

論文の内容の要旨

miR-199a が形成する遺伝子制御ネットワークの解析

指導教員 伊庭 英夫 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 18 年 4 月入学

医学博士課程

病因病理学専攻

氏名 櫻井浩平

背景と目的

microRNA は、植物、線虫、脊椎動物など幅広く存在する 21~25 塩基程度のノンコーディング RNA であって標的遺伝子 mRNA の 3'UTR 内の相補配列に結合し、翻訳抑制あるいは mRNA の分解を引き起こすことにより遺伝子の転写後抑制を行う。脊椎動物の microRNA ではこの相補性に多少のミスマッチが許容され、主として翻訳抑制を行っていると考えられる。

microRNA 遺伝子は、まず RNA ポリメラーゼ II によって pri-miRNA へと転写され 5'端には cap 構造、3'端にはポリ A が付加される。pri-miRNA は細胞核内で Drosha によってヘアピン領域が切断された後に、pre-miRNA へとプロセシングされる。pre-miRNA は細胞質へと輸送され Dicer により切断された後に成熟 microRNA となり、RISC (RNA induced silencing complex) に取り込まれてその機能を発揮する。

ヒトがんを中心とした疾患において複数種の *microRNA* の発現異常が報告されているが、発現異常の原因については不明なことが多い。その原因の一つは *microRNA* 遺伝子のプロモーターの同定や構造の決定が充分になされていない点にある。そこで我々の研究室では脊椎動物間で保存されている *microRNA* について、プロモーター領域をゲノムワイドに予測するアルゴリズムの開発を行い、多くの *microRNA* プロモーター (miPPRs : promoter regions of miRNAs) を予測した。その中で miPPR21 が実際に *miR-21* のプロモーターであり、これが転写因子 AP-1 による制御を受けることを報告した。miR-21 は多くのがん組織でその発現が上昇することが知られているが、これはがん部では一般に内在性の AP-1 も活性化されていることを反映していると考えられる。

本研究ではがん等の疾患において特異的な発現異常を示す miR-199a に注目した。これは 19 番染色体の *miR-199a-1* と 1 番染色体の *miR-199a-2* の 2 つの染色体座から産生されるが、どちらの pri-miRNA もプロセッシングされた後、多くの場合ほぼ同量の miR-199a-5p と miR-199a-3p の 2 つの成熟 *microRNA* が生成されることが考えられている。*miR-199a-1* 近傍には EST の存在は認められないが、我々のアルゴリズムにより予測した *miR-199a-2* のプロモーター miPPR199a-2 近傍には EST が存在することから、*miR-199a-2* は様々な状況で活発に転写されていることが予想される。生成された miR-199a-5p, -3p はそれぞれ生理学的に重要な標的遺伝子を持ち、がんの進展に関与することが示唆されている。そこで本研究では *miR-199a-2* 遺伝子の発現制御機構および miR-199a の標的遺伝子を明らかにし、miR199a が形成する遺伝子制御ネットワークを解析することにした。またホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて *in situ* hybridization 法を行い、miR-199a を *in situ* hybridization 法で検出することにより正常上皮とがんにおける miR-199a の発現様式を明らかにす

ることを目指した。

結果と考察

・ miR-199a-2 のプロモーターの同定とその解析

miR-199a-5p の発現が高い SW13(vim-)細胞と発現が低い MDA-MB435 細胞を用いて、miR-199a-2 の転写開始点を RT-PCR 法およびプライマーエクステンション、ダイデオキシシーケエンシングにより解析したところ、SW13(vim-)細胞において、miPPR199a-2 内に転写開始点を同定した。

ヒトの miPPR199a-2 内には、E-box 配列、AP-1、NFkB、HIF-1 α 及び Egr1 結合配列などが予測された。この中で Egr1 結合配列が 3 つ点在していて、MDA-MB435 細胞を用いて Egr1 を過剰発現すると miR-199a-5p の発現が誘導され、SW13(vim-)細胞で Egr1 をノックダウンすると miR-199a-5p の発現が低下したことから miR-199a-2 の主要転写制御因子として Egr1 に注目した。

miR-199a-2 プロモーター領域を *Luciferase* 遺伝子に接続したレポータープラスミドを作製し MDA-MB435 細胞に導入したところ、Egr1 発現ベクターの容量依存的にそのレポーター活性が上昇した。3 ヶ所の Egr1 結合部位のおののにおに変異を導入した一連の変異体レポーターの解析から、TATAbox と転写開始部位近傍に位置するもっとも下流の Egr1 結合部位がこの誘導と basal level で発現に必須であることが示された。また SW13(vim-)細胞において、この結合予測部位近傍に Egr1 が動員されていることがクロマチン免疫沈降実験により示された。種々のがん細胞株における miR-199a-5p, -3p と *Egr1* の発現様式は正に相関しており、多くの細胞種で内在性の Egr1 により miR-199a-2 の転写が行われていると考えられる。

・ miR-199a-5p および-3p の新規標的遺伝子の同定

miR-199a-5p と miR-199a-3p の新規標的遺伝子を同定するため、microRNA の標的遺伝子を予測する既存のアルゴリズムである PicTar、TargetScan を用いて検索したところ、Brm が miR-199a-5p、-3p 両者の有力な標的遺伝子となっていた。Brm はクロマチン構造変換因子 SWI/SNF 複合体の触媒サブユニットであり様々な遺伝子のプロモーター上に動員され転写制御を行う。Brm はエピジェネティカルに極めて広汎な転写制御を行うため、様々な遺伝子群に大きな影響を及ぼすことが予想される。また我々の研究室ではこれまでに多くのがん細胞株で Brm の発現は転写後レベルで制御されることを示していることから、この標的候補遺伝子に注目した。

miR-199a-5p/-3p 発現ベクターを利用して MDA-MB435 細胞に miR-199a-5p および-3p を発現誘導させると、Brm タンパクの発現が低下した。また我々の研究室では microRNA の機能を特異的に抑制するデコイ RNA (TuD RNA) を発現するベクターの開発に成功しているので、これを用いて TIG3 細胞で miR-199a-5p あるいは-3p の機能を抑制すると、Brm タンパクの発現が上昇した。さらに Brm の 3'UTR をルシフェラーゼ遺伝子の下流につなげたレポータープラスミドと miR-199a-5p/-3p 発現ベクターをトランスフェクションしたところ、miR-199a-5p と-3p の結合予測部位の両方に変異を導入した場合にレポーター活性が上昇した。以上の結果により miR-199a-5p および-3p は Brm を標的とすることが示された。

・ miR-199a、Egr1、Brm が形成する遺伝子制御ネットワークの解析

複数のがん細胞株における Brm、Egr1、miR-199a-5p、-3p の発現様式を比較

検討したところ、Brm 欠失細胞株では *Egr1*、miR-199a-5p、-3p の発現は高く、Brm 発現細胞株では *Egr1*、miR-199a-5p、-3p の発現は低い傾向があった。そこで「Brm が *Egr1* の転写を抑制することにより、その下流の miR-199a-2 の転写をも低下することを反映している」という作業仮説を立て、これを検証することにした。

SW13(vim-)細胞に Brm を発現誘導させると *Egr1* の発現は低下し、miR-199a-5p の発現も低下した。MDA-MB435 細胞で Brm をノックダウンすると *Egr1* の発現は上昇し、同時に miR-199a-5p の発現も上昇した。そこで *Egr1* 遺伝子のプロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子上流につないだレポータープラスミドを作製し MDA-MB435 細胞にトランスフェクション後、ルシフェラーゼ遺伝子の安定発現株を取得し、この安定発現株で Brm をノックダウンすると、レポーター活性が上昇した。またクロマチン免疫沈降実験により MDA-MB435 細胞において内在性の Brm が *Egr1* プロモーターに動員されていたことから、Brm は *Egr1* の転写を負に制御してその下流の miR-199a-5p の発現も低下する可能性が示唆された。

miR-199a-5p、-3p の生体内における発現様式を明らかにするために、ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて *in situ* hybridization 法により検出したところ、食道扁平上皮がんの浸潤部において miR-199a-5p、-3p の発現は正常上皮に比べ低下していた。また連続切片を用いて *Egr1* と Brm の発現を免疫染色により検出したところ、*Egr1* は miR-199a-5p、-3p 同様に正常上皮に比べ浸潤部で発現低下していたが Brm の発現は高く、がん細胞株における発現様式がヒト食道扁平上皮がんにおいても認められた。

本研究により miR-199a-2 の発現は *Egr1* によって制御されること、miR-199a-5p および-3p は Brm を標的とすることが示された。また Brm は *Egr1*

プロモーター上に動員されこの遺伝子の転写を抑制することにより miR-199a-2 の転写も低下させることが示唆された。これは、miR-199a、Egr1、Brm の 3 因子のみが主体となり形成されるものではないものの、他の制御因子も含めた遺伝子制御ネットワークががんにおいて働くことが考えられる。