

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：34315

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657121

研究課題名(和文)線虫の高次生命現象に影響を与えるアンチセンス転写物の検索

研究課題名(英文)A search for the antisense transcripts that affect higher-order life phenomena in nematodes

研究代表者

西澤 幹雄(Nishizawa, Mikio)

立命館大学・生命科学部・教授

研究者番号：40192687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：アンチセンス転写物はメッセンジャーRNAと相補的な配列を持つRNAである。本研究では線虫を用いて、アンチセンス転写物が高次生命現象に与える影響を明らかにしようと試みた。まず、熱ショック転写因子やNotchシグナル経路の因子のアンチセンス転写物が実際に存在することを確認した。次に、メッセンジャーRNAの相補鎖を発現するライブラリーを構築した。これを線虫に食べさせてアンチセンス転写物を線虫に導入し、発生や稔性などにおいて表現型が現れるか調べた。その結果、線虫の成長遅延または不妊の表現型が観察された。この方法は、発生等に関与するアンチセンス転写物を同定解析する基盤になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：An antisense transcript (asRNA) has a sequence that is complementary to its messenger RNA (mRNA). In this study, we tried to clarify the effects of asRNAs on higher-order life phenomena in a nematode. We confirmed that asRNAs were transcribed from a heat shock factor gene and a gene encoding a protein in the Notch signaling pathway. Then, we constructed a library to express transcripts that were complementary to mRNA. Nematodes were fed with the library to express asRNAs inside of the nematodes, and then phenotypic changes in development or fertility were examined. Indeed, developmental retardation or sterility of the nematodes was observed. Therefore, this method may provide a basis to functionally analyze the asRNAs that are involved in development.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：アンチセンス転写物 RNA 線虫

1. 研究開始当初の背景

アンチセンス転写物 (AS 転写物) は、mRNA の相補鎖 (アンチセンス鎖) と同じ配列を持つ RNA である。mRNA はタンパク質に翻訳されるが、大部分の AS 転写物はタンパク質に翻訳されず、AS 転写物自体が重要な機能を持つと考えられている。私たちは、炎症に深く関連する誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) の mRNA の 3' 非翻訳領域 (3'UTR) に相補的な AS 転写物が存在することを見出した [Matsui et al. (2008) *Hepatology* **47**: 686–697]。さらに肝細胞において、iNOS の AS 転写物が iNOS mRNA の安定性を増加させていることも発見した。

AS 転写物が mRNA の安定化する際には、mRNA に存在する塩基配列が関わっている。とりわけ、mRNA の 3'UTR に対応する AS 転写物の領域が mRNA と結合して、機能を果たすと考えられている [Nishizawa et al. (2012) *Front Biosci (Landmark Ed)* **17**: 938–958]。

iNOS 以外にも多くの遺伝子から AS 転写物が作られており、さまざまな生物種で AS 転写物が見出されている。mRNA 安定化だけでなく、AS 転写物が遺伝子の発現制御にさまざまな影響を与えていることが多数報告されているが、AS 転写物が個体レベルの高次生命現象にどのような役割を果たしているかはほとんど不明であった。

線形動物の一種である線虫 *C. elegans* は、体長が 1 mm 程度と短く比較的飼育が容易であることから、発生やストレス耐性など個体レベルでの解析に適したモデル系の一つである。また変異体や RNA 干渉 (RNAi) 法による遺伝子機能阻害実験系などさまざまな遺伝学的な解析ツールが充実している。線虫の全ゲノムは解読されており、さらにトランスクリプトーム解析により線虫においても AS 転写物が存在すると示されていた。しかしながら、直接的には線虫の AS 転写物は確認されていなかった。また AS 転写物が高次生命現象に関与するかどうかも未知であった。

2. 研究の目的

本研究では、線虫の全 RNA を用いて、mRNA の 3'UTR を逆向きに組んだプラスミドを作り、大腸菌内で転写させると相補的 RNA (一本鎖アンチセンス RNA) を合成できるようなライブラリーの構築を試みた。これを線虫に導入して、表現型にどのような影響が起こるか網羅的に検討することを目指した。表現型が変化した線虫では、導入したプラスミドに AS 転写物が発現し機能している可能性があるため、mRNA の発現量を調べて、AS 転写物が mRNA に対してどのような作用をしているか検討しようとした。

このように、AS 転写物の過剰発現を通じ

て過剰発現表現型解析を行い、個体レベルでの生理現象に機能を持つ AS 転写物を網羅的に見出すアッセイ系を確立することで、高次生命現象における AS 転写物の意義を総合的に理解する基盤を作ることを目指した。

3. 研究の方法

(1) AS 転写物発現のパイロット実験

発生に関わる細胞間シグナル伝達経路である Notch 経路の因子、および熱ショック遺伝子発現に関わる転写因子 (heat shock factor 1, HSF1) について、遺伝子特異的なセンスオリゴプライマーを用いて逆転写 (RT) を行い、PCR によって AS 転写物を検出した。HSF1 mRNA でも同様に、RT-PCR 法によって検出した。

RNA-seq 法によって線虫の初期胚の全転写物の配列解読を行った。RiboMinus Kit (インビトロジェン社) を用いて、初期胚の全 RNA からリボソーム RNA を除去した。cDNA は断片化した後、ScriptSeq RNA-Seq Library Preparation Kit (epicentre 社) を用いてライブラリーを構築した。次世代シーケンサー (イルミナ社) を用いて全 cDNA 配列を決定し、TopHat RNA mapping software を用いて線虫ゲノム配列にマッピングした。

また 3'UTR の cDNA を単離して組み込んだ発現ベクターからアンチセンス RNA を合成し、線虫に導入したときに現れる表現型を観察した。

(2) 発現ライブラリーを用いた AS 転写物の探索

AS 転写物の発現ライブラリーの作製

線虫の初期胚から全 RNA を抽出し、RiboMinus Kit によってリボソーム RNA を除去した。Gateway 法 (インビトロジェン社) を用いてライブラリーを構築するために、オリゴ(dT)プライマー・アダプターを用いて逆転写を行い、cDNA を合成した。全長が最大 1 kb までの cDNA を分画して精製し、もう 1 つのアダプターと連結した。Gateway 法に従い、組換え酵素クロナーゼを用いて、cDNA をエンターベクター pDONRattPR [Kimura et al. (2010) *Med Mol Morphol* **43**: 145–157] に逆向きに組み込んだ。そして、大腸菌 HST08 株の形質転換を行い、コロニーを得た。なお pDONRattPR には T7 プロモーターが含まれているので、一本鎖アンチセンス RNA (AS 転写物) を発現させることができる。またランダムプライマーを用いて逆転写を行い、上記と同様に cDNA を pDONRattPR に組み込み、形質転換を行った。

線虫における AS 転写物の発現

線虫での RNAi 法の一つである feeding

RNAi 法では、餌となる大腸菌内で二本鎖 RNA を発現させ、線虫に大腸菌ごと取り込ませることによって、二本鎖 RNA の片側鎖が mRNA と結合してその発現を減少させる。同様にして、 で構築した発現ライブラリーのプラスミド DNA を用いて、線虫の餌となる大腸菌 HT115 株 [Kamath et al. (2001) *Genome Biol* 2:1-10] を形質転換した。

HT115 株では IPTG 添加により T7 RNA ポリメラーゼが発現するので、pDONRattPR 上の cDNA が転写されてアンチセンス RNA (AS 転写物) が合成される。そこで、IPTG を与えてアンチセンス RNA の合成を誘導し、大腸菌ごと餌として線虫に取り込ませた。AS 転写物が過剰に発現する状態を模していると考えられるので、アンチセンス RNA が導入された線虫の表現型を観察した。

アンチセンス RNA 導入による遺伝子発現への影響の解析

において表現型の観察された線虫から全 RNA を抽出し、RT-PCR 法によって該当する mRNA の定量を行った。コントロールの線虫における mRNA 量と比較し、導入されたアンチセンス RNA が与える影響を解析した。

4. 研究成果

(1) 線虫での AS 転写物発現

AS 転写物発現とパイロット実験

多細胞生物における重要な細胞間シグナル伝達経路の 1 つである Notch 経路は、主要な因子として 2 つの膜タンパク質 (Notch タンパク質と Delta タンパク質) から構成されている。異なる細胞間で Notch および Delta が結合することで、両細胞の細胞運命の決定に影響を与え、細胞の非対称分裂・分化などの発生や器官形成の過程に関わっている。線虫の Notch 経路は、産卵口形成における細胞運命決定や生殖細胞の細胞分裂の維持などを制御することが知られている。Notch, Delta の線虫ホモログがそれぞれ 2 遺伝子ずつ存在し、初期胚発生、神経発生、腸・産卵口形成および生殖細胞の運命決定などに関与する。

これら 4 遺伝子について、それぞれの遺伝子の 3'UTR に対合する特異的なセンスオリゴプライマーを用いて逆転写後、PCR による cDNA の増幅を確認した。その結果、Delta に相当する *lag-2* 遺伝子についてのみ 3'UTR の相補鎖由来の cDNA が増幅した。すなわち、*lag-2* 遺伝子に AS 転写物が存在することが示唆された (未発表データ)。*lag-2* 遺伝子は神経、生殖腺、産卵口形成前駆細胞などの細胞に発現しており、それらの細胞運命の決定に重要であると報告されている。

一方、熱ショック因子 HSF1 は、熱ストレスによる熱ショックタンパク質 (heat shock protein, HSP) の誘導に関わる転写因子である。熱以外にもさまざまな外因ストレスに対抗するための遺伝子群の転写制御や細胞死にも関わっている。HSF1 の線虫ホモログ *hsf-1* 遺伝子についても、3'UTR に対合する特異的なセンスオリゴプライマーを用いた RT-PCR 法で調べた。その結果、3'UTR の相補鎖に由来する cDNA の増幅が確認され、*hsf-1* 遺伝子の AS 転写物の存在が示唆された [発表論文]。

機能的食品 AHCC は肝癌患者の肝切除術後の癌再発を抑制し予後を高めることが報告されている。線虫に対して AHCC を与えると熱耐性が向上され、熱ショックによる *hsp* 遺伝子の誘導がさらに促進されることが分かった [発表論文]。また AHCC は *hsf-1* 遺伝子の mRNA および AS 転写物の発現をもともに増加させていた。これらの結果から、AHCC は線虫に対して *hsf-1* 遺伝子の AS 転写物に影響を与えて mRNA の発現を増加させることで、熱ショックによる *hsp* 遺伝子誘導を促進し、熱耐性を向上させることが考えられた [発表論文]。

RNA-seq 法による AS 転写物発現の確認

RNA-seq 法によって線虫の全転写物の配列解読を行い、AS 転写物の発現を調べた。その結果、上記の遺伝子 *lag-2* および *hsf-1* について mRNA に相当する配列が確認され、さらに 3'UTR に相補的な配列も確認できた (未発表データ)。*lag-2* および *hsf-1* 遺伝子には 3'UTR を含む領域に相補的な AS 転写物が存在すると考えられた。

次に、2 遺伝子の mRNA の 3'UTR に対する cDNA を単離して、発現ベクターに組み込んだ。これらのプラスミドから、3'UTR の相補的な配列を持つアンチセンス RNA を発現させて線虫に導入し、発生や稔性における表現型を観察した。しかしながら、成長速度や体長、産卵口形成などの形態に対して大きな影響は観察されず、また成虫からの産卵数や孵化率に大きな影響は観察されなかった (未発表データ)。

(2) 発現ライブラリーを用いた AS 転写物の探索

AS 転写物の発現ライブラリーの作製

リボソーム RNA を除去した線虫初期胚の全 RNA から cDNA を合成し、Gateway 法に従って pDONRattPR ベクターに組み込み、mRNA の 3'UTR の逆向き発現ライブラリーを構築した。オリゴ(dT)プライマーを用いて逆転写を行った場合には約 900 個のコロニー (形質転換体) を、ランダムプライマーを用いた場合には約 400 個のコロニーを得た。

これらのうち、約 200 個のコロニーからプラスミド DNA を抽出して、feeding RNAi で餌として使う大腸菌 HT115 株を形質転換した。なお HT115 株では、IPTG 添加により T7 RNA ポリメラーゼが発現するので、pDONRattPR 上の cDNA が転写されて AS 転写物が合成される。

線虫における AS 転写物の発現

IPTG 存在下で、形質転換した HT115 株内で 3'UTR のアンチセンス RNA を誘導し、線虫に食べさせることによって、大腸菌ごとアンチセンス RNA を取り込ませた。形態形成や配偶子形成などの発生等に関わる遺伝子について調べるため、親世代 (P0) からアンチセンス RNA を導入し、それらの子 (F1) の個体を観察した。200 クローンのうち、4 クローンで発生遅延が観察され、1 クローンで不妊が観察された。発生遅延が観察されたクローンについてプラスミドの塩基配列を決定した結果、4 つのうち、2 つがリボソームタンパク質 large subunit (*rpl*) をコードする遺伝子の配列を含んでいた (未発表データ)。これらは、3'UTR のポリ(A)付加部位から上流 401 bp と 376 bp の領域をそれぞれ含んでいた。

アンチセンス RNA 導入による遺伝子発現への影響の解析

見出された *rpl* 遺伝子について mRNA 発現量を RT-PCR によって確認したところ、アンチセンス RNA 導入により表現型が観察された線虫で減少したが、コントロールの線虫では影響がなかった (未発表データ)。すなわち、3'UTR のアンチセンス RNA の導入により特異的に遺伝子発現が阻害されることが分かった。

これまでの線虫における feeding RNAi 法では二本鎖 RNA を導入する方法が採用されており、RNA が二本鎖を形成することが細胞への取り込みや遺伝子の発現阻害に関係すると考えられていた。本研究において一本鎖 RNA であっても遺伝子発現を十分に阻害することが示された。

以上のように、本研究では線虫を用いて、個体レベルで影響を与える AS 転写物を同定解析するアッセイ系を確立した。効率を改善して、さらに多数のクローンをスクリーニングできれば、発生などに関与する多くの機能的 AS 転写物を同定できると思われる。このアッセイ系は、発生等における AS 転写物による発現制御機構を解き明かす端緒となると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

著書名: Okuyama T, Yoshigai E, Ikeya Y, Nishizawa M.

論文標題: Active hexose correlated compound extends the lifespan and increases the thermotolerance of nematodes.

雑誌名: Functional Foods in Health and Disease

査読: 有

巻: 3

発行年: 2013

ページ: 166-182

<http://functionalfoodscenter.net/files/69624283.pdf>

[学会発表](計 4 件)

発表者名: 奥山 哲矢, 吉開 会美, 池谷 幸信, 西澤 幹雄.

発表標題: 線虫 *C. elegans* の寿命延長と熱耐性に対する AHCC の効果

学会名: 第 21 回統合医療機能性食品国際会議 (ICNIM2013)

発表年月日: 2013 年 7 月 27 日

発表場所: ホテルロイトン札幌, 札幌 (北海道)

発表者名: Okuyama T, Yoshigai E, Ikeya Y, Nishizawa M.

発表標題: Active hexose correlated compound extends lifespan and increases thermotolerance of nematodes.

学会名: The 13th International Conference of Functional Food Center and The First International Symposium of Academic Society for Functional Foods and Bioactive Compounds

発表年月日: 2013 年 5 月 12 日

発表場所: 京都府立医科大学, 京都 (京都府)

発表者名: Okuyama T, Yoshigai E, Ikeya Y, Nishizawa M.

発表標題: Effects of active hexose correlated compound on lifespan and stress resistance of *C. elegans*.

学会名: American Society for Parenteral and Enteral Nutrition (ASPEN), Clinical Nutrition Week 2013

発表年月日: 2013 年 2 月 11 日

発表場所: フェニックス, アリゾナ (米国)

発表者名: 奥山 哲矢, 吉開 会美, 奥村 忠芳, 池谷 幸信, 西澤 幹雄.

発表標題: 線虫 *C. elegans* の寿命およびラット肝細胞の一酸化窒素産生に与える AHCC の影響の比較解析

学会名: 第 20 回統合医療機能性食品国際

会議 (ICNIM 2012)
発表年月日: 2012年7月21日
発表場所: ホテルロイトン札幌, 札幌(北海道)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等

立命館大学 生命科学部生命医科学科 医化学研究室ホームページ
<http://www.medch.sk.ritsumeai.ac.jp/>

立命館大学 研究者学術情報データベース
<http://research-db.ritsumeai.ac.jp/scripts/websearch/index.htm>

6. 研究組織

(1)研究代表者
西澤 幹雄 (NISHIZAWA MIKIO)
立命館大学・生命科学部・教授
研究者番号: 40192687

(2)研究分担者
奥山 哲矢 (OKUYAMA TETSUYA)
立命館大学・理工学研究科・研究員
研究者番号: 80614966

(3)連携研究者
なし