



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on the function of miR-124 during neurogenesis in the medaka, <i>Oryzias latipes</i> [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	加藤, 裕美子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第11162号
Issue Date	2013-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/54634
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Yumiko_Kato_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

自然史科学専攻 博士(理 学) 氏 名 加 藤 裕 美 子

学 位 論 文 題 名

Studies on the function of miR-124 during neurogenesis in the medaka, *Oryzias latipes*

(メダカ神経発生過程における miR-124 の機能に関する研究)

脳の形態は脊椎動物の種間できわめて多様で各部の外部形態のみならず、細胞の種類や数、神経回路、組織構造など、さまざまな段階で多様性がみられる。脳・神経系の多様性の獲得には、ゲノムのノンコーディング領域における機能が大きく貢献していると考えられているが、その働きの具体的プロセスが明らかになっているものは極めて少ない。

microRNA (miRNA) は約 22 塩基からなる一本鎖のノンコーディング RNA の一群で、相補的な配列をもつ標的 mRNA の 3'非翻訳領域 (UTR) に結合し、タンパク質発現を抑制する。マウス成体の脳に多量に発現する miRNA の 1 つに miR-124 がある。miR-124 は両生類、魚類などからも見つかっており、脊椎動物の胚発生過程において神経分化に関与することが近年の研究で明らかにされつつある。

ヒトと同じく脊椎動物であるメダカは、その大半の遺伝子がヒトと共通であるにも関わらず、ゲノムサイズはヒトの 4 分の 1 程度と小さくゲノム解析に適していること、胚が透明なため発生過程を生きたまま観察できることなどの利点から、発生遺伝学的解析に適したモデル生物の 1 つである。これまでにメダカの脳・神経系に発現する miRNA の機能を明らかにした報告がなかったことから、本研究ではメダカ神経発生過程における miR-124 の機能を解析することで他の脊椎動物との比較検討を可能とし、ひいては脊椎動物の脳の多様性がどのように生み出されたのかを理解することを目指した。

I. メダカ miR-124 のゲノム構成と発現

ゼブラフィッシュの miR-124 前駆体配列 (pre-miR-124) を用いたメダカゲノムの BLAST 検索により、21 塩基の mature miR-124 (mat-miR-124) 配列を含む 5 つの pre-miR-124 配列を同定した。mat-miR-124 に相同な配列をもつ locked nucleic acid (LNA) プローブを用いたノザンブロッティング、*in situ* ハイブリダイゼーションの結果、受精後 3 日胚以降に miR-124 の発現が見られ、発生が進むにつれて増加して行くことがわかった。加えて、眼を含む中枢神経系で miR-124 が強く発現することも示された。さらに、メダカの脳・眼の切片を用いた詳細な発現解析により、miR-124 が分化した神経細胞に発現するという結果が得られた。以上の結果から、メダカ miR-124 は神経形成過程に重要な役割をしていると考えられた。また、5 つの pre-miR-124 をコードする一次転写産物 (pri-miR-124) が時空

間的に異なる発現パターンを示すことが明らかとなり、それぞれの pri-miR-124 から産生される miR-124 の機能に違いがある可能性が示唆された。

II. メダカ miR-124 の標的遺伝子 *Ptbp* の配列と発現

マウス初期胚の中樞神経系において、miR-124 が組織特異的スプライシング抑制因子である polypyrimidine tract binding protein 1 (PTBP1) の翻訳を制御し、神経細胞への分化を促進するという報告がある (Makeyev *et al.*, 2007)。本研究では、NBRP メダカ EST データベースから見出した PTBP1 パラログ (*ptbp1a* と *ptbp1b*) の cDNA をもとに塩基配列とアミノ酸配列を同定し、メダカ PTBP1 が 4 か所の RNA 認識モチーフをもち、RNA 結合タンパク質として機能する可能性を示した。*in situ* ハイブリダイゼーションの結果から *ptbp1a* はユビキタスに、*ptbp1b* は耳胞特異的に発現することが明らかになり、それぞれに異なる機能を待っていると考えられた。さらに、*in silico* 予測により *ptbp1a* および *ptbp1b* の mRNA の 3'UTR に miR-124 結合モチーフが見つかり、miR-124 による転写後制御を受ける可能性が示唆された。

III. メダカ miR-124 による転写後制御

II で明らかとなった *ptbp1a* と *ptbp1b* の 3'UTR の結合モチーフに miR-124 が結合し、翻訳阻害を行っているかどうかを調べるために GFP レポーターアッセイを行った。GFP コード配列に miR-124 結合モチーフをつなげた RNA コンストラクトを作製し、miR-124 duplex とともに 1 細胞期のメダカ胚に注入すると、GFP 発現に著しい減少が見られた。一方で、GFP コード配列に mutated miR-124 標的サイトをつなげた RNA コンストラクトと miR-124 duplex を注入した場合には GFP が強く発現した。GFP コード配列に *ptbp1* 3'UTR 全体をつなげた RNA コンストラクトで同様の実験を行った場合も標的サイトの場合と同様の結果が得られた。これらの結果から、メダカ胚において miR-124 が *ptbp1* 3'UTR 上の標的サイトに結合してタンパク質発現を阻害していることが示された。

以上の解析結果から、メダカの胚発生過程において miR-124 が中枢神経系特異的に発現し、神経分化に関与すること、*ptbp1* 3'UTR に結合し翻訳阻害を行っていることが示された。本研究から、メダカの神経発生過程においても、他の脊椎動物と同様に miRNA による遺伝子発現制御機構が機能していることが明らかになった。さらに、5 つの pri-miR-124 がそれぞれに異なる標的遺伝子を有し、異なる機能を持つ可能性があることから、今後の詳細な機能解析により、神経系の形態・機能の多様性を生み出すメカニズムが明らかになることが期待される。