

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：14603

研究種目：国際共同研究加速基金（帰国発展研究）

研究期間：2019～2021

課題番号：17K20145

研究課題名（和文）miRNA生合成の調節機構とその影響のゲノムワイド解析

研究課題名（英文）Genome-wide analysis of regulation of miRNA processing and its effects on transcriptome

研究代表者

岡村 勝友（Okamura, Katsutomo）

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授

研究者番号：70817733

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 45,000,000円

研究成果の概要（和文）：遺伝子発現は厳密に制御される必要があり、その破綻は疾患の原因にもなる。厳密な制御のため、遺伝子は様々な機構で制御されている。遺伝子の活性がオンになる場合、まず遺伝子配列がRNAに読み換えられコピーされる（転写）。コピーされたRNAに対して起こる調節を転写後調節と呼ぶ。我々はmicroRNA（miRNA）と呼ばれる小分子RNAをコードする遺伝子群の発現量が転写後にどのように調節されているかを解析した。疾患組織由来の網羅的遺伝子発現データを解析し、新規miRNA転写後調節機構の候補を見出した。さらに新規の手法を開発してこれら新規分子機構候補を生化学的および細胞生物学的に解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究から様々な蛋白質がmiRNA遺伝子の発現制御に関わることが明らかになった。今回見つかった機構の多くは以前から蛋白質をコードする遺伝子のmRNAの生合成制御に関わることが知られている機構であり、miRNAとmRNAの生合成が共通の機構で制御されている可能性を示唆している。このような協調的機構が正常な細胞分化、発生過程でどのように機能しているのか、その破綻がどのようにして疾患につながるのか、今後の解析が必要である。本研究で開発された手法や実験材料は今後の本分野での研究に貢献できると期待される。

研究成果の概要（英文）：To maintain the levels of gene products within the normal range, genes are regulated at various levels including the process known as transcription, where DNA sequence is copied onto RNA molecules, and the processes after that. We focused our attention to a group of genes called microRNAs (miRNAs) that encode small RNAs as their gene products, and studied how miRNAs are regulated after transcription. By analyzing large gene expression data derived from human cancers, we identified candidates of novel mechanisms that might regulate the efficiency of miRNA production. By developing new methods of biochemical and cell biological analyses, we molecularly characterized the novel mechanisms. In addition, we studied how levels of proteins involved in miRNA processing change over time during cellular differentiation. These results will help us understand how different types of genes including miRNA genes and protein coding genes are coordinately regulated to achieve precise gene regulation.

研究分野：遺伝子発現制御

キーワード：miRNA トランスクリプトーム 転写後制御

1. 研究開始当初の背景

遺伝子発現は様々なレベルで絶妙に制御されており、そのほんのわずかな異常が疾患の原因となる。小分子RNAであるmicroRNA(miRNA)による調節機構は重要な働きを持っているため、miRNA遺伝子自身の発現調節も非常に重要になるが、miRNA遺伝子の発現を転写後に調節する機構の重要性について網羅的には調べられていない。miRNAは初期転写産物が生成されたのちDROSHA、DICER1という2つのRNA切断酵素によりプロセッシングを受けたのち、Ago2などのArgonauteタンパク質に取り込まれて成熟化し、miRNAに相補的な配列を持つmRNAの翻訳抑制や分解を介して遺伝子発現制御因子として働く(図1)。この生合成の過程で、生合成因子の存在量やmiRNA初期転写産物や前駆体に結合するRNA結合タンパク質による調節が起こることが知られているが、その詳細は未だ不明である。

本研究は、疾患サンプルからのゲノミクスデータの再解析と生化学的解析を通して、miRNA遺伝子の発現の転写後調節機構を網羅的に理解し、その異常が疾患に与える影響を考察することを目的を行う。

2. 研究の目的

重要な遺伝子発現因子の一群であるmiRNA遺伝子の発現制御機構をよりよく理解することは、正常細胞内での遺伝子制御の全体像を理解するためには必須のステップである。本研究は、それぞれのmiRNA生合成因子の活性の組織間での違いを検証し、その違いを生み出すメカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

疾患ゲノミクスデータの解析を通してmiRNA生合成効率とmiRNA生合成因子やRNA結合タンパク質遺伝子の発現との相関を調べることで、miRNA生合成効率が調節されるメカニズムの網羅的な解析を行う。そのうち、いくつかの遺伝子について、遺伝子ノックダウン解析、レポーター細胞を用いた生細胞内での発現および局在の変動の解析、またin vitro実験系における酵素活性の解析を通し、miRNA生合成効率を調節するメカニズムを明らかにする。またその過程で、本解析に必要な解析法を樹立する。

4. 研究成果

(1) 疾患ゲノミクスデータの解析

疾患ゲノミクスデータとして、CCLE(Cancer Cell Line Encyclopedia)データを用い、約1,000種類の細胞株における287のmiRNA遺伝子について初期転写産物量と成熟産物量の定量値から、各細胞株でのそれぞれのmiRNAの生合成効率を推定した。さらにこのmiRNAの生合成効率推定値と発現相関を示すRNA結合タンパク質遺伝子を同定することで、miRNAの生合成を調節するRNA結合タンパク質候補を選定した(発表1、2)。同定された候補の中にはmiR-18aとHNRNPA1やlet-7aとLIN28Bなど、生合成制御の関係が知られるmiRNAとRNA結合タンパク質の組み合わせに加え、多くの新規の候補の組み合わせが見出された(図2)。また、アルツハイマー病患者と健常者におけるmiRNA生合成の差異を調べるために、19名の健常者、16名の軽度認知障害および19名のアルツハイマー病患者の血液サンプルを用いたmiRNA発現解析を行った。軽度認知障害と健常者に有意な差を示すmiRNAバイオマーカー候補は見つけることはできなかったが

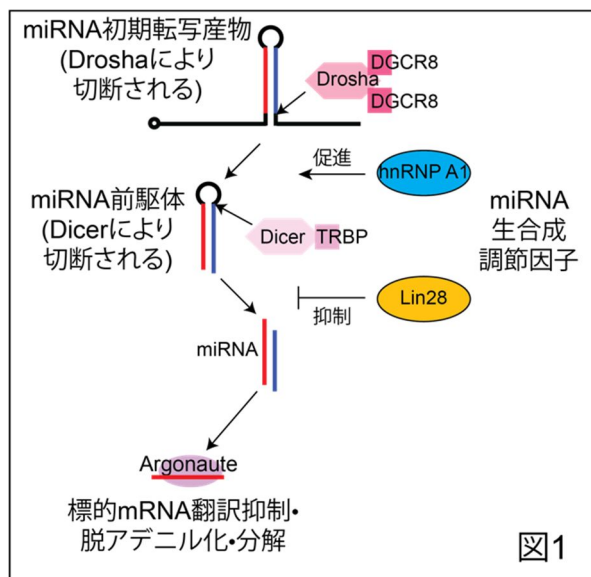


図1

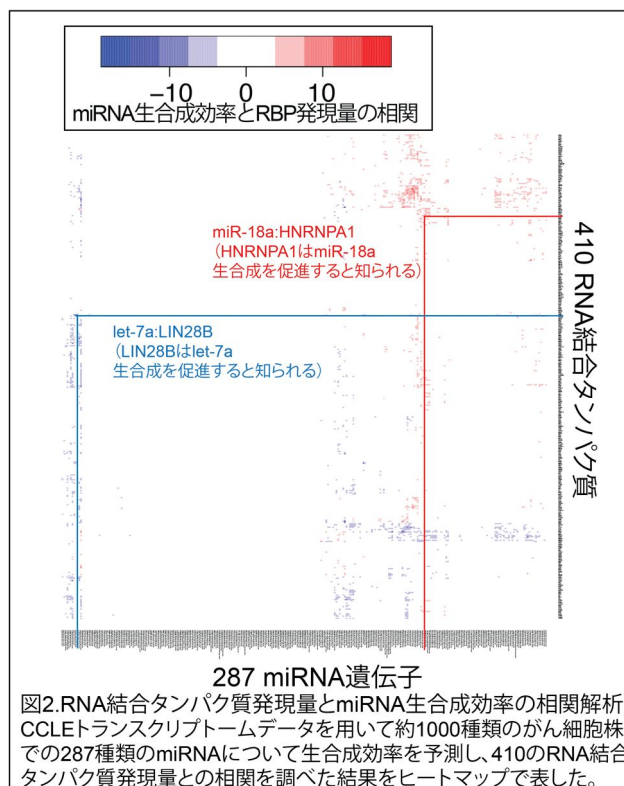


図2.RNA結合タンパク質発現量とmiRNA生合成効率の相関解析
CCLEトランスクリプトームデータを用いて約1000種類のがん細胞株での287種類のmiRNAについて生合成効率を予測し、410のRNA結合タンパク質発現量との相関を調べた結果をヒートマップで表した。

複数の miRNA の発現がアルツハイマー病患者で特有の発現異常を示すことを明らかにした (論文 1)。これら miRNA の発現異常と生合成調節機構との関わりは明らかではないが、アルツハイマー病患者における miRNA の役割を解析するきっかけとなった。

(2) miRNA の生合成効率を調節する RNA 結合タンパク質候補の生化学的解析

CLE データ解析で miRNA と RNA 結合タンパク質との間に相関が見られた候補について、生化学的手法を用いて RNA 結合タンパク質が miRNA の生合成効率制御に関わるかを検討した。候補タンパク質として複数の mRNA スプライシング因子 (SRSF 遺伝子群) および mRNA 転写産物の 3' 末端切断調節因子 (CFIm) に注目して、2 つの細胞株 (HeLa および HEK293T) を用いてノックダウン実験を行った。すると、癌遺伝子として働くことが知られる mir-17-92a クラスター内の miRNA の一部で発現の変化が見られ、これら RNA 結合タンパク質が実際に miRNA 生合成調節を行う可能性が示された。さらに一部の RNA 結合タンパク質を CFIm 構成因子が mir-17-92a の一部の断片と結合していることも明らかになり、これらの RNA 結合タンパク質が直接 mir-17-92a クラスター miRNA のプロセッシング調節を行うと示唆された (発表 1、2)。

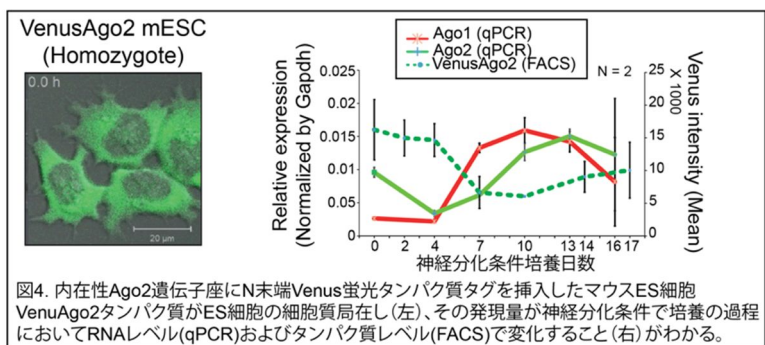
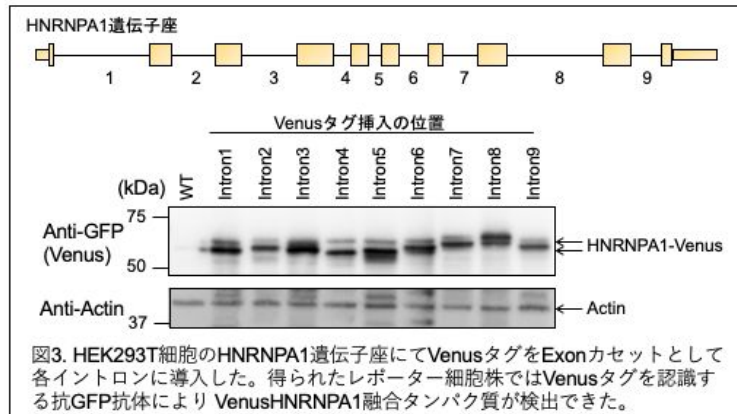
また RNA 結合タンパク質群の解析をより効率化するために、既存の CRISPR/Cas9 によるノックイン法の改良を試み、条件の至適化や実験の効率化することにより、内在性の遺伝子の様々な領域に蛍光タンパク質タグを最小限の実験工程で簡単にノックインする方法を確立した (発表 4)。蛍光タンパク質のような大きな分子をタンパク質に融合した場合、本来のタンパク質の機能が正常に保持されているかは大きな懸念材料となる。今回開発した手法

により、本来のタンパク質機能をできる限り阻害しないノックイン細胞を様々な領域に蛍光タンパク質タグが挿入されたノックイン細胞のコレクションから選抜することができる。例として HNRNPA1 遺伝子座の各イントロンに蛍光タンパク質タグを挿入した細胞株を作成し、どのイントロンへの挿入で、より本来のタンパク質機能を保持したまま蛍光タンパク質タグを付加できるか検討することができた (図 3)。このような材料を用いることで、生化学解析のみならず生細胞内での定量解析、タンパク質局在解析を行うことができる。

また既存の方法を用いて蛍光タンパク質タグを miRNA 生合成因子である AGO2 および DROSHA 遺伝子座に導入したマウス ES 細胞を作成し、細胞分化過程におけるこれらの遺伝子の発現量変化を調べた (発表 5、図 4)。これらの遺伝子が恒常的に同程度の発現量が見られるわけではなく、細胞分化過程でこれらのタンパク質の発現量が大きく変動することを見出した。

(3) AGO タンパク質や人工 PNA による Dicing 活性制御の定量的解析

AGO タンパク質が特定の miRNA 前駆体の Dicer による切断活性を促進するかを調べるために、定量的な *in vitro* 解析系を用い、種々の配列を持つ miRNA 前駆体ヘアピンの切断効率を AGO タンパク質の有無の条件で解析した。予想に反し、AGO タンパク質は種々のヘアピン分子に対し同様の Dicing 活性向上効果を持ち、異なる基質に対して同様に Dicer 複合体の基質結合能を向上させることが示唆された。基質濃度が低い場合に特に強い活性向上効果を持つことから、Dicer 複合体の基質に対する結合能を向上させていると考えられる。また同様の定量実験系を用いることで、特定の miRNA 前駆体に対する Dicing 活性を人工的に制御するための PNA (Peptide Nucleic Acid) 開発のための実験系としても使い、有効な PNA の開発にも貢献した (論文 2)。また、異なる生物由来の AGO タンパク質の配列比較解析も行い、マダニ類の AGO タンパク質が異なる複合体中で哺乳動物 AGO タンパク質とは性質の異なる小分子 RNA 生合成に関わることを示唆する結果を得た (発表 5、論文 3)。



学会発表等

発表 1 Regulation of miRNA biogenesis

【AMSI BIOINFOSUMMER 2020】

発表 2 Global prediction of regulators of miRNA processing using cancer cell line gene expression data.

【RNA society meeting 2021】

発表 3 Improvement of intronic knock-in system by using NHEJ (non-homologous end joining) for in vivo characterization of RNA-binding proteins

【RNA meeting 2021 in Tsuruoka】

発表 4 Argonaute による成熟 miRNA 産生の選択的促進の生物学的役割

【日本分子生物学会 2021】

発表 5 Novel tick RdRP-dependent small RNA pathways have roles in gene regulation

【RNA meeting 2021 in Tsuruoka】

論文発表等

論文 1 microRNA-150-5p: A Novel Blood-Based Biomarker for Alzheimer 's Dementia with Good Correlation to Cognition, Cerebrospinal Fluid Amyloid- β , and Cerebral Atrophy

【ResearchSquare, DOI: 10.21203/rs.3.rs-942370/v1】

論文 2 Incorporating 2-Thiouracil into Short Double-Stranded RNA-Binding Peptide Nucleic Acids for Enhanced Recognition of A-U Pairs and for Targeting a MicroRNA Hairpin Precursor

【Biochemistry, DOI: 10.1021/acs.biochem.9b00521】

論文 3 RNA-dependent RNA polymerases in the black-legged tick produce Argonaute-dependent small RNAs and regulate genes

【bioRxiv, DOI: 10.1101/2021.09.19.460923】

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Feng, Canran; Torimaru, Kyosuke; Lim, Mandy Yu Theng; Chak, Li-Ling; Tsuji, Kosuke; Tanaka, Tetsuya; Iida, Junko; Okamura, Katsutomo	4. 巻 -
2. 論文標題 RNA-dependent RNA polymerases in the black-legged tick produce Argonaute-dependent small RNAs and regulate genes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2021.09.19.460923	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Sook-Yoong Chia Ashwati Vipin Kok-Pin Ng Haitao Tu Ananth Bommakanti Brian Zhiyang Wang Yi Jayne Tan Fatin Zahra Zailan Adeline Su-Lyn Ng Shuo-Chian Ling3 Katsutomo Okamura Eng-King Tan Nagaendran Kandiah Li Zeng	4. 巻 -
2. 論文標題 microRNA-150-5p: A Novel Blood-Based Biomarker for Alzheimer's Dementia with Good Correlation to Cognition, Cerebrospinal Fluid Amyloid- β , and Cerebral Atrophy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Research Square	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21203/rs.3.rs-942370/v1	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Canran Feng Mandy Yu Theng Lim Li-Ling Chak Junko Iida Katsutomo Okamura
2. 発表標題 Novel tick RdRP-dependent small RNA pathways have roles in gene regulation
3. 学会等名 RNA meeting 2021 in Tsuruoka
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuma Hanai Yae Toda Katsutomo Okamura
2. 発表標題 Improvement of intronic knock-in system by using NHEJ (non-homologous end joining) for in vivo characterization of RNA-binding proteins
3. 学会等名 RNA meeting 2021 in Tsuruoka
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryosuke Hirota Junko Iida Katsutomo Okamura
2. 発表標題 Global prediction of regulators of miRNA processing using cancer cell line gene expression data.
3. 学会等名 RNA society meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yun Sungsik, Lee Li Ming, 島本 廉, Wan Yun Ho, Shuo-Chien Ling, Eugene V. Makeyev, 岡村 勝友
2. 発表標題 Argonauteによる成熟miRNA産生の選択的促進の生物学的役割
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡村 勝友
2. 発表標題 miRNA生合成の制御
3. 学会等名 東名産学官・医連携研究会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
シンガポール	Temasek Life Sciences Laboratory	National University of Singapore	National Neuroscience Institute	
英国	King's College London			