

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 10 日現在

機関番号：17102  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21659084  
 研究課題名（和文）人工マイクロ RNA による個体レベルでの制御下  
 アレル特異的発現抑制系の開発  
 研究課題名（英文）Approach to allele specific and regulated gene silencing  
 using the artificial miRNA expression system  
 研究代表者  
 服巻 保幸（FUKUMAKI YASUYUKI）  
 九州大学・生体防御医学研究所・教授  
 研究者番号：90128083

## 研究成果の概要（和文）：

個体レベルにおけるアレル特異的な、かつ制御下における遺伝子発現抑制系の開発を目指し、点変異 *TTR* 遺伝子を対象に、至適な miRNA の設計を行った。アレル特異的抑制は見られたものの、期待された共通領域のミスマッチによる、共発現別種 miRNA による抑制の増強効果は得られなかった。また、既に抑制効果を至適化している *Smad2* 及び *Smad3* を標的とする 2 種の並列した miRNA を用いて、*Cre-loxP* システムを利用した人工 miRNA スイッチングベクターを構築し、ES 細胞レベルでの人工 miRNA による抑制作用を制御する転写スイッチングシステムを確立した。

## 研究成果の概要（英文）：

The allele specific and regulated gene silencing is needed in various aspects of biological and medical fields. To establish this system, artificial miRNA driven by the poly II promoter was designed for discrimination between normal and mutated alleles in silencing effect. Although the allele specific silencing was obtained using artificial miRNA, there was no increased silencing effect expected to be provided by co-expression of another miRNA targeting the region shared by two genotypes. *Cre* dependent silencing of *Smad2* and *Smad3* as a model was obtained in ES cells using the construct in which expression of two miRNA species is blocked by the *Neor* gene flanked by two *loxP* sites.

## 交付決定額

（金額単位：円）

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2009 年度 | 1,200,000 | 0       | 1,200,000 |
| 2010 年度 | 1,000,000 | 0       | 1,000,000 |
| 2011 年度 | 800,000   | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 総計      | 3,000,000 | 240,000 | 3,240,000 |

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：マイクロ RNA、発現抑制、遺伝子変異、アレル特異的

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 1998 年に発表された *C. elegans* における 2 重鎖 RNA を介した発現抑制の現象は (Fire, A. *et al.* 1998)、その後、種を越えて見られる普遍的な現象であることがわか

り、現在人為的な発現抑制系として広く細胞・分子生物学の実験に利用されている。しかしその多くは、発現効率を得るために、また転写産物が比較的短いこともあり Pol III 系を用いた構成的な RNAi 発現系であり、ま

た細胞レベルでの発現抑制系であることが一般的である。今後の展開のためには Pol II 系のプロモーターを使用した組織特異的また時期特異的な発現抑制系とともに、個体レベルでの制御下における発現抑制系の開発が望まれる。ところで Pol II 系転写のためには、安定した転写物のサイズとして 500 bp 以上の大きさを保持しなくてはならないが、転写強度が強すぎると核外輸送に必要な Exportin-5 の枯渇を来し細胞機能が不全に陥ること (Grimm *et al.*, 2006)、しかし弱すぎると抑制効果が期待できないことなどの問題がある。

(2) 我々はこれらの点を解決するために、自然界に存在するマイクロ RNA を模してステム・ループ構造を持つ全く人工的な pre-miRNA 配列カセットを作製し、AMPM (artificial miRNA precursor motif) と名付けた (図 1 上) (Shibata *et al.*, 2007)。さらにこのカセットを Pol II 転写系遺伝子のイントロン内に挿入することにより、効率良く遺伝子の発現を抑制する系を開発し、TRIAMPH (transcription of intron artificial miRNA precursor-like hairpin RNA) と名付けた (図 1 下)。

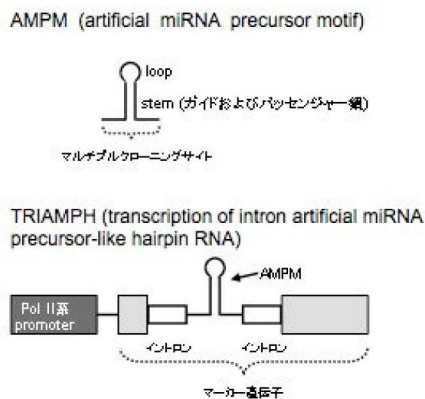


図 1 既に細胞レベルで効果的な抑制能を得ている AMPM と TRIAMPH の一般的構造

これを用いて個体レベルでの遺伝子発現抑制系への展開を図るが、プロモーター活性の問題を含め個体レベルでは制御された遺伝子発現抑制の必要性が高いため、*Cre-loxP* の系を組み込んだ抑制系を開発する。

(3) アレル特異的な遺伝子抑制系の開発は、優性遺伝病における治療のみならず、広く細胞生物学研究への応用が可能ありその開発が強く望まれている。上記人工 miRNA の系では、2 箇所ターゲットサイトを同時に攻撃できることや、ターゲット配列とガイド鎖配列間の塩基置換が存在しても、異なるターゲットサイトに対する複数の pre-miRNA 配列を

一定距離でタンデムに挿入することにより、抑制効果を制御できることを明らかにしている (Shibata *et al.*, 2007)。そこで、これをさらに発展させ、病因変異とともに当該遺伝子の他の領域に別のターゲット配列を設定し、これに対しミスマッチ配列を持つ miRNA を用いて、病因変異のアレル特異的抑制の増強効果が狙うことを着想した。

## 2. 研究の目的

我々がすでに開発した人工 miRNA の系の特徴を生かし (Shibata *et al.*, 2007)、個体レベルにおけるアレル特異的な、かつ制御下における遺伝子発現抑制系を開発することを目指す。

## 3. 研究の方法

(1) モデルとして家族性アミロイドポリニューロパチーの *TTR* (トランスサイレチン) 遺伝子の 30 番目コドンの一塩基置換を対象に、この変異を含む領域 (ここでは A 領域と名付ける) をターゲットとした pre-miRNA 配列をもつ AMPM を作製する。この際我々が開発した人工 miRNA の系では 26 塩基のガイド鎖で効率よい抑制が見られたこと、さらに miRNA の 5' 側の seed 配列の置換が、抑制効果に影響を来し易いこと、また siRNA では中央に位置する置換がアレル特異的抑制効果を示すことを考慮し (Kurosawa *et al.*, 2005)、seed 配列の 3' 端近くに、つまり miRNA の中央付近に病因遺伝子変異を設定する。またオフターゲット効果を避けるために 1 個のミスマッチを導入した分子も作製する (図 2 A-AMPM)。つまり、seed 配列に 1 塩基毎ミスマッチを導入するとともに、3' 側の配列のミスマッチの効果も見るとともに 2 塩基毎にミスマッチを導入する (図 2 B-AMPM)。

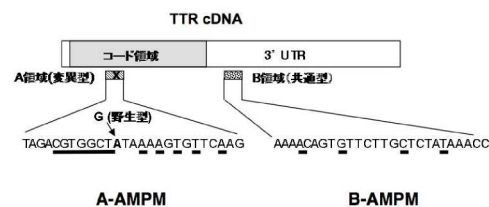


図 2 A-および B-AMPM のミスマッチ導入部位

(2) さらに抑制効果の増強を狙い、A 領域以外の領域 (ここでは B 領域と名付ける) をターゲットとした pre-miRNA 配列を持つ AMPM を作製する。この場合ミスマッチを 2~4 塩基導入した pre-miRNA を作製する (図 2 B-AMPM)。これは 2~3 塩基のミスマッチがデュアル AMPM での効果を発揮できる基礎データに由来している。

(3) A-AMPM のみをネオマイシン遺伝子に設置

した人工イントロン内に埋め込んだ発現コンストラクト TRIAMPH を作製する。

(4) 一方、野生型 A 領域と共通型 B 領域のターゲットサイトを *Photinus* ルシフェラーゼ遺伝子の 3' UTR に導入したコンストラクトと、変異型 A 領域と共通型 B 領域を *Renilla* ルシフェラーゼの 3' UTR に挿入したコンストラクトを作製し、これらとともに上記 TRIAMPH を HeLa 細胞に導入し、*Photinus* ルシフェラーゼ/*Renilla* ルシフェラーゼの比が最も高い A-AMPM を選択する (Stage 1)。

(5) 次に、この A-AMPM とともに B-AMPM の組み合わせを先の TRIAMPH ベクターに導入したコンストラクトを作製し、同様に *Photinus* ルシフェラーゼ/*Renilla* ルシフェラーゼの比が最も高いつまりアレル特異的抑制能の高い組み合わせを選択する (Stage 2)。

(6) Stage 1 と Stage 2 の結果を比較し、B 領域のアレル特異的抑制能に及ぼす増強効果を評価する。

(7) 生体での制御下での TRIAMH 抑制系の開発を目指し、上記変異 *TTR* 遺伝子抑制系の最適化の実験と並行して、既に抑制能を最適化している *Smad 2, 3* 遺伝子抑制 AMPM を使用して系の開発を試みる。このベクターは CAG プロモーターの下流に、*loxP*、MAZ サイト (Pol II による転写を停止する配列)、*loxP*、二つの人工 miRNA 前駆体モチーフ、EYFP を順に有し、*Cre recombinase* の発現に依存して人工 miRNA と EYFP が共発現するように設計した。このスイッチングベクターをマウス ES 細胞に導入し、トランスジェニック ES 細胞を作成する。この細胞に組換えアデノウイルスを用いて *Cre recombinase* を発現させ、*Cre recombinase* 導入前後での EYFP の発現強度や、人工 miRNA の発現と標的遺伝子の抑制効果を検討する。この ES 細胞を用いてトランスジェニックマウスを作成し、個体レベルでの人工 miRNA スwitchングシステムの機能評価や表現型の解析を行う。

#### 4. 研究成果

(1) 家族性アミロイドポリニューロパチーの *TTR* 遺伝子の 30 番目コドンの 1 塩基置換を対象に、この変異を含む領域をターゲットとした AMPM とオフターゲット効果を避けるために 1 個のミスマッチを 1 塩基ずつずらして導入した AMPM のコンストラクトを用いて、HeLa 細胞による transient expression の系により解析を行った。その結果 1 個のミスマッチの導入により、変異アレルについては 10~20% への抑制効果ながら野生型アレルについてはほぼ抑制効果が見られない配列を見出した。しかし 2 塩基のミスマッチ導入によっては、却って変異アレルの抑制効果が減ることが分かった。さらに、並列して設定する AMPM による本来のターゲットサイトに対する抑制効果増強の

可能性を検討するため、上記変異領域以外の領域 (3' -UTR) をターゲットとしたミスマッチ pre-miRNA 配列を持つ AMPM を用いて同様な解析を行ったが、却って抑制効果の減少が見られ、予期した抑制増強効果が得られなかった。

(2) *Cre* の導入によるコンディショナルな個体レベルで抑制系の開発を進めるため、すでに細胞レベルでの抑制効果の最適化が終了している *Smad2, 3* に対する AMPM を用いて、*loxP* 配列で挟み込んだ *Neo* 遺伝子 (3' 側に MAZ 配列を 4 コピー設定している) を CAG プロモーターと AMPM-EYFP 遺伝子間に逆向きに挿入したコンストラクトを作成した。このスイッチングベクターをマウス ES 細胞に導入してトランスジェニック ES 細胞を作成した。この細胞に *Cre recombinase* を発現させたところ、*Cre recombinase* 導入前と比較して EYFP の発現強度が増強し、人工 miRNA の発現とそれに伴う標的遺伝子の抑制が見られた。以上の結果から、人工 miRNA の発現を制御する転写スイッチングシステムを確立することができたと考える。今後はトランスジェニック ES 細胞を用いてトランスジェニックマウスを作成し、個体レベルでの人工 miRNA スwitchングシステムの機能評価が必要である。

#### 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 2 件)

1. Tateishi, T., Hokonohara, T., Yamasaki, R., Miura, S., Kikuchi, H., Iwaki, A., Tashiro, H., Furuya, H., Nagara, Y., Ohyagi, Y., Nukina, N., Iwaki, T., Fukumaki, Y. and Kira, JI.: Multiple system degeneration with basophilic inclusions in Japanese ALS patients with *FUS* mutation. *Acta Neuropathol.* 119: 355-364, 2010. (査読有り) DOI: 10.1007/s00401-009-0621-1
2. Miura, S., Shibata, H., Kida, H., Noda, K., Toyama, T., Iwasaki, N., Iwaki, A., Ayabe, M., Aizawa, H., Taniwaki, T. and Fukumaki, Y.: Partial *SPAST* and *DPY30* deletions in a Japanese spastic paraplegia type 4 family. *Neurogenetics.* 12: 25-31, 2011. (査読有り) DOI: 10.1007/s10048-010-0260-7

[学会発表] (計 6 件)

1. Shibata, A., Kaneko, S., Teramoto, N. and Fukumaki, Y.: Stoichiometric analysis of short hairpin RNAs in cultured cells. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 12/9-12, 2009.

2. Miura, S., Shibata, H., Noda, K., Y. Kaku, Y. Kida, H., Iwaki, A., Ayabe, M., Aizawa, H., Taniwaki, T. and Fukumaki, Y.: A novel type of hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominancy in the lower extremities found in a Japanese descent. 135th Annual Meeting of American Neurological Association, San Francisco, CA, USA, 11/2-6, 2010.
3. Furuya, H., Arahata, H., Fujii, N., Miura, S., Shibata, H. and Fukumaki, Y.: Haplotype analysis of fukutin (*FKTN*) gene in two very mild Fukuyama type congenital muscular dystrophy (FCMD). 135th Annual Meeting of American Neurological Association, San Francisco, CA, USA. 9/12-15, 2010.
4. Miura, S., Shibata, H., Kida, K. Noda, A. Iwaki, A., M. Ayabe, M., H. Aizawa, H., T. Taniwaki, T. and Fukumaki, Y.: Partial *SPAST* and *DPY30* deletions in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. 60th Annual Meeting of The American Society of Human Genetics, Washington, DC, USA. 11/2-6, 2010.
5. Shibata, H., Miura, S., Kida, H., Noda, K., Kaku, Y., Iwaki, A., Ayabe, M., Taniwaki, T. and Fukumaki, Y.: Exome sequencing approach to identify the responsible variant for a novel type of hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominancy in the lower extremities found in a Japanese descent. The 12th International Congress of Human Genetics / The 61st Annual Meeting of The American Society of Human Genetics, Montreal, Canada, 10/11-15, 2011.
6. Shibata, H., Miura, S., Kida, H., Noda, K., Kaku, Y., Iwaki, A., Ayabe, M., Taniwaki, T. and Fukumaki, Y.: Linkage-assisted exome sequencing to identify the responsible variant for a novel type of hereditary motor and sensory neuropathy with proximal dominancy in the lower extremities found in a single Japanese family. Human Genome Meeting 2012, Sydney, Australia, 3/11-14, 2012.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ:

<http://www.gen.kyushu-u.ac.jp/~byouin/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

服巻 保幸 (FUKUMAKI YASUYUKI)

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号: 90128083