

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：32503

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24310147

研究課題名(和文) マウス細胞内に存在する低分子RNAの高次構造に基づく網羅的解析

研究課題名(英文) Secondary structure-based analysis of small RNA from mouse brain

## 研究代表者

河合 剛太 (Kawai, Gota)

千葉工業大学・工学部・教授

研究者番号：70211860

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの脳に由来するRNAについて次世代シーケンサーによる配列解析等を行い、約1億配列を得た。二次構造予測とその結果に基づくクラスタリングを行うシステムを開発し、解析を行った結果、16個の新規低分子RNA候補、MsncR (mouse structured non-coding RNA) を見出した。ノーザン解析による発現評価を行い、予想よりも小さいRNAの存在を示唆するものがあった。

MsncR-11は、ミトコンドリアtRNA遺伝子の裏鎖に相当するRNAである。NMR法による解析により、MsncR-11は、tRNAのアクセプタステムとTステムに相当する二次構造を形成していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Next-generation sequencing was applied to small RNA fractions with lengths ranging from 40 to 140 nt from mouse brain and secondary structure-based clustering was performed. From the hundred million sequences obtained, 16 candidates of the mouse structured small non-coding RNAs (MsncRs) were isolated. Their expressions, together with those of other candidates, were analyzed by northern hybridization. One among 16 candidates obtained by the next-generation sequencing revealed a signal shorter than expected.

One of the candidates, MsncR-11, have a sequence complementary to a mitochondrial tRNA. NMR analysis suggested that MsncR-11 forms a secondary structure similar to tRNA including acceptor and T stems.

研究分野：構造生物学

キーワード：機能性RNA NMR 立体構造解析 トランスクリプトーム

## 1. 研究開始当初の背景

研究分担者である清澤らは、哺乳動物における内在性のアンチセンス/非翻訳性 RNA (non-coding RNA; ncRNA) を研究中に新しい一群の低分子 RNA (miRNA や siRNA よりは少し大きめの 50-100 ヌクレオチド [nt]程度) を発見した。その後の解析で、このサイズの低分子 RNA はアンチセンス RNA が転写されている遺伝子座を含め、その他のゲノム全体の領域から転写されていることが判明した。これら RNA は始めから 50-100nt として転写されたとは考えにくく、プライマリー転写産物からプロセスされ、細胞内で安定的に存在するために立体構造を形成し、特定のタンパク質に結合していると考えられる。そのサイズを考慮すると既に知られている 20-30nt 程度の mi/si/piRNA とは別のカテゴリーの RNA 分子と考えられる。ランダムに 30 個程度の 50-100nt の RNA を調べたところ、すべて dicer-independent であった。その存在の普遍性から生命活動に非常に重要な役割を担っていることが予想されている。

これら新規低分子 RNA の機能の解明をめざし、清澤を中心として、同じく本研究計画の研究分担者である牛田および研究代表者の河合の 3 名で、新学術領域研究 (課題提案型) 「マウス細胞内に普遍的に存在する 50-100 ヌクレオチド低分子 RNA の多角的解析」(平成 21~23 年度) をスタートさせた。このプロジェクトでは、清澤によって行われたマウス由来の低分子 RNA 画分についてのシーケンス解析の結果を、河合が二次構造に基づいてクラスタリングし、見出した RNA 候補を牛田がノーザン解析によって検証する、というスタイルで解析を進めた。

本研究の計画は、このアプローチを基本的にしつつも、高次構造に基づく網羅的な解析を中心とした解析を強力に推進することをめざして立案された。

## 2. 研究の目的

次世代シーケンサーなどによって得られる大量の RNA 配列データを、高次構造の視点から解析し、構造を形成して機能する RNA を迅速に見出す手法を開発することを目的とした。

(1) このために、大規模な二次構造予測とその結果を用いたクラスタリング手法を開発し、特徴的な二次構造をもつ RNA を効率良く見出すことを試みた。

(2) また、NMR 試料管内転写法による RNA の立体構造形成のスクリーニング手法を開発し、試料精製等の手間をかけることなく、迅速に立体構造情報を得ることを試みた。

(3) さらに、研究分担者の清澤および牛田と協力して、これらの手法を実際にマウスから抽出した低分子 RNA に適用し、新しい RNA/RNP を見つけ、その構造と機能を明らかにすることをめざした。

## 3. 研究の方法

(1) 低分子 RNA 候補の二次構造解析とクラスタリング[河合]

最新のシーケンサーを利用すれば、一度に数千万配列のデータを得ることができる。このような桁の大量データについて、二次構造に基づくクラスタリングを行う技術を開発する。

二次構造予測については、千葉工業大学において開発された vsfold5 を用いる。予測された二次構造を用いて構造パターンに基づく大まかな分類を行う。得られたそれぞれのグループについて、ステムの長さや内部ループあるいはバルジアウトの特徴などを利用して詳細な分類を行い、特定の二次構造を形成する新しい一群の RNA を発見することをめざす。

(2) 低分子 RNA 候補の立体構造形成スクリーニング[河合]

研究分担者の清澤や牛田によって得られる低分子 RNA 候補は、40 塩基程度の DNA プローブに基づくものであり、その構造あるいは機能解析の前に、正確な発現領域あるいは構造形成領域を知ることが必須である。本研究計画では、二次構造予測と立体構造形成スクリーニングによって、立体構造を形成する領域を迅速に推定する手法を開発する。

(3) 配列解析[清澤]

次世代シーケンサーの能力は日増しに高まっており、得られるリード(配列)の長さあるいは精度は飛躍的に向上している。これまでは、rRNA や tRNA など細胞内に大量に存在する RNA を取り除いてから配列解析を行うことが主流であったが、これによって RNA 試料の品質が低下し、結果として新規 RNA を見落とす可能性もあった。これに対し、現在では、細胞から抽出した RNA をできるだけ手をかけず配列解析に持ち込み、高品質で大量の配列データを得たうえで、rRNA や tRNA などを取り除く方法が現実的となってきている。さまざまな組織あるいは状態の細胞から RNA を抽出し、低分子量画分を得たのち、配列解析を引き続き行うことを計画している。なお、配列決定そのものは受託で行う。

(4) マイクロアレイ解析[清澤]

すでに、新学術領域研究において、全ての SAT 遺伝子座にプローブを設計したマイクロアレイを作製し、マウスの特定の組織から得られた RNA の解析を進めている。実際の解析では、全 RNA を 20-40nt および 40-100nt のサイズに分画し、全 RNA と分画した RNA をラベルしてマイクロアレイ解析を行う。この時、全 RNA (=長鎖 RNA サンプル) をターゲットとした場合と、低分子 RNA をターゲットとした場合の比を計算し、低分子 RNA をターゲットとした際に有意に発現が高いプローブを選定する。さまざまな組織あるいは状態の細胞から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を進めることを計画し

ている。

#### (5) ノーザン解析[牛田]

マイクロアレイ解析より低分子 RNA が検出されるプローブを選定し、マイクロアレイプローブと同一配列のオリゴ DNA プローブにより、ノーザンプロットによる低分子 RNA の検出を試みる。このとき、細胞を核、細胞質、他細胞内小器官に分画した後、どの画分に目的の RNA が含まれているかノーザンプロットを用いて明らかにし、目的の RNA が含まれている画分をショ糖密度勾配遠心法やグリセロール密度勾配遠心法を用いてさらに分画する。これによって、目的の RNA がどのような細胞内局在を示すかとともに、どのような大きさの複合体を形成しているか、その複合体は比較的安定に細胞から取り出せるものであるか否か、についての情報を得る。

#### (6) 転写単位の間定[清澤]

RACE 法を用い、低分子の RNA プライマリー転写産物の解析を行う。図 5 にあるように、ノーザンの結果がスメアとなることがあるが、これらの RNA の実態にも迫る。

#### (7) 低分子 RNA に対する結合因子や複合体の精製[牛田]

各種カラムクロマトグラフィーを用いて結合因子や複合体を精製する。得られた因子の RNA 結合能を、ゲルシフトアッセイや UV クロスリンク法により解析する。

#### (8) 立体構造解析[河合]

低分子 RNA とそれに結合するタンパク質との複合体の立体構造解析を NMR 法によって行う。

### 4. 研究成果

本研究計画では、遺伝学的、生化学的、および構造生物学的アプローチを駆使して、マウス由来の新規低分子 RNA の解析を進めた。

#### (1) 低分子 RNA 候補の二次構造解析とクラスタリング

マウスの脳に由来する RNA およびマウスの ES 細胞に由来する RNA について次世代シーケンサーによる配列解析を行うことによって得られた配列データを用い、二次構造に基づくクラスタリングを進めている。脳については約 1 億配列、ES 細胞については約 6 千億配列が得られている。脳に由来するデータについては、解析をほぼ完了し、16 個の新規低分子 RNA 候補を見出した(発表論文 1)。なお、これらの新規 RNA を MsncR (mouse structured non-coding RNA に由来)と呼ぶこととした。

また、マウス ES 細胞から得られた約 6 千億配列および ES 細胞から神経細胞に分化する過程でのさまざまな段階の細胞から得られたそれぞれ約 1 千万配列についても解析を進めており、新規低分子 RNA の候補を数個見出した。

#### (2) 低分子 RNA 候補の立体構造形成スクリーニング

多数の低分子 RNA 候補について、その立体構造形成を迅速に評価するための、NMR 試料管内転写法を開発し、構造既知の RNA について適用することによって、その有用性を実証した。本手法を INTT 法 (in NMR tube transcription に由来) と命名した(発表論文 2)。この手法をプロジェクトで見出した低分子 RNA 候補に適用し、安定な立体構造を形成する RNA を探索している。

#### (3) 配列解析

マウス ES 細胞が神経細胞に分化する過程のさまざまな段階の細胞から低分子 RNA を抽出し、その配列解析を進めた。

#### (4) マイクロアレイ解析

マウスゲノム上で全てのセンス-アンチセンス遺伝子座 (SAT 遺伝子鎖) においてエクソン同士の重なりを考慮して作製したマイクロアレイを用い、マウス脳由来の低分子 RNA をターゲットとして配列解析を行った。現在、ノーザン解析での検証を行っている。

#### (5) ノーザン解析

次世代シーケンサーによる配列解析等によって見出した新規低分子 RNA 候補の発現量等を確認するため、マウスのさまざまな組織から RNA を抽出し、ノーザン解析を行い、3 つの RNA について強い発現、4 つの RNA について弱い発現を示す結果を得た。このうち、暫定的に S4-11 と命名した RNA については得られている cDNA 情報とノーザン解析の結果に矛盾があったため、さらなる解析を行った。その結果、この RNA はいくつかの臓器で 30 nt 程度の短い断片として存在することが示唆された。

#### (6) 転写単位の間定

non-RI によるプライマーエクステンション法を確立し、ノーザン解析でシグナルを得た RNA のうち 4 種類に対して 5' 末端の配列を決定するための実験を行った。残り 3 種類に関してはノーザン解析で得られたシグナルがかなり弱かったので解析対象から除外した。その結果、末端を特定できたものは 1 種類のみであった。

#### (7) 低分子 RNA に対する結合因子や複合体の精製

新規低分子 RNA 候補のうち、ノーザン解析で発現が確認でき、その末端が決定できたものを対象として、複合体解析を行うことを計画したが、上述 (5)、(6) の通り、最終的な対象候補は 1 種類に絞られた。しかし、この RNA については、後に反復配列由来のものであることが判明したため、これも解析の対象から除外した。

なお、これらの結果を受けて当初計画を修正し、上述の S4-11 およびそれに由来する可能性のある短い RNA について、それぞれの生合成経路および機能を明らかにする方向での研究の展開を検討している。

#### (8) 立体構造解析

これまでに見出した新規 RNA 候補のひとつである MsncR-11 に着目し、立体構造解

析を進めた。MsnR-11 は、ミトコンドリア tRNA 遺伝子の裏鎖に相当する RNA であり、ミトコンドリア mRNA のプロセシングに参与している可能性がある。NMR 法による解析を行ったところ、MsnR-11 は、tRNA のアクセプタステムと T ステムに相当する二次構造を形成していることが示唆され、現在論文作成中である。

なお、2014 年 6 月に千葉工業大学において公開シンポジウム「Structured ncRNA 研究への前哨」を実施し、研究成果を紹介するとともに、今後の研究の展開について議論した。さらに、2014 年 11 月の日本分子生物学会年会において、ワークショップ「機能性 RNA 分子研究の新展開」を実施し、これまでの成果を発表した。

#### 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 2 件)

Kiyosawa, H., Okumura, A., Okui, S., Ushida, C., and Kawai, G., Secondary structure-based analysis of mouse brain small RNA sequences obtained by using next-generation sequencing, *Genomics* in press. (査読有)

doi: 10.1016/j.ygeno.2015.05.003

Okui, S. and Kawai, G., In NMR tube transcription for rapid screening of RNA conformation, *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids* **34**, 103-113 (2015). (査読有)

doi: 10.1080/15257770.2014.964412

##### 〔学会発表〕(計 7 件)

清澤秀孔, 奥居沙弥, 生田千里, 河合剛太, マウス細胞内で発現している低分子 RNA とその構造解析, 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 25 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)

奥居沙弥, 生田千里, 清澤秀孔, 河合剛太, RNA 構造スクリーニングのための NMR 試験管内転写法の検証, 第 16 回日本 RNA 学会年会, 2014 年 7 月 23 日-25 日, ウィンクあいち (愛知県)

奥居沙弥, 生田千里, 清澤秀孔, 河合剛太, マウスの脳から得られた新規低分子 RNA の構造解析, 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 5 日, 神戸国際展示場 (兵庫県)

奥居沙弥, 鈴木穰, 加藤英政, 生田千里, 清澤秀孔, 河合剛太, 配列解析によって得られた低分子 RNA の NMR 構造解析, 第 15 回日本 RNA 学会年会, 2013 年 7 月 24 日-26 日, ひめぎんホール (愛媛県)

奥居沙弥, 生田千里, 清澤秀孔, 河合剛太, マウス脳から発現する 50-100 残基 RNA のクラスタリングと構造解析,

第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 13 日, 福岡国際会議場 (福岡県)

奥居沙弥, 生田千里, 清澤秀孔, 河合剛太, マウス由来の新規低分子 RNA の構造的特徴の解析, 第 51 回 NMR 討論会 (日本核磁気共鳴学会年会), 2012 年 11 月 8 日-10 日, ウィンクあいち (愛知県)

奥居沙弥, 生田千里, 清澤秀孔, 河合剛太, RNA 構造スクリーニングのための NMR 試験管内転写法の開発, 第 14 回日本 RNA 学会年会, 2012 年 7 月 18 日-20 日, 東北大学 (宮城県)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.le.it-chiba.ac.jp/kawai/mouerna2/index.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

河合 剛太 (KAWAI, Gota)  
千葉工業大学・工学部・教授  
研究者番号: 70211860

##### (2) 研究分担者

清澤 秀孔 (KIYOSAWA, Hidenori)  
高知大学・医学部・特任准教授  
研究者番号: 30295422

##### (3) 研究分担者

生田 千里 (USHIDA, Chisato)  
弘前大学・農学生命科学部・准教授  
研究者番号: 50250593