

平成 24 年度 学内研究助成金 研究報告書

近畿大学

課題番号：S R 05

研 究 種 目	■奨励研究助成金	□研究成果刊行助成金
	□21 世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	□21 世紀教育開発奨励金 (教育推進研究助成金)
研 究 課 題 名	microRNA-328 における BMP-2 誘導骨芽細胞分化調節機構の解明 -microRNA は骨粗鬆症予防食材スクリーニングマーカーとして活用できるか-	
研究者所属・氏名	研究代表者：農学部 水産学科 講師 伊藤 智広 共同研究者：	

1. 研究目的・内容

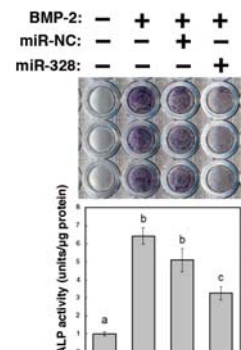
本研究課題は、骨芽細胞分化関連 miRNA として同定した miRNA-328 が BMP-2 刺激により無刺激の細胞と比較して有意に低下し、何らかの分化因子を上方制御していることが推察されたことから miRNA-328 の分化制御機構の解明は、非コード RNA マシナリーの動作原理を利用した新しい RNA 創薬開発や分化を促進する食品成分を探索する際の分化マーカーにつながると考え、検証した。

2. 研究経過及び成果

1. BMP-2 刺激による miRNA-328 の低下は前駆骨芽細胞の分化を誘導する

miRNA array の結果、BMP-2 刺激後の前駆骨芽細胞における miRNA-328 レベルが有意に低下したことから、マウス前駆骨芽細胞 MC3T3-E1 細胞に Precursor miRNA-328 (Life Technologies 社製) を Lipofectamine RNAi Max を用いたリポフェクション法により導入し、BMP-2 刺激を行ったところ、有意に分化の指標である ALP 活性が低下した(図 1)。この結果から、BMP-2 刺激後の miRNA-328 の低下は、前駆骨芽細胞の分化に重要役割を果たしていることが示唆された。

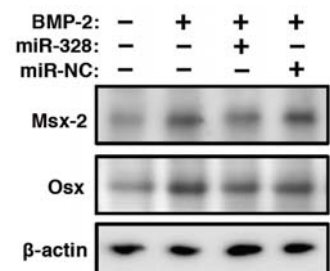
図 1 .miRNA-328 導入細胞による骨芽細胞分化抑制→



2. miRNA-328 は Msx2 を標的遺伝子とし、骨芽細胞の分化を調節する

Sanger Institute database および TargetScan5.2 などのバイオインフォマティクスを駆使し標的遺伝子を推察したところ分化に関わる分子 Msx2 が候補として挙げた。標的遺伝子を同定するために、western Blot 法、Real time-PCR 法によりタンパク及び mRNA 発現レベルを検証した。また、標的遺伝子の Msx2 の 3'-非翻訳領域を含むまたは含まないセンサーベクターをそれぞれ作製後、Luciferase reporter assay により標的遺伝子の結合を検証した。その結果、Precursor miRNA-328 導入 MC3T3-E1 細胞では、BMP-2 誘導の Msx2 のタンパク発現が有意に低下した。Msx2 の下流因子である Osx の発現も同様に低下した(図 2)。Luciferase reporter assay により、Msx2 の 3'-非翻訳領域を含むセンサーベクターと Precursor miRNA-328 導入細胞では発光強度が低下したが、3'-非翻訳領域を含まないまたは変異導入をしたセンサーベクターと Precursor miRNA-328 導入細胞では発光強度は低下しなかった。以上の結果から、miRNA-328 は Msx2 を標的遺伝子とし、骨芽細胞の分化を調節することが示唆された。

図 2.miRNA-328 は Msx-2 のタンパク発現抑制→



3. 本研究と関連した今後の研究計画

今後の研究としては、この BMP-2 刺激による miRNA-328 の発現変化を刺激経過時間的に追跡することで骨芽細胞分化過程における miRNA-328 発現変動を確認する。それにより、この miRNA-328 が分化におけるどの段階で作用する因子なのか検討することが可能となる。本検証には Taqman プローブを用いた Real time-PCR 法で検討が可能なので、各 BMP-2 処理経過時間後の細胞から Total RNA を抽出し、検討を進めていきたい。また、Msx-2 を標的遺伝子とすることで Msx-2 のタンパク発現が低下したが、mRNA の発現変化についてさらに Real time-PCR 法により検証を進めていきたい。

4. 成果の発表等

発 表 機 関 名	種類 (著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
Biochemical and Biophysical Research Communications	雑誌	2014 年内(予定)