

(様式4)

学 位 論 文 の 内 容 の 要 旨

(氏 名) 岩 宗 政 幸 印

(学位論文のタイトル)

MicroRNA-376a regulates 78-kilodalton glucose-regulated protein expression in rat granulosa cells

(ラット顆粒膜細胞においてmiR-376aはGRP78の発現を調節する)

(学位論文の要旨)

我々の研究室はLHR mRNAのdown regulationに関与している因子として、MvKやGRP78、miRNAなどがあることを報告してきた。GRP78は分子シャペロンの一つで、ストレスに応答して小胞体内で発現が増強し、タンパクの一次修飾に関与し、細胞の恒常性を保っている。また、miRNAはmRNAの3'-UTRに結合することにより、転写後の発現調節に関与している。GRP78と、それに結合し得るmiRNAに着目し、LHR発現調節における関連性を検討した。

miRNAマイクロアレイを用いたラット卵巣におけるmiRNAの変化

排卵モデルとしてPMSG - hCG刺激を行った21日齢の雌ラットより経時的に卵巣を摘出し、RNA抽出を行った。これらのRNAを用いてラット卵巣に発現しているmiRNAを網羅的に探索するためにmiRNAマイクロアレイを行い、miRNAの発現量の経時的な変化を調べた。統計学的に有意な差を認めたmiRNAは44個あり、そのうちで、hCG投与後6時間で発現増強のピークとなり、その後減少していく群のmiRNAは23個、hCG投与後6時間まで減少し、その後発現を増強させていく群のmiRNAは19個であった。これら42個のmiRNAについて、miRNAのデータベース(MicroCosm, <http://ebi.ac.uk/>)を用いて、GRP78と結合し得る配列をもつmiRNAを検索した。その結果、GRP78と結合し得る配列をもつmiRNAを3つに絞り込むことができた。これらmiR-144、miR-376a、miR-451をターゲットとして以後の実験を行うこととした。

ラット卵巣におけるmiRNAとGRP78の発現量の経時的変化 (in vivoにおいて)

同様の方法でPMSG - hCG刺激を行った21日齢の雌ラットより卵巣を経時的に摘出し、それぞれの卵巣よりRNAを抽出し、real time RT-PCRを行い、miRNAの経時的な発現量の変化を調べた。GRP78はhCG投与後12時間まで発現を増強させ、その後減弱した。miRNA-144はhCG投与後12-24時間まで発現増強し、その後減弱した。miR-376aは12時間で、miR-451は24時間で発現のピークをむかえる結果であった。これはマイクロアレイの結果と同様であった。

未熟な顆粒膜細胞の初代培養におけるmiRNAの発現量の経時的变化について(in vitroにおいて)

ラット卵巣より未熟な顆粒膜細胞を採取した後、初代培養を行い、実験を行うこととした。

21日齢の雌ラットにDESを2mg/body/dayで4日間投与し、その後卵巣を摘出し未熟な顆粒膜細胞を採取した。血清無添加の培養液で培養しながらFSHを添加し、48時間後にhCGを添加した排卵誘起と同じ状態とした。その際のGRP78とmiRNAの発現量の変化を、real time RT-PCRにて確認した。GRP78はin vivoとmiR-376aはin vivoと同様にhCG 12hで発現のピークがみられたが、miR-144, miR-451はhCG添加後発現を減弱させていき、増強することは認められなかった。以上のことから、miR-376aにさらに絞り込んで実験をすすめることとした。

未熟な顆粒膜細胞の初代培養におけるmiRNAの機能解析

DES primingを行った21日齢の雌ラットより、未熟な顆粒膜細胞を採取し培養を行った。この未熟な顆粒膜細胞にFSH添加後36時間でmiR-376aの前駆体であるprecursor、もしくはmiR-376aの働きを抑制するinhibitorをトランスフェクトし、その12時間後にhCGを添加し、経時的に細胞を回収し、GRP78の発現量をreal time RT-PCRにて調べた。結果は、precursorをトランスフェクトしてもGRP78の発現量は減少せず、inhibitorをトランスフェクトしても発現量は増加しなかった。これらのことから、miR-376aはGRP78-mRNAの発現調節には関与していないことが示唆された。

次に、タンパクレベルでの発現調節に関与しているかどうか、ウェスタンブロットを行い確認した。培養法、トランスフェクトに関しては同様の方法を行った。precursorをトランスフェクトした場合、hCG添加後12hから48hまで有意にGRP78のタンパクの発現を低下させた。一方、inhibitorをトランスフェクトした場合、hCG添加後から24hまで発現を増強させ、その後発現低下していくことが確認された。

これらのことから、miR-376aはGRP78-mRNAの発現調節には関与せず、GRP78-proteinの発現調節に関わっていることが示唆された。

GRP78 mRNAにおけるmiRNAの結合部位の同定について

miRNAはRISCに取り込まれた後、標的としているmRNAの3'末端非翻訳領域(3'UTR)に結合することにより、翻訳の制御(抑制)や、場合によってはmRNAの分解を引き起こすと考えられている。

miR-376aの結合予測部位は、GRP78-mRNAの3'UTR内の2439~2459番目にあると、先にあげたMicroCosm(miRNAのデータベース)で予想されている。そこで、luciferase assayを用いて、GRP78に対するmiRNAの結合部位の同定を試みた。

結合予測部位の配列をluciferase vectorに導入し、HEK293細胞にprecursor、inhibitorとともにトランスフェクトした。24時間後にassayを行ったが、precursorをトランスフェクトした場合、luciferaseタンパクの発現が抑制され、luciferase活性はコントロールと比較し、約50%低下していた。

また、luciferase vectorにmiR-376aの配列を導入し、同様にprecursorとともにトランスフェクトした場合、luciferase活性はほぼ0%の結果となった。このことから、precursorから切り取られたmiR-376aが完全相補の部位に結合した場合、siRNAと同様な働きをし、mRNAの分解を引き起こしていることが示唆された。

以上のことより、miR-376aはラット顆粒膜細胞においてGRP78-mRNAに結合し、GRP78-proteinの転写後の翻訳抑制に関与していることが示唆された。