

## 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：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22710189

研究課題名（和文） マイクロRNAプロモータの網羅的プロファイリング

研究課題名（英文） Comprehensive analysis of miRNA promoters

研究代表者

川路 英哉 (KAWAJI HIDEYA)

独立行政法人理化学研究所・小分子RNA連携ユニット・ユニットリーダー

研究者番号：20525406

研究成果の概要（和文）：

マイクロRNAの生合成経路をノックダウンしその核内RNAを次世代シーケンサによりプロファイリングするアプローチを試みた。一分子シーケンサを用いることで定量的な転写開始点プロファイリングを行うHeliScopeCAGEを用い60のmiRNAに関するプロモータ24個を同定し、長鎖RNAを断片的にシーケンスすることでその全長の再構築を目指すRNA-Seqを用いることで、24のうちの半数以上にに関するprimary miRNAを同定した。

研究成果の概要（英文）：

We performed siRNA knockdown experiments against factors contributing the miRNA biogenesis, and profiled nuclear RNA with high-throughput sequencing technologies. With HeliScopeCAGE that profile TSS activities quantitatively, we identified 24 promoters on sixty miRNAs. With RNA-seq, we identified more than half of the 24 miRNA promoters.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：

miRNA, primary transcript, promoter, transcriptome, transcriptional regulation, small RNA, next generation sequencer

## 1. 研究開始当初の背景

近年タンパク質をコードせずに機能を担うRNA(ノンコーディングRNA)が注目を集

めており、その代表的な一つであるマイクロRNA(miRNA)は遺伝子発現に関与する短鎖RNAである。miRNAは発生をはじめとする様々な場面で遺伝子調節における重要な役割を担っており、その制御対象となる遺伝子についてはこれまでに数多くの研究がなされてきた。しかしmiRNA自身の制御、特に転写制御についてはこれまで限られた研究しか行われてこなかった。

短鎖RNAであるmiRNAはまずゲノムから長鎖RNA(primary miRNA)として転写され、Drosha/Dgcr8(核内)、Dicer(細胞質)による、プロセッシングを経た後に成熟miRNAとなりAGOタンパク質と結合することでターゲットとなるメッセンジャーRNA(mRNA)からのタンパク質合成を抑制する。miRNAのターゲット遺伝子を同定することと同様、miRNA自身の制御がどのように行われているかを理解することは、細胞内の分子機構を理解するためには必須である。ヒトゲノムにコードされているmiRNAのうち約半数がmRNAのイントロンに存在すると言われており、そのprimary miRNAはmRNAの前駆体と同じものであると考えられてきた。しかし近年、様々な例外が見つかってきており、miRNAは複雑に制御されていることが理解され始めていた。

## 2. 研究の目的

ゲノムワイドにmiRNAの転写開始点を同定するアプローチとしてはこれまでゲノム配列の特徴から計算機的手法(マシーナーニング)を用いて予測するアプローチ(Wang, et al., PLoS ONE 5, e13798)、ゲノム上のエピジェネティック情報を利用するアプローチ(Ozsolak et al., Gene & Dev. 2008 22:3172-83)、などがこれまでにとられてきた。前者のアプローチは計算機的予測であることから予測の域を出ず、直接的な証明が必要である。また後者のアプローチでは実験データを加味してはいるが、その根拠がエピジェネティック情報であることからやはり直接的なエビデンスとなるとは考え辛い。primary miRNAを直接測定するのがもっとも直接的なアプローチであるが、これには少なくとも二つの困難がある。一つはprimary miRNAの不安定性である。Primary miRNAは細胞核内における転写と同時にDrosha/Dgcr8によって切断されるため、細胞核内にしか存在せず、さらにその存在期間がきわめて短い。もう一つはゲノムワイドな転写開始点の定量的プロファイリングである。これについては近年、一分子次世代シーケンサを用いた手法(HeliScopeCAGE, Kanamori-Katayama et al., Genome Res

21:1150-1159)を用いることで解決できると考えた。

そこで本研究では、miRNAのプロモータの網羅的なプロファイリングを目指した。特に、ゲノム配列やエピジェネティクスのような間接情報でなく、primary RNAをプロファイリングすることで直接的にmiRNAプロモータへアプローチした。

## 3. 研究の方法

上記で述べたように、primary miRNAは非常に不安定かつ細胞の中でも局所的にしか存在しない。これをプロファイリングするために、我々はmiRNAの生合成に関与するタンパク質のsiRNAノックダウンを用い、その生合成経路の効率を実験的に遅くすることを試みた。Primary miRNAをまず最初にプロセスするタンパク質はDrosha/Dgcr8であることから、これらをノックダウンすることでprimary miRNAがプロセスされずに蓄積されると考えられる。そのため、ノックダウン前の細胞とノックダウン後の細胞を比較することでprimary miRNAの同定ができると考えられた。

しかしながら、Drosha/Dgcr8をノックダウンした場合、miRNAの生合成経路の効率が落ちることから、産生されるmiRNAの量が減り、これによってmiRNAのターゲットであるmRNAの量が増加すると予想される。つまりこの二者の比較ではprimary miRNAとmiRNAターゲットの区別を行うことが難しい。そこで本研究では、Drosha/Dgcr8に加え、Dicerについてのノックダウンも行い、これとの比較を行った。Dicerの活性が減少した細胞ではやはりmiRNAの量が減少すると考えられることから、これとの比較を行うことでprimary miRNAを同定できると計画した。

これら細胞において、細胞核内、細胞質由来のRNAを生化学的に分離し抽出した。これによりPrimary miRNAがより蓄積されているRNAを選択することができる。また、RNAのプロファイル手法としてはHeliScopeCAGEを用いた。通常の次世代シーケンサによるRNA解析では解析感度の限界からその分析行程の中にPCRがかならず含まれてしまう。しかし高感度な一分子シーケンサであるHeliScopeを用い、分析行程にPCRを含まないHeliScopeCAGEを用いることでRNAの5'端をゲノムワイドに定量することが可能である。この技術を用いて、上記ノックダウン細胞の比較を行うことが、研究開始当時最適の手法と考えられた。

HeliScopeCAGE は転写開始点だけを網羅的にプロファイルする技術であり、そのRNAの内部構造に関する情報は得られない。そこで、同定された転写開始点に関する primary miRNA の内部構造を得るために RNA-seq を用いた。これより、上記で同定された転写開始点に関する補完的な情報が得られることが期待できた。

#### 4. 研究成果

解析対象としてヒト細胞株である HeLa 細胞を用い、miRNA の生合成に関与するタンパク質(Dicer, Drosha, DGCR8)の siRNA によるノックダウンとその対照実験を 3 度繰り返し、各々(12 条件)から核内 RNA の抽出を行った。各々の RNA においては、ノックダウン効率や、核内/核外 RNA の分離が適切に行われていることを確認した。また、核内 RNA を抽出する際に得られた細胞質 RNA を用いて、small RNA-seq によるシーケンスを行った。これにより、データベース(miRbase v18)に登録されている約 2,000 の miRNA のうち、620 個が HeLa 細胞で発現していることがわかった。

HeliScopeCAGE 法を用いたライブラリ作成と、シーケンスを、上記で準備した核内 RNA に対して行った。データの解析を行った結果、Drosha, Dgcr8 をノックダウンした際にいずれも発現が有意に上昇しているプロモータ領域を約 1,200 個同定した。そのうちの 24 個が miRNA の上流 20kbp 以内に存在し、これらは HeLa 細胞で産生されている 60 の miRNA に対応していた。miRNA のホスト遺伝子とプロモータが一致する場合もあったが、ここで同定されたものの多くは一致しないものであった。Drosha と Dgcr8 のノックダウンにより得られた RNA に対して、RNA-seq を行い RNA 構造のアセンブリを行ったところ、上記 24 のうちの半数以上について、primary transcript と思われる構造を得ることができた。

miRNA の上流 100kbp 以内のプロモータとして範囲を広げ探索した場合には、107 の miRNA に対応する 57 のプロモータを同定することができた。以上より、発現している miRNA の約 1/6 について、そのプロモータらしい領域を同定することができたといえる

本研究でプロモータが同定できなかったものが存在する理由として、少なくとも二つの可能性が考えられる。近年、その生合成に Drosha/Dgcr8 を必要としない mirtron のようなものも発見されており、このような場合、本研究のアプローチで同定できることは期

待できない。もう一つの理由としては、検出限界の問題であり、これについては実験の拡大(レプリケートの数を増やす、シーケンス数をより増やすなど)をすることで感度を上げられると期待できる。これによって、Drosha/Dgcr8 を必要とする miRNA と必要としないものの区別まで踏み込むことができる可能性があるが、本研究での予算ではそこまで実験を拡大することは不可能であった。計画していた研究については、上記のように完遂した。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

①川路英哉, 網羅的なRNAの同定、定量、ネットワーク解析における計算機解析, 第14回情報論的学習理論ワークショップ (IBIS2011) (2011年11月10日) 奈良県奈良市

②川路英哉, Alternative structures of primary microRNAs revealed with high-throughput sequencing, 中央大学理工学部物理学科 セミナー (2011年9月7日) 東京都文京区

③Kawaji H., Alternative structures of primary microRNAs revealed with high-throughput sequencing, RNA2011 (2011年6月14日-17日) 京都府京都市

④川路英哉, Alternative structures of primary miRNAs, NGS現場の会 (2011年5月29日) 静岡県熱海市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：

出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川路 英哉 (KAWAJI HIDEYA)  
独立行政法人理化学研究所・小分子 RNA 連携  
ユニット・ユニットリーダー  
研究者番号：20525406