



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_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博 士 (理 学) 氏 名 加 藤 裕 美 子

審査担当者	主 査	教 授	枡 内 新
	副 査	教 授	増 田 隆 一
	副 査	准教授	柁 原 宏

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)

博士学位論文審査等の結果について (報告)

脊椎動物の脳は極めて多様で複雑な形態と機能をもつ一方、前脳・中脳・後脳からなる基本構造は進化初期の魚類の段階ですでに完成しており、形態形成に関わる調節因子などの保存性が高いにもかかわらず多様な形態と機能が作られる遺伝子発現の制御機構が進化発生学の大きなテーマのひとつになっている。近年、遺伝子発現の制御因子として、タンパク質に翻訳されないノンコーディング領域の中にあり、約 22 塩基からなる一群の一本鎖 RNA に転写され、相補的な配列をもつ標的 mRNA の 3'非翻訳領域 (UTR) に結合して mRNA の翻訳を阻害することによって機能する microRNA (miRNA) が注目を集めている。特に脳・神経系において、多くの miRNA が同定され、その機能解析が盛んに行われるようになるとともに、神経発生過程における miRNA の役割が指摘されてきた。しかしながら、脊椎動物の中でも数少ない日本発のモデル動物であるメダカにおいては、神経発生過程における miRNA の発現や作用機序を明らかにした報告はこれまでになかった。本論文は、直接的には神経系特異的な miRNA の 1 つである miR-124 に着目し、メダカ胚発生過程における miR-124 の発現パターンとその機能を明らかにすることを目的としているが、進化発生学的に考察することで、脊椎動物において脳の多様性がどのように獲得されたのかを理解するための基礎となる情報を与えるものとなっている。

miR-124 はさまざまな動物でよく保存されており、これまでの研究から、中枢神経系の形成や機能の維持に中心的な役割を担っていると考えられている。本論文の第 1 章では、メダカゲノムや miRNA のデータベースを利用した配列解析や二次構造予測から、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。さらに、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と *in situ* ハイブリダイゼーションの結果から、受精後 3 日胚以降に miR-124 の発現が強く見られるようになり、発生が進むにつれて眼を含む中枢神経系で増

加していくことがわかった。メダカの網膜の周縁部には CMZ と呼ばれる未分化な細胞が局在する領域がある。凍結切片を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションの結果、miR-124 のシグナルは網膜の層状構造の全体に見られたが、CMZ では見られないことがわかった。このことから、メダカ胚において miR-124 は未分化な神経幹細胞では発現しておらず、分化した神経細胞に広く発現していると考えられ、メダカ miR-124 が神経分化に関与している可能性を示した。また、5 つの pre-miR-124 をコードする一次転写産物 (pri-miR-124) は時空間的に異なる発現パターンを示していることから、染色体上にばらばらに局在する 5 つの miR-124 遺伝子は異なる性質のプロモーターを持ち、時空間的特徴をもって転写される結果、それぞれが脳の異なる部域を作ることに貢献している可能性を示唆した。

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)。第 2 章では、NBRP メダカの 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。加えて、*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 標的サイトが見つかり、miR-124 による転写後制御を受ける可能性があることもわかった。これらのデータをふまえて、第 3 章では、*ptbp1a* と *ptbp1b* の 3'UTR の標的サイトに miR-124 が結合することで確かに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 標的サイトをつなげた 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。対照として、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にも、標的サイトのみ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。また、この実験の成功から、発生過程のメダカ胚における miRNA の機能解析に、上記のようなレポーターアッセイの系が適用できることが示され、今後の活用が期待される。

本論文において、著者は、メダカの神経発生過程において他の脊椎動物と同様に miR-124 が標的 mRNA を転写後に制御することを示すとともに、miR-124 遺伝子の時空間的な発現制御が中樞神経系の形態と機能の多様化に寄与している可能性を示した。本論文の結果は、優れたモデル動物であるメダカ miR-124 をさらに詳細に解析することにより、miRNA の多様な機能が明らかになる可能性を示しており、脊椎動物の進化過程に獲得された神経系の形態・機能の多様性を生み出すメカニズムの解明にも寄与することが期待される。

よって著者は、北海道大学博士 (理学) の学位を授与される資格があるものと認められる。