

Title	機能性RNAにより制御される下垂体内分泌機構の解明
Sub Title	Analysis of pituitary function regulated by miRNA
Author	蓮輪, 英毅(Hasuwa, Hidetoshi)
Publisher	
Publication year	2015
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2014.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>生体内に存在するマイクロRNAと呼ばれるもののうち, 脳下垂体にたくさん存在するmiR-200bとmiR-429が排卵をおこなうために必須の役割をしていることを明らかにしました。これらのマイクロRNAをもたないマウスを作製すると不妊になります。その仕組みはこれらのマイクロRNAがZEB1と呼ばれる転写因子の産生量を減らすことにより, 排卵に必要な黄体形成ホルモンが正常に分泌されるようにしていることがわかりました。排卵は生殖の原点であり種を維持していくために非常に大切ですが, 生殖に重要である「排卵現象」が小さな分子であるマイクロRNAの調節なしにはうまく機能できないことを明らかにしました。</p> <p>miR-200b and miR-429 are nearly essential for successful reproduction in female mouse. The miR-200b and miR-429 double-disrupted (miR-DKO) mouse line featured healthy animals. However, the miR-DKO females were infertile as a result of anovulation. Both miRNAs were found to be expressed strongly in the pituitary gland and they were functioning to suppress the expression of transcriptional repressor ZEB1. The elimination of these miRNAs increased ZEB1 which resulted in the inhibition of luteinizing hormone (LH) synthesis through LH beta subunit gene. This lowered the serum LH concentration and impaired LH surge, leading to aovulation.</p>
Notes	研究種目：基盤研究(C) 研究期間：2012～2014 課題番号：24591363 研究分野：実験動物, 分子生物
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_24591363seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591363

研究課題名(和文)機能性RNAにより制御される下垂体内分泌機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of pituitary function regulated by miRNA

研究代表者

運輸 英毅 (Hidetoshi, Hasuwa)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：50343249

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：生体内に存在するマイクロRNAと呼ばれるもののうち、脳下垂体にたくさん存在するmiR-200bとmiR-429が排卵をおこなうために必須の役割をしていることを明らかにしました。これらのマイクロRNAをもたないマウスを作製すると不妊になります。その仕組みはこれらのマイクロRNAがZEB1と呼ばれる転写因子の産生量を減らすことにより、排卵に必要な黄体形成ホルモンが正常に分泌されるようにしていることがわかりました。排卵は生殖の原点であり種を維持していくために非常に大切ですが、生殖に重要である「排卵現象」が小さな分子であるマイクロRNAの調節なしにはうまく機能できないことを明らかにしました。

研究成果の概要(英文)：miR-200b and miR-429 are nearly essential for successful reproduction in female mouse. The miR-200b and miR-429 double-disrupted (miR-DKO) mouse line featured healthy animals. However, the miR-DKO females were infertile as a result of anovulation. Both miRNAs were found to be expressed strongly in the pituitary gland and they were functioning to suppress the expression of transcriptional repressor ZEB1. The elimination of these miRNAs increased ZEB1 which resulted in the inhibition of luteinizing hormone (LH) synthesis through LH beta subunit gene. This lowered the serum LH concentration and impaired LH surge, leading to anovulation.

研究分野：実験動物・分子生物

キーワード：マイクロRNA 生殖内分泌

1. 研究開始当初の背景

現在、日本において10組に1組が不妊であると言われている。女性側に起因する不妊の原因は、結婚の高齢化や女性の社会進出がその背景の1つとして考えられているが、それと同様に遺伝的背景により支配される原因についても議論されており、遺伝的病因の解明や治療法の開発が切望されている。

(1) miRNA と雌性不妊

申請者はこれまでに新規遺伝子群であるマイクロRNA (miRNA) に着目し、ノックアウトマウスを作製・解析することで、miRNA が寄与する生命現象を明らかにしてきた。これまで解析を行ったmiRNAの中で、下垂体で特に強く発現するmiR-200ファミリー遺伝子(miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, miR429)がある。miR-200b, miR-429 遺伝子を欠損させたマウスは雌性不妊であり、その原因は下垂体機能不全による排卵機能障害であることを明らかにした。

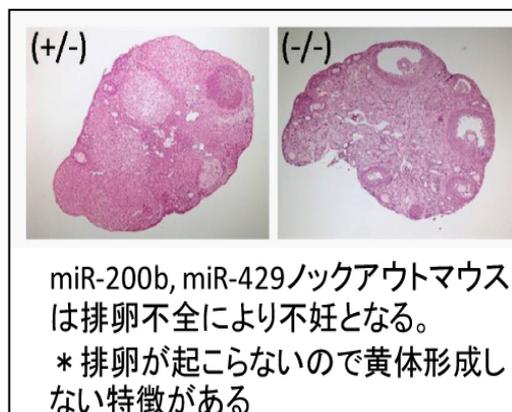
(2) miRNA ノックアウトマウス解析の意義

miRNA の機能は標的とする遺伝子に干渉し、その発現を翻訳レベルで抑制的に調節することにより生命現象を調節していると考えられている。したがって、miRNA ノックアウトマウスではその標的となる遺伝子群がmiRNAにより抑制されなくなることで、表現型を示すこととなる。言い換えると、miRNA ノックアウトマウスでは、標的遺伝子の翻訳が上昇し、任意のタンパク質量が増加することが、表現型の原因となっているわけである(右図)。これらのことから、miRNA ノックアウトマウスは、これまでのタンパク質をコードする遺伝子をノックアウトしたマウスでは知り得なかった遺伝子発現制御の破綻から生じる新たな疾患モデルマウスとなるものである。miRNA を起点として新たな疾患関連遺伝子群を明らかにすることで、これまで

になかった知見が得られることが予想される。

2. 研究の目的

miR-200b, miR-429 ノックアウトマウスは排卵不全により雌性の不妊となる(下図)。



これまでの解析から、抑制型の転写因子であるZeb1遺伝子がmiR-200bとmiR-429の下垂体における標的遺伝子であることを明らかにし、ZEB1による発現制御の破綻が下垂体機能異常による不妊を引き起こしていると考えている。実際に、Zeb1を下垂体前葉のゴナドトロフで強発現させたZeb1トランスジェニックマウスも排卵不全による不妊となる。しかしながら、どのようなメカニズムでZeb1が排卵異常による不妊を引き起こしているのかについては不明である。本研究では、視床下部-下垂体-卵巢系におけるmiRNA-標的遺伝子-高次生命現象の関わりを明らかにするために、miR-200b, miR-429およびZeb1遺伝子に着目し、Zeb1から排卵までの遺伝的カスケードを個体レベルで解明することを目的とし研究を進めた。

3. 研究の方法

miR-200b, miR-429 ノックアウトマウスとその標的遺伝子であるZeb1トランスジェニックマウスに見られる下垂体機能異常を詳細に解析するために、これらの下流にある遺伝子群を分子生物学的手法により見つけ出し、

分子レベルでの機能解析を行う。

(1) Zeb1 により制御される生殖内分泌遺伝子群の検索

下垂体における Zeb1 の下流遺伝子を明らかにするために、miR-200b, miR-429 ノックアウトマウスおよび Zeb1 トランスジェニックマウス下垂体を試料として、Zeb1 抗体を用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行った。既知の排卵関連遺伝子群に絞って qPCR を行い、miRNA-Zeb1 の直接の下流遺伝子の抽出を試みた。

(2) 内分泌機能異常の解析

miR-200b, miR-429 ノックアウトマウスの卵巣には、成熟した卵胞はあるが黄体がなく肥大化した間質細胞が見られる。この形態は、LH サージに異常がある時に起こる特徴的な形態であるため、卵巣切除とエストラジオールを用いて LH サージを誘導し、血中の LH サージが機能しているかどうか調べる。また、膣スミア法で発情前期の雌マウスに排卵ホルモン (hCG) を投与することで排卵が起きるかどうか調べ、miR-200b, miR-429 ノックアウトマウスの表現型が LH サージに起因しているかどうか検討した。

(3) miRNA ノックアウトマウスの表現型を示す直接の原因遺伝子の解析

上記 (1) および (2) の研究により見出された Lhb 遺伝子について、その発現を RT-qPCR 法を用いて野生型マウスと miR-200b, miR-429 ノックアウトマウスを比較した。さらに、miR-200b および miR-429 の直接の標的遺伝子として見出した Zeb1 について、下垂体のゴナドトロフ細胞でのみ強発現するトランスジェニックマウスについても合わせて Lhb 遺伝子の発現解析を行った。

また、Lhb 遺伝子と miR-200b, miR-429 の標的遺伝子である抑制性転写因子 Zeb1 との

関係性について、Lhb の発現制御における Zeb1 の機能をゲルシフトアッセイおよび Chip アッセイにより検討した。

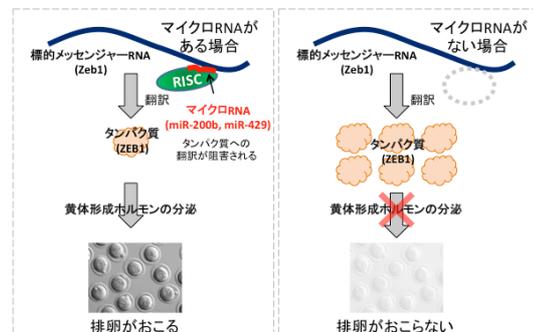
4. 研究成果

これまでに miR-200b, miR-429 ノックアウトマウスに見られる不妊の直接的な原因が不明であったが、本研究により新たな排卵調節機構が明らかとなった (下図)。

(1) miR-200b, miR-429 が下垂体のゴナドトロフから無くなったことで、その細胞内の Zeb1 遺伝子の翻訳抑制が解除され多くの ZEB1 タンパク質がつけられる。

(2) Lhb 遺伝子の発現が ZEB1 タンパク質により転写抑制されることで十分な LH が産生されない。

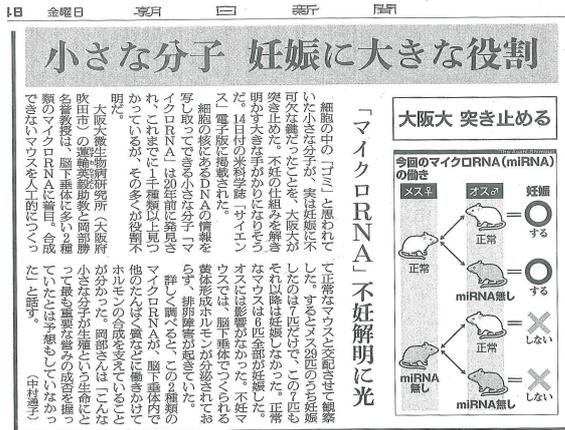
(3) 排卵の引き金となる LH サージが起こらないため、排卵不全となる。



生殖という生物の繁殖には不可欠な現象が 20 塩基程度の RNA によって制御されていることを見出し、培養系では決して明らかにできない miRNA と高次生命現象との関係を明らかにした。さらに、miR-200b と miR-429 の生体内での標的遺伝子と明らかにした Zeb1 遺伝子はこれまで排卵機能に関わるという報告はなく、miRNA ノックアウトマウスを解析することで初めて明らかにした。このように miRNA ノックアウトマウスを用いた研究を行うことにより、miRNA が関わる生命現象を浮き彫りにするだけでなく、タンパク質をコー

ドする標的遺伝子の新たな機能を見出すことが可能であることを明らかにした。

これらの成果は、世界的に評価され Science 誌 (vol. 341, 2013) に掲載されるとともに、新聞 (下図) やインターネットニュースに取り上げられました。さらに、臨床を中心とした日本受精着床学会や日本卵子学会において招待講演として発表し社会へ発信しました。



今後は、miR-200b, miR-429 と配列が類似した miR-200a, miR-200c, miR-141 のノックアウトマウスもすでに作製しており、miRNA 視点からの生命科学研究、生殖内分泌を制御する新しい遺伝子群としての視点から、さらに研究を進めるとともに、小分子 RNA や Zeb が新たな生殖内分泌異常の標的となるか否かについて検討を進めたいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

(1) miR-200b and miR-429 function in mouse ovulation and are essential for female fertility.

Hasuwa H, Ueda J, Ikawa M, *Okabe M.

Science. 2013 Jul 5;341(6141):71-3.

doi: 10.1126 (査読有り)

[学会発表] (計 4 件)

(1) 蓮輪 英毅、マイクロ RNA により制御される排卵システム、第 32 回日本受精着床学会総会学術講演会 (招待講演)、2014 年 7 月 31、東京都・ハイアット・リージェンシー 東京

(2) 蓮輪 英毅、マイクロ RNA を必須の要素としていた排卵システム、第 55 回日本卵子学会 (招待講演)、2014 年 5 月 17 日、兵庫県・神戸国際会議場

(3) Hidetoshi Hasuwa, Jun Ueda, Masahito Ikawa, Masaru Okabe, Disruption of miR-200b and miR-429 leads to anovulation in female mouse, February 1 2014, Sheraton Seattle Hotel/Seattle, Washington/USA, KEYSTON SYMPOSIA

(4) 蓮輪 英毅、上田 潤、伊川 正人、岡部 勝、排卵機能を制御するマイクロ RNA の機能解析、第 15 回日本 RNA 学会年会、2013 年 7 月 24 日、愛媛県・県民文化会館・ひめぎんホール

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://siomilab.med.keio.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蓮輪 英毅 (Hidetoshi Hasuwa)

慶応義塾大学・医学部・講師

研究者番号：50343249