

microRNAによる筋肉発生と再生の制御

神戸大学大学院 理学研究科 生物学専攻
日下部 りえ

1. はじめに

骨格に連結し伸縮することで運動や呼吸、嚥下をもたらす骨格筋は、生命維持に不可欠な器官である。骨格筋は、常時損傷と再生を繰り返しており、非常に再生能力の高い組織であるが、治療法の確立していない遺伝性疾患が多数存在する。また、筋肉ごとに異なる形態や機能と遺伝子機能の関連は謎に包まれている。

昨今のゲノム情報の蓄積により、骨格筋の再生過程やタンパク質をコードしない機能性RNAの重要な関わりが示されつつある。機能性RNAのグループであるmicroRNAはわずか22塩基の短いRNA分子で、標的messenger RNAの非翻訳領域への結合により、翻訳抑制や分解促進を引き起こす。microRNAの多くは時間・空間特異的に発現し、転写因子、分泌タンパク質、各種構造タンパク質や酵素の遺伝子の発現調節を担う。例として、筋ジストロフィーのうちジストロフィンタンパク質を欠くデュシェンヌ型(DMD)と肢帯型ジストロフィー(LGMD)では、複数のmicroRNAの発現レベルが異なることが知られている。しかし、さまざまな形態と機能をもつ骨格筋の発生過程においてこれらのmicroRNAの発現パターンや、標的mRNAとの相互作用がどのように変化するかは未解明な部分が多い。

本研究では、このような遺伝子調節システムの発生中の胚内での機能を実験的に調べる基盤を立ち上げたいと考え、筋肉発生を生きのまま解析できるモデルとしてメダカを用い、骨格筋の発生・再生過程におけるmiRの機能に迫る。

2. 方法

本研究では主として以下の方法により、メダカのmicroRNAの配列およびゲノム上の位置の同定、発現パターンの解析、および抑制機能の解析を行った。

(1) メダカ *Oryzias latipes* の小分子RNAライブラリーの作成と大規模解読

小分子RNAに最適化された抽出キット(Ambion社)を用い、日本産ヒメダカから、22塩基前後の長さのRNA分子を抽出する。得られたRNAにアダプターオリゴを連結し、PCR反応を用いてDNAライブラリーへと変換した。次世代シーケンサー(454 Life Sciences/Roche GS FLXおよびIllumina GA)を用いて配列を解読した。さらに、メダカゲノム配列データベース(ナショナルバイオリソースプロジェクト・基礎生物学研究所)を用いて、microRNAのゲノム上の位置を同定した。

(2) 筋肉関連microRNAの発現パターンの解析

(1)で同定されたmicroRNAのうち、筋肉の発生過程に機能していると予想されるものを選び、1)ノザンハイブリダイゼーションによる発生段階特異的な発現の検出、2)in situハイブリダイゼーションによる組織特異的な発現の検出、という2種類の手法で発現パターンの解析を行う。プローブとしてLNA(locked-nucleic acid-modified oligonucleotide) 修飾オリゴプローブを使用した。

(3) microRNAの機能阻害実験

筋肉特異的なmicroRNAが生体内でどのように機能しているか調べるため、モルフォリノアンチセンスオリゴ(カスタム合成)を用いた機能阻害実験を行った。顕微注入法(マイクロインジェクション)による導入は、卵殻の固いメダカ受精卵には困難を伴う。そこで、還元型グルタチオン溶液処理を行って卵殻を軟化させ、手製のホールディングピペットを用いた顕微注入を行った。

3. 結果

(1) メダカ筋肉特異的microRNAの同定

メダカ胚から抽出した小分子RNAより遺伝子ライブラリーを作製し、まずRoche 454を用いて17,414配列の解読を行った。その結果メダカ由来のmicroRNAが単離出来ていることが確認されたため、より多くのシーケンスを解析可能なIlluminaGAを用いて、800万配列以上解読した。その結果、約560種類の

新規メダカmicroRNAを同定することができた。

次にメダカゲノム上におけるmicroRNA遺伝子の位置を同定した。筋肉に発現する代表的なmicroRNAであるmiR-1, miR-133, miR-206は近傍に位置し、特徴的なクラスター構造をもっていた。miR-1遺伝子(第7染色体と第17染色体)、miR-206(第24染色体)、miR-133遺伝子(第7染色体、第17染色体、第24染色体)は、「miR-1とmiR-133」「miR-206とmiR-133」という組合せで同じ染色体上の近傍に位置し、遺伝子対を形成していた。

(2) 発生過程におけるメダカmiR-1, miR-133, miR-206の発現パターンの解析

成魚から数種類の組織を取り出し、各組織から抽出したtotal RNAに対してノザンプロットを行ったところ、主に心臓と体幹部筋肉において約22塩基鎖長のmiR-1とmiR-133の発現が見られた。一方、miR-206は体幹部筋肉のみで発現しており、心臓由来のtotal RNAでは発現が見られなかった。また、各発生段階を追ったノザンプロットでは、いずれのmicroRNAも体節が形成され始める受精後2日から発現が始まり、発生が進むにつれてその発現量は増加していた。また、成熟型microRNAの発現だけでなくmiR-206とmiR-133の前駆体(約80塩基)に対応するバンドも検出することができた。

次に胚に対するホールマウント*in situ*ハイブリダイゼーションを行った。発現の検出にはノザンプロットで使用したものと同一配列のLNAプローブを用いた。これらのmicroRNAは受精後3日において体節由来の骨格筋細胞での発現が確認された。しかし哺乳類での場合と異なり、心臓での発現は見られなかった。さらに、これらのmiRNAは、体幹部と胸鰭原基内の筋肉で異なる発現様式を示していた。受精後5日胚では体幹部の筋肉に加え、胸鰭原基内でも筋細胞の分化が起こる。この発生段階の胚においてmiR-206は体幹部と胸鰭原基内の両方の筋肉で発現が検出された。一方、miR-1の発現は体幹部の筋肉のみで、胸鰭原基内では見られなかった。

上記のような発現様式の違いがmicroRNA生成過程のどの段階で起こっているか調べるため、一次転写産物の前駆体miRNAを含む領域をクローニングし、発現様式を調べた。遺伝子間領域が800bpとコンパクトなmiR-206とmiR-133bについて、RT-PCRを行ったところ、この領域に対応するひとつながりの遺伝子断片を増幅することができた。さらにこの産物に対するRNAプローブを用いてホールマウント*in situ*ハイブリダイゼーションを行ったところ、miR-206/133bの発現は体幹部や胸びれ原基、さらに頭部の骨格筋でもmiR-206/133bの転写産物が見られた。一方、心臓での発現は見られなかった。

同様の解析を、miR-1-1/miR-1-2及びmiR-133a-1/miR-133a-2遺伝子対についても行った。その結果、miR-1-1とmiR-133a-2は体節由来の筋肉と胸びれ原基内の筋肉で発現しており、心臓では発現が見られなかった。成熟型miRNAと前駆体miRNAの発現様式を比較すると成熟型miR-1は胸鰭原基内での筋肉細胞に発現が見られなかったのに対し、前駆体miR-1-1にはその発現が見られた。microRNAは一次転写産物の産生調節と細胞質内でのプロセッシング調節の両方により、筋肉器官ごとに異なる遺伝子調節機構を担っていることが示唆された。

(3) microRNA遺伝子の上流転写調節領域の予測

これらのmiRNAファミリー遺伝子の上流領域に結合する転写因子の予測を行った。転写因子結合モチーフの予測解析ソフト(TFsearch)を用いてこれらmiRNA遺伝子の上流領域の配列に対して筋肉関連転写因子の結合モチーフの探索を行った。その結果、これらのmicroRNA遺伝子対は複数種の心筋や骨格筋形成関連転写因子群により転写制御を受け、一続きあるいは個別の転写産物として生成されると予想される。一方、miR-206/miR-133遺伝子対については前述のmiR-206/133bの転写産物の検出実験結果と一致して、miR-206上流のE-boxとMyoDファミリーによる骨格筋特異的な転写制御によって、一続きの転写産物が生成され、その後miR-206とmiR-133の個別のmiRNAへとプロセッシングを受けると考えられる。

さらにMyoDファミリーに含まれるMyoDとMyf-5, Myogenin, MRF-4の発現様式をメダカ胚を用いたホールマウント*in situ*ハイブリダイゼーションにより調べた。これらはどの因子も筋肉特異的な発現パターンを示したが、その発現領域や発現のタイミングが微妙に異なっていた。これらの発現様式とmiR-206/133bの発現様式を比較するとmiR-206/133とMyoDの発現様式がよく似ていることがわかった。miR-206については、E-boxへのMyoD結合による転写制御がmiR-206の骨格筋特異的な発現に関わっていることが示唆され、現在その相互作用を調べるためのレポーターアッセイを試行中である。

(4) microRNAの機能阻害による機能解析

まず成熟型miR-206の配列に完全に相補なモルフォリノオリゴ(MO)をメダカの1細胞期の細胞質に顕微注入した。ネガティブコントロールとして、miR-206MOの5塩基に塩基置換を挿入したMOも使用した。実験胚を体幹部と胸びれの筋肉が完全に形成される受精後5日まで発生させ、totalRNAを抽出し、ノザンプロットを行った。コントロールMO注入胚や正常胚ではmiR-206の発現が検出されたのに対し、miR-206MOを顕微注入した胚ではmiR-206の発現はほとんど見られず、このmiR-206MOがmiR-206の発現を特異的に抑制できることが確認できた。

続いて、このmiR-206機能阻害胚を受精後5日で固定し、さまざまな筋肉マーカーによる発現検出を行い、筋肉形成に与える影響を調べた。まずホルマウント*in situ* ハイブリダイゼーションにより骨格筋アクチン*OIMAI*と筋肉分化決定因子*MyoD*の発現を調べた。正常胚ではどちらのmRNAも体幹部の筋肉、胸鰭原基内の筋肉細胞、さらには頭部の筋肉で発現が見られる。しかしmiR-206機能阻害胚では*OIMAI*の発現が体幹部の筋肉で減少していた。さらに胸鰭原基内での発現は見られなかった。miR-206機能阻害胚における*MyoD*の発現は正常胚のものと同様であった。以上の結果からmiR-206は筋分化決定因子の下流に位置する収縮タンパク質(特に筋肉アクチン)遺伝子の転写を亢進する機能を持ち、そこには未知の抑制的な因子が介在していると考えられる。

4. 考察

本研究では、胚が透明で生きたまま筋肉の発生を観察できるメダカの特徴を活かし、miR-1,206,133の発現様式を解明し、標的mRNAとの対応関係を実験的に解明する第一歩を踏み出すことができた。さらにmiR-1,133は胚発生期には骨格筋でのみ発現するが、成魚になると体幹部の骨格筋に加え、心臓でも発現を示す。一方、miR-206は胚発生期、成魚ともに骨格筋特異的に発現する。さらにmiR-1,206は骨格筋の中でも筋肉の部位(体幹部と胸鰭原基)によって異なる発現様式をもつことが示された。

平行して進めている他の動物(ヤツメウナギ、ホヤ、ゼブラフィッシュ、アフリカツメガエルなど)を用いた解析の結果と合わせ、miR-1/miR-133は脊椎動物の共通祖先においてすでに、遺伝子対としてゲノム上の近傍に位置するようになり、一続きの前駆体として筋肉特異的に産生されるようになったことが示唆された。また、魚類の系統ではすでに、miR-206による対鰭(=哺乳類の四肢)に特異的な筋分化制御が獲得され、精妙な筋肉形態の形成に役割を果たしていると考えられる。

現在、microRNA遺伝子の上流領域をGFP遺伝子につないだレポーター遺伝子を用いて、筋肉特異的な転写調節をモニターする実験を試行している。また、microRNAの過剰発現実験についても、合成二重鎖microRNAを用いた実験に成功しつつある。今後は後期発生および成体でのmicroRNAの機能、特に成体の筋肉幹細胞における挙動の詳細な解明を目指す。将来的には、遺伝性筋疾患の変異体メダカを用いて、通常状態と運動を制限した状態での相互作用の比較を行い、筋分化と再生における機能性RNAの役割を明らかにしていきたい。

5. 発表論文、参考文献

Kusakabe, R.*, Tani, S., Nishitsuji, K., Shindo, M., Okamura, K., Miyamoto, Y., Nakai, K., Suzuki, Y., Kusakabe, T. and Kunio, I. Characterization of the compact dicistronic microRNA precursor, miR-1/miR-133, expressed in specifically in Ciona muscle cells. *Submitted, in revision.*

Kusakabe R.*, Kuraku S. and Kuratani S. (2011) Expression and interaction of muscle-related genes in the lamprey imply the evolutionary scenario for vertebrate skeletal muscle, in association with the acquisition of the neck and fins. *Dev. Biol.* 350, 217-227.

Tani, S., Kusakabe, R. *, Naruse, N., Sakamoto, H. and Inoue, K. (2010) Genomic organization and embryonic expression of miR-430 in medaka (*Oryzias latipes*): insights into the post-transcriptional gene regulation in early development. *Gene* 449, 41-49.

Liu, N., Williams, A.H., Kim, Y., McAnally, J., Bezprozvannaya, S., Sutherland, L.B., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R. and Olson, E.N. (2007) An intragenic MEF2-dependent enhancer directs muscle-specific expression of microRNAs 1 and 133. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 20844-9.

Callis, T.E., Deng, Z., Chen, J.F. and Wang, D.Z. (2008) Muscling through the microRNA world. *Exp Biol Med (Maywood)* 233, 131-8.