

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570273

研究課題名(和文) マイクロRNAと転写因子による協調的制御の分子進化

研究課題名(英文) Evolution of coordinated regulation of microRNAs and transcription factors

研究代表者

岩間 久和 (IWAMA, Hisakazu)

香川大学・総合生命科学研究センター・准教授

研究者番号：20398035

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト・マイクロRNAの生起の時期をゲノムのシンテニー情報に依拠して同定する方法を開発した。この方法により、1433のヒト・マイクロRNAそれぞれの生起時期を43種のゲノムDNAの比較により推定した。この推定結果に基づき、マイクロRNAの生起の時期と有意に関連する限定された転写因子遺伝子の機能を明らかにした。また、新規マイクロRNAの生起速度は、哺乳類進化の初期とヒト上科進化初期にピークを持つことを明らかにし、この時期がヒト・トランスクリプトームに影響した可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：A method to identify the evolutionary period of origin of human microRNAs (miRNAs) was established based on the genome synteny information. Applying the method to the genomes of 43 species estimated the period of origin for each of 1433 human miRNAs. Based on the estimation, the categories of transcription factors significantly associated with the evolutionary periods of origin of human miRNAs were specified. Furthermore, the rate at which human miRNAs originated was shown to have two peaks at the early phase of mammalian evolution and at the initial phase hominoid evolution, suggesting the effects of the two periods on the human transcriptome.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・進化生物学

キーワード：マイクロRNA 転写因子 協調的遺伝子制御 cis-element 遺伝子進化

1. 研究開始当初の背景

遺伝子の使われ方、つまり遺伝子の制御機構を知ることは、生命の成り立ちを理解する鍵の一つである。他の遺伝子を制御する遺伝子として、二つの範疇がある。一つは転写因子、もう一つはマイクロ RNA である。いずれも約 1000 のメンバー遺伝子を擁し、密な遺伝子制御網を形成している。これらマイクロ RNA と転写因子は互いに協調的な制御を行うことが知られるようになった。また、本報告者の先行研究は、マイクロ RNA が進化の過程で有意に遺伝子制御網に冗長性をもたらすことを示した。このような協調的制御は、これまで主に保存されたマイクロ RNA とターゲットの間で調べられてきた。

一方、マイクロ RNA は、進化の過程で早い生成と消滅を経る事が明らかにされた。このことから、新たに生じたマイクロ RNA と転写因子との協調的制御を調べることにより、協調的制御の動的な進化過程を明らかにすることが期待された。特に、哺乳類のゲノム配列が 30 種以上で決定され、ゲノム DNA の比較を網羅的に行うことが可能となった。

2. 研究の目的

マイクロ RNA と転写因子との協調的制御の進化過程をゲノム DNA の比較に基づいて解明する。まず、比較ゲノムによるマイクロ RNA の生起時期推定の方法論を確立する。確立した方法を用い、諸種の哺乳類ゲノム配列からヒト・マイクロ RNA 個々の生起時期を推定する。

推定に基づき、各マイクロ RNA 生起時期によって、いかなる機能が転写因子との協調的制御によって形成されるかを、転写因子の機能分類によって明らかにする。

3. 研究の方法

(1) データの取得

下記いずれも公開データベースを使用

欧州分子生物学研究所 (EMBL) からシンテニーを考慮した哺乳類 35 種のゲノム DNA 配列を、58,159 アライメントブロック (EP035) と 19 種、11,282 アライメント・ブロック (Pecan19) として取得。

カリフォルニア大学サンタクルズ校 (UCSC) のデータベースからペアワイズ・ゲノムアライメントと 46 種の中立距離付種系統樹を取得

マンチェスター大学 miRBase より 1,523 ヒト・マイクロ RNA 配列情報を取得。

(2) マイクロ RNA オーソログの同定法

ヒト・マイクロ RNA の前駆体マイクロ RAN のゲノム座標に対応するゲノム配列をマルチプル・ゲノムアライメントから切り出した。この際、前駆体マイクロ RNA が隣り合う 2 つのアライメント・ブロックにまたがる場合は、二つのブロックが 2 塩基以下のギャップである場合のみ採用した。

切り出した前駆体マイクロ RNA 配列全てについて二次構造エネルギー (Folding energy) を計算した。計算は RNAfold を用いた。ヒト 1,523 前駆体マイクロ RNA についても同様に folding energy を計算し、その全ての 99.5 パーセントイル値 -13Kcal/mol を得た。

他種に対応する候補マイクロ RNA をオーソログとするための 2 つの基準を以下の様に定めた。

基準 1: 二つの可能なシード配列の少なくとも一方の配列がヒト・マイクロ RNA のシード配列と完全一致する。(ヒトにおいてシード配列が一つのみの場合、それと完全一致しなければならない。)

基準 2: Folding energy が -13Kcal/mol より低い。

哺乳類のアウトグループにあたる脊椎動物については、ヒトゲノムとのペアワイズ・ゲノムアライメントを用いているので、その場合にも同様の基準 1, 2 を用いてオーソログを同定した。

(3) マイクロ RNA 各々の生起時期の推定

取得したゲノムアライメントとマイクロ RNA 配列・アノテーション情報の全てをローカルサーバに置き、一連の計算プログラムを作成した。本研究で確立した推定法は、下記研究成果に記した。

(4) 転写因子のターゲット予測と分類

マイクロ RNA ターゲット予測は PITA と TargetScan を用いた。転写因子の分類は Gene Ontology に従った。

4. 研究成果

(1) ゲノムシンテニーに基づくマイクロ RNA 生起時期の推定法の確立

解析に供した 43 種について、ヒトと他の種または系統 (クレード) との分岐点が 16 となった。この分岐点によりヒトに至る哺乳類の進化過程を 16 区間に分割した (ただし、原獣類分岐以前の保存を示す 1 区間を含む)。

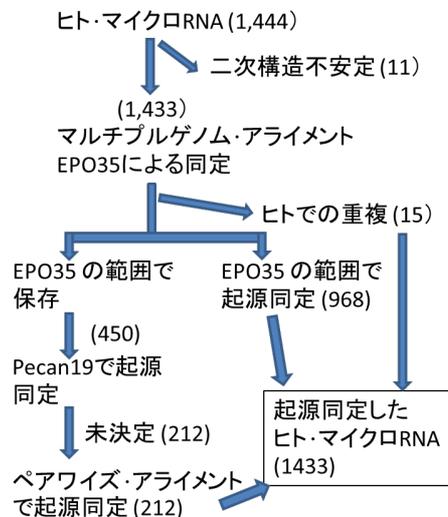
種の系統樹に従って最節約法により、マイクロ RNA オーソログの生起した区間を同定した。この際、低カバレッジゲノムではシンテニー情報が曖昧となるため、偽陽性のオーソログを同定する機会が増える。こ

の点に対処するため、高カバレッジゲノムにより支持されるオーソログを優先し、低カバレッジゲノムによる支持の場合は2種以上で一致する場合に、オーソログとして採用する基準とした。

以上の過程を一連のプログラムのパイプラインとして構築した。過程の形式的記述は、論文発表にて示した。

(2) ヒト・マイクロ RNA 生起時期の推定

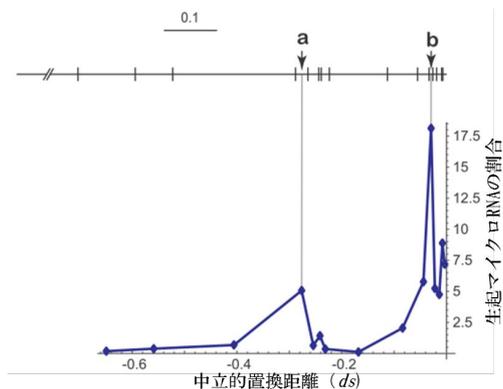
ヒト・マイクロ RNA 1,523 のうち、ゲノムアライメントを得ることのできた 1,444 マイクロ RNA について、上述のように確立した生起時期推定法を適用した。RNA 二次構造が計算により不安定とみなされた 11 マイクロ RNA をのぞき、1,433 マイクロ RNA の生起時期を推定した。各過程の流れと生起時期が同定されたマイクロ RNA の内訳を下図に示す。



(3) ヒト・マイクロ RNA 生起速度の推定

分岐により 16 に分割した哺乳類の進化過程の区間それぞれの中立距離あたりの新規ヒト・マイクロ RNA 生起数をもって生起の速度とした。

その結果、哺乳類進化の初期において種が放散する時期と、ヒト上科進化初期の二



つの区間にピークがあることが分かった。後者のヒト上科進化の初期には、中立的置換による距離 0.01 あたり 260 のマイクロ RNA が生起したと推定できた。

図中グラフがヒト・マイクロ RNA の生起速度を示す。図中の上部横線の区切り線の間が 16 の区間を示す。矢印 a と b が速度ピークの二区間を示す。a の区間は Atlantogenata (異節類 + アフリカ獣類) の分岐とローラシア獣上目分岐との間、b の区間はアカゲザル分岐とテナガザル分岐の間に相当する。

ヒト・マイクロ RNA レポートリーのうち、53%は真猿亜目 (Simian) の進化過程で生じ、その中で、28%はヒト上科の進化過程で生じていた。一方、哺乳類以前から保存されているヒト・マイクロ RNA は 15%に過ぎなかった。

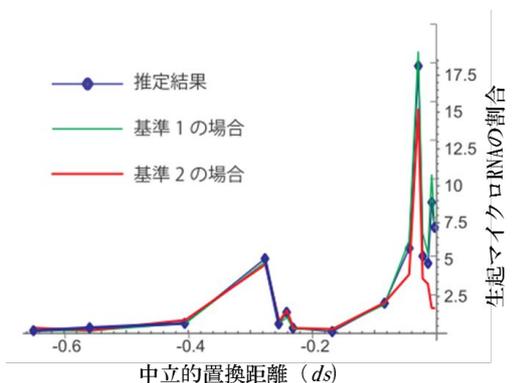
(4) シミュレーションによる検証

推定の阻害要因となる次の 2 点についてシミュレーションによる検証を行った。

一つの系統が多く種の種により構成されていれば、その系統でオーソログが同定される機会が増す。系統を構成する種の多寡による推定結果への影響を評価するために、複数の種により構成される系統からランダムに 1 つの種を選び、上述の生起時期推定のパイプラインを適用して結果を得る。この過程を 1 万回繰り返して、各区間のマイクロ RNA 生起速度に対する影響を調べた。その結果、2 つの速度のピークは有意に支持された。ヒト・マイクロ RNA の miRBase のアノテーションに不確かさが含まれる場合を想定して、より厳しい 2 つの基準でヒト・マイクロ RNA を選択し、上述の生起時期推定の方法で推定した。

基準 1 : Folding energy が -20.5Kcal/mol より低い (全ヒト前駆体マイクロ RNA の 95 パーセンタイル値)。

基準 2: Folding energy $< -20.5\text{Kcal/mol}$ に加えてヒトにおいて 2 つの成熟マイクロ RNA が確認されていること。



上図に示すように、miRBase からヒト・マイクロ RNA をより厳しく選抜する基準 1、

2のいずれを用いても2つの速度のピークは支持された。これにより、データベースが持ち得る潜在的な誤りのアノテーションに対して結果が頑健であることが示された。

(4)マイクロRNA生起時期と転写因子との関連の解明

転写因子遺伝子に存在するマイクロRNAのターゲット数とその他の遺伝子のターゲット数を比較した。マイクロRNAの生起時期に関わらず、転写因子は有意に多くのマイクロRNAのターゲットを持つことが示された。ただし、3'UTRが長ければ、偶然により多くのターゲットを持つ場合がある。この点で、転写因子遺伝子は、他の遺伝子に比べて有意に長い3'UTRを持つことが明らかになったので、3'UTRの長さで補正する方法を用い検定した結果、3'UTR長に比しても転写因子のマイクロRNAターゲット数は有意に多いことが明らかになった。

さらに、転写因子の機能を Gene Ontology により細分した。すると、一部の細分化された転写因子の機能は、マイクロRNAの生起時期に関連して有意にターゲット数が変化することが明らかになった。新規に生じたマイクロRNAによる転写因子遺伝子との協調は、いくつかの限定された機能において有意に認められた。この結果の詳細は論文投稿中である。

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12件)

岩間久和. 「ヒト・マイクロRNA遺伝子ファミリーの進化と起源推定」査読無、生体の科学, 2014, Vol. 65, No. 1, 80-90

Iwama H, Kato K, Imachi H, Murao K, Masaki T, “Human microRNAs originated from two periods at accelerated rates in mammalian evolution.” 査読有, Molecular Biology and Evolution. 2013, Vol 30, No. 1, 613-626.

Iwama H. “Coordinated networks of microRNAs and transcription factors with evolutionary perspectives.” 査読有, Adv Exp Med Biol, 2013, Vol. 774, 169-187.

Iwama H, Murao K, Imachi H, Ishida T. “Transcriptional double-autorepression feedforward circuits act for multicellularity and nervous system development.” 査読有, BMC Genomics. 2011 Vol. 11, No. 12,

[学会発表](計10件)

岩間久和、加藤清仁、井町仁美、村尾孝児、正木勉、「哺乳類進化過程でのヒト・マイクロRNA生起とターゲット配列との関連」、日本遺伝学会第85回大会(口演、査読有、2013年9月20日、東京)

岩間久和、加藤清仁、井町仁美、村尾孝児、正木勉、「ヒト・マイクロRNAの哺乳類進化における生起数とターゲット配列の相互関連」、日本進化学会第15回大会(口演、査読有、2013年8月30日、茨城)

岩間久和、加藤清仁、井町仁美、村尾孝児、正木勉、「ヒト・マイクロRNA遺伝子セットにおける起源時期推定と形成の速度」、日本遺伝学会第84回大会(口演、査読有、2012年9月24日、福岡)

岩間久和、加藤清仁、井町仁美、村尾孝児、正木勉、「ヒト・マイクロRNA遺伝子の比較ゲノムによる生起時期の推定」、日本進化学会第14回大会(口演、査読有、2012年8月23日、東京)

H. Iwama, H. Imachi, K. Murao. “MicroRNA Networks Alter to Conform to Transcription Factor Networks Adding Redundancy and Reducing the Target Gene Repertoire for Coordinated Regulation.”

Annual conference of the Society for Molecular Biology and Evolution (口演(シンポジウム)、査読有、2011年7月28日、京都)

岩間久和、井町仁美、村尾孝児、「二重自己抑制性のフィードフォワード遺伝子制御の多細胞性への関与とマイクロRNA寄与の可能性」、日本遺伝学会第83回大会(口演、査読有、2011年9月25日、福岡)

6. 研究組織

(1)研究代表者

岩間久和 (IWAMA Hisakazu)
香川大学・総合生命科学研究センター・准教授

研究者番号：20398035

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし