

科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金) 研究成果報告書

平成25年5月15日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23651200

研究課題名(和文) マイクロRNAサイレンシングの分子機構と定量的解析

研究課題名(英文) Molecular mechanism and quantitative analysis of microRNA-mediated gene silencing

研究代表者

程 久美子 (UI-TEI KUMIKO)

東京大学・大学院理学系研究科・准教授

研究者番号：50213327

研究成果の概要(和文)：本研究では、次の2項目の研究を実施した。(1) RNAサイレンシングエフェクター複合体に含まれる内在性 microRNA (miRNA)が、細胞外から miRNA を導入することによって交換するメカニズムについて、マイクロアレイを用いた解析を行った。(2) miRNA の標的 mRNA に対する抑制効率が、2本鎖 miRNA の塩基対合力によって決まることを明らかにし、数式を用いて定量化することに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed studies as follows: (1) When exogenous miRNAs (exo-miRNAs) are introduced into cells, endogenous miRNAs (endo-miRNAs) in the RISC may be replaced with exo-miRNAs. We examined the fluctuation of target gene expression of endo-miRNAs response to the introduction of an exo-miRNA using microarray. (2) We identified the crucial factors that determine the efficacy of miRNA-mediated gene silencing, and successfully mathematized the silencing efficacy using values reflecting base-pairing stabilities in miRNA duplex and seed-target duplex.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・システムゲノム科学

キーワード：機能性 RNA、miRNA silencing

1. 研究開始当初の背景

microRNA (miRNA)や small interfering RNA (siRNA)などの小分子 RNA は20～22塩基の2本鎖 RNA となり、Argonaute (Ago)タンパク質を中核とする RNA-induced silencing complex (RISC)というエフェクター複合体にとりこまれ1本鎖化して、標的となる mRNA と対合する。その結果、Agoによって mRNA の切断や翻訳抑制反応が触媒され、RNAサイレンシングと呼ばれる遺伝子発現抑制がおこる。我々は、哺乳類細胞では、RNAサイレンシング効果は siRNA の塩基配列によって大きく異なることを見いだした。サイレンシング効果が高い siRNA とは、ガイドとなる RNA 鎖の5'末端の7塩基にアデニン(A)とウリジン(U)が多く、逆末端はグアニン(G)またはシトシン(C)であ

るという共通の配列特性を示していた(Ui-Tei *et al.* 2004)。このことから、両末端が非対称で、5'末端側から1本鎖化しやすい RNA 鎖は効率よくサイレンシング効果を示すことが示唆された。また、5'末端の1塩基目は標的 mRNA と必ずしも相補的である必要はなく、むしろ A/U であることが重要であることを示したが、近年、この理由は構造化学的に明らかにされた。すなわち、ガイド鎖の5'末端が A/U であると Ago タンパク質のポケット構造に安定に固定されるが、G/C は不安定なためである。これらのことは siRNA の塩基配列は標的 mRNA を識別するだけでなく、タンパク質との相互作用においても重要な役割をもつことを意味していた。さらに、ガイド鎖のシード領域(5'末端から2～8塩

基)のみが相補的な遺伝子群も抑制される(オフターゲット効果と呼ばれる)。我々は、オフターゲット効果はシード領域の塩基配列に依存し、その主要な決定要因は標的 mRNA との塩基対合のエネルギー(安定性)であることを明らかにし、オフターゲット効果の定量化に成功した(Ui-Tei *et al.* 2008a)。

2. 研究の目的

小分子 RNA によるゲノムワイドな遺伝子発現調節作用を網羅的に解析するためには、そのサイレンシングの共通のメカニズムを明らかにする必要がある。RNA サイレンシングの過程は多段階のステップから成り立っている。また、小分子 RNA は全長約 20 塩基と短い、領域ごとの役割分担があると考えられる。そこで、それぞれの素過程における、小分子 RNA の領域ごとの共通の機能とその作用機序の関連性を明らかにして定量化し、これらを統合したモデルを構築することによって全体像を明らかにする。

3. 研究の方法

研究対象の小分子 RNA としては、最も多くの miRNA が同定されているヒト miRNA (約 1,000 種)を中心に扱い、ヒト細胞(HeLa, HEK293, Huh7, NT-2 細胞等)を用いた実験およびそのデータ解析を行った。本研究では、特にサイレンシングの素過程を解析するために重要と考えられる次の項目について検討した。(1) RISC に含まれる内在性 miRNA の外来性 miRNA による交換機構。(2) miRNA の標的 mRNA に対する抑制効率の定量的解析。

4. 研究成果

(1) 内在的に存在する miRNA は細胞内のほとんど全ての RISC に取り込まれて飽和しており、標的となる mRNA 群は定常状態では恒常的に抑制されていると考えられる。一方で、外来性 miRNA を細胞外から導入したり、過剰発現させると、新たに生成された RISC に取り込まれるか、すでに内在する RISC 中の miRNA と置き換わることで初めてサイレンシング効果を示すと考えられる。すなわち、外来性 miRNA は自身の標的遺伝子に対してサイレンシングを誘導するだけでなく、内在性 miRNA によるサイレンシング効果を抑制する作用もあると考えられる。

我々は、外来性 miRNA のトランスフェクションによる外来性/内在性 miRNA のサイレンシング効果について、マイクロアレイを用いた解析を行なった。まず、外来性 miRNA を導入することにより、外来性 miRNA の標的 mRNA 群の発現は低下する一方で、内在性 miRNA の標的 mRNA の発現量が増加するこ

とがわかった。内在性 miRNA の標的 mRNA の発現量の増加の程度は、外来性 miRNA の種類によって異なるが、内在性 miRNA の種類は問わず、ほぼ一定であることがわかった。このことから、外来性 miRNA が RISC に含まれている内在性 miRNA と交換する効率は、外来性 miRNA の種類によって異なると考えられた。また、交換される RISC 中の内在性 miRNA の量はほぼ一律であることから、内在性 miRNA は一本鎖化した状態のときに交換されると考えられた。さらに、外来性 miRNA の標的 mRNA のうち、3'UTR が短い mRNA は強く抑制され、3'UTR が長い mRNA は弱く抑制された。このことは、3'UTR の短い mRNA は、内在性 miRNA による抑制作用がそもそも弱く、3'UTR が長い mRNA は、内在性 miRNA による抑制作用が強いためと推定された。

(2)我々は、siRNA による off-target 効果の強さは、5'末端から 2-8 塩基の部分(シード領域)の mRNA との塩基対合力に依存することを報告している。しかしながら、miRNA による遺伝子サイレンシングの機構は、siRNA による off-target の機構と非常に良く似ていると考えられているにも関わらず、miRNA による標的遺伝子のサイレンシング効率を決定する要因については、これまでよくわかっていなかった。そこで、我々は miRNA によるサイレンシングの効率を数式を用いて定量化することを試みた。その結果、miRNA によるサイレンシングの効率はシード領域とターゲット mRNA との塩基対合力(Tm2-8)のみによって決まるのではなく、miRNA の 2 本鎖状態のときの 5'末端の 5 塩基の対合力の安定性(miTm1-5)によっても変動することが明らかとなった。すなわち、miRNA の 5'末端の 2 本鎖部分が不安定であり、シード領域と標的 mRNA によって形成される 2 本鎖が安定な miRNA が、強力なサイレンシング活性を示すことを明らかにし、miRNA による遺伝子サイレンシングの強さは、 $Tm2-8 - 0.53 \times miTm1-5$ という数式で表すことができることを明らかにした。この結果は、2 本鎖 miRNA の 2 本の RNA 鎖のうち、不安定な 5'末端を持つ RNA 鎖は、容易に RISC に取り込まれること、また、miRNA は、シード領域と相補的な配列を持つ mRNA を標的として認識し、抑制するというこれまでの知見と一致する。しかし、それを数式として定量的に表すことによって、シード領域とターゲット mRNA との塩基対合力(Tm2-8)に対して、miRNA の 2 本鎖状態のときの 5'末端の 5 塩基の対合力の安定性(miTm1-5)は約半分の寄

与をしていることを初めて明確に示すことができた。このように、私たちの結果は、miRNA の一本鎖化の過程および標的認識過程の両方が、塩基対合の熱力学的性質によってうまく制御されている可能性を示唆していた。

さらに興味深いことに、そのような塩基配列の相違に依存した熱力学的性質の違いが miRNA によるサイレンシング効率の決定要因であるとすれば、異なる体温の生物種では、同じ miRNA が異なる強さのサイレンシング活性を示す可能性があることが推定される。そこで、体温あるいは生育温度が異なる 16 種の生物種のすべての miRNA の Tm2-8, miTm1-5, および $Tm2-8 - 0.53 \times miTm1-5$ の平均値を算出し、それぞれの生物種の体温および生育温度との相関関係を調べた (図 5-3)。すると、Tm2-8 および $Tm2-8 - 0.53 \times miTm1-5$ は、それぞれの生物種の体温あるいは生育温度と強い相関関係があることが明らかになった。したがって、microRNA は進化の過程において、その体温あるいは生育温度によって microRNA の選択を受けている可能性が考えられた。

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 10 件)

(1) Nishi K, Nishi A, Nagasawa T, Ui-Tei K、Human TNRC6A is an Argonaute-navigator protein for microRNA-mediated gene silencing in the nucleus.、*RNA*、査読有、vol.19、2013、pp.17-35

(2) Naito Y, Ui-Tei K、Designing functional siRNA with reduced off-target effects.、"siRNA Design" *Methods Mol. Biol.*、査読有、vol.942、2013、pp.57-68.

(3) Ackerman WE 4th, Carter AM, De Mestre AM, Golos TG, Jeschke U, Kusakabe K, Laurent LC, Parast MM, Roberts RM, Robinson JM, Rutherford J, Soma H, Takizawa T, Ui-Tei K, Las GE.、IFPA meeting 2012 workshop report I: Comparative placentation and animal models, advanced techniques in placental histopathology, human pluripotent stem cells as a model for trophoblast differentiation、*Placenta*、査読有、vol.34、2013、pp.S3-5.

(4) Hibio N, Hino K, Shimizu E, Nagata Y, Ui-Tei K、Stability of miRNA 5' terminal and seed

regions is correlated with experimentally observed miRNA-mediated silencing efficacy.、*Sci. Rep.*、査読有、vol.2、2012、p.996.

(5) Ui-Tei K、sdRNA: siRNA with a DNA seed for an efficient and target-gene specific RNA interference.、*Gene Technology*、査読有、vol.1、2012、p.102.

(6) Naito Y, Ui-Tei K、siRNA design software for a target gene-specific RNA interference.、*Front. Genet.*、査読有、vol.3、2012、p.102.

(7) Ui-Tei K, Nishi K, Takahashi T, Nagasawa T.、Thermodynamic control of small RNA-mediated gene silencing.、*Front. Genet.*、査読有、vol.3、2012、p.101.

(8) Mazda M, Nishi K, Naito Y, Ui-Tei K、E-cadherin is transcriptionally activated via suppression of ZEB1 transcriptional repressor by small RNA-mediated gene silencing.、*PLoS ONE*、査読有、vol.6、2011、p. e28688.

(9) Yamato K, Egawa K, Endo S, Ui-Tei K, Yamada T, Saigo K, Hyodo I, Kiyano T, Nakagawa I.、Enhanced specificity of HPV16 E6E7 siRNA by RNA-DNA chimera modification.、*Cancer Gene Ther.*、査読有、vol.18、2011、pp. 587-597.

(10) Sasaki N, Shinomi M, Hirano K, Ui-Tei K, Nishihara S.、Lacdinac (Galnac β 1-4glnac) Contributes to Self-Renewal of Mouse Embryonic Stem Cells by Regulating LIF/STAT3 Signaling.、*Stem Cells*、査読有、vol.29、2011、pp.641-650.

[学会発表] (計 24 件)

(1) 芦本徹、加藤詩子、程久美子、池ノ内順一、梅田真郷、形質膜におけるリン脂質動態解析—ショウジョウバエ培養細胞をモデルとして、第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 15 日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

(2) Kenji Nishi, Ai Nishi, Tatsuya Nagasawa, Kumiko Ui-Tei、Human TNRC6A recruits Argonaute associated small RNA into the nucleus to lead RNA silencing、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 14 日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

(3) Rintaro Ishii, Yutaka Suzuki, Shinji Kondo, Mariko Okada, Kenji Nishi, Kumiko Ui-Tei、Next generation sequencing analysis of miRNA editing by adenosine deaminase acting on RNA、第 35 回日本分子生

物学会年会、2012年12月14日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

(4) Naoki Hibio, Kimihiro Hino, Eigo Shimizu, Yoshiro Nagata, Kumiko Ui-Tei, Thermodynamic stability in base-pairing regulates the efficiency of small RNA-mediated gene silencing, 第35回日本分子生物学会年会、2012年12月12日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

(5) Yuhei Nitta, Kazumichi Shimizu, Maki Otsubo, Kenji Nishi, Kumiko Ui-Tei, Tetsuya Tabata, Disco-interacting protein 2 (DIP2) regulates guidance of sister axons in the *Drosophila* mushroom body, 第35回日本分子生物学会年会、2012年12月12日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

(6) Tomoko Takahashi, Kenji Nishi, Shuheii Zenno, Kumiko Ui-Tei, Distinguishable *In Vitro* siRNA-Binding Mechanisms of TRBP and PACT, 第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

(7) Eigo Shimizu, Naoki Hibio, Yoshiro Nagata, Kumiko Ui-Tei, Microarray analysis of non-negligible effect of endogenous miRNAs on exogenous miRNA-mediated silencing activity, 第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

(8) Kimihiro Hino, Eigo Shimizu, Kumiko Ui-Tei, Development of high-throughput screening method to identify microRNA which maturation is inhibited at the processing steps, 第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

(9) 石井 倫太郎、鈴木 穰、近藤 伸二、岡田 眞里子、西 賢二、程 久美子、次世代シーケンサーを用いた ADAR による miRNA エディティングの網羅的解析、東京大学 GCOE『ゲノム情報ビッグバンから読み解く生命圏』ワークショップ2012、2012年11月2日、東京大学柏キャンパス 柏図書館1階 メディアプロムナード

(10) Kumiko Ui-Tei, Target gene-specific RNAi for placental research., International Federation of Placental Associations (IFPA) 2012 Hiroshima Meeting, 2012年9月18日 poster, 19日 workshop, International Conference Center Hiroshima

(11) 越智 晴香、今村 亮俊、谷 英典、秋月 源、小島 周二、内海 文彰、程 久美子、関水 和久、秋光 信佳、核内機能性 non-coding RNA の分解に関与する RNA 結合蛋白質の同定、日本アイソトープ協会 エンライトニングセミナー、2012年7月12日、東京理科大学・森戸記念館

(12) 石井 倫太郎、西 賢二、程 久美子、アデノシンデアミナーゼによる miRNA エディティングの網羅的解析、第12回 東京大学生命科学シンポジウム 2012 BIO UT、2012年6月30日、東京大学・山上会館

(13) 清水 英悟、日比生 直樹、長田 喜郎、程 久美子、細胞内 miRNA による遺伝子発現制御の外來性 miRNA 導入による摂動解析、第12回 東京大学生命科学シンポジウム 2012 BIO UT、2012年6月30日、東京大学・山上会館

(14) 越智 晴香、今村 亮俊、谷 英典、秋月 源、程 久美子、関水 和久、秋光 信佳、核内機能性 non-coding RNA の分解に関与する RNA 結合蛋白質の同定、第12回 東京大学生命科学シンポジウム 2012 BIO UT、2012年6月30日、東京大学・山上会館

(15) Tomoko Takahashi, Kenji Nishi, Shuheii Zenno, Kumiko Ui-Tei, Distinguishable *In Vitro* Binding Mode of TRBP and PACT with siRNA、RNA Sciences in Cell and Developmental Biology II、2012年6月11日-12日、RIKEN Center for Developmental Biology

(16) 西 賢二、西 愛、程 久美子、核内 RNA サイレンシングはヒト TNRC6A/GW182 による Argonaute の核内移行により引き起こされる、第34回日本分子生物学会年会、2011年12月16日、パシフィコ横浜

(17) Tomoko Takahashi, Kenji Nishi, Shuheii Zenno, Kumiko Ui-Tei, Comparative analysis of siRNA binding patterns of dsRNA binding proteins, TRBP and PACT, 第34回日本分子生物学会年会、2011年12月16日、パシフィコ横浜

(18) 日比生 直樹、長田 喜郎、西 賢二、程 久美子、miRNA によるサイレンシング効率を決定する要因の同定、第34回日本分子生物学会年会、2011年12月16日、パシフィコ横浜

(19) 石井 倫太郎、西 賢二、程 久美子、2本鎖 RNA 特異的アデノシンデアミナーゼと相互作用する miRNA の同定、第34回日本分子生物学会年会、2011年12月16日、パシフィコ横浜

(20) 長沢 達矢、程 久美子、RNA サイレンシング関連分子のヒト shRNA ライブラリを用いたスクリーニング、第34回日本分子生物学会年会、2011年12月16日、パシフィコ横浜

(21) 清水 英悟、日比生 直樹、長田 喜郎、程 久美子、外來性 miRNA のトランスフェクションによる内在性 miRNA サイレンシング効果抑制のマイクロアレイ解析、第34回日本分子生物学会年会、2011年12月16日、パシフィコ横浜

(22) Tomoko Takahashi, Kenji Nishi, Shuheii Zenno, Kumiko Ui-Tei, Identification of small

interfering RNA binding domains of the TAR RNA binding protein (TRBP) and their molecular implication in RNA interference、Sixteenth Annual Meeting of the RNA Society、2011年6月14日-18日、東京大学・武田先端知ビル

(23)程 久美子、高感度アレイを利用した小分子RNAの作用機序の解明、2011 アジレント ゲノミクスフォーラム、2011年6月14日、KFCビル(東京都)

(24)日比生 直樹、長田 喜郎、西 賢二、程 久美子、microRNA サイレンシング活性の定量的解析、第11回 東京大学生命科学シンポジウム LSM SYMPOSIUM 2011、2011年6月30日、東京大学・工学部2号館

[図書] (計4件)

①程 久美子、シーエムシー出版、**BIO INDUSTRY** 核酸医薬の開発動向、2012、30-34

②程 久美子、北條 浩彦、他、羊土社、実験医学別冊 目的別で選べる 遺伝子導入プロトコール、2012、40-43

③程 久美子、羊土社、実験医学別冊 目的別で選べる 遺伝子導入プロトコール、2012、44-49

④西 賢二、高橋 朋子、長沢 達矢、程 久美子、羊土社、実験医学別冊 目的別で選べる 遺伝子導入プロトコール、2012、50-54

[その他]

ホームページ等

<http://ui-tei.rnai.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

程 久美子 (UI-TEI KUMIKO)

東京大学・大学院理学系研究科・准教授
研究者番号：50213327

(2) 連携研究者

西 賢二 (NISHI KENJI)

東京大学・大学院理学系研究科・助教
研究者番号：50466801