

主論文の要旨

**Systematic characterization of seed overlap microRNA
cotargeting associated with lupus pathogenesis**

重複するシード配列を有する二つのマイクロRNAによる
遺伝子制御機構の全身性エリテマトーデスにおける役割と体系的解析

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態内科学講座 腎臓内科学分野

(指導：丸山 彰一 教授)

北井 啓己

【緒言】

マイクロ RNA(miRNA)は、約 22 塩基の非コード RNA で、標的 mRNA の 3'非翻訳領域(3'UTR)に結合しその発現を抑制する。近年、複数の miRNA が同じ標的遺伝子の異なる配列に結合することで協調的に遺伝子を抑制することが注目され(miRNA cotargeting)、特に複数の標的部位が 15-100 塩基以内にある場合はその抑制効果が相乗的になることが知られている(neighborhood cotargeting)。こうした部位は、総数は少ないが偶発的とはいえ高い頻度で 3' UTR に存在するため、進化の過程で選択的に保存されていることが示唆されてきた。複数の miRNA の制御異常が様々な疾患で確認されているが、複数の miRNA と標的部位間でのクロストークや背後のメカニズムについては不明な点が多い。

全身性エリテマトーデス(SLE)は、自己抗体産生により全身症状を引き起こす疾患である。形質細胞様樹状細胞(pDCs)の病態への関与が知られているが、pDCs における miRNA の役割については深く検討されてこなかった。

本研究では SLE における miR-128-3p(miR-128)・miR-148a-3p(miR-148a)の発現異常の重要性を明らかにし、さらに統合的 bioinformatics を通じて、複数の miRNA による制御様式の多様性と、miRNA の標的部位の進化学的特徴との関係性を明らかにした。

【結果】

Toll like receptor (TLR) 7 刺激薬: イミキモド(IMQ)により SLE を誘発する IMQ マウスモデルを用いた。脾臓 pDCs において miRNA マイクロアレイおよび qRT-PCR 解析を行った結果、miR-128 および miR-148a の発現が対照群と比較して有意に低下していた(Fig 1 A, B)。これらの miRNA の発現量変化を small RNA-seq でも確認した(Fig 1C)。

pDC 細胞株: CAL-1 細胞を TLR7/8 刺激薬: R848 で刺激したところ、miR-128、miR-148a の発現低下がみられた(Fig 2A)。また、miR-128、miR-148a を CAL-1 細胞に導入すると TNF- α /IL-6 両者の分泌低下を認め、それぞれ単独で導入した群と比較し同時導入群でより TNF- α /IL-6 両者の分泌が低下した(Fig 2B)。これらの結果から、miR-128/miR-148a 両者の発現低下により TLR7 を介した炎症反応が亢進するフィードバックループの存在が示唆された。この 2 つの miRNA に共通する標的遺伝子を探索し Kruppel-like factor 4(*KLF4*)に着目した(Fig 2C)。miR-128/miR-148a は類似したシード配列を有し、*KLF4* の miR-128/miR-148a に対応する標的部位は重複していた。*KLF4* の 3' UTR を用いた Luciferase Reporter Assay と *KLF4* タンパクの Western blot 解析を行ったところ、miR-128/miR-148a をそれぞれ単独導入した群で有意に Luciferase Reporter Activity およびタンパクの発現が低下し、同時導入群でさらに低下した(Fig 2D-F)。また、IMQ モデルの pDCs での *KLF4* の発現上昇と(Fig 2G, H)、CAL-1 細胞での R848 刺激による *KLF4* の発現上昇を認めた(Fig 2I)。CAL-1 細胞に対し *KLF4* のノックダウンを行い、TNF- α /IL-6 両者の分泌低下を確認した(Fig 2J)。以上より、miR-128 と miR-148a は重複する標的部位(seed overlap site)によって *KLF4* を相補的に抑制しており(seed overlap cotargeting)、内在性の miR-128/-148a-*KLF4* 経路が IMQ モデルおよび

CAL-1 細胞での炎症制御に寄与していることが示唆された (Fig 2K)。

次に、RNA-seq 解析を用い、miR-128 と miR-148a の強制発現による、2 つの miRNA の seed overlap site を有する標的遺伝子の発現への影響を網羅的に解析した。miR-128/miR-148a の 7 塩基のシード配列は 5 塩基重複しており、保存された標的部位 (conserved site) に着目すると、miR-128 の 8mer site、7mer-m8 site と miR-148a の 7mer-m8 site が 5-15% 重複していた (conserved overlap site) (Fig 3A)。conserved overlap site を持つ標的遺伝子は、炎症反応、NF- κ B を介した TNF- α signal、転写調節因子の経路に関わるものが多かった (Fig 3B)。単独または両者の miRNA を導入した場合でのそれぞれにおいて有意に発現低下する遺伝子の割合を比較したところ、両者の miRNA の導入により有意に発現低下する遺伝子の割合は、conserved overlap site をもつ標的遺伝子と比べそれをもたない遺伝子よりも多い傾向にあった (Fig 3C)。この傾向は conserved site が 1 つだけの遺伝子でより顕著であった (Fig 3D)。また、conserved overlap site をもつ標的遺伝子は、他の標的遺伝子よりもハプロ不全遺伝子である確率が高かった (Fig 3E)。

KLF4 における miR-128/miR-148a に対する conserved overlap site は幅広い生物種で保存されていたため、conserved overlap site の進化的特徴を詳細に検討した。ヒトにおける miR-128 と miR-148a の標的部位の全てに対し、その標的部位がヒトからシーラカンスまでの 84 種の脊椎動物間で保存されている生物種の数と、進化的保存の指標である Branch length score (BLS) を解析した。より多くの種で conserved overlap site は保存されており (Fig 4A, B)、保存された生物種の数と BLS を比較したところ、conserved site は 2 つのグループ (約 60 種未満とそれ以上で保存) に大別される可能性が見出された (Fig 4C-E)。

この解析を脊椎動物でよく保存された miRNA (broadly conserved miRNA) の全ての標的部位に拡張し検証したところ、保存度が低い部位が保存された生物種の数通常 20 種未満まで、保存度が高い部位は前述と同様に 2 つのグループに分類されうることを見出した (Fig 5A, B)。この 2 つのグループは BLS では大別できなかった (Fig 5B)。保存された生物種数の閾値を 62 種に設定すると、62 種未満に保存された標的部位は主にヒトから有袋類までの哺乳類までに、62 種以上で保存された標的部位はヒトとシーラカンスの間に広く保存されていることが明らかになった (Fig 5C)。

ランダムに生成したシード配列を用いて、broadly conserved miRNA のシード配列が重複する頻度について検証した。broadly conserved miRNA の 7mer-m8 site、7mer-A1 site、6mer site のシード配列が 4 塩基以上の重複を示す頻度は、偶発的頻度よりも高く (Fig 6A)、また、このような高度なシード配列の重複は miRNA cluster 遺伝子やゲノムの複数の場所にコードされる miRNA 遺伝子で多くみられた (Fig 6B, C)。

高度にシード配列が重複する miRNA のペアの標的部位の一般的な特徴を明らかにするため、broadly conserved miRNA の 50 ペアについて同様の解析を行った。約半数で、conserved overlap site がより多くの種に保存されており、多くの組み合わせで conserved overlap site をもつ標的遺伝子がハプロ不全遺伝子である確率も高かった (Fig

7A-C)。

複数の miRNA に制御される標的部位を保存された生物種の数を用いて 2 つのグループに分け、標的抑制・ハプロ不全遺伝子との関係性などを検討した。ヒトからシーラカンスまで広く保存された標的部位は、neighborhood cotargeting と seed overlap cotargeting 両者との関連が強く、またそのような標的部位をもつ遺伝子はハプロ不全遺伝子である確率が高かった (Fig 8A-D)。

【考察】

本研究では、IMQ マウスモデルの pDC において、miR-128 と miR-148a が共に発現低下し、それが KLF4 を介して TLR7 による炎症反応を増強するというフィードバックループの存在を明らかにした。

miR-128 と miR-148a について、単独または両者を導入することで、seed overlap site をもつ遺伝子の発現低下の程度に顕著な違いは生じなかったが、これらの遺伝子は 2 つの miRNA により発現が抑制される確率が高まることが示唆された。また、neighborhood cotargeting と比較して seed overlap cotargeting の抑制効果は弱いものの、その両方の標的部位が高度に保存されていたことから、複数の進化的シナリオが neighborhood cotargeting や seed overlap cotargeting という制御機構を介し miRNA による遺伝子制御ネットワークを安定化させている可能性が示唆された。本研究結果は、seed overlap cotargeting において miRNA と標的の双方の発現量の微調整が重要であり、進化の過程でこうした特徴が重要であった可能性も考えられる。

また、保存度が高い標的部位において、進化的な保存様式が異なる 2 つの主要なグループが系統的に同定された。標的部位が保存された生物種の数と BLS の両方を入力として使用することで、現行の miRNA 標的予測プログラムの精度向上が期待される。高度に保存された broadly conserved miRNA の標的部位は、高い確率でハプロ不全遺伝子であった。これは、miRNA の生物学的機能を理解する上で、単純な標的 mRNA の抑制程度の解析のみならず、標的遺伝子の特性を踏まえることの重要性を示唆している。

【結語】

SLE の病態における miR-128-3p および miR-148a-3p の発現異常の重要性と、複数の miRNA による制御様式の多様性、miRNA の標的部位の進化的特徴との関係性を明らかにした。

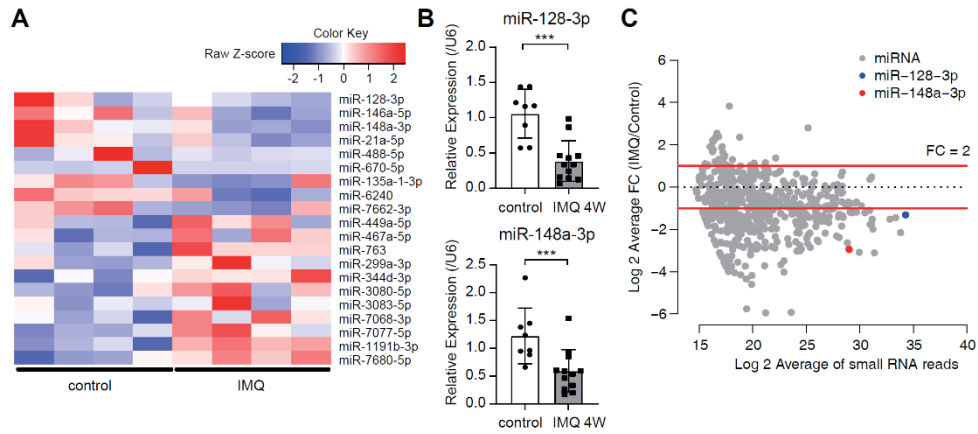


Figure 1. IMQ 誘発 SLE マウスモデルにおける脾臓 pDC での miR-128-3p および miR-148a-3p の発現低下

- A. コントロールマウスおよび IMQ マウス (IMQ 投与後 4 週) の pDC における miRNA マイクロアレイの結果 (N = 4/群、fold change > 1.5)。カラースケールは各行で正規化した。
- B. A で同定した miRNA の発現変化の qRT-PCR による検証。
 平均値±SD (N = 8-12, **P < 0.01, ***P < 0.001, two-tailed Wilcoxon rank sum test)
- C. コントロールマウスおよび IMQ マウス (IMQ 投与後 4 週) の pDC における small RNA-seq 解析 (N = 3/群)。miRNA の発現変動と平均発現レベルを示す。

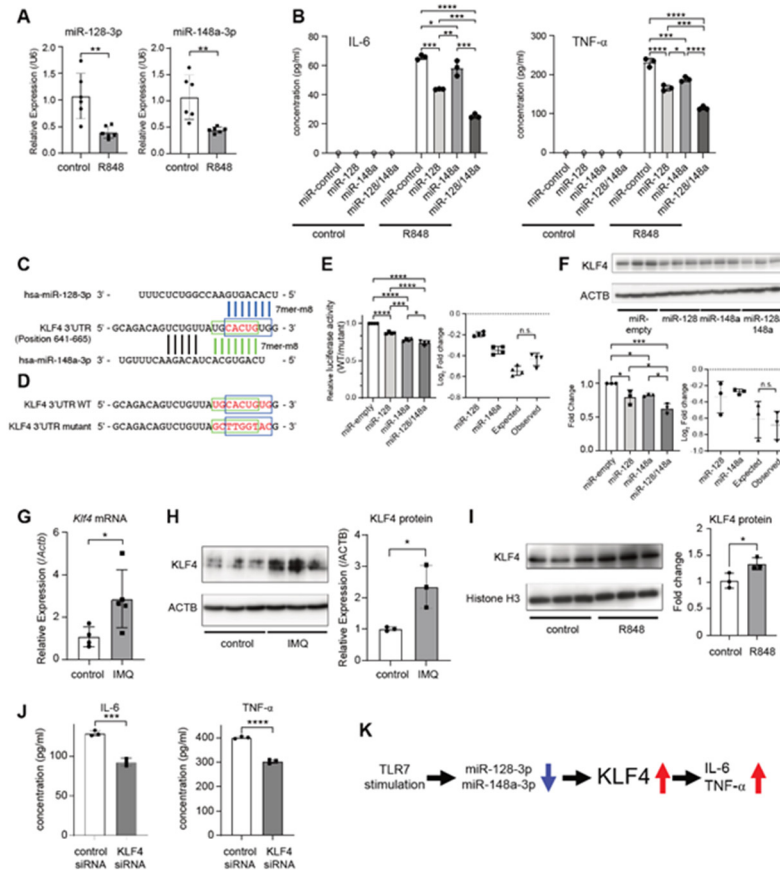


Figure 2. miR-128-3p と miR-148a-3p による KLF4 の抑制を介した炎症反応の制御

- A. R848 による 72 時間刺激後の CAL-1 細胞における miR-128 および miR-148a の発現量の変化 (N = 6, **P < 0.01, two-tailed Wilcoxon rank sum test)。
- B. CAL-1 細胞における R848 誘導性サイトカイン産生に対する miRNA の導入の影響。miRNA 導入後 R848 で 24 時間刺激し、上清中の IL-6 (左) および TNF- α (右) 濃度を ELISA で測定した (コントロール: N = 1, R848: N = 3, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001, one-way ANOVA and post hoc Tukey test)。
- C. KLF4 3' UTR における miR-128、miR-148a の結合部位の推定。各 miRNA に対して相補的な部位は長方形で示されている (青: miR-128, 緑: miR-148a)。重複する標的配列は赤でハイライトされている。
- D. Luciferase Reporter Assay に使用した KLF4 3' UTR の標的部位の野生型 (WT) 配列および変異型配列。
- E. KLF4 3' UTR に対する miR-128 と miR-148a の過剰発現の影響。HeLa 細胞において Luciferase Reporter Assay を実施し、WT 3' UTR の Luciferase 活性を変異型 3' UTR の活性で正規化し、相対的活性を産出した (左)。右は、相加作用 (log₂-additive) を考慮した場合の予想される抑制の程度 (log₂ fold change) と観察された抑制の程度の比較を示す。平均値 \pm SD。各ドットは、4 つの独立した実験における 5 つの biological replicate の平均値を表す (*P < 0.05, ***P < 0.001, ****P < 0.0001, one-way ANOVA and post hoc Tukey test (左), n.s.; not significant, two-tailed Wilcoxon rank sum test (右))。
- F. HeLa 細胞における miR-128 および miR-148a の過剰発現下での KLF4 の Western blot 解析。右下は、相加作用 (log₂-additive) を考慮した場合の予想される抑制の程度 (log₂ fold change) と観察された抑制の程度の比較を示す。各ドットは、3 つの独立した実験における biological triplicate の平均値を表す (*P < 0.05, ***P < 0.001, one-way ANOVA and post hoc Tukey test (左下), n.s.; not significant, two-tailed Wilcoxon rank sum test (右下))。
- G. IMQ マウスおよびコントロールマウス (IMQ 投与後 4 週) の pDC における Klf4 mRNA の qRT-PCR 解析。平均値 \pm SD (コントロール: N = 4, IMQ: N = 5, *P < 0.05, two-tailed Wilcoxon rank sum test)。
- H. IMQ マウスおよびコントロールマウス (IMQ 投与後 4 週) の pDC における KLF4 タンパクの Western blot 解析。平均値 \pm SD (N = 3/群, *P < 0.05, two-tailed Student's t-test)。
- I. R848 で 72 時間刺激した CAL-1 細胞における KLF4 タンパクの Western blot 解析。平均値 \pm SD (N = 3/群, *P < 0.05, two-tailed Student's t-test)。
- J. 炎症反応に対する KLF4 ノックダウンの効果。KLF4 ノックダウン後 R848 で 24 時間刺激し、上清中の IL-6 (左) および TNF- α (右) の濃度を ELISA にて測定した。平均値 \pm SD (N = 3/群, ***P < 0.001, ****P < 0.0001, two-tailed Student's t-test)。
- K. pDC における miR-128/148a-KLF4 axis の SLE 病態への寄与。

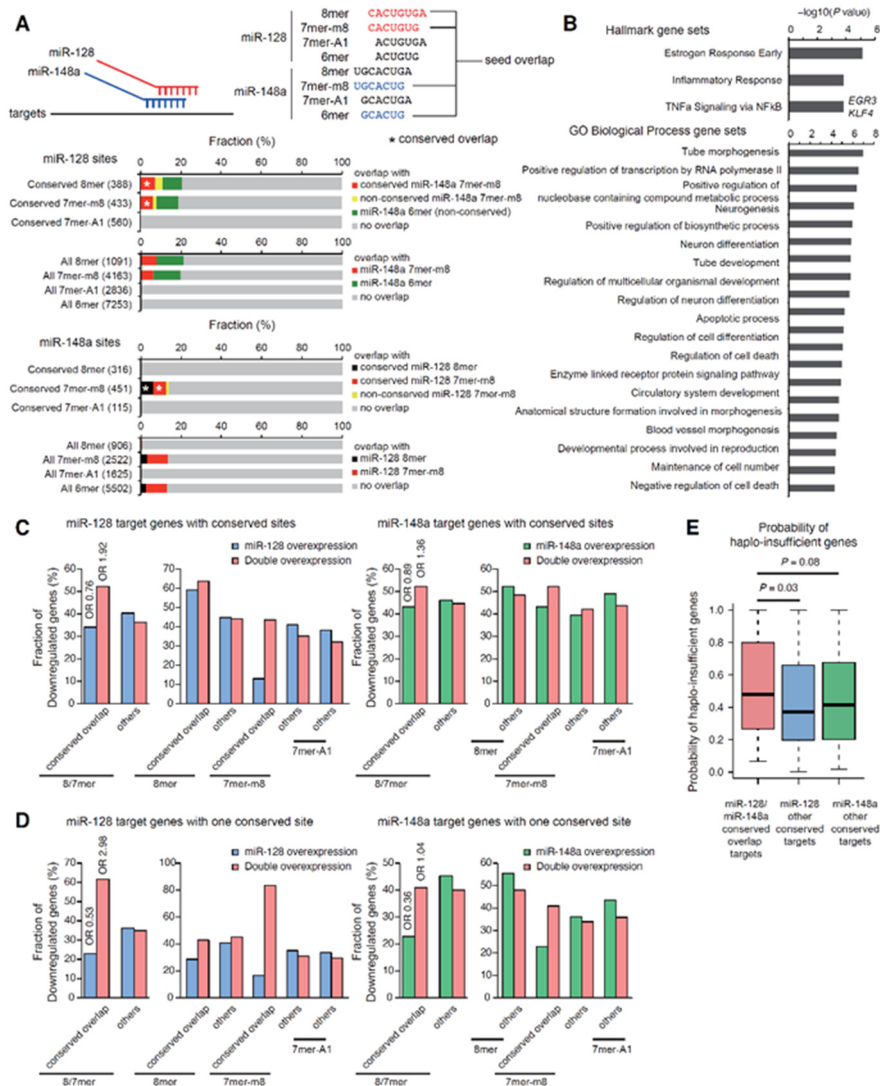


Figure 3. miR-128-3p と miR-148a-3p の過剰発現に対する標的遺伝子の反応性の包括的な解析

- A. miR-128-3p と miR-148a-3p の保存された標的部位（上、conserved site）と全ての標的部位（下）における重複した標的部位の割合。括弧内の数値は標的部位の数を示す。
- B. MSigDB データベースの hallmark 遺伝子セットと Gene Ontology Biological Process 遺伝子セットを用いた conserved overlap site を有する標的遺伝子の enrichment 解析。P 値は hypergeometric test により算出した。
- C, D. シードタイプごとの有意に発現抑制された標的遺伝子の割合。conserved site を持つ全ての標的遺伝子（C）、conserved site が 1 つで non-conserved site を持たない標的遺伝子（D）の結果を示す。また、conserved overlap site を有する標的遺伝子とその他の 8/7mer site を有する標的遺伝子についてのオッズ比を示す。
- E. conserved overlap site を有する標的遺伝子と他の標的遺伝子がハプロ不全遺伝子である確率の検証。P 値は one-tailed Wilcoxon rank sum test により算出した。

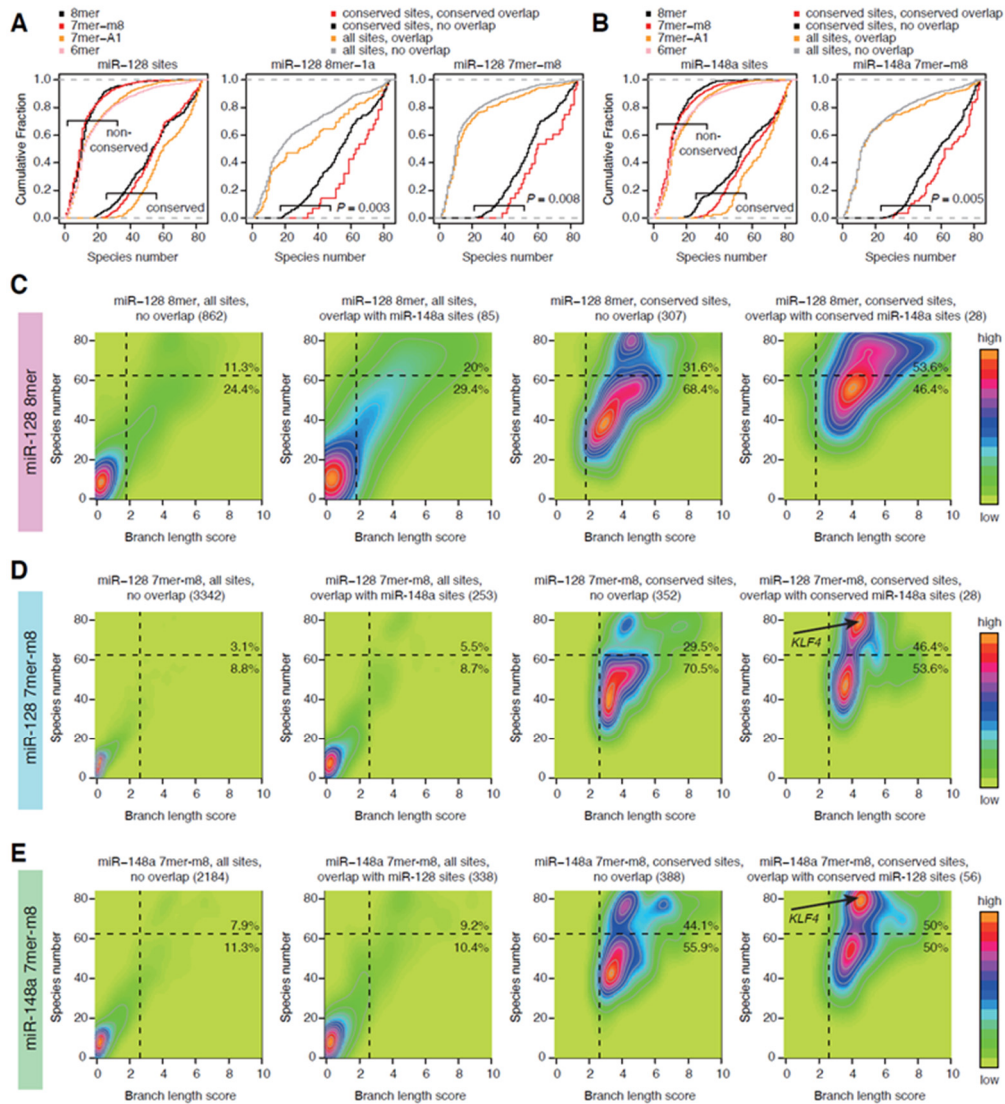


Figure 4. miR-128 と miR-148a の標的部位の進化的保存傾向の検証

A, B. miR-128-3p (A) と miR-148a-3p (B) のそれぞれの標的配列の種類（シード配列の種類）について、標的配列がヒトからシーラカンスまでの 84 種の脊椎動物の内、何種類の生物種で保存されているか、保存されている生物種の数（累積分布）を示す。conserved site と non-conserved site は TargetScan によって定義した。標的部位は Fig3A に従って分類した。P 値は one-tailed Wilcoxon rank sum test により算出した。

C-E. BLS の値と標的部位が保存されている生物種の数（密度プロットおよび等高線プロット）。miR-128-3p 8mer site (C) , miR-128-3p 7mer-m8 site (D) , miR-148a-3p 7mer-m8 site (E) について、左から順に、重複のない全ての標的部位、重複のある全ての標的部位、重複のない保存された標的部位（conserved site）、重複のある保存された標的部位（conserved overlap site）の結果を示す。縦と横の破線は、BLS カットオフ値（8mer は 1.8、7mer-m8 は 2.8）と生物種数の閾値（62）を示す。括弧内の数値は標的部位の数を示す。

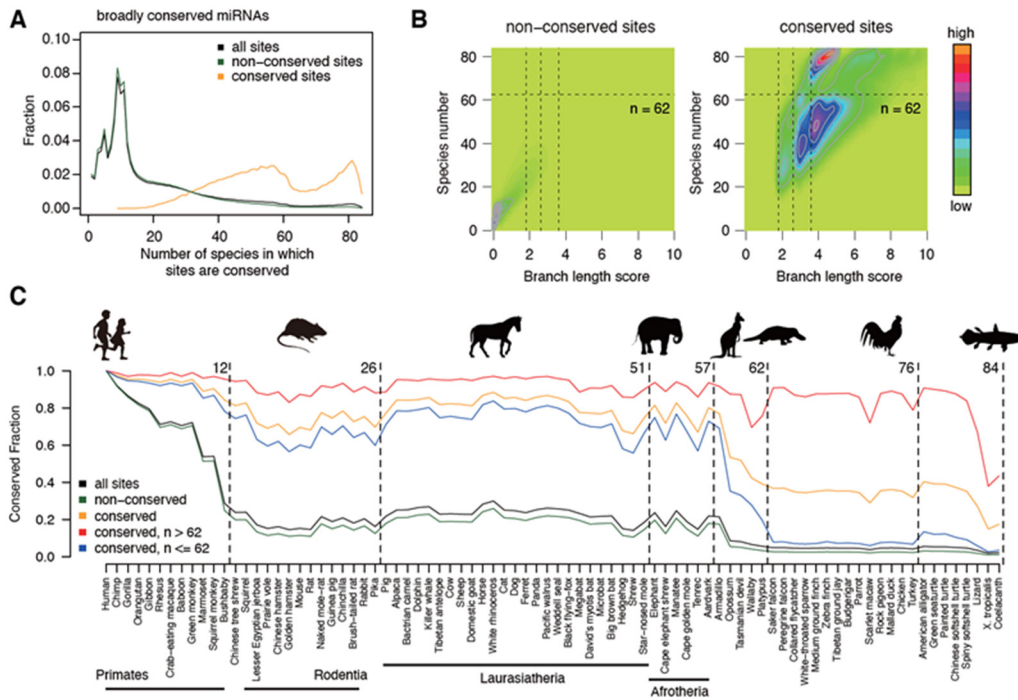


Figure 5. broadly conserved miRNA の標的部位の進化的保存傾向の検証

- 全ての broadly conserved miRNA の non-conserved site と conserved site について、標的部位が保存されている生物種の数と標的部位全体における割合を示す。
- BLS の値と標的部位が保存されている生物種の数分布 (密度プロットおよび等高線プロット)。縦と横の破線は BLS のカットオフ値 (8mer site は 1.8、7mer-m8 site は 2.8、7mer-A1 site は 3.6) と生物種数の閾値 (62) を示す。
- 脊椎動物 84 種における non-conserved site、conserved site、および、conserved site の 2 グループ (生物種数の閾値を $n=62$ とし大別) の生物種ごとの保存パターン。

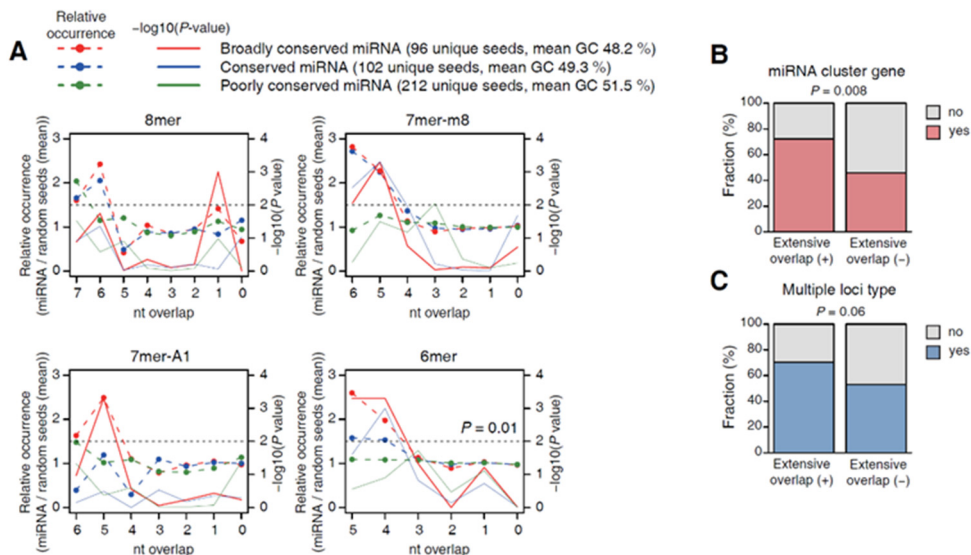


Figure 6. broadly conserved miRNAs 間では高度なシード配列の重複が高頻度に見られる

- broadly conserved miRNAs, conserved miRNAs, poorly conserved miRNAs ごとに、ありうる全ての miRNA のペアとランダムに生成したシード配列のペアを用いて、それぞれのシード配列タイプ (8mer, 7mer-m8, 7mer-A1, 6mer) における最大重複塩基数の相対出現率 (破線)、および、その出現率が偶発的なものかどうかの統計学的有意差 ($-\log_{10}(P \text{ 値})$ 、実線) を算出した。
- B, C. 高度なシード配列の重複が見られる miRNA 遺伝子が、miRNA クラスター遺伝子であるかどうか (B)、および、ゲノム上で複数座に存在するかどうか (C) の検証。P 値は one-tailed Fisher's exact test により算出した。

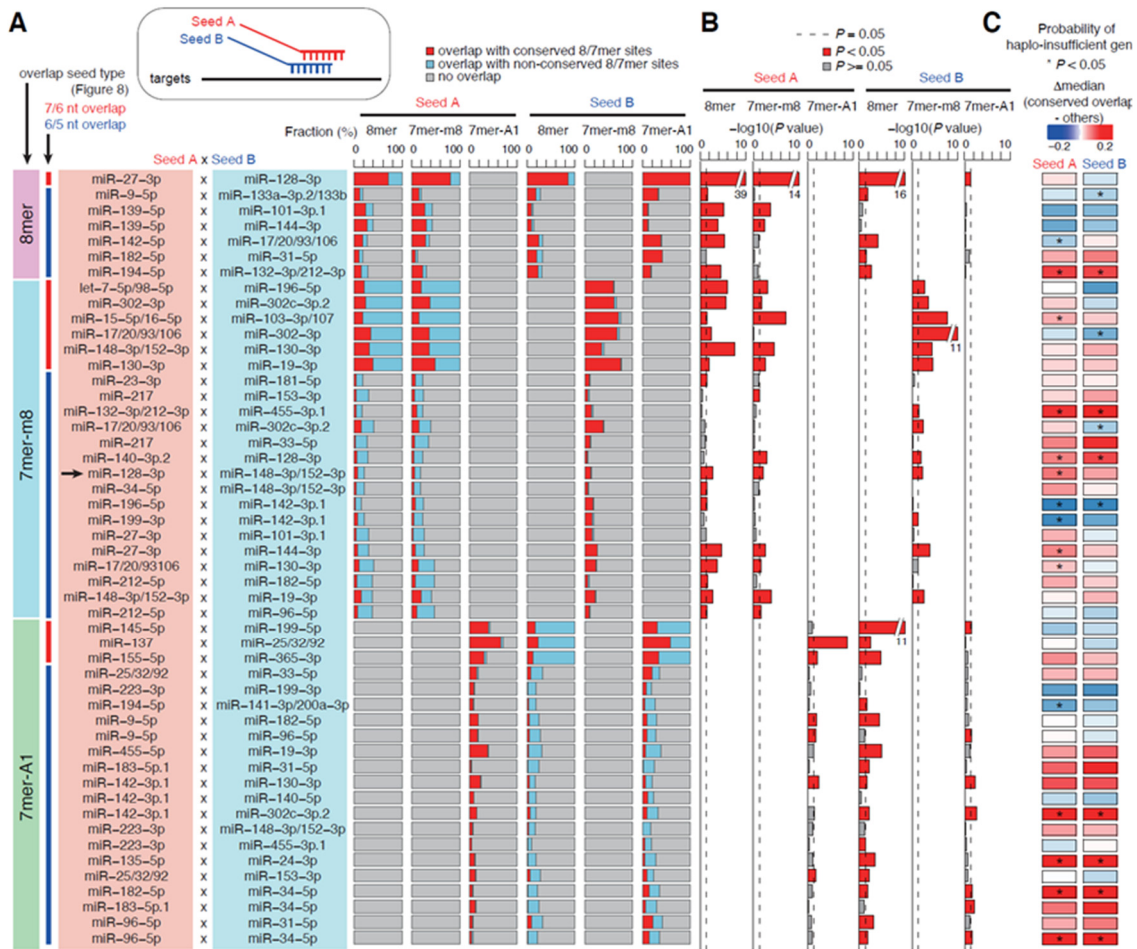


Figure 7. broadly conserved miRNA 間の seed overlap miRNA cotargeting の全体像

- 高度なシード配列の重複がみられる 50 組の miRNA ペアでの、各 miRNA の conserved site に対する conserved overlap site の割合。解析は Fig3A と同様に行った。左側に示すシードタイプと重複塩基数は、Fig. 6 に対応する。水平矢印は、miR-128 と miR-148a のペアを示す。
- conserved overlap site とその他の標的部位の保存度の比較。解析は Fig 4A, B と同様に行い、統計的検証には one-tailed Wilcoxon rank sum test を用いた。
- conserved overlap site とその他の標的部位をもつ標的遺伝子がハプロ不全遺伝子である確率の検証。解析は Fig3E と同様に行い、統計的検証には one-tailed Wilcoxon rank sum test を用いた。

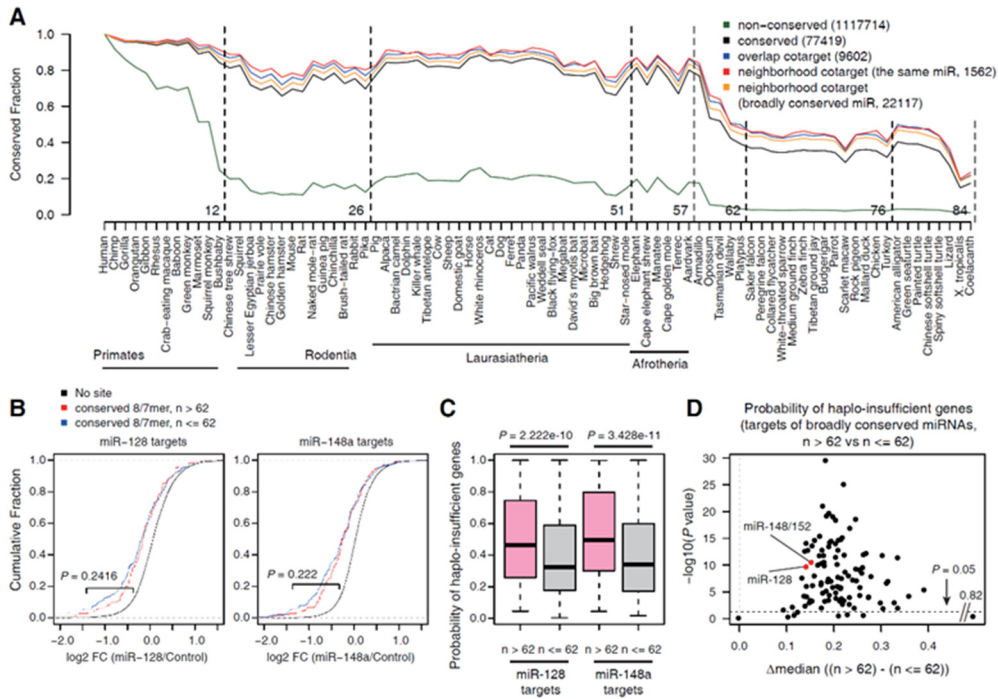


Figure 8. miRNA の保存グループと miRNA cotargeting、RNA 制御、ハプロ不全遺伝子との関連性

- A. 脊椎動物 84 種における、non-conserved site、conserved site、seed overlap cotargeting を示す標的的部位、同一の miRNA による neighborhood cotargeting を示す標的的部位、および、異なる miRNA による neighborhood cotargeting を示す標的的部位の保存パターン。
- B. miR-128-3p (左) および miR-148a-3p (右) の標的部位的保存の程度と標的抑制の関係性。それぞれの miRNA の標的的部位を標的的部位が保存されている生物種の数 (閾値 62) によって分類し、それらの標的的部位を有する標的遺伝子の各 miRNA の過剰発現に対する応答性 (fold change, FC) の累積分布を示す。P 値は one-tailed Wilcoxon rank sum test により算出した。
- C. miR-128-3p (左) および miR-148a-3p (右) の標的部位的保存の程度とハプロ不全遺伝子との関係性。それぞれの miRNA の標的的部位 (保存された 8/7mer site) を標的的部位が保存されている生物種の数 (閾値 62) によって分類し、それらの標的的部位を有する標的遺伝子がハプロ不全遺伝子である確率を比較した。P 値は one-tailed Wilcoxon rank sum test により算出した。
- D. C の解析をすべての broadly conserved miRNA について実施し、その統計学的有意差 (P 値) と 2 つの標的部位的グループの間のハプロ不全遺伝子である確率の差分を示す。P 値は one-tailed Wilcoxon rank sum test により算出した。