

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 4 月 23 日現在

機関番号：12102

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21200039

研究課題名（和文） マウス細胞内に普遍的に存在する 50～100ヌクレオチド低分子 RNA の多角的解析

研究課題名（英文） Multi-disciplinary analysis of 50-100nt-sized, small RNAs
Universally found in mouse cells

研究代表者

清澤 秀孔 (KIYOSAWA HIDENORI)

筑波大学・体育系・研究員

研究者番号：30295422

研究成果の概要（和文）：

当初アンチセンス RNA の発現が見られる遺伝子座で発現が確認されていた新規サイズ（50-100nt）の低分子 RNA の網羅的解析を試み、カスタムのマイクロアレイを開発、発現のスクリーニングを行い、ノーザン解析により発現の検証を行った。低分子 RNA の構造解析の為に、試験管内転写法による構造スクリーニングの方法を開発した。次世代シーケンサーによる発現解析も試み、RNA 配列データの構造的クラスタリングを行った。

研究成果の概要（英文）：

We performed genome-wide analysis of novel-sized (50-100nt) small RNAs that is originally discovered in the gene loci producing endogenous antisense RNA, based on the custom-made microarrays. The expression validation was analyzed by Northern hybridization. We developed a structural screening method by the in NMR tube transcription for the structural analysis of small RNA. We also performed a trial expression analysis of small RNAs using the next generation sequencers and structural clustering of the RNA sequences.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2009 年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
2010 年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2011 年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
年度			
年度			
総 計	23,800,000	7,140,000	30,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学・分子生物学

キーワード：RNA

1. 研究開始当初の背景

従来、ゲノム DNA の一方の鎖に遺伝子が存在すると、その相補鎖領域は転写されないと考えられていた。しかし、21 世紀に入って飛躍的な進展を遂げたゲノムプロジェクトの成果や、網羅的な cDNA 解析、タイリングアレイの結果がこの概念を覆した。細胞内には

ゲノム DNA の同じ領域に由来するセンスおよびアンチセンス転写産物が多く存在することが明らかになった。このような転写産物は「sense-antisense transcript: SAT」と名付けられ、現在様々な解析が進められている。これら SAT の発現解析を行っている過程で研究代表者らは、センス鎖とアンチセンス鎖

の重なる領域からのみ 50-100nt 程度の低分子 RNA が検出される傾向があることを発見した(1,2)。これらはそのサイズから、明らかに miRNA や siRNA、piRNA とは違ったものである。10 対の SAT 遺伝子解析中、8 割でこのような低分子 RNA が検出されることから（研究代表者の未公開データ）、これら低分子 RNA の産生は SAT 遺伝子座では比較的高頻度に行っていると考えられた。SAT 遺伝子座と 50-100 nt サイズの低分子 RNA との関係については、研究代表者らの報告以外、発表されていなかった。しかし、今後同様の報告は増えるものと予想され、これらの生理的意義や機能を解明することは急務であると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、研究代表者らが発見した新しい一群の新規サイズ低分子 RNA (50-100nt 程度) を解析の対象としている。SAT 遺伝子座から 50-100nt サイズの RNA が頻繁に検出されることから、その存在がゲノムレベルで普遍的であるかもしれないと考え、このサイズの RNA を解析の対象とした。これら RNA は始めから 50-100nt として転写されたとは考えにくく、プライマリー転写産物からプロセスされ、細胞内で安定的に存在するために立体構造を形成し、特定のタンパク質に結合していると考えた。また、これら新規低分子 RNA がゲノム上にマップされる位置は哺乳動物において高度に保存されている場合が多く、生命活動に非常に重要な役割を担っていることが予想される。これら新規低分子 RNA に関して、遺伝学的アプローチ、生化学的アプローチ、構造生物学的アプローチを駆使して、その基本的な機能の解明を計画した。

3. 研究の方法

(1) SAT 遺伝子座におけるマイクロアレイを用いた新規低分子 RNA の同定
ゲノムレベルで SAT 遺伝子座におけるセンス鎖とセンス鎖とアンチセンス鎖の重なり具合を考慮したカスタムマイクロアレイを作製し、低分子 RNA やポリ A 鎖を持たない RNA もターゲットとして発現解析を行った。

(2) ノーザン解析による発現の再確認
上記マイクロアレイのデータに基づき、SAT 遺伝子座に由来するマウス新規低分子 RNA (50-140 nt) 候補 50 種類について、マウスの各臓器（脳、胸腺、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、胃、腸、精巣）における発現の有無をノーザンハイブリダイゼーションにより評価した。

(3) RNA 塩基配列データの構造的クラスタリング

申請者らが既に所有しているパイロットによる低分子 RNA の次世代シーケンサーによるデータ、及び新規で行った次世代シーケンサーデータに対して、すべて二次構造予測を行い、その二次構造および塩基配列によるクラスタリングを行った。二次構造予測にはプログラム vsfold5 を使い、クラスタリングは自作ソフトウェアを用いた。

(4) 試験管内転写法による低分子 RNA の構造スクリーニング

マウス cSAT-025 の領域*において、S3 および AS2 のプロンプトによるノーザン解析によってそれぞれ 80nt および 60nt の RNA の発現が確認されている。これらについてソフトウェア vsfold による二次構造の予測結果を指標に発現領域を推定した。またそれぞれについて実際に T7 RNA ポリメラーゼを用いた試験管内転写によって RNA を調製し、その NMR スペクトルを測定した。

4. 研究成果

(1) マイクロアレイの設計、作製と低分子 RNA の発現解析

50-100nt 程度の低分子 RNA の存在の普遍性及び、アンチセンス転写との関連性を解析するため、センス鎖とアンチセンス鎖の重なりを考慮した部分にプロンプトを設計したマイクロアレイを作製した（図 1）。

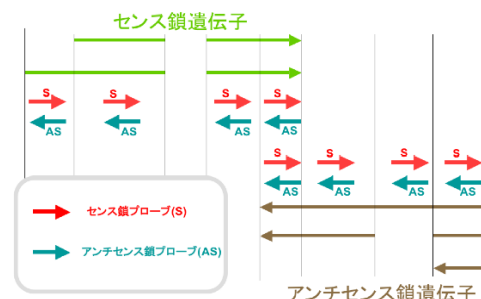


図1 カスタムマイクロアレイ作製の概念図

ターゲット RNA はマウス脳からの低分子及び全 RNA とし、全 RNA に関してはラベル方法を random priming 及び oligo dT priming の両方で行うことにより、ポリ A 鎖の付加された RNA と共にポリ A 鎖が付加されていない RNA も対象とした。低分子 RNA/長鎖 RNA のシグナル比や低分子 RNA のシグナル自体の大きさからノーザン解析への候補を選んだ。

(2) ノーザン解析及び、機能解析への候補選定

SAT 遺伝子座に由来するマウス新規低分子 RNA (50-140 nt) 候補 50 種類のうち、発現がノーザンハイブリダイゼーションにより確認されたものについて、配列を精査した (例、図 2)。

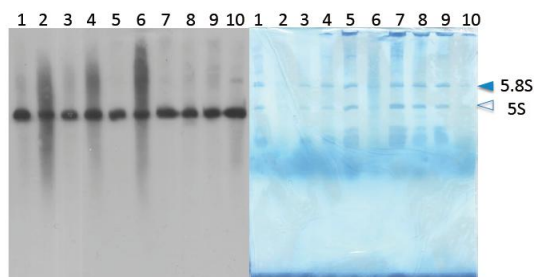


図 2 ノーザンブロットの例

左パネル：ノーザンブロット。右パネル：メチレンブルー染色。レーン：1. brain; 2. thymus; 3. heart; 4. lung; 5. liver; 6. spleen; 7. stomach; 8. intestine; 9. kidney; 10. Testis

この結果、新規性の高いもの 2 種類に絞り込んだ。一方、既に研究代表者らが既に発表済みのマウス cSAT-025 の領域の AS2 RNA と S3 RNA については、前者が脳、胸腺、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、胃、腸、精巣のいずれにおいても発現が確認できたのに対し、後者はいずれにおいても確認できず、発現パターンの違いを示すことがわかった。S3 は NIH3T3 細胞株での発現が確認されている。このことから、*in vivo* では線維芽細胞で発現していることが期待される。残りの新規低分子 RNA 候補については脳、胸腺、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、胃、腸、精巣のいずれにおいても同程度の量の発現を示した。

(3) 試験管内転写法による低分子 RNA の構造スクリーニング

マウス cSAT-025 の領域において、S3 および AS2 のプロンプによるノーザン解析によってそれぞれ 80nt および 60nt の RNA の発現が確認されている。これらについて、二次構造の予測結果を指標に発現領域を推定した結果、S3 については 2 つの候補 (S3-1 と S3-2)、AS2 については一つの候補 (AS2-1) が得られた。それぞれについて実際に T7 RNA ポリメラーゼを用いた試験管内転写によって RNA を調製し、その NMR スペクトルを測定した (図 3)。

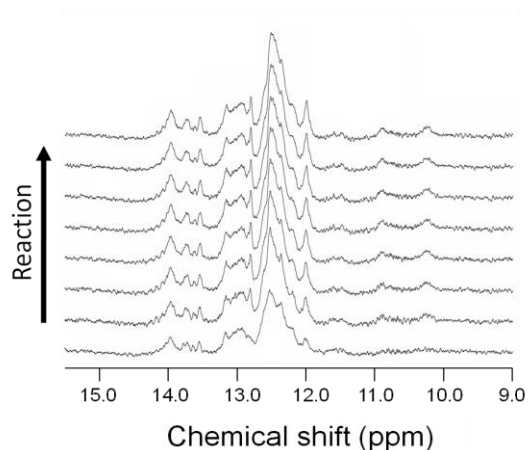


図 3 試験管内転写法によって得られた NMR スペクトル

二次構造の形成を反映するイミノプロトン領域のスペクトルを比較検討した結果、S3-2 (89nt) に対して S3-1 (81nt) の方がより安定な二次構造を形成していることがわかり、S3-1 の RNA が発現している可能性が示唆された。AS2-1 (97nt) については、二次構造予測によって GC 塩基対からなる長いステムの存在が推定されたが、NMR スペクトルの解析によっても GC 塩基対からなるステムの形成が確認された。ただし、この長い GC 塩基対は AS2 プロンプに相補的な領域の前後の配列から形成されており、プロンプに相補的な領域自体は、AU や GU 塩基対を多く含むステムループの形成が予測されていたが、NMR スペクトルからはそのようなステムループの形成は認められなかった。ノーザン解析からは 60nt 程度の RNA の存在が推定されているが、AS2-1 は 97nt からなる。したがって、AS2 については、立体構造を形成していない可能性もある。

(4) RNA 塩基配列データの構造的クラスタリング

マウス脳から 50-140 nt の RNA 画分を調製し、次世代シーケンサーによる解析を行った。得られた約 1 億個の RNA 配列について予測した二次構造および塩基配列によるクラスタリングを行い、これまでに 51%が BoxC/D 型の snoRNA、42%が rRNA の断片、6%がその他の既知の RNA であることが判明している。現在、残りの約 72 万個の RNA 配列について解析を進めている。なお、これまでに 4 つの未同定 RNA を検出している。これらはいずれもイントロン内に位置し、哺乳類での保存性が高い領域であった (例、図 4)。

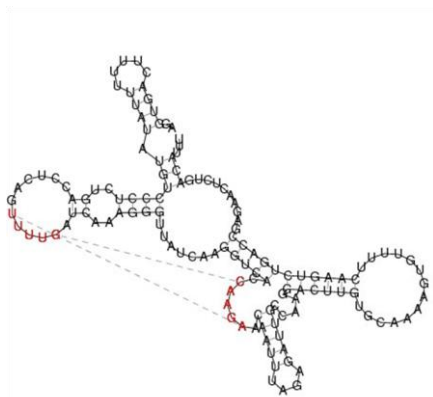


図4 マウス脳において発見された未
 定低分子 RNA の候補の一例
 vsfold による推定二次構造を示した。

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 8 件)

1. Dawson W and Kawai G: A new entropy model for RNA: part V, Incorporating the Flory-Huggins model in structure prediction and folding, *J. Nucleic Acids Invest. in press.* (査読あり)
2. Dawson W and Kawai G: A new entropy model for RNA: part IV, The minimum free energy and the thermodynamically most-probable folding pathway, *J. Nucleic Acids Invest. in press.* (査読あり)
3. Dawson W, Takai T, Ito I, Shimizu K, and Kawai G: A new entropy model for RNA: part III, Is the folding free energy landscape of RNA funnel shaped?, *J. Nucleic Acids Invest. in press.* (査読あり)
4. Dawson W, Yamamoto K, Shimizu K, and Kawai G: A new entropy model for RNA: part II, persistence-related entropic contributions to RNA secondary structure free energy calculation, *J. Nucleic Acids Invest. in press.* (査読あり)
5. Dawson W, Yamamoto K, and Kawai G: A new Entropy model for RNA: part I, a critique of the standard Jacobson-Stockmayer model applied to multiple cross links, *J. Nucleic Acids Invest. in press.* (査読有り)
 Kohama C, Kato H, Numata K, Hirose

M, Ogura A, and Kiyosawa H: An ES cell-differentiation system recapitulates a developmentally regulated neuron-specific parent-of-origin expressivity. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 1391-1401. 2012. (査読あり)

Saito R, Kohno K, Okada Y, Osada Y, Numata K, Kohama C, Watanabe K, Nakaoka H, Yamamoto N, Kanai A, Yasue H, Murata S, Abe K, Tomita M, Ohkohchi N, and Kiyosawa H: Comprehensive expressional analyses of antisense transcripts in colon cancer tissues using artificial antisense probes. *BMC Medical Genomics* **4**, 42, 2011. (査読あり)

Hokii Y, Sasano Y, Sato M, Sakamoto H, Sakata K, Shingai R, Taneda A, Oka S, Himeno H, Muto A, Fujiwara T, and Ushida C: A small nucleolar RNA functions in rRNA processing in *C. elegans*. *Nucleic Acids Res.* **38**, 5909-5918, 2010. (査読あり)

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 河合剛太、牛田千里、清澤秀孔: マウス SAT 領域から発現する 50-100 残基 RNA のクラスターリングと構造解析、第 84 回日本生化学会大会、国立京都国際会館 (京都府)、2011 年 9 月 24 日。
2. Kawai G, Ushida C, and Kiyosawa H: Analysis of Small RNAs, with 50-100 nt Length, from the Loci of the Sense-Antisense Transcription in Mouse Genome, The 16th Annual Meeting of The RNA Society, Kyoto International Conference Center (Kyoto), June 15, 2011.
3. Ushida C, Ono T, Saito R, Osada Y, Shindo Y, Kaneko N, Kawai G, and Kiyosawa H: Expression of small RNAs from mouse SAT loci, The 16th Annual Meeting of The RNA Society, Kyoto International Conference Center (Kyoto), June 15, 2011.
4. 斎藤裕之、伊谷野悠里、牛田千里、清澤秀孔、河合剛太: NMR 試験管内転写による RNA の NMR スペクトルの測定、第 49 回 NMR 討論会、タワーホール船堀 (東京都)、2010 年 11 月 15 日。

〔図書〕(計 4 件)

1. Kohama C and Kiyosawa H: Genome-wide analysis of sense-antisense transcripts, in "Non-coding RNAs

and Epigenetic Regulation of Gene Expression: Drivers of Natural Selection,” pp. 3-29, Morris KV (ed.), Caister Academic Press, Norwich, U.K., 2012.

2. 河合剛太、清澤秀孔編：「機能性 RNA の分子生物学」、クバプロ、2010. (全 287 ページ)

3. 牛田千里、他：「機能性 RNA の分子生物学」、第 I 章 (pp. 23-24)、第 III 章 (pp. 79-109) 章、第 IV 章 (pp. 111-150)、クバプロ、2010.

4. Ushida C and Hokii Y: Isolation and characterization of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. in “Regulation of Gene Expression by Small RNAs,” pp. 101-121, Rossi J and Gaur RK (ed.), CRC press, 2009.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：低分子 RNA の分析方法

発明者：牛田 千里

権利者：青森県弘前市文京町 1 番地国立大学法人弘前大学

種類：特許

番号：第 4599555 号

取得年月日：2010 年 10 月 8 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.le.it-chiba.ac.jp/kawai/mouse/erna/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清澤 秀孔 (KIYOSAWA HIDENORI)

筑波大学・体育系・研究員

研究者番号：30295422

(2) 研究分担者

河合 剛太 (KAWAI GOTA)

千葉工業大学・工学部・教授

研究者番号：70211860

牛田 千里 (USHIDA CHISATO)

弘前大学・農学生命科学部・准教授

研究者番号：50250593

