

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K06501

研究課題名（和文）細胞質における機能性RNA生成機構の解明とRNAベクター技術への応用

研究課題名（英文）Elucidation of cytoplasmic miRNA biogenesis towards application of RNA vector technology

研究代表者

佐野 将之（Sano, Masayuki）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：80415687

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：microRNA（miRNA）は約22塩基の機能性RNAであり、多岐にわたる生命現象を制御している。miRNAは前駆体として核内で転写された後、核および細胞質でprocessingを受けるが、細胞質で生産されるmiRNA前駆体のprocessing機構については十分に理解されていない。本研究では、細胞質に局在し、遺伝子発現を行うセンダイウイルスベクターを用いて、miRNAの細胞質での生成機構を調べるとともに、miRNAを効率よく生産できるベクターの開発を目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

miRNAは幅広い生命現象に関与するため、その発現制御により細胞を任意にマニピレーションすることができ、また様々な疾患に対する標的分子や治療薬となりうる。miRNAの生成機構を理解することは、RNA生物学を統合的に理解する上で学術的な意義があり、さらにmiRNAを人為的に制御、利用し、ベクター開発に活かすことで、医療やバイオテクノロジーへの応用展開が可能となる。

研究成果の概要（英文）：MicroRNAs (miRNAs) are ~22-nucleotide-long functional RNAs that regulate a broad range of biological processes. It is known that miRNAs are transcribed as primary miRNAs (pri-miRNAs) in the nucleus, and then processed to mature miRNAs in the nucleus and cytoplasm. However, the processing mechanism of pri-miRNAs generated in the cytoplasm is not fully understood. In this study, we investigated the biogenesis of cytoplasmic miRNAs using Sendai virus vectors and aimed to develop the vectors that can efficiently produce functional miRNAs.

研究分野：分子生物学

キーワード：miRNA 細胞質RNAベクター 人工miRNA RNAi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

microRNA (miRNA) は真核生物で高度に保存された約 22 塩基の低分子 RNA であり、RNA-induced silencing complex (RISC) と複合体を形成し、mRNA の 3' 非翻訳領域に配列特異的に結合することで、標的 mRNA の分解および翻訳阻害を引き起こす。ヒトにおいては、2,000 種類以上の miRNA が存在しており、mRNA 全体の約 70% がそれぞれの miRNA によって特異的に制御されていると考えられている。miRNA は細胞の発生、分化、増殖など様々な生命現象に関与しており、miRNA の発現異常は、がんや神経変性疾患など多くの疾患の原因となることから、特定の miRNA を標的とした治療方法の開発も進められている。miRNA の発見は、線虫における *lin-4* が最初であるが、1998 年の RNA interference (RNAi) 発見以降、ヒトを含む哺乳動物においても多数の miRNA が同定された。miRNA の生成機構についても盛んに研究が行われ、現在までに基盤となる miRNA 生成機構についての理解が進んでいる。

ゲノムにコードされた miRNA 遺伝子は、primary miRNA (pri-miRNA) と呼ばれる、ステムループ構造の 5' および 3' 末端に長い延長配列を持つ前駆体として転写され、核に局在するエンドヌクレアーゼ Drosha と DiGeorge syndrome critical region 8 (DGCR8) との複合体が約 70-80 塩基のステムループ構造を持った precursor miRNA (pre-miRNA) に切断する。その後、pre-miRNA は輸送タンパク質である exportin-5 により細胞質に輸送され、Dicer と呼ばれるエンドヌクレアーゼにより切断を受け、約 22 塩基の二本鎖 miRNA となる。二本鎖 miRNA のうちの片方の鎖は Argonaute タンパク質に取り込まれ、RISC を形成することで標的 mRNA に作用する。この一連の miRNA 生成機構は canonical miRNA biogenesis として広く認識されており、多くの miRNA はこの機構により生成されるが、一方で、この生成機構に依らない miRNA も複数発見されている。例えば、イントロンのスプライシングや tRNA 前駆体から Drosha 非依存的に生成するもの、Argonaute タンパク質である Ago2 により切断を受け生成されるもの等が含まれ、これらの特殊な miRNA 生成機構は non-canonical miRNA biogenesis と呼ばれている。

これまでに我々はセンダイウイルスを骨格とした遺伝子発現ベクターの構築を行っており、センダイウイルス変異株 CI.151 を利用した SeVdp (replication-defective and persistent Sendai virus) ベクターを開発している (Nishimura et al., J. Biol. Chem., 286, 4760-4771, 2011)。SeVdp ベクターは複数の遺伝子を効率よく細胞に導入し、長期持続的に発現できることから、体細胞からの iPS 細胞誘導等に有用であることが示されている (Nishimura et al., J. Biol. Chem., 286, 4760-4771, 2011)。このベクターの特徴は、細胞に導入したセンダイウイルス RNA ゲノムが細胞質に限定的に局在し、自身がコードする RNA 依存性 RNA ポリメラーゼによりウイルスゲノムの複製および転写が行われる。このため、SeVdp ベクターによる遺伝子発現は、細胞質で翻訳が行われるタンパク質をコードする遺伝子に対しては広く適用されていたが、一方で、核内で前駆体の processing を必要とする miRNA の産生については十分に検討されていなかった。しかしながら、フラビウイルスやシンドビスウイルス等の細胞質に局在する RNA ウィルスから転写された pri-miRNA から miRNA が生成することが報告され (Rouha et al., Nucleic Acids Res., 38, 8328-8337, 2010; Shapiro et al., RNA, 16, 2068-2074, 2010) SeVdp ベクターによっても miRNA が生産できる可能性が示唆された。実際に、我々は SeVdp ベクターにマウス細胞からクローニングした pri-miRNA 配列を組込み、培養細胞で発現させたところ miRNA の生産を確認することができた。しかしながら、その生成機構や processing に影響する配列的、構造的特徴については解析が十分に進められていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、細胞質に局在する RNA ウィルスベクターを用い、核内での生成経路を経由しない non-canonical miRNA biogenesis について研究を行う。具体的には、SeVdp ベクターに pri-miRNA 配列を組込み、導入細胞内で生成した miRNA の発現を解析することで、miRNA の生成に影響を与える配列的および構造的特徴について検証する。また、細胞質での pri-miRNA processing に関与する因子についても検証を行う。さらに、miRNA 生成効率に優れた miRNA 前駆体配列を骨格に用いることで、任意の miRNA を生産し、遺伝子発現抑制を効果的に誘導できる SeVdp ベクターを構築する。これらの研究により、細胞質での miRNA 生成機構を理解し、機能性 RNA を効率よく生産できる細胞質 RNA ベクターの開発を行う。

3. 研究の方法

(1) SeVdp ベクターの構築と miRNA 発現評価

Mouse embryonic fibroblast (MEF) から抽出したゲノム DNA から特定の miRNA 領域を PCR により増幅し、SeVdp ベクターゲノムへの組込みを行う。構築した SeVdp ベクターは種々の培養細胞に導入し、Blasticidin S 等による薬剤セレクションを行うことで、pri-miRNA を持続的に発現する細胞を取得する。miRNA の発現評価は、定量 RT-PCR または miRNA 標的配列を含むルシフェラーゼ発現プラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイにより行う。

(2) miRNA 生成に影響を与える miRNA 前駆体の配列的および構造的特徴の検証

上記(1)の方法により、複数の miRNA 前駆体配列を比較し、miRNA の生産量が最も高いものを選定する。天然の miRNA の多くは標的 mRNA と部分的相補に結合し、mRNA の分解および翻訳阻害を引き起こす。一方、miRNA が標的配列に完全相補に結合した場合、mRNA の切断が起こり、強力に遺伝子発現を抑制する。このため、miRNA 前駆体配列を骨格に用い、標的配列と完全相補な任意の miRNA (artificial miRNA) を発現させることで遺伝子発現抑制を行う手法が開発されている。artificial miRNA は、RNAi 誘導に一般的に用いられる short hairpin RNA (shRNA) に比べ、細胞障害性が低いことが知られており、これまでに miR-30 前駆体や miR-155 前駆体などの骨格を用いた報告例がある (Silva et al., Nat. Genet., 37, 1281-1288, 2005; Chung et al., Nucleic Acids Res., 34, e53, 2006)。SeVdp ベクターを用いた artificial miRNA の利用に対して、本研究で選定した miRNA 前駆体、および既存の miRNA 前駆体を SeVdp ベクターから発現させ、その効果を比較する。さらに、選定した miRNA 前駆体骨格に改変を加え、miRNA 生成に影響を与える配列的および構造的特徴を検証する。

(3) miRNA 生成機構の解析

CRISPR-Cas9 システムを用いたゲノム編集により、細胞質での pri-miRNA processing に関与すると想定される遺伝子をノックアウトした細胞株を作製する。その細胞株に pri-miRNA 配列をコードした SeVdp ベクターを導入し、(1)の方法により検証を行う。

4. 研究成果

(1) SeVdp ベクターの構築と miRNA 発現評価

MEF から取得した miR-124 領域 (mmu-miR-124) をコードした SeVdp ベクターを構築し、HCT116 細胞に導入後、生成した miR-124 を定量 RT-PCR で評価した。その結果、ベクターの導入により、miR-124 の発現量が有意に上昇することが分かった。また、HeLa 細胞、A549 細胞、Jurkat 細胞等の種々の細胞に mmi-miR-124 をコードする SeVdp ベクターを導入し、比較した場合、細胞種の違いにより miR-124 の発現量が異なっていた。このことから、細胞種ごとの miRNA 生成に関与する因子の発現量や発現様式の違いが、細胞質での miRNA 生成効率に影響している可能性が考えられた。また、ルシフェラーゼアッセイにより、細胞質においても遺伝子発現抑制活性を持つ miRNA が生成されることが確認できた。さらに、mmu-miR-124 に代え、mmu-miR-9 や mmi-miR-302-367 領域をコードする SeVdp ベクターを HCT116 細胞に導入し、それぞれの miRNA の発現量および遺伝子発現抑制活性を調べた。mmu-miR-302-367 は複数の miRNA 前駆体がタンデムに連結したクラスター構造を取り、miR-302a、miR-302b、miR-302c、miR-302d、miR-367 の 5 種類の miRNA が発現する。解析の結果、全ての miRNA の発現が確認できたが、この中で miR-367 の発現量が最も高いことが分かった。miR-367 前駆体を mmi-miR-302-367 クラスターから分離し、単独で SeVdp ベクターに組込んだ場合も極めて高い遺伝子発現抑制効果が認められたことから、miR-367 前駆体配列は細胞質で効率よく miRNA を生成できることが明らかとなった (Sano et al., Mol. Ther. Methods Clin. Dev., 15, 371-382, 2019)。

(2) miRNA 生成に影響を与える miRNA 前駆体の配列的および構造的特徴の検証

上記(1)の結果より、miR-367 前駆体の構造を骨格として選定し、その効果を検証した。Mfold 構造予測 (Zuker, Nucleic Acids Res., 31, 3406-3415, 2003) を用い、miR-367 前駆体のステムループ構造を保持させたまま、天然の miR-367 配列を miR-124 配列に置換した。その結果、miR-124 に対する標的配列に対し、高い遺伝子発現抑制活性を示すことが分かった。また、ステム中のバルジやミスマッチ配列の置換に対しても活性の維持が認められた。さらに、miR-367 前駆体の構造を保持し、ステム中の配列をホタルルシフェラーゼ遺伝子の相補配列に置換した artificial miRNA を発現する SeVdp ベクターを作製した。コントロールとして、miR-30 前駆体または miR-155 前駆体を骨格にし、同様の配列を組込んだベクターも用意した。それぞれのベクターを培養細胞に導入し、ルシフェラーゼアッセイにより遺伝子発現抑制活性を調べたところ、miR-30 前駆体および miR-155 前駆体に比べ、miR-367 前駆体の骨格を利用したものが最も活性が高いことが分かった。さらに、miR-367 前駆体を利用した artificial miRNA により、EGFP や p53 配列をもつ遺伝子発現についても抑制することができた (Sano et al., Mol. Ther. Methods Clin. Dev., 15, 371-382, 2019)。次に、ルシフェラーゼ標的配列を持つ miR-367 前駆体に pri-miRNA の processing を促進することが報告されている配列を付加または置換し (Fang and Bartel, Mol. Cell, 60, 131-145, 2015) その効果を検証した。SeVdp ベクターに種々の改変 miR-367 前駆体配列を組込み、ルシフェラーゼアッセイにより遺伝子発現抑制活性を調べた結果、顕著な促進効果は見られなかった。このことから、細胞質での pri-miRNA processing は canonical miRNA biogenesis とは異なる作用様式を持つ可能性が示唆された。

(3) miRNA 生成機構の解析

現在までに、pri-miRNA の processing に関与する複数の因子が同定されている。しかし、細胞質での pri-miRNA processing 機構および関連因子については十分に理解されていない。そこで、細胞質での miRNA 生成機構を調べるために、miRNA 前駆体の processing に関与することが推測される因子をゲノム編集により欠損させた細胞株の取得を試みた。標的因子に対する guide

RNA をデザインし、Cas9 タンパク質とともに培養細胞内で発現させた。その後、限界希釈法を用いて細胞株の選択を行ったが、ロックアウト細胞株を得ることができなかった。その理由として、ロックアウト細胞株は正常細胞よりも増殖速度が遅いため選択が困難であると考え、標的因子がロックアウトされると細胞が蛍光を発する選択システムを構築した。このシステムを用いることで、ゲノム編集後、蛍光を指標にロックアウト細胞株の選択を行うことに成功した。樹立した細胞株に種々の pri-miRNA 配列を持つ SeVdp ベクターを導入し、遺伝子発現抑制活性を調べることで、その効果を評価した。その結果、活性が減少する miRNA と、一部活性を維持する miRNA が存在することが分かった。このことから、miRNA 前駆体の配列的および構造的特徴の違いにより、miRNA processing 因子の関与に違いが生じる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Kishimoto Takumi, Nishimura Ken, Morishita Kana, Fukuda Aya, Miyamae Yusaku, Kumagai Yutaro, Sumaru Kimio, Nakanishi Mahito, Hisatake Koji, Sano Masayuki | 4. 巻 18 |
| 2. 論文標題 An engineered ligand-responsive Csy4 endoribonuclease controls transgene expression from Sendai virus vectors | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Biological Engineering | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13036-024-00404-9 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Sano Masayuki, Morishita Kana, Oikawa Satoshi, Akimoto Takayuki, Sumaru Kimio, Kato Yoshio | 4. 巻 26 |
| 2. 論文標題 Live-cell imaging of microRNA expression with post-transcriptional feedback control | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Molecular Therapy - Nucleic Acids | 6. 最初と最後の頁 547-556 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.omtn.2021.08.018 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Sano Masayuki, Nakasu Asako, Ohtaka Manami, Nakanishi Mahito | 4. 巻 15 |
| 2. 論文標題 A Sendai virus-based cytoplasmic RNA vector as a novel platform for long-term expression of microRNAs | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Molecular Therapy-Methods & Clinical Development | 6. 最初と最後の頁 371-382 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.omtm.2019.10.012 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 佐野将之、森下加奈、及川哲志、秋本崇之、須丸公雄、加藤義雄 |
| 2. 発表標題 転写後フィードバック制御を利用したmiRNA検出システムの開発 |
| 3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 佐野将之、中須麻子、大高真奈美、中西真人 |
| 2. 発表標題 人工マイクロRNAを発現できる細胞質RNAウイルスベクターの開発 |
| 3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

| | | |
|--|------------------|--------------------------|
| 産業財産権の名称 人工マイクロRNA前駆体およびそれを含む改良されたマイクロRNA発現ベクター | 発明者 佐野将之、中西真人 | 権利者 国立研究開発法人産業技術総合研究所 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/002519 | 出願年 2020年 | 国内・外国の別 外国 |

| | | |
|--|------------------|--------------------------|
| 産業財産権の名称 人工マイクロRNA前駆体およびそれを含む改良されたマイクロRNA発現ベクター | 発明者 佐野将之、中西真人 | 権利者 国立研究開発法人産業技術総合研究所 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、17/425193 | 出願年 2020年 | 国内・外国の別 外国 |

〔取得〕 計1件

| | | |
|--|------------------|--------------------------|
| 産業財産権の名称 人工マイクロRNA前駆体およびそれを含む改良されたマイクロRNA発現ベクター | 発明者 佐野将之、中西真人 | 権利者 国立研究開発法人産業技術総合研究所 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特許第7406257号 | 取得年 2023年 | 国内・外国の別 国内 |

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
| | | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |