

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：33101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430187

研究課題名(和文)マイクロRNA前駆体におけるRNA編集部位の解析

研究課題名(英文)Analysis of RNA editing loci in human brain pre-miRNA

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：miRNA前駆体の網羅的な発現解析は、miRNA前駆体と全長に近いsnoRNAが細胞内に大量に存在するために困難となっている。ヒト脳サンプルを用いたmiRNA前駆体の次世代シーケンシング解析において、新規のDNA/LNAオリゴを用いることによりsnoRNAの割合を低下させることができ、miRNA前駆体リード総数を増やすことができた。その結果miRNA前駆体上に生じたRNA編集部位を複数箇所発見することができた。さらに、let-7ファミリーを特異的に減弱できるDNA/LNAオリゴを作製して次世代シーケンシング解析を行ったところ、let-7ファミリー以外のmiRNAリードカウントを上げることができた。

研究成果の概要(英文)：Comprehensive expression analysis of miRNA precursors is difficult due to the large amount of snoRNAs that are close in length to miRNA precursors and are present in cells. In the next-generation sequencing analysis of miRNA precursors using human brain samples, it was possible to decrease the proportion of snoRNA by using novel DNA/LNA oligos, and to increase the total number of miRNA precursor leads. As a result, it was possible to find multiple RNA editing sites generated on the miRNA precursors. Furthermore, DNA/LNA oligos capable of specifically attenuating the let-7 family were prepared and next-generation sequencing analysis was carried out. As a result, miRNA lead counts other than the let-7 family could be increased.

研究分野：分子生物学

キーワード：マイクロRNA RNA編集 機能性RNA 次世代シーケンシング解析 LNAオリゴ 生命情報科学 遺伝子発現制御

## 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 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 の次世代シーケンス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いる。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報告されている。しかし、それらを検出する 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するため 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、通常の方法でライブラリー作成を行った我々の予備実験でも、pre-miRNA の全体に占める割合は 0.1%にも満たなかった。そのため、その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 と成熟 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。

A-to-I RNA 編集 (RNA 編集) は、二重鎖 RNA 中のアデノシンをイノシンへと置換する反応である。RNA 編集が翻訳領域内に生じた場合は、イノシンはグアノシン (G) と同等であると見なされ翻訳される。従って RNA 編集は、DNA 中に変異が生じなくても、タンパク質に変異を導入することができる。近年、バイオフィーマティクス技術の発達によって、85%程度の転写産物は RNA 編集を受けているという解析もあり、よりグローバルな遺伝子発現制御を行っていると考えられている。現在同定されている RNA 編集部位の 99% は、非翻訳領域、イントロン、miRNA 前駆体など、タンパク質情報をコードしていない非翻訳 RNA 中に存在している。しかし、非翻訳 RNA 編集の大部分については、まだその生理的意味については不明である。次世代シーケンス解析を用いて pre-miRNA 上に生じる RNA 編集部位を網羅的に調べることは非常に有益だと考えられる。

## 2. 研究の目的

miRNA 前駆体 (pre-miRNA) の網羅的な塩基配列解析に関する研究は、miRNA 前駆体から成熟 miRNA への発現制御機構を理解するために重要な知見を与えてくれるのにも関わらず、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 を効率よく網羅的に塩基配列決定

するための技術を活用し、RNA 編集活性が高いことが知られているヒト脳細胞サンプルを用いて、pre-miRNA および成熟 miRNA の同定を行う。さらにその中に生じる RNA 編集部位の同定を試みる。そして、LNA/DNA 法を用いて、脳で高発現している let-7 miRNA の出現頻度を調べる。年齢による pre-miRNA と成熟 miRNA の発現量の解析も行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 高出現 RNA と相補的な LNA/DNA オリゴの設計・合成

ヒト脳細胞 (胎児、成人、老人を各一人ずつ) の全 RNA サンプルを企業から購入し、それらを用いて約 50~100 塩基からなる RNA の次世代シーケンス解析を行った。結果を基に、出現頻度ランク top100 リストを作成した。このリストと塩基配列データを用いて、出現頻度の高い rRNA や snoRNA に特異的に結合し、それらの cDNA 産物を減少させる LNA/DNA キメラオリゴを設計した。

### (2) 小分子 RNA 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 (約 50 種類) を用いて、各ヒト脳細胞の全 RNA サンプル由来の cDNA ライブラリーを、申請者が開発したプロトコルを用いて作製した。オリゴの濃度や塩基組成を検討することで、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。また、高次構造をとる pre-miRNA を効率よく逆転写反応できる条件検討を行った。

### (3) 生命情報科学解析による RNA 編集部位の同定

一連の次世代シーケンス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、RNA 編集部位を同定した。その部位が転写後に編集されていることを、ゲノム DNA の塩基配列を決定して確認した。

### (4) pre-miRNA 中の RNA 編集による、成熟 miRNA 発現量への影響を調査

RNA 編集をもつ pre-miRNA および snoRNA 種のリード数と、そこから発生する成熟 miRNA 種のリード数を比較し、RNA 編集による成熟 miRNA 発現量調節機構を推測した。さらに、let-7 ファミリーの読み取りを特異的に減弱できる DNA/LNA オリゴの有無による let-7 miRNA およびその他の成熟型 miRNA 発現プロファイルを取得しサンプル間で比較した。

## 4. 研究成果

購入したヒト脳細胞 (胎児、成人を各一人ずつ) の全 RNA サンプルを用いて約 50 から 90 塩基 RNA の次世代シーケンス配列解析を行った。この結果を基に、出現頻度ランク top100 リストを作成し、出現頻度の高い rRNA 断片や snoRNA に特異的に結合する LNA/DNA オリゴを設計した。そして、新規に設計・合

成した LNA/DNA オリゴを用いて、各ヒト脳細胞の全 RNA サンプル由来の cDNA ライブラリーの作製を行った。この際、効率良くライブラリー作製が行えるようにプロトコルの改善を行った。

ヒト脳サンプルを用いた pre-miRNA の次世代シーケンシング解析によって得られたデータを使用して研究協力者と共同で生命情報学的解析を行った結果、新規にデザインした DNA/LNA オリゴを用いることにより snoRNA の割合を大幅に減らすことができた。これにより予想通り pre-miRNA の総数を増やすことができ、その中に含まれる pre-miRNA 上に生じた RNA 編集部位を生命情報学的な解析により複数箇所発見することができた。さらに、生命情報科学的解析により、pre-miRNA 上の RNA 編集部位のみならず、snoRNA および成熟型 miRNA の発現プロファイルを効率よく調べることができた。候補部位が転写後に編集されていることを確かめるために、ライブラリー作製に用いた同じ細胞サンプルから回収したゲノム DNA を用いて塩基配列を決定して RNA 編集を確認した。

成人および胎児の脳細胞全 RNA サンプルの配列データを用いて、snoRNA および成熟型 miRNA の分類と頻度を調べ、各サンプルにおいて顕著な差異がある miRNA を探索した。さらに、申請者が独自に開発した、脳で高発現している let-7 ファミリーの読み取りを特異的に減弱できる DNA/LNA オリゴを用いてライブラリーを作製して次世代シーケンシング解析を行ったところ、let-7 ファミリーの出現頻度を有意に低下させることができ、その他の miRNA リードカウントを上げることも成功した。

DNA/LNA オリゴを次世代シーケンシング sRNA ライブラリー作成時に使用した場合と使用しなかった場合での、pre-miRNA ライブラリーと成熟型 miRNA ライブラリーにおける miRNA 出現頻度を生命情報科学解析により調べた。pre-miRNA ライブラリー作成において DNA/LNA オリゴを用いた場合は pre-miRNA と成熟型 miRNA の出現頻度は用いなかった場合に比べて各約 5 倍、約 1000 倍多かった。成人 (82 歳男性) および胎児 (29 週齢男性) の脳細胞全 RNA サンプルにおいて顕著な差は認められなかった。成熟 miRNA ライブラリー作成において DNA/LNA オリゴを用いた場合は pre-miRNA の出現頻度は用いなかった場合に比べて約 2 倍多かった。しかし、成熟型 miRNA の出現頻度は用いなかった場合に比べて顕著な差はみられなかった。成人および胎児の脳細胞全 RNA サンプルにおいて比較したところライブラリー間で顕著な差は認められなかった。次に、各ライブラリーにおけるゲノムへのリードタグマップ率を調べた。DNA/LNA オリゴを用いた pre-miRNA ライブラリーでは約 35%、DNA/LNA オリゴを用いてない pre-miRNA ライブラリーでは 0.04% だった。また、成熟型 miRNA ライブラリーでは、

DNA/LNA オリゴの有無に関わらず約 70% だった。これらのことから、DNA/LNA オリゴを用いると、pre-miRNA ライブラリーにおいては pre-miRNA および成熟型 miRNA の出現頻度を上昇させ、マップ率が約 900 倍改善されることがわかった。さらに、DNA/LNA オリゴを用いた場合と用いなかった場合で、個々の成熟型 miRNA リードの出現頻度の比較を行ったところ、相関係数が成人サンプルでは 0.9878、胎児サンプルでは 0.8791 になった。

#### 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 4 件)

1: Sato M, Suzuki T, Kawano M, Tamura M. Circulating osteocyte-derived exosomes contain miRNAs which are enriched in exosomes from ML0-Y4 cells. Biomed Rep. 2017; 6(2):223-231. 査読有り

2: Tamura M, Kawano M, Sato M, Nashimoto M: Involvement of an intracellular vesicular transport process in naked-sgRNA-mediated TRUE gene silencing. Molecular Medicine Reports. 2015; 12(4):6365-6369. 査読有り

3: Ninomiya S\*, Kawano M\*, Abe T\*, Ishikawa T\*, Takahashi M, Tamura M, Takahashi Y, Nashimoto M. Potential small guide RNAs for tRNase ZL from human plasma, peripheral blood mononuclear cells, and cultured cell lines. PLoS One. 2015; 10(3):e0118631. \*These authors contributed equally to this work. 査読有り

4: Takahashi M, Elbarbary RA, Watanabe N, Goto A, Kamiya D, Watabe Y, Uchiyama T, Narita M, Takahashi M, Takahashi Y, Ishihara N, Miyazawa T, Yoshida T, Kawano M, Tamura M, Nashimoto M. Screening of a heptamer-type sgRNA library for potential therapeutic agents against hematological malignancies. Leuk Res. 2014; 38(7):808-815. 査読有り

[学会発表](計 5 件)

1: 川野 光興、石本 巧  
タイプ I トキシン・アンチトキシン系の遺伝子発現制御機構  
第 89 回日本細菌学会総会、大阪国際交流センター (大阪市)、2016 年 3 月 23 日

2: 石本巧、水吉智彦、橋本兼吾、川野 光興

アンチセンス RNA とオーバーラップ遺伝子による毒性遺伝子の翻訳制御機構  
平成 27 年度日本生化学会関東支部例会、第 56 回新潟生化学懇話会、新潟日報メディアシップ（新潟市）、2015 年 6 月 20 日

3：川野 光興、藤田 翔太、石本 巧、津森 豊  
オペロン型小分子アンチセンス RNA を用いた遺伝子発現制御法の開発  
第 37 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜（横浜市）、2014 年 11 月 27 日

4：川野 光興  
大阪市立大学肝臓研究セミナー  
次世代シーケンス解析による新規機能性小分子 RNA の探索  
大阪市立大学医学部（大阪市）、2014 年 10 月 8 日

5：川野 光興  
公開シンポジウム「Structured ncRNA 研究への前哨」  
親子をつなぐ RNA の秘密  
千葉工業大学（習志野市）、2014 年 6 月 20 日

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www2.nupals.ac.jp/labo/ap/amage/>

#### 6．研究組織

##### (1)研究代表者

川野 光興 (Mitsuoki Kawano)  
新潟薬科大学・応用生命科学部・助教  
研究者番号：00455338

##### (2)研究協力者

マックスウェル バローズ (Burroughs Maxwell)