



2010年6月14日

独立行政法人理化学研究所

ナノグラムレベルのRNAから遺伝子発現をキャッチする新解析手法を確立

—2つの新たな解析手法がRNAの網羅的な機能解析を促進—

本研究成果のポイント

OnanoCAGE法でナノグラムを解析、CAGEscan法で5′と3′側の両配列を決定
 ○未知のトランスクリプトーム解析や細胞核と細胞質のRNAの比較を実現
 ○ORNAの研究を促進させ、がんの個別診療など医療分野への応用に期待

独立行政法人理化学研究所（野依良治理事長）は、イタリアのSISSA^{*1}（Scuola Internazionale Superiore di Studi Avanzati）と共同で、従来のCAGE法^{*2}の感度を1,000倍以上向上させ、ナノグラムレベル（ng：1ngは 10^{-9} グラム）のmRNAを解析して遺伝子の転写開始点を決定することができるnanoCAGE法と、mRNA鎖の5′末端^{*3}と3′側^{*3}の両方の配列を一度に解析することができるCAGEscan法という2つの高感度な新遺伝子発現解析方法を開発しました。理研オミックス基盤研究領域（OSC、林崎良英領域長）のピエロ・カルニンチチームリーダーとSISSA神経生物学部門のステファノ・グスティンチッチ（Stefano Gustincich）博士らの共同研究による成果です。

nanoCAGE法は、現行のCAGE法などの遺伝子発現解析法がマイクログラムレベル（ μg ：1 μg は 10^{-6} グラム）のRNAの量を必要とするのに対し、ngレベルのRNAの量でも解析できるように設計した技術で、DNAの断片であるプライマー配列の工夫とcDNAの特異的な増幅法の導入によって、CAGE法と比較して1,000倍以上の感度向上を実現しました。このため、単一の細胞に存在している微量なmRNAの5′末端を検出し、関連するプロモーター^{*4}をゲノム上で同定することができます。このことは、個々の細胞内の遺伝子発現がどのように制御されているかを網羅的に知ることで、例えば、神経細胞やがんを発症している細胞などで発現する微量なRNAを解析することを可能にします。

一方CAGEscan法は、nanoCAGE法と同様に微量なmRNAを解析できる上に、次世代シーケンサーの能力を活用し、5′末端とその反対側である3′側の塩基配列の両方を同時に解析できるというメリットがあります。その結果、5′末端が、自分自身やほかのmRNAの3′側の塩基配列に結合する様子を明らかにして、mRNA間の相互作用を理解することができるようになります。

さらに、CAGE法では、すべてのRNAを逆転写した後、mRNAだけを分離する必要があるため、解析終了までに約5日の日数を費やしますが、nanoCAGE法とCAGEscan法は、mRNAだけを逆転写することができるため、解析に要する時間を2～3日と短縮することができます。

両手法を導入することで、研究グループが「RNA新大陸^{*5}」と名付けた全遺伝子の半分以上を占めるncRNA^{*6}に関する知見を増やし、これまで、ほとんど不明確なまま取り残されてきたRNAの理解が飛躍的に向上すると期待できます。

この成果は、英国の科学雑誌『Nature Method』の7月号に掲載されるに先立ち、オンライン版（6月13日付：日本時間6月14日）に掲載されました。

1. 背景

研究グループは、ヒトをはじめとするほ乳類のゲノム解読の結果を基に、従来 100 個ぐらいしか知られていなかった ncRNA が、実は 23,000 個以上、つまり、全遺伝子の半分以上 (53%) を占めているという新しい事実が明らかにしてきました (2005 年 9 月 2 日プレス発表 :

<http://www.riken.jp/r-world/info/release/press/2005/050902/index.html>)。「RNA 新大陸」と名付けたこの発見は、タンパク質に翻訳されない膨大な RNA の重要性を明らかにしたもので、転写産物全体が織り成すネットワークの複雑さを再認識させるものでした。

この発見に研究グループが用いた独自技術の CAGE 法では、まず、転写された RNA (mRNA、rRNA、tRNA、ncRNA など) を逆転写後、mRNA だけを分離・増幅して cDNA ライブラリーを作製します。次に、先頭部分 (Cap サイト) である 5' 末端の 20~27 塩基を切り出し、その配列を次世代シーケンサーで解析します。この解析結果をゲノム配列と比較することで、ゲノム上の転写開始点を正確に同定することができますと同時に、その転写開始点ごとの発現量をほぼ定量的に計測することもできます。しかし、CAGE 法で解析するには、 μg レベルの RNA 量が必要になるとともに、5' 末端の反対側である 3' 側の塩基配列を解析することができないため、全 RNA を網羅的に解析するためには不十分でした。

2. 研究手法

研究グループは、CAGE 法の解析能力の向上を図り、ng レベルの量の RNA の解析と 3' 側の塩基配列の同時解析、さらに解析スピードの向上を目指しました。

具体的には、rRNA や tRNA などを含めたすべての種類の RNA のうち、mRNA からの cDNA だけを特異的に逆転写することが可能な Template switch 法 (図 1) と、この方法で逆転写した cDNA だけを増幅する Semisuppressive 法 (図 2) を導入しました。その結果、ng レベルという非常に少ない量の mRNA から 5' 末端の 27 塩基のタグ配列を切り出し、次世代シーケンサーを用いて大規模に転写開始点を決定することができる nanoCAGE 法の開発に成功しました (図 3)。

さらに、次世代シーケンサーの解析能力の向上にあわせて 150 塩基以上の cDNA ライブラリーを作製し、CAGEscan 法を確立しました (図 4)。5' 末端と同時に 3' 側の塩基配列も解析できるようになり、着目した mRNA がどの遺伝子のどの領域に結合しているかを解析できるようになりました。

3. 研究成果

研究グループは、ヒト白血病 K562 細胞に nanoCAGE 法を適用し、約 100~500ng という微量ではあるものの、核内にある核小体、核細胞質、染色体や rRNA の構成要素であり、mRNA の末端を意味する polyA テール^{*7}を持たないポリソーム RNA^{*8} などの転写開始点を調べることに成功しました。このように、これまで未知であった部分の RNA という転写産物全体の解析が可能となるだけでなく、生命の維持活動に欠かせない神経細胞などが産出する微量な mRNA の機能も解析できるようになりました。

また、CAGEscan 法を使って、ヒト肝細胞がん Hep G2 細胞の細胞核と細胞質にある mRNA を解析したところ、細胞核内にある mRNA は細胞質にある mRNA に比べ、タンパク質に翻訳されないゲノム領域と多く結合していることが明らかになりました。このことは、細胞核内ではタンパク質翻訳以外の機能を持つゲノム領域も重要な役割を果たしていることを意味します。

これらの 2 つの新手法を用いることにより、発見されたばかりで謎の多い RNA 新大陸がもたらす生体内のメカニズムをより深く理解することができると考えています。

4. 今後の期待

nanoCAGE 法は mRNA を特異的に増幅するため、これまで解析できなかった微量な mRNA を容易に解析できるようになります。一方 CAGEscan 法は、mRNA の両側の配列情報を明らかにするため、mRNA 間の相互作用が明らかになり、例えば、ヒトのがん細胞など無秩序な増殖のメカニズム解明に貢献すると期待されます。

今後、これらの 2 つの新たな生物学的解析方法を駆使すると、RNA の制御メカニズムに関する詳細な研究を展開することができるようになるとともに、将来的には、がんに対する個別診療など、医療分野への応用に貢献する手法になると考えています。

<報道担当・問い合わせ先>

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所

オミックス基盤研究領域 ゲノム機能研究チーム

チームリーダー Piero Carninci (ピエロ・カルニンチ)

TEL : 045-503-9222 FAX : 045-503-9216

横浜研究推進部 企画課

TEL : 045-503-9117 FAX : 045-503-9113

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室 報道担当

TEL : 048-467-9272 FAX : 048-462-4715

<補足説明>

※1 SISSA

イタリアにおける代表的な研究機関 (Scuola Internazionale Superiore di Studi Avanzati) で、国際的にも著名な機関。大学院レベルの研究に特化。物理学、数学、神経学分野で最先端の研究を行っている。また、イタリアで最初に博士号を授与した教育機関でもあり、注目すべき多大な成果をあげている。1978年の創立以来、数多くの博士を研究および教育分野に輩出している。

※2 CAGE 法

Cap Analysis of Gene Expression の略。理研オミックス基盤研究領域が開発した方法で、耐熱性逆転写酵素や cap-trapper 法を組み合わせ、5′ 末端から 20 塩基のタグ配列を切り出し、塩基配列を決定する実験技法。この塩基配列を読み取ってゲノム配列と照らし合わせ、どの部分がコピーされているかを調べることができる。

※3 5′末端、3′側

DNA、RNA は塩基の糖の部分の 5′側から 3′側に向かって合成が進み、mRNA の 5′ 末端の塩基には CAP 構造が、3′末端の塩基には例外を除いてほとんどの場合 polyA テール配列が付加されている。ここでいう 3′側とは、この polyA テールを除いた塩基配列の部分を指す。

※4 プロモーター

mRNA 合成の開始に関与する DNA 上の特定領域の短い塩基配列のこと。プロモーター領域に RNA を合成する酵素である RNA ポリメラーゼが結合し、転写が開始される。

※5 RNA 新大陸

多様な細胞内 RNA 集団の莫大（ばくだい）な可能性を示す比喩的表現。2005 年 9 月 2 日のプレス発表で、遺伝子の定義を新たに提案した際に用いた新用語。細胞が生産する RNA に関し、今までにない大規模なスケールで調べたところ、従来 100 個ぐらいしか知られていなかった ncRNA が、実は 23,000 個以上、つまり、全遺伝子の半分以上（53%）を占めているという新しい事実を示したものだ。このことは、タンパク質がゲノムにコードされている最終生理活性物質であるというこれまでの常識を覆し、予想を凌ぐトランスクリプトームの複雑さを認識させるもので、ほ乳動物ゲノムの情報内容に対するこれまでの理解（「遺伝子」という領域が散在しているゲノムのイメージ）を根幹から変えてしまうものだった。

※6 ncRNA

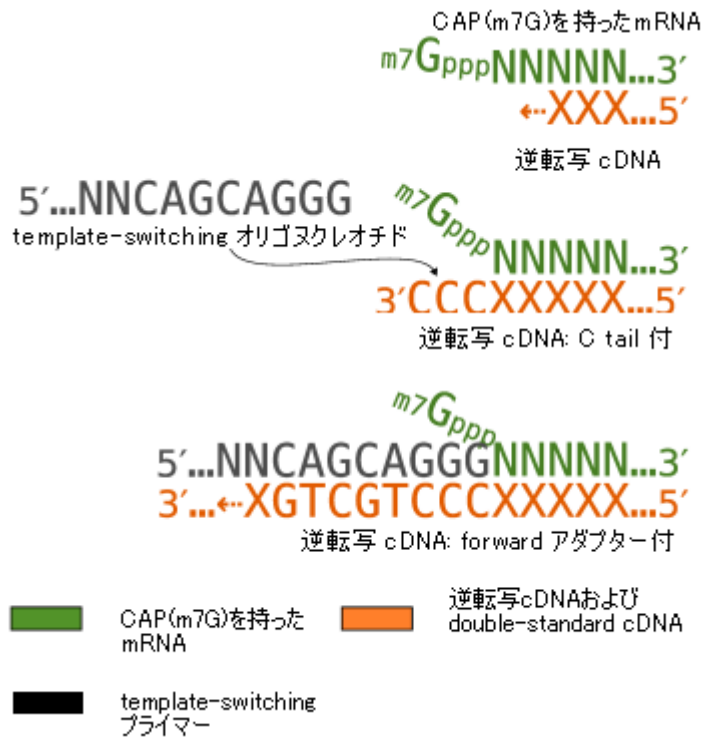
非タンパク質コード RNA (non-coding RNA) のことで、この RNA からはタンパク質は翻訳されない。

※7 polyA テール

mRNA の 3′末端に 50~200 塩基ほどのアデニン (A)ヌクレオチドが付加されており、これを polyA テールと呼ぶ。mRNA に安定性を与え、翻訳を促進する働きがあると考えられている。

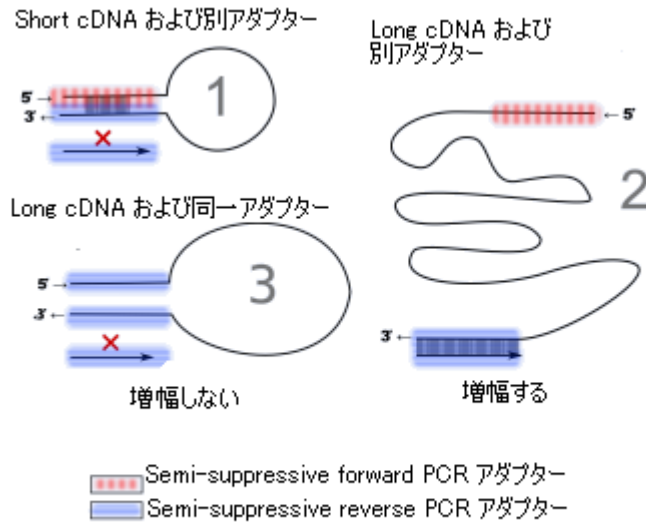
※8 ポリソーム RNA

リボソームは転写されている mRNA に速やかに集まり翻訳を開始する。一本の mRNA に複数のリボソームが連結した状態をポリソーム (polysome) と呼ぶ。



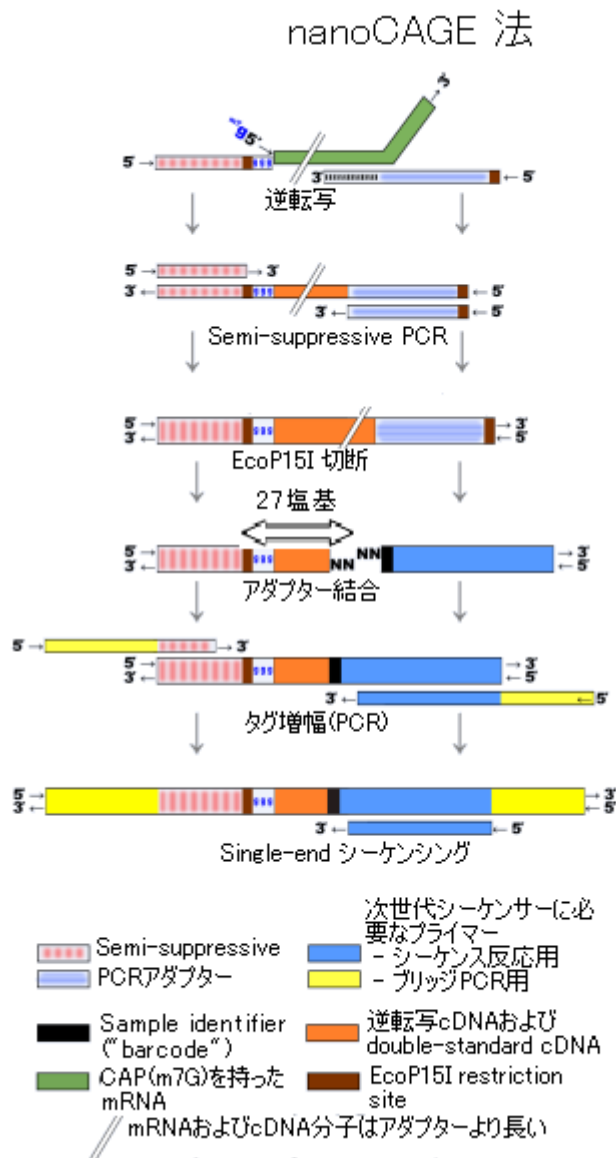
(図 1) Template switching 法

5'末端に CAP (m7G) を持った mRNA (緑) が逆転写反応を起こして cDNA (オレンジ) に逆転写される時(上)、逆転写酵素は CAP と相補鎖のシトシン (C) を付加する(中)。それぞれの cDNA の 5'末端に付加されたシトシンは、リボグアノシン (G) という CAP と疑似的な配列を持つ template-switching プライマー (黒) と相補鎖を作るため、cDNA の両末端は違う配列が増幅される(下)。この時点では長さの調整はできず、150 塩基以下の短いものも、それ以上の長いものも逆転写される。長さの調整は図 2 の Template switching で行われる。



(図 2) Semisuppressive PCR 反応

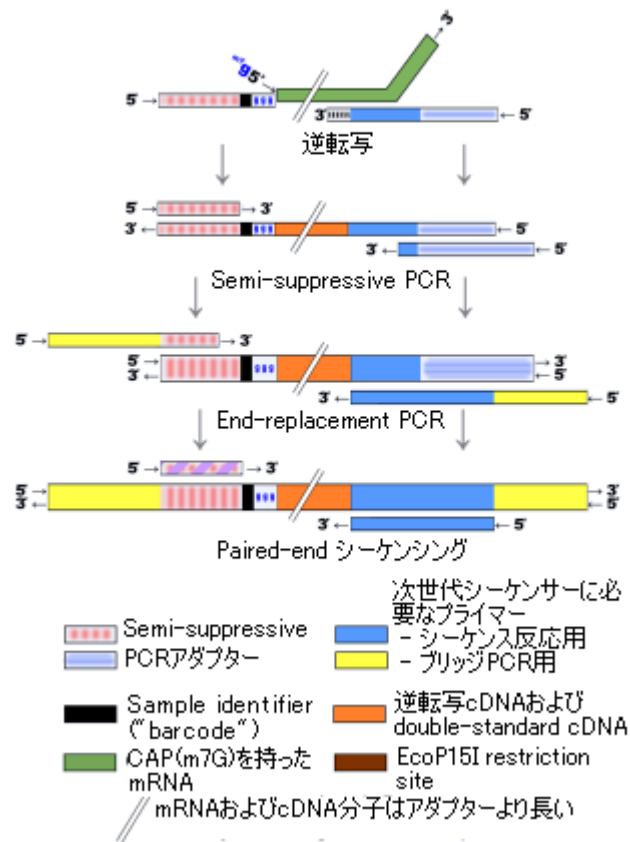
150 塩基以下の短い cDNA テンプレートは、末端の塩基同士が容易に相補鎖を形成するため(1)、プライマーが cDNA テンプレートと相補鎖を形成できず PCR 反応が進まない。また、150 塩基以上の cDNA テンプレートでも、逆転写反応中に両末端が template-switching オリゴヌクレオチドに置換されてしまったもの(3)はプライマーが相補鎖を形成できず、PCR 反応が進まない。template-switching 法で相補鎖を形成した cDNA テンプレート(逆転写反応で末端が別々のプライマーに置換された 150 塩基以上の cDNA テンプレート)だけが PCR 反応で増幅される(2)。



(図 3) nanoCAGE 法

Template switching 反応と Semisuppressive PCR 反応後、EcoP15I 酵素で切断した 27 塩基のタグに、次世代シーケンサー Illumina Genome Analyzer Single read kit で配列を読むためのアダプターとプライマーを付加し、解析する。

CAGEscan 法



(図 4) CAGEscan 法

nanoCAGE 法と同様、Template switching 反応と Semisuppressive PCR 反応を行う。その後、EcoP15I 酵素で切断することなく、次世代シーケンサーIllumina Genome Analyzer Paired End kit で、5'末端と 3'側の両方を解析する。