

ラット卵巣 LH 受容体の発現調節における microRNA の意義

北原 慈和

群馬大学大学院医学系研究科産科婦人科学教室

はじめに

卵巣などの性腺の機能調節には、視床下部-下垂体-性腺の相互作用が重要である。なかでも下垂体前葉から分泌されるゴナドトロピン (FSH, LH) は、卵巣における卵胞の発育を促し、LH サージにより成熟卵の排卵を引き起こし、さらに排卵後の卵胞の黄体化を誘導するなど、さまざまな役割を担っている。また、これらのゴナドトロピンは、卵巣の顆粒膜細胞と莖膜細胞に発現しているゴナドトロピン受容体 (FSH 受容体や LH 受容体) に結合することにより、細胞内におけるステロイド産生の調節を行っている。さらに、卵巣より分泌されるステロイドホルモンやインヒピンが中枢にフィードバックをかけることにより、ゴナドトロピンの分泌の調節を行っている。

われわれの研究グループでは、ゴナドトロピン受容体の機能や発現調節について、さまざまな角度から研究を行ってきた。例えば、卵胞発育の際には FSH 受容体の発現の増強がみられるが、その増強を誘導する因子としてアクチビンが作用していることなどを報告してきた [1, 2]。また、卵巣の顆粒膜細胞における LH 受容体の発現調節においても、その発現を増強する因子として FSH やアクチビン [1], エストラジオール (E2) などに関与していることを報告してきた。

さらに、顆粒膜細胞において FSH の刺激により発現が誘導された LH 受容体は、hCG や LH の刺激が加わるとその受容体の発現が低下する、いわゆる LH 受容体 mRNA の down regulation が起こることも知られている (図 1)。これに関連するタンパク質の 1 つとして、メバロネート カイネース (MvK) が発見された [3, 4]。この MvK はコレステロール合成に関与している酵素であり、LH 受容体 mRNA に結合することにより mRNA を不安定な状態にすると考えられている [5]。

このように、顆粒膜細胞における LH 受容体の発現調節はさまざまな因子によって行われていることが知られるようになってきたが、これらの発現調節機構の解明は、受容体遺伝子の転写や mRNA の安定性に着目して行われてきた。そこでわれわれは 'post transcriptional regulation' に着目し、新たなゴナドトロピン受容体発現調節機構の解明を目指すこととした。そのため 'post transcriptional regulation' において重要な因子として最近注目されている microRNA (miRNA) に着目し、研究を進めることとした (図 2)。

microRNA (miRNA) とは

microRNA (miRNA) は、19~23塩基からなる小さな 1 本鎖 RNA である。幅広い生物種に存在しており、RNA ではあるがそれ自身はタンパク質をコードしていない。しかし、miRNA と相補性を示す mRNA (メッセンジャー RNA) と結合することにより、mRNA の分解や翻訳の制御を行っていると考えられている。このように、タンパク質をコードしていないが、何らかの機能を果たしている RNA のことを、一般的にノンコーディング RNA (non-coding RNA: ncRNA) と呼んでいる。よく知られている ncRNA には、トランスファー RNA (tRNA) やリボゾーム RNA (rRNA) などがある。さらに、miRNA

連絡先：北原慈和，群馬大学医学系研究科産科婦人科学教室
〒371-8511 群馬県前橋市昭和町3-39-15
TEL：027-220-8423
FAX：027-220-8443
E-mail：kitahara@med.gunma-u.ac.jp

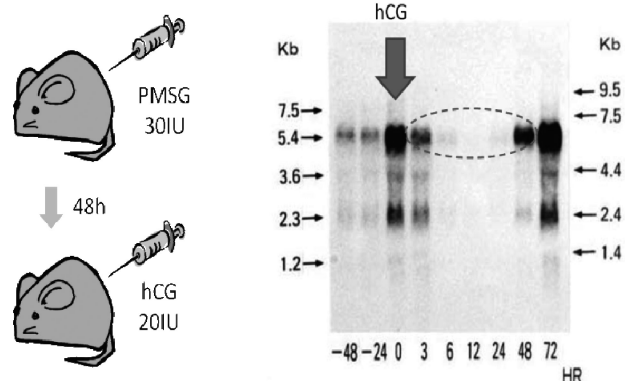


図1 hCG 投与後に起こるラット卵巣 LH 受容体の mRNA レベルでの down regulation (northern blotting)

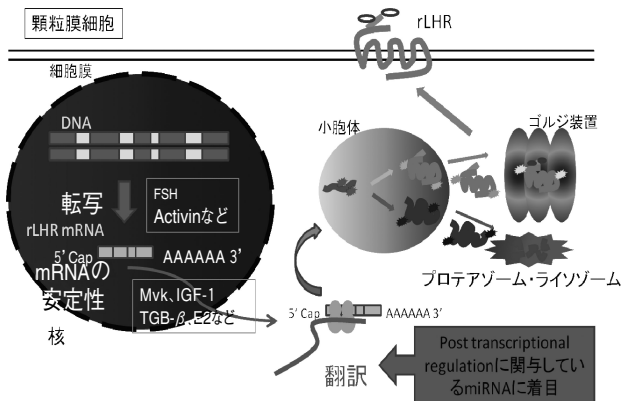


図2 ラット顆粒膜細胞における LH 受容体の発現調節の概略図

のように短い塩基鎖からなる non-coding RNA には、RNA 干渉を引き起こす small interfering RNA (siRNA) や、生殖幹細胞の分化に関与していると考えられている piwi-associated RNA (piRNA) などがあげられる。

miRNA の最初の発見は、1993年の Ambros らのグループが線虫の *lin-4* 遺伝子を同定したことによるといわれている [6]。 *lin-4* 遺伝子は、22塩基と61塩基の2種類の RNA をコードしており、このかなり短い塩基鎖からなる RNA が、LIN-14タンパク質の発現レベルの一時的な減少と関係があるということを見出した。さらに、Ruvkin らのグループとともに、 *lin-4* 遺伝子より転写された短い方の22塩基の RNA と、 *lin-14* mRNA の3'非翻訳領域 (UTR) の塩基配列と相補性をもっており、 *lin-4* は *lin-14* の翻訳に何らかの影響を及ぼしていることが示唆されると報告した [7]。その後、同じく線虫から発見された短い RNA である *let-7* などが、さまざまな種類の動物たちにおいても検出され、進化の過程において *lin-4* や *let-7* などは保存されていることがわかった [8]。

このような発見によって、進化の過程で保存されている、タンパク質をコードしていない20塩基程度の短い1本鎖 RNA が、発生過程や細胞機能の制御などに重要な役割を果たしている可能性が示され、これを microRNA (miRNA) と呼ぶようになった。

miRNA の発現は、siRNA とは異なり、miRNA 遺伝子より転写されることにより引き起こされる。まず、miRNA 遺伝子より数百から数千の塩基からなる pri-miRNA に核内で転写される。この pri-miRNA は Drosha を含む MicroProcessor という複合体により切断され、stem loop 構造をもつ約70塩基程度の長さの pre-miRNA となる。この pre-miRNA は輸送タンパクである Exportin-5 によって細胞質へと輸送される。そこで、Dicer によ

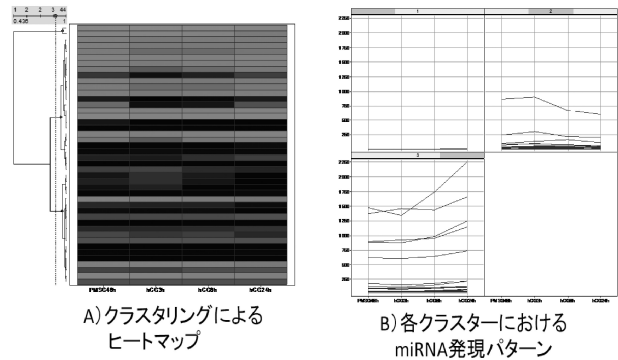


図3 ラット卵巣における miRNA マイクロアレイについて

てさらに切断されることにより、22塩基程度の miRNA-miRNA* duplex (2本鎖) を形成する。その後、一般的には pre-miRNA の5'末端側の miRNA が成熟した miRNA として RNA-induced silencing complex (RISC) に取り込まれることにより、miRNA としての働きをなすと考えられている。

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

3週齢の雌のラットに妊馬血清性腺刺激ホルモン (pregnant mare serum gonadotropin; PMSG) を投与し、卵巣を发育させる。その後、hCG を投与し排卵を誘起させると、先に述べたように、PMSG の刺激によって発現していた顆粒膜細胞における LH 受容体の down regulation が起こる (図1)。この LH 受容体の down regulation が起こっている時相に一致して、増加しているタンパク質として MvK があり、この働きによって LH 受容体の mRNA が不安定となり、LH 受容体の down regulation が起こっていることは先に述べたとおりである。そこで、もしこの時相に増加している miRNA があれば、それらの miRNA もまた、LH 受容体の down regulation に関与している可能性があると考えた。つまり、miRNA は遺伝子の翻訳の制御・抑制、もしくは、mRNA の分解を行っていると考えられているので、LH 受容体の down regulation が miRNA の働きによって引き起こされている可能性もあると考えた。

そこで、われわれは、PMSG-hCG 刺激を行った3週齢の雌ラットより経時的 (PMSG 0 h, hCG 0 h (PMSG 48 h), hCG 3 h, hCG 8 h, hCG 24 h) に卵巣を摘出し、それぞれの卵巣より 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、

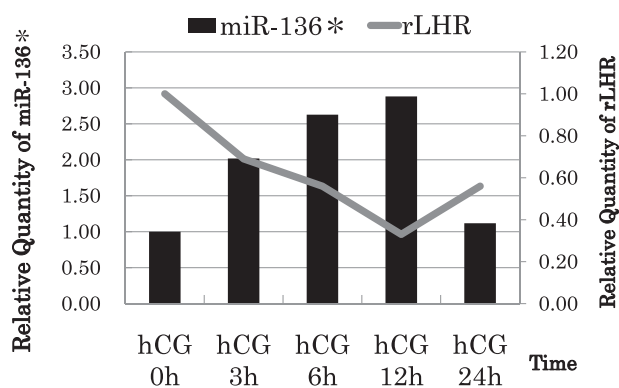


図4 ラット卵巢における miRNA と LH 受容体の発現量の経時的変化 (in vivo)

miRNA の発現量の経時的な変化を調べることにした。

この miRNA マイクロアレイの結果において、PMSG 0h を除いた残りの 4 群 (hCG 0h (PMSG 48h), hCG 3h, hCG 8h, hCG 24h) を用いて、一元配置分散分析を行った。その結果、統計学的に有意な差を認めた miRNA は 44 個であった。これらの miRNA を用いて階層クラスタリング解析を行ったところ、3 群にクラスター分割することができた (図 3)。それぞれのクラスターは、以下である。

第 1 クラスター；経時的に発現の変動がみられない miRNA。

第 2 クラスター；hCG 3h 時点で若干の発現の増加がみられ、その後、発現が減少している miRNA。

第 3 クラスター；hCG 3h 時点で若干の発現の減少がみられ、その後、発現が増加している miRNA と分割することができた。

これらのクラスターのなかで、LH 受容体の down regulation に関連していると考えられるのは、第 2 クラスターであろうと予想した。なぜならば、LH 受容体の発現を抑制する方向に miRNA が作用しているのであれば、LH 受容体が down regulation されている時相で miRNA の発現量は増加し、逆に、LH 受容体の発現が回復してくる時相においては、miRNA の発現量は減少してくると予想されるからであった。そこで、第 2 クラスターに分類された miRNA 23 個を LH 受容体の down regulation を引き起こす miRNA の候補とし、実験を進めることにした。

miRNA database を用いた miRNA の絞り込み

miRNA マイクロアレイの結果により、候補に挙げられた 23 個の miRNA について、web site 上に公開されてい

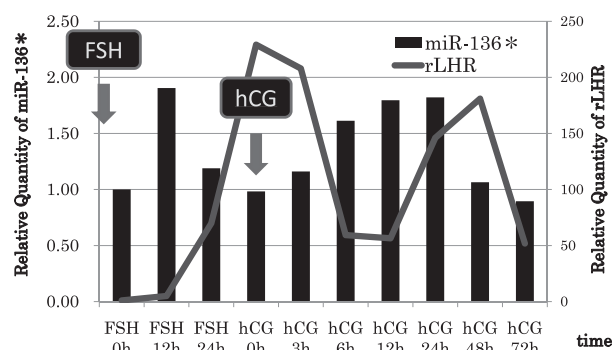


図5 顆粒膜細胞における miRNA と LH 受容体の発現量の経時的変化 (in vitro)

る miRNA のデータベース (miRBase ; <http://www.mirbase.org/>) を用いて、LH 受容体と結合し得る配列をもつ miRNA を検索した。その結果、LH 受容体と結合し得る配列をもつ miRNA を 1 つに絞り込むことができた。この miRNA をターゲットとして、以後の実験を行うことにした。

ラット卵巢における miRNA の発現量と LH 受容体の発現量の経時的変化 (in vivo において)

先ほどと同様の方法で、PMSG-hCG 刺激を行った 3 週齢のメスのラットより卵巢を摘出し、それぞれの卵巢より RNA を抽出し、real time RT-PCR を行い、miRNA と LH 受容体の発現量の経時的な変化を調べた (図 4)。これらの結果は、先の miRNA マイクロアレイの結果と同様に、LH 受容体 mRNA の down regulation が起こっている時相に一致して miRNA の発現量が増加し、さらに、LH 受容体の発現量が回復してくると、miRNA の発現量は減少傾向となっていた。これらの結果より、LH 受容体の down regulation に miRNA が何らかの影響を及ぼしている可能性があることが、再度示唆された。

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

次に、ラット卵巢より未熟な顆粒膜細胞を採取したのち初代培養を行い、実験を行うことにした。

3 週齢のメスラットに DES を 2 mg/body/day 4 日間投与し、その後卵巢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 添加し、LH 受容体の発現を誘導して、さらに FSH を添加してから 48h 後に hCG を添加し、LH 受容体の down regulation を惹起した。その際の miRNA の発現量の変化を、real

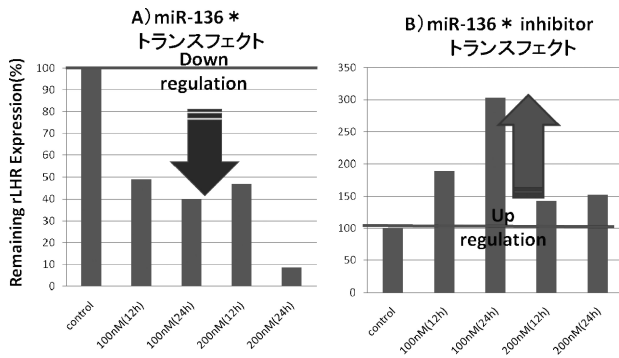


図6 顆粒膜細胞における miRNA の機能解析
 A) miRNA をトランスフェクトした場合の LH 受容体の発現量の変化
 B) miRNA inhibitor をトランスフェクトした場合の LH 受容体の発現量の変化

time RT-PCRにて確認した(図5)。

すると、LH 受容体の down regulation が起こる時相に、miRNA の増加がみられ、in vivo の結果と同様、顆粒膜細胞の初代培養の系においても、LH 受容体の down regulation に miRNA が何らかの関与をしていることを示唆する結果であった。

未熟な顆粒膜細胞の初代培養における miRNA の機能解析

先と同じ方法で DES priming を行った3週齢のメスラットより、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 miRNA をトランスフェクトし、miRNA を強発現させた後、FSH を添加し LH 受容体の発現を誘導した。その際の、LH 受容体の発現量を real time RT-PCRにて調べると、コントロールに比べ miRNA をトランスフェクトした顆粒膜細胞では、LH 受容体の mRNA レベルでの減少がみられた。つまり、miRNA をトランスフェクトすることにより、LH 受容体の発現の抑制が引き起こされたと考えられた(図6A)。

逆に、顆粒膜細胞に miRNA inhibitor をトランスフェクトし、その後 FSH を添加し LH 受容体を発現させた。その際の LH 受容体の発現量を real time RT-PCRにて調べたところ、コントロールに比べ LH 受容体の発現量は増加していた。これは miRNA inhibitor によって顆粒膜細胞内の miRNA の働きが抑制されたため、LH 受容体の発現の抑制が起こらず、LH 受容体の発現量の増加につながったと考えられた(図6B)。

これらの2つの実験より、LH 受容体の発現調節には miRNA が大きく関わっていることが示唆された。

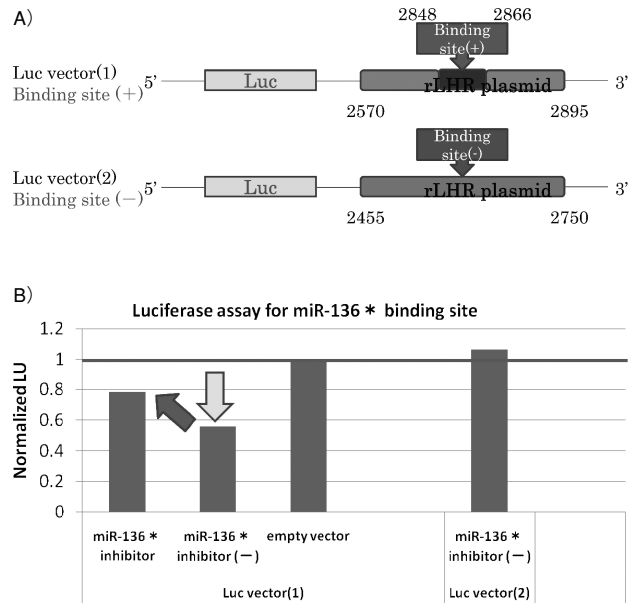


図7 A) luciferase assay に用いたベクター
 B) LH 受容体 mRNA における miRNA binding site の同定について (luciferase assay)

LH 受容体 mRNA における miRNA の結合部位の同定について

miRNA は RISC に取り込まれたのち、ターゲットとしている 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。

今回ターゲットにしている miRNA の結合部位は、ラット LH 受容体 mRNA の 3' UTR 内の 2848~2866 番目にあると、先にあげた miRBase (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、LH 受容体に対する miRNA の結合部位の同定を試みた。

まず、ラット LH 受容体の cDNA を用いて、miRBase に予想されている結合部位を含んだ luciferase vector (これを vector 1 とする) と、結合部位を含まない luciferase vector (これを vector 2 とする) を作製した(図7A)。これらのベクターを、未熟な顆粒膜細胞の初代培養にトランスフェクトしたのち、FSH を添加し LH 受容体の発現を促した。その際に、細胞内で産生される miRNA によって翻訳の抑制 (もしくは、mRNA の分解) が起こると、Vector 1 の luciferase タンパクの発現が抑制されるため、luciferase 活性がコントロール (empty vector の luciferase 活性) と比べて低下することとなる。実際に今回の実験においても、luciferase 活性は約 50% 低下していた。

さらに、luciferase vector とともに、miRNA inhibitor も同時にトランスフェクトすると、FSH の添加によって誘導された miRNA の働きを抑制するため、luciferase タンパクの発現の抑制が起こりにくくなり、luciferase 活性が回復することとなる。実験においても、その活性はコントロールに比べ約80%の活性(20%の活性の低下)を示し、inhibitor をトランスフェクトしなかったときに比べ、明らかにその活性は回復していることが示された(図7B)。

ちなみに、結合部位を含まない Vector 2 は、いずれの条件においても、コントロール(empty vector)の luciferase 活性とほぼ同等の活性であった。つまり、miRNA の結合部位をもたない vector は、翻訳の制御などが起こらず、luciferase 活性の変化も起こらないことが示された。

おわりに

われわれのグループでは今までに、卵巣に発現しているゴナドトロピン受容体がどのように発現調節されているかを解明してきた。今回はその一環として、翻訳の制御や mRNA の分解など 'post transcriptional regulation' に関与している miRNA に着目し研究を行った。

ターゲットとした miRNA は、LH 受容体の down regulation において、何らかの作用を及ぼしていることが今回の実験結果から示すことができたと思われる。しかし、そもそも miRNA がどのように誘導され、どのように翻訳の制御や mRNA の分解を行っているのかなど、まだまだ解明されていない点も多くあるのも事実である。今後、そのような点を解明していければと考えている。

謝 辞

このような執筆の機会を与えてくださいました、日本生殖内分泌学会理事長 峯岸 敬教授、第14回日本生殖内分泌学会学術集会会長 倉智博久教授に感謝申し上げます。

引用文献

1. Nakamura M, Minegishi T, Hasegawa Y, Nakamura K, Igarashi S, Ito I, Shinozaki H, Miyamoto K, Eto Y, Ibuki Y (1993) Effect of an activin A on follicle-stimulating hormone (FSH) receptor messenger ribonucleic acid levels and FSH receptor expressions in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 133, 538-544.
2. Takashi M (2004) The regulation of gonadotropin receptor in the ovary. In: Leung MP (ed) *The Ovary*: Academic Press, pp. 664.
3. Nair A, Young M, Menon K (2008) Regulation of luteinizing hormone receptor mRNA expression by mevalonate kinase-role of the catalytic center in mRNA recognition. *FEBS J* 275, 3397-3407.
4. Wang L, Nair A, Menon K (2007) Ribonucleic acid binding protein-mediated regulation of luteinizing hormone receptor expression in granulosa cells: relationship to sterol metabolism. *Mol Endocrinol* 21, 2233-2241.
5. Ikeda S, Nakamura K, Kogure K, Omori Y, Yamashita S, Kubota K, Mizutani T, Miyamoto K, Minegishi T (2008) Effect of estrogen on the expression of luteinizing hormone-human chorionic gonadotropin receptor messenger ribonucleic acid in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 149, 1524-1533.
6. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.
7. Wightman B, Ha I, Ruvkun G (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75, 855-862.
8. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degnan B, Muller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G (2000) Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408, 86-89.