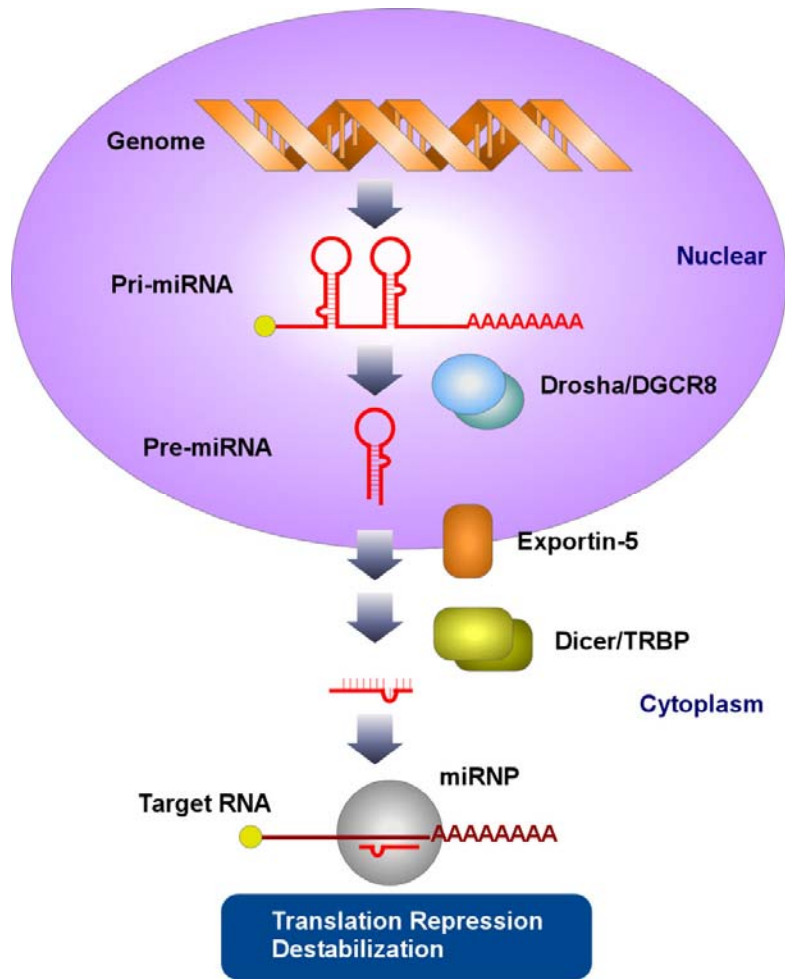


Figure.2

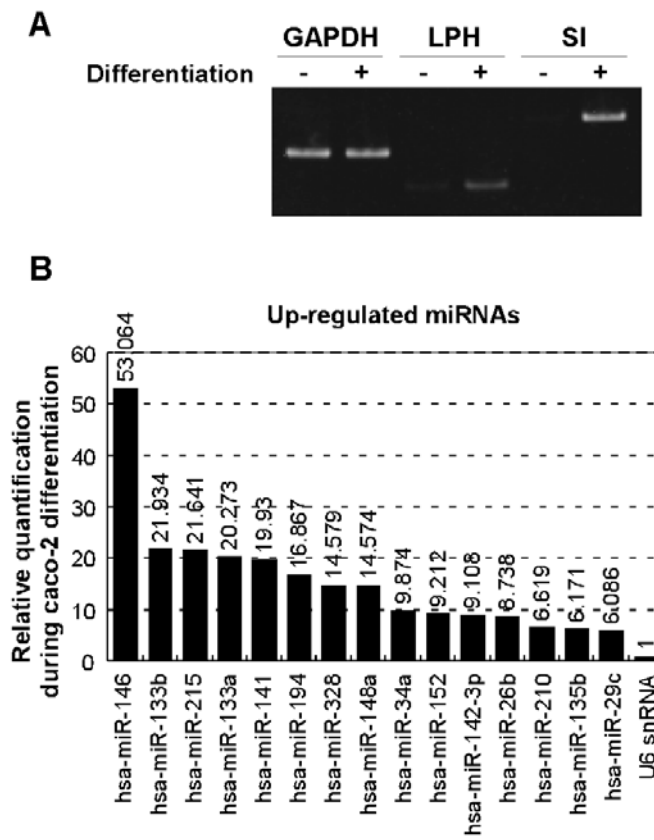


Figure.3

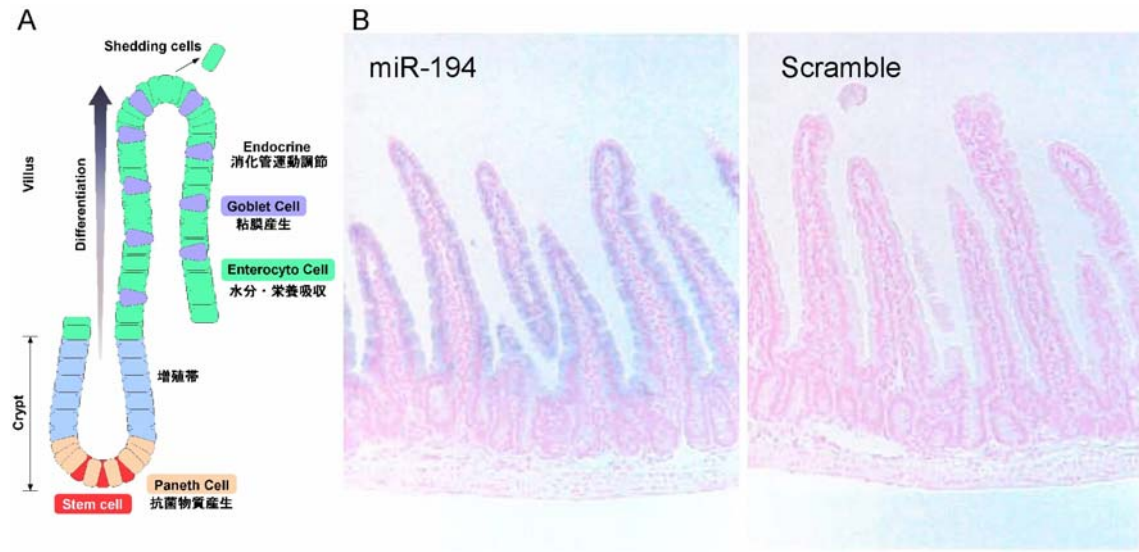
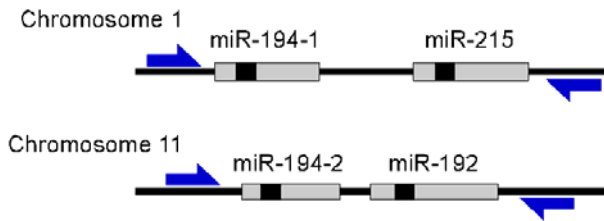


Figure.4

A



miR-194 UGUAACAGCAACUCCAUGUGGA
miR-192 CUGACCUAUGAAUUGACAGCC
miR-215 AUGACCUAUGAAUUGACAGAC

B

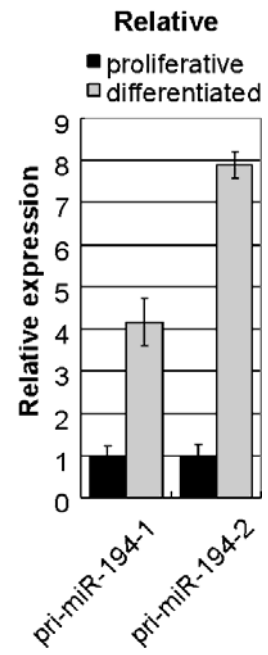


Figure.5

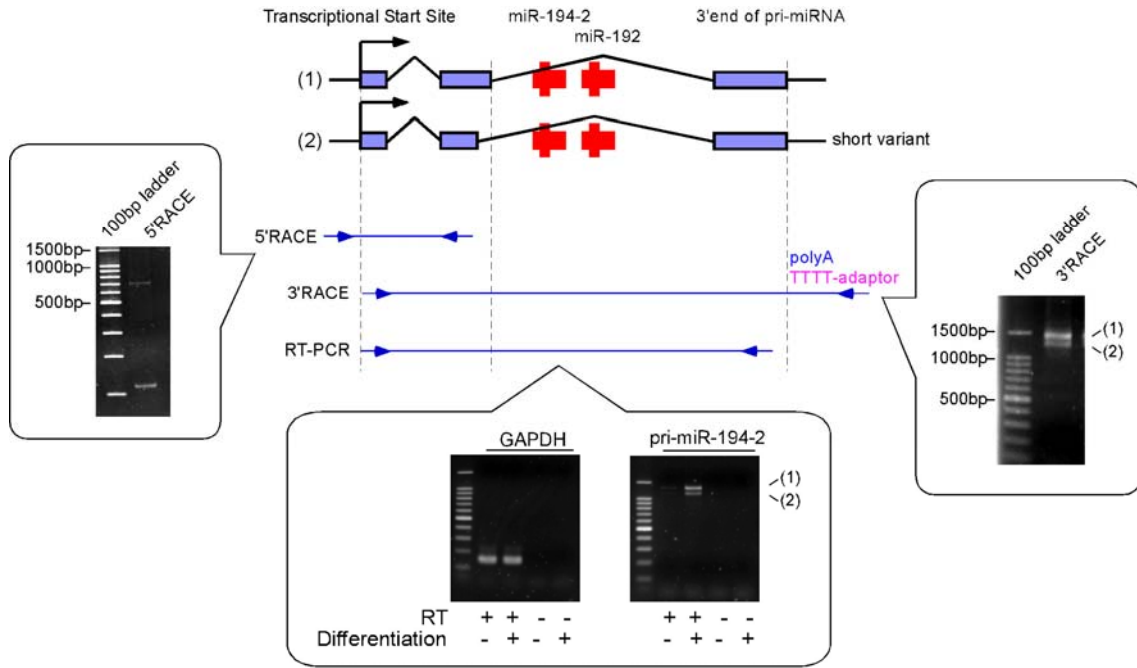


Figure.6

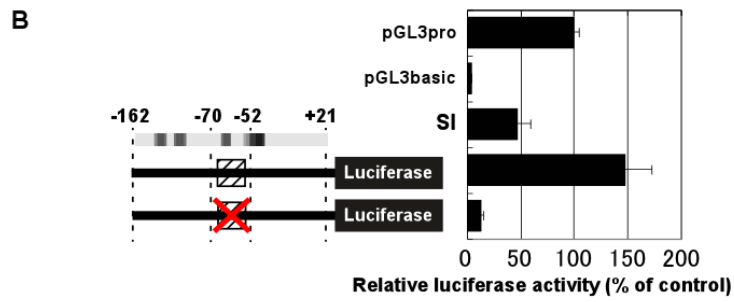
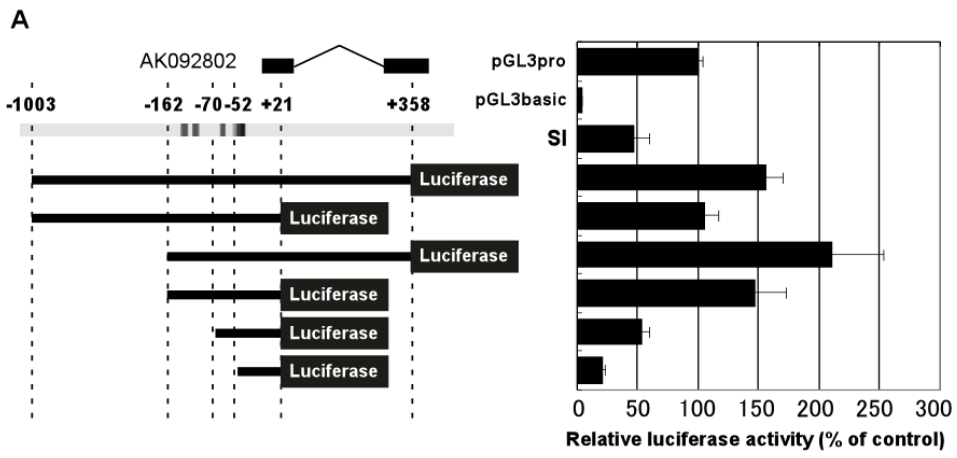
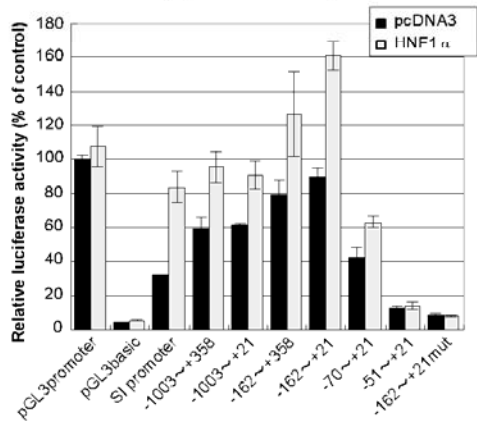
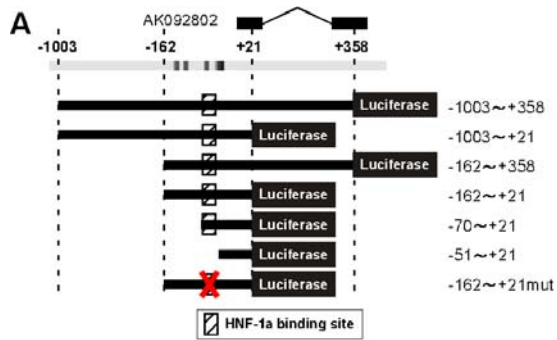


Figure.7



B

