

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23710270

研究課題名(和文)非内在性マイクロRNAの創成と遺伝子発現制御

研究課題名(英文)Gene regulation by using an ligand-responsive miRNA pathway

研究代表者

村田 亜沙子(MURATA, Asako)

大阪大学・産業科学研究所・助教

研究者番号：50557121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、「非内在性マイクロRNA(miRNA)による標的遺伝子の発現制御」を目指した、pre-miRNA配列に低分子化合物の結合サイトとなる部分構造を人為的に作り出し、リガンド応答性のmiRNA経路の構築を行った。内在性のpre-miRNA配列を部分的にランダム化したRNAプールから、cell-basedあるいはin vitroセレクションによる、リガンド応答性のpre-miRNA配列の取得を試みた。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to explore an artificial miRNA pathway that can be regulated by small-molecule ligands. Ligand-binding sites were created in an endogenous pre-miRNA by partially randomizing the sequence. Construction of the expression vector containing the partially randomized pre-miRNA library and the optimization of conditions for cell-based selection were performed. Moreover, in vitro selection of RNA molecules that bind to a novel naphthyridine derivatives was performed.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：マイクロRNA cell-basedセレクション 低分子化合物

### 1. 研究開始当初の背景

マイクロ RNA (miRNA) は、18~25 塩基からなる内在性の短い一本鎖 RNA である。miRNA は、ゲノムから転写された前駆体が Drosha と Dicer という 2 つの RNase による切断を受けて生成される。細胞内で生成された miRNA は、特定の mRNA の 3' 非翻訳領域に結合し、RNA 誘導サイレンシング複合体 (RISC) の形成を引き起こす。その結果、標的 mRNA の分解、あるいはタンパク質への翻訳が抑制される。miRNA は、それ自身タンパク質をコードしないが、他の遺伝子の発現を翻訳レベルで制御する機能性 RNA として種々の生命現象に関わっている。従って、特定の miRNA 経路、具体的には miRNA の成熟過程や標的 mRNA への結合などを人為的に調節することができれば、miRNA が標的とする遺伝子の発現や生物学的プロセスを自在にコントロールすることが可能である。そこで申請者は、ある特定の miRNA 経路を低分子化合物で制御することを考えた。

### 2. 研究の目的

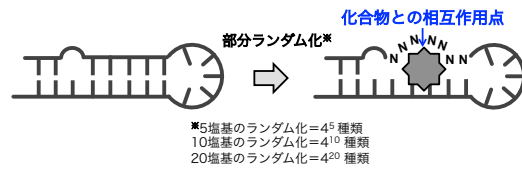
本研究は、「ある特定の miRNA 経路を低分子化合物で制御し、標的遺伝子の発現を制御すること」を目的とした。では、化合物で特定の miRNA 経路を調節するにはどうしたらよいだろうか。申請者は、化合物と相互作用する部分構造を持つ非内在性の pre-miRNA を人工的に作り出すことで、それを実現しようと考えた。すなわち、内在性 pre-miRNA の配列を部分的にランダム化した人工 pre-miRNA ライブラリーから、特定の低分子化合物と相互作用する配列を選別し、得られた配列を化合物応答性の人工 pre-miRNA として用いる。pre-miRNA 配列に低分子化合物の結合サイトとなる部分構造を人為的に作り出すことで、化合物の結合と、それによる miRNA 成熟過程の抑制が可能になる。申請者らの研究室は、DNA や RNA など核酸に含まれる特異構造を認識して結合する分子化合物を多数生み出してきた。それらの化合物を利用して、人工 pre-miRNA 配列の探索を行う。

### 3. 研究の方法

本研究は、下記の 6 つの段階を設定し、目的の達成を目指した。

(1) 人工 pre-miRNA ライブラリーの作製  
内在性の pre-miRNA の配列を、部分的にランダム化した doped pre-miRNA ライブラリーを作製する。ランダム部分は、内在性の pre-miRNA と同じ塩基を 85% 使用し、残り 15% はそれ以外の塩基を 5% ずつ使用した、

doped RNA ライブラリーにする。鋳型となる DNA は化学合成し、ショートヘアピン RNA (shRNA) 発現用ベクターに組み込む。

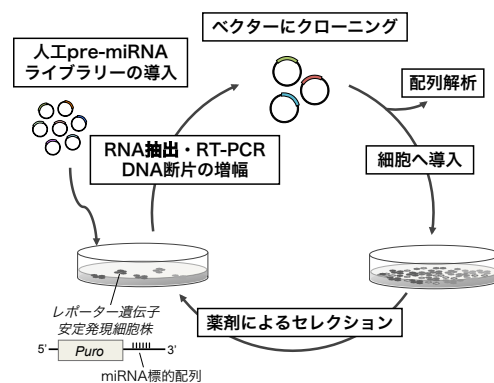


(2) レポーター遺伝子、および人工 pre-miRNA ライブラリーを発現する細胞株の作製  
レポーター遺伝子の 3'-非翻訳領域 (3'-UTR) に miRNA の標的配列を導入したレポーターベクターを作製し、哺乳細胞に導入して安定発現株を作製する。得られた安定発現株に、段階(1)で作製した人工 pre-miRNA 発現プラスミドライブラリーを導入する。レポーター遺伝子としては、ピューロマイシン耐性遺伝子を用いる。

(3) 低分子化合物と人工 pre-miRNA との相互作用をレポーター遺伝子の活性により評価、選別

段階(2)で作製した細胞を用いて、化合物に結合する人工 pre-miRNA の配列を選別する。化合物存在下、ピューロマイシン耐性が増大した細胞クローンを単離する。

(4) 化合物に結合する人工 pre-miRNA 配列をプール化、発現ベクターへの再組み込み  
段階(3)で単離した細胞クローンから RNA を回収し、得られた pre-miRNA 配列をプール化する。これを PCR で増幅し、得られた DNA 断片を発現用ベクターに組み込む。



(5) 段階(2)に戻り、段階(3)(4)の繰り返し  
配列の濃縮のためにより高い選択圧をかけて上記の段階を繰り返す。

(6) 得られた人工 pre-miRNA 配列と化合物による、標的遺伝子の発現制御  
段階(1)~(5)を経ることで、化合物と相互作用する人工 pre-miRNA 配列が得られたら、実

際の標的遺伝子の発現を制御できるか確認する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 人工 pre-miRNA ライブラリーの作製

pre-miRNA ライブラリーの作製に先立って、pre-miR122 配列を組み込んだ発現ベクターを作製した。また、ホタルルシフェラーゼ遺伝子の 3'-UTR に miR122 の標的配列を含むレポーターベクターを作製した。レポーターベクターを導入した細胞に、先の pre-miR122 発現ベクターを導入すると、ホタルルシフェラーゼの活性が抑制されることを確認した。構築した発現ベクターが、細胞内で pre-miR122 を生成させるのに有効であることを確認したので、成熟 miR122 鎖のアンチセンス側を部分的にランダム化した pre-miR122 doped ライブラリーを含む発現ベクターを調製した (図 1)。エレクトロポレーションにより、調製した発現ベクターを大腸菌に導入し、菌液の一部をプレートに播種、多様性の確認を行った。その結果、3,276,000 個/ライブラリーのコロニーが得られ、 $4 \times 10^6 = 1,048,576$  種類を上回る種類のクローンを得ることに成功した。

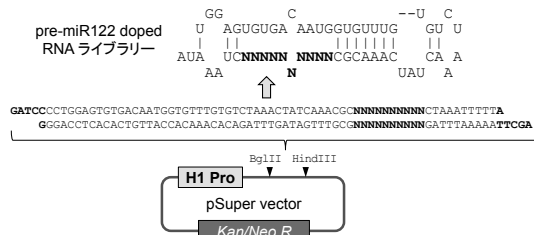


図 1. pre-miR122 doped ライブラリー発現ベクター

##### (2) レポーター遺伝子、および人工 pre-miRNA ライブラリーを発現する細胞株の作製

ピューロマイシン耐性遺伝子の 3'-UTR に miR122 の標的配列を含むレポーターベクターを作製し (図 2a), HEK293 細胞に導入した。この細胞を、1.25~10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のピューロマイシン存在下で培養し、耐性株を単離した (図 2b)。

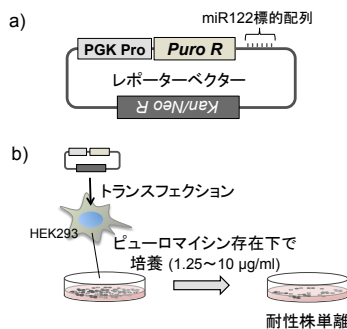


図 2. a) レポーターベクターの作製. b) ピューロマイシン耐性株の単離

HEK293 細胞は 0.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のピューロマイシン濃度で約 50% の細胞生存率を示したため、通常の HEK293 細胞が殆ど死滅すると考えられる 5, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のピューロマイシン存在下で耐性を示したレポーター遺伝子導入細胞株 (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  耐性株: 37 クローン, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  耐性株: 28 クローン) を以後の実験に用いた。単離した耐性株より RNA を抽出し、ピューロマイシン耐性遺伝子の発現量を qPCR により確認した (図 3)。

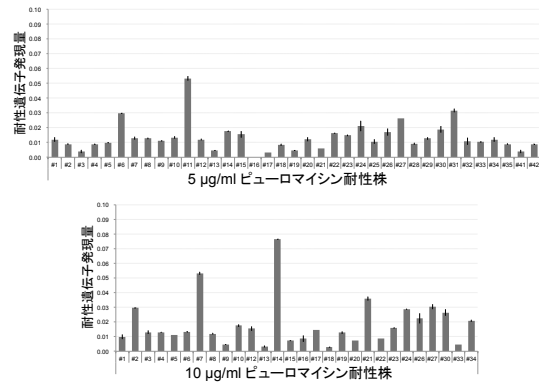


図 3. ピューロマイシン耐性遺伝子の発現量定量

その結果、ピューロマイシン耐性の大小と、ピューロマイシン耐性遺伝子の発現量に相関が見られなかった。そこで先のクローンからピューロマイシン耐性遺伝子の発現量の異なっていた耐性株をいくつか選択し、耐性濃度範囲が各耐性株で異なるかを調べた (図 4)。

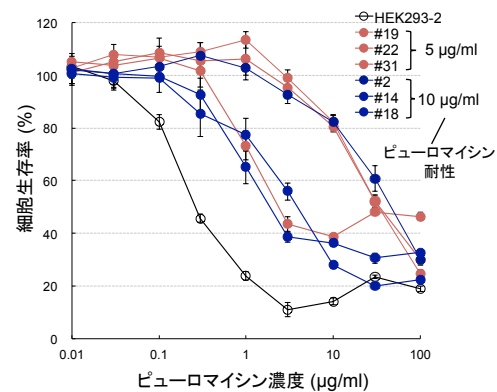


図 4. 各耐性株のピューロマイシン耐性濃度の検討

その結果、各クローンは HEK293 細胞よりも高いピューロマイシン耐性を示したものの、薬剤選択の濃度と耐性濃度範囲に相関がないことが分かった。よって、耐性遺伝子の発現量で cell-based セレクションに用いる細胞株を選択することが困難であった。

##### (3) 低分子化合物と人工 pre-miRNA との相互作用をレポーター遺伝子の活性により評価、選別

段階(2)で作製した細胞を用いて、化合物に結合する人工 pre-miRNA の配列を選別する予定であったが、(2)に示した通り、ピューロマイシン耐性遺伝子の発現と耐性に相関がないことが分かった。cell-based セレクションに用いるのに適当な耐性株を得ることができず、セレクションの条件を検討・最適化するには相当の時間を要すると考えられた。そこで、cell-based セレクションと並行して、成熟 miR122 鎖のアンチセンス側を部分的にランダム化した pre-miR122 doped ライブラリーから、*in vitro* セレクションにより任意の化合物に結合する配列を探索し、(2)で作製したレポーター発現細胞株で、その効果を検証することとした。*in vitro* セレクションの対象の化合物は、当研究室で開発した新規ナフチリジン誘導体 RND とした (図 5a)。

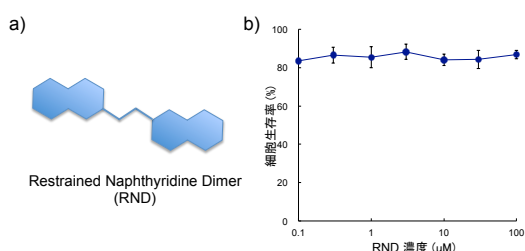


図 5. a) RND のデザイン (模式図) . b) RND の細胞毒性評価

RND は、2つのナフチリジン環を2つの炭素でつないだ誘導体であり、平面性を持たない分子である。そのため、2本鎖部分へのインターカレーションが抑制され、複雑な2次構造を有する RNA に結合する可能性を秘めている。また、細胞毒性も認められず、細胞を用いた実験への適用が容易である (図 5b)。RND を固定化したセファロース担体に対して、先に調製した pre-miR122 doped ライブラリーを RNA プールとして用いた *in vitro* セレクション実験を行った。現在までに配列の収束が見られないため、セレクション過程を継続中である。段階(4)~(6)については、cell-based セレクションに適当な耐性株を得ることができなかつたため、段階(3)で得られる配列を発現ベクターに組み込み、化合物 (RND) の効果を検証することとした。

## 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 4 件)

① Murata, A.; Harada, Y.; Fukuzumi, T.; Nakatani, K. Fluorescent indicator displacement assay of ligands targeting 10 microRNA precursors. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 7101-7106. (査読有)

DOI: 10.1016/j.bmc.2013.09.007.

② Murata, A.; Fukuzumi, T.; Umemoto, S.; Nakatani, K. Xanthone derivatives as potential inhibitors of miRNA processing by human Dicer: Targeting secondary structures of pre-miRNA by small molecules. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 252-255. (査読有)

DOI: 10.1016/j.bmcl.2012.10.108.

[学会発表] (計 11 件)

① 村田亜沙子

RNA の構造・機能を制御する小分子化合物の開発. 日本化学会第 94 春季年会, 2014 年 3 月 27 日, 名古屋大学 (愛知県)

② Murata, A.; Sugai, A.; Fukuzumi, T.; Umemoto, S.; Dohno, C.; Nakatani, K. Targeting secondary structures of pre-miRNA by small molecules : Development of potential inhibitors of pre-miRNA processing. 2013.6.11-16. RNA 2013, the 18th Annual Meeting of the RNA Society, Congress Center Davos (Switzerland).

③ 村田亜沙子・福澄岳雄・梅本詩織・神山いつみ・堂野主税・中谷和彦 RNA 結合性化合物を用いたマイクロ RNA 前駆体プロセシングの調節. 日本化学会第 93 春季年会, 2013 年 3 月 23 日立命館大学 (滋賀県)

## 6. 研究組織

研究代表者

村田 亜沙子 (MURATA, Asako)  
大阪大学・産業科学研究所・助教  
研究者番号 : 50557121