

氏 名	山元 宏貴
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博士 甲第677号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成25年 3月7日
学位論文題目	MicroRNA(miRNA)-494 regulates mitochondrial biogenesis in skeletal muscle through mitochondrial transcriptional factor A (mtTFA) and forkhead box j3 (Foxj3). (microRNA-494 は骨格筋において mtTFA、Foxj3 を介してミトコンドリアのバイオジェネシスを調節する)
審査委員	主査 教授 堀池 喜八郎 副査 教授 平田 多佳子 副査 教授 江口 豊

論文内容要旨

*整理番号	602	氏名 (ふりがな)	(やまもと ひろたか) 山元 宏貴
学位論文題目	<p>MicroRNA(miRNA)-494 regulates mitochondrial biogenesis in skeletal muscle through mitochondrial transcriptional factor A (mtTFA) and forkhead box j3 (Foxj3).</p> <p>(microRNA-494 は骨格筋において mtTFA、Foxj3 を介してミトコンドリアのバイオジェネシスを調節する。)</p>		
<p>【目的】骨格筋のミトコンドリア機能障害は、糖尿病発症の原因となることが示唆されている。そのため、骨格筋におけるミトコンドリアの量的、機能的な調節メカニズムの解明は糖尿病の新たな治療標的となる可能性があり、数多くの研究が行われてきたが未だ不明な点も多い。MicroRNA(miRNA)は長さ約20bpの1本鎖 non-coding RNA であり、標的遺伝子の3'UTR部に結合することでその発現を転写後に調節する。骨格筋においてもいくつかのmiRNAが様々な遺伝子を調節することで重要な機能制御に関わることが知られている。本研究ではmiRNAによる骨格筋のミトコンドリアのバイオジェネシスにおける役割を検討した。</p> <p>【方法】C2C12筋芽細胞を筋管細胞に分化させるとミトコンドリアDNA(mtDNA)の増加や種々のミトコンドリア蛋白の増加が観察される。マイクロアレイで分化前後のmiRNA発現を網羅的に解析し、ミトコンドリアのバイオジェネシスに関与する可能性を有するmiRNAのスクリーニングを行った。また各miRNAの標的遺伝子をWeb上の予測プログラムを用いて検索し、ミトコンドリアのバイオジェネシスと関与していると考えられるmiRNAと標的遺伝子の組み合わせ(miR-494 - mtTFA, Foxj3)を選別した。</p> <p>次に培養C2C12細胞において、miR-494の過剰発現およびノックダウン実験を行い、mtDNAコピー数をqPCR法にて、標的遺伝子の蛋白発現量をウェスタンブロッティング法、mRNA発現量をRT-qPCR法にて測定した。更に、miR-494が直接標的遺伝子を調節しているかを確認するため、標的遺伝子の3'UTRを用いたレポーターアッセイを行った。</p> <p>また <i>in vivo</i> におけるmiR-494とミトコンドリアのバイオジェネシスの関係を評価するため、バイオジェネシスが起ることが知られている持久的運動(1日2時間、7日間の水泳)をC57BL/6Jマウスに負荷し、腓腹筋中のmiR-494量の変化をRT-qPCR法にて測定した。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

【結果】 microarray の結果、培養 C2C12 細胞の分化前後で 3 種の miRNA (miR-206、miR-133a、miR-133b) が有意に増加し、1 種の miRNA (miR-494) が有意に減少していた。複数の miRNA 標的遺伝子探索プログラムを用いて各 miRNA の標的遺伝子を予測したところ、miR-494 は mtTFA および Foxj3 を標的としていることが確認された。mtTFA は mtDNA の複製に関与することが、Foxj3 はミトコンドリアが豊富な遅筋の分化に関与することが知られている。これらの標的遺伝子は、C2C12 分化に伴い転写後に変化しており、miRNA によって調節されている可能性が示唆された。

培養 C2C12 細胞において pGFP-miR494 発現ベクターの過剰発現を行ったところ、mtDNA コピー数は有意に減少し、その際 mtTFA および Foxj3 の mRNA 発現は変化しなかったものの、蛋白発現量は有意に減少していた。また内因性の miR-494 を antisense-inhibitor によりノックダウンしたところ、mtDNA コピー数は有意に増加し、mtTFA、Foxj3 の発現は mRNA レベルでは変化を認めないものの、蛋白レベルで増加した。このことから、miR-494 は転写後に mtTFA および Foxj3 を調節し、ミトコンドリアのバイोजェネシスに関与することが示された。

mtTFA および Foxj3 の 3'UTR を用いたレポーターアッセイにおいて、miR-494 の過剰発現またはノックダウンにより、活性の低下、上昇がそれぞれ認められた一方、miR-494 結合部位に変異を導入した変異型では変化が認められなかった。このことから、miR-494 は mtTFA、Foxj3 を直接の標的として調節していることが示された。

また C57BL/6J マウスに持久的運動 (1 日 2 時間、7 日間の水泳) を負荷し、腓腹筋中の miR-494 を測定したところ、運動を負荷しない対照群と比較し、運動群では有意に減少していることが確認された。また、標的遺伝子である mtTFA、Foxj3 は運動負荷により増加している事が示された。

【考察】 本研究により、miR-494 が骨格筋においてミトコンドリアのバイोजェネシスを調節していることが示された。その調節は少なくとも、mtDNA、Foxj3 の 2 種の転写因子の 3'UTR 部位に直接結合し、制御していることによると考えられた。

持久的運動負荷時、miR-494 はその発現量が低下していることが認められ、運動によるミトコンドリアのバイोजェネシスにも関与している可能性が示唆された。

miR-494 の発現量を低下させる、またはその働きを阻害する分子を導入することで骨格筋におけるミトコンドリアの量的な機能不全を改善し、糖尿病の治療に応用できるものと考えられる。

【結語】 miR-494 は骨格筋において、mtTFA、Foxj3 に直接結合し、その発現を転写後調節することでミトコンドリアのバイोजェネシスに関与していることを明らかにした。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	682	氏名	山元宏貴
論文審査委員			
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>骨格筋におけるミトコンドリアの機能不全が糖尿病発症の原因となることが示唆され、ミトコンドリアの量的調節や機能的調節の研究が行われているが、いまだ十分には解明されていない。一方、microRNA (約 20 bp の 1 本鎖 non-coding RNA) は標的遺伝子の 3' 非翻訳領域に結合して発現を転写後に調節するが、骨格筋においても microRNA が様々な遺伝子の発現調節に関わっている。本論文では骨格筋ミトコンドリアのバイオジェネシスにおける microRNA の役割を検討した。</p> <p>その結果、次のことを明らかにした。1) 培養 C2C12 筋芽細胞 (マウス骨格筋由来) において、microRNA のうち、miR-494 は遺伝子 mtTFA (ミトコンドリア DNA の複製に関与) と Foxj3 (遅筋の分化に関与) に結合し、その発現を転写後調節することでミトコンドリアのバイオジェネシスを制御する。2) miR-494 は持久運動 (マウス) におけるミトコンドリアのバイオジェネシスにも関与する。</p> <p>この研究成果から、骨格筋におけるミトコンドリアの量的な機能不全の改善法として、miR-494 発現量の低下やその働きの阻害が考えられ、その方法の糖尿病治療への応用が期待される。</p> <p>よって本論文は博士 (医学) の学位論文に値するものと認められる。なお申請者は最終試験 (論文内容に関連した試問) に合格した。</p>			
(総字数 575 字)			
(平成 25 年 / 月 3 / 日)			