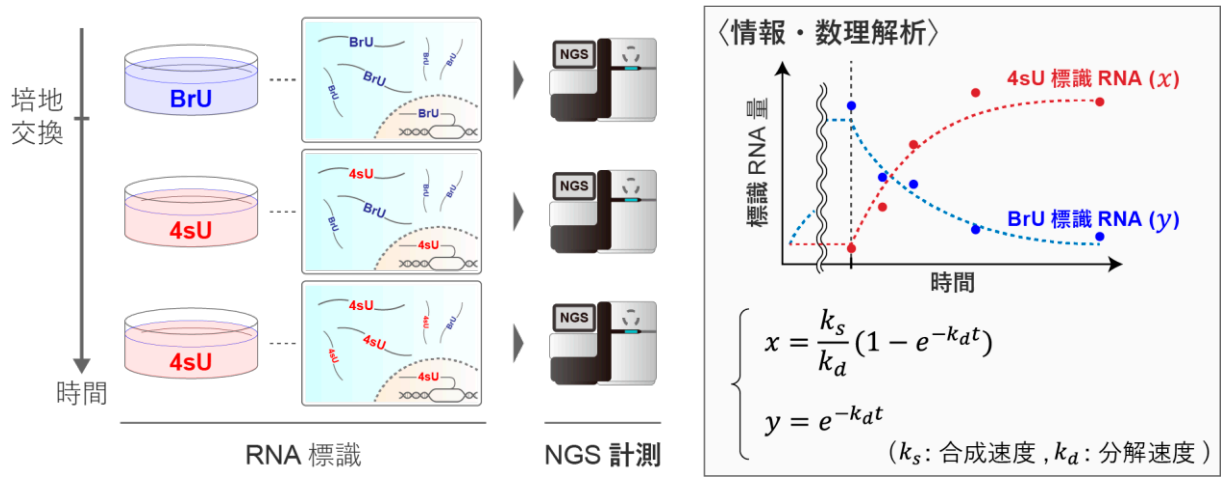
17　RNA dynamics recordingで解明するインスリン応答	秋光　信佳

【目的】遺伝子発現は細胞の状態を決定する最も基本的な調節因子の一つである。細胞内 RNA は、インスリン刺激などの様々な刺激に応答することで変動を示し、その量は合成と分解のバランスにより制御を受ける。近年、SLAM-seq や BRIC-seq など、核酸アナログによる RNA 標識を用いて RNA 合成速度や分解速度を計測する手法が多く開発されている。しかしながら、これらを同時に定量する手法は未だ存在しない。したがって本研究では、複数の核酸アナログを用いて細胞内 RNA の合成速度および分解速度を同時かつ網羅的に計測する新規手法を開発した。

【方法】本研究では、4-チオウリジン（4sU）と 5-ブロモウリジン（BrU）の同時標識を用いて、細胞内 RNA 合成および分解速度を同時かつ網羅的に計測する新規手法 “Dyrec-seq” を開発した。初めに BrU を含む培地を用いてヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞を培養し、細胞内 RNA を BrU 標識した。続いて、培地を 4sU を含むものと交換し、時系列で細胞内 RNA を回収・精製した。培地交換に伴って、BrU 標識 RNA は時間依存的な減少を、4sU 標識 RNA は時間依存的な増加を示す。次世代シーケンサ（NGS）を用いて回収した RNA を解析することにより、培地交換後の各時点における 4sU 標識 RNA および BrU 標識 RNA を情報学的に定量した。また、これらの標識 RNA の時間的変化を、微分方程式を用いた数理モデルにフィテッィングすることで、個々の RNA の合成速度と分解速度を定量した。

【結果】本研究により、4,702 遺伝子に由来する細胞内 RNA について合成速度と分解速度を同時計測した。またそれぞれの合成速度と分解速度により遺伝子を分類・機能解析を行うことで、遺伝子の生物学的機能によって RNA の合成速度や分解速度が決定されている可能性が示唆された。さらに数理解析と実測値を比較した結果、細胞内 RNA 量は合成速度および分解速度の比で決定される一方、外部刺激に対する応答速度は分解速度のみで決定されることが明らかになった。これらにより遺伝子発現プロファイルの形成には、転写のみならず RNA 分解も重要であることが明らかになった。この様に複数の核酸アナログを用いて各段階の RNA 制御を実測する手法を総称し、我々は “RNA dynamics recording” という概念を提唱している。今後は本研究で開発した Dyrec-seq を用いて、インスリン刺激に応答する RNA 合成速度および分解速度の変化を定量する。これにより、インスリン刺激に応答した遺伝子発現変動に対する転写制御および分解制御の寄与を解明する予定である。

RNA 合成および分解速度を同時定量する新規手法 “Dyrec-seq” の概要



17. RNA dynamics recording で解明するインスリン応答

秋光　信佳

東京大学 アイソトープ総合センター

Key words：RNA，転写，RNA 分解，遺伝子発現制御，核酸アナログ

緒　言

遺伝子発現は細胞の状態を決定する最も基本的な因子のひとつである。インスリン刺激を初めとした外部環境変化はシグナル伝達経路を介して細胞内へと伝えられ、遺伝子発現変動を引き起こす。細胞内 RNA は遺伝子発現産物として生成され、その量は主に転写因子を初めとした転写制御と、主に RNA 結合タンパク質（RBP）によって制御される RNA 分解のバランスにより決定される。近年、環境変化に対する遺伝子発現プロファイルの形成には転写のみならず RNA 分解も重要な影響を与えることが明らかになっている［1］。したがって、インスリン刺激に応答した遺伝子発現制御メカニズムを真に理解するためには、RNA の転写と分解を同時に定量する必要がある。

近年、転写や RNA 分解などのカイネティクスをゲノムワイドに定量するための手法が多く開発されている。例えば Herzog らは、4-チオウリジン（4sU）標識した RNA を、次世代シーケンサ（NGS）を用いて網羅的に計測することで、細胞内 RNA の転写をゲノムワイドに定量する SLAM-seq を開発している［2］。この手法では、RNA に取り込まれた 4sU がアルキル化を受けると、アデニン（A）ではなくグアニン（G）との対合が惹起されるという性質を利用して、標識 RNA を同定する。また我々は過去に、5-ブロモウリジン（BrU）を用いて細胞内 RNA を標識し、細胞内 RNA の分解をゲノムワイドに定量する BRIC-seq を開発している［3］。この手法では、免疫沈降法により BrU 標識 RNA を単離することで、RNA の分解速度を網羅的に計量する。しかし、これらの手法の多くは転写や RNA 分解など特定の制御に着目したものであり、複数のカイネティクスを同時に計測した例は存在しない。

本研究では、複数の核酸アナログを組みあわせて RNA 合成速度と分解速度を同時に定量する手法“Dyrec-seq”を開発した（図 1）。ここでは、あらかじめ BrU で標識した細胞内 RNA を、引き続き 4sU により標識する。4sU 標識に際して BrU が取り除かれる為、BrU 標識 RNA 量は経時的に減少する。また 4sU 標識に伴って、4sU 標識 RNA 量は経時的に増加する。したがって、BrU 標識もしくは 4sU 標識 RNA を NGS で定量し、微分方程式より導かれる数理モデルにフィテッィングすることで、それぞれの遺伝子における RNA 合成速度および分解速度を、網羅的かつ同時に推定する。本研究で開発した本手法により、インスリン刺激に応答する遺伝子発現に対する転写制御および分解制御を解明する基盤を整えると共に、これらのカイネティクスが RNA 量や外部刺激応答に与える影響を明らかにした［4］。

方法および結果

1. 細胞内 RNA に対する BrU および 4sU 標識

RNA 合成速度と分解速度を同時に定量するため、ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞を BrU および 4sU で標識した。あらかじめ HeLa 細胞を、BrU を含む培養液中で 12 時間前培養し、引き続き培養液を 4sU を含むものと交換した。培養液を交換した後、0、15、30、45、60、120、240、480、720 分後に細胞を回収し、RNA を精製した（Total-RNAs）。培養液交換に伴って、BrU 標識 RNA 量は経時的に減少し、4sU 標識 RNA 量は経時的に増加する。精製した RNA を二群に分けて、片方から BrU 標識 RNA を単離するため抗 BrdU 抗体による免疫沈降を行い（IP-RNA）、また他方をヨードアセトアミド（IAA）により処理することで新生 RNA 中の 4sU をアルキル化した（Alkyl-RNA）。アルキル化 4sU は逆転写の際に A の代わりに G と対合するため、新生 RNA は特異的な変異（T-to-C 変異）を含む RNA として

検出される。IP-RNA および Alkyl-RNA を 3’ 非翻訳領域（UTR）依存的な配列決定法である QuantSeq［5］を用いて定量した。

2. 細胞内 RNA における合成および分解速度の同時評価

次に得られた QuantSeq データから個々の遺伝子の RNA 合成速度と分解速度を推定した。ここで RNA 合成速度は「単位時間当たりに合成された RNA 数（本研究では、CPM 単位）」、RNA 分解速度は「単位時間当たりに分解された RNA の割合」として定義される。SLAM-seq 解析に用いられる SlamDunk ツールを用いて、Alkyl-RNA に含まれる各リードをアラインメントし、続いて T-to-C 変換を探索することで、4sU 標識 RNA に由来するリードを定量した。4sU 標識 RNA は、培地交換後に合成された RNA と見なすことが出来る。また同ツールを用いて IP-RNA に含まれる各リードをアラインメント、BrU 標識 RNA に由来するリードを定量した。BrU 標識 RNA は、培地交換以前の段階で合成された既存 RNA と見なすことが出来る。これらの新規合成 RNA、および既存 RNA の時間変化を、数理モデルを用いて解析することで、個々の遺伝子の RNA 合成速度と分解速度を推定した。

時刻tにおける新規合成 RNA 数（x_t）および既存 RNA 数（y_t）は以下の式で表される。

$$x_t = \frac{k_s}{k_d}\left(1 - e^{-k_d(t-t_0)}\right) + \beta_1$$
$$y_t = \alpha e^{-k_d t} + \beta_2$$

ここでk_s およびk_d は、それぞれ RNA 合成および RNA 分解速度を表す。また、t_0、α、β_1、およびβ_2は、それぞれ核酸アナログが RNA に取り込まれるまでの時間遅れ、スケーリングファクター、新規合成 RNA のバックグラウンド、および既存 RNA のバックグラウンドを表す。これらの式に、QuantSeq データから得られた新規合成 RNA 量および既存 RNA 量をフィッティングすることで、個々の遺伝子の RNA 合成速度および分解速度をゲノムワイドに推定した。これにより定常的な発現の認められる計 4,702 遺伝子について、RNA 合成速度と分解速度を求めた。

3. RNA 合成および分解速度が遺伝子機能にもたらす影響

これらの RNA 合成・分解速度は、細胞の生理的機能にどのような影響を与えるのだろうか？遺伝子をそれぞれの RNA 合成速度と分解速度により 4 つのクラスに分類、各クラスに対する遺伝子オントロジー（GO）解析を行い、以下の知見を得た（図 2）：(i) シグナル伝達に関連する RNA は合成速度が速い、(ii) スプライシングなどの転写後制御に関わるタンパク質をコードする RNA は合成が早く、分解が遅い、(iii) 転写因子をコードする RNA は分解が早い、(iv) アセチル化などの翻訳後修飾を受けるタンパク質をコードする遺伝子は分解が遅い。これらの結果から、RNA はその機能や生理的役割に応じて、転写や分解の制御を最適化している可能性が示唆された。一般的に定常状態における遺伝子の発現レベルは、その合成速度と分解速度の比で決定されることが知られている。本研究で測定した合成速度と分解速度の比（k_s/k_d）を各遺伝子の発現レベルと比較した結果、これらの間に強い正の相関が認められた（R^2＝0.85、p＜0.01）。また理論的には、外部刺激に対する遺伝子発現応答の速さは、RNA の合成速度ではなく分解速度によって決定されることが知られている。

以上の結果より、RNA 合成速度および分解速度と各 RNA の生理的機能の間に、以下のような関係が示唆された。

(i) リン酸化タンパク質などシグナル伝達因子をコードする遺伝子は、一般的に高いレベルで恒常的な発現を示す。
(ii) スプライシング因子などの転写後因子は、高いレベルで恒常的に発現するが、細胞外刺激に対する応答は遅い。
(iii) 転写因子をコードする RNA は種類によって発現レベルは異なる一方で、細胞外刺激に対する応答は早い。
(iv) アセチル化などの翻訳後制御をうけるタンパク質をコードする RNA は、細胞外刺激への応答が遅い。

これらの知見により、遺伝子発現量の制御メカニズムや機能によって細胞外刺激への応答が異なる理由の、少なくとも一部を説明することが可能となる。これにより、遺伝子の機能と発現の挙動を統合的に理解することが可能となった。

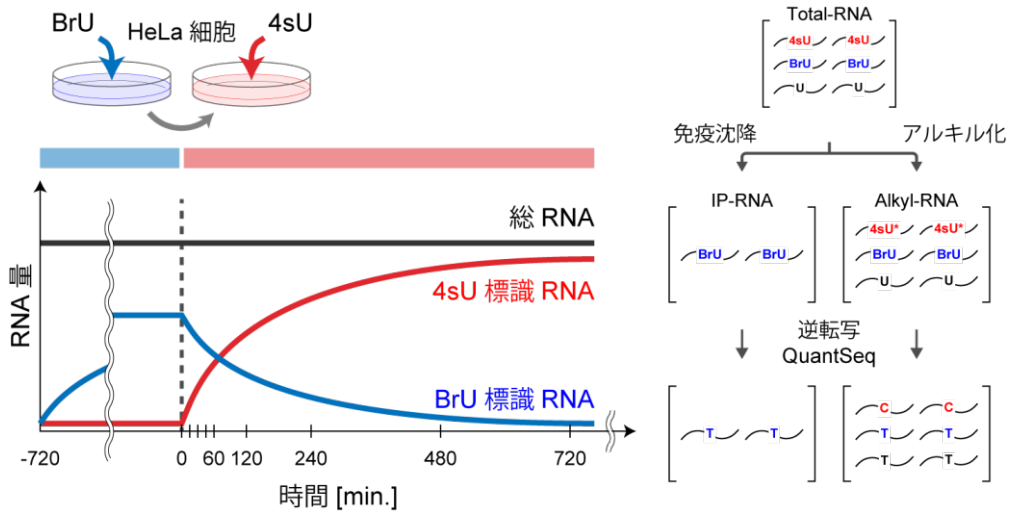


図1. RNA合成速度と分解速度を同時定量する“Dyrec-seq”の模式図

細胞を150μM BrUを含む培地で培養し、細胞内RNAをBrUで標識する。続いて培地を200μM 4sUを含むものと交換する。4sU標識後の各時点において、細胞内RNAを回収する（左）。回収および精製した細胞内RNA （Total-RNA）を2つに分けて、片方から免疫沈降法によりBrU標識RNAを単離し（IP-RNA）、他方をアルキル化する（Alkyl-RNA）。アルキル化により4sU標識RNAはT-to-C置換として検出することが可能となる（右）。

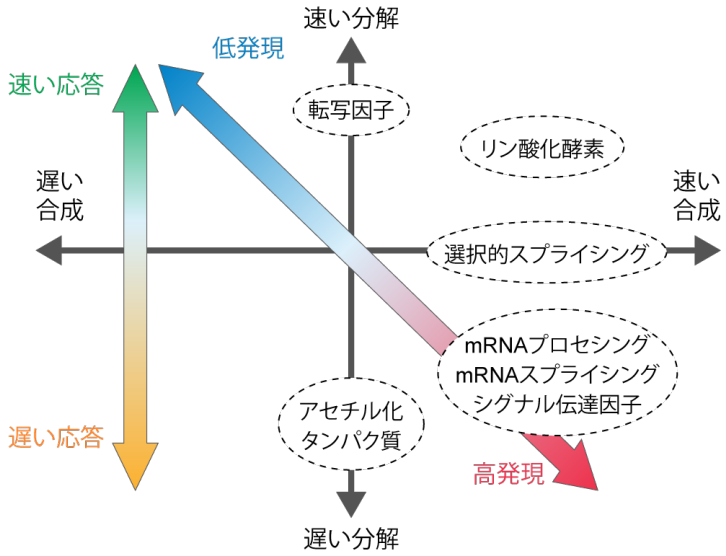


図2. RNA合成速度と分解速度が遺伝子機能にもたらす影響

RNA合成速度と分解速度の組み合わせによりRNAの時間的発現プロファイルが制御される。細胞内RNAの存在量は、RNA合成速度と分解速度の比として決定され（斜め矢印）、外部刺激に対する応答の速さはRNA分解速度のみにより決定される（縦矢印）。RNA合成速度と分解速度を示す遺伝子の機能を調べることで、各機能を示す遺伝子の時間的発現プロファイルがRNA合成や分解制御によってどのように制御されるかが明らかになる。

考　察

本研究では、BrU と 4sU という 2 つの核酸アナログを用いることで、細胞内 RNA の合成速度と分解速度を同時かつ網羅的に測定する“Dyrec-seq”を開発した。また計測した RNA 合成および分解速度と各遺伝子の機能を比較することにより、発現量や細胞外刺激に対する応答がどのように制御されるかを実験的に検証した。これらの結果を基に我々は、複数の核酸アナログを用いて RNA のダイナミクスを RNA 自体に記録する“RNA dynamics recording”の概念を提唱する。これにより、RNA 制御の各段階の寄与や時間的変化を独立に定量することが可能となった。今後は本研究で開発した Dyrec-seq を用いて、インスリン刺激に応答した遺伝子発現変動に対する転写制御および RNA 分解制御の寄与を解明する。

共同研究者

本研究は、東京大学大学院新領域創成科学研究科生命システム観測分野の鈴木穣教授および関真秀特任助教との共同研究として行われた。本研究における情報解析は、情報・システム研究機構（ROIS）の国立遺伝学研究所（NIG）のスーパーコンピュータシステムを用いて行った。本研究は、日本学術振興会（JSPS）科研費（17KK0163、18H02570、18KT0016、16H06279、20H04838、19K16635、16H06279，19K16108、16H06279）、武田科学振興財団ライフサイエンス研究助成、JSPS 特別研究員助成金（17J11266）の助成の下で行った。

文　献

1） Claudio R Alonso. A complex 'mRNA degradation code' controls gene expression during animal development. Trends Genet. 2012 Feb 28(2):78-88. Epub 2012 Jan 16 PMID: 22257633 DOI: 10.1016/j.tig.2011.10.005

2） Veronika A Herzog, Brian Reichholf, Tobias Neumann, Philipp Rescheneder, Pooja Bhat, Thomas R Burkard, Wiebke Wlotzka, Arndt von Haeseler, Johannes Zuber, Stefan L Ameres. Thiol-linked alkylation of RNA to assess expression dynamics. Nat Methods. 2017 Dec 14(12):1198-1204. Epub 2017 Sep 25 PMID: 28945705 DOI: 10.1038/nmeth.4435

3） Naoto Imamachi, Hidenori Tani, Rena Mizutani, Katsutoshi Imamura, Takuma Irie, Yutaka Suzuki, Nobuyoshi Akimitsu. BRIC-seq: a genome-wide approach for determining RNA stability in mammalian cells. Methods. 2014 May 1 67(1):55-63. Epub 2013 Jul 17 PMID: 23872059 DOI: 10.1016/j.ymeth.2013.07.014

4） Kentaro Kawata, Hiroyasu Wakida, Toshimichi Yamada, Kenzui Taniue, Han Han, Masahide Seki, Yutaka Suzuki, Nobuyoshi Akimitsu. Metabolic labeling of RNA using multiple ribonucleoside analogs enables the simultaneous evaluation of RNA synthesis and degradation rates. Genome Res. 2020 Oct 30(10):1481-1491. Epub 2020 Aug 25 PMID: 32843354 DOI: 10.1101/gr.264408.120

5） Susan M Corley, Niamh M Troy, Anthony Bosco, Marc R Wilkins. QuantSeq. 3' Sequencing combined with Salmon provides a fast, reliable approach for high throughput RNA expression analysis. Sci Rep. 2019 Dec 11 9(1):18895. PMID: 31827207 DOI: 10.1038/s41598-019-55434-x