

論文の内容の要旨

論文題目 RIP-seq 法を用いた miRNA の標的転写産物の網羅的探索

氏名 兼松 宗太郎

1. 背景

microRNA (以下miRNA) はヒトの細胞に内在的に発現する約21-25塩基のnon-coding RNAである。miRNAは、様々な生理的環境で、相補的な配列を持つmRNAと相互作用して、遺伝子発現制御を行うと考えられている。ゲノムから転写されたmiRNAの前駆体はプロセシングを受け、細胞質で成熟型となる。成熟したmiRNAは、Argonaute (Ago)を主要コンポーネントとするmiRISC complexを形成することで、標的mRNAの量あるいは翻訳効率を制御する。近年、miRNAによる遺伝子発現制御が細胞増殖、細胞分化、アポトーシス、癌化といった様々な細胞の生理現象への関与を示唆する結果が多数報告されている。miRNAによる標的転写産物の遺伝子発現制御の全体像を把握することは、多岐にわたる生命現象あるいは様々な病態、病因を理解する上で重要であると考えられている。

一方、近年のシーケンス技術の急速な発展により、データベース中に登録されているmiRNAの数は飛躍的に増えており、代表的なmiRNAのデータベース miRBase (<http://www.mirbase.org/>) には、現在、1000種を超えるmiRNAが登録されている。しかし、その標的転写産物の同定の困難さから生理的機能の解明されていないmiRNAが数多く存在する。TargetScan (<http://www.targetscan.org/>), MiRanda (<http://www.miRNA.org/>), Pictar (<http://pictar.mdc-berlin.de/>)といった標的転写産物を予測するアルゴリズムは多く開発されてきているが、これらの予測アルゴリズムはmiRNAの5'側から2'-8'塩基までのseed配列をもとに標的転写産物を予測するものである。予測される結合のseed配列はゲノム上に多く存在しており、一つのmiRNAあたり平均2000個の転写産物が同定されるために、予測アルゴリズムのみをもちいて真の標的転写産物を同定することは極めて困難である。そこで近年、RISC complexの主要コンポーネントであるAgoタンパク質を用いた免疫共沈降法とgene Chipを組み合わせることにより、Agoタンパク質と結合する転写産物を網羅的に解析するという報告が複数のグループからなされている。本研究では、次世代シーケンサーを用いたRIP-miRNA Seq、RIP-mRNA Seq法を組み合わせることにより、miRISC complexの主要構成要因であるArgonaute1 (ago1), Argonaute2 (ago2) に結合するmiRNAと標的mRNAを同時に同定することを試みた。同定したmiRNAとmRNAを用いて、Target Scanにより、miRNAとmRNAの対応付けをおこない、miRNA Seq, mRNA Seqおよびpolysome Seqにより結果の検証を行った。また、miRNAとmRNAの関係性の細胞外刺激依存的な応答性を明らかにするために、低酸素環境下で培養したDLD-1細胞についても同様の解析を行い、低酸素応答性miRNAお

よびmRNAを同定した。

材料と方法

1) 細胞培養

ヒト大腸由来腺がん細胞株 DLD-1 (JCRB 細胞バンク、資源番号：JCRB9094)を終濃度 10% FCS (fetal calf serum)、終濃度 4.5 g/L グルコース、アンピシリンを添加した DMEM (Dulbecco's Eagle's medium、ニッスイ)を用いて培養を行った。低酸素状態の細胞の培養には、1%O₂ 濃度の低酸素インキュベーター(SANYO)を使用した。低酸素状態のサンプルとは 1% O₂、5% CO₂、37℃で培養したものを指し、通常酸素濃度状態とは 21% O₂、5% CO₂、37℃で培養したものを指す

2) *Small RNA Seq, mRNA Seq* の作製

通常酸素濃度状態、低酸素濃度状態下における miRNA, mRNA の発現量を調べるために illumina の protocol に従い、small RNA library および mRNA library の作製を行った。低酸素濃度状態下においては、4 時間、24 時間、48 時間の三点 miRNA, mRNA の発現量を調べることにより低酸素状況下における miRNA の発現量の経時変化を検証した。

3) *RIP (RNA immunoprecipitation)* 法

5×10^6 個の DLD-1 細胞を 1×PBS で 3 回洗浄した後、1 mL の使用時に 100U RNase inhibitor (Promega)、1× complete mini EDTA free protease inhibitor cocktail (Roche) を加えた細胞溶解バッファー (20 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 1mM Na₃VO₄, 1% Digitonin) を用いて細胞を溶解させた。その後 14000rpm で 10 分間遠心し、上清のうち 100 uL をコントロールと使用し、(これを以下 Total RNA: (全細胞抽出物) とする)、残りを免疫沈降反応に用いた。免疫沈降反応は、30 uL Dynabeads Protein G (Invitrogen)を洗浄バッファー (10 mM HEPES-NaOH, 150 mM NaCl, 0.1% Triton-X) で洗浄した後、300 uL の洗浄バッファーを加え、転倒混和した後、10 ug の anti-human Ago1 antibody もしくは、anti-human Ago2 antibody (Wako)を加え室温で 1 時間混和しながらインキュベートした。抗体が架橋したビーズは、更に洗浄バッファーで 3 回洗浄し、先に回収した上清を加え転倒混和した後、4℃で 3 時間インキュベートして免疫沈降反応を行った。

結果と考察

1) *RIP-miRNA Seq*によるAgo1およびAgo2に結合するmiRNAの同定

DLD-1細胞において、Ago1およびAgo2に結合するmiRNAの同定を行った。Ago1およびAgo2に結合するmiRNAとして、免疫共沈降分画のタグ濃度 (IP)と全細胞抽出物中のタグ濃度の比 (以下IP/Tとする)を算出し、IP/T>4.0のmiRNAをAgo1、Ago2に結合するmiRNAとした。結果、ago1に結合するmiRNAとして157種、ago2に結合するmiRNAとして121種を同定した。これらのうち、Ago1/Ago2で共通して結合が確認されたものは、107種であった。Agoに結合する多くのmiRNAはAgo1、Ago2の両方を通じて、その機能を発現していると考えられた。

2) RIP-mRNA SeqによるAgo1およびAgo2に結合するmRNAの同定

同様にDLD-1細胞において、Ago1, Ago2に結合する標的mRNAの同定を行った。Ago1およびAgo2に結合するmRNAとして、免疫共沈降分画のタグ濃度 (IP)と全細胞抽出物中のタグ濃度の比 (以下IP/Tとする)を算出し、IP/T>5.0のmRNAをAgo1、Ago2に結合するmiRNAとした。結果、Ago1と結合する標的mRNAとして453種、Ago2と結合する標的mRNAとして1563種を同定した。Ago1, Ago2に共通して結合しているmRNAは184種であった。この結果からAgo1、Ago2が標的遺伝子に対してそれぞれ独立の機能を発現している可能性が示唆された。

3) Target Scan 5.2によるmiRNAと標的mRNAの対応付け

RIP-miRNA SeqおよびRIP-mRNA SeqでAgo1およびAgo2に結合するとされたmiRNAとmRNAの対応付けをTarget Scan5.2を用いて行った。結果、Ago1においては245種、Ago2に関しては472種の対応付けを行うことが出来た。Target Scan上でDLD-1細胞中に発現しているmiRNAもしくはmRNAを用いて解析を行う場合と比較してmiRNA側、mRNA側ともに、約20倍程度対応を絞りこむことができた。

4) Ago1とAgo2の機能の差異に関する検証

Ago1およびAgo2に結合するmiRNAと標的mRNAの二次構造の差異の検討を行った。結果、Ago1およびAgo2に結合するmiRNAとその標的mRNA間のギブス自由エネルギー、Targetscanのscore値、GC含量には有意な差が認められなかった。この結果から一時配列のみから、miRNAとその標的mRNAを絞り込むことは依然として難しいことが示唆された。一方一miRNAあたりが制御する標的mRNAの数 (mRNAs/miRNA)、一mRNAを制御するmiRNAの数 (miRNAs/mRNA)は、Ago2に結合が予測されたものの方が大きいことからAgo2の機能はAgo1の機能と比較して広範にわたっていることが示唆された。

5) 低酸素濃度状態におけるmiRNAによるmRNAの遺伝子発現制御機構の検討

低酸素濃度状態 (1%O₂)におけるmiRNAを介した標的mRNAの遺伝子発現制御機構を明らかにするために、低酸素濃度状態に24時間おいたDLD-1細胞を用いて、通常酸素濃度時同様に、RIP-miRNA Seq、RIP-mRNA Seqを行い、miRNAと標的mRNAの同定を行った。通常酸素濃度状態で通常酸素濃度下と比較してAgo1、Ago2複合体に誘導されるmiRNAおよびmRNAの条件としてHypoxia/Normoxia (IP/T)>2.0と設定してmiRNAとmRNAの対応付けをTarget Scanを用いて行ったところ、結果Ago1に結合するmiRNAとして43種、Ago2に結合するmiRNAとして12種、その内、Ago1, Ago2に共通して結合するmiRNAは1種であった。一方、Ago1に結合する標的mRNAは180種、Ago2に結合する標的mRNAは376種、Ago1,Ago2に共通して結合していたmRNAは67種であった。次に同定されたmiRNAとmRNAの対応付けをTarget Scanを用いて行い、Ago1においては1475種、Ago2においては864種のmiRNA:mRNAのペアが同定された。

低酸素濃度状態でAgo1、Ago2に結合するmRNA、Ago2に結合するmRNAの翻訳抑制レベルを確認する目的で、低酸素濃度下と通常酸素下の細胞内遺伝子発現量変化および、ポ

リソーム分画内遺伝子発現量変化の分布を比較した。Ago1、Ago2に結合するmRNA細胞内遺伝子発現量は、有意な差は認められなかったのに対して、ポリソーム分画内遺伝子発現量変化は、Ago2に結合しているmRNAの方が有意に大きいことが示された。このことより低酸素状態下においては、Ago2に結合するmRNAのほうが、翻訳抑制を受けることが予測された。

6) 今後の展望

RIP-miRNA Seq, RIP-mRNA Seqにより、対応付けられたmiRNAと標的mRNAの関連性をmiRNA Seq, mRNA Seq, polysome Seqといった複数の結果から検討することは、miRNAと標的mRNAの関連性を同定するだけでなく、転写、翻訳という発現制御の全体像を掴む方法としても有用であることが示された。結合部位を同定するCLIP法と今回のRIP法を併用することでより精度の高い同定が出来ると考えられた。