

審査の結果の要旨

氏名 和田 正吾

本研究は遅筋優位な発現パターンを示す microRNA (miRNA)、miR-23 に着目して、その骨格筋可塑性制御における機能と転写調節機構について解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 遅筋-速筋間において発現レベルの異なる miRNA をマイクロアレイ解析によって網羅的にスクリーニングし、miR-23 およびそのクラスターmiRNA が遅筋優位な発現を示す miRNA であることを見いだした。
2. 筋萎縮の原因遺伝子として知られる筋特異的ユビキチンリガーゼ Atrogin-1 および MuRF1 の 3' 非翻訳領域 (3' UTR) に miR-23 のターゲット配列が存在することを見いだした。それぞれのターゲット配列をルシフェラーゼ ORF 下流にサブクローニングしたレポーターを用いて、miR-23 の発現が各ターゲット配列依存的にレポーター活性を低下させることを示した。さらに、miR-23 が両遺伝子のタンパク質発現をそれぞれの 3' UTR 依存的に抑制することを示した。
3. miR-23 の強発現が筋萎縮を抑制することを、デキサメタゾンを用いた *in vitro* の筋萎縮モデルで示した。また、Atrogin-1 と MuRF1 の強発現ベクターを生体骨格筋に導入した場合に誘導される筋萎縮を miR-23 の強発現が抑制し、更にその機構が両遺伝子の 3' UTR 依存的であることを示した。
4. miR-23 トランスジェニックマウスを作成し、これが複数の筋萎縮モデル (デキサメタゾン投与、除神経) に対して筋萎縮抵抗性を示すことを見だし、miR-23 が *in vivo* においても筋萎縮を抑制する機能を持つことを示した。
5. 骨格筋代謝特性の制御キー遺伝子である PGC-1 α の 3' UTR に、miR-23 のターゲット配列が複数存在することを見だし、このターゲット配列依存的に miR-23 が PGC-1 α の発現を抑制しうることをレポーター実験によって示した。
6. miR-23 トランスジェニックマウスの遅筋特異的に PGC-1 α とミトコンドリア関連遺伝子の発現が低下することをウェスタンブロットにより確認し、miR-23 が遅筋特異的なミトコンドリア量抑制因子として機能しうることを見いだした。
7. miR-23 およびそのクラスターmiRNA が遅筋優位な発現パターンを示すメカニズムを解析した。miR-23 は miR-27, 24 とともにクラスターを構成し、さらにほ乳類においては、miR-23a,

b クラスターが存在する。両クラスターの一次転写産物がともに遅筋優位な発現を示したことから、転写レベルの調節が miR-23 の遅筋優位な発現パターンを規定するものと考えられた。そこで、プロモーターレポーターアッセイによって miR-23 の転写調節機構を解析した。miR-23b クラスターは機能未知の遺伝子 2010111I01Rik-201 (Rik-201) の第 15 イントロン内にコードされ、その転写を一部宿主遺伝子に依存する。そこで、Rik-201 の新規プロモーター領域 (ExP) を同定/クローニングし、プロモーターレポーターベクターを作製した。プロモーターレポーターベクターを遅筋と速筋に導入してレポーターアッセイを行い、ExP 上に存在する CACC box が遅筋優位な Rik-201 の転写活性に必要なエレメントであることを同定した。CACC box は宿主遺伝子の転写調節を介して、miR-23b クラスターの遅筋優位な発現に寄与すると考えられた。

8. miR-23a クラスター、miR-23b クラスターの骨格筋分化に伴う発現変動を *in vitro* の筋分化モデルを用いて解析したところ、miR-23b クラスターのみが筋分化に伴って発現増大することが見いだされた。さらにその転写様式は宿主遺伝子に依存せず、イントロン内に存在する miR-23b クラスター独自のプロモーター (IntP) に依存する様式であると考えられた。プロモーターレポーターアッセイの結果、IntP の活性は MyoD による調節を受けることが示され、筋分化に伴う転写活性の増大との関連が示唆された。

以上、本論文は遅筋優位に発現する miR-23 が骨格筋萎縮を抑制する機能を持つこと、ミトコンドリア量を抑制する機能を持つことを明らかにし、その遅筋優位な発現をもたらす転写調節機構において CACC box の関与を見いだした。本研究はこれまで明らかにされてこなかった骨格筋可塑性制御における miRNA の機能解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。