

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22651077

研究課題名（和文） 遺伝子発現をオンにするプロモータ領域付随リボ核酸

研究課題名（英文） Gene activating RNAs based on naturally occurring promoter associated RNAs

研究代表者

フォレスト アリスター (FORREST ALISTAIR)

独立行政法人理化学研究所・ゲノムプロファイル技術開発ユニット・ユニットリーダー

研究者番号：40569084

研究成果の概要（和文）：本研究は「挑戦的萌芽研究」の助成金で実施。目的は各遺伝子のプロモータ領域を標的とする合成短鎖 RNA 分子を用い、遺伝子上方制御を誘導する設計ルールを発見することでした。上流アンチセンス転写物を標的とする合成 RNA を設計し、2つの細胞株で合計25個の遺伝子をテストしたところ、EGR2、NANOG、SPI1、MAFB に対する潜在的な低分子活性化 RNA を特定しましたが、効果は小さく、一方の細胞型でしか作用しませんでした。残念ながら本実験は発表には至りませんでした。

研究成果の概要（英文）：The research project was funded by a ‘challenging exploratory’ research grant. The project aimed to search for design rules for inducing gene up-regulation by synthetic short RNA molecules that target the promoter region of each gene. Synthetic RNAs were designed to target upstream antisense transcripts. In total 25 genes were tested in 2 cell lines. Four potential short activating RNAs were identified for EGR2, NANOG, SPI1, MAFB, however the effect was small and did not work in both cell types. Unfortunately the experiments did not result in any publications.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 2,200,000 | 0       | 2,200,000 |
| 2011年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,200,000 | 300,000 | 3,500,000 |

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・システムゲノム科学

キーワード：リボ核酸、遺伝子発現を、プロモータ

## 1. 研究開始当初の背景

マイクロ RNA と低分子干渉 RNA (siRNA) による RNA を介した発現抑制の発見のおかげで、遺伝子機能研究は飛躍的に進歩しました。現在では、いかなる遺伝子もその転写物に対する dsRNA オリゴヌクレオチドを設計すること

でノックダウンできるようになり、例えば私たちは siRNA を使って 52 個のミエロイド転写因子を組織的に抑制させ、遺伝子ネットワークに及ぼす影響をモニターしました (Suzuki 2009 Nat. Gen. 41:553-62)。さらにこの方法を拡大し、既知の遺伝子すべてに

対する siRNA ライブラリをゲノムワイドな機能喪失型スクリーニングに利用できるようになりました。しかしながら、機能獲得型スクリーニング（過剰発現系）は、転写物ごとに完全長 cDNA 配列を作成し、適切な発現ベクターにサブクローンする必要があるため、困難かつ多大な労力を要します。転写物の長さはさまざまなので、それぞれの cDNA ごとにウイルス力価と発現レベルは大幅に異なります。また、完全長 cDNA が入手できない遺伝子も多数存在します。こうした障害を考慮し、当該プロジェクトでは、天然起源のプロモーター関連 RNA 種をもとに遺伝子を活性化させる RNA を設計するための設計ルールの発見を目指していました。いわゆる低分子活性化 RNA (saRNA) とは短鎖の合成 RNA で、標的遺伝子の発現を誘導するプロモーター領域に合わせて設計されています。プログステロン受容体 (Janowski et al. Nat. Chem. Biol. 2007)、VEGF (Turunen et al. Circ. Res. 2009)、p21 および E-cadherin (Li et al. PNAS 2006) 用の saRNA は既に報告されています。これら 4 つの遺伝子すべてについて、多数の RNA が試されましたが、発現を誘導したのは一部のみで、遺伝子を抑制したものもありました。したがって saRNA を機能させるには、saRNA を正確に配置する必要があります。先日私たちは、プロモーターと関連する新しいクラスの短鎖 RNA 種、転写開始 RNA (tiRNA - Taft et al. Nat. Gen. 2009) を発表しました。これらの短鎖 RNA は 18 塩基が最も多く、転写開始点 (TSS) のすぐ下流に位置しています。tiRNA に加え、過去数カ月間で、ほかに 3 つ短鎖のプロモーター関連 RNA 種が特定されました (PASRs, PROMPTS, TSSa-RNAs - Kapranov Science 2007;316,1484-88; Preker Science 2008;322,1851-54; Seila 2008;322,1849-51)。私はこれらの RNA について、天然起源の saRNA である可能性を組織的にテストする計画でした。

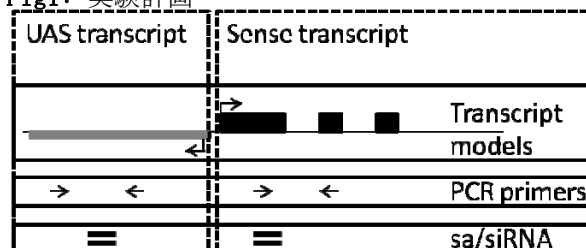
## 2. 研究の目的

目的は、こうした天然起源の RNA をモデルとして作った一本鎖および二本鎖の合成 RNA が遺伝子発現を誘導または抑制するか、また、この情報を用いて、広く適用可能な活性化 RNA 設計のための一連の設計ルールを作れるかを試すことでした。

## 3. 研究の方法

(1) 上流のアンチセンス (UAS) 転写物およびセンス転写物に対する二本鎖の saRNA と siRNA、qRTPCR でレベルをモニターするためのプライマーを設計。

Fig1: 実験計画



下記の A と B に対して、saRNA/siRNA、UAS/センス合成二本鎖および qRTPCR プライマーを設計：

A: saRNA によって活性化されることが既に報告されている、ポジティブコントロールの VEGFA、CDH1、PGR および CDKN1A

B: 追加の標的細胞 21 個

合成二本鎖はステルス siRNA としてインビトロジェンに注文。UAS シグナルやセンス転写物の既知のエクソンに対応するゲノム配列を使って設計されました。

(2) 25 個の標的遺伝子をさまざまなレベルで発現する 3 つの細胞株一式について、qRTPCR でプライマーをテストしました。プライマーはインビトロジェンに注文。逆転写は PrimeScript 第 1 鎖 cDNA 合成用キット、リアルタイム PCR は SYBR Premix Ex TaqII (Perfect Real Time キット) を使って行いました。

(3) saRNA および siRNA トランスフェクションが THP-1 および TC-Y1K 細胞内のセンス転写物および UAS 転写物のレベルに及ぼす影響をテスト。THP-1 細胞には amaxa の nucleofection テクノロジー、TC-Y1K 細胞には lipofectamine 2000 (インビトロジェン) を使ってトランスフェクトを行いました。RNA は 48 時間後に QIAGEN miRNeasy column を使って収集しました。

## 4. 研究成果

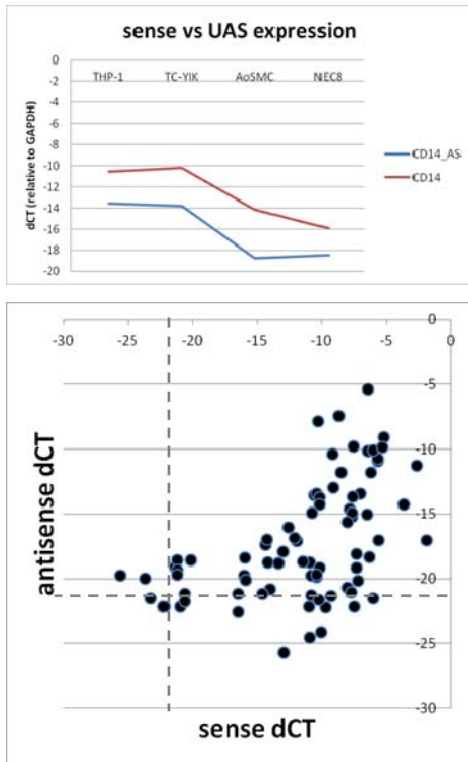
### (1) qRTPCR によるアンチセンス転写物の確認

①プライマーは 25 個の標的細胞および予測された上流アンチセンス転写物用に設計し、細胞株 3 個において増幅を確認しました。

②テストした 25 個の遺伝子中 24 個で UAS 転写物が検出されました。これらはいずれもセンス転写物よりも低レベルで検出され、センス転写物の検出量と相関関係がありました (例 Fig. 2 参照)。

Fig2: A) 4 個の細胞株における CD14 と CD14\_UAS の発現。B) 上記 4 個の細胞株における 24 個の遺伝子すべてのセンス/アンチ

センス発現の相関関係。センスのほうが発現レベルが高く、全体的に相関関係があることを示しています。



### (2) 設計した saRNA が UAS 転写レベルに及ぼす影響

①9 個の saRNA は UAS 発現を 30%以上、**減少**させました (RB1, MYC, PAX4, p53, CD14, INS, Mir9-1 宿主遺伝子の UAS)。これはより影響の大きかったコントロールである SPI1 と PAX4 の siRNA と対照的です (SPI1 と PAX4 に対するノックダウン効率は 83%と 84%)。

②13 個の saRNA は UAS 発現を 30%以上、**誘導**しました (SPI1, MYB, VEGFA, WT1, HES1, SOX2, EGR2, PAX4, SOX2, NANOG の UAS)。

### (3) 推定上の saRNA がセンス転写レベルに与える影響

①5 個の saRNA はセンス転写物発現を 30%以上、**減少**させました (CD14, EGR1, INS, MYB, PAX4)。

②4 個の saRNA はセンス転写物発現を細胞型特異的に 30%以上、**誘導**しました (EGR2\_AS1, MAFB\_AS, SPI1\_AS2, NANOG\_AS1)。

Table1: TC-YIK および THP-1 細胞における saRNA の影響

| oligoID   | THP-1 |       | TC-YIK |       |
|-----------|-------|-------|--------|-------|
|           | UAS   | sense | UAS    | sense |
| NANOG_AS1 | -     | 1.3   | 12.16  | 1.01  |
| SPI1_AS2  | 0.98  | 1.06  | 1.03   | 1.33  |
| MAFB_AS   | 1.06  | 1.15  | 1.05   | 1.4   |
| EGR2_AS1  | 0.92  | 1.14  | 2.27   | 1.9   |

### (4) 追加的成果

UAS レベルに対する siRNA の影響—遺伝子座の全般的抑制を示唆

①MYC, PAX4, SPI1 転写物に対するコントロールの siRNA は UAS 転写物の発現も**減少**させました。

Table2: センスに対する siRNA は UAS レベルも低下させる

| siRNA | sense | UAS  | cell type |
|-------|-------|------|-----------|
| MYC   | 0.31  | 0.3  | TC-YIK    |
| PAX4  | 0.17  | 0.4  | TC-YIK    |
| SPI1  | 0.16  | 0.24 | THP-1     |

### 結論:

テストした遺伝子の過半数は UAS (上流アンチセンス) 転写物を発現し、センス転写物発現と相関関係がありました。これら UAS 転写物 25 個の組織的 siRNA ノックダウンは、UAS およびセンス転写物のレベルにほとんど影響しませんでした。センス転写物の発現をわずかに増加させる 4 個の潜在的 saRNA (NANOG, SPI1, MAFB, EGR2, Table1 参照) を特定しましたが、このわずかな誘導は細胞型に特異的で、THP-1 と TC-YIK 細胞に試したところ、異なる結果が得られました。このことから、UAS のノックダウンに伴うセンス転写物の誘導は、各細胞型内に存在する因子のネットワークに左右されると考えられます。

興味深いことに、MYC, PAX4 および SPI1 に対するコントロールの siRNA を含めた場合、siRNA はセンス転写物と上流アンチセンス転写物両方の発現を減少させました。これは、全領域が発現抑制されることを示唆しています。

残念ながら、これらの研究結果は論文を発表できるほど強力なものではありません (センス転写レベルを増加させた合成 RNA は 4 個しか特定されず、そのうち 2 倍近く増加させたのは EGR2\_AS1 だけでした)。そのため、この挑戦的萌芽研究の助成金から論文発表に

は至りませんでした。いずれ当該研究成果を補助的データセットとして利用したいと思いますが、目下、本研究を継続する予定はありません。

#### 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 件)

なし

〔学会発表〕(計 件)

なし

〔図書〕(計 件)

なし

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

フォレスト アリスター (FORREST ARISTAIR)  
独立行政法人理化学研究所・ゲノムプロファイ  
ル技術開発ユニット・ユニットリーダー  
研究者番号：40569084

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし