

プロセッシング過程で生成される microRNA の多様性と その機能についての解明（横断型研究 1 年目）

原 敏文、横川 慧
(医療生命薬学研究ユニット)

研究の背景と目的

microRNA(miRNA)は、線虫から霊長類まで進化的に保存されるノンコーディング RNA の一つである。miRNA は、ゲノム DNA から転写された RNA が複数のプロセスを経て、最終的に 22 ヌクレオチド程度の短鎖 RNA として生成される。生成された miRNA は、RISC (RNA-induced silencing complex) とよばれるタンパク質複合体に取り込まれ、miRNA 配列と相補性を有する mRNA を認識し、ポリ A 鎖の分解や翻訳の抑制をひき起こすことにより、標的遺伝子の発現抑制に働く。つまり、miRNA は細胞内の遺伝子発現を転写後レベルで調節するノンコーディング RNA である。

miRNA は、線虫から霊長類まで進化的に保存され、一つの miRNA が数百から数千の遺伝子の発現に影響を及ぼすことが知られている。miRNA は、細胞の増殖や分化に関わるだけでなく、癌や神経疾患においても、正常組織に比べ miRNA は発現変動しているため、miRNA の機能はこれら病態の発症に関与すると考えられている。そのため、miRNA は正常な細胞機能を維持するための、重要なファインチューナーとして働くと考えられている。

近年、miRNA には転写後の RNA 編集やプロセッシング過程で構造的に異なる isoform が生成されることが明らかとなった。これまで、miRNA の機能解析において miRNA の構造的異性体は注目されておらず、これらが細胞内で与える影響についてはほとんど明らかとなっていない。そこで、本研究では細胞内で生成される miRNA の構造的異性体のうち、5'末端の異なる miRNA に注目し、miRNA の構造的異性体が癌細胞で果たす役割を明らかにすることを目的とした。研究初年度では、①miRNA 構造的異性体の発現動態の解析、②miRNA 構造的異性体の検出方法の確立、③miRNA 構造的異性体の発現システムの開発、④in vivo イメージングによる細胞の生体内動態の確立、以上の研究を計画した。

実験方法

① miRNA の情報解析

miRNA の前駆型および成熟型の配列情報、および次世代シーケンサーの解析情報は、公共データベースである miRBase (version 22) からダウンロードした。

② miRNA の発現解析

miRNA の発現を解析するため、サンプル RNA に対し種々のアダプターを結合後に逆転写反応を行い、cDNA を合成した。その後、TaqMan Probe とプライマーセットを用いてリアルタイム PCR を行った。

③ miRNA の細胞内発現誘導システム

細胞内で効率的かつ持続的に miRNA の発現誘導を行うため、shRNA 発現ベクター (Fellmann C et al, Cell Rep, 2013) を利用した。Doxycycline (Dox) 添加による遺伝子発現は、緑色蛍光タンパク質 (EGFP) の発現の有無で確認した。

④ in vivo イメージング

マウスの生体内において、癌細胞の動態を解析するため、人工生物発光システム AkaBLI を利用した。発光は、Imagem X2 EM-CCD カメラ (浜松ホトニクス) で検出した。

結果および考察

① miRNA 構造的異性体の発現動態の解析

公共データベース miRBase の情報を利用し、miRNA の構造的異性体の発現動態を解析した。80%以上が単一の成熟型 miRNA として発現する一方で、5'末端の異なる構造的異性体が 20%程度発現していることが明らかとなった。構造的異性体が生成される要因について、情報学的解析を進めたが、その要因は明らかにならなかった。しかし、構造的異性体の進化的保存性について検討したところ、一部の miRNA では、哺乳類だけでなく、ゼブラフィッシュにおいても構造的異性体は発現していることが明らかとなった。これら結果は、miRNA の 5'末端の構造的異性体が生体内において重要な働きを担うことを示唆した。

② miRNA 構造的異性体の検出方法の確立

miRNA の発現動態を 5'末端の構造的異性体ごとに検出するため、5'末端の構造的差異を踏まえた Bridge アダプターと TaqMan Probe を用いた Dumbbell-PCR 法 (Honda S et al, NAR, 2015)を利用した。人工合成した RNA をサンプルに対し、5'末端の構造に基づいて設計した 4 つのアダプターを用いて、Dumbbell-PCR 法の有用性を検討した。その結果、設計したアダプターは、それぞれの RNA を選択的に検出することが明らかとなった。

③ miRNA 構造的異性体の発現システムの開発

極めて厳密な切断を示すことが知られる shRNA 発現ベクターを利用し、5'末端の構造異性体を個別に細胞内で発現できるか否かを検証した。5'末端の配列情報を基に miRNA 発現ベクターを作製し、細胞内に導入した。Dox の有無による細胞内の EGFP 発現を確認した後、細胞内の miRNA 発現量を Dumbbell-PCR 法により解析した。その結果、miRNA の 5'末端構造異性体は選択的に発現誘導していることが明らかとなった。しかし、miRNA の発現レベルが異なったため、Dox 誘導後に一定の EGFP レベルを指標として細胞分取を行い、miRNA の発現レベルが同程度となる細胞株を樹立した。

④ in vivo イメージングによる細胞の生体内動態の確立

生体内における癌細胞を高精度に検出するため、AkaBLI を利用した。人工発光ルシフェラーゼ Akaluc を導入したヒト癌細胞をヌードマウスへ移植し、移植から 53 日後に尾静脈より基質の Akalumine-HCl を投与して、癌細胞の検出を試みた。その結果、マウス体内において癌細胞を非侵襲的かつ深部組織においても検出できることが明らかとなった。

令和 6 年度の研究計画

- miRNA 構造的異性体の発現レベルを一定に保つため、BFP2 タンパク質発現カセットを miRNA 発現ベクターに挿入し、本ベクターを細胞へ導入することにより、Dox による発現誘導を介さず、細胞の BFP2 発現レベルを指標とした細胞分取を行う。
- miRNA 構造的異性体の発現細胞を用いて、細胞の増殖能、遊走能、浸潤能など細胞レベルでの機能解析を行う。
- miRNA 構造的異性体の発現が細胞内の遺伝子発現に与える影響について、網羅的遺伝子発現解析を行い、miRNA 構造的異性体ごとに標的となる遺伝子群やシグナルパスウェイを明らかにする。
- miRNA 構造的異性体の発現による癌細胞の生体内動態の変化を in vivo イメージングにより明らかにする。

以上の研究計画により、癌細胞で発現する miRNA の構造的異性体について分子レベルおよび細胞レベルの機能を明らかにすることを目指す。