

平成21年6月22日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19710171

研究課題名（和文） miRNA 標的遺伝子スクリーニング系の開発

研究課題名（英文） Functional system development towards screening of miRNA targets

研究代表者 加藤 義雄（YOSHIO KATO）

独立行政法人産業技術総合研究所・セルエンジニアリング研究部門・研究員

研究者番号：20415657

研究成果の概要：

蛍光タンパク質遺伝子の非翻訳領域に、miRNA と完全に相補的な配列を挿入したウイルスベクターを構築し、miRNA の発現を生きた細胞内で検出する方法を構築した。筋肉特異的に発現する miR-133 について、幹細胞から筋管細胞へと分化する際に発現上昇する miR-133 の様子を生きた細胞内でレシオイメージングすることにより定量的に捉えることに成功した。本系は miRNA の標的配列探索にも展開することが可能である。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：応用ゲノム科学・機能ゲノミクス

キーワード：マイクロ RNA、標的遺伝子同定、遺伝子発現イメージング

1. 研究開始当初の背景

2004年にヒトゲノムの概要が発表され、タンパク質をコードする遺伝子の数は従来予想よりも遥かに少ない2万2千個程度である事がわかった。ノンコーディング RNA と呼ばれる、タンパク質をコードしない RNA がゲノムの約70%の領域から転写され、さらにこの RNA が遺伝子発現の制御に深く関与していることが報告されており、タンパク質の機能を中心とした従来分子生物学に加えて RNA 分子が直接的に関与する生命現象がポストゲノム研究の本命として掲げられ

ている (*Science* (2005) 309, 1559)。

ノンコーディング RNA として最も注目されているのが、マイクロ RNA (miRNA) である。miRNA は22塩基程度の小さな RNA であり、配列依存的に標的 mRNA の翻訳を抑制することで遺伝子発現を抑制している (*Cell* (2004) 116, 281)。ヒトには約500種類の miRNA が見出されており、これまでの解析から miRNA が生体の発生段階で時期・組織特異的に発現し、細胞の運命を左右することが分かってきている。しかし種々の miRNA がどの遺伝子の発現するのかは明ら

かになっておらず、また、明らかにするための方法論も確立されていない。

申請者はこれまでの研究で新規 miRNA を見出し報告してきた (*FEBS lett.*, (2005) 580, 1553)。アデノウイルスのノンコーディング領域を研究している中で、この領域から miRNA が発現している事を確認し、miRNA のパスウェイで遺伝子発現調節を行っていることを突き止めた。これは、ウイルスのノンコーディング RNA 領域から発見された最初の miRNA であり、申請者によるこの業績は多くの Review 誌に紹介されている (*Nat. Rev. Microbiol.* (2006) 4, 651; など 24 報)。

アデノウイルスに存在するノンコーディング RNA (VA RNA) は、ウイルス感染時において大量に存在し (通常の mRNA の 100~10000 倍程度) ウイルスの複製に必須な因子である。この VA RNA を前駆体として、20~25 塩基の RNA が切り出されている。この短い RNA の遺伝子発現抑制機能を解析すると、RNAi 機構を担う RISC 複合体と相互作用して遺伝子の発現を抑制する機能を持つ miRNA として働いている事が明らかとなった。さらに、アデノウイルスのノンコーディング RNA が、宿主細胞に備わっているウイルス防御機構を破壊する機能を担っている可能性を示唆する結果を得た。

miRNA は一般的に、部分的に相補的な mRNA と相互作用し、その標的 mRNA の発現を抑制する役割を担っている。数百種類存在する miRNA にはそれぞれ固有の標的 RNA があり (単一遺伝子とは限らない)、個々の miRNA の発現パターンによって、異なる遺伝子の発現を制御すると考えられている。そこで、各 miRNA の標的遺伝子を探索するために、コンピューター予測プログラムを用いて、部分的に相補的な配列を予測する方法が報告されている (*Genome Biology* (2003) 5, R1)。

申請者もこの手法を用いて、ウイルス由来 miRNA の標的遺伝子の探索を行い、数十遺伝子の標的候補配列をリストアップした。予測に用いたのは、米国のグループが開発した miRanda というプログラムである (<http://www.microrna.org/miranda.html>)。リストアップされた標的配列が、実際にウイルス miRNA によって遺伝子発現抑制されるかどうかを実験的に検証したが、コンピューター上で候補に挙げた 30 遺伝子について、遺伝子発現抑制が見られたのはわずか 1 遺伝子だけであった。

別のアプローチから miRNA の標的配列を探索する手法も報告されている。一部の miRNA が標的 mRNA 自体を破壊する場合において、マイクロアレイを用いて miRNA 導入後に変化する遺伝子発現の定量解析を行い、その結果から標的 mRNA を予測する

方法が報告されている (*Nature* (2004) 433, 769)。しかし、この方法では miRNA が別の上流遺伝子を標的としている可能性を否定しきれない。さらに別の方法論として、標的配列と塩基対形成する事を利用し、miRNA に相補的な配列を RT-PCR で増幅する手法がある (*Cell* (2003) 112, 317)。申請者もこの手法を用いてウイルス miRNA の標的遺伝子の同定を試みたが、残念ながら標的候補遺伝子の中で実際に発現抑制が見られる配列は確認できなかった。

これら既存の標的遺伝子探索法の問題点をまとめてみると以下の様になる。

(1) バイオインフォマティクスで標的配列を予測する際に、miRNA 標的配列の基準を研究者独自に設けているが、その基準に用いられるほどの十分な実験データが蓄積されていない。そのため、リストアップされる配列が膨大すぎて絞り込めなくなったり、本物の標的配列が得られなかったりする。

(2) PCR のプライマーとして miRNA 相補的な配列を用いると、類似した配列は得られるだろう。しかし、それが miRNA 複合体によって認識される保証は全くない。

つまり、これらの手法には不確定要素が多く、予測の後に miRNA の真の標的遺伝子であるかどうかを研究者が実験的に検証しなければならない。それは、これらの手法に「miRNA の機能で探索する」という本質的な原理が欠けていることに起因している。

申請者の研究だけではなく他の miRNA 研究の報告例を見ても、各 miRNA の標的遺伝子の同定には、実験的に苦勞している部分が見受けられる。miRNA の標的遺伝子探索では、予測した標的を一つずつ検証しているため、時間と労力がかかっているのが現状である。そこで、「miRNA の機能で探索する」新たな方法論が提供されれば、miRNA の生理的な側面から研究が飛躍的に進むものと考えられる。

2. 研究の目的

miRNA の機能をもとに標的遺伝子配列を探索するためには、miRNA の機能を簡便かつ定量的に評価する必要がある。miRNA の発現を生きた細胞内で観測することができれば、その細胞がまさに miRNA を発現しつつあるという状況を捉えることができる。しかし、miRNA を直接的に定量するためには、現状 RNA を抽出せざるを得ない。一方で、miRNA を間接的に検出する方法として、miRNA による遺伝子発現抑制効果を利用する方法が報告されている。miRNA に完全に相補的な配列をレポーター遺伝子の下流に組み込むと、そのレポーター遺伝子の発現が抑制されることが知られており、これまでの報告例では、ルシフェラーゼや β -ガラクトシ

ーダーゼといったレポーター遺伝子を用いて miRNA の活性が評価されてきた。しかしながら、細胞を溶解または固定化させなければならず、ヘテロな細胞集団の中で miRNA を発現する細胞を特定することは困難であった。

そこで私は、レポーター遺伝子として緑色蛍光タンパク質 (GFP) と赤色蛍光タンパク質 (RFP) を採用し、生きた細胞内で miRNA の活性を測定することを試みた。従来、1 色の蛍光タンパク質を用いた評価系が報告されているものの、1 色の蛍光だけでは目的の蛍光強度の減少なのか、細胞活動の低下による蛍光の減少なのか、あるいは蛍光タンパク質遺伝子導入の効率が悪かったのか判別できないという問題点があった。2 色の蛍光タンパク質を同一発現ベクターに搭載することにより細胞ごとに内部標準化し、miRNA の活性を定量化することが可能となる。

本研究の最初の目標として、2 色の蛍光タンパク質を搭載したベクターを構築することにより、生きた細胞内で定量的に miRNA の発現を捉えることができるかについて検討することとし、いくつかの miRNA を例として実験を行なうこととした。

3. 研究の方法

今回、私が着目した miRNA は、骨格筋に特異的に発現する miR-133 である。マウス間葉系幹細胞の一種である C2C12 細胞株を用いて、血清低減による筋肉への分化を誘導すると、4-7 日後に miR-133 の発現が上昇する。このとき、miR-133 の発現をノーザンブロット法によって確認したが、筋肉への分化誘導による miR-133 の上昇なのか、血清低減による上昇なのか区別することができなかった。これは、細胞を擦り潰してから miRNA を解析することによって、ヘテロであるべき細胞集団を均一化してしまったことに起因している。したがって、生きた細胞内での miRNA の挙動を観測できる手法が必須となる。

蛍光タンパク質を搭載したベクターを構築するにあたり、発現ベクターが様々な細胞に導入できるよう、レトロウイルスベクターを骨格として 2 色の蛍光タンパク質を独立のプロモーターで発現させる系を組み立てた。今回用いたレトロウイルスベクターは、M-MLV 由来 pMX を基にしたもので、5'LTR とパッケージングシグナルの下流に GFP をコードする遺伝子を導入した。また、レトロウイルス感染後の選択を容易にするため、この GFP にはブラストサイジン耐性遺伝子を C 末端側に融合させた融合タンパク質として発現することにした。この GFP-ブラストサ

イジン耐性遺伝子のストップコドンの下流に、miRNA と相補的な配列を挿入することにより、miRNA の発現時に GFP の蛍光が減少することが期待される。

また、さらに下流には CMV プロモーターと RFP を挿入し、GFP とは独立した発現カセットとして機能する。さらに下流には活性型の 3'LTR を組み込むことにより、GFP と RFP の発現が独立でなおかつ、同一のプロウイルスとして機能する様に構築した。通常、プロウイルスの組み込まれたゲノム DNA の場所はランダムであり、その場所に依存して蛍光タンパク質の発現に変動が生じるが、このような変動は同一ベクターに搭載された RFP によって補正される。GFP と蛍光がオーバーラップしないよう、RFP について様々な系を検討した結果、蛍光波長が長く輝度が高い mCherry (Tsien 博士より提供) を用いることとした。

4. 研究成果

今回、GFP 遺伝子の下流に miR-133 に完全相補的な標的配列を挿入したレトロウイルスベクター (pMXCRGb[133]) を構築した。PlatE パッケージング細胞に pMXCRGb[133] を TransIt-293 を用いてトランスフェクション後、48 時間後の培養上清をポリブレンとともに、マウス C2C12 細胞へ感染させた。感染から 48 時間後、ブラストサイジンによる薬剤選択を行ない、GFP および RFP がともに発現している細胞株を得た。

C2C12 細胞はマウス間葉系幹細胞の一種であり筋肉、骨、脂肪細胞へと分化する能力がある。筋肉への分化には、サブコンフルエント状態の細胞を 2% ウマ血清で培養することにより 3-4 日で形態的な変化が生じてくる。さらに 3-4 日の培養により個々の細胞が融合を始め、細長い筋管細胞を形成するようになる。

GFP の下流に挿入された標的配列が、分化誘導後の miR-133 の発現上昇に伴って発現阻害を受けると、GFP の発現が抑制された。筋肉への分化誘導に伴って、細胞が融合して筋管を形成するが、GFP の発現は、この筋管において著しく減少していた。これは、筋管形成に伴って発現した miR-133 が、GFP 下流の標的配列と相互作用して発現を抑制していることを示しており、血清低減に影響ではないことが明らかとなった。

さらに面白いことに、miR-133 は筋管形成する細胞融合の前に、発現していることが明らかとなった。従来の解析から、筋肉への分化誘導が miR-133 の発現を上昇させることが示唆されていたが、筋管形成との前後関係は明らかになっていなかった。今回開発し

た系を用い、1細胞ごとに生きたまま miRNA を解析することによって初めて、筋肉分化誘導との関係性が明らかとなった。これらの実験から、miRNA に完全相補的な配列を使用することによって細胞レベルでの miRNA 発現パターンを定量的に可視化できること、及び、蛍光を指標として miRNA 標的配列を検出する事が可能であることを示す事ができた (Kato et al., Int. J. Biochem. Cell Biol., in press)。

本研究成果は「miRNA の機能で探索する」標的遺伝子のスクリーニング系へと展開することが可能である。miRNA は発生や分化だけではなくガンや糖尿病、肝炎などの疾病にも深く関連しており、miRNA の標的配列を実験的に見つける手法が提供されれば、この分野の研究が加速度的に進行し、それらの成果が医療や産業の場に反映されると期待される。

5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- 1) Shigeru Miyaki, Tomoyuki Nakasa, Shuhei Otsuki, Shawn P. Grogan, Reiji Higashiyama, Atsushi Inoue, Yoshio Kato, Tempei Sato, Martin K. Lotz, Hiroshi Asahara (2009) MicroRNA-140 is expressed in differentiated human articular chondrocytes and modulates IL-1 responses. *Arth. Rheum.*, in press. 査読有
- 2) Yoshio Kato, Shigeru Miyaki, Shigetoshi Yokoyama, Shin Omori, Atsushi Inoue, Machiko Horiuchi and Hiroshi Asahara (2009) Real-time functional imaging for monitoring miR-133 during myogenic differentiation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, in press. 査読有
- 3) Kittiphong Paiboonskuwong, Yoshio Kato (2008) Detection of active microRNA species using fluorescent DNA probe. *Miami Winter Symp. Short Rep.*, **19**, T22. 査読無
- 4) Yoshio Kato (2008) An efficient fluorescent mehod for selective detection of mature miRNA spiecies. *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.*, **52**, 71-72. 査読無
- 5) 加藤義雄 (2007) HEKfectin トランスフェクション試薬を用いた HEK 細胞への遺伝子導入, *BioRadiations*, **8**, 40-41. 査読無

[学会発表] (計 5 件)

- 1) 井上敦、味八木茂、○加藤義雄 “継続的・定量的に miRNA 発現を観測するための蛍光レポーターベクターの開発” 第4回ケミカルバイオロジー学会年会、神戸、2009.5.18
- 2) ○Yoshio Kato “An efficient fluorescent mehod for selective detection of mature miRNA spiecies” Joint Symposium of 18th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids (IRTXVIII) and 35th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (SNAC), Kyoto, Japan, 2008.09.10
- 3) Kittiphong Paiboonskuwong, ○Yoshio Kato (2008) “Detection of active microRNA species using fluorescent DNA probe” Miami Winter Symposium, Florida, USA, 2008.02.02
- 4) ○井上敦、味八木茂、大森慎、浅原弘嗣、加藤義雄 “新規レポーターシステムによる microRNA の標的遺伝子同定” 遺伝情報 DECODE 会議、箱根、2007.6.24
- 5) ○加藤義雄 “細胞内における低分子 RNA の可視化に向けた蛍光 DNA プロブの配列設計” 第2回ケミカルバイオロジー研究会、京都、2007.5.10

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 義雄 (YOSHIO KATO)

産業技術総合研究所・セルエンジニアリング研究部門・研究員

研究者番号：20415657