microRNA 生合成変動が引き起こす病態生理現象

戸 高 寛^{1,2}・樋 口 琢 磨²・坂 本 修 士²

microRNA (miRNA) は、標的となるメッセンジャー RNA の翻訳を阻害することで様々な生命現象を制御する。これらの miRNA の生合成は、多くの RNA 結合タンパク質により厳密に制御されている。従って miRNA 生合成を制御する RNA 結合タンパク質の異常な発現変動は生体システムの破綻を引き起こし、疾患発症に影響を及ぼすことが知られている。我々は、これまでに、過剰発現した RNA 結合タンパク質 Nuclear Factor 90 (NF90)-NF45 複合体が miRNA 初期転写産物のプロセッシングを抑制し、miRNA 産生を負に制御することを見出している。本稿では、NF90-NF45 過剰発現マウスを用いた表現型解析および機能解析より見出された「過剰発現した NF90-NF45 は miR-133 生合成を抑制し、骨格筋の中心核化および筋萎縮を誘導する」ことを主として紹介する。加えて、近年発表した「肝細胞癌において発現増加する NF90-NF45 が miR-7 生合成機構を抑制して細胞増殖を促進する」ことについても紹介する。これらの知見を通じて NF90-NF45 の過剰発現および発現増加が及ぼす miRNA 生合成機構の制御とその機構を介した疾患発症について述べる。

1. miRNA の機能と生合成機構

non-coding RNA (ncRNA) の一つである miRNA は、様々な生物種において高度に保存されており、2016 年 9 月時点で、ヒトで約 2600 種類、マウスで約 1900 種類、ショウジョウバエで約 500 種類、線虫で約 400 種類、シロイヌナズナで約 400 種類が同定されている (miRbase Release 21 より引用)。miRNA は 21-25 塩基程度の非常に小さな RNA で、標的となるメッセンジャー RNA (mRNA) の 3' 非翻訳領域 (3'-UTR) に結合し、mRNA の翻訳抑制あるいは分解に働き遺伝子の発現を制御する。miRNA - mRNA 3'-UTR の結合は完全相補である必要はなく、一部相補的な配列にも結合する。そのため、一つの miRNA は数十から数百の mRNA を標的にすると考えられており、ヒトにおいては全 mRNA の約 60% が miRNA に制御されると推定されている¹³⁾。このように miRNA は非常に多くの mRNA の発現を制御し、発生¹⁾や細胞の増殖⁴⁾、分化⁵⁾、アポトーシス⁸⁾等の様々な生命現象のイベントにおいて重要な役割を果たしている。

miRNA の生合成機構は、以下の 4 ステップより構成されている (図 1)。①ゲノム DNA よりステムループ構造を有する数百塩基以上の miRNA 初期転写産物 (primary-

図 1 miRNA 生合成機構 DNA より RNA ポリメラーゼ II (Pol II) を介して miRNA の初期転写産物である pri-miRNA が転写される。転写された pri-miRNA はマイクロプロセッサーと呼ばれる Drosha-DGCR8 によりプロセッシングを受け、pre-miRNA が産生される。pre-miRNA は Exportin-5 を経由して核から細胞質へと移行する。移行した pre-miRNA は Dicer-TRBP によるプロセッシングを受け二本鎖 miRNA となり、これが RISC 複合体に取り込まれた後に一本鎖となり成熟した miRNA が産生される。

miRNA: pri-miRNA) が RNA ポリメラーゼ II (Pol II) により転写される³²⁾。② pri-miRNA は、RNase 活性を有する Drosha-DGCR8 によりプロセッシングされ、ステムループ構造の前駆体 miRNA (precursor-miRNA: pre-miRNA) が産生される^{10, 15, 22, 31)}。③ pre-miRNA は、Exportin-5 を経由して核から細胞質へと移行し^{3, 35, 46)}、Dicer-TRBP によるプロセッシングが行われ短い 2 本鎖 miRNA が産生される^{16, 26, 29)}。④ 2 本鎖 miRNA は RNA 誘導サイレンシング複合体 (RNA induced silencing complex: RISC) に取込まれ、2 本鎖 miRNA から 1 本鎖 miRNA へと解かれて成熟した miRNA となり mRNA の翻訳抑制および分解の機能を発揮する^{14, 21, 36)}。また miRNA 生合成機構は Drosha-DGCR8 や Exportin-5, Dicer-TRBP, RISC に加え、複数の RNA 結合タンパク質によって制御されている。miRNA 生合成を正に制御する因子としては、SMAD-p68 や hnRNP A1, SNIP1, SF2/ASF, KSRP 等が報告されており、これらの因

^{1,2}Hiroshi TODAKA, ²Takuma HIGUCHI, ²Shuji SAKAMOTO, ¹高知大学医学部生理学講座循環制御学 (〒783-8505 高知県南国市岡豊町小蓮高知大学医学部), ²高知大学総合研究センター分子生物学教室 (〒783-8505 高知県南国市岡豊町小蓮高知大学総合研究センター)

Received 3 October 2016, Accepted 31 October 2016

子はプロセッシング促進に働くことでmiRNA産生を増加させる³⁰⁾。一方で、負に制御する因子としてLin28A/BやMusashi homolog 2/ Hu antigen R, ADAR1/2, ER α 等が報告されており、これらの因子はプロセッシング経路を阻害しmiRNA産生を抑制する^{6, 30)}。これらに加え、我々は、miRNA生合成機構における新たな制御因子としてRNA結合タンパク質Nuclear Factor 90 (NF90)-NF45複合体を見出している。

2. miRNA生合成機構におけるNF90-NF45の役割

NF90は、4種類のスプライシングバリエーションが存在し(NF90ファミリー: NF90a, NF90b, NF110a, NF110b)、結合パートナーであるNF45と複合体(NF90-NF45)を形成して主に核に局在するタンパク質である。NF90およびNF45は、二本鎖RNA結合に関与するdsRNA binding domain (dsRBD)あるいは一本鎖核酸への結合に関与するArg-Gly-Gly (RGG)モチーフを有しており(図2A)、様々

なRNAおよびDNAに結合することが分かっている。我々のグループは、以前に、主要組織適合遺伝子複合体(major histocompatibility complex: MHC)クラスII遺伝子の転写を調節するDNA領域に存在するパリンドローム構造に結合する因子としてNF90を単離、同定した⁴¹⁾。この発見の後に、他のグループよりNF90がアデノウイルス由来のVirus associated RNA (VARNA)と呼ばれるncRNAの変異型に結合することが報告された²⁰⁾。我々は、NF90が結合するパリンドローム構造とVARNAの二次構造に共通してステムループ構造が存在することに着目し、NF90がステムループ構造を認識して核酸に結合して機能しているのではないかと想定した。加えて、NF90-NF45が結合するVARNAとmiRNA前駆体(pri-miRNAおよびpre-miRNA)のステムループ構造は非常に類似しており、且つVARNAはpre-miRNA同様にExportin-5により核外に輸送されることが知られている。これらの知見から我々は、NF90あるいはNF90-NF45がmiRNA前駆体に結合しmiRNA生合成機構に関与するのではないかと仮説を立てた。特に、上述のようにNF90-NF45は主に核に局在するので、当該タンパク質は核内のイベントであるpri-miRNAからpre-miRNAのプロセッシング過程に影響を及ぼすのではないかと考えた。そこで、ヒト胎児腎細胞由来の培養細胞株HEK293T細胞にNF90ファミリーおよびNF45を過剰発現させた細胞の抽出液を用いて*in vitro* pri-miRNAプロセッシングアッセイを行った(図2B)。*In vitro* pri-miRNAプロセッシングアッセイとは、放射性同位体でラベルしたpri-miRNAに細胞抽出液を加え、pri-miRNAのプロセッシングを誘導し、pri-miRNA(図2B黒矢印)および中間産物のpre-miRNA(図2B灰矢印)、最終産物の成熟型miRNA(図2B白矢印)の量を検出する手法である。その結果、コントロールおよびNF45やNF90ファミリー単独で過剰発現した細胞の抽出液に比べ、NF90ファミリーとNF45の両タンパク質を過剰発現させた細胞の抽出液においてpri-miRNAのプロセッシングが顕著に抑制された(図2Bレーン2-7とレーン8-11の比較)。この結果よりNF90-NF45はpri-miRNAのプロセッシングに対し抑制的に機能することが示唆された。さらにNF90とNF45、DGCR8(Drosha-DGCR8のpri-miRNA結合活性はDGCR8に依存する)の組換えタンパク質と放射性同位体でラベルしたpri-miRNAを用いたRNA Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA)を行い、NF90-NF45はDGCR8に比べpri-miRNAに強い結合活性を示すことを明らかにした(図2Cレーン2-4とレーン5-7の比較)。これらの知見は、過剰発現したNF90-NF45がpri-miRNAに結合しDrosha-DGCR8のアクセスを阻害することを示唆している。その結果、過剰発現した当該タンパク質はpri-miRNAのプロセッシングを抑制し、miRNA産生を負に制御するものと考えられた(図3)⁴⁰⁾。

3. NF90-NF45過剰発現マウスの表現型解析

次に我々は、個体レベルにおいても過剰発現したNF90-NF45がmiRNA生合成を負に制御するかを検証するため、NF90-NF45過剰発現(Transgenic: Tg)マウスの作出を試みた。NF90-NF45 Tgマウスの作出にあたって、pCAGGSベクターの β -actinプロモーターの下流にNF90あるいはNF45を組み込んだトランスジェーンを用いて、

図2 NF90-NF45の構造と機能 (A) ヒトNF90およびNF45の分子構造を示す。タンパク質相互作用に重要であるdsRBDとzinc finger associated (DZF)モチーフ、二本鎖RNA結合ドメインであるdsRNA binding domain (dsRBD)、核移行シグナル(Nuclear localization signal: NLS)、一本鎖の核酸結合モチーフのRGGモチーフ、Glutamine-rich domainをそれぞれ示す。(B) NF90ファミリーおよびNF45を過剰発現させたHEK293T細胞抽出液に放射性ラベルしたpri-miR-30aを加え、37℃でプロセッシング反応を促した。その後RNAを抽出して変性ポリアクリルアミドゲルにて泳動を行い、オートラジオグラフィーにて視覚化した。黒矢印はpri-miR-30a、灰矢印はpre-miR-30a、白矢印はmiR-30aを示す。RNAマーカーの単位であるntはnucleotideを示す。(C) let-7aの前駆体をプローブとしたEMSA。レーン2-4はNF90およびNF45組換えタンパク質とプローブ、レーン5-7はDGCR8組換えタンパク質とプローブを用いた。黒矢印はNF90-NF45とプローブの複合体、白矢印はDGCR8とプローブの複合体を示す。40) より引用改変。

図3 NF90-NF45によるmiRNA生合成機構の抑制モデル 過剰発現したNF90-NF45はpri-miRNAに結合することでDrosha-DGCR8のアクセスを阻害し、pri-miRNA プロセッシングを阻害する。これによりpri-miRNAはプロセッシングが抑制され細胞内に蓄積し、miRNAの産生は低下する。

NF90 Tg マウスとNF45 Tg マウスをそれぞれ作出した。さらにこれらのマウスを掛け合わせてNF90-NF45 Tg マウス2系統 (Tg1, 2) を作出した。まず我々は、作出したNF90-NF45 Tg マウスの表現型解析を行った。その結果、野生型 (Wild type: WT) マウスに比べNF90-NF45 Tg1およびTg2マウスは顕著な体重の減少が観察された (図4 A)。加えて、NF90-NF45 Tg マウスの体重の減少は、X-線CT解析により、骨格筋量の減少に起因することが明らかとなった (図4 B)。次にNF90-NF45 Tg マウスの骨格筋量の減少の原因を解明するために、15週齢のWTとNF90-NF45 Tg マウス骨格筋の組織学的解析を行った (図5 A)。その結果、NF90-NF45 Tg マウスはWT マウスに比べ筋繊維のサイズが細く筋萎縮を発症することが明らかとなった (図5 B)。加えて、NF90-NF45 Tg マウスの骨格筋の筋繊維では核が繊維の中心に存在する中心核繊維が多数観察された (図5 A, 白矢尻)。通常、正常に成熟した骨格筋の筋繊維は核が繊維の辺縁に存在する。一方で、生体の骨格筋における中心核の発生は異常な筋繊維を示し、未成熟な筋繊維および筋疾患発症の指標とされている。次に我々は、NF90-NF45 Tg マウスの骨格筋において発生段階のどの時期において中心核を発症するかを検討するために、15週齢から週齢を遡り6週齢と3週齢のマウスの組織学的解析を行った (図5 A)。その結果、6週齢NF90-NF45 Tg マウスの骨格筋は15週齢同様の割合で中心核が観察された (図5 A, C)。これに対し、3週齢NF90-NF45 Tg マウスの骨格筋では中心核が観察されなかった (図5 A, C)。上記の結果より、成長期のNF90-NF45 Tg マウスの骨格筋において萎縮および中心核が発生することがわかった。加えて、NF90-NF45 Tg マウスの骨格筋におけるNF90およびNF45の発現は、3週齢からすでに過剰発現しており (未掲載データ)、過剰発現したNF90-NF45が中心核発症に影響を及ぼす可能性が示唆された。また、この表現型は中心核病というヒトの筋疾患に酷似している。中心核病は、中心核を伴う筋萎縮により全身の筋力が著しく低下する難治性

図4 NF90-NF45 Tg マウスにおける表現型解析 (A) WT マウスおよびNF90-NF45 Tg マウスの7-13週齢の体重の変化を示す (左図は雄マウス、右図は雌マウスの体重)。○はWT マウス (n=7), ■はNF90-NF45 Tg1 マウス (n=7), ◆はNF90-NF45 Tg2マウス (n=3) を示す。*, P<0.01。 (B) 14週齢のWT マウスおよびNF90-NF45 Tg マウスの後肢 (右肢: R, 左肢: L) におけるX線CT解析の結果。下のグラフはX線CT解析の画像より野生型マウスおよびNF90-NF45 Tg マウスの骨格筋量を算出した結果。□は野生型マウス, ■はNF90-NF45 Tg マウスを示す。**, P<0.01 (n=4)。44) より改変引用。

図5 NF90-NF45 Tg マウスの骨格筋における組織学的解析 (A) 3, 6, 15週齢のWT マウスおよびNF90-NF45 Tg マウスの大腿四頭筋におけるヘマトキシリン・エオジン染色の結果。白矢尻は中心核を示す。 (B) 15週齢のWT マウスおよびNF90-NF45 Tg マウスの大腿四頭筋のHE染色の結果より導いた、筋繊維のサイズの平均値を示す。測定にはWT マウスおよびNF90-NF45 Tg マウスの筋線維100個のサイズをImageJにより測定した。*, P<0.05 (n=3)。 (C) 3, 6, 15週齢のWT マウスおよびNF90-NF45 Tg マウスの骨格筋繊維における中心核の数を測定した。それぞれのマウスの筋繊維100個を測定し、中心核の割合を算出した。**, P<0.01 (n=3)。 (D) Dnm2の発現を解析するためWT マウス (n=6) およびNF90-NF45 Tg マウス (n=7) の骨格筋抽出液を用いて、Western blot解析を行った。GAPDHは、内部標準遺伝子。下のグラフはバンド強度を定量化したもの。*, P<0.05。44) より改変引用。

の筋疾患である。これまでに中心核病を引き起こす原因遺伝子はいくつか報告されており、乳児重症型を誘導するX染色体劣性遺伝 Myotubularin1 (MTM1)、重症～中等型を誘導する Amphiphysin2 (BIN1)、重症～軽症型を誘導する Dynamin2 (Dnm2) 等が挙げられる²⁷⁾。これらの遺伝子に変異および発現変動があると中心核病を発症する。特にDnm2の変異および発現増加に由来する中心核病は、青年期において発症するという特徴を持つことが明らかとなっている^{2,9)}。さらにマウスの骨格筋にDnm2を過剰発現させた動物実験においても6週齢以降において中心核病を発症することが報告されている³³⁾。以上の知見より、NF90-NF45 Tg マウスは骨格筋においてDnm2の発現が変動しており、そのことが要因で中心核病を発症しているのではないかと想定された。そこで我々はこのことを検証するために、WT マウスの骨格筋とNF90-NF45 Tg マウスの骨格筋におけるDnm2の発現解析を行った。その結果、WT マウスに比べNF90-NF45 Tg マウスの骨格筋においてDnm2の発現が上昇していることが明らかとなった(図5D)。以上の結果より、NF90-NF45 Tg マウスの骨格筋はDnm2の発現が増加することで中心核病を発症することが示唆された。

4. NF90-NF45 Tg マウスの骨格筋において発現変動するmiRNAの同定

次に我々は、NF90-NF45の過剰発現によるDnm2の発現増加メカニズムの解明を試みた。先に述べたように、過剰発現したNF90-NF45はmiRNAの生合成機構を抑制する⁴⁰⁾。従って、NF90-NF45 Tg マウスの骨格筋において過剰発現したNF90-NF45がmiRNA生合成機構の抑制を介してDnm2の発現を増加させている可能性が考えられた。そこで我々はNF90-NF45 Tg マウスの骨格筋におけるmiRNAの発現変動を網羅的に調べるためにWTとNF90-NF45 Tg マウスの骨格筋を抽出し、miRNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、WT マウスに比べNF90-NF45 Tg マウスの骨格筋においてmiR-133aおよびmiR-133b (miR-133) を含む23種のmiRNAの発現が0.5倍以下に低下することが明らかとなった。これまでに他のグループより、miR-133ノックアウトマウスの骨格筋においてDnm2の発現が増加し中心核病を誘導することが報告されている³³⁾。従って、我々はDnm2の産生調節因子であるmiR-133に着目し、以下の解析を行った。まず我々はWT マウスとNF90-NF45 Tg マウスのmiR-133aおよびmiR-133bの量をqRT-PCR法により解析した(図6A)。その結果、WT マウスに比べNF90-NF45 Tg マウスの骨格筋においてmiR-133aおよびmiR-133bの発現が有意に低下していることが明らかとなった。さらに、これらの発現低下したmiRNAが過剰発現したNF90-NF45のmiRNA生合成の抑制作用によるものならば、図3の仮説モデルのようにpri-miRNAの蓄積が観察されるはずである。そこで我々は、miR-133aおよびmiR-133bの前駆体であるpri-miR-133a-1, pri-miR-133a-2とpri-miR-133bをqRT-PCRにより測定した(図6B)。その結果、WTに比べNF90-NF45 Tg マウスの骨格筋において測定した全てのpri-miRNAの蓄積が観察された。以上の結果よりNF90-NF45 Tg マウスの骨格筋においてmiR-133の生合成が抑制されることでDnm2の発現が上昇し、中心核病が誘導されるものと考えられた。

図6 NF90-NF45 Tg マウスの骨格筋におけるmiR-133の発現測定 15週齢のWTマウスおよびNF90-NF45 Tgマウスの骨格筋よりtotal RNAを抽出し、qRT-PCRによりmiRNAおよびpri-miRNAの産生量を測定した。(A)miR-133aおよびmiR-133b。(B)pri-miR-133a-1およびpri-miR-133a-2, pri-miR-133b。□は野生型マウス、■はNF90-NF45 Tgマウスを示す。**, P<0.01 (n=4-9)。44)より改変引用。

5. NF90-NF45過剰発現によるpri-miR-133aのプロセシング阻害

次に我々は、過剰発現したNF90-NF45がmiR-133生合成機構におけるプロセシング過程に影響するかを明らかにするため、*in vitro* pri-miRNA プロセシングアッセイを行った。*In vitro* pri-miRNA プロセシングアッセイには、マウス筋芽細胞株C2C12細胞にNF90, NF45を単独または両方(NF90-NF45)を過剰発現させた細胞の抽出液を用いた(図7A)。プローブとして、miR-133前駆体の一つであるpri-miR-133a-1を放射性同位体でラベルして用いた。これらの細胞の抽出液とpri-miR-133a-1を混合し、プロセシング反応を促した後にRNA抽出を行った。これらのRNAを変性ゲルにて電気泳動し、pri-miR-133a-1とmiR-133aの発現量を比較することでNF90-NF45によるpri-miR-133a-1へのプロセシングの影響を調べた(図7B)。その結果、コントロールおよびNF45を過剰発現させた細胞の抽出液に比べNF90を過剰発現させた細胞の抽出液でpri-miR-133a-1の蓄積(図7B, 黒矢印)およびmiR-133aの産生低下(図7B, 白矢印)が観察された(図7Bレーン2, 4とレーン3の比較)。さらにNF90とNF45の両方を過剰発現させた細胞の抽出液はNF90単独に比べてより強いpri-miR-133a-1の蓄積およびmiR-133aの産生抑制が観察された(図7Bレーン3とレーン5の比較)。これらの結果より過剰発現したNF90-NF45はpri-miR-133a-1のプロセシングを抑制することが明らかとなった。さらにNF90-NF45がpri-

図7 NF90-NF45 過剰発現によるpri-miR-133のプロセッシング阻害 (A) C2C12細胞にNF90およびNF45を過剰発現させた細胞抽出液を用いてWestern blot解析を行い、NF90およびNF45の発現を測定した。GAPDHは内部標準遺伝子。(B) NF90およびNF45を過剰発現させたC2C12細胞抽出液に放射性ラベルしたpri-miR-133a-1をプローブとして加え、37℃でプロセッシング反応を促した。60分間の反応後、RNAを抽出して変性ポリアクリルアミドゲルにて泳動を行い、pri-miR-133a-1(←)およびmature-miR-133a(⇐)のバンド強度を測定した。右の図は長時間の露光により得られたデータ。(C) NF90とNF45の組換えタンパク質を用いて、RNA-EMSAを行った。プローブは放射性ラベルしたpri-miR-133a-1を用いた。ゲル写真の下の数値は、シフトしたバンドとフリープローブのバンド強度を示す。44)より改変引用。

図8 NF90-NF45 Tg マウスにおける中心核病の発症の仮説モデル 骨格筋において過剰発現したNF90-NF45はpri-miR-133に結合してmiR-133生合成機構の抑制を介し、miR-133aの標的であるDnm2の発現上昇を促す。これにより筋成熟が異常となり、筋繊維の萎縮および中心核が生じることが示唆された。

miR-133a-1に直接結合するかを検証するために、NF90およびNF45の組換えタンパク質を用いてEMSAを行った(図7C)。その結果、NF45単独はpri-miR-133a-1に結合しなかったが、NF90単独およびNF90-NF45はpri-miR-133a-1に結合することが明らかとなった(図7C)。またNF90-NF45はNF90単独に比べpri-miR-133a-1に対してより強い結合活性を示すことが明らかとなった(図7C)。これらの結果より、NF90-NF45はpri-miR-133に結合し、そのプロセッシングを抑制させることでmiR-133の産生を低下させることが明らかとなった。以上のNF90-NF45 Tg マウスを用いた実験および*in vitro* 実験によるNF90-NF45過剰発現の機能解析から、骨格筋におけるNF90-NF45過剰発現の中心核病発症モデルとして下記が想定された。

「NF90-NF45の過剰発現 → pri-miR-133のプロセッシング抑制 → miR-133産生低下 → Dnm2発現上昇 → 中心核病発症」(図8)⁴⁴⁾。

6. NF90-NF45の発現増加と疾患発症との関連性

これまでの我々の*in vitro*および*in vivo*解析より、NF90-NF45の過剰発現はmiRNA生合成を負に制御することが明らかとなった^{40, 44)}。本節では、NF90-NF45の発現増加によるmiRNA産生変動を介した疾患発症について紹介する。これまでにNF90およびNF45は、様々な腫瘍において発現増加が報告されている。NF90は乳癌や卵巣癌、肺癌において^{18, 19, 24)}、NF45は結腸癌、食道扁平上皮癌、神経膠腫において発現が増加する^{7, 25, 37)}。これらに加え、我々は新たに肝細胞癌患者手術標本の癌部においてNF90およびNF45の発現が有意に増加することを見出していた(図9A)。一方で様々な腫瘍において多くのmiRNAの発現が低下することが報告されており³⁴⁾、この中には腫瘍化抑制に作用するmiRNA (anti-oncomiR)が含まれることが知られている。従って、癌部において発現増加したNF90-NF45はanti-oncomiRの生合成を抑制することで腫瘍化を促進する可能性が考えられた。そこで我々はこの作業仮説を検証するため、NF90-NF45が高く発現している肝細胞癌由来の細胞株Huh7細胞を用いNF90-NF45をノックダウンし肝細胞癌におけるNF90-NF45の機能解析を試みた。これまでにNF90およびNF45は互いのタンパク質の安定化に寄与することが知られておりNF90単独のノックダウンによりNF45の発現が低下することが明らかとなっている¹⁷⁾。我々はこの系を利用し、Huh7細胞にNF90 siRNA (siNF90)を導入しNF90およびNF45のノックダウン(KD) (NF90-NF45 KD)を行った。はじめに、我々は癌部におけるNF90-NF45が影響するmiRNAを調べるために、コントロールHuh7細胞とNF90-NF45 KD Huh7細胞にて、miRNAマイクロアレイ解析を行った。その結果、コントロール細胞と比較してNF90-NF45 KD Huh7細胞において7種類のmiRNA発現が2倍以上に増加していた。我々は、これらmiRNAの中でanti-oncomiRとして知られるmiR-7に着目し、以下の解析を行った^{28, 45)}。まずmiR-7生合成機構におけるNF90-NF45の影響を検討するため、コントロールHuh7細胞とNF90-NF45 KD Huh7細胞におけるmiR-7産生量をqRT-PCR法により測定した(図9B)。その結果、コントロール細胞と比較しNF90-NF45 KD Huh7細胞においてmiR-7の産生が増加することが明らかとなった。さらにこれらの細

図9 癌部において発現増加したNF90-NF45の役割

(A) 肝細胞癌患者手術標本18検体の癌部および隣接する非癌部における抽出液を用い、Western blot 解析によりNF90およびNF45の発現解析を行った。グラフはバンド強度を定量化したもの。**, $P<0.005$ 。(BとC) Huh7細胞にNegative control siRNA (siNTC) またはNF90 siRNA (siNF90)を導入したHuh7細胞のRNAを抽出し、qRT-PCR法によりmiR-7 (B) およびpri-miR-7 (C) の発現を測定した ($n=3$)。 (D) Huh7細胞にsiNTCまたはsiNF90を導入し、それぞれの細胞の抽出液におけるEGFRの発現解析をWestern blot 解析により測定した。グラフはバンド強度を定量化したもの。*, $P<0.05$ 。(E) NF90-NF45の発現増加が腫瘍細胞の増殖に影響するかを検討するためにHuh7細胞にsiNTCまたはsiNF90を導入し、MTSアッセイによりそれぞれの細胞の増殖能を測定した。*, $P<0.05$ 。23) より改変引用。

胞においてmiR-7の前駆体であるpri-miR-7-1の蓄積を検討した結果、NF90-NF45 KD Huh7細胞においてpri-miR-7-1の蓄積が有意に減少した(図9 C)。これらの結果より、癌部において発現増加したNF90-NF45はanti-oncomiRであるmiR-7の産生を抑制することが明らかとなった。またmiR-7は腫瘍化促進に作用する因子の一つである上皮成長因子受容体(EGFR)を標的とすることが知られている^{11,43)}。そこで、コントロールHuh7細胞およびNF90-NF45 KD Huh7細胞のEGFR発現を比較した結果、NF90-NF45 KD Huh7細胞においてEGFRの発現が有意に低下することが明らかとなった(図9 D)。加えて、NF90-NF45 KD Huh7細胞は、コントロール細胞と比べ細胞の増殖が顕著に低下することも明らかとなった(図9 E)。以上の結果より、肝細胞癌におけるNF90-NF45の発現増加は、miR-7の産生を抑制してEGFRの発現を亢進することで、腫瘍化促進的に作用することが示唆された²³⁾。

7. miRNA 生合成機構におけるRNA 結合タンパク質の役割と今後の展望

miRNAは組織特異的および発生段階特異的に発現することが知られており、このいくつかの発現調節にはRNA 結合タンパク質が関与することが報告されている。このmiRNA 生合成の制御に関するRNA 結合タンパク質の発現変動あるいはRNA 結合能の異常は、miRNA 生合成機構の破綻を招き組織形成や発生の異常を引き起こす。たとえば、Lin28A/Bの発現増加はlet-7生合成を抑制し、ヒトの乳癌や結腸癌の増殖を促進することが見出されている³⁸⁾。またpre-miRNAのプロセシング促進因子であるMBNL1の機能抑制はmiR-1の生合成が阻害され筋ジストロフィーが誘導される³⁹⁾。さらにFMR1 mRNA 5'-UTRのCGGリピート配列の挿入は、CGGリピート配列とDrosha-DGCR8が積極的に結合することによりDrosha-DGCR8のpri-miRNAのプロセシングを阻害し、脆弱X 随伴振戦/失調症候群を誘導することも明らかとなっている⁴²⁾。上記に加え、我々は、骨格筋におけるNF90-NF45過剰発現がmiR-133の生合成を抑制し、中心核病を誘導すること⁴⁴⁾ および、癌組織におけるNF90-NF45の発現増加はanti-oncomiRであるmiR-7の生合成を抑制し癌細胞の増殖を促進することも見出している²³⁾。このように、miRNA 生合成の制御に関するRNA 結合タンパク質の発現変動およびRNA 結合能の異常はmiRNAの生合成機構の破綻を誘導し疾患発症を招く。従って、当該RNA 結合タンパク質自身の異常がもたらす疾患の治療には変動したmiRNAの補填・阻害、あるいは当該RNA 結合タンパク質を標的とする創薬が有効であると考えられる。現在、肺がんにおけるlet-7、前立腺癌におけるmiR-34の補填療法や心疾患および癌におけるmiR-21の阻害療法の開発が積極的に進められている。またmiRNA 生合成を制御するRNA 結合タンパク質を標的とした創薬に関しては、Musashiに対する創薬の開発が進んでいる。MusashiはmiRNA 生合成を抑制するRNA 結合タンパク質の一つであり、膵臓癌において発現増加する。これまでにマウスに移植した膵臓癌にMusashiを標的とするアンチセンスオリゴを投与してMusashiの発現を抑制させることで膵臓癌の増殖を低下させることが見出されている¹²⁾。今後はこのようなmiRNAの補填・阻害療法やNF90-NF45を含むmiRNA 生合成の制御に関するRNA 結合タンパク質を軸に置いた新たなmiRNA 治療法の開発が進むと考えられ、これらの基礎研究の遂行と成功が期待されている。

最後に、今回紹介したNF90-NF45やLin28, MusashiなどのmiRNA 生合成を制御するRNA 結合タンパク質の多くはヒトやマウス、アフリカツメガエル、ゼブラフィッシュといった幅広い生物種において保存されている。しかしながら、機能が明らかとなっているRNA 結合タンパク質は全体の一握りであり、今後のRNA 結合タンパク質の研究の進展が期待されている。また、RNA 結合タンパク質によるmiRNA 生合成の制御を丁寧に読み解くことでmiRNAが制御する生命現象の全容を解き明かす手掛かりになると考えている。

謝 辞

本稿で紹介した研究は、高知大学総合研究センターで行

われ、当センター機器施設および動物施設の皆様にご協力を頂きました。ここに深く感謝を申し上げます。さらに今回、寄稿の機会をお与えいただきました村田芳博先生および貴重なご意見を頂きました査読者の先生方に深くお礼を申し上げます。

文 献

- 1) Bartel, D.P., *Cell*, 116, 281-297 (2004)
- 2) Bitoun, M., Maugendre, S., Jeannet, P.Y., Lacène, E., Ferrer, X., Laforêt, P., Martin, J.J., Laporte, J., Lochmüller, H., Beggs, A.H., Fardeau, M., Eymard, B., Romero, N.B. & Guicheney, P.: *Nat. Genet.*, 37, 1207-9 (2005)
- 3) Bohnsack, M.T., Czaplinski, K. & Go, D.: *RNA*, 10, 185-191 (2004)
- 4) Brennecke, J., Hipfner, D.R., Stark, A., Russell, R.B. & Cohen, S.M.: *Cell*, 113, 25-36 (2003)
- 5) Chen, C.Z., Li, L., Lodish, H.F. & Bartel, D.P., *Science*, 303, 83-86 (2004)
- 6) Choudhury, N.R., de Lima Alves, F., de Andrés-Aguayo, L., Graf, T., Cáceres, J.F., Rappsilber, J. & Michlewski, G.: *Genes Dev.*, 27, 24-38 (2013)
- 7) Chung, F.H., Lee, H.H. & Lee, H.C.: *PLoS One*, 8, e65683 (2013)
- 8) Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., Iorio, M.V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Aqeilan, R.I., Zupo, S., Dono, M., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C., Kipps, T.J., Negrini, M. & Croce, C.M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102, 13944-13949 (2005)
- 9) Cowling, B.S., Chevremont, T., Prokic, I., Kretz, C., Ferry, A., Coirault, C., Koutsopoulos, O., Laugel, V., Romero, N.B. & Laporte, J.: *J. Clin. Invest.*, 124, 1350-1363 (2014)
- 10) Denli, A.M., Tops, B.B.J., Plasterk, R.H.A., Ketting, R.F. & Gregory, J.H.: *Nature*, 432, 231-235 (2004)
- 11) Engelman, J.A.: *Nat. Rev. Cancer*, 9, 550-562 (2009)
- 12) Fox, R.G., Lytle, N.K., Jaquish, D.V., Park, F.D., Ito, T., Bajaj, J., Koechlein, C.S., Zimdahl, B., Yano, M., Kopp, J.L., Kritzik, M., Sicklick, J.K., Sander, M., Grandgenett, P.M., Hollingsworth, M.A., Shibata, S., Pizzo, D., Valasek, M.A., Sasik, R., Scadeng, M., Okano, H., Kim, Y., MacLeod, A.R., Lowy, A.M. & Reya, T.: *Nature*, 534, 407-11 (2016)
- 13) Friedman, R.C., Farh, K.K., Burge, C.B. & Bartel, D.P.: *Genom Res.*, 19, 92-105 (2009)
- 14) Gregory, R.I., Chendrimada, T.P., Cooch, N. & Shiekhattar, R.: *Cell*, 123, 631-640 (2005)
- 15) Gregory, R.I., Yan, K.P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N. & Shiekhattar, R.: *Nature*, 432, 235-240 (2004)
- 16) Grishok, A., Pasquinelli, A.E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D.L., Fire, A., Ruvkun, G. & Mello C.C.: *Cell*, 106, 23-34 (2001)
- 17) Guan, D., Altan-Bonnet, N., Parrott, A.M., Arrigo, C.J., Li, Q., Khaleduzzaman, M., Li, H., Lee, C.G., Pe'ery, T. & Mathews, M.B.: *Mol. Cell Biol.*, 28, 4629-4641 (2008)
- 18) Guo, N.L., Wan, Y., Tosun, K., Lin, H., Msiska, Z., Flynn, D.C., Remick, S.C., Vallyathan, V., Dowlati, A., Shi, X., Castranova, V., Beer, D.G. & Qian, Y.: *Clin. Cancer Res.*, 14, 8213-8220 (2008)
- 19) Guo, Y., Fu, P., Zhu, H., Reed, E., Remick, S.C., Petros, W., Mueller, M.D. & Yu, J.J.: *Oncol. Rep.*, 27, 286-292 (2012)
- 20) Gwizdek, C., Ossareh-nazari, B., Brownawell, A.M., Evers, S., Macara, I.G. & Dargemont, C.: *J. Biol. Chem.*, 279, 884-891 (2004)
- 21) Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D. & Hannon, G.J.: *Nature*, 404, 293-296 (2000)
- 22) Han, J., Lee, Y., Yeom, K.H., Kim, Y.K., Jin, H. & Kim, V.N.: *Genes Dev.*, 18, 3016-3027 (2004)
- 23) Higuchi, T., Todaka, H., Sugiyama, Y., Ono, M., Tamaki, N., Hatano, E., Takezaki, Y., Hanazaki, K., Miwa, T., Chin See, L.S., Morisawa, K., Tsuda, M., Taniguchi, T. & Sakamoto, S.: *J. Biol. Chem.*, in press, (2016)
- 24) Hu, Q., Lu, Y.Y., Noh, H., Hong, S., Dong, Z., Ding, H.F., Su, S.B. & Huang, S.: *Oncogene*, 32, 3933-3943 (2014)
- 25) Huang, Q., He, X., Qiu, X., Liu, X., Sun, G., Guo, J., Ding, Z., Yang, L., Ban, N., Tao, T. & Wang, D.: *Tumor Biol.*, 35, 10149-10157 (2014)
- 26) Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Balint, E., Tuschl, T. & Zamore, P.D.: *Science*, 293, 834-838 (2001)
- 27) Jungbluth, H., Wallgren-Pettersson, C. & Laporte, J.: *Orphanet J. Rare Dis.*, 3, 26 (2008)
- 28) Kefas, B., Godlewski, J., Comeau, L., Li, Y., Abounader, R., Hawkinson, M., Lee, J., Fine, H., Chiocca, E.A., Lawler, S. & Purow, B.: *Cancer Res.*, 68, 3566-3572 (2008)
- 29) Ketting, R.F., Fischer, S.E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G.J. & Plasterk, R.H.: *Genes Dev.*, 2654-2659 (2001)
- 30) Krol, J., Loedige, I. & Filipowicz, W.: *Nat. Rev. Genet.*, 11, 597-610 (2010)
- 31) Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S. & Kim, V.N.: *Nature*, 425, 415-419 (2003)
- 32) Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H. & Kim, V.N.: *EMBO J.*, 23, 4051-4060 (2004)
- 33) Liu, N., Bezprozvannaya, S., Shelton, J.M., Frisard, M.I., Hulver, M.W., Mcmillan, R.P., Wu, Y., Voelker, K.A., Grange, R.W., Richardson, J.A., Bassel-duby, R. & Olson, E.N.: *J. Clin. Invest.*, 121, 3258-3268 (2011)
- 34) Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A., Downing, J.R., Jacks, T., Horvitz, H.R. & Golub, T.R.: *Nature*, 435, 834-838 (2005)
- 35) Lund, E., Güttinger, S., Angelo, C., James, E.D. & Ulrike, K.: *Science*, 303, 95-98 (2004)
- 36) Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Lührmann, R. & Tuschl, T.: *Cell*, 110, 563-574 (2002)
- 37) Ni, S., Zhu, J., Zhang, J., Zhang, S., Li, M., Ni, R., Liu, J., Qiu, H., Chen, W., Wang, H. & Guo W.: *Tumour Biol.*, 36, 747-56 (2015)
- 38) Piskounova, E., Polytarchou, C., Thornton, J.E., Lapierre, R.J., Pothoulakis, C., Hagan, J.P., Iliopoulos, D. & Gregory, R.I.: *Cell*, 147, 1066-1079 (2011)
- 39) Rau, F., Freyermuth, F., Fugier, C., Villemin, J.P., Fischer, M.C., Jost, B., Dembele, D., Gourdon, G., Nicole, A., Duboc, D.,

- Wahbi, K., Day, J.W., Fujimura, H., Takahashi, M.P., Auboeuf, D., Dreumont, N., Furling, D. & Charlet-Berguerand, N.: *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 18, 840-845 (2011)
- 40) Sakamoto, S., Aoki, K., Higuchi, T., Todaka, H., Morisawa, K., Tamaki, N., Hatano, E., Fukushima, A., Taniguchi, T. & Agata Y.: *Mol. Cell. Biol.*, 29, 3754-3769 (2009)
- 41) Sakamoto, S., Morisawa, K., Ota, K., Nie, J. & Taniguchi, T.: *Biochemistry*, 38, 3355-3361 (1999)
- 42) Sellier, C., Freyermuth, F., Tabet, R., Tran, T., He, F., Ruffenach, F., Alunni, V., Moine, H., Thibault, C., Page, A., Tassone, F., Willemsen, R., Disney, M.D., Hagerman, P.J., Todd, P.K. & Charlet-Berguerand, N.: *Cell Rep.*, 3, 869-880 (2013)
- 43) Shaw, R.J. & Cantley, L.C.: *Nature*, 441, 424-430 (2006)
- 44) Todaka, H., Higuchi, T., Yagyu, K., Sugiyama, Y., Yamaguchi, F., Morisawa, K., Ono, M., Fukushima, A., Tsuda, M., Taniguchi, T. & Sakamoto, S., *Mol. Cell. Biol.*, 35, 2295-2308 (2015)
- 45) Webster, R.J., Giles, K.M., Price, K.J., Zhang, P.M., Mattick, J.S. & Leedman, P.J.: *J. Biol. Chem.*, 284, 5731-5741 (2009)
- 46) Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G. & Cullen, B.R., *Genes Dev.*, 17, 3011-3016 (2003)

Abstract

Pathophysiological events induced by alteration of microRNA biogenesis pathway.

Hiroshi TODAKA^{1,2}, Takuma HIGUCHI², Shuji SAKAMOTO²

¹Department of Cardiovascular Control, Kochi Medical School, Kohasu, Oko-cho, Nankoku-shi, Kochi 783-8505, Japan

²Laboratory of Molecular Biology, Sience Research Center, Kochi Medical School, Kohasu, Oko-cho, Nankoku-shi, Kochi 783-8505, Japan

MicroRNAs (miRNAs), which are 21-25 nucleotides in length, regulate various developmental and cellular processes through translational inhibition of target messenger RNA in vertebrates. The biogenesis of miRNAs is strictly controlled by numerous RNA binding proteins (RBPs). Therefore, alteration in expression or RNA binding activity of the RBPs induces a number of diseases by aberrant generation of miRNAs. We previously demonstrated that overexpression of nuclear factor 90 (NF90)-NF45 complex suppresses primary-miRNA processing step, resulting in a reduction of mature miRNA production *in vitro*. In this review, we mainly presented the data obtained from phenotypic analysis of transgenic mice overexpressing NF90-NF45 (NF90-NF45 Tg mice). NF90-NF45 Tg mice exhibited skeletal muscle atrophy accompanied with centronuclear muscle fibers. Finally, we found that this centronuclear myopathy is induced by a rise in dynamin 2, a causative gene of the myopathy and a target of miR-133, through an NF90-NF45-induced inhibition of miR-133 biogenesis. In addition to this observation, we also examined whether the phenomenon that overexpression of NF90-NF45 negatively regulates the miRNA biogenesis

pathway involves in the occurrence of human diseases. As a result, the high expression of NF90-NF45 was found to accelerate cell proliferation by activation of epidermal growth factor receptor (EGFR)-dependent Akt signaling via an NF90-NF45-induced suppression of miR-7, which is targeted to EGFR, in hepatocellular carcinoma. Taken together, it was revealed that overexpression of NF90-NF45 influences pathophysiological events including myopathy and cancer through its ability to regulate the miRNA biogenesis pathway.

Key words: NF90, NF45, microRNA, miRNA biogenesis, myopathy, cancer