

主論文の要旨

**Suppression of the TGF- β 1-induced protein
expression of SNAI1 and N-cadherin by miR-199a**

〔 TGF- β 1 により誘導される SNAI1 と N-カドヘリンの
タンパク質発現の miR-199a による抑制 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻
病態外科学講座 腫瘍外科学分野

(指導：椰野 正人 教授)

鈴木 俊裕

【緒言】

内在性に発現する 23 塩基前後の小分子 RNA であるマイクロ RNA (以下 miRNA) は、タンパク質に翻訳されない非コード RNA の一種である。miRNA は、標的遺伝子の mRNA の 3'非翻訳領域 (3'UTR) 内に存在する標的配列に結合し、標的遺伝子のタンパク質への翻訳過程を阻害する。miRNA は分化、増殖、アポトーシスなどの生物学的过程に関与し、がんにおいても発生、進行、転移に関与している。miR-199a は 1 番染色体上で miR-214 とクラスターとして存在し、上皮間葉転換に関わる転写因子により発現が制御される。本研究では、miR-199a と上皮間葉転換に関わる制御因子である SNAI1 との関係について、特に細胞接着分子の発現の変化に着目して解析した。

【方法】

miR-199a が SNAI1 の mRNA の翻訳を直接的に制御しているかを、ヒト胎児腎 HEK293 細胞を用いてルシフェラーゼアッセイ法で検討した。SNAI1 タンパク質発現に対する miR-199a の影響を検討するため、miR-199a を遺伝子導入したヒト肺腺癌 A549 細胞からタンパク質を抽出してウエスタンブロット法を行った。また、miR-199a が接着結合分子である E-カドヘリンと、N-カドヘリン、密着結合分子である claudin-1 のタンパク質の発現に及ぼす影響を、ウエスタンブロット法を行うことで検討した。さらに、上皮間葉転換を誘導する TGF- β 1 によるタンパク質の発現変化と miR-199a の働きとの関連を、A549 細胞を用いて検討した。miR-199a の標的配列を持たない SNAI1 発現プラスミドを作成し、miR-199a を介したタンパク質の発現変化が SNAI1 を介しているのかをウエスタンブロット法で検討した。

最後に miR-199a が N-カドヘリンの mRNA の翻訳を直接的に制御しているかを、ヒト胎児腎 HEK293 細胞を用いてルシフェラーゼアッセイ法で検討した。

【結果】

SNAI1 の 3'UTR 内の miR-199a の標的配列を含む部位を融合させたルシフェラーゼ発現プラスミドを作成し (Fig. 1A)。ルシフェラーゼアッセイ法を行った。コントロールと比較し miR-199a を発現させた細胞では、ルシフェラーゼ活性の低下を認めた。一方、標的配列に変異を導入したプラスミドでは miR-199a によるルシフェラーゼ活性の低下は認められなかった (Fig. 1B)。miR-199a は SNAI1 の 3'UTR 内の標的配列に特異的に作用して翻訳を抑制していることが示された。

miR-199a を遺伝子導入した A549 細胞では、コントロールと比較し SNAI1 のタンパク質発現の抑制が認められた。TGF- β 1 を作用させ SNAI1 の発現誘導を行った場合にも miR-199a による SNAI1 のタンパク質発現の抑制効果を認めた (Fig. 2A と 2B)。

miR-199a を強制発現させた A549 細胞では、TGF- β 1 による刺激の有無に関わらず、N-カドヘリンのタンパク質量は低下し、E-カドヘリンのタンパク質量は変化せず、claudin-1 のタンパク質量は上昇した (Fig. 3A と 3B)。

これらの接着分子の発現変化に miR-199a を介した SNAI1 の発現低下が関与しているか確認するため、miR-199a の標的部位を持たない SNAI1 を A549 細胞に遺伝子導入し、miR-199a を強制発現させると、N-カドヘリン、E-カドヘリンのタンパク質発現は変化しなかったが、claudin-1 のタンパク質の発現は低下した (Fig. 4A と 4B)。これにより miR-199a 発現細胞における claudin-1 の発現上昇の機序の少なくとも一部には、SNAI1 が関与していることが示された。

最後に、N-カドヘリンの 3'UTR 内の miR-199a の標的配列を含む部位を融合させたルシフェラーゼアッセイ発現プラスミドを作成し (Fig. 5A)、ルシフェラーゼアッセイ法を行った。その結果、コントロールと比較し miR-199a を発現させた細胞では、ルシフェラーゼアッセイ活性の低下を認めたことから (Fig. 5B)、SNAI1 と同様に、N-カドヘリンも miR-199a により直接転写を抑制されていることが示された。

【考察】

miR-199a の発現は上皮間葉転換に関わる転写因子により発現が制御される。また、上皮間葉転換はがんの浸潤および転移に関わる重要な機構である。本研究では miR-199a が SNAI1 と N-カドヘリンの発現を直接抑制すること、および、miR-199a が TGF- β 1 の負の制御因子として働くことを示した。miR-199a は N-カドヘリンの発現を強く抑制したが、ルシフェラーゼアッセイ法を用いた直接的な翻訳抑制能は十分なものではなかった。N-カドヘリンの制御に関しては転写因子やプロモーター領域のメチル化が報告されており、これらの因子への miR-199a の関与があると推測された (Fig. 6)。

SNAI1 は E-カドヘリンのプロモーター領域に作用して発現を抑制する。しかし、本研究では miR-199a により SNAI1 は抑制されたが、E-カドヘリンタンパク質の発現には変化が見られなかった。E-カドヘリンの制御には ZEB など他の転写因子も関与することから、miR-199a 発現細胞では E-カドヘリンタンパク質の発現には変化が見られなかったと推測する。

miR-199a は様々ながんで発現の上昇や低下が認められる。私たちは、miR-199a がネクチン様分子-2 の発現を介して、細胞の運動や生存に関わる ErbB2/ErbB3 シグナル伝達系を活性化することを報告してきた。したがって、miR-199a は上皮間葉転換に関わる細胞表面タンパク質のみならず、細胞増殖、細胞死、細胞運動に関わる他の細胞表面タンパク質の発現も介して、がんを含む細胞動態の変化に重要な働きをもつと考えられる。

【結論】

miR-199a は SNAI1 と N-カドヘリンを直接の標的とし TGF- β を介した上皮間葉転換に関わるタンパク質発現の負の制御因子として働くことが示された。