

論文の内容の要旨

論文題目 骨格筋可塑性制御における miR-23 の機能とその転写調節機構の解析

氏名 和田 正吾

背景と目的

骨格筋は動物における能動的な身体運動に与る器官である。骨格筋は運動によるメカニカルストレスや諸々の環境要因を感知して、適応を図る可塑性を有している。骨格筋の可塑性は量的な可塑性と機能的な可塑性に区分できる。

筋の量的な可塑性とは、骨格筋の肥大と萎縮である。骨格筋の肥大はその機能的側面から好ましい変化であるが、骨格筋の萎縮は種々の疾病に伴って進行し、ヒトの身体運動機能を低下させることからその抑制が求められる。筋の肥大と萎縮は、骨格筋線維内のタンパク質合成と分解のバランスによって制御される。PI3K-Akt シグナルによって亢進するタンパク質合成は筋肥大を誘導する。一方、筋萎縮では、筋特異的ユビキチンリガーゼ Atrogin-1 と MuRF1 が制御するユビキチン-プロアソーム経路に依存的なタンパク質分解が重要な役割を担う。

持久性運動によって骨格筋の疲労耐性が向上することは広く知られている。筋の運動適応においては、筋の量的な可塑性に加え、機能的な可塑性、すなわち筋収縮代謝特性の可塑性が重要な役割を担っている。骨格筋を構成する筋線維はその収縮代謝特性によって、遅筋線維と速筋線維とに区分される。遅筋線維はゆっくりとした収縮特性を持ち、酸化的代謝に優れる。一方、速筋線維は速い収縮特性を持ち、解糖的代謝が優位である。持久性運動を行うと、遅筋線維が増加し、筋の疲労耐性や酸化的代謝能力が向上する。筋線維の収縮特性は発現するミオシン重鎖のアイソフォームによって制御され、代謝特性はミトコンドリア量によって制御される。

このように骨格筋可塑性は、筋線維の構造と機能のダイナミックな変化によって保障され、これは広範な遺伝子の発現が統合的に制御されることによって達成されている。これまでの研究により、骨格筋可塑性制御にとってボトルネックとなるいくつかの分子の存在が明らかにされてきた。骨格筋可塑性に関与する多くのシグナル伝達経路は、これらの分子に集約され、遺伝子群の発現変化が惹起されることで、骨格筋可塑性が制御されるというモデルが提唱されている。

近年の研究技術の革新によって、ゲノムの大部分が RNA に転写され、さらに、多様な転写産物の大部分はタンパク質をコードしない non-coding RNA であることが明らかとなった。このうち~22 塩基からなる低分子 non-coding RNA の一種である microRNA (miRNA) は、遺伝子発現の抑制機構として、その機能的な重要性が注目を集めてきた。miRNA は、特定の mRNA の 3' 非翻訳領域 (3' untranslated region: 3'UTR) に対する部分的な配列相補性を介してこれらと相互作用し、その発現を抑制する。miRNA はこれまでに発生、病態など様々な生命現象への関与が報告されており、その重要性は広く知られている。筋においても、筋特異的 miRNA を始めとして複数の miRNA が筋の発生やストレス応答などへ関与することが報告されている。また、一部の miRNA は遅筋と速筋で発現パターンが異なり、それらが骨格筋可塑性制御に重要な役割を持つことが報告されている。

本研究では、骨格筋可塑性を制御する新しいメカニズムとして miRNA による遺伝子発現制御に着目し、その機能解析を行った。まず、マイクロアレイ解析により、miRNA の発現パターンを遅筋と速筋で比較した。その結果、miR-23a および miR-23b を含む複数の miRNA が遅筋優位に発現することが明らかとなった。miR-23 は骨格筋における機能解析の報告がない miRNA であり、かつ骨格筋可塑性制御に重要な複数の分子をターゲットしていることが示唆された。本研究では miR-23 の骨格筋可塑性制御における機能を解析することを目指した。

結果および考察

miR-23a と筋萎縮抵抗性

miR-23 がターゲットする mRNA についてデータベース検索した結果、筋特異的ユビキチンリガーゼ Atrogin-1, MuRF1 がそのターゲット候補として検出された。miR-23 がこれらユビキチンリガーゼの発現を抑制するのであれば、miR-23 は筋萎縮抵抗性を誘導する機能を持つと予想された。始めに Atrogin-1, MuRF1 の 3' UTR に存在する miR-23 のターゲットサイト配列を組み込んだレポーターベクターと miR-23a 発現ベクターを細胞に導入し、そのレポーター活性を解析した。その結果、miR-23a はターゲットサイト依存的に Atrogin-1, MuRF1 遺伝子の発現を抑制する可能性が示唆された。また、骨格筋培養細胞およびマウス骨格筋へ miR-23a 発現ベクターを導入したところ、miR-23a は糖質コルチコイドによる筋萎縮を抑制した。Atrogin-1, MuRF1 の

発現ベクターを miR-23a 発現ベクターとともにマウス骨格筋へ導入した実験により、miR-23a は両遺伝子の 3' UTR 依存的に筋萎縮を抑制することが示された。次に miR-23 と筋萎縮抵抗性の関係について、miR-23a トランスジェニック (Tg) マウスの作出を通じて検討した結果、miR-23a は筋萎縮抵抗性を誘導しうることが明らかとなった。

miR-23a と骨格筋代謝特性の可塑性

PGC-1 α はミトコンドリア量の調節に必要な転写調節因子のコアクチベーターとして機能し、筋代謝特性の可塑性制御において中心的な役割を担う。データベース検索の結果、PGC-1 α の 3' UTR には miR-23 のターゲット配列が複数存在することが分かった。miR-23a Tg マウスの骨格筋を解析した結果、miR-23a は遅筋特異的に PGC-1 α の発現を抑制し、ミトコンドリア量の減少をもたらすことが示された。そこで、筋の運動適応における miR-23a の機能を検討するため、miR-23a Tg マウスを自発走運動に供した。miR-23a Tg マウスの遅筋では、自発走運動後も依然として PGC-1 α の発現が野生型マウスに比べて低く、かつミトコンドリア量も低下したままであった。一方、miR-23a Tg マウスの速筋では、自発走運動後、適応的に PGC-1 α の発現とミトコンドリア量が増大し、その程度において野生型マウスとの間に有意な差は認められなかった。ゆえに、miR-23a による PGC-1 α の発現制御とミトコンドリア量調節は遅筋に特有のメカニズムである可能性が示唆された。次に、ミオシン重鎖アイソフォームの発現パターンを指標に、miR-23a Tg マウスの筋収縮特性の可塑性を解析した。その結果、miR-23a Tg マウスの骨格筋では自発走運動後、適応的に遅筋線維の割合が増大しており、野生型マウスとの間に有意な差は見いだされなかった。ゆえに miR-23a は、筋収縮特性の可塑性制御には関与しないことが示された。

miR-23a クラスターならびに miR-23b クラスターの転写制御

miR-23 には、miR-23a と miR-23b のアイソフォームが存在する。それぞれの miR-23 は miR-27、miR-24 とクラスター (miR-23 クラスター) を構成し、これら三つの miRNA は共通の転写産物からプロセッシングを経て発現する。miR-23 クラスターの miRNA はいずれも遅筋優位な発現パターンを示したことから、これらの転写産物の発現量を遅筋と速筋において比較した。その結果、miR-23a と miR-23b クラスターはともに転写レベルで遅筋優位な発現パターンを示すことが明らかになった。そこで両 miR-23 クラスターのプロモーター解析を通じて、その遅筋優位な転写制御機構について検討した。

miR-23a クラスターのプロモーター領域は先行研究により同定されていたが、miR-23b クラスターのプロモーター領域の解析は十分に行われていなかった。miR-23b クラスターは、2010111I01Rik-201 (Rik-201) の第 15 イントロンにコードされていることが報告されていたため、その転写は Rik-201 の転写に依存するものと考えられた。Rik-201 の転写動態を解析した結果、

Rik-201 の第 11 エクソン上流に新規プロモーター領域 (ExP) が見いだされ、これが骨格筋において Rik-201 の主要な転写を担うと考えられた。miR-23a クラスターのプロモーターレポーターベクターおよび Rik-201 の ExP レポーターベクターを遅筋および速筋に導入したところ、両プロモーターレポーターはともに遅筋優位な転写活性を示した。プロモーターレポーターの欠損型変異体を用いた解析の結果、miR-23a クラスターのプロモーターについては上流 130b 以内に遅筋優位な転写を制御する領域が存在することが示唆された。一方、Rik-201 ExP の遅筋優位な転写活性は、Sp1/KLF family 転写調節因子が結合する CACC box によって制御されていることが明らかになった。

また、miR-23b クラスターは骨格筋分化に伴い発現が増大した。RT-PCR により miR-23b クラスターの転写動態を解析した結果、筋分化に伴い Rik-201 に依存しない転写産物 (pri-miR-23b) の発現が強く誘導されていた。その際、pri-miR-23b は miR-23b クラスターがコードされている Rik-201 の第 15 イントロン内に存在する新規プロモーター領域 (IntP) によって転写調節される可能性が示唆された。IntP レポーターの欠損型変異体を用いた解析の結果、筋分化に伴う IntP の転写活性の増大は MyoD による制御を受けている可能性が示唆された。