第 70 回日本電気泳動学会シンポジウム：電気泳動によって解き明かされる生命現象
論文種目：総合論文

二本鎖 RNA 結合タンパク質が結合する
マイクロ RNA 初期転写産物の構造的特徴の解析

樋口琢磨¹・Rosemary Kiernan^{2*}・坂本修士^{1*}

¹ 高知大学総合研究センター実験実習機器施設・RI 実験施設・分子生物学教室

² Institute of Human Genetics, University of Montpellier

(受付 2020 年 12 月 28 日, 受理 2021 年 2 月 17 日)

SUMMARY

MicroRNAs (miRNA) are non-coding small RNAs that function as a suppressor for gene expression by binding to the 3' untranslated region (3'UTR) of target messenger RNAs. We previously reported that Nuclear Factor 90 (NF90) and NF45 complex, a double-stranded RNA-binding protein, plays a negative regulator in miRNA biogenesis through a binding to primary miRNAs (pri-miRNAs) which are initially transcribed from miRNA gene. However, a common secondary structure of the NF90-targeted pri-miRNAs are still unclear. In this study, we attempted to characterize the structure of NF90 binding pri-miRNAs by informatics analysis and RNA-electrophoretic mobility shift assay (RNA-EMSA). We used genome-wide approaches including ENCODE and small RNA-seq to identify pri-miRNAs that are associated with NF90. As a result, we found that NF90-targeted pri-miRNAs are highly stable, having a lower free energy and fewer mismatches compared to all pri-miRNAs. To confirm this, we performed RNA-EMSA probed with mutated pri-miRNAs. Pri-miR-3173 and pri-miR-186, the NF90-targeted pri-miRNA, were mutated to unstable structure by making bulges in the stem structure, whereas pri-miR-200a, which exhibits low affinity to NF90, was changed to more stable structure by forming long duplex in the stem. Consequently, we found that the mutated pri-miR-3173 and pri-miR-186 lead to a reduction in binding activity of NF90 to the pri-miRNAs. On the other hand, the binding affinity of NF90 to pri-miR-200a was dramatically elevated by forming the long duplex in the structure. These results suggest that NF90 preferentially binds pri-miRNAs having less mismatches and highly stable stem structure.

Key words: Nuclear Factor 90, miRNA biogenesis, RNA binding protein, secondary structure of RNA, RNA-EMSA

はじめに

機能性小分子 RNA であるマイクロ RNA (miRNA) は、相補的または一部相補的なメッセンジャー RNA (mRNA) に結合することで、翻訳抑制を引き起こす。miRNA はその機能を通じて、細胞における様々な遺伝子発現制御を介して生理的機能の調節を担っている。また miRNA の異常な発現変化は、様々な疾患の発症・増悪化に関与することが示唆されている。特にがんにおいては、がん遺伝子を

標的とするがん抑制 miRNA (anti-oncogenic miRNA, anti-oncomiR) の産生低下が報告されており、miRNA は新たな医療標的やバイオマーカーとしても着目されている。従って、がんをはじめ様々な疾患における miRNA の発現変動機構の解明は、各疾患の発症・増悪化の機序を明らかにする上で非常に重要な課題となっている。miRNA は通常、下記の一連の経路を経て生合成される。①ゲノムから転写され初期転写産物である primary-miRNA (pri-miRNA) を形成、② pri-miRNA は核内において Drosha/DGCR8 に

Characteristic analysis of a secondary structure of primary microRNA bound to a double-strand RNA-binding protein, NF90
Takuma Higuchi¹, Rosemary Kiernan², Shuji Sakamoto¹

¹ Laboratory of Molecular Biology, Science Research Center, Kochi Medical School, Kochi University; and ² Institute of Human Genetics, University of Montpellier

* Corresponding authors: Shuji Sakamoto and Rosemary Kiernan; Laboratory of Molecular Biology, Science Research Center, Kochi Medical School, Kochi University, Oko-cho, Kohasu, Nankoku, Kochi 783-8505, Japan; and Institute of Human Genetics, University of Montpellier, 141 rue de la Cardonille Montpellier, 34396, France
E-mail: sshuji@kochi-u.ac.jp, rosemary.kiernan@igh.cnrs.fr

第70回日本電気泳動学会シンポジウム：電気泳動によって解き明かされる生命現象

Fig. 1 Proposed mechanism of miRNA biogenesis negatively regulated by NF90-NF45

よるプロセッシングを受け前駆体の precursor-miRNA (pre-miRNA) へと変化, ③ pre-miRNA は Exportin-5 を介して核外に移行, ④細胞質で pre-miRNA は Dicer によるプロセッシングを受け, miRNA duplex を形成, ⑤ miRNA duplex は RNA-induced silencing complex (RISC) に取り込まれた後にパッセンジャー鎖が外れ, 一本鎖の成熟型 miRNA を形成. 上記の①～⑤のステップでそれぞれに miRNA の産生調節機構が存在し, 特にステップ②の核内における調節に関しては RNA 結合タンパク質が重要な役割を果たしていることが明らかとなっている^{1,2)}.

我々の研究チームではこれまで, 二本鎖 RNA 結合タンパク質である Nuclear Factor 90 (NF90, ILF3, NFAR1) が結合パートナーである NF45 と複合体 (NF90-NF45) を形成し, pri-miRNA への結合を介して Drosha/DGCR8 のプロセッシングを阻害することで, 複数の miRNA の生合成経路を負に制御することを見出してきた (Fig. 1)³⁾. 我々は, NF90 がヒトでは let-7a および miR-30³⁾, miR-7⁴⁾, miR-3173⁵⁾, マウスでは miR-133a/b および miR-1⁶⁾ の生合成を抑制することを見出しているが, これらの pri-miRNA には配列的相同性は確認されない. 他の研究チームからは NF90 が mRNA の AU-rich motif に結合することが報告されているが⁷⁾, NF90 が結合する pri-miRNA には AU-rich motif は共通して存在しない. これらの知見から我々は, NF90 と pri-miRNA の結合では, mRNA の AU-rich motif への結合とは異なり, pri-miRNA の構造特異的に結合するのではないかと想定した. そこで, 本研究において我々は, NF90 が優先的に結合する pri-miRNA の構造的特徴を同定するため, ENCODE Database の eCLIP-seq データを用いたインフォマティクス解析および RNA-Electrophoretic Mobility Shift Assay (RNA-EMSA) によりその検証を行った⁸⁾.

Fig. 2 RNA-EMSA performed using recombinant NF90 and probed with NF90-targeted pri-miRNAs⁸⁾

NF90 が結合する pri-miRNA の網羅的探索

今回我々はフランス・モンペリエ大学との共同研究を通して, NF90 が結合する pri-miRNA の網羅的探索を実施した. まず, ChIP-seq や RIP-seq 等の解析結果が登録されているデータベースである ENCODE (<https://www.encodeproject.org>) から, NF90 に結合する RNA を網羅的に解析した eCLIP-seq のデータを取得し, NF90 が結合する pri-miRNA を探索した. 次に, NF90 をノックダウンした培養細胞において発現増加する miRNA, つまり NF90 によって産生阻害を受けている miRNA を small RNA seq により網羅的に同定した. 2つの網羅的解析の結果を統合し, NF90 による結合を介してプロセッシングが抑制される可能性のある pri-miRNA を 22 個同定した. 次に, 得られた候補 pri-miRNA が実際に NF90 と直接結合するか否かを検証するため, 放射性同位体で標識した候補 pri-miRNA プローブ 4 種類とリコンビナント NF90 タンパク質による RNA-EMSA を実施した. その結果, ネガティブコントロール (前述の網羅解析でヒットしなかった pri-miRNA) である pri-miR-200a と比較し, 候補である pri-miR-186, -1273c, -3189, および -3173 は NF90 によるシフトバンドが強く検出された (Fig. 2). この結果から, 前述の網羅的解析で探索した候補 pri-miRNA は NF90 と強く結合することが示唆された.

NF90 が優先的に結合する pri-miRNA の構造的特徴の同定

前述の網羅的解析の結果から, NF90 が結合する可能性のある複数の候補 pri-miRNA 配列を得ることができた. 次に, 候補 pri-miRNA の構造的特徴を同定するため, RNA 二次構造予測ソフトウェアである RNAfold (

Fig. 3 RNA-EMSA carried out using recombinant NF90 and probed with wild-type (WT) or mutated pri-miRNAs as indicated⁸⁾

rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi) を用いて、得られた候補 pri-miRNA 配列内部のステムループ構造部分 (pre-miRNA) の二次構造予測を実施した。得られた RNA 二次構造より構造的特徴を探索した結果、現在 miRbase に登録されているヒトの全 pri-miRNA と比較し、NF90 が結合する候補 pri-miRNA では形成する二本鎖領域 (ミスマッチが 1 塩基以下のステム構造) が長いことが判明した (全 pri-miRNA の平均が 21.11 塩基なのに対して、候補 pri-miRNA は 27.68 塩基)⁸⁾。また、ステムループ構造の自由エネルギー値 (RNAfold による解析で得られる) を比較すると、ヒト全 pri-miRNA の平均が -38.19 kcal/mol であるのに対し、NF90 が結合する候補 pri-miRNA では平均 -42.26 kcal/mol と低くなっていることも明らかとなった⁸⁾。これらの結果から、NF90 は「ミスマッチによるバルジが少なく、長いステム構造」を有する pri-miRNA に優先的に結合する可能性が示唆された。この仮説を実証するため、前述の RNA-EMSA で用いた pri-miRNA に対して変異を導入し、ミスマッチの有無およびステム構造の長さを変化させたプローブを作製した。得られた変異 pri-miRNA と野生型 pri-miRNA において NF90 に対する結合活性が変化するか否かを検証するため、再度 RNA-EMSA を実施した。まず、NF90 と高い結合活性を示す候補 pri-miRNA に対しては、ミスマッチを増やしステム構造が短くなるような変異を導入し RNA-EMSA を行った。pri-miR-3173 では、野生型プローブと比較して

ム構造が短い変異プローブでは NF90 に対する結合性が大幅に減少することが明らかとなった (Fig. 3 lanes 2, 4 and 6)。また同様に候補 pri-miRNA である pri-miR-186 に対しても、ミスマッチを増やすような複数の変異を導入することで、NF90 との結合を示すシフトバンドの検出強度の減少が認められた (Fig. 3 lanes 8, 10 and 12)。一方で、NF90 の結合性が低い pri-miR-200a に対してミスマッチを減らしステム構造が長くなるように変異を導入したプローブで検証した結果、野生型 pri-miR-200a プローブを用いた場合と比較し、ステム構造が長い変異プローブでは NF90 の結合量が顕著に増加した (Fig. 3, lanes 14 and 16)。以上の結果より、NF90 は「ミスマッチが少なく自由エネルギーの低い安定なステム構造」を有する pri-miRNA に優先的に結合し、miRNA 生合成経路を負に制御する可能性が示唆された⁸⁾。

おわりに

今回の解析より、NF90 が優先的に結合する pri-miRNA の構造的特徴の一端が明らかになった。NF90 は肝細胞がん、乳がん、肺がんなど様々な組織由来のがん部において発現増加が報告されており、発がんやがんの悪性化に関与する可能性が示唆されている。我々はこれまでに、肝細胞がんにおいて NF90-NF45 が anti-oncomiR である miR-7 の生合成を負に制御することを報告している⁴⁾。miR-7 の pri-miRNA である pri-miR-7-1 は「NF90 が優先的に結合す

る pri-miRNA の構造的特徴 (ミスマッチの少ない安定な長いステム構造)」を有することが RNA fold による 2 次構造予測で示されており、この知見は、本研究により明らかにした「NF90 が優先的にミスマッチの少ない安定で長いステム構造に結合する」という結論と一致する。今後は、RNA のメチル化等のエピトランスクリプトームによる「RNA 二次構造変化」が NF90 による miRNA 生合成制御機構に影響を与えるか否かについて検証する予定である。

謝 辞

この度は、歴史ある日本電気泳動学会シンポジウムにて講演させていただく機会を頂き大変感謝しております。電気泳動学会の皆様へ厚く御礼申し上げます。また、本講演のお誘いを下さいましたオーガナイザーである香川大学杉山康憲先生にもこの場をお借りしてお礼申し上げます。

本研究は、フランス・モンペリエ大学の Rosemary Kiernan 先生の研究チームとの共同で実施いたしました。また、今回実施した標識プローブの作製および RNA-EMSA は、高知大学総合研究センター実験実習機器施設・RI 実験施設の設置機器を使用して実施しました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

本論文に関して開示すべき利益相反状態はありません。

文 献

- 1) Treiber T, Treiber N, Meister G. Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20:5–20.
- 2) Michlewski G, Cáceres JF. Post-transcriptional control of miRNA biogenesis. *RNA.* 2019;25:1–16.
- 3) Sakamoto S, Aoki K, Higuchi T, Todaka H, Morisawa K, Tamaki N, Hatano E, Fukushima A, Taniguchi T, Agata Y. The NF90-NF45 complex functions as a negative regulator in the microRNA processing pathway. *Mol Cell Biol.* 2009;29:3754–3769.
- 4) Higuchi T, Todaka H, Sugiyama Y, Ono M, Tamaki N, Hatano E, Takezaki Y, Hanazaki K, Miwa T, Lai S, Morisawa K, Tsuda M, Taniguchi T, Sakamoto S. Suppression of microRNA-7 (miR-7) biogenesis by Nuclear Factor 90-Nuclear Factor 45 complex (NF90-NF45) controls cell proliferation in hepatocellular carcinoma. *J Biol Chem.* 2016;291:21074–21084.
- 5) Barbier J, Chen X, Sanchez G, Cai M, Helsmoortel M, Higuchi T, Giraud P, Contreras X, Yuan G, Feng Z, Nait-Saidi R, Deas O, Bluy L, Judde JG, Rouquier S, Ritchie W, Sakamoto S, Xie D, Kiernan R. An NF90/NF110-mediated feedback amplification loop regulates dicer expression and controls ovarian carcinoma progression. *Cell Res.* 2018;28:556–571.
- 6) Todaka H, Higuchi T, Yagyu K, Sugiyama Y, Yamaguchi F, Morisawa K, Ono M, Fukushima A, Tsuda M, Taniguchi T, Sakamoto S. Overexpression of NF90-NF45 represses myogenic microRNA biogenesis, resulting in development of skeletal muscle atrophy and centronuclear muscle fibers. *Mol Cell Biol.* 2015;35:2295–2308.
- 7) Kuwano Y, Pullmann R, Marasa BS, Abdelmohsen K, Lee EK, Yang X, Martindale JL, Zhan M, Gorospe M. NF90 selectively represses the translation of target mRNAs bearing an AU-rich signature motif. *Nucleic Acids Res.* 2010;38:225–238.
- 8) Grasso G, Higuchi T, Mac V, Barbier J, Helsmoortel M, Lorenzi C, Sanchez G, Bello M, Ritchie W, Sakamoto S, Kiernan R. NF90 modulates processing of a subset of human pri-miRNAs. *Nucleic Acids Res.* 2020;48:6874–6888.