

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K14640

研究課題名(和文)細胞内温度に依存したRNAサイレンシング活性の制御機構

研究課題名(英文)Regulation of the efficiency of RNA silencing by growth temperature

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(理学部)・准教授

研究者番号：50213327

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエ・ヒト・ニワトリ細胞を用いて、RNAサイレンシング効果のレポーター解析を行った。生育温度が低いショウジョウバエで最も強い活性が見られたため、生育温度に依存してRNAサイレンシング活性が異なる可能性が強く示唆された。また、細胞内の温度分布に依存した影響を明らかにするため、Argonauteタンパク質に各細胞内小器官のセンサーシグナルをつけたコンストラクトを作製した。microRNAの生合成過程において、二次構造が温度の影響をうけるかをノーザンブロットで検出中である。さらに、2本鎖RNAのセンサータンパク質R2D2とTRBPの温度依存的2本鎖RNA結合力を検討している。

研究成果の概要(英文)：To reveal the effect of growth temperature for the efficiency of RNA silencing, reporter assay of RNA silencing activity was performed using cultured cells derived from *Drosophila*, human, and chicken. Since the strongest activity was observed in the cells of *Drosophila* rearing in a low growth temperature, it was strongly suggested that the RNA silencing activity may depend on the growth temperature. In addition, in order to clarify the effects of the temperature in the different places in the cells, the constructs expressing Argonaute protein with the sensor signals of each intracellular organelle were prepared. During the biosynthesis process of microRNA, it is also being detected by Northern blot if the secondary structure is affected by temperature. Furthermore, the temperature dependent binding activities for double-stranded RNAs of their sensor proteins R2D2 and TRBP are studied.

研究分野：ゲノム情報生物学

キーワード：RNAサイレンシング miRNA 細胞内温度

1. 研究開始当初の背景

ヒトやマウスなどの高等生物では、microRNA を始めとするタンパク質をコードしない non-coding RNA (ncRNA) が、タンパク質をコードする RNA よりも多量に存在することが明らかになり、ncRNA は生物の進化に伴って出現してきた、複雑な高次生命機能を担う重要な分子であることがわかってきた。

RNA サイレンシングは microRNA や small interfering RNA (siRNA) といった約 21 塩基の小さな ncRNA による転写後遺伝子抑制機構であり、相補的な塩基配列をもつ mRNA と対合してその機能を抑制する。しかしながら、ヒトを始めとする哺乳類細胞では、有効な siRNA は特定の配列規則性をもつ、限られたものであることを我々は明らかにしている (Ui-Tei *et al.* Nucleic Acids Res. 2004; Naito *et al.* Nucleic Acid Res. 2004)。現在、世界的に利用されている siRNA は我々のガイドラインに基づくものが多く、その後の多くのグループの生化学的・構造生物学的研究から、それらは RNA サイレンシングの分子メカニズムを非常によく反映したものであることが明らかにされている。このように、RNA サイレンシングの動作原理の研究が進むにつれて、siRNA の 5' 末端から 2-8 塩基のほんの 7 塩基の“シード”と呼ばれる領域が、まず最初に標的となる mRNA を識別する領域であることがわかってきた。大変興味深いことに、哺乳類細胞では、siRNA がシードと相補的配列をもつ遺伝子を抑制する効率は、この領域の熱力学的な安定性に依存することを我々は見出した (Ui-Tei *et al.* Nucleic Acids Res. 2008)。すなわち、塩基対合力が強いシード配列をもつ siRNA は相補的遺伝子を強く抑制し、弱い siRNA はその抑制効果が弱い。このような傾向は microRNA でも同様であった (Hibio *et al.* Sci. Rep. 2012)。さらに驚いたことに、体温の異なるさまざまな生物のもつ microRNA のシード配列の融解温度の平均値を計算してみると体温に依存して増加していた。

2. 研究の目的

研究期間内には、RNA サイレンシングによる遺伝子抑制効果が生物の体温や生体内の個々の細胞温度、あるいは 1 つの細胞内の温度分布によって制御されていることを明らかにして、細胞内温度が RNA サイレンシングによる遺伝子発現機構を制御していることを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 「RNA サイレンシング効果のショウジョウバエ・ヒト・ニワトリ細胞を用いたレポーターおよびマイクロアレイ解析」により、体温に依存して RNA サイレンシング活性が異なることを実証する。さらに、(2) 「細胞内の温度分布の相違に依存した RNA サイレン

シング活性の測定」により、細胞内の温度が異なる領域におけるサイレンシング活性への影響の相違を解析する。また、(3) 「miRNA 二次構造の温度による制御機構の解析」により、温度により miRNA の生合成過程が影響をうけるかどうかを明らかにし、(4) 「2 本鎖 RNA 対合力のセンサータンパク質 R2D2 と TRBP の機能解析」により、RNA サイレンシング関連分子の進化的相違を考察する。

4. 研究成果

温度はさまざまな形で生体に影響を与えている。我々は RNA サイレンシングの強さが塩基対合の強さに依存していることを明らかにした。塩基対合の強さは、温度に依存して変動する性質をもっている。そこで、RNA サイレンシングによる遺伝子発現制御という極めて重要な生命機能が、細胞内温度に依存するという目から鱗の性質を明らかにするために、まず生育温度が異なる生物種として、ショウジョウバエ、ヒト、ニワトリの 3 種の培養細胞を用いたレポーター実験を行った。ショウジョウバエは変温動物であるが、通常 25°C で飼育される。恒温動物であるヒトの体温は 37°C 付近であり、ニワトリは 42°C 付近である。ショウジョウバエ細胞としては S2 細胞、ヒトは HeLa 細胞、ニワトリでは我々が独自に樹立した繊維芽細胞由来培養細胞株を用いて、RNA サイレンシング活性を測定するためのレポーターアッセイを行った。レポーター遺伝子としてはホタルルシフェラーゼ遺伝子を用い、シード領域の塩基対合力が異なるルシフェラーゼ遺伝子に対する 20 種類の siRNA を用いて、RNA サイレンシング活性を測定した。標的配列は測定感度を上げるために 3 回連続した重複配列を挿入したレポーターを用いた。RNA サイレンシングの強さは、同一の siRNA を用いた場合には、ショウジョウバエ細胞で最も強い抑制作用を示す傾向が認められた。そこで、同一生物種でも温度が異なると RNA サイレンシング活性が異なることを示すために、ショウジョウバエ細胞では 18~28°C、ヒト細胞では 35~40°C 程度で培養可能であるので、異なる温度環境下でも RNA サイレンシング活性を測定中である。さらに、ヒトのがん化細胞を用いた解析を実施している。がん細胞は正常細胞に比べて、低温を好み、35°C 付近という低温で最もよく増殖することが知られている。そこで、低温条件下における遺伝子発現調節機構の変化を解析していく予定である。

また、1 つの細胞においても、細胞内の温度も均一ではなく、細胞核や中心体は特にあたたかく、ミトコンドリア近くでは熱が発生して温度が低いことが明らかになってきている。そのため、細胞内温度の分布に依存した RNA サイレンシング活性の変化を測定する手法を構築している。RNA サイレンシングに必須なタンパク質である Argonaute タンパク質に、細胞内小器官のセンサーシグナルを

つけて Argonaute タンパク質の局在をコントロールすることで、異なる細胞内局在における RNA サイレncing 活性をレポーターアッセイにより測定する。現在、センサーシグナルを付加したコンストラクトを作製中である。

microRNA は、その生合成過程で特徴的な二次構造を形成する。前駆体の stem-loop 構造は、その後の生合成過程における Drosha や Dicer といった二本鎖 RNA 切断酵素によるプロセッシングや、Argonaute タンパク質への取り込みに大きな影響を与えることがわかっている。しかし、その構造の安定性は温度による強い影響を受けると想定されるため、その生合成効率を測定する目的で、前駆体から成熟型の microRNA の合成効率をノーザンブロットで検出中である。

さらに、ショウジョウバエでは、siRNA の両末端のうち、2 本鎖 RNA の対合力が強いほうの末端を感知して対合できるタンパク質として R2D2 が同定されている。アミノ酸配列の同一性は非常に低いが、類似のドメイン構造をもつヒト遺伝子として TRBP と PACT がある。これらの siRNA との結合様式は全くわかっていなかったが、我々は siRNA の一部をシステムティックに DNA に置換することで、TRBP が結合する部位の特定を行い、その結合部位は末端ではなく、約 10 塩基分の長さの 2 本鎖領域と考えられる結果を得ている。このような R2D2 と TRBP の結合様式の違いは、生育温度の低いショウジョウバエでは R2D2 はより強固に対合している 2 本鎖 RNA の末端に結合するが、体温の高いヒトでは TRBP は対合力は弱くてもある程度の長さがあれば 2 本鎖 RNA に結合できるというゆるい結合でも機能することを示しているのかもしれない。これらのタンパク質の大腸菌で発現される系は構築できたので、温度に依存した *in vitro* での小分子 RNA への結合実験を行い、機能分子の進化を考察する。

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)(すべて査読有り)

(1) Galipon J, Ishii R, Suzuki Y, Tomita M, Ui-Tei K. Differential binding of three major human ADAR isoforms to coding and long non-coding transcripts. *Genes (Basel)*, 8, E68, 2017. doi:10.3390/genes8020068.

(2) Ui-Tei K, Maruyama S, Nakano Y. Enhancement of single guide RNA transcription for efficient CRISPR/Cas-based genomic engineering. *Genome*, 1-9, 2017. doi:10.1139/gen-2016-0127.

(3) Kato M, Huang Y-Y, Matsuo M, Takashina Y,

Sasaki K, Horai Y, Juni A, Kamijo S, Saigo K, Ui-Tei K, Tei H. RNAi-mediated knockdown of mouse melanocortin-4 receptor *in vitro* and *in vivo*, using an siRNA expression construct based on the mir-187 precursor. *Exp. Anim.*, 66, 41-50, 2016. doi: 10.1538/expanim.16-0065.

(4) Ui-Tei K. Is the efficiency of RNA silencing evolutionarily regulated? *Int. J. Mol. Sci.*, 17, 719, 2016. doi: 10.3390/ijms17050719.

[学会発表](計 16 件)

(1) 程久美子 女性研究者のトリレンマ
東北大学 多元物質科学研究所 男女共同参画講演会 (2017.2.20) 東北大学 (宮城県仙台市)

(2) Nakano Y, Takahashi T, Murakami F, Ui-Tei K. Identification of interacting RNAs with an RNA silencing enhancer TRBP. 文部科学省科学研究費新学術領域研究「先進ゲノム支援」国際シンポジウム "The Start of New Genomics"(2017.1.10) 東京大学 (東京都文京区)

(3) 明奕博、ガリポン・ジョゼフィーヌ、程久美子 microRNA 前駆体の A-to-I 編集による成熟 microRNA のストランド選択への影響 第 39 回日本分子生物学会年会(2016.12.2) パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

(4) 丸山翔平、王青波、李雨恬、程久美子 CRISPR システムにおける Cas9 と dCas9 の遺伝子抑制作用の比較 第 39 回日本分子生物学会年会(2016.12.1) パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

(5) 高橋朋子、中野悠子、尾野本浩司、小森千晶、米山光俊、程久美子 ヒト細胞における、RNA サイレncing と抗ウイルス反応のクロストーク Crosstalk mechanism between RNA silencing and antiviral response in human cells 第 39 回日本分子生物学会年会(2016.11.30) パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

□**優秀ポスター賞受賞**□

(6) 中野悠子、高橋朋子、村上文則、程久美子 二本鎖 RNA 結合タンパク質 TRBP と相互作用する RNA の網羅的解析による TRBP の新規機能の解明 第 39 回日本分子生物学会年会(2016.11.30) パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

(7) 須澤壮崇、西賢二、秦裕子、尾山大明、程久美子 ヒト GW182 ファミリータンパク質のリン酸化による RNA サイレncing 活性の制御 Regulation of miRNA-mediated gene silencing activity through phosphorylation of

hGW182 family proteins 第39回日本分子生物学会年会(2016.11.30) パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

(8) 小森千晶、高橋朋子、程久美子 二本鎖RNA結合タンパク質 TRBP と HIV-1 TAR RNA の相互作用に Dicer が与える影響 Effects of Dicer on interaction of a double-stranded RNA binding protein, TRBP, with HIV-1 TAR RNA 第39回日本分子生物学会年会(2016.11.30) パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

(9) 小林芳明、ガリポン・ジョゼフィーヌ、程久美子 細胞内 miRNA 活性化システムの包括的な理解 Comprehensive understanding of miRNA activation system in the cells 第39回日本分子生物学会年会(2016.11.30) パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

(10) 野口賢太郎、須澤壮崇、西賢二、秦裕子、尾山大明、程久美子 ヒト TNRC6A タンパク質の核内相互作用因子の同定と機能解析 第39回日本分子生物学会年会(2016.11.30) パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

(11) Ui-Tei K, Kamola P.J, Hibio N., Takahashi T., Nakano Y. Thermodynamic regulation of the efficiency of RNA silencing and its evolutionary perspective. Cell Symposia Functional RNAs (2016.11.7-8) Guangzhou, China.

(12) Takahashi T, Nakano Y, Onomoto K, Komori C, Yoneyama M, Ui-Tei K. Mutual regulation between RNA silencing and anti-virus defense system. Cell Symposia Functional RNAs (2016.11.7-8) Guangzhou, China.

(13) Nakano Y, Takahashi T, Murakami F, Ui-Tei K. Global analysis of interacting and/or regulating RNAs of a double-stranded RNA binding protein, TRBP, and its associated proteins to define the not-well-determined function. Cell Symposia Functional RNAs (2016.11.7-8) Guangzhou, China.

(14) Galipon J, Ishiguro S, Ishii R, Kume H, Suzuki Y, Tomita M, Ui-Tei K. A-to-I editomes indicate genome-wide regulation of gene expression via ADAR-isoform specific miRNA editing. International conference on systems biology (2016.9.19) Barcelona, Spain.

(15) Galipon J, Ishiguro S, Ishii R, Suzuki Y, Kondo S, Okada-Hatakeyama M, Tomita M, Ui-Tei K. A-to-I editome reveals ADAR-isoform specific patterns of sequence and structure on miRNA. The 2016 joint annual meeting of the RNA Society and the RNA Society of Japan (RNA 2016) (2016.6.28-7.2) 国立京都国際会

館(京都市左京区)

(16) 須澤壮崇、西賢二、程久美子 ヒト GW182 ファミリータンパク質のリン酸化による細胞内局在と RNA サイレncing 活性の制御 第16回東京大学生命科学シンポジウム(2016.4.23) 東京大学(東京都目黒区)

〔図書〕(計3件)

(1) 中野悠子、高橋朋子、程久美子「第1章 核酸医薬品における開発の現状と安全性評価、第4節 siRNA の利点と技術開発・安全性評価」次世代を担う、核酸医薬、免疫療法、遺伝子治療、細胞医薬品の課題と各疾患治療への横断的展開、印刷中、技術情報協会。

(2) ガリポン・ジョゼフィーヌ、石黒宗、富田勝、程久美子「RNA-Seq による A-to-I RNA 編集の検出」NGS アプリケーション RNA-Seq 実験ハンドブック, 282 (pp.113-117), 2016, 羊土社。

(3) 高橋朋子、程久美子「核酸医薬と small RNA」DOJIN BIOSCIENCE シリーズ「ノンコーディング RNA」, 372 (pp.146-153), 2016, 化学同人。

〔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 (KUMIKO UI-TEI)

東京大学・大学院理学系研究科・准教授
研究者番号：50213327