

機関番号：33101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24710212

研究課題名(和文)マイクロRNA前駆体の効率的な塩基配列決定手法の開発と配列解析

研究課題名(英文)Development of novel techniques for efficient next-generation pre-miRNA sequencing

研究代表者

川野 光興(Kawano, Mitsuoki)

新潟薬科大学・応用生命科学部・助教

研究者番号：00455338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：HeLa細胞で高発現している約80塩基のRNA配列リストを次世代シーケンス解析により作成し、それらRNAに相補的となる約30種類のLNA/DNAオリゴを合成した。これらのオリゴを逆転写反応液に加え、標的となるcDNA産物の特異的な除去を行った。このようにして調整したcDNAライブラリーを次世代シーケンス解析したところ、LNA/DNAオリゴを加えないライブラリーに比べ、約10倍のpre-miRNAタグを回収することができ、ゲノムへのマップ部位も約2倍になった。これらデータを用いて詳細な解析を行ったところ、pre-miRNAの部位特異的な塩基付加や、中間産物の存在等を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：Global profiling of pre-miRNA and its potential to increase understanding of the pre-miRNA landscape is impeded by overlap with highly expressed classes of other noncoding (nc) RNA. We present a data set excluding these RNA before sequencing through locked nucleic acids (LNA), greatly increasing pre-miRNA sequence counts with no discernable effect on pre-miRNA or mature miRNA sequencing. Analysis of profiles generated in total, nuclear and cytoplasmic cell fractions reveals that pre-miRNAs are subject to a wide range of regulatory processes involving loci-specific 3'- and 5'-end variation entailing complex cleavage patterns with co-occurring polyuridylation. Our findings point to particularly intricate regulation of the let-7 family in many ways reminiscent of DICER1-independent, pre-mir-451-like processing, introduce novel and unify known forms of pre-miRNA regulation and processing, and shed new light on overlooked products of miRNA processing pathways.

研究分野：複合新領域

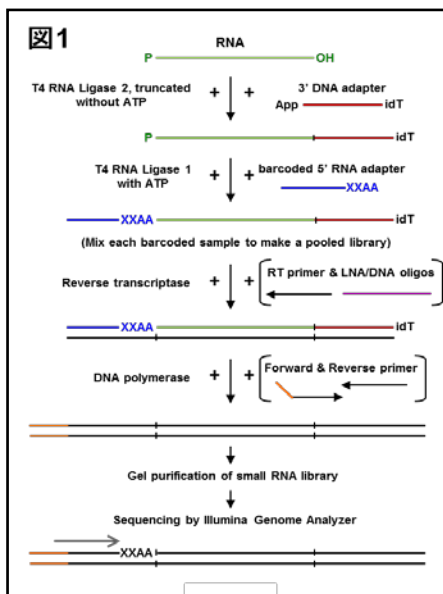
科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：マイクロRNA前駆体 機能性RNA トランスクリプトーム 次世代シーケンシング解析 RNA編集 遺伝子発現 ゲノム LNAオリゴ

1. 研究開始当初の背景

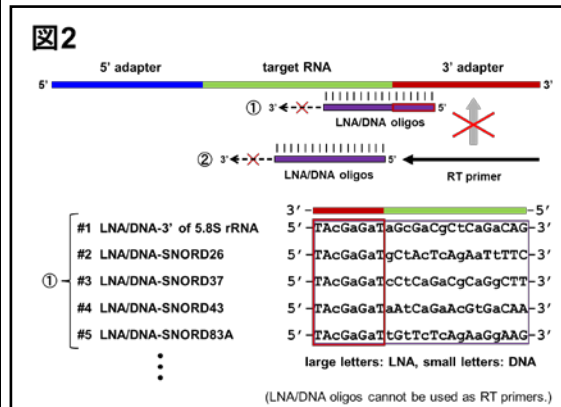
microRNA (miRNA、約 21 塩基) は翻訳レベルで遺伝子発現の制御を行う機能性小分子 RNA である。miRNA は、その前駆体 RNA である precursor RNA (pre-miRNA、約 70 塩基) から DICER1 という酵素によって切断され産生される。その生合成経路や miRNA の次世代シーケンシング解析については多くの研究者が取り組んでおり多数の報告がある。また、miRNA の発現量の変化が疾患の原因になり得ることが明らかとなってきた。miRNA の細胞内存在量は i) 前駆体 RNA の転写レベル ii) pre-miRNA から miRNA へのプロセッシングレベル iii) miRNA の分解レベルで制御されており、pre-miRNA の末端に付加される塩基や A-to-I RNA 編集によって pre-miRNA の切断効率の変化が miRNA の産出量に影響を及ぼすことがわかっている。しかし、それらを調べるための pre-miRNA の塩基配列決定による網羅的な発現解析は、pre-miRNA と全長に近い snoRNA が細胞内に大量に存在しており cDNA ライブラリー作製の妨げとなっているために報告はなく、通常の方法で行った我々の予備実験でも、pre-miRNA の全体に占める割合は 1%にも満たなかった。そのため全体像は未だ把握されていない。さらに、同一サンプルにおける pre-miRNA と miRNA の発現パターンや発現量については不明な点が多く、その発現調節機構の解明には至っていない。

申請者は、理化学研究所に在籍中に、次世代シーケンサーを用いた小分子 RNA の次世代シーケンス解析に携わった。アダプターオリゴが連結して生じる、インサートの入っていないアダプターダイマー産物が副産物として問題となったが、RT 反応の際に (図 1)、



アダプターダイマーと相補的な LNA/DNA キメラオリゴを加えることにより、その cDNA 産物のみを取り除くことに成功し、小分子 RNA 由来の cDNA ライブラリーを効率よく作製する方法を開発した。その後、この手法を

基に新たなデザインの LNA/DNA オリゴを合成し、pre-miRNA を濃縮した cDNA ライブラリーを作製する方法のアイデアを得ることができた (図 2)。



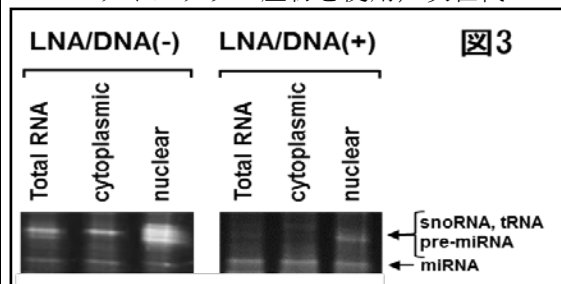
2. 研究の目的

pre-miRNA の網羅的な塩基配列解析は、pre-miRNA から成熟 miRNA への発現制御機構を理解するうえで重要な情報になるにも関わらず、その技術的困難さから現在までほとんど報告がない。本研究では、次世代シーケンサーを用いて、miRNA の前駆体である pre-miRNA を効率よく塩基配列決定するための技術開発を行う。そして、種々の細胞における、pre-miRNA 上の RNA 編集部位の同定や、新たな (pre-)miRNA 発現調節機構の解明などの研究へと展開するための研究基盤を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 標的 RNA と相補的な LNA/DNA オリゴの設計と長さの検討

HeLa 細胞の全 RNA、細胞質画分 RNA、核画分 RNA サンプルを用いて行った (図 3 の左側の泳動写真で確認できる、約 50~90 塩基の cDNA ライブラリー産物を使用) 次世代シー



ケンシング解析結果を基に、出現頻度ランク top100 リストを作成した (表 1. では一部表示)。このリストおよび塩基配列データを用いて、出現頻度の高い RNA (top50) に特異的に結合する LNA/DNA キメラオリゴをデータベースやプライマー設計ソフトを用いて設計した。この設計に先立ち、費用対効果を鑑み、LNA/DNA オリゴの長さの検討を行った。旧デザインでは 24 塩基だが、同じ標的 (3' end of 5.8S rRNA と SNORD43) に対して数種類の長さの異なるオリゴを用意して、各

ライブラリー作製を行い、その効果を cDNA ライブラリーバンドの量と種類から調べた。

表1. LNA/DNA (-) HeLa total RNAのtop20リスト (~50-100 bp cDNA)

rank	gene name	length (nt)	raw tag count	percentage	locus chr	tag start	end variation
1	3' end of 5.8S rRNA	75	2721559	24.94	chr16	33873007	O
2	3' end of 5.8S rRNA	73	2214808	20.30	chr16	33873009	O
3	3' end of 5.8S rRNA	74	1734956	15.90	chr16	33873008	O
4	SNORD43	61	834899	7.65	chr22	38045002	O
5	SNORD43	62	665009	5.18	chr22	38045002	O
6	SNORD26	75	524405	4.81	chr11	62379339	O
7	SNORD83A	90	378376	3.47	chr22	38041165	O
8	3' end of 5.8S rRNA	76	331434	3.04	chr16	33873006	O
9	SNORD37	66	293838	2.69	chr19	3933504	O
10	SNORD44	61	253844	2.33	chr1	172101728	O
11	SNORD29	62	226509	2.08	chr11	62377954	O
12	SNORD80	72	222895	2.04	chr1	172100593	O
13	SNORD2	63	211890	1.94	chr3	187985280	O
14	SNORD78	62	178805	1.64	chr1	172101384	O
15	SNORD45A	82	169272	1.55	chr1	76026161	O
16	SNORD44	60	168509	1.54	chr1	172101728	O
17	SNORD42A	59	164621	1.51	chr17	24074575	O
18	SNORD30	67	160240	1.47	chr11	62377713	O
19	SNORD49A	71	151945	1.39	chr17	16284074	O
20	SNORD26	74	145627	1.33	chr11	62379340	O

(2) cDNA ライブラリーの作製およびライブラリー作製プロトコルの改善

新規に設計・合成した LNA/DNA オリゴ (全 50 種類) を用いて、HeLa 細胞の全 RNA、細胞質画分 RNA、核画分 RNA サンプルの cDNA ライブラリーを、私が以前に論文発表したプロトコルを用いて作製した。逆転写反応の温度やオリゴ濃度を検討することで、pre-miRNA 由来 cDNA の産生量には影響を与えず、標的 RNA に対してのみ機能するオリゴの最適条件を調べた。

(3) cDNA ライブラリーの塩基配列の決定

電気泳動によりバックグラウンドバンドの十分な消失が確認できた cDNA サンプル (snoRNA バンドは見えない) を用いて、次世代シーケンシング解析 (HiSeq2000 を使用) を行った。

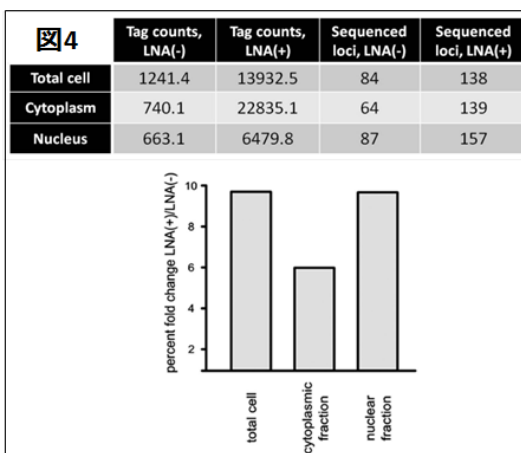
(4) 生命情報科学的シーケンスデータ解析

一連の次世代シーケンシングデータ解析を研究協力者と共同で行った。以前の pre-miRNA 解析では発見することができなかった新規 pre-miRNA 候補や、A-to-I RNA 編集部位の同定を我々が既に開発したプログラムを用いて探索した。

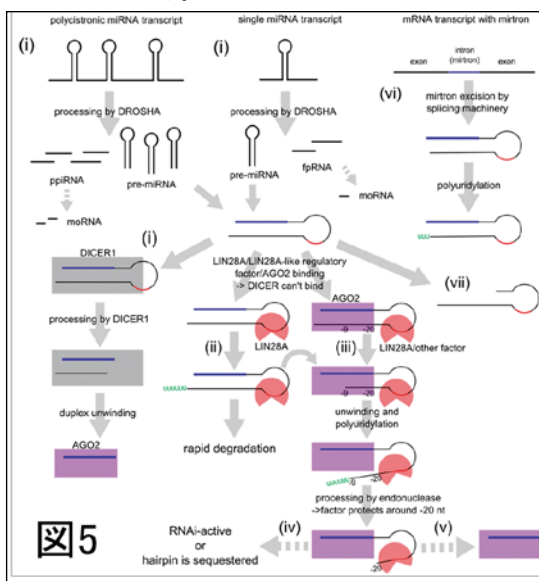
4. 研究成果

HeLa 細胞で高発現している 60~90 塩基の RNA 配列リスト (5.8S rRNA の 3' 末端断片や snoRNA など) を次世代シーケンシング解析により作製した。それら RNA の 3' 末端と 3' アダプターの 5' 末端との連結部位に相補的となる約 30 種類の LNA/DNA オリゴ (図 2 ①) を合成した。そして、これらのオリゴを RT 反応液に加えることにより、相補的なインサート配列のみと結合させ、RT プライマーのアニールを防ぐことにより、標的となる cDNA 産物の特異的な除去を行った (図 3)。このようにして調整した cDNA ライブラリーを次世代シーケンシング解析したところ、LNA/DNA オリゴを加えないライブラリーに比べ、約 10 倍

の pre-miRNA タグ (約 1~2 万タグ) を回収することができ、ゲノムへのマップ部位も約 2 倍になった (図 4)。これらデータを用いて



詳細な解析を行ったところ、pre-miRNA の部位特異的な塩基付加や、中間産物の存在等を明らかにすることができた。さらに、pre-miRNA の上流と下流の配列由来の断片や切断配列情報から、新規の miRNA 生合成経路を提唱することができた (図 5)。(Burroughs et al. 2012)。



しかしながら、この実験に用いた約 30 種類の LNA/DNA オリゴは、標的 RNA の 3' 末端と 3' アダプターの 5' 末端との連結部位に相補的な配列であったために、標的となる RNA の 3' 末端に塩基の付加や欠失の多型がある場合は期待通りに結合できず、pre-miRNA 以外の配列も大量にシーケンシングされてしまい、低頻度に存在する RNA 編集部位や新規 pre-miRNA の同定には至らなかった。実験系のさらなる改良という課題が残ったため、今後は、図 2 の②で示しているように、LNA/DNA オリゴが標的 RNA の 3' 末端における多型に影響を受けないよう、標的 RNA 部位とのみ完全に相補的となる部位でアニールできるように設計して行う予定である。既に、数種類のオリゴを用いた予備実験から、この新しいデザインの場合でも標的の cDNA

産物が電気泳動レベルで有意に減少することを確認している。

なし

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)

(3) 連携研究者
なし

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 5 件)

① 川野 光興

「Pre-miRNA deep sequencing」 NGS 現場の会
第三回研究会、神戸国際会議場、2013 年 9 月
4-5 日

② 川野 光興

「Towards RNA editing study of pre-miRNA
and repetitive sequences by deep
sequencing in human brain」 第 4 回新潟大
学脳研究所共同研究拠点国際シンポジウム：
RNA World in Brain、新潟大学脳研究所、2013
年 7 月 27-28 日

③ 川野 光興、Burroughs Maxwell

「DNA/LNA オリゴを用いた pre-miRNA の deep
sequencing 手法と解析」 第 35 回日本分子生
物学会年会、福岡国際会議場、2012 年 12 月
11-14 日

④ Kawano, M., and Burroughs, M.

「Pre-miRNA deep sequencing」 Cell
Symposia: Functional RNAs、Sitges, Spain、
2012 年 12 月 2-4 日

⑤ 川野 光興、マックスウェル・バローズ

「pre-miRNA の deep sequencing 手法と解析」
第 14 回日本 RNA 学会年会、東北大学百周年
記念会館、2012 年 7 月 18-20 日

[図書] (計 1 件)

Ando Y, Burroughs A, Kawano M, M., de Hoon,
M. J., and Hayashizaki, Y. Targeted
Methods to Improve Small RNA Profiles
Generated by Deep Sequencing. Regulatory
RNAs: Basics and Applications. 2012;
253-72.

[その他]

ホームページ等

<http://www.nupals.ac.jp/labo/ap/amage/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川野 光興 (KAWANO, Mitsuoki)

新潟薬科大学・応用生命科学部・助教

研究者番号：00455338

(2) 研究分担者