

特別講演

主催 ゲノム医学研究センター 遺伝子治療部門

後援 医学教育センター 卒後教育委員会

平成24年6月12日 於 ゲノム医学研究センター 6階会議室

Small RNA regulation pluripotency and embryonic development

Robert Blelloch

(Institute for Regenerative Medicine and Comprehensive Cancer Center,
Department of Urology and Pathology, University of California, San Francisco)

Blelloch 博士は多能性幹細胞の研究で有名なマサチューセッツ工科大学のJaenisch 博士の研究室の出身で、山中教授のiPS 誘導の実験をいち早く追試した研究者である。その後、独立してカリフォルニア大学サンフランシスコ校で研究室を持ち、特にmiRNA 研究の第一人者としての地位を確立している。

マイクロRNA (miRNA) は、RNA 干渉によって標的遺伝子の発現を抑制して細胞の運命決定をグローバルに調節する機能を持つ小さな非コードRNAの一種である。個々のmiRNAは一つが何百ものmRNAを標的とし、また、mRNAの側も数十ものmiRNAによって標的とされるため一つのmiRNAの機能を完全に解明することは困難であった。Blelloch 博士は、核内で転写された長いpri-miRNAを切断してショートヘアピン型のpre-miRNAに切断するのに必須なDGCR8/Drosha 複合体を構成するDGCR8 遺伝子のノックアウト (KO) した内在性miRNAが機能しない細胞を得て、その細胞に個別に合成miRNAを導入した際に量が変化するmRNAを同定すると共に細胞に起こる変化を調べるという手法で個別のmiRNAの標的や機能を解明するという戦略を確立した。

前半は、ES細胞において自己複製と多分化能という相反する2つの運命への調節に互いに拮抗的に働く2群のmiRNAについての話題であった (Nature, 2010;463:621-6)。DGCR8-KOマウスのES細胞は、レチノイン酸 (RA) による分化誘導に抵抗性を示す。そこで博士らは、miRNAがES細胞の分化誘導に関わっていることを予測し、様々なmiRNAをこのES細胞に加えていくとlet-7 familyと呼ばれる一連のmiRNAがRAに対する応答性を相補することが示された。一方で、逆にES細胞のRAに対する応答を抑制する

miRNAも発見され、ES細胞の細胞周期調節する因子の発現抑制に関わることから、それらを胚性幹細胞細胞周期調節 (ESCC) familyと名づけた。ESCC familyは、標的認識に関わるseedと呼ばれる7塩基の配列がfamily内でよく似ており同じ標的を持っていることが示唆された。またさらに、このESCC familyのmiRNAは、体細胞が脱分化して人工多能性幹細胞へ誘導される過程も促進することがわかった (Nature Biotech, 2011;29:443-8)。ヒト繊維芽細胞からのiPS細胞の誘導過程において、ヒトのESCC family miRNAであるmiR-302bやmiR-378を加えるとiPS誘導効率が上昇した。山中4因子の中からc-Mycを除いた3因子で行なうと、iPS誘導効率が低下するが、そこにmiR-302bやmiR-378を加えるとiPS誘導効率が回復した。更にこれらのmiRNAの詳しい標的遺伝子の解析を行ったところ、細胞周期やクロマチン修飾等に関わる因子に加えて、Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT; 上皮間葉移行) に関わるRHOCやTGF β レセプター IIの発現を抑制しており、それによって引き起こされるSMADのリン酸化を介したTGF β シグナルの伝達を阻害することで、EMTも抑制していることが明らかとなった。

後半は、卵細胞や初期胚では、大半のmiRNAが機能を失っており、かわりにsiRNAが働いているという興味深い話題であった (2010, Suh N. et al.)。CanonicalなmiRNAの産生にはDGCR8/Drosha 複合体が必須である一方で、non-canonicalなmiRNAや、内在性siRNA、shRNAは、mirtron pathwayと呼ばれるスプライシング反応によって切出されたイントロンがpre-miRNAとなったり、逆鎖RNA転写によって長鎖dsRNAが産生されたりすることで、DGCR8非依存的にDicerによつ

て切断され成熟 miRNA となって RISC 複合体に取り込まれ機能を発揮する。そのため、DGCR8-KO マウスでは miRNA は機能を失うが、non-canonical な miRNA や、内在性 siRNA, shRNA は機能する。一方で、Dicer-KO マウスでは、双方ともに機能を失う。マウスの卵母細胞においては、転写活性が殆ど抑制されておりタンパク質の発現抑制は転写後レベルで行なわれるため、miRNA が重要な役割を果たしていると考えられる。事実、Dicer を卵母細胞で条件的に KO すると、減数分裂の進行が停止するほどの顕著な機能阻害がみられ、WT 卵母細胞と Dicer-KO 卵母細胞の間では、mRNA 量的プロファイルに顕著な差異が見られた。ところが、卵母細胞で DGCR8 を KO した場合には、減数分裂は進行し、WT 卵母細胞との間で mRNA 量的プロファイルに殆ど差が見られなかった。このことから、卵母細胞では殆ど miRNA は機能せず、non-canonical な miRNA や、内在性 siRNA, shRNA が減数分裂の進行に関わ

る重要な機能をもっていることが明らかとなった。一方で、miRNA が卵母細胞において機能を失う原因はまだ不明である。miRNA の定量解析を行なうと WT 卵母細胞と比べて DGCR8 条件 KO 卵母細胞でも Dicer 条件 KO 卵母細胞でも同程度に各種 miRNA 量が低下しているため、WT 卵母細胞では、miRNA は存在しているにも関わらず機能していない。また siRNA は機能しているため RISC 複合体に問題はないとのことである。どのような機構で miRNA が機能を失っているのか非常に興味深い。仮説としては、卵母細胞で特異的に P body と呼ばれるオートファジー関連の構造体が消失していることと関連があるのではないかという説や、RISC 複合体が働く際の修飾サブユニットが miRNA と siRNA で異なり miRNA に必要なものが卵母細胞では失われているのではないかという説などがあるが、まだ確定的なものはないらしく解明が待たれる。

(文責 曾根岳史)