

# miRNA によるマウス胚性幹細胞の 分化過程における発現制御

Gene expression regulation during differentiation from murine ES cells due to microRNA

物理学専攻 吉澤 政人

Department of physics Masato Yoshizawa

## 第 1 章 研究背景・目的

microRNA (miRNA) は 18 ~ 25 塩基からなる 1 本鎖の RNA であり、タンパク質に翻訳されない低分子の non-codingRNA の 1 種である。そして、遺伝子の転写後の発現制御に関与していると言われている。

そのことを実験的に実証することは可能<sup>1)</sup>と言っても、その過程には多くの時間と経費が必要である。したがって、通常では miRNA の標的遺伝子の発現制御の予測にはコンピュータが使用される。そこで、私は標的遺伝子の制御するそれぞれの miRNA の寄与する量を統計的に予測する MiRaGE 法<sup>2),3),4)</sup>を提案した。

この論文では、マウスの胚性幹細胞が神経細胞に分化する過程を用いて、miRNA が有意に標的遺伝子の発現制御を行っているかを MiRaGE 法を用いて確かめる。

## 第 2 章 使用した解析方法・データ

### 2.1 主成分分析

相関のある何種類かの変数のもつ情報を、互いに無相関な少数個の総合特性値に要約する。また、目的変数は仮説的で、 $p$  個の説明変数  $x_1, \dots, x_p$  の間の構造を把握しようとするのが目的である。

### 2.2 t 検定 (t-test)

t 検定とは、帰無仮説が正しいと仮定した場合に、統計量が t 分布に従うことを利用する統計学的検定法の総称である。母集団が正規分布に従うと仮定するパラメトリック検定法であり、t 分布が直接もとの平均や標準偏差にはよらない (ただし自由度による) ことを利用している。2 組の標本について平均に有意差があるかどうかの検定などに用いられる。統計的仮説検定のひとつである。

### 2.3 MiRaGE 法

「miRNA ranking by gene expression」の略で、miRNA が標的遺伝子の制御にどれほど寄与しているかを統計的に予測する方法である。具体的には、標的遺伝子の発現量と miRNA の発現量には相互関係を持っていると考えられる点に着目して、ある生理現象下での mRNA の発現の変化から、その重要な miRNA の推定を行うのが MiRaGE 法である。

miRNA を考慮した場合、遺伝子は以下の 3 つのカテゴリに分類される。

- (1) miRNA の標的遺伝子。
- (2) (1) の miRNA の標的遺伝子ではないが、他の miRNA の標的遺伝子。
- (3) どの miRNA にも標的とされていない遺伝子。

カテゴリ (1) に属する遺伝子の集合を  $G$ 、カテゴリ (2) に属する遺伝子の集合を  $G_0$  と表す。そのとき、それぞれの miRNA の  $G$  と  $G_0$  間の遺伝子発現の差の統計的有意性を MiRaGE 法は、t 検定 (t-test)、ウィルコクソンの順位和検定 (Wilcoxon rank sum test)、コルモゴロフ - スミルノフ検定 (Kolmogorov-Smirnov test) を用いて P-値を計算し、比較する。

## 2.4 使用したデータ

### 2.4.1 遺伝子の発現量

遺伝子発現情報データベースである「GEO」に掲載されている accession number “GSE115234”を使用した。このデータには、ES細胞から様々な部位に分化する過程での25164種類の遺伝子の発現量が0～5日間の計6日間で2回測定したものが書かれている。そのなかでも、この研究ではES細胞から神経細胞に分化する過程のデータを使用した。

### 2.4.2 miRNAの標的遺伝子の表

ゲノムアノテーション閲覧システムである「UCSC」に掲載されている3'UTRのエクソン配列と、miRNAの塩基配列やアノテーション、標的遺伝子の予測などを提供するデータベースである「miRBase」に掲載されているmiRNAの配列とを照らし合わせて作製した。このデータは、1122種類のmiRNAそれぞれが28614種類の遺伝子に対して抑制対象で有るか否かが書かれている。

### 2.4.3 miRNAの発現量

miRNAの発現情報が載っているデータベースである「smiRNadb」に掲載されているES細胞から脳へ分化する過程でのデータを使用した。このデータは、299種類のmiRNAのES細胞から脳へ分化する過程での発現量が書かれている。

## 第3章 研究内容

### 3.1 0～5日間の遺伝子の発現量を総合的に解析する

#### 3.1.1 解析手順

- (1) 0～5日間の遺伝子の発現量のデータを作成する。
- (2) (1)で作成したデータを用いて主成分分析を行う。
- (3) 各miRNAにおいて標的遺伝子と標的遺伝子ではないグループに分け、リストを作成する。
- (4) (3)で作成したリストを用いて、(2)で作成したデータの主成分分析の結果を標的遺伝子と標的遺伝子ではない2つのグループに分ける。
- (5) (4)で分けた2つのグループを第1主成分でt検定を行い、標的遺伝子の発現量の増加率が高いものから順に上位100までのmiRNAのリストを作成する。
- (6) 0～5日間の遺伝子の発現量のデータの組み合わせを変えて、(1)～(5)を行う(合計64回)。
- (7) 64通り全て行ったら、(5)で作成した64個のmiRNAのリストを用いて、64回中何回上位100位以内に選ばれたかのリストを作成する。
- (8) miRNAの発現量のデータからmiRNAの発現量が減少したmiRNAと(7)で作成した標的遺伝子の発現の増加率が高いmiRNAのリストを照らし合わせる。

### 3.2 0～5日間の遺伝子の発現量を各日付けで比較する

遺伝子の発現データは3.1と同じデータを使用するが、3.1では遺伝子の発現量のデータを0～5日間の全てデータを用いて主成分分析を行いMiRaGE法を行い総合的に解析を行ったのに対し、今回は各日付ごとにMiRaGE法を使用していく。また、今回の解析では解析方法は同じだが、「MiRaGE Server」(<http://www.granular.com/MiRaGE/>)を使用した。

### 3.2.1 解析手順

- (1) 3.2.2で示した組み合わせの遺伝子発現のデータを作成する。
- (2) (1)で作成したデータを「MiRaGE Server」を用いてMiRaGE法を行う。
- (3) (2)で得られたP-値を多重比較補正をする。
- (4) (3)で多重比較補正されたP-値をグラフにする。
- (5) 5% 検定を行い、標的遺伝子が有意に発現している miRNA をリストにする。

## 第4章 結果・考察

### 4.1 3.1の結果・考察

#### 4.1.1 3.1の結果

結果の表 4.1 を見てみると、多くの生物学上に関連がある miRNA がリストされていることは明らかである。注目してもらいたいグループは3つあり、1つ目は、「mmu-miR-302a」、「mmu-miR-302b」、「mmu-miR-302d」であり、これらは発現することで、リプログラミングを促すとして知られている。2つ目は「mmu-miR-200a」、「mmu-miR-200b」、「mmu-miR-200c」、「mmu-miR-429」、「mmu-miR-141」であり、これらは癌遺伝子であるc-Mycによって誘導されるといわれている。3つ目は、「mmu-miR-294」、「mmu-miR-295」であり、これらはマウスのES細胞で発現するとして知られている有名な「mmu-miR-290」に属している。

miRNAs	Freq
mmu-miR-200b	64
mmu-miR-200c	64
mmu-miR-23a	64
mmu-miR-23b	64
mmu-miR-291a-3p	64
mmu-miR-297a	64
mmu-miR-29a	64
mmu-miR-429	64
mmu-miR-467a	64
mmu-miR-467b	64
mmu-miR-467c	64
mmu-miR-467d	64
mmu-miR-467e	64
mmu-miR-669b	64
mmu-miR-669d	64
mmu-miR-294	63

miRNAs	Freq
mmu-miR-295	63
mmu-miR-302a	63
mmu-miR-302b	62
mmu-miR-302d	62
mmu-miR-199a-5p	60
mmu-miR-199b	58
mmu-miR-34a	53
mmu-miR-130a	44
mmu-miR-141	44
mmu-miR-200a	44
mmu-miR-409-3p	43
mmu-miR-369-3p	23
mmu-miR-96	7
mmu-miR-674	5
mmu-miR-467b	4

表 4.1: “Freq” は上位100位以内として挙げられた回数である。

#### 4.1.2 3.1 の考察

結果をみて分かるとおり、MiRaGE法は、miRNAの発現が減少するにともない、多くの生物学上に関連があるmiRNAの標的遺伝子が増加傾向にあるmiRNAを正確に検出した。今回この研究において、使用したデータはそれぞれ別々のところから得たものであるということを考慮しても、この結果は十分注目すべき結果であると考えられる。

#### 4.2 3.2 の結果・考察

##### 4.2.1 3.2 の結果

図4.1の4日目と5日目の間の遺伝子の発現を見てみると、miRNAの標的遺伝子が、まだ有意に発現しているのがわかる。この結果から、0～5日間の間では神経細胞に分化しきっていないということが読み取れる。

##### 4.2.2 3.2 の考察

この結果から、0～5日間の間では神経細胞に分化しきっていないということが読み取れる。つまりES細胞から神経細胞に分化する過程において、0～5日間では測定期間が短かったということが考えられる。このことが原因で、miRNAの発現の増加がmiRNAの標的遺伝子の発現を有意に減少させているmiRNAをうまく検出できなかった。

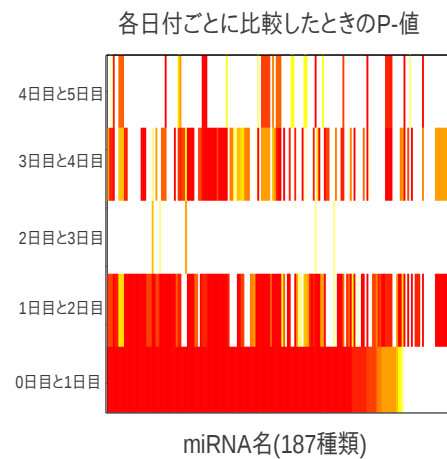


図4.1: 赤色に近いほどP-値は低く、白色は、0.05以上のもの。

## 第5章 結論

この論文では、MiRaGE法をマウスのES細胞が、神経細胞に分化する過程において使用した。その結果、MiRaGE法は標的遺伝子の発現量とmiRNAの発現量の相互関係の中で、miRNAの発現の減少がmiRNAの標的遺伝子の発現の増加に大きく関わっており、miRNAが標的遺伝子の制御を正確に行っていることを検出することができた。よって、私は、マウスのES細胞においてmiRNAの発現が、標的遺伝子を確実に制御していることを示すことに成功した。

しかし、その逆であるmiRNAの発現の増加がmiRNAの標的遺伝子の発現の減少に関わっていることの証明することはできなかった。これは、今回使用した遺伝子の発現データの測定期間が短かったのが原因だと考えられる。

## 参考文献

- 1) Chi, S.W., Zang, J.B., Mele, A., and Darnell, R.B. : Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps, Nature, Vol.460, No.7254, pp.479-86 (2009).
- 2) Taguchi, Y-h., and Yasuda, J., : Search of miRNAs critical for medulloblastoma formation using MiRaGE method, IPSJ SIG Technical Report, 2011-BIO-25, No.5, pp.1-8, (2011).
- 3) Yoshizawa, M., Taguchi, Y-h., and Yasuda, J., : Inference of Gene Regulation via miRNAs During ES Cell Differentiation Using MiRaGE Method, International Journal of Molecular Sciences, 2011,12(12), 9265-9276; doi:10.3390/ijms12129265(2011).
- 4) Yoshizawa, M., Taguchi, Y-h., : Gene expression regulation during differentiation from murine ES cells due to microRNA, Bioinformatics and Biomedicine, BIBM, vol.2, pp948-949, (2011)