

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：33916

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14659

研究課題名(和文) コーディングRNAから捨てられたノンコーディングRNAが生かされる仕組み

研究課題名(英文) Mechanisms to make important noncoding RNAs from dispensable coding RNAs

研究代表者

前田 明 (Mayeda, Akila)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・教授

研究者番号：50212204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：環状RNA(circRNA)は、遺伝子発現を制御する新しいlncRNAとして注目されている。最初に機能が報告されたciRS-7は、miRNA(miR-7)を吸着し、その標的遺伝子の発現調節を担う。このciRS-7の生合成機構を解明した。ciRS-7エクソン両端近傍に存在する哺乳類のMIR反復配列同士の相補的結合によりciRS-7エクソン両端をつなぐ逆位スプライシングが誘導され環状化されていた。以前は、霊長類特異的なAlu反復配列だけしか関与が知られておらず、MIR反復配列の発見は、哺乳類全般におけるcircRNA生合成が逆位スプライシングで起こっている事実を、合理的に説明する。

研究成果の概要(英文)：The circRNAs are abundant and stable noncoding RNAs with closed circular structure. The function of ciRS-7 (CDR1as) as 'sponges', or decoys, of the miR-7 micro RNA shed light on the biological roles of circRNAs. We elucidated the biosynthesis pathway of this functional ciRS-7. Anti-sense oligoribonucleotide experiments targeting the relevant splice sites suggested the generation of ciRS-7 by back-splicing. We identified conserved inverted elements of MIR (mammalian-wide interspersed repeat) in the flanking region of the ciRS-7, which promoted the back-splicing event. Splicing reporter assays in stably transfected HEK293 cells with mini-genes, with and without MIR element, demonstrated the essential role of inverted MIR sequences in the ciRS-7 generation. Previously the inverted repeats of Alu, primate-specific SINE was reported to involve in the back-splicing. The MIR-dependent circRNAs have emerged as a new category of circRNAs that are widely conserved in mammalian.

研究分野：分子生物学

キーワード：遺伝子発現調節 ノンコーディングRNA 環状RNA スプライシング ciRS-7 MIR

1. 研究開始当初の背景

次世代シーケンサーによる大規模解析によって、ヒト、マウス、線虫などで数千個の環状 RNA (circRNA) が組織・発生段階特異的に発現し、また安定に細胞内に存在していることがわかり、circ RNA は、新たな機能的ノンコーディング RNA 群として世界的に注目されている。しかしながら、それがどういう経路で作られ輸送されているか、まだよくわかっていないことが多々ある。

circRNA が単数・複数のエクソンから構成されていることから、circRNA が mRNA 前駆体からスプライシング依存的に作られることは想定され、現在、有力な2つのモデルがある(後述)。私たちは、最初に機能が明らかにされた ciRS-7 (CDR1as) に注目、未知の生合成経路、そして核外輸送機構を明らかにしようと考えた。

2. 研究の目的

スプライシングで mRNA 前駆体から切り捨てられた RNA 断片から機能のある RNA が作られているようだ！ しかもその構造は完全な環状である。circRNA の一種 ciRS-7 は、miRNA (miR-7) の吸着材として働き、miR-7 の遺伝子発現抑制機能を解消しているという画期的な論文が発表された [*Nature* 495, 333; 384 (2013)]。環状 RNA は、新たな機能的ノンコーディング RNA 群として世界的に注目され始めた。以下の挑戦的な3課題に取り組んだ。

(1) ciRS-7 生合成機構の解明

Kjems 研からプラスミド構築、配列情報などの提供を受け、世界に先駆けて最初に機能が判明した ciRS-7 をモデルに circRNA 生合成の経路を解明する。miRNA を制御する機能が明らかになっている ciRS-7 の生合成機構の解明は、きわめて重要である。

(2) circRNA の体系的解析と分類

circRNA の生合成経路には2つのモデル「逆位スプライシング経路」と「投縄状産物再スプライシング経路」があるが、前者は進化的短鎖反復配列 (SINE) が生合成に関与していることに注目した。しかし、関与が知られているのは霊長類特異的な *Alu* 配列のみである。霊長類以外の circRNA の生合成にはどのような配列が関与しているのだろうか？

(3) 翻訳される circRNA 存在の検証

circRNA はエクソンで構成されているから、アミノ酸コード情報を有する。また環状であり終止コドンがないので、内部リボソーム導入部位 (IRES) やコザック配列など翻訳開始シグナルが存在すれば、連続的な翻訳が予想

される。はたしてこのような circRNA の翻訳系が細胞内でも存在するのだろうか？ もし翻訳されているならば、circRNA が脳や神経系細胞で他の細胞に比べ圧倒的に多量存在する意義に迫れるかもしれない！

3. 研究の方法

(1) ciRS-7 生合成機構の解明

circRNA 生合成で提唱されている2つの仮説のどちらで最初の機能的な circRNA である ciRS-7 が作られているかを決定するアイデアがある。経路特異的な中間産物の検出と、アンチセンス RNA 実験により論理的に証明できるのだ。

(2) circRNA の体系的解析と分類

既に circRNA のデータベースが公開されており、*Alu* 以外の SINE の関与を明らかにし、進化的保存されている circRNA 生合成の統合的理解をめざす。多くの機能的 RNA モチーフを指標に体系的分類も可能だろう。

(3) 翻訳される circRNA 存在の検証

活発に翻訳が起きているポリソーム分画から RNA を抽出して RNase R 処理で直鎖状 RNA を分解後に次世代シーケンサーで解析し、circRNA を検出する。

4. 研究成果

(1) ciRS-7 生合成機構の解明

circRNA の生合成経路には有力な2つのモデルがある： (i) *Alu* 反復配列のような相補的配列を介してループ構造を作り circRNA の尾部 5'スプライス部位から頭部 3'スプライス部位への逆方向のスプライシングを誘導する「逆位スプライシング経路」と、(ii) mRNA 前駆体から circRNA コーディングエクソンを除外するスプライシングより切り出された投縄状 RNA が再びスプライシングしてエクソンが環状化する「再スプライシング経路」である(図1)。

ヒト脳の全転写物配列 (RNA-Seq) の調査により、約8万塩基長の4つのイントロンを含む前駆体転写物が存在することが判明し、ciRS-7 生成の前に、この前駆体が選択的スプライシングを受け4種類のアイソフォームができることを見いだした。そこでアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて ciRS-7 エクソン近傍のスプライス部位を阻害したところ、どのアイソフォームも ciRS-7 の生成に影響がなかった(図1、赤棒)。この結果は、CRISPR/Cas9 によるゲノム上の相当部位の切除によって確実に証明された。上記(ii)「再スプライシング経路」は、これらのアイソフォームと同時に作られる投縄状 RNA が再スプライシングされて ciRS-7 ができるため、上

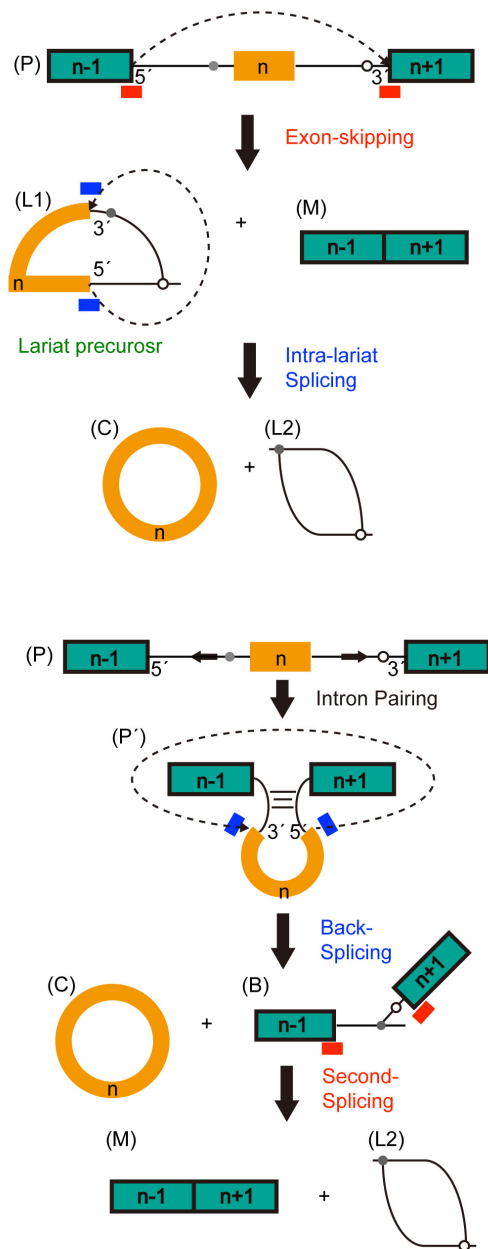


図1 circRNA 生合成経路の2つのモデル
再スプライシング経路(上図)と
逆位スプライシング経路(下図)

記のアンチセンスオリゴヌクレオチドで *ciRS-7* の生成が阻害されるはずである(図1、赤棒)。以上の結果は、(i) の「逆位スプライシング経路」によって *ciRS-7* が産生していることを支持している。

逆位スプライシングを促進するループ構造形成に必要な相補的配列であるが、相補的な *Alu* 配列は、*ciRS-7* エクソンの両端近傍イントロンに近傍に見つからなかった。ところが、*MIR* という *SINE* (反復配列) の一種が *ciRS-7* エクソンが存在し、相補的な配列を形成できることを発見した。そこで、発現誘導可能な *ciRS-7* レポーターを培養細胞に導入する実験で、レポーターから *MIR* 配列を除外すると *ciRS-7* が産生しないことがわかった。

以上の結果より、*ciRS-7* は近傍に存在する *MIR* の相補的配列により、逆位スプライシングが誘導され、*ciRS-7* が環状化すると結論できた[論文投稿中]。

(2) circRNA の体系的解析と分類

「逆位スプライシング経路」によって生合成される circRNA は、環状化されるエクソンの両端近傍イントロンに存在する反復配列 *Alu* の相補的配列が環状化に必要なことが知られているが、*Alu* は霊長類になってから出現した反復配列なので、霊長類以外にも保存されている circRNA の環状化が説明できない。

今回の私たちの研究によって、*MIR* という哺乳類全般に保存されている新たな反復配列を用いて circRNA が環状化される事実を示した。実際に、データベース調査をして、*ciRS-7* 以外に、*circCDK8*、*circSPNS1*、という2種類の circRNA が、環状化エクソン両端近傍の相補的な *MIR* 配列によって環状化していることを、ミニ遺伝子導入実験によって証明した。ただ、同時に、*circTMEM109*、*circZMYND8*、*circSRGAP2C* の2種類に代表される相補性の低い *MIR* 配列は環状化に利用されないことも見いだした。このような *MIR* 配列非依存的 circRNA が、どのような相補的配列を環状化に用いているかは、現状ではわからない。

私たちは、*MIR* 配列依存的に環状化される新しい circRNA のカテゴリーを見いだした。この発見により、哺乳類に広く保存されている circRNA 生合成を説明することが可能になった[論文投稿中]。

(3) *ciRS-7* 核外輸送機構の解明

上記「研究の目的」で記載したように、研究開始当初は翻訳される circRNA の探索を課題としていたが、海外のグループが、翻訳される circRNA の同定に成功したことを Annual Meeting of the RNA Society (2016) で知り、実際に論文発表されてしまった [*Mol. Cell* **66**, **22** (2017); *Cell Res.* **27**, 626 (2017)]。私たちの予想は的中していたが、研究は先を越されてしまった。従って、当初の課題が諦め、*ciRS-7* 生合成機構の解明に続く、未知の核外輸送機構の解明に集中し、実験を遂行した。

circRNA はスプライシング依存的に作られているが、mRNA と異なりその輸送機構はまったく研究されておらず、circRNA の多くが細胞質に局在するものの、積極的に輸送されているのか、あるいは M 期の核膜崩壊時に受動的に拡散しているのかすら知られていない。

私たちは *ciRS-7* の核外輸送機構を調べるために、アフリカツメガエル卵母細胞へのプラスミド DNA 注入実験を用いて *ciRS-7* の動態を調べた (ウイルス再生医科学研究所、大野陸人研究室との共同研究)。その結果、転写さ

れ、スプライシングを受けた ciRS-7 が核から細胞質へ積極的に輸送されることが判明した。さらに ciRS-7 の輸送は mRNA 核外輸送因子 TAP に依存していることを競合阻害実験および培養細胞を用いたノックダウン実験により明らかにした。現在 ciRS-7 側の TAP のアダプター因子を探索している。候補として EJC、TREX というタンパク質複合体が考えられるが、ノックダウン・CLIP 実験の結果から、EJC ではなく TREX が TAP のアダプターであるという予備の結果がでている[論文準備中]。すこぶる興味深く、独創的な研究になりそうだ。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① H. Suzuki, Y. Aoki, T. Kameyama, T. Saito, S. Masuda, J. Tanihata, T. Nagata, A. Mayeda, S. Takeda, T. Tsukahara (2016). Endogenous multiple exon skipping and back-splicing at the DMD mutation hotspot. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, E1722. 査読有 [doi: 10.3390/ijms17101722]
- ② R. Yoshimoto, A. Mayeda, M. Yoshida, S. Nakagawa (2016). MALAT1 long non-coding RNA in cancer. *Biochem. Biophys. Acta*, **1859**, 192–199. 査読有 [doi: 10.1016/j.bbagr.2015.09.012]
- ③ 片岡 直行, 前田 明 (2016). mRNA 前駆体スプライシング: 分子機構とその破綻による疾患まで. *実験医学*, **34**, 3108–3115. 査読無 [https://www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/book/9784758101585/index.html]
- ④ R. Yoshimoto, D. Kaida, M. Furuno, AM, Burroughs, S. Noma, H. Suzuki, Y. Kawamura, Y. Hayashizaki, A. Mayeda, M. Yoshida (2017). Global analysis of pre-mRNA subcellular localization following splicing inhibition by spliceostatin A. *RNA* **23**, 47–57. 査読有 [doi: 10.1261/rna.058065.116]

[学会発表] (計5件)

- ① A. Mayeda (2016). Topological constraint and solution to generate circular RNA (circRNA) from linear RNA (pre-mRNA). *NAIST International Workshop 'New era of pre-mRNA splicing world'* (March 14–15). Nara Institute of Science and Technology, Nara, Japan.
- ② R. Yoshimoto, T.B. Hansen, J. Kjems, A. Mayeda (2016). The functional circular RNA, ciRS-7/CDR1as, is biosynthesized from back-splicing promoted by

Inverted MIR (not Alu) Elements. *The 21th Annual Meeting of the RNA Society / The 18th Annual Meeting of the RNA Society of Japan* (June 28–July 2). Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan.

- ③ A. Mayeda (2016). Pre-mRNA splicing generates not only linear coding RNA (mRNA), but also circular non-coding RNA (circRNA). *Mini-Symposium on ncRNA* (September 29). Academia Sinica, Taipei, Taiwan.
- ④ 芳本 玲, 谷口 一郎, 大野 睦人, 前田 明 (2017). 環状 RNA (circRNA) の核外輸送機構の解明 (口頭・ポスター発表). 2017 年度 生命科学系学会合同年次大会 / 第 40 回 日本分子生物学会年会 (12 月 8 日). 神戸ポートアイランド, 神戸, 兵庫.
- ⑤ 芳本 玲, 谷口 一郎, 大野 睦人, 前田 明 (2017). 逆位スプライシングによって作られる環状 RNA が核外に輸送される仕組み (フォーラム口頭発表). 2017 年度 生命科学系学会合同年次大会 / 第 40 回 日本分子生物学会年会 (12 月 9 日). 神戸ポートアイランド, 神戸, 兵庫.

[図書] (計1件)

- ① 芳本 玲, 前田 明 (2016). 環状 RNA (circRNA). *DOJIN BIOSCIENCE シリーズ: ノンコーディング RNA—RNA 分子の全体像を俯瞰する*. 化学同人. 京都. pp. 271–279. [https://www.kagakudojin.co.jp/book/b227362.html]

[その他]

研究室のホームページ:

<http://www.fujita-hu.ac.jp/~gem-1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 明 (MAYEDA, Akila)

藤田保健衛生大学 総合医科学研究所 遺伝子発現機構学研究部門・教授

研究者番号: 5 0 2 1 2 2 0 4

(2) 連携研究者

芳本 玲 (YOSHIMOTO, Rei)

藤田保健衛生大学 総合医科学研究所 遺伝子発現機構学研究部門・助教

研究者番号: 7 0 5 9 5 6 5 2

大野 睦人 (OHNO, Mutsuhito)

京都大学医学部 ウイルス再生医科学研究所・教授

研究者番号: 8 0 2 0 1 9 7 9