

平成30年5月28日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26440197

研究課題名(和文) 新生マイクロRNAの遺伝子制御網への組み込み過程の分子進化

研究課題名(英文) Integration process of microRNAs into gene regulatory network and its evolution.

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

研究成果の概要(和文)：臓器別ヒト遺伝子発現の公開データと網羅的なマイクロRNAターゲット予測に基づき、本研究は、マイクロRNAとターゲット遺伝子が相互に排他的に発現するターゲッティング忌避という遺伝子制御網おける特徴が哺乳類の進化の過程で形成されたことを定量的に示した。また、忌避に加え新たに、高発現するマイクロRNAは中程度の発現をする遺伝子に好性をもってターゲッティングし、その好性は哺乳類進化の過程で形作られたことを定量的に明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Based on publicly available by-organ human transcriptome data sets and exhaustive microRNA (miRNA) target prediction, the present study quantitatively demonstrates that the miRNA targeting characteristic of mutually exclusive expression between miRNAs and target genes is formed by mammalian evolution. This study also revealed quantitatively that human miRNAs prefer targeting genes with intermediate levels of expression and that the preference has been formed by mammalian evolution.

研究分野：進化生物学

キーワード：マイクロRNA 哺乳類 ターゲット遺伝子 遺伝子制御網

### 1. 研究開始当初の背景

マイクロ RNA は約 22 塩基の内在性の 1 本鎖 RNA で、他の遺伝子の転写後の制御に関与する。ヒトにおいて約 1500~1800 のマイクロ RNA 遺伝子座位がデータベースに登録されている。近年、進化の過程で多くのマイクロ RNA が新生することが知られるようになってきた。

本報告者は、先行研究として哺乳類 38 種を含む脊椎動物 43 種のゲノム DNA 配列比較により、ヒト・マイクロ RNA レパートリーの 53% は比較的新しく、真猿亜目の進化過程で新たに生じ、特に全体の 28% はヒト上科の進化過程で生じたと推定し発表した。マイクロ RNA は多くの他の遺伝子をターゲットとしてその制御に関わるので、新生したマイクロ RNA の与える影響は広範である。このことから、新生した多くのマイクロ RNA がいかに確立された遺伝子発現制御網に組み込まれるかについて興味を持たれていた。

### 2. 研究の目的

新生から比較的新しいマイクロ RNA が既に確立された遺伝子制御網にいかに組み込まれ、あるいは排除されるかを、マイクロ RNA のターゲット遺伝子を網羅的に推定することにより分子進化の観点から定量的に捉えることを目的とした。特に、制御対象の遺伝子に対するマイクロ RNA のターゲッティング好性/忌避傾向がマイクロ RNA とターゲット遺伝子の発現強度といかに関連するかを詳しく調べる。

### 3. 研究の方法

#### (1) ゲノム、マイクロ RNA 情報の取得

いずれも公開されたデータを用いた。ヒト・ゲノムとそのアノテーション情報は、Ensembl 89 から取得し、ヒトの 18,951 遺伝子の代表トランスクリプトを選択し用いた。マイクロ RNA の情報は miRBase release 21 を用いた。

#### (2) 遺伝子発現情報の取得

論文公開されている網羅的に行われた臓器別の RNA-seq データセットを用いた。ヒト・マイクロ RNA 発現情報は、Landgraf P et al. 2007, Cell. 129:1401-1414 を用い、タンパクコード遺伝子の発現情報は、Uhlén M et al. 2015. Science. 347:1260419 を用いた。

#### (3) ターゲット遺伝子の予測

異なる 2 つの予測アルゴリズム、TargetScan 7.01 (Agarwal V et al. 2014. eLife. 05005. 001.) と PITA (Kertesz M et al.

2007. Nat Genet. 39:1278-1284) を用い、それぞれ別に解析を進めた。

#### (4) 臓器別遺伝子発現レベルのランク分け

すでに論文公開されているヒトの臓器別の RNA-seq によるマイクロ RNA 発現情報を用い、その発現レベルにより 5 ランクに分けた (図 1)。発現が 0 の遺伝子は全て 0 発現に分類し、それ以外は各ランクの遺伝子数が等しくなるように分割した。ここで 0 発現とは、他の少なくとも一つの臓器には発現があるにもかかわらず、当該臓器では発現がない遺伝子を指している。タンパクコード遺伝子についても同様に、0 発現以外は各ランクが等しい数になるように 11 ランクに分けた (図 1)。

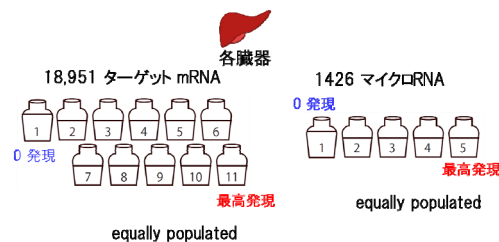


図 1. 臓器別遺伝子発現レベルのランク分け

#### (5) マイクロ RNA の起源による区分

本報告者の先行研究 (Iwama et al. 2013. Mol Biol Evol. 30:613-626) の推定結果より、ヒト・マイクロ RNA レパートリーの各マイクロ RNA をその起源により、有胎盤類以前、有胎盤類、真猿亜目、ヒト上科の 4 区分に分類した (図 2)。

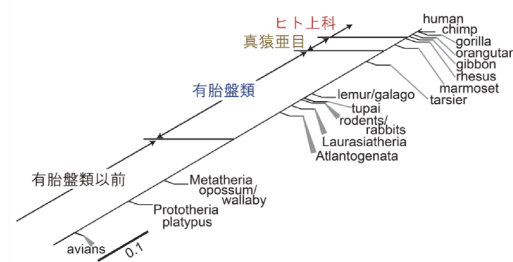


図 2. ヒト・マイクロRNAの進化的起源による分類

Iwama H. et al. 2013. Mol Biol Evol. 30:613-626. より抜粋改変.

#### (6) マイクロ RNA ターゲッティングの好性/忌避バイアスの推定

好性/忌避バイアスを推定するために、観測されたマイクロ RNA のターゲッティングの数が期待値からどれ程ずれているかをカイ二乗値で表し、観測値が期待値を上回ればプラスで、下回ればマイナスの符号を付した。以後、この値をバイアスと称して記述する。バイアスは、4 つの変数で指し示される、すなわち、(i) マイクロ RNA の発現ランク、(ii) ターゲット遺伝子の発現ランク、(iii) 臓器、(iv) マイクロ RNA

の起源区分である。ここでは、ターゲッティング成立は同じ臓器でマイクロ RNA とターゲット配列をもつ遺伝子が共発現している場合と見なした。

#### 4. 研究成果

(1) 進化的に古いマイクロ RNA ほど臓器別においても発現レベルは高い

一般に起源の古いマイクロ RNA ほど発現レベルは高いことが知られている。この傾向は臓器別に見ても成り立つかを、ヒトについて調べた。結果、臓器別においても古いマイクロ RNA ほど発現レベルは高い傾向が有意に認められた (図 3)。但し、睾丸、胎盤、精巣上体では真猿亜目、ヒト上科起源のマイクロ RNA が例外的に高い発現レベルを示した。

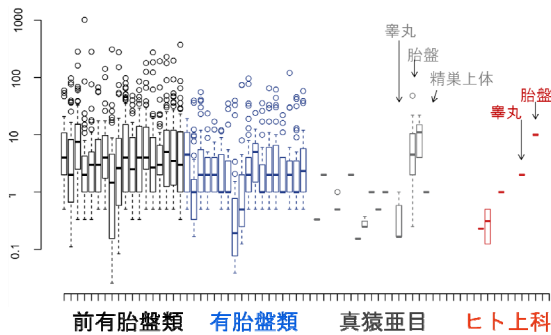


図 3. 臓器別及び生起起源別マイクロ RNA 発現レベル

(2) マイクロ RNA のターゲッティング特性

マイクロ RNA の 5 つの発現ランクの内、最高発現マイクロ RNA と 0 発現マイクロ RNA が各々、ターゲットとする遺伝子の発現レベルにより、いかなる好性/忌避のバイアスを示すかを図 4 で示すようにプロットした。このプロットを、臓器別、マイクロ RNA の起源別に描いた (図 5)。ただし、真猿亜目とヒト上科のマイクロ RNA の発現はほとんどが 0 発現でありバイアスを求めることができなかつたので、有胎盤類以前と有胎盤類起源のマイクロ RNA について比較し示した。

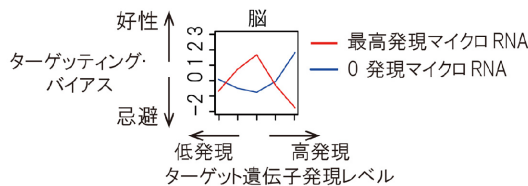


図 4. マイクロ RNA ターゲッティング特性

Iwama H. et al. PLOS ONE. 2018, 13(5):e0198142 より抜粋翻訳.

この結果より、ヒト・マイクロ RNA のタ

ーゲッティング特性として 3 点が明らかになった。

(i) ——選択的忌避—— 最高発現マイクロ RNA は高発現する遺伝子に対してターゲッティングを忌避する。

(ii) ——相互排他性—— 0 発現マイクロ RNA は高発現遺伝子にターゲッティング好性を持つ。換言すれば、ある臓器で発現していないマイクロ RNA はその臓器で高発現している遺伝子に多くターゲット配列を持つ、または残しているといえる。

(iii) ——中程度発現好性—— 最高発現マイクロ RNA は中程度の発現をする遺伝子に好性をもってターゲッティングする。

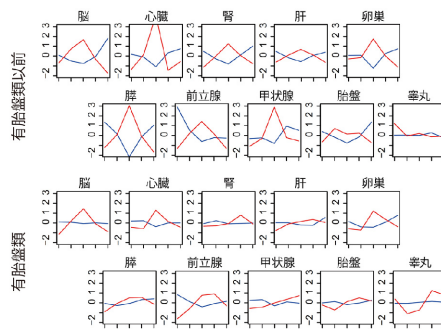


図 5. ヒト・マイクロ RNA のターゲッティング特性の哺乳類進化過程での変遷

Iwama H. et al. PLOS ONE. 201813(5):e0198142 より抜粋翻訳.

上記 3 つの特性は、有胎盤類以前と有胎盤類起源のマイクロ RNA いずれにも認められ、今回調べられた 10 臓器のうち睾丸を除いて概ね共通であった。

(3) ヒト・マイクロ RNA のターゲッティング特性は哺乳類進化の過程で形成された

今回示したヒト・マイクロ RNA の 3 つのターゲッティング特性、すなわち、(i) 選択的忌避、(ii) 相互排他性、(iii) 中程度発現好性は有胎盤類以前のマイクロ RNA (哺乳類に広く保存されたマイクロ RNA) でより顕著に認められる。一方、比較的新しい有胎盤類の進化過程で新生したマイクロ RNA では、それらの傾向は認められるものの不明瞭である。この違いを (i) 選択的忌避、(iii) 中程度発現好性について定量化し比較した (図 6)。

その結果、ヒト・マイクロ RNA のターゲッティング特性(i)と (iii) は進化的に古い起源のマイクロ RNA の方がその度合いにおいてより強いことが明らかになった。この結果は、次の点で意義がある。それはまず、これまで主にターゲッティングの忌避傾向に関わる (i) 選択的忌避、(ii) 相互排他性については知られていたが、本研究では、その忌避傾向が進化の過程で形作ら

れることを定量的に示した点。また、これまで知られていなかったマイクロ RNA のターゲッティング好性を (iii) 中程度発現好性として、定量的に特徴付けることができ、さらに、その好性も哺乳類進化の過程で形作られたことを明らかにした点である。

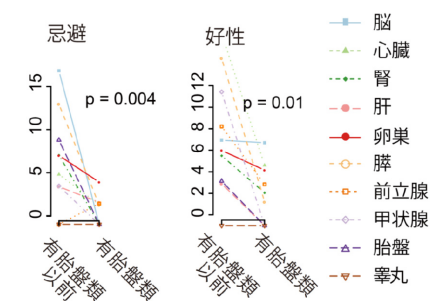


図 6. ターゲッティング特性の進化過程における変遷の定量比較

Iwama H. et al. PLOS ONE. 2018, 13(5):e0198142 より抜粋翻訳.

#### (4) マウスのデータによる検証

ヒト・マイクロ RNA で明らかになったターゲッティング特性が哺乳類進化の過程で形作られたのならば、ヒト以外の哺乳類においても認められるはずである。このことを確かめるために、利用可能な情報のあるマウスのデータセットを用い解析した。マウスのマイクロ RNA レポートリーについては、各マイクロ RNA の起源を体系的に調べた結果がないため、今回はヒトのマイクロ RNA に対するマウスの 1 対 1 オルソログを用い、有胎盤類以前と有胎盤類の起源のマイクロ RNA について同様の方法により比較を行った。

その結果、マウスのデータによってもヒトのマイクロ RNA のターゲッティング特性と一致する傾向が認められた。このことは本研究で明らかになったターゲッティング特性は哺乳類進化の過程で形作られた事を裏付けるもう一つの根拠となると考えられる。

#### (5) 方法論的検証

2つの異なるアルゴリズムによりターゲット遺伝子の予測を行って、それぞれの予測結果について解析を進め比較した。その結果、これら2つのアルゴリズムの違いによる結果の齟齬は認められなかった。

また、本研究において遺伝子発現のレベルは、網羅的に行われた RNA-seq のデータを用いて行った。今回、RNA-seq に加え、マイクロアレイを用いて網羅的に行われたマイクロ RNA の発現データを利用し、異なる発現量測定のパラットフォームにおいても、結果の再現性が保たれかを検証した。その結果、マイクロアレイによるマイ

クロ RNA の発現データを用いた場合も、同様に有意なマイクロ RNA ターゲッティング特性が示された。

これらの検証から、本研究の方法はマイクロ RNA ターゲット予測アルゴリズムの特性や発現レベル測定のパラットフォームの違いに対してロバストな結果を与え得るものと考えられた。

## 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 1 件)

- ① Iwama H, Kato K, Imachi H, Murao K, Masaki T. “Human microRNAs preferentially target genes with intermediate levels of expression and its formation by mammalian evolution.” 査読有, PLOS ONE, 2018, 13(5):e0198142.

[学会発表] (計 5 件)

- ① 岩間久和<sup>○</sup>、藤田浩二、井町仁美、村尾孝児、正木勉、「ヒト・マイクロ RNA とターゲットの発現強度の相関とマイクロ RNA の古さ」、日本遺伝学会第 88 回大会 (口演、査読有、2016 年 9 月 8 日、静岡)
- ② 岩間久和<sup>○</sup>、藤田浩二、井町仁美、村尾孝児、正木勉、「ヒト・マイクロ RNA の臓器別発現量とターゲット選択特性」、日本遺伝学会第 87 回大会 (口演、査読有、2015 年 9 月 25 日、宮城)
- ③ 岩間久和<sup>○</sup>、藤田浩二、井町仁美、村尾孝児、正木勉、「マイクロ RNA の生起時期と臓器別発現量」、日本進化学会第 17 回大会 (口演、査読有、2015 年 8 月 20 日、東京)
- ④ 岩間久和<sup>○</sup>、藤田浩二、井町仁美、村尾孝児、正木勉、「ヒト・マイクロ RNA の生起時期と発現量およびターゲット機能」、日本遺伝学会第 86 回大会 (口演、査読有、2014 年 9 月 17 日、滋賀)
- ⑤ 岩間久和<sup>○</sup>、藤田浩二、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 16 回大会 (口演、査読有、2014 年 8 月 22 日、大阪)

## 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

(4) 研究協力者  
なし